

**GLUKOFRANGULINANTHRONE A/B, DEREN OXIDATIONSFORMEN  
UND DAVON ABGELEITETE ZUCKERESTER AUS RHAMNUS-ARTEN:  
BEITRÄGE ZUR CHEMISCH-ANALYTISCHEN  
UND -PHYSIOLOGISCHEN KENNZEICHNUNG**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

**L. Ömür Demirezer**  
aus Ankara (Türkei)

Frankfurt am Main  
1991

**GLUKOFRANGULINANTHRONE A/B, DEREN OXIDATIONSFORMEN  
UND DAVON ABGELEITETE ZUCKERESTER AUS RHAMNUS-ARTEN:  
BEITRÄGE ZUR CHEMISCH-ANALYTISCHEN  
UND -PHYSIOLOGISCHEN KENNZEICHNUNG**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim  
Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**L. Ömür Demirezer**  
aus Ankara (Türkei)

Frankfurt am Main  
1991

**vom Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittel-  
chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
als Dissertation angenommen.**

---

|                                      |                                |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Dekan:</b>                        | <b>Prof. Dr. A. Mosandl</b>    |
| <b>Erster Gutachter:</b>             | <b>Prof. Dr. H. W. Rauwald</b> |
| <b>Zweiter Gutachter:</b>            | <b>Prof. Dr. A. Mosandl</b>    |
| <b>Datum der mündlichen Prüfung:</b> | <b>30.10.1991</b>              |

---

---

**für  
Onver**

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. H. W. Rauwald

Herrn Prof. Dr. Rauwald danke ich sehr herzlich für das Thema, für die wissenschaftliche Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft, besonders für seine tägliche Ansprechbarkeit und für seine hilfsreichen Ratschläge.

Für die Aufnahmen der  $^1\text{H}$ -/ $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren danke ich Herrn Prof. Dr. H. Linde sowie Herrn S. Bihler.

Besonders dankbar bin ich Ute und Klaus Reh, die mir gute Freunde waren und immer Zeit für mich hatten.

Anette Beil danke ich sehr herzlich für die vielfältige Hilfestellung der Dissertation.

Allen Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Bei Herrn Obergartenmeister H. Grasmück, und Herrn Gärtner H. Meyer, Botanischer Garten Frankfurt am Main, bedanke ich mich für die bereitwillige Überlassung von Pflanzenmaterial.

Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker danke ich für die Überlassung von Drogen- und Sachmaterialien.

Herrn Prof. Dr. A. Hincal und Herrn Prof. Dr. I. Calis, beide Hacettepe Universität, Pharmazeutische Fakultät, Ankara, danke ich für die großzügige Gewährung von Sonderurlaub zur Promotion in Frankfurt/M.

Besonders herzlich möchte ich meinem Mann danken, der mich stets unterstützt und meine Promotion finanziell ermöglicht hat.

---

## **INHALTSVERZEICHNIS**

|                                                                                                            | <b>Seite</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>1. Problemstellung und Zielsetzung</b>                                                                  | <b>1</b>     |
| <b>2. Einleitung</b>                                                                                       | <b>6</b>     |
| <b>2.1 Botanische Kennzeichnung der untersuchten Rhamnus-Arten</b>                                         | <b>6</b>     |
| <b>2.2 Sekundäre Inhaltsstoffe der Rhamnaceen</b>                                                          | <b>10</b>    |
| <b>2.3 Pharmazeutische Verwendung der untersuchten Rhamnus-Arten</b>                                       | <b>11</b>    |
| 2.3.1 Rhamnus frangula L.                                                                                  | 11           |
| 2.3.2 Rhamnus fallax Boiss.                                                                                | 11           |
| 2.4.3 Rhamnus catharticus L.                                                                               | 12           |
| <b>3. Hauptteile</b>                                                                                       | <b>13</b>    |
| <b>3.1 Glukofrangulinanthrone A und B sowie deren oxidierte Formen aus Rhamnus frangula</b>                | <b>13</b>    |
| 3.1.1 Herkunft des Pflanzenmaterials                                                                       | 13           |
| 3.1.2 DC-Ortung der relevanten Glykoside                                                                   | 13           |
| 3.1.3 Erstmalige Reindarstellung der labilen Glukofrangulinanthrone durch eine schnelle Isolierungsmethode | 14           |
| 3.1.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen                                                                          | 14           |
| 3.1.3.2 Extraktion                                                                                         | 14           |
| 3.1.3.3 Schnelle Isolierung und Trennung der Glukofrangulinanthrone A und B und deren HPLC-Analyse         | 15           |
| 3.1.4 Isolierung der Glukofrangulin-bianthronglykoside A/B                                                 | 19           |

|         |                                                                                                                                                                                     |    |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.5   | DAB 9-Prüfung auf Anthrone: Ein längst<br>fälliger Ersatz für das cancerogene<br>Nitrosodimethylanilin/Pyridin-Reagenz                                                              | 22 |
| 3.1.6   | Qualitative und quantitative HPLC-Analyse<br>der frischen Rinde von drei verschiedenen<br>Faulbäumen                                                                                | 30 |
| 3.1.6.1 | Allgemeine Vorbemerkungen                                                                                                                                                           | 30 |
| 3.1.6.2 | Herkunft des Pflanzenmaterials                                                                                                                                                      | 31 |
| 3.1.6.3 | Orientierende Dünnschichtchromatographie (DC)                                                                                                                                       | 32 |
| 3.1.6.4 | Qualitative und quantitative HPLC-Bestimmung                                                                                                                                        | 32 |
| 3.1.7   | Qualitative und quantitative Untersuchung<br>des Verhältnisses reduzierter und oxidierter<br>Primärglykoside der frischen Rinde während<br>einer Vegetationsperiode                 | 39 |
| 3.1.7.1 | Allgemeine Vorbemerkungen                                                                                                                                                           | 39 |
| 3.1.7.2 | Herkunft des Pflanzenmaterials                                                                                                                                                      | 39 |
| 3.1.7.3 | Extraktion für die DC- und HPLC-<br>Untersuchungen                                                                                                                                  | 39 |
| 3.1.7.4 | Dünnschichtchromatographie                                                                                                                                                          | 40 |
| 3.1.7.5 | Quantitative HPLC-Bestimmung der<br>Hauptglykoside Glukofrangulinanthrone<br>A und B sowie der Glukofranguline<br>A und B in der frischen Rinde während<br>einer Vegetationsperiode | 41 |
| 3.1.8   | HPLC-Bestimmung der reduzierten und<br>oxidierten Glykoside nichtarznei-<br>buchkonformer Cortex Frangulae-<br>Handelsdrogen                                                        | 56 |
| 3.1.8.1 | Allgemeine Vorbemerkungen                                                                                                                                                           | 56 |
| 3.1.8.2 | Dünnschichtchromatographie                                                                                                                                                          | 57 |
| 3.1.8.3 | Quantitative HPLC-Bestimmung                                                                                                                                                        | 58 |
| 3.1.9   | Qualitative und quantitative Untersuchung<br>oxidativer und hydrolytischer Umwandlungs-<br>und Abbauprozesse in der frischen Rinde;<br>Infragestellen der DAB 9-Vorschrift          | 61 |

|         |                                                                                                                                                                                    |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.9.1 | Allgemeine Vorbemerkungen                                                                                                                                                          | 61  |
| 3.1.9.2 | Erhitzen von frischer Faulbaumrinde nach Temperaturgradienten in Anlehnung an die DAB 9-Vorschrift                                                                                 | 62  |
| 3.1.9.3 | Inkubation der Glukofranguline mit $\beta$ -Glucosidase                                                                                                                            | 63  |
| 3.2     | Vergleichende chemische Kennzeichnung der offizinellen Frangularinde und ihrer Hauptverfälschung Fallaxrinde unter besonderer Berücksichtigung der Glukofranguline bzw. Franguline | 86  |
| 3.2.1   | Allgemeine Vorbemerkungen                                                                                                                                                          | 86  |
| 3.2.2   | Herkunft der Rindendrogen                                                                                                                                                          | 86  |
| 3.2.3   | Qualitative analytische Kennzeichnung mittels DC                                                                                                                                   | 87  |
| 3.2.4   | Isolierung und Strukturrevision der Xanthorhamnine, der analytischen Leitstoffe der Fallaxrinde                                                                                    | 88  |
| 3.2.4.1 | Allgemeine Vorbemerkungen                                                                                                                                                          | 88  |
| 3.2.4.2 | Isolierung von Xanthorhamnin                                                                                                                                                       | 90  |
| 3.2.4.3 | Strukturrevision der Xanthorhamnine                                                                                                                                                | 90  |
| 3.2.5   | Vergleichende HPLC-Bestimmung der Frangula- und Fallaxrinden                                                                                                                       | 98  |
| 3.3     | Phytochemische Erstuntersuchung der Emodinglykoside der reifen Früchte von <i>Rhamnus catharticus</i> - Isolierung neuartiger Glukofrangulindiacetate sowie des neuen Frangulin C  | 108 |
| 3.3.1   | Allgemeine Vorbemerkungen                                                                                                                                                          | 108 |
| 3.3.2   | Gehaltsbestimmung der Emodinglykoside gemäß der DAB 9-Methode                                                                                                                      | 109 |
| 3.3.3   | Orientierende DC-Untersuchungen                                                                                                                                                    | 110 |
| 3.3.4   | Isolierung von Anthrachinonglykosiden aus Kreuzdornbeeren                                                                                                                          | 116 |
| 3.3.4.1 | Drogenmaterial                                                                                                                                                                     | 116 |
| 3.3.4.2 | Extraktion                                                                                                                                                                         | 116 |

|         |                                                                                                         |     |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3.4.3 | Isolierung und Strukturaufklärung<br>von A1 als Emodin-6-O- $\beta$ -D-xylopyranosid<br>(Frangulin C)   | 116 |
| 3.3.4.4 | Eigenschaften von A1<br>Identifizierung als Frangulin C                                                 | 118 |
| 3.3.4.5 | Isolierung und Trennung von E1 und E2                                                                   | 132 |
| 3.3.4.6 | Eigenschaften von E1<br>Identifizierung als Glukofrangulin A-<br>2",3"-O-diacetat                       | 135 |
| 3.3.4.7 | Eigenschaften von E2<br>Identifizierung als isomere<br>Glukofrangulin-A-2",4"- und<br>3",4"-O-diacetate | 136 |
| 4.      | Zusammenfassung und Diskussion                                                                          | 164 |
| 5.      | Experimenteller Teil                                                                                    | 170 |
| 5.1     | Herkunft des Pflanzenmaterials                                                                          | 170 |
| 5.1.1   | Rhamnus frangula                                                                                        | 170 |
| 5.1.2   | Rhamnus fallax                                                                                          | 170 |
| 5.1.3   | Rhamnus catharticus                                                                                     | 171 |
| 5.2     | Chemikalien, Lösungsmittel,<br>Vergleichssubstanzen, Drogenextrakte                                     | 171 |
| 5.2.1   | Chemikalien                                                                                             | 171 |
| 5.2.1.1 | Sprühreagenzien, siehe 5.4.1                                                                            | 171 |
| 5.2.1.2 | Sonstige Chemikalien                                                                                    | 172 |
| 5.2.2   | Lösungsmittel                                                                                           | 172 |
| 5.2.3   | Vergleichs- und Referenzsubstanzen                                                                      | 172 |
| 5.2.4   | Drogenextrakte aus dem Handel<br>(Extracta siccata)                                                     | 173 |

|         |                                                                                                       |     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3     | Extraktionsmethoden                                                                                   | 173 |
| 5.3.1   | Rhamnus frangula                                                                                      | 173 |
| 5.3.1.1 | Extraktionsmethode für die Isolierung der Glukofrangulinanthrone und Glukofrangulinbianthronglykoside | 173 |
| 5.3.1.2 | Extraktionsmethode für die quantitativen HPLC-Untersuchungen zu den Kapiteln 3.1.6, 3.1.7, 3.1.9      | 174 |
| 5.3.1.3 | Extraktionsmethode für die DC- und HPLC-Untersuchungen zu den Kapiteln 3.1.8                          | 174 |
| 5.3.2   | Rhamnus fallax und Rhamnus frangula                                                                   | 175 |
| 5.3.2.1 | Extraktionsmethode für die HPLC-Analytik der Frangula- und Fallax- Drogen zu den Kapiteln 3.2         | 175 |
| 5.3.2.2 | Extraktion von Rhamnus fallax-Rinde für die Isolierung der Substanzen                                 | 175 |
| 5.3.3   | Extraktionsmethode der Kreuzdornbeeren zu den Kapiteln 3.3                                            | 176 |
| 5.4     | Verwendete chromatographische Methoden                                                                | 176 |
| 5.4.1   | Dünnschichtchromatographie (DC)                                                                       | 176 |
| 5.4.2   | Säulenchromatographie (SC)                                                                            | 181 |
| 5.4.2.1 | Isolierung der Glukofranguline als Referenzsubstanz                                                   | 181 |
| 5.4.2.2 | Isolierung von Emodin-8-glucosid                                                                      | 182 |
| 5.4.2.3 | Isolierung von Physcion-8-rutinosid                                                                   | 182 |
| 5.4.2.4 | Isolierung der Xanthorhamnine                                                                         | 183 |
| 5.4.2.5 | Isolierung und Trennung der Glukofrangulinanthrone A und B                                            | 183 |
| 5.4.2.6 | Isolierung der Glukofrangulin-bianthronglykoside A/B                                                  | 184 |
| 5.4.2.7 | Isolierung von A1                                                                                     | 184 |
| 5.4.2.8 | Isolierung und Trennung von E1 und E2                                                                 | 185 |
| 5.4.3   | Niederdruckflüssigkeitschromatographie (LPLC)                                                         | 186 |
| 5.4.4   | Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)                                                         | 186 |
| 5.4.5   | Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)                                                           | 187 |

|         |                                                                       |     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.4.5.1 | Für die HPLC-Analytik zu 3.1.6, 3.1.7,<br>3.1.8 und 3.1.9             | 187 |
| 5.4.5.2 | Für die HPLC-Analytik zu 3.2                                          | 187 |
| 5.4.6   | Tropfengegenstromchromatographie (DCCC)                               | 188 |
| 5.5     | Verwendete Geräte zur Strukturaufklärung                              | 188 |
| 5.5.1   | UV/VIS-Spektroskopie                                                  | 188 |
| 5.5.2   | $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie                 | 188 |
| 5.6     | Chemische Analysenmethoden                                            | 189 |
| 5.6.1   | Hydrolyse und Dünnschichtchromatographie                              | 189 |
| 5.6.2   | Acetylierung                                                          | 189 |
| 5.6.3   | Gehaltsbestimmung der Frangularinden<br>(nach DAB 9)                  | 189 |
| 5.7     | Enzymatische Glykosidspaltung durch<br>$\beta$ -Glucosidase (3.1.9.3) | 191 |
| 5.8     | Bestimmung des pH-Wertes                                              | 191 |
| 5.9     | Schmelzpunktbestimmung                                                | 191 |
| 5.10    | Gefriertrocknung                                                      | 191 |
| 6.      | Literaturverzeichnis                                                  | 192 |
| 7.      | Lebenslauf                                                            | 197 |

---

# 1. Problemstellung und Zielsetzung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die Anthra-bis-O-glykoside Glukofrangulinanthron A und B sowie deren oxidierte Formen, die Glukofranguline A und B (siehe Abb. 1 und 2). Glukofrangulin A [=6-O-( $\alpha$ -L-Rhamnosyl)-8-O-( $\beta$ -D-glucosyl)emodin] und Glukofrangulin B [=6-O-(D-Apiosyl)-8-O-( $\beta$ -D-glucosyl)emodin\*] sind die wertbestimmenden Inhaltsstoffe der offizinellen Faulbaumrinde von *Rhamnus frangula* (siehe Abb. 1 und 2).

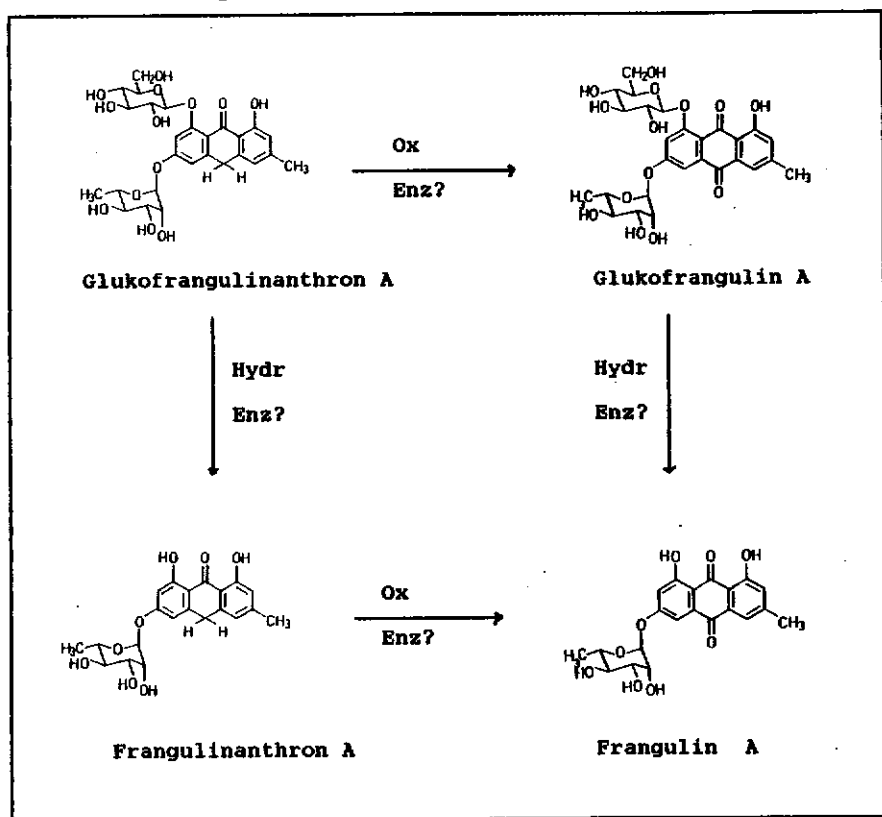


Abb. 1: Formelschema zu Glukofrangulinanthron A und Frangulinanthron A sowie deren oxidierten Formen

\* Anm.: Die anomere Konfiguration der Apiose ist bisher nicht gesichert.

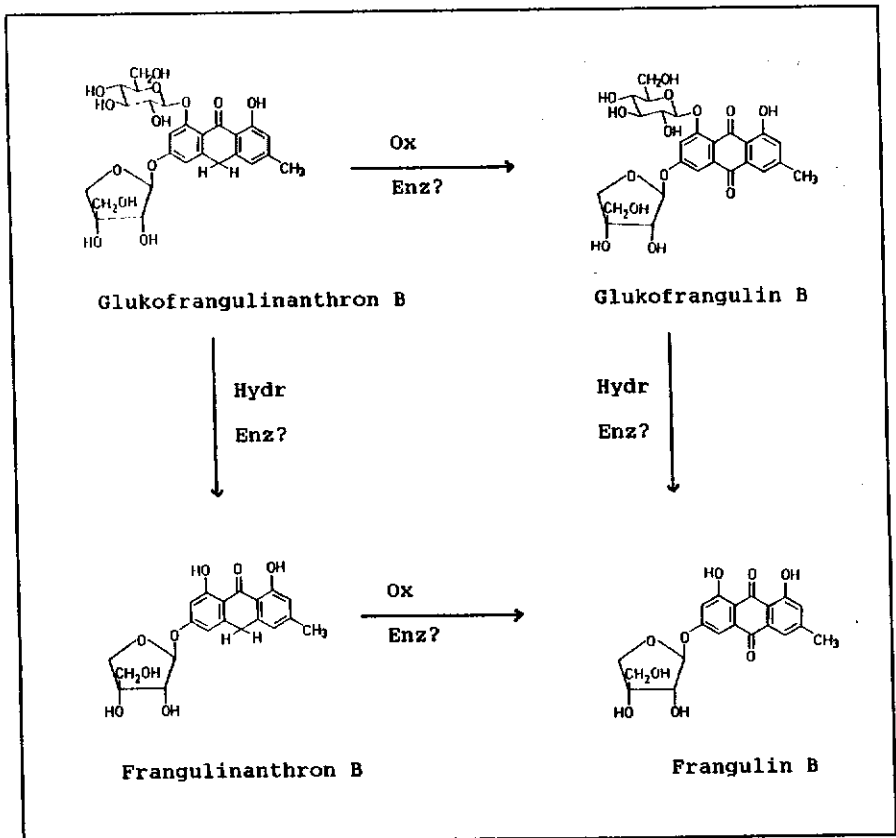


Abb. 2: Formelschema zu Glukofrangulinanthron B und Frangulinanthron B sowie deren oxidierten Formen

Daneben wurden sie bisher lediglich ein weiteres Mal, nämlich in der als Verwechslung oder Verfälschung der Faulbaumrinde geltenden Fallaxrinde von *Rhamnus fallax*, eindeutig nachgewiesen (1). Diese charakteristischen und selektiven Inhaltsstoffe sind von Bedeutung für die chemisch-analytische und pflanzenphysiologische Kennzeichnung von drei verschiedenen, pharmazeutisch interessanten *Rhamnus*-Arten:

- der frischen und gelagerten (offizinellen) Rinde von *Rhamnus frangula*,
- der im Arzneibuch als Verfälschung eingestuft, gelagerten Rinde von *Rhamnus fallax* sowie
- der reifen, getrockneten Kreuzdornbeeren von *Rhamnus catharticus*, die in der hiesigen Phytotherapie wie auch in der türkischen Volksmedizin noch eine Rolle spielen.

Die vorliegende Arbeit will zur Klärung folgender Probleme bei der Faulbaumrinde beitragen:

Sind die Glukofrangulinanthrone tatsächlich die Primärglykoside der frischen Faulbaumrinde, wie analog von LEMLI für die Faulbaumblätter nachgewiesen wurde (2)? Welche Bedeutung kommt dabei den früher häufig, heute noch gelegentlich (3,4), als Primärglykoside angesehenen dimeren Glukofrangulinanthronen, den Glukofrangulinbianthronglykosiden, zu (5,6,7,8)?

Zur Klärung dieses pflanzenphysiologischen Problems war es notwendig, eine neue analytische Methode zu entwickeln: Es galt, die labilen Glukofrangulinanthrone bzw. die Glukofrangulinbianthronglykoside mit Hilfe moderner, schonender (schneller) Arbeitstechniken erstmals rein darzustellen, um anhand authentischer Substanzen die Primärglykoside eindeutig zu charakterisieren. Wegen der leichten Oxidierbarkeit und Hydrolysierbarkeit der reduzierten Anthraglykoside lagen bisher keine zuverlässigen Untersuchungen über das Inhaltsstoffspektrum der frischen Faulbaumrinde in der Literatur vor. Hier sollte eine qualitative und quantitative HPLC-Analyse der Glukofrangulinanthrone, gegebenenfalls der Glukofranguline sowie der davon abgeleiteten glucosefreien Frangulinanthrone bzw. Franguline A/B (siehe Abb. 1 und 2) und der korrespondierenden Aglykone Emodinanthron bzw. Emodin eine eindeutige Klärung liefern. Ob die oxidierten Formen überhaupt in der frischen Faulbaumrinde vorliegen, ist in der Literatur ebenfalls umstritten. Verschiedene Autoren führen dies beispielsweise auf den Mangel einer geeigneten Extraktionsmethode zurück (9).

Im Rahmen dieser Fragestellung erschien es konsequent, die reduzierten und -wenn sinnvoll- oxidierten Formen über eine

gesamte Vegetationsperiode zu beobachten und somit einen optimalen Erntezeitpunkt zu ermitteln: In welchem Monat werden die höchsten Konzentrationen an Glukofrangulinanthronen oder - gegebenenfalls - an Glukofrangulinen festgestellt? Welche Rolle kommt dabei wiederum den Oxidationsprodukten der Bianthronglykoside tatsächlich zu? Können hydrolytische oder oxidative Abbauprodukte beobachtet werden (vgl. Abb.1 und 2)?

Diese pflanzenphysiologischen Probleme waren zugleich an Probleme der praktischen Arzneibuchanalytik geknüpft. Einige Pharmakopöen, auch das DAB 9, prüfen auf das Vorhandensein unerwünschter Anthrone in der Faulbaumrinde und Cascararinde mit Hilfe des Nitrosodimethylanilin/Pyridin (NDA)-Reagenzes. Dieses NDA-Sprühareagenz wird schon seit längerem in einschlägigen Lehr- und Handbüchern (auch im neuen DAB 9-Kommentar) sowie in phytochemischen Praktikumsskripten wegen seiner toxischen Eigenschaften kritisiert, und es wird "expressis verbis" zur Vorsicht im Umgang mit dem Reagenz geraten. In der vorliegenden Arbeit sollte ein neues Reagenz als Ersatz für dieses problematische Reagenz gefunden werden. In diesem Zusammenhang waren uns vom Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker einige nicht arzneibuchkonforme Handelschargen von *Rhamni frangulae cortex* für eine Untersuchung zur Verfügung gestellt worden, die trotz einjähriger Lagerung einen unzulässigen Gehalt an Anthronderivaten aufwiesen. Eine HPLC-Analyse mittels Photodiodenarray-Detektion, die die reduzierten und oxidierten Formen gleichzeitig erfaßt, sollte dabei Aufschluß über die tatsächlichen qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Glukofrangulinanthrone bzw. der Glukofranguline in der Faulbaumrinde bringen. Gleichzeitig sollte überprüft werden, inwieweit bei der DAB 9-Vorschrift (einstündiges Erhitzen frischer Rinde bei 100°C) die Glukofrangulinanthrone überhaupt zu den Glukofrangulinen oxidiert werden. Der thermische Einfluß beim Erhitzen frischer Faulbaumrinde auf die vermuteten Primärglykoside, die Glukofrangulinanthrone A und B, sollte dabei anhand eines Temperaturgradienten beobachtet werden, ausgehend von 20°C bis zu 100°C. Die dabei entstehenden Hauptumwandlungs- und -abbauprodukte (durch Oxidation und Hydrolyse) sollten mit Hilfe der HPLC-Technik bestimmt werden.

---

Für den Fall der Fallaxrinde von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax* sollte zur Klärung der Frage beigetragen werden, inwiefern diese Rinde, die heutzutage häufig als Verfälschung der Faulbaumrinde im Handel angetroffen wird (10,11), überhaupt als minderwertige Anthranoiddroge eingestuft werden muß. Im Arbeitskreis waren zuvor die Glukofranguline A und B sowie weitere Hauptanthrachinonglykoside vom Emodin-Typ in einer qualitativen HPLC-Analyse charakterisiert worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Hauptinhaltsstoffe quantitativ mittels HPLC zu bestimmen sowie anhand der analytischen Leitstoffe der Fallaxrinde, den Xanthorhamnin, eine Unterscheidung zwischen der Fallaxrinde und der offizinellen Faulbaumrinde durch eine HPLC-Analyse zu ermöglichen. Weiter sollte geklärt werden, ob die Fallaxrinde aufgrund ihrer quantitativen Anthranoid-Zusammensetzung tatsächlich als eine echte Verfälschung der Faulbaumrinde angesehen werden muß, oder ob, wie von RAUWALD, MIETHING (1) aufgrund einer qualitativen HPLC-Analyse vermutet wurde, es anscheinend keine Anhaltspunkte dafür gibt, diese in den Balkanländern seit langem volksmedizinisch anstelle der Faulbaumrinde genutzte Droge als Verfälschung einzuordnen.

Im Fall der reifen Kreuzdornbeeren von *Rhamnus catharticus*, die wie erwähnt auch heute noch pharmazeutisch verwendet werden, war überraschenderweise nur ein DC-Nachweis von Glukofrangulin A und Frangulin A in der Literatur beschrieben (12,13,14), überraschenderweise insbesondere deswegen, weil für die Droge ein Gehalt von 4 - 5 % an Anthraglykosiden beschrieben wurde, deren chemische Zusammensetzung bisher völlig unbekannt ist. Ziel dieses Untersuchungsteiles war es, die Hauptanthraglykoside der Kreuzdornbeeren analytisch zu orten, anschließend zu isolieren und ihre Struktur aufzuklären.

## 2. Einleitung

### 2.1. Botanische Kennzeichnung der untersuchten Rhamnus-Arten

In der nachstehende Tabelle 1 sind wichtige botanische Merkmale der drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten, pharmazeutisch interessanten Rhamnus-Arten *Rhamnus frangula*, *Rhamnus catharticus* und *Rhamnus fallax* beschrieben. Weitere ausführliche botanische Beschreibungen finden sich bei DEUTSCHMANN et al. (15), HAGER (16), HEGI (17), WICHTL (14) und SAVONIUS (18).

Tab. 1: Pharmazeutisch interessante botanische Merkmale der untersuchten Rhamnus-Arten (nach 14,15,16,17,18)

|                  | Rh. frangula L.<br>Syn. Frangula<br>alnus Miller<br>(Faulbaum)                                                              | Rh. catharticus L.<br>(Purglerkreuzdorn)                             | Rh. fallax Boiss.<br>Syn. Oreoherzogia<br>fallax Boiss.<br>(Alpenkreuzdorn)             |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Habitus          | meist 1 bis 3 m<br>hoher Strauch,<br>selten Baum                                                                            | 1 bis 3,5 m hoher<br>Strauch, selten<br>krummständiger<br>Baum       | 1 bis 3 m hoher<br>Strauch                                                              |
| Verbrei-<br>tung | beheimatet in<br>Europa,<br>Mittelmeergeb.,<br>Türkei,<br>Nordwestasien<br>(Importe aus<br>UdSSR,<br>Jugoslawien,<br>Polen) | Europa,<br>Nordafrika,<br>Türkei,<br>Asien<br>(Importe aus<br>UdSSR) | südliche Balkan-<br>halbinsel,<br>Türkei,<br>Jugoslawien,<br>Süd Steiermark,<br>Kärnten |

|        | Rh. frangula L.<br>Syn. Frangula<br>alnus Miller<br>(Faulbaum)                                                                                                                                    | Rh. catharticus L.<br>(Purgierkreuzdorn)                                                                                                        | Rh. fallax Boiss.<br>Syn. Oreoherzogia<br>fallax Boiss.<br>(Alpenkreuzdorn)                                                                                                                                                                                   |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rinde  | in der Jugend<br>grün, an der<br>Sonnenseite<br>oder ringsum<br>dunkel<br>überlaufen,<br>später<br>graubraun<br><br>mit langen<br>quergestellten<br>grauweißen<br>Lentizellen                     | feinrissig<br>schwärzlich<br><br><br>großen Lentizellen<br>später mit kleinen<br>querrunzeligen<br>Rissen                                       | in der Jugend<br>graubraun,<br>ältere Rinde<br>grau bis dunkel-<br>braun, rissig,<br>rauchig, zum Teil<br>borkig, an den<br>Bruchstellen<br>Fasern, Innen-<br>seite gelbgrün<br><br>mit vielen<br>quergestellten<br>hellgrauen<br>Lentizellen,<br>Steinzellen |
| Frucht | kugelig,<br><br>etwa 8 mm<br>Durchmesser,<br><br>anfangs grün,<br>später rot,<br>zur Reife<br>schwarzviolett                                                                                      | kugelig,<br><br>6 bis 8 mm<br>Durchmesser,<br><br>anfangs grün,<br>zur Reife<br>schwarz,<br>selten gelb                                         | kugelig,<br><br>7 bis 10 mm<br>Durchmesser,<br><br>schwarz                                                                                                                                                                                                    |
| Blatt  | anfangs weich,<br>später streifer<br><br>breit und<br>elliptisch bis<br>eiförmig<br><br>3,5 cm lang und<br>5 cm breit<br><br>vorne spitz<br>oder<br>zugespitzt,<br>selten stumpf<br>oder gestutzt | anfangs weich,<br>später streifer<br><br>kreisrundlich bis<br>elliptisch<br><br>3 bis 13 cm lang<br>und 1 bis 3,5 cm<br>breit<br><br>zugespitzt | <br><br>länglich eiförmig<br>bis breitlanzett-<br>lich<br><br>10 bis 13 cm lang<br>selten 7 cm, 2 bis<br>6 cm breit<br><br>stumpflich bis<br>zugespitzt                                                                                                       |

|       | Rh. frangula L.<br>Syn. Frangula<br>alnus Miller<br>(Faulbaum)                                                                                                                                                     | Rh. catharticus L.<br>(Purgierkreuzdorn)                                                                                                                                                                | Rh. fallax Boiss.<br>Syn. Oreoherzogia<br>fallax Boiss.<br>(Alpenkreuzdorn)                    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Blatt | <p>meist ganzrandig und leichtgewellt sehr selten ringsum undeutlich oder gegen die Spitze zu etwas deutlich gezähnt</p> <p>7 bis 9 Nerven</p> <p>auf der Blattunterseite auf den Nerven in der Jugend behaart</p> | <p>am Rand mit feinen bis kerbigen, selten groben, stumpfen Zähnen</p> <p>3 bis 4 Nervenpaare</p> <p>auf der Blattunterseite selten beidseitig, auf der Spreite und auf den Nerven kurz weichhaarig</p> | <p>fein gezähnt</p> <p>15 bis 18 Nervenpaare</p> <p>unterseits an den Nerven etwas behaart</p> |



**Rhamnus frangula L.** a: Sproß mit Blüten und Früchten, b: Frucht, c: Laubblatt, d: Blüte, e: Querschnitt durch die Blüte, f: Samen, g: Blütendiagramm (nach Eichler in HEGI 17)



**Rhamnus fallax Boiss.** a: Blühender Zweig, b: Zweig im Winterstadium, c: Winterknospe, d: Blüte (nach HEGI 17)



**Rhamnus catharticus L.** a: Fruchttender Zweig, b: Laubblatt, c: Frucht, d und e: Keimlinge (nach HEGI 17)

**Abb. 3: Vergleichende Darstellung morphologisch-anatomischer Merkmale der untersuchten Rhamnus-Arten**

## 2.2 Sekundäre Inhaltsstoffe der Rhamnaceen

Nach HEGNAUER (19) konnten neben den für viele Rhamnaceen charakteristischen

- Anthranoiden vom Emodin-Typ und
- Naphthalinderivaten (Nepodin- und Sorigenin-Typ) folgende Naturstoffgruppen nachgewiesen werden:
- Flavonole (besonders Kämpferol, Quercetin und verschiedene davon abgeleitete Methylether sowie deren Glykoside),
- Gerbstoffe (kondensierte Proanthocyanidine),
- Alkaloide (Isochinolin-Typ sowie basische cyclische Peptide),
- Saponine unbekannter Struktur,
- ätherische Öle.

In nur zwei Vertretern (*Rhamnus fallax* und *Ventilago viminalis*) sind bisher

- Naphthochinone gefunden worden (20).

Außer den bekannten sekundären Inhaltsstoffen der *Rhamnus*-Arten seien einige neu isolierte Inhaltsstoffe aus nicht einheimischen *Rhamnus*-Arten aufgeführt:

- Anthrachinonlactone aus *Araliorhamnus vaginata* (21),
- Physcion-rhamnoglukosid aus *Rhamnus formosana* (22),
- Physcion-primverosid aus *Rhamnus pallasii* (23),
- Sorinin aus *Rhamnus japonica* (24) und *Rhamnus pallasii* (23).

## 2.3 Pharmazeutische Verwendung der untersuchten Rhamnus-Arten

### 2.3.1 Rhamnus frangula L.

Die im DAB 9 offizinelle Droge Rhamni frangulae cortex wird als dickdarmwirksames Laxans bei Obstipation und allen Erkrankungen, bei denen eine leichte Defäkation mit weichem Stuhl erwünscht ist (z.B. Analfissuren, Hämorrhoiden, nach rektalanalen operativen Eingriffen), eingesetzt (3). Als wirksames Prinzip gelten die Hauptglykoside Glukofrangulin A und B und Frangulin A und B (25). Im frischen Zustand enthält die Droge Anthrone und sollte deshalb vor Verwendung mindestens ein Jahr gelagert oder unter Luftzutritt und Erwärmen künstlich gealtert werden (3). Verwendet werden die geschnittene Droge oder Drogenpulver für Aufgüsse, Abkochungen, Kaltmazerate oder Elixiere (14). Trocken- oder Spissum-Extrakte finden sich in vielen Fertigarzneimitteln in Form von Dragees oder Tabletten (26).

### 2.3.2 Rhamnus fallax Boiss.

Die Rinde von Rhamnus fallax ist im DAB 9 nicht offizinell, gilt aber als Verfälschung der Rhamnus frangula- und Rhamnus purshianus- Rinde. In ihrer Heimat, den Balkanländern, wird sie ebenfalls als Laxans genutzt (27).

### 2.3.3 Rhamnus catharticus L.

Im Gegensatz zu *Rhamnus frangula* finden bei *Rhamnus catharticus* hauptsächlich die reifen, getrockneten Früchte als Laxans Verwendung. Die Früchte werden meist als Saft oder Sirup zubereitet. Die Rezeptur eines Kreuzdornbeerensirups fand sich beispielsweise noch im DAB 6 (28).

In der Homöopathie werden nur die frischen, reifen Kreuzdornbeeren verwendet (29).

Die Volksmedizin kennt die unreifen, frischen Früchte als Diuretikum und "Blutreinigungsmittel" (30). Sie wurden als Gelbbeeren gehandelt und als Abführmittel nur Hunden gegeben (31). Heute befindet sich im DAB 9 keine Monographie mehr zu den Kreuzdornbeeren. Es existiert jedoch eine Standardzulassung für diese Droge.

---

### 3. Hauptteile

#### 3.1 Glukofrangulinanthrone A und B sowie deren oxidierte Formen aus Rhamnus frangula

##### 3.1.1 Herkunft des Pflanzenmaterials

Für die Untersuchungen wurde im Mai 1987 frische Faulbaumrinde aus dem Hunsrück beschafft. Die Identität wurde durch vergleichende DC und anhand mikroskopischer Untersuchungen mit selbstgesamelter Rinde von *Rhamnus frangula* L. aus dem Botanischen Garten in Frankfurt/M. gesichert.

##### 3.1.2 DC-Ortung der relevanten Glykoside

Der methanolische Gesamtextrakt der frischen Faulbaumrinde wurde an Kieselgel dc im Fließmittel (FM) nach DAB 9 (Ethylacetat: Methanol:Wasser/100:17:13) untersucht. Bei den dc Voruntersuchungen wurde die frisch gesammelte Faulbaumrinde sowohl mit anthronhaltiger Rinde aus dem Drogenhandel als auch mit vorschriftsmäßig gelagerter Rinde verglichen.

Die Identifizierung der Glukofrangulinanthrone A und B erfolgte aufgrund eines Laufhöhen-Vergleiches mit Literaturangaben (32,33,34) und der Farbreaktion mit Nitrosodimethylanilin gemäß DAB 9. Als korrespondierende Anthrone der Glukofranguline besitzen die Glukofrangulinanthrone ähnliche  $R_f$ -Werte in DAB 9-FM wie die Glukofranguline;  $R_f$ -Werte: Glukofrangulin A=0,26, Glukofrangulin-anthron A=0,27, Glukofrangulin B=0,32, Glukofrangulinanthron B=0,33. Dieses dc Verhalten korrespondierender Anthron-Anthrachinon-Paare ist in der Literatur schon seit längerem bekannt (35,32,36).

### 3.1.3 Erstmalige Reindarstellung der labilen Glukofrangulinanthrone durch eine schnelle Isolierungsmethode

#### 3.1.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Für die späteren physiologischen und pharmazeutisch-analytischen DC- und HPLC-Untersuchungen (siehe 3.1.6) mußten die labilen Glukofrangulinanthrone A und B isoliert und rein dargestellt werden. Bisher sind deren Isolierung und präparative Auftrennung einerseits wegen ihrer extremen Oxidationsempfindlichkeit, andererseits offensichtlich auch wegen ihrer chemischen Ähnlichkeit nicht gelungen. Die Literatur beschreibt lediglich die Isolierung eines acetylierten Gemisches der Glukofrangulinanthrone aus frischer Faulbaumrinde (5). Eine Gewinnung der Glukofrangulinanthrone durch Reduktion der Glukofranguline, beispielsweise nach Auterhoff mit Zinn-(II)-chlorid und Salzsäure (37) oder nach Eder mit Zinkspänen in Eisessig (38,39), gelingt nur mit den freien Anthronen und ergibt bei den glykosidischen Verbindungen eine Karamelisierung des Zuckers. Eine Reduktion ist somit nicht möglich.

#### 3.1.3.2 Extraktion

400 g frische Faulbaumrinde wurden mehrmals mit je 2 l Methanol, danach mit 2 l 50 % igem Methanol insgesamt zwei Stunden unter Stickstoffbegasung und  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  am Ultra-Turrax extrahiert. Ausschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur entfernt. Es resultierten ca. 20 g Rohextrakt.

---

### 3.1.3.3 Schnelle Isolierung und Trennung der Glukofrangulinanthrone A und B und deren HPLC-Analyse

Zunächst wurden 500 mg Rohextrakt an Sephadex LH-20 vorgereinigt; überraschenderweise konnten dabei die Glukofrangulinanthrone A und B bereits präparativ getrennt werden. Die Fraktionierung wurde im DAB 9-FM dc verfolgt. Als Sprühreagenz wurde Nitroblau-tetrazoliumchlorid verwendet, das im Rahmen dieser Arbeit als neues Reagenz zur Prüfung auf Anthrone vorgeschlagen wird (siehe 3.1.5). Genau 21,2 mg der Fraktion, die Glukofrangulinanthron A enthielt, wurde mit Hilfe der Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC) an Kieselgel RP-18 mit Methanol:Wasser: Ameisensäure/60:40:0,5 von den unpolareren Begleitsstoffen befreit, wobei 5 mg reines Glukofrangulinanthron A anfielen.

Auf dem gleichen Weg wurden aus der 18,2 mg Glukofrangulinanthron B enthaltenden Fraktion 3 mg Glukofrangulinanthron B in reiner Form dargestellt. (siehe Abb. 4) Die gesamte Reindarstellung erforderte nur drei Stunden 15 Minuten, wovon die MPLC lediglich 15 Minuten beanspruchte (siehe Isolierungs Schema Abb. 5). Die Abbildungen 6 und 8 zeigen die HPL-Chromatogramme, Abbildungen 7 und 9 die entsprechenden UV-Spektren der Glukofrangulinanthrone A und B.

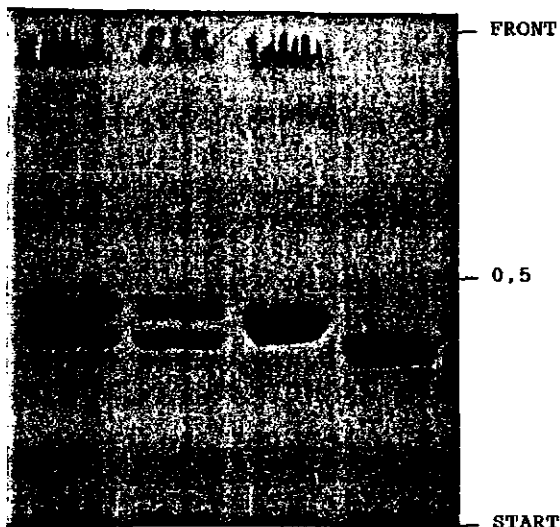


Abb. 4 : Dünnsichtchromatogramm der getrennte Glukofrangulinanthrone A und B

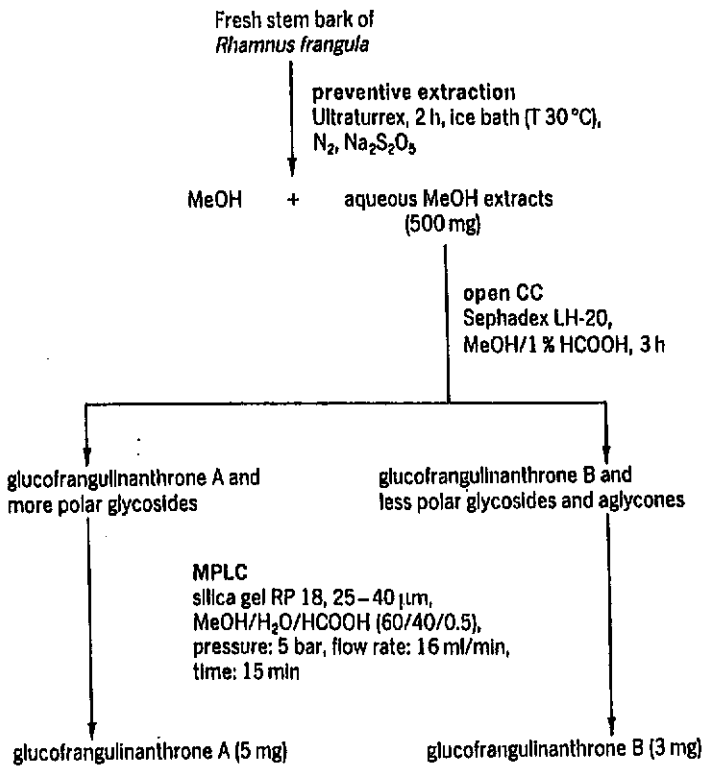


**Abb. 5 : Isolierungsschema für die Glucofrangulinanthrone A und B aus frischer Faulbaumrinde (40)**

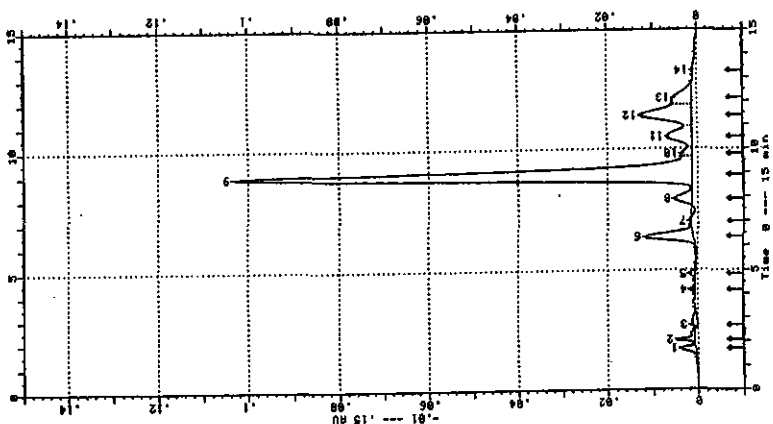


Abb. 6 : HPL-Chromatogramm des isoliertes  
Glukofrangulinanthron A  
Gerät: Waters 600;  
Säule: RP-18, 250/8/4  
Fließmittel: Methanol/Wasser  
Detektion: 320 nm (Photodiodearray)

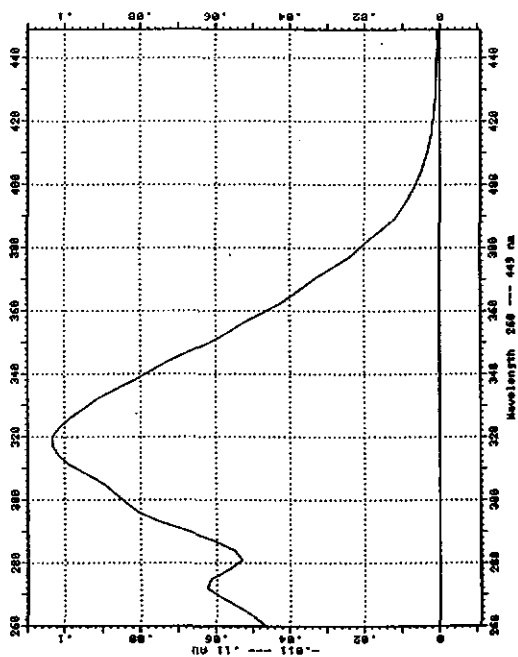


Abb. 7 : UV-Spektrum von Glukofrangulinanthron A  
Gerät: Waters 990-Photodiodearray

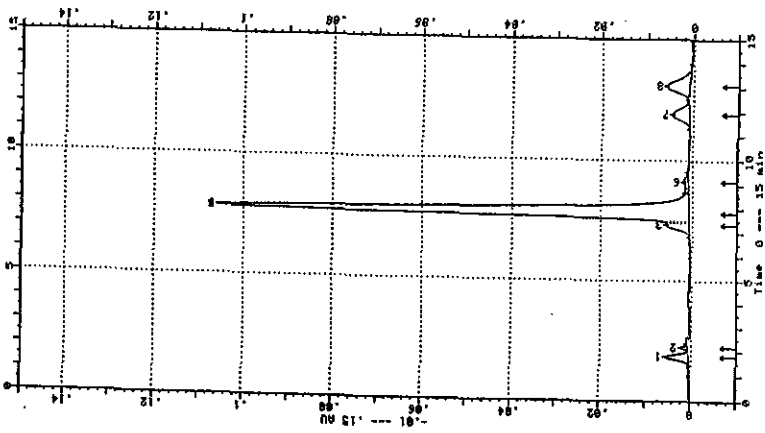


Abb. 8 : HPL-Chromatogramm des isoliertes  
Glukofrangulinanthron B  
Gerät: Waters 600;  
säule: Rp-18, 250/8/4

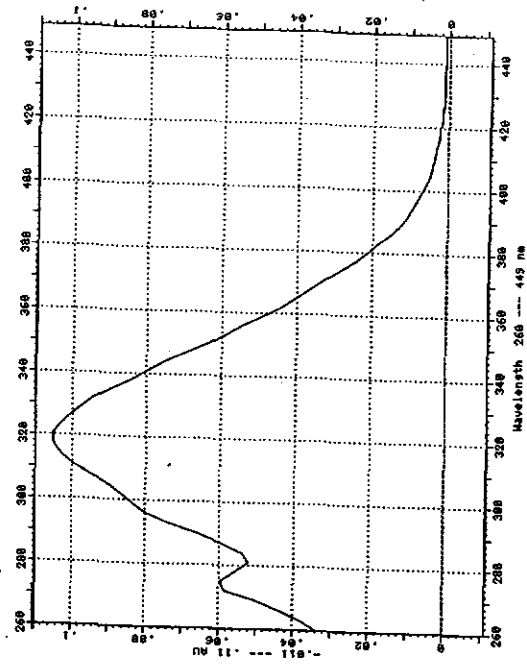


Abb. 9 : UV-Spektrum von Glukofrangulinanthron B  
Gerät: Waters 990-Photodiodenarray

### 3.1.4 Isolierung der Glukofrangulinbianthronglykoside

Im Hinblick auf die noch zu klärende Frage, ob die Glukofrangulinanthrone oder die korrespondierenden dimeren Oxidationsprodukte, die Glukofrangulinbianthronglykoside, als die eigentlichen Primärglykoside der Faulbaumrinde zu betrachten sind, wurde zunächst der Extraktionsansatz (3.1.3.1) auf das Vorkommen dieser Bianthronglykoside geprüft. Analog den bekannten Sennosiden finden sich die Bianthronglykoside im DAB 9-FM bei niedrigen Rf-Werten (ca. 0,1) und können nach Besprühen mit konz. Salpetersäure (Oxidation zum Anthrachinon) mit KOH detektiert werden. Tatsächlich konnten vier eng beieinander liegende Zonen nachgewiesen werden. Zur Isolierung dieser vermeintlichen Bianthronglykosid-Fraktion wurde wiederum eine Kombination von MPLC und Sephadex LH-20-SC eingesetzt. Die genauen Parameter finden sich im Isolierungsschema der Abbildung 10. Es gelang so eine vollständige Abtrennung der Naphtaline und übrigen Anthranoide, was durch dc Kontrolle des Eluats im DAB 9-FM verfolgt wurde. Mit Hilfe der HPLC wurden vier Peaks beobachtet, die aufgrund ihrer UV-Spektren (Photodiodearray-Detektion, Abb. 12) eindeutig als Bianthronglykosid-Typ, nämlich als Glukofrangulinbianthronglykoside, identifiziert werden können. Durch die Dimerisierung des Emodinanthrons entstehen zwei chirale Zentren an C-10 bzw. C-10'. Vergleichbar den diastereomeren Sennosiden A,B bzw. C,D können mit Hilfe der HPLC je zwei Diastereomeren-Paare identifiziert werden, die sich vom Glukofrangulinanthron A (Peaks A<sup>1</sup> und A<sup>2</sup>) und B (Peaks B<sup>1</sup> und B<sup>2</sup>) ableiten (Abb. 11). Im übrigen wurde dieses Untersuchungsergebnis später durch Umsetzung der Glukofrangulinanthrone mit Nitroblautetrazoliumchlorid-Reagenz bestätigt, wobei als Hauptoxidationsprodukte ebenfalls die hier aufgefundenen Peaks nachgewiesen werden konnten. Diese Bianthronglykoside werden bei einer schnellen und schonenden Probenaufbereitung im analytischen Maßstab nicht beobachtet, wie die später beschriebenen DC- und HPLC-Untersuchungen des Glukofrangulin-anthron-Auftretens über eine Vegetationsperiode belegen. Bereits hier kann zweifelsfrei gesagt werden, daß es sich bei den dimeren Produkten um Isolierungs-Artefakte handelt, die bei der präparativen Extraktion entstanden sein müssen.

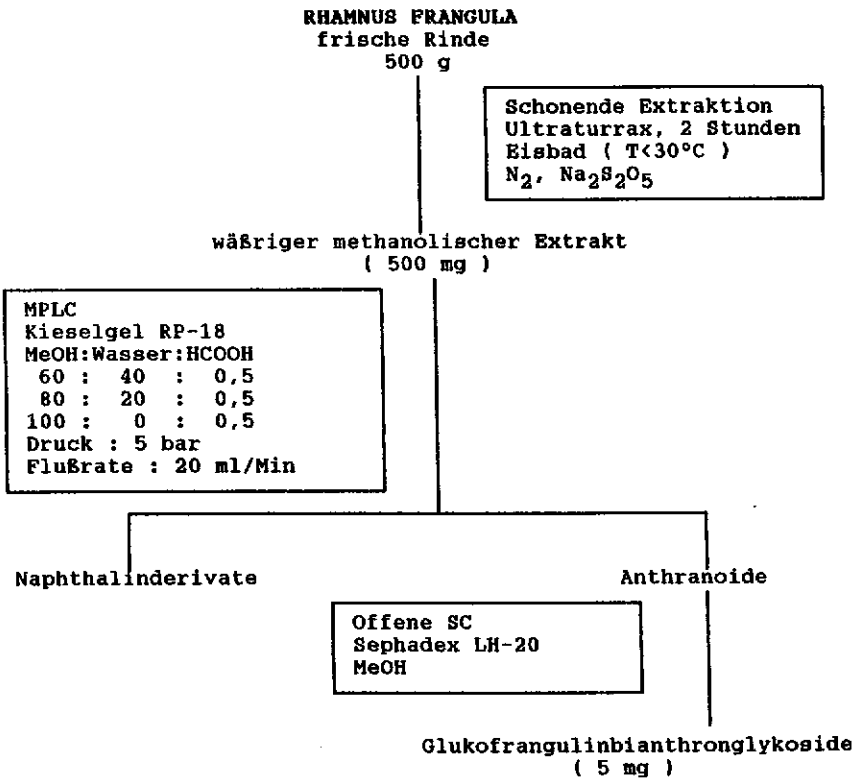


**Abb. 10: Schnelle Isolierung der Glukofrangulinbianthronglykoside aus frischer Faulbaumarinde**

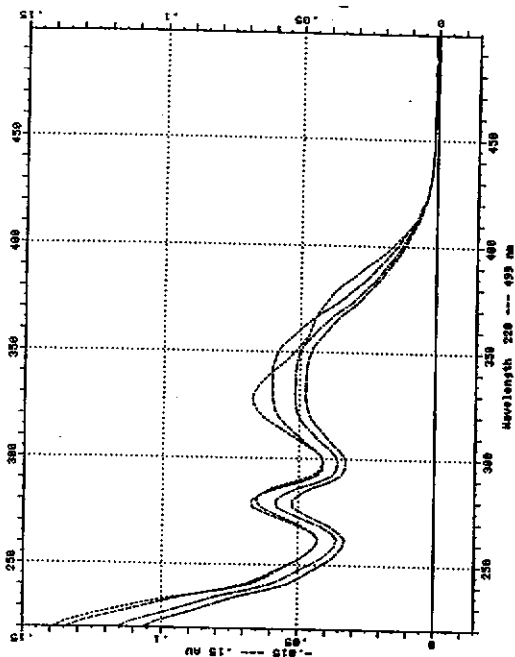


Abb. 12 : UV-Spektrum der Glukofrangulinbianthrone  
Gerät: Waters 990-Photodiodenarray

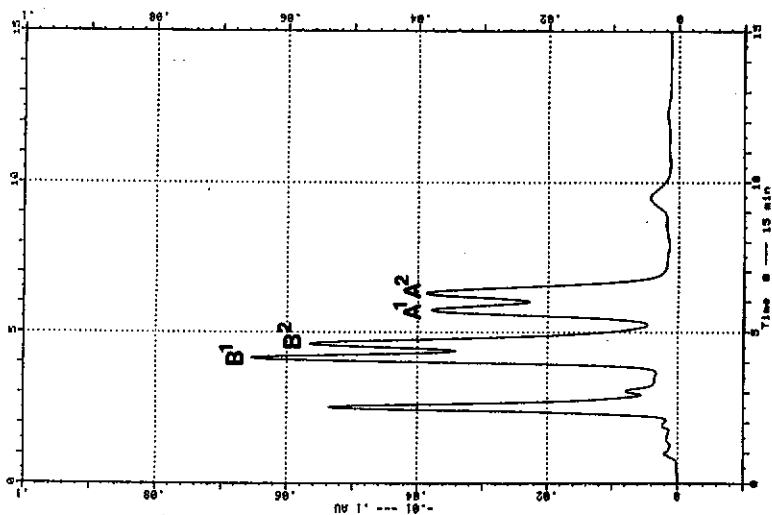


Abb. 11 : HPL-Chromatogramm der isolierten  
Glukofrangulinbianthrone A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>/B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>  
Gerät: Waters 600;  
Säule: RP-18, 250/8/4  
Fließmittel: Methanol/Wasser  
Detektion: 320 nm (Photodiodenarray)

3.1.5 DAB 9 - Prüfung auf Anthrone: Ein längst fälliger Ersatz für das cancerogene Nitrosodimethylanilin/Pyridin-Reagenz

Der Nachweis von Anthronderivaten erfolgt im DAB 9 und anderen Pharmakopöen als dc Reinheitsprüfung zur Unterscheidung zwischen frischer und alter Faulbaumrinde. In der frischen Faulbaumrinde liegen die Anthraglykoside als reduzierte Anthrone vor (vgl. 3.1.6), die laxierend wirken, wegen Reizerscheinungen von seiten des Magens aber nicht verträglich sind und zu Erbrechen und Koliken führen können (16,41). Primärglykoside und Hauptinhaltsstoffe der frischen Faulbaumrinde sind die vorstehend beschriebenen Glukofrangulinanthrone A und B.

In Anwesenheit von Luftsauerstoff lagern sich die autoxidablen Anthrone in die entsprechenden Anthrachinone um. Vor der Verwendung muß die Faulbaumrinde daher entweder ein Jahr lagern oder unter Luftzutritt 1-2 Stunden lang auf 100°C erhitzt werden. Arzneibuchkonforme Ware enthält die oxidierten Anthraglykoside vom Typ der Glukofranguline, die erwünschten Glykoside der Frangularinde.

Die Pharmakopöen lassen mit Hilfe der DC auf unzulässiges Vorkommen von an C-10 unsubstituierten Anthronglykosiden prüfen. Besprühen mit 4-Nitrosodimethylanilin, gelöst in Pyridin, führt bei positivem Ergebnis zu graublauen Kondensationsprodukten, den Azomethinen (Abb. 13).

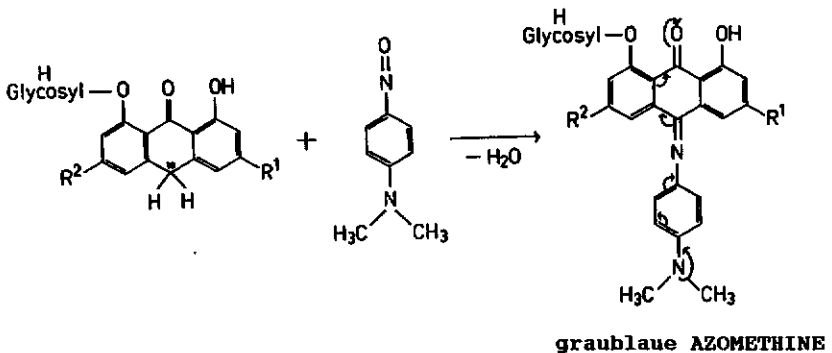


Abb. 13: Reinheitsprüfung auf Anthronderivate gemäß DAB 9 /Ph.Eur. mittels DC: 4-Nitrosodimethylanilin/Pyridin-Sprühreagenz

Die Anwendung des Nitrosodimethylanilin-Sprühareagenzes wird schon seit längerem in einschlägigen Lehr- und Handbüchern, auch im neuen DAB 9-Kommentar sowie in phytochemischen Praktikumsakripten wegen seiner toxischen Eigenschaften kritisiert, und es wird "expressis verbis" zur Vorsicht geraten: So muß wegen der möglichen Kanzerogenität und Blutgift-Wirkung des Nitrosodimethylanilins (42,43) unter effektiv arbeitenden Abzügen besprüht werden; das Tragen von Handschuhen ist unbedingt erforderlich (44). Zudem können die bereits ab 30 ppm unerträglich riechenden Pyridin-Dämpfe- je nach Ausmaß der resorbierten Menge- Vergiftungserscheinungen wie Übelkeit, Erbrechen, Haut und Schleimhautreizungen hervorrufen. Ein diesbezügliches Fazit läßt sich auch einem neueren Lehrbuch der Phytopharmazie entnehmen: Es wäre umweltfreundlicher, würde man auf das Reagenz ganz verzichten (45).

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Ersatz von Nitrosodimethylanilin-Pyridin durch ein selektives und empfindliches Sprühreagenz, das eine leichte Unterscheidung zwischen frischer und alter Faulbaumrinde erlaubt.

Insgesamt wurden 26 verschiedene Reagenzien getestet, die sieben unterschiedlichen Reaktionstypen zugeordnet werden können:

1. Redox-Farbreaktionen  
(u.a. TTC, Molybdatophosphorsäure)
2. Kondensationen  
(u.a. 1,2-Naphtochinon-4-sulfonat)
3. Azokupplungsreaktionen  
(u.a. Echtblausalz-B)
4. Oxidative Kupplungsreaktionen  
(u.a. 4-Aminoantipyrin)

5. Charge-Transfer-Komplexbildungen  
(u.a. 1,3-Dinitrobenzol)
6. Metallkomplex-Reaktionen  
(u.a. Naturstoffreagenz)
7. Elektrophile aromatische Substitution  
mit Folgereaktion  
(u.a. 4-Dimethylaminobenzaldehyd)

Die besten Ergebnisse wurden mit den Redox-Farbreaktionen erzielt, bei denen die reduzierende Eigenschaft der aktiven C-10-Methylengruppe im ungesättigten Anthronmolekül analytisch verwertbar ist. In dieser Gruppe zeigte das DAB 9-Universalreagenz Molybdatophosphorsäure eine hohe Nachweisempfindlichkeit für die reduzierenden Anthronglykoside. Die unterschiedliche Färbung ermöglicht außerdem eine eindeutige Unterscheidung der blau gefärbten Anthronglykoside von den oxidierten hellgelben Anthrachinonglykosiden. Die mangelnde Selektivität schränkt jedoch den Einsatz dieses Reagenzes ein, da die begleitenden acetogenen Naphthalinglykoside ebenfalls als blaue Zonen auftreten und den Nachweis stören.

Hinsichtlich Selektivität, Spezifität und Empfindlichkeit als optimal geeignet für den Nachweis von Anthronen erweist sich der Einsatz von Nitrotetrazoliumblau. Es wird im analytischen Sprachgebrauch mit der Kurzbezeichnung NBT belegt. NBT gehört zur Gruppe der Triphenyltetrazolium-Verbindungen, von denen das TTC und das nitrogruppenfreie Tetrazolblau in der Arzneistoffanalyse des DAB 9 zum Nachweis von reduzierenden Substanzen verwendet werden (3). Im biochemischen und biologischen Bereich wird Nitroblau-tetrazoliumchlorid ebenfalls zum Sichtbarmachen von Reduktionsvorgängen eingesetzt, z.B. für die histochemische Bestimmung von Dehydrogenasen (46).

---

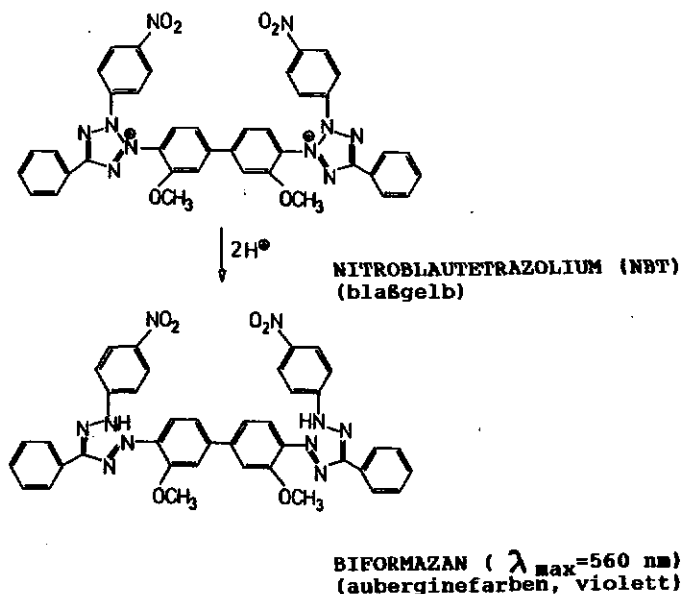


**Abb. 14: Redox-Farbreaktionen des Nitrotetrazoliumblau (NBT)**

Beim Besprühen des Chromatogrammes mit Nitrotetrazoliumblau ergeben die reduzierenden Anthrone mit dem Reagenz eine charakteristische Aubergine-Violettfröbung, während die korrespondierenden Anthrachinone hellgelb erscheinen. Somit ist eine Abgrenzung alter von frischer Faulbaumrinde leicht möglich. Bei dieser Reaktion wird das blaßgelbe NBT reduktiv geöffnet zum aubergine-violettfarbenen Biformazan der abgebildeten Struktur (siehe Abb.14).

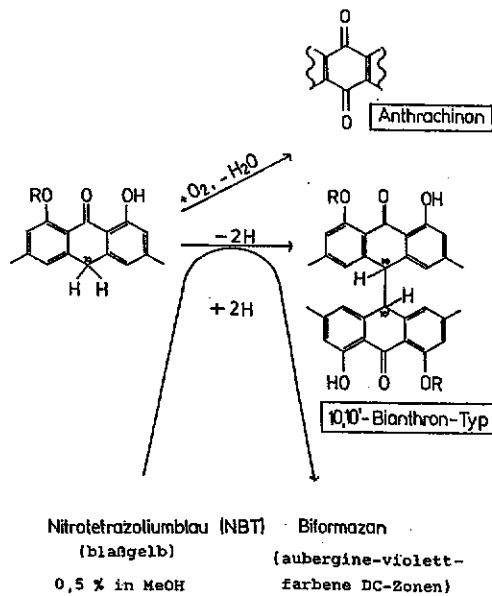


**Abb. 15: Oxidationsprodukte der Anthrone bei der Umsetzung mit NBT: 10, 10'-Bianthrone (Hauptprodukte) und Anthrachinone (Nebenprodukte)**

Im Zuge der reduktiven Biformazanbildung reagiert das Anthronmolekül unter dehydrierender Dimerisierung zum 10,10'-Bianthronderivat bzw. in einer Nebenreaktion autoxidativ zum korrespondierenden Anthrachinon (siehe Abb.15).

Das Dünnschichtchromatogramm zum Nachweis unerwünschter Glukofrangulinanthrone in einer Handelsdroge zeigt Abb. 16. Zwei Handelschargen waren trotz einjähriger Lagerung vom Zentral-laboratorium Deutscher Apotheker beanstandet und uns zu einer klärenden Untersuchung weitergegeben worden.

Abschließend wurde überprüft, ob die NBT-Reaktion nicht nur bei

~~Anthronglykosiden, sondern auch bei Anthronaglykonen eine sichere Unterscheidung von den korrespondierenden Anthrachinonaglykonen erlaubt. Entsprechend wurden dünn-schichtchromatographisch die vier pharmazeutisch interessanten 1,8-Dihydroxyanthrone Dithranol, Aloeemodinanthron, Chrysophanolanthron und Frangulaemodinanthron mit den jeweils zugehörigen Oxidationsformen verglichen (Abb.17,18).~~

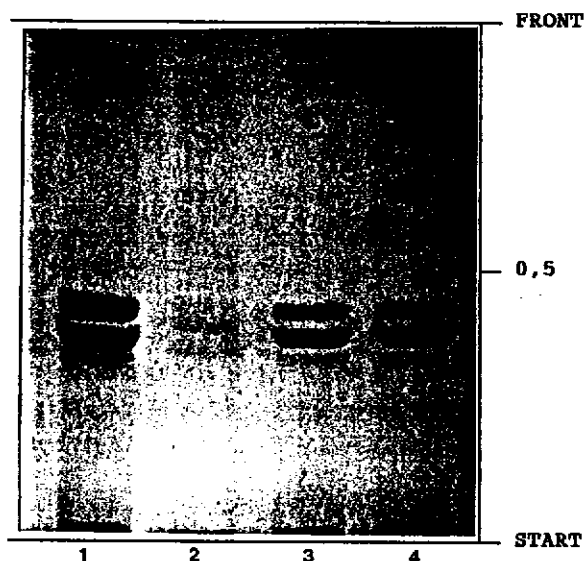


Abb. 16: Dünnschicht-Chromatogramm von Handelschargen, besprüht mit Nitroblautetrazoliumchlorid  
 1: frischer Rindenextrakt, 2: gelagerter Rindenextrakt,  
 3: Handelscharge (I), 4: Handelscharge (II)

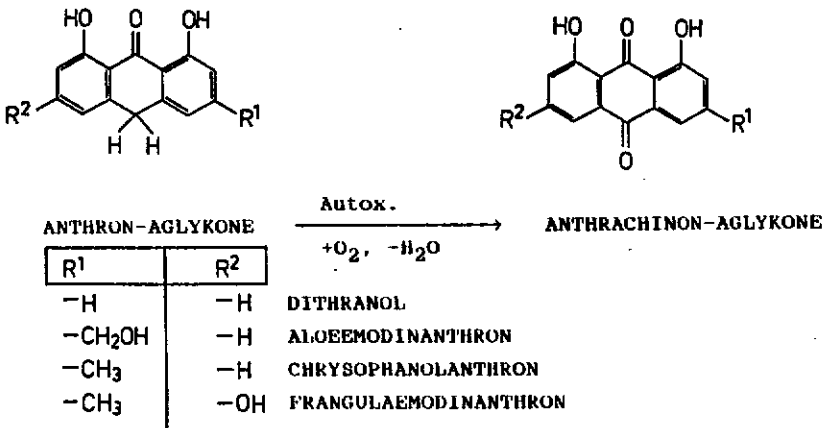


Abb. 17: Pharmazeutisch wichtige Anthrone/Anthrachinone vom Emodintyp

Man erkennt im oberen R<sub>f</sub>-Bereich die lipophileren Substanzen Dithranol und Chrysophanolanthron mit ihren korrespondierenden Anthrachinonen. Im mittleren und unteren R<sub>f</sub>-Bereich finden sich Frangulaemodinanthron und Aloeemodinanthron, wiederum zusammen mit ihrer oxidierten Anthrachinonform. Eine Differenzierung gelingt hier ebenfalls aufgrund der unterschiedlichen Färbungen: Die reduzierten Aglykone erscheinen violett, ihre oxidierten Formen hingegen gelb.

In der Arzneibuchanalytik hat sich das Nitroblautetrazoliumchlorid Reagenz inzwischen in den phytochemischen Praktika der Studenten bestens bewährt. Im Hinblick auf dessen Einsatz im Europäischen Arzneibuch wurde das Reagenz von der Arbeitsgruppe um Prof. STICHER, Zürich, geprüft und der Arzneibuch-Kommision zur Aufnahme in das kommende Arzneibuch empfohlen. Eine kritische Bemerkung zur

Arzneibuch-Vorschrift ist schließlich noch anzubringen: Während der vorliegenden Untersuchungen zeigte es sich, daß die geltende DAB 9-Vorschrift - "es treten graublaue Zonen in dem Chromatogrammen auf" - analytisch ungenau und unklar hinsichtlich Anzahl und  $R_f$ -Werte der anzusprechenden Anthron-Zonen ist. Die Vorschrift ist analytisch und praxisgerecht so zu konkretisieren, daß nur auf die beiden Zonen der Glukofrangulinanthrone A und B bei  $R_f$  0,33 und 0,27 geprüft werden sollte.

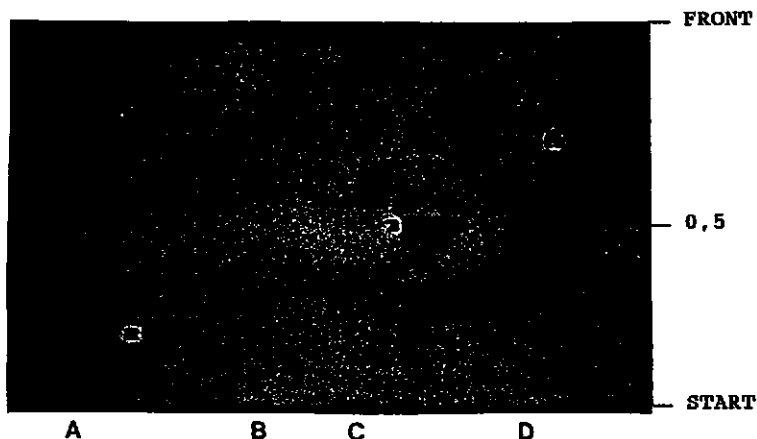


Abb. 18: Dünnschichtchromatogramm pharmazeutisch wichtiger Anthrone/Anthrachinone  
 A: Aloeemodin, B: Chrysophanol,  
 C: Emodin, D: Danthron  
 1: Chrysophanolanthron, 2: Aloeemodinanthron,  
 3: Emodinanthron, 4: Dithranol

### 3.1.6 Qualitative und quantitative HPLC-Analyse der frischen Rinde von drei verschiedenen Faulbäumen

#### 3.1.6.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Für die Existenz der oxidierten Formen der Glukofrangulinanthrone, nämlich der Glukofranguline in der frischen Faulbaumrinde, findet man in der Literatur kaum allgemeingültige Angaben. Auch in den neueren Literaturstellen ist es fraglich geblieben, ob in der frischen Rinde neben den reduzierten Verbindungen überhaupt oxidierte Formen wie Anthrachinone und Bianthrone vorhanden sind (Tab. 2).

Tab. 2: Literaturangaben zu den Anthranoiden aus frischer *Rhamnus frangula* Rinde

| Lit.                       | Aussage zur Konstitution                                                                                                                                                               |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mühlemann et al. (5,6,7,8) | reduzierte Derivate der sennosidähnlichen Dihydrobianthrone der Glukofranguline                                                                                                        |
| Loth et al (35)            | Frangulinanthron                                                                                                                                                                       |
| Lemli et al. (32,47,48)    | Emodin, Chrysophanol, Emodinbianthron, Palmidin C, Frangulinanthron A, Glukofrangulinanthrone, Frangulin A, Frangulinbianthron, Emodinbianthronbisrhamnosid, Palmidin C-monorhamnosid, |
| Labadie (9)                | Emodinanthron, Chrysophanolanthron, Physcionanthron, Aglykone und Glykoside                                                                                                            |
| Hörhammer/Wagner (49)      | Frangulinanthrone, Glukofrangulinanthrone<br>geringe Menge Glukofranguline                                                                                                             |

Unterschiedliche Ergebnisse zum Anthranoid-Spektrum in der frischen Rinde sind zum einen durch Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden und insbesondere chromatographischer Methoden denkbar, können zum anderen aber auch durch Pflanzenmaterial unterschiedlicher Herkunft (verschiedene Bäume oder Standorte), verschiedenen Alters und verschiedener Sammelzeiten entstehen.

In der vorliegenden Untersuchung sollten die relevanten Inhaltsstoffe der reduzierten und oxidierten Formen, die Glukofrangulinanthrone, ihre Folge-Glykoside, die Frangulinanthrone, Glukofranguline und die Franguline sowie die dazugehörigen Aglykone in einer Einzelbestimmung erfaßt werden. Nach dem derzeitigen Stand der Analytik eignet sich hierzu nur die schnelle und schonende Hochdruckflüssigkeitschromatographie in Verbindung mit einem schonenden, schnellen Extraktionsverfahren. Zusätzlich erweist sich der Einsatz eines Photodiodenarray UV-Detektors als sehr nützlich, da eine Detektion bei unterschiedlichen Wellenlängen gleichzeitig möglich ist und die entsprechenden UV-Spektren jeweils den Anthron- bzw. Anthrachinoncharakter der Verbindungen belegen. Somit können pro Injektion Anthrone neben Anthrachinonen quantitativ erfaßt werden. Die Gefahr einer Oxidation in der HPLC-Probe ist aufgrund der geringen Analysendauer nicht gegeben, wie ein vergleichender Versuch mit Glukofrangulinanthron bzw. Emodinanthron klar belegt.

#### 3.1.6.2 Herkunft des Pflanzenmaterials

Frische Faulbaumrinde von *Rhamnus frangula* wurde Ende Januar 1990 im Botanischen Garten, Frankfurt/M., von drei verschiedenen Bäumen (Baum C, D und E) gesammelt. Die Identität wurde durch vergleichende DC und mikroskopische Untersuchung mit authentischem Probenmaterial aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie/Frankfurt bestätigt.

### 3.1.6.3 Orientierende Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Vergleichbarkeit der Analysenproben bei den jeweiligen HPLC-Bestimmungen wurde eine vororientierende DC-Untersuchung durchgeführt. Der methanolische Gesamtextrakt der frischen Faulbaumrinde wurde an Kieselgel dc untersucht. Alle Extrakte enthalten die Glukofrangulinanthrone A und B; in den Extrakten "D" und "E" fehlen jedoch die Glukofranguline, während sie in Extrakt "C" nachgewiesen werden konnten.

### 3.1.6.4 Qualitative und quantitative HPLC-Bestimmung

Für die HPLC wurden je 1000,0 mg frische Faulbaumrinde der Bäume C, D und E mit 45,0 ml Methanol am Ultraturrax im Eisbad 5 Minuten schonend extrahiert. Anzumerken ist, daß bereits ein geringer Zusatz von Wasser zum Methanol die Trennqualität deutlich verschlechterte. Zudem haben orientierende Vorversuche mit Methanol gezeigt, daß neben den Aglykonen auch die relevanten Glykoside quantitativ extrahiert werden. Nach dem Abzentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit sofort dekantiert und im Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt. Von diesem Rohextrakt wurden

3 mg genau eingewogen, in Methanol:Wasser (1:1) klar gelöst und als HPLC-Untersuchungslösung verwendet.

Als mobile Phase für die Serienanalyse diente ein Methanol:Wasser-Gradient, der wie folgt programmiert wurde:

| ZEIT   | A(40% Methanol) | B(80% Methanol) |
|--------|-----------------|-----------------|
| 0 min  | 60%             | 40%             |
| 25 min | 0%              | 100%            |
| 40 min | 0%              | 100%            |
| 47 min | 60%             | 40%             |

Standardlösungen: Glukofrangulinanthron A und B, Glukofrangulin A und B, Frangulin A und B, Emodinanthron, Emodin.

Untersuchte Substanzen: Glukofrangulinanthron A und B, Glukofrangulin A und B, Frangulinanthron A und B, Frangulin A und B, Emodinanthron, Emodin.

Retentionzeiten: (min)

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Glukofrangulinanthron B | 7,57  |
| Glukofrangulinanthron A | 8,49  |
| Glukofrangulin B        | 9,07  |
| Glukofrangulin A        | 10,15 |
| Frangulinanthron B      | 26,15 |
| Frangulinanthron A      | 28,40 |
| Emodinanthron           | 31,15 |

Die UV-Spektren ergaben für die Glukofrangulinanthrone ein Absorptionsmaximum bei 320nm, für die Frangulinanthrone und Emodinanthrone bei 350nm und für die Glukofranguline und Franguline bei 420nm, die entsprechend zur Detektion verwendet wurden.

Die Abbildungen 19, 20 und 21 zeigen die entsprechenden HPL-Chromatogramme.

In der vorliegenden Untersuchung werden erstmals die Ergebnisse einer Einzelstoffbestimmung zum Anthranoidspektrum der frischen Faulbaumrinde beschrieben. Die Tab. 3 und Abb. 22 fassen die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Untersuchungen zusammen. Die Glukofrangulinanthrone sind jeweils mengenmäßig am stärksten vertreten. Auch Frangulinanthrone sind deutlich nachweisbar. Für den Baum "C" bestätigt die HPLC die Ergebnisse der qualitativen DC-Untersuchungen: Glukofranguline sind zu 0,54 bis 0,75 Prozent ebenfalls in der frischen Rinde enthalten, während weder die Franguline noch Glukofrangulinbianthrone gefunden werden konnten. Das Ergebnis bestätigt die bei der präparativen Isolierung vorstehend beschriebenen Ergebnisse, daß

eindeutig die Glukofrangulinanthrone als Primärglykoside angesehen werden können. Die von ihnen abgeleiteten reduzierten und oxidierten Anthranoid-Formen, wie sie in der vorliegenden HPLC-Untersuchung beschrieben werden, weisen eine starke Streuung im Einzel- wie auch im Gesamtgehalt der auf, so daß scheinbar eine einheitliche In-situ-Situation innerhalb eines bestimmten Zeitpunktes einer Vegetationsperiode nicht gegeben ist. Dies trifft im übrigen auch auf den Totalgehalt der Einzelstoffbestimmung zu: Baum C: 6,95 % , Baum D: 11,65 %, Baum E: 5,59 %.

---

---

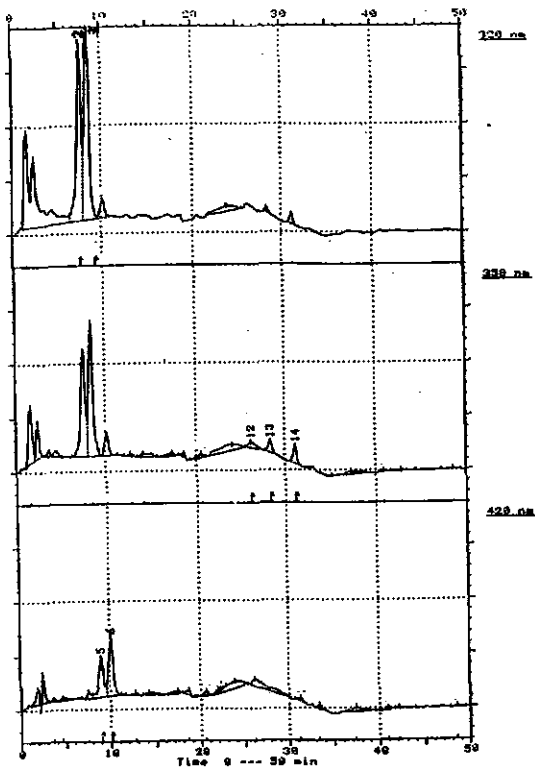


**Abb. 19 : HPL-Chromatogramm der frischen Rinde von Baum C**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodearray**  
**Bei 320 nm 2: Glukofrangulinanthron B,**  
**3: Glukofrangulinanthron A**  
**Bei 350 nm 12: Frangulinanthron B,**  
**13: Frangulinanthron A, 14: Emodinanthron,**  
**Bei 420 nm 5: Glukofrangulin B, 6: Glukofrangulin A**

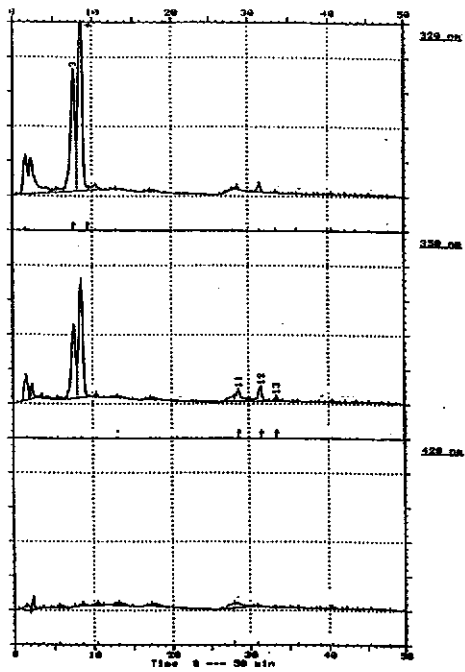


Abb. 20 : HPL-Chromatogramm der frischen Rinde von Baum D  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodearray  
 Bei 320 nm 3: Glukofrangulignantron B,  
 4: Glukofrangulignantron A  
 Bei 350 nm 11: Frangulignantron B,  
 12: Frangulignantron A, 13: Emodignantron,  
 Bei 420 nm keine Peaks

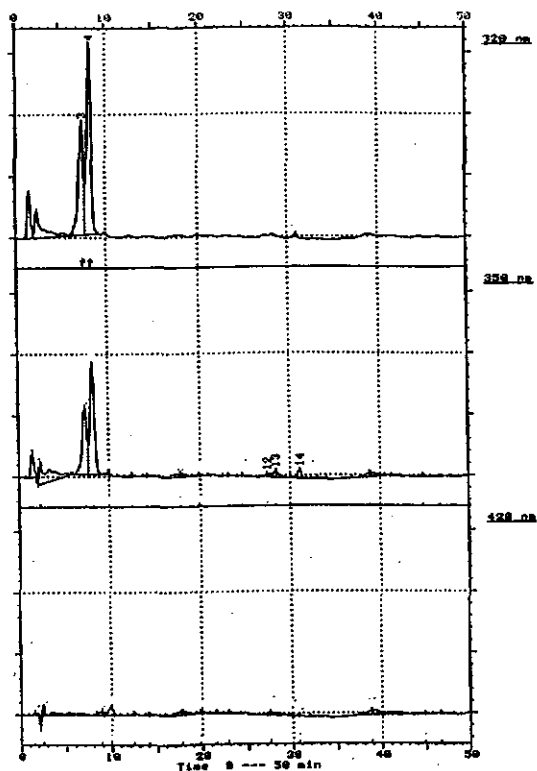


**Abb. 21 : HPL-Chromatogramm der frischen Rinde von Baum E**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodenarray**  
**Bei 320 nm 3: Glukofrangulinanthron B,**  
**4: Glukofrangulinanthron A**  
**Bei 350 nm 12: Frangulinanthron B,**  
**13: Frangulinanthron A, 14: Emodinanthron,**  
**Bei 420 nm keine Peaks**

Tab. 3 : Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen in den frischen Extrakten von drei verschiedenen Faulbäumen  
 GFAA: Glukofrangulinanthron A, GFBA: Glukofrangulin A,  
 GFBA: Glukofrangulinanthron B, GFB: Glukofrangulin B,  
 FRAA: Frangulinanthron A, FRA: Frangulin A,  
 FRBA: Frangulinanthron B, FRB: Frangulin B,  
 EA: Emodinanthron, E: Emodin

| Gehalt in % |      |      |      |      |      |      |     |     |      |   |
|-------------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------|---|
|             | GFAA | GFBA | GFA  | GFB  | FRAA | FRBA | FRA | FRB | EA   | E |
| Baum C      | 2,81 | 2,51 | 0,75 | 0,54 | 0,16 | 0,12 | -   | -   | 0,06 | - |
| Baum D      | 6,00 | 4,56 | -    | -    | 0,49 | 0,56 | -   | -   | 0,04 | - |
| Baum E      | 3,13 | 2,16 | -    | -    | 0,13 | 0,16 | -   | -   | 0,01 | - |

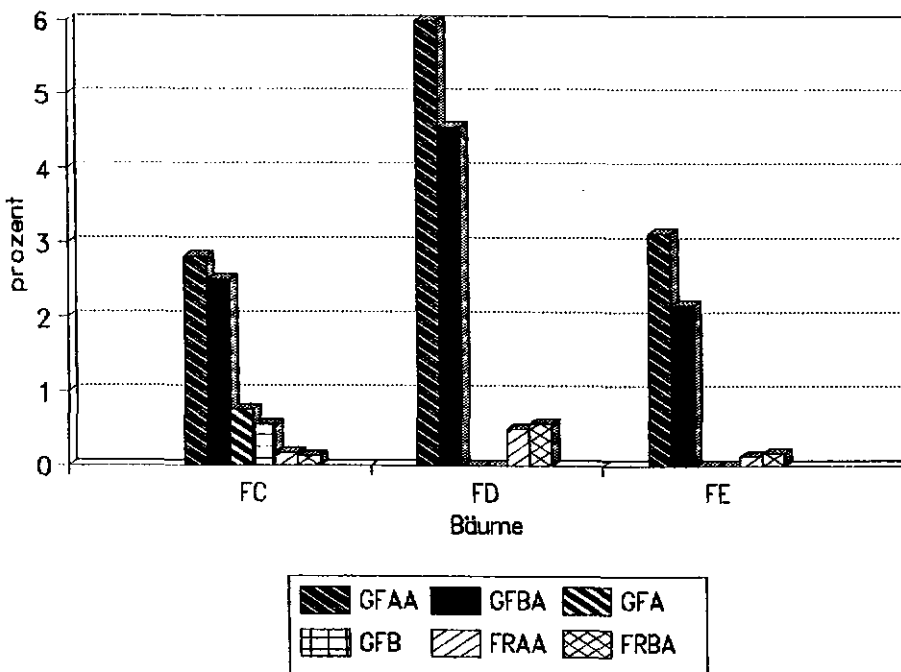


Abb. 22 : Gehalt der untersuchten Anthranoide in den Extrakten von drei verschiedenen Faulbäumen (in Prozent)

### 3.1.7 Qualitative und quantitative Untersuchung des Verhältnisses reduzierter und oxidierter Primärglykoside der frischen Rinde während einer Vegetationsperiode

#### 3.1.7.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Nach bisherigen Kenntnissen nehmen in der frischen Rinde reduzierte Verbindungen in der Winterzeit zu, im Sommer hingegen ab (50). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei Untersuchungen an Rheum-Arten (51).

#### 3.1.7.2 Herkunft des Pflanzenmaterials

Frische Faulbaumrinde wurde ab August 1988 bis August 1989 jeden Monat, insgesamt 12 Monate lang, im Botanischen Garten, Frankfurt, bei trockenem Wetter und jedes Mal um 13<sup>00</sup> Uhr selbst gesammelt und sofort extrahiert.

#### 3.1.7.3 Extraktion für die DC- und HPLC- Untersuchungen

2 g der frischen Rinde wurden mit 80 ml Methanol am Ultraturrax im Eisbad 5 Minuten schonend extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit sofort dekantiert. Diese Flüssigkeit wurde im Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt. Daraus resultierte ein Rohextrakt für die DC- und HPLC-Untersuchungen.

#### 3.1.7.4 Dünnschichtchromatographie

Für einen Gesamtvergleich der Rindenauszüge über eine Vegetationsperiode wurde jeweils 1 mg frischer Extrakt in 1 ml Methanol gelöst. Von jedem Extrakt wurden 10 µl auf eine Kieselgel Platte aufgetragen. Bei der dc Untersuchung wurde das neue Anthron-Reagenz Nitroblautetrazoliumchlorid verwendet (siehe 3.1.5). Zunächst zeigte die DC-Analyse das mengenmäßige Überwiegen der Glukofrangulinanthrone während der Monate Januar bis Juli und ebenfalls das Auftreten der Frangulinanthrone, wie die Banden im  $R_f$ -Bereich 0,80 bis 0,82 von Mai bis Juni deutlich zeigen. Darüber hinaus finden sich die Zonen der Glukofranguline von August bis Dezember und entsprechende Konzentrationen an Frangulinen im höheren  $R_f$ -Bereich. Die Analyse zeigt demnach deutliche Unterschiede im qualitativen und quantitativen Gehalt der relevanten Glykoside, wie mittels HPLC nachstehend bestätigt wird (siehe 3.1.7.5). Den höchsten Gehalt an Anthronderivaten zeigt der Juni-Extrakt, während im September und August die Anthrone kaum nachweisbar sind, dafür aber ein hoher Gehalt an Glukofrangulinen und Frangulinen zu beobachten ist (siehe Abb. 23).

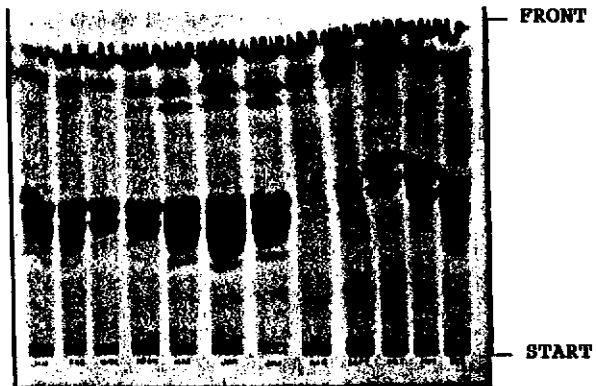


Abb. 23 : Dünnschichtchromatogramm der frischen Faulbaumrinde während einer Vegetationsperiode

**3.1.7.5 Quantitative HPLC-Bestimmung der Hauptglykoside Glukofrangulinanthrone A und B sowie der Glukofranguline A und B in der frischen Rinde während einer Vegetationsperiode**

Für die Einzelstoffbestimmung mittels HPLC wurden von dem unter 3.1.7.3 erhaltenen Extrakt 3 mg in Methanol:Wasser (1:1) klar gelöst und als HPLC-Untersuchungslösung verwendet.

Als mobile Phase diente ein Methanol-Wasser-Gradient, der wie folgt programmiert wurde:

| <u>ZEIT</u> | <u>A 40 % Methanol</u> | <u>B 80 % Methanol</u> |
|-------------|------------------------|------------------------|
| Anfang      | 60                     | 40                     |
| 15 Min      | 60                     | 40                     |
| 30 Min      | 20                     | 80                     |
| 37 Min      | 60                     | 40                     |

Als Referenzsubstanzen wurden authentische, selbst isolierte Substanzen verwendet: Glukofrangulinanthron A, Glukofrangulinanthron B, Glukofrangulin A, Glukofrangulin B, Glukofrangulinbianthron.

Untersucht wurden folgende Glykoside: Glukofrangulinanthron A, Glukofrangulinanthron B, Glukofrangulin A, Glukofrangulin B Glukofrangulinbianthron.

Die Detektion erfolgte für die Glukofrangulinanthrone bei 320nm, für die Glukofranguline bei 420nm, für Glukofrangulinbianthron bei 335nm.

Die Abbildungen 24-35 zeigen die entsprechenden HPL-Chromatogramme.

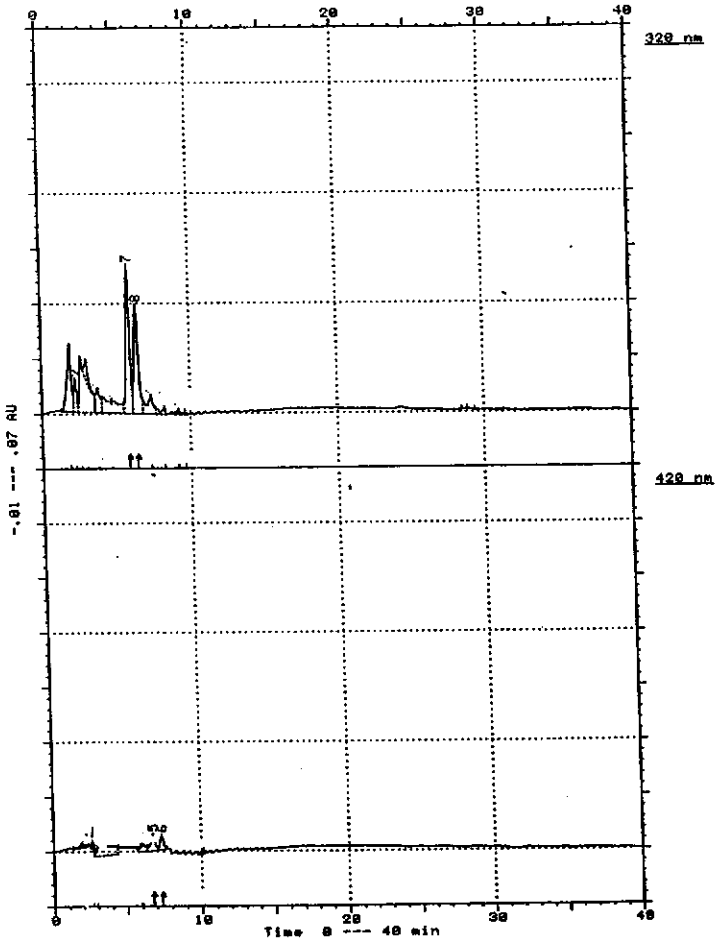


Abb. 24 : HPL-Chromatogramm der im Januar gesammelten frischen Faulbaumrinde  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
 Bei 320 nm 7: Glukofrangulinanthron B,  
 8: Glukofrangulinanthron A,  
 Bei 420 nm 5: Glukofrangulin B,  
 6: Glukofrangulin A

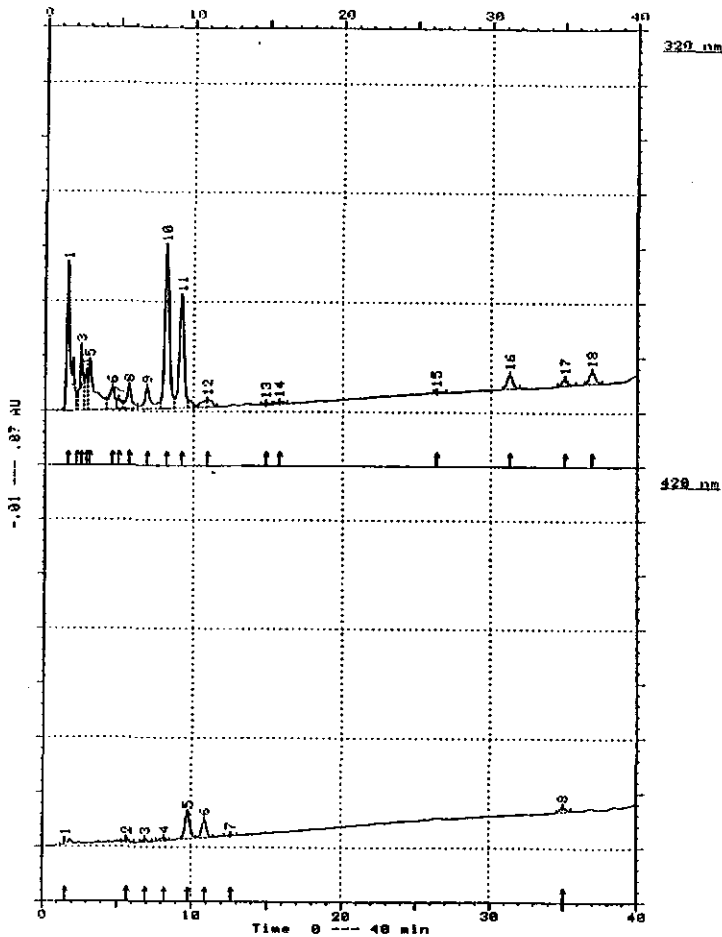


Abb. 25 : HPL-Chromatogramm der im Februar gesammelten frischen Faulbaumrinde

Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4

Fließmittel: Methanol:Wasser

Detektor: Waters 990-Photodiodenarray

Bei 320 nm 10: Glukofrangulinanthron B,

11: Glukofrangulinanthron A, 16: Frangulinanthron B,

17: frangulinanthron A, 18: Emodinanthron,

Bei 420 nm 5: Glukofrangulin B, 6: Glukofrangulin A,

8: Frangulin A

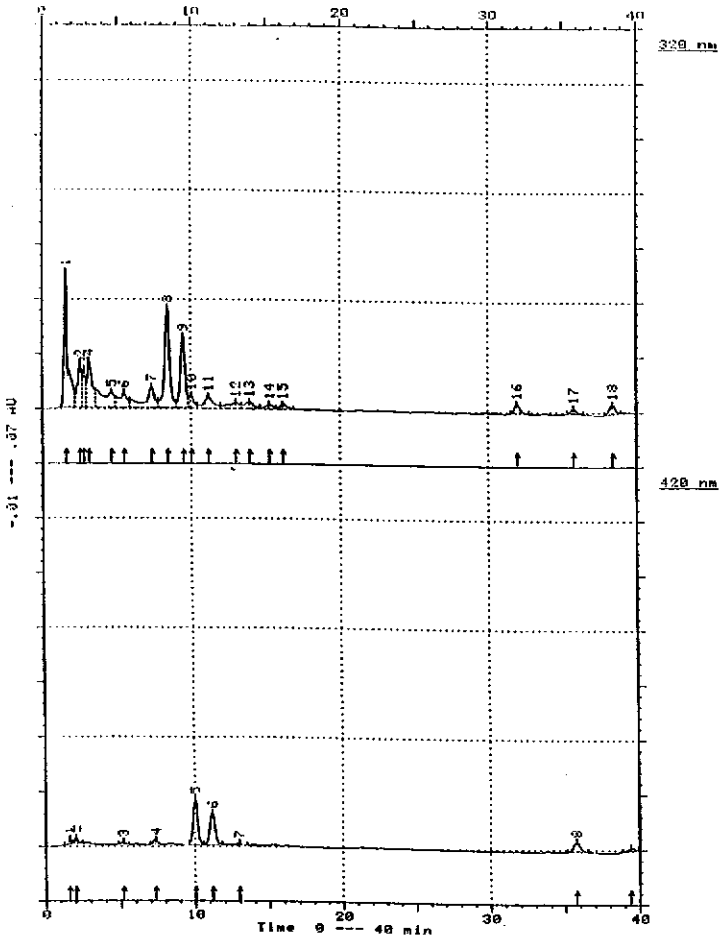


Abb. 26 : HPL-Chromatogramm der im März gesammelten frischen Faulbaumrinde  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
 Bei 320 nm 8: Glukofrangulinanthron B,  
 9: Glukofrangulinanthron A, 16: Frangulinanthron B,  
 17: Frangulinanthron A, 18: Emodinanthron,  
 Bei 420 nm 5: Glukofrangulin B, 6: Glukofrangulin A  
 8: Frangulin A

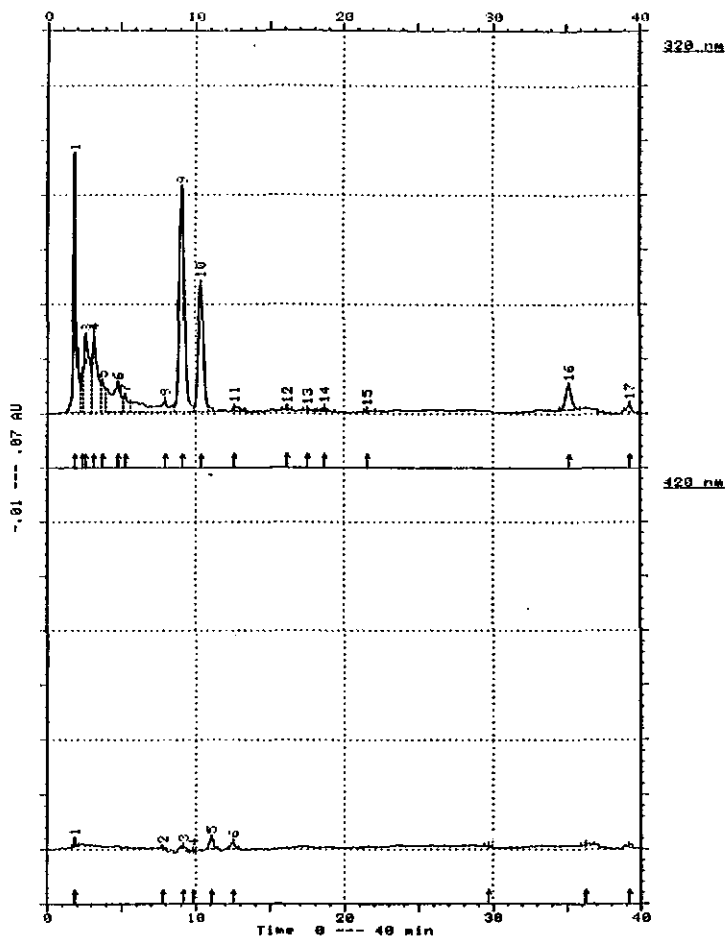


**Abb. 27 : HPL-Chromatogramm der im April gesammelten frischen Faulbaumrinde**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodearray**  
**Bei 320 nm 9: Glukofrangulinanthron B,**  
**10: Glukofrangulinanthron A, 16: Frangulinanthron B,**  
**17: Frangulinanthron A,**  
**Bei 420 nm 5: Glukofrangulin B, 6: Glukofrangulin A**

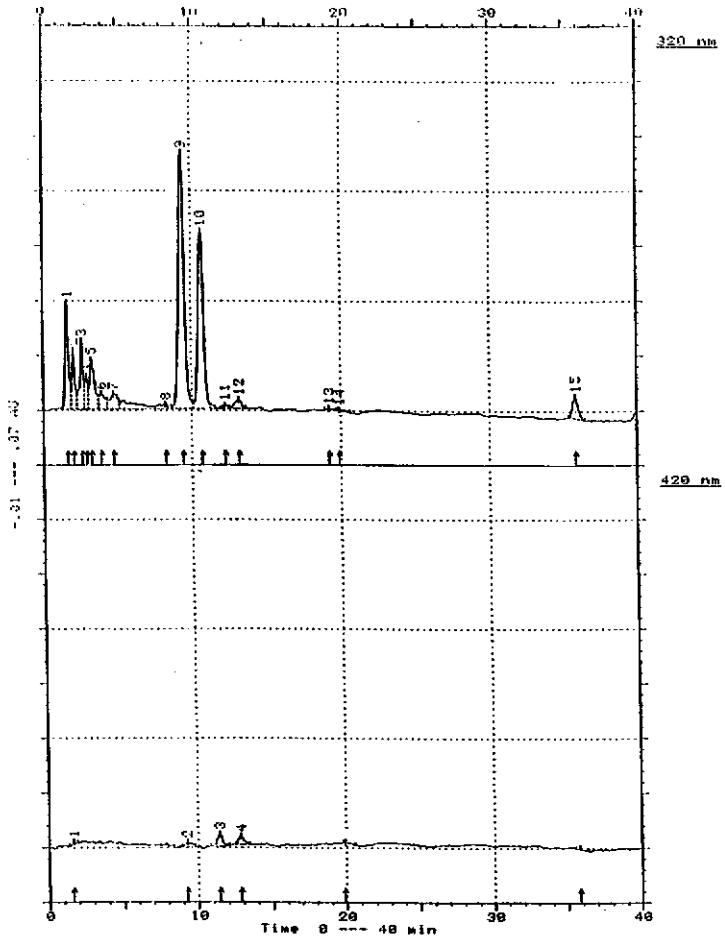


Abb. 28 : HPL-Chromatogramm der im Mai gesammelten frischen  
 Faulbaumrinde  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
 Bei 320 nm 9: Glukofrangulinanthron B,  
 10: Glukofrangulinanthron A, 15: Frangulinanthron B,  
 Bei 420 nm 3: Glukofrangulin B, 4: Glukofrangulin A

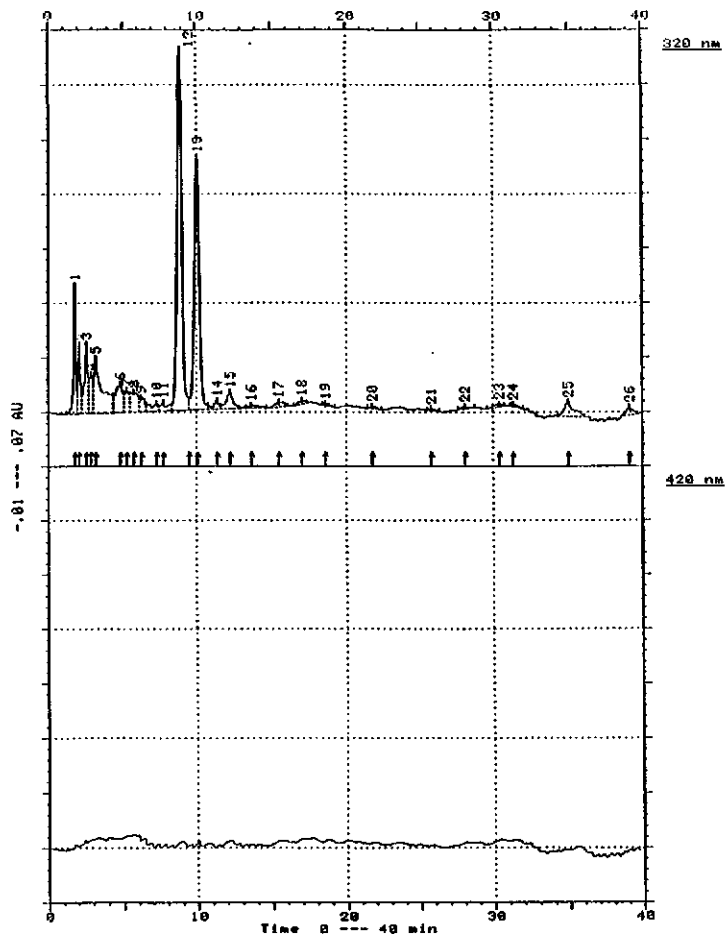


Abb. 29 : HPL-Chromatogramm der im Juni gesammelten frischen  
 Faulbaumrinde  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodearray  
 Bei 320 nm 12: Glukofrangulinanthron B,  
 13: Glukofrangulinanthron A, 25: Frangulinanthron B,  
 26: Frangulinanthron A,  
 Bei 420 nm keine Peaks

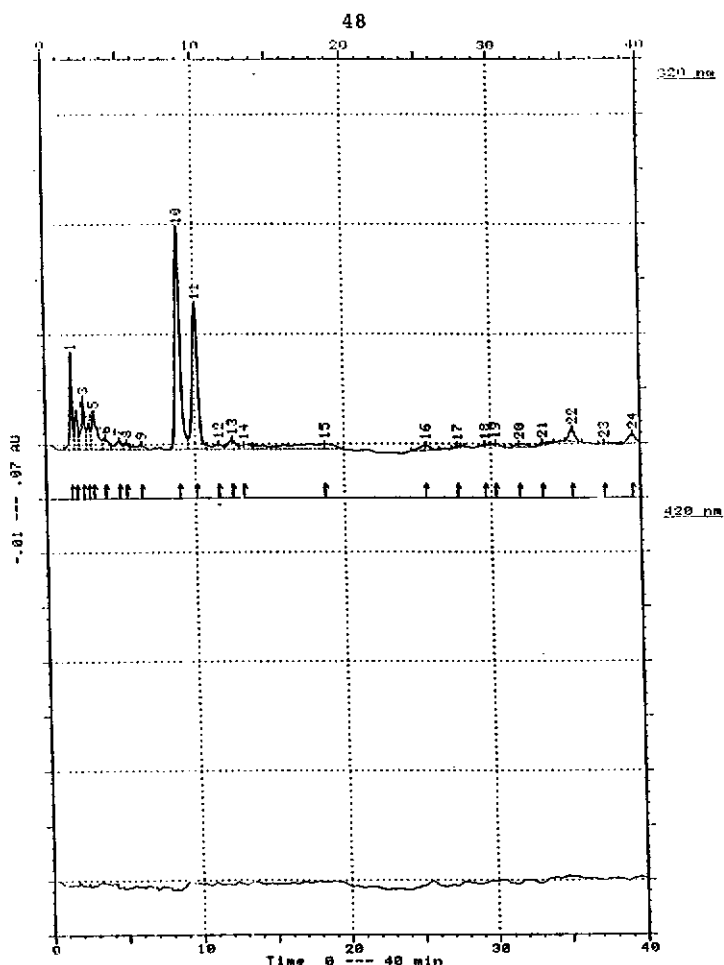


Abb. 30 : HPL-Chromatogramm der im Juli gesammelten frischen  
 Faulbaumrinde  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodearray  
 Bei 320 nm 10: Glukofrangulinanthron B,  
 11: Glukofrangulinanthron A, 22: Frangulinanthron B,  
 24: Frangulinanthron A,  
 Bei 420 nm keine Peaks

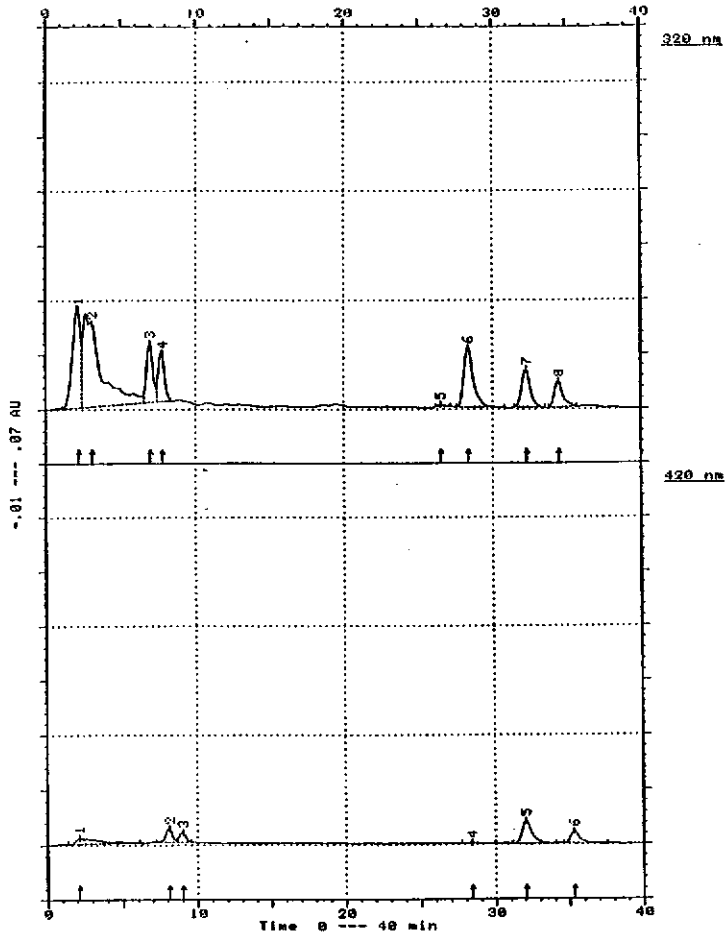


Abb. 31 : HPL-Chromatogramm der im August gesammelten frischen Faulbaumrinde

Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4

Fließmittel: Methanol:Wasser

Detektor: Waters 990-Photodiodenarray

Bei 320 nm 3: Glukofrangulinanthron B,

4: Glukofrangulinanthron A, 6: Frangulinanthron B,

7: Frangulinanthron A, 8: Emodinanthron,

Bei 420 nm 2: Glukofrangulin B, 3: Glukofrangulin A

5: Frangulin B, 6: Frangulin A

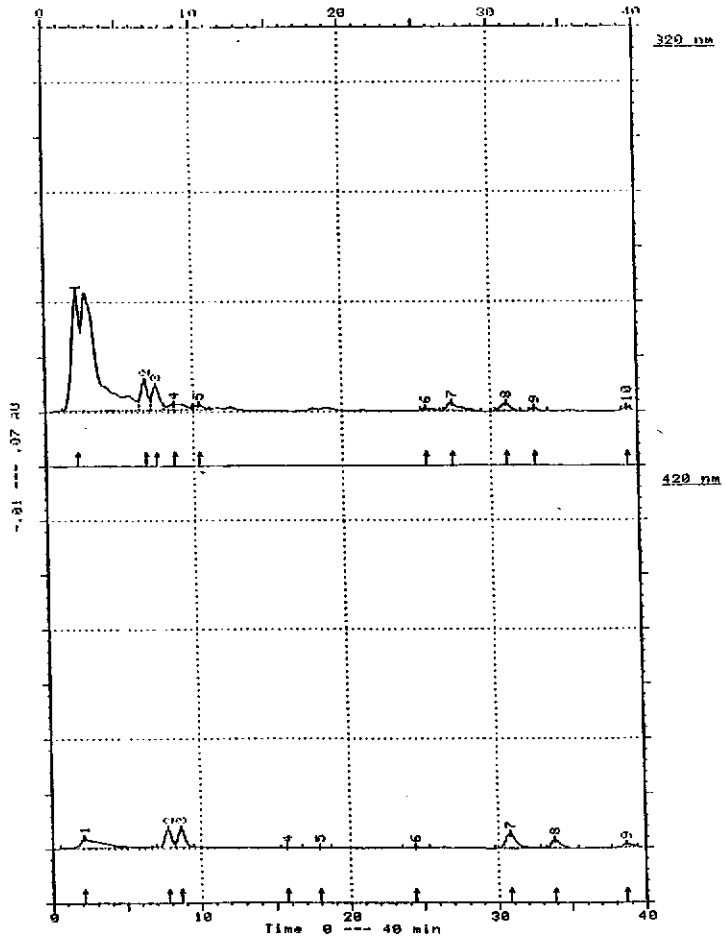


Abb. 32 : HPL-Chromatogramm der im September gesammelten frischen Faulbaumrinde  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodearray  
 Bei 320 nm 2: Glukofrangulinanthron B, 3: Glukofrangulinanthron A, 7: Frangulinanthron B, 8: Frangulinanthron A, 9: Emodinanthron,  
 Bei 420 nm 2: Glukofrangulin B, 3: Glukofrangulin A 7: Frangulin B, 8: Frangulin A, 9: Emodin

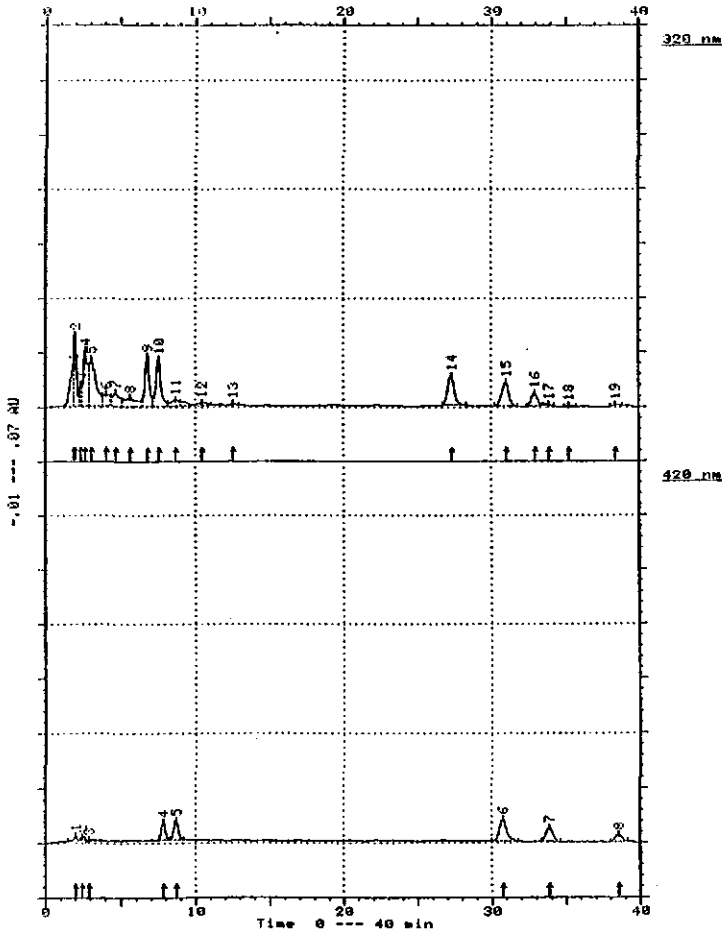


**Abb. 33 : HPL-Chromatogramm der im Oktober gesammelten frischen Faulbaumrinde**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodenarray**  
**Bei 320 nm 9: Glukofrangulinanthron B,**  
**10: Glukofrangulinanthron A, 14: Frangulinanthron B,**  
**15: Frangulinanthron A, 16: Emodinanthron,**  
**Bei 420 nm 4: Glukofrangulin B, 5: Glukofrangulin A,**  
**6: Frangulin B, 7: Frangulin A, 8: Emodin**

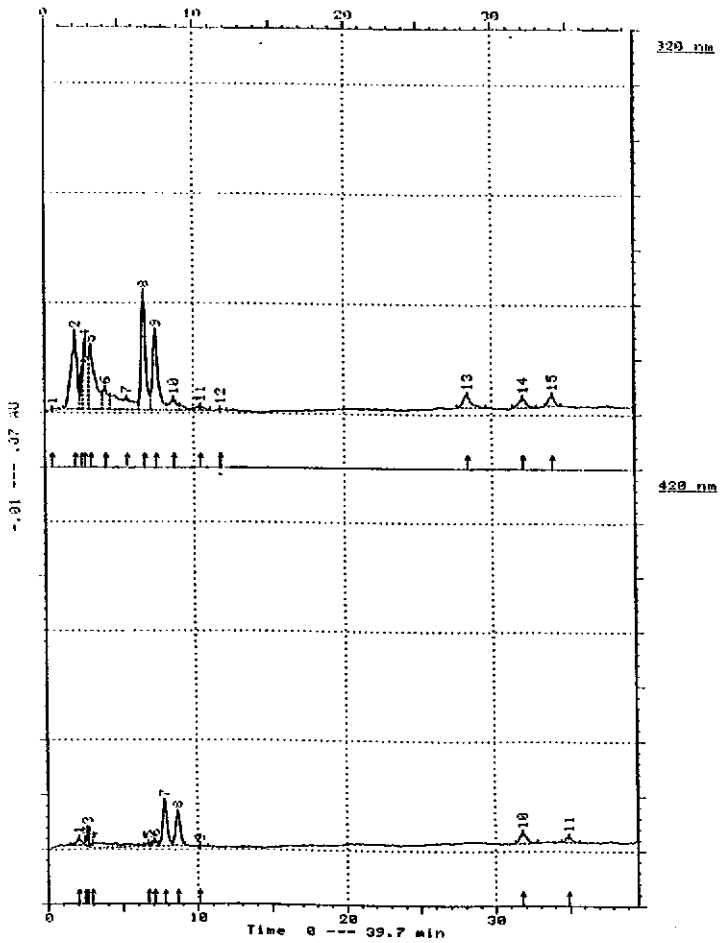


Abb. 34 : HPL-Chromatogramm der im November gesammelten frischen Faulbaumrinde  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
 Bei 320 nm 8: Glukofrangulinanthron B,  
 9: Glukofrangulinanthron A, 13: Frangulinanthron B,  
 14: Frangulinanthron A, 15: Emodinanthron,  
 Bei 420 nm 7: Glukofrangulin B, 8: Glukofrangulin A,  
 10: Frangulin B, 11: Frangulin A

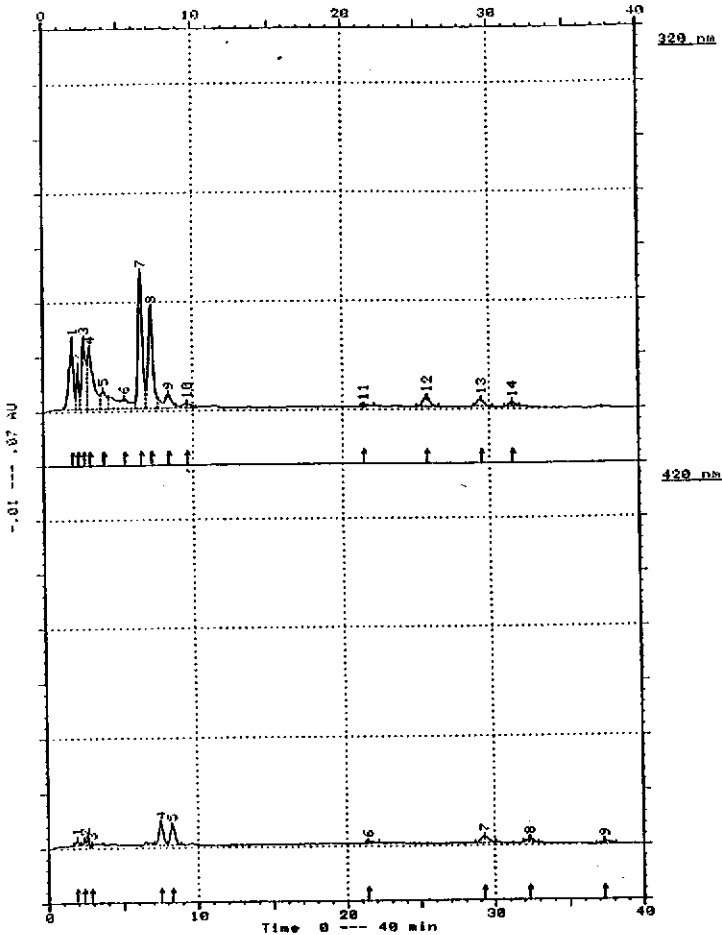


Abb. 35 : HPL-Chromatogramm der im Dezember gesammelten frischen Faulbaumrinde

Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4

Fließmittel: Methanol:Wasser

Detektor: Waters 990-Photodiodenarray

Bei 320 nm 7: Glukofrangulinanthron B,

8: Glukofrangulinanthron A, 12: Frangulinanthron B,

13: Frangulinanthron A, 14: Emodinanthron,

Bei 420 nm 4: Glukofrangulin B, 5: Glukofrangulin A,

7: Frangulin B, 8: Frangulin A, 9: Emodin

Tab. 4 : Resultate der Gehaltsbestimmungen während einer Vegetationsperiode von *Rhamnus frangula*  
 GFAA : Glukofrangulinanthron A, GFA : Glukofrangulin A  
 GFBA : Glukofrangulinanthron B, GFB : Glukofrangulin B

|           | Gehalt in % |      |      |      |       |
|-----------|-------------|------|------|------|-------|
| MONATE    | GFAA        | GFBA | GFA  | GFB  | TOT.  |
| JANUAR    | 1,40        | 1,90 | 0,16 | 0,24 | 3,70  |
| FEBRUAR   | 2,52        | 4,10 | 0,32 | 0,63 | 7,57  |
| MÄRZ      | 1,75        | 2,83 | 0,35 | 1,11 | 6,04  |
| APRIL     | 2,71        | 5,01 | 0,12 | 0,19 | 8,03  |
| MAI       | 4,02        | 6,63 | 0,22 | 0,28 | 11,15 |
| JUNI      | 4,77        | 6,83 | —    | —    | 11,60 |
| JULI      | 2,96        | 4,24 | —    | —    | 7,20  |
| AUGUST    | 1,19        | 1,60 | 0,25 | 0,35 | 3,39  |
| SEPTEMBER | 1,15        | 1,39 | 0,78 | 0,77 | 4,09  |
| OKTOBER   | 1,16        | 1,25 | 0,47 | 0,39 | 3,27  |
| NOVEMBER  | 2,06        | 2,84 | 0,84 | 1,05 | 6,79  |
| DEZEMBER  | 2,42        | 3,28 | 0,48 | 0,54 | 6,72  |

In Abb. 36 sind die einzelnen Ergebnisse nochmals zusammengefaßt. Die Untersuchungsergebnisse weisen darüber hinaus darauf hin, daß die beschriebenen qualitativen und quantitativen Änderungen im Anthranoid-Spektrum während einer Vegetationsperiode eine der Hauptursachen für die Unterschiedlichkeit bisheriger pflanzenphysiologischer Untersuchungsergebnisse an *Rhamnus frangula* sein können (siehe 3.1.6). Als praktische Konsequenz der vorliegenden Untersuchungen läßt sich festhalten, daß die Monate April bis Juni im Hinblick auf den Sammelzeitpunkt aufgrund der höchsten Anthranoid-Gesamtgehalte sich als die günstigste Sammelzeit ergeben könnten. Diese Aussage bedarf jedoch einer breiter angelegten Untersuchung.

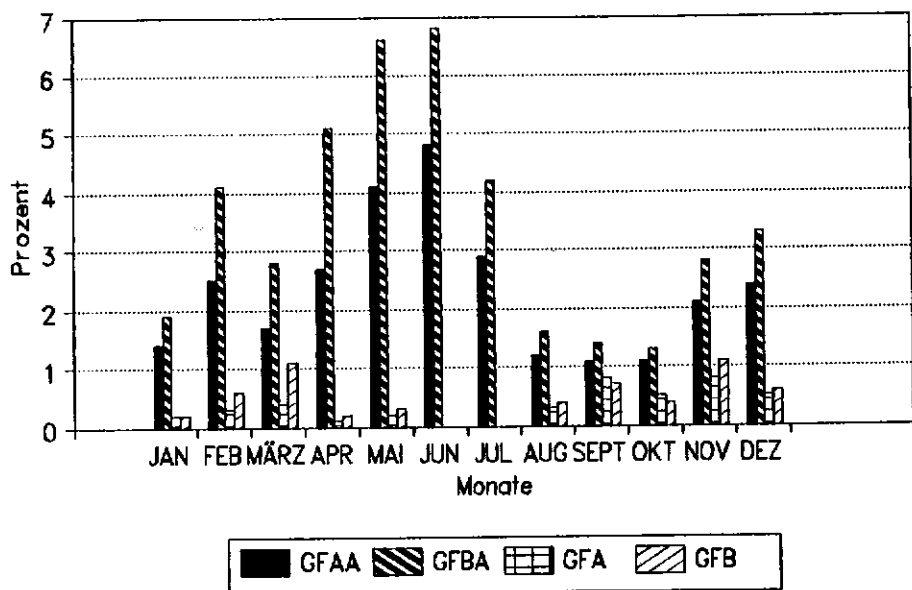


Abb. 36 : Prozentualer Anteil der Glukofrangulinanthrone A und B sowie Glukofrangulin A und B an den Extrakten der monatlich während einer Vegetationsperiode gesammelten Faulbaumrinde

### 3.1.8 HPLC-Bestimmung der reduzierten und oxidierten Glykoside nicht-arzneibuchkonformer Cortex Frangulae-Handelsdrogen

#### 3.1.8.1 Allgemeine Vorbemerkungen

In Handelschargen offizineller Cortex Rhamni Frangulae war von seiten des Zentrallaboratoriums Deutscher Apotheker, Eschborn, sowie von Großhandelsfirmen (Klenk) festgestellt worden, daß diese Proben trotz einjähriger Lagerung bzw. Erhitzen nach Arzneibuchvorschrift noch positive Anthron-Nachweise mittels Nitrosodimethylanilin gemäß DAB 9 ergaben. Zur Klärung dieser Unsicherheit wurden uns zwei Handelschargen vom Zentrallaboratorium übergeben. Wie erwähnt, waren beide Drogen nach Firmen-Zertifikat ein Jahr gelagert. Trotzdem konnte durch die HPLC-Analyse ein hoher Anteil von Glukofrangulinanthronen festgestellt und bestätigt werden, der den Gehalt an Glukofrangulinen sogar noch übertrifft. Dieser Befund stimmt überein mit Beobachtungen der Europäischen Arzneibuch-Kommission, die zur Zeit mit der Praxisrelevanz dieses Problems konfrontiert ist (Persönl. Mitt. von Prof. Sticher, Zürich an Prof. Rauwald). Im übrigen wird dieses Phänomen auch von LEMLI (52) beschrieben, der nach einjähriger Lagerung von Faulbaumrinde noch 35 bis 40 % der ursprünglichen Anthronmenge fand. Nach CUCU, TARPO (53) enthält Faulbaumrinde durch einjährige Lagerung immer noch 25 bis 30 % Anthrone. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund von LEMLI überein.

In dem Zusammenhang wäre das bisher noch immer ungelöste toxikologische Problem zu klären, ob die bei frischer Rinde beobachteten Unverträglichkeiten von seiten des Magen-Darm-Traktes wie Koliken und etc. tatsächlich von den Glukofrangulinanthronen herrühren oder aber, wie eine Reihenuntersuchung von FLÜCK (54) zeigt, Glukofrangulinanthron-Reinstoffe keine entsprechenden negativen Erscheinungen bei Probanden ergaben. Ein Ansatz zur analytischen Lösung des hier offen gelegten Problems bieten möglicherweise die früheren Untersuchungen von LEMLI und CUCU, die eine Oxidation der Glukofrangulinanthrone unter gespanntem Wasserdampf und Luftzutritt als Lösungsmöglichkeit postulieren.

Für die Droge Cortex Rhamni frangulae schreiben die Arzneibücher eine mindestens einjährige Lagerung oder ein- bis dreistündiges Erhitzen der Droge bei 100°C vor.

Im Zusammenhang mit den soeben diskutierten, nicht arzneibuchkonform gelagerten Frangula-Rinden, die uns vom Zentral-Laboratorium zur Verfügung gestellt wurden, sollte die hier behandelte Untersuchung einen Beitrag dazu liefern, welchen oxidativen und/oder hydrolytischen Umwandlungs- und Abbauprozessen die Primärglykoside, die Glukofrangulinanthrone A und B, in der frischen Rinde unterworfen sind.

### 3.1.8.2 Dünnschichtchromatographie

Die DC der Handelschargen (ZL-1 und ZL-2) erfolgte gemäß der DAB 9- Vorschrift:

0,50 g gepulverte Droge werden mit 5 ml Äthanol 70 % (V/V) zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen und Abzentrifugieren wird die überstehende Flüssigkeit sofort dekantiert. Diese Flüssigkeit muß innerhalb von 30 Minuten für die DC verwendet werden.

Als Vergleichslösung diente ein Extrakt arzneibuchkonformer Ware. Auf eine Startlinie von 15 mm Länge und höchstens 5mm Breite wurden 10 µl beider Lösungen getrennt aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte über eine Laufstrecke von 15 cm mit einer Mischung von 100 Volumenteilen Ethylacetat, 17 Volumenteilen Methanol und 13 Volumenteilen Wasser. Nach Verdunsten der mobilen Phase innerhalb von 5 Minuten wurde sofort die Platte mit frisch hergestellter 0,1 prozentiger Lösung von Nitrosodimethylanilin in Pyridin besprüht. Beide Chargen zeigten im Glukofrangulinbereich große graublaue Flecken.

Auch nach Detektion mit Nitroblautetrazoliumchlorid in Methanol (5 %ige Lösung) erschien im gleichen Rf-Bereich eine starke aubergine-violette Färbung (siehe Abb. 16). Die DC-Untersuchungen von ZL-1 und ZL-2 weisen somit auf Glukofrangulinanthrone hin. Dieses qualitative Ergebnis sollte mittels quantitativer HPLC verifiziert werden.

### 3.1.8.3 Quantitative HPLC-Bestimmung

Für die HPLC wurden 200 mg der gepulverten Drogen (ZL-1 und ZL-2) mit 70 %igem Methanol am Ultraturrax unter Eiskühlung extrahiert. Anschließend wurde zentrifugiert, sofort dekantiert und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur unter Vakuum entfernt. Für die Injektionslösung wurden je 3,0 mg der erhaltenen Extrakte in 50 %igem Methanol aufgenommen.

Als Referenzsubstanzen wurden die Glukofrangulinanthrone A und B sowie die Glukofranguline A und B verwendet. Mit Hilfe des Photodiodenarrays konnten die Glukofrangulinanthrone A und B sowie die Glukofranguline A und B gleichzeitig detektiert werden: Die Detektion erfolgte für die Glukofrangulinanthrone bei 320 nm, für die Glukofranguline bei 420 nm. Für die HPLC-Trennung wurde mit einem Fließmittelgradienten gearbeitet:

|        | A(40 % Methanol) | B(80 % Methanol) |
|--------|------------------|------------------|
| 0 Min  | 60               | 40               |
| 15 Min | 60               | 40               |
| 25 Min | 20               | 80               |
| 37 Min | 60               | 40               |

Die HPL-Chromatogramme beider Drogen finden sich in den Abb.37,38. Tab. 5 zeigt die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen.

Tab. 5 : Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen der beiden beanstandeten Handelsdrogen ZL-1 und ZL-2  
GFAA: Glukofrangulinanthron A, GFA: Glukofrangulin A  
GFBA: Glukofrangulinanthron B, GFB: Glukofrangulin B

| Untersuchungs-<br>material | Gehalt in % |      |      |      |
|----------------------------|-------------|------|------|------|
|                            | GFAA        | GFBA | GFA  | GFB  |
| ZL-1                       | 4,40        | 3,31 | 2,80 | 1,87 |
| ZL-2                       | 7,30        | 4,50 | 3,10 | 1,90 |

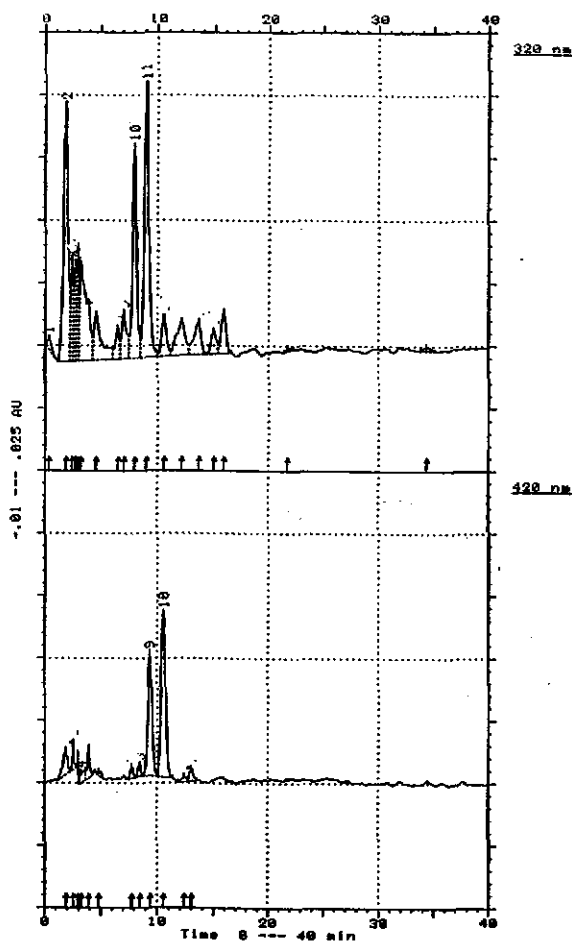


Abb. 37 : HPL-Chromatogramm der vom ZL beanstandeten  
 Rhamni frangulae cortex (ZL-1)  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodearray  
 Bei 320 nm 10: Glukofrangulinanthron B,  
 11: Glukofrangulinanthron A,  
 Bei 420 nm 9: Glukofrangulin B,  
 10: Glukofrangulin A

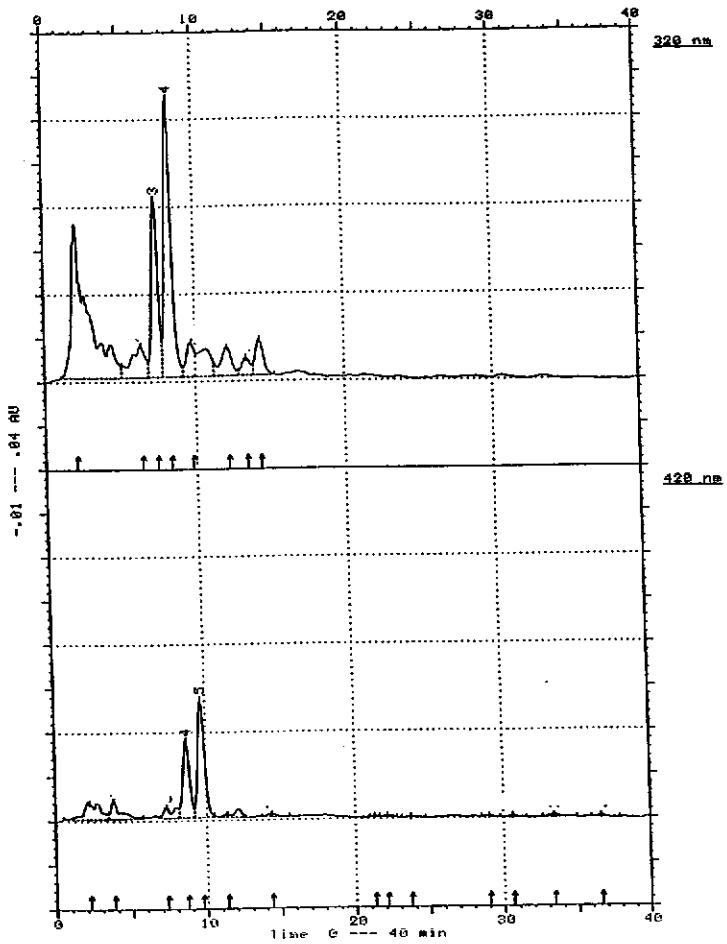


**Abb. 38 : HPL-Chromatogramm der vom ZL beanstandeten  
 Rhamni frangulae cortex (ZL-2)  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
 Bei 320 nm 3: Glukofrangulinanthron B,  
 4: Glukofrangulinanthron A,  
 Bei 420 nm 4: Glukofrangulin B,  
 5: Glukofrangulin A**

### 3.1.9 Qualitative und quantitative Untersuchung oxidativer und hydrolytischer Umwandlungs- und Abbauprozesse in der frischen Rinde; Infragestellen der DAB 9-Vorschrift

#### 3.1.9.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Über den Vorgang der Oxidation der Anthrone zu den Anthrachinon-derivaten liegen einige ältere Literaturangaben vor, in denen sowohl eine Enzym-Beteiligung wie auch die Autoxidation diskutiert werden; u.a. wird das Vorkommen von Frangulinen in der Droge durch Abspaltung von Glucose nach Oxidation der Glukofrangulinanthrone zu den Glukofrangulinen erklärt (49). In einer anderen Arbeit gelingt die in vitro Abspaltung des Glucose-Restes von Glukofrangulinanthron bedeutend schneller als die Abspaltung der Rhamnose (55). SCHENK und Mitarb. postulieren ein enzymatisches Hydrolase-Peroxydase-System, das den Oxidationsvorgang der Glukofrangulinanthrone zu den Glukofrangulinen und Frangulinen verwirklicht. Allerdings sei die Oxidation eines Anthrons erst möglich nach Abspaltung der Glucose von der 8-OH- Gruppe der Glukofrangulinanthrone, so daß die in der Droge enthaltenen Glukofranguline aus den Frangulinen durch erneute Glykosidierung entstehen sollen (56). Nach CUCU, TARPO (53) liegt die optimale Temperatur für diesen enzymatischen Vorgang bei 80-100°C, was für eine Enzymreaktion jedoch ungewöhnlich hoch sei. Sie stellen sogar einen erhöhten Gehalt an Glukofrangulinanthronen bei dieser Temperatur fest, so daß das Vorhandensein einer Reduktase diskutiert wird.

Nach LONGO et al. (57) gelingt die Hydrolyse der Glukofranguline zu den Frangulinen durch Einwirken von  $\beta$ -Glucosidase bei 30°C. Andere Autoren verneinen jedoch eine enzymatisch gesteuerte Hydrolyse. Für die Abspaltung der Glucose vom Glukofrangulinanthron-Molekül könnte nach LEMLI et al. (2) auch ein nicht-enzymatischer Prozeß bei Anwendung von Hitze und Anwesenheit von Luftsauerstoff verantwortlich sein: Bei der Aufarbeitung von Faulbaumblättern hydrolysierten mit zunehmender

Temperatur die Glukofrangulinanthrone zu Frangulinanthronen, bis da bei die auf 100°C erhitzte Blätter keine Glukofrangulinanthrone mehr nachweisbar waren. Auch nach LABADIE (58) wird die Hydrolyse nicht durch  $\beta$ -Glucosidase katalysiert. Die Glukofranguline wurden dabei auf der DC-Platte mit dem Enzym besprüht. Eine Abspaltung von Glucose konnte nicht beobachtet werden. In der vorliegenden Untersuchung wird der thermische Einfluß beim Erhitzen frischer Faulbaumrinde gemäß DAB 9 auf die Primärglykoside, die Glukofrangulinanthrone A und B, beobachtet. Dabei werden mit Hilfe einer qualitativen und quantitativen HPLC-Analyse die Hauptumwandlungs- und abbauprodukte der Oxidation und Hydrolyse erfaßt.

### 3.1.9.2 Erhitzen von frischer Faulbaumrinde nach Temperaturgradienten in Anlehnung an die DAB 9-Vorschrift

Die Rinde von drei verschiedenen Faulbäumen (C, D und E) wurde bei 20°C, 40°C, 60°C, 80°C und 100°C eine Stunde lang erhitzt. Nach anschließender schonender Probenaufbereitung (gemäß 3.1.6) wurden diese Extrakte direkt per HPLC untersucht. Als Vergleich diente der Extrakt von unbehandelter frischer Rinde.

Als Referenzsubstanzen für die HPLC wurden Glukofrangulinanthron A, Glukofrangulinanthron B, Glukofrangulin A, Glukofrangulin B, Frangulin A, Frangulin B, Emodinanthron und Emodin verwendet. Die Detektion erfolgte bei 320 nm für die Glukofrangulinanthrone A und B, bei 350 nm für die Frangulinanthrone A und B sowie für Emodinanthron, bei 420 nm für die Glukofranguline A und B sowie für Emodin.

Die Trennung der anthronhaltigen Extrakte erfolgte durch Reversed-Phase-HPLC mit einem Methanol-Wasser-Gradienten (siehe 3.1.6). Die Abb. 39-43, 45-49 und 51-55 zeigen die entsprechenden HPL-Chromatogramme. Zur quantitativen Auswertung wurden die Peakflächen der Reinsubstanzen und der Extrakte mit einem

Computergesteuerten Integrationssystem ausgewertet. Die Tabellen 6-8 zeigen die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen. Lineare Korrelationen bestehen nicht: Die Mengen der Anthranoide eines Temperaturgradienten schwanken sehr. Als vorläufiges Fazit dieser Untersuchung, die zusätzlich noch einer Serienuntersuchung mit mehreren Rinden bedarf, kann jedoch bemerkt werden: Bei Temperaturen von 30 bis 60°C nimmt der Gehalt an Glukofrangulinanthronen (1) zu. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung von CUCU, TARPO (53). Bei Erhitzen auf 100°C nimmt der Glukofrangulinanthron-Gehalt leicht ab zugunsten eines steigenden Gehaltes an korrespondierenden Hydrolyse-Produkten, den Frangulinanthronen (1). Dieser Befund bestätigt die von LEMLI an Blattmaterial festgestellte Beobachtung (2), widerspricht allerdings dem Befund, daß die Glukofrangulinanthrone bei 100°C vollständig zu Frangulinanthronen umgesetzt würden, was in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden kann. In Übereinstimmung mit den älteren Untersuchungen von CUCU, TARPO und ebenfalls mit denen von LEMLI an Blattmaterial kann festgehalten werden, daß die DAB 9-Vorschrift (einstündiges Erhitzen auf 100°C), der eine quantitative Umwandlung der Glukofrangulinanthrone zu den Glukofrangulinen ermöglichen soll, in Frage gestellt werden muß und einer Überarbeitung bedarf. Entsprechende Untersuchungen sind im Arbeitskreis bereits im Gange.

Einzig der Gehalt an Frangulinanthronen nahm beim einstündigen Erhitzen auf 100°C immer zu. Eine Hydrolysereaktion kann also festgestellt werden. Eine Oxidation zu Glukofrangulinen (Ausnahme Baum D, 60°C) fand nicht statt.

### 3.1.9.3 Inkubation von Glukofrangulinen mit $\beta$ -Glucosidase

Nach 3.1.9.2 hydrolysieren die Glukofrangulinanthrone am stärksten bei einstündigem Erhitzen auf 100°C. Es erschien daher sinnvoll, die Hydrolyse durch enzymatische Katalyse bei dieser Temperatur in Anlehnung an die Untersuchung von CUCU, TARPO (53) nachzuvollziehen.

Nach Lösen der Glukofranguline in Acetatpuffer (pH=5) wurde mit  $\beta$ -Glucosidase aus süßen Mandeln bei 100°C inkubiert; unter gleichen Bedingungen wurde eine Blindprobe ohne Enzymzusatz behandelt.

Die Reaktion wurde mit Hilfe der HPLC verfolgt; die Bedingungen entsprechen denen in Kapitel 3.1.9.2.

Abb. 57 zeigt das HPL-Chromatogramm der Substrate. Das HPL-Chromatogramm des Blindversuches (Abb. 58) unterscheidet sich davon nicht.

Im HPL-Chromatogramm des Reaktionsansatzes (100°C, 15 min) sind deutlich die Peaks der beiden Franguline im Retentionsbereich von 30 bis 34 min zu erkennen (Abb. 59). Dieses Ergebnis läßt das Vorhandensein von  $\beta$ -Glucosidase in Frangularinde vermuten. Es ergänzt die o.a. Kritik an der DAB 9- Vorschrift des Erhitzens frischer Rinde dahingehend, daß bei 100°C aufgrund von Hydrolysereaktionen der Gehalt an wertvollen Glukofrangulinen/-anthronen deutlich abnimmt.

Auch hier sind weitere systematische Untersuchungen notwendig, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würden.

---

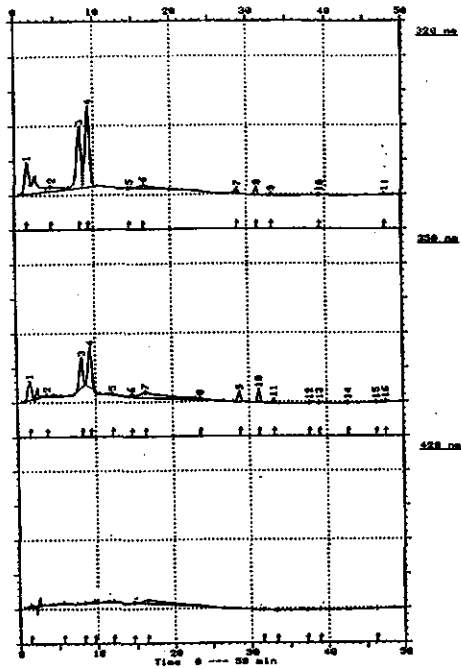


**Abb. 39 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 20°C erhitzten Rinde von Faulbaum C**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodenarray**  
**Bei 320 nm 3: Glukofrangulinanthron B,**  
**4: Glukofrangulinanthron A,**  
**Bei 350 nm 9: Frangulinanthron B,**  
**10: Frangulinanthron A,**  
**11: Emodinanthron**  
**Bei 420 nm keine Peaks**

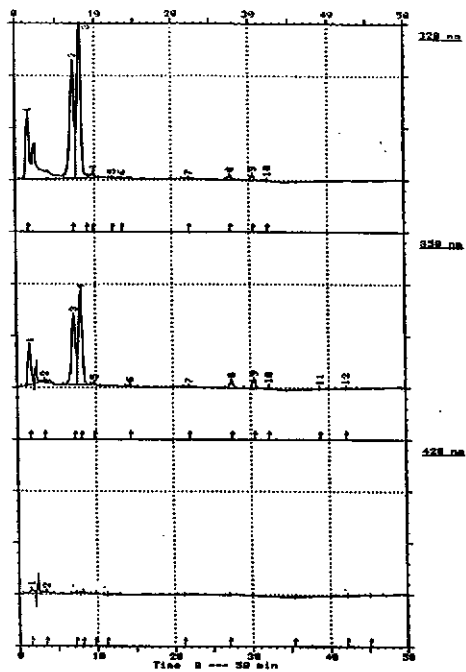


Abb. 40 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 40°C  
 erhitzten Rinde von Faulbaum C  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
 Bei 320 nm 2: Glukofrangulinanthron B,  
 3: Glukofrangulinanthron A,  
 Bei 350 nm 8: Frangulinanthron B,  
 9: Frangulinanthron A,  
 10: Emodinanthron  
 Bei 420 nm keine Peaks

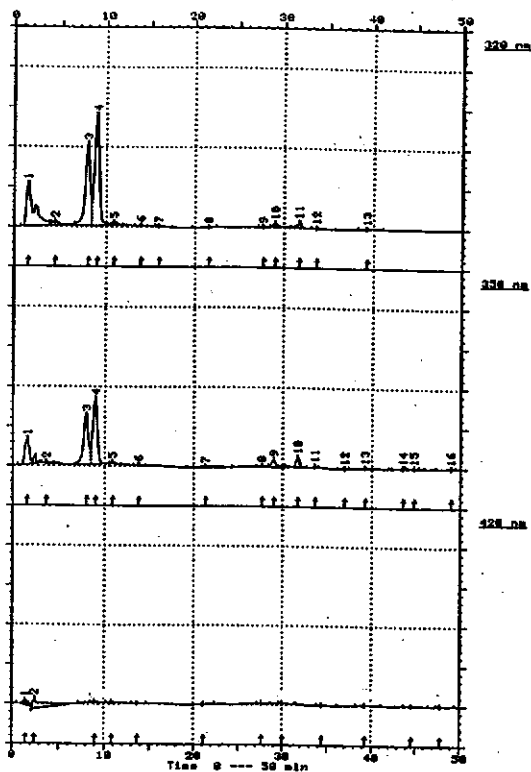


**Abb. 41 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 60°C erhitzten Rinde von Faulbaum C**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodearray**  
**Bei 320 nm 3: Glukofrangulignantron B,**  
**4: Glukofrangulignantron A,**  
**Bei 350 nm 9: Frangulignantron B,**  
**10: Frangulignantron A,**  
**11: Emodignantron**  
**Bei 420 nm keine Peaks**

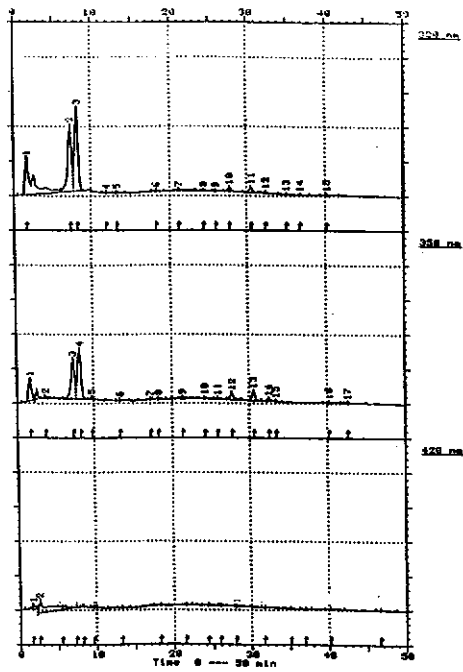


Abb. 42 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 80°C  
erhitzten Rinde von Faulbaum C  
Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
Fließmittel: Methanol:Wasser  
Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
Bei 320 nm 2: Glukofrangulinanthron B,  
3: Glukofrangulinanthron A,  
Bei 350 nm 12: Frangulinanthron B,  
13: Frangulinanthron A,  
14: Emodinanthron  
Bei 420 nm keine Peaks.

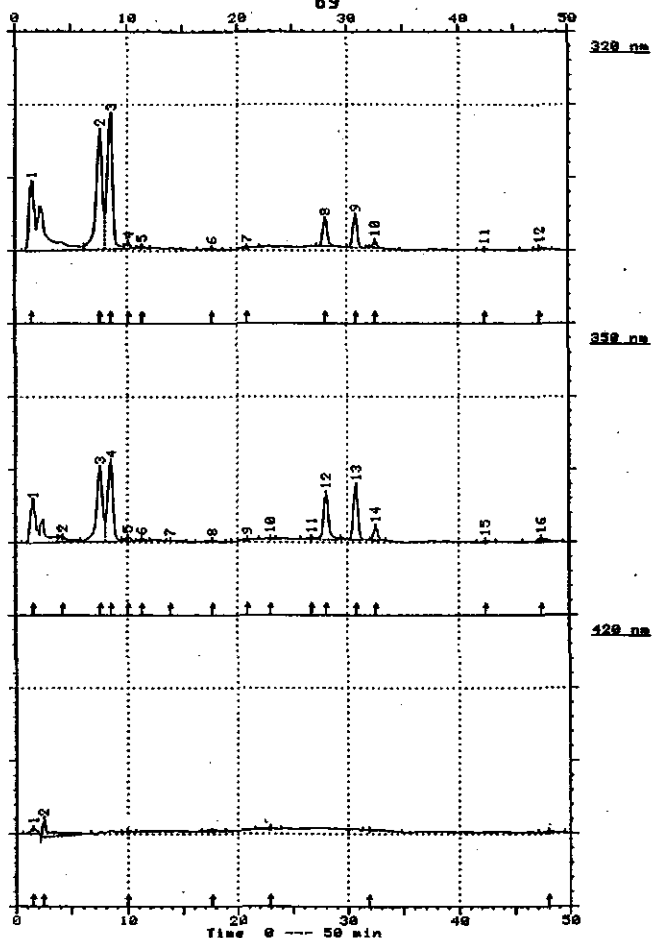


Abb. 43 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 100°C erhitzten Rinde von Faulbaum C  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodearray  
 Bei 320 nm 2: Glukofrangulinanthron B,  
 3: Glukofrangulinanthron A,  
 Bei 350 nm 12: Frangulinanthron B,  
 13: Frangulinanthron A,  
 14: Emodinanthron  
 Bei 420 nm keine Peaks

**Tab. 6 : Quantitative Auswertung der erhitzten Rindendroge von Faulbaum C**

| Gehalt in % |      |       |       |       |       |       |
|-------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
|             | F    | 20°C  | 40°C  | 60°C  | 80°C  | 100°C |
| GFAA        | 2,81 | 3,26  | 3,90  | 3,60  | 2,62  | 2,12  |
| GFBA        | 2,51 | 2,86  | 3,33  | 3,24  | 2,55  | 2,32  |
| GFA         | 0,75 | -     | -     | -     | -     | -     |
| GFB         | 0,54 | -     | -     | -     | -     | -     |
| FRAA        | 0,16 | 0,26  | 0,24  | 0,32  | 0,30  | 0,73  |
| FRBA        | 0,12 | 0,33  | 0,23  | 0,32  | 0,32  | 0,78  |
| FRA         | -    | -     | -     | -     | -     | -     |
| FRB         | -    | -     | -     | -     | -     | -     |
| EA          | 0,06 | 0,045 | 0,018 | 0,013 | 0,054 | 0,060 |
| E           | -    | -     | -     | -     | -     | -     |

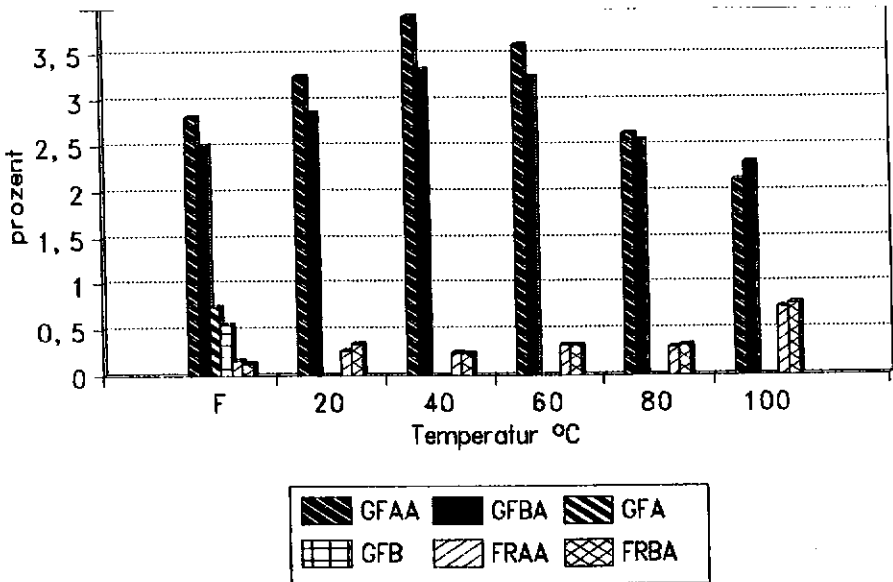


**Abb. 44 : Übersicht der Einzelstoffbestimmungen in den durch Hitze veränderten frischen Rinden von Faulbaum C**

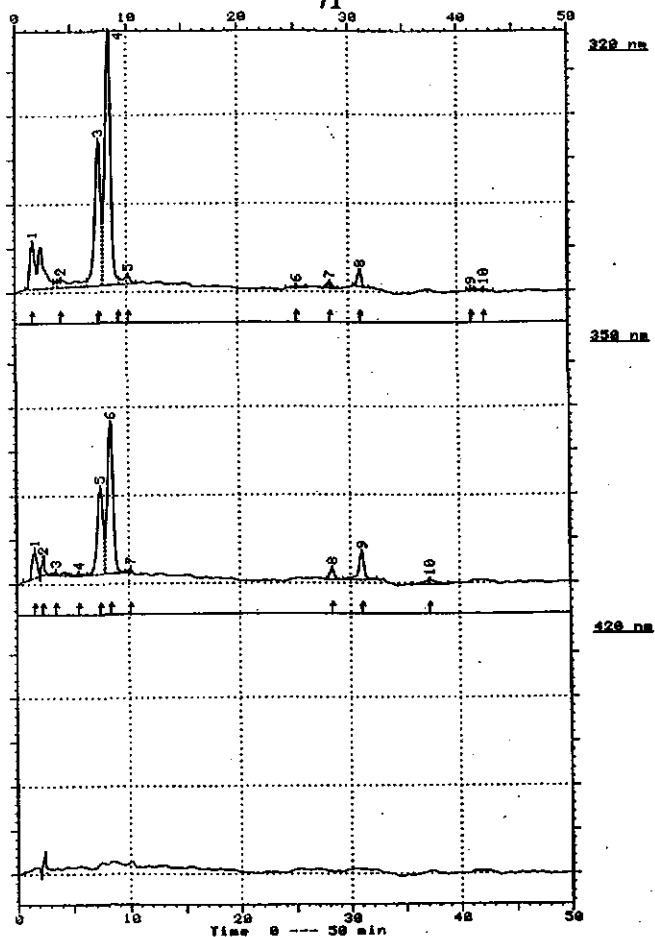


Abb. 45 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 20°C  
 erhitzten Rinde von Faulbaum D  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
 Bei 320 nm 3: Glukofrangulianthron B,  
 4: Glukofrangulianthron A,  
 Bei 350 nm 8: Frangulianthron B,  
 9: Frangulianthron A,  
 10: Emodinanthron  
 Bei 420 nm keine Peaks

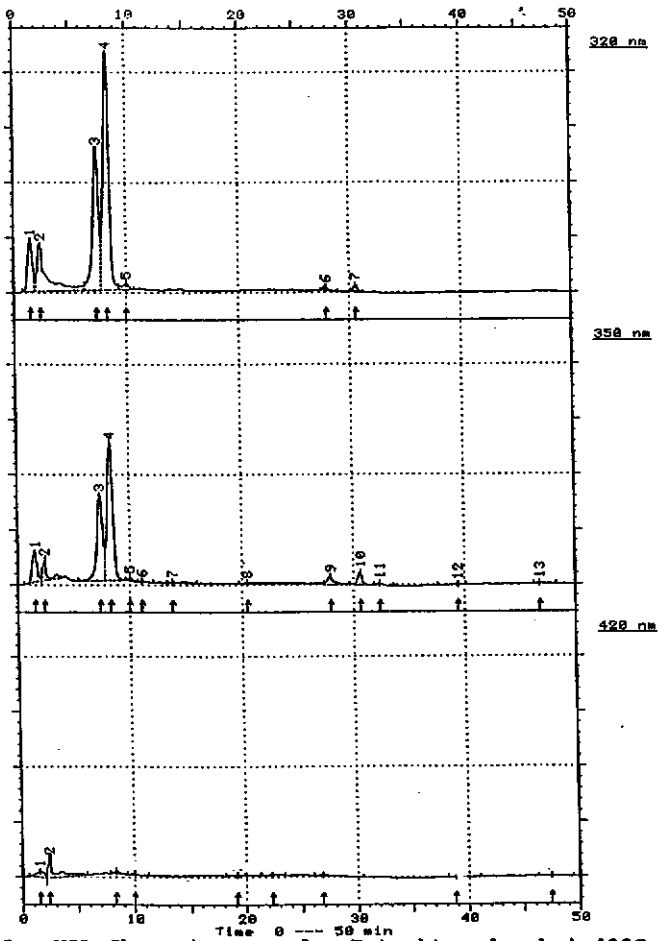


Abb. 46 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 40°C erhitzten Rinde von Faulbaum D  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
 Bei 320 nm 3: Glukofrangulinanthron B,  
 4: Glukofrangulinanthron A,  
 Bei 350 nm 9: Frangulinanthron B,  
 10: Frangulinanthron A,  
 11: Emodinanthron  
 Bei 420 nm keine Peaks

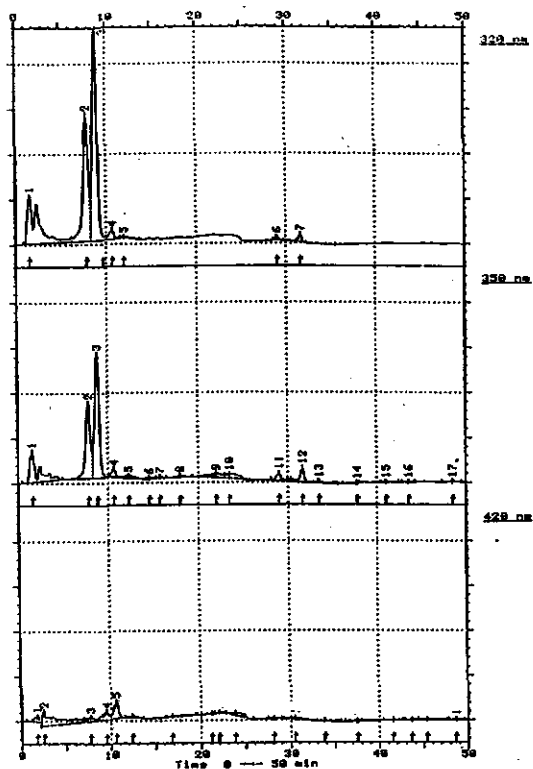


Abb. 47 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 60°C erhitzten Rinde von Faulbaum D  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodearray  
 Bei 320 nm 2: Glukofrangulinanthron B,  
 3: Glukofrangulinanthron A,  
 Bei 350 nm 11: Frangulinanthron B,  
 12: Frangulinanthron A,  
 13: Emodinanthron  
 Bei 420 nm 4: Glukofrangulin B,  
 5: Glukofrangulin A

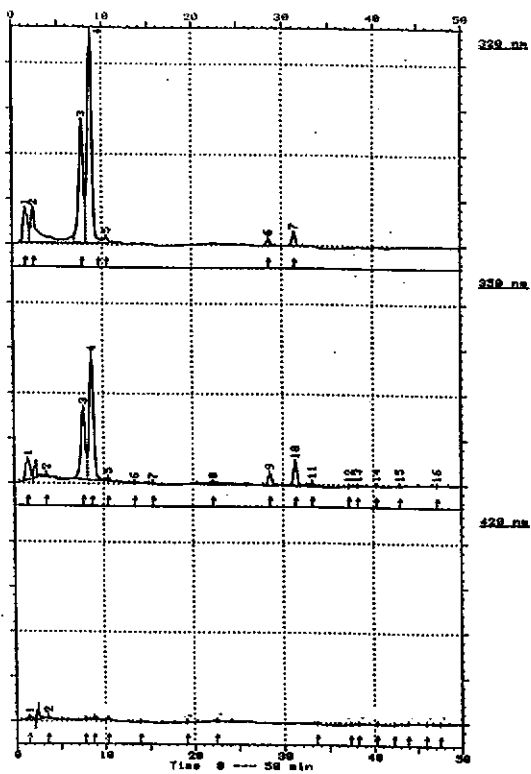


**Abb. 48 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 80°C erhitzten Rinde von Faulbaum D**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodearray**  
**Bei 320 nm 3: Glukofrangulinanthron B,**  
**4: Glukofrangulinanthron A,**  
**Bei 350 nm 9: Frangulinanthron B,**  
**10: Frangulinanthron A,**  
**11: Emodinanthron**  
**Bei 420 nm keine Peaks**

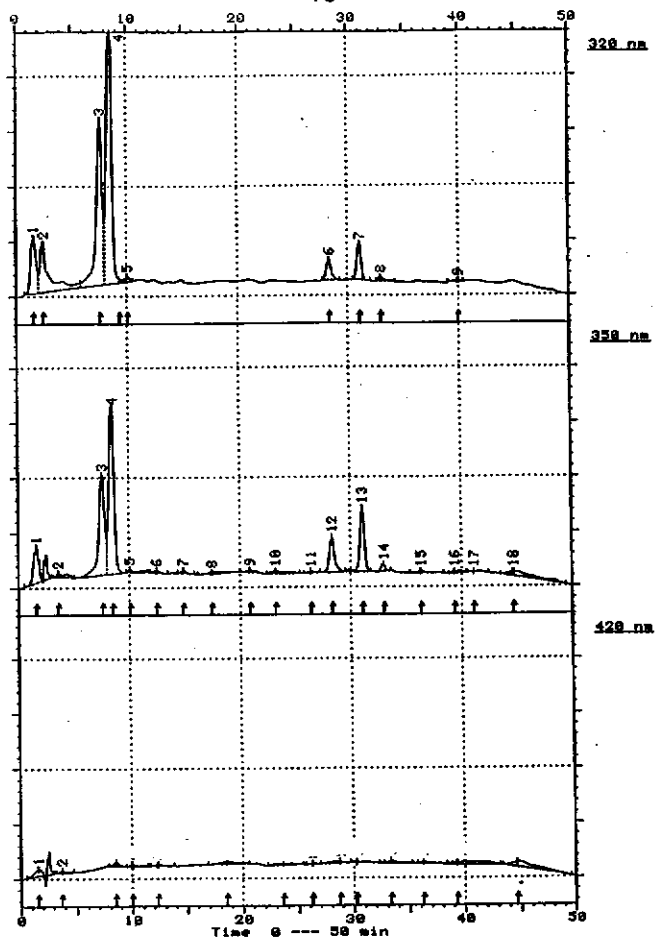


Abb. 49 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 100°C erhitzten Rinde von Faulbaum D  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodenarray  
 Bei 320 nm 3: Glukofrangulinanthron B,  
 4: Glukofrangulinanthron A,  
 Bei 350 nm 12: Frangulinanthron B,  
 13: Frangulinanthron A,  
 14: Emodinanthron  
 Bei 420 nm keine Peaks

Tab. 7 : Quantitative Auswertung der erhitzten Rindendroge von Faulbaum D

| Gehalt in % |       |      |       |      |       |       |
|-------------|-------|------|-------|------|-------|-------|
|             | F     | 20°C | 40°C  | 60°C | 80°C  | 100°C |
| GFAA        | 6,00  | 6,32 | 4,49  | 5,09 | 4,84  | 5,04  |
| GFBA        | 4,56  | 4,08 | 3,07  | 3,88 | 3,34  | 3,85  |
| GFA         | —     | —    | —     | 0,44 | —     | —     |
| GFB         | —     | —    | —     | 0,22 | —     | —     |
| FRAA        | 0,49  | 0,67 | 0,22  | 0,36 | 0,56  | 1,00  |
| FRBA        | 0,56  | 0,24 | 0,24  | 0,30 | 0,33  | 0,73  |
| FRA         | —     | —    | —     | —    | —     | —     |
| FRB         | —     | —    | —     | —    | —     | —     |
| EA          | 0,039 | —    | 0,014 | —    | 0,047 | 0,027 |
| E           | —     | —    | —     | —    | —     | —     |

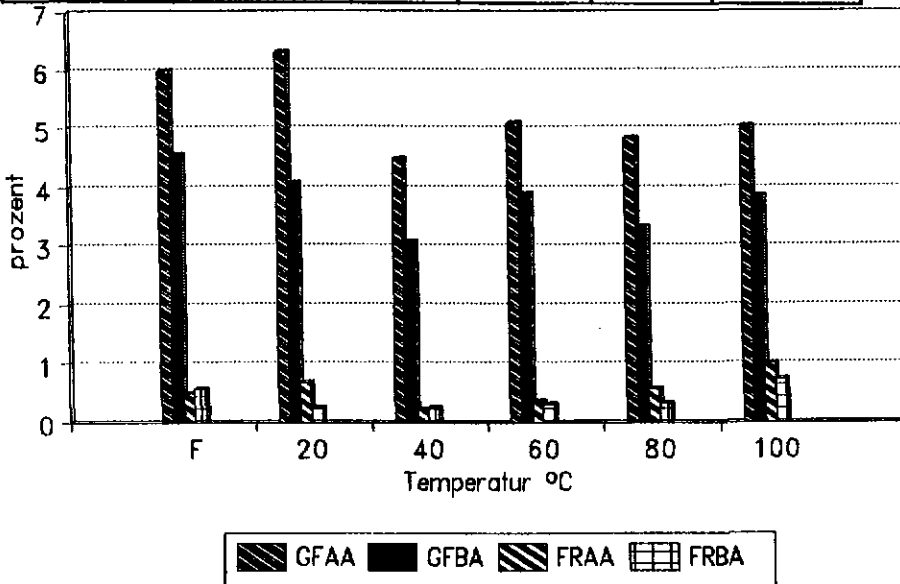


Abb. 50 : Übersicht der Einzelstoffbestimmungen in den durch Hitze veränderten frischen Rinden von Faulbaum D

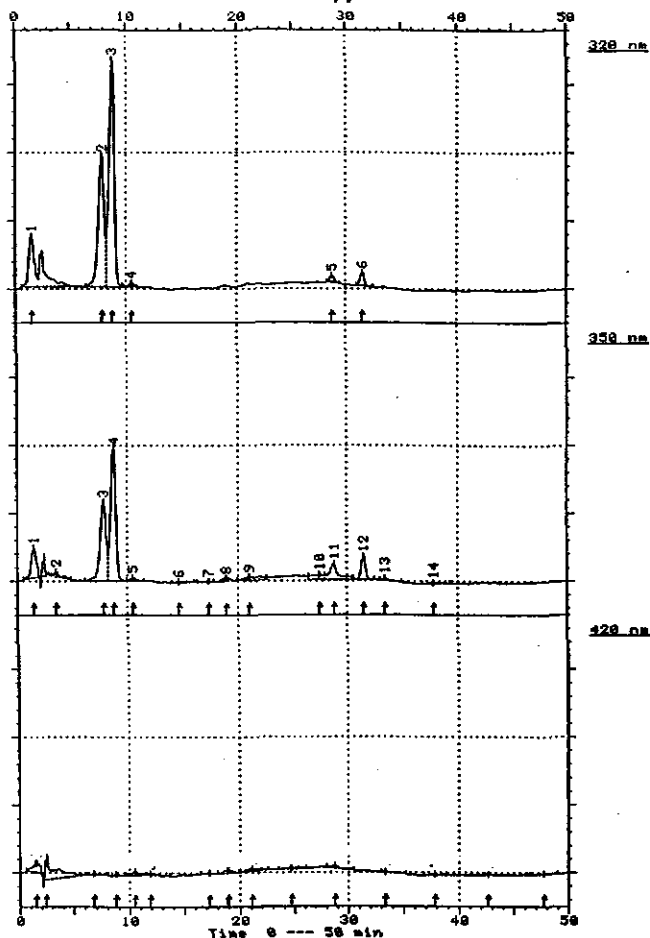


**Abb. 51 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 20°C  
erhitzten Rinde von Faulbaum E  
Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
Fließmittel: Methanol:Wasser  
Detektor: Waters 990-Photodiodearray  
Bei 320 nm 2: Glukofrangulignantron B,  
3: Glukofrangulignantron A,  
Bei 350 nm 11: Frangulignantron B,  
12: Frangulignantron A,  
13: Emodignantron  
Bei 420 nm keine Peaks**

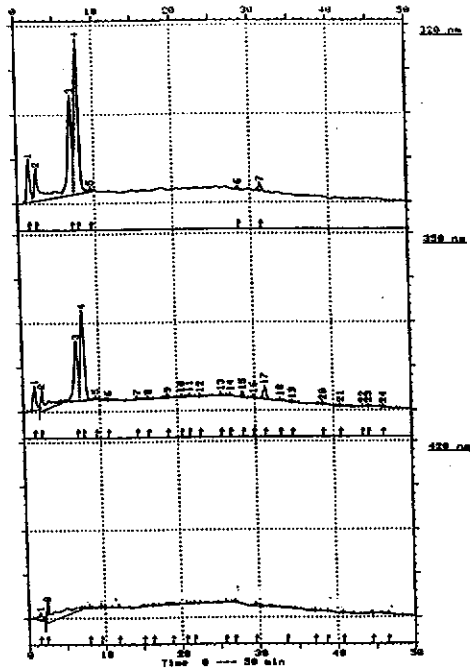


Abb. 52 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 40°C  
 erhitzten Rinde von Faulbaum E  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol:Wasser  
 Detektor: Waters 990-Photodiodearray  
 Bei 320 nm 3: Glukofrangulinanthron B,  
 4: Glukofrangulinanthron A,  
 Bei 350 nm 15: Frangulinanthron B,  
 16: Frangulinanthron A,  
 17: Emodinanthron  
 Bei 420 nm keine Peaks

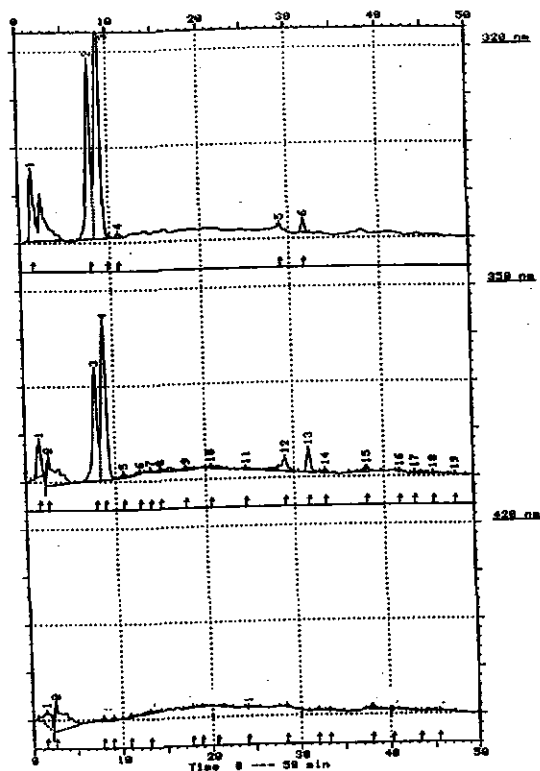


**Abb. 53 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 60°C erhitzten Rinde von Faulbaum E**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodenarray**  
**Bei 320 nm 2: Glukofrangulinanthron B,**  
**3: Glukofrangulinanthron A,**  
**Bei 350 nm 12: Frangulinanthron B,**  
**13: Frangulinanthron A,**  
**14: Emodinanthron**  
**Bei 420 nm keine Peaks**

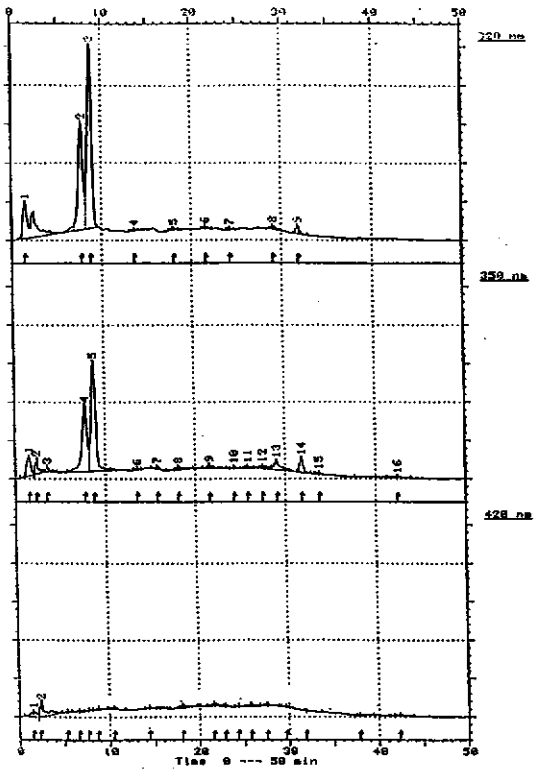


**Abb. 54 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 80°C erhitzten Rinde von Faulbaum E**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodenarray**  
**Bei 320 nm 2: Glukofrangulinanthron B,**  
**3: Glukofrangulinanthron A,**  
**Bei 350 nm 12: Frangulinanthron B,**  
**13: Frangulinanthron A,**  
**14: Emodinanthron**  
**Bei 420 nm keine Peaks**

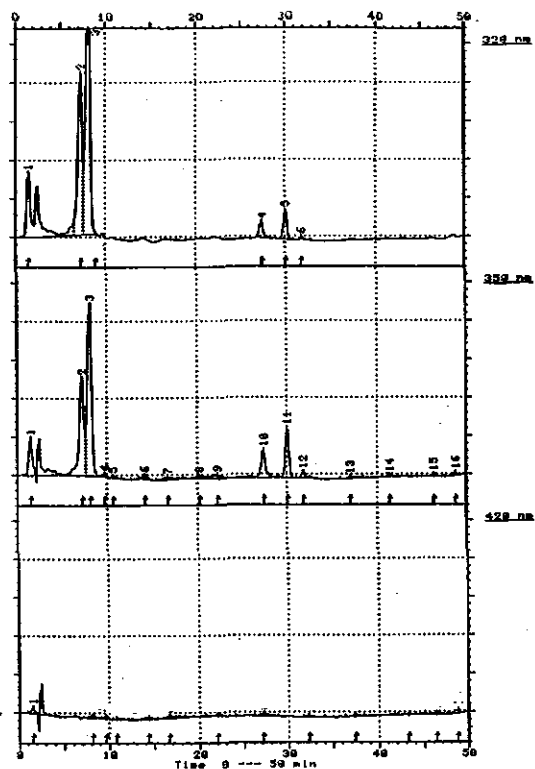


**Abb. 55 : HPL-Chromatogramm des Extraktes der bei 100°C erhitzten Rinde von Faulbaum E**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol:Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodearray**  
**Bei 320 nm 2: Glukofrangulignantron B,**  
**3: Glukofrangulignantron A,**  
**Bei 350 nm 10: Frangulignantron B,**  
**11: Frangulignantron A,**  
**12: Emodignantron**  
**Bei 420 nm keine Peaks**

Tab. 8 : Quantitative Auswertung der erhitzten Rindendroge von Faulbaum E

| Gehalt in % |       |      |       |      |      |       |
|-------------|-------|------|-------|------|------|-------|
|             | F     | 20°C | 40°C  | 60°C | 80°C | 100°C |
| GFAA        | 3,13  | 3,18 | 3,57  | 2,93 | 4,69 | 3,79  |
| GFBA        | 2,16  | 2,28 | 2,71  | 2,19 | 3,28 | 2,39  |
| GFA         | -     | -    | -     | -    | -    | -     |
| GFBB        | -     | -    | -     | -    | -    | -     |
| FRAA        | 0,13  | 0,31 | 0,34  | 0,23 | 0,30 | 0,52  |
| FRBA        | 0,16  | 0,42 | 0,005 | 0,22 | 0,43 | 0,45  |
| FRA         | -     | -    | -     | -    | -    | -     |
| FRB         | -     | -    | -     | -    | -    | -     |
| EA          | 0,013 | 0,09 | 0,09  | 0,02 | -    | 0,019 |
| E           | -     | -    | -     | -    | -    | -     |

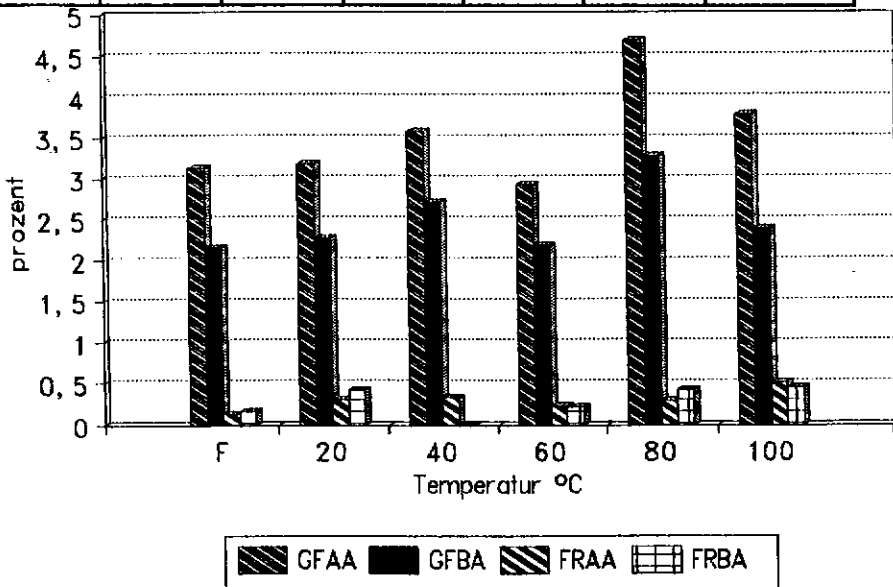


Abb. 56 : Übersicht der Einzelstoffbestimmungen in den durch Hitze veränderten frischen Rinden von Faulbaum E

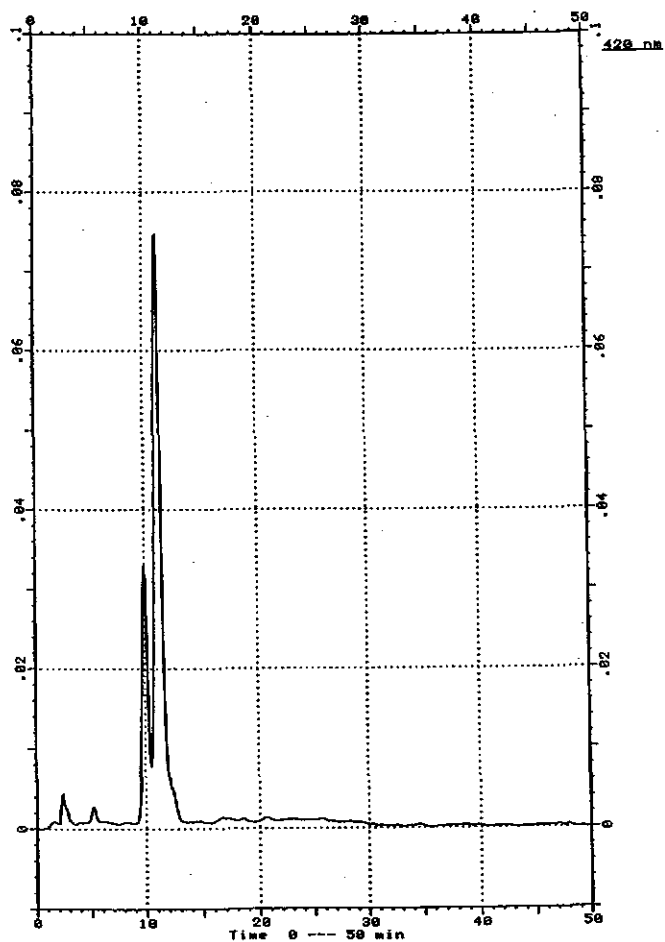


Abb. 57 : HPL-Chromatogramm der Substrate Glukofrangulin A und B

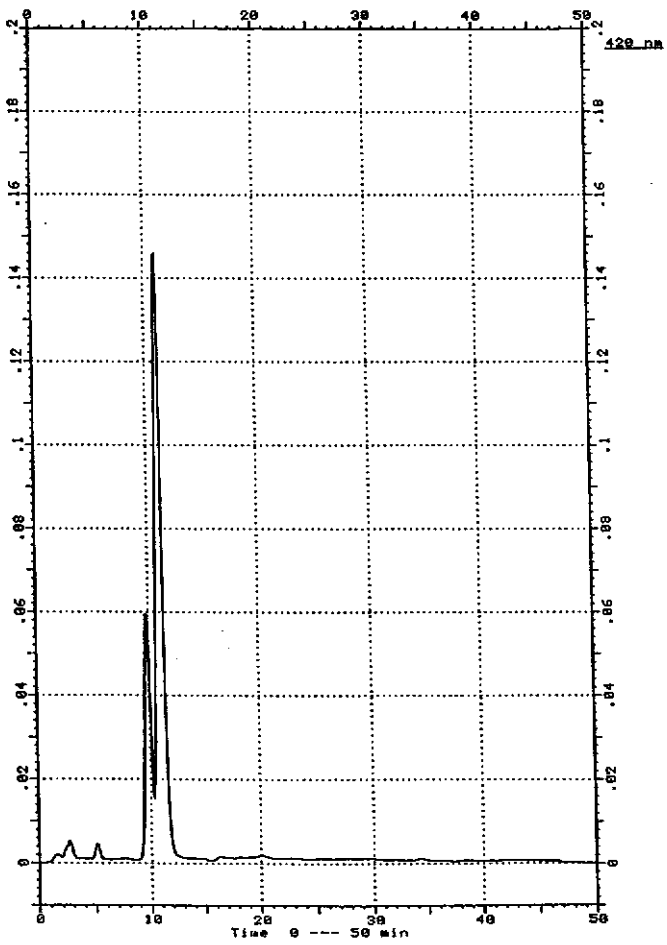


Abb. 58 : HPL-Chromatogramm der Glukofranguline ohne Enzymanatz  
(Blindversuch) (15', 100°C)

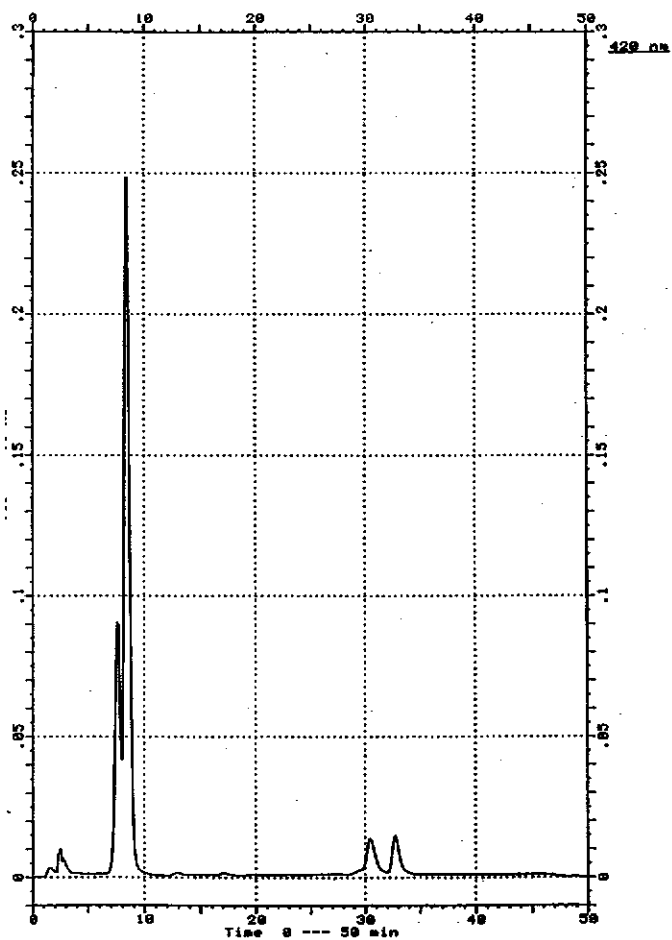


Abb. 59 : HPL-Chromatogramm der Glukofranguline mit  $\beta$ -Glucosidase (15', 100°C)

### 3.2 Vergleichende chemische Kennzeichnung der offizinellen Frangularinde und ihrer Hauptverfälschung Fallaxrinde unter besonderer Berücksichtigung der Glukofranguline bzw. Franguline

#### 3.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Die Rinde von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax* wird, wie bereits in 3.2.3 ausführlich beschrieben, in letzter Zeit als häufige Verfälschung der offizinellen Faulbaumrinde im Handel angetroffen. Nachdem mittels qualitativer DC- und HPLC-Analyse die Hauptanthranoxide der Fallaxrinde kürzlich von RAUWALD und MIETHING (1) analysiert wurden, blieb trotzdem immer noch ungeklärt, weshalb die Fallaxrinde überhaupt als minderwertige Anthranoxid-droge gegenüber der Faulbaumrinde angesehen wird. Insbesondere deswegen, weil die charakteristischen Inhaltsstoffe der Faulbaumrinde, die erwähnten Glukofranguline und Franguline, in ihrem bereits früher vermuteten Vorkommen bestätigt werden konnten (1). Allerdings gibt es keine quantitativen Angaben hierzu. Orientierende Vorversuche nach der DAB 9-Methode für Faulbaumrinde ergaben bei der Fallaxrinde einen Gehalt von 4 bis 6 % Anthrachinonglykosiden, berechnet als Glukofrangulin A. Eine quantitative Analyse der Hauptanthranoxide von Fallaxrinde im Vergleich zur offizinellen Faulbaumrinde sollte daher zunächst folgen.

#### 3.2.2 Herkunft der Rindendrogen

Von *Rhamni fallacis cortex* (Stammpflanze *Rhamnus fallax* Boiss.) und *Frangulae cortex* (Stammpflanze *Rhamnus frangula* L.) wurden jeweils drei verschiedene Muster über den Drogenhandel bezogen. Die Identität der Drogen wurde durch vergleichende DC mit einem Fallax-Trockenextrakt der Firma Finzelberg und einem Frangula-Glykosid-Konzentrat der Firma Extrakt Chemie sichergestellt (1).

### 3.2.3 Qualitative analytische Kennzeichnung mittels DC

Die Zahl der im Handel befindlichen Drogenverfälschungen hat in den letzten Jahren in erheblichem Ausmaß zugenommen (10,59).

Zu den besonders häufig verfälschten Drogen zählen die offizinellen *Frangulae cortex* und *Rhamni purshiani cortex* (beide DAB 9, Ph.Eur. II (33,60)). Sie werden zumeist mit den Rinden von *Rhamnus fallax* Boiss., dem Alpenkreuzdorn, und von *Rhamnus catharticus* L., dem Purgierkreuzdorn, gestreckt (10,11,61). So hatten wiederholte Lieferungen von *Rhamni purshiani cortex*, die aus dem Großhandel bezogen wurden und sich alle als Verfälschungen erwiesen hatten, aktuellen Anlaß zu einer neuen morphologischen und anatomischen Untersuchung der *Rhamnus*-Rinden und ihrer Verfälschungen gegeben (10). Die Ph. Eur. II (60) und das DAB 9 (33) prüfen die offizinellen Faulbaumrinden auf Verfälschung oder Verunreinigung durch die *Fallax*- und *Kreuzdorn*-Rinde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie: Eine in Startnähe auftretende rote Zone (*Rhamnalpinosid*) würde eine Verfälschung mit *Rhamnus fallax* anzeigen; Zonen blauer Fluoreszens (*Sorigeninglykoside*) weisen auf Anwesenheit von *Rhamnus catharticus* hin. Diese Leitsubstanzen sind in ihrer chemischen Struktur aufgeklärt worden (20,62,63).

Mehr Aussagekraft zur Unterscheidung von Faulbaum- und *Fallax*-Rinde hat nach (1) die Dünnschichtchromatographie mit den Xanthorhamninen als Leitsubstanzen der *Fallax*rinde: Nach Entwickeln des Chromatogramms gemäß Ph. Eur. II erscheinen bei  $R_f$  0,25 bei Betrachten im UV 365 nm die Xanthorhamnine dunkelbraun bis schwarz, während im Faulbaumrindenextrakt auf dieser Laufhöhe eine blaugrüne Fluoreszenz-Zone [*Naphthalinglykoside* (49)] zu beobachten ist. Nach dem Besprühen mit Diphenylboryloxyethylamin-Lösung (Naturstoffreagenz Ph. Eur. II) fluoreszieren die Xanthorhamnine intensiv gelb, während die  $R_f$ -identische Zone der Faulbaumrinde weiterhin blaugrün fluoresziert. Als weiteres dc-analytisches Unterscheidungsmerkmal zur *Frangularinde* findet man oberhalb der *Glukofranguline* und unterhalb der *Franguline* im UV

365 nm vor und nach Besprühen mit methanolischer KOH zusätzlich vier charakteristische rote Fluoreszenz-Zonen (UV 365 nm) von Emodin- und Physcionglykosiden.

Für eine Kieselgel-DC im DAB 9-Fließmittel Ethylacetat:Methanol:Wasser/100:17:13 wurden die je drei Handelschargen von Rhamni fallacis cortex und Frangulae cortex mit 70 %igem Ethanol extrahiert. Zur Detektion wurde eine 5 %ige Lösung von Kaliumhydroxid in Methanol verwendet. Die wichtigsten Anthrachinonglykoside und das Flavonoid Xanthorhamnin haben in diesem Fließmittel folgende  $R_f$ -Werte:

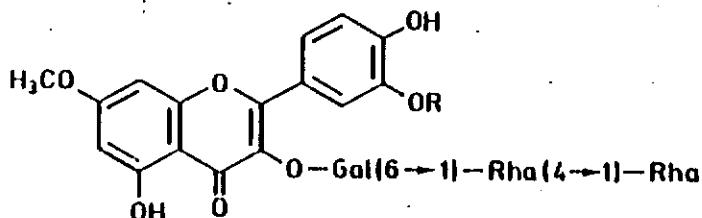
|                      |      |
|----------------------|------|
| Rhamnalpinosid       | 0,15 |
| Xanthorhamnin        | 0,25 |
| Glukofrangulin A     | 0,26 |
| Glukofrangulin B     | 0,32 |
| Physcion-8-rutinosid | 0,44 |
| Emodin-8-glucosid    | 0,59 |
| Frangulin A          | 0,80 |
| Frangulin B          | 0,84 |

### 3.2.4 Isolierung und Strukturrevision der Xanthorhamnine, der analytischen Leitstoffe der Fallaxrinde

#### 3.2.4.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Kürzlich ist von RAUWALD und MIETHING (1) zur chemischen Unterscheidung der Faulbaum- von der Fallax-Rinde empfohlen

worden, die Flavonolglykoside, die Xanthorhamnine, heranzuziehen, die in der offizinellen *Frangulae cortex* fehlen. Als Xanthorhamnine bezeichnet man triglykosidische Flavonol-rhamninoside oder -isorhamninoside ein (64). Beim Xanthorhamnin der Fallaxrinde soll es sich um zwei Triglykoside, nämlich um die 3-O- $\beta$ -Rhamninoside des Rhamnetins (=7-Methylquercetin) und des Rhamnazins [=3',7-Dimethylquercetin (12,65)] handeln. Bei RAUWALD, MIETHING (1) findet sich die entsprechende DC-Zone in einer farbigen Abbildung.



Xanthorhamnine: R= H, CH<sub>3</sub> (Nach DAB 9 Kommentar (3))

Im DAB 7 (4) wurden die Xanthorhamnine mit Hilfe des Tauböck-Tests anhand einer Reagenzglasreaktion nachgewiesen, wobei der Drogenauszug der Fallaxrinde eine positive Bor-Oxalsäure-Reaktion gibt. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen wird der Zuckerrest am C-3 hydrolytisch abgespalten, so daß ein fünfgliedriger Flavonol-Borinsäure-Chelat-Komplex entsteht (66), der in Ether löslich ist und darin stark grün fluoresziert. Faulbaumrinde reagiert auf diesen Test negativ. Eine systematische Prüfung dieser Flavonol-Reaktion zeigt, daß eine sichere Aussage zur Identität nur beim Vorliegen der Fallaxrinde als Monodroge gewährleistet ist; bei Anwesenheit von Faulbaumrinde werden Intensität und Farbe des Fluoreszenzlichts beeinflusst (1).

### 3.2.4.2 Isolierung von Xanthorhamnin

Cortex Rhamni fallacis (siehe 3.2.1) wurde dreimal mit je 2 l Methanol 15 min am Ultra-Turrax extrahiert. Nach Filtration wurde im Vakuum schonend zur Trockne eingengt. Es resultierten 44 g Rohextrakt.

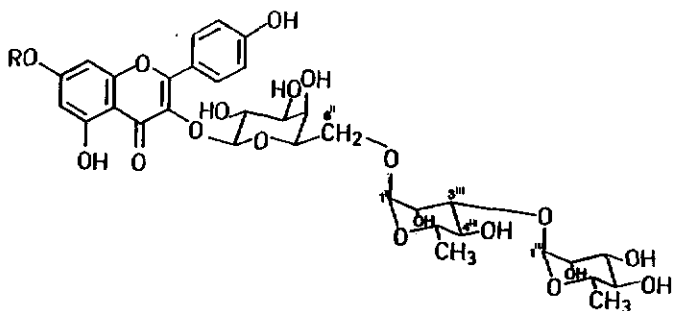
Der Rohextrakt wurde über eine Kieselgel-Säule mit Ethylacetat:Methanol:Wasser/100:15:10 vorgereinigt. Die die Xanthorhamnine enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und die Xanthorhamnine mittels präparativer DC isoliert. Die DC-Platten wurden in Ethylacetat:Methanol:Wasser/100:20:15 entwickelt. Die Elution der Substanzen vom Kieselgel erfolgte mit Methanol:Aceton:Wasser (90:5:5).

Insgesamt wurden 38 mg Xanthorhamnine isoliert.

### 3.2.4.3 Strukturrevision der Xanthorhamnine

Mit Hilfe des hydrolytischen Abbaus konnten die Zuckerteile Galaktose und Rhamnose wie in 3.2.3.1 aufgezeigt nachgewiesen werden. Auch die HPLC-Analyse (siehe Abb. 60) zeigte das Vorliegen zweier Verbindungen im Verhältnis 91 zu 9. Überraschenderweise ergaben jedoch die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren eine andere Konstitution der Aglykonkomponente als in 3.2.3.1 in Form des Quercetins beschrieben. Demnach handelt es sich bei den Aglykonen um das Kämpferol als Hauptkomponente sowie um das 7-O-Methylkämpferol (= Rhamnocitrin) (siehe Formel) (64).

---



# XANTHORHAMNINE

R=H (91 % Kämpferol als Aglykon)

R=CH<sub>3</sub> (9 % 7-O-Methylkämpferol als Aglykon)

Dieser Befund geht eindeutig aus den <sup>13</sup>C-NMR-Signalen des C-Ringes für C-3', 5' bzw. C-2', 6' bei 132 bzw. 116 ppm (siehe Abb. 63) hervor. Zudem finden sich im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum die Signale für jeweils zwei äquivalente Protonen des C-Ringes, H-3', 5' und 2', 6' bei δ 7,99 bzw. 6,82 ppm im Aufspaltungsmuster A, A', B, B'. Außerdem finden sich im Bereich aromatische Protonen lediglich zwei Singuletts für H-6 und H-8 bei 5,99 bzw. 5,85 ppm (siehe Abb. 61,62). Dieser Befund wird wiederum durch die <sup>13</sup>C-DEPT- Analyse (siehe Abb. 64) bestätigt, wonach zwei aromatische C-H Komponenten bei 106 und 103 ppm nachgewiesen werden. Im übrigen finden sich 13 Signale für die C-Atome der drei Zucker im Bereich von 67 und 79 ppm. Diese Signale belegen die interglykosidische 1-->6-Verknüpfung zwischen Galaktose und Rhamnose. Die beiden Rhamnose-Methylgruppen finden sich bei 17,99 und 18,02 ppm getrennt. Alle Signale stimmen überein mit denen aus der Literatur bekannten Signale des Kämpferols (67). Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum belegt gleichzeitig das in geringeren Anteilen (9 % s. o.) vorhandene 7-O-Methylkämpferol. Das entsprechende Signal der Methoxygruppe findet sich als schwaches Signal bei 56,9 ppm.

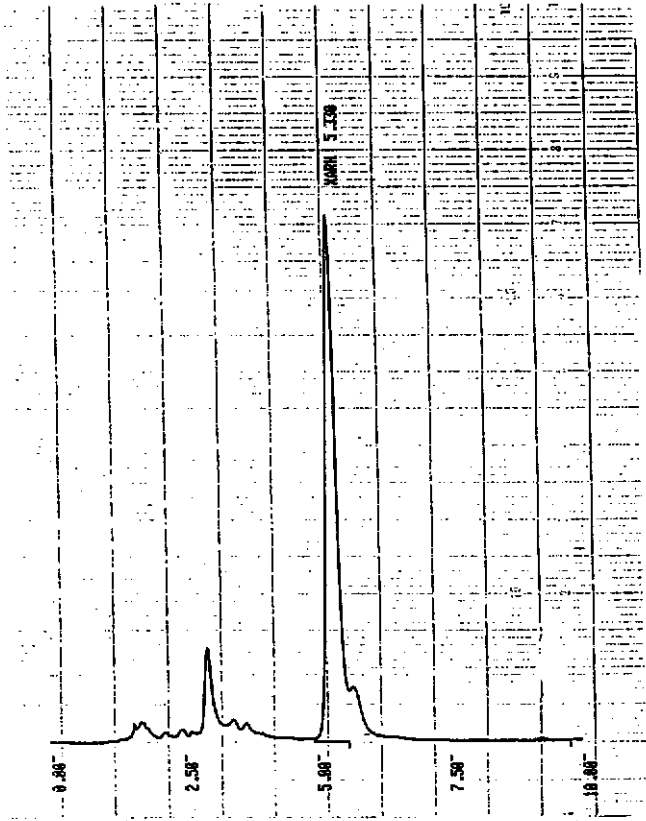


Abb. 60 : HPLC-Analyse der Xanthorhamnine

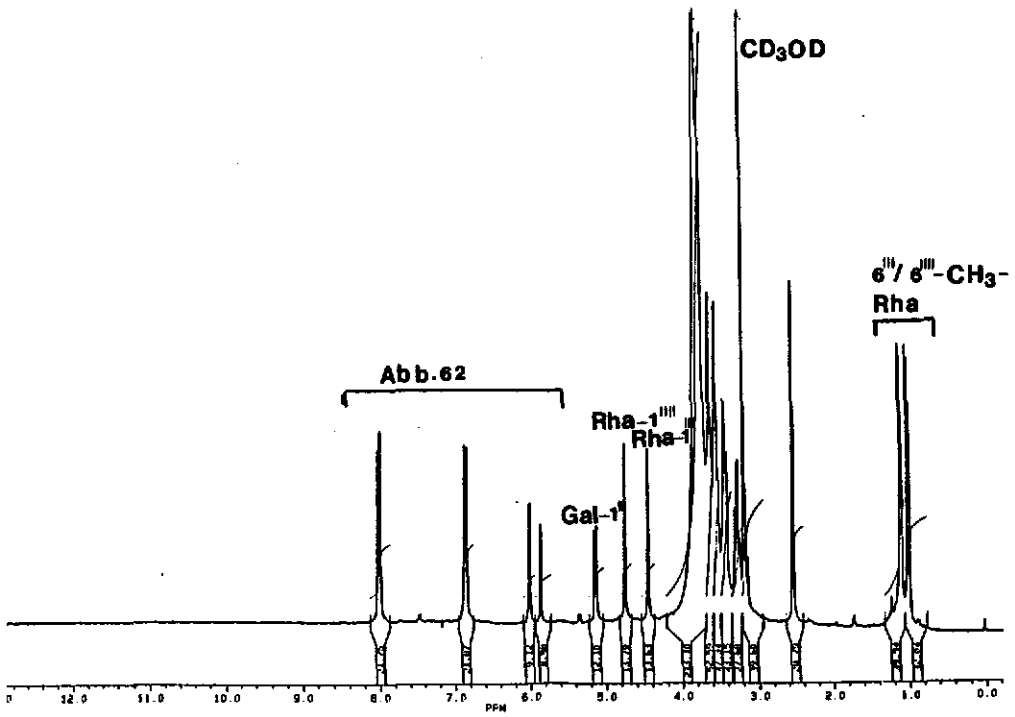


Abb. 61 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Xanthorhamnine in  $\text{CD}_3\text{OD}$

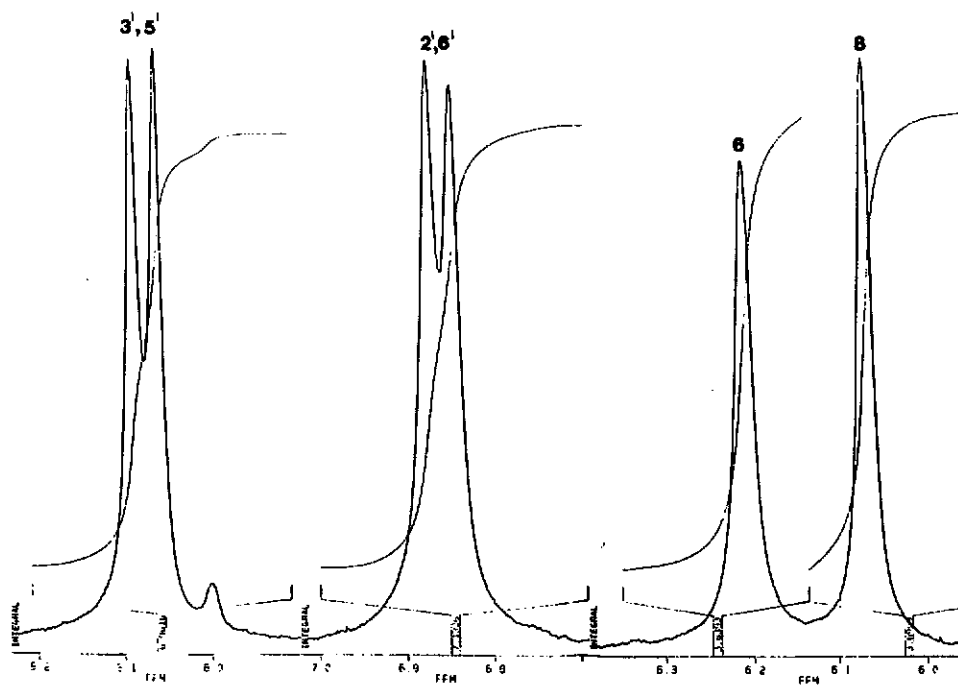


Abb. 62 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Xanthorhamnine in  $\text{CD}_3\text{OD}$   
Ausschnitt von 5,9-8,2 ppm.

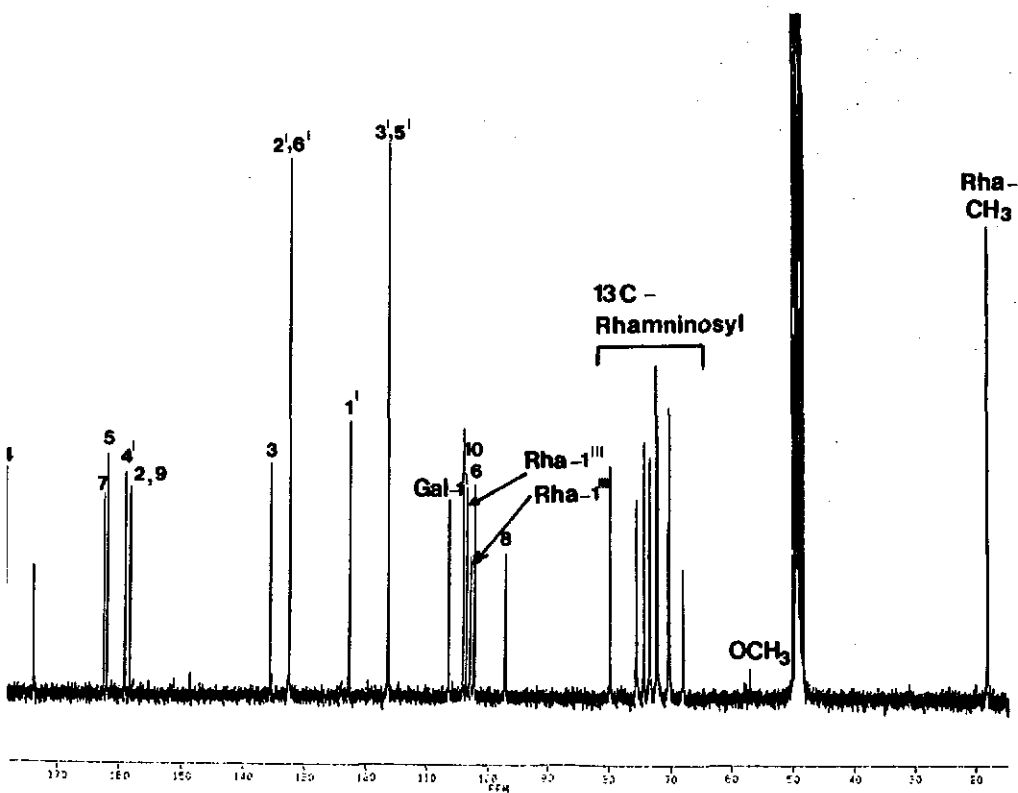


Abb. 63 :  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Xanthorhamnine ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

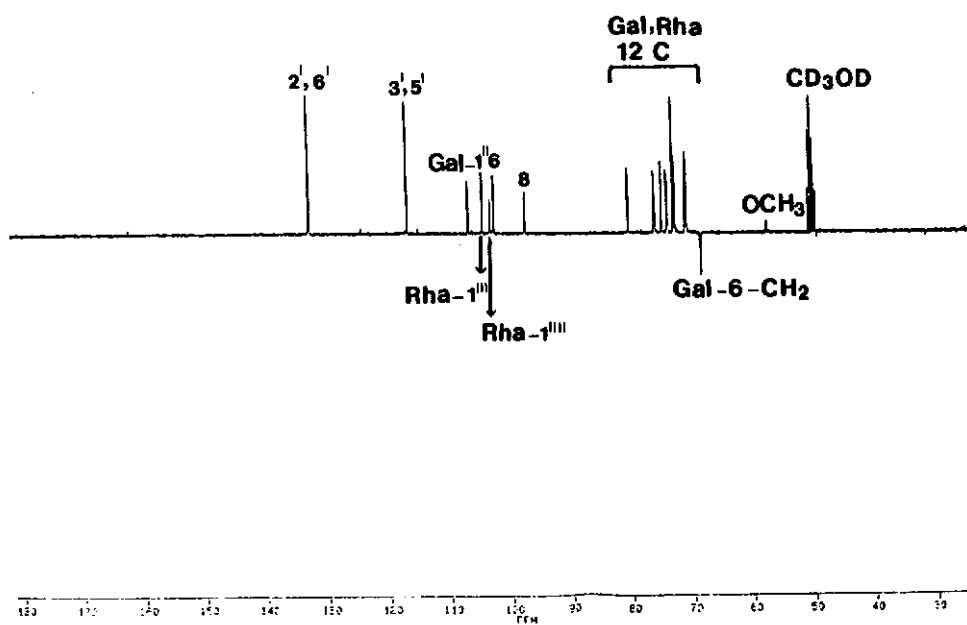


Abb. 64 : <sup>13</sup>C-NMR-DEPT-Spektrum der Xanthorhamnine

Tab. 9 :  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopische Daten der Xanthorhamnine  
in  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$  /ppm)

| Proton              |              |
|---------------------|--------------|
| H-2', 6'            | 6,85 (B, B') |
| H-3', 5'            | 7,99 (A, A') |
| H-6                 | 5,99         |
| H-8                 | 5,85         |
| Gal-1"              | 5,12         |
| Rha-1""             | 4,74         |
| Rha-1""             | 4,45         |
| Rha-CH <sub>3</sub> | 1,10         |
| Rha-CH <sub>3</sub> | 1,00         |

Tab. 10:  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopische Daten der Xanthorhamnine

| C-Atom              | Xanthorhamnine | Kämpferol-3-O-glucosid <sup>67</sup> |
|---------------------|----------------|--------------------------------------|
| 2, 9                | 158,35         | 156,3                                |
| 3                   | 135,48         | 133,0                                |
| 4                   | 178,57         | 177,4                                |
| 5                   | 161,89         | 161,1                                |
| 6                   | 102,08         | 98,7                                 |
| 7                   | 162,43         | 164,1                                |
| 8                   | 96,91          | 93,6                                 |
| 10                  | 103,35         | 104,1                                |
| 1'                  | 122,62         | 121,0                                |
| 2', 6'              | 132,36         | 130,7                                |
| 3', 5'              | 116,26         | 115,0                                |
| 4'                  | 159,09         | 159,8                                |
| OCH <sub>3</sub>    | 56,90          |                                      |
| Gal-1"              | 106,26         | Glu-1 101,4                          |
| Gal-6"              | 67,76          | Glu-2 74,2                           |
| Rha-1""             | 103,90         | Glu-3 77,2                           |
| Rha-1""             | 102,70         | Glu-4 70,1                           |
| Rha-CH <sub>3</sub> | 18,03          | Glu-5 76,5                           |
| Rha-CH <sub>3</sub> | 17,99          | Glu-6 61,0                           |
| Zuckerring-C*:      | 79,54          |                                      |
| (13 C)              | 75,31          |                                      |
|                     | 75,19          |                                      |
|                     | 74,08          |                                      |
|                     | 73,19          |                                      |
|                     | 73,01          |                                      |
|                     | 72,14          |                                      |
|                     | 72,12          |                                      |
|                     | 71,87          |                                      |
|                     | 70,25          |                                      |
|                     | 70,05          |                                      |
|                     | 69,99          |                                      |
|                     | 67,79          |                                      |

\* Zuordnungen austauschbar

### 3.2.5 Vergleichende HPLC-Bestimmung der Frangula- und Fallaxrinden

Einen Überblick zu den Inhaltsstoffen von Rhamni fallacis cortex geben RAUWALD UND MIETHING (1): Mengenmäßig vorherrschendes Hauptglykosid ist das 8-Rutinosid des Physcions (1). Die Hauptinhaltsstoffe der Faulbaumdroge, die Glukofranguline und Franguline, sind ebenfalls enthalten, jedoch vermutlich in erheblich geringerer Konzentration (49,68,69).

Ansonsten findet sich in der Anthranoidfraktion der Fallaxdroge noch Emodin-8-glucosid.

Alle aufgeführten Anthranoide und die Xanthorhamnine sollten mittels HPLC in der Fallaxdroge quantitativ bestimmt werden. Ein entsprechender Überblick und Vergleich mit dem Anthranoidgehalt der Franguladroge sollte weitere Hinweise geben, ob die Fallaxrinde überhaupt als Verfälschung von Rhamni frangulae cortex gelten kann.

Die Vergleichssubstanzen wurden zunächst isoliert und rein dargestellt (siehe 5.4.2):

Aus Fallaxrinde wurden Emodin-8-glucosid und Physcion-8-rutinosid durch kombinierte präparative Säulen- und Dünnschichtchromatographie erhalten. Aus Frangula-Glykosid-Konzentrat der Firma Extrakt Chemie konnten die Glukofranguline mittels Säulen- und Tröpfchengegenstromchromatographie (DCCC) isoliert werden. Die Isolierung der Xanthorhamnine wurde unter 3.2.4.2 dargelegt. Die Franguline A und B wurden von der Firma Carl Roth, Karlsruhe, bezogen.

Für die HPLC wurden je 500 mg Fallax- und Franguladroge mit 40,0 ml Ethanol am Ultraturrax extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit dekantiert und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Von diesem Rohextrakt wurden 3 mg eingewogen, in Methanol:Wasser (1:1) klar gelöst und als HPLC-Untersuchungslösung verwendet.

---

Als mobile Phase diente ein Methanol:Wasser-Gradient:

| ZEIT   | A (40% Methanol) | B (80% Methanol) |
|--------|------------------|------------------|
| 0 min  | 60%              | 40%              |
| 25 min | 20%              | 80%              |
| 30 min | 20%              | 80%              |
| 37 min | 60%              | 40%              |

Standardlösungen: Glukofrangulin A und B, Frangulin A und B, Xanthorhamnine, Emodin-8-glucosid und Physcion-8-rutinosid.

Untersuchte Substanzen der Fallaxrindendrogen: Xanthorhamnine, Emodin-8-glucosid, Physcion-8-rutinosid, Glukofrangulin A und B sowie Frangulin A und B.

Untersuchte Substanzen der Frangularindendrogen: Glukofrangulin A und B sowie Frangulin A und B.

Die Detektion erfolgte bei 285 nm.

Die entsprechenden HPL-Chromatogramme finden sich in den Abb. 65-70. Die Tabellen 9-10 zeigen die Ergebnisse der HPLC-Gehaltsbestimmungen der Fallax- und Frangula-Rindendrogen.

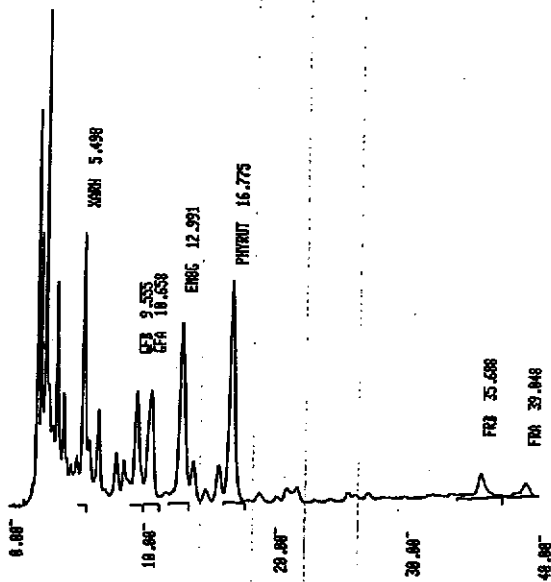


**Abb. 65 : HPL-Chromatogramm des Extraktes von Rhamni fallacis cortex-I**

**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**

**Fließmittel: Methanol/Wasser**

**Detektor: Millipore Waters Lambda-Max,**

**Modell 481 LC Spectrophotometer**

**Detektion bei 285 nm**

**XARRH: Xanthorhamnine, GFB: Glukofrangulin B,**

**GFA: Glukofrangulin A, EM8G: Emodin-8-glucosid,**

**PHYRUT: Physcion-8-rutinosid, FRB: Frangulin B,**

**FRA: Frangulin A**

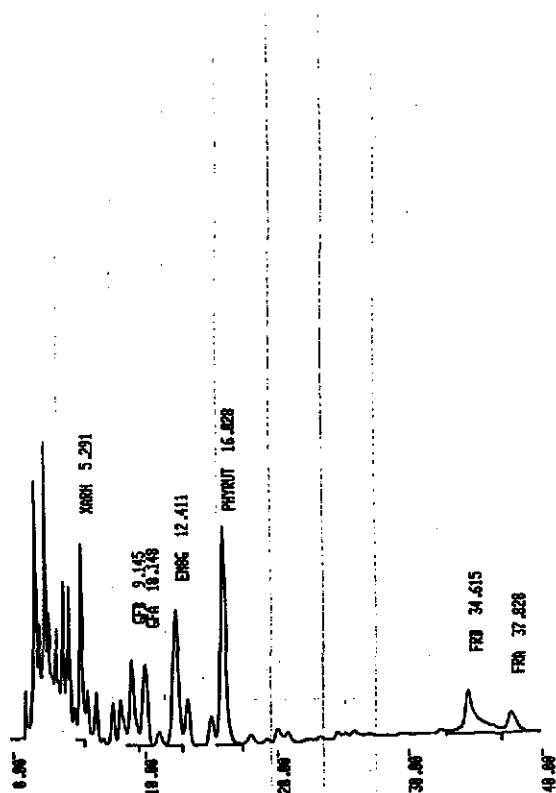


**Abb. 66 : HPL-Chromatogramm des Extraktes von *Rhamni fallacis* cortex-II**

**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**

**Fließmittel: Methanol/Wasser**

**Detektor: Millipore Waters Lambda-Max,**

**Modell 481 LC Spectrophotometer**

**Detektion bei 285 nm**

**XARRH: Xanthorhamnine, GFB: Glukofrangulin B,**

**GFA: Glukofrangulin A, EM8G: Emodin-8-glucosid,**

**PHYRUT: Physcion-8-rutinosid, FRB: Frangulin B,**

**FRA: Frangulin A**

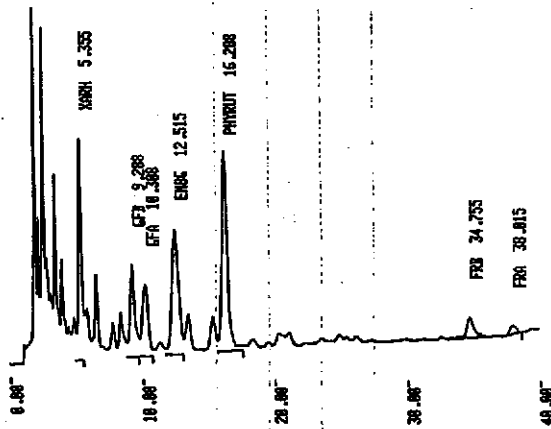


Abb. 67 : HPL-Chromatogramm des Extraktes von *Rhamni fallacis* cortex-III  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol/Wasser  
 Detektor: Millipore Waters Lambda-Max, Modell 481 LC Spectrophotometer  
 Detektion bei 285 nm  
 XARH: Xanthorhamnine, GFB: Glukofrangulin B,  
 GFA: Glukofrangulin A, EM8G: Emodin-8-glucosid,  
 PHYRUT: Physcion-8-rutinosid, FRB: Frangulin B,  
 FRA: Frangulin A

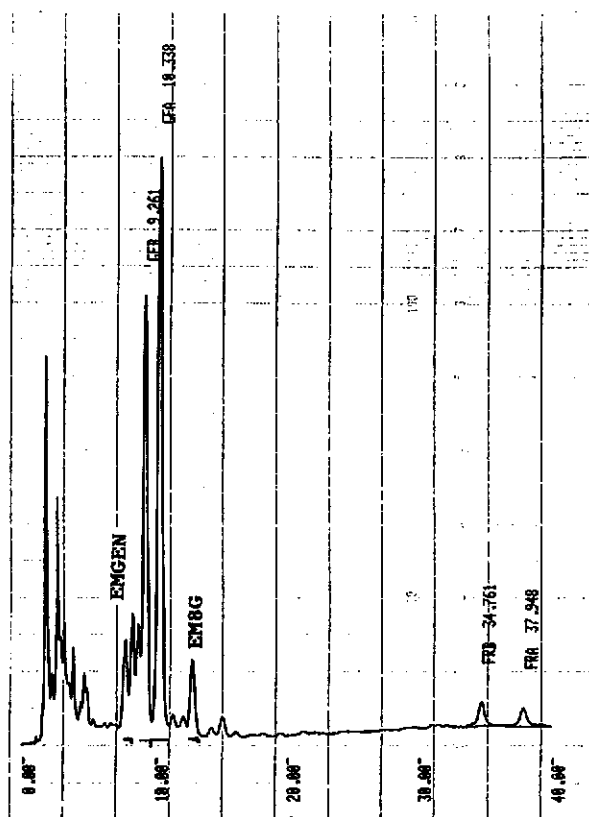


**Abb. 68 : HPL-Chromatogramm des Extraktes von Rhamni frangulae cortex-I**  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol/Wasser  
 Detektor: Millipore Waters Lambda-Max, Modell 481 LC Spectrophotometer  
 Detektion bei 285 nm  
 GFB: Glukofrangulin B, GFA: Glukofrangulin A,  
 EM8G: Emodin-8-glucosid, EMGEN: Emodin-8-gentiobiosid,  
 FRB: Frangulin B, FRA: Frangulin A

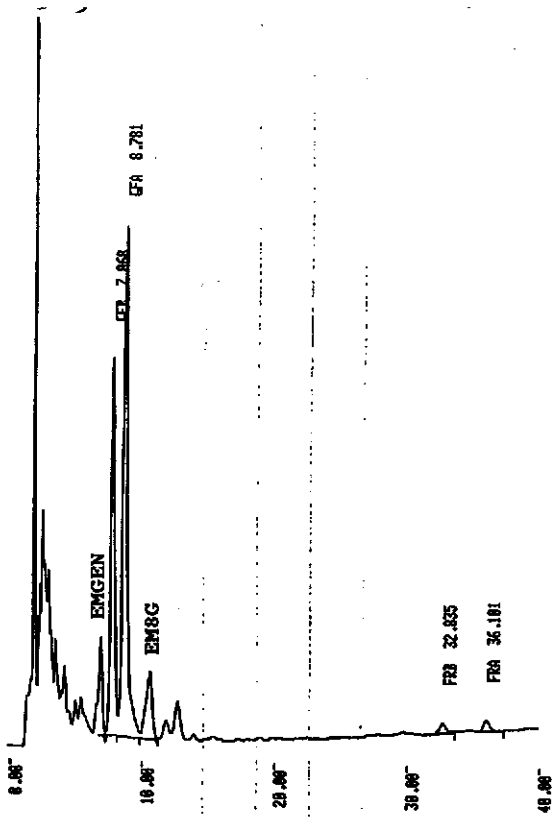


Abb. 69 : HPL-Chromatogramm des Extraktes von *Rhamni frangulae* cortex-II  
 Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4  
 Fließmittel: Methanol/Wasser  
 Detektor: Millipore Waters Lambda-Max, Modell 481 LC Spectrophotometer  
 Detektion bei 285 nm  
 GFB: Glukofrangulin B, GFA: Glukofrangulin A,  
 EM8G: Emodin-8-glucosid, EMGEN: Emodin-8-gentiobiosid,  
 FRB: Frangulin B, FRA: Frangulin A

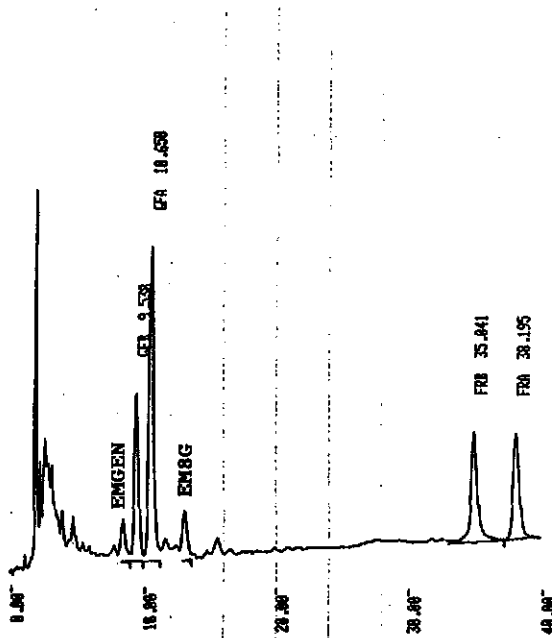


**Abb. 70 : HPL-Chromatogramm des Extraktes von Rhamni frangulae cortex-III**  
**Gerät:** Waters 600; **Säule:** RP-18, 250/8/4  
**Fließmittel:** Methanol/Wasser  
**Detektor:** Millipore Waters Lambda-Max, Modell 481 LC Spectrophotometer  
**Detektion bei 285 nm**  
**GFB:** Glukofrangulin B, **GFA:** Glukofrangulin A,  
**EMSG:** Emodin-8-glucosid, **EMGEN:** Emodin-8-gentiobiosid,  
**FRB:** Prangulin B, **FRA:** Frangulin A

Tab. 11 : Ergebnisse der HPLC-Gehaltsbestimmungen von  
 Fallax-Rindendrogen  
 XARRH: Xanthorhamnin, PHYRUT: Phycion-8-rutinosid,  
 EM8G: Emodin-8-glucosid, GFA: Glukofrangulin A,  
 GFB: Glukofrangulin B, FRA: Frangulin A,  
 FRB: Frangulin B, TOT.ANT.: Total Anthrachinon

|          | Gehalt in % |              |               |
|----------|-------------|--------------|---------------|
|          | Rh.fallax-I | Rh.fallax-II | Rh.fallax-III |
| XARRH    | 1,14        | 0,86         | 0,92          |
| PHYRUT   | 3,85        | 4,14         | 3,75          |
| EM8G     | 0,85        | 0,65         | 0,68          |
| GFA      | 0,72        | 0,47         | 0,47          |
| GFB      | 0,61        | 0,44         | 0,50          |
| FRA      | 0,49        | 0,55         | 0,24          |
| FRB      | 0,76        | 0,69         | 0,67          |
| TOT.ANT. | 7,28        | 6,94         | 6,31          |

Tab. 12 : Ergebnisse der HPLC-Gehaltsbestimmungen von  
 Frangula-Rindendrogen  
 GFA: Glukofrangulin A, GFB: Glukofrangulin B,  
 FRA: Frangulin A, FRB: Frangulin B,  
 EM8G: Emodin-8-glucosid, EMGEN: Emodin-8-gentiobiosid  
 TOT.: Total Anthrachinon

|       | Gehalt in %   |                |                 |
|-------|---------------|----------------|-----------------|
|       | Rh.frangula-I | Rh.frangula-II | Rh.frangula-III |
| GFA   | 3,09          | 2,73           | 2,44            |
| GFB   | 2,13          | 1,67           | 1,23            |
| FRA   | 0,59          | 0,35           | 4,20            |
| FRB   | 0,74          | 0,34           | 5,05            |
| EM8G  | 0,37          | 0,53           | 0,38            |
| EMGEN | 0,51          | 0,65           | 0,36            |
| TOT   | 7,43          | 6,27           | 13,66           |

Die drei untersuchten Fallaxdrogen entsprechen sich im Gehalt ihrer einzelnen Anthranoide und der Xanthorhamnine. Hauptglykosid ist eindeutig das Physcion-8-rutinosid mit einem Gehalt von etwa vier Prozent in der Droge. Die restlichen untersuchten Substanzen sind bis um ein Prozent in der Droge enthalten.

Eine Überraschung zeigen allerdings die untersuchten Franguladrogen. Sie stimmen in ihrem Gehalt an Frangulinen miteinander nicht überein: Die Droge III enthält zehn Mal mehr Franguline als die Drogen I und II.

Ein quantitativer Vergleich zur Inhaltsstoffführung der Fallax- mit der Frangula-Rindendroge erschwert sich natürlich durch den schwankenden Gehalt innerhalb der Franguladrogen.

Die pharmazeutisch erwünschten Hauptanthranoide der Frangularinde, die Glukofranguline und Franguline, sind in der Fallaxrinde nur in geringen Mengen enthalten; dafür ist Physcion-8-rutinosid das mengenmäßig vorherrschende Hauptglykosid in allen untersuchten Rhamnus fallax-Chargen. Die vorliegende Untersuchung belegt erstmals, daß es vom analytischen Standpunkt aus keine Anhaltspunkte dafür gibt, daß die Fallaxrinde als minderwertig im Vergleich zu den offizinellen Faulbaumrinden eingestuft wird. In der Literatur liegen keine pharmakologischen Daten darüber vor, inwieweit sich Anthranoide vom Bis-O-glykosid-Typ (Glukofranguline) von Anthraglykosiden des Diglykosid-Typs (Physcion-8-rutinosid) in ihrem laxativen Effekt unterscheiden. Ebenfalls können in der Literatur keine Daten zu toxikologischen Wirkungsunterschieden zwischen beiden Rindendrogen entnommen werden.

### 3.3 Phytochemische Erstuntersuchung der Emodinglykoside der reifen Früchte von Rhamnus catharticus Isolierung neuartiger Glukofrangulindiacetate sowie des neuen Frangulin C

#### 3.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Nach dem "Lehrbuch der Phytotherapie" von WEISS (70) spielen die getrockneten Kreuzdornbeeren, Rhamni cathartici fructus (DAB 6; Erg. Bd. 6 (28)) auch heute noch eine Rolle in der Phytotherapie, beispielsweise in der galenischen DAB 6-Zubereitung des Kreuzdornbeeren-Sirups als mildwirksames Laxans. Gemäß der Standardzulassung enthält die Droge mindestens 4 % Anthrachinonglykoside, berechnet als Glukofrangulin. Es ist nach WICHTL (14) bisher allerdings nicht geklärt, um welche Inhaltsstoffe es sich handelt; vermutlich bilden die Glukofranguline und Franguline die Hauptbestandteile (14). In der Literatur finden sich jedoch widersprüchliche Angaben zum Vorkommen der Glukofranguline und Franguline in Kreuzdornbeeren (vgl. entsprechende Ausführungen bei MARTIN (71)).

Lediglich im DC-Atlas von WAGNER et. al. (12) findet sich eine DC-Abbildung, in der zwei Zonen von Anthrachinonen dem Frangulin A und dem Glukofrangulin A aufgrund des chromatographischen Vergleichs mit der Faulbaumrinde zugeordnet werden.

In der vorliegende Arbeit wird somit erstmals versucht, aufgrund der Isolierung der Anthrachinonglykoside eine Klärung des Inhaltsstoffspektrums dieser Droge herbeizuführen.

Aufgrund älterer Untersuchung ist die derzeit gültige Lehrbuchmeinung (45), daß sich in den unreifen, noch grünen Beerenfrüchten nur reduzierte Verbindungen finden. Beginnen die Beeren zu reifen, tritt daneben auch das entsprechende oxidierte Glykosid auf. Mit dem Weichwerden der Beeren beginnt der Prozeß der Glykosidspaltung, der schließlich zur Zeit der Erntereife zum überwiegenden Vorliegen des freien oxidierten Aglykons führt. Nach Grahle (30) fand sich in der dreizehnten Woche nach der Blüte die höchste Konzentration an Anthraglykosiden.

### 3.3.2 Gehaltsbestimmung der Emodinglykoside gemäß der DAB 9-Methode

Auch im Gehalt der therapeutisch relevanten Anthrachinonglykoside finden sich in der Literatur recht unterschiedliche Angaben.

Nach WAGNER (13) enthalten Kreuzdornbeeren 2 %, nach WICHTL (14) 2-5 %, nach STEINEGGER/HÄNSEL (44) 0,7 bis 1,5 % Anthranoidgehalt, berechnet als Glukofranguline.

Es sollte daher an drei Handelsmustern der Gesamtanthranoidgehalt der Kreuzdornbeeren entsprechend der Gehaltsbestimmung der Faulbaumrinde nach DAB 9 ermittelt werden. Die Kreuzdornbeeren wurden von drei verschiedenen Firmen bezogen. Die Ergebnisse der Doppel-Gehaltsbestimmungen finden sich in der Tabelle:

|                | Anthranoidgehalt<br>in Prozent |      |
|----------------|--------------------------------|------|
| Fa. Müggenburg | 4,72                           | 4,60 |
| Fa. Klenk      | 4,34                           | 4,17 |
| Fa. Peter      | 5,63                           | 6,02 |

Da Kreuzdornbeeren in reichlichen Maßen Flavonolglykoside führen (siehe 3.3.3) und damit die Ergebnisse nicht einen durch Flavonoide hervorgerufenen Gehalt vortäuschen, wurde analog die Gehaltsbestimmung des DAB 9 auf die Flavonoiddroge *Betulae Folium* übertragen. Dabei zeigte sich, daß unter den Bedingungen des DAB 9 mit dieser Methode keine Flavonoide erfaßt werden.

### 3.3.3 Orientierende DC-Untersuchungen

Für eine dc Voruntersuchung wurden selbstgesammelte reife, anschließend getrocknete Kreuzdornbeeren mit Methanol unter Eiskühlung am Ultra Turrax extrahiert. Im konzentrierten Extrakt konnte dc nach Entwicklung im DAB 9-Fließmittel Ethylacetat: Methanol:Wasser/100:17:13 und Detektion mit 5%iger methanolischer KOH Frangulin A und erstmals Emodin-8-Glucosid nachgewiesen werden (siehe Abb. 71). Als Vergleichssubstanzen dienten die authentischen Franguline A und B sowie selbst isoliertes Emodin-8-glucosid (siehe 5.4.2).

In weiteren dc Untersuchungen mit unterschiedlich extrahierten Kreuzdornbeeren-Konzentraten, konnten Anthranoide ebenfalls in nur geringen Mengen nachgewiesen werden: Frangulin A und Emodin-8-glucosid erschienen auch hier nach methanolischer KOH nur als schwach sichtbare Flecken. Dieses dc Ergebnis ist jedoch überraschend, vergleicht man es mit dem der Gehaltsbestimmung nach DAB 9 (3.3.2). Zudem fällt auf, daß nach der DC-Analyse die Kreuzdornbeeren als Flavonoiddroge zu bezeichnen wären (siehe Abb. 71). Die Flavonoide sind mit Naturstoffreagenz in großen Mengen als dominante Flecken nachweisbar. Die auffälligsten Flavonolglykoside werden ebenfalls als Xanthorhamnine bezeichnet (vgl. *Rhamnus fallax*) und wurden zum überwiegenden Teil bereits von RIESS-MAURER und WAGNER isoliert und aufgeklärt (64).

Auch ein HPLC-Test (Bedingungen siehe 3.2.5) des Kreuzdornbeeren-Auszuges zeigte eine ähnliche Tendenz: Es können keine Anthrachinonglykoside (Frangulin A und Emodin-8-glucosid), selbst in einer 2 %igen Probe nicht, nachgewiesen werden. Deutlich identifizierbar waren nur die Flavonolglykoside, wie die entsprechenden UV-Spektren der Peaks ausweisen (siehe Abb. 72).

Somit ergibt sich für die Kreuzdornbeeren folgende Problematik: Dem relativ hohen Anthranoidgehalt von durchschnittlich 5 % steht ein mageres qualitativ-chromatographisches Ergebnis gegenüber. Nur zwei Anthranoide sind dc schwach nachweisbar; durch HPLC ließ sich mit der Photodiodenarray-Technik nicht eine einzige Substanz mit einem typischen Anthranoidspektrum im Rohextrakt identifizieren (Abb. 73).

Es erschien daher notwendig, durch Fraktionierung des Rohextraktes eventuell vorhandene Anthranoxide über die DC-Nachweisgrenze aufzukonzentrieren. Zusätzlich sollte in den verschiedenen Fraktionen der Gehalt an Anthranoxiden nach DAB 9 bestimmt werden. Dazu wurden pulverisierte reife, getrocknete Kreuzdornbeeren (Firma Klenk) mit Methanol 15 min unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde filtriert, das Filtrat mit Wasser versetzt und dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Beide Phasen wurden dc im Fließmittel Ethylacetat:Methanol:Wasser/100:17:13 und 100:10:5 untersucht; detektiert wurde mit 5%iger methanolischer KOH-Lösung, dem Anthronreagenz Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) sowie konzentrierter Salpetersäure als Bianthronreagenz.

Der Anthranoxidgehalt wurde ebenfalls in beiden Phasen bestimmt. Statt Ether wurden zum Ausschütteln der obigen wäßrig-methanolischen Lösung außerdem Dichlormethan und Ethylacetat verwendet. Die jeweiligen wäßrigen und organischen Phasen wurden wiederum dc untersucht, der Anthranoxidgehalt der entsprechenden wäßrigen Phase nach DAB 9 bestimmt. Alle Ergebnisse der DC und der Gehaltsbestimmungen finden sich in Tab. 11.

Durch die Aufkonzentrierung konnte zunächst Glukofrangulin A dc identifiziert werden. Nach Besprühen mit konzentrierter Salpetersäure und Erhitzen ließen sich Bianthronglykoside in den wäßrigen Phasen feststellen. Anthrone konnten nicht nachgewiesen werden.

Nur in der Dichlormethanphase fiel ein unbekanntes Anthrachinonglykosid auf. Nach der Bornträger-Reaktion ist es rot gefärbt. Die Trennung vom Emodin-8-glucosid gelingt in Ethylacetat:Methanol:Wasser/100:10:5 erheblich besser als in 100:17:13. Dieses Anthrachinonglykosid - kurz mit A1 bezeichnet - erscheint für den hohen Anthranoxidgehalt der Kreuzdornbeeren mitverantwortlich zu sein. Seine Isolierung und Strukturaufklärung wird im folgenden beschrieben. Erst bei der sc Fraktionierung eines Kreuzdornbeerenextraktes für die Reindarstellung von A1 wurden noch zwei weitere Anthrachinonglykoside (kurz: E1 und E2) entdeckt. Ihre Isolierung und Strukturaufklärung finden sich im Kapitel 3.3.4.5.

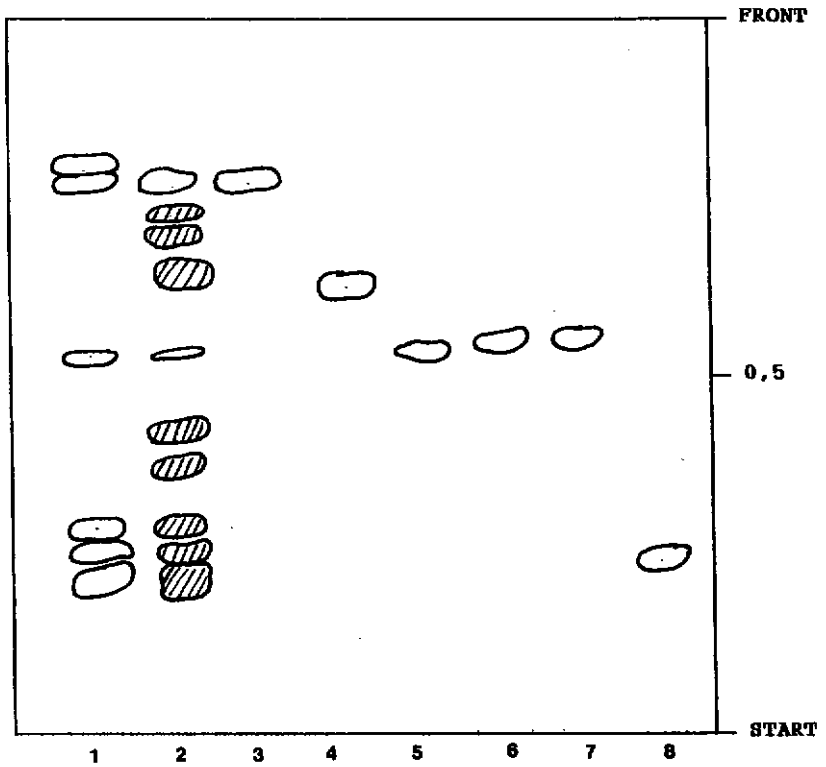


Abb. 71 : DC-Übersicht der isolierten Substanzen von reifen getrockneten Kreuzdornbeeren  
 Fließmittel: Ethylacetat:Methanol:Wasser(100/10/5)  
 1: Extrakt von *Rhamnus frangula*  
 2: Extrakt von *Rhamnus catharticus*  
 3: Frangulin A (0,75)  
 4: A1 (Frangulin C) (0,66)  
 5: Emodin-8-glucosid (0,54)  
 6: E1 (Glukofrangulin A-2",3"-O-diacetat) (0,55)  
 7: E2 (a und b) (a: Glukofrangulin A-2",4"-O-diacetat),  
 b: Glukofrangulin A-3",4"-O-diacetat) (0,55)  
 8: Glukofrangulin A (0,18)

 Flavonoide

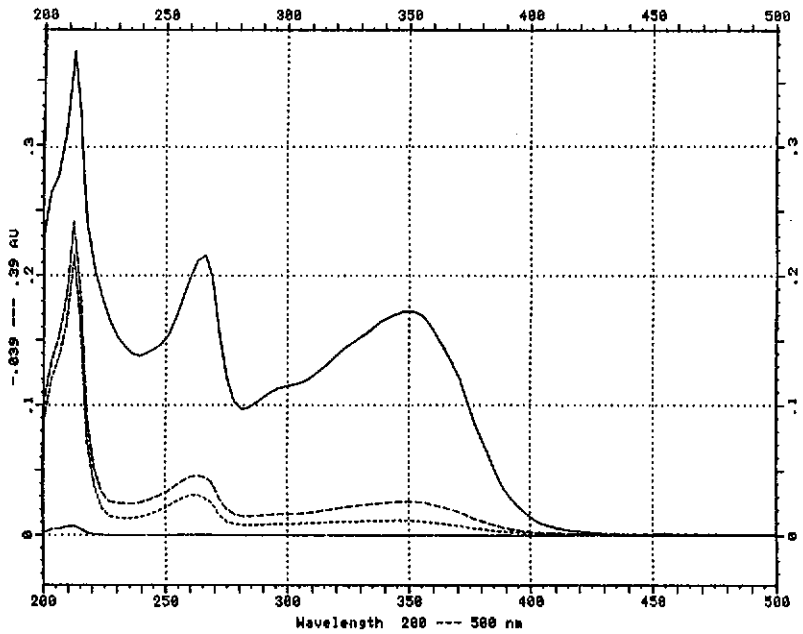


**Abb. 72 : UV-Spektren der drei Hauptflavonoide  
in Kreuzdornbeeren zu Abb.**

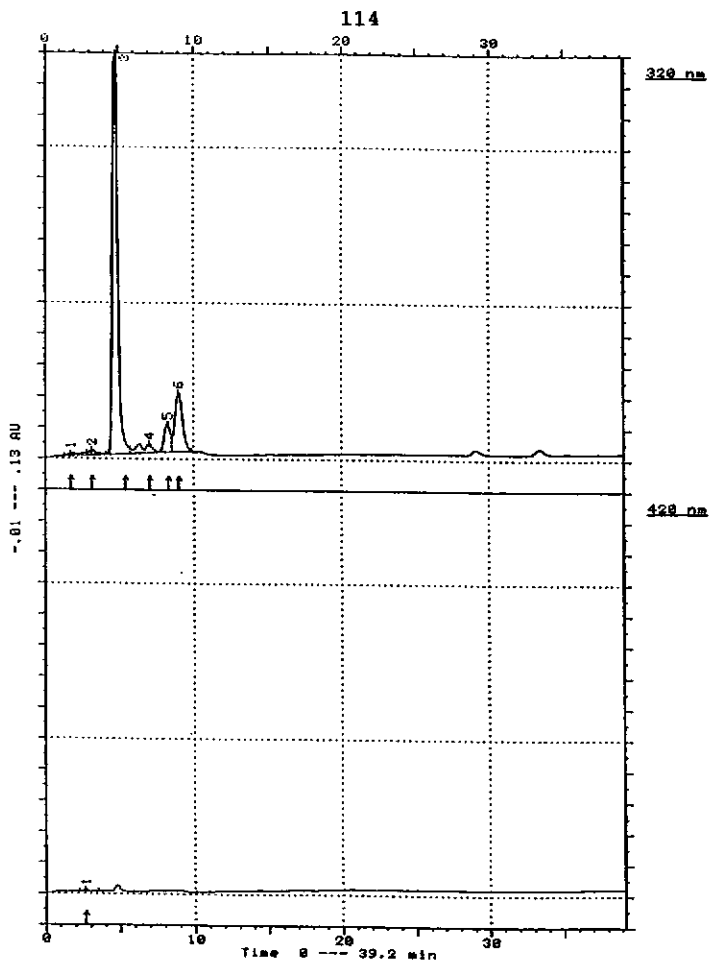
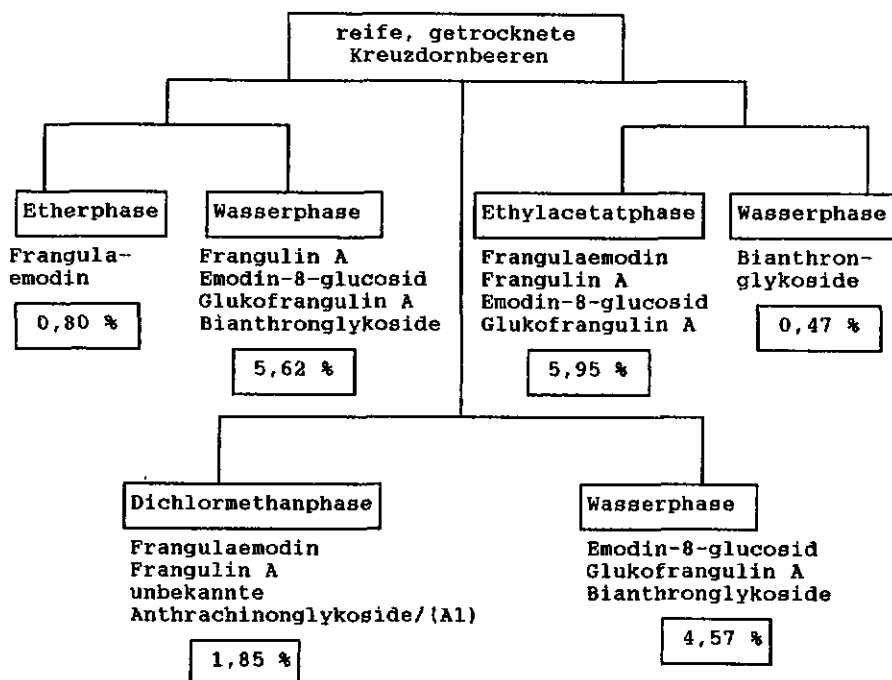


**Abb. 73 : HPL-Chromatogramm der Extrakte von reifen getrockneten Kreuzdornbeeren**  
**Gerät: Waters 600; Säule: RP-18, 250/8/4**  
**Fließmittel: Methanol/Wasser**  
**Detektor: Waters 990-Photodiodenarray**  
**Detektion bei 320 nm 3: Xanthorhamnine,**  
**5 und 6 Flavonoidspeaks**

**Tab. 13 : Quantitative Bestimmung der Anthrachinone in verschiedenen organischen und wässrigen Phasen (DAB 9-Spektrophotometrie). Die Inhaltstoffsangaben beziehen sich auf DC-Analysen der jeweiligen Phasen**



### 3.3.4 Isolierung von Anthrachinonglykosiden aus Kreuzdornbeeren

#### 3.3.4.1 Drogenmaterial

Für die Aufarbeitung wurden reife, getrocknete Kreuzdornbeeren der Firma Klenk bezogen. Die Identität wurde durch vergleichende DC mit selbstgesammelten Früchten von *Rhamnus catharticus* L. aus dem Botanischen Garten, Frankfurt/M., gesichert.

#### 3.3.4.2 Extraktion

Die pulverisierten Kreuzdornbeeren wurden zunächst mit Ether am Rückfluß erhitzt, um eventuell vorhandene Aglyka abzutrennen. Die Extraktion der Anthrachinonglykoside erfolgte dann mit siedendem Methanol (Rückfluß). Nach Filtration wurde das Lösungsmittel entfernt und eine Glykosid-Rohfraktion erhalten.

#### 3.3.4.3 Isolierung und Strukturaufklärung von A1 als Emodin-6- $\beta$ -D-xylopyranosid (Frangulin C)

Die unter 3.3.4.2 erhaltene Rohfraktion wurde zunächst sc über Kieselgel mit einem Chloroform-Methanol-Gradienten (90:10 bis 65:35) vorgereinigt.

Eine Aufreinigung der A1-enthaltenden Fraktionen erfolgte über eine weitere Kieselgel-SC mit einem Chloroform-Methanol-Gradienten (97:3 bis 65:35) und mehrfache Sephadex-LH20-SC mit Methanol als Eluens. Dadurch wurde eine Fraktion erhalten, die außer A1 noch Frangulin A und Emodin-8-Glucosid enthielt. Die Reindarstellung von A1 gelang durch Kieselgel-SC mit Ethylacetat-Methanol-Wasser (100:5:2).

---

## ISOLIERUNGSSCHEMA

Rhamnus catharticus  
reife, getrocknete Früchte  
500 g

Extraktion unter Rückfluß  
1. Diethylether  
2. Methanol

Methanol-Extrakt  
(15 g)

Säulenchromatographie  
1. Kieselgel (450 g)  
(CHCl<sub>3</sub>:MeOH)  
Fraktion von 500 mg  
2. Kieselgel (250 g)  
(CHCl<sub>3</sub>:MeOH)

weniger polare Glykoside  
mit A1

stärker polare Glykoside

Fraktion von 200 mg  
Mehrfach-Säulen-  
chromatographie  
Sephadex LH-20  
Methanol

A1, Frangulin A, Emodin-8-glucosid  
(45 mg)

Säulenchromatographie  
Kieselgel (200 g)  
Ethylacetat:Methanol:Wasser  
(100:5:2)

A1  
15 mg

### 3.3.4.4 Eigenschaften von A1 Identifizierung als Frangulin C

Zusammensetzung :  $C_{20}H_{19}O_{10}$   
 Molekulargewicht : 419  
 Schmelzpunkt : 196-200°C

Rf-Wert in

EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O

100 : 10 : 5 : 0,66

Detektion : 1. orange Fluoreszenz bei 365 nm  
 2. 5 %ige methanolische KOH: rotviolett

Hydrolyse : Erhitzen mit 1N Salzsäure unter  
 Rückfluß ergibt dc Emodin und Xylose  
 Fließmittel für Aglykon:  
 Cyclohexan:Methylenchlorid:Ethylformiat  
 Ameisensäure (35:30:30:5)  
 Emodin  $R_f$  = 0,76  
 Detektion: methanolische KOH: rot  
 Fließmittel für Zucker:  
 Ethylacetat:Ethanol(70 %)/65:35  
 Xylose  $R_f$  = 0,69  
 Detektion: Thymol-Schwefelsäure: blau

Die in der Isolierung als A1 bezeichnete Substanz konnte aufgrund ihres UV-Spektrums (Abb. 75) als Anthrachinon, aufgrund der <sup>1</sup>H-NMR-Daten (Tab. 12, Abb. 76-79) und <sup>13</sup>C-NMR-Daten (Tab. 13, Abb. 82-83) als Emodin-6-O-β-D-xylopyranosid (Frangulin C) identifiziert werden.

Die Aglykon-Komponente ist im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum charakterisiert durch die beiden jeweils metaständigen Protonen H-2 und H-4 mit beiden Singulets bei 7,52 und 7,19 ppm sowie für H-5 und H-7 mit einer Kopplungskonstante von J = 1,8 Hz bei δ 7,23 und 6,90. Vorhandensein zweier chelatisierender, nicht glykosylierter Hydroxyl-Funktionen an C-1 und C-8 geht durch die Resonanz für entsprechend zwei Protonen bei 12,01 ppm hervor, so daß die

Substitution durch die Xylose an O-6 erfolgt. Die Xylose ist charakterisiert durch die anomere  $\beta$ -Konfiguration (Doublet bei  $\delta = 5,12/J = 7$  Hz) sowie im Spektrum in DMSO- $d_6$  (siehe Abb. 78) durch die Resonanzen für die Hydroxyl-Protonen 2, 3 und 4 ( $J = \text{ca. } 4,5 \text{ bis } 5,5$  Hz). Die vorliegende Pyranose-Form geht aus den  $^{13}\text{C}$ -Resonanz-Signalen der Xylosyl-C-Atome hervor (72). Die übrigen Ring-Protonen des Zuckers können durch Anwendung der 2-D-NMR-Cosy-Technik identifiziert werden (siehe Tab. 13). Außerdem bestätigen die  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale das Vorliegen des  $\beta$ -D-Glykopiranosylrestes sowie die Glykosylierung in Position O-6, da entsprechende Glykosylierungsunterschiede bei einer O-8- bzw. O-1-Glykosylierung nicht auftreten (73). Zur endgültigen Absicherung dieser Analyse wurde Emodin-6-O- $\beta$ -D-xylopyranosid acetyliert. In diesem Spektrum wird die O-6 Glykosylierung bestätigt, da die beiden Methylgruppen aus den phenolischen Acetoxygruppen beide bei 2,44 bzw. 2,43 ppm erscheinen, während eine C-6-O-Acetylgruppe bei ca. 2,30 ppm deutlich abgesetzt von diesen beiden Signalen erscheinen würde.

Nach den bei STEGLICH und LÖSEL (74) beschriebenen Verfahren der "Acylierungs-Verschiebungen" gestattet der Vergleich der H-1 chemischen Verschiebungen der aromatischen Protonen im pertrimethyl silylierten Frangulaemodin mit den entsprechenden Verschiebungen im peracetylierten Glykosid A1 eine Festlegung der Stellung des Glykosyl-Substituenten an C-6. Die  $\Delta_{\text{Ac}}$ -Werte für H-2 und H-7 entsprechen den Acylierungs-Verschiebungen des Emodin-6-mono- $\beta$ -D-Glykosids, wie die gefundenen Werte in Abb. 74 zeigen. Auch das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von A1 bestätigt eindeutig die Glykosylierung an C-6: Wie ein Vergleich mit den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des Emodin-6-rhamnosids (Frangulin A) und des Emodin-8-glucosids zeigt, bestehen deutliche Übereinstimmung in den wichtigen Signalen zwischen Frangulin A und A1. C-6 zeigt in beiden Fällen eine gegenüber dem Aglykon ca. 2 ppm Hochfeld Verschiebung von ca. 165 zu 163 ppm. Zudem äußert sich die zusätzliche Chelatisierungsmöglichkeit an C-9 durch eine freie C-8-OH-Gruppe durch eine signifikante Tieffeld-Verschiebung des Carbonyl-Kohlenstoffs von 186 zu ca. 190 ppm.

Nach Frangulin A (O-6-Rhamnosyl) und Frangulin B (O-6-Apiosyl) wurde mit dieser Verbindung ein drittes Mal eine Pentose substituiert am O-6 von Frangulaemodin aufgefunden. Für die neue Verbindung wird daher entsprechend der Reihenfolge die Bezeichnung Frangulin C vorgeschlagen.

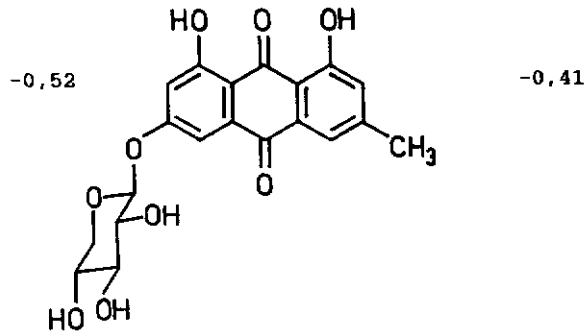


Abb. 74 : Acylierungs-Verschiebungen  $\Delta_{Ac}$  beim Emodin-6-O- $\beta$ -D-xylosid (in ppm) [Vgl. (74) Emodin-6- $\beta$ -D-glucosid: -0,52 (H-7) und -0,39 (H-2)]

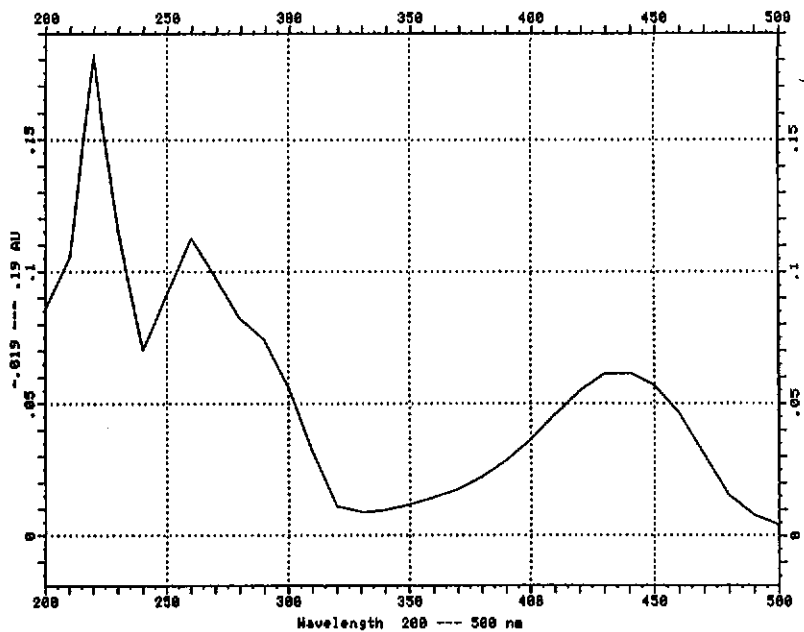


**Abb. 75 : UV-Spektrum von A1**  
**Gerät: Waters 990-Photodiodenarray**



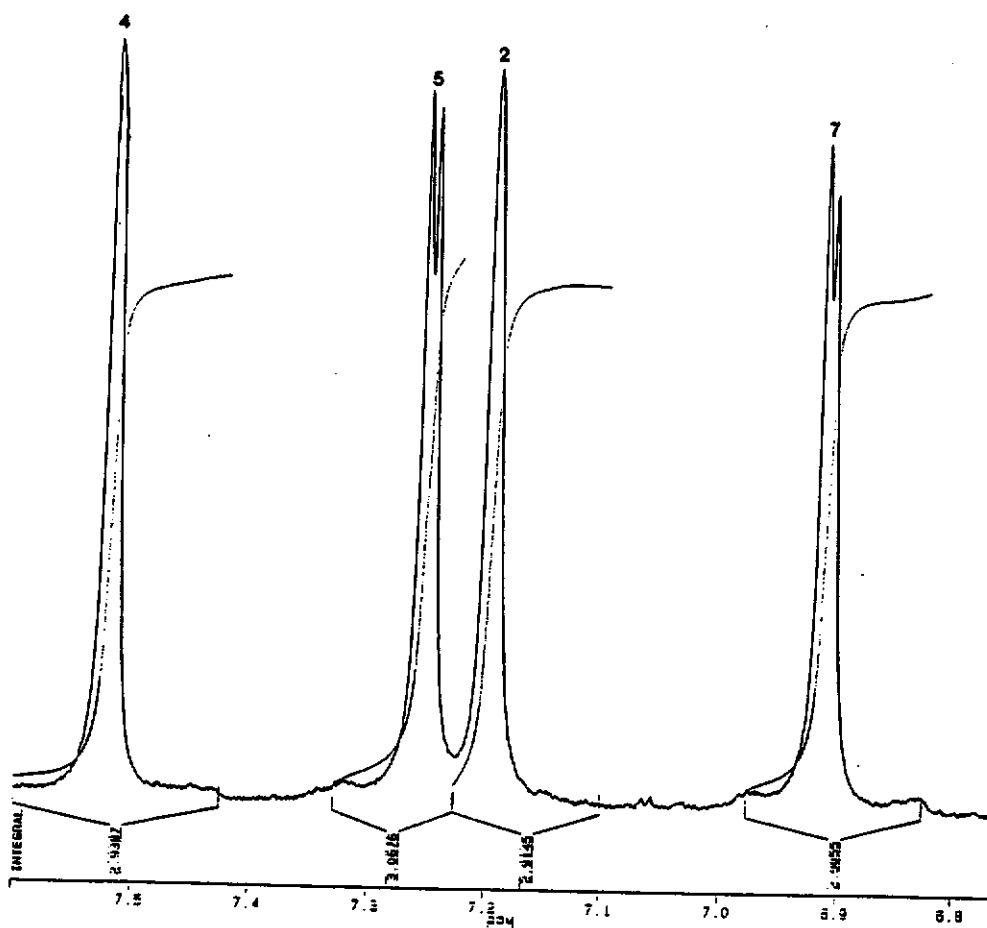


Abb. 77 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von A1 in  $\text{DMSO-d}_6$   
Ausschnitt von 6,8-7,5 ppm.

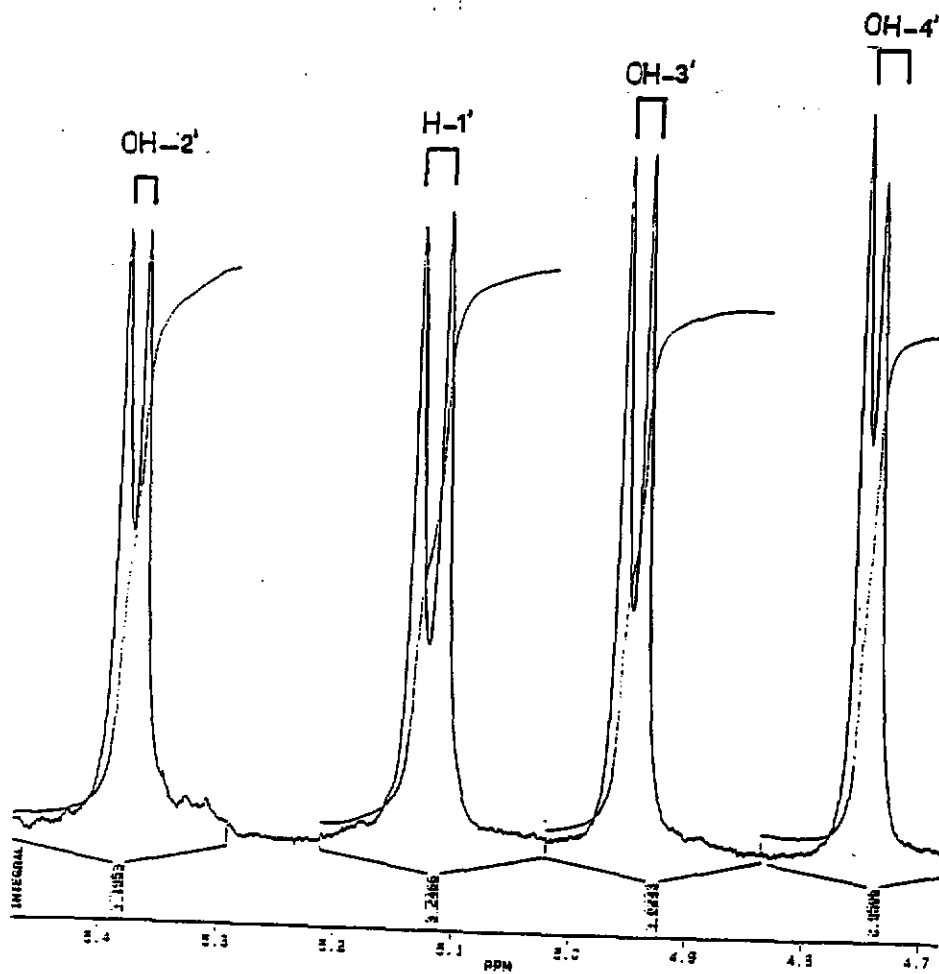


Abb. 78 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von A1 in  $\text{DMSO-d}_6$   
Ausschnitt von 4,7-5,4 ppm.

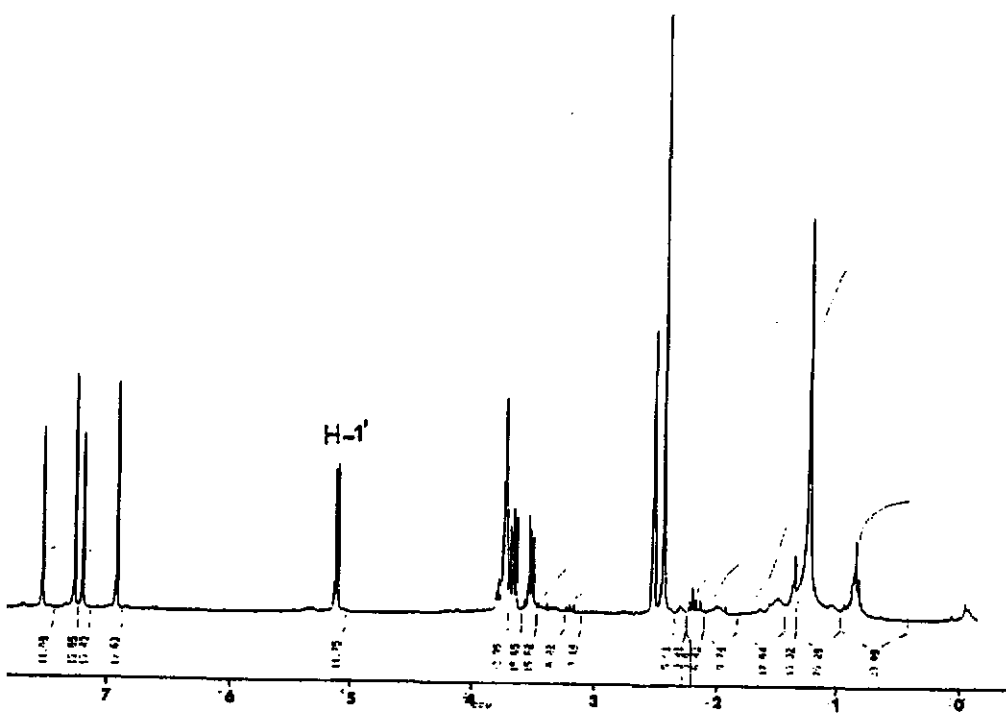


Abb. 79 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von A1 in  $\text{DMSO-d}_6$   
(Austausch mit  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )

Abb. 81

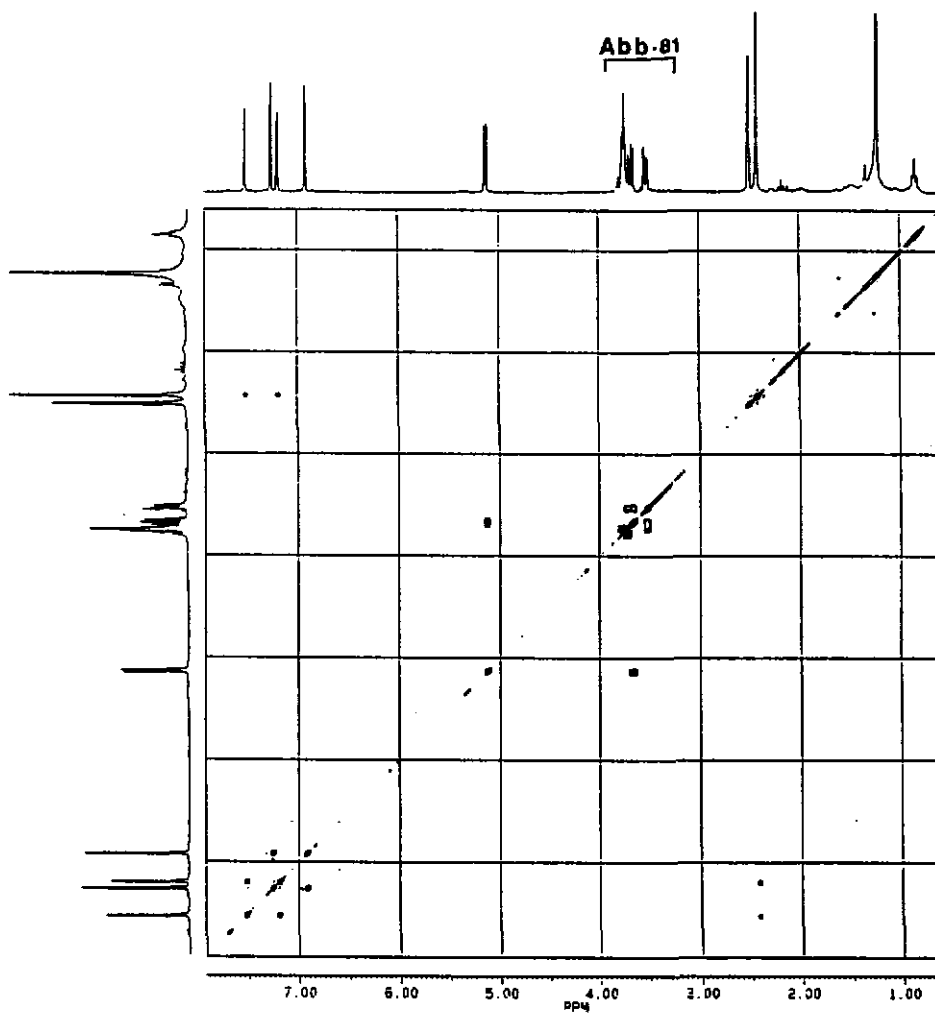


Abb. 80 :  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von A1 in  $\text{DMSO-d}_6$   
(Austausch  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )

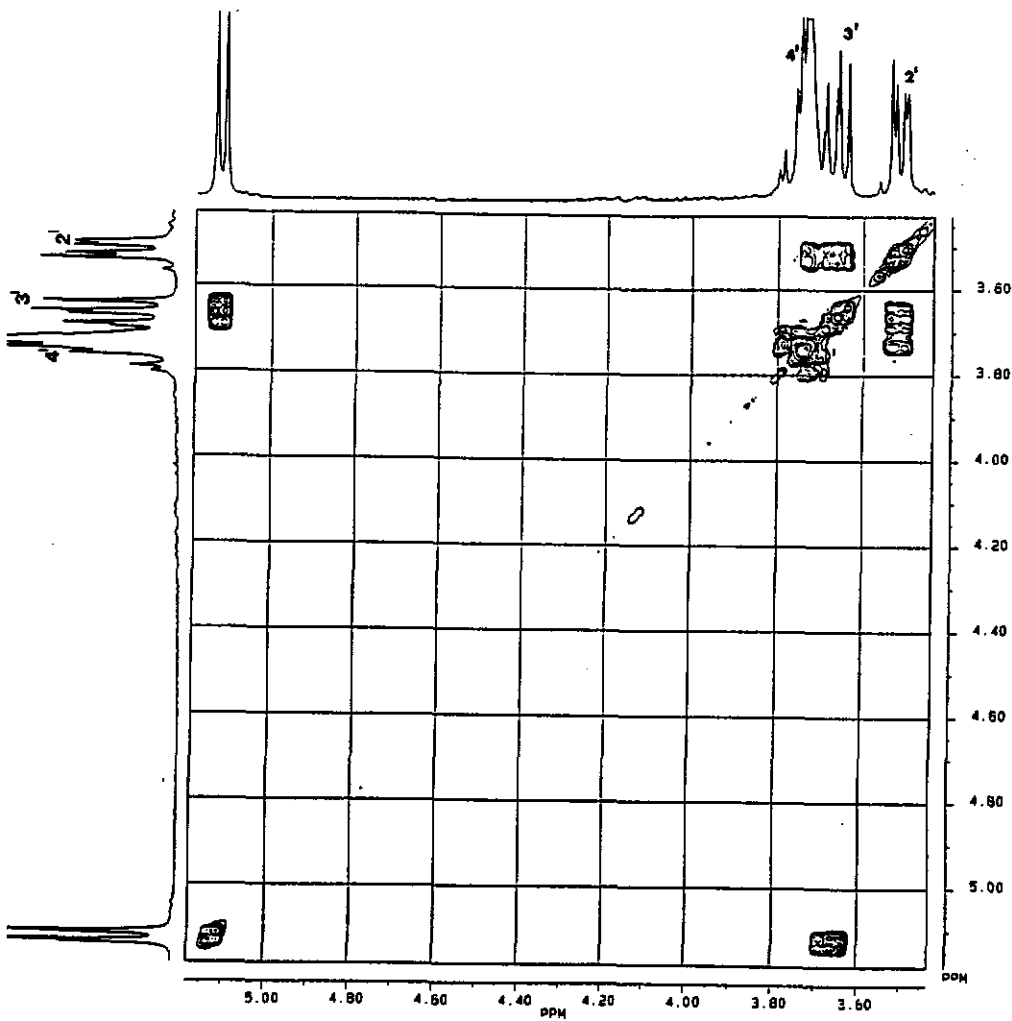


Abb. 81 :  ${}^1\text{H}$ ,  ${}^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von A1 in  $\text{DMSO-d}_6$   
(Austausch  $\text{CF}_3\text{COOD}$ ) Ausschnitt 3,60–5,00 ppm.

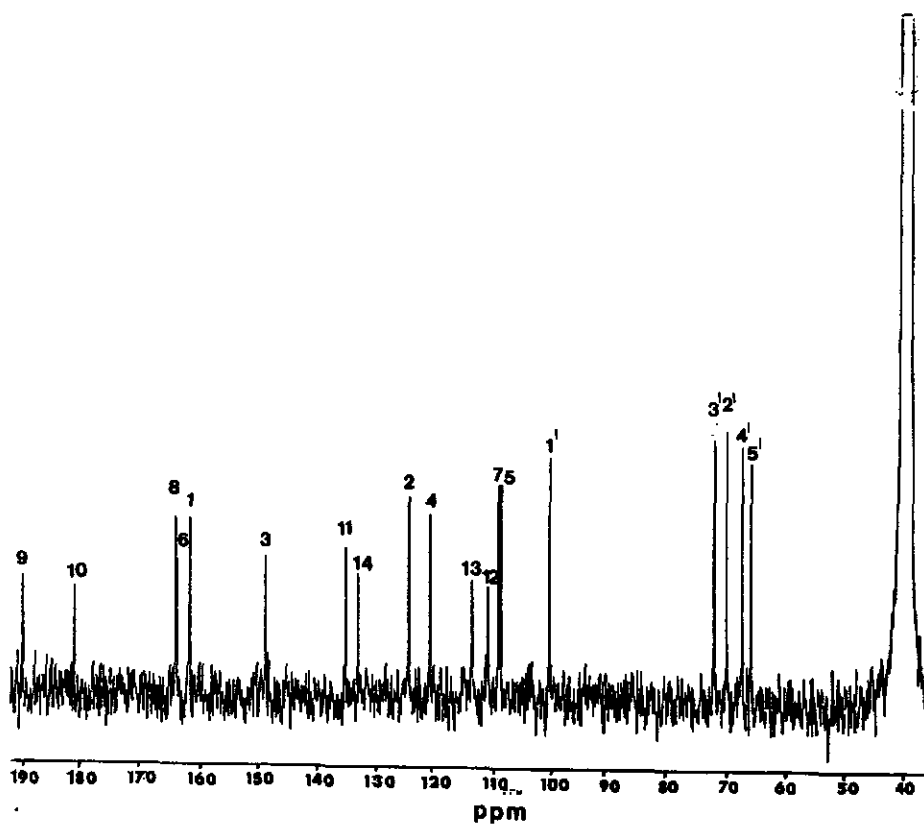


Abb. 82 :  $^{13}\text{C}$ -NMR-Aufnahme von A1 in  $\text{DMSO-d}_6$

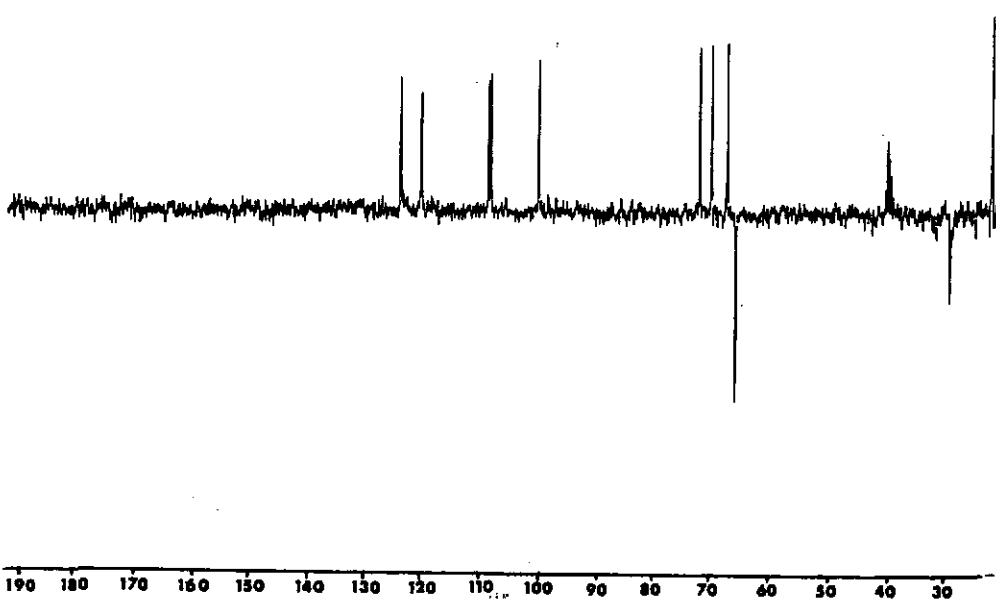


Abb. 83 :  $^{13}\text{C}$ -NMR-DEPT-Spektrum von A1 in  $\text{DMSO-d}_6$

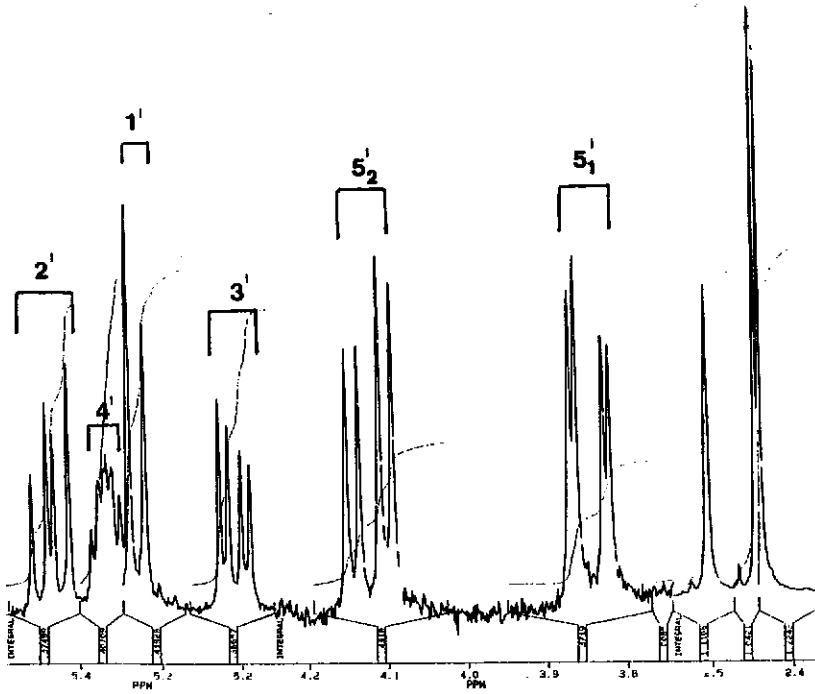


Abb. 84 :  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der acetylierten Verbindung A1  
(in  $\text{CDCl}_3$ /300 MHz)

Tab. 14 : (zu Abb. 76-79)  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopische Daten von A1 in  $\text{DMSO-d}_6/\text{CF}_3\text{COOD}$  ( $\delta$  /ppm)

| Proton            |      | J (Hz)      |
|-------------------|------|-------------|
| H-2               | 6,91 | d, J=2,3 Hz |
| H-4               | 7,52 | s, br       |
| H-5               | 7,25 | d, J=2,3 Hz |
| H-7               | 7,19 | s, br       |
| H-1'              | 5,12 | d, J=6,8 Hz |
| 3-CH <sub>3</sub> | 2,42 | s           |

Tab. 15 : (zu Abb. 82-83)  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopische Daten von A1 (\* selbst isolierte Substanzen zu Abb. 104,108))

| C-Atom | A1     | Emodin <sup>89</sup> | Frangulin A* | Emodin-8-Gl* |        |
|--------|--------|----------------------|--------------|--------------|--------|
| 1      | 161,49 | 161,16               | 161,42       | 161,74       |        |
| 2      | 124,20 | 124,21               | 124,06       | 123,71       |        |
| 3      | 148,59 | 146,96               | 148,53       | 144,43       |        |
| 4      | 120,58 | 119,30               | 120,49       | 118,18       |        |
| 5      | 108,53 | 108,78               | 108,44       | 103,22       |        |
| 6      | 163,69 | 164,60               | 163,75       | 163,59       |        |
| 7      | 108,95 | 108,70               | 108,95       | 104,44       |        |
| 8      | 163,90 | 161,91               | 162,62       | 179,23       |        |
| 9      | 190,08 | 186,59               | 189,80       | 185,97       |        |
| 10     | 181,13 | 182,36               | 180,60       | 184,48       |        |
| 11     | 134,93 | 136,65               | 134,64       | 135,71       |        |
| 12     | 110,76 | 114,05               | 110,46       | 111,73       |        |
| 13     | 113,49 | 114,63               | 113,12       | 117,38       |        |
| 14     | 132,86 | 132,28               | 132,47       | 132,48       |        |
| Xyl-1  | 100,14 | Rha-1                | 98,46        | Glc-1        | 101,14 |
| Xyl-2  | 72,04  | Rha-2                | 70,21        | Glc-2        | 73,28  |
| Xyl-3  | 69,99  | Rha-3                | 69,74        | Glc-3        | 75,29  |
| Xyl-4  | 67,24  | Rha-4                | 71,55        | Glc-4        | 69,76  |
| Xyl-5  | 65,71  | Rha-5                | 68,11        | Glc-5        | 77,49  |
|        |        | Rha-Me               | 17,89        | Glc-6        | 60,75  |
| 3-Me   | 21,53  | 21,22                | 21,50        |              | 21,27  |

### 3.3.4.5 Isolierung und Trennung von E1 und E2

Bei den Arbeiten zur Isolierung von A1 deuteten sich überraschenderweise noch zwei weitere Anthranoiden in den Kreuzdornbeeren an.

In Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:10:5) besitzen diese beiden Substanzen, die auf Kieselgel bisher dc nicht getrennt werden konnten, den  $R_f$ -Wert von 0,55. Somit laufen sie in diesem Fließmittel mit Emodin-8-glucosid auf der gleichen Laufhöhe.

Im UV 365 nm erscheinen E1 und E2 orange-rot, nach 5 %iger methanolischer KOH färben sie sich rot. Diese Färbung ist jedoch instabil und verwandelt sich nach ca. 15 Minuten in gelb.

Eine dc Trennung von E1, E2 und Emodin-8-glucosid (EM8G) gelingt auf Kieselgel RP-18-Material mit 80 %igem Methanol. Bei diesen Bedingungen besitzen die Substanzen folgende  $R_f$ -Werte:

|      | $R_f$ -Werte |
|------|--------------|
| E1   | 0,51         |
| E2   | 0,43         |
| EM8G | 0,57         |

Vorversuche zur Isolierung von E1 und E2 mittels präparativer DC durch Elution in Methanol hatten ergeben, daß beide Substanzen sich weitgehend unter Ausbildung eines Anthrachinons zersetzten, das im  $R_f$ -Wert mit dem aus der Faulbaumrinde bekannten Glukofrangulin A übereinstimmte. Dieses Glykosid konnte sowohl als Abbauprodukt von E1 und E2 als auch als genuiner Inhaltsstoff wie in 3.3.3 bereits mittels DC vermutet, durch eine HPLC-Bestimmung bestätigt werden. Dabei konnte gleichzeitig festgestellt werden, daß die Kreuzdornbeeren kein Glukofrangulin B und Frangulin B wie die anderen Rhamnus-Arten enthalten.

Für die präparative Anreicherung von E1 und E2 wurde zunächst die SC an polarem Material (Kieselgel 60) gewählt. Apolares Trägermaterial (modifiziertes Kieselgel) wurde schließlich zur Trennung von E1 und E2 angewandt:

Ein Rohextrakt von reifen, getrockneten Kreuzdornbeeren (Gewinnung siehe 3.3.3.2) wurde durch Mehrfach-SC an Kieselgel mit Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:5:2) fraktioniert. Nach SC an Sephadex-LH-20 mit Methanol konnte eine nur noch gering verunreinigte Fraktion mit E1 und E2 erhalten werden. Eine Entfernung dieser Verunreinigungen war sc an Kieselgel mit Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:5:2) möglich.

Die Trennung von E1 und E2 an RP-18-Material wurde über LPLC (Niederdruckflüssigkeitschromatographie) erreicht. Als Fließmittel diente eine 1:1-Mischung von 40- und 80 %igem Methanol.

Abb. 85 dokumentiert das LPL-Chromatogramm der Trennung.

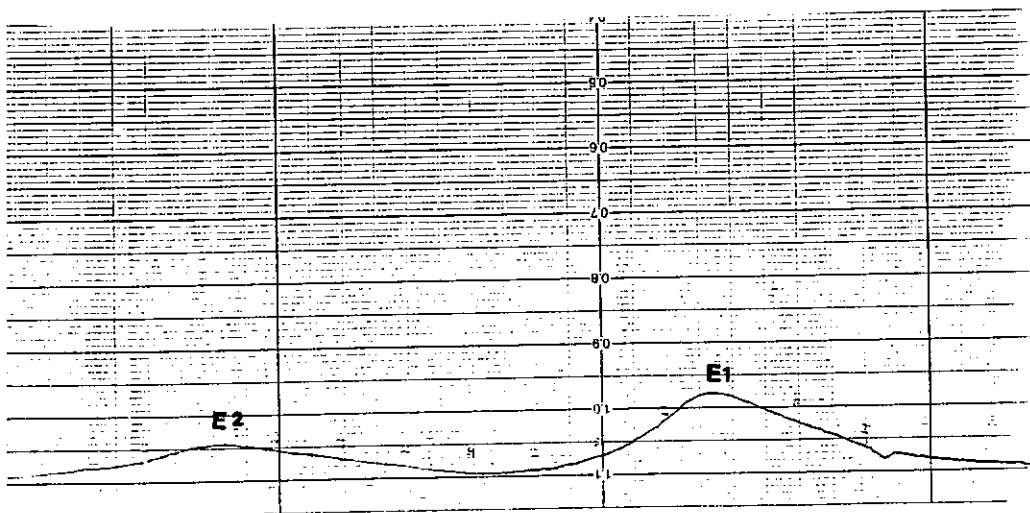


Abb. 85 :Trennung der E1 und E2 mittels LPLC

**ISOLIERUNGSSSCHEMA**  
**Rhamnus catharticus**  
 reife, getrocknete Früchte (500 g)

Extraktion am Rückfluß  
 1. Diethylether  
 2. Methanol

Methanol-Extrakt

SC (Kieselgel)  
 EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O  
 100:5:2

Aglykone

E1  
 E2  
 Emodin-8-glucosid  
 Frangulin A  
 weitere unbekannte  
 Substanzen

SC (Kieselgel)  
 EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O  
 100:5:2

Aglykone

polarere  
 Glykoside

E1  
 E2  
 Emodin-8-glucosid  
 Frangulin A  
 Verunreinigungen

SC (Sephadex-LH-20)  
 MeOH

E1  
 E2  
 Verunreinigungen

Frangulin A  
 EM8G

LPLC (RP-18-Material)  
 MeOH 40%, 80% (1:1)

E1  
 7 mg

E2  
 5 mg

3.3.4.6 Eigenschaften von E1  
Identifizierung als Glukofrangulin A-2",3"-O-diacetat

Zusammensetzung :  $C_{31}H_{34}O_{18}$   
 Molekulargewicht : 663  
 Schmelzpunkt : 146-151°C  
 $R_f$ -Wert in  
 EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O  
 100 : 10 : 5 : 0,55  
 Detektion : 1. orange Fluoreszenz bei 365 nm  
 2. 5 %ige methanolische KOH: rot,  
 innerhalb 15 min gelb  
 Hydrolyse : Erhitzen mit 1N Salzsäure am Rückfluß  
 ergibt dc Emodin, Rhamnose und Glucose.  
 Fließmittel für das Aglykon:  
 Cyclohexan:Methylenchlorid:Ethylformiat:  
 Ameisensäure (35:30:30:5)  
 Emodin  $R_f$  = 0,75  
 Detektion: methanolische KOH: rot  
 Fließmittel für Zucker:  
 Ethylacetat:Ethanol(70 %ige)/65:35  
 Glucose  $R_f$  = 0,56  
 Rhamnose  $R_f$  = 0,78  
 Detektion: Thymol-Schwefelsäure: rosa

Die in 3.3.4.5 als E1 bezeichnete Substanz konnte aufgrund ihres UV-Spektrums (Abb. 86) als Anthrachinon, ihrer <sup>1</sup>H-NMR- (Tab. 14, Abb. 87-90) und <sup>13</sup>C-NMR-Daten (Tab. 15, Abb. 93,94) als Glukofrangulin A-2",3"-O-diacetat identifiziert werden.

3.3.4.7 Eigenschaften von E2  
Identifizierung als isomere Glukofrangulin A-2",4"-  
und- 3",4"-O-diacetate

Zusammensetzung :  $C_{33}H_{36}O_{19}$   
 Molekulargewicht : 663  
 Schmelzpunkt : 166-168°C  
 R<sub>f</sub>-Wert in EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O-100/10/5: 0,55  
 Detektion : 1. orange Fluoreszenz bei 365nm  
               2. 5 %ige methanolischer KOH: rot  
                   innerhalb 15 min gelb  
 Hydrolyse : Erhitzen mit 1N Salzsäure am Rückfluß  
               ergibt dc Emodin, Rhamnose und Glucose  
               Fließmittel für das Aglykon: siehe 3.3.4.6  
               Fließmittel für Zucker: siehe 3.3.4.6  
               R<sub>f</sub>-Werte von Emodin, Rhamnose und Glucose:  
               siehe 3.3.4.6

Die in 3.3.4.5 als E2 bezeichnete Substanz konnte aufgrund ihres UV-Spektrums als Anthrachinon (Abb. 86), ihrer <sup>1</sup>H-NMR-Daten (Tab. 14, Abb. 96-100) und <sup>13</sup>C-NMR-Daten als ein Gemisch zweier Stellungsisomere Glukofrangulin A -2",4"- diacetat und -3",4"-O-diacetat identifiziert werden.

Bei der sauren Hydrolyse ergaben E1 und E2 die Bestandteile des Glukofrangulins, nämlich die Zucker Rhamnose und Glucose sowie das Aglykon Frangulaemodin. Die lipophilere Molekülkomponente, die sich bei der DC bei E1 und E2 durch deutlich größere R<sub>f</sub>-Werte als bei reinem Glukofrangulin A äußert, konnte zweifelsfrei durch die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren als Acetylgruppierungen erkannt werden. E1 und E2 zeigen völlige Übereinstimmung der Signale für die Aglykon- Komponente Frangulaemodin sowie für den Glykosyl-Rest in Position 8. Eine Ausnahme bilden die aromatischen Protonen H-5 und H-7 in ortho-Stellung zum Rhamnosyl- Substituenten. Bei diesen wird im Vergleich zum Frangulin A und C eine deutliche Tieffeld-Verschiebung der Resonanzen 5 und 7 beobachtet, was auf die Acetylierung am Rhamnosyl-O-2' zurückzuführen ist. Die peracetylierten Verbindungen von E1 bestätigen im übrigen diese Tatsache. Wesentliche Unterschiede im Vergleich zu den <sup>13</sup>C-NMR-Spektren von Frangulin A und Emodin-8-glucosid (siehe Tab. 17, Abb. 104,108) finden sich im Bereich der Rhamnosyl-Ring-Protonen.

Diese erfahren durch die direkte Veresterung ihrer zugehörigen OH-Gruppen durch die Essigsäure jeweils eine charakteristische Tieffeld-Verschiebung in den Bereich um 5,1 und 5,4 ppm. Die Festlegung der Position der Veresterung am Rhamnosylrest gelingt mit Hilfe der 2D- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Cosy-Spektren. Ausgehend vom Signal des anomeren Protons H-1 bei ca. 5,8 ppm (s,br) gelingt für E1 die Zuordnung der Positionen Rhamnosyl C-2 und C-3. Für E2 wurde zunächst aufgrund des Nachweises dreier Acetylgruppen im  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum das Vorliegen eines Triacetats vermutet. Die genaue  $^1\text{H}$ -NMR-Integration zeigte jedoch, daß es sich um ein Gemisch zweier stellungsisomerer Rhamnosyldiacetate handeln mußte, bei denen die Positionen der Veresterung ebenfalls mit Hilfe der 2D- $^1\text{H}$ -NMR-Cosy-Technik festgelegt werden konnten. Es handelte sich um die beiden stellungsisomeren 2,2'-, 4,2'- und 3,2'-, 4,2'- Diacetate des Glukofrangulins A. Mit den Glykosiden E1 sowie E2 (a und b) sind somit drei isomere Diacetate des Glukofrangulins A aufgefunden worden, in denen der Rhamnosyl-Teil jeweils in allen Varianten diacetyliert vorliegt.

Essigsäure ist bisher als Veresterungspartner nur bei Aloe-Arten beschrieben, nämlich in 7-OH-Aloin-Acetylderivaten aus *Aloe succotrina*. Nicht nur aus taxonomischer Sicht stellt dies einen interessanten Befund dar. Vielmehr wird auch in pflanzen-physiologischer Sicht wiederum die Frage nach den tatsächlichen Primärglykosiden bei der Faulbaumrinde aufgeworfen und die mögliche Funktion als Transportform in den relevanten Gewebeteilen zu untersuchen sein.

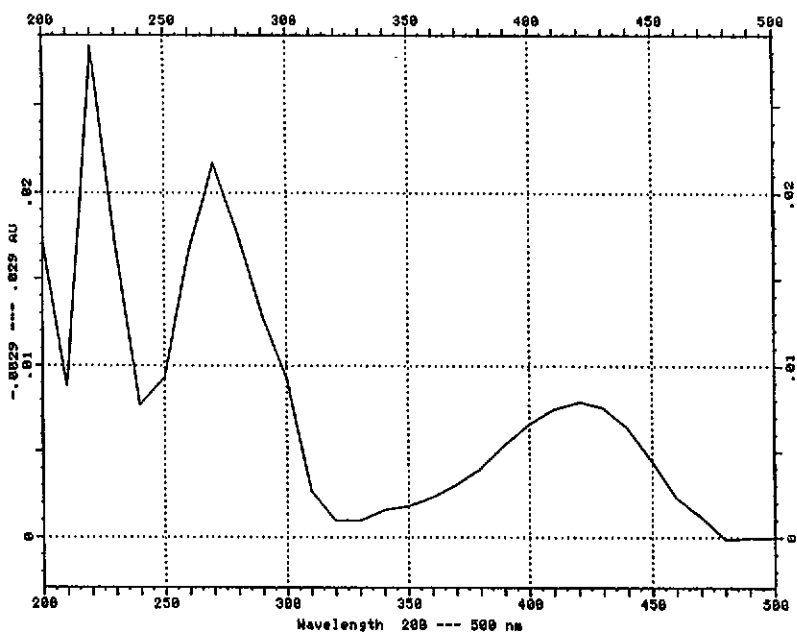


Abb. 85 : UV-Spektrum von E1  
Gerät: Waters 990-Photodiodenarray

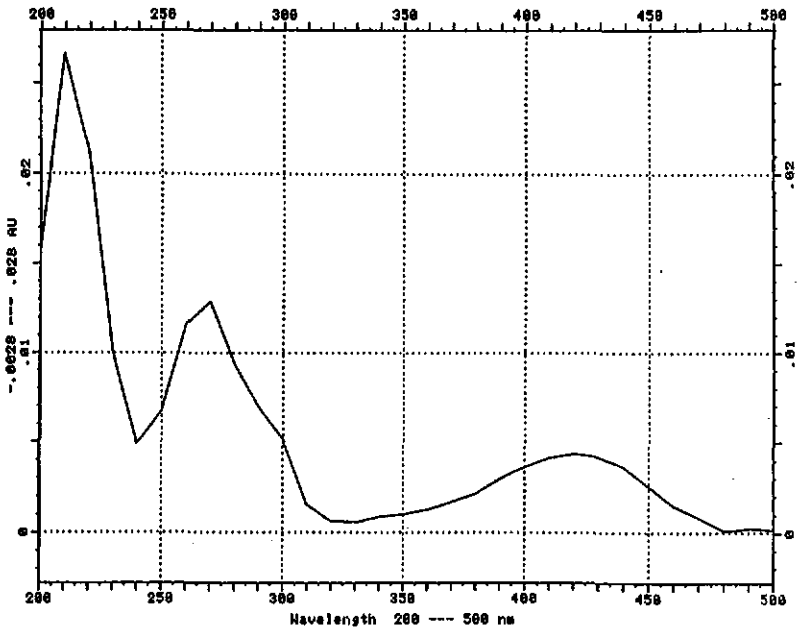


Abb. 86 : UV-Spektrum von E2  
Gerät: Waters 990-Photodiodenarray

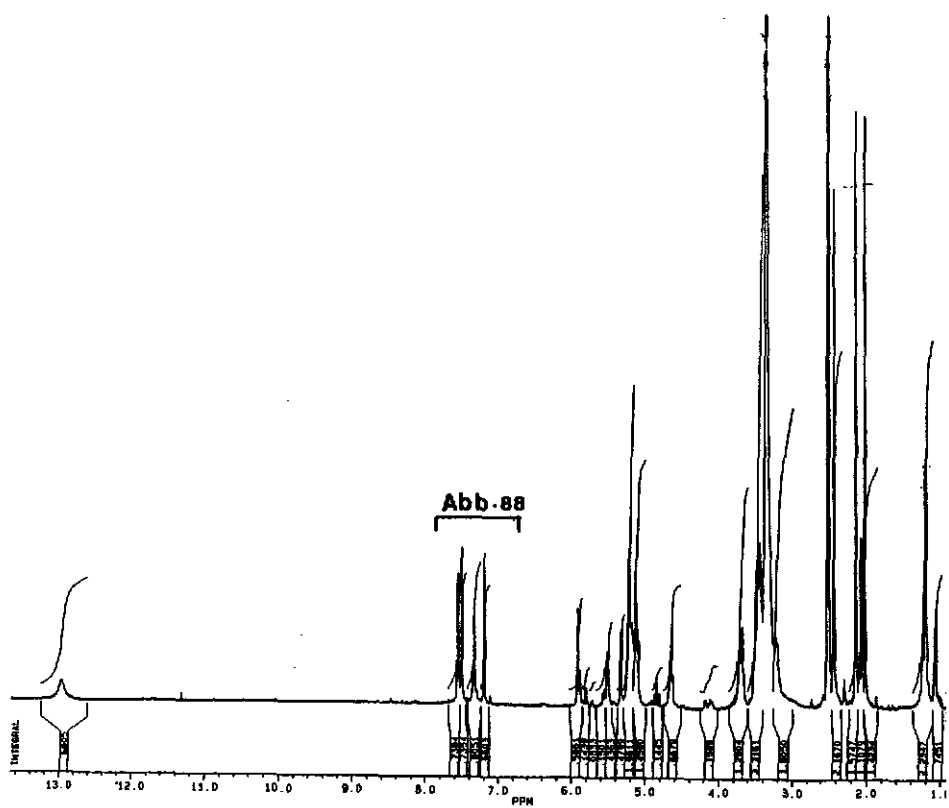


Abb. 87 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von E1 in  $\text{DMSO-d}_6$

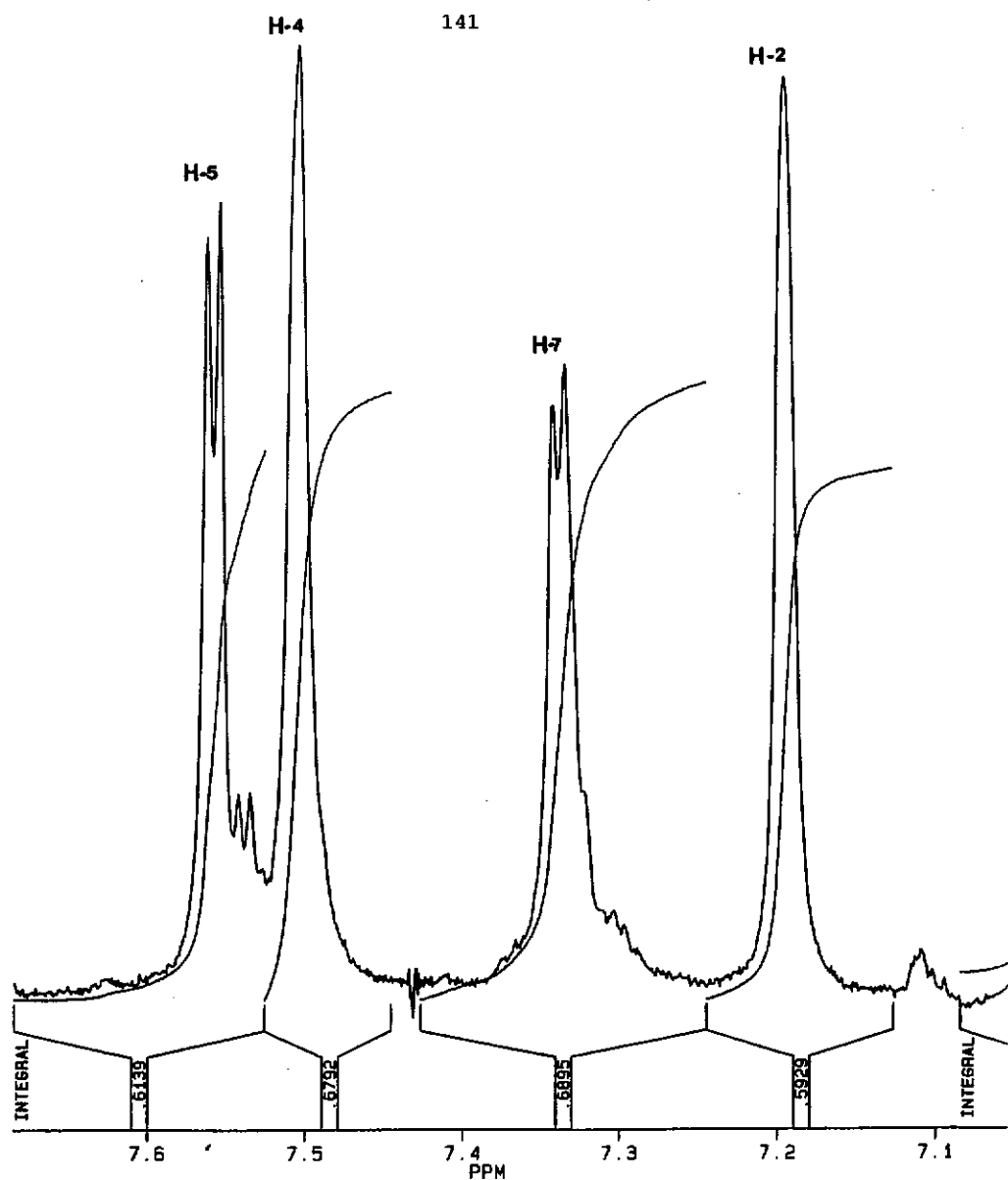


Abb. 88 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von E1 in  $\text{DMSO-d}_6$   
Ausschnitt von 7,1-7,6 ppm.

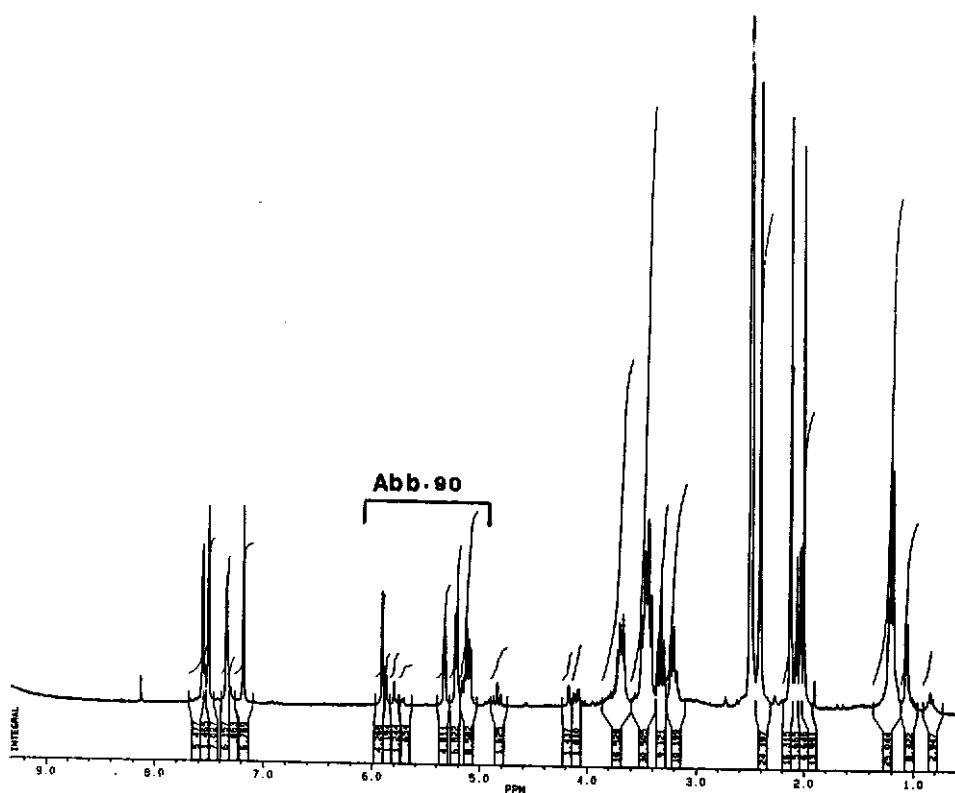


Abb. 89 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von E1 in  $\text{DMSO-d}_6$   
(Austausch mit  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )

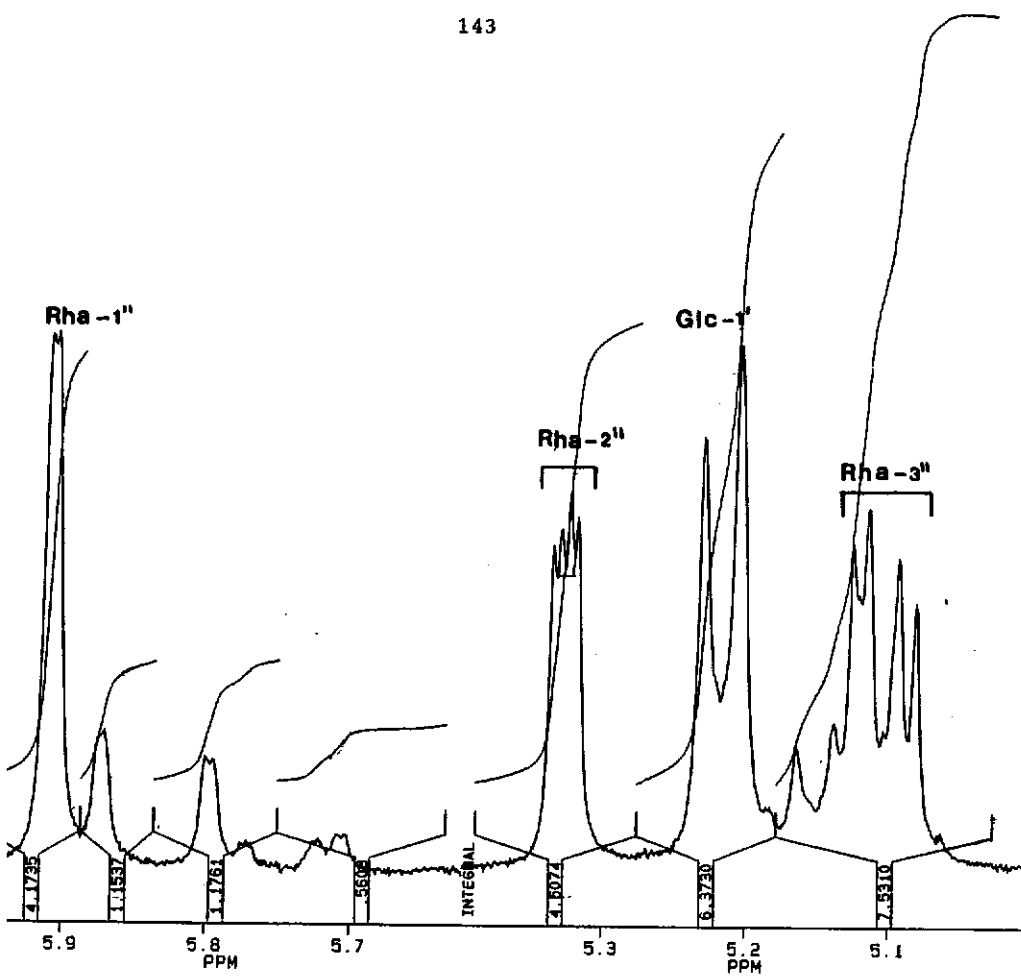


Abb. 90 :  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von E1 in  $\text{DMSO-d}_6$   
(Austausch mit  $\text{CF}_3\text{COOD}$ ) Ausschnitt von 5,1-5,9 ppm.

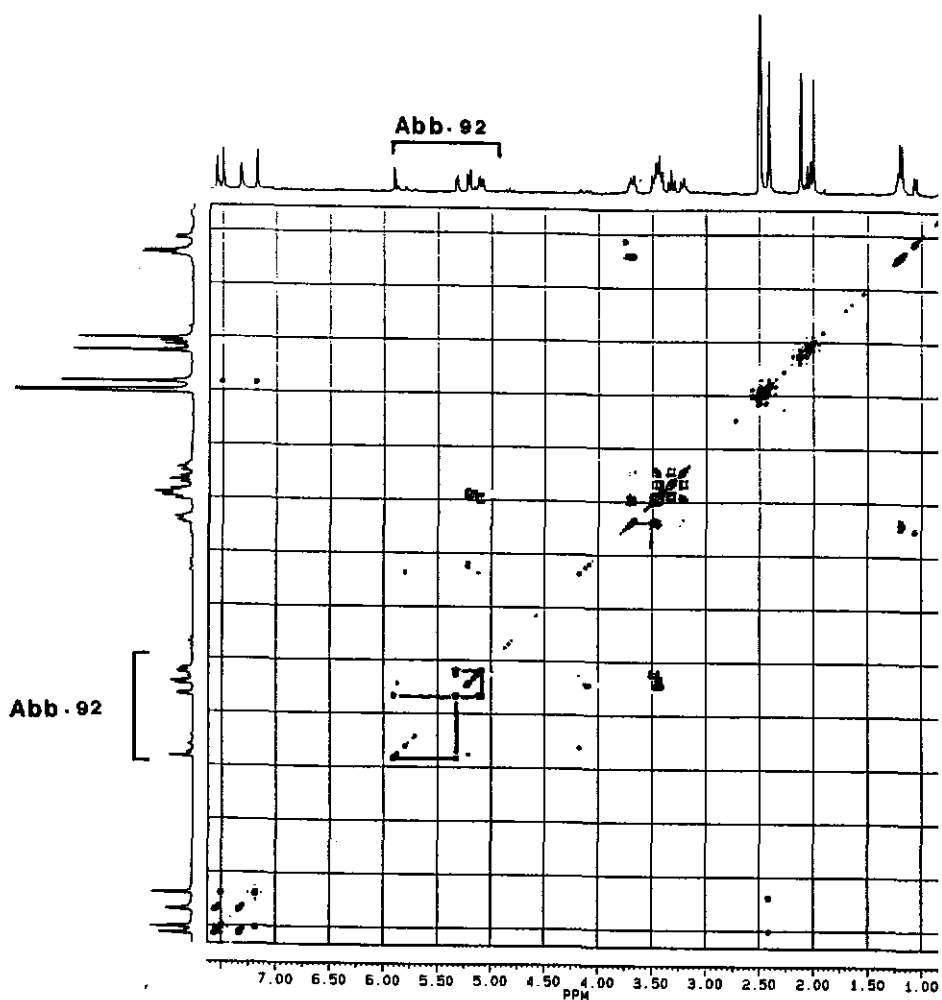


Abb. 91 : H,H-COSY-NMR-Spektrum von EI in DMSO-d<sub>6</sub>  
(Austausch CF<sub>3</sub>COOD)

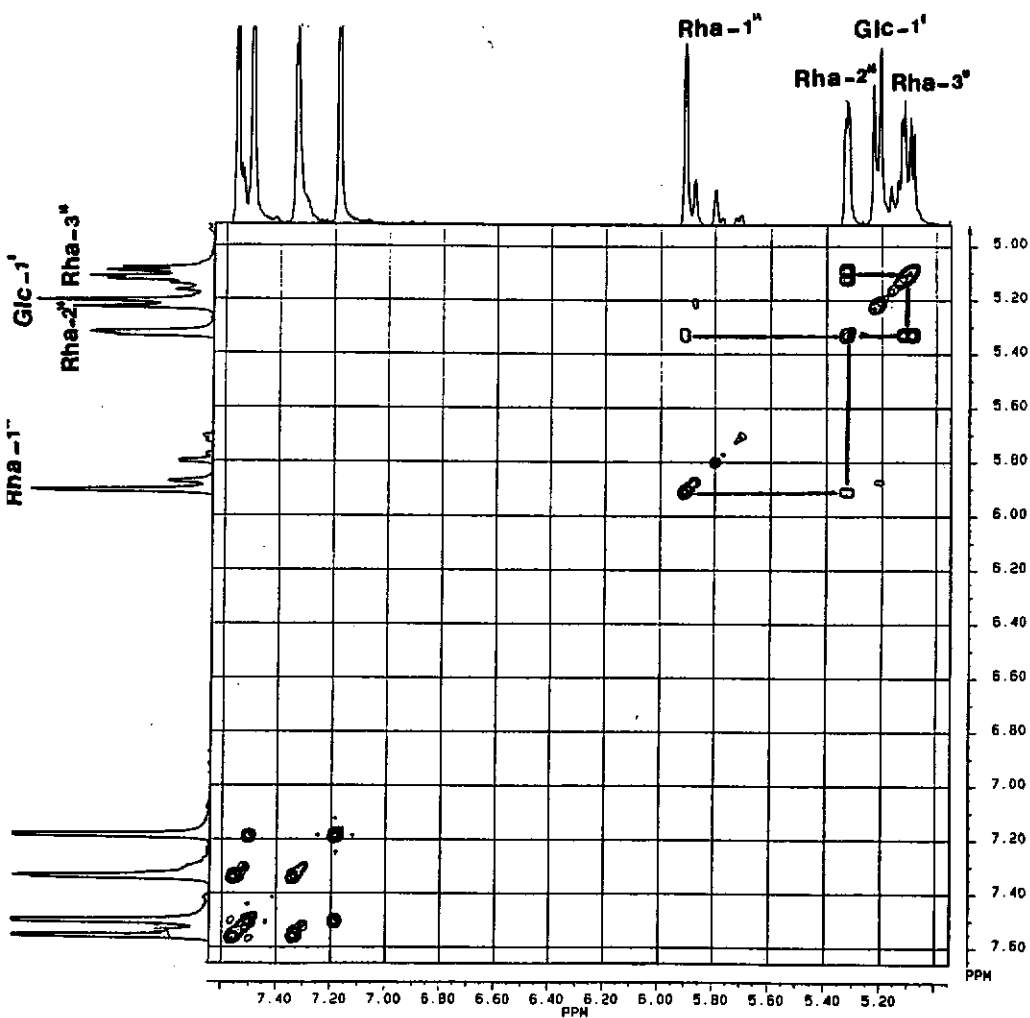


Abb. 92 :  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von E1 in  $\text{DMSO}-d_6$   
(Austausch  $\text{CF}_3\text{COOD}$ ) Ausschnitt 5,20-7,40 ppm.

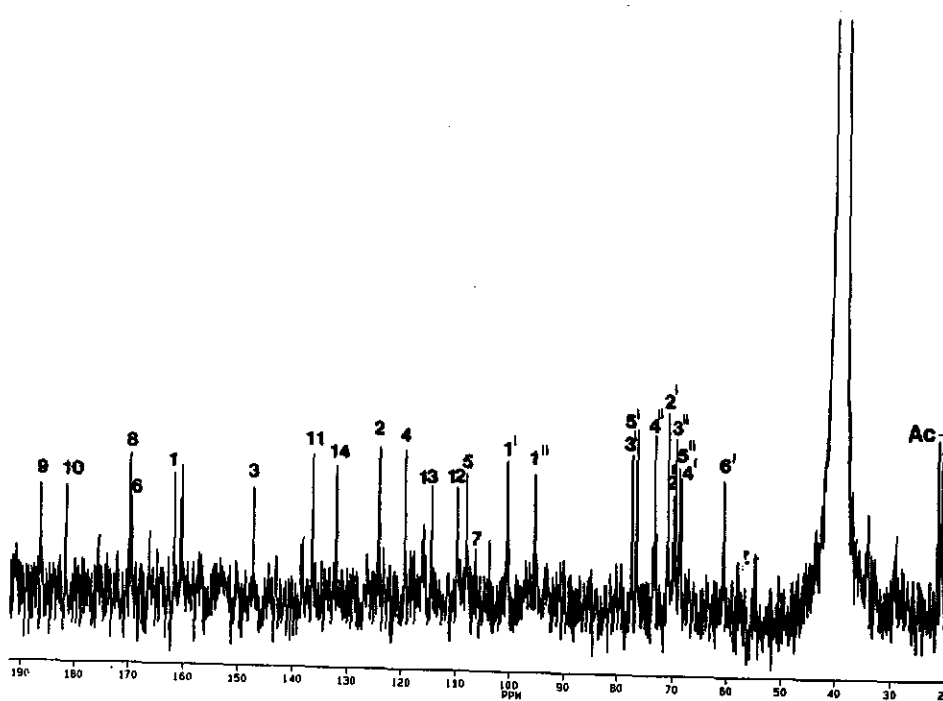


Abb. 93 :  $^{13}\text{C}$ -NMR-Aufnahme von E1 in  $\text{DMSO-d}_6$

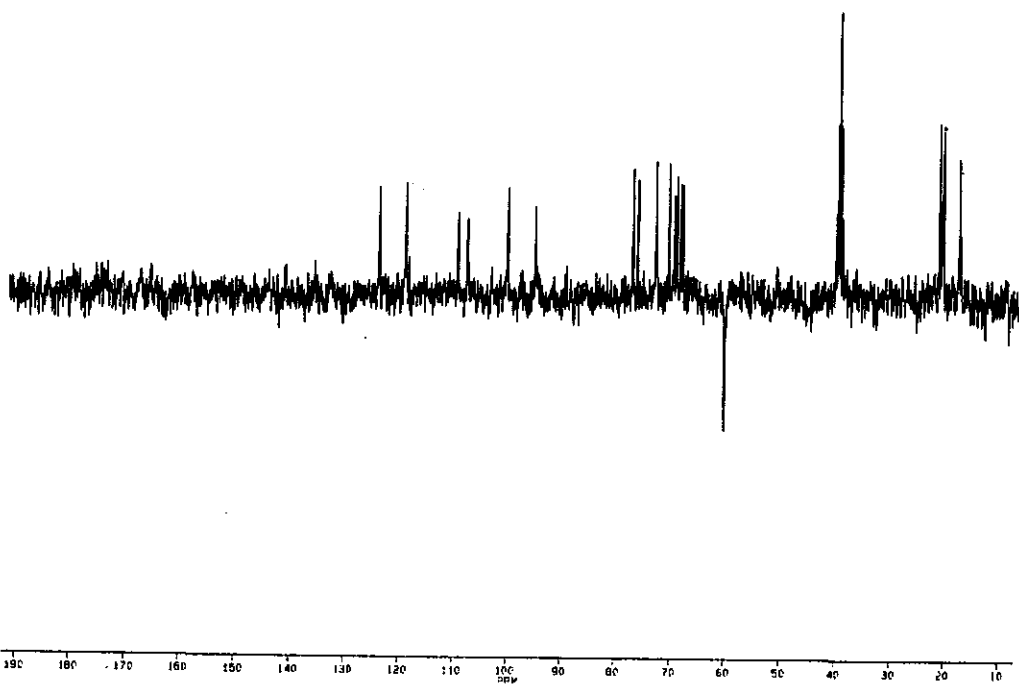


Abb. 94 :  $^{13}\text{C}$ -NMR-DEPT-Spektrum von E1 in  $\text{DMSO-d}_6$

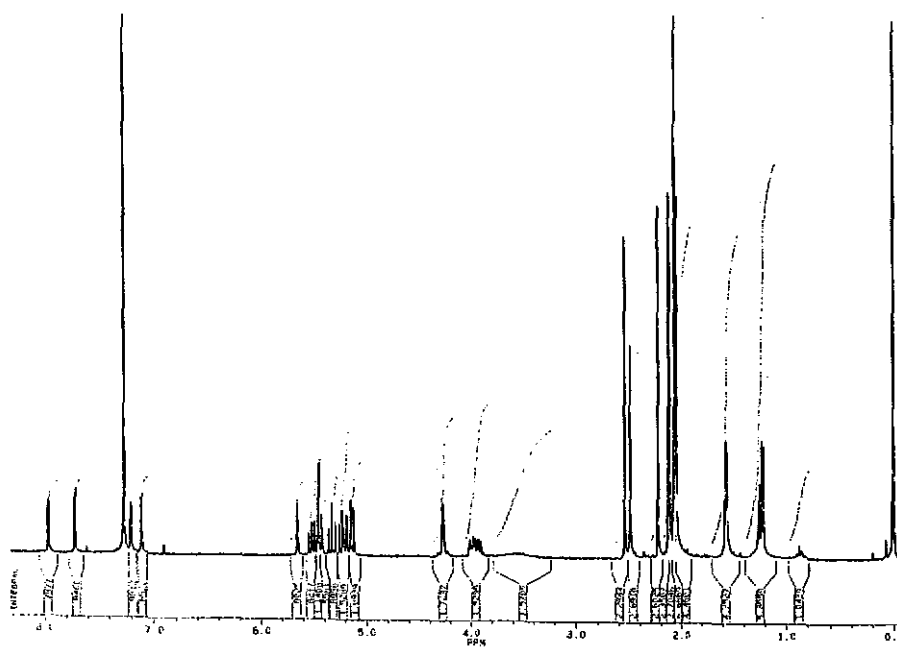


Abb. 95 :  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der acetylierten Verbindung E1  
(in  $\text{CDCl}_3$ /300 MHz)

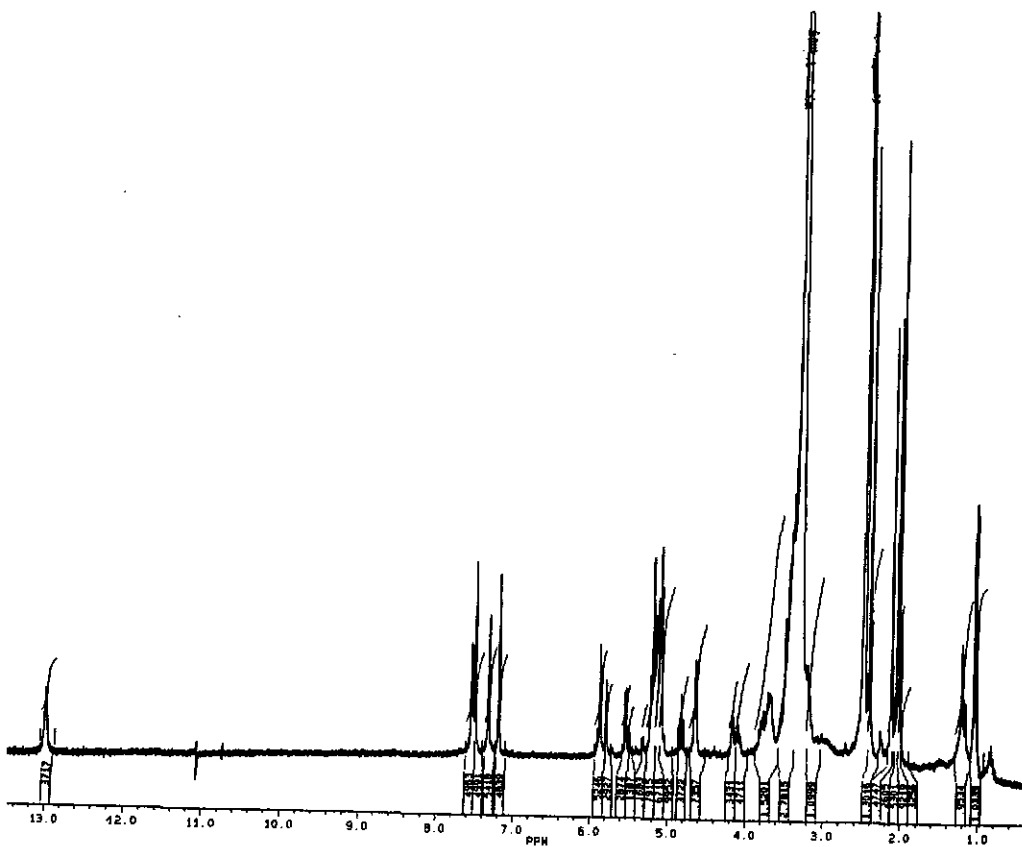


Abb. 96 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von E2 (a und b) in  $\text{DMSO-d}_6$

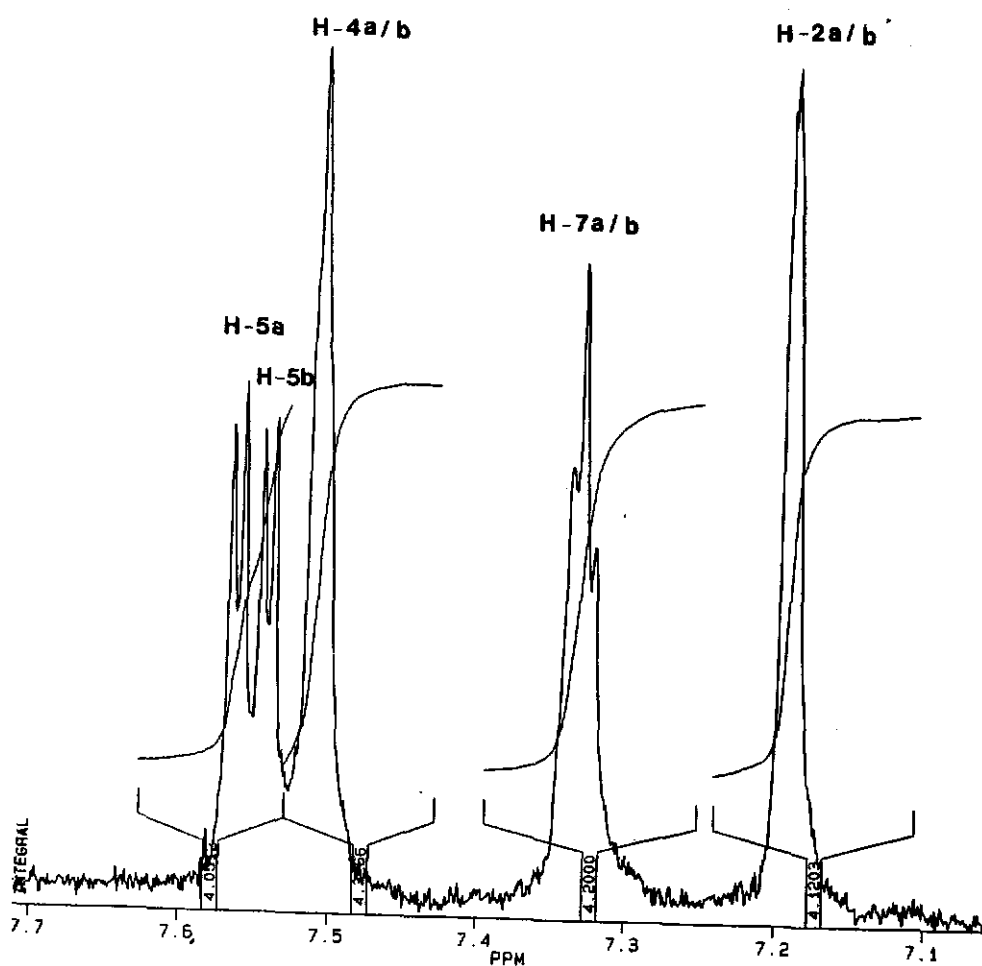


Abb. 97 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von E2 (a und b) in  $\text{DMSO-d}_6$  (Austausch mit  $\text{CF}_3\text{COOD}$ ) Ausschnitt von 7,1-7,5 ppm.

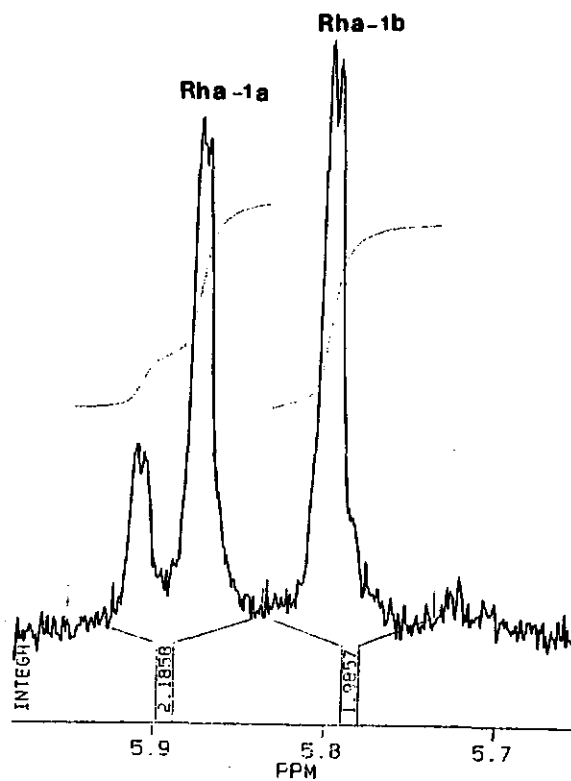


Abb. 98 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von E2 (a und b) in  $\text{DMSO-d}_6$   
(Austausch mit  $\text{CF}_3\text{COOD}$ ) Ausschnitt von 5,7-5,9

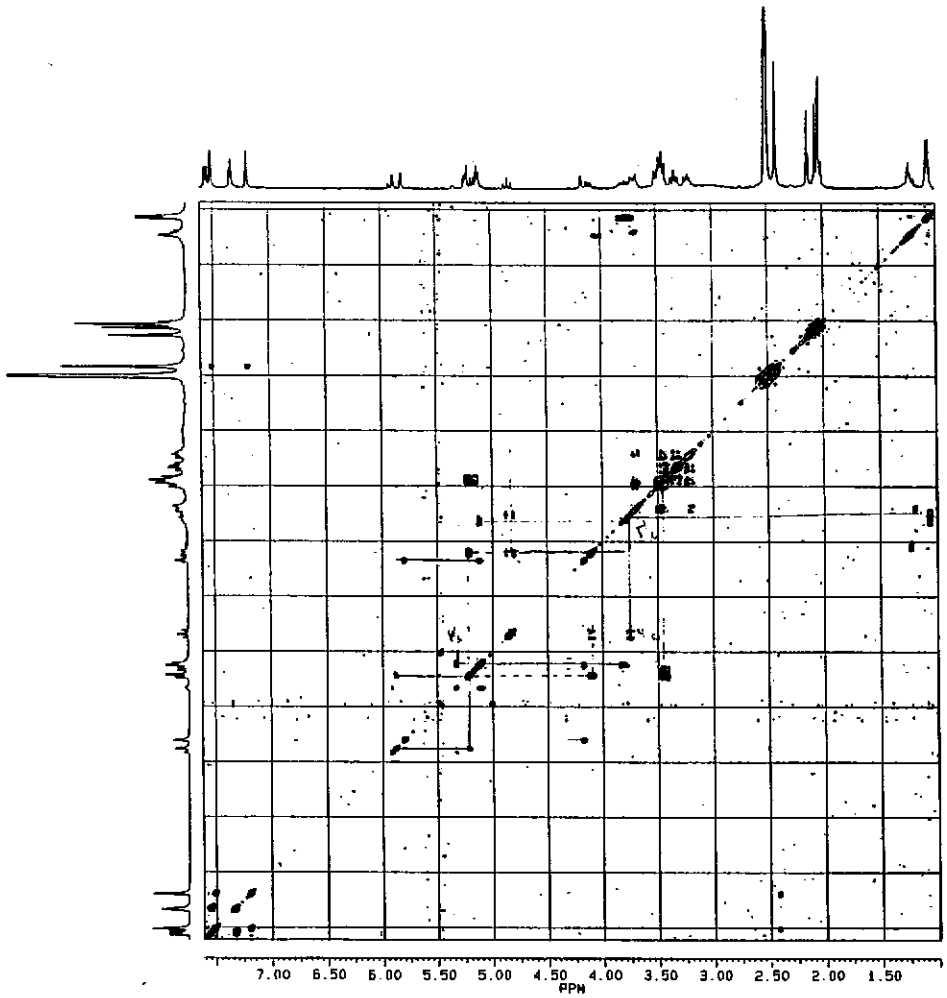


Abb. 99 : H,H-COSY-NMR-Spektrum von E2 (a und b) in DMSO- $d_6$   
(Austausch  $CF_3COOD$ )

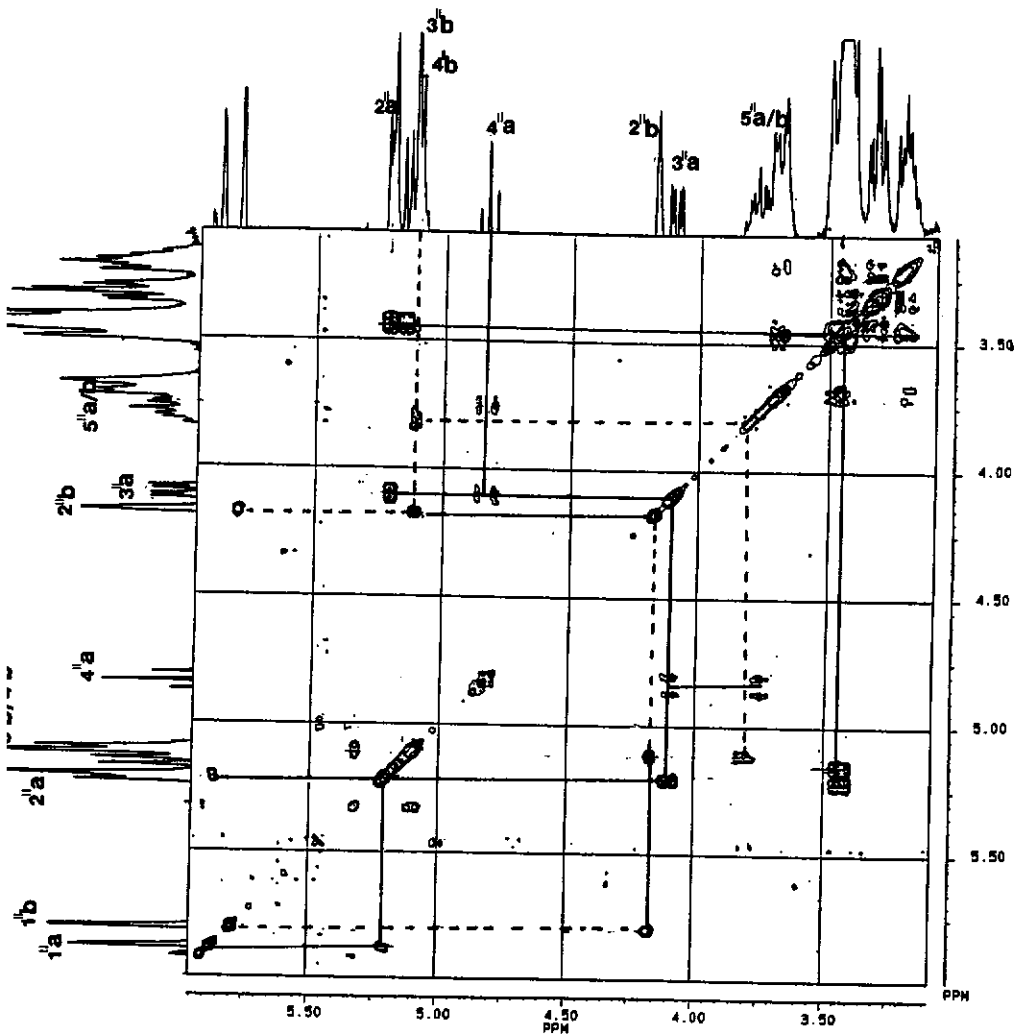


Abb. 100 : H,H-COSY-NMR-Spektrum von E2 (a und b) in DMSO- $d_6$  (Austausch  $CF_3COOD$ ) Ausschnitt 3,50-5,50 ppm. Die beiden Isomeren sind als a und b gekennzeichnet. Der Übersicht wegen sind nur die Rhamnose-Signale beschriftet. a = 2",4"-diacetat, b = 3",4"-diacetat

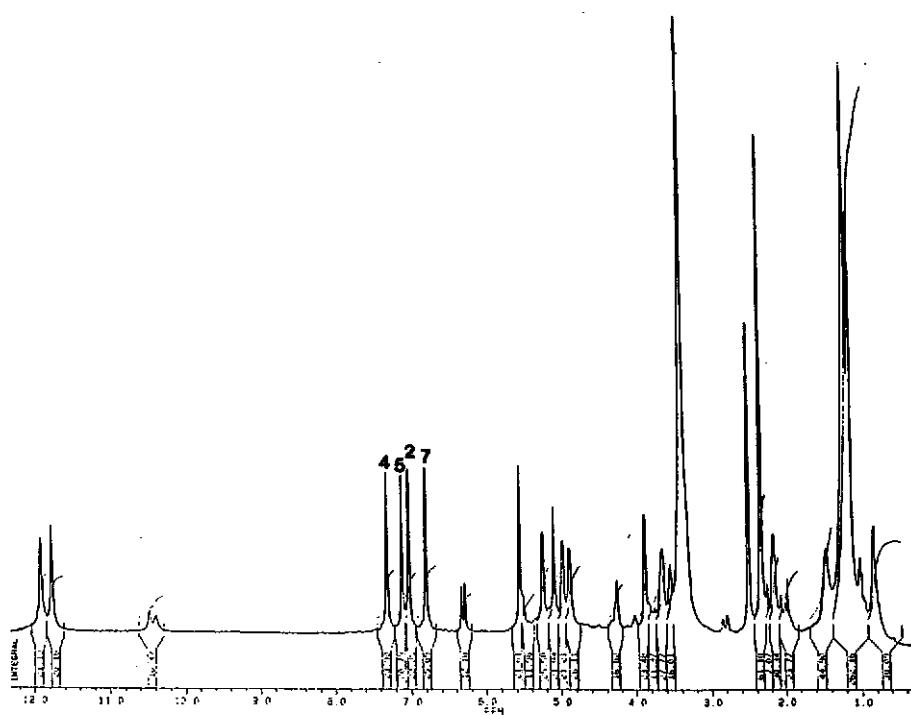


Abb. 101 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Frangulin A in  $\text{DMSO-d}_6$

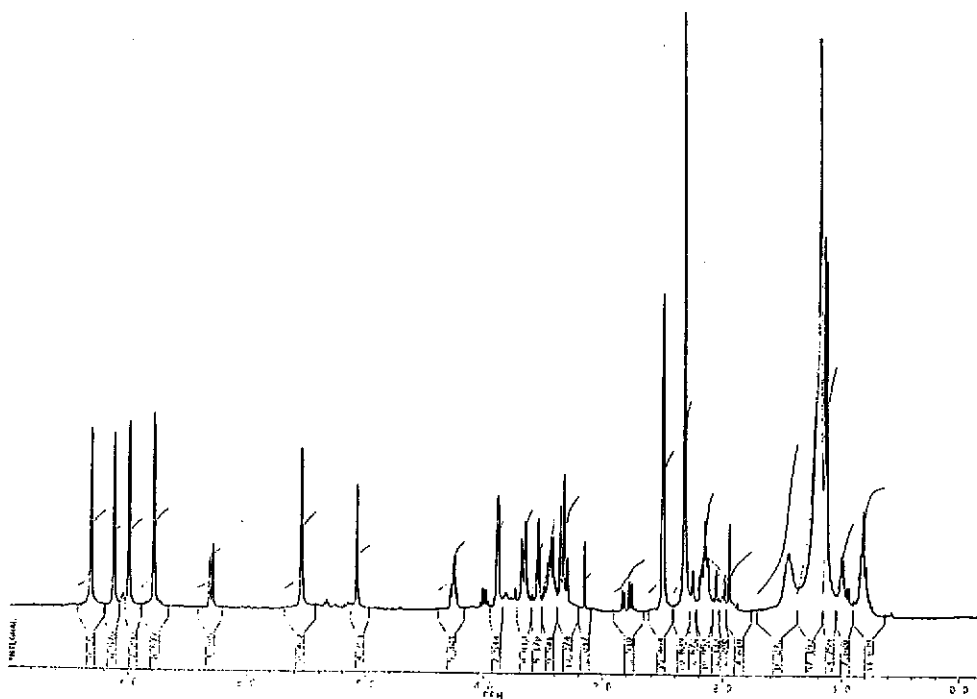


Abb. 102 : 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Frangulin A in  $\text{DMSO-d}_6$   
(Austausch mit  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )

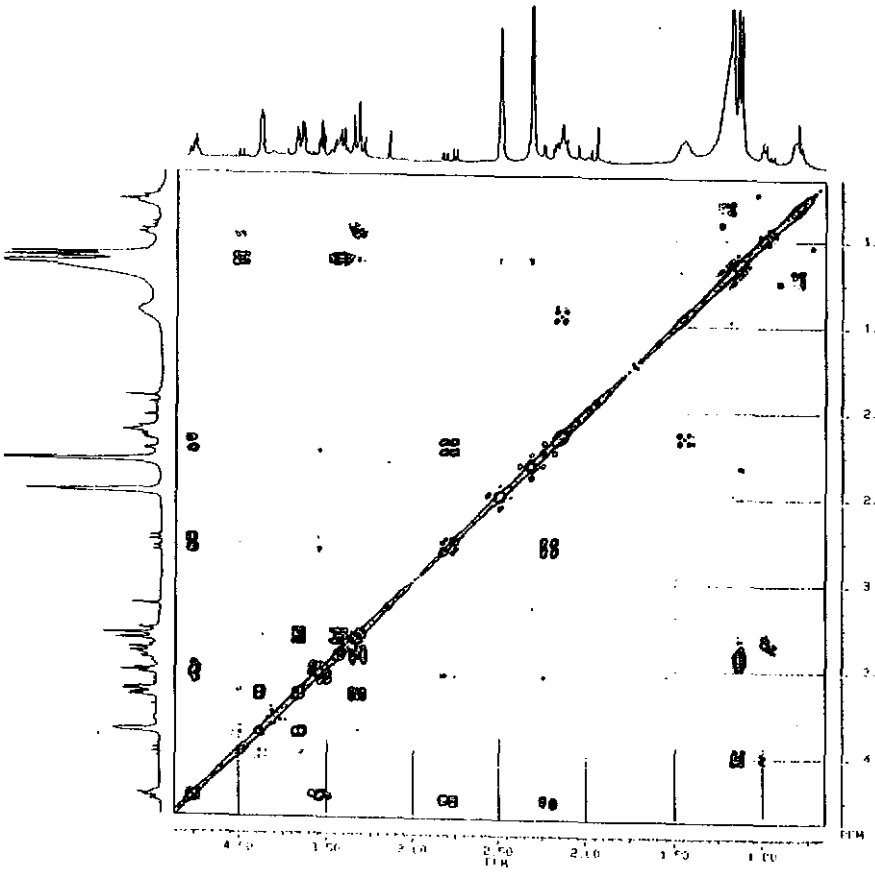


Abb. 103 : H,H-COSY-NMR-Spektrum von Frangulin A in DMSO- $d_6$   
(Austausch  $CF_3COOD$ ) Ausschnitt von 1,00-4,00 ppm.

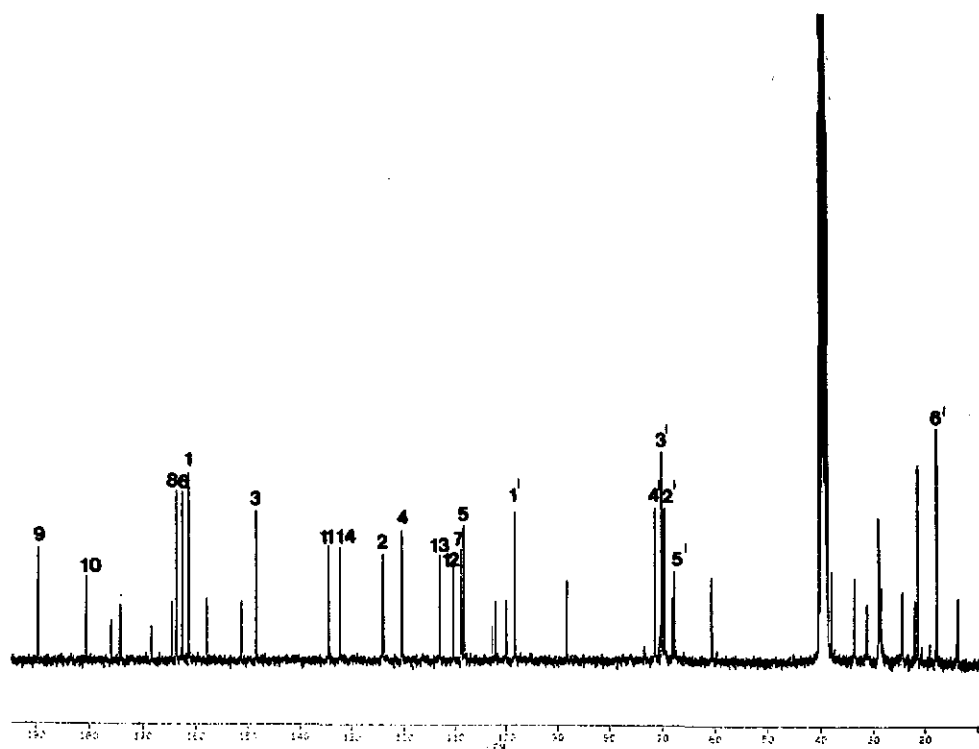


Abb. 104 :  $^{13}\text{C}$ -NMR-Aufnahme von Frangulin A in  $\text{DMSO-d}_6$

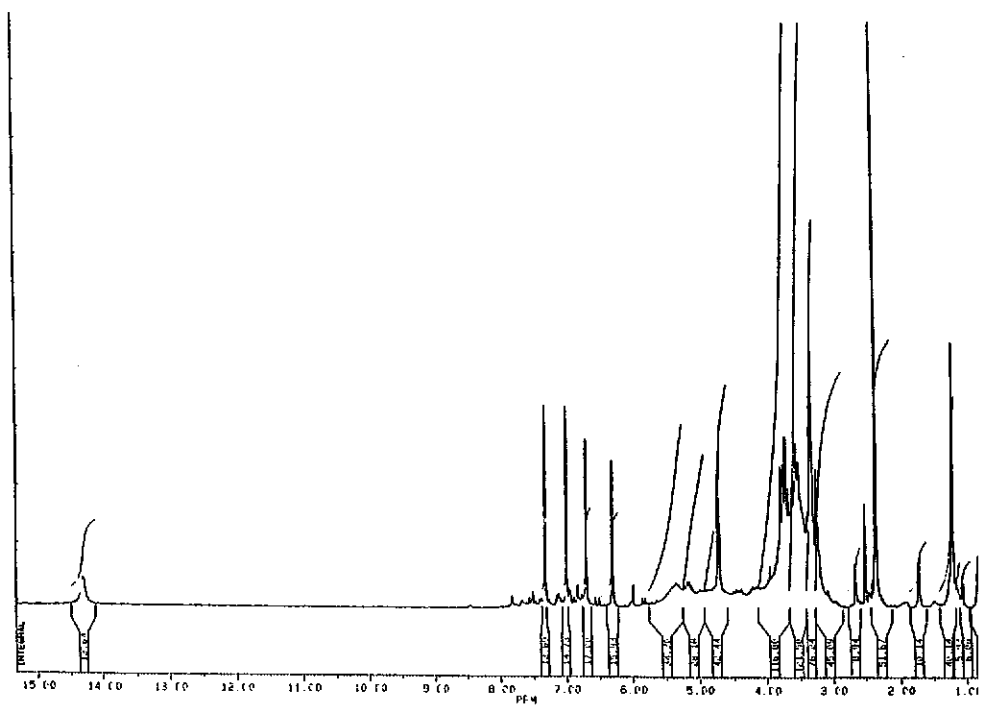


Abb. 105: 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Emodin-8-glucosid in  $\text{DMSO-d}_6$

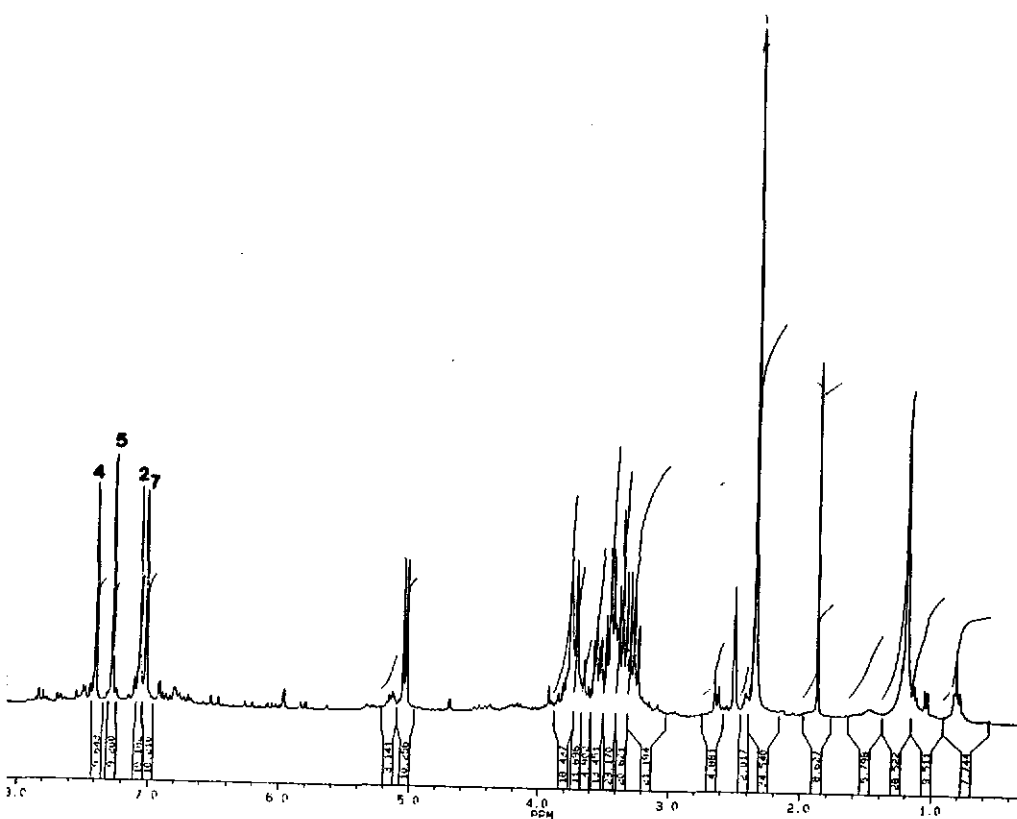


Abb. 106: 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Emodin-8-glucosid in  $\text{DMSO-d}_6$   
(Austausch mit  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )

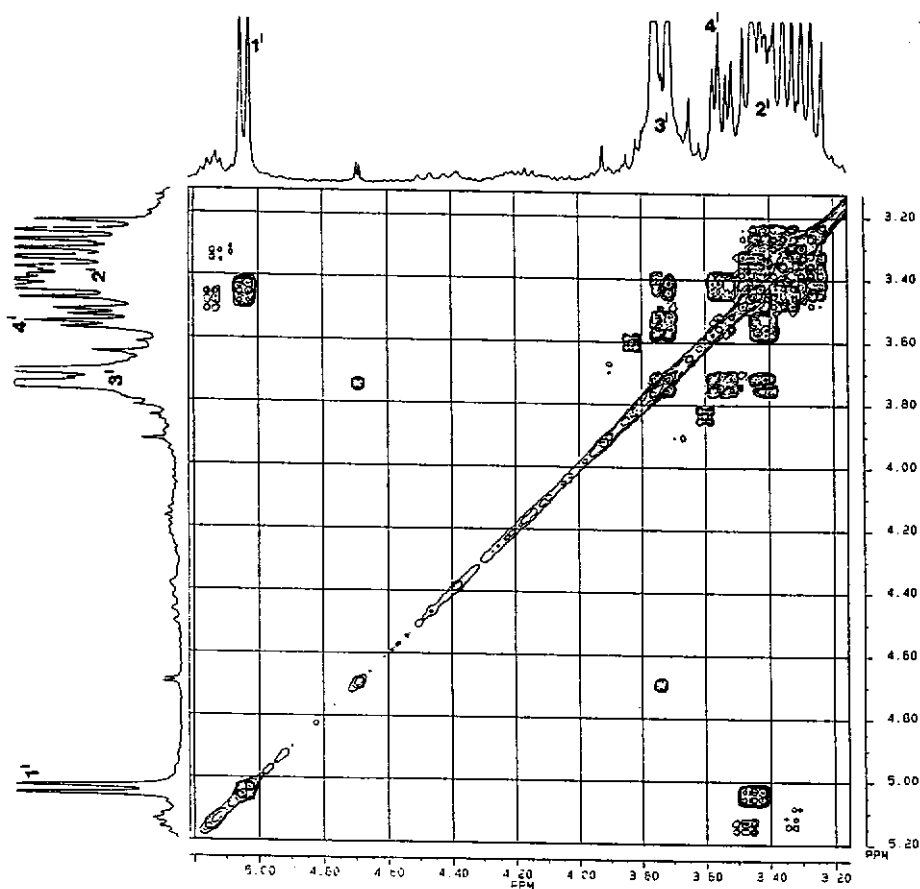


Abb. 107:  $H,H$ -COSY-NMR-Spektrum von Emodin-8-glucosid in  $DMSO-d_6$  (Austausch  $CF_3COOD$ ) Ausschnitt von 3,20–5,00 ppm.

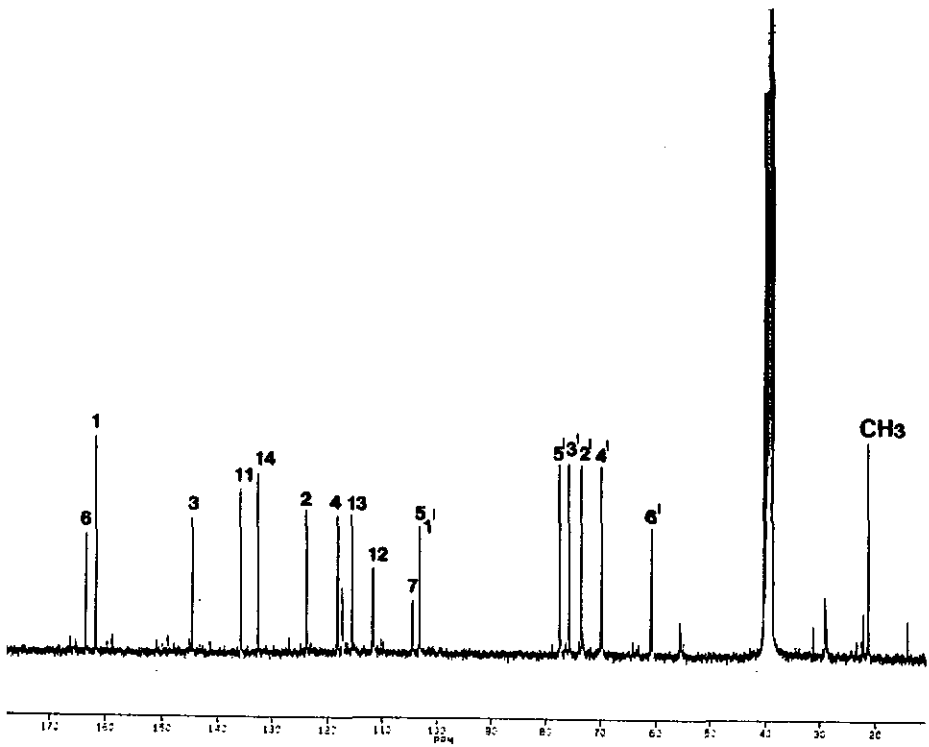
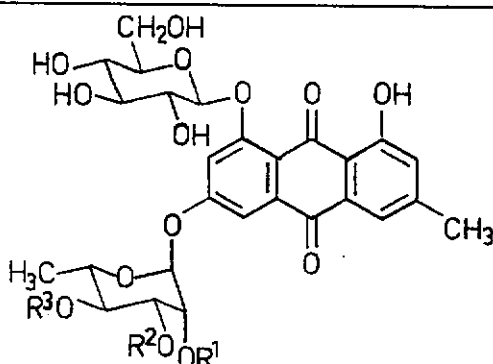


Abb. 108 :  $^{13}\text{C}$ -NMR-Aufnahme von Emodin-8-glucosid in  $\text{DMSO-d}_6$

Tab. 16 :  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Daten von E1 und E2  
in  $\text{DMSO-d}_6/\text{CF}_3\text{COOD}$

| Proton                  | E1 [ppm, J (Hz)]   | E2 (a), (b) [ppm, J(Hz)]      |
|-------------------------|--------------------|-------------------------------|
| OH-1/8                  | 12,95 (s, br, 2H)  | 12,99 (s, br, 2H) (a, b)      |
| H-2                     | 7,19 (s, br)       | 7,19 (s, br) (a, b)           |
| H-4                     | 7,51 (s, br)       | 7,50 (s, br) (a, b)           |
| H-5                     | 7,56 (d, J=2,3)    | 7,56 (d, J=2,3) (a), 7,54 (b) |
| H-7                     | 7,34 (d, J=2,3)    | 7,33 (d, J=2,3) (a), 7,32 (b) |
| H-1"-Rha                | 5,90 (d, J=0,8)    | 5,87 (a), 5,80 (b)            |
| H-2"-Rha                | 5,32 (dd, J=0,8/4) | 5,23 (a)                      |
| H-3"-Rha                | 5,10 (dd, J=4/9)   | 5,12 (b)                      |
| H-4"-Rha                |                    | 4,86 (a), 5,09 (b)            |
| H-1'-Glc                | 5,21 (d, J=7)      | 5,16 (d, J=7)                 |
| 3-CH <sub>3</sub>       | 2,48 (s, 3H)       | 2,41 (s, 3H)                  |
| CH <sub>3</sub> -CO-    | 2,13 (s, 3H)       | 2,13                          |
| CH <sub>3</sub> -CO-    | 2,01 (s, 3H)       | 2,06                          |
| CH <sub>3</sub> -CO-    |                    | 2,04                          |
| CH <sub>3</sub> -CO-    |                    | 2,03                          |
| 6"-CH <sub>3</sub> -Rha | 1,19 (d, J=6)      | 1,06                          |



|                                             |                                                                |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{R}^3=\text{H}$ | GLUKOFRANGULIN A                                               |
| $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{COCH}_3$       | $\text{R}^3=\text{H}$ GLUKOFRANGULIN A-2",3"-DIACETAT (E1)     |
| $\text{R}^1=\text{R}^3=\text{COCH}_3$       | $\text{R}^2=\text{H}$ GLUKOFRANGULIN A-2",4"-DIACETAT [E2 (a)] |
| $\text{R}^2=\text{R}^3=\text{COCH}_3$       | $\text{R}^1=\text{H}$ GLUKOFRANGULIN A-3",4"-DIACETAT [E2 (b)] |

Abb. 109 : Struktur Formeln der E1, E2 (a) und E2 (b)

Tab. 17 :  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopische Daten von E1  
 (\* selbst isolierte Substanzen (zu Abb. 104,108))

| C-Atom               | ppm    | Emodin <sup>89</sup> | Frangulin A <sup>*</sup> | Emodin-8-Gl <sup>*</sup> |
|----------------------|--------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1                    | 161,67 | 161,16               | 161,42                   | 161,74                   |
| 2                    | 123,35 | 124,21               | 124,06                   | 123,71                   |
| 3                    | 147,25 | 146,96               | 148,53                   | 144,43                   |
| 4                    | 119,43 | 119,30               | 120,49                   | 118,18                   |
| 5                    | 108,11 | 108,78               | 108,44                   | 103,22                   |
| 6                    | 169,92 | 164,60               | 163,75                   | 163,59                   |
| 7                    | 106,34 | 108,70               | 108,95                   | 104,44                   |
| 8                    | 170,79 | 161,91               | 162,62                   | 179,23                   |
| 9                    | 186,46 | 186,59               | 189,80                   | 185,97                   |
| 10                   | 181,70 | 182,36               | 180,60                   | 184,48                   |
| 11                   | 136,50 | 136,65               | 134,64                   | 135,71                   |
| 12                   | 109,82 | 114,05               | 110,46                   | 111,73                   |
| 13                   | 114,51 | 114,63               | 113,12                   | 117,38                   |
| 14                   | 132,02 | 132,28               | 132,47                   | 132,48                   |
|                      |        |                      |                          |                          |
| Glc-1                | 100,53 | Rha-1                | 98,46                    | Glc-1 101,14             |
| Glc-2                | 71,57  | Rha-2                | 70,21                    | Glc-2 73,28              |
| Glc-3                | 78,56  | Rha-3                | 69,74                    | Glc-3 75,29              |
| Glc-4                | 68,82  | Rha-4                | 71,55                    | Glc-4 69,76              |
| Glc-5                | 77,31  | Rha-5                | 68,11                    | Glc-5 77,49              |
| Glc-6                | 60,54  | Rha-CH <sub>3</sub>  | 17,89                    | Glc-6 60,75              |
|                      |        |                      |                          |                          |
| Rha-1                | 95,39  |                      |                          |                          |
| Rha-2                | 70,92  |                      |                          |                          |
| Rha-3                | 69,92  |                      |                          |                          |
| Rha-4                | 73,29  |                      |                          |                          |
| Rha-5                | 69,47  |                      |                          |                          |
| Rha-CH <sub>3</sub>  | 17,64  |                      |                          |                          |
| 3-Me                 | 21,39  | 21,22                | 21,50                    | 21,27                    |
| CH <sub>3</sub> -CO- | 20,70  |                      |                          |                          |
| CH <sub>3</sub> -CO- | 20,60  |                      |                          |                          |

#### 4. Zusammenfassung und Diskussion

1. Im Zuge der vorliegenden Untersuchungen ist es erstmals gelungen, die Primärglykoside der frischen Faulbaumrinde eindeutig zu bestimmen. Mit Hilfe einer Kombination aus MPLC und Sephadex LH-20 SC gelang es, die beiden labilen Substanzen Glukofrangulinanthron A und Glukofrangulinanthron B präparativ zu trennen und in ihrer Struktur zu charakterisieren. Eine HPLC-Analyse von frischer Faulbaumrinde verschiedener Herkünfte zeigte außerdem, daß die dimeren Dehydrierungsprodukte der Glukofrangulinanthrone, die Glukofrangulinbianthronglykoside A und B, auf keinen Fall als Primärglykoside angesehen werden können, sondern eindeutig als Isolierungs-Artefakte zu kennzeichnen sind. Die Frangulinanthrone A und B, in der einschlägigen Literatur auch oft mit der historischen Bezeichnung "Frangularosid" belegt, können ebenfalls mit Sicherheit als Primärglykoside ausgeschlossen werden. Ein Nachweis in der frisch gesammelten Faulbaumrinde ist ebenfalls nicht sicher; diese Hydrolyseprodukte der Gluko-frangulinanthrone A und B werden nur beim Betrachten des Anthranoidspektrums während einer gesamten Vegetationsperiode beobachtet (vgl.2).

2. Um einen optimalen Erntezeitpunkt für die Faulbaumrinde zu ermitteln und um das Anthranoidspektrum der frischen Faulbaumrinde von verschiedenen Standorten vergleichend betrachten zu können, wurde eine HPLC-Analyse der reduzierten und oxidierten Anthranoidformen der frischen Faulbaumrinde über eine gesamte Vegetationsperiode durchgeführt. Es zeigte sich, daß die wertvollen Glukofrangulinanthrone A und B den höchsten Gehalt in den Monaten Mai und Juni aufwiesen. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu den bisher gültigen Literaturangaben, wonach in den Wintermonaten, insbesondere im Januar, der höchste Glykosidgehalt vorliegen sollte. Deutliche Unterschiede konnten bei den drei Faulbäumen auch in den Mengenverhältnissen zwischen den Glukofrangulinanthronen A und B festgestellt werden. Ebenso zeigten die monatlich ermittelten Analysenwerte keine augenfälligen Übereinstimmungen in den jeweiligen Gehalten der Glykoside.

---

Ein überraschender Befund bei diesen Untersuchungen ist die Tatsache, daß in einigen Monaten (September, Oktober) auch die oxidierten Formen der Glukofrangulinanthrone in der frischen Rinde eindeutig nachgewiesen werden konnten wie auch, allerdings in geringerer Konzentration, die korrespondierenden Franguline. Da das Extraktionsverfahren äußerst schnell und schonend entwickelt worden war, wird mit dieser Untersuchung klar aufgezeigt, daß die Oxidation in der pflanzlichen Zelle auch unter physiologischen Bedingungen, also mit Hilfe von Oxidasen, stattfinden sollte. Inzwischen konnte diese These in einer Dissertationsarbeit von Langwieder, Freie Universität Berlin, (in Kooperation mit Prof. Rauwald) mit Hilfe eines Peroxidase-Enzymsystems weiter verifiziert werden. Gleichzeitig ist damit die Meinung verschiedener Autoren widerlegt, die das Vorliegen oxidierter Formen in der frischen Rinde lediglich auf den Mangel von geeigneten Extraktionsmethoden zurückführen. Darüberhinaus bestätigt die Untersuchung über eine Vegetationsperiode den unter 1. beschriebenen Befund, daß die Bianthronglykoside in pflanzenphysiologischer Hinsicht in der Faulbaumrinde als Oxidationsprodukte keine Rolle spielen; dies im Gegensatz beispielsweise zu den Sennosiden, die sich ebenfalls von Anthronglykosiden ableiten.

3. Im Rahmen des dc Nachweises der Anthrone gemäß DAB 9/Ph. Eur. konnte ein Ersatz für das toxische NDA-Reagenz gefunden werden. Von 26 geprüften Reagenzien erwies sich NBT als ein spezifisches und selektives Reagenz, mit dem die Anthrone sicher erfaßt werden können. Inzwischen hat dieses Reagenz bereits Eingang in die laufenden phytochemischen Praktika gefunden. Zudem wurde von der Europäischen Arzneibuchkommission es als Ersatz für das Nitrosodimethylanilin/Pyridin vorgeschlagen.

4. Eine Reihe von Handelschargen von *Rhamni frangulae cortex* wiesen trotz einjähriger Lagerung wie es das Arzneibuch vorschreibt immer noch einen unzulässigen Gehalt an Anthronderivaten auf. In Zusammenarbeit mit dem Zentrallaboratorium

Deutscher Apotheker wurde im Rahmen dieser Arbeit eine HPLC-Analytik mittels Photodiodenarray-Detektion entwickelt, bei der die reduzierten und oxidierten Formen gleichzeitig erfaßt und bestimmt werden. Dabei zeigte sich überraschenderweise, daß die unerwünschten Glukofrangulinanthrone A und B zu ca. 7 % in der Droge vorlagen, während die wertvollen Glukofranguline A und B lediglich in Mengen um 2 bis 3 % nachgewiesen werden konnten.

5. Da eine Untersuchung der Anthranoid-Zusammensetzung der Faulbaumrinde während einer einjährigen Lagerung den zeitlichen Rahmen der vorliegenden Dissertation gesprengt hätte, wurde zunächst die alternative Arzneibuch-Vorschrift zur Umwandlung der reduzierten Glukofrangulinanthrone in die wertvollen Glukofranguline untersucht, nämlich ein einstündiges Erhitzen frischer Rinde bei 100°C. Die Untersuchung war so angelegt, daß sowohl ein einmaliges Erhitzen bei 100°C getestet wurde als auch die Umwandlung der Glukofrangulinanthrone im Verlauf eines Temperaturgradienten, ausgehend von 20 bis zu 100°C. Dabei konnten einige überraschende Ergebnisse erzielt werden, die diese DAB 9-Vorschrift stark in Frage stellen: Bei direktem Erhitzen bei 100°C werden aus den Glukofrangulinanthronen überhaupt keine Glukofranguline gebildet, während die Hydrolyseprodukte (!), die Frangulinanthrone A und B, mengenmäßig deutlich ansteigen. Dieser Befund stimmt völlig überein mit den vergleichbaren Experimenten an frischen Faulbaumblättern von LEMLI: Dabei konnten ebenfalls Frangulinanthrone als Hauptumwandlungsprodukte bei 100°C nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen an den Faulbaumblättern bleiben bei der Faulbaumrinde jedoch die Glukofrangulinanthrone zum größten Teil erhalten, die in den frischen Faulbaumblättern komplett abgebaut wurden. Ein weiterer überraschender Befund im mittleren Temperaturbereich zwischen 40 und 60°C ist die Tatsache, daß die Glukofrangulinanthrone in ihrer Konzentration ansteigen(!). Diese Beobachtung ist ebenfalls in der Literatur der sechziger Jahre in einer Untersuchung von CUCU und Mitarb. beschrieben, allerdings später mehrfach angezweifelt worden. Sie führten dieses Phänomen auf das Vorliegen einer

---

pflanzeneigenen Reduktase zurück. Insgesamt bleibt festzuhalten, daß bei den untersuchten Temperaturen eine signifikante Umwandlung der Glukofrangulinanthrone zu den Glukofrangulinen nicht zu beobachten ist. Im Gegenteil, bei allen drei verschiedenen Faulbaumrinden konnten überhaupt keine nennenswerten Mengen dieser erwünschten Inhaltsstoffe nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigten eindeutig, daß die Arzneibuchvorschrift nicht nur in Frage zu stellen, sondern zu revidieren ist.

6. Die Rinde von *Rhamnus fallax* wird heutzutage noch als Abführdroge in den Balkanländern therapeutisch verwendet. Demgegenüber steht ihre Einstufung als minderwertige Anthranoiddroge in den offizinellen Arzneibüchern, DAB 9/Ph. Eur., wo sie gegenüber den Faulbaumrinden (*Rhamnus frangula*, *Rhamnus purshianus*) als Verwechslung oder Verfälschung beschrieben wird. Orientierende Vorversuche zur quantitativen Gehaltsbestimmung der Anthrachinonglykoside zeigten Gehalte von 4 bis 5 %, berechnet als Glukofrangulin A. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe einer neu entwickelten HPLC-Gradienten-Elution die Hauptanthrachinon-glykoside einzeln quantitativ bestimmt. Dabei ergaben sich Gesamtgehalte zwischen 6 bis 7 % Emodinglykoside. Die ebenfalls erstmalig durchgeführten Reihenuntersuchungen an verschiedenen *Rhamnus frangula*-Mustern ergaben die gleichen Gesamtgehalte wie bei der Fallaxrinde. Die Unterschiede zwischen beiden Rinden liegen nur in der Quantität der Glukofranguline A und B, die die erwartungsgemäß dominanten Glykoside der offizinellen *Rhamnus frangula* Droge darstellen. Diese liegen in der Fallaxrinde in deutlich geringerer Konzentration vor; dafür ist Physcion-8-rutinosid das mengenmäßig vorherrschende Hauptglykosid in allen untersuchten *Rhamnus fallax*-Chargen. Die vorliegende Untersuchung belegt erstmals, daß es vom analytischen Standpunkt aus keine Anhaltspunkte dafür gibt, daß die Fallaxrinde als minderwertig im Vergleich zu den offizinellen Faulbaumrinden eingestuft wird. In der Literatur liegen keine pharmakologischen Daten darüber vor, inwieweit sich Anthranoide vom Bis-O-glykosid-Typ (Glukofranguline) von Anthraglykosiden des

Diglykosid-Typs (Physcion-8-rutinosid) in ihrem laxativen Effekt unterscheiden. Ebenfalls können der Literatur keine Daten zu toxikologischen Wirkungsunterschieden zwischen beiden Rindendrogen entnommen werden.

7. "Xanthorhamnin" ein Gemisch zweier Flavonoltriglykoside, wird als analytischer Leitstoff der Fallaxrinde herangezogen. [Das Arzneibuch verwendet an dessen Stelle das Anthrachinonderivat Rhamnalpinosid (vgl. 3.2.3), das nach kürzlichen Untersuchungen im Arbeitskreis nicht als Leitstoff geeignet ist]. Das mit Hilfe der präparativen DC und SC isolierte "Xanthorhamnin" wurde mit Hilfe der  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie in seiner Konstitution aufgeklärt. Dabei wurde überraschenderweise festgestellt, daß die in der Literatur angegebene Aglykon-Komponente nicht vorliegt. Die Strukturrevision führt zu Kämpferol und 7-O-Methyl-Kämpferol als Aglykonkomponenten, an die jeweils zweimal Galaktose und Rhamnose in Form eines Trisaccharids, nämlich der Rhamninoose, geknüpft sind. Eine HPLC-Bestimmung der beiden Flavonoltriglykoside ergab ein Verhältnis zwischen Kämpferol- und 7-O-Methyl-Kämpferol-Glykosiden von 9 zu 1.

8. Für die Kreuzdornbeeren von *Rhamnus catharticus* liegen in der Literatur verschiedenartige Angaben zum quantitativen Gehalt der Anthraglykoside vor. In der vorliegenden Arbeit konnten die Angaben der Standardzulassung bestätigt werden, wonach mindestens 4 bis ca. 6 % an Anthraglykosiden in der Droge ermittelt werden können. Wie eingangs erwähnt, bestand bezüglich des Inhaltsstoffspektrums weitgehend Unklarheit. Bei der Isolierung der Glykoside war es notwendig, den hohen Anteil an Flavonolglykosiden, der die Droge charakterisiert, durch Mehrfach-SC vorher abzutrennen. Mit Hilfe einer neu entwickelten LPLC-Methode an RP-18-Kieselgel-Material gelang es, 7 Anthrachinonglykoside rein darzustellen. Alle weisen Frangulaemodin als Aglykonkomponente auf. Mit dem neuen Frangulin C, Emodin-6- $\beta$ -D-xylopyranosid, wurde ein weiteres Emodinpentosid aufgefunden. Erstmals in den Beeren wurde Emodin-8-glucosid aufgefunden, das in

sämtlichen bisher im Arbeitskreis untersuchten Rhamnus-Arten nachgewiesen werden konnte. Zwei weitere Glykoside wurden als Glukofrangulin A und Frangulin A identifiziert. Festzuhalten ist, daß Glukofrangulin B und Frangulin B, beide mit Apiose als Zuckerkomponente, in *Rhamnus catharticus* nicht vorkommen. Der wertvollste und überraschendste Befund war die Isolierung dreier isomerer Glukofrangulin A-diacetate, nämlich 2",3" und 2",4" sowie 3",4", von denen eines rein dargestellt wurde, während die beiden übrigen im Gemisch identifiziert wurden. Die Zuordnung der beiden Acetylgruppen zu den Rhamnose-Hydroxylen, also die Bestimmung der verschiedenen Zuckerester, gelang mit Hilfe der zweidimensionalen H,H-COSY-Technik. Die Acetylgruppen bewirken am jeweiligen Proton des Kohlenstoffs, an dem die Substitution erfolgt, eine charakteristische, signifikante Tieffeld-Verschiebung der entsprechenden Signale, so daß die Festlegung der Stellung des Estersubstituenten, ausgehend von dem Signal des anomeren Protons, eindeutig gelingt. Im Bereich der Anthrachinon-O-Glykoside ist mit diesem Befund erstmals die Essigsäure als Acylierungskomponente in Zuckerresten aufgefunden worden. Bislang war sie nur in Anthron-C-Glykosylen, nämlich in den 7-OH-Aloin-acetaten, in entsprechender Funktion kürzlich in unserem Arbeitskreis nachgewiesen worden. Nicht nur aus chemotaxonomischer Sicht stellt dieses Ergebnis einen interessanten Befund dar. Vielmehr wird auch in pflanzenphysiologischer Sicht wiederum die Frage nach den tatsächlichen Primärglykosiden auch bei der Faulbaumrinde neu aufgeworfen.

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1 Herkunft des Pflanzenmaterials

#### 5.1.1 Rhamnus frangula

Für die Isolierung der Glukofrangulinanthrone und Glukofrangulinbianthrone wurde frisch geerntete Faulbaumrinde im Mai 1987 aus Buch im Hunsrück direkt von der Firma Hego bezogen und unmittelbar nach dem Sammeln selbst sofort ins Institut gebracht und tiefgefroren.

Für die HPLC-Untersuchungen zu 3.1.6 und 3.1.9 wurde frische Faulbaumrinde Ende Januar 1990 im Botanischen Garten, Frankfurt/M. gesammelt.

Für die Untersuchungen zur Vegetationsperiode (siehe 3.1.7) des Faulbaums wurde frische Rinde ab August 1988 bis August 1989 jeden Monat im Botanischen Garten der Universität Frankfurt/M., gesammelt.

Für die HPLC-Analytik der reduzierten und oxidierten Glykoside nicht-arzneibuchkonformer Frangulae Cortex- Handelsdrogen wurde entsprechende Handelsware vom Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker in Eschborn bezogen.

#### 5.1.2 Rhamnus fallax

Von Rhamni fallacis Cortex wurden drei verschiedene Chargen über den Drogenhandel bezogen.

---

### 5.1.3 Rhamnus catharticus

Für die Isolierung der neuen Anthrachinonglykoside (siehe 3.3.4) wurden reife getrocknete Kreuzdornbeeren der Firma Klenk, Schweinfurt, bezogen.

## 5.2 Chemikalien, Lösungsmittel, Vergleichssubstanzen, Drogenextrakte

### 5.2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, p.a. Qualität, Merck-Darmstadt.

#### 5.2.1.1 Sprühreagenzien, siehe 5.4.1:

3,5-Dinitrobenzoesäure; 4-Dimethylaminobenzaldehyd; Xanthydrol; Pikrinsäure; Echtblausalz  $B=[4,4'\text{-Bis}(-2\text{-Methoxybenzoldiazonium-chlorid})]$ ; 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC); Reagenz nach Folin-Ciocalteaus; Dichlorchinonchlorimid (DCC); Vanillin; Kaliumpermanganat; Dibromchinonchlorimid; Natriummetaperiodat; Molybdatophosphorsäure; Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), Fluka Chemie AG, CH., Buchs; Tetrazolblau (Blautetrazolium); Selenige Säure; Anisaldehyd; Naturstoffreagenz (Diphenylborinsäure-ethanolaminkomplex 98%), Aldrich-Chemie Steinheim; 2,6-Dichlorphenolindophenol-Natrium; Natriumhydroxid; Kaliumhydroxid; Eisen-3-chlorid; 4-Nitrosodimethylanilin, Fa. Schuchardt, München; Naphtochinon-(1,2)-sulfonsäure-(4), purum p.a.>97% Qualität, Fluka Chemika.

### 5.2.1.2 Sonstige Chemikalien

Natriumdithionat, Natriumcarbonat, Bariumcarbonat, D(+)-Xylose, D(+)-Glukose-Monohydrat, L(+)-Rhamnose-Monohydrat, Arabinose, Galaktose,  $\beta$ -Glucosidase (sweet almonds, 12 U/mg, Molekulargewicht: 135000, lyophil salt-free, Fa. Serva, Heidelberg), Salpetersäure, Essigsäure, Rotipuran Qualität, Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Schwefelsäure, Ameisensäure, o-Phosphorsäure, Salzsäure, Pyridin, Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Essigsäureanhydrid.

### 5.2.2 Lösungsmittel

Methanol, Ethanol, Chloroform, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether, Petrolether, Cyclohexan, Ethylformiat, n-Propanol, Isopropanol, Merck-Darmstadt.

### 5.2.3 Vergleichs- und Referenzsubstanzen

Franguline A/B: Qualität Rotichrom von der Firma Carl Roth  
Glukofranguline A und B, Emodin- $\beta$ -glucosid, Physcion- $\beta$ -rutinosid, Xanthorhamnine, Glukofrangulinanthrone A und B sowie die Fraktion der Glukofrangulinbianthronglykoside wurden selbst isoliert. Emodinanthron und Dithranol wurden selbst hergestellt.  
Als fertige Substanzen wurden verwendet: Emodin, Danthron, Chrysophanol und Chrysophanolanthron, Islandicin, Digitoxypurpon.

Herstellung von Emodinanthron und Dithranol:

5,0 g 1,8-Dihydroxyanthrachinon wurden in 250 ml siedendem Eisessig gelöst und 3 Stunden lang am Rückflußkühler im siedend

gehalten. Während dieser Zeit ließ man aus einem Scheidetrichter durch den Rückflußkühler tropfenweise 125 ml einer 40 %igen Lösung von Zinn(II)-chlorid in 37 %iger Salzsäure zufließen. Beim Erkalten der Lösung kristallisierte das 1,8-Dihydroxyanthron in Form von orangegelben Kristallen aus, die anschließend filtriert und getrocknet wurden.

#### 5.2.4 Drogenextrakte aus dem Handel (Extracta siccata)

"Frangula-Glykosid-Konzentrat 26,24 %", wurde von der Firma Extrakt Chemie, Stadthagen, bezogen.

Fallax-Trockenextrakt (Fallax E. cort.sicc.Me), Ch. B.: 0445100, wurde von der Firma Finzelberg Extrakte, Andernach, bezogen.

### 5.3 Extraktionsmethoden

#### 5.3.1 Rhamnus frangula

##### 5.3.1.1 Extraktionsmethode für die Isolierung der Glukofrangulinanthrone (s. 3.1.3) und Glukofrangulinbianthronglykoside (s. 3.1.4)

400 g frische Faulbaumrinde wurde mehrmals mit je 2 l Methanol, danach mit 2 l 50 %igem Methanol insgesamt zwei Stunden unter Stickstoffbegasung und Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  sowie im Eisbad am Ultraturrax extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur entfernt. Dieser Rohextrakt wurde auch als DC-Vergleich verwendet.

5.3.1.2 Extraktionsmethode für die quantitativen  
HPLC-Untersuchungen zu den Kapiteln 3.1.6,  
3.1.7, 3.1.9

Zu Kapitel 3.1.6:

Je 1000,0 mg frische Faulbaumrinde der Bäume C, D, und E wurden mit 45 ml Methanol am Ultraturrax im Eisbad 5 Minuten schonend extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit sofort dekantiert und im Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt.

Zu Kapitel 3.1.7:

2000,0 mg der frischen Faulbaumrinde wurden mit 80 ml Methanol am Ultraturrax im Eisbad 5 Minuten schonend extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit im Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt.

Zu Kapitel 3.1.9:

Die Rinde von drei verschiedenen Faulbäumen (C,D und E) wurde vor der Extraktion bei 20°C, 40°C, 60°C, 80°C und 100°C eine Stunde lang erhitzt. Je 1000,0 mg Rinde wurden mit 45 ml Methanol am Ultraturrax im Eisbad 5 Minuten schonend extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit sofort dekantiert und im Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt.

5.3.1.3 Extraktionsmethode für die DC- und HPLC-Untersuchungen  
zu den Kapiteln 3.1.8

Für die DC:

Nach Ph. Eur. II: 0,50 g gepulverte Droge werden mit 5 ml Ethanol 70 % (V/V) zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen und Abzentrifugieren wird die überstehende Flüssigkeit sofort dekantiert. Diese Flüssigkeit soll innerhalb von 30 Minuten für die DC verbraucht werden.

Für die HPLC:

200,00 mg der gepulverten Drogen (ZL-1 und ZL-2) wurden mit 40 ml 70 %igem Methanol am Ultraturrax unter Eiskühlung extrahiert. Anschließend wurde zentrifugiert, sofort dekantiert und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur unter Vakuum entfernt.

### 5.3.2 Rhamnus fallax und Rhamnus frangula

#### 5.3.2.1 Extraktionsmethode für die HPLC-Analytik der Frangula- und Fallax- Drogen zu den Kapiteln 3.2

Je 500,00 mg Fallax- und Franguladroge wurden mit 40 ml Ethanol am Ultraturrax extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit dekantiert und im Vakuum zur Trockne eingengt.

#### 5.3.2.2 Extraktionsmethode von Rhamnus fallax Rinde für die Isolierung der Substanzen

250 g Rhamni fallacis Cortex wurde dreimal mit je 2 l Methanol 15 Minuten am Ultraturrax extrahiert. Nach Filtration wurde im Vakuum zur Trockne eingengt. Es resultierten 44 g Rohextrakt.

### 5.3.3 Extraktionsmethode der Kreuzdornbeeren zu den Kapiteln 3.3

500 g pulverisierte Rhamnus catharticus- Früchte wurden mit je 1,5 l Diethylether dreimal 15 Minuten unter Rückfluß erhitzt, dann filtriert und das Filtrat verworfen. Der Filtrationsrückstand wurde nochmals mit je 1,5 l Methanol dreimal 20 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach Filtration wurde im Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt. Daraus resultierte ein Rohextrakt von 46 g.

### 5.4 Verwendete chromatographische Methoden

#### 5.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur DC wurden Kieselgel 60 F<sub>254</sub> und Kieselgel RP-18-Fertigplatten der Firmen Merck, Darmstadt, und Macherey-Nagel, Düren, der Größe 20x20 cm verwendet, Schichtdicke 0,2 mm. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe einer Universal UV-Lampe, Typ 5201 (Fluotest) der Firma Original Hanau Quarzlampen GmbH. Die Emissionsmaxima lagen wahlweise bei 254 bzw. 366 nm. Die Konzentrations- und Verhältnisangaben bei Fließmitteln beziehen sich auf Volumina (V/V). Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten F<sub>254</sub> der Firma Merck, Darmstadt, und Macherey-Nagel, Düren, verwendet (Größe: 20x20 cm, Schichtdicke 0,50 mm)

Zur Entwicklung wurden folgende Fließmittel verwendet:

Für Glykoside: Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:17:13, 100:10:5).

Für Aglyka: Cyclohexan:Ethylformiat:Dichlormethan:Ameisensäure (35:30:30:5) oder

Petrolether:Ethylacetat:Ameisensäure (75:25:1).

Für Zucker: Ethylacetat:Ethanol (70%ig) (65:35) oder

n-Propanol:Ethylacetat:Wasser (7:1:2).

Zur dc Detektion wurden folgende Sprühreagenzien verwendet:

1. Bornträgerreagenz: für Anthrachinone (75))  
5 g Kaliumhydroxid werden in einem Gemisch von 90 Teilen Methanol und 5 Teilen Wasser gelöst.
2. Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT): für Anthrone (3.1.5)  
0,5 g NBT werden in 100 ml Methanol gelöst.  
Nachbehandlung: Erhitzen auf 100°C bis zur optimalen Fleckausbildung.
3. Molybdatophosphorsäure: für Anthrone (nach DAB 9)  
20 g Molybdatophosphorsäure werden in 100 ml Ethanol gelöst.  
Nachbehandlung: Erwärmen auf 120°C.
4. Nitrosodimethylanilin/Pyridin: für Anthrone (nach DAB 9)  
0,1 %igen Lösung (M/V) von Nitrosodimethylanilin in Pyridin.
5. Salpetersäure: für Bianthrone  
Salpetersäure wurde konzentriert verwendet.
6. Thymol/Schwefelsäure: für Zucker (76)  
0,5 %ige Thymollösung in Ethanol/Schwefelsäure konz. (95:5).
7. Diphenylboryloxyethylamin (Naturstoffreagenz): für Flavonoide (77)  
1 g Diphenylboryloxyethylamin wird in 100 ml Methanol gelöst.

Zum Ersatz des Nitrosodimethylanilin/Pyridin wurden folgende Reagenzien getestet:

1. Kedde Reagenz (3,5-Dinitrobenzoesäure): (12)  
Je 5 ml einer frisch bereiteten 3 %igen ethanolischen 3,5-Dinitrobenzoesäure-Lösung und 2N Natronlauge werden gemischt.

2. EP-Reagenz nach Stahl: (12)  
0,25 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd werden in einer Mischung aus 45 ml Eisessig, 5ml o-Phosphorsäure (85 %) und 45 ml Wasser gelöst.
  3. Ehrlichs Reagenz: (78)  
1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung von 25 ml Salzsäure (36 %) und 75 ml Methanol gelöst.
  4. XanthydroL Lösung: (nach DAB 9)  
0,1 ml einer 10%igen Lösung (m/v) von XanthydroL in Methanol werden mit 100 ml wasserfreier Essigsäure und 1 ml Salzsäure (36 %) versetzt. Die Lösung muß vor Gebrauch 24 Stunden lang stehengelassen werden.
  5. Baljet-Lösung:  
1,8 g Pikrinsäure werden in einem 100 ml Meßkolben in einer Mischung von 50 ml Ethanol 90 % und 30 ml Wasser gelöst; die Lösung wird mit Wasser zu 100 ml aufgefüllt.
  6. Echtblausalz B [4,4'-Bis-(2-Methylbenzoldiazoniumchlorid)]:  
(nach DAB 9)  
50 mg Echtblausalz werden in 10 ml Wasser gelöst.
  7. Van-Urk-Reagenz: (12)  
0,2 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in 100 ml 25 %iger Salzsäure unter Zugabe von 1 Tropfen 10 %iger Eisen-III-chlorid-Lösung gelöst.
  8. 4-Dimethylaminobenzaldehyd-Salzsäure (modifiziertes Van-Urk-Reagenz): (79)  
1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in 50 ml Salzsäure (36 %) gelöst; anschließend werden 50 ml Ethanol zugegeben.
-

9. 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC): (80)  
Lösung a: TTC-Lösung (4 % in Methanol)  
b: 1N Natronlauge  
Sprühlösung: Vor Gebrauch werden gleiche Volumina von a und b frisch gemischt.
10. Folins Reagenz:  
1 Teil Folin-Ciocalteus und 3 Teile Wasser werden gemischt.  
Nachbehandlung: Mit Natriumcarbonatlösung (20 % in Wasser) besprühen.
11. Dichlorchinonchlorimid (DCC): (81)  
1 %ige methanolische Lösung von 2,6 Dichlorchinonchlorimid.
12. Dibromchinonchlorimid (Gibbs Reagenz) (82)  
Sprühlösung: 0,4 %ige methanolische Lösung  
Nachbehandlung: Mit Natriumcarbonatlösung (10 % in Wasser) besprühen.
13. Natriummetaperiodat:  
0,5 %ige Lösung in Wasser.
14. Tetrazolblau (Blautetrazolium): (83)  
Lösung a: Tetrazolblaulösung (0,5 % in Methanol)  
b: 6N Natronlauge  
Sprühlösung: Gleiche Volumina von a und b werden vor dem Gebrauch gemischt.
15. Tetrazolblau (Blautetrazolium): (nach DAB 9)  
Lösung a: Tetrazolblaulösung (0,2 % in Methanol)  
b: 12 %igen Natronlauge  
Sprühlösung: 1 Volumenteil von a und 3 Volumenteile von b werden vor dem Gebrauch gemischt.
16. Selenige Säure:  
0,5 % in konzentrierter Schwefelsäure.

17. Vanillin/Schwefelsäure: (84)  
1 g Vanillin wird in 100 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst.
18. Anisaldehyd/Schwefelsäure: (nach DAB 9)  
0,5 ml Anisaldehyd wird mit 10 ml Eisessigsäure 98 %, 85 ml Methanol 5 ml Schwefelsäure (konz.) in der angegebenen Reihenfolge gemischt.
19. 2,6-Dichlorphenolindophenol-Natrium: (85)  
0,1 %ige Lösung in Ethanol
20. Eisen-III-Chlorid: (12)  
10 %ige Lösung in Wasser.
21. Kaliumpermanganat:  
- 0,05 %ige Lösung in Wasser  
- 0,05 g Kaliumpermanganat werden in 10 ml 1N NaOH gelöst.  
- 1 %ige Kaliumpermanganat (Zur Nachbehandlung mit Natriumcarbonatlösung (5 % in Wasser) besprühen).
22. Chloramin-T: (nach DAB 9)  
2 % Chloramin T in konzentrierter Schwefelsäure  
Nachbehandlung: 5 Minuten auf 110°C Erhitzen.
23. Naturstoffreagenz (siehe zur Detektion verwendete Reagenzien).
24. 4-Aminoantipyrin-Kaliumhexacyanoferrat(III): (86)  
Sprühlösung I : 4-Aminoantipyrin-Lösung (2 % in Ethanol)  
Sprühlösung II: Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung  
(8 % in Wasser)  
Vorgang: Nach dem Sprühen mit I und anschließend mit II wird das Chromatogramm in eine mit Ammoniaklösung (25 %) gesättigte Kammer gestellt.
- 
-

25. Naphtochinon-(1,2)-sulfonsäure-(4)-Perchlorsäure: (87)

Sprühlösung: 0,1 g Naphtochinon-(1,2)-sulfonsäure-(4) wird in 100 ml eines Gemisches aus 20 ml Ethanol, 10 ml Perchlorsäure (60 %), 1 ml Formaldehydlösung (40 %) und 9 ml Wasser gelöst.

Vorgang: Auf 70-80°C erwärmen.

26. Pyridin/Methanol: (88)

Pyridin und Methanol werden zu gleichen Teilen gemischt.  
(Anthronglykoside geben negative Ergebnisse)

#### 5.4.2 Säulenchromatographie (SC)

Verwendete Materialien:

- Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, Korngröße: 0,063-0,200 mm
- Sephadex LH-20, Pharmacia
- Polyamid-MN-Polyamid SC 6, Macherey-Nagel, Düren,  
Korngröße: 0,05-0,16 mm

##### 5.4.2.1 Isolierung der Glukofranguline als Referenzsubstanz

4 g Paulbaumrinden-Fertigextrakt (Frangula-Glykosid-Konzentrat 26,24 %, Extrakt Chemie, Stadthagen) wurden über 60 g Polyamid in einer Säule von 70 cm Länge und 4 cm Durchmesser mit 40 %igem Methanol vorgereinigt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 0,6 ml/min.

Die die Glukofranguline enthaltende Fraktion wurde durch DCCC von den Verunreinigungen befreit. Als Phasensystem für die DCCC wurde Chloroform:Methanol:Wasser:Isopropanol:Ameisensäure (10:10:6:1:0,4) verwendet. Die untere Phase diente als mobile, die obere als stationäre Phase. Die Fraktionierung wurde im DAB 9 Fließmittel Ethylacetat:Methanol:Wasser/100:17:13 dc verfolgt.

Zur Detektion wurde methanolische KOH benutzt.

#### 5.4.2.2 Isolierung von Emodin-8-glucosid

Der nach 5.3.2.2 gewonnene Rohextrakt (25 g) wurden an 650 g Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Korngröße: 0,063-0,200 mm) in einer Säule von 125 cm Länge und 5,5 cm lichtigem Durchmesser mit Ethylacetat: Methanol:Wasser (100:17:13) vorgereinigt. Die Fraktionierung wurde dc im gleichen Fließmittel verfolgt. Als Sprühreagenz wurde methanolische KOH verwendet. Die Emodin-8-glucosid enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und die Substanz mittels präparativer DC isoliert. Die DC-Platten wurden wiederum in Ethylacetat: Methanol:Wasser (100:17:13) entwickelt; Emodin-8-glucosid besitzt hier einen  $R_f$ -Wert von 0,59. Die Elution der Substanz vom Kieselgel erfolgte mit Methanol:Aceton:Wasser (90:5:5). Insgesamt wurde 22 mg Emodin-8-glucosid isoliert.

#### 5.4.2.3 Isolierung von Physcion-8-rutinosid

Die Isolierung wurde entsprechend 5.4.2.2 vorgenommen; Physcion-8-rutinosid besitzt einen  $R_f$ -Wert von 0,44. Insgesamt wurden 40 mg Physcionrutinosid isoliert.

---

#### 5.4.2.4 Isolierung der Xanthorhamnine

Die Isolierung wurde entsprechend 5.4.2.2 durchgeführt. Für die präparative DC wurde Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:20:15) verwendet; die Xanthorhamnine besitzen hier einen  $R_f$ -Wert von 0,32. Die Elution der Substanzen vom Kieselgel erfolgte wieder mit Methanol:Aceton:Wasser (90:5:5).

Insgesamt wurden 36 mg Xanthorhamnine isoliert.

#### 5.4.2.5 Isolierung und Trennung der Glukofrangulinanthrone A und B

Zunächst wurde der nach 5.3.1.1 gewonnene Rohextrakt (500 mg) im Fließmittel gelöst und an 35 g Sephadex LH-20 (Säule: 45 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser) vorgereinigt. Als Fließmittel diente Methanol, das 1 % Ameisensäure enthielt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 0,7 ml/min. Dabei konnten die Glukofrangulinanthrone A und B getrennt werden. Die Fraktionierung wurde im DAB 9-Fließmittel (Ethylacetat:Methanol:Wasser/100:17:13) dünnschichtchromatographisch verfolgt. Als Sprühreagenz wurde Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) (siehe 3.1.5) verwendet. 21,2 mg der Fraktion, die Glukofrangulinanthron A ( $R_f=0,27$  im DAB 9-Fließmittel) enthielt, wurden mit Hilfe der Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC) von den Verunreinigungen befreit. Dazu wurde die Glassäule mit 150 g RP-18-Material der Firma Merck, Korngröße 25-40  $\mu\text{m}$  gefüllt. Fließmittel war Methanol:Wasser:Ameisensäure (60:40:0,5). Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 16 ml/min (Druck: 5 bar). Es resultierte eine saubere Fraktion Glukofrangulinanthron A von 5 mg. Auf dem gleichen Weg wurden aus der Glukofrangulinanthron B enthaltenden Fraktion (18,2 mg) 3 mg Glukofrangulinanthron B ( $R_f=0,33$  im DAB 9-Fließmittel) in reiner Form dargestellt.

#### 5.4.2.6 Isolierung der Glukofrangulinbianthronglykoside

500 mg Rohextrakt (siehe 5.3.1.1), gelöst im Fließmittel, wurden zunächst mittels MPLC (Säule: 150 g RP-18 Material der Firma Merck, Korngröße 25-40 µm) vorgereinigt. Als Fließmittel diente Zuerst Methanol:Wasser:Ameisensäure (60:40:0,5), dann 80 %iges Methanol, zuletzt reines Methanol. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 20 ml/min, Druck: 5 bar. Die Fraktionierung wurde im Fließmittel Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:17:13) dünn-schicht-chromatographisch verfolgt. Zur Detektion diente konzentrierte Salpetersäure und anschließendes Erhitzen bei 120°C für 15-20 Min. Die die Glukofrangulinanthrone enthaltenden Fraktionen wurden über 35 g Sephadex LH-20 in einer Glassäule von 45 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser mit Methanol eluiert. Dadurch wurden Fraktionen erhalten, die 4 Diastereomere der Glukofrangulinbianthronglykoside A/B führen.

#### 5.4.2.7 Isolierung von A1

Der nach 5.3.3 gewonnene Rohextrakt (15 g) wurde über 450 g Kieselgel in einer Säule von 80 cm Länge und 5 cm Innendurchmesser mit einem  $\text{CHCl}_3$ :MeOH-Gradienten (90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 65:35) vorgereinigt. Nach dieser Grobtrennung wurde die A1 enthaltende Fraktion (500 mg) über 250 g Kieselgel in einer Säule von 100 cm Länge und 3 cm Innendurchmesser mit einem  $\text{CHCl}_3$ :MeOH-Gradienten (97:3, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 65:35) getrennt. Die A1 enthaltende Fraktion (200 mg) wurde mehrfach über 35 g Sephadex LH-20 in einer Glassäule von 45 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser mit Methanol aufgereinigt. Dabei wurde eine Fraktion (45 mg) erhalten, die nur noch Frangulin A, Emodin-8-glucosid und A1 führten. 15 mg A1 wurden aus dieser Fraktion durch Säulenchromatographie an 200 g Kieselgel (Säule: 2cmx125 cm) mit

---

Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:5:2) dargestellt. Die Fraktionierung wurde dc im Fließmittel Ethylacetat Methanol:Wasser (100:10:5) verfolgt. Als Sprühreagenz wurde methanolische KOH verwendet.

#### 5.4.2.8 Isolierung und Trennung von E1 und E2

15 g Rohextrakt (5.3.3) wurden an 450 g Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Korngröße: 0,063-0,200 mm) der Firma Merck, Darmstadt, in einer Glassäule von 80 cm Länge und 5 cm Innendurchmesser mit Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:5:2) grob fraktioniert. Die E1 und E2 enthaltenden Fraktionen (400 mg) wurden an 250 g Kieselgel in einer Glassäule von 100 cm Länge und 3 cm Innendurchmesser mit Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:5:2) vorgereinigt. Eine E1, E2, Emodin-8-glucosid, Frangulin A und weitere unbekannte Substanzen enthaltende Fraktion (65 mg) wurde an 35 g Sephadex LH-20 in einer Säule von 45 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser mit Methanol chromatographiert. Dabei konnten Emodin-8-glucosid und Frangulin A sowie die unbekannten Substanzen abgetrennt werden. Diese Fraktion wurde an 200 g Kieselgel in einer Glassäule von 125 cm Länge und 2 cm Durchmesser mit Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:5:2) von den Verunreinigungen befreit. Die Fraktionierung wurde dc mit Ethylacetat:Methanol:Wasser (100:10:5) verfolgt. E1 und E2 (15 mg) wurden mit Hilfe der Niederdruckflüssigkeitschromatographie (LPLC) unter Verwendung von RP-18-Material in einer 1:1-Mischung von 80- und 40 %igem Methanol voneinander getrennt. Dabei wurden 7 mg E1 und 5 mg E2 erhalten. Die Fraktionierung wurde dc an RP-18-Material in 80 %igem Methanol verfolgt. Als Sprühreagenz wurde methanolische KOH verwendet.

#### 5.4.3 Niederdruckflüssigkeitschromatographie (LPLC)

Pumpe: Duramat<sup>R</sup>

Spektrophotometer: PMQ 2D Zeiss

Fraktionssammler: LKB Bromma 2111 Multirac

Schreiber: Hitachi, Modell 056-3002

Säule: 24 cm x 1 cm

Stationäre Phase: Li-Chroprep<sup>R</sup> RP-18 Merck, Darmstadt,  
Korngröße: 25-40 µm

Injektionsvolumen: 1 ml

Eluent: Methanol-Wasser, 1 Liter

Flußrate: 3,5 ml/min

Druck: 3-4 bar

Mittels LPLC konnten E1 und E2 getrennt werden (siehe 5.4.2.8)

#### 5.4.4 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)

Zur MPLC wurde ein Gerät der Firma Büchi verwendet.

Säule: 48 cm x 3,5 cm

Stationäre Phase: Li-Chroprep<sup>R</sup> RP-18 Merck, Darmstadt,  
Korngröße: 25-40 µm

Injektionsvolumen: 2 ml

Eluent: Methanol-Wasser, 4-5 Liter

Flußrate: 16-20 ml/min

Druck: 4-5 bar

Die MPLC wurde für die Isolierung der Glukofrangulinanthrone A und B (siehe 5.4.2.5) sowie der Glukofrangulinbianthronglykoside (siehe 5.4.2.6) benötigt.

---

#### 5.4.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

##### 5.4.5.1 Für die HPLC-Analytik zu 3.1.6, 3.1.7, 3.1.8 und 3.1.9

Pumpe: Waters 600 Multisolvant Delivery-System

Detektor: Waters 990 Photodiode array detector

Schreiber: Waters 990 Plotter

Säule: NUCLEOSIL<sup>R</sup> 7 C18, 250/8/4, Art. 720018 ET,

Fa. Macherey-Nagel, Düren

Injektionsvolumina: 15-20 µl

Fließmittel: Methanol-Wasser-Gradienten (40 bis 80 %)

Flußrate: 1 ml/min

Druck: 1700-1800 PSI

##### 5.4.5.2 Für die HPLC-Analytik zu 3.2

Pumpe: Waters 600 Multisolvant Delivery-System

Detektor: Millipore Waters Lambda-Max Model 481

LC-Spektrophotometer

Schreiber: Water 740 Data Module

Säule: NUCLEOSIL<sup>R</sup> 7 C18, 250/8/4, Art. 720018 ET,

Fa. Macherey-Nagel, Düren

Injektionsvolumina: 15-20 µl

Fließmittel: Methanol-Wasser-Gradienten (40 bis 80 %)

Flußrate: 1 ml/min

Druck: 1700-1800 PSI

Für die HPLC-Analytik wurden von den nach 5.3 gewonnenen Extrakten 3 mg eingewogen und in 10,0ml Methanol:Wasser (1:1) Mischung klar gelöst.

#### 5.4.6 Tropfen-Gegenstrom-Chromatographie (DCCC)

Für die DCCC (zu 5.4.2.1) wurde ein Gerät "DCCC-A" der Firma Rikakikai Co. Ltd. Tokyo/Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt benutzt. Für die Trennung wurden 300 Säulen (40 cm x 2 mm) verwendet.

Fließmittel: Chloroform:Methanol:Wasser:Isopropanol:Ameisensäure  
(10:10:6:1:0,4)

Mobile Phase: Unterphase

Stationäre Phase: Oberphase

Injektionsvolumina: 10 ml [Unterphase und Oberphase (2:1)]

#### 5.5 Verwendete Geräte zur Strukturaufklärung

##### 5.5.1 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden mit dem Waters 990 Photodiodenarray Detector aufgenommen.

##### 5.5.2 $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden bei 75 MHz und 300 MHz mit einem AC-300-Gerät der Fa. Bruker aufgenommen. Als Lösungsmittel dienten DMSO- $d_6$  bzw.  $\text{CDCl}_3$ . Alle Angaben der chemischen Verschiebungen erfolgten in ppm-Werten nach der  $\delta$ -Scala.

---

## 5.6 Chemische Analysenmethoden

### 5.6.1 Hydrolyse und Dünnschichtchromatographie

1 mg Substanz wurde in 2 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 1 ml 2N HCL 1 Stunde lang auf dem Wasserbad unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen der Lösung wurde mit wenig Bariumcarbonat neutralisiert. Die Hydrolyse-Lösung wurde anschließend mit Chloroform ausgeschüttelt.

Die Identifizierung des Zuckeranteils erfolgte dc im Fließmittel, n-Propanol:Ethylacetat:Wasser (7:1:2) und Ethylacetat:Ethanol (70 %ig) (65:35). Detektiert wurde mit Thymol/Schwefelsäure.

### 5.6.2 Acetylierung

Die Acetylierung der Substanzen mit Essigsäureanhydrid wurde im Mikromaßstab durchgeführt. Dazu wurden etwa 3 mg Substanz in 2 ml eines Gemisches von Acetanhydrid und Pyridin (Verhältnis 1:1) gelöst und 24 Stunden bei Zimmertemperatur, danach 48 Stunden im Kühlschrank stehengelassen. Die Mischung wurde anschließend in 50 ml Eiswasser gegeben und der Niederschlag abzentrifugiert.

### 5.6.3 Gehaltsbestimmung der Franularinden (nach DAB 9)

0,250 g pulverisierte Droge werden in einen Schliffgrundkolben eingewogen und mit 25,0 ml Methanol 70 % (V/V) gemischt. Der Kolben wird erneut gewogen und 15 Min lang im Wasserbad unter Rückfluß

erhitzt. Nach dem Abkühlen wird gewogen, mit Methanol 70 % (V/V) auf die ursprüngliche Masse ergänzt und filtriert. 5,0 ml Filtrat werden in einem Scheidetrichter mit 50 ml Wasser und 0,1 ml Salzsäure 36 % versetzt und dreimal mit je 20 ml Ether ausgeschüttelt. Nach dem Trennen der Schichten wird die wäßrige Phase in einen 100-ml-Meßkolben gegeben. Die vereinigten Etherphasen werden zweimal mit je 15 ml Wasser nachgewaschen. Das Wasser wird zum Spülen des Scheidetrichters verwendet und zur wäßrigen Lösung in den Meßkolben gegeben. Nach Zugabe von Natriumcarbonat wird mit Wasser zu 100,0 ml ergänzt. Die Etherphase wird verworfen. 40,0 ml der wäßrigen Schicht werden in einen 200-ml-Schlifftrichter überführt. Nach Zusatz von 20 ml einer 20 %igen Lösung (m/V) von Eisen (III)-chlorid wird 20 min lang im Wasserbad, dessen Wasserspiegel oberhalb der Flüssigkeit im Kolben liegen soll, unter Rückfluß erhitzt. 2 ml Salzsäure 36 % werden zugefügt und erneut 20 min lang unter häufigem Schütteln erhitzt bis der Niederschlag gelöst ist. Nach dem Abkühlen wird die Mischung in einem Scheidetrichter dreimal mit je 25 ml Ether ausgeschüttelt, wobei zuvor der Kolben mit dem Ether ausgespült wird. Die Etherauszüge werden vereinigt, zweimal mit je 15 ml Wasser gewaschen und mit Ether zu 100,0 ml verdünnt. 20,0 ml der Lösung werden vorsichtig zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 10,0 ml einer 0,5 %igen Lösung (m/V) von Magnesiumacetat in Methanol gelöst. Die Absorption der Lösung wird bei 515 nm gegen Methanol als Kompensationsflüssigkeit gemessen. Der Prozentgehalt an Glukofrangulin A errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{A \times 3,25}{m}$$

Dabei wird eine spezifische Absorption des Glukofrangulins A von 192 zugrunde gelegt.

A=Gemessene Absorption bei 515nm

m=Einwaage der Droge in Gramm.

### 5.7 Enzymatische Glucosidspaltung durch $\beta$ -Glucosidase (3.1.9.3)

Acetatpuffer pH=5,5 nach DAB 9: 54,4 g Natriumacetat werden in 50 ml Wasser gelöst (im Ultraschalbad, ohne Hitze). Anschließend werden langsam 10 ml wasserfreie Essigsäure zugesetzt. Nach Umschütteln wird mit Wasser zu 100,0 ml verdünnt.

Acetatpuffer pH=5: 1 ml Acetatpuffer (pH=5,5) werden mit 10 ml Wasser verdünnt.

3 mg Glukofrangulin A und B wurden in 1 ml Acetatpuffer (pH=5) gelöst, 10 mg  $\beta$ -Glucosidase dazugegeben und anschließend 15 min bei 100°C erhitzt.

### 5.8 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wässriger Lösungen wurde mit einem Gerät der Firma Knick ermittelt.

### 5.9 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Kofler Heiztischmikroskop der Firma Reichert Austria bestimmt.

### 5.10 Gefriertrocknung

Zur Gefriertrocknung wurde ein Lyovac GT2 der Firma Leybold/Heraeus, Hanau, verwendet.

Pumpe: Elektromotorenwerke Kaisser, Type EN 71 B/4 CS, Vacuubrand RD 3 NP.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Rauwald, H. W., Miething, H., Dtsch. Apotheker Ztg., 3, 101 (1985).
2. Lemli, J., Cuveele, J., Planta Med., 34, 311 (1978).
3. Hartke, K., Mutschler, E., DAB 9 Kommentar, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Govi-Verlag GmbH Frankfurt (1986).
4. Luckner, M., in: DAB 7 DDR Kommentar zur Monographie "Cortex Frangulae", 1969
5. Mühlemann, H., Schmid, H., Pharm. Acta Helv., 30, 363 (1955).
6. Mühlemann, H., Pharm. Acta Helv., 30, 350 (1955).
7. Mühlemann, H., Tatrai, O., Pharm. Acta Helv., 42, 717 (1967).
8. Mühlemann, H., Lyk, P. J., Pharm. Acta Helv., 45, 728 (1970).
9. Labadie, R. P., Pharm. Weekbl., 105, 189 (1970).
10. Schier, W., Dtsch. Apotheker Ztg., 119, 527 (1979).
11. Schier, W., Dtsch. Apotheker Ztg., 121, 323 (1981).
12. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M., Drogenanalyse, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1983
13. Wagner, H., Pharmazeutische Biologie Band 2, "Drogen und ihre Inhaltsstoffe", G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1980
14. Wichtl, M., Teedrogen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1989
15. Deutschmann, F., Hohmann, B., Sprecher, E., Stahl, E., Pharm. Biologie Bd. III, Drogenanalyse I. Morphologie und Anatomie, G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1979
16. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, VI Band, Chemikalien und Drogen, Teil B, Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1979
17. Hegi, G., Illustrierte Flora von Mitteleuropa Bd. V, 1. Teil, J.F. Lehmanns Verlag, München, 1906
18. Savonius, K., Farm. Aikak., 84, 21 (1975).
19. Hegnauer, R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. VI, Birkhäuser Verlag, Basel, 1973
20. Miething, H., Dissertation, Berlin, 1984

21. Mammo, W., Dagne, E., Casser, I., Steglich, W., *Phytochem.*, 29, No. 8, 2637 (1990).
22. Lin, C. N., Chung, M. I., Lu, C. M., *Phytochem.*, 29, No. 12, 3905 (1990).
23. Coskun, M., Tanker, N., Sakushima, A., Kitagawa, S., Nishibe, S., *Phytochem.* 23, No. 7, 1485 (1984)
24. Nikuni, Z., *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 14, 352 (1938).
25. Cesseri, A., Peruto, I., Longo, R., *Arch. Pharm.*, 299, 615 (1966).
26. Rote Liste Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. Editio Cantor. Aulendorf/Württ. 1988
27. Schneider, G., *Pharmazeutische Biologie*, Zürich, 1975
28. *Deutsches Arzneibuch* 6. Ausgabe K. V. Decker's Verlag 1926
29. *Homöopathisches Arzneibuch*, 3. Aufl., 1958
30. Grahle, A., *Südd. Apoth. Ztg.*, 3, 51 (1946).
31. Hoppe, H. A., *Drogenkunde*, 8. Aufl., Bd. 1, S. 916, de Gruyter, Berlin, 1975
32. Lemli, J., Cuveele, J., *Plant. Med. Phytother.*, 3, 260 (1969).
33. *Deutsches Arzneibuch* 9. Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag GmbH Frankfurt, 1986
34. Lemli, J., Cuveele, J., *Planta Med.*, 26, 193 (1974).
35. Loth, H., Schenck, G., Faustmann, B., *Arch. Pharm.*, 295, 847 (1962).
36. Labadie, R. P., *Pharm. Weekbl.*, 113, 1 (1968).
37. Auterhoff, H., Scherff, F. C., *Arch. Pharm.*, 293, 918 (1960).
38. Eder, R., *Arch. Pharm.*, 254, 1 (1916).
39. Eder, R., Häuser, F., *Arch. Pharm.*, 436 (1925).
40. Rauwald, H. W., Demirezer, Ö., *Planta Med.*, 56, 563 (1990).
41. Schneider, G., *Arzneidrogen*, Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 1990
42. Mutschler, E., *Arzneimittelwirkungen*, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1986
43. Wirth, W., Gloxhuber, W., *Toxikologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1981

44. Steinegger, E., Hänsel, R., Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie, 4. Auflage, Springer Verlag 1988
45. Steinegger, E., Hänsel, R., Lehrbuch der Pharmakognosie, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1972
46. Tsou, K. C., Cheng, C. S., J. Am. Chem. Soc., 78, 6139 (1956).
47. Lemli, J., Cuveele, J., Pharmazie, 20, 396 (1965).
48. Lemli, J., Lloydia, 28, 63 (1965).
49. Hörhammer, L., Wagner, H., Hörhammer, H. P., Dtsch. Apotheker Ztg. 107, No. 17, 563 (1967).
50. Rosenthaler, L., Anthracenglykoside, in: Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, III, 2, 1004 (1932).
51. Verhaeren, E. H. C., Dreessen, M., Lemli, J., Planta Med., 45,15 (1982).
52. Lemli, J., Plant. Med. Phytother., 4, 201 (1967).
53. Cucu, V., Tarpo, E., Arch. Pharm., 294, 102 (1961).
54. Flück, H., in: Kommentar Helv., s. 338 (1971).
55. Ebel, S., Kaal, M., Planta Med., 40, 271 (1980).
56. Schenck, G., Loth, H., Feyen, F. D., Arch. Pharm., 290, 292 (1957).
57. Longo, R., Meinardi, G., Korte, F., Arch. Pharm. 297, 248 (1964).
58. Labadie, R. P., Morrien, M. B. M., Pharm. Weekbl., 113,1 (1978).
59. Schilcher, H., Dtsch. Apotheker Ztg., 121, 1317 (1981).
60. Europäisches Arzneibuch Band II, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi Verlag GmbH Frankfurt, 1975
61. Schorn, P. J., in Ph. Eur. II Kommentar 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1978
62. Rauwald, H. W., Just, H. D., Arch. Pharm., 316, 399 (1983).
63. Rauwald, H. W., Miething, H., Farm. Tijdschr. Belg. (Abstracts), 3, 286 (1984).
64. Maurer-Riess, I., Wagner, H., Tetrahedron 38 (9), 1269 (1982).
65. Harborne, J. B., Williams, C. A., in : Harborne, J. B., Mabry, T. I., Mabry, H., The Flavonoids, Chapman and Hall, London S. 422, 1975

66. Langhammer, L., Hänsel, R., *Sci. Pharm.*, 41, 129 (1973).
67. Harborn, J. B., Mabry, T. J., *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall, London-New York 1982
68. Poethke, W., Behrendt, H., *Pharm. Zentralh.*, 104, 549 (1965).
69. Benzinger, F., Lehner, J., *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 101, 627 (1961).
70. Weiss *Lehrbuch der Phytotherapie* 6. Auflage, Hippokrates Verlag GmbH Stuttgart, 1985
71. Arker-Martin, B., *Dissertation*, Berlin, 1987
72. Rauwald, H. W., Just, H. D., *Arch. Pharm.*, 316, 409 (1983).
73. Breitmaier, E., Voelter, W.,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spectroscopy, s. 156-159 und 223-240, Verlag Chemie, Weinheim 1974
74. Steglich, W., Lösel, W., *Tetrahedron*, 25, 4391 (1969).
75. Hörhammer, H., Wagner, H., Bittner, G., *Arzneim. Forsch.* 13, 537 (1963), in: *Merck Reagenzienbuch*.
76. Adachi, S., *J. Chromatog.*, 17, 295 (1965), in: *Merck Reagenzienbuch*.
77. Stahl, E., Schorn, P. J., Seylers, H., *Z. Physiol. Chem.*, 325, 263 (1961), in: *Merck Reagenzienbuch*.
78. Heacock, R. a., Mahon, M. E., *J. Chromatog.*, 17, 338 (1965), in: *Merck Reagenzienbuch*.
79. Stahl, E., Kaldewey, H., Seylers, H., *Z. Physiol. Chem.*, 323, 182 (1961), in: *Merck Reagenzienbuch*.
80. Metz, H., *Naturwissenschaften* 48, 569 (1961), in: *Merck Reagenzienbuch*.
81. Heide, R. F., Wouters, O., *Z. Lebensmittelunters. Forsch.*, 115, 129 (1962), in: *Merck Reagenzienbuch*.
82. Nürnberg, E., *Dtsch. Apotheker Ztg.*, 101, 268 (1961), in: *Merck Reagenzienbuch*.
83. Adamec, O., *Steroids*, 1, 495 (1963), in: *Merck Reagenzienbuch*.
84. Tyihak, E., Vagujfalvi, D., Hagony, P. L., *J. Chromatog.* 11, 45 (1963), in: *Merck Reagenzienbuch*.
85. Passera, C., Pedrotti, A., Ferrari, G., *J. Chromatog.*, 14, 289 (1964), in: *Merck Reagenzienbuch*.

86. Gabel, G., Müller, K. H., Schoknecht, J., Dtsch. Apotheker Ztg., 102, 293 (1962), in: Merck Reagenzienbuch.
  87. Richter, E., J. Chromatog. 18, 164 (1965), in: Merck Reagenzienbuch.
  88. Labadie, R. P., Baerheim Svendsen, A., Pharm. Weekbl. 103, 1177 (1968).
  89. Rauwald, H. W., Z. Naturforsch, 38c, 170 (1983).
-

7. Lebenslauf

Name : L. Ömür Demirezer, geb. Kanalp  
 Geburt : 10.10.1957 in Ankara, Türkei  
 Eltern : Sadettin Kanalp, Lehrer und Rechtsanwalt  
 Perizat Kanalp, Hausfrau  
 Heirat : am 26.12.1979 mit Ünver Demirezer,  
 Rechtsanwalt  
 Schulausbildung : 1963 bis 1968 Maltepe-Grundschule, Ankara  
 1968 bis 1971 Namik-Kemal-Mittelschule, Ankara  
 1971 bis 1974 Ankara-Kiz-Gymnasium  
 Studium : 1975 bis 1979 Studium der Pharmazie an der  
 Universität Ankara  
 30.11.1979 Approbation als Apothekerin  
 Beruflicher Werdegang: 1980 bis 1982 Leitung der Kizilirmak  
 Apotheke in Ankara  
 1982 bis 1986 wissenschaftliche  
 Mitarbeiterin am Institut für  
 Pharmakognosie an der Universität  
 Hacettepe, Ankara  
 Gleichzeitig Weiterbildung zum Master  
 für Pharmakognosie.  
 12.9.1985 Masterprüfung  
 5.8.1986 Umzug nach Deutschland  
 September 1986 bis März 1987 Deutschkurs  
 am Goethe Institut, Frankfurt/M.  
 Seit 10.3.1987 Doktorandin bei Prof. Dr.  
 H. W. Rauwald am Institut für  
 Pharmazeutische Biologie der Johann  
 Wolfgang Goethe- Universität, Frankfurt/M.  
 Oktober 1987 bis Februar 1988 Deutschkurs  
 an der J. W. G. Universität, Frankfurt/M.

