

Bachelor-Arbeit 2009

ENTWICKLUNG EINER NEUEN METHODE ZUR ISOLIERUNG VON ACETYLLUPEOLSÄURE AUS WEIHRAUCHHARZ UND DEREN SOLUBILISIERUNG ZUR APPLIKATION IN BIOLOGISCHEN TESTSYSTEMEN

Auftraggeber : Universität Ulm
Beauftragter : Joëlle Seppey
Dozent, Ulm : Prof. Dr. Thomas Simmet
Dozent, Sitten : Prof. Dr. Frans Zonnevrijle
Ausführungsort : Universität Ulm, Institut für Naturheilkunde & Klinische Pharmakologie
Zeitraum : 4. Mai 2009 – 19. August 2009

Ulm, den 19. August 2009

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit ist eine neue, effiziente Methode zur Isolierung von Acetyllopeolsäure aus Weihrauchharz zu entwickeln. Acetyllopeolsäure ist ein pentacyclisches Triterpen mit der CAS Registriernummer: 934826-48-9. Mittels eines HPLC-Screening Verfahrens wird zu Beginn aus einer Gruppe verschiedener Weihrauchharz Sorten diejenige ermittelt, welche den höchsten Gehalt an Acetyllopeolsäure aufweist. Die primäre Anreicherung erfolgt durch Soxhlet Extraktion wobei Hexan und Methanol als Extraktionsmittel verwendet werden. Nach einer flüssig-flüssig Extraktion, einer Normalphasen Chromatographie an Kieselgel mit einer nassgepackten Trennsäule und einer semi-präparativen Niederdruck-Chromatographie im reversed Phase Modus wird Acetyllopeolsäure mit einer Reinheit >95% isoliert. Mittels nachgeschalteter Umkristallisation oder Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC im reversed Phase Modus wird Acetyllopeolsäure mit einer Reinheit >99.0% erhalten. Zur Überbrückung der Wasserunlöslichkeit dieser Substanz bei Applikation in biologischen Testsystemen, wird eine Komplexierungsmethode mittels Cyclodextrin und alternativ mit Polyvinylpyrrolidon K10 entwickelt.

Schlüsselwörter: Acetyllopeolsäure, Boswelliasäuren, Komplexierung, Cyclodextrin, PVP K10

Abstract

The purpose of this work is to develop a new effective method for the isolation of acetyllopeolic acid from frankincense gum resin. Acetyllopeolic acid is a pentacyclic triterpen and belongs to the group of the boswellic acids (CAS-number: 934826-48-9). With the help of an HPLC-screening method, the frankincense gum resin with the highest amount of acetyllopeolic acid was identified. The primary accumulation was done with a Soxhlet-extraction with hexane and methanol as solvent. After a liquid-liquid extraction, a normal-phased chromatography with silica gel in a wet-packed column and a semi-preparative low pressure chromatography in the reversed phase mode, acetyllopeolic acid is obtained with a purity >95%. A recrystallization or a separation with semi-preparative HPLC in reversed phase mode allow finally reaching a purity >99.0%. Solubilisation of acetyllopeolic acid for the application in water based biological test systems, a complexation method with hydroxypropyl- γ -cyclodextrin and alternatively with polyvinylpyrrolidone K10 was developed.

Keywords: Acetyllopeolic acid, Boswellic acids, Complexation, Cyclodextrin, PVP K10

Résumé

Le but de ce travail est le développement d'une nouvelle méthode efficace pour l'isolation de l'acide acétyllupéolique de la résine d'encens. L'acide acétyllupéolique est un triterpène pentacyclique appartenant au groupe des acides boswelliques (numéro CAS: 934826-48-9). La résine d'encens qui contient la plus grande quantité d'acide acétyllupéolique a été identifiée à l'aide d'une méthode d'HPLC-screening. La première concentration a été effectuée par une extraction Soxhlet avec de l'hexane et du méthanol comme solvants. Après une extraction liquide-liquide, une chromatographie en phase normale avec une colonne remplie, et une chromatographie semi-préparative basse pression en phase inverse, l'acide acétyllupéolique obtenu présente une pureté de plus de 95%. Une recristallisation ou une séparation à l'aide d'HPLC semi-préparative en phase inverse permettent d'atteindre une pureté finale supérieure à 99.0%. Pour contourner le problème de l'insolubilité dans l'eau de l'acide acétyllupéolique et permettre ainsi son application dans des systèmes de tests biologiques, une méthode de complexation avec l'hydroxypropyl- γ -cyclodextrine et alternativement avec du polyvinylpyrrolidone K10 a été développée.

Mots clés: Acide acétyllupéolique, Acides boswelliques, Complexation, Cyclodextrine, PVP K10

Danksagung

Mein Dank geht zu aller erst an Herrn Prof. Dr. Thomas Simmet, der mir die Möglichkeit gegeben hat, eine sehr interessante Bachelor-Arbeit am Institut für Naturheilkunde & Klinische Pharmakologie der Universität Ulm durchzuführen. Ich danke ihm auch noch für die Hilfe, die er mir am Anfang meines Aufenthaltes gegeben hat.

Ich danke Herrn Berthold Büchele für die wertvolle Unterstützung im Labor und vor allem für die Zeit, die er verbracht hat, um meinen Bericht zu korrigieren.

Danke auch an Frau Nadine Bukowski für die Hilfestellung bei der Lösung der vielen kleinen technischen Fragestellungen und besonders für die gute Organisation im Labor.

Ausserdem danke ich dem ganzen Arbeitskreis am Institut für den angenehmen und dynamischen Rahmen während der Durchführung meiner Bachelor-Arbeit.

Danke an alle Leute, die mir geholfen haben, Deutsch besser zu verstehen und zu sprechen.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei allen Professoren der Hochschule Wallis für die gute Ausbildung. Danke an Herrn Dr. Alain-François Grogg, der mich überzeugt hat, meine Bachelor-Arbeit im Ausland anzufertigen. Und besonders bedanke ich mich noch bei Herrn Dr. Frans Zonnevillje, der für mich eine Verbindung mit dem Institut für Naturheilkunde & Klinische Pharmakologie an der Universität Ulm hergestellt hat.

Joëlle Seppey

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT	3
RESUME.....	4
1. EINLEITUNG	5
2. ARBEITSPLAN.....	8
3. EXPERIMENTELLER ABSCHNITT	9
3.1. WEIHRAUCHHARZE.....	9
3.2. MATERIAL.....	9
3.3. CHEMIKALIEN UND TOXIKOLOGIE.....	10
3.4. METHODEN.....	12
3.4.1 Dünnschichtchromatographie.....	12
3.4.2 HPLC-Screening	12
3.4.3 Soxhlet-Extraktion	13
3.4.4 Flüssig-flüssig Extraktion.....	14
3.4.5 Normalphasen Chromatographie an Kieselgel	15
3.4.6 Semi-präparative Niederdruck-Chromatographie	18
3.4.7 Semi-präparative HPLC	20
3.4.8 Umkristallisation.....	22
3.4.9 Charakterisierung der isolierten Acetyllupeolsäure.....	23
3.4.10 Solubilisierung der isolierten Acetyllupeolsäure mit Cyclodextrin.....	25
3.4.11 Mikrosuspension der isolierten Acetyllupeolsäure mit PVP K10	28
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	30
4.1. HPLC-SCREENING.....	30
4.2. SOXHLET-EXTRAKTION.....	31
4.3. FLÜSSIG-FLÜSSIG EXTRAKTION.....	33
4.4. NORMALPHASEN CHROMATOGRAPHIE AN KIESELGEL	36
4.5. SEMI-PRÄPARATIVE NIEDERDRUCK-CHROMATOGRAPHIE	40
4.6. SEMI-PRÄPARATIVE HPLC.....	47
4.7. UMKRISTALLISATION.....	51
4.8. CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN ACETYLLUPEOLSÄURE	52
4.8.1. Physikalische Eigenschaften.....	52
4.8.2. Chemische und biochemische Eigenschaften	54
4.9. SOLUBILISIERUNG DER ISOLIERTEN ACETYLLUPEOLSÄURE MITTELS CYCLODEXTRIN.....	60
4.10. MIKROSUSPENSION DER ISOLIERTEN ACETYLLUPEOLSÄURE MIT PVP K10	63
5. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICKE	64
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	66
7. TABELLENVERZEICHNIS	66
8. GLEICHUNGSVERZEICHNIS	66
9. CHROMATOGRAMMEVERZEICHNIS	67
10. LITERATUR	68

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit ist eine neue, effiziente Methode zur Isolierung von Acetyllopeolsäure aus Weihrauchharz zu entwickeln. Acetyllopeolsäure ist ein pentacyclisches Triterpen mit der CAS Registriernummer: 934826-48-9. Mittels eines HPLC-Screening Verfahrens wird zu Beginn aus einer Gruppe verschiedener Weihrauchharz Sorten diejenige ermittelt, welche den höchsten Gehalt an Acetyllopeolsäure aufweist. Die primäre Anreicherung erfolgt durch Soxhlet Extraktion wobei Hexan und Methanol als Extraktionsmittel verwendet werden. Nach einer flüssig-flüssig Extraktion, einer Normalphasen Chromatographie an Kieselgel mit einer nassgepackten Trennsäule und einer semi-präparativen Niederdruck-Chromatographie im reversed Phase Modus wird Acetyllopeolsäure mit einer Reinheit >95% isoliert. Mittels nachgeschalteter Umkristallisation oder Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC im reversed Phase Modus wird Acetyllopeolsäure mit einer Reinheit >99.0% erhalten. Zur Überbrückung der Wasserunlöslichkeit dieser Substanz bei Applikation in biologischen Testsystemen, wird eine Komplexierungsmethode mittels Cyclodextrin und alternativ mit Polyvinylpyrrolidon K10 entwickelt.

Schlüsselwörter: Acetyllopeolsäure, Boswelliasäuren, Komplexierung, Cyclodextrin, PVP K10

Abstract

The purpose of this work is to develop a new effective method for the isolation of acetyllopeolic acid from frankincense gum resin. Acetyllopeolic acid is a pentacyclic triterpen and belongs to the group of the boswellic acids (CAS-number: 934826-48-9). With the help of an HPLC-screening method, the frankincense gum resin with the highest amount of acetyllopeolic acid was identified. The primary accumulation was done with a Soxhlet-extraction with hexane and methanol as solvent. After a liquid-liquid extraction, a normal-phased chromatography with silica gel in a wet-packed column and a semi-preparative low pressure chromatography in the reversed phase mode, acetyllopeolic acid is obtained with a purity >95%. A recrystallization or a separation with semi-preparative HPLC in reversed phase mode allow finally reaching a purity >99.0%. Solubilisation of acetyllopeolic acid for the application in water based biological test systems, a complexation method with hydroxypropyl- γ -cyclodextrin and alternatively with polyvinylpyrrolidone K10 was developed.

Keywords: Acetyllopeolic acid, Boswellic acids, Complexation, Cyclodextrin, PVP K10

Résumé

Le but de ce travail est le développement d'une nouvelle méthode efficace pour l'isolation de l'acide acétyllupéolique de la résine d'encens. L'acide acétyllupéolique est un triterpène pentacyclique appartenant au groupe des acides boswelliques (numéro CAS: 934826-48-9). La résine d'encens qui contient la plus grande quantité d'acide acétyllupéolique a été identifiée à l'aide d'une méthode d'HPLC-screening. La première concentration a été effectuée par une extraction Soxhlet avec de l'hexane et du méthanol comme solvants. Après une extraction liquide-liquide, une chromatographie en phase normale avec une colonne remplie, et une chromatographie semi-préparative basse pression en phase inverse, l'acide acétyllupéolique obtenu présente une pureté de plus de 95%. Une recristallisation ou une séparation à l'aide d'HPLC semi-préparative en phase inverse permettent d'atteindre une pureté finale supérieure à 99.0%. Pour contourner le problème de l'insolubilité dans l'eau de l'acide acétyllupéolique et permettre ainsi son application dans des systèmes de tests biologiques, une méthode de complexation avec l'hydroxypropyl- γ -cyclodextrine et alternativement avec du polyvinylpyrrolidone K10 a été développée.

Mots clés: Acide acétyllupéolique, Acides boswelliques, Complexation, Cyclodextrine, PVP K10

1. Einleitung

Die Pflanze, welche in dieser Arbeit untersucht wird, stammt aus der Gattung *Boswellia*. Es gibt viele verschiedene Sorten von *Boswellia*, welche an verschiedenen Orten wachsen. Zum Beispiel, in Südarabien findet man den arabische Weihrauchbaum *Boswellia sacra*, in Somalia sind zwei wesentliche Spezies beheimatet: *Boswellia carterii* und *Boswellia frereana* und in Indien findet man *Boswellia serrata*. Das Gummiharz des Weihrauchbaumes bildet sich durch Einschneiden der Baumrinde in den Monaten März und April. Dadurch tritt der Milchsaft der Rinde aus und verfestigt sich an der Luft zu einem Gummiharz. Das Harz kann von klarer karamellartiger bis zu schwarzer Farbe sein. [1]

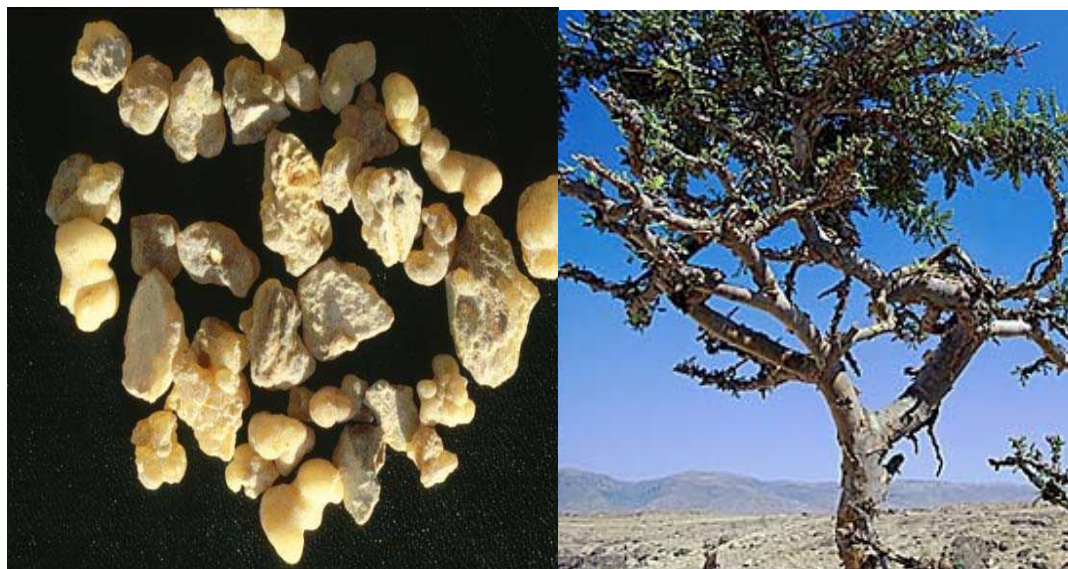


Abbildung 1: Weihrauchharz und Baum von *Boswellia carterii* [2]

Der Gattungsname *Boswellia* erinnert an Johann Boswell aus Edinburgh, der im Jahre 1735 eine Schrift über Ambra verfasste. Hier ist die klassische Klassifikation dieser Pflanze, welche den wissenschaftlichen Namen *Boswellia sacra* Flueck. oder *Boswellia carterii* Birdw. besitzt:

Tabelle 1: Klassische Klassifikation von der Gattung *Boswellia* [3]

Herrschaft	<i>Plantae</i>
Klasse	<i>Rosopsida</i>
Unterklasse (Klad 1)	<i>Rosidae</i>
Klad 2	eudicot
Klad 3	rosid
Ordnung	<i>Sapindales</i>
Familie	<i>Burseraceae</i>
Gattung	<i>Boswellia</i>

Weihrauch wurde schon seit langer Zeit bei religiösen Riten benutzt. Schon im 4. bis 5. Jahrhundert v. u. Z. waren Rauchopfer bei fast allen damaligen Religionen praktiziert worden. In dem alten Ägypten (5. Dynastie, etwa 2455-2443 v. U. Z.) wurde Weihrauchharz als Räuchermittel angewandt. Sie brauchten aber auch Weihrauch um dreimal täglich der Sonne ein Räucheropfer zu bringen. Die griechische Geschichte erzählt auch, dass im Tempel der Isis dreimal täglich geraucht wurde: morgens vermutlich mit Olibanum, mittags mit Myrrhe und abends mit „Kyphi“. Auch die Heiligen Drei Könige hatten damals nach christlicher Überlieferung neben Gold und Myrrhe dem Christuskind Weihrauch gebracht.

In Afrika beräuchert man noch heute die Räume mit Weihrauch, um sich gegen Malaria zu schützen. Damit sollen die fieberübertragenden Moskitos aus den Zimmern vertrieben werden. In verschiedenen Anwendungen ist Weihrauch als Parfüm eingesetzt worden, und einige südarabische Frauen setzen sich über Weihrauchbrenner, um ihre Fruchtbarkeit zu steigern. Weihrauchpulver ist auch zur Gesichts- und Körperpflege verwendet worden. Aber vor allem ist Weihrauchharz als Arzneimittel angewandt worden. Schon in der Medizin des klassischen Altertums und des Mittelalters hatte Weihrauchharz breite Anwendungen gefunden, wie z. B. seine speziellen Wirkungen als Stimulans, Antikatarrhale und Mittel gegen Diarrhoe. Heute werden auch vielfältige andere Krankheitssymptome, wie z. B. Tumor, mit Weihrauch versucht zu therapieren. [1]

Einige der wichtigsten Verbindungen im Weihrauchharz sind die Boswelliasäuren. Sie gehören zur Gruppe der pentazyklischen Triterpene, welche aus sechs Einheiten aktivem Isopren aufgebaut sind und somit aus 30 C-Atomen bestehen. Es gibt α und β -konfigurierte als auch deacetylierte und acetylierte Boswelliasäuren. [4]

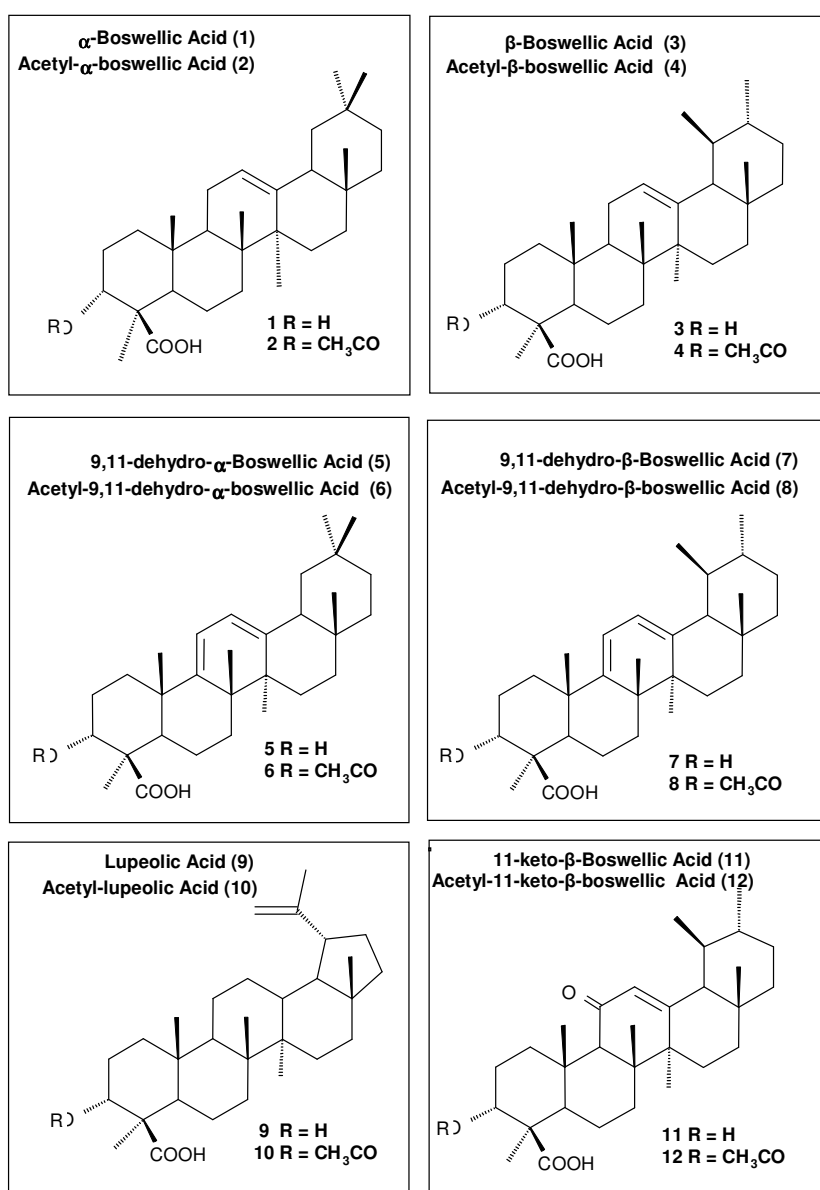


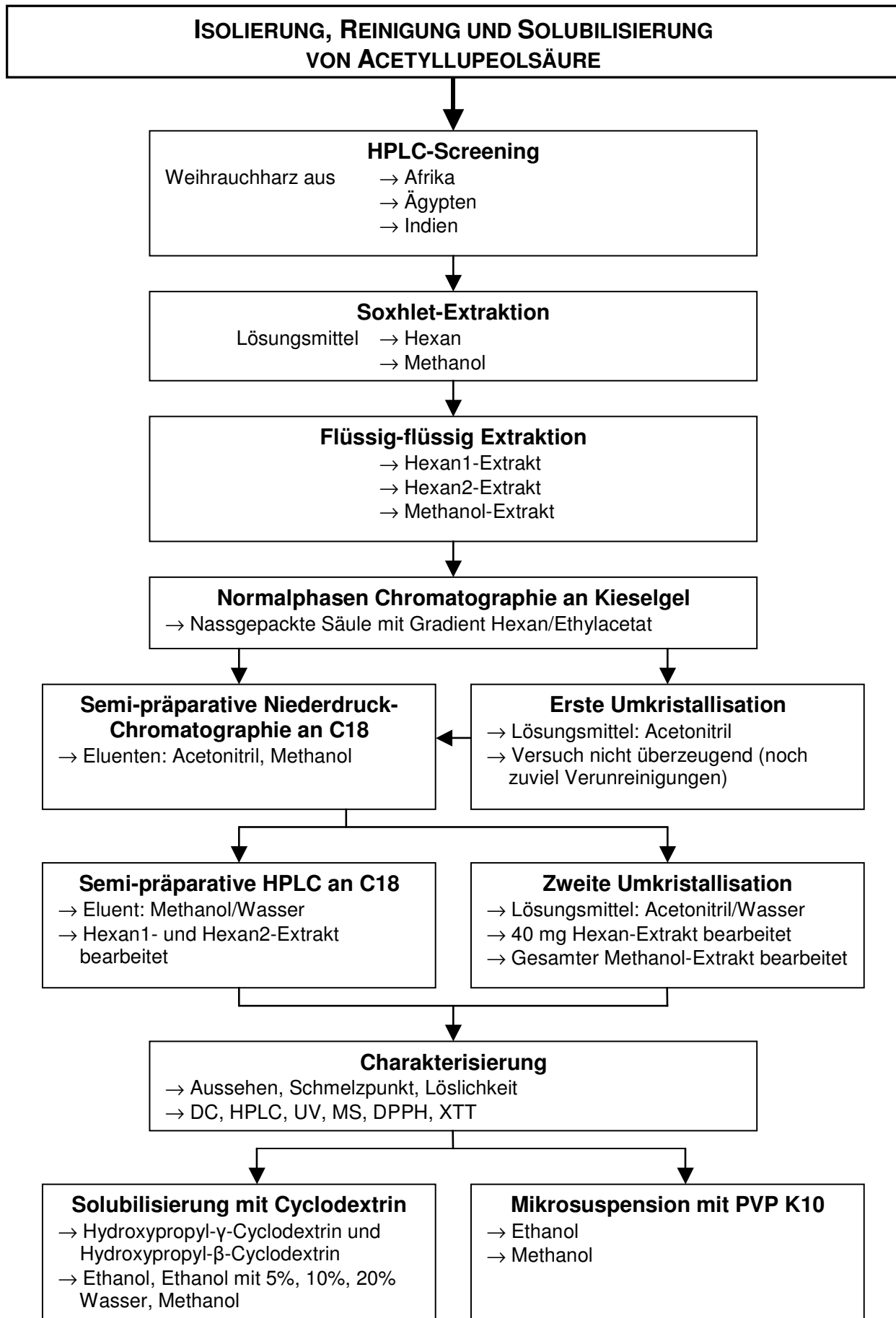
Abbildung 2: Strukturformeln von Boswelliasäuren [5]

Charakteristische biochemische Eigenschaften einiger dieser pentazyklischen Triterpene sind ihre antientzündliche und tumorhemmende Wirkung, welche in zahlreichen Arbeiten dokumentiert sind. [6-8] Von den bekannten Boswelliasäuren hat sich reine Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure als die bisher wirksamste Komponente und am weitestgehendsten untersuchte Verbindung etabliert. In der alternativen Tumorthherapie werden bis jetzt keine Reinsubstanzen, sondern spezielle Weihrauchharz Extrakte eingesetzt.

In dieser Arbeit soll mittels einer neuen Isolierungsmethode Acetyllopeolsäure isoliert werden. (Abbildung 2, Struktur Nr.10) Zu Beginn, wird im Rahmen eines HPLC-Screening Verfahrens, diejenige Weihrauchharz Sorte mit dem höchsten Gehalt an dieser gesuchten Boswelliasäure ermittelt. Die primäre Anreicherung erfolgt mittels einer Soxhlet Extraktionstechnik, gefolgt von Normalphasen Chromatographie an Kieselgel und reversed Phase Chromatographie in LPLC bzw. HPLC Technik. Nach erfolgter Isolation und Struktur Bestätigung soll die wasserunlösliche Acetyllopeolsäure in eine wasserlösliche biokompatible Applikationsform überführt werden. Zur Auswahl stehen eine Cyclodextrin Komplexierung oder PVP Mikrosuspensionstechnik.

Die biochemische Wirksamkeit dieser Boswelliasäure ist bisher noch sehr wenig untersucht worden. Mittels einer neuen effektiven Isolierungsmethode soll diese Säure deshalb aus Weihrauchharz isoliert werden, um genügend Substanz für die benötigten biochemischen Test zur Verfügung zu haben.

2. Arbeitsplan



3. Experimenteller Abschnitt

3.1. Weihrauchharze

Drei verschiedene Weihrauchharze standen für diese Arbeit zur Verfügung. Sie stammen aus Afrika, Ägypten und Indien:

- *Boswellia carterii* Olibanum elect. in granis EB 6, Ch.-B.:96-02-16, (Heinrich Klenk, Schwebheim)
- Weihrauchharz aus Ägypten, (ohne Chargen Angabe)
- *Boswellia serrata* Extrakt, BSE-018-0001/B-2, von Biomex

3.2. Material

Ausser den standardmässig vorhandenen Labor-Geräten sind folgende Materialien für die Durchführung dieser Arbeit verwendet worden:

- Dünnschichtchromatographie
 - Platten: - Kieselgel 60 F₂₅₄, 10x10 cm, Merck 1.05629, Deutschland
 - RP-18 WF_{254s}, 10x10 cm, Merck 1.13124,0001, Deutschland
 - Nano Kieselgel C2, UV₂₅₄, 10x10 cm, Macherey-Nagel 612400, Deutschland
 - Diol F254s, 10x10 cm, Merck 12668, Deutschland
 - RP-8, 10x10 cm, Merck 1.137259, Deutschland
 - CN F254s, 10x10 cm, Merck 1.16464, Deutschland
 - Probenapplikator für DC-Platten: Camag Nanomat III, Deutschland
 - DC Doppeltrog-Kammer für 10 x 10 cm Platten, Camag, Deutschland
 - Heizplatte: Ceran 500, Ni.-Cr.-Ni. electronic, Typ 11A, LHG, Deutschland
- Soxhlet-Extraktion
 - 250 ml Soxhlet-Extraktor mit 500 ml Rundkolben und Extraktionshülse
- Semi-präparative Niederdruck-Chromatographie
 - Trennsäule: Lichrospher® 100 RP-18 (12 µm) , 150 mm x 20 mm, Merck, Deutschland
 - Pumpe: Sykam, S1121 Solvent Delivery System
 - Detektor: Gynkotec Typ SP-6, Deutschland
 - Schreiber: Kipp & Zonen, BD40, Holland
 - Fraktions-Sammler: Gilson Abimed, Modell 201, France
- Semi-präparative HPLC
 - Trennsäule: Reprosil-Pur ODS-3, 250 x 8 mm, Partikel Grösse 5 µm, Dr. Maisch GmbH, Deutschland
 - Injektor: Manuelles Injektionsventil, 6 Wege, mit 200 µl Dosierschleife, typ Valco, Schweiz
 - Binäres Hochdruckgradienten System: Shimadzu, Liquid Chromatograph LC-9A, Deutschland
 - Detektor: Dioden Array Detektor, UVD 340U, Dionex, Idstein (DE)
 - Auswertesystem: Chromeleon, Version 6.60 SP1a, Dionex, Idstein (DE)
 - Fraktions-Sammler: Gilson Abimed, Modell 201, France

- Analytische HPLC
 - Trennsäule: Reprosil-Pur ODS-3, 250 x 3 mm, Partikel Grösse 5 µm, Dr. Maisch GmbH, Deutschland
 - Injektor: ASPEC XL Abimed Gilson
 - Pumpe: Shimadzu, Liquid Chromatograph LC-9A, Deutschland
 - Ternäres Niederdruckgradienten System: Shimadzu, Deutschland
 - Detektor: Dioden Array Detektor, Dionex UVD 340U, Idstein (DE)
 - Auswertesystem: Chromeleon, Version 6.60 SP1a, Dionex, Idstein (DE)
- Mikropipetten:
 - 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl: Gilson, Pipetman, France
 - 5000 µl: Eppendorf Research, France
- Waagen:
 - MC1, Laboratory LC 4200, Max: 4200 g, Min: 25 g, d=0.1 g, e=0.5 g, Sartorius, Deutschland
 - Mettler AE160, Max: 162 g, Min: 50 mg, d_d=0.1 mg, e=1 mg, Deutschland
 - Sartorius BP210D, Max: 210 g, Min: 1 mg, d=0.01 mg (80 g) / 0.1 mg (210 g), e=1 mg, Deutschland
- Zentrifuge:
 - Biofuge fresco, Heraeus sepatech, Deutschland
 - Megafuge 1.0R, Heraeus sepatech, Deutschland
- Scheidetrichter 1 l
- Glas-Säule: Länge 200 mm, Innen Durchmesser 17 mm
- Rotationsverdampfer: Rotavapor RE120, Büchi, Schweiz
- Ultraschallbad: Transsonic TS540, Elma, Deutschland
- Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Schweiz
- Lyophilisator: Lyovac GT 2, Finn-Aqua, Deutschland, mit Pumpe AEG Typ AMM7IZBA4 (EU)
- Schmelzpunktbestimmungsgerät: Gallenkamp, Cat Nr. MPD350.BM2.5, VWR, Deutschland
- XTT-Test-Kit: Cat. Nr. 1 465 015, Roche, Deutschland
- Filter: Minisart RC4, Produkt Nr. 17822K, Membran 0.45 µm, Sartorius stedim biotech, Deutschland

3.3. Chemikalien und Toxikologie

Die folgenden Chemikalien sind für diese Arbeit benutzt worden:

Tabelle 2: Chemikalien und Toxikologie

Substanz Qualität	Summenformel	Lieferant Artikelnummer	Toxikologie
Acetonitril, LiChrosolv	CH ₃ CN	Merck (DE) 1.00030.2500	Leichtentzündlich, giftig
Chlorwasserstoff, 37%	HCl	Analar Normapur (DE) 20 252.290	Ätzend
Dichlormethan, 99.5%	CH ₂ Cl ₂	Roth (DE) 8424.2	Gesundheitsschädlich
Dimethylsulfoxid, puriss	C ₂ H ₆ OS	Fluka (DE) 41647	-

Substanz Qualität	Summenformel	Lieferant Artikelnummer	Toxikologie
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, 95%, freies Radikal	$C_{18}H_{12}N_5O_6 \cdot xH_2O$	Aldrich (DE) D211400	Gesundheitsschädlich
Essigsäure, 96% p. a.	CH_3COOH	Merck (DE) 1.00062.2500	Ätzend
Ethanol, LiChrosolv	C_2H_5OH	Merck (DE) 1.11727.2500	Leichtentzündlich
Ethanol, p. a.	C_2H_5OH	Merck (DE) 1.00983.2500	Leichtentzündlich
Ethylacetat, LiChrosolv	$CH_3COOC_2H_5$	Merck (DE) 1.00868.2500	Leichtentzündlich, reizend
Ethylacetat, zur Synthese	$CH_3COOC_2H_5$	Merck (DE) 8.22277.2500	Leichtentzündlich, reizend
n-Hexan, 95%	C_6H_{14}	AppliChem (DE) A1621,2500	Leichtentzündlich, umweltgefährlich, gesundheitsschädlich
n-Hexan, LiChrosolv	C_6H_{14}	Merck (DE) 1.04391.2500	Leichtentzündlich, umweltgefährlich, gesundheitsschädlich
(2-Hydroxypropyl)- β - Cyclodextrin	$C_{45}H_{76}O_{36}$	Fluka (DE) 56332	-
Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin	$C_{51}H_{86}O_{41}$	Wacker (DE) Cavasol W8 HP Pharma	-
Isotonische Kochsalzlösung, 0.9% Natriumchlorid	$NaCl$	Fresenius Kabi (DE) 14BA33	-
Kieselgel, Pore 60 Å, Partikel 0.040-0.063 mm	SiO_2	Macherey-Nagel (DE) 815380	-
Methanol, LiChrosolv	CH_3OH	Merck (DE) 1.06007.2500	Leichtentzündlich, giftig
Methanol, puriss p. a.	CH_3OH	Sigma-Aldrich (DE) 32213	Leichtentzündlich, giftig
Natriumhydroxid, puriss p. a.	$NaOH$	Merck (DE) 1.05033	Ätzend
Natriumsulfat, puriss p. a.	Na_2SO_4	Merck (DE) 1.06603.1000	-
Polyvinylpyrrolidone K10	$(C_6H_9NO)_x$	Sigma-Aldrich (DE) PVP10	-
Schwefelsäure, p. a. 95-97%	H_2SO_4	Merck (DE) 1.00731.2500	Ätzend, umweltgefährlich
Wasser, Milli-Q	H_2O	Ultra-pure Water System, Millipore (FR)	-

3.4. Methoden

3.4.1 Dünnschichtchromatographie

Mittels Dünnschichtchromatographie ist es möglich, jeden Arbeitsschritt schnell und präzise zu kontrollieren. Damit kann untersucht werden, ob sich Acetyllopeolsäure in unsere Probe befindet. Zu diesem Zweck ist eine TLC Trennplatte und eine geeignete mobile Phase welche eine effiziente Trennung erlaubt nötig.

Verschiedene stationäre TLC Phasen sind untersucht worden: SiO₂, C2, C8, C18, CN und C-diol. Mit Acetyllopeolsäure und Deacetyllopeolsäure als Standard kann die Trennung kontrolliert werden. Von den Probelösungen werden jeweils 1 µl im Abstand von 1 cm vom unteren Platten Rand auf die TLC Platten aufgetragen. Zur Startpunktoptimierung wird das Probelösungsmittel mittels Stickstoff entfernt. Die DC-Kammer wird mit 10 ml Eluent befüllt und mit einem Filterpapier Streifen zur Dampfraum-Sättigung ausgekleidet. Die gesamte Laufstrecke der mobilen Phase wird auf 5 cm festgelegt, wodurch eine effektive Trennstrecke von 4 cm resultiert.

Die Detektion erfolgt zuerst unter UV Licht bei 254 nm. Anschliessend werden die DC-Platten intensiv mit einer Lösung bestehend aus 10% Schwefelsäure und 90% Ethanol besprüht. Die Platten werden dann 5 Minuten bei 150°C über einer Heizplatte erhitzt. Nach erfolgter Derivatisierung sind die pentazyklischen Triterpene bei 365 nm unter Fluoreszenz Ausbildung sichtbar.

3.4.2 HPLC-Screening

Das Ziel eines HPLC-Screening ist, die drei verschiedenen Weihrauchharz Sorten auf deren Gehalt an Acetyllopeolsäure zu überprüfen. Diejenige mit dem höchsten Gehalt an dem gesuchten pentazyklischen Triterpen wird zur weiteren Aufarbeitung verwendet.

3.4.2.1 Probenvorbereitung

Etwa 2 g der verschiedenen Weihrauchharze werden in einem Mörser zerkleinert. Dann werden etwa 400 mg in einen kleinen Rezipient aus Glas abgewogen, und 6 ml Ethanol zugegeben. Bei Raumtemperatur wird anschliessend 40 min unter rühren extrahiert. Danach bringt man die Suspension in Zentrifugegefässe um während 10 Minuten, bei 20°C und 4000 rcf zu zentrifugieren. Man gibt anschliessend 40 µl des Zentrifugates in ein Probengeber Gefäss und engt mit Stickstoff bei 70°C zur Trockene ein und löst in 120 µl DMSO auf.

3.4.2.2 HPLC Methode [5]

Trennsäule : Reprosil Pur ODS-3, 5 µm, 250 x 3 mm
Temperatur : 28°C
Flussrate : 0.56 ml/min

Eluent (v/v) :	<u>Methanol</u>	<u>Wasser</u>	<u>Essigsäure</u>
A :	80	20	0.2
B :	100	-	0.2

Gradient <i>File1</i> :	<u>Zeit [min]</u>	<u>A [%]</u>	<u>B [%]</u>	<u>Fluss [ml/min]</u>
	0.1	62	38	0.56
	20.0	51	49	0.56
	35.0	39	61	0.56
	40.0	32	68	0.56
	45.0	31	69	0.56
	50.0	10	90	0.56
	50.1	10	90	0.80
	50.9	10	90	0.90
	55.0	0	100	0.56
	60.0	62	38	0.56

Injiziert : 65 µl
Druck : ca 130 bar
Wellenlängen : 210 nm, 250 nm und 280 nm

3.4.3 Soxhlet-Extraktion

Das Ziel einer Soxhlet-Extraktion ist, die Verbindungen, welche uns interessieren, aus dem Weihrauchharz zu extrahieren. Der Vorteil dieser Extraktions Methode ist, dass man zyklisch extrahieren kann, d. h. bei jedem neuen Durchgang liegt frisches Lösungsmittel vor.

3.4.3.1 Probenvorbereitung

Etwa 60 g Weihrauchharz aus Afrika (*Boswellia carterii*) werden gewogen und bei -80 °C abgekühlt. Dann werden 40 g in einen abgekühlten Mörser zerkleinert.

3.4.3.2 Soxhlet-Extraktor

Zuerst wird unten in die Extraktionshülse Watte eingefügt, anschliessend 33 g Weihrauchharz Pulver zugegeben und wieder mit Watte verschlossen. In einem 500 ml Rundkolben werden 300 ml Extraktionsmittel vorgelegt und auf 90 °C erhitzt. In der Literatur findet man Angaben, dass nach 3 Stunden die Extraktion vollständig ist. [5] In dieser Arbeit ist aufgrund von unterschiedlichen Weihrauchharz Sorten abweichend davon eine Extraktionszeit von 5 Stunden verwendet worden.

3.4.3.3 Lösungsmittel

Zwei Lösungsmittel sind geprüft worden: Hexan und Methanol. In die Literatur ist beschrieben, dass bei Verwendung von Hexan als Lösungsmittel die Extrakt Ausbeute niedriger ist, als mit polareren Lösungsmitteln. [5] Dies hat den Vorteil, dass bei der späteren Aufreinigung mit weniger Matrix Belastung gearbeitet werden kann. Als Alternative wird mit dem polaren Lösungsmittel Methanol extrahiert.

3.4.3.4 Analytische Kontrolle

Die zwei Extrakte (Hexan und Methanol) werden mittels Dünnschichtchromatographie (C18 mit Eluent Methanol/Wasser 9:1 (v/v) und SiO₂ mit Eluent Hexan/Aceton 7:3 (v/v), und HPLC (Gradient *File1*) analysiert.

3.4.4 Flüssig-flüssig Extraktion

Die flüssig-flüssig Extraktion ermöglicht viele störende Begleitkomponenten zu eliminieren. Dabei ist es auch möglich, die Boswelliasäuren, welche uns interessieren, gezielt zu beeinflussen. Diese Säuren haben eine -COOH -Gruppe, die im Gleichgewicht mit den dissoziierten Formen COO^- und H^+ steht. Dazu gibt man zuerst NaOH in den Extrakt um die polare Gruppe COO^- zu favorisieren. Dann gibt man Wasser zu, um die polaren Moleküle zu lösen. Anschliessend wird die Wasser-Phase mit HCl angesäuert und die unpolare COOH -Form bildet sich wieder, welche dann in ein organisches Lösungsmittel – Dichlormethan – zurückextrahiert wird.

3.4.4.1 Probenvorbereitung

Der gesamte Extrakt aus der Soxhlet-Extraktion mit Hexan (8.0 g) wird in 100 ml Hexan aufgelöst. Die Ausbeute von 19.1 g-Extrakt aus der Methanol Extraktion wird mit 100 ml Methanol gelöst.

3.4.4.2 Flüssig-flüssig Extraktion

Zuerst erfolgt für beide Extrakte die gleiche Behandlung: Mit methanolischer Natriumhydroxid-Lösung (10% NaOH in Methanol) wird ein pH-Wert von etwa 14 eingestellt. In einen 1L-Scheidetrichter werden dann 200 ml Wasser dazugegeben und intensiv geschüttelt. Die Phasentrennung ist aufgrund der komplexen Weihrauch Matrix nicht sehr schnell. Also wurde folgende Variation eingebaut:

- Mit der einen Hälfte des Hexan-Extraktes (etwa 150 ml) wartet man bis zwei Phasen auftreten. Dieser Teil heisst Hexan1.
- Zu der anderen Hälfte bringt man in einen anderen Scheidetrichter 20 ml Methanol um die Phasentrennung zu beschleunigen. Dieser Teil heisst Hexan2.

Die erste Hexan-Phase trennt sich sehr langsam, während bei Hexan2 die Phasentrennung deutlich schneller erfolgt. Insgesamt wird noch zwei Mal mit 100 ml H_2O extrahiert. Alle Wasser-Phasen werden gesammelt und anschliessend weiter aufbereitet.

- Zu dem Methanol-Extrakt gibt man 100 ml Hexan, um zwei Phasen zu bekommen. Danach extrahiert man noch 2 Mal mit 100 ml Hexan. Die Hexan-Phasen werden zusammen gesammelt.

Dann werden alle drei Wasser-Phasen mit einer Chlorwasserstoff-Lösung (10% HCl in Wasser) auf einen pH-Wert von etwa 2 gebracht. Die Lösungen werden weisslich trübe aufgrund der Fällung von Boswelliasäuren. Diese sauren Wasser-Phasen werden drei Mal mit 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethan-Phasen von jedem Extrakt werden vereint und mit Natriumsulfat getrocknet. Mittels Rotationsverdampfer wird Dichlormethan entfernt.

3.4.4.3 Analytische Kontrolle

Die drei Extrakte und alle weiteren Phasen werden mit Dünnschichtchromatographie (C18 mit Eluent Methanol/Wasser 9:1 (v/v) und SiO_2 mit Eluent Hexan/Aceton 7:3 (v/v), und HPLC (Gradient *File1*) überprüft.

3.4.5 Normalphasen Chromatographie an Kieselgel

Mittels einer nassgepackten Kieselgel Säule und einem speziellen Lösungsmittelgradient, werden einzelne Fraktionen mit unterschiedlichen Substanz Mustern erhalten. Damit kann auch Acetyllopeolsäure von anderen Substanzen, die uns nicht interessieren, getrennt werden. Der Gradient ist der Literatur angelehnt worden. [9]

3.4.5.1 Säule-Packung

Die benutzte Glas-Säule hat eine Länge von 200 mm und einen Innen Durchmesser von 17 mm. Sie wird mit 10.0 g Kieselgel, suspendiert in 30 ml Hexan, gepackt. Dann werden 40 ml Hexan über eine Dosiereinrichtung über die Säule gebracht, mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 0.6 ml/min. Wenn das Lösungsmittel etwa 2 mm über Kieselgel Oberfläche ist, kann die Probe aufgegeben werden.

3.4.5.2 Versuche

Erster Versuch

Eine Probe von 100 mg Hexan1-Extrakt gelöst in 1 ml Hexan/Ethylacetat 9:1 (v/v), und 400 mg in 1 ml Hexan/Ethylacetat 9:1 (v/v) werden fraktioniert. Die Fraktionsgrösse beträgt zunächst jeweils 40 ml.

Der Gradient hat folgende Zusammensetzung:

- 1) Hexan 100%
- 2) Hexan/Ethylacetat 90:10 (v/v)
- 3) Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v)
- 4) Hexan/Ethylacetat 70:30 (v/v)
- 5) Hexan/Ethylacetat 60:40 (v/v)
- 6) Hexan/Ethylacetat 50:50 (v/v)
- 7) Hexan/Ethylacetat 10:90 (v/v)

Mittels Vakuumpumpe wird eine konstante Durchflussgeschwindigkeit von 1.8 ml/min eingestellt.



Abbildung 3:
Nassgepackte Säule

Zweiter Versuch

Eine Probe von 100 mg Hexan1-Extrakt gelöst in 1 ml Hexan/Ethylacetat 9:1 (v/v), und von 400 mg Hexan1-Extrakt in 1 ml Hexan/Ethylacetat 9:1 (v/v), werden fraktioniert. Die erste Fraktion beträgt 40 ml Lösungsmittel die restlichen jeweils 20 ml.

Der Gradient hat folgende Zusammensetzung:

- 1) Hexan/Ethylacetat 90:10 (v/v)
- 2A+B) Hexan/Ethylacetat 85:15 (v/v)
- 3A+B) Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v)
- 4A+B) Hexan/Ethylacetat 75:25 (v/v)
- 5A+B) Hexan/Ethylacetat 70:30 (v/v)
- 6A+B) Hexan/Ethylacetat 65:35 (v/v)

Jede Fraktion wird mittels Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand ist in 1 ml Methanol, mit Hilfe von Wärme und Ultraschallbad gelöst. Die Fraktionen werden zur Charakterisierung mittels TLC und HPLC untersucht.

Dritter Versuch

Folgendes Protokoll ist für die weitere Aufarbeitung gültig. Die Einwaage für jede Fraktionierung beträgt 400 mg Extrakt. Für die erste und die dritte Fraktionen werden 40 ml Lösungsmittel benötigt, während die 2. Fraktion in 2 mal 20 ml aufgeteilt wird. Von der zweiten Fraktion wird nur die 2B gesammelt. Für die Isolierung von Acetyllopeolsäure werden Fraktion 2B und Fraktion 3 aktiv verwendet.

Der Gradient:

- 1) Hexan/Ethylacetat 90:10 (v/v)
- 2A+B) Hexan/Ethylacetat 85:15 (v/v)
- 3) Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v)

Der restliche Teil von Hexan1, das heisst 1.1 g Extrakt, wird in 2.5 ml Hexan/Ethylacetat 9:1 (v/v) gelöst. Jede Fraktion wird mittels Rotationsverdampfer eingeeengt und im Kühlschrank bis zur Aufarbeitung gelagert.

Dieses Protokoll ist für die gesamte weitere Aufreinigung von Hexan2-Extrakt verwendet worden. Für die Aufarbeitung des Methanol-Extraktes wird zunächst versucht, mit der bisher für den Hexan-Extrakt optimierten Fraktionierungsmethode zu arbeiten.

3.4.5.3 Analytische Kontrolle

Dünnschichtchromatographie

Die verwendeten stationären Phasen sind C18 und Kieselgel. Für C18 wird der Eluent Methanol/Wasser 9:1 (v/v) verwendet, und für Kieselgel Hexan/Aceton 7:3 (v/v). Von den Probelösungen wird jeweils 1 µl aufgetragen.

HPLC-Methode

Trennsäule : Reprosil Pur ODS-3, 5 µm, 250 x 3 mm
Temperatur : 28 °C
Flussrate : 0.56 ml/min

Eluent (v/v) :	<u>Methanol</u>	<u>Wasser</u>	<u>Essigsäure</u>
A :	80	20	0.2
B :	100	-	0.2

Gradient <i>File3</i> :	<u>Zeit [min]</u>	<u>A [%]</u>	<u>B [%]</u>	<u>Fluss [ml/min]</u>
	0.1	40	60	0.56
	3.0	40	60	0.56
	25.0	20	80	0.56
	28.0	5	95	0.56
	30.0	5	95	0.56
	34.0	40	60	0.56

Injiziert : 50 µl
Druck : ca 120 bar
Wellenlängen : 210 nm, 250 nm und 280 nm

Die methanolische Probelösung wird 1:10 mit Eluent A verdünnt, und wenn notwendig, vor der Injektion filtriert.

3.4.5.4 Methanol-Extrakt

Eine Probe von 400 mg Methanol-Extrakt gelöst in 1 ml Hexan/Ethylacetat 9:1 (v/v) wird fraktioniert. Diese Probe ist jedoch aufgrund des sehr hohen Matrixanteiles nur mit Wärme löslich. Bei Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgt vollständige Phasentrennung. Die erste Probe wird deshalb warm auf die Säule injiziert und fraktioniert. Bei den drei weiteren Proben wird nur die obere Phase über die Säule aufgetrennt.

Der Gradient:

- 1) Hexan/Ethylacetat 90:10 (v/v)
- 2A+B) Hexan/Ethylacetat 85:15 (v/v)
- 3) Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v)

Alle Fraktionen werden dann mit HPLC, Gradient *File3* analysiert. Es erfolgt genau die gleiche Fraktionierung wie bei dem Hexan-Extrakt. Für die Isolierung von Acetyllupeolsäure werden die Fraktionen 2B (20 ml) und 3 (40 ml) gesammelt.

3.4.6 Semi-präparative Niederdruck-Chromatographie

Mittels semi-präparativer Niederdruck-Chromatographie (LPLC) ist es möglich, Substanzen mit relativ hoher Reinheit (>90%) und grösseren Mengen (mg bis Gramm) in kurzer Zeit (Stunden) zu gewinnen. Zur Durchführung benötigt man ein LPLC-System mit einer semi-präparativen Pumpe, einer Säule, einem Detektor, einem Schreiber und einem Fraktionssammler. Die Abtrennung der interessierenden Komponenten erfolgt manuell durch Kombination von Schreiber Signal und Fraktionssammler.

Die Säule ist mit einem C18 reversed phased Material gepackt worden. Ihre Abmessungen sind: Länge 150 mm und Innen-Durchmesser 20 mm. Die Partikel der stationären Phase haben einen Durchmesser von 10 µm.

3.4.6.1 Eluent

Erster Eluent

Das erste Eluent ist auf der Basis von Acetonitril gemacht worden: Acetonitril/Wasser, 86:14 (v/v) mit 0.2% Essigsäure. Die Parameter sind folgende:

- Flussrate: 12 ml/min
- Druck: 2.4 MPa
- Detektor: Wellenlänge von 215 nm und Absorption von 1.28 AU
- Schreiber: Vorschubgeschwindigkeit von 2 mm/min und Vollausschlag von 20 mV
- Eluent zum Spülen: Acetonitril/Wasser, 97:3 (v/v) mit 0.2% Essigsäure

Zweiter Eluent

Das Ziel ist, Acetonitril wenn möglich durch Methanol zu ersetzen, weil Acetonitril:

1. Aufgrund der wirtschaftlichen Krise sehr knapp und auch sehr teuer geworden ist (ca. 150 € pro 2.5 Liter, während Methanol ca. 8 € pro 2.5 Liter). Dies entspricht einem Preisfaktor von ca. 20.
2. Acetonitril ist toxisch und verursacht deshalb deutlich höhere Entsorgungskosten als Methanol.

In der Regel braucht man im Eluent ca. 10% mehr Methanol als Acetonitril für die selbe Elutionskraft, weil die Selektivität und die Viskosität sich ändern. Der zweite Eluent besteht also aus Methanol/Wasser, 95:5 (v/v) mit 0.2% Essigsäure. Die Parameter sind dieselben wie vorher, jedoch der Säulenrückdruck ist aufgrund der höheren Viskosität von Methanol um ca. 1 MPa höher. Der Eluent zum spülen der Trennsäule nach beendeter Trennung besteht aus Methanol/Wasser, 98:2 (v/v) mit 0.2% Essigsäure.

Alle Substanzen unseres Substanzgemisches eluieren sehr eng beieinander, wodurch eine Eluentänderung nötig wird. Der neue Eluent wird mit einem geringeren Methanol Anteil hergestellt.

Dritter Eluent

Der dritte Eluent besteht aus Methanol/Wasser, 92:8 (v/v) mit 0.2% Essigsäure. Die Parameter sind dieselben wie vorher, nur die Flussrate muss aufgrund des höheren Säulengegendruckes auf 11 ml/min reduziert werden. Der resultierende Druck beträgt 3.6 MPa. Der Eluent zum Spülen besteht immer aus Methanol/Wasser, 98:2 (v/v) mit 0.2% Essigsäure.

Die Substanzen eluieren unter den jetzigen Bedingungen sehr langsam und mit zu hohen Trennfaktoren. Zur weiteren Optimierung der mobilen Phase wird ein Mittelwert aus den beiden Eckpunkten gewählt.

Vierter Eluent

Der vierte Eluent besteht aus Methanol/Wasser, 93.5:6.5 (v/v) mit 0.2% Essigsäure. Die Parameter sind dieselben wie für den dritten Eluent. Der Druck ist bei 3.2 MPa. Dieser Eluent ist optimal. Die Substanzen eluieren mit sehr guten Trennfaktoren, in sehr kurzer Zeit und ohne zusätzlichen Spülschritt der verwendeten Trennsäule.

3.4.6.2 Proben

Der Hexan1-Extrakt ist mit diesen vier Methoden bearbeitet worden. Mittels optimierten Chromatographie Bedingungen werden von dem Extrakt zunächst 207 mg in 1 ml Methanol gelöst, und 150 µl injiziert. Zur Identifikation der einzelnen eluierenden Peaks, wird jede Fraktion mittels analytischer HPLC analysiert. Durch Vergleich von Retentionszeit und UV Spektrum, Probe und Standard, kann in den einzelnen Fraktionen die gesuchte Zielsubstanz – Acetyllupeolsäure – eindeutig zugeordnet werden.

Der Rest des Hexan1-Extrakt, 390 mg, werden in 1800 µl Methanol gelöst, und sechs Mal 300 µl injiziert. Die gesamte Menge von Hexan2-Extrakt, 644 mg, werden dann in 3500 µl Methanol und 500 µl DMSO gelöst, und zehn Mal 400 µl injiziert. Alle Fraktionen, die Acetyllupeolsäure enthalten werden vereint und mittels Rotationsverdampfer eingeengt. Zur Entfernung des Restlösungsmittels wird die Probe mittels Lyophilisator getrocknet. Aufbewahrung erfolgt bei 4 °C.

Nach derselben Methodik wurde der Methanol-Extrakt aufgearbeitet.

3.4.7 Semi-präparative HPLC

Das Ziel einer semi-präparativen Probenaufreinigung mittels HPLC ist, Acetyllupeolsäure mit grosser Reinheit (>99.0%) zu gewinnen. Diese Reinheit ist notwendig, um die Interpretation pharmakologischer Testergebnisse eindeutig zu gestalten, d. h. die Versuchsergebnisse werden nicht durch eventuell vorhandene Verunreinigungen verfälscht. Dazu ist eine HPLC Anlage mit einer C18 Trennsäule mit 8 mm Innendurchmesser nötig. Mittels eines Fraktions-Sammlers kann die gewünschte Substanz isoliert werden.

Die Parameter zur semi-präparativen HPLC können aus der Niederdruck-Chromatographie adaptiert werden. Die Beziehung zwischen Flussrate (v) und Innen-Durchmesser (Radius r) ist:

$$\frac{r_1^2}{r_2^2} = \frac{v_1}{v_2}$$

Gleichung 1: Beziehung zwischen Flussrate und Innen-Durchmesser [10]

Bei der semi-präparativen Niederdruck-Chromatographie war den Innen-Durchmesser 20 mm und die Flussrate 11 ml/min. Mit dieser Berechnung kann man eine neue Flussrate von etwa 2 ml/min für die semi-präparative 8 mm HPLC Trennsäule finden. Aufgrund von Zeit- und Lösungsmittel Einsparung wurde die Flussrate auf 4 ml/min erhöht.

Die semi-präparative Niederdruck-Chromatographie erfolgte mittels eines Lösungsmittel-gemisches aus Methanol/Wasser, 93.5:6.5 (v/v) mit 0.2% Essigsäure. Diese Mischung kann direkt auf die semi-präparative HPLC übertragen werden, wobei hier ein Gemisch aus Methanol/Wasser, 93:7 (v/v) mit 0.2% Essigsäure eingesetzt wird. Es stehen zwei Behälter für den binären Hochdruckgradienten zur Verfügung. Der erste (A) ist Methanol/Wasser, 80:20 (v/v) mit 0.2% Essigsäure und der zweite (B) Methanol 100% mit 0.2% Essigsäure. Um 93:7 (v/v) zu erreichen muss man 35% A und 65% B nehmen.

3.4.7.1 Versuche

Erster Versuch

Die eingestellten Versuchsparameter sind folgende:

- Trennsäulen Temperatur: 28 °C
- Eluent: 35% A, 65% B
- Flussrate: 4 ml/min
- Injektion: 100 µl von einer Lösung 1 mg Acetyllupeolsäure pro 100 µl DMSO

Acetyllupeolsäure kann mit dieser Methode gut getrennt werden, ist jedoch zeitlich nicht optimal.

Zweiter Versuch

Die eingestellten Versuchsparameter sind folgende:

- Trennsäulen Temperatur: 28 °C
- Eluent: 30% A, 70% B
- Flussrate: 4 ml/min
- Injektion: 100 µl von einer Lösung 1 mg Acetyllupeolsäure pro 100 µl DMSO

Acetyllupeolsäure kann immer noch gut getrennt werden, jedoch zeitlich noch nicht optimal.

Dritter Versuch

Die eingestellten Versuchsparameter sind folgende:

- Trennsäulen Temperatur: 28 °C
- Eluent: 25% A, 75% B
- Flussrate: 4 ml/min
- Injektion: 100 µl von einer Lösung 1 mg Acetyllupeolsäure pro 100 µl DMSO

Acetyllupeolsäure Abtrennung von Nebenprodukten wird schlechter.

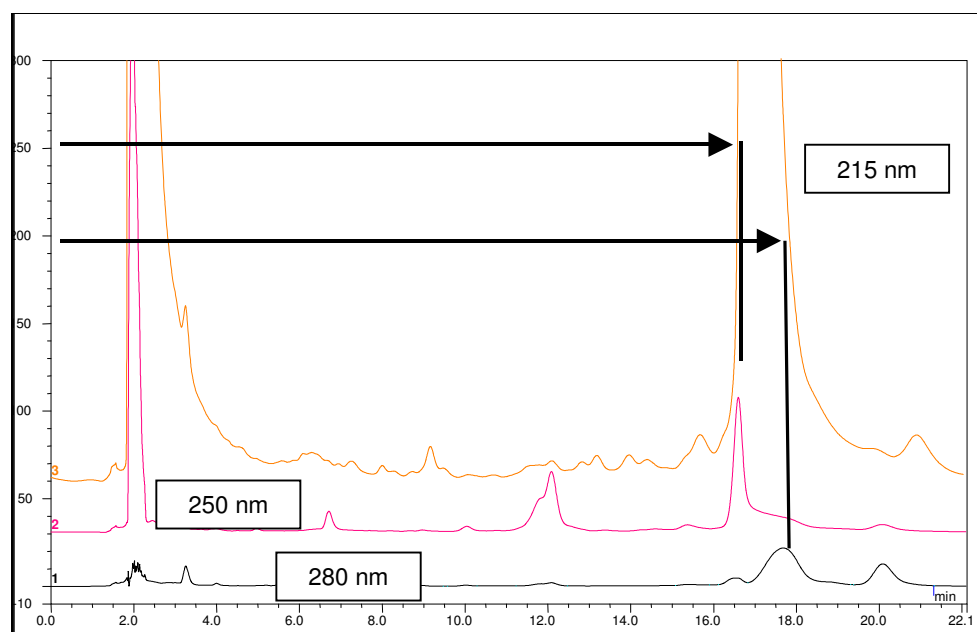
Vierter Versuch

Die eingestellten Versuchsparameter sind folgende:

- Trennsäulen Temperatur: 28 °C
- Eluent: 30% A, 70% B
- Flussrate: 4.5 ml/min
- Injektion: 100 µl von einer Lösung 1 mg Acetyllupeolsäure pro 100 µl DMSO

Diese Methode ist geeignet. Sie erlaubt Acetyllupeolsäure in Bezug auf Zeit und Peakreinheit am besten zu trennen. Eine weitere Optimierung erfolgt in Bezug auf die Probenaufgabemenge; getestet wird 1 mg/100 µl, 2 mg/100 µl, 3 mg/100 µl und 4 mg/100 µl DMSO.

Acetyllupeolsäure wird durch Kontrolle der drei UV-Detektionspuren, 215 nm, 250 nm, 280 nm isoliert. Die Kriterien zur Substanz-Peak Abtrennung sind in Chromatogramm 1 zu sehen.



Chromatogramm 1: Acetyllupeolsäure-Peak Abtrennung

Diese Abtrennung erlaubt den grössten Anteil der bei 250 nm und 280 nm sichtbaren Verunreinigungen abzutrennen. Die resultierende Reinheit der Acetyllupeolsäure ist nach Kontrolle mittels analytischer HPLC >99.0%.

3.4.7.2 Analytische Kontrolle

Die aufgereinigte Substanz (Acetyllupeolsäure) wird mit analytischer HPLC, Gradient *File3*, analysiert. Dazu werden 90 µl direkt aus der semi-präparativen HPLC Fraktionierung injiziert. Die Reinheit der isolierten Acetyllupeolsäure und damit auch die Kriterien zur Substanz-Peak Abtrennung können durch Kontrolle der drei UV-Detektionsspektren, 215 nm, 250 nm, 280 nm sowie der Peakpurity Parameter des Dioden Array Detektors festgelegt werden.

3.4.8 Umkristallisation

In der Chemie versteht man unter Umkristallisation ein Stofftrennverfahren, das als Reinigungsverfahren eingesetzt wird. Dabei wird eine heisse, gesättigte Lösung eines verunreinigten Stoffes hergestellt, eventuell heiss filtriert um die unlöslichen Verunreinigungen abzutrennen, und die Substanz durch langsames Abkühlen der Lösung zur erneuten Kristallisation angeregt. Die Substanz wird dabei in der Regel in sehr reiner Form erhalten.

Erster Versuch

Die erste Umkristallisation wird mit dem Hexan2-Extrakt direkt nach der Kieselgel Fraktionierung getestet. Dafür werden 100 mg abgewogen und in 400 µl warmem Acetonitril (etwa 80°C) gelöst. Nach dem abkühlen fällt eine klebrige und ölige Substanz aus. Es sind noch zu viele nicht abtrennbare Verunreinigungen in der Probe, um eine reine Substanz zu bekommen.

Zweiter Versuch

Der zweite Versuch wird mit Substanz durchgeführt, welche nach der LPLC Aufreinigung anfällt. Es werden 20 mg Substanz gewogen und in 3.0 ml warmen Acetonitril (80°C) gelöst. Nach Abkühlung im Kühlschrank fällt eine weisse kristalline Substanz aus. Das Gefäß wird eine Minute bei 1000 rcf zentrifugiert. Das Zentrifugat wird mittels HPLC, Gradient *File3* analysiert und das Lösungsmittel mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Die Kristalle werden zwei Mal mit 1 ml Acetonitril/Wasser 2:8 (v/v) gewaschen und dann mit dem Lyophilisator getrocknet. Zur Reinheitskontrolle werden 0.5 mg in 1 ml Methanol gelöst und mittels analytischer HPLC analysiert.

Dritter Versuch

In dem dritten Versuch wird das Lösungsmittel zur Umkristallisation verändert, anstelle reinem Acetonitril wird Acetonitril/Wasser 9:1 (v/v) verwendet. Um 20 mg zu lösen, werden 4.2 ml Lösungsmittel benötigt. Die ganze Menge Acetyllupeolsäure aus dem Methanol-Extrakt (27 mg) ist mit dieser Methode bearbeitet worden.

3.4.9 Charakterisierung der isolierten Acetyllupeolsäure

Zur Charakterisierung einer "reinen Substanz" werden verschiedene allgemeine Informationen zusammen mit physikalischen und chemischen Testmethoden beschrieben, wie z. B. Aussehen, Strukturformel, Molmasse, UV-Spektrum, IUPAC- und CAS-Name verbunden mit CAS-Nummer des Moleküls.

3.4.9.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie auf C18 reversed Phase Trennmaterial, mit Eluent Methanol/Wasser 9:1 (v/v), und auf Kieselgel, mit Eluent Hexan/Aceton 7:3 (v/v), erlaubt ebenfalls die Reinheit der isolierten Acetyllupeolsäure zu beurteilen. Acetyllupeolsäure nach semi-präparativer HPLC und nach Umkristallisation werden beide geprüft. Zur Analyse werden jeweils 1 µg Acetyllupeolsäure pro µl Methanol und 2 µg/µl auf die Platten aufgetragen.

3.4.9.2 HPLC

Die isolierte Substanz wird mit HPLC, Gradient *File3*, bei drei verschiedenen spezifischen Wellenlängen vermessen. Die Aussage wird zusätzlich durch Analyse des dreidimensionalen Datenfeldes und des resultierenden UV-Spektrums verifiziert.

3.4.9.3 Schmelzpunkt

Der Schmelzpunkt ist ein weiterer wichtiger physikalischer Parameter zur empfindlichen Detektion der Substanz Reinheit. Dazu werden zwei Proben Acetyllupeolsäure gleichzeitig mit einem Schmelzpunktbestimmungsgerät analysiert. Der gefundene Wert kann mit Literaturangaben verglichen werden.

3.4.9.4 Massenspektrometrie

Mittels der Massenspektrometrie wird die Molmasse und zum Teil über die typischen Fragmente die räumliche Struktur eines Moleküls ermittelt. Dazu werden 0.2 mg Substanz abgewogen und mittels Massenspektrometrie im Electron Impact Modus analysiert.

3.4.9.5 DPPH-Test

Der DPPH-Test erlaubt die antioxidative Eigenschaften einer Substanz zu bestimmen. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ist ein stabiles violettes freies Radikal, welches bei 517 nm absorbiert. Diese Farbe verschwindet, wenn DPPH von einem Radikalfänger reduziert wird. Diese Radikalfänger besitzen antioxidative Eigenschaften. [11]

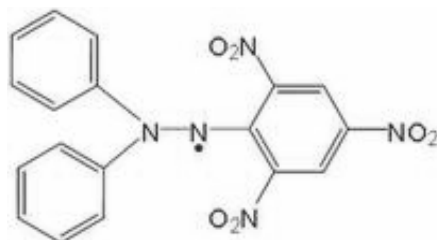


Abbildung 4: Struktur von 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl [12]

Der DPPH-Test wurde auf einer Kieselgel-Platte, mit Eluent Hexan/Aceton 6:4 (v/v) durchgeführt. Der Standard für diesen Test ist Ascorbinsäure (Vitamin C). Diese Substanz besitzt starke antioxidative Eigenschaften. Aus einer Lösung von 1 mg Ascorbinsäure pro ml Methanol wird 1 µl auf der Platte aufgetragen. Die Konzentrationen Acetyllopeolsäure sind 1 µg/µl und 2 µg/µl Methanol. Nach der Elution wird die Platte getrocknet und dann während 2 Sekunden in eine Lösung von 0.05% (w/v) DPPH in Methanol eingetaucht. Die Platte wird anschliessend auf einer Heizplatte bei 130°C getrocknet. Substanzen, welche antioxidative Eigenschaften besitzen, werden mittels weisser Flecke auf der Platte detektiert. Bei einem negativen DPPH-Testergebnis bleiben die Flecken violett.

3.4.9.6 XTT-Test

Der XTT-Test ist ein biochemischer Test zum Nachweis von lebensfähigen Zellen. Dieser Test wird mit einem Test-Kit durchgeführt. XTT (Natrium-3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzolsulfonsäure hydrat) ist ein Tetrazolium Salz, das metabolisch aktive Zellen färben kann. Die isolierte Reinsubstanz, welche untersucht werden soll, wird mit PC3 Tumorzellen inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wird die photometrische Auswertung gemacht. Generell gilt, je farbiger die Lösung nach der Inkubation ist, desto mehr Zellen sind noch aktiv, und umso weniger aktiv ist die Testsubstanz.

3.4.10 Solubilisierung der isolierten Acetyllopeolsäure mit Cyclodextrin

Acetyllopeolsäure ist ein unpolares Molekül, welches in Wasser völlig unlöslich ist. Zur Applikation dieser Substanz in biologischen Testsystemen, z. B. Chorionallantois Membran – CAM Modell – oder Maus Modell, muss die Substanz wasserlöslich sein. Dieses Problem kann dadurch gelöst werden, indem die Testsubstanz in hydrophile Trägersubstanzen implementiert wird, z. B. komplexieren mit Cyclodextrin. Cyclodextrine besitzen eine hydrophobe Kavität im Innern und eine polare Aussenfläche.

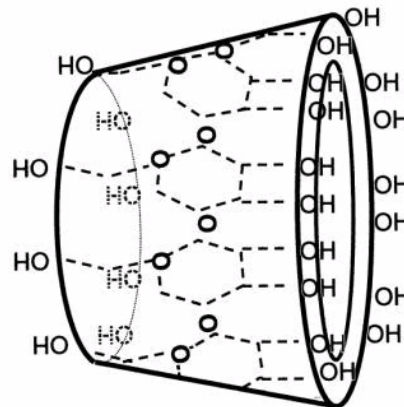


Abbildung 5: Kavitätsstruktur von γ -Cyclodextrin [13]

Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften sind Cyclodextrine in der Lage, so genannte Einschlussverbindungen mit unpolaren organischen Verbindungen zu bilden. Für diese Versuche wurde Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin und Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin ausgewählt. Die beiden Moleküle unterscheiden sich dadurch, dass die beta Form aus insgesamt 7, die gamma Form aus 8 cyclisch angeordneten Glucosemolekülen besteht. Aufgrund dieser unterschiedlichen Glucose Anzahl pro Molekül, resultieren verschieden geformte Kavitäten, welche in der Lage sind, Moleküle nach einer bestimmten räumlichen Anordnung zu selektieren.

3.4.10.1 Versuche

Erster Versuch

Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin (HP- γ -CD) wurde zuerst geprüft. Dazu wurde 0.5 ml einer Lösung von 1 mg Acetyllopeolsäure pro ml Ethanol mit 1 ml folgender Lösungen gemischt: 5 mg HP- γ -CD pro ml Ethanol, 7.5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml und 25 mg/ml. Die Lösungen wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschliessend wird das Lösungsmittel bei 60 °C, mit Stickstoff abgedampft. Die vollständige Trocknung erfolgt mittels Lyophilisierung. Der fertige Komplex aus Acetyllopeolsäure und Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin wird nun versucht durch vorsichtiges bewegen mit insgesamt 200 μ l 0.9% isotonischer Kochsalzlösung in Lösung zu bringen.

Zweiter Versuch

Die selben Bedingungen wie in Versuch 1, jedoch mit Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD) als Trägersystem wurden geprüft.

Dritter Versuch

Dieselben Bedingungen wie in Versuch 1 bzw. Versuch 2, jedoch mit verringerten Konzentrationen an Cyclodextrin. Folgende Konzentrationen HP- γ -CD und HP- β -CD: 5 mg/ml Ethanol, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml und 1 mg/ml wurden getestet.

Vierter Versuch

Nur HP- γ -CD wurde noch geprüft, mit folgenden Konzentrationen: 10 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml und 1 mg/ml. Die Substanzlösungen wurden aber dieses Mal in Ethanol/Wasser 98:2 (v/v) gelöst.

Fünfter Versuch

Dieselben Konzentrationen HP- γ -CD wie in dem vierten Versuch, jedoch mit dem Lösungsmittel Ethanol/Wasser 9:1 (v/v).

Sechster Versuch

Folgende Konzentrationen HP- γ -CD wurden geprüft: 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml und 0.5 mg/ml, mit dem Lösungsmittel Ethanol/Wasser 8:2 (v/v).

Siebter Versuch

Anstelle Ethanol wurde Methanol als Lösungsmittel getestet. Dazu wurde 0.5 ml einer Lösung von 1 mg Acetyllupeolsäure pro ml Methanol und folgenden Konzentrationen HP- γ -CD: 5 mg pro ml Methanol, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml und 25 mg/ml gemischt und aufgearbeitet wie in Versuch 1.

Nach jedem Versuch wurden die Acetyllupeolsäure haltigen Lösungen gesammelt und mittels flüssig-flüssig Extraktion mit Dichlormethan die Testsubstanz wieder zurückgewonnen.

3.4.10.2 Analytische Kontrolle der Komplexbildung

Der Standard besteht aus einer Lösung von 1 mg Acetyllupeolsäure in 4 ml Methanol, wovon 80 µl in das HPLC System mit Gradient *File 3* injiziert wurden.

Aus den Auflösungsversuchen mit isotonischer Kochsalzlösung hat sich die Formulierung von 0.5 mg Acetyllupeolsäure und 5 mg HP-γ-CD in Ethanol und mit 15 mg HP-γ-CD in Methanol als brauchbar erwiesen.

Zur Herstellung der jeweiligen Probelösungen werden nach der Lyophilisierung jeweils 150 µl isotonische Kochsalzlösung zugegeben und vorsichtig umgeschwenkt, bis eine klare Lösung resultiert. Aus dieser klaren Lösung werden 10 µl mit 90 µl Methanol bzw. 90 µl isotonischer Kochsalzlösung gemischt und mit dem HPLC, Gradient *File3* analysiert.

Zur Analytik dieser Probelösungen wurde der bisher verwendete Gradient *File3* geringfügig verändert, indem Start und Ende des Gradienten bei 100% Eluent A erfolgen.

Eluent (v/v) :	<u>Methanol</u>	<u>Wasser</u>	<u>Essigsäure</u>
A :	80	20	0.2
B :	100	-	0.2

Gradient :	<u>Zeit [min]</u>	<u>A [%]</u>	<u>B [%]</u>	<u>Fluss [ml/min]</u>
	0.1	100	0	0.56
	3.0	40	60	0.56
	25.0	20	80	0.56
	28.0	5	95	0.56
	30.0	5	95	0.56
	40.0	100	0	0.56

Zur Identifikation von Nebenpeaks wurde jeweils ein Blindwert hergestellt.

Zur Dokumentation der Komplexbildung wird folgender Versuchsablauf durchgeführt:

- Eine Probe mit 0.5 mg Acetyllupeolsäure in 300 µl Kochsalzlösung 0.9% NaCl wird 10 min bei Raumtemperatur gerührt und anschliessend mittels Membranfiltration – 0.45 µm – gefiltert. Zur Analytik werden 10 µl mit 90 µl Methanol gemischt und 80 µl injiziert.

- Eine Probe mit 0.5 mg Acetyllupeolsäure und 15 mg HP-γ-CD werden in 300 µl Kochsalzlösung 0.9% NaCl 10 min bei Raumtemperatur gerührt und anschliessend mittels Membranfiltration – 0.45 µm – gefiltert. Zur Analytik werden 10 µl mit 90 µl Methanol gemischt und 80 µl injiziert.

- Es erfolgt eine vollständige Komplexbildung, wobei zur Analytik drei mal jeweils 2 mg Komplex in 260 µl Methanol gelöst werden. Von dieser Lösung werden 80 µl injiziert.

Zur Deklaration des resultierenden Gehalts-Wertes wird neben dem Mittelwert, die resultierende relative Standardabweichung angegeben.

$$VK[\%] = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Gleichung 2: Berechnung des Variationskoeffizient [14]

3.4.11 Mikrosuspension der isolierten Acetyllupeolsäure mit PVP K10

Polyvinylpyrrolidon, PVP K10, ist ein Polymer mit der Basiskomponente Vinylpyrrolidon und besitzt eine mittlere molare Masse von 10 kDa. Diese Substanz löst sich sowohl ins Wasser als auch in vielen organischen Lösungsmitteln. Sie wird in der pharmazeutischen Industrie häufig als Hilfsstoff benutzt, z. B. Lösungsvermittler oder als Mittel zur Herstellung von Jod-Einschlussverbindungen z. B. Jod-Povidon.

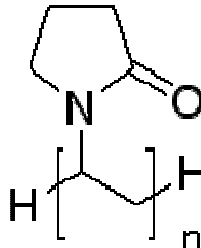


Abbildung 6: Struktur von Polyvinylpyrrolidon [15]

PVP K10 besitzt eine Helixstruktur, welche in der Lage ist, Moleküle temporär einzubauen. Das Inklusions-Molekül geht keine feste chemische Bindung mit dem aufgenommenen Stoff ein, sondern lagert sie lediglich aufgrund seiner räumlichen Konstellation in seinem Gerüst ein. Die chemischen Eigenschaften der einzelnen Stoffe bleiben im wesentlichen erhalten, die physikalischen, z. B. die Lösungsfähigkeit, können sich dagegen verändern. Schwer wasserlösliche Moleküle, wie Iod, werden in die Helixstruktur des PVP eingebaut, indem I^3 -Anionen über Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonylgruppen zweier Pyrrolidonringe reversibel binden. [16]

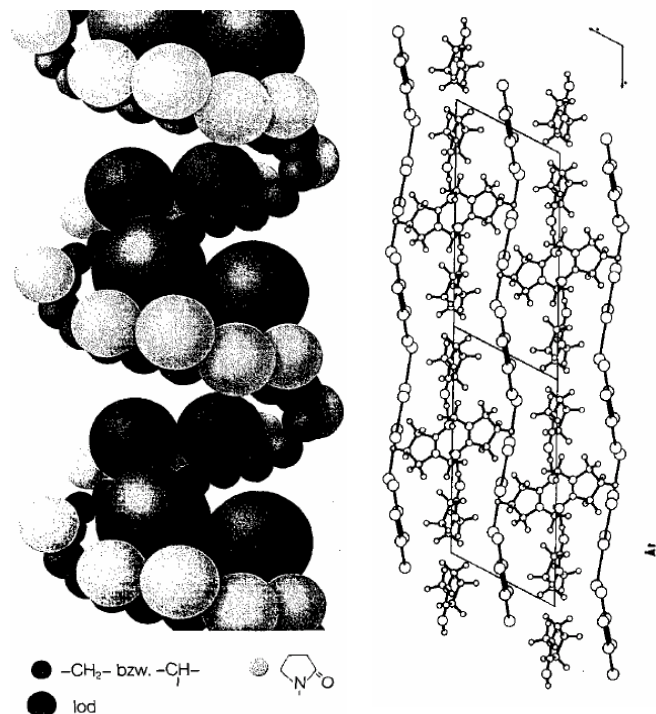


Abbildung 7: Helixstruktur des PVP-Iod Komplexes [16] und Räumliche Struktur von Polyvinylpyrrolidon [17]

Mit Acetyllupeolsäure wird versucht eine stabile wasserlösliche Mikrosuspension zu generieren.

3.4.11.1 Versuche

Erster Versuch

Eine Lösung von 20 mg PVP K10 pro ml Ethanol wird hergestellt. Verschiedene Mengen hiervon werden mit 0.5 ml einer Lösung von 1 mg Acetyllupeolsäure pro ml Ethanol gemischt, um folgende Konzentrationen an PVP K10 zu erreichen: 2 mg, 4 mg, 8 mg, 20 mg, 40 mg und 50 mg. Die Lösungen werden dann 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden sie bei 60°C, mit Stickstoff zur Trockene eingedampft. Mittels Lyophilisator wird vollständig getrocknet und der Rückstand in insgesamt 200 µl einer 0.9% Natriumchlorid Lösung aufgelöst. Die Lösungen werden mittels Vortex geschüttelt und anschliessend eine Minute in einem Ultraschallbad vollständig homogenisiert. Es bildet sich abhängig von dem Acetyllupeolsäure PVP K10 Mischungsverhältnis eine stabile leicht opalescente Suspension.

Zweiter Versuch

Dieselben Konzentrationen wie im ersten Versuch jedoch als Lösungsmittel wird Methanol statt Ethanol verwendet.

Nach jedem Versuch werden die wässrigen Acetyllupeolsäure haltigen Proben gesammelt und mittels flüssig-flüssig Extraktion mit Essigsäureethylester als Lösungsmittel extrahiert. Nach der Phasentrennung wird Essigsäureethylester mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und dann abgedampft. Der Rückstand wird in 1000 µl Acetonitril und 600 µl Wasser gelöst, abgedampft und mit dem Lyophilisator getrocknet. Damit kann Acetyllupeolsäure für einen neuen Versuch benutzt werden.

3.4.11.2 Analytische Kontrolle der Komplexbildung

Die Proben mit 20 mg PVP K10, 40 mg und 50 mg in Ethanol werden mittels HPLC, und dem veränderten Gradientenprofil analysiert. Zur Kontrolle der homogenen Probenentnahme aus der jeweiligen Mikrosuspension werden jeweils 3 Einwaagen untersucht. Dazu werden 3 Mal 10 µl mit 90 µl Methanol gemischt und 80 µl injiziert. Der Standard besteht aus 80 µl einer Lösung von 1 mg Acetyllupeolsäure in 4 ml Methanol.

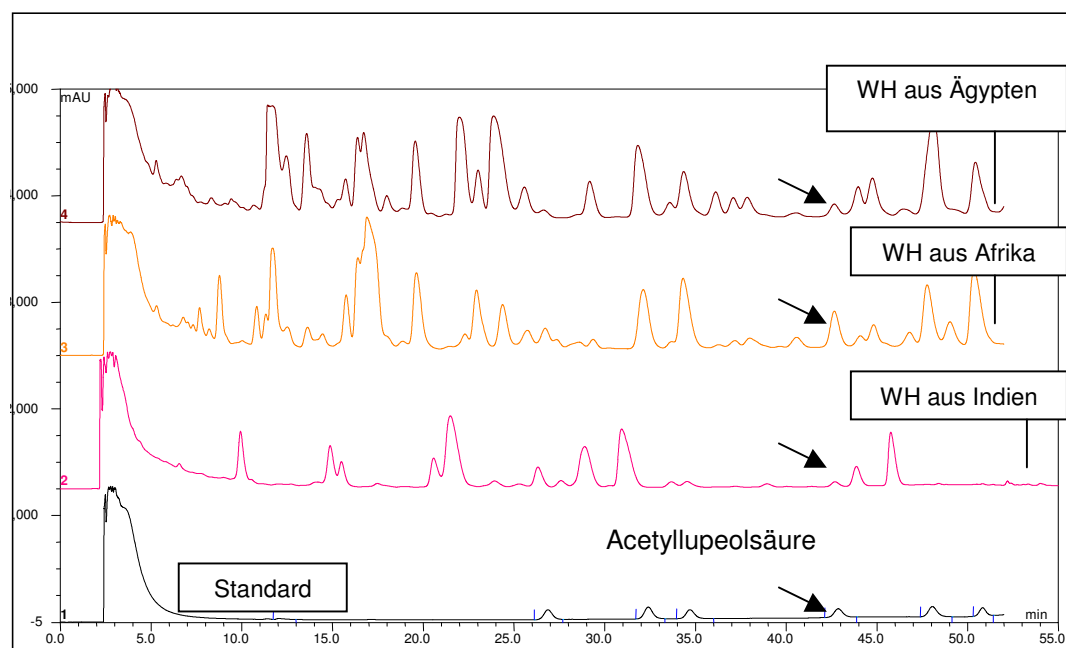
Alle Proben mit Methanol als Lösungsmittel werden in der gleichen Art auch mit HPLC analysiert. Die Kontrolle auf homogene Probenentnahme erfolgt mit den Konzentrationen 2 mg PVP K10, 4 mg, 8 mg und 20 mg.

Zur Kontrolle bzw. Identifikation von Nebenpeaks wird ein Blindwert nur mit PVP K10 und Lösungsmittel hergestellt. Dazu werden drei Mal je 20 mg PVP K10 in 1 ml Ethanol gelöst, 10 Minuten gerührt und anschliessend zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 200 µl isotonischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) gelöst, 10 µl davon mit 90 µl Methanol gemischt und 80 µl mittels analytischer HPLC analysiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. HPLC-Screening

Drei verschiedene Weihrauchharz Sorten sind mittels HPLC analysiert worden, um diejenige Species zu lokalisieren, welche den höchsten Acetyllopeolsäure Gehalt aufweist. Die drei verschiedenen Species stammen aus Afrika (*Boswellia carterii*), aus Indien (*Boswellia serrata*) und aus Ägypten. Die Auftrennung erfolgt mittels HPLC-Methode Gradient *File 1*.



Chromatogramm 2: HPLC-Screening der drei verschiedenen Weihrauchharze (WH)

Acetyllopeolsäure kann im Standardgemisch bei einer Retentionszeit von 43 Minuten lokalisiert werden. Beim Vergleich der überlagerten HPLC Chromatogramme sieht man deutlich, dass das Weihrauchharz aus Afrika mehr Acetyllopeolsäure enthält als die anderen. Die quantitative Berechnung über einen reinen Acetyllopeolsäure Standard ergab folgende Ergebnisse:

Tabelle 3: Menge von Acetyllopeolsäure pro Gramm Weihrauchharz

	Acetyllopeolsäure [mg / g Weihrauchharz]
Weihrauchharz aus Afrika	8.7
Weihrauchharz aus Ägypten	2.4
Weihrauchharz-Extrakt (BSE018) aus Indien	6.8

Aufgrund dieser Ergebnisse wird für die Durchführung der vorliegenden Arbeit Weihrauchharz aus Afrika verwendet.

4.2. Soxhlet-Extraktion

Mittels einer Soxhlet-Extraktion können die interessierenden Verbindungen sehr effektiv und schonend aus der Proben Matrix Weihrauchharz extrahiert werden. Zwei Lösungsmittel sind dafür getestet worden: Hexan und Methanol.

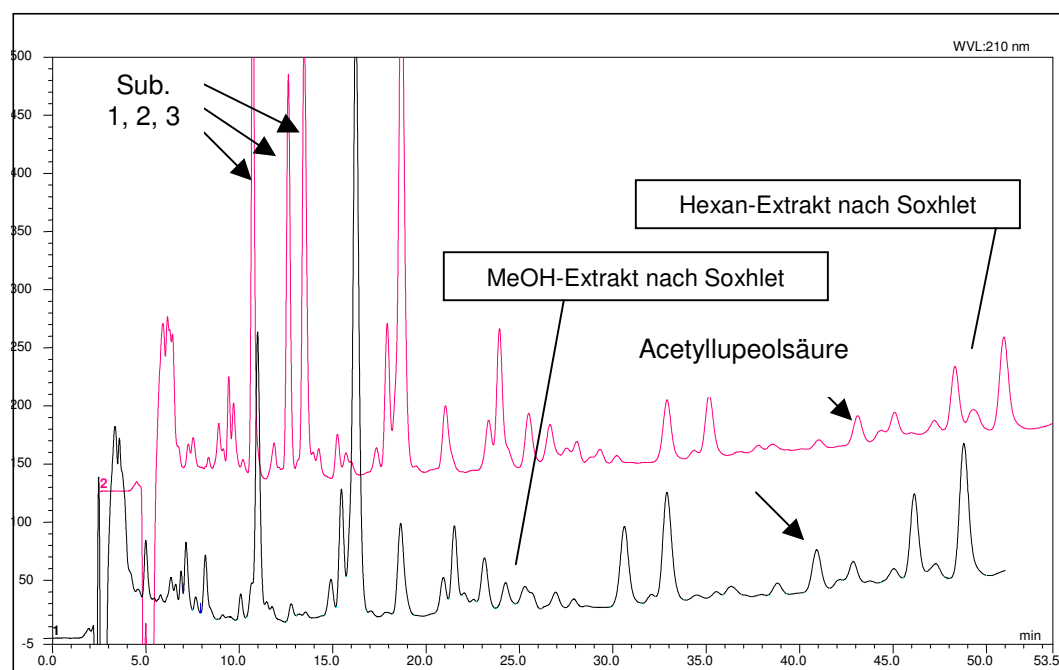
Die Abbildung zeigt die beiden afrikanischen Weihrauchharz Proben, nachdem sie mit **Hexan (links)** und **Methanol (rechts)** extrahiert worden sind:



Abbildung 8: Weihrauchharz nach der Soxhlet-Extraktion mit Hexan und Methanol

Weihrauchharz, welches mit Hexan extrahiert worden ist, ist noch deutlich gelber, als der Vergleich mit Methanol. Hexan extrahiert insgesamt weniger Verbindungen als Methanol, was für die spätere weitere Aufreinigung von Vorteil sein kann.

Die HPLC Chromatogramme der beiden Extrakte:



Chromatogramm 3: Soxhlet-Extraktion mit Hexan und mit Methanol

Beide Lösungsmittel extrahieren qualitativ und quantitativ nicht dieselben Substanzen. Die jeweilige Polarität und Selektivität spielen dafür eine grosse Rolle. Im vorderen Teil des HPLC Chromatogrammes (7 – 12 min) sieht man deutlich, dass nur Hexan einige Substanzen in grösserer Menge extrahiert und dass sie sehr gut voneinander getrennt sind. (siehe Chromatogramm 3: Substanzen 1, 2, 3) Diese Substanzen sind noch unbekannt und werden eventuell in einer späteren Arbeit untersucht.

Insgesamt liefert jedoch Methanol eine höhere gesamt Extrakt Ausbeute. Ein Vergleich der beiden Extrakte mittels TLC und HPLC zeigt jedoch deutlich, dass das polarere Extraktionsmittel Methanol auch wesentlich mehr polarere Matrixkomponenten mitextrahiert. (siehe Abbildung 8) Insgesamt gesehen ist jedoch Hexan besser, da hier das Acetyllopeolsäure/Matrix Verhältnis deutlich günstiger ist. Ferner hat man bei der späteren Hochreinigung des Hexan-Extraktes nicht soviel Ballaststoffe zu verarbeiten.

Jedoch mittels Methanol ist es möglich, aus dem nativen Weihrauchharz Acetyllopeolsäure mit einer grösseren Ausbeute im Vergleich zu Hexan zu extrahieren. Die Berechnung über einen Acetyllopeolsäure Standard ergibt folgende Resultate:

Tabelle 4: Menge von Acetyllopeolsäure nach der Soxhlet-Extraktion

	Acetyllopeolsäure nach der Soxhlet-Extraktion [mg / g Extrakt]	Ausbeute [%]
Hexan-Extrakt (8.0 g)	16.1	44
Methanol-Extrakt (19.1 g)	9.7	65

Die Ausbeute für den Hexan-Extrakt nach Soxhlet Extraktion ist 16.1 mg pro Gramm und für den Methanol-Extrakt 9.7 mg Acetyllopeolsäure pro Gramm Extrakt. Insgesamt gesehen ist dem Hexan-Extrakt der Vorzug zu geben, da zunächst eine 1.6 fach höhere Extrakt Ausbeute resultiert und zusätzlich mit dem Hexan-Extrakt bei der weiteren Aufreinigung deutlich weniger Ballaststoffe abgetrennt werden müssen.

4.3. Flüssig-flüssig Extraktion

Die flüssig-flüssig Extraktion ermöglicht gezielt Matrix Verunreinigungen zu eliminieren. Nach der Soxhlet-Extraktion werden die zwei resultierenden Extrakte Methanol und Hexan unterschiedlich bearbeitet. Der Hexan-Extrakt wird aufgrund der schlechten Phasentrennung mit zwei verschiedenen Varianten aufgearbeitet. Bei Methanol-Extrakt erfolgt eine Rückextraktion der Verunreinigungen in die Hexan Phase auf der Basis eines Methanol-Wasser Gemisches.

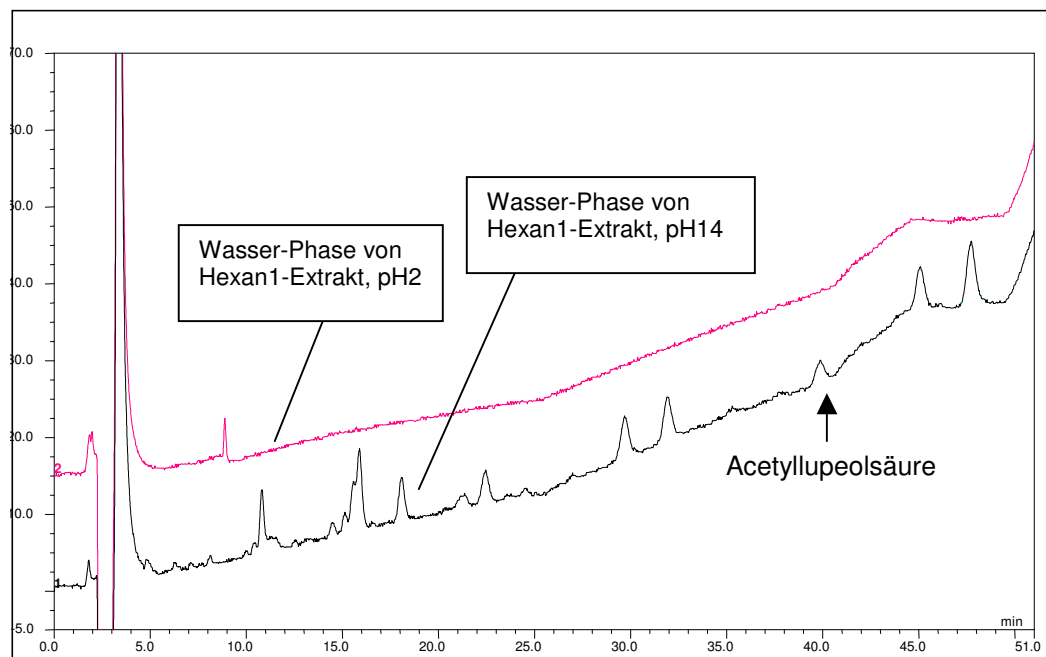
Abbildung der Phasentrennungen von **Methanol-Extrakt (links)** und **Hexan-Extrakt (rechts)**:



Abbildung 9: Phasen-Trennungen von flüssig-flüssig Extraktion

Die Phasen-Trennung erfolgt bei dem Methanol-Extrakt deutlich schneller als bei dem Hexan-Extrakt. Aus diesem Grund wird die Hexan-Extrakt Aufarbeitung variiert. Bei einer Hälfte des Extraktes wird abgewartet bis eine Phasentrennung erfolgt, während man zu der anderen Extraktmenge in einem separaten Scheidetrichter 20 ml Methanol zusetzt um die Phasentrennung zu beschleunigen.

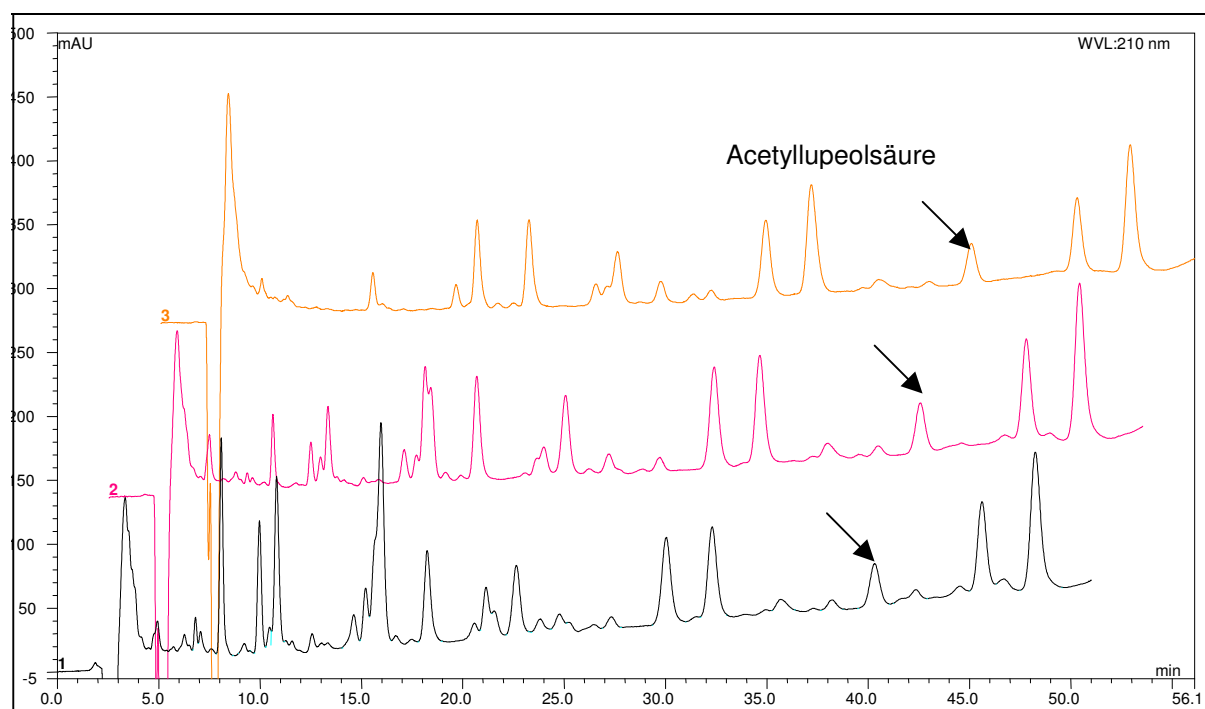
Am Ende wird die Zusammensetzung der Wasser-Phasen mittels HPLC kontrolliert.



Chromatogramm 4: Wasser-Phasen pH-Wert 2 und 14 von Hexan1-Extrakt

Man sieht, dass die Boswelliasäuren bei pH-Wert 14 auf Grund der Dissoziation der Carboxylgruppen in der Wasser-Phase vorhanden sind. Im Gegensatz dazu, können bei pH 2 auf Grund der unterdrückten Carboxylgruppen Dissoziation keine Boswelliasäure mehr in der Wasser-Phase detektiert werden. Die unpolaren Boswelliasäuren gehen bei saurem pH-Wert vollständig in die organische Phase über. Dasselbe resultiert mit den Wasser-Phasen von Hexan2-Extrakt und Methanol-Extrakt.

Am Ende der Aufarbeitung werden die organischen Phasen von allem Extrakten (Hexan1, Hexan2 und Methanol) mittels einer standardisierten HPLC Methode (Gradient *File1*) analysiert und der Gehalt an Acetylpupeolsäure quantitativ bestimmt.



Chromatogramm 5: Organische Phasen nach der flüssig-flüssig Extraktion

Chromatogramm 1: Hexan1-Extrakt

Chromatogramm 2: Hexan2-Extrakt

Chromatogramm 3: Methanol-Extrakt

Tabelle 5: Menge von Acetyllupeolsäure pro Gramm Extrakt nach der flüssig-flüssig Extraktion

	Acetyllupeolsäure nach der flüssig-flüssig Extraktion [mg / g Extrakt]	Ausbeute [%]
Hexan1-Extrakt (2.4 g)	19.4	ca. 33
Hexan2-Extrakt (2.1 g)	22.6	
Methanol-Extrakt (10.7 g)	15.6	ca. 58

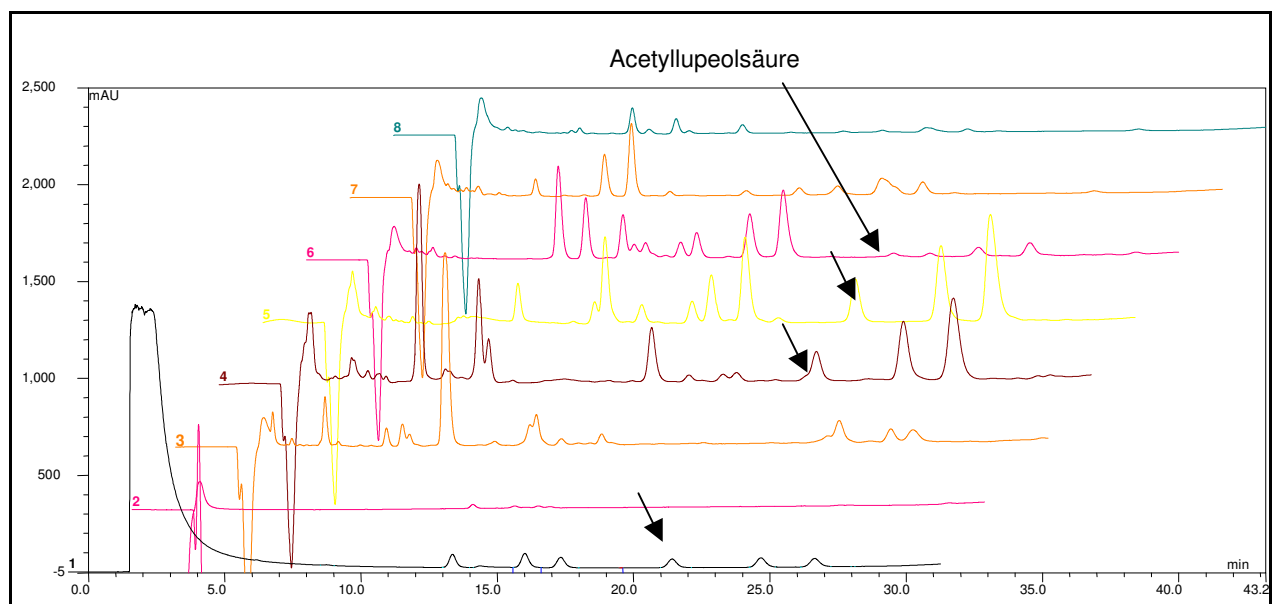
Die Ausbeute ist im Vergleich mit einem Standard grob berechnet worden. Die Ergebnisse zeigen, dass bei der flüssig-flüssig Extraktion die Acetyllupeolsäure Verluste beim Hexan-Extrakt grösser sind, als bei dem entsprechenden Methanol-Extrakt. Die Analyse der korrespondierenden Lösungsmittel Phasen hat gezeigt, dass die Hexan-Phase des Hexan1-Extraktes und die Hexan-Phase des Methanol-Extraktes noch eine Menge Acetyllupeolsäure enthalten. Der Grund liegt in der zögerlichen Ausbildung der Phasengrenzen nach durchmischen der beiden unlöslichen Phasen.

Die Hexan-Extrakte enthalten mehr Acetyllupeolsäure pro Gramm als der Methanol-Extrakt, weshalb zuerst die zwei Hexan-Extrakte für die weitere Aufarbeitung verwendet werden.

4.4. Normalphasen Chromatographie an Kieselgel

Mit einer nassgepackten Kieselgel Säule und einem speziellen Lösungsmittelgradient, werden einzelne Fraktionen mit unterschiedlichen Substanzmustern erhalten. Nur die Fraktionen, welche Acetyllopeolsäure enthalten, sind für die weitere Aufarbeitung interessant. Um diese zu lokalisieren, werden alle Fraktionen mittels HPLC, Gradient *File3* Methode analysiert.

Die Fraktionen aus der ersten Aufarbeitung mit 100 mg Probenbeladung des Hexan1-Extraktes haben folgende Zusammensetzung:

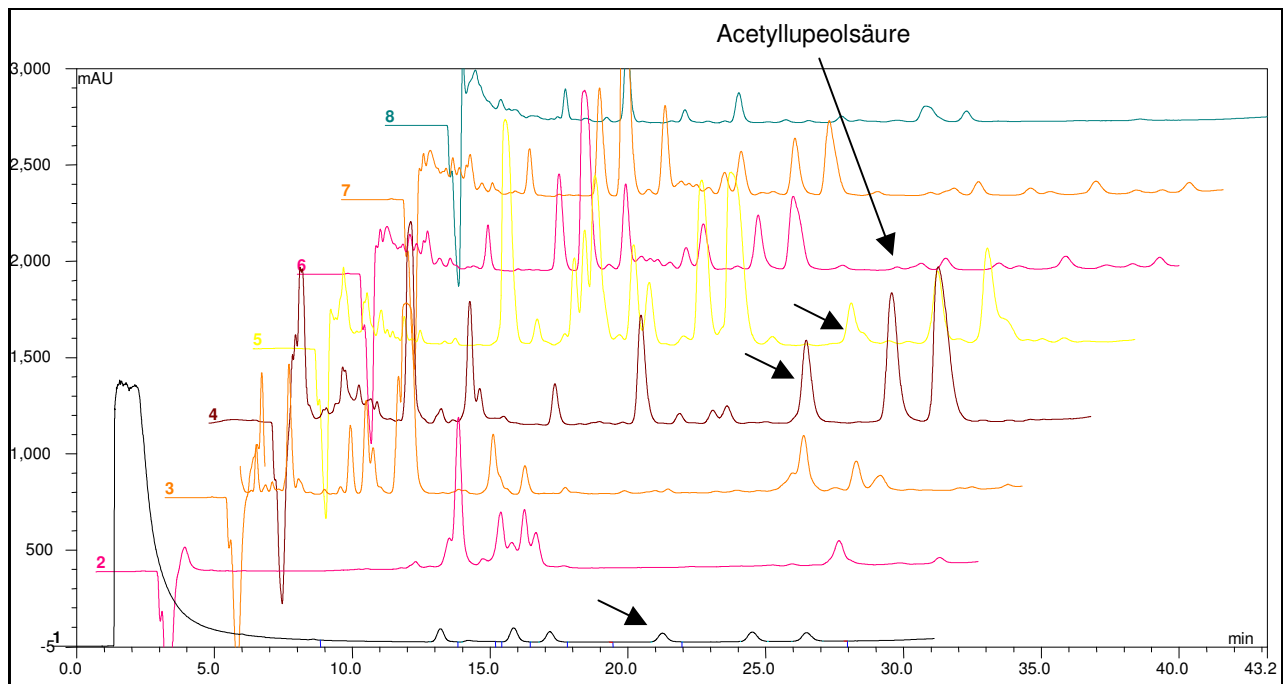


Chromatogramm 6: Fraktionen Hexan1-Extrakt mit 100 mg Beladung

- Chromatogramm 1: Standard
- Chromatogramm 2: Fraktion 1: Hexan 100%
- Chromatogramm 3: Fraktion 2: Hexan/Ethylacetat 9:1 (v/v)
- Chromatogramm 4: Fraktion 3: Hexan/Ethylacetat 8:2 (v/v)
- Chromatogramm 5: Fraktion 4: Hexan/Ethylacetat 7:3 (v/v)
- Chromatogramm 6: Fraktion 5: Hexan/Ethylacetat 6:4 (v/v)
- Chromatogramm 7: Fraktion 6: Hexan/Ethylacetat 5:5 (v/v)
- Chromatogramm 8: Fraktion 7: Hexan/Ethylacetat 1:9 (v/v)

Die Fraktionen 3 (Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v)) und 4 (Hexan/Ethylacetat 70:30 (v/v)) enthalten viel Acetyllopeolsäure. In der fünften Fraktion (Hexan/Ethylacetat 60:40 (v/v)) ist nur noch ein wenig Substanz vorhanden.

Eine weitere Fraktionierung wurde mit demselben Gradient und 400 mg Probe Hexan1-Extrakt gemacht. Damit kann überprüft werden, ob die Trennung/Fraktionierung stabil arbeitet, bzw. ob die Erhöhung der Beladungsmenge zu einer Verschiebung des Elutionsmusters führt. Die Chromatogramme der verschiedenen Fraktionierungen und weiteren Optimierungen sind in Chromatogramm 7 bis 9.

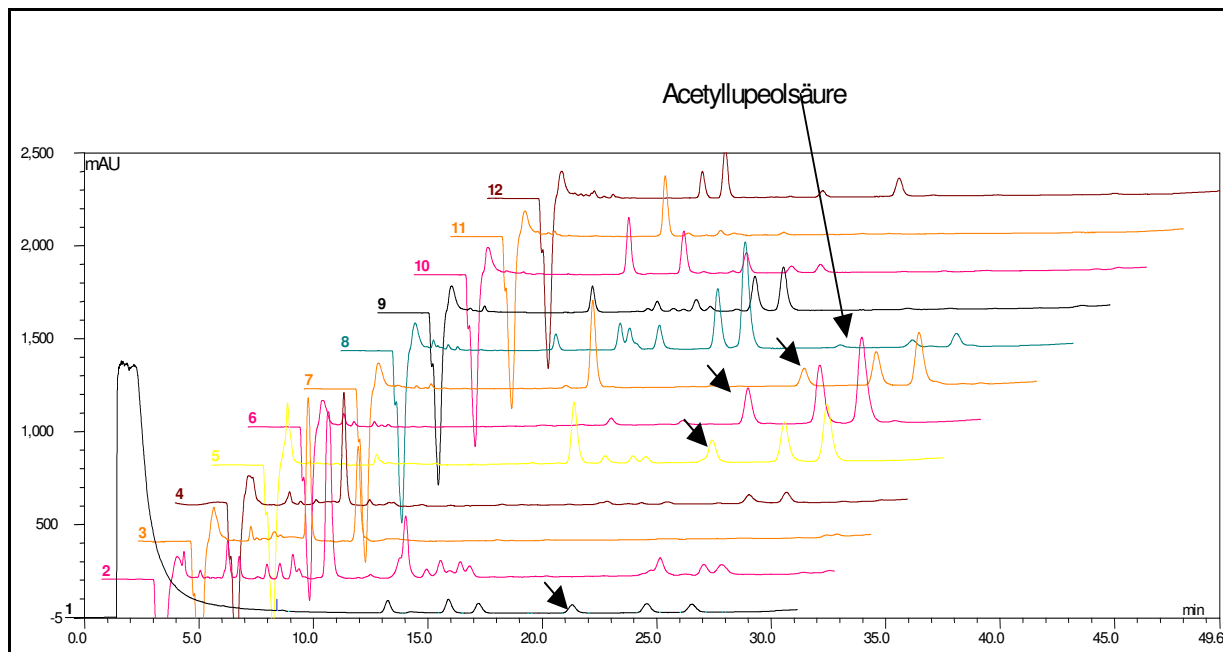


Chromatogramm 7: Fraktionen Hexan1-Extrakt mit 400 mg Beladung

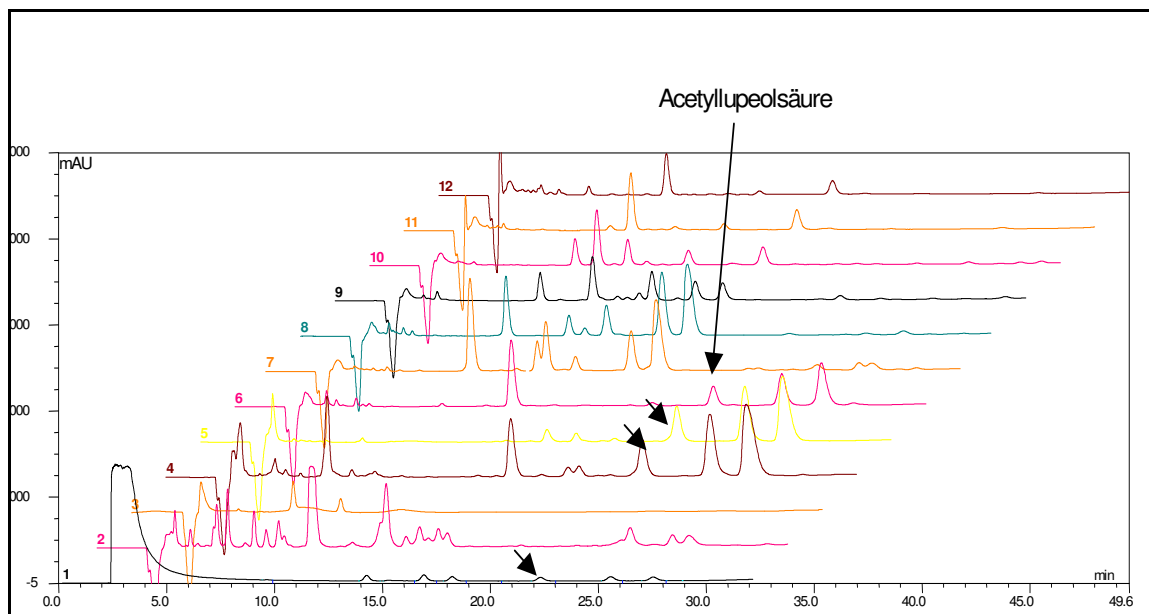
- Chromatogramm 1: Standard
- Chromatogramm 2: Fraktion 1: Hexan 100%
- Chromatogramm 3: Fraktion 2: Hexan/Ethylacetat 9:1 (v/v)
- Chromatogramm 4: Fraktion 3: Hexan/Ethylacetat 8:2 (v/v)
- Chromatogramm 5: Fraktion 4: Hexan/Ethylacetat 7:3 (v/v)
- Chromatogramm 6: Fraktion 5: Hexan/Ethylacetat 6:4 (v/v)
- Chromatogramm 7: Fraktion 6: Hexan/Ethylacetat 5:5 (v/v)
- Chromatogramm 8: Fraktion 7: Hexan/Ethylacetat 1:9 (v/v)

In den gleichen Fraktionen wie vorher (3, 4 und 5) ist Acetyllupeolsäure enthalten. Dies bedeutet, dass eine Beladungsmenge zwischen 100 mg und 400 mg eine stabile Fraktionierung erlaubt.

Zur Optimierung des Gradientenverlaufes bzw. der Steigung des Gradienten, wird ein neuer Versuch mit 100 mg und 400 mg Beladung unternommen.



Chromatogramm 8: Fraktionen mit dem veränderten Gradienten und 100 mg Hexan1-Extrakt

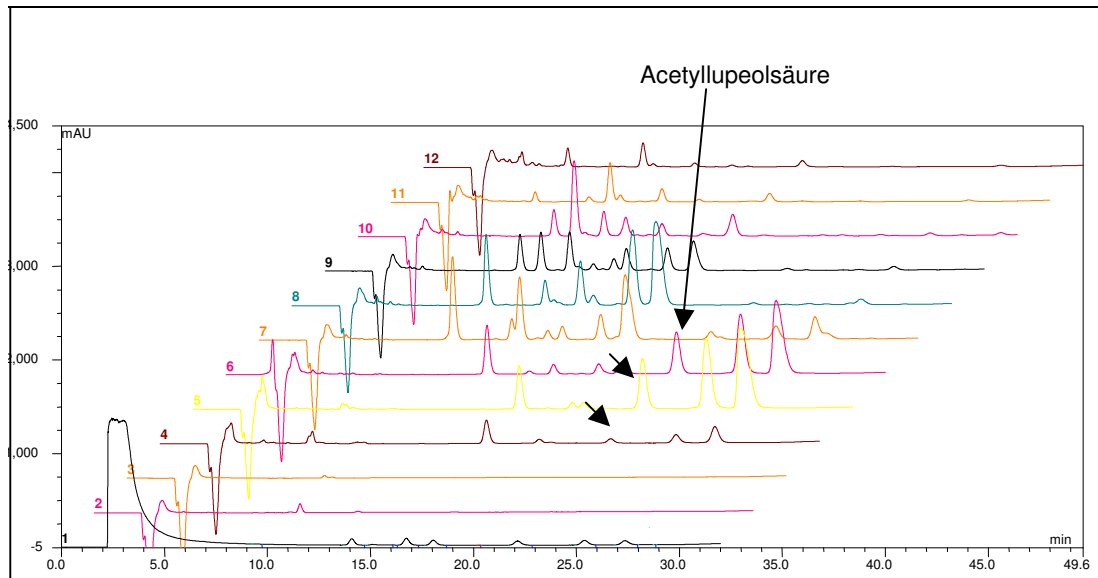


Chromatogramm 9: Fraktionen mit dem veränderten Gradienten und 400 mg Hexan1-Extrakt

- | | |
|----------------------|--|
| Chromatogramm 1 | : Standard |
| Chromatogramm 2 | : Fraktion 1: Hexan/Ethylacetat 90:10 (v/v) |
| Chromatogramme 3+4 | : Fraktion 2A+B: Hexan/Ethylacetat 85:15 (v/v) |
| Chromatogramme 5+6 | : Fraktion 3A+B: Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v) |
| Chromatogramme 7+8 | : Fraktion 4A+B: Hexan/Ethylacetat 75:25 (v/v) |
| Chromatogramme 9+10 | : Fraktion 5A+B: Hexan/Ethylacetat 70:30 (v/v) |
| Chromatogramme 11+12 | : Fraktion 6A+B: Hexan/Ethylacetat 65:35 (v/v) |

Bei der Probenbeladung mit 100 mg Extrakt enthalten die Fraktionen 3A+B (Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v)) und 4A+B (Hexan/Ethylacetat 75:25 (v/v)) Acetyllupeolsäure. Bei der 400 mg-Probenbeladung sind die interessanten Fraktionen 2B (Hexan/Ethylacetat 85:15 (v/v)), und 3A+B (Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v)).

Mit dieser optimierten Methode werden alle weiteren Aufreinigungen des Hexan2-Extraktes durchgeführt. Der Methanol-Extrakt (400 mg) wird nach dem gleichen Fraktionierungsmuster wie der Hexan-Extrakt überprüft.



Chromatogramm 10: Fraktionen mit dem veränderten Gradienten und 400 mg Methanol-Extrakt

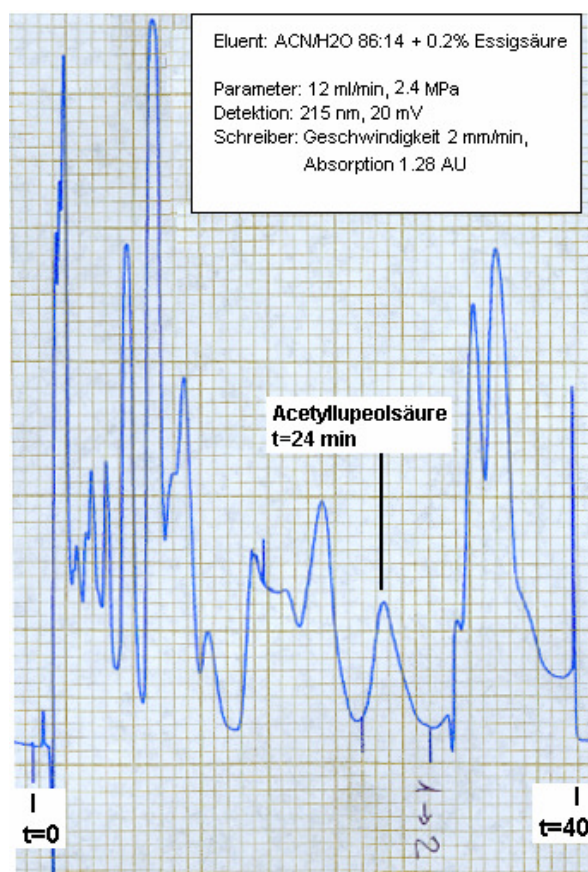
- Chromatogramm 1 : Standard
- Chromatogramm 2 : Fraktion 1: Hexan/Ethylacetat 90:10 (v/v)
- Chromatogramme 3+4 : Fraktion 2A+B: Hexan/Ethylacetat 85:15 (v/v)
- Chromatogramme 5+6 : Fraktion 3A+B: Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v)
- Chromatogramme 7+8 : Fraktion 4A+B: Hexan/Ethylacetat 75:25 (v/v)
- Chromatogramme 9+10 : Fraktion 5A+B: Hexan/Ethylacetat 70:30 (v/v)
- Chromatogramme 11+12 : Fraktion 6A+B: Hexan/Ethylacetat 65:35 (v/v)

Die interessanten Fraktionen sind wie beim Hexan-Extrakt Nr. 2B (Hexan/Ethylacetat 85:15 (v/v)), und 3A+B (Hexan/Ethylacetat 80:20 (v/v)). Diese Methode ist also sehr robust.

4.5. Semi-präparative Niederdruck-Chromatographie

Mittels semi-präparativer Niederdruck-Chromatographie (LPLC) können Substanzen mit relativ hoher Reinheit erhalten werden. Die Abtrennung der interessierenden Komponenten erfolgt manuell durch Kombination von Schreiber Signal und Fraktionssammler.

Der erste Eluent besteht aus Acetonitril/Wasser, 86:14 (v/v) mit 0.2% Essigsäure. Während der Elution werden mehrere Substanzen aus dem Hexan1-Extrakt abgetrennt und gesammelt. Im Anschluss daran werden sie mittels HPLC, Gradient *File3*, analysiert, um zu entscheiden, unter welchem Peak die gesuchte Acetyllupeolsäure eluiert.

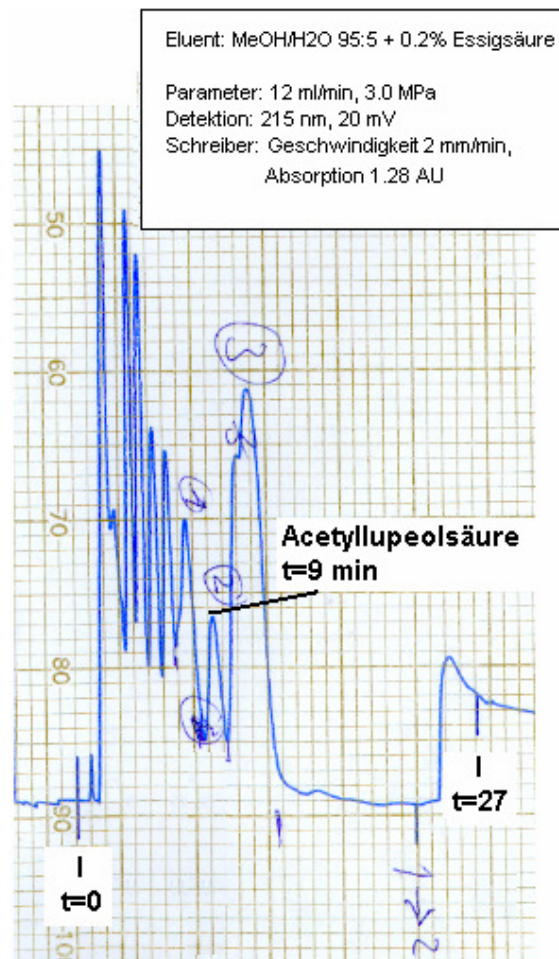


Chromatogramm 11: LPLC von Hexan1-Extrakt mit Eluent Acetonitril/Wasser, 86:14 (v/v)

Acetyllupeolsäure ist gut getrennt und kann relativ rein gesammelt werden. Die HPLC-Analyse zeigt, dass seine Reinheit etwa 95% ist.

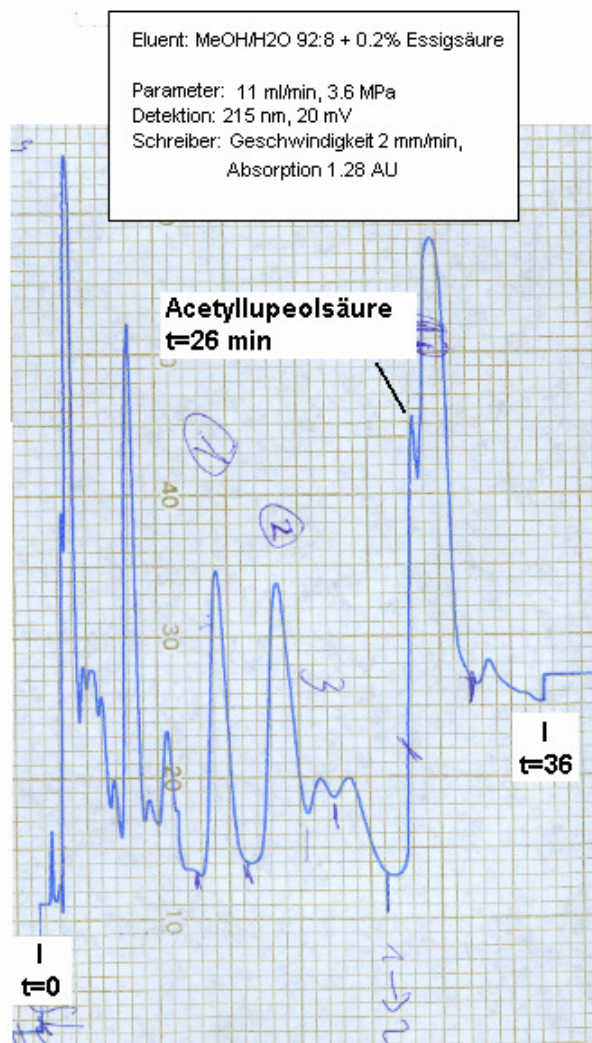
Mit diesem Acetonitril Eluent braucht man 24 Minuten, um Acetyllupeolsäure zu trennen und 40 Minuten, um eine neue Injektion zu starten. Zur vollständigen Reinigung der Säule muss nach jeder Injektion ein Waschzyklus der Säule erfolgen. Aufgrund der Acetonitril Knappheit, der Toxizität und des relativ hohen Preises wird versucht, Acetonitril durch Methanol in der mobilen Phase zu ersetzen.

Der erste Eluent mit Methanol anstelle Acetonitril besteht aus Methanol/Wasser, 95:5 (v/v) mit 0.2% Essigsäure. Die einzelnen Peaks werden wieder fraktioniert und mittels analytischer HPLC auf Anwesenheit von Acetyllopeolsäure geprüft.



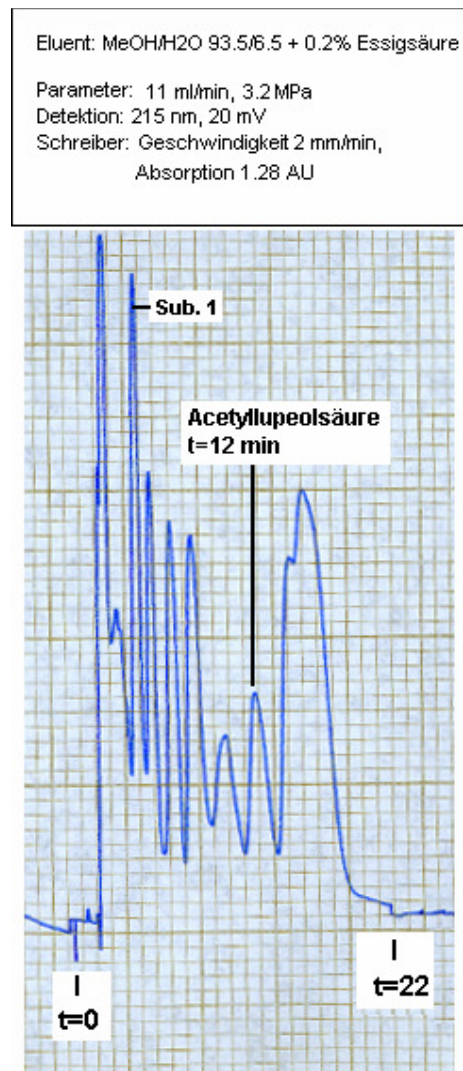
Chromatogramm 12: LPLC von Hexan1-Extrakt mit Eluent Methanol/Wasser, 95:5 (v/v)

Mit diesem Gradient ist der Säulen-Druck um ca. 1 MPa höher als bei Verwendung von Acetonitril. Acetyllopeolsäure eluiert schon nach 9 Minuten und man braucht nur 27 Minuten um eine neue Injektion zu starten. Aber die Peaks eluieren sehr nah nacheinander und es ist nicht leicht, sie vollständig zu trennen. Die HPLC-Analyse zeigt, dass unsere gesuchte Substanz unter diesen Bedingungen eine Reinheit von 95.1% aufweist. Zur Verbesserung der Auflösung wird ein neuer Eluent mit Methanol/Wasser, 92:8 (v/v) mit 0.2% Essigsäure getestet.



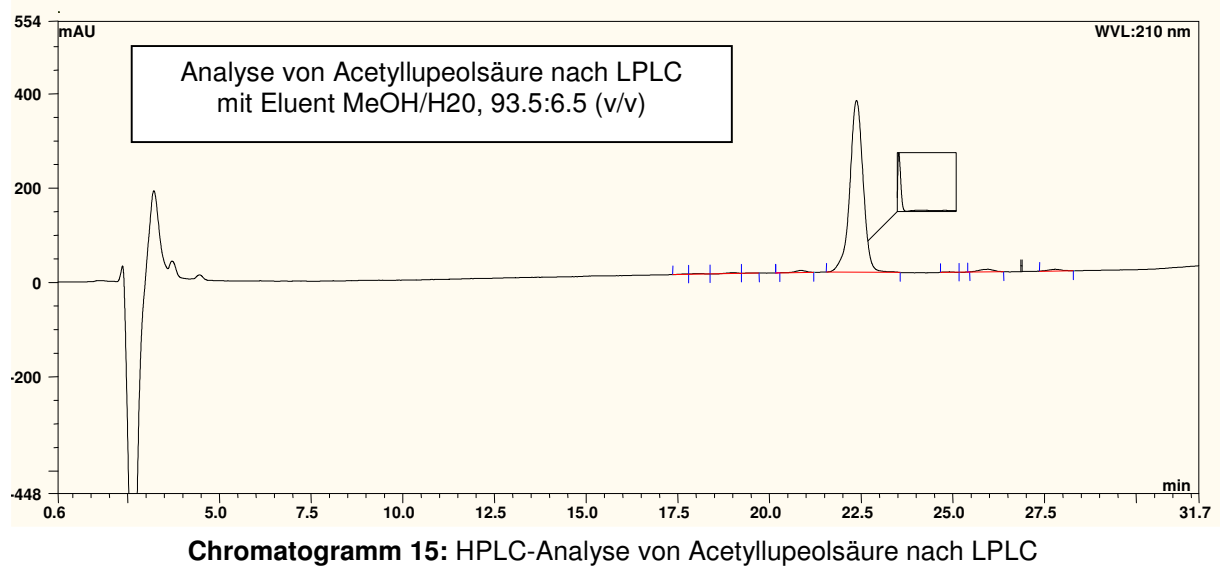
Chromatogramm 13: LPLC von Hexan1-Extrakt mit Eluent Methanol/Wasser, 92:8 (v/v)

Mit diesem Gradient ist aufgrund des höheren Wasseranteiles der Säulengegendruck noch höher (ca. 3.6 MPa). Dies ist die Grenze der Belastbarkeit des Trennsäulen Materiales. Unter diesen Elutionsbedingungen eluiert Acetylrupeolsäure sehr spät und ist nicht mehr so rein wie im ersten Versuch. Ein Kompromiss bezüglich Zusammensetzung der mobilen Phase zwischen 95:5 (v/v) und 92:8 (v/v) muss gefunden werden. In einem neuen Versuch wird mit Methanol/Wasser, 93.5:6.5 (v/v) mit 0.2% Essigsäure gearbeitet.



Chromatogramm 14: LPLC von Hexan1-Extrakt mit Eluent Methanol/Wasser, 93.5:6.5 (v/v)

Dieses Elutionsprofil ist optimal: die Peaks des Hexan1-Extraktes sind gut getrennt und es dauert nur 12 Minuten um Acetyllupeolsäure abzutrennen. Die Gesamtzeit für eine Analyse dauert 22 min. Ausserdem ist keine Spüllösung nötig. Die Überprüfung der isolierten Acetyllupeolsäure Fraktion ergab eine HPLC Reinheit von 95.1%. (siehe Chromatogramm 15)



Peakreinheit-Analyse mittels 3D-Datenfeld Analytik:

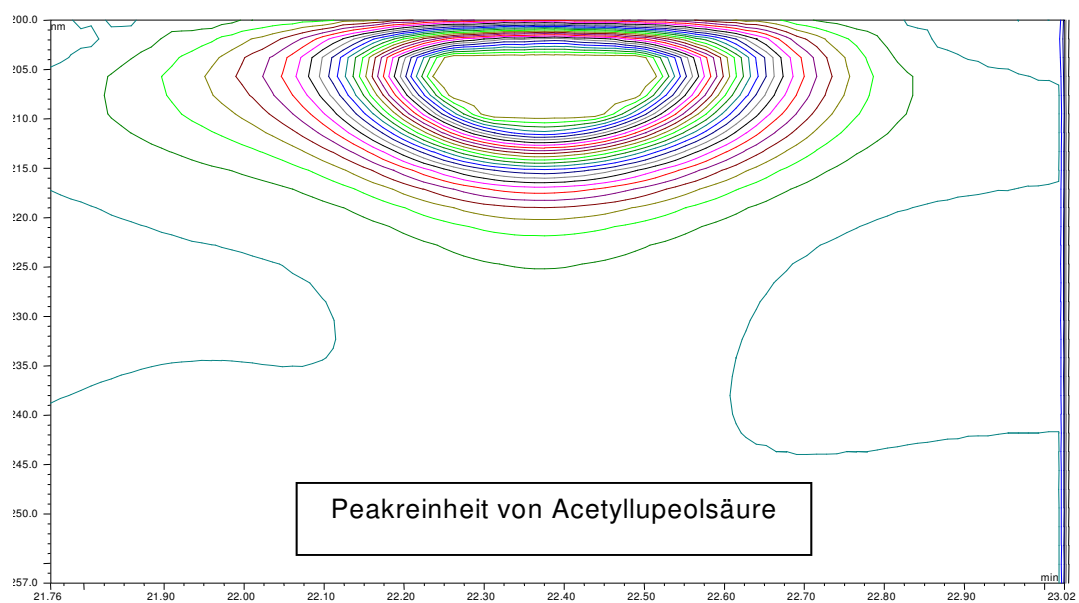
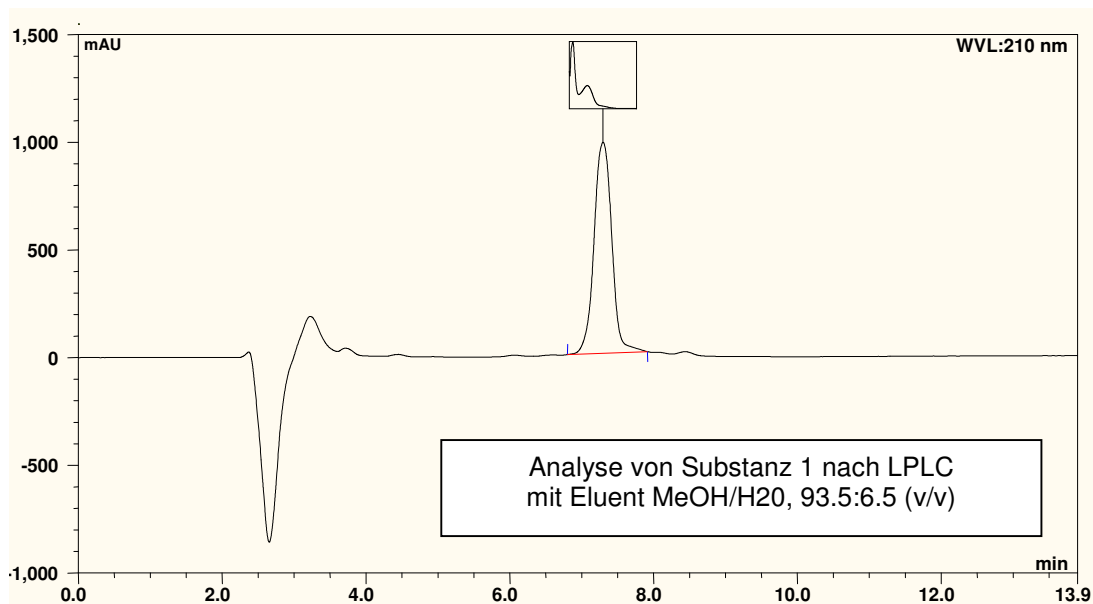


Abbildung 10: Peakreinheit-Analyse von Acetyllupeolsäure zu Chromatogramm 15

Die symmetrische Verteilung der kumulierten UV-Spektren über einem gesamten Acetyllupeolsäure Peak deutet auf eine hohe Reinheit des detektierten Peak hin.

Während einer chromatographischen Trennung ist es durchaus möglich, dass mehrere Substanzen gleichzeitig unter einem homogenen symmetrischen Peak eluieren. Als Beispiel wird an Substanz 1 aus Chromatogramm 14 gezeigt, wie mittels Peakreinheit-Analyse die Reinheit aller isolierten Substanzen effektiv überprüft werden kann



Chromatogramm 16: HPLC-Analyse von Substanz 1 nach LPLC

Auf dem Chromatogramm 16 sieht der eluierte Peak symmetrisch aus, wodurch eine homogene Zusammensetzung des eluierten Peaks zunächst angenommen werden kann. Doch die Peakreinheit-Analyse mittels des gespeicherten 3D-Datenfeldes zeigt eindeutig zwei Verunreinigungen an:

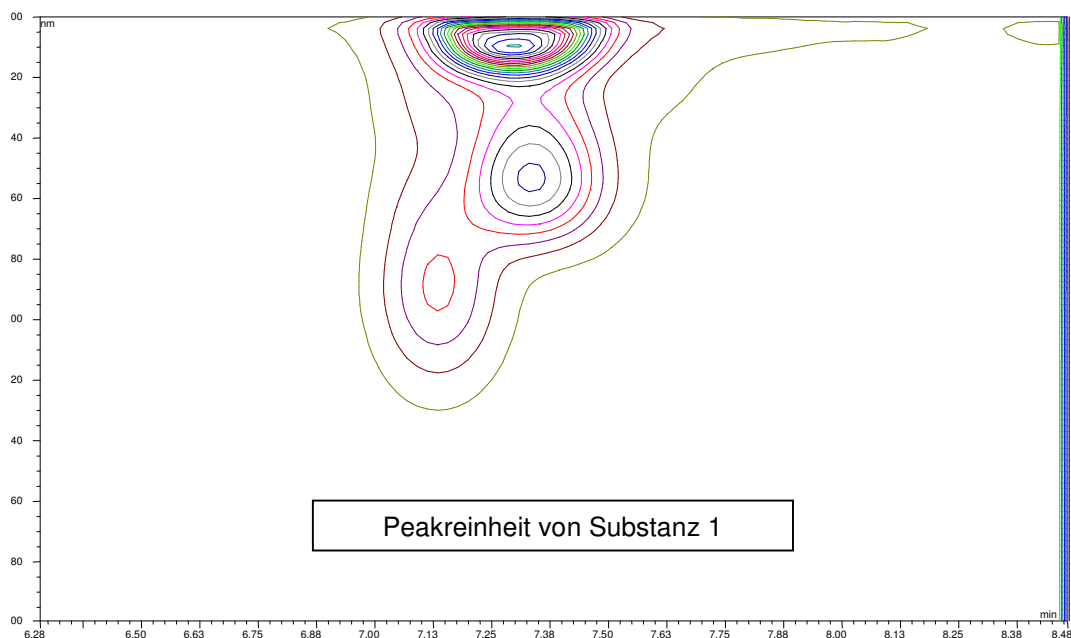
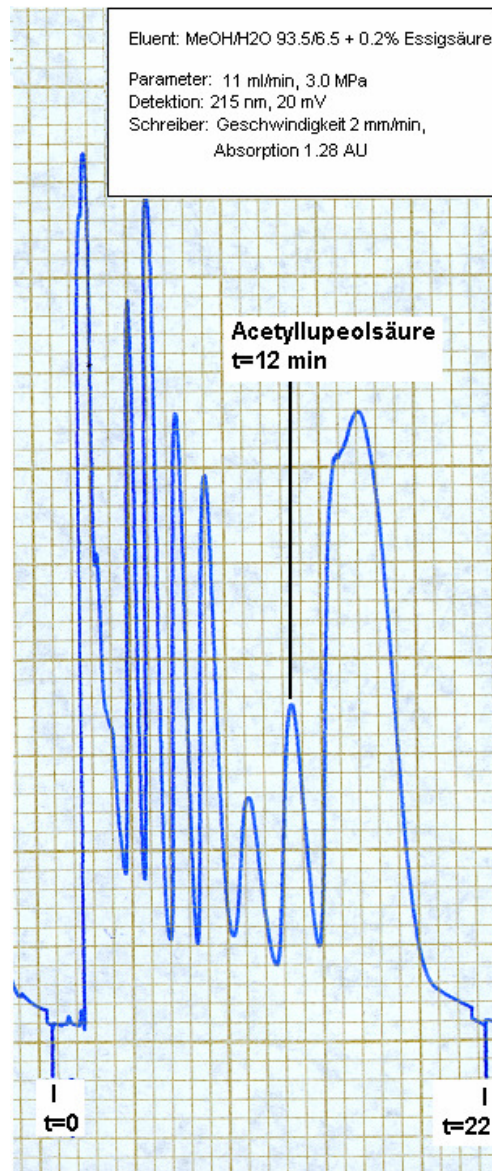


Abbildung 11: Peakreinheit-Analyse von Substanz 1 zu Chromatogramm 16

Es sind insgesamt drei verschiedene Substanzen unter demselben Peak zu detektieren. Sie können mit angewandten Methode nicht aufgetrennt werden.

Die Methode mit Eluent Methanol/Wasser, 93.5:6.5 (v/v) mit 0.2% Essigsäure wird auch für den Hexan2-Extrakt verwendet.



Chromatogramm 17: LPLC von Hexan2-Extrakt mit Eluent Methanol/Wasser, 93.5:6.5 (v/v)

Es sind dieselben Substanzen wie im Hexan1-Extrakt vorhanden, jedoch in verschiedenen Mengen.

Am Ende der LPLC Aufarbeitung wurden aus dem Hexan1- und Hexan2-Extrakt insgesamt 120 mg Acetyllupeolsäure isoliert. Mit etwa 95%-Reinheit ist die Substanz genügend rein, um mit semi-präparativer HPLC weiter aufgereinigt zu werden.

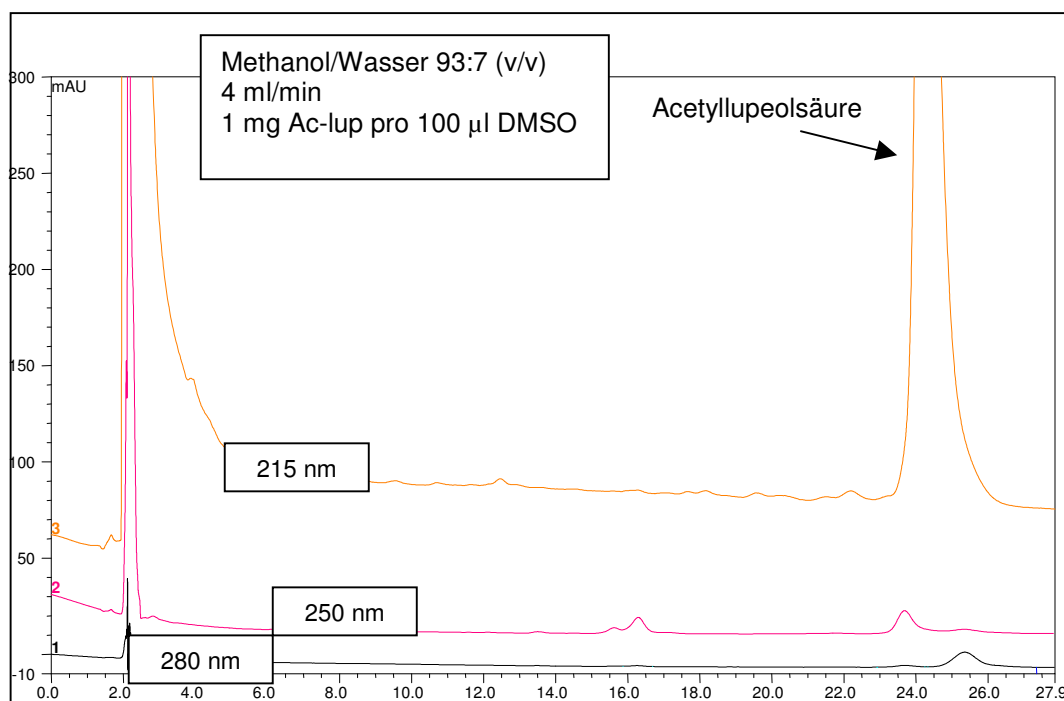
Die gleiche LPLC Methode ist auch für den Methanol-Extrakt angewandt worden. Aus 1.6 g Methanol-Extrakt, werden nach Kieselgel Fraktionierung 27 mg Acetyllupeolsäure isoliert. Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels Umkristallisation bzw. semi-präparativer HPLC.

Zur Aufreinigung des gesamten Hexan- und Methanol-Extraktes waren 27 LPLC Analysenläufe nötig. Der Wechsel von Acetonitril auf Methanol als Basislösungsmittel hat insgesamt eine Einsparung von 9 h reiner Analysenzeit und 780 € Lösungsmittel Kosten gebracht. Die Reinheit von Acetyllupeolsäure nach LPLC Aufreinigung mit Acetonitril oder Methanol als Eluent war in beiden Fällen gleich gut.

4.6. Semi-präparative HPLC

Ziel der semi-präparativen Probenaufreinigung mittels HPLC ist, Acetyllupeolsäure mit sehr grosser Reinheit (>99.0%) zu gewinnen. Dazu muss die HPLC-Methode, basierend auf der LPLC Methode, adaptiert werden.

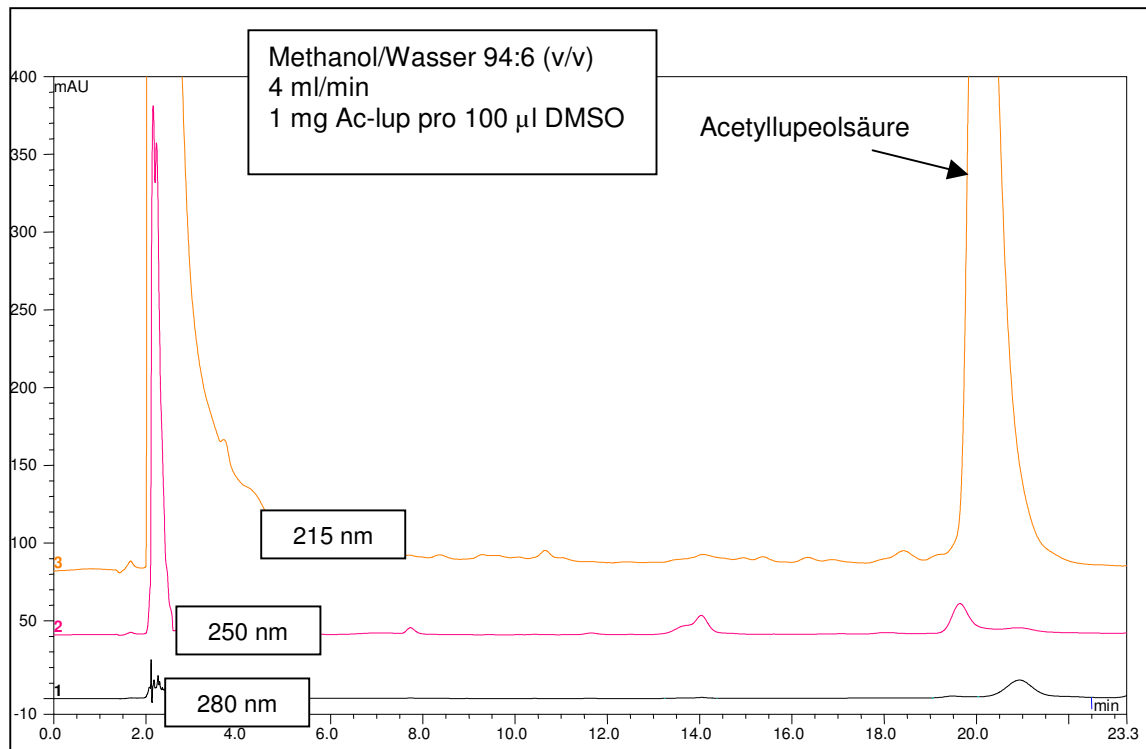
Der erste Versuch wurde mit dem Eluent Methanol/Wasser 93:7 (v/v), mit 0.2% Essigsäure, und einer Flussrate von 4 ml/min durchgeführt. Eine Probe von 1 mg Acetyllupeolsäure pro 100 µl DMSO wurde injiziert und bei den 3 Wellenlängen (215, 250 und 280 nm) detektiert.



Chromatogramm 18: Semi-präparative HPLC von 1 mg Acetyllupeolsäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 93:7 (v/v) und Flussrate 4 ml/min

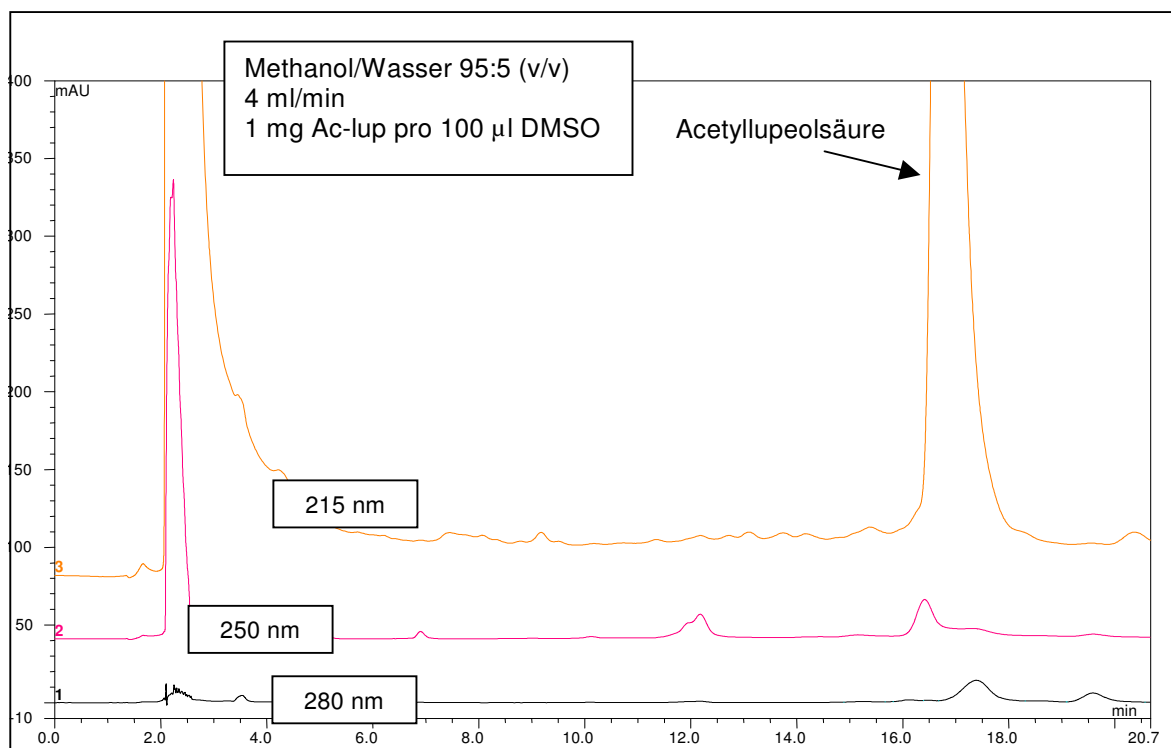
Mit Acetyllupeolsäure eluieren zwei weitere Substanzen mit UV-Spektrum Maximum bei 250 nm und 280 nm. Zur weiteren Aufreinigung der Acetyllupeolsäure muss der Schnittpunkt der Fraktionierung auf das jeweilige Peakmaximum der beiden Nebenkompenten gesetzt werden.

Mit diesem Eluent dauert eine chromatographische Trennung ca. 27 min. Dies ist zeitlich zu viel, da insgesamt 80 mg aufgereinigt werden müssen. Aus diesem Grund wird mit einer geänderten mobilen Phase deren Elutionskraft höher ist als die zuvor getestete, ein weiterer Lauf gestartet. Die neue mobile Phase besteht aus Methanol/Wasser 94:6 (v/v), mit 0.2% Essigsäure.



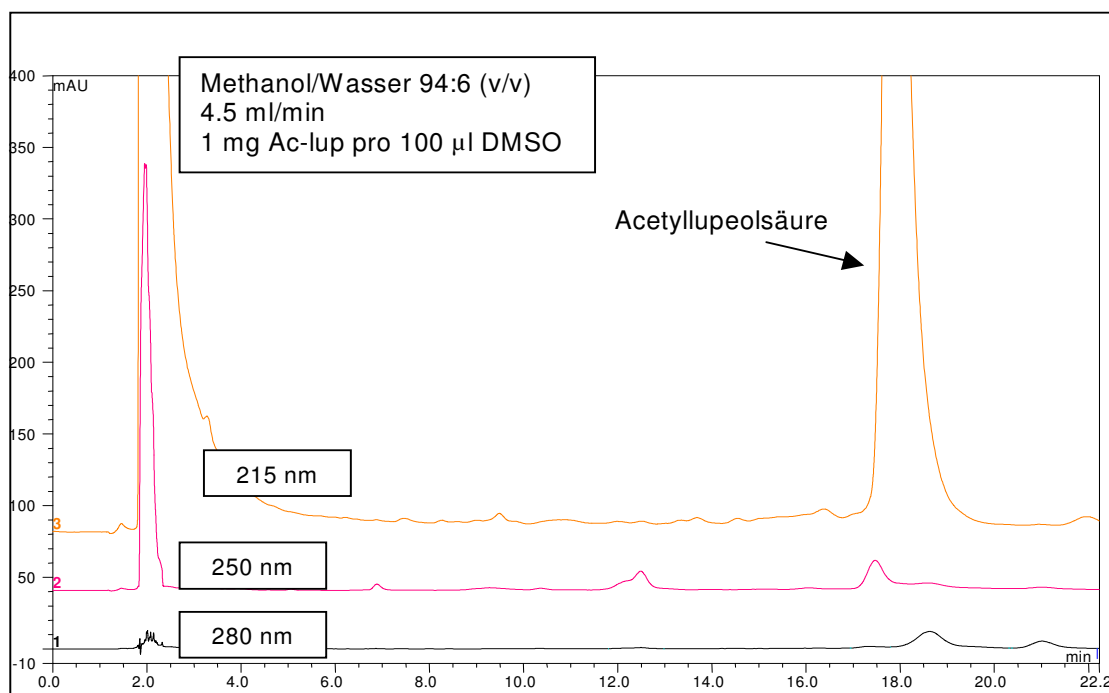
Chromatogramm 19: Semi-präparative HPLC von 1 mg Acetylloleic acid pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 94:6 (v/v) und Flussrate 4 ml/min

Mit diesem Eluent eluiert Acetylloleic acid nach etwa 23 Minuten. Zur weiteren Verkürzung der Elutionszeit wird ein weiterer Eluent mit erhöhter Elutionskraft getestet. Der Methanolanteil in dieser neuen mobilen Phase beträgt 95%.



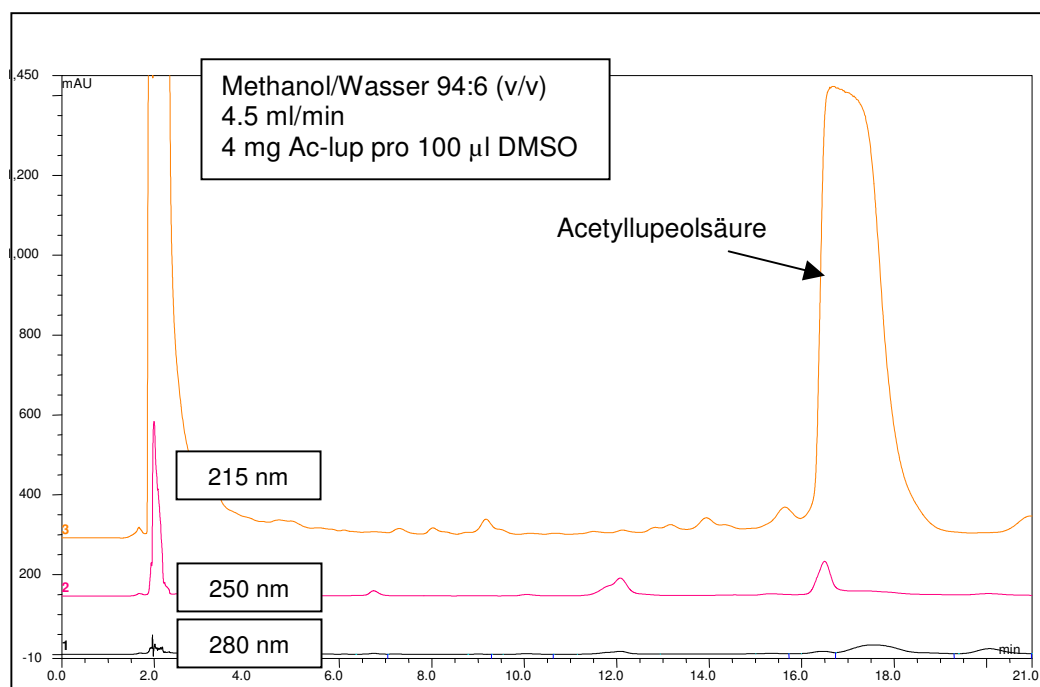
Chromatogramm 20: Semi-präparative HPLC von 1 mg Acetylloleic acid pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 95:5 (v/v) und Flussrate 4 ml/min

Dieser Eluent erlaubt Acetyllupeolsäure in etwa 18 Minuten zu eluieren, jedoch die Abtrennung der beiden Nebenkomponten ist nicht mehr ausreichend. Der beste Eluent optimiert bezüglich Elutionszeit und Auflösung ist also Methanol/Wasser 94:6 (v/v), mit 0.2% Essigsäure. Die Flussrate wird von 4 ml/min auf 4.5 ml/min erhöht, um zusätzlich die benötigte Aufreinigungszeit zu verringern.



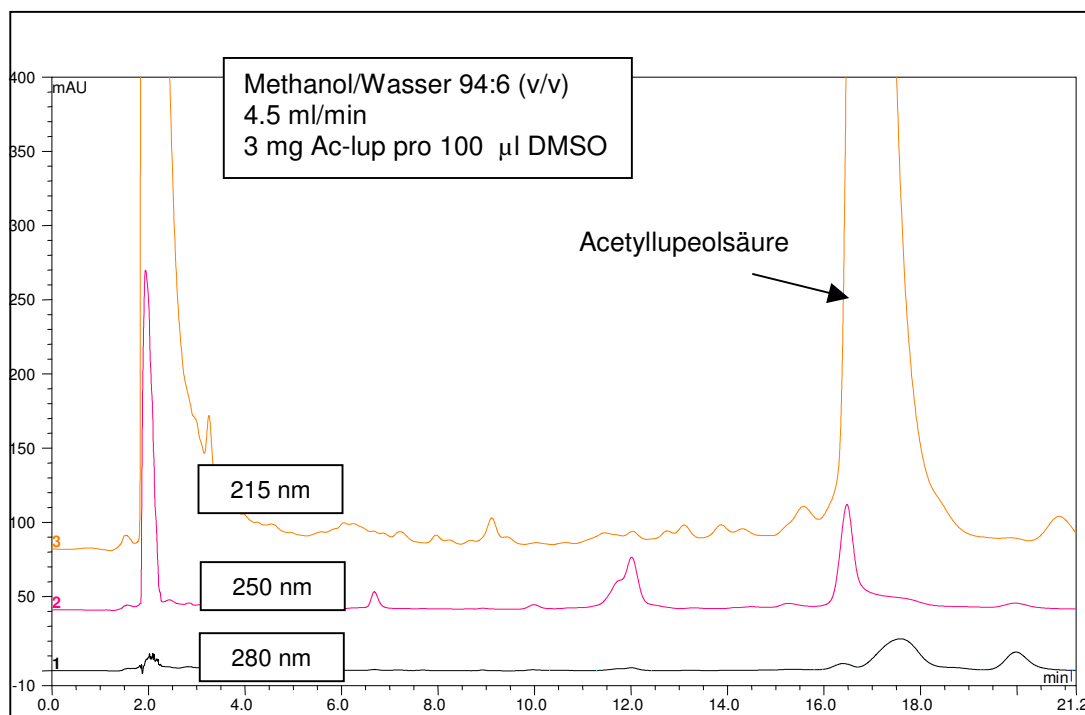
Chromatogramm 21: Semi-präparative HPLC von 1 mg Acetyllupeolsäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 94:6 (v/v) und Flussrate 4.5 ml/min

Unter den jetzt optimierten Bedingungen, wird Acetyllupeolsäure nach etwa 20 Minuten vollständig eluiert. Eine weitere Optimierung erfolgt bezüglich der Probenbeladung unter den optimierten Elutionsbedingungen. Die Proben Menge wird zwischen 1 mg / Injektion und 4 mg / Injektion variiert. Begrenzender Faktor der Beladungsoptimierung ist die Abtrennung der beiden sehr nahe bei Acetyllupeolsäure eluierenden Begleitverbindungen.



Chromatogramm 22: Semi-präparative HPLC von 4 mg Acetyllopolysäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 94:6 (v/v) und Flussrate 4.5 ml/min

Mit 4 mg Acetyllopolysäure pro 100 µl DMSO ist die Beladung im Hinblick auf Abtrennung der Begleitverbindungen überschritten. Im weiteren wird eine Injektionsmenge von 3 mg getestet.



Chromatogramm 23: Semi-präparative HPLC von 3 mg Acetyllopolysäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 94:6 (v/v) und Flussrate 4.5 ml/min

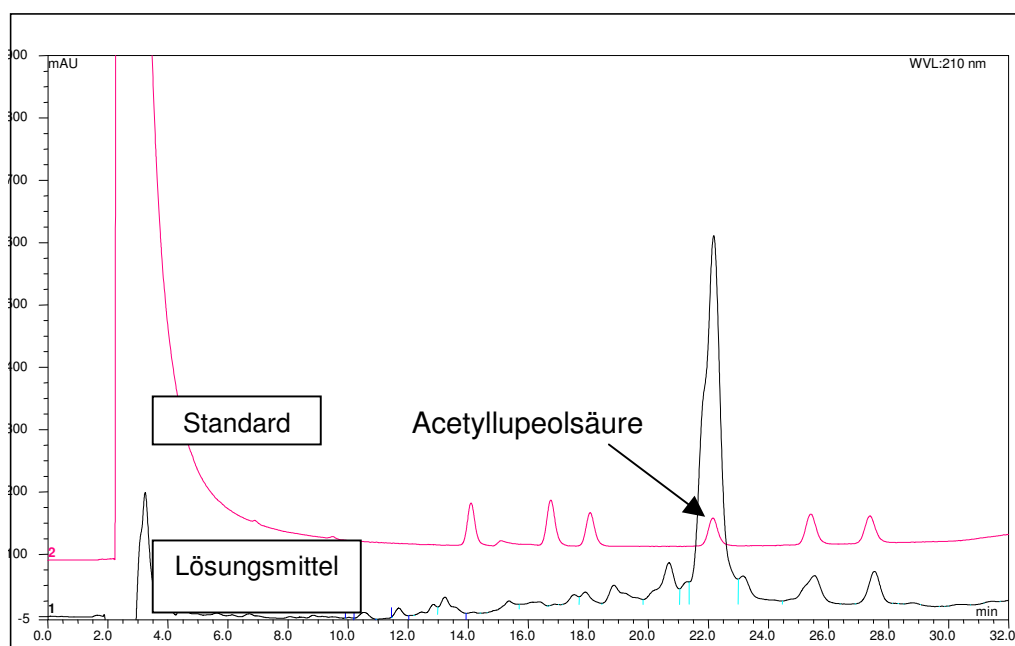
Diese Trennung ist optimal bezüglich Analysendauer und Beladungsmenge bzw. Reinheit der abgetrennten Acetyllopeolsäure. Für alle weiteren Aufreinigungen werden diese Bedingungen verwendet.

Mittels analytischer HPLC Gradientenanalyse mit *File3* wird die Reinheit der isolierten Acetyllopeolsäure kontrolliert. (siehe Kapitel 4.8)

4.7. Umkristallisation

Die Methode der Umkristallisation ist ein Reinigungsverfahren, um verunreinigte chemische Substanzen durch Auflösen und anschliessendes Wiederauskristallisieren in reinere Endprodukte zu überführen. Die Acetyllopeolsäure welche nach LPLC Aufreinigung anfällt, hat eine Reinheit von ca. 95% und wird mittels dieser einfachen Methode versucht weiter aufzureinigen. Dazu werden 20 mg Substanz in 4.2 ml warmen Acetonitril-Wassergemisch (9:1 v/v) gelöst. Nach Abkühlung im Kühlschrank fallen 17 mg einer weissen kristallinen Substanz aus. Die erhaltenen Acetyllopeolsäure Kristalle werden ebenfalls mittels analytischer Gradienten HPLC auf deren Reinheit überprüft. Die Substanzreinheit wird im Kapitel "4.8 Charakterisierung der isolierten Acetyllopeolsäure" beschrieben.

Der resultierende flüssige Überstand (= Lösungsmittel) aus der Umkristallisation wird mittels analytischer Gradient HPLC auf Reste von nicht ausgefällter Acetyllopeolsäure überprüft.



Chromatogramm 24: Kontrolle des Lösungsmittel nach Umkristallisation

Die in der wässrigen Phase vorhandenen Reste von nicht ausgefällter Acetyllopeolsäure, werden mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Mit dieser Methodik werden noch 20 mg Acetyllopeolsäure aus dem Hexan-Extrakt und die gesamte Menge aus dem Methanol-Extrakt aufgereinigt.

4.8. Charakterisierung der isolierten Acetyllupeolsäure

Die erhaltene Reinsubstanz muss am Ende der Aufarbeitung charakterisiert werden. Dazu sind verschiedene physikalische und chemische Testverfahren nötig, wie Bestimmung des Schmelzpunkts, Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln, wie Dünnschichtchromatographie auf zwei verschiedenen polaren stationären Phasen, Gradienten HPLC, UV-Spektrum, Massenspektrometrie und DPPH-Test. Bezüglich der biochemischen Aktivität wird ein XTT-Test durchgeführt. Alle diesen Informationen charakterisieren unsere Substanz. Allgemeine Angaben zur Substanz wie Summenformel, Molmasse, ihr exakter IUPAC-Name, ihr CAS-Name und ihre CAS-Registriernummer ergänzen die vorherigen Angaben. Die CAS-Registriernummer (CAS = *Chemical Abstracts Service*) ist ein internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe. Für jeden bekannten chemischen Stoff (auch Biosequenzen, Legierungen, Polymere) existiert eine eindeutige CAS-Nummer.

4.8.1. Physikalische Eigenschaften

4.8.1.1 Allgemeine Eigenschaften

Acetyllupeolsäure ist ein pentazyklisches Triterpen, welches aus sechs Einheiten aktivem Isopren aufgebaut ist. Sie besitzt folgende Struktur:

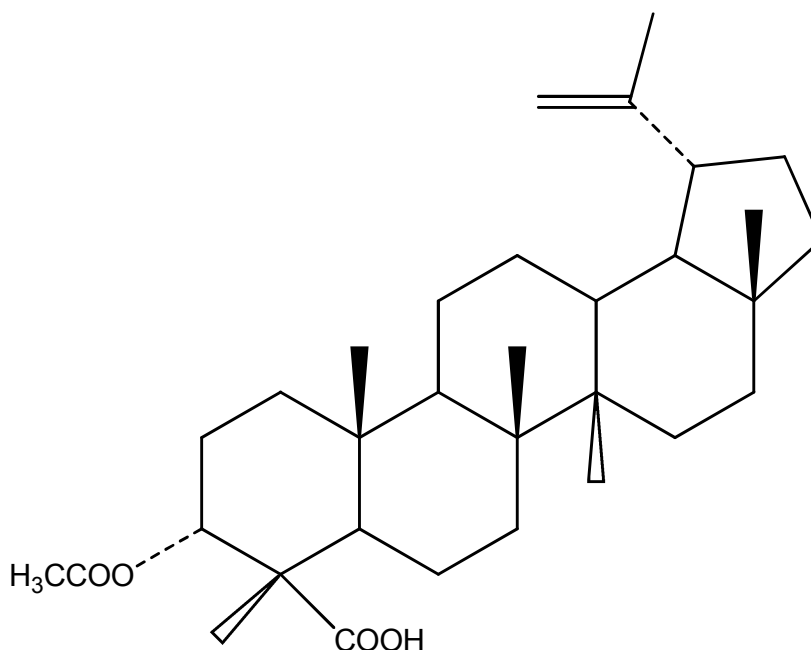


Abbildung 12: Struktur von Acetyllupeolsäure

Die Summenformel ist $C_{32}H_{50}O_4$, die Molmasse 498.7 g/mol. Ihrer IUPAC-Name ist (1*R*,3*aR*,5*aS*,5*bR*,8*S*,9*R*,11*aR*)-9-acetoxy-3*a*,5*a*,5*b*,8,11*a*-pentamethyl-1-(prop-1-en-2-yl)icosahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]chrysene-8-carboxylic acid. Der CAS-Name: Lup-20(29)-en-23-oic acid, 3-(acetyloxy)-, (3*α*,4*β*,13*α*,18*β*)- mit der CAS-Registriernummer 934826-48-9. [18]

4.8.1.2 Aussehen und Menge

Reine Acetyllupeolsäure ist weiss und kristallin.

Aus dem Hexan-Extrakt und dem nur zum Teil aufgearbeiteten Methanol-Extrakt, konnten insgesamt 120 mg reine Acetyllupeolsäure isoliert werden. Mittels Hexan Extraktion können ca. 33% der ursprünglich im Ausgangsharz vorhandenen Acetyllupeolsäure gewonnen werden. Mittels alternativer Methanol Extraktion sind dies ca. 55%. Bei jeder Aufreinigungstufe, speziell Soxhlet und flüssig-flüssig Extraktion geht allerdings ein gewisser Anteil an Wirksubstanz verloren. Die weiteren anschliessenden Reinigungsverfahren verlaufen fast nahezu quantitativ. (siehe Tabelle 5)

4.8.1.3 Schmelzpunkt

Der Schmelzpunkt ist ein wichtiger physikalischer Parameter zur empfindlichen Detektion der Substanz Reinheit. Zwei Proben Acetyllupeolsäure wurden gleichzeitig mit einem Schmelzpunktbestimmungsgerät analysiert. Die Substanz hat einen Schmelzbereich von 232 °C - 234 °C.

Dieser gefundene Wert kann mit Literaturangaben verglichen werden. Der in der Literatur beschriebene Schmelzpunkt ist 234 °C, mit einem Schmelzbereich von 224 °C - 234 °C. [19] Der Endschmelzpunkt von 234 °C ist mit der Literatur identisch. Der verringerte Schmelzbereich in diesem Experiment gibt eventuell Hinweise auf eine etwas höhere Reinheit oder andere Kristallstruktur. Acetyllupeolsäure ist in diesem Experiment aus Acetonitril kristallisiert, während in der Literatur dies aus Methanol erfolgte.

4.8.1.4 Löslichkeit

Acetyllupeolsäure ist aufgrund der chemischen Struktur eine relativ unpolare Substanz, mit einer polaren Carboxylgruppe im Molekülaufbau. Sie ist gut löslich in Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol, Aceton, DMSO, Chloroform und Ethylacetat. Der Polaritätsindex nach Snyder befindet sich für diese organischen Lösungsmittel zwischen 4.4 und 6.6. [20] Acetyllupeolsäure ist jedoch in dem polaren Lösungsmittel Wasser völlig unlöslich (Polaritätsindex nach Snyder von 9.0), was bei einer späteren Anwendung dieser Substanz in biologischen Testsystemen problematisch ist.

4.8.2. Chemische und biochemische Eigenschaften

4.8.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die kombinierte Dünnschichtchromatographie auf zwei verschiedenen polaren stationären Trägersystemen erlaubt die Substanz Reinheit gut zu charakterisieren. Zur Kontrolle werden Acetyllupeolsäure aus semi-präparativer HPLC und aus Umkristallisationsversuchen gewonnen, auf C18- und SiO₂-Platten aufgetragen und analysiert.

Zur Auswertung der Reinheit werden die TLC-Nachweisgrenzen, ermittelt im Institut für Naturheilkunde und klinische Pharmakologie in Ulm herangezogen. Auf beiden stationären Phasen kann eine minimale Substanzmenge von 5 ng Acetyllupeolsäure/Spot detektiert werden. [21] Mit diesem Wert kann die relative Reinheit von Acetyllupeolsäure berechnet werden.

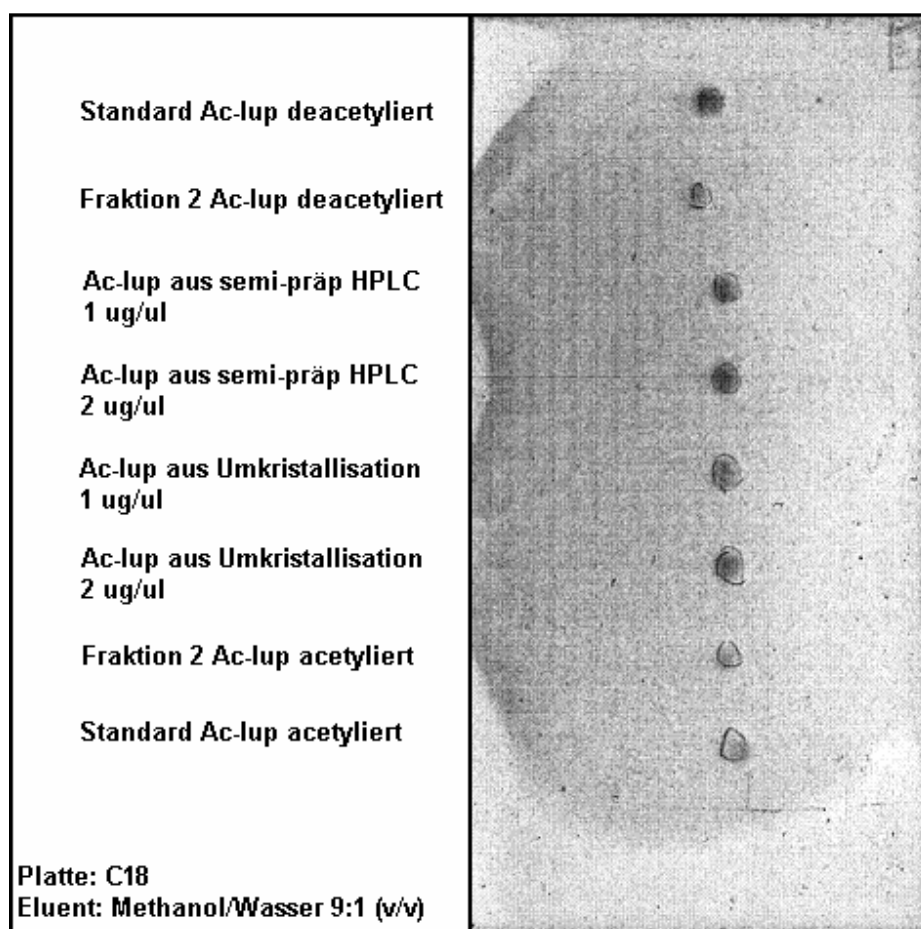


Abbildung 13: Kontrolle von Acetyllupeolsäure auf C18 DC Platte

Auf dieser C18 Platte können auch bei 2 µg Testsubstanz keine weiteren Flecke als die von Acetyllupeolsäure detektiert werden. Mit der Nachweisgrenze von 5 ng/Spot berechnet, resultiert eine Reinheit von >99.75%.

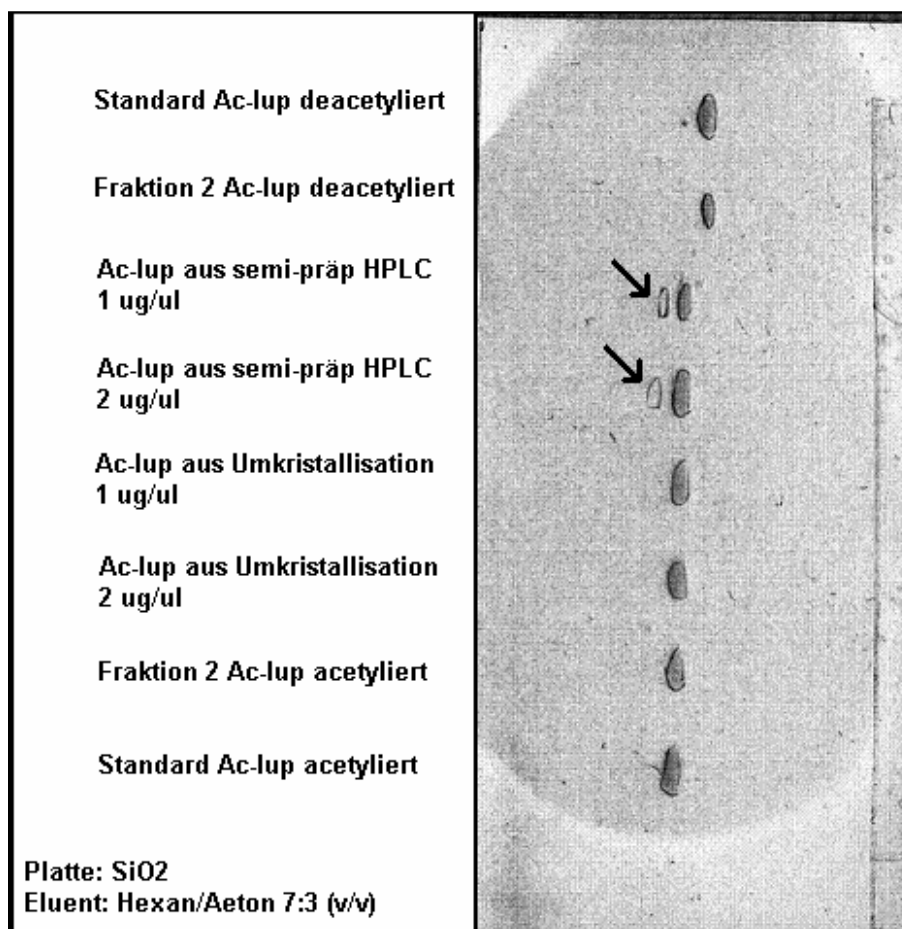


Abbildung 14: Kontrolle von Acetyllupeolsäure auf SiO₂ DC-Platte

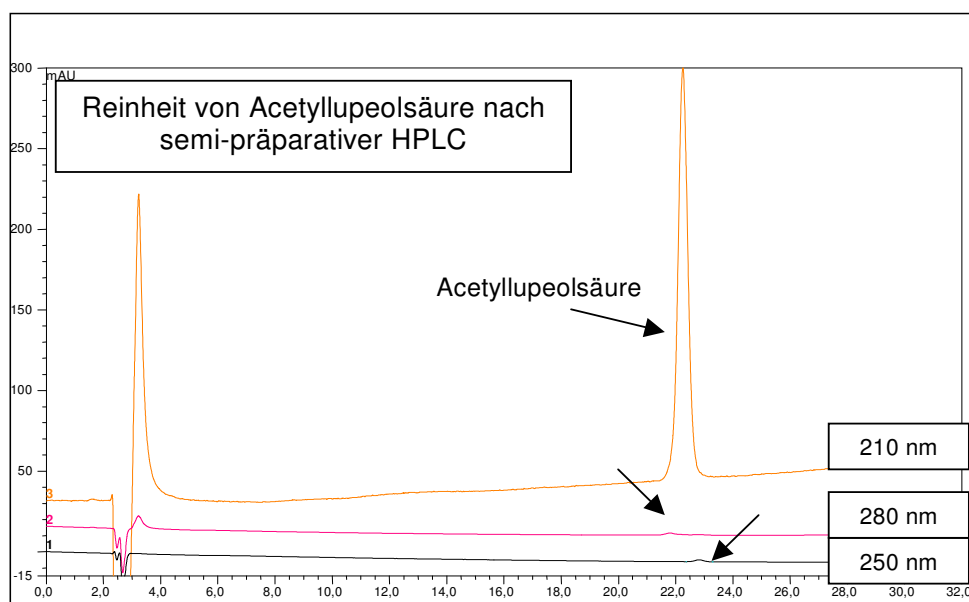
Die Auswertung der polaren Kieselgel-Platte zeigt unterschiedliche Ergebnisse. Die Acetyllupeolsäure, über die Methode der Umkristallisation gewonnen, zeigt wie auf der reversed Phase Platte selbst bei 2 µg/Spot keine weiteren Flecke. Dies bedeutet Acetyllupeolsäure hat eine Reinheit von >99.75 %.

Die Probe aus der semi-präparativen Aufarbeitung hat dagegen einen weiteren Substanzfleck. Zur Abschätzung der relativen Menge dieser Verunreinigung über die Nachweisgrenze werden unterschiedliche Mengen Acetyllupeolsäure aufgetragen. Diese Konzentrationen sind folgende: 2 µg Acetyllupeolsäure pro µl Methanol, 1 µg/µl, 0.7 µg/µl, 0.5 µg/µl und 0.3 µg/µl. Auf die SiO₂-Platte kann man diesen kleinen Fleck noch bei 0.7 µg/µl sehen, aber nicht mehr bei 0.5 µg/µl. Mit der Nachweisgrenze von 5 ng/Spot kann man berechnen, dass dies etwa 0.7% Verunreinigung in Acetyllupeolsäure bezogen auf 0.7 µg dieser Säure ist. Diese Acetyllupeolsäure ist also ca 99.3% rein.

Zur Ergänzung und Verifikation dieses Ergebnisses, wird zusätzlich noch eine HPLC Analyse durchgeführt.

4.8.2.2 Analytische HPLC

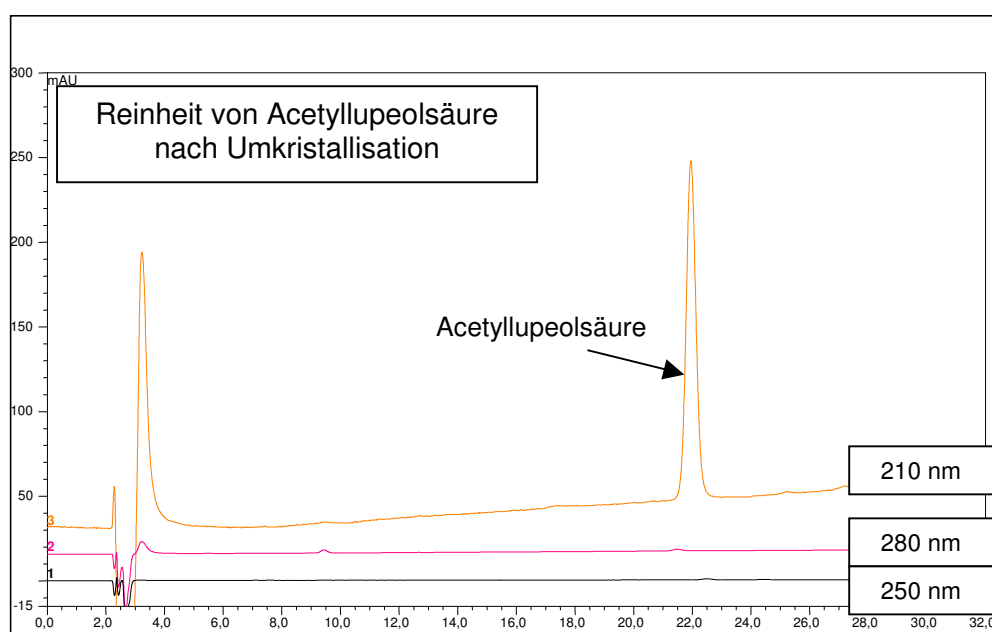
Eine HPLC-Analyse mit Gradient *File3* erlaubt die Reinheit unserer Acetyllupeolsäure genauer zu spezifizieren.



Chromatogramm 25: Acetyllupeolsäure nach semi-präparativen HPLC

Innerhalb des Elutionsprofils bei 215 nm Detektionswellenlänge ist nur Acetyllupeolsäure zu detektieren. Die Reinheit von Acetyllupeolsäure aus semi-präparativer HPLC Aufreinigung bezogen auf Flächenprozent Angaben ist 99.8%. Die Auswertung der beiden Detektionsspuren 250 nm, 280 nm zeigen einen Restgehalt von Verunreinigungen die nicht abgetrennt werden konnten von 0.5% an. Die Reinheit ist also von 99.3% (bezogen auf Flächen %).

Acetyllupeolsäure aus Umkristallisation wird ebenfalls mit HPLC analysiert.



Chromatogramm 26: Acetyllupeolsäure nach Umkristallisation

Die Reinheit ist in diesem Fall auch bei 99.8%. Die Auswertung der beiden Detektionsspuren 250 nm und 280 nm zeigen einen Restgehalt von Verunreinigungen die nicht abgetrennt werden konnten von <0.1% an. Die Reinheit ist also von 99.8% (bezogen auf Flächen %).

Semi-präparative HPLC und Umkristallisation sind beides geeignete Methoden, um reine Acetyllopeolsäure zu gewinnen. Umkristallisation geht aber wesentlich schneller und ist billiger. Die gesamte Acetyllopeolsäure aus dem Methanol-Extrakt wird deshalb mittels Umkristallisation aufgereinigt. Bei einer durchgeführten Aufreinigung von ca. 70 mg Acetyllopeolsäure kann etwa 8 Stunden Arbeitszeit eingespart werden.

4.8.2.3 UV-Spektrum

Das UV-Spektrum ist ein weiteres Kriterium zur Charakterisierung einer Substanz. Mittels dieser Daten ist es möglich, Informationen zur Struktur, Reinheit und mögliche Detektionswellenlängen für die empfindliche Detektion in der HPLC zu gewinnen. Das UV-Spektrum von Acetyllopeolsäure, in Methanol/Wasser 80:20 (v/v), mit 0.2% Essigsäure gelöst, ist folgendes:

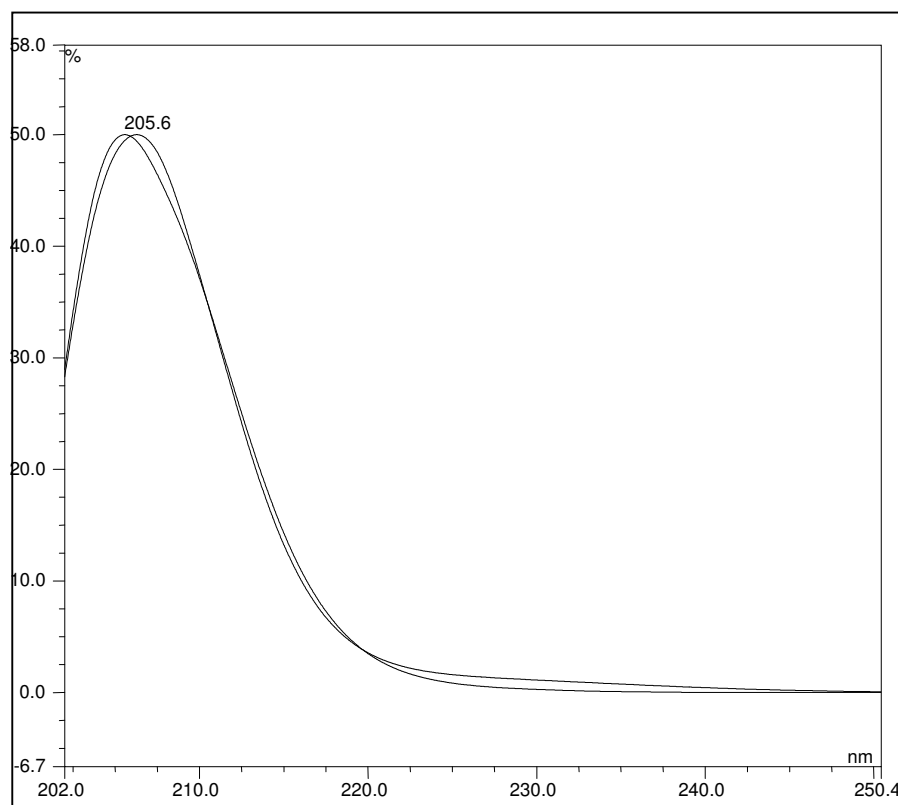


Abbildung 15: UV-Spektrum von Acetyllopeolsäure

Acetyllopeolsäure hat unter diesen Lösungsmittel Bedingungen ein Absorptions-Maximum bei 205.6 nm. In der angewandten HPLC Methode wird eine Detektions Wellenlänge von 210 nm benutzt. Dies ist ein Kompromiss zwischen ansteigender UV Absorption des HPLC Eluenten, und dadurch verringerter Detektionsempfindlichkeit bei niederen Wellenlängen, und Nachweisempfindlichkeit zur Detektion von Acetyllopeolsäure.

4.8.2.4 Massenspektrometrie

Mittels der Massenspektrometrie im Electron Impact Modus wird die Molmasse und z. T. die Struktur des Moleküls identifiziert. Acetyllupeolsäure MS-Spektrum ist folgendes:

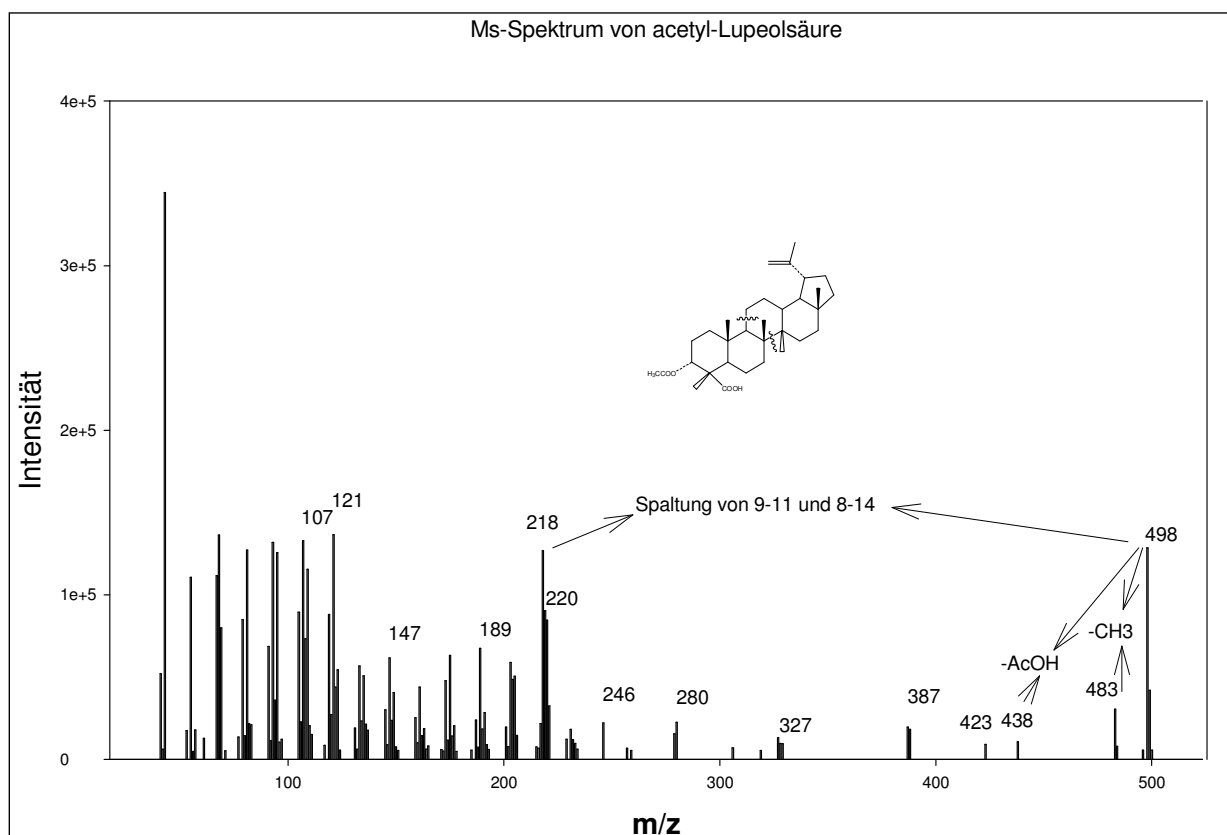


Abbildung 16: MS-Spektrum von Acetyllupeolsäure

Die Molmasse von 498 m/z ist direkt sichtbar neben einigen markanten Fragmenten des gesuchten Moleküls. Dieses Spektrum ist identisch mit den für Acetyllupeolsäure publizierten Daten. [19] Aufgrund der Übereinstimmung kann die isolierte Substanz als Acetyllupeolsäure identifiziert werden.

4.8.2.5 DPPH-Test

Der DPPH-Test erlaubt die antioxidativen Eigenschaften einer Substanz zu charakterisieren.

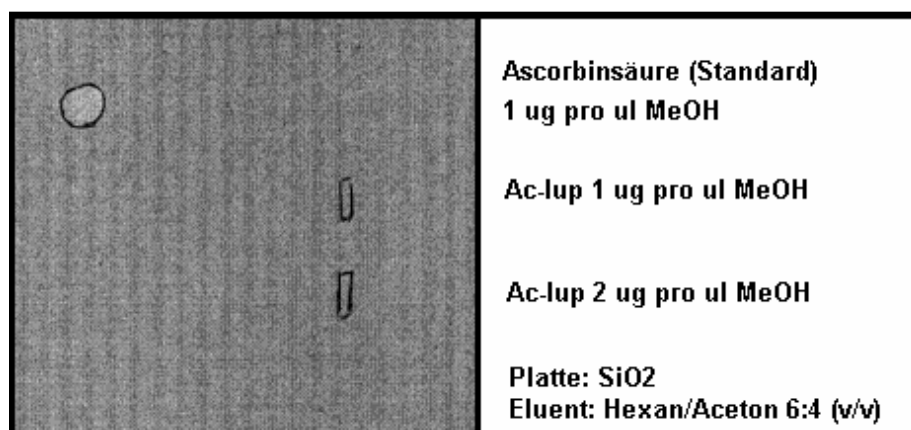


Abbildung 17: DC-Platte für DPPH-Test

Die Ascorbinsäure dient als Standard. Diese Substanz besitzt starke antioxidative Eigenschaften. Auf der Platte erscheint Ascorbinsäure sofort nach Beginn der Detektionsreaktion als ein weisser Fleck. Die zwei Acetyllopeolsäure Flecken sind jedoch negativ. Dies zeigt, dass Acetyllopeolsäure keine antioxidativen Eigenschaften besitzt. Der DPPH-Test ist also negativ.

4.8.2.6 XTT-Wert

Der XTT-Test ist ein biochemischer Test zum Nachweis von lebensfähigen Zellen. Die photometrische Auswertung nach dem Test mit Acetyllopeolsäure und Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AkBA) auf PC3 Tumorzellen liefert folgende Resultate:

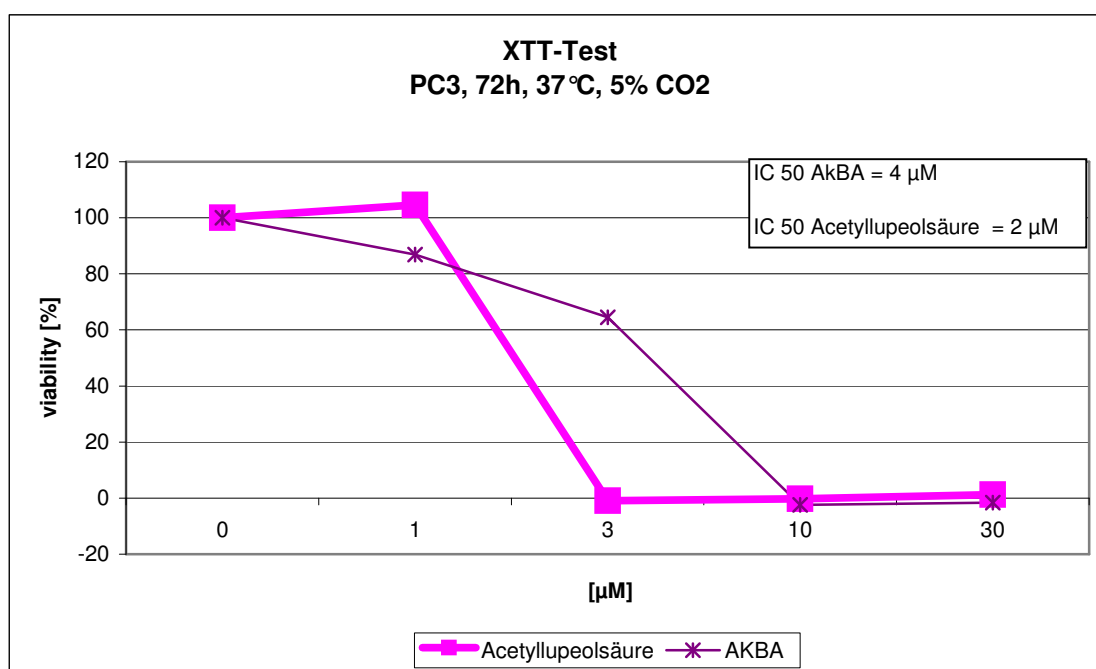


Abbildung 18: Resultate von XTT-Test für Acetyllopeolsäure und AkBA

AkBA ist bekannt als aktive Substanz zur Zerstörung von PC3 Tumorzellen. Ihr IC_{50} -Wert ist ca 4 μM , das heisst dass schon eine 4 μM AkBA Konzentration ausreicht um die Hälfte der aktiven PC3 Tumorzellen abzutöten.

Der XTT Vergleich mit AkBA zeigt, dass Acetyllopeolsäure gegen PC3 Tumor Zellen ähnlich aktiv. Ihr IC_{50} -Wert ist ca 2 μM .

Acetyllopeolsäure wurde in der Literatur auch gegen andere Tumorzellen getestet. Folgende IC_{50} -Werte sind publiziert worden. [6]

Tabelle 6: IC_{50} -Werte von Acetyllopeolsäure an verschiedenen Tumorzellen

	IC_{50} -Wert [μM]
SK-N-SH human neuroblastoma cells	4.7
NB-39 human neuroblastoma cells	86.7
IMR-32 human neuroblastoma cells	4.1

4.9. Solubilisierung der isolierten Acetyllopeolsäure mittels Cyclodextrin

Acetyllopeolsäure ist ein unpolares Molekül, welches in Wasser nicht löslich ist. Mittels Cyclodextrin Komplexierung ist es möglich, diese Substanz physikalisch so zu verändern, dass sie in Wasser löslich wird. Dies ist Voraussetzung, damit eine Applikation in biologischen Testsystemen (Chorionallantoismembran – CAM –, Maus) möglich wird.

Die Komplexierung von Acetyllopeolsäure mit Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin ist aufgrund räumlicher Gegebenheiten der beiden Moleküle nicht möglich. Die resultierende Komplexlösung war trübe, bzw. Ausfällungen der Acetyllopeolsäure Kristalle sichtbar.

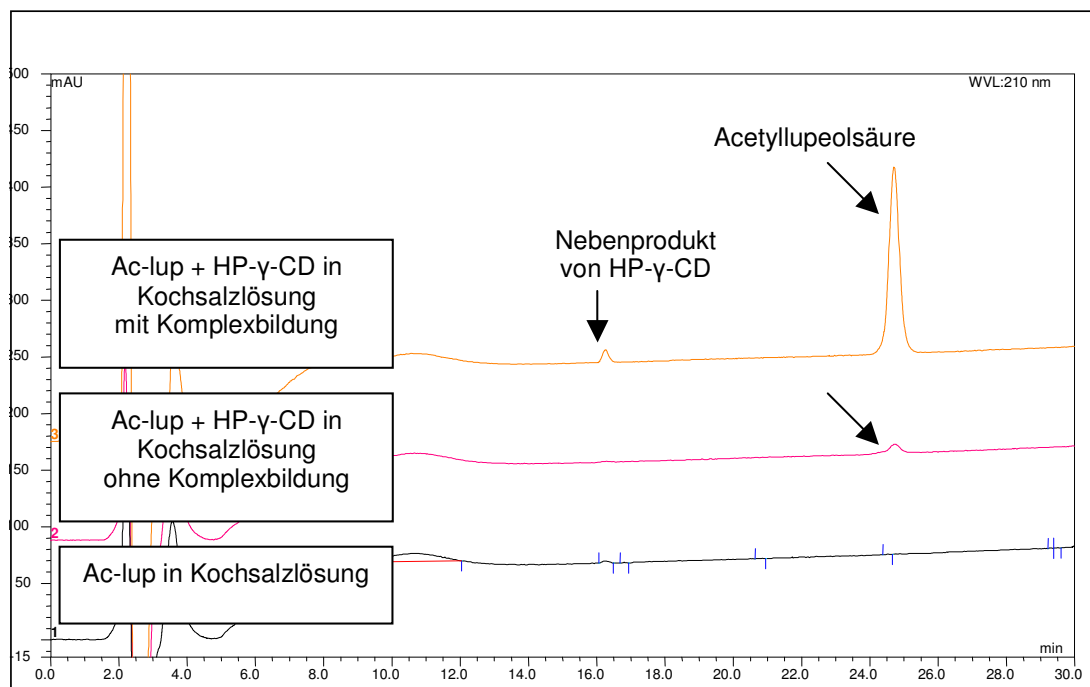
Versuche zur Komplexierung mit Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin waren erfolgreich. Der beste Komplex bildete sich bei einem Verhältnis von 0.5 mg Acetyllopeolsäure und 5 mg HP- γ -CD mit dem Lösungsmittel Ethanol zur Komplexierung und 0.9% NaCl Lösung als Lösungsmittel für den resultierenden Komplex.

Diese Menge von 0.5 mg Acetyllopeolsäure und 5 mg HP- γ -CD entspricht einem molaren Verhältnis von 1:3. Dies bedeutet, dass z. B. für eine Applikation dieses Komplexes in der Maus bei einer Dosierung von 100 $\mu\text{mol/kg}$ nur 15 mg HP- γ -CD nötig sind. Je geringer der Hilfsstoff Anteil bei der Applikation des Wirkstoffes, desto besser bezüglich evt. negativen toxischen Eigenschaften des Hilfsstoffes. Vorversuche zur Komplexierung mit dem Lösungsmittel Ethanol/Wasser 8:2 (v/v) haben gezeigt, dass durch gezielten Einsatz definierter Wassermengen das molare Verhältnis der beiden Komponenten bis auf 1:1 eventuell verändert werden kann. Das heisst für eine Dosierung von 100 $\mu\text{mol/kg}$, sind nur noch 5 mg HP- γ -CD nötig.

Eine weitere Variante zur Herstellung des Cyclodextrin Komplexes wurde bezüglich Art des Lösungsmittels untersucht. Anstelle von Ethanol wurde das wesentlich billigere Methanol getestet (2.5 Liter Ethanol Reinheit p. a. kosten etwa 160 €, während Methanol Reinheit p. a. ca. 8 € pro 2.5 Liter kosten).

Ein optimaler Komplex zwischen Acetyllopeolsäure und Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin mit Methanol als Lösungsmittel bildet sich bei einem Verhältnis von 0.5 mg Acetyllopeolsäure und 25 mg HP- γ -CD. Mit 15 mg HP- γ -CD ist die Komplexbildung ebenfalls noch möglich, jedoch grenzgängig. Diese Menge von 0.5 mg Acetyllopeolsäure und 15 mg HP- γ -CD entspricht einem molaren Verhältnis von 1:9. Dieses Verhältnis ist gegenüber 1:3 bei Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel deutlich grösser. Für die Dosierung einer Maus mit 100 $\mu\text{mol/kg}$, bedeutet dies die Verabreichung von 45 mg HP- γ -CD pro Injektion. Diesbezüglich sollten weitere Versuche durchgeführt werden indem das Lösungsmittel mit definierten Mengen Wasser bei der Komplexbildung versetzt wird. Vorversuche mit Ethanol zeigen, dass hier das molare Verhältnis von Wirkstoff zu Komplexbildungsmittel deutlich in Richtung 1:1 verschoben werden kann.

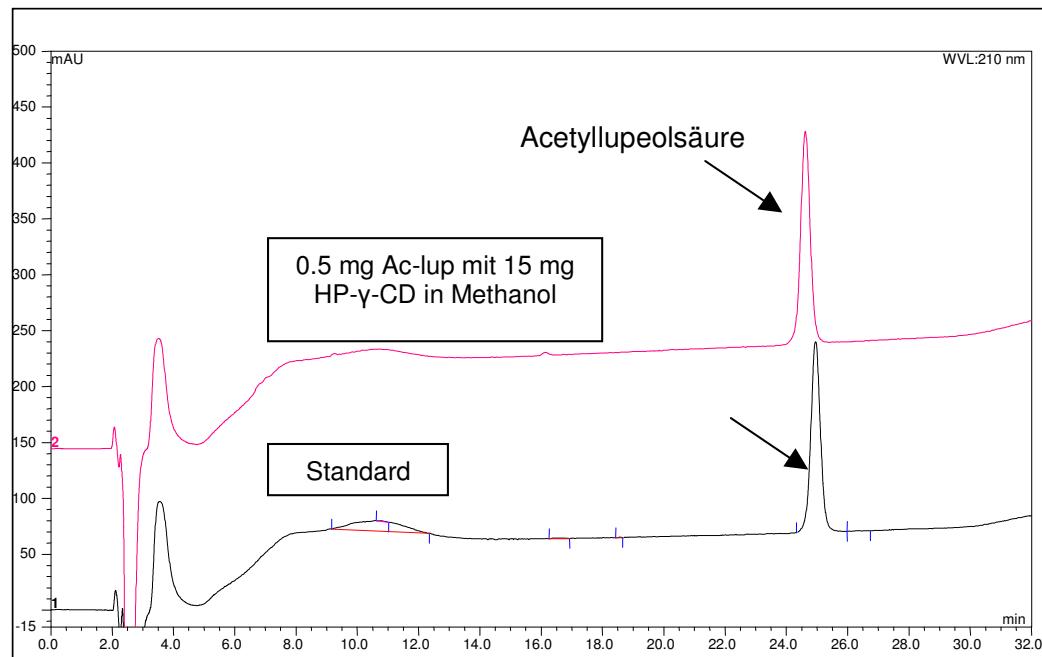
Nachweis der Cyclodextrin Komplexierung :

**Chromatogramm 27:** Komplexierung von 0.5 mg Acetyllopeolsäure mit 15 mg HP-γ-CD in Methanol

Zum Nachweis der Komplexbildung werden drei verschiedene Versuche gestartet. Zuerst wird Acetyllopeolsäure allein in Kochsalzlösung 0.9% NaCl (= Lösungsmittel für fertigen Komplex) gerührt, mit dem Ergebnis, dass nichts in Lösung geht. In dem Chromatogramm ist kein Peak für Acetyllopeolsäure zu sehen.

In einem zweiten Versuch wird eine definierte Menge Acetyllopeolsäure mit einer definierten Menge HP-γ-CD gemischt und gerührt. Im Chromatogramm ist ein kleiner Peak der Acetyllopeolsäure zu detektieren, welche über eine Komplexbildung im Milieu Wasser entstanden ist.

Im dritten Versuch wird der fertige Acetyllopeolsäure Komplex in isotonischer Kochsalzlösung gelöst, und ein Teil davon zur Analyse mit Methanol verdünnt. Die Analytik zeigt, dass die gesamte Acetyllopeolsäure jetzt unter diesen Bedingungen zur Verfügung steht, da sie im Innenraum des hydrophoben Cyclodextrin Käfiges eingeschlossen wurde. Die Gehaltsbestimmung von Acetyllopeolsäure mit dem Komplex aus 0.5 mg Acetyllopeolsäure und 15 mg HP-γ-CD ergab einen Wert von ca. 93% vom Sollwert.



Chromatogramm 28: Gehaltsbestimmung nach Komplexierung von 0.5 mg Acetylrupeolsäure mit 15 mg HP-γ-CD in Methanol

Die Gehaltsbestimmung von Acetylrupeolsäure nach Komplexierung ergibt einen Wert von $93\% \pm 3.9\%$ ($n=3$) (% bezogen auf Sollwert). Der Variationskoeffizient ist akzeptabel, da jeweils nur 2 mg des gemahlenen Komplexes eingewogen wurden.

Für weitere Untersuchungen kann die Stabilität des Komplexes als Funktion der Zeit und der Temperatur untersucht werden.

Als Alternative zu der Cyclodextrin Komplexierung wird eine weitere Variante mit PVP K10 getestet.

4.10. Mikrosuspension der isolierten Acetyllupeolsäure mit PVP K10

Polyvinylpyrrolidon wird in der Galenik von Arzneimitteln oft als Hilfsstoff eingesetzt, z. B. als Bindemittel, Sprengmittel oder auch als Lösungsvermittler für Jod. Um Acetyllupeolsäure wasserlöslich zu machen wird versucht eine stabile Mikrosuspensionen mittels PVP K10 zu erzeugen.

Mit Ethanol als Lösungsmittel wird die beste Mikrosuspension bei 0.5 mg Acetyllupeolsäure und 20 mg PVP K10 erhalten. Die resultierende Mikrosuspension ist homogen und transparent. Mit 50 mg PVP K10 kann ebenfalls eine gute Mikrosuspension erzielt werden, jedoch der Anteil an PVP K10 ist für eine Therapie zu hoch. Das Molare Verhältnis mit 0.5 mg Acetyllupeolsäure und 20 mg PVP K10 entspricht 1:2. Zum Test auf Homogenität der erhaltenen Suspension wird aus 200 μ l Probenlösung je drei mal 10 μ l entnommen und mittels HPLC analysiert. Der Acetyllupeolsäure Gehalt in der Mikrosuspension beträgt $93\% \pm 1.7\%$ ($n=3$) vom Sollwert. Dieser Variationskoeffizient ist ausreichend um die homogene Entnahme der Probe zu dokumentieren.

Aus demselben Grund wie bei der Cyclodextrin Komplexierung wird auch hier als alternatives Lösungsmittel Methanol getestet. Die Ergebnisse mit Methanol sind besser als mit Ethanol. Die Mikrosuspension ist auch mit den geringeren Konzentrationen akzeptabel. Zur Kontrolle der homogenen Probenentnahme wurden dieselben Tests wie mit den Ethanol-Proben durchgeführt. Die besten Ergebnisse resultierten mit 2 mg und 4 mg PVP K10 wobei der Acetyllupeolsäure Gehalt in der Mikrosuspension $99.8\% \pm 3.46\%$ ($n=3$) vom Sollwert, bsw. $102.9\% \pm 2.73\%$ ($n=3$) beträgt. Diese zwei Variationskoeffizienten sind akzeptabel. Die Probe mit 2 mg PVP K10 ist aber die beste, weil für eine eventuelle Therapieanwendung die zwangsläufige Belastung mit Hilfsstoffen geringer ist. Unter diesen Gegebenheiten resultiert ein molares Verhältnis von Wirksubstanz zu Trägermaterial von 1:0.2. Dies bedeutet, dass z. B. für eine Applikation dieses Komplexes in der Maus bei einer Dosierung von 100 μ mol/kg nur 6 mg PVP K10 nötig sind.

5. Schlussfolgerungen und Ausblicke

Eine neue effektive auch bezüglich anfallenden Kosten und Umweltschutz Aspekten optimierte Methode zur Isolierung von Acetyllupeolsäure aus Weihrauchharz wurde entwickelt. Folgende Zielvorgaben sind mit Erfolg erreicht worden:

Zuerst wurde reine Acetyllupeolsäure isoliert mit einer Reinheit von 99.3% aus semi-präparativer HPLC und 99.8% Reinheit durch einfache Umkristallisation. Diese letztere Methode war sehr effektiv, da sie sich durch Einfachheit, verbunden mit Zeit- und Kosteneinsparung auszeichnet. Sie kann als vollwertiger Ersatz für die kostenintensive HPLC Aufreinigung eingesetzt werden. Hiermit ist es möglich, dass z. B. bei einer Aufreinigung von ca. 70 mg Acetyllupeolsäure eine Arbeitszeit Einsparung gegenüber HPLC Aufreinigung von ca. 8 Stunden resultiert.

Ein weiterer sehr positiver Aspekt war die gelungene Solubilisierung der absolut wasserunlöslichen Zielsubstanz. Erreicht wurde dies auf zwei unterschiedlichen Wegen. Zuerst durch Komplexierung der Acetyllupeolsäure mit Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin mit Ethanol oder Methanol als Lösungsmittel, und alternativ wurde eine stabile Mikrosuspension mit PVP K10 in Ethanol oder Methanol als Lösungsmittel erfolgreich etabliert. Die beste Methode, bezüglich minimalem Anteil an Hilfsstoff in Bezug auf gleiche Menge Wirkstoff, ist mit PVP K10 und Verwendung des Lösungsmittels Methanol. Unter diesen Bedingungen wird ein molares Verhältnis von Acetyllupeolsäure : PVP K10 von 1:0.2 erreicht.

Diese neue Methode zur Isolierung von Acetyllupeolsäure bringt auch deutliche Kosteneinsparungen. Der Lösungsmittelwechsel von Acetonitril zu Methanol bei der semi-präparativen Niederdruck Chromatographie bezogen auf 27 Analysen bringt etwa 9 Stunden Arbeitszeit und 760 € Lösungsmittelkosten Einsparung.

Eine gewisse Menge Acetyllupeolsäure ging aber im Laufe der Aufarbeitung verloren, besonders während der Soxhlet-Extraktion und der flüssig-flüssig Extraktion. In einem weiteren Optimierungsschritt der jetzt entwickelten Methode, muss die Extraktionszeit der Soxhlet-Extraktion, von z. B. 5 Stunden nach ca. 9 Stunden verlängert werden. Bei der flüssig-flüssig Extraktion sind 3 wiederholte Extraktionsschritte mit Dichlormethan nicht ausreichend, wobei mit $n=6$ Extraktionsschritte mit Sicherheit die Ausbeute deutlich verbessert werden kann. Der Grund für die Ausbeute Verluste liegen in der nur zögerlichen Ausbildung der Phasengrenzen nach dem Schütteln der beiden nicht mischbaren Phasen. Eine mögliche Verbesserung wäre der Zusatz von geringen Mengen Methanol, wie dies im Hexan2-Extrakt getestet wurde, bzw. eine Zentrifugation der beiden nicht mischbaren Phasen.

Eine weitere Optimierung des molaren Masseverhältnisses von Wirksubstanz zu Trägermolekül für die Komplexierung mit Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin kann durch gezielten Einsatz gewisser Mengen Wasser in dem jeweils verwendeten Lösungsmittel erreicht werden. Vorproben haben gezeigt, dass z. B. ein Zusatz von 20% Wasser zu Ethanol eine Verbesserung des molaren Verhältnisses von 1:3 nach 1:1 erlaubt. Dieser Einfluss ist auch noch mit dem Lösungsmittel Methanol zu testen. Für die Herstellung von PVP K10 Mikrosuspensionen gelten die gleichen Vorgaben. Im Anschluss an diese Optimierung muss die Stabilität der Komplexe mit Cyclodextrin und PVP K10 als Funktion der Zeit und der Temperatur getestet werden, damit eine erfolgreiche Applikation in biologischen Testsystemen möglich wird.

Ein weiteres Ziel ausserhalb der Arbeit ist die biologische Aktivität des Acetyllupeolsäure Komplexes (Cyclodextrin und PVP K10) gegen Tumorzellen zu testen. Mit dem bereits durchgeführten XTT-Test an Acetyllupeolsäure konnte bereits gezeigt werden, dass diese Substanz ähnlich wirksam ist, wie die Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure. Vielleicht könnte Acetyllupeolsäure in der Zukunft ein weiteres wichtiges Molekül in der Tumorthherapie werden!

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weihrauchharz und Baum von <i>Boswellia carterii</i> [2].....	5
Abbildung 2: Strukturformeln von Boswelliasäuren [5].....	6
Abbildung 3: Nassgepackte Säule	15
Abbildung 4: Struktur von 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl [12].....	24
Abbildung 5: Kavitätsstruktur von γ -Cyclodextrin [13].....	25
Abbildung 6: Struktur von Polyvinylpyrrolidon [15].....	28
Abbildung 7: Helixstruktur des PVP-Iod Komplexes [16] und Räumliche Struktur von Polyvinylpyrrolidon [17].....	28
Abbildung 8: Weihrauchharz nach der Soxhlet-Extraktion mit Hexan und Methanol.....	31
Abbildung 9: Phasen-Trennungen von flüssig-flüssig Extraktion	33
Abbildung 10: Peakreinheit-Analyse von Acetyllopeolsäure zu Chromatogramm 15.....	44
Abbildung 11: Peakreinheit-Analyse von Substanz 1 zu Chromatogramm 16	45
Abbildung 12: Struktur von Acetyllopeolsäure.....	52
Abbildung 13: Kontrolle von Acetyllopeolsäure auf C18 DC Platte.....	54
Abbildung 14: Kontrolle von Acetyllopeolsäure auf SiO ₂ DC-Platte	55
Abbildung 15: UV-Spektrum von Acetyllopeolsäure	57
Abbildung 16: MS-Spektrum von Acetyllopeolsäure	58
Abbildung 17: DC-Platte für DPPH-Test	58
Abbildung 18: Resultate von XTT-Test für Acetyllopeolsäure und AkBA	59

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassische Klassifikation von der Gattung <i>Boswellia</i> [3].....	5
Tabelle 2: Chemikalien und Toxikologie.....	10
Tabelle 3: Menge von Acetyllopeolsäure pro Gramm Weihrauchharz.....	30
Tabelle 4: Menge von Acetyllopeolsäure nach der Soxhlet-Extraktion.....	32
Tabelle 5: Menge von Acetyllopeolsäure pro Gramm Extrakt nach der flüssig-flüssig Extraktion.....	35
Tabelle 6: IC ₅₀ -Werte von Acetyllopeolsäure an verschiedenen Tumorzellen.....	59

8. Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1: Beziehung zwischen Flussrate und Innen-Durchmesser [10].....	20
Gleichung 2: Berechnung des Variationskoeffizient [14].....	27

9. Chromatogrammeverzeichnis

Chromatogramm 1: Acetyllopeolsäure-Peak Abtrennung	21
Chromatogramm 2: HPLC-Screening der drei verschiedenen Weihrauchharze (WH)	30
Chromatogramm 3: Soxhlet-Extraktion mit Hexan und mit Methanol	32
Chromatogramm 4: Wasser-Phasen pH-Wert 2 und 14 von Hexan1-Extrakt	34
Chromatogramm 5: Organische Phasen nach der flüssig-flüssig Extraktion	35
Chromatogramm 6: Fraktionen Hexan1-Extrakt mit 100 mg Beladung	36
Chromatogramm 7: Fraktionen Hexan1-Extrakt mit 400 mg Beladung	37
Chromatogramm 8: Fraktionen mit dem veränderten Gradienten und 100 mg Hexan1-Extrakt	38
Chromatogramm 9: Fraktionen mit dem veränderten Gradienten und 400 mg Hexan1-Extrakt	38
Chromatogramm 10: Fraktionen mit dem veränderten Gradienten und 400 mg Methanol-Extrakt	39
Chromatogramm 11: LPLC von Hexan1-Extrakt mit Eluent Acetonitril/Wasser, 86:14 (v/v)	40
Chromatogramm 12: LPLC von Hexan1-Extrakt mit Eluent Methanol/Wasser, 95:5 (v/v)	41
Chromatogramm 13: LPLC von Hexan1-Extrakt mit Eluent Methanol/Wasser, 92:8 (v/v)	42
Chromatogramm 14: LPLC von Hexan1-Extrakt mit Eluent Methanol/Wasser, 93.5:6.5 (v/v)	43
Chromatogramm 15: HPLC-Analyse von Acetyllopeolsäure nach LPLC	44
Chromatogramm 16: HPLC-Analyse von Substanz 1 nach LPLC	45
Chromatogramm 17: LPLC von Hexan2-Extrakt mit Eluent Methanol/Wasser, 93.5:6.5 (v/v)	46
Chromatogramm 18: Semi-präparative HPLC von 1 mg Acetyllopeolsäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 93:7 (v/v) und Flussrate 4 ml/min	47
Chromatogramm 19: Semi-präparative HPLC von 1 mg Acetyllopeolsäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 94:6 (v/v) und Flussrate 4 ml/min	48
Chromatogramm 20: Semi-präparative HPLC von 1 mg Acetyllopeolsäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 95:5 (v/v) und Flussrate 4 ml/min	48
Chromatogramm 21: Semi-präparative HPLC von 1 mg Acetyllopeolsäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 94:6 (v/v) und Flussrate 4.5 ml/min	49
Chromatogramm 22: Semi-präparative HPLC von 4 mg Acetyllopeolsäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 94:6 (v/v) und Flussrate 4.5 ml/min	50
Chromatogramm 23: Semi-präparative HPLC von 3 mg Acetyllopeolsäure pro 100 µl DMSO mit Eluent Methanol/Wasser 94:6 (v/v) und Flussrate 4.5 ml/min	50
Chromatogramm 24: Kontrolle des Lösungsmittel nach Umkristallisation	51
Chromatogramm 25: Acetyllopeolsäure nach semi-präparativen HPLC	56
Chromatogramm 26: Acetyllopeolsäure nach Umkristallisation	56
Chromatogramm 27: Komplexierung von 0.5 mg Acetyllopeolsäure mit 15 mg HP-γ-CD in Methanol	61
Chromatogramm 28: Gehaltsbestimmung nach Komplexierung von 0.5 mg Acetyllopeolsäure mit 15 mg HP-γ-CD in Methanol	62

10. Literatur

- [1] D. Martinetz, K. Lohs, J. Janzen ; Weihrauch und Myrrhe, Kulturgeschichte und wirtschaftliche Bedeutung ; Botanik, Chemie, Medizin ; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1988, S. 73-139
- [2] Website: <http://www.stnikola.net/admin/upload/products/boswellia.jpg> (27.05.09)
- [3] R.-E. Spichiger, V. V. Savolainen, M. Figeat, D. Jeanmonod ; Botanique Systématique des plantes à fleurs, Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales, 3^{ème} édition ; Presses polytechniques et universitaires romande, 2002, p.278
- [4] B. Büchele, W. Zugmaier, T. Simmet ; Phythopharmaka ; Analytik von pentazyklischen Triterpenen aus Weihrauchharz, Weihrauchharz-Extrakt Kapseln und H15 Tabletten ; GIT Labor-Fachzeitschrift 2/2004
- [5] B. Büchele, W. Zugmaier, T. Simmet ; Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene ; Journal of Chromatography B, 791, 2003, p. 21-30
- [6] T. Akihisa, K. Tabata, N. Banno, H. Tokuda, R. Nishihara, Y. Nakamura, Y. Kimura, K. Yasukawa, T. Suzuki ; Cancer Chemopreventive Effects and Cytotoxic Activities of the Triterpene Acids from the Resin of *Boswellia carteri* ; Biol. Pharm. Bull. 29(9), 2006, p. 1976-1979
- [7] M. T. Huang, V. Badmaev, Y. Ding, Y. Liu Y, J. G. Xie, C. T. Ho ; Anti-tumor and anti-carcinogenic activities of triterpenoid, beta-boswellic acid ; Biofactors, 13(1-4):225-30, 2000
- [8] M. B. Frank, Q. Yang, J. Osban, J. T. Azzarello, M. R. Saban, R. Saban, R. A. Ashley, J. C. Welter JC, K. M. Fung, H. K. Lin ; Frankincense oil derived from *Boswellia carteri* induces tumor cell specific cytotoxicity ; BMC Complement Altern Med, 2009 Mar 18 ; 9:6
- [9] S. D. Sarker, Z. Latif, A. I. Gray ; Natural Products Isolation ; Second Edition, Human Press, 2005
- [10] R. Ciccirelli ; Chromatographie en phase liquide ; HES-SO Valais, 2008
- [11] N. Marcon ; Analyse de l'activité anti-radicalaire au moyen du radical stabilisé DPPH ; HES-SO Valais, 2005
- [12] Website: http://chemistry.uca.edu/faculty/desrochers/chem3150/lab_practice.htm (14.07.09)
- [13] Website: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gamma_CD_cone_shape.jpg (02.07.09)
- [14] A.-F. Grogg ; Statistique appliquée ; HES-SO Valais, 2007
- [15] Website: <http://www.sigmaaldrich.com/thumb/structureimages/16/mfcd00149016.gif> (13.07.09)

- [16] G. Görtz, K. Reimer, H. Neef ; Entwicklung, Eigenschaften und Bedeutung von PVP-Iod ; In: Topische Infektionstherapie und Prophylaxe ; Herausgegeben: G. Hierholzer, K. Reimer , E. R. Weissenbacher ; Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996, S. 3-7
- [17] H.-U. Schenck, P. Simak, E. Hädicke ; Einige Modelluntersuchungen zur Chemie und Struktur von Polyvinylpyrrolidon-Halogenophoren ; Makromol. Chem. 181, 1980, S. 1871-1888
- [18] Chemical Abstracts Service, Databank, CAS-Registriernummer 934826-48-9
- [19] K. Belsner, B. Büchele, U. Werz, T. Simmet ; Structural analysis of 3- α -acetyl-20(29)-lupene-24-oic acid, a novel pentacyclic triterpene isolated from the gum resin of *Boswellia serrata*, by NMR spectroscopy ; Magnetic Resonance in Chemistry, 2003, 41:639-632
- [20] LAB TOOLS, Tabellen für das Labor, Merck eurolab
- [21] Nicht publiziert Daten, Institut für Naturheilkunde & Klinische Pharmakologie, Ulm