

**HPTLC, HPLC-UV und HPLC-MS Untersuchungen zur Isolierung,
zum Fingerprint und zur Quantifizierung von Iridoid- und
Phenylethanoidglykosiden in den Blättern von *Plantago lanceolata* L.**



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg

vorgelegt von:
Eva Maria Wolfgarten
geb. Lotter
aus Augsburg

2019

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2013 bis April 2019 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg sowie unter Leitung von Herr apl. Prof. Dr. Dietmar Kammerer und Herr apl. Prof. Dr. Florian Stintzing der Firma WALA Heilmittel GmbH, Bad Boll/Eckwälden angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im November 2019

Datum der mündlichen Prüfung: 20.12.2019

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Siavosh Mahboobi	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. Jörg Heilmann	(Erstgutachter)
	apl. Prof. Dr. Florian Stintzing	(Zweitgutachter)
	Prof. Dr. Frank-Michael Matysik	(dritter Prüfer)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Frankfurt, den _____

(Eva Maria Wolfgarten)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Einige davon seien hier namentlich aufgeführt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Heilmann gilt mein Dank für die enthusiastische Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die vielseitigen und wertvollen fachlichen Diskussionen und Inspirationen, die geduldige Durchsicht der Arbeit und Übernahme der Funktion des Erstgutachters, die finanzielle Unterstützung sowie die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl promovieren und eine Vorlesung halten zu dürfen. Lieber Jörg, herzlichen Dank für Dein Vertrauen, die gemeinsamen philosophischen und freundschaftlichen Gespräche und Erlebnisse.

Der Firma WALA Heilmittel GmbH, allen voran apl. Prof. Dr. Florian Stintzing und apl. Prof. Dr. Dietmar Kammerer, gebührt mein Dank für die Vergabe des interessanten und herausfordernden Promotionsthemas, die wertvollen und inspirierenden fachlichen Besprechungen, die großzügige finanzielle Unterstützung sowie das entgegengebrachte Vertrauen. Für die Übernahme der Funktion des Zweitgutachters möchte ich mich bei Herrn apl. Prof. Dr. Florian Stintzing bedanken.

Für die Tatsache, dass alle Betreuer - Prof. Dr. Jörg Heilmann, apl. Prof. Dr. Florian Stintzing und apl. Prof. Dr. Dietmar Kammerer - stets an einem Strang gezogen haben und eine reibungslose und konstruktive Zusammenarbeit ermöglichten, bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Frank-Michael Matysik danke ich für die freundliche Bereitwilligkeit, das Amt des Drittprüfers zu übernehmen.

Für die Bereitschaft den Vorsitz der mündlichen Prüfung zu übernehmen, bedanke ich mich bei Herr Prof. Dr. Siavosh Mahboobi sehr herzlich.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Firma WALA Heilmittel GmbH, die an dieser Arbeit mitgewirkt haben, insbesondere: die Mitarbeiter des Pflanzenlabors, die Mitarbeiter des Garten-Teams unter der Leitung von Bernhard Ehrmann sowie Dr. Peter Lorenz, Dr. Diana Knittel, Dr. Miriam Heinrich und Lysanne Apel für ihren Tatendrang, das Teilen ihres Wissens- und Erfahrungsschatzes und das freundschaftliche Miteinander.

Bei PD Dr. Guido Jürgenliemk möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im PB3-Praktikum, die fachlichen Diskurse sowie die schöne Zeit in Südtirol bedanken.

PD Dr. Birgit Kraus sei für die wertvollen Gespräche und die schöne Zeit im Rahmen ihrer kreativen Lehrveranstaltung gedankt.

Gabriele Brunner gilt mein Dank für ihre mannigfaltige Unterstützung, die unterhaltsamen Gespräche sowie den gemeinsamen Kampf um Ordnung und Sauberkeit im Laboralltag.

Anne Grashuber sei für die fürsorgliche Unterstützung im PB3-Praktikum sowie für die angenehme Gesellschaft im Glaskasten gedankt.

An Jonas Buschmann geht mein Dank für die freundliche Unterstützung und Gerätebereitstellung zur Wasserbestimmung nach Karl-Fischer.

Für die Bereitstellung der HILIC-Säule und den fachlichen Austausch möchte ich Herrn Dr. Rudolf Vasold meinen Dank zum Ausdruck bringen.

Der Zentralen Analytik der Universität Regensburg gebührt mein Dank: dem NMR-Team, speziell Herr Dr. Shenderovich und Herr Kastner, für die Aufnahmen der NMR-Spektren sowie fachlichen Diskurse, Joachim Rewitzer für die Reinheitsbestimmung mittels ICP-OES, Herrn Kiermaier für die LC-HRMS Analysen, die gemeinsamen Tüffteleien sowie seine Motivation und Tipps zur Entwicklung der optimalen HPLC-Methode.

Mein Dank gilt außerdem der Feinmechanikwerkstatt und der Glasbläserabteilung, die durch diverse Reparaturen und Spezialanfertigungen zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die gute Zusammenarbeit, humorvolle Zeit und kreativen Stadt-Land-Fluss-Sessions möchte ich mich bei dem PB3-Team bedanken.

Den Praktikanten und Lehrlingen möchte ich für ihre Unterstützung meinen Dank ausdrücken: Daniel Schöbl für die Mitwirkung bei der DC- und HPLC-Methodenentwicklung, Elisabeth Mayer für ihre arbeitstüchtige Unterstützung während der sukzessiven Extraktion, Katrin Kuck für ihr geduldiges Engagement bei den CPC-Läufen, Marie Tischhöfer für ihren Arbeitseifer bei der Isolierung an der präparativen HPLC, Martin Hartmann für seine Unterstützung bei der Wasserbestimmung, Katharina Satzinger für ihre Hilfe bei der Methodenoptimierung zur Frischpflanzenaufarbeitung, Lukas Prock, Tobias Roth und Stefanie Zwisele für ihre verantwortungsvolle Unterstützung bei der Frischpflanzenaufarbeitung.

Ein riesen Dankeschön geht raus an alle meine ehemaligen und derzeitigen Arbeitskollegen: ihr habt meine Promotionszeit zu einem unvergesslich schönen und erfahrungsreichen Lebensabschnitt gemacht. Gelebte Albernheit und Verrücktheit haben die

Professionalität und Leidenschaft bei der Arbeit aufrechterhalten. Ich danke Dr. Petr Jirasek für sein einfühlsames und freundliches Wesen, Dr. Daniel Bücherl für die Überlassung seines Schreibtisches, Dr. Marcel Flemming für die Einführung in das aufgeräumteste Labor und in das Auswerten *via* SPSS, Dr. Sebastian Schmidt für die amüsante Zeit im Labor, Kondi und seine Freundschaft darüber hinaus, Dr. Beata Kling für ihre Fürsorge in meiner Bambizeit, Dr. Monika Untergehrer für die HPLC-Einführung, dem Sonnenschein Dr. Edna Makule für ihr Lachen und ihre positive Ausstrahlung, Dr. Rosmarie Scherübl für das Schnupperpraktikum sowie die CAMAG- und HPLC-Einführung, Markus Löhr für die erfrischenden Kabbeleien, Dr. Stefan Wiesneth für die fachlichen Anregungen sowie Unterstützung bei der NMR-Auswertung, Dr. Christian Zeh für die Unterstützung bei CPC und Sephadexchromatographie, Sebastian Schwindl für seine fachlichen Anregungen, Sina Malenke für die Celitespende, Katrin Kuck, Martina Tremmel, Dr. Filip Sibul, Bernhard Kram, Dagmar Flittner, Lucia Kastner, Tom Gruber, Artemis Daskalaki, Angeliki Mathioudaki, Diandra, Tanja, Wanja, Mirjam Abu-Salah, Dr. Julianna Ziegler, Nidhal Farhem, Dr. Elisabeth Grünstein und Dr. Ingrid de Pontes für die wohlthuende Würze des Laboralltags, den Einblick in andere Kulturen, die stets hoch motivierten Fitnessseinheiten und ihre Freundschaft.

Für die wunderschöne, witzige und inspirierende Zeit im Ka-ka-katzenlabor der Spinnerei bin ich meinen beiden Laborkollegen Dr. Ilyá Volkov und Dr. Katharina Schiller sehr dankbar. Ilyá, Dir danke ich speziell für Deine Hilfsbereitschaft bei der MPLC-Praxis und NMR-Auswertung, für das gemeinsame Verrücktwerden, für jedes einzelne Miao, Deinen Humor, Deine Freundschaft und Deine Fähigkeit zu Verzeihen. Dir, Kathi, danke ich für die fachlichen Diskussionen über Validierung und Statistik, die Saunaabende, die persönliche Modeberatung, Dein offenes Ohr und für Deine Freundschaft.

Bei Dr. Herwig Pongratz und dem Rest des Lehrstuhls Mahboobi/Elz bedanke ich mich für die amüsanten Grillabende.

Dr. Hanna Straß-Şenol und Dr. Sebastian Schmidt bin ich für die Durchsicht des Manuskripts dankbar.

Ich bedanke mich bei Steffi, Sabrina, Thomas und Lisa für ihre Freundschaft.

Meinem Schatz Sebastian danke ich herzlichst für seine Motivation, Geduld und technische Unterstützung, vor allem in der Zielphase, welche entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Von Herzen danke ich meiner Familie, die mir diesen Weg ermöglicht hat. Euch ist diese Arbeit gewidmet.

Für meine Familie

„There are no authoritative sources of knowledge, and no source is particularly reliable. Everything is welcome as a source of inspiration, including intuition; especially if it suggests new problems to us. But nothing is secure, and we are all fallible.“

Sir Karl R. Popper

Beiträge zur Wissenschaft und Lehre

Publikation

Lorenz, P.; Knittel, D.; Conrad, J.; Lotter, E., Heilmann, J.; Stintzing, F; Kammerer, D.: 1-Acetyl-3-[(3R)-hydroxyfatty acyl] glycerols: Lipid compounds from *Euphrasia rostkoviana* HAYNE and *E. tetraquetra* (BREB.) ARROND. *Chemistry and Biodiversity*, 2016, 13 (5), 602 – 612.

Konferenzbeiträge

1. Doktorandenkolleg der WALA Heilmittel GmbH, 2014, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland:

Lotter, E.: Änderungen des Fingerprints ausgewählter Stoffgruppen in *Plantago lanceolata* L. im Verlauf der Urtinkturherstellung.

2. Doktorandenkolleg der WALA Heilmittel GmbH, 2015, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland:

Lotter, E.: Isolierung der Hauptiridoide aus *Plantago lanceolata* L.

3. Doktorandenkolleg der WALA Heilmittel GmbH, 2016, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland:

Lotter, E.: Iridoide aus *Plantago lanceolata* L. - stabil oder nicht stabil, das ist hier die Frage.

Posterbeitrag

65th International Congress and Annual Meeting of the Society of Medicinal Plant and Natural Product Research, 2017, Basel, Schweiz:

Lotter, E.; Heilmann, J.; Stintzing, F; Kammerer, D.: Development and validation of an HPLC-DAD method for iridoid glycoside screening in fresh plant parts from *Plantago lanceolata* L.

Vorlesung

Grundlagen der Ernährungslehre, Sommersemester 2018, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg: Lotter, E.

Abstract

Diese Dissertation leistet einen wichtigen Beitrag zur Analyse des Sekundärstoffspektrums in *Plantago lanceolata* L. Die neu entwickelte und validierte HPLC-DAD-Fingerprintmethode ermöglicht erstmals eine simultane HPLC-DAD-Analytik mehrerer ausgewählter Iridoidglykoside (IGs) und Phenylethanoide (PEs) in den frischen Blättern von *P. lanceolata*. Sie kann überdies auch zur Qualitätssicherung und in der Routineanalytik von Spitzwegerichprodukten in diversen Matrices angewendet werden. Des Weiteren konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich das günstigere (HP)TLC-Verfahren nicht zum Screening der ausgewählten Analyten in der Pflanze eignet. Der Einfluss vegetativer Faktoren auf die IG- und PE-Gehalte von *P. lanceolata* konnte anhand der neuen HPLC-Methode analysiert werden, um einen optimalen Erntezeitpunkt zur pharmazeutischen Nutzung der Pflanze zu definieren. Aufgrund zu geringer Anzahl an Proben und nicht-repräsentativer Probennahmen bieten die erhobenen Resultate jedoch lediglich erste Anhaltspunkte bezüglich vegetativer Effekte auf das Sekundärstoffspektrum und bedürfen einer Verifizierung in zukünftigen Studien. Darüber hinaus konnten während der Überprüfung der Literaturangaben auf Richtigkeit bezüglich der Genuität bestimmter postulierter Verbindungen, vielversprechende Hinweise auf neue Isomere in *P. lanceolata* gewonnen werden, welche z.T. auch für andere Pflanzen bisher noch nicht beschrieben wurden. Zudem konnten wesentliche Mengen der Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol isoliert und charakterisiert werden, welche im Rahmen dieser Arbeit als Referenzsubstanzen zur analytischen Methodenentwicklung und -validierung dienen.

The dissertation contributes significantly to analytical research on the secondary metabolite profile in *Plantago lanceolata* L. A newly developed and validated HPLC-DAD fingerprint method enabled simultaneous HPLC-DAD analysis of several selected iridoid glycosides (IGs) and phenyl ethanoids (PEs) in the fresh leaves of *P. lanceolata* for the first time. The new HPLC method can be used for quality assurance and routine analyses of products derived from ribwort plantain from diverse matrices. Moreover, it could be demonstrated that the more economical (HP)TLC process is not suitable for screening the chosen analytes in the plant. The influence of vegetative factors on the IG and PE contents of *P. lanceolata* has been successfully analyzed to define an optimal time of harvesting for the pharmaceutical use of the plant. In view of an insufficient sample size and sampling process, however, the related results offer merely initial indications referring to vegetative effects on the secondary metabolite pattern requiring further verification in future studies. Furthermore, while examining the correctness of the literature on the genuinity of particular postulated compounds, potential hints on new isomers of *P. lanceolata* have been discovered, some of which have not been described for other plants yet, either. In addition, considerable amounts of the main IGs aucubin and catalpol have been isolated and characterized, which were used as reference substances for method development and validation during this work.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung: Allgemeines zur Pflanze und Einordnung der Arbeit in den wissenschaftlichen Kontext	1
1.1	<i>Plantago lanceolata</i> L.	1
1.1.1	Etymologie und Botanik	1
1.1.2	Inhaltsstoffe	3
1.1.2.1	Iridoidglykoside	7
1.1.2.2	Iridoidglykoside in <i>P. lanceolata</i>	9
1.1.2.3	Phenylethanoide	14
1.1.2.4	Phenylethanoide in <i>P. lanceolata</i>	16
1.1.3	Pharmazeutische Anwendung	20
1.2	Einflüsse auf das Sekundärstoffspektrum	24
1.2.1	Allgemeine Einflüsse auf das Sekundärstoffspektrum	24
1.2.2	Ursachen für Variationen im IG-Inhaltsstoffspektrum	25
1.2.2.1	Ontogenetik	25
1.2.2.2	Ökosystem	27
1.2.2.3	Genetik	29
1.2.2.4	Diurnalität	29
1.2.2.5	Zusammenfassung	29
1.3	Historie der Extraktion und Isolierung von IGs	30
1.4	Fingerprintanalytik von IGs mittels (HP)TLC und HPLC	36
1.4.1	(HP)TLC-Systeme zur IG-Analytik in der Literatur	36
1.4.2	Derivatisierung und Detektion von IGs in der Literatur	40
1.4.3	HPLC-Systeme zur IG-Analytik in der Literatur	43
2	Zielsetzung	51

3	Isolierung der Hauptiridoidglykoside aus <i>P. lanceolata</i>	52
3.1	Hintergrund und Motivation	52
3.2	Strategie	53
3.3	Ergebnis und Diskussion	55
3.3.1	Extraktion und Isolierung	55
3.3.2	Identität und Reinheit der Isolate	62
3.3.2.1	Aucubin	62
3.3.2.2	Catalpol	66
3.3.3	Sonstige isolierte Verbindungen	70
3.4	Zusammenfassung	70
3.5	Material und Methoden	71
3.5.1	Verwendete Chemikalien und Materialien	71
3.5.2	Verwendete Referenzen	71
3.5.3	Verwendetes Drogenmaterial	71
3.5.4	Verwendete Geräte und Software	71
3.5.5	Lyophilisation	71
3.5.6	DC	72
3.5.7	Extraktion	73
3.5.8	CC Sephadex [®] LH-20	76
3.5.9	CPC	77
3.5.10	MPLC	80
3.5.11	CC Kieselgel	81
3.5.12	Präparative HPLC-DAD	83
3.5.13	Analytische HPLC-DAD	92
3.5.14	NMR-Spektroskopie	93
3.5.15	HPLC-DAD/ESI-HRMS/MS	93
3.5.16	Karl-Fischer-Titration	94
3.5.17	ICP-OES	94
4	Verifizierung der Literaturangaben	95
4.1	Hintergrund, Motivation und Strategie	95
4.2	Ergebnis und Diskussion	96
4.2.1	Genuitätsprüfung anhand ausgewählter Fraktionen	96
4.2.2	Genuitätsprüfung anhand eines Rohextrakts	99
4.2.3	Postulierung neuer Isoformen	107
4.2.4	Vergleich des IG- und PE-Spektrums der frischen und der getrockneten Pflanze	114
4.3	Zusammenfassung und Ausblick	115
4.4	Material und Methoden	117
4.4.1	Verwendetes Drogenmaterial	117
4.4.2	Verwendete Extrakte	117
4.4.3	Präparative HPLC-DAD	117

4.4.4	HPLC-DAD/ESI-HRMS	119
5	Entwicklung einer (HP)TLC-Fingerprintmethode	120
5.1	Hintergrund und Motivation	120
5.2	Strategie	121
5.3	Ergebnisse und Diskussion	123
5.3.1	(HP)TLC-Systeme	123
5.3.1.1	FM-Systeme	123
5.3.1.2	Stationäre Phasen	131
5.3.1.3	Sackgassen der Fingerprintanalytik eignen sich zur DC-geleiteten Isolierung der Hauptiridoglykoside . .	134
5.3.1.4	Beurteilung der getesteten DC-Systeme	137
5.3.2	Derivatisierung und Detektion	141
5.3.2.1	Derivatisierung auf Kieselgel	141
5.3.2.2	Derivatisierung auf Kieselgel vs. Diolmaterial	147
5.3.3	Bewertung der (HP)TLC-Fingerprintanalytik	150
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	153
5.4.1	(HP)TLC-Systeme	153
5.4.2	Derivatisierung und Detektion	153
5.4.3	Bewertung der (HP)TLC-Fingerprintanalytik	154
5.5	Material und Methoden	155
5.5.1	Verwendete Referenzsubstanzen und Extrakte	155
5.5.2	Stationäre und mobile Phasen	155
5.5.3	Derivatisierung und Detektion	156
5.5.4	HPLC-DAD/ESI-HRMS	157
6	Entwicklung einer HPLC-DAD-Fingerprintmethode	158
6.1	Hintergrund und Motivation	158
6.2	Strategie	159
6.3	Ergebnisse und Diskussion	160
6.3.1	Stationäre Phase	160
6.3.1.1	Diolsäule	161
6.3.1.2	HILIC-Säule	164
6.3.1.3	Phenylhexylsäule	167
6.3.1.4	Biphenylsäule	171
6.3.1.5	C8e-Säule	174
6.3.1.6	C18e-Säule	177
6.3.2	Mobile Phase	179
6.3.2.1	Eluenten	180
6.3.2.2	Säurezusatz	181
6.3.2.3	Wahl der zugesetzten Säure	181
6.3.2.4	Konzentration der zugesetzten Säure	183

6.3.3	Detektion	186
6.3.3.1	Analyten	186
6.3.3.2	Hintergrundrauschen	188
6.3.4	Optimale HPLC-DAD-Fingerprintmethode	189
6.4	Zusammenfassung	191
6.5	Material und Methoden	193
6.5.1	Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software	193
6.5.2	Verwendete Referenzen, Analytlösungen, Leerwerte und Extrakte	193
6.5.3	UV-spektrometrische Analysen	194
6.5.4	HPLC-Analytik	194
6.5.5	HPLC-DAD/ESI-HRMS- und MS ⁿ -Analytik	194
7	Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode	195
7.1	Hintergrund und Motivation	195
7.2	Strategie	196
7.2.1	Spezifität und Selektivität	197
7.2.2	Messbereich	197
7.2.3	Linearität	198
7.2.3.1	Lineare Regression	199
7.2.3.2	Quadratische Regression	202
7.2.3.3	Test nach Mandel	204
7.2.3.4	Korrelationskoeffizient und Bestimmtheitsmaß	205
7.2.4	LOD und LOQ	206
7.2.5	Präzision	206
7.2.5.1	Wiederhol- und Laborpräzision des Geräts	206
7.2.5.2	Methodenpräzision	208
7.2.6	Robustheit als Analytstabilität	208
7.2.7	Richtigkeit als Wiederfindung	209
7.3	Ergebnis und Diskussion	212
7.3.1	Spezifität und Selektivität	212
7.3.1.1	Identifizierung ausgewählter IGs und PEs im Rohextrakt der Frischpflanze	212
7.3.1.2	Identifizierung von Aucubin, Catalpol und Verbascosid in verschiedenen Matrices	218
7.3.1.3	Peakreinheit von Aucubin, Catalpol und Verbascosid in verschiedenen Matrices	220
7.3.1.4	Zusammenfassung	220
7.3.2	Verbleibende Validierungsparameter	221
7.3.2.1	Linearität, Messbereich, LOD und LOQ	221
7.3.2.2	Präzision	223
7.3.2.3	Robustheit	224
7.3.2.4	Richtigkeit	224

7.3.2.5	Zusammenfassung	226
7.4	Zusammenfassung	226
7.5	Material und Methoden	227
7.5.1	Verwendete Chemikalien und Materialien	227
7.5.2	Verwendetes Frischpflanzenmaterial	227
7.5.3	Verwendete Drogen- und Fermentationsextrakte	227
7.5.4	Verwendete Referenzen	227
7.5.5	Herstellung der Analytlösungen	228
7.5.6	Vorversuche zur Evaluierung der Kalibrierfunktion	229
7.5.7	Linearität, Messbereich, LOD und LOQ	231
7.5.7.1	Catalpol	231
7.5.7.2	Aucubin	238
7.5.7.3	Verbascosid	245
7.5.8	Präzision	253
7.5.8.1	Messpräzision	253
7.5.8.2	Methodenpräzision	259
7.5.9	Robustheit als Analytstabilität	260
7.5.9.1	Catalpol	261
7.5.9.2	Aucubin	263
7.5.9.3	Verbascosid	265
7.5.10	Richtigkeit als Wiederfindung	266
7.5.10.1	Catalpol	266
7.5.10.2	Aucubin	270
7.5.10.3	Verbascosid	274
7.5.11	Bestimmung des Wassergehalts	278
7.5.12	Methodenfindung zur Bestimmung des Wassergehalts	280
7.5.12.1	Karl-Fischer-Titration	280
7.5.12.2	Azeotrope Destillation	281
7.5.12.3	Trocknungsverlust	281
7.5.12.4	¹ H-NMR	282
7.5.12.5	Beurteilung der getesteten Methoden zur Bestimmung des Wassergehalts in FP-Material	282
7.5.12.6	Zusammenfassung	284
7.5.13	Analytische HPLC-DAD	284
7.5.14	HPLC-DAD/ESI-HRMS	285
7.5.15	HPLC-DAD/ESI-MS ⁿ	285
8	Einfluss des Erntezeitpunkts auf das Inhaltsstoffspektrum	286
8.1	Hintergrund, Motivation und Strategie	286
8.2	Ergebnis und Diskussion	288
8.2.1	Catalpolgehalte	288
8.2.2	Aucubingehalte	288

8.2.3	Verbascosidgehalte	292
8.2.4	Positiv korrelierende IG-Gehalte	294
8.2.5	Variationen des Gehalts um den Mittelwert	295
8.2.6	Bewertung der Resultate	295
8.2.6.1	Probennahme	295
8.2.6.2	Probenaufbereitung	296
8.2.6.3	Integration	297
8.2.6.4	Statistik	299
8.2.6.5	Zusammenfassung	300
8.2.7	Abgleich der Gehalte mit der Literatur	301
8.2.7.1	Allgemeine Datenlage	301
8.2.7.2	Postulierte Vegetationsabhängigkeit	302
8.2.8	Ideale Erntebedingungen	303
8.2.9	Wild- vs. Kulturpflanze	304
8.2.10	Morphologische Unterschiede	304
8.2.11	Zusammenfassung	307
8.3	Material und Methoden	308
8.3.1	Verwendete Chemikalien, Materialien, Software und Geräte	308
8.3.2	Verwendetes FP-Material und Aufbereitung der FP-Proben	308
8.3.3	Verwendete Wetterdaten	308
8.3.4	Abschätzung des Fehlers der Probennahme	308
8.3.5	Statistische Auswertung	308
8.3.6	HPLC-DAD-Analytik und Auswertung	309
8.3.7	Berechnung der Analytgehalte	310
8.3.8	Erhobene Messwerte und Daten	311
8.3.8.1	Catalpol	311
8.3.8.2	Aucubin	317
8.3.8.3	Verbascosid	323
9	Zusammenfassung	329
10	Material und Methoden	333
10.1	Verwendete Chemikalien	333
10.2	Verwendete Referenzsubstanzen	336
10.3	Verwendete fermentierte Extrakte	336
10.4	Verwendetes Frischpflanzenmaterial	337
10.4.1	FP-Material zur Methodenentwicklung und -validierung	337
10.4.2	FP-Material zur Analytik des Inhaltsstoffspektrums von <i>P. lanceolata</i>	337
10.4.3	Archivierung von Belegexemplaren	338
10.4.4	Ernte, Reinigung und Lagerung des FP-Materials	339
10.4.5	Probenaufbereitung	341

10.5	Verwendetes Drogenmaterial	343
10.5.1	Verwendetes Drogenmaterial	343
10.5.2	Bestimmung des Verbascosidgehalts	343
10.6	Verwendete Materialien	345
10.6.1	Verwendete (HP)TLC-Platten	345
10.6.2	Verwendete HPLC-Säulen	346
10.6.3	Sonstige verwendete Materialien	347
10.7	Verwendete Software	351
10.8	Verwendete Geräte	352
	Literaturverzeichnis	356

Abbildungsverzeichnis

1.1	Grundgerüst der IGs.	7
1.2	Oxidative Decarboxylierung der C ₁₀ - zu den C ₉ -Grundkörpern der IGs.	8
1.3	Strukturformeln der für <i>P. lanceolata</i> postulierten IGs.	10
1.4	Struktureller Aufbau von PEs am Beispiel von Verbascosid	14
1.5	Substitutionsmuster der für <i>P. lanceolata</i> postulierten PEs (siehe Tabelle 1.3).	17
3.1	Schema der Isolierung von Aucubin und Catalpol aus <i>P. lanceolata</i>	54
3.2	Übersichts-DC der sukzessiven Extraktion.	55
3.3	Übersichts-DC der Fraktionierung des ethanolschen Extraktes über eine offene Sephadexsäule.	56
3.4	Übersichts-DC der CPC-Fraktionierung.	58
3.5	Übersichts-DC der MPLC-Fraktionierung 1.	60
3.6	Übersichts-DC der MPLC-Fraktionierung 2.	60
3.7	Exemplarische Darstellung eines präparativen HPLC-Chromatogramms.	61
3.8	DC zur Prüfung der Identität und Reinheit des isolierten Aucubins.	64
3.9	DC zur Prüfung der Identität und Reinheit des isolierten Catalpols.	69
3.10	Reaktionsgleichgewicht zwischen Ethylacetat und Essigsäure.	75
4.1	Übersichts-DC der offenen Säulenchromatographie.	97
4.2	Strukturformel von Isoaucubin.	108
4.3	Strukturformel von Isolavandulifoliosid.	109
4.4	Struktureller Aufbau der in Pflanzen beschriebenen Konstitutionsisomere des Verbascosids.	111
5.1	DC gemäß Krzek et al. [113].	123
5.2	DC gemäß Tiwari et al. [58].	124
5.3	DC gemäß Munteanu und Vlase [103].	125
5.4	DC gemäß Nikolova-Damyanova et al. [111].	126
5.5	DC gemäß Yadav et al. [112].	127
5.6	DC gemäß Rischer et al. [29].	128

5.7	DC gemäß Ph. Eur. [43].	129
5.8	DC gemäß Pachaly und Koch [109].	130
5.9	DC gemäß Camag Application Notes [110].	131
5.10	DC gemäß Coran et al. [106].	132
5.11	DC gemäß Pachaly und Koch [109].	133
5.12	DC gemäß Camag Application Notes [110].	134
5.13	Einfluss des Methanolanteils in ethylacetathaltigen FM-Systemen.	135
5.14	Optimierung des FM-Systems 1.	136
5.15	Optimierung des FM-Systems 2.	136
5.16	Derivatisierung mittels Ehrlich-Reagenz.	142
5.17	Derivatisierung mittels Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz.	143
5.18	Derivatisierung mittels Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz.	144
5.19	Derivatisierung mittels Echtblausalz-Reagenz.	144
5.20	Derivatisierung mittels Eisenchlorid-Reagenz.	145
5.21	Derivatisierung mittels Chloramin-T-Reagenz.	146
5.22	Derivatisierung mittels Naturstoff-Reagenz.	147
5.23	Derivatisierung mittels <i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyd auf stationärer Kieselgel- bzw. Diolphase.	148
5.24	Derivatisierung mittels Phloroglucin auf stationärer Kieselgel- bzw. Diolphase.	149
5.25	Chromatogramm zur Bestimmung der Bandenreinheit per LC-MS.	151
6.1	HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Diolsäule mit der Methode nach Dimov et al. [117].	162
6.2	HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Diolsäule mit modifizierter Methode nach Dimov et al. [117].	163
6.3	HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer HILIC-Säule mit entwickelter isokratischer Methode.	165
6.4	HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer HILIC-Säule mit entwickelter Gradientenmethode.	166
6.5	HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Phenylhexylsäule mit entwickelter Gradientenmethode SunFire1.	168
6.6	HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Phenylhexylsäule mit entwickelter Gradientenmethode SunFire1.	169
6.7	HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Biphenylsäule mit entwickelter Gradientenmethode ChP2010 in Anlehnung an die Monographie von <i>Scrophulariae Radix</i> des Chinesischen Arzneibuches (2010) [156] beschrieben ist.	172
6.8	HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer C8e-Säule mit entwickelter Gradientenmethode ChP2010, die an die HPLC-Methode der Monographie von <i>Scrophulariae Radix</i> des Chinesischen Arzneibuches [156] angelehnt ist.	175

6.9	HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer C18e-Säule mit entwickelter Gradientenmethode EL082Fingerprint9minspülen.	178
6.10	Nachteiliger Effekt von Methanol im Fließmittelgradienten.	180
6.11	Vergleich des Grundrauschens von Phosphorsäure bzw. Ameisensäure im mobilen System.	182
6.12	Einfluss der zugesetzten Phosphor- bzw. Ameisensäure auf das Spektrum von Aucubin gemessen <i>via</i> HPLC-DAD.	183
6.13	Einfluss der Säurekonzentration auf das Grundrauschen der Basislinie. .	184
6.14	Einfluss der Säurekonzentration auf das Grundrauschen der Basislinie ohne Matrix.	185
6.15	Einfluss der Säurekonzentration auf das Grundrauschen der Basislinie mit Matrix.	185
6.16	HPLC-Chromatogramm eines Frischpflanzenextrakts der Spitzwegerichblätter.	190
7.1	Identitätszurodnungen der ausgewählten IGs und PEs von <i>P. lanceolata</i> in verschiedenen Matrices.	219
8.1	Catalpolgehalte der Spitzwegerichblätter.	290
8.2	Aucubingehalte der Spitzwegerichblätter.	291
8.3	Verbascosidgehalte der Spitzwegerichblätter.	293
8.4	Korrelationen verfügbarer Wetterdaten und erhobener Analytgehalte <i>via</i> SPSS.	294
8.5	Problematik der IG-Integration am Beispiel von Aucubin.	298
8.6	Übersicht der Höhen bzw. Längen einzelner Pflanzenorgane der drei Pflanzenkategorien.	305
8.7	Größenunterschied zwischen Kultur- und Wildwuchs.	306
10.1	Ernte der Frischpflanze.	340
10.2	Schema der Aufarbeitung des Frischpflanzenmaterials.	342

Tabellenverzeichnis

1.1	Zusammenstellung der bisher für <i>P. lanceolata</i> postulierten Inhaltsstoffe.	3
1.2	Zusammenstellung der IUPAC-Bezeichnungen und Trivialnamen der für <i>P. lanceolata</i> postulierten IGs laut Scifinder Datenbank inklusive der dazugehörigen Summenformeln.	11
1.3	Substitutionsmuster der für <i>P. lanceolata</i> postulierten PEs.	16
1.4	Zusammenstellung der IUPAC-Bezeichnungen und Trivialnamen der für <i>P. lanceolata</i> postulierten PEs laut Scifinder Datenbank inklusive der dazugehörigen Summenformeln.	19
1.5	Zusammenstellung der bis <i>dato</i> bekannten Bioaktivitäten des Spitzwegereichs bzw. seiner Inhaltsstoffe.	21
1.6	Einsatz von Methanol zur Extraktion und Isolierung (z.T. auch Fraktionierung und Probenaufarbeitung) von IGs in der einschlägigen Literatur.	31
1.7	Übersicht der in der Literatur angewendeten DC-Systeme.	37
1.8	Übersicht der Literaturstellen zur Derivatisierung von IGs.	41
1.8	Übersicht der Literaturstellen zur Derivatisierung von IGs.	42
1.9	Übersicht der in der Literatur beschriebenen stationären Phasen zur IG-Analytik <i>via</i> HPLC.	43
1.10	Übersicht der in der Literatur beschriebenen mobilen Phasen zur IG-Analytik <i>via</i> HPLC.	44
1.11	Übersicht der in der Literatur beschriebenen Additive zur mobilen Phase.	45
1.12	Übersicht der in der Literatur beschriebenen HPLC-gekoppelten Detektionsarten von IGs.	46
1.13	Übersicht der in der Literatur beschriebenen HPLC-Systeme zur Analytik von IGs und PEs.	47
1.13	Übersicht der in der Literatur beschriebenen HPLC-Systeme zur Analytik von IGs und PEs.	48
1.13	Übersicht der in der Literatur beschriebenen HPLC-Systeme zur Analytik von IGs und PEs.	49
3.1	NMR-spektroskopische Daten des isolierten Aucubins.	63
3.2	NMR-spektroskopische Daten des isolierten Catalpols.	67

3.3	Gewonnene Extrakte der sukzessiven Extraktion.	74
3.4	Übersicht der Fraktionierung mittels CC Sephadex [®] LH-20.	76
3.5	Übersicht der Fraktionierung mittels CPC.	79
3.6	Übersicht der Fraktionierung mittels MPLC.	81
3.7	Parameter der Fraktionssammlung der CC an Kieselgel.	82
3.8	Übersicht der Fraktionierung mittels CC Kieselgel.	82
3.9	Präparative HPLC: Methodenübersicht.	83
3.10	Übersicht der durchgeführten Läufe an der präparativen HPLC zur Isolierung der Hauptiridoidglykoside.	88
3.10	Übersicht der durchgeführten Läufe an der präparativen HPLC zur Isolierung der Hauptiridoidglykoside.	89
3.10	Übersicht der durchgeführten Läufe an der präparativen HPLC zur Isolierung der Hauptiridoidglykoside.	90
3.10	Übersicht der durchgeführten Läufe an der präparativen HPLC zur Isolierung der Hauptiridoidglykoside.	91
3.11	Isolierungsparameter der nicht charakterisierten Isolate nach präparativer HPLC-DAD Analyse.	92
3.12	Fließmittelgradient der analytischen HPLC zur Identitäts- und Reinheitsbestimmung des isolierten Aucubins.	92
4.1	Tabellarische Zusammenstellung der per LC-HRMS nachweisbaren IGs und PEs in einem Spitzwegerichrohextrakt mittels Biphenylsäule.	100
4.2	Tabellarische Zusammenstellung der per LC-HRMS nachweisbaren IGs und PEs in einem Spitzwegerichrohextrakt mittels C8e-Säule.	104
4.3	Zusammenfassung der LC-HRMS-Ergebnisse in Hinblick auf potentielle Isomere.	107
4.4	Struktureller Aufbau der in Pflanzen beschriebenen Konstitutionsisomere des Verbascosids.	111
4.5	Einpflegen der in <i>P. lanceolata</i> entdeckten neuen IG- und PE-Isomere in den bisherigen wissenschaftlichen Kontext.	112
4.6	Vergleich der Rohextrakte aus der frischen und der getrockneten Pflanze bezüglich ausgewählter, nachweisbarer IGs und PEs.	114
4.7	Übersicht der HPLC-Läufe zur Überprüfung der Genuität der IGs in <i>P. lanceolata</i>	118
4.8	Die 22 isolierten Verbindungen, die aus den sieben präparativ aufgearbeiteten Fraktionen CC.2-CC.9 ohne Fraktion CC.5 gewonnen werden konnten.	119
5.1	Erhobene Daten zur Beurteilung der Eignung der getesteten (HP)TLC-Methoden zur IG-Fingerprintanalytik.	138
5.2	Übersicht der angewendeten Derivatisierungsreagenzien auf stationärem Kieselgel.	141

5.3	Detektierte Masse-/Ladungsverhältnisse zur Bestimmung der Bandenreinheit per LC-MS.	152
6.1	Vergleich der Retentionszeiten bei identischer HPLC-Methode an stationärer Biphenyl- und C8e-Säule.	176
6.2	Vergleich der UV-Maxima der Referenzsubstanzen mit der Literatur. . .	187
6.3	UV-Maxima relevanter Zusammensetzungen der mobilen Phase.	189
6.4	Relevante Parameter der entwickelten HPLC-Fingerprintmethode zur IG- und PE-Analytik.	189
7.1	Übersicht der angewendeten Excelbefehle zur Bestimmung relevanter Parameter der linearen Kalibrierfunktion.	201
7.2	Erhobene LC-DAD/ESI-MS ⁿ -Daten der IGs und PEs in einem Spitzweigerichfrischpflanzenextrakt.	213
7.3	Gegenüberstellung der Retentionszeiten von Aucubin, Catalpol und Verbascosid mittels HPLC-DAD und LC-DAD/ESI-MS ⁿ -Anlage.	217
7.4	Übersicht der erhaltenen LC-DAD-ESI-MS ⁿ -Daten zur Peakreinheit. . .	220
7.5	Ermittelte Validierungsparameter der HPLC-DAD-Fingerprintmethode. . . .	222
7.6	Eingesetzte Parameter zur Bestimmung der Validierungsparameter. . . .	227
7.7	Einwaagen der Referenzsubstanzen.	229
7.8	Herstellung der Verdünnungsreihe der Kalibrierfunktion von Catalpol. . .	230
7.9	Herstellung der Verdünnungsreihe der Kalibrierfunktion von Aucubin. . .	230
7.10	Herstellung der Verdünnungsreihe der Kalibrierfunktion von Verbascosid. . .	230
7.11	Messwerte zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Catalpol.	232
7.12	Gemittelte Messwerte zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Catalpol. . . .	235
7.13	Berechnete Validierungsparameter zur Evaluierung des Messbereichs für Catalpol.	236
7.14	Test nach Mandel zur Verifizierung einer linearen KF für Catalpol.	237
7.15	Messwerte zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Aucubin.	239
7.16	Gemittelte Messwerte zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Aucubin. . . .	242
7.17	Berechnete Validierungsparameter zur Evaluierung des Messbereichs für Aucubin.	244
7.18	Test nach Mandel zur Verifizierung einer linearen KF für Aucubin.	245
7.19	Messwerte zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Verbascosid.	246
7.20	Gemittelte Messwerte zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Verbascosid. . . .	249
7.21	Berechnete Validierungsparameter zur Evaluierung des Messbereichs für Verbascosid.	251
7.22	Test nach Mandel zur Verifizierung einer linearen KF für Verbascosid. . . .	252
7.23	Erhaltene Flächen von Catalpol im Extrakt zur Ermittlung der Messpräzision.	253
7.24	Erhaltene Flächen von Catalpol in wässriger Lösung (0,0849 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision.	253

7.25 Erhaltene Flächen von Catalpol in wässriger Lösung (0,0265 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision.	254
7.26 Erhaltene Flächen von Catalpol in wässriger Lösung (0,0066 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision.	254
7.27 Wiederholungsmesspräzision von Catalpol.	254
7.28 Labormesspräzision von Catalpol.	255
7.29 Erhaltene Flächen von Aucubin im Extrakt zur Ermittlung der Messpräzision.	255
7.30 Erhaltene Flächen von Aucubin in wässriger Lösung (0,0514 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision.	255
7.31 Erhaltene Flächen von Aucubin in wässriger Lösung (0,0128 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision.	256
7.32 Wiederholungsmesspräzision von Aucubin.	256
7.33 Labormesspräzision von Aucubin.	256
7.34 Erhaltene Flächen von Verbascosid im Extrakt zur Ermittlung der Messpräzision.	257
7.35 Erhaltene Flächen von Verbascosid in wässriger Lösung (0,3125 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision.	257
7.36 Erhaltene Flächen von Verbascosid in wässriger Lösung (0,0781 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision.	258
7.37 Wiederholungsmesspräzision von Verbascosid.	258
7.38 Labormesspräzision von Verbascosid.	258
7.39 Ermittlung der Methodenpräzision von Catalpol.	259
7.40 Ermittlung der Methodenpräzision von Aucubin.	260
7.41 Ermittlung der Methodenpräzision von Verbascosid.	260
7.42 Ermittlung der Flächen von Catalpol für $t=0$	261
7.43 Ermittlung der Flächen von Catalpol für $t=3$ d.	261
7.44 Ermittlung der Differenz der Flächen von Catalpol.	262
7.45 Ermittlung der Flächen von Aucubin für $t=0$	263
7.46 Ermittlung der Flächen von Aucubin für $t=3$ d.	263
7.47 Ermittlung der Differenz der Flächen von Aucubin.	264
7.48 Ermittlung der Flächen von Verbascosid für $t=0$	265
7.49 Ermittlung der Flächen von Verbascosid für $t=3$ d.	265
7.50 Ermittlung der Differenz der Flächen von Verbascosid.	266
7.51 Ermittlung von $x_{N, \text{intern}}$ von Catalpol.	267
7.52 Ermittlung der Wiederfindung von Catalpol.	269
7.53 Ermittlung von $x_{N, \text{intern}}$ von Aucubin.	271
7.54 Ermittlung der Wiederfindung von Aucubin.	273
7.55 Ermittlung von $x_{N, \text{intern}}$ von Verbascosid.	275
7.56 Ermittlung der Wiederfindung von Verbascosid.	277
7.57 Wasserbestimmung des „neuen“ FP-Materials.	278

7.58	Wasserbestimmung des „alten“ FP-Materials.	279
7.59	Vergleich der Verfahren zur Bestimmung des Wassergehalts in Frischpflanzenmaterial.	283
8.1	Peakintegrationskategorien.	298
8.2	Literaturwerte der Catalpol-, Aucubin- und Verbascosidgehalte in <i>P. lanceolata</i>	301
8.3	Wetterdaten am Ernteort.	309
8.4	Abschätzung des Fehlers der angewendeten Probenaufarbeitungsmethode.	310
8.5	Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Catalpol für das Jahr 2014. .	311
8.6	Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Catalpol für das Jahr 2015. .	312
8.7	Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Catalpol für das Jahr 2016. .	315
8.8	Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Aucubin für das Jahr 2014. .	317
8.9	Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Aucubin für das Jahr 2015. .	318
8.10	Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Aucubin für das Jahr 2016. .	321
8.11	Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Verbascosid für das Jahr 2014.	323
8.12	Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Verbascoid für das Jahr 2015.	324
8.13	Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Verbascoid für das Jahr 2016.	327
10.2	Erntezeitpunkte der FP-Probenzüge.	338
10.3	Geerntete Pflanzenkategorien pro FP-Probenzug.	338
10.4	Herbarnummern der Belegexemplare.	339

Abkürzungsverzeichnis

'	Minuten
°	Grad
°C	Grad Celsius
¹³ C	Kohlenstoffatom mit Atommasse 13 u
1D	eindimensional
¹ H	Wasserstoffisotop mit Atommasse 1 u
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Å	Angström
A	Aucubin
Ac-MVA	Acetat-Mevalonat
ASE	automatische Festphasenextraktion
AU	Absorptionseinheiten
AUC	Fläche/Integral unter der Kurve
BPC	<i>base peak chromatogram</i>
br.sg.	breites Singulett
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoffatom
c	Konzentration
ca.	circa
CC	offene Säulenchromatographie
CE	Kapillarelektrophorese
Ch.	Charge
ChP	Chinesisches Arzneibuch
cm	Zentimeter
Co./No.	Säulenummer
CoA	CoenzymA
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CPC	Zentrifugalverteilungschromatographie
δ	chemische Verschiebung

ΔT	Temperaturunterschied, verstanden als Erhitzung
D	Wasserstoffisotop mit Atommasse 2 u (Deuteriumatom)
d	Tag(e)
Da	Dalton
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtschromatographie (=TLC)
dd	Dublett vom Dublett
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
d.h.	das heißt
$-d_i$	Anzahl i der Deuteriumatome im Molekül
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
DOX	1-Deoxy-D-xylose
dubl	Dublett
DXP	1-Deoxy-D-xylose-5-phosphat
E	Extrakt
e	endgecappt
<i>E-/Z-</i>	entgegen-/zusammen- bzw. <i>trans-/cis-</i>
ELSD	Lichtstreuungsdetektor
EM	Elutionsmittel
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESCAP	<i>European Scientific Cooperative on Phytotherapy</i>
ESI	Elektrosprayionisation
EW	Einwaage
F	Freiheitsgrad
f	Freiheitsgrad
FM	Fließmittel
FP	Frischpflanze
g	Gramm
GAP	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
GC	Gaschromatographie
GDP	Geranyldiphosphat
GLP	gute Laborpraxis
h	Stunde(n)
H ⁺	Proton
HAB	Homöopathisches Arzneibuch
HCl	Salzsäure
HILIC	hydrophile Interaktionschromatographie

Hortus	arbeitsinterne Kategoriebezeichnung der Spitzwegerichpflanze, die vom Saatgutvertreibers Hortus kommerziell erworbenen wurde
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMPC	<i>Committee on Herbal Medicinal Products</i>
(HP)LC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
HRMS/MS	hochauflösende Tandemmassenspektrometrie
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HWE	Heißwasserextraktion
Hz	Hertz
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
ICP-OES	optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem (Hochfrequenz-)Plasma
IG(s)	Iridoidglykosid(e)
inkl.	inklusive
IPP	Isopentenylidiphosphat
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
J	Kopplungskonstante
Jh.	Jahrhundert
Kat.	Kategorie
KF	Korrekturfaktor
KF1	Kalibrierfunktion 1
KF2	Kalibrierfunktion 2
kg	Kilogramm
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
L	Liter
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
Libor	arbeitsinterne Kategoriebezeichnung der Spitzwegerichpflanze der Sorte Libor, welche käuflich erworben wurde
LM	Lösungsmittel
LOD	Detektionsgrenze, Nachweisgrenze
LOQ	Quantifizierungsgrenze
μ S/cm	Mikrosiemens pro Zentimeter
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
M	molar
m	Gewichtsmasse

<i>m-</i>	<i>meta-</i>
mAU	Milliabsorptionseinheiten
max	maximal/Maximum/Maxima
MEKC	mizellare elektrokinetische Chromatographie
MEP	2C-Methylerythriol-4-phosphat
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mPA	Millipascal
mPA s	Millipascalsekunden (Viskositätsangabe)
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
mult	Multiplizität
multi	Multipllett
MW	Mittelwert
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
N	Anzahl an Kalibrierpunkten
n.B.	nördliche Breite
n	Anzahl an Messungen oder Proben
N ₂	Stickstoff
n.a.	nicht angegeben
NaOH	Natriumhydroxid
Nds	Niederschlag
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
No.	=Nr.
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
Nollen	arbeitsinterne Kategoriebezeichnung der Spitzwegerichpflanze der Wildsammlung von <i>P. lanceolata</i>
NP	Normalpase
Nr.	Nummer (=No.)
NS	Normalschliff
<i>o-</i>	<i>ortho-</i>
OH-	Hydroxyl-/Hydroxygruppe
ö.B.	östliche Breite
<i>p-</i>	<i>para-</i>
p	Signifikanzwert
<i>P. lanceolata</i>	<i>Plantago lanceolata</i> L.

P./No.	Partikelnummer
p.a.	<i>pro analysis</i> (analyserein)
PDA	Photodiodenarraydetektor
PE(s)	Phenylethanoid(e)
PEG	Polyethylenglykol
Ph. Eur.	<i>Pharmacopoea Europaea</i> (Europäisches Arzneibuch)
pM	Methode an der präparativen HPLC
Pos.	Position
ppm	<i>parts per million</i>
psi	Druckeinheit (≈ 00689 bar, ≈ 6895 Pa)
qNMR	quantitative NMR
qTOF	<i>quadrupol time of flight</i>
r	Korrelationskoeffizient
r^2	Bestimmtheitsmaß
R_f	Retentionsfaktor
RP	Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute
R_t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
sg	Singulett
sh	shoulder (Schulter)
STABW bzw. StabW	Standardabweichung
T	Temperatur
tr	Triplett
t	Zeit
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenstrom
TLC	<i>thinlayer chromatography</i> (=DC)
TS	Trockensubstanz
UV	ultraviolett bzw. ultraviolettes Licht
V	Volt
v	Volumen
VarK	Variationskoeffizient
VIS	Tageslicht
vs.	<i>versus</i>
WF	Wiederfindung
x	x-Wert, unabhängige Messgröße
y	y-Wert, abhängige Messgröße

z.B. zum Beispiel
z.T. zum Teil

Kapitel 1

Einleitung: Allgemeines zur Pflanze und Einordnung der Arbeit in den wissenschaftlichen Kontext

Die Wahl des Spitzwegerichs (*Plantago lanceolata* L.) durch den interdisziplinären Studienkreis Entwicklungsgeschichte der Arzneipflanzen am Institut für Geschichte der Medizin der Universität Würzburg zur Arzneipflanze des Jahres 2014 verdeutlicht das erhöhte wissenschaftliche Interesse an dieser Pflanze [1]. Als Grundlage für erstrebenswerte pharmakologische und klinische Untersuchungen [1, 2] galt es, im Rahmen dieser Arbeit einen Beitrag zur phytochemischen Analytik zu leisten. Im Fokus standen die im Spitzwegerich enthaltenen, pharmakologisch aktiven Substanzklassen der Phenylethanoide (PEs) und Iridoidglykoside (IGs).

1.1 *Plantago lanceolata* L.

1.1.1 Etymologie und Botanik

Spitzwegerich (*Plantago lanceolata* L.) zählt zur Familie der Wegerichgewächse (Plantaginaceae) [3]. Aus dem Altdeutschen hergeleitet, bedeutet die Bezeichnung Wegerich so viel wie „König am Wegrund“, zusammengesetzt aus „wega“ (Weg) und „rih“ (König/Herr/Herrscher). Der Wortstamm „planta“ (Fußsohle) für den Gattungsnamen stammt aus dem Lateinischen. Er bezieht sich darauf, dass insbesondere die Sporen des verwandten Breitwegerichs leicht an den Fußsohlen der Menschen kleben blieben und sich auf diese Weise anthropogen verteilten. [1, 4, 5, 6]

Namensgebend und charakteristisch für den Spitzwegerich sind überdies die vergleichbar mit einer Lanze (lateinisch: „lanceo“) bzw. kleinen Lanze (lateinisch: „lanceolatus“) spitzzulaufenden, lanzettenförmigen Blätter [1, 4, 6].

Die spitzzulaufenden, bis 25 cm langen und 7-20 mm breiten, lanzettenförmigen Blätter sind grundständig in einer Rosette angeordneten und weisen 3-7 parallel verlaufende

Blattnerven auf. Sie sind häufig aber nicht zwangsläufig behaart. Die Blattränder sind ungeteilt bzw. undeutlich gezähnt. Die Pflanze besitzt keinen Stängel. Die fünf- bis siebenfurchigen Blütenschäfte, die bis zu 50 cm lang aus der bodenständigen Rosette emporwachsen können, münden in bräunliche Blüten mit walzen- oder kugelförmigen Ähren. Diese tragen hervorstehende, gelblich-weiße Staubblätter. [3, 7, 8]

Die Blütezeit der mehrjährigen, krautigen Pflanze wird von April bis September datiert [9], kann jedoch in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen sowie der genetischen Veranlagungen davon abweichen [10]. Das stark verzweigte Wurzelsystem kann bis zu 60 cm in die Tiefe wachsen [8]. *P. lanceolata* präferiert trockene, kalkarme Böden [6]. Durch die Fähigkeit Dürre und Kälte gut zu überstehen [10], wächst er vorwiegend auf kargen Böden, trockenen Wiesen, Feldern und Wegränder bis hin zu Bauschuttflächen [6, 11]. *P. lanceolata* bevorzugt eine kühl-gemäßigte Umgebung und ist hauptsächlich in der nördlichen Hemisphäre, v.a. in Mittel- und Nordasien sowie ganz Europa und Nordafrika beheimatet [6]. Inzwischen scheint sich die Pflanze aber auch an andere, nicht-moderate Biotope angepasst zu haben und besiedelt deshalb auch feuchtere Gebiete bis hin zu mediterranen Zonen [10].

Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei *P. lanceolata* um einen Archäophyt, also um einen nicht-heimischen Alteinwanderer, mit Ursprung in Asien handelt. Die Pflanze soll bereits in der Steinzeit mit Getreide von Asien nach Mitteleuropa verschleppt worden sein, von wo sie sich weiter ausbreitete [12].

Die Anbautraditionen von *P. lanceolata* variieren in den Verbreitungsgebieten. So wurde beispielsweise in Deutschland die Pflanze deutlich früher in Kultur genommen als in Großbritannien. [10]

Traditionell wird die Pflanze für den pharmazeutischen Gebrauch in der Blütezeit geerntet [7]. Die zur pharmazeutischen Anwendung eingesetzte Droge stammt vorwiegend aus Kulturen osteuropäischer Länder [3], wobei zur Zeit neben lokalen Herkünften vor allem die spätblühende, blattreiche tschechische Sorte „Libor“ kultiviert wird [6], die mitunter auch für die vorliegende Arbeit herangezogen wurde. Ihre Blütezeit erstreckt sich von Juni bzw. Juli bis September, wie eigene Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten.

1.1.2 Inhaltsstoffe

Für *P. lanceolata* werden anorganische sowie organische Inhaltsstoffe in der Literatur beschrieben, unter ihnen diverse sekundäre Pflanzenstoffe aus unterschiedlichen Stoffgruppen (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Zusammenstellung der bisher für *P. lanceolata* postulierten Inhaltsstoffe unter Angabe der üblichen Gehalte in der getrockneten Pflanze und Zuordnung in die entsprechenden Stoffklassen.

Gehalt ^a	übergeordnete Stoffklasse	Inhaltsstoff
3-8% ^b [6]	Phenylethanoide [3, 6, 14]	Cistanosid F [15] Forsythosid B [16] Isoverbascosid [15, 16] Lavandulifoliosid [15, 16, 17] Martynosid [16] Plantainosid D [16] Plantamajosid [15, 17] Verbascosid [15, 16, 17, 18, 19]
^c	Flavonoide [3, 6, 14]	Amentoflavon [20] Ampelopsin-3'-glukosid [16] Apigenin [20] Apigenin-7-O-glukosid [3, 20] Apiin [20] Chrysoeriol [20] Hyperosid [20] Kämpferol-3-O-glukosid [20] Luteolin [20] Luteolin-7-O-glukosid [20] Naringenin [20] Ombuosid [16] Quercetin [20] Quercetin-3-O-glukosid [20] Quercitrin [20] Rutin [20] Vitexin [20]
ca. 6% [3, 6]	Gerbstoffe [3, 6, 14]	^a

^a bezogen auf die Droge

^b Berechnung bezieht sich auf *o*-Dihydroxizimtsäurederivate

^c nicht angegeben

^d berechnet aus 0,077% α -Tocopherol und 0,56% β -Carotin [13]

^e Synonyme Bezeichnung: Schleimstoffe, Mucopolysaccharide

Gehalt ^a	übergeordnete Stoffklasse	Inhaltsstoff
^c	Phenolcarbonsäuren [6, 14]	Chlorogensäure [20] <i>p</i> -Cumarsäure [20] 2,5-Dihydroxybenzoesäure [20] Ferulasäure [20] Gallussäure [20] Gentisinsäure [14] <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure [20] Kaffeesäure [20] Protocatechusäure [20] Sinapinsäure [20] Syringasäure [20] Vanillinsäure [20] Zimtsäure [20]
^c	Cumarinderivate [14]	Aesculetin [20, 21] Scopoletin [20]
^c	Xanthophyllabbauprodukte [14]	Loliolid [14]
2-3% [6]	Iridoidglykoside [6, 14]	Alpinosid [16] Arborescosidsäure [16] Asperulosid [3, 17, 22, 23, 24, 25] Aucubin [3, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31] <i>6-epi</i> -Aucubin [32] Catalpol [3, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31] Deacetylasperulosidsäuremethylester [17, 23] Dihydroaucubin [23] Dihydrocatalpol [23] Gardosid [30] Geniposidsäure [16, 25] Globularin [17, 23, 25] <i>8-epi</i> -Logansäure [30]

^a bezogen auf die Droge^b Berechnung bezieht sich auf *o*-Dihydroxymimtsäurederivate^c nicht angegeben^d berechnet aus 0,077% α -Tocopherol und 0,56% β -Carotin [13]^e Synonyme Bezeichnung: Schleimstoffe, Mucopolysaccharide

Gehalt ^a	übergeordnete Stoffklasse	Inhaltsstoff
		Shanzisid [16] Verbenalin [24]
^c	Saponine [3, 6]	^c
0,21% [13]	Carotinoide ^d [13]	β -Carotin [13] Lutein [13]
0,1% [13]	Tocopherole [13]	α -Tocopherol [13]
1,7% [13]	Fettsäuren [13]	v.a. C18:3n-3, C18:2n-6 und C16:0 [13]
2 [3]-6% [6]	Polysaccharide ^e [6, 14]	u.a. mit folgenden Zuckereinheiten: Rhamnogalacturonan [3, 6, 14], Rhamnoarabinogalactan [14], Arabi-nogalactan [3, 6, 14], Glucomannan [3, 6, 14]
1% [3] ^c	anorganische Säuren [6]	Kieselsäure [3, 6]
^c	Mineralstoffe [6, 14]	Zink [6, 14] Kalium [6, 14]

^a bezogen auf die Droge

^b Berechnung bezieht sich auf *o*-Dihydroxyzimtsäurederivate

^c nicht angegeben

^d berechnet aus 0,077% α -Tocopherol und 0,56% β -Carotin [13]

^e Synonyme Bezeichnung: Schleimstoffe, Mucopolysaccharide

Als organische Verbindungen sind im Spitzwegerich diverse phenolische Verbindungen enthalten, die den Stoffgruppen der Phenylethanoide (PEs), Flavonoide, Phenolcarbonsäuren und Gerbstoffen zugeordnet werden können.

Auf die Stoffgruppe der PEs, welche in dieser Arbeit im Mittelpunkt steht, wird in diesem Kapitel nicht eingegangen, da sie sehr ausführlich in Kapitel 1.1.2.3 behandelt wird. Gleiches gilt für die Iridoidglykoside (IGs), die neben den PEs eine zentrale Rolle in dieser Arbeit einnehmen (Kapitel 1.1.2.1).

Es konnten weiter diverse Flavonoide in *P. lanceolata* nachgewiesen werden, wobei die vormals hauptsächlich bekannten Apigenin- und Luteolinglykoside [14] inzwischen durch einige weitere ergänzt werden konnten: Amentoflavon [20], Ampelopsin-3'-glukosid [16], Apigeninin [20], Apigenin-7-*O*-glukosid [20], Apiin [20], Chrysoeriol [20], Hyperosid [20], Kämpferol-3-*O*-glukosid [20], Luteolin [20], Luteolin-7-*O*-glukosid [20], Narin-

genin [20], Ombuosid [16], Quercetin [20], Quercetin-3-*O*-glukosid [20], Quercitrin [20], Rutin [20], Vitexin [20].

Die Existenz von Gerbstoffen in *P. lanceolata* wird postuliert, ohne dabei konkrete Einzelsubstanzen zu nennen. Gleiches gilt für die Gruppe der Saponine. [33]

Als Cumarine bzw. Cumarinderivate konnten Aesculetin [20, 21] und Scopoletin [20] in der Pflanze erfolgreich nachgewiesen werden.

Überdies wird das Vorkommen des Xanthophyllabbauprodukts Loliolid im Kraut beschrieben [33].

Als lipophile Inhaltsstoffe des Spitzwegerichs, die in der Literatur nur geringfügig Beachtung finden, konnten die Carotinoide Lutein und β -Carotin, α -Tocopherol sowie diverse Fettsäuren identifiziert werden. Elgersma et al. [13] ermittelten u.a. ein komplettes Fettsäureverteilungsmuster für *P. lanceolata*, dessen ausführliche Darstellung den Rahmen sprengen würde. Zusammengefasst sei, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit 69,34% den Löwenanteil darstellen. Weiter sind die am häufigsten vertretenen Fettsäuren die dreifach ungesättigte Linolensäure mit 41,51%, gefolgt von der zweifach ungesättigten Linolsäure mit 21,62% und der gesättigten Palmitinsäure mit 17,77% am Gesamtfettanteil. [13]

Diverse Polysaccharide, bestehend aus unterschiedlichen Zuckerbausteinen, wie Rhamnogalacturanen, Rhamnoarabinogalactanen, Arabinogalactanen und Glucomannanen, zählen darüber hinaus zu den Inhaltsstoffen der Pflanze [33].

Als anorganische Komponenten konnten für Spitzwegerich Kieselsäure sowie verschiedene Mineralstoffe detektiert werden, wobei der Anteil an Zink und Kalium besonders hoch ist [33].

Zu den Gehaltsangaben der Inhaltsstoffe in der Literatur ist hervorzuheben, dass sie meist als Intervall angegeben werden (Tabelle 1.1), da die Gehalte der Inhaltsstoffe natürlicherweise deutlichen Schwankungen unterliegen. Verantwortlich dafür können diverse Faktoren sein, wie z.B. ontogenetische, diurnale, ökologische oder genetische Aspekte [33, 34], wie in Kapitel 1.2 ausführlich erläutert wird.

1.1.2.1 Iridoidglykoside

Iridoidglykoside (IGs) zählen zu den Iridoiden, die der Klasse der Monoterpene untergeordnet sind. Diese wiederum gehören der Naturstoffgruppe der Terpenoide bzw. Isoprenoide an. [33]

Obwohl die ersten IGs bereits in der ersten Hälfte des 19. Jh. als spezielle D-Glukoside in der Literatur beschrieben wurden, wie beispielsweise das Verbenalin, welches 1828 aus *Cornus florida* L. unter dem Namen Cornin isoliert wurde [35], waren bis Mitte des 20. Jh. kaum korrekte Summenformeln noch das korrekte Strukturskelett dieser Verbindungen bekannt [26, 27, 36, 37]. Für Aucubin z.B. wurde Mitte der 1900er Jahre statt eines Cyclopenta[c]pyranglykosids ein β -Oxofuranglykosid als Grundgerüst angenommen [27, 37]. Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jh. sind in der Literatur die heute gültigen Strukturen der IGs beschrieben worden [38]. Als eigenständige Stoffklasse wurden IGs erst um 1966 anerkannt [39], wobei bereits zu Beginn der 1900er Jahre diese speziellen glykosidischen Substanzen als Vertreter einer potentiellen neuen Naturstoffgruppe gemutmaßt wurden [26, 36].

Namensgebend für die Stoffklasse der Iridoide war letztendlich die Entdeckung dieses Strukturtyps in Ameisenarten der Gattung *Iridomyrmex*, die Iridodial ($C_{10}H_{16}O_2$), den einfachsten Grundkörper der Iridoide, in ihrem Abwehrsekret führen. Charakteristisches Modul für Iridoide ist ihr Cyclopenta[c]pyran-Grundgerüst. Weiter verfügen sie über mindestens zwei Sauerstoffgruppen im Molekül. Die monoterpentypischen zweifach enthaltenen C_5 -Isopreneinheiten im Molekül sind nicht immer direkt in der Molekülstruktur zu erkennen, da durch Folgereaktionen Modifizierungen stattfinden, Kohlenstoffe eliminiert oder funktionelle Gruppen hinzugefügt werden können. Iridoide selbst werden in drei Untergruppen eingeteilt: IGs, nicht-glykosidische Iridoide und Secoiridoide. IGs unterscheiden sich von nicht-glykosidischen Iridoiden durch die *O*-glykosidische Bindung mit einem Glykosyl, in der Regel Glukose, an Position 1 des Aglykons, wodurch ihre Hydrophilie sowie ihr Wassergängigkeit deutlich erhöht werden. Bis *dato* sind in der Literatur ausschließlich IGs mit Glukose als Zuckereinheit bekannt. Das typische IG-Grundgerüst ist in Abbildung 1.1 dargestellt. [33]

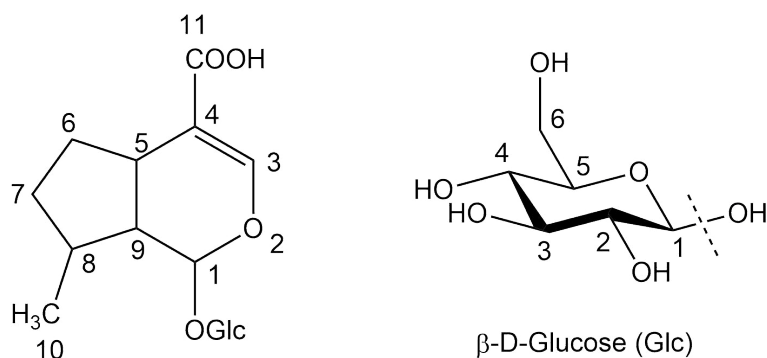


Abbildung 1.1: Grundgerüst der IGs.

Durch oxidative Decarboxylierung können C₁₀-Iridoidskelette glykosidischer und nicht-glykosidischer Iridoide um C-Einheiten gekürzt werden (Abbildung 1.2) [33].

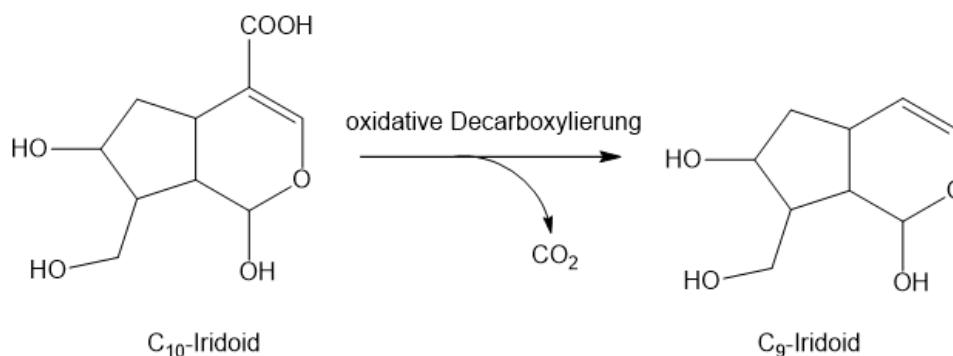


Abbildung 1.2: Oxidative Decarboxylierung der C₁₀- zu C₉-Grundkörpern der IGs.

Neben häufig vorkommenden C₉- und C₁₀-Gerüsten sind auch C₈-Iridoide bekannt [33]. Secoiridoide unterscheiden sich von den ersten beiden Untergruppen durch die Öffnung des Cyclopentanrings im Cyclopenta[c]pyran-Gerüsts des C₁₀-Körpers, wobei je eine endständige Alkohol- sowie Aldehydeinheit gebildet werden. Unter Wasserabgabe kann das entstandene Ethanyl weiter zu einem Allyl umgewandelt werden. [33]

Biosynthetisch können Iridoide auf zwei Wegen entstehen: a) klassisch, b) alternativ. Im klassischen, zuerst entdeckten Acetat-Mevalonat-Weg (Ac-MVA-Weg), der im Zytoplasma stattfindet, entsteht aus zwei Acetyl-CoA-Molekülen, über die Zwischenstufen des 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und des MVAs, Isopentenylidiphosphat (IPP), welches enzymatisch zu Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) isomerisiert werden kann, und *vice versa*. IPP und DMAPP stellen die beiden aktiven Schlüsselverbindungen bei der Iridoidbiosynthese dar. Ein IPP-Molekül und ein DMAPP-Molekül reagieren in einer Kopf-Schwanz-Reaktion zu einem aktiven, azyklischen Geranyldiphosphat (GDP)-Molekül, welches durch Ringschluss das typische Iridoidgrundgerüst (C₁₀-Körper) formt. Aus dem alternativen Biosynthesemechanismus in den Plastiden, können aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) über die Zwischenprodukte 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat (DXP) und 2C-Methylerythriol-4-phosphat (MEP) ebenfalls die beiden Schlüsselverbindungen IPP und DMAPP erzeugt werden. Der alternative Biosyntheseweg ist auch als Nicht-Mevalonat-Weg, DXP/MEP-Weg, GAP-Pyruvat-Weg oder 1-Desoxy-D-Xylose (DOX)-Weg bekannt. [33]

Chemisch-physikalisch betrachtet sind IGs relativ kleine organischen Moleküle, die aufgrund der Glykosylkomponente relativ hydrophil und polar und damit gut in Wasser und Ethanol und quasi nicht in unpolaren Lösungsmitteln löslich sind [33].

Seit den frühen 1900ern ist, insbesondere für Aucubin, eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Säuren und β -Glukosidasen bekannt, wobei es jeweils zur Deglykosylierung kommt. Das freigesetzte Aglykon reagiert daraufhin rasch und irreversibel zu unlöslichen, schwarzen Polymerisaten. [26, 27, 33, 36, 37]

Dieses Verhalten hat einen entscheidenden Einfluss auf die Bedingungen ihrer Extraktion

und Isolierung sowie ihrer Analytik. Ergänzend zu morphologischen Merkmalen dienen charakteristische Iridoidglykosidmuster zur chemotaxonomischen Einordnung von Pflanzen im Allgemeinen [40] sowie von unterschiedlichen Arten der Gattung *Plantago* im Speziellen [17, 25, 32].

1.1.2.2 Iridoidglykoside in *P. lanceolata*

Für *P. lanceolata* werden aktuell 15 IGs postuliert: Alpinosid [16], Arborescosidsäure [16], Asperulosid [3, 17, 22, 23, 24, 25], Aucubin [3, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31], 6-*epi*-Aucubin [32], Catalpol [3, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31], Deacetylasperulosidsäuremethylester [17, 23], Dihydroaucubin [23], Dihydrocatalpol [23], Gardosid [30], Geniposidsäure [16, 25], Globularin [17, 23, 25], 8-*epi*-Logansäure [30], Shanzisid [16], Verbenalin [24], deren Gesamtgehalt in der Krautdroge 2-3% beträgt [6]. Die dazugehörigen Strukturformeln werden in Abbildung 1.3 präsentiert.

Für *P. lanceolata* vor allem bekannt sind die beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol, die in vielen Literaturstellen für die Pflanze beschrieben werden [3, 11, 33]. Biosynthetisch wird Catalpol durch nachträgliches Einfügen einer Epoxidgruppe zwischen den C-7 und C-8 unter Eliminierung der C=C-Doppelbindung zwischen den C-7 und C-8 aus Aucubin gebildet [33]. Die enge strukturelle Verbundenheit geht überdies auch aus dem Trivialnamen 7,8-Epoxyaucubin für Catalpol hervor.

Weiterhin werden für die Pflanze die IGs Globularin, Asperulosid und Deacetylasperulosidsäuremethylester übereinstimmend in der Literatur postuliert [33]. Die restlichen aufgelisteten IGs konnten nur von einer bzw. maximal zwei Literaturstellen als Inhaltsstoff für *P. lanceolata* angegeben werden. Ihr Vorkommen gilt es noch in weiteren Studien zu verifizieren.

Da Aucubin und Catalpol die Hauptvertreter der IGs im Spitzwegerich darstellen, sind sie im Wesentlichen Gegenstand von phytochemischen Untersuchungen.

Um in der Literatur identische Verbindungen mit unterschiedlichem Namen eindeutig zuzuordnen zu können, werden die Trivialnamen der postulierten IGs sowie die dazugehörigen IUPAC-Nomenklaturen an dieser Stelle zusammengefasst (Tabelle 1.2).

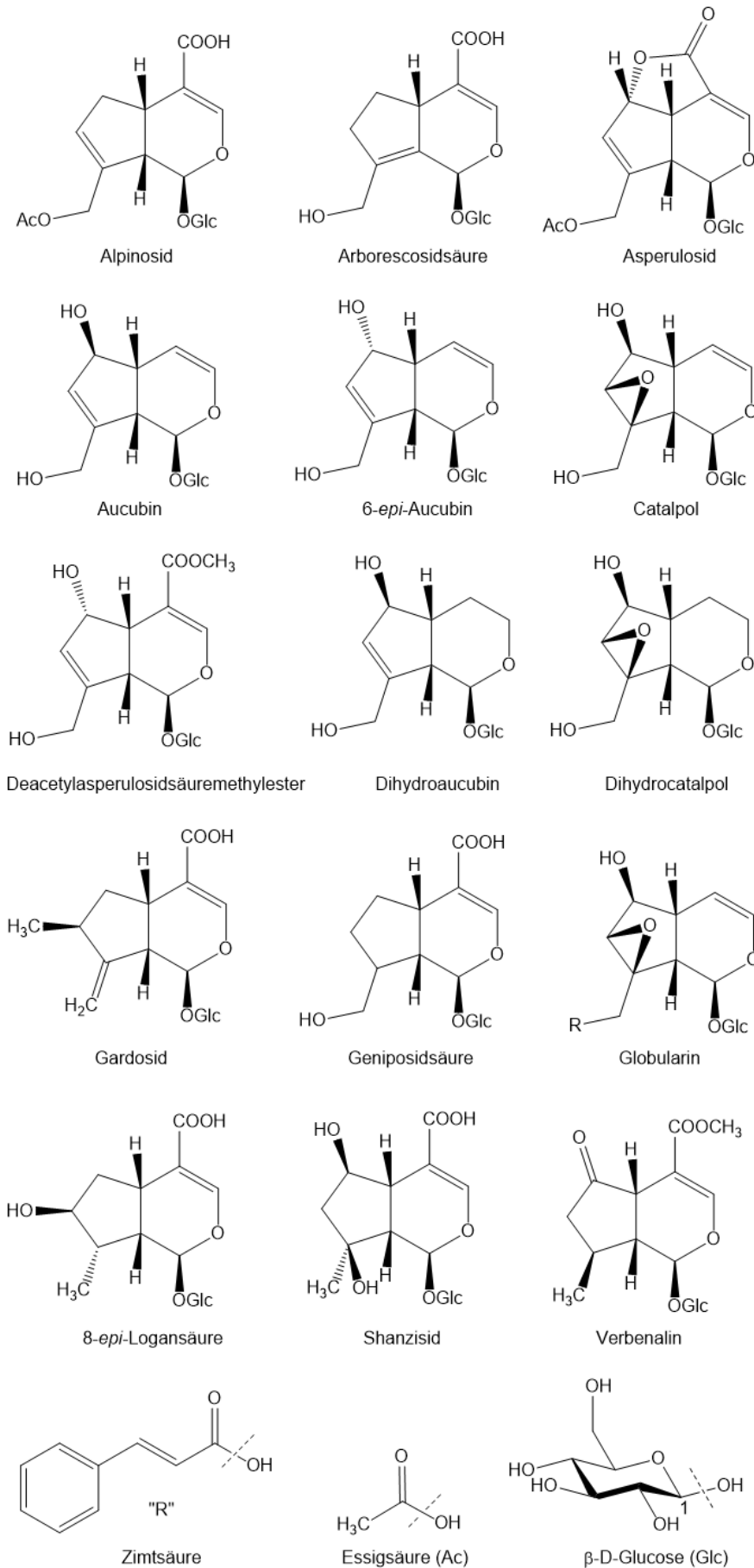


Abbildung 1.3: Strukturformeln der für *P. lanceolata* postulierten IGs.

Tabelle 1.2: Zusammenstellung der IUPAC-Bezeichnungen und Trivialnamen der für *P. lanceolata* postulierten IGs laut Scifinder Datenbank inklusive der dazugehörigen Summenformeln.

IUPAC-Bezeichnung	Summenformel	Trivialname ^a	weitere Trivialnamen
(1S,4aS)-7-[(Acetyloxy)methyl]-1-(β-D-glucopyranosyloxy)-2a,4a,5,6-tetrahydrocyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₈	Alpinosid	^b
(1S,4aS)-1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,6-tetrahydro-7--(hydroxymethyl)cyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	Arborescosidsäure	Deacetylalpinosidsäure
1H-2,6-Dioxacyclopent[cd]inden-1-one, 4-[(acetyloxy)methyl]-5-(β-D-glucopyranosyloxy)-2a,4a,5,7b-tetrahydro-, (2aS,4aS,5S,7bS)-	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	Asperulosid	^b
β-D-Glucopyranosid, (1S,4aR,5S,7aS)-1,4a,5,7a-tetrahydro-5-hydroxy-7-(hydroxymethyl)cyclopenta[c]pyran-1-yl	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	Aucubin	Acubin, Aucubosid, Rhimantin, Rhinantin [3, 37]
(1S,4aR,5R,7aS)-1,4a,5,7a-Tetrahydro-5-hydroxy-7-(hydroxymethyl)cyclopenta[c]pyran-1-yl β-D-glucopyranosid	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	6- <i>epi</i> -Aucubin	^b
β-D-Glucopyranosid, (1aS,1bS,2S,5aR,6S,6aS)--1a,1b,2,5a,6,6a-hexahydro-6-hydroxy-1a-(hydroxymethyl)-oxireno[4,5]cyclopenta[1,2-c]pyran-2-yl	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	Catalpol	7,8-Epoxyaucubin, Catalpol, Catalpinosid, De(<i>p</i> -hydroxybenzoyl)catalposid
Cyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure, 1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,7a-tetrahydro-5-hydroxy-7-(hydroxymethyl)-, methylester, (1S,4aS,5S,7aS)-	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	Deacetylasperulosidsäure-methylester	6-α-Hydroxygeniposid

^a Trivialname, der in dieser Arbeit genutzt wird^b kein weiterer Trivialname bekannt

IUPAC-Bezeichnung	Summenformel	Trivialname ^a	weitere Trivialnamen
β -D-Glucopyranosid, 1,3,4,4a,5,7a-hexahydro-5-hydroxy-7-(hydroxymethyl)cyclopenta[c]pyran-1-yl, [1S-(1 α ,4 α ,5 α ,7 α)]	C ₁₅ H ₂₄ O ₉	Dihydroaucubin	3,4-Dihydroaucubin
β -D-Glucopyranosid, octahydro-6-hydroxy-1a-(hydroxymethyl)oxireno[4,5] cyclopenta[1,2-c]pyran-2-yl, [1aS-(1 α -,1b β ,2 β ,5a β ,6 β ,6a α)]	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀	Dihydrocatalpol	Catalposid, De(hydroxybenzoyl)-dihydro- (7CI,8CI)
(1S,4aS,6S,7aS)-1-(β -D-Glucopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-6-hydroxy-7-methylcyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	Gardosid	b
(1S,4aS,7aS)-1-(β -D-Glucopyranosyloxy)-1,4a,5,7a-tetrahydro-7-(hydroxymethyl)cyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	Geniposidsäure	b
β -D-Glucopyranosid, (1aS,1bS,2S,5aR,6S,6aS)-1a,1b,2,5a,6,6a-hexahydro-6-hydroxy-1a-[[[(2E)-1-oxo-3-phenyl-2-propen-1-yl]oxy]methyl]oxireno[4,5]cyclopenta[1,2-c]pyran-2-yl	C ₂₄ H ₁₈ O ₁₁	Globularin	Globularosid
(1S,4aS,6S,7S,7aS)-1-(β -D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-6-hydroxy-7-methylcyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	8- <i>epi</i> -Logansäure	b

^a Trivialname, der in dieser Arbeit genutzt wird

^b kein weiterer Trivialname bekannt

IUPAC-Bezeichnung	Summenformel	Trivialname ^a	weitere Trivialnamen
(1S,4aS,5R,7S,7aS)-1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,-7a-hexahydro-5,7-dihydroxy-7-methylcyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	Shanzisid	^b
Cyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure, 1-(β-D-glucopyranosyl-oxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-7-methyl-5-oxo-, methylester, (1S,4aS,7S,7aR)-	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	Verbenalin	5-Deoxyhastatoside, Cornin(glykosid), NSC 118055, Verbenaloid

^a Trivialname, der in dieser Arbeit genutzt wird

^b kein weiterer Trivialname bekannt

1.1.2.3 Phenylethanoide

PEs zählen zu den phenolischen Sekundärstoffwechselprodukten von Pflanzen und Mikroorganismen. Ihre charakteristische Einheit besteht aus einem Benzolring (C_6 -Körper), der mit einer Ethanyleinheit (C_2 -Körper) über eine einfache C-C-Bindung verknüpft ist. Biosynthetisch werden die C_6 - C_2 -Körper aus C_6 - C_3 -Körpern durch produziert. C_6 - C_3 -Körper werden in diesem Zusammenhang auch als Phenylpropane bezeichnet und sowohl von den Pflanzen als auch den Mikroorganismen über den Shikimatweg biosynthetisiert. Dabei wird als Zwischenprodukt Prephensäure gebildet, die weiter zur Aminosäure L-Phenylalanin und anschließend zur Zimtsäure (C_6 - C_3 -Körper) umgewandelt wird. Zusätzliche Gruppen am Benzolring erzeugen dabei Substanzen, wie z.B. Tyrosin oder DOPA, die über ein bzw. zwei Hydroxygruppen am Benzolring verfügen, und zur Cumarsäure bzw. Kaffeesäure umgesetzt werden. Ein prominenter Vertreter der PEs ist das Verbascosid, anhand dessen Strukturformel der strukturelle Aufbau von PEs verdeutlicht werden soll (Abbildung 1.4). [33]

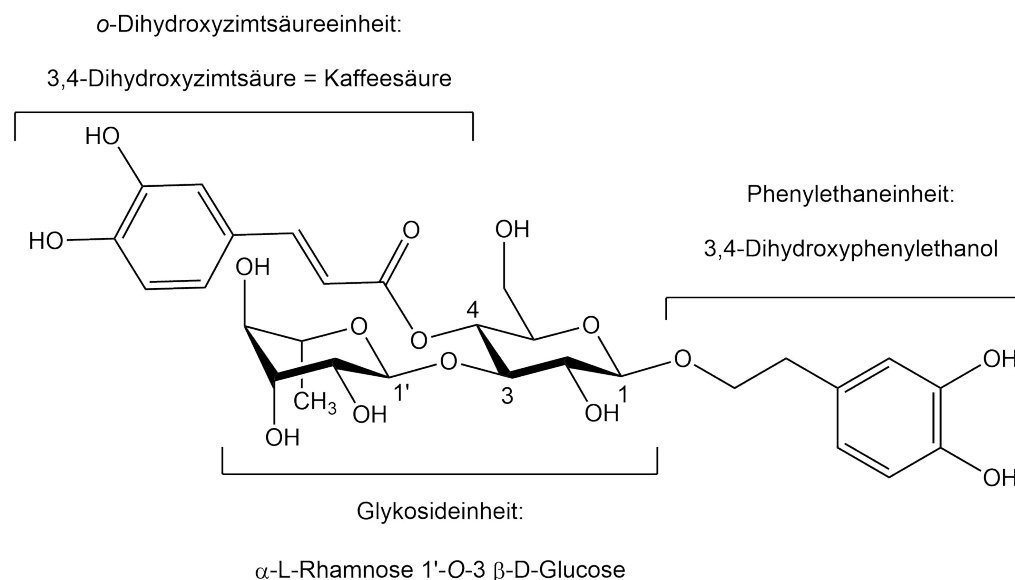


Abbildung 1.4: Struktureller Aufbau von PEs am Beispiel von Verbascosid [41]. Das Strukturskelett der PEs beinhaltet eine β -D-Glucose, welche im Allgemeinen mit einer Phenylethaneinheit, einer *o*-Dihydroxyzimtsäureeinheit und einem weiteren Zucker verknüpft ist. Die einzelnen Einheiten können auch an anderen Positionen der Glucose gebunden sein oder ganz fehlen. Außerdem können zusätzliche funktionelle Gruppen oder Moleküleinheiten enthalten sein.

PEs setzen sich aus einer β -D-Glukose, welche an Position 1 mit einer Phenylethaneinheit (z.B. 3,4-Dihydroxyphenylethanol) und an Position 3 mit einer oder mehreren weiteren Zuckereinheiten (z.B. α -L-Rhamnose) verknüpft ist, zusammen. Position 4 oder 6 der Glukose ist im Allgemeinen mit einem *o*-Dihydroxymzimtsäurederivat (z.B. Kaffeesäure) verestert. Die Verknüpfungsstellen der einzelnen Konstituenten untereinander können variieren, wodurch sich eine Reihe an Konstitutionsisomeren ergeben können. [33]

Darüber hinaus sind auch methoxylierte Phenylethanoide bzw. -propanoide bekannt [42]. Die Glukose kann als elementarer Grundbaustein aller PEs betrachtet werden. Deswegen wird er untypischerweise bei der Numerierung des PE-Moleküls in dieser Arbeit mit C1-6 anstatt der üblichen primären glykosylbezifferung C1'-6' betitelt. Der zweite anhängende Zucker beginnt für die in dieser Arbeit dargestellten PEs dementsprechend mit C1' anstelle von C1'', usw. Dies wurde aus praktischen Gründen im Zuge einer übersichtlichen Darstellung der in *P. lanceolata* befindlichen PE-Strukturen gewählt und lehnt sich an die in der Literatur angewendeten Bezifferung von Di- und Polysacchariden an [33, S. 332-385].

In der Literatur werden Verbindungen, die keine charakteristische Phenylethan- (C₂) bzw. Phenylpropan-(C₃) Gruppe mehr besitzen, bei ansonsten identischem strukturellem Aufbau, und damit gleichem Biosyntheseweg, weiterhin als Phenylethanoide bzw. Phenylpropanoide geführt. Überdies werden im pharmazeutischen Jargon die Vertreter der Phenylethanoide und -propanoide auch als *o*-Dihydroxymzimtsäurederivate bezeichnet [33, 43].

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den „echten“ PEs. Chemisch-physikalisch betrachtet, sind PEs mittelgroße, polare bis mittelpolare Naturstoffe. Im Allgemeinen lassen sie sich gut in Ethanol und Ethylacetat lösen, wobei ihre Hydrophilie, Polarität und Löslichkeit stark von der Art, Anzahl und Verteilung der Zucker und der unpolaren Konstituenten abhängt. [33]

Aufgrund ihres oxidationsempfindlichen Charakters können PEs als Leitsubstanzen zur Sicherung der Qualität getrockneter Pflanzen (Drogen) eingesetzt werden [33].

1.1.2.4 Phenylethanoide in *P. lanceolata*

Für *P. lanceolata* werden nach aktuellem Wissensstand acht PEs postuliert [11, 33]: das Hauptphenylethanoid Verbascosid [15, 16, 17, 18, 19], sein Konstitutionsisomer Isoverbascosid [15, 16], sein zweites Konstitutionsisomer Forsythosid B [16], Plantamajosid [15, 17], Plantainosid D [16], Martynosid [16], Lavandulifoliosid [15, 16, 17] und Cistanosid F [15], deren Gesamtgehalt im getrockneten Kraut, berechnet als *o*-Dihydroxizimtsäurederivate, 3-8% beträgt [6].

Dabei ist anzumerken, dass Verbascosid nur in den Blättern des Spitzwegerichs das Hauptphenylethanoid darstellt. In den Wurzeln überwiegt altersunabhängig mit doppelt so hohen Mengen das PE Plantamajosid. [44]

In den meisten Literaturstellen wird Isoverbascosid als einziges Konstitutionsisomer des Hauptphenylethanoids Verbascosids in *P. lanceolata* deklariert [6, 14, 15]. Das zweite Konstitutionsisomer Forsythosid B hingegen wird einzig von Zhou et al. [16] für die Pflanze postuliert. Ebenso werden die PEs Martynosid [16], Plantainosid D [16] und Cistanosid F [15] jeweils nur von einer Literaturstelle als Inhaltsstoff des Spitzwegerichs beschrieben. Die mangelhafte Datenlage hierzu fordert eine intensivere Beschäftigung mit diesen Verbindungen. Die jeweiligen chemischen Strukturen der für *P. lanceolata* postulierten PEs sind der nachfolgenden Abbildung 1.5 sowie der dazugehörigen Tabelle 1.3 zu entnehmen, wobei ein Abgleich diverser Literaturstellen mit den Strukturvorschlägen gemäß Scifinder vorgenommen wurde. Soweit hier nicht explizit diskutiert, stimmen die Angaben der Scifinderstrukturdatenbank mit denen in der einschlägigen Literatur überein.

Tabelle 1.3: Strukturformeln der für *P. lanceolata* postulierten PEs. Die vorgenommene Einteilung der in *P. lanceolata* enthaltenen PEs in diverse Typen basiert auf den unterschiedlichen Resten R₃ und R₄ an den Positionen 4 und 6 im Molekül (siehe Abbildung 1.5).

PE-Typ	Substanzname	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Typ-A (Verbascosid-Typ)	Verbascosid	DHPE	Rha ^a	KS	H
	Cistanosid F	H	Rha ^a	KS	H
	Lavandulifoliosid	DHPE	Ara+Rha ^b	KS	H
	Plantmajosid	DHPE	Glc ^c	KS	H
	Martynosid	MeHPE	Rha ^a	MeKS	H
	Forsythosid B	DHPE	Rha ^a	KS	Api ^d
Typ-B (Isoverbascosid-Typ)	Isoverbascosid	DHPE	Rha ^a	H	KS
	Plantainosid D	DHPE	Glc ^c	H	KS

^a *O*-glykosidische Bindung: Rha 1' → 3 Glc

^b *O*-glykosidische Bindung: Ara 1'' → 2' Rha, Rha 1' → 3 Glc

^c *O*-glykosidische Bindung: Glc 1' → 3 Glc

^d *O*-glykosidische Bindung: Api 1' → 3 Glc

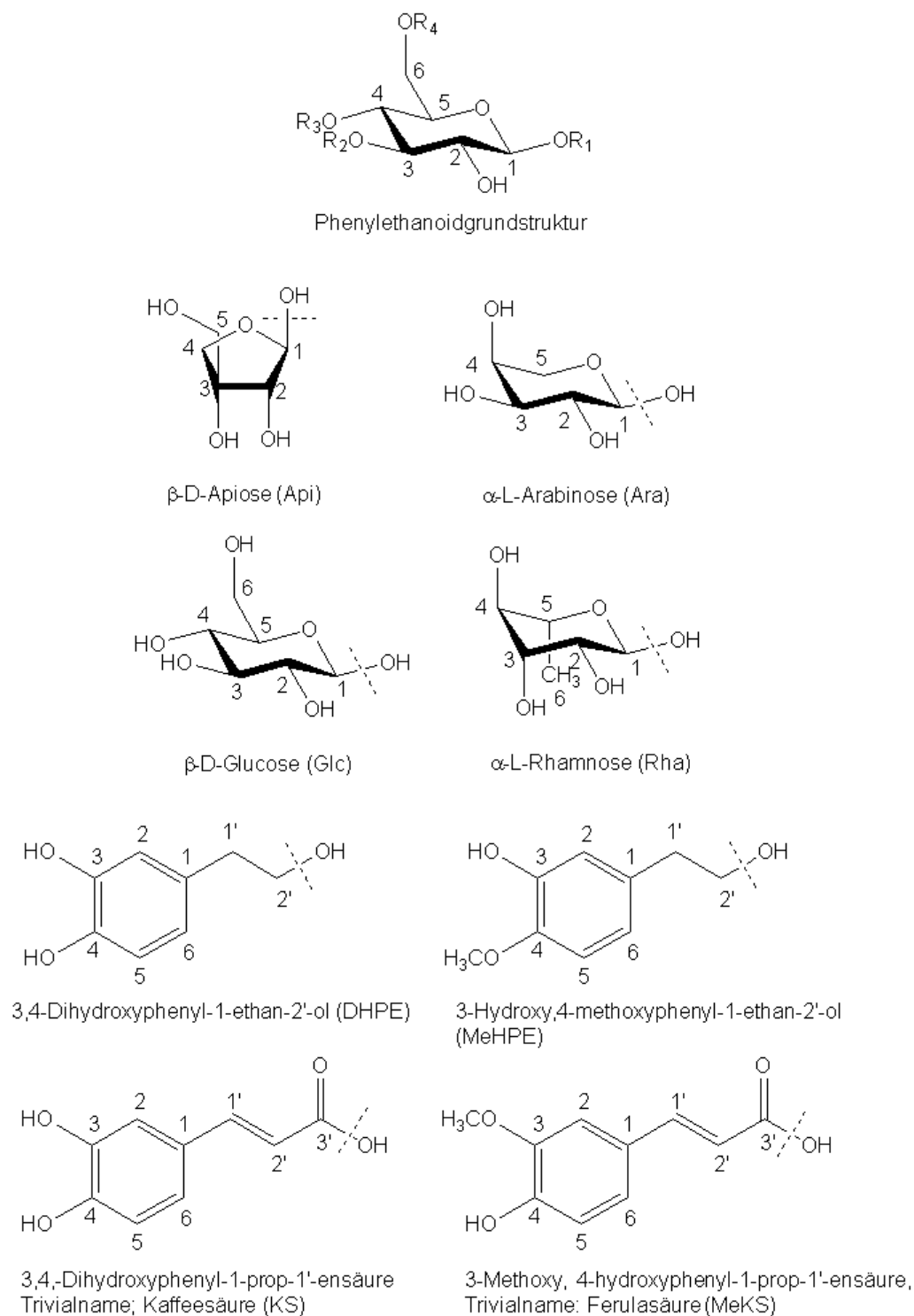


Abbildung 1.5: Substitutionsmuster der für *P. lanceolata* postulierten PEs (siehe Tabelle 1.3).

Erwähnenswert zu den Strukturformeln ist an dieser Stelle außerdem, dass aktuell eine kontroverse Datenlage zur *E*-/*Z*-Isomerie des Lavandulifoliosids in *P. lanceolata* in der Literatur im Vergleich zur Scifinderdatenbank vorherrscht. So wird bei Scifinder ausschließlich die *Z*-Form beschrieben, wohingegen Basaran et al. [45] eine *E*-Konfiguration postulieren. Murai et al. [15] legen sich bei der Strukturformel für Lavandulifoliosid nicht

auf eine Konfiguration fest, indem sie eine Strukturformelschreibweise wählen, bei der keine *E/Z*-Isomerie im Kaffeesäurerest ersichtlich wird. Chemisch gesehen, verfügt die *Z*-Form über eine geringere sterische Hinderung, ist damit energetisch günstiger und somit die wahrscheinlichere räumliche Ausrichtung. Diese These wird zudem dadurch gestützt, dass für alle anderen PEs *E*-konfigurierte Kaffeesäuregerüste beschrieben sind [42, 46]. Folglich wird in dieser Arbeit die *E*-konfigurierte Form des Lavandulifoliosids vertreten.

Alle für *P. lanceolata* postulierten PEs, mit Ausnahme von Martynosid und Cistanosid F verfügen über eine 3,4-Dihydroxyphenylethanyl-Teilstruktur. Diese ist an C-1 der zentralen Glukose gebunden. Martynosid besitzt stattdessen eine 3-Hydroxy-4-methoxyphenylethanyl-Struktur, wohingegen die namensgebende Struktureinheit bei Cistanosid F völlig fehlt. Per Definition handelt es sich bei Cistanosid F demnach nicht um ein „echtes“ PE, jedoch wird die Verbindung in der Literatur, aufgrund der übereinstimmenden Biosynthese, trotzdem als solches bezeichnet.

Die *o*-Dihydroxymzimtsäureeinheit ist bei den vorliegenden PEs entweder an Position 4 oder an Position 6 der zentralen Glukose lokalisiert, weswegen in dieser Arbeit die PEs in zwei Typen A und B (Verbascosid- und Isoverbascosidtyp) unterschieden werden. Dabei können Isoverbascosid und Plantainosid D der Isoverbascosidgruppe zugeordnet werden. Die restlichen PEs gehören der Verbascosidvariante an. Einen Spezialfall stellt auch hier wieder das Martynosid dar, welches eine Ferulasäure enthält.

Die letzte für PEs charakteristische Einheit stellt eine additive Zuckerkomponente dar. Diese ist bei allen für *P. lanceolata* postulierten PEs an Position 3 der zentralen Glukose verknüpft. Davon ausgenommen ist Forsythosid B, welches ein Monosaccharid an Position 6 enthält. Dabei werden meist α -L-Rhamnosen eingebaut. Weitere enthaltene Zucker sind β -D-Apiose (Forsythosid B), β -D-Glukose (Plantainosid D, Plantamajosid) sowie ein Disaccharid aus α -L-Arabinose und α -L-Rhamnose (Lavandulifoliosid). Die für *P. lanceolata* postulierten PEs werden in der Literatur unter weiteren Trivialnamen geführt (Tabelle 1.4).

Tabelle 1.4: Zusammenstellung der IUPAC-Bezeichnungen und Trivialnamen der für *P. lanceolata* postulierten PEs laut Scifinder Datenbank inklusive der dazugehörigen Summenformeln.

IUPAC-Bezeichnung	Summenformel	Trivialname ^a	weitere Trivialnamen
D-Glukose, 3- <i>O</i> -(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 4-[(2textitE)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	Cistanosid F	Lingupurosid E
β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl <i>O</i> -D-apio- β -D-furanosyl-(1 \rightarrow 6)- <i>O</i> -[6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-, 4-[(2textitE)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	Forsythosid B	^b
β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 3- <i>O</i> -(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 6-[(2textitE)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	Isoverbascosid	Isoacteosid
β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-, 4-[(2Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	Lavandulifoliosid	^b
β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 3- <i>O</i> -(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 4-[(2textitE)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoat]	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	Martynosid	^b
β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 3- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-, 6-[(2textitE)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	Plantainosid D	Calcedariosid D, Isoplantamajosid
β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-, 4-[(2textitE)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	Plantamajosid	Plantamosid, Purpureasid A
β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 3- <i>O</i> -(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 4-[(2textitE)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	Verbascosid	Acteosid, Distinctive Active Powder SL Specia, Distinctive Phytostem Lilac, Kusagin, NSC 603831, <i>O</i> ''-Desarabinsyllavandulifolioside A, Russetinol, Stereospermin, TJC 160, <i>trans</i> -Acteosid, <i>trans</i> -Verbascosid

^a Trivialname, der in dieser Arbeit genutzt wird

^b nicht bekannt

1.1.3 Pharmazeutische Anwendung

Wegerichgewächse, früher als Breitwege oder Wegerich bezeichnet und die Arten *P. major*, *P. media* und *P. lanceolata* umfassend [26], zählen zu den ältesten bekannten Nahrungsmitteln und Heilpflanzen [5].

Ihr Gebrauch geht zurück bis in die Jungsteinzeit, wie Funde von Samenresten in jungsteinzeitlichen Pfahlbauten in der Schweiz belegen. Es wird davon ausgegangen, dass damals die Samen der Pflanze als fettreiches Nahrungsmittel konsumiert wurden und sich durch die positive Wirkung der Pflanze die Nutzung als Heilmittel ergab. [5]

Seitdem werden Wegerich-Arten zur Heilung diverser Leiden eingesetzt, wie z.B. als Reinigungs-, Blutgerinnungs- und Wundheilungsmittel sowie bei Blasenschwäche, Leberleiden, Durchfall, Sodbrennen, Asthma, Husten, Spulwürmer, Fieber, Gicht, Rheuma, Augenentzündungen und Insektenstiche angewendet. Dabei werden sowohl die ober- als auch die unterirdischen Bestandteile der Pflanze medizinisch angewendet. [3, 5, 6, 7, 26, 47, 48]

Von den drei Arten *P. major*, *P. media* und *P. lanceolata* werden heutzutage im europäischen Raum nur die getrockneten Blätter des Spitzwegerichs pharmazeutisch genutzt [49]. Diese sind als Teedroge frei verkäuflich erhältlich. Zum arzneilichen Gebrauch werden sie meist zu wässrigen oder wässrig-ethanolischen Extrakten verarbeitet [50]. Zu den zugelassenen und belegten Indikationen zählen inzwischen vor allem Entzündungen im Mund- und Rachenraum sowie Katarrhe und Husten [8]. Das HMPC, ein Fachgremium der EMA, regelt dabei den traditionellen Gebrauch bei Schleimhautreizungen im Mund- und Rachenraum sowie darauf beruhendem trockenem Reizhusten. Die Verwendung bei Katarrhen der oberen Luftwege sowie kurzzeitigen leichten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhaut ist durch die ESCOP dokumentiert. Außerdem ist die innere Anwendung bei Katarrhen der Atemwege und entzündlichen Veränderungen der Mund- und Rachenschleimhaut sowie die topische Anwendung bei entzündlichen Hautveränderungen durch die Kommission E beschrieben. [11]

Sowohl Extrakte der Pflanze als auch der einzelnen Inhaltsstoffe wurden zur Bestimmung der pharmakologischen Wirkung in *in vitro*- und *in vivo*-Studien untersucht, wie im Sachstandsbericht von 2010 des HMPC ausführlich behandelt. Die pharmazeutischen Eigenschaften werden dabei vor allem den IGs, hier besonders dem Aucubin und Catalpol, den schleimbildenden Polysacchariden und den phenolischen Naturstoffen, zu denen Flavonoide, allen voran Apigenin und Luteolin, PEs, hauptsächlich Verbascosid und Plantamajosid, phenolische Carbonsäuren und Gerbstoffe gehören, zugeschrieben. [2]

Tabelle 1.5 gibt einen Überblick über die in der Literatur beschriebenen Bioaktivitäten des Spitzwegerichs bzw. seiner Inhaltsstoffe.

Tabelle 1.5: Zusammenstellung der bis *dato* bekannten Bioaktivitäten des Spitzwegerichs bzw. seiner Inhaltsstoffe.

Bioaktivität	relevante/r Einzelsubstanz, Stoffklasse bzw. Extrakt
anti-helminthisch	a
anti-bakteriell	Plantamajosid ^e [51], Aucubin bzw. Aucubigenin ^b
anti-biotisch	a
anti-diabetisch	PEs ^{c, e} [52]
anti-glykosilierend (Maillard-Reaktion)	PEs ^e [42]
anti-hämorrhagisch/prokoagulent	Verbenalin ^{c, d} [53]
anti-entzündlich	IGs ^e [54], PEs ^e [15, 55], Extrakt der Blätter [56], Extrakt des Krauts ^a [20], Extrakt der Samen ^e [16]
anti-obesitativ	Extrakt der Blätter ^e [57]
anti-oxidativ	IGs ^e [58], Flavonoide ^e [59], PEs ^e [42, 59], Extrakt der Blätter [21, 59], Extrakt des Krauts ^e [20], Extrakt der Samen ^e [16]
anti-toxisch	a
anti-tumorigen	a
anti-tussiv	Extrakt des Krauts ^f [60]
anti-viral	a
blutdrucksenkend	PEs ^e [46]
immunstimulierend/-modulierend	a
hepatoprotektiv	a
hepatotoxisch	a
spasmolytisch	a
uteruskontrahierend	Verbenalin ^{c, d} [53]
wundheilend/epithelisierend	Extrakt der Blätter ^{c, d, e} [61, 62]
zytotoxisch	Extrakt der Blätter ^e [63]

^a Primärliteratur nicht zugänglich, Quelle: European Medicines Agency [2]

^b Primärliteratur nicht zugänglich, Quelle: Sticher et al. [33]

^c in vivo

^d ex vivo

^e in vitro

^f klinische Studie

Laut European Medicines Agency [2] konnte eine anti-oxidative Aktivität von Spitzwegerichextrakten, der Einzelsubstanz Verbascosid sowie den Stoffgruppen der Flavonoide und Polysaccharide nachgewiesen werden. Weiter konnten anti-virale Eigenschaften von einem Extrakt (Tee, Einzelfallstudie), den Einzelsubstanzen Aucubin bzw. Aucubigenin, Catalpol, Verbascosid, Kaffee- und Chlorogensäure je in *in vitro*-Testungen beobachtet werden. Für Aucubin, Catalpol, Catalpolperacetat, Verbascosid, Plantamajosid und Luteolin sowie für Extrakte konnte eine spasmolytische Wirkung anhand von *ex vivo*-Experimenten gemessen werden, wobei die Aktivität der untersuchten Extrakte mit Atropin und Papaverin vergleichbar war. Des Weiteren konnte in Extrakten *in vitro* und *in vivo* sowie durch die Einzelsubstanz Aucubin und der Stoffgruppe der Polysaccharide je in *in vitro*-Assays epithelisierende bzw. wundheilende Effekte beobachtet werden. Spitzwegerichextrakte zeigten darüber hinaus prokoagulante bzw. antihämorrhagische (*in vitro* und *in vivo*) sowie anti-helminthische (*ex vivo*) Eigenschaften. Zytotoxische Effekte konnten für einen Extrakt, die Einzelsubstanz Luteolin sowie für Flavonoide und Saponine, jeweils in *in vitro*-Untersuchungen bestimmt werden. [2]

Kontrovers diskutiert werden aktuell anti-inflammatorische, anti-bakterielle, hepatoprotektive, hepatotoxische sowie anti-toxische Aktivität von Extrakten, wobei mehreren positiven Aussagen lediglich eine negative Studie gegenübersteht. *In vitro* und *in vivo*-Experimenten mit Spitzwegerichextrakten mit z.T. ähnlich starkem anti-inflammatorischem Effekt wie mit Natrium-Diclofenac, Hydrocortison und Phenylbutazon stehen die negativen Ergebnisse von Vigo et al. [56] bezüglich der fehlenden Aktivität von Aucubin, Catalpol, Verbascosid und Plantamajosid auf COX-1, COX-2 und das PGE₂-Level *in vitro* und *in vivo* entgegen [2]. Die in der Literatur stark postulierte anti-bakterielle Aktivität des Extraktes sowie der Einzelsubstanzen Aucubin bzw. Aucubigenin und Verbascosid und der Stoffgruppe der Saponine [2, 33] konnte für einen ethanolschen Extrakt in *in vitro* Agardiffusions- sowie Mikrodilutionstest nicht bestätigt werden [2]. Weiter stehen hepatoprotektive und hepatotoxische Effekte im Widerspruch zueinander [2]. Zur Verifizierung der Ergebnisse sollten weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

Postulierte anti-fungale Aktivität sowie einen wesentlichen Einfluss auf den muskuziliären Transport (expektorierende Eigenschaften) werden in der Literatur kontrovers diskutiert und konnten beispielsweise nicht für einen ethanolschen Extrakt über Agardiffusions- sowie Mikrodilutionstests (*in vitro*) [2] oder für einen Extrakt über Viskosimetrie mittels Flimmerepithelpräparat eines Frosches (*in vitro*) [64] beobachtet werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass für beide Wirksamkeitsüberprüfungen je nur eine Studie dieser Art durchgeführt wurde [2]. Um die entsprechenden Ergebnisse zu überprüfen, sollten weitere Untersuchungen folgen.

Neuen Studien zufolge wirken PEs wie Verbascosid, Isoverbascosid oder Plantamajosid außerdem blutdrucksenkend, wobei gezeigt werden konnte, dass der bioaktive Molekülteil nicht die Phenylethaneinheit, sondern die Kaffeesäure ist [46].

Weiter wurde in aktuellen *in vitro*-Untersuchungen inhibierende Effekte von Verbascosid und Isoverbascosid auf die Bildung von fortgeschrittenen Glykosylierungsendprodukten

(Advanced Glycation Endproducts, AGEs) beobachtet [42]. AGEs entstehen als Produkte der Maillard-Reaktion, die in Lebensmitteln aber auch im Menschen stattfinden kann [65, 66]. Sie sollen unter anderem Arteriosklerose, Diabetes sowie diabetesbedingte Leiden wie Neuropathie im menschlichen Körper fördern und den Alterungsprozess allgemein vorantreiben [65, 67, 68]. Eine Verifizierung der inhibierenden Wirkung von Verbascosid und Isoverbascosid auf die Bildung von AGEs *in vivo* steht noch aus.

Weiter konnte für den Breitwegerich ein anti-arteriosklerotisches Potential in Kaninchen nachgewiesen werden [69]. Es wird darüber hinaus angenommen, dass die Wirkung des Spitzwegerichs auf dem Zusammenspiel mehrerer Einzelstoffe mit ergänzenden bzw. verstärkenden Eigenschaften beruht [70]. Das Zusammenwirken mehrerer Inhaltsstoffe bzw. Stoffgruppen mit unterschiedlichen, ergänzenden Bioaktivitäten wird besonders gut bei der Therapie von Entzündungen im Mund- und Rachenraum sowie damit verbundenem trockenem Husten ersichtlich, für die der Spitzwegerich therapeutisch eingesetzt wird. Schleimbildende Polysaccharide wirken reizmildernd, indem sie bei Kontakt mit Wasser aufquellen, sich nach oraler Zufuhr schützend auf die betroffenen Schleimhäute legen und somit den Hustenreiz unterdrücken [64]. Die adstringierende Aktivität der in Spitzwegerich enthaltenen Gerbstoffe sowie epithelisierende Eigenschaften regen zudem die Regeneration entzündeter Hautpartien an [6]. Anti-virale und anti-bakterielle Wirkungen sorgen außerdem dafür, dass die Wunden nicht zusätzlich von unerwünschten Viren bzw. Bakterien infiziert werden [50] und durch die geschädigte Haut systemisch in den Körper eindringen können. Zudem konnten synergistische Effekte hinsichtlich der anti-oxidativen Aktivität der phenolischen Stoffgruppen, speziell der PEs und Flavonoide, für *P. lanceolata* nachgewiesen werden [59].

Phenolischen Verbindungen werden aufgrund ihrer chemischen Beschaffenheit generell anti-oxidative Fähigkeiten zugesprochen. Aufgrund ihrer phenolischen Struktur sind sie in der Lage, freie Radikale sowie Lichtenergie zu quenchen. In Pflanzen dienen diese vor allem als UV-Schutz. [71, 72]

Beim Menschen steht die Beseitigung von überschüssigen Radikalen, wie freie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), auch bezeichnet als oxidativer Stress, im Vordergrund [73].

Die Datenlage zur kontrollierten klinischen Anwendung des Extrakts gegen Husten ist aktuell noch recht übersichtlich. In einer Anwendungsstudie wurden 539 Patienten mit Spitzwegerichkraut-Fluidextrakten (DER 1 : 1, ethanolisch) behandelt Kraft [60]. Die Probanden litten überwiegend an respiratorischen Infekten (32%), akuter Bronchitis (28%) sowie Reizhusten nach akuten respiratorischen Infekten (18%). Die Hustensymptomatik bestand bereits vier Tage (Median) vor Untersuchungsbeginn. 75% der Patienten waren spätestens nach einer Woche hustenfrei, wodurch die antitussive Wirkung des Spitzwegerichkraut-Fluidextraktes als klinisch erwiesen gilt.

1.2 Einflüsse auf das Sekundärstoffspektrum

1.2.1 Allgemeine Einflüsse auf das Sekundärstoffspektrum

Gehalte pflanzlicher Inhaltsstoffe können variieren, wie in Kapitel 1.1.2 dargelegt. Allgemein können dafür ontogenetische, diurnale, ökologische sowie genetische Faktoren verantwortlich gemacht werden, wobei noch nicht ausreichend geklärt ist, inwieweit sich die einzelnen Parameter gegenseitig beeinflussen [33, 34].

Diurnale Faktoren beziehen sich auf die direkte Beeinflussung des Primär- und vermutlich auch Sekundärstoffwechsels der Pflanzen durch den Tag-Nacht-Rhythmus bzw. den Licht-Dunkel-Wechsel. Dies bedeutet konkret, dass es einen quantitativen und/oder qualitativen Unterschied im Inhaltsstoffspektrum geben kann, je nachdem ob morgens, mittags, abends oder nachts geerntet wurde. [33]

Zu den relevanten ontogenetischen Phasen zählen insbesondere Keimung und Blütenbildung, in deren Verlauf markante Änderungen im Sekundärmetabolismus (Aufbau, Speicherung, Mobilisierung und Abbau der Sekundärstoffe) beobachtet werden können. Ein maximaler Sekundärstoffgehalt wird häufig während oder kurz vor dem Blühen gemessen. Es können ferner saisonale Variationen im Sekundärstoffmuster auftreten. [33]

Als weitere Einflussparameter auf den pflanzlichen Sekundärmetabolismus gelten ökologische Bedingungen, deren konkrete Auswirkungen auf das Sekundärstoffprofil aufgrund ihrer Komplexität noch nicht ausreichend erforscht sind. Sie können sowohl qualitative als auch quantitative Aspekte betreffen. Ökologische Parameter werden in lebende (biotische) und nicht-lebende (abiotische) Faktoren differenziert. Beispiele für biotische Faktoren sind Schädlingsbefall, Fraßfeinde sowie vegetationspezifische Kriterien, z.B. Artenzahl, Artenkonkurrenz und Moosbedeckung. Zu den abiotischen Aspekten zählen Klimadaten, wie Temperatur, Niederschlag, UV-Einstrahlung und Sonnenscheindauer, sowie Bodendaten, wie z.B. der pH-Wert, die Phosphat- und Kaliumkonzentration und das Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff. Dabei können Variationen des Inhaltsstoffspektrums sowohl zwischen verschiedenen Standorten als auch innerhalb eines engbegrenzten Standortes auftreten. [33]

Grundsätzlich definiert das Genom der Pflanze, welche Substanzen prinzipiell exprimiert werden können. Umweltparameter und Genotyp regulieren gemeinsam die Bildung von Sekundärmetaboliten, wobei noch nicht hinreichend erforscht wurde, inwieweit sich ökologische und genetische Konstitutionen gegenseitig beeinflussen [33]. Des Weiteren wird eine Verknüpfung von ökologischen und ontogenetischen Aspekten in der Literatur beschrieben, welche jedoch zum Teil kontrovers diskutiert werden. So ist zum Beispiel das Keimungsvermögen abhängig von den jeweiligen Umweltbedingungen [74, 75]. Weiter existieren konkrete Daten über den Einfluss von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Lichtqualität, Samenalter etc. auf die Keimungsfähigkeit diverser *Plantago*-Arten, wobei die Ergebnisse auch hier z.T. äquivok sind [75].

1.2.2 Ursachen für Variationen im IG-Inhaltsstoffspektrum

Abhängigkeiten ontogenetischer, diurnaler, ökologischer und genetischer Kriterien auf das IG-Sekundärstoffprofil in *P. lanceolata* bzw. die IGs Aucubin und Catalpol in anderen Pflanzen sind in der Literatur mehrfach dokumentiert, wohingegen Einflüsse auf den Verbascosidgehalt weniger bekannt sind [76]. In manchen Studien wurde, für ein tiefer greifendes Verständnis der phytochemischen Zusammenhänge, eine Differenzierung der Pflanze in ihre einzelnen Organe (Blüte, Stengel, Blatt, Wurzel) vorgenommen [77, 78]. So konnten beispielsweise Marak et al. [77] einen abweichenden IG-Gehalt sowie ein abweichendes Verteilungsmuster von Aucubin zu Catalpol in den Blüte, Stengel, Blatt und Wurzel registrieren, wobei in den Blütenständen mehr Catalpol als Aucubin gefunden wurde und die restlichen Pflanzenteile hingegen mehr oder gleichviel an Aucubin aufwiesen. Genetische Unterschiede machten sich dabei nur teilweise bemerkbar [77]. Dabei ist prinzipiell festzuhalten, dass die Gehalte von Aucubin und Catalpol sowie ihr Verhältnis zueinander im Spitzwegerich z.T. erheblich voneinander abweichen und dadurch kontroverse Aussagen implizieren können [24, 28]. Während z.B. Bowers und Collinge [28] in den Blättern von *P. lanceolata* stets etwa doppelt so viel Aucubin wie Catalpol detektierten, fanden Jurisic et al. [31] in ihnen durchweg höhere Mengen an Catalpol vor.

Trotz zahlreicher Literaturdaten zum Einfluss diverser Faktoren auf IG-Gehalte in Pflanzen, reichen die einzelnen Informationen nicht aus, um einen fundierten Zusammenhang zwischen den einzelnen beeinflussenden Ereignissen und jeweiligen Auswirkungen herzustellen. Aufgrund der Fülle an Literaturdaten zu IG-Variationen in *P. lanceolata* bzw. anderen IG-haltigen Pflanzen, kann die aktuelle Datenlage zu dieser Thematik hier nicht vollständig wiedergegeben werden. Stattdessen soll ein breitgefächertes Überblick an Informationen zur Beeinflussung der IG-Gehalte in *P. lanceolata* präsentiert werden.

1.2.2.1 Ontogenetik

Keimung und Pflanzenalter Intensive Untersuchungen zu ontogenetischen Aspekten IG-haltiger Pflanzen wurden für den Zeitpunkt der Keimung bzw. den ersten Wochen danach unter anderem von Barton [74] für *P. lanceolata* und Alba et al. [79] für *Verbascum thapsus* L. vorgenommen.

Bei der Erforschung des Pflanzenalters als Einflussfaktor auf das IG-Muster in Spitzwegerichsamen verschiedener *Plantago*-Arten konnte z.B. gezeigt werden, dass die Aucubin-, Catalpol- sowie Gesamtiridoidglykosidgehalte in den ersten sechs Wochen nach der Keimung mit zunehmendem Pflanzenalter anstiegen, wobei zwischen Keimung und zwei Wochen alter Pflanze der Gehalt jeweils zunächst abfiel. Zeitgleich sank der Anteil an Catalpol am Gesamtiridoidglykosidgehalt von zwei bis sechs Wochen, während der von Aucubin deutlich zunahm. Des Weiteren konnte Barton [74] beobachten, dass später auskeimende Spitzwegerichpflanzen mehr Aucubin in den Blättern beinhalten als früher keimende, wobei der Gehalt an Catalpol in der Pflanze nicht merklich durch den Zeitpunkt der Keimung verändert wurde. [74]

In den Blättern von *Verbascum thapsus* L., welche ebenfalls grundständig rosettenförmig angeordnet sind und ebenfalls die IGs Aucubin und Catalpol beinhalten, verhielt es sich hingegen genau umgekehrt. Junge Blätter wiesen im Vergleich zu älteren Blättern einen zum Teil sechsfach und damit signifikant höheren Gesamtiridoidglykosidgehalt sowie einen signifikant höheren Anteil an Catalpol als an Aucubin auf. Bei den älteren Pflanzen war das Verhältnis von Aucubin zu Catalpol hingegen relativ ähnlich. [79]

Auch wenn es sich hierbei um zwei verschiedene Pflanzenarten und -gattungen (*V. thapsus* bzw. *P. lanceolata*) handelt, ist ein ähnliches Verhalten anzunehmen und ein Vergleich der beiden Ergebnisse möglich. So kann geschlussfolgert werden, dass die in den Samen angesammelten IGs in den ersten zwei Wochen verstärkt in die Blätter transportiert werden, wodurch sich zum einen der Abfall der IG-Gesamtkonzentration sowie die starke Zunahme am Gesamt-IG-Gehalt in den Blättern in diesem Zeitraum erklären würde. Eine reziprok ungleiche Anhäufung der IGs Aucubin und Catalpol über das Pflanzenalter in Samen bzw. den Blättern wäre ein Zeichen dafür, dass weiterhin äquivalente Mengen an beiden IGs biosynthetisiert, jedoch zu unterschiedlichen Orten transportiert und deponiert werden. Der Zusammenhang zwischen Expression und Verteilung der IGs in diversen Pflanzenkompartimenten über die Zeit ist ein spannender Ansatz für zukünftige Analysen. Bei Auswertung der Literatur wird deutlich, wie wenig über diese Thematik bis *dato* bekannt ist.

Vegetation Vegetative Veränderungen des Aucubin-, Catalpol- und Verbascosidgehalts, welche auch ein zentrales Thema dieser Arbeit darstellen, wurden von Tamura und Nishibe [18] untersucht, wobei zwei Spitzwegerichkultivare jeweils im Zweiwochenrhythmus von Juni bis einschließlich Oktober eines Jahr beprobt wurden [18, 33]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gehalte an Aucubin von 2,1% auf 4,8% (Grassland Lancelot) bzw. 1,0% auf 2,7% (Ceres Tonic) und Verbascosid von 3,4% auf 7,1% (Grassland Lancelot) bzw. 1,5% auf 4,1% (Ceres Tonic) über die Zeit insgesamt anstiegen, wobei insbesondere bei Aucubin Anfang August eine starke Schwankung nach unten beobachtet werden konnte. Der Catalpolgehalt hingegen fluktuierte im Bereich 1-2% für Grassland Lancelot (nicht detektierbar in Ceres Tonic) ohne nennenswerte saisonale Beeinflussung. Hierbei wurde jedoch nur der Verlauf eines Jahres betrachtet. Da interannuale Abweichungen von IG-Gehalten teilweise gravierend sein können, wie Qi et al. [78] bei der IG-Analytik von Gentiopicrosid, Loganinsäure, Swertiamarin und Swerosid in drei aufeinander folgenden Jahren aufdeckten, bestehen Zweifel an einer allgemeinen Richtigkeit bzw. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Jahre der von Tamura und Nishibe [18] publizierten vegetativen Abhängigkeiten der Aucubin-, Catalpol- und Verbascosidgehalte im Spitzwegerich.

1.2.2.2 Ökosystem

Abiotik Signifikante Unterschiede im Gesamt-IG-Gehalt konnten überdies zwischen einzelnen Populationen im Kraut von *V. thapsus* registriert werden, welche innerhalb eines Monats des gleichen Jahres gesammelt wurden und u.a. in den abiotischen Parametern Standort und geographische Höhe sowie den biotischen Faktoren Art und Anzahl an Nachbarpflanzen voneinander variierten. Trotz stark abweichenden Gesamt-IG-Gehalten ähnelte das Verhältnis von Catalpol zu Aucubin hierbei zwischen den einzelnen Populationen. Intrapopulationäre Differenzen beliefen sich auf $\leq 5\%$ und waren folglich vernachlässigbar. [79]

Anhand dieses Beispiels wird klar, dass es aufgrund des Geflechts an mannigfaltigen Einzelparametern, schwierig ist, den Einfluss eines einzelnen Kriteriums auf das Sekundärstoffspektrum jeweils separat zu erforschen.

Biotik In der Literatur besonders gut dokumentiert ist die Einflussnahme und Interaktion von Fraßfeinden wie Insekten oder Weidentiere auf das Sekundärstoffmuster diverser IG-haltiger Pflanzen, wie dem Spitzwegerich, wobei insbesondere Aucubin und Catalpol in diesem Kontext im Vordergrund der einschlägigen Literatur stehen [28, 30, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85]. Dabei ist es fast unmöglich diese Effekte, wie z.B. Pflanzenalter und IG-Gehalt, isoliert von anderen zu ergründen [79]. So konnte für *V. thapsus* eine Verbindung zwischen IG-Gehalt und Fraßschädigung demonstriert werden, wobei ältere, IG-ärmere Pflanzen erheblich stärker durch kauende Fraßfeinde geschädigt wurden als jüngere, IG-reichere Exemplare [79]. Dies verdeutlicht die Schutzfunktion von IGs in Pflanzen gegenüber Fraßfeinden. Weiter konnte in diesem Kontext für *P. lanceolata* herausgefunden werden, dass in durch Fraßfeinde beschädigten Blättern eindeutig mehr Aucubin und Catalpol (separat und in Summe) produziert wurden, wobei der Anteil an Catalpol gegenüber dem von Aucubin klar überwog [82]. Eine eindeutige Steigerung der Biosynthese von Aucubin, Catalpol und Gesamtiridoidglykosiden konnte dabei bereits nach sechs Tagen beobachtet werden, was auf eine relativ schnelle Anpassung der Pflanze an die jeweiligen Umgebungsbedingungen hindeutet. Im Versuchsaufbau von Fuchs und Bowers [82] wurde allerdings nicht abgesichert, ob der Effekt tatsächlich durch die Schädigung der Blätter hervorgerufen wurde oder auf der Tatsache beruhte, dass neue Blätter *per se* quantitativ höhere IG- sowie höhere Catalpolmengen enthielten. [82]

Zu dem gleichen Ergebnis der vermehrten IG-Bildung in Spitzwegerichblättern als Folge herbizider Schädigung kamen auch Pankoke und Müller [85]. Sie sicherten ihre Resultate ab, indem sie den IG-Gehalt in nachwachsenden Blättern aus herbizider Schädigung zusätzlich mit dem von ungeschädigten Kontrollpflanzen sowie fachmännisch gestutzten Blättern verglichen. Dabei kamen sie zu der Erkenntnis, dass keine relevante Änderung des IG-Gehalts bei fachmännisch gestutzten Blättern auftrat, jedoch eine starke positive Korrelation zwischen Insektenbefall und IG-Gehalt zu beobachten war. [85]

Insektenbefall kann somit als Grund für eine erhöhte IG-Produktion gesehen werden, was die Frage aufwirft, inwieweit herbizide Schädigung bzw. Interaktion wichtig ist, um

einen bestimmten Gehalt an bioaktiven Inhaltsstoffen in der Pflanze zu generieren bzw. für die pharmazeutische Nutzung zu gewährleisten. Welche fraßschädigenden Insekten (Motten, Schmetterlinge, Käfer, etc.) mit der Pflanze in Kontakt treten, scheint dabei irrelevant zu sein [28, 80, 84, 85]. Im Vergleich mit anderen Faktoren wie Phänologie [86], Pflanzenalter [87] oder verfügbare Nahrung [86] wird dem Einfluss der Fraßschädigung jedoch eine untergeordnete Rolle beigemessen [86, 87]. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse der Studie von Pankoke und Müller [85], welche einen massiven Anstieg der IGs Aucubin und Catalpol in *P. lanceolata* nach Raupenbefall von bis zu 220% bzw. bis zu 750% im Vergleich zur unbehandelten Pflanze feststellen konnten.

Es wurde weiterhin herausgefunden, dass die Insekten die aufgenommenen IGs selbst zu Abwehrzwecken speichern und bei Bedarf als Sekret absondern können [80, 84]. Hierbei scheint es insektenspezifische, selektive Muster der IG-Aufnahme bzw. Sekretbildungen zu geben [30, 83]. Des Weiteren sind offenbar nicht alle Insekten dazu befähigt, IGs als Abwehrsekret einzusetzen [30, 83]. Speicherkapazität und Sekretion der IGs Aucubin und Catalpol in den Insekten [30, 84] sowie ein gewisses IG-Metabolisierungsvermögen der Insekten von z.B. Catalpolderivaten in Catalpol [83] wurden in diesem Zusammenhang bereits erforscht und bestätigt, sind aktuell jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Ein interessanter Aspekt dabei ist, dass die von IG-sekretierenden Insekten aufgenommenen IGs unter bestimmten Bedingungen auch negative Effekte auf die Wirtstiere selbst haben können [84]. Insbesondere konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen reiner Aucubin- bzw. Catalpolaufnahme und Melaninproduktion in den betroffenen Insekten eruiert werden, welche jedoch nicht bei einer gemischten IG-Kost auftrat [84]. Zudem zeigten Spitzwegerichextrakte eine toxische Wirkung auf den Fadenwurm *Meloidogyne incognita*, wohingegen keine signifikanten Vergiftungserscheinungen an diversen Pilzen und Bakterien beobachtet werden konnten [88].

Weiter wurden signifikante Variationen des IG-Inhaltsstoffprofils von *P. lanceolata* nicht nur durch Fraßfeinde, wie Insekten und Weidentiere, sondern auch durch fungale Mikroorganismen herbeigeführt [77, 89].

So erhöhte der pathogene Pilz *Diaporthe adunca* den Gesamtgehalt an Aucubin und Catalpol in den differenzierten Pflanzengewebe Blüte, Stengel, Blatt und Wurzel in zwei von drei (Blütenstand) bzw. eins von drei (Stengel, Blatt und Wurzel) Genotypen signifikant erhöhte. Für einen der Genotypen konnte hierbei ein deutlicher Anstieg der IG-Menge bereits sechs Stunden und ein Ausbleiben von Fäulnis bis zu acht Tage nach der Pilzbeimpfung registriert werden. Um weitere einflussreiche Parameter gleichzustellen, wurden die geernteten drei Genotypen in dieser Studie geklont und anschließend auf die gleiche Weise behandelt. Das Verhältnis von Aucubin zu Catalpol schien durch die Pilzbeimpfung im Großen und Ganzen unangetastet zu bleiben. Eine direkte Proportionalität zwischen IG-Gehalt und Schutz gegenüber Feinden konnte allerdings nicht bestätigt werden. [77]

1.2.2.3 Genetik

Darüber hinaus konnten in der Literatur auch genetisch bedingte Unterschiede in den IG-Mustern zwischen verschiedenen Spitzwegerichfamilien aufgezeigt werden [74], wobei die Datenlage hierzu weniger gesichert ist.

1.2.2.4 Diurnalität

Es sind keine konkreten Literaturdaten zu diurnalen Einflüssen auf das IG-Spektrum in *P. lanceolata* bekannt.

1.2.2.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend bedeutet dies, dass das IG-Sekundärstoffprofil von Pflanzen, wie dem Spitzwegerich von ontogenetischen, genetischen und ökologischen Faktoren beeinflussbar ist. Zu potentiellen Einflussursachen liegen Studienergebnisse vor, welche mitunter äquivok diskutiert werden. Die in dieser Arbeit thematisierte Veränderung des IG- und PE-Spektrums wurde bereits in der Literatur untersucht, wobei die allgemeine Gültigkeit der dabei gewonnenen Erkenntnisse, aufgrund der nur auf ein Jahr limitierten Probenahme, angezweifelt werden. Gegenwärtig reicht die Informationslage nicht für eine abgesicherte Einstufung der kausalen Zusammenhänge einzelner Einflussparameter auf Sekundärstoffvariationen aus. Als weitere Parameter für schwankende Gehalte an Sekundärstoffwechselprodukten sind außerdem Prozesse denkbar, die *post metentes* stattfinden, wie z.B. das Trocknen der frischen Pflanze zur Droge [18, 34], die Dauer und Art der Lagerung vor der Analyse [19, 89] sowie die Analysemethode selbst. Dies erschwert überdies die Vergleichbarkeit individueller Studienergebnisse miteinander.

1.3 Historie der Extraktion und Isolierung von IGs

Ziele dieser Arbeit waren unter anderem die Extraktion und Isolierung der Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol aus *P. lanceolata*. Hierbei sollte überprüft werden, ob die in der Literatur postulierten IGs tatsächlich genuin in der Pflanze enthalten sind. Insbesondere sollte untersucht werden, ob es sich bei den zwei methoxylierten IGs Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester um Artefakte handelt, die durch Einsatz von Methanol gebildet werden. Die Entstehung von Artefakten durch Lösungsmittel wurde bereits in [90] beschrieben. Aus diesem Grund sollte während des gesamten Extraktions- und Isolierungsprozesses auf Methanol verzichtet werden. In der Literatur konnte keine geeignete Methode gefunden werden, in der die Extraktion aller prominenter IGs (Aucubin, Catalpol, Asperulosid, Verbenalin, Globularin und Deacetylasperulosidsäuremethylester) aus *P. lanceolata* ohne den Einsatz von Methanol beschrieben ist. Um erste Anhaltspunkte zur eingesetzten Methoden zu erhalten, wurde die Suche auf andere IGs und andere Pflanzen ausgeweitet. Dadurch ergab sich eine sehr große Bandbreite an Informationen, die als exemplarischer Auszug in Tabelle 1.6 chronologisch aufgelistet sind.

Tabelle 1.6: Einsatz von Methanol zur Extraktion und Isolierung (z.T. auch Fraktionierung und Probenaufarbeitung) von IGs in der einschlägigen Literatur.

Literatur	IGs	Ausgangsmaterial	Methanol in Extraktion	Methanol in Isolierung ^a
[26]	Aucubin	<i>P. major</i> , <i>P. media</i> (jeweils Samen)	_b	-
[37]	Aucubin	<i>P. lanceolata</i> (Samen)	_b	+
[27]	Aucubin	<i>Aucuba japonica</i> , <i>Melampyrum arvense</i> , <i>Buddleia globosa</i>	- ^c	_b
	Asperulosid	<i>Rubia tinctorum</i> , <i>Daphniphyllum macropo-</i> <i>dum</i>	- ^c	_b
[22]	Aucubinderivat	<i>Verbascum sinutaum</i>	_d	d
	Aucubin, Catalpol, Harpagid, Ajugol	<i>V. thapsus</i> L.	_d	d
	Asperulosid	<i>P. major</i> , <i>P. lanceolata</i>	_d	d
[91]	Aucubin, Monomelittosid und -derivat	diverse IG-haltige Pflanzen, u.a. <i>P. media</i> L. var. <i>urvilleana</i>	+	_f, b
[92]	Excelsioside (= Secoiridoid)	<i>Fraxinus excelsior</i>	- ^e	+
[40]	Plantarenaloid, Bartosiosid	<i>Plantago</i> subg. <i>Psyllium</i>	+	+
[93]	Swertiamarin, Gentioprosid	<i>Centaurium erythraea</i> , <i>C. turcium</i>	+	+

^a z.T. auch Fraktionierung und Probenaufarbeitung

^b Ethanol-Wasser-Gemisch

^c Wasser

^d nicht angegeben

^e Ethanol

^f Butanol

^g nicht durchgeführt

Literatur	IGs	Ausgangsmaterial	Methanol in Extraktion	Methanol in Isolierung ^a
[17]	u.a. Aucubin, Catalpol und -derivate, Asperulosid	34 <i>Plantago</i> -Spezies, u.a. <i>P. amplexicaulis</i> und <i>P. cretica</i> , nicht aber <i>P. lanceolata</i>	-	+
[25]	Aucubin, Catalpol, Globularin, Asperulosid, Deacetylasperulosid-säuremethylester, Geniposidsäure	diverse <i>Plantago</i> -Spezies, u.a. <i>P. lanceolata</i> , <i>P. media</i> und <i>P. major</i>	+	+
[94]	Aucubin, Euphrosid, Ixorodosid, Boschnalosid	<i>Euphrasia pectinata</i>	+	+
[18]	Aucubin, Catalpol	<i>P. lanceolata</i>	+	+
[77]	Aucubin, Catalpol	<i>P. lanceolata</i>	+	+
[95]	Catalpolderivate	<i>Jamesbrittenia fodina</i>	+	+
[31]	Aucubin, Catalpol	diverse <i>Plantago</i> -Spezies <i>P. lanceolata</i>	- ^c	- ^e
[96]	11 IGs, darunter Aucubin	<i>Pedicularis kansuensis</i> forma <i>albiflora</i>	- ^b	+
[97]	Aucubin, -derivate, Catalpolderivate	<i>Verbascum lasianthum</i>	+	+
[82]	Aucubin, Catalpol	<i>P. lanceolata</i> , Schmetterling <i>Junonia coenia</i>	+	+
[98]	Asperulosid, -derivat, Monotropein, Scandosidderivat, Daphyllosid, -derivat	<i>Gallium verum</i> subsp. <i>verum</i>	+	- ^f
[99]	diverse, u.a. Sesamosid, Barlerin	<i>Lamium</i>	+	- ^f

^a z.T. auch Fraktionierung und Probenaufarbeitung

^b Ethanol-Wasser-Gemisch

^c Wasser

^d nicht angegeben

^e Ethanol

^f Butanol

^g nicht durchgeführt

Literatur	IGs	Ausgangsmaterial	Methanol in Extraktion	Methanol in Isolierung ^a
[100]	diverse, u.a. Aucubin, Catalpol und -derivate, Globularin, Asperulosid und -derivate, Besperulosid, Alpinosid	<i>Globularia aphyllanthes</i>	+	+
[101]	Aucubin, Catalpol	<i>Veronica</i> -Spezies	+	+
[102]	Aucubin, Agnusid	<i>Vitex agnus-castus</i>	+	+
[103]	Aucubin	<i>Melampyrum</i> -Spezies	+	+
[83]	Aucubin, Catalpol, Antirrhinosid	<i>Coleoptera curculionidae</i>	+	+
[58]	Agnusid, Negundosid, 6'- <i>p</i> -Hydroxybenzoylmussaenosidicsäure	<i>Vitex trifolia</i>	+	+
[104]	24 IGs, u.a. Asperulosid, Asperulosidsäure, Deacteylasperulosidsäure, Deacteylasperulosidsäuremethylester	<i>Paederia scandens</i>	- ^e	+
[105]	Agnusid	<i>Vitex negundo</i> , <i>V. trifolia</i>	+	- ^d
[106]	Geniposid, Geniposidderivat, Gardenosid	<i>Gardenia jasminoides</i> J. ELLIS	^g	+
[107]	Aucubin, Catalpol	<i>Globularia</i> -Spezies	+	+

^a z.T. auch Fraktionierung und Probenaufarbeitung

^b Ethanol-Wasser-Gemisch

^c Wasser

^d nicht angegeben

^e Ethanol

^f Butanol

^g nicht durchgeführt

Zum besseren Verständnis der in der Literatur verwendeten Methoden, erscheint eine chronologische Einteilung der Extraktionshintergründe von Bedeutung und soll im Folgenden kurz diskutiert werden.

Zwischen 1907-1952 stand die Gewinnung von Reinisolaten zur Bestimmung der korrekten Summenformel und chemischen Konstitution des Isolats sowie der entsprechenden charakterisierenden Daten wie Lösungsverhalten, Drehwert und Schmelzpunkt im Vordergrund. Diese Errungenschaften stellen den Grundstein der heutigen Analytik dar.

Ab 1953 bis heute, als ein gewisses Portfolio an gesammelten Daten bestimmter Verbindungen verfügbar war, fanden Extraktionen vermehrt zu weiterführenden Analysezwecken statt. Zum Beispiel gewann die Isolierung neuer Verbindungen generell [92, 95] bzw. in bestimmten Pflanzengattungen [22] sowie chemotaxonomische Untersuchungen [17], qualitative und quantitative Fingerprintscreenings [106] an Bedeutung. Neben den traditionellen Ausschüttelmethoden fanden ab dieser Zeit vermehrt chromatographische Methoden wie MPLC, CPC und HPLC zur Fraktionierung Anwendung [22, 98]. Dies gelang auch zunehmend mit kleinen Mengen an Ausgangsmaterial und ohne intensive vorhergehende Probenaufarbeitung des Rohextraktes [18, 99, 101]. Anfänglich (1907-1952) wurde in Gegenwart von Calciumcarbonat und dem Lösungsmittel Ethanol gearbeitet. Das leicht basische, puffernde Calciumcarbonat sollte der Zersetzung der säurelabilen IGs vorbeugen [26, 27, 37]. Es ist nicht auszuschließen, dass es mit den zu isolierenden IGs Komplexe eingeht oder ausfällt. Um unlösliche Präzipitate zu vermeiden, wurde später auf den Einsatz dieses Salzes verzichtet. Die Zugabe von Aktivkohle in wässriger Lösung wurde als Alternative gewählt (1952 – 1992) [22, 27, 91, 92]. Die polaren Glykoside sollten zunächst an die Aktivkohle adsorbieren und später mithilfe von Wasser bzw. Wasser-Ethanol-Gemischen abgelöst werden. Ab etwa 1991 wurde dann das eingesetzte Ethanol durch Methanol ersetzt [92]. Diese Entscheidung beruhte vermutlich auf der höheren Affinität des Methanols zu den polaren-mittelpolaren Verbindungen, die sich ohne Probleme darin lösen lassen. Es ist darüber hinaus mit vielen Lösungsmitteln kompatibel sowie kostengünstiger zu erwerben als Ethanol. Seit etwa 1993 ist die Verwendung der Aktivkohlemethode quasi obsolet. Seit dieser Zeit wurde zur Extraktion, Fraktionierung und Probenaufarbeitung fast ausschließlich auf Methanol gesetzt. Vom Einsatz von Aktivkohle ebenso wie von Methanol sollte in dieser Arbeit abgesehen werden, unter anderem auch, um das Risiko der Bildung von Methoxyartefakten zu vermeiden. Zu den wenigen Wissenschaftlern, die aktuell ohne Methanol arbeiten, gehört insbesondere Johanna Suomi (ehemals Institut für Analytische Chemie in Helsinki, Finnland), die eine HWE-Methode zur Probenaufbereitung für MEKC-Analysen entwickelte. Sie erforschte unter anderem, welche Extraktionsmittel für IGs am geeignetsten sind. Dabei setzten sich Verfahren mit heißem Wasser gegenüber Methanol, Butanol oder Propan-2-ol durch, wobei die Extraktion mit heißem Wasser die höchste Extraktionskraft und beste Wiederholbarkeit zeigte und überdies noch umweltfreundlich ist [108]. Das Verfahren fand kaum Anklang in der Literatur mit Ausnahme von Jurisic et al. [31], der ebenfalls mit MEKC arbeitete. Anzumerken ist hier, dass sowohl Suomi als auch Jurisic dabei ein selbstgebautes und

nicht kommerziell erwerbbares Gerät einsetzen, dessen Nachbau im Rahmen dieser Arbeit als zu aufwendig und in keinem Verhältnis zum Endergebnis betrachtet wurde. Deswegen wurde in dieser Arbeit nicht auf diese Methode zurückgegriffen. Ein weiteres, seltenes Beispiel, bei dem statt Methanol auf ein anderes Lösungsmittel ausgewichen wurde, stellt die Arbeit von Wu et al. [104] dar. In dieser wird das weniger polare Ethanol verwendet. Allerdings dient die Extraktion hier, analog zu Suomi et al. [108] und Jurisic et al. [31], nicht zur Isolierung von Reinsubstanzen, sondern zur Probenaufbereitung für analytische Zwecke. Folglich ist diese Methode unzureichend zur vollständigen Gewinnung der Hauptiridoidglykoside aus *P. lanceolata*.

Bis *dato* existieren keine umfassend geeigneten Literaturstellen zur Extraktion von IGs aus *P. lanceolata*. Auch unter Miteinbezug anderer IGs und anderer Pflanzen konnten keine ausreichend geeigneten Vorlagen zur Extraktion und Isolierung der gewünschten IGs aus *P. lanceolata* ohne Methanol gefunden werden. Als Konsequenz war die Entwicklung einer neuen Isolierungsstrategie im Rahmen dieser Arbeit notwendig, um die Iridoidglykoside möglichst genuin aus *P. lanceolata* zu gewinnen.

1.4 Fingerprintanalytik von IGs mittels (HP)TLC und HPLC

Fingerprint-Screening-Methoden sind ein geeignetes Mittel um in Routinekontrollen schnell und einfach die Qualität der zu verarbeitenden Pflanze zu ermitteln und somit rasch verlässliche Entscheidungen im Verarbeitungsprozess zu treffen. (HP)TLC- und HPLC-Anwendungen sind dabei inzwischen in den meisten industriellen Betrieben Standard, weshalb sie auch im Rahmen dieser Arbeit als Methoden der Wahl getestet werden sollen.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse ausführlicher Literaturrecherchen *via* Scifinder, Pubmed, GoogleScholar und Researchgate zu dieser Thematik vorgestellt und in Bezug auf die Fragestellungen dieser Arbeit gebracht werden.

Anzumerken ist, dass bei den zu analysierenden IGs und PEs jeweils nur die für die Pflanze bekanntesten Vertreter im Zentrum stehen. Dies sind Aucubin, Catalpol, Globularin, Verbenalin, Asperulosid, Deasperulosidsäuremethylester bzw. Verbascosid, Isoverbascosid, Plantamajosid und Lavandulifoliosid.

1.4.1 (HP)TLC-Systeme zur IG-Analytik in der Literatur

Trotz ausführlicher Literaturrecherche konnten keine einschlägigen Literaturdaten zur Fingerprintbestimmung aller IGs in Spitzwegerich gefunden werden. Qualitative Analysen fokussieren sich auf die Erfassung des Aucubins oder andere, nicht in Spitzwegerich enthaltene IGs. Gleiches gilt für die Quantifizierung. Hierbei stellt die Densitometrie ein mögliches Verfahren dar (Kapitel 5.1). Einzig eine Quelle befasst sich mit der DC-Bestimmung von Aucubin und Catalpol in *P. lanceolata* [29]. Zur (HP)TLC-Fingerprint-Methodenentwicklung der IGs wurden daher neben Literaturquellen die Aucubin und/oder Catalpol untersuchten auch Methoden, in denen andere IGs analysiert wurden, als Basis herangezogen. Die in der Literatur angewendeten stationären Phasen und damit kombinierte FM-Systeme sind in Tabelle 1.7 aufgelistet.

Tabelle 1.7: Übersicht der in der Literatur angewendeten DC-Systeme unter Angabe der stationären Phase, des FM-Systems, diverser Entwicklungsstrecke sowie behandelte IGs mit R_f -Wert. Desweiteren wird veranschaulicht, ob die Analysen an *P. lanceolata* durchgeführt wurden (+) oder nicht (-).

Literatur	stationäre Phase	FM-System	Entwicklungsstrecke	<i>P. lanceolata</i>	relevante IGs (R_f -Wert)
[106]	RP18 W	Acetonitril/0,1%-ige wässrige Ameisensäure (40:60, v/v)	1 x 7,5 cm (horizontal)	-	Geniposid (0,53), Genepin-1-β--D-gentiobiosid (0,63), Gardenosid (0,71)
[109]	Kieselgel F ₂₅₄	Ethylacetat/Methanol/Wasser (77:20:5, v/v/v)	1 x 12 cm (28 min)	-	Aucubin (0,23)
[110]	Kieselgel F ₂₅₄	Ethylacetat/Methanol/Wasser (77:15:8, v/v/v)	1 x 6 cm	-	Aucubin (0,20) und Agnusid (0,40)
[102]	Kieselgel F ₂₅₄	Ethylacetat/Methanol/Wasser (77:15:8, v/v/v)	1 x 12 cm (2 h)	-	Aucubin (0,50)
[43]	Kieselgel F ₂₅₄	Ethylacetat/Wasser/Essigsäure/Ameisensäure (100 : 27 : 11 : 11, v/v/v/v)	1 x 8 cm	+	Aucubin (n.a., unteres Drittel der Platte)
[111]	Kieselgel F ₂₅₄	Chloroform/Methanol/Wasser (30:11:2, v/v/v)	1 x 16 cm	-	Antirrinosid (n.a.), Linarosid (n.a.), 5-O-Glucosylantirrinosid (n.a.), 5-O-allosylantirrinosid (n.a.)
[93]	Kieselgel F ₂₅₄	Chloroform/Methanol/Wasser (30:11:2, v/v/v)	1 x 16 cm	-	Swertiamarin (n.a.), Gentiopicrosid (n.a.)

Literatur	stationäre Phase	FM-System	Entwicklungsstrecke	<i>P. lanceolata</i>	relevante IGs (R _f -Wert)
[29]	Kieselgel F ₂₅₄	Chloroform/Methanol/ <i>p</i> -Toluolsulfonsäure (0,25 M) in 25%-igem Ammoniak (70:40:10, v/v/v)	2 x 7 cm	+	Catalpol (0,27), Aucubin (0,34)
[112]	Kieselgel F ₂₅₄	Chloroform/Methanol (80 : 20, v/v)	n.a.	-	diverse IGs, u.a. ein Catalpolderivat (0,44)
[58]	Kieselgel F ₂₅₄	Petroleum (60-80)/Toluol/Aceton/Wasser (10:10:80:2, v/v/v/v)	n.a.	-	6'- <i>p</i> -Hydroxybenzoylmussaenoidsäure (0,32), Agnusid (0,47), Negundosid (0,53)
[103]	Kieselgel F ₂₅₄	n-Propanol/Toluol/Eisessig/Wasser (25:20:10:10, v/v/v/v)	1 x 10 cm (40 min)	-	Aucubin (0,24)
[113]	Kieselgel F ₂₅₄	1,4-Dioxan/Xylen/Propan-2-ol/25%-iger Ammoniak (1:3:5:1, v/v/v/v)	1 x 15 cm (2,5 h)	+ (Sirup)	u.a. Aucubin (0,10)

Die Literatur zeigt, dass zur DC IG-Analytik fast ausschließlich polare stationäre Phasen aus Kieselgel verwendet werden [29, 43, 58, 93, 103, 110, 111, 112, 113]. Selten findet unpolares Material, wie C18, Anwendung [106]. Die Auswahl an FM-Systemen hingegen war mannigfaltig und abhängig von der Polarität der zu trennenden IGs. Auf polarer Kieselgelphase kommen vorwiegend polare bis mittelpolaren FM-Systeme zum Einsatz, die entweder auf Ethylacetat [43, 102, 110] oder Chloroform [29, 93, 111, 112] basieren und mit den polarerer Komponenten Methanol und/oder Wasser kombiniert sind. Anhand dieser polaren bis mittelpolaren FM-Systeme werden für Aucubin R_f -Werte im unteren bis mittleren Bereich der Platte erzielt, wie z.B. R_f (Aucubin) = 0,5 [102] oder R_f (Aucubin) = 0,2 [110]. Ersteres stellt gute Startbedingungen für weitere analytische Untersuchungen dar, wie z.B. solche um die beiden chemisch sehr ähnlichen, polaren Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol voneinander zu trennen. Bemerkenswert ist außerdem die erfolgreiche chromatographische Trennung von Catalpol und Aucubin von Rischer et al. [29] mit resultierenden R_f -Werten von 0,27 bzw. 0,34. Diese Methode stellt ausgezeichnete Startparameter für eine Fingerprintmethodenentwicklung aller IGs in *P. lanceolata* dar, da die chemisch ähnlichen IGs Aucubin und Catalpol bereits erfolgreich, mit ausreichend Abstand getrennt vorliegen. Seltener finden unpolare Fließmittel Verwendung [58, 103, 113]. Polare IGs wie Aucubin resultieren dabei in sehr geringen R_f -Werten, wie beispielsweise 0,1 [113]. Die niedrigen R_f -Wertbereiche sind für eine aussagekräftige Fingerprintanalytik der in *P. lanceolata* enthaltenen IGs unbrauchbar, denn sie sind zu nahe an der Startlinie um die chemisch sehr ähnlichen, polaren Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol ausreichend gut voneinander zu trennen. Der Gebrauch von Additiven, die die Protonierung der Moleküle beeinflussen, wie Säuren [43, 103, 106] oder Basen [113], ist in vielen FM-Systemen zu beobachten. Auch eine Kombination aus Säure und Base wird angewendet [29]. Der Einsatz dieser Additive garantiert eine vollständige Protonierung (Säure) bzw. Deprotonierung (Base), was zu einer Bandenverschärfung der OH-Gruppen reichen IGs auf der Platte führt. Verbindungen mit deprotonierten, also ionischen OH-Gruppen wechselwirken stärker mit dem stationären Kieselgel als protonierte. Ihre Lage im Chromatogramm wird durch die starken ionischen Wechselwirkungskräfte folglich noch weiter unten erwartet, als die über Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirkenden Verbindungen mit protonierten OH-Gruppen.

Die große Vielfalt an mobilen Phasen verdeutlicht, dass aktuell noch kein allgemein geeignetes FM-System zur IG-Analytik existiert. Dies wird auch deutlich durch die uneinheitlichen Entwicklungsparameter, Laufhöhen (6-16 cm) und Anzahl an Entwicklungen (1-2 mal).

1.4.2 Derivatisierung und Detektion von IGs in der Literatur

Um chromophorarme IGs mit UV_{\max} bei etwa 195 nm detektieren zu können, bedarf es einer Derivatisierung. Meist werden dabei chromophorvergrößernde Verbindungen wie Vanillin, Anisaldehyd oder *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in Kombination mit oxidierenden Reagenzien wie Schwefelsäure oder Salzsäure verwendet.

In der Literatur werden drei IG-spezifische Derivatisierungsmittel beschrieben. Das IGs und Proazulene spezifisch blau färbende Ehrlich-Reagenz, welches auf chromophorerweiterndem *p*-Dimethylaminobenzaldehyd und oxidierender Salzsäure besteht [114, Seite 235]. Das zweite spezifische Reagenz basiert auf chromophorerweiterndem Phloroglucin, das ebenfalls in Kombination mit oxidierende Salzsäure Verwendung findet und IGs spezifisch grün färbt [115]. Außerdem wird die Visualisierung von IGs mittels Benzidin beschrieben [115], welches jedoch aufgrund seiner Toxizität im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurde.

Im Allgemeinen werden die mit Derivatisierungsmitteln behandelten IGs erst durch Temperatureinwirkung in angemessenen Zeiten derivatisiert [37]. Karrer und Schmid [37] führten die schwache Anfärbefähigkeit von IGs wie Aucubin in Gegenwart von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd bzw. Antimontrichlorid und von Essigsäureanhydrid auf ihr komplexes Furanderivatsystem zurück. Einfachere Furanderivate reagierten unter diesen Bedingungen auch ohne Erhitzung sofort mit Färbung.

Zur IG-Analytik wurden neben spezifischem Ehrlich-Reagenz [102, 113] auch andere, unspezifische Reagenzien zur Derivatisierung sowie densitometrische Analysen zur Quantifizierung auf stationärer Kieselgelphase angewendet (Tabelle 1.8).

Tabelle 1.8: Übersicht der Literaturstellen zur Derivatisierung von IGs. Aufgelistet sind neben der Literaturstelle, die relevanten IGs, das Derivatisierungsreagenz, die Detektionsart sowie densitometrische Parameter, sofern durchgeführt.

Literatur	IGs	Derivatisierung	Detektion	Densitometrie
[102]	Aucubin	Ehrlich-Reagenz + ΔT	VIS	580 nm
[43]	Aucubin	ΔT	VIS, 366 nm (blau)	-
[110]	Aucubin, Agnusid	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT	VIS (Aucubin, Agnusid, beide braun)	-
[110]	Aucubin, Agnusid	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT	254 nm (nur Agnusid, Fluoreszenzlösung)	-
[103]	Aucubin	Anisaldehyd-Essigsäure-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT	VIS (braun)	-
[103]	Aucubin	Eisenchlorid- bzw. Anisaldehyd-Reagenz + ΔT	-	550 nm
[113]	u.a. Aucubin	Ehrlich-Reagenz + ΔT	VIS (dunkelblau)	580 nm
[29]	Catalpol, Aucubin	Vanillin-Essigsäure-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT	VIS (rot-violett)	530 nm
[111]	diverse IGs, u.a. Antirrinosid, Linarosid, 5-O-Glucosylantirrinosid, 5-O-Allosylantirrinosid	Sulphurylchloriddämpfe + ΔT	-	450 nm
[112]	diverse IGs, u.a. ein Catalpolderivat	Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT	-	430 nm
[112]	diverse IGs, u.a. ein Catalpolderivat	-	-	240 nm

Tabelle 1.8: Übersicht der Literaturstellen zur Derivatisierung von IGs. Aufgelistet sind neben der Literaturstelle, die relevanten IGs, das Derivatisierungsreagenz, die Detektionsart sowie densitometrische Parameter, sofern durchgeführt.

Literatur	IGs	Derivatisierung	Detektion	Densitometrie
[106]	Geniposid, Genepin-1- β -D-gentiobiosid, Gardenosid	Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, + ΔT	VIS	-
[106]	Geniposid, Genepin-1- β -D-gentiobiosid, Gardenosid	-	-	240 nm
[93]	Swertiamarin, Gentiopicrosid	-	-	240 nm
[58]	6'- <i>p</i> -Hydroxybenzoylmussaenosid-säure, Agnusid, Negundosid	-	254 nm	263 nm

Anzumerken ist weiterhin, dass underivatisierte Platten bei der densitometrischen Quantifizierungen kleinere Messabweichungen aufweisen [58, 93, 106], da die Fehlerquelle Derivatisierung entfällt [93]. Aufgrund des Mangels an ausreichend großen chromophoren Systemen der Hauptiridoidglykoside in *P. lanceolata*, konnte keine underivatisierte densitometrische Untersuchung zur quantitativen Fingerprintanalytik in dieser Arbeit angewendet werden. Für die Fingerprintanalytik der IGs in dieser Arbeit wurde stattdessen ein etwas spezifischeres Derivatisierungsreagenz klar präferiert, um eindeutig die enthaltenen IGs qualitativ und quantitativ zu analysieren. Dabei gilt, je spezifischer und selektiver die Derivatisierung, desto weniger stören Substanzüberlagerungen mit Verbindungen anderer Stoffklassen.

Da zu diesem frühen Zeitpunkt der Arbeit nur die Referenzen Aucubin und Catalpol zur Verfügung standen, hatte eine spezifische Anfärbung darüber hinaus den Vorteil, dass die restlichen vier für *P. lanceolata* postulierten IGs anhand der charakteristischen Farbe identifiziert werden können.

Schließlich sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass das spezifische Ehrlich-Reagenz zur Anwendung auf RP18-Platten ungeeignet ist [106]. Eine Fingerprintmethode auf stationärem Kieselgel ist somit in einer Kombination mit diesem Reagenz zu bevorzugen.

1.4.3 HPLC-Systeme zur IG-Analytik in der Literatur

Einen Überblick der in der Literatur angewendeten stationären Phasen der HPLC-Systeme zur IG-Analytik gibt Tabelle 1.9 wieder. Aufgrund der hohen Fülle an Literaturdaten konnten nicht alle Literaturquellen zu diesem Thema berücksichtigt werden.

Tabelle 1.9: Übersicht der in der Literatur beschriebenen stationären Phasen zur IG-Analytik *via* HPLC.

Stationäre Phase	Literatur
C18	[18, 29, 78, 95, 99, 104, 105, 107, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127]
Carbopac PA1 (=Ionenaustauschsäule)	[81]
Diol	[117]
HILIC	[101, 103, 117]

In der Literatur werden diverse HPLC-Systeme zur Analytik von IGs beschrieben, wobei vor allem unpolare stationäre C18-Phasen zum Einsatz kommen [29, 95, 104, 116, 118, 122, 123, 127, 128]. Sie werden in der Regel mit Wasser als Eluent A und Acetonitril oder Methanol als Eluent B genutzt (Tabelle 1.10).

Polare stationäre Phasen wie Diol- [117] oder HILIC-Säulen [101, 103] werden seltener verwendet. Nach aktuell zugänglicher Literaturlage wurde einmalig der Gebrauch einer Ionenaustauschsäule beschrieben. Hierbei stand die Erforschung direkter und korrelierender Reaktionen auf die Selektion von IGs in *P. lanceolata* im Vordergrund [81].

Der vermehrte Gebrauch von unpolaren C18-Säulen zur flüssigchromatographischen Analytik von IGs lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass diese Phase zurzeit die

gängigste stationäre Phase in der HPLC-Analytik darstellt. Interessant ist hierbei, dass zur DC-Analytik im Gegensatz zur HPLC am häufigsten polares Kieselgel als stationäre Phase Anwendung findet. Wahrscheinlich spielt auch hier - ebenso wie bei der HPLC - die gängigere Verwendung dieser stationären Phase eine Rolle und nicht die beste Eignung aufgrund analytischer Kriterien.

Die am häufigsten in der Literatur eingesetzte stationäre C18-Phase wurde in der Regel mit Wasser als Eluent A und Acetonitril oder Methanol als Eluent B gefahren (Tabelle 1.10).

Tabelle 1.10: Übersicht der in der Literatur beschriebenen mobilen Phasen zur IG-Analytik *via* HPLC. Die Literaturstellen sind, nach ihrem stärker eluierenden B-Eluenten eingeteilt, alphabetisch aufgelistet. Berücksichtigt wurden ausnahmslos Systeme, die an stationären RP18-Phasen Einsatz fanden.

Eluent B der mobilen Phase	Literatur
Acetonitril	[18, 29, 78, 104, 105, 107, 116, 117, 118, 119, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128]
Methanol	[95, 99]

Acetonitril [29, 107, 116, 118, 127, 128] findet als Komponente der mobilen B-Phase deutlich häufiger Verwendung als Methanol [95, 99]. Die UV-Grenze für Acetonitril bzw. Methanol beträgt 190 nm bzw. 205 nm [129, S. 78]. Eine niedrigere Eigenabsorption des Lösungsmittels ermöglicht eine bessere Absorption der zu untersuchenden Substanzen. Gerade bei den schwach absorbierenden IGs ist dies erstrebenswert.

Zudem unterscheiden sich die beiden organischen Lösungsmittel in ihrer Viskosität η mit 0,37 mPA s bzw. 0,60 mPA s für Acetonitril bzw. Methanol [129, Seite 77]. Je viskoser die mobile Phase, desto höher sind die resultierenden Drücke in der Säule. Eine niedrigere Viskosität ermöglicht damit eine schonendere Methodenentwicklung. Darüber hinaus können Änderungen in der mobilen Phase grundsätzlich Einfluss auf die Basislinie des Chromatogramms haben. Eine suboptimale Eluenten-Mischung, wie sie bei einem Gradienten aus Wasser und Methanol zustande kommt, kann einen Basisliniendrift verursachen [129, Seite 362]. Je steiler der Gradient, desto offensichtlicher der Drift. Bei Acetonitril ist dieser Effekt deutlich geringer, wie interne Versuche zeigten. Insgesamt kann Acetonitril damit als geeigneter zur IG-Fingerprintanalytik eingestuft werden als Methanol.

Häufig wird in der HPLC-Analytik der mobilen Phase Säure zugesetzt, um eine vollständige Protonierung von OH-Gruppen und damit schärfere Peaks an der RP-Phase zu erhalten. Dies trifft auch für die HPLC-Analytik von IGs zu (Tabelle 1.11). Der Zusatz anderer Additive, wie z.B. Basen, wurde bis *dato* nicht in diesem Zusammenhang beschrieben.

Als Säureadditive finden in der Literatur zur flüssigchromatographischen IG-Analytik TFA [95, 116, 122], Phosphorsäure [105, 124], Ammoniumacetat [104] und Ameisensäure [118, 119, 123, 125] Verwendung, wobei letzteres am häufigsten genutzt wird. Die Additivkonzentrationen liegen meist zwischen 50 ppm [116] und 0,5% [95, 105, 118]; für Ameisensäure zwischen 0,1% [123, 125] und 0,5% [118]. Hierbei ist zu beachten, dass für MS-gekoppelte HPLC-Systeme flüchtige Additive wie Ameisensäure, Acetat

Tabelle 1.11: Übersicht der in der Literatur beschriebenen Additive zur mobilen Phase, welche in Kombination mit einer stationären C18-Phase verwendet wurden. Die Säure wurde entweder nur zu Eluent A oder zu Eluent A und B hinzugefügt, als Eluent A wurde ausnahmslos Wasser eingesetzt.

Additiv	Konzentration	Literatur
ohne Zusatz	^a	[18, 29, 78, 95, 99, 107, 121, 126, 127]
Ameisensäure	0,1%	[120, 123, 125]
	0,2%	[119]
	0,5%	[118]
Ammoniumacetat	0,5%	[104]
Phosphorsäure	0,3%	[124]
	0,5%	[105]
TFA	50 ppm	[116]
	0,5%	[95]
	^b	[122]

^a entfällt

^b nicht angegeben

und TFA benötigt werden [130, Seite 85]. TFA führt zu unerwünschten Memoryeffekten in der MS-Analytik. Zudem trägt es in vielen Fällen zu einer Ionenunterdrückung bei [130, Seite 85] und ist bei MS-Kopplungen zu vermeiden. Phosphorsäure ist aufgrund ihres nicht-volatilen Charakters in der MS-Analytik nicht bzw. nur bedingt geeignet. Es werden auch erfolgreiche Chromatographieergebnisse ohne Säurezusatz an RP18-Phasen publiziert [78, 99, 107, 121, 127].

Auch die Detektion der Untersuchungssubstanzen stellt einen entscheidenden Punkt in der HPLC-Methodenentwicklung dar. Insbesondere hier lag in der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit der Fokus auf den relativ chromophorarmen und damit UV-metrisch, verglichen mit den PEs, weniger selektiv erfassbaren IGs. PEs absorbieren auch bei höheren Wellenlängen und können daher selektiver detektiert werden. Tabelle 1.12 bietet eine ausgewählte Übersicht der in der Literatur angewendeten HPLC-gekoppelten Detektionsarten. Primär wird an dieser Stelle die Detektion der IGs, sekundär die der PEs berücksichtigt.

In der Literatur werden zur Detektion von IGs (und PEs) UV-metrische (UV, UV/VIS, DAD, PDA) [18, 78, 81, 117, 121], MS-spektrometrische [116, 123, 127, 128] sowie vereinzelt NMR-spektroskopische [95] Detektionsarten genutzt. Gängig ist auch die Kopplung von UV-metrischer und MS-spektrometrischer Detektion [99, 101, 103, 104, 107]. IGs werden in der Literatur bei UV-metrischer Vermessung bei Wellenlängen zwischen 204 nm [18, 29] und 254 nm [105] detektiert. IGs, die bei 254 nm analysiert werden, weisen chromophorreichere Strukturen als die hier vorliegenden IGs auf. Ausnahmen stellen Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester dar, die, obwohl kein ausgeprägtes chromophores System vorhanden ist, beide bei 240 nm detektiert werden [124, 125]. Im Einklang dazu werden Asperulosid und Deasperulosidsäuremethylester bei 233 nm

Tabelle 1.12: Übersicht der in der Literatur beschriebenen HPLC-gekoppelten Detektionsarten von IGs. Literatur zur Erfassung der in der Arbeit betrachteten IGs und PEs bzw. anderer IGs und PEs, gekennzeichnet mit „+“, bzw. keiner Detektion der Stoffgruppen („-“).

Literatur	Detektion (λ)	IGs	PEs
[116]	MS	Aucubin, Catalpol	-
[95]	UV (210 nm), MS	+	-
[95]	NMR	+	-
[101]	UV (208 nm), MS	Aucubin, Catalpol	-
[117]	UV (233 nm)	Asperulosid, Deacetylasperulosidsäuremethylester	-
[118]	DAD	Globularin	-
[118]	MS	Globularin	-
[119]	UV, MS	Globularin	-
[128]	MS	+	-
[121]	UV-VIS (204 nm)	Aucubin	-
[122]	UV (205 nm)	Aucubin, Catalpol	-
[123]	MS	Asperulosid, Deacetylasperulosidsäuremethylester	-
[81]	UV-VIS	Aucubin, Catalpol	-
[103]	UV (208 nm), MS	Aucubin	-
[124]	UV (240 nm)	Verbenalin	Verbascosid
[78]	DAD (241 nm)	+	-
[125]	UV (240 nm), MS	Deacetylasperulosidsäuremethylester	-
[29]	DAD (204 nm)	Aucubin, Catalpol	-
[107]	UV (210 nm), MS	Aucubin, Catalpol	-
[105]	PDA (254 nm)	+	-
[18]	DAD (204 nm)	Aucubin, Catalpol	+
[18]	DAD (330 nm)	+	Verbascosid
[104]	DAD, MS	Asperulosid	-
[99]	PDA, MS	+	-
[126]	PDA, MS	+	-
[127]	MS	+	-

bestimmt Dimov et al. [117].

Aucubin und Catalpol werden vornehmlich bei niedrigeren Wellenlängen untersucht: 204 nm [29, 121], 205 nm [122], 208 nm [101, 103] und 210 nm [107].

PEs, die in der Literatur zusammen mit den IGs analysiert werden, werden entweder simultan bei der gleichen Wellenlänge [124] oder separat quantifiziert [18]. Im ersten Fall liegt diese bei 240 nm, im zweiten bei 330 nm. Alles in allem existieren ausreichend Daten zur HPLC-Analytik von IGs. Es werden auch IGs, die für *P. lanceolata* postuliert werden, in der Literatur behandelt, jedoch existiert *bis dato* keine Fingerprintmethode mittels HPLC-UV für diese. Die Datenlage bildet somit ein gutes Fundament zur Entwicklung einer geeigneten HPLC-Fingerprintmethode für IGs und PEs des Spitzwegerichs. Tabelle 1.13 fasst eine Auswahl der bisher aufgeführten Daten zusammen.

Tabelle 1.13: Übersicht der in der Literatur beschriebenen HPLC-Systeme zur Analytik von IGs und PEs. Angegeben sind die verwendeten stationären und mobilen Phasen sowie Detektion. Weiter wird gekennzeichnet, ob die Untersuchungen an *P. lanceolata* vorgenommen wurden sowie ob bzw. welche relevanten IGs und gegebenenfalls auch PEs untersucht wurden. Positive Ergebnisse werden mit einem „+“, negative mit einem „-“-Zeichen dargestellt.

Literatur	stationäre Phase	mobile Phase	Detektion	<i>P. lanceolata</i>	IGs	PEs
[116]	C18	Wasser mit 50 ppm TFA (A), Acetonitril (B)	MS	-	Aucubin, Catalpol	-
[95]	C18	Wasser (A), Methanol (B)	UV (210 nm), MS	-	+	-
[95]	C18	D ₂ O (A), Methanol (B)	NMR	-	+	-
[117]	C18	nicht angegeben	UV (233 nm)	-	Asperulosid, Deacetylasperulosidsäuremethylester	-
[118]	C18	Wasser mit 0,5% Ameisensäure (A), Acetonitril (B)	DAD	-	Globularin	-
[118]	C18	Wasser mit 0,5% Ameisensäure (A), Acetonitril mit 0,5% Ameisensäure (B)	MS	-	Globularin	-
[119]	C18	Wasser mit 0,2% Ameisensäure (A), Acetonitril (B)	UV, MS	-	Globularin	-
[120]	C18	Wasser mit 0,1% Ameisensäure (A), Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure (B)	MS	-	+	-
[121]	C18	Wasser (A), Acetonitril (B)	UV (204 nm)	-	Aucubin	-
[122]	C18	Wasser mit TFA (pH = 2, 3, A), Acetonitril mit TFA (B)	UV (205 nm)	-	Aucubin, Catalpol	-

Tabelle 1.13: Übersicht der in der Literatur beschriebenen HPLC-Systeme zur Analytik von IGs und PEs. Angegeben sind die verwendeten stationären und mobilen Phasen sowie Detektion. Weiter wird gekennzeichnet, ob die Untersuchungen an *P. lanceolata* vorgenommen wurden sowie ob bzw. welche relevanten IGs und gegebenenfalls auch PEs untersucht wurden. Positive Ergebnisse werden mit einem „+“, negative mit einem „-“-Zeichen dargestellt.

Literatur	stationäre Phase	mobile Phase	Detektion	<i>P. lanceolata</i>	IGs	PEs
[123]	C18	Wasser mit 0,1% Ameisensäure (A), Acetonitril (B)	MS	-	Asperulosid, Deacetylasperulosidsäuremethylester	-
[124]	C18	Wasser mit 0,3% Phosphorsäure (A), Acetonitril (B)	UV (240 nm)	-	Verbenalin	Verbascosid
[78]	C18	Wasser mit 0,1% Ameisensäure (A), Acetonitril (B)	DAD (241 nm)	-	+	-
[125]	C18	Wasser mit 0,1% Ameisensäure (A), Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure (B)	UV (240 nm), MS	-	Deacetylasperulosidsäuremethylester	-
[29]	C18	Wasser (A), Acetonitril (B)	DAD (204 nm)	+	Aucubin, Catalpol	-
[107]	C18	Acetonitril-Wasser-Ameisensäure-Gemisch (5 : 95 : 0,1, v/v/v)	UV (210 nm), MS	-	Aucubin, Catalpol	-
[105]	C18	Wasser mit 0,5% Phosphorsäure (A), Acetonitril (B)	PDA (254 nm)	-	+	-
[18]	C18	Wasser (A), Acetonitril (B)	DAD (204 nm)	-	Aucubin, Catalpol	+
[18]		Wasser (A), Methanol (B)	DAD (330 nm)	-	+	Verbascosid
[104]	C18	Wasser mit 0,5% Ammoniumacetat (A), Acetonitril (B)	DAD, MS	-	Asperulosid	-

Tabelle 1.13: Übersicht der in der Literatur beschriebenen HPLC-Systeme zur Analytik von IGs und PEs. Angegeben sind die verwendeten stationären und mobilen Phasen sowie Detektion. Weiter wird gekennzeichnet, ob die Untersuchungen an *P. lanceolata* vorgenommen wurden sowie ob bzw. welche relevanten IGs und gegebenenfalls auch PEs untersucht wurden. Positive Ergebnisse werden mit einem „+“, negative mit einem „-“-Zeichen dargestellt.

Literatur	stationäre Phase	mobile Phase	Detektion	<i>P. lanceolata</i>	IGs	PEs
[99]	C18	Wasser (A), Methanol (B)	PDA, MS	-	+	-
[126]	C18	Wasser (A), Acetonitril (B)	PDA, MS	-	+	-
[127]	C18	Wasser mit 0,1% Ameisensäure (A), Acetonitril (B)	MS	-	+	-
[81]	Carbopac PA1 (=Ionenaustauschsäule)	Natronlauge-Wasser-Gemisch	UV	+	Aucubin, Catalpol	-
[101]	HILIC	Acetonitril (A), Wasser (B)	UV (208 nm), MS	-	Aucubin, Catalpol	-
[117]	HILIC	Acetonitril mit 2% THF (isokratisch)	UV (233 nm)	-	Asperulosid, Deacetylasperulosidsäuremethylester	-
[103]	HILIC	Wasser mit 1% Essigsäure und 20 µM Natriumacetat (A), Acetonitril (B)	UV (208 nm), MS	+	Aucubin	-

Abschließend ist festzuhalten, dass bis *dato* weder eine HPLC-Fingerprintmethode zur IG- noch zur PE-Analytik für *P. lanceolata* existiert. Untersuchungen der IGs in *P. lanceolata* aus der Literatur beschränken sich auf die beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol [29, 81, 103]. Dies ist vermutlich auch der deutlich höheren Konzentration dieser beiden im Vergleich zu den anderen IGs in der besagten Pflanze geschuldet, wie in Kapitel 3 bzw. 3.3.1 begründet und in den dort präsentierten Abbildungen 3.5 und 3.6 veranschaulicht. Folglich stellt die Suche nach einer HPLC-Fingerprintmethode zur Analytik der bioaktiven Stoffgruppen IGs und PEs des Spitzwegerichs Neuland dar und ist darüber hinaus eine äußerst komplexe analytische Herausforderung.

Kapitel 2

Zielsetzung

Im Fokus der Arbeit lag die qualitative sowie quantitative Analytik der prominentesten IGs und PEs des Spitzwegerichs. Für ausgewählte Vertreter beider Stoffgruppen sollte erstmalig eine simultane Fingerprintmethode per (HP)TLC bzw. HPLC-DAD entwickelt werden. Neben der im Vordergrund stehenden Analyse der Frischpflanze, sollte die Methode auch in der qualitätssichernden Routineanalytik anderweitiger Spitzwegerichzubereitungen mit abweichenden Matrices verwendet werden können. Aufgrund der anspruchsvolleren Analytik der chromophorarmen IGs im Vergleich zu den chromophoreichen PEs richtete sich hierbei das Hauptaugenmerk auf die Analytik der IGs. Bereits beschriebene Analysemethoden sollten auf ihre Eignung zur Fingerprintanalytik getestet, weiterentwickelt und die optimierte Methode validiert werden.

Im Zentrum stand darüber hinaus die Analyse der Hauptkomponenten der IGs (Aucubin und Catalpol) und PEs (Verbascosid) in den frischen Blättern von *P. lanceolata* in Abhängigkeit der Blütezeit dreier aufeinander folgender Jahre zur Festlegung eines idealen Erntezeitpunkts. In diesem Kontext sollten bereits postulierte saisonale Verläufe dieser Verbindungen des Spitzwegerichs überprüft werden. Zur Analyse des frischen Pflanzenmaterials sollte außerdem der Wassergehalt des FP-Materials bestimmt und bei der Gehaltskalkulation berücksichtigt werden. Wie interne Versuche im Verlauf dieser Promotion zeigten, übte dieser einen wesentlichen Einfluss auf die Quantifizierung der Inhaltsstoffe aus.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, das in der Literatur postulierte IG- und PE-Muster von *P. lanceolata* auf seine Genuinität hin zu kontrollieren, wobei sich auf die prominentesten Vertreter beider Stoffgruppen beschränkt wurde. Dabei galt es vor allem, potentielle Methoxyartefakte zu identifizieren.

Überdies sollten Aucubin und Catalpol für weitere, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuche in entsprechender Reinheit aus der Pflanze isoliert werden.

Kapitel 3

Isolierung der Haupttiridoidglykoside aus *P. lanceolata*

3.1 Hintergrund und Motivation

Ein Ziel der Arbeit war es, die in *P. lanceolata* enthaltenen Haupttiridoidglykoside Aucubin und Catalpol zu isolieren. Zeitgleich galt es, das genuine Vorkommen der sechs populärsten für *P. lanceolata* postulierten IGs Aucubin, Catalpol, Globularin, Verbenalin, Asperulosid und Deacetylasperulosidsäuremethylester (Kapitel 1.1.2.2) zu überprüfen, welche nachfolgend zum Teil auch als „alle“ IGs der Pflanze bezeichnet werden. Dabei standen speziell die zwei methoxylierten IGs Verbenalin und Deasperulosidsäuremethylester im Zentrum. Da die beiden Fragestellungen bezüglich Isolierung und Genuinität miteinander verknüpft zu beantworten sind, wurde bei dem Extraktions- und Isolierungsvorgehen der Haupttiridoidglykoside konsequent auf Methanol verzichtet, das potentiell Methoxyartefakten erzeugen kann [90]. Diese Entscheidung erschwerte den Prozess, die Isolate zu gewinnen, denn Methanol stellt aufgrund seiner Polarität ein ideales Extraktionsmittel für die relativ polaren IGs dar und wird in vielen Fällen zur Gewinnung von IGs aus *P. lanceolata* verwendet (Kapitel 1.3). Aktuell existieren keine geeigneten, methanolfreien Methoden zur Isolierung von IGs aus *P. lanceolata* (Kapitel 1.3). Polaritätsnahe Alternativen wie Wasser [24, 31], Ethanol [37, 92], Wasser-Ethanol-Gemische [27] oder Butanol [91] werden in der Literatur beschrieben. Diese Methoden mussten zur Beantwortung der vorliegenden Problemstellung jedoch modifiziert werden. Ein weiterer Grund für die Anpassung der Methoden war, dass die in der Literatur untersuchten IGs im Allgemeinen unpolarer sind als die in dieser Arbeit behandelten und daher *per se* über eine höhere Affinität zu Ethanol verfügen als die hier in dieser Arbeit relevanten, relativ polaren IGs.

Um anderweitige Reaktionen, die genuine Verbindungen verändern können, wie Oxi-

dationsprozesse, zu unterbinden, wurde neben dem Verzicht auf Methanol zusätzlich darauf geachtet, bestmöglichst unter Ausschluss von Luftsauerstoff und Licht, insbesondere Sonnenlicht, zu arbeiten. Verstärktes Augenmerk lag auf der Einhaltung eines neutralen pH-Bereiches, da insbesondere für saure Milieus in der Literatur eine sofortige, irreversible Polymerisierungsreaktionen für Aucubin und Catalpol nach Abspaltung der Zuckereinheit berichtet werden [26, 36]. Ursächlich dafür ist vermutlich die hohe Reaktivität der infolge von sauren Hydrolysereaktionen freigesetzten Aglyka der genannten IGs untereinander [36].

3.2 Strategie

Das strategische Vorgehen beruhte auf dem Hintereinanderschalten möglichst vieler verschiedener Trennprinzipien. Das Ziel dabei war die maximale Anreicherung der erwünschten und maximale Abreicherung der unerwünschten Substanzen zur schnellen Gewinnung der Reinisolate. Fraktionskontrollen fanden DC-geleitet statt. Aus Ermangelung einer optimalen, für IGs spezifischen und selektiven Anfärbungsmöglichkeit sowie eines ausreichend guten DC-Fließmittel-Systems für *P. lanceolata* in der Literatur wurde parallel zur Isolierung an einer Optimierung dieser beiden Parameter gearbeitet. Die verwendeten DC-Fließmittel-Methoden sowie Derivatisierungen variierten deshalb im Verlauf des Isolierungsprozesses. Im Zuge dessen weichen auch die R_f -Werte der Inhaltsstoffe ab, verstärkt durch unkontrollierbare Außenparameter wie Temperaturschwankungen und Luftfeuchtigkeit. Zur Identifizierung der Aucubin- und Catalpolbande wurden deshalb Referenzlösungen auf der DC mitgeführt. Die Bande auf Höhe des Aucubins im Extrakt war deutlich stärker sichtbar als die des Catalpols. Deshalb wurde rasch auf das Mitführen von Catalpol verzichtet. Bestärkt wurde dieser Entschluss durch das nahe Zusammenliegen beider Banden. Die beiden Verbindungen zeigen eine sehr hohe Strukturähnlichkeit mit einzigem Unterschied in der Epoxidgruppe (Catalpol) bzw. Doppelbindung (Aucubin) zwischen C7 und C8. Damit haben sie auch eine sehr ähnliche Polarität und verhalten sich chemisch sehr ähnlich. Folglich wurde unter der Prämisse gearbeitet, dass aucubinhaltige Fraktionen zwangsläufig auch Catalpol beinhalten. Im späteren Verlauf wurde auch auf das Mitführen des Aucubins verzichtet, da es ausreichend gut anhand seiner Färbung und Lage im DC und der intensiven Färbung in den entsprechenden Fraktionen identifizierbar war. Die Isolierung der IGs aus *P. lanceolata* wurde schlussendlich nach folgendem Schema durchgeführt (Abbildung 3.1).

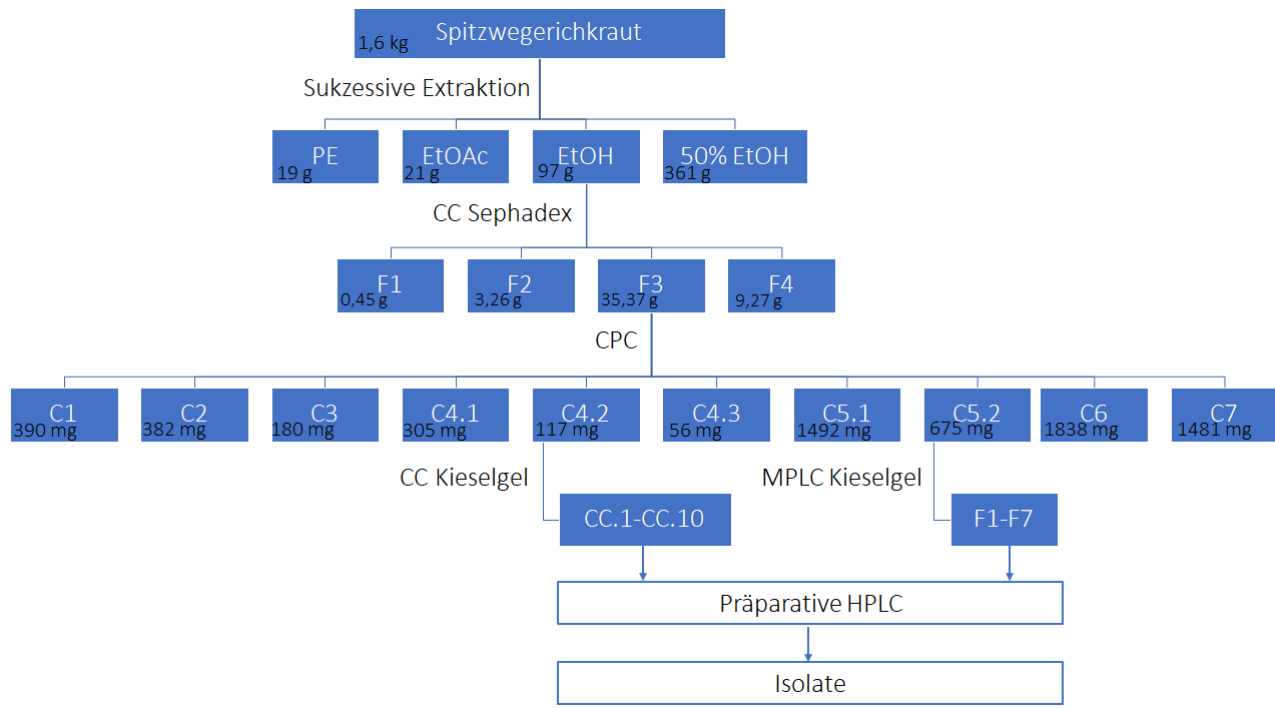


Abbildung 3.1: Schema der Isolierung von Aucubin und Catalpol aus *P. lanceolata*. Angegeben sind die eingesetzte Drogenmenge an Spitzwegerichkraut sowie die erhaltenen Mengen an Fraktionen im Extraktions- und Isolierungsprozess. Dabei wurden die Extrakte mittels Petrolether (PE), Ethylacetat (EtOAc), Ethanol (EtOH), 50%-iger Ethanol (50% EtOH) nach sukzessiver Extraktion des Pflanzenmaterials gewonnen, die Fraktionen F1-4 nach CC an Sephadexmaterial (CC Sephadex), die Fraktionen C1-7 nach CPC, die Fraktionen CC.1-10 nach CC an Kieselgel (CC Kieselgel), die Fraktionen F1-F7 nach MPLC an Kieselgel sowie alle Isolate wurden nach präparativer HPLC-Aufarbeitung erhalten.

3.3 Ergebnis und Diskussion

3.3.1 Extraktion und Isolierung

Als initialer Schritt wurde das vorbereitete Drogenmaterial 2 (Kapitel 10.5) einer sukzessiven elutropen Extraktion unterzogen (Kapitel 3.5.7). Knapp 1,6 kg präpariertes Drogenmaterial wurden dazu nacheinander mit vier Extraktionsmitteln steigender Polarität behandelt: Petrolether, Ethylacetat, Ethanol und 50%-igem Ethanol. Primäres Ziel war das Herauslösen der relativ polaren IGs durch polare Lösungsmittel. Mithilfe des unpolaren Petrolethers und mittelpolaren Ethylacetats als Extraktionsmittel sollten die IGs von unpolaren Nebenkomponenten abgetrennt und in einem der ethanolhaltigen Extrakte konzentriert werden. Das höchste Aufkommen an Aucubin und Catalol befand sich im Ethanolextrakt, gefolgt von 50%-igem Ethanolextrakt, erkennbar an den mitgeführten Referenzen. Für Aucubin mit R_f 0,44 waren unter VIS braune Banden (B) bzw. blaue Banden (C) sowie unter 366 nm dunkle Banden (B) eindeutig sichtbar. Catalpol mit R_f 0,39 konnte anhand der braunen Bande (VIS, B) bzw. heller Fluoreszenz (366 nm, B) eindeutig im DC identifiziert werden (Abbildung 3.2).

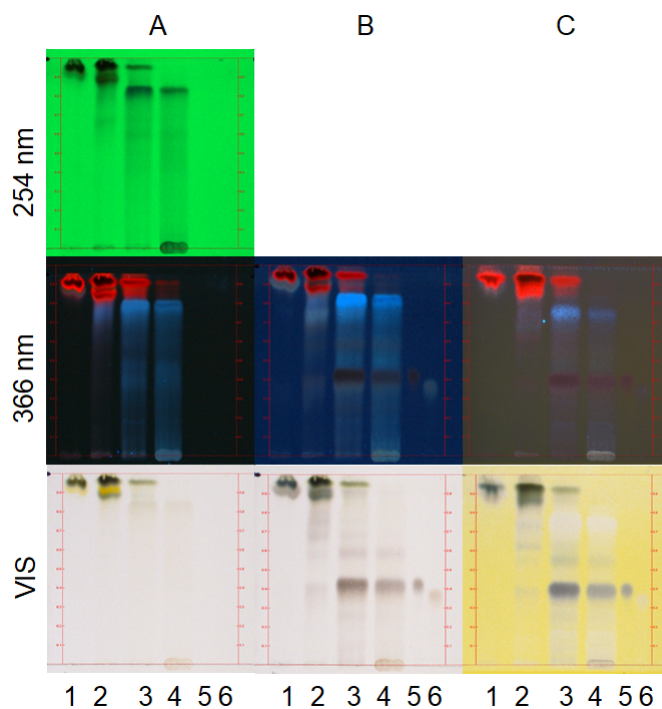


Abbildung 3.2: Übersichts-DC der sukzessiven Extraktion. Detektion von oben nach unten: 254 nm, 366 nm und Tageslicht (VIS), Derivatisierung von links nach rechts: underivatisiert (A), Vanillin-HCl 1 (B) und Ehrlich-Reagenz (C) je 15 min bei 120°C, Auftragung von links nach rechts: gewonnene Extrakte aus Petrolether (1), Ethylacetat (2), Ethanol (3) und 50%-igem Ethanol (4, je 50 µg) sowie die Referenzsubstanzen Aucubin (5, 2 µg, R_f 0,44) und Catalpol (6, 2 µg, R_f 0,38), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: FM-System 1.

Chlorophyll war in allen Extrakten mit Ausnahme des 50%-igem Ethanolextraktes nachweisbar, erkennbar an der grünen (VIS) bzw. rot fluoreszierenden Bande (366 nm) auf Höhe der Fließmittelfront. Auch vorhandenes Verbascosid (hellblaue Fluoreszenz bei R_f 0,83, 366 nm, A, B, C bzw. Fluoreszenzlöschung unter 254 nm) konnte nicht vollständig von den gesuchten IGs, die vor allem in F3 vorzufinden waren, separiert werden. Trotz des Vorhandenseins unpolarer Verbindungen wurde der Ethanolextrakt weiter aufkonzentriert, da dort die höchste IG-Menge zu finden war. Im ersten Anreicherungsschritt wurde der aucubin- und catalpolhaltige Ethanolextrakt einer offenen Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 Material unterzogen (Kapitel 3.5.8). In dieser Methode wurde das Zusammenwirken zweier Trennstrategien genutzt: Größenausschluss und Adsorption. Da es eine große Menge an Extrakt aufzutrennen galt, wurde sich für die Überladung der Säule entschieden. Als Elutionsmittel diente 70%-iger Ethanol. Diese Bedingungen haben bereits in vorhergehenden arbeitskreisinternen Versuchen zu einer effektiven Vortrennung großer Mengen diverser Extrakte geführt. Ein Teil dieses Extraktes (53,2 g von 97,2 g) konnte dabei erfolgreich in vier Fraktionen (F1-F4) separiert werden (Abbildung 3.3).

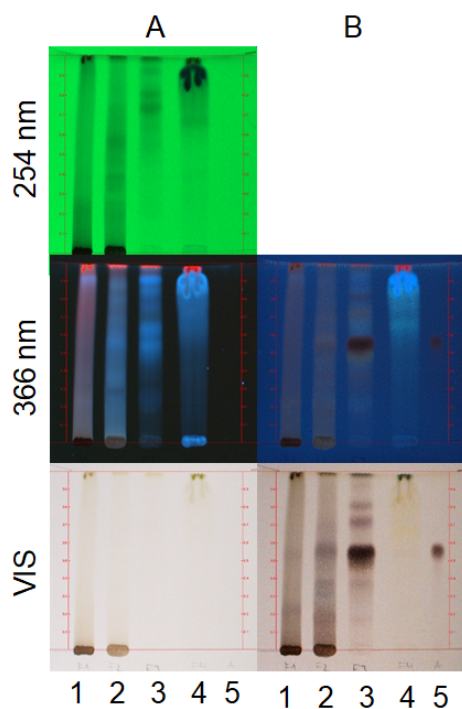


Abbildung 3.3: Übersicht-DC der Fraktionierung des ethanolischen Extraktes über eine offene Sephadexsäule. Detektion von oben nach unten: 254 nm, 366 nm und Tageslicht (VIS), Derivatisierung von links nach rechts: underivatisiert (A), Vanillin-HCl 1 für 4 min bei 120°C (B), Auftragung von links nach rechts: F1-F4 (1-4, je 0,30 mg) sowie die Referenzsubstanz Aucubin (5, 2 µg, R_f 0,58), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: FM-1.

Hohe Konzentrationen an Aucubin und Catalpol enthielt vor allem Fraktion F3, gefolgt von F2, erkennbar an der intensiv braun gefärbten Bande mit R_f 0,58. Im Gegensatz zu den anderen drei Fraktionen konnten in F3 zwei weitere stark braun gefärbte Banden bei R_f 0,74 und 0,80 (VIS, B) sichtbar gemacht werden. Aufgrund der braunen Färbung könnte es sich hierbei um weitere IGs handeln. Hervorzuheben ist außerdem, dass durch diesen Separationsschritt die IGs mit Erfolg vom Hauptphenylethanoid Verbascosid abgetrennt werden konnten. Dieses befand sich fast ausschließlich in Fraktion F4 als hellblau fluoreszierende Zone mit R_f 0,90 unter 366 nm in A und B bzw. schwarze Fluoreszenzlösung bei 254 nm in A. Außerdem fand eine klare Abtrennung von nicht bekannten, auf der Startlinie verbleibenden Substanzen statt. Diese waren lediglich in F1 und F2 enthalten. In allen vier Fraktionen konnte jedoch weiterhin Chlorophyll detektiert werden. Weiter aufkonzentriert wurde letztendlich die IG-reiche Fraktion F3 (35,4 g). Ein Teil von F3 wurde im nächsten Anreicherungsschritt einer zentrifugalen Verteilungschromatographie (CPC, Kapitel 3.5.9) unterzogen. Dieses Verfahren erzielte in Vorversuchen vielversprechende Ergebnisse und setzte sich damit gegenüber der Alternative Mitteldrucksäulenchromatographie (MPLC) durch, die weder im Normal- noch im Umkehrphasensystem eine passable Separation ergab (Ergebnisse nicht dargestellt). Weiter galt es, eine relativ große Menge der Fraktion F3 zu separieren (8,63 g). Pro Durchlauf konnte bis zu 2,0 g Beladungsmenge erfolgreich chromatographiert werden. Die im ersten Durchgang erzielten sieben Fraktionen C1-C7 konnten in weiteren Läufen auf insgesamt zehn ergänzt werden. Fraktion C4 differenzierte sich dabei weiter in die Fraktionen C4.1, C4.2 und C4.3; C5 in C5.1 und C5.2 aus. Zum besseren Vergleich der erhaltenen Einzelfraktionen C1-C7 zur Ausgangssituation wurde die Mutterfraktion F3 im Übersichts-DC mitgeführt. Dies erübrigte auch das Mitführen der Referenzsubstanzen. Um Verunreinigungen in den aucubin-/catalpolreichen Fraktionen C5.1 und C5.2 erkennen zu können, musste eine genügend hohe Menge an Fraktion aufgetragen werden. Dies führte jeweils zu einer Überladung der stationären Phase und somit zu einer Bandenverbreiterung besagter IGs. Es wurden diverse Derivatisierungsreagenzien angewendet, um falsch-positiven sowie falsch-negativen Ergebnissen vorzubeugen. Hierbei kamen Anisaldehyd-Schwefelsäure und Vanillin-HCl 2-Reagenz sowie konz. HCl zum Einsatz. Zudem wurden jeweils alle Detektionsmodi (254 nm, 366 nm und VIS) analysiert. Davon werden hier der Übersichtlichkeit halber lediglich drei der aussagekräftigsten Chromatogramme präsentiert (Abbildung 3.4).

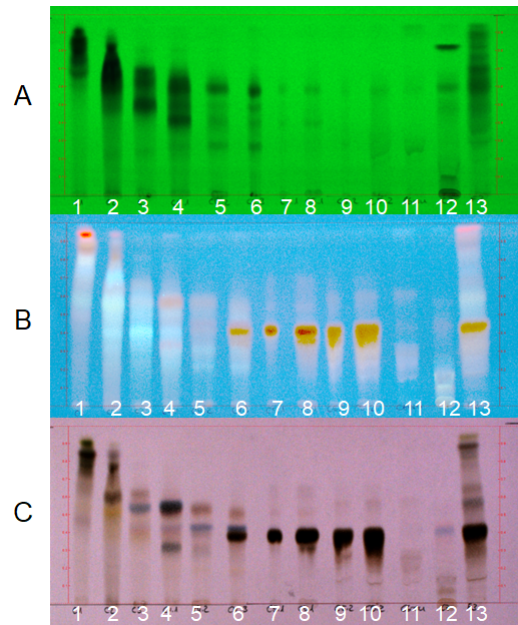


Abbildung 3.4: Übersicht-DC der CPC-Fraktionierung bei verwendetem Drei-Komponenten-Zwei-Phasen-System Ethylacetat/Ethanol/Wasser (2:1:2, v/v/v). Derivatisierung und Detektion von oben nach unten: underivatisiert, 254 nm (A), Vanillin-HCl 2, 366 nm (B) und konz. HCl, VIS (C) für 5-10 min bei 115-120°C, Auftragung von links nach rechts: Fraktionen C1-C7 (1-12) sowie die Mutterfraktion F3 (13), Auftragemenge: 1: 25 µg C1, 2: 25 µg C2, 3: 50 µg C3, 4: 50 µg C4.1, 5: 50 µg C4.2, 6: 15 µg C4.3, 7: 5 µg C5.1, 8: 25 µg C5.1, 9: 5 µg C5.2, 10: 25 µg C5.2, 11: 25 µg C6, 12: 25 µg C7, 13: 50 µg F3, stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: FM-System 2.

Aucubin/Catalpol konnte ausreichend gut bei R_f 0,42 (gemeinsamer R_f -Wert, da nicht eindeutig trennbar) im Fingerprint der Mutterfraktion identifiziert werden. Das Vorkommen der IGs konnte mit zunehmender Menge in den Fraktionen C4.3, C5.1 und C5.2 registriert werden, erkennbar an der zunehmend stark braun gefärbten Bande (B, C). Demnach wurde Fraktion C5.2 zur weiteren Aufkonzentrierung favorisiert. Neben der Identifizierung und semi-quantitativen Einstufung des Aucubingehalts, galt es Verunreinigungen qualitativ und semi-quantitativ abschätzen zu können. Dies half bei der Entscheidung über die nachfolgende Aufreinigungsmethode. Zusätzliche Banden in allen drei aucubin-/catalpolhaltigen Extrakten konnten ober- und unterhalb der Aucubin-/Catalpolzone deutlich ausfindig gemacht werden (A, B, C). Speziell auf der underivatisierten DC konnte überprüft werden, ob auch Substanzen enthalten waren, die das gleiche chemische Verhalten bei der DC zeigen, wie Aucubin und Catalpol. Auf der verwendeten Kieselgelplatte ist keines der Hauptiridooidglykoside detektierbar. Dies bedeutete im Umkehrschluss: waren in aucubin-/catalpolhaltigen Extrakten, Zonen auf Höhe der besagten IGs im underivatisierten Zustand sichtbar, lagen höchstwahrscheinlich polaritätsähnliche Verunreinigungen im entsprechenden Extrakt vor. Dies konnte sowohl bei Fraktion C4.3 als auch bei Fraktion C5.1 festgestellt werden (A). Aus diesem Grund wurde die reinere Fraktion C5.2 zur weiteren Anreicherung der gewünschten IGs herangezogen. Auch in den anderen, nicht dargestellten Chromatogrammen konnten Verunreinigungen

detektiert werden. Diese entsprachen weitgehend den bereits aufgeführten Ergebnissen. Daraus lässt sich schließen, dass ein zusätzlicher Vorreinigungsschritt der präferierten Fraktion C5.2 vor der finalen Substanzisolierung sinnvoll ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Fraktion C5.2 sowohl die größte Menge an Aucubin und Catalpol als auch die geringste Menge an DC-nachweisbaren Verunreinigungen enthielt, weswegen die beiden Hauptiridoidglykoside nach einem weiteren Aufreinigungsschritt aus dieser Fraktion isoliert wurden. Dazu wurde eine MPLC an polarer Kieselgelphase durchgeführt (Kapitel 3.5.10). Unpolare stationäre Phasen (C18, C8) ergaben hierbei stets schlechtere Resultate (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Wahl der mobilen Phase gestaltete sich schwieriger. Zum einen, da auf gut geeignetes Methanol verzichtet werden sollte. Zum anderen, da polaritätsähnliche Gemische mit Wasserbasis auf Kieselgel nicht angewendet werden können. Aus diesem Grund musste auf weniger polare Lösungsmittel wie Ethanol und Ethylacetat als Bestandteile der mobilen Phase zurückgegriffen werden. Dies führte zu einer suboptimalen chromatographischen Trennung der sieben resultierenden Fraktionen C5.2.F1-C5.2.F7 (Abbildung 3.5).

Besonders hohe Mengen an Aucubin/Catalpol (gemeinsamer R_f -Wert bei 0,42) wiesen dabei C5.2.F2-F5 auf, ersichtlich an der braunen Bande bei 366 nm und VIS (B, C). Weiter konnten mehrere Nebenkomponten in allen Fraktionen detektiert werden zu sehen in allen derivatisierten Chromatogrammen und allen Detektionsmodi (254 nm, 366 nm und VIS, B-E). Die im vorhergehenden Schritt der CPC bereits sichtbare Diskrepanz zwischen den Hauptiridoidglykosiden und diversen Nebenkomponten wurde nach der MPLC noch stärker sichtbar. Dies war erkennbar durch die noch massivere Bandenverbreiterung in dem Übersichts-DC der MPLC. Die extreme Überladung der stationären DC-Phase bei den Fraktionen C5.2.F2-C5.2.F5 machte das Chromatogramm sehr unübersichtlich. Mit einem Faktor von 10^{-3} wurden deutlich geringere Konzentrationen aufgetragen, mit dem Ergebnis, dass sich für Aucubin und Catalpol nun klar definierte Zonen abzeichnen (Abbildung 3.6).

Unter Tageslicht ergeben beide Hauptiridoidglykoside eine braune Zone bei R_f 0,45 und sind nicht voneinander differenzierbar (B). Dagegen ermöglichte die Detektion bei 366 nm durch die deutlich geringere Dosierung der Substanzen eine visuelle Unterscheidung der beiden Hauptiridoidglykoside. Aucubin (R_f 0,45) ist als dunkle Zone zu erkennen, wohingegen Catalpol (R_f 0,44) eine blau fluoreszierende Zone aufweist (A).

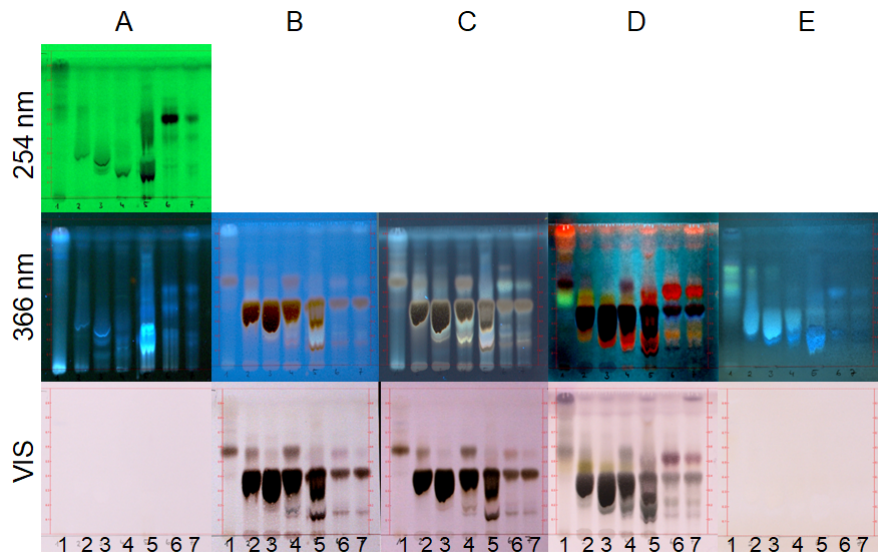


Abbildung 3.5: Übersicht-DC der MPLC-Fraktionierung 1 an Kieselgel als stationärer und einem Ethylacetat-Ethanol-Gradienten als mobiler Phase. Detektion von oben nach unten: 254 nm, 366 nm und Tageslicht (VIS), Derivatisierung von links nach rechts: underivatisiert (A) sowie Vanillin-HCl-2 (B), HCl konz. (C), Anisaldehyd-Schwefelsäure (D), Naturstoffreagenz/Macrogol (E) bei 2-5 min und 120°C, Auftragung von links nach rechts: Fraktionen C5.2.F1-C5.2.F7 (1-7, je 10 µg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: FM-System 2.

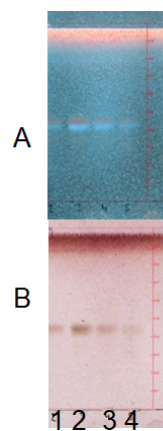


Abbildung 3.6: Übersicht-DC der MPLC-Fraktionierung 2 an Kieselgel als stationärer und einem Ethylacetat-Ethanol-Gradienten als mobiler Phase. Detektion von oben nach unten: 366 nm (A) und VIS (B), Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz für 2-5 min bei 120°C, Auftragung von links nach rechts: Fraktionen C5.2.F2-C5.2.F5 (1-4, je 0,01 µg) stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: FM-System 2.

Obwohl die Detektionsempfindlichkeit bei 366 nm höher als bei Tageslicht ist, konnten hierbei keine der bei Überladung sichtbaren Verunreinigungen mehr auf der DC erkannt werden und die Haupttiridoidglykoside erfolgreich zur finalen Reindarstellung angereichert worden sind.

Die Isolierung der Reinsubstanzen erfolgte *via* präparativer HPLC-DAD an einer polaren Diolsäule. Die Methoden wurden an die jeweiligen Bedingungen angepasst (Kapitel 3.5.12). Es wurden alle durch die MPLC erhaltenen Fraktionen C5.2.F1-F7 aufgearbeitet, wobei die Fraktionen C5.2.F2 und C5.2.F3, C5.2.F4 und C5.2.F5 sowie C5.2.F6 und C5.2.F7 aufgrund ihrer Ähnlichkeit vereinigt wurden, um die Aufarbeitung zu beschleunigen. Das stationäre Diolmaterial setzte sich in Vorversuchen an der analytischen HPLC gegenüber einer unpolaren C18 Phase durch. Wie oben ausführlich erläutert, war ein Säurezusatz im Fließmittelsystem zu vermeiden. Der an die HPLC gekoppelte, auf UV/VIS-Absorption basierende DAD beschränkte die Auswahl an einsetzbaren Lösungsmitteln. Die IGs von Interesse besitzen im vorliegenden Fließmittelsystem ein UV-Maximum unter 200 nm. Deshalb kamen als Fließmittelkomponenten nur Wasser und Acetonitril in Frage. Die Gewinnung der beiden Hauptiridoidglykoside ist in Abbildung 3.7 mit einem exemplarischen Trennungslauf wiedergegeben.

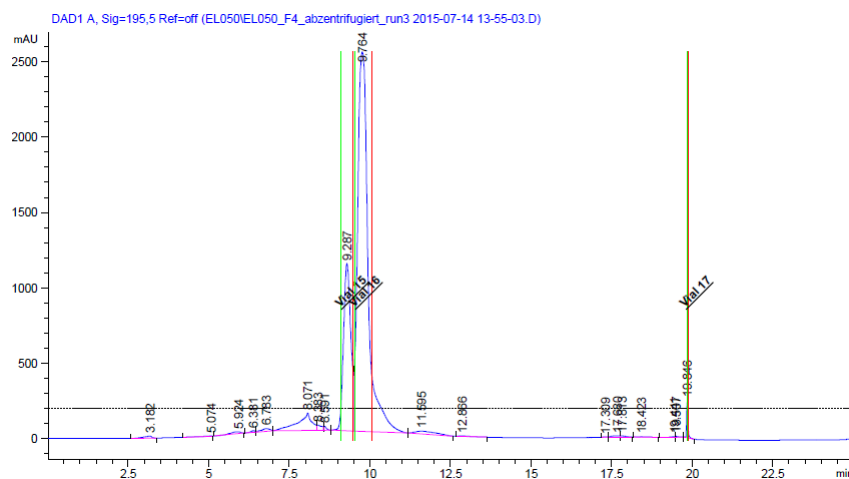


Abbildung 3.7: Exemplarische Darstellung eines präparativen HPLC-Chromatogramms. Gerät: präparative HPLC-DAD, stationäre Phase: Diolsäule, mobile Phase: Gradient aus Acetonitril und Wasser. Details in Kapitel 3.5.12.

Die beiden großen, sich überlappenden Peaks in der Mitte des Chromatogramms können den beiden Hauptiridoidglykosiden Catalpol ($t_R=9,3$ min) und Aucubin ($t_R=9,8$ min) zugeordnet werden. Ihre suboptimale Trennung wird auf ihre hohe Strukturähnlichkeit zurückgeführt. Dabei ist ersichtlich, wie komplex die Trennung der beiden fast identischen Verbindungen ist.

Insgesamt konnten 169,7 mg Aucubin und 48,7 mg Catalpol sowie geringe Mengen (unter 2 mg) sechs unbekannter Substanzen (P1-P6) erfolgreich isoliert werden. Im nachfolgenden Kapitel 3.3.2 wird die Identitäts- sowie Reinheitsbestimmung der Isolate beschrieben.

3.3.2 Identität und Reinheit der Isolate

Die Identität und Reinheit der in Kapitel 3.3.1 erhaltenen Isolate sollte bestimmt werden. Als identitätsbestimmende Analysen kamen NMR-spektroskopische Methoden und LC-MS-Analysen zum Einsatz. Zur NMR-spektroskopischen Vermessung der beiden Haupttiridoidglykoside wurde Methanol- d_4 verwendet. In der Literatur werden neben deuteriertem Methanol für Aucubin [94] und Catalpolderivate [95] auch andere Lösungsmittel zu NMR-spektroskopischen Analysen herangezogen, wie beispielsweise D_2O [96] und $DMSO-d_6$ [97] für Aucubin oder Pyridin- d_5 für Catalpolderivate [112]. Die Verwendung dieser alternativen Lösungsmittel erübrigte sich jedoch, da die Substanzen eindeutig NMR-spektroskopisch in Methanol- d_4 identifiziert werden konnten. Das potentiell artefaktbildende Lösungsmittel Methanol war in diesem Schritt ohne Bedenken anwendbar, da die bekannten Strukturen der beiden IGs keine Methoxyeinheiten besaßen und somit keine etwaigen Methoxyartefakte darstellen konnten.

Die Reinheit wurde mittels HPLC-DAD bestimmt. Für Aucubin wurden weitere Reinheitsbestimmungen vorgenommen, da es zu Quantifizierungszwecken in späteren Analysen als Referenzsubstanz eingesetzt wurde. Daten aus DCs, Retentionszeiten- und UV-Spektrenabgleich ergänzen sowohl Identitäts- als auch Reinheitsmessungen.

3.3.2.1 Aucubin

NMR-Daten aus 1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, COSY, NOESY (Kapitel 3.5.14) wurden in Methanol- d_4 aufgenommen. Tabelle 3.1 fasst die gemessenen NMR-Daten zusammen.

Im Aglykon konnten alle Positionen eindeutig zugeordnet werden. Im Zuckerrest war dies bei zwei Kohlenstoffen nicht zweifelsfrei möglich. Positionen 4' und 5' sind folglich gegenseitig austauschbar. Aufgrund von Signalüberlappungen der 1H -Protonen an C-4' und C-5' können ihre Multiplizitäten und damit auch ihre zugehörige Kopplungskonstanten im glukosid nicht genau definiert werden.

Der Abgleich mit NMR-Daten aus der Literatur bestätigt die zu den Positionen zugeordneten Signale und damit die Identität des isolierten Aucubins. Die von Ersöz et al. [94] veröffentlichten NMR-Daten in Methanol- d_4 sind fast identisch und enthalten um 0,04 ppm höhere 1H -Signale. Die Tieffeldverschiebungen der ^{13}C -Kerne stimmen exakt mit denen von Ersöz et al. [94] überein. Eine maximale Abweichung von $\pm 0,1$ ppm δ_C (entspricht etwa 0,1%) ist dabei so gering, dass sie vernachlässigt werden kann. Kontrovers ist jedoch die Zuordnung der ^{13}C -Signale der beiden einzigen CH_2 -Gruppen im Molekül. Bei Ersöz et al. [94] werden diese vertauscht im Gegensatz zu den hier erhobenen NMR-Daten.

Tabelle 3.1: NMR-spektroskopische Daten des isolierten Aucubins, vermessen in Methanol-d₄ bei RT an einem AVANCE III 600 Kryo NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI Cryoprobe bei 600,25 MHz (¹H-NMR) bzw. 150,95 MHz (¹³C-NMR). Angegeben sind die Positionen inklusive Typ, Kohlenstoff- (δ_C)- und Wasserstoffprotonenverschiebungen (δ_H), Multiplizitäten (mult) sowie Kopplungskonstanten (J [Hz]). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Signale bzw. Positionen überlappen bzw. sind miteinander austauschbar.

Molekülteil	Pos.	Typ	δ_C [ppm]	δ_H [ppm] mult (J [Hz])
Aglykon	1	-CH	97,7	4,94 1H, dubl (7,1)
	2	-O-	-	-
	3	-CH=	141,6	6,30 1H, dd (6,1/2,0)
	4	-CH=	105,7	5,08 1H, dd (6,1/3,9)
	5	-CH	46,3	2,64 1H, multi (-)
	6	-CH	82,9	4,43 1H, multi (-)
	7	-CH=	130,3	5,75 1H, br.sg. (-)
	8	qC	148,0	–
	9	-CH	47,9	2,88 1H, tr (7,4)
	10a	-CH ₂	61,4	4,16 1H, dubl (15,5)
10b		61,4	4,34 1H, dubl (15,3)	
Glucosyl	1'	-CH	99,9	4,67 1H, dubl (7,9)
	2'	-CH	74,9	3,21 1H, dd (8,0/9,1)
	3'	-CH	77,9	3,36 1H, dd (8,8)
	4'	-CH	71,6 ^a	3,26 1H, m (-) ^b
	5'	-CH	78,3 ^a	3,27 1H, m (-) ^b
	6'a	-CH ₂	62,7	3,64 1H, dd (12,0/5,4)
	6'b		62,7	3,85 1H, dubl (4,6)

^a Signale sind miteinander austauschbar

^b Signale überlappen

Kohlenstoff 10, der in α -Stellung zu einer Doppelbindung sowie in direkt Bindung mit einer OH-Gruppe steht, wurde bei Ersöz et al. [94] bei 62,7 ppm, in dieser Arbeit bei 61,4 ppm detektiert. C-6' hingegen, der ebenfalls direkt an eine OH-Gruppe bindet, zusätzlich aber in β -Stellung zu einem heterozyklischen Sauerstoff lokalisiert ist, wird bei Ersöz et al. [94] bei 62,7 ppm δ_C , in der vorliegenden Arbeit bei 61,4 ppm detektiert. Anhand der in dieser Arbeit gemessenen HMBC-Daten kann die Verknüpfung zwischen den Kohlenstoffen für alle Positionen, also auch für C10 und C6', einwandfrei bestimmt werden. Auch bei Anwendung anderer Lösungsmittel wie z.B. DMSO-d₆ [97] oder D₂O [96] ist die chemische Verschiebung des Kohlenstoffs im Aglykon in Pos. 10 stärker als die von C6' im glukosid.

Eine fast identische Tieffeldverschiebung der ¹³C-Kerne der hier ermittelten Werte kann auch für Catalpol beobachtet werden (Kapitel 3.3.2.2) und ist im Einklang mit den NMR-

Daten diverser IG-Derivate in der einschlägigen Literatur [95, 112].

Zur Überprüfung der Identität fanden zusätzlich LC-ESI-MS Analysen Anwendung (Kapitel 3.5.15). Dabei konnten folgende charakteristische Ionensignale detektiert werden: $[M-H]^-$ bei m/z 345, $[M+HCOO]^-$ bei m/z 391 und $[2M-H]^-$ bei m/z 691. Die ersten beiden detektierten Ionenmoleküle inklusive der zugehörigen Masse-/Ladungsverhältnissen stimmen exakt mit denen überein, die Sertic et al. [107] für Aucubin erhielten. Identität und Reinheit des isolierten Aucubins wurden zudem per DC überprüft (Abbildung 3.8).

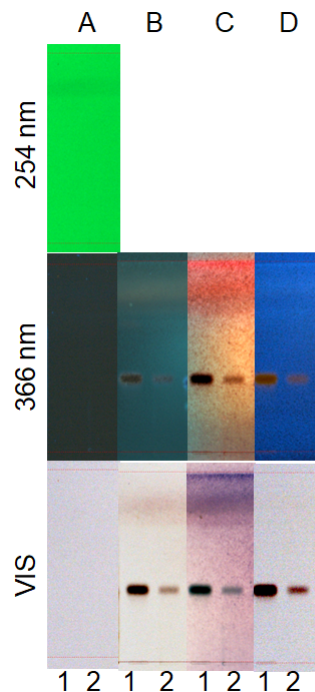


Abbildung 3.8: DC zur Prüfung der Identität und Reinheit des isolierten Aucubins. Detektion von oben nach unten: 254 nm, 366 nm und Tageslicht, Derivatisierung von links nach rechts: underivatisiert (A) sowie Anisaldehyd-Schwefelsäure für 2 min (B) bzw. 30 min (C) und Vanillin-HCl 2 für 3 min (D) bei 120 °C, Auftragung: 5 µg der Referenz (1) sowie 8 µg des Isolats (2), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: FM-System 1.

Sowohl bei der Referenz (1) als auch beim Isolat (2) befanden sich in den derivatisierten Chromatogrammen (B-D) jeweils nur eine Bande auf der entsprechenden Höhe (R_f 0,40). Diese ist jeweils braun bzw. dunkel (C, VIS) gefärbt. Im underivatisierten Chromatogramm lassen sich in keinem der drei Detektionsmodi Banden erkennen. In allen derivatisierten Chromatogrammen ist die Bande der Referenz intensiver gefärbt als die des Isolates. Daraus lässt sich schließen, dass Aucubin erfolgreich isoliert werden konnte. Weder mit universal anfärbenden Anisaldehyd-Schwefelsäure (B, C) noch unspezifisch oxidierendem Vanillin-HCl (D) konnten zusätzliche Banden detektiert werden. Selbst bei übermäßig langer Derivatisierung von 30 min (C) statt üblichen 2 min (B) konnten mit Anisaldehyd-Schwefelsäure keine weiteren Banden sichtbar gemacht werden. Daraus wird geschlossen, dass das Isolat mit keinen organischen Verbindungen verunreinigt war, die dünnschichtchromatographisch nachweisbar gewesen wären.

Die unterschiedlichen Intensitäten der Bandenfärbung zeigen, dass, obwohl das Isolat höher konzentriert aufgetragen wurde, es deutlich weniger Substanz beinhaltet. Dies deutet darauf hin, dass im Isolat andere, nicht per DC nachweisbare Verunreinigungen wie z.B. Wasser oder anorganische Verbindungen enthalten sind. Gleiches lässt sich aus HPLC-DAD-Analysen schließen (Kapitel 3.5.13). Diese ergaben für das isolierte Aucubin eine Reinheit von $99,52 \pm 0,73\%$ bzw. gerundet $100 \pm 1\%$ (n (Einwaage)=1, n (Messung)=3). Das bedeutet, dass so gut wie keine organischen Verbindungen mitisoliert wurden. Auch hier muss die Detektionsfähigkeit des angewendeten Detektionssystems mit einbezogen werden. Mithilfe des DADs können nur Substanzen nachgewiesen werden, die im UV/VIS-Bereich (190-900 nm) absorbieren. Wasser und anorganische Verbindungen, wie Natriumionen, können damit nicht erfasst werden. Allerdings wurde im Isolierungsprozess mit Natronlauge neutralisiert und das dadurch in das Isolierungsprodukt gelangte Natrium wurde in keinem Schritt explizit entfernt. Deshalb ist davon auszugehen, dass sich eine bestimmte Menge an Natrium im Isolat befindet. Die marginal vorhandene organische Hauptverunreinigung wurde durch Vergleich der Retentionszeiten und des UV-Spektrums mit authentischer Referenz als Catalpol identifiziert. Dies verdeutlicht, wie schwierig eine gänzliche Separation beider so ähnlicher Haupttiridoidglykoside ist. Da das isolierte Aucubin in dieser Arbeit als Referenz zur Quantifizierung herangezogen werden sollte, war es von Bedeutung eine exakte Reinheit zu bestimmen. Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden durchgeführt und miteinander verglichen.

Methode 1:

Berechnung der Reinheit des Isolates unter Berücksichtigung der an- und organischen Verunreinigungen sowie des Wasseranteils nach folgender Differenzgleichung, wobei organisch: organische Verunreinigungen, anorganisch: anorganische Verunreinigungen.

$$\text{Reinheit [\%]} = 100\% - \text{Wasser [\%]} - \text{organisch [\%]} - \text{anorganisch [\%]} \quad (3.1)$$

Enthaltenes Wasser wurde *via* Karl-Fischer-Titration ermittelt (Kapitel 3.5.16) und belief sich auf $5,72 \pm 0,29\%$ (n (Einwaage)=3, n (Messung)=1). Aus den HPLC-DAD-Analysen (Kapitel 3.5.13) ergab sich eine organische Verunreinigung von $0,48 \pm 0,73\%$ (n (Einwaage)=1, n (Messung)=3), wie bereits diskutiert. Als anorganische Verunreinigungen wurde hier nur Natrium untersucht, da keine anderen anorganischen Komponenten bewusst hinzugefügt wurden, wie weiter oben begründet. Der Natriumgehalt von $0,35 \pm 0,06\%$ wurde mittels ICP-OES gemessen (n (Einwaage)=2, n (Messung)=1, Kapitel 3.5.17). Damit resultierte eine Gesamtreinheit des Isolats von $93,45 \pm 1,08\%$ bzw. gerundet $93 \pm 1\%$. Die erhaltenen Abweichungen wurden addiert, obwohl die Anzahl der Einwaagen und Messungen nicht exakt übereinstimmten. Dadurch bedingte Fehler wurden in diesem Fall als vernachlässigbar eingestuft.

Methode 2:

Weiter wurde die Reinheit des Isolates mithilfe eines definierten Standards („Goldstandard“, Aucubin 2 (Kapitel 10.2)) ermittelt. Anhand der während der Validierung erstellten Kalibriergerade (Kapitel 7) wurde für das isolierte Aucubin eine Reinheit von $91,98 \pm 1,18\%$ bzw. gerundet $92 \pm 1\%$ ermittelt. Es muss berücksichtigt werden, dass die erhaltenen Daten des käuflich erworbenen Standards sowie des in dieser Arbeit gewonnenen Isolates ausschließlich per HPLC-DAD bestimmt wurden. Diese beziehen nicht-organische Verunreinigungen nicht mit ein.

In Analogie zu Reinheitsangaben diverser industriell erwerblicher Standards, werden hier die auf Null Nachkommastellen gerundeten Werte betrachtet und miteinander verglichen. So stehen die Resultate der berechneten Gesamtreinheit *via* Additionsverfahren mit $93 \pm 1\%$ dem, der *via* Kalibriergerade und Goldstandard per HPLC-DAD berechneten, mit $92 \pm 1\%$ gegenüber. Unter Berücksichtigung der Fehlerbereiche von jeweils 1%, können beide Werte als quasi identisch bezeichnet werden. Sie weichen damit deutlich von der über den auf Absorptionskräfte limitierten Reinheitsbestimmungsweg per HPLC-MaxPlot mit $100 \pm 1\%$ Reinheit ab. Aufgrund der quasi identischen Ergebnisse der Gesamtreinheitsbestimmung wurde für die in dieser Arbeit durchgeführte Validierung (Tabelle 7.5 in Kapitel 7.3.2) letztendlich eine Reinheit des Aucubins von 92% festgelegt. Schlussendlich kann zusammengefasst werden, dass die isolierte Substanz (Kapitel 3.2) anhand von durchgeführten NMR- und MS-Analysen sowie über den Abgleich mit Literaturdaten eindeutig als Aucubin identifiziert werden konnte. Dadurch erübrigten sich weitere strukturverifizierende Analysen, wie beispielsweise die Bestimmung des Drehwerts. Für das Isolat konnte eine Gesamtreinheit von $93 \pm 1\%$ bzw. $92 \pm 1\%$ auf zwei unterschiedlichen Wegen ermittelt werden. Für nachfolgende Analysen wurde mit einer Reinheit von 92% gerechnet.

3.3.2.2 Catalpol

NMR-Daten aus $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC, COSY, NOESY (Kapitel 3.5.14) wurden in Methanol- d_4 aufgenommen und dienen zur Charakterisierung des isolierten Catalpols. Tabelle 3.2 fasst die gemessenen NMR-Daten zusammen.

Tabelle 3.2: NMR-spektroskopische Daten des isolierten Catalpols, vermessen in Methanol-d₄ bei RT an einem AVANCE III 600 Kryo NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI Cryoprobe bei 600,25 MHz (¹H-NMR) bzw. 150,95 MHz (¹³C-NMR). Angegeben sind die Positionen, Kohlenstoff- (δ_C)- und Protonenverschiebungen (δ_H), Multiplizitäten (mult) sowie Kopplungskonstanten (J [Hz]). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Signale bzw. Positionen überlappen bzw. sind miteinander austauschbar.

Molekülteil	Pos.	Typ	δ_C	δ_H mult (J [Hz])
Aglykon	1	-CH	95,2	5,03 1H, dubl (9,7)
	2	-O-	-	-
	3	-CH=	141,8	6,33 1H, dd (6,0/1,8)
	4	-CH=	104,0	5,06 1H, dd (1,3)
	5	-CH	39,1	2,26 1H, multi (-)
	6	-CH	79,2	3,90 1H, multi ^b (-)
	7	-CH	62,5	3,43 1H, sg (9,7)
	8	qC	66,2	-
	9	-CH	43,6	2,25 1H, dd (5,8)
	10a	-CH ₂	61,6	3,78 1H, dubl (13,1)
	10b		61,6	4,13 1H, dubl (13,1)
Glucosyl	1'	-CH	99,7	4,76 1H, dubl (8,0)
	2'	-CH	74,8	3,25 1H, multi ^c (-)
	3'	-CH	77,7	3,39 1H, multi (9,0)
	4'	-CH	71,8 ^a	3,25 1H, multi ^{c,e} (-)
	5'	-CH	78,6 ^a	3,30 1H, multi ^{d,e} (-)
	6'a	-CH ₂	62,9	3,62 1H, dd (12,0/6,5)
	6'b		62,9	3,90 1H, multi ^b (-)

^a Signale sind miteinander austauschbar

^{b-e} Signale mit gleichen Buchstaben überlappen

Alle Kohlenstoffatome konnten eindeutig den Positionen im Molekül zugeordnet werden, mit Ausnahme der C-4' und C-5' des glukosids, deren Lokalisierung auch vertauscht sein könnte (siehe NMR-Daten des isolierten Aucubins im vorhergehenden Kapitel 3.3.2.1). Signalüberlappungen lagen bei folgenden ¹H-Signalen vor: C-6 des Aglykons mit C-6' der Zuckereinheit, C-2' mit C-4' sowie C-5' mit dem Signal des verwendeten Lösungsmittels Methanol-d₄. Hier konnten weder eindeutige Multiplizitäten noch Kopplungskonstanten bestimmt werden.

Literaturvergleiche mit zwei Catalpolderivaten gemessen in Methanol-d₄ [95] sowie einem Catalpolderivat gemessen in Pyridin [112] stimmen mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen überein und bekräftigen die Identität des Catalpols.

Erwartungsgemäß gab es starke Analogien zu den NMR-Daten des isolierten, strukturähnlichen Aucubins (Kapitel 3.3.2.1) sowie gravierende Differenzen für δ_C sowie δ_H an

der Stelle, an der sich beide Strukturen unterscheiden, nämlich C-7 und C-8. Während bei Aucubin zwischen diesen C-Atomen eine Doppelbindung vorliegt, befindet sich bei Catalpol dort eine Epoxidgruppe. Die elektronenziehende, auf sp^2 -hybridisierten C-Atomen basierende Doppelbindung verursachte starke Tieffeldverschiebungen von 130,3 ppm (C-7) und 148,0 ppm (C-8) für δ_C , wohingegen die Epoxidgruppe mit 62,5 ppm (C-7) und 66,2 ppm (C-8) für δ_C die C-Atome wesentlich weniger entschirmt. Analog dazu verhalten sich die chemischen Verschiebungen der 1H -Kerne. Aucubin weist an Pos. 7 eine Verschiebung von 5,75 ppm auf. Bei Catalpol sind es 3,43 ppm.

Eine weitere, weniger gravierende Differenz zwischen den beiden Haupttiridoidglykosiden findet sich an C-5. Auch hier sind δ_C und δ_H im Aucubin stärker ins Tieffeld verschoben als bei Catalpol: 46,3 ppm δ_C und 2,64 ppm δ_H für Aucubin *versus* 39,1 ppm δ_C und 2,26 ppm δ_H .

Neben dem Einfluss der direkten chemischen Nachbarn, tragen stereochemische Effekte höchst wahrscheinlich einen wesentlichen Teil zu den Unterschieden der chemischen Verschiebungen bei. Aufgrund der verschiedenen Hybridisierungsarten der C-Atome an C-7 und C-8 in Aucubin und Catalpol ergeben sich andere räumliche Eigenschaften, die die restlichen Atome der Verbindung beeinflussen. Zur Überprüfung der Identität wurde zusätzlich die Masse analysiert (Kapitel 3.5.15). Dabei konnten folgende charakteristische Ionensignale detektiert werden: $[M-H]^-$ bei m/z 361, $[M+HCOO]^-$ bei m/z 407 sowie $[2M-H]^-$ bei m/z 723.

Die ersten beiden Ionen und Masse-Ladungsverhältnisse stimmen exakt mit denen überein, die Sertic et al. [107] für Catalpol postulieren. Ferner wurden Identität und Reinheit des isolierten Catalpols dünnschichtchromatographisch überprüft (Abbildung 3.9).

Sowohl bei der Referenz (1) als auch beim Isolat (2) befindet sich im mit Vanillin-HCl derivatisierten Chromatogramm (D) jeweils nur eine Bande mit R_f 0,39. Diese ist blau (Referenz) bzw. gelb (Isolat) fluoreszierend (D, 366 nm) oder braun gefärbt (D, VIS). Bei zwei-minütiger Behandlung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure konnte in der Referenzlösung eine weitere Bande bei R_f 0,28 detektiert werden, die im Isolat erst nach 30-minütiger Erhitzung auftrat. Im underivatisierten Chromatogramm ließen sich keine Banden erkennen. In allen derivatisierten Chromatogrammen war die Bande des Isolates intensiver gefärbt als die der Referenz, also genau anders herum als bei dem isolierten Aucubin, hervorgerufen durch die unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen.

Daraus lässt sich schließen, dass Catalpol erfolgreich isoliert werden konnte. Abgesehen von der zusätzlichen Bande im unteren DC-Bereich, die verstärkt bei der Referenz auftrat, ließen sich weder mit universal anfärbenden Anisaldehyd-Schwefeläure (B, C) noch Vanillin-HCl (D) weitere Banden detektieren. Selbst bei übermäßig langer Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefeläure-Reagenz von 30 min konnten keine weiteren Banden nachgewiesen werden. Warum sich sowohl in der Referenz als auch im Isolat eine zusätzliche Bande im unteren Drittel der DC befand, ist unklar. Da in der Referenz augenscheinlich mehr von dieser Cosubstanz enthalten war, könnte es sich hierbei um ein lagerungsbedingtes Abbau- bzw. Umwandlungsprodukt des Catalpols handeln. Abgese-

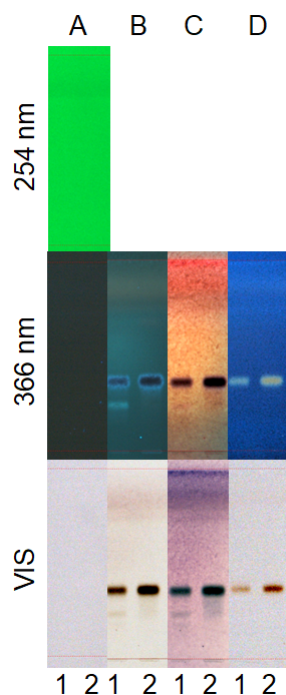


Abbildung 3.9: DC zur Prüfung der Identität und Reinheit des isolierten Catalpols. Detektion von oben nach unten: 254 nm, 366 nm und Tageslicht, Derivatisierung von links nach rechts: underivatisiert (A) sowie Anisaldehyd-Schwefelsäure für 2 min (B) bzw. 30 min (C) und Vanillin-HCl 2 für 3 min (D) bei 120°C, Auftragung: 5 µg der Referenz (1) sowie 8 µg des Isolats (2), stationäre Phase: Kieselgel, FM-System 1.

hen von dieser Nebenverbindung, konnten keine weiteren organischen Verbindungen per DC ermittelt werden.

Gleiches lässt sich aus den HPLC-DAD Analysen schließen (Kapitel 3.5.13). Diese ergaben für das isolierte Catalpol eine Reinheit von $99,08 \pm 0,04\%$ bzw. gerundet $99 \pm 0\%$, was bedeutet, dass auch bei diesem Isolat kaum organische Verbindungen enthalten waren. Die Testung auf organische Verunreinigungen mittels HPLC-MaxPlot zeigte mit einer Reinheit von $99 \pm 0\%$, dass nahezu keine absorptionsfähigen organischen Verunreinigungen im isolierten Catalpol vorhanden waren. Auf die Aussagekraft dieses Ergebnisses mit der angewendeten Methode soll hier nicht näher eingegangen werden, da dies bereits im vorhergehenden Kapitel 3.3.2.1 ausführlich erläutert wurde. Auf nicht-organische Verunreinigungen wurde nicht geprüft.

Anhand von Abgleichen der Retentionszeit und UV-Spektren des isolierten Aucubins konnten auch hier Spuren des zweiten Hauptiridoidglykosides nachgewiesen werden. Schlussendlich kann zusammengefasst werden, dass die isolierte Substanz (Kapitel 3.2) anhand von durchgeführten NMR- und MS-, DC- und HPLC-Analysen sowie über den Abgleich mit einschlägiger Literatur eindeutig als Catalpol identifiziert werden konnte. Dadurch erübrigten sich weitere strukturverifizierende Analysen.

3.3.3 Sonstige isolierte Verbindungen

Die sechs erhaltenen unbekanntenen Isolate aus Kapitel 3.2 konnten nicht näher charakterisiert werden, denn sie konnten im Anschluss an die Gewinnung weder durch Pyridin-d₅, Aceton-d₆, Chloroform-d₆, DMSO-d₆, D₂O, Methanol-d₄ noch durch eine Mischung aus D₂O und Methanol-d₄ wieder in Lösung gebracht werden.

Die Idee, die Mutterfraktion C5.2 per LC-ESI-MS auf typische Iridoidglykosidfragmente hin zu untersuchen, wurde verworfen. Grund war das Fehlen genügend charakteristischer Fragmentierungsmuster zur eindeutigen Identifizierung von Verbindungen dieser Stoffgruppe. Wie eine eingehende Literaturrecherche zeigte, ist nach aktuellem Wissensstand kein einheitliches Fragmentierungsmuster für IGs bekannt. Lediglich der Abgang von Neutralgruppen wie Glukose oder Wasser waren IG-spezifisch jedoch nicht selektiv genug. Der Abgang semi-charakteristischer Fragmentationen mit definiertem Masse-/Ladungsverhältnis ist ebenso unzureichend, da massengleiche Fragmente nicht automatisch über einen identischen strukturellen Aufbau verfügen.

3.4 Zusammenfassung

Aucubin und Catalpol konnten erfolgreich aus *P. lanceolata* isoliert werden. Die Ausbeute betrug 169,7 mg bzw. 48,7 mg für Aucubin bzw. Catalpol. Ihre Gewinnung aus der Pflanze erfolgte ohne den Einsatz von Methanol. Dabei konnten Reinheiten von $100 \pm 1\%$ bzw. $99 \pm 0\%$ für isoliertes Aucubin bzw. Catalpol, gemessen *via* HPLC-DAD-MaxPlot, erzielt werden. Das isolierte Aucubin wies eine absolute Reinheit von $92 \pm 1\%$ auf.

Außerdem konnten geringe Mengen sechs unbekannter Substanzen (P1-P6) isoliert werden. Da es nicht gelang, diese wieder in Lösung zu bringen, wurden sie nicht näher charakterisiert.

3.5 Material und Methoden

3.5.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Verwendete Chemikalien und Materialien sind den Kapiteln 10.1 und 10.6.1 zu entnehmen, wobei zur Extraktion die günstigere, technische Qualität sowie rückdestilliertes Lösungsmittel verwendet wurden.

3.5.2 Verwendete Referenzen

Als Referenzsubstanzen wurden im Rahmen der Isolierung Aucubin 1, Catalpol 1 und Catalpol 2 (Kapitel 10.2) genutzt. Den „Goldstandard“ zur Reinheitsbestimmung des isolierten Aucubins stellte Aucubin 2 dar.

3.5.3 Verwendetes Drogenmaterial

Das Drogenmaterial 2 (Kapitel 10.5) wurde zur Extraktion mithilfe einer Ultrazentrifugalmühle und einem Siebeinsatz mit einer Lochgröße von 500 µm pulverisiert (Kapitel 3.5.7).

3.5.4 Verwendete Geräte und Software

Verwendete Geräte und Software befinden sich in den Kapiteln 10.7 und 10.8.

3.5.5 Lyophilisation

Ein geeignetes Verfahren, um Substanzen oder Extrakte in komplett trockener, wasserfreier Form zu erhalten, stellt die Lyophilisation dar. Diese beruht auf dem Prinzip, dass der Übergang des Wassers von fest zu gasförmig energetisch günstiger ist als der vom flüssigen Zustand aus. In der Durchführung wird das zu Trocknende mit Wasser versetzt und eingefroren. Das feste, gefrorene Wasser wird unter Vakuum sublimiert, wobei schlussendlich ein wasserfreier Feststoff entsteht. Grundlegende Bedingung ist, dass die zu lyophilisierenden Extrakte bzw. Substanzen zunächst vollständig lösungsmittelfrei vorliegen müssen. Befinden sich organische Restlösungsmittel im Gemisch, taut der gefrorene Kolbeninhalt während dem Lyophilisationsvorgang auf. Eine vollständige Sublimation des Wassers kann somit nicht erfolgen. Es konnte festgestellt werden, dass die gänzlich lösungsmittelfreien Extrakte am schnellsten und vollständigsten zu lyophilisieren waren, wenn sie in einen 250 mL Kolben gehandhabt wurden, der zu maximal einem Drittel mit Extrakt und Wasser befüllt war. Ferner zeigte sich, dass besonders trockene und homogene Pulver entstanden, wenn der mit Wasser versetzte und bei moderater Wärmeeinwirkung (40°C) in Lösung gebrachte Extrakt durch Behandlung im Ultraschallbad homogenisiert, bei 4°C vorgekühlt und im Isopropanolbad vollständig gefroren wurde, bevor er der Lyophilisation unterzogen wurde. Aus logistischen und zeitlichen Gründen wurden zudem Extrakte unter anderen Bedingungen gefroren, wie z.B. bei -20 oder -80°C.

3.5.6 DC

Erhaltene Fraktionen aus Extraktions- und Isolierungsprozess wurden dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Des Weiteren fanden dünnschichtchromatographische Analysen zur Identitäts- und Reinheitsbestimmung der Isolate Aucubin und Catalpol sowie zur Verifizierung der Literaturangaben statt.

Für alle Untersuchungen wurden als stationäre Phase 20 x 20 cm Kieselgel DC-Platten der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die DC-Platten wurden einmalig unter Kammersättigung (10-60 min) in einer Doppeltrogkammer entwickelt, wobei eine Laufhöhe von 7-8 cm angestrebt wurde. Im Folgenden sind die verwendeten Fließmittel (FM)-Systeme aufgelistet.

- FM-System 1:
Ethylacetat p.a./Ethanol p.a./Ameisensäure 98-100% (60:40:2, v/v/v).
- FM-System 2:
Ethylacetat p.a./Methanol p.a./Ameisensäure 98-100% (140:60:5, v/v/v).
- FM-System 3:
Ethylacetat p.a./Methanol p.a./Ameisensäure 98-100% (70:30:5, v/v/v).

Die trockenen, entwickelten Platten wurden mithilfe folgender Reagenzien derivatisiert, wobei die erhaltenen Chromatogramme zur Dokumentation per Fotodokumentationsgerät 1, 2 oder 3 fotografiert und abgespeichert wurden.

- Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz [131, Seite 303], modifiziert:
Unter Eiskühlung wurden der Reihenfolge nach 85 mL Methanol p.a., 10,0 mL Eisessig und 5,0 mL konzentrierte Schwefelsäure vermischt. In das kühle Gemisch wurden 0,5 mL Anisaldehyd pipettiert und vermischt.
- Ehrlich-Reagenz [114, Seite 235]:
0,5 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd wurden in 50 mL 1 N methanolische Salzsäure (4,2 mL konzentrierte Salzsäure auf 50,0 mL mit Methanol p.a. aufgefüllt) gelöst.
- HCl konz.:
Als besonders geeignetes Derivatisierungsmittel hat sich konzentrierte Salzsäure im Verlauf der Arbeit herauskristallisiert, welche durch Oxidation farbgebende Banden hervorbrachte, wie unter anderem bereits für oxidierende Sulfurylchloriddämpfe zur Anfärbung von IGs publiziert wurde Nikolova-Damyanova et al. [111].
- Naturstoff-Macrogol-Reagenz nach Neu [131, Seite 304]:
Hierbei handelte es sich um eine Derivatisierung mit zwei Sprühreagenzien. Das erste Reagenz bestand aus einer 1,0%-igen methanolischen (p.a.) Lösung aus Diphenylborsäure- β -ethylaminoester (=Diphenylboryloxythylamin), das zweite aus 5%-iger ethanolischer (technisch) Polyethylenglykol (PEG, auch Macrogol

genannt)-400-Lösung. Die Reagenzien wurden nacheinander angewendet. Zwischen den Anwendungen wurden die Platten für etwa 30 s erhitzt.

- Vanillin-HCl-Reagenz 1 [131, Seite 305]:
Hierbei handelte es sich um eine Derivatisierung mit zwei Sprühreagenzien. Das erste Reagenz bestand aus 1,0%-iger ethanolischer (p.a.) Vanillinlösung, das zweite aus konzentrierter Salzsäure. Die Reagenzien wurden nacheinander angewendet. Zwischen den Anwendungen wurden die Platten für etwa 30 s erhitzt.
- Vanillin-HCl-Reagenz 2 [131, Seite 305], modifiziert:
Reagenz Herstellung und Derivatisierung erfolgte analog zu Vanillin-HCl-Reagenz 1 nach [131, Seite 305] mit dem Unterschied, dass Methanol anstelle von Ethanol zur Herstellung der 1,0%-igen Vanillinlösung verwendet wurde.

Die besprühten Platten wurden 2-30 min bei 115-120°C erhitzt. Die Derivatisierung auf der Heizplatte wurde beendet, sobald die Zonen genügend gut sichtbar waren oder sich der Hintergrund zu stark anfärbte. Es wurde darauf geachtet, einen ausreichend hohen Kontrast zwischen Banden und Hintergrund zu erzielen. Die Detektion derivatisierter sowie underivatisierter Platten wurde bei Tageslicht, 254 nm bzw. 366 nm vorgenommen.

3.5.7 Extraktion

Um das Extraktionsvermögen einheitlich zu erhöhen, wurde die Oberfläche des Drogenmaterials 2 durch homogene Pulverisierung der bereits zentimetergroßen Drogenstücke vergrößert. 5 kg Drogenmaterial 2 wurde dazu mittels Ultrazentrifugalmühle bei einer Siebgröße von 0,5 (entspricht einer Lochgröße von 500 µm) auf Stufe 4 gemahlen. Zwischen den einzelnen Mahlvorgängen wurde die Mühle komplett auseinander gebaut, gesäubert und erkalten gelassen, um einer thermischen Zerstörung der genuinen Verbindungen im Pflanzenmaterial vorzubeugen. Auch wurde auf eine geringstmögliche Aussetzung gegenüber Luftsauerstoff sowie Licht geachtet. Das pulverisierte Drogenmaterial wurde zur vollständigen Abkühlung und Trocknung zwei Wochen unter einem Tuch bei RT verwahrt, bevor es in ein fest verschließbares Gefäß gefüllt und unter Ausschluss von Luft und Licht gelagert wurde. Die in dieser Arbeit nicht dargestellte, interne Bestimmung der Quellungszeit nach Ph. Eur. 7.0 sowie nicht dargestellte, interne Vorversuche zur wässrigen Extraktion des pulverisierten Drogenmaterials 1 zeigten ein enormes Quellungsvermögen der Droge. Trotz dreitägigem Vorquellen bei einem gängigen Droge-Seesand-Verhältnis von 1:1 (m/m) kam es zu einer vollständigen Verstopfung der verwendeten Säule. Um dies zu umgehen und eine einwandfreie Fließgeschwindigkeit sicherzustellen, wurde das pulverisierte Drogenmaterial zur Extraktion der IGs mit einer größeren Menge an Seesand als üblich vermischt. Eine optimale Fließgeschwindigkeit sollte auch noch bei dem letzten der vier einzusetzenden Extraktionsmittel gewährleistet sein, das einen Wasseranteil von 50% aufwies. Das Droge-Seesand-Verhältnis betrug schlussendlich 1:3 (m/m), wobei die Masse an Seesand in etwa dem Volumen an pulverisierter Droge entsprach.

Eine große Menge an Ausgangsmaterial wurde eingesetzt, um von den nur in geringen Mengen enthaltenen Inhaltsstoffen ausreichend hohe Mengen für strukturcharakterisierende Untersuchungen gewinnen zu können. Insgesamt 1580 g, also knapp 1,6 kg des vorbereiteten, oben beschriebenen Droge-Seesand-Gemisches (1:3, m/m) wurden in drei Durchgängen, auf mehrere große Säulen verteilt, und anschließend extrahiert. Die Säulen wurden mit Petrolether befüllt und über Nacht mazeriert, bevor über mehrere Tage hinweg der Reihe nach mit Ethylacetat, Ethanol und Ethanol 50% extrahiert wurde. Eine Seesandschicht und ein konstanter Lösungsmittelspiegel oberhalb des eingefüllten Droge-Seesand-Gemisches sowie eine die obere Säulenöffnung verschließende Alufolienabdichtung unterstützten eine sauerstofffreie Extraktion. Es bot sich an, über Nacht bis zur Extraktionsmittelsättigung zu mazerieren und tagsüber mit neuem, ungesättigtem Extraktionsmittel zu perkolieren. Die Perkolation mit frischem Extraktionsmittel diente der Maximierung der Extraktionskraft durch Verschiebung des Konzentrationsgleichgewichts im Extraktionsmittel. Der Extraktionsmittelwechsel fand stets abends statt. Um Sauerstoffeinschlüsse zu vermeiden, wurde dabei ein Trockenlaufenlassen unterbunden. Die Extraktionsdauer pro Extraktionsmittel betrug jeweils 2-3 Tage, die Perkulationsgeschwindigkeit 1 Tropfen pro 3 s. Beim Wechsel von Mazeration auf Perkolation wurde zuerst bei vollständig geöffnetem Hahn das gesättigte Extraktionsmittel rasch entleert und neues, ungesättigtes Extraktionsmittel eingefüllt bevor die ursprüngliche Tropfgeschwindigkeit wieder konstant eingestellt wurde. Die erhaltenen Extrakte aller Durchgänge wurden fortlaufend lösungsmittelspezifisch vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Danach wurden sie lyophilisiert (Kapitel 3.5.5). Insgesamt resultierten aus der sukzessiven, elutropen Extraktion vier Extrakte (Tabelle 3.3). Sie wurden unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff bei 4 °C aufbewahrt, wie auch alle weiteren in dieser Arbeit erhaltenen Fraktionen und Isolate.

Tabelle 3.3: Gewonnene Extrakte der sukzessiven, elutropen Extraktion.

Extrakt	Farbe	Konsistenz	m [g]	Ausbeute	DEV
Petrolether	dunkelgrün	ölig, viskos	18,8	1,19%	84 : 1
Ethylacetat	dunkelgrün	fest, pulvrig	21,0	1,33%	75 : 1
Ethanol	dunkelbraun	fest, hygroskopisch	97,2	6,15%	16 : 1
Ethanol 50%	braun	fest, hygroskopisch	361,1	22,85%	4 : 1
Gesamtausbeute	31,52%				

Der unpolare, dunkelgrüne Petroletherextrakt wies auch bei RT eine klebrige, viskose Konsistenz auf. Dies erschwerte die Überführung aus dem Kolben nach der Vaporisierung am Rotationsverdampfer. Deshalb wurde das Lösungsmittel im Extrakt mit Hilfe von Stickstoff entfernt. Beim Entfernen des Lösungsmittels des Ethylacetatextraktes am Rotationsverdampfer wurde darauf geachtet, nie gänzlich bis zur Trockene einzuengen, da dabei aus Ethylacetat durch Esterhydrolyse Essigsäure entstehen kann [132]. Die dazugehörige Gleichgewichtsreaktion ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 3.10).

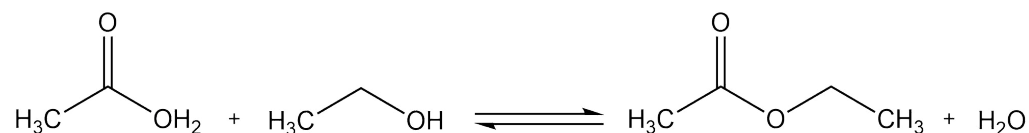


Abbildung 3.10: Reaktionsgleichgewicht zwischen Ethylacetat und Essigsäure. Essigsäure und Ethanol reagieren unter Esterbildung zu Ethylacetat und Wasser, u.u. (Esterhydrolyse).

Die Abdestillation des Ethanols führt voraussichtlich zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts auf die linke Seite und fördert somit die Bildung von Essigsäure, welche zu Hydrolysereaktionen der säurelabilen IGs führen kann (Kapitel 3.1). Um die Hydrolyse der IGs zu verhindern, wurde ab einer Menge von ca. 10-20 mL Restextraktionsmittel etwa das gleiche Volumen an Wasser hinzugegeben, das Gemisch kurz im Ultraschallbad durchmischt und anschließend weiter am Rotationsverdampfer abgedampft. Die Idee dahinter war die schrittweise Verdünnung der entstehenden Säure, was die Hydrolyseaktivität maximal senken sollte. Der Vorgang wurde mindestens drei Mal pro Extrakt im Rundkolben wiederholt oder bis kein Geruch nach Essigsäure mehr auftrat. Nach Kontrollen mittels pH-Indikatorpapier ergab sich jedoch trotzallem ein relativ saurer pH-Wert von 2-5. Zum Schutz der zu isolierenden Substanzen vor Glykolyse und Polymerisation wurde der Ethylacetatextrakt deshalb mit 1 M Natronlauge auf pH 6-8 neutralisiert. Lösungsmittelfreier Ethylacetat-, Ethanol und 50-%ige ethanolische Extrakt wurden *via* Lyophilisation getrocknet (Kapitel 3.5.5).

Aus 1580 g pulverisierter Droge konnten vier Extrakte mit insgesamt 498,0 g (31,52% Ausbeute) erhalten werden. Fraktionskontrollen wurden mithilfe des FM-Systems 1 durchgeführt. Anzumerken ist, dass aus Zeitgründen nicht vollständig erschöpfend extrahiert wurde, so dass, neben nicht mit Lösungsmitteln extrahierbaren Bestandteilen wie Cellulose, vermutlich noch andere extrahierbare Substanzen im verbleibenden Drogenpulver enthalten sind.

3.5.8 CC Sephadex[®] LH-20

Die offene Säulenchromatographie (CC) an dem Sephadex[®] LH-20 Material wurde als erster Schritt zur Aufkonzentrierung der gewünschten Substanzen nach der Extraktion eingesetzt. Auf eine vorbereitete Sephadexsäule (Sephadexmaterial: 265 g, Glassäule mit Länge 95 cm und Durchmesser 5 cm, Befüllungshöhe: 71,5 cm) wurden von 97,23 g des aucubin-/catalpolreichen Ethanolextrakts 53,2 g in drei Durchgängen flüssig aufgetragen und mit 70%-igem Ethanol eluiert. Zwischen den Läufen wurde die Säule mit 70%-igem Aceton gespült sowie auf die Anfangsbedingungen equilibriert. Die Spüllösungen wurden verworfen. Zur Probenvorbereitung wurden 19,37, 19,32 bzw. 19,02 g des Extrakts jeweils mit 100 mL 70%-igem Ethanol versetzt und für 3-5 Stunden im Ultraschallbad behandelt. Der unlösliche Rückstand wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 3 min, RT), so dass 18,21, 17,93 bzw. 17,06 g als Beladungsvolumen resultierten. Der stark dunkelbraun gefärbte Überstand war mit bloßem Auge nur marginal vom ebenso dunkel gefärbten Rückstand zu unterscheiden. Nach 200 mL Vorlauf wurde das Eluat bei einer Tropfgeschwindigkeit von 0,6-1,0 mL/min mittels Fraktionskollektor in Reagenzgläsern mit einer Auffangdauer von 16 min bzw. 9,6-16,0 mL pro Glas gesammelt. Die Tropfgeschwindigkeit änderte sich im Verlauf der Sephadex[®]-Chromatographie. Regelmäßige Kontrollen ergaben die oben angegebenen Tropfgeschwindigkeitsbereiche. Der Trennungsgang brachte vier Fraktionen (F1-F4) hervor, eingeteilt anhand von DC-Kontrollen mit dem FM-System 1 (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Übersicht der Fraktionierung mittels CC Sephadex[®] LH-20.

Fraktion	F1	F2	F3	F4
Elutionsbereich [mL]				
Lauf 1 (18,2 g)	0-293	293-374	374-571	571-Ende
Lauf 2 (17,9 g)	0-416	416-541	541-836	836-Ende
Lauf 3 (17,1 g)	0-380	380-524	524-810	810-Ende
Auswaage [g]	0,4527	3,2636	35,4	9,2744
Farbe	braun	braun	braun	ocker
Konsistenz	fest, pulvrig	fest, pulvrig	fest, hygroskopisch	fest, hygroskopisch
Ausbeute [%]	0,85	6,13	66,48	17,43
Gesamtausbeute [%]	92,54			

Die Separation an der offenen Sephadexsäule ergab eine Gesamtausbeute von 92,54%, wobei die Spülreste nicht miterfasst wurden. Internen Untersuchungen zufolge eluieren diverse Gerbstoffe im gewählten System mit 70%-igem Aceton, das zum Spülen verwendet wurde. Daher liegt die Vermutung nahe, dass in den Spülresten vor allem die in der Pflanze enthaltenen Gerbstoffe, die 6-8% der Droge ausmachen, enthalten waren. Vor diesem Hintergrund kann eine Ausbeute von 92,54% als realistisch betrachtet werden.

3.5.9 CPC

Zur Separation der aucubin-/catalpolreichen Fraktion F3, die aus der offenen Säulenchromatographie resultierte, fand eine CPC Anwendung. Dabei handelt es sich um eine Flüssig-Flüssig Verteilungschromatographie aus zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. Eine Phase stellt dabei die stationäre, die andere die mobile Phase dar. Auf einen Rotor, der über mehrere hintereinandergeschaltete Kammern verfügt, wird die stationäre Phase aufgezogen. Anschließend wird die mobile Phase durch die rotierenden Kammern gepumpt. Dadurch entstehen Zentrifugalkräfte. Die chromatographische Trennung beruht auf den Wechselwirkungskräften der Inhaltsstoffe zu den jeweiligen Phasen, verstärkt und beschleunigt durch die gebildeten Zentrifugalkräfte sowie den angelegten Pumpendruck. In der Literatur werden zur verteilungschromatographischen Separation von IGS ein 4-Komponenten-System aus Chloroform, Methanol, Propanol und Wasser sowie für strukturverwandte Secoiridoidglycoside ein 3-Komponenten-System aus Chloroform, Methanol und Wasser eingesetzt [133]. Aufgrund des enthaltenen, möglicherweise zu Methoxyartefakten führenden Methanols schieden diese Gemische *per se* aus. Nach der guten Laborpraxis galt es auch, wenn möglich den Einsatz von Chloroform zu vermeiden. Vorversuche, mit der Prämisse ein für polare Substanzen geeignetes, schnell (< 60 s) entmischbares Lösungsmittelgemisch zu finden, ergaben letztendlich ein 3-Komponenten-System aus Ethylacetat (technisch), Ethanol (technisch) und Wasser (2:1:2, v/v/v) als geeignetes Lösungsmittelsystem. Durch drei Mal einminütiges Ausschütteln im Scheidetrichter wurden die Phasen gegeneinander gesättigt, bevor die stationäre Phase bei stehendem Rotor aufgezogen wurde. Angelehnt an arbeitsgruppeninterne Versuche mit Flavonoidglykosiden wurde die polare, untere Phase als stationäre Phase, die unpolare, obere Phase als mobile Phase verwendet. Die Separation wurde durchgehend in diesem, auch als *ascending* (aufsteigenden) bezeichneten Modus vorgenommen. Ein späterer Wechsel in den *descending* (absteigenden) Modus, in dem stationäre und mobile Phase getauscht werden, fand nicht statt. Nach erfolgter Chromatographie wurde die CPC mit Methanol gespült. Die Spülphasen wurden aufgefangen und vereinigt. Die CPC wurde mit einem Fluss von 5 mL/min mit 800 rpm gefahren. Die Einstellungen orientierten sich an den intern durchgeführten, erfolgreichen Versuchen mit Flavonoidglykosiden an der CPC. Zudem waren sie ähnlich zu den Parametern der Isolierung zweier Secoiridoidglykoside, die bei einem Fluss von 3 mL/min mit 700 rpm angewendet wurden [134]. Ein angeschlossener Kollektor sammelte 1-2 min, d.h. 5-10 mL pro Glas. Ein Auffangvolumen von 1 min war dabei während der ersten beiden Läufe eingestellt, 2 min bei den restlichen. Die vorbereiteten Proben wurden mit einer Einwegspritze aus Plastik injiziert, sobald das System vollständig äquilibriert war. Dies wurde mittels Messzylinder überprüft. Darin wurde zuerst die stationäre Phase beim Aufspielen in den Rotor mit Fassungsvermögen 250 mL aufgefangen. Im zweiten Schritt wurde beim Einspülen der mobilen Phase, diese zu der bereits im Messzylinder befindlichen stationären Phase geleitet. Konnte dort für mindestens 20-30 min eine stabile Phasengrenze beobachtet werden, wurde die Chromatographie gestartet. Pro Lauf wurden 1,0-2,0 g der Fraktion F3 chromatographiert.

Dazu wurde ein Aliquot in ein Plastikfalcon mit Standboden eingewogen, mit 5,0-6,0 mL gesättigter, oberer und unterer Phase (1:1, v/v) versetzt und zum Lösen 1 min gevortext sowie anschließend maximal 1 Stunde im Ultraschallbad behandelt. Das Volumen des Injektionsloops betrug 10 mL und wurde mit den eingesetzten Volumina nicht überschritten. Nicht lösliche Rückstände wurden abzentrifugiert (2500 rpm, 5 min, RT) und rückgewogen. Fraktionskontrollen wurden mittels DC vorgenommen, unter Verwendung des FM-System-2 sowie die Sprühreagenzkombination Vanillin-HCl 1 (Kapitel 3.5.6). Insgesamt wurden sechs erfolgreiche Läufe mittels CPC durchgeführt. 8,63 g der vorhandenen 49,2 g von Fraktion F3 wurden auf diese Weise aufgearbeitet. Dabei konnten zehn Unterfraktionen erhalten werden, wie in Kapitel 3.2 dargestellt. Die im ersten Durchgang gewonnenen sieben Fraktionen C1-C7 konnten in weiteren Läufen auf insgesamt zehn erweitert werden. Fraktion C4 differenzierte sich dabei weiter in die Fraktionen C4.1, C4.2 und C4.3; C5 in C5.1 und C5.2. Bei Fraktion C7 handelte es sich um die Spülfraction mit Methanol. Die vereinigten Fraktionen der einzelnen Läufe wurden am Rotationsverdampfer von Lösungsmitteln befreit, lyophilisiert (Kapitel 3.5.5) und ausgewogen, wobei sich eine Gesamtausbeute von 87,30% ergab.

Für diese Art der Flüssig-Flüssig Verteilung sind Substanzverluste normalerweise marginal. Die hier doch relativ hohen Substanzverluste werden auf das Vereinen der vielen erhaltenen Gläser zurückgeführt. Eine untergeordnete Rolle werden Substanzrückständen im Injektionsventil und in der Injektionsspritze zugeschrieben. Tabelle 3.5 bietet einen Überblick der Fraktionierung.

3.5.10 MPLC

Die Mitteldrucksäulenchromatographie (MPLC), wurde zur Aufkonzentrierung der gewünschten IGs nach erfolgter CPC für Fraktion C5.2 eingesetzt (Kapitel 3.2). Das Anlegen eines Drucks an die Säule ermöglicht eine schnellere Trennung als bei einer offenen Säule. Als Gerät stand eine Spot Liquid Chromatography FLASH mit gekoppeltem UV-Detektor, Fraktionskollektor und Software Armen Glider Flash V 2.3 (Armen Instrument, Saint-Avé, Frankreich) zur Verfügung. Als stationäre Phase diente eine Kieselgelsäule (Silica 12 g, 20 µm, 8,0 x 2,5 cm, Reveleris HP der Firma Grace (Worms, Deutschland)). Diese konnte sich gegenüber einer selbstgepackten Kieselgelsäule sowie C18-Material in Vorversuchen durchsetzen. Eine manuell gepackte 3 cm hohe, 4 cm breite Vorsäule aus dem Material Geduran für CC Si60 0,063-0,200 mm wurde vor die Hauptsäule geschaltet. Auf diese wurde die zu untersuchende Fraktion trocken aufgegeben. Damit die Probe bei Kontakt mit Lösungsmittel nicht verklumpte, sondern möglichst gleichmäßig verteilt chromatographiert werden konnte, wurden 1,08 g Kieselgel, das auch für die Vorsäule benutzt wurde, auf die 647,8 mg der Fraktion C5.2 aufgezogen. Um ein trockenes Pulver zu erhalten, wurden das Kieselgel und die in rückdestilliertem Ethanol gelöste Probe in einem Kolben vermischt und am Rotationsverdampfer mit Glasfritte bis zur Trockene einrotiert. Als mobile Phase kam ein Gradient aus Ethylacetat p.a. und rückdestilliertem Ethanol zum Einsatz, der sich aus Vorversuchen mittels DC ergab. Der Clou hierbei war, so polare Lösungsmittel wie möglich zu kombinieren, ohne auf Wasser oder Methanol zurückzugreifen. Bei einem Fluss von 10 mL/min wurde der Gradient linear innerhalb von 60 min von 0% auf 100% Ethanol erhöht, gefolgt von einem 65-minütigen Spülschritt mit 100% Ethanol, bis auf dem DC keine IG-typischen Banden mehr sichtbar waren. Das System wurde davor bei einem Fluss von 20 mL/min bis zur vollständigen Benetzung der Säulen äquilibriert. Pro Glas wurden während des 60-minütigen Gradientens 7,5 mL Eluat *via* Fraktionskollektor gesammelt, im Spülschritt waren es 25 mL Eluat pro Glas. Die gewonnenen Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt. Um eine Spaltung der säureempfindlichen IGs zu unterbinden, wurden die nach Essig riechenden Proben beim Eindampfen mehrfach mit Wasser versetzt, bevor bis zur Trockene einrotiert wurde. Half dies nicht einen neutralen pH-Bereich zu erreichen, wurde mit 1 N Natronlauge neutralisiert, wie in Kapitel 3.5.7 erläutert. Die trockenen Fraktionen wurden in wenigen mL rückdestilliertem Ethanol gelöst, in Schnapdeckelgläser überführt, unter Stickstoff bis zur Trockene abgeblasen und ausgewogen. Da der Lösungsmittel Cut-off der Eluenten Ethylacetat und Ethanol die *per se* niedrig wellige UV-Absorption der chromophorarmen IGs überlagerte, konnte der zur Detektion eingesetzte DAD keine nennenswerte Auskunft über die Abtrennung der IGs von den anderen Substanzen geben. Aus diesem Grund war eine simultane Kontrolle *via* DC unverzichtbar, um den Verlauf der Chromatographie zu beobachten und das Ende der Chromatographie sowie die anschließende Einteilung von Fraktionen zu definieren. Zur DC-Kontrolle wurden das FM-System-2 sowie die Sprühreagenzkombination Vanillin-HCl 2 verwendet (Kapitel 3.5.6). Aus diesem Trennungsschritt ergaben sich sieben Unterfraktionen C5.2 F1-F7 (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Übersicht der Fraktionierung mittels MPLC.

Fraktion	V [mL]	m [mg]	Farbe	Konsistenz	Ausbeute [%]
C5.2 F1	0-225	9,8	weiß	fest	1,15
C5.2 F2	225-285	225,5	weiß	fest	34,69
C5.2 F3	285-330	118,6	weiß	fest	18,24
C5.2 F4	330-390	54,8	weiß	fest	8,42
C5.2 F5	390-650	56,9	weiß	fest	8,75
C5.2 F6	650-740	12,0	weiß	fest	1,84
C5.2 F7	740-Ende	11,4	weiß	fest	1,76
Gesamtausbeute:	75,22%				

Die Gesamtausbeute der MPLC-Chromatographie belief sich auf 75,22%. Diese ist geringer als bei den anderen durchgeführten chromatographischen Prozessen. Wie allgemein bekannt, besitzt Kieselgel das Vermögen polare, OH-Gruppen-reiche Verbindungen wie Zuckereinheiten zu adsorbieren, was als Hauptgrund der geringen Ausbeute angenommen wurde. Eine untergeordnete Rolle wurde Verlusten durch das Handling beim Vereinigen zugeschrieben.

3.5.11 CC Kieselgel

Zur Überprüfung, ob die in der Literatur angegebenen IGs in *P. lanceolata* genuinen Ursprungs sind, wurden ausgewählte Fraktionen aufkonzentriert. Im Zuge dessen wurde eine CC an Kieselgel mit den Fraktionen C4.2 und C4.3 in einem Schritt durchgeführt. Die Separation sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, auch gering konzentrierte IGs nachzuweisen und wenn möglich charakterisieren zu können. In Kapitel 4 sind nähere Erläuterungen zum Vorgehen aufgeführt.

Als stationäre Phase wurde Kieselgel (Geduran) verwendet, das in eine Glassäule mit Fritte gefüllt wurde. Das Packungsvolumen betrug $43,5 \text{ cm} \cdot (1,1/2)^2 \text{ cm} \times \pi = 42 \text{ mL}$. Wie bereits bei den vorhergehenden Versuchen, eigneten sich Ethylacetat und Ethanol am besten als Fließmittelkomponenten. Vorversuche per DC ergaben drei geeignete Elutionsmittel (EM)-systeme: EM-System 1 bestehend aus Ethylacetat und Ethanol (300:200, v/v), Ethanol rückdestilliert als EM 2 und Methanol p.a. als EM 3. Letztere beiden dienten als Spülemitteln, um auch sehr polare Substanzen von der stationären Phase zu lösen. Mit dem Methanolspülextrakt nicht weitergearbeitet. Die Chromatographie wurde wie folgt durchgeführt: zu analysierende Fraktionen C4.2 und C4.3 wurden vereinigt (insgesamt 94,5 mg), mit Ethanol p.a. versetzt und durch Behandlung *via* Vortex (3 min) und Ultraschallbad (10 min) weitestgehend gelöst. Unlösliche Rückstände wurden abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min, RT). Zwei Mal wurde der Rückstand nachgewaschen, indem wie oben beschrieben, verfahren wurde. Substanzrückstände wurden unter Stickstoff getrocknet und rückgewogen (4,4 mg). Die mit den Waschlösungen vereinigte, komplett gelöste Probenlösung wurde wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben, gefriergetrocknet, ausgewogen und anschließend in Ethanol p.a. vollständig gelöst (90,1 mg/200 µL). Diese Lösung wurde

flüssig aufgetragen und nacheinander drei Mal mit 200 µL Ethanol p.a. sowie einmal mit 500 µL EM-1 in die Säule nachgespült.

Die Tropfgeschwindigkeit schwankte zwischen 0,45-0,83 mL/min und belief sich im Schnitt auf 0,55 mL/min. Pro Fraktionsglas wurden zunächst 4 min, d.h. ca. 2,20 mL Eluat manuell gesammelt. Parameter der Fraktionssammlung sind in Tabelle 3.7 wiedergegeben.

Tabelle 3.7: Parameter der Fraktionssammlung der CC an Kieselgel.

Fraktionssammlung [min/Glas]	Volumen an Eluat [mL]
4	22-236
10	236-665
20	665-885
-	885-1985

Der Wechsel von EM 1 auf EM 2 fand bei etwa 236 mL, der von EM 2 auf EM 3 bei etwa 885 mL Eluat statt. DC-Fraktionskontrollen wurden *via* FM-System 3 durchgeführt (Kapitel 3.5.6). Schlussendlich ergaben sich aus der offenen Säulenchromatographie an Kieselgel zehn Unterfraktionen CC.1-CC.10 (Tabelle 3.8), deren Gesamtausbeute sich auf 108,91% belief. Vermutlich resultierte diese hohe Ausbeute durch das von Methanol verursachte Herauslösen von Kieselgel aus der stationären Phase. Fraktion CC.10 enthielt den methanolischen Spülschritt und eignete sich deshalb nicht zur Prüfung auf Methoxyartefakte. Ohne Miteinkalkulierung der methanolischen Fraktion, wurden lediglich 80,75% Ausbeute erreicht. Ein Substanzverlust von knapp 20% wird auf das hohe Adsorptionsvermögen OH-haltiger Verbindung an das Kieselgel zurückgeführt und entspricht den Resultaten vergleichbarer Experimente.

Tabelle 3.8: Übersicht der Fraktionierung mittels CC Kieselgel.

Fraktion	V [mL]	EM-System	m [mg]	Ausbeute [%]
CC.1	0-33	1	3,2	3,58
CC.2	33-48	1	7,7	8,58
CC.3	48-79	1	24,6	27,30
CC.4	79-105	1	6,3	6,95
CC.5	105-180	1	7,5	8,36
CC.6	180-293	1, 2	4,5	5,01
CC.7	293-309	2	1,2	1,29
CC.8	309-449	2	6,3	7,00
CC.9	449-867	2	11,4	12,69
CC.10	867-Ende	2, 3	25,4	28,16
Gesamtausbeute	108,91%			

3.5.12 Präparative HPLC-DAD

Der finale Schritt zur Isolierung von Aucubin und Catalpol fand an einer präparativen HPLC-DAD statt. Dazu wurden die Fraktionen C5.2F1-F7 (Kapitel 3.2) herangezogen. Als stationäre Phase erwies sich in Vorversuchen an der analytischen HPLC für beide Fragestellungen polares Diolmaterial gegenüber dem unpolaren C18 Material als optimal, wie in Kapitel 3.2 ausführlich erläutert. Die 250 x 21,2 mm, 6 µm, 120 Å Uptisphere DI-OL Prep-LC-Säule mit Vorsäule der Firma Interchim (Montluçon Cedex, Frankreich) fand hierbei Verwendung. Die Wahl der mobilen Phase war aufgrund der chromophorarmen Strukturen der IGs eingeschränkt. Als geeignete Fließmittel für die Chromatographie an der Diolsäule kamen demnach nur Wasser und Acetonitril in Frage. Diese beiden verfügen, im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln, über die niedrigsten Cut-offs und ermöglichten eine Detektion im niederwelligen Bereich. Gradient und Flussgeschwindigkeit variierten je nach Methode. Angewendete Methoden sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Methodenübersicht der Analysen an der präparativen HPLC mit Acetonitril HPLC grade als Eluent A und Wasser als Eluent B.

Methodenname	Fluss [mL/min]	t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
pM1	11	0	97	3
		13	97	3
		14	60	40
		19	60	40
		20	97	3
		25	97	3
pM2	11	0	93,1	6,9
		13	93,1	6,9
		14	60	40
		19	60	40
		20	93,1	6,9
		25	93,1	6,9
pM3	10	0	99	1
		6,5	99	1
		14	75	25
		18	75	25
		19	60	40
		23	60	40
		15	99	1
		30	99	1
pM4	11	0	99	1

Methodenname	Fluss [mL/min]	t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
		4	99	1
		10	80	20
		13	80	20
		16	75	25
		18	75	25
		19	60	40
		24	60	40
		25	99	1
		30	99	1
pM5	11	0	99	1
		4	99	1
		10	80	20
		13	80	20
		16	75	25
		17	60	40
		22	60	40
		23	99	1
		28	99	1
pM6	15	0	95	5
		5	99	1
		8	85	15
		16	85	15
		26	75	25
		27	50	50
		30	50	50
		31	95	5
		36	95	5
pM7	15	0	95	5
		5	95	5
		8	85	15
		16	85	15
		17	50	50
		20	50	50
		21	95	5
		25	95	5
pM8	15 mL/min	0	95	5

Methodenname	Fluss [mL/min]	t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
		5	99	1
		8	85	15
		16	85	15
		17	50	50
		20	50	50
		21	95	5
		25	95	5
pM9	11	0	93,1	6,9
		13	93,1	6,9
		14	10	90
		24	10	90
		26	93,1	6,9
		30	93,1	6,9
pM10	12	0	100	0
		13	100	0
		14	20	80
		24	20	80
		25	100	0
		30	100	0
pM11	15	0	100	0
		13	100	0
		14	20	80
		24	20	80
		25	100	0
		30	100	0
pM12	12	0	99	1
		5	99	1
		8	93	7
		18	93	7
		23	10	90
		33	10	90
		35	99	1
		40	99	1
pM13	11	0	95	5
		13	95	5

Methodenname	Fluss [mL/min]	t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
		14	10	90
		24	10	90
		26	95	5
		30	95	5
pM14	11	0	97,5	2,5
		13	97,5	2,5
		14	10	90
		24	10	90
		26	97,5	2,5
		30	97,5	2,5
pM15	11	0	97,5	2,5
		7	97,5	2,5
		10	90	10
		20	90	10
		26	10	90
		32	10	90
		34	97,5	2,5
		36	97,5	2,5

Die Detektion fand mittels gekoppeltem DAD bei $\lambda = 195$ nm im Bereich 190-400 nm statt. 190 nm stellte dabei die untere Detektionsgrenze des Detektors dar. Das Ausweichen auf einen anderen Detektor machte aus logistischen Gründen keinen Sinn. Nichtsdestotrotz führte die Detektion im kurzwelligen Bereich unter den gegebenen Bedingungen zu einem erhöhten Hintergrundrauschen. Zudem konnte bereits bei geringen Änderungen im Fließmittelgradienten ein deutlicher Anstieg der Basislinie beobachtet werden, der z.T. wie ein Peak aussah. Anhand von regelmäßigen Kontrollen mit Blanks konnten diese Unebenheiten erkannt und richtig interpretiert werden.

Die Proben wurden vor der Injektion aufbereitet, indem sie in Acetonitril 95% oder einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (meist 1:1, v/v) gelöst wurden. Unlösliche Rückstände wurden durch Zentrifugation (2000-4000 rpm, 5-10 min) abgetrennt und rückgewogen. Vorversuche an der analytischen HPLC zeigten, dass die Peakverbreiterung deutlich geringer war, wenn die Proben statt in Wasser in Acetonitril 95% gelöst wurden. Da die Trennung von Aucubin und Catalpol aufgrund ihrer hohen Strukturähnlichkeit *per se* gering war, war es von umso größerer Relevanz, die Entfernung der Retentionszeiten voneinander so maximal und die Peakverbreiterung so minimal wie möglich zu halten. Obwohl die Löslichkeit in Wasser besser war als in Acetonitril, wurde deshalb versucht einen möglichst hohen Acetonitrilanteil aufzubringen. Pro Lauf wurde die Säule mit Injektionsmengen von 0,5-27,4 mg bzw. 0,2-5,9 mg für C5.2F1-7 bzw.

C4.2+C4.2 CC.2-9 (ohne von CC.5) beladen. Die Läufe ein und derselben Probe mit ein und derselben Methode konnten von Tag zu Tag aber auch innerhalb eines Tages variieren. Dies erforderte eine laufende, flexible Anpassung der Methoden. Mitunter werden dafür die unterschiedlich hohen Injektionsmengen und -volumina sowie Stoffgemischzusammensetzungen der injizierten Fraktionen verantwortlich gemacht. Außerdem wird als ein gravierender Grund für die Inkonsistenz der Läufe die deutlich schwankende Außen-/Raumtemperatur (20-40°C) angenommen. Die Säule befand sich nicht in einem temperierbaren Säulenofen und war somit direkt der Raumtemperatur und damit im Extremfall Differenzen bis zu 20°C ausgesetzt. Das erschwerte die Zuordnung der Peaks. Es war folglich nicht auszuschließen, dass es sich bei einem oder mehreren der unterschiedlich bezeichneten Isolate um dieselbe Substanz handelt. Dies war vor allem bei der präparativen Aufarbeitung der Isolate zur Überprüfung der Genuität der IGs relevant. Bei der Isolierung von Aucubin und Catalpol spielte dies eine untergeordnete Rolle. Je nach Fragestellung wurden alle interessant erscheinenden Peaks mittels des in der präparativen HPLC integrierten, automatischen Fraktionskollektor gesammelt und bei Bedarf vereinigt. Sie wurden unter Stickstoff vom Lösungsmittel befreit und lyophilisiert (Kapitel 3.5.5). Zur Darstellung von Aucubin und Catalpol wurden folgende Fraktionen miteinander vereinigt: C5.2.F2 und C5.2.F3, C5.2.F4 und C5.2.F5 sowie C5.2.F6 und C5.2.F7 (Kapitel 3.2). Alle durchgeführten Läufe inklusive entsprechender relevanter Parameter sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Tabelle 3.10: Übersicht der durchgeführten Läufe an der präparativen HPLC zur Isolierung der Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol aus *P. lanceolata*. Die untersuchten Fraktionen C5.2F1-7 stammen aus der CPC Fraktion C5.2.

Fraktion	Einwaage Nr.	Einwaage [mg]	V [μ L]	Lauf Nr.	Injektion V [μ L]	Beladungsmenge [mg]	Methode			
C5.2.F1	1	5,1	1000	1	100	0,5	pM1			
				2	350	1,8	pM1			
				3	350	1,8	pM1			
C5.2.F2+F3	1	8,7	1000	1	1000	8,7	pM1			
				2	500	5,6	pM2			
	3	5,0	200	1	100	2,5	pM3			
				2	100	2,5	pM4			
				4	10,7	400	1	150	4,0	pM4
							2	100	2,7	pM5
	5	18,0	300	3	80	2,0	pM5			
				4	80	2,0	pM5			
				1	100	6,0	pM5			
				2	59	3,0	pM5			
	6	44,9	500	3	150	9,0	pM5			
				1	100	9,0	pM5			
				2	250	22,5	pM5			
				3	150	13,5	pM5			
					4	100	9,0	pM5		

Tabelle 3.10: Übersicht der durchgeführten Läufe an der präparativen HPLC zur Isolierung der Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol aus *P. lanceolata*. Die untersuchten Fraktionen C5.2F1-7 stammen aus der CPC Fraktion C5.2.

Fraktion	Einwaage Nr.	Einwaage [mg]	V [μ L]	Lauf Nr.	Injektion V [μ L]	Beladungsmenge [mg]	Methode
7		44,9	450	1	150	15,0	pM5
				2	100	10,0	pM5
8		129,9	1000	1	150	19,5	pM5
				2	50	6,5	pM5
				3	150	19,5	pM5
				4	100	13,0	pM5
				5	100	13,0	pM5
				6	150	19,5	pM5
				7	150	19,5	pM5
				8	150	19,5	pM5
9		14,7	1000	1	200	2,9	pM5
				2	750	11,0	pM5
C5.2.F4+F5	1	91,4	1000	1	300	27,4	pM1
				2	100	9,1	pM1
				3	50	4,6	pM1
				4	100	9,1	pM1
				5	50	4,6	pM1
				6	50	4,6	pM1

Tabelle 3.10: Übersicht der durchgeführten Läufe an der präparativen HPLC zur Isolierung der Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol aus *P. lanceolata*. Die untersuchten Fraktionen C5.2F1-7 stammen aus der CPC Fraktion C5.2.

Fraktion	Einwaage Nr.	Einwaage [mg]	V [μ L]	Lauf Nr.	Injektion V [μ L]	Beladungsmenge [mg]	Methode
				7	100	9,1	pM1
				8	50	4,6	pM1
				9	50	4,6	pM1
				10	50	4,6	pM1
				11	100	9,1	pM1
	2	84,8	1000	1	100	8,5	pM1
				2	200	17,0	pM1
				3	250	21,2	pM1
				4	250	21,2	pM1
	3	8,1	900	1	150	1,4	pM1
				2	150	1,4	pM1
				3	250	2,3	pM1
				4	150	1,4	pM1
				5	150	1,4	pM1
C5.2.F6+F7	1	22,0	1000	1	500	11,0	pM5
				2	500	11,0	pM5
	2	38,6	1000	1	150	5,8	pM6
				2	200	7,7	pM7

Tabelle 3.10: Übersicht der durchgeführten Läufe an der präparativen HPLC zur Isolierung der Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol aus *P. lanceolata*. Die untersuchten Fraktionen C5.2F1-7 stammen aus der CPC Fraktion C5.2.

Fraktion	Einwaage Nr.	Einwaage [mg]	V [μ L]	Lauf Nr.	Injektion V [μ L]	Beladungsmenge [mg]	Methode
				3	200	7,7	pM8
				4	200	7,7	pM8
				5	200	7,7	pM8

Aus den sieben präparativ aufgearbeiteten Fraktionen (C5.2F1-7) wurden acht Isolate erhalten, aufgelistet in Tabelle 3.11. In der Bezeichnung der Isolate ist die Fraktion, aus der sie isoliert wurden, enthalten und wird daher nicht explizit mit angegeben.

Tabelle 3.11: Isolierungsparameter der sechs nicht charakterisierten Isolate nach präparativer HPLC-DAD Analyse, die aus den Fraktionen C5.2F1-7 gewonnen werden konnten.

Isolat Nr.	Bezeichnung	Auswaage [mg]	t _R [min]	Methode	Mutterfraktion
1	P1	0,3	12,6	pM5	F3
2	P2	0,8	7,4	pM1	F1
3	P3	1,7	8,8	pM1	F1
4	P4	0,5	17,2	pM5	F4
5	P5	1,3	9,8	pM6	F7
6	P6	0,5	15,5	pM6	F7

3.5.13 Analytische HPLC-DAD

Die Reinheit der isolierten Verbindungen Aucubin und Catalpol wurde per MaxPlot an einer EliteLaChrom HPLC von Hitachi (Tokio, Japan; Vertrieb: VWR, Darmstadt, Deutschland) mit Autosampler L2200, Pumpe L2130, Säulenofen L2350, Dioden-Array-Detektor L2444 und Software EZChrome Elite 3.1.7 bestimmt. Als stationäre Phase kam eine 250 x 4,6 mm Hibar[®] Säule mit Purospher[®] Star RP18e 5 µm Material mit Vorsäule (Merck, Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz. Die Säulenofentemperatur betrug 25 °C, der Autosampler 4 °C. Die mobile Phase setzte sich aus millipore Wasser (A) und HPLC grade Acetonitril (B) mit jeweils 0,01% Ameisensäure > 98% zusammen. Aucubin und Catalpol wurden über den Gradienten in Tabelle 3.12 chromatographiert, wobei für letztere Verbindung 2 min länger äquilibriert wurde als in dieser angegeben.

Tabelle 3.12: Fließmittelgradient der analytischen HPLC zur Identitäts- und Reinheitsbestimmung des isolierten Aucubins. Bei Catalpol wurde 2 min länger äquilibriert als hier angegeben. Eluenten A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: HPLC grade Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure.

Fluss [mL/min]	t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
1	0	97	3
	10	90	10
	11	20	80
	14	20	80
	15	97	3
	20	97	3

Das Injektionsvolumen belief sich auf 5 μL für Catalpol ($c = 1,00 \text{ mg/mL}$ Wasser/Acetonitril (1:1, v/v)) und Aucubin ($c = 1,68 \text{ mg/mL}$ Wasser/Acetonitril (1:1, v/v)). Die filtrierte Lösung (0,2 μm) der Analyten wurde je dreimal injiziert.

Die Detektion fand im Bereich von 190-400 nm statt. Die aufgenommenen Chromatogramme wurden im MaxPlot Modus analysiert und mithilfe der Software Excel (Microsoft Office 2010) ausgewertet. Die daraus resultierende Reinheit entsprach $99,52 \pm 0,73\%$ (n (Injektion)=3) bzw. $99,08 \pm 0,04\%$ (n (Injektion)=3) für isoliertes Aucubin bzw. Catalpol.

3.5.14 NMR-Spektroskopie

NMR-spektroskopische Untersuchungen $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC, COSY, NOESY dienten der Identifizierung der isolierten Verbindungen Aucubin und Catalpol (Kapitel 3.2). Sie wurden an einem AVANCE III 600 Kryo NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI CryoProbe (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) bei 600,25 MHz ($^1\text{H-NMR}$) bzw. 150,95 MHz ($^{13}\text{C-NMR}$) bei RT von der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg durchgeführt. Alle Spektren wurden über die Lösungsmittelsignale der nicht deuterierten Lösungsmittelrückstände kalibriert. ^1H -, ^{13}C -Daten für Vorversuche wurden mithilfe des AVANCE III 300 NMR-Spektrometers aufgenommen. 10,0 mg Substanz wurden dazu in 0,7 mL Methanol- d_4 vollständig gelöst. Anhand der Software TopSpin 3.2 konnten die aufgenommenen NMR-Spektren ausgewertet werden. Zusätzliche Informationen über die theoretische Bindungslänge zwischen zwei Atomen im Molekül wurden mittels der Software ChemDraw erhalten. Sie erleichterten die räumliche Einordnung der Atome durch NOESY-Daten.

3.5.15 HPLC-DAD/ESI-HRMS/MS

HPLC-DAD/ESI-HRMS/MS-Untersuchungen fanden zur Charakterisierung der gewonnenen Isolate (Kapitel 3.2) Anwendung. Die Analysen wurden von der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg an einem quadrupol-Time of Flight (q-TOF) 6540 UHD (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA) Massenspektrometer mit einer Dual-ESI-Ionenquelle (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich der negative Detektionsmodus besser eignete als der positive (Ergebnisse nicht dargestellt). Daher fanden alle Aufnahmen im negativen Modus statt.

3.5.16 Karl-Fischer-Titration

Die auf der stöchiometrischen Redoxreaktion von zu bestimmendem Wasser mit elementarem Iod, Schwefeldioxid, Alkohol und Base basierende Karl-Fischer-Titration wurde zur Quantifizierung des Wassergehaltes im isolierten Aucubin herangezogen. Die Untersuchungen wurden an einem 870 KF Titrino Plus der Firma METROHM (Filderstadt, Deutschland) mit den Reagenzien Methanol p.a. und der Kombilösung Aquastar ComiTitrant 5 der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland), die die restlichen oben erwähnten, essentiellen Komponenten (Iod, Schwefeldioxid, Base) beinhaltet, durchgeführt. Das Gerät wurde vor den Messungen mit Wasser kalibriert (10 μL , $n=5$). Aliquote des isolierten Aucubins (14,4 mg, 7,3 mg und 8,5 mg) wurden ungelöst in die methanolische Vorlage gegeben und anschließend *via* Titration vermessen. Anhand von Sichtkontrollen wurde geprüft, ob der gesamte Feststoff während der Messung in Lösung überging. Auf diese Weise sollte eine Erfassung der kompletten enthaltenen Wassermenge im Analyt sichergestellt werden. Der ermittelte Wassergehalt im isolierten Aucubin belief sich auf $5,72 \pm 0,29\%$ (n (Einwaage)=3, n (Messung)=1). Mit über 5% befand sich der Wasseranteil somit deutlich über dem Spurenbereich und war folglich von Relevanz für die Bestimmung der absoluten Reinheit des Isolats.

3.5.17 ICP-OES

Der im Aucubin enthaltene Natriumgehalt wurde mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem (Hochfrequenz-)Plasma (ICP-OES) bestimmt. Gemessen wurde dabei die elektromagnetische Strahlung der angeregten Atome beim Übergang vom energetisch höheren in den Grundzustand, welche elementcharakteristisch ist und hervorragend zur Quantifizierung in Vielstoffgemischen eingesetzt werden kann [135, Seite 4-7]. Die ICP-OES wurde von der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg an einem ICP-OES Spectroflame EOP von SPECTRO Analytical Instruments (Kleve, Deutschland) mit Software Smart Analyzer bei der natriumspezifischen Wellenlänge von 589,952 nm und einer Messzeit von 500 ms vorgenommen. Die Quantifizierung fand mithilfe einer externen Kalibriergerade (Natriumchlorid p.a., 1-22 ng Natrium/mL Salpetersäure, $r^2 = 0,9992$) statt. Das Grundrauschen der hergestellten 1 molaren Salpetersäure wurde berücksichtigt. Zur Probenvorbereitung wurden 4,8 mg und 5,4 mg des Isolates in einen 10 mL Messkolben eingewogen, mit 1 molarer Salpetersäure versetzt, 15 min im Ultraschallbad behandelt und nach Abkühlen auf RT bis zur Markierung aufgefüllt. Zum Schutz vor Verstopfung der Anlage wurden die schwarzen Polymerisate des säurelabilen Aucubins durch Filtration (0,2 μm) entfernt. Um den Substanzverbrauch gering zu halten, wurde lediglich eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Dabei konnte ein Natriumgehalt von $0,35 \pm 0,06\%$ (n (Einwaage)=2, n (Messung)=1) ermittelt werden. Dieser befand sich mit unter 1% im Spurenbereich und trug somit nicht wesentlich zum Reinheitsgehalt des Isolates bei. Dies rechtfertigte die Doppel- statt der bei den anderen Reinheitsbestimmungen durchgeführten Dreifachbestimmungen.

Kapitel 4

Verifizierung der Literaturangaben

4.1 Hintergrund, Motivation und Strategie

Ein weiterer Aspekt der Arbeit war es, zu überprüfen, ob die für *P. lanceolata* nachgewiesenen prominentesten IGs (Aucubin, Catalpol, Globularin, Verbenalin, Asperulosid sowie Deacetylasperulosidsäuremethylester (Kapitel 1.1.2.2)) tatsächlich genuin in der Pflanze vorkommen. Im Fokus standen insbesondere die zwei methoxylierten IGs Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester, die potentielle Methoxyartefakte darstellen. Es wurde vermutet, dass diese aufgrund von verwendetem Methanol in Extraktions- und Isolierungsprozessen vorangegangener Arbeiten als Isolate erhalten wurden (Kapitel 1.3), wie bereits für andere methoxylierte Verbindungen beschrieben [90, 136].

Zur Verifizierung der Genuinität der in der Literatur für *P. lanceolata* postulierten Verbindungen wurden zwei Ansätze gewählt, wobei als Untersuchungsmaterial jeweils die getrocknete Pflanze verwendet wurde. Zum einen wurden ausgewählte, IG-reiche Fraktionen aus dem Isolierungsprozess der Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol herangezogen. Der Nachweis der entsprechenden Verbindungen sollte durch die aufkonzentrierte Analytmenge verbessert werden. Während des gesamten Isolierungsprozesses wurde dementsprechend darauf geachtet, Reaktionen, die genuine Verbindungen degradieren können zu unterbinden (Kapitel 3 bzw. 3.1) und komplett auf den Einsatz von Methanol zu verzichten, um der Bildung von Methoxyartefakten vorzubeugen [90]. Zum anderen wurde ein Spitzwegerichrohextrakt untersucht, bei dem keine Anreicherung oder Verlust der gewünschten Verbindungen im Zuge der Fraktionierung stattfand, wodurch die Detektion sehr gering konzentrierter Mengen erschwert wurde.

4.2 Ergebnis und Diskussion

4.2.1 Genuitätsprüfung anhand ausgewählter Fraktionen

Zur Kontrolle der Literaturangaben wurden die in Kapitel 3.2 gewonnenen Fraktion C4.2 und C4.3 vereinigt. Die Vereinigung der beiden Fraktionen erfolgte, um höhere Ausbeuten und damit genügend Material für substanzcharakterisierende Analysen zu erhalten. Die beiden Fraktionen wurden wegen ihrer Elutionsnähe sowie Fingerprintähnlichkeit zu den aucubin-/catalpolhaltigen Fraktionen ausgewählt. Es wurde vermutet, dass die gesuchten IGs in der Nähe von Aucubin und Catalpol eluieren. Die Vermutung stützte sich darauf, dass alle postulierten IGs ein identisches Grundgerüst aufwiesen und damit ein ähnliches chemisches Verhalten wie Retentionsvermögen erwartet wurde. Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur sowie einer ähnlichen Polarität zu Aucubin und Catalpol fiel zur weiteren Aufreinigung die Wahl auf ein Trennverfahren mit polaren bis mittelpolaren Elutionsmitteln. Statt einer MPLC-Chromatographie wurde hier eine offene Säulenchromatographie an Kieselgel durchgeführt (Kapitel 3.5.11). Analog der MPLC eigneten sich auch hier weder Wasser noch Methanol als Komponenten der mobilen Phase, sondern es fiel die Wahl ebenfalls auf einen Gradienten aus Ethanol und Ethylacetat. Aus der Trennung resultierten zehn Unterfraktionen CC.1-CC.10. Letztere verkörperte den Spülschritt mit Methanol und war folglich zur Beantwortung der Frage nach Genuität nicht von Relevanz. Die restlichen, erhaltenen Fraktionen sollten auf das Vorkommen der postulierten IGs untersucht werden. Durch Anwendung diverser Derivatisierungen konnten die Fraktionen per DC charakterisiert und potentiell enthaltene IGs ausfindig gemacht werden (Abbildung 4.1).

Aus Mangel an ausreichend guten Literaturstellen über das Derivatisierungsverhalten von IGs auf der DC, wurden zur Identifizierung der postulierten IGs die bisher gewonnenen Erkenntnissen zu Aucubin und Catalpol herangezogen. Durch Derivatisierungen mit HCl konz. bzw. Vanillin-HCl ergeben Aucubin und Catalpol unter VIS und 366 nm braune Banden. Daher wurde angenommen, dass auch andere IGs diese Färbung aufweisen. Die Identifizierung über das Färbeverhalten sollte mittels Naturstoff-Macrogol-Reagenz kontrolliert werden, welches Flavonoide spezifisch gelb-orange anfärbt (VIS) und für Phenole oft eine blaue Fluoreszenz unter 366 nm ergibt. Außerdem konnten falsch-positive Ergebnisse anhand von Fluoreszenzlöschung auf underivatisierter Platte unter 254 nm überprüft werden. Nebenkomponenten sollten mittels unspezifisch anfärbendem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (VIS, 366 nm, diverse konzentrationsabhängige Farben) nachgewiesen werden.

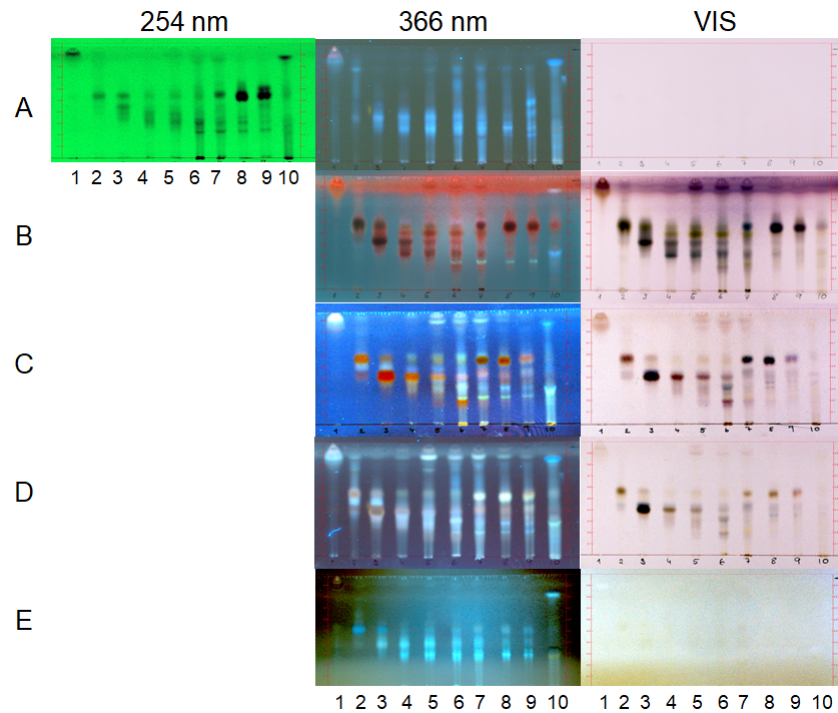


Abbildung 4.1: Übersicht-DC der offenen Säulenchromatographie mit Kieselgel als stationärer sowie Ethylacetat/Ethanol (60:40, v/v) als mobiler Phase. Detektion von links nach rechts: 254 nm, 366 nm und Tageslicht (VIS), Derivatisierung von oben nach unten: underivatisiert (A) sowie Anisaldehyd-Schwefelsäure (B), Vanillin-HCl 2 (C), HCl konz. (D) und Naturstoffreagenz/Macrogol (E) nach 2-5 min und 120°C, Auftragung von links nach rechts Fraktionen CC.1-CC.10 (1-10, je 40 µg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: FM-System 3.

Als potentielle IGs kamen daher zunächst alle durch HCl konz. bzw. Vanillin-HCl braun gefärbten Zonen in Frage (C, D). Neben Aucubin und Catalpol mit R_f 0,42 in Fraktionen CC.3, CC.4 und CC.5 konnten braune Zonen bei R_f 0,58 in Fraktionen CC.2, CC.7, CC.8 und CC.9 (C, D) detektiert werden. Das Wiederauftauchen dieser Bande in weiter hinten liegenden Fraktionen war ein Beweis dafür, dass die Chromatographie an der offenen Kieselgelsäule erfolgreich war. Eine zusätzliche braune Bande bei R_f 0,20 in Fraktion CC.6 konnte anhand der Derivatisierung mit Vanillin-HCl (C) sowohl unter VIS als auch unter 366 nm detektiert werden, die auf ein weiteres IG hindeutete. Zur Überprüfung, ob es sich bei den oben beschriebenen Banden tatsächlich um die gewünschten IGs oder nur um falsch-positive Ergebnisse handelte, wurden phenoltypische Derivatisierungen vorgenommen. In allen Fraktionen traten phenoltypische Fluoreszenzen bei 366 nm auf. Diese lagen direkt unterhalb der Zonen mit R_f 0,58 in Fraktionen CC.2, CC.7, CC.8 und CC.9 sowie direkt oberhalb von R_f 0,20 in Fraktion CC.6. Jedoch konnten sie unter weniger sensitiver Tageslichtdetektion nicht mehr eindeutig registriert werden. Dies deutete darauf hin, dass die enthaltenen phenolischen Verbindungen in geringen Konzentrationen vorkamen. Auf den underivatisierten Platten konnten bei 254 nm Fluoreszenzlöschungen bei R_f 0,58 in den Fraktionen CC.8 und CC.9 beobachtet werden und zwar exakt

auf der Höhe der potentiellen IGs. Dies deutete darauf hin, dass es sich hierbei doch nicht um die gesuchten IGs handelte. Durch den Vergleich mit den anderen DCs wurde klar, dass es sich aller Wahrscheinlichkeit nach bei den potentiellen IGs nicht um falsch-positive Annahmen handelte. Stattdessen besaßen polaritätsähnliche bzw. -gleiche phenolische Substanzen einen ähnlichen bzw. identischen R_f -Wert wie die gesuchten IGs. Bestärkt wurde diese These vor allem durch die bei 366 nm intensiv braunen Banden des Vanillin-HCl-Chromatogramms (C) bei R_f 0,58 in der Fraktion C.2. Die mit Anisaldehyd-Schwefelsäure behandelten Chromatogramme bestätigten die bisherigen Erkenntnisse. Potentiell IG-haltige Fraktionen CC.2 CC.9 ohne Zwischenfraktion CC.5 wurden per präparativer HPLC aufgearbeitet (Kapitel 3.5.12 und Kapitel 4.4.3). Daraus resultierten insgesamt 22 Isolate. Diese wurden *via* LC-HRMS auf die postulierten IGs, speziell auf die methoxylierten IGs hin analysiert. Von den sechs IGs Aucubin, Catalpol, Globularin, Verbenalin, Asperulosid sowie Deacetylasperulosidsäuremethylester konnten Masse-Ladungs-Verhältnisse, die zu den beiden Hauptiridoidglykosiden Aucubin und Catalpol sowie zu Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester mit endständiger Methoxygruppe passten, nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, dass die beiden Methoxyverbindungen in der Tat genuin in der Pflanze enthalten sind. Ob es sich bei den erhaltenen Masse-Ladungs-Verhältnissen tatsächlich um die beiden methoxylierten IGs handelt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht mit Sicherheit gesagt werden. Wegen zu geringen Substanzmengen konnten verifizierende Analysen nicht durchgeführt werden.

Die beiden IGs Globularin sowie Asperulosid konnten anhand der durchgeführten LC-HRMS-Analysen nicht nachgewiesen werden. Dies bedeutet nicht, dass die beiden Verbindungen nicht in der Pflanze enthalten waren. Möglich ist, dass sie sich aufgrund unterschiedlichen Trennverhaltens während der vorgenommenen Fraktionierungsschritte in einer anderen Fraktion befinden.

Globularin, das als einziges IG in *P. lanceolata* eine Zimtsäure besitzt, ist deutlich unpolarer als die restlichen IGs und somit in einer unpolaren Fraktion zu erwarten. Zudem könnte es auch im Rahmen der Aufkonzentrierung an der Sephadexsäule abgetrennt worden sein.

Asperulosid, welches als einziges in *P. lanceolata* enthaltenes IG über einen Lactonring verfügt, könnte sich durch diesen Ring ebenfalls abweichend von den anderen IGs im chromatographischen Prozess verhalten und auf diese Weise im Prozess der Aufkonzentrierung in einer anderen Fraktion zu finden sein.

Um den Effekt des Substanzverlustes während der Fraktionierung zu umgehen, wurde zusätzlich ein Rohextrakt der Spitzwegerichdroge per LC-HRMS analysiert (Kapitel 4.2.2 und 4.4.4).

4.2.2 Genuitätsprüfung anhand eines Rohextrakts

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein methanolfreier Rohextrakt aus *Plantaginis lanceolatae herba* mittels LC-HRMS gescreent (Kapitel 4.4.2 und Kapitel 4.4.4). Ziel war es, herauszufinden, ob die prominentesten, postulierten IGs Aucubin, Catalpol, Globularin, Verbenalin, Asperulosid sowie Deacetylasperulosidsäuremethylester genuiner Herkunft sind.

Im Gegensatz zur Analyse einer ausgewählten Fraktion im Isolierungsprozess sollte durch den Verzicht auf substanzdiskriminierende Aufreinigungsschritte ein möglichst vollständiges Spektrum der Inhaltsstoffe erfasst werden. Insbesondere wurde darauf geachtet, dass sowohl die polareren als auch die unpolaren IGs der Pflanze extrahiert wurden, weswegen ein relativ polares bis mittelpolares Extraktionsmittelgemisch aus Acetonitril/Wasser (1:1, v/v) zum Einsatz kam (Kapitel 4.4.2).

In Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte HPLC-Fingerprintmethodenentwicklung und -validierung wurden neben den oben genannten IGs zusätzlich die in *P. lanceolata* enthaltenen PEs auf ihr natürliches Vorkommen hin kontrolliert. Hierbei standen lediglich die prominentesten PEs der Pflanze im Fokus: Verbascosid, Isoverbascosid, Lavandulifoliosid und Plantamajosid.

Zur LC-HRMS-Analytik wurden die HPLC-Methoden aus der HPLC-Fingerprintmethodenentwicklung herangezogen. Die Bestimmung der Retentionszeit war von Bedeutung, um Isomere herauszufiltern. Das Erkennen von Isomeren sollte durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Säulen gesichert werden. Darüber hinaus wurden zwei unterschiedliche Algorithmen *find by formula* und *find by molecular feature* zur Substanzidentifizierung eingesetzt. Verbindungen, welche gemäß des angewendeten Algorithmuses einen mathematisch-statistischen Score von $\geq 75\%$ aufzeigten, galten als nachgewiesen. Treffer mit kleineren Scores wurden aufgrund der fehlenden statistischen Sicherheit als nicht nachgewiesen deklariert. Die Ergebnisse der LC-HRMS-Analytik an stationärer Biphenylsäule mit einem ameisensauren Wasser-Acetonitril-Gradienten über die Algorithmen *find by formula* und *find by molecular feature* sind der Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Tabelle 4.1: Tabellarische Zusammenstellung der per LC-HRMS nachweisbaren IGs und PEs in einem Spitzwegerichrohextrakt mittels Biphenylsäule. Angegeben werden die verwendeten Algorithmen, die jeweilige Verbindung mit der zugehörigen Stoffklasse, ihre Summenformel, Zielmasse, experimentell ermittelte Masse und Retentionszeit t_R . Als Nachweisgrenze wurde ein Score von $\geq 75\%$ definiert. Verbindungen, die nicht detektiert werden konnten oder sich unterhalb dieser Grenze befanden, wurden als nicht enthalten deklariert. Für diese gab das Programm keine Zielmasse an.

Algorithmus	Stoffklasse	Verbindung	Summenformel	m/z [M-H] ^{- a}	m/z [M-H] ⁻	t_R [min]			
<i>find by formula</i>	IGs	Aucubin	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	346,1264	346,1269	4,645			
					346,1266	5,266			
					346,1264	5,510			
		Asperulosid	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	414,1162	414,1161	15,920			
					Catalpol	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	362,1213	362,1221	3,159
								362,1210	4,057
	Deacetylasperulosidsäuremethyl- ester	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	b	c	c				
	Globularin	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	b	c	c				
	Verbenalin	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	b	c	c				
	PEs	Lavandulifoliosid	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756,2477	756,2473	17,125			
					756,2482	18,254			
					756,2477	18,598			
Plantamajosid		C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	640,2003	640,2007	18,254				

^a Zielmasse

^b wurde vom Programm nicht ermittelt

^c nicht detektiert

Algorithmus	Stoffklasse	Verbindung	Summenformel	m/z [M-H] ^{-a}	m/z [M-H] ⁻	t_R [min]
		(Iso-)Verbascosid	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624,2054	624,2070 624,2054 624,2048	18,892 19,480 20,700
<i>find by molecular feature</i>	IGs	Aucubin	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	346,1264	346,1261 346,1272 346,1268 346,1260	4,642 4,644 5,269 5,270
		Asperulosid	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	414,1162	414,1162	15,917
		Catalpol	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	362,1213	362,1222 362,1212	3,156 4,060
		Deacetylasperulosidsäuremethyl-ester	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	b	c	c
		Globularin	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	478,1475	478,1472 478,1472	19,015 19,231
		Verbenalin	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	b	c	c
	PEs	Lavandulifoliosid	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756,2477	756,2480	18,599
		Plantamajosid	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	640,2003	640,2002	16,993

^a Zielmasse

^b wurde vom Programm nicht ermittelt

^c nicht detektiert

Algorithmus	Stoffklasse	Verbindung	Summenformel	m/z [M-H] ⁻ ^a	m/z [M-H] ⁻	t_R [min]
					640,2000	17,145
					640,2011	18,256
		(Iso-)Verbascosid	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624,2054	624,2072	18,891
					624,2058	19,482

^a Zielmasse

^b wurde vom Programm nicht ermittelt

^c nicht detektiert

Mittels *find by formula* konnten an der Biphenylsäule drei der sechs betrachteten IGs, konkret Aucubin, Asperulosid und Catalpol sowie alle im Mittelpunkt stehenden PEs Lavandulifoliosid, Plantamajosid sowie (Iso-)Verbascosid mit einem Score $\geq 75\%$ nachgewiesen werden. Mithilfe des Algorithmus hinter *find by molecular feature* konnte überdies auch Globularin als Bestandteil im Rohextrakt erfasst werden. Als Konstitutionsisomere ist es nicht verwunderlich, dass Verbascosid und Isoverbascosid zwei Signale gleicher Masse mit unterschiedlichen Retentionszeiten hervorbringen. Durch Abgleich mit den Referenzsubstanzen im Rahmen der HPLC-Methodenentwicklung (Kapitel 6.3.1 und 7.2) konnte Verbascosid dem ersten Signal bei 18,891 min und Isoverbascosid dem späteren bei 19,482 min eindeutig zugeordnet werden. Des Weiteren konnten sowohl Aucubin als auch sein in *P. lanceolata* enthaltenes Epimer 6-*epi*-Aucubin detektiert werden. Für Plantamajosid konnte anhand dieses Algorithmus nur ein Signal beobachtet werden. Sein im Spitzwegerich enthaltenes Isomer Plantainosid D konnte demnach nicht aus den Ergebnissen bestätigt werden.

Unerwartet war, dass auch Zielverbindungen, für die *bis dato* keine bzw. nur eine Isoform in *P. lanceolata* bekannt ist, anhand beider Algorithmen multiple Signale erzeugten und somit nahelegten, dass im Spitzwegerich (weitere) isomere Formen dieser Substanzen vorliegen. Im *find by formula* Modus ergaben sich dementsprechend für Aucubin und Lavandulifoliosid insgesamt drei und für Catalpol zwei unterschiedliche Signale. Interessant ist überdies die Existenz eines weiteren Signals für die Summenformel von (Iso-)Verbascosid, das auf eine weitere Isoform hindeutet. Gleiches gilt für (6-*epi*-)Aucubin. Die Ergebnisse des *find by formula* Modus konnten teilweise durch die Auswertung mittels *find by molecular feature* bestätigt werden. Hier ergaben sich für Aucubin jedoch vier statt drei unterschiedliche Signale. Die Anzahl an Signalen für Catalpol blieb identisch. Lavandulifoliosid rief stattdessen nur noch ein Signal hervor. Dafür wurden für Plantamajosid, statt wie zuvor ein Signal, *via find by molecular feature* drei unterschiedliche Signale aufgezeichnet, wobei eines davon mit hoher Wahrscheinlichkeit seinem in *P. lanceolata* enthaltenem Isomer Plantainosid D entspricht. Verbascosid und Isoverbascosid resultierten statt der vorherigen drei in zu erwartende zwei Signale. Die restlichen Zielstrukturen lieferten erwartungsgemäß nur ein Signal und werden deshalb nicht näher diskutiert.

Um diese Ergebnisse gegenzuprüfen wurden die gleichen LC-HRMS-Analysen an einer C8e-Säule durchgeführt (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Tabellarische Zusammenstellung der per LC-HRMS nachweisbaren IGs und PEs in einem Spitzwegerichrohextrakt mittels C8e-Säule. Angegeben werden die verwendeten Algorithmen, die jeweilige Verbindung mit der zugehörigen Stoffklasse, ihre Summenformel, Zielmasse, experimentell ermittelte Masse und Retentionszeit t_R . Als Nachweisgrenze wurde ein Score von $\geq 75\%$ definiert. Verbindungen, die nicht detektiert werden konnten oder sich unterhalb dieser Grenze befanden, wurden als nicht nachgewiesen deklariert. Für diese gibt das Programm keine Zielmasse an.

Algorithmus	Stoffklasse	Verbindung	Summenformel	m/z [M-H] ⁻ ^a	m/z [M-H] ⁻	t_R [min]
<i>find by formula</i>	IGs	Aucubin	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	346, 1264	346, 1281	6, 469
					346, 1278	7, 706
					346, 1274	12, 542
		Asperulosid	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	414, 1162	414, 1179	14, 561
					Catalpol	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀
		362, 1226	4, 384			
	362, 1227	12, 985				
	PEs	Deacetylasperulosidsäure-methylester	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	b	c	c
					Globularin	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁
		Verbenalin	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	b		
					Lavandulifoliosid	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉
		756, 2495	16, 535			
		756, 2491	16, 962			
		Plantamajosid	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	640, 2003	640, 2021	18, 535

^a Zielmasse

^b wurde vom Programm nicht ermittelt

^c nicht detektiert

Algorithmus	Stoffklasse	Verbindung	Summenformel	m/z [M-H] ^{- a}	m/z [M-H] ⁻	t_R [min]
		(Iso-)Verbascosid	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624, 2054	624, 2082 624, 2067	17, 356 18, 188
<i>find by molecular feature</i>	IGs	Aucubin	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	346, 1264	346, 1279	7, 706
		Asperulosid	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	414, 1162	414, 1178	14, 560
		Catalpol	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	362, 1213	362, 1236 362, 1227	3, 319 4, 384
		Deacetylasperulosidsäure-methylester	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	b	c	c
		Globularin	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	478, 1475	478, 1488	17, 494
		Verbenalin	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	b	c	c
	PEs	Lavandulifoliosid	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	756, 2477	756, 2494	16, 958
		Plantamajosid	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	640, 2003	640, 2013 640, 2024	15, 493 16, 532
		(Iso-)Verbascosid	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624, 2054	624, 2088 624, 2069	17, 355 18, 185

^a Zielmasse

^b wurde vom Programm nicht ermittelt

^c nicht detektiert

Die LC-HRMS-Untersuchungen an der C8e-Säule führten zu ähnlichen Ergebnissen wie an der Biphenylsäule. Mittels *find by formula*-Algorithmus konnten für (6-*epi*-)Aucubin und Lavandulifoliosid, wie gehabt, je drei Signale detektiert werden. Das an der Biphenylsäule mit zwei Signalen vertretene Catalpol, brachte an der C8e-Säule *via find by formula*-Algorithmus nun ebenfalls drei Signale hervor. Beide Algorithmussysteme resultierten hingegen für (Iso-) Verbascosid an stationärer C8e-Säule in den erwarteten zwei Signalen. Catalpol und Lavandulifoliosid wiesen je zwei Signale auf. Für Plantamajosid bzw. Plantainosid D konnte *find by formula*-Modus ein, im *find by molecular feature*-Modus drei Signale detektiert werden. Mithilfe des Modus *find by molecular feature* wurden insgesamt weniger Isoformen erfasst als mit *find by formula*. Die restlichen Zielstrukturen zeigten erwartungsgemäß nur ein Signal und geben damit keinen Anlass zur näheren Diskussion.

Qualitativ konnten schlussendlich die IGs Globularin, Asperulosid, Aucubin und Catalpol sowie die PEs Lavandulifoliosid, Plantamajosid, Verbascosid und Isoverbascosid im angewendeten Spitzwegerichrohextrakt nachgewiesen werden, weswegen diese - in Einklang mit den Literaturdaten - als genuin vorkommend angenommen werden. Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester konnten im Screening des Rohextraktes zwar nicht detektiert werden, doch ist ihr natürliches Vorkommen in der Pflanze deshalb nicht automatisch ausschließbar. Denkbar wäre, dass sie in geringen, nicht-detektierbaren Mengen in der Pflanze vorliegen, dass sie im nicht-aufkonzentrierten Rohextrakt unterhalb der Detektionsgrenze lagen und somit nicht nachgewiesen werden können.

Weiterhin ist anzumerken, dass die teilweise unstimmigen Informationen aus den zwei angewendeten Algorithmussystemen verdeutlichen, dass die erhaltene Datenlage stark vom eingesetzten mathematischen System abhängt, das für die Auswertung der Daten genutzt wird. Der resultierende mathematisch-statistische Score des zugrundeliegenden Algorithmus sowie die festgelegte Nachweisgrenze beeinflussen zudem das Ergebnis der Auswertung und sind bei einer kritischen Einstufung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Besonders hervorzuheben ist, dass im Rahmen der vorgenommenen Untersuchungen erstmalig Hinweise zur Existenz von Isoformen der Verbindungen Catalpol, Globularin, und Lavandulifoliosid in *P. lanceolata* beschrieben werden konnten. Darüber hinaus besteht die begründete Vermutung, dass je eine weitere Isoform der bereits bekannten Konstitutionsisomere Verbascosid und Isoverbascosid sowie der Konstitutionsisomere Plantamajosid und Plantainosid D in *P. lanceolata* existiert. Des Weiteren geben die Ergebnisse Grund zur Annahme, dass mindestens zwei weitere Isoformen des (6-*epi*-)Aucubins im Spitzwegerich vorliegen. Im anschließenden Kapitel 4.2.3 soll das Vorkommen bekannter und neuer Isoformen ausführlicher diskutiert werden.

4.2.3 Postulierung neuer Isoformen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für die Spezies *P. lanceolata* neue potentielle Isoformen der enthaltenen IGs und PEs postuliert werden (Kapitel 4.2.2). Eine Zusammenfassung der LC-HRMS-Ergebnisse in Hinblick auf potentielle Isomere an den beiden herangezogenen stationären Phasen Biphenyl und C8e mit Auswertungen anhand beider Algorithmenmodi *find by formula* sowie *find by molecular feature* als Diskussionsgrundlage bietet Tabelle 4.3. Die Anzahl an gemessenen Signalen wird der Anzahl der Strukturformeln, also Originalverbindungen plus Isoformen, gleichgesetzt.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der LC-HRMS-Ergebnisse in Hinblick auf potentielle Konstitutionsisomere. Angegeben ist die maximale Anzahl an gemessenen Signalen pro postulierter Substanz sowie die Anzahl der daraus resultierenden potentiellen Konstitutionsisomere. Als Nachweisgrenze wurde ein Score von $\geq 75\%$ definiert. Berücksichtigt wurden die Ergebnisse der Analytik an der Biphenyl- sowie C8e-Säule sowie Auswertungen anhand der Algorithmenmodi *find by formula* sowie *find by molecular feature*.

Stoffklasse	Verbindung	max. Signalanzahl	Anzahl der Isomere
IGs	Aucubin	4	3
	Asperulosid	1	0
	Catalpol	3	2
	Deacetylasperulosidsäure-methylester	0	0
	Globularin	2	1
	Verbenalin	0	0
PEs	Lavandulifoliosid	3	2
	Plantamajosid	3	2
	(Iso-)Verbascosid	3	2

Insgesamt können aufgrund der hier erhobenen Daten vier Formen für Aucubin, drei für Catalpol, zwei für Globularin und je drei für Lavandulifoliosid, Plantamajosid sowie (Iso-)Verbascosid angenommen werden. Für Asperulosid zeichnete sich nur ein Signal ab, was folglich auf lediglich eine Konstitutionsform hindeutet. Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester konnten nicht im Rohextrakt, dafür in einer ausgewählten Fraktion nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.1). Die Nachweise in der ausgewählten Fraktion ließen keinen Hinweis auf mehrere Isoformen der beiden genannten IGs in *P. lanceolata* erkennen.

Die Existenz von Isocatalpol wurde für *P. maxima* [137, 138], *Veronica spicata* [137] und *Euphrasia brevipila* [139] in der Literatur beschrieben. Für *P. lanceolata* ist diese Isoform jedoch bisher unbekannt. Auch Nemereshina et al. [137], die sich ausführlich mit der Analytik entsprechender IGs in diversen *Plantaginaceae*n befassten, konnten kein Isocatalpol in Spitzwegerichblättern nachweisen. Im Gegensatz zu den hier ermittelten MS-Daten, die auf insgesamt zwei zusätzliche Isoformen hindeuten, wird in der Literatur nur eine beschrieben. Dieser Kontroverse gilt es in weiteren Analysen nachzugehen, die im Rahmen dieser Arbeit offen bleibt. Anzumerken ist weiterhin, dass eine Strukturformel des Isocatalpols weder in den entsprechenden Literaturstellen noch *via* Scifinder

dargestellt wird, weswegen über die genaue Struktur des Isomers nur spekuliert werden kann. Bezüglich der Polarität konnte mit unterschiedlichen FM-Systemen auf stationärer Kieselgelplatte gezeigt werden, dass sich Isocatalpol polarer als Catalpol verhält Nemereshina et al. [137], Tinkov et al. [138] und Suchinina et al. [139], begründet durch den eindeutig niedrigeren R_f -Wert. Darüber hinaus konnte ein unterschiedliches Anfärbeverhalten während der Derivatisierung beobachtet werden Nemereshina et al. [137], Tinkov et al. [138] und Suchinina et al. [139]. Es liegen weder strukturcharakterisierende NMR- noch MS-Daten zu Isocatalpol in der Literatur vor.

Im Gegensatz zu Aucubin ist das Vorhandensein seines Epimers 6-*epi*-Aucubin in der Literatur weniger bekannt (Kapitel 1.1.2.2). Isoaucubin wurde bis *dato* für diverse *Alectra*- und *Striga*-Spezies [140] sowie für *Hygrophila polysperma* [141] und *Aeginetia indica* L. [142], jedoch bis *dato* nicht für *P. lanceolata* in der Literatur beschrieben. In den genannten Literaturstellen sowie mittels Scifinder wird die Strukturformel für Isoaucubin einstimmig formuliert. Isoaucubin (β -D-Glucopyranoside, (1S,4aS,7aR)-1,4a,5,7a-tetrahydro-4a-hydroxy-7-(hydroxymethyl)cyclopenta[C]pyran-1-yl) ist demnach ein Konstitutionsisomer des Aucubins (β -D-Glucopyranoside, (1S,4aR,5S,7aS)-1,4a,5,7a-tetrahydro-5-hydroxy-7-(hydroxymethyl)cyclopenta[C]pyran-1-yl), wobei die endständige Hydroxylgruppe statt an Position C6 an Position C5 lokalisiert ist (Abbildung 4.2).

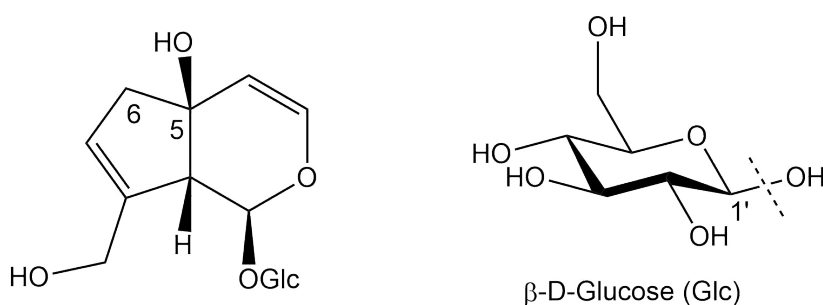


Abbildung 4.2: Strukturformel von Isoaucubin [142].

Die Struktur von Isoaucubin wird in der Literatur durch NMR-Daten eindeutig definiert [142]. Verifizierende MS-Daten des beschriebenen Isoaucubins liegen bis *dato* nicht vor. Ob die Epiform des Aucubins und/oder das in der Literatur für andere Pflanzen postulierte Isoaucubin zu den drei detektierten Isomersignalen gehören, gilt es in zukünftigen Analysen zu verifizieren. Auch kann das Auftreten zusätzlicher epimerer Formen nicht ausgeschlossen werden.

Keine Isoformen werden in der Literatur für Deacetylasperulosidsäuremethylester, Verbenalin, Asperulosid und Globularin beschrieben, wobei bei der Literaturrecherche diverse Trivialnamen berücksichtigt wurden. In den hier durchgeführten Experimenten konnten Deacetylasperulosidsäuremethylester und Verbenalin nicht im Rohextrakt, jedoch in der ausgewählten Analysefraktion detektiert werden. In Einklang mit der Literatur bestehen anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten für beide Verbindungen keine

Hinweise auf isomere Formen. Auch für Asperulosid, das im Rohextrakt, jedoch nicht in der Einzelfraktion detektiert werden konnte, ergaben die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Hinweis auf enthaltene Isomere der Verbindung in *P. lanceolata* und stimmen somit mit den Literaturangaben überein. Für Globularin konnte in Diskrepanz zur Literaturlage experimentell eine existierende Isoform ermittelt werden. Die unterschiedliche Datenlage zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den bisherigen Daten der Literatur ist in weiteren Experimenten zu überprüfen.

Für Lavandulifoliosid konnte in der Literatur die Isoform Isolavandulifoliosid u.a. für *Sideritis trojana* [143], jedoch nicht für *P. lanceolata* beschrieben werden (Abbildung 4.3).

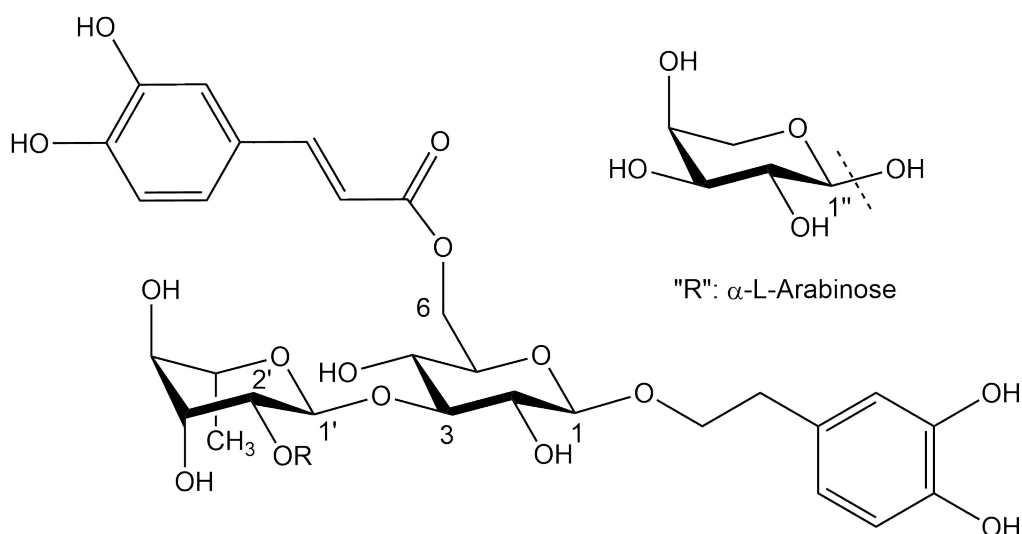


Abbildung 4.3: Strukturformel von Isolavandulifoliosid [143].

Im Gegensatz zu Lavandulifoliosid (β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl *O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-, 4-[(2*Z*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]) ist bei Isolavandulifoliosid (β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl *O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-, 6-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]) die Kaffeesäure an C6 der mittelständigen Glukose statt an C4 verestert. Es konnten keine charakterisierenden MS-Literaturdaten für Isolavandulifoliosid in der Literatur gefunden werden. Statt der hier ermittelten zwei konnte anhand einschlägiger Literaturdaten nur eine weitere Isoform für Lavandulifoliosid belegt werden [143]. Es ist darüber hinaus anzumerken, dass das im Spitzwegerich beinhaltete Forsythosid B die selbe Summenformel wie (Iso-) Lavandulifoliosid aufweist. Es unterscheidet sich von Lavandulifoliosid einzig in den Zuckern. Während bei Lavandulifoliosid an der α -L-Rhamnose eine α -L-Arabinose verknüpft ist und Position 6 der zentralen Glukose eine OH-Gruppe sitzt, weist Forsythosid B keinen weiteren Zucker an der α -L-Rhamnose auf, jedoch befindet sich bei Forsythosid B an Position 6 der mittelständigen Glukose eine Apiose. Substanzverifizierende Analysen stehen noch aus.

Isoplantamajosid (Synonym: Plantainosid D) konnte u.a. in den Samen von *P. major* L.

[144], *P. asiatica* L. [144, 145] und *P. depressa* WILLD. [144, 145] sowie den oberirdischen Teilen der letzten beiden Arten [145, 146] nachgewiesen werden. Auch für *P. lanceolata* L. wird es beschrieben [16]. Die Struktur von Isoplantamajosid inklusive MS-Fragmentierungsmuster wird in der Literatur ausführlich dargelegt [144, 145, 146, 147] und stehen im Einklang mit den Strukturinformationen von Scifinder (Kapitel 1.1.2.4). Isoplantamajosid und Plantamajosid unterscheiden sich, wie bei (Iso-) Lavandulifoliosid, in der Stellung der Kaffeesäure, die bei Isoplantamajosid an C6 und bei Plantamajosid an C4 der mittelständigen Glukose verestert ist. Zudem wird für die endständige Glukose bei Isoplantamajosid im Gegensatz zu Plantamajosid am C3-Atom der mittelständigen Glukose eine S statt einer R-Konfiguration postuliert. In Analogie zu Lavandulifoliosid, konnte auch für Plantamajosid trotz Berücksichtigung der Trivialnamen nur eine Isoform in der Literatur bestätigt werden [16], obwohl experimentelle Daten dieser Arbeit auf zwei Isoformen hinweisen. Weiterführende Untersuchungen, um die Existenz einer zweiten Isoform zu bestätigen, stehen noch aus.

Für Verbascosid ist bis *dato* nur das Konstitutionsisomer Isoverbascosid als Inhaltsstoff von *P. lanceolata* bekannt. Während die im Molekül enthaltene Kaffeesäure bei Verbascosid (β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 3-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 4-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]) an C4 verankert ist, befindet sie sich bei Isoverbascosid an Pos. C6. Außerdem unterscheiden sich die Isomere in der Konfiguration der endständigen Rhamnose, die für Isoverbascosid im Gegensatz zu Verbascosid S-konfiguriert an C3 der mittelständigen Glukose verbunden ist. Das Vorkommen von Isoverbascosid in *P. lanceolata*, seine chemische Struktur sowie näher charakterisierende Daten wie NMR, MS und UV sind in der Literatur einschlägig belegt (Kapitel 1.1.2.4). Theoretisch sind weitere Konstitutionsisomere möglich. Einige davon wurden bereits in der Literatur für andere Pflanzen beschrieben, wie z.B. Forsythosid A [148, 149, 150], Forsythosid H [150] und Forsythosid I [150]. Synonyme Trivialnamen für Forsythosid A (β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 6-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 2-[(2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]) lauten Forsythiasid bzw. Forsythiasid A. Forsythosid H (β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 6-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 3-[(2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]) besitzt keine Synonyme. Forsythosid I (β -D-Glucopyranosid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 6-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 4-[(2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoat]) wird in der Literatur auch als Isoforsythosid oder Lianqiaoxinsid A bezeichnet.

Das Vorliegen verschiedener Trivialnamenstämmen (Verbascosid vs. Forsythosid) deutet auf unterschiedliche Fundquellen bzw. genuines Vorkommen in verschiedenen Pflanzen hin. Alle drei Isomere konnten in *Forsythia suspense* (THUNB.) VAHL erfasst werden [148, 150]. Forsythosid A konnte zudem in Oliven nachgewiesen werden [149]. Abgesehen von der 3,4-Dihydroxy-phenethyl-Einheit, die stets an Position 1 der mittelständigen Glukose verknüpft ist, variieren die Konstituenten α -L-Rhamnose (Rha) und Kaffeesäure (KS) in den Konstitutionsisomeren des Verbascosids (Abbildung 4.4, Tabelle 4.4).

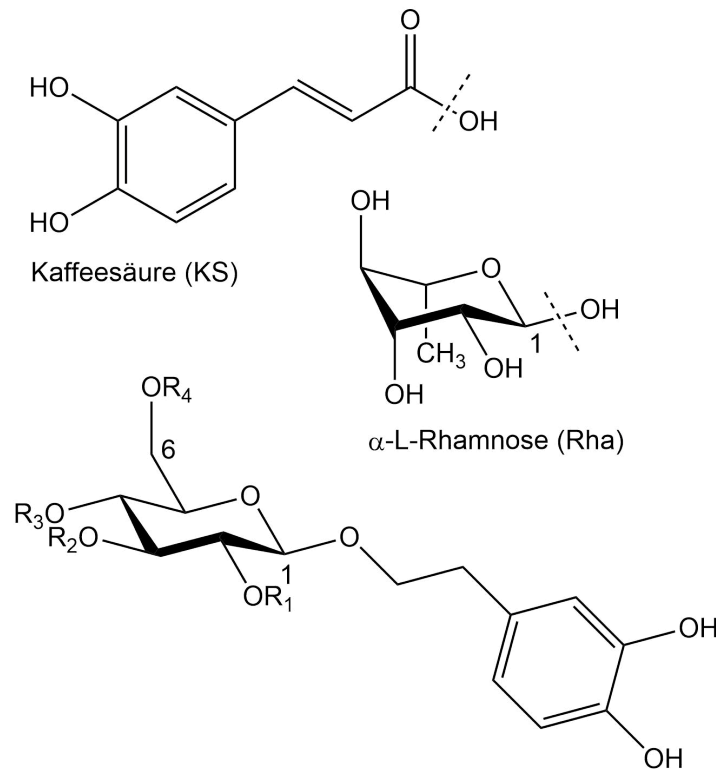


Abbildung 4.4: Struktureller Aufbau der in Pflanzen beschriebenen Konstitutionsisomere des Verbascosids.

Tabelle 4.4: Struktureller Aufbau der in Pflanzen beschriebenen Konstitutionsisomere des Verbascosids.

Substanzname	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Verbascosid ^a	H	Rha ^c	KS	H
Isoverbascosid ^a	H	Rha ^c	H	KS
Forsythosid A ^b	H	H	KS	Rha ^c
Forsythosid H ^b	KS	Rha ^c	H	Rha ^c
Forsythosid I ^b	H	KS	H	Rha ^c

^a Vorkommen für *P. lanceolata* nachgewiesen

^b Vorkommen nachgewiesen, aber bis *dato* noch nicht für *P. lanceolata* beschrieben

^c O-glykosidische Bindung: Rha 1' → Glu

Da neben den für *P. lanceolata* bekannten PEs Iso- und Verbascosid noch eine weitere Verbindung des gleichen Masse-Ladungs-Signals in der Pflanze erfasst werden konnte, ist es denkbar, dass es sich bei dieser Substanz um eines der bereits für andere Pflanzen beschriebenen Konstitutionsisomere Forsythosid A, Forsythosid H oder Forsythosid I handelt. Ungewöhnlich im Vergleich zu den bisherigen für *P. lanceolata* postulierten PEs ist hierbei die Bindung der Caffeoyleinheiten an Position 2 der zentralen Glukose des PEs Forsythosid H. Bei allen anderen PEs, die aktuell für Spitzwegerich beschrieben werden, befindet sich an dieser Position eine OH-Gruppe. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit ein bekanntes (Isoverbascosid) sowie die neuen Isomere Isoaucubin, Isocatalpol, Isolavandulifoliosid, Isoplantamajosid, Neoisoaucubin A und B, Neoisocatalpol A, Neoisolavandulifoliosid A, Neoisoplantamajosid A und Neoisoverbascosid A für *P. lanceolata* entdeckt werden konnten (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Einpflegen der in *P. lanceolata* entdeckten neuen IG- und PE-Isomere in den bisherigen wissenschaftlichen Kontext. Angegeben sind die für *P. lanceolata* postulierten Originalverbindungen, allgemein bekannte Isoformen, speziell für *P. lanceolata* bekannte Isoformen und bisher unbekannte Isomere.

Stoffklasse	Original- verbindung	allgemein bekannte Isomere	für <i>P. lanceo- lata</i> bekann- te Isomere	experimentell ermittelte Gesamt- zahl an potentiellen Isomeren in <i>P. lanceolata</i>
IGs	Aucubin	Isoaucubin, 6- <i>epi</i> -- Aucubin	6- <i>epi</i> -- Aucubin	3
	Asperulosid	-	-	0
	Catalpol	Isocatalpol	-	2
	Deacetylasperu- losidsäuremethyl- ester	-	-	0
	Globularin	-	-	1
	Verbenalin	-	-	0
PEs	Lavandulifoliosid	Isolavanduli- foliosid	-	2
	Plantamajosid	Isoplantama- josid	Isoplantama- josid	2
	Verbascosid	Isoverbas- cosid, For- sythosid A, Forsytho- sid H und Forsythosid I	Isoverbasco- sid	2

Isoaucubin, Isocatalpol, Isolavandulifoliosid, Isoplantamajosid sowie die Verbascosidisomere Forsythosid A, Forsythosid H und Forsythosid I wurden dabei in der Literatur für andere Pflanzen jedoch nicht für *P. lanceolata* beschrieben. Die restlichen, in dieser Arbeit mit „Neo-“ betitelten Isomere wurden bisher weder für *P. lanceolata* noch für eine andere Pflanze beschrieben. Die provisorischen Namen Neoisoaucubin A, Neoisocatalpol A, Neoisolavandulifoliosid A, Neoisoplantamajosid A und Neoisoverbascosid A bezeichnet, wobei ein oder beide Isomere des Aucubins Iso- und 6-*epi*-Aucubin darstellen können. Weiter besteht die Möglichkeit, das letzteres eines der drei in der Literatur bekannten Verbascosidisomere ist. Der Zusatz „A“ bzw. „B“ soll darauf hindeuten, dass noch weitere Isomere der Originalverbindung erwartet werden.

Eine exakte, strukturelle Aufklärung der unbekannt Substanzen war anhand der herangezogenen Methoden nicht möglich. Als Grundlage gilt lediglich das Auffinden massen-/ladungsgleicher Verbindungen per LC-DAD/ESI-HRMS. Ob diese Verbindungen genuin von der Pflanze biosynthetisiert oder durch Isomerisierungsprozesse außerhalb der Pflanze gebildet wurden, ist überdies in zukünftigen Experimenten zu ermitteln.

Neben konstitutionscharakterisierende 2D-NMR-Messungen, wären zur Bestimmung der genauen Konfigurationen weitere Analysen, wie z.B. das Aufnehmen von Circular dichroismus-Spektren notwendig. Eine HPLC-gekoppelte LC-NMR-Messung würde zudem die Separierung sowie NMR-spektroskopische Auswertung einzelner Isomere anhand ihrer individuellen Retentionszeiten erleichtern. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt können weder die prinzipiell noch die für die Spezies *P. lanceolata* potentiellen neuen isomeren Verbindungen verifiziert oder den Peaks im Chromatogramm zugeordnet werden. Die Notwendigkeit der Verifizierung gilt ebenso für die jeweiligen Originalverbindungen, welche für *P. lanceolata* bis *dato* in der Literatur postuliert wurden.

Aufgrund des mangelhaften Wissens um isomere Formen kann nicht ausgeschlossen werden, dass keine genügend ausreichende Differenzierung zwischen Original- und isomere Verbindung in den entsprechenden Literaturstellen vorgenommen wurde. Als Konsequenz muss daher das Vorhandensein der für *P. lanceolata* postulierten Originalverbindungen in zukünftigen, kritischen Analysen erst bestätigt werden.

Damit ergibt sich auch die Frage nach der Richtigkeit der kommerziell erworbenen, durch Isolierung aus Pflanzenmaterial gewonnenen Referenzsubstanzen, die möglicherweise vom Hersteller nicht bzw. nicht ausreichend auf ihre exakte Isomerie hin überprüft wurden, da kein Anlass dazu bestand. Schlussendlich wird eine komplette und intensive Überarbeitung der bisherigen Datenlage zu den einzelnen IGs und PEs, die für *P. lanceolata* angenommen werden, empfohlen, um sichere Aussagen über die tatsächlich natürlich enthaltenen Isoformen der Inhaltsstoffe treffen zu können.

Auf welche Weise diese potentiellen Isoformen gebildet wurden, wäre darüber hinaus ein spannendes Forschungsfeld. Neben genuinem Vorkommen, könnten die Isomere auch artefaktisch *post metentes* durch Trocknung zur Droge, durch die Extrakterstellung, durch Isomerisierung während der Lagerung des Drogenextraktes, etc. entstanden sein.

4.2.4 Vergleich des IG- und PE-Spektrums der frischen und der getrockneten Pflanze

Die Ergebnisse der potentiellen Isoformen, welche *via* LC-HRMS-Analysen für getrocknete Spitzwegerichblätter erhoben wurden (Kapitel 4.2.3), ähneln den Ergebnissen, welche aus Untersuchungen des frischer Spitzwegerichblätter aus LC-DAD/ESI-MSⁿ-Experimenten herrührten (Kapitel 7.3.1.2). Tabelle 4.6 gibt die maximale Anzahl an übereinstimmenden Masse-Ladungs-Verhältnissen (m/z) unterschiedlicher Peaks in den jeweiligen Rohextrakten wieder und stellt sie der Anzahl der postulierten gegenüber.

Tabelle 4.6: Vergleich der Rohextrakte aus der frischen und der getrockneten Pflanze bezüglich ausgewählter, nachweisbarer IGs und PEs. Die Blätter der getrockneten Pflanze wurden *via* LC-DAD/(ESI)-HRMS analysiert, die der Frischpflanze (FP) mittels LC-DAD/ESI-MSⁿ. Angegeben sind die maximale Anzahl an übereinstimmenden Masse-/Ladungsverhältnissen (m/z) unterschiedlicher Peaks der jeweiligen Rohextrakte. Der Wert in Klammern beschreibt die Abweichung zur Anzahl der in der Literatur angegebenen Verbindungen gleicher Masse, wobei „+“ bzw. „-“ bedeutet, dass mehr bzw. weniger massegleiche Verbindungen, als in der Literatur postuliert werden, detektiert werden konnten.

Inhaltsstoffe gleicher Masse	Droge	FP
Aucubin, 6-epi-Aucubin	4 (+2)	3 (+1)
Asperulosid	1 (0)	2 (+1)
Catalpol	3 (+2)	2 (+1)
Deacetylasperulosidsäuremethylester	1 ^a (0)	0 (-1)
Globularin	2 (+1)	3 (+2)
Verbenalin	1 ^a (0)	2 (+1)
Lavandulifoliosid, Forsythosid B	3 (+1)	1 (-1)
Plantamajosid, Isoplantamajosid	3 (+1)	3 (+1)
Verbascosid, Isoverbascosid	3 (+1)	2 (0)

^a Nachweis verlief nur nach Aufkonzentrierung in einer ausgewählten Fraktion. Keine Detektion im Rohextrakt. Keine Aussage über potentielle Isomere anhand der aufgenommenen Daten möglich.

Eine exakte Übereinstimmung der Ergebnisse liegt lediglich bei dem Isomerenpaar Plantamajosid und Isoplantamajosid vor. Alle anderen Daten unterscheiden sich in einem Signal, mit Ausnahme von den massegleichen Inhaltsstoffe Lavandulifoliosid und Forsythosid B, welche mit zwei Signalen von einander abweichen. Es fällt auf, dass im Schnitt mehr masse-ladungs-gleiche Verbindungen detektiert werden konnten, als in der Literatur postuliert werden. Ausgenommen davon sind die Verbindungen Asperulosid (Droge), Deacetylasperulosidsäuremethylester (Droge und FP), Verbenalin (Droge) sowie Lavandulifoliosid und Forsythosid B (FP) und das Isomerenpaar Iso- und Verbascosid (FP).

Da die zwei Rohextrakte mit unterschiedlichen Analysemethoden untersucht wurden, ist nicht eindeutig abzugrenzen, ob die beobachteten Variationen auf das unterschiedliche Ausgangsmaterial (Droge vs. FP) und/oder auf die Nutzung einer anderen Analysemethode zurückzuführen sind. Dies stellt einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Analysen dar.

Weiter lassen sich anhand der erhobenen Daten keine umfassenden Substanzcharakterisierungen ableiten, weswegen keine klare Aussage über die Identität der detektierten Verbindungen mittels der vorgenommenen Messungen möglich ist. Auch dieser Fragestellung sollte in zukünftigen Forschungen nachgegangen werden.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Erhaltene HRMS-Daten aus dem Spitzwegerichrohextrakt der getrockneten Pflanze sowie nach zielgerichteter Fraktionierung dieser bestätigen die Existenz aller sechs betrachteten IGs Aucubin, Catalpol, Globularin, Asperulosid, Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester sowie aller vier betrachteten PEs Verbascosid, Isoverbascosid, Plantamajosid und Lavandulifoliosid in *P. lanceolata*. Damit besteht Grund zur Annahme, dass diese genuin vorkommen und die Literaturangaben richtig sind.

Bezüglich der Nachweisstrategie ist anzumerken, dass nur Aucubin und Catalpol sowohl im Rohextrakt als auch in der ausgewählten Fraktion per LC-HRMS nachgewiesen werden konnten. Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester konnten nur in der angereicherten Fraktion der IG-Isolierung detektiert werden, Asperulosid und Globularin hingegen ausschließlich im Rohextrakt. Vermutlich lag dies daran, dass Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester in zu geringen Mengen in der Pflanze enthalten sind und deshalb erst nach Aufkonzentrierung in nachweisbaren Mengen vorliegen. Globularin und Asperulosid könnten aufgrund ihrer strukturellen Alleinstellungsmerkmale, konkret der Zimtsäureeinheit bzw. dem Lactonring, ein abweichendes Verhalten während der Fraktionierung zeigen und aus diesem Grund in der herangezogenen Fraktion nicht enthalten sein.

Artefakte durch Verwendung von Methanol können für die untersuchten IGs, speziell Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester, negiert werden. Bei den methoxylierten Verbindungen Verbenalin und Deacetylasperulosidsäuremethylester handelt es sich auch um natürlich gebildete Inhaltsstoffe der Pflanze. Die Informationen beruhen hierbei auf LC-HRMS-Analysen der getrockneten Pflanze. LC-DAD/ESI-MSⁿ-Experimente der Frischpflanze bestätigen hierbei das Vorkommen von Verbenalin, nicht jedoch das von Deacetylasperulosidsäuremethylester.

Besondere Beachtung soll hier das erstmalige Auffinden potentieller isomerer Formen der IGs Asperulosid (FP), Catalpol (Droge, FP), Globularin (Droge, FP) und Verbenalin (FP) sowie der PEs Lavandulifoliosid bzw. Forsythosid B (Droge) in *P. lanceolata* finden. Zudem konnten für diese Pflanze zum ersten Mal weitere potentielle isomere Verbindungen der bereits für *P. lanceolata* bekannten Isomere Aucubin/6-*epi*-Aucubin (Droge, FP), Plantamajosid/Isoplantamajosid (Droge, FP), Verbascosid/Isoverbascosid (Droge) postuliert werden, welche teilweise in der frischen und/oder der getrockneten Pflanze erfasst werden konnten.

Die Suche nach weiteren isomeren Formen, begünstigt durch die weiterentwickelte, immer sensitivere Analysetechnologie, unter anderem auf dem Gebiet der LC-MS-Analytik [149], stellt ein äußerst interessantes Forschungsfeld zukünftiger Arbeiten dar. Es ist ferner

hervorzuheben, dass die Inhaltsstoffe des Spitzwegerichs in der Literatur bis *dato* nur unzureichend auf weitere vorhandene Isomere hin überprüft worden sind. Eine Verifizierung der exakten Isomerie und die genaue Zuordnung der in *P. lanceolata* enthaltenen IGs und PEs stehen somit noch aus (Kapitel 4.2.3).

Strukturaufklärende NMR-spektroskopische Messungen konnten aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden. Eine eindeutig charakterisierende Identifizierung erfolgte somit ausschließlich für die beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol aus dem getrockneten Pflanzenmaterial.

4.4 Material und Methoden

4.4.1 Verwendetes Drogenmaterial

Das Drogenmaterial 2 (Kapitel 10.5) wurde zur Extraktion mithilfe einer Ultrazentrifugalmühle und einem Siebeinsatzes mit einer Lochgröße von 500 μm pulverisiert (Kapitel 3.5.7).

4.4.2 Verwendete Extrakte

Der zu vermessene Rohextrakt für die HPLC-DAD/ESI-HRMS-Analytik (Kapitel 4.2.2 und Kapitel 4.4.4) bestand aus 1 mg pulverisiertem Drogenmaterial 2 (Kapitel 4.4.1), das in 10 mL Acetonitril-Wasser-Gemisch (1:1, v/v) für 75 min im Ultraschallbad behandelt, in einen 10,0 mL Messkolben filtriert, zweimal mit wenigen Millilitern des Gemisches nachgepült und bis zur Markierung aufgefüllt wurde.

Informationen zum verwendeten FP-Extrakt befinden sich in Kapitel 7.5.2.

4.4.3 Präparative HPLC-DAD

Zur Verifizierung der Literaturangaben wurden die ausgewählten Fraktionen CC.2-CC.9 exklusive Fraktion CC.5, welche aus den vereinigten Fraktionen C4.2 + C4.3 (Kapitel 4) stammen, mithilfe präparativer HPLC-DAD aufgearbeitet. Alle Parameter stimmen dabei mit denen aus Kapitel 3.5.12 überein, sofern hier nicht explizit angegeben (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Übersicht der HPLC-Läufe zur Überprüfung der Genuität der IGs in *P. lanceolata*.

Fraktion	Einwaage Nr.	Einwaage [mg]	V [μ L]	Lauf Nr.	Injektion V [μ L]	Beladungsmenge [mg]	Methode			
CC.2	1	7,0	1000	1	100	0,7	pM1			
				2	100	0,7	pM13			
				3	100	0,7	pM14			
				4	150	1,0	pM14			
				5	250	1,7	pM14			
				6	100	0,7	pM14			
	2	5,3	800	1	250	1,7	pM14			
				2	250	1,7	pM14			
				3	150	1,0	pM14			
	CC.3	1	21,6	1250	1	100	1,7	pM1		
2					22,9	900	1	50	1,3	pM10
							2	100	2,5	pM11
							3	200	5,1	pM12
							4	200	5,1	pM11
							5	150	3,8	pM11
		6	150	3,8			pM11			
3		1,6	800	1	100	0,2	pM14			
				2	250	0,5	pM14			
				3	250	0,5	pM14			
CC.4		1	4,7	600	1	50	0,4	pM9		
					2	100	0,8	pM9		
	3				150	1,2	pM9			
	4				100	0,8	pM9			
	2				4,6	800	1	100	0,6	pM14
							2	250	1,5	pM14
		3	250	1,5			pM14			
	CC.6	1	3,7	600	1	50	0,3	pM15		
					2	300	1,8	pM15		
CC.8	1	5,0	500	1	100	1,0	pM14			
				2	200	2,0	pM14			
CC.7+8+9	1	10,1	600	1	350	5,9	pM14			

Aus den sieben präparativ aufgearbeiteten Fraktionen CC.2-CC.9 ohne Fraktion CC.5 konnten 22 Isolate gewonnen werden (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Die 22 isolierten Verbindungen, die aus den sieben präparativ aufgearbeiteten Fraktionen CC.2-CC.9 ohne Fraktion CC.5 gewonnen werden konnten.

Isolat Nr.	Bezeichnung	m [mg]	t _R [min]	Methode	Mutterfraktion
1	A	2,3	8,7	pM9	CC.3
2	B	2,8	10,3	pM9	CC.3
3	C	0,5	10,5	pM9	CC.4
4	D	0,8	10,4	pM9	CC.2
5	E	0,2	9,7	pM13	CC.2
6	F	0,4	9,3	pM13	CC.2
7	G	0,1	9,6	pM14	CC.2
8	H	0,7	9,4	pM14	CC.3
9	I	0,6	10,2	pM14	CC.3
10	J	0,7	11,0	pM14	CC.3
11	K	1,2	12,9	pM14	CC.3
12	L	0,2	13,8	pM14	CC.3
13	M	1,4	14,7	pM14	CC.3
14	N	0,5	12,7	pM14	CC.8
15	O	1,2	13,7	pM14	CC.8
16	P	0,2	13,7	pM14	CC.6
17	Q	0,3	11,3	pM14	CC.7 + 8 + 9
18	R	2,4	16,3	pM14	CC.7 + 8 + 9
19	S	0,3	10,4	pM14	CC.3
20	T	1,4	13,2	pM14	CC.3
21	U	0,2	14,1	pM14	CC.3
22	V	0,3	15,0	pM14	CC.3

Die Retentionszeiten konnten aufgrund diverser Faktoren von Lauf zu Lauf abweichen, wie in Kapitel 3.5.12 ausführlicher beschrieben. Bei der Peakzuordnung war es deshalb notwendig, sich an den vorhergehenden Chromatogrammen zu orientieren, und über einen Vergleich mit diesen die einzelnen Peaks zuzuordnen. Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist somit von Grund auf schwierig.

Aufgrund der inkonsistenten Chromatogramme ist auch nicht auszuschließen, dass es sich bei einem oder mehreren unterschiedlich benannten Isolaten um ein und dieselbe Substanz handelt.

4.4.4 HPLC-DAD/ESI-HRMS

HPLC-DAD/ESI-HRMS-Untersuchungen wurden von der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg an einem quadrupol-Time of Flight (q-TOF) 6540 UHD (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA) Massenspektrometer mit einer Dual-ESI-Ionenquelle (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich der negative Detektionsmodus besser eignete als der positive (Ergebnisse nicht dargestellt). Daher fanden alle Aufnahmen im negativen Modus statt.

Kapitel 5

Entwicklung einer (HP)TLC-Fingerprintmethode

5.1 Hintergrund und Motivation

Es sollte erstmalig eine DC-basierte Screeningmethode der IGs und PEs des Spitzwegerichs entwickelt werden. Dabei standen jeweils die prominentesten Vertreter der Inhaltsstoffgruppen im Fokus (Aucubin, Catalpol, Globularin, Verbenalin, Asperulosid und Deacetylasperulosidsäuremethylester bzw. Verbascosid, Isoverbascosid, Plantamajosid und Lavandulifoliosid (Kapitel 1.1.2.2 und 1.1.2.4), welche vereinfachter Weise im Folgenden auch als „alle“ IGs bzw. PEs der Pflanze betrachtet werden. Neben Informationen zur qualitativen Zusammensetzung der Verbindungen der Stoffgruppen anhand des Fingerprints sollten die entsprechenden Hauptverbindungen Aucubin und Catalpol bzw. Verbascosid quantitativ bestimmt werden. Ziel war es, schnell an Informationen über Identität, Reinheit und andere Qualitätsparameter der Pflanze zu gelangen. In den Qualitätsanforderungen der Monographie für Spitzwegerichblätter im Ph. Eur. [43, 49] werden zur Identitätsprüfung der Blätterextrakt der Droge mit den Referenzen Aucubin (im unteren Drittel der DC) und Verbascosid (im oberen Drittel der DC) dünnschichtchromatographisch analysiert [43]. Verunreinigungen durch Blätter des wolligen Fingerhuts können anhand dieses DCs durch eine blaue Zone unterhalb der Aucubinzone erkannt werden. Das Arzneibuch beschränkt sich somit auf die Analyse je einer Hauptverbindung der jeweiligen Stoffklasse. Eine Fingerprintmethode, welche zusätzlich zu den Hauptverbindungen weitere Substanzen der jeweiligen Stoffgruppe miteinbezieht, brächte einen Gewinn an Informationen und wäre zur Qualitätsbestimmung den bisherigen, limitierteren Methode vorzuziehen.

Des Weiteren fordert die Monographie für Spitzwegerichblätter die Gehaltsbestimmung der Gesamt-*ortho*-dihydroxymzimtsäurederivate, berechnet als Verbascosid, bezogen auf die getrocknete Droge. Dieser Gehalt wird photometrisch ermittelt. Da diese Methode nicht spezifisch für PEs gilt, sondern Zimtsäurederivate im Allgemeinen erfasst, außerdem

weder genaue Mengen noch das Verhältnis der Einzelkomponenten daraus abgeleitet werden kann, wurde in dieser Arbeit eine andere Quantifizierungsart gewählt, welche verknüpft an eine einfache (HP)TLC-Chromatographie erfolgt. Ein Leitkriterium war hierbei, den Arbeitsaufwand gering zu halten. Deshalb bot es sich an, den Gehalt an Hauptkomponenten *via* Densitometrie direkt nach erfolgter (HP)TLC-Analyse zu erhalten. Dieses Verfahren hat sich in diversen Arbeiten, die am Lehrstuhl der Pharmazeutischen Biologie (Regensburg) durchgeführt worden sind sowie für verschiedene Pflanzen und Substanzen bewährt [151, 152]. Gleichzeitig sind auch DC-gekoppelte densitometrische Verfahren zur Quantifizierung von IGs ausreichend in der Literatur beschrieben [29, 58, 93, 102, 106, 110, 111, 112, 113].

5.2 Strategie

Die (HP)TLC-Fingerprintmethodenentwicklung für die beiden Stoffgruppen IGs und PEs wurde separat behandelt. Der Fokus lag auf der Bestimmung der chromophorarmen IGs, da diese schwieriger visualisiert werden können.

Hauptaugenmerk bei der (HP)TLC-Fingerprintmethodenentwicklung lag insbesondere auf der Trennung der beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol, die ein ähnliches chemisches Verhalten aufweisen und deshalb auch auf der DC-Platte potentiell schwer trennbar sind. Um diese qualitativ sowie quantitativ densitometrisch genau bestimmen zu können, müssen beide Zonen jedoch klar voneinander getrennt vorliegen. Deshalb wurde die Methodenentwicklung zunächst nur mit diesen beiden Substanzen durchgeführt. In der Literatur fanden sich dazu nur bedingt geeignete Systeme. Eine umfängliche Methodenentwicklung war deshalb unumgänglich.

Chromophorarme IGs wie Aucubin und Catalpol müssen zur Detektion derivatisiert werden, da sich ihr Absorptionsspektrum am unteren Rand des UV/VIS-Spektrums befindet. Hinsichtlich ihrer Derivatisierung existieren jedoch kaum einschlägige Literaturdaten. Daher sollte dieses Thema im Rahmen der vorliegenden Arbeit intensiver untersucht werden. Neben Untersuchungen mit diversen Derivatisierungsreagenzien auf Kieselgel, sollten auch andere stationäre Phasen getestet werden. Insbesondere die variierenden Derivatisierungseigenschaften auf den unterschiedlichen, in dieser Arbeit eingesetzten stationären Phasen, wie in Kapitel 5.3.1.2 beschrieben, begründeten die Entscheidung für umfassendere Untersuchungen.

Zur Methodenentwicklung wurden zunächst diverse FM-Systeme und stationäre Phasen, wie sie in der Literatur beschrieben werden, getestet und bei Bedarf optimiert. Neben einem Spitzwegerichextrakt wurden dazu die Referenzen Aucubin und Catalpol herangezogen. Die erfolgreiche Trennung dieser beiden Verbindungen galt als Maßstab der chromatographischen Arbeit. Dabei durfte nicht außer Acht gelassen werden, dass die beiden Hauptiridoidglykoside von 15 für *P. lanceolata* postulierten IGs zwei relativ polare Vertreter darstellen. Dies bedeutet, dass ihre Lage im unteren DC-Bereich anzustreben ist, um im mittleren und oberen Bereich noch genügend Platz für weitere enthaltene IGs der Pflanze freizuhalten. Im Allgemeinen wird ein R_f -Wert zwischen 0,2

und 0,8 als aussagekräftig und erstrebenswert angesehen. Folglich erscheint ein R_f -Wert der beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol zwischen 0,2 und 0,3 sinnvoll. Ein weiterer Aspekt war die Überprüfung von Identität und Reinheit der (potentiellen) Zonen der ausgewählten Inhaltsstoffe von *P. lanceolata*. Aus Ermangelung an diversen relevanten Referenzsubstanzen zum damaligen Zeitpunkt der Arbeit, wurde dies anhand von MS-Analysen vorgenommen. Die relevanten Zonen wurden dazu nach erfolgreicher chromatographischer Entwicklung von der underivatisierten DC-Platte abgekratzt und mittels LC-ESI-MS vermessen.

Es sei überdies angemerkt, dass bei Mehrfachentwicklungen die R_f -Werte in dieser Arbeit zum besseren Vergleich nicht nach der allgemeingültigen Formel, die wie folgt lautet, berechnet wurden:

Gleichung 1: Eigentliche Formel zur Berechnung des R_f -Werts bei einmaliger Entwicklung, wobei n: Anzahl der Entwicklungen.

$$R_f = \frac{\text{Höhe der Substanzzone ab Start [cm]}}{n * \text{Höhe der Fließmittelfront ab Start [cm]}} \quad (5.1)$$

Werden unterschiedliche Höhen erreicht, dann müssen diese stattdessen explizit mit einander multipliziert werden und das n fällt weg. Dadurch wird der R_f -Wert kleiner, je häufiger entwickelt wurde. Ziel dieser Arbeit war es aber, die tatsächliche Höhe auf der Platte zu vergleichen. Daher wurde auf die Einberechnung der Entwicklungsanzahl verzichtet und folgende Formel angewendet, die für Einfachentwicklungen gilt:

Gleichung 2: In dieser Arbeit vereinfachterweise modifizierte und angewendete Formel zur Berechnung des R_f -Werts bei mehrfacher Entwicklung, wobei n: Anzahl der Entwicklungen.

$$R_f = \frac{\text{Höhe der Substanzzone ab Start [cm]}}{\text{Höhe der Fließmittelfront ab Start [cm]}} \quad (5.2)$$

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 (HP)TLC-Systeme

Im Folgenden sollen die Resultate der in dieser Arbeit getesteten (HP)TLC-Methoden aus der Literatur dargestellt und verglichen werden, mit dem Ziel die optimale Methode im Rahmen dieser Methodenentwicklung zu präsentieren. Als Grundlage für weitere Untersuchungen in dieser Richtung sollen außerdem nicht-zielführende Verfahren und Wege aufgezeigt werden, damit die gesamte gewonnene Expertise festgehalten und ganzheitlich übermittelt werden kann. In erster Linie sollen dadurch zukünftige Forschungsarbeiten profitieren, indem etwaige Sackgassen und Fehlritte offengelegt und somit vermieden werden können.

5.3.1.1 FM-Systeme

Diverse Methoden aus der Literatur, die als stationäre Phase Kieselgelmaterial verwenden, wie in vorhergehenden Kapitel 1.4.1 zusammengefasst, wurden im Rahmen dieser Arbeit experimentell auf die Eignung des vorliegenden Trennproblems getestet und teilweise optimiert. Die entsprechenden Resultate werden in diesem Kapitel vorgestellt und diskutiert, beginnend mit den unpolaren FM-Systemen. Verhältnismäßig unpolares 1,4-Dioxan/Xylen/Propan-2-ol/25%-iger Ammoniak (1:3:5:1, v/v/v/v) auf stationärer Kieselgel F₂₅₄-Phase [113] ergab folgendes Chromatogramm (Abbildung 5.1).

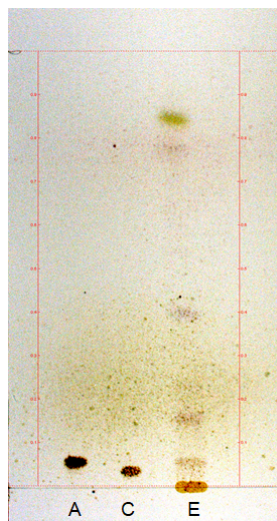


Abbildung 5.1: DC gemäß Krzek et al. [113]. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 14 μg , $R_f = 0,07$), Catalpol (C, 14 μg , $R_f = 0,04$), Extrakt (E, 1,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: 1,4-Dioxan/*p*-Xylol/Propan-2-ol/28-30%-iger Ammoniak (20:60:100:20, v/v/v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 15 cm, Entwicklungsdauer: 2,5 h, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

Dieses DC-System eignet sich nicht zur Fingerprintanalytik der IGs des Spitzwegerichs, da die Hauptverbindungen dieser Stoffgruppe nicht ausreichend voneinander getrennt sind. Zudem sind sie mit $R_f = 0,07$ (Aucubin) bzw. $R_f = 0,04$ (Catalpol) zu weit unten im Chromatogramm lokalisiert und somit kaum von der Startlinie entfernt. Neben dem hohen Anteil an unpolarem Xylol im FM-System scheint der enthaltene deprotonierende Ammoniak mit dafür verantwortlich zu sein, wie in Kapitel 1.4.1 erklärt. Nachteilig für eine optimale Methode ist die lange Entwicklungsstrecke von 1 x 15 cm, die knapp 2,5 h Entwicklungsdauer unter den gegebenen Bedingungen benötigt. Für schnelle Routineanalysen kann diese Methode daher nicht angewendet werden. Krzek et al. [113] konnten einen R_f -Wert von 0,1 für Aucubin erzielen. Dieser entspricht gerundet dem in dieser Arbeit erhaltenem Wert. Es ist nicht auszuschließen, dass die Anwendung von 28-30%-igem Ammoniak statt dem in der Literatur [113] verwendeten 25%-igem eine stärkere Deprotonierung der OH-Gruppen und damit eine intensivere Wechselwirkung mit dem stationären Kieselgel verursacht hat. Die relativ ungenaue Angabe des R_f -Wertes auf eine Nachkommestelle lässt darüber nur spekulieren.

Etwas höhere, aber ebenfalls zu niedrige R_f -Werte lieferte die stationäre Phase Kieselgel mit mobiler Phase Petroleum (60-80)/Toluol/Aceton/Wasser (10:10:80:2, v/v/v/v) bei einer Entwicklungsstrecke von 1 x 7 cm) gemäß Tiwari et al. [58] (Abbildung 5.2).

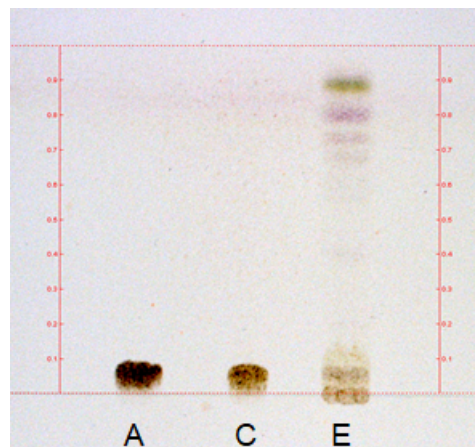


Abbildung 5.2: DC gemäß Tiwari et al. [58]. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 14 μg , $R_f = 0,19$), Catalpol (C, 14 μg , $R_f = 0,18$), Extrakt (E, 1,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Petroleum (60-80)/Toluol/Aceton/Wasser (10:10:80:2, v/v/v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 7 cm, Entwicklungsdauer: 15 min, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

Unpolares Petroleum und Toluol verhindern offensichtlich, dass sich die Hauptiridoidglykoside aus *P. lanceolata* über dem erstrebenswerten R_f -Wert von 0,2 befinden. Die Konkurrenz zur polaren stationären Phase dieser Lösungsmittel scheint zu schwach zu sein.

Weiterhin sind die Banden im DC verbreitert. Dies resultiert aller Wahrscheinlichkeit nach aus dem Fehlen eines vollständig de-/protonierenden Additivs im Fließmittel zur Zonenkonzentrierung. Dazu kommt, dass die beiden relevanten Banden nur marginal

voneinander getrennt sind. Damit ist diese DC-Methode von Tiwari et al. [58] zur Fingerprintanalytik der IGs in *P. lanceolata* ungeeignet. Die fehlende Eignung dieser DC-Methode zur Analytik der polaren IGs Aucubin und Catalpol wird klar, dass sie für die deutlich unpolare IGs 6'-*p*-Hydroxybenzoylmussaenosidensäure ($R_f = 0,32$), Agnusid ($R_f = 0,47$) und Negundosid ($R_f = 0,53$) entwickelt wurde. Vielversprechendere Ergebnisse konnte von der DC-Methode von Munteanu und Vlase [103] erwartet werden, bei der die Quantifizierung des Aucubins im Mittelpunkt stand (Abbildung 5.3).

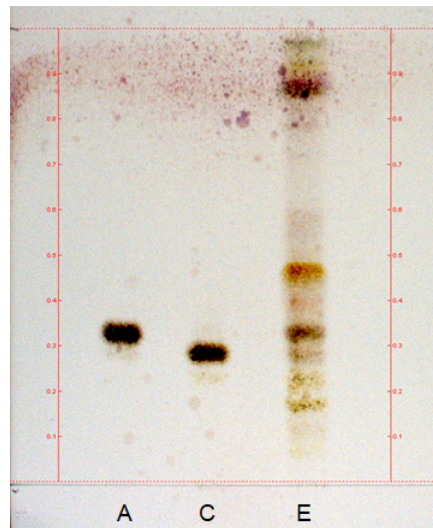


Abbildung 5.3: DC gemäß Munteanu und Vlase [103]. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 14 μg , $R_f = 0,33$), Catalpol (C, 14 μg , $R_f = 0,29$), Extrakt (E, 1,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Propan-2-ol/Toluol/Eisessig/Wasser (50:40:20:20, v/v/v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 10 cm, Entwicklungsdauer: 75 min, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

Wie erwartet, lagen die R_f -Werte mit $R_f = 0,33$ bzw. $R_f = 0,29$ für Aucubin bzw. Catalpol höher als die der für unpolare IGs konzipierten FM-Systeme. Darüber hinaus konnten beide Verbindungen in den in dieser Arbeit vorgenommenen Experimenten erfolgreich voneinander getrennt werden. Weiterhin gibt es im mittleren und oberen DC-Bereich noch Platz für die unpolare IGs, die in *P. lanceolata* enthalten sind. Trotz der hohen Konzentration an aufgetragener Referenz sind die Zonen relativ scharf. Auch die Zonen im aufgetragenen Extrakt sind klar definiert. Der mit 15% relative hohe Anteil an Eisessig im FM gewährleistet augenscheinlich eine erfolgreiche vollständige Protonierung der freien OH-Gruppen der aufgetragenen Referenzen bzw. der im Extrakt befindlichen Verbindungen. Insgesamt scheint diese DC-Methode gut zur Fingerprintanalytik geeignet zu sein. Zu bemerken ist außerdem, dass das von Munteanu und Vlase [103] eingesetzte *n*-Propanol in der vorliegenden Promotionsarbeit aus logistischen Gründen durch Propan-2-ol ersetzt wurde. Dadurch wurde die Polarität des Fließmittels in den polaren Bereich verschoben. Dies erklärt auch den höheren R_f -Wert des Aucubins in dieser Arbeit. Statt einem R_f -Wert von 0,24 wurde ein R_f -Wert von 0,33 erhalten. In nachfolgenden Untersuchungen wäre spannend zu ermitteln, ob erst durch die Verschiebung des FM in den

polaren Bereich eine Trennung der beiden chemisch ähnlichen Verbindungen möglich ist. DC-Analysen von diversen IGs, durchgeführt von einem Forscherteam um Nikolova-Damyanova [111], befassen sich ausschließlich mit chromophoren, unpolaren IGs wie Antirrinosid, Linarosid, 5-*O*-Glucosylantirrinosid und 5-*O*-Allosylantirrinosid bzw. Swertiamarin und Gentiopicrosid [93]. Trotzdem erschien es sinnvoll, die den beiden Papern von Nikolova-Damyanova et al. zugrundeliegende DC-Methode auf ihre Tauglichkeit zur IG-Fingerprintanalytik im Rahmen dieser Arbeit hin zu überprüfen (Abbildung 5.4).

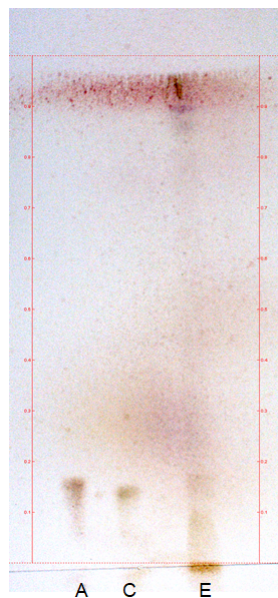


Abbildung 5.4: DC gemäß Nikolova-Damyanova et al. [111]. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 14 μg , $R_f = 0,16$), Catalpol (C, 14 μg , $R_f = 0,14$), Extrakt (E, 1,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser (60:22:4, v/v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 16 cm, Entwicklungsdauer: 105 min, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120 °C, Detektion: Tageslicht (VIS).

Obwohl die DC-Methode von Nikolova-Damyanova et al. [111] für unpolare IGs ausgelegt ist, konnten die beiden Hauptiridoidglykoside ansatzweise voneinander getrennt werden. Die mit 16 cm relativ lange Entwicklungsstrecke, lässt die resultierenden kaum unterschiedlichen R_f -Werte 0,16 bzw. 0,14 für Aucubin bzw. Catalpol, weiter auseinander liegen als bei kürzeren Entwicklungsstrecken und sollte deshalb explizit Erwähnung finden. Unpolare Verbindungen hätten auf der Platte noch genügend Platz, um im mittleren und oberen Plattenbereich isoliert vorzuliegen. Nachteilig ist jedoch die lange Dauer der Entwicklung mit 105 Minuten sowie ein hoher Lösungsmittelverbrauch für die benötigte größere DC-Kammer und die Verwendung von Chloroform. Alles in allem schneidet die Methode chromatographisch besser ab, als erwartet, jedoch wurde die im Verlauf der Arbeit nicht weiterverwendet. Eine weitere DC-Methode, in der neben diversen IGs auch ein Catalpolderivat analysiert wurde, basierte auf nur zwei FM-Komponenten: Chloroform und Methanol [112]. Da in der entsprechenden Literatur keine genauen Entwicklungsparameter angegeben waren, wurden die Entwicklungsstrecken

von 1 x 8 cm (nicht dargestellt) und 1 x 16 cm (Abbildung 5.5) gewählt.



Abbildung 5.5: DC gemäß Yadav et al. [112]. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 2 μg , $R_f = 0,11$), Catalpol (C, 2 μg , $R_f = 0,09$), Extrakt (E, 0,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Chloroform/Methanol (80:20, v/v), Kammersättigung: 25 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 16 cm, Entwicklungsdauer: nicht bestimmt, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120 °C, Detektion: Tageslicht (VIS).

Die Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol konnten dabei marginal voneinander separiert werden. Allerdings führte das Ausbleiben von zonenverschärfenden Additiven zu einem Schweif der Banden, der die ansatzweise getrennten Hauptbereiche beider Zonen im Extrakt überlappen lässt, wie auch an deren Referenzen gut erkennbar ist. Mit einem R_f von 0,11 bzw. 0,09 für Aucubin bzw. Catalpol befinden sich die beiden Verbindungen wiederum nahe an der Startlinie. Aufgrund der langen Entwicklungsstrecke wird trotz der geringen R_f -Werte unter 0,2 keine Einschränkung der Aussagekraft angenommen. Das von Yadav et al. [112] untersuchte unpolare Catalpolderivat (6-*O*-(2'',3''-Dibenzoyl)- α -L-rhamnopyranosylcatalpol), für das die Methode konzipiert ist, verfügt im Gegensatz zu polarem Aucubin bzw. Catalpol über einen deutlich höheren R_f -Wert von 0,44. Eine kürzere Entwicklungsstrecke von 8 cm resultierte in niedrigeren R_f -Werten (0,05 bzw. 0,04 für Aucubin bzw. Catalpol). Abgesehen von einer kürzeren Entwicklungsdauer wurde kein Mehrgewinn durch die verkürzte Entwicklungsstrecke erreicht. Nachteilig wirkt sich der relativ große Anteil an Chloroform im FM aus, auf das laut GLP-Richtlinien möglichst verzichtet werden sollte. Eine weitere auf Chloroform basierende DC-Methode wurde von Rischer et al. [29] publiziert. In dieser werden erstmalig und bis *dato* einmalig in der Literatur beide Hauptiridoidglykoside des Spitzwegerichs qualitativ und quantitativ dünnschichtchromatographisch analysiert (Abbildung 5.6).

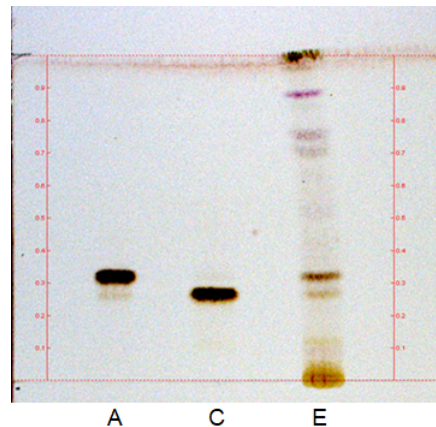


Abbildung 5.6: DC gemäß Rischer et al. [29]. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 14 μg , $R_f = 0,33$), Catalpol (C, 14 μg , $R_f = 0,27$), Extrakt (E, 1,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Chloroform/Methanol/*p*-Toluolsulfonsäure (0,25 M) in 28-30%-igem Ammoniak (70:40:10, v/v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 2 x 7 cm, Entwicklungsdauer: 2 x 15 min, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120 °C, Detektion: Tageslicht (VIS).

Mittels dieser DC-Methode gelang eine deutliche Trennung der beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol, erkennbar sowohl an den eingesetzten Referenzen als auch im aufgetragenen Extrakt. Trotz der niedrigen Entwicklungsstrecke von 7 cm resultierten relativ hohe R_f -Werte für die beiden polaren Substanzen, nämlich $R_f = 0,33$ bzw. $R_f = 0,27$ für Aucubin bzw. Catalpol. Entscheidend dafür war die zweifache Entwicklung der DC-Platten. Interne, hier nicht dargestellte Versuche, zeigten eine schlechtere Trennung der beiden polaren IGs bei einfacher Entwicklung. Der Zusatz von in Base gelöster Säure führte zu einer exzellenten Schärfung der Zonen im Extrakt sowie bei den mitgeführten Referenzen. Die leicht abgewandelte Verwendung von 28-30%-igem Ammoniak schien die Chromatographie nur marginal zu beeinflussen, erkennbar an dem leicht erniedrigten R_f -Wert des Aucubins mit 0,33 anstelle von 0,34. Der R_f -Wert für Catalpol war identisch. Chromatographisch gesehen, scheint die DC-Methode von Rischer et al. [29] sehr gut zur Lösung des IG-Trennungsszenarios der vorliegenden Arbeit geeignet. Bemängelt werden kann lediglich die aufwendigere FM-Herstellung, bei der die eingesetzte *p*-Toluolsulfonsäure in Ammoniak gelöst werden muss. Weiter entspricht der Gebrauch von Chloroform nicht den Maßstäben der GLP. Besser mit den Grundsätzen der GLP vereinbar ist der Einsatz von Ethylacetat, das in der Literatur äquivalent zu Chloroform als Basis für polare bis mittelpolare FM-Systeme Anwendung findet. Von pharmazeutischer Relevanz erscheint vor allem das im Ph. Eur. 7.3 verwendete säurereiche FM-System für Spitzweigerichblätter [43] zu sein (Abbildung 5.7).

Durch diese DC-Methode konnten die beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol jedoch nur marginal voneinander getrennt werden. Bei der geringen Entwicklungshöhe von 1 x 8 cm wirken sich die resultierenden R_f -Werte von 0,22 bzw. 0,18 für Aucubin bzw. Catalpol nur gering auf die Lage im Chromatogramm aus. Die Lage des Aucubins stimmt mit den Vorgaben im Ph. Eur. 7.3 überein. Es befindet sich im unteren Drittel

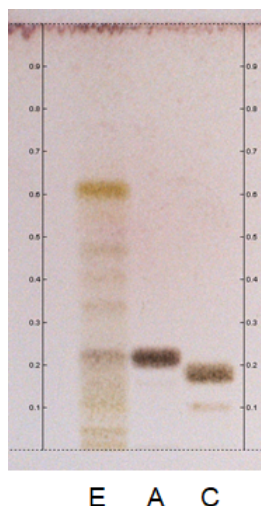


Abbildung 5.7: DC gemäß Ph. Eur. [43]. Auftragung von links nach rechts: Extrakt (E, 1,0 mg), Aucubin (A, 1 μ g, $R_f = 0,22$), Catalpol (C, 1 μ g, $R_f = 0,18$), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Wasser/Essigsäure/Ameisensäure (100:27:11:11, v/v/v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 8 cm, Entwicklungsdauer: nicht bestimmt, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

der Platte. Ein R_f -Wert wird nicht in der entsprechenden Monographie angegeben. Der mit 15% relativ hohe Gesamtsäureanteil im FM zeigt kaum einen zonenverschärfenden Effekt und scheint damit noch zu niedrig für die aufgetragenen Substanzmengen. Durch die Lage der polaren IGs im Chromatogramm um den R_f von 0,2, befindet sich noch ausreichend Platz für die unpolaren im Spitzwegerich enthaltenen IGs auf der Platte. Die DC-Methode des Ph. Eur. wird deshalb als bedingt geeignet eingestuft. Eine weitere auf Ethylacetat beruhende DC-Methode für Spitzwegerichkraut wird in Pachaly und Koch [109] beschrieben. Als Referenzen werden dabei Aucubin sowie Chlorogen- und Kaffeesäure berücksichtigt (Abbildung 5.8).

Anhand dieser Methode konnte keine befriedigende Separation der beiden Hauptiridoidglykoside erzielt werden. Dies wird an den R_f -Werten für Aucubin und Catalpol mit 0,28 bzw. 0,26 ersichtlich. Eine Erhöhung der Laufstrecke von 12 auf 16 cm vergrößert den Abstand der beiden Substanzen zueinander, so dass sie gerade voneinander getrennt sind und resultiert in deutlich höhere R_f -Werte von 0,38 bzw. 0,34 für Aucubin bzw. Catalpol. Dadurch verringert sich der Platz auf der DC für die isolierte Darstellung der restlichen vier in *P. lanceolata* befindlichen IGs. Somit ist diese Variante suboptimal. Interne, nicht gezeigte Versuche, mit Entwicklungen von 4 x 8 cm verschlechterten dies. Aucubin und Catalpol wurden dadurch in die obere Hälfte der DC-Platte verschoben. Dies verringerte den freien Platz für die restlichen vier IGs des Spitzwegerichs noch mehr. Die Trennung der Banden voneinander entsprach etwa der der 16 cm langen Entwicklungsstrecke. Der Verzicht auf Säure oder äquivalente Additive führte zu einer Bandenverbreiterung. Insgesamt eignet sich die DC-Methode weniger zur Fingerprintanalytik der IGs in *P. lanceolata*. Ähnlich der Methode aus dem DC-Atlas, werden bei Hajimehdipoor et al. [102] sowie in

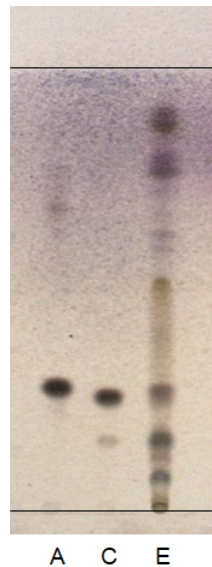


Abbildung 5.8: DC gemäß Pachaly und Koch [109]. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 5 μg , $R_f = 0,28$), Catalpol (C, 5 μg , $R_f = 0,26$), Extrakt (E, 0,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 12 cm, Entwicklungsdauer: 30 min, Derivatisierung: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

den CAMAG-Unterlagen [110], ein FM-System aus Ethylacetat, Methanol und Wasser beschrieben. Ihre Zusammensetzungen variieren nur geringfügig von dem im DC-Atlas. Die Methoden von Hajimehdipoor et al. [102] und Camag Application Notes [110] unterscheiden sich ausschließlich in einem Punkt: der Entwicklungsstrecke. Während in den CAMAG-Unterlagen eine Entwicklungsstrecke von 1 x 7 cm angegeben wurde, belief sich die von Hajimehdipoor et al. [102] auf 1 x 12 cm. Im Folgenden wird das Verfahren gemäß den CAMAG-Unterlagen [110] dargestellt (Abbildung 5.9).

Mithilfe dieses FM-Systems konnten Aucubin und Catalpol nicht getrennt werden. Die beiden Banden überlappten noch stärker als bei dem im DC-Atlas beschriebenen FM-System und lieferten näher zusammenliegende R_f -Werte von 0,25 bzw. 0,24 für Aucubin bzw. Catalpol. Angesichts der deutlich kürzeren Entwicklungsstrecke von 6 cm ist die räumliche Entfernung bei einem R_f -Wert-Unterschied von 0,01 kleiner als bei einer längeren Entwicklungsstrecke. Gründe der abweichenden, verschlechterten Separation könnten der höhere Wasseranteil bzw. geringere Methanolanteil im FM-System sein, die feinporigere stationäre Phase der HPTLC-Platte sowie die kürzere, halb so lange Entwicklungsstrecke. Aufgrund der eingesetzten HPTLC-Phase wurde die Fließhöhe von den in der CAMAG-Vorschrift angegebenen 7 cm auf 6 cm reduziert. Insgesamt liefert diese DC-Methode keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Auch die Methode von Hajimehdipoor et al. [102] mit einer Entwicklungsstrecke von 1 x 12 cm auf normaler Kieselgel-DC führte zu keiner wesentlichen Verbesserung der Trennleistung. Für Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol konnten dabei niedrigere R_f -Werte von 0,22 bzw. 0,20 erzielt werden.



Abbildung 5.9: DC gemäß Camag Application Notes [110]. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 1 μg , $R_f = 0,25$), Catalpol (C, 1 μg , $R_f = 0,24$), Extrakt (E, 0,1 mg), stationäre Phase: Kieselgel (HPTLC), mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:15:8, v/v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 6 cm, Entwicklungsdauer: nicht bestimmt, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

5.3.1.2 Stationäre Phasen

Neben Variation der FM-Systeme und Entwicklungsstrecken auf stationärem Kieselgel, wurden außerdem andere stationäre Phasen in der in dieser Arbeit durchgeführten Methodenentwicklung getestet. Einige davon werden in der Literatur zur IG-Analytik beschrieben, wie z.B. stationäres RP18-Material [106]. Die entsprechenden Resultate werden in diesem Kapitel dargestellt und diskutiert. Hierbei wurde zunächst die in der Literatur für unpolares Geniposid ($R_f = 0,53$), Genepin-1- β -D-gentiosid ($R_f = 0,63$) und Gardenosid ($R_f = 0,71$) generierte DC-Methode in Augenschein genommen (Abbildung 5.10). Für eine konkretere Einordnung der chromatographischen Auftrennung in Verbindung mit der Polarität der Analyten von Interesse, wurden die zwei Zucker Glukose und Rhamnose mit aufgetragen.

Es fällt auf, dass sich sowohl Aucubin als auch Catalpol direkt an der Fließmittelfront befinden. Mitgeführte L-Glukose und L-Rhamnose sind ebenfalls direkt an der Fließmittelfront lokalisiert. Im Gegensatz dazu umschließen die beiden Zucker die Verbindungen Aucubin und Catalpol auf stationärem Kieselgel, wie interne Versuche zeigten (Abbildung 5.16 in Kapitel 5.3.2.1). Zwar hätten die unpolaren, in *P. lanceolata* enthaltenen IGs auf der restlichen Laufstrecke genügend Platz chromatographiert zu werden, doch ist dies irrelevant, wenn sich die beiden zu quantifizierenden Hauptverbindungen der IGs nicht trennen lassen. Zusammenfassend ist diese Methode eindeutig unbrauchbar zur Fingerprintanalytik der IGs in *P. lanceolata*. Möglicherweise könnten die Effekte der Plattenvorbehandlung mit Propan-2-ol für eine erfolgreiche Chromatographie aus-



Abbildung 5.10: DC gemäß Coran et al. [106]. Auftragung von links nach rechts: Extrakt (E, 0,1 mg), Aucubin (A, 2 μg), Catalpol (C, 3 μg), L-Glukose (G, 40 μg), L-Rhamnose (R, 40 μg), stationäre Phase: RP18W (HPTLC, vorbehandelt mit Propan-2-ol), mobile Phase: Acetonitril/0,1%-ige wässrige Ameisensäure (40:60, v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 6,5 cm, Entwicklungsdauer: nicht bestimmt, Derivatisierung: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

schlaggebend sein. Diese wird im Paper nicht detailliert beschrieben. In der dargestellten DC wurde die komplette DC-Platte über Nacht (16 h) in Propan-2-ol gelegt. In vorhergehenden Versuchen, in denen die DC-Platte mit Propan-2-ol in eine Richtung gewaschen wurde, wurde das spätere Fließverhalten der mobilen Phase negativ beeinflusst. Aus Zeitgründen wurden sich nicht intensiver mit dieser spannenden Thematik befasst, auch wenn nachfolgende Untersuchungen dazu interessant wären. Stationäres Aluminiumoxidmaterial wurde darüber hinaus zur Auftrennung von Aucubin und Catalpol herangezogen. Als mobile Phase wurde das FM-System von Pachaly und Koch [109] verwendet, wobei die Entwicklungsstrecke mit 1 x 6 cm (links) und 4 x 7 cm (rechts) variierte (Abbildung 5.11).

Sowohl bei 1 x 6 cm (links) als auch bei 4 x 7 cm (rechts) Entwicklungsstrecke konnten keine zufriedenstellenden Resultate gewonnen werden. Die R_f -Werte bei einmaliger Entwicklung betragen 0,09 bzw. 0,07, bei viermaliger Entwicklung 0,19 bzw. 0,17 für Aucubin bzw. Catalpol. Bei einmaliger Entwicklung sind die beiden Hauptiridoidglykoside nicht getrennt. Bei mehrmaliger Entwicklung konnten zusätzliche Banden in der Laufbahn der aufgetragenen Referenzsubstanzen beobachtet werden, wodurch eine eindeutige Identifizierung bzw. Zuordnung der Banden nicht gewährleistet werden konnte. Nicht auszuschließen ist eine Abbaureaktion der Verbindungen während der Entwicklung durch Reaktion mit dem stationären Aluminiumoxidmaterial. Nähere Untersuchungen diesbezüglich stehen noch aus. Zudem sind die Banden bei wiederholter Entwicklung leicht verbreitert, was dem Fehlen eines zonenschärfenden Additivs zugeschrieben wird. Alles in allem eignet sich diese Methode nicht zur Fingerprintanalytik der IGs in *P. lanceolata*.

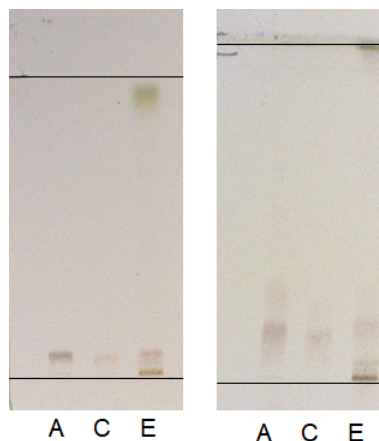


Abbildung 5.11: DC gemäß Pachaly und Koch [109] . Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 2 μg , $R_f = 0,09$ (links) bzw. 0,19(rechts)), Catalpol (C, 2 μg , $R_f = 0,07$ (links) bzw. 0,17 (rechts)), Extrakt (E, 0,4 mg), stationäre Phase: Aluminiumoxid, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 6 cm (links) und 4 x 7 cm (rechts), Entwicklungsdauer: nicht bestimmt, Derivatisierung: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

Auch mittels stationärer Aminoplatte können die Aucubin und Catalpol nur marginal voneinander getrennt werden (Abbildung 5.12).

Durch diese Methode können für Aucubin bzw. Catalpol R_f -Werte von 0,15 bzw. 0,13 erzielt werden, die zu niedrig für eine geeignete Fingerprintanalytik sind. Interessant ist, dass sich die IGs auf der Aminoplatte ohne Nutzung eines Derivatisierungsreagenzes sichtbar machen lassen. Dies beruht auf der sogenannten Maillard-Reaktion zwischen reduzierender Zuckereinheit im IG und verfügbarer Aminogruppe der stationären Phase. Für denisometrische Messungen ist das ein klarer Vorteil dieser stationären Phase gegenüber anderen auf Derivatisierungsreagenzien angewiesenen Verfahren. Je mehr variierende Komponenten, desto größer ist die Fehlerwahrscheinlichkeit im angestrebten Quantifizierungsprozess der IGs. Auch aus umwelttechnischer Sicht wäre die Vermeidung von zusätzlichen Reagenzien während des Derivatisierungsprozesses zu präferieren.

Weiter wurden stationäres RP2-, Polyamid- Cyano- und Diolmaterial in Kombination mit dem FM-System des DC-Atlas Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v) getestet (nicht dargestellt). Dabei konnte keine Verbesserung zur herkömmlichen stationären Kiesegelphase festgestellt werden.

Erwähnenswert sind abweichende Derivatisierungseigenschaften auf dem Diolmaterial im Vergleich zur Kiesegelplatte. Weiter trat bei stationärem Cyano- und Polyamidmaterial sehr starkes Tailing (Schwanzbildung) auf. Beide Effekte wirkten einer aussagekräftigen Detektion und Auswertung entgegen. Eine Trennung von Aucubin und Catalpol konnte mit keinem der angewendeten DC-Systeme erreicht werden. Zusammenfassend kann somit kein Gewinn durch Anwendung anderer, weniger gängiger stationärer Phasen wie Aluminiumoxid-, Amino-, RP2-, Polyamid-, Cyano- und Diolmaterial im Vergleich zu üblichem Kiesegelmaterial festgestellt werden. Aufgrund oben erwähnter variierender

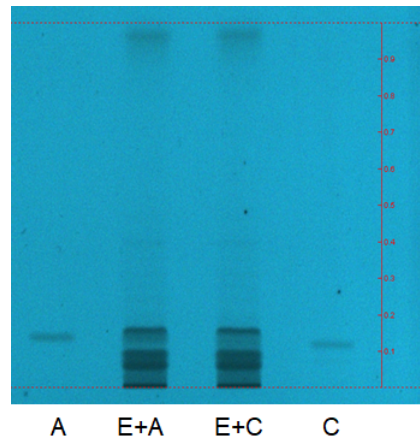


Abbildung 5.12: DC gemäß Camag Application Notes [110]. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 1 μg , $R_f = 0,15$), Extrakt+Aucubin (E+A, 0,2 mg + 1 μg), Extrakt+Catalpol (E+C, 0,2 mg + 1 μg), Catalpol (C, 1 μg , $R_f = 0,13$), Extrakt (E, 0,6 mg), stationäre Phase: Aluminiumoxid (HPTLC), mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:15:8, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungstrecke: 1 x 6 cm, Entwicklungsdauer: nicht bestimmt, Derivatisierung: ΔT für 30 min bei 200 °C, Detektion: Tageslicht (VIS).

Derivatisierungseigenschaften auf den angewendeten stationären Phasen, erschien es weiterhin sinnvoll die Derivatisierungsfähigkeit ausgewählter Reagenzien auf ausgewählten stationären Phasen zu überprüfen.

5.3.1.3 Sackgassen der Fingerprintanalytik eignen sich zur DC-geleiteten Isolierung der Hauptiriodglykoside

Weiter wurden im Rahmen der DC-Methodenentwicklung zur Fingerprintanalytik DC-Methoden kreiert, die sich nicht für eine Fingerprintanalytik der IGs in *P. lanceolata* eigneten und quasi als „Sackgassen“ bezeichnet werden können. Jedoch waren diese ideal für die in dieser Arbeit durchgeführte DC-geleitete Isolierung von Aucubin und Catalpol. Auf diese Sackgassen der DC-Methodenentwicklung für ein IG-Fingerprint-Screening soll an dieser Stelle eingegangen werden. Der Übersicht halber werden hier nur ausgewählte Beispiele dargestellt. Als bevorzugte stationäre Phase wurde Kieselgel verwendet. Der Einsatz von Ethylacetat im FM-System wurde in Anlehnung an die GLP-Richtlinien anderen organischen Lösungsmitteln, insbesondere Chloroform, vorgezogen. Zunächst wurde der erforderliche Methanolanteil untersucht, um die Zonen von Aucubin und Catalpol in einer passablen Höhe, konkret R_f -Werte von 0,2 bis 0,8, zu erhalten (Abbildung 5.13, in Tabelle 5.1 als Methode 1 (A, B, C) bezeichnet).

100% Methanol (A) führte zu hohen R_f -Werten von 0,69 bzw. 0,68 für Aucubin bzw. Catalpol, die beide Substanzen nicht voneinander trennten. 48% Methanol (B) führte zu einem identischen R_f -Wert im Fall des Aucubins und unwesentlich geringerem R_f -Wert von 0,67 im Falle des Catalpols und verfügte ebenfalls nicht über das Potential die beiden Hauptiriodglykoside auf der DC-Platte zu separieren. Deutlich geringere

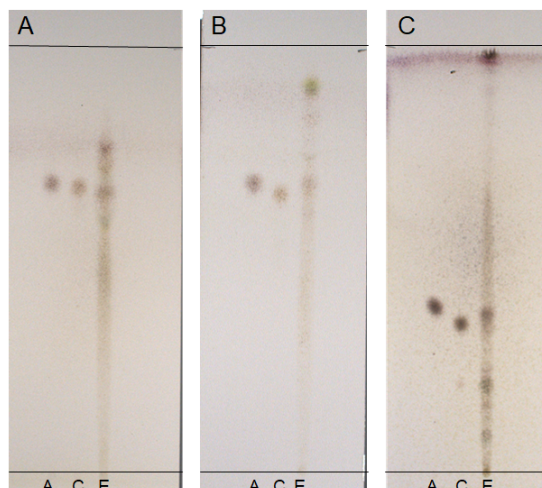


Abbildung 5.13: Einfluss des Methanolanteils in ethylacetathaltigen FM-Systemen. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 2 μg , $R_f = 0,69$ (A), 0,69 (B) bzw. 0,38 (C)), Catalpol (C, 2 μg , $R_f = 0,68$ (A), 0,67 (B) bzw. 0,34 (C)), Extrakt (E, 0,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Methanol (A), Ethylacetat/Methanol/Wasser (50:50:5, v/v/v, B), Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v, C), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 18 cm, Entwicklungsdauer: > 1 h, Derivatisierung: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

R_f -Werte von 0,38 bzw. 0,34 für Aucubin bzw. Catalpol wurden bei einem Anteil von 20% Methanol (C), in dem bereits untersuchten FM-System des DC-Atlas [109], erzielt. Dabei konnte bei der gegebenen Entwicklungsstrecke von 1 x 18 cm sowohl eine Separation von Aucubin und Catalpol als auch R_f -Werte im gewünschten Bereich der Platte erreicht werden. Sichtbare Zonenverbreiterung in allen additivfreien FM-Systemen gab den Anlass zu einem bandenschärfenden Zusatz. Deshalb wurde im FM-System des nachstehenden Chromatogramms statt Wasser Säure hinzugefügt (Abbildung 5.14 in Tabelle 5.1 als Methode 2 bezeichnet).

Durch den Säurezusatz konnte eine erfolgreiche Zonenverschärfung im Extrakt sowie für die Einzelsubstanzen, trotz einer erhöhten Auftragemenge, erreicht werden. Die R_f -Werte variierten leicht zum säurefreien FM-System mit 0,39 bzw. 0,37 für Aucubin bzw. Catalpol. Eine Trennung der beiden IGs konnte nicht erzielt werden. In einem nächsten Schritt wurde toxisches Methanol durch weniger toxisches Ethanol ersetzt. Mit dem Einsatz des unpolaren Ethanol und der gleichzeitigen Verringerung des Ethylacetatanteils von 67% auf 57% konnte eine Trennung der beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol auf der DC erreicht werden (Abbildung 5.15 in Tabelle 5.1 als Methode 3 bezeichnet). Die R_f -Werte lagen bei 0,42 bzw. 0,38 für Aucubin bzw. Catalpol. Letztendlich mussten die FM-Systeme situationsbedingt angepasst werden, weswegen unterschiedliche DC-Systeme während des Isolierungsprozesses Anwendung fanden. Einfluss auf die dünnstichtchromatographische Trennung hatte neben starken Temperaturunterschieden über die Dauer des Isolierungsprozesses auch die variierenden Auftragsmengen.

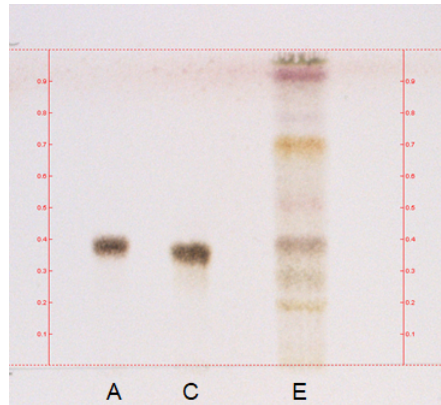


Abbildung 5.14: Optimierung des FM-Systems 1. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 14 μg , $R_f = 0,39$), Catalpol (C, 14 μg , $R_f = 0,37$), Extrakt (E, 1,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Ameisensäure (70:30:5, v/v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 7 cm, Entwicklungsdauer: 15 min, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

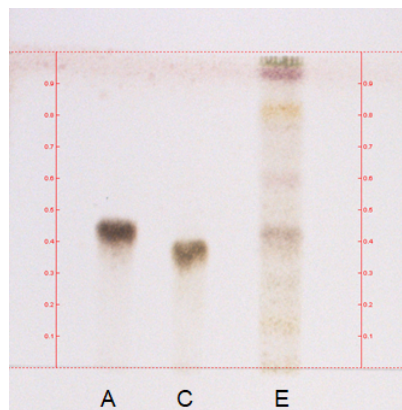


Abbildung 5.15: Optimierung des FM-Systems 2. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, 14 μg , $R_f = 0,42$), Catalpol (C, 14 μg , $R_f = 0,38$), Extrakt (E, 1,6 mg), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Ethanol/Ameisensäure (60:40:5, v/v/v), Kammersättigung: 30 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 7 cm, Entwicklungsdauer: 15 min, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 2-5 min bei 120°C, Detektion: Tageslicht (VIS).

5.3.1.4 Beurteilung der getesteten DC-Systeme

Die erhaltenen dünnenschichtchromatographischen Ergebnisse wurden anhand folgender Kriterien zur Fingerprintanalytik der IGs in *P. lanceolata* eingestuft.

- der Höhe des R_f -Wertes, ohne Einberechnung der Mehrfachentwicklung, wie oben beschrieben, charakterisiert durch einen R_f -Wert zwischen 0,2 und 0,8.
- der Selektivität, bezogen auf die Differenz der R_f -Werte der Aucubin- und Catalpolzone, ebenfalls ohne Einberechnung der Mehrfachentwicklung, wie oben beschrieben.
- der optischen Trennung der Zonen im Chromatogramm.
- der Trennleistung, als optisch sichtbare Zonenverbreiterung entlang der Laufrichtung.
- der Entwicklungsdauer.
- dem freien Platz für die restlichen, betrachteten, unpolaren IGs, die für *P. lanceolata* postuliert werden. Dafür werden 2/3 der Platte angenommen. Eine für die Isolierung der Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol geeignete Methode charakterisierte sich durch einen R_f -Wert zwischen 0,2 und 0,8, wobei eine möglichst mittige Lage angestrebt wurde.

Priorität besaß dabei die Selektivität der Methode. Die Trennleistung wurde als zweitrangig eingestuft. Tabelle 5.1 fasst die erhobenen Parameter zusammen und gibt eine Beurteilung über die Eignung zur Fingerprintanalytik bzw. DC-geleiteten Isolierung wieder.

Die beste Selektivität, ermittelt anhand der Differenz der R_f -Werte (ΔR_f) von Aucubin und Catalpol, wurde mit ΔR_f 0,07 mithilfe des DC-Systems von Rischer et al. [29] erzielt. Dabei fand das FM-System Chloroform/Methanol/*p*-Toluolsulfonsäure (0,25 M) in 28-30%-igem Ammoniak (70:40:10, v/v/v) sowie eine zweifache Entwicklung auf kurzer Strecke (2 x 7 cm) Verwendung. Das Alleinstellungsmerkmal dieser Methode war die Verwendung von in Ammoniak gelöster *p*-Toluolsulfonsäure. Normalerweise würden bei aciden, OH-reichen Verbindungen, wie bei IGs, Säuren hinzugesetzt werden, um eine einheitliche Protonierung der Verbindungen sicherzustellen. Der Zusatz von Ammoniak stellt damit *per se* ein ungewöhnliches Verfahren dar. *p*-Toluolsulfonsäure ist eine nicht-oxidierende Säure, welche in der chemischen Synthese zu Acetalisierungen, Veresterungen und Dehydrierungen verwendet wird. Ihre chemische Funktion in Kombination mit Ammoniak sollte in zukünftigen Analysen ausführlicher erforscht werden. Neben der optimalen Trennung der beiden chemisch sehr ähnlichen IGs, gelang es nur mithilfe dieser Methode auf einer DC scharfe Zonen zu erhalten. Selbst auf der HPTLC-Kieselgel-Platte, die eine feinere Korngröße und Porengröße besitzt, konnten keine scharfen Zonen generiert werden.

Tabelle 5.1: Erhobene Daten zur Beurteilung der Eignung der getesteten (HP)TLC-Methoden zur IG-Fingerprintanalytik. „-“ bzw. „+“ stehen für eine schlechte bzw. gute Einstufung der Eignung.

Literatur	R _f -Wert Aucubin	R _f -Wert Catalpol	Δ R _f	R _f -Wert zwischen 0,2 und 0,8	getrennte Aucubin- und Catalpol- zonen	Trenn- leistung	Entwick- lungs- dauer	2/3 der Plat- te für restli- che IGs frei	geeignet für Finger- print	geeignet für Isolie- rung
[106]	0,96	0,96	0,00	-	-	-	a	+	-	-
[109]	0,28	0,26	0,02	+	-	-	30 min	+	-	-
[109] mit Alumini- umoxid-DC	0,09	0,07	0,02	-	+/-	+/-	a	+	-	-
[110]	0,25	0,24	0,01	+	-	-	120 min	+	-	-
[110] mit Amino- DC	0,15	0,13	0,02	-	+/-	+/-	a	+	-	-
[113]	0,07	0,04	0,03	-	+/-	+/-	150 min	+	-	-
Methode 1 A	0,69	0,68	0,01	-	-	-	a	-	-	-
Methode 1 B	0,69	0,67	0,02	-	-	-	a	-	-	-
Methode 1 C	0,38	0,34	0,04	-	+	-	a	-	-	+/-
Methode 2	0,39	0,37	0,02	-	-	-	15 min	-	-	-
Methode 3	0,42	0,38	0,04	-	+	-	15 min	-	-	+/-
[103]	0,33	0,29	0,04	+	+	+/-	75 min	-	+/-	-
[111]	0,16	0,14	0,02	+/-	-	-	105 min	+	-	-

^a nicht angegeben

Literatur	R _f -Wert Aucubin	R _f -Wert Catalpol	Δ R _f	R _f -Wert zwischen 0,2 und 0,8	getrennte Aucubin- und Catalpol- zonen	Trenn- leistung	Entwick- lungs- dauer	2/3 der Plat- te für restli- che IGs frei	geeignet für Finger- print	geeignet für Isolie- rung
[43]	0,22	0,18	0,04	+/-	+/-	-	a	+	+/-	-
[29]	0,33	0,27	0,07	+	+	+	2 x 15 min	-	+/-	-
[58]	0,19	0,18	0,01	+/-	-	-	15 min	+	-	-
[112] (kurz)	0,05	0,04	0,01	-	-	-	a	+	-	-
[112] (lang)	0,11	0,09	0,02	-	+	-	a	+	+/-	-

^a nicht angegeben

Nachteilig wirkt sich der hohe R_f -Wert der Substanzen aus, die kaum Raum für die Separation der vier irioidglykosidischen Minorkomponenten in *P. lanceolata* bieten. Das DC-System von Munteanu und Vlase [103], das der Monographie der Spitzwegerichblätter (Ph. Eur. 7.0-9.0) [43, 49] sowie das der entwickelten Methoden 1 C und 3 zeigten mit einem ΔR_f von 0,04 die zweitbeste Selektivität. Bei Munteanu und Vlase [103] sind die zwei separaten Zonen gut erkennbar. Bei der Methode gemäß Ph. Eur. 7.0-9.0 [43, 49] sowie der entwickelten Methode 1C und Methode 3 tangieren sich die Zonen dieser Verbindungen.

Wegen der vergleichsweise langen Entwicklungsdauer von 75 min und den hohen R_f -Werten wurde das DC-Verfahren nach Munteanu und Vlase [103] jedoch als ungeeignet eingestuft. Die entwickelten Methoden 1C und 3 waren aufgrund ihres hohen R_f -Wertes ebenfalls ungeeignet für die Fingerprintanalytik der IGs, wurden aber für die DC-geleitete Isolierung der Hauptiridoidglykoside eingesetzt. Aufgrund der kürzeren Entwicklungsdauer von 15 min sowie des Einsatzes von nicht-toxischem Ethanol wurde Methode 3 bevorzugt. Die weniger gute Trennleistung wie beispielsweise im Vergleich zur Methode gemäß Munteanu und Vlase [103] wurde vernachlässigt. Die drittbeste Selektivität wurde mit einem ΔR_f von 0,03 von Krzek et al. [113] erhalten. Mit einer Entwicklungsdauer von 150 min und den unter 0,1 liegenden R_f -Werten ist diese Methode zur IG-Fingerprintanalytik auch nicht geeignet. Die Trennleistung der angewendeten DC-Verfahren war insgesamt nicht besonders gut. Einzig anhand der Methode von Rischer et al. [29] konnte eine gute Trennleistung erzielt werden. Als ansatzweise gut konnte die Trennleistung auf der Aluminiumoxid- und Aminoplatte sowie durch die Methoden von Krzek et al. [113] sowie Munteanu und Vlase [103] betrachtet werden. Die restlichen DC-Systeme lieferten keine zufriedenstellenden Trennleistungen. Insgesamt wurde kein Mehrgeinn durch Anwendung anderer, weniger gängiger stationärer Phasen wie Aluminiumoxid-, Amino-, RP2-, Polyamid- Cyano- und Diolmaterial im Vergleich zu üblichem Kieselgelmaterial festgestellt.

5.3.2 Derivatisierung und Detektion

5.3.2.1 Derivatisierung auf Kieselgel

Zur Fingerprintanalytik wurde ein Derivatisierungsverfahren gesucht, um die in *P. lanceolata* enthaltenen IGs nach DC-Analyse detektieren zu können. Dazu wurden das Derivatisierungsverhalten der IGs sowohl durch Behandlung mit spezifischen als auch unspezifischen Derivatisierungsreagenzien auf Kieselgel untersucht. Darüber hinaus wurden zur IG-Anfärbung untypische Derivatisierungsreagenzien getestet. Tabelle 5.2 gibt einen Überblick über einige der verwendeten Derivatisierungsmittel, inklusive ihrer Eignung zur IG-Anfärbung auf stationärem Kieselgel, wieder.

Tabelle 5.2: Übersicht der angewendeten Derivatisierungsreagenzien auf stationärem Kieselgel. Aufgelistet sind die entsprechende Spezifität zur IG-Detektion, die verwendeten Derivatisierungsreagenzien, -bedingungen, charakteristische Stoffklasse sowie Detektionsart.

Derivatisierungsreagenz	Spezifität für IGs	Derivatisierungsbedingungen	charakteristische Stoffklasse	Detektion
Ehrlich-Reagenz	spezifisch	10 min bei 120°C	Iridoide, Proazulene	VIS [114, Seite 235]
Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz	unspezifisch	5 min bei 120°C	Terpenoide, u.a. Iridoide	VIS (rotbraune, gelbbraune, dunkelgrüne Zonen) [114, Seite 234]
Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz		5 min bei 120°C	Universalreagenz, z. B. Terpenoide	VIS (rotbraune, gelbbraune, dunkelgrüne Zonen) [131, Seite 305]
Echtblausalz-Reagenz	spezifisch für andere Stoffgruppen	Trocknen ohne Erhitzen	Hopfenbitterstoffe, phenolische Verbindungen	VIS [131, Seite 301]
Eisenchlorid-Reagenz		Trocknen ohne Erhitzen	Hopfenbitterstoffe, Oleuropein, Carnolsäure	VIS [131, Seite 302]
Chloramin-T-Reagenz		30 min bei 120°C	Herzglykoside	366 nm [131, Seite 300]
Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz		5 min bei 120°C	Flavonoide	366 nm (blau, gelb, grüne Fluoreszenz) [131, Seite 304] 254 nm (Fluoreszenzlösung) [131, Seite 304]

Das angewendete polare bis mittelpolare Fließmittelsystem Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v) sowie die Entwicklungstrecke war bei den in dieser Arbeit durchgeführten und nachfolgend präsentierten Experimenten gleich. Als R_f -Marker wurden neben Aucubin und Catalpol Glukose und Rhamnose mitgeführt. Weiter wurden mit polaren Lösungsmitteln erhaltene Rohextrakte der Pflanze aufgetragen. Detaillierte Informationen zu deren Herstellung befinden sich in Kapitel 5.5.1. Für ein umfassenderes Verständnis des Derivatisierungsverhaltens wurden nicht nur die in der Literatur vorgeschlagenen Detektionswellenlängen herangezogen, sondern alle drei gängigen Detektionsmodi (254 nm, 366 nm, VIS) betrachtet. Die Derivatisierung mittels IG-spezifischem Ehrlich-Reagenz zeigte im Tageslicht (VIS) blaue Zonen für Aucubin und Catalpol (Abbildung 5.16).

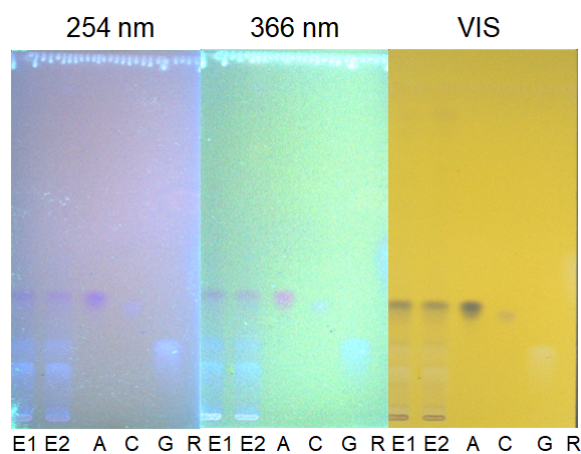


Abbildung 5.16: Derivatisierung mittels Ehrlich-Reagenz. Auftragung von links nach rechts: Extrakt (E1, E2, 0,2 mg), Aucubin (A, 2 μ g, $R_f = 0,33$), Catalpol (C, 2 μ g, $R_f = 0,31$), L-Glukose (G, 83 μ g, $R_f = 0,19$), L-Rhamnose (R, 77 μ g, $R_f = 0,42$), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungstrecke: 1 x 15 cm, Derivatisierung: Ehrlich-Reagenz + ΔT für 5 min bei 120 °C, Detektion von links nach rechts: 254 nm, 366 nm, VIS.

Trotz gleicher Auftragemenge, ist die Bande des Aucubins stark, die des Catalpols nur marginal gefärbt. Bis auf eine Zone auf der Startlinie sind keine weiteren extrahierten Inhaltsstoffe unter Tageslichtdetektion sichtbar. Die polarere L-Glukose ist bei einem R_f von 0,19, die unpolare L-Rhamnose bei einem R_f von 0,42 lokalisiert. Beide Zucker sind nicht unter Tageslicht zu erkennen und können nur schwach als hellblaue Fluoreszenzen unter 366 nm erfasst werden. Eine spezifische Anfärbung des Aucubins, jedoch nicht des Catalpols ist damit gegeben, weswegen Ehrlich-Reagenz als Derivatisierungsmittel IGs nur bedingt selektiv sichtbar macht. Mittels universal färbendem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz sind Aucubin und Catalpol sowohl bei 366 nm als auch unter Tageslicht eindeutig detektierbar (Abbildung 5.17).

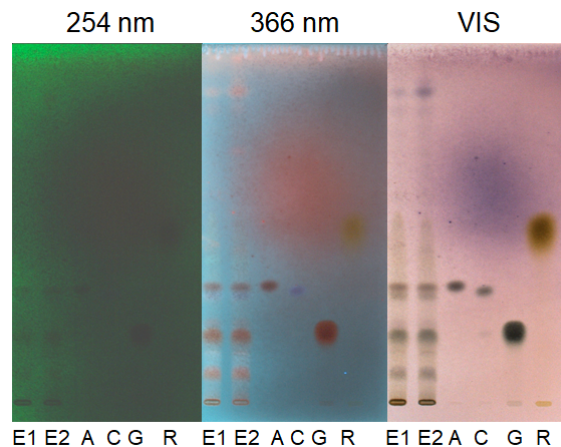


Abbildung 5.17: Derivatisierung mittels Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz. Auftragung von links nach rechts: Extrakt (E1, E2, 0,2 mg), Aucubin (A, 2 μg , $R_f = 0,33$), Catalpol (C, 2 μg , $R_f = 0,32$), L-Glukose (G, 83 μg , $R_f = 0,20$), L-Rhamnose (R, 77 μg , $R_f = 0,49$), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75 + 20 + 5, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 16 cm, Derivatisierung: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 5 min bei 120 °C, Detektion von links nach rechts: 254 nm, 366 nm, VIS.

Beide Substanzen zeigen dunkle Zonen in der Tageslichtdetektion. Unter 366 nm weisen sie jedoch unterschiedliche Fluoreszenzen auf, wobei Aucubin als braune und Catalpol als blaue Zone sichtbar ist. Die mitgeführten Zucker sind ebenso in beiden Detektionsmodi gut zu erkennen, wobei sich bei Detektion unter Tageslicht die Zonen besser vom Hintergrund abheben. Dabei ist L-Glukose dunkel und L-Rhamnose gelb-grün gefärbt. Das unterschiedliche Färbeverhalten der beiden IGs bei Detektion unter 366 nm zeigt, dass IGs nicht einheitlich angefärbt werden. Eine IG-spezifische sowie selektive, sich von Substanzen anderer Stoffklassen abhebende Farbigeit/Fluoreszenz liegt zudem nicht vor. Durch Derivatisierung *via* unspezifisch färbendem Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz können Aucubin und Catalpol als dunkle Zonen bei Detektion unter 366 nm sowie VIS sichtbar gemacht werden (Abbildung 5.18). Die beobachteten Zonen sind eindeutig mit Ausnahme von Catalpol unter 366 nm. Wie bei universal färbendem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz heben sich die Farben/Fluoreszenzen der IG-Zonen nicht von denen der extrahierten Inhaltsstoffe ab. L-Glukose und L-Rhamnose können eindeutig gefärbt werden, wobei sich lediglich die Zone der L-Rhamnose mit seiner gelben (366 nm) bzw. orangen (VIS) Fluoreszenz bzw. Farbe von den anderen Zonen merklich unterscheidet.

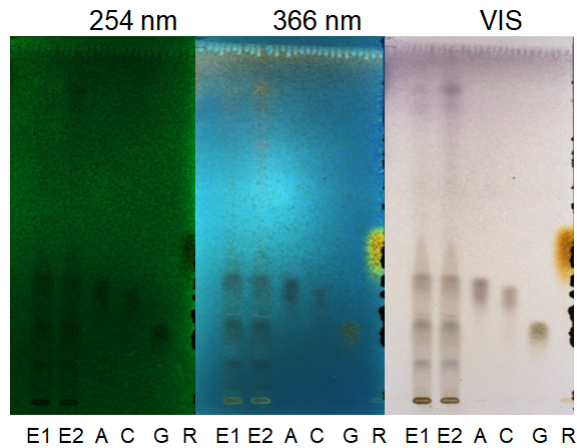


Abbildung 5.18: Derivatisierung mittels Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz. Auftragung von links nach rechts: Extrakt (E1, E2, 0,2 mg), Aucubin (A, 2 μg , $R_f = 0,33$), Catalpol (C, 2 μg , $R_f = 0,31$), L-Glukose (G, 83 μg , $R_f = 0,19$), L-Rhamnose (R, 77 μg , $R_f = 0,42$), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 15 cm, Derivatisierung: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz + ΔT für 5 min bei 120°C, Detektion von links nach rechts: 254 nm, 366 nm, VIS.

Zwar weisen beide IGs einheitliche Fluoreszenzen bzw. Farben auf, zeigen aber keinen nennenswerten Unterschied zu Verbindungen anderer Stoffgruppen. Die Derivatisierung anhand von Echtblausalz, das bevorzugt für phenolische Verbindungen und Hopfenbitterstoffe eingesetzt wird, ruft keine Färbung oder Fluoreszenz der IGs hervor (Abbildung 5.19). Gleiches gilt für die beiden mitgeführten Zucker.

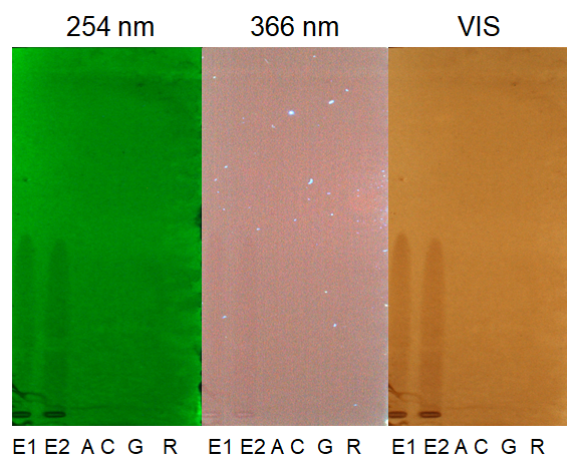


Abbildung 5.19: Derivatisierung mittels Echtblausalz-Reagenz. Auftragung von links nach rechts: Extrakt (E1, E2, 0,2 mg), Aucubin (A, 2 μg , $R_f = 0,33$), Catalpol (C, 2 μg , $R_f = 0,32$), L-Glukose (G, 83 μg , $R_f = 0,20$), L-Rhamnose (R, 77 μg , $R_f = 0,49$), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 16 cm, Derivatisierung: Echtblausalz-Reagenz ohne Temperatureinwirkung, Detektion von links nach rechts: 254 nm, 366 nm, VIS.

Auch mittels Eisenchlorid-Reagenz konnten keine Banden für die mitgeführten IGs und Zucker registriert werden. Beide Reagenzien sind absolut ungeeignet als Derivatisierungsmittel für die IGs (Abbildung 5.20).

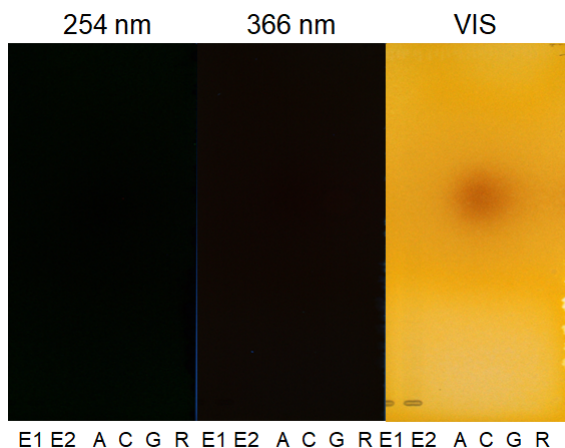


Abbildung 5.20: Derivatisierung mittels Eisenchlorid-Reagenz. Auftragung von links nach rechts: Extrakt (E1, E2, 0,2 mg), Aucubin (A, 2 μg , $R_f = 0,33$), Catalpol (C, 2 μg , $R_f = 0,31$), L-Glukose (G, 83 μg , $R_f = 0,19$), L-Rhamnose (R, 77 μg , $R_f = 0,42$), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 15 cm, Derivatisierung: Eisenchlorid-Reagenz ohne Temperatureinwirkung, Detektion von links nach rechts: 254 nm, 366 nm, VIS.

Die Derivatisierung mittels Chloramin-T-Reagenz ergibt unter 366 nm für alle sichtbaren Zonen eine blaue Fluoreszenz (Abbildung 5.21). Die Fluoreszenz des Aucubins ist stärker als die des Catalpols. Die Fluoreszenzen unterscheiden sich jedoch nicht von denen anderer Verbindungsklassen. Im Tageslicht sind lediglich gelb-braune Zonen der aufgetragenen Extrakte auf der Startlinie erkennbar. Eine blaue Fluoreszenz der Zucker bei 366 nm kann nur erahnt werden.

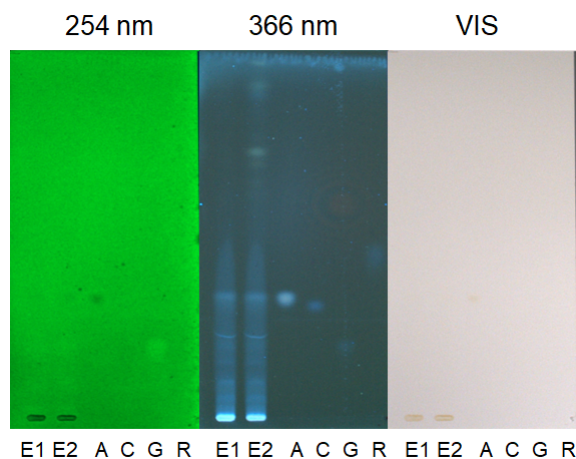


Abbildung 5.21: Derivatisierung mittels Chloramin-T-Reagenz. Auftragung von links nach rechts: Extrakt (E1, E2, 0,2 mg), Aucubin (A, 2 μg , $R_f = 0,33$), Catalpol (C, 2 μg , $R_f = 0,31$), L-Glukose (G, 83 μg , $R_f = 0,19$), L-Rhamnose (R, 77 μg , $R_f = 0,42$), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 15 cm, Derivatisierung: Chloramin-T-Reagenz + ΔT für 30 min bei 120 °C, Detektion von links nach rechts: 254 nm, 366 nm, VIS.

Wie erwartet ist Chloramin-T-Reagenz ungeeignet zur spezifischen und selektiven Derivatisierung von IGs. Auch die herangezogenen Zucker konnten damit nicht visualisiert werden. Für phenolische Verbindungen charakteristisches Naturstoff-Reagenz ermöglichte eine schwache Detektion von Aucubin und Catalpol als blaue Fluoreszenz unter 366 nm (Abbildung 5.22). Diese ist für beide Substanzen identisch stark ausgeprägt. Extrahierte Verbindungen im Extrakt zeigen ähnliches, wenn auch weniger starkes Fluoreszenzvermögen. Im Gegensatz zu L-Glukose und L-Rhamnose, die jeweils intensiv blau fluoreszieren. Analog zur Derivatisierung mit Chloramin-T kann lediglich eine braune Zone in den Extrakten auf Starthöhe bei Tageslichtdetektion visualisiert werden.

Erwartungsgemäß zeigte auch die Derivatisierung mittels Naturstoff-Reagenz kein erhebliches Potential zur Anwendung für die DC-basierte IG-Fingerprintanalytik. Zusammenfassend konnte keines der getesteten Derivatisierungsmittel mit seiner Spezifität und Selektivität gegenüber IGs überzeugen. Dies betraf auch das in der Literatur verwendete IG-spezifische Ehrlich-Reagenz. Dieses färbt trotz gleichhoher Auftragemenge Aucubin deutlich stärker blau (VIS-Detektion) an als Catalpol. Positiv fiel hingegen die erfolgreiche, wenn auch nicht charakteristische Anfärbung der IGs mittels universal färbendem Anisaldehyd und Vanillin in Kombination mit Schwefelsäure aus. Zu bemerken sei hierbei die unterschiedlich gefärbte Fluoreszenz unter 366 nm der beiden IGs Aucubin und Catalpol in Gegenwart von Anisaldehyd-Schwefelsäure im Gegensatz zu Vanillin-Schwefelsäure.

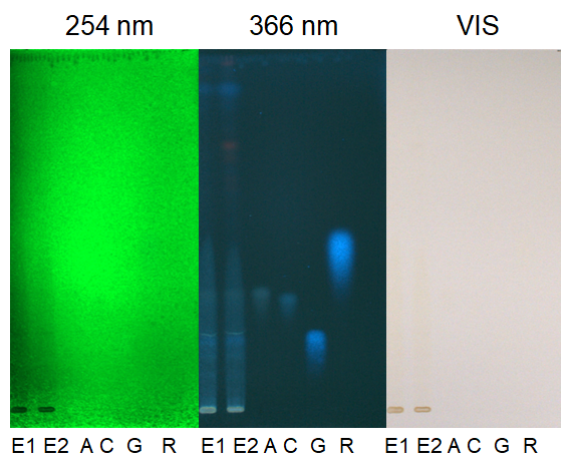


Abbildung 5.22: Derivatisierung mittels Naturstoff-Reagenz. Auftragung von links nach rechts: Extrakt (E1, E2, 0,2 mg), Aucubin (A, 2 μg , $R_f = 0,33$), Catalpol (C, 2 μg , $R_f = 0,31$), L-Glukose (G, 83 μg , $R_f = 0,19$), L-Rhamnose (R, 77 μg , $R_f = 0,42$), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v), Kammersättigung: 20 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 15 cm, Derivatisierung: Naturstoff-Reagenz + ΔT für 5 min bei 120 °C, Detektion von links nach rechts: 254 nm, 366 nm, VIS.

5.3.2.2 Derivatisierung auf Kieselgel vs. Diolmaterial

Weiter wurde besonderes Augenmerk auf das Derivatisierungsverhalten zweier spezifischer Derivatisierungsreagenzien auf unterschiedlichen polaren stationären Phasen gelegt (Kapitel 5.3.1.2). Verstärktes Interesse lieferten außerdem die nicht zufriedenstellenden Ergebnisse aus Kapitel 5.3.2.1. Überraschend war dabei vor allem, dass das in der Literatur als IG-spezifisch postulierte Ehrlich-Reagenz keine einheitliche Anfärbung der beiden Hauptiridoidglykoside erkennen lässt. Nachfolgende Untersuchungen verzichteten auf die DC-Entwicklung beschränken sich auf die Derivatisierung. Dazu wurden lediglich dreimal Substanz (Catalpol bzw. Aucubin) mit bestimmter Konzentration auf eine Diol- bzw. Kieselgelplatte appliziert, mit Phloroglucin-Salzsäure bzw. *p*-Dimethylaminobenzaldehyd-Salzsäure (Ehrlich-Reagenz) derivatisiert und unter 254 nm, 366 nm und VIS detektiert, um Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede im Derivatisierungsverhalten herauszuarbeiten. In Abbildung 5.23 ist das Derivatisierungsvermögen des Ehrlich-Reagenzes auf der Kieselgel- dem auf der Diolplatte für Aucubin und Catalpol gegenübergestellt. Dabei sind für Aucubin bei allen drei applizierten Mengen intensiv blaue bzw. blaugraue Spots zu sehen. Die blauen Spots auf der Kieselgelplatte heben sich unter Tageslichtdetektion am besten vom Hintergrund (gelb) ab.

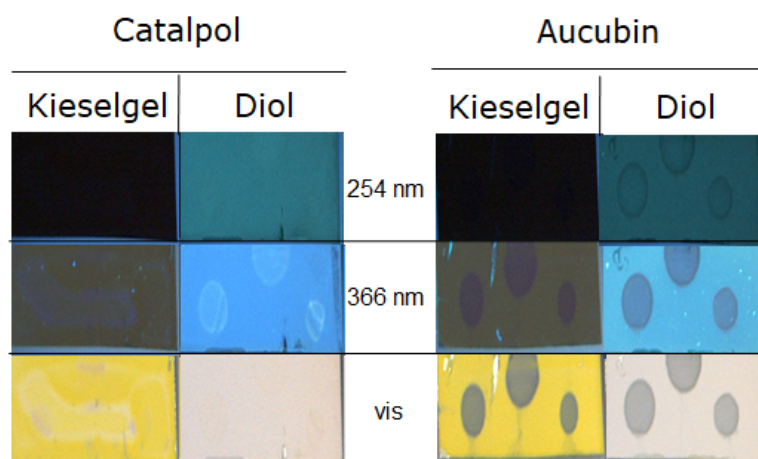


Abbildung 5.23: Derivatisierung mittels *p*-Dimethylaminobenzaldehyd auf stationärer Kieselgel- bzw. Diolphase. Auftragung von links nach rechts: 5, 10 und 2 μg Catalpol (links) bzw. Aucubin (rechts), stationäre Phase: Kieselgel (links, Merck, Darmstadt, Deutschland) bzw. Diolmaterial (rechts, Machery-Nagel, Düren, Deutschland), Derivatisierung: Ehrlich-Reagenz + ΔT für 15 min bei 120 °C, Detektion von oben nach unten: 254 nm, 366 nm, VIS.

Unterschiedliche Auftragemengen an Aucubin (2, 5 und 10 μg) ließen keinen Unterschied im Derivatisierungsverhalten erkennen. Für Catalpol dagegen waren keine so deutlich gefärbten Spots auf beiden stationären Phasen zu beobachten. Leichte weiße Fluoreszenzen können auf der Diolplatte unter 366 nm bzw. schwache blaue Spots auf der Kieselgelplatte unter 366 nm sowie VIS registriert werden. Wie auch für Aucubin besteht kein konzentrationsabhängiges Derivatisierungsverhalten. Die Untersuchung des Derivatisierungsvermögens von Aucubin und Catalpol auf den beiden stationären Phasen Diol und Kieselgel zeigt gravierende Unterschiede in der Intensität der Anfärbung, wobei auf beiden stationären Phasen Aucubin sehr viel stärker und Catalpol nur ansatzweise angefärbt werden kann. Überdies gibt es Unterschiede in der Farbgebung. Während Aucubin blau (Kieselgel) bzw. blaugrau (Diol) gefärbt war, weist Catalpol auf der Diolplatte eine weiße Farbe auf. Weder für Aucubin noch für Catalpol konnten konzentrationsabhängige Unterschiede im Derivatisierungsverhalten bei 2, 5 und 10 μg beobachtet werden. Das uneinheitliche Derivatisierungsverhalten des Ehrlich-Reagenzes scheint für eine bessere Anfärbung von IGs mit einer Doppelbindung zwischen C-7 und C.8 zu sorgen (Aucubin), als bei vorliegender Epoxidgruppe (Catalpol). Ein exakter Derivatisierungsmechanismus für diese Reaktion ist bis *dato* aber noch nicht beschrieben. In weiterführenden Versuchen, die aber nicht mehr Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, könnte dieser Sachverhalt weiter untersucht werden. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass anhand des Ehrlich-Reagenzes keine farbspezifische Visualisierung von IGs mit unterschiedlicher Substitution möglich ist. Zudem weist es markante Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber IGs auf. Die in der Literatur postulierte Eignung als IG-spezifisches Derivatisierungsreagenz muss anhand der hier erhaltenen Daten folglich negiert bzw. eingeschränkt werden. Ein weiteres IG-spezifisches Derivatisierungsmittel stellt das Phloroglucin-Salzsäure-

Reagenz dar. Dieses wurde analog dem Ehrlich-Reagenz auf Diol- und Kieselgelmaterial auf sein Derivatisierungsvermögen für IGs getestet. Abbildung 5.24 illustriert die bei Tageslichtdetektion erhaltenen Resultate.

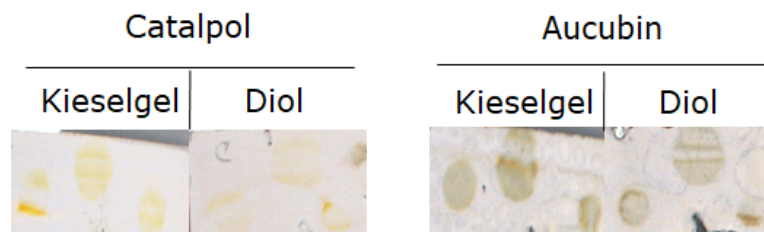


Abbildung 5.24: Derivatisierung mittels Phloroglucin auf stationärer Kieselgel- bzw. Diolphase. Auftragung von links nach rechts: 5, 10 und 2 μg Catalpol (links) bzw. Aucubin (rechts), stationäre Phase: Kieselgel (links, Merck, Darmstadt, Deutschland) bzw. Diolmaterial (rechts, Machery-Nagel, Düren, Deutschland), Derivatisierung: Phloroglucin-Salzsäure-Reagenz + ΔT für 1 min bei 120°C, Detektion: VIS.

Die Behandlung mit Phloroglucin-Salzsäure ruft auf beiden stationären Phasen eine braun-grüne bzw. gelbe Farbe für Aucubin bzw. Catalpol hervor. Die Spots des Aucubins sind dabei etwas intensiver gefärbt als die des Catalpols. Möglicherweise beruhen diese Beobachtungen darauf, dass sich der Kontrast und damit die Abhebung vom weißen Hintergrund bei Braun-grün stärker auswirken als bei Gelb. Es kann keine konzentrationsabhängige Derivatisierung im betrachteten Bereich (2, 5 und 10 μg) festgestellt werden. Alles in allem zeigen sich Analogien zum Ehrlich-Reagenz in Hinblick auf eine uneinheitliche Farbgebung und Empfindlichkeit gegenüber den getesteten IGs, wie oben ausführlich diskutiert. Die Anfärbekraft des Phloroglucin-Salzsäure-Reagenzes scheint schwächer zu sein als die des Ehrlich-Reagenzes. Aufgrund der Uneinheitlichkeiten im Derivatisierungsverhalten wird es trotz Verwendung in der Literatur als IG-spezifisches Reagenz als ungeeignet zur dünnschichtchromatographischen IG-Fingerprintanalytik eingestuft.

5.3.3 Bewertung der (HP)TLC-Fingerprintanalytik

Wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben und aus den dort dargestellten Abbildungen 3.5 und 3.6 ersichtlich, existiert eine große Diskrepanz zwischen Haupt- und Minorkomponenten der IGs in *P. lanceolata*. Diese Diskrepanz ist so groß, dass keine vernünftige Auftragemenge an Extrakt gefunden werden kann, um sowohl die Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol als auch die in geringeren Mengen enthaltenen IGs Verbenalin, Globularin, Asperulosid und Asperulosidsäuremethylester ausreichend gut zu chromatographieren. Sollen die Minorkomponenten detektierbar sein, so muss so viel an Extrakt aufgetragen werden, dass die stationäre Phase durch die Hauptiridoidglykoside massiv überladen wird und sich die Banden über mehrere R_f -Werte erstrecken, wobei sie die darüber und darunter befindlichen Banden anderer Substanzen überlagern und ob der dunklen Färbung komplett verdecken. Wird entsprechend weniger aufgetragen, so dass präzise, schmale Banden der Hauptiridoidglykoside erzielt werden, sind die Minorkomponenten weder unter 254 nm, 366 nm noch VIS erkennbar. Dies veranschaulicht, dass eine Fingerprobe per DC für das in *P. lanceolata* enthaltene iridoidglykosidische Inhaltsstoffspektrum bei Applikation einer einzigen Extraktkonzentration wenig Sinn macht. Für zukünftige Untersuchungen könnte überlegt werden, ob Spitzwegerichextrakte zu IG-basierten Screeningzwecken in zwei unterschiedlichen Konzentrationen appliziert und dünnschichtchromatographisch analysiert werden könnten. Somit könnte der IG-Fingerprint sowohl von den Minor- als auch den Majorkomponenten untersucht werden. Da sowohl der konzentrierte als auch der verdünnte Rohextrakt simultan auf der DC analysiert werden können, ist kein nennenswerter größerer Zeitaufwand mit dieser Strategie verbunden. Voraussetzung dafür wäre allerdings das Vorliegen aller relevanten IGs der Pflanze als Standard, um die entsprechende Lage auf der DC, das Derivatisierungsmuster und die Detektionsart sicher definieren zu können. Da zum damaligen Zeitpunkt der Arbeit nur die Referenzen Aucubin und Catalpol verfügbar waren, konnte dieser Idee nicht nachgegangen werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Zonen, die mit bloßem Auge als isolierte Zonen sichtbar sind, tatsächlich mehrere Substanzen beherbergen. Untersucht wurde dies anhand eines Extraktes (E 3, Kapitel 5.5.1), der auf stationärer Kieselgelphase aufgetragen und entwickelt und anschließend zum Teil mit Ehrlich-Reagenz angefärbt wurde. Die blau gefärbten Zonen 1-4 des Extraktes mit $R_f = 0,50$, $R_f = 0,45$, $R_f = 0,33$ und $R_f = 0,21$ wurden auf dem derivatisierten Bereich markiert und konnten somit auf der underivatisierten Platte zugeordnet werden. Die abgekratzten und gelösten Zonen wurden per detektionsempfindlicher HPLC-ESI-HRMS untersucht (Abbildung 5.25, Tabelle 5.3).

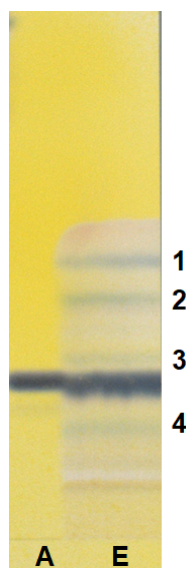


Abbildung 5.25: Chromatogramm zur Bestimmung der Bandenreinheit per LC-MS. Blau gefärbte und gekennzeichnete Zonen 1-4 des Extraktes mit $R_f = 0,50$, $R_f = 0,45$, $R_f = 0,33$ und $R_f = 0,21$ wurden auf underivatisierter Platte abgekratzt und per LC-MS untersucht. Auftragung von links nach rechts: Aucubin (A, $R_f = 0,29$), Extrakt (E 3), stationäre Phase: Kieselgel, mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Wasser (75:20:5, v/v/v), Kammersättigung: 35 min, Entwicklungsstrecke: 1 x 12 cm, Derivatisierung: Ehrlich-Reagenz + ΔT für 5-10 min bei 80-90 °C, Detektion: VIS (siehe Tabelle 5.3).

Untenstehend aufgelistete Massen bzw. Masse-/Ladungsverhältnisse konnten in den entsprechenden vier Zonen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass Zone 1 bzw. 2 aus fünf bzw. zehn Einzelverbindungen zusammengesetzt waren. Zone 3 bestand aus einem Polymer und Zone 4 besaß ein Masse-/Ladungsverhältnis, das auf keines der für *P. lanceolata* postulierten Verbindungen zutrif. Letzteres könnte aufgrund der blauen, potentiell IG-spezifischen Färbung ein für Spitzwegerich noch unbekanntes IG darstellen. Möglich ist, dass es ursächlich seiner hohen Polarität, zu erkennen an dem niedrigeren R_f -Wert als Catalpol und Aucubin auf Kieselgel, bis *dato* noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Letztendlich veranschaulichen diese Ergebnisse, dass das Trennvermögen des DC-Verfahrens begrenzt und bei einer hohen Fülle an Einzelsubstanzen im Vielstoffgemisch des Extraktes eine isolierte Darstellung einzelner Verbindung äußerst kompliziert ist. Weiter wird dadurch bewusst, wie essentiell eine spezifische Derivatisierung und Detektion ist, um überlagernde Störkomponenten des Extraktes nicht mit zu erfassen. Da spezifische Derivatisierungsreagenzien oft teilweise auch andere Substanzen anfärben, wenn auch in einer unterschiedlichen Farbe, führt dies doch zu einem gewissen Grad an Verfälschung des Ergebnisses. Daher wird die DC zur Etablierung eines Fingerprints von sechs in der Literatur postulierten IGs des Spitzwegerichs als ungeeignet eingestuft. Stattdessen wird die Analytik an der HPLC als geeignete Alternative angesehen, wie ausführlich in Kapitel 6 behandelt. Dabei eröffnet die Trennstrecke der Säule als Faktor über die Zeit in Kombination mit einem geschickt gewählten Fließmittelgradienten einen größeren Auftrennungsspielraum. Zudem könnte

Tabelle 5.3: Detektierte Masse-/Ladungsverhältnisse zur Bestimmung der Bandenreinheit per LC-MS (siehe Abbildung 5.25).

Zone	m/z	Fragmention	Masse [Da]	potentielle IGs oder PEs	
1	305.1018	$[M+H]^+$ - Glukose	466	-	
	642.2390	$[M+NH_4]^+$ - Glukose	624	Iso-/Verbascosid	
	642.2389	$[M+NH_4]^+$ - Glukose	624	Iso-/Verbascosid	
	468.1863	$[M+NH_4]^+$	450	-	
	493.1702	$[M+NH_4]^+$	492	-	
2	361.1134	$[M+HCOO]^-$	316	-	
	459.1139	$[M+HCOO]^-$	414	Asperulosid	
	433.2076	$[M+HCOO]^-$	388	Verbenalin	
	639.1921	$[M-H]^-$	640	Iso-/Plantamajosid	
	639.1919	$[M-H]^-$	640	Iso-/Plantamajosid	
	623.1974	$[M-H]^-$	624	Iso-/Verbascosid	
	623.1967	$[M-H]^-$	624	Iso-/Verbascosid	
	565.1916	$[M+HCOO]^-$	520	-	
	415.1967	$[M+HCOO]^-$	370	-	
	565.1916	$[M+HCOO]^-$	520	-	
3	525.2883, 481.2621, 437.2359, usw.	-	-	Polymer, mit neutralen Abgangsgruppen 44 Da	
	4	375.1294	$[M-H]^-$	376	-

eine andere Form der Detektion, die nicht auf Derivatisierungsprozessen beruht, von Vorteil sein.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

5.4.1 (HP)TLC-Systeme

Alles in allem konnte kein bekanntes oder neu entwickeltes DC-System auf ganzer Linie zur Fingerprintanalytik der IGs in *P. lanceolata* überzeugen. In die näheren Auswahl kommen die Methoden von Rischer et al. [29] und Munteanu und Vlase [103] sowie das Verfahren der Monographie der Spitzwegerichblätter (Ph. Eur. 7.0-9.0) [43]. Eine Kombination aus den Parametern dieser drei Methoden wäre vermutlich sinnvoll und sollte in zukünftigen Analysen getestet werden. Das auf fast allen Ebenen geeignete FM-System von Rischer et al. [29] könnte z.B. durch unpolare, weniger konkurrierende FM-Komponenten optimiert werden, um mehr Platz für die anderen, im Spitzwegerich enthaltenen IGs zu schaffen. Eine weitere Variante zur Optimierung könnte der Zusatz von in Ammoniak gelöster *p*-Toluolsulfonsäure zu den bereits bestehenden FM-Komponenten sein. Die experimentelle Testung im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt eine hohe Trennleistung und könnte für eine erhöhte Trennschärfe im FM sorgen. Aus Zeitgründen wurde auf weitere Optimierungsschritte des DC-Systems in dieser Arbeit verzichtet. Es konnte ein ausführlicher Überblick der bisher in der Literatur angewendeten Methoden, die sich mit der dünnschichtchromatographischen Analytik von IGs befassen, erhalten werden. Anzumerken ist hier insbesondere, dass bis dato keine DC-Fingerprintmethode für alle IGs aus *P. lanceolata* in der Literatur beschrieben ist. Einzig die Methode von Rischer et al. [29] beschäftigte sich neben der Analytik von Aucubin auch mit der simultanen DC-Analytik des Catalpols.

5.4.2 Derivatisierung und Detektion

Zusammenfassend zeigt sich, dass die in der Literatur als IG-spezifischen beschriebenen Derivatisierungsreagenzien Ehrlich-Reagenz und Phloroglucin-Salzsäure-Reagenz, weder eine einheitliche, spezifische Farbe noch Empfindlichkeit gegenüber den zwei getesteten Hauptiridoidglykosiden Aucubin und Catalpol des Spitzwegerichs aufweisen. Mehr noch ist die Empfindlichkeit gegenüber Catalpol so gering, dass es weder mit dem Ehrlich-Reagenz noch mit dem Phloroglucin-Salzsäure-Reagenz ausreichend gut visualisiert werden kann - im Gegensatz zu Aucubin, das anstelle der Epoxidgruppe über eine Doppelbindung im Molekül verfügt. Aus diesen Gründen wurden beide Reagenzien als ungeeignet für die anvisierte DC-IG-Fingerprintanalytik betrachtet. Darüber hinaus ist die in der Literatur postulierte IG-Spezifität einzuschränken bzw. in Frage zu stellen. Inwieweit beide Färbereagenzien für andere IGs spezifisch sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und sollte in weiteren Versuchen erforscht werden. Aucubin und Catalpol lassen sich durch universal färbendes Anisaldehyd-Schwefelsäure- sowie Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz intensiv anfärben, so dass eine aussagekräftige Detektion insbesondere im Tageslicht erfolgen kann. Wie zu erwarten lässt sich keine Farbspezifität für die getesteten IGs bei beiden Universalderivatisierungsmitteln beobachten. Nicht-IG-spezifische Derivatisierungsmittel wie Chloramin-T- und Naturstoff-

Reagenz zeigen keine Farbigekeit im Tageslicht. Doch weisen beide IGs unter 366 nm nicht-spezifische blaue Fluoreszenzen auf. Keinerlei Visualisierungsfähigkeit bei allen drei Detektionsmodi (254 nm, 366 nm und VIS) geht von den weniger spezifischen Reagenzien Echtblausalz und Eisenchlorid aus. Für die DC-Fingerprintanalytik der in *P. lanceolata* enthaltenen IGs eignet sich schlussendlich keines der untersuchten Derivatisierungsmittel. Eine Detektion und densitometrische Auswertung ohne Derivatisierung ist durch die niedrigwellige Absorption der IGs von Relevanz nicht realisierbar.

5.4.3 Bewertung der (HP)TLC-Fingerprintanalytik

Die Entwicklung einer (HP)TLC-Fingerprintmethode zur Untersuchung des iridoidglykosidischen Inhaltsstoffspektrums von *P. lanceolata* erscheint anhand der erhaltenen Ergebnisse bezüglich nicht zufriedenstellender DC-Systeme, d.h. der Kombination aus stationärer und mobiler Phase, nicht-spezifischer Derivatisierung sowie der zu großen Diskrepanz zwischen Haupt- und Minorkomponenten, als nicht möglich bzw. nicht sinnvoll. Für alle Untersuchungen zur DC-Fingerprintanalytik der IGs in *P. lanceolata* wird das Vorliegen aller enthaltenen IGs als essentielle Voraussetzung gesehen. In Ermangelung einer zufriedenstellenden, validen qualitativen (HP)TLC-Fingerprintanalytik, welche Voraussetzung für eine Quantifizierung ist, konnte keine (HP)TLC-geleitete quantitative Methode entwickelt werden. Auf die Fragestellung nach einer simultanen Berücksichtigung des PE-Inhaltsstoffspektrums neben dem der IGs des Spitzwegerichs wurde nicht weiter eingegangen, da der Fokus auf einem zeitgleichen Screening der beiden Inhaltsstoffgruppen lag.

5.5 Material und Methoden

5.5.1 Verwendete Referenzsubstanzen und Extrakte

Als Referenzsubstanzen wurden Aucubin 1, Catalpol 1 sowie *L*-Glukose und *L*-Rhamnose verwendet (Kapitel 10.2 und 10.1).

Folgende Extrakte fanden im Rahmen der (HP)TLC-Methodenentwicklung Anwendung:

- Extrakt (E): 1,0 g pulverisiertes Drogenmaterial 1 wurde mit 10 mL Methanol (p.a.) versetzt, 30 min im Ultraschallbad extrahiert, der Rückstand zweimal mit 5 mL Methanol gewaschen und anschließend ad 25 mL aufgefüllt.
- Extrakt (E1): 0,2 g pulverisiertes Drogenmaterial 1 wurde mit 10 mL Methanol (p.a.) -Wasser-Gemisch (1:1, v/v) versetzt, 40 min im Ultraschallbad extrahiert und der Rückstand abzentrifugiert (40 min, 3500 rpm).
- Extrakt (E2): 0,2 g pulverisiertes Drogenmaterial 1 wurde mit 10 mL Acetonitril p.a.-Wasser-Gemisch (1:1, v/v) versetzt, 40 min im Ultraschallbad extrahiert und der Rückstand abzentrifugiert (40 min, 3500 rpm).
- Extrakt (E 3): 20 mL des Drogenextraktes 2 (Kapitel 6.5.2) mit einer Konzentration von 0,07 g Extrakt/mL Wasser wurden drei mal nacheinander mit je 10 mL *n*-Butanol im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Zur Analyse wurden die vereinigten organischen Auszüge eingesetzt.

5.5.2 Stationäre und mobile Phasen

Im Rahmen der (HP)TLC-Methodenentwicklung zur Untersuchung des IG-Inhaltsstoffspektrums von *P. lanceolata* verwendete stationäre Phasen sind in Kapitel 10.6.1 aufgelistet. Sie wurden zur Analytik bedarfsgerecht zugeschnitten. Die in der Arbeit angewendeten mobilen Phasen zur DC-Methodenentwicklung im Rahmen der IG-Fingerprintanalytik wurden mit (p.a.) Chemikalien hergestellt. Ausgenommen davon sind eingesetzter Ethanol, der geringere HSL-Qualität aufwies sowie verwendetes Wasser, das von einer speziellen Filteranlage bezogen wurde. Die konkrete Zusammensetzung der mobilen Phase befindet sich jeweils direkt bei der entsprechenden Abbildung des im Text vorgestellten DC-Chromatogramms.

5.5.3 Derivatisierung und Detektion

Die trockenen, entwickelten Platten wurden mithilfe folgender Reagenzien und Angaben derivatisiert.

- Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz [131], modifiziert:
Unter Eiskühlung wurden der Reihenfolge nach 85 mL Methanol (p.a.), 10,0 mL Eisessig, 5,0 mL konzentrierte Schwefelsäure und 1 mL Anisaldehyd vermischt und angewendet. Die besprühte Platte wurde zur Derivatisierung erhitzt.
- Chloramin-T-Reagenz [131]:
10 mL frisch bereitete 3%-ige wässrige Chloramin-T-Lösung wurde mit 40 mL 25%-ige Trichloressigsäure vermischt und angewendet. Die besprühte Platte wurde zur Derivatisierung nicht erhitzt.
- Echtblausalz-Reagenz [131]:
Erstes Derivatisierungsreagenz war eine 0,5%-ige wässrige Lösung aus Echtblausalz, das zweite 0,1 N Natronlauge. Zwischen den Anwendungen der Reagenzien wurde die Platte getrocknet. Die besprühte Platte wurde zur Derivatisierung nicht erhitzt.
- Ehrlich-Reagenz [114, Seite 235]:
0,5 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd wurden in 50 mL 1 N methanolische (p.a.) Salzsäure (4,2 mL konzentrierte Salzsäure auf 50,0 mL mit Methanol (p.a.) aufgefüllt) gelöst. Die besprühte Platte wurde zur Derivatisierung erhitzt.
- Eisenchlorid-Reagenz [131]:
10%-ige wässrige Eisen (III)-chloridlösung wurde zur Derivatisierung herangezogen. Die besprühte Platte wurde nicht erhitzt.
- Phloroglucin-Salzsäure-Reagenz [115]:
Direkt hintereinander wurden die Reagenzien 2%-ige ethanolische (technisch) Phloroglucin (p.a.)-Lösung und konzentrierte Salzsäure angewendet. Die Platte wurde zwischen den Anwendungen nicht getrocknet. Die besprühte Platte wurde zur Derivatisierung erhitzt.
- Naturstoff-Reagenz nach Neu [131]:
Die Platte wurde mit 1,0%-iger methanolischen (p.a.) Lösung aus Diphenylborsäure- β -ethylaminoester (=Diphenylboryloxythylamin) behandelt. Die besprühte Platte wurde zur Derivatisierung erhitzt.
- Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz [131]:
0,5 g Vanillin wurde unter Eiskühlung mit 85 mL Methanol (p.a.), 10,0 mL Eisessig und 5,0 mL konzentrierte Schwefelsäure vermischt und zur Derivatisierung angewendet. Die besprühte Platte wurde zur Derivatisierung erhitzt.

In der Regel erfolgte die Erhitzung der Platten für 2-30 min bei 120°C. Die Detektion wurde bei Tageslicht, 254 nm bzw. 366 nm per Fotodokumentationsgerät 1, seltener *via* Fotodokumentationsgerät 2 fotografiert und abgespeichert.

5.5.4 HPLC-DAD/ESI-HRMS

HPLC-DAD/ESI-MS-Analysen dienen zur Bestimmung der Zonenreinheit eines Rohextrakts (E 3, Kapitel 5.5.1 bzw. 5.3.3). Sie wurden von der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg an einem quadrupol-Time of Flight (q-TOF) 6540 UHD (Agilent) Massenspektrometer mit einer Dual-ESI-Ionenquelle (Agilent) durchgeführt. Alle Zonen wurden im positiven wie im negativen Modus vermessen. Die zielführendsten Aufnahmen der Zonen 1 und 3 fanden im positiven Modus statt, die der Zonen 2 und 4 im negativen Modus.

Kapitel 6

Entwicklung einer HPLC-DAD-Fingerprintmethode

6.1 Hintergrund und Motivation

Es sollte erstmalig eine HPLC-Screeningmethode zur simultanen Analytik der zwei bioaktiven Stoffgruppen IGs und PEs des Spitzwegerichs entwickelt werden. Im Mittelpunkt stand die Quantifizierung der entsprechenden Hauptkomponenten Aucubin und Catalpol (IGs) bzw. Verbascosid (PEs). Daneben sollten weitere Vertreter der zwei ausgewählten Naturstoffgruppen qualitativ und semi-quantitativ erfasst werden können. Mithilfe dieser Informationen galt es etwaige Variationen der Inhaltsstoffspektren beider Stoffgruppen im Verlauf der Blütezeit mehrerer aufeinanderfolgender Jahre zu erforschen. Des Weiteren sollte diese Methode Informationen zur Identität und Reinheit der Pflanze in der betrieblichen Routinekontrolle schnell und einfach zugänglich machen. Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, beschränken sich die Qualitätsprüfungen im Ph. Eur. der Monographie für Spitzwegerichblätter [43] auf spärliche qualitative Analytik von Aucubin und Verbascosid sowie photometrische Quantifizierung des letzteren. Vor dem Hintergrund dass auch andere Verbindungen der entsprechenden Stoffgruppen der IGs und PEs Bioaktivität besitzen oder diese positiv beeinflussen können, wäre es von wissenschaftlichem Interesse auch diese zu berücksichtigen. Darüber hinaus werden für IGs in *P. lanceolata* taxonomische Aspekte des Fingerprintspektrums in der Literatur aufgeführt [32]. Beschrieben ist auch eine Veränderung des Inhaltsstoffspektrums im Jahresverlauf [33]. Besondere Beachtung fand im Zuge der HPLC-Methodenentwicklung die Analytik der IGs, da sie aufgrund ihres chromophorarmen Systems über ein deutlich geringes Absorptionsvermögen als die chromophorreichen PEs verfügen. Im Folgenden wird deswegen vornehmlich auf die Analytik der IGs eingegangen. In der Literatur werden zur IG-Analytik diverse chromatographische Verfahren wie DC [29], MEKC [19, 24, 31], GC [28, 30, 79, 82, 84, 85] und HPLC [29, 117, 121, 122] bzw. (UP)LC-MS [95, 99, 101, 104, 107, 123, 125, 127] beschrieben. Die Erarbeitung eines qualitativen sowie quantitativen (HP)TLC-Systems

zur Fingerprintanalytik der IGs bzw. PEs (Kapitel 5) führte zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen und wurde nicht weiter verfolgt. Von den verbleibenden Methoden (MEKC, GC und HPLC) wurde eine Fingerprintanalytik per HPLC als besonders sinnvoll erachtet. Zum einen sind die Verbindungen beider Stoffgruppen nicht unzerstört verdampfbar. Das bedeutet, dass sie für gaschromatographische Analysen derivatisiert werden müssten, was eine GC-basierte Fingerprintanalytik unattraktiv werden lässt. Eine MEKC stellt ein weniger übliches analytisches Verfahren im Vergleich zur DC oder HPLC dar. Ihr Einsatz erscheint deshalb als routinemäßige Screeningmethode zum aktuellen Zeitpunkt vergleichsweise ungeeignet. Als Vorteil einer HPLC- gegenüber einer (HP)TLC-basierten Analytik ist eine verbesserte Trennleistungsfähigkeit aufgrund einer höheren Anzahl theoretischer Böden bzw. einer längeren, stärker variierbaren Trennstrecke gegeben.

6.2 Strategie

Anders als bei der DC-Strategie zur Fingerprintanalytik in Kapitel 5.2, wurden bei der HPLC-Methodenentwicklung von Anfang an beide Stoffgruppen berücksichtigt, obwohl auch hier der Schwerpunkt auf der anspruchsvolleren IG-Analytik lag. Die Datenlage zur IG-Chromatographie *via* HPLC schien von vorne herein erfolgversprechender als die der DC zu sein, was zu der simultanen Methodenentwicklung beider Stoffgruppen führte. Ein weiterer Unterschied zur Methodenentwicklung des HPLC- im Vergleich zum (HP)TLC-Fingerprint bestand darin, dass zu diesem späteren Zeitpunkt mehr Referenzsubstanzen zur Verfügung standen. Beschränkte sich die Auswahl an Standards für die DC-basierte Analytik zunächst auf Aucubin und Catalpol, waren bei der HPLC-Analytik zudem die IGs Asperulosid und Verbenalin sowie die Phenylethanoide Verbascosid, Isoverbascosid und Plantamajosid verfügbar. Dies ermöglichte eine zielführendere und aussagekräftigere Methodenfindung. Aus Kostengründen und um den Rahmen nicht zu sprengen, konnten nicht alle enthaltenen IGs und PEs des Spitzwegerichs mit einbezogen werden. So wurden letztendlich die IGs Aucubin, Catalpol, Asperulosid und Verbenalin sowie die PEs Verbascosid, Isoverbascosid und Plantamajosid in der HPLC-Methodenentwicklung berücksichtigt. Es wurden diverse stationäre und mobile Phasen sowie Detektionsarten aus der Literatur getestet und bei Bedarf modifiziert. Zur Orientierung dienten die oben genannten, verfügbaren Referenzsubstanzen sowie ein Rohextrakt der Droge. Da die IGs über kein hochwelliges charakteristisches UV-Maximum verfügen, galt es, die erhaltenen Chromatogramme mithilfe eines zweiten (Detektions-)Verfahrens gegen zu prüfen. LC-MS-Untersuchungen boten sich hier als passendes Verfahren an, weshalb darauf geachtet wurde, dass das HPLC-System der Wahl MS tauglich war. Die besten aus der Methodenentwicklung resultierenden Methoden wurden anschließend im zweiten Teil der Methodenentwicklung mittels LC-HRMS und LC-ESI-MSⁿ hinsichtlich der Identität und Reinheit der Peaks in Extrakten bzw. Zubereitungen untersucht. Da die Methode später vor allem zu Screeningzwecken in der Frischpflanzenroutineanalytik eingesetzt werden sollte, wurden neben Extrakten aus der Droge des Spitzwegerichs auch Rohextrakte aus

ausgewähltem Frischpflanzenmaterial herangezogen. Die beste, resultierende Methode wurde schlussendlich validiert.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 Stationäre Phase

Zur Findung einer geeigneten HPLC-Fingerprintmethode für IGs und PEs des Spitzwegereichs wurden sowohl aus der Literatur bekannte Systeme zur IG-Analytik (Kapitel 1.4.3) herangezogen, welche bei Bedarf optimiert wurden, als auch komplett neue HPLC-Systeme entwickelt. Die insgesamt sieben käuflich oder durch Isolierung gewonnenen Referenzsubstanzen, nämlich Aucubin, Catalpol, Verbenalin, Asperulosid als Vertreter der IGs und Verbascosid, Isoverbascosid und Plantamajosid als Vertreter der PEs, wurden je nach Verfügbarkeit zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung eingesetzt. Aus Zeit- und Kostengründen wurden nicht alle getesteten HPLC-Methoden mit allen Referenzen nachanalysiert, die nicht in die nähere Auswahl als geeignete HPLC-Methode kamen. Insgesamt wurden dabei neben Variation der mobilen Phase an in der Literatur hauptsächlich verwendetem unpolarem RP18-Material (Tabelle 1.9 in Kapitel 1.4.3) auch diverse andere stationäre Phasen getestet, wie polare Diol- und HILIC-Phase sowie unpolare Phenylhexyl-, Biphenyl- und C8-Säulen. Diese wurden, mit Ausnahme der C18- und der Diolphase, bis *dato* noch nicht in der Literatur zur IG-Analytik beschrieben. Die Reihenfolge der in dieser Arbeit vorgestellten Methodenentwicklungsschritte wurde in Abhängigkeit des Säulenmaterials geordnet. Begonnen wird dabei mit den Normalphasenchromatographien. Aufgrund der hohen Anzahl an Entwicklungsschritten wird im Folgenden zur Übersicht nur auf ausgewählte Versuche eingegangen.

6.3.1.1 Diolsäule

Diolsäulen setzt sich zusammen aus Kieselgel, das mit funktionellen (vicinalen) Dihydroxyethyleinheiten, verknüpft ist [129, Seite 123]. Aufgrund der enthaltenen OH-Gruppen gilt diese stationäre Phase als interessant für Verbindungen, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt sind [129, Seite 184], d.h. die selbst OH-Gruppen oder entsprechende Strukturen besitzen. Diolsäulen können sowohl als Normalphase (NP) als auch als Umkehrphase (RP) gefahren werden. Bei NP-Applikation gilt das Diolmaterial als weniger polar als Kieselgel. Im RP-Modus wird ihm hingegen weniger Hydrophobizität zugesprochen als C8-Material [153]. Dies eröffnet ein breites Einsatzspektrum und ein interessantes Werkzeug zur Generierung einer geeigneten HPLC-Fingerprintmethode zur Charakterisierung der IGs und PEs in *P. lanceolata*.

Dimov et al. [117] untersuchten das chromatographische Verhalten diverser IGs, mitunter die hier relevanten IGs Asperulosid und Deacetylasperulosidsäuremethylester, an stationärem Diolmaterial unter Verwendung eines isokratisch gefahrenen Gemisches aus Acetonitril und THF (98:2, v/v). Die dabei untersuchten IGs wiesen Absorptionsmaxima zwischen 233-239 nm auf und lagen damit deutlich über den UV-Maxima der beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol mit < 200 nm. Unter Anpassung der Wellenlänge von 233 auf 195 nm wurde diese Methode auf ihre Eignung zur Fingerprintanalytik der IGs und PEs in *P. lanceolata* an einer Diolsäule (Diol, Interchim.uptispherOH, 250 x 4,6 mm, UP6OH-250/P46, No. 133362, Interchrom, Frankreich) getestet (Abbildung 6.1).

Für keine der drei Referenzsubstanzen Catalpol, Aucubin und Verbascosid konnten dabei Peaks innerhalb des 20 minütigen Chromatographiebereichs detektiert werden. Eine Elution im Spülbereich ist aufgrund des Zusammenspiels zwischen relativ hoher Polarität der Substanzen und relativ geringer Polarität des Elutionsmittels nicht auszuschließen. Diese Methode wurde deshalb als ungeeignet befunden. Neben der ungeeigneten Polarität der Elutionsmittel, verfügt insbesondere angewendetes THF eine verhältnismäßig hohe Eigenabsorption mit einer UV-Grenze von 220 nm [129, S. 78]. Der injizierte Rohextrakt zeigte, abgesehen von einem weiteren Peak, lediglich zu Elutionsbeginn einen Peakcluster. Es konnten keine weiteren Peaks registriert werden. Um die Chromatographie auf der polaren Diolphase für die Verbindungen von Interesse zu verbessern, wurde das enthaltene THF durch Wasser ersetzt und damit Polarität und Elutionskraft der mobilen Phase erhöht (Abbildung 6.2).

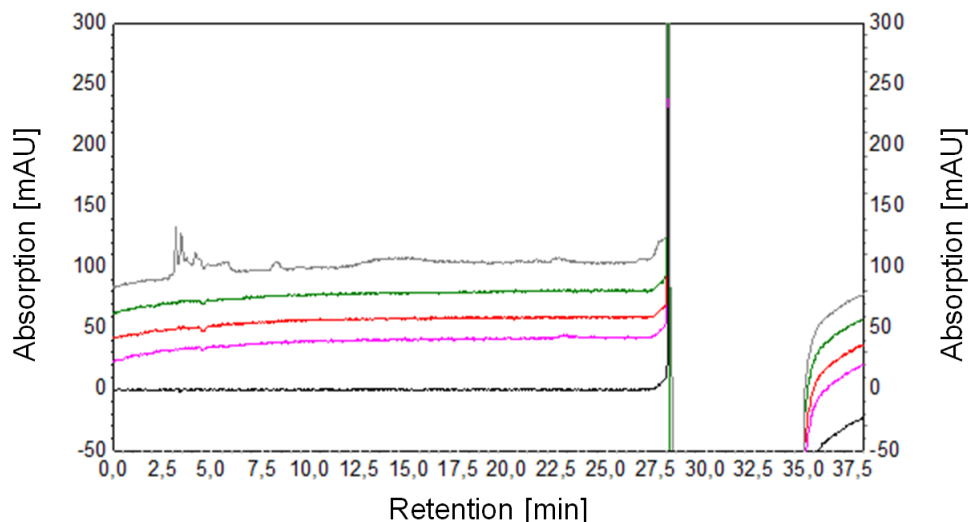


Abbildung 6.1: HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Diolsäule mit der Methode nach Dimov et al. [117]. Analyselösungen: Referenzen Catalpol (0,5 mg/mL Acetonitril-Wasser (1:1, v/v), Injektion: 5 μ L, rosa, +20 mAU), Aucubin (0,01 mg/mL Acetonitril/Wasser (1:1, v/v), Injektion: 5 μ L, rot, +40 mAU) und Verbascosid (0,2 mg/mL Acetonitril/Wasser (1:1, v/v), Injektionsvolumen: 5 μ L, grün, +60 mAU), Drogenextrakt 1 (Injektion: 5 μ L, grau, +800 mAU) und Leerwert (Injektion: 5 μ L, schwarz), stationäre Phase: Diolsäule Interchim.uptispherOH UP6OH-250/P46, ohne Vorsäule, 250 x 4,6 mm, (Interchrom, Montlucon Cedex, Frankreich), mobile Phase: Eluent A: Acetonitril/THF (98:2, v/v), Eluent B: Wasser, Gradient: 0-22 min 0%, 22-24 min 0-85%, 24-30 min: 85%, 30-32 min: 85-0%, 32-38 min: 0% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

Durch den Austausch des THFs gegen Wasser konnte eine wesentlich ruhigere und lineare Basislinie bei 195 nm erhalten werden, was auf ein geringeres Hintergrundrauschen der Eluenten zurückgeführt werden kann. Da das eingesetzte Wasser eine UV-Grenze von < 190 nm aufweist [129, Seite 78] und damit einen geringeren LM-Cut-off als THF besitzt. Ferner führte die höhere Polarität des Wassers im Vergleich zum unpolaren THF zu einer geringeren Retardierung der Analyten. Die IGs Aucubin und Catalpol retinierten bei $t_R = 14,7$ min bzw. $t_R = 13,5$ min isoliert voneinander. Für Verbascosid konnte kein signifikanter Peak während des Chromatographielaufs nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Anzahl an OH-Gruppen dieses PE und damit starken Wechselwirkung mit der stationären Diolphase, wird vermutet, dass die Substanz erst im Spülschritt eluiert. Das Chromatogramm des angewendeten Rohextrakts zeigt, verteilt über die erste Hälfte des Chromatogramms mehrere vereinzelte Peaks und veranschaulichte somit den positiven Effekt der Änderung der mobilen Phase auf die Chromatographie des Extraktes. Damit konnte ein Fortschritt im Vergleich zur Literaturmethode von Dimov et al. [117] erreicht werden.

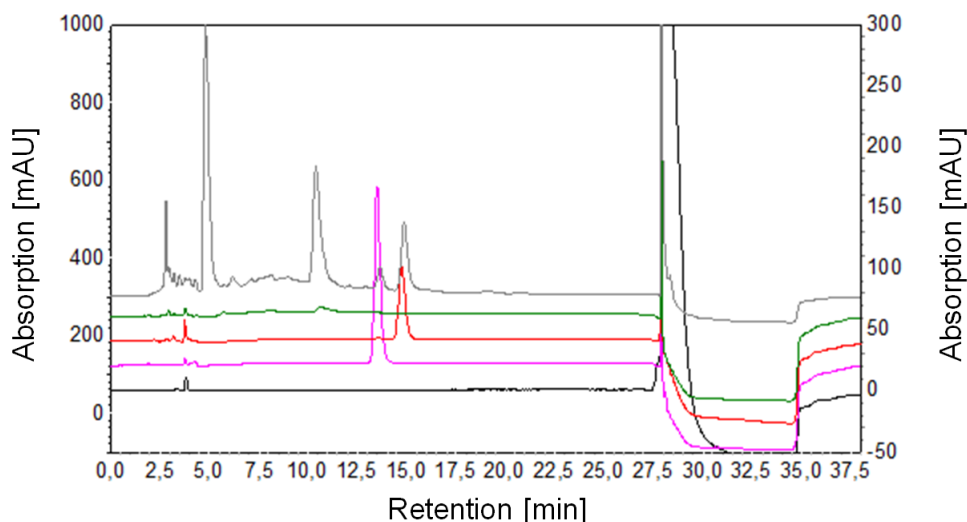


Abbildung 6.2: HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Diolsäule mit modifizierter Methode nach Dimov et al. [117]. Analyselösungen: Referenzen Catalpol (0,5 mg/mL Acetonitril/Wasser (1:1, v/v), Injektions: 5 μ L, rosa, $t_R = 13,51$ min, +20 mAU rechte Skala), Aucubin (0,01 mg/mL Acetonitril/Wasser (1:1, v/v), Injektion: 5 μ L, rot, $t_R = 14,74$ min, +40 mAU rechte Skala) und Verbascosid (0,2 mg/mL Acetonitril/Wasser (1:1, v/v), Injektion: 5 μ L, grün, mehrere Peaks bei $t_R = 5,71 - 10,64$ min, +60 mAU rechte Skala), Drogenextrakt 1 (Injektion: 5 μ L, grau, +300 mAU linke Skala) und Leerwert (Injektion: 5 μ L, schwarz), stationäre Phase: Diolsäule Interchim.uptispherOH UP6OH-250/P46, ohne Vorsäule, 250 x 4,6 mm, (Interchrom, Montlucon Cedex, Frankreich), mobile Phase: Eluent A: Acetonitril, Eluent B: Wasser, Gradient: 0-22 min 2%, 22-24 min 2-80%, 24-30 min: 80%, 30-32 min: 80-2%, 32-38 min: 2% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

Alles in allem konnte durch Modifizierung der Methode von Dimov et al. [117] eine zeitlich passable Retardierung der Analyten an der Diolsäule erzielt werden. In Abwägung mit anderen HPLC-Systemen, schnitt sie jedoch weniger gut ab, mitunter aufgrund der relativ breiten Peakform der Analyten. Deswegen wurden keine weiteren Schritte zur Methodenoptimierung an der Diolsäule vorgenommen. Weitere Literaturstellen zur Analytik von IGs per HPLC-Diolsäule in der Literatur nicht zu finden. Eine Verbesserung der Trennung an einer Diolsäule mit höherer Trennkraft durch z.B. mehr stationäre Böden bzw. anderem Packmaterial wurde nicht untersucht und könnte in zukünftigen Analysen IG- und PE-Analytik an stationärer Diolsäule herangezogen werden. Ein sinnvoller Ansatzpunkt zur Verschmälerung der Peaks ist die die Zugabe von Säuren, sofern diese mit dem Säulenmaterial kompatibel sind.

6.3.1.2 HILIC-Säule

Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) wird insbesondere zur Trennung von sehr polaren Verbindungen im Normalphasen (NP)-Modus eingesetzt, die an Umkehrphasen nicht retardiert werden. Die mobile Phase besteht jedoch nicht aus NP-typischen, sondern aus RP-typischen Komponenten, wie Wasser und Acetonitril, wobei Wasser die stärkste Elutionskraft besitzt sowie Puffer-Systemen. [129, 154, Seite 78]

Sie wird daher auch als inverse RP-Chromatographie bezeichnet [154].

Packungsmaterialien für HILIC-Säulen sind vielfältig und bestehen u.a. aus Kieselgel, mit Diol-, Nitril, Amino- oder Amidgruppen verestertes Kieselgel oder Kieselgel mit hydrophiler polymerer Beschichtung. Sie alle werden speziell für den HILIC-Gebrauch konzipiert. Gewöhnliches Kieselgel oder Diolmaterial liefern in der Regel enttäuschende Ergebnisse, wenn sie im HILIC-Modus gefahren werden. [129, Seite 187f]

Charakteristisch für die HILIC-Chromatographie ist weiter das adsorptive Ausbilden eines wässrigen Films über der originalen, stationären Phase, sofern die mobile Phase wasserhaltig ist. Dieser Wasserfilm ist vom pH-Wert der mobilen Phase abhängig und stellt die eigentliche stationäre Phase dar, mit der die zu trennenden Substanzen primär über Verteilungskräfte interagieren. Sekundär finden darüber hinaus elektrostatische Wechselwirkungen mit geladenen Silanolgruppen der originalen stationären Phase statt, deren Vorhandensein abhängig vom eingestellten pH-Wert der mobilen Phase ist. Die Einhaltung eines gewissen Wasseranteils sowie des pH-Wertes durch ein adequates Puffersystem gelten daher als absolut essentiell für die Chromatographie an HILIC-Säulen. [129, 154, Seite 187f]

Änderungen des mobilen Systems, z.B. durch einen Gradienten, sind laut Säulenhersteller Phenomenex nur bedingt möglich und erfordern eingehende Expertise im Umgang mit diesem Material [155]. Aufgrund der postulierten Eignung zur Chromatographie von sehr polaren Substanzen wurde diese Säule zur HPLC-Fingerprintanalytik der in *P. lanceolata* enthaltenen verhältnismäßig polaren, OH-Gruppen reichen IGs und PEs herangezogen. Aus Mangel an Literaturstellen zur IG-Analytik mittels HILIC-HPLC-Säulen wurde sich bei der Methodenentwicklung an allgemein gültigen Richtwerten zur HILIC-Chromatographie laut Hersteller gehalten. Als Säule stand eine Luna 3 u HILIC, P/No. OOF-4449-BO, mit Vorsäule, 150 x 2,00 mm, 3 µm, 300 Å (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) zur Verfügung. Zunächst wurde ein vollständig isokratisches System gewählt, bei dem kein Spülschritt miteingebaut war. Eine ausreichende Äquilibrierung vor den Messungen wurde somit gewährleistet. Als Testkriterium wurde die Trennung von Aucubin und Catalpol gewählt. Zudem wurde ein Extrakt mitgeführt, um das Trennpotential anhand der Peakverteilung über das Chromatogramm der eingesetzten Methode einstuft zu können (Abbildung 6.3).

Durch die angewendete, isokratische Methode konnte keine Separation von Aucubin und Catalpol erzielt werden. Diese eluierten simultan bei $t_R = 7,7$ min. Darüber hinaus waren alle detektierten Peaks im eingesetzten Rohextrakt zu Beginn des Laufs als Peakscluster lokalisiert. Das angewendete HPLC-System ist zur Fingerprintanalytik des Spitzwege-

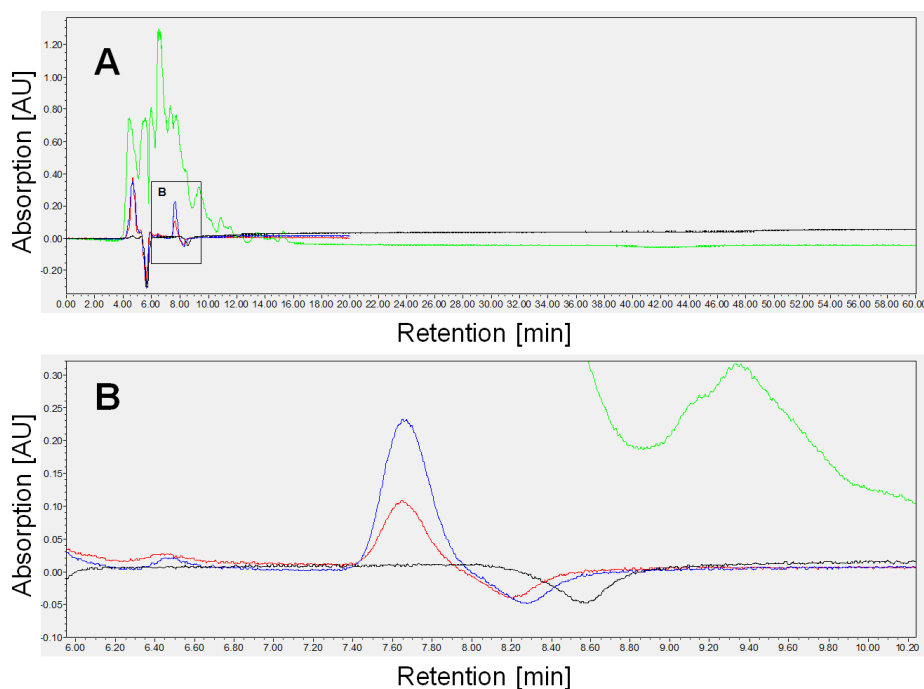


Abbildung 6.3: HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer HILIC-Säule mit entwickelter isokratischer Methode. Analyselösungen: Referenzen Catalpol (1,4 µg/mL Wasser, Injektion: 5 µL, rot, $t_R = 7,7$ min), Aucubin (1,0 µg/mL Wasser, Injektion: 5 µL, blau, $t_R = 7,7$ min), Drogenextrakt 3 (Injektion: 10 µL, grün), Leerwert (Injektion: 10 µL, schwarz), stationäre Phase: Luna 3 u HILIC, P/No. OOF-4449-BO, mit Vorsäule, 150 x 2,00 mm, 3 µm, 300 Å Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland), mobile Phase: Acetonitril/Wasser/100 mM Ammoniumacetat-Puffer (80:15:5, v/v/v, pH = 5,8), Gradient: isokratisch 60 min, Fluss 0,35 mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: PDA, 195 nm, HPLC-Anlage 2.

richs unzureichend geeignet. Im darauffolgenden Optimierungsschritt wurde daher eine Stufe in den isokratischen Lauf eingefügt (Abbildung 6.4). Im Fokus stand vor allem die Separation der Peaks von Aucubin und Catalpol.

Mithilfe der Gradientenstufe im Lauf konnten mit $t_R = 3,1$ min bzw. $t_R = 3,0$ min die Peaks von Aucubin und Catalpol ansatzweise getrennt werden. Aufgrund der starken Verdünnung des eingesetzten Rohextraktes konnte keine Aussage zur Trennung des Peakclusters im vorderen Chromatogrammbereich getroffen werden. Des Weiteren führte das nicht-isokratische Fließmittelsystem zu einer unruhigen und nicht-linearen Basislinie, wobei die Amplitude der Schwankungen über den gesamten Gradienten etwa 120 AU betrug. HILIC-Säulen reagieren besonders empfindlich auf Schwankungen der Fließmittelzusammensetzung und benötigen eine sehr lange Äquilibrierungszeit. Das Fahren eines nicht-isokratischen Systems verursacht dabei Probleme. Darüber hinaus wurde das angewendete, bei > 200 nm absorbierende Puffersystem in Kombination mit der niedrigen Detektionswellenlänge von 195 nm für die deutlich sichtbaren Veränderungen in der Basislinie verantwortlich gemacht. Methoden zur IG-Analytik *via* HPLC-HILIC-Säulen, auf die zurückgegriffen werden könnten, sind nicht in der Literatur bekannt.

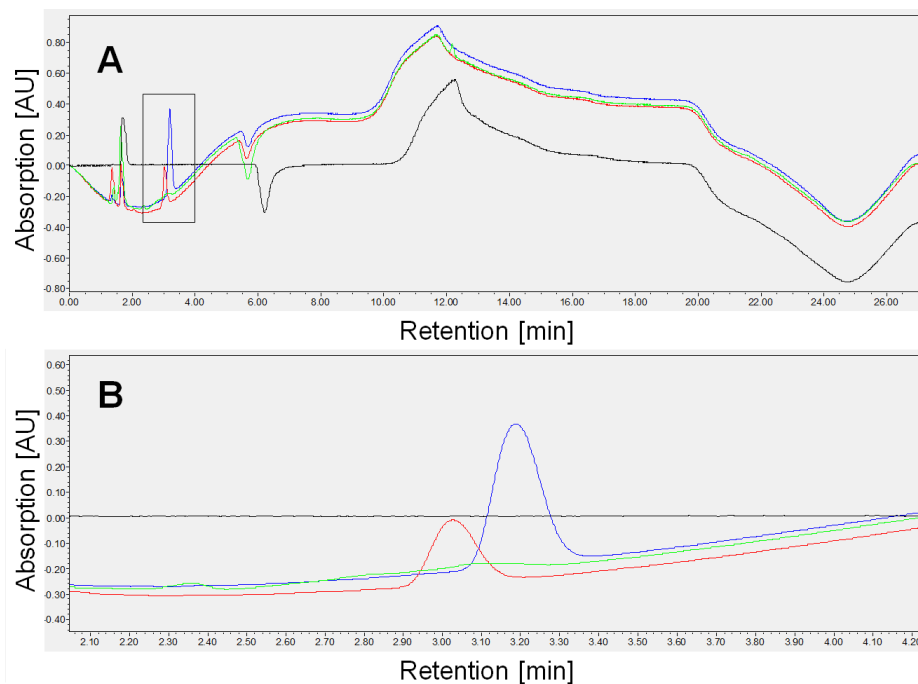


Abbildung 6.4: HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer HILIC-Säule mit entwickelter Gradientenmethode. Analyselösungen: Referenzen Catalpol (1,4 µg/mL Wasser, Injektion: 5 µL, rot, $t_R = 3,0$ min), Aucubin (1,0 µg/mL Wasser, Injektion: 5 µL, blau, $t_R = 3,1$ min), Drogenextrakt 4 (Injektion: 10 µL, grün), Leerwert (Injektion: 10 µL, schwarz), stationäre Phase: Luna 3 u HILIC, P/No. OOF-4449-BO, mit Vorsäule, 150 x 2,00 mm, 3 µm, 300 Å (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Acetonitril/Wasser/100 mM Ammoniumacetat-Puffer (90:5:5, v/v/v), Eluent B: Acetonitril/Wasser/100 mM Ammoniumacetat-Puffer (50:45:5, v/v/v), 0-5 min 0%, 5-10 min 0-100%, 10-15 min: 100%, 15-21 min: 100-0%, 21-27 min: 0% Eluent B, Fluss 0,35 mL/min, Säulenofen: 25 ± 5 °C, Detektion: PDA, 195 nm, HPLC-Anlage 2.

Gerade deshalb wäre es interessant, in zukünftigen Untersuchungen, die Analytik von IGs (und PEs) an dieser für sehr polare Substanzen prädestinierter stationärer Phase zu erforschen. Denkbare Lösungsansätze könnten in einem isokratischem Fließmittelsystem mit deutlich polarerer Startbedingung liegen. Vermutlich würde dies jedoch zu sehr langen HPLC-Methoden führen. Ein weiteres Manko für die flüssigchromatographische Trennung *via* HILIC stellt die starke pH-Abhängigkeit des Systems dar. Durch exaktes Einstellen des Puffersystems entsteht ein deutlicher Mehraufwand im Handling im Vergleich zu pufferfreien Methoden sowie eine zusätzliche Fehlerquelle bei Nichteinhaltung des entsprechenden pH-Wertes. Abschließend betrachtet, führten weder das isokratische noch das nicht-isokratische Verfahren zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Aus Zeitgründen sowie aufgrund der geringen Flexibilität des HILIC-Systems wurde die Methodenentwicklung an stationärem HILIC-Material nicht weiter verfolgt.

6.3.1.3 Phenylhexylsäule

Phenylhexylsäulen werden durch Modifizierung von Kieselgel mit funktionellen Phenylhexylgruppen hergestellt [129, Seite 121ff].

Sie werden zur klassischen RP-Analytik angewendet und verfügen über die Besonderheit der doppelten Selektivität, wodurch sie sowohl über den Phenyl- als auch über den Alkylteil mit den Substanzen in Wechselwirkung treten können. Die doppelte Selektivität wird durch eine mobile Phase ermöglicht, die selbst kein π -Elektronensystem ausbildet, wie z.B. Methanol, das in Konkurrenz zu dem des Phenyls treten könnte und dieses dann quasi ausschaltet, wie z.B. in Gegenwart von Acetonitril. [155]

Obwohl es sich bei den Substanzen von Interesse um relativ polare Verbindungen handelt, welche möglicherweise kaum Retention an der unpolaren stationären Phenylhexylphase finden, wurde die Analytik an Phenylhexylmaterial getestet. Zum einen, da die Analytik von IGs und PEs an anderem RP-Material, insbesondere C18, mehrfach in der Literatur beschrieben wurde und zum anderen, weil bis *dato* zu diesem Material noch keine einschlägigen Daten zur IG-Analytik vorliegen. Im Folgenden werden ein Spitzwegerichextrakt der Droge und Frischpflanze sowie ein Fermentationsextrakt, die IG-Referenzen Aucubin, Catalpol, Asperulosid und Verbenalin sowie die PE-Referenzen Verbascosid, Isoverbascosid und Plantamajosid auf Eignung zur HPLC-Fingerprintanalytik an einer X SELECT™ CSH™ Phenyl-Hexyl-Säule (150 x 2,1 mm, 3,5 μ m, P.No. 186005367, S.No. 010733345124_01, Waters, Eschborn, Deutschland) mit zwei verschiedenen Gradienten getestet. Alle Referenzen sowie Extrakte wurden einzeln vermessen und zusätzlich zur Methodenentwicklung herangezogen. Um das Retentionsvermögens der Substanzen zu erhöhen, wurde zur mobilen Phase Säure hinzugesetzt, so dass eine vollständige Protonierung der OH-Gruppen erreicht wurde. Ein Overlay dieser an stationärer Phenylhexylsäule mit Methode SunFire1 wird in Abbildung 6.5 illustriert. Der dabei angewendete Fließmittelgradient erzielte im Rahmen der Methodenentwicklung für klassische RP-Säulen gute Ergebnisse und wurde aus Ermangelung einer Literaturmethode auf die Phenylhexylsäule übertragen.

Knapp hinter dem Injektionspeak (1,53 min) eluierten Catalpol und Aucubin mit $t_R = 2,10$ min bzw. $t_R = 3,11$ min. Die restlichen Referenzen waren im mittleren Teil des Chromatogramms lokalisiert: Asperulosid mit $t_R = 19,23$ min, Verbenalin mit $t_R = 19,95$ min, Verbascosid mit $t_R = 23,54$ min, Plantamajosid mit $t_R = 24,20$ min und Isoverbascosid mit $t_R = 24,90$ min. Es zeigt sich, dass eine Retention der Referenzen trotz ihrer hohen Polarität erzielt werden konnte. Besser zugängliche, unpolare Molekülstrukturen erzeugten dabei stärkere Wechselwirkungen mit der stationären Phase und somit stärkere Retardierungen. Insbesondere fiel auf, dass die PEs nach den IGs eluierten. Dies wird auf die phenolischen Gruppen der PEs zurückgeführt. Diese wechselwirken, trotz Nicht-Aktivierung des doppelten selektiven Systems, aufgrund ihrer hohen Unpolarität besonders gut mit der unpolaren stationären Phase.

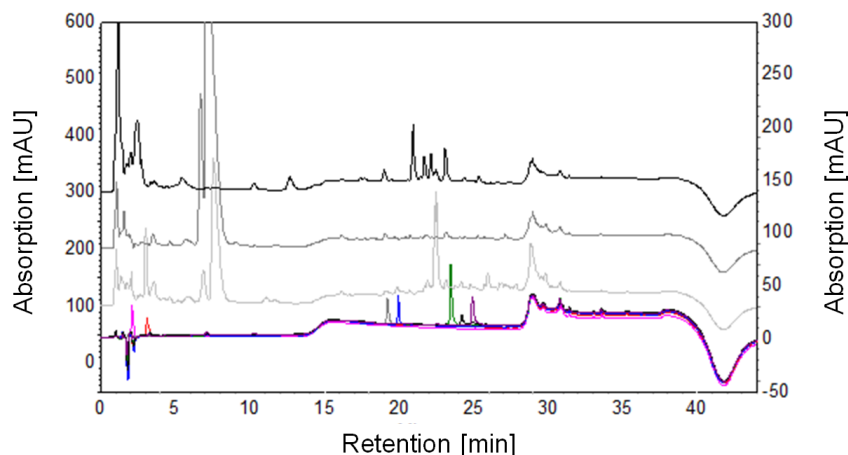


Abbildung 6.5: HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Phenylhexylsäule mit entwickelter Gradientenmethode SunFire1. Analyselösungen: Referenzen Catalpol (50 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, rosa, $t_R = 2, 10$ min), Aucubin (50 µg/mL Wasser, Injektion: 20 µL, rot, $t_R = 3, 11$ min), Asperulosid (50 µL Wasser, Injektion: 5 µL, grau, $t_R = 19, 23$ min), Verbenalin (50 µg/mL Wasser, Injektion: 30 µL, blau, $t_R = 19, 95$ min), Verbascosid (4 µg/mL Wasser, Injektion: 15 µL, grün, $t_R = 23, 54$ min), Plantamajosid (5 µg/mL Wasser, Injektion: 20 µL, schwarz, $t_R = 24, 20$ min), Isoverbascosid (5 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, lila, $t_R = 24, 90$ min), Drogenextrakt 6 (5 µL, grau, +100 mAU, linke Skala), FP-Extrakt 1 (Injektion: 5 µL, grau, +200 mAU, linke Skala), Fermentationsextrakt 3 (5 µL, schwarz, +300 mAU, linke Skala), stationäre Phase: SunFireTMC18, P.No. 186002541, S.No. 015432174145_01, mit Vorsäule, 150 x 2,1 mm, 5 µm (Waters, Eschborn, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-8 min: 3%, 8-24 min: 3-33%, 24-25 min: 33-98%, 25-33 min: 98%, 33-34 min: 98-3% , 34-44 min: 3% Eluent B, Fluss 0,35 mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

Die auffälligen Drifts in der Basislinie im Bereich von 15-17 min sowie ab 30 min begründen sich durch die Stufen im Gradienten bzw. den Spülschritt. Obwohl unschön, hat dies erstmal keine relevante Beeinträchtigung der Richtigkeit des Fingerprints der Testsubstanzen auch in Hinblick auf die Quantifizierung. Im vorderen Chromatogrammbereich jedoch, in dem sich Aucubin und Catalpol befinden, lassen sich bei allen injizierten Proben Unebenheiten in der Basislinie beobachten, weswegen eine korrekte Quantifizierbarkeit dort fraglich ist. Zudem erscheinen im Elutionsbereich von Catalpol bei den Extrakten aus Droge und Frischpflanze Peakcluster, welche die Quantifizierung stören. Für die anderen Referenzen sind keine störenden Coelutionen in den herangezogenen Extrakten ersichtlich. Zur Verbesserung der Catalpol- und Peakclusterproblematik, wurden für den nächsten Schritt der Methodenoptimierung polarere Startbedingungen gewählt. Statt 97% Wasser wurde mit 100% Wasseranteil begonnen und isokratisch für 8 min gehalten (Abbildung 6.6).

Konkretes Ziel war dabei, die Retention von Catalpol herauszuzögern, um es aus dem Bereich mit unebener Basislinie sowie dem Bereich mit coeluiierenden Clustern zu bringen.

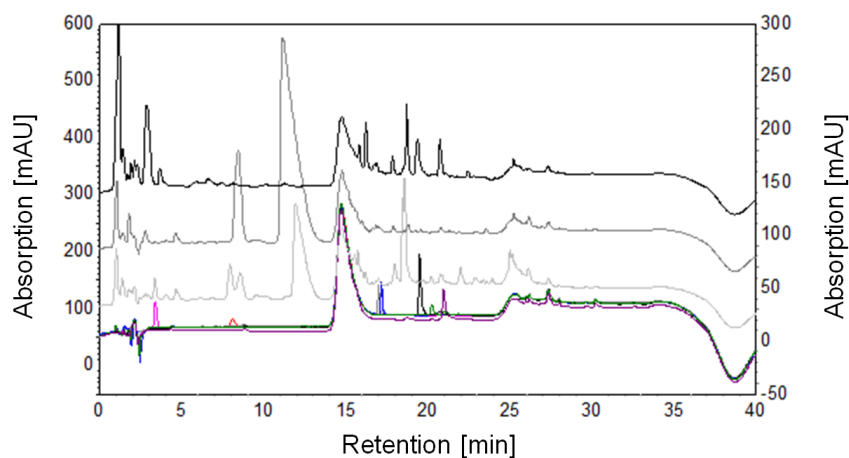


Abbildung 6.6: HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Phenylhexylsäule mit entwickelter Gradientenmethode SunFire2. Analyselösungen: Referenzen Catalpol (50 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, rosa, $t_R = 3,40$ min), Aucubin (50 µg/mL Wasser, Injektion: 20 µL, rot, $t_R = 8,11$ min), Asperulosid (50 µL Wasser, Injektion: 5 µL, grau, $t_R = 17,00$ min), Verbenalin (50 µg/mL Wasser, Injektion: 30 µL, blau, $t_R = 17,19$ min), Verbascosid (4 µg/mL Wasser, Injektion: 15 µL, grün, $t_R = 23,54$ min), Plantamajosid (5 µg/mL Wasser, Injektion: 20 µL, schwarz, $t_R = 24,20$ min), Isoverbascosid (5 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, lila, $t_R = 24,90$ min), Drogenextrakt 6 (5 µL, grau, +100 mAU, linke Skala), FP-Extrakt 1 (Injektion: 5 µL, grau, +200 mAU, linke Skala), Fermentationsextrakt 3 (5 µL, schwarz, +300 mAU, linke Skala), stationäre Phase: SunFireTMC18, P/No. 186002541, S/No. 015432174145₀1, mit Vorsäule, 150 x 2,1 mm, 5 µm (Waters, Eschborn, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-8 min: 0%, 8-10 min: 0-25%, 10-20 min: 25-33%, 20-22 min: 33-98%, 22-29 min: 98%, 29-31 min: 98-0%, 31-40 min: 0% Eluent B, Fluss 0,35 mL/min, Säulenofen: 25 ± 5 °C, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

Erfolgreich konnte durch diese Modifikation eine stärkere Retardierung von Aucubin und Catalpol mit $t_R = 3,40$ min bzw. $t_R = 8,11$ min erreicht werden. Der Abstand zwischen den Peaks vergrößerte sich in dieser Methode. Dahingegen retenierten alle anderen Referenzen Asperulosid, Verbenalin, Verbascosid, Plantamajosid und Isoverbascosid wesentlich früher als bei Gradient 1 mit $t_R = 17,00$ min, 17,19 min, 19,52 min, 20,25 min und 20,97 min. Dies kann auf den ersten Blick als positiv beurteilt werden, da eine Verkürzung der Laufdauer Zeit spart. Allerdings wirkte sich die Verschiebung der Retentionszeiten nachteilig auf die Trennung der IGs Verbenalin und Asperulosid aus. Im Gegensatz zur ursprünglichen Methode 1 führte Gradient 2 zu einer Peaküberlappung dieser beiden Verbindungen. Darüber hinaus vergrößerte sich die Unebenheit der Basislinie in der Chromatogrammmitte in ihrer Intensität von 20 mAU auf 130 mAU. Dies konnte auch in den Chromatogrammen der analysierten Extrakte beobachtet werden. Durch den massiven Basisliniendrift in diesem Bereich wird eine Erkennung potentiell

interessanter Peaks erschwert bis ganz verhindert. Folglich stellte diese Methode eine Verschlechterung zur Ausgangslage dar. Ein weiterer Erfolg der vorgenommenen Optimierung lag in der Entzerrung der Peakcluster beider Extrakte im Elutionsbereich von Catalpol. Dadurch konnten zum Teil bereits isolierte Peaks erhalten werden, zu deren Identität und Reinheit aber anhand der vorhandenen Informationen keine klare Aussage getroffen werden kann. Insgesamt konnten an der Phenylhexylsäule mittels Methode SunFire1 alle sieben Referenzsubstanzen erfolgreich separiert werden. Jedoch zeigten sich anhand dieses Prozesses Coelutionen im Bereich der Catalpolretention sowohl im Extrakt der Droge als auch der Frischpflanze, die sich nachteilig auf Identifizierung, Reinheits- und Gehaltsbestimmung auswirken. Anhand der zweiten Methode konnte zwar das Problem der Coelution in den untersuchten Vielstoffgemischen behoben werden. Jedoch überlappten zwei der vier verwendeten IGs und die bereits durch Gradient 1 verursachte deutliche Erhebung in der Basislinie wurde zusätzlich gesteigert. Hervorgehoben werden soll hier, dass der Unterschied zwischen Gradient SunFire1 und 2 gering war. Lediglich die Startbedingungen der mobilen Phase variierten um 3%. Dies reichte bereits aus, um entweder eine Coelution des Catalpols mit anderen Extraktbestandteilen oder eine Peaküberlappung der IGs Asperulosid und Verbenalin auszulösen. Dies minimierte den Entwicklungsspielraum stark. Deswegen und aus zeitlichen Aspekten wurde keine weitere Optimierung an der stationären Phenylhexylphase vorgenommen. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit der HPLC-Methodenentwicklung an der Phenylhexylsäule zur Erarbeitung einer Fingerprintmethode zur Analytik der IGs und PEs in *P. lanceolata* nicht weiter nachgegangen wurde, wäre es interessant, ob sich das Retentionsverhalten der sieben Referenzen durch eine andere Säure oder Säuremenge in der mobilen Phase bereits verbessern ließe. Zudem könnte durch Veränderung weiterer Parameter, wie der Temperatur oder der Flussgeschwindigkeit, Einfluss auf die Trennung genommen werden. Das Zurückgreifen auf Fließmittelkomponenten - außer Wasser und Acetonitril - sind durch die UV-Limitierung der IGs Aucubin und Catalpol nicht sinnvoll. Der Einsatz von Methanol wurde an einer chemisch verwandten, zu π -System Doppelselektivität befähigten Säule getestet und führte aufgrund des enormen Basisliniendriffs durch erhöhte Absorption zu keinen erfolgreichen Ergebnissen (Abbildung 6.10 in Kapitel 6.3.2). Nichtsdestotrotz würden weitere Untersuchungen mit dieser stationären Phase das Gesamtwissen auf diesem Gebiet definitiv bereichern, gerade im Hinblick auf die erzielten Chromatographieergebnisse zur Analytik von IGs *via* HPLC-Phenylhexylphase und einer bis dato noch nicht beschriebenen Eignung dieser speziellen stationären Phase zur IG-Analytik per HPLC.

6.3.1.4 Biphenylsäule

Stationäres Biphenylmaterial besteht aus mit funktionellem Biphenylmethyl modifiziertem Kieselgel [129, Seite 121ff]. Analog dem Phenylhexylmaterial (Kapitel 6.3.1.3) kann es in Gegenwart von Methanol oder anderen nicht- π -systemfähigen Lösungsmitteln über die π -Bindungen der beiden Phenylgruppen wechselwirken. Fließmittelbestandteile, die selbst π -systemaktiv sind, wirken diesem Effekt entgegen und begünstigen vorrangig gewöhnliche RP-Wechselwirkungen, wie Van-der-Waals-Kräfte.

Im Folgenden soll ein Ausschnitt des Verfahrens zur Methodenentwicklung an stationärer Biphenylphase (Kinetex, Coreshell, 250 x 4,6 mm, 5 μ m, 100 Å, P.No. OOG-4627-EO, S.No. H15-168734, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) vorgestellt werden. Zur Methodencharakterisierung standen die Referenzen Catalpol ($t_R = 4,15$ min), Aucubin ($t_R = 5,95$ min), Verbenalin ($t_R = 17,71$ min), Asperulosid ($t_R = 17,81$ min), Plantamajosid ($t_R = 20,15$ min), Verbascosid ($t_R = 20,77$ min) und Isoverbascosid ($t_R = 21,36$ min) sowie ein Drogen- und ein fermentierter Extrakt zur Verfügung. Ein Overlay-Chromatogramm dieser mit Methode ChP2010 vermessenen Proben befindet sich in Abbildung 6.7. Die angewendete Methode basiert auf der HPLC-Methode, die in der Monographie von *Scrophulariae Radix* des Chinesischen Arzneibuches (2010) [156] beschrieben ist und wurde an die aktuelle Problematik angepasst (Methode 1).

Eine erfolgreiche Trennung aller getesteten Referenzen - mit Ausnahme von Verbenalin und Asperulosid - konnte innerhalb von weniger als 22 min erzielt werden. Die mittels dieser Methode erhaltenen Chromatogramme eines Drogen- sowie eines Fermentationsextraktes weisen über den gesamten Gradientenbereich relativ gleichmäßig verteilt Peaks auf und stellen somit ihre potentielle Eignung als Screeningmethode unter Beweis. Die Basislinie ist über den gesamten Chromatographiebereich im Wesentlichen linear. Relevante Peaks der Referenzen tauchen isoliert auf, ausgenommen die der simultan eluierenden IGs Verbenalin und Asperulosid. Umfassende Beurteilungen bezüglich der Peakidentität und -reinheit der isoliert vorliegenden Peaks sind anhand der vorhandenen Messdaten nicht möglich. Aufgrund der suboptimalen Separation der IGs Verbenalin und Asperulosid wurden weiterführende Untersuchungen im Rahmen der Methodenentwicklung zur Trennung dieser beiden Verbindungen angestrebt. Dazu wird exakt die gleiche Methode, die bereits an der materialverwandten Phenylhexylsäule angewendet wurde, eingesetzt (Abbildung 6.6 in Kapitel 6.3.1.3). Maßgebliche Merkmale dieser Methode (SunFire2) waren der 8 minütige, isokratische Start mit 100% wässriger Phase, der im Gegensatz zu dem sofort startenden Gradienten der vorhergehenden Methode ChP2010 steht sowie der Anteil von 33% organischem Eluent B bei Minute 20, wie er in Methode 1 beschrieben wurde.

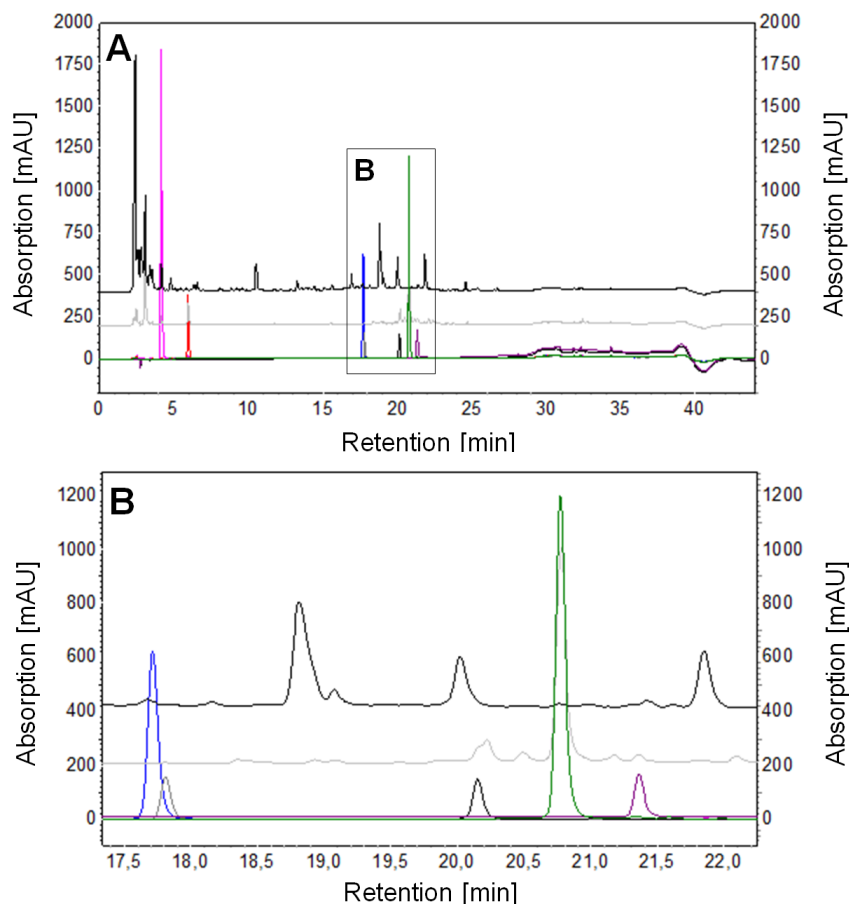


Abbildung 6.7: HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer Biphenylsäule mit entwickelter Gradientenmethode ChP2010 in Anlehnung an die HPLC-Methode, die in der Monographie von *Scrophulariae Radix* des Chinesischen Arzneibuches [156] beschrieben ist. Analyselösungen: Referenzen Catalpol (50 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, rosa, $t_R = 4,15$ min), Aucubin (50 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, rot, $t_R = 5,95$ min), Verbenalin (500 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, blau, $t_R = 17,71$ min), Asperulosid (50 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, grau, $t_R = 17,81$ min), Plantamajosid (5 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, schwarz, $t_R = 20,15$ min), Verbascosid (4 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, grün, $t_R = 20,77$ min), Isoverbascosid (5 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, lila, $t_R = 21,36$ min), Drogenextrakt 5 (Injektion: 10 µL, grau, +200 mAU), Fermentationsextrakt 3 (Injektion: 10 µL, schwarz, +400 mAU), stationäre Phase: Kinetex Biphenyl, Coreshell, P.No. OOG-4627-EO, S.No. H15-168734, mit Vorsäule, 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-95%, 30-35 min: 95%, 35-36 min: 95-3%, 36-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 ± 5 °C, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

Trotz stark polarem, isokratischen Schritt zu Beginn der angewendeten Methode SunFire2 konnte keine Trennung der IGs Verbenalin ($t_R = 16,90$ min) und Asperulosid ($t_R = 16,97$ min) erreicht werden. Hinzukommt, dass stattdessen eine merkliche Basislinienerhebung nach dem anfänglichen isokratischen Schritt zu beobachten ist.

In dieser Erhebung eluiert Aucubin. Folglich ist diese Methode denkbar ungeeignet zur Fingerprintanalytik der IGs und PEs in *P. lanceolata*. Alle anderen getesteten Referenzen lagen als isolierte Peaks vor. Eine relativ gleichmäßige Verteilung der vielen scharfen Peaks bleibt nach wie vor bestehen. In einem dritten Methodenentwicklungsschritt sorgte ein flacherer Gradient mit 0-8 min: 0%, 8-30 min: 0-25%, 30-35 min: 25-50%, 35-36 min: 50-98%, 36-43 min: 98%, 43-45 min: 98-0%, 45-50 min: 0% Eluent B, bei ansonsten gleichbleibenden Parametern, lediglich für eine Verschiebung der Retentionen beider Peaks nach hinten (nicht dargestellt) ohne die Trennung von Verbenalin ($t_R = 26,06$ min) und Asperulosid ($t_R = 26,19$ min) zu realisieren. Die restlichen Referenzen lagen weiterhin voneinander separiert vor. Positiv wirkte sich der flachere Gradient auf die Lokalisierung des Aucubinpeaks aus, der dadurch hinter der Basislinienerhebung eluierte. Jedoch wies die Basislinie in diesem Bereich trotzdem keine konstante Linearität auf. Das Gesamtbild der mitgeführten Extrakte ähnelt denen der ersten beiden Methoden. Auch durch weiteres Abflachen des Gradienten in einer vierten Methode (0-8 min: 0%, 8-50 min: 0-30%, 50-52 min: 30-50%, 52-54 min: 50-98%, 54-62 min: 98%, 62-64 min: 98-0%, 64-74 min: 0% Eluent B), bei ansonsten identischen Parametern, konnte keine verbesserte Separation der beiden IGs Verbenalin ($t_R = 31,37$ min) und Asperulosid ($t_R = 31,58$ min) oder ein verbessertes Gesamtchromatogramm erzielt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). (Methode 1: 44 min inklusive Säulen und Äquilibrieren). Darüber hinaus verstärkte sich der Basisliniendrift bei Einsatz eines isokratischen Schrittes. Die Peaks von Verbenalin und Asperulosid, die auch schon an der Phenylhexylsäule (Kapitel 6.3.1.3) überlappten, scheinen generell an phenylischen stationären Phase ähnlich stark wechselzuwirken und weisen ein kaum voneinander unterscheidbares, chromatographisches Verhalten auf. Daher wurde auch die stationäre Biphenylphase, trotz zahlreicher scharfer, isolierte Peaks und fehlender Peakscluster, als nicht ideal zur Fingerprintanalytik der IGs und PEs in *P. lanceolata* angesehen.

Schlussendlich wurde die Trennung an phenylischem Säulenmaterial nicht weiter verfolgt. Fortführende Untersuchungen dazu wären nichtsdestotrotz spannend, sofern Verbenalin und Asperulosid getrennt werden könnten. Dazu kommt, dass auch die Biphenylphase *bis dato* nicht für die HPLC-Analytik von IGs verwendet wird. Als Ansatzpunkt zur Methodenoptimierung dazu könnten neben Parametern wie Säulentemperatur und Säureart und -menge auch der Einsatz von nicht- π -systemaktiven mobiler Phase interessant sein, um eine Separation anhand von π -Wechselwirkungen mit den Biphenylgruppen zu erhalten. Dies wurde im Rahmen der Arbeit untersucht, resultierte aber in einen enormen Basisliniendrift (Kapitel 6.3.1.3). Nachfolgend werden klassische Umkehrphasen zur Findung einer geeigneten HPLC-Fingerprintmethode der IGs und PEs in Spitzwegerich getestet.

6.3.1.5 C8e-Säule

C8-Material aus mit n-Oktanyl verknüpftem Kieselgel [129, Seite 121ff]. Retardiert werden Substanzen daran um so stärker, je größer ihre unpolare Angriffsfläche ist, durch die die über Van-der-Waals-Kräfte mit den unpolaren C8-Ketten der stationären Phase interagieren. Die hier eingesetzte C8e-Säule (RP8e, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, 250 x 4,0 mm, 5 μ m, Cat.1.50035.001, Lot. FC075418, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde zusätzlich endgecappt. Zur Nachbehandlung der stationären Phase mit z.B. Trimethylchloresilan wird die Anzahl der freien, nicht unbesetzten Silanolgruppen reduziert [129, Seite 121], wodurch insbesondere die Peaks polarer Verbindungen schärfer werden. Präsentiert wird, in Analogie zur Biphenylsäule, eine modifizierte HPLC-Methode aus der Monographie von *Scrophulariae Radix* ChP2010 (Methode 1, Abbildung 6.8) [156]. Ein Overlay-Chromatogramm mit den verfügbaren Referenzsubstanzen Catalpol ($t_R = 4,37$ min), Aucubin ($t_R = 7,11$ min), Asperulosid ($t_R = 17,33$ min), Verbenalin ($t_R = 17,98$ min), Plantamajosid ($t_R = 20,02$ min), Verbascosid ($t_R = 20,73$ min), Isoverbascosid ($t_R = 21,38$ min) sowie eines Drogen- und eines Fermentationsextraktes sind in Abbildung 6.8 illustriert.

Alle sieben Analysesubstanzen ergaben voneinander isolierte Peaks, deren Retentionszeiten sich nur marginal von denen der Biphenylsäulenchromatographie unterscheiden (Tabelle 6.1). Einzig Aucubin zeigte mit einer Abweichung von 7,11 min eine größere Abweichung. Spannenderweise gelang die Separation der beiden IGs Verbenalin und Asperulosid an stationärer C8e-Säule mit der Methode ChP2010. Alles in allem scheint die Methode gut geeignet zur Fingerprintanalytik der IGs und PEs in *P. lanceolata* zu sein. Durch Abgleich der Retentionszeiten sowie der UV-Spektren der Peaks aus HPLC-DAD-Messungen konnte die Identität der Analyten im Extrakt bestätigt werden.

Anhand der während der Läufe mittels DAD aufgenommenen UV-Spektren konnten keine Verunreinigung der Peaks in den herangezogenen Extrakten erkannt werden. Durch Zuspiken von bestimmten Catalpol-, Aucubin- bzw. Verbascosidmengen zu den Extrakte, mit denen die Identität der zugeordneten Peaks auf etwaige Abweichung durch Matrixeffekte überprüft werden sollte, entstand der Verdacht, dass sich der Catalpolpeak aus

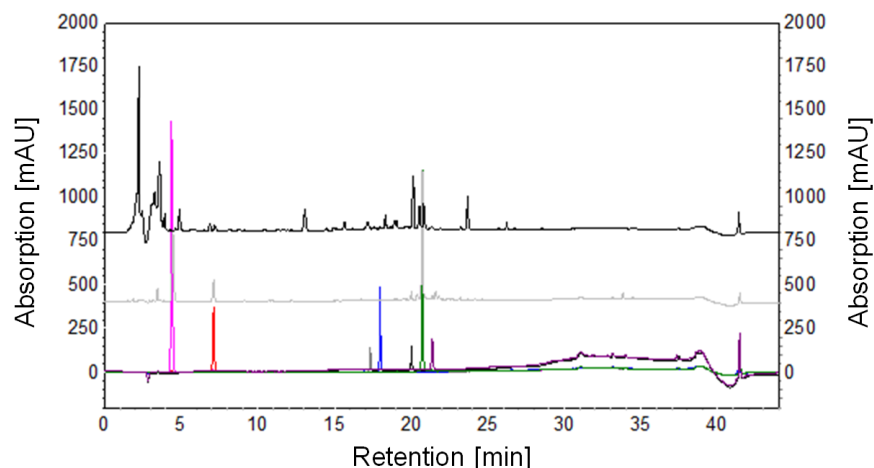


Abbildung 6.8: HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer C8e-Säule mit entwickelter Gradientenmethode ChP2010, die an die HPLC-Methode der Monographie von *Scrophulariae Radix* des Chinesischen Arzneibuches [156] angelehnt ist. Analyselösungen: Referenzen Catalpol (50 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, rosa, $t_R = 4,37$ min), Aucubin (50 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, rot, $t_R = 7,11$ min), Asperulosid (50 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, grau, $t_R = 17,33$ min), Verbenalin (50 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, blau, $t_R = 17,98$ min), Plantamajosid (5 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, schwarz, $t_R = 20,02$ min), Verbascosid (4 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, grün, $t_R = 20,73$ min), Isoverbascosid (5 µg/mL Wasser, Injektion: 10 µL, lila, $t_R = 21,38$ min), Drogenextrakt 5 (Injektion: 10 µL, grau, +400 mAU), Fermentationsextrakt 3 (Injektion: 10 µL, schwarz, +800 mAU), stationäre Phase: Hibar® 250-4, Purospher® STAR, RP8e, Cat. 1.50035.001, Lot. FC075418, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-95%, 30-35 min: 95%, 35-36 min: 95-3%, 36-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

mindestens einer weiteren Komponente zusammensetzte, dessen UV-Spektrum mit dem von Catalpol übereinstimmte. Anschließende LC-HRMS-Messungen bestätigten eine Co-Elution von Catalpol mit einer Substanz mit m/z 191.0216, die *per* DAD nicht entdeckt werden konnte. An diesem Beispiel wird ersichtlich, wie wichtig die MS-Kompatibilität der HPLC-DAD-Methode bei der Validierung dieser komplexen chromatographischen Aufgabe war. Nur mithilfe einer zweiten, spezifischeren Detektion bei ansonsten gleicher Methode, können die beschränkten Fähigkeiten des DADs ausgeglichen werden. Die auf den ersten Blick perfekte HPLC-Methode an stationärer C8e-Säule war demnach doch nicht zu Screeningzwecken geeignet. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass in der Literatur zur Zeit keine HPLC-Methode an stationärer C8(e)-Säule zur IG-Analytik existiert. Die hier erhaltenen Ergebnisse demonstrieren, dass diese stationäre Phase durchaus gut in der Lage ist, IGs zu trennen. Die Überlagerung mit Nebenkomponenten des Spitzwegerichextrakts müssten aber mithilfe weiterer Optimierungsschritte beseitigt werden. Aus zeitlichen Aspekten wurden die gewonnenen Erfahrungen stattdessen zunächst auf eine C18-Säule angewendet. Dieses Material stellt den Standard in der aktuellen

Tabelle 6.1: Vergleich der Retentionszeiten bei identischer HPLC-Methode an stationärer Biphenyl- und C8e-Säule. Mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-95%, 30-35 min: 95% , 35-36 min: 95-3%, 36-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 ± 5 °C, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

Referenzsubstanz	t _R [min] an Biphenylsäule	t _R [min] an C8e-Säule
Catalpol	4,15	4,37
Aucubin	5,95	7,11
Verbenalin	17,71	17,33
Asperulosid	17,81	17,98
Plantamajosid	20,15	20,02
Verbascosid	20,77	20,73
Isoverbascosid	21,36	21,38

RP-HPLC-Analytik dar und sollte deshalb unbedingt in der Methodenentwicklung zur HPLC-Fingerprintanalytik berücksichtigt werden.

6.3.1.6 C18e-Säule

Analog dem C8-Material werden C18-Säulen aus mit n-Oktadecyl modifiziertem Kieselgel hergestellt. C18-Säulen sind seit der Einführung der Umkehrphasenchromatographie in der HPLC die gängigsten Säulen. Meist sind sie über Si-O-Si-C-Bindungen am Kieselgel verknüpft und werden als Oktadecylsilan (ODS)-Säulen bezeichnet. [129, Seite 121ff] Im Rahmen dieser Arbeit fanden diverse C18- sowie C18e-Säulen während der HPLC-Methodenentwicklung zur Fingerprintanalytik der IGs und PEs aus *P. lanceolata* Anwendung (Kapitel 10.5). Hier präsentiert werden soll aus Übersichtsgründen lediglich die beste Kombination aus stationärer und mobiler Phase, wobei als stationärer Phase eine C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Deutschland) die besten Ergebnisse erzielte. Als Referenzsubstanzen konnte dabei auf Catalpol ($t_R = 13,40$ min), Aucubin ($t_R = 16,09$ min), Asperulosid ($t_R = 23,82$ min), Verbenalin ($t_R = 24,63$ min), Plantamajosid ($t_R = 27,44$ min), Verbascosid ($t_R = 28,37$ min) und Isoverbascosid ($t_R = 29,39$ min) sowie einen Drogen-, einen Frischpflanzen- und einen Fermentationsextrakt zurückgegriffen werden (Abbildung 6.9).

Die sieben eingesetzten Referenzen besitzen damit voneinander verschiedene Retentionszeiten und eluieren in Abständen von 1 Minute oder mehr von der Säule. Eine Basislinienerhebung aufgrund des anfänglichen isokratischen Schrittes ist sichtbar, tangiert aber die Elution der IGs und PEs nicht. Die Chromatogramme des Drogen-, Frischpflanzen- sowie Fermentationsextraktes zeigen über den gesamten Chromatographiebereich relativ gleichmäßig verteilte und überwiegend isolierte Peaks. Eine leicht verzögerte Coelution im Falle von Aucubin mit einem Inhaltsstoff des Drogenextraktes ist im Chromatogramm erkennbar. Insgesamt wird das angewendete HPLC-System, aufgrund der Trennung aller eingesetzten Referenzen voneinander, als sehr positiv bewertet. Positiv wird auch die Elution der Referenzen in einem nicht-kritischen, engeren Abschnitt und linearen Bereich eingestuft. Die im DAD-Chromatogramm sichtbare Überlagerung des Aucubinpeaks mit einer Nebenkomponeute im Drogen-, nicht aber im Frischpflanzen- oder Fermentationsextrakt, wird als Kompromiss in Kauf genommen. Schlussendlich wurde die präsentierte Methode an der herangezogenen stationären C18e-Säule als am besten geeignete HPLC-Methode deklariert, das mit den zur Verfügung stehenden Mitteln in einer annehmbaren Zeit entwickelt werden konnte. In Kapitel 7.3.1 sollen per LC-HRMS und LC-MSⁿ zusätzlich herausgearbeitete Informationen zu Peakidentität und -reinheit des oben vorgestellten HPLC-Systems dargestellt und im Hinblick auf Eignung zum Fingerprintsystem der IGs und PEs in *P. lanceolata* diskutiert werden.

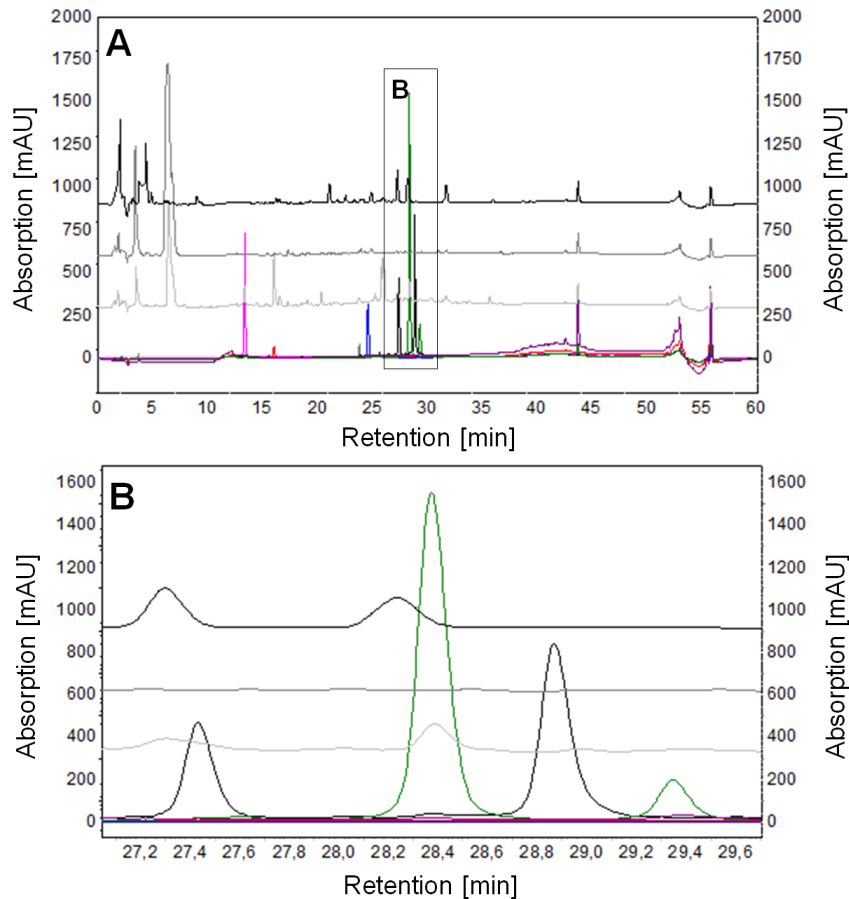


Abbildung 6.9: HPLC-Overlay-Chromatogramm an stationärer C18e-Säule mit entwickelter Gradientenmethode EL082Fingerprint9minspülen. Analytlösungen: Referenzen Catalpol (0,25 mg/mL Wasser, Injektion: 10 μ L, rosa, t_R = 13,40 min), Aucubin (50 μ g/mL Wasser, Injektion: 10 μ L, rot, t_R = 16,09 min), Asperulosid (50 μ g/mL Wasser, Injektion: 10 μ L, grau, t_R = 23,82 min), Verbenalin (0,5 mg/mL Wasser, Injektion: 10 μ L, blau, t_R = 24,63 min), Plantamajosid (0,5 mg/mL Wasser, Injektion: 10 μ L, schwarz, t_R = 27,44 min), Verbascosid (0,5 mg/mL Wasser, Injektion: 1 μ L, grün, t_R = 28,37 min) und Isoverbascosid (0,5 mg/mL Wasser, Injektion: 10 μ L, lila, t_R = 29,39 min), Drogenextrakt 6 (Injektion: 10 μ L, grau, +300 mAU), FP-Extrakt 1 (Injektion: 10 μ L, grau, +600 mAU), Fermentationsextrakt 3 (Injektion: 10 μ L, schwarz, +900 mAU), stationäre Phase: Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, RP18e, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-5 min: 0%, 5-15 min: 0-10%, 15-30 min: 10-33%, 30-35 min: 33-50%, 35-40 min, 50-98%, 40-49 min: 98%, 49-50 min: 98-0%, 50-60 min: 0% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 \pm 5 $^{\circ}$ C, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

Anzumerken ist hierbei, dass die Eignung stationärer C18(e)-Phasen, wie zahlreich in der Literatur beschrieben, zur Chromatographie von IGs und PEs bestätigt werden kann. Die Chromatographie aller eingesetzter Referenzen gelang an dieser stationären Phase problemlos.

Peaküberlappungen der relevanten Substanzen mit anderen Inhaltsstoffen der Spitzwegerichmatrix konnten dabei, trotz eingehender Optimierung, aufgrund der Fülle an bei 195 nm detektierbaren Substanzen nicht vollständig vermieden werden. Trotz etlicher Literaturstellen zur HPLC-Analytik von IGs an C18-Säulen wurde in dieser Arbeit erstmals ein Mix aus Catalpol, Aucubin, Verbenalin und Asperulosid simultan analysiert. Darüber hinaus stellt die kombinierte HPLC-Analytik dieser IGs mit den ausgewählten PEs Plantamajosid, Verbascosid und Isoverbascosid eine zusätzliche Premiere im wissenschaftlichen Kontext dar.

6.3.2 Mobile Phase

Die Wahl der mobilen Phase beruht in erster Linie auf ihren chromatographischen Eigenschaften, d.h. ihrer Fähigkeit an der passenden stationären Phase eine schnelle, optimale Auftrennung des Analytengemisches zu erzielen [129, Seite 62f]. Von den weiteren die HPLC beeinflussenden Kriterien wie Viskosität, UV-Durchlässigkeit (bei UV-absorptionsabhängigen Detektoren), Reinheit, Siedepunkt, Inertheit gegenüber den Analyten, Korrosionsbeständigkeit, Toxizität und Preis [129, Seite 62f], sind für die vorliegende Aufgabenstellung vor allem die UV-Durchlässigkeit der mobilen Phase von Bedeutung. Die Absorptionsmaxima der zu quantifizierenden Hauptiridoidglykoside des Spitzwegerichs Aucubin und Catalpol wurden im ersten Schritt zur Definierung der mobilen Phase mittels UV-Spektrometer in Wasser bestimmt und betragen 190 nm bzw. 193 nm (Kapitel 6.5.3). Zusätzlich wurden die Absorptionsmaxima der verfügbaren Referenzen in HPLC-DAD-Läufen ermittelt und mit denen der Literatur verglichen. Unter Berücksichtigung der Abhängigkeit vom gegenwärtigen Lösungsmittel(gemisch) stimmten die Werte der Literatur mit den gemessenen überein. Für die nicht verfügbaren IGs und PEs, die für Spitzwegerich in der Literatur postuliert werden, wurden ausschließlich Literaturwerte herangezogen (Abbildung 6.2 in Kapitel 6.3.3.1). Diese UV-Maxima sind stoffgruppenspezifisch und waren im Einklang mit den hier ermittelten Absorptionsmaxima der Referenzen. Anhand dieser Daten wurde eine Detektionswellenlänge für die zu analysierenden IGs bei 195 nm festgelegt (Kapitel 6.3.3). Aucubin und Catalpol wurden bis *dato* bei Wellenlängen von 204 nm [29, 121], 205 nm [122], 208 nm [101, 103] bzw. 210 nm [107] analysiert (Abbildung 1.12 in Kapitel 1.4.3). Für PEs wurde eine höhere Wellenlänge von 330 nm definiert, welche in Kombination mit diversen, relevanten Lösungsmitteln problemlos eingesetzt werden kann ohne die Detektion zu stören. Deswegen wird im Folgenden hauptsächlich auf die Kompatibilität der Eluenten mit der kritischeren Wellenlänge von 195 nm eingegangen, die zur IG-Analytik Anwendung finden soll.

6.3.2.1 Eluenten

Die ausgewählte Detektionswellenlänge der IG-Fingerprintanalytik von 195 nm limitierte die einzusetzenden Fließmittelkomponenten auf ein Minimum. Als schwächer eluierender Eluent A fiel die Wahl dabei auf Wasser (Kapitel 1.4.3). Wasser besitzt einen Cut-off unterhalb von 190 nm [129, Seite 78] und stört damit die Detektion bei 195 nm nicht. Als Eluent B setzte sich das mit $\eta = 0,37$ [129, Seite 78] weniger viskose und mit einer UV-Grenze von 190 nm [129, Seite 78] schwächer absorbierende Acetonitril gegenüber dem mit $\eta = 0,60$ [129, Seite 78] viskoserem und mit einer UV-Grenze von 205 nm [129, Seite 78] stärker absorbierenden Methanol bevorzugt. Der nachteilige Effekt von Methanol im Fließmittelgradienten der mobilen Phase ist in Abbildung 6.10 veranschaulicht.

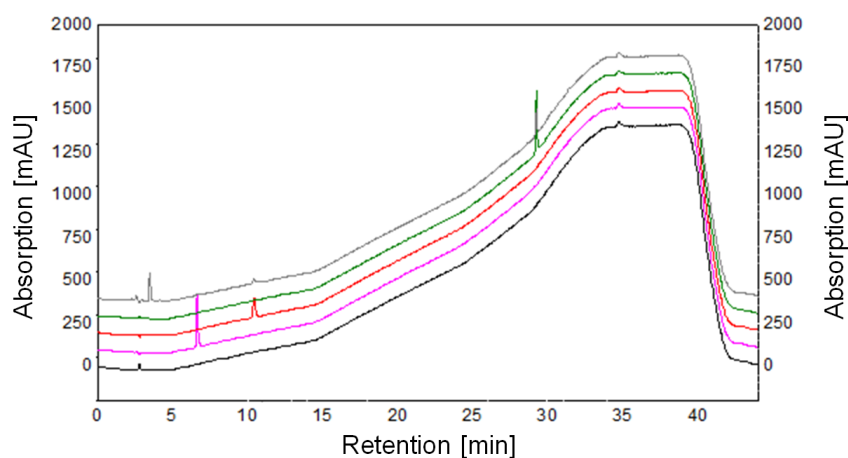


Abbildung 6.10: Nachteiliger Effekt von Methanol im Fließmittelgradienten. Analytlösungen: Referenzen Catalpol (0,5 mg/mL Wasser, Injektion: 5 μ L, rosa, $t_R = 5,14$ min, +100 mAU), Aucubin (1,0 mg/mL Wasser, Injektion: 5 μ L, rot, $t_R = 8,94$ min, +200 mAU) und Verbascosid (1,4 mg/mL Wasser, Injektion: 5 μ L, grün, $t_R = 27,76$ min, +300 mAU), Drogenextrakt 5 (Injektion: 5 μ L, grau, +400 mAU), Leerwert (Injektion: 5 μ L, schwarz), stationäre Phase: Kinetex Biphenyl, Coreshell, P.No. OOG-4627-EO, S.No. H15-168734, mit Vorsäule, 250 x 4,6 mm, 5 μ m, 100 Å (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Methanol mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-80%, 30-35 min: 80%, 35-37 min: 80-3%, 37-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

Ein stetig steigender Basisliniendrift von insgesamt 1400 mAU über den gesamten Gradienten kann für alle vermessenen Analyselösungen beobachtet werden. Dieser steht in einem direkt proportionalen Zusammenhang mit dem Methanolanteil in der mobilen Phase.

Im Vergleich dazu kann kein nennenswerter Anstieg der Basislinie beim Einsatz von Acetonitril festgestellt werden, der gleichermaßen für andere Säulenmaterialien, wie z.B. RP18, gilt (Ergebnisse nicht dargestellt). Weiter führten methanolhaltige Gradienten zu wesentlich höheren Drücken im HPLC-System. Diese verhindern schnelle Änderungen der Fließmittelzusammensetzung bei entsprechendem Fluss und wirken sich nachteilig auf die Lebensdauer des gesamten HPLC-Geräts aus. Einen stärkeren Effekt als Methanol auf die Basislinie zeigte der Einsatz von Propan-2-ol, welches sowohl mit 210 nm [129, Seite 78] über eine höhere UV-Grenze als auch mit $\eta = 2,3$ [129, Seite 78] über eine deutlich höhere Viskosität im Vergleich zu Methanol und vor allem zu Acetonitril verfügt (Ergebnisse nicht dargestellt). Andere organische Lösungsmittel wurden aufgrund ihrer Nichteignung für die RP-Chromatographie nicht in die Methodenentwicklung der mobilen Phase miteinbezogen. Eine neben dem Gradientenlauf sonst übliche Variation der Komponenten der mobilen Phase im Rahmen einer HPLC-Methodenentwicklung wurde in dieser Arbeit daher nicht durchgeführt und mit dem Einsatz unterschiedlicher stationärer Phasen kompensiert.

6.3.2.2 Säurezusatz

Der Einsatz von Säuren zum Fließmittelsystem wird in der Literatur zur IG-Analytik oft genutzt. Dabei finden sowohl flüchtige Säuren wie Essig-, Trifluoressig-, Ameisen- als auch nicht flüchtige Säuren wie Phosphorsäure Verwendung (Tabelle 1.11 in Kapitel 1.4.3).

6.3.2.3 Wahl der zugesetzten Säure

In der Problemstellung der vorliegenden Arbeit wurde die Detektion der IGs *via* absorptionsbasiertem DAD bei 195 nm durchgeführt, da Aucubin und Catalpol in diesem Bereich gut absorbieren (Kapitel 6.3.3). Allerdings sind niedrige Wellenlängen wie diese nicht substanzspezifisch. Daher war es von Bedeutung für die Validierung der HPLC-Fingerprintmethode, die erhaltenen Daten mittels LC-MS gegenzuprüfen. Die entwickelte HPLC-Methode konnte eins zu eins übertragen und zusätzliche Informationen mithilfe des sensitiveren, absorptionsunabhängigen Detektionssystem erhalten werden konnten. Ergänzende Informationen zu Identität und Reinheit der jeweiligen Peaks können z.B. mittels HRMS bzw. MSⁿ-Schaltungen geliefert werden. Aus diesem Grund wurde zur HPLC-Fingerprintanalytik der IGs und PEs von *P. lanceolata* ein MS-kompatibles System gewählt. Als Säurezusatz wurde die leicht volatile, gut MS-kompatible Ameisensäure verwendet, obwohl die Addition von MS-inkompatibler Phosphorsäure zu einem geringeren Hintergrundrauschen, d.h. zu einer ruhigeren Basislinie führte (Abbildung 6.11). Alternativen wurden aufgrund der positiven Ergebnisse mit Ameisensäure nicht ausprobiert. Erstaunlicherweise ergab der Gradient mit Phosphorsäureaddition eine linearere Basislinie als mit Ameisensäure, obwohl Phosphorsäure im Vergleich zur Ameisensäure nur zu Eluent A und nicht zu beiden Eluenten hinzugefügt wurde. Nachteilig beim Gebrauch von 0,2% Ameisensäure in der mobilen Phase war das Entstehen eines zweiten Ab-

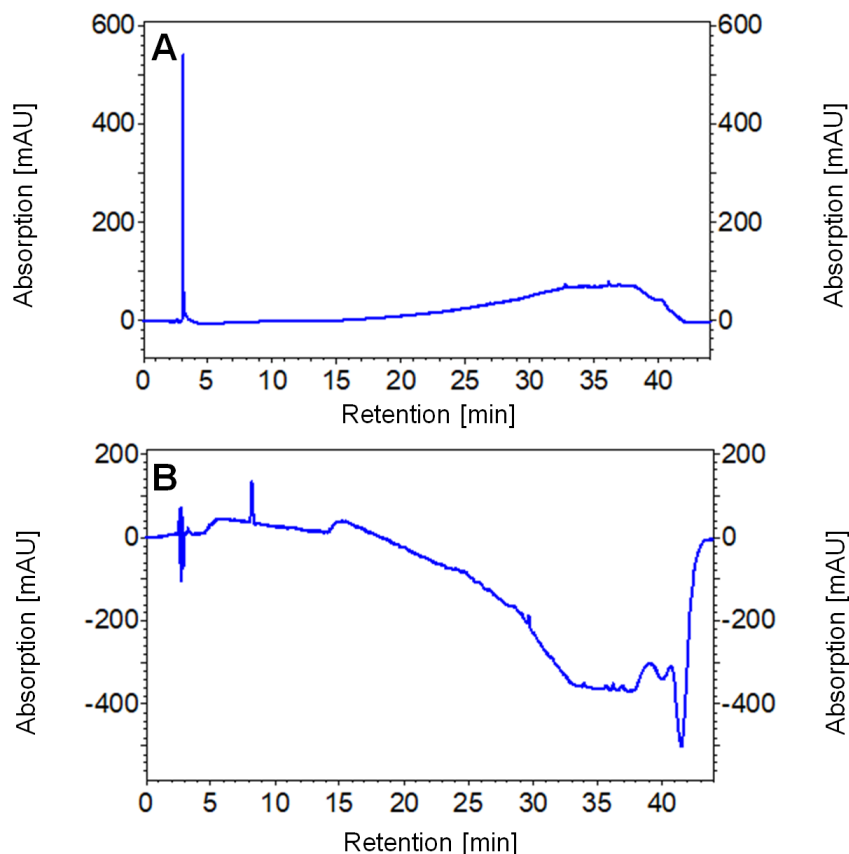


Abbildung 6.11: Vergleich des Grundrauschens von Phosphorsäure bzw. Ameisensäure im mobilen System. Analytlösung: Aucubin (1,7 mg/mL Wasser, Injektion: 5 μ L, t_R = 3,11 min (A) bzw. 8,21 min (B)), stationäre Phase: C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,03% Phosphorsäure (A) bzw. Wasser mit 0,2% Ameisensäure (B), Eluent B: Acetonitril (A) bzw. Acetonitril mit 0,2% Ameisensäure (B), Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-95%, 30-35 min: 95% , 35-36 min: 95-3%, 36-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 \pm 5 $^{\circ}$ C, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

sorptionmaximums bei etwa 215 nm, welches beim Zusatz von Phosphorsäure fehlt (Abbildung 6.12).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass sich die Absorption der 0,2%igen Ameisensäure störend auf die Basislinie und damit auf das gesamte Chromatogramm auswirkt und auch das UV-Spektrum der Peaks beeinflusst. Durch die Veränderung der relativ substanzcharakteristischen UV-Spektren ließen sich Identität und Reinheit der Verbindungen erschwert ablesen. Zu berücksichtigen ist auch, dass das zweite Absorptionsmaximum im Verlauf des Gradientens in Abhängigkeit der tatsächlichen, momentanen Fließmittelzusammensetzung leicht variierte (Kapitel 6.3.3). Durch die benötigte MS-Kompatibilität war als Additiv Ameisensäure jedoch nicht entbehrlich. Ein Verzicht auf Säurezusatz führte in Vorversuchen zu keiner nennenswerten Retention der relevanten IGs Aucubin und Catalpol an stationärer Umkehrphase. Inwieweit der Säurezusatz für die Retention

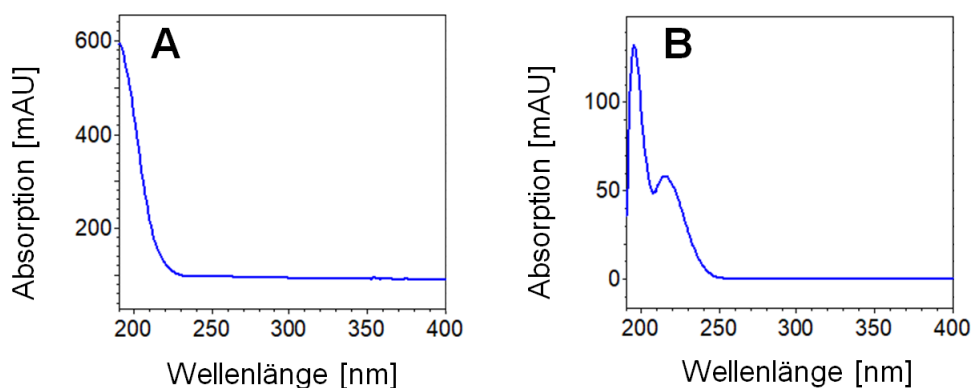


Abbildung 6.12: Einfluss der zugesetzten Phosphor- bzw. Ameisensäure auf das Spektrum von Aucubin gemessen *via* HPLC-DAD im Peakmaximum. Analytlösung: Aucubin (1,7 mg/mL Wasser, Injektion: 5 μ L, t_R = 3,11 min (A) bzw. 8,21 min (B)), stationäre Phase: C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,03% Phosphorsäure (A) bzw. Wasser mit 0,2% Ameisensäure (B), Eluent B: Acetonitril (A) bzw. Acetonitril mit 0,2% Ameisensäure (B), Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-95%, 30-35 min: 95% , 35-36 min: 95-3%, 36-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 \pm 5 $^{\circ}$ C, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

polarer IGs wie Aucubin und Catalpol tatsächlich erforderlich ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher erforscht und wäre somit in nachfolgenden Analysen noch zu beantworten.

6.3.2.4 Konzentration der zugesetzten Säure

Zur HPLC-Fingerprintanalytik wurde Ameisensäure als Additiv zur mobilen Phase verwendet Abschnitt 6.3.2.3. Im Folgenden soll die Ermittlung der optimalen Säurekonzentration anhand ausgewählter Beispiele eruiert werden. Ein Aspekt dabei war die Ermittlung des Einflusses verschiedenener Säurekonzentrationen auf die Basislinie bei den Detektionswellenlängen λ = 195 nm sowie λ = 330 nm (Abbildung 6.13), bei denen die relevanten IGs bzw. PEs detektiert wurden (Kapitel 6.3.3).

Von den getesteten Ameisensäurekonzentrationen 0,001% (blau), 0,01% (rot) bzw. 0,1% (grün) konnte bei 195 nm ein großer Unterschied im Verlauf der Basislinie mit zunehmendem Acetonitrilanteil registriert werden. Während 0,001% Ameisensäurezusatz zu einer nach oben driftenden Basislinie führte, driftet die Basislinie bei einem Zusatz von 0,1% mit zunehmendem Acetonitrilanteil deutlich nach unten ab. Die geringste Veränderung in der Basislinie konnte bei Addition von 0,01% Ameisensäure beobachtet werden. Diese Konzentration ist daher am besten geeignet für ein gleichmäßiges Hintergrundrauschen und eine lineare Basislinie. Im Gegensatz dazu, hatten bei 330 nm die verschiedenen Säurekonzentrationen keinen erheblichen Effekt auf die Basislinie.

Die ideale Konzentration von 0,01% Ameisensäure im Fließmittelsystem konnte auch in weiterführenden Analysen mit einer höheren Bandbreite an Säurekonzentrationen für

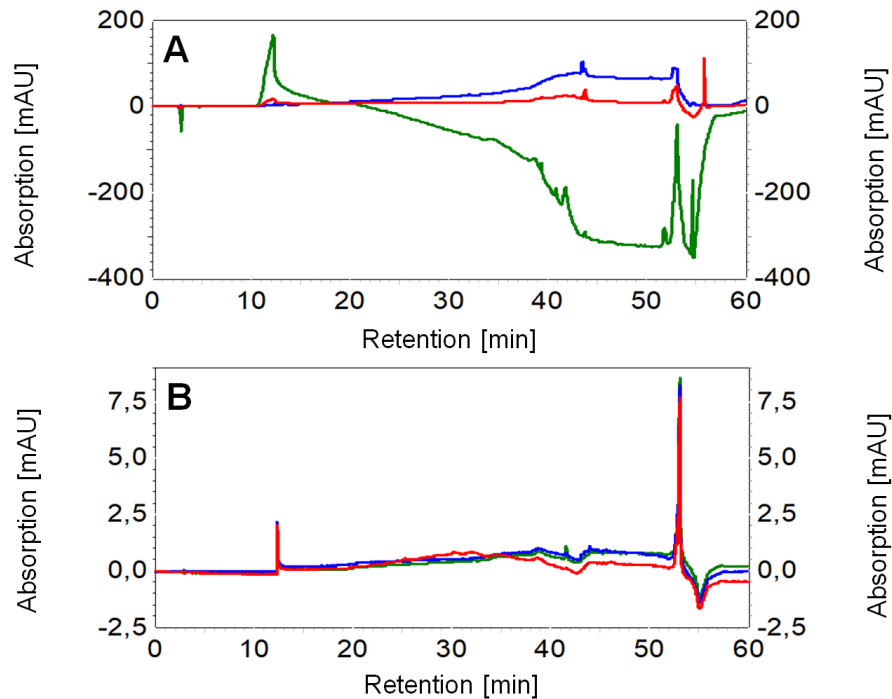


Abbildung 6.13: Einfluss der Säurekonzentration auf das Grundrauschen der Basislinie. Analytlösung: Leerwert, stationäre Phase: C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit Ameisensäure, Ameisensäurekonzentration in beiden Eluenten je: 0,001% (blau), 0,01% (rot) bzw. 0,1% (grün), Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-95%, 30-35 min: 95%, 35-36 min: 95-3%, 36-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: DAD, 195 nm (A) bzw. 330 nm (B), HPLC-Anlage 1.

matrixfreie Lösungen bestätigt werden (Abbildung 6.14). Da die Variation der Säurekonzentration sich kaum bei der Detektionswellenlänge von 330 nm, jedoch merklich bei der von 195 nm im Hintergrundrauschen bemerkbar machte, wurde nur letztere betrachtet. Zu dem gleichen Ergebnis gelangten auch die Analysen zum Einfluss verschiedener Säurekonzentrationen auf das Chromatogramm eines Drogenextrakts. Somit kann auch für matrixstarke Lösungen eine optimale Eignung von 0,01% Ameisensäure im Fließmittelsystem demonstriert werden (Abbildung 6.15).

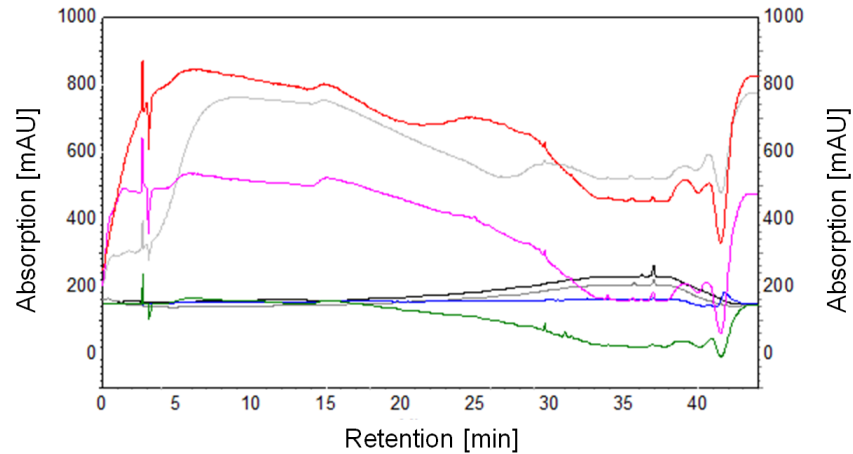


Abbildung 6.14: Einfluss der Säurekonzentration auf das Grundrauschen der Basislinie ohne Matrix. Analytlösung: Leerwert, Injektion: 5 μL , stationäre Phase: C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μm (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit Ameisensäure, Ameisensäurekonzentration in beiden Eluenten je: 0,0001% (schwarz), 0,001% (grau), 0,01% (blau), 0,05% (grün), 0,1% (rosa), 0,15% (grau), bzw. 0,2% (rot), mit jeweils +150 mAU, Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-95%, 30-35 min: 95% , 35-36 min: 95-3%, 36-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

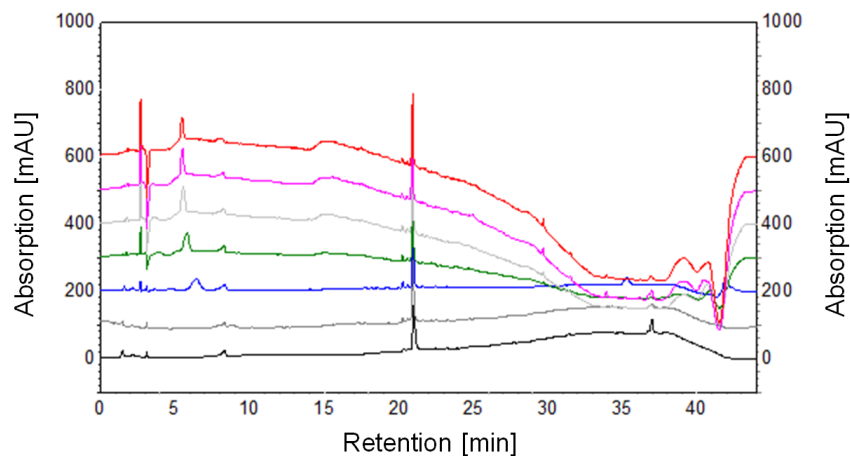


Abbildung 6.15: Einfluss der Säurekonzentration auf das Grundrauschen der Basislinie mit Matrix. Analytlösung: Drogenextrakt 5, Injektion: 5 μL , stationäre Phase: C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μm (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit Ameisensäure, Ameisensäurekonzentration in beiden Eluenten: 0,0001% (schwarz), 0,001% (grau), 0,01% (blau), 0,05% (grün), 0,1% (grau), 0,15% (rosa), bzw. 0,2% (rot), Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-95%, 30-35 min: 95%, 35-36 min: 95-3%, 36-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: DAD, 195 nm, HPLC-Anlage 1.

Genauer betrachtet gilt sowohl für die matrixfreie (Abbildung 6.14) als auch matrixhaltige (Abbildung 6.15) Lösung ein Abfall der Basislinie bei zunehmender Säurekonzentration mit steigendem Acetonitrilanteil. Bei niedrigeren Konzentrationen als 0,01% stieg sie bei Erhöhung des Acetonitrilanteils an. Dieses Optimum an Säurekonzentration ähnelt einer U-Kurve mit einem Optimum bei 0,01% Ameisensäure.

Angemerkt werden soll darüber hinaus, dass es für im Extrakt vermessenes Verbascosid - in Gegenwart von 0,01%, 0,001% bzw. 0,0001% Ameisensäure in beiden Eluenten - eine optisch sichtbare Peakverbreiterung mit abnehmender Säurekonzentration festgestellt werden konnte (Resultate nicht dargestellt). Schlussendlich wurde aufgrund der einstimmigen Daten ein Ameisensäurezusatz von 0,01% (v/v) in den beiden Eluenten A und B gewählt, was einem pH-Wert von 3,2 in Eluent A entspricht.

6.3.3 Detektion

Die relevanten IGs und PEs des Spitzwegerichs, die in einer HPLC-Screeningmethode simultan analysiert werden sollen, wurden mittels HPLC-DAD detektiert.

6.3.3.1 Analyten

Zur Definierung der Analysenwellenlänge wurde sich an den Absorptionsmaxima der einzelnen Verbindungen orientiert. Dazu wurden zum einen die UV-Spektren der im Vordergrund stehenden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol mittels UV-VIS-Spektrometer vermessen (Kapitel 6.5.3). Zum anderen, um den Einfluss der jeweiligen Fließmittelzusammensetzung auf das Absorptionsspektrum der Referenzen mitzubersichtigen, wurden die Absorptionsmaxima während des HPLC-Laufs im Peakmittelpunkt der entsprechenden Verbindung anhand des UV-Spektrums des DADs abgelesen.

Tabelle 6.2 fasst die erhaltenen Daten aus beiden Verfahren der zur Verfügung gestandenen Referenzsubstanzen zusammen und stellt sie einschlägigen Literaturwerten gegenüber. Darüber hinaus werden auch die IGs und PEs aus *P. lanceolata* berücksichtigt, die nicht als Referenzsubstanzen zur Verfügung standen.

Alle IGs besaßen ein Absorptionsmaximum im niederwelligen, unspezifischen Bereich von ≤ 190 -204 nm. Im Gegensatz zu Aucubin und Catalpol, die nur dieses eine Maximum im unspezifischen Absorptionsbereich zeigten, weisen Verbenalin und Asperulosid zudem ein zweites, charakteristischeres Absorptionsmaximum bei 236-238 nm auf. Globularin verfügt als einziges für *P. lanceolata* postuliertes IG über eine verknüpfte Zimtsäuregruppe, woraus ein vergleichsweise langwelliges, zweites Absorptionsmaximum von 283 nm resultiert.

Der Absorptionsverlauf hängt entscheidend von dem Vorhandensein freibeweglicher, anregbarer Elektronen im Molekül ab. Bei organischen Verbindungen gilt allgemein, dass Verbindungen ohne freie Elektronenpaare bzw. Doppelbindungen nicht per UV/VIS detektiert werden können, da diese lediglich dazu in der Lage sind Energieübergänge von $\sigma \rightarrow \sigma^*$ und $n \rightarrow \sigma^*$ fähig sind, die Anregungswellenlängen von 130 nm bzw. 200 nm entsprechen. Freie Elektronenpaare bzw. Doppelbindungen können $n \rightarrow \pi^*$ - und

$\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen unterliegen, wodurch sich ein Anregungs- bzw. Detektionsbereich von 200-700 nm ergibt. Konjugierte π -Elektronensysteme, auch chromophore Systeme genannt, senken das Anregungsenergieniveau und verschieben somit die Absorptionsmaxima zu höheren, energieärmeren Wellenlängen. Dieser Effekt wird als Bathochromie bzw. Rotverschiebung bezeichnet. [135]

Damit wird klar, warum Aucubin und Catalpol mit nur zwei bzw. einer Doppelbindung im Molekül, über nur ein Maximum bei ≤ 190 -195 nm verfügen, Globularin, Verbenalin und Asperulosid jedoch mit zusätzlichen bathochromen Carbonyl- und Acetylgruppen ein zweites, höheres Absorptionsmaximum bei 238 nm bzw. 237 nm aufweisen. Die hier experimentell ermittelten Daten stimmten mit denen der Literatur überein. Kleinere Abweichungen werden auf unterschiedliche, verwendete Lösungsmittel zurückgeführt.

Tabelle 6.2: Vergleich der UV-Maxima (λ_{\max}) der Referenzsubstanzen aus der Literatur mit den experimentell erhobenen Daten *via* Spektrometer in reinem Wasser bzw. *via* UV-Spektrum in der Peakmitte des jeweiligen Analyten während des HPLC-Laufs. Stationäre Phase: C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-10 min: 3-10%, 10-20 min: 10-33%, 20-25 min: 33-50%, 25-30 min: 50-95%, 30-35 min: 95%, 35-36 min: 95-3%, 36-44 min: 3% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 \pm 5 °C, Detektion: DAD, HPLC-Anlage 1.

Referenzsubstanz	λ_{\max} aus HPLC-Lauf [nm]	λ_{\max} <i>via</i> Spektrometer [nm]	λ_{\max} [nm] der Literatur
Catalpol	195	193	194 [157]
Aucubin	192	≤ 190	191 [157]
Verbenalin	$\leq 190, 238$	^a	236 [158]
Deacetylasperulosidsäuremethyl-ester	^b	^b	^b
Asperulosid	192, 237	^a	192, 239 [157]
Globularin	^b	^b	204, 217, 283 [157]
Plantamajosid	200, 215 <i>sh</i> , 280 <i>sh</i> , 328	^a	327 [16]
Verbascosid	200, 218 <i>sh</i> , 280 <i>sh</i> , 330	^a	198, 219, 250 <i>sh</i> , 290 <i>sh</i> , 331 [157], 347 [158], 330 [16]
Isoverbascosid	200, 220 <i>sh</i> , 280 <i>sh</i> , 329	^a	199, 218, 291, 328 [157]
Lavandulifoliosid	^b	^b	203, 219 <i>sh</i> , 242 <i>sh</i> , 291 <i>sh</i> , 333 [45], 251, 327 [16]

^a wurde nicht bestimmt

^b war nicht verfügbar

Um alle IGs detektieren zu können, wurde eine Detektionswellenlänge von 195 nm zur IG-Detektion ausgewählt. Aufgrund von Strukturähnlichkeiten wurde davon ausgegangen, dass bei dieser Wellenlänge auch die nicht als Referenzen vorliegenden IGs Globularin und Deactylasperulosidsäuremethylester bei dieser Wellenlänge problemlos detektiert würden. Erstmals in der Literaturhistorie wurde somit im Rahmen dieser Arbeit eine Detektionswellenlänge von unter 200 nm zur Detektion von IGs verwendet (Tabelle 1.12 in Kapitel 1.4.3). Auch die zu analysierenden PEs Lavandulifoliosid, Plantamajosid, Verbascosid und Isoverbascosid absorbieren im niederwelligen, unspezifischen Bereich von 200-203 nm. Außerdem verfügen sie aufgrund ihres chromophorreichen, substanzcharakteristischen Grundgerüsts über ein zweites, Hydroxyzimtsäure-typisches Absorptionsmaximum bei 328-330 nm. Wie diese Maxima zustandekommen, ist weiter oben im Text ausführlich erläutert. Die hier erhobenen Daten stimmten mit denen der Literatur überein. Kleinere Abweichungen sind auf unterschiedliche verwendete Lösungsmittel zurückzuführen. Da Verbascosid als Hauptphenylethanoid neben der qualitativen Erfassung auch quantifiziert werden sollte, stützt sich die Wahl der PE-Detektionswellenlänge auf das spezifische Absorptionsmaximum des Verbascosids. Aus diesem Grund findet die Detektion aller für *P. lanceolata* postulierten PEs in der entwickelten HPLC-Fingerprintmethode bei 330 nm statt. Die Nutzung einer spezifischen Detektionswellenlänge für die PEs begünstigt die Spezifität und Selektivität der generierten HPLC-Methode. Wegen der chemischen Struktur der IGs, konnte bei der IG-Detektion nicht auf eine spezifische Detektionswellenlänge zurückgegriffen werden. Die Miterfassung von Verbindungen anderer Stoffgruppen ist somit bei der IG-Detektion in der Fingerprintanalytik schwierig zu vermeiden und muss in der Methodvalidierung besonders berücksichtigt werden.

6.3.3.2 Hintergrundrauschen

Weiter wurde überprüft, inwiefern sich die variierende Zusammensetzung der mobilen Phase über den angewendeten Gradienten hinweg auf die Eigenabsorption und damit auf das Hintergrundrauschen auswirkt. Das Hintergrundrauschen wird im Verhalten der Basislinie widerspiegelt. Durch den eingesetzten Fließmittelgradienten zur HPLC-Fingerprintanalytik kommt es zu einem variierenden Anteil an Wasser und Acetonitril in der mobilen Phase. Die Säurekonzentration bleibt hingegen, durch Zusatz gleicher Mengen an Säure in beide Eluenten, über den gesamten Gradienten verteilt gleich. Ausgehend davon wurde UV-spektrometrisch evaluiert, wie die Absorption durch relevante Wasser-Acetonitril-Gemische in Gegenwart von 0,01% Ameisensäure beeinflusst wird. Außerdem wurden die Spektren von reinem Acetonitril, reinem Wasser sowie 0,01%iger Ameisensäure aufgenommen (Tabelle 6.3).

Anhand der gemessenen Absorptionsmaxima wird verständlich, dass das während des Laufs ermittelte UV-Spektrum in Abhängigkeit von der Fließmittelzusammensetzung leicht variiert. Deshalb können die UV-Spektren von Substanzen je nach Wasser-Acetonitril-Verhältnis andere oder zusätzliche Maxima aufweisen. Dies galt es im nächsten

Tabelle 6.3: UV-Maxima (λ_{\max}) relevanter Zusammensetzungen der mobilen Phase während des Gradientenlaufs, gemessen mittels UV-Spektrometer.

Analytlösung	λ_{\max} [nm]
0,01% Ameisensäure	200
Wasser	194
Wasser mit 0,01% Ameisensäure	202
Wasser/Acetonitril (1:1, v/v) mit 0,01% Ameisensäure	210
Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure	217
Acetonitril	191

Schritt der HPLC-Fingerprintmethodenentwicklung, der Validierung, insbesondere bei der Reinheitsbestimmung der Peaks, zu berücksichtigen.

6.3.4 Optimale HPLC-DAD-Fingerprintmethode

Letztendlich kristallisierte sich eine Methode an RP-Material als beste HPLC-Fingerprintmethode zur simultanen Erfassung des iridoidglykosidischen und phenylethanoidischen Inhaltstoffspektrums von *P. lanceolata* heraus, deren Parameter nachfolgend aufgelistet sind.

Tabelle 6.4: Relevante Parameter der entwickelten HPLC-Fingerprintmethode zur IG- und PE-Analytik.

Parameter	Einstellung
Stationäre Phase	C18e-Säule (Hibar [®] 250-4, Purospher [®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μ m, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Säulenofen	25 \pm 5 °C
Mobile Phase	
Eluent A	Wasser mit 0,01% Ameisensäure
Eluent B	Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure
Gradient	0-5 min: 0%, 5-15 min: 0-10%, 15-30 min: 10-33%, 30-35 min: 33-50%, 35-40 min, 50-98%, 40-49 min: 98%, 49-50 min: 98-0%, 50-60 min: 0% Eluent B
Fluss	1,0 mL/min
Detektor	DAD
Detektion der IGs	$\lambda = 195$ nm
Detektion der PEs	$\lambda = 330$ nm

Das daraus resultierende HPLC-DAD-Fingerprintchromatogramm eines Frischpflanzenextraktes des Spitzwegerichs gibt Abbildung 6.16 wieder.

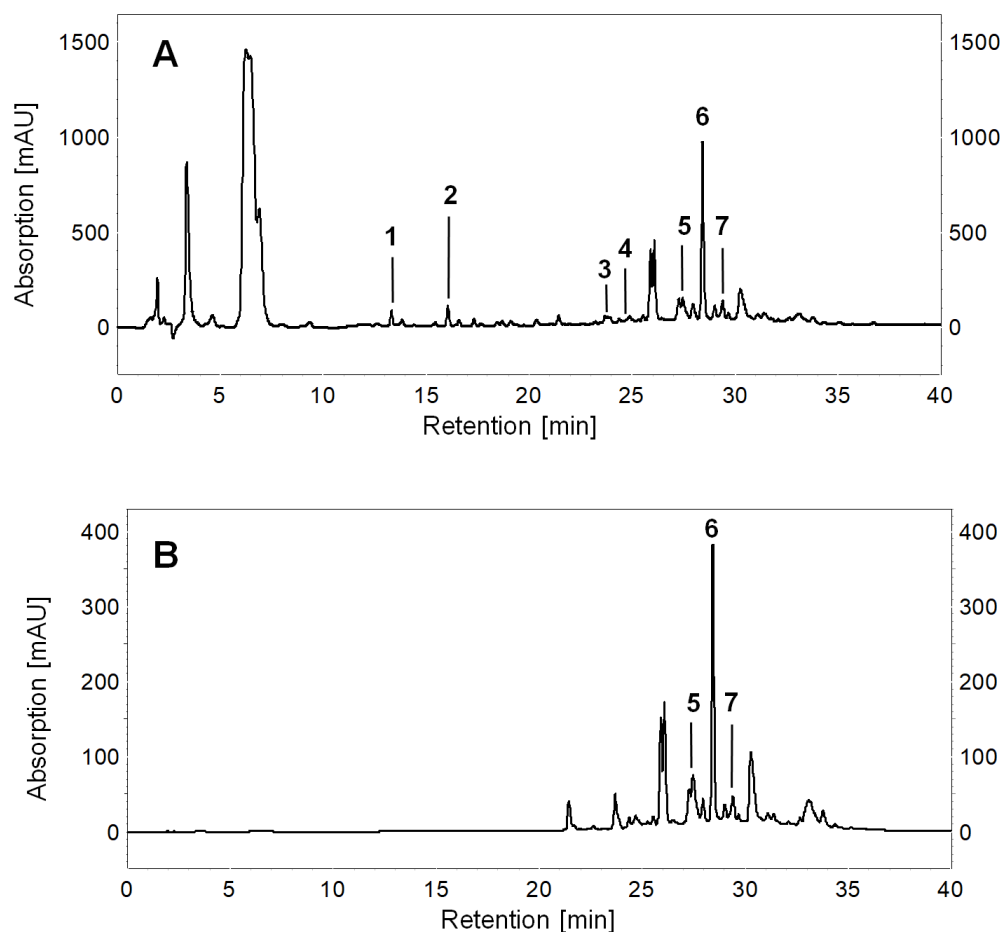


Abbildung 6.16: HPLC-Chromatogramm eines Frischpflanzenextrakts der Spitzweigerichblätter. Die Zuordnung der Peaks erfolgte anhand der Retentionszeiten der Referenzsubstanzen: Catalpol (1, $t_R = 13,3$ min), Aucubin (2, $t_R = 16,1$ min), Asperulosid (3, $t_R = 23,8$ min), Verbenalin (4, $t_R = 24,7$ min), Plantamajosid (5, $t_R = 27,5$ min), Verbascosid (6, $t_R = 28,4$ min) und Isoverbascosid (7, $t_R = 29,4$ min), Frischpflanzenextrakt 1, Injektion: $10 \mu\text{L}$, stationäre Phase: C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, $250 \times 4,0$ mm, $5 \mu\text{m}$ (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit $0,01\%$ Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit $0,01\%$ Ameisensäure, Gradient: 0-5 min: 0% , 5-15 min: $0-10\%$, 15-30 min: $10-33\%$, 30-35 min: $33-50\%$, 35-40 min: $50-98\%$, 40-49 min: 98% , 49-50 min: $98-0\%$, 50-60 min: 0% Eluent B, Fluss $1,0$ mL/min, Säulenofen: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, Detektion: DAD, 195 nm (A) bzw. 330 nm (B), HPLC-Anlage 1.

Anhand der Retentionszeiten der voneinander isoliert eluierenden Referenzsubstanzen Catalpol ($t_R = 13,3$ min), Aucubin ($t_R = 16,1$ min), Asperulosid ($t_R = 23,8$ min), Verbenalin ($t_R = 24,7$ min), Plantamajosid ($t_R = 27,5$ min), Verbascosid ($t_R = 28,4$ min) und Isoverbascosid ($t_R = 29,4$ min) konnten die entsprechenden Peaks im angewendeten Extrakt identifiziert werden.

Im Fingerprint des Frischpflanzenextraktes von *P. lanceolata* eluieren die relativ kleinen, polaren IGs im mittleren Bereich und die größeren PEs im hinteren Drittel des Chromatogramms. Geschuldet ist dies offenbar den größeren und vermutlich auch besser

zugänglichen unpolaren Bereichen der PEs im Vergleich zu den IGs, welche somit zu einer verstärkten Interaktion mit der unpolaren stationären Phase führen. Die zwei bis drei polaritätssteigernden Zuckereinheiten in den untersuchten PEs im Gegensatz zu den IGs, die nur über eine Zuckereinheit verfügen, scheinen dabei nebensächlich zu sein. Je größer dieser Interaktionsbereich ist, desto intensiver sind die retardierenden Wechselwirkungen und desto später ist die Elution von der Säule, was auch innerhalb der Stoffgruppen beobachtet werden kann.

HPLC-DAD/ESI-MSⁿ- (Kapitel 7.3.1.2) sowie HPLC-DAD/ESI-HRMS-Analysen (nicht dargestellt) bestätigten die Identität der Peaks. Die Reinheit bestimmter Peaks in diversen, pharmazeutisch relevanten Matrices konnte zudem mithilfe von HPLC-DAD/ESI-MSⁿ-Experimenten bewiesen werden (Kapitel 7.3.1.3). Weitere Validierungsparameter werden in Kapitel eingehend behandelt (Kapitel 7).

6.4 Zusammenfassung

Im Zuge der Methodenentwicklung einer geeigneten HPLC-DAD-Fingerprintmethode zu Screeningzwecken des iridoidglykosidischen und phenylethanoidischen Inhaltsstoffspektrums in *P. lanceolata* kamen insgesamt elf verschiedene Säulen, bestehend aus den insgesamt fünf Materialien Diol, HILIC, Phenylhexyl, Biphenyl, C18(e) und C8e zum Einsatz. Dabei ist festzuhalten, dass HPLC-Methoden zur Analytik diverser IGs in der Literatur vor allem für C18(e)-Säulen beschrieben wurden. Diolmaterial wurden nach aktuellem Wissenstand nur in einer Literaturquelle als geeignete stationäre Phase zur IG-HPLC-Analytik befunden. Die restlichen, getesteten stationären Phasen fanden bis *dato* in der Wissenschaft noch keine Beachtung. Die RP bzw. RP-artigen Materialien C8e und C18e bzw. Phenylhexyl und Biphenyl zeigten höheres chromatographisches Trennpotential als Normalphasen- bzw. inverse RP-Systeme, wie Diol- und HILIC-Säule. Interessant war dabei, dass bei den RP(-artigen)-Materialien die Elutionsreihenfolge der Analyten Verbascosid und Plantamajosid variierte, während die restlichen vermessenen Referenzen stets in der gleichen Reihenfolge retardierten. Konkret eluierte Verbascosid an Phenylhexyl- und Biphenylmaterial vor Plantamajosid, wohingegen die Retention an stationärer C8e- und C18(e)-Phase umgekehrt verlief. Dies wird auf die jeweiligen funktionellen Gruppen der stationären Phasen zurückgeführt, die der entscheidende Faktor für die Stärke der Wechselwirkungskräfte zwischen Analyt- und stationärem Material sind. Folglich kann Verbascosid offensichtlich über seine zwei Kaffeesäure- und Phenylethanoidstruktur stärker mit den Alkylketten der C8e- und C18e-Säulen interagieren und so länger in der Säule verbleiben als Plantamajosid, das nur eine Caffeoyleinheit aufweist; *vice versa* bei stationärem Phenylhexyl- und Biphenylmaterial. Alles in allem war die Elutionsreihenfolge an den getesteten RP(-artigen)-Materialien wie folgt: Catalpol, Aucubin, Asperulosid, Verbenalin, Plantamajosid/Verbascosid, Isoverbascosid. Die Elution der betrachteten IGs grenzte sich von der der untersuchten PEs im Chromatogramm räumlich bzw. zeitlich ab. Eine Differenzierung der Verbindungen der beiden unterschiedlichen Stoffgruppen kann somit, neben den erarbeiteten, stoffgruppenspezifi-

schen Detektionswellenlängen 195 nm und 330 nm zur IG- bzw. PE-Analytik, auch über die Zeit im Chromatogramm erfolgen. In der mobilen Phase zeichneten sich aufgrund ihrer geringen Eigenabsorptionsaktivität, der geringen Dichte sowie einer geringen Volumenausdehnungen bei Mischprozessen im Gradientenlauf Wasser und Acetonitril als einzige, geeignete Elutionsmittel aus. Ein optimaler Säurezusatz von 0,01% Ameisensäure zu den beiden Eluenten A und B der mobilen Phase konnte experimentell ermittelt werden. Schwankungen des Hintergrundrauschens bzw. der Basislinie konnten durch eine konstante Säurekonzentration von 0,01% in der mobilen Phase während des gesamten Gradientenlaufs minimiert werden. Die Zugabe von Ameisensäure wurde hierbei der von Phosphorsäure vorgezogen, obwohl letztere ein deutlich geringeres Hintergrundrauschen und damit sowohl eine konstantere, linearere Basislinie als auch eine höhere Sensitivität gegenüber den Analyten hervorbrachte. Da die Detektion bei 195 nm *via* DAD nur bedingt zur aussagekräftigen Bestimmung diverser Validierungsparameter der IGs, wie z.B. der Peakreinheitsbestimmung war, war ein Abgleich mit entsprechenden HPLC-DAD-MS-Messungen unabdingbar. In Hinblick auf die Absorptionsmaxima, wurde die Detektion der IGs und PEs bei 195 nm bzw. 330 nm vollzogen. Als Entscheidungsgrundlage zur Bestimmung der besten HPLC-Fingerprintmethode dienten Analysen mit relevanten Referenzsubstanzen sowie diversen Spitzwegerichextrakten. Schlussendlich konnte eine geeignete HPLC-DAD-Methode zur Fingerprintanalytik von IGs und PEs in *P. lanceolata* generiert werden. Anhand der Retentionszeiten ausgewählter Vertreter der jeweiligen Stoffgruppen sowie Informationen aus HPLC-DAD/ESI-MSⁿ- und HPLC-DAD-ESI-HRMS-Analysen konnten Identität und Reinheit für diese ausgewählten Verbindungen in diversen, pharmazeutisch relevanten Matrices bestätigt werden. Diese entwickelte HPLC-DAD-Methode wurde im späteren Verlauf der Arbeit eingehend validiert (Kapitel 7).

Es ist hierbei anzumerken, dass eine HPLC-DAD-Fingerprintmethode mit Detektion vieler relativ ähnlich polarer Verbindungen bei 195 nm in einem Rohextrakt eine äußerst komplexe analytische Herausforderung darstellt, weswegen es sich bei der in dieser Arbeit entwickelten Methode um eine Kompromisslösung handelt. So verläuft zum Beispiel die Basislinie nicht über den gesamten Detektionsbereich linear sondern unterliegt gradientenabhängigen Schwankungen. Auf Basis der in dieser Arbeit erhobenen Daten kann in fortführenden Arbeiten an einer Optimierung der hier entwickelten Methode angesetzt werden.

6.5 Material und Methoden

6.5.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

Die angewendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Software sind in Kapitel 10 angegeben. Verwendetes Acetonitril und Methanol für die HPLC-Analytik waren von HPLC grade Qualität. Das eingesetzte Wasser wurde von einer Milliporefilteranlage bezogen und lag stets unter $0,077 \mu\text{S}/\text{cm}$. In der mobilen Phase zugesetzte Säuren waren analyserein. Informationen zur HPLC-Analytik stehen zudem in Kapitel 6.5.4.

6.5.2 Verwendete Referenzen, Analytlösungen, Leerwerte und Extrakte

Während der gesamten HPLC-Methodenentwicklung wurden alle in Kapitel 10.2 angegebenen Referenzsubstanzen verwendet, sofern sie zu dem jeweiligen Zeitpunkt der Methodenentwicklung zur Verfügung standen. Weitere Informationen zu den jeweils verwendeten Analytlösungen sind den Abbildungsbeschriftungen der zugehörigen Chromatogramme zu entnehmen. Als Leerwert wurden entweder Acetonitril, Methanol, Wasser, Methanol-Wasser- oder Acetonitril-Wasser-Gemische eingesetzt. Drogenextrakte bestanden aus pulverisiertem Drogenmaterial 1 und 2 (Kapitel 10.5). Detaillierte Informationen zum eingesetzten Frischpflanzenmaterial befinden sich in Kapitel 7.5.2.

Folgende Extrakte fanden in der HPLC-Methodenentwicklung Anwendung:

- Drogenextrakt 1: 1,0 g Drogenmaterial 2 wurde mit 8 mL eines Acetonitril p.a.-Wasser-Gemisches (1:1, v/v) versetzt, für 30 min im Ultraschallbad extrahiert, durch einen Faltenfilter in einem 10 mL-Messkolben filtriert, zweimal nachgespült und anschließend bis zur Markierung aufgefüllt. Die Endkonzentration belief sich damit auf 100 mg/mL. Vor analytischen Gebrauch wurde der Extrakt durch einen $0,20 \mu\text{m}$ Filter filtriert.
- Drogenextrakt 2: 10,0 g Drogenmaterial 1 wurde mit einem 126 mL Ethanol HSL-Wasser-Gemisch (70:30, v/v) *via* automatischer Feststoffextraktion (ASE) bei RT in fünf Zyklen für je 5 min pro Zyklus mit einem 60%igem Spülvolumen und einer Purgezeit von 100 s im Zelltyp SST extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde gefriergetrocknet (Kapitel 3.5.5). Der trockene Extrakt (3,6 g) wurde in einen 50 mL-Messkolben überführt und bis zur Markierung mit Wasser aufgefüllt (Endkonzentration $0,07 \text{ g}/\text{mL}$). Vor dem analytischen Gebrauch wurde der Extrakt erst über Watte, dann durch einen $0,20 \mu\text{m}$ Filter filtriert.
- Drogenextrakt 3: 1:10 Verdünnung des filtrierten Drogenextrakts 2 mit einer Endkonzentration von $7,2 \text{ mg}/\text{mL}$.
- Drogenextrakt 4: 1:50 Verdünnung des filtrierten Drogenextrakts 2 mit einer Endkonzentration von $1,4 \text{ mg}/\text{mL}$.
- Drogenextrakt 5: 1:10 Verdünnung des filtrierten Drogenextrakts 1 mit einer Endkonzentration von $10 \text{ mg}/\text{mL}$.

- Drogenextrakt 6: 0,3 g Drogenmaterial 2 wurde mit 8 mL Wasser versetzt, für 30 min im Ultraschallbad extrahiert, durch einen Faltenfilter in einem 10 mL-Messkolben filtriert, zweimal nachgespült und anschließend bis zur Markierung aufgefüllt. Die Endkonzentration belief sich somit auf 30 mg/mL. Vor dem analytischen Gebrauch wurde der Extrakt durch einen 0,20 µm Filter filtriert.
- Frischpflanzenextrakt 1: 3,1 g Frischpflanzenmaterial (Kapitel 10.4.1) wurde mit 8 mL Wasser versetzt, für 30 s mit dem Ultraturax (Stufe 1) zerkleinert, 15 min im Ultraschallbad extrahiert, durch einen Faltenfilter in einem 10 mL-Messkolben filtriert, zweimal nachgespült und anschließend bis zur Markierung aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug 0,03 g/mL. Vor dem analytischen Gebrauch wurde der Extrakt durch einen 0,20 µm Filter filtriert.
- Fermentationsextrakt 1, 2 und 3: Informationen sind Kapitel 10.3 zu entnehmen.

6.5.3 UV-spektrometrische Analysen

UV-Spektren wurden mittels UV-Spektrometer Cary 50 Scan und Software Cary WinUV 3.00(182) der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Die Spektren der Referenzen Aucubin (Artikel Nr. 89163, Charge Nr. 5970) und Catalpol (Artikel Nr. 89595, Charge Nr. 1344) von Phytolab (Vestenbergsgreuth, Deutschland) wurden dazu in Wasser gelöst und in einem Wellenlängenbereich von 190-800 nm vermessen (Kapitel 6.3.3.1). Die Spektren der diversen Lösungsmittelzusammensetzungen wurden in einem Bereich von 190-400 nm gescannt (Kapitel 6.3.3.2). Das eingesetzte Wasser (0,056 µS/cm) wurde analog der Referenzen UV-spektrometrisch im gesamten Messbereich auf seine Reinheit hin überprüft. Es wies keinerlei Absorption im gesamten Messbereich auf.

6.5.4 HPLC-Analytik

Zur Methodenentwicklung des Fingerprints der IGs und PEs in *P. lanceolata* kamen die zwei HPLC-Anlagen 1 und 2 zum Einsatz (Kapitel 10.8). Alle HPLC-Säulen, die in Kapitel 10.5 aufgelistet sind, wurden im Rahmen der HPLC-DAD-Fingerprintmethodenentwicklung getestet. Jeweilige stationäre sowie mobile Phasen sind den jeweiligen Chromatogrammabbildungen zu entnehmen. Die eingesetzten Injektionsvolumina variierten mit dem Trennvermögen der Säule, der Analytkonzentration und der Detektionsintensität.

6.5.5 HPLC-DAD/ESI-HRMS- und MSⁿ-Analytik

Informationen zur HPLC-DAD/ESI-HRMS- und MSⁿ-Analytik sind im Validierungsteil in den Kapiteln 7.5.14 und 7.5.15 zu finden.

Kapitel 7

Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode

7.1 Hintergrund und Motivation

Ein Ziel dieser Dissertation bestand in der Erforschung der Inhaltsstoffspektren der IGs bzw. PEs in den Blättern von *P. lanceolata* im Verlauf unterschiedlicher Blütestadien. Um abgesicherte, qualitative sowie quantitative Aussagen über ausgewählte Vertreter der beiden Stoffgruppen treffen zu können, war es notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HPLC-DAD-Fingerprintmethode zum Screening der IGs sowie PEs zu validieren (Kapitel 6.3.4, Kapitel 6.4). Qualitativ und semi-quantitativ bewertet werden können, sollten dabei die prominentesten IGs Aucubin, Catalpol, Verbenalin, Asperulosid, Globularin und Deacetylasperulosidsäuremethylester sowie die prominentesten PEs Verbascosid, Plantamajosid, Isoverbascosid und Lavandulifoliosid. Im Vergleich zu den meisten, herkömmlichen Validierungsprozessen, wurde in dieser Arbeit den substanziellen Validierungsparametern Selektivität und Spezifität besondere Beachtung geschenkt [159], da in vorangegangenen Experimenten dieser Dissertation eine gewisse Unsicherheit bezüglich der tatsächlichen Identität der betrachteten Verbindungen, durch potentiell neu entdeckte Isomere, gezeigt werden konnte (Kapitel 4 bzw. Kapitel 4.2.3).

Die entwickelte HPLC-DAD-Methode sollte zur Quantifizierung der Hauptkomponenten der Stoffgruppen der IGs und PEs, nämlich Aucubin und Catalpol bzw. Verbascosid, dienen, um den Einfluss unterschiedlicher Vegetationsstadien beurteilen zu können. Zur Evaluierung quantitativer Auswirkungen sollte, durch die Bearbeitung der Parameter Linearität, Messbereich, LOD, LOQ, Robustheit, Präzision und Richtigkeit der Methode, sichergestellt werden, dass die Gehalte der Hauptkomponenten der beiden bioaktiven Stoffgruppen einwandfrei bestimmt werden können. Als unabdingbar wurde dabei die Berücksichtigung des im Untersuchungsmaterial befindlichen Wassers angesehen, welcher einen wesentlichen Einfluss auf den ermittelten Substanzgehalt ausübt. Da für die Fingerprintuntersuchungen Frischpflanzen (FP) herangezogen wurden, erschien es sinnvoll, für

die Methodvalidierung ebenso FP-Material anstelle von Drogenmaterial zu verwenden. Die zu einem definierten Zeitpunkt geernteten FPs wurden bis zum Validierungsprozess tiefgefroren gelagert, wodurch sich z.T. unregelmäßig viel externes Wasser (Eiskristalle) unentfernbar anlagerte. Neben der Validierung der entwickelten HPLC-Methode war es deshalb erforderlich, eine geeignete Aufarbeitungsmethode zur Bestimmung des internen und externen Wassergehalts des gefrorenen Frischpflanzenmaterials herauszuarbeiten.

7.2 Strategie

Die in dieser Arbeit vorgenommene Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) richtete sich nach den Vorgaben der harmonisierten ICH-Richtlinie Q2 zur Validierung analytischer Verfahren von 2005 [160], welche die Validierungsparameter Linearität, Messbereich, Präzision, Richtigkeit, Detektions- (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ), Robustheit, Spezifität und Selektivität definiert.

Als ersten Schritt im Validierungsprozess sollten die Spezifität und Selektivität der ausgewählten IGs und PEs im Fingerprintchromatogramm des Extraktes bestimmt werden. Die Peakzuordnung fand mithilfe verfügbarer Referenzsubstanzen und Literaturdaten statt. Als Zuordnungsparameter der verfügbaren Referenzsubstanzen (Aucubin, Catalpol, Verbenalin, Asperulosid, Verbascosid, Plantamajosid und Isoverbascosid) wurden Retentionszeiten, UV-Spektren sowie MSⁿ-Daten herangezogen. Die Identifizierung der ausgewählten Verbindungen, die nicht verfügbar waren (Globularin, Deacetylasperulosid-säuremethylester und Lavandulifoliosid), basierte ausschließlich auf einem Abgleich der MS bzw. MSⁿ-Daten aus der Literatur. Für Aucubin, Catalpol und Verbascosid wurde die Peakreinheit *via* LC-DAD/ESI-MSⁿ-Experimenten untersucht. Das im HPLC-Lauf per DAD aufgenommene UV-Spektrum ist dabei nur bedingt geeignet, da es keine Unterscheidung von Substanzen einer Stoffgruppe bzw. mit gleichen Struktureinheiten zulässt. Eine höhere Aussagekraft zur Peakreinheit wurde stattdessen von dem masseabhängigen und empfindlicheren MS-Detektor [135, Seite 6-36] erwartet. Die durch MSⁿ-Schaltung resultierenden Fragmentierungsmuster boten dabei ergänzende Informationen.

Nach Absicherung der Peakidentität und -reinheit wurden im Rahmen der Validierung der entwickelten HPLC-DAD Fingerprintmethode, als zweiter Schritt, Aucubin, Catalpol und Verbascosid auf die restlichen Validierungsparameter hin untersucht: Linearität, Messbereich, LOD, LOQ, Präzision, Robustheit und Richtigkeit, wobei in Vorversuchen (nicht gezeigt) der Kalibrierbereich zunächst grob eingegrenzt wurde.

7.2.1 Spezifität und Selektivität

„Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren. [...] Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, eine Substanz oder eine Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren.“ [161, Seite 119]

Zur Ermittlung der Identität der ausgewählten Inhaltsstoffe wurde ihre spezifische Retentionszeit sowie das dazugehörige UV/VIS-Spektrum verwendet, die aus den Daten der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) resultierten und direkt abgelesen werden konnten.

Die Bestimmung der Peakreinheit anhand der HPLC-DAD-Messung war jedoch ungeeignet. Grund war die zugesetzte Ameisensäure in der mobilen Phase (Kapitel 6.3.3.2), welche insbesondere bei kleinen Peaks die Reinheitsbestimmung durch ihre Eigenabsorption verfälschte (Ergebnisse nicht dargestellt). Generell konnten die chromophorarmen IGs, die nur im kurzwelligen UV-Bereich eine (maximale) Absorption aufweisen, von anderen, coeluierenden Substanzen mittels DAD und erst recht bei der experimentell festgelegten Detektionswellenlänge von 195 nm nicht verlässlich voneinander differenziert werden. Zur Überprüfung der Selektivität wurde deshalb eine zusätzliche Detektionsart gewählt, die nicht absorptionsbasiert ist. Als Lösung schien der Einsatz von LC-DAD/ESI-MSⁿ-Analysen mit Ionenfalle am sinnvollsten. Vorteilhaft hierbei war, dass die entwickelte HPLC-DAD-Methode eins zu eins übernommen werden konnte. Zudem ermöglichte der wesentlich empfindlichere MSⁿ-Detektor die Detektion geringerer Mengen an Verunreinigungen als der im Vergleich dazu unempfindliche DAD [Seite 6-36][135]. Ein weiterer positiver Aspekt der LC-DAD/ESI-MSⁿ-Analytik stellte darüber hinaus die substanzcharakterisierende Zusatzinformation über das jeweilige Fragmentierungsmuster dar. Die Vorzüge des LC-DAD/ESI-MSⁿ-Verfahrens gelten gleichermaßen für die zu analysierenden PEs, welche simultan und auf die gleiche Weise wie die IGs charakterisiert wurden, obwohl sie ein charakteristisches UV-Maximum bei etwa 330 nm aufweisen. Dieses ist allerdings nicht spezifisch genug für die Stoffgruppe der PEs, da es auch bei anderen phenolischen Verbindungen auftreten kann.

7.2.2 Messbereich

Der Messbereich einer Methode, auch Arbeitsbereich [161] oder *range* [160, 161] genannt, orientiert sich an der Substanzmenge in den zu untersuchenden Pflanzenproben [160, 161]. Sein Intervall wird durch die niedrigste und höchste, gemessene Analytkonzentration in der Untersuchungsprobe definiert, wobei üblicherweise Grenzen von 80-120% der mittleren Konzentration als Unter- bzw. Obergrenze angesetzt werden [160, 162]. Für diesen kompletten Bereich müssen entsprechend Präzision, Richtigkeit sowie Linearität gewährleistet werden [160].

Die Validierung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) stand dabei vor dem Problem, dass der Umfang an zu untersu-

chenden Frischpflanzenproben zu groß war, um sie zur ordentlichen Prognostizierung des Messbereichs alle einmal aufzuarbeiten und zu vermessen. Weder ein benötigter, aussagekräftiger Mittelwert aller relevanter Frischpflanzenproben wurde gebildet noch begrenzende, maximale und minimale Substanzkonzentration der Pflanzenproben ermittelt, um den Konzentrationsbereich der zu untersuchenden Analyseproben zu prognostizieren. Stattdessen wurde der Arbeitsbereich anhand von wenigen Stichproben in Vorversuchen grob ermittelt (Kapitel 7.5.6) und dem Linearitätsbereich angepasst, wobei die entsprechenden LODs und LOQs berücksichtigt wurden. Messbereiche und Linearitätsbereiche sind somit identisch (Tabelle 7.5 in Kapitel 7.4). Innerhalb dieser Bereiche wurden jeweils die Parameter Präzision, Robustheit und Richtigkeit bestimmt.

Bei der Analytik der Frischpflanzenproben wurde die Einhaltung des Arbeitens im validen Messintervall über Anpassung der Injektionsvolumina der später durchgeführten Analysen gesteuert. Dies war zeitlich praktikabler, zumal die Substanzmengen in manchen Proben so gering waren, dass eine Detektion nur durch eine Erhöhung des Injektionsvolumens möglich war. Die Änderung des Injektionsvolumens im Rahmen einer validierten Methode kann eine zusätzliche Fehlerquelle bei nicht akkurat eingestellten Autosamplern darstellen [135]. Eine direkt vor Beginn des Validierungsprozesses durchgeführte Wartung der genutzten HPLC-Anlage sollte diesem Fehler minimal und vernachlässigbar halten.

7.2.3 Linearität

Einen weiteren Validierungsparameter der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) stellte die Bestimmung der Linearität dar. Dazu wurde für Aucubin, Catalpol und Verbascosid jeweils separat eine äquidistante Verdünnungsreihe aus der matrixfreien Analytlösung erstellt ($n=6$) und *via* der entwickelten HPLC-Methode ($n(\text{Injektion})=2$, Kapitel 6.3.4) vermessen. Initial wurden hierbei sechs Kalibrierungspunkte angesetzt. Ergab sich keine lineare Funktion, wurde der Messbereich verkleinert. Dabei wurden entweder die oberen oder die unteren Endpunkte des Kalibrierbereichs ausgeschlossen, da bei genügend hohen und genügend kleinen Konzentrationen häufig keine linearen Zusammenhänge zwischen Konzentration und Messsignal mehr vorliegen. Das Minimum an erforderlichen fünf Kalibrierpunkten zur Linearitätsentscheidung wurde hierbei beachtet. Die äquidistante Verteilung der Messwerte ermöglichte eine gleichmäßige Gewichtung der einzelnen Kalibrierpunkte bei der Ermittlung des Linearitätszusammenhangs. Mithilfe der erhaltenen Daten wurde eine Kalibrierfunktion sowie entsprechende Parameter *via* Excel berechnet. Der getestete Konzentrationsbereich wurde durch gezielte Experimente bereits im Vorfeld eingegrenzt (Kapitel 7.5.6). Die angewendeten Rechenwege gemäß den Ausführungen von Gottwald [163] sind am Ende dieses Unterkapitels aufgeführt.

Die Entscheidung, ob die Kalibrierfunktion einem linearen oder quadratischen Beziehung folgte, wurde anhand des Vergleichs der relativen Verfahrensstandardabweichung V_{x0} aus linearer und quadratischer Regression getroffen [163]. Die zugehörigen Rechenschritte gemäß den Vorgaben von Gottwald [163] befinden sich in Kapitel 7.2.3.1 bzw. 7.2.3.2. Der Test auf Linearität fiel positiv aus, wenn die relative Verfahrensstan-

Standardabweichung V_{x0} der linearen Regression kleiner war als die der quadratischen [161, 163]. Bei Nichterfüllung dieser Bedingung, wurde der Anpassungstests nach Mandel durchgeführt (Kapitel 7.2.3.3), welcher eine lineare Annahme trotz quadratischem Zusammenhang legitimiert, sofern die Abweichung von der Idealform vernachlässigbar erscheint [161, 163]. Dazu wurde die entsprechende Prüfgröße PG über die Restvarianzdifferenz Δs_y^2 berechnet und mit den korrelierenden Werten aus der F -Tabelle (99% bzw. 95%) verglichen [161]. Die Annahme der Linearität wurde akzeptiert, wenn die ermittelte Prüfgröße PG kleiner als der F -Wert aus der entsprechenden F -Tabelle war [161, 163].

7.2.3.1 Lineare Regression

In diesem Unterkapitel sind die verwendeten Formeln zur Ermittlung der linearen Regression dargestellt. Sie basieren auf den statistischen Ausführungen von Gottwald [163].

Gleichung 3: **Allgemeine Formel der linearen Funktion**, wobei y : Fläche [AUC], m : Steigung der linearen Kalibriergerade, x : Analytkonzentration [mg/mL], b : Ordinatenabschnitt.

$$y = m \cdot x + b \quad (7.1)$$

Gleichung 4: Formel zur Berechnung der **Steigung m** der linearen Kalibriergeraden, wobei Q_{xy} : Quadratsumme der x - und y -Werte, Q_{xx} : Quadratsumme der x -Werte, x : Analytkonzentration [mg/mL], y : Fläche [AUC].

$$m = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} \quad (7.2)$$

Gleichung 5: Formel zur Berechnung der **Quadratsumme Q_{xy}** der x - und y -Werte, wobei y : Fläche [AUC], b : Ordinatenabschnitt, N : Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$Q_{xy} = \sum(x_i \cdot y_i) - \frac{\sum y_i \cdot \sum x_i}{N} \quad (7.3)$$

Gleichung 6: Formel zur Berechnung der **Quadratsumme Q_{xx}** der x -Werte, wobei x : Analytkonzentration [mg/mL], N : Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (7.4)$$

Gleichung 7: Formel zur Berechnung der **Quadratsumme** Q_{yy} der y-Werte, wobei y: Fläche [AUC], N: Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$Q_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (7.5)$$

Gleichung 8: Formel zur Berechnung des **Ordinatenabschnitts** b , wobei \bar{y} : Arbeitsbereichsmittle der abhängigen Größe (Fläche [AUC]), m : Steigung der linearen Kalibriergeraden, \bar{x} : Arbeitsbereichsmittle der unabhängigen Größe (Analytkonzentration [mg/mL]).

$$b = \bar{y} - m \cdot \bar{x} \quad (7.6)$$

Gleichung 9: Formel zur Berechnung der **Arbeitsbereichsmittle** \bar{x} der unabhängigen Größe x (Analytkonzentration [mg/mL]), wobei N: Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} \quad (7.7)$$

Gleichung 10: Formel zur Berechnung der **Arbeitsbereichsmittle** \bar{y} der abhängigen Größe (Fläche [AUC]), wobei N: Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{N} \quad (7.8)$$

Gleichung 11: Formel zur Berechnung der **Reststandardabweichung** s_{yL} der linearen (L) Kalibrierfunktion als Maß der Streuung der y-Werte um die Regressionsgerade, wobei y: Fläche [AUC], m : Steigung der linearen Kalibriergeraden, x : Analytkonzentration [mg/mL], b : Ordinatenabschnitts, N: Anzahl der Kalibrierpunkte, Q_{yy} : Quadratsumme der y-Werte, Q_{xy} : Quadratsumme der x- und y-Werte, Q_{xx} : Quadratsumme der x-Werte.

$$s_{yL} = \sqrt{\frac{\sum [y_i - (m \cdot x_i + b)]^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{Q_{yy} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{xx}}}{N - 2}} \quad (7.9)$$

Gleichung 12: Formel zur Berechnung der **Verfahrensstandardabweichung** s_{x0} der linearen Kalibrierfunktion, wobei s_{yL} : Reststandardabweichung der linearen (L) Kalibrierfunktion, m : Steigung der linearen Kalibriergeraden.

$$s_{x0} = \frac{s_{yL}}{m} \quad (7.10)$$

Gleichung 13: Formel zur Berechnung der **relativen Verfahrensstandardabweichung** V_{x0} der linearen Kalibrierfunktion, wobei s_{x0} : Verfahrensstandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion, \bar{x} : Arbeitsbereichsmittle der unabhängigen Größe (Analytkonzentration [mg/mL]).

$$V_{x0} = \frac{s_{x0} \cdot 100}{\bar{x}} [\%] \quad (7.11)$$

Die gemäß den oben stehenden Formeln kalkulierten Parameter der linearen Kalibrierfunktion [163] wurden mittels expliziten Excelbefehlen kontrolliert und ergänzt. Die verwendeten Excelbefehle der betrachteten Kriterien sind in Tabelle 7.1 aufgeführt.

Tabelle 7.1: Übersicht der angewendeten Excelbefehle (Microsoft Excel Version 2016) zur Bestimmung relevanter Parameter der linearen Kalibrierfunktion bzw. Regressionsgeraden, wobei „x“ die Konzentration der Analysesubstanzen und „y“ die gemittelte resultierende Fläche [AUC] der gemessenen Absorption [mAU] bei $n=6$ (gemittelte Injektionsduplikate entsprechen $n=1$) wiedergibt. „Y_Werte“ bzw. „X_Werte“ werden im Excel-Sheet als „y₁:y_n“ bzw. „x₁:x_n“ dargestellt. „Matrix1“ bzw. „Matrix2“ werden im Excel-Sheet ebenfalls durch die Eingabe „y₁:y_n“ bzw. „x₁:x_n“ generiert. Der Excelbefehl „Zahl1; [Zahl2];...“ wird im Excel-Sheet als „y₁:y_n“ ausgedrückt. Für „x“ des Regressionswertes der Regressionsgeraden wurde jeweils die höchste Analytkonzentration [mg/mL] eingesetzt.

Parameter	Excelbefehl
Steigung	=STEIGUNG(Y_Werte;X_Werte)
Achsenabschnitt	=ACHSENABSCHNITT(Y_Werte;X_Werte)
Bestimmtheitsmaß	=BESTIMMTHEITSMASS(Y_Werte;X_Werte)
Reststandardabweichung	=STFEHLER(Y_Werte;X_Werte)
Korrelationskoeffizient nach Korrel	=KORREL(Matrix1;Matrix2)
Korrelationskoeffizient nach Pearson	=PEARSON(Matrix1;Matrix2)
Summe der Abweichungsqua- drate vom Mittelwert	=SUMQUADABW(Zahl1;[Zahl2];...)

7.2.3.2 Quadratische Regression

In diesem Unterkapitel sind die verwendeten Formeln zur Ermittlung der quadratischen Regression dargestellt. Sie entsprechen den statistischen Grundlagen von Gottwald [163].

Gleichung 14: **Allgemeine Formel der polynomischen Funktion**, wobei y: Fläche [AUC], n: Steigung des quadratischen Funktionsabschnitts, x: Analytkonzentration [mg/mL], m: Steigung des linearen Funktionsabschnitts, b: Ordinatenabschnitt.

$$y = n \cdot x^2 + m \cdot x + b \quad (7.12)$$

Gleichung 15: Formel zur Berechnung der **Steigung n** des quadratischen Funktionsabschnitts der polynomischen Kalibrierfunktion, wobei Q_{xy} : Quadratsumme der x- und y-Werte, x: Analytkonzentration [mg/mL], y: Fläche [AUC], Q_{x^3} : Kubiksumme der x-Werte, Q_{x^2y} : Kubiksumme der x- und y-Werte, Q_{xx} : Quadratsumme der x-Werte, Q_{x^4} : Biquadrat der x-Werte.

$$n = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} \cdot Q_{x^4}} \quad (7.13)$$

Gleichung 16: Formel zur Berechnung der **Steigung m** des linearen Funktionsabschnitts der polynomischen Kalibrierfunktion, wobei Q_{xy} : Quadratsumme der x- und y-Werte, x: Analytkonzentration [mg/mL], y: Fläche [AUC], n: Steigung des quadratischen Funktionsabschnitts, Q_{x^3} : Kubiksumme der x-Werte, Q_{xx} : Quadratsumme der x-Werte.

$$m = \frac{Q_{xy} - n \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}} \quad (7.14)$$

Gleichung 17: Formel zur Berechnung des **Ordinatenabschnitts b**, wobei y: Fläche [AUC], m: Steigung des linearen Funktionsabschnitts, x: Analytkonzentration [mg/mL], n: Steigung des quadratischen Funktionsabschnitts, N: Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$b = \frac{\sum y_i - m \cdot \sum x_i - n \cdot \sum x_i^2}{N} \quad (7.15)$$

Gleichung 18: Formel zur Berechnung der **Quadratsumme Q_{xy}** der x- und y-Werte, wobei y: Fläche [AUC], b: Ordinatenabschnitt, N: Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$Q_{xy} = \sum (x_i \cdot y_i) - \frac{\sum y_i \cdot \sum x_i}{N} \quad (7.16)$$

Gleichung 19: Formel zur Berechnung der **Kubiksumme** Q_{x^3} der x-Werte, wobei x: Analytkonzentration [mg/mL], N: Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$Q_{x^3} = \Sigma(x_i^3) - \frac{\Sigma x_i \cdot \Sigma x_i^2}{N} \quad (7.17)$$

Gleichung 20: Formel zur Berechnung der **Biquadratsumme** Q_{x^4} der x-Werte, wobei x: Analytkonzentration [mg/mL], N: Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$Q_{x^4} = \Sigma(x_i^4) - \frac{(\Sigma x_i^2)^2}{N} \quad (7.18)$$

Gleichung 21: Formel zur Berechnung der **Kubiksumme** Q_{x^2y} der x- und y-Werte, wobei x: Analytkonzentration [mg/mL], y: Fläche [AUC], N: Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$Q_{x^2y} = \Sigma(x_i^2 \cdot y_i) - \frac{\Sigma y_i \cdot \Sigma x_i^2}{N} \quad (7.19)$$

Gleichung 22: Formel zur Berechnung der **Arbeitsbereichmitte** \bar{x} der unabhängigen Größe x (Analytkonzentration [mg/mL]) der quadratischen Regression ist identisch mit der der linearen Regression, wobei N: Anzahl der Kalibrierpunkte.

$$\bar{x} = \frac{\Sigma(x_i)}{N} \quad (7.20)$$

Gleichung 23: Formel zur Berechnung der **Reststandardabweichung** s_{yQ} der quadratischen (Q) Kalibrierfunktion als Maß der Streuung der y-Werte um die Regressionsgerade, wobei y: Fläche [AUC], m: Steigung der linearen Kalibriergeraden, x: Analytkonzentration [mg/mL], b: Ordinatenabschnitts, N: Anzahl der Kalibrierpunkte, Q_{yy} : Quadratsumme der y-Werte, Q_{xy} : Quadratsumme der x- und y-Werte, Q_{xx} : Quadratsumme der x-Werte.

$$s_{yQ} = \sqrt{\frac{\Sigma y_i^2 - b \cdot \Sigma y_i - m \cdot \Sigma(y_i \cdot x_i) - n \cdot \Sigma(y_i \cdot x_i^2)}{N - 3}} \quad (7.21)$$

Gleichung 24: Formel zur Berechnung der **Empfindlichkeit E** der quadratischen Kalibrierfunktion, wobei m : Steigung der linearen Kalibriergeraden, n : Steigung der linearen Kalibriergeraden, \bar{x} : Arbeitsbereichsmittle der unabhängigen Größe x (Analytkonzentration [mg/mL]).

$$E = m + 2 \cdot n \cdot \bar{x} \quad (7.22)$$

Gleichung 25: Formel zur Berechnung der **Verfahrensstandardabweichung s_{x0}** der quadratischen Kalibrierfunktion, wobei s_{yQ} : Reststandardabweichung der quadratischen (Q) Kalibrierfunktion, E : Empfindlichkeit.

$$s_{x0} = \frac{s_{yQ}}{E} \quad (7.23)$$

Gleichung 26: Formel zur Berechnung der **relativen Verfahrensstandardabweichung V_{x0}** der quadratischen Kalibrierfunktion, wobei s_{x0} : Verfahrensstandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion, \bar{x} : Arbeitsbereichsmittle der unabhängigen Größe (Analytkonzentration [mg/mL]).

$$V_{x0} = \frac{s_{x0} \cdot 100}{\bar{x}} [\%] \quad (7.24)$$

7.2.3.3 Test nach Mandel

Mithilfe des Tests nach Mandel wurde überprüft, ob, trotz Abweichung der erhaltenen Kalibrierfunktion von der idealen linearen Form, annäherungsweise eine direkt proportionale Relation angenommen werden durfte. Dazu wurden eine Prüfgröße PG aus den Reststandardabweichungen der quadratischen (s_{yQ}) und linearen (s_{yL}) Regressionsfunktion berechnet und mit dem entsprechenden F -Wert aus der F -Tabelle (95% bzw. 99%) verglichen. Der jeweilige F -Wert ergab sich aus den Freiheitsgraden f_1 und f_2 . Die Annahme auf Linearität wurde akzeptiert, wenn die Prüfgröße PG kleiner oder gleich dem F -Wert war, d.h. wenn kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Reststandardabweichungen vorlag [161, 163]. Da die Anzahl an Kalibrierpunkten der linearen (N_L) und der quadratischen (N_Q) Kalibrierfunktion identisch waren, gilt im Folgenden: $N_L = N_Q = N$ [161].

Gleichung 27: Formel zur Berechnung der **Prüfgröße PG** , wobei Δs^2 : Restvarianzdifferenz, s_{yQ} : Reststandardabweichung der quadratischen Regression.

$$PG = \frac{\Delta s^2}{s_{yQ}^2} \quad (7.25)$$

Gleichung 28: Formel zur Berechnung der **Restvarianzdifferenz** Δs^2 , wobei N_L : Anzahl an Kalibrierpunkten der linearen Kalibrierfunktion, N_Q : Anzahl an Kalibrierpunkten der quadratischen Kalibrierfunktion, N : Anzahl an Kalibrierpunkten, s^2_{yL} :

Reststandardabweichung der linearen Regression, s^2_{yQ} : Reststandardabweichung der linearen Regression.

$$\Delta s^2 = [(N_L - 2) \cdot s^2_{yL}] - [(N_Q - 3) \cdot s^2_{yQ}] = [(N - 2) \cdot s^2_{yL}] - [(N - 3) \cdot s^2_{yQ}] \quad (7.26)$$

Gleichung 29: Formel zur Berechnung des **Freiheitsgrades** f_1 , wobei N_L : Anzahl an Kalibrierpunkten der linearen Kalibrierfunktion, N_Q : Anzahl an Kalibrierpunkten der quadratischen Kalibrierfunktion, N : Anzahl an Kalibrierpunkten.

$$f_1 = (N_L - 2) - (N_Q - 3) = (N - 2) - (N - 3) = 1 \quad (7.27)$$

Gleichung 30: Formel zur Berechnung des **Freiheitsgrades** f_2 , wobei N_Q : Anzahl an Kalibrierpunkten der quadratischen Kalibrierfunktion, N : Anzahl an Kalibrierpunkten.

$$f_2 = N - 3 \quad (7.28)$$

7.2.3.4 Korrelationskoeffizient und Bestimmtheitsmaß

Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß r^2 wurden zur Evaluierung der Linearität der Kalibrierfunktion verwendet, obwohl ihre Eignung hierzu umstritten ist [163, 164]. Dabei gilt: je höher der Betrag von r bzw. r^2 , der zwischen 0 und 1 liegt, ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein direkt proportionaler Zusammenhang besteht [163]. Das Bestimmtheitsmaß r^2 ist aufgrund seiner mathematischen Formel das strengere Richtkriterium der beiden [163]. Korrelationskoeffizient und Bestimmtheitsmaß wurden mittels Excelbefehl ermittelt, um die Qualität der linearen Kalibrierfunktion bestimmen (Tabelle 7.1 in Kapitel 7.2.3.1). Dabei wurde der Korrelationskoeffizient sowohl nach Korrel als auch nach Pearson ermittelt. Korrelationskoeffizienten und Bestimmtheitsmaß von $\leq 0,99$ wurden hierbei als zusätzliche Bestätigung einer direkt proportionalen Beziehung erachtet [165]. Zusätzlich wurden zur Linearitätskontrolle die Grafiken der Kalibrierfunktion begutachtet, welches laut [164] die zupräferierende Variante zur Linearitätsverifizierung darstellt.

7.2.4 LOD und LOQ

Aus der Steigung der Kalibrierfunktion wurden die Parameter Detektionsgrenze (LOD) und Quantifizierungsgrenze (LOQ) bestimmt. LOD und LOQ stehen im mathematischen Zusammenhang mit den Konzentrationen, welche der Kalibrierfunktion zugrundeliegen. Die Berechnung des LODs und LOQs erfolgte anhand folgender Gleichungen. [161]

Gleichung 31: Formel zur Berechnung des **LODs**, wobei s_{yL}^2 : Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion, m : Steigung der linearen Kalibrierfunktion.

$$LOD = \frac{3,3 \cdot s_{yL}}{m} \quad (7.29)$$

Gleichung 32: Formel zur Berechnung des **LOQs**, wobei s_{yL}^2 : Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion, m : Steigung der linearen Kalibrierfunktion.

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{yL}}{m} \quad (7.30)$$

7.2.5 Präzision

Im Zuge der Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) wurde hier sowohl die Mess- als auch die Methodenpräzision bestimmt. Während die Methodenpräzision neben dem Fehler der chromatographischen Methode auch die Fehler der Einwaage und kompletten Probenaufarbeitung miteinschließt, gibt die Messpräzision nur das Maß des Fehlers der HPLC-Messung an, wie z.B. Fehler bezüglich des Injektionsvolumen, der Chromatographie an der Säule und der Detektionsfähigkeit des Detektors. Die Methodenpräzision setzt sich aus der Summe der Einzelfehler von Einwaage, Aufarbeitung und HPLC-Messung zusammen, welche jeweils aufaddiert werden [135, 161]. Folglich wird für die Methodenpräzision ein größerer Fehler als bei der Messpräzision erwartet.

7.2.5.1 Wiederhol- und Laborpräzision des Geräts

Wiederhol- und Laborpräzision (*intraday* und *interday precision*) des Geräts, auch als Mess-, System- oder Gerätepräzision bezeichnet, wurden für die Analyten Aucubin, Catalpol und Verbascosid in wässriger Lösung definierter Konzentration (Kapitel 7.5.5) sowie im aufgearbeiteten Extrakt (Kapitel 8.3.2) ermittelt. Dazu wurden die entsprechenden Proben in sechs unterschiedliche Vials gefüllt, ein definiertes Volumen aus jedem Vial je einmal per entwickelter HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) chromatographiert. Zur Auswertung wurden die Parameter Mittelwert, Standardabweichung und relativen Standardabweichung der gemessenen Flächen [AUC] mittels Excel generiert. Die relative Standardabweichung wurde als Gütemaß zur Evaluierung der jeweiligen Präzision herangezogen und wurde gemäß folgender Formel kalkuliert.

Gleichung 33: Formel zur Berechnung der **relativen Standardabweichung STABW [%]**, wobei STABW: Standardabweichung, MW: Mittelwert, der entweder \bar{x} : Mittelwert der unabhängigen Größe x (Analytkonzentration [mg/mL]) oder \bar{y} : Mittelwert der abhängigen Größe y (Peakfläche [AUC]) darstellen kann.

$$STABW[\%] = \frac{STABW}{MW} \cdot 100 [\%] \quad (7.31)$$

Dabei wurde die Standardabweichung STABW bzw. der Mittelwert MW mittels Excelbefehl =STABW bzw. =MITTELWERT erhalten.

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision (*intraday precision*) wurden die HPLC-Messungen an ein und demselben Tag durchgeführt. Insgesamt wurde die Wiederholpräzision an drei unterschiedlichen Tagen bestimmt. Die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie relative Standardabweichungen der einzelnen drei Tage wurden jeweils gemittelt, um das Maß der Wiederholpräzision als $STABW_{intraday} [\%]$ widerzugeben.

Gleichung 34: Formel zur Berechnung der **Wiederholpräzision (*intraday precision*)**, wobei STABW: Standardabweichung, MW: Mittelwert, der entweder \bar{x} : Mittelwert der unabhängigen Größe x (Analytkonzentration [mg/mL]) oder \bar{y} : Mittelwert der abhängigen Größe y (Peakfläche [AUC]) darstellen kann.

$$STABW_{intraday} [\%] = MW(STABW[\%]_{\text{Tag 1}}; STABW[\%]_{\text{Tag 2}}; STABW[\%]_{\text{Tag 3}}) [\%] \quad (7.32)$$

Zur Festlegung der Laborpräzision (*interday precision*) wurden die Proben an drei unterschiedlichen Tagen (n=3) vermessen. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der drei Tage per Excelbefehl gemittelt. Die Standardabweichung der Mittelwerte der drei Tage wurde ebenso via Excelbefehl erhalten. Gemäß oben aufgeführter Gleichung lieferte das mit 100 multiplizierte Verhältnis von errechneter Standardabweichung zu errechnetem Mittelwert die relative Standardabweichung, welche zur Beurteilung der Präzisionsqualität diente. Der Präzisionstest der Gerätepräzisionen (*intra-* und *interday*) wurde bei relativen Standardabweichungen von ≤ 5 akzeptiert. Akzeptierbare Resultate der Messpräzision, sowohl der *intra-* als auch der *interday precision*, galten als Grundlage für eine einmalige statt in Duplikaten vollzogene Injektion der im späteren Verlauf der Arbeit zu untersuchenden, geernteten FP-Proben. Eine Aussage über die Qualität der FP-Aufarbeitungsmethode ist anhand dieser Vorgehensweise nicht möglich, da lediglich Aliquote ein und desselben aufgearbeiteten Extraktes verwendet wurden. Um sowohl im oberen als auch im unteren Messbereich die Präzision der HPLC-Methode eruiern zu können, wurden zwei (Aucubin und Verbascosid) bzw. drei (Catalpol) verschiedene Analytkonzentrationen gewählt, die im oberen bzw. unteren Bereichen lagen.

7.2.5.2 Methodenpräzision

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methodenpräzision der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) unter Miteinbeziehung der angewendeten Aufarbeitungsmethode (Kapitel 8.3.2) für die Analysesubstanzen Aucubin, Catalpol und Verbascosid bestimmt. Sechs unabhängige Proben wurden dazu an einem (max. zwei) Tag(en) aufgearbeitet und mittels der entwickelten HPLC-Methode in Duplikaten vermessen ($n=6$), wobei die zweifache Injektion gemittelt und als $n=1$ gehandhabt wurde. Die Evaluierung der Methodenpräzision erfolgte anhand der resultierten, relativen Standardabweichung der x-Werte [mg/mL], welche über die entsprechenden Messsignale (y-Werte [AUC]) und die zugehörige Geradengleichung (Tabelle 7.5 in Kapitel 7.3.2) sowie nach Normierung auf 7,0 g Einwaage und 100% Trockensubstanz (TS) bzw. 0% Wasser erhalten wurden. Die Gleichung zur Berechnung der relativen Standardabweichung ist in Kapitel 7.2.5.1 aufgeführt. Es fand keine Differenzierung in Wiederhol- und Laborpräzision statt.

Der Methodenpräzisionstest wurde in Anlehnung an die Wiederfindung auch bei höheren relativen Standardabweichungen als ≤ 5 akzeptiert (≤ 20 , Kapitel 7.2.7), da der Fehler der kompletten Probenaufarbeitung zu dem Fehler der bloßen HPLC-Messung (Gerätepräzision, Kapitel 7.2.5.1) hinzuaddiert wird und sich deshalb der Gesamtfehler erhöht [135, 161].

7.2.6 Robustheit als Analytstabilität

Als Kriterium für die Evaluierung der Robustheit der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) diente die Stabilität der Analyten, da sowohl die enthaltenen IGs als auch PEs als wenig stabil gelten [33] (Kapitel 1.1.2.1 bzw. 1.1.2.3). Die Proben wurden hierbei in sechs Vials gefüllt. Pro Vial wurde einmal ein definiertes Volumen injiziert ($n=6$). Die Vials wurden anschließend für 3 d im auf 4 °C temperierten HPLC-Autosampler belassen, bevor sie erneut auf die gleiche Weise vermessen wurden. Als Proben dienten verschieden konzentrierte, wässrige Analytlösungen sowie ein aufgearbeiteter Rohextrakt (Kapitel 7.2.5). Mittelwerte, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen der erhaltenen Messsignale (y-Werte [AUC]) wurden, wie in Kapitel 7.2.5 beschrieben, berechnet. Die Werte wurden als relative Abweichung bezogen auf die Anfangskonzentration (100%) dargestellt und bewertet. Werte innerhalb von 95-105% bestätigten die Analytstabilität und damit eine unkritische Standdauer im Autosampler (3 d, 4 °C). Die Testung weiterer variierender Parameter zur Bestimmung der Robustheit der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode, wie z.B. die Säulenofentemperatur, der Einsatz einer anderen RP18e-Säule oder die Berücksichtigung des FP-Aufarbeitungsverfahrens würden die Beurteilung der Robustheit der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode jedoch maßgeblich verbessern.

7.2.7 Richtigkeit als Wiederfindung

Zur Ermittlung der Richtigkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) wurde die Wiederfindung, auch Wiederfindungsrate genannt, der Analysesubstanzen Catalpol, Aucubin und Verbascosid eruiert. Dazu wurde ein definiertes Volumen an Analytlösung bestimmter Konzentration zu einer definierten Menge an gefrorenem, vorzerkleinertem Frischpflanzenmaterial (Kapitel 7.5.2) in sechs unabhängig durchgeführten Experimenten (n=6) hinzugefügt, gemäß der festgelegten FP-Probenaufarbeitung (Kapitel 8.3.2) vollständig aufgearbeitet und per entwickelter HPLC-Methode analysiert. Es wurden im Schnitt 15-40% der im Extrakt enthaltenen Analytmenge hinzugegeben. Die Berechnung mit Normierung erfolgte bezogen auf die Einwaage von 7,0 g, aber ohne Normierung auf einen einheitlichen Wassergehalt. Insgesamt wurden damit 115-140% der Anfangskonzentration erwartet. Die Analytkonzentration in den FP-Proben ohne Substanzzusatz, welche als Grundlage zur Berechnung der erwarteten Analytkonzentration x_{soll} dienten, setzen sich ebenfalls aus sechs unabhängigen Experimenten zusammen (n=6) und wurden wie folgt berechnet.

Gleichung 35: Formel zur Berechnung der **Konzentration x** [mg/mL] des Analyten, wobei y: Fläche [AUC], b: y-Achsenabschnitt, m: Steigung der linearen Kalibriergerade.

$$x = \frac{y - b}{m} \quad (7.33)$$

Zum besseren Vergleich der Analytkonzentrationen wurde zur Wiederfindung der erhaltene Konzentrationswert der Pflanze [mg/mL] auf 7,0 g FP und 0% Wasser, ausgedrückt als 100% Trockensubstanz (TS), normiert. Der Wasseranteil wurde per azeotroper Destillation bestimmt (Kapitel 7.5.12). Die Berechnung der normierten Analytkonzentration lag nachfolgender Gleichung zugrunde.

Gleichung 36: Formel zur Berechnung der **normierten Konzentration x_N** [mg/mL] des Analyten, wobei x: Konzentration des Analyten [mg/mL], EW: Einwaage der FP [g], TS: Trockensubstanz, 25: Probenendvolumen (Meßkolben) [mL].

$$x_N = x \cdot \frac{7,0}{EW} \cdot \frac{100}{TS} \cdot 25 \quad (7.34)$$

TS resultierte aus folgender Gleichung.

Gleichung 37: Formel zur Berechnung der **Trockensubstanz TS** [%].

$$TS = 100 - \text{Wassergehalt} [\%] \quad (7.35)$$

Zum genormten x-Wert der Frischpflanze x_N ($=x_{N, \text{intern}}$) wurde die Konzentration x_{extern} [mg/mL] an definierter Analytlösung hinzuaddiert, um die theoretisch erreichbare Konzentration (x_{soll}) zu gewinnen. Dies erfolgte gemäß nachstehender Formel.

Gleichung 38: Formel zur Berechnung der **theoretischen Konzentration** x_{soll} , wobei $x_{\text{N, intern}}$: normierte Analytkonzentration in der Pflanze [mg/mL], x_{extern} : Konzentration der extern zugesetzten Analytlösung [mg/mL], V_{extern} : Volumen an extern zugesetzter Analytlösung [mL], verstanden als Verdünnungsfaktor.

$$x_{\text{soll}} = x_{\text{N, intern}} + x_{\text{extern}} \quad (7.36)$$

x_{extern} setzte hierbei sich aus der Konzentration c der Analytlösung [mg/mL], dem eingesetzten Volumen V_{extern} [mL] sowie dem Verdünnungsvolumen am Ende des Aufarbeitungsprozesses (25 mL) zusammen.

Gleichung 39: Formel zur Berechnung der **Konzentration** x_{extern} des zugesetzten Analyten, wobei c : Konzentration der extern zugesetzten Analytlösung [mg/mL], V_{extern} : Volumen an extern zugesetzter Analytlösung [mL], 25: Probenendvolumen (Meßkolben) [mL].

$$x_{\text{extern}} = c \cdot \frac{V_{\text{extern}}}{25} \quad (7.37)$$

Die Wiederfindung wurde gemäß folgender Formel ermittelt, wobei x_{ist} die gemessene Konzentration des tatsächlich mit Analytlösung versetzten und vollständig aufgearbeiteten FP-Materials wiedergab [161].

Gleichung 40: Formel zur Berechnung der **Wiederfindung** WF [%], wobei x_{ist} : gemessener x-Wert, x_{soll} : theoretischer x-Wert, x-Wert: Analytkonzentration [mg/mL].

$$WF = \frac{x_{\text{ist}}}{x_{\text{soll}}} \cdot 100 \text{ [%]} \quad (7.38)$$

Neben akzeptablen Abweichungen von $\leq 5\%$ [166], werden häufig auch Wiederfindungen mit Abweichungen bis zu 8% akzeptiert [163]. Bei sehr geringen Mengen sind die Toleranzgrenzen weiter gefasst. Grund dafür ist, dass bei kleineren Werten Abweichungen, relativ gesehen, stärker ins Gewicht fallen als bei größeren [161, 166]. Daher wurden die Wiederfindungskriterien an die jeweiligen Gehalte der Analyten im FP-Extrakt angepasst. Bei Werten im ppm-Bereich wurden größere Abweichungen von 80-120% geduldet [166]. Lagen die Abweichungen über 20%, machte der Einsatz eines Korrekturfaktors Sinn, sofern die Variabilität der Werte akzeptabel war. Der Korrekturfaktor setzt sich gemäß folgender Rechnung zusammen.

Gleichung 41: Formel zur Berechnung des **Korrekturfaktors** KF , wobei WF : Wiederfindung [%].

$$KF = \frac{100}{WF} \quad (7.39)$$

Der richtige x-Wert lautet demnach wie folgt:

Gleichung 42: Formel zur Berechnung des **richtigen x-Werts** x_{richtig} [mg/mL], wobei c_{ist} : gemessener x-Wert, c_{soll} : berechneter x-Wert, x-Wert: Analytkonzentration [mg/mL].

$$x_{\text{richtig}} = x_{\text{gemessen}} \cdot KF [mg/mL] \quad (7.40)$$

Wiederfindungen von Substanzen in Rohmatrizes von pflanzlichen Naturprodukten führen häufig zu größeren Abweichungen vom Sollwert [167, 168], weswegen speziell für die Wiederfindung auch größere Abweichungen geduldet wurden ohne einen Korrekturfaktor einzusetzen.

7.3 Ergebnis und Diskussion

7.3.1 Spezifität und Selektivität

7.3.1.1 Identifizierung ausgewählter IGs und PEs im Rohextrakt der Frischpflanze

Um die Identität der ausgewählten IGs (Aucubin, Asperulosid, Catalpol, Deacetylasperulosidsäuremethylester, Globularin und Verbenalin) und PEs (Verbascosid, Plantamajosid, Lavandulifoliosid und Isoverbascosid) im Fingerprintchromatogramm von *P. lanceolata* zu ermitteln, wurden neben HPLC-DAD- (Kapitel 6.4) auch LC-DAD/ESI-MSⁿ-Analysen (Kapitel 7.5.15) durchgeführt. Dabei konnten Aucubin, Asperulosid, Catalpol, Verbenalin, Verbascosid, Plantamajosid und Isoverbascosid im Rohextrakt der frischen Pflanze *via* HPLC-DAD- und LC-DAD/ESI-MSⁿ identifiziert und den entsprechenden Peaks zugeordnet werden. LC-DAD/ESI-MSⁿ-Analysen konnten darüber hinaus das Vorkommen der nicht als Referenzsubstanz verfügbaren, ausgewählten IGs und PEs im Frischpflanzenmaterial bestätigen, mit Ausnahme des Deacetylasperulosidsäuremethylesters. Die erhobenen LC-DAD/ESI-MSⁿ-Daten des Frischpflanzenrohextrakts sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

Tabelle 7.2: Abgleich der erhobenen LC-DAD/ESI-MSⁿ-Daten der IGs und PEs in einem Spitzwegerichfrischpflanzenextrakt bei Zielmassen von 400, 600 und 800 *m/z* mit den Daten der Referenzsubstanzen bzw. aus der einschlägiger Literatur, dargestellt als einfache MS-Messung.

Nr.	Substanzname	t _R [min]	gemessene MS Fragmentierung <i>m/z</i>	Verifizierung mittels Standard	Verifizierung mittels Litera- turdaten	Diskrepanz mit Literaturdaten
1	Catalpolisomer	11,6	407 ^b , 361, 163	-	-	-
2	Catalpol	12,6	407 ^b , 361, 199, 169, 137	+	407 ^b , 169 [170]	151, 127 [170]
3	Aucubinisomer	13,0	391 ^b , 389, 208, 165, 141, 123	-	-	-
4	Aucubin	15,3	391 ^b , 229, 183, 165, 135	+	-	-
5	Aucubinisomer	16,9	391 ^b , 167, 123	-	-	-
6	Verbenalinisomer	23,6	433 ^b , 387, 207	-	-	-
7	Verbenalin	23,8	433 ^b , 387, 161	+	-	-
8	Asperulosid	24,5	459 ^b , 193, 134	+	-	-
9	Asperulosid- isomer	32,7	459 ^b , 399, 161	-	-	-
10	Globularin bzw. Globularinisomer	28,6	491 ^a , 311, 267, 163, 162, 161	-	491 ^a [119, 170], 161 [119, 170]	315 [119, 170], 175 [119, 170], 147 [119]
11	Globularin bzw. Globularinisomer	31,1	491 ^a , 473, 152	-	491 ^a [119, 170], 161 [119, 170]	315 [119, 170], 175 [119, 170], 147 [119]

^a *m/z* [M-H]⁻

^b *m/z* [M+HCOO]⁻

^c Fragmentierung stimmt genau mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid B überein [169]

^d Fragmentierung stimmt genau mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid A überein [169]

^e Fragmentierung stimmt nicht mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid H (*m/z* 639, 487, 477, 461, 443, 178) überein [46]

^f Fragmentierung stimmt teilweise mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid I (*m/z* 639, 487, 477, 461, 443, 315, 205, 203, 179, 162, 163, 145, 143, 135, 134) überein [46]

Nr.	Substanzname	t _R [min]	gemessene MS Fragmentierung <i>m/z</i>	Verifizierung mittels Standard	Verifizierung mittels Literaturdaten	Diskrepanz mit Literaturdaten
12	Globularin bzw. Globularinisomer	34,2	491 ^a , 473, 327, 267, 171, 161, 152	-	491 ^a [119, 170], 161 [119, 170]	315 [119, 170], 175 [119, 170], 147 [119]
13	Lavandulifoliosid	26,6	755 ^a , 593, 447, 461, 315 ^c	-	755 ^a [45]	-
14	Plantamajosid	25,2	639 ^a , 621, 459	+	639 ^a [144, 145, 147, 171]	477 [144, 145, 147, 171], 315 [144, 145, 147, 171], 251 [147], 179 [144, 147], 161 [144, 145, 147, 171], 131 [147]
15	Plantamajosid	25,4	639 ^a , 621, 459	+	639 ^a [144, 145, 147, 171]	477 [144, 145, 147, 171], 315 [144, 145, 147, 171], 251 [147], 179 [144, 147], 161 [144, 145, 147, 171], 131 [147]
16	Plantamajosid- isomer	25,6	639 ^a , 621, 459, 247	-	639 ^a [144, 145, 147, 171]	477 [144, 145, 147, 171], 315 [144, 145, 147, 171], 251 [147], 179 [144, 147], 161 [144, 145, 147, 171], 131 [147]

^a *m/z* [M-H]⁻

^b *m/z* [M+HCOO]⁻

^c Fragmentierung stimmt genau mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid B überein [169]

^d Fragmentierung stimmt genau mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid A überein [169]

^e Fragmentierung stimmt nicht mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid H (*m/z* 639, 487, 477, 461, 443, 178) überein [46]

^f Fragmentierung stimmt teilweise mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid I (*m/z* 639, 487, 477, 461, 443, 315, 205, 203, 179, 162, 163, 145, 143, 135, 134) überein [46]

Nr.	Substanzname	t _R [min]	gemessene MS Fragmentierung <i>m/z</i>	Verifizierung mittels Standard	Verifizierung mittels Literaturliteraturdaten	Diskrepanz mit Literaturdaten
17	Plantamajosid- isomer	26,5	639 ^a , 621, 459, 178, 151	-	639 ^a [144, 145, 147, 171]	477 [144, 145, 147, 171], 315 [144, 145, 147, 171], 251 [147], 179 [144, 147], 161 [144, 145, 147, 171], 131 [147]
18	Verbascosid	27,8	623 ^a , 461, 315, 179, 135 ^{d, e}	+	623 ^a [128, 146, 169, 172], 461 [128, 146, 169, 172], 315 [128, 169], 179 [128, 169], 135 [128, 169]	443 [169], 202 [169], 161 [146, 170, 172]
19	Isoverbascosid	28,8	623 ^a , 461, 315, 135 ^{d, e}	+	623 ^a [128, 172], 461 [128, 172, 173], 315 [128, 173], 179 [128, 173], 161 [128], 135 [128, 173]	297 [173], 161 [170, 173]

^a *m/z* [M-H]⁻

^b *m/z* [M+HCOO]⁻

^c Fragmentierung stimmt genau mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid B überein [169]

^d Fragmentierung stimmt genau mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid A überein [169]

^e Fragmentierung stimmt nicht mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid H (*m/z* 639, 487, 477, 461, 443, 178) überein [46]

^f Fragmentierung stimmt teilweise mit der von Konstitutionsisomer Forsythosid I (*m/z* 639, 487, 477, 461, 443, 315, 205, 203, 179, 162, 163, 145, 143, 135, 134) überein [46]

Unter der Prämisse, dass die verwendeten Referenzsubstanzen auch hinsichtlich ihrer Isomerie korrekt sind, konnten Aucubin, Catalpol, Verbenalin und Asperulosid sowie Verbascosid, Plantamajosid und Isoverbascosid eindeutig im Rohextrakt der frischen Pflanze mittels LC-DAD/ESI-MSⁿ identifiziert werden. Zweifel bezüglich der isomeren Richtigkeit der für *P. lanceolata* postulierten IGs und PEs wurden bereits diskutiert (Kapitel 4 bzw. 4.2.3), weswegen an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen werden soll. Neben den Signalen der vorliegenden Referenzsubstanzen konnten weitere Signale mit identischen Masse-Ladungs-Verhältnissen und z.T. übereinstimmendem Fragmentierungsmuster erfasst werden. Es wird angenommen, dass es sich dabei um isomere Verbindungen handelt 4.2.4, wobei die hierbei erhobenen Daten nicht für eine eindeutige Charakterisierung ausreichen. Des Weiteren konnten drei Signale bzw. ein Signal mit übereinstimmendem Masse-Ladungs-Verhältnis(en) von Globularin bzw. Lavandulifoliosid gemessen werden. Die Fragmentierungen der drei Globularin- bzw. Globularinisomersignale waren nur teilweise mit der Literatur im Einklang. Für Lavandulifoliosid konnte aufgrund eines fehlenden Fragmentierungsmusters kein Abgleich mit einschlägigen Literaturdaten vorgenommen werden. Es sei hierbei aber darauf hingewiesen, dass das ebenfalls im Spitzwegerich enthaltene Forsythosid B die gleiche Summenformel wie Lavandulifoliosid besitzt und über ein identisches Masse-Ladungs-Verhältnis verfügt. Dies veranschaulicht, dass eine gleiche Masse nicht automatisch ein Indiz für eine isomere Verbindung darstellt und zeigt, dass der Verdacht auf weitere Isomere in *P. lanceolata* überprüft werden muss. Interessant ist, dass die kommerziell erworbene Referenzsubstanz Plantamajosid stets zwei Peaks im Chromatogramm hervorbrachte und möglicherweise ein Isomerengemisch enthält. Hinweise in der Literatur bezüglich einer begünstigten Isomerisierung des Plantamajosids in Lösung liegen aktuell nicht vor. Auffällig ist, dass sowohl die Referenzlösung als auch der Rohextrakt entsprechende Peaks an exakt der gleichen Stelle vorweisen, die dem Isomerengemisch Plantamajosid zugeordnet werden können. Der Deacetylasperulosidsäuremethylester konnte anhand der erhobenen MSⁿ-Daten im Spitzwegerichfrischpflanzenextrakt nicht mit ausreichender Sicherheit nachgewiesen werden. Zur HPLC-DAD und LC-DAD/ESI-MSⁿ-Analytik wurden zwei unterschiedliche HPLC-Anlagen genutzt. Daraus ergaben sich unterschiedliche Verweildauern der Substanzen im System und damit abweichende Retentionszeiten. Bestimmt wurden diese Unterschiede für die drei zu quantifizierenden Hauptkomponenten Aucubin, Catalpol und Verbascosid.

Im LC-DAD/ESI-MSⁿ-System waren die Retentionszeiten im Schnitt 0,5 min kürzer als in der genutzten HPLC-DAD-Anlage 1 (Tabelle 7.3).

Tabelle 7.3: Gegenüberstellung der Retentionszeiten t_R [min] von Aucubin, Catalpol und Verbascosid mittels HPLC-DAD-Anlage 1 und LC-DAD/ESI-MSⁿ-Anlage. Stationäre Phase: C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-5 min: 0%, 5-15 min: 0-10%, 15-30 min: 10-33%, 30-35 min: 33-50%, 35-40 min, 50-98%, 40-45 min: 98%, 45-47 min: 98-0%, 47-54 min: 0% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 \pm 5 °C, Detektion: DAD, 195 nm bzw. 330 nm.

Verbindung	LC-DAD/ESI-MS ⁿ	HPLC-DAD
Catalpol	$t_R=12,9$ min	$t_R=13,3$ min
Aucubin	$t_R=15,4$ min	$t_R=16,1$ min
Verbascosid	$t_R=28,0$ min	$t_R=28,4$ min

Eine exakte Zuordnung des detektierten Globularins war ohne Referenz nicht möglich, da mehrere potentielle Peaks der Verbindung im Chromatogramm verteilt vorlagen. Lavan-dulifoliosid konnte ebenfalls nicht mit ausreichender Sicherheit im Spitzwegerichextrakt identifiziert werden, da charakterisierende Literaturdaten über sein Fragmentierungsmuster zum Abgleich fehlten. Deacetylasperulosidsäuremethylester war nicht im Rohextrakt der Frischpflanze nachgeweisbar. Das Vorliegen diverser, für *P. lanceolata* noch unbekannter Isoformen der Verbindungen Aucubin/6-*epi*-Aucubin, Asperulosid, Catalpol, Globularin, Verbenalin sowie Plantamajosid/Isoplantamajosid kann aufgrund der erhobenen LC-DAD/ESI-MSⁿ-Daten vermutet werden, wobei Isomere des Asperulosids und des Verbenalins bisher noch für keine Pflanze in der Literatur beschrieben wurden. Eine eindeutige Unterscheidung potentieller Konformationsisomere anhand von MSⁿ-Daten ist jedoch kaum möglich. Der Abgleich mit der einschlägigen Literatur gestaltet sich aufgrund der mangelnden Erforschung dieser Thematik als schwierig.

7.3.1.2 Identifizierung von Aucubin, Catalpol und Verbascosid in verschiedenen Matrices

Als weiteren Punkt der Identitätsprüfung ausgewählter IGs und PEs in *P. lanceolata* galt es, die Identität dieser in verschiedenen, pharmazeutisch relevanten Matrices bzw. Extrakten zu bestimmen. Dazu dienten neben dem getesteten Rohextrakt des Frischpflanzenmaterials auch ein Rohextrakt der Droge sowie eine fermentierte, wässrige Extraktzubereitung. Diese wurden jeweils mittels LC-DAD/ESI-MSⁿ analysiert (Abbildung 7.1).

Anhand der Chromatogramme in Abbildung 7.1 wird ersichtlich, dass alle betrachteten Substanzen in dem Rohextrakt der Frischpflanze sowie der Droge detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu konnten im wässrigen Fermentationsextrakt nur Spuren von Verbascosid bestimmt werden. Es wird angenommen, dass alle untersuchten Verbindungen über Degradierungsprozesse der Fermentation abgebaut wurden [174, 175], so dass sie, bis auf Verbascosid, nicht mehr nachweisbar waren. Dabei ist anzumerken, dass auch Verbascosid nicht per DAD erfasst werden konnte. Lediglich mithilfe des empfindlicheren MS-Detektors konnte es registriert werden. Die entwickelte HPLC-DAD-Fingerprintmethode scheint spezifisch genug zu sein, um das IG- und PE-Inhaltsstoffspektrum von *P. lanceolata* in den Matrices von Frischpflanzenrohextrakten, Drogenrohextrakten und fermentierten, wässrigen Zubereitungen zu erforschen.

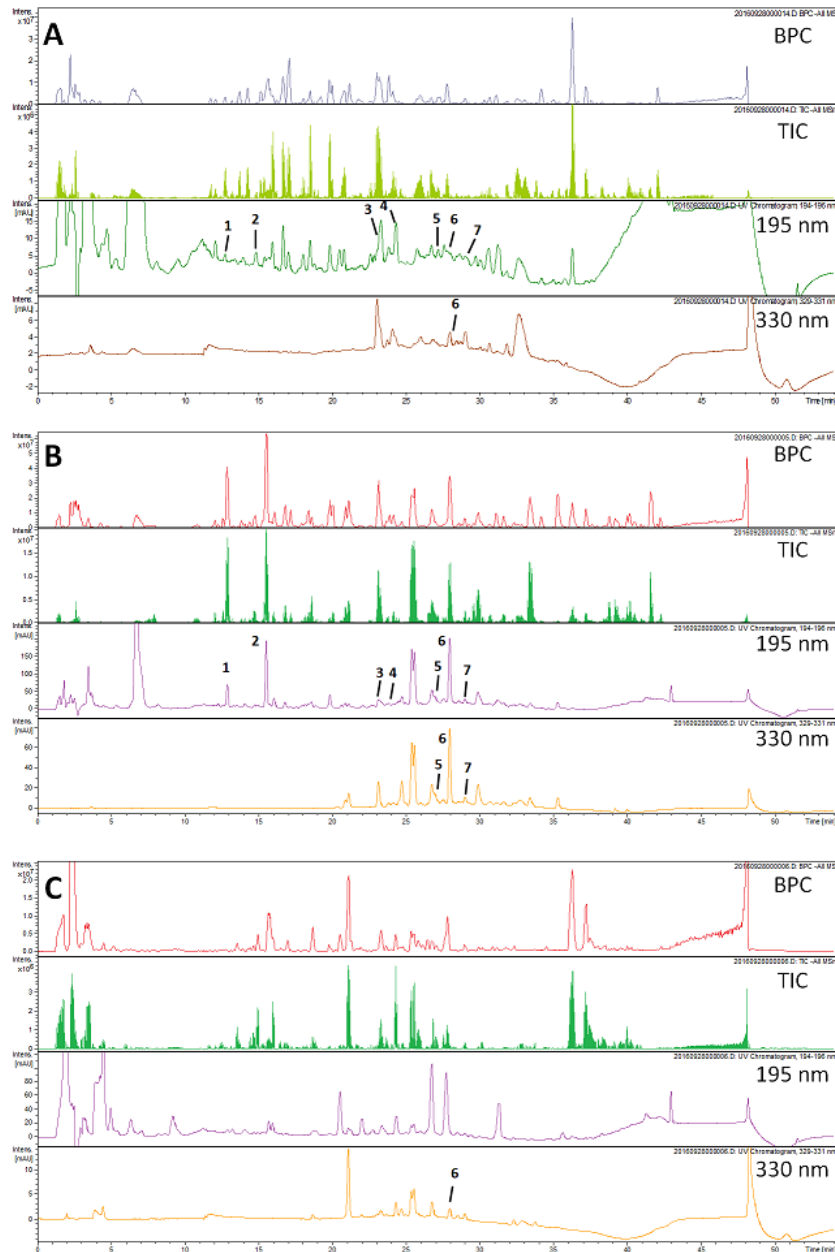


Abbildung 7.1: Identitätszuordnungen der ausgewählten IGs und PEs von *P. lanceolata* in verschiedenen Matrices. LC-DAD/ESI-MSⁿ-Chromatogramme eines FP- (A), Drogen- (B) und Fermentationsextrakts (C) der Spitzwegerichblätter: Catalpol (1, $t_R = 12,8$ min), Aucubin (2, $t_R = 15,4$ min), Asperulosid (3, $t_R = 23,3$ min), Verbenalin (4, $t_R = 24,1$ min), Plantamajosid (5, $t_R = 27,0$ min), Verbascosid (6, $t_R = 28,0$ min) und Isoverbascosid (7, $t_R = 29,0$ min). Stationäre Phase: C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Deutschland), mobile Phase: Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-5 min: 0%, 5-15 min: 0-10%, 15-30 min: 10-33%, 30-35 min: 33-50%, 35-40 min: 50-98%, 40-45 min: 98%, 45-47 min: 98-0%, 47-54 min: 0% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 \pm 5 $^{\circ}$ C, Detektion: DAD und ESI-MS⁴ (HCT Ultra Ionenfalle): negativer Modus, Zielmassen m/z 400, 600 bzw. 800.

7.3.1.3 Peakreinheit von Aucubin, Catalpol und Verbascosid in verschiedenen Matrizes

Die Reinheit der zu quantifizierenden Substanzen Aucubin, Catalpol und Verbascosid wurde mittels HPLC-DAD-ESI-MSⁿ in drei verschiedenen Matrizes bestimmt: Droge, Frischpflanze, fermentierter wässriger Extrakt (Kapitel 7.3.1.2). Dieses Analyseverfahren sollte mithilfe der MS-Detektion die *per* DAD erhaltenen Informationen kontrollieren und ergänzen. Insbesondere zur Reinheitsbestimmung der chromophorarmen und UV-VIS-schwachen IGs Aucubin und Catalpol erschien dies notwendig. Eine Übersicht der erhaltenen LC-DAD-ESI-MSⁿ-Daten zur Peakreinheit gibt Tabelle 7.4.

Tabelle 7.4: Übersicht der erhaltenen LC-DAD-ESI-MSⁿ-Daten zur Peakreinheit.

Verbindung	t _R [min]	Kontrollbereich [min]	Frischpflanze	Droge	Fermentation
Catalpol ^a	12,9	12,8-13,1	rein ^d	rein	rein ^g
Aucubin ^b	15,4	15,4-15,7	rein ^e	rein	rein ^g
Verbascosid ^c	28,0	27,8-28,2	rein	rein ^f	rein ^h

^a *m/z* MS: 407, 361, MS²: 361, 199, 169, MS³: 199, 169, 137, MS⁴: 169, 137

^b *m/z* MS: 435, 391, 345, MS²: 389, 345, 307, 271, 183, MS³: 233, 291, MS⁴: -

^c *m/z* MS: 623, MS²: 461, MS³: 315, 135, MS⁴: -

^d Kontrollbereich: 12,6-12,9 min

^e Kontrollbereich: 15,3-15,5 min

^f Verunreinigung kurz vor Peakbeginn bei 27,8 min mit Substanz *m/z* MS: 545, MS²: 193, MS³: 131

^g Substanz nicht detektierbar

^h Substanz nur in Spuren enthalten

Die Peakreinheit der von Aucubin, Catalpol und Verbascosid kann für alle drei untersuchten Matrizes bestätigt werden, weswegen die entwickelte HPLC-DAD-Fingerprintmethode als selektiv hinsichtlich zur Analytik in den drei Matrizes Frischpflanze, Droge und wässrig fermentierter Zubereitung eingestuft wird.

7.3.1.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) zur simultanen Quantifizierung von Aucubin, Catalpol und Verbascosid sowie zur qualitativen und semi-quantitativen Bestimmung von Catalpol, Aucubin, Asperulosid, Verbenalin, Globularin, Deacetylasperulosidsäuremethylester, Plantamajosid, Lavandulifoliosid, Verbascosid und Isoverbascosid in Spitzwegerichextrakten galt es mitunter Spezifität und Selektivität zu definieren. Mittels LC-DAD/ESI-MSⁿ-Analysen konnten Retentionszeit, UV/VIS-Spektrum sowie MS-Fragmentierungsmuster der Referenzsubstanzen erhalten und mit denen im Chromatogramm des Extraktes verglichen werden. Anhand dieser Informationen ließen sich die Verbindungen Catalpol, Aucubin, Asperulosid, Verbenalin, Plantamajosid, Verbascosid und Isoverbascosid eindeutig im Fingerprint der frischen Pflanze identifizieren und den entsprechenden Peaks zuordnen. Globularin und Lavandulifoliosid konnten ebenfalls darin nachgewiesen, jedoch allein über den Vergleich mit Literaturdaten nicht eindeutig zugeordnet werden (keine Referenz). Weder

Nachweis noch Zuordnung war bei Deacetylasperulosidsäuremethylester möglich (keine Referenz).

Die Methode ist spezifisch zur Analytik von Catalpol, Aucubin, Asperulosid, Verbenalin, Plantamajosid, Verbascosid und Isoverbascosid in der frischen Pflanze von *P. lanceolata*. Dies gilt auch für die getrocknete Pflanze sowie für wässrig fermentierte Extrakte. Die Verbindungen Catalpol, Aucubin und Verbascosid lagen im Fingerprintchromatogramm der Frischpflanze, der Droge und der fermentierten Zubereitung jeweils als reine Peaks vor. Eine selektive Bestimmung dieser mittels der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode kann somit bestätigt werden.

7.3.2 Verbleibende Validierungsparameter

Nach Bestätigung der Spezifität und Selektivität (Kapitel 7.3.1) wurden im Zuge der Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) die Validierungsparameter Linearität, Messbereich, LOD, LOQ, intra- und interday Messpräzision (Wiederhol- und Laborpräzision), Methodenpräzision, Robustheit und Richtigkeit bestimmt [160, 161]. Dazu wurden die drei zu quantifizierenden Hauptkomponenten Aucubin und Catalpol (IGs) sowie Verbascosid (PEs), die im späteren Verlauf der Arbeit als Marker zur Ermittlung des Einflusses des Erntezeitpunkts auf das Inhaltsstoffspektrum von *P. lanceolata* dienen sollten, herangezogen. Sie wurden, falls nicht explizit angegeben, in Hexaplikaten vermessen (Tabelle 7.5).

7.3.2.1 Linearität, Messbereich, LOD und LOQ

Die drei Analysesubstanzen resultierten - unter Gewährleistung von Linearität, LOD und LOQ - in Messbereiche mit unterschiedlichen Konzentrationsspannweiten: Catalpol mit 0,0066-0,1035 mg/mL, Aucubin mit 0,0128-0,0642 mg/mL und Verbascosid mit 0,0887-0,4437 mg/mL. Die Annahme einer direkten Proportionalität der Kalibrierfunktion der drei Analyte konnte jeweils nicht anhand des Vergleichs der linearen mit der quadratischen relativen Verfahrensstandardabweichung bestätigt werden, sondern, stattdessen, mittels des Tests nach Mandel. Alle ermittelten Korrelationskoeffizienten bzw. Bestimmtheitsmaße betragen mindestens 0,99 und bestätigen die lineare Relation, welche auch durch optische Kontrolle der Kalibriergeraden evaluiert werden konnte (Grafiken nicht dargestellt). Resultierende LODs und LOQs befanden sich jeweils unterhalb des Arbeits- und Linearitätsbereichs (0,0015 bzw. 0,0046 mg/mL (Catalpol), 0,0026 bzw. 0,0078 mg/mL (Aucubin), 0,0088 bzw. 0,0268 mg/mL (Verbascosid)), wodurch eine Quantifizierung innerhalb der Arbeitsgrenzen als gesichert galt.

Tabelle 7.5: Ermittelte Validierungsparameter der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode. Die Ergebnisse stammen aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6), sofern nicht anders beschrieben.

Substanz	Catalpol	Aucubin	Verbascosid
t _R [min]	13,3	16,1	28,4
Linearität [mg/mL]	0,0040-0,1035 ^e	0,0128-0,0642 ^c	0,0887-0,4437 ^c
Arbeitsbereich [mg/mL]	0,0066-0,1035 ^b	a	a
Arbeitsbereich [AUC]	236.411-4.319.111 ^b	811.838-4.357.036 ^c	5.421.308-29.047.660 ^c
Kalibrierfunktion	y = 42133131 · x - 41668 ^b	y = 68972729 · x - 71013 ^c	y = 66553103 · x - 481952 ^c
r ^d , r ²	0,9999 ^b ; 0,9998 ^b	0,9994 ^c ; 0,9989 ^c	0,9999 ^c ; 0,9997 ^c
LOD [mg/mL]; LOQ [mg/mL]	0,0015 ^b ; 0,0046 ^b	0,0026 ^c ; 0,0078 ^c	0,0088 ^c ; 0,0268 ^c
LOD [AUC]; LOQ [AUC]	21.532 ^b ; 152.144 ^b	108.316 ^c ; 466.974 ^c	103.715 ^c ; 1.301.671 ^c
Messpräzision (intraday) [%] ^f	1,59; 2,02; 1,19; 1,61 ^j	1,51; 0,93; 2,54 ^k	2,03; 1,63; 1,90 ^l
Messpräzision (interday) [%] ^{f, g}	0,22; 1,56; 1,43; 0,16 ^j	0,50; 0,37; 3,64 ^k	1,74; 1,04; 1,13 ^l
Methodenpräzision [%] ^f	12,79	9,10	14,08
Robustheit [%] ^h	101,63; 98,61 98,65; 101,93 ^j	99,82; 98,74 97,78 ^k	93,96; 91,47 91,20 ^l
Richtigkeit [%] ⁱ	122,20 ± 19,84 (16,24)	53,19 ± 4,57 (8,60)	27,07 ± 8,66 (31,96)

^a entspricht dem Linearitätsbereich

^b 9 Kalibrierungspunkte, d.h. N=9

^c 5 Kalibrierungspunkte, d.h. N=5

^d Berechnungen nach Pearson und nach Korrel führten zu dem gleichen Ergebnis

^e 10 Kalibrierungspunkte, d.h. N=10

^f Angabe der relativen Standardabweichung

^g n=3

^h Stabilität der Analytlösung bzw. des Extrakts bei Lagerung für 3 d bei 4 °C im Autosampler, Angabe als durchschnittliche Wiederfindung in Bezug auf 100% bei t=0

ⁱ Angabe der durchschnittlichen Wiederfindung ± Standardabweichung (relative Standardabweichung)

^j 0,0849 mg/mL Analytlösung; 0,0265 mg/mL Analytlösung; 0,0066 mg/mL Analytlösung; Extrakt

^k 0,0514 mg/mL Analytlösung; 0,0128 mg/mL Analytlösung; Extrakt

^l 0,3125 mg/mL Analytlösung; 0,0781 mg/mL Analytlösung; Extrakt

7.3.2.2 Präzision

Die relativen Standardabweichungen von Wiederhol- und Labormesspräzision der reinen, matrixfreien Analytlösungen sowie des Frischpflanzenrohextrakts lagen stets unter 5% und waren somit ausreichend niedrig zur Akzeptierung des Tests auf *intra-* und *interday* precision. Durch die Verifizierung der Messpräzision wird eine Injektion, statt der üblichen Zweifachmessung, folglich als ausreichend sicher betrachtet. Dadurch kann die hohe Probenzahl an Frischpflanzen zur Bestimmung des Einflusses des Erntezeitpunkts auf das IG- und PE-Spektrum im späteren Teil der Arbeit in kürzerer Zeit analysiert werden. Da der Arbeitsbereich für Catalpol nachträglich angepasst wurde, erschien es sinnvoll den nach oben erweiterten Bereich in die Präzisionsbestimmung miteinzugliedern, weswegen hier drei anstatt der zwei Konzentrationen zur Testung herangezogen wurden. Die relativen Standardabweichungen der Wiederholpräzision der Analytlösungen (0,93-2,02%) ähnelten denen des Extraktes (1,61-2,59%). Gleiches kann für die Laborpräzision mit 0,22-1,43% für die matrixfreien Lösungen und 0,16-3,23 im Extrakt beobachtet werden.

Die relativen Standardabweichungen der Methodenpräzision der entwickelten HPLC-Methode unter Berücksichtigung der kompletten Probenaufarbeitungsmethode lagen für alle drei Analyten mit 9,10% (Aucubin), 12,79% (Catalpol) und 14,08% (Verbascosid) unter 15%, aber damit höher als die der Messpräzision mit $\leq 5\%$. In Anbetracht dessen, dass, im Gegensatz zur Messpräzision des HPLC-Geräts mit der angewendeten HPLC-Methode, hier neben der Gerätepräzision zusätzlich der Fehler der Einwaage und der gewählten Aufarbeitungsmethode von sechs individuell vorbereiteten Proben hinzukommt, werden die erhaltenen Abweichungen trotzdem akzeptiert, angelehnt an die Grenzen der Wiederfindung kleiner Werte im ppm-Bereich (Kapitel 7.2.7) [166]. Die größeren relativen Standardabweichungen der Methodenpräzision im Vergleich zur Gerätepräzision machen darauf aufmerksam, dass höchstwahrscheinlich die gewählte Aufarbeitungsmethode eine nicht unerhebliche Fehlerquelle darstellt, die es zukünftig näher zu untersuchen gilt. Zu berücksichtigen ist, dass die Messpräzision anhand ein und derselben Probe ermittelt wurde, während die Methodenpräzision aus sechs individuellen, komplett aufgearbeiteten Proben stammte. Die Unsicherheit der Gesamtpräzision setzt sich aus den Summen der einzelnen Fehler zusammen [135]. Somit wird ersichtlich, dass der Fehler der Methodenpräzision durch Aufaddierung der Unsicherheiten aus Messpräzision, Einwaage und Wassergehaltsbestimmung zusammensetzt, und von daher logischerweise größer ist [135].

Es fiel zudem auf, dass die gemessenen Verbascosidsignale bei der Evaluierung der Methodenpräzision mit der Zeit - von der ersten bis zur letzten gemessenen Probe - abnahmen. Bei den Injektionen von Aliquoten der gleichen Lösung sowie gleichen Extraktes trat dieser Effekt nicht auf. Dies deutet auf einen Abbau des Verbascosids bei längerer Aufarbeitungsdauer hin. Bei den beiden IGs konnte dieser Trend nicht beobachtet werden.

7.3.2.3 Robustheit

Die Resultate der Robustheitsbestimmung der matrixfreien Lösungen entsprachen im Wesentlichen denen der Extrakte, bis auf Aucubin, welches im Extrakt eine positive Abweichung von knapp 4% besaß, während die Analytlösungen negative Abweichungen von 1-2% aufzeigten. Dies wird auf Matrixeffekte zurückgeführt. Auffällig ist, dass Aucubin und Catalpol mit Fehlern $\leq 5\%$ kleinere Abweichungen aufwiesen als Verbascosid mit Fehlern zwischen 5-10%. Damit werden die Grenzen von 95-105% Analytstabilität von den beiden IGs Aucubin und Catalpol in den verschiedenen konzentrierten Analytlösungen sowie im Extrakt eingehalten, wohingegen Verbascosid die Robustheitsanforderungen weder innerhalb noch außerhalb relevanter Matrix erfüllt. Verbascosid besitzt demnach sowohl in wässriger Lösung als auch im Extrakt eine geringere Stabilität als die beiden IGs. Folglich wird ein längeres Stehenlassen der Vials im gekühlten Autosampler als kritisch zur Verbascosidquantifizierung beurteilt, wohingegen sich die Quantifizierung der IGs als unproblematisch erweist. Überdies konnte in Analogie zur kontinuierlichen Wertabnahme des Verbascosidsignals mit der Zeit bzw. mit der Anzahl der gemessenen Proben während der Methodenpräzisionsbestimmung (Kapitel 7.3.2.2) bei der Robustheitsevaluierung eine entsprechende Tendenz beobachtet werden. In zukünftigen Robustheitstestungen wäre es, gerade im Hinblick auf die geringe Stabilität des PE Verbascosid, von Interesse, explizit das FP-Aufarbeitsverfahren auf seine Robustheit hin zu kontrollieren, um das Ausmaß stabilitätsbeeinträchtigender Prozessvorgänge hierbei besser beurteilen zu können. Darüber hinaus wäre es interessant, zu erforschen, ob sich die Instabilität auf alle PEs sowie andere Inhaltsstoffe bezieht.

7.3.2.4 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde anhand der Wiederfindung der Referenzen im Rohextrakt evaluiert. Aufgrund der mit etwa 140 und 110 ppm geringen Substanzgehalte der IGs Aucubin respektive Catalpol in der Frischpflanze fanden hier die erweiterten Akzeptanzgrenzen von 80-120% Wiederfindung Anwendung. Das Hauptphenylethanoid Verbascosid bewegte sich mit natürlichen Gehalten von rund 820 ppm am Limit dieser und muss daher strenger beurteilt werden als die beiden IGs. Catalpol erzielte die höchste Wiederfindung der drei Analyten mit $122,20 \pm 19,84\%$ (16,24%) und befand sich somit außerhalb des akzeptablen Bereichs. In Anbetracht der Komplexität der Wiederfindung in nativen Pflanzen(roh)extrakten, für die in der Literatur vermehrt höhere Wiederfindungsabweichungen erzielt und toleriert wurden [167, 168], wurde die Wiederfindung des Catalpols ohne Einsatz eines Korrekturfaktors akzeptiert. Bestärkt wurde die Entscheidung durch die kalkulierte Variabilität der genormten x-Werte von $\pm 19,84\%$, welche sich mit einer relativer Standardabweichung von 16,24%, in Analogie zur Methodenpräzisionsbestimmung (Kapitel 7.3.2.2), innerhalb der akzeptablen 20%-Grenze befand.

Schlechter fiel die Wiederfindung von Aucubin und Verbascosid in der Frischpflanzenmatrix aus. Mit $53,19 \pm 4,57\%$ (8,60%) bzw. $27,07 \pm 8,66\%$ (31,96%) für Aucubin bzw. Verbascosid, bewegten sich die Wiederfindungen ganz klar ausserhalb des in dieser Arbeit

festgelegten Akzeptanzbereichs sowie außerhalb der Toleranzbereiche aus der Literatur [167, 168]. Aufgrund der geringen Standardabweichungen $\leq 10\%$ der Wiederfindungen beider Analyten, welche sich prozentual gesehen bei Verbascosid mit einer inakzeptablen relativen Abweichung von 31,94% deutlich stärker auf das Endergebnis auswirkten als bei Aucubin mit passablen 8,60%, wird die Variabilität der Werte als genügend klein befunden, um mithilfe eines Korrekturfaktors den richtigen Substanzgehalt der beiden Analyten im Spitzwegerich zu bestimmen (Kapitel 7.2.7). Der Korrekturfaktor für Aucubin bzw. Verbascosid beträgt gemäß den Kalkulationen des Kapitels 7.2.7 1,886081 bzw. 3,707524.

Die geringen Wiederfindungen von Aucubin und Verbascosid erhärten den Verdacht auf Substanzverlust des Verbascosids im Zuge der Probenaufbereitung und geben gleichzeitig Grund zu Annahme, dass auch Aucubin im 24-stündigen Aufarbeitsverfahren eine Degradation wiederfährt. Die Hypothese überprüfende Untersuchungen wären hier aufschlussreich. Neben den langen Standzeiten in Aceton/Wasser (1:1, v/v) während der Extraktion werden insbesondere beim Evaporieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer entscheidende Fehlerquellen vermutet. Dabei könnte die Temperatur des Wasserbads sowie Einrotierdauer von Bedeutung sein. Als besonders sensibel wird der Einrotierungsschritt bis fast zur Trockene eingestuft, da bereits ausgefallene Substanz (der Farbe nach vermutlich Verbascosid) am Glasrand ungeschützt der direkten Temperatureinwirkung ausgesetzt ist, wodurch Degradationsreaktionen begünstigt werden. Weiter ist zu klären, inwieweit Substanzen im verwendeten Celitematerial zur Filtration hängen bleiben. Die Aufarbeitsmethode stellt zusammenfassend eine entscheidende Fehlerquelle bei der Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Methode zur Untersuchung des Inhaltsstoffspektrums von *P. lanceolata*, insbesondere der Evaluierung des Parameters Richtigkeit, dar. Es sei deshalb zu überlegen, ob das für Gerbstoffe verifizierte Aufarbeitsverfahren eventuell weiter angepasst oder durch ein komplett anderes Verfahren ersetzt werden sollte, welches besser zur Analytik der instabilen Substanzen geeignet ist. Nicht außer Acht gelassen werden darf hierbei die Tatsache, dass Aucubin und Verbascosid nebeneinander wiedergefunden wurden, wobei die Wiederfindung von Catalpol separat untersucht wurde. Möglicherweise könnte dies auch eine Erklärung dafür sein, dass Catalpol eine Abweichung nach oben erfährt, wohingegen kleinere Mengen an Aucubin und Verbascosid wiedergefunden wurden. Eventuell waren die Extraktionslösungen der Proben, welche über zugesetztes Aucubin und Verbascosid verfügten, zu stark durch die Menge an beiden Komponenten gesättigt, um noch eine ausreichend starke Extraktionsfähigkeit gegenüber der in der Pflanze enthaltenen Verbindungen aufbringen zu können. Auch dieser Aspekt könnte in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden. Weiter muss berücksichtigt werden, dass Aucubin und Verbascosid der „neuen“ Frischpflanze hinzugefügt wurden, der theoretische Sollwert jedoch aus der „alten“ Frischpflanze stammte. Da die Qualität des Wasserbestimmungsverfahrens nicht nach den Validierungskriterien der ICH *guidelines* [160] verifiziert wurde, kann der Fehler der azeotropen Destillation nicht klar definiert werden. Somit stellt das nicht validierte Verfahren,

neben der nicht validierten Probenaufarbeitungsmethode, eine potentielle Fehlerquelle unbekanntes Ausmaßes dar. Auf eine nähere Charakterisierung dieser Fehlerquelle sollte in nachfolgenden Analysen eingegangen werden.

7.3.2.5 Zusammenfassung

Im Rahmen der Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode konnten für Catalpol, Aucubin und Verbascosid in der Spitzwegerichfrischpflanze die Validierungsparameter Linearität, Messbereich, LOD, LOQ, Methodenpräzision, Gerätepräzision als Labor- sowie Wiederholpräzision, Robustheit als Stabilität und Richtigkeit als Wiederfindung erfolgreich evaluiert werden. Unter Zuhilfenahme von Korrekturfaktoren bei der Ermittlung des richtigen Aucubin- und Verbacosidgehalts können alle Parameter als valide eingestuft werden. Ausgenommen davon ist die Stabilität des Verbascosids. Es wird davon ausgegangen, dass sich Verbascosid bei längeren Verweildauern (3 d) zersetzt. Geachtet werden sollte deshalb auf kurze Standdauern der Analyseproben vor der HPLC-DAD-Messung. Zudem lässt die miserable Wiederfindung der verhältnismäßig instabilen Analyten Aucubin und Verbascosid an der Eignung der herangezogenen Aufarbeitungsmethode zweifeln und sollte in zukünftigen Forschungen eingehend überprüft werden. Betont werden soll darüber hinaus die verifizierte, ausreichend gute Messpräzision aller drei Analyten, welche, bei den nachfolgenden Untersuchungen zahlreicher FP-Proben zur Bestimmung des IG- und PE-Inhaltsstoffspektrums des Spitzwegerichs, eine Einfachinjektion, statt den sonst üblichen Duplikatmessungen, legitimiert.

7.4 Zusammenfassung

Die erhaltenen Resultate bestätigen die Validität der neuen HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) zur qualitativen Analytik der IGs Aucubin, Asperulosid, Catalpol und Verbenalin sowie der PEs Verbascosid, Isoverbascosid und Plantamajosid in den Blättern von *P. lanceolata* in den Matizes der frischen, getrockneten und fermentierten Pflanze. Die Quantifizierung von Catalpol, Aucubin und Verbascosid in der Frischpflanze mittels entwickelter HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) kann unter Verwendung der Korrekturfaktoren für Aucubin und Verbascosid ebenfalls als gewährleistet eingestuft werden, wobei aufgrund der geringen Stabilität des Verbascosids auf kurze Standzeiten der Proben geachtet werden muss. Alles in allem eignet sich die im Rahmen dieser Arbeit generierte HPLC-DAD-Methode zur Erforschung des Einflusses des Erntezeitpunkts auf das Inhaltsstoffspektrum der IGs und PEs in den Blättern von *P. lanceolata*. Ein Einsatz der entwickelten Methode in der Routineanalytik zur Qualitätskontrolle diverser IG- und PE-haltiger Pflanzenrohmaterialien sowie deren Produkte ist denkbar.

7.5 Material und Methoden

7.5.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Die eingesetzten Chemikalien sind in Kapitel 10 angegeben. Acetonitril und Methanol für die HPLC-Analytik waren von HPLC grade Qualität. Für die MSⁿ-Analytik wurde Acetonitril mit ultra HPLC grade Qualität eingesetzt. Das verwendete Wasser wurde von einer Milliporefilteranlage bezogen, wobei darauf geachtet wurde, dass eine Leitfähigkeit von $\leq 0,077 \mu\text{S/cm}$ nicht überschritten wurde. Das Wasser wurde spätestens nach sieben Tagen gewechselt. Die der mobilen Phase zugesetzten Säuren zur HPLC-Analytik waren analyserein, die zur MS-Analytik verwendete Ameisensäure hatte MS-Qualität.

7.5.2 Verwendetes Frischpflanzenmaterial

Zur Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode wurde das in Kapitel 10.4.1 aufgeführte FP-Material herangezogen. Ernte und Lagerung des FP-Materials bis zur Analyse fanden gemäß Kapitel 10.4.4 statt. Die Aufarbeitung der FP-Proben zum Analyseextrakt wird in Kapitel 10.4.5 beschrieben.

7.5.3 Verwendete Drogen- und Fermentationsextrakte

Drogenextrakt 5 (Kapitel 6.5.2) mit einer Endkonzentration von 10 mg Drogenmaterial 2 (Kapitel 10.5) pro mL Acetonitril p.a.-Wasser-Gemisch (1:1, v/v) sowie Fermentationsextrakt 3 (Kapitel 6.5.2) wurden zur Identitäts- und Reinheitsbestimmung (Spezifität und Selektivität in Kapitel 7.3.1) genutzt.

7.5.4 Verwendete Referenzen

Im Rahmen der Spezifitäts- und Selektivitätsbestimmungen der generierten HPLC-Methode (Kapitel 7.3.1) wurden die in Kapitel 10.2 angegebenen Referenzsubstanzen verwendet.

Zur Bestimmung der restlichen Validierungsparameter (Kapitel 7.4) wurden die unten aufgelisteten Referenzsubstanzen eingesetzt (Tabelle 7.6).

Tabelle 7.6: Eingesetzte Parameter zur Bestimmung der Validierungsparameter Linearität, Messbereich, LOD, LOQ, Robustheit, Präzision, Richtigkeit.

Bezeichnung	Substanz	Charge	absolute Reinheit	Hersteller
Aucubin	Aucubin 3	-	92%	im Rahmen dieser Arbeit isoliert (Kapitel 3 bzw. 3.3.2.1)
Catalpol	Catalpol 3	8920	97%	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Verbascosid	Verbascosid 2	10528	91%	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland

7.5.5 Herstellung der Analytlösungen

Die verwendeten Referenzsubstanzen (Kapitel 7.5.4) wurden zur Bestimmung des Validierungsparameters Linearität jeweils in Wasser gelöst, entsprechend verdünnt und in Duplikaten vermessen, wobei der resultierenden Mittelwert beider Injektionen ein und derselben Probe als $n=1$ definiert wurde. Motivation war hierbei primär die Definierung eines linearen Arbeitsbereichs. Zur Evaluierung eines Linearitätsbereichs sollten sechs ($N=6$) bzw. mindestens fünf ($N=5$) Kalibrierpunkte der jeweiligen Analysesubstanzen (Aucubin, Catalpol und Verbascosid) dienen. Um den Fehler der Einwaage auf der Analysenfeinwaage minimal zu halten, wurden Mengen ≤ 5 mg eingewogen. Zudem wurden anstatt einer einzigen Einwaage, aus der sechs Verdünnungsreihen unterschiedlicher Konzentrationen entstehen, zwei Einwaagen mit möglichst ähnlichen Mengen an Analysesubstanz vorgenommen, aus denen jeweils drei Verdünnungsreihen erstellt wurden. Näherungsweise wurde für den Bereich eine Linearität angenommen, so dass sich insgesamt $n=6$ für jeden einzelnen Kalibrierpunkt ergaben, deren gemessene Flächen auf eine Konzentration pro Kalibrierpunkt umgerechnet wurden. Es wurde des Weiteren darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Messpunkten äquidistante Abstände vorherrschten, um eine gleichmäßige Verteilung der Kalibrierpunkte und ihre ausgeglichene Gewichtung der einzelnen Kalibrierpunkte zu erreichen. Die hergestellten Analytlösungen (Stammlösung und/oder verdünnte Kalibrierlösung) wurden zudem zur Bestimmung der restlichen Validierungsparameter Präzision, Robustheit und Richtigkeit verwendet.

Catalpol, Aucubin und Verbascosid wurden getrennt voneinander in ein Schnappdeckelglas eingewogen, mit wenig Wasser versetzt und im Ultraschallbad für mindestens 10 min vollständig gelöst. Anschließend wurden sie über einen Glastrichter in einen geeigneten Meßkolben überführt, um eine definierte Konzentration zu erreichen. Um eine quantitative Überführung zu gewährleisten, wurden die Glasgefäße mehrmals mit Wasser nachgespült, bevor der Meßkolben bis zur Markierung aufgefüllt wurde. Nach zehnmalem, langsamem manuellem Umschütteln wurden aus dem Meßkolben entsprechende Aliquote *via* Glasvollpipette in weitere Meßkolben pipettiert, die wiederum mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt und manuell durchmischt wurden. Die Kalibrierlösungen wurden in Plastikfalcons umgefüllt und bei nicht sofortigem Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Die Lagerung in Plastikgefäßen wurde gewählt, da Glasgefäße in vorangegangenen Experimenten bei der gefrorenen Aufbewahrung bei -20°C zerrissen. Zur HPLC-Analyse wurden die Kalibrierlösungen vollständig aufgetaut und wiederholt mindestens zehnmal per Hand durch Umschütteln durchmischt, um eine gute Durchmischung und gleichmäßige Konzentrationsverteilung im Gefäß sicherzustellen. Aus zwei Einwaagen pro Analysesubstanz wurden jeweils drei quasi gleiche Verdünnungsreihen generiert (Kapitel 7.5.7). Die eingewogenen Mengen an Analyt sowie Volumen und Konzentration der daraus resultierenden Stammlösungen sind in Tabelle 7.7 wiedergegeben.

Aus den erstellten Stammlösungen wurden zunächst Verdünnungsreihen mit je sechs unterschiedlich konzentrierten Messpunkten erstellt. Nicht dargestellte Vorversuche mit Frischpflanzenmaterial (Kapitel 7.5.2) gaben Anhaltspunkte über die enthaltenen Sub-

Tabelle 7.7: Einwaagen der Referenzsubstanzen Aucubin, Catalpol und Verbascosid inklusive Volumen und Konzentration der daraus resultierenden Stammlösung.

Substanz	Aucubin	Catalpol	Catalpol ^a	Verbascosid
absolute Reinheit [%]	92	97	97	91
Lösungsvolumen [mL]	100	200	50	100
Einwaage KF1 [mg]	6,98	6,83	5,33	42,93
tatsächliche Menge KF1 [mg] ^b	6,42	6,63	5,17	39,06
Konzentration KF1 [mg/mL] ^c	0,0642	0,1035	0,0332	0,3906
Einwaage KF2 [mg]	6,99	7,26	5,47	48,76
tatsächliche Menge KF2 [mg] ^b	6,43	7,05	5,31	44,37
Konzentration KF2 [mg/mL] ^c	0,0643	0,1062	0,0353	0,4437

^a nachträgliche Einwaage zur Erweiterung des Kalibrierbereichs

^b tatsächliche Menge an eingewogener Substanz nach Einberechnung der absoluten Reinheit

^c Konzentration der resultierenden Stammlösung

stanzmengen in den zu analysierenden Pflanzenproben. Allerdings wurden für Catalpol in nachfolgenden Analysen im Rahmen der Arbeit häufig Mengen außerhalb des linearen Arbeitsbereichs gemessen, weswegen dieser nachträglich auf 10 Messpunkte erweitert wurde. Für Verbascosid wurden zudem zwei Kalibrierpunkte im unteren Bereich eingefügt, um die richtige Berechnung von LOD und LOQ aussagekräftiger bestimmen zu können [161]. In den Tabellen 7.8, 7.9 und 7.10 sind die erstellten Verdünnungen der einzelnen Kalibrierpunkte für Catalpol, Aucubin und Verbascosid angegeben, anhand derer die Validierungsparameter Linearität, Arbeitsbereich, LOD und LOQ ermittelt wurden.

7.5.6 Vorversuche zur Evaluierung der Kalibrierfunktion

Verschieden konzentrierte Analytlösungen (Catalpol, Aucubin und Verbascosid) wurden per entwickelter HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) vermessen. Anhand der Flächen [AUC] der dabei erhaltenen Absorptionssignale [mAU], welche gegen die injizierte Analytkonzentrationen [mg/mL] aufgetragen wurde, konnte eine provisorische Kalibriergerade erstellt werden. Diese wurde mithilfe der Software Valoo (Kapitel 10.7) vor allem auf ihren direkt proportionalen Zusammenhang überprüft. Der Konzentrationsbereich der vorläufigen Kalibriergeraden wurde so angepasst, dass eine lineare Abhängigkeit gemäß der Valoo Software bestätigt werden konnte.

Um den Gehalt der Analysesubstanzen in den zukünftigen FP-Proben abschätzen zu können, wurde aufgearbeitetes FP-Material (Kapitel 7.5.2) *via* HPLC-DAD-Fingerprintmethode analysiert. Es wurde darauf geachtet, dass sich der Extraktwert in der Mitte der Kalibrierfunktion befand. Anhand der vorläufigen Kalibriergeradenfunktion wurden die enthaltenen Analytmengen über die erhaltenen Flächen [AUC] berechnet (Kapitel 8.3.7). Sie dienten neben der Linearitätsbestimmung mittels Valoo als Anhaltspunkt für die Definierung des Arbeits- und Linearitätsbereichs.

Tabelle 7.8: Herstellung der Verdünnungsreihe der Kalibrierfunktionen KF1 und KF2 von Catalpol unter Angabe des eingesetzten Volumens an Stammlösung sowie Gesamtvolumens.

N	Konzentration KF1	Konzentration KF2	Volumen der Stammlösung [mL]	Volumen des Meßkolbens (Gesamtvolumen) [mL]
1	0,1035	0,1062	- ^a	-
2	0,0828	0,0849	4 ^a	5
3	0,0621	0,0667	3 ^a	5
4	0,0414	0,0425	2 ^a	10
5	0,0331	0,0352	- ^b	-
6	0,0265	0,0282	2 ^b	5
7	0,0199	0,0211	2 ^b	5
8	0,0133	0,0141	2 ^b	10
9	0,0066	0,0070	2 ^b	10
10	0,0040	0,0042	2 ^b	25

^a ursprüngliche Einwaage basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche

^b nachträgliche Einwaage zur Erweiterung des Kalibrierbereichs basierend auf den in der Arbeit nachfolgend durchgeführter FP-Analysen

Tabelle 7.9: Herstellung der Verdünnungsreihe der Kalibrierfunktionen KF1 und KF2 von Aucubin unter Angabe des eingesetzten Volumens an Stammlösung sowie Gesamtvolumens.

N	Konzentration KF1	Konzentration KF2	Volumen der Stammlösung [mL]	Volumen des Meßkolbens (Gesamtvolumen) [mL]
1	0,0642	0,0643	-	-
2	0,0541	0,0541	4	5
3	0,0385	0,0385	3	5
4	0,0275	0,0275	2	5
5	0,0128	0,0128	5	25
6	0,0013	0,0013	2	100

Tabelle 7.10: Herstellung der Verdünnungsreihe der Kalibrierfunktionen KF1 und KF2 von Verbascosid unter Angabe des eingesetzten Volumens an Stammlösung sowie Gesamtvolumens.

N	Konzentration KF1	Konzentration KF2	Volumen der Stammlösung [mL]	Volumen des Meßkolbens (Gesamtvolumen) [mL]
1	0,3906	0,4437	-	-
2	0,3125	0,3550	4	5
3	0,2344	0,2662	3	5
4	0,1563	0,1775	4	10
5	0,0781	0,0887	10	50
6	0,0156	0,0177	1 ^a	10
7	0,0078	0,0089	5 ^b	50
8	0,0016	0,0018	1	250

^a Verdünnung erstellt durch 1:10-Verdünnung von Konzentration 4

^b Verdünnung erstellt durch 1:10-Verdünnung von Konzentration 5

7.5.7 Linearität, Messbereich, LOD und LOQ

Zur Evaluierung der Kriterien Linearität, Messbereich, LOD und LOQ wurden die in Kapitel 7.5.5 hergestellten Analytlösungen per entwickelter HPLC-DAD-Methode vermessen. Die erhaltenen Signale mit der Einheit $\text{mAU} \cdot \text{min}$, synonym auch als AUC ausgedrückt, werden im Text auch als y-Wert oder Messwert bezeichnet. Die zugrundeliegenden Berechnungsformeln bzw. expliziten Excelbefehle zur Bestimmung der Validierungsparameter werden in den jeweiligen Unterkapitel des Kapitels 7.2 erläutert und sollen deshalb hier nicht wiederholt werden.

7.5.7.1 Catalpol

Zur Erstellung der Kalibrierfunktion wurden die in Kapitel 7.5.5 hergestellten Analytlösungen in Duplikaten vermessen, wobei der Mittelwert der zweifachen Injektion als $n=1$ gewertet wurde (Tabelle 7.11).

Tabelle 7.11: Messwerte (MW) [AUC] zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Catalpol der beiden Einwaagen (EW1 und EW2) der jeweiligen Kalibrierpunkte N1-N10 der Kalibrierfunktionen KF1, KF2 und KF3.

EW	N	c [mg/mL]	KF1			KF2			KF3		
			MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert
EW1	1	0,1035	4.571.258	4.587.552	4.579.405	4.527.490	4.423.183	4.475.337	4.413.737	4.406.125	4.409.931
	2	0,0828	3.500.213	3.505.964	3.503.089	3.493.583	3.486.908	3.490.246	3.517.929	3.493.840	3.505.885
	3	0,0621	2.614.851	2.626.518	2.620.685	2.611.232	2.610.030	2.610.631	2.626.874	2.613.174	2.620.024
	4	0,0414	1.720.936	1.718.350	1.719.643	1.735.957	1.724.664	1.730.311	1.730.159	1.719.312	1.724.736
	5	0,0331	1.334.639	1.344.313	1.339.476	1.341.548	1.333.158	1.337.353	1.336.638	1.348.314	1.342.476
	6	0,0265	1.085.386	1.096.110	1.090.748	1.087.767	1.087.710	1.087.739	1.073.986	1.049.638	1.061.812
	7	0,0199	786.152	772.615	779.384	787.906	782.793	785.350	777.956	775.383	776.670
	8	0,0133	527.262	537.849	532.556	519.109	519.781	519.445	531.517	533.445	532.481
	9	0,0066	263.681	256.961	260.321	257.254	258.234	257.744	253.693	256.670	255.182
	10	0,0040	150.116	152.838	151.477	154.105	152.059	153.082	148.601	149.302	148.952
EW2	1	0,1062	4.338.202	4.320.029	4.329.116	4.304.216	4.294.957	4.299.587	4.337.672	4.297.216	4.317.444
	2	0,0849	3.446.791	3.447.915	3.447.353	3.428.265	3.439.604	3.433.935	3.444.841	3.425.960	3.435.401
	3	0,0637	2.561.746	2.593.723	2.577.735	2.569.886	2.566.472	2.568.179	2.601.379	2.579.353	2.590.366
	4	0,0425	1.709.730	1.693.612	1.701.671	1.716.838	1.712.878	1.714.858	1.728.369	1.739.172	1.733.771
	5	0,0352	1.422.968	1.439.413	1.431.191	1.396.508	1.391.959	1.394.234	1.382.576	1.391.385	1.406.279
	6	0,0282	1.127.075	1.119.979	1.123.527	1.076.478	1.066.711	1.071.595	995.284	1.035.540	1.077.024
	7	0,0211	806.154	805.342	805.748	791.334	805.342	798.338	797.691	778.741	798.586

EW	N	c [mg/mL]	KF1			KF2			KF3		
			MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert
	8	0,0141	532.018	541.476	536.747	547.201	543.130	545.166	544.057	538.569	541.045
	9	0,0070	261.715	152.336	207.026	246.412	254.759	250.586	251.875	251.828	234.567
	10	0,0042	160.897	158.197	159.547	153.662	156.422	155.042	152.798	153.476	156.255
EW2 ^a	1	0,1035	4.227.237	4.209.529	4.218.383	4.194.120	4.185.098	4.189.609	4.226.721	4.187.299	4.207.010
	2	0,0828	3.358.627	3.359.722	3.359.175	3.340.575	3.351.624	3.346.099	3.356.727	3.338.329	3.347.528
	3	0,0621	2.496.220	2.527.379	2.511.800	2.504.152	2.500.825	2.502.489	2.534.839	2.513.377	2.524.108
	4	0,0414	1.665.998	1.650.292	1.658.145	1.672.924	1.669.065	1.670.994	1.684.160	1.694.686	1.689.423
	5	0,0331	1.338.726	1.354.198	1.346.462	1.313.833	1.309.553	1.311.693	1.300.725	1.309.013	1.323.025
	6	0,0265	1.060.351	.053.675	1.057.013	1.012.749	1.003.560	1.008.155	936.362	974.235	1.013.262
	7	0,0199	758.428	757.665	758.047	744.486	757.665	751.075	750.467	732.638	751.309
	8	0,0133	500.522	509.420	504.971	514.806	510.976	512.891	511.848	506.685	509.015
	9	0,0066	246.221	143.317	194.769	231.824	239.677	235.750	236.964	236.919	220.680
	10	0,0040	151.372	148.832	150.102	144.565	147.162	145.863	143.752	144.390	147.005

^a EW2 in EW1 umgerechnet

Die gemittelten Messsignale der Duplikate pro Kalibrierpunkt wurden wiederum gemittelt (n=6). Dabei konnten prozentuale Standardabweichungen von ≤ 5 verzeichnet werden, welche auf unauffällige Variationen der Messsignale schließen ließen (Tabelle 7.12).

Tabelle 7.12: Gemittelte Messwerte (MW) [AUC] zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Catalpol der beiden Einwaagen (EW1 und EW2) der jeweiligen Kalibrierpunkte N1-N10 der Kalibrierfunktionen KF1, KF2 und KF3, aus denen der gemittelte y-Wert $y_{\text{gemittelt}}$ [AUC] für jeden Kalibrierpunkt erhalten werden konnte (n=6).

N	EW1			EW2			$y_{\text{gemittelt}}$	STABW	STABW [%]
	KF1	KF2	KF3	KF1	KF2	KF3			
1	4.579.405	4.475.337	4.409.931	4.218.383	4.189.609	4.207.010	4.346.612	164.532	3,79
2	3.503.089	3.490.246	3.505.885	3.359.175	3.346.099	3.347.528	3.425.337	81.801	2,39
3	2.620.685	2.610.631	2.620.024	2.511.800	2.502.489	2.524.108	2.564.956	57.655	2,25
4	1.719.643	1.730.311	1.724.736	1.658.145	1.670.994	1.689.423	1.698.875	30.377	1,79
5	1.339.476	1.337.353	1.342.476	1.346.462	1.311.693	1.304.869	1.330.388	17.529	1,32
6	1.090.748	1.087.739	1.061.812	1.123.527	1.071.595	1.015.412	1.075.139	36.059	3,35
7	779.384	785.350	776.670	805.748	798.338	788.216	788.951	11.191	1,42
8	532.556	519.445	532.481	536.747	545.166	541.313	534.618	8.940	1,67
9	260.321	257.744	255.182	257.026	250.586	251.852	255.452	3.692	1,45
10	151.477	153.082	148.952	159.547	155.042	153.137	153.539	3.578	2,33

Mithilfe der gemittelten y -Werte wurde kalkuliert, ob ein linearer oder quadratischer Zusammenhang zwischen Messsignal und resultierendem Substanzgehalt vorlag (Tabellen 7.13 und 7.14). Da der unterste Kalibrierpunkt mit 0,0040 mg/mL unterhalb des LOQs lag, wurde zur Bestimmung der Kalibrierfunktion und den dazugehörigen Parametern mit $N=9$ (N2-N10) gearbeitet. Die Grenzen des Linearitätsbereichs für Catalpol stimmen deshalb nicht mit denen des Messbereichs überein.

Tabelle 7.13: Berechnete Validierungsparameter zur Evaluierung des Messbereichs für Catalpol, mit $N=9$ (N2-N10) und $n=6$.

Validierungsparameter	lineare Regression	quadratische Regression
Q_{xx}	0,008715 ^a	0,008715 ^a
Q_{yy}	15473753410980 ^{a, b}	d
Q_{xy}	367196 ^a	367196 ^a
Q_{x^3}	d	0,0009462 ^a
Q_{x^4}	d	0,00010875 ^a
Q_{x^2y}	d	39968 ^a
Steigung der linearen Kalibrierfunktion m	42133131 ^{a, b}	40277752 ^a
Steigung der quadratischen Kalibrierfunktion n	d	17090042 ^a
Arbeitsbereichsmittle der y -Werte \bar{y}	1780036 ^a	d
Arbeitsbereichsmittle der x -Werte \bar{x}	0,0432 ^a	0,0432 ^a
Ordinatenabschnitt b	-41668 ^{a, b}	-9945 ^{a, b}
Reststandardabweichung S_y	19357 ^{a, b}	11991 ^a
Anzahl der einbezogenen Kalibrierpunkte	9 (N2-N10)	9 (N2-N10)
Empfindlichkeit E	d	41755592 ^a
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	0,0004594 ^a	0,0002872 ^a
relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	1,06 ^a	0,66 ^a
Bestimmtheitsmaß r^2	0,9998 ^b	c
Korrelationskoeffizient r nach Korrel	0,9999 ^b	c
Korrelationskoeffizient r nach Pearson	0,9999 ^b	c
LOD [mg/mL]	0,0015 ^a	c

^a aus den Berechnungen erhalten

^b aus den Excelbefehlen erhalten

^c nicht bestimmt

^d entfällt

Tabelle 7.14: Test nach Mandel zur Verifizierung einer linearen KF für Catalpol, mit N=9 (N2-N10) und n=6.

Validierungsparameter	Resultat
Restvarianzdifferenz Δs^2	$1,76 \cdot 10^9$
Prüfgröße PG	12,24
aus F-Wert (99%)	13,75
aus F-Wert (95%)	5,99

Validierungsparameter	lineare Regression	quadratische Regression
LOQ [mg/mL]	0,0046 ^a	^c

^a aus den Berechnungen erhalten

^b aus den Excelbefehlen erhalten

^c nicht bestimmt

^d entfällt

Da die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} der quadratischen Regression mit 0,66 kleiner als die der linearen mit 1,06 war, wurde der Test nach Mandel angewendet. Der Vergleich der erhobenen Prüfgröße mit dem F-Wert (99%) rechtfertigte die angenäherte Annahme eines direkt proportionalen Zusammenhangs zwischen dem Messsignals und der Substanzkonzentration [mg/mL] und verifizierte die Linearität des untersuchten Messbereichs (Tabelle 7.14). [161]

Wurden alle Kalibrierpunkte zur Festlegung des LODs und LOQs von Catalpol (N1-N10) herangezogen, so ergab sich ein LOQ-Wert von 0,0048 mg/mL (Tabelle 7.13 in Kapitel 7.5.7.1), der oberhalb des untersten Kalibrierpunkts (N10) mit 0,0040 mg/mL lag. Somit galt dieser nicht mehr als genügend abgesichert, wodurch sich der Messbereich verkleinerte. Grund waren die hohen Konzentrationen der KF, welche mathematisch zu höheren LOD- und LOQ-Werten führen, als z.T. tatsächlich richtig und notwendig. Um auch die Frischpflanzenproben mit sehr geringem Catalpolgehalt quantitativ beurteilen zu können, wurde deshalb zur Bestimmung des LODs und LOQs nur der untere Kalibrierbereich N2-N10 betrachtet [161], wodurch sich ein LOD und ein LOQ von 0,0015 mg/mL bzw. 0,0046 mg/mL erreichen ließen.

Schlussendlich lieferte die Validierungskalkulation für Catalpol einen linearen Arbeitsbereich zwischen 0,0066-0,1035 mg/mL mit dazugehörigem LOD und LOQ von 0,0015 mg/mL bzw. 0,0046 mg/mL aus neun äquidistanten Kalibrierpunkten. Außerhalb des Arbeitsbereichs befindlicher LOD und LOQ gewährleisteten eine aussagekräftige Quantifizierung innerhalb der angegebenen Messgrenzen.

7.5.7.2 Aucubin

Zur Ermittlung der Kalibrierfunktion wurden die in Kapitel 7.5.5 hergestellten Analytlösungen in Duplikaten vermessen, wobei der Mittelwert der zweifachen Injektion als $n=1$ gewertet wurde (Tabelle 7.15).

Tabelle 7.15: Messwerte (MW) [AUC] zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Aucubin der beiden Einwaagen (EW1 und EW2) der jeweiligen Kalibrierpunkte N1-N6 der Kalibrierfunktionen KF1, KF2 und KF3.

EW	N	c [mg/mL]	KF1			KF2			KF3		
			MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert
EW1	1	0,0642	4.405.408	4.315.484	4.360.446	4.326.496	4.358.299	4.342.398	4.441.458	4.300.668	4.371.063
	2	0,0514	3.475.113	3.372.386	3.423.750	3.398.865	3.393.408	3.396.137	3.525.622	3.382.163	3.453.893
	3	0,0385	2.573.050	2.521.051	2.547.051	2.492.514	2.465.733	2.479.124	2.529.213	2.447.349	2.488.281
	4	0,0257	1.725.781	1.696.431	1.711.106	1.733.263	1.720.541	1.726.902	1.720.004	1.682.401	1.701.203
	5	0,0128	853.044	838.695	845.870	835.755	832.224	833.990	848.012	831.363	839.688
	6	0,0013	80.664	81.137	80.901	79.929	79.372	79.651	80.447	79.623	80.035
EW2	1	0,0643	4.601.341	4.379.298	4.490.320	4.605.465	4.377.473	4.491.469	4.407.028	4.396.046	4.401.537
	2	0,0514	3.502.167	3.414.751	3.458.459	3.535.435	3.455.598	3.495.517	3.440.463	3.482.082	3.461.273
	3	0,0385	2.553.870	2.476.532	2.515.201	2.571.773	2.509.142	2.540.458	2.523.452	2.557.848	2.540.650
	4	0,0257	1.718.832	1.674.659	1.696.746	1.736.177	1.728.037	1.732.107	1.673.335	1.693.276	1.683.306
	5	0,0128	849.416	855.958	852.687	854.950	845.544	850.247	867.733	862.856	865.295
	6	0,0013	82.951	84.354	83.653	81.943	86.648	84.296	85.664	84.994	85.329
EW2 ^a	1	0,0642	4.594.758	4.373.033	4.483.896	4.598.876	4.371.211	4.485.043	4.400.723	4.389.757	4.395.240
	2	0,0514	3.502.167	3.414.751	3.458.459	3.535.435	3.455.598	3.495.517	3.440.463	3.482.082	3.461.273
	3	0,0385	2.553.870	2.476.532	2.515.201	2.571.773	2.509.142	2.540.458	2.523.452	2.557.848	2.540.650
	4	0,0257	1.718.832	1.674.659	1.696.746	1.736.177	1.728.037	1.732.107	1.673.335	1.693.276	1.683.306

EW	N	c [mg/mL]	KF1			KF2			KF3		
			MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert
	5	0,0128	849.416	855.958	852.687	854.950	845.544	850.247	867.733	862.856	865.295
	6	0,0013	82.951	84.354	83.653	81.943	86.648	84.296	85.664	84.994	85.329

^a EW2 in EW1 umgerechnet

Die gemittelten Messsignale der Duplikate pro Kalibrierpunkt wurden wiederum gemittelt (n=6). Dabei konnten prozentuale Standardabweichungen von ≤ 5 verzeichnet werden, welche auf unauffällige Variationen der Messsignale schließen ließen (Tabelle 7.16).

Tabelle 7.16: Gemittelte Messwerte (MW) [AUC] zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Aucubin der beiden Einwaagen (EW1 und EW2) der jeweiligen Kalibrierpunkte N1-N6 der Kalibrierfunktionen KF1, KF2 und KF3, aus denen der gemittelte y-Wert $y_{\text{gemittelt}}$ [AUC] für jeden Kalibrierpunkt erhalten werden konnte (n=6).

N	EW1			EW2			$y_{\text{gemittelt}}$	STABW	STABW [%]
	KF1	KF2	KF3	KF1	KF2	KF3			
1	4.360.446	4.342.398	4.371.063	4.483.896	4.485.043	4.395.240	4.406.348	62.884	1,43
2	3.423.750	3.396.137	3.453.893	3.458.459	3.495.517	3.461.273	3.448.171	34.222	0,99
3	2.547.051	2.479.124	2.488.281	2.515.201	2.540.458	2.540.650	2.518.461	29.197	1,16
4	1.711.106	1.726.902	1.701.203	1.696.746	1.732.107	1.683.306	1.708.561	18.595	1,09
5	845.870	833.990	839.688	852.687	850.247	865.295	847.963	10.918	1,29
6	80.901	79.651	80.035	83.653	84.296	85.329	82.311	2.412	2,93

Mithilfe der gemittelten y -Werte konnten Validierungskriterien berechnet und die Entscheidung über einen linearen oder quadratischen Zusammenhang zwischen Messsignal und resultierendem Substanzgehalt getroffen werden. Diese wurden unter Miteinbeziehung aller sechs Kalibrierpunkte berechnet (Daten nicht aufgeführt). Da die daraus resultierende LOD- und LOQ-Werte von 0,0025 mg/mL bzw. 0,0076 mg/mL weit über dem untersten Kalibrierpunkt (0,0013 mg/mL) der KF lagen, wurde - trotz der erlaubten Annahme eines linearen Zusammenhangs laut dem Test nach Mandel (95%) - der unterste Kalibrierpunkt nicht in die Kalkulation der Geradengleichung miteinbezogen. Die fünf verbleibenden Kalibrierpunkte N1-N5 führten zu unten aufgelisteten Validierungsparametern (Tabelle 7.17).

Tabelle 7.17: Berechnete Validierungsparameter zur Evaluierung des Messbereichs für Aucubin, mit N=5 (N1-N5) und n=6.

Validierungsparameter	lineare Regression	quadratische Regression
Q_{xx}	0,001649 ^a	0,001649 ^a
Q_{yy}	7852238711162 ^{a, b}	d
Q_{xy}	113744 ^a	113744 ^a
Q_{x^3}	d	0,0001271 ^a
Q_{x^4}	d	0,00001018 ^a
Q_{x^2y}	d	8817 ^a
Steigung der linearen Kalibrierfunktion m	68957735 ^{a, b}	40221242 ^a
Steigung der quadratischen Kalibrierfunktion n	d	136392311 ^a
Arbeitsbereichsmittle der y-Werte \bar{y}	2585901 ^a	d
Arbeitsbereichsmittle der x-Werte \bar{x}	0,0385 ^a	0,0385 ^a
Ordinatenabschnitt b	-35102 ^{a, b}	86470 ^{a, b}
Reststandardabweichung S_y	53828 ^{a, b}	28340 ^a
Anzahl der einbezogenen Kalibrierpunkte	5 (N1-N5)	5 (N1-N5)
Empfindlichkeit E	d	68957735 ^a
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	0,0007806 ^a	0,0004110 ^a
relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	2,03 ^a	1,07 ^a
Bestimmtheitsmaß r^2	0,9989 ^b	c
Korrelationskoeffizient r nach Korrel	0,9994 ^b	c
Korrelationskoeffizient r nach Pearson	0,9994 ^b	c
LOD [mg/mL]	0,0026 ^a	c
LOQ [mg/mL]	0,0078 ^a	c

^a aus den Berechnungen erhalten^b aus den Excelbefehlen erhalten^c nicht bestimmt^d entfällt

Da die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} der quadratischen Regression mit 1,07 kleiner als die der linearen mit 2,03 war, wurde der Test nach Mandel angewendet. Der Vergleich der erhobenen Prüfgröße mit dem F-Wert (95%) rechtfertigte die

näherungsweise Annahme eines direkt proportionalen Zusammenhangs zwischen dem Messsignal und der Substanzkonzentration [mg/mL] und verifizierte die Linearität des untersuchten Messbereichs (Tabelle 7.18). [161]

Tabelle 7.18: Test nach Mandel zur Verifizierung einer linearen KF für Aucubin, mit N=5 (N1-N5) und n=6.

Validierungsparameter	Resultat
Restvarianzdifferenz Δs^2	$7,09 \cdot 10^9$
Prüfgröße PG	8,82
aus F-Wert (99%)	98,50
aus F-Wert (95%)	18,51

Schlussendlich konnte für Aucubin aus fünf äquidistanten Kalibrierpunkten (N1-N5) ein linearer Messbereich zwischen 0,0128-0,0642 mg/mL erarbeitet werden. Eine einwandfreie Quantifizierung im Messbereich wird durch die unterhalb des niedrigsten Kalibrierpunktes gelegenen LOD- und LOQ-Wertes mit 0,0025 mg/mL bzw. 0,0076 mg/mL verifiziert, welche anhand der unteren sechs Kalibrierpunkte kalkuliert wurden.

7.5.7.3 Verbascosid

Zur Definierung der Kalibrierfunktion wurden die in Kapitel 7.5.5 hergestellten Analytlösungen in Duplikaten vermessen, wobei der Mittelwert der zweifachen Injektion als n=1 gewertet wurde (Tabelle 7.19). Die Kalibrierpunkte N6 und N7 wurden aus den Lösungen der Punkte N4 bzw. N5 verdünnt (1:10, v/v). Dazu ist anzumerken, dass N6 nur aus einer Einwaage (EW1) der Konzentration N4 gewonnen wurde. Die entsprechenden Verdünnungen werden im Folgenden als N6A und N6B bezeichnet und tauchen deshalb nur unter EW1 auf.

Tabelle 7.19: Messwerte (MW) [AUC] zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Verbascosid der beiden Einwaagen (EW1 und EW2) der jeweiligen Kalibrierpunkte N1-N8 der Kalibrierfunktionen KF1, KF2 und KF3.

EW	N	c [mg/mL]	KF1			KF2			KF3		
			MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert
EW1	1	0,3906	28.149.612	28.003.192	28.076.402	27.494.870	27.453.060	27.473.965	26.139.154	26.059.460	26.099.307
	2	0,3125	21.713.312	21.151.699	21.432.506	21.570.935	21.320.578	21.445.757	21.187.052	21.059.460	21.123.256
	3	0,2344	15.900.142	15.826.403	15.863.273	15.881.160	15.595.575	15.738.368	15.598.701	15.870.576	15.734.639
	4	0,1563	10.472.071	10.388.604	10.430.338	10.381.191	10.413.165	10.397.178	10.472.036	10.370.591	10.421.314
	5	0,0781	5.069.372	5.076.986	5.073.179	5.145.073	5.208.032	5.176.553	5.108.696	5.115.104	5.111.900
	6A	0,0156	1.065.139	1.064.743	1.064.941	1.070.887	1.055.672	1.063.280	1.063.956	1.060.297	1.062.127
	6B	0,0156	1.058.175	1.059.309	1.058.742	1.067.426	1.066.984	1.067.205	1.082.767	1.084.090	1.083.429
	7	0,0078	559.403	555.796	557.600	555.791	551.692	553.742	542.556	541.576	542.066
8	0,0016	83.854	83.080	83.467	91.180	75.164	83.172	83.584	81.595	82.590	
EW2	1	0,4437	28.445.825	28.287.194	28.366.510	27.357.007	27.277.884	27.317.446	26.894.504	26.955.781	26.925.143
	2	0,3550	22.011.274	22.173.089	22.092.182	21.881.420	21.879.180	21.880.300	21.631.774	21.455.666	21.543.720
	3	0,2662	16.278.342	16.179.706	16.229.024	16.303.571	16.265.161	16.284.366	16.112.423	16.081.830	16.097.127
	4	0,1775	10.707.087	10.673.265	10.690.176	10.957.404	10.802.137	10.879.771	10.724.771	10.615.007	10.669.889
	5	0,0887	5.333.032	5.325.007	5.329.020	5.318.211	5.303.193	5.310.702	5.307.245	5.335.162	5.321.204
	6	0,0177	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	7	0,0089	542.186	546.631	544.409	552.380	548.551	550.466	550.285	552.265	551.275

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

EW	N	c [mg/mL]	KF1			KF2			KF3		
			MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert	MW1	MW2	Mittelwert
	8	0,0018	90.392	90.697	90.545	84.471	85.941	85.206	89.544	90.562	90.053
EW1 ^b	1	0,4437	31.974.882	31.808.564	31.891.723	31.231.166	31.183.675	31.207.420	29.691.221	29.600.697	29.645.959
	2	0,3550	24.663.948	24.026.017	24.344.983	24.502.224	24.217.846	24.360.035	24.066.175	23.921.244	23.993.709
	3	0,2662	18.060.823	17.977.063	18.018.943	18.039.261	17.714.868	17.877.065	17.718.419	18.027.239	17.872.829
	4	0,1775	11.895.128	11.800.318	11.847.723	11.791.898	11.828.217	11.810.057	11.895.088	11.779.858	11.837.473
	5	0,0887	5.758.252	5.766.901	5.762.577	5.844.240	5.915.755	5.879.998	5.802.920	5.810.199	5.806.559
	6A	0,0177	1.209.881	1.209.432	1.209.657	1.216.411	1.199.128	1.207.769	1.208.538	1.204.381	1.206.460
	6B	0,0177	1.201.971	1.203.259	1.202.615	1.212.479	1.211.977	1.212.228	1.229.905	1.231.408	1.230.656
	7	0,0089	635.421	631.323	633.372	631.318	626.662	628.990	616.284	615.171	615.728
	8	0,0018	95.249	94.370	94.809	103.571	85.378	94.474	94.942	92.683	93.813

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Die gemittelten Messsignale der Duplikate pro Kalibrierpunkt wurden wiederum gemittelt (n=6). Dabei konnten prozentuale Standardabweichungen von ≤ 5 verzeichnet werden, welche auf unauffällige Variationen der Messsignale schließen ließen (Tabelle 7.20).

Tabelle 7.20: Gemittelte Messwerte (MW) [AUC] zur Erstellung der Kalibrierfunktion von Verbascosid der beiden Einwaagen (EW1 und EW2) der jeweiligen Kalibrierpunkte N1-N8 der Kalibrierfunktionen KF1, KF2 und KF3, aus denen der gemittelte y-Wert $y_{\text{gemittelt}}$ [AUC] für jeden Kalibrierpunkt erhalten werden konnte (n=6).

N	EW1			EW2			$y_{\text{gemittelt}}$	STABW	STABW [%]
	KF1	KF2	KF3	KF1	KF2	KF3			
1	31.891.723	31.207.420	29.645.959	28.366.510	27.317.446	26.925.143	29.225.700	2.043.708	6,99
2	24.344.983	24.360.035	23.993.709	22.092.182	21.880.300	21.543.720	23.035.821	1.329.439	5,77
3	18.018.943	17.877.065	17.872.829	16.229.024	16.284.366	16.097.127	17.063.226	945.204	5,54
4	11.847.723	11.810.057	11.837.473	10.690.176	10.879.771	10.669.889	11.289.181	598.974	5,31
5	5.762.577	5.879.998	5.806.559	5.329.020	5.310.702	5.321.204	5.568.343	274.348	4,93
6	1.209.657	1.207.769	1.206.460	1.202.615	1.212.228	1.230.656	1.211.564	9.891	0,82
7	633.372	628.990	615.728	544.409	550.466	551.275	587.373	42.809	7,29
8	94.809	94.474	93.813	90.545	85.206	90.053	91.483	3.681	4,02

Mithilfe der gemittelten y -Werte konnte errechnet werden, ob ein linearer oder quadratischer Zusammenhang zwischen Messsignal und resultierendem Substanzgehalt vorlag. Diese wurden unter Miteinbeziehung aller acht Kalibrierpunkte berechnet (Daten nicht gezeigt). Über den Vergleich der relativen Verfahrensstandardabweichungen der quadratischen mit der der linearen Regression sowie gemäß des Tests nach Mandel zeigte sich für $N=8$ eine quadratische Beziehung zwischen x - und y -Werten. Erfahrungswerte ließen vermuten, dass der Grund für den nicht-linearen Kontext in den oberen oder unteren Randbereichen lag, welche häufig nicht-linearen Relationen folgen [161]. Da sich die untere(n) Konzentration(en) unterhalb des LODs und LOQs befand(en), wurden von unten her so lange Werte entfernt, bis die Kalibriergerade im linearen Bereich lag. Letztlich ergab sich ein Linearitätsbereich aus den oberen fünf Kalibrierpunkten N1-N5. Die quadratische Regression lieferte dabei zwar kleinere relative Verfahrensstandardabweichungen als die lineare, doch konnte mithilfe des Tests nach Mandel (99%) die näherungsweise Annahme einer direkten Proportionalität angewendet werden (Tabelle 7.21).

Tabelle 7.21: Berechnete Validierungsparameter zur Evaluierung des Messbereichs für Verbascosid, mit N=5 (N1-N5) und n=6.

Validierungsparameter	lineare Regression	quadratische Regression
Q_{xx}	0,078754 ^a	0,078754 ^a
Q_{yy}	348918552259794 ^{a, b}	d
Q_{xy}	5241294 ^a	5241294 ^a
Q_{x^3}	d	0,0419331 ^a
Q_{x^4}	d	0,02319594 ^a
Q_{x^2y}	d	2799726 ^a
Steigung der linearen Kalibrierfunktion m	66553103 ^{a, b}	61063915 ^a
Steigung der quadratischen Kalibrierfunktion n	d	10309125 ^a
Arbeitsbereichsmittle der y-Werte \bar{y}	17236454 ^a	d
Arbeitsbereichsmittle der x-Werte \bar{x}	0,2662 ^a	0,2662 ^a
Ordinatenabschnitt b	-481952 ^{a, b}	86364 ^{a, b}
Reststandardabweichung S_y	178140 ^{a, b}	38217 ^a
Anzahl der einbezogenen Kalibrierpunkte	5 (N1-N5)	5 (N1-N5)
Empfindlichkeit E	d	66553103 ^a
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	0,0026767 ^a	0,0005742 ^a
relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	1,01 ^a	0,22 ^a
Bestimmtheitsmaß r^2	0,9997 ^b	c
Korrelationskoeffizient r nach Korrel	0,9999 ^b	c
Korrelationskoeffizient r nach Pearson	0,9999 ^b	c
LOD [mg/mL]	0,0088 ^a	c
LOQ [mg/mL]	0,0268 ^a	c

^a aus den Berechnungen erhalten^b aus den Excelbefehlen erhalten^c nicht bestimmt^d entfällt

Da die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} der quadratischen Regression mit 0,22 kleiner als die der linearen mit 1,01 war, wurde der Test nach Mandel angewendet.

Die zur Linearitätsannahme führenden Werte des Tests nach Mandel für N=8, N=7, N=6 und N=5 sind in Tabelle 7.22 angegeben.

Tabelle 7.22: Test nach Mandel zur Verifizierung einer linearen KF für Verbascosid, für N=8, N=7, N=6 und N=5 bei n=6.

Validierungsparameter	N=8	N=7	N=6	N=5
Restvarianzdifferenz Δs^2	$2,55 \cdot 10^{11}$	$2,52 \cdot 10^{11}$	$2,24 \cdot 10^{11}$	$9,23 \cdot 10^{10}$
Prüfgröße PG	101,30	165,72	206,95	63,18
aus F-Wert (99%)	16,26	21,20	34,12	98,50
aus F-Wert (95%)	6,61	7,71	10,13	18,51

Der Vergleich der erhobenen Prüfgröße für N=5 mit dem F-Wert (99%) rechtfertigte die Annahme eines direkt proportionalen Zusammenhangs zwischen dem Messsignal und der Substanzkonzentration [161]. Zudem befanden sich der ermittelte LOD- und LOQ-Wert mit 0,0088 mg/mL bzw. 0,0268 mg/mL unterhalb der niedrigsten Konzentration des Kalibrierbereichs (0,0887 mg/mL), wodurch eine einwandfreie Quantifizierung im Messbereich legitimiert wird. Somit konnte letztendlich für Verbascosid ein linearer Messbereich zwischen 0,0887-0,4437 mg/mL aus fünf äquidistanten Kalibrierpunkten (N1-N5) evaluiert werden.

7.5.8 Präzision

7.5.8.1 Messpräzision

Die Messpräzision der Quantifizierung der Analyten Catalpol, Aucubin und Verbascosid mittels entwickelter HPLC-DAD-Methode wurde über den gesamten Arbeitsbereich getestet. Dazu wurden verschieden konzentrierte, matrixfreie Analytlösungen verwendet. Zusätzlich wurde der Effekt der Matrix durch die Analytik im Rohextrakt des Spitzweigrichs untersucht, wobei durch die Verwendung ein und desselben Extraktes zur Analyse auf eine Normierung auf eine definierte Einwaagemenge oder Wassergehalt verzichtet werden konnte.

Catalpol Für Catalpol wurden, neben dem Extrakt (Tabelle 7.23), drei verschiedene Analytkonzentrationen (0,0849 mg/mL, 0,0265 mg/mL, 0,0066 mg/mL) zur Festlegung der *intra*- und *interday* Messpräzision eingesetzt (Tabelle 7.24, Tabelle 7.25, Tabelle 7.26). Ausgangsmaterial zur Extrakterstellung war das „neue“ FP-Material.

Tabelle 7.23: Erhaltene Flächen von Catalpol im Extrakt zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	1.949.789	1.956.105	1.953.437
2	1.929.135	1.930.637	1.935.144
3	1.919.182	1.891.529	1.889.037
4	1.902.539	1.886.940	1.880.631
5	1.878.432	1.885.821	1.876.182
6	1.872.838	1.891.428	1.883.078
MW	1.908.653	1.907.077	1.902.918
STABW	29.853	29.335	32.828
STABW [%]	1,56	1,54	1,73

Tabelle 7.24: Erhaltene Flächen von Catalpol in wässriger Lösung (0,0849 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	3.600.048	3.585.533	3.627.667
2	3.571.090	3.567.757	3.595.692
3	3.515.720	3.486.703	3.544.735
4	3.504.179	3.497.198	3.483.563
5	3.482.873	3.472.171	3.460.182
6	3.502.723	3.481.044	3.453.274
MW	3.529.439	3.515.068	3.527.519
STABW	45.670	48.710	73.420
STABW [%]	1,29	1,39	2,08

Tabelle 7.25: Erhaltene Flächen von Catalpol in wässriger Lösung (0,0265 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	1.165.420	1.147.133	1.130.485
2	1.145.718	1.154.327	1.126.010
3	1.142.297	1.127.968	1.103.956
4	1.142.620	1.109.776	1.101.300
5	1.122.811	1.104.734	1.074.382
6	1.106.996	1.090.688	1.080.993
MW	1.137.644	1.122.438	1.102.854
STABW	20.211	25.057	22.768
STABW [%]	1,78	2,23	2,06

Tabelle 7.26: Erhaltene Flächen von Catalpol in wässriger Lösung (0,0066 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	264.266	253.027	254.474
2	263.199	254.892	257.225
3	259.960	260.758	249.524
4	264.180	256.305	255.247
5	257.358	252.738	259.778
6	261.366	253.531	256.553
MW	261.722	255.209	255.467
STABW	2.719	3.026	3.441
STABW [%]	1,04	1,19	1,35

Aus den HPLC-Messungen für Catalpol ergaben sich schließlich *intra-* (Tabelle 7.27) und *interday* (Tabelle 7.28) Messpräzisionen $\leq 5\%$, welche in Kapitel 7.3.2.2 diskutiert werden.

Tabelle 7.27: Wiederholungsmesspräzision von Catalpol aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen (n=6).

	Extrakt	0,0849 mg/mL	0,0265 mg/mL	0,0066 mg/mL
MW	1.906.216	3.524.008	1.120.979	257.466
STABW	30.672	55.933	22.678	3.062
STABW [%]	1,64	1,59	2,02	1,19

Tabelle 7.28: Labormesspräzision von Catalpol aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen (n=3).

	Extrakt	0,0849 mg/mL	0,0265 mg/mL	0,0066 mg/mL
MW	1.906.216	3.524.008	1.120.979	257.466
STABW	2.963	7.802	17.441	3.688
STABW [%]	0,16	0,22	1,56	1,43

Aucubin Für Aucubin wurden, neben dem Extrakt (Tabelle 7.29), zwei verschiedene Analytkonzentrationen (0,0514 mg/mL, 0,0128 mg/mL) zur Festlegung der *intra*- und *interday* Messpräzision eingesetzt (Tabelle 7.30, Tabelle 7.31). Ausgangsmaterial zur Extrakterstellung war das „neue“ FP-Material.

Tabelle 7.29: Erhaltene Flächen von Aucubin im Extrakt zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	3.015.733	2.749.092	2.906.635
2	2.963.147	2.771.222	2.889.734
3	2.912.701	2.663.819	2.830.617
4	2.851.894	2.617.334	2.808.509
5	2.764.939	2.641.922	2.807.159
6	2.747.266	2.663.918	2.804.810
MW	2.875.947	2.684.551	2.841.244
STABW	107.661	61.430	45.389
STABW [%]	3,74	2,29	1,60

Tabelle 7.30: Erhaltene Flächen von Aucubin in wässriger Lösung (0,0514 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	3.557.189	3.576.590	3.548.753
2	3.535.905	3.518.496	3.535.288
3	3.433.063	3.535.566	3.465.272
4	3.397.600	3.447.460	3.488.008
5	3.439.891	3.483.882	3.460.458
6	3.456.572	3.469.397	3.424.375
MW	3.470.037	3.505.232	3.487.026
STABW	62.671	47.467	47.423
STABW [%]	1,81	1,35	1,36

Tabelle 7.31: Erhaltene Flächen von Aucubin in wässriger Lösung (0,0128 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	812.151	807.200	804.914
2	806.511	796.852	804.490
3	801.085	808.847	802.217
4	820.104	808.559	818.803
5	816.927	800.935	799.494
6	816.284	815.806	819.658
MW	812.177	806.367	808.263
STABW	7.175	6.645	8.716
STABW [%]	0,88	0,82	1,08

Aus den HPLC-Messungen für Aucubin ergaben sich schließlich *intra-* (Tabelle 7.32) und *interday* (Tabelle 7.33) Messpräzisionen $\leq 5\%$, wobei die Abweichungen der Substanz im Extrakt deutlich höher ausfallen als die in den matrixfreien Lösungen. Zur Diskussion der Resultate sei auf Kapitel 7.3.2.2 verwiesen.

Tabelle 7.32: Wiederholungsmesspräzision von Aucubin aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen (n=6).

	Extrakt	0,0849 mg/mL	0,0265 mg/mL
MW	2.800.581	3.487.431	808.935
STABW	71.494	52.520	7.512
STABW [%]	2,54	1,51	0,93

Tabelle 7.33: Labormesspräzision von Aucubin aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen (n=3).

	Extrakt	0,0849 mg/mL	0,0265 mg/mL
MW	2.800.581	3.487.431	808.935
STABW	101.972	17.601	2.963
STABW [%]	3,64	0,50	0,37

Verbascosid Für Verbascosid wurden, neben dem Extrakt (Tabelle 7.34), zwei verschiedene Analytkonzentrationen (0,3125 mg/mL, 0,0781 mg/mL) zur Festlegung der *intra*- und *interday* Messpräzision eingesetzt (Tabelle 7.35, Tabelle 7.36). Ausgangsmaterial zur Extrakterstellung war das „neue“ FP-Material.

Tabelle 7.34: Erhaltene Flächen von Verbascosid im Extrakt zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	14.823.346	15.495.494	15.218.793
2	14.835.097	15.209.443	15.089.171
3	14.692.952	14.921.403	14.792.117
4	14.600.880	14.738.344	14.536.490
5	14.449.461	14.730.148	14.595.633
6	14.289.598	14.589.089	14.593.273
MW	14.615.222	14.947.320	14.804.246
STABW	215.135	343.231	287.368
STABW [%]	1,47	2,30	1,94

Tabelle 7.35: Erhaltene Flächen von Verbascosid in wässriger Lösung (0,3125 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	21.983.794	20.962.374	21.435.419
2	21.978.330	21.280.621	21.093.586
3	21.488.606	21.092.970	21.018.076
4	21.155.649	20.934.982	20.262.055
5	21.031.509	20.918.541	20.392.161
6	20.887.591	20.566.050	19.981.048
MW	21.420.913	20.959.256	20.697.058
STABW	477.193	235.806	565.743
STABW [%]	2,23	1,13	2,73

Tabelle 7.36: Erhaltene Flächen von Verbascosid in wässriger Lösung (0,0781 mg/mL) zur Ermittlung der Messpräzision aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Injektion	Tag 1	Tag 2	Tag 3
1	5.032.256	4.927.369	5.105.499
2	5.214.628	5.077.912	4.978.567
3	5.113.660	5.112.384	4.962.990
4	5.189.853	4.946.656	5.103.485
5	5.051.997	5.192.609	5.082.381
6	5.223.878	5.036.562	5.032.191
MW	5.137.712	5.048.915	5.044.186
STABW	83.792	100.896	62.892
STABW [%]	1,63	2,00	1,25

Aus den HPLC-Messungen für Verbascosid ergaben sich schließlich *intra-* (Tabelle 7.37) und *interday* (Tabelle 7.38) Messpräzisionen $\leq 5\%$.

Tabelle 7.37: Wiederholungsmesspräzision von Verbascosid aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen (n=6).

	Extrakt	0,3125 mg/mL	0,0781 mg/mL
MW	14.788.930	21.025.742	5.076.938
STABW	28.911	426.247	82.527
STABW [%]	1,90	2,03	1,63

Tabelle 7.38: Labormesspräzision von Verbascosid aus sechs Injektionen pro Tag an insgesamt drei aufeinanderfolgenden Tagen (n=3).

	Extrakt	0,3125 mg/mL	0,0781 mg/mL
MW	14.788.930	21.025.742	5.076.938
STABW	166.578	366.479	52.685
STABW [%]	1,13	1,74	1,04

Die Resultate werden in Kapitel 7.3.2.2 diskutiert.

7.5.8.2 Methodenpräzision

Zur Evaluierung der Methodenpräzision wurde in sechs unabhängigen Experimenten (n=6) das FP-Material (Kapitel 7.5.2) aufgearbeitet (Kapitel 10.4.5) und mit der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) in Duplikaten chromatographiert, wobei eine Doppelinjektion zu n=1 gemittelt wurde. Die Bestimmung der Methodenpräzision fand über die erhaltenen Peakflächen [AUC] des Analyten statt. Die Auswertung erfolgte *via* Excel, wobei eine Normierung auf 7,0 g eingewogenes FP-Material vorgenommen wurde. Eine Normierung auf einen einheitlichen Wassergehalt bzw. Trockensubstanzgehalt erübrigte sich, da als Ausgangsmaterial ausschließlich einheitliches FP-Material eingesetzt wurde („altes“ FP-Material, siehe Kapitel 7.5.11).

Catalpol Für Catalpol konnten im Rohextrakt der Spitzwegerichblätter aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6), wobei die Proben n1-n3 an einem anderen Tag aufgearbeitet wurden als die Proben n4-n6, Variationen um den Mittelwert von 12,82% festgestellt werden (Tabelle 7.39).

Tabelle 7.39: Ermittlung der Methodenpräzision von Catalpol aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6), wobei die Proben n1-n3 an einem anderen Tag aufgearbeitet wurden als die Proben n4-n6.

n	EW [g]	y1 [AUC]	y2 [AUC]	y _{gemittelt} [AUC]	y _{gemittelt, N} [AUC]
1	6,60	1.090.013	1.086.680	1.088.347	1.154.307
2	5,47	1.054.530	1.047.449	1.050.990	1.344.955
3	5,43	1.052.822	1.055.238	1.054.030	1.358.786
4	6,72	949.965	949.178	949.572	989.1387
5	6,90	1.270.147	1.256.650	1.263.399	1.281.705
6	7,10	1.085.942	1.071.633	1.078.788	1.063.593
				MW	1.198.745
				STABW	153.656
				STABW [%]	12,82

Die Resultate werden in Kapitel 7.3.2.2 diskutiert.

Aucubin Für Aucubin konnten im Rohextrakt der Spitzwegerichblätter aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6) Variationen um den Mittelwert von 9,33% festgestellt werden (Tabelle 7.40).

Die Resultate werden in Kapitel 7.3.2.2 diskutiert.

Verbascosid Für Verbascosid konnten im Rohextrakt der Spitzwegerichblätter aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6) Variationen um den Mittelwert von 14,53% festgestellt werden (Tabelle 7.41).

Die Resultate werden in Kapitel 7.3.2.2 diskutiert.

Tabelle 7.40: Ermittlung der Methodenpräzision von Aucubin aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6).

n	EW [g]	y1 [AUC]	y2 [AUC]	y _{gemittelt} [AUC]	y _{gemittelt, N} [AUC]
1	7,06	3.159.224	3.141.754	3.150.489	3.312.714
2	7,09	3.013.742	3.004.014	3.008.878	2.970.683
3	7,04	3.131.100	3.096.661	3.113.881	3.096.188
4	7,05	3.158.348	3.153.224	3.155.786	3.133.405
5	7,01	2.435.050	2.414.275	2.424.663	2.421.204
6	7,01	3.059.787	3.152.672	3.106.230	3.101.798
				MW	2.974.495
				STABW	277.373
				STABW [%]	9,33

Tabelle 7.41: Ermittlung der Methodenpräzision von Verbascosid aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6).

n	EW [g]	y1 [AUC]	y2 [AUC]	y _{gemittelt} [AUC]	y _{gemittelt, N} [AUC]
1	7,06	17.452.990	17.367.717	17.410.354	17.262.390
2	7,09	14.777.513	14.695.264	14.736.389	14.549.326
3	7,04	17.726.649	17.591.082	17.658.866	17.558.531
4	7,05	15.050.292	14.910.028	14.980.160	14.873.918
5	7,01	13.862.257	13.913.884	13.888.071	13.868.259
6	7,01	11.746.072	11.798.120	11.772.096	11.755.303
				MW	14.977.954
				STABW	2.176.671
				STABW [%]	14,53

7.5.9 Robustheit als Analytstabilität

Die Robustheit der Methode wurde durch die Analytstabilität definiert. Das gewählte Stabilitätskriterium war eine dreitägige Standdauer der Probe im Autosampler, welcher auf 4 °C temperiert war. Aus sechs unterschiedlichen Vials mit ein und derselben Probe wurde an einem Tag (t=0) je eine einmal in die HPLC injiziert, per entwickelter HPLC-DAD-Methode (Kapitel 6.3.4) chromatographiert und die Proben im gekühlten Autosampler für drei Tage belassen, bevor der Vorgang auf die gleiche Weise wiederholt wurde (t=3 d). Die erhaltenen Flächen des ersten Tages wurden mit denen des dritten Tages verglichen. Die resultierenden Unterschiede wurden als Differenz zum ersten Tag, welcher auf 100% gesetzt wurde, angegeben. Getestet wurden Proben der Analyten Aucubin, Catalpol und Verbascosid in matrixfreier, wässriger Lösung (Kapitel 7.5.5) sowie in einem Rohextrakt der Spitzwegerichblätter (Kapitel 7.5.2 und Kapitel 10.4.5). In den wässrigen Lösungen wurden die drei Analyten einzeln untersucht, wohingegen eine simultane Bestimmung im angewendeten Extrakt stattfand. Für t=0 konnten folgende Werte erhoben werden (Tabelle 7.42).

7.5.9.1 Catalpol

Die prozentuale Variation der erhaltenen Mittelwerte für t=0 bewegte sich dabei bei allen untersuchten catalpolhaltigen Proben unter 2% und bestätigte somit eine akzeptable Präzision der Resultate (Tabelle 7.42).

Tabelle 7.42: Ermittlung der Flächen von Catalpol [AUC] für t=0 aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6) aus unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Analytlösungen sowie im Rohextrakt der Spitzwegerichblätter.

n	Analytlösung			Extrakt ^a
	0,0849 mg/mL	0,0265 mg/mL	0,0066 mg/mL	
1	3.585.533	1.165.420	264.266	1.956.105
2	3.567.757	1.145.718	263.199	1.930.637
3	3.486.703	1.142.297	259.960	1.891.529
4	3.497.198	1.142.620	264.180	1.886.940
5	3.472.171	1.122.811	257.358	1.885.821
6	3.481.044	1.106.996	261.366	1.891.428
MW	3.515.068	1.137.644	261.722	1.907.077
STABW	48.710	20.211	2.719	29.335
STABW [%]	1,39	1,78	1,04	1,54

^a Konzentration nicht bestimmt

Für t=3 d konnten folgende Werte ermittelt werden (Tabelle 7.43).

Tabelle 7.43: Ermittlung der Flächen von Catalpol [AUC] für t=3 d aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6) aus unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Analytlösungen sowie im Rohextrakt der Spitzwegerichblätter.

n	Analytlösung			Extrakt ^a
	0,0849 mg/mL	0,0265 mg/mL	0,0066 mg/mL	
1	3.691.938	1.113.650	256.943	1.971.264
2	3.623.251	1.130.766	257.934	1.965.483
3	3.585.479	1.142.260	247.879	1.991.126
4	3.520.080	1.099.122	267.452	1.894.980
5	3.504.806	1.143.570	258.124	1.907.216
6	3.507.938	1.101.290	260.760	1.933.375
MW	3.572.249	1.121.776	258.182	1.943.907
STABW	75.509	19.871	6.330	38.196
STABW [%]	2,11	1,77	2,45	1,96

^a Konzentration nicht bestimmt

Die prozentuale Variation der erhaltenen Mittelwerte für t=3 d bewegte sich dabei bei allen untersuchten Proben unter 3% und bestätigte somit eine akzeptable Präzision der Resultate. Aus der Differenz der Analytflächen von t=0 und t=3 d konnte letztlich die Stabilität des Analyten in der jeweiligen Probe abgeleitet werden (Tabelle 7.44).

Tabelle 7.44: Ermittlung der Differenz der Flächen von Catalpol [AUC] nach drei tägiger Lagerung der Probengefäße im Autosampler bei 4 °C in sechs unabhängigen Experimenten (n=6).

	0,0849 mg/mL	Analytlösung 0,0265 mg/mL	0,0066 mg/mL	Extrakt ^a
y-Wert [AUC]	57.181	-15.867	-3.540	36.831
y-Wert [%]	1,63	-1,39	-1,35	1,93
WF [%]	101,63	98,61	98,65	101,93

^a Konzentration nicht bestimmt

Alle vier catalpolhaltigen Proben lieferten mit 101,63% (0,0849 mg/mL Analytlösung), 98,61% (0,0265 mg/mL Analytlösung), 98,65% (0,0066 mg/mL Analytlösung) und 101,93% (Extrakt) eine Wiederfindung innerhalb der Akzeptanzgrenzen von 95-105%, wodurch die Stabilität des Catalpols bei den angewendeten Kriterien (3 d bei 4 °C) im gesamten Messbereich außerhalb der Matrix (verschiedene Konzentrationen an Analytlösung) sowie in Gegenwart der Matrix (Extrakt) als verifiziert galt.

7.5.9.2 Aucubin

Die prozentuale Variation der erhaltenen Mittelwerte für $t=0$ bewegte sich für die matrixfreien Aucubinlösungen unter 2% und bestätigte somit eine akzeptable Präzision der Resultate, wohingegen sich die aus den Extrakten gewonnenen Variationen des Aucubins mit 6,55% relativer Standardabweichung außerhalb der $\leq 5\%$ -Grenze befanden (Tabelle 7.45).

Tabelle 7.45: Ermittlung der Flächen von Aucubin [AUC] für $t=0$ aus sechs unabhängigen Experimenten ($n=6$) aus unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Analytlösungen sowie im Rohextrakt der Spitzwegerichblätter.

n	Analytlösung		Extrakt ^a
	0,0514 mg/mL	0,0128 mg/mL	
1	3.576.590	807.200	1.548.596
2	3.518.496	796.852	1.465.350
3	3.535.566	808.847	1.426.361
4	3.447.460	808.559	1.361.492
5	3.483.882	800.935	1.339.586
6	3.469.397	815.806	1.297.728
MW	3.505.232	806.367	1.406.519
STABW	47.467	6.645	92.069
STABW [%]	1,35	0,82	6,55

^a Konzentration nicht bestimmt

Für $t=3$ d konnten folgende Werte ermittelt werden (Tabelle 7.46).

Tabelle 7.46: Ermittlung der Flächen von Aucubin [AUC] für $t=3$ d aus sechs unabhängigen Experimenten ($n=6$) aus unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Analytlösungen sowie im Rohextrakt der Spitzwegerichblätter.

n	Analytlösung		Extrakt ^a
	0,0514 mg/mL	0,0128 mg/mL	
1	3.529.436	789.037	1.394.544
2	3.553.086	797.319	1.388.638
3	3.550.175	796.512	1.372.899
4	3.492.592	773.174	1.356.816
5	3.456.663	809.864	1.369.972
6	3.411.224	811.219	1.369.180
MW	3.498.863	796.188	1.375.342
STABW	56.584	14.108	13.867
STABW [%]	1,62	1,77	1,01

^a Konzentration nicht bestimmt

Die prozentuale Variation der erhaltenen Mittelwerte für t=3 d bewegte sich dabei bei allen untersuchten Proben unter 2% und bestätigte somit eine akzeptable Präzision der Resultate. Aus der Differenz der Analytflächen von t=0 und t=3 d konnte letztlich die Stabilität des Analyten in der jeweiligen Probe definiert werden (Tabelle 7.47).

Tabelle 7.47: Ermittlung der Differenz der Flächen von Aucubin [AUC] nach drei tägiger Lagerung der Probengefäße im Autosampler bei 4 °C in sechs unabhängigen Experimenten (n=6).

	Analytlösung 0,0514 mg/mL	0,0128 mg/mL	Extrakt a
y-Wert [AUC]	-6.369	-10.179	-31.177
y-Wert [%]	0,18	1,26	2,22
WF [%]	99,82	98,74	97,78

^a Konzentration nicht bestimmt

Alle drei aucubinhaltenen Proben lieferten mit 99,82% (0,0514 mg/mL Analytlösung), 98,74% (0,0128 mg/mL Analytlösung) und 97,78% (Extrakt) Wiederfindungen innerhalb der Akzeptanzgrenzen von 95-105%, wodurch die Stabilität von Aucubin bei den angewendeten Kriterien (3 d bei 4 °C) im gesamten Messbereich außerhalb der Matrix (verschiedene Konzentrationen an Analytlösung) sowie in Gegenwart der Matrix (Extrakt) als verifiziert galt.

7.5.9.3 Verbascosid

Die prozentuale Variation der erhaltenen Mittelwerte für t=0 bewegte sich bei allen untersuchten verbascosidhaltigen Proben unter 3% und bestätigte somit eine akzeptable Präzision der Resultate (Tabelle 7.48).

Tabelle 7.48: Ermittlung der Flächen von Verbascosid [AUC] für t=0 aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6) aus unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Analytlösungen sowie im Rohextrakt der Spitzwegerichblätter.

n	Analytlösung		Extrakt ^a
	0,3125 mg/mL	0,0781 mg/mL	
1	22.189.929	5.585.236	15.495.494
2	22.504.260	5.522.672	15.209.443
3	21.912.844	5.386.120	14.921.403
4	22.239.395	5.360.029	14.738.344
5	22.077.575	5.484.034	14.730.148
6	21.852.610	5.404.010	14.589.089
MW	22.129.436	5.457.017	14.947.320
STABW	237.688	88.004	343.231
STABW [%]	1,07	1,61	2,30

^a Konzentration nicht bestimmt

Für t=3 d konnten folgende Werte ermittelt werden (Tabelle 7.49).

Tabelle 7.49: Ermittlung der Flächen von Verbascosid [AUC] für t=3 d aus sechs unabhängigen Experimenten (n=6) aus unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Analytlösungen sowie im Rohextrakt der Spitzwegerichblätter.

n	Analytlösung		Extrakt ^a
	0,3125 mg/mL	0,0781 mg/mL	
1	20.737.526	5.072.030	13.612.579
2	21.941.342	5.161.308	13.804.486
3	20.317.240	4.910.018	13.972.619
4	21.101.291	4.868.902	13.390.788
5	20.264.880	5.235.688	13.463.320
6	20.398.464	4.700.270	13.544.790
MW	20.793.457	4.991.369	13.631.430
STABW	644.628	200.715	219.267
STABW [%]	3,10	4,02	1,61

^a Konzentration nicht bestimmt

Die prozentuale Variation der erhaltenen Mittelwerte für t=3 d bewegte sich dabei bei allen untersuchten Proben unter 5% und bestätigte somit eine akzeptable Präzision der Resultate. Aus der Differenz der Analytflächen von t=0 und t=3 d konnte letztlich die Stabilität des Analyten in der jeweiligen Probe definiert werden (Tabelle 7.50).

Tabelle 7.50: Ermittlung der Differenz der Flächen von Verbascosid [AUC] nach dreitägiger Lagerung der Probengefäße im Autosampler bei 4 °C in sechs unabhängigen Experimenten (n=6).

	Analytlösung 0,3125 mg/mL	0,0781 mg/mL	Extrakt ^a
y-Wert [AUC]	-1.335.978	-465.648	-1.315.890
y-Wert [%]	-6,04	-8,53	-8,80
WF [%]	93,96	91,47	91,20

^a Konzentration nicht bestimmt

Alle drei verbascosidhaltigen Proben lieferten mit 93,96% (0,3125 mg/mL Analytlösung), 91,47% (0,0781 mg/mL Analytlösung) und 91,20% (Extrakt) Wiederfindungen außerhalb der Akzeptanzgrenzen von 95-105%, wodurch die Stabilität von Verbascosid bei den angewendeten Kriterien (3 d bei 4 °C) weder außerhalb der Matrix (Analytlösung) noch in Gegenwart der Matrix (Extrakt) akzeptiert werden konnte. Als Konsequenz der geringen Analytstabilität wird empfohlen, bei den Analysen - sogar unter gekühlten Bedingungen - auf eine rasche Analytik und somit kurze Standzeiten der verbascosidhaltigen Proben zu achten. Auf die Evaluierung einer konkreten Standzeitdauer mit Ergebnissen innerhalb der Akzeptanzgrenzen wurde verzichtet.

7.5.10 Richtigkeit als Wiederfindung

Die Wiederfindung (WF) der drei Analyten Aucubin, Catalpol und Verbascosid wurde, wie in Kapitel 7.2.7 beschrieben, ausgeführt. Es wurden je sechs unabhängige Experimente zur Bestimmung von x_{ist} und x_{soil} herangezogen (n=6), welche, sofern nicht explizit berichtet, an einem Tag aufbereitet und in Duplikaten per HPLC vermessen wurden. Der Mittelwert der Duplikate wurde als n=1 behandelt. Aucubin und Verbascosid wurden zusammen analysiert, während die Wiederfindung von Catalpol separat untersucht wurde.

7.5.10.1 Catalpol

Die Ermittlung von $x_{\text{N, intern}}$ von Catalpol basierte auf sechs unabhängigen Experimenten des „alten“ FP-Materials (n=6), wobei die Proben n1-n3 an einem anderen Tag aufgearbeitet wurden als die Proben n4-n6. Insgesamt konnte eine mittlere genormte Konzentration $x_{\text{N, intern}}$ in den Spitzwegerichblättern von $11,0513 \pm 1,4022$ mg/mL mit einer prozentualen Standardabweichung von 12,69% erzielt werden (Tabelle 7.51). Zur Berechnung von $x_{\text{N, intern}}$ wurde ein Wassergehalt des eingesetzten FP-Materials von 93,31% herangezogen (Tabelle 7.58 in Kapitel 7.5.11).

Tabelle 7.51: Ermittlung von $x_{N, \text{intern}}$ von Catalpol aus sechs unabhängigen Experimenten des „alten“ FP-Materials (n=6), wobei die Proben n1-n3 an einem anderen Tag aufgearbeitet wurden als die Proben n4-n6.

n	EW [g]	y1 [AUC]	y2 [AUC]	$y_{\text{gemittelt}}$ [AUC]	x [mg/mL]	$x_{N, \text{intern}}$ [mg/mL]
1	6,60	1.090.013	1.086.680	1.088.347	0,0268	10,6378
2	5,47	1.054.530	1.047.449	1.050.990	0,0259	12,4111
3	5,43	1.052.822	1.055.238	1.054.030	0,0260	12,5373
4	6,72	949.965	949.178	949.572	0,0235	9,1648
5	6,9	1.270.147	1.256.650	1.263.399	0,0310	11,7516
6	7,1	1.085.942	1.071.633	1.078.788	0,0266	9,8050
				MW	0,0266	11,0513
				STABW	0,0024	1,4022
				STABW [%]	9,10	12,69

Nach erfolgter Einwaage des FP-Materials wurden 5 mL einer 0,0352 mg/mL konzentrierten wässrigen Analytlösung (Kapitel 7.5.5) zum FP-Material hinzupipettiert und aufgearbeitet (Kapitel 10.4.5). Somit belief sich die zugesetzte Analytmenge x_{extern} unter Berücksichtigung des Verdünnungsvolumens von 25 mL auf 0,0070 mg/mL und führte zu einem x_{soll} -Wert von 11,0583 mg/mL. Zur Berechnung der Wiederfindung wurde ein Wassergehalt des eingesetzten FP-Materials von 89,48% angenommen (Tabelle 7.58 in Kapitel 7.5.11). Gemäß den mathematischen Formeln in Kapitel 7.2.7 konnte über den Vergleich der x_{ist} -Werte mit dem x_{soll} die Wiederfindung \pm Standardabweichung sowie die dazugehörige prozentuale Standardabweichung erhalten werden, welche $122,20 \pm 19,84\%$ mit 16,24% relativer Abweichung betrug (Tabelle 7.52). Die erzielten Resultate werden in Kapitel 7.3.2.4 diskutiert.

Tabelle 7.52: Ermittlung der Wiederfindung sowie des $x_{N, \text{ist}}$ -Wertes von Catalpol aus sechs unabhängigen Experimenten des „alten“ FP-Materials (n=6).

n	EW [g]	y 1 [AUC]	y 2 [AUC]	$y_{\text{gemittelt}}$ [AUC]	x [mg/mL]	$x_{N, \text{ist}}$ [mg/mL]	x_{soll} [mg/mL]	WF[%]
1	6,77	1.797.930	1.775.473	1.786.702	0,0433	16,7798	11,0583	151,74
2	7,02	1.420.933	1.409.957	1.415.445	0,0345	12,8964	11,0583	116,62
3	6,99	1.566.242	1.568.530	1.567.386	0,0381	14,3023	11,0583	129,34
4	7,27	1.486.707	1.486.716	1.486.712	0,0362	13,0620	11,0583	118,12
5	7,09	1.096.719	1.114.315	1.105.517	0,0271	10,0531	11,0583	90,91
6	6,94	1.511.151	1.529.282	1.520.217	0,0370	13,9831	11,0583	126,45
				MW	0,0361	13,5128		122,20
				STABW	0,0053	2,1941		19,84
				STABW [%]	14,63	16,24		16,24

7.5.10.2 Aucubin

Die Ermittlung von $x_{N, \text{intern}}$ von Aucubin basierte auf sechs unabhängigen Experimenten des „alten“ FP-Materials (n=6). Insgesamt konnte eine mittlere genormte Konzentration $x_{N, \text{intern}}$ in den Spitzwegerichblättern von $16,5104 \pm 1,5032$ mg/mL mit einer prozentualen Standardabweichung von 9,10% erzielt werden (Tabelle 7.53). Zur Berechnung von $x_{N, \text{intern}}$ wurde ein Wassergehalt des eingesetzten FP-Materials von 93,31% angenommen (Tabelle 7.58 in Kapitel 7.5.11).

Tabelle 7.53: Ermittlung von $x_{N, \text{intern}}$ von Aucubin aus sechs unabhängigen Experimenten des „alten“ FP-Materials (n=6).

n	EW [g]	y1 [AUC]	y2 [AUC]	$y_{\text{gemittelt}}$ [AUC]	x [mg/mL]	$x_{N, \text{intern}}$ [mg/mL]
1	7,06	3.159.224	3.141.754	3.150.489	0,0467	17,3186
2	7,09	3.013.742	3.004.014	3.008.878	0,0447	16,4872
3	7,04	3.131.100	3.096.661	3.113.881	0,0462	17,1704
4	7,05	3.158.348	3.153.224	3.155.786	0,0468	17,3717
5	7,01	2.435.050	2.414.275	2.424.663	0,0362	13,5123
6	7,01	3.059.787	3.152.672	3.106.230	0,0461	17,2025
				MW	0,0444	16,5104
				STABW	1,5032	
				STABW [%]	9,10	

Nach erfolgter Einwaage des FP-Materials wurden 5 mL einer 0,0653 mg/mL konzentrierten wässrigen Analytlösung (Kapitel 7.5.5) zum FP-Material hinzupipettiert und aufgearbeitet (Kapitel 10.4.5). Somit belief sich die zugesetzte Analytmenge x_{extern} unter Berücksichtigung des Verdünnungsvolumens von 25mL auf 0,0131 mg/mL und führte zu einem x_{soll} -Wert von 16,5235 mg/mL. Zur Berechnung der Wiederfindung wurde ein Wassergehalt des eingesetzten FP-Materials von 89,48% angenommen (Tabelle 7.57 in Kapitel 7.5.11). Gemäß den Formeln in Kapitel 7.2.7 konnte über den Vergleich der x_{ist} -Werte mit dem x_{soll} die Wiederfindung \pm Standardabweichung sowie die dazugehörige prozentuale Standardabweichung erhalten werden, welche $53,19 \pm 4,57\%$ mit 8,60% relativer Abweichung betrug (Tabelle 7.54). Die gewonnenen Resultate werden in Kapitel 7.3.2.4 diskutiert.

Tabelle 7.54: Ermittlung der Wiederfindung sowie des $x_{N, \text{ist}}$ -Wertes von Aucubin aus sechs unabhängigen Experimenten des „neuen“ FP-Materials (n=6).

n	EW [g]	y1 [AUC]	y2 [AUC]	$y_{\text{gemittelt}}$ [AUC]	x [mg/mL]	$x_{N, \text{ist}}$ [mg/mL]	x_{soll} [mg/mL]	WF[%]
1	6,87	2.654.618	2.636.831	2.645.725	0,0394	9,5405	16,5235	57,74
2	7,00	2.314.304	2.298.272	2.306.288	0,0345	8,1935	16,5235	49,59
3	7,05	2.806.110	2.835.046	2.820.578	0,0419	9,8953	16,5235	59,89
4	6,99	2.345.837	2.368.700	2.357.269	0,0352	8,3812	16,5235	50,72
5	6,87	2.388.942	2.401.675	2.395.309	0,0358	8,6611	16,5235	52,42
6	7,04	2.286.788	2.276.298	2.281.543	0,0341	8,0621	16,5235	48,79
				MW	0,0368	8,7890		53,19
				STABW	0,0031	0,7556		4,57
				STABW [%]	8,53	8,60		8,60

7.5.10.3 Verbascosid

Die Ermittlung von $x_{N, \text{intern}}$ von Verbascosid basierte auf sechs unabhängigen Experimenten des „alten“ FP-Materials (n=6). Insgesamt konnte eine mittlere genormte Konzentration $x_{N, \text{intern}}$ in den Spitzwegerichblättern von $86,8548 \pm 12,23$ mg/mL mit einer prozentualen Standardabweichung von 14,08% erzielt werden (Tabelle 7.55). Zur Berechnung von $x_{N, \text{intern}}$ wurde ein Wassergehalt des eingesetzten FP-Materials von 93,31% angenommen (Tabelle 7.58 in Kapitel 7.5.11).

Tabelle 7.55: Ermittlung von $x_{N, \text{intern}}$ von Verbascosid aus sechs unabhängigen Experimenten des „alten“ FP-Materials (n=6).

n	EW [g]	y1 [AUC]	y2 [AUC]	$y_{\text{gemittelt}}$ [AUC]	x [mg/mL]	$x_{N, \text{intern}}$ [mg/mL]
1	7,06	17.452.990	17.367.717	17.410.354	0,2688	99,6849
2	7,09	14.777.513	14.695.264	14.736.389	0,2287	84,4285
3	7,04	17.726.649	17.591.082	17.658.866	0,2726	101,3566
4	7,05	15.050.292	14.910.028	14.980.160	0,2323	86,2676
5	7,01	13.862.257	13.913.884	13.888.071	0,2159	80,6320
6	7,01	11.746.072	11.798.120	11.772.096	0,1841	68,7590
				MW	0,2337	86,8548
				STABW	12,23	
				STABW [%]	14,08	

Nach erfolgter Einwaage des FP-Materials wurden 5 mL einer 0,4437 mg/mL (n1-n5) bzw. 4 mL einer 0,3906 mg/mL (n6) konzentrierten wässrigen Analytlösung (Kapitel 7.5.5) zum FP-Material hinzupipettiert und aufgearbeitet (Kapitel 10.4.5). Somit belief sich die zugesetzte Analytmenge x_{extern} unter Berücksichtigung des Verdünnungsvolumens von 25mL auf 0,0131 mg/mL (n1-n5) bzw. 0,3906 mg/mL (n6) und führte zu einem x_{soll} -Wert von 16,5235 mg/mL (n1-n5) bzw. 16,5235 mg/mL (n6). Zur Berechnung der Wiederfindung wurde ein Wassergehalt des eingesetzten FP-Materials von 89,48% angenommen (Tabelle 7.57 in Kapitel 7.5.11). Gemäß den mathematischen Formeln in Kapitel 7.2.7 konnte über den Vergleich der x_{ist} -Werte mit dem x_{soll} die Wiederfindung \pm Standardabweichung sowie die dazugehörige prozentuale Standardabweichung erhalten werden, welche $27,08 \pm 8,66\%$ mit $31,96\%$ relativer Abweichung betrug (Tabelle 7.56). Die erhaltenen Resultate werden in Kapitel 7.3.2.4 diskutiert.

Tabelle 7.56: Ermittlung der Wiederfindung sowie des $x_{N, \text{ist}}$ -Wertes von Verbascosid aus sechs unabhängigen Experimenten des „neuen“ FP-Materials (n=6), wobei die Proben n1-n5 auf einer anderen zugesetzten Analytmenge beruhten als n6.

n	EW [g]	y1 [AUC]	y2 [AUC]	$y_{\text{gemittelt}}$ [AUC]	x [mg/mL]	$x_{N, \text{ist}}$ [mg/mL]	x_{soll} [mg/mL]	WF[%]
1	6,87	8.317.177	8.463.767	8.390.472	0,1333	32,2907	86,9435	37,14
2	7,00	7.675.860	7.685.809	7.680.835	0,1227	29,1563	86,9435	33,53
3	7,05	7.398.062	7.441.260	7.419.661	0,1187	28,0232	86,9435	32,23
4	6,99	5.627.831	5.639.185	5.633.508	0,0919	21,8748	86,9435	25,16
5	6,87	4.070.415	4.054.940	4.062.678	0,0683	16,5399	86,9435	19,02
6	7,04	3.291.547	3.279.626	3.285.587	0,0566	13,3806	86,9329	15,39
				MW	0,0986	23,5442	86,9417	27,08
				STABW	0,0314	7,5260	8,66	
				STABW [%]	31,81	31,97	31,96	

7.5.11 Bestimmung des Wassergehalts

Zur Wiederfindungsevaluierung wurden zum besseren Vergleich die betrachteten x-Werte auf einen Wassergehalt von 0% bzw. TS-Gehalt von 100% des eingesetzten FP-Materials genormt. Dazu wurde das verwendete Frischpflanzenmaterial (Kapitel 7.5.2) einer azeotropen Destillation (Kapitel 7.5.12.2) unterzogen.

Aufgrund des hohen analytischen Verbrauchs an FP-Material, reichte ein Gefäß an FP-Material nicht aus, weswegen zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal gefrorenes Blattmaterial des gleichen Erntezeitpunkts der gleichen Pflanzenkategorie vorzerkleinert und in einem neuen Behälter aufbewahrt wurde. Die erste Zerkleinerung wurde als „alte“ Frischpflanze, die zweite als „neue“ Frischpflanze bezeichnet. Der Wassergehalt der alten FP setzte sich aus acht, der der neuen FP aus sechs unabhängigen Versuchen zusammen. Dabei wurden pro Tag aus logistischen Gründen nur drei Bestimmungen durchgeführt. Einzelne Versuche mussten dabei aufgrund von Störungen, wie Undichtigkeit des Apparaturhahns oder unzureichende Phasentrennung im Messrohr, bei der Bildung des Mittelwerts ausgeschlossen werden.

Tabelle 7.57 fasst die Resultate der Wasserbestimmung der neuen Frischpflanze zusammen, welche an zwei unterschiedlichen Tagen innerhalb einer Woche erhalten wurden.

Tabelle 7.57: Wasserbestimmung des „neuen“ FP-Materials (n=6).

Datum	n	V1 [mL]	V2 [mL]	ΔV [mL]	EW [g]	Wassergehalt [%]
28.07.2017	1	1,50	3,45	1,95	2,25	86,67
	2	2,60	4,45	1,85	1,93	95,85
	3	0,20	1,90	1,70	1,93	88,08
02.08.2017	4	1,75	3,30	1,55	1,73	89,60
	5	1,75	3,50	1,75	1,95	89,74
	6	0,60	2,20	1,60	1,84	86,96
					MW	89,48
					STABW	3,38
					STABW [%]	3,77

Der durchschnittliche Wassergehalt der „neuen“ Frischpflanze betrug 89,48%. Die Streuung um den Mittelwert lag mit einer prozentualen Standardabweichung $\leq 5\%$ im akzeptablen Bereich. Weiter wurden keine Validierungsparameter zur Beurteilung der Wasserbestimmung betrachtet. Im Vergleich dazu war der Wasseranteil im „alten“ FP-Material mit durchschnittlichen 93,31% Wasser höher, was auf die optisch sichtbare, vermehrte Anlagerung von externem Haftwasser auf dem FP-Material, bedingt durch die längere Gebrauchsdauer, zurückgeführt wurde. Der Wassergehalt des „alten“ FP-Materials wurde an vier unterschiedlichen Tagen innerhalb einer Woche erhoben und wies ebenfalls eine akzeptable Wertevariation von $\leq 5\%$ auf (Tabelle 7.58).

Tabelle 7.58: Wasserbestimmung des „alten“ FP-Materials (n=8).

Datum	n	V1 [mL]	V2 [mL]	ΔV [mL]	EW [g]	Wassergehalt [%]
03.08.2017	1	1,75	3,50	1,75	1,81	96,69
	2	0,30	4,00	3,70	3,77	98,14
04.08.2017	3	1,95	3,60	1,65	1,75	94,29
	4	0,60	2,65	2,05	2,27	90,31
08.08.2017	5	1,80	3,45	1,65	1,79	92,18
	6	0,60	2,65	2,05	2,27	90,31
09.08.2017	7	1,75	3,55	1,80	1,93	93,26
	8	0,50	2,40	1,90	2,08	91,35
MW						93,31
STABW						2,90
STABW [%]						3,11

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die angewendete Methode zur Wasserbestimmung (azeotrope Destillation) unter den vorliegenden Gegebenheiten keiner fundierten Validierung gemäß ICH *guidelines* [160] unterzogen wurde. Zwar handelt es sich bei der herangezogenen azeotropen Destillation prinzipiell um eine validierte Methode des Ph. Eur. [176], doch sind die zugrundeliegenden Validierungsaspekte nicht identisch. Es wird davon ausgegangen, dass zur Validierung der Methode des Ph. Eur. die Droge eingesetzt wurde, während hier das FP-Material verwendet wurde. Von einem sehr signifikanten Unterschied im Wassergehalt der frischen und getrockneten Spitzwegerichblätter wird ausgegangen, was die Validität der Methode zur FP-Analytik in Frage stellt. Deswegen ergibt sich ein Fehler unbekannter Höhe. Eine fundierte Validierung unter den vorliegenden Bedingungen gemäß ICH *guidelines* [160] hätten den Rahmen dieser Dissertation deutlich gesprengt und empfiehlt sich als Thema für zukünftige Forschungsprojekte.

7.5.12 Methodenfindung zur Bestimmung des Wassergehalts

Der Wassergehalt einer Pflanze hängt von diversen Faktoren ab, wie z.B. Temperatur und Niederschlag und kann in ein und derselben Pflanze innerhalb eines Tages variieren. Es wurde eine deutliche Variation der Substanzgehalte an Aucubin, Catalpol und Verbascosid während der Methodenfindung eines geeigneten Aufarbeitsverfahrens festgestellt. Für diese Schwankungen wurde mitunter der sich verändernde Wassergehalt im eingefrorenen Frischpflanzenmaterial über die Zeit verantwortlich gemacht.

Das grob zerkleinerte, gefrorene Frischpflanzenmaterial wurde in einer Schottflasche bei -20°C aufbewahrt, die während der Methodenfindung immer wieder geöffnet wurde. Somit war das gefrorene Material zeitweise der Temperatur im Raum ausgesetzt und taute z.T. sogar leicht auf. Außerdem konnte auf diese Weise Feuchtigkeit aus der Luft in die Flasche, die anschließend immer wieder bei -20°C gelagert wurde, gelangen. Im Laufe der Monate konnte die zunehmende Entstehung von Haftwasser auf dem zerkleinerten Pflanzenmaterial beobachtet werden. In den Literaturstellen, die sich mit der Analytik von Frischpflanzenmaterial beschäftigen, wurde der Wassergehalt bis *dato* kaum berücksichtigt. Aus diesem Grund wurden verschiedene Verfahren zur Ermittlung des Gehalts an Wasser in gefrorenem Frischpflanzenmaterial getestet und miteinander verglichen, um eine geeignete Methode definieren zu können (Kapitel 7.5.12.5).

7.5.12.1 Karl-Fischer-Titration

Die Karl-Fischer-Titration wurde an einem 870 KF Titrino Plus der Firma METROHM (Filderstadt, Deutschland) mit den Reagenzien Methanol (p.a.) und der Kombilösung Aquastar ComiTitrant 5 der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland), die die restlichen oben erwähnten Komponenten (Iod, Schwefeldioxid, Base) beinhaltet, durchgeführt. Das Gerät wurde vor den Messungen mit Wasser kalibriert ($10\ \mu\text{L}$, $n = 5$).

Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: 2,0 g präpariertes Frischpflanzenmaterial (Blätter, Libor, Ernte 05.08.2013, Kapitel 7.5.2, Kapitel 8.3.2) wurden mit 15 mL Methanol (p.a.) versetzt, analog der Frischpflanzenaufbereitung (Abbildung 10.2) in Kapitel 8.3.2 per Ultraturrax zerkleinert und unter Verwendung von Methanol (p.a.) in einen vorher gewogenen Erlenmeyerkolben mit Schliff überführt. Der volle Erlenmeyerkolben wurde rückgewogen, ein Teil des Inhalts in ein Falcon überführt, zentrifugiert (4000 rpm, 15 min) und der Überstand abgenommen. Dieser stellte die zu vermessene Probenlösung dar, welche in die Lösungsmittelvorlage pipettiert wurde. Zur Messung wurden je $500\ \mu\text{L}$ der Probenlösung eingesetzt ($n = 5$).

7.5.12.2 Azeotrope Destillation

Die azeotrope Destillation wurde gemäß Ph. Eur. Methode 2.2.13 [176] mithilfe einer speziellen Wasserabscheideapparatur durchgeführt. Die Methode wurde an die verwendete Apparatur angepasst, bei denen die geforderten 2 mL Wasser bei der Vordestillation nicht ausreichen, um in der Messskala des Abscheiderohrs abgelesen zu werden. Letztendlich wurden zur Vordestillation 200 mL Toluol (p.a.) und 3 mL Wasser in einen 500 mL Rundkolben mit Siedesteinen gefüllt und für 2 h im Heizpilz unter starkem Rückfluss erhitzt. Um in dem System der Apparatur anhaftende Wasserreste quantitativ in das Wasserabscheiderohr zu bringen, wurde 5 min vor Beendigung der Destillation in die obere Öffnung des Rückflusskühlers ausreichend Toluol (p.a.) gegossen. Nach 30 minütigem Erkaltenlassen der Apparatur wurde das im Abscheider gesammelte Wasservolumen an der Skala des Abscheidebereichs auf 0,05 mL genau abgelesen. Eine definierte Menge des zu analysierenden Frischpflanzenmaterials, wenn möglich 2,0 g, wurde in den abgekühlten Rundkolben gegeben. Daraufhin wurde auf die gleiche Weise verfahren, wie zuvor. Die abgelesenen Volumina wurden voneinander substrahiert um den Gehalt an Wasser in der Probe zu berechnen. Um der Adsorption von Wasser an der Glaswand, speziell Messbereich des Abscheiderohrs, zu vermeiden, wurde die Apparatur über Nacht in verdünnter Natronlauge (1 : 5, v/v) eingelegt. Der Wassergehalt wurde anhand folgender Gleichung kalkuliert.

Gleichung 43: Formel zur Berechnung des **Wassergehalts WG [%]** im Frischpflanzenmaterial, wobei V_2 : abgelesenes Volumen nach Vordestillation, V_1 : abgelesenes Volumen nach Destillation (welches dem Volumen der Vordestillation plus Volumen der FP-Destillation entspricht), m : Einwaage der Frischpflanze [g].

$$WG = \frac{V_2 - V_1}{m} \cdot 100 [\%] \quad (7.41)$$

7.5.12.3 Trocknungsverlust

Der Wassergehalt des präparierten Frischpflanzenmaterials (Blätter, Libor, Ernte 05.08.2013, Kapitel 7.5.2, Kapitel 8.3.2) wurde unter anderem anhand des Trocknungsverlustes sowohl *via* Exsikkator als auch *via* Lyophilisation ermittelt.

Zur Bestimmung des Wassergehalts mittels Exsikkator wurden 2,0 g präpariertes Frischpflanzenmaterial mit 15 mL Methanol (p.a.) versetzt, analog der Frischpflanzenaufbereitung (Abbildung 10.2) in Kapitel 8.3.2 per Ultraturrax zerkleinert und unter Zuhilfenahme von Methanol (p.a.) in einen ausgewogenen 100 mL Rundkolben überführt. Nach Abdampfen des Methanols am Rotationsverdampfer wurde der Kolben im Exsikkator über Orangegel 10 bzw. 15 Tage getrocknet, gewogen und der Wassergehalt berechnet.

Zur Bestimmung des Wassergehalts mittels Lyophilisation wurden 2,0 g präpariertes Frischpflanzenmaterial mit 15 mL Methanol (p.a.) versetzt, analog der Frischpflanzenaufbereitung (Abbildung 10.2) in Kapitel 8.3.2 per Ultraturrax zerkleinert und unter

Zuhilfenahme von Methanol (p.a.) in einen ausgewogenen 100 mL Rundkolben überführt. Nach vollständigem Abdampfen des Methanols am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand mit 10 mL Wasser versetzt, im Ultraschallbad gut durchmischt und mittels Isopropanolbad eingefroren und an der Gefriertrocknungsanlage das Wasser entfernt. Die Kolben wurden rückgewogen und der Wassergehalt berechnet.

7.5.12.4 $^1\text{H-NMR}$

Auch spektroskopische Untersuchungen *via* $^1\text{H-NMR}$ dienten zur Bestimmung des Wassergehalts in Frischpflanzenproben. Als Probenmaterial wurden vorzerkleinerte, gefrorene Spitzwegerichblätter (Libor, Ernte 05.08.2013, Kapitel 7.5.2, Kapitel 8.3.2) eingesetzt. Die NMR-Spektren wurden an einem AVANCE III 300 NMR-Spektrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg bei 300 MHz und RT aufgenommen und anhand der Software TopSpin 3.2 ausgewertet. Als deuteriertes Lösungsmittel wurde, aufgrund seiner verhältnismäßig geringen Flüchtigkeit, DMSO- d_6 eingesetzt. Zudem weist DMSO- d_6 keine Signale zwischen 5-10 ppm auf, in denen die Signale des Standards Phloroglucin erwartet werden. Phloroglucin wurde als Standard ausgewählt, da er zwei definierte, eindeutig zuordbare ^1H -Signale aufweist. Außerdem ist Phloroglucin bei RT fest. Der Vorteil fester Standards im Vergleich zu flüssigen liegt darin, dass bei der exakten Umrechnung von Volumen in Masse die Temperatur im Raum berücksichtigt werden muss, die nicht immer exakt bekannt ist und eine Fehlerquelle darstellt.

Eine definiert eingewogene Menge an Phloroglucin wurde in einer definiert eingewogenen Menge an DMSO- d_6 gelöst. Diese Mischung, bezeichnet als Mix I, wurde NMR-spektroskopisch vermessen und das Integral des ^1H -Protonen-Signals ermittelt. Im Anschluss daran wurde eine definiert eingewogene Menge an Frischpflanzenmaterial in genau diesem Mix I im Ultraschallbad innerhalb von 30 min gelöst, filtriert (0,20 μm) und NMR-spektroskopisch vermessen. Der Wassergehalt wurde über das Verhältnis der Integrale der ^1H -Protonen-Signale von Phloroglucin in Mix I und der Frischpflanze bestimmt. Zur Berechnung wurden die entsprechenden Stoffmengen herangezogen.

7.5.12.5 Beurteilung der getesteten Methoden zur Bestimmung des Wassergehalts in FP-Material

Zur Bestimmung des Wassergehalts des in dieser Arbeit verwendeten, gefrorenen Frischpflanzenmaterials (Kapitel 10.4.1) wurden folgende Verfahren getestet und miteinander verglichen: azeotrope Destillation, Karl-Fischer-Titration, qNMR, Trocknungsverlust *via* Lyophilisation sowie per Exsikkator (Tabelle 7.59).

In Hinblick auf Präzision liefern fast alle getesteten Methoden genaue Ergebnisse mit Variationskoeffizienten $\leq 5\%$, wobei der Trocknungsverlust *via* Lyophilisation und im Exsikkator sowohl nach 15 als auch nach 10 Tagen Trocknung unter 1% am geringsten sind. Untersuchungen *via* qNMR ergaben dabei die größten Standardabweichungen sowie Variationskoeffizienten mit 6,90% bzw. 5,26% und befanden sich somit knapp über der

Tabelle 7.59: Vergleich der Verfahren zur Bestimmung des Wassergehalts in Frischpflanzenmaterial. Alle Experimente wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt (n=3).

Methode	Wassergehalt±Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient [%]	Analyse-dauer
Azeotrope Destillation	90,69 ± 2,12 [%]	2,34	1 d
Karl-Fischer-Titration	94,23 ± 2,04 [%]	2,16	1 d
Trocknungsverlust im Exsikkator	91,19 ± 0,75 [%]	0,82	10 d
Trocknungsverlust im Exsikkator	90,69 ± 0,25 [%]	0,28	15 d
Trocknungsverlust <i>via</i> Lyophilisation	91,54 ± 0,12 [%]	0,13	2-3 d
qNMR	133,79 ± 6,90 [%]	5,26	1-2 d

allgemein akzeptierten Grenze von ≤ 5 Präzision.

Nach Rücksprache mit Fachexperten können für die verwendeten frischen Blättern des Spitzwegerichs jedoch Werte zwischen von 60-95% als realistisch betrachtet werden. Demnach liefern alle herangezogenen Verfahren, bis auf die quantitative NMR (qNMR) realistische Wassergehalte. Mögliche Fehlerquelle bei der durchgeführten qNMR kann das Nichtbestimmen bzw. das Bewegen außerhalb eines gültigen, linearen Kalibrierbereichs sein. Weiter ist es möglich, dass die Lösungsmittel während des Handlings Wasser aus der Luft gezogen haben und somit ein höherer Wassergehalt resultierte.

Weiter fällt auf, dass von den restlichen vier realistischen Wassergehalten einer merklich abweicht. Die Karl-Fischer-Titration ergab einen Wassergehalt von 94,23%, wohingegen sich die anderen Methoden Trocknungsverlust *via* Lyophilisation und im Exsikkator sowie azeotrope Destillation im Bereich von 90,69-91,19% bewegten. Es wird vermutet, dass mittels der Karl-Fischer-Methode tendenziell ein etwas höherer, nicht wahrer Wasserwert gemessen wurde. Ursächlich dafür wird das Aufnehmen von Wasser in das Methanol-Frischpflanzengemisch, das während der Aufarbeitung, konkret dem Homogenisieren *via* Ultraturrax, sowie durch Luftfeuchtigkeit während des Handlings der Proben (Kapitel 7.5.12.1) gemacht. Dieses wird letztendlich im anschließenden Titrationsverfahren miterfasst. Weiter wird vermutet, dass dieser Effekt zum Tragen kommt, obwohl explizit der Wassergehalt im Methanol berücksichtigt wurde. Obwohl auch bei der Aufbereitung mittels Trocknungsverlust *via* Lyophilisation und im Exsikkator das gleiche Aufbereitungsverfahren unter Zugabe von Methanol am Ultraturrax eingesetzt

wurde, wirkt sich die Aufnahme von Wasser aus der Luft nicht auf das Ergebnis aus. Bei dem Lyophilisationsverfahren wird sogar bewusst Wasser hinzugegeben. Grund ist, das unterschiedliche Messprinzip. Bei der Bestimmung des Trocknungsverlustes wird die Differenz zwischen Anfangs- und Endwert bemessen. Ob zwischenzeitlich mehr Wasser in der Probe war, ist daher irrelevant bei dieser Methodik. Im Vergleich dazu verfügt die azeotrope Destillation über ein in sich geschlossenes System, das von dem Umgebungswassergehalt relativ unbeeinflusst ist.

Obwohl im Vergleich der Punkte Präzision und wahrer Gehalt bzw. Richtigkeit, die Bestimmung des Trocknungsverlustes *via* Lyophilisation, knapp gefolgt von der des Trocknungsverlustes *via* Exsikkator, am besten abschnit, wurde zur Bestimmung des Wassergehalts in den Frischpflanzenproben die azeotropen Destillation ausgewählt. Ausschlaggebend hierfür waren die Praktikabilität des Verfahrens sowie logistische Vorteile. Zum einen ist diese Methode ohne aufwändiges Handling innerhalb der kurzen Dauer von einem Tag durchführbar. Nur die Karl-Fischer-Titration kann bei der kurzen Analysedauer von einem Tag mithalten, im Vergleich beispielsweise 10-15 Tagen des Trocknungsverlustes im Exsikkator, basiert aber auf einem deutlich intensiveren Aufwand in der Handhabung. Zum anderen konnten die Apparaturen, die zur azeotropen Destillation benötigt wurden, jederzeit benutzt werden, im Gegensatz zur Gefriertrocknungsanlage oder dem NMR-Gerät, und ermöglichten somit ein unabhängiges und schnelles Arbeiten.

7.5.12.6 Zusammenfassung

Schlussendlich kristallisierte sich die azeotrope Destillation als Methode der Wahl zur Bestimmung des Wassergehalts in FP-Material heraus und fand sowohl bei der Validierung der entwickelten HPLC-Methode (Kapitel 7.2) als auch bei der Analytik der FP-Proben zur Definierung von Einflüssen auf das IG- und PE-Inhaltsstoffspektrum des Spitzwegerichs Anwendung. Ausschlaggebend für die Entscheidung war die kurze Analysedauer, das unkomplizierte Handling und die durchweg freie Verfügbarkeit aller benötigten Geräte und Materialien. Eine geringere Präzision als z.B. bei der Bestimmung *via* Trocknungsverlust im Vergleich zur azeotropen Destillation wurde zugunsten der Praktikabilität in Kauf genommen.

7.5.13 Analytische HPLC-DAD

Die Validierung der entwickelten HPLC-DAD-Fingerprintmethode wurde mit HPLC-Anlage 1 (Kapitel 10.8) an stationärer C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Co.No.027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Kombination mit der mobile Phase aus Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-5 min: 0%, 5-15 min: 0-10%, 15-30 min: 10-33%, 30-35 min: 33-50%, 35-40 min, 50-98%, 40-49 min: 98%, 49-50 min: 98-0%, 50-60 min: 0% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 ± 5 °C und Detektion mittels DAD 190-400 nm, λ = 195 nm zur Bestimmung der IGs und λ = 330 nm zur Bestimmung der PEs durchgeführt. Das Injektionsvolumen der Referenz-

substanzen Aucubin, Catalpol und Verbascosid sowie der gespikten Extrakte im Rahmen der Wiederfindung betrug 10 μL .

7.5.14 HPLC-DAD/ESI-HRMS

HPLC-DAD/ESI-HRMS-Untersuchungen wurden von der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg an einer Agilent Infinity 1290 HPLC-Anlage (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA) mit binärer Pumpe, Mikrovakuumdegasser, Autosampler, thermostatischem Säulenofen und UV-VIS Diodenarray-Detektor gekoppelt mit an einem quadrupol-Time of Flight (q-TOF) 6540 UHD (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA) Massenspektrometer mit einer Dual-ESI- bzw. Jet Stream Ionenquelle (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA), unter den Parametern Spannung +3500 V, Trockengasfluss (N_2) 10,00 L/min, 300 °C, Zerstäubungsdruck 50 psi, Scanbereich m/z 40-1400, durchgeführt. Die Aufnahmen fanden im negativen Modus statt. Die Steuerung der Geräte und Auswertung der Daten wurde mithilfe der Software MassHunter Workstation B.06.01 bzw. B.07.00 unternommen.

7.5.15 HPLC-DAD/ESI-MSⁿ

HPLC-DAD/ESI-MSⁿ-Analysen wurden an einem Agilent 1200 HPLC-System (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA), mit binärer Pumpe, Mikrovakuumdegasser, Autosampler, thermostatischem Säulenofen und UV-VIS Diodenarray-Detektor durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine C18e-Säule, Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR, Säulennummer 027442, mit Vorsäule, 250 x 4,0 mm, 5 μm (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Kombination mit der mobile Phase aus Eluent A: Wasser mit 0,01% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril mit 0,01% Ameisensäure, Gradient: 0-5 min: 0%, 5-15 min: 0-10%, 15-30 min: 10-33%, 30-35 min: 33-50%, 35-40 min, 50-98%, 40-49 min: 98%, 49-50 min: 98-0%, 50-60 min: 0% Eluent B, Fluss 1,0 mL/min, Säulenofen: 25 \pm 5 °C, Detektion: DAD 190-400 nm verwendet. Das LC-System war an eine HCTultra Ionenfalle (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) mit ESI Ionenquelle gekoppelt, die im negativen Modus mit einer Kapillarspannung von +4000 V, einem Trockengasfluss (N_2) von 9,00 L/min, einer Kapillartemperatur von 365 °C sowie einem Zerstäubungsdruck von 50 psi gefahren wurde. $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ionen resultierten nach Einstellung der Zielmassen m/z 400, 600 bzw. 800 für nieder-, -mittel- bzw. höhermolekulare Verbindungen. MSⁿ-Daten wurden im auto MS Modus erhalten. Das System wurde mittels Agilent Chemstation (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA) and EsquireControl Software (V7.1, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) betrieben.

Kapitel 8

Einfluss des Erntezeitpunkts auf das Inhaltsstoffspektrum der IGs und PEs in den Blättern von *P. lanceolata*

8.1 Hintergrund, Motivation und Strategie

Quantitative Veränderungen im Sekundärstoffprofil sollten bekannt sein, um den optimalen Erntezeitpunkt wählen zu können. Wie aus der Literatur bekannt (Kapitel 1.2), kann das Sekundärstoffspektrum sowohl qualitativ als auch quantitativ von zahlreichen Faktoren beeinflusst werden, wobei dies bei Spitzwegerichblättern auffallend stark ausfallen kann [33, Seite 95]. Hervorgehoben werden sollte hier der ontogenetische Aspekt der Vegetation bzw. die Variationen im IG- und PE-Spektrum von *P. lanceolata* über die Dauer der gesamten Blütezeit. Dazu wurden pro Jahr fünf Probenzüge vorgenommen, welche jeweils kurz vor Öffnung der Blüte (Juni) sowie zu Beginn jeden Monats während bzw. am Ende der Blütezeit (Juli - Oktober). Explizit wurden die Blätter der Heilpflanze untersucht, da nur diese gemäß Europäischem Arzneibuch monographiert werden [49]. Um Resultate unabhängig von diurnalen Abhängigkeiten zu vermeiden, wurde stets morgens geerntet. Annuale Besonderheiten im Inhaltsstoffspektrum sollten durch die Beprobung in drei aufeinanderfolgenden Jahren (2014, 2015 und 2016) erkennbar gemacht werden. Um mögliche Unterschiede zwischen wilden und in Kultur wachsenden Pflanzen bestimmen zu können, wurden insgesamt zwei Kulturpflanzenkategorien (Libor und Hortus) und eine Wildpflanzenkategorie (Nollen) analysiert (Kapitel 10.4.2 und 10.4.4). Bei Libor handelt es sich um eine kommerziell erwerbbar Spitzwegerichsorte, Hortus steht für die in Kultur genommene Wildpflanze, welche ebenfalls käuflich erworben wurde. Als Nollen wird die auf einer biologisch-dynamischen Wiese geerntete Wildpflanze bezeichnet, auf der lediglich Mäharbeiten, jedoch keine Dünge-, Hack- oder Jätemaß-

nahmen ausgeführt wurden (Kapitel 10.4.2). Die Standorte der Pflanzen variierten nur leicht voneinander und besaßen die gemeinsamen Koordinaten 48°37'n.B. und 9°35'ö.B. (Kapitel 10.4.3).

Um Variationen im IG- und PE-Muster ausgewählter Vertreter des Spitzwegerichs über den gesamten Verlauf der Blütezeit in drei aufeinanderfolgenden Jahren bestimmen zu können, war es notwendig, eine geeignete Fingerprintmethode zur Identifizierung und Quantifizierung der ausgewählten Verbindungen an der Hand zu haben. In der Literatur wurde bisher noch keine geeignete Fingerprintmethode zur Beantwortung dieser Fragestellung beschrieben, weswegen im Rahmen dieser Arbeit eine geeignete HPLC--DAD-Methode entwickelt (Kapitel 6) und validiert (Kapitel 7) wurde.

Die Frischpflanzen wurden nach der Ernte gereinigt und bis zur Aufarbeitung unter Vakuum eingefroren aufbewahrt (Kapitel 10.4.4). Nach erfolgter Probenaufarbeitung (Kapitel 10.4.5) wurden sie mithilfe der etablierten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4) analysiert. Zur Ermittlung des Gehalts der betrachteten Analyten wurde hierbei erstmalig in der vergleichbaren FP-Analytik der Gesamtwassergehalt des verwendeten Frischpflanzenmaterials mit einbezogen, wobei die Art der Wasserbestimmung (azeotrope Destillation) im Zuge dieser Arbeit eruiert wurde (Kapitel 7.5.12). Die Berücksichtigung des Wassergehalts des eingefrorenen FP-Materials wird als essentiell für eine aussagekräftige Vergleichbarkeit der Resultate erachtet, da unterschiedlich viel externes, nicht entfernbares Wasser (Eiskristalle) in den eingefrorenen FP-Materialproben festgestellt werden konnte. Zudem muss aufgrund unterschiedlicher Umgebungs-, speziell Witterungsbedingungen, bei den Probenzügen davon ausgegangen werden, dass auch das interne Pflanzenwasser von Probenzug zu Probenzug variierte. Schlussendlich wurden die Gehalte der Hauptvertreter der IGs (Aucubin und Catalpol) und PEs (Verbascosid) unter Normierung des Wassergehalts auf Null und gemäß den aus der Validierung erhaltenen Geradengleichungen berechnet (Tabelle 7.5 in Kapitel 7.3.2).

8.2 Ergebnis und Diskussion

Über den gesamten Blütezeitraum wurden einmal pro Monat (insgesamt fünf Erntezeitpunkte) von drei Pflanzenkategorien (Libor, Hortus, Nollen) des Spitzwegerichs in drei aufeinanderfolgenden Jahren 2014, 2015 und 2016 Proben genommen und mithilfe der HPLC-DAD-Fingerprintmethode analysiert. Ziel war die Festlegung eines optimalen Erntezeitpunkts der Arzneipflanze, definiert durch den maximalen Gehalt pharmazeutisch relevanter Inhaltsstoffe. Dabei wurden die Gehalte der Hauptkomponenten der IGs (Aucubin und Catalpol) sowie der PEs (Verbascosid) herangezogen. Die erzielten Resultate werden im Folgenden behandelt. Die Gehalte werden als Analytmenge pro Menge des entsprechenden FP-Materials [mg/g] (m/m) bezogen auf die trockene Frischpflanze angegeben.

8.2.1 Catalpolgehalte

Es fällt auf, dass sich die Catalpolgehalte in den in Kultur aufgezogenen Pflanzenkategorien Libor und Hortus in allen untersuchten Jahren und Erntezeitpunkten um die $\leq 0,1$ mg/g bewegten. Davon ausgenommen waren einzelne Erntezeitpunkte. Für Libor traten zwei Ausnahmen auf. Beide konnten für das Jahr 2014 verzeichnet werden: vor der Blüte mit 2,99 mg/g und Anfang September mit 4,38 mg/g. Hortus hingegen zeigte nur ein Maximum vor der Blüte im Jahr 2016 mit 4,92 mg/g. Im Gegensatz dazu lagen die Gehalte in der wilden, auf der Wiese habitierten Pflanze mit $\leq 0,2$ mg/g tendenziell höher als bei den Kulturpflanzen, bei welcher sich insgesamt drei Maxima heraushoben. Diese lagen mit 0,47 mg/g (Anfang Juli 2016), 2,98 mg/g (Anfang September 2014) und 1,08 mg/g (Anfang Oktober 2016) unterhalb der Spitzenwerte der Kulturpflanzen. Insgesamt konnten Catalpolgehalte zwischen 0,02-4,38 mg/g (Libor), 0,01-4,92 mg/g (Hortus) und 0,01-2,98 mg/g (Nollen) erhalten werden, welche sich im Großen und Ganzen ähneln und nur durch ihre Maximalgehalte leicht voneinander abweichen. Eine Relation zwischen Substanzgehalt und Erntezeitpunkt bzw. Blütestadium war anhand der erhobenen Daten visuell nicht zu erkennen (Abbildung 8.1).

8.2.2 Aucubingehalte

Wie bei Catalpol zeichneten sich auch für Aucubin sichtlich erhöhte Gehalte zu den Erntezeitpunkten vor der Blüte (Libor 2014 mit 4,95 mg/g und Hortus 2016 mit 5,34 mg/g), Anfang September (Libor 2014 mit 9,88 mg/g, Nollen 2014 mit 3,84 mg/g) sowie Anfang Oktober (Nollen 2016 mit 1,33 mg/g) ab. Dabei bewegten sich die restlichen ermittelten Gehalte jeweils unter 0,4 mg/g (Libor, Nollen) bzw. 0,3 mg/g (Hortus) und differenzierten sich damit kaum voneinander. Allein bei Hortus konnten durchweg höhere Gehalte im Jahr 2016 als im vorhergehenden Jahr erzielt werden. Dies konnte weder bei den andern betrachteten Pflanzenkategorien noch für Catalpol beobachtet werden. Damit korrelierend wiesen im Jahr 2016 alle kultivierten Hortusexemplare ein sehr auffälliges, erhöhtes Pflanzenwachstum auf, welches jedoch nicht ausreichend protokolliert wurde.

Ein möglicher Zusammenhang diesbezüglich ist tendenziell möglich, kann aber aufgrund zu geringer Probenstichzahl nicht mit Sicherheit belegt werden und bietet sich als Ansatzpunkt zukünftiger Forschungen an. Ansonsten waren die Gehalte auch hier unregelmäßig verteilt und ließen keine Korrelation mit dem Erntemonat erkennen. Insgesamt konnten Aucubingehalte zwischen 0,04-9,88 mg/g (Libor), 0,06-5,34 mg/g (Hortus) und 0,01-3,84 mg/g (Nollen) erhalten werden. Die Spannweiten beginnen etwa mit gleich niedrigen Gehalten, variieren jedoch stärker in ihren oberen Grenzen als Catalpol. Die gefundenen Aucubinmengen waren im Schnitt etwa doppelt so hoch wie die des Catalpols (Abbildung 8.2).

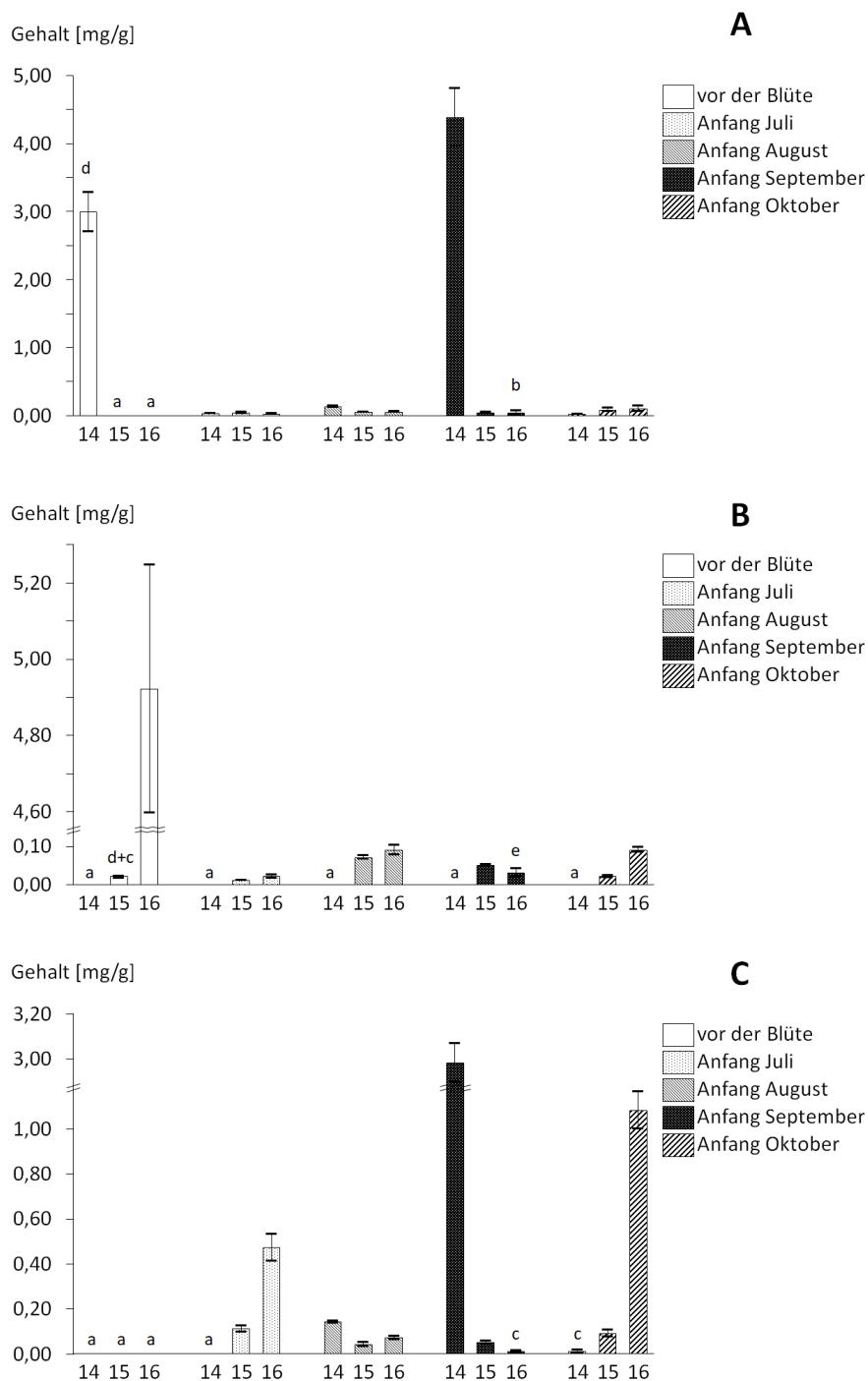


Abbildung 8.1: Catalpolgehalte der Spitzwegerichblätter bezogen auf die trockene Frischpflanze [mg/g] über die Jahre 2014 (14), 2015 (15) und 2016 (16) der Pflanzenkategorien Libor (A), Hortus (B) und Nollen (C) zu den Erntezeitpunkten (von links nach rechts) vor der Blüte, Anfang Juli, Anfang August, Anfang September, Anfang Oktober. Die einfach durchgeführten Probenzüge ($n=1$) wurden in Triplikaten ($n=3$ Messwerte) aufgearbeitet. Angegeben sind die $MW \pm VarK$, wobei a: nicht geerntet, b: Arbeitsbereich > Messwert > LOQ, c: $LOQ > Messwert > LOD$, d: $n=2$ Messwerte, e: $n=4$ Messwerte.

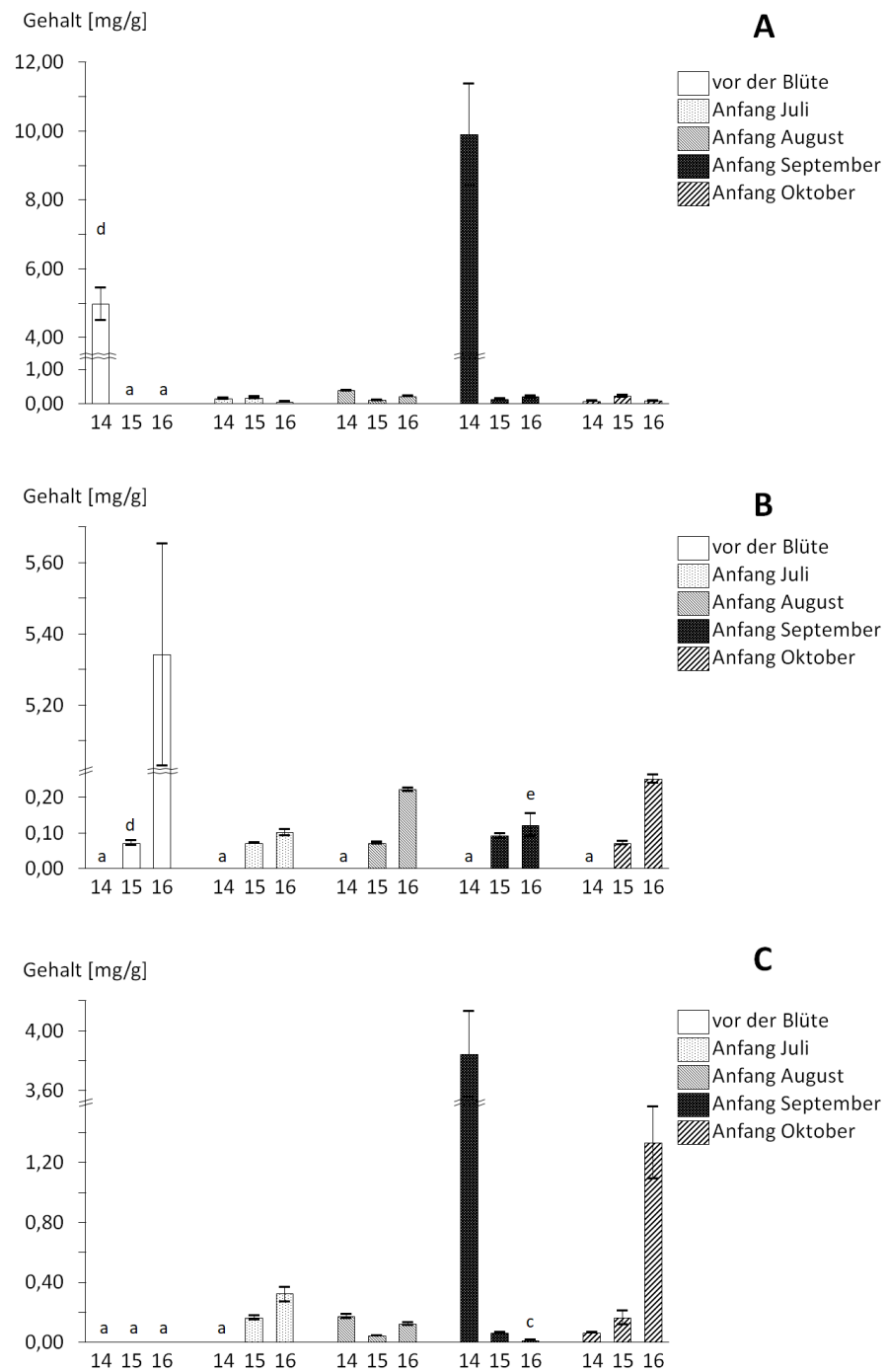


Abbildung 8.2: Aucubingehalte der Spitzwegerichblätter bezogen auf die getrocknete Frischpflanze [mg/g] über die Jahre 2014 (14), 2015 (15) und 2016 (16) der Pflanzenkategorien Libor (A), Hortus (B) und Nollen (C) zu den Erntezeitpunkten (von links nach rechts) vor der Blüte, Anfang Juli, Anfang August, Anfang September, Anfang Oktober. Die einfach durchgeführten Probenzüge (n=1) wurden in Triplikaten (n=3 Messwerte) aufgearbeitet. Angegeben sind die MW \pm VarK, wobei a: nicht geerntet, b: Arbeitsbereich > Messwert > LOQ, c: LOQ > Messwert > LOD, d: n=2 Messwerte, e: n=4 Messwerte.

8.2.3 Verbascosidgehalte

In den Spitzwegerichblättern konnte im Schnitt merklich mehr an Verbascosid als an Aucubin oder Catalpol nachgewiesen werden, wobei die Maximalgehalte an Verbascosid sich, im Gegensatz zu den beiden IGs, weniger deutlich von den restlichen Gehalten abhoben. Generell war eine wesentlich größere Spannweite der Gehalte zu vermerken als bei den IGs. So wurden Minimalgehalte an Verbascosid unterhalb des LOQs detektiert (Nollen, vor der Blüte im Jahr 2016), wohingegen der höchste gemessene Gehalt 30,15 mg/g (Nollen, Anfang Oktober im Jahr 2014) betrug. Im Kontrast zu den beiden IGs konnten Abweichungen der Gehalte der Kulturpflanzen mit der Wildpflanze beobachtet werden. So lieferte die auf der Wiese wachsenden Wildpflanze (Nollen) durchschnittlichen höhere Verbascosidgehalte ($> 12,5$ mg/g) als die beiden in Kultur lebenden Pflanzen. Libor und Hortus zeigten je etwa $\leq 7,0$ mg/g an Verbascosidgehalt auf. Die Differenz zwischen Kultur- und Wiesenpflanzen könnte, neben den vermutlich stressfreieren Bedingungen im Beet als auf der freien Wiese, auch auf das unterschiedliche Alter der Pflanzen in Kultur und freier Wildbahn zurückzuführen sein. Während der wilde Spitzwegerich im Allgemeinen mehrjährig ist, wurden die Kulturpflanzen hier jedes Jahr neu angepflanzt. Untersuchungen dazu würden darüber Aufschluss geben. Maximalgehalte für Libor erreichten 12,18 mg/g (Anfang Juli, 2015) und 13,57 mg/g (Anfang Oktober, 2015) und lagen damit höher als die für die kultivierte Wildform Hortus mit 9,85 mg/g (Anfang Juli, 2016) sowie 9,94 mg/g (Anfang September, 2015). Insgesamt konnten Verbascosidgehalte zwischen 0,31-13,57 mg/g (Libor), 0,26-9,94 mg/g (Hortus) und 0,43-30,15 mg/g (Nollen) erhalten werden. Die Gehaltsbereiche der Kulturpflanzen ähneln sich, sind jedoch maximal halb so groß wie bei der Wildpflanze. In Übereinstimmung mit den beiden IGs kann auch hinsichtlich des Verbascosidgehalts keine klare Tendenz bezüglich eines idealen Erntezeitpunktes anhand der erhobenen Daten erkannt werden (Abbildung 8.3).

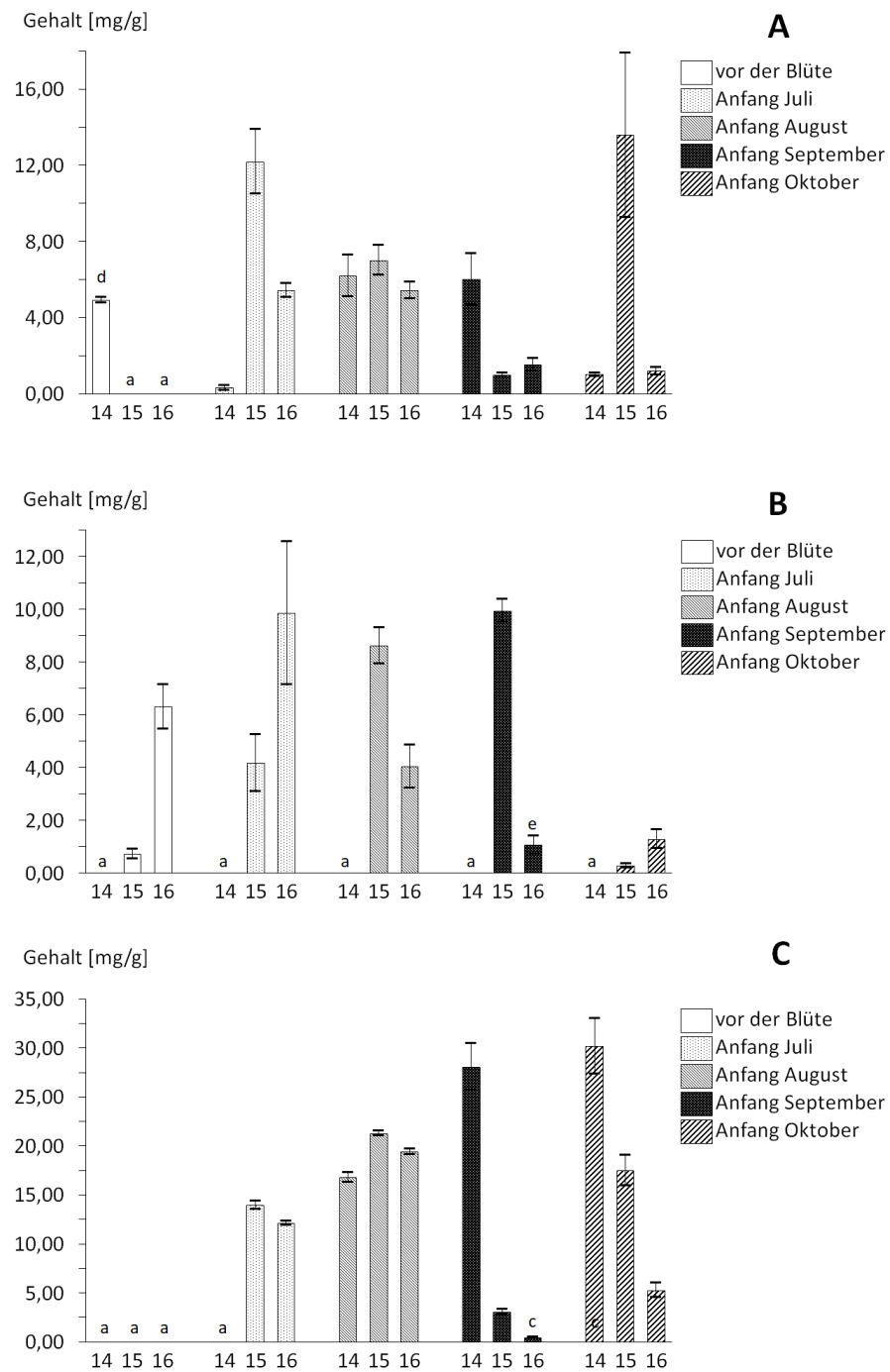


Abbildung 8.3: Verbascosidgehalte der Spitzwegerichblätter bezogen auf die trockene Frischpflanze [mg/g] über die Jahre 2014 (14), 2015 (15) und 2016 (16) der Pflanzenkategorien Libor (A), Hortus (B) und Nollen (C) zu den Erntezeitpunkten (von links nach rechts) vor der Blüte, Anfang Juli, Anfang August, Anfang September, Anfang Oktober. Die einfach durchgeführten Probenzüge ($n=1$) wurden in Triplikaten ($n=3$ Messwerte) aufgearbeitet. Angegeben sind die MW \pm VarK, wobei a: nicht geerntet, b: Arbeitsbereich $>$ Messwert $>$ LOQ, c: LOQ $>$ Messwert $>$ LOD, d: $n=2$ Messwerte, e: $n=4$ Messwerte.

8.2.4 Positiv korrelierende IG-Gehalte

Etwaige Korrelationen zwischen den ermittelten Gehalten der Inhaltsstoffe Aucubin, Catalpol und Verbascosid untereinander sowie zu ausgewählten Umweltparametern wurden im Rahmen dieser Arbeit mithilfe der Software SPSS untersucht (Kapitel 8.3.5). Als verfügbare ökologische Parameter dienten Lufttemperatur und Niederschlag, welche von der Firma WALA Heilmittel GmbH direkt vor Ort gemessen wurden (Kapitel 8.3.3). In die Korrelationsstatistik miteingeflossen sind weiter alle Gehalte der drei Leitsubstanzen unabhängig vom jeweiligen Erntemonat, Jahr oder der jeweiligen Pflanzenkategorie. Die Resultate wurden mittels SPSS Software grafisch dargestellt (Abbildung 8.4).

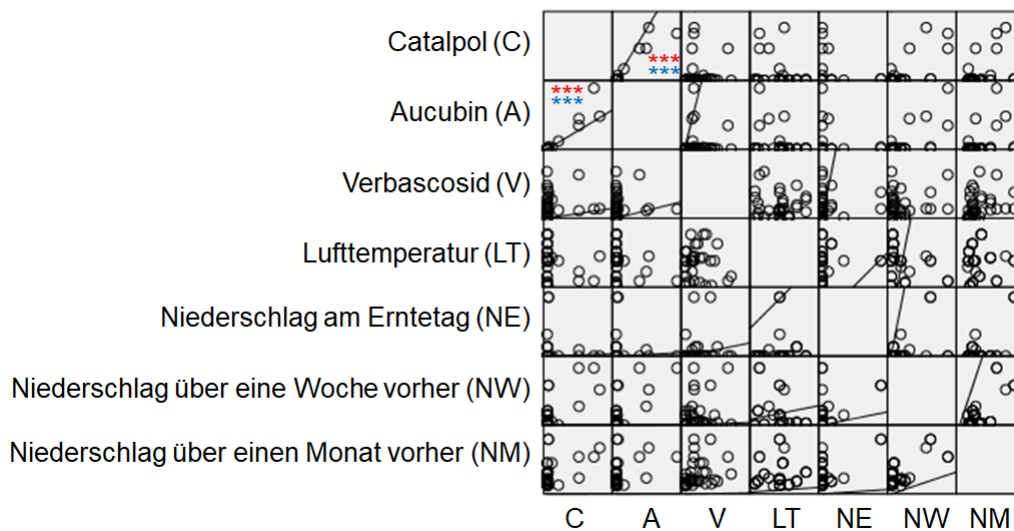


Abbildung 8.4: Korrelationen der verfügbaren Wetterdaten Lufttemperatur ($^{\circ}\text{C}$) und Niederschlag (mm/m^2) mit den erhobenen Analytgehalten *via* SPSS, wobei die Werte aller Jahre 2014, 2015 und 2016 und Erntemonate zusammengefasst wurden. Die Grafik wurde mittels SPSS generiert. Signifikante Korrelationen wurden *via* parametrischem Pearson (rot) und nicht-parametrischem Spearman (blau) Test über SPSS ermittelt: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$.

Eine eindeutig nachweisbare, starke positive Korrelation konnte ausschließlich zwischen den Gehalten der beiden IGs Aucubin und Catalpol nachgewiesen werden, welche signifikante Korrelationen von $p \leq 0,001$ sowohl anhand des parametrischen Pearson als auch anhand des nicht-parametrischen Spearman Test aufwies. Dies lässt vermuten, dass die Produktion der beiden Hauptiridoidglykoside in der Pflanze gemeinsam reguliert wird. Es konnte keine eindeutige Korrelation zwischen dem Verbacosidgehalt und einem der IG-Gehalte nachgewiesen werden. Ebenso konnte keine Korrelation der jeweiligen Gehalte mit einem der Wetterparameter verifiziert werden. In Anbetracht dessen, dass eine aussagekräftige Statistik sowie eine grundlegende Einteilung in parametrischer und nicht-parametrischer Datenverteilung bei zu geringer Probenzahl schwierig ist (Kapitel 8.3.5), wurde hier sowohl mittels parametrischem als auch nicht-parametrischem Test gearbeitet. Beide Tests zeigen eine deutliche, positive Korrelation zwischen Aucubin- und Catalpolgehalt. Die Übereinstimmung beider Tests sichert das Resultat zusätzlich

ab. Damit konnte erstmalig eine ausgeprägte Korrelation zwischen dem Aucubin- und Catalpolgehalt in *P. lanceolata* - unter den gegebenen Bedingungen - gezeigt werden. Die erhaltene, stark positive Korrelation der beiden Hauptiridoidglykoside des Spitzwegerichs steht im Widerspruch zu den Resultaten von Tamura und Nishibe [18], welche einen starken Anstieg von Aucubin während der Blütezeit beobachten konnten, wohingegen der Gehalt an Catalpol über den Messzeitraum relativ konstant war [18, 33]. Da die hier erhobenen Daten auf verschiedenen Einflusspools beruhen (drei unterschiedliche Jahre, fünf unterschiedliche Erntemonate und drei unterschiedliche Pflanzenkategorien), wohingegen Tamura und Nishibe [18] nur in einem Jahr Proben gezogen hat, werden die Resultate dieser Arbeit als aussagekräftiger erachtet.

8.2.5 Variationen des Gehalts um den Mittelwert

Die gemessenen Gehalte von Aucubin, Catalpol und Verbascosid variierten um den Mittelwert der drei Aufarbeitungen einer gezogenen Probe in einigen Fällen stark. Dafür können neben generellen, unregelmäßigen Fehlern aus der Probenaufarbeitungsmethode (Kapitel 8.2.6.2) auch unterschiedlich verteilte Substanzgehalte im Blatt selbst verantwortlich gemacht werden. Die mehreren Zentimeter langen Blätter der Pflanzen wurden vor der Aufarbeitung grob zerkleinert. Es ist möglich, dass, aufgrund der variierenden Verteilung der Substanzen über das gesamte Blatt (Blattspitzen, Blattmitte, -anfang, Ober- und Unterseite, Kapitel 1.2.1, [33]), sich zufällig in einer Aufarbeitungsprobe merklich mehr oder weniger an Analysesubstanz befand als in der anderen bzw. den anderen beiden und deshalb in verschiedenen Aufarbeitungen der Proben deutlich abweichende Gehalte erfasst wurden. Vergleichbar hohe Gehaltsschwankungen [167, 177] sowie höhere von bis zu 87% [167] oder sogar 104% [177] konnten auch in anderen nativen Pflanzenrohextrakten vorgefunden werden.

8.2.6 Bewertung der Resultate

Die Auswertung der Experimente birgt Probleme. Neben der Integration der IGs im Rohextrakt bei unspezifischer Wellenlänge von $\lambda=195$ nm, rühren diese mitunter von der Art der Probennahme der Frischpflanze und ihrer Aufarbeitung her. Zudem erschwert die generell geringe Probenanzahl eine statistische Absicherung der Resultate. Der Fehler der neu entwickelten und validierten HPLC-DAD-Methode zur Fingerprintanalytik ausgewählter IGs und PEs (Kapitel 6.3.4) wird in Kapitel 7 ausführlich behandelt und muss an dieser Stelle daher nicht wiederholt werden.

8.2.6.1 Probennahme

Bei der Interpretation der Resultate muss berücksichtigt werden, dass die Probenzüge mit $n=1$ von einer Stelle (Hortus, Libor) bzw. einem kleinem Erntegebiet (Nollen) pro betrachteter Pflanzenkategorie und Erntezeitpunkt erfolgten und nicht repräsentativ sind. Dieser grundlegende und richtigkeitslimitierende Faktor der Probennahme auf das Endergebnis kann nachträglich nicht ausgeglichen werden. Hinzukommt, dass sich der Fehler

der Probennahme im Vergleich zu dem der Probenaufbereitung und insbesondere zu dem der analytischen Messung beträchtlich stärker auf den Gesamtfehler auswirkt. [135]

Von demher sind die gewonnenen Resultate als erste Richtwerte für eine intensivere Grundlagenforschung zu verstehen und legen lediglich Tendenzen für zukünftige Experimente offen. In Zukunft sollte auf eine repräsentativere Probennahme geachtet werden, womit allerdings auch ein erheblich höherer Arbeitssaufwand einhergeht (Kapitel 8.2.6.4).

8.2.6.2 Probenaufbereitung

Da es sich bei den FP-Proben nicht um gleichmäßig pulverisiertes Drogenmaterial, sondern um grob vorzerkleinertes FP-Material handelte, bestand in der Einwaage des frischen FP-Materials vermutlich ein größerer Fehler als bei der Einwaage von homogenem Drogenpulver.

Hinzu kommt, dass das eingefrorene Spitzwegerichfrischpflanzenmaterial von Ernte zu Ernte und wahrscheinlich auch von Pflanzenkategorie zu Pflanzenkategorie und von Pflanzenexemplar zu Pflanzenexemplar unterschiedlich hohe Wassergehalte führt. Darüber hinaus sammelte sich externes Wasser an dem eingefrorenen Pflanzenmaterial während der Aufbewahrung bei -20°C bzw. -80°C an, wobei sich die mit bloßem Auge gut sichtbaren Wasseranlagerungen unregelmäßig und irreversibel verhielten. Eine Miteinbeziehung des Wassergehalts in die Quantifizierung bestimmter Inhaltsstoffe des Spitzwegerichs wurde daher als sinnvoll erachtet. Die zur Wassergehaltsbestimmung eingesetzte azeotrope Destillation, welche eine valide Arzneibuchmethode darstellt [43, 49], wurde nicht explizit auf ihre Eignung und Validität gemäß ICH *guidelines* [160] hin überprüft. Die der Methode zugrundeliegenden Validierungsdaten des Ph. Eur. [43, 49] sind überdies nicht bekannt. Ein Resümee über mögliche Diskrepanzen bei der Evaluierung des externen und internen Wassergehalts der Pflanze von wasserarmem, relativ trockenem Drogenpulver und der wasserreichen, eingefrorenen Frischpflanze kann daher nicht gestellt werden. Es wird empfohlen die Güte der Wassergehaltsbestimmungsmethode in zukünftigen Studien im Nachhinein zu kontrollieren, um den Fehler der angewendeten Methode festlegen zu können.

Eine weitere Fehlerquelle verbirgt sich in der Methodik zur Probenvorbereitung. Verglichen mit dem Fehler der Probennahme wirkt sich der Fehler der Probenaufbereitung schwächer auf das Gesamtergebnis aus, besitzt jedoch einen wesentlich stärkeren Einfluss als die nachfolgende analytische Messung [135]. Indirekt kann durch Anwendung des Fehlerquadratgesetzes [135] die Größenordnung der Unsicherheit der Probenaufbereitung abgeschätzt werden, indem die Differenz der ins Quadrat genommenen Variationen (STABW [%]) aus Methoden- und Messpräzision (Tabelle 7.5) gebildet wird (Kapitel 8.3.4). Dabei muss berücksichtigt werden, dass streng genommen auch andere Fehlerquellen dabei miteinbezieht werden, wie z.B. Variationen durch die Einwaage oder die Ermittlung des Wassergehalts. Es wird somit eher ein potentieller Maximalfehler errechnet, von dem die quadrierten Einzelfehler der Einwaage und des Wassergehalts noch zu subtrahieren sind. Der ermittelte Fehler der Probenaufarbeitung der Analyten Catalol,

Aucubin und Verbascosid belief sich dabei auf 12,69%, 8,74% und 13,95%, respektive. Dieser ist erheblich größer als der der jeweiligen Messpräzision und entspricht etwa dem der jeweiligen Methodenpräzision der drei Analyten. Die Abweichungen befinden sich ausserhalb der normalen Akzeptanzgrenzen von ≤ 5 und deuten somit darauf hin, dass die verwendete Probenaufarbeitungsmethode, inklusive weiterer potentieller Fehler aus Einwaage und Wasserbestimmung, den Löwenanteil des per Methodenpräzision der drei Analyten.

Da der Fehler einheitlich bei allen Messergebnissen der drei Analyten involviert ist, können die Endresultate aufgrund gegebener Vergleichbarkeit trotzdem zu einander in Relation gesetzt werden. Gleiches gilt für die hier nicht näher diskutierten Fehlerwahrscheinlichkeiten aus den restlichen Validierungsparametern (Kapitel 7).

8.2.6.3 Integration

Verlässliche Ergebnisse der HPLC-Analytik basieren auf einer korrekten und vor allem einheitlichen Integration der Peaks. Dazu ist es von Bedeutung neben Linearität, Richtigkeit, Präzision und Robustheit der betreffenden Analyten Spezifität und Selektivität der Substanzpeaks zu garantieren. Die üblicherweise dazu als Maß der Spezifität (Selektivität) betrachtete Entfernung eines beliebigen Peaks zum Peak der Analysesubstanz ergab aufgrund der Komplexität der erhaltenen Rohextraktchromatogramme, insbesondere für die bei der Detektionswellenlänge von $\lambda=195$ nm detektierten IGs, keinen Sinn. Durch das Zusammenspiel der pflanzlichen Matrix und der unspezifischen Detektionswellenlänge war es oft nicht möglich, einen großen Abstand zwischen die relevanten Peaks der IGs und die nicht-relevanten Peaks zu bringen. Die Zielvorgabe an die entwickelte HPLC-DAD-Fingerprintmethode vier IGs und drei PEs simultan qualitativ sowie Aucubin, Catalpol und Verbascosid gleichzeitig quantitativ zu analysieren, wobei sich die Verbindungen nicht wesentlich in ihrer Polarität unterschieden, erschwerte dieses Kriterium zudem. Von störenden Coabsorptionen betroffen waren dabei eher die IGs, da sie bei unspezifischen $\lambda=195$ nm quantifiziert wurden. Die Integration des Verbascosids bei spezifischeren $\lambda=330$ nm erwies sich hingegen als relativ unproblematisch. Überdies führten unterschiedlich hohe Substanzgehalte in den zu analysierenden FP-Proben im Vergleich zum FP-Material, welches zur Methodvalidierung genutzt wurde, zu Variationen in den Peakgrößen. Weiter bildeten sich, in Abhängigkeit der Probenmatrix bzw. der Substanzgehalte, z.T. Doppelpeaks (Abbildung 8.5 D) bis hin zu Peakclustern aus, welche ebenfalls in ihrer Form variieren konnten (Abbildung 8.5 E, F). Dieser Effekt wurde durch Injektion von z.T. hohen Volumina (≤ 99 μmL), aufgrund der sonst zu geringen Detektionsmengen ($\leq \text{LOD}$, $\leq \text{LOQ}$), teilweise verstärkt (Abbildung 8.5 E, F). Bei sehr niedrigen Substanzkonzentrationen ($\leq \text{LOD}$) kam zusätzlich dem Verlauf der Basislinie eine ausschlaggebendere Rolle auf die ermittelte Fläche bzw. den daraus errechneten Gehalt zu (Abbildung 8.5 C).

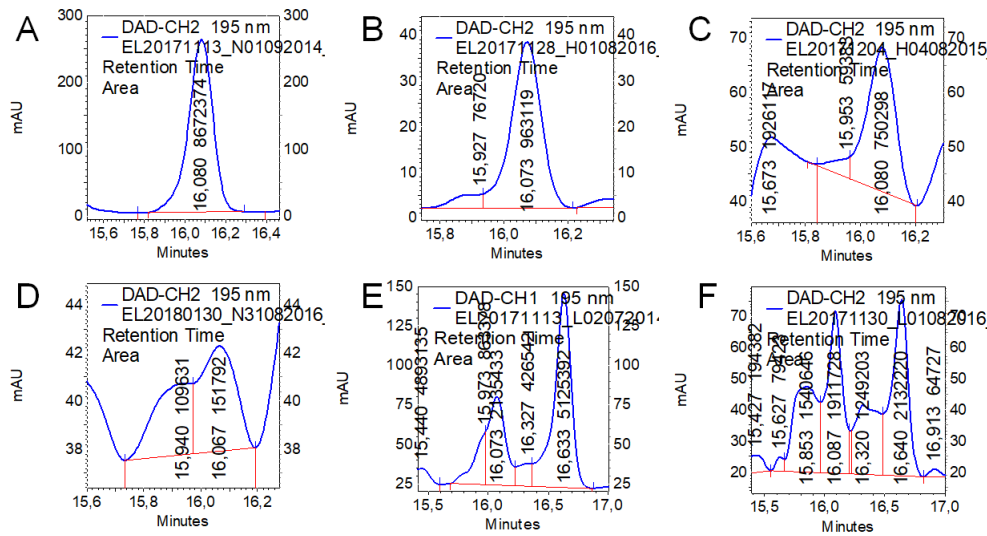


Abbildung 8.5: Problematik der IG-Integration am Beispiel von Aucubin ($t_R=16,1$ min). Chromatogrammausschnitte verschiedener FP-Proben, mit A: Nollen, Ernte: 01.09.2014, $t_R=16,080$ min, Injektion: $10 \mu\text{L}$; B: Hortus, Ernte: 01.08.2016, $t_R=16,073$ min, Injektion: $10 \mu\text{L}$; C: Hortus, Ernte 04.08.2015, $t_R=16,080$, Injektion: $80 \mu\text{L}$; D: Nollen, Ernte 31.08.2016, $t_R=16,067$, Injektion: $99 \mu\text{L}$; E: Libor, Ernte: 02.07.2014, $t_R=16,073$ min, Injektion: $80 \mu\text{L}$; F: Libor, Ernte: 01.08.2016, $t_R=16,087$ min, Injektion: $80 \mu\text{L}$.

Um dennoch eine weitestgehend einheitliche Integration der Peaks zu realisieren, wurden kritische Peakintegrationssituationen kategorisiert. Die Kategorien umfassen fünf verschiedene Peakmuster mit entsprechenden Integrationsrichtlinien (Tabelle 8.1).

Tabelle 8.1: Erarbeitete Peakintegrationskategorien (Kat.) zur einheitlichen Quantifizierung der IGs Aucubin und Catalpol im Spitzwegerichrohextrakt.

Kat.	Spezifizierung	Beispiel	Integrationsverfahren
1	Perfekter Peak (Gauss'sche Kurve)	nicht gezeigt	Integration des ganzen Peaks von Basislinie zu Basislinie
2	Zwei sich überschneidende Peaks mit Valley	Abbildung 8.5 B, C, D	Splitpeak
3	Peak mit Fronting	Abbildung 8.5 A	Integration des ganzen Peaks von Basislinie zu Basislinie
4	Peakcluster mit Valley	Abbildung 8.5 E, F	Splitpeak
5	Anormale Peakform (ohne Valley)	nicht gezeigt	Integration des ganzen Peaks

Der Fehler der Integration wird abschließend, unter Einhaltung der Integrationskategorien, als akzeptabel betrachtet. Zudem wird der, von den unterschiedlich hohen Injektionsvolumina der Proben (1-99 μL) herrührende Fehler hier als vernachlässigbar eingestuft, da das Gerät vor den HPLC-Messungen fachgerecht gewartet wurde. Alles in allem wird, in Anbetracht der Komplexität der untersuchten Rohextrakte, insbesondere bei höheren Injektionsvolumina und unspezifischer Detektionswellenlänge, die angewendete HPLC-DAD-Methode und -Integrationsweise als solide eingestuft. Die gravierenden Variationen im Peakmuster der IGs sind der enormen Spannweite an deutlich unterschiedlich zusammengesetzten Frischpflanzenproben geschuldet, welche neben verschiedenen Genotypen auch Variationen bezüglich des Standorts und vor allem bezüglich des Erntezeitpunkts aufweisen.

8.2.6.4 Statistik

Wie in Kapitel 8.2.6.1 angedeutet, wurden die Probenzügen mit $n=1$ von einer Stelle (Hortus, Libor) bzw. einem kleinem Erntegebiet (Nollen) pro betrachteter Pflanzenkategorie (Libor, Hortus, Nollen) und Erntezeitpunkt (vor der Blüte, Juli - Oktober) pro untersuchtem Jahr (2014, 2015, 2016) nur von einer Stelle genommen und bieten keine repräsentative Verteilung der Probennahme. Werden die Gehalte der Pflanzenkategorien und Erntemonate hinsichtlich der drei Erntejahre verglichen, so ergibt sich dafür $n=3$. Gleiches trifft auf die Zusammenfassung der drei Erntejahre und der fünf Erntemonate bezüglich der verschiedenen drei Pflanzenkategorien zu. $n=5$ würde sich bei der gemeinsamen Betrachtung der drei Erntejahre und den drei Pflanzenkategorien über die fünf Erntezeitpunkte ergeben. Findet keine Differenzierung in Erntemonat, Jahr oder Pflanzenkategorie statt, so kann mit $n=15$ gerechnet werden.

Eine Miteinbeziehung der pro Probenzug aufgearbeiteten und gemittelten drei Frischpflanzenextrakte ist hierbei nicht legitim, denn sie haben keine Aussagekraft bezüglich der Variationen des getätigten Probenzugs. Stattdessen geben sie Aufschluss über die Güte der Aufarbeitungsmethode, Einwaage und HPLC-Analytik.

Für eine aussagekräftige, deskriptive Statistik werden mindestens 15 individuelle Proben benötigt ($n=15$) [178]. Dies heißt im Umkehrschluss, dass eine differenzierte Betrachtung nach Erntezeitpunkt, -jahr und Pflanzenkategorie ($n \leq 15$), wie oben aufgeführt, statistisch nicht sinnvoll ist.

Die Frage der Datenverteilung geht als Konsequenz der geringen Stichprobenzahl nicht mehr klar aus den Messwerten hervor. [178]

Wird bei kleiner Stichprobenzahl ein parametrischer Test bei eigentlichem Vorliegen eines nicht-parametrischen Datensatzes durchgeführt, so besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erster Art, auch α -Fehler genannt. Dabei werden Gruppen als unterschiedlich gewertet (Hypothese H_1), obwohl sie gleich sind. Der eingesetzte, statistische Test verliert dabei an Robustheit. Als Schutz vor α -Fehler können strikte Post-hoc-Tests angewendet werden. [178]

Wird bei zu geringer Stichprobenzahl stattdessen ein nicht-parametrischer Test verwendet,

obwohl eine parametrische Verteilung vorherrscht, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers zweiter Art, auch β -Fehler genannt. Als Folge werden Gruppen als gleich bewertet (Nullhypothese H_0), obwohl sie unterschiedlich sind. Der β -Fehler kann nur durch eine vermehrte Stichprobenzahl behoben werden. [178]

Schlussendlich müssten zur Erhöhung der Aussagekraft der erhobenen Daten, deutlich mehr Proben gezogen und analysiert werden. Die größere Anzahl der Proben, kombiniert mit einer Probenaufarbeitungen in Triplikaten zur HPLC-Analyse, mündet in einer beträchtlichen Verlängerung der ohnehin schon verhältnismäßig langen Bearbeitungsdauer (Probenaufarbeitung ca. 1 d, HPLC-Messung ca. 1 h) münden. Arbeitsaufwand und Resultat müssen daher für zukünftige Forschungen eingehend abgewogen werden.

8.2.6.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend setzt sich der Gesamtfehler der gewonnenen Resultate aus den Unsicherheiten der Probennahme, der Probenaufarbeitung, der Einwaage und der HPLC-DAD-Analytik inklusive Peakintegration zusammen, wobei die Fehlergewichtung der Reihe nach abnimmt und durch die nachfolgenden Schritte nicht korrigiert werden kann [135]. Eine hier vorgenommene Probenanzahl von $n=1$ pro Probenzug, stellt in jedem Sinne die größte Unsicherheit in diesem Prozess dar und erschwert eine verlässliche statistische Auswertung. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate für den Aucubin-, Catalpol- und Verbascosidgehalt in *P. lanceolata* sind daher als erste Grundbausteine für weitere Forschungsprojekte zu verstehen.

Das Umsteigen auf eine andere Analysemethode zur Minimierung des Integrationsfehlers könnte zwar Vorteile bringen, benötigt aber ebenfalls eine hohe Trennfähigkeit zur Analytik des Spitzwegerichrohextrakts der frischen Pflanze (Kapitel 5). In diversen Naturstoffsystemen [177, 179] sowie speziell für *P. lanceolata* [76] konnte die HPLC-MS-Analytik erfolgreich als qualitätssicherndes Verfahren angewendet werden. Um die Analysezeit (60 min) zu verkürzen, ist dabei die Verwendung eines UPLC-Systems von Vorteil.

8.2.7 Abgleich der Gehalte mit der Literatur

8.2.7.1 Allgemeine Datenlage

In der Literatur werden sehr unterschiedliche Catalpol-, Aucubin- und Verbascosidgehalte für die Blätter des Spitzwegerichs beschrieben (Tabelle 8.2).

Tabelle 8.2: Literaturwerte der Catalpol-, Aucubin- und Verbascosidgehalte in *P. lanceolata* umgerechnet auf die Einheit mg/g des Trockengewichts der Spitzwegerichblätter.

Literatur	Aucubin [mg/g]	Catalpol [mg/g]	Verbascosid [mg/g]	nähere Informationen zur Pflanze
[18]	21-48	10-20	34-71	Wachstum auf Experimentfeld in Japan, Kultivar Grasslands Lancelot aus Neuseeland
[18]	10-27	n.d.	15-41	Wachstum auf Experimentfeld in Japan, Kulivar Ceres Tonic aus Neuseeland
[19]	6	4,7	10,3	Droge (Ph. Eur. 6)
[28]	6,6 ± 0,3	3,4 ± 0,2	n.b.	Aufzucht in Garten und Gewächshaus, USA
[83]	1,1	1,0	4,7	Wildwuchs Schleswig-Holstein, Deutschland
[31]	1,15 ± 0,10	1,59 ± 0,01	n.b.	Wildwuchs, Kroatien
[85]	≤ 10	≤ 20	n.b.	unbehandelte Pflanze
[85]	≤ 10	≤ 90	n.b.	mechanische Blattkürzung
[85]	≤ 22	≤ 150	n.b.	Behandlung mit Raupe <i>Grammia incorrupta</i>
[30]	4,6	3,2	n.b.	Wildwuchs, Freiburg, Deutschland

Dabei fällt auf, dass z.T. außerordentlich hohe Gehalte an Aucubin, Catalpol und Verbascosid in der speziellen Züchtung Grasslands Lancelot sowie, mit mit etwas geringeren Werten, auch in der Züchtung Ceres Tonic, auftreten [18]. Diese wurden als Futtermittel für Weidevieh, wie Schafe und Kühe, gezüchtet und sollen möglichst hohe Gehalte an gesundheitsförderlichen Stoffen enthalten [180]. Dies erklärt auch die weitaus höheren Substanzgehalte als in herkömmlichen Vertretern. Darüber hinaus konnten noch höhere Gehalte durch mechanisches Stutzen der Blätter erzielt werden, die jedoch unter den Gehalten nach herbizidem Stress lagen [85]. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Analytgehalte wiesen ebenso beträchtliche Intervalle auf. Die kleinsten Gehaltsbereich

lassen sich bei Catalpol mit 0,02-4,38 mg/g (Libor), 0,01-4,92 mg/g (Hortus) und 0,01-2,98 mg/g (Nollen) finden. Aucubin zeigt mit 0,04-9,88 mg/g (Libor), 0,06-5,34 mg/g (Hortus) eine doppelt so hohe Gehaltsvariation. Für Verbascosid findet sich eine Variation von 0,31-13,57 mg/g (Libor), 0,26-9,94 mg/g (Hortus) und 0,43-30,15 mg/g (Nollen). Die ermittelten Gehalte der drei Analysesubstanzen stimmen mit denen in der Literatur für Exemplare ohne Insektenbefall, mechanische Blattverkürzung oder besondere Züchtungsverfahren weitgehend überein.

8.2.7.2 Postulierte Vegetationsabhängigkeit

Tamura und Nishibe [18] beobachteten anhand von Proben eines Jahres (2000), in Unterkapitel 1.2.2.1 näher ausgeführt, einen gleichbleibenden Catalpolgehalt sowie einen Einbruch des Aucubingehalts Mitte August. Verbascosid wies zwei Minima in der Gehaltskurve (Mitte August und Ende September) auf. Für Aucubin- und Verbascosidgehalt konnte im Verlauf der Blühperiode eine positive Korrelation vermerkt werden. Bei [18] In dieser Arbeit konnte nur für Nollen im Jahr 2014 eine konstante Zunahme des Verbascosidgehalts beobachtet werden, der mit dem von Tamura und Nishibe [18] in etwa übereinstimmt. Ansonsten verliefen die Gehaltsvariationen nach keinem erkennbaren oder mit Tamura und Nishibe [18] vergleichbaren Muster für Verbascosid. Gleiches gilt für Aucubin. Die Abweichung von den Literaturangaben kann auf interannuale Differenzen [78], genetische, standortfaktorische oder umweltbedingte Bedingungen beruhen. Für Catalpol konnte im Einklang mit den Angaben von Tamura und Nishibe [18] meist ein relativ gleichbleibender Gehalt in den Proben festgestellt werden. Auftretende Abweichungen können aufgrund der geringen Probenzahl nicht als zufällige Ausreißer eingestuft werden. Aufgrund der zahlreichenauf das Sekundärmuster einflussnehmenden Faktoren kann nicht eindeutig differenziert werden, ob potentielle Gehaltsverläufe tatsächlich auf das Blüt stadium zurückzuführen sind, oder ob es sich um die Auswirkung nicht-betrachteter Parameter handelt.

Alles in allem konnten die von Tamura und Nishibe [18] proklamierten Gehaltsverläufe der drei Verbindungen nicht bestätigt werden. Wegen der geringen Probenanzahl konnten sie jedoch auch nicht mit Sicherheit widerlegt werden. Definitiv konnte jedoch gezeigt werden, dass die Betrachtung von Sekundärstoffverläufen über mehrere Jahre hinweg und eine allgemeingültige intensive Erforschung der individuellen Parameter wäre in Zukunft wünschenswert, da der Spitzwegerich offensichtlich sehr anpassungsfähig gegenüber diversen Umweltfaktoren ist.

8.2.8 Ideale Erntebedingungen

Anhand der erhobenen Daten konnte (noch) kein idealer Erntezeitpunkt definiert werden. Die sich ändernden Gehalte von Catalpol, Aucubin und Verbascosid verhalten sich nicht einheitlich. Weder für den von WALA Heilmittel GmbH vorgenommenen Erntezeitpunkt kurz vor der Blüte noch für den in Hänsel et al. [3] beschriebenen während der Blütezeit (Mai - September) noch für den in der Studie von Tamura und Nishibe [18] präferierte Erntezeitpunkt im Oktober gibt eine Bestätigung (Kapitel 8.2.7.2). Die geringe Probenstückzahl ($n=1$) ermöglicht darüber hinaus keine zuverlässige Statistik (Kapitel 8.2.6.1 und 8.2.6.4). Auch nach Zusammenschluss verschiedener Gruppen, wie Erntejahr, Erntemonat oder Pflanzenkategorie (Resultate nicht gezeigt), reichen die genommenen Proben nicht für eine aussagekräftige Statistik aus (Kapitel 8.2.6.4). Überdies ist der Zusammenschluss der Einzelresultate zu übergeordneten Gruppen fragwürdig. Individuelle, extraordinäre Messspitzen können dabei weniger gut herausgelesen werden und verfälschen stattdessen das Gesamtergebnis durch ein übermäßig hohes Fehlerintervall. Aufgrund der mannigfaltigen Einflüsse auf den Substanzgehalt gestaltet sich die Korrelation von Substanzmengen- oder -abnahmen mit einem konkreten Faktor generell als äußerst schwierig [33, 159]. Speziell eine Unterscheidung zwischen genetischer und ontogenetischer Ursache ist äußerst kompliziert [181]. Weiter können Verfälschungen angenommener, ontogenetisch begründeter Zusammenhänge durch spezifische und unspezifische Fraßfeinde erzeugt werden [87], wodurch sich, neben abiotischen Faktoren wie Wetter und Bodenbeschaffenheit, die Substanzgehalte ändern. Für weitere Faktoren sei auf Kapitel 1.2 bzw. die Unterkapitel 1.2.1 und 1.2.2 verwiesen.

Durch die Fokussierung auf drei Verbindungen wird der Blick auf das variierende Gesamtspektrum der Inhalte limitiert. Mögliche signifikante Veränderungen (unbekannter) Nebenverbindungen werden nicht erfasst. Von Vorteil wäre eine ganzheitlichere Betrachtung aller in *P. lanceolata* enthaltenen IGs und PEs. In diesem Kontext konnten Diskrepanzen bei der Einstufung des Einflusses von Herbivoren und Phytohormonen auf das IG-Spektrum in *P. lanceolata* durch ganzheitliche und auf Leitverbindungen fixierte mittels der LC-TOF-MS herausgearbeitet werden [76]. Die hier erhobenen Daten sind somit als erste Vorexperimente mit tendenzieller Aussagekraft zu verstehen und sollten in weiterführenden Experimenten intensiv und statistisch fundiert weiter erforscht werden. Mögliche Ansätze wären z.B. das Wachstum in Gewächshäusern, wodurch sich bestimmte externe Parameter wie Bodenbeschaffenheit und umgebende, kommunikationsverfügbare Pflanzen einheitlich festlegen ließen. Weiter würden sich eine regelmäßige und fachgerechte Bestimmung relevanter externer Faktoren, wie Bodenbeschaffenheitskriterien, Lichteinstrahlungsart und Dauer, Niederschlag/Gießwasser etc., als förderlich für die Differenzierung ontogenetischer von anderweitigen Ursachen erweisen. Besondere Beachtung sollte auch die Interaktion der Pflanze mit Insekten und anderen Pflanzenschädlingen finden, da diese den Gehalt an relevanten Inhaltsstoffen maßgeblich hochregulieren können, wie mehrfach in der Literatur beschrieben [28, 80, 82, 84, 85, 87, 182].

8.2.9 Wild- vs. Kulturpflanze

Keine nennenswerten Unterschiede wiesen die Gehalte der IGs Catalpol und Aucubin in der Wild- (Nollen) *versus* den Kulturpflanzen (Libor und Hortus) auf. Dahingegen zeigte sich für Verbascosid im Schnitt ein deutlich höherer Gehalt im Wildwuchs als bei Libor und Hortus. Ein höherer Gehalt pharmakologisch aktiver Inhaltsstoffe gilt als Kennzeichen für bessere Erntebedingungen. Die früher vorgenommenen, heute den speziell angelegten Erntefeldern gewichenen, Wildsammlungen, welche für die Verwendung von pharmazeutischen Spitzwegerichzubereitungen hergenommen wurden, sind den Pflanzen aus Kulturanbau daher überlegen. Dies muss allerdings mit einer größeren Probenstückzahl in nachfolgenden Untersuchungen noch verifiziert werden. Ein Umsteigen auf die pharmazeutisch hochwertigere Wildpflanze birgt dennoch Risiken, wie unkontrolliertere Umgebungsbedingungen, geringeres Verhältnis von Blattzahl und -menge pro Pflanze und vor allem keine sicher Abgrenzung der Blätter zu ähnlichen Morphologien wie z.B. zu *P. media* oder zu *Digitalis lanatae folium* [3, 49] und führt schlussendlich zu einer verschlechterten Zeit-Kosten-Bilanz.

8.2.10 Morphologische Unterschiede

Die Ermittlung morphologischer Variationen war zwar nicht Thema dieser Arbeit, wurde aber am Rande mitberücksichtigt, um die Variabilität des Sekundärmusters der Pflanze ganzheitlicher zu verstehen. Dazu wurden Blatt, Blütenschaft und Blütenkopf von Libor, Hortus und Nollen in drei aufeinanderfolgenden Jahren stichprobenhaft vermessen, wobei erhebliche Variationen bezüglich Pflanzenkategorie, Jahr und Saison für alle drei Pflanzengewebe festgestellt werden konnten. Trotz der nur exemplarisch durchgeführten Maßbestimmungen, sollen die Resultate hier vorgestellt werden, um zu verdeutlichen, dass die starke Variabilität von *P. lanceolata* auch die Morphologie betrifft (Abbildung 8.6). Unabhängig von Jahr, Erntemonat oder Pflanzenkategorie sind die Blüten in der Regel länger als die Blätter, wie auch in der Literatur beschrieben [3]. Bei dem Wildwuchs (Nollen) treten stets kürzere Pflanzenorgane auf als bei den kultivierten Habitanten - mit Ausnahme der Messung im Juli 2015. Die gewonnenen Werte von Nollen stimmen mit denen aus der Literatur für Blütenschaft (≤ 50 cm [3]) und Blattlänge (≤ 25 cm [3]) überein, wohingegen die kultivierten Habitanten (Libor und Hortus) weitaus höhere Wuchshöhen erreichten. Auffällig war überdies die eher längliche Form des Blütenkopfes bei hohem Wuchs, wohingegen kleinere Pflanzen eine stärkere Walzenform aufwiesen. Am Beispiel der Gegenüberstellung der Kulturpflanze Libor mit der Wildform von der Wiese des Erntetags 04.08.2014 sollen die Größenunterschiede veranschaulicht werden (Abbildung 8.7).

Eine absolut maximale Blattlänge von bis zu 70 cm konnte für Libor im August 2014 vermerkt werden. Diese überdimensionale Wuchshöhe und generelle üppige Erscheinung wird auch als Mastigkeit bezeichnet und ist typisch für Kulturpflanzen mit ausreichend Nahrung und wenig Konkurrenz. Sie trat in besonders hohem Ausmaß bei Libor 2014 und Hortus 2016 auf. Im Zusammenhang damit konnte beim direkten Vergleich der

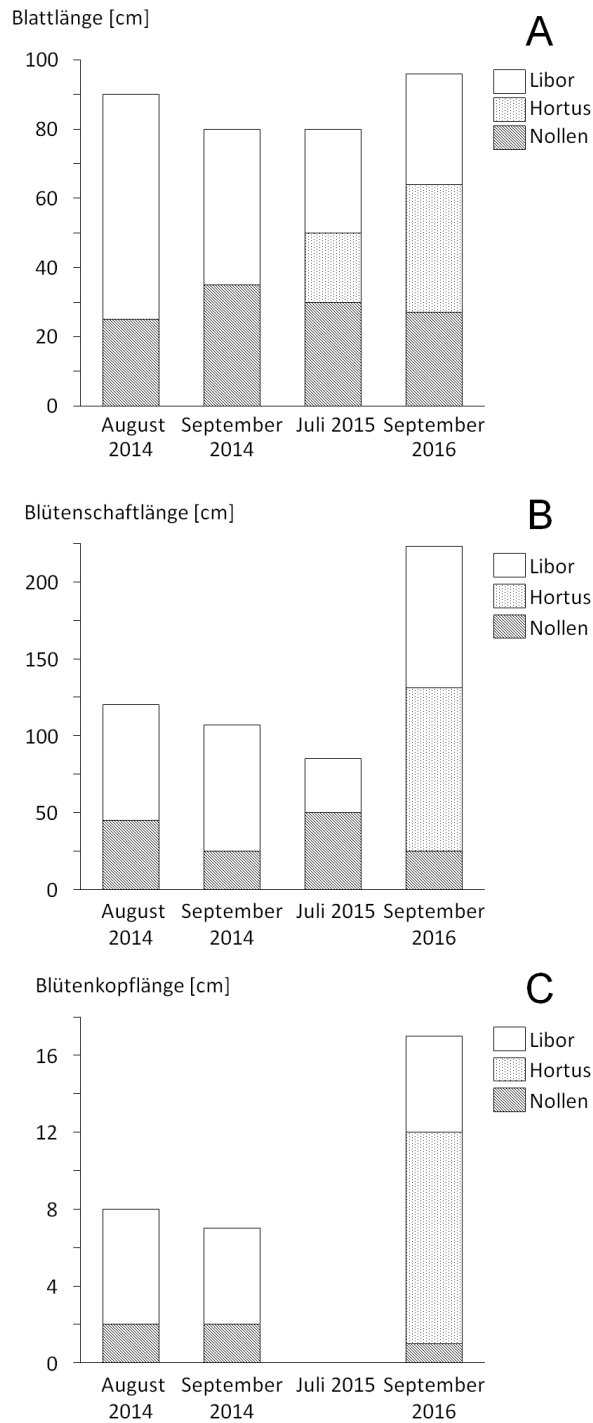


Abbildung 8.6: Übersicht der Höhen bzw. Längen einzelner Pflanzenorgane der drei Pflanzenkategorien Libor, Hortus und Nollen, erhalten aus vier Stichprobenmessungen zu beliebigen Erntezeitpunkte der drei aufeinanderfolgenden Jahre 2014, 2015 und 2016. Im Jahr 2014 wurde die Kategorie Hortus nicht angepflanzt und ist deshalb nicht im Diagramm abgebildet. Im Juli 2015 wurden die Blütenkopfgrößen für Libor, Hortus und Nollen nicht bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren für Hortus *per se* weder Blütenköpfe noch Blütensäfte ausgebildet und konnten daher nicht vermessen werden.



Abbildung 8.7: Größenunterschied zwischen Kultur- und Wildwuchs am Erntetag 04.08.2014, fotografiert nach der Ernte als ganze Pflanze (A) und nach der Trennung in einzelne Pflanzenteile (B), wobei sich jeweils links Libor und rechts Nollen befindet.

beiden kultivierten Typen Libor und Hortus eine nennenswerte Zunahme der Blattlänge von Hortus im Jahr 2016 in Vergleich mit dem Vorjahr beobachtet werden, während die von Libor in etwa gleich blieb. Auch Blütenstängel- und -kopflänge von Hortus zeigten Maximalwerte im Jahr 2016 im Gegensatz zu den anderen beiden Pflanzenkategorien, vor allem verglichen mit Nollen, für welche die kürzesten Längen im Jahr ermittelt wurden. Der Unterschied war so immens, dass zusätzlich eine botanische Kontrolle der Blätter vorgenommen wurde: die Blätter von Hortus sind rundum sehr stark behaart, wohingegen Libor über eine schwach ausgeprägte Blattbehaarung verfügt. Die üblicherweise verlässlichen Differenzierungsmerkmale (der ursprünglich stets geringeren Wuchshöhe sowie das Auftreten von mehr Blättern und fast keinen Blüten von Hortus im Vergleich zu Libor) griffen dabei nicht. Verantwortlich für die starke Wachstumszunahme von Hortus, jedoch nicht der anderen beiden Pflanzenkategorien, könnte z.B. eine stärkere Sonnenexposition sein, welche aus einer weniger baumnahen/schattigen Lage im Garten, welcher aufgrund ökodynamischer Gartenführung jedes Jahr wechselt, resultierte. Als potentieller Auslöser kommen auch genetische Variationen des Saatguts in Frage [183]. Eine absolut maximale Blattlänge von bis zu 70 cm konnte für Libor im August 2014 vermerkt werden. Diese überdimensionale Wuchshöhe und generelle üppige Erscheinung wird auch als Mastigkeit bezeichnet und ist typisch für Kulturpflanzen mit ausreichend Nahrung und wenig Konkurrenz. Sie trat in besonders hohem Ausmaß bei Libor 2014 und Hortus 2016 auf. Im Zusammenhang damit konnte beim direkten Vergleich der beiden kultivierten Pflanzenkategorien Libor und Hortus eine nennenswerte Zunahme der Blattlänge von Hortus im Jahr 2016 in Vergleich mit dem Vorjahr beobachtet werden, während

die von Libor in etwa gleich blieb. Auch Blütenschaft- und -kopflänge von Hortus zeigten Maximalwerte im Jahr 2016 im Gegensatz zu den anderen beiden Pflanzenkategorien, vor allem verglichen mit Nollen, für welchen die niedrigsten ängen im Jahr ermittelt wurden. Der Unterschied war so immens, dass zusätzlich eine botanische Kontrolle der Blätter vorgenommen wurde: die Blätter von Hortus weisen rundum eine sehr starke Blattbehaarung auf, wohingegen Libor über eine geringer ausgeprägte Blattbehaarung verfügt. Die üblicherweise verlässlichen Differenzierungsmerkmale (der ursprünglich stets geringeren Wuchshöhe sowie das Auftreten von mehr Blättern und fast keinen Blüten von Hortus im Vergleich zu Libor) griffen dabei nicht. Verantwortlich für die starke Wachstumszunahme von Hortus, jedoch nicht der anderen beiden Pflanzenkategorien kann kein allgemeiner, alle betreffender Parameter, wie Niederschlag und Lufttemperatur, als Ursache sein. Denkbar wäre stattdessen z.B. eine bessere Sonnenexposition als Ursache, welche aus einer weniger baumnahen/schattigen Lage im Garten, welcher aufgrund ökodynamischer Gartenführung jedes Jahr wechselt, resultierte. Als potentieller Auslöser kommen auch genetische Variationen des Saatguts in Frage [183].

Generell konnte kein eindeutiges System in den Morphologievariationen der untersuchten Pflanzenkategorien erkannt werden, was sicherlich hauptsächlich auch an den spärlichen Messergebnissen liegt. Eine verlässliche Korrelation von Morphologie und Inhaltsstoffspektrum konnte daher hier nicht vorgenommen werden und wird für nachfolgende Studien als ergänzende Thematik erachtet. Eine möglicherweise positive Korrelation zwischen dem auffällig starken Wachstum und den Aucubin- sowie in geringerem Ausmaß auch den Catalpolgehalten konnte im Jahr 2016 für Hortus beobachtet werden.

8.2.11 Zusammenfassung

Mithilfe der neu entwickelten und validierten Methode konnten die gezogenen FP-Proben von *P. lanceolata* erfolgreich analysiert werden. Die Gehalte an Aucubin, Catalpol und Verbascosid variierten stark hinsichtlich des Erntejahres, Erntemonats und Pflanzenkategorie. Aus einer Tendenz war durch die Betrachtung verschiedener Jahre und Pflanzenkategorien ersichtlich. Dies wird auch als Kritikpunkt der Studie von Tamura und Nishibe [18] gesehen, welche Oktober als idealen Erntezeitpunkt empfiehlt. Diese Empfehlung kann weder bestätigt noch eindeutig widerlegt werden. Des Weiteren ist eine bessere Eignung der Wildpflanze im Vergleich zur Kulturpflanze für die Verwendung in pharmazeutischen Produkten zu diskutieren, da in der Wildsammlung deutlich mehr Verbascosid gefunden werden konnte. Darüber hinaus wurde erstmalig eine signifikante, positive Korrelation zwischen Aucubin- und Catalpolgehalt unter den gegebenen Bedingungen festgestellt. Weiterführende Untersuchungen bezüglich eines optimalen Erntezeitpunkts sind mit einer höheren, statistisch besser verwertbaren Probenzahl zu empfehlen. Die Beprobung über mehrere Jahre wird als äußerst sinnvoll erachtet. Außerdem sollte zur besseren Einzelbetrachtung von vegetativen Effekten auf das Sekundärstoffspektrum auf möglichst identische Umgebungsparameter geachtet werden.

8.3 Material und Methoden

8.3.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Software und Geräte

Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software sind den Kapiteln 10.1, 10.6 und 10.8 zu entnehmen.

8.3.2 Verwendetes FP-Material und Aufbereitung der FP-Proben

Zur Untersuchung des IG- und PE-Inhaltsstoffspektrums von *P. lanceolata* kamen die in Kapitel 10.4.1 aufgelisteten Frischpflanzen zum Einsatz, deren Ernte und Aufbewahrung bis zur Analyse in Kapitel 10.4.4 erläutert wird. Die Aufbereitung der FP-Proben fand gemäß der Beschreibung in Kapitel 10.4.5 statt. Zur Gehaltsbestimmung der FP-Proben wurde zusätzlich der Wassergehalt im eingesetzten FP-Material am Tag der Aufarbeitung bestimmt (Kapitel 7.5.12).

8.3.3 Verwendete Wetterdaten

Die verwendeten Wetterdaten wurden von der Firma WALA Heilmittel GmbH direkt vor Ort erhoben und zur Verfügung gestellt, wobei zur Korrelationskalkulation die Mittelwerte aus der minimalen und maximalen Tagestemperatur gebildet und eingesetzt wurden (Tabelle 8.3).

8.3.4 Abschätzung des Fehlers der Probennahme

In Anlehnung an das Fehlerquadratgesetz lässt sich aus der Summe der quadrierten Einzelfehler der Gesamtfehler berechnen [135]. Dazu wurden die relativen Variationen der Methoden- und Messpräzision des Extrakts verwendet (Tabelle 8.4).

Der hierbei resultierende Fehler der Probenaufarbeitung (Δ) bezieht streng genommen auch andere Fehlerquellen ein, wie z.B. Fehler der Einwaage oder der Wassergehaltsbestimmung. Es handelt sich folglich nur um eine Abschätzung der Größenordnung des Probenaufarbeitungsfehlers bzw. eines Maximalfehlers, von dem die quadrierten Einzelfehler von Einwaage und Wassergehalt noch abgezogen werden müssen. Die Resultate werden in Kapitel 8.2.6.1 diskutiert.

8.3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Statistiksoftware SPSS gemäß dem Leitfaden von Pallant [184]. Die jeweils eingesetzten Tests sind im entsprechenden Kapitel bzw. der entsprechenden Abbildung angegeben.

Tabelle 8.3: Wetterdaten am Ernteort. Angabe der Lufttemperatur T_{minimal} und T_{maximal} in °C und des Niederschlags des Erntetags ($N_{\text{dsErntetag}}$), der gesamten vorhergehenden Woche (N_{dsWoche}) und des gesamten vorhergehenden Monats (N_{dsMonat}) als Summe in mm/m^2 für die jeweiligen Erntezeitpunkte der Jahre 2014 - 2016.

Erntetag	T_{minimal} [°C]	T_{minimal} [°C]	$N_{\text{dsErntetag}}$ [mm/m ²]	N_{dsWoche} [mm/m ²]	N_{dsMonat} [mm/m ²]
02.06.2014	8	22	2	30	77
12.06.2014	15	24	0	1	53
02.07.2014	12	21	0	16	39
04.08.2014	12	25	19	64	264
01.09.2014	10	14	0	92	179
02.10.2014	9	18	0	1	96
15.06.2015	17	20	7	16	76
30.06.2015	15	29	0	13	105
02.07.2015	20	34	0	3	105
04.08.2015	19	29	3	4	61
07.09.2015	8	15	0	23	63
01.10.2015	4	17	0	0	50
28.06.2016	15	25	2	57	223
05.07.2016	14	25	0	5	149
01.08.2016	14	23	19	16	68
31.08.2016	15	28	0	3	45
30.09.2016	4	23	0	0	42

8.3.6 HPLC-DAD-Analytik und Auswertung

Mithilfe der hier entwickelten und validierten HPLC-DAD-Fingerprintmethode (Kapitel 6.3.4 und Kapitel 7) wurden die aufgearbeiteten Proben (Kapitel 8.3.2) vermessen. Das ursprünglich angewendete Injektionsvolumen von 10 μL wurde bei Über- oder Unterschreiten des Arbeitsbereichs entsprechend angepasst (1 - 99 μL). Die Integration der relevanten Peaks wurde durchweg manuell vorgenommen. So konnte die entsprechende Integrationsart individuell nach der Kategorisierung (Tabelle 8.1 in Kapitel 8.2.6.3) gewählt und durchgeführt werden.

Tabelle 8.4: Abschätzung des Fehlers Δ der angewendeten Probenaufarbeitungsmethode in Anlehnung an das Fehlerquadratgesetz [135] unter Angabe der Fehler als relative Standardabweichung (STABW [%]) der im Extrakt bestimmten Methoden- und Messpräzision (n=6).

Substanz	Catalpol	Aucubin	Verbascosid
Methodenpräzision	12,79	9,10	14,08
Methodenpräzision ²	163,5841	82,81	198,2464
Messpräzision (<i>intraday</i>)	1,61	2,54	1,90
Messpräzision (<i>intraday</i>) ²	2,5921	6,4516	3,61
Δ^2	160,992	76,3584	194,6546
Δ	12,69	8,74	13,95

8.3.7 Berechnung der Analytgehalte

Der Gehalt der jeweiligen Analyten in der Frischpflanze wurde als Analytmenge pro FP-Menge [mg/g] angegeben.

Dazu wurde zunächst zur Ermittlung der Aufarbeitungspräzision die erhaltene Peakfläche (y [AUC]) auf ein Injektionsvolumen von 10 μL , eine Einwaage von 7,0 g sowie einen TS-Gehalt von 100% genormt. Die genormte Peakfläche wird im Weiteren mit y_N bezeichnet und anhand folgender Formel berechnet.

Gleichung 44: Formel zur Berechnung von y_N [AUC] im FP-Material, wobei V: Injektionsvolumen [μL], EW: Einwaage der FP [g], TS: Trockensubstanzgehalt als Differenz des Wassergehalts von 100% [%].

$$y_N = y \cdot \frac{10 \cdot 7 \cdot 100}{V \cdot TS \cdot EW} \quad (8.1)$$

Die entsprechende Kalibrierfunktionsgleichung lieferte aus y_N den dazugehörigen x -Wert. Dieser wurde mit dem Verdünnungsvolumen (25 mL) multipliziert und durch die genormte Einwaagemenge (7,0 g) dividiert, um den Gehalt an Analysesubstanz in mg/g zu erhalten, wie in folgender Gleichung beschrieben.

Gleichung 45: Formel zur Berechnung von y_N [AUC] im FP-Material, wobei V: Injektionsvolumen [μL], EW: Einwaage der FP [g], TS: Trockensubstanzgehalt als Differenz des Wassergehalts von 100% [%].

$$G [\text{mg/g}] = x \cdot \frac{25}{7} \quad (8.2)$$

8.3.8 Erhobene Messwerte und Daten

8.3.8.1 Catalpol

Tabelle 8.5: Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Catalpol für das Jahr 2014.

Erntezeitpunkt	Erntedatum	Pflanzenkategorie	Aufarbeitung	n	EW [g]	Wassergehalt [%]	Injektion [μ L]	y [AUC]	Kat.	y_N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
vor Blüte	02.06.14	libor	06.09.17	1	7,03	87,08	2	851.721	3	32.820.679	35.200.561	3.365.661	9,56	0,84	2,99
				2	7,00	87,08	2	238.064		9.213.003					
				3	7,68	87,08	2	1.065.412	3	37.580.443					
Juli	02.07.14	libor	06.11.17	1	7,04	89,66	80	201.678	2	242.423	334.210	158.074	47,30	0,01	0,03
				2	7,07	89,66	80	203.412	2	243.470					
				3	7,03	89,66	80	429.277	2	516.737					
August	04.08.14	libor	04.09.17	1	7,65	83,91	80	2.300.452	4	1.635.324	1.510.990	108.475	7,18	0,04	0,13
				2	7,13	83,91	80	1.882.325	2	1.435.678					
				3	7,17	83,91	80	1.927.549	2	1.461.969					
		nollen	15.11.17	1	6,82	86,44	80	1.702.060	3	1.610.419	1.588.144	42.159	2,65	0,04	0,14
				2	7,00	86,44	80	1.670.071	3	1.539.520					
				3	6,99	86,44	80	1.748.899	3	1.614.492					
September	01.09.14	libor	07.09.17	1	6,80	85,56	1	802.553	3	57.213.123	51.592.175	5.001.583	9,69	1,23	4,38
				2	7,15	85,56	1	736.445	3	49.930.409					

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [μ L]	y [AUC]	Kat.	y_N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
				3	6,96	85,56	1	683.890	3	47.632.992					
		nollen	09.11.17	1	6,50	88,06	10	3.874.322	3	34.944.278	35.056.041	1.013.332	2,89	0,83	2,98
				2	7,00	88,06	10	4.071.925	3	34.103.224					
				3	7,33	88,06	3	1.354.836	3	36.120.621					
Oktober	06.10.14	libor	24.10.17	1	6,88	74,75	80	272.850	4	137.430	137.482	773	0,56	0,00	0,02
				2	7,00	74,75	80	276.206	4	136.736					
				3	6,90	74,75	80	275.333	4	138.279					
		nollen	04.10.17	1	6,94	87,11	80	154.644	4	151.262	83.135	59.234	71,25	0,00	0,01
				2	7,32	87,11	80	47.230	4	43.799					
				3	7,42	87,11	80	59.404	4	54.346					

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Tabelle 8.6: Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Catalpol für das Jahr 2015.

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [μ L]	y [AUC]	Kat.	y_N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
vor Blüte	15.06.15	hortus	30.08.17	1	8,16	90,67	80	137.742	4	158.308	194.419	50.138	25,79	0,01	0,02
				2	7,10	90,67	80	131.188	4	173.285					
				3	7,40	90,67	80	198.576	4	251.664					

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]		
Juli	02.07.15	libor	14.09.17	1	7,63	90,80	80	342.958	4	427.500	451.509	124.280	27,53	0,01	0,04		
				2	7,34	90,80	80	263.154	4	340.984							
				3	7,40	90,80	80	455.974	4	586.042							
		hortus	31.08.17	1	7,30	88,12	80	59.223	4	59.753	4	59.753	62.737	4.220	6,73	0,00	0,01
				2	7,15	88,12	80	63.800	4	65.721							
				3	7,13	88,12	80										
		nollen	26.10.17	1	6,61	78,08	80	1.825.142	2	1.102.206	2	1.102.206	1.238.254	154.305	12,46	0,03	0,11
				2	6,90	78,08	80	2.085.733	2	1.206.638							
				3	6,75	78,08	80	2.377.368	2	1.405.918							
August	04.08.15	libor	23.10.17	1	6,93	71,65	80	1.147.978	4	511.276	519.320	11.270	2,17	0,01	0,05		
				2	6,80	71,65	80	1.172.546	4	532.201							
				3	7,07	71,65	80	1.178.514	4	514.482							
		hortus	18.09.17	1	7,61	84,17	80	1.106.572	2+4	803.752	2+4	803.752	752.114	52.688	7,01	0,02	0,07
				2	6,97	84,17	80	950.968	2+4	754.154							
				3	7,16	84,17	80	904.715	2+4	698.435							
		nollen	28.09.17	1	6,98	84,33	99	474.864	4	306.978	4	306.978	374.131	74.992	20,04	0,01	0,04
				2	6,95	84,33	99	700.897	4	455.054							
				3	6,99	84,33	99	558.239	4	360.360							
September	07.09.15	libor	05.09.17	1	6,90	81,88	80	606.672	3	424.575	459.133	111.166	24,21	0,01	0,04		
				2	7,34	81,88	80	561.416	3	369.350							

^a entfällt^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
				3	7,66	81,88	80	925.551	3	583.474					
		hortus	19.09.17	1	7,04	80,65	80	892.572	4	573.321	602.732	25.498	4,23	0,02	0,05
				2	7,00	80,65	80	957.609	2+4	618.610					
				3	7,80	80,65	80	1.063.004	4	616.265					
		nollen	30.10.17	1	6,09	74,31	80	1.004.957	4	562.049	528.854	60.577	11,45	0,01	0,05
				2	6,53	74,31	80	1.084.332	4	565.579					
				3	6,11	74,31	80	823.283	4	458.936					
Oktober	01.10.15	libor	27.09.17	1	6,98	85,74	40	594.277	2+4	1.044.845	947.944	302.134	31,87	0,02	0,08
				2	7,09	85,74	40	687.352	2+4	1.189.738					
				3	6,92	85,74	40	343.543	2+4	609.247					
		hortus	01.11.17	1	6,88	77,00	80	431.194	2	238.432	243.665	37.252	15,29	0,01	0,02
				2	7,15	77,00	80	532.361	2	283.257					
				3	6,91	77,00	80	380.172	2	209.306					
		nollen	20.09.17	1	7,00	85,50	40	589.926	2+4	1.017.114	1.006.859	170.331	16,92	0,02	0,09
				2	6,98	85,50	40	677.720	2+4	1.171.831					
				3	7,54	85,50	40	519.556	2+4	831.632					

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Tabelle 8.7: Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Catalpol für das Jahr 2016.

Erntezeitpunkt	Erntedatum	Pflanzenkategorie	Aufarbeitung	n	EW [g]	Wassergehalt [%]	Injektion [μ L]	y [AUC]	Kat.	y_N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
vor Blüte	28.06.16	hortus	20.11.17	1	7,17	87,39	2	1.569.376	3	60.752.032	58.041.636	3.833.078	6,60	1,38	4,92
				2	6,95	87,39	2	1.455.599	3	58.131.282					
				3	7,20	87,39	2	1.435.324	3	55.331.241					
Juli	05.07.16	libor	18.10.17	1	7,36	83,41	80	424.986	4	304.550	235.756	60.642	25,72	0,01	0,02
				2	6,93	83,41	80	279.440	4	212.675					
				3	6,87	83,41	80	247.541	4	190.043					
		hortus	09.10.17	1	6,93	88,76	80	246.513	1	276.916	225.117	52.064	23,13	0,01	0,02
				2	6,98	88,76	80	202.319	1	225.644					
				3	7,11	88,76	80	157.816	1	172.792					
		nollen	28.08.17	1	7,14	66,94	10	1.893.542	4	5.615.287	5.515.302	683.395	12,39	0,13	0,47
				2	6,60	66,94	10	1.914.887	3+4	6.143.196					
				3	6,03	66,94	10	1.363.402	3+4	4.787.423					
August	01.08.16	libor	28.03.17	1	7,01	94,07	80	262.523	4+5	552.590	555.334	43.957	7,92	0,01	
				2	7,01	94,07	80	243.626	4	512.813					
				3	7,00	94,07	80	284.924	2+4	600.599					
		hortus	17.01.17	1	7,02	76,26	10	212.090	1	890.841	1.061.994	148.683	14,00	0,03	0,09
				2	7,03	76,26	10	276.387	2+4	1.159.257					
		nollen	24.01.17	3	7,00	76,26	10	269.659	2+4	1.135.885					
				05.10.17	1	7,03	85,67	50	671.048	3	932.567	826.488	97.908	11,85	0,02

^a entfällt^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]			
				2	6,92	85,67	50	523.861	3	739.591								
				3	6,86	85,67	50	566.865	3	807.304								
September	31.08.16	libor	21.03.17	1	7,00	93,81	80	414.224	2+4	836.478	437.966	345.159	78,81	0,01	0,04			
				2	7,00	93,81	80	115.691	2+4	233.625								
				3	7,01	93,81	80	120.900	4	243.796								
		hortus	29.08.17	1	6,65	85,23	80	262.867	1	234.176	1	234.176	304.489	104.823	34,43	0,01	0,03	
				2	5,92	85,23	80	253.704	3	253.883								
				2	7,04	85,23	80	320.489	4	269.692								
		nollen	14.03.17	21.02.17	3	7,00	85,23	80	543.780	4	460.206	4	460.206	109.026	21.416	19,64	0,00	0,01
					1	6,98	91,67	99	92.460	4	112.439							
					2	6,99	91,67	99	105.844	4	128.531							
				3	6,99	91,67	99	70.910	4	86.109								
Oktober	30.09.16	libor	07.03.17	1	7,01	84,06	30	724.928	4+5	1.513.789	1.088.949	416.104	38,21	0,03	0,10			
				2	7,01	84,06	30	326.679	2+5	682.169								
				3	7,00	84,06	30	512.100	2+5	1.070.891								
		hortus	01.03.17	1	7,00	84,24	40	631.900	2	1.002.379	2	1.002.379	1.054.851	66.370	6,29	0,03	0,09	
				2	7,01	84,24	40	713.029	2	1.129.460								
				3	6,99	84,24	40	650.092	2	1.032.713								
		nollen	27.02.17	1	7,00	82,00	10	2.213.937	2+4	12.299.650	2+4	12.299.650	12.694.014	964.969	7,60	0,30	1,08	
				2	7,00	82,00	10	2.482.867	2+4	13.793.706								
				3	6,99	82,00	10	2.154.881	2+4	11.988.688								

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

8.3.8.2 Aucubin

Tabelle 8.8: Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Aucubin für das Jahr 2014.

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]	
vor Blüte	02.06.14	libor	06.09.17	1	7,03	87,08	2	2.315.780	1	89.237.523	95.597.942	8.994.991	9,41	1,39	4,95	
				2	7,00	87,08	2	756.869		29.290.596						
				3	7,68	87,08	2	2.890.537	1	101.958.361						
Juli	02.07.14	libor	06.11.17	1	7,04	89,66	80	1.841.561	4	2.213.609	2.550.856	327.863	12,85	0,04	0,14	
				2	7,07	89,66	80	2.396.510	4+5	2.868.450						
				3	7,03	89,66	80	2.135.438	4	2.570.509						
August	04.08.14	libor	04.09.17	1	7,65	83,91	10	1.216.391	3	6.917.573	7.119.724	179.389	2,52	0,10	0,37	
				2	7,13	83,91	10	1.176.990	3	7.181.667						
				3	7,17	83,91	10	1.196.492	4	7.259.933						
		nollen	15.11.17	1	6,82	86,44	80	3.128.960	2	2.960.493	3.181.078	231.627	7,28	0,05	0,17	
				2	7,00	86,44	80	3.428.383	2	3.160.383						
				3	6,99	86,44	80	3.707.270	2	3.422.358						
September	01.09.14	libor	07.09.17	1	6,80	85,56	1	3.128.680	3	223.040.166	190.730.100	28.636.162	15,01	2,77	9,88	
				2	7,15	85,56	1	2.664.690	3	180.663.948						
				3	6,96	85,56	1	2.419.038	1	168.486.185						
		nollen	09.11.17	1	6,50	88,06	3	2.340.156	1	70.356.449	74.134.255	5.554.513	7,49	1,08	3,84	

^a entfällt^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
				2	7,00	88,06	3	2.562.363	1	71.534.422					
				3	7,33	88,06	3	3.019.893	1	80.511.893					
Oktober	06.10.14	libor	24.10.17	1	6,88	74,75	80	1.656.195	2+4	834.199	1.067.181	204.754	19,19	0,02	0,06
				2	7,00	74,75	80	2.461.394	2+4	1.218.512					
				3	6,90	74,75	80	2.287.486	2+4	1.148.831					
		nollen	04.10.17	1	6,94	87,11	80	1.169.637	2+4	1.144.055	1.139.583	36.805	3,23	0,02	0,06
				2	7,32	87,11	80	1.186.980	2+4	1.100.747					
				3	7,42	87,11	80	1.283.209	2+4	1.173.947					

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Tabelle 8.9: Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Aucubin für das Jahr 2015.

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
vor Blüte	15.06.15	hortus	30.08.17	1	8,16	90,67	99	1.441.186	4	1.338.478	1.256.386	116.095	9,24	0,02	0,07
				2	7,10	90,67	99	1.100.156	4	1.174.295					
				3	7,40	90,67	99	1.068.028	4						
Juli	02.07.15	libor	14.09.17	1	7,63	90,80	80	2.613.900	2+4	3.258.252	3.109.948	600.661	19,31	0,05	0,16

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
				2	7,34	90,80	80	1.890.033	2+4	2.449.027					
				3	7,40	90,80	80	2.818.562	2+4	3.622.564					
		hortus	31.08.17	1	7,30	88,12	80	1.264.219	4+5	1.275.531	1.280.081	6.434	0,50	0,02	0,07
				2	7,15	88,12	80	1.247.075	4+5	1.284.630					
				3	7,13	88,12	80								
		nollen	26.10.17	1	6,61	78,08	40	2.277.008	2	2.750.177	3.012.172	270.616	8,98	0,04	0,16
				2	6,90	78,08	40	2.589.093	2	2.995.684					
				3	6,75	78,08	40	2.782.201	2	3.290.654					
August	04.08.15	libor	23.10.17	1	6,93	71,65	80	3.372.649	4	1.502.079	1.583.656	129.103	8,15	0,02	0,09
				2	6,80	71,65	80	3.340.905	4	1.516.388					
				3	7,07	71,65	80	3.968.608	3+4	1.732.502					
		hortus	18.09.17	1	7,61	84,17	80	1.643.296	2+4	1.193.599	1.228.361	62.423	5,08	0,02	0,07
				2	6,97	84,17	80	1.639.802	2+4	1.300.426					
				3	7,16	84,17	80	1.542.834	2+4	1.191.059					
		nollen	28.09.17	1	6,98	84,33	99	1.009.521	4	652.610	673.993	27.696	4,11	0,01	0,04
				2	6,95	84,33	99	1.086.306	4	705.279					
				3	6,99	84,33	99	1.028.748	4	664.088					
September	07.09.15	libor	05.09.17	1	6,90	81,88	80	2.862.258	2+4	2.003.132	2.183.780	352.244	16,13	0,03	0,12
				2	7,34	81,88	80	2.976.950	2+4	1.958.508					
				3	7,66	81,88	80	4.107.979	2+4	2.589.699					
		hortus	19.09.17	1	7,04	80,65	80	2.393.861	4	1.537.635	1.623.774	120.572	7,43	0,02	0,09

^a entfällt^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
				2	7,00	80,65	80	2.433.642	2+4	1.572.120					
				3	7,80	80,65	80	3.038.553	2+4	1.761.568					
		nollen	30.10.17	1	6,09	74,31	80	1.886.884	2	1.055.290	1.057.340	42.240	3,99	0,02	0,06
				2	6,53	74,31	80	2.110.017	2	1.100.568					
				3	6,11	74,31	80	1.822.890	2	1.016.163					
Oktober	01.10.15	libor	27.09.17	1	6,98	85,74	40	2.327.897	2+4	4.092.860	3.899.482	512.197	13,13	0,06	0,21
				2	7,09	85,74	40	2.476.651	2+4	4.286.838					
				3	6,92	85,74	40	1.871.380	2+4	3.318.749					
		hortus	01.11.17	1	6,88	77,00	80	1.999.759	4	1.105.782	1.209.055	89.444	7,40	0,02	0,07
				2	7,15	77,00	80	2.367.252	4	1.259.559					
				3	6,91	77,00	80	2.291.904	4	1.261.823					
		nollen	20.09.17	1	7,00	85,50	40	1.638.961	2+4	2.825.795	3.027.041	856.540	28,30	0,04	0,16
				2	6,98	85,50	40	2.293.873	2+4	3.966.286					
				3	7,54	85,50	40	1.430.063	2+4	2.289.043					

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Tabelle 8.10: Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Aucubin für das Jahr 2016.

Erntezeitpunkt	Erntedatum	Pflanzenkategorie	Aufarbereitung	n	EW [g]	Wassergehalt [%]	Injektion [μ L]	y [AUC]	Kat.	y_N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
vor Blüte	28.06.16	hortus	20.11.17	1	7,17	87,39	2	2.770.138	3	107.234.667	102.991.593	6.000.613	5,83	1,49	5,34
				2	6,95	87,39	2	3.017.684	3	120.515.224					
				3	7,20	87,39	2	2.561.593	3	98.748.519					
Juli	05.07.16	libor	18.10.17	1	7,36	83,41	80	1.109.042	4	794.752	755.629	75.012	9,93	0,01	0,04
				2	6,93	83,41	80	1.055.073	4	802.991					
				3	6,87	83,41	80	871.593	4	669.143					
		hortus	09.10.17	1	6,93	88,76	80	1.620.248	4	1.820.078	1.844.252	158.758	8,61	0,03	0,10
				2	6,98	88,76	80	1.523.346	4	1.698.967					
				3	7,11	88,76	80	1.839.183	4+5	2.013.711					
		nollen	28.08.17	1	7,14	66,94	10	1.997.295	3+4	5.922.965	6.185.211	837.733	13,54	0,09	0,32
				2	6,60	66,94	10	2.220.205	3+4	7.122.695					
				3	6,03	66,94	10	1.569.176	3+4	5.509.974					
August	01.08.16	libor	28.03.17	1	7,01	94,07	80	1.756.616	4	3.697.534	3.867.049	166.227	4,30	0,06	0,20
				2	7,01	94,07	80	1.840.372	4	3.873.834					
				3	7,00	94,07	80	1.911.728	4	4.029.781					
		hortus	17.01.17	1	7,02	76,26	10	971.339	2	4.079.914	4.113.996	96.050	2,33	0,06	0,22
				2	7,03	76,26	10	963.119	2	4.039.633					
		nollen	24.01.17	3	7,00	76,26	10	1.002.407	2	4.222.439					
				05.10.17	1	7,03	85,67	50	1.786.353	2	2.482.526	2.323.211	184.701	7,95	0,03

^a entfällt^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]										
				2	6,92	85,67	50	1.502.158	2	2.120.759															
				3	6,86	85,67	50	1.661.579	2	2.366.349															
September	31.08.16	libor	21.03.17	1	7,00	93,81	80	1.483.346	2+4	2.995.448	3.670.167	595.500	16,23	0,05	0,19										
				2	7,00	93,81	80	1.927.661	2+4	3.892.692															
				3	7,01	93,81	80	2.044.309	2+4	4.122.360															
		hortus	29.08.17	1	6,65	85,23	80	1.749.137	3+4	1.558.223						2.241.978	594.755	26,53	0,03	0,12					
				2	5,92	85,23	80	1.928.583	3+4	1.929.942															
				2	7,04	85,23	80	3.236.831	3+4	2.723.798															
		nollen	14.03.17	1	6,98	91,67	99	151.792	2	184.591											196.876	10.642	5,41	0,00	0,01
				2	6,99	91,67	99	167.390	2	203.269															
				3	6,99	91,67	99	166.978	2	202.768															
Oktober	30.09.16	libor	07.03.17	1	7,01	84,06	80	1.640.235	4	1.284.422	1.322.959	136.887	10,35	0,02	0,07										
				2	7,01	84,06	80	1.544.521	4	1.209.471															
				3	7,00	84,06	80	1.880.900	4	1.474.984															
		hortus	01.03.17	1	7,00	84,24	40	3.190.530	2+4	5.061.120						4.822.306	213.083	4,42	0,07	0,25					
				2	7,01	84,24	40	2.936.565	2+4	4.651.612															
				3	6,99	84,24	40	2.992.758	2+4	4.754.187															
		nollen	27.02.17	1	7,00	82,00	10	4.277.360	2	23.763.111											25.529.428	4.616.557	18,08	0,37	1,33
				2	7,00	82,00	6	3.322.982	2	30.768.352															
				3	6,99	82,00	10	3.964.556	2	22.056.821															

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

8.3.8.3 Verbascoid

Tabelle 8.11: Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Verbascoid für das Jahr 2014.

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
vor Blüte	02.06.14	libor	06.09.17	1	7,03	87,08	10	12.026.013	1	92.683.381	90.965.696	2.429.174	2,67	1,37	4,91
				2	7,00	87,08	10	3.996.452	1	30.932.291					
				3	7,68	87,08	10	12.650.982	1	89.248.011					
Juli	02.07.14	libor	06.11.17	1	7,04	89,66	80	4.229.829	1	5.084.376	5.236.823	2.174.776	41,53	0,09	0,31
				2	7,07	89,66	80	6.252.515	1	7.483.812					
				3	7,03	89,66	80	2.610.436	1	3.142.283					
August	04.08.14	libor	04.09.17	1	7,65	83,91	10	17.105.235	1	97.276.874	114.600.651	20.176.886	17,61	1,73	6,18
				2	7,13	83,91	10	22.412.373	1	136.754.085					
				3	7,17	83,91	10	18.091.091	1	109.770.994					
		nollen	15.11.17	1	6,82	86,44	3	12.322.363	1	310.904.293	312.267.979	9.701.641	3,11	4,70	16,78
				2	7,00	86,44	3	12.339.071	1	303.320.329					
				3	6,99	86,44	3	13.103.780	1	322.579.313					
September	01.09.14	libor	07.09.17	1	6,80	85,56	10	15.305.541	1	109.111.523	111.442.788	25.162.501	22,58	1,68	6,01
				2	7,15	85,56	10	20.308.458	1	137.689.795					
				3	6,96	85,56	10	12.566.683	1	87.527.045					
		nollen	09.11.17	1	6,50	88,06	3	16.688.172	1	501.727.458	522.545.281	44.275.350	8,47	7,86	28,07

^a entfällt^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [μL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
				2	7,00	88,06	3	17.641.913 1		492.515.717					
				3	7,33	88,06	3	21.507.189 1		573.392.668					
Oktober	06.10.14	libor	24.10.17	1	6,88	74,75	10	8.334.069 1		33.581.904	18.102.048	13.459.524	74,35	0,28	1,00
				2	7,00	74,75	80	18.508.039 1		9.162.396					
				3	6,90	74,75	60	17.265.963 1		11.561.844					
		nollen	04.10.17	1	6,94	87,11	2	12.792.229 1		500.497.465	561.288.522	52.690.688	9,39	8,44	30,15
				2	7,32	87,11	2	16.009.019 1		593.839.068					
				3	7,42	87,11	2	16.109.942 1		589.529.034					

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Tabelle 8.12: Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Verbascoïd für das Jahr 2015.

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [μL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
vor Blüte	15.06.15	hortus	30.08.17	1	8,16	90,67	80	12.544.134 1		14.417.068	12.764.445	3.288.589	25,76	0,20	0,71
				2	7,10	90,67	80	6.796.392 1		8.977.315					
				3	7,40	90,67	80	11.756.039 1		14.898.952					
Juli	02.07.15	libor	14.09.17	1	7,63	90,80	7	17.203.772 1		245.081.942	226.489.115	31.217.513	13,78	3,41	12,18

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
				2	7,34	90,80	7	16.472.585	1	243.937.108					
				3	7,40	90,80	7	12.965.720	1	190.448.296					
		hortus	31.08.17	1	7,30	88,12	10	11.313.570	1	91.318.424	77.166.485	20.013.865	25,94	1,17	4,17
				2	7,15	88,12	10	7.646.545	1	63.014.545					
				3	7,13	88,12	40	12.099.859	1						
		nollen	26.10.17	1	6,61	78,08	2	10.545.501	1	254.737.717	259.474.362	8.364.864	3,22	3,91	13,95
				2	6,90	78,08	2	11.000.167	1	254.552.685					
				3	6,75	78,08	2	11.377.392	1	269.132.685					
August	04.08.15	libor	23.10.17	1	6,93	71,65	3	9.594.096	1	113.944.810	129.783.486	14.537.187	11,20	1,96	6,99
				2	6,80	71,65	3	11.774.804	1	142.517.599					
				3	7,07	71,65	3	11.415.150	1	132.888.051					
		hortus	18.09.17	1	7,61	84,17	7	20.598.759	1	170.991.879	159.959.667	12.654.346	7,91	2,41	8,61
				2	6,97	84,17	7	16.125.029	1	146.145.959					
				3	7,16	84,17	7	18.445.539	1	162.741.162					
		nollen	28.09.17	1	6,98	84,33	2	12.450.089	1	398.397.020	395.668.160	4.319.744	1,09	5,95	21,26
				2	6,95	84,33	2	12.381.726	1	397.919.693					
				3	6,99	84,33	2	12.226.663	1	390.687.768					
September	07.09.15	libor	05.09.17	1	6,90	81,88	30	10.441.223	1	19.485.918	18.034.193	1.424.484	7,90	0,28	0,99
				2	7,34	81,88	30	9.484.065	1	16.638.610					
				3	7,66	81,88	30	10.694.310	1	17.978.050					
		hortus	19.09.17	1	7,04	80,65	4	15.066.688	1	193.554.029	184.692.905	8.196.998	4,44	2,78	9,94

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]
				2	7,00	80,65	4	14.175.3081		183.143.514					
				3	7,80	80,65	4	15.298.3661		177.381.173					
		nollen	30.10.17	1	6,09	74,31	10	12.301.5521		55.039.762	56.206.191	4.718.895	8,40	0,85	3,04
				2	6,53	74,31	10	12.504.9651		52.179.899					
				3	6,11	74,31	10	13.767.9081		61.398.913					
Oktober	01.10.15	libor	27.09.17	1	6,98	85,74	3	9.421.877	1	220.871.290	252.362.867	56.270.810	22,30	3,80	13,57
				2	7,09	85,74	3	9.484.449	1	218.888.593					
				3	6,92	85,74	3	13.420.1761		317.328.718					
		hortus	01.11.17	1	6,88	77,00	80	10.629.9501		5.877.911	4.422.225	1.404.908	31,77	0,07	0,26
				2	7,15	77,00	80	8.108.726	1	4.314.464					
				3	6,91	77,00	80	5.583.984	1	3.074.301					
		nollen	20.09.17	1	7,00	85,50	3	12.738.1711		292.831.517	325.249.645	29.149.194	8,96	4,89	17,48
				2	6,98	85,50	3	15.151.1051		349.299.262					
				3	7,54	85,50	3	15.631.9171		333.618.156					

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Tabelle 8.13: Messwerte zur Kalkulation des Gehalts an Verbascoïd für das Jahr 2016.

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]	
vor Blüte	28.06.16	hortus	20.11.17	1	7,17	87,39	10	16.515.4681		127.865.883	116.877.500	15.539.920	13,30	1,76	6,30	
				2	6,95	87,39	10	14.580.6491		116.459.522						
				3	7,20	87,39	10	13.734.1211		105.889.117						
Juli	05.07.16	libor	18.10.17	1	7,36	83,41	10	18.914.9841		108.437.580	100.573.299	6.823.369	6,78	1,52	5,42	
				2	6,93	83,41	10	15.940.7891		97.057.306						
				3	6,87	83,41	10	15.667.2601		96.225.011						
		hortus	09.10.17	1	6,93	88,76	10	15.394.3571		138.343.911	183.100.812	50.247.329	27,44	2,76	9,85	
				2	6,98	88,76	10	19.446.1451		173.504.134						
				3	7,11	88,76	10	27.109.2861		237.454.392						
		nollen	28.08.17	1	7,14	66,94	2	15.059.0221		223.287.161	225.023.942	3.515.655	1,56	3,39	12,10	
				2	6,60	66,94	2	14.280.6161		229.069.992						
				3	6,03	66,94	2	12.685.3061		222.714.673						
August	01.08.16	libor	28.03.17	1	7,01	94,07	25	15.251.5751		102.730.645	100.613.852	8.100.950	8,05	1,52	5,43	
				2	7,01	94,07	25	13.608.6981		91.664.653						
				3	7,00	94,07	25	15.928.9081		107.446.260						
		hortus	17.01.17	1	7,02	76,26	10	21.887.9911		91.936.108	74.637.920	14.985.017	20,08	1,13	4,03	
				2	7,03	76,26	10	15.818.9391		66.349.759						
		nollen	24.01.17	3	7,00	76,26	10	15.580.0621		65.627.894						
				05.10.17	1	7,03	85,67	2	10.544.6971		366.353.744	360.763.321	4.951.316	1,37	5,43	19,39

^a entfällt^b EW1 in EW2 umgerechnet

Erntezeit- punkt	Ernte- datum	Pflanzen- kategorie	Aufar- beitung	n	EW [g]	Wasser- gehalt [%]	Injektion [µL]	y [AUC]	Kat.	y _N [AUC]	MW [AUC]	STABW [AUC]	STABW [%]	x [mg/mL]	Gehalt [mg/g]	
				2	6,92	85,67	2	10.112.7281		356.930.850						
				3	6,86	85,67	2	10.083.3121		359.005.369						
September	31.08.16	libor	21.03.17	1	7,00	93,81	80	12.129.2431		24.493.625	28.009.561	6.128.139	21,88	0,43	1,53	
				2	7,00	93,81	80	17.374.4291		35.085.681						
				3	7,01	93,81	80	12.124.6281		24.449.378						
		hortus	29.08.17	1	6,65	85,23	80	14.759.3371		13.148.396	19.108.414	6.221.869	32,56	0,29	1,05	
				2	5,92	85,23	80	27.150.5591		27.169.686						
				2	7,04	85,23	80	24.537.4341		20.648.288						
		nollen	14.03.17	1	6,98	91,67	99	5.589.986	1	6.797.874	7.589.736	686.318	9,04	0,12	0,43	
				2	6,99	91,67	99	6.553.601	1	7.958.307						
				3	6,99	91,67	99	6.598.663	1	8.013.027						
Oktober	30.09.16	libor	07.03.17	1	7,01	84,06	30	11.060.2081		23.095.839	21.584.151	3.764.580	17,44	0,33	1,18	
				2	7,01	84,06	30	8.284.053	1	17.298.694						
				3	7,00	84,06	30	11.647.9571		24.357.919						
		hortus	01.03.17	1	7,00	84,24	40	10.318.8601		16.368.750	23.437.443	6.314.005	26,94	0,36	1,28	
				2	7,01	84,24	40	16.050.9611		25.425.228						
				3	6,99	84,24	40	17.952.2851		28.518.350						
		nollen	27.02.17	1	7,00	82,00	10	14.852.5151		82.513.972	97.052.308	13.780.732	14,20	1,47	5,23	
				2	7,00	82,00	10	17.769.4451		98.719.139						
				3	6,99	82,00	10	19.758.0201		109.923.812						

^a entfällt

^b EW1 in EW2 umgerechnet

Kapitel 9

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertationsarbeit liefert eine sehr umfassende Zusammenfassung der für *P. lanceolata* beschriebenen IGs und PEs. Die bisher in den großen Sammelwerken Hänsel et al. [3], Wichtl [11] und Sticher et al. [33] aufgeführten Vertreter dieser beiden Stoffgruppen (sechs IGs (Aucubin, Catalpol, Asperulosid, Deacetylasperulosid-säuremethylester, Globularin und Verbenalin) und fünf PEs (Verbascosid, Isoverbascosid, Plantamajosid, Lavandulifoliosid, Cistanosid F)) in *P. lanceolata* konnten durch umfassende Recherche der aktuellen Literatur auf insgesamt 15 IGs und acht PEs erweitert und durch Alpinosid, Arborescosidsäure, 6-*epi*-Aucubin, Dihydroaucubin, Dihydrocatalpol, Gardosid, Geniposidsäure, 8-*epi*-Logansäure, Shanzisid bzw. Forsythosid B, Plantainosid D, Martynosid ergänzt werden.

Die Aufgabenstellungen Isolierung der Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol und Verifizierung ausgewählter IGs (Aucubin, Catalpol, Asperulosid und Globularin sowie Deacetylasperulosid-säuremethylester und Verbenalin mit endständiger Methoxygruppe) untersucht. Die Hauptiridoidglykoside konnten - komplett ohne den Einsatz von potentiell methoxylierend wirkendem Methanol - erfolgreich aus der Droge gewonnen werden. Schlussendlich konnten 169,7 mg Aucubin und 48,7 mg Catalpol mit einer Reinheit $92 \pm 1\%$ (absolut) von bzw. $99 \pm 0\%$ (HPLC-DAD, MaxPlot) aus der Spitzwegerichdroge isoliert werden. Ihre Identität und vollständige Strukturcharakterisierung gelang mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC, COSY und NOESY-Experimenten, LC-DAD/ESI-HRMS-Messungen sowie DC- und HPLC-DAD-Analysen, welche mit Referenzsubstanzen und einschlägigen Literaturdaten abgeglichen wurden. Im Bezug auf die Korrektheit der Literaturangaben konnte die Genuinität der sechs betrachteten IGs bestätigt werden.

Darüber hinaus konnten möglicherweise neue IGs und PEs anhand von LC-DAD/ESI-HRMS bzw. LC-DAD/ESI-MSⁿ-Analysen detektiert werden. Dabei handelt es sich um potentielle Isoformen der angegebenen prominentesten IGs und PEs der Pflanze. Diese werden im Rahmen dieser Arbeit zum Großteil erstmalig für *P. lanceolata* postuliert. Manche davon wurden bisher auch noch für keine andere Pflanze beschrieben. Eine eindeutige Strukturspezifizierung der mutmaßlichen Isomere war anhand der vorliegenden

Daten nicht möglich. Eine Verifizierung der in dieser Arbeit gewonnenen Resultate in zukünftigen Analysen wird als äußerst interessant erachtet.

Als Kernstück dieser Dissertation konnte erstmalig eine HPLC-UV-Analysemethode entwickelt werden, mit welcher die in *P. lanceolata* enthaltenen, prominentesten IGs (Aucubin, Catalpol, Asperulosid, Deacetylasperulosidsäuremethylester, Globularin und Verbenalin) und PEs (Verbascosid, Isoverbascosid, Plantamajosid und Lavandulifoliosid) nebeneinander identifiziert und die jeweiligen Hauptvertreter der Stoffgruppen (Aucubin, Catalpol und Verbascosid) simultan quantifiziert werden können. Dieses Verfahren kann vielfältig in der Analytik des Spitzwegerichs in verschiedenen Matrices (Drogen-, Frischpflanzen- und Fermentationsextrakt der Blätter) genutzt werden. Als Analysemethoden wurden (HP)TLC und HPLC-DAD-Verfahren getestet und miteinander verglichen. Das (HP)TLC-Verfahren erwies sich als ungeeignet zur anspruchsvollen Fingerprintanalytik der sechs IGs in Spitzwegerichzubereitungen. Die drei Hauptgründe der Unzulänglichkeit der (HP)TLC-Analytik waren hierbei ein unzureichendes Trennvermögen der (HP)TLC-Platten, keine selektive oder spezifische Derivatierungs- und Detektion sowie eine zu große Diskrepanz zwischen den Gehalten an Minor- und Hauptkomponenten der betrachteten IGs des Spitzwegerichs. Letzter Punkt äußerte sich darin, dass die Chromatogramme entweder in einer angemessenen Detektion der Haupt- jedoch keinerlei Sichtbarmachung der Minorverbindungen resultierte oder sich eine vernünftige Visualisierung der Minorkomponenten auf Kosten einer massiven, andere relevante Zonen verdeckenden Zonenüberladung der Hauptkomponenten ergab.

Im Gegensatz dazu konnte während dieser Arbeit eine neue, erstmals für alle prominenten IGs und PEs geeignete Fingerprintmethode zur Analytik der IG- und PE-Muster in *P. lanceolata* per HPLC-DAD an stationärer RP18e-Phase mit einem ameisensauren Gradienten aus Wasser und Acetonitril und einer Detektion bei $\lambda=195$ nm (IGs) bzw. $\lambda=330$ nm (PEs) erfolgreich entwickelt und validiert werden. Untersuchungen der IGs in *P. lanceolata* beschränkten sich bisher in der Regel auf die beiden Hauptiridoidglykoside Aucubin und Catalpol [29, 81, 103]. Dies ist vermutlich auch der deutlich höheren Konzentration im Vergleich zu den anderen IGs geschuldet. Neben der erstmaligen, simultanen Analytik beider Stoffgruppen im Spitzwegerich mittels HPLC-DAD besteht die Besonderheit der entwickelten Methode in der erstmals unter 200 nm liegenden Detektionswellenlänge für die IGs. Die Analytik des Rohextrakts mit vielen ähnlich polaren Verbindungen bei einer Wellenlänge von 195 nm stellte überdies, aufgrund der Komplexität der resultierenden Chromatogramme, eine große analytische Herausforderung dar.

Mit der angewendeten, für bestimmte phenolische Verbindungen (Gerbstoffe, Flavonoide und Hydroxyzimtsäurederivate) generierten Aufarbeitungsmethode (Modifikation der Methode von Duckstein und Stintzing [185]) wurden akzeptable Wiederfindungen für Catalpol, jedoch suboptimale Wiederfindungen für Aucubin und Verbascosid erzielt, weswegen Korrekturfaktoren zur Quantifizierung eingesetzt werden sollten. Das Umschwenken auf eine andere bzw. modifizierte Aufarbeitungsmethode könnte sich positiv auf die Richtigkeit auswirken und bietet ein interessantes Thema für zukünftige Studien.

Insbesondere für Verbascosid werden für die geringe Wiederfindungsrate Abbauprozesse während des Aufarbeitungsprozesses vermutet, wie sich bereits in den Tests zur Robustheit der Analytstabilität abzeichneten. Es wird darüber hinaus, aufgrund der geringen Stabilität dieser Verbindung, empfohlen, die aufgearbeiteten Spitzwegerichproben stets gekühlt zu lagern und rasch zu analysieren, da bereits nach 3 Tagen bei 4 °C im Autosampler Degradationsprozesse bemerkbar waren.

Weiter wurde im Rahmen dieser Arbeit eine geeignete Methode zur Bestimmung des Wassergehalts in FP-Material herausgearbeitet, um den Substanzgehalt der betrachteten Analyten unabhängig vom internen Wassergehalt des jeweiligen eingefrorenen Frischpflanzenmaterials sowie unabhängig von der Menge des potentiell extern angesammelten Wassers bestimmen zu können. Dies war für die Quantifizierung von Aucubin, Catalpol und Verbascosid in den eingefrorenen Spitzwegerichfrischpflanzenproben von Bedeutung, da diese unterschiedlich viele, externe Wasserkristalle aufzeigten. Die Einbeziehung des Wassergehalts bei der Analytik der FP-Proben stellt hierbei ein Alleinstellungsmerkmal dieser Arbeit im Vergleich zur einschlägigen Literatur dar.

Mithilfe der entwickelten und validierten HPLC-DAD-Methode konnten Änderungen der Metabolitprofile der Hauptkomponenten beider Stoffgruppen (Aucubin, Catalpol und Verbascosid) in den Blättern des frischen Spitzwegerichs über den Blütezeitraum (Juni-Oktober) von drei verschiedenen Pflanzenkategorien (Wildwuchs: Nollen, Kulturwuchs: Libor und Hortus) in drei aufeinander folgenden Jahren (2014, 2015 und 2016) erfolgreich ermittelt werden. Die gezogenen Proben variierten z.T. zusätzlich in ihrer Genetik, ihrem exakten Standort, ihren biotischen (Fraßfeinde, benachbarte Pflanzen, etc.) und abiotischen (Lichtqualität und -quantität, Bodenparameter, etc.) Faktoren. Die Gehalte der drei Leitsubstanzen variieren in allen drei untersuchten Gruppierungen (Erntejahr, Erntemonat und Pflanzenkategorie) anhand derer kein einheitliches Verlaufsbild ersichtlich war. Eine ontogenetische Abhängigkeit der jeweiligen Substanzgehalte mit dem Erntezeitpunkt kann daher nicht postuliert werden. Folglich ist es nicht möglich einen perfekten Erntezeitpunkt mit maximalen Substanzgehalten zu definieren. Die isolierte Beurteilung der Effekte des Blütenstadiums wurde durch die unterschiedlichen Nebenparameter sowie der geringen Probenanzahl erschwert. Generell konnte aufgrund der zu geringen Probenzahl ($n=1$) pro Erntezeitpunkt der durchgeführten Probenzüge in dieser Arbeit keine verlässliche deskriptive Statistik zur Bestimmung eines idealen Erntezeitpunkts betrieben werden. Weiter konnte der von Tamura und Nishibe [18] präferierte Erntezeitpunkt im Oktober nicht bestätigt werden. Stattdessen konnte, durch die Ermittlung der Substanzgehalte der drei Analyten über die Jahre, gezeigt werden, dass die Allgemeingültigkeit und damit Übertragbarkeit der von Tamura und Nishibe [18] erhobenen Daten zweifelhaft ist, da sie nur aus einem Erntejahr stammen.

Mit genügend hoher Sicherheit ($***p \leq 0,001$) konnte darüber hinaus erstmalig eine signifikante positive Korrelation der Aucubin- und Catalpolgehalte gezeigt werden, welche auf allen erhaltenen Werten der drei Jahre, fünf Erntezeitpunkte und drei Pflanzenkategorien basiert. Eine Korrelation der einzelnen Substanzgehalte mit biotischen Daten (Nieder-

schlag, Lufttemperatur) konnte dabei nicht verifiziert werden. Alles in allem konnten entscheidende Grundlagen zur weiteren Erforschung des Inhaltstoffspektrums der IGs und PEs in *P. lanceolata* und anderen diese Substanzgruppen tragenden Pflanzen gelegt werden, auf die in zukünftigen Studien aufgebaut werden kann.

Kapitel 10

Material und Methoden

10.1 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Aceton	p.a.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aceton	technisch	CSC Jäcklechemie, Nürnberg, Deutschland
Acetonitril	p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	HPLC-grade	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	<i>ultra HPLC-grade</i>	J. T. Baker, Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, USA
Ameisensäure	98-100%, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	> 98%, p.a., ACS, Rotipuran [®]	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	98%, <i>for mass spectrometry</i>	Fluka, St. Gallen, Schweiz
Anisaldehyd	98%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
n-Butanol	≥ 99,5%, p.a.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform-d ₁	99,8%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Deuteriumoxid	99,9%	Deuterio GmbH, Kastellaun, Deutschland
Dichlormethand-d ₂	99,6%	Deuterio GmbH, Kastellaun, Deutschland
DMSO-d ₆	99,8%	Deuterio GmbH, Kastellaun, Deutschland
Diphenylboryloxyethylamin	> 97%, p.a.	Fluka, St. Gallen, Schweiz/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Echtblausalz B	p.a.	Fluka, St. Gallen, Schweiz
Eisen(III)-chlorid B	wasserfrei, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure/Eisessig	konz., p.a. 99%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylacetat	p.a.	Acros Organics, Geel, Belgien
Ethylacetat	technisch	CSC Jäklechemie, Nürnberg, Deutschland
Ethanol	absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	technisch	CSC Jäklechemie, Nürnberg, Deutschland
n-Hexan	HPLC-grade	Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, USA
n-Hexan	p.a.	Acros Organics, Geel, Belgien
Heptan	p.a.	Acros Organics, Geel, Belgien
Isopropanol	HPLC-grade	Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, USA
Isopropanol	technisch	CSC Jäklechemie, Nürnberg, Deutschland
Karl-Fischer Reagenz	Aquastar CombiTitrant 5, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Macrogol 400	p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Methanol	HPLC-grade	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol-d ₄	99,8%	Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland
Natriumchlorid	100,1%, p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid	Plättchen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	1 N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit	NaNO ₂ , Ph. Eur.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Petrolether	technisch	CSC Jäklechemie, Nürnberg, Deutschland
Phloroglucin (1,3,5-Trihydroxybenzol)	> 99%, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>o</i> -Phosphorsäure	85%, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pyridin-d ₅	99,5%	Deuterio GmbH, Kastellaun, Deutschland
Salpetersäure	65%, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	1 N, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	rauchend, konz., 36%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure	konz. 95-97%, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Toluol	p.a.	Acros Organics, Geel, Belgien
Vanillin	> 99%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser	Leitfähigkeit 0,055-0,077 µS/cm, millipore gefiltert (Astacus Filteranlage)	MembraPure, Hennigsdorf/Berlin, Deutschland
<i>p</i> -Xylol	p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland

10.2 Verwendete Referenzsubstanzen

Bezeichnung	Reinheit [%]	Charge	Hersteller
Asperulosid	96 ^a	11262	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Aucubin 1	95 ^a	5970	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Aucubin 2	91 ^b	311159717	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aucubin 3	92 ^a	^c	im Rahmen dieser Arbeit isoliert (Kapitel 3 bzw. 3.3.2.1)
Catalpol 1	100 ^a	1344	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Catalpol 2	> 98 ^a	03-14	TransMIT, Gießen, Deutschland
Catalpol 3	97 ^a	8920	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Catalpol 4	99 ^b	^c	im Rahmen dieser Arbeit isoliert (Kapitel 3 bzw. 3.3.2.2)
Verbenalin 1	99 ^a	3244	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Isoverbascosid	84 ^a	2168	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Plantamajosid	92 ^a	7638	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Verbascosid 1	96 ^a	7613	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Verbascosid 2	91 ^a	10528	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
L-Glukose	> 98 ^a	^d	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Rhamnose	> 99 ^a	^d	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

^a absolute Reinheit

^b Reinheit per HPLC

^c keine Charge, da selbst isoliert

^d keine Charge angegeben

10.3 Verwendete fermentierte Extrakte

Zur HPLC-Methodenentwicklung wurden Fermentationsextrakte der frischen Spitzwegerichpflanze von der Firma WALA Heilmittel GmbH (Bad Boll/Eckwälden, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Fermentationsextrakte sind wässrige, fermentierte Zubereitungen frischer Spitzwegerichblätter (*Plantago lanceolatae* foliis ferm 34c, welche gemäß dem Homöopathischen Arzneibuch HAB2011 nach der Vorschrift 34c aus frischen zerkleinerten Pflanzenteilen, Molke und gereinigtem Wasser im Verhältnis 100:50:75 (m/m/m) hergestellt wurden. Ch. 904528 (Fermentationsextrakt 1) und 904542 (Fermentationsextrakt 2) wurden im Mai 1999 produziert, Ch. 908521 (Fermentationsextrakt 3) im August 1999.

10.4 Verwendetes Frischpflanzenmaterial

10.4.1 FP-Material zur Methodenentwicklung und -validierung

Zur (HP)TLC und HPLC-DAD-Methodenentwicklung, HPLC-DAD-Methodenvalidierung sowie Findung einer geeigneten Wassergehaltsbestimmung der FP-Proben wurden die frischen, gefroren gelagerten Blätter des Spitzwegerichs verwendet, welche am 05.08.2013 auf dem landwirtschaftlichen Betrieb Sonnenhof (Bad Boll, Deutschland) geerntet, eingefroren und bis zur Analyse gefroren aufbewahrt wurden (Kapitel 10.4.4). Die Lagertemperaturen betragen -30°C , -80°C bzw. -20°C in den Zeiträumen 05.08.2013 - 12.09.2013, 12.09.2013 - 01.07.2018 bzw. ab dem 01.07.2018. Zur Analyse wurde das gefrorene Material mit einem Hammer vorzerkleinert. Es wurde darauf geachtet, dass das gefrorene FP-Material bei der Vorzerkleinerung nicht auftaute.

10.4.2 FP-Material zur Analytik des Inhaltsstoffspektrums von *P. lanceolata*

Frischpflanzenmaterial des Spitzwegerichs zur Untersuchung des IG- und PE-Inhaltsstoffspektrums wurde in drei aufeinanderfolgenden Jahren in Bad Boll/Eckwälden (Baden-Württemberg, Deutschland) geerntet, gereinigt und bis zur Aufarbeitung bei -20°C bzw. -80°C gelagert (Kapitel 10.4.4). Das verwendete Pflanzenmaterial wurde in drei Kategorien eingeteilt: Libor, Hortus und Nollen. Bei Libor handelt es sich um eine kommerziell erworbene Sorte, die im Garten der Firma WALA Heilmittel GmbH (Bad Boll/Eckwälden, Deutschland) in Kultur genommen wurde. Hortus stellt den kommerziell erworbenen, z.T. selbst weiterkultivierten Samen von wilden Spitzwegerichpflanzen dar. Er wurde im gleichen Garten der Firma WALA Heilmittel GmbH (Bad Boll/Eckwälden, Deutschland) angepflanzt. Nollen bezeichnet die wilde Pflanze, welche auf einer biologisch-dynamisch bewirtschafteten Fläche (Wiese) hinter dem WALA-Garten wuchs, auf welcher lediglich Mäharbeiten, jedoch keine Dünge-, Hack- oder Jätemaßnahmen ausgeführt wurden. Die Identität der Wildsammlungen wurde über ihre Morphologie bestimmt. Die Identität der Kulturpflanzen war zusätzlich durch ihr Saatgut abgesichert. Die in Kultur wachsenden Pflanzen wurden, trotz mehrjährigen Wachstums, jedes Jahr neu angepflanzt. Aufgrund der biodynamischen Gartenführung, variierte die Anbaufläche der beiden Pflanzenkategorien Hortus und Libor innerhalb des Gartens, wohingegen der Standort von Nollen über die drei Jahre gleich blieb. Es wurde in drei aufeinander folgenden Jahren (2014, 2015 und 2016) geerntet, wobei mehrmals im Jahr, verteilt über die Blütezeit, beprobt wurde. Der erste Probenzug fand kurz vor Öffnung der Blüte statt, der letzte wurde gegen Ende der Blütezeit vollzogen. In diesem Zeitraum wurde, mit Ausnahme des ersten Probenzuges kurz vor Beginn der Blütezeit, immer Anfang des Monats geerntet. Der Beginn der Blütezeit variierte von Anfang bis Ende Juni (02.06.2014, 15.06.2015, 28.06.2016), wodurch sich unterschiedliche Zeitintervalle zwischen dem ersten und dem zweiten Probenzug ergaben. Die Erntezeitpunkte der FP-Probenzüge sind in Tabelle 10.2, die geernteten Spitzwegerichpflanzenkategorien in Tabelle 10.3 angegeben.

Tabelle 10.2: Erntezeitpunkte der FP-Probenzüge der Jahre 2014 - 2016.

Erntezeitpunkt	Erntejahr 2014	Erntejahr 2015	Erntejahr 2016
vor der Blüte	02.06.2014	15.06.2015	28.06.2016
Anfang Juli	02.07.2014	02.07.2015	05.07.2016
Anfang August	04.08.2014	04.08.2015	01.08.2016
Anfang September	01.09.2014	07.09.2015	31.08.2016
Anfang Oktober	02.10.2014	01.10.2015	30.09.2016

Tabelle 10.3: Geerntete Pflanzenkategorien pro Probenzug der Jahre 2014 - 2016.

Erntezeitpunkt	Erntejahr 2014	Erntejahr 2015	Erntejahr 2016
vor der Blüte	Libor	Hortus	Hortus
Anfang Juli	Libor	Hortus, Libor, Nollen	Hortus, Libor, Nollen
Anfang August	Libor, Nollen	Hortus, Libor, Nollen	Hortus, Libor, Nollen
Anfang September	Libor, Nollen	Hortus, Libor, Nollen	Hortus, Libor, Nollen
Anfang Oktober	Libor, Nollen	Hortus, Libor, Nollen	Hortus, Libor, Nollen

10.4.3 Archivierung von Belegexemplaren

Einmal pro Jahr (Septembeernte) wurden ausgewählte Pflanzenexemplare mit Wasser gereinigt, trockengetupft und bei RT unter Druck gepresst und getrocknet. Diese sind als Belegexemplare im Herbarium am Institut für Botanik der Universität Hohenheim (Hohenheim/Stuttgart, Deutschland) hinterlegt (Tabelle 10.4).

Tabelle 10.4: Herbarnummern der Belegexemplare des gesammelten Spitzwegerichs, die im Herbarium am Institut für Botanik der Universität Hohenheim (Hohenheim/Stuttgart, Deutschland) hinterlegt sind.

Pflanzen- kategorie	Sammlungs- datum	Fundort	Koordinaten	Herbarnummer
Libor ^a	01.09.2014	WALA-Garten, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland	48°37'n.B., 9°35'ö.B.	HOH-020283
Nollen ^b	01.09.2014	Wiese hinter WALA-Garten, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland	48°37'n.B., 9°35'ö.B.	HOH-020284
Libor ^a	07.09.2015	WALA-Garten, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland	48°37'n.B., 9°35'ö.B.	HOH-020281
Nollen ^b	07.09.2015	WALA-Garten, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland	48°37'n.B., 9°35'ö.B.	HOH-020285
Hortus ^c	07.09.2015	Wiese hinter WALA-Garten, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland	48°37'n.B., 9°35'ö.B.	HOH-022620
Libor ^a	31.08.2016	WALA-Garten, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland	48°37'n.B., 9°35'ö.B.	HOH-022619
Nollen ^b	31.08.2016	WALA-Garten, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland	48°37'n.B., 9°35'ö.B.	HOH-020286
Hortus ^c	31.08.2016	Wiese hinter WALA-Garten, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland	48°37'n.B., 9°35'ö.B.	HOH-020282

^a Libor ist der Name der Sorte von *P. lanceolata*, die käuflich erworben und jedes Jahr in Kultur neu ausgesät wurde.

^b Nollen bezeichnet die Wildsammlung von *P. lanceolata*, welche mehrjährig ist.

^c Hortus lautet der Name des Saatgutvertreibers des kommerziell erworbenen Spitzwegerichsaatguts, welcher jedes Jahr in Kultur neu ausgesät wurde.

10.4.4 Ernte, Reinigung und Lagerung des FP-Materials

Der zur Analytik herangezogene Spitzwegerich wurde als *planta tota* geerntet (Abbildung 10.1A). Nach einer ersten Vorreinigung unter fließendem Wasser, bei der vor allem Fremdbestandteile wie Erde entfernt wurden (Abbildung 10.1B), wurden die Pflanzen erneut mit Wasser gereinigt. Das außen anhaftende Wasser wurde durch Abtupfen und kurzes Lufttrocknen (≤ 2 h) entfernt. Anschließend fand eine Selektion nach Blüte mit Schaft, Blatt und Wurzel statt (Abbildung 10.1C). Es wurden pro Probe mindestens 50 g Gesamtpflanze geerntet.

Die weitgehend abgetrockneten, selektierten Pflanzenteile wurden ohne Zerkleinerung in Plastiktüten gepackt, gewogen, einvakuuminiert und bei -20°C bzw. -80°C bis zur



Abbildung 10.1: Ernte der gesamten Frischpflanze (A), Entfernen von Fremdbestandteilen (B), Separierung in Einzelbestandteile: Blüte mit Schaft, Blatt und Wurzel (C). Spezifizierung: Libor, Erntedatum: 01.09.2014, Ernteort: WALA-Garten, Bad Boll/Eckwälden, Deutschland (48°37' n.B., 9°35' ö.B.).

Aufarbeitung aufbewahrt. Bei Bedarf wurden zur besseren Verpackung lange Blätter und Blütenschäfte mit einer Schere geteilt.

10.4.5 Probenaufbereitung

Der Umgang mit Frischpflanzenmaterial ist in der Literatur seltener anzutreffen als der mit getrocknetem Pflanzenmaterial. Aus diesem Grund galt es im Rahmen dieser Arbeit eine geeignete Extraktionsmethode zur Aufarbeitung von Frischpflanzenmaterial zu etablieren. In Vorversuchen setzte sich eine erschöpfende Extraktionsmethode zur Aufarbeitung des Frischpflanzenmaterials gegenüber einer schnelleren, jedoch nicht-erschöpfenden durch. Grund waren geringere Schwankungen der Messwerte und damit der daraus resultierenden Gehalte an Aucubin, Catalpol und Verbascosid. Neben statistischen Aspekten kann durch eine erschöpfende Extraktion dem wahren Gehalt in der Pflanze näher gekommen werden. Schlussendlich wurde eine von Duckstein und Stintzing [185] entwickelte Aufarbeitungsmethode gewählt, welche vor allem zur Extraktion von phenolischen Verbindungen aus Frischpflanzen Anwendung findet [177, 186, 187] und sich durch eine schonende Prozessführung (Sauerstoff- und Lichtausschluss, milde Temperaturen von 4 - 38 °C) auszeichnet. Diese wurde an die vorliegenden Bedingungen (logistische Gegebenheiten, unterschiedliche Stoffgruppen im Fokus) angepasst. Zur Probenaufbereitung wurde das gefrorene Frischpflanzenmaterial kurz einer Temperatur von -80 °C ausgesetzt und anschließend mit einem Hammer vorzerkleinert. Es wurde darauf geachtet, dass das Material bei diesem Vorgang nicht auftaute, um potentiellen Degradationsprozessen zu vermeiden. Die Aufarbeitung der präparierten Proben verlief daraufhin nach folgendem Schema (Abbildung 10.2).

Kritische Schritte dieser Aufarbeitung stellen das quantitative Entfernen der Rückstände des pürierten Frischpflanzenmaterials, die sich im Mixstab des Ultraturrxs verfangen, und des Evaporieren am Rotationsverdampfer dar. Es darf nicht gänzlich zur Trockene evaporiert werden, da sich sonst das grüne Präzipitat nicht mehr vom Kolbenrand entfernen lässt. Der wasserunlösliche, grüne Rückstand konnte teilweise durch Abspülen *via* Pasteurpipette entfernt und in den Messkolben überführt werden. Ob sich dieser nachträglich wieder in Lösung ging, wurde nicht überprüft.

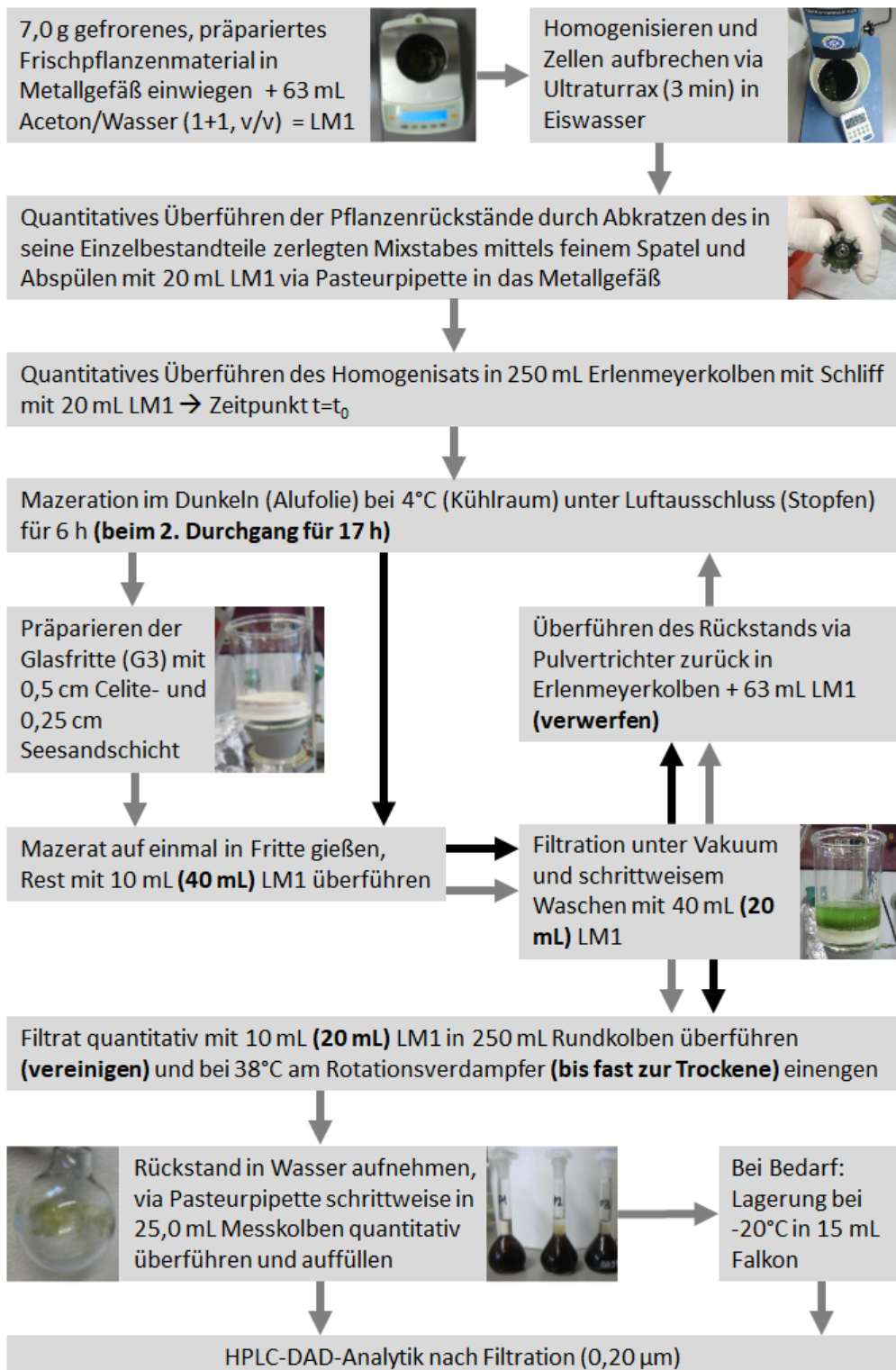


Abbildung 10.2: Schema der Aufarbeitung des Frischpflanzenmaterials.

10.5 Verwendetes Drogenmaterial

10.5.1 Verwendetes Drogenmaterial

- Drogenmaterial 1:
Für Vorversuche wurde das geschnittene Drogenmaterial Folia Plantaginis lanceolatae conc. Ph. Eur. 7.3, Charge 12362906 der Firma Caesar&Loretz (Caelo, Hilden, Deutschland) herangezogen. Das Drogenmaterial wurde mittels Handmühle vor der Bearbeitung vermahlen.
- Drogenmaterial 2:
Geschnittene Plantaginis lanc. herba conc. DAB 1999 der Firma Galke wurde über die Kreuz Apotheke in Seelze bezogen und enthalten keine Chargennummer.

10.5.2 Bestimmung des Verbascosidgehalts

Für das Drogenmaterial 2 wurde der Verbascosidgehalts gemäß der Gehaltsanforderung des Ph. Eur. 7.0 bestimmt, da das käuflich erworbene Drogenmaterial lediglich DAB 1999 geprüft war [188] und den Qualitätsansprüchen des Ph. Eur. 7.0 (2011) entsprechen sollte [43]. Dazu wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt. Das Drogenmaterial wurde vorbereitet, indem es mithilfe einer Ultrazentrifugalmühle auf Stufe 1 etwa eine Minute gemahlen wurde. In Ermangelung des in der Monografie vorgeschriebenen Siebeinsatzes 355, der einer Lochgröße von 355 μm entspricht, fand ein kleinerporiger Siebeinsatz mit einer Lochgröße von 250 μm Anwendung.

Die eingesetzten Reagenzien wurden wie folgt hergestellt.

- Ethanol 50%: 100,0 mL Ethanol technisch wurden in einem 200 mL Messkolben mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Salzsäure 0,5 M: 10 mL 1 N Salzsäure wurden mit 10 mL Wasser vermischt.
- Natriumnitrit-Natriummolybdat-Lösung: 2,51 g Natriumnitrit und 2,51 g Natriummolybdat wurden in einen 25 mL Messkolben eingefüllt, in Wasser gelöst und bis zur Markierung aufgefüllt.
- Natronlaugenreagenz: 1,74 g NaOH-Plättchen wurden in 20,5 mL Wasser gelöst.
- Stammlösung: 1,000 g der gemahlene Droge wurden in ein Wägeschiffchen abgewogen, mit 5 mL Ethanol 50% in einen 250 mL Rundkolben überführt, mit weiteren 85 mL Ethanol 50% versetzt und 30 Minuten im Ölbad unter Rückflusskühlung erhitzt. Nach Erkalten des Kolbens unter fließendem Wasser wurde das Gemisch durch einen Faltenfilter in einen 100 mL Messkolben filtriert, wobei Kolben und Filter mit 10 mL Ethanol 50% in den Messkolben nachgespült und anschließend mit Ethanol 50% auf 100,0 mL aufgefüllt wurden.

- **Untersuchungslösung:** Der Reihe nach wurden in einen 10 mL Messkolben 1,0 mL der Stammlösung, 2 mL Salzsäure 0,5 M, 2 mL der Natriumnitrit-Natriummolybdat-Lösung und 2 mL des Natronlaugenreagenzes pipettiert, mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt und sofort vermessen. Um eine homogene Vermischung zu gewährleisten, wurde der Messkolben nach jedem Reagenzzusatz gut geschwenkt.
- **Kompensationsflüssigkeit:** Der Reihe nach wurden in einen 10 mL Messkolben 1,0 mL der Stammlösung, 2 mL Salzsäure 0,5 M und 2 mL des Natronlaugenreagenzes pipettiert, mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt und sofort vermessen. Um eine homogene Vermischung zu gewährleisten, wurde der Messkolben nach jedem Reagenzzusatz gut geschwenkt.

Die photometrische Vermessung und Berechnung fand wie folgt statt. Ein Aliquot der zu bestimmenden Lösung wurde in eine Glasküvette überführt, im Photometer bei 525 nm vermessen und anschließend der Gehalt an Gesamt-*ortho*-dihydroxyzimtsäurederivaten als Verbascosid nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Absorption} \cdot 1000}{185 \cdot m[\text{g}]} \quad (10.1)$$

Gleichung 46: Formel zur Berechnung des Verbascosidgehalts, wobei m: Einwaagemenge.

Das untersuchte Drogenmaterial wies einen Gehalt an Gesamt-*ortho*-dihydroxyzimtsäurederivaten, berechnet als Verbascosid, von $3,5 \pm 0,1\%$ (n=5) auf. Laut Ph. Eur. 7.0 wird ein Mindestgehalt von 1,5% Gesamt-*ortho*-dihydroxyzimtsäurederivaten berechnet als Verbascosid gefordert. Die Monographie wurde im aktuellen Ph. Eur. 9.8 [49] unverändert beibehalten. Folglich entspricht die erworbene Droge nicht nur den Qualitätsanforderungen des Ph. Eur. 7.0 sondern auch der aktuellen Ausgabe 9.8.

10.6 Verwendete Materialien

10.6.1 Verwendete (HP)TLC-Platten

Material	Spezifizierung	Hersteller
Aluminiumoxid	HPTLC-Fertigplatten ALUGRAM Nano-SIL Aluminiumoxid/UV ₂₅₄ , 20 x 20 cm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Aluminiumoxid	DC Aluminiumoxid 150 F ₂₅₄ , neutral, 20 x 20 cm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Amino	HPTLC-Fertigplatten-SIL NH ₂ /UV ₂₅₄ , 10 x 10 cm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Cyano	HPTLC-Fertigplatten Nano-SIL CN/UV ₂₅₄ , 10 x 20 cm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Diol	HPTLC-Fertigplatten Nano-SIL Diol/UV ₂₅₄ , 10 x 20 cm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Kieselgel	HPTLC Silica gel 60 F ₂₅₄ , 10 x 10 cm, 10 x 20 cm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kieselgel	DC Silica gel 60 F ₂₅₄ , 20 x 20 cm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polyamid	POLYGRAM® Polyamid-6/UV ₂₅₄ 20 x 20 cm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
RP2	DC-Fertigplatten RP2 F ₂₅₄ , 10 x 20 cm, 20 x 20 cm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
RP18 W	HPTLC-Fertigplatten RP18 W, F ₂₅₄ , 10 x 10 cm	Merck, Darmstadt, Deutschland

10.6.2 Verwendete HPLC-Säulen

Material	Spezifizierung	Hersteller
Biphenyl	Kinetex Biphenyl, Coreshell 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm, P.No. OOG-4627-EO, S.No. H15-168734, mit Vorsäule	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
C8e	Hibar® 250-4, Purospher® STAR, RP8e, 250 x 4,0 mm, 5 µm, Cat.1.50035.001, Lot. FC075418, mit Vorsäule	Merck, Darmstadt, Deutschland
C18	Kinetex 5 u XB-C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, P.No. OOG-4605-EO, S.No. 759-395-24, mit Vorsäule	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
C18	SunFire™ C18, 150 x 2,1 mm, 5 µm, P/No. 186002541, S.No. 015432174145_01, mit Vorsäule	Waters, Eschborn, Deutschland
C18	LiChroCart 125-4, Lichrospher® 100, RP18, 125 x 4 mm, 5 µm, Cat.1.50823, Lot. α55120617, Co.No.641617, mit Vorsäule	Merck, Darmstadt, Deutschland
C18	X SELECT™ CSH™ C18, 100 x 2,1 mm, 3,5 µm	Waters, Eschborn, Deutschland
C18e	Hibar® 250-4, Purospher® STAR, RP18e, 250 x 4,0 mm, 5 µm, Co.No.027442, mit Vorsäule	Merck, Darmstadt, Deutschland
	LiChroCart 250-4, Purospher® STAR, RP18e, 250 x 4,0 mm, 5 µm, Cat.1.50252.0001, Lot. HX815867, Co.No.841127, mit Vorsäule	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diol	Interchim.uptispherOH UP6OH-250/P46, 250 x 4,6 mm, ohne Vorsäule	Interchrom, Montlucon Cedex, Frankreich
HILIC	Luna 3 u HILIC 300 Å, 150 x 2,00 mm, 3 µm, P/No. OOF-4449-BO, mit Vorsäule	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Phenylhexyl	X SELECT™ CSH™ Phenyl-Hexyl, 150 x 2,1 mm, 3,5 µm, P.No. 186005367, S.No. 010733345124_01, mit Vorsäule	Waters, Eschborn, Deutschland

10.6.3 Sonstige verwendete Materialien

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
C18 Material	LiChroprep RP18, 25-40 µm für die Säulen-chromatographie	Merck, Darmstadt, Deutschland
C18 Säule für präparative HPLC	C18-WP 4 g, 20 µm, 15-60 mm Reveleris HP	Frace, Worms, Deutschland
Celite	Celite [®] 535, Art. Nr. 0009.1, Charge 156201998, EG Nr. 272-489-0	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diolsäule für präparative HPLC	Uptisphere DIOL Prep-LC-Säule, 250 x 21,2 mm, 6 µm, 120 Å, mit Vorsäule	Interchim, Montlucon Cedex, Frankreich
Einmalspritzen	Norm-Ject, Tuberculin, 1 mL	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland
Entwicklungskammer (HPTLC)	Doppeltrog 10 x 20 cm	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Entwicklungskammer (TLC)	Doppeltrog 10 x 10 cm und 20 x 20 cm	Brand, Wertheim, Deutschland
Exsikkator	Vakuum Exsikkator, diverse Größen	Duran, Wertheim, Deutschland
Falcon (Plastik)	15 und 50 mL	TPP, Trasadingen, Schweiz
Faltenfilter	Qualitative, grade 1289, Dia. 125 mm, 84 g/m ²	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland
Diverse Glasgeräte	Erlenmeyerkolben mit Deckel 25-500 mL, Messbecher 10-5000 mL, Messpipette 1-50 mL, Messzylinder 10-1000 mL, Rundkolben 5-2000 mL, Spitzkolben 1-100 mL, Trichter 25-500 mm, Vollpipetten 0,1-50,0 mL, etc.	Brand, Wertheim, Deutschland
Glasfritten	Spezialanfertigung, G3-Filter, Höhe 9 cm, Durchmesser 6,5 cm	Glasbläserwerkstatt, Universität Regensburg, Deutschland

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Glasfrittenadapter	top female Joint: ST/NS 29/32, bottom male Joint: ST/NS 29/32	Glasbläserwerkstatt, Universität Regensburg, Deutschland
Glasspritze zur manuellen Injektion (präparative HPLC, CPC)	Gas Tight Syringe 2,5 mL, Cat. No. 549-0537	VWR, hergestellt von VWR-Leuven, Belgien
Heizpilz	für 500 mL Rundkolben, Fab Nr. 360137, Typ 8271, V 220, 400 W	Herbeus Wittmann, Heidelberg, Deutschland
Inlays	Micro Insert, 100-500 µL, passend für 11 mm CrimSnap Vials	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Kanüle	Sterican 1,20 x 40 mm BC/SB, 18 G x 1,5"	Braun Melsung AG, Melsungen, Deutschland
Kieselgel für die Säulenchromatographie	Geduran for Columnchromatography Si60, 63-200 mm für die Säulenchromatographie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kieselgekartuschen für die MPLC	Silica 12 g, 20 µm, 8,0 x 2,5 cm, Reveleris HP	Grace, Worms, Deutschland
NMR-Röhrchen	507HP	Norell, Landisville, USA
Orangegel	Silica Gel Orange mit Feuchtigkeitsindikator, 1-3 mm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Parafilm	Parafilm [®] „M“ 4 in. x 125 ft. roll, Cat. No. PM996	Bemis, Neeneh, WI, USA
Pasteurpipetten	150 und 230 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten mit Watte	230 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Peleusball	Sicherheitspipettierball 100 mL Füllvolumen	Merck, Darmstadt, Deutschland
pH-Papier	universal Indikator, pH 1-10	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	10 Reference (2,5-10 µL), 100 Reference (10-100 µL), 1000 Research (100-1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Pipetten	1000 TransferpetteS (100-1000 µL)	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	0,5-10 µL (T-300-L)	Axygen Scientific, Union City, CA, USA
Pipettenspitzen	200 µL, 1000 µL	Sarstedt, Hamburg, Deutschland
Quarzglasküvetten	10,00 mm	Hellma, Müllheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (Plastik)	1,5 und 2,0 mL	Merck, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (Plastik)	1,5 und 2,0 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rückflusskühler		Normschliff Gerätebau, Wertheim, Deutschland
Rührfisch	Magnetrührstäbchen in diversen Größen	Brand, Wertheim, Deutschland
Schütteltrichter	10-2000 mL	Schott, Mainz, Deutschland
Seesand	technisch	CSC Jäcklechemie, Nürnberg, Deutschland
Sephadex Material	Sephadex [®] LH-20	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Siebeinsatz für Ultrazentrifugalmühle	Größe 0,25 und 0,5, 704284 (DIN 4188)	Retsch, Haan, Deutschland
Siedesteine	Typ A für präperative Arbeiten, Destillationen und Rückflussierungen	Pöllath Labortechnologie, Bamberg, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC Membrane 0,2 µm	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Sprühfinger		Witeg, Wertheim, Deutschland
Vakuumfolien	250 x 400 mm La.Va Verpackung	La.Va (Landig und Lava), Bad Saulgau/Lampertsweiler, Deutschland
Verschlusskappe	PP Schnappkappe, blau, für 11 mm CrimSnap Vial, mit Teflon/Silikon-Septum	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Vial	11 mm CrimSnap Vial, braun, 2 mL	Wicom, Heppenheim, Deutschland

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Wasserabscheider	Messrohr mit Sperrhahn, Nullpunkt am Sperrhahn, Schliff 29/32NS, Kapazität 10 mL, Graduierung 0,1 mL, Nr. LENZ05600000	Merck, Darmstadt, Deutschland

10.7 Verwendete Software

Bezeichnung	Spezifizierung/Version	Hersteller
Armen Glider Flash ^a	Version 2.3	Armen Instrument, Saint-Avé, Frankreich
ChemDraw	Version 18.0	PerkinElmer, Waltham, USA
Empower ^b	Version 3	Waters, Eschborn, Deutschland
Excel	Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
EZChrom Elite ^c	3.1.7	VWR, Darmstadt, Deutschland
OpenLAB ^d	CDS ChemStation LC and CE Drivers A.02.09 [018]	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
SPSS	IBM SPSS Statistics 24	IBM, Ehningen, Deutschland
ThinkCell ^e	Version 9	think-cell, Berlin, Deutschland
TopSpin ^f	Version 3.2	Bruker Corporation, Billerica, MA, USA
Valoo	Demoversion 2.6.0.1	Analytik-Software Dr. Stella Nieto-Ernst, Leer, Deutschland
WinCats ^g	Version 1.4.6	Camag, Muttenz, Schweiz

^a MPLC Software

^b HPLC Software Anlage 2

^c HPLC Software Anlage 1

^d Präparative HPLC Software

^e Software zur Diagrammerstellung

^f NMR Software

^g HPTLC Software

10.8 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Spezifizierung/Modell	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage	MS 205 DU	Mettler-Toledo, Ingolstadt, Deutschland
ASE-Anlage	Accelerated Solvent Extractor ASE150 Dionex, P/N 082992	Thermo Fisher Scientific, früher: Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
CPC-Anlage	SPOT Centrifugal Partition Chromatography mit Pumpe 515 (Waters, Eschborn, Deutschland) und CPC-Fraktionskollektor 2211 Superrac mit Racks Type B2 (LKB Bromma, Sollentuna, Schweden)	Armen, Saint-Ave, Frankreich
Fotodokumentationsgerät 1	CAMAG Reprostar 3 (Dokumentation), WinCats (Software)	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Fotodokumentationsgerät 2	Camag DCVisualizer	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Fotodokumentationsgerät 3	CarbUVis 131305, Serie 08692, DigiDocAufsatz mit UV-Filter Nr. 131325	Sarstedt, Wiesloch/Nümbrecht, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Thermoscientific Freezer, Forma -86 °C ULT Freezer, Modell 995	Thermo Fisher Scientific, früher: Thermo Electronic Cooperation, Waltham, Massachusetts, USA
Gefriertrocknungsanlage	Anlage P10-85 mit Pumpe PK8D	Ilmvac, Ilmenau, Deutschland
Handmühle	ZM1 Yellow Line A10	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Heizplatte	Thermoplate S Desaga	Sarstedt-Gruppe, Nümbrecht, Deutschland

Bezeichnung	Spezifizierung/Modell	Hersteller
HPLC-Anlage 1 (analytisch)	Hitachi HPLC mit Pumpe L2130, Autosampler L2200, Säulenofen L2350, Diodenarray-Detektor L2444, Software EZChromElite 3.1.7	Hitachi, Tokio, Japan; Vertrieb: VWR, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Anlage 2 (analytisch)	Waters HPLC mit binärer Pumpe 1525, Autosampler 2707, Säulenofen L1500, Photodiodenarray-Detektor 2998, Software Empower 3	Waters, Eschborn, Deutschland
HPLC-Anlage (präparativ)	Binäre 1260 HPLC Infinity mit 1260 DAD, 1260Fraktionskollektor, 1260 manueller Injektor und ChemStation Software	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
HPTLC-Anlage	CAMAG Linomat 5 (Auftragung), CAMAG ADC2 (Automatic Developing Chamber), CAMAG Reprostar 3 (Dokumentation), WinCats (Software)	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Isopropanolbad	Isopropanol technisch mit Kühler EK 30	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Karl-Fischer-Titrationsgerät	870 KFT Titrino Plus	Metrohm, Filderstadt, Deutschland
Magnetrührer	diverse Modelle	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
MPLC-Anlage	Spot Liquid Chromatography FLASH mit gekoppeltem UV-Detektor, Fraktionskollektor und Software Armen Glider Flash V 2.3	Armen Instrument, Saint-Avé, Frankreich
MS-Anlage	UPLC-HRMS: Q-TOF 6540 UHD, Ionenquelle: AJS ESI G6540A	Agilent, Santa Clara, USA

Bezeichnung	Spezifizierung/Modell	Hersteller
MS ⁿ -Anlage	Agilent 1200 HPLC-System mit Chemstation, binärer Pumpe, Mikrovakuumdegasser, Autosampler, thermostatischem Säulenofen und UV/VIS-DAD-Detektor und Ionenfalle	Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA
NMR-Spektrometer	Avance III HD 300, 400 und 600 Kryo	Bruker Corporation, Billerica, MA USA bzw. Ettlingen, Deutschland
Oberschalenwaage	MC 1, Laboratory LC 6200 S 6	Sartorius, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	InoLab pH Level 1 mit Halbmikromesselektrode SenTix [®] Mic, pH 0-14, 0-100 °C, Schaftlänge 40/80 mm, Durchmesser 12/5 mm, Material Glas	WTW, Weilheim, Deutschland
Präzisionswaage	LE4202S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Rotationsverdampfer	Typ Laborata 4003	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Trockenschrank	TY50UL 770169	Memmert, Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner USC1200TH	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner USC1700TH	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ultra Turrax	Ultra Turrax T 25, 220 V, 600 W, 50/60 Hz, 24000 min ⁻¹ , 8000 U/min, CH13.138.0038, Nr. 461614	Janke und Kunkel IKA [®] Labortechnik, Staufen, Deutschland
Ultrazentrifugalmühle	UZM 1	Retsch, Haan, Deutschland
UV-Spektrometer	Cary 50 Scan mit Software Cary WinUV 3.00(182)	Varian, Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung	Spezifizierung/Modell	Hersteller
Vakuumiergerät	Vakuumverpackung V.300	La.Va (Landig und Lava), Bad Saulgau/Lampertsweiler, Deutschland
Vortex	Vortex Mixer VV3	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge	EBA21	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Jouan BR4i	Thermo Electron, Karlsruhe, Deutschland

Literatur

- [1] C. Ganz. „Arzneipflanze des Jahres 2014: Spitzwegerich (*Plantago lanceolatae*)“. In: *Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin* 26.1 (2014), S. 8.
- [2] European Medicines Agency. *Assessment report on Plantago lanceolatae L. folium*. Techn. Ber. European Medicines Agency, 2011, S. 1–24.
- [3] R. Hänsel, K. Keller, H. Rimpler und G. Schneider. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Band 6, Drogen P-Z*. Springer Verlag Heidelberg, 1994, S. 221–228.
- [4] H. Marzell. *Geschichte und Volkskunde der deutschen Heilpflanzen*. Hippokrates Verlag Marquardt & Cie Stuttgart, 1938, S. 239–245.
- [5] A. Achmüller. *Teufelskraut, Bauchwehblüml, Wurmtod - Das Kräuterwissen Südtirols*. Edition Raetia Bozen, 2012, S. 170–173.
- [6] A. Biertümpfel, U. Lohwasser und R. Schmatz. *Krankheiten und Schädigungen an Arznei- und Gewürzpflanzen, Band 3*. Grafisches Centrum Cuno, 2007, S. 564–569.
- [7] B. Fischer, C. Hartwich, M. Arnold, B. Fischer, H. Hager und W. Lenz. *Hagers Handbuch der Pharmaceutischen Praxis für Apotheker, Ärzte, Drogisten und Medicinalbeamte*. 6. Auflage. Springer Verlag Heidelberg, 1910, S. 221–237. DOI: 10.1007/978-3-662-41202-2.
- [8] M. Wichtl. *Teedrogen. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2009, S. 514–517.
- [9] Ohne Verfasser. „Spitzwegerich“. In: *Deutsche Apotheker Zeitung* 153.49 (2013), S. 84.
- [10] A. Grigore, C. Bubueanu, L. Pirvu, L. Ionita und G. Toba. „*Plantago lanceolatae* L. crops - source of valuable raw material for various industrial applications.“ In: *Scientific Papers - Series A, Agronomy* 58 (2015), S. 207–214.
- [11] M. Wichtl. *Teedrogen. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2016, S. 505–507.

- [12] ohne Autor. *Spitzwegerich - König am Wegrand*. <https://www.forum-naturheilkunde.de/phytotherapie/heilpflanzen/spitzwegerich.html>, aufgerufen am 11.09.2018. 1994.
- [13] A. Elgersma, K. Søgaard und S. K. Jensen. „Fatty acids, α -tocopherol, β -carotene and lutein contents in forage legumes, forbs and a grass–clover mixture“. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61.49 (2013), S. 11913–11920. DOI: 10.1021/jf403195v.
- [14] O. Sticher und R. Hänsel. *Hänsel / Sticher Pharmakognosie Phytopharmazie*. 9. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2010, S. 936–945.
- [15] M. Murai, Y. Tamayama und S. Nishibe. „Phenylethanoids in the herb of *Plantago lanceolatae* and inhibitory effect on arachidonic acid-induced mouse ear edema“. In: *Planta Medica* 61.05 (1995), S. 479–480. DOI: 10.1055/s-2006-958143.
- [16] Q. Zhou, W. Lu, Y. Niu, J. Liu, X. Zhang, B. Gao, C. C. Akoh, H. Shi und L. Yu. „Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory, cellular antioxidant, and radical scavenging activities of 12 *Plantago* species“. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61.27 (2013), S. 6693–6702. DOI: 10.1021/jf401191q.
- [17] N. Ronsted, E. Gobel, H. Franzyk, S. R. Jensen und C. E. Olsen. „Chemotaxonomy of *Plantago*, iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides“. In: *Phytochemistry* 55.4 (2000), S. 337–348. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)00306-x.
- [18] Y. Tamura und S. Nishibe. „Changes in the concentrations of bioactive compounds in plantain leaves“. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50.9 (2002), S. 2514–2518. DOI: 10.1021/jf011490x.
- [19] S. Gonda, N. M. Nguyen, G. Batta, G. Gyemant, C. Mathe und G. Vasas. „Determination of phenylethanoid glycosides and iridoid glycosides from therapeutically used *Plantago* species by CE-MEKC“. In: *Electrophoresis* 34.17 (2013), S. 2577–2584. DOI: 10.1002/elps.201300121.
- [20] I. N. Beara, M. M. Lesjak, D. Z. Orcic, N. D. Simin, D. D. Cetojevic-Simin, B. N. Bozin und N. M. Mimica-Dukic. „Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolatae* L.“ In: 47.1 (2012), S. 64–70. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.01.001.
- [21] M. Adam, P. Dobiasv, A. Eisner und K. Ventura. „Extraction of antioxidants from plants using ultrasonic methods and their antioxidant capacity“. In: *Journal of Separation Science* 32.2 (2009), S. 288–294. DOI: 10.1002/jssc.200800543.
- [22] A. Bianco, M. Guiso, P. Passacantilli und A. Francesconi. „Iridoid and phenylpropanoid glycosides from new sources“. In: *Journal of Natural Products* 47.5 (1984), S. 901–902. DOI: 10.1021/np50035a033.

- [23] N. Handjieva, H. Saadi und L. Evstatieva. „Iridoid glucosides from *Plantago altissima* L., *Plantago lanceolatae* L., *Plantago atrata* HOPPE and *Plantago argentea* CHAIX.“ In: *Zeitschrift für Naturforschung* 46.9-10 (1991), S. 963–965. DOI: 10.1515/znc-1991-9-1041.
- [24] J. Suomi, S. K. Wiedmer, M. Jussila und M. L. Riekkola. „Analysis of eleven iridoid glycosides by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) and screening of plant samples by partial filling (MECC)-electrospray ionisation mass spectrometry“. In: *Journal of Chromatography A* 970.1-2 (2002), S. 287–296.
- [25] R. Taskova, L. Evstatieva, N. Handjieva und S. Popov. „Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance“. In: *Zeitschrift für Naturforschung* 57 (2002), S. 42–50. DOI: 10.1515/znc-2002-1-208.
- [26] L. Bourdier und E. Bourquelot. „Über das Vorkommen von Aucubin in den verschiedenen Arten der Gattung *Plantago*“. In: *Archiv der Pharmazie* 246.2-3 (1908), S. 81–88. DOI: 10.1002/ardp.19082460202.
- [27] A. R. Trim und R. Hill. „The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides“. In: *Biochemical Journal* 50.3 (1952), S. 310–319.
- [28] M. D. Bowers und S. K. Collinge. „Fate of iridoid glycosides in different life stages of the buckeye, *Junonia coenia* (lepidoptera: nymphalidae)“. In: *Journal of Chemical Ecology* 18.6 (1992), S. 817–831. DOI: 10.1007/bf00988322.
- [29] M. Rischer, M. Adamczyk, H. Ratz, S. Hose, M. Marchesan, D. Paper, G. Franz, E. Wolf-Heuss und J. Engel. „Quantitative determination of the iridoid glycosides aucubin and catalpol in *Plantago lanceolatae* L. extracts by HPTLC and HPLC“. In: *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 11 (1998), S. 374–378.
- [30] G. Willinger und S. Dobler. „Selective sequestration of iridoid glycosides from their host plants in *Longitarsus* flea beetles“. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 29.4 (2001), S. 335–346. DOI: 10.1016/s0305-1978(00)00082-x.
- [31] R. Jurisic, Z. Debeljak, S. Vladimir-Knezevi und J. Vukovi. „Determination of aucubin and catalpol in *Plantago* species by micellar electrokinetic chromatography“. In: *Zeitschrift für Naturforschung* 59.1-2 (2004), S. 27–31.
- [32] E. Andrzejewska-Golec. „Taxonomic aspects of the iridoid glucosides occurring in the genus *Plantago* L.“ In: *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66.2 (1997), S. 201–205. DOI: 10.5586/asbp.1997.026.
- [33] O. Sticher, J. Heilmann und I. Zündorf. *Hänssel / Sticher Pharmakognosie Phytopharmazie*. 10. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2015.
- [34] K. Hartke, H. Hartke, E. Mutschler, G. Rücker, M. Wichtl, F. Bracher und E. Stahl-Biskup. „*Plantago lanceolatae* herba“. In: *Arzneibuch-Kommentar*. 15. Lieferung. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2002.

- [35] B. Reichert. „Über die Inhaltsstoffe von *Verbena officinalis* L.. 1. Mitteilung: Die Identität des Verbenalins mit Cornin“. In: *Archiv der Pharmazie* 273.21-24 (1935), S. 357–360. DOI: 10.1002/ardp.19352732107.
- [36] M. Bergmann und G. Michalis. „Über das Glucosid Aucubin“. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 60.4 (1927), S. 935–942. DOI: 10.1002/cber.19270600418.
- [37] P. Karrer und H. Schmid. „Über die Konstitution des Aucubins“. In: *Helvetica Chimica Acta* 29.3 (1946), S. 525–552. DOI: 10.1002/hlca.19460290306.
- [38] R. B. Duff, J. S. Bacon, C. M. Mundie, V. C. Farmer, J. D. Russel und A. R. Forrester. „Catalpol and methylcatalpol: naturally occurring glycosides in *Plantago* and *Buddleia* species“. In: *Biochemical Journal* 96 (1965), S. 1–5.
- [39] J. Wieffering. „Aucubinartige Glucoside (pseudoindikane) und verwandte Heteroside als systematische Merkmale“. In: *Phytochemistry* 5.6 (1966), S. 1053–1064. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)86099-9.
- [40] E. Andrzejewska-Golec, S. Ofterdinger-Daegel, I. Çaliş und L. Swiatek. „Chemotaxonomic aspects of iridoids occurring in *Plantago* subg. *Psyllium* (*Plantaginaceae*)“. In: *Plant Systematics and Evolution* 185.1-2 (1993), S. 85–89. DOI: 10.1007/bf00937721.
- [41] L. Birkofer, C. Kaiser und U. Thomas. „Acteosid und Neoacteosid; Zuckerester aus *Syringa vulgaris* (L.)“. In: *Zeitschrift für Naturforschung B* 23.8 (1968), S. 1051–1058. DOI: 10.1515/znb-1968-0806.
- [42] Y. Fuji, A. Uchida, K. Fukahori, M. Chino, T. Ohtsuki und H. Matsufuji. „Chemical characterization and biological activity in young sesame leaves (*Sesamum indicum* L.) and changes in iridoid and polyphenol content at different growth stages“. In: *Plos One* 13.3 (2018), S. 1–15. DOI: 10.1371/journal.pone.0194449.
- [43] Ohne Autor. „Spitzwegerichblätter: *Plantaginaceae lanceolatae folium*“. In: *Europäisches Arzneibuch*. 7. Ausgabe inkl. Nachtrag 7.8 - Amtliche deutsche Ausgabe. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2011, S. 1881–1882.
- [44] F. Fons, A. Gargadennec, A. Gueiffier, J. L. Roussel und C. Andary. „Effects of cinnamic acid on polyphenol production in *Plantago lanceolatae*“. In: *Phytochemistry* 49.3 (1998), S. 697–702. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00116.
- [45] A. A. Basaran, I. Çaliş, C. Anklin, S. Nishibe und O. Sticher. „Lavandulifolioside: a new phenylpropanoid glycoside from *Stachys lavandulifolia*“. In: *Helvetica Chimica Acta* 71.6 (1988), S. 1483–1490. DOI: 10.1002/hlca.19880710612.
- [46] Y. Li, Y. Liu, R. Liu, S. Liu, X. Zhang, Z. Wang, J. Zhang und J. Lu. „HPLC-LTQ-orbitrap MSⁿ profiling method to comprehensively characterize multiple chemical constituents in xiao-er-qing-jie granules“. In: *Analytical Methods* 7.18 (2015), S. 7511–7526. DOI: 10.1039/c5ay00420a.

- [47] A. B. Samuelson. „The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review“. In: *Journal of Ethnopharmacology* 71.1-2 (2000), S. 1–21. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00212-9.
- [48] Y. Najafian, S. S. Hamed, M. K. Farshchi und Z. Feyzabadi. „*Plantago major* in traditional Persian medicine and modern phytotherapy: a narrative review“. In: *Electronic Physician* 10.2 (2018), S. 6390–6399. DOI: 10.19082/6390.
- [49] Ohne Autor. „Spitzwegerichblätter: *Plantaginis lanceolatae folium*“. In: *Europäisches Arzneibuch*. 9. Ausgabe inkl. Nachtrag 9.8 - Amtliche deutsche Ausgabe. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2017, S. 2302–2303.
- [50] S. Büechli und T. Wegener. „Spitzwegerich (*Plantago lanceolatae*). Neue Erkenntnisse zu einem alten Heilmittel“. In: *Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin / Swiss Journal of Integrative Medicine* 17.3 (2005), S. 167–170. DOI: 10.1159/000281928.
- [51] H. Ravn und L. Brimer. „Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subs. *major*“. In: *Phytochemistry* 27 (1988), S. 3433–3437. DOI: 10.1016/0031-9422(88)80744-1.
- [52] T. Morikawa, K. Ninomiya, M. Imamura, J. Akaki, S. Fujikura, Y. Pan, D. Yuan, M. Yoshikawa, X. Jia, Z. Li und O. Muraoka. „Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glucose tolerance in mice“. In: *Journal of Natural Medicines* 68.3 (2014), S. 561–566. DOI: 10.1007/s11418-014-0837-9.
- [53] A. Holste. „Das Verbenalin“. In: *Zeitschrift für Experimentelle Pathologie und Therapie* 19.3 (1918), S. 483–493. DOI: 10.1007/bf02659588.
- [54] A. Viljoen, N. Mncwani und I. Vermaak. „Anti-inflammatory iridoids of botanical origin“. In: *Current Medical Chemistry* 19.14 (2012), S. 2104–2127.
- [55] M. Czerwinska, A. Swierczewska, M. Wozniak und A. Kiss. „Bioassay-guided isolation of iridoids and phenylpropanoids from aerial parts of *Lamium album* and their anti-inflammatory activity in human neutrophils“. In: *Planta Medica* 83.12/13 (2017), S. 1011–1019. DOI: 10.1055/s-0043-107031.
- [56] E. Vigo, A. Cepeda, O. Gualillo und R. Perez-Fernandez. „In-vitro anti-inflammatory activity of *Pinus sylvestris* and *Plantago lanceolatae* extracts: effect on inducible NOS, COX-1, COX-2 and their products in J774A.1 murine macrophages“. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57.3 (2005), S. 383–391. DOI: 10.1211/0022357055605.
- [57] T. Yoshida, K. Rikimaru, M. Sakai, S. Nishibe, T. Fujikawa und Y. Tamura. „*Plantago lanceolatae* L. leaves prevent obesity in C57BL/6J mice fed a high-fat diet“. In: *Natural Product Research* 27.11 (2013), S. 982–987. DOI: 10.1080/14786419.2012.704377.

- [58] N. Tiwari, S. Luqman, N. Masood und M. M. Gupta. „Validated high performance thin layer chromatographic method for simultaneous quantification of major iridoids in *Vitex trifolia* and their antioxidant studies“. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 61 (2012), S. 207–214. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.12.007.
- [59] M. Galvez, C. Martin-Cordero, P. J. Houghton und M. J. Ayuso. „Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species“. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53.6 (2005), S. 1927–1933. DOI: 10.1021/jf048076s.
- [60] K. Kraft. „Therapeutisches Profil eines Spitzwegerichkraut-Fluidextraktes bei akuten respiratorischen Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter“. In: *Phytopharmaka III*. Steinkopff, 1997, S. 199–209. DOI: 10.1007/978-3-642-95993-6_17.
- [61] E. Kuranel, E. Akkol, I. Süntar, S. Gürsoy, H. Keles und G. Aktay. „Investigating biological activity potential of *Plantago lanceolatae* L. in healing of skin wounds by a preclinical research“. In: *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 13 (2016), S. 1–16. DOI: 10.5505/tjps.2016.08370.
- [62] M. Dzialo, J. Mierziak, U. Korzun, M. Preisner, J. Szopa und A. Kulma. „The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 17.2 (2016), S. 1–41. DOI: 10.3390/ijms17020160.
- [63] M. Gálvez. „Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines“. In: *Journal of Ethnopharmacology* 88.2-3 (2003), S. 125–130. DOI: 10.1016/S0378-8741(03)00192-2.
- [64] W. Müller-Limmroth und H. H. Fröhlich. „Effect of various phytotherapeutic expectorants on mucociliary transport“. In: *Fortschritte der Medizin* 98.3 (1980), S. 95–101.
- [65] J. A. Gerrard. „The Maillard reaction in food: Progress made, challenges ahead“. In: *Trends in Food Science & Technology* 17.6 (2006), S. 324–330. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.11.011.
- [66] W. Baltes. *Lebensmittelchemie*. Springer Verlag Heidelberg, 2007. DOI: 10.1007/978-3-540-38183-9.
- [67] S.-I. Yamagishi, S. Ueda und S. Okuda. „Food-derived advanced glycation end products AGEs: A novel therapeutic target for various disorders“. In: *Current Pharmaceutical Design* 13.27 (2007), S. 2832–2836. DOI: 10.2174/138161207781757051.
- [68] H. Unoki und S.-I. Yamagishi. „Advanced glycation end products and insulin resistance“. In: *Current Pharmaceutical Design* 14.10 (2008), S. 987–989. DOI: 10.2174/138161208784139747.

- [69] M. A. Angarskaya und V. E. Sokolova. „The effect of plantain *Plantago major* on the course of experimental atherosclerosis in rabbits“. In: *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 53.4 (1962), S. 410–412. DOI: 10.1007/bf00783859.
- [70] M. Wurglics und C. Ude. „Spitzwegerich, Eibisch, Efeu und Thymian im Einsatz gegen Husten“. In: *PZ-Prisma* 20 (2013), S. 43–53.
- [71] D. C. Close und C. McArthur. „Rethinking the role of many plant phenolics - protection from photodamage not herbivores?“ In: *Oikos* 99.1 (2002), S. 166–172. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2002.990117.x.
- [72] M. A. Ebrahimzadeh, R. Enayatifard, M. Khalili, M. Ghaffarloo, M. Saeedi und J. Yazdani Charati. „Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants“. In: *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 13.3 (2014), S. 1041–1047.
- [73] G. Rehner und H. Daniel. *Biochemie der Ernährung*. 3. Auflage. Spektrum-Akademischer Verlag, 2010, S. 291–294.
- [74] K. E. Barton. „Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (Plantaginaceae): genetic variation and trade-offs“. In: *American Journal of Botany* 94.1 (2007), S. 56–66. DOI: 10.3732/ajb.94.1.56.
- [75] F. Fons, A. Gargadennec und S. Rapior. „Culture of *Plantago* species as bioactive components resources: a 20-year review and recent applications“. In: *Acta Botanica Gallica* 155.2 (2008), S. 277–300. DOI: 10.1080/12538078.2008.10516109.
- [76] R. Sutter und C. Müller. „Mining for treatment-specific and general changes in target compounds and metabolic fingerprints in response to herbivory and phytohormones in *Plantago lanceolatae*“. In: *New Phytologist* 191.4 (2011), S. 1069–1082.
- [77] H. B. Marak, A. Biere und J. M. Van Damme. „Systemic, genotype-specific induction of two herbivore-deterrent iridoid glycosides in *Plantago lanceolatae* L. in response to fungal infection by *Diaporthe adunca* (ROB.) NIESSEL“. In: *J. Chem. Ecol.* 28.12 (2002), S. 2429–2448.
- [78] L.-M. Qi, J. Zhang, Y.-L. Zhao, Z.-T. Zuo, H. Jin und Y.-Z. Wang. „Quantitative and qualitative characterization of *Gentiana rigescens* franch (Gentianaceae) on different parts and cultivations years by HPLC and FTIR spectroscopy“. In: *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2017 (2017), S. 1–10. DOI: 10.1155/2017/3194146.
- [79] C. Alba, R. Pioreschi und C. Quintero. „Population and leaf-level variation of iridoid glycosides in the invasive weed *Verbascum thapsus* L. common mullein: implications for herbivory by generalist insects“. In: *Chemoecology* 23.2 (2013), S. 83–92. DOI: 10.1007/s00049-012-0121-y.

- [80] D. R. Gardner und F. R. Stermitz. „Host plant utilization and iridoid glycoside sequestration by *Euphydryas anicia* L. *epidoptera: Nymphalidae*“. In: *Journal of Chemical Ecology* 14.12 (1988), S. 2147–2168.
- [81] H. B. Marak, A. Biere und J. M. M. van Damme. „Direct and correlated responses to selection on iridoid glycosides in *Plantago lanceolatae* L.“ In: *Journal of Evolutionary Biology* 13.6 (2000), S. 985–996. DOI: 10.1046/j.1420-9101.2000.00233.x.
- [82] A. Fuchs und M. D. Bowers. „Patterns of iridoid glycoside production and induction in *Plantago lanceolatae* and the importance of plant age“. In: *Journal of Chemical Ecology* 30.9 (2004), S. 1723–1741.
- [83] C. U. Baden, S. Franke und S. Dobler. „Differing patterns of sequestration of iridoid glycosides in the *Mecininae* (*Coleoptera, Curculionidae*)“. In: *Chemoecology* 22.2 (2012), S. 113–118. DOI: 10.1007/s00049-012-0103-0.
- [84] L. A. Richards, E. C. Lampert, M. D. Bowers, C. D. Dodson, A. M. Smilanich und L. A. Dyer. „Synergistic effects of iridoid glycosides on the survival, development and immune response of a specialist caterpillar, *Junonia coenia* (Nymphalidae)“. In: *Journal of Chemical Ecology* 38.10 (2012), S. 1276–1284. DOI: 10.1007/s10886-012-0190-y.
- [85] H. Pankoke und C. Müller. „Impact of defoliation on the regrowth capacity and the shoot metabolite profile of *Plantago lanceolatae* L.“ In: *Plant Physiology and Biochemistry* 71 (2013), S. 325–333. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.07.016.
- [86] C. M. Jarzomski, N. E. Stamp und M. D. Bowers. „Effects of plant phenology, nutrients and herbivory on growth and defensive chemistry of Plantain, *Plantago lanceolatae*“. In: *Oikos* 88.2 (2000), S. 371–379.
- [87] C. Quintero und M. D. Bowers. „Plant induced defenses depend more on plant age than previous history of damage: implications for plant-herbivore interactions“. In: *Journal of Chemical Ecology* 37.9 (2011), S. 992–1001.
- [88] S. L. F. Meyer, I. A. Zasada, D. P. Roberts, B. T. Vinyard, J.-K. L. Dilip K. Lakshamn, D. J. Chitwood und L. K. Carta. „*Plantago lanceolatae* and *Plantago rugelii* extracts are toxic to *Meloidogyne incognita* but not to certain microbes“. In: *Journal of Nematology* 28.3 (2006), S. 333–338.
- [89] S. Gonda, L. Tóth, G. Gyémánt, M. Braun, T. Emri und G. Vasas. „Effect of high relative humidity on dried *Plantago lanceolatae* L. leaves during long-term storage: effects on chemical composition, colour and microbiological quality“. In: *Phytochemical Analysis* 23.1 (2011), S. 88–93. DOI: 10.1002/pca.1329.
- [90] A. Zamanikas und G. Jürgenliemk. „Influence of different solvents on extractable saponins from *rusci rhizoma*“. Poster at 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Münster, Deutschland. 2013.

- [91] N. Handjieva, H. Saadi, S. Popov und I. Baranovska. „Separation of iridoids by vacuum liquid chromatography“. In: *Phytochemical Analysis* 2.3 (1991), S. 130–133. DOI: 10.1002/pca.2800020308.
- [92] S. Damtoft, H. Franzyk und S. R. Jensen. „Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior*“. In: *Phytochemistry* 31.12 (1992), S. 4197–4201. DOI: 10.1016/0031-9422(92)80442-h.
- [93] B. Nikolova-Damyanova und N. Handjieva. „Quantitative determination of swerti-amarin and gentiopicroside in *Centaureum erythraea* and *C. turcicum* by densitometry“. In: *Phytochemical Analysis* 7.3 (1996), S. 140–142. DOI: 10.1002/(sici)1099-1565(199605)7:3<140::aid-pca297>3.0.co;2-0.
- [94] T. Ersöz, M. Z. Berkman, D. Tasdemir, I. Çaliş und C. M. Ireland. „Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Euphrasia pectinata*“. In: *Turkish Journal of Chemistry* 26.2 (2002), S. 179–188.
- [95] A.-L. Cogne, E. F. Queiroz, J.-L. Wolfender, A. Marston, S. Mavi und K. Hostettmann. „On-line identification of unstable catalpol derivatives from *Jamesbrittenia fodina* by LC-MS and LC-NMR“. In: *Phytochemical Analysis* 14.2 (2003), S. 67–73. DOI: 10.1002/pca.689.
- [96] C.-S. Yuan, Q. Zhang, W. D. Xie, X.-P. Yang und Z.-J. Jia. „Iridoids from *Pedicularis kansuensis* forma *albiflora*“. In: *Die Pharmazie* 58 (2003), S. 428–30. DOI: 10.1002/chin.200340174.
- [97] Z. Akdemir, I. Tatli, E. Bedir und I. A. Khan. „Acylated Iridoid Glycosides from *Verbascum lasianthum*“. In: *Turkish Journal of Chemistry* 28 (2004), S. 101–109.
- [98] L. Ö. Demirezer, F. Gürbüz, Z. Güvenalp, K. Ströch und A. Zeeck. „Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*“. In: *Turkish Journal of Chemistry* 30 (2006), S. 525–534.
- [99] F. Yalcin, D. Kaya Bilecenoglu, I. Çaliş, T. Ersöz und E. Palaska. „Determination of iridoid glycosides from four Turkish *Lamium* species by HPLC-ESI/MS“. In: *Turkish Journal of Chemistry* 32 (2008), S. 457–467.
- [100] H. Kirmizibekmez, C. Bassarello, S. Piacente, G. Akaydin und I. Çaliş. „Flavonoid, phenylethanoid and iridoid glycosides from *Globularia aphyllanthes*“. In: *Zeitschrift für Naturforschung* 64b (2009), S. 252–256. DOI: 10.1055/s-0028-1084397.
- [101] G. Crisan, L. Vlase, G. Balica, D. Munteanu, C. Stefanescu, P. Ramona, M. Tamas und S. Leucuta. „LC/MS analysis of aucubin and catalpol of some *Veronica* species“. In: *Farmacologia* 58 (2010), S. 237–242.
- [102] H. Hajimehdipoor, M. Shekarchi, M. P. Piralihamedani, Z. Abedi, H. Zahedi, M. Shekarchi und A. R. Gohari. „A validated HPTLC-densitometric method for assay of aucubin in *Vitex agnus-castus* L.“ In: *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10.4 (2011), S. 705–710.

- [103] M. F. Munteanu und L. Vlase. „The determination of the iridoids from the *Melampyrum* species by modern chromatographic methods“. In: *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39.1 (2011), S. 79. DOI: 10.15835/nbha3915803.
- [104] Z.-J. Wu, J.-H. Wang, D.-M. Fang und G.-L. Zhang. „Analysis of iridoid glucosides from *Paederia scandens* using HPLC–ESI-MS/MS“. In: *Journal of Chromatography B* 923-924 (2013), S. 54–64. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.01.032.
- [105] S. Shah, T. Dhanani und S. Kumar. „Validated HPLC method for identification and quantification of *p*-hydroxy benzoic acid and agnuside in *Vitex negundo* and *Vitex trifolia*“. In: *Journal of Pharmaceutical Analysis* 3.6 (2013), S. 500–508. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.09.008.
- [106] S. A. Coran, S. Mulas und A. Vasconi. „Profiling of components and validated determination of iridoids in *Gardenia Jasminoides* ellis fruit by a high-performance-thin-layer-chromatography/mass spectrometry approach“. In: *Journal of Chromatography A* 1325 (2014), S. 221–226. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.12.001.
- [107] M. Sertic, M. Crkvencic, A. Mornar, K. Hazler Pilepic, B. Nigovic und Z. Males. „Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species“. In: *Journal of Applied Botany and Food Quality* 88 (2015), S. 209–214. DOI: 10.5073/JABFQ.2015.088.030.
- [108] J. Suomi, H. Siren, K. Hartonen und M. L. Riekkola. „Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar electrokinetic capillary chromatography“. In: *Journal of Chromatography A* 868.1 (2000), S. 73–83.
- [109] P. Pachaly und A. Koch. *DC-Atlas - Dünnschicht-Chromatographie in der Apotheke ; mit 90 Monographien. Grundwerk. 1. Auflage inkl. 6. aktuelle Lieferung.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2015.
- [110] Camag Application Notes. *HPTLC identification of chaste tree fruits (Vitex agnus-castus)*. 2003, F–10C.
- [111] B. Nikolova-Damyanova, E. Ilieva, N. Handjieva und Y. Bankova. „Quantitative thin layer chromatography of iridoid and flavonoid glucosides in species of *Linaria*“. In: *Phytochemical Analysis* 5.1 (1994), S. 38–40. DOI: 10.1002/pca.2800050110.
- [112] A. K. Yadav, N. Tiwari, P. Srivastava, S. C. Singh, K. Shanker, R. K. Verma und M. M. Gupta. „Iridoid glycoside-based quantitative chromatographic fingerprint analysis: a rational approach for quality assessment of Indian medicinal plant gambhari (*Gmelina arborea*)“. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47.4-5 (2008), S. 841–846. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.04.012.
- [113] J. Krzek, Z. Janeczko, D. Walusiak und I. Podolak. „Densitometric determination of aucubin in syrups in the presence of other iridoids: an approach to standardization“. In: *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* 15.3 (2002), S. 196–199. DOI: 10.1556/jpc.15.2002.3.7.

- [114] E. Reich und A. Schibli. *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*. George Thieme Verlag Stuttgart, 2007, S. 234–237.
- [115] Y. P. S. Bajaj. *Medicinal and Aromatic Plants VIII*. Springer Verlag Heidelberg, 1995, S. 153. DOI: 10.1007/978-3-662-08612-4.
- [116] D. C. Albach, C. H. Gotfredsen und S. R. Jensen. „Iridoid glucosides of *Paederota lutea* and the relationships between *Paederota* and *Veronica*“. In: *Phytochemistry* 65.14 (2004), S. 2129–2134. DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.05.022.
- [117] N. Dimov, K. Chervenкова und B. Nikolova-Damyanova. „Retention of iridoid glycosides on octadecylsilane and diol columns“. In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 23.6 (2000), S. 935–947. DOI: 10.1081/JLC-100101500.
- [118] N.-E. Es-Safi, S. Khelifi, A. Kollmann, L. Kerhoas, A. El Abbouyi und P.-H. Ducrot. „Iridoid glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae)“. In: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 54 (2006), S. 85–88. DOI: 10.1248/cpb.54.85.
- [119] N.-E. Es-Safi, L. Kerhoas und P.-H. Ducrot. „Fragmentation study of iridoid glucosides through positive and negative electrospray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry“. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21.7 (2007), S. 1165–1175. DOI: 10.1002/rcm.2930.
- [120] H. Han, A.-Z. Xiong, C.-Y. He, Q. Liu, L. Yang und Z.-T. Wang. „Combination of UHPLC/Q-TOF-MS, NMR spectroscopy, and ECD calculation for screening and identification of reactive metabolites of gentiopicoside in humans“. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406.6 (2014), S. 1781–1793. DOI: 10.1007/s00216-013-7572-z.
- [121] K. Kartini und A. Ma'mur. „Chromatographic fingerprinting and clustering of *Plantago major* L. from different areas in Indonesia“. In: *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5 (2012), S. 191–195.
- [122] B.-H. Kim, N.-K. Lee und I.-M. Chang. „Simultaneous analysis of a mixture of iridoids in water extracts of *Plantago asiatica* L. by LC“. In: *Chromatographia* 69.11-12 (2009), S. 1397–1400. DOI: 10.1365/s10337-009-1069-0.
- [123] C.-M. Li, X.-L. Zhang, X.-Y. Xue, F.-F. Zhang, Q. Xu und X.-M. Liang. „Structural characterization of iridoid glucosides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry“. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22.12 (2008), S. 1941–1954. DOI: 10.1002/rcm.3579.
- [124] Ohne Autor. „Eisenkraut: *Verbenae herba*“. In: *Europäisches Arzneibuch*. 7. Ausgabe inkl. Nachtrag 7.8 - Amtliche deutsche Ausgabe. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2011, S. 1698–1700.

- [125] L. Ren, X. Xue, F. Zhang, Y. Wang, Y. Liu, C. Li und X. Liang. „Studies of iridoid glycosides using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry“. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21.18 (2007), S. 3039–3050. DOI: 10.1002/rcm.3189.
- [126] L. Yang, Y. Wang, L. Wang, H. Xiao, Z. Wang und Z. Hu. „Rapid quantification of iridoid glycosides analogues in the formulated Chinese medicine Longdan Xiegan decoction using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry“. In: *Journal of Chromatography A* 1216.11 (2009), S. 2098–2103. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.06.043.
- [127] H. Zhu, K. Bi, F. Han, J. Guan, Z. Tang, K. Chen, L. Zhao, Q. Li, R. Yin und X. Hou. „Simultaneous determination of two iridoid glycosides, two anthraquinones and four flavonoid glycosides of Zhi-Zi-Da-Huang decoction in rat plasma by UFLC-MS/MS: Application to a comparative pharmacokinetic study in normal and cholestatic liver injury rats“. In: *Journal of Chromatography B* 960 (2014), S. 116–125. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.04.031.
- [128] L. Han, M. Boakye-Yiadom, E. Liu, Y. Zhang, W. Li, X. Song, F. Fu und X. Gao. „Structural characterisation and identification of phenylethanoid glycosides from *Cistanchesdeserticola* Y.C. MA by UHPLC/ESI-QTOF-MS/MS“. In: *Phytochemical Analysis* 23.6 (2012), S. 668–676. DOI: 10.1002/pca.2371.
- [129] V. R. Meyer. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 10. Auflage. Wiley VCH Verlag Weinheim, 2009.
- [130] S. Kromidas. *HPLC richtig optimiert*. 1. Auflage. Wiley VCH Verlag Weinheim, 2006.
- [131] H. Wagner, S. Bladt und E.-M. Zgainski. *Drogenanalyse*. Springer Verlag Heidelberg, 1983, S. 299–305.
- [132] C. E. Mortimer und U. Müller. *Chemie: Das Basiswissen der Chemie. Mit Übungsaufgaben und Lösungen*. George Thieme Verlag Stuttgart, 2001.
- [133] A. Marston und K. Hostettmann. „Counter-current chromatography as a preparative tool —applications and perspectives“. In: *Journal of Chromatography A* 658.2 (1994), S. 315–341. DOI: 10.1016/0021-9673(94)80023-5.
- [134] M.-C. Recio-Iglesias, A. Marston und K. Hostettmann. „Xanthones and secoiridoid glucosides of *Halenia campanulata*“. In: *Phytochemistry* 31.4 (1992), S. 1387–1389. DOI: 10.1016/0031-9422(92)80297-r.
- [135] K. Cammann. *Instrumentelle Analytische Chemie*. 1. Auflage. Spektrum-Akademischer Verlag, 2001.
- [136] P. Stevenson, G. Kite und M. Simmonds. „Pipelicolic acid methyl esters as artefacts from the ion-exchange chromatography of *inga punctata* foliar extracts“. In: *Journal of Chromatography A* 766.1-2 (1997), S. 267–269. DOI: 10.1016/s0021-9673(96)01054-0.

- [137] O. N. Nemereshina, A. A. Tinkov, V. A. Gritsenko und A. A. Nikonorov. „Influence of *Plantaginaceae* species on *E. coli* K12 growth *in vitro*: possible relation to phytochemical properties“. In: *Pharmaceutical Biology* 53.5 (2014), S. 715–724. DOI: 10.3109/13880209.2014.940426.
- [138] A. A. Tinkov, O. N. Nemereshina, E. V. Popova, V. S. Polyakova, V. A. Gritsenko und A. A. Nikonorov. „*Plantago maxima* leaves extract inhibits adipogenic action of a high-fat diet in female Wistar rats“. In: *European Journal of Nutrition* 53.3 (2013), S. 831–842. DOI: 10.1007/s00394-013-0587-6.
- [139] T. V. Suchinina, T. S. Shestakova, V. M. Petrichenko und V. V. Novikova. „Solvent polarity effect on the composition of biologically active substances, UV spectral characteristics, and antibacterial activity of *Euphrasia brevipila* herb extracts“. In: *Pharmaceutical Chemistry Journal* 44.12 (2011), S. 683–686. DOI: 10.1007/s11094-011-0542-x.
- [140] C. Rank, L. S. Rasmussen, S. R. Jensen, S. Pierce, M. C. Press und J. D. Scholes. „Cytotoxic constituents of *Alectra* and *Striga* species“. In: *Weed Research* 44.4 (2004), S. 265–270. DOI: 10.1111/j.1365-3180.2004.00398.x.
- [141] H. F. W. Jensen, S. R. Jensen und B. J. Nielsen. „Chemotaxonomy of the *acanthaceae*. Iridoids and quaternary amines“. In: *Phytochemistry* 27.8 (1988), S. 2581–2589. DOI: 10.1016/0031-9422(88)87029-8.
- [142] T. Endo, H. Taguchi, H. Sasaki und I. Yosioka. „Studies on the constituents of *Aeginetia indica* L. var. *gracilis* NAKAI. Structures of three glycosides isolated from the whole plant.“ In: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 27.11 (1979), S. 2807–2814. DOI: 10.1248/cpb.27.2807.
- [143] H. Kirmizibekmez, E. Ariburnu, M. Masullo, M. Festa, A. Capasso, E. Yesilada und S. Piacente. „Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *sideritis trojana*“. In: *Fitoterapia* 83.1 (2012), S. 130–136. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.10.003.
- [144] D. Wang, M. Qi, Q. Yang, R. Tong, R. Wang, S. A. Bligh, L. Yang und Z. Wang. „Comprehensive metabolite profiling of plantaginis semen using ultra high performance liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry coupled with elevated energy technique“. In: *Journal of Separation Science* 39.10 (2016), S. 1842–1852. DOI: 10.1002/jssc.201501149.
- [145] M. Qi, A. Xiong, F. Geng, L. Yang und Z. Wang. „A novel strategy for target profiling analysis of bioactive phenylethanoid glycosides in *Plantago* medicinal plants using ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem quadrupole mass spectrometry“. In: *Journal of Separation Science* 35.12 (2012), S. 1470–1478. DOI: 10.1002/jssc.201200010.

- [146] T. Deyama, H. Kobayashi, S. Nishibe und P. Tu. „Isolation, structure elucidation and bioactivities of phenylethanoid glycosides from *Cistanche*, *Forsythia* and *Plantago* plants“. In: (2006), S. 645–674. DOI: 10.1016/s1572-5995(06)80036-0.
- [147] M. Wang, S. Fu, X. Zhang, J. Li, M. Gong und F. Qiu. „LC-ESI-MS/MS analysis and pharmacokinetics of plantainoside D isolated from *Chirita longgangensis* var. *hongyao*, a potential anti-hypertensive active component in rats“. In: *Molecules* 19.9 (2014), S. 103–115. DOI: 10.3390/molecules190915103.
- [148] S. Nishibe, K. Okabe, H. Tsukamoto, A. Sakushima und S. Hisada. „The structure of forsythiaside isolated from *Forsythia suspensa*“. In: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 30.3 (1982), S. 1048–1050. DOI: 10.1248/cpb.30.1048.
- [149] D. Ryan, K. Robards, P. Prenzler, D. Jardine, T. Herlt und M. Antolovich. „Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*“. In: *Journal of Chromatography A* 855.2 (1999), S. 529–537. DOI: 10.1016/s0021-9673(99)00719-0.
- [150] F. N. Wang, Z. Q. Ma, Y. Liu, Y. Z. Guo und Z. W. Gu. „New phenylethanoid glycosides from the fruits of *Forsythia Suspense* (THUNB.) VAHL“. In: *Molecules* 14.3 (2009), S. 1324–1331. DOI: 10.3390/molecules14031324.
- [151] R. B. Scherübl. „Qualitative und quantitative Analytik von Pflanzen aus der Traditionellen Chinesischen Medizin am Beispiel von *Artemisiae scopariae herba*, *Saposhnikoviae radix* und *Siegesbeckiae herba*“. Diss. Universität Regensburg, 2014.
- [152] M. Rothenhöfer, R. Scherübl, G. Bernhardt, J. Heilmann und A. Buschauer. „Qualitative and quantitative analysis of hyaluronan oligosaccharides with high performance thin layer chromatography using reagent-free derivatization on amino-modified silica and electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupling on normal phase“. In: *Journal of Chromatography A* 1248 (2012), S. 169–177. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.05.057.
- [153] Merck. *LiChrospher 100 DIOL (5 µm) LiChroCART 250-4*. http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/LiChrospher-100-DIOL-5-m-LiChroCART-250-4,MDA_CHEM-150836. aufgerufen am 05.11.2018. 2018.
- [154] P. Appelblad, T. Jonsson, E. Ponten, C. Viklund und W. Jiang. *A Practical Guide to HILIC*. Techn. Ber. Merck SeQuant AB, Umea, Schweden, 2008.
- [155] B. Grillenberger. *Reversed Phase HPLC Methodenentwicklung mit Phenomenex HPLC-Säulen*. Techn. Ber. Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland, 2016.
- [156] Ohne Autor. „Xuan Shen: *Scrophulariae radix*“. In: *Arzneibuch der chinesischen Medizin*. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2010, S. 398–399.
- [157] M. Friscic, F. Bucar und K. H. Pilepic. „LC-PDA-ESI-MSⁿ analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp.“ In: *Journal of Mass Spectrometry* 51.12 (2016), S. 1211–1236. DOI: 10.1002/jms.3844.

- [158] M. I. Calvo, A. S. Julian und M. Fernández. „Identification of the major compounds in extracts of *Verbena officinalis* L. (Verbenaceae) by HPLC with post-column derivatization“. In: *Chromatographia* 46.5-6 (1997), S. 241–244. DOI: 10.1007/bf02496313.
- [159] J. M. Betz, P. N. Brown und M. C. Roman. „Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research“. In: *Fitoterapia* 82.1 (2011), S. 44–52. DOI: 10.1016/j.fitote.2010.09.011.
- [160] ICH expert working group. „Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)“. In: *ICH harmonised tripartite guideline*. 4. Auflage. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005.
- [161] S. Kromidas. *Validierung in der Analytik*. 2. Auflage. Wiley VCH Verlag Weinheim, 2011.
- [162] ICH expert working group. „Validation of analytical procedures: methodology Q2B“. In: *ICH harmonised tripartite guideline*. 4. Auflage. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 1996.
- [163] W. Gottwald. *Statistik für Anwender*. Wiley-VCH Verlag Weinheim, 2000.
- [164] ohne Autor. *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*. 2002.
- [165] Ohne Autor. *Technical Material and Preparations: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex II (part A, section 4) and Annex III (part A, section 5) of Directive 91/414, SANCO/3030/99, 4. Revision*. Techn. Ber. European Commission, Directorate General Health und Consumer Protection, 2000.
- [166] U. Lipke. „Grundlagen der Validierung von Prüfverfahren für genotoxische Verunreinigungen“. In: *Pharmind* 77.6 (2015), S. 910–919.
- [167] M. Heinrich, R. Daniels, F. C. Stintzing und D. R. Kammerer. „Comprehensive phytochemical characterization of St. John’s wort (*Hypericum perforatum* L.) oil macerates obtained by different extraction protocols via analytical tools applicable in routine control“. In: *Pharmazie* 72.3 (2017), S. 131–138. DOI: 10.1691/ph.2017.6749.
- [168] X.-Q. Li, C. Ji, Y.-Y. Sun, M.-L. Yang und X.-G. Chu. „Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS“. In: *Food Chemistry* 113.2 (2009), S. 692–700. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.072.

- [169] H. Guo, A.-H. Liu, M. Ye, M. Yang und D.-A. Guo. „Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry“. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21.5 (2007), S. 715–729. DOI: 10.1002/rcm.2875.
- [170] N. Amessis-Ouchemoukh, I. M. Abu-Reidah, R. Quirantes-Pine, C. Rodriguez-Perez, K. Madani, A. Fernandez-Gutierrez und A. Segura-Carretero. „Tentative characterisation of iridoids, phenylethanoid glycosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS“. In: *Phytochemical Analysis* 25.5 (2014), S. 389–398. DOI: 10.1002/pca.2506.
- [171] C. Li, Y. Liu, R. Abdulla, H. A. Aisa und Y. Suo. „Characterization and identification of chemical components in *Neopicrorhiza scrophulariiflora* roots by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry“. In: *Analytical Methods* 6.11 (2014), S. 3634–3643. DOI: 10.1039/c4ay00157e.
- [172] Q. Cui, Y. Pan, X. Xu, W. Zhang, X. Wu, S. Qu und X. Liu. „The metabolic profile of acteoside produced by human or rat intestinal bacteria or intestinal enzyme in vitro employed UPLC-Q-TOF-MS“. In: *Fitoterapia* 109 (2016), S. 67–74. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.12.011.
- [173] X. Liao, F. Hu und Z. Chen. „Identification and quantitation of the bioactive components in osmanthus fragrans fruits by HPLC-ESI-MS/MS“. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66.1 (2018), S. 359–367. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b05560.
- [174] A. Millet, F. Stintzing und I. Merfort. „Flavonol quantification and stability of phenolics in fermented extracts from fresh *Betula pendula* leaves“. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53.2 (2010), S. 137–144. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.02.001.
- [175] S. M. Duckstein, P. Lorenz und F. C. Stintzing. „Conversion of phenolic constituents in aqueous *Hamamelis virginiana* leaf extracts during fermentation“. In: *Phytochemical Analysis* 23.6 (2012), S. 588–597. DOI: 10.1002/pca.2359.
- [176] Ohne Autor. „Bestimmung von Wasser durch Destillation“. In: *Europäisches Arzneibuch*. 7. Ausgabe inkl. Nachtrag 7.8 - Amtliche deutsche Ausgabe. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2011, S. 40–41.
- [177] D. N. Knittel, F. C. Stintzing und D. R. Kammerer. „Simultaneous determination of bufadienolides and phenolic compounds in sea squill (*Drimys maritima* (L.) Stearn) by HPLC-DAD-MSⁿ as a means to differentiate individual plant parts and developmental stages“. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406.24 (2014), S. 6035–6050. DOI: 10.1007/s00216-014-8008-0.

- [178] M. Marusteri und V. Bacarea. „Comparing groups for statistical differences: how to choose the right statistical test?“ In: *Biochemia Medica* 20.1 (2010), S. 15–32. DOI: 10.11613/bm.2010.004.
- [179] F. S. Wagner. „Prüfung der Authentizität von Lebensmitteln mittels Time-of-Flight Massenspektrometrie (metabolisches Fingerprinting)“. Vortrag auf dem 35. Analytikforum der Firma Agilent, Wien, Österreich. 2018.
- [180] W. Rumball, R. G. Keogh, G. E. Lane, J. E. Miller und R. B. Claydon. „‘Grasslands lancetot’ plantain (*Plantago lanceolatae* L.)“ In: *New Zealand Journal of Agricultural Research* 40.3 (1997), S. 373–377. DOI: 10.1080/00288233.1997.9513258.
- [181] R. P. Shefferson und D. A. Roach. „The triple helix of *Plantago lanceolatae*: genetics and the environment interact to determine population dynamics“. In: *Ecology* 93.4 (2012), S. 793–802.
- [182] K. Darrow und M. D. Bowers. „Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolatae*“. In: *Journal of Chemical Ecology* 25.1 (1997), S. 1–11.
- [183] S. I. Warwick und D. Briggs. „The genecology of lawn weeds. I. population differentiation in *Poa annua* L. in mosaic environment of bowling green lawns and flower beds“. In: *New Phytologist* 81.3 (1978), S. 711–723. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1978.tb01646.x.
- [184] J. Pallant. *The SPSS Survival Manual*. 6. Auflage. McGraw-Hill Education Ltd, 2016.
- [185] S. M. Duckstein und F. C. Stintzing. „Investigation on the phenolic constituents in *Hamamelis virginiana* leaves by HPLC-DAD and LC-MS/MS“. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401.2 (2011), S. 677–688. DOI: 10.1007/s00216-011-5111-3.
- [186] S. M. Duckstein, E. M. Lotter, U. Meyer, U. Lindequist und F. C. Stintzing. „Phenolic constituents from *Alchemilla vulgaris* L. and *Alchemilla mollis* (BUSER) ROTHM. at different dates of harvest“. In: *Zeitschrift für Naturforschung* 67c (2012), S. 529–540. DOI: 10.1515/znc-2012-11-1201.
- [187] S. M. Duckstein und F. C. Stintzing. „Comprehensive study of the phenolics and saponins from *Helleborus niger* L. leaves and stems by liquid chromatography/tandem mass spectrometry“. In: *Chemistry & Biodiversity* 11.2 (2014), S. 276–298. DOI: 10.1002/cbdv.201300267.
- [188] Ohne Autor. „Spitzwegerichkraut: *Plantaginis lanceolatae* herba“. In: *Deutsches Arzneibuch*. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 1999.