Isolierung und MEKC-Quantifizierung von analytischen Markersubstanzen von *Dipsacus sylvestris* HUDS. sowie pharmakologische Untersuchung von Extrakten und Reinstoffen aus *Dipsacus sylvestris* HUDS. und Ladanum (*Cistus creticus* L.) an *Borrelia burgdorferi* s.s.

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Universität Leipzig
genehmigte

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

vorgelegt
von

Dipl. pharm. Tobias Liebold
geboren am 05.09.1983 in Karl-Marx-Stadt

Dekan: Prof. Dr. Marc Schönwiesner

Gutachter: Prof. Dr. Michaela Schulz-Siegmund
Prof. Dr. Dr. h. c. Matthias F. Melzig

Tag der Verteidigung: 17.12.2021

BIBLIOGRAPHISCHE DARSTELLUNG

Tobias Liebold

Isolierung und MEKC-Quantifizierung von analytischen Markersubstanzen von *Dipsacus sylvestris* HUDS. sowie pharmakologische Untersuchung von Extrakten und Reinstoffen aus *Dipsacus sylvestris* HUDS. und Ladanum (*Cistus creticus* L.) an *Borrelia burgdorferi* s.s.

Fakultät für Lebenswissenschaften

Universität Leipzig

Dissertation

341 Seiten, 277 Literaturangaben, 154 Abbildungen, 74 Tabellen

Die vorliegende Arbeit widmet sich größtenteils der bisher kaum beachteten einheimischen Pflanze *Dipsacus sylvestris* HUDS. Letztere erschien durch die in der Laienpresse propagierte Anwendung bei Borreliose im Fokus der Öffentlichkeit. Da wirksame Alternativen zur schulmedizinischen Antibiotikatherapie bisher fehlen, sind neue Therapieansätze dringend gefragt. Zunächst musste eine intensive phytochemische Analytik betrieben werden, um das nur wenig untersuchte Sekundärstoffspektrum näher zu beleuchten. Methoden zur Identifizierung der Pflanzenart und Quantifizierung markanter Inhaltsstoffe waren bisher nicht vorhanden. Sie mussten im Rahmen dieser Forschungsarbeit entwickelt werden, so zum Beispiel mittels mizellarer elektrokinetischer Kapillarchromatographie und einer in der Arbeit entwickelten Stufen-Dünnschichtchromatographie. Um Extrakte und Reinstoffe für mikrobiologische Versuche zu erhalten, wurden aus einem hydroethanolischen und einem methanolischen *Dipsacus*-Extrakt Reinstoffe isoliert. Neben den Iridoiden Loganin und Cantleyosid konnten das Triterpen Ursolsäure und das Lignan Prinsepiol isoliert werden. Neben Extrakten aus *Dipsacus* wurden letztere im Bakterienmodell an *Borrelia burgdorferi* s.s. untersucht. Prinsepiol zeigte eine wachstumshemmende Aktivität. Daneben wurden Inhaltstoffe aus dem ätherischen Öl und Ladanum-Harz der mediterranen Heilpflanze *Cistus creticus* L. ebenfalls im Bakterienmodell untersucht. Für die aktiven Inhaltsstoffe und Extrakte sind weitere Forschungsarbeiten lohnenswert.

Für meine Familie

„Das Unverständlichste am Universum ist im Grunde, dass wir es verstehen können.“

(Albert Einstein)

Die vorliegende Arbeit wurde vom 1.1.2009 bis 16.03.2015 betreut von Professor Dr. Hans Wilhelm Rauwald (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig) angefertigt. Die pharmakologischen Untersuchungen an *Borrelia burgdorferi* s.s. wurden in der Arbeitsgruppe Dr. Jörg Lehmann am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI, Leipzig unter Anleitung von Dr. Jens Knauer selbständig durchgeführt. Die schriftlichen Ausarbeitungen wurden ab 16.03.2015 von Frau Professor Dr. Michaela Schulz-Siegmund (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, Institut für Pharmazie, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig) betreut.

Frau Professor Schulz-Sigmund danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit und die Motivation zur Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Professor Rauwald danke ich für die Überlassung des spannenden Themas, die Herstellung der Kontakte zum Fraunhofer Institut und die Arbeitsmöglichkeiten in der Pharmazeutischen Biologie.

Herrn Dr. Lehmann danke ich für die großzügige Möglichkeit der selbstständigen Arbeiten im S2-Labor am Fraunhofer-Institut mit seiner guten technischen Ausstattung.

Für die NMR-Messungen danke ich Dr. Lothar Hennig (Fakultät für Chemie und Mineralogie, Institut für Organische Chemie) Für seine Zeit, Hilfe und konstruktiven Gespräche bei der Auswertung der erhaltenen Spektren möchte ich mich herzlich bedanken. Auch Dr. Matthias Findeisen (Fakultät für Chemie und Mineralogie, Institut für Organische Chemie) und Frau Jutta Ortwein (Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Pharmazie) danke ich für ihre NMR-Messungen. Bei Frau Ramona Oehme (Fakultät für Chemie und Mineralogie, Institut für Analytische Chemie, Arbeitskreis Massenspektrometrie Dr. Claudia Birkemeyer) bedanke ich mich für die durchgeführten MS- und GC-MS-Messungen.

Frau Professor Dr. Karin Fester danke ich für hilfreiche Ideen während der Laborzeit und besonders für das Korrekturlesen, die vielen Hinweise zu den Schwerpunkten der Arbeit und die Zeit, die Sie sich für Rückfragen, Verbesserungsvorschläge auch bei der Übersetzung und die organisatorischen Probleme rund um die Fertigstellung der Arbeit genommen hat.

Meinen Kollegen, Freunden und insbesondere meiner Frau Sabine danke ich für die Zeit im Labor und Institut, Diskussionsbereitschaft zu Thema der Arbeit und motivierende Vorschläge. Meiner Familie danke ich für die Unterstützung, besonders meiner Frau für Korrekturlesen, Hinweise und dafür, dass sie mir den Rücken frei gehalten hat und trotz meiner beruflichen Tätigkeit genügend Zeit zum Fertigstellen der Arbeit ermöglicht hat. Unserem Sohn Oliver danke ich für seine Fröhlichkeit, die immer auch Motivation war, die Arbeit zu beenden.

Kurzfassung / Abstract

Tobias Liebold: Isolierung und MEKC-Quantifizierung von analytischen Markersubstanzen von *Dipsacus sylvestris* HUDS. sowie pharmakologische Untersuchung von Extrakten und Reinstoffen aus *Dipsacus sylvestris* HUDS. und Ladanum (*Cistus creticus* L.) an *Borrelia burgdorferi* s.s.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die in unter anderen in Mitteleuropa heimische Pflanze *Dipsacus sylvestris* HUDS. in einer Arbeit gleichzeitig phytochemisch-analytisch und pharmakologisch untersucht. Zur sicheren Identifizierung der Pflanze wurden dünnschicht- und kapillarchromatographische Methoden entwickelt und geeignete Markersubstanzen identifiziert. Dabei konnte eine Stufen-DC etabliert werden, die ein breites Fingerprintchromatogramm über das polare und apolare Inhaltsstoffspektrum auf einer DC-Folie ermöglicht. Mithilfe von CZE und MEKC konnten instrumentelle Methoden entwickelt werden, die sowohl eine Pflanzen-Identifizierung, als auch im Falle der MEKC eine quantitative Erfassung ausgewählter iridoider und phenolischer Markersubstanzen zulassen. Dabei konnten Kaffee-, Chlorogensäure, Cantleyosid und Loganin quantifiziert werden. Die Methode wurde auch auf *Dipsacus asperoides* CHENG übertragen. Um analytische Markersubstanzen und Testsubstanzen für sich anschließende mikrobiologische Untersuchungen an *Borrelia burgdorferi* s.s. zu erhalten, wurden die Iridoide Loganin und Cantleyosid, das Lignan Prinsepiol und das Triterpen Ursolsäure aus *D. sylvestris* isoliert. Dazu wurden säulen- und planarchromatographische Methoden angewandt. Mittels NMR- und ESI-MS-Messungen wurden die erhaltenen Substanzen identifiziert.

Neben den phytochemischen Untersuchungen wurden Extrakte und isolierte Reinstoffe aus *D. sylv. in vitro* an mediumsadaptierten *B. burgdorferi* s.s. auf wachstumshemmende Effekte hin untersucht. Vor allem das Lignan Prinsepiol, das erstmals aus *D. sylvestris* isoliert werden konnte, zeigte signifikante wachstumshemmende Effekte (0,2 mg/ml). Daneben wurden im Modell auch Ladanum und Manoyloxide sowie Carvacrol aus *Cistus creticus* eingesetzt. Ladanum (2,0 mg/ml), Carvacrol (0,2 und 0,05 mg/ml) und *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (0,2 mg/ml) waren hier *in vitro* signifikant aktiv, während stereoisomere Manoyloxide kaum Effekte zeigten.

Mit der Arbeit wurden interessante Grundlagen geschaffen, die Ausgangspunkt für weitere Forschungen sein können. So könnten sich z.B. Studien zur Toxizität, Metabolisierung und Bioverfügbarkeit der aktiven Substanzen anschließen.

Tobias Liebold: Isolation of analytical markers from *Dipsacus sylvestris* HUDS., their quantification by MEKC and pharmacological studies of extracts and pure substances from *Dipsacus sylvestris* HUDS. and ladanum (*Cistus creticus* L.) on *Borrelia burgdorferi* s.s.

In the present study, the plant *Dipsacus sylvestris* HUDS., which is native in Central Europe among others, was examined for the first time both phytochemically and pharmacologically. Thin-layer and capillary chromatographic methods have been developed and suitable marker substances have been identified for the reliable identification of the plant. A stepwise developed TLC was established, which enables a broad fingerprint chromatogram over the polar and apolar ingredient spectrum on one single TLC plate. With the help of CZE and MEKC, instrumental methods have been developed that allow both plant identification and, in the case of MEKC, quantitative detection of selected iridoid and phenolic marker substances. Caffeic acid, chlorogenic acid, cantleyoside, and loganin could be quantified. The method was also transferred to *Dipsacus asperoides* CHENG. In order to obtain analytical marker substances and test substances for subsequent microbiological investigations on *Borrelia burgdorferi* s.s., the iridoids loganin and cantleyoside, the lignan prinsepiol and the triterpenoid ursolic acid were isolated from *D. sylvestris*. Column and planar chromatographic methods were used for this purpose. The isolated substances were identified by NMR and ESI-MS measurements.

In addition to phytochemical investigations, extracts and isolated pure substances from *D. sylv.* were tested *in vitro* for growth-inhibiting effects on medium-adapted *B. burgdorferi* s.s. Especially the lignan prinsepiol, which could be isolated from *D. sylvestris* for the first time, showed significant growth-inhibiting effects (0.2 mg/ml). Ladanum and various manoyl oxides as well as carvacrol from *Cistus creticus* were also used in the model. Ladanum (2.0 mg/ml), carvacrol (0.2 and 0.05 mg/ml) and *ent*-13-*epi* manoyl oxide (0.2 mg/ml) were significantly active *in vitro*, while stereoisomeric manoyl oxides showed hardly any effects.

The results obtained in this work set the stage for further research including e.g. studies on toxicity, metabolism, and bioavailability of active substances.

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG 13

1 Einführung in die Aufgabenstellung 14

2 Wilde Karde 15

2.1 Anwendung und Wirkungen 18

2.2 Bekannte Inhaltsstoffe 20

2.3 Wurzeldroge 22

3 Graubehaarte Zistrose 23

3.1 Ladanum: Allgemeines und historische Betrachtung 24

3.2 Anwendung und Wirkungen von *Cistus*-Arten 26

3.2.1 Anwendung und Wirkungen von Ladanum 27

3.3 Bekannte Inhaltsstoffe der Gattung *Cistus* 27

3.3.1 Inhaltsstoffe im ätherischen Öl von *Cistus*-Arten 28

3.3.2 Ladanum-Inhaltsstoffe 29

4 Borrelia burgdorferi 29

4.1 Lyme-Borreliose 32

5 Ziele der Arbeit 33

MATERIAL UND METHODEN 35

6 Verwendete Materialien 36

6.1 Verwendetes Pflanzenmaterial 36

6.2 Eingesetzte Bakterien im *in-vitro*-Modell 36

6.3 Chemikalien 37

6.4 Geräte und sonstige Materialien 40

6.5 Spezielle Mess- und Auswertungssoftware 42

7 Methoden 42

7.1 Gerbstoffbestimmung 42

7.2 Herstellung von Extrakten 44

7.2.1 Hydroethanolischer-Extrakt aus frischen Kardenwurzeln und daraus hergestellte Extrakte 44

7.2.1.1 Fraktionierung des hydroethanolischen Extrakts „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“ 45
7.2.2 MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge und daraus hergestellte Extrakte 45
7.2.2.1 Fraktionierung des methanolischen Extrakts „DS_WD_MeOH-TE“ 46
7.2.3 Chloroform-Extrakt aus Ladanum 46
7.2.4 Methanolische und hydroethanolische Flüssigextrakte für die Dünnschichtchromatographie (DC) 46
7.2.5 Methanolische Trockenextrakte zur Drogenidentifizierung und Substanzquantifizierung mittels Kapillarelektrophorese (CE) 47
7.3 Chromatographie 48
7.3.1 DC 48
7.3.1.1 Analytisch und präparativ genutzte DC-Trennsysteme und chromatographisch eingesetzte Fließmittel (FM) 50
7.3.1.2 Detektionsmethoden für die DC 52
7.3.1.3 Analytische DC 53
7.3.1.3.1 Analytische DC von *D. sylv.* 53
7.3.1.3.2 Analytische DC von *C. cret.* und Ladanum 55
7.3.1.4 Präparative DC 55
7.3.1.4.1 Präparative DC für die Prinsepiol-Isolierung 55
7.3.1.4.2 Präparative DC für die Ursolsäure-Isolierung 56
7.3.1.4.3 Präparative DC zur Iridoid–Aufreinigung 57
7.3.2 Säulenchromatographie (SC) 57
7.3.2.1 Präparative Normaldrucksäulen 58
7.3.2.1.1 Erste präparative KG-Säule für Prinsepiol-Isolierung 58
7.3.2.1.2 Zweite präparative KG-Säule für Prinsepiol-Isolierung 60
7.3.2.1.3 Präparative Aluminiumoxidsäule zur Iridoidisolierung 61
7.3.2.1.4 Präparative KG-Säule zur Iridoidisolierung 61
7.3.2.1.5 Präparative RP-Säule zur Iridoidisolierung 62
7.3.2.1.6 Präparative Säule zur Ursolsäure-Isolierung 63
7.3.2.1.7 Präparative Säule zur Fraktionierung von „DS_WD_Frak-Hex“ 64
7.3.2.2 Präparative MPLC 65
7.3.3 Gaschromatographie (GC) 66

7.3.3.1 GC-Methode 67
7.3.4 Flüssig-Flüssig-Gegenstromchromatographie 68
7.3.4.1 Rotierende Flüssig-Flüssig-Gegenstromchromatographie 68
7.3.4.1.1 RLCC-Methode 70
7.4 Kapillarelektrophorese (CE) 71
7.4.1 Identifizierung und Quantifizierung in der CE 74
7.4.2 Verwendete CE-Methoden 74
7.4.2.1 Pufferherstellung 74
7.4.2.2 CZE 76
7.4.2.2.1 Entwicklung der CZE-Methode 76
7.4.2.2.2 Aufnahme der CZE-Fingerprint-Elektropherogramme 77
7.4.2.3 Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC) 79
7.4.2.3.1 Entwicklung der qualitativen MEKC-Methode 79
7.4.2.3.2 Vergleichende Aufnahme von Fingerprint-Elektropherogrammen verschiedener methanolischer *Dipsacus*-Wurzelextrakte 80
7.4.2.3.3 Quantifizierung ausgewählter Markersubstanzen 81
7.5 Kernspinresonanz 82
7.5.1 NMR-Untersuchungen 83
7.6 UV/Vis-Spektralphotometrie 84
7.7 Untersuchung der bakterienwachstumshemmenden Aktivitäten 85
7.7.1 Herstellung des BSK-II-Mediums 85
7.7.2 Herstellung einheitlicher *Bb*ss-Aliquote 85
7.7.3 Sensitivitätstest 86
7.7.4 Mikroskopische Bestimmung der Borrelienkonzentration 87
7.7.4.1 Dunkelfeldmikroskopie 87
7.7.4.2 Petroff-Hausser-Zählkammer 87
7.7.4.3 Durchführung Konzentrationsbestimmung 88
7.7.5 Versuchsdesign 88
7.7.5.1 Extraktpräparation 88
7.7.5.2 Stammkultur 89
7.7.5.3 Kulturansatz 89
7.7.5.4 Zähltage 90
7.7.6 Statistische Auswertung 90

ERGEBNISSE 91

8 Ergebnisse 92

8.1 Bestimmung der an Hautpulver absorbierbaren Polyphenole (Gerbstoffe) 92

8.2 Bestimmung des Gesamtgehalts an H_2O und flüchtigen Bestandteilen der Frischpflanze von *D. sylv.* 92

8.3 Ergebnisse der DC-Voruntersuchungen 93

8.4 Ergebnisse der analytischen Fingerprint DC von *D. sylv.* 95

8.5 Ergebnisse der Isolierungen und begleitenden DC 97

8.5.1 Extraktherstellung und Grobfraktionierung 98

8.5.2 Ergebnisse der Isolierung von Loganin und Cantleyosid 101

8.5.3 Ergebnisse der Isolierung von Prinsepiol 105

8.5.4 Ergebnisse der Isolierung von Ursolsäure 108

8.5.5 RLCC-Ergebnisse für die Iridoid-Anreicherung aus „DS_fW_Frak-n-But“ .. 111

8.6 Ergebnisse der NMR- und MS-Untersuchungen 112

8.6.1.1 Loganin 114

8.6.1.2 Cantleyosid 119

8.6.1.3 Prinsepiol 125

8.6.1.4 Ursolsäure 130

8.7 Ergebnisse der GC-MS-Untersuchungen 136

8.7.1 GC-MS-Messung von Fraktion „MPLC_Fr3“ 136

8.7.2 GC-MS-Messungen der Fraktionen „MPLC_Fr7“, „MPLC_Fr36“ und „MPLC_Fr48“ 138

8.8 Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen 140

8.8.1 Ergebnisse der CZE Fingerprint-Analytik 140

8.8.2 Ergebnisse der MEKC Fingerprint-Analytik 143

8.8.3 Ergebnisse der MEKC Quantifizierung 145

8.9 Ergebnisse der Untersuchung auf bakterienwachstumshemmende Aktivitäten 148

8.9.1 Untersuchung von Medium, Kontrollen und Lösungsvermittlern 148

8.9.2 Untersuchung der fraktionierten Kardenextrakte 152

8.9.3 Untersuchung von Reinstoffen aus *D. sylv.* 164

8.9.4 Reinstoffe aus *Cistus* bzw. Ladanum 167

DISKUSSION 176

9 Diskussion 177
9.1 Analytik von *D. sylv.*-Wurzeln 177
9.1.1 Cantleyosid und Loganin 177
9.1.2 Prinsepiol 179
9.1.3 Ursolsäure 181
9.2 Mikrobiologische Untersuchungen 181
9.2.1 Diskussion der mikrobiologischen Untersuchungen zu *D. sylv.* 181
9.2.2 Diskussion der mikrobiologischen Untersuchungen zu Ladanum aus *C. cret.* 185
9.2.3 Allgemeine Ausführungen zu den mikrobiologischen Untersuchungen 186
9.3 Weiterführende Betrachtungen 187

ZUSAMMENFASSUNG UND THESEN 188

10 Zusammenfassung und Thesen 189

11 Summary and theses 193

ANHANG 197

12 GC-MS-Chromatogramme und Massenspektren 198

13 CE-Daten, Spektren und Elektropherogramme 206

14 NMR-Spektren 214

15 Zähldaten der Bbss-Bestimmungen 233

16 Weitere Diagramme der Bbss-Bestimmungen (Wiederholungsexperimente) 292

VERZEICHNISSE 299

17 Literaturverzeichnis 300

18 Abbildungsverzeichnis 323

19 Tabellenverzeichnis 330

20 Formelverzeichnis 333

21 Abkürzungsverzeichnis 333

WEITERE INFORMATIONEN 337

22 Lebenslauf, Publikationen 338
22.1 Lebenslauf 338
22.2 Veröffentlichungen und Poster 339
23 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit 341

EINLEITUNG

1 Einführung in die Aufgabenstellung

Seit der Antike wurden natürliche Heilmittel zur Linderung von Krankheiten eingesetzt. Durch Beobachtung und Probieren wurden Arzneien gefunden und sorgsam überliefert. Oft war das Geheimnis des Heilens schon damals auch ein gut gehütetes wirtschaftliches Standbein. Mit dem Fortschreiten der synthetischen Möglichkeiten nach der industriellen Revolution konnten in historisch kurzer Zeit viele neue therapeutische Ansätze entwickelt werden. Plötzlich konnten Krankheiten durch Impfungen und Antibiotika verhindert und geheilt werden. Die über Jahrhunderte verwendeten, oft nur lindernden Heilmittel gerieten ins Abseits und damit häufig auch in Vergessenheit.

Konfrontiert mit zunehmenden Resistenzen gegen etablierte Antibiotika und immer noch schlecht behandelbaren Leiden, wird wieder verstärkt nach neuen Wirkprinzipien gesucht. Größtenteils geschieht das großindustriell, oft auch ungerichtet im Hochdurchsatzscreening. Aber auch durch die Beobachtung von Heilern von Naturvölkern, Studium von bis in die Antike zurückreichender Literatur oder Hinterfragen von traditionellen Behandlungsweisen lassen sich teilweise neue Wirkprinzipen finden. Der Vorteil letzterer Methode ist, dass auch bisher unbekannte potentielle Wirkstoffe untersucht werden, während im Hochdurchsatz-screening mit bereits bekannten Substanzen an neuen Zielstrukturen experimentiert wird.

In der vorliegenden Arbeit sollen traditionelle oder volksmedizinisch verwendete Pflanzenextrakte von *Dipsacus sylvestris* L. (*D. sylv.*) auf ihre *in-vitro*-Aktivität gegen *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Bb*ss), einen der Erreger der Lyme-Borreliose (Kapitel 4.1) untersucht werden. Letztere Erkrankung kann mit rechtzeitiger Antibiose im Allgemeinen sehr gut behandelt werden. Bei zunächst unerkannten Infektionen kommt es aber teilweise zu chronischen Verläufen mit möglicher Spätmanifestation von arthritischen, dermalen und neurologischen, oft schmerzhaften Folgen. Diese sind nach derzeitigem Stand häufig trotz etablierter Therapieschemen nicht vollständig heilbar. Daneben sollen Inhaltsstoffe der Pflanze als mögliche Wirkstoffe analytisch betrachtet werden. Zusätzlich soll mit isolierten Inhaltstoffen aus *Cistus creticus* L. (*C. cret.*). und ihrem Ladanum-Harz eine weitere Pflanze am Bakterienmodell untersucht werden.

2 Wilde Karde

Die Wilde Karde (*Dipsacus sylvestris* HUDS., *D. sylv.* = *Dipsacus fullonum* L., Caprifoliaceae) ist eine einheimische, zweijährige Pflanze, die in Europa, im Orient, auf den Kanaren und im nordafrikanischen Mittelmeerraum heimisch ist. Als Pionierpflanze ist sie auf frischen und feuchten Ruderalstellen, an Wald- und Wegrändern, im Uferbereich, auf Wiesen sowie auf Lehmböden anzutreffen [1], [2], (Abb. 2-1, Abb. 2-2, Abb. 2-3, Abb. 2-4).



Abb. 2-1: Typischer Habitus der Wilden Karde



Abb. 2-2: Wassergefüllte Becken um die Sprossachse am Grund der gegenständigen Blätter der Wilden Karde

Sie wurde in frühgeschichtlicher Zeit nach Europa eingeschleppt (Archaeophyt) und ist ein zweikeimblättriges Kraut, das im ersten Jahr eine Blattrosette ausbildet. Wenn sie im ersten Jahr einen Mindestdurchmesser von etwa 30 cm erreicht [3], geht aus jener im zweiten Jahr ein bis zu zwei Meter hoher stacheliger Spross hervor. Dieser ist teilweise im oberen Bereich verzweigt und endet jeweils in einem länglichen, zonenweise aufblühenden Blütenkopf mit spitzen Tragblättern. Die vierzähligen Blüten mit blass lila Kronblättern blühen meist ab Juli mittig beginnend auf und werden von den Spreublättern überragt. An der Sprossachse befinden sich ungeteilte, stachelige, gegenständige Blätter, die am Grund verwachsen sind und dort ein Becken bilden. In diesem kann sich Regenwasser sammeln, das zum Schutz der Pflanze vor an der Sprossachse emporkletternden Schädlingen dienen kann. Auch der lateinische Gattungsname „Dipsacus“ wird in diesem Zusammenhang gedeutet: Wanderer könnten das Wasser des Blätterbeckens zum Stillen ihres Durstes getrunken haben; griech. "dipsa" bedeutet "Durst" [4], [5]. Der deutsche Name leitet sich durch ihr Aussehen von lat. „carduum“, d. h. Distel, ab. Im botanischen Sinne sind Karden jedoch keine Disteln, welche zu den Asteraceae gehören. Weitere deutschsprachige Bezeichnungen für die Wilde Karde sind Kardendistel, Wilde Distel, Schutt-Karde, Venusbecken, Igelkopf, Hexenkamm und Immerdurst [6], [7]. Im angelsächsischen Sprachraum finden sich häufig wild teasel und venus bath. Im Französischen typische Namen sind cardère, tête de loup, cabaret des oiseaux und lavoir de venus. Alle diese Namen geben Hinweise auf Standort oder Aussehen, wobei häufig die wassersammelnde Eigenschaft Erwähnung findet. Die systematische Einordnung von *D. sylv.* findet sich in Tab. 2-1.

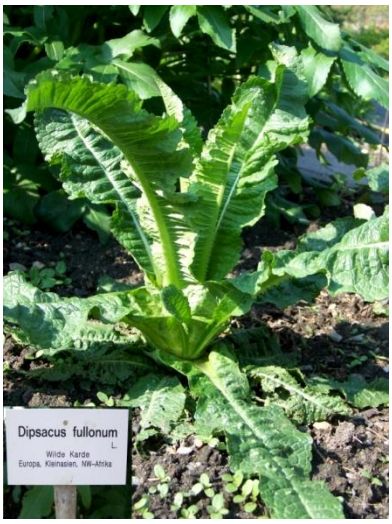


Abb. 2-3: Wilde Karde Anfang Mai im zweiten Jahr im Botanischen Garten Leipzig 2008

Tab. 2-1: Systematische Einordnung der Karden nach [1], [8], [9], [10]

Abteilung	**Spermatophyta** - Samenpflanzen
Unterabteilung	**Angiospermae (Magnolio- / Angiospermophytina)** - Bedecktsamer
Klasse	**Dicotyledoneae (Magnoliopsida / Rosopsida)** - Zweikeimblättrige
Unterklasse	**Asteridae -** Asternähnliche
Überordnung	**Asteranae**
Ordnung	**Dipsacales** - Kardenartige
Familie	**Caprifoliaceae** – Geißblattgewächse
Unterfamilie	**Dipsacoideae -** Kardengewächse
Gattung	**Dipsacus** - Karde

Weitere Vertreter der Gattung Dipsacus sind *Dipsacus sativus* (L.) HONCK = *D. fullonum* (HUDS.) non L., die Weberkarde, *D. laciniatus L.*, die Himalaya-Karde, *D. mitis* DON. = *D. inermis* WALL, die Schlitzblattkarde, *D. asper* WALL bzw. *D. asperoides* CHENG & AL (*D. asp.*), die Japanische oder Chinesische Karde [11], *D. ferox* LOIS., die Dornige Karde, *D. psilosus*, die Borstenkarde, *D. strigosus*, die Schlanke Karde und andere Arten. Von diesen hier aufgeführten Arten ist vor allem die Chinesische Karde als Drogenlieferant für die Traditionelle Chinesische Medizin (TCM) von Bedeutung [12]. Die Köpfe der Weberkarde waren bis ins beginnende 20. Jahrhundert wichtiger Bestandteil in der Textilienherstellung zur Aufrauhung von Stoffen [4], [13], [14], [15], [16].



Abb. 2-4: Ansammlung vieler blühender Wilder Karden auf einer lehmigen Schuttfläche in Dessau 2007

2.1 Anwendung und Wirkungen

Seit der Antike gibt es Berichte über die heilende Wirkung der Karde, auch wenn die Anwendungsgebiete sehr vielfältig waren. PEDANIOS DIOSKURIDES beschreibt in seiner „De Materia Medica“ im ersten Jahrhundert n. Chr. eine Medizin mit wachssalbenartiger Konsistenz aus gestoßener Kardenwurzel, die mit Wein gekocht wurde. Der Hinweis „in einer ehernen Büchse [aufzubewahren]“ lässt auf flüchtige Stoffe schließen [17]. Anwendung fand die Salbe bei Rissen am After, Fisteln sowie gewöhnlichen und gestielten Warzen. Würmer aus den Blütenköpfen, nach JULIUS BERENDES vermutlich die Larven von *Cassida rubiginosa* L., dem Distelschildkäfer bzw. rostigroten Schildkäfer, sollten in Beuteln um Hals oder Arm getragen das viertägige Fieber heilen. Im Lorscher Arzneibuch (Codex Bambergensis medicinalis 1) von 795 n. Chr. findet sich die Karde in einem Gemisch mit anderen Drogen bei geschwollenen Mandeln bzw. geschwollenen Halsdrüsen, bei Krätze und „gegen die schädlichen Säfte“ im Körper [18]. HIERONYMUS BOCK verwendet die Wurzel von *D. sylv.* in seinem „Kreutterbuch“ von 1565 äußerlich bei Fisteln, Schrunden und Warzen sowie das Wasser aus den Blattbecken bei trüben, roten Augen [19]. Im „New Kreuterbuch“ von PETRUS ANDREAS MATTHIOLUS aus dem Jahr 1626 finden sich dieselben Anwendungen wie bei Bock und zusätzlich das aus den Blättern destillierte Wasser zum Spülen bei Mundfäule [19]. ALBRECHT VON HALLER empfiehlt Salben aus der Wurzel der Weberkarde in seinem „Medicinischen Lexicon“ von 1755 bei Analschrunden, Fisteln, Flechten und Warzen. Der Saft soll innerlich angewandt gegen Phthisis, d. h. Tuberkulose, helfen [19]. 1905 findet sich in der „Realenzyklopädie der gesamten Pharmazie“ bei *D. sylv.* die Anwendung „Brustkrankheiten“ [20].

Volksmedizinisch wird eine breite Indikationslyrik von *D. sylv.* angegeben [2], [5]: Borreliose, Verdauungsschwäche, Magenschwäche, Gallenschwäche, Rheuma, Gicht, Ödeme, Kopfschmerzen, Hautkrankheiten, Furunkel, Rhagaden, Sommersprossen, Warzen, Fingerwunden, als Einreibung bei Gicht und Rheuma. Sie wird als schmerzlindernd, immunstärkend, antibakteriell wirksam, blutreinigend sowie harn- und schweißtreibend angesehen. Der Amerikaner MATTHEW WOOD verwendete nach Vorbild der „Xu Duan“-Droge der Chinesischen Karde eine alkoholische Tinktur aus der Wurzel der heimischen Karde zur Behandlung der Lyme-Borreliose [21]. In Deutschland griff der Ethnobotaniker WOLF-DIETER STORL diese Idee auf. Er schlägt neben der Karde auch viele andere,

wissenschaftlich nicht belegte, alternative Heilmethoden zur Behandlung der Borreliose vor [22]. Seine propagierte Anwendung ist eher philosophisch geprägt und wird von einigen Einzelberichten und Selbstversuchen untermauert. Über die Wirksamkeit der Wurzel von *D. sylv.* gegen Borreliose gibt es bislang keine wissenschaftlichen Untersuchungen. Eine in Vorbereitung dieser Arbeit durchgeführte *in-vitro*-Testreihe an *Bb*ss lieferten einen Hinweis auf eine mögliche wachstumshemmende Aktivität gegen einen der möglichen Erreger, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto [23]. Trotzdem finden sich im Fernsehen, in der Presse und bei Selbsthilfegruppen bzw. in Foren im Internet viele Stellungnamen für aber auch gegen diese Anwendung [24], [25], [26], [27]. Homöopathisch wird die gesamte blühende Frischpflanze als Essenz bei Hautleiden verwendet.

Aktuelle wissenschaftliche Untersuchungen beschreiben die diuretische Wirkung [28], eine Anwendung von Kompressen aus den Blättern als Gesichtshauttonikum in Italien [29], die antifungale Aktivität von *D. sylv.* [30], mögliche antihypertensive und hypoglykämische Effekte über eine ACE-Hemmung (ACE - Angiotensin-Converting-Enzyme) und α-Amylase-Inhibition [31]. Die bisher eher geringe medizinische Bedeutung der Pflanze zeigt sich auch durch das Fehlen einer Monographie der Kommission E des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes (BGA, jetzt BfArM - Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) [32]. Ebenso fehlt eine Bearbeitung durch das europäische Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) bei der European Medicines Agency (EMA) sowie durch die European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP). Fertigarzneimittel sind nicht im Handel.

Wesentlich besser untersucht ist die TCM-Droge „chuan duan“ bzw. „Xu Duan“ (Pinyin-Schreibweise) aus der Wurzel der Chinesischen Kardenarten *D. asp.* CHENG & AL sowie *Dipsacus asper* WALL. [33], [34], [35], [36], [11]. Neben antioxidativen Effekten und Neuroprotektion durch Caffeoylchinasäurederivate [37], [38] finden sich neuroprotektive Effekte im Zusammenhang mit degenerativ-neuronalen Erkrankungen [39], [40], [41], [42], antinozizeptive Effekte eines Saponingemischs [43], [44], Zytotoxizität gegen bestimmte Tumorzelllinien [45], eine Erhöhung der Knochendichte [46] und eine Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten [47]. Auch eine antikomplementäre Aktivität enthaltener Saponine [48] und eine Immunmodulation durch heißwasserlösliche Polysaccharide [49] konnte bei *D. asp.* gefunden werden. Mögliche Parallelen in der Anwendung

beider Drogen wurden beschrieben [50], obwohl wissenschaftlich belegte Übereinstimmungen der Inhaltsstoffe und Anwendung fehlen.

2.2 Bekannte Inhaltsstoffe

Die chemische Zusammensetzung von *D. sylv.* ist bisher recht wenig untersucht worden. Ein Überblick über in der Literatur bekannte Stoffe folgt:

Als Speicherstoffe gibt es kein Inulin und praktisch keine Stärke [51], dafür β-Methylglucosid v. a. in Stengeln und Blüten [52], Saccharose als Hauptspeicherstoff der vegetativen Organe, daneben Glucose und Fructose [53]. In den Samen wurden als Fettsäuren Palmitinsäure (16:0), Ölsäure (18:1) und Linolsäure (18:2) in beträchtlichen Mengen gefunden [51], [54].

Das Alkaloid Cantleyin (Abb. 2-5 (a)) wurde aus Sprossorganen isoliert [55]. Später wurde aber gezeigt, dass es sich nur um ein Artefakt des Loganins bei der Aufarbeitung mit Ammoniak, d. h. ein Pseudoalkaloid, handelt, das bei analogem Vorgehen mit Kaliumhydrogencarbonat nicht entsteht [56].

Bereits sehr früh beobachtet, aber bis heute nicht restlos aufgeklärt ist die Bildung eines stabilen blauen Farbstoffs namens Dipsacotin. Beim langsamen Trocknen der Blätter von *D. sylv.* unter erhöhter Temperatur (35-60 °C) im sauren Milieu oder unter Einwirkung des Enzyms Dipsacase entsteht aus einer unbekannten Verbindung zunächst ein gelbes Zwischenprodukt, das durch Luftsauerstoff zum blauen Dipsacotin oxidiert wird [57]. Diese unbekannte Ausgangsverbindung für die Dipsacotinbildung wurde zunächst als Dipsacan bezeichnet. Die später isolierten Verbindungen Cephalarosid und Scabiosid scheinen aber dieselbe oder sehr ähnliche Verbindungen, nämlich glykosidische Pseudoindikane vom Loganintyp [58], zu sein, die auch mit Emulsin spaltbar sind [51]. Dipsacan ist recht typisch für die Unterfamilie der Dipsacoideae [53].

Eine große Anzahl iridoider Stoffe wurde aufgeklärt, darunter die Iridoidglucoside Loganin und Swerosid sowie die Bis-(Seco)-Iridoidglucoside Cantleyosid (= Sylvestrosid III-1β-O-glucosid), Sylvestrosid I (v. a. in der Wurzel), Sylvestrosid II (v. a. in den Samen), Sylvestrosid III (v. a. in den Samen) und Sylvestrosid IV (v. a. in den Blättern, auch in der

Wurzel) [59], [60] (Abb. 2-5 (b-h)). Aus *D. asper* wurden zwei Tetra-Iridoidglucoside, Dipsanosid A und B, isoliert [61].

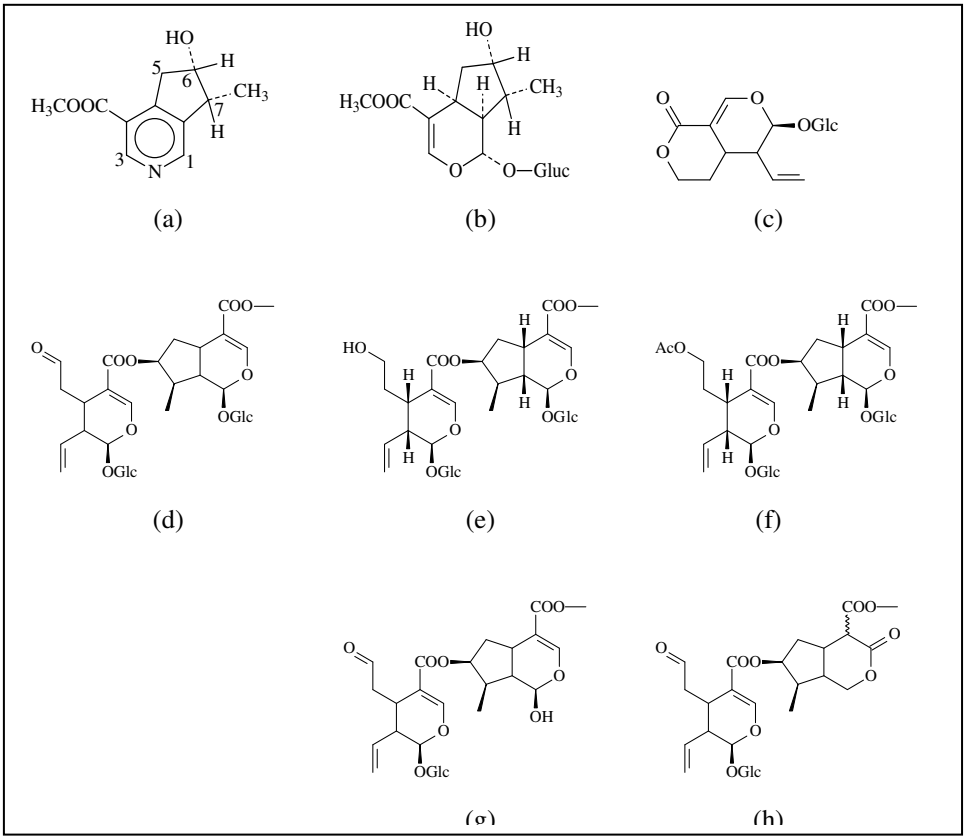


Abb. 2-5: Strukturformeln von Cantleyin (a), Loganin (b), Swerosid (c), Cantleyosid (d), Sylvestrosid I (e), Sylvestrosid II (f), Sylvestrosid III (g) und Sylvestrosid IV (h)

Aus der Stoffklasse der Polyphenole sind Kaffeesäure (KS), v. a. in Form ihres Esters Chlorogensäure (CS) [53], und Saponarin (= Saponaretin-7-O-glucosid = Isovitexin-7-O-glucosid = Apigenin-6-C-7-O-bis-glucosyl), ein Flavonglykosid, bekannt (Abb. 2-6), [62], [63], [64]. Auch Apigenin- und Luteolin-monoglykoside wurden nachgewiesen [65].

Bisher wurden in *D. sylv.* keine Saponine gefunden, wohl aber in der chinesischen Kardenwurzel „Xu Duan“ [66], [67], [68], [69], [70], [71], [72], [73], [43], [44], [45], [40], [41], [42], [48], [74].

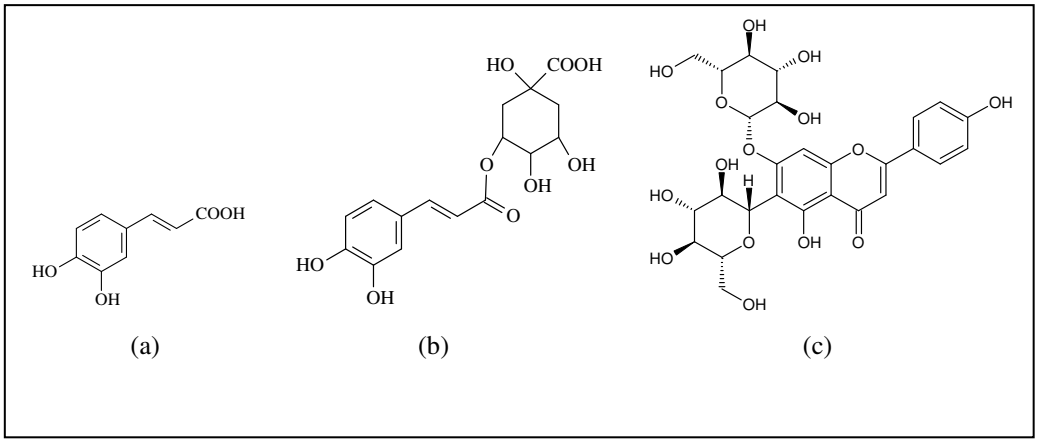


Abb. 2-6: Strukturformeln von KS (a), CS (b) und Saponarin (c)

2.3 Wurzeldroge

Die Kardenwurzel, d. h. die Wurzel von *D. sylv.*, ist nicht offizinell. Zur Herstellung von Zubereitungen kann die frische Wurzel (Abb. 2-7) der einjährigen Wilden Karde nach Zerkleinerung direkt verwendet werden, oder zunächst unter moderatem Erwärmen bzw. mittels Lyophilisation getrocknet werden. V.a. bei letzterer Methode können neben Wasser (H_2O) auch andere flüchtige Bestandteile verloren gehen. Abb. 2-8 zeigt die geschnittene, lyophilisierte Droge.



Abb. 2-7: Frische Wurzel von *D. sylv.* nach der Ernte



Abb. 2-8: Geschnittene und gefriergetrocknete Wurzelstücke von *D. sylv.*

3 Graubehaarte Zistrose

Die graubehaarte oder kretische Zistrose (*Cistus creticus* L. (*C. cret.) = Cistus incanus subsp. creticus (L.) Heyw. = Cistus incanus* auct. non L. = *C. villosus* L. = *C. polymorphus*) ist ein immergrüner, bis etwa ein Meter hoher Zwergstrauch. Sie ist in der Garigue, Phrygana und Macchie des Mittelmeer- und Schwarzmeerraumes indigen. Ihre mit zerknitterten, rosaroten Kronblättern besetzten Blüten sind fünfzählig und etwa 4 bis 6 cm im Durchmesser. Der Griffel ist in etwa so lang wie die zahlreichen Staubblätter [75]; die Blühzeit einer Blüte beträgt etwa zwölf Stunden [76]. Die Zistrose bildet Kapselfrüchte aus [77]. Ihre festen, elliptischen, fiedernervigen Blätter sind graugrün gefärbt, dicht behaart und gegenständig angeordnet [78], [79].



Abb. 3-1: einzelne fünfzählige Blüte von *C. cret.* [80]

Tab. 3-1: Systematische Einordnung der Zistrosen nach [8], [81], [82], [83]

Abteilung	**Spermatophyta** - Samenpflanzen
Unterabteilung	**Angiospermae (Magnolio- / Angiospermophytina)** - Bedecktsamer
Klasse	**Dicotyledoneae (Magnoliopsida / Rosopsida)** - Zweikeimblättrige
Unterklasse	**Rosidae –** Rosenähnliche
Überordnung	**Rosidae**
Ordnung	**Malvales** - Malvenartige
Familie	**Cistaceae** - Zistrosengewächse
Gattung	**Cistus** – Zistrose

Seinen Namen trägt die Gattung Cistus, griechisch kístos, bereits seit der Antike [84]. Von den mehr als 20 Arten der taxonomisch unsteten Gattung *Cistus* sind u. a. noch folgende Vertreter zu nennen: *Cistus ladanifer* bzw. *ladaniferus* L., die Lack- oder Ladanum-Zistrose, *C. monspeliensis* L., die Montpellier-Zistrose, *Cistus salviifolius*, die salbeiblättrige Zistrose und C. *laurifolius* L. = *C. cypricus* bzw. *cyprius,* die lorbeerblättrige oder zyprische Zistrose [85], [86], [87].

Die Kommission E des BGA, jetzt BfArM, hat keine Monographie über Cistus-Arten erstellt [32]. Ebenso existiert keine Abhandlung durch die ESCOP. Seit 2014 ist eine Monographie zu den Blättern von *C. cret.* beim HMPC unter Bearbeitung. Die wichtigsten (nicht offizinellen) Drogen von *C. cret.* sind Ladanum (Kapitel 3.1) und Cistuskraut.

3.1 Ladanum: Allgemeines und historische Betrachtung

Das Ladanum oder Labdanum ist ein elastisches Harz, das von verschiedenen Cistus-Arten ausgeschieden wird. Erwähnt wird das aromatische Harz bereits in zwei Versen des Alten Testaments: „Als sie dann beim Essen saßen und aufblickten, sahen sie, dass gerade eine Karawane von Ismaelitern aus Gilead kam. Ihre Kamele waren mit Tragakant, Mastix und Ladanum beladen. Sie waren unterwegs nach Ägypten.“ [88] und „Da sagte ihr Vater Israel zu ihnen: Wenn es schon sein muss, dann macht es so: Nehmt von den besten Erzeugnissen des Landes in eurem Gepäck mit und überbringt es dem Mann als Geschenk: etwas Mastix, etwas Honig, Tragakant und Ladanum, Pistazien und Mandeln.“ [89]. Das Wort Ladanum ist laut HERODOT VON HALIKARNASS aus dem Arabischen entlehnt: „ladāna“ bedeutet Biegsamkeit, Weichheit und „ladn“ biegsam, weich, elastisch, knetbar [84].

Die Bedeutung des Ladanums reicht bis in die Antike zurück. PEDANIUS DIOSKURIDES beschrieb die Gewinnung aus dem Fell von Ziegen, die zwischen den Cistus-Sträuchern weiden, und durch Abstreifen des Harzes von Hand mittels Schnüren [90]. Das „wohlriechende, grünliche, leicht erweichende, fette, sand- und schmutzfreie, harzige“ Ladanum aus Zypern beschrieb er als das qualitativ Beste. Im 19. Jahrhundert fand neben der Gewinnung aus dem Fell von Ziegen und Schafen das Abstreifen mittel Labdanostrions, einem speziellen Sammelgerät mit Lederstreifen oder Stricken, Erwähnung [91]. Die Hauptproduzenten waren damals Mönche. Das reine Ladanum wurde wie folgt charakterisiert: Das geschmolzene und zu Stangen geformte oder in Blechbüchsen gedrückte Ladanum ist in reinem Alkohol löslich und behält nach dessen Verdampfung den charakteristischen Geruch und bitteren Geschmack. Das häufig gehandelte unreine hingegen, war oft durch Weihrauch, Sandarak, Storax, Mastix, Terpentin, Bernstein, Sand, Kienruß, Wolle und Lederreste verfälscht [91], [92]. Als Drogen liefernde Arten wurden damals *C. cret.*, *C. ladanifer* und *C. cyprius* genannt [93]. Die gehandelte Menge pro Jahr wurde Mitte des 19. Jahrhunderts auf etwa eine Tonne unterschiedlichster Qualitäten geschätzt [94]. Nach ihrer Form und Verpackung unterschied man vier Handelsarten [95]:

1. Ladanum cyprium bzw. Ladanum in massis, bis 25 Pfund schwere, in Pflanzenblätter eingehüllte, dunkelrot- oder schwarzbraune Klumpen mit angenehmen, storaxartigem Geruch und balsamig-reizendem Geschmack. Es ist brennbar und in Weingeist fast vollständig löslich, erweicht zwischen den Fingern wie Pech und ist dann klebrig. Die Bruchfläche ist anfangs grau und wird schwarz.
2. Ladanum in tortis bzw. gewundenes oder gewöhnliches Ladanum, in platten, schneckenförmig gewundenen Stücken verschiedener Dicke vorkommend. Es war gewöhnlich mit der vier- bis sechsfachen Menge eisenhaltigem, schwarzen Sand gemischt und dadurch trocken, spröde und schwarz. Nach PIERRE-JOSEPH PELLETIER bestand das verunreinigte Ladanum zu 20% aus Harz, 3,6% aus mit Kalk gemischtem Gummi, 0,6% Äpfelsäure, 1,9% Wachs und 73,9% eisenhaltigem Sand mit ätherischem Öl. Auf dem deutschen Markt herrschten Gemische mit Weihrauch, Sandarak, Mastix, Bernstein, Storax, Terpentin und Kienruß vor.
3. Ladanum in baculis, d.h. Ladanum in Stangen, wurde von *C. ladaniferus* abgesammelt oder durch Auskochen der Äste von *C. ladaniferus*, *C. laurifolius* und *C. ledon* gewonnen und enthielt viele Beimengungen wie Erde. Es galt trotz teilweise angenehmen Geruchs als weniger wertvoll.

4. Ladanum liquidum, d.h. flüssiges Ladanum, eine bereits Anfang des 19. Jh. nicht mehr gehandelte Sorte aus Nordamerika, wahrscheinlich eine Storaxsorte. Auch reinere Sorten Ladanum enthielten damals nach Analytik von NICOLAS-JEAN-BAPTISTE-GASTON GUIBOURT nur 86% Harz und ätherisches Öl sowie 7% Wachs. Der Rest waren meist Erde oder Haare [96].
Heute wird das Ladanum teils noch von Hand mittels Lederriemen oder Lappen von sogenannten „Zistrosenschlägern“ geerntet [97]. Industriell erfolgt die Herstellung durch Auskochen von Blättern und Zweigen im gesamten Mittelmeergebiet.

3.2 Anwendung und Wirkungen von *Cistus*-Arten

In der Antike waren die Blüten als Adstringens in Form eines Weinaufgusses gegen Bakterienruhr gebräuchlich. Äußerlich wurden sie als Umschläge bei „fressenden Geschwüren“, Krebs, und als Wachssalben gegen Brand- und schlechtheilende Wunden eingesetzt [98]. Die Droge Herba et Flores Cisti foeminae, „Burber“, wird im Mittelmeergebiet bei Ruhr, Durchfall, Geschwüren und Wunden eingesetzt [99]. Auch die Wurzel findet z. B. in Kolumbien Anwendung als Wundmittel [100]. Cistuskraut findet vor allem Anwendung als Tee. Zistrosentee aus dem getrockneten Kraut fand in den letzten Jahren Verbreitung als Abwehrkräfte-stärkendes Mittel. So wird dieser trotz noch unzureichender Untersuchungen volksmedizinisch als Grippemittel eingesetzt. Auch Borreliose-Selbsthilfegruppen verwenden den Cistus-Tee zur Therapie ihrer Erkrankung [101]. Das Kraut wird in Form von Spülungen bei Entzündungen und Hautkrankheiten verwendet [75].

Eine Vielzahl von *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen von Extrakten und isolierten Inhaltsstoffen aus *Cistus*-Arten finden sich z. B. zur Aktivität von Myricetin und zur Zytotoxizität des Diterpens *ent*-13-*epi*-Manoyloxid und seiner Isomere gegen diverse humane Leukämiezelllinien [102], [103], zur Aktivität von Blattextrakten und Flavonoiden bei Acetaminophen-induzierter Hepatotoxizität in Mäusen [104] bzw. über deren anti-inflammatorische Aktivität [105] und zur möglichen Prävention neurodegenerativer Erkrankungen über Hemmung der Acetylcholinesterase [106].

Neben der Droge Ladanum (Kap. 3.2.1) wurden Inhaltsstoffe und Extrakte verschiedener *Cistus*-Arten auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht [107], [108], [109], [110], [111],

[112], [113], [114] jedoch noch nicht die Wirkung einzelner Inhaltsstoffe gegen Borrelien. Erste Untersuchungen zur Aktivität von Rohextrakten und ätherischem Öl aus *Cistus* gegen *Borrelia burgdorferi* sensu stricto wurden in der Arbeitsgruppe RAUWALD, Institut für Pharmazie der Universität Leipzig durchgeführt [115]. Die größte Aktivität hatte in den Untersuchungen das ätherische Öl.

3.2.1 Anwendung und Wirkungen von Ladanum

Nach PEDANIUS DIOSKURIDES hat das Ladanum „adstringierende, erwärmende, erweichende, eröffnende Kraft". Es wurde in alkoholischer Lösung als Narbenmittel, ölig als Auricularium, als Räucherwerk zur Austreibung der Nachgeburt, als Suppositorium bei „Verhärtungen in der Gebärmutter" und in Mischungen gegen Haarausfall, Schmerzen, Husten und Durchfall sowie zum Harntreiben verwendet [90]. Im 19. Jahrhundert wurden die Verwendung als Pflaster, Salben und Räucherpulver [116], sowie die historischen Verwendungen als nervenstärkendes Mittel bei innerlicher Anwendung [93] und als „Specificum antipestilentiale" zum Riechen oder als Salbe [94] beschrieben. Ebenso fand sich eine ölige Zubereitung, genannt „Labdanoladon" bei rheumatischen und erkältungsbedingten Schmerzen. Heute findet das Ladanum neben der griechischen Volksmedizin als Hämostyptikum und Expektorans vor allem in der Aromatherapie, Kosmetikindustrie und Parfümerie Anwendung [86], [75], [117].

Aktuelle *in-vitro*-Untersuchungen zeigen u. a. die antimikrobielle Aktivität verschiedener Labdanditerpene aus Ladanum gegen *Staphylococcus aureus* und sechs gram-negative Bakterienstämme. Diese wirken allerdings schwächer als der Dichlormethan (DCM)-Methanol (MeOH)-Rohextrakt [118]. Daneben findet sich eine antimikrobielle Aktivität von Ladanum gegen drei Bakterienstämme und vier Pilzarten - wiederum schwächer als beim ätherischen Öl [119]. Ebenso wurden keim- und wurzelwachstumshemmende Effekte auf andere Pflanzenarten gefunden [120].

3.3 Bekannte Inhaltsstoffe der Gattung *Cistus*

Für Pflanzen der Gattung *Cistus* sind v. a. Polyphenole, niedermolekulare Phenole, das ätherische Öl und Harze charakteristisch [75], [115], [121], [122]. Phenolische Inhaltsstoffe wie z. B. Flavan-3-ole, Flavone, Flavonole, Proanthocyanidine und Ellagitannine [123]

wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Da sich in vorhergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe das ätherische Öl als wirksamste Fraktion herausstellte [115], wurden ein n-Hexan (Hex)-Extrakt sowie das Oleoresin Ladanum und deren Inhaltsstoffe einer weiteren Testung unterworfen. So sollen im Folgenden die Inhaltsstoffe des ätherischen Öls und von Ladanum näher betrachtet werden.

Das Inhaltsstoffspektrum der Pflanzen ist saisonal unterschiedlich. Während der Gehalt an Flavonoiden im Sommer maximal und im Winter minimal ist, liegt er bei den Diterpenen im Frühsommer am höchsten und im Winter am niedrigsten [124]. Am Beispiel des Diterpens 6-Oxocativinsäure wurde gezeigt, dass neben den jahreszeitlichen Schwankungen in den Blättern auch der Gehalt in der Blattstreu saisonal verschieden ist. Dadurch ändert sich die Interaktion der Pflanze mit den Organismen ihrer Umgebung. Besonders im Frühling kann das 6-Oxocativinsäurereiche Laub auf dem Boden das Auskeimen anderer Pflanzen behindern [125]. Für das von der Pflanze abgeschiedene Harz Ladanum konnten ähnliche Effekte gezeigt werden [126]. Ebenso ist die Zusammensetzung an Diterpenen des Labdan- und Clerodantyps im ätherischen Öl bestimmter *Cistus*-Arten jahres- und tageszeitlich verschieden [127].

3.3.1 Inhaltsstoffe im ätherischen Öl von *Cistus*-Arten

Das aus Blättern isolierte ätherische Öl von *Cistus*-Arten enthält u. a. α-Pinen, β-Pinen, Camphen, p-Cymen, Fenchen, 1,8-Cineol = Eucalyptol, Borneol, Ledol, Benzaldehyd, Eugenol, Fettsäuren, Diacetyl = 2,3-Butandion und Furfural [117]. Im ätherischen Öl von *C. cret.* konnte ein hoher Gehalt an Labdanditerpenen, z. B. Manoyloxid, 13-*epi*-Manoyloxid, 3β-Acetoxymanoyloxid, Manool und Sclareol, festgestellt werden. Daneben finden sich Monoterpene (wie *cis*-Thujon, Carvacrol, Terpin-4-ol, Eugenol, β-Ionon), Sesquiterpene (wie β-Caryophyllen, β-Bourbonen), aliphatische Aldehyde (wie Nonanal), Alkane (wie Tri- bis Heptacosan) und anderen Substanzen [128], [129]. Mittels GC-MS-Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe RAUWALD hier weitere Stoffe nachgewiesen bzw. bekannte Inhaltsstoffe bestätigt, wie z. B. Carvacrol, Calamenen, Hexahydrofarnesylaceton = Phyton, Diterpene vom Labdan-Typ wie *ent*-Manoyloxid, *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-Manoyl-oxid, *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid und gesättigte Fettsäuren wie Nonacosan (C-29) [115], [130], siehe Abb. 3-2.

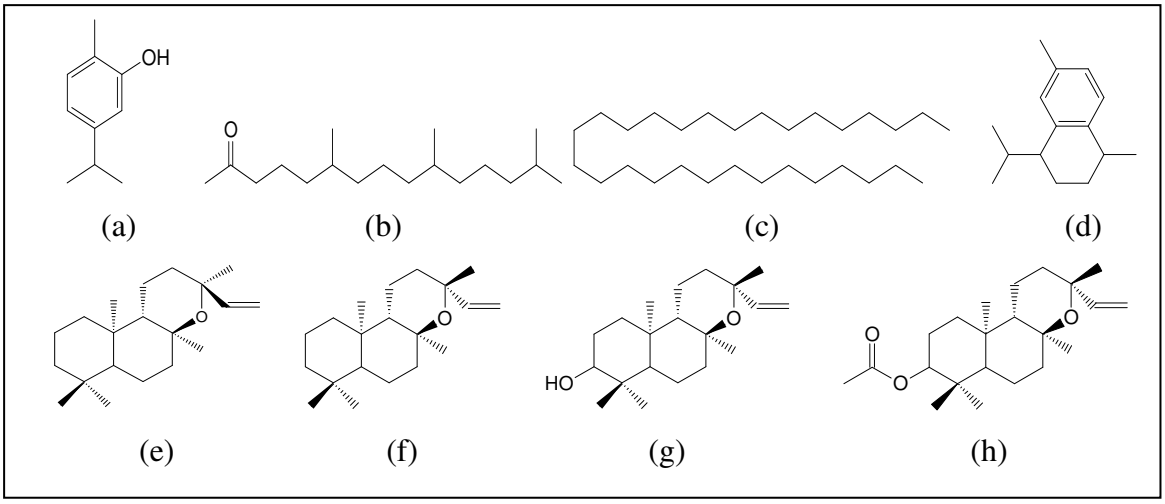


Abb. 3-2: Strukturformeln ausgewählter Inhaltsstoffe aus dem ätherischen Öl von *C. cret.*: Carvacrol (a), Hexahydrofarnesylaceton (Phyton) (b), Nonacosan (c), Calamenen (d), *ent*-Manoyloxid (e), *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (f), 3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid (g), und *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-Manoyloxid (h)

3.3.2 Ladanum-Inhaltsstoffe

Das Oleoresin Ladanum ist durch den Gehalt an ätherischem Öl, Paraffin und Harz gekennzeichnet. In seinem ätherischen Öl (1,6 %) wurden Acetophenon, 2,2,6-Trimethyl-cyclohexanon, Phenole, Ester und Sesquiterpene gefunden [117]. Das Harz setzt sich aus Säuren wie Labdanol- [131], Dihydrozimt-, Anis-, Arachin-, Behen- und 6-Oxocativinsäure, Phenolen und neutralen Substanzen wie $\Delta^{13,14}$-Isohydroabietinsäuremethylester, Dehydro-abietinsäuremethylester, Labdan-(8α, 15)-diol, Labdan-(8α, 15, 19α)-triol und verschiedenen Manoyloxiden (Abb. 3-2 (e) bis (h)) zusammen [117]. Von der Harzbestandteilen erscheinen die Diterpene vom Labdantyp, insbesondere die Manoyloxide, charakteristisch [115], [132].

4 Borrelia burgdorferi

Ein Erreger der Lyme-Borreliose, das gramnegative Bakterium *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Bb*ss) (Abb. 4-1), wurde 1982 von WILLI BURGDORFER in den Rocky Mountains Laboratories entdeckt. Er isolierte die wie die Erreger der Syphilis zu den Spirochäten zählende Art aus Neuseeland-Hasen, die von der Zeckenart *Ixodes dammini* befallen waren [133]. Auch in der europäischen Schildzecke *Ixodes ricinus*, dem gemeinen Holzbock (Abb. 4-2), konnte das Bakterium kurze Zeit später nachgewiesen werden [134].

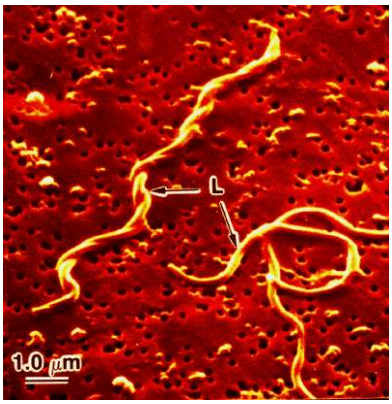


Abb. 4-1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Borrelia burgdorferi*



Abb. 4-2: Weiblicher Holzbock (*Ixodes ricinus* L.)

Während die Lyme-Borreliose in den Vereinigten Staaten fast ausschließlich durch *Bb*ss verursacht wird, sind die wichtigsten Erreger in Westeuropa *Borrelia afzelii* und *Borrelia garinii* [135], [136], [137]. Zusammen mit *Bb*ss und neun anderen *Borrelia*-Arten werden die beiden zuvor genannten Arten als *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplex bezeichnet [138], [139]. Borrelien kommen bisher nur auf der nördlichen Hemisphäre vor. Die systematische Einordnung der Gattung *Borrelia* findet sich in Tab. 4-1. *Bb*ss hat eine spiralige Form, ist zwischen 4 und 30 µm lang, 0,1 bis 0,3 µm im Durchmesser und mobil durch sieben bis elf Endoflagellen [138], [140] (Abb. 4-3). Es besitzt ein lineares Chromosom (0,91 Mb) sowie neun zirkuläre (9 - 30 kb) und zwölf lineare Plasmide (5,2-53,5 kb) [141], [142]. Eine erst in den letzten Jahren bei *Bb*ss beschriebene, transduktorische Form des horizontalen Gentransfers erfolgt mithilfe des Bakteriophagen ΦBB-1 [143]. Eine Einordnung nach der Anfärbbarkeit in gramnegativ oder grampositiv ist nicht eindeutig möglich. Die Darstellung

der Borrelien erfolgt stattdessen üblicherweise mittels Dunkelfeld- (Abb. 4-4) oder Phasenkontrastmikroskopie [144].

Tab. 4-1: Systematische Einordnung von Bbss

Domäne	**Bakterien**
Abteilung	**Spirochaetes**
Klasse	**Spirochaetes**
Ordnung	**Spirochaetales**
Familie	**Spirochaetaceae**
Gattung	**Borrelia**

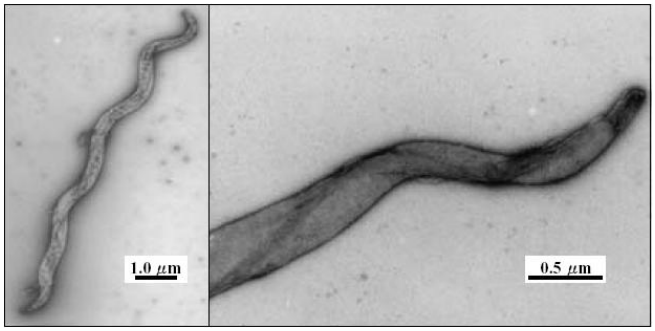


Abb. 4-3: Morphologie von *Borrelia burgdorferi* sensu lato mit periplasmatischen Flagellen



Abb. 4-4: Bbss im BSK-II-Medium unter dem Dunkelfeldmikroskop (400-fache Vergrößerung)

Als mikroaerophiles Bakterium verbreitet sich *Bb*ss im menschlichen Wirt nicht über die Blutgefäße, sondern mittels aktiver Wanderung durch das (Binde-) Gewebe [138]. Der intrazelluläre Verbleib von *Bb*ss ist eine Ursache z. B. für die Neuroborreliose [145], [146].

Die Kultur des Bakteriums erfolgt üblicherweise in BSK-II-Medium, benannt nach ALAN G. BARBOUR, HERBERT G. STOENNER und RICHARD KELLY, die das Medium einsetzten und optimierten [147], [148], [149]. Seine Zusammensetzung und Herstellung ist unter Kapitel 7.7.1 beschrieben. Die Verdopplungszeit von *Bb*ss beträgt in BSK-II-Medium ca. 12 bis 18 Stunden [150].

4.1 Lyme-Borreliose

Die Erkrankung Lyme-Borreliose ist die nach dem Ort Lyme im US-Bundesstaat Connecticut benannte Erkrankung, die durch Borrelien verursacht wird. 1977 erkannte der Humanmediziner und Epidemiologe ALLEN C. STEERE den Zusammenhang epidemisch gehäufter Fälle von Arthritis in Ost-Connecticut mit dem Auftreten von Hautläsionen, die er in Verbindung mit Zeckenstichen brachte [151]. Lyme-Borreliose äußert sich initial durch das typische, aber nicht immer vorhandene Leitsymptom Erythema migrans, die Wanderröte um den Zeckenstich, welche i. A. binnen zehn Tagen erscheint [135]. Sie ist oft von unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Fieber oder Gliederschmerzen begleitet. Die Erkrankung kann spontan ausheilen, aber auch generalisieren und in eine chronische Form mit neurologischen, kardialen, okulären und allgemein unspezifischen Symptomen übergehen, die wenige Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich beginnt. Als häufigste Spätmanifestationen finden sich nach Jahren Arthritis, Hautveränderungen (Acrodermatitis chronica atrophicans) und neurologische Erscheinungen [152].

Die Standardtherapie mit Antibiotika erfolgt unter Beachtung der Kontraindikationen für zwei bis vier Wochen meist mit folgenden Wirkstoffen [138], [153], [154], [155]: Doxycyclin (v.a. bei Erythema migrans), Amoxicillin bzw. Cefuroxim (bei Kontraindikation gegen Doxycyclin z. B. bei Kindern und Schwangeren), Azithromycin (bei Unverträglichkeiten gegen andere Wirkstoffe) oder Ceftriaxon (eingesetzt u.a. bei Neuroborreliose, Karditis, Arthritis);

Neben der Lyme-Borreliose kann *Ixodes ricinus* auch die Frühsommer-Menigoenzephalitis (FSME) übertragen, eine durch Flaviviren ausgelöste Erkrankung. Sie kann durch mehrere Unterarten mit unterschiedlichem Letalitätsrisiko für den Menschen ausgelöst werden und ist nicht ursächlich behandelbar. Im Gegensatz zur Borreliose steht aber eine Schutzimpfung (z. B. Encepur® von Novartis Vaccines und FSME IMMUN® von Baxter) zur wirksamen

Vorbeugung zur Verfügung [156], die auch in den aktuellen Impfempfehlungen der Ständigen Impfkommission am Robert-Koch-Institut (STIKO) für bestimmte Risikogruppen enthalten ist [157].

5 Ziele der Arbeit

Im Hauptteil der Arbeit sollen Untersuchungen über *Dipsacus sylvestris* HUDS. durchgeführt werden. Erst in den letzten zwei Jahrzehnten ist diese Pflanze im Zusammenhang mit der Lyme-Borreliose erwähnt worden. Das ist bemerkenswert, da sie auch in anderen Indikationsgebieten nicht zum bekannten Heilpflanzenschatz der mitteleuropäischen Medizin gehört. Untersucht werden soll der Teilaspekt der antibakteriellen Aktivität von Extrakten und isolierten Reinstoffen gegen einen der Erreger: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto *(Bb*ss). Aufgrund des gewaltigen Versuchsbedarfs bei der Arzneistoffforschung von einem experimentellen Effekt zur therapeutisch nutzbaren Substanz oder Zubereitung soll sich die Arbeit auf die *in-vitro*-Untersuchungen beschränken. Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit soll sich der seit der Antike im Mittelmeerraum intensiv genutzten Heilpflanze *Cistus creticus* L. (graubehaarte Zistrose) und ihrem Harz Ladanum widmen. Beide sind chemisch recht gut charakterisiert und Gegenstand diverser Forschungsarbeiten (Kapitel 3.2 und 3.3). Nachdem erste Voruntersuchungen bereits *in-vitro*-Effekte des ätherischen Öls zeigen konnten [115], soll die Aktivität des Ladanums als angereichertes Harz untersucht werden. Darüber hinaus stehen isolierte Reinsubstanzen aus *Cistus creticus* L. und seinem Harz zur Verfügung, deren Anteil am bereits bekannten *in-vitro*-Effekt geprüft werden soll.

Zur chemischen Charakterisierung der wilden Karde liegen bisher recht wenige Arbeiten vor. Einige iridoide Bestandteile wurden näher charakterisiert (Kapitel 2.2); eine detailliertere Analytik steht aus. Dementsprechend soll die vorliegende Arbeit auch das Ziel verfolgen, weitere Inhaltsstoffe zu identifizieren, gegebenenfalls zu charakterisieren bzw. zu isolieren und im *in-vitro*-Bakterienmodell neben Extrakten zu testen. Reinstoffe sollen isoliert werden, um Referenzsubstanzen für die Analytik zur Verfügung zu haben. Die Entwicklung einer phytochemischen Analytik zur Identifizierung von Drogen und Wildsammlungen der wilden Karde steht dabei ebenso im Fokus, da die Pflanze bisher nicht monographiert ist. Mithilfe von Markersubstanzen sollen u.a. Fingerprint-Chromatogramme gewonnen werden, die eine Abgrenzung z. B. von anderen Arten ermöglichen. Dazu sollen neben der gängigen Methodik

der DC auch instrumentelle Methoden wie die CE zu Hilfe genommen werden. Zur Quantifizierung ausgewählter Leitsubstanzen soll dabei eine kapillarelektrophoretische Methode entwickelt werden.

MATERIAL UND METHODEN

6 Verwendete Materialien

6.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

„Frische Karde“: frische Wurzeln von *Dipsacus sylvestris* HUDS. im 1. Jahr, geerntet am 21. Oktober 2007, von H. MACHURA von „physiologica naturprodukte“, Ruppichteroth (von W.-D. STORL empfohlener Anbauer der Karde zur Gewinnung der hydroethanolischen Wurzelextrakts.) Die Wurzeln wurden unmittelbar nach der Ernte geliefert und im Labor manuell geschnitten. Ein erster Teil wurde sofort im frischen Zustand, ein zweiter nach Lagerung im Tiefkühlschrank bei -25 °C weiterverarbeitet, ein dritter gefriergetrocknet.

„getrocknete Karde“: geschnittene Wurzeldroge von *Dipsacus sylvestris* HUDS., Fa. Alfred Galke GmbH, Gittelde, Ch.: 15117.

Andornkraut (Herba Marrubii conc.) aus den Laboren der Pharmazeutischen Biologie, Universität Leipzig

Angelikawurzel (Radix Angelicae conc.) Ph.Eur. 4.02, Ch.: 43597255, Caesar & Lorenz GmbH, Hilden

Bitterkleeblätter (Folia Trifolii fibrini conc.) Ph.Eur. 4.00, Ch.: 30131243, Caesar & Lorenz GmbH, Hilden

Cistus incanus-Kraut, Ch.: 1 1396 106 01, „WBT Tarım Ürünleri Antalya Türkei“, LR Health & Beauty Systems, Ahlen

Geschnittene Wurzeldroge von *Dipsacus asperoides* CHENG „Xu Duan“, Ch.: 51241317, Caesar & Lorenz GmbH, Hilden

Ladanum (“Labdanum resin from Cistus Incanus Creticus”), Nyktaris Dimitris, Rethymno, Kreta

6.2 Eingesetzte Bakterien im *in-vitro*-Modell

Borrelia burgdorferi sensu stricto N40, Passage 49, Ch.: JK.02.03.2004, 100 µl (Mischung aus 82,8 µl Borrelienkultur in BSK-II-Medium und 27,2 µl sterilem Glycerol 87 %) gelagert bei -80 °C, zur Verfügung gestellt von Dr. J. LEHMANN und Dr. J. KNAUER, Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig

6.3 Chemikalien

Folgende Chemikalien der jeweils angegebenen Herkunft kamen zum Einsatz. Wurden gleiche Chemikalien verschiedener Anbieter oder Spezifikationen angegeben, ist der jeweilige Verwendungszweck aufgeführt. Sämtliche Lösungsmittel und Ac. form. wurden vor ihrer Verwendung destilliert. Chemikalien aus dem Fundus der Labore der Pharmazeutischen Biologie, Universität Leipzig, wurden mit Pharm. Bio. gelistet.

Aceton, BASF, Ludwigshafen

Ameisensäure (Ac. form.) 99-100 %, BASF, Ludwigshafen

Ammoniak 25 % reinst, Grüssing GmbH, Filsum

Amoxicillin, Pharm. Bio.

Apigenin-7-O-glucosid Rotichrom® HPLC, Ch.: 08461785, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

L-(+)-Arabinose puriss., Ch.: 4339263, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Borsäure zur Analyse, Ch.: 60119 011068, VEB Laborchemie, Apolda

Bovine serum albumin Low Endotoxin (V), Ch.: K01106-1328, Sigma, St. Louis, MO

n-Butanol, BASF, Ludwigshafen

Carvacrol = Carvacrolum purum (>97% GC), Ch: 1384779, Fluka Analytical, Buchs

Chloroform, Brenntag Chemiepartner GmbH, Mühlheim a. d. Ruhr

Chloroform-d ($CDCl_3$) aus den Laboren der Organischen Chemie, Universität Leipzig

Chlorogensäure Reagenz Ph. Eur., Ch.: K29125419, Merck KGaA, Darmstadt

CMRL (Connaught Medical Research Laboratories) media 1066 10X (sterile), Ch.: 463927, Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA

Cumarin DAB 9, Ch.: 0959773, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Deuteriumoxid = Schweres Wasser, 100 Atom% D, Ch.: 4529, ARMAR AG, Döttingen, CH

Dichlormethan = Methylenchlorid, 98-100 %, BASF, Ludwigshafen

Diethylether 99,5 % reinst DAB, Grüssing GmbH, Filsum

N,N-Dimethyl-4-aminobenzaldehyd, Pharm. Bio.

Dimethylsulfoxid = DMSO, Ch: 11K2394, St. Louis, MO

3,5-Dinitrobenzoesäure rein (purum), VEB Jenapharm Laborchemie, Apolda

Echinacosid, Phytolab, Vestenbergsgreuth

Echtblausalz B, Ch.: 336449/1 395, Fluka Chemie, Buchs

Echtrotsalz B (Fast Red B Salt pure), Ch.: 21300, Serva Feinbiochemica, Heidelberg / New York

Esculetin Rotichrom ® CHR, Ch.: 4832530, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Esculin Rotichrom® CHR, Ch.: 0587019, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Essigsäure 99,8 %, Ch.: 24816-068, Sigma-Aldrich, Steinheim

Ethanol, BASF, Ludwigshafen

Ethylacetat 98-100 %, BASF, Ludwigshafen

Ethylmethylketon = Methylethylketon, BASF, Ludwigshafen

Fructose besonders gereinigt, 2. AB-DDR, Ch.: 15/04/170, VEB-Berlin-Chemie, Berlin

Galactose, Pharm. Bio.

Gelatine, Ch.: 025K00011, Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ

D-(+)-Glucose wasserfrei für biochemische Zwecke (für DC), Ch.: 804 K01826737, Merck, Darmstadt

Glucose (für BSK-II-Medium), Ch.: 036K01374, Sigma, St. Louis, MO

Glycerol AnalaR Normapur, 99,5 %, bidestilliert, Ch.: 08G180510, VWR, Darmstadt

Hautpulver vom Schwein, Pharm. Bio.

Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), Ch.: 076K5429, Sigma, St. Louis, MO

Hexan, BASF, Ludwigshafen

4-Hydroxybenzaldehyd > 98 % zur Synthese, Merck, Darmstadt

Hyperosid Reagenz Ph. Eur., Ch.: K26349837, Merck KGaA, Darmstadt

Kaffeesäure, Pharm. Bio.

Kaliumhydroxid, Chemapol, Prag

Kanamycin solution from *Streptomyces kanamyceticus* (10 mg/100 ml in 0,9 % NaCl), Ch: 0808200, Sigma, St. Louis, MO

Khellin (TLC), Ch.:405985/1, Fluka Chemie, Buchs

Lactose, Pharm. Bio.

Loganin (HPLC), Ch.: 08040809, Extrasynthese, Genay Cedex

Luteolin-7-O-glucosid Rotichrom® HPLC, Ch.: 29573079, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Maltose z. A., Ch.: 24010485, Fritz Leidholdt, Kleinmachnow

D-(+)-Mannose für biochemische Zwecke, Ch.: K30283788 232, Merck, Darmstadt

Methanol, BASF, Ludwigshafen

8-Methoxypsoralen aus Oxsoralen® Kapseln, Gerot Pharmazeutika, Wien

Molybdat-Wolframat-Lösung (Molybdat-Wolframat-Reagenz *R*, Ph. Eur. 5.0), Pharm. Bio.

N-acetyl-D-glucosamin, Ch.: 097K531011, Sigma, St. Louis, MO

Natriumcitrat, Ch.: 018K0052, Sigma, St. Louis, MO

Natriumcarbonatdecahydrat zur Analyse, Ch.: A714591620, Merck KGaA, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat, Ch.: 068K01052, Sigma, St. Louis, MO

Natriumhydroxid zur Analyse, reinst, (zur CE-MEKC-Pufferherstellung) Pharm. Bio.

Natriumpyruvat, Ch.: 117K06621, Sigma, St. Louis, MO

Natronlauge 0,1 mol/l, F = 1,000 ± 0,2 %,(für CE-Spülung) Ch.: 5130, Grüssing GmbH, Filsum

Natronlauge 0,15 mol/l (für CE-CZE-Pufferherstellung), Pharm. Bio.

Naturstoffreagenz A = Diphenylboryloxyethylamin, Ch.: 41837438, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Neopepton, Ch.: 8099560, BD Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ

Oleanolsäure Rotichrom® HPLC, Ch.: 36524584, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Phthalsäure (PS), Pharm. Bio.

Polyethylenglycol 400 zur Synthese, Ch.: 44015833, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

Polysorbat 80, Pharm. Bio.

n-Propanol, Pharm. Bio.

Pyridin-d_5 aus den Laboren der Organischen Chemie, Universität Leipzig

Pyrogallol, Pharm. Bio.

Rabbit serum, Ch.: 1214160, Sigma, St. Louis, MO

Ribose, Pharm. Bio.

Rifampicin, Ch: 85K192925, Sigma, St. Louis, MO

Rosmarinsäure ca. 99 %, von M. Petersen, Universität Marburg zur Verfügung gestellt

Rutin reinst DAB 7, Ch.: 3651909 Merck, Darmstadt

Saccharose = Rohrzucker, reinst zur Analyse (purissimum), Ch.: 260110, Biochemie Bernd Belger, Kleinmachnow

Salzsäure 37 % für analytische Zwecke, Ch.: 4106, Grüssing GmbH & Co, Filsum

Schwefelsäure 95-97 % reinst, Ch.: 3098, Grüssing GmbH, Filsum

Scopoletin Rotichrom® > 98 %, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

SDS ultra pure ≥ 99 % f. d. Elektrophorese (Natriumdodecylsulfat), Ch.: 50630055, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Seesand, Pharm. Bio.

β-Sitosterol, Pharm. Bio.

TC Yeastolate, Ch.: 8218835, Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ

Thymol, Pharm. Bio.

Vanillin zur Synthese, Ch.: S4551918625, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

Verbascosid, von I. Calis, Hacettepe Universität, Ankara zur Verfügung gestellt

Vitexin Rotichrom® TLC, Ch.: 089 28755, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Wasser, dest. - für die CE wurde daraus H_2O (bidest.) hergestellt, Pharm. Bio.

Wasser, dest. und steril aus den Laboren des Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig (nur zur Herstellung des BSK-II-Mediums)

D-(+)-Xylose für biochemische Zwecke, Ch.: 712 V518789, Merck, Darmstadt

Aluminiumoxid 90, Aktivitätsstufe I, neutral, Korngröße 0,063 - 0,200 mm, Ch.: 418TA689777 Merck KGaA, Darmstadt

DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 F_{254}, Ch.: HX616606 und OB405095, Merck KGaA, Darmstadt; jeweils zur Entfernung der Weichmacher und etwaiger Verunreinigungen zweifach mit destilliertem MeOH vorgewaschen

Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie, Korngröße 0,040 - 0,063 mm, TA 431785, Merck AG, Darmstadt

RP-KG-Säulenmaterial Nucleodur® 100-50 C18 endcapped, Ch.: 35503013, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

6.4 Geräte und sonstige Materialien

CE-Anlage: P/ACE™ System MDQ Capillary Electrophoresis mit Pace™ System MDQ Diode Array Detector, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA

CE-Kapillaren: eCAP™ Capillary Tubing, unbeschichtet, Innen-ø 75 µm, Außen-ø 375 µm, Länge 40 cm, effektive Länge zum Detektorfenster 30 cm [158], Ch.: S606016, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA

DC-Dokumentation mit Kodak easyshare ZD 710 Zoom Digitalkamera, Eastman Kodak Company, Rochester, NY

Filtration: Cellulose Acetat Filter 0,45 µm zum Filtrieren der CE-Puffer, Ch.: 0703 11106 0201863, Sartorius AG, Göttingen; Chromafil® GF/PET 45/25 Einmalfilter, Glasfaser-Vorfilter + Polyester, Porengröße 1,0/0,45 µm, ø 25 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren; Filtrak Faltenfilter 1288 (qualitativ), ø 110 mm, Ch.: 2386/1, Spezialpapier Filtrak GmbH, Niederschlag; Filtrak 390 Rundfilter (dicht, engporig, langsam filtrierend für feinste Niederschläge), 0,025 mg, Ch.: 05. März 1971, VEB Spezialpapierfabrik, Niederschlag; Folded Filters (Qual.), Grade 6, 80 g/m², ø 90 mm, Ch.: 01-059, Sartorius AG, Göttingen

Fraktionssammler: SuperFrac mit Rack B für 180 Reagenzgläser à 20 ml, amersham pharmacia biotech, Amersham, HP, Großbritannien

Gaschromatographie: 5890 Series II GC-System mit EI-Quadrupol-Massenspektrometer HP-MSD 5973 und Agilent DB-5-Säule, Agilent, Waldbronn

Homogenisation: Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY

Inkubator für *Bb*ss-Anzucht und zum Temperieren des BSK-II-Mediums: Thermo Forma Series II Water Jacketed CO_2 Incubator with HepaFilter, (Inkubationsbedingungen: 33 °C, 5,0 % CO_2, 10 % O_2, 73 % rel. Luftfeuchte), Thermo Forma Scientific, Marietta, OH

Kulturröhrchen für *Bb*ss: Rundbodenröhrchen mit Steckkappe gelb, γ-sterilisiert, 5ml, Laborfachhandel Dr. Ilona Schubert, Leipzig

Mikroskopie: Axioskop 2 plus mit folgenden Objektiven: PLAN-Neoflur 5x/0,15; 10x/0,30; 20x/0,50; 40x/0,75; 100x/1,30 Oil; Okular W-PL 10x/23 und Axiolab re, mit folgenden Objektiven Achroplan 4x/0,10; 10x/0,25; 20x/0,45; 40x/0,60; 100x/1,25 Oil; Okular E-PL 10x/20, jeweils Carl Zeiss, Jena

Mikroskopie-Zählkammer: Petroff-Hausser Counting Chamber, 1/400 sqm, 0,0200 mm dep, Hausser Scientific, Blue Bell, PA

NMR-Spektrometer: Varian Mercury-300BB und Varian Mercury-400BB, Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Bruker DRX-600, Bruker BioSpin Corp., Billerica, MA

pH-Messgerät: pH 211 Microprocessor pH Meter, Hanna instruments, Bedfordshire

Pipettierhilfen und –spitzen: Eppendorf AG, Hamburg

RLCC-Anlage mit separater Pumpe: Rotation Locular Countercurrent Chromatograph Modell RLCC-A, Eyela Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan (16 Glassäulen à 11mm x

450mm mit je 37 Kompartimenten, 3ml Teflon-Probenschleife, 20 bis 100 U/min, interne Pumpe defekt, dafür Perkin-Elmer Series 200 LC pump, Shelton, CT)

Sterilbank: NuAire "NU-S437-500-E" Biological Safety Cabinet Class II EN A2, NuAire, Plymouth, MN

Sterilfiltration: sterile Spritzenvorsatzfilter 0,20 µm, hydrophil, Ch.: 16532 050184; 0,45 µm, hydrophil, Ch.: 16537 050185; 0,80 µm, hydrophil, Ch.: 16532 070964, Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig; sterile Spritzen Terumo® Syringe 2 ml, Ch.: 03136/0473, Somerset, NJ

UV/Vis-Spektralphotometer: DU® 520 General Purpose UV/Vis-Spectrophotometer, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA

Zentrifuge: Labofuge 400R, Heraeus, Hanau

Zerkleinerung: Pulvermühle MF10 basic; Ultra-Turrax T25; Ultra-Turrax T50, jeweils Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen

6.5 Spezielle Mess- und Auswertungssoftware

Der CE-Betrieb und die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mittels 32 karat Software Version 8.0, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA. Die Daten der GC-MS Messungen wurden mittels AMDIS-Software 2.65 (National Institute of Standards Technology, Gaithersburg, MD), die NMR-Daten mittels MestReNova Version 7.1.2-10008, Mestrelab Research S.L. ausgewertet. Die statistischen Auswertungen und Diagramme wurden mit SPSS Statistics 17.0, IBM® und Microsoft® Office Excel® 2007 SP3 MSO, Microsoft Corporation erstellt. Die Strukturformeln wurden mit ChemDraw® Ultra 8.0, CambridgeSoft Corporation und ChemSketch 2018.1.1, ACD Labs erstellt.

7 Methoden

7.1 Gerbstoffbestimmung

Mithilfe der Methode „Gerbstoffe in pflanzlichen Drogen" des Europäischen Arzneibuchs wurde als Groborientierung der Anteil an Hautpulver adsorbierbarer Polyphenole („Gerbstoffe"), berechnet als Pyrogallol, bestimmt [159]. Dabei wird der Gerbstofftyp nicht betrachtet. Zur Gerbstoffbestimmung wurden in zwei Parallelansätzen m_{1a} = 0,7527 g bzw. m_{1b} = 0,7696 g pulverisierte, lyophilisierte Kardenwurzel 30 min mit 150 ml H_2O unter

Rückfluss gekocht und mit fließendem H_2O abgekühlt. Anschließend wurde quantitativ überführt, mit H_2O auf 250,0 ml verdünnt und filtriert. Die ersten 50 ml des Filtrats wurden verworfen. Jeweils 5,0 ml Filtrat wurden auf 25,0 ml verdünnt, 2,0 ml davon mit 1,0 ml Molybdat-Wolframat-Reagenz und 10,0 ml H_2O versetzt und mit 29 %-iger Natriumcarbonatlösung auf 25,0 ml verdünnt. Nach genau 30 min wurden die Absorptionen bei 760 nm gegen H_2O als Kompensationsflüssigkeit gemessen (Gesamt-Polyphenole, Absorptionen A_{1a} und A_{1b}).

Je 10,0 ml Filtrat wurden mit 0,1 g Hautpulver versetzt, 60 min lang geschüttelt und danach filtriert. 5,0 ml dieses Filtrats wurden auf 25,0 ml verdünnt, 2,0 ml davon mit 1,0 ml Molybdat-Wolframat-Reagenz und 10,0 ml H_2O versetzt und mit 29 %-iger Natriumcarbonatlösung auf 25,0 ml verdünnt. Nach genau 30 min wurden die Absorptionen bei 760 nm gegen H_2O als Kompensationsflüssigkeit gemessen (durch Hautpulver nicht adsorbierbare Polyphenole, Absorptionen A_{2a} und A_{2b}).

Als Referenzlösung wurden 50 mg Pyrogallol (Einwaage m_2 = 49,8 mg) in 100,0 ml H_2O gelöst und 5,0 ml dieser Lösung erneut mit H_2O auf 100,0 ml verdünnt. 2,0 ml dieser 0,0025 %-igen Pyrogallol-Lösung wurden mit 1,0 ml Molybdat-Wolframat-Lösung und 10,0 ml H_2O versetzt und mit 29 %-iger Natriumcarbonatlösung auf 25,0 ml verdünnt. Nach genau 30 min wurden die Absorptionen bei 760 nm gegen H_2O als Kompensationsflüssigkeit gemessen (Referenzlösung, Absorption A_3).

Der prozentuale Anteil an Gerbstoffen, d. h. durch Hautpulver nicht adsorbierbare Polyphenole, wurde als Pyrogallol berechnet:

$$x = \frac{62{,}5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot m_2}{A_3 \cdot m_1} \qquad \textbf{(Formel 1)}$$

x = Anteil an Gerbstoffen [%], A_1 = Absorption der Gesamt-Polyphenole, A_2 = Absorption der durch Hautpulver nicht adsorbierbaren Polyphenole, A_3 = Absorption der Pyrogallolreferenzlösung, m_1 = Einwaage Droge [g], m_2 = Einwaage Pyrogallol [g]

7.2 Herstellung von Extrakten

Für die phytochemischen Untersuchungen wurden verschiedene Extrakte aus der Kardenwurzel hergestellt und weiterverarbeitet. Einige dieser Extrakte und Isolate wurden im Verlauf der Arbeit im Bakterienmodell oder als Referenzsubstanzen verwendet. Ebenso wurde für die biologische Testung ein Direktextrakt aus Ladanum hergestellt.

Bei der Betrachtung der Kardenwurzel wurde ausgehend von der traditionellen Anwendung verdünnter alkoholischer Tinkturen zunächst ein hydroethanolischer Wurzelextrakt hergestellt und weiterverarbeitet (7.2.1). Dafür wurden frische Wurzeln verwendet, die von einem Anbauer bezogen wurden, der explizit in den Büchern über die Heilwirkung von Kardenextrakt genannt wird [22]. In DC-Vorversuchen zeigte ein methanolischer Extrakt gegenüber dem alkoholischen Extrakt ein unterschiedliches Inhaltsstoffspektrum. Daher wurde zusätzlich ein methanolischer Extrakt aus im Handel erhältlicher, geschnittener Wurzeldroge zubereitet (7.2.2).

7.2.1 Hydroethanolischer-Extrakt aus frischen Kardenwurzeln und daraus hergestellte Extrakte

Um zunächst den Gehalt an H_2O und flüchtigen Bestandteilen zu bestimmen und die Frischpflanzenteile lagerfähig zu halten, wurden in 21 Teilmengen insgesamt 2628,3 g frische Wurzel von *D. sylv.* („frische Karde“) kleingeschnitten, eingefroren und lyophilisiert. Anschließend wurden die Trocknungsverluste bestimmt.

Nach manueller Zerkleinerung von 1633,4 g frischer Kardenwurzel wurde diese in zwei Teilen zu 565,0 g und 1068,4 g tiefgefroren. Unter Eiskühlung und nach Zusatz von 1,2 bzw. 3,5 l Ethanol (EtOH) 70 % (V/V) wurde jeweils mit dem Ultra-Turrax®-Rührwerk bei 4000 min^{-1} homogenisiert und der Ansatz für einige Stunden stehen gelassen. Anschließend wurde durch ein Baumwolltuch filtriert. Die verbliebenen Schwebeteilchen wurden abzentrifugiert. Der Flüssigextrakt wurde unter vermindertem Druck durch Filterpapier in einem Büchner-Trichter abgesaugt. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck einrotiert. Das abrotierte Lösungsmittel einschließlich abdestillierter flüchtiger Bestandteile wurde durch Zugabe von EtOH unter Aräometer-Kontrolle erneut auf EtOH 70 % (V/V) eingestellt. Die

zerkleinerten Pflanzenteile aus dem Baumwolltuch wurden mehrfach mit dem redestillierten Ethanol versetzt und wie zuvor beschrieben behandelt. Die erhaltenen Flüssigextrakte wurden vereinigt, zur Trockne einrotiert und zur Resttrocknung lyophilisiert. Der Trockenextrakt „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“ wurde erhalten.

7.2.1.1 Fraktionierung des hydroethanolischen Extrakts „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“

Ein Anteil von 100,0 g von „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“ wurde durch Ausschüttelung in fünf Extrakte steigender Polarität fraktioniert. Dazu wurde der hydroethanolische Trockenextrakt im Ultraschallbad in 350 ml H_2O gelöst und in einen Scheidetrichter überführt. Unlösliche Bestandteile lösten sich bei Zugabe von Hex im ersten Ausschüttelungsschritt. Nacheinander wurde mit 100, 100 und 150 ml Hex ausgeschüttelt und die vereinigten Hex-Phasen bei 40 °C unter vermindertem Druck zur Trockene eingeengt und später lyophilisiert. Analog wurde die verbliebene H_2O-Phase je dreimal mit DCM und Ethylacetat (EE, in Diagrammen auch EtOAc) ausgeschüttelt, wobei sich bei diesen Schritten keine vollständige Phasentrennung ergab, so dass der Bereich um die Phasengrenze zentrifugiert werden musste. Dabei blieben 2,1 g des bei der Ausschüttelung ausgeflockten, nicht mehr löslichen Rückstands übrig, der keiner der Phasen zugeordnet werden konnte. Die vereinigten DCM- und EE-Phasen wurden wiederum zur Trockne eingeengt. Am Ende wurde die übriggebliebene H_2O-Phase noch mit 100, 100 und 150 ml n-Butanol (n-But) ausgeschüttelt, die Phasen im Scheidetrichter getrennt und die entstanden Extrakte einrotiert. Der H_2O-Extrakt wurde bis zur Zähflüssigkeit eingeengt und dann lyophilisiert, die n-But-Phase zur Trockne eingeengt, in etwas H_2O angelöst und lyophilisiert. Dabei wurden die Fraktionen „DS_fW_Frak-Hex“, „DS_fW_Frak-DCM“, „DS_fW_Frak-EE“, „DS_fW_Frak-n-But“ und „DS_fW_Frak-H_2O“ erhalten.

7.2.2 MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge und daraus hergestellte Extrakte

2752,2 g geschnittene, trockene Wurzeldroge („getrocknete Karde“) wurde in vier Teilansätzen mit insgesamt etwa 10 l destilliertem MeOH versetzt, stehen gelassen und anschließend abfiltriert. Die Filtrate wurden unter vermindertem Druck einrotiert. Die Drogenmasse wurde in der beschriebenen Weise noch viermal mit redestilliertem MeOH versetzt, mittels Ultra-Turrax®-Rührwerk bei 3000 min^{-1} homogenisiert, mittels hydraulischer

Tinkturenpresse bei ca. 10 kg/cm² ausgepresst, anschließend filtriert und unter vermindertem Druck einrotiert. Die erhaltenen Dickextrakte wurden vereinigt, zur Trockne einrotiert und zur Resttrocknung lyophilisiert. Es wurde der Trockenextrakt „DS_WD_MeOH-TE“ erhalten.

7.2.2.1 Fraktionierung des methanolischen Extrakts „DS_WD_MeOH-TE“

Der erhaltene Trockenextrakt „DS_WD_MeOH-TE“ wurde durch Ausschüttelung in fünf Subfraktionen steigender Polarität aufgetrennt. Nach Zugabe von 950 ml H_2O und 300 ml Hex wurde ausgeschüttelt, im Scheidetrichter abgetrennt und die Hex-Phase abgenommen. Nach Abrotieren des Lösungsmittels unter vermindertem Druck zur Trockne wurde das Hex erneut zum Scheidetrichtergemisch gegeben und der Vorgang insgesamt siebenmal wiederholt. Analog wurde die verbleibende H_2O-Phase fünfmal mit je 350 ml DCM, sechsmal mit je 400 ml EE und viermal mit je 300 ml n-But ausgeschüttelt. Die Restwasserphase wurde bis zur Zähflüssigkeit einrotiert und anschließend lyophilisiert. Die fünf Fraktionen „DS_WD_Frak-Hex“, „DS_WD_Frak-DCM“, „DS_WD_Frak-EE“, „DS_WD_Frak_n-But“ und „DS_WD_Frak-H_2O“ wurden erhalten. Aus der Fraktion „DS_WD_Frak-Hex“ wurden säulenchromatographisch weitere Subfraktionen gewonnen (7.3.2.1.7).

7.2.3 Chloroform-Extrakt aus Ladanum

Für die angestrebte Testung im *in-vitro*-Bakterienmodell wurden aufgrund der guten Löslichkeit 212,6 mg Ladanum mit 7,0 ml Chloroform ($CHCl_3$) versetzt, im Ultraschallbad extrahiert, anschließend abfiltriert und als „Lad-TE“ zur Trockne einrotiert.

7.2.4 Methanolische und hydroethanolische Flüssigextrakte für die Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Untersuchungslösungen (UL) insbesondere für die Fingerprint-DC wurden drei methanolische sowie drei hydroethanolische Flüssigextrakte hergestellt. Für „DS_fW_MeOH_DC“ wurden 5,0 g gepulverte *D. sylv.*-Wurzeln (selbst getrocknet aus „frischer Karde“, siehe Kapitel 7.2.1, im ersten Jahr geerntet), für „DS_WD_MeOH_DC“ 5,0 g *D. sylv.*-Wurzeln („getrocknete Karde“) und für „DA_MeOH_DC“ 5,0 g *D. asp.*-Wurzeln mit jeweils 5 ml MeOH versetzt und unter Rückfluss 5 min erwärmt. Analog wurden

„DS_fW_EtOH_DC“, „DS_WD_EtOH_DC“ und „DA_EtOH_DC“ mit jeweils 5 ml EtOH (70 % (V/V)) hergestellt.

Für das DC-Screening wurden „Marr_acEx_DC“ und „DS_fW_acEx_DC“ hergestellt. Je 1,0 g gepulverte Droge (gepulverte lyophilisierte Kardenwurzel bzw. Andornkraut) wurden in einer Mischung aus 8 ml MeOH und 2 ml verdünnter Salzsäure unter Rückfluss 30 min erhitzt und nach Erkalten filtriert. Für „Menyan_Ex_DC“ wurden 1,0 g gepulverte Bitterkleeblätter in 12 ml MeOH 5 min bei 60 °C erhitzt, nach Erkalten filtriert, zur Trockne eingeengt und in 2,0 ml MeOH gelöst. Für „Ang_Ex_DC“ wurden 1,0 g gepulverte Angelikawurzel in 5 ml MeOH 30 s sieden gelassen und nach Erkalten filtriert.

Als Referenzlösung „CI_MeOH_DC“ für DC-Voruntersuchung mit Ladanum und ätherischen Öl von *C. cret*. wurden 5,0 g *Cistus incanus*-Kraut in 15,0 ml MeOH 30 min unter Rühren bei 50 °C extrahiert und nach Erkalten abfiltriert. Zusätzlich wurden 100 mg Ladanum in 1,0 ml $CHCl_3$ suspendiert, geschüttelt und als „Lad_$CHCl_3$_DC“ abfiltriert.

7.2.5 Methanolische Trockenextrakte zur Drogenidentifizierung und Substanzquantifizierung mittels Kapillarelektrophorese (CE)

Für die UL für die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und die Mizellare Elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC) wurden drei methanolische Trockenextrakte hergestellt. Für „DS_fW_MeOH-TE_CE“ wurden 5,00 g gepulverte *D. sylv.*-Wurzeln (selbst getrocknet aus „frischer Karde“, siehe Kapitel 7.2.1, im ersten Jahr geerntet), für „DS_WD_MeOH-TE_CE“ 5,00 g *D. sylv.*-Wurzeln („getrocknete Karde“) und für „DA_MeOH-TE_CE“ 5,00 g *D. asp.*-Wurzeln mit jeweils 75 ml MeOH versetzt, unter Rückfluss 20 min sieden gelassen und nach Erkalten filtriert. Die Filtrate wurden unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt und anschließend zur vollständigen Entfernung von Lösungsmittelresten lyophilisiert. Es ergab sich eine unterschiedliche Ausbeute an methanolischem Trockenextrakt.

7.3 Chromatographie

Chromatographie ist eine Technik zur Auftrennung von Stoffgemischen und zum Aufreinigen von Substanzen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Erfunden vom russischen Botaniker MICHAIL S. TSWETT im Jahr 1903 [160], wurde das chromatographische Verfahren erst zu Beginn der 1930er Jahre mit Arbeiten wie der des Nobelpreisträgers RICHARD KUHN 1931 populär [161]. Viele chromatographische Techniken etablierten sich seither, wie z. B. die Säulenchromatographie (SC) (Normaldruck-, Flash [162]-, Mitteldruck- und Hochleistungsflüssigchromatographie), Planarchromatographie (Papier- [163], [164] und DC), Membranchromatographie und Gaschromatographie (GC, gasförmige mobile Phase, gepackte Säulen oder Kapillarsäulen als stationäre Phase) [165]. 1956/57 entwickelte EGON STAHL unter dem Namen DC die heute gebräuchliche Arbeitsmethode mit auf (Glas-) Platten fixiertem Kieselgel (KG) [166]; seit 1963 wurde diese Technik auch präparativ genutzt [167].

Chromatographische Verfahren beruhen prinzipiell auf Adsorptionseffekten der gelösten oder gasförmigen zu trennenden Teilchen an einer festen Phase, auf Verteilungsvorgängen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, auf Größenausschluss durch unterschiedliche Teilchengrößen oder auf dem Zusammenspiel dieser Vorgänge. Bei der Normalphasen-DC spielen Adsorptionseffekte eine besondere Rolle, bei Umkehrphasen auch verstärkt Verteilungsvorgänge.

7.3.1 DC

Die DC ist eine Form der Planarchromatographie, die sich seit vielen Jahren aufgrund ihrer Vielfältigkeit bei Entwicklung und Detektion, Möglichkeit zur Parallelanalyse mehrerer verschiedener Proben, leichten Durchführbarkeit und Kostengünstigkeit fest in der Analytik von Arzneipflanzen etabliert hat [168, pp. 79-99]. Sie lässt sich nach verschiedenen Aspekten einteilen, z. B. nach Art der stationären Phase (Normal- (NP) und Umkehrphase (RP)) sowie dem Ziel der Trennung (qualitative, semiquantitative und quantitative Analytik). Als stationäre NP, d. h. polare Sorbentien, werden KG mit Partikeldurchmessern zwischen 5 und 40 nm eingesetzt. Die normalerweise verwendete off-line-Technik benötigt mehrere nacheinander durchgeführte Arbeitsschritte für Probenauftragung, -entwicklung und -detektion. Die qualitative Auswertung erfolgt i. A. neben dem Vergleich der Farbe und

Intensität der Bande über die relative Laufstrecke bezogen auf die Fließmittelfront (Verzögerungsfaktor = R_f-Wert):

$$R_f = \frac{l_{Fleck}}{l_{FM-Front}} \qquad \textbf{(Formel 2)}$$

R_f = Verzögerungsfaktor, l_{Fleck} = Laufweite des Substanzflecks von der Startlinie aus, $l_{FM\text{-}Front}$ = Laufweite des Fließmittels von der Startlinie aus

Der R_f-Wert hat den Vorteil, dass er idealerweise unabhängig von der Trennstrecke ist und somit den Vergleich zwischen verschiedenen DC im gleichen Fließmittel (FM)-System zulässt. Einen großen Einfluss auf den R_f-Wert hat das Vorliegen bzw. Fehlen einer Kammersättigung, die durch Filterpapierauskleidung und Einfüllen des FM ca. 1-2 h vor Beginn der Trennung erreicht werden kann. Liegt keine Kammersättigung vor, wandern die Zonen durch Verdampfen von FM von der DC-Platte in die Kammer höher; der R_f-Wert steigt. Um diesen Effekt zu minimieren wird normalerweise zur Charakterisierung der Zonen mit einem Referenzgemisch verglichen, das entweder typische Bestandteile des zu untersuchenden Extrakts enthält, oder preiswerte Markersubstanzen, die als Bezugspunkte für die Zonen im Untersuchungsgemisch dienen.

Zur semiquantitativen Analytik werden die Fleckgrößen und Fleckfarbintensitäten mit bloßem Auge mit einer Referenzsubstanz verglichen, dazu ist die Auftragung definierter Mengen Probelösung bekannter Konzentration nötig. Die im visuellen Bereich oft unsichtbaren Banden werden häufig indirekt sichtbar gemacht, indem sie die Fluoreszenz des den DC-Platten zugesetzten Fluoreszenzindikators bei 254nm mindern, oder direkt mit ultravioletten Licht von 366nm (UV_{366nm}) zur Eigenfluorenzenz angeregt werden. Neben der Direktdetektion, z. B. per ultraviolettem und sichtbarem Licht (UV/Vis), findet die Detektion nach Derivatisierung breite Anwendung, wofür viele Tauch- und Sprühverfahren etabliert wurden [169], [170]. Diese können teils zur spezifischen Anfärbung, teils als Universalnachweismittel genutzt werden. Beispiele sind Vanillin-Schwefelsäure als Universalreagenz, Thymol-Schwefelsäure für Zucker, Naturstoffreagenz A für Flavonoide und Ehrlichs-Reagenz für Iridoide.

Als präparatives Verfahren ist die DC bedingt geeignet, sofern die Weichmacher mit MeOH oder Aceton aus den DC-Folien gewaschen wurden und keine Bestandteile des Bindemittels herausgelöst werden. Zu diesem Zweck werden auf den DC-Folien die Banden ausgeschnitten oder ausgekratzt bzw. bei Durchflusstechniken wie der Zentrifugal-DC die entsprechenden Fraktionen gesammelt [171]. Die Hauptanwendung liegt hier in der einfachen Nachreinigung kleiner Probemengen, die mittels SC vorgereinigt wurden.

7.3.1.1 Analytisch und präparativ genutzte DC-Trennsysteme und chromatographisch eingesetzte Fließmittel (FM)

Soweit nicht anders angegeben, wurden NP-KG-DC-Platten für die Trennungen eingesetzt. Vor Beginn der Experimente wurden die Platten zweimal mit MeOH gereinigt. Der Kontrast der Banden v. a. bei UV-Detektion konnte damit deutlich erhöht werden. Durch banden- statt punktförmige Auftragung von UL und Referenzlösung (RL) konnte eine optimierte Ablesbarkeit der R_f-Werte und eine leichtere Zuordnung der Referenzsubstanzen zu Banden in den Extrakten erreicht werden. Für dünnschichtchromatographische Untersuchungen und Trennungen wurden im Laufe der Arbeit folgende Trennsysteme eingesetzt:

Probeauftrennung für Lignanaufreinigung auf KG-DC, Screening auf Diterpene:

FM1: Diethylether (EtOEt) (100 %) [172, pp. 131-134]

Lignanaufreinigung auf KG-DC; Kontroll-DC erhaltener Fraktionen bei präp. Lignan-DC:

FM2a: $CHCl_3$: MeOH (95 : 5) mit zweifacher Entwicklung, modifiziert nach [173]

Probeauftrennung für Lignanaufreinigung auf KG-DC; Kontroll-DC erhaltener Lignan-Fraktionen bei präparativer KG-DC; zur Ursolsäureisolierung mittels präparativer KG-DC; Kontroll-DC erhaltener Fraktionen bei Isolierung von Ursolsäure mittels präparativer KG-DC und apolarer Fraktionen der Hex-Phasen-MPLC, Screening auf Diterpene:

FM2b: $CHCl_3$: MeOH (95 : 5) mit einfacher Entwicklung [173]

Auftrennung von Iridoiden auf KG-DC:

FM3: DCM : MeOH : H_2O (40 : 10 : 1)

FM4: DCM : MeOH (2 : 1)

FM5: DCM : MeOH (50 : 50)

Standard Kontroll-DC für polare Substanzen, z. B. bei der Iridoidaufreinigung und RLCC-Methode sowie zum Screening auf Flavonoide, phenolische Säuren, Phenylethanoide und Iridoide:

FM6: EE : Methylethylketon (MEK) : H_2O : Ameisensäure (Ac. form.) (50 : 30 : 10 : 10) [174]

Standard Kontroll-DC für apolare Substanzen, z. B. bei MPLC-Fraktionen:

FM7: DCM : MeOH (19 : 1)

Kontroll-DC für Ladanum, *C. cret.*- und Ladanum-Extrakte, Labdan-Diterpene, Carvacrol:

FM8: Hex : DCM : MeOH (35 : 15 : 1)

Screening auf Flavonoide, phenolische Säuren, Phenylethanoide und Iridoide:

FM9: $CHCl_3$: MeOH : H_2O : Ac. form. (61 : 32 : 7 : 2), modifiziert nach [175]

FM10: $CHCl_3$: MeOH : H_2O : Ac. form. (61 : 32 : 7 : 7), modifiziert nach [175]

Screening-Tests für phenolische Substanzen:

FM11: $CHCl_3$: MeOH : H_2O (61 : 32 : 7) [175]

Screening-Tests für phenolische Substanzen und Iridoide:

FM12: EE : MeOH : H_2O (13 : 5 : 2) [176]

Screening auf Cumarine, Cumaringlykoside und Furanochromone:

FM13: EE : Ac. form. : Essigsäure (AcOH) : H_2O (100 : 11 : 11 : 26) [177]

FM14: DCM : Toluol (1 : 1) mit zweifacher Entwicklung [178]

FM15: Toluol : EtOEt : 10 %-ige AcOH (1 : 1 : 1, Oberphase) [179]

FM16: EE (100 %) [179]

Screening auf Iridoide:

FM17: AcOH : H_2O : EE (1 : 1 : 3) [180]

FM18: EE : MeOH : H_2O (77 : 15 : 8) [181]

Screening auf Saccharide:

FM19: EE : MeOH : AcOH : H_2O (12 : 3 : 2 : 3)

Screening auf Diterpene:

FM20: Methylenchlorid : Hexan : Methanol (11 : 8 : 1)

7.3.1.2 Detektionsmethoden für die DC

Substanzen mit geeignetem Chromophor konnten mit UV_{366nm} zur Eigenfluoreszenz angeregt werden und waren direkt nachweisbar. Andere Substanzen waren indirekt sichtbar, indem sie die Fluoreszenz des den DC-Platten zugesetzten Fluoreszenzindikators bei UV_{254nm} minderten. Zahlreiche Verbindungen waren wie zuvor beschrieben nicht oder aufgrund geringer Konzentration nur unzureichend schwach detektierbar. Für diese wurde eine chemische Derivatisierung mittels der nachfolgend aufgeführten Sprühreagenzien vorgenommen:

- Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (VanS):

  Besprühen der getrockneten DC zunächst mit 1 %-iger methanolischer Vanillinlösung, danach sofort mit 5 %-iger methanolischer Schwefelsäurelösung; Erhitzen unter visueller Kontrolle für 5-10 min auf 110 °C, anschließend sofortige Auswertung im Vis und bei $UV_{366\,nm}$;

  → als Universalreagenz für eine Fülle von Naturstoffen.

- Thymol-Schwefelsäure-Reagenz (ThyS):

  Besprühen der getrockneten DC zunächst mit 1 %-iger methanolischer Thymollösung, danach sofort mit 10 %-iger ethanolischer Schwefelsäurelösung; Erhitzen unter visueller Kontrolle für 5-20 min auf 110-125 °C, anschließend sofortige Auswertung im Vis;

  → v. a. für Saccharide, Iridoidgycoside u. ä.

- Naturstoffreagenz A-Polyethylenglycol 400-Reagenz (NSR/PEG):

  Besprühen der getrockneten DC zunächst mit 1 %-iger methanolischer Lösung von Naturstoffreagenz A (Diphenylboryloxyethylamin), anschließend mit 5 %-

iger methanolischer Polyethylenglycol 400-Lösung; letzteres erhöht die Nachweisempfindlichkeit durch Stabilisierung der Fluoreszenz und Glättung der Oberfläche der DC;

→ eingesetzt zur Detektion von Flavonoiden und Hydroxyzimtsäurederivaten.

- Ehrlichs-Reagenz (Ehr):

  Besprühen der getrockneten DC mit einer Lösung von 0,2 g Dimethyl-aminobenzaldehyd in einer Mischung von 4,5 ml H_2O und 5,5 ml Salzsäure, anschließend ca. 10 min bis zum Erscheinen farbiger Zonen auf 100 - 105 °C erhitzt und im Vis ausgewertet;

  → zum Nachweis von Iridoiden (erscheinen als graublaue oder ähnliche Zonen).

- Ethanolische Kalilauge (EtOH-KOH):

  Besprühen der getrockneten DC mit 5 %-iger ethanolischer Kaliumhydroxid-lösung, Auswertung im $UV_{366\,nm}$ und im Vis;

  → zum Nachweis von Anthrachinonen, Anthronen und Cumarinen.

- Echtblausalz B / Natronlauge (EchtB/NaOH):

  Getrocknete DC mit einer 0,5 %-igen wässrigen Lösung von Echtblausalz B besprüht, nach Trocknung im Vis ausgewertet, anschließend mit Natronlauge (0,1 mol/l) nachbesprüht und erneut im Vis ausgewertet;

  → eingesetzt zum Nachweis phenolischer Verbindungen.

- Echtrotsalz B / Ammoniakdämpfe (EchtR/NH_3):

  Besprühen der getrockneten DC mit einer 0,5 %-igen wässrigen Lösung von Echtrotsalz B, sofortige Nachbehandlung mit Ammoniakdämpfen; Auswertung nach dem Trocknen im Vis;

  → eingesetzt zum Nachweis phenolischer Verbindungen.

7.3.1.3 Analytische DC

7.3.1.3.1 Analytische DC von *D. sylv.*

Neben dem analytischen Einsatz der DC für Auswertungen von Isolierungsfraktionen von Säulen und präparativer DC wurden auch zu Screenings- und Identifizierungszwecken DC angefertigt. Mithilfe von FM6, FM9 und FM10 (Detektion mittels NSR/PEG) wurde auf das Vorhandensein von Flavonoiden, phenolischen Säuren und Phenylethanoiden geprüft. Als

Referenzen wurden u. a. Kaffee-, Chlorogen- und Rosmarinsäure, die Flavonolglykoside Rutin und Hyperosid, die Flavonglykoside Apigenin- und Luteolin-7-O-glucosid sowie das Flavon-C-glucosyl Vitexin und die Phenylethanoide Echinacosid und Verbascosid aufgetragen. Ebenso wurde die Eignung von FM11 und FM 12 für phenolische Substanzen untersucht. Zusätzlich wurde mittels EchtR/NH_3 und EchtB/NaOH in FM6, FM9 und FM10 auf das Vorhandensein von Flavonoiden und phenolischen Säuren untersucht. Nach Cumarinen und Furanochromonen wurde in FM13, FM14, FM15 und FM16 mittels DC-Direktauswertung und nach Besprühen mit EtOH-KOH und Erwärmen jeweils bei UV_{365nm} geschaut. Als Referenzen wurden Cumarin, Scopoletin und Esculin, das Furanocumarin 8-Methoxypsoralen, das Cumaringlykosid Esculetin, das Furanochromon Khellin sowie „Ang_Ex_DC“ eingesetzt. Zur Analytik der für *D. sylv.* typischen iridoiden und bis-iridoiden Glykoside wurden ebenfalls systematisch vielfältige Fließmittel und Detektionsreagenzien durchprobiert: FM6, FM9, FM10, FM12, FM17 und FM18 wurden mit VanS- und Ehr-Detektion kombiniert. In FM18 wurde mit „Menyan_Ex_DC“ verglichen, da für Bitterklee die Lage der Loganinbande bei $R_f = 0{,}3$ im verwendeten Fließmittel beschrieben ist [181]. Zur Prüfung auf Zucker wurden die hydroethanolischen bzw. methanolischen Extrakte „DS_fW_EtOH_DC“ und „DS_fW_MeOH_DC““ gegen die Referenzen Arabinose, Fructose, Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Mannose, Ribose, Saccharose und Xylose aufgetragen und nach der Entwicklung in FM19 mit ThyS detektiert. Mithilfe der Fließmittel FM2b und FM20 wurden „Marr_acEx_DC“ und „DS_fW_acEx_DC“ unter VanS-Detektion auf das Vorkommen von Diterpenen geprüft. In den Fließmittelsystemen FM2b und FM1 wurde unter VanS-Detektion nach Triterpenen und Steroiden wie β-Sitosterol, Oleanol- und Ursolsäure gesucht.

Um einen DC-Überblick über das gesamte Inhaltsstoffspektrum der Kardenwurzel auf einer DC-Platte zu erhalten, eigneten sich einzelne vorab untersuchte Fließmittelsysteme nicht. Um die polaren Substanzen vom Start wegzubewegen, bedurfte es so polarer Fließmittel, dass die apolaren Substanzen zusammengedrängt an der Front ($R_f = 1$) lagen. Dieses Problem ließ sich umgehen, indem zunächst über eine kurze Strecke mit einem polaren Fließmittelgemisch entwickelt, und dann nach vollständigem Abtrocknen der DC-Platte eine zweite Entwicklung mit einem wesentlich apolareren Fließmittel angeschlossen wurde [172, p. 23]. Für diesen Zweck stellte sich FM6 in Kombination mit dem apolaren FM2b als geeignet heraus. Zunächst wurden testweise 5, 6 oder 7 cm mit FM6 entwickelt, anschließend 15 cm mit

FM2b, wobei sich 6 + 15 cm als die günstigste Variante für die beschriebene Stufen-DC zeigte. Als Referenzen wurden CS, KS, Loganin, β-Sitosterol, Oleanolsäure, Fructose und Saccharose gewählt. Untersucht wurden die methanolischen und hydroethanolischen Direktextrakte „DS_fW_MeOH_DC“, „DS_WD_MeOH_DC“, „DS_fW_EtOH_DC“, sowie „DS_WD_EtOH_DC“ von *D. sylv.* und zur Abgrenzung der TCM-Droge auch von *D. asp.* („DA_MeOH_DC“ und „DA_EtOH_DC“) Die Auswertung erfolgte direkt im UV_{254nm} und UV_{365nm} sowie nach VanS-Derivatisierung im UV_{365nm} und Vis.

7.3.1.3.2 Analytische DC von *C. cret.* und Ladanum

Vor den Untersuchungen von *C. cret.* an *Bb*ss (8.9.4) wurden verschiedene DC-Voruntersuchungen gemacht. In FM8 wurden die in $CHCl_3$ gelösten Substanzen Carvacrol, *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-, *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-Manoyloxid und *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, sowie „Lad_$CHCl_3$_DC“ und „CI_MeOH_DC“ nach VanS-Detektion betrachtet.

7.3.1.4 Präparative DC

7.3.1.4.1 Präparative DC für die Prinsepiol-Isolierung

Zur weiteren Feinauftrennung und Aufreinigung der mittels präparativer SC gewonnenen 13,0 mg „KG3_Fr5“ von Kapitel 7.3.2.1.2 wurde die NP-DC als geeignetste Variante befunden. Aufgrund des im Trennmaterial vorhandenen Fluoreszenzindikators war eine direkte Detektion nach der Auftrennung möglich. Die alternative Verwendung einer Miniatursäule hätte höhere Verluste durch die notwendige indirekte Detektion mittels DC nach erfolgter Trennung der ohnehin kleinen Probenmenge mit sich gebracht. Als potentielle Trennsysteme wurden FM1, FM2a und FM2b untersucht. FM2a zeigte im Vorversuch die beste Auftrennung der in der Probe „KG3_Fr5“ enthaltenen Substanzen und wurde daher für die präparative DC gewählt (Tab. 7-1). Nach doppelter Entwicklung der über die volle DC-Breite aufgetragenen Probe wurden sechs UV-löschende Banden detektiert, aus der DC-Folie ausgeschnitten, sofort in Aceton gelegt und die Probe mittels Ultraschall vom KG desorbiert. Nach Filtration durch feinstes KG und Seesand zur Entfernung von Schwebeteilchen der DC-Folie wurden die Proben einrotiert und in Rollrandgefäße überführt. Nach Trocknung unter Vakuum wurden die sechs Isolate ausgewogen.

Tab. 7-1: Präparative DC von „KG3_Fr5“

DC-Material	KG 60 F_{254} Aluminiumfolien 20 x 20 cm
Spülung	2x MeOH dest.
Probenvorbereitung	13,0 mg „KG3_Fr5“ in 0,4 ml Aceton gelöst über 18 cm Breite aufgetragen
Trennsystem und Durchführung	$CHCl_3$: MeOH (95 : 5) bei zweimaliger Entwicklung über je 15 cm, Bandendetektion mit UV_{254nm}
Ergebnis	sechs UV-löschende Banden

Analog wurde mit „KG3_Fr4“ (11,4 mg) von Kapitel 7.3.2.1.2 verfahren (Tab. 7-2).

Tab. 7-2: Präparative DC von „KG3_Fr4“

DC-Material	KG 60 F_{254} Aluminiumfolien 20 x 20 cm
Spülung	2x MeOH dest.
Probenvorbereitung	11,4 mg „KG3_Fr4“ in 0,4 ml Aceton gelöst über 18 cm Breite aufgetragen
Trennsystem und Durchführung	$CHCl_3$: MeOH (95 : 5) bei zweimaliger Entwicklung über je 15 cm, Bandendetektion mit UV_{254nm}
Ergebnis	vier UV-löschende und zwei fluoreszierende Banden

7.3.1.4.2 Präparative DC für die Ursolsäure-Isolierung

Zur Aufreinigung der mittels präparativer SC gewonnenen 27,7 mg „KG44_FrC“ von Kapitel 7.3.2.1.6 wurde ebenfalls die NP-DC verwendet. Nach vielversprechenden Vorversuchen wurde FM2b als Eluent gewählt (Tab. 7-3). Nach Entwicklung zweier DC mit der über die volle Breite aufgetragenen Probe wurden drei UV-löschende Banden detektiert. Um die nicht UV-aktive Hauptbande zu lokalisieren, wurden drei dünne vertikale Streifen aus der DC-Folie herausgeschnitten und mit VanS besprüht. Zwischen der ersten und zweiten UV-löschenden Bande befand sich die nach Besprühen violette Hauptbande. Letztere und die zweite UV-aktive Bande wurden aus der unbesprühten DC-Folie ausgeschnitten, in Aceton gelegt und die Proben jeweils mittels Ultraschall vom KG desorbiert. Nach Filtration durch feinstes KG und Seesand zur Entfernung von Schwebeteilchen der DC-Folie wurden die Proben einrotiert und in Rollrandgefäße überführt. Eine Kontroll-DC mit FM2b und VanS-Detektion gegen die Referenzen Oleanolsäure, „KG44_FrC“ und „MPLC_Fr44“ wurde durchgeführt. Nach Trocknung unter Vakuum wurden die zwei isolierten Fraktionen ausgewogen.

Tab. 7-3: Präparative DC von „KG44_FrC“

DC-Material	KG 60 F_{254} Aluminiumfolien 20 x 20 cm, 2 Platten
Spülung	2x MeOH dest.
Probenvorbereitung	27,7 mg „KG44_FrC“ in 0,7 ml Aceton gelöst über 2x18 cm Breite aufgetragen
Trennsystem und Durchführung	$CHCl_3$: MeOH (95 : 5) bei einmaliger Entwicklung über 10 cm, Bandendetektion durch Direktauswertung bei $UV_{254\,nm}$ und Besprühen schmaler vertikaler Abschnitte mit VanS und Auswertung im UV_{365nm}
Ergebnis	drei UV-löschende Banden und eine nur nach Besprühen sichtbare Bande zwischen der unteren und mittleren UV-löschenden Bande

7.3.1.4.3 Präparative DC zur Iridoid–Aufreinigung

Zur weiteren Aufreinigung der iridoidhaltigen, mittels präparativer SC gewonnenen 35,2 mg Fraktion „KG1_FrB“ von Kapitel 7.3.2.1.4 wurde eine präparative NP-DC eingesetzt. In Vorversuchen wurden FM3, FM4 und FM5 als Eluent getestet. FM4 zeigte die vielversprechendste Trennleistung für die Probe und wurde verwendet (Tab. 7-4). Die ausgekratzte Hauptbande wurde in MeOH suspendiert, im Ultraschallbad vom KG desorbiert, filtriert, zur Trockne eingeengt und im Vakuum getrocknet.

Tab. 7-4: Präparative DC von „KG1_FrB“

DC-Material	KG 60 F_{254} Aluminiumfolien 20 x 20 cm
Spülung	2x MeOH dest.
Probenvorbereitung	32,4 mg „KG1_FrB“ in 0,8 ml MeOH gelöst über 15 cm Breite aufgetragen
Trennsystem und Durchführung	DCM : MeOH (2 : 1) bei einmaliger Entwicklung über 15 cm, Bandendetektion mit UV-Licht 254 nm und Besprühen der Restplatte nach Auskratzen der Hauptbande mit VanS und Auswertung im UV_{365nm}
Ergebnis	eine UV-löschende Bande, nach Besprühen mit Nebenbanden oberhalb, unterhalb und am Start sichtbar

7.3.2 Säulenchromatographie (SC)

Zur präparativen Auftrennung von Stoffgemischen eignet sich die SC. Je nach Dimensionierung der verwendeten Säule lassen sich Stoffgemische von wenigen Milligramm bis zu mehreren Gramm auftrennen. Häufig sind bis zum Erreichen sauberer Reinstoffe mehrere

aufeinanderfolgende Trennungen unter Variation der mobilen Phase („FM“) und teilweise stationären Phase oder vor- bzw. nachgeschaltete andere Trennmethoden nötig.

Neben der Unterteilung in NP- und RP-Chromatographie lässt sich die SC nach dem Antrieb der mobilen Phase unterteilen. Neben der normalen Schwerkraftelution finden sich z. B. Methoden mit Überdruck am Säulenanfang (u. a. Mitteldruckchromatographie (MPLC)). Die Güte einer Trennung wird dabei unter anderem durch das Säulenmaterial (Art, Polarität, Teilchengröße), das Elutionsmittel, die Verweildauer auf der Säule (Diffusion und Zersetzung) und die Säulenlänge beeinflusst. Mit sinkendem Teilchendurchmesser des Trennmaterials steigt der hydrodynamische Widerstand, so dass sich sehr kleine Partikelgrößen nur in Verbindung mit einem Druckgradienten nutzen lassen. Industrieller und forschungstechnischer Standard für die Gehaltsbestimmung, zur (Fingerprint-) Identifizierung und Reinheitsanalytik ist heutzutage die Hochdruckchromatographie (HPLC).

Für die Gewinnung von Extrakten eignen sich aufgrund der deutlich höheren Beladungsmenge die Schwerkraft-SC und die MPLC. Nach gründlichem Spülen des Säulenmaterials und Äquilibrierung auf das Start-FM wird die Probe aufgetragen und anschließend isokratisch oder mittels (Stufen-)Gradienten aufgetrennt. Am Säulenende werden die einzelnen Fraktionen aufgefangen. Idealerweise wird bei langen Trennvorgängen ein automatischer Fraktionssammler angeschlossen. Die Detektion erfolgt im Allgemeinen off-line, d.h. nach Auffangen der Fraktionen z. B. durch DC.

7.3.2.1 Präparative Normaldrucksäulen

7.3.2.1.1 Erste präparative KG-Säule für Prinsepiol-Isolierung

Zur Aufkonzentrierung der DC-Hauptbanden der „DS_WD_Frak-DCM“ wurde mittels DC-Vorversuchen eine präparative KG-Säule als geeignet befunden. Um etwa 1,2 g Probe aufarbeiten zu können, wurden zwei Durchläufe mit 0,5232 g und 0,5064 g unter leicht veränderten Bedingungen durchgeführt. Mithilfe eines Hex : EE : EtOH – Stufengradienten auf einer KG-Säule von jeweils 1,45 cm Durchmesser und etwa 25 cm Länge wurden 30 bzw. 27 Fraktionen von je 19 bzw. 20 ml erhalten (Tab. 7-5).

Tab. 7-5: Vergleich der beiden Durchgänge der präparativen KG-Säulen von „DS_WD_Frak-DCM“

	Durchgang 1	Durchgang 2
Säulendaten	⇳ 25,0 cm, ∅ 1,45 cm, d.h. V≈41,3 ml 21,8 g KG (0,040 – 0,063 mm) in 80 ml EE quellen gelassen, auf Watte und Seesand gegossen	⇳ 25,2 cm, ∅1,45 cm, d.h. V≈41,6 ml 22,2 g KG (0,040 – 0,063 mm) in 100 ml Hex : EE (1 : 1) quellen gelassen, auf Watte und Seesand gegossen
Spülung	65 ml EE, 80 ml Hex, 50 ml Hex : EE (9:1)	110 ml Hex : EE (9:1)
Proben-vorbereitung	0,5232 g „DS_WD_Frak-DCM“ in 0,4 ml $CHCl_3$ gelöst, mit Start-FM auf 2 ml verdünnt	0,5064 g „DS_WD_Frak-DCM“ analog Durchgang 1
Trennsystem und Durchführung	Hex / EE / EtOH 90 / 10 / 0 80 / 20 / 0 70 / 30 / 0 50 / 50 / 0 30 / 70 / 0 10 / 90 / 0 0 / 100 / 0 0 / 90 / 10 0 / 75 / 25 0 / 40 / 60 0 / 0 / 100 Jeweils mit 50 ml FM pro Stufe eluiert, 29 Fraktionen zu je 19 ml aufgefangen. Abschließend Säule mit 50 ml Aceton nachgespült, um eventuell verbliebene Reste zu erhalten.	Hex / EE / EtOH 50 / 50 / 0 35 / 65 / 0 25 / 75 / 0 10 / 90 / 0 0 / 99 / 1 0 / 90 / 10 0 / 75 / 25 0 / 40 / 60 0 / 0 / 100 Jeweils mit 50 ml FM pro Stufe (Ausnahme 1. Stufe: 100 ml) eluiert, 25 Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen Abschließend Säule mit 50 ml Aceton nachgespült, um eventuell verbliebene Reste zu erhalten.
Ergebnis	drei Sammelfraktionen	drei Sammelfraktionen erhalten und zur jeweils ähnlichen Sammelfraktion des ersten Durchgangs gegeben, vier weitere Sammelfraktionen zusätzlich erhalten.

Nach DC-Kontrolle mit FM2b und VanS-Detektion wurden die erhaltenen Fraktionen vereinigt: Die drei Sammelfraktionen aus dem ersten Durchlauf wurden mit der jeweils entsprechenden Sammelfraktion des zweiten Durchlaufs vereinigt. Zusätzlich wurden vier weitere Fraktionen des zweiten Durchlaufs separat aufbewahrt. Die somit erhaltenen sieben Fraktionen wurden in tarierten Rollrandgefäßen einrotiert, unter Vakuum getrocknet und ausgewogen.

7.3.2.1.2 Zweite präparative KG-Säule für Prinsepiol-Isolierung

Fraktion „KG-DCM_Fr3“ wurde einem weiteren Aufreinigungsschritt unterzogen. Aufgrund der Ähnlichkeit in der Polarität mit zu trennenden Substanzen aus MPLC-Fraktionen von „DS_WD_Frak-Hex“ (Kapitel 7.3.2.2) wurde für die Auftrennung ein DCM-EE-Trennsystem gewählt. Mittels präparativer KG-Säule von 30 cm Länge und 2,0 cm Durchmesser wurden aus 0,5503 g Probe im Stufengradient 80 Fraktionen zu je 25 ml erhalten (Tab. 7-6).

Tab. 7-6: Präparative KG-Säule von „KG-DCM_Fr3“

Säulendaten	⇳ 30,0 cm, ∅ 2,0 cm, d.h. V≈94,2 ml 50,6 g KG (0,040 – 0,063 mm) in 125 ml DCM : EE (8 : 2) quellen gelassen, auf Watte und Seesand gegossen
Spülung	175 ml DCM : EE (8:2)
Probenvorbereitung	0,5503 g in 1,0 ml EE gelöst, mit Start-FM auf 3 ml verdünnt
Trennsystem und Durchführung	DCM EE 80 20 73 27 65 35 57 43 48 52 39 61 30 70 20 80 10 90 0 100
	Jeweils mit 200 ml FM pro Stufe wurde eluiert, 80 Fraktionen zu je 25 ml aufgefangen Abschließend Säule mit 200 ml EtOH nachgespült, um eventuell verbliebene Reste zu erhalten.
Ergebnis	zehn Sammelfraktionen

Von DCM : EE 80 : 20 wurde die Polarität des FM schrittweise bis zum reinen EE gesteigert. Nach DC-Kontrolle mit FM2b und VanS-Detektion wurden die erhaltenen Fraktionen zu zehn Sammelfraktionen vereinigt.

7.3.2.1.3 Präparative Aluminiumoxidsäule zur Iridoidisolierung

Die Ausschüttelung „DS_fW_Frak-H_2O“ enthielt nach DC-Kontrolle mit FM6 (EE : MEK : H_2O : Ac. form. 5 : 3 : 1 : 1) neben potentiellen Iridoiden auch einige UV-aktive Phenole, die zur leichteren Isolierung der Iridoide von diesen abgetrennt werden mussten. Als Methode wurde eine Al_2O_3-Säule gewählt, über die bei reiner H_2O-Elution zunächst nur die nicht-phenolischen, weniger polaren Substanzen eluiert werden. Erst durch Zusatz von Ac. form. zum FM werden auch polarere Substanzen eluiert. Eine 8,7 cm lange Säule mit 5 cm Durchmesser wurde dafür gewählt (Tab. 7-7).

Tab. 7-7: Präparative KG-Säule von „DS_fW_Frak-H_2O“

Säulendaten	⇳ 8,7 cm, ∅ 5,1 cm, d.h. V≈173,6 ml 150,2 g Al_2O_3 (Aktivitätsstufe 1, neutral, 0,063 – 0,200 mm) in 200 ml H_2O quellen gelassen, auf Watte und Seesand gegossen
Spülung	650 ml H_2O
Probenvorbereitung	30,596 g in 25,0 ml H_2O gelöst
Trennsystem und Durchführung	Die ersten drei Fraktionen wurden mit reinem H_2O eluiert (150, 450, 500 ml), Fraktion 4 mit 3,8 %iger Ac. form. (400 ml)
Ergebnis	vier Fraktionen („Al_Fr1“ bis „Al_Fr4“)

7.3.2.1.4 Präparative KG-Säule zur Iridoidisolierung

Fraktion „Al_Fr1“ wurde nach der Al_2O_3-Säule weiter aufgereinigt. Um die von phenolischen Substanzen abgereicherte Probe weiter aufzureinigen, wurde eine KG-Säule von 27,3 cm Länge und 1,45 cm Durchmesser gewählt. Ein $CHCl_3$: MeOH-Stufengradient kam als FM zur Anwendung. Je nach Bewegung der farbig sichtbaren Banden auf der Säule wurde das FM-Volumen pro Stufe gewählt. Insgesamt wurden 110 Fraktionen zu je 6 ml aufgefangen (Tab. 7-8).

Unter DC-Kontrolle mit FM6 und VanS-Detektion wurden die erhaltenen Fraktionen zu sechs Sammelfraktionen vereinigt, unter Vakuum getrocknet und gewogen.

Tab. 7-8: Präparative KG-Säule von „Al_Fr1“

Säulendaten	⇳ 27,3 cm, ∅ 1,45 cm, d.h. V≈45,0 ml 32,2 g KG (0,040 – 0,063 mm) in 100 ml $CHCl_3$ quellen gelassen, auf Watte und Seesand gegossen
Spülung	100 ml $CHCl_3$, 150 ml $CHCl_3$: MeOH (95:5)
Probenvorbereitung	380,2 mg in 0,5 ml MeOH : H_2O (97,5 : 2,5) gelöst, mit Start-FM verdünnt
Trennsystem und Durchführung	$CHCl_3$ MeOH Volumen 95 5 100 ml 90 10 70 ml 85 15 70 ml 80 20 75 ml 78 22 50 ml 75 25 50 ml 70 30 50 ml 60 40 50 ml 50 50 50 ml 0 100 130 ml Pro Stufe wurde je nach Wanderung der farbigen Banden auf der Säule mit unterschiedlicher FM-Menge eluiert, 110 Fraktionen zu je 6 ml und der restliche Nachlauf wurden aufgefangen.
Ergebnis	sechs Sammelfraktionen

7.3.2.1.5 Präparative RP-Säule zur Iridoidisolierung

Die in Kernresonanzspektroskopie (NMR)-Voruntersuchungen als Gemisch analysierte Probe „DC-B_Fr2“ (Kapitel 7.3.1.4.3) wurde zur Isolierung der Einzelbestandteile einer weiteren SC unterzogen. Aufgrund der geringen Menge und günstiger Trennleistung in Vorversuchen wurde eine reversed-phase Miniatursäule (RP-Pipettensäule) verwendet. Als Säule diente eine an der Spitze verkürzte Natron-Kalk-Glas-Pasteurpipette. Als Trennsystem kam ein H_2O-MeOH-Gradient im Verhältnis von 95 : 5 bis 0 : 100 über neun Stufen zum Einsatz. 29 Fraktionen zu je 1 ml wurden aufgefangen und mittels DC-Kontrolle (FM2b, VanS-Detektion) zu sieben Sammelfraktionen vereinigt (Tab. 7-9).

Tab. 7-9: Präparative RP-Säule von „DC-B_Fr2“

Säulendaten	⇳ 7,0 cm, ∅ 0,55 cm, d.h. V≈1,66 ml 1 g Nucleodur 100-50 C18 ec trocken auf Watte und Seesand gefüllt, mit MeOH benetzt
Spülung	5 ml MeOH, dann 5 ml H_2O : MeOH (95:5)
Probenvorbereitung	27,4 mg in 0,25 ml H_2O : MeOH (95 : 5) gelöst
Trennsystem und Durchführung	H_2O MeOH 95 5 90 10 85 15 80 20 75 25 70 30 65 35 60 40 0 100 Jeweils mit 3,0 ml FM pro Stufe wurde eluiert, 29 Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen Abschließend Säule mit 4 ml MeOH nachgespült, um eventuell verbliebene Reste zu erhalten.
Ergebnis	sieben Sammelfraktionen

Nach Überführen in tarierte Probengefäße wurden die Proben einrotiert und gewogen.

7.3.2.1.6 Präparative Säule zur Ursolsäure-Isolierung

In DC-Vorbetrachtungen zeigte „MPLC_Fr44“ (Kapitel 7.3.2.2) eine Bande ungefähr auf Höhe der Oleanolsäure. Mithilfe einer KG-Säule sollte diese Bande aufgereinigt werden, um sie genauer bestimmen zu können. Aufgrund der Elution der Probe in der MPLC bei etwa DCM : EE (4 : 6) sollte als Trennsystem ein DCM : EE Gradient zur Anwendung kommen. Die 0,2138 g Probe wurden im Stufengradienten von DCM : EE (9 : 1) bis (0 : 10) fraktioniert, die Säule anschließend mit MeOH gespült (Tab. 7-10). Nach DC-Kontrolle der Fraktionen (FM2b, VanS-Detektion) wurden die Fraktionen zu fünf Sammelfraktionen vereinigt.

Tab. 7-10: Präparative KG-Säule von „MPLC_Fr44“

Säulendaten	⇳ 24,5 cm, ∅ 1,45 cm, d.h. V≈40,4 ml 25,0 g KG (0,040 – 0,063 mm) in 75 ml DCM quellen gelassen, auf Watte und Seesand gegossen
Spülung	50 ml DCM, 50 ml EE : DCM (5:45)
Probenvorbereitung	243,8 mg in 1,0 ml DCM : EE (1 : 9) gelöst
Trennsystem und Durchführung	DCM EE 90 10 80 20 70 30 60 40 50 50 40 60 30 70 15 85 Jeweils mit 100 ml FM pro Stufe wurde eluiert, 36 Fraktionen zu je 25 ml aufgefangen Abschließend Säule mit 50 ml MeOH nachgespült, um eventuell verbliebene Reste zu erhalten und in drei weiteren Fraktionen aufgefangen.
Ergebnis	fünf Sammelfraktionen

Die dritte Sammelfraktion wurde als „KG44_FrC“ einer weiteren Feintrennung zugeführt (Kapitel 7.3.1.4.2).

7.3.2.1.7 Präparative Säule zur Fraktionierung von „DS_WD_Frak-Hex“

Um die mittels Ausschüttelung von „DS_WD_MeOH-TE“ erhaltene Fraktion „DS_WD_Frak-Hex“ weiter zu fraktionieren, wurde in DC-Vorversuchen eine NP-KG-Säule mit Hex-EE-Gradient für geeignet befunden. 571 mg des Trockenextrakts wurden im Stufengradienten aufgetrennt. Anschließend wurde mit MeOH nachgespült (Tab. 7-11). Unter DC-Kontrolle (FM7, VanS-Detektion) wurden die erhaltenen 110 Fraktionen zu sieben Sammelfraktionen vereinigt, getrocknet und ausgewogen.

Tab. 7-11: Präparative KG-Säule von „DS_WD_Frak-Hex“

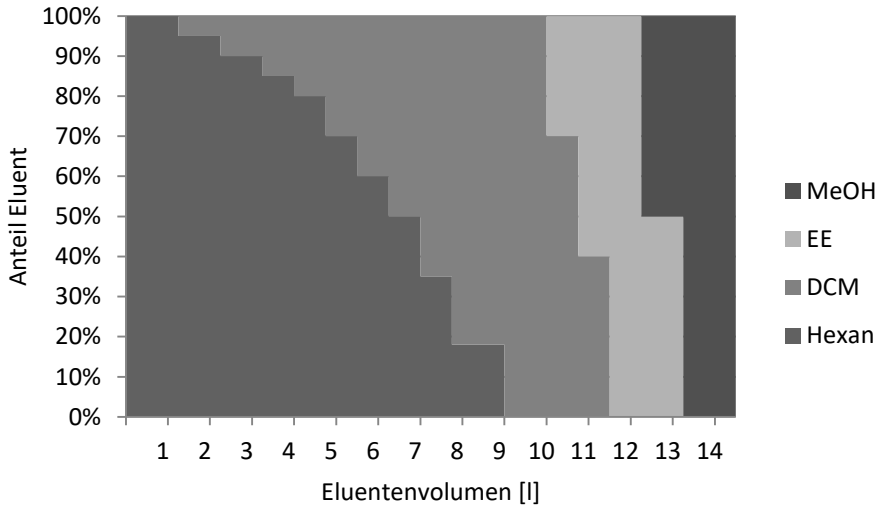
Säulendaten	⇳ 24,0 cm, ∅ 1,42 cm, d.h. V≈38,0 ml 20,0 g KG (0,040 – 0,063 mm) in 100 ml Hex quellen gelassen, auf Watte und Seesand gegossen
Spülung	100 ml Hex
Probenvorbereitung	571,0 mg in 2,0 ml Hex gelöst (Ultraschallbad)
Trennsystem und Durchführung	Hex EE Volumen 100 0 170 ml 98,5 1,5 200 ml 97 3 100 ml 95 5 200 ml 92 8 200 ml 90 10 200 ml 87 13 200 ml 83 17 100 ml 70 30 100 ml 55 45 100 ml 20 80 100 ml 0 100 100 ml 110 Fraktionen zu je 16 ml aufgefangen. Abschließend Säule mit 250 ml EtOH nachgespült, um eventuell verbliebene Reste zu erhalten und in zwei weiteren Fraktionen aufgefangen.
Ergebnis	sieben Sammelfraktionen

7.3.2.2 Präparative MPLC

Die Hex-Ausschüttelung „DS_WD_Frak-Hex“ zeigte bei DC-Voruntersuchungen mutmaßlich terpenoide Banden (violette Färbung nach VanS-Detektion; FM7) im mittleren Drittel, etwa in Höhe der Oleanolsäure. Für die Isolierung der Bande wurde zunächst zur Grobfraktionierung einer größeren Menge Hex-Ausschüttelung in einem Schritt eine NP-MPLC-durchgeführt.

Tab. 7-12: NP-MPLC von „DS_WD_Frak-Hex“

Säulendaten	⇳ 46,0 cm, ∅ 4,9 cm, d.h. V≈867 ml 510 g (0,040 – 0,063 mm) in 1000 ml MeOH quellen gelassen, mittels Überdruck 0,6 - 1,0 bar eingefüllt.
Spülung	2500 ml MeOH, 7500 ml Hex
Proben-vorbereitung	10,162 g in 18,5 ml Hex gelöst, bei 5 ml/min über Probenschleife eingepumpt

Trennsystem und Durchführung	Mit einer konstanten Flussrate von 12,5 ml/min wurde ein Hex-EE-DCM-MeOH-Stufengradient gefahren:  Es wurden 56 Fraktionen zu je 250 ml aufgefangen (erste und letzte Fraktion 500 ml).
Ergebnis	56 Fraktionen

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels DC (FM2b, VanS-Detektion) untersucht. Nach dem Trocknen wurden sie gewogen und zur Lagerung tiefgekühlt (Tab. 8-12).

Mehrere Fraktionen wurden anschließend weiter untersucht bzw. aufgereinigt: Die Fraktionen „MPLC_Fr3“, „MPLC_Fr7“, „MPLC_Fr36“ und „MPLC_Fr48“ wurden einer Übersichts-GC-MS-Methode zugeführt (Kapitel 8.7.1 ff). „MPLC_Fr44“ wurde über mehrere Stufen weiter aufgereinigt (7.3.2.1.6). In „MPLC_Fr48“ befand sich eine blaue Bande, deren Isolierung mithilfe dreier aufeinander folgender, präparativer Säulen (1.: DCM-EE-Gradient, NP; 2.: H_2O-MeOH-Gradient, RP; 3.: DCM-EE-Gradient, NP im Mikromaßstab) gelang. Für eine abschließende Strukturaufklärung war die erhaltene Substanz zu instabil (siehe dazu auch 8.5.4).

7.3.3 Gaschromatographie (GC)

In der GC werden Proben auf einer dünnen Trennsäule zwischen einer mobilen gasförmigen und einer stationären flüssigen oder festen Phase getrennt. Das Europäische Arzneibuch verwendet vor allem die 1958 von MARCEL JULES EDOUARD GOLAY entwickelte Methode der Kapillarsäulen-GC [182], [183]. Während gasförmige Proben direkt analysiert werden können, müssen flüssige bzw. gelöste Proben zunächst verdampft werden. Die on-column-Auftragung bietet eine Vorauftrennung durch allmähliches Verdampfen der Substanzen am

Säulenanfang in Reihenfolge ihrer Siedepunkte. Zur Detektion der aufgetrennten Probe kommen u.a. massensensitive (GC/MS) Detektoren zum Einsatz. Nach geeigneter Kalibrierung lassen sich je nach Methode und Detektor über Ihre Retentionszeiten und in Verbindung mit Vergleichsspektren die getrennten Stoffe damit identifizieren und quantifizieren.

7.3.3.1 GC-Methode

Für die einordnende Untersuchung der MPLC-fraktionierten Extrakte wurde eine Übersichts-GC von vier Fraktionen durchgeführt, mit dem Ziel jeweils möglichst sauberere Massenspektren zu erhalten. Diese sollten mittels Datenbankvergleich bekannten Substanzen zugeordnet werden, um einen Überblick über bekannte apolare Substanzen in „DS_WD_Frak-Hex“ zu erhalten. Die in Hex zu 1 mg/ml gelösten Proben wurden nach geeigneter Verdünnung mittels Splitless-Injektor bei 250 °C auf die Säule aufgegeben. Unter einem Heizgradienten des Säulenofens (Tab. 7-13) wurde die Probe mittels Helium isobar bei 12 psi auf einer DB-5-Säule (Polyphenylmethylsiloxan, 30 m Säulenlänge, 0,25mm, 0,25 µm, Hersteller: Agilent Technologies) aufgetrennt. Die anschließende Detektion erfolgte mittels Elektronenstoß-Ionisations-Quadrupol-Massenspektrometrie.

Tab. 7-13: Säulenofen-Temperaturgradient der GC/MS-Messungen

Zeit	0-2 min	2-25 min	25-55 min
Temperatur	50 °C	+10 °C/min	280 °C

Über den gesamten Zeitraum wurden Spektren im Masse-zu-Ladungs-Verhältnis 40 bis 550 m/z aufgenommen. Die Messungen erfolgten durch Frau Ramona Oehme (Fakultät für Chemie und Mineralogie, Institut für Analytische Chemie, Arbeitskreis Massenspektrometrie Dr. C. Birkemeyer). Anhand von Referenzmassenspektren aus der Wiley™ 6 [184] und der NIST™-8 Datenbank [185] wurde eine mögliche Zuordnung ausgewählter Peaks getroffen und deren Trefferwahrscheinlichkeit (match quality) bestimmt.

7.3.4 Flüssig-Flüssig-Gegenstromchromatographie

Die Flüssig-Flüssig-Gegenstromchromatographie (Countercurrent Chromatography, CCC) ist eine Methode zur Auftrennung von Stoffgemischen, die auf der Verteilung der Probe zwischen zwei nicht miteinander mischbaren, flüssigen Phasen in Abwesenheit einer Festphase beruht [186], [187], [188]. Mittels Überdruck bewegt sich die mobile Phase durch die stationäre Phase hindurch. Die dabei stattfindende Durchmischung an den Phasengrenzen führt in den Kompartimenten jeweils zur Einstellung eines Gleichgewichts nach dem NERNST'schen Verteilungssatz [189]:

$$K = \frac{c_{OP}}{c_{UP}} \qquad \textbf{(Formel 3)}$$

K – temperaturabhängige Stoffkonstante für zwei definierte Flüssigkeiten, C_{OP} – Konzentration des Stoffes in der Oberphase, C_{UP} – Konzentration des Stoffes in der Unterphase

7.3.4.1 Rotierende Flüssig-Flüssig-Gegenstromchromatographie

Eine spezielle Form der CCC stellt die rotierende Flüssig-Flüssig-Gegenstromchromatographie (RLCC) dar. Eine Konstruktionsart ist die verwendete RLCC-A aus Pumpen- und Kontrolleinheit und Säulenhalterung (Abb. 7-1).

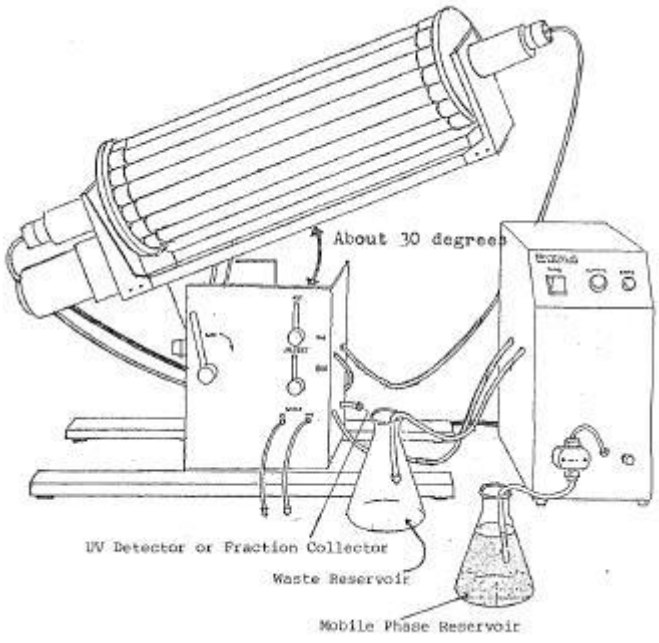


Abb. 7-1: RLCC-A Apparatur von Eyela [190]

Die Säulenhalterung der Apparatur enthält 16 Glassäulen à 45 cm mit jeweils 1,1 cm Innendurchmesser. Jede ist durch Teflonscheiben, die in der Mitte mit einem kleinen Loch versehen sind, in 37 Kompartimente getrennt. Dadurch ergeben sich 592 serielle Trennböden. Üblicherweise werden Auftrennungen mit einer Rotation der gesamten Glassäulenhalterung von 60 – 80 min^{-1} unter einer Neigung von 20 – 40° durchgeführt. Durch die Rotation werden mobile und stationäre Phase an den Grenzflächen durchmischt, so dass die Gleichgewichtseinstellung in den Kompartimenten beschleunigt wird (Abb. 7-2). Je nach Verteilungskoeffizient der zu trennenden Substanzen lässt sich die Anlage im auf- oder absteigenden Modus betreiben [191].

Da die mobile Phase hierbei durch die stationäre Phase strömt und keine Tropfenbildung nötig ist, lassen sich auch emulgierende Lösungsmittelsysteme z. B. mit EE einsetzen. Dadurch lassen sich nicht nur völlig neue Verteilungssysteme konstruieren, sondern teilweise auch ein Verzicht auf die umwelt- und gesundheitsschädlichen Lösungsmittel $CHCl_3$ und DCM erreichen.

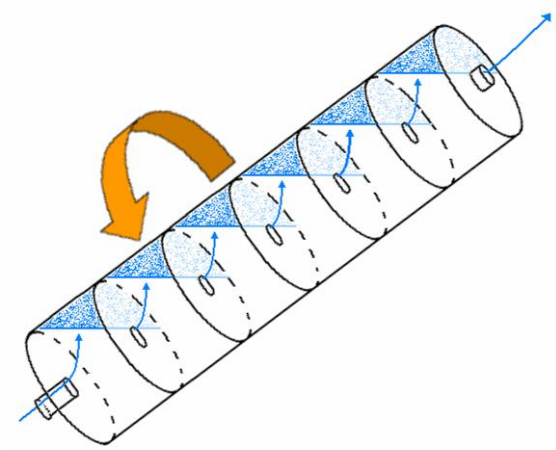


Abb. 7-2: schematische Detailzeichnung einer einzelnen Glasröhre bei einer Neigung von etwa 37° im aufsteigenden Modus: Kompartimentbildung

Die RLCC ist besonders gut geeignet zum Aufkonzentrieren von Proben in nahezu beliebigen FM-Systemen bei einer ähnlichen Geschwindigkeit wie bei der Droplet-Countercurrent Chromatography (DCCC). Durch die niedrigere Anzahl theoretischer Trennböden ist die Trennleistung der RLCC etwas geringer.

7.3.4.1.1 RLCC-Methode

Zur Gewinnung von Substanzen zu Referenzzwecken und zur Nachisolierung wurde ein alternativer Auftrennungsweg gesucht, bei dem weniger Trennsäulen und präparative DC hintereinander nötig waren. Testweise wurde für die n-But-Ausschüttelungsfraktion „DS_fW_Frak-n-But“ eine RLCC-Methode eingesetzt. Vorbetrachtend wurde die zu trennende Probe zwischen verschiedenen FM-Systemen ausgeschüttelt und jeweils nach Aufkonzentrieren durch Einengen die Ober- und Unterphase auf DC aufgetragen. Die Phase mit der stärkeren Extraktanreicherung wurde als potentielle stationäre Phase ausgewählt. Neben der Verteilung der Probe wurden auch vollständige Phasentrennung, Löslichkeit der Probe in beiden Phasen, DC-Verhalten in Ober- und Unterphase [191] und Giftigkeit des Lösungsmittelsystems in die Auswahl einbezogen. Die in Tab. 7-14 dargestellten Trennsysteme wurden in der Vorbetrachtung getestet. Ein EE-Ethanol-H_2O-Trennsystem (2 : 1 : 2) im aufsteigenden Modus [192] mit der Oberphase als mobile Phase wurde aufgrund der DC-Vorversuche ausgewählt. Auch die leichte Flüchtigkeit der Oberphase begünstigte die Verwendung als mobile Phase.

Tab. 7-14: Potentielle RLCC Trennsysteme in der Voruntersuchung

FM-Gemisch		Literatur
EE – MeOH – H_2O	46 – 14 – 70	-
$CHCl_3$ – MeOH – H_2O	35 – 65 – 40	[193]
EE – n-Propanol – H_2O	40 – 20 – 70	[194]
$CHCl_3$ – MeOH – n-Propanol – H_2O	21 – 30 – 12 – 36	-
EE – Ethanol – H_2O	40 – 20 – 40	[192]

Aufgrund fehlender Funktionalität der Pumpe in der Pumpen- und Kontrolleinheit wurde zusätzlich eine HPLC-Pumpe zum Erreichen eines kontinuierlichen, kontrollierten Flusses der mobilen Phase angeschlossen. Die RLCC-Prozedur wurde zweimal mit 534,2 mg und 1553,8 mg „DS_fW_Frak-n-But“ durchgeführt, um ausreichend Extrakt aufreinigen zu können. Nach Spülen mit Aceton und H_2O wurde die RLCC in senkrechter Position mit 2,5 ml/min mit der stationären Phase - der Unterphase eines EE-Ethanol-H_2O-Gemischs (2 : 1 : 2) - befüllt. Nach Einstellung der für die Trennung gewünschten 30° Neigung wurde die mobile Phase, die Oberphase des beschriebenen Gemisches, mit 0,55 ml/min aufsteigend

in die RLCC eingefüllt. Zum Entfernen verbliebener Gasbläschen wurde mit 0,65 ml/min mobile Phase durch das System gepumpt.

Die Probe wurde jeweils in 4 ml stationärer Phase gelöst und über die Probenschleife injiziert. Bei einer Flussrate von 0,8 ml/min [194] und einer Rotation von 75 min^{-1} wurden 160 bzw. 180 Einzelfraktionen zu je 8 bzw. 12 ml mittels eines automatischen Fraktionssammlers gesammelt. Nach einer Laufzeit von 33 Stunden war die eigentliche Trennung abgeschlossen. Die verbliebene stationäre Phase wurde in senkrechter Geräteposition in sechs Fraktionen aus der RLCC gepumpt. Alle Fraktionen wurden unter verminderten Druck eingeengt und nach DC-Kontrolle (FM6, VanS-Detektion) zu 16 Fraktionen im ersten und zehn Fraktionen im zweiten Lauf zusammengefasst. Unter erneuter DC-Kontrolle (FM6) wurden ähnliche Fraktionen beider Durchläufe vereinigt. Mit den erhaltenen Sammelfraktionen wurden Vergleichs-DC mit per SC und DC aufgereinigten Fraktionen erstellt, um die Eignung der RLCC-Methode als Isolierungsweg alternativ zur SC-/DC-Isolierung zu untersuchen. Anschließend wurden weitere Aufreinigungsschritte der RLCC-Fraktionen mit RP-Säulen durchgeführt.

7.4 Kapillarelektrophorese (CE)

Die CE ist eine physikalische Analysenmethode und trennt Stoffgemische in puffergefüllten Kapillaren im elektrischen Feld [195], [196], [197]. Zur Grundausstattung der CE gehören Hochspannungsquelle, Kapillare aus amorphem SiO_2 [168], Probeninjektor, Detektor und Puffer in zwei Reservoiren, teilweise auch die Möglichkeit zur Thermostatisierung (Abb. 7-3)

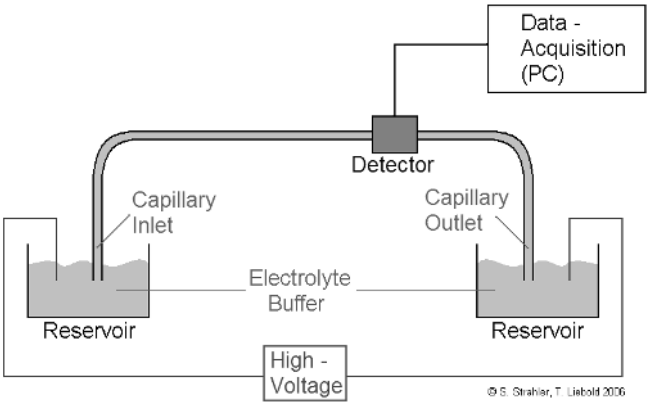


Abb. 7-3: Schematischer Aufbau einer CE-Anlage

[198]. Vor allem gegen die JOULEsche Erwärmung bei hohen Pufferkonzentrationen und großen Durchmessern erweist sich eine Thermostatisierung der Kapillare als günstig. Außerdem lässt sich durch Herabsetzung der Viskosität bei erhöhter Temperatur der Elektroosmotische Fluss (EOF) erhöhen und damit die Trennzeit stark verkürzen. Die Auflösung wird dadurch trotz verstärkter Diffusion oft überproportional verbessert.

Die kapillarelektrophoretische Trennung wird durch zwei sich überlagernde elektrochemische Phänomene ermöglicht, die elektrophoretische Mobilität und den EOF. Die elektrophoretische Komponente entsteht durch das auf die verschieden geladenen Teilchen unterschiedlicher Größe einwirkende angelegte elektrische Feld:

$$v = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} * E = \mu_{ep} * E \qquad \textbf{(Formel 4)}$$

v = elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens, q = Ladung des zu trennenden Teilchens, η = Viskosität des Puffers, r = Radius des als kugelförmig angenommenen zu trennenden Teilchens, E = elektrische Feldstärke, μ_{ep} = elektrophoretische Mobilität

Der EOF ist unter festen Bedingungen ein konstanter Bewegungsvektor aller Teilchen, der i. A. in Richtung Kathode führt. Er entsteht durch Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht an der inneren Quarzoberfläche. Diese ist bei pH-Werten über 2 durch Dissoziation der Silanolgruppen negativ geladen, zum Ladungsausgleich adsorbieren Kationen des Puffers, die in der starren HELMHOLTZ-Schicht kaum hydratisiert und unbeweglich, in der darüberfolgenden diffusen Sternschicht (auch GOUY-CHAPMAN-Schicht oder DEBYE-HÜCKEL-Schicht) aber hydratisiert sind. Das Potential durch den negativen Ladungsüberschuss nimmt in der starren Grenzschicht linear, in der diffusen Grenzschicht exponentiell ab. Am Übergang der starren zur diffusen Grenzschicht liegt das ζ-Potential, dessen Größe unmittelbaren Einfluss auf die durch den EOF verursachte elektroosmotische Wanderungsgeschwindigkeit hat:

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} E \qquad \textbf{(Formel 5)}$$

v_{eo} = Wanderungsgeschwindigkeit durch EOF, ε = Dielektrizitätskonstante des Puffers, ζ = Zetapotential, η = Viskosität des Puffers, E = Elektrische Feldstärke

Beim Anlegen einer Spannung an die Kapillare werden die Kationen der diffusen Schicht mit ihren Hydrathüllen in Richtung Kathode gezogen, durch Kohäsion wird der restliche Puffer in der Kapillare mitgezogen. Damit entsteht ein Flüssigkeitsstrom in der Kapillare, der seinen Ursprung an der Wand der Kapillare hat und damit zu einem viel flacheren Strömungsprofil führt als das parabolische Profil des hydrodynamischen Flusses in der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) [168, pp. 204-215].

Durch Überlagerung von EOF und elektrophoretischer Wanderung resultiert die Gesamtwanderungsgeschwindigkeit (Abb. 7-4). Im Normalfall ist die elektrophoretische Mobilität kleiner als die elektroosmotische, daher wandern neben Kationen und Neutralteilchen auch Anionen zur Kathode (Minuspol). Der EOF führt zu einem viel flacheren Strömungsprofil als der hydrodynamische Fluss in der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) [168, pp. 204-215]. Zusätze von Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) können die Trennung maßgeblich beeinflussen [199, p. 70], [200].

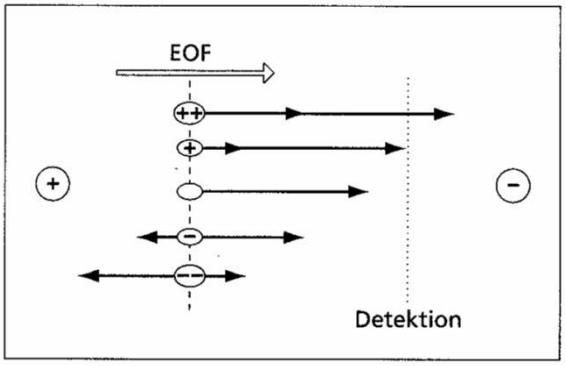


Abb. 7-4: Durch Überlagerung von elektroosmotischem Fluss und elektrophoretischer Mobilität ergibt sich die Gesamtbewegung der zu analysierenden Teilchen

Die Standardmethode der CE ist die CZE, die nur zur Trennung geladener Teilchen verwendet werden kann, da die Auftrennung allein nach der elektrophoretischen Mobilität erfolgt. Durch Zusatz oberflächenaktiver Stoffe zum Puffer in Konzentrationen oberhalb ihrer kritischen mizellare Konzentration (CMC) kommen bei der MEKC [201] polaritätsabhängige Trenneffekte zu den elektrophoretischen Einflüssen hinzu. Meist wird SDS verwendet.

7.4.1 Identifizierung und Quantifizierung in der CE

Die Identifizierung einzelner Substanzen über ihre Migrationszeiten ist unsicher. Durch die Verwendung eines Diodenarraydetektors (PDA-Detektor) lassen sich über das jeweilige UV-Spektrum die Zuordnungen überprüfen. Um trotz vieler Widrigkeiten klare qualitative Aussagen treffen zu können, bedient man sich der relativen Migration, die sich auf einen internen Standard sowie einen polaren, neutralen Marker für die Totzeit (z. B. MeOH), welche durch die Stärke des EOF bedingt ist, bezieht. Dabei wurde die Migrationszeit der jeweiligen Substanz abzüglich der mittels Marker bestimmten Totzeit (Nettomigrationszeit) ins Verhältnis zur Nettomigrationszeit des internen Standards Phthalsäure (PS) gesetzt.

Die Quantifizierung in der CE gestaltet sich insgesamt als schwierig [199, pp. 61-69]: miniaturisierte automatische Probenaufgeber sorgen bei mehrmaliger Injektion für ein gleichbleibendes Probenvolumen, die Probenkonzentration kann sich aber zwischen den einzelnen Läufen verändern. Abhilfe kann durch einen internen Standard geschaffen werden. Die einzelnen Substanzen wandern beim Erreichen des Detektors mit steigender Migrationszeit zunehmend langsamer. Durch Standardisierung der integrierten Peakflächen auf die Migrationszeiten werden aussagekräftige korrigierte Peakflächen erhalten [200]. Diese wurden im Rahmen der Arbeit durch Division der mittels Software ermittelten Peakflächen durch die jeweilige Migrationszeit errechnet.

7.4.2 Verwendete CE-Methoden

Um einen Grobüberblick über das Inhaltsstoffspektrum der untersuchten Wurzeldroge von *D. sylv.* mit einer automatisierbaren Methode zu erhalten, wurde mit zwei Methoden der CE experimentiert. Um einen einfachen und schnellen Überblick zu ermöglichen, wurde die CZE verwendet. Desweiteren wurde mittels MEKC eine von Materialbedarf und Vorbereitungen etwas aufwändigere, dafür aber mit einer wesentlich besseren Auftrennung neutraler iridoider Bestandteile verbundene Methode eingesetzt.

7.4.2.1 Pufferherstellung

Zunächst wurde eine Stammlösung (SL) mit 150 mmol/l Borsäure (4,6375 g Borsäure mit H_2O (bidest.) auf 500 ml aufgefüllt, „SL-Bors“) angefertigt, von der ausgehend die einzelnen

Pufferlösungen hergestellt wurden. Diese wurde zur Sicherstellung der Partikelfreiheit und zur Reduzierung eventueller Keimzahlen sterilfiltriert (≤0,2 µm). Je nach gewünschter Endkonzentration an Boratpuffer wurden 20 ml dieser SL (für c = 30 mmol/l), 30 ml (für c = 45 mmol/l) oder 40 ml (c = 60 mmol/l) mit Natronlauge 0,15 mol/l in einem Becherglas unter Rühren und pH-Kontrolle mittels pH-Meter auf den gewünschten pH-Wert zwischen 8,8 und 9,8 (Ausnutzung der ionischen Eigenschaften der deprotonierten Phenolcarbonsäuren und Phenole) eingestellt. Diese Lösung wurde quantitativ in einen 100,0 ml-Maßkolben überführt und mit H_2O (bidest.) auf 100,0 ml Messpuffer aufgefüllt.
Für die Herstellung der tensidhaltigen Pufferlösungen wurde eine definierte Menge SDS eingewogen und mit der entsprechenden Menge Boratpuffer der gewünschten Konzentration im Maßkolben aufgefüllt (Tab. 7-15).

Tab. 7-15: Herstellung der SDS-haltigen Boratpuffer

pH-Wert	Konz. Borat [mmol/l]	Soll-Konz. SDS [mmol/l]	Einwaage SDS [mg]	Gesamtvolumen [ml]	Ist-Konz. SDS [mmol/l]
8,8	45	20	57,8	10	20,04
9,2	45	20	144,4	25	20,03
9,4	45	20	57,8	10	20,04
9,4	60	20	144,6	25	20,06
9,6	30	20	144,3	25	20,02
9,6	45	20	145,0	25	20,11
9,6	45	40	115,6	10	40,09
9,8	45	20	144,5	25	20,04

Die Lagerung der Pufferlösungen erfolgte bei 4 °C. Vor jedem Messtag wurden die befüllten Puffervials mittels Ultraschall einige Minuten entgast, um einem Zusammenbruch des Stromflusses durch Gasbläschenbildung in der Kapillare bei Erwärmung entgegenzuwirken. Für den Pufferbedarf der späteren MEKC-Methode wurde erneut eine SL mit 150 mmol/l Borsäure (2,3187 g Borsäure mit H_2O (bidest.) auf 250,0 ml aufgefüllt, „SL-Bors“, filtriert) angefertigt. Der Stammpuffer wurde durch Vorlage von 75 ml „SL-Bors“, pH-Einstellung mit Natronlauge 0,2 mmol/l auf pH 9,4 und Auffüllen mit H_2O (bidest.) hergestellt. Daraus wurde jeweils der Messpuffer durch Einwaage von 130,7 mg SDS und Zugabe von Stammpuffer ad 40,0 ml erhalten.

7.4.2.2 CZE

Um ein schnelles und einfach durchführbares Verfahren zu entwickeln, das eine Abgrenzung der untersuchten *D. sylv.*-Wurzeldroge von anderen ähnlichen Drogen (z. B. den Wurzeln von *D. asp.*) mittels Fingerprint-Chromatogramm ermöglicht, wurde die CZE eingesetzt.

Um die Kapillare jeweils reproduzierbar zu äquilibrieren wurde vor jedem Messtag 2 min bei 20 psi mit Natronlauge 0,1 mol/l, dann 4 min bei 20 psi mit H_2O (bidest.) und zuletzt 5 min bei 20 psi mit dem gewünschten Boratpuffer der Methode gespült. Zur schnelleren Einstellung der elektroosmotischen Doppelschicht wurde daraufhin dreimal abwechselnd mit Puffer gespült (3 min, 3 psi) und Spannung (3 min, 15 kV) angelegt. Vor jeder einzelnen Messung wurde mit Puffer gespült (2 min, 20 psi), dann die Probe injiziert (0,2 psi, 3 s) und bei 30 °C mit 12 kV über 11 min aufgetrennt. Am Ende eines Messtages wurde reinigend für 1 min bei 20 psi mit Natronlauge 0,1 mol/l und 5 min bei 20 psi mit H_2O (bidest.) gespült. Zuletzt wurde die Kapillare mittels Luftdruck (1 min, 20 psi) geleert und so bis zur nächsten Serie belassen.

7.4.2.2.1 Entwicklung der CZE-Methode

Für die Auftrennung phenolischer Verbindungen und organischer Säuren im elektrischen Feld ist ebenso wie für Iridoide [202] ein alkalischer pH-Wert notwendig. Im erwarteten günstigen pH-Bereich eignet sich Boratpuffer aufgrund des pK_a-Wertes der Borsäure von 9,1 [203], [204], [205], [206], [207], [208], [209]. Um einen guten Kompromiss zwischen pH-Wert und entstehendem EOF, Auftrennung und Wärmeentwicklung zu finden, wurde mit verschiedenen Pufferstärken und pH-Werten experimentiert. Als Messwellenlänge wurden 234 nm gewählt, da die zu trennenden Iridoide kein nützliches Chromophor für eine größere Messwellenlänge enthielten. Um trotzdem auch phenolische Substanzen leichter identifizieren zu können und Reinheitsaussagen durch Vergleich der UV-Spektren im auf- und absteigenden Teil einzelner Peaks treffen zu können, wurden alle Messungen mittels PDA-Detektor kontinuierlich zwischen 190 und 400 nm aufgezeichnet. Daneben wurden die Trennspannung und der Temperaturbereich variiert, um optimale Ergebnisse zu erreichen. Als Kapillare wurden 40 cm lange unbeschichtete Quarzkapillaren mit 75 µm Innendurchmesser, einer effektiven Trennstrecke von 30 cm und einem 100 x 800 µm Detektorfenster eingesetzt.

Zur Eingrenzung wurde der pH-Bereich von 9,0 bis 9,8 in Schritten von 0,2 pH-Einheiten jeweils mit Boratpufferkonzentrationen von 30 und 45 mmol/l durchgetestet. Das Trennoptimum wurde mit Boratpuffer 45 mmol/l, pH 9,6 erreicht. Durch Änderung der Kapillartemperatur von 20 auf 15 °C konnte die Auftrennung ebenfalls verbessert werden. Auch der Einfluss der Trennspannung auf den Separationsprozess (21, 18, 15 und 12 kV) wurde untersucht: Auch wenn höhere Spannungen den Vorteil verkürzter Trennzeiten bringen, wird dieser durch schlechtere Peakauflösungen, unter anderem wegen verstärkter Diffusion durch entstehende JOULEsche Wärme in der Kapillare, überkompensiert. Die optimierte Methode mit einer Trenndauer von 10 min verwendet Boratpuffer pH 9,6, 45 mmol/l, eine Trennspannung von 18 kV bei 15 °C und eine hydrodynamische Injektion mit 0,2 psi über 3 s. Dabei wurden jeweils etwa 7 µl Probenlösung injiziert [210].

Um den in Kapitel 7.4.1 beschriebenen Einfluss der veränderlichen Einspritzvolumina zu minimieren und mit gut reproduzierbaren relativen Migrationen zu arbeiten, wurden testweise 4-Hydroxybenzaldehyd [211], Cumarin, Thymol und 3,5-Dinitrobenzoesäure als interner Standard eingesetzt, deren Peaks sich aber vor allem bei der später in Kapitel 7.4.2.3 beschriebenen MEKC-Methode mit Substanzzonen aus den Elektropherogrammen der gemessenen Kardenproben überlagerten. Um trotzdem einen Marker für die wechselnden Einspritzvolumina sowie die leicht veränderlichen Migrationszeiten zu haben, wurde eine Substanz gewählt, die durch ihre Polarität und stark negative Ladung hinter allen aufgetrennten Substanzen der Kardenproben liegt: PS. Sie zeigte sich als gut geeignet als interner Standard, insbesondere weil sie in Verbindung mit dem eingesetzten Totzeitmarker MeOH bei Berechnung der Nettomigration die gesamte Trenndauer überspannt. Die daraus errechneten relativen Migrationszeiten dienten als Identifizierungsmarker.

7.4.2.2.2 Aufnahme der CZE-Fingerprint-Elektropherogramme

Als Messproben wurden verschiedene Gemische hergestellt. Um die Mischungen auch während der Methodenentwicklung bei allen zu testenden pH-Werten zwischen 9.0 und 9,8 einsetzen zu können, wurde den Gemischen ein Boratpuffer pH 9,4 zugesetzt.

Die Referenzsubstanz-SL „Ref_CE1“ enthielt Loganin (0,16 mg/ml), CS (0,167 mg/ml), KS (0,067 mg/ml) und PS (0,1 mg/ml) in Boratpuffer 3,9 mmol/l pH 9,4. Sie wurde durch

Mischen von 15 µl PS-SL (2,4 mg in 1,2 ml Boratpuffer 4,5 mmol/l pH 9,4), 40 µl Loganin-SL (1,2 mg in 1,0 ml H_2O), 50 µl CS-SL (1,0 mg in 1,0 ml Boratpuffer 4,5 mmol/l pH 9,4) und 20 µl KS-SL (1,0 mg in 1,0 ml Boratpuffer 4,5 mmol/l pH 9,4) mit 175 µl Boratpuffer 4,5 mmol/l pH 9,4 erhalten.

Vor Aufnahme der Fingerprint-Elektropherogramme wurde dreimal das Referenz-Gemisch CE vermessen, um später in den Proben die Referenzsubstanzen über deren relative Migration zuordnen zu können. Zur Berechnung der relativen Migration wurde über die Migrationszeit des in Referenzgemisch und Proben enthaltenen MeOH jeweils die Totzeit bestimmt und die Nettomigrationszeiten der Referenzen ins Verhältnis zur Nettomigrationszeit des inneren Standards PS gesetzt.

Für die CZE-Messungen der drei Drogenextrakte aus Kapitel 7.2.5 wurden je 100,4 mg („DS_fW_MeOH-TE_CE“ und „DS_WD_MeOH-TE_CE“) bzw. 100,3 mg („DA_MeOH-TE_CE“) in 1,0 ml MeOH gelöst („DS_fW_MeOH-TE_CE“-Lösung, „DS_WD_MeOH-TE_CE-Lösung“ und „DA_MeOH-TE_CE“-Lösung). Ein Aliquot der SL von jeweils 75 µl (bzw. 100 µl methanolische „Da_MeOH-TE_CE“-Lösung) wurde mit 70 µl MeOH, 40 µl H_2O (bidest.), 115 µl Boratpuffer 4,5 mmol/l pH 9,4 und 15 µl PS-SL (2,4 mg in 1,2 ml Boratpuffer 4,5 mmol/l pH 9,4) gemischt. Die entstandenen Messproben „DS_fW_CE1“ und „DS_WD_CE1“ enthielten somit je 23,90 mg/ml Trockenextrakt und 0,095 mg/ml PS in Boratpuffer 1,64 mmol/l pH 9,4 mit 46 % MeOH-Anteil. „DA_CE1“ enthielt 31,84 mg/ml Trockenextrakt und 0,095 mg/ml PS in Boratpuffer 1,29 mmol/l pH 9,4 mit 54 % MeOH-Anteil.

Die Proben „DS_fW_CE1“, „DS_WD_CE1“ und „DA_CE1“ wurden unter der Referenzmessung identischen Bedingungen und der Referenz entsprechender Proben-vorbereitung vermessen. Zur Absicherung der Peakzuordnung wurden auch die UV-Spektren aus dem jeweiligen PDA-Spektrum mit denen des Referenzgemischs verglichen. Die Auftrennung phenolischer Verbindungen wurde zusätzlich in den Elektropherogrammen bei 330 nm untersucht.

7.4.2.3 Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC)

Zur Verbesserung des Fingerprint-Elektropherogramms der CZE wurde die MEKC eingesetzt, da sich die typischen iridoiden Verbindungen in *D. sylv.* aufgrund ihrer fehlenden Ladung im leicht basischen Milieu mithilfe der CZE nicht trennen lassen [212], [213], [214]. Um auch Loganin zuordnen zu können, wurde der Mizellbildner SDS zugesetzt. Mittels MEKC sollten parallel auch phenolische Substanzen wie die organischen Säuren KS und CS aufgetrennt und zugeordnet [215], [216], [217], [218] und ausgewählte Markersubstanzen quantifiziert werden.

7.4.2.3.1 Entwicklung der qualitativen MEKC-Methode

Um die CMC zu überschreiten, mussten größenordnungsmäßig mehr als 8,2 mmol/l SDS zugesetzt werden, was der CMC bei 25 °C in reinem H_2O entspricht [219]. Zur Auffindung der optimalen Trennbedingungen wurde zunächst bei pH 9,6, dem Optimum bei der CZE, und konstantem SDS-Zusatz von 20 mmol/l die günstigste Boratpufferkonzentration untersucht: 45 mmol/l eigneten sich deutlich besser als 30 mmol/l. Eine Erhöhung der SDS-Konzentration auf 40 mmol/l zeigte sich hingegen als ungünstig, v. a. für die Auftrennung der ungeladenen apolaren Stoffe, die am Ende des Elektropherogramms zusammengedrängt wurden. Daraufhin wurde die Trennung durch Änderung des pH-Wertes des Boratpuffers optimiert: Von den untersuchten pH-Werten 8,8 / 9,2 / 9,4 / 9,6 / 9,8 war ein pH-Wert von 9,4 am geeignetsten; bei steigendem bzw. sinkendem pH-Wert wurde die Auftrennung zunehmend schlechter. Ähnlich wie bei der CZE-Methodenentwicklung wurde die Kapillar-temperatur variiert: 15 / 20 / 25 / 30 °C wurden untersucht, wobei bei der MEKC erwartungs-gemäß die Kühlung der Kapillare negative Effekte brachte: Obwohl die Diffusion gemindert wurde, sank die Trennschärfe deutlich, da die Löslichkeit des Mizellbildners SDS so stark fiel, dass entweder die CMC komplett unterschritten wurde oder zumindest die Anzahl der Mizellen stark absank. Eine Temperaturerhöhung auf bis zu 30 °C hingegen führte zu einer deutlichen Verbesserung der Trennschärfe. Die soweit optimierte Methode wurde noch auf Verbesserungsmöglichkeiten durch Erhöhung der Boratpufferkonzentration geprüft. Der Einsatz von 60 mmol/l brachte jedoch keine Verbesserung, sondern machte den Einsatz höherer Spannungen unmöglich, da bei 12 kV bereits so viel JOULEsche Wärme entstand, dass es bei 25 bis 30 °C zur Gasbläschenbildung in der Kapillare und damit zum Zusammenbruch

des elektrischen Stromes führte. Zuletzt wurde auf die günstigste Spannung hin untersucht und diese bei 12 kV gefunden. Eine Erhöhung der Spannung auf bis zu 24 kV verkürzte zwar die absolute Trennzeit von ca. 10 auf ca. 6 min, brachte aber zunehmende Schwierigkeiten mit der Ableitung der entstehenden Wärme und verschlechterte das Auflösungsvermögen. Eine niedrigere Spannung anzulegen brachte ebenfalls keine Vorteile, da nur die Trennzeit länger wurde, ohne die Auflösung zu beeinflussen.

Die optimierte Methode mit einer Messdauer von 11 min verwendete folglich Boratpuffer 45 mmol/l mit 20 mmol/l SDS-Zusatz, pH 9,4, eine Trennspannung von 12 kV (daraus resultierte ein Stromfluss von ca. 39 µA) und eine Kapillartemperatur von 30 °C. Die 40 cm lange unbeschichtete Quarzkapillare der CZE-Methode mit 75 µm Innendurchmesser, einer effektiven Trennstrecke von 30 cm und einem 100 x 800 µm Detektorfenster wurde auch hier eingesetzt. Analog zur CZE wurde bei 234 nm detektiert und mittels PDA-Detektor wurden 3D-Elektropherogramme von 190 bis 400 nm aufgezeichnet. Der interne Standard der CZE-Methode PS wurde auch für die MEKC-Methode beibehalten, da er sich bei Vorversuchen aufgrund vollständiger Abtrennung von den in Karden-Proben enthaltenen Substanzen als geeignet erwies. Die ebenfalls testweise untersuchten Substanzen 4-Hydroxybenzaldehyd, Cumarin, Thymol und 3,5-Dinitrobenzoesäure zeigten dagegen Überlappung mit Peaks der untersuchten Proben.

7.4.2.3.2 Vergleichende Aufnahme von Fingerprint-Elektropherogrammen verschiedener methanolischer *Dipsacus*-Wurzelextrakte

Wie bei der CZE-Methode aus 7.4.2.2.2 wurde das Referenzgemisch „Ref_CE1“ vermessen, um sowohl Vergleichswerte für die relativen Migrationszeiten berechnen zu können, als auch Vergleichs-UV-Spektren der Referenzen zu erhalten und mit diesen die Peakzuordnung abzusichern. Aus den Elektropherogrammen dreier Referenz-Messungen wurden die Migrationszeiten entnommen und daraus Netto-Migrationszeiten, relative Migrationen und die für die Auswertung der Extraktmessungen relevanten Mittelwerte der relativen Migrationen sowie deren Standardabweichung berechnet.

Unter identischen MEKC-Bedingungen wie bei den Referenzen wurden die Gemische „DS_fW_CE1“, „DS_WD_CE1“ und „DA_CE1“ aus 7.4.2.2.2 vermessen, um die gesuchten Fingerprint-Elektropherogramme zu erhalten.

7.4.2.3.3 Quantifizierung ausgewählter Markersubstanzen

Um den Gehalt von der CE zugänglichen, ausgewählten Substanzen in Extrakten bestimmen zu können, wurde aufbauend auf der Fingerprint-MEKC-Methode nach einer Möglichkeit zur Gehaltsbestimmung gesucht. Zunächst wurden Markersubstanzen ausgewählt, die zum einen als Reinstoffe ausreichend zur Verfügung standen, zum anderen in den gemessenen Extrakten von anderen Substanzen möglichst abgetrennt sein mussten. Die Messparameter der Fingerprint-MEKC-Methode (siehe 7.4.2.3.1) wurden dazu nochmals modifiziert: Die Messtemperatur wurde aufgrund des bei höherer Temperatur leicht Gasbläschen-bildenden Puffers auf 25 °C begrenzt. Die damit verbundene Verlängerung der Migrationszeiten wurde durch eine Messzeit von 15 min ausgeglichen.

Als typische Inhaltsstoffe für *D. sylv*. wurden die Iridoide Loganin und Cantleyosid und die Phenolcarbonsäuren KS und CS ausgewählt. Zur Erstellung von Kalibriergeraden wurden sie und der interne Standard PS in verschiedenen Konzentrationen mehrfach einzeln und in verschieden konzentrierten Gemischen vermessen. Je nach Substanz wurde im Konzentrationsbereich von 0,001 mg/ml bis 0,250 mg/ml untersucht. Die untersuchten Referenzgemische wurden durch Verdünnen mit 1:10 verdünntem Messpuffer aus einer Referenz-SL „Ref_CE2“ erhalten. „Ref_CE2“ enthielt Loganin (0,24 mg/ml), CS (0,25 mg/ml), KS (0,10 mg/ml) und PS (0,15 mg/ml) in Boratpuffer 5,2 mmol/l pH 9,4 mit 2,3 mmol/l SDS-Zusatz. Sie wurde durch Mischen von 165 µl PS-SL (5,1 mg in Mischung aus 0,5 ml Boratpuffer 45 mmol/l pH 9,4 20 mmol/l SDS und 4,6 ml H_2O), 220 µl Loganin-SL (1,2 mg in 1,0 ml H_2O), 275 µl CS-SL (1,0 mg in 1,0 ml MeOH), 110 µl KS-SL (1,0 mg in 1,0 ml MeOH) und 220 µl Cantleyosid-SL (1,2 mg in 1,0 ml H_2O) mit 110 µl Boratpuffer 45 mmol/l pH 9,4 20 mmol/l SDS erhalten. Die Zusammensetzungen der verschiedenen konzentrierten Referenzgemische finden sich in Tab. 7-16.

Zur Quantifizierung der vier ausgewählten Substanzen aus den Wurzeln von *D. sylv.* und *D. asp.* wurden erneut die in Kap. 7.4.2.2.1 und 7.4.2.2.2 eingesetzten MEOH-Extrakt-SL verwendet („DS_fW_MeOH-TE_CE“-Lösung, „DS_WD_MeOH-TE_CE“-Lösung und

„DA_MeOH-TE_CE“-Lösung). Jeweils 30 µl SL wurden mit 70 µl MeOH, 30 µl PS-SL (1,0 mg/ml) und 170 µl Boratpuffer (4,5 mmol/l, pH 9,4) versetzt und mit der modifizierten MEKC-Methode vermessen.

Tab. 7-16: Verwendete Referenzgemische für die MEKC-Quantifizierung ausgewählter Inhaltsstoffe von *Dipsacus* aus methanolischen Direktextrakten

	Ref_CE2_1	Ref_CE2_2	Ref_CE2_3	Ref_CE2_4	Ref_CE2_5 = Ref_CE2
PS	0,05 mg/ml	0,075 mg/ml	0,1 mg/ml	0,125 mg/ml	0,15 mg/ml
Loganin	0,08 mg/ml	0,12 mg/ml	0,16 mg/ml	0,2 mg/ml	0,24 mg/ml
CS	0,083 mg/ml	0,125 mg/ml	0,167 mg/ml	0,208 mg/ml	0,25 mg/ml
KS	0,033 mg/ml	0,05 mg/ml	0,067 mg/ml	0,083 mg/ml	0,1 mg/ml
Cantleyosid	0,08 mg/ml	0,12 mg/ml	0,16 mg/ml	0,2 mg/ml	0,24 mg/ml
jeweils aufgefüllt mit Boratpuffer 4,5 mmol/l, pH 9,4, 2,0 mmol/l SDS auf 300 µl					

7.5 Kernspinresonanz

Die NMR ist eine der wichtigsten und meistgenutzten Methoden für die Strukturbestimmung chemischer Substanzen. Sie geht auf die Resonanz-Wechselwirkung zwischen Radiowellen und Atomkernen der Substanz in einem sehr starken äußeren homogenen Magnetfeld zurück. [220], [221], [222], [223]. Durch ständige Verbesserungen an den Magneten werden heute mit heliumgekühlten, supraleitenden Magneten über 23 Tesla erreicht, was einer ^{1}H-Mess-frequenz von 1 GHz entspricht.

Vermessen werden können nur magnetische Kerne, typischerweise ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{17}O und ^{31}P. Bei der Auswertung von NMR-Spektren betrachtet man die chemische Verschiebung. Diese gibt Aufschluss über die physiko-chemische Umgebung des Atomkerns. Die Signal-aufspaltung in Singuletts, Dubletts usw. bis hin zu Multipletts ist durch die Anzahl verschiedener koppelnder Nachbaratome bedingt. Die Größe der Signale weist auf die Anzahl identischer Protonen bei der Protonen-NMR hin. Bei der ^{13}C-NMR werden die Spektren im Allgemeinen entkoppelt aufgenommen und nur die Lage der Signale ausgewertet. Durch APT-NMR (Attached Proton Test) lässt sich zwischen gerad- und ungeradzahliger Anzahl an gebundenen Protonen am C-Atom unterscheiden. Mittels zweidimensionaler Kombination lassen sich homo- (COSY – Correlated Spectroscopy) und heteronukleäre (HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence, HMBC – Heteronuclear Multi Bond Correlation)

verschiebungskorrelierte NMR-Spektren aufnehmen, um Aussagen über H-H und H-C-Kopplungen zu treffen.

7.5.1 NMR-Untersuchungen

Zur Identifikation und Strukturaufklärung von aus *D. sylv.* isolierten Substanzen wurde neben der MS die NMR eingesetzt. Je nach Verfügbarkeit der Geräte und der Notwendigkeit aufgrund vorhandener Probenmengen und -eigenschaften wurden dazu Spektrometer zwischen 300 MHz und 700 MHz eingesetzt. Die Messungen erfolgten durch Herrn Dr. Lothar Hennig (Fakultät für Chemie und Mineralogie, Institut für Organische Chemie), Herrn Dr. Matthias Findeisen (Fakultät für Chemie und Mineralogie, Institut für Analytische Chemie) und Frau Jutta Ortwein (Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Pharmazie).
Vor der Vermessung wurden sämtliche Proben lyophilisiert und bis unmittelbar vor der Messung dicht verschlossen tiefgekühlt oder im Exsikkator gelagert. Je nach Polarität und Löslichkeit der zu untersuchenden Proben wurden verschiedene deuterierte Lösungsmittel zum Lösen der Proben unmittelbar vor den Messungen eingesetzt: deuteriertes Wasser, Chloroform-d und Pyridin-d_5.

Die in Tab. 7-17 aufgeführten Proben wurden nach ihrer Isolierung mittels NMR-Spektroskopie bei 26°C untersucht. Referenziert wurde dabei auf die ^{1}H- bzw. ^{13}C-Signale des Lösungsmittels.

Tab. 7-17: Mittels NMR vermessene Proben mit ihren jeweiligen Lösungsmitteln und ^{1}H-Messfrequenzen

Probe	**Lösungsmittel**	**^{1}H-Messfrequenz**
Loganin	D_2O	600 MHz
Cantleyosid	D_2O	300 MHz
Prinsepiol	$CDCl_3$	400 MHz
Ursolsäure	d_5-Pyridin	400 MHz

7.6 UV/Vis-Spektralphotometrie

Die UV/Vis-Spektralphotometrie beruht auf der Grundlage der Absorption elektromagnetischer Energie im sichtbaren und ultravioletten Bereich durch Elektronen in Molekülen und Komplexen. Die Ursache für die Absorption des Lichts liegt in der Anregung von Elektronen in Molekülorbitalen, d. h. diese nehmen einen definierten Energiebetrag auf, der dem Elektronenübergang in ein höheres, freies Molekülorbital entspricht. Da neben der Anregung des Elektronenübergangs ein Teil der Energie auch für die Anregung von Schwingungen genutzt wird, entsteht kein reines Linienspektrum wie bei der Atomabsorptionsspektroskopie, sondern durch viele nebeneinander liegende Absorptionslinien ein Bandenspektrum [224], [225]. Zur Messung der Absorption bedient man sich eines Photometers, bei den durchgeführten Versuchen eines DU® 520 General Purpose UV/Vis-Spectrophotometers. Dieses misst die Menge des von einer Lösung absorbierten Lichts einer definierten Wellenläng. Die gemessene Absorption ist nach dem BOUGUER-LAMBERT-BEERschen Gesetz wie folgt definiert [168, pp. 19-24]:

$$A = -\lg T = \lg \frac{1}{T} = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \qquad \textbf{(Formel 6)}$$

A = Absorption, T = Transmission, I_0 = Intensität des eingestrahlten Lichts, I = Intensität des ausgestrahlten Lichts, ε_λ = molarer Extinktionskoeffizient [$l*mol^{-1}*cm^{-1}$], c = Konzentration der Lösung [mol/l], d = durchstrahlte Schichtdicke der Lösung [cm]

Neben der Gehaltsbestimmung lässt sich die Methode auch zur Aufnahme von UV/Vis-Spektren nutzen, indem man über Drehung des Monochromators die eingestrahlte Wellenlänge des Lichts kontinuierlich ändert und die Absorption bestimmt, oder bei moderneren Photodiodenfeldgeräten den gesamten Spektralbereich gleichzeitig einstrahlt und erst nach Durchstrahlung der Küvette über ein Prisma oder Gitter aufspaltet. Das aufgetrennte Spektrum wird dann über eine lineare Photodiodenreihe aufgenommen. Dadurch wird die Aufnahme von (Voll-) Spektren in kürzester Zeit ermöglicht, was beim Einsatz in der CE (Pace™ System MDQ Diode Array Detector) die Aufnahme von kontinuierlichen 3D-Spektren des Trennungsprozesses zulässt, so dass einzelne Substanzzonen („Peaks“) über ihr UV/Vis-Spektrum identifiziert werden können [168, pp. 19-24].

7.7 Untersuchung der bakterienwachstumshemmenden Aktivitäten

7.7.1 Herstellung des BSK-II-Mediums

In einen sterilen 5 l-Erlenmeyerkolben mit 900,0 ml destilliertem, sterilem H_2O wurden folgende Bestandteile eingewogen und mit einem Magnetrührer ca. drei Stunden gerührt, bis alle Bestandteile vollständig gelöst waren (Tab. 7-18):

Tab. 7-18: Herstellung BSK-II-Medium (Teil 1)

Bovine serum albumin (V)	50,0 g
Neopepton	5,0 g
HEPES	6,0 g
Natriumcitrat	0,7 g
Glucose	5,0 g
Natriumpyruvat	0,8 g
N-acetyl-D-glucosamin	0,4 g
Natriumhydrogencarbonat	2,2 g
TC Yeastolate	2,6 g

Daraufhin wurden 100,0 ml CMRL media 1066 10X (sterile), 84,0 ml Rabbit serum (8 %), 962 µl Kanamycinlösung (10 mg/ml in 0,9 % NaCl, entsprechend 81 µl/ml Endkonzentration im Medium) und 1196 µl Rifampicinlösung (50 mg/ml in DMSO, entsprechend 50 µg/ml Endkonzentration im Medium) hinzugefügt [226]. Der pH-Wert musste nicht eingestellt werden, da er wie gewünscht 7,5 betrug. Nach Sterilfiltration durch eine 0,22 µm-Filtermembran wurden 100,0 ml 8,60 %-ige autoklavierte Gelatinelösung hinzugefügt. Die erhaltenen 1.186 ml BSK-II-Medium wurden bei 3 °C in sterilen 1000 ml-Glasflaschen gelagert. Kurz vor seiner Verwendung wurde das Medium in sterile 50 ml-Röhrchen umgefüllt und auf 33 °C temperiert.

7.7.2 Herstellung einheitlicher *Bb*ss-Aliquote

Um für alle Versuche einen einheitlichen Borrelienstamm zur Verfügung zu haben, wurden vor Beginn der Testungen 100 µl *Bb*ss der Passage 49 in 6 ml BSK-II als Kultur angesetzt.

Nach acht Tagen bei 33 °C im Brutschrank wurde deren Konzentration mit 4,0 x 10^8 ml^{-1} bestimmt. 5,5 ml dieser Kultur wurden mit 0,971 ml Glycerol 99,5 % versetzt, im Vortex-mischer homogenisiert und verteilt auf 63 Aliquote zu je 100 µl bei -80 °C eingefroren [227]. Durch den Glycerolzusatz, der als Kryoprotektor die Bakterienzellen vor Beschädigung durch Eiskristalle schützt, ergab sich eine Endkonzentration von 3,4 x 10^8 ml^{-1} in den tiefgefrorenen Aliquoten (Passage 50) zur weiteren Verwendung.

7.7.3 Sensitivitätstest

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze an *Bb*ss im hergestellten BSK-II-Medium (siehe 7.7.1) wurde ein Sensitivitätstest durchgeführt. Ein Teil der zur Aliquotierung genutzten Kultur der Passage 50 wurde am achten Tag über eine Verdünnungsreihe in Mikroreaktionsgefäßen auf definierte Konzentrationen verdünnt. Durch Zugabe von jeweils 500 µl der letzten sechs Verdünnungsstufen zu 2,5 ml BSK-II-Medium wurden Kulturen mit 10.000, 1.000, 100, 10, 5 und 1 *Bb*ss erhalten (Abb. 7-5).

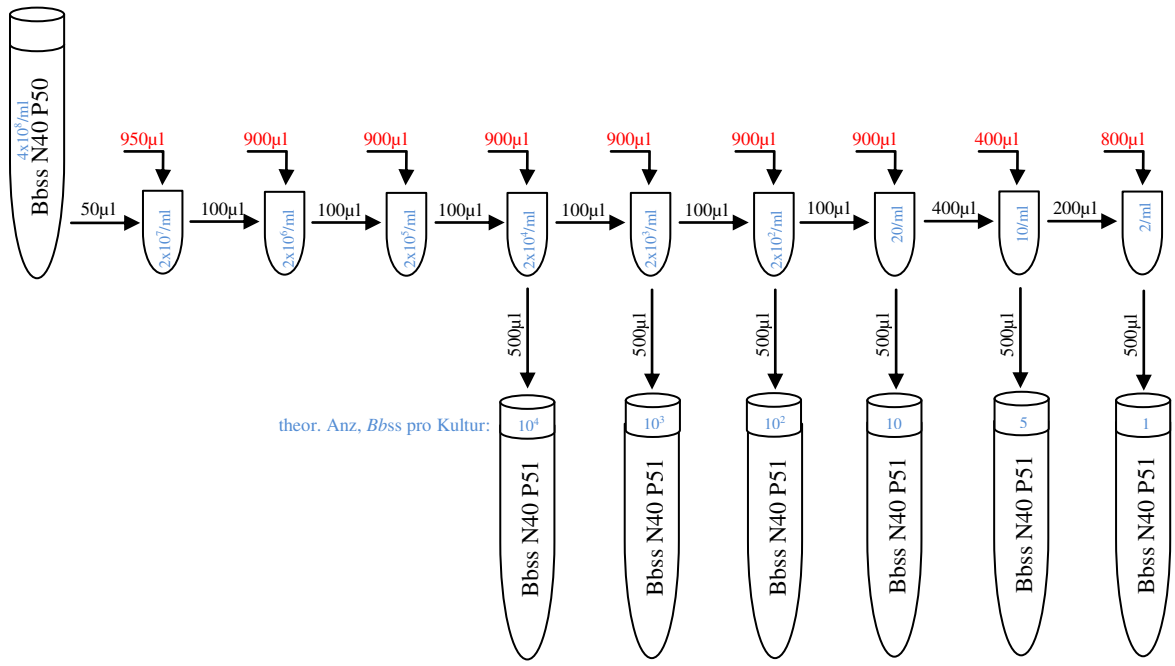


Abb. 7-5: Verdünnungsreihe für Sensitivitätstests zur Ermittlung der Nachweisgrenze von *Bb*ss

Nach einer sowie nach zwei Wochen wurden die sechs Kulturen mikroskopisch auf das Vorhandensein von *Bb*ss untersucht. Nach einer Woche waren *Bb*ss in den Kulturen mit

anfänglich 10.000, 1.000 und 100 Individuen nachweisbar, nach zwei Wochen auch in den Kulturen mit anfangs 10, 5 und 1 Individuum.

7.7.4 Mikroskopische Bestimmung der Borrelienkonzentration

7.7.4.1 Dunkelfeldmikroskopie

Zur mikroskopischen Betrachtung sehr kontrastarmer Bakterien, die der normalen Lichtmikroskopie unzugänglich sind, eignet sich die Dunkelfeldmikrokopie. Sie wird für die visuelle Untersuchung von Borrelien in BSK-II-Medium eingesetzt [228], [229], [230], [231], [232], [233]. Physikalisch beruht sie auf der Streuung von Licht im Strahlengang. Gerade durch den Objektträger fallendes, ungestreutes Licht wird vom Objektiv nicht eingefangen, während das Streulicht vom Betrachter gesehen wird Dadurch entsteht ein helles Präparat auf schwarzem Untergrund.

7.7.4.2 Petroff-Hausser-Zählkammer

Neben der reinen Sichtbarmachung bedarf es zur Feststellung der Bakterienkonzentration unter dem Mikroskop zusätzlich einer Standardisierung des betrachteten Volumens. Für Spirochäten eignet sich zu diesem Zweck besonders die Zählkammer nach Petroff-Hausser [234]. Die Kammer hat eine lichte Höhe von 0,02 mm zwischen Deckgläschen und Objektträger, die Kantenlänge eines Zählbereiches aus 16 Kleinfeldern beträgt 1 mm. Insgesamt finden sich 4 solcher Bereiche auf den Träger graviert. Dazwischen liegen weitere Zählbereiche mit kleineren Dimensionen (Abb. 7-6) [235], [236]. Mit einem Deckgläschen bedeckt wird sie wie ein Objektträger unter das Mikroskop gelegt

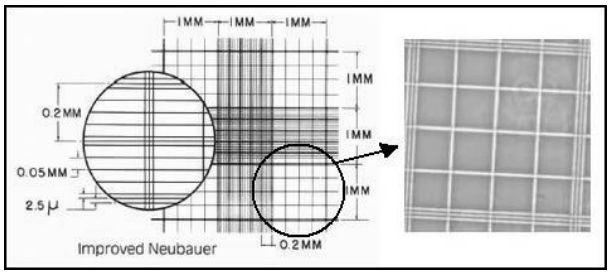


Abb. 7-6: Darstellung des geätzten Zählrasters der Petroff-Hausser-Zählkammer (Improved Neubauer-Raster) von Hausser Scientific mit Detailfoto eines Zählfeldes mit 4 x 4 Kleinfeldern

7.7.4.3 Durchführung Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration an Borrelien in den Kulturen wurde mittels Dunkelfeldmikroskopie (7.7.4.1) an einem Axioskop 2 plus-Mikroskop in Verbindung mit einer Petroff-Hausser-Zählkammer mit Improved Neubauer-Zählgitter (7.7.4.2) bestimmt.

Nach gründlichem Mischen des jeweiligen Kulturröhrchens mittels Vortex Genie (Stufe 5) wurden 10 µl entnommen und auf die Zählkammer aufgebracht. Bei Bedarf wurden die entnommenen Aliquote zuvor in Mikroreaktionsgefäßen mit Medium verdünnt (für höhere Verdünnungen über zwei Stufen), mittels Vortex gemischt und dann gezählt. Beim Aufbringen auf die Zählkammer sog sich eine definierte Menge des borrelienhaltigen Mediums zwischen Deckgläschen und Kammervolumen. Unter dem Dunkelfeldmikroskop wurde jeweils bei 200-facher Vergrößerung die Anzahl der Borrelien in allen 4 x 16 Kleinfeldern gezählt, soweit die Anzahl in 4 diagonal liegenden Kleinfeldern eines 16er-Feldes nicht 20 deutlich überstieg. Aus den Summen der gezählten 4 großen Felder wurde der Mittelwert gebildet. Überstieg die Anzahl 20, konnte auf die Zählung aller 16 Kleinfelder eines Bereichs verzichtet werden. In diesen Fällen wurden nur 4 bzw. 8 zufällig ausgewählte Kleinfelder gezählt und auf 16 Felder extrapoliert. Die Anzahl der gezählten Felder ist in den Wertetabellen im Anhang jeweils angegeben. Die Dimension eines Zählfeldes aus 16 Kleinfeldern betrug (7.7.4.2) beschrieben 1 x 1 x 0,02 mm, d. h. 0,02 mm³ = 2 x 10^{-5} ml. Um die Konzentration als Anzahl der Borrelien pro ml zu erhalten, musste die Menge der in einem 16er-Zählfeld gezählten Individuen mit dem Kammerfaktor 1/(2 x 10^{-5} ml) = 50.000 ml^{-1} sowie dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden:

$$\boldsymbol{c = z_i \times \frac{16}{p} \times 50.000 ml^{-1} \times f} \qquad \textbf{(Formel 7)}$$

c = Borrelien-Konzentration [ml^{-1}], z = Anzahl Borrelien in gezählten Kleinfeldern, p = Anzahl der gezählten Kleinfelder, f = Verdünnungsfaktor

7.7.5 Versuchsdesign

7.7.5.1 Extraktpräparation

Die zu untersuchenden Trockenextrakte und Substanzen wurden in Abhängigkeit von ihrer Wasserlöslichkeit auf verschiedene Weise jeweils frisch vorbereitet: H_2O-Phasen wurden

direkt in H_2O, alle anderen Extrakte und Substanzen aufgrund ihrer höheren Lipophilie in 5 %-iger wässriger Polysorbat 80 (PS80)-lösung zu SL definierter Konzentration gelöst. Zur Beschleunigung des Löseprozesses wurden die Proben dazu kurzzeitig in ein auf 40 °C temperiertes Ultraschallbad gehalten. Unmittelbar vor Verwendung im Bakterienmodell wurden die gelösten Proben durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert und anschließend mit sterilem H_2O bzw. steriler PS80-Lösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Extrakte wurden im Konzentrationsbereich von 2.000 bis 20 µg/ml, Reinstoffe von 200 bis 5 µg/ml in mehreren Konzentrationen in der Kultur untersucht. Die Konzentrationsbereiche wurden für eine gute Vergleichbarkeit mit den *Cistus*-Voruntersuchungen [115] der Arbeitsgruppe gewählt.

7.7.5.2 Stammkultur

Um für jede Testsequenz mit einer homogenen Borrelienpopulation in der exponentiellen Wachstumsphase beginnen zu können, wurden jeweils etwa vier Tage vor Versuchsstart 100 µl tiefgefrorenes Aliquot von *Bb*ss der Passage 50 unmittelbar nach dem Auftauen in 2,95 ml temperiertes BSK-II Kulturmedium pipettiert, mittels Vortex gemischt und anschließend bei 33 °C im Brutschrank aufbewahrt. Am Versuchstag wurde dann mittels mikroskopischen Auszählens nach geeigneter Verdünnung die Konzentration der Stammkultur bestimmt. Ein Anteil dieser Kultur wurde mit frischem BSK-II Kulturmedium auf 1,05 bis 2,1 x 10^6 ml^{-1} eingestellt, um je nach Testsequenz zwischen 70 und 90 ml beimpftes Medium definierter Konzentration zur Verfügung zu haben.

7.7.5.3 Kulturansatz

Die Testung der zu untersuchenden Extrakte und Substanzen wurde aufgrund des hohen Zeitbedarfes beim manuellen Auszählen auf 10 Etappen verteilt, welche jeweils einmal unabhängig wiederholt wurden, um eine Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten zu gewährleisten. Jeweils 8 bis 10 Substanz- und Extraktverdünnungen bzw. Kontrollen konnten pro Versuchsabschnitt getestet werden. Ansatz, Präparation und Zählung wurden dreifach parallel durchgeführt (n = 3), um eine statistische Auswertbarkeit der Versuche zu ermöglichen. Folglich wurden pro Etappe 24 bis 30 Bakterienkulturen untersucht; insgesamt über die 20 Durchläufe 552 Kulturen.

Jeweils 2,85 ml *Bb*ss-Stammkultur wurden in verschließbaren 5 ml Rundbodenröhrchen mit 150 µl der entsprechenden Substanz- bzw. Extraktlösungen versetzt, mit dem Vortex gut durchmischt und anschließend bei 33 °C im Brutschrank gelagert. Dadurch wurde zum einen eine *Bb*ss-Konzentration von ca. 1,0 bis 2,0 x 10^6 ml^{-1} in den Untersuchungskulturen erhalten, zum anderen dem empfindlichen Modell nicht mehr als 5 % Fremdlösung zugesetzt.

7.7.5.4 Zähltage

Am Tag 0 (Kulturansatz) wurden 5 bis 6 zufällig ausgewählte Kulturen gezählt, um die durchschnittliche Konzentration an *Bb*ss zum Versuchsstart zu bestimmen. Jeweils ein, vier und acht Tage nach Beginn wurden sämtliche Kulturen nach geeigneter Verdünnung gezählt (siehe 7.7.4). Sämtliche Zählwerte und die daraus berechneten Konzentrationen und Standardabweichungen der Konzentrationen finden sich im Anhang unter 12. Die zeitliche Lage der Zähltage wurde durch Vorversuche anhand zweier Wachstumskurven der *Bb*ss über jeweils 11 Tage bestimmt (siehe Tab. Anhang 15-1). Die Zähltage wurden auf den Beginn, den Verlauf und das Ende der logarithmischen Wachstumsphase festgelegt. Die Positionierung der Zähltage ermöglichte eine gute Vergleichbarkeit mit den *Cistus*-Voruntersuchungen [115] der Arbeitsgruppe.

7.7.6 Statistische Auswertung

Die erhaltenen Daten, insgesamt 6624 Zählwerte, wurden mittels SPSS auf ihre Aussagekraft untersucht und statistisch signifikante Ergebnisse mittels T-Test herausgefiltert. Eine weitere Feineinteilung erfolgte mittels beidseitigem T-Test in statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) und hochsignifikant ($p \leq 0,01$). In den Diagrammen wurde der p-Wert mit * ($p \leq 0,05$) und ** ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet.

ERGEBNISSE

8 Ergebnisse

Im Verlauf der Arbeit konnten mit den in Kapitel 7 beschriebenen Methoden vom Pflanzenmaterial ausgehend vier Reinstoffe aus *D. sylv.* isoliert und charakterisiert werden. Neben NMR-, MS- und GC-MS-Untersuchungen diente häufig die DC der Verlaufskontrolle von Isolierungsschritten sowie der Zusammensetzungs- und Reinheitsbetrachtung von Extrakten, Isolaten, präparativen Säulen und DC. Mittels CZE und MEKC wurden Extrakte auf ihren Iridoid- und Flavonoidgehalt untersucht. Diverse Extrakte und Reinstoffe von *D. sylv.* sowie in der Arbeitsgruppe vorhandene Substanzen aus *C. cret.* wurden im Bakterienmodell an *Bb*ss auf wachstumshemmende Eigenschaften untersucht.

8.1 Bestimmung der an Hautpulver absorbierbaren Polyphenole (Gerbstoffe)

Zwei Proben von *D. sylv.* wurden auf ihren Gerbstoffanteil untersucht (Tab. 8-1). Insgesamt wurde ein Gehalt an Gerbstoffen von 0,364 % berechnet als Pyrogallol bestimmt.

Tab. 8-1: Messwerte und berechneter Gehalt an Gerbstoffen

Probe	A_1	A_2	A_3	m_1[g]	m_2 [g]	x [%]	$\bar{x}$ [%]
a	0,034	0,022	0,157	0,7527	0,0498	0,316	0,364
b	0,038	0,022	0,157	0,7696	0,0498	0,412	

8.2 Bestimmung des Gesamtgehalts an H_2O und flüchtigen Bestandteilen der Frischpflanze von *D. sylv.*

Nach vollständiger Gefriertrocknung (siehe Methoden 7.2.1) wurden 443,7 g Trockendroge, d. h. $15{,}6 \pm 0{,}77$ % der Ausgangsmasse, erhalten (Tab. 8-2). Dies entsprach einem Trocknungsverlust von $84{,}4 \pm 0{,}77$ %, der neben kleinen Mengen flüchtiger Stoffe hauptsächlich durch den H_2O-Verlust entstand.

Tab. 8-2: Bestimmung des Trocknungsverlustes der Kardenwurzel durch Gefriertrocknung

Einwaage [g]	Endmasse nach Trocknung [g]	Differenz [g]	Trocknungs-rückstand [%]	Trocknungs-verlust [%]	Einwaage [g]	Endmasse nach Trocknung [g]	Differenz [g]	Trocknungs-rückstand [%]	Trocknungs-verlust [%]
64,29	10,9222	53,3678	16,99	83,01	391,2	65,0	326,2	16,62	83,38
83,13	11,4216	71,7084	13,74	86,26	176,7	28,2	148,5	15,96	84,04
63,97	9,6250	54,3450	15,05	84,95	174,5	26,8	147,7	15,36	84,64
74,61	11,9482	62,6618	16,01	83,99	205,4	31,6	173,8	15,38	84,62
62,31	9,6526	52,6574	15,49	84,51	216,1	34,1	182,0	15,78	84,22
40,96	5,9176	35,0424	14,45	85,55	111,0	18,0	93,0	16,22	83,78
65,23	10,4326	54,7974	15,99	84,01	118,4	19,1	99,3	16,13	83,87
64,93	10,9388	53,9912	16,85	83,15	128,1	20,0	108,1	15,61	84,39
203,2	30,0	173,2	14,76	85,24	130,2	20,3	109,9	15,59	84,41
158,1	24,3	133,8	15,37	84,63	148,5	22,7	125,8	15,29	84,71
145,5	22,7	122,8	15,60	84,40					

8.3 Ergebnisse der DC-Voruntersuchungen

Bei den Voruntersuchungen zum Screening von *D. sylv.* nach Inhaltsstoffgruppen-Übereinstimmungen mit im Labor verfügbaren Referenzsubstanzen wurden verschiedenste Fließmittel und Detektionsreagenzien eingesetzt 7.3.1.3. Nachfolgende Substanzen bzw. Inhaltsstoffgruppen konnten identifiziert werden (Tab. 8-3).

Tab. 8-3: Zusammenfassung DC-Inhaltstoffscreening von *D. sylv.*

Stoffgruppe	Referenz	Nachweis
Flavonoide	Rutin	-
	Hyperosid	-
	Apigenin-7-O-glucosid	-
	Luteolin-7-O-glucosid	-
	Vitexin	-
	(ohne)	+ [1]
phenolische Säuren	Kaffeesäure	+
	Chlorogensäure	+
	Rosmarinsäure	-

[1] – weiteres Flavonoid gefunden, mutmaßlich Saponarin (Isovitexin-7-O-glucisid) [63]

Stoffgruppe	Referenz	Nachweis
Phenylethanoide	Echinacosid	-
	Verbascosid	-
Cumarine / Furanochromone	„Ang_Ex_DC“	-
	Cumarin	-
	Scopoletin	-
	Esculin	-
	8-Methoxypsoralen	-
	Esculetin	-
	Khellin	-
Iridoide	„Menyan_Ex_DC“	/ [2]
	Loganin	+
	(ohne)	+ [3]
Zucker	Arabinose	-
	Fructose	+
	Galactose	-
	Glucose	+
	Lactose	-
	Maltose	-
	Mannose	-
	Ribose	-
	Saccharose	+
	Xylose	-
Diterpene	„Marr_acEx_DC“	- [4]
Triterpene / Steroide	β-Sitosterol	+
	Oleanolsäure (Ursolsäure?)	+ [5]

[2] – als Referenzextrakt für Iridoide verwendet

[3] – diverse weitere Banden (violett nach VanS-Detektion), die mutmaßlich iridoide und bis-iridoide Verbindungen darstellen [59]

[4] – keine übereinstimmenden Banden gefunden, violette Banden nach VanS-Detektion mit ähnlichem R_f-Wert zeigen aber die Möglichkeit, dass Diterpene vorhanden sein könnten

[5] – Bande auf Höhe der Referenz Oleanolsäure gefunden, R_f-Wert von Ursolsäure aber gleich nach Literaturangaben [237], daher DC-Unterscheidung nicht möglich

Bei den DC-Vorbetrachtungen mit *C. cret.* und Ladanum wurde der Schwerpunkt auf die später zu untersuchenden Labdanditerpene und auf Carvacrol gesetzt. Im Ladanumextrakt „Lad_$CHCl_3$_DC“ ließen sich die drei untersuchten Manoyloxide deutlich nachweisen. Eine Carvacrol-Bande war hingegen nicht vorhanden. Im methanolischen Cistusextrakt

„CI_MeOH_DC“ ließ sich Carvacrol nachweisen, die Labdanditerpene praktisch nicht (Abb. 8-1).

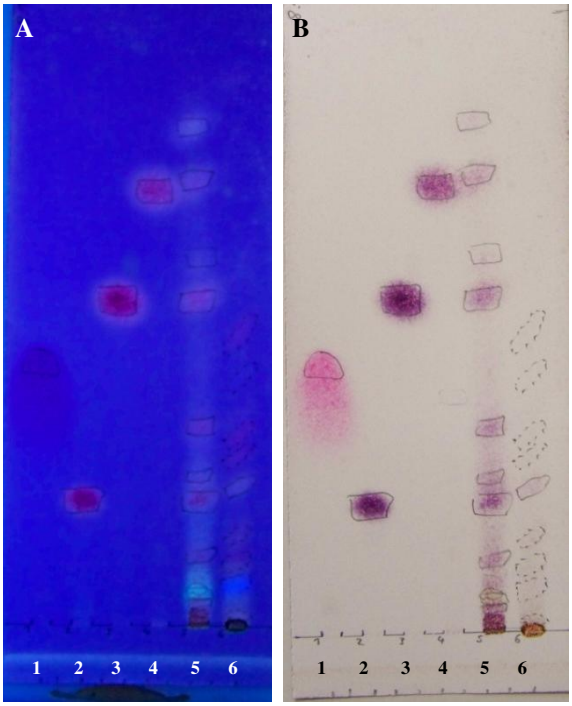


Abb. 8-1: DC-Übersicht von *C. cret.*: 1 – Carvacrol, 2 – *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid, 3 – *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-Manoyloxid, 4 – *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, 5 – „Lad_CHCl$_3$_DC“, 6 – „CI_MeOH_DC“, Abbildung A – Detektion: UV$_{365nm}$ / VanS, Abbildung B – Detektion : Vis / VanS

8.4 Ergebnisse der analytischen Fingerprint DC von *D. sylv.*

Mithilfe der Stufen-DC ließ sich ein Gesamtüberblick über das polare und apolare Inhaltsstoffspektrum von *D. sylv.* erhalten. Die gewählten Referenzen als Markersubstanzen ließen eine Zuordnung der Inhaltsstoffe β-Sitosterol, Oleanol- bzw. Ursolsäure (im DC nicht unterscheidbar [237]), KS, CS und Loganin zu. Auch der Bereich der Saccharide wurde durch die Referenzen Saccharose und Fructose eingegrenzt. Eine Beschränkung z. B. auf β-Sitosterol, CS und Fructose zum Zuordnen der R_f-Werte in der Routineanalytik ist denkbar.

Im Vergleich von methanolischen und hydroethanolischen Extrakten der jeweils gleichen Ausgangsdroge zeigte sich, dass die methanolischen Extrakte die günstigere Variante darstellten, da sie einfacher herzustellen sind und darüber hinaus auch höhere Konzen-

trationen an apolaren Substanzen enthalten, die Identifizierungsmarker darstellen können. Schon bei Direktauswertung im UV_{254nm} / UV_{365nm} ließen sich einjährige und zweijährige *D. sylv.*-Drogen so untereinander sowie von der TCM-Droge *D. asp.* unterscheiden. Für eine einfachere und spezifischere Auswertung wurde zusätzlich mit VanS besprüht (Abb. 8-2). Viele gut aufgetrennte Banden konnten keinen Inhaltsstoffen zugeordnet werden, lieferten aber jeweils spezifische Fingerprint-Muster (UV_{365nm}: Tab. 8-4, VIS: Tab. 8-5).

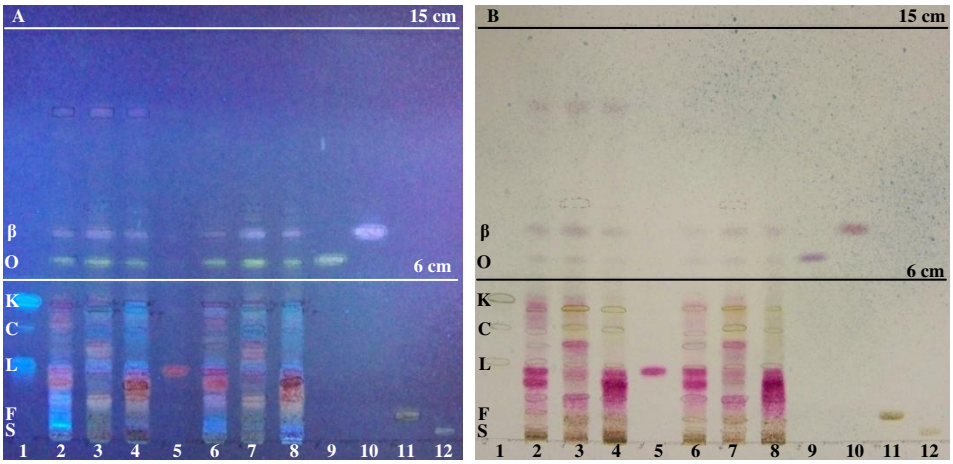


Abb. 8-2: Analytische Stufen-DC zur Identifizierung von *Dipsacus*: 1 – KS und CS, 2 – „DS_fW_MeOH_DC“, 3 – „DS_WD_MeOH_DC“, 4 – „DA_MeOH_DC“, 5 – Loganin, 6 – „DS_fW_EtOH_DC“, 7 – „DS_WD_EtOH_DC, 8 – „DA_EtOH_DC“, 9 – Oleanolsäure, 10 – β-Sitosterol, 11 – Fructose, 12 – Saccharose ; Bandenzuordnung : β – β-Sitosterol, O – Oleanolsäure, K – KS, C – CS, L – Loganin, F – Fructose, S – Saccharose ; zweistufige Entwicklung mit FM6 (6 cm) + FM2b (15 cm), Abbildung A – Detektion: UV_{365nm} / VanS, Abbildung B – Detektion : Vis / VanS

Tab. 8-4: Zonenfolge dreier *Dipsacus*-Proben („DS_fW_MeOH_DC“, „DS_WD_MeOH_DC“, „DA_MeOH_DC“) im UV_{365nm} nach Stufenentwicklung in FM6 über 6 cm und FM2b über 15 cm, Detektion mit VanS (* - vor dem Besprühen mit VanS bei UV_{365nm} markiert; charakteristische Zonen fett hervorgehoben); weitere Zonen können vorhanden sein, die gepunktete Linie markiert die 6 cm der ersten Entwicklung

Referenz	*D. sylv.* (einjährig.)	*D. sylv.* (zweijährig.)	*D. asp.*
	violette Zone	violette Zone **gelb vor Besprühen***	violette Zone
violette Zone (Oleanolsäure) gelbe Zone (β-Sitosterol)	violette Zone gelbe Zone	violette Zone gelbe Zone	violette Zone gelbe Zone

Referenz	*D. sylv.* (einjährig.)	*D. sylv.* (zweijährig.)	*D. asp.*
hellblaue Zone (KS)	violette Zone	violette Zone	**hellblaue Zone**
	-	-	**hellblaue Zone**
hellblaue Zone (CS)	hellblaue Zone	hellblaue Zone	hellblaue Zone
rotviolette Zone (Loganin)	rotviolette Zone	rotviolette Zone	rotviolette Zone
	rötliche Zone	-	rötliche Zone
	bläuliche Zone	rotbräunliche Zone	rotbräunliche Zone
braune Zone (Fructose)	**hellblaue Zone**	-	-
graue Zone (Saccharose)	-	**bräunliche Zone**	**dunkelbraune Zone**

Tab. 8-5: Zonenfolge dreier *Dipsacus*-Proben („DS_fW_MeOH_DC“, „DS_WD_MeOH_DC“, „DA_MeOH_DC“) im Vis nach Stufenentwicklung in FM6 über 6 cm und FM2b über 15 cm, Detektion mit VanS (charakteristische Zonen fett hervorgehoben); weitere Zonen können vorhanden sein, die gepunktete Linie markiert die 6 cm der ersten Entwicklung

Referenz	*D. sylv.* (einjährig.)	*D. sylv.* (zweijährig.)	*D. asp.*
	violette Zone	violette Zone	violette Zone
violette Zone (Oleanolsäure)	violette Zone	violette Zone	violette Zone
violette Zone (β-Sitosterol)	violette Zone	violette Zone	violette Zone
gelbe Zone (KS)	violette Zone	violette Zone	-
	-	**orange Zone**	**gelbe Zone**
		violette Zone	
gelbliche Zone (CS)	gelbliche Zone	gelbliche Zone	gelbliche Zone
violette Zone (Loganin)	violette Zone	violette Zone	violette Zone
	violette Zone	-	violette Zone
	violette Zone	violette Zone	violette Zone
braune Zone (Fructose)	braune Zone	braune Zone	braune Zone
braune Zone (Saccharose)	braune Zone	braune Zone	braune Zone

8.5 Ergebnisse der Isolierungen und begleitenden DC

Zur Überprüfung der Reinheit isolierter Fraktionen und Substanzen, zur Übersichtsanalytik in Extrakten und Fraktionen enthaltener Stoffe sowie zur Auswahl zu vereinigender und weiter zu verarbeitender Isolate wurden zahlreiche DC angefertigt. Einige typische und besonders interessante seien nachfolgend im Zusammenhang mit den Reinstoffisolierungen aufgeführt. Gekoppelt sind diese Darstellungen mit den Ergebnissen der Fraktionierung und Isolierung mithilfe der Säulen- und präparativen Dünnschichtchromatographie.

8.5.1 Extraktherstellung und Grobfraktionierung

Aus dem aus 1633,4 g frischer, zerkleinerter Kardenwurzel hergestellten hydroethanolischen Extrakt wurden 120,11 g Trockenextrakt „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“ erhalten. Das Droge-Extrakt-Verhältnis betrug 2,12 : 1; der H_2O-Gehalt der frischen Wurzel 15,6 %. Der Direktextrakt zeigte in ersten Übersichts-DC mit verschiedenen Detektionsreagenzien und FM-Systemen (siehe 7.3.1.2 und 7.3.1.1) ein breites Spektrum an Inhaltstoffen von polaren Zuckern bis zu apolaren Terpenen und Chlorophyllresten (mutmaßlich wurden Sprossreste an den Kardenwurzeln mit als Wurzel gehandelt), sodass sich eine weitere Auftrennung nach Polarität der Inhaltsstoffe anbot. Zu diesem Zweck wurde der in H_2O gelöste Extrakt mit diversen Lösungsmitteln steigender Polarität ausgeschüttelt (Hex, DCM, EE, n-But; siehe 7.2.1.1).

Insgesamt wurden aus 100,0 g hydroethanolischem Trockenextrakt erhalten:

0,9220 g Hex-Extrakt (= 0,9 %),	„DS_fW_Frak-Hex“
1,0956 g DCM-Extrakt (= 1,1 %),	„DS_fW_Frak-DCM“
0,3040 g EE-Extrakt (= 0,3 %),	„DS_fW_Frak-EE“
4,9547 g n-But-Extrakt (= 5,0 %)	„DS_fW_Frak-n-But“
und 90,6023 g H_2O-Extrakt (= 90,6 %).	„DS_fW_Frak-H_2O“

Die Fraktionen wurden mittels DC in verschiedenen Fließmittelsystemen untersucht (Abb. 8-3). Die drei apolaren Ausschüttelungsfraktionen (Bahnen 7, 10, 14) zeigten verschiedene Inhaltsstoffspektren: In „DS_fW_Frak-Hex“ und „DS_fW_Frak-DCM“ waren apolare Substanzen wie Fettsäuren, (tri-)terpenoide Verbindungen (z. B. Oleanolsäure, β-Sitosterol) und Chlorophylle angereichert; die DC-Bahnen beider Fraktionen ähnelten sich. Dagegen fanden sich in „DS_fW_Frak-EE“ weniger apolare, sondern überwiegend Substanzen mittlerer Polarität. Neben Loganin waren weitere Banden im R_f-Bereich bis KS angereichert. In „DS_fW_Frak-n-But“ und „DS_fW_Frak-H_2O“ fanden sich phenolische Substanzen, Zucker und Iridoide wie Loganin sowie mutmaßliche bis-Iridoide.

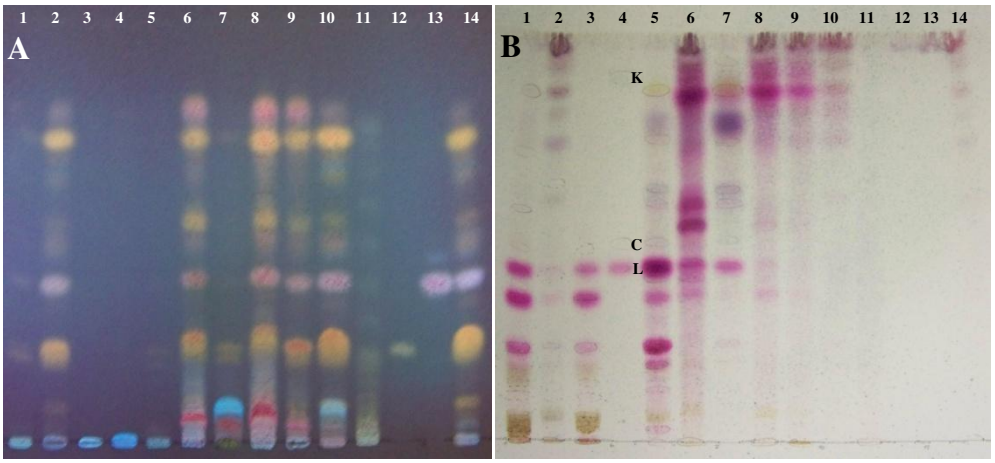


Abb. 8-3: DC-Übersicht der EtOH-H_2O-Ausschüttelungsfraktionen von „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“: 1 – wasserlöslicher Anteil von „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“, 2 – wasserunlöslicher Anteil von „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“, 3 – „DS_fW_Frak-H_2O“, 4 – Referenzen KS (K), CS (C), Loganin (L), 5 – „DS_fW_Frak-n-But“, 6 – EE-Direktextrakt aus *D. sylv.*, 7 – „DS_fW_Frak-EE“„ 8 – DCM-Direktextrakt aus *D. sylv.*, 9 – H_2O- und MeOH-unlöslicher Zentrifugationsrückstand bei der Herstellung von 8 , 10 – „DS_fW_Frak-DCM“ , 11 – 5 %ige wässrige PS80 Stammlösung, 12 - Oleanolsäure, 13 - β-Sitosterol, 14 - „DS_fW_Frak-Hex“, Abbildung A – FM2b, Detektion: UV_{365nm} / VanS, Abbildung B –FM6, Detektion: Vis nach VanS

Zusätzlich zu diesem hydroethanolischen Frischpflanzenextrakt und seinen Ausschüttelungen wurde für weitere Arbeitsschritte und zum Vergleich der Extraktionsprozesse ein methanolischer Extrakt aus geschnittener Wurzeldroge angefertigt. Insgesamt wurden aus den 2752,2 g trockener Kardenwurzel 732,9 g Trockenextrakt „DS_WD_MeOH-TE“ erhalten. Das Droge-Extrakt-Verhältnis betrug 3,755 : 1. Wiederum wurde mit Lösungsmitteln steigender Polarität ausgeschüttelt, um eine ähnliche Grobfraktionierung des Inhaltsstoffspektrums wie beim hydroethanolischen Extrakt zu erhalten. Analog dem hydroethanolischen Extrakt wurde mit n-Hex, DCM, EE und n-But ausgeschüttelt. Trotz mittels DC festgestellter geringer Unterschiede in n-But und Rest-H_2O-Phase beim MeOH-Extrakt wurde für die Vergleichbarkeit im Bakterienmodell dort auch die n-But-Ausschüttelung untersucht (Kap. 8.9.2).

Insgesamt wurden aus den 732,9 g methanolischen Trockenextrakts erhalten:

32,209 g	Hex-Extrakt (= 4,5 %),	„DS_WD_Frak-Hex“
5,489 g	DCM-Extrakt (= 0,8 %),	„DS_WD_Frak-DCM“
5,637 g	EE-Extrakt (= 0,8 %),	„DS_WD_Frak-EE“
98,640 g	n-But-Extrakt (= 0,8 %),	„DS_WD_Frak-n-But“
~568,4 g	H_2O-Extrakt (= 93,9 %).	„DS_WD_Frak-H_2O“

Aus diesen Ausschüttelungsphasen und Extrakten wurden die weiteren Isolierungsschritte für *D. sylv.* vorgenommen, darunter die Weiterfraktionierung von 571,0 mg „DS_WD_Frak-Hex“ zur Gewinnung von Probematerial für die mikrobiologische Testung. Die vereinigten sieben Sammelfraktionen unterschieden sich in der Polarität der enthaltenen Inhaltsstoffe deutlich (Abb. 8-4, Tab. 8-6).

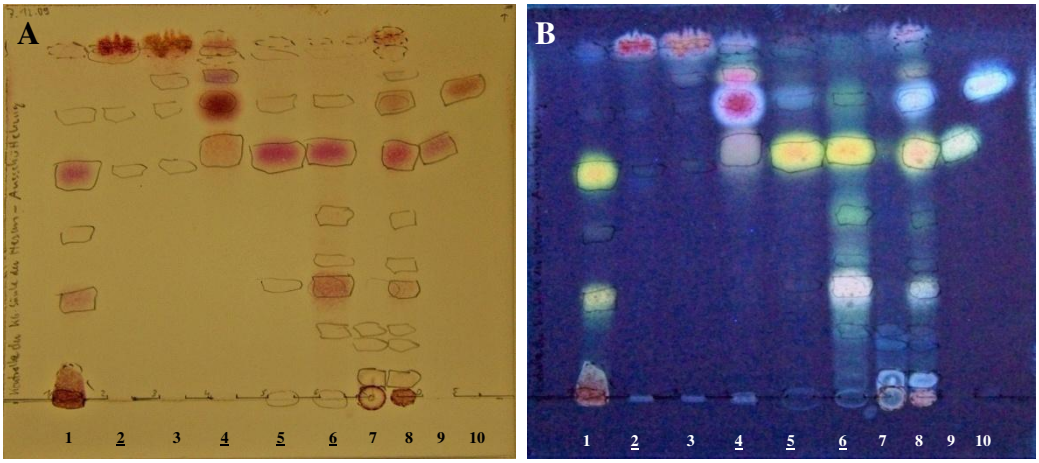


Abb. 8-4: DC-Übersicht der KG-Säulen-Fraktionen von „DS_WD_Fr-Hex“ mit FM7: 1 bis 7 – Sammelfraktionen 1 – 7, 8 – DS_WD_Fr-Hex, 9 – Oleanolsäure, 10 – β-Sitosterol; Abbildung A – Vis nach VanS, B – UV_{365nm} / VanS

Tab. 8-6: Fraktionsmassen der Sammelfraktionen der präparativen KG-Säule von „DS_WD_Frak-Hex“

Sammelfraktion	Vereinigte Säulenfraktionen	Masse
1	1-6	63,5 mg
2	**7-34**	**49,0 mg**
3	35-42	27,3 mg
4	**43-59**	**63,6 mg**
5	**60-91**	**69,9 mg**
6	**92-106**	**64,2 mg**
7	107-NL2	169,7 mg

Im Borrelienmodell wurden die Sammelfraktionen 2, 4, 5 und 6 untersucht (siehe 7.3.2.1.7). Die untersuchte Fraktion 2 enthielt vor allem sehr apolare Substanzen unbekannter Art. Fraktion 4 enthielt Phytosterole wie β-Sitosterol neben apolareren und polareren triterpenoiden Substanzen. In Fraktion 5 fanden sich hauptsächlich triterpenoide Substanzen wie

Oleanol- oder Ursolsäure. Fraktion 6 enthielt neben den triterpenoiden auch polarere Substanzen.

Zur Identitätsbestimmung von *Dipsacus*-Drogen mittels DC und CE sowie zur Quantifizierung ausgewählter Inhaltsstoffe mittels MEKC wurden zusätzliche MeOH-Extrakte angefertigt. Aus *D. sylv.*- und *D. asp.* Wurzeln (siehe 7.2.5) wurden folgende methanolische Trockenextrakte erhalten und ausgewogen (Tab. 8-7).

Tab. 8-7: Trockenmasse und Droge-Extrakt-Verhältnisse der Extrakte für die CE

Extrakt	Trockenmasse	DEV
„DS_fW_MeOH-TE_CE“	1,2012 g	4,15 : 1
„DS_WD_MeOH-TE_CE“	0,7255 g	6,89 : 1
„DA_MeOH-TE_CE“	2,3722 g	2,11 : 1

Zusätzlich wurde für die Testung im Borrelienmodell ein $CHCl_3$-Extrakt aus Ladanum hergestellt. Aus 212,6 mg Ladanum wurden 125,1 mg $CHCl_3$-Extrakt „Lad-TE“ (DEV 1,70 : 1) erhalten.

8.5.2 Ergebnisse der Isolierung von Loganin und Cantleyosid

Um eine Isolierung der iridoiden Verbindungen zu vereinfachen, wurden phenolische Substanzen erfolgreich mittels Al_2O_3-Säule aus „Ds_fW_Frak-H_2O“ abgereichert (siehe 7.3.2.1.3). Die drei mit H_2O eluierten Fraktionen enthielten einen deutlich geringeren Anteil an im UV-Licht bei 254 nm absorbierenden und bei 365 nm fluoreszierenden Phenolen im R_f-Bereich der Chlorogensäureband e (Abb. 8-5). Diese ließen sich mit der vierten Fraktion (3,8 %ige Ac. form.) teilweise wieder vom Al_2O_3 entfernen. Von den vier aufgefangenen Fraktionen wurde die erste (“Al_Fr1“, 380,2 mg) weiter aufgereinigt, da sie bei DC-Kontrolle (FM6, VanS-Detektion) eine relativ separierte Iridoidbande aufwies.

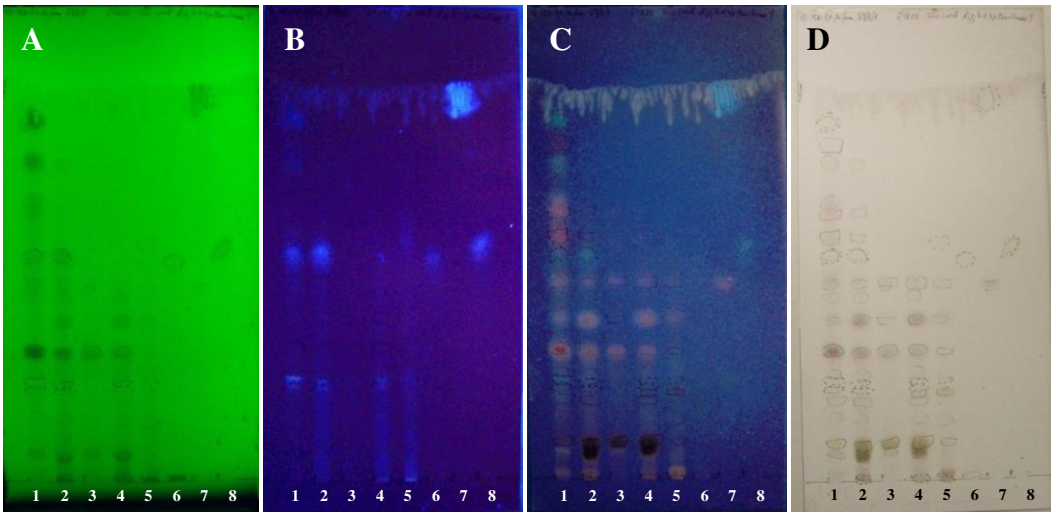


Abb. 8-5: DC-Übersicht der Al_2O_3-Säulen-Fraktionen von „Ds_fW_Frak-H_2O“ mit FM6: Bahnen 1 – n-But-Phase „DS_fW_Frak-n-But“, 2 – H_2O-Phase „DS_fW_Frak-H_2O“, 3 – „Al_Fr1“, 4 – „Al_Fr2“, 5 – „Al_Fr3“, 6 – „Al_Fr4“, 7 – Loganin, 8 – KS/CS; Abbildung A – UV_{254nm}, B – UV_{365nm}, C – UV_{365nm} / VanS, D – Vis nach VanS

Aus der gewonnenen Fraktion „Al_Fr1“ (380,3 mg) wurde im nächsten Schritt eine NP-KG-Säule durchgeführt (7.3.2.1.4), um die iridoiden Banden weiter anzureichern. Die gewonnenen 110 Fraktionen wurden unter DC-Kontrolle (FM6, Abb. 8-5) weiterbearbeitet: Die Fraktionen 1 bis 32 wurden verworfen, da sie keine per DC detektierbaren Substanzen enthielten. Die restlichen Fraktionen und der Nachlauf wurden zu sechs Sammelfraktionen vereinigt (Abb. 8-6), einrotiert und gewogen (Tab. 8-8).

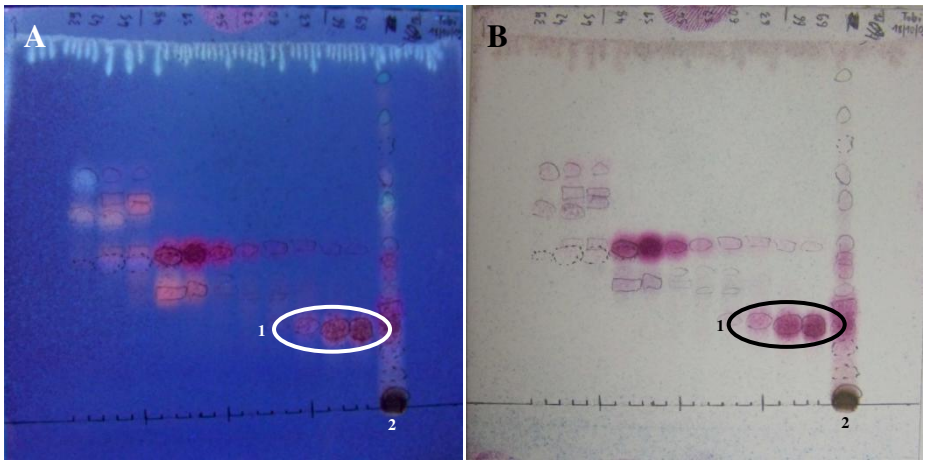


Abb. 8-6: DC-Übersicht der KG-Säulen-Fraktionen von „Al_Fr1“ mit FM6: 1 – als „KG1_FrB“ vereinigte Säulenfraktionen 63 - 71, 2 – H_2O-Phase „DS_fW_Frak-H_2O“; Abbildung A – UV_{365nm} / VanS, B – Vis nach VanS

Tab. 8-8: Fraktionsmassen der präparativen KG-Säule von „Al_Fr1“ (Sammelfraktionen)

Vereinigte Säulenfraktionen	Sammelfraktion	Masse
33-37	A	1,8 mg
38-47	C	9,7 mg
48-62	D	22,6 mg
63-71	**B** („KG1_FrB“)	**35,2 mg**
72-88	E	30,3 mg
89-110, Nachlauf	F	211,5 mg

Insgesamt wurden 311,1 mg Probe in den Fraktionen aufgefangen, d.h. 81,8 % der aufgetragenen Probe wurden wiedergefunden. Die Sammelfraktion „KG1_FrB“ wurde aufgrund der nach Besprühen hervorstechenden, stark violett gefärbten Bande weiter bearbeitet (siehe Kapitel 7.3.1.4.3). Neben der iridoiden Hauptbande bei $R_f = 0,23$ in „KG1_FrB“ war im DC noch mindestens eine weitere Bande bei $R_f = 0,39$ sichtbar, die eine ebenfalls violette Färbung nach Besprühen mit VanS und anschließendem Erwärmen aufwies.

Mittels präparativer KG-DC mit FM4 wurden aus „KG1_FrB“ nach Elution und Trocknung unter Vakuum 34,8 mg Hauptbande gewonnen. Ein Teil des KG-Trägers ließ sich durch Filtration nicht abtrennen. Nach Lösen in D_2O und Abzentrifugieren der verbleibenden Schwebeteilchen (10 min, 2000 min^{-1}) wurde mittels ^{1}H-NMR die Reinheit geprüft. Mindestens eine Nebenverbindung war in der Probe noch vorhanden. Die Probe wurde lyophilisiert und als „DC-B_Fr2“ weiter aufgereinigt (Kapitel 7.3.2.1.5).

Mittels RP-Miniatur-SC mit H_2O-MeOH-Gradient wurden die nach NMR verbliebenen 27,4 mg Probe „DC-B_Fr2“ in 29 Fraktionen separiert. Daraus wurden unter DC-Kontrolle (FM2, Abb. 8-7) sieben Sammelfraktionen vereinigt (Tab. 8-9).

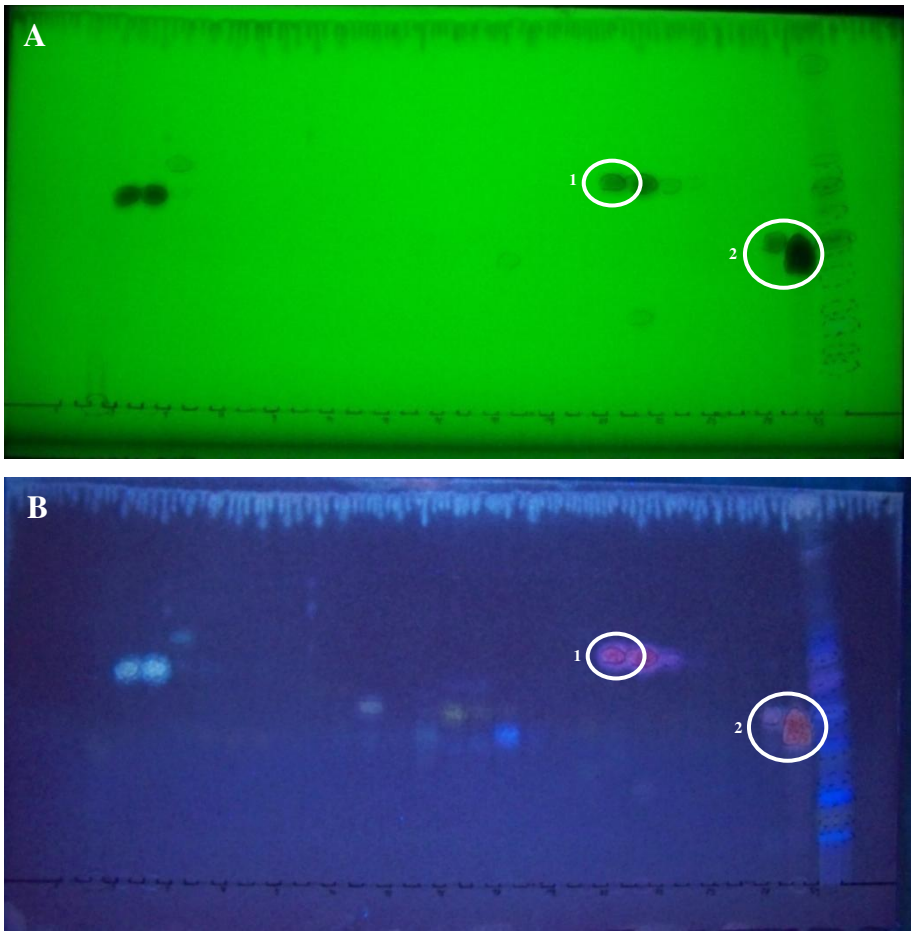


Abb. 8-7: DC-Übersicht der RP-Pipettensäulen-Fraktionen von „DC-B_Fr2“ mit FM6: 1 – Sammelfraktion 4, 2 – Sammelfraktion 6 ; Abbildung A – UV_{254nm}, B – UV_{365nm} / VanS

Tab. 8-9: erhaltene Fraktionsmassen der präparativen RP-Säule von „DC-B_Fr2“ (Sammelfraktionen)

Sammelfraktion	Vereinigte Säulenfraktionen	Masse
1	3, 4	2,7 mg
2	1, 2, 5-11, 13-20, 25-26	3,6 mg
3	12	0,2 mg
4	**21**	**1,5 mg**
5	22-24	2,1 mg
6	**27, 28**	**30,1 mg**
7	Nachlauf MeOH	verworfen

Die Gesamtmasse der Sammelfraktionen war etwas größer als die Probenmasse, ein Indiz für die noch unvollständige Trocknung vor dem Wägevorgang. Nach vollständiger Trocknung wurden die Sammelfraktionen Nummer 4 mit 1,5 mg und Nummer 6 mit 30,1 mg mittels

NMR als Reinstoffe identifiziert (siehe Kapitel 8.6.1.1 für Sammelfraktion 4 (Loganin) und Kapitel 8.6.1.2 für Sammelfraktion 6 (Cantleyosid)).

8.5.3 Ergebnisse der Isolierung von Prinsepiol

Aus „DS_WD_Frak-DCM“ wurden mittels NP-SC (Hex : EE : EtOH-Stufengradient) in zwei Durchläufen 30 bzw. 27 Fraktionen erhalten (Kapitel 7.3.2.1.1). Nach Vereinigung unter DC-Kontrolle (FM2b) wurden sieben Sammelfraktionen erhalten (Tab. 8-10, Abb. 8-8).

Tab. 8-10: erhaltene Fraktionsmassen der präparativen KG-Säule der DCM-Ausschüttelung „DS_WD_Frak-DCM“ (Sammelfraktionen)

Sammelfraktion	Vereinigte Säulenfraktionen von Säule I und II	Masse
1	I (1 - 14) & II (1, 2, 4, 5)	88,8 mg
2	II (3)	25,0 mg
3	**I (15 - 25) & II (6, 7, 14 - 18, 20 – 22)**	**550,3 mg**
4	II (8, 9)	23,7 mg
5	II (10 – 13)	71,7 mg
6	II (19)	34,6 mg
7	I (26 – Nachlauf Aceton) & II (23 – Nachlauf Aceton)	138,0 mg

Sammelfraktion 3 („KG-DCM_Fr3“) wurde als Hauptisolat der Trennsäule erhalten. In ihr befanden sich bei DC-Kontrolle noch viele Substanzen verschiedenster Farbgebung nach VanS-Detektion. Stark apolare und sehr polare Verbindungen konnten auf dieser Säule erfolgreich abgetrennt werden. Lediglich 9,5 % der aufgegebenen Probe gingen auf der Säule verloren, so dass Fraktionen mit einer Gesamtmasse von 932,1 mg erhalten wurden.

Zur weiteren Auftrennung der Fraktion „KG-DCM_Fr3“ wurde eine präparative KG-Säule genutzt (7.3.2.1.2). Mittels DCM-EE-Stufengradient wurden 80 Fraktionen erhalten**.** Daraus wurden unter DC-Kontrolle (FM2b) zehn Sammelfraktionen erhalten **(**Abb. 8-9**,** Tab. 8-19). Die vierte (11,7 mg) und fünfte Sammelfraktion (13,0 mg) wurden als „KG3_Fr4“ und „KG3_Fr5“ weiter aufgereinigt.

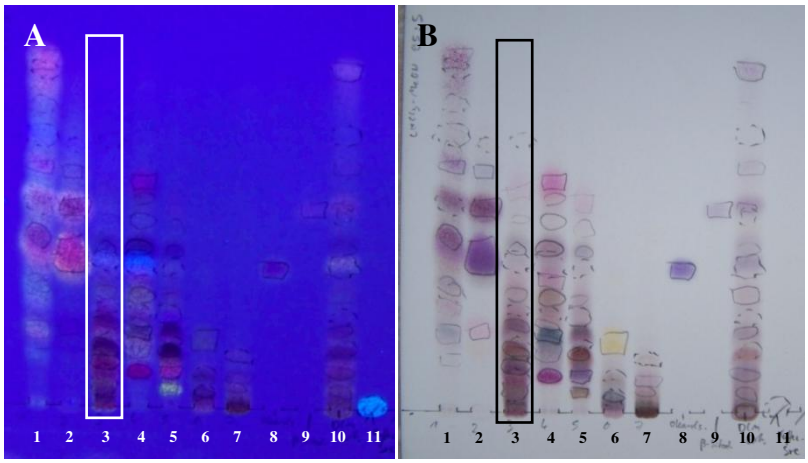


Abb. 8-8: DC-Übersicht der Sammelfraktionen 1 - 7 der KG-Säule von „DS_WD_Frak-DCM“ mit FM2b: 1 bis 7 – Sammelfraktionen 1 – 7 (davon 3 = „KG-DCM_Fr3“), 8 – Oleanolsäure, 9 – β-Sitosterol, 10 - „DS_WD_Frak-DCM“, 11 - KS; Abbildung A – UV_{365nm} / VanS, B – Vis nach VanS

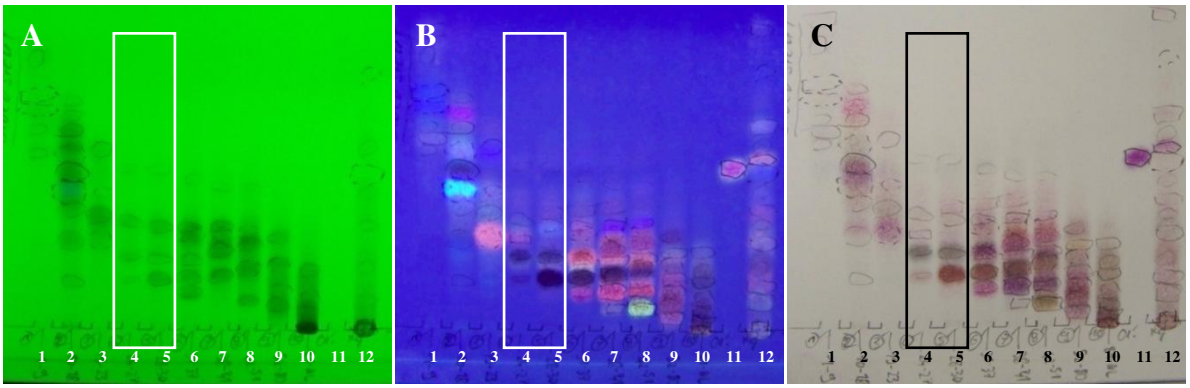


Abb. 8-9: DC-Übersicht der Sammelfraktionen 1 – 10 der KG-Säule von „KG-DCM_Fr3“ mit FM2b: 1 bis 10 – Sammelfraktionen 1 – 10 (davon 4 = „KG3_Fr4“ und 5 = „KG3_Fr5“), 11 – Oleanolsäure, 12 - „DS_WD_Frak-DCM“; Abbildung A – UV_{254nm}, B – UV_{365nm} / VanS, C – Vis nach VanS

Tab. 8-11: Erhaltene Fraktionsmassen der präparativen KG-Säule von „„KG-DCM_Fr3“ (Sammelfraktionen)

Sammelfraktion	Vereinigte Säulenfraktionen	Masse
1	1-9	3,8 mg
2	10-18	9,8 mg
3	19-23	7,4 mg
4	**24-27**	**11,7 mg**
5	**28-30**	**13,0 mg**
6	31-37	25,3 mg

Sammelfraktion	Vereinigte Säulenfraktionen	Masse
7	38-41	24,1 mg
8	42-51	55,7 mg
9	52-80	100,7 mg
10	81, 82, EtOH-Nachlauf	403,6 mg

Zur weiteren Aufreinigung der gewonnenen Fraktionen „KG3_Fr4“ und „KG3_Fr5“ wurde nach erfolgreichen DC-Vortests mit beiden Fraktionen jeweils eine präparative DC durchgeführt (FM2a, Kapitel 7.3.1.4.1). Es wurde jeweils eine Kontroll-DC mit FM2b und VanS-Detektion gegen die Referenzen Oleanolsäure und „DS_WD_Frak-DCM“ angefertigt.

Bei der Aufreinigung von „KG3_Fr5“ waren die Hauptbanden nach isolierter Masse die zweite (6,1 mg), dritte (3,4 mg) und vierte (1,1 mg) von unten (DC-Kontrolle: Abb. 8-10). Weitere drei Banden wurden mit jeweils weniger als 1,0 mg erhalten. Mittels NMR wurden die 6,1 mg der zweiten Bande weiter analysiert und als Reinstoff charakterisiert (siehe Kapitel 5.3.1.3, Prinsepiol).

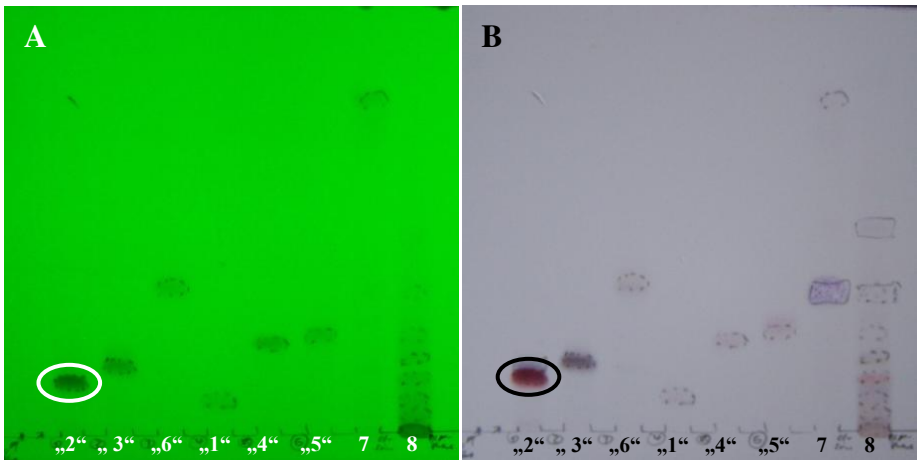


Abb. 8-10: DC-Übersicht der Banden 1 – 6 der präparativen DC von „KG3_Fr5“ mit FM2b: „1“ bis „6“ – 1. bis 6. präp. DC-Bande (hervorgehoben: 2. = Prinsepiol), 7 – Oleanolsäure, 8 - „DS_WD_Frak-DCM“; Abbildung A – UV_{254nm}, B – Vis nach VanS

Bei der Aufreinigung von „KG3_Fr4“ konnten ebenfalls sechs Banden isoliert werden, von denen sich vier als massenmäßige Hauptbanden herausstellten: die zweite Bande mit 4,6 mg, die dritte mit 2,2 mg, die vierte mit 1,5 mg und die erste mit 1,3 mg (DC-Kontrolle: Abb. 8-11). Die verbliebenen beiden Banden enthielten jeweils weniger als 1,0 mg. Die zweite Bande war mit der zweiten Bande aus Fraktion 5 identisch (^{1}H-NMR bei 400 MHz und DC-

Kontrolle in FM2b bei VanS-Detektion der Proben sowohl jeweils einzeln als auch additiv aufgetragen: beide Isolate bildeten nur eine Bande).

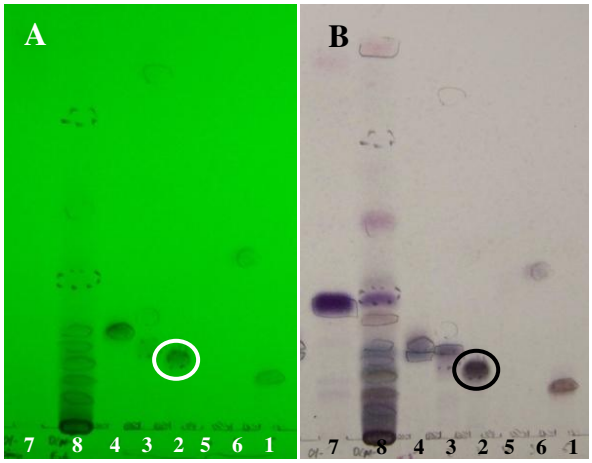


Abb. 8-11: DC-Übersicht der Banden 1 – 6 der präparativen DC von „KG3_Fr4“ mit FM2b: 1 bis 6 – 1. bis 6. präp. DC-Bande (hervorgehoben: 2. = Prinsepiol), 7 – Oleanolsäure, 8 - „DS_WD_Frak-DCM“; Abbildung A – UV_{254nm}, B – Vis nach VanS

8.5.4 Ergebnisse der Isolierung von Ursolsäure

Aus dem grobfraktionierten MeOH-Trockenextrakt der Kardenwurzeldroge wurden mittels präparativer NP-MPLC (Kapitel 7.3.2.2) aus etwa 10 g „DS_WD_Frak-Hex“ unter Nutzung eines Hex-EE-DCM-MeOH-Stufengradienten 56 Fraktionen zu je 250 ml erhalten. Nach dem Trocknen konnten 8,170 g Gesamtmasse erhalten werden, d.h. nur knapp 20 % der aufgetragenen Probe verblieben auf der Säule (Tab. 8-12). Eine DC-Übersicht der gesammelten Fraktionen findet sich in Abb. 8-12. Die markierten Fraktionen 3, 7, 36 und 48 wurden einer Übersichts-GC-MS zugeführt (Kapitel 8.7).

Tab. 8-12: erhaltene Fraktionsmassen der MPLC von „DS_WD_Frak-Hex“

Fraktion	Masse	Fraktion	Masse	Fraktion	Masse	Fraktion	Masse
1	0,1 mg	6	189,1 mg	11	42,4 mg	16	8,7 mg
2	56,5 mg	7	344,9 mg	12	38,7 mg	17	8,6 mg
3	288,2 mg	8	217,9 mg	13	26,3 mg	18	10,8 mg
4	230,7 mg	9	232,0 mg	14	24,7 mg	19	6,9 mg
5	144,1 mg	10	90,4 mg	15	11,8 mg	20	7,1 mg

Fraktion	Masse	Fraktion	Masse	Fraktion	Masse	Fraktion	Masse
21	6,1 mg	30	7,1 mg	39	14,4 mg	48	261,3 mg
22	5,5 mg	31	9,1 mg	40	11,4 mg	49	196,4 mg
23	5,2 mg	32	10,2 mg	41	8,1 mg	50	100,3 mg
24	5,9 mg	33	14,2 mg	42	15,7 mg	51	520,8 mg
25	11,8 mg	34	12,8 mg	43	250,8 mg	52	2183,9 mg
26	8,7 mg	35	14,8 mg	44	335,6 mg	53	930,3 mg
27	8,6 mg	36	20,7 mg	45	82,7 mg	54	557,0 mg
28	10,8 mg	37	18,0 mg	46	87,8 mg	55	109,6 mg
29	5,7 mg	38	16,5 mg	47	101,6 mg	56	200,6 mg

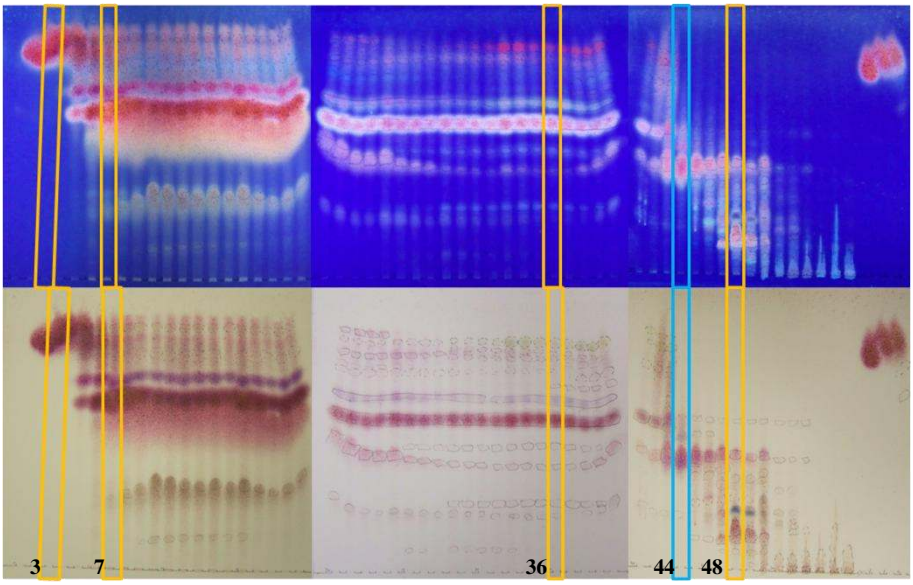


Abb. 8-12: DC-Übersicht der Fraktionen 1 bis 56 der MPLC von „DS_WD_Frak-Hex“ mit FM7 (gelb hervorgehoben: Fraktionen 3, 7, 36 und 48, die einer GC-MS-Untersuchung zugeführt wurden; hellblau hervorgehoben: Fraktion 44, die mittels NP-KG-Säule weiter-fraktioniert wurde); oben – UV_{254nm} nach VanS, unten – VIS nach VanS

In Fraktion 48 befand sich eine blaue Bande (Abb. 8-12, FM7, VanS-Detektion, Vis, bei $R_f = 0,2$), die mittels NP-KG-Säule (DCM-EE-Gradient) und anschließender RP-Säule (H_2O-MeOH-EtOH-Gradient) isoliert werden konnte. Charakteristische triterpenoide bzw. steroide Strukturelemente zeigten sich im NMR, allerdings war die Substanz zu instabil für ausreichende Untersuchungen (Zersetzung im deuterierten $CHCl_3$ während der NMR-Messungen, ESI-MS zeigte nur noch Fragmente).

Fraktion „MPLC_Fr44“ wurde mittels präparativer KG-Säule weiter aufgereinigt (Kapitel 7.3.2.1.6). Mittels DCM-EE-Gradient wurden 36 Fraktionen und drei Nachspülungen erhalten und unter DC-Kontrolle (FM2b, Abb. 8-13) zu fünf Sammelfraktionen vereinigt (Tab. 8-13).

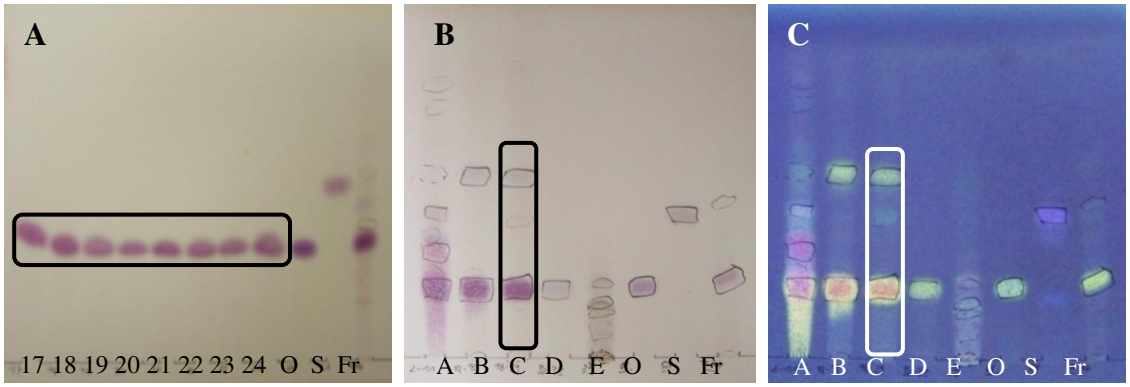


Abb. 8-13: DC-Übersicht der Fraktionen der präparativen KG-Säule von „MPLC_Fr44“ mit FM7: 17 bis 24 – Fraktionen 17 – 24 der KG-Säule, A bis E – Sammelfraktionen A – E, O – Oleanolsäure, S – β-Sitosterol, Fr –„MPLC_Fr44“; Abbildung A, B – Vis nach VanS, C – UV_{365nm} / VanS

Tab. 8-13: Erhaltene Fraktionsmassen der präparativen KG-Säule von „MPLC_Fr44“

Sammelfraktion	Vereinigte Säulenfraktionen	Masse
A	2-11	160,1 mg
B („KG44_FrB“)	12-15	23,5 mg
C („KG44_FrC“)	**16-29**	**27,7 mg**
D	30-33	2,5 mg
E	39	22,7 mg

Die dritte Sammelfraktion „KG44_FrC“ mit 27,7 mg zeigte in der Übersichts-DC und bei NMR-Kontrolle noch Verunreinigungen, so dass eine präparative DC (siehe 7.3.1.4.2) zur weiteren Aufreinigung mit FM2b angeschlossen wurde.

Mittels VanS-Detektion von je drei schmalen Streifen der beiden durchgeführten DC konnte die Position der nicht UV-aktiven Bande der zu isolierenden triterpenoiden Verbindung zwischen den beiden UV-löschenden Banden festgestellt werden. Nach Desorption und Trocknung wurden Bande 2 mit 7,0 mg und Bande 3 mit 1,5 mg erhalten. Aufgrund der geringen Masse konnte Bande 3 nicht näher charakterisiert werden. Bande 2 wurde mittels NMR weiter untersucht und als Reinstoff charakterisiert (siehe Kapitel 8.6.1.4, Ursolsäure).

Zusätzlich wurde die zweite Sammelfraktion „KG44_FrB“ mittels RP-Pipettensäule (70 x 5,5 mm, H_2O-MeOH-Gradient, 18 Fraktionen, DC-Kontrolle mit FM7) weiter aufgereinigt. Die so gewonnene Fraktion 12 (5,1 mg) wurde mittels ^{1}H-NMR untersucht. Sie zeigte charakteristische triterpenoide Banden. Es wurden Hinweise auf geminale Methylgruppen (CH_3-Gruppen) an C-20 gefunden, die für Oleanol- statt Ursolsäure sprechen würden. Die Reinheit der isolierten Substanz reichte nicht zur Strukturaufklärung. Aufgrund einer zu geringen Fraktionsmasse ließ sich das Isolat nicht weiter aufreinigen.

8.5.5 RLCC-Ergebnisse für die Iridoid-Anreicherung aus „DS_fW_Frak-n-But“

Zur Anreicherung von Iridoidglykosiden wurde „DS_fW_Frak-n-But“ mittels RLCC bearbeitet (Kapitel 7.3.4.1.1). In zwei Durchgängen konnten aus 534,2 mg und 1553,8 mg Probe je 160 bzw. 180 Fraktionen erhalten werden. Unter DC-Kontrolle (FM6) wurden diese jeweils zu Sammelfraktionen vereinigt (Tab. 8-14).

Tab. 8-14: Erhaltene Sammelfraktionen der beiden präparativen RLCC-Durchläufe von „DS_fW_Frak-n-But“

Sammel-fraktion 1. Lauf	Vereinigte Säulenfraktionen	Sammel-fraktion 2. Lauf	Vereinigte Säulenfraktionen
1	1-6		1-13 verworfen
2	7-16	1	12-44
3	17-39	2	45-66
4	40-60	3	67-79
5	61-79	4	80-95
6	80-95	5	96-128
7	96-118	6	129-153
8	119-135		154-159 verworfen
9	136-160	7	160-180 u. Nachlauf stat. Phase 0-150 ml
10	161-180	8	Nachlauf stat. Phase 151-275 ml
A	Nachlauf stat. Phase 0-50 ml	9	Nachlauf stat. Phase 276-510 ml
B	Nachlauf stat. Phase 51-100 ml	10	Nachlauf stat. Phase 511-630 ml
C	Nachlauf stat. Phase 101-150 ml		
D	Nachlauf stat. Phase 151-200 ml		
E	Nachlauf stat. Phase 201-250 ml		
F	Nachlauf stat. Phase 251-350 ml		
G	Nachlauf stat. Phase 351-450 ml		
H	Nachlauf stat. Phase 451-600 ml		

Diese Fraktionen wurden erneut mittels DC untersucht und äquivalente Fraktionen beider Läufe zusammengefasst, um jeweils mehr Probenmasse zu erhalten (Tab. 8-15).

Tab. 8-15: Mischfraktionen aus beiden präparativen RLCC-Durchläufen von „DS_fW_Frak-n-But“

Sammelfraktion	Vereinigte Sammelfraktionen von Durchlauf 1 (links) u. 2 (rechts)		Masse
	1		verworfen
I	2, 3	1	242,2 mg
II		2	80,1 mg
III	4		29,3 mg
IV	5, 6, 8		62,9 mg
V		3	109,8 mg
VI		4	196,3 mg
VII	7		21,2 mg
VIII	9		59,8 mg
IX		6	17,5 mg
X	10, B, C, D, E	5	103,0 mg
XI		7	14,8 mg
XII		8	5,8 mg
	A		verworfen
XIII		9	198,8 mg
XIV	F		19,5 mg
XV	G, H		78,7 mg
XVI		10	17,2 mg

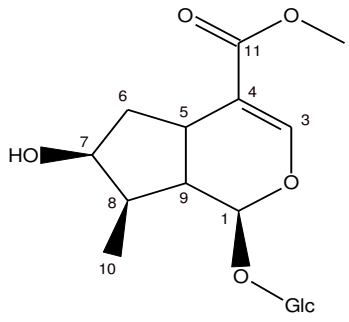
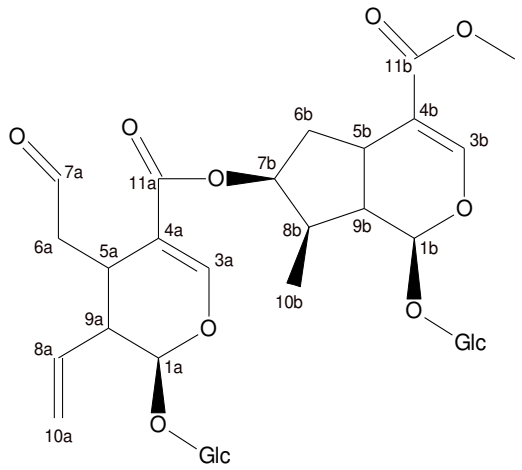
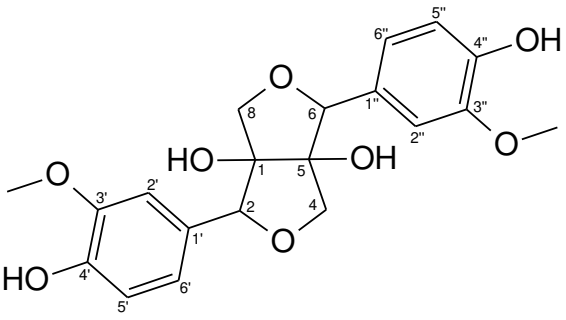
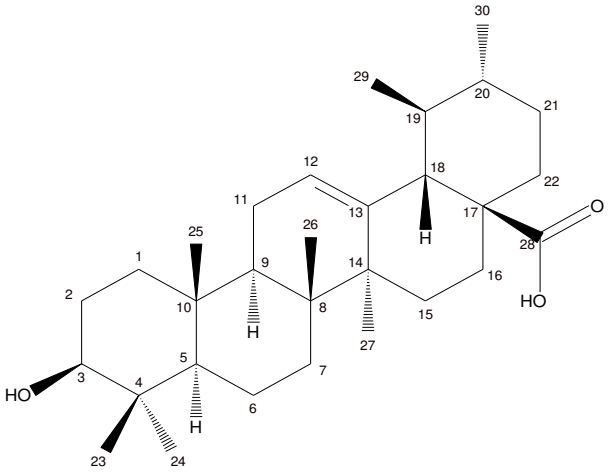
Aus den 103,5 mg von Mischfraktion X konnte durch Aufreinigung über eine RP-Säule und eine Mikro-RP-Säule (jeweils H_2O-MeOH-Stufengradient) eine Verbindung isoliert werden. Sie ähnelte im DC (FM6, VanS-Detektion) vom R_f-Wert und der Lage zu den isolierten Iridoiden der Literaturbeschreibung eines weiteren Bis-Iridoids, Sylvestrosid I [59], das sich aufgrund der geringen Menge (unter 2 mg) und Reinheit im NMR nicht sicher bestimmen ließ.

8.6 Ergebnisse der NMR- und MS-Untersuchungen

Im Verlauf der Arbeit wurden vier Substanzen in ausreichender Menge und Reinheit isoliert, um sie mittels NMR und GC identifizieren zu können und im Borrelienmodell zu testen bzw. als CE-Referenz einzusetzen. Die Stoffe entstammen den Stoffklassen der Iridoide/Bis-

Iridoide (Loganin, Cantleyosid), Lignane (Prinsepiol) und Triterpene (Ursolsäure) - Strukturformeln siehe Tab. 8-16. Nach Aufnahme von 1d- und 2d- NMR-Spektren und Vergleich mit Literaturwerten (Tab. 8-17 bis Tab. 8-24) wurden die Molmassen der erhaltenen Strukturen mittels ESI-MS-Messungen bestätigt (Abb. 8-15, Abb. 8-16).

Tab. 8-16: mittels NMR identifizierte Substanzen

	
Loganin	Cantleyosid
$C_{17}H_{26}O_{10}$	$C_{33}H_{46}O_{19}$
M = 390 g/mol	M = 746 g/mol
	
Prinsepiol	Ursolsäure
$C_{20}H_{22}O_8$	$C_{30}H_{48}O_3$
M = 390 g/mol	M = 457 g/mol

8.6.1.1 Loganin

Mittels NMR-Messungen wurde die chemische Struktur vom isolierten Loganin bestimmt und mit Literaturangaben verglichen (Tab. 8-17, Tab. 8-18). Die erhaltene Struktur wurde mittels MS bestätigt. Im ESI-Massenspektrum im Positivmodus (Abb. 8-15) zeigte sich wie erwartet bei 413,1 m/z deutlich der Massenpeak von $[Loganin+Na]^+$, bei 803,2 m/z der von $[2x\ Loganin+Na]^+$. Als Nebenpeak fand sich bei 429,0 m/z $[Loganin+K]^+$. In der Vergrößerung (Abb. 8-16) war das Isotopenmuster erkennbar: 413,1 m/z, 414,1 m/z und 415,1 m/z in einem mit dem berechneten übereinstimmenden Verhältnis (100 %, 19,1 %, 3,8 %) [238].

Das ^{1}H-NMR (D_2O bei 600 MHz) wies 21 H-Atome auf. Die fünf Hydroxygruppen (OH-Gruppen) waren im ^{1}H-Spektrum erwartungsgemäß unsichtbar, da die Protonen mit denen des Lösungsmittels austauschen. Im ^{13}C-NMR (D_2O, 150 MHz) konnten alle 17 C-Atome identifiziert werden. Zusammen mit den COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren ließen sich die Atome wie dargestellt zuordnen (Abb. 8-14, links). Der Zucker wurde als β-D-Glucoserest bestimmt. Charakteristische Verschiebungen im ^{13}C-Spektrum (Abb. Anhang 14-1) zeigten die olefinische Doppelbindung bei 113,5 (C-4) und 151,3 (C-3) ppm, das am stärksten entschirmte Carbonyl-C-Atom (C-11) des Esters bei 170,5 ppm und die CH_3-Gruppe von C-10 im Hochfeld mit 12,4 ppm. Das C-3-Atom war durch das benachbarte Acetal zusätzlich entschirmt und damit ins Tieffeld verschoben. Die CH_3-Gruppe im Methylester war auf 52,2 ppm typischerweise deutlich ins Tieffeld verschoben. Die CH-Gruppen von C-1 und C-1‘ waren durch den elektronenziehenden Effekt der benachbarten O-Atome in den Acetalen ebenfalls ins Tieffeld verschoben (97,0 bzw. 99,0 ppm). C-7 mit seiner OH-Gruppe zeigte erwartungsgemäß eine ähnliche Verschiebung wie die Kohlenstoffatome C-2‘ bis C-5‘ im Zuckerteil.

Bei Betrachtung der Aufspaltungen im ^{1}H-Spektrum (Abb. 8-17) und Kombination mit den Korrelationen im COSY (Abb. Anhang 14-2) fielen unter anderem das Dublett der CH_3-Gruppe H-10 bei 0,99 ppm (Kopplung mit H-8, Multiplett, 1,84 ppm), das tieffeldverschobene Singulett vom olefinischen H-3 bei 7,35 ppm und das Dublett des H-1 bei 5,33 ppm in der Acetalstruktur (koppelt mit H-9, Multiplett, 2,05 ppm) auf. Mittels HSQC (Abb. Anhang 14-3) ließen sich die Protonen ihren jeweiligen C-Atomen zuordnen. Mittels

Fernkopplungen im HMBC (Abb. Anhang 14-4) war auch eine genaue Zuordnung der Brückenatome am Methylester, die Verknüpfung zum Glucoserest und zu quartären C-Atomen möglich (Abb. 8-14, rechts). Bestätigt wurden die Untersuchungen durch Vergleich der Messwerte mit Literaturangaben.

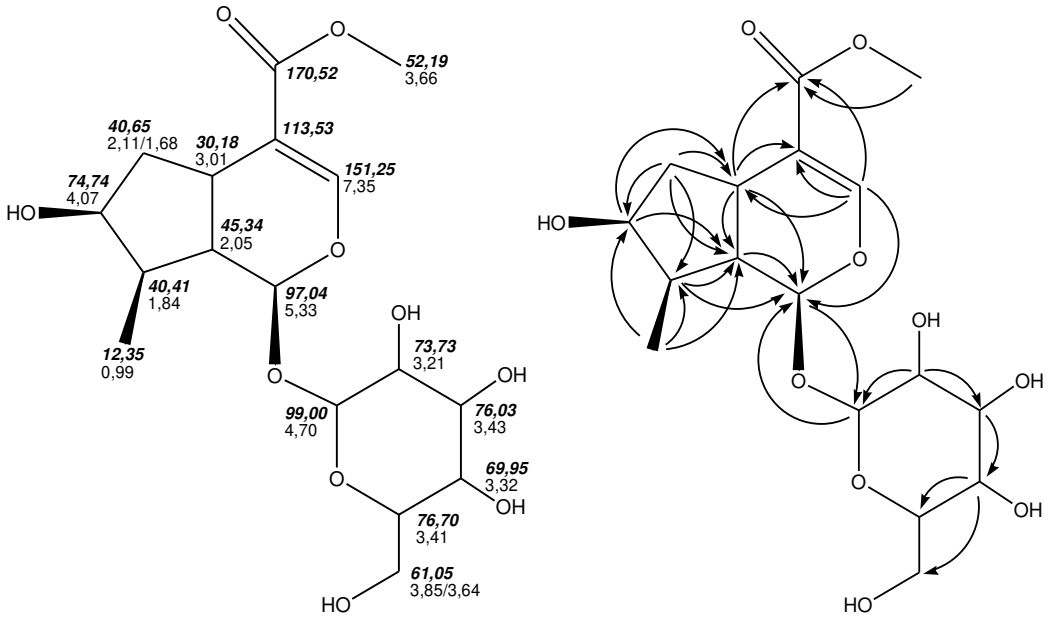


Abb. 8-14: ^{1}H-und ^{13}C-Verschiebungen (links) und ausgewählte long-range-Kopplungen aus dem HMBC (rechts) von Loganin

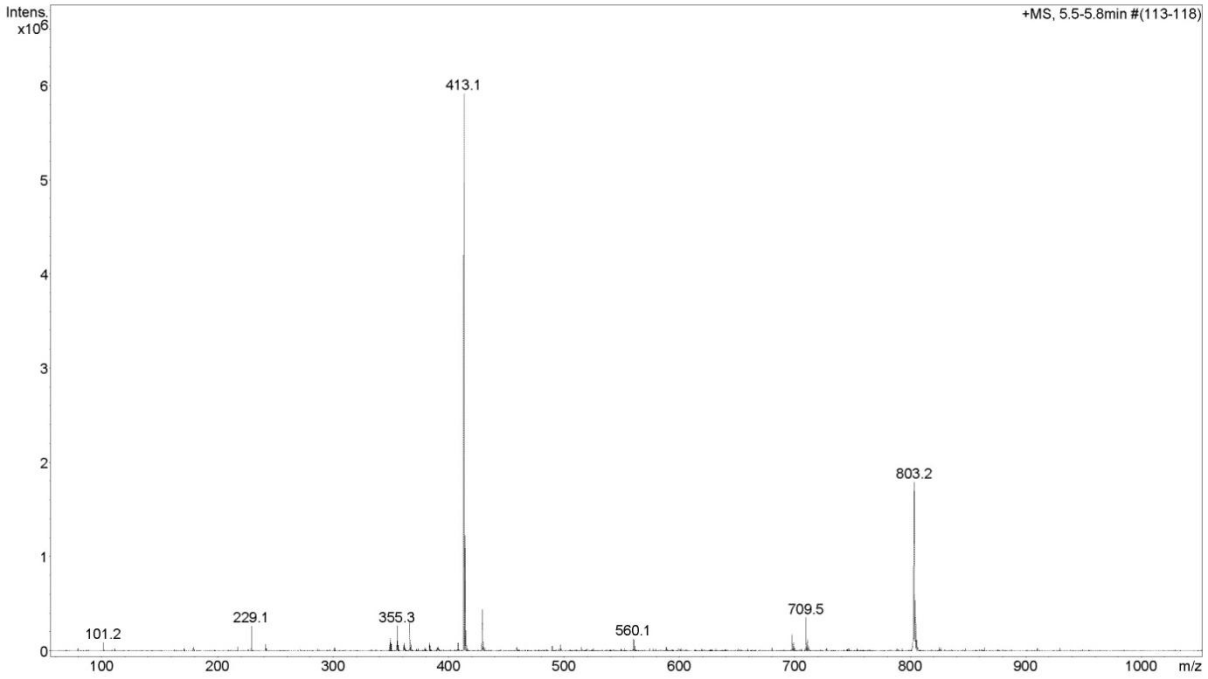


Abb. 8-15: ESI-MS-Spektrum (m/z 40 – 1050, +MS, 6 Scans) von Loganin in MeOH

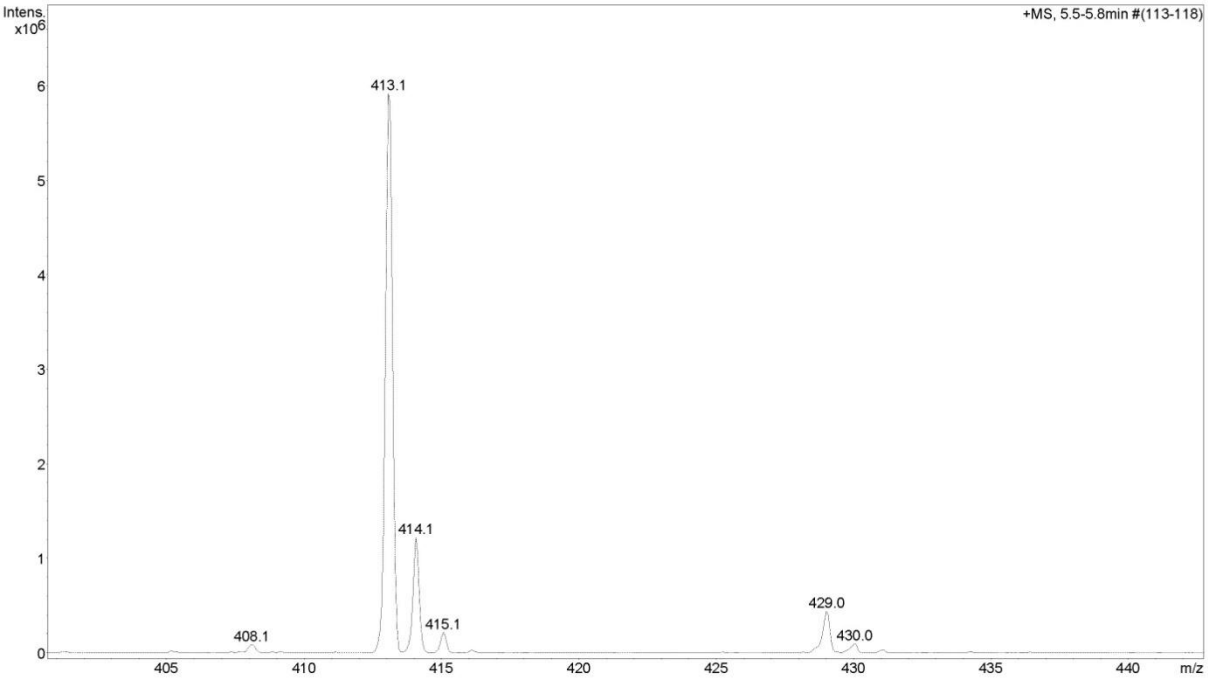


Abb. 8-16: ESI-MS-Spektrum (m/z 400 – 443, +MS, 6 Scans) von Loganin in MeOH: Detailvergrößerung für das Isotopenmuster

Tab. 8-17: ^{1}H-NMR-Daten des isolierten Loganins mit Literaturvergleich

	Loganin	**Pandey** [239]	**Calis** [240]	**Boros** [241]
	(D_2O)	(D_2O)	(CD_3DO)	(CD_3DO)
H-1	5,33 (d, 3,5)	5,41 (d)	5,26 (d, 4,5)	5,37 (d, 4,5)
H-3	7,35 (s)	7,42 (s)	7,38 (d, 1,2)	7,37 (d, 0,5)
H-5	3,01 (m)	3,07 (m)	3,12 (m)	3,10 (m)
H-6a	2,11 (ddd, 22,1/10,4/4,6)	2,15 (m)	2,03 (m)	2,25 (ddd, 12/8/1,5)
H-6b	1,68 (ddd, 26,4/14,8/2,7)	1,75 (m)	1,62 (m)	1,60 (ddd, 14/7,5/4,5)
H-7	4,07 (m)	4,14 (bs)	4,04 (m)	4,04 (m)
H-8	1,84 (m)	1,92 (m)	1,87 (m)	1,86 (m)
H-9	2,05 (m)	2,15 (m)	2,23 (m)	2,03 (m)
H-10	0,99 (d, 7,0)	1,06 (d)	1,09 (d, 6,9)	1,08 (d, 7,5)
OMe	3,66 (s)	3,72 (s)	3,69 (s)	3,67
H-1‘	4,70 (d)	4,81 (d)		4,65 (d, 8)
H-2‘	3,21 (t)	3,27 (t)		3,20 (d, 8)
H-3‘	3,43 (m)	3,49 (t)		
H-4'	3,32 (t)	3,39 (t)		
H-5‘	3,41 (m)	3,73 (m)		
H-6’a	3,85 (dd, 14,2/10,6)	3,92 (d)		
H-6‘b	3,64 (dd, 17,8/6,0)	3,31 (d)		

Tab. 8-18: ^{13}C-NMR-Daten des isolierten Loganins mit Literaturvergleich

	Loganin	**Jensen** [59]	**Damtoft** [242]	**Boros** [241]
	(D_2O)	(D_2O)	(D_2O)	(D_2O)
C-1	97,04	97,6	97,5	97,5
C-3	151,25	151,8	151,7	151,7
C-4	113,53	113,9	113,8	113,8
C-5	30,18	30,7	30,6	30,6
C-6	40,65	41,3	41,2	41,2
C-7	74,74	74,9	74,8	74,8
C-8	40,41	41,0	40,9	40,9
C-9	45,34	45,8	45,7	45,7
C-10	12,35	12,9	12,8	12,8
C-11	170,52	170,6	170,5	170,5
OMe	52,19	52,6	52,5	52,5
C-1‘	99,00	99,5	99,4	99,4
C-2‘	73,04	73,6	73,6	73,6
C-3‘	76,03	76,6	76,5	76,5
C-4'	69,95	70,5	70,4	70,4
C-5‘	76,70	77,2	77,1	77,1
C-6‘	61,05	61,6	61,5	61,5

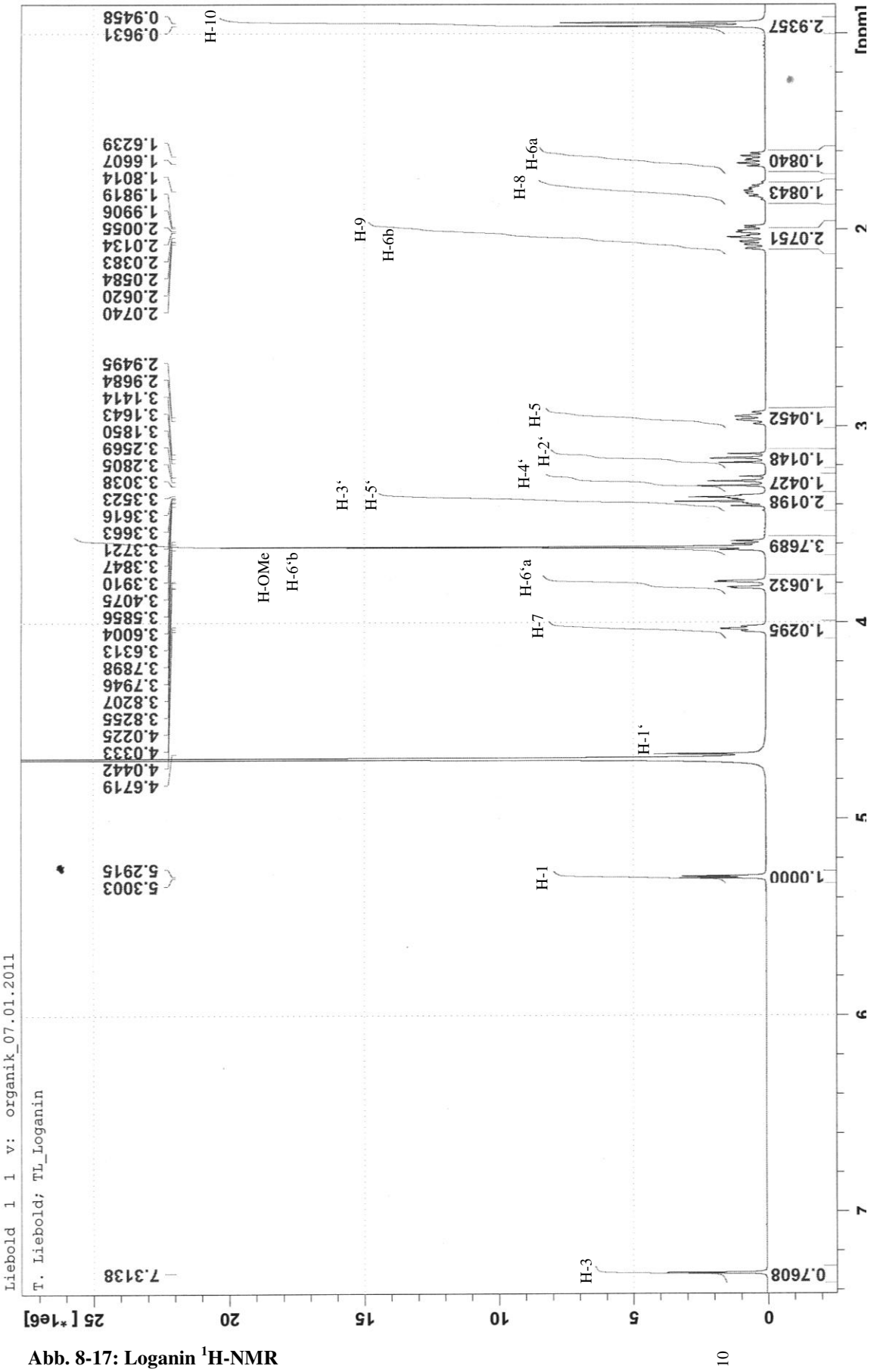


Abb. 8-17: Loganin ^{1}H-NMR

8.6.1.2 Cantleyosid

Die chemische Struktur vom isolierten Cantleyosid wurde mittels NMR-Messungen bestimmt und mit Literaturangaben verglichen (Tab. 8-19, Tab. 8-20). Der Haupt- und damit Massenpeak im ESI-Massenspektrum im Positivmodus (Abb. 8-19) lag bei 769,2 m/z $[Cantleyosid+Na]^+$. Ein weiterer Peak lag bei 802,3 m/z, ohne dass er zugeordnet wurde. In der Vergrößerung (Abb. 8-20) war das Isotopenmuster erkennbar: 769,2 m/z, 770,2 m/z, 771,2 m/z, 772,2 m/z und 773,2 m/z in einem optisch abgeschätzten Verhältnis, das dem vorher berechneten Verhältnis von 100 %, 36,9 %, 10,5 %, 2,2 % zu 0,4 % entsprach [238]. Bei 785,2 m/z, 786,2 m/z, 787,2 m/z und 788,2 m/z finden sich entsprechend die Kaliumaddukte $[Cantleyosid+K]^+$.

Mit Ausnahme der acht durch Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel unsichtbaren OH-Gruppen-Protonen wies das ^{1}H-NMR (D_2O bei 300 MHz) alle weiteren 38 H-Atome auf. Im ^{13}C-NMR (D_2O, 75 MHz) konnten alle 33 C-Atome identifiziert werden. Mittels APT (Abb. Anhang 14-6) wurden die Zuordnungen der C-Atome über ihre gerad- bzw. ungeradzahlige Anzahl gebundener Protonen bestätigt. Zusammen mit den COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren ließen sich die Atome wie dargestellt zuordnen (Abb. 8-18, oben). Beide Zucker wurden als β-D-Glucoserest identifiziert.

Im ^{13}C-Spektrum (Abb. Anhang 14-5) zeigten sich die olefinischen Doppelbindungen bei 112,6 (C-4b) und 151,5 ppm (C-3b), bei 109,1 (C-4a) und 153,7 ppm (C-3a) sowie bei 120,9 (C-10a) und 133,2 ppm (C-8a). Die C-3-Atome C-3a und C-3b sind durch die benachbarten Acetale zusätzlich entschirmt und damit weiter Tieffeld verschoben als das jeweils andere C-Atom der Doppelbindung. Die drei Carbonyl-C-Atome, C-11b bei 170,1 ppm, C11a bei 168,6 ppm und C-7a als Aldehyd bei 206,7 ppm waren am stärksten ins Tieffeld verschoben. An der CH_3-Gruppe von C-10b mit 12,4 ppm lag die höchste Elektronendichte an einem C-Atom. Die CH_3-Gruppe im Methylester ist auf 52,0 ppm typischerweise deutlich ins Tieffeld verschoben. C-1a und C-1‘a sowie C-1b und C-1’b sind durch den elektronenziehenden Effekt der benachbarten O-Atome in den Acetalen ebenfalls ins Tieffeld verschoben (97,1 bzw. 99,0 ppm sowie 96,7 bzw. 98,9 ppm). C-7b mit der veresterten OH-Gruppe zeigte erwartungsgemäß eine ähnliche Verschiebung wie die Kohlenstoffatome C-2‘ bis C-5‘ der Glucosereste.

Im ^{1}H-Spektrum (Abb. 8-21) und in Kombination mit den Korrelationen im COSY (Abb. Anhang 14-7) traten das sehr stark entschirmte Aldehyd-Proton H-7a mit 9,56 ppm, die CH_3-Gruppe H-10a mit 0,92 ppm und dreifacher Intensität sowie die beiden Singuletts der tieffeldverschobenen olefinischen H-3a und H-3b bei 7,51 und 7,34 ppm hervor. Die tieffeldverschobenen H-Atome H-1a (5,43 ppm) und H-1b (5,27 ppm) in der Acetalstruktur koppeln mit H-9a bzw. H-9b. Die Zuordnung der Protonen zu ihrem zugehörigen Kohlenstoffatomen war mittels HSQC (Abb. Anhang 14-8) möglich. Die long-range-Kopplungen im HMBC (Abb. Anhang 14-9) ermöglichten eine genaue Zuordnung der Brückenatome am Methylester, an der Esterbindung beider Iridoidteile, die Verknüpfung zu den Glucosereste und zu H-NMR-unsichtbaren quartären C-Atomen (Abb. 8-18, unten). Die Kopplung zwischen H-7b und C-11a ist wie in Literaturspektren zusammengesetzter Iridoide nur schwach sichtbar [61]. Bestätigt wurden die Untersuchungen durch Vergleich der Messwerte mit Literaturangaben.

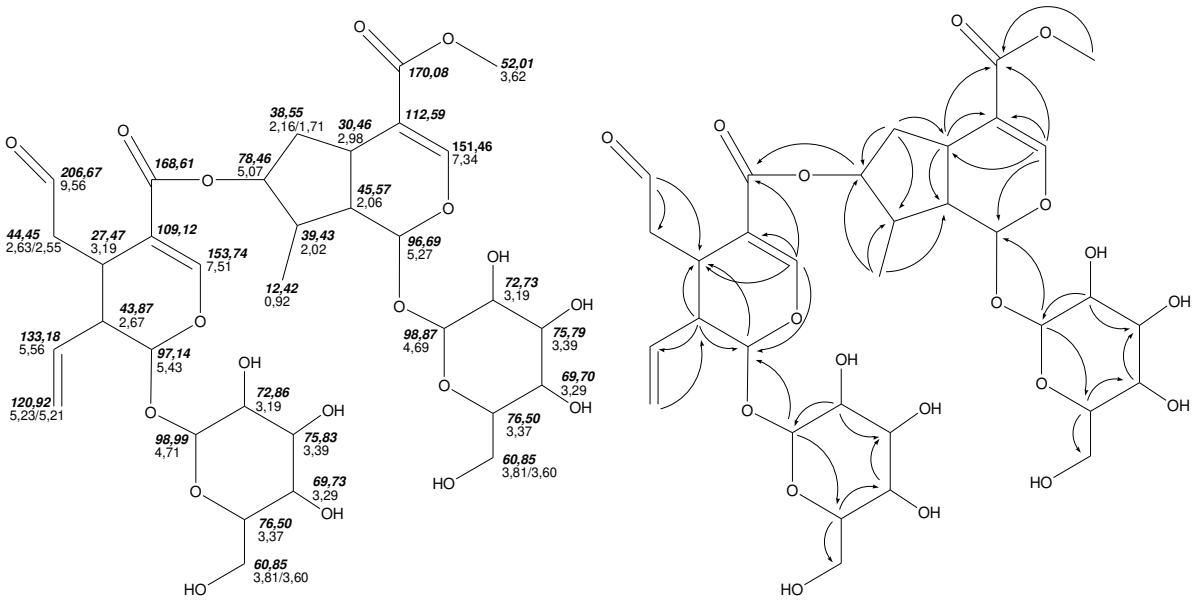


Abb. 8-18: ^{1}H-und ^{13}C-Verschiebungen (links) und ausgewählte long-range-Kopplungen aus dem HMBC (rechts) von Cantleyosid

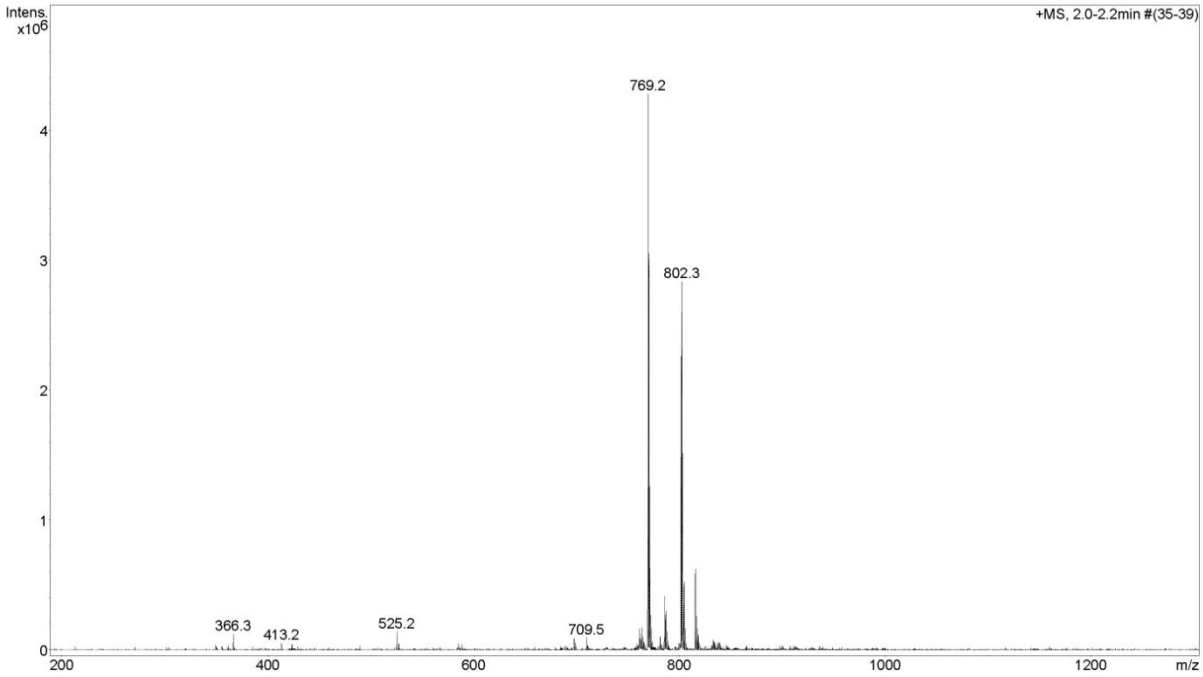


Abb. 8-19: ESI-MS-Spektrum (m/z 200 – 1300, +MS, 5 Scans) von Cantleyosid in MeOH

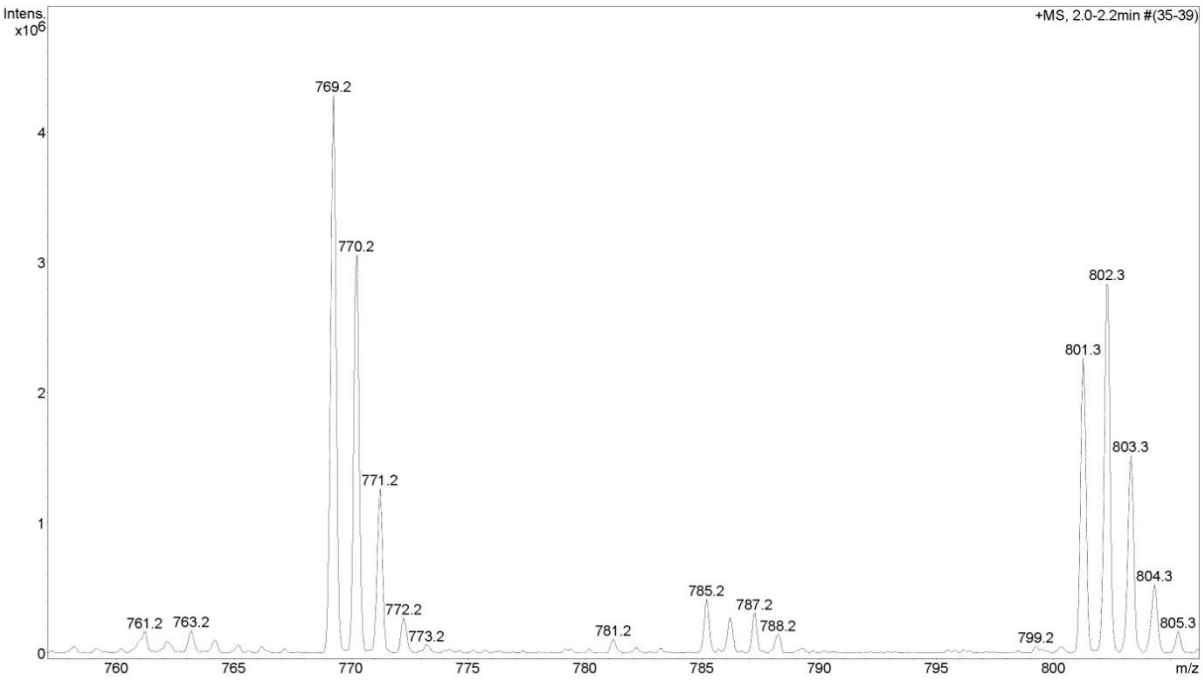


Abb. 8-20: ESI-MS-Spektrum (m/z 755 – 806, +MS, 5 Scans) von Cantleyosid in MeOH: Detailvergrößerung für das Isotopenmuster

Tab. 8-19: ^{1}H-NMR des isolierten Cantleyosids mit Literaturvergleich

	Cantleyosid	**Jensen** [59]
	(D_2O)	(D_2O)
H-1a	5,43 (m)	
H-1b	5,27 (m)	
H-3a	7,51 (br s)	7,65 (br s)
H-3b	7,34 (br s)	7,51 (br s)
H-5a	3,19 (m)	
H-5b	2,98 (m)	
H-6aA	2,63 (m)	
H-6aB	2,55 (m)	
H-6bA	2,16 (m)	
H-6bB	1,71 (m)	
H-7a	9,56 (t, 1,5)	9,73 (br s)
H-7b	5,07 (m)	
H-8a	5,56 (m)	
H-8b	2,02 (m)	
H-9a	2,67 (m)	
H-9b	2,06 (m)	
H-10aA	5,23 (m)	
H-10aB	5,21 (m)	
H-10b	0,92 (m)	1,09 (m)
OMe	3,62 (s)	3,74 (s)
H-1’a	4,71 (br s)	
H-1’b	4,69 (br s)	
H-2’a	3,19 (m)	
H-2‘b	3,19 (m)	
H-3’a	3,39 (m)	
H-3’b	3,39 (m)	
H-4'a	3,29 (m)	
H-4'b	3,29 (m)	
H-5’a	3,37 (m)	
H-5’b	3,37 (m)	
H-6’aA	3,81 (dd, 12,3/1,8)	
H-6’aB	3,60 (dd, 12,8/5,9)	
H-6’bA	3,81 (dd, 12,3/1,8)	
H-6‘bB	3,60 (dd, 12,8/5,9)	

Tab. 8-20: ^{13}C-NMR des isolierten Cantleyosids mit Literaturvergleich

	Cantleyosid	**Jensen** [59]
	(D_2O)	(D_2O)
C-1a	97,14	97,7
C-1b	96,69	97,4
C-3a	153,74	154,2
C-3b	151,46	152,2
C-4a	109,12	109,8
C-4b	112,59	113,1
C-5a	27,47	28,2
C-5b	30,46	31,3
C-6a	44,45	44,5
C-6b	38,55	40,1
C-7a	206,67	206,7
C-7b	78,46	78,8
C-8a	133,18	133,9
C-8b	39,43	39,3
C-9a	43,87	45,1
C-9b	45,57	46,3
C-10a	120,92	121,6
C-10b	12,42	13,2
C-11a	168,61	168,9
C-11b	170,08	170,3
OMe-C	52,01	52,7
C-1’a	98,99	99,6
C-1’b	98,87	99,6
C-2’a	72,86	73,5
C-2‘b	72,73	73,5
C-3’a	75,83	76,6
C-3’b	75,79	76,6
C-4'a	69,73	70,5
C-4'b	69,70	70,5
C-5’a	76,50	77,2
C-5’b	76,50	77,2
C-6’a	60,85	61,6
C-6‘b	60,85	61,6

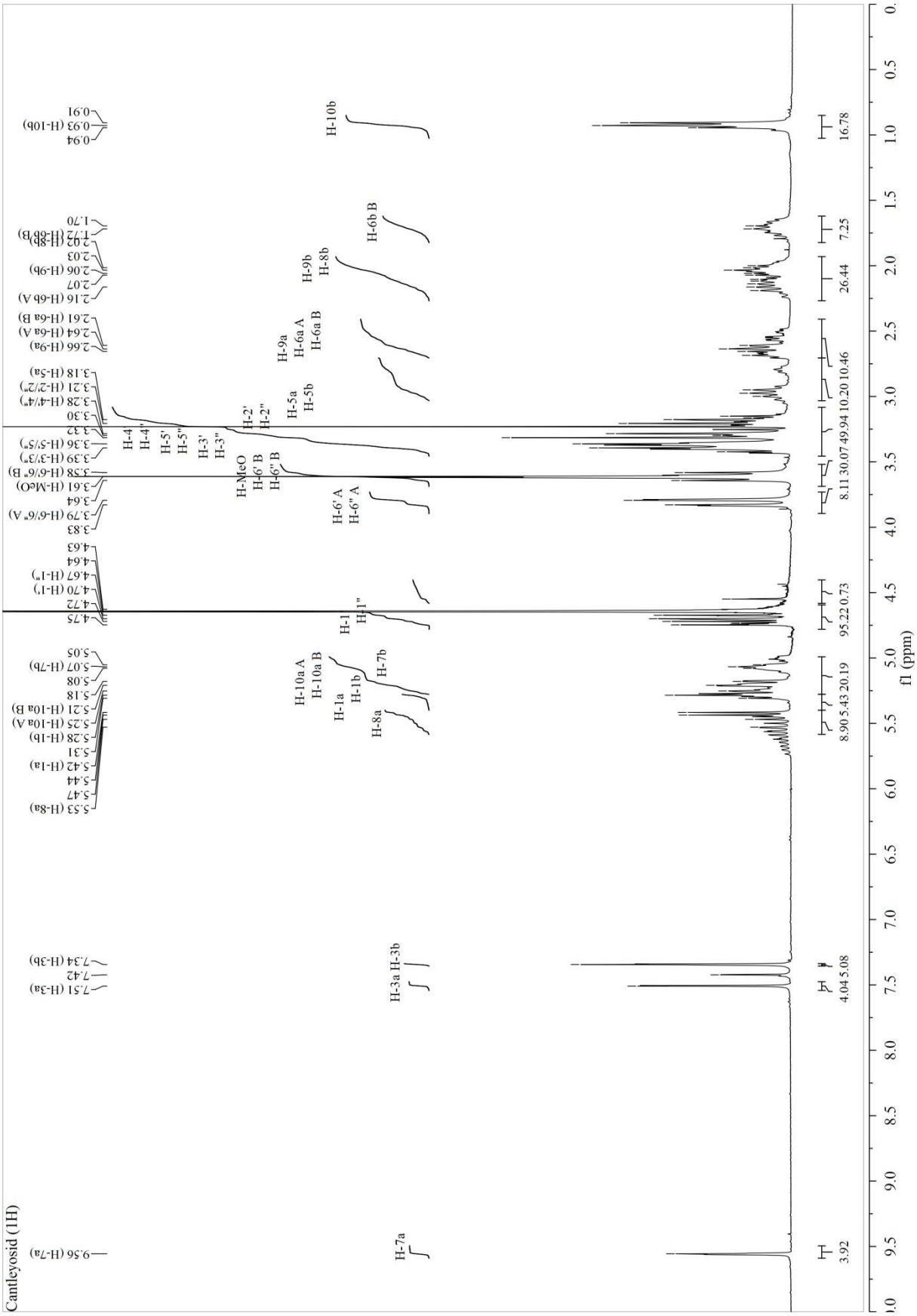


Abb. 8-21: Cantleyosid ^{1}H-NMR

8.6.1.3 Prinsepiol

Mittels NMR-Messungen wurde die chemische Struktur vom isolierten Prinsepiol bestimmt und mit Literaturangaben verglichen (Tab. 8-21, Tab. 8-22). Durch MS wurde die erhaltene Formel bestätigt. Die Hauptpeaks im ESI-Massenspektrum im Positivmodus (Abb. 8-23) lagen bei 413,2 m/z [Prinsepiol+Na]$^+$ und 803,2 m/z [2xPrinsepiol+Na]$^+$. In der Vergrößerung (Abb. 8-24) war das Isotopenmuster erkennbar: 413,2 m/z, 414,2 m/z und 415,2 m/z in einem optisch abgeschätzten Verhältnis, das dem vorher berechneten Verhältnis von 100 %, 22,2 % zu 4,0 % entsprach [238]. Auch [Prinsepiol+K]$^+$ war bei 429,1 m/z erkennbar.

Das ^{1}H-NMR ($CDCl_3$ bei 400 MHz) wies alle identifizierbaren 18 H-Atome auf, mit Ausnahme der vier durch Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel unsichtbaren OH-Gruppen-Protonen. Im ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) konnten alle 20 C-Atome identifiziert werden. Da das Prinsepiolmolekül als Lignan vom Pinoresinoltyp aus zwei kondensierten identischen Einheiten besteht, sind erwartungsgemäß nur zehn Signale ermittelbar. Den Beweis für die Summenformel $C_{20}H_{22}O_8$ brachte das ESI-Massenspektrum (s. o.). Mittels APT (Abb. Anhang 14-11) wurden die Zuordnungen der C-Atome über ihre gerad- bzw. ungeradzahlige Anzahl gebundener Protonen bestätigt. Die Verschiebungen von C-1 / C-5 (87,8 ppm) und C-2 / C-6 (87,2 ppm) konnten so unterschieden werden. Zusammen mit den COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren ließen sich die Atome wie dargestellt zuordnen (Abb. 8-22). Im ^{13}C-Spektrum (Abb. Anhang 14-10) zeigen sich die aromatischen C-Atome in Nachbarschaft zur Methoxygruppe (C-3‘/C-3‘‘, 147,0 ppm) und OH-Gruppe (C-4‘/C-4‘‘, 146,1 ppm) durch die zusätzliche Entschirmung deutlich weiter tieffeldverschoben als die übrigen vier C-Atome der Phenylreste.

Im ^{1}H-Spektrum *(*Abb. 8-25*)* ließen sich neben den Methoxygruppen-H-Atomen dreifacher Intensität (Singulett, 3,91 ppm) die Protonen im zentralen 3,7-Dioxabicyclo[3,3,0]octan-System H-2/H-6 (5,02 ppm), H-4a/H-8a (4,156 ppm) und H-4b/H-8b (4,160 ppm) jeweils als Singulett identifizieren. Durch Kombination mit dem COSY (Abb. Anhang 14-12) und HSQC (Abb. Anhang 14-13) ließen sich auch die Protonen im 4-Methoxy-3-hydroxyphenylrest und sämtliche C-Atome zuordnen. Die long-range-Kopplungen im HMBC (Abb. Anhang 14-14) ermöglichten eine genaue Zuordnung der metaständigen Position des Methylethers und der paraständigen OH-Gruppe, die Verbindung von H-2/H-6 (5,02 ppm) mit C-4/C-8 (76,8 ppm)

über den Sauerstoff und die Verknüpfung zu den im H-NMR-unsichtbaren quartären C-Atomen (Abb. 8-22, unten). Bestätigt wurden die Untersuchungen durch Vergleich der Messwerte mit Literaturangaben.

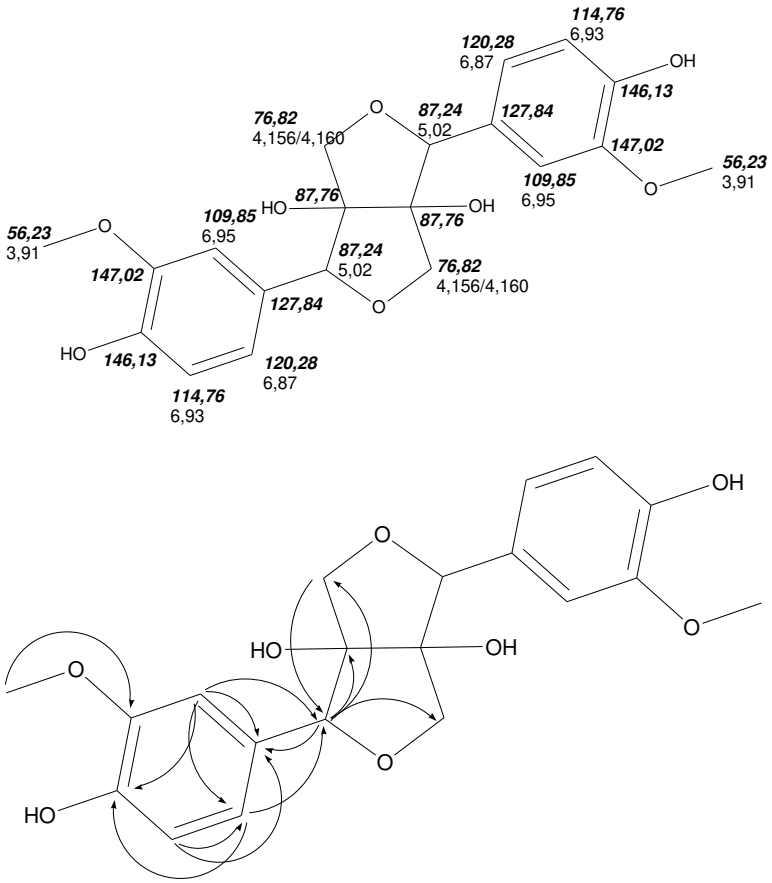


Abb. 8-22: ^{1}H-und ^{13}C-Verschiebungen (oben) und ausgewählte long-range-Kopplungen aus dem HMBC (unten) von Prinsepiol. Die HMBC-Kopplungen sind aufgrund der Punktsymmetrie des Prinsepiols nur für eine Molekülhälfte dargestellt.

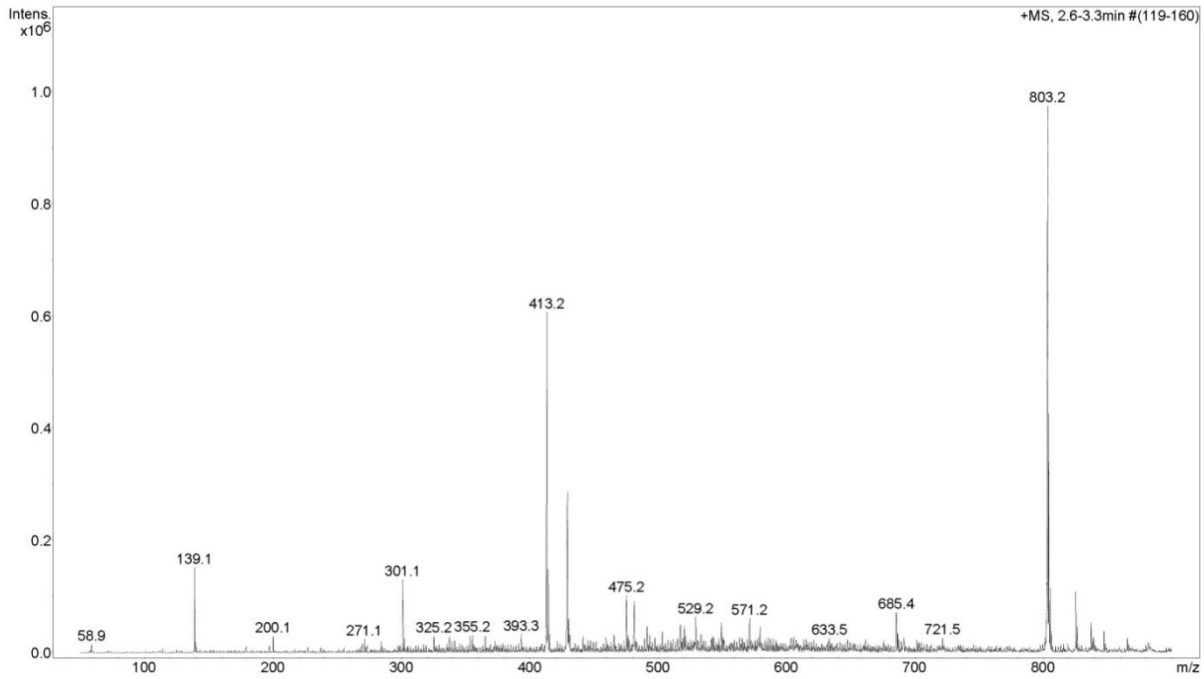


Abb. 8-23: ESI-MS-Spektrum (m/z 40 – 900, +MS, 42 Scans) von Prinsepiol in Aceton

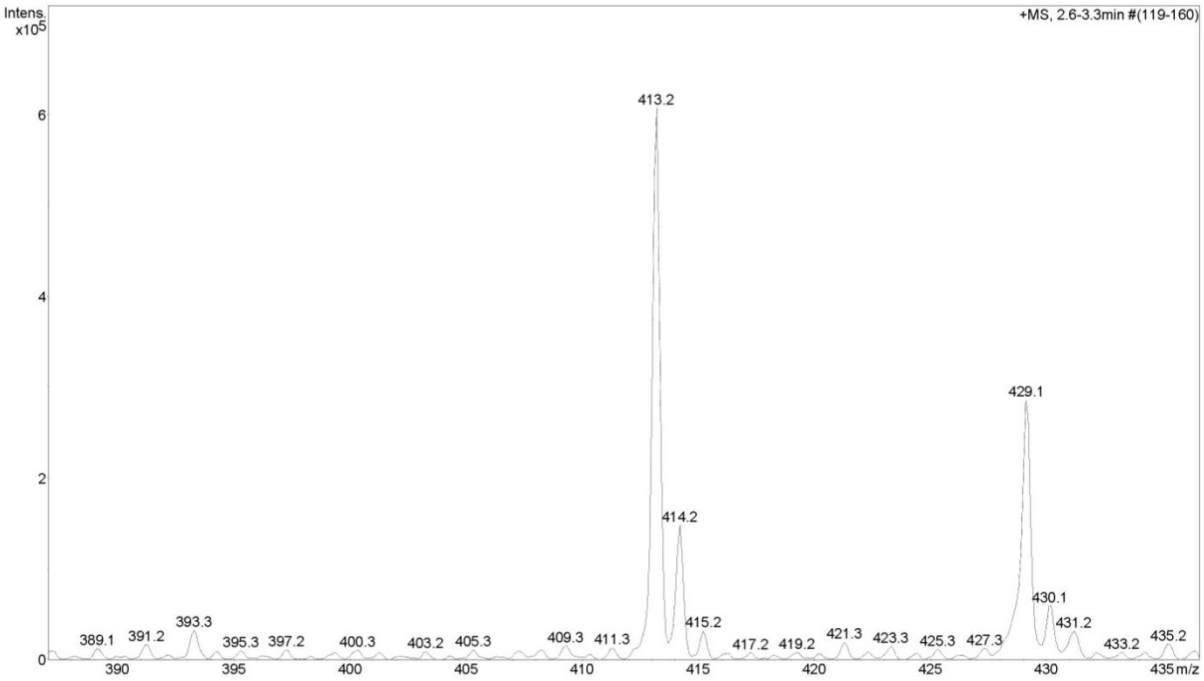


Abb. 8-24: ESI-MS-Spektrum (m/z 380 – 436, +MS, 42 Scans) von Prinsepiol in Aceton: Detailvergrößerung für das Isotopenmuster

Tab. 8-21: ^{1}H-NMR des isolierten Prinsepiols mit Literaturvergleich

	Prinsepiol	**Cuadra** [243]	**Kilidhar** [244]
	($CDCl_3$)	($CDCl_3$)	($CDCl_3$)
H-2	5,02 (s)	4,93 (s)	5,24 (s)
H-4a	4,156 (s)	4,06 (s)	4,32 (s)
H-4b	4,160 (s)	4,06 (s)	4,32 (s)
H-6	5,02 (s)	4,93 (s)	5,24 (s)
H-8a	4,156 (s)	4,06 (s)	4,32 (s)
H-8b	4,160 (s)	4,06 (s)	4,32 (s)
OMe‘	3,91 (s)	3,83 (s)	3,95 (s)
OMe‘‘	3,91 (s)	3,83 (s)	3,95 (s)
H-2‘	6,95 (d, 1,2)	6,90 (d)	6,97 (br s)
H-5‘	6,93 (br s)	6,85 (d)	6,97 (br s)
H-6‘	6,87 (dd, 8,1/1,8)	6,96 (dd)	6,97 (br s)
H-2‘‘	6,95 (d, 1,2)	6,90 (d)	6,97 (br s)
H-5‘‘	6,93 (br s)	6,85 (d)	6,97 (br s)
H-6‘‘	6,87 (dd, 8,1/1,8)	6,96 (dd)	6,97 (br s)

Tab. 8-22: ^{13}C-NMR des isolierten Prinsepiols mit Literaturvergleich

	Prinsepiol	**Cuadra** [243]	**Kilidhar** [244]
	($CDCl_3$)	($CDCl_3$)	(d_6-DMSO)
C-1	87,76	87,48	87,49
C-2	87,24	86,88	86,91
C-4	76,82	76,33	74,56
C-5	87,76	87,48	87,49
C-6	87,24	86,88	86,91
C-8	76,82	76,33	74,56
OMe‘	56,23	55,80	55,54
OMe‘‘	56,23	55,80	55,54
C-1‘	127,84	127,5	128,39
C-2‘	109,85	109,8	112,20
C-3‘	147,02	145,6	145,84
C-4'	146,13	146,7	146,82
C-5‘	114,76	114,4	114,49
C-6‘	120,28	119,9	120,09
C-1‘‘	127,84	127,5	128,39
C-2‘‘	109,85	109,8	112,20
C-3‘‘	147,02	145,6	145,84
C-4‘‘	146,13	146,7	146,82
C-5‘‘	114,76	114,4	114,49
C-6‘‘	120,28	119,9	120,09

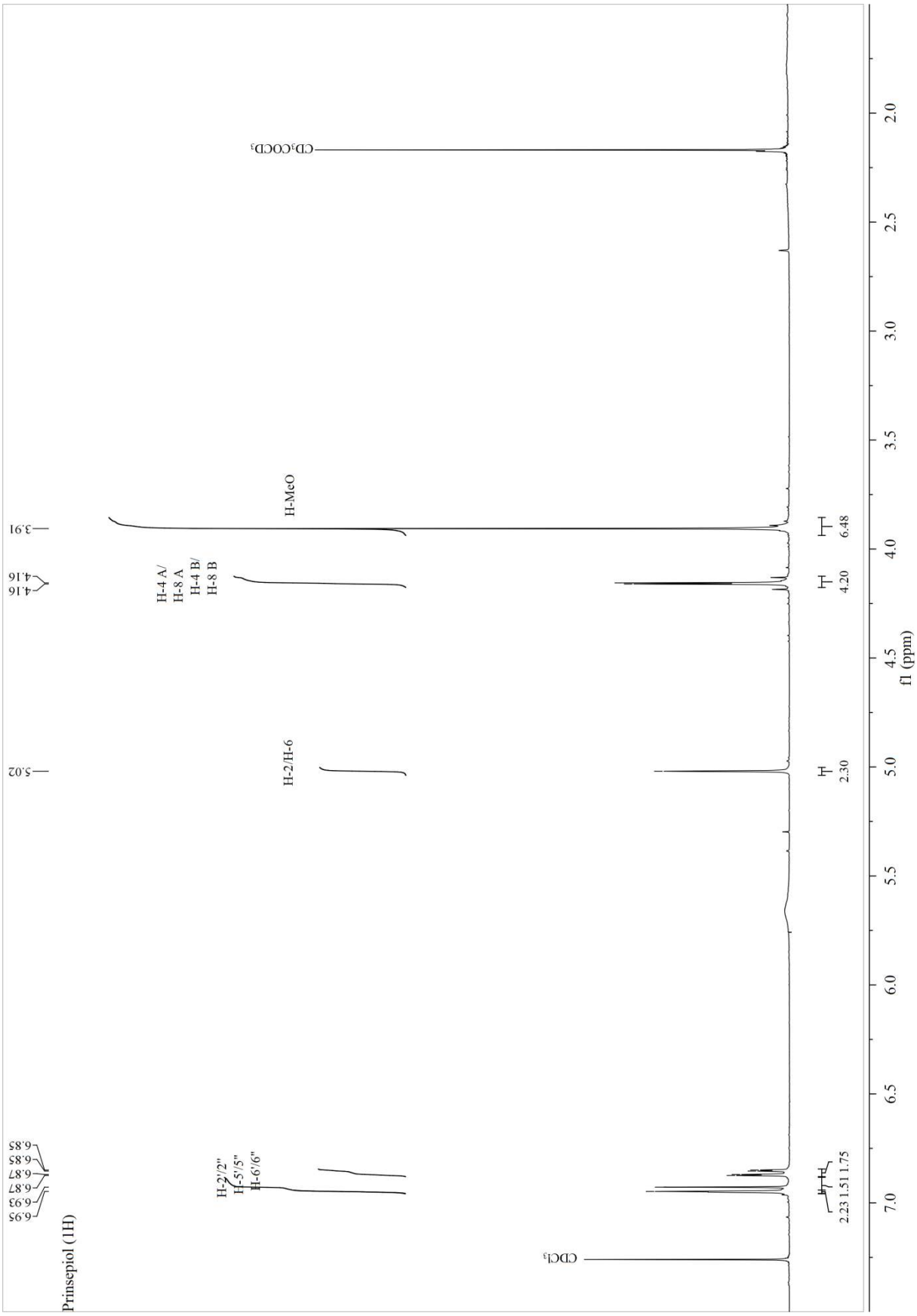


Abb. 8-25: Prinsepiol ^{1}H-NMR

8.6.1.4 Ursolsäure

Die chemische Struktur von Ursolsäure wurde mittels NMR-Messungen bestimmt, die erhaltene Formel mittels MS bestätigt und die NMR-Werte mit Literaturdaten verglichen. Im ESI-Massenspektrum im Negativmodus (Abb. 8-27) fand sich der Massenpeak bei 455,4 m/z [Ursolsäure-H]$^-$. Das Isotopenmuster war in der Vergrößerung (Abb. 8-28) deutlich: 455,4 m/z, 456,4 m/z, 457,4 m/z im Verhältnis 100,0 %, 32,6 % zu 5,3 % wie berechnet [238].

Das ^{1}H-NMR (d_5-Pyridin bei 400 MHz) wies 46 H-Atome auf. Die zwei OH-Gruppenprotonen waren im ^{1}H-Spektrum erwartungsgemäß unsichtbar, da die Protonen sich mit denen des Lösungsmittels austauschen. Im ^{13}C-NMR (d_5-Pyridin, 100 MHz) konnten alle 30 C-Atome identifiziert werden. Zusammen mit den APT-, COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren ließen sich die Atome wie dargestellt zuordnen (Abb. 8-26).

Charakteristische Verschiebungen im ^{13}C-Spektrum (Abb. Anhang 14-15) zeigten die olefinischen C-12 (125,7 ppm) und C-13 (139,4 ppm) sowie das mit 179,9 ppm am stärksten entschirmte Carboxyl-C-28. Das C-3 lag aufgrund der OH-Gruppe tieffeldverschoben bei 78,2 ppm. Die sieben CH_3-Gruppen lagen mit 15,8 bis 28,9 ppm deutlich im Hochfeld. Die vicinalen CH_3-Gruppen an C-19 und C-20, nämlich C-29 (17,5 ppm) und C-30 (21,5 ppm), haben Verschiebungen wie in der Literatur beschrieben [245] und unterscheiden sich deutlich von den Literaturwerten für Oleanolsäure mit zwei geminalen CH_3-Gruppen an C-20. Ebenfalls stark abgeschirmt waren C-6 (18,9 ppm), C-11 (23,7 ppm) und C-16 (25.0 ppm), die sich aber schon aufgrund des APT als sekundäre C-Atome herauskristallisierten. Im APT (Abb. Anhang 14-16) löschen sich C-9 (tertiäres C) und C-17 (quartäres C) mit jeweils 48,1 ppm, aber gegensätzlicher Orientierung nahezu vollständig aus.

Die CH_3-Gruppen mit H-23 bis H-27 lieferten aufgrund fehlender benachbarter Protonen klare Singuletts, während die Signale von H-29 und H-30 mit jeweils einem benachbarten Proton zumindest als breite Singuletts anzutreffen waren. In Übereinstimmung mit der Literatur und aufgrund der sterischen Lage zeigten die Protonen H-1a (0,98 ppm), H-5 (0,87 ppm) und H-20 (1,04 ppm) eine deutliche Abschirmung. Die geminalen CH_3-Gruppen an C-4 (H-23, 1,26 ppm und H-24, 1,04 ppm) unterscheiden sich aufgrund der räumlichen

Anordnung der Ursolsäure in ihrer Verschiebung deutlich voneinander. Im COSY (Abb. Anhang 14-17) finden sich weitere Korrelationen, welche die Strukturformel untermauern. Mittels HSQC (Abb. Anhang 14-18) ließen sich sämtliche Protonen ihren jeweiligen C-Atomen zuordnen. Durch die Fernkopplungen im HMBC (Abb. Anhang 14-19), von denen einige interessante Kopplungen in Abb. 8-26 unten dargestellt sind, wurden u. a. die Kopplungen von H-29 mit C-19 und von H-30 mit C-20 (vicinale CH_3-Gruppen im Ring E des Ursangerüstes) nachgewiesen. Bestätigt wurden die Untersuchungen durch Vergleich der Messwerte mit Literaturangaben.

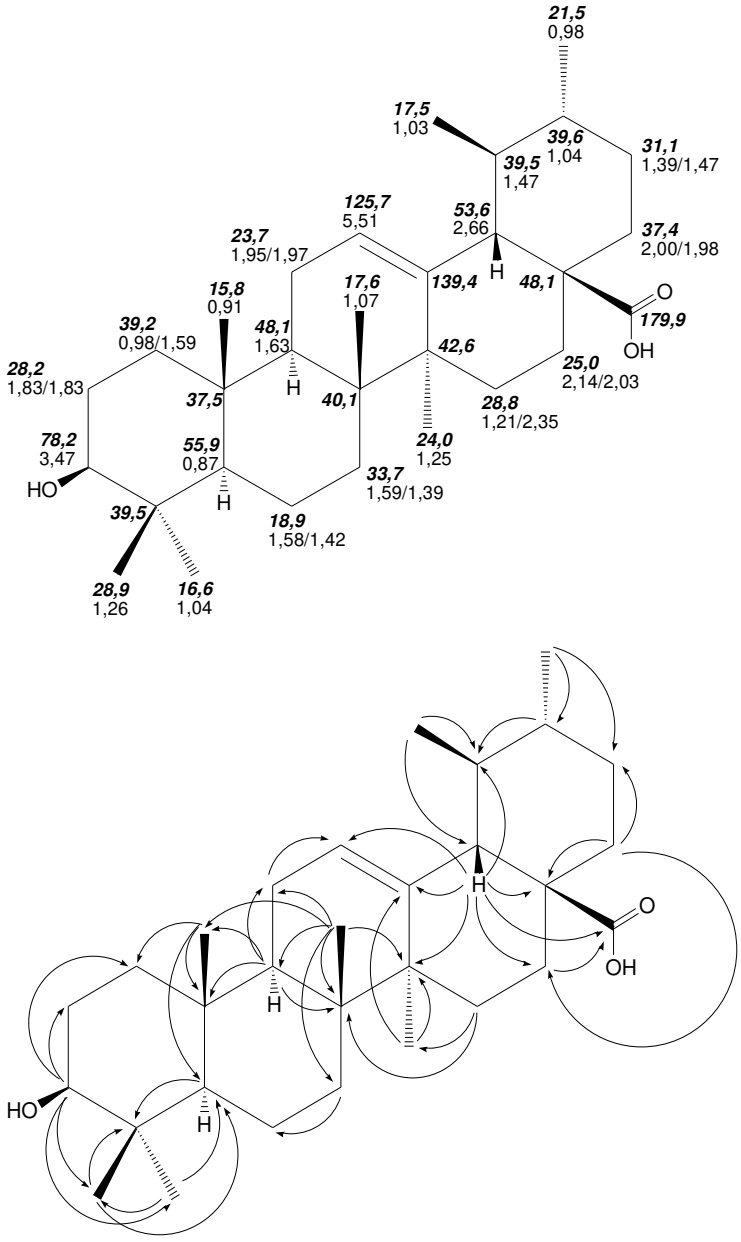


Abb. 8-26: ^{1}H-und ^{13}C-Verschiebungen (oben) und ausgewählte long-range-Kopplungen aus dem HMBC (unten) von Ursolsäure.

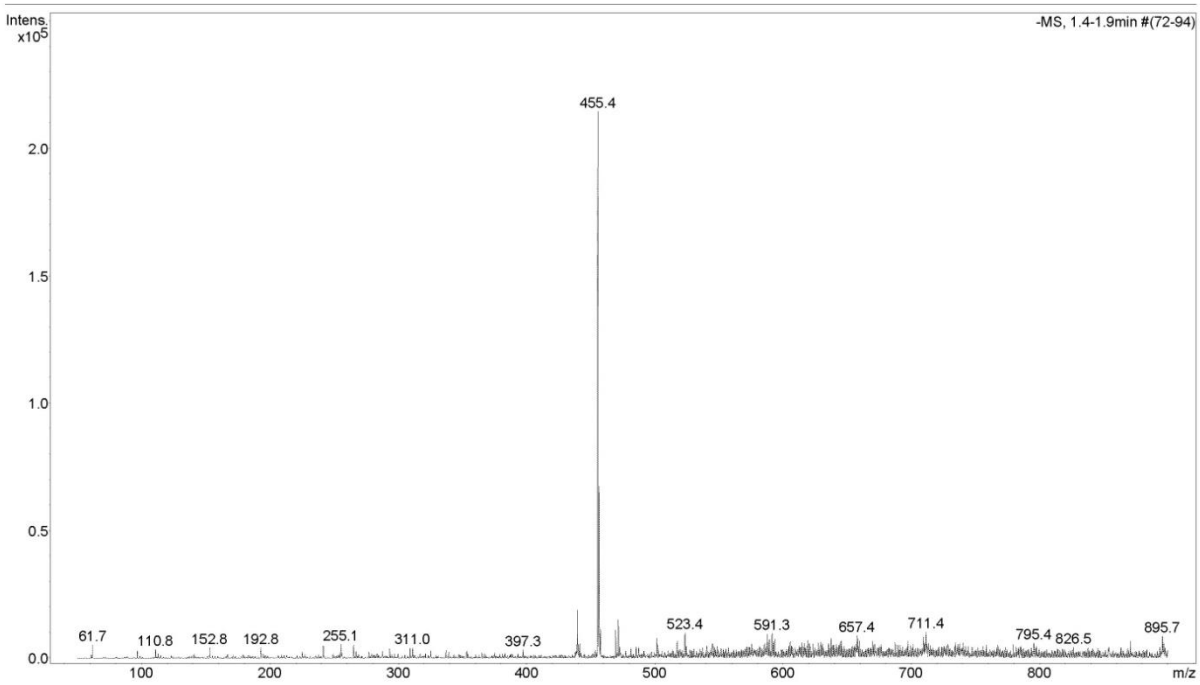


Abb. 8-27: ESI-MS-Spektrum (m/z 40 – 900, -MS, 23 Scans) von Ursolsäure in Aceton

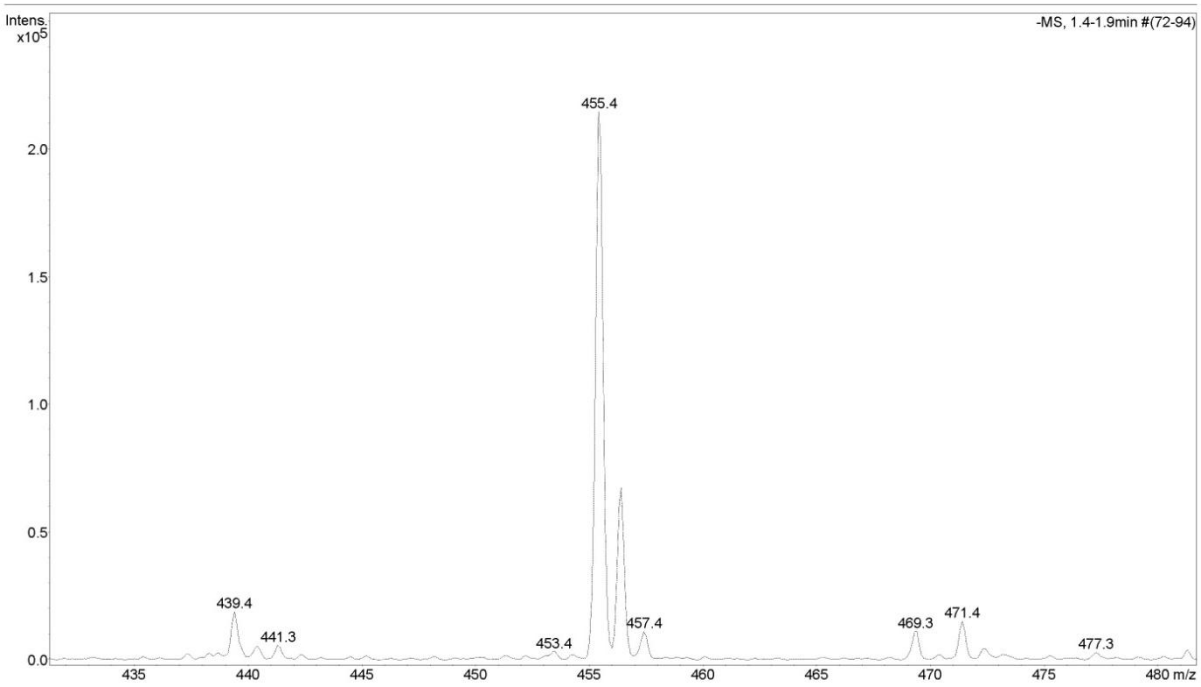


Abb. 8-28: ESI-MS-Spektrum (m/z 430 – 480, -MS, 23 Scans) von Ursolsäure in Aceton: Detailvergrößerung für das Isotopenmuster

Tab. 8-23: ^{1}H-NMR der isolierten Ursolsäure mit Literaturvergleich

	Ursolsäure	**Seebacher** [245]
	(d_5-Pyridin)	(d_5-Pyridin)
H-1a	0,98 (m)	1,00
H-1b	1,59 (m)	1,58
H-2a	1,83 (m)	1,81
H-2b	1,83(m)	1,81
H-3	3,47 (dd, 10,1/6,0)	3,44 (dd)
H-5	0,87 (br s)	0,88 (d)
H-6a	1,58 (m)	1,58
H-6b	1,42 (m)	1,39
H-7a	1,59 (m)	1,59
H-7b	1,39 (m)	1,39
H-9	1,63 (m)	1,65
H-11a	1,95 (m)	1,96
H-11b	1,97 (m)	1,96
H-12	5,51 (t, 3,4/3,4)	5,49 (s)
H-15a	1,21 (m)	1,22
H-15b	2,35 (td, 13,5/13,4/3,8)	2,33 (t)
H-16a	2,14 (td, 14,8/14,1/4,5)	2,14 (t)
H-16b	2,03 (m)	2,01
H-18	2,66 (d, 11,3)	2,63 (d)
H-19	1,47 (m)	1,49
H-20	1,04 (br s)	1,05
H-21a	1,39 (m)	1,40
H-21b	1,47 (m)	1,49
H-22a	2,00 (m)	1,97
H-22b	1,98 (m)	1,97
H-23	1,26 (s)	1,24 (s)
H-24	1,04 (s)	1,02 (s)
H-25	0,91 (s)	0,92 (s)
H-26	1,07 (s)	1,06 (s)
H-27	1,25 (s)	1,24 (s)
H-29	1,03 (br s)	1,02 (d)
H-30	0,98 (br s)	0,97 (d)

Tab. 8-24: ^{13}C-NMR der isolierten Ursolsäure mit Literaturvergleich

	Ursolsäure	**Seebacher** [245]
	(d_5-Pyridin)	(d_5-Pyridin)
C-1	39,16	39,2
C-2	28,22	28,2
C-3	78,20	78,2
C-4	39,46	39,6
C-5	55,90	55,9
C-6	18,87	18,8
C-7	33,66	33,7
C-8	40,05	40,1
C-9	48,13	48,1
C-10	37,52	37,5
C-11	23,71	23,7
C-12	125,73	125,7
C-13	139,35	139,3
C-14	42,59	42,6
C-15	28,77	28,8
C-16	25,00	25,0
C-17	48,13	48,1
C-18	53,63	53,6
C-19	39,48	39,5
C-20	39,57	39,4
C-21	31,14	31,1
C-22	37,36	37,4
C-23	28,88	28,8
C-24	16,64	16,5
C-25	15,75	15,7
C-26	17,59	17,5
C-27	23,99	24,0
C-28	179,94	179,7
C-29	17,54	17,5
C-30	21,48	21,4

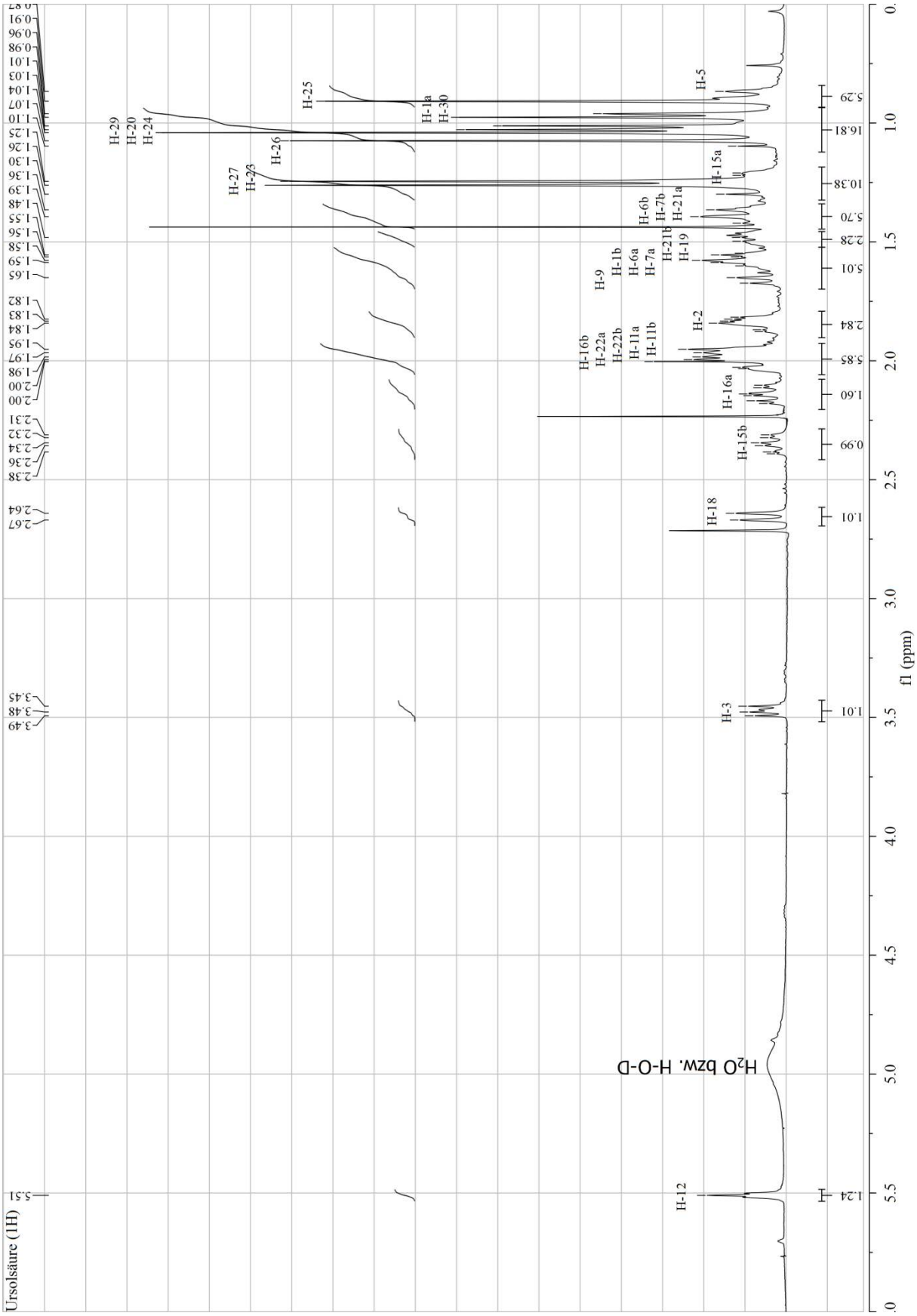


Abb. 8-29: Ursolsäure ^{1}H-NMR

8.7 Ergebnisse der GC-MS-Untersuchungen

In den GC-MS-Messungen wurden vier MPLC-Fraktionen aus einer n-Hexan-Fraktion eines methanolischen Extrakts von *D. sylv.* (Kapitel 7.3.2.2) untersucht.

8.7.1 GC-MS-Messung von Fraktion „MPLC_Fr3“

Die erste GC-MS-Messung wurde mit Fraktion „MPLC_Fr3“ durchgeführt (Abb. 8-30), die nach DC-Kontrolle (FM7, VanS-Detektion, siehe Abb. 8-12) nur sehr apolare Substanzen erwarten ließ. Einige markante Peaks konnten nach Abgleich mit der NIST-Datenbank mit hoher Übereinstimmungswahrscheinlichkeit zugeordnet werden (Tab. 8-25).

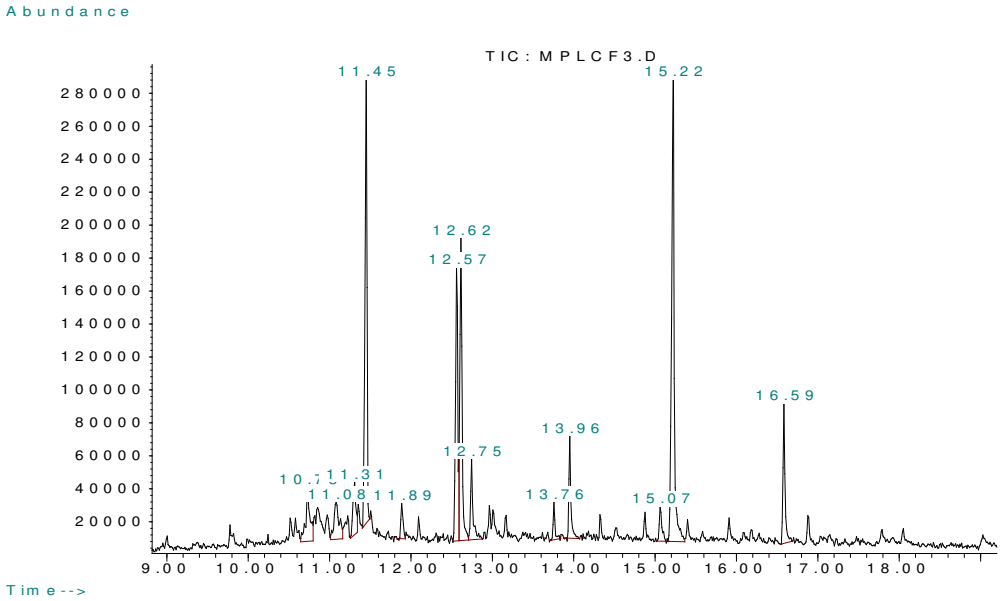


Abb. 8-30: GC-MS-Chromatogramm von Fraktion „MPLC_Fr3“

In der Fraktion wurden ausschließlich Methylester von Fettsäuren identifiziert, insbesondere Palmitinsäuremethylester (C-16:0). Ein Vergleich des gemessenen Massenspektrums bei t = 11,45 min mit dem Referenzspektrum zeigte die Übereinstimmungen (Abb. 8-31).

Tab. 8-25: Datenbankzuordnung von GC-MS-Peaks von Fraktion „MPLC_Fr3“

Zeit [min]	Substanz	Trefferüber-einstimmung	erhaltenes Massenspektrum
11,45	Palmitinsäuremethylester	98%	Abb. 8-31
12,57	(*trans*, *trans*)-Octadeca-9,12-diensäuremethylester (Isomer der Linolsäure)	98%	Abb. Anhang 12-1
12,62	Linolsäuremethylester	99%	Abb. Anhang 12-2
12,75	Stearinsäuremethylester	93%	Abb. Anhang 12-3
13,96	Arachinsäuremethylester	98%	Abb. Anhang 12-4

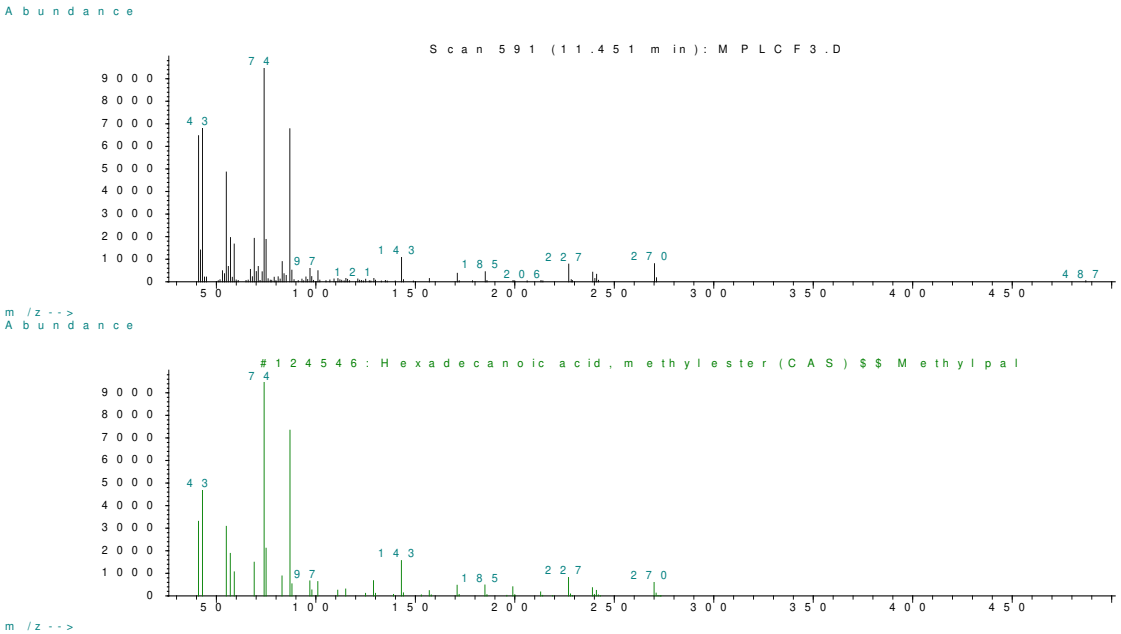


Abb. 8-31: Vergleich der Massenspektren des mittels GC aufgetrennten Palmitinsäuremethylesters (oben) mit der NIST-Referenz (unten)

Die charakteristische Peakverteilung von m/z 270 (Molpeak Palmitinsäuremethylester), 227, 185, 143, 97, 74 und 43 ist im Größenverhältnis des Referenzspektrums zu erkennen.

8.7.2 GC-MS-Messungen der Fraktionen „MPLC_Fr7“, „MPLC_Fr36“ und „MPLC_Fr48“

Bei der GC-MS-Untersuchung der Fraktionen „MPLC_Fr7“ (Abb. Anhang 12-5), „MPLC_Fr36“ (Abb. Anhang 12-13) und „MPLC_Fr48“ (Abb. Anhang 12-19) waren von „MPLC_Fr3“ differierende Substanzen messbar (siehe Tab. 2-1).

In DC-Voruntersuchungen von „MPLC_Fr7“ (FM7, VanS-Detektion, siehe Abb. 8-12) zeigten sich unter den Banden im oberen Viertel weitere etwa bei $R_f = 0{,}65$. Mittels Referenzvergleichs konnten bei den GC-MS-Untersuchungen wiederum charakteristische Massenspektren zugeordnet werden. Neben Palmitinsäure (m/z 256) waren Linolsäure (m/z 280) und Sitosterol (m/z 414) erkennbar. Ob es sich um β- oder γ- Sitosterol handelte, konnte mithilfe des Massenspektrums nicht ermittelt werden, da es sich um Stereoisomere handelt. Interessanterweise waren keine leicht flüchtigen Fettsäuremethylester messbar, sondern nur deren freie Fettsäuren. Dies korreliert mit den im DC sichtbaren, weniger apolaren Banden. Ein Vergleich der gemessenen Massenspektren mit den jeweiligen Referenzspektren zeigte die Übereinstimmungen in Molpeak und Fragmentmuster.

In Fraktion „MPLC_Fr36“ zeigte sich in DC-Voruntersuchungen (FM7, VanS-Detektion, siehe Abb. 8-12) ein ähnliches Bandenmuster wie in der Fraktion „MPLC_Fr7“. Im apolaren Bereich (R_f = 0,9) tauchte eine zusätzliche rote Bande auf (UV_{365nm} nach Besprühen). Die GC-MS-Untersuchung) ergab dementsprechend das Vorhandensein von Palmitin-, Linol- und Arachinsäure, Δ5-Ergostenol und Sitosterol wie in der Fraktion „MPLC_Fr7“. Daneben waren weitere Peaks vorhanden, die über die vorhandenen Referenzmassenspektren nicht zugeordnet werden konnten. Vor allem im Bereich um Sitosterol fanden sich eine Menge unaufgelöste Banden, denen aufgrund ihrer Retentionszeit und vergleichbaren, obgleich überlagerten, Massenspektren ebenfalls Steroidstrukturen zugrunde liegen könnten.

Bei der GC-MS-Messung von Fraktion „MPLC_Fr48“ ließ sich neben den Fettsäuren Palmitin-, Linol-, Stearin- und Acharinsäure auch Stigmasta-3,5-dien-7-on (synonym: Tremulon) nachweisen. Zwischen 20 und 28 min deuten die Massenspektren auf weitere, per Datenbank nicht identifizierte, triterpenoide Strukturen hin.

Tab. 8-26: Datenbankzuordnung von GC-MS-Peaks der Fraktionen „MPLC_Fr7“, „MPLC_Fr36“ und „MPLC_Fr48“

Zeit [min] u. Trefferübereinstimmung			Substanz	Erhaltene Massenspektren
A: „MPLC_Fr7“	B: „MPLC_Fr36“	C: „MPLC_Fr48“		
15,58 (95%)			Pentadecansäure	A: Abb. Anhang 12-6
17,10 (98%)	16,53 (97%)	16,72 (98%)	Palmitinsäure	A: Abb. Anhang 12-7 B: Abb. Anhang 12-14 C: Abb. Anhang 12-20
18,61 (90%)	18,15 (96%)	18,31 (94%)	Linolsäure	A: Abb. Anhang 12-8 B: Abb. Anhang 12-15 C: Abb. Anhang 12-21
18,77 (96%)		18,45 (97%)	Stearinsäure	A: Abb. Anhang 12-9 C: Abb. Anhang 12-22
20,25 (93%)	20,05* (52%)	20,09 (96%)	Arachinsäure	A: Abb. Anhang 12-10 B: Abb. Anhang 12-16 C: Abb. Anhang 12-23
26,66 (93%)	26,87* (64%)		Δ5-Ergostenol = 22-Dihydrobrassicasterol = 24-Methylcholesterol	A: Abb. Anhang 12-11 B: Abb. Anhang 12-17
27,80 (91%)	28,54 (91%)		Sitosterol (β- oder γ-)	A: Abb. Anhang 12-12 B: Abb. Anhang 12-18
		28,41 (95%)	Stigmasta-3,5-dien-7-on	C: Abb. Anhang 12-24

*überlagertes Spektrum in Fraktion „MPLC_Fr36“

8.8 Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen

8.8.1 Ergebnisse der CZE Fingerprint-Analytik

Zur CZE Fingerprint-Analytik von *D. sylv.* (Kapitel 7.4.2.2.2) wurden zunächst Referenzelektropherogramme aufgenommen, um die relativen Migrationszeiten der zu analysierenden Substanzen zu erhalten (Tab. Anhang 13-1, Beispielmessung: Abb. 8-32). Die durchschnittlichen relativen Migrationszeiten betrugen 0,013 für Loganin, 0,305 für Chlorogensäure (CS) und 0,557 für (Kaffeesäure) KS.

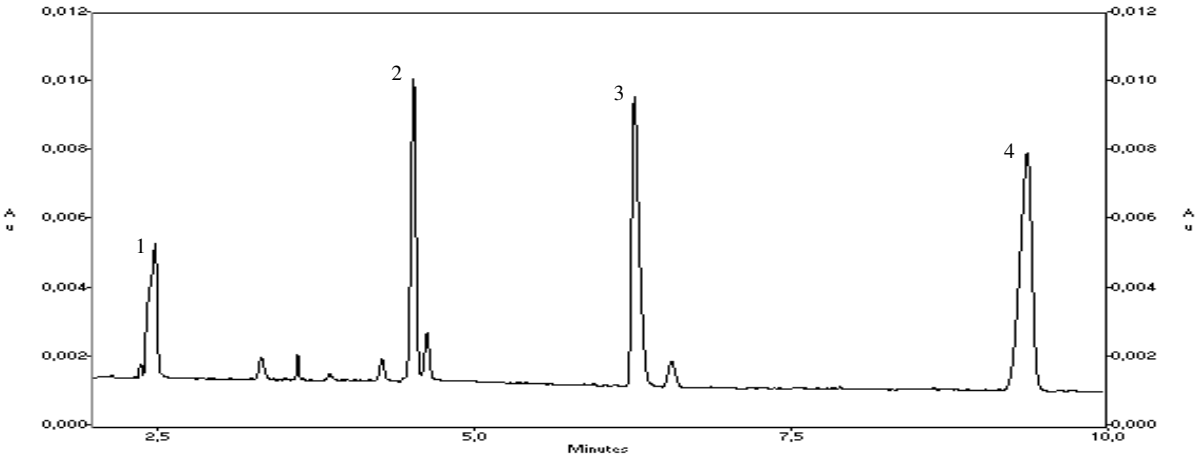


Abb. 8-32: CZE-Elektropherogramm vom Referenz-Gemisch „Ref_CE1“ bei 234 nm; 1 - Loganin, 2 - CS, 3 - KS, 4 - PS; Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,6, 45 mmol/l, 15 °C, 18 kV, 10 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster

Anschließend wurden die Proben DS_fW_CE1“, „DS_WD_CE1“ und „DA_CE1“ unter identischen Bedingungen vermessen (Elektropherogramme in Abb. 8-33, Abb. 8-34 und Abb. 8-35). Durch Zusatz des internen Standards PS konnte in den Elektropherogrammen auf die absoluten Migrationszeiten der Substanzen Loganin und CS zurückgerechnet - bei *D. sylv.* („DS_fW_CE1“ und „DS_WD_CE1“) auch auf die der KS – werden. Dadurch konnten die entsprechenden Peaks identifiziert werden (Tab. Anhang 13-2). Die maximale Abweichung der gemessenen absoluten Migrationszeiten der Substanzen von den berechneten Zeiten betrug 1,86 %. Der Abgleich der UV-Spektren der Peaks mit denen des Referenzspektrums sowie die Untersuchung der Elektropherogramme bei 330 nm (Abb. Anhang 13-1, Abb. Anhang 13-2, Abb. Anhang 13-3) bestätigten die Zuordnung der Substanzen.

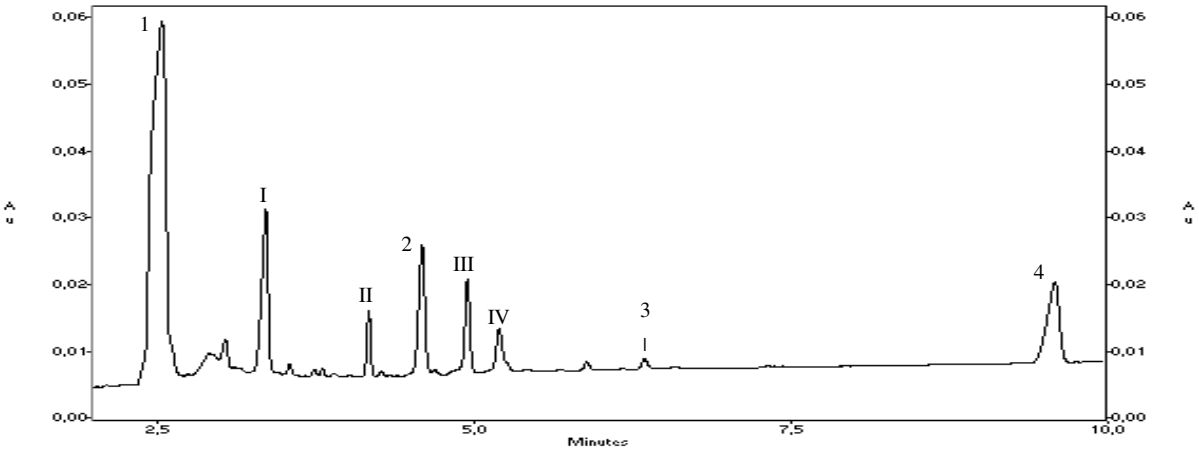


Abb. 8-33: CZE-Elektropherogramm vom „DS_fW_CE1“ bei 234 nm; 1 - Loganin-haltiger „Neutralpeak“, weitere Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32, zusätzlich: I - IV = unbekannte Peaks

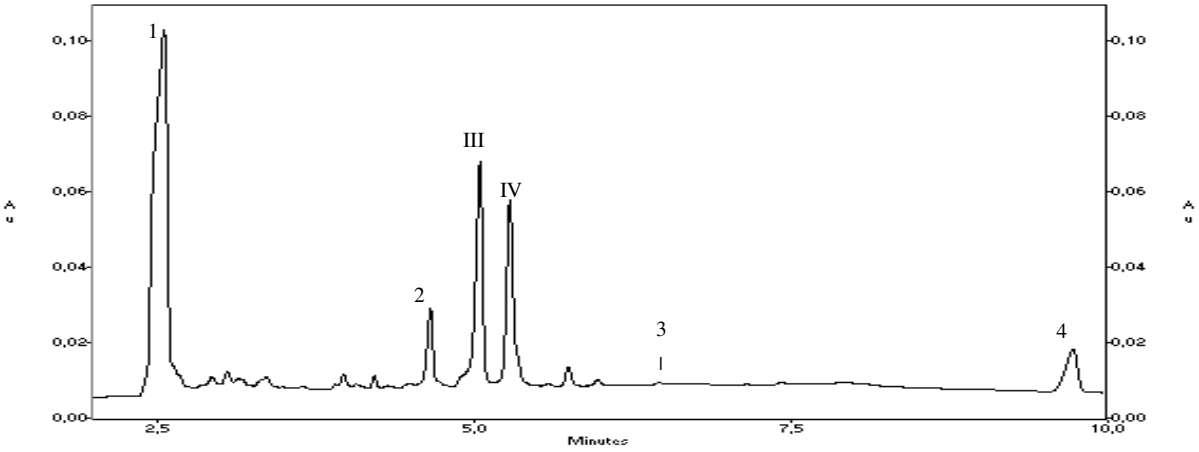


Abb. 8-34: CZE-Elektropherogramm vom „DS_WD_CE1“ bei 234 nm; 1 - Loganin-haltiger „Neutralpeak“, weitere Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32, zusätzlich: III - IV = unbekannte Peaks

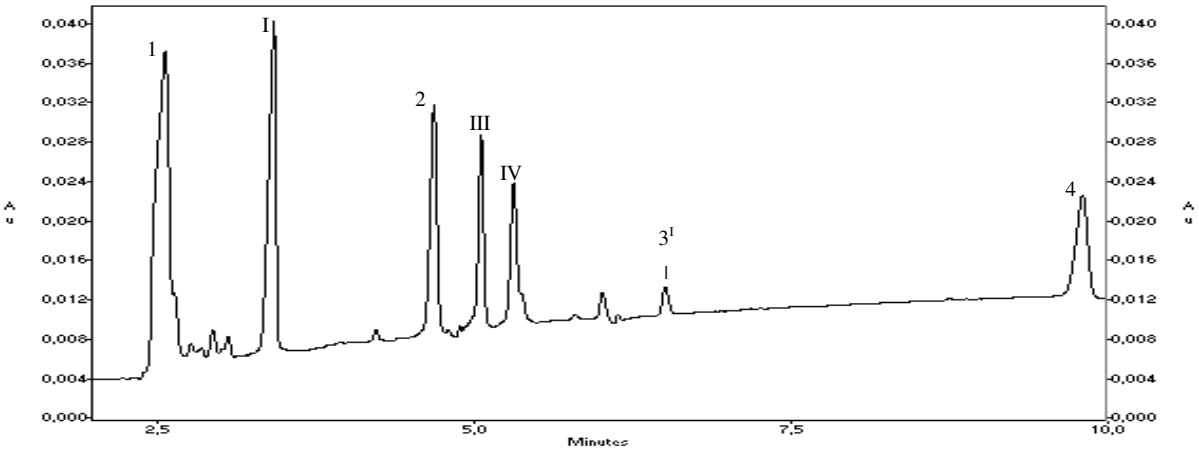


Abb. 8-35: CZE-Elektropherogramm vom „DA_CE1“ bei 234 nm; 1 - Loganin-haltiger „Neutralpeak“, 3^{I} - unbekannter Peak, weitere Bezifferung und Trennbed. siehe Abb. 8-32, zusätzlich: I, III - IV = unbekannte Peaks

Die erhaltenen Elektropherogramme ermöglichten einen Überblick sowie die Unterscheidung der drei Extrakte über das Fingerprint-Muster. Eine scharfe Auftrennung phenolischer Substanzen wie CS und KS wurde erreicht. Im Elektropherogramm der frischen, einjährigen *D. sylv.*-Wurzel „DS_fW_CE1“ finden sich zwei große Peaks „I“ und „II“ zwischen dem Loganin-haltigen „Neutralpeak“, der sämtliche ungeladenen Verbindungen enthält, und der CS. Diese beiden Peaks fehlen in der Wurzel der blühenden Pflanze im zweiten Jahr „DS_WD_CE1“. Im Elektropherogramm der chinesischen Droge „DA_CE1“ fehlt der zweite dieser beiden Peaks „II“

8.8.2 Ergebnisse der MEKC Fingerprint-Analytik

Zunächst wurde wie in Kapitel 7.4.2.3.2 beschrieben das Referenzgemisch „Ref_CE1“ mittels MEKC-Methode vermessen (Abb. 8-36).

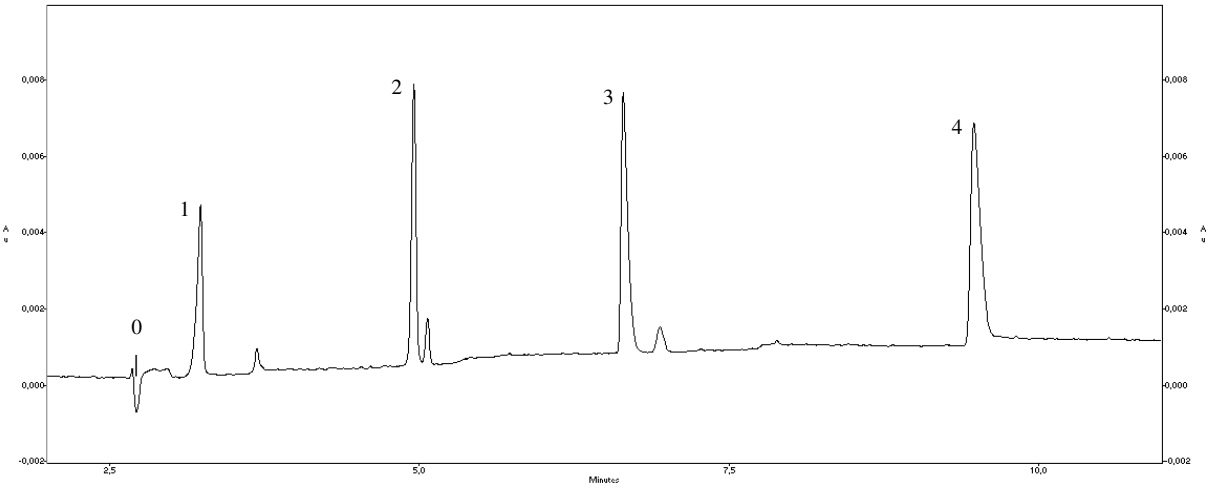


Abb. 8-36: MEKC-Elektropherogramm von „Ref_CE1“ bei 234 nm; 0 - MeOH, 1 - Loganin, 2 - CS, 3 - KS, 4 - PS; Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,4, 45 mmol/l, 20 mmol/l SDS-Zusatz, 30 °C, 12 kV, 11 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster

Dadurch ließen sich die relativen Migrationszeiten der Referenzen im Vergleich zum internen Standard PS sowie deren Standardabweichung berechnen (Tab. Anhang 13-3). Die durchschnittlichen relativen Migrationszeiten betrugen 0,076 für Loganin, 0,330 für CS und 0,581 für KS. Ebenso wurden Vergleichs-UV-Spektren der Referenzen erhalten. Die zeitliche Reihenfolge der einzelnen Referenzsubstanzen im Referenz-Gemisch „Ref_CE1“ wurde vorher durch Einzelmessungen der Substanzlösungen bestimmt. Das in den Proben enthaltene MEOH ergab durch seine geringere Absorption bei 234 nm im Vergleich zur Pufferlösung einen deutlichen negativen Peak, der die Totzeit markiert.

Unter identischen Bedingungen wurden die Probengemische „DS_fW_CE1“, „DS_WD_CE1“ und „DA_CE1“ vermessen (Abb. 8-37, Abb. 8-38 und Abb. 8-39). In diesen wurden mithilfe ihrer relativen Migrationszeit die zu identifizierenden Inhaltsstoffe Loganin und CS, bei *D. sylv.* auch KS, zugeordnet (Tab. Anhang 13-4). Die maximale Abweichung der gemessenen absoluten Migrationszeiten der drei Substanzen von den aus der relativen

Migration berechneten Zeiten betrug 1,07 %. Ein Vergleich der jeweiligen UV-Spektren mit den aus dem Referenzgemisch extrahierten Spektren sicherte die Zuordnung ab (UV-Spektren der Referenzmessung von „Ref_CE1“ siehe Abb. Anhang 13-4). Wie bei der CZE-Methode wurden die Elektropherogramme bei 330 nm betrachtet (Abb. Anhang 13-5, Abb. Anhang 13-6 und Abb. Anhang 13-7). Dadurch konnte die Zuordnung phenolischer Substanzen abgesichert werden. Für die weiteren unbekannten Peaks aus Abb. 8-37 bis Abb. 8-39 wurden die relativen Retentionen berechnet (Tab. Anhang 13-5) und UV-Spektren aufgezeichnet.

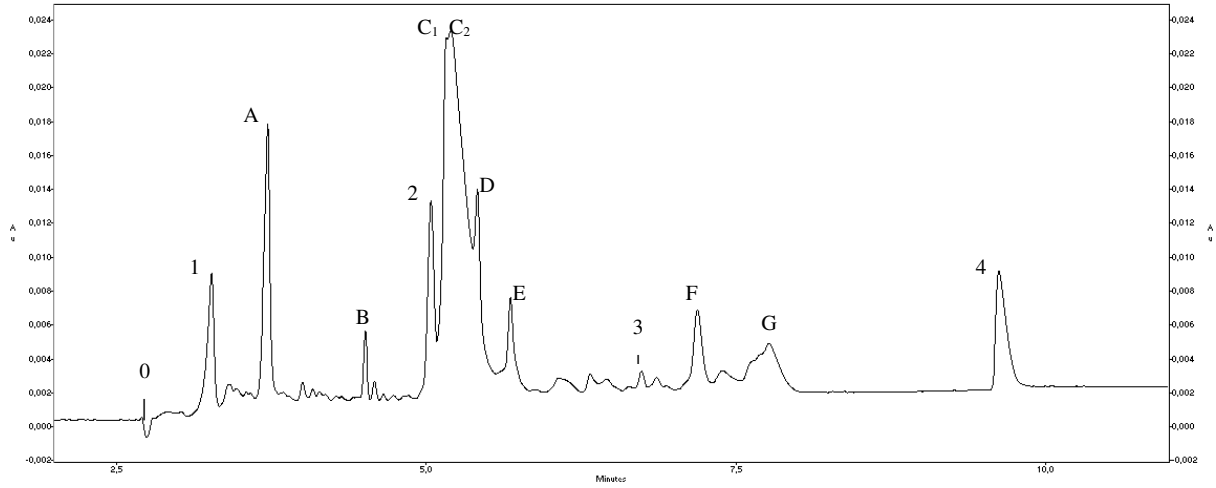


Abb. 8-37: MEKC-Elektropherogramm von „DS_fW_CE1“ bei 234 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-36, zusätzlich: A - G = unbekannte Peaks

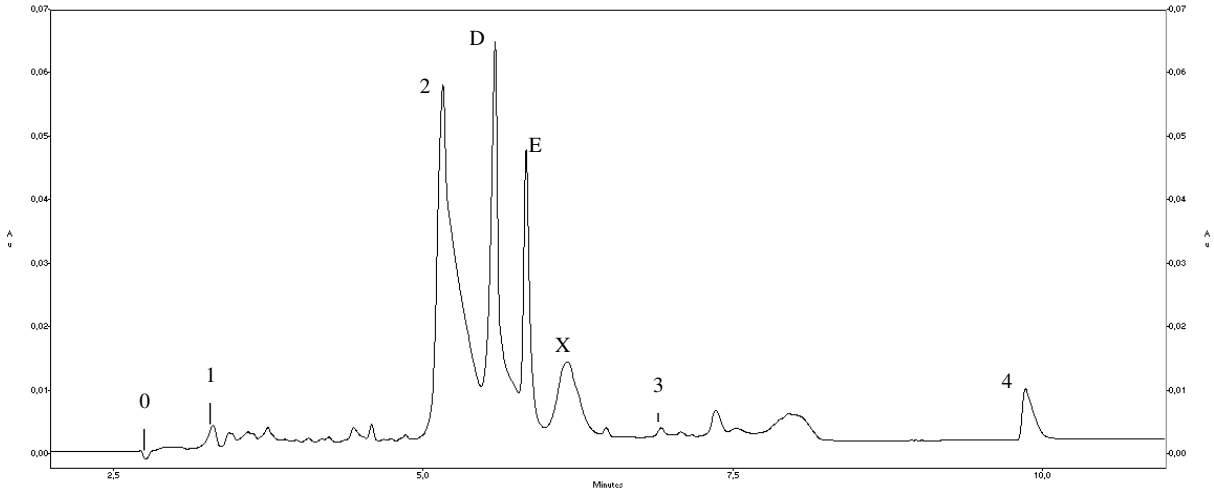


Abb. 8-38: MEKC-Elektropherogramm von “DS_WD_CE1“ bei 234 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-36, zusätzlich: D, E, X = unbekannte Peaks

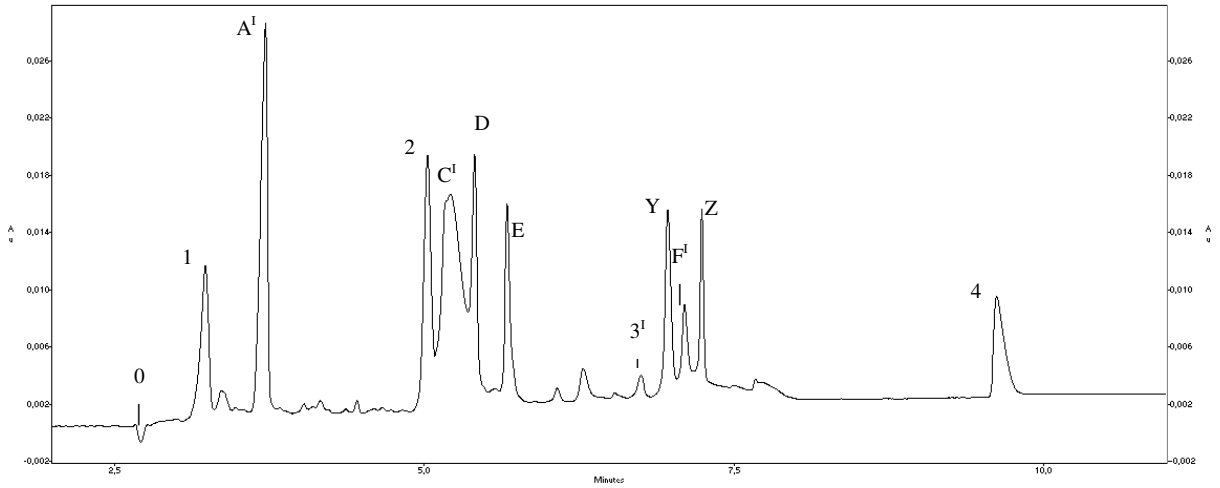


Abb. 8-39: MEKC-Elektropherogramm von „DA_CE1“ bei 234 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-36, zusätzlich: A^I, C^I, D, E, 3^I, Y, F^I, Z = unbekannte Peaks

8.8.3 Ergebnisse der MEKC Quantifizierung

Nach der erreichten Auftrennung der Fingerprint MEKC-Methode wurden einige charakteristische Substanzen aus *Dipsacus* quantifiziert. Die Fingerprint-Methode wurde dazu nochmals modifiziert (Kapitel 7.4.2.3.3). Gegen den inneren Standard PS wurden die Iridoide Loganin und Cantleyosid sowie die Phenolcarbonsäuren KS und CS quantifiziert.

Mithilfe von acht Referenzgemischen verschiedener Konzentration konnten Chromatogramme erhalten werden. Daraus wurden nach Nachweis der Linearität im Messbereich Kalibriergeraden von den zu quantifizierenden Verbindungen erstellt. Die aus den Chromatogrammen erhaltenen Peakflächen wurden mittels Division durch ihre Migrationszeit korrigiert. Von den erhaltenen Chromatogrammen ist stellvertretend die Messung des Referenzgemischs „Ref_CE2_3“ in Abb. 8-40 und Abb. 8-41 dargestellt. Die erhaltenen Kalibriergeraden finden sich im Anhang: für Loganin, Cantleyosid, KS und CS siehe Abb. Anhang 13-8 bis Abb. Anhang 13-11 und für die Referenz PS Abb. Anhang 13-12. Je nach Substanz wurde bei drei Messungen pro Konzentration ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,9484 bis 0,9977 für die Kalibriergeraden erhalten.

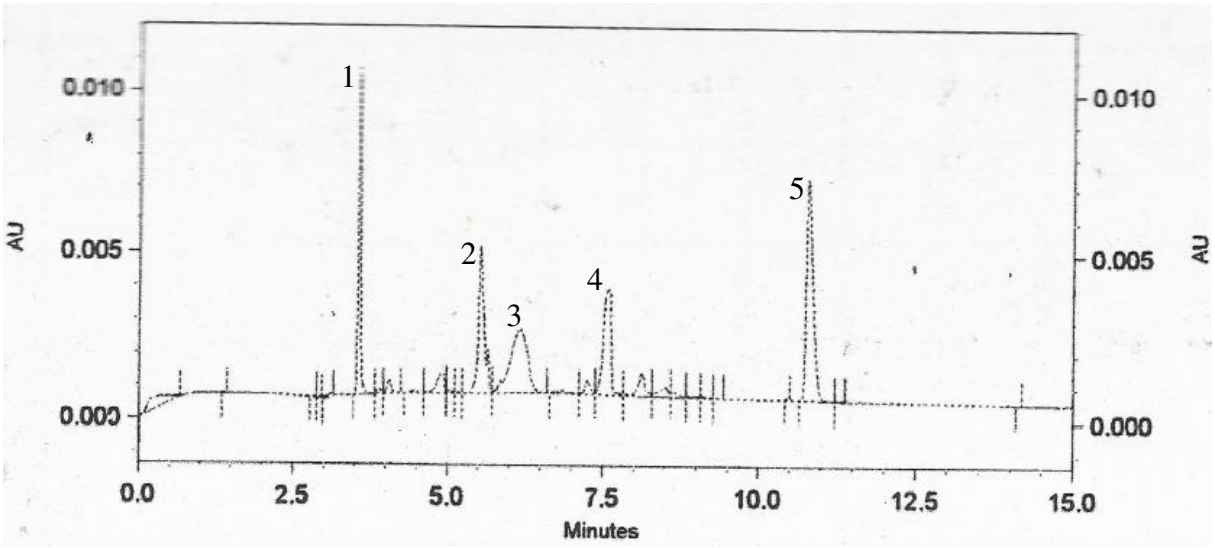


Abb. 8-40: MEKC-Elektropherogramm vom Referenz-Gemisch „Ref_CE2_3“ bei 234 nm; 1 - Loganin, 2 - CS, 3 - Cantleyosid, 4 - KS, 5 - PS; Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,4, 45 mmol/l, SDS-Zusatz 20 mmol/l, 25 °C, 12 kV, 15 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster

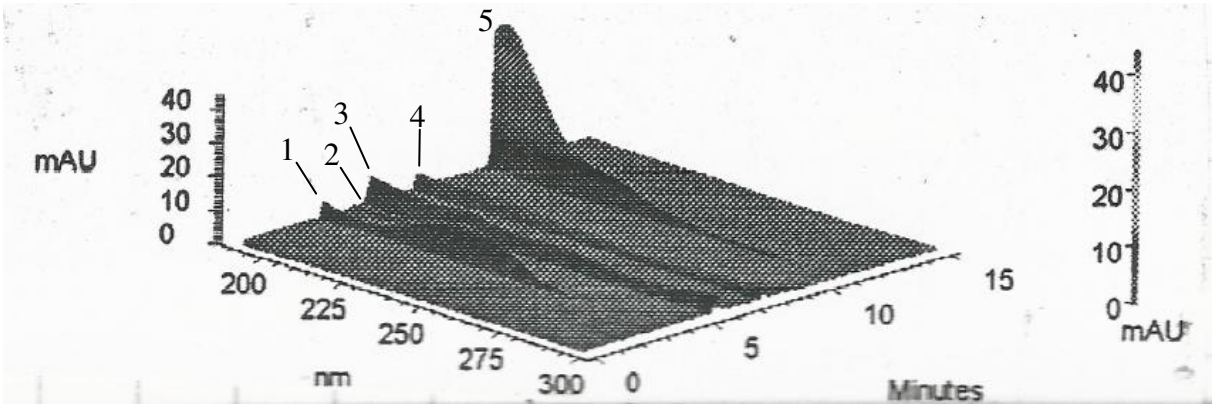


Abb. 8-41: MEKC-Elektropherogramm vom Referenz-Gemisch „Ref_CE2_3“ in PDA-Ansicht von 190 bis 300 nm; 1 - Loganin, 2 - CS, 3 - Cantleyosid, 4 - KS, 5 - PS; Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,4, 45 mmol/l, SDS-Zusatz 20 mmol/l, 25 °C, 12 kV, 15 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster

Aus den verdünnten SL „DS_fW_MeOH-TE_CE“-Lösung, „DS_WD_MeOH-TE_CE“-Lösung und „DA_MeOH-TE_CE“-Lösung wurden die korrigierten Peakflächen von Loganin, Cantleyosid, KS, CS und dem internen Standard PS bestimmt. Nach Mittelwertbildung aus mehreren Messungen wurden die Gehalte im Extrakt und deren Standardabweichung berechnet:

$$c_{Subst} = \frac{A(korr)_{Subst}}{A(korr)_{PS}} \times \frac{m_{PS}}{m_{Subst}} \times c_{PS} \qquad \textbf{(Formel 8)}$$

c_{Subst} = Konzentration des zu bestimmenden Inhaltsstoffes, c_{PS} = eingesetzte Konzentration an PS, $A(korr)_{Subst}$ = korrigierte Peakfläche des zu bestimmenden Inhaltsstoffes, $A(korr)_{PS}$ = korrigierte Peakfläche von PS, m_{Subst} = Anstieg der Kalibiriergeraden des zu bestimmenden Inhaltsstoffes, m_{Subst} = Anstieg der Kalibiriergeraden von PS

Ausgehend von einer annähernd vollständigen Extraktion durch MeOH bei der Herstellung der CE-Extrakte wurde durch Division durch das DEV auf die Stoffkonzentration in der Droge zurückgerechnet (Tab. 8-27):

Tab. 8-27: Gehaltsbestimmung ausgewählter Inhaltsstoffe von *Dipsacus* mittels MEKC

	MeOH-Extrakt *D. sylv.* (1. Kultivierungsjahr) (n=3) DEV 4,15 : 1			**MeOH-Extrakt *D. sylv.* (2. Kultivierungsjahr) (n=4) DEV 6,89 : 1**			**MeOH-Extrakt *D. asp.* (n=4) DEV 2,11 : 1**			**Relative Migrations-zeit zum internen Standard PS**
Substanz	**c [mg/ml] im Extrakt**	**c [%] im Extrakt**	**c [%] in der Droge**	**c [mg/ml] im Extrakt**	**c [%] im Extrakt**	**c [%] in der Droge**	**c [mg/ml] im Extrakt**	**c [%] im Extrakt**	**c [%] in der Droge**	
Loganin	0,111 ± 0,003	1,10	0,27 ± 0,01	0,035 ± 0,002	0,35	0,05 ± 0,00	0,109 ± 0,008	1,08	0,51 ± 0,04	0,340 ± 0,017
	d.h. 0,284 mmol/l im Extrakt			d.h. 0,089 mmol/l im Extrakt			d.h. 0,278 mmol/l im Extrakt			
CS	0,141 ± 0,011	1,40	0,34 ± 0,03	0,255 ± 0,014	2,54	0,37 ± 0,02	0,127 ± 0,011	1,26	0,60 ± 0,05	0,533 ± 0,021
	d.h. 0,397 mmol/l im Extrakt			d.h. 0,721 mmol/l im Extrakt			d.h. 0,358 mmol/l im Extrakt			
Cantleyosid	0,427 ± 0,033	4,26	1,03 ± 0,08	0,754 ± 0,054	7,51	1,09 ± 0,08	0,361 ± 0,033	3,60	1,71 ± 0,016	0,581 ± 0,016
	d.h. 0,573 mmol/l im Extrakt			d.h. 1,010 mmol/l im Extrakt			d.h. 0,484 mmol/l im Extrakt			
KS	0,012 ± 0,001	0,12	0,03 ± 0,00	-	-	-	-	-	-	0,699 ± 0,045
	d..h. 0,065 mmol/l im Extrakt									

Die höchsten Loganin-Konzentrationen fanden sich in der frisch verarbeiteten, einjährigen *D. sylv.*-Wurzel und in *D. asp.*. Das Bis-Iridoid Cantleyosid war in der im zweiten Vegetationsjahr geernteten Pflanze etwas höher konzentriert als in der einjährigen. Am höchsten war es in *D. asp.* konzentriert. Unter Einbeziehung der molaren Massen lag das molare Verhältnis von Loganin (390,4 g/mol) zu Cantleyosid (746,3 g/mol) bei der einjährigen *D. sylv.* bei etwa 1 : 2. Bei der zweijährigen *D. sylv.* lag es dagegen bei etwa 1 : 11 und bei *D. asp.* bei etwa 1 : 1,8. CS war in den beiden *D. sylv.*-Proben fast gleich konzentriert und in *D. asp.* deutlich mehr enthalten. KS war nur in der frisch verarbeiteten, einjährigen *D. sylv.*-Wurzel messbar.

8.9 Ergebnisse der Untersuchung auf bakterienwachstumshemmende Aktivitäten

Jeweils aus der gezählten Anzahl Individuen pro Kultur und der entsprechenden Verdünnung wurden für jeden der vier Zähltage (Tag 0, 1, 4 und 8) die gemittelten Borrelienkonzentrationen und deren Standardabweichung berechnet (Tab. Anhang 15-2 bis Tab. Anhang 15-21). Mittels zweiseitigem T-Test wurde überprüft, ob sich der erhaltene Konzentrationsmittelwert von der jeweiligen Kontrolle unterschied. In zehn verschiedenen, jeweils für die Reproduzierbarkeit wiederholten Messreihen, wurden verschiedene Kontrollen, Extrakte und Reinstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht.

8.9.1 Untersuchung von Medium, Kontrollen und Lösungsvermittlern

Zunächst wurde das Borrelienwachstum in reinem BSK-II-Medium („Kontrolle_1“) mit dem Wachstum in BSK-II-Medium mit Zusatz von jeweils fünf Prozent

- destilliertem H_2O („Kontrolle_2“)
- 2,5 %-iger wässriger PS80-Lösung
- 5 %-iger wässriger PS80-Lösung („PS80-BSK-II-Medium“)
- 2,5 %-iger wässriger DMSO-Lösung
- 5 %-iger wässriger DMSO-Lösung

verglichen. Zusätzlich wurde das Borrelienwachstum in mit 0,5 µg/ml Amoxicillin versetztem „PS80-BSK-II-Medium“ beobachtet. Beide Experimente wurden für die Absicherung der Reproduzierbarkeit doppelt ausgeführt.

Die *Bb*ss-Kulturen der „Kontrolle_1“ zeigten ein den Vorversuchen äquivalentes Wachstum über die acht Zähltage (Abb. 8-42, Abb. Anhang 16-1). In den ersten vier Tagen erhöhte sich die Konzentration deutlich (exponentielle Phase), während die Kulturen bis zum achten Tag in die stationäre Phase übergingen. Die Kulturen der „Kontrolle_2“ (Zusatz von 5 % Wasser zum Medium) zeigten ein der „Kontrolle_1“ (reines Medium) ähnliches Wachstumsverhalten, auch wenn die erreichten Konzentrationen an Tag eins und vier etwas unter denen der Kontrolle lagen. Das durch die Verdünnung mit Wasser suboptimale Medium führte zu einer etwas langsamer ansteigenden Individuenzahl pro ml. Trotzdem wurde nach acht Tagen nahezu die gleiche Endkonzentration erreicht (kein signifikanter Unterschied gegenüber der „Kontrolle_1“ mit reinem Medium).

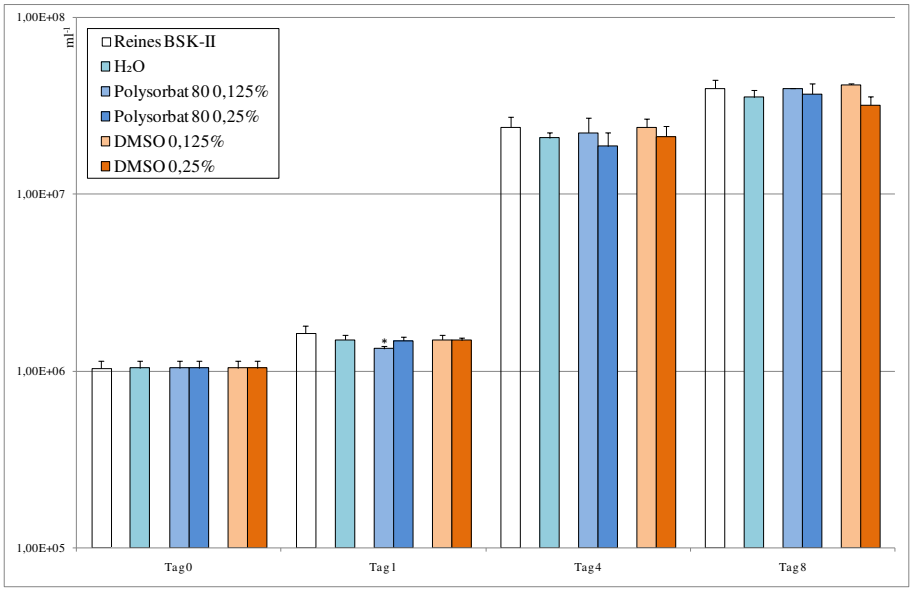


Abb. 8-42: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Aqua dest., PS80 und DMSO an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Die mit wässrigen Lösungen der Lösungsvermittler DMSO und PS80 versetzten Kulturen werden nachfolgend betrachtet. Die durch Zusatz von jeweils 2,5 und 5 %-iger wässriger Lösung enthaltenen Kulturen mit den Endkonzentrationen 0,125 und 0,25 % Lösungsvermittler zeigten gegenüber der „Kontrolle_1“ ein leicht verzögertes Wachstum. Auch hier war die Verdünnung des Mediums eine bedeutende Ursache, da das Wachstum gegenüber der als Referenz relevanten „Kontrolle_2“ nahezu äquivalent erfolgte. Zusätzlich fand sich eine minimale, tendenziell konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, die aber nicht signifikant war. DMSO zeigte eine ähnliche oder sogar stärkere Hemmung als PS80. Da sich darüber hinaus viele der untersuchten Extrakte und Reinstoffe mithilfe von PS80 besser als mit DMSO in Lösung bringen ließen, wurde es als Lösungsvermittler für die Experimente eingesetzt.

Als Positivkontrolle für die Wachstumshemmung wurde das auch therapeutisch eingesetzte Antibiotikum Amoxicillin getestet (Abb. 8-43, Abb. Anhang 16-2): Schon am ersten Zähltag war die Borrelienkonzentration der Kulturen gegenüber dem Start minimal rückläufig und gegenüber ihrer Kontrolle in „PS80-BSK-II-Medium“ statistisch signifikant niedriger. Am Zähltag vier waren im unverdünnten Medium mikroskopisch nur noch wenige, am Zähltage

acht praktisch keine Borrelien mehr zu erkennen. Auch hier war die Wachstumshemmung statistisch signifikant.

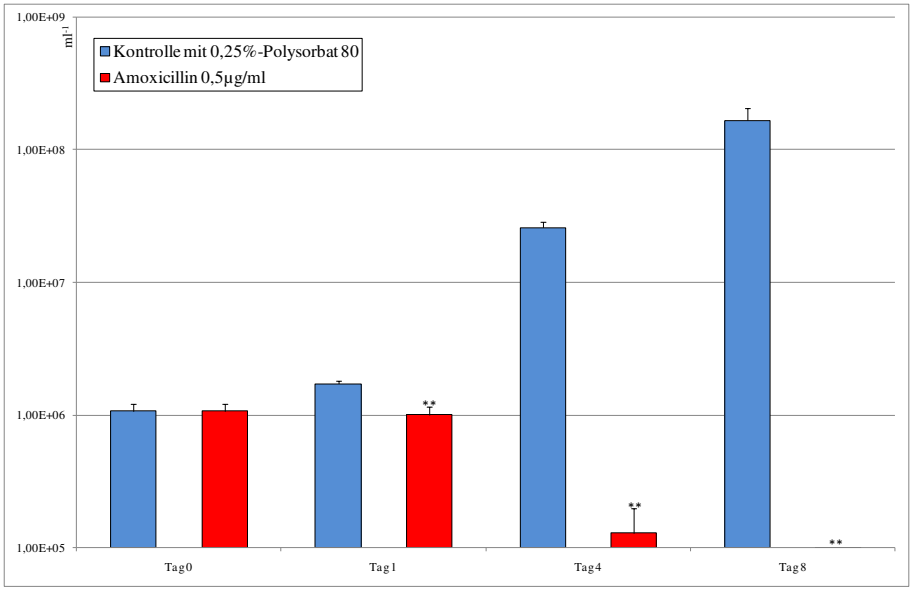


Abb. 8-43: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in „PS80-BSK-II-Medium“ und solchem mit Zusatz von Amoxicillin an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Zusätzlich zu den halblogarithmischen Darstellungen wurde für die bessere Vergleichbarkeit der Kulturen innerhalb eines Zähltages eine relative Darstellung der Konzentrationen erstellt (Abb. 8-44). Die Konzentrationsmittelwerte aller getesteten Ansätze und ihrer Wiederholungen sind in prozentualem Bezug zu der „Kontrolle_1“ (*Bb*ss in reinem BSK-II-Medium) des jeweiligen Messtages dargestellt. Ein Vergleich der absoluten Borrelienkonzentrationen zwischen den Tagen lässt sich mit dieser Darstellung nicht ziehen. Deutlich besser als in den halblogarithmischen Diagrammen lassen sich hier die Standardabweichungen der Messwerte und der Einfluss der zugesetzten Extrakte erkennen.

Insgesamt zeigte sich, dass die gewählten Versuchsbedingungen es ermöglichten, ein typisches Kulturwachstum zu simulieren. Die Positivkontrolle Amoxicillin bewies mit der stark sinkenden Individuenzahl, dass sich die gewählten Versuchsbedingungen als Modell für die Wachstumshemmung eignen. Der Zusatz geringer Mengen Fremdsubstanz, untersucht wurden fünf Prozent, störte das Wachstum praktisch nicht.

Um später genaue Vergleiche der Extrakteffekte ermöglichen zu können, wurde in jeder Versuchsreihe mindestens eine Mediumkontrolle untersucht. Bei Extrakten, die in „PS80-BSK-II-Medium“ gelöst wurden, kam als Kontrolle ebenfalls „PS80-BSK-II-Medium“ zum Einsatz. Bei in Aqua dest. gelösten Extrakten wurde als Kontrolle BSK-II-Medium mit Zusatz von fünf Prozent H_2O verwendet.

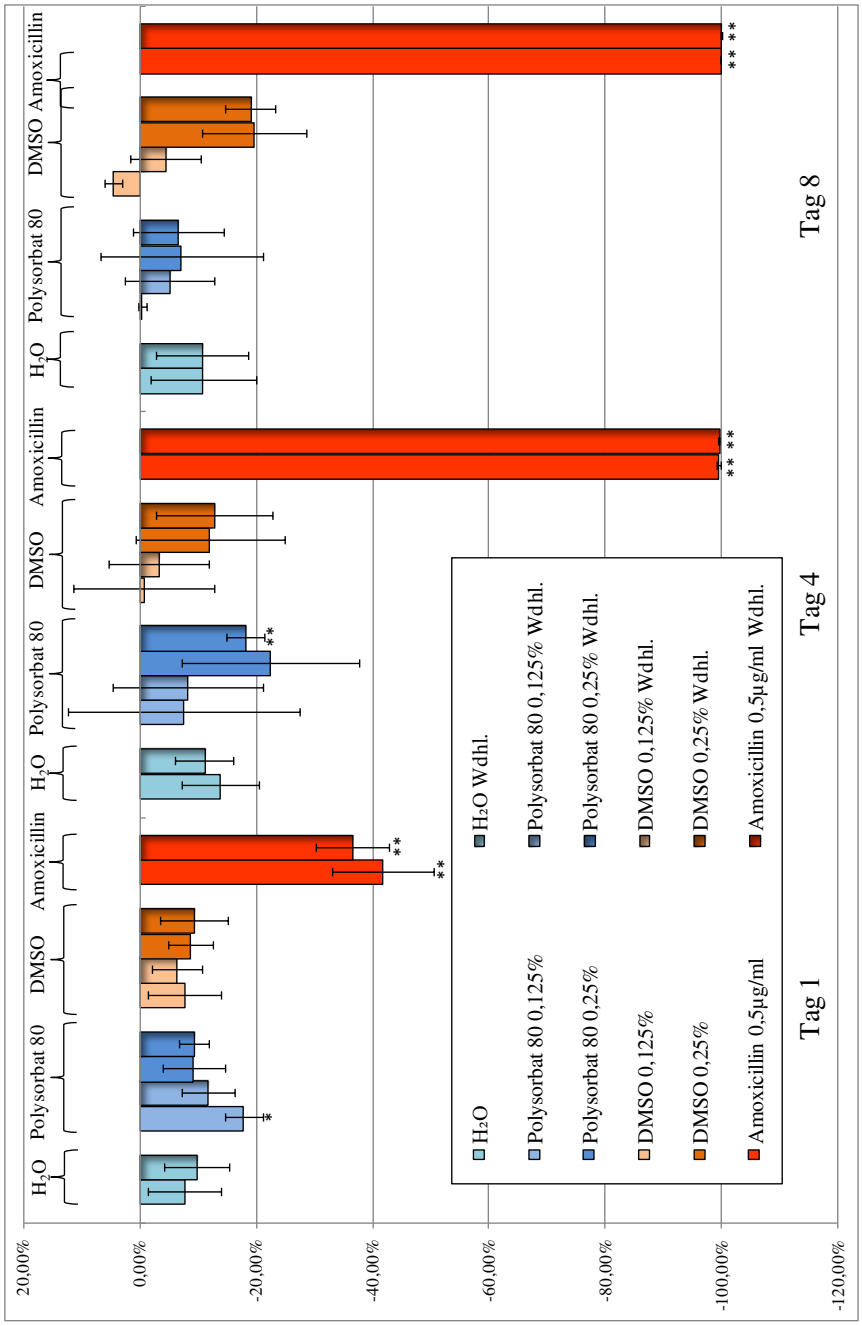


Abb. 8-44: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit H_2O, PS80, DMSO sowie Amoxicillin + 0,25 % PS80 versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in reinem BSK-II-Medium. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

8.9.2 Untersuchung der fraktionierten Kardenextrakte

Nach den Vorversuchen zu Medium und Lösungsvermittlern wurden jeweils H_2O-, n-But-, EE-, DCM- und Hex-Extrakte aus dem hydroethanolischen Extrakt frischer Kardenwurzeln und aus dem MeOH-Extrakt geschnittener Kardenwurzeldroge im Borrelienmodell untersucht. Wiederum wurden alle Experimente für die Absicherung der Reproduzierbarkeit doppelt ausgeführt.

Zunächst wurden Ausschüttelungsphasen aus dem EtOH-H_2O-Extrakt untersucht. Die beiden polaren Extrakte („DS_fW_Frak-H_2O“ und „DS_fW_Frak-n-But“) zeigten am ersten Tag ein der jeweiligen Kontrolle ähnliches Wachstum (Abb. 8-45, Abb. Anhang 16-3). Am vierten Zähltag waren die *Bb*ss-Konzentrationen des H_2O-Extraktes denen der H_2O-Kontrolle ähnlich. Eine leichte, statistisch nicht signifikante Wachstumsverstärkung war im ersten Experiment für die Konzentrationen 0,2 und 0,02 mg/ml zu erahnen, im Wiederholungs-experiment jedoch nicht zu erkennen. Die *Bb*ss- Konzentrationen der n-But-Phase in niedriger und mittlerer Konzentration waren ähnlich denen der PS80-Kontrolle. In der höchsten Konzentration der n-But-Phase zeigte sich eine leichte Wachstumshemmung.

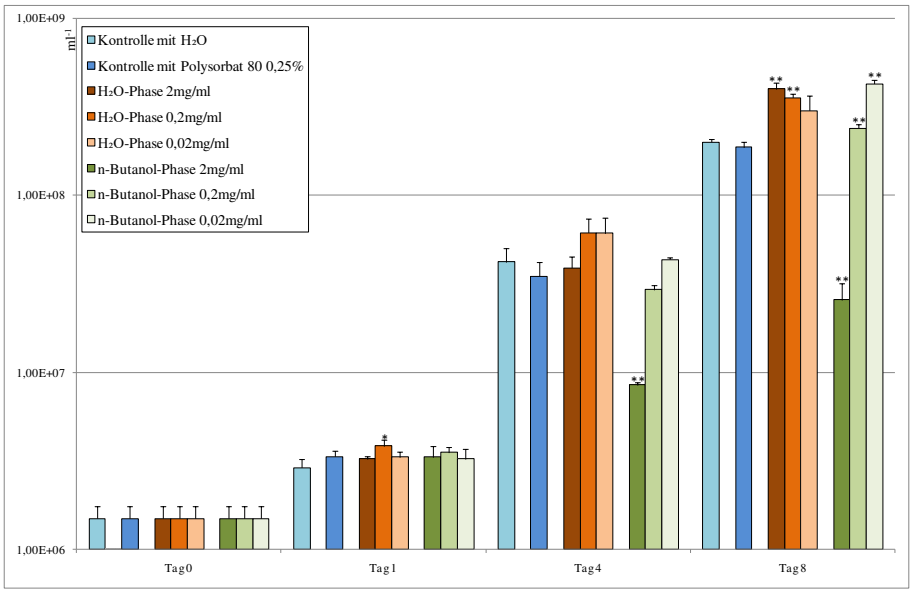


Abb. 8-45: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von PS80, H_2O- und n-But-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Am achten Zähltag zeigte sich bei beiden getesteten Extrakten ein interessanter Effekt: bis auf die n-But-Phase in höchster Konzentration führten alle zugegebenen Extrakte zu einer signifikant höheren Endkonzentration an *Bb*ss als die jeweilige Kontrolle. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt in der Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede (Abb. 8-46).

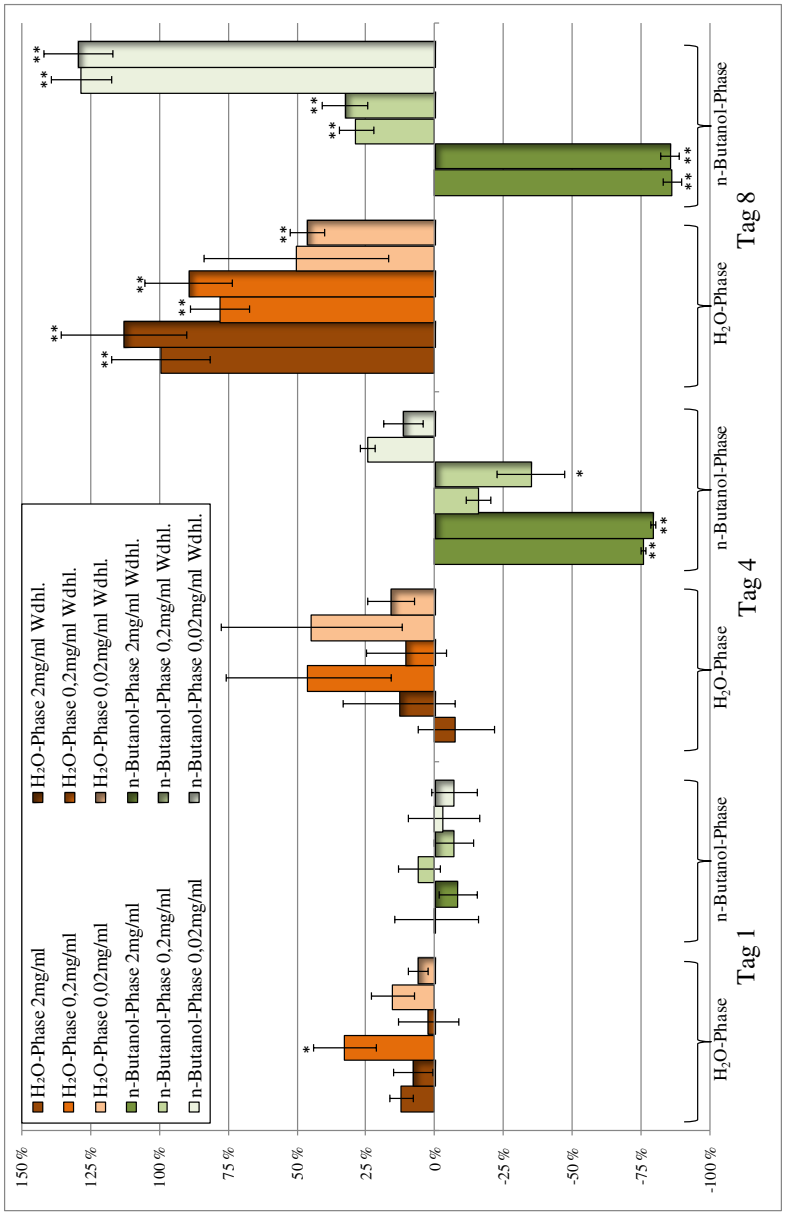


Abb. 8-46: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit H_2O- und n-But-Phase aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus H_2O-Zusatz (für die H_2O-Phase) bzw. plus PS80-Zusatz (für die n-But-Phase). Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Während die Borrelienkonzentrationen mit zunehmender Konzentration der H_2O-Phase stiegen, ließ sich bei der n-But-Phase der gegenteilige Effekt beobachten. In geringster Konzentration ergaben sich in der H_2O-Phase um 51 % bzw. 47 %, in mittlerer um 78 % bzw. 90 % und in höchster Konzentration um 100 % bzw. 113 % höhere Borrelienendkonzentrationen am achten Tag. Für die n-But-Phase ergaben sich für 0,02 mg/ml um 129 % bzw. 130 % und für 0,2 mg/ml um 29 % bzw. 33 % erhöhte Endkonzentrationen. In höchster Konzentration zeigte die n-But-Phase eine signifikante Hemmung des *Bb*ss-Wachstums um 85 % bis 86 % gegenüber der Kontrolle.

Als apolare Extrakte wurden die EE-, DCM- und Hex-Phasen („DS_fW_Frak-EE“, „DS_fW_Frak-DCM“ und „DS_fW_Frak-Hex“) aus dem EtOH-H_2O-Extrakt im Borrelienmodell getestet (Abb. 8-47, Abb. Anhang 16-4, Abb. 8-48). Am ersten Zähltag zeigten sich nur in den höchsten Extraktkonzentrationen statistisch relevante wachstumshemmende Effekte. Bei 0,2 und 0,02 mg/ml lag das Wachstum jeweils im Bereich der Kontrolle. Am vierten Zähltag waren die *Bb*ss-Konzentrationen bei den höchsten Extraktkonzentrationen statistisch signifikant gegenüber der Kontrollkultur vermindert (um mindestens 97,5%). Die EE- und die DCM-Phase (letztere nur in der Wiederholung) zeigten in mittlerer Konzentration (0,2 mg/ml) ebenfalls eine Wachstumshemmung (beim EE-Extrakt signifikant um 48,6 %

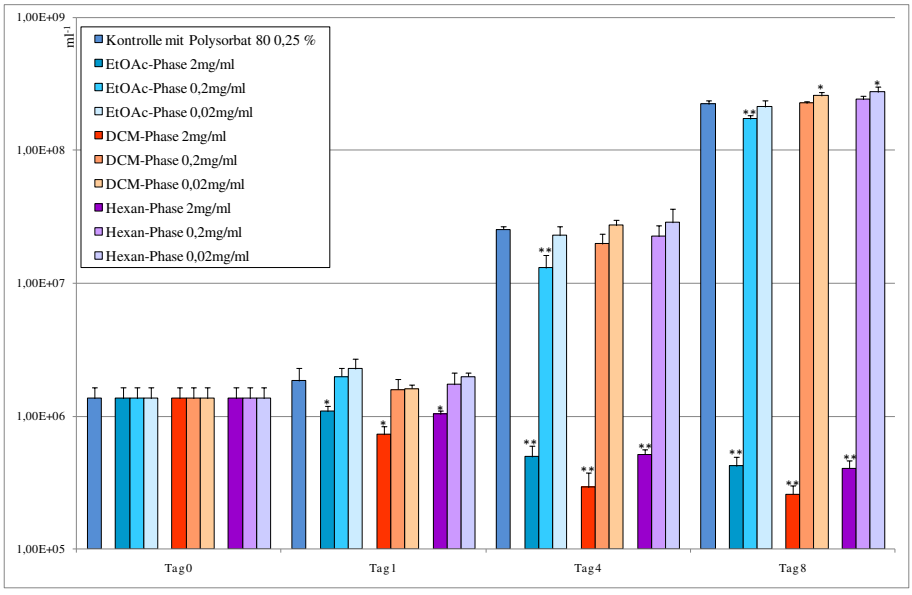


Abb. 8-47: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit EE-, DCM- und Hex-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

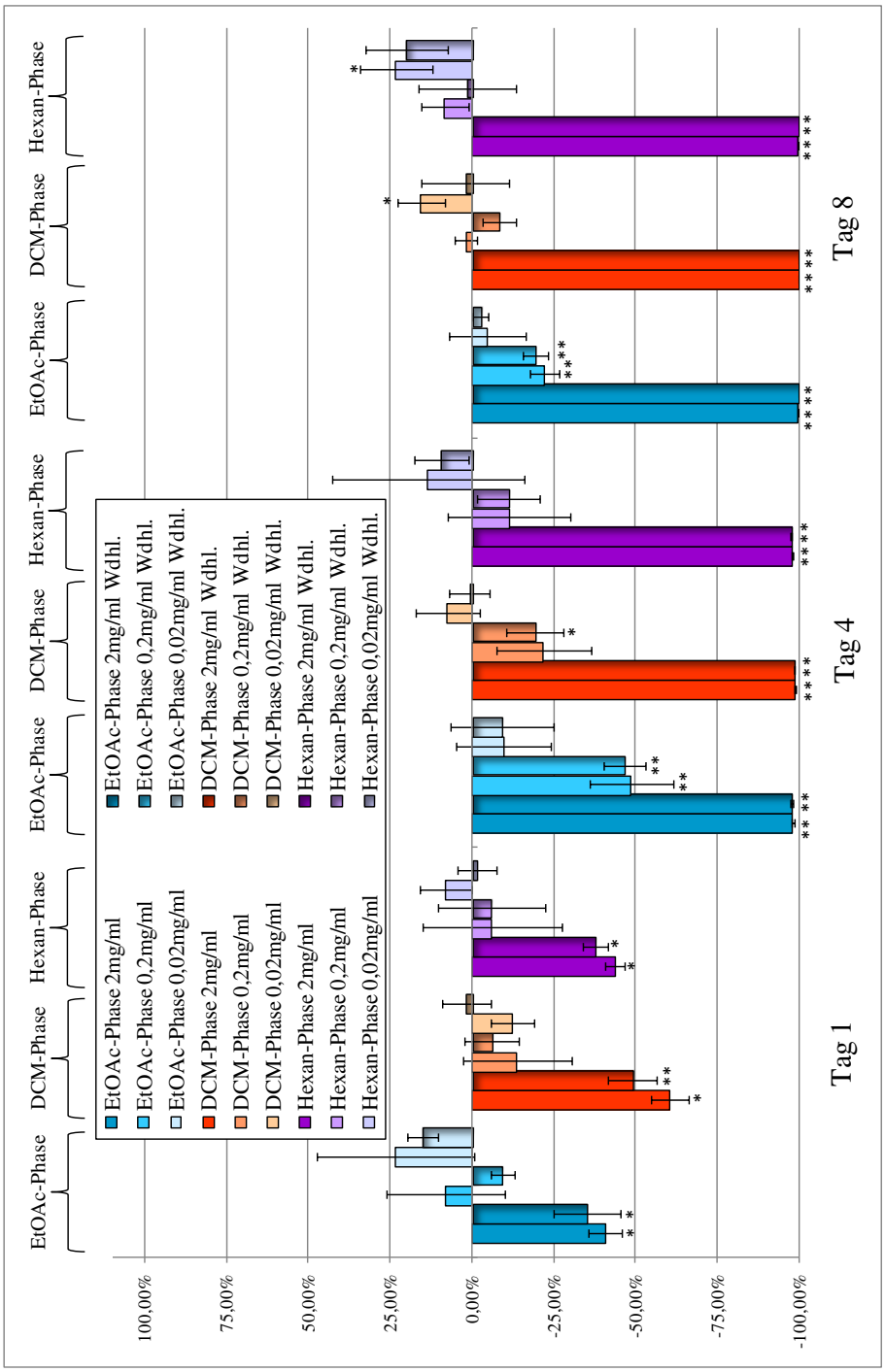


Abb. 8-48: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit EE-, DCM- und Hex-Phase aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

bzw. 46,5 %; beim DCM-Extrakt (Wiederholung) tendenziell um 19,2 %). Die anderen getesteten Extraktkonzentrationen waren statistisch nicht signifikant von der Kontrolle

verschieden. Am achten Zähltag war beim EE-Extrakt ein sehr deutlicher Effekt zu erkennen: Sowohl die hohe, als auch die mittlere Extraktkonzentration führten zu einer signifikant erniedrigten *Bb*ss-Konzentration (Reduktion der *Bb*ss-Konzentration im Vergleich zur Kontrollkultur um 99,8 % bei 2,0 mg/ml (d. h. nahezu keine *Bb*ss mehr nachweisbar) und 22,3 % bzw. 19,3 % bei 0,2 mg/ml). Beim DCM- und Hex-Extrakt wurde nur in der höchsten Konzentration eine signifikante Reduktion erhalten (99,9 % und 99,8 %). In niedrigeren Konzentrationen ergab sich kein Unterschied zur Kontrolle bzw. sogar eine tendenzielle Endkonzentrationserhöhung. Alle drei Extrakte zeigten in der höchsten Konzentration von 2 mg/ml bereits ab dem erstem Zähltag eine Reduktion der absoluten Borrelienkonzentration gegenüber den Startkulturen (Tag 0), die sich bis zum achten Zähltag jeweils verstärkte.

Zusätzlich zum fraktionierten EtOH-H_2O-Extrakt wurden Fraktionen aus einem MeOH-Extrakt aus der Droge im Borrelienmodell getestet. Die möglicherweise veränderte Aktivität der Fraktionen durch ein anderes Extraktionsverfahren sollte damit untersucht werden. Die Experimente wurden zur Absicherung der Ergebnisse wiederholt. Zunächst wurden H_2O- und n-But-Phasen („DS_WD_Frak-H_2O“ und „DS_WD_Frak-n-But“) untersucht (Abb. 8-49, Abb. Anhang 16-5).

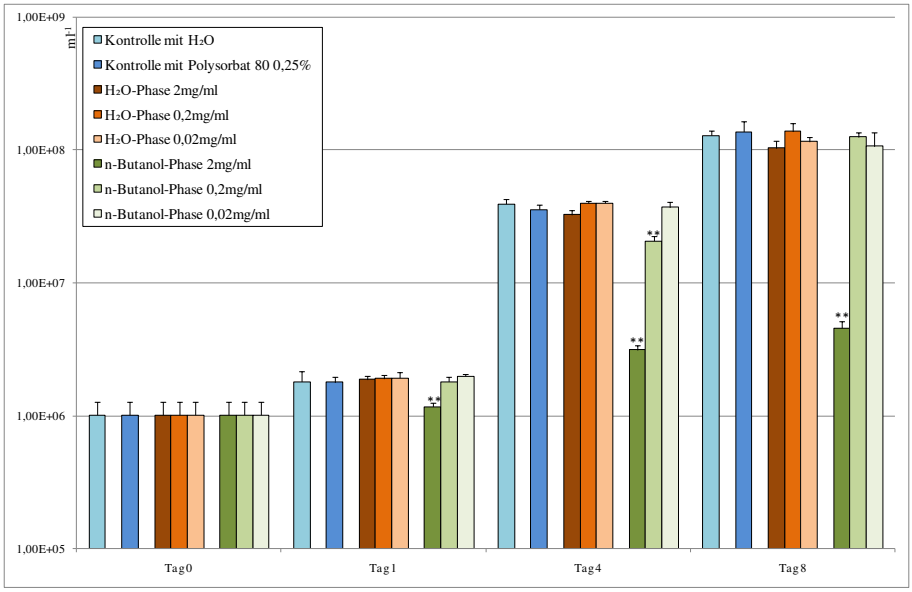


Abb. 8-49: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von PS80, H_2O- und n-But-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Am ersten Zähltag war beim n-But-Extrakt in hoher Konzentration (2 mg/ml) ein relevanter Unterschied zur Kontrolle sichtbar: Die erreichte Bbss-Konzentration lag signifikant ca. 34 % bzw. 32 % unter der Kontrolle. Die anderen Fraktionen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Am vierten Zähltag zeigten die Bakterienkulturen der n-But-Phase eine signifikante Wachstumshemmung in hoher (91 % bzw. 92 % Hemmung) und mittlerer (42 % bzw. 41 % Hemmung) Konzentration. Bei der H_2O-Phase war das Bild uneinheitlich. Es zeigte sich bei beiden Experimenten eine tendenzielle Wachstumshemmung um ca. 17 % in der höchsten Konzentration, die aber nur beim Wiederholungsexperiment statistisch relevant war. Am letzten Zähltag zeigte sich nur in der n-But-Phase mit 2 mg/ml eine signifikante Wachstumshemmung (97 % bzw. 96 %).

Insgesamt kam es auch in der n-But-Phase mit 2 mg/ml über die acht Testtage zu einem Anstieg der absoluten Individuenzahl. Minimale hemmende Tendenzen bei 0,2 und 0,02 mg/ml zeigten eine sehr hohe Streuung und waren ohne statistische Aussagekraft. Die H_2O-Phasen unterschieden sich nicht von der Kontrolle. In der relativen Darstellung (Abb. 8-50) sind Experiment und Wiederholung vergleichend dargestellt. Es zeigt sich ein sehr ähnliches Kulturverhalten für die einzelnen Extrakte. Die geringe Wachstumshemmung mit Ausnahme der n-But-Phase in höchster (und an Tag 4 mittlerer) Konzentration und deren teils hohe relative Standardabweichung bedingen die (statistisch) nicht vorhandenen Wachstumsunterschiede der *Bb*ss-Kulturen.

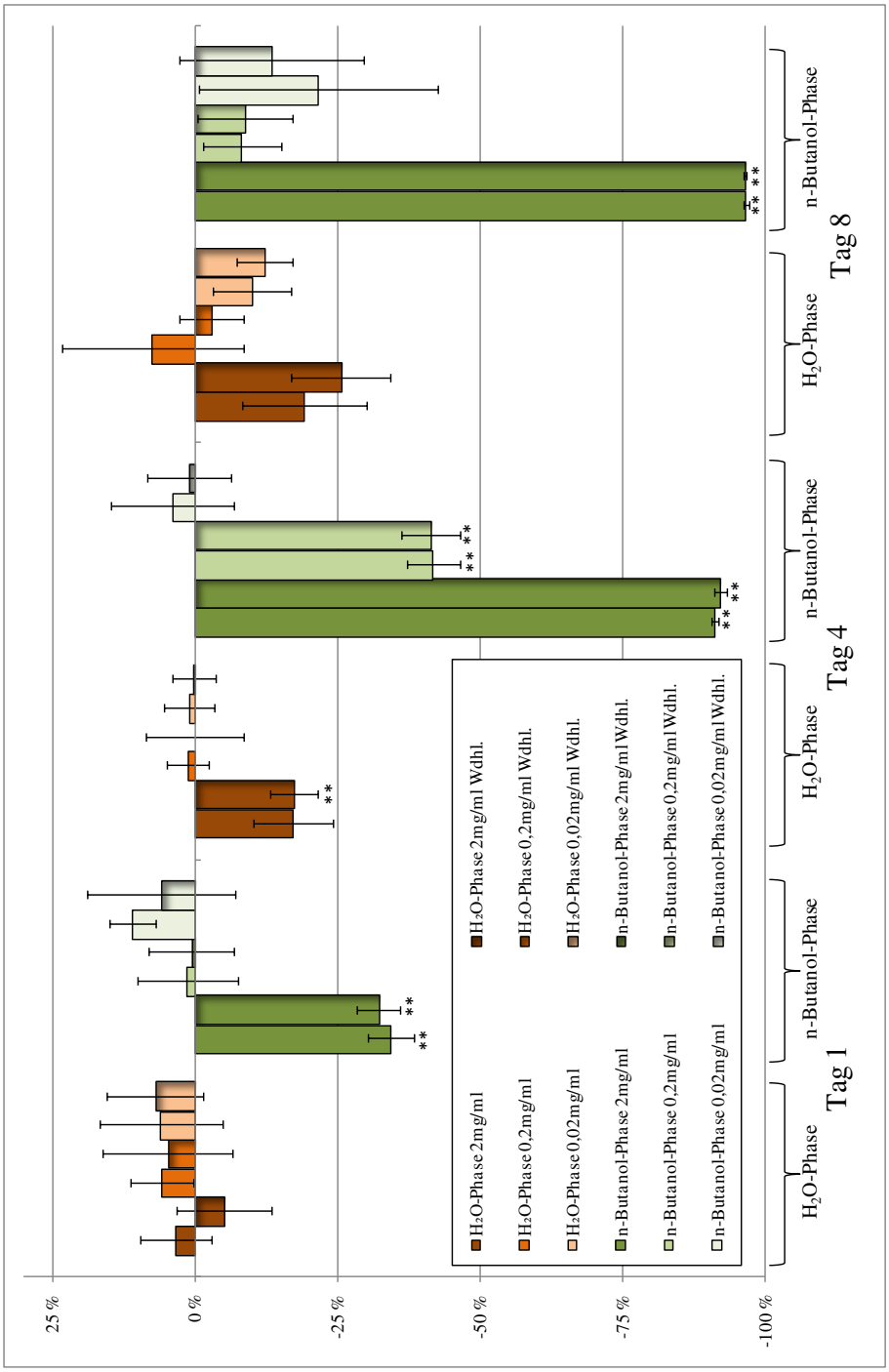


Abb. 8-50: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit H_2O- und n-But-Phase aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus H_2O-Zusatz (für die H_2O-Phase) bzw. plus PS80-Zusatz (für die n-But-Phase). Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Auch aus dem MeOH-Extrakt wurden die ausgeschüttelten apolareren EE-, DCM- und Hex-Phasen („DS_WD_Frak-EE“, „DS_WD_Frak-DCM“ und „DS_WD_Frak-Hex“) im Borrelienmodell untersucht (Abb. 8-51, Abb. Anhang 16-6). Im Gegensatz zu den polaren Extrak-

ten zeigten sich schon am ersten Zähltag sichtbare Effekte (Abb. 8-52). Am ersten Zähltag war in allen Kulturen mit 2 mg/ml Extrakt die Borrelienkonzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt. In mittlerer und niedriger Extraktkonzentration zeigte sich bei der EE-Phase ein leicht verstärktes Wachstum. Bei der DCM-Phase war in niedrigster Konzentration ein stärkeres Wachstum als bei der Kontrolle zu erkennen. Auch die Hex-Phase mit 0,02 mg/ml zeigte diese Tendenz. Am vierten Zähltag zeigte sich eine signifikante Wachstumshemmung bei den DCM- (99,7 % bzw. 99,6 %) und Hex-Phasen (91,9 % bzw. 90,3 %) höchster Konzentration. Die absolute Borrelienkonzentration der mit DCM-Phase (2 mg/ml) versetzten Kultur lag unter der Ausgangskonzentration beim Versuchsansatz (Tag 0). Die anderen getesteten Extraktkonzentrationen zeigten keinen in beiden Wiederholungen auftretenden, signifikanten Unterschied zur Kontrolle; eine tendenzielle Wachstumshemmung war zu erkennen. Am letzten Zähltag hemmten die DCM- und Hex-Phasen in höchster Konzentration das *Bb*ss-Wachstum wiederum signifikant um 99 %. Die absolute Borrelienkonzentration beim DCM-Extrakt (2 mg/ml) sank weiter, die des Hex-Extrakts (2 mg/ml) im Vergleich zum vierten Zähltag. Für die geringer konzentrierten Phasen und alle untersuchten EE-Phasen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollkultur.

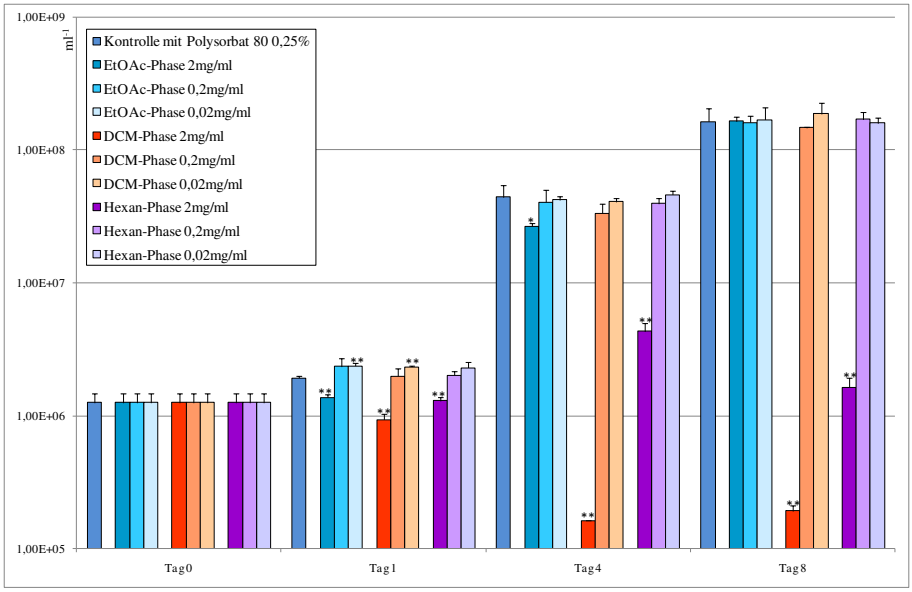


Abb. 8-51: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit EE-, DCM- und Hex-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

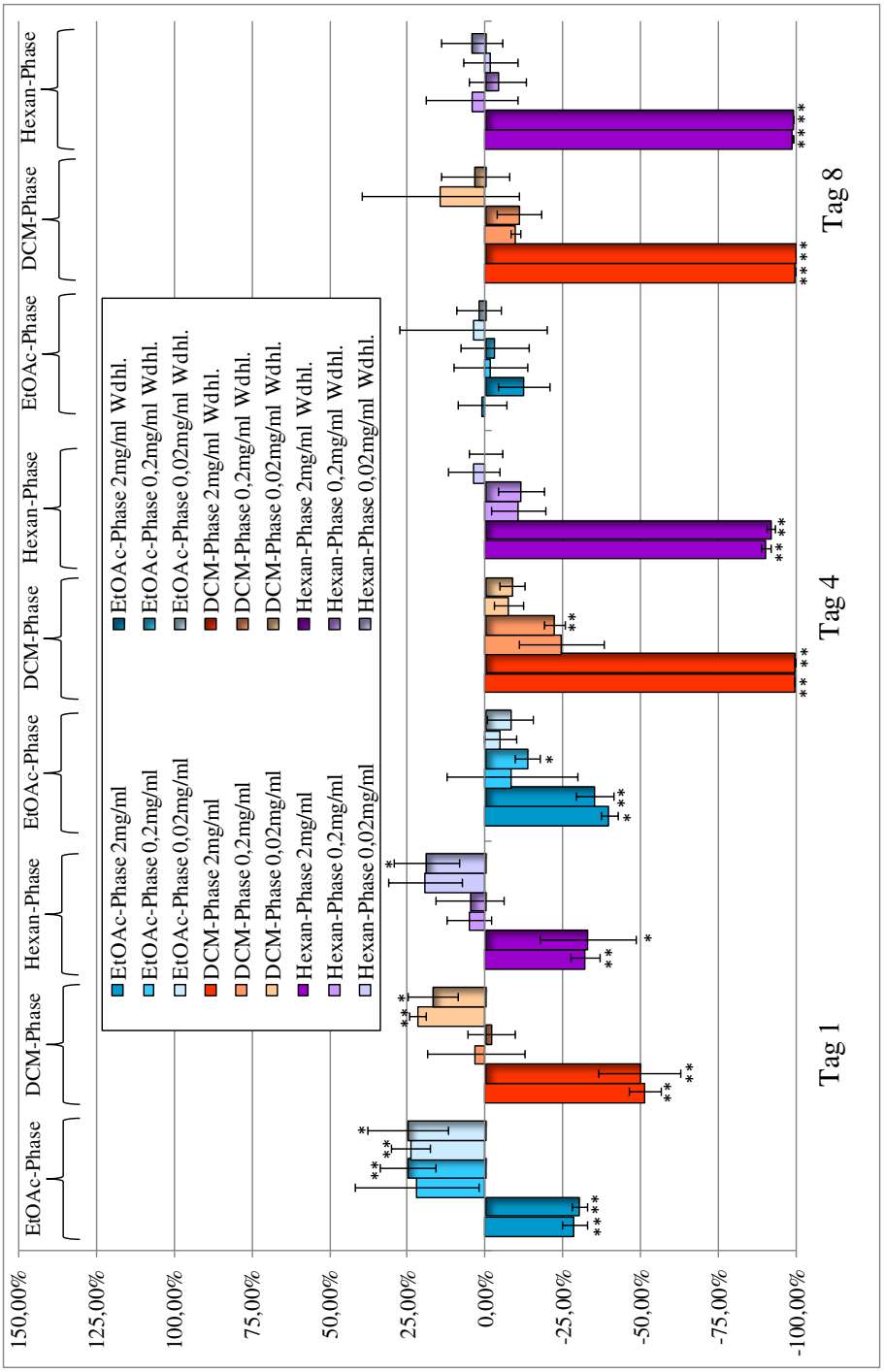


Abb. 8-52: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit EE-, DCM- und Hex-Phase aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Da mittels GC-MS-Screening-Untersuchungen Erkenntnisse zur Hex-Phase vorlagen (Kapitel 8.7), sollten Subfraktionen der Hex-Ausschüttelung („DS_WD_Frak-Hex“) aus dem MeOH-Extrakt (Fraktionierung in Kapitel 7.3.2.1.7; Übersichts-DC-Abbildungen zu den Subfraktionen in Kapitel 8.5.1) auch im Borrelienmodell näher betrachtet werden. Vier verschiedene Subfraktionen wurden untersucht (Subfraktionen II – mit sehr apolaren Substanzen; IV – mit Phytosterolen wie β-Sitosterol und anderen triterpenoiden Substanzen; V – mit triterpenoiden Substanzen wie Oleanol- oder Ursolsäure; VI – mit triterpenoiden und polareren Substanzen; DC-Übersicht siehe Abb. 8-4). Diese standen in ausreichender Menge zur Verfügung. Zur statistischen Absicherung wurde das Experiment insgesamt wiederholt (Abb. 8-53, Abb. Anhang 16-7, Abb. 8-54).

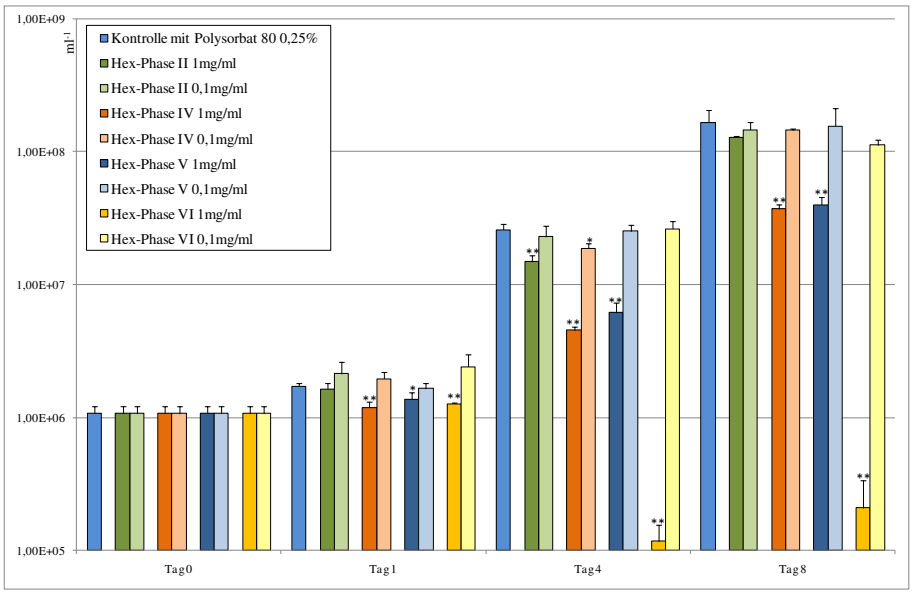


Abb. 8-53: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz der Hex-Subfraktionen II, IV, V und VI aus dem MeOH-Extrakt (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Am ersten Tag zeigten die Hex-Subfraktionen IV und VI jeweils in hoher Konzentration (1 mg/ml) eine signifikante (im ersten Experiment) bzw. tendenzielle (im Wiederholungsexperiment) Wachstumshemmung. Die anderen Subfraktionen und Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle. Am vierten Zähltag zeigte sich in beiden Experimenten eine deutliche Wachstumshemmung in den Subfraktionen IV, V und VI in hoher Konzentration (82,5 % bzw. 80,3 %, 76,2 % bzw. 77,4 % und 99,5 % bzw. 99,6 %). In der konzentrierten Subfraktion II war die Hemmung nur teilweise signifikant. In der niedrig

konzentrierten Subfraktion IV (0,1 mg/ml) zeigte sich eine tendenzielle Wachstumshemmung um 27,5 % bzw. 30,5 %. Die anderen niedrig konzentrierten Fraktionen zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Am letzten Zähltag zeigten wieder die konzentrierten Subfraktionen IV, V und VI eine signifikante Wachstumshemmung (77,6 % bzw. 78,6 %, 76,0 % bzw. 77,6 % und 99,9 % bzw. 99,8 %). Beim Wiederholungsexperiment zeigte sich eine Hemmung der *Bb*ss-Konzentration für die konzentrierte Subfraktion II und die verdünnten Subfraktionen IV und VI). Insgesamt sank die absolute Borrelienkonzentration über acht Zähltage gegenüber Tag null nur bei der konzentrierten Hex-Subfraktion VI (1 mg/ml). Bei den anderen Fraktionen erfolgte trotz Hemmung ein verzögertes Wachstum.

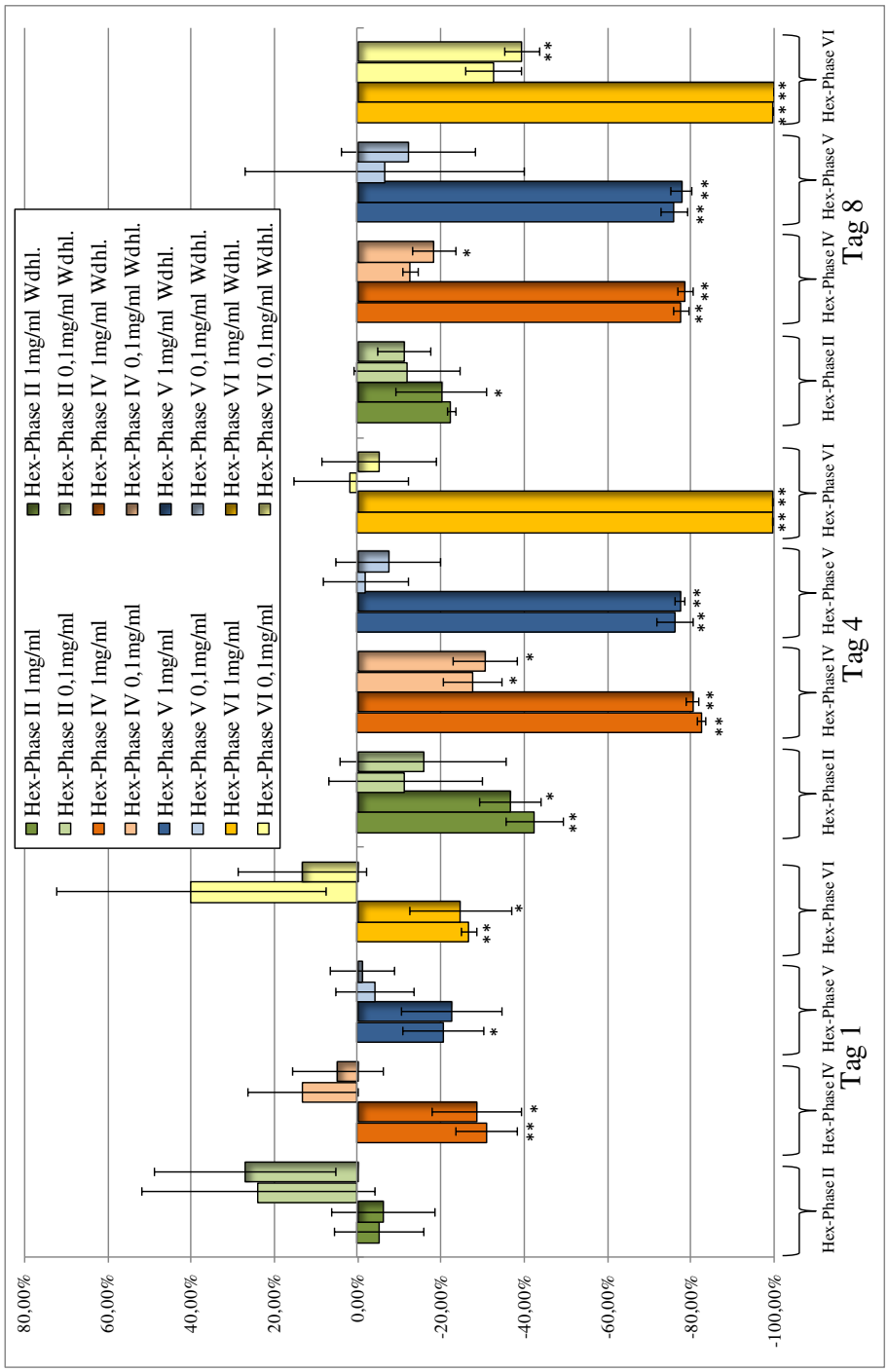


Abb. 8-54: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit den Hex-Subfraktionen II, IV, V und VI aus dem MeOH-Extrakt versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

8.9.3 Untersuchung von Reinstoffen aus *D. sylv.*

Das in *D. sylv.* nachgewiesene β-Sitosterol (8.3) und die beiden im Rahmen der Arbeit isolierten Reinstoffe Ursolsäure und Prinsepiol (8.5.4 und 8.5.3) sollten im Borrelienmodell ebenfalls untersucht werden. In zwei wiederholten Durchläufen wurden die Stoffe in jeweils vier Konzentrationen über acht Zähltage getestet. Betrachtet wurden 0,2, 0,05, 0,02 und 0,005 mg/ml.

Bei den mit β-Sitosterol (Abb. 8-55, Abb. Anhang 16-8, Abb. 8-57) versetzten Kulturen lag die Borrelienkonzentration am ersten Zähltag maximal 22,1 % unter der Kontrolle (0,05 mg/ml Kultur), am vierten 7,0 % (0,05 mg/ml Kultur) darüber und am achten 21,4 % (0,02 mg/ml Kultur) darunter. Es zeigten sich über die acht Zähltage in allen Extrakt-konzentrationen keine signifikanten Unterschiede. Auch eine nur tendenziell konzentrations-abhängige Wachstumshemmung oder –steigerung gegenüber der Kontrolle war nicht festzustellen.

Beim Zusatz von Ursolsäure und Prinsepiol (Abb. 8-56, Abb. Anhang 16-9, Abb. 8-57) ergab sich ein anderes Bild: am ersten Tag lag die Borrelienkonzentration der mit Ursolsäure versetzen Fraktionen in abnehmender Extraktkonzentration 27,3 % bzw. 26,1 % bis 5,0 % bzw. 8,8 % unter der Kontrolle, ohne signifikante Unterschiede. Beim Prinsepiol war das Wachstum um 53,3 % bzw. 53,2 % bis 14,1 % gehemmt. Hier war der Unterschied zur Kontrolle in den beiden höheren Konzentrationen mit 0,2 und 0,05 mg/ml jeweils signifikant.

Am vierten Zähltag war die absolute Borrelienkonzentration in den betrachteten Ansätzen der verschiedenen Extrakte gegenüber dem vorherigen Zähltag angestiegen. Während alle Ursolsäurefraktionen keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrolle zeigten, war die Borrelienkonzentration der Prinsepiol-Fraktion (0,2 mg/ml) signifikant um 90,7 % bzw. 92,1 % erniedrigt. Die Prinsepiol-Fraktionen mit niedrigeren Konzentrationen zeigten ein der Kontrolle nahezu identisches Wachstum. Zum achten Zähltag stieg die absolute Konzentration der Bakterien in allen Kulturen weiter an. In den am höchsten konzentrierten Prinsepiol-Fraktionen (0,2 mg/ml) zeigte sich weiterhin eine signifikante Hemmung des Wachstums (um 58,3 % bzw. 61,2 %).

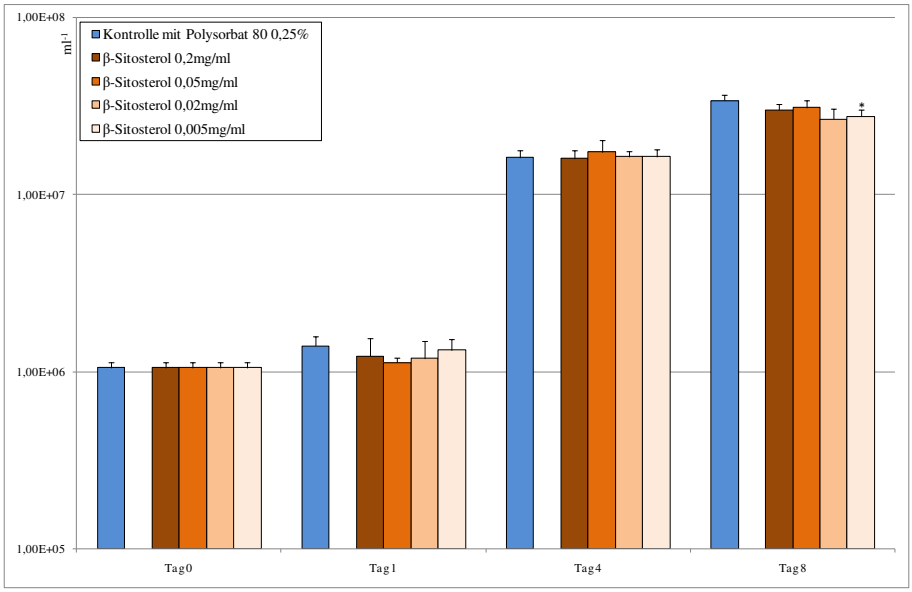


Abb. 8-55: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von β-Sitosterol (mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

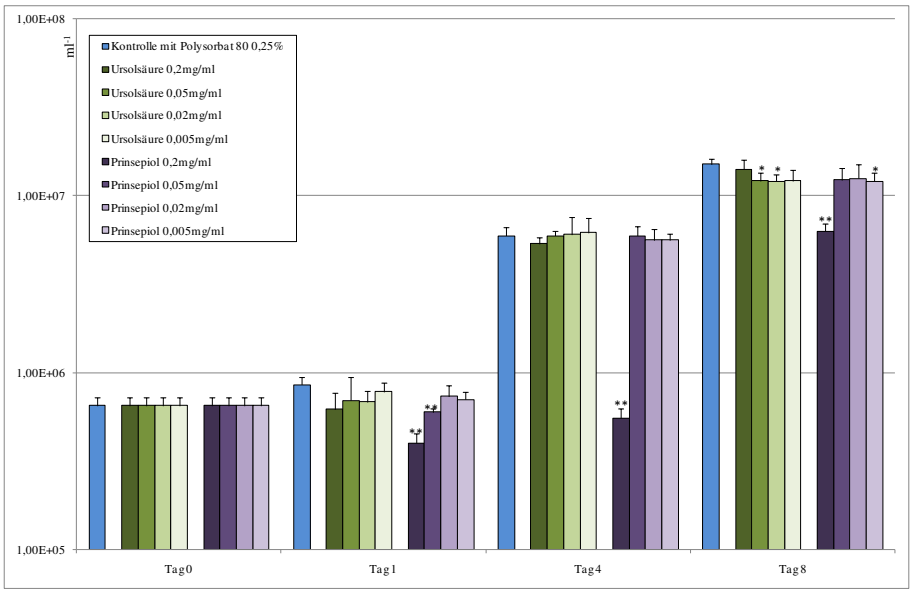


Abb. 8-56: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Ursolsäure und Prinsepiol (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

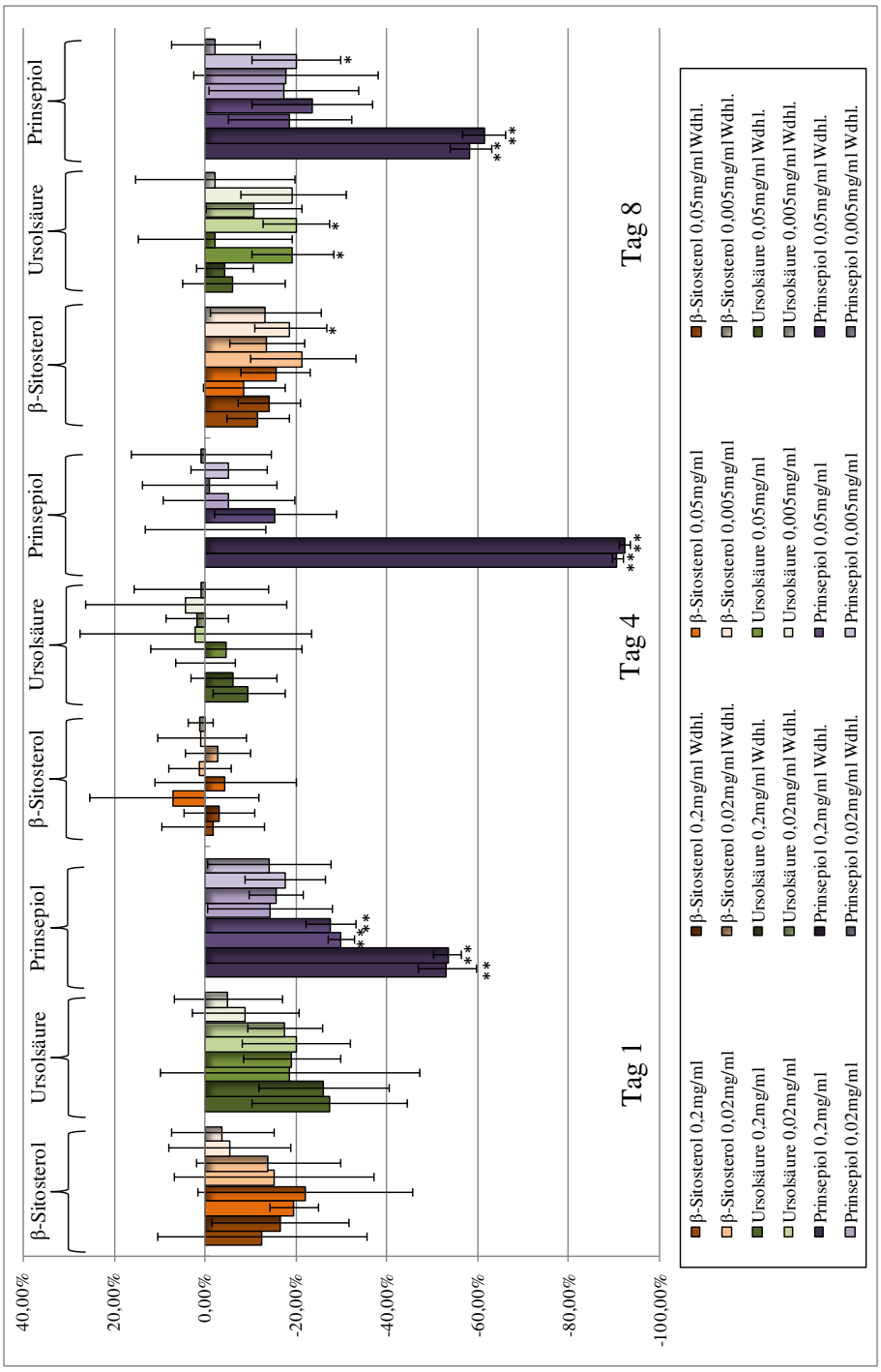


Abb. 8-57: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit β-Sitosterol, Ursolsäure und Prinsepiol versetzten *Bbs*s-Kulturen gegenüber *Bbs*s in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

8.9.4 Reinstoffe aus *Cistus* bzw. Ladanum

In Vorbereitung der Reinstoffuntersuchungen aus *C. cret.* wurden Lösung und $CHCl_3$-Extrakt „Lad-TE“ des Ladanum-Harzes (Herstellung „Lad-TE“: siehe 8.5.1; Extraktpräparation wie bei den *Dipsacus*-Untersuchungen: siehe 7.7.5.1), die potentiell Substanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften enthielten, in jeweils zwei Konzentrationen untersucht. Wiederum wurden alle Experimente zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit unabhängig voneinander zweimal durchgeführt (Abb. 8-58, Abb. Anhang 16-10, Abb. 8-59).

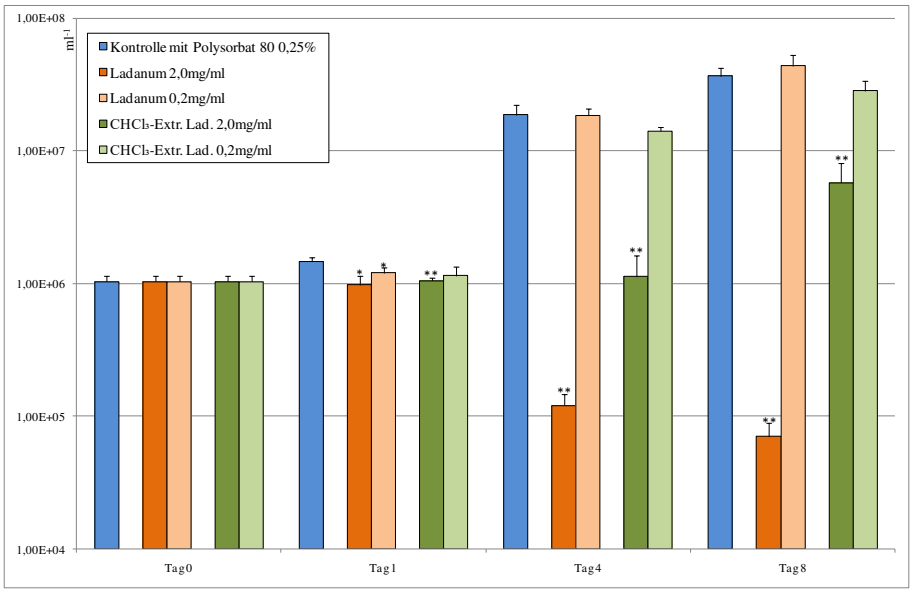


Abb. 8-58: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Ladanum und $CHCl_3$-Extrakt aus Ladanum ($CHCl_3$-Extr. Lad.) (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Am ersten Zähltag zeigte die Lösung von Ladanum leicht hemmende Effekte (maximal 35,5 % Wachstumshemmung; nur im Wiederholungsexperiment statistisch signifikant). Der $CHCl_3$-Extrakt hemmte das Wachstum in hoher Konzentration (2 mg/ml) signifikant um 28,7 % bzw. 23,7 %, in niedriger Konzentration (0,2 mg/ml) tendenziell um bis zu 22,5 %. Am vierten Zähltag hemmte die Lösung von Ladanum in hoher Konzentration das Wachstum um 99,4 % bzw. 99,3 %. Die Gesamtindividuenzahl sank auf etwa 13 % der Ausgangskonzentration am Tag Null, während sich im selben Zeitraum in der PS80-Kontrolle die Individuenzahl fast verzwanzigfacht hatte. Der konzentrierte $CHCl_3$-Extrakt von Ladanum zeigte eine statistisch signifikante, etwas geringere Hemmung um 94,0 % bzw. 93,2 %.

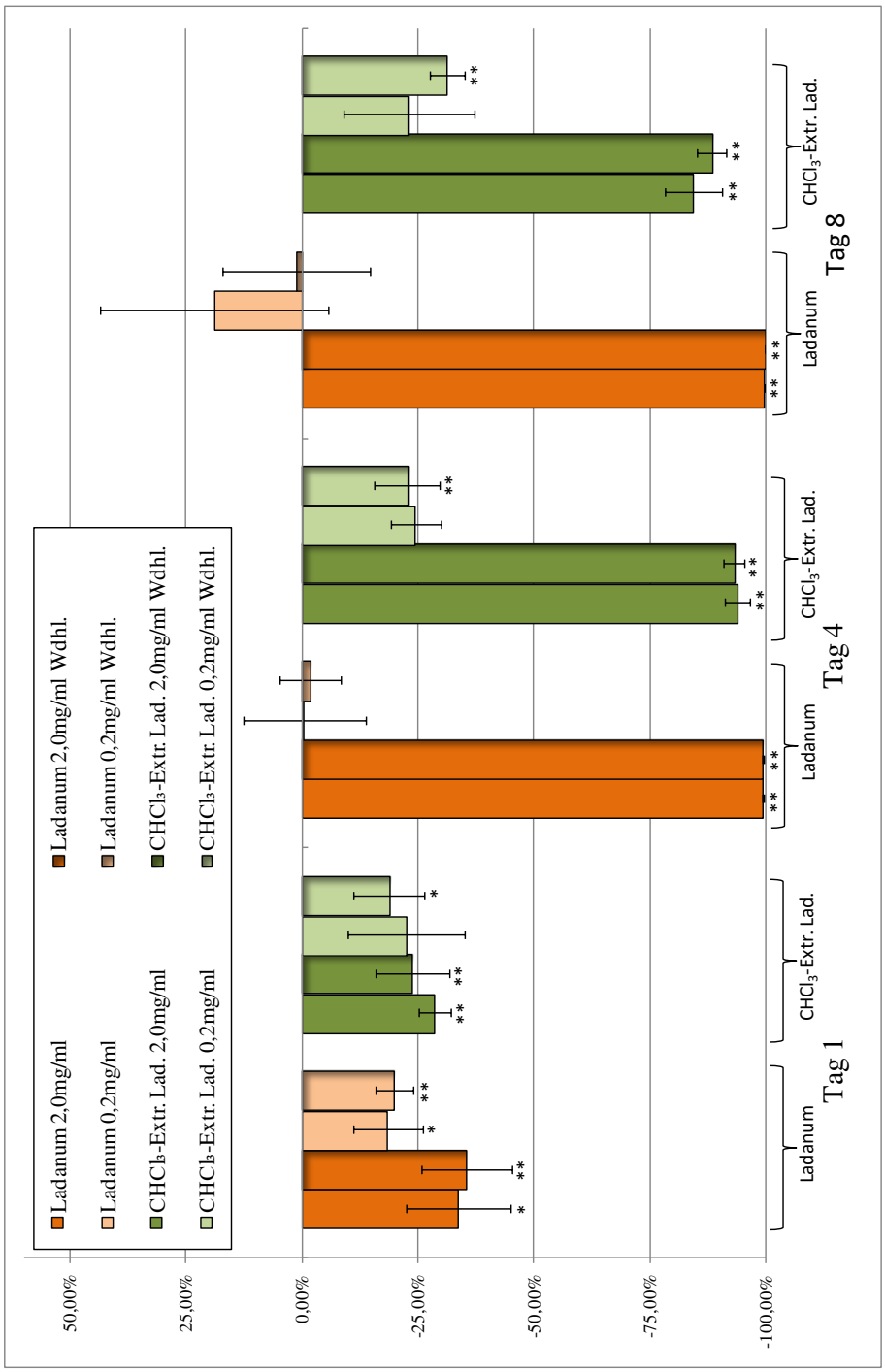


Abb. 8-59: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede von mit Ladanum und $CHCl_3$-Extrakt aus Ladanum (CHCl3-Extr. Lad.) versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

In den verdünnten Extrakten zeigte sich bei der Ladanum-Lösung keine statistisch relevante Hemmung, beim Ladanum-Extrakt eine tendenzielle Hemmung (signifikante Hemmung um ca. 23 % beim Wiederholungsexperiment). Am achten Zähltag ergab sich ein ähnliches Bild: In hoher Konzentration hemmte die Ladanum-Lösung das Wachstum statistisch signifikant um 99,8 % bzw. 99,9 % bei Rückgang der absoluten Borrelienkonzentration gegenüber den Vortagen. In niedriger Konzentration zeigten sich keine statistischen Unterschiede gegenüber der Kontrolle. Beim konzentrierten $CHCl_3$-Extrakt aus Ladanum zeigte sich eine signifikante Hemmung um 84,4 % bzw. 88,4 %, beim verdünnten Extrakt im Wiederholungsexperiment um ca. 31 % (statistisch signifikant). Die beobachte Hemmwirkung des $CHCl_3$-Extrakts aus Ladanum bewirkte lediglich ein langsameres Wachstum der Kulturen. Die absoluten Individuenzahlen stiegen im Vergleich zum vierten Zähltag.

Nach den Voruntersuchungen mit Ladanum wurden die in der Arbeitsgruppe isolierten Reinsubstanzen *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (*epi*-MO), *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-manoyloxid (AcO-*epi*-MO), *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid (OH-*epi*-MO) und *ent*-Manoyloxid (MO) [130] sowie das handelsübliche Carvacrol als apolare Bestandteile von Ladanum und ätherischem Öl aus *C. cret.* untersucht. Aus Kapazitätsgründen des Modells wurden maximal zwei Substanzen gleichzeitig in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Betrachtet wurden wie bei den Untersuchungen zu Reinstoffen aus *Dipsacus* (Kapitel 8.9.3) 0,2, 0,05, 0,02 und 0,005 mg/ml. Für die Reproduzierbarkeit wurden auch diese Versuche zweimal durchgeführt.

Der Zusatz von MO zur Borrelienkultur (Abb. 8-60, Abb. Anhang 16-11) führte am ersten Zähltag konzentrationsunabhängig zu keiner signifikanten Wachstumshemmung. Am vierten Tag zeigte sich bei 0,2 mg/ml eine signifikante Hemmung um 68,0 % bzw. 69,7 %. In den Kulturen mit 0,05 mg/ml Extraktzusatz zeigte sich eine tendenzielle Hemmung um 18,0 % bzw. 19,7 %. In niedrigerer Konzentration war kein Unterschied zur Kontrollkultur festzustellen. Am achten Zähltag war in der höchsten Extraktkonzentration wiederum eine signifikante Wachstumshemmung festzustellen (um 49,5 % bzw. 47,0 %). In niedrigeren Extraktkonzentrationen war die Borrelienkonzentration größtenteils nicht von der Kontrolle verschieden. In allen Kulturen kam es zu einem Anstieg der absoluten Individuenzahl.

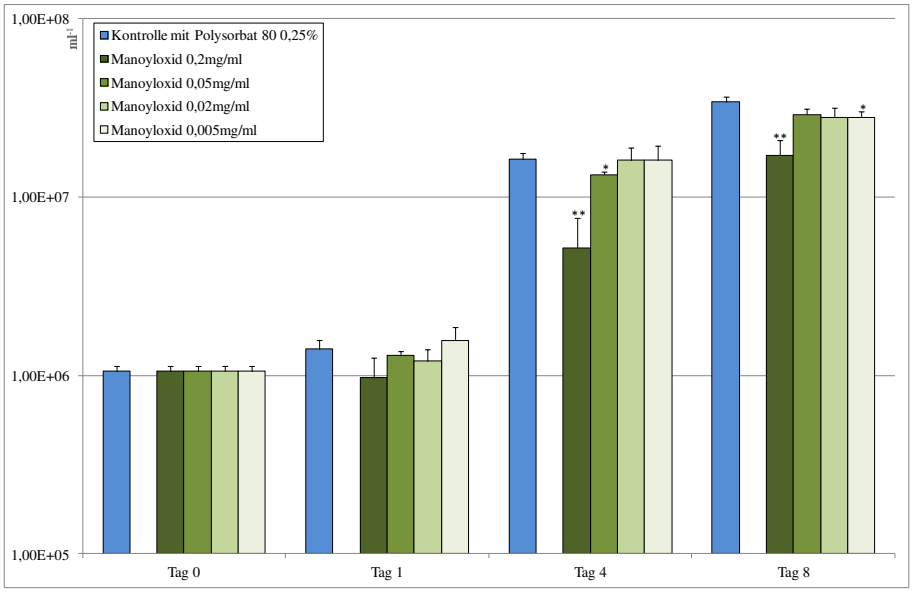


Abb. 8-60: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von *ent*-Manoyloxid (mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Im zweiten Teilexperiment wurde der Zusatz von *epi*-MO und Carvacrol auf das Kulturwachstum untersucht (Abb. 8-61, Abb. Anhang 16-12). Bei Carvacrol zeigte sich eine konzentrationsabhängige signifikante Wachstumshemmung ab dem ersten Zähltag. Bei Zusatz von 0,2 mg/ml betrug sie 80,5 % bzw. 81,2 % und bei 0,05 mg/ml 63,5 % bzw. 64,22 %. Bei 0,02 mg/ml Carvacrolzusatz war nur noch eine hemmende Tendenz mit 34,2 %, (im Wiederholungsexperiment ohne statistischen Unterschied zur Kontrolle) feststellbar. Ein ähnliches Bild ergab sich beim *epi*-MO: 97,1 % bzw. 95,2 % Wachstumshemmung bei 0,2 mg/ml Zusatz und 41,0 % bzw. 37,9 % bei 0,05 mg/ml (im Wiederholungsexperiment nur tendenziell hemmend). Am vierten Zähltag ergaben sich ähnliche Ergebnisse: Carvacrol führte in höchster Konzentration zu 99,2 % erniedrigten Individuenzahlen, *epi*-MO zu 99,7 % bzw. 99,3 % Reduktion der Borrelienkonzentration gegenüber der Wachstumskontrolle. Auch in geringster Konzentration zeigte sich eine tendenzielle, statistisch auswertbare Hemmung durch Carvacrol um 29,2 % bzw. 21,0 %. Bei *epi*-MO-Zusatz wirkten zumindest 0,05 mg/ml noch wachstumshemmend. Äquivalente Beobachtungen waren am achten Zähltag zu treffen: Carvacrol verminderte die Bakterienkonzentration signifikant um 99,8 % bei 0,2 mg/ml Zugabe, um 99,7 % bei 0,05 mg/ml und bis zu 60,4 % bei 0,02 mg/ml (letzteres nur im Wiederholungsexperiment, im ersten Durchgang trotzdem statistische Tendenz erkennbar mit 56,9 % Hemmung). *Epi*-MO führte zu einer über 99,9 %igen Konzentrationsreduktion bei Zusatz von 0,2 mg/ml. Bei 0,05 mg/ml war die Borrelienanzahl etwa halbiert (51,2 % bzw.

51,4 %). Gegenüber der Ausgangskonzentration am Tag null sanken die absoluten Individuenzahlen bei Carvacrol mit 0,2 und 0,05 mg/ml, bei *epi*-MO nur bei 0,2 mg/ml Zusatz.

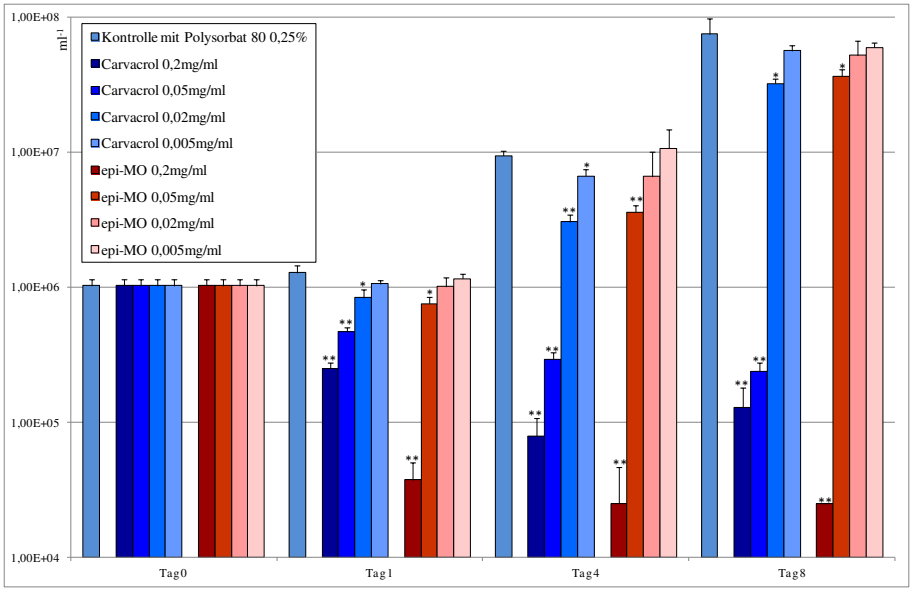


Abb. 8-61: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Carvacrol und *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Im letzten Teilexperiment wurden AcO-*epi*-MO und OH-*epi*-MO auf identische Weise auf ihre wachstumshemmenden Eigenschaften auf *Bb*ss untersucht (Abb. 8-62, Abb. Anhang 16-13). Am ersten Zähltag zeigte sich bei AcO-*epi*-MO in höchster Konzentration eine signifikante Hemmung von 23,9 %, die im Wiederholungsexperiment nur tendenziell (21,3 %) war. Eine ebenfalls signifikant um 11,9 % geminderte *Bb*ss-Konzentration bei Zusatz von 0,005 mg/ml war im Wiederholungsexperiment nicht feststellbar. Bei OH-*epi*-MO war kein Unterschied zur Kontrolle zu erkennen. Am vierten Tag war wiederum bei höchstem Zusatz von AcO-*epi*-MO (0,2 mg/ml) eine tendenzielle (im Wiederholungsexperiment signifikante) Hemmung um 33,5 % bzw. 31,8 % messbar. OH-*epi*-MO zeigte praktisch keine Unterschiede zur Kontrolle. Am achten Zähltag waren bei beiden untersuchten Reinstoffen keine Wachstumshemmungen mehr festzustellen. Tendenzielle Effekte zeigten sich gleichzeitig im Experiment und seiner Wiederholung nur für AcO-*epi*-MO mit 0,2 mg/ml. Bei beiden zugesetzten Reinstoffen stiegen in allen vier Konzentrationen die absoluten *Bb*ss-Konzentrationen über die Zähltage an. Ein Bakterienwachstum war teilweise gegenüber der Kontrolle vermindert, aber immer vorhanden.

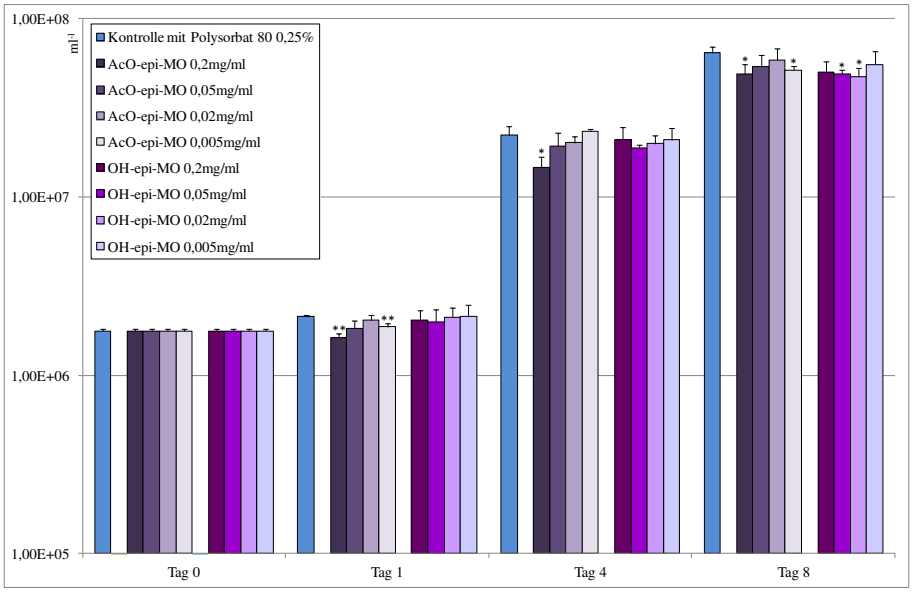


Abb. 8-62: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*- und *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Im Gesamtvergleich aller fünf zugesetzter Reinstoffe in prozentualer Darstellung (pro Zähltag jeweils ein Diagramm in Abb. 8-63 (Tag 1), Abb. 8-64 (Tag 4) und Abb. 8-65 (Tag 8)) wird in Abstufung eine starke Wachstumshemmung durch Carvacrol und *epi*-MO, eine geringere Wachstumshemmung durch MO und eine nicht vorhandene oder nahezu fehlende Wachstumshemmung durch AcO-*epi*-MO und OH-*epi*-MO sichtbar. Die Effekte vermindern sich jeweils mit sinkender Konzentration des zugesetzten Reinstoffes.

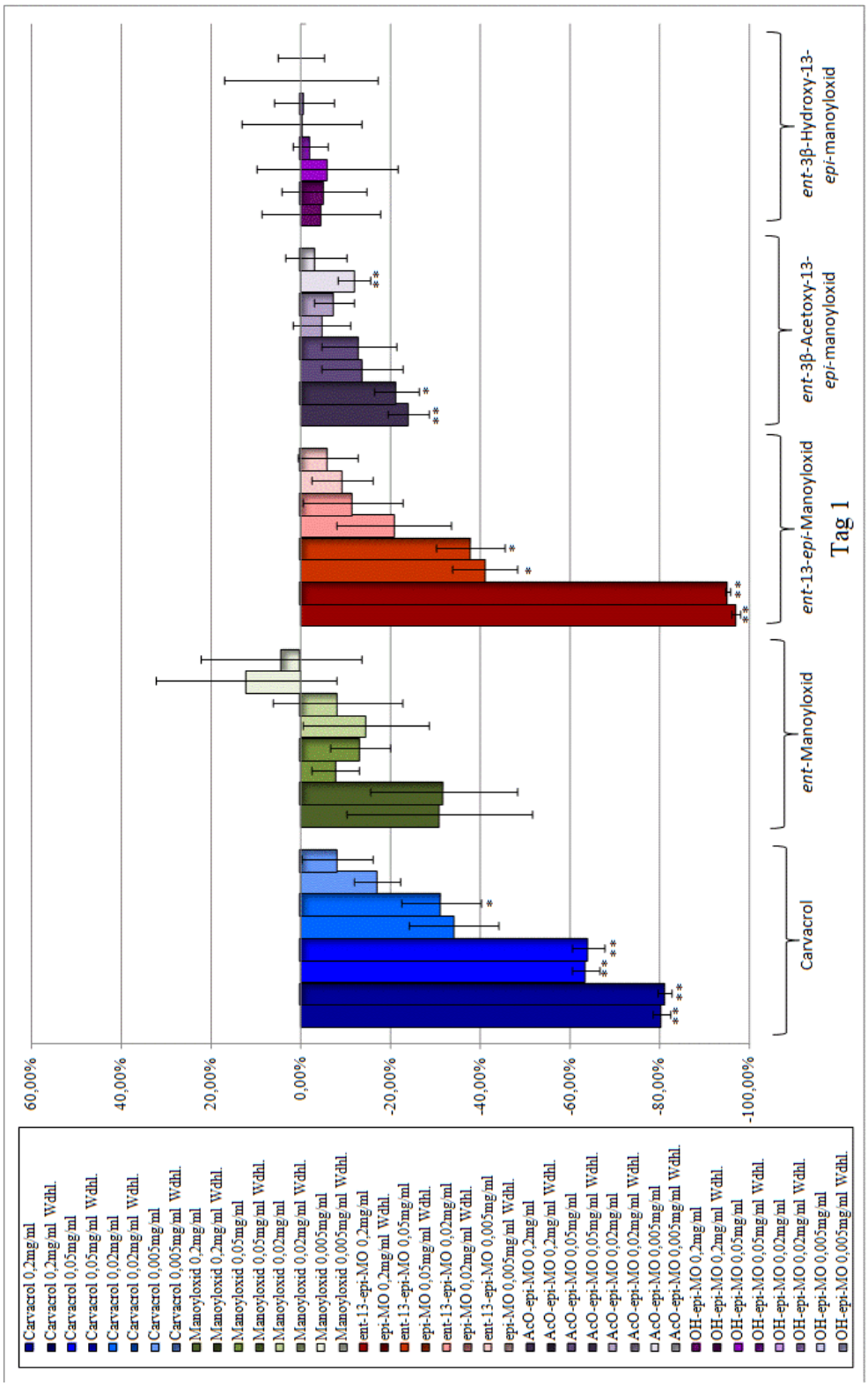


Abb. 8-63: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-Manoyloxid und Carvacrol versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz am ersten Messtag. Die Prozentwerte beziehen sich auf die Mediumkontrolle desselben Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

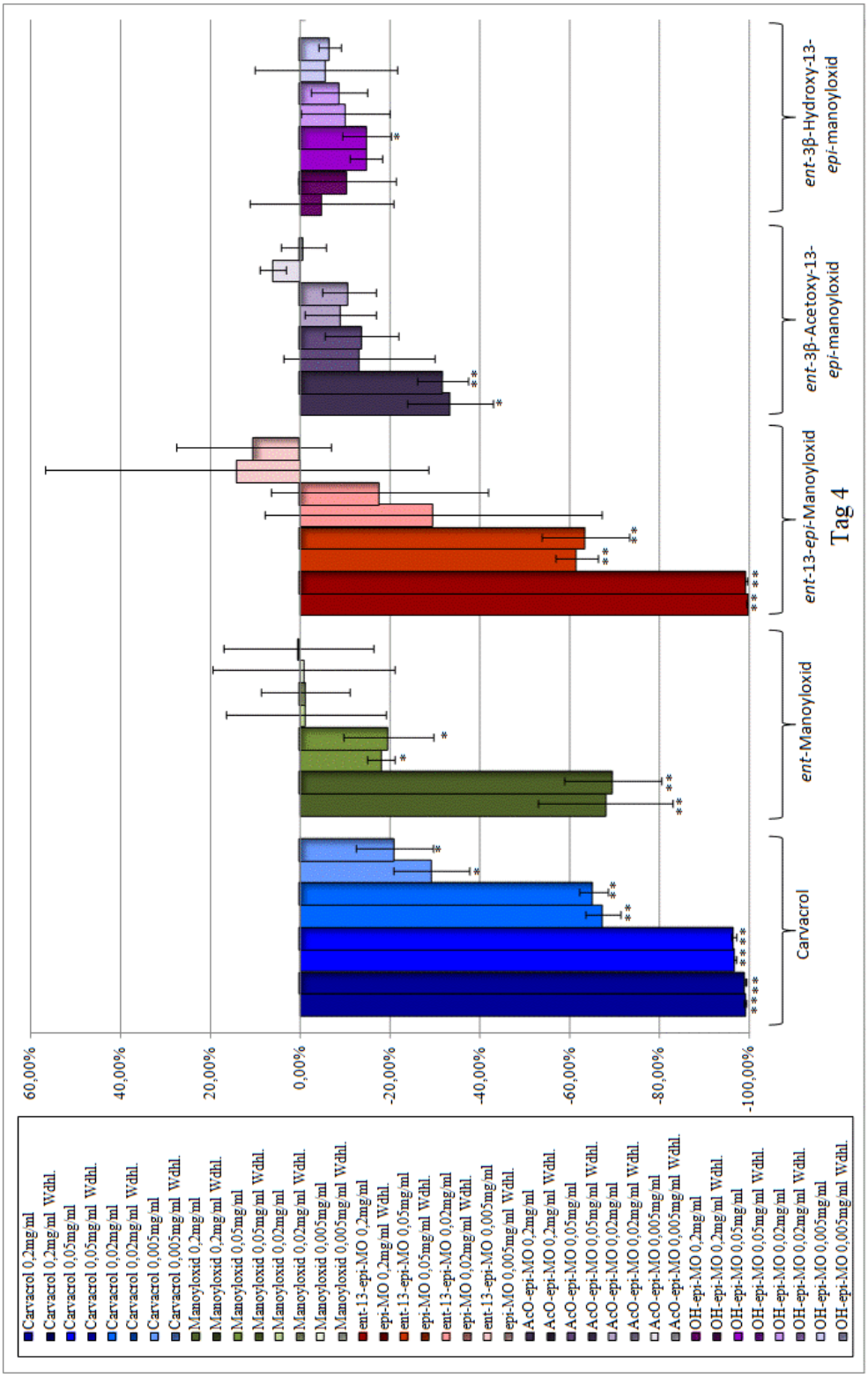


Abb. 8-64: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-Manoyloxid und Carvacrol versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz am vierten Messtag. Die Prozentwerte beziehen sich auf die Mediumkontrolle desselben Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

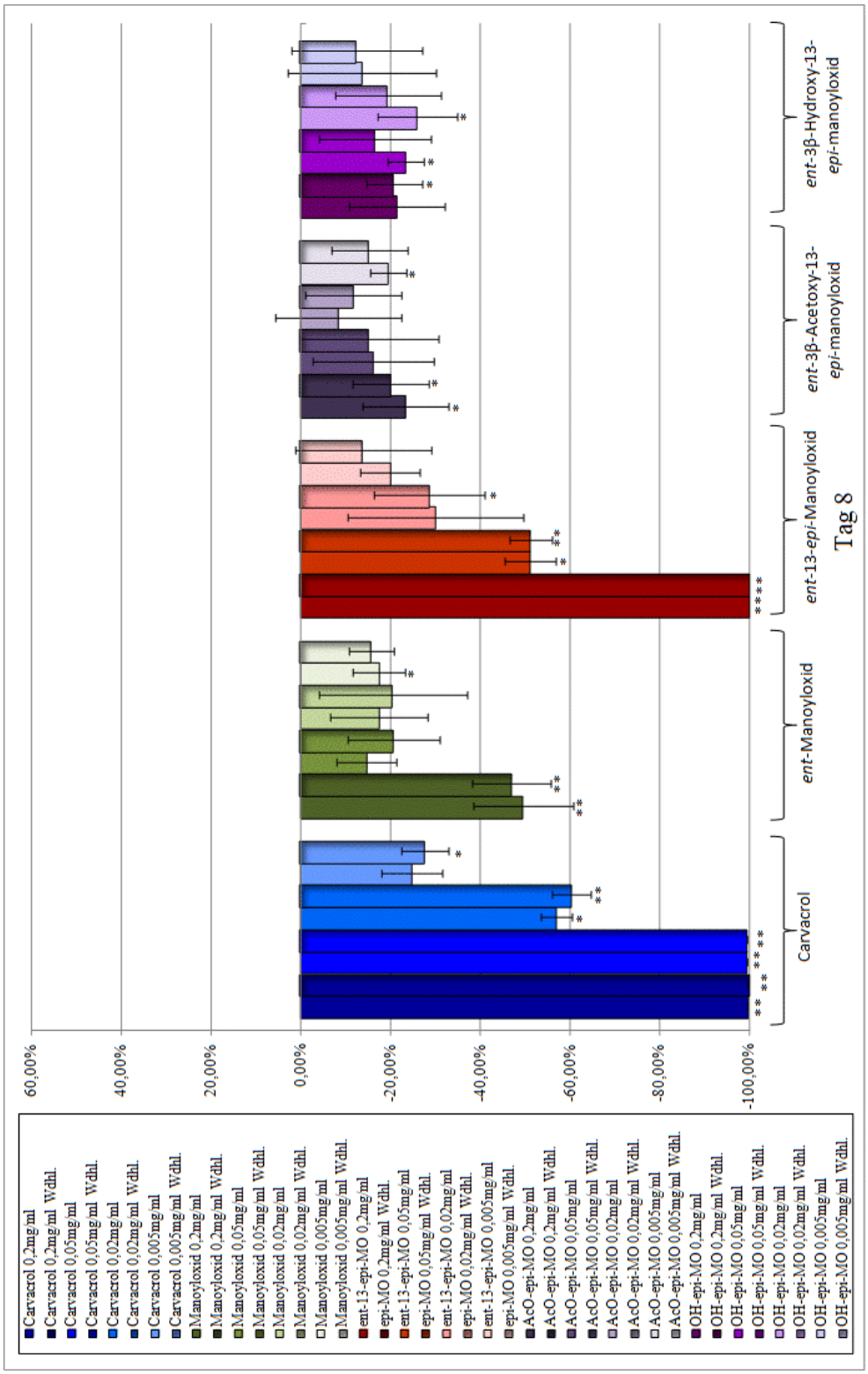


Abb. 8-65: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-Manoyloxid und Carvacrol versetzten *Bbss*-Kulturen gegenüber *Bbss* in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz am achten Messtag. Die Prozentwerte beziehen sich auf die Mediumkontrolle desselben Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Diskussion

9 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten mit dem etablierten Bakterienmodell Pflanzenextrakte von zwei verschiedenen Pflanzen unterschiedlicher Familien untersucht werden. Während für *C. cret.* umfangreiche phytochemische und pharmakologische Betrachtungen veröffentlich sind, findet sich zu *D. sylv.* kaum Literatur.

9.1 Analytik von *D. sylv.*-Wurzeln

Phytochemisch ist *D. sylv.* bisher sehr wenig untersucht (Kapitel 2.2). Die umfassendste Arbeit von 1979 beschäftigte sich mit der Isolierung und Strukturaufklärung von iridoiden und bis-iridoiden Verbindungen aus Wurzeln, Samen und Blättern [59]. Fettsäureuntersuchungen waren bisher nur von den Samen von *D. sylv.* bekannt. Daneben wurden einige Kohlenhydrate und Polyphenole beschrieben. Im Verlauf der aktuellen Arbeit wurden aus verschiedenen Blickwinkeln neue Erkenntnisse zur Charakterisierung von *D. sylv.* gewonnen. Es wurde erstmals eine Gehaltsbestimmung von Inhaltsstoffen aus *D. sylv.* etabliert. Dazu konnte eine instrumentelle MEKC-Methode erarbeitet werden (siehe nachfolgend 9.1.1), die mit ihrer Messzeit von 15 Minuten deutlich schneller ist, als gängige HPLC-Verfahren. Für eine schnelle Identifizierung von *D. sylv.* wurde eine Stufen-DC mit Bezug auf die für *D. sylv.* typischen Markersubstanzen Loganin und Cantleyosid im polaren sowie β-Sitosterol und Oleanolsäure im apolaren Bereich etabliert. Als Untersuchungsextrakte genügen methanolische Direktextrakte aus dem zu untersuchenden Drogenmaterial. Die Stufen-DC ermöglicht die schnelle Identifizierung von *D. sylv.* auch in nicht instrumentell eingerichteten Laboren und in der Ausgangsstoffprüfung im Apothekenalltag. Dabei wird mit dieser in der Arbeit entwickelten Methode auch eine Abgrenzung von anderen offizinell verwendeten *Dipsacus*-Arten erreicht. Zusätzlich konnten mittels GC-MS charakteristische Fettsäure- und Phytosterolmuster aus einer n-Hexan-Ausschüttelung nachgewiesen werden, die ebenso zur Charakterisierung der bisher kaum untersuchten wilden Karde beitragen.

9.1.1 Cantleyosid und Loganin

Das Bis-Iridoid Cantleyosid wurde erstmals in *Cantleya corniculata* (Becc.) Howard, Stemonuraceae, isoliert [246]. Es wurde zusammen mit Loganin 1979 auch in *D. sylv.* nach-

gewiesen [59]. Loganin wurde um 1884 erstmals im Fruchtfleisch, später in den Samen von *Strychnos nux-vomica* beschrieben [247]. Seine Struktur wurde 1961 veröffentlicht [248]. Einige Studien finden sich zur antimikrobiellen Aktivität der beiden Iridoide. Mittels Agardiffusionstest wurden je 0,1 mg/ml Loganin und Cantleyosid aus *Pterocephalus perennis* (Caprifoliaceae) auf antibakterielle und antifungale Aktivität untersucht. *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis und Pseudomonas aeruginosa* zeigten die größten Hemmhofdurchmesser bei Inkubation mit Cantleyosid. Durch Loganin wurden auch *Escherichia coli* und verschiedene *Candida*-Arten gehemmt [249], [250]. Als Referenz-Antibiotikum wurde u. a. Amoxicillin mit Clavulansäure bei 0,02 mg/ml eingesetzt. Für *Borrelia*-Arten finden sich bisher keine Untersuchungen.

Mittels automatisierbaren MEKC-Verfahrens konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals der Gehalt an Cantleyosid in *D. sylv.* bestimmt werden [250]. Zurückgerechnet auf die Droge war Cantleyosid mit einem Gehalt von 1,03 % (erstes Kultivierungsjahr) bzw. 1,09 % (zweites Kultivierungsjahr) deutlich mehr enthalten als Loganin (erstes Kultivierungsjahr: 0,27 %; zweites Kultivierungsjahr: 0,05 %). In *D. asp.* lag der Gehalt mit 1,71 % Cantleyosid noch höher. Auffallend ist die Abnahme des Gehalts an Loganin im zweiten Jahr. Ursächlich könnte der Umbau des Loganins in Bis-Iridoide sein. Dafür spricht neben den absoluten Konzentrationen der Anstieg des molaren Verhältnisses von Cantleyosid zu Loganin von 2 : 1 auf 11 : 1 binnen eines Jahres. In jüngster Zeit erschien ein Ansatz zur Quantifizierung von Loganin und Cantleyosid in *Pterocephalus hookeri* mittels UHPLC-Methode (ultra-high performance liquid chromatography) [251], der aber eine längere Messzeit benötigt als die in der Arbeit etablierte MEKC-Methode. Die Strukturanalytik der vorliegenden Arbeit mittels ESI-MS und 1D- und 2D-NMR ergab eine Übereinstimmung mit Literaturdaten. Während für Cantleyosid aus *D. sylv.* bereits ^{1}H-NMR-Daten in D_2O vorhanden waren, war dies für Loganin aus *D. sylv.* nicht der Fall. Für letzteres existierten Daten z. B. von *Strychnos nux-vomica* [239], [250], allerdings nur bei maximal 500 MHz. In der vorliegenden Arbeit konnten Messungen bei 600 MHz und damit einer verbesserten Auflösung durchgeführt werden.

9.1.2 Prinsepiol

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals in *D. sylv.* ein Lignan isoliert und als Prinsepiol charakterisiert werden. Prinsepiol wurde 1982 erstmalig in *Prinsepia utilis*, Rosaceae, isoliert [244]. Das Auffinden von Prinsepiol in *D. sylv.* erscheint plausibel, da in anderen Dipsacus-Arten ebenfalls Lignane gefunden wurden. So wurden zum Beispiel aus *D. asp.* Dipsalignan A, B, C und D isoliert, die wie Prinsepiol Diepoxylignane vom Pinoresinoltyp sind [252] (Abb. 9-1). Dipsalignan B ist dabei ein Diastereomer von Prinsepiol. Es unterscheidet sich in den Verschiebungen von C-2 und C-6 sowie von H-2 und H-6 aufgrund unterschiedlicher räumlicher Ausrichtung der 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-reste. Für Lignane vom Pinoresinoltyp sind in anderen Pflanzenarten enantiokomplementäre Proteine beschrieben, die als Hilfsproteine die stereoselektive Biosynthese der Lignane dirigieren [253], [254], [255].

Für *D. sylv.* ist daher sowohl das Auftreten nur des isolierten Diastereomers Prinsepiol, als auch wie in *D. asp.* anderer Stereoisomere denkbar. In der Unterfamilie der Dipsacoideae und der Ordnung Dipsacales allgemein sind weitere verschiedene Lignane vertreten, so z. B. in *Cephalaria*- und *Pterocephalus*-Arten [256], [257]. Prinsepiol wirkt im Trolox-Modell (Trolox equivalent antioxidant capacity assay) stark antioxidativ [258]. Über die Wirkeigen-schaften der Stoffgruppe der Lignane auf biologische Systeme im Rezeptormodell und an Organismen gibt es verschiedenste Untersuchungen. Beispielsweise wurden verschiedene Diepoxylignane einschließlich Prinsepiol aus *Valeriana officinalis* (Caprifoliaceae) isoliert und an verschiedenen Rezeptormodellen untersucht. Eine leichte, konzentrationsabhängige Affinität von Prinsepiol zum 5-HT_{1A}-Rezeptor konnte festgestellt werden [258]. Andere Lignane wurden hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials betrachtet. Dihydro-guaiaretsäure (ein einfaches Lignan), 4-*epi*-Larreatricin (ein Epoxylignan) und 3′-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin (ein Cyclolignan) aus *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae) zeigten antimikrobielle Eigenschaften. Je nach Substanz hemmten sie das Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* bzw. *Escherichia coli* [259]. Der Mechanismus der Wachstumshemmung gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* konnte als Hemmung von Membrantransportern vom Typ ATP-binding cassette bzw. als Hemmung von deren Genexpression nachgewiesen werden [260]. Für Pinoresinol, ebenfalls ein Diepoxylignan, gibt es Untersuchungen zur anti-

bakteriellen Aktivität gegen grampositive Bakterien [261]. Innerhalb der Gattung *Borrelia* wurden laut eingehender Literaturbetrachtung keine Studien mit Lignanen durchgeführt.

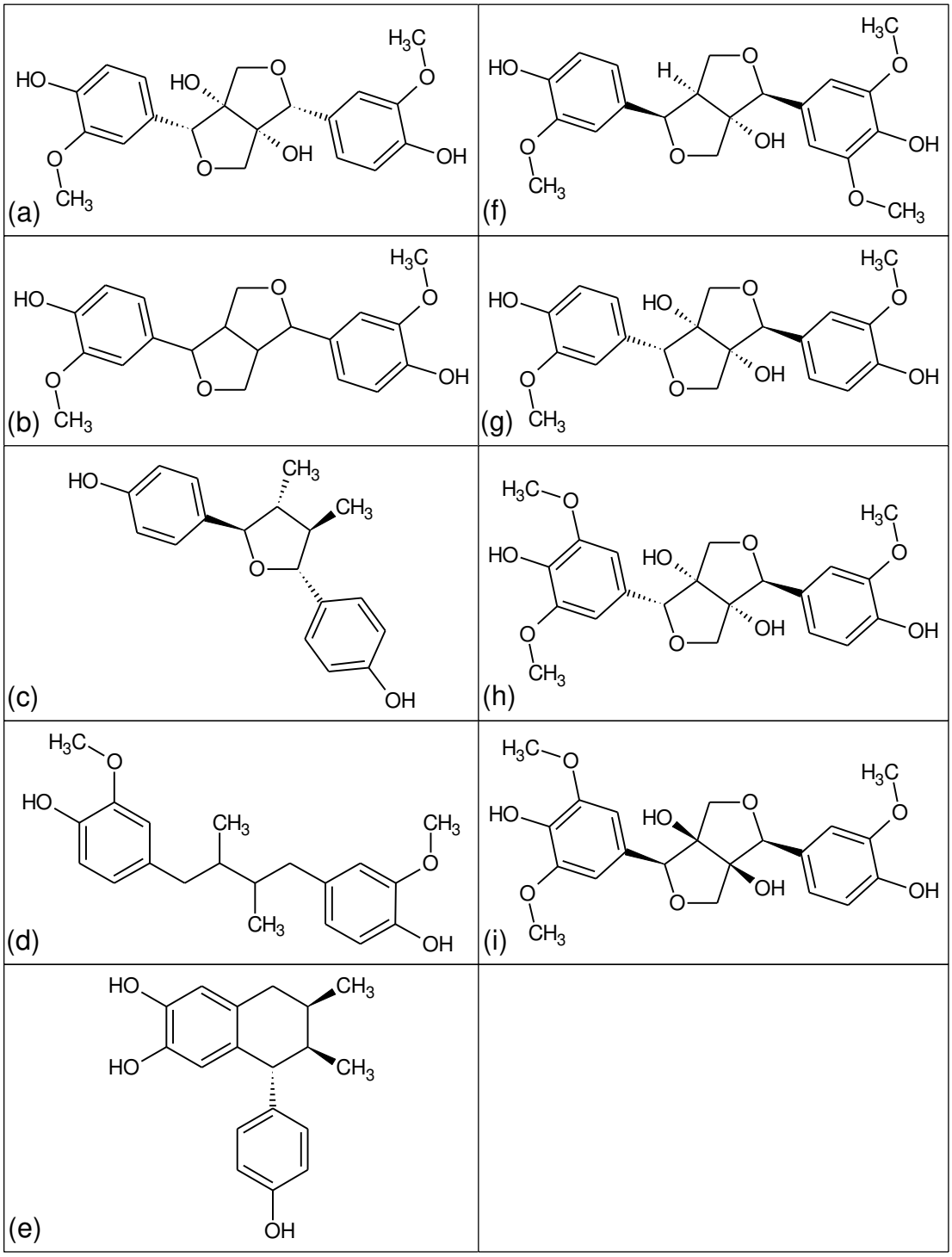


Abb. 9-1: Strukturformeln von Prinsepiol (a), Pinoresinol (b), 4-*epi*-Larreatricin (c), Dihydroguaiaretsäure (d), 3′-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin (e), Dipsalignan A (f), Dipsalignan B (g), Dipsalignan C (h), und Dipsalignan D (i)

9.1.3 Ursolsäure

Das Triterpenoid Ursolsäure wurde 1854 erstmals unter dem Namen Urson aus den Blättern von *Arctostaphylos uva-ursi*, Ericaceae, isoliert [262]. Drei als Malol, Prunol und Urson bezeichnete Stoffe aus verschiedenen Pflanzen wurden 1924 als Bezeichnungen für den immer gleichen chemischen Stoff, Ursolsäure, erkannt [263]. In *D. sylv.* wurde Ursolsäure bisher noch nicht beschrieben. Dagegen wurde sie in *Dipsacus lacinatus* bereits nachgewiesen [264], [265]. In der Literatur finden sich Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität gegen einige typische Krankheitserreger wie *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*. Die Aktivität war auf grampositive Bakterien beschränkt. Ursolsäure zeigte eine stärkere inhibitorische Aktivität als sein Stellungsisomer Oleanolsäure [266]. Obwohl *Bb*ss vor allem populärwissenschaftlich als gramnegative Bakterien eingeordnet werden, zeigen Untersuchungen zum Verhalten bei Gramfärbung und zum Aufbau der Bakterienumhüllung, dass sich *Bb*ss in ihrer Hülle deutlich von typischen gram-negativen Bakterien unterscheiden [267]. Trotzdem zeigten sie im Bakterienmodell der vorliegenden Arbeit analog zu Literaturdaten gram-negativer Bakterienstämme gegenüber Ursolsäure keinen statistisch bedeutenden, wiederholbaren Effekt.

In *D. asp*. finden sich Saponine des Triterpens Oleanolsäure [268]. Ein paralleles Auftreten von Oleanolsäure in *D. sylv.* neben der nachgewiesenen Ursolsäure scheint daher möglich. Eine im Rahmen der Arbeit nicht isolierbare Verbindung zeigte im ^{1}H-NMR in Position des C-20 typische Merkmale von Oleanolsäure (siehe 8.5.4).

9.2 Mikrobiologische Untersuchungen

9.2.1 Diskussion der mikrobiologischen Untersuchungen zu *D. sylv.*

Bisher fehlen in der Literatur Untersuchungen von Pflanzenextrakten an Borrelien und ein dokumentiertes systematisches Vorgehen zum Auffinden der wirksamkeitsbestimmenden Bestandteile. Aufgrund der Berichte von Selbsthilfegruppen über die Anwendung von *D. sylv.* bei Borreliose in Form alkoholischer Tinkturen wurde zunächst ein hydro-ethanolischer Extrakt erstellt und fraktioniert. Die ersten orientierenden Untersuchungen im *in-vitro*-Modell wurden mit den erhaltenen Fraktionen durchgeführt. Die Rest-H_2O- und n-But-Phasen zeigten am achten Untersuchungstag in hoher und mittlerer Konzentration signifikant gegen Kontrolle

erhöhte *Bb*ss-Endkonzentrationen (etwa sechsfach gegen Kontrolle erhöht bei H_2O-Phase 2 mg/ml und n-But-Phase 0,02 mg/ml). Hier ist mutmaßlich die Zufuhr von zusätzlichen Nährstoffen, darunter Aminosäuren und Sacchariden zum Medium ausschlaggebend. Während in der Kontrolle die Nährstoffe bereits aufgebraucht sind und ein weiteres Borrelienwachstum nicht mehr stattfindet (stationäre Phase), teilen sich die Bakterien in den beschriebenen Fraktionen weiter. Auch Spurenelemente und Mineralstoffe könnten eine Rolle spielen, wobei Eisen als für *Bb*ss einzigartigerweise nicht-essentielles Element für den Effekt ausgeschlossen werden kann [269]. Die für *D. sylv.* charakteristischen Iridoide und Bis-Iridoide, die in den polaren Fraktionen angereichert sind, haben offensichtlich keinen wachstumshemmenden Effekt. Nachdem die vorgenannten Phasen keinen (deutlich) hemmenden Einfluss auf das Bakterienwachstum zeigten, wurden die apolareren Phasen untersucht. Alle drei Phasen zeigten in höchster Konzentration wachstumshemmende Effekte verbunden mit einem Rückgang der absoluten Individuenzahl. Die größte Hemmung wurde an Tag 8 in der DCM-Phase 2 mg/ml erzielt. Ursächlich könnten die angereicherten Substanzen aus dem Spektrum der Lipide, triterpenoiden Verbindungen und Phytosterole sein.

Der im zweiten Schritt hergestellte MeOH-Extrakt mit seinen Ausschüttelungen wurde in gleicher Weise untersucht wie der hydroethanolische Extrakt. Bei den polaren Fraktionen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zum EtOH-H_2O-Extrakt: Während die n-But-Fraktion in höchster Konzentration am vierten und achten Tag eine nicht nur schwache, sondern starke Wachstumshemmung zeigten, führte die H_2O-Phase nicht zu einem verstärkten Wachstum. Hier sind das andere Extraktionsverfahren und die Verwendung von getrockneter statt frischer Kardenwurzel ursächlich. MeOH als Lösungsmittel könnte weniger Nährstoffe wie Saccharide und Aminosäuren aus *D. sylv.* gelöst haben, als beim hydroethanolischen Extrakt. Dagegen deutet die stärker wachstumshemmende Wirkung der n-But-Phase auf eine intensivere Extraktion wachstumshemmender Inhaltsstoffe. DC-Untersuchungen dazu zeigten nur minimale Unterschiede der mittels EtOH-H_2O erhaltenen n-But-Fraktion im Vergleich zu der mittels MeOH extrahierten Fraktion. Einige bei VanS-Detektion im Vis violett gefärbte Banden höheren Rf-Wertes als Loganin erschienen in der n-But-Phase des MeOH-Extrakts intensiver. Dies könnte auf ebenfalls terpenoide Substanzen hindeuten, die aufgrund ihrer geringeren Polarität nicht-iridoider Natur sein könnten. Bei den apolaren Fraktionen zeigte die EE-Phase anders als beim EtOH-H_2O-Extrakt keine Hemmwirkung. Auch hier sind ein

anderes Extraktionsvermögen von MeOH beim Ansatz und die Verwendung der getrockneten Droge von *D. sylv.* vermutlich ursächlich. Die in der n-But-Phase intensiveren Banden waren hier etwas weniger stark ausgeprägt. Die DCM- und die Hex-Phase zeigten eine Hemmwirkung. Die dominierenden Inhaltsstoffgruppen waren nach DC-Kontrolle vergleichbar.

Bei den untersuchten vier Hex-Phasen-Subfraktionen aus dem MeOH-Extrakt zeigte sich mit zunehmender Polarität der Subfraktionen eine verstärkte Wachstumshemmung. Kaum wachstumshemmend war die hauptsächlich stark apolare Substanzen wie Chlorophylle enthaltende Fraktion II. Stark mit Phytosterolen wie β-Sitosterol angereichert war Fraktion IV, die ähnlich stark wachstumshemmend wirkte wie die stark mit triterpenoiden Verbindungen wie Ursol- oder Oleanolsäure angereicherte Fraktion V. Die stärkste Hemmung zeigte sich in Fraktion VI, die neben den triterpenoiden Substanzen auch polarere Inhaltsstoffe enthielt. Dabei könnten der Polarität nach auch Lignane wie das isolierte Prinsepiol enthalten sein. Konzentrationsmäßig liegen die untersuchten Fraktionen mit 0,02 bis 2 mg/ml vergleichbar mit Literaturdaten anderer Extrakte. So wurden für Aceton-, Ethanol- und Wasser-Extrakte aus *Scabiosa arenaria* (Forsk) minimale inhibitorische und minimale bakterizide Konzentrationen von 1,25 bis 10 mg/ml gegen *Psoeudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis* erhalten [271]. Auch deutlich höhere einzusetzende minimale inhibitorische Konzentrationen im Microdilution Test mit ca. 500 mg/ml Spezialextrakt aus *Microplumeria anomala* wurden als relevant publiziert [272]. Die loganinhaltige Acetonitril-H_2O-Phase aus diesem Spezialextrakt im Agardiffusionstest war gegen *Escherichia coli* aktiver als der Spezialextrakt selbst. Kürzlich veröffentlicht wurde eine Studie zum „Anti-Krebs-Effekt“ von bis-iridoidhaltigen Extrakten aus *Dipacus fullonum.* In diesen Extrakten wurden Sylvestrosid III / IV und deren Diethylacetale nachgewiesen und deren Zytotoxizität gegen bestimmte Zelllinien untersucht [273]. Eingesetzt wurden Extrakte in Konzentrationen von 0,02 bis 0,1 mg/ml. Dies entspricht dem unteren Teil des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentrationsbereichs von 0,02 bis 2 mg/ml, was eine Vergleichbarkeit ermöglicht. Bei den Zytotoxizitätstests mittels WST-1 Test (water soluble tetrazolinium; für Proliferationstest eingesetzt) und Propidiumiodid-Test (Quantifizierung der nicht lebenden Zellen) zeigten sich interessante Eigenschaften. Während murine embryonale Fibroblasten (NIH/3T3-Zellen) im WST-1 Test keine signifikant geminderte Überlebensfähigkeit zeigten, war diese bei den Krebszelllinien MCF7 (humaner Brustkrebs), MDB-MB-231 (humaner Brustkrebs) und HeLa (humaner Gebärmutterhals-

krebs) signifikant vermindert. Im Propidiumiodid-Test zeigte die Zugabe von 0,1 mg/ml bis-iridoidhaltigen Extrakts zum Medium bei den MCF7- und MDB-MB-231-Zellen eine erhöhte Anzahl toter Zellen. Aus der zitierten Studie [273] kann darauf geschlossen werden, dass gesunde Zellen im Extrakt-Konzentrationsbereich von 0,02 bis etwa 0,2 mg/ml nicht signifikant in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt werden. Die stark polaren Extrakte der vorliegenden Arbeit waren nicht wachstumshemmend gegen *Bb*ss. Dagegen zeigten apolare Phasen wachstumshemmende Effekte. Daher wäre für diese apolaren Extrakte eine vergleichbare Studie auf Zytotoxizität wünschenswert.

Abschließend für die Untersuchungen zu *D. sylv.* wurden drei Reinstoffe untersucht, um Vergleiche zu den Ergebnissen der Extrakttestungen und Hinweise auf mögliche ursächliche Wirkkomponenten zu erhalten. Die beiden isolierten Substanzen Ursolsäure und Prinsepiol wurden neben β-Sitosterol im Bakterienmodell untersucht. Die gefundenen Effekte korrelierten gut mit den Ergebnissen der Hex-Subfraktionen. Während die sehr apolaren Substanzen β-Sitosterol und Ursolsäure wie vermutet keinen deutlichen Effekt zeigten, hemmte das polarere Prinsepiol das Borrelienwachstum signifikant. Der antibakterielle Effekt bestimmter anderer Lignane wie Pinoresinol ist bekannt (siehe auch 9.1.2). Für Ursolsäure liegen Untersuchungen zur fehlenden antibakteriellen Aktivität gegen gramnegative Bakterien vor (siehe 9.1.3). β-Sitosterol als häufiges Phytosterol war als wirksamkeitsbestimmende Komponente ebenso unwahrscheinlich. In Bezug auf die Zytotoxizität speziell des im Modell aktiven Lignans Prinsepiol findet sich ein Hinweis in der Literatur [270]. Untersucht wurde die Zytotoxizität gegen HL-60 (human acute promyelocytic leukemia cells); Hep-G2 (human hepatocellular carcinoma cells), KB (human oropharyngeal epidermoid carcinoma cells) und MDA-MB-231 (human breast cancer cells). Je nach untersuchter Zelllinie war die IC_{50} deutlich höher als bei der eingesetzten Positivkontrolle. Eine therapeutisch nutzbare Selektivität von Prinsepiol für *Bb*ss lässt sich daraus jedoch nicht ableiten: Gegen die untersuchten vier Zelllinien bei WANG [270] lag die IC_{50} zwischen 8,3 und 33,6 µmol/l. In der vorliegenden Arbeit war Prinsepiol (390,4 g/mol) im *Bb*ss-Modell erst mit 0,2 mg/ml entsprechend ca. 512 µmol/l wachstumshemmend. Literaturdaten zur Wirkung gegen normal-gesunde Zelllinien ließen sich nicht finden.

9.2.2 Diskussion der mikrobiologischen Untersuchungen zu Ladanum aus *C. cret.*

Durch Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe waren Bestandteile aus dem ätherischen Öl von *C. cret.* bzw. Ladanum verfügbar [130]. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung existierten keine veröffentlichten Versuche über die Wirkung dieser Inhaltsstoffe auf Borrelien. Bei einer später veröffentlichten Untersuchung des ätherischen Öls von Oregano zeigte sich Carvacrol als wirksamster Bestandteil gegen niedrig passagere *Bb*ss in der stationären Wachstumsphase [271]. Es war eine gewisse Zytotoxizität gegen Säugerzellen vorhanden. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden hochpassagere, mediumadaptierte *Bb*ss verwendet. Carvacrol zeigte auch hier eine starke Aktivität in einer Konzentration ab 0,05 ml/ml. Zu den Labdan-Diterpenen existieren keine Untersuchungen.

Die durchgeführten Experimente mit gelöstem Ladanum und einem Ladanum-$CHCl_3$-Extrakt zeigten die stärkere Wirkung des Ladanums gegenüber dem $CHCl_3$-Extrakt. Dies ist aus Gründen der traditionellen Anwendung des Ladanums interessant, dass direkt oder ölig bzw. alkoholisch gelöst verwendet wird (siehe 3.2.1). Der Chloroform-Extrakt, der gerade diterpenoide Verbindungen anreichert, enthielt offensichtlich weniger wirksamkeits-bestimmende Inhaltsstoffe als die Ladanumlösung. In einer Kontroll-DC (FM8) mit *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (*epi*-MO), *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-Manoyloxid (AcO-*epi*-MO), *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid (OH-*epi*-MO) und Carvacrol gegen den Ladanum-$CHCl_3$-Extrakt und einen methanolischen *C. cret*-Extrakt konnte diese Beobachtung, ausgehend von der Vermutung, dass Carvacrol und andere ätherisch-Öl-Bestandteile wirksamkeits-bestimmend sind, bestätigt werden: Während die Labdan-Diterpene deutlich nachweisbar sind, ist Carvacrol im $CHCl_3$-Extrakt - anders als im ätherischen Öl - nicht nachzuweisen.

Bei der Untersuchung der fünf Reinstoffe stellten sich Carvacrol und *epi*-MO als deutlich wachstumshemmend gegen *Bb*ss heraus. *Ent*-Manoyloxid (MO) zeigte einen deutlich schwächeren Effekt, während die beiden anderen Substanzen einen höchstens minimalen Effekt zeigten. Als ätherisch-Öl-Bestandteil ist Carvacrol zum Schutz vor Fraßfeinden und zur Abwehr von Krankheitserregern in *C. cret.* prädestiniert. Seine antibakteriellen Effekte sind auch vor der existierenden Literaturlage plausibel. Interessant ist der Unterschied zwischen den Stereoisomeren MO und *epi*-MO. Da ein Stereoisomer eine deutlich stärkere Wachstumshemmung zeigte, ist ein unspezifischer Effekt z. B. durch Einlagerung in die Zell-

membran und Störung der Lipid-Doppelschicht oder Einbau in die Zellwand eher unwahrscheinlich. Denkbar wäre eine spezifische Hemmung essentieller Proteine oder Enzyme in *Bb*ss. Aufgrund deutlich erhöhter Polarität von OH-*epi*-MO gegenüber den anderen Manoyloxiden könnte hier eine fehlende Aufnahme in die Bakterienzelle ausschlaggebend sein. AcO-*epi*-MO als acetyliertes OH-*epi*-MO ist wieder deutlich apolarer, allerdings polarer als *epi*-MO (Kontroll-DC, s. o.). Auch hier ist der wachstumshemmende Effekt kaum vorhanden. Die Substanz ist deutlich größer und eine Andockmöglichkeit am Ring A für Interaktionen mit Proteinen erschwert. Eine weiterführende Ermittlung des Wirkortes (Target) und daraus mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen ließen Erklärungen zu verschiedenen sterischen Anordnungen der Labdan-Diterpene zu. Carvacrol ist mit seinem aromatischen Ringsystem strukturell verschieden von den *Cistus*-Diterpenen und könnte einen völlig anderen Wirkmechanismus haben, obgleich ein gleicher Wirkort nicht auszuschließen ist. Als wirksamkeitsbestimmend für Ladanum kommt Carvacrol durchaus in Betracht. Im Ladanum-$CHCl_3$-Extrakt ließ es sich nicht nachweisen. Dieser wiederum wirkte interessanterweise schwächer als eine direkt Ladanum-Lösung im Medium, was letztere Vermutung zusätzlich bestätigt.

9.2.3 Allgemeine Ausführungen zu den mikrobiologischen Untersuchungen

Die durchgeführten Untersuchungen konnten das Ziel der Arbeit erreichen und sowohl Hinweise auf antibakterielle Fraktionen und Inhaltsstoffe von *D. sylv.* liefern, als auch Carvacrol und die isolierten Labdan-Diterpene aus *C. cret.* untersuchen und in ihren wachstumshemmenden Eigenschaften charakterisieren. Mit den Ergebnissen im *in-vitro*-Borrelienmodell lässt sich naturgemäß noch keine Aussage zur Wirksamkeit von Extrakten und Reinstoffen im Organismus machen. Grundsätzlich sind die Problematik der Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von *D. sylv.* (bei peroraler Anwendung von Pflanzenextrakten ist neben der Verteilung und Metabolisierung im Körper auch die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt entscheidend) bisher vollkommen unbeleuchtet. Für die untersuchten Substanzen aus *C. cret.* existieren einige pharmakokinetische Untersuchungen. So wurden z. B. Abbauprodukte und die zeitliche Ausscheidung von Carvacrol in Rattenurin [272] und die Carvacrol-Metabolisierung in humanen Leber-Mikrosomen untersucht, wobei bei letzterer eine CYP2A6-Metabolisierung nachgewiesen wurde [273]. Im Rattenurin wurde ein hoher Anteil unverändert ausgeschiedenen Carvacrols nachgewiesen. Zur Metabolisierung im menschlichen Organismus finden sich keine Literaturdaten. Insgesamt verfügt Carvacrol über

ein breites Spektrum an *in-vitro*-Effekten und viele denkbare Einsatzgebiete. Die geringe Löslichkeit und Bioverfügbarkeit limitieren allerdings den Einsatz bisher, obwohl verschiedene technologische Versuche zur verbesserten Verabreichung - etwa mit Liposomen - gemacht wurden [274]. Für Manoyloxide sind keine pharmakokinetischen Studien verfügbar.

9.3 Weiterführende Betrachtungen

Den dargelegten Untersuchungen der Arbeit könnte man als nächsten Schritt Versuche zur Zytotoxizität an etablierten Zelllinien anschließen. Besonders wichtig wären diese Untersuchungen an gesunden humanen Zelllinien. Damit ließe sich herausfinden, ob ein Einsatz im Organismus überhaupt in relevanten Wirkkonzentrationen möglich ist. Dies wäre sowohl für Prinsepiol aus *D. sylv.*, wie auch für Carvacrol und *epi*-MO aus *C. cret.* wünschenswert.

Darüber hinaus könnten immunologische Tests klären, ob der von W.-D. STORL [22] propagierte Einsatz von *D. sylv*. gegen die Erkrankung der Lyme-Borreliose möglicherweise auch ohne antibakterielle Wirkung im menschlichen Organismus plausibel sein könnte. Eventuell ist eine Beeinflussung immunologischer Reaktionen, wie sie bei der Lyme-Arthritis als Spätfolge einer Infektion auftreten [152], denkbar. Ließen sich therapeutische Effekte bei tolerierbaren unerwünschten Wirkungen nachweisen, könnte man die Untersuchungen auf andere Erkrankungen wie Hautinfektionen ausdehnen. Anhaltspunkt dafür sind volksmedizinische Indikationen [2], [5]. Auch die Entwicklung einer halbfesten Zubereitung auf der Haut zur prophylaktischen Anwendung nach einem Zeckenstich wäre ein großer therapeutischer Fortschritt. Eine Phase-III-Studie mit einem Azithromycin-Gel zur kurativen Anwendung nach einem Zeckenstich verlief erfolglos [275], [276].

Die schon in der Antike gekannte Heilwirkung von Ladanum verdient nicht nur hinsichtlich ihrer möglichen Anwendung bei Borreliose weiterer Untersuchungen. Aufmerksamkeit bei nachfolgenden Studien sollte besonders den in der Arbeit untersuchten Terpenoiden entgegengebracht werden, für die in der Literatur *in vitro* Untersuchungen vorliegen [118].

Erstmalig wurden mit dieser Arbeit die antibakteriellen Effekte von *D. sylv.* und Ladanum-Inhaltsstoffen aus *C. cret.* gegen *Bb*ss untersucht. Mit den erhaltenen Aktivitäten bieten sich interessante Anhaltspunkte für weitere Forschungen.

ZUSAMMENFASSUNG UND THESEN

10 Zusammenfassung und Thesen

Die erst in den letzten Jahren vom deutschen Ethnobotaniker W.-D. STORL in den öffentlichen Fokus gebrachte Wilde Karde (*Dipsacus sylvestris* HUDS., *D. sylv.*) war der Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Anhand STORLS anthroposophischer Überlegungen wurden alkoholisch-wässrige Wurzelextrakte dieser Pflanze von Borreliosepatienten eingesetzt. Laienberichte deuteten auf eine Besserung der Symptomatik betroffener Patienten. Diese wissenschaftlich bisher nicht untersuchten Hinweise waren Motivation, *D. sylv. in vitro* an *Borrelia burgdorferi* s.s. (*Bb*ss), dem Erreger der Lyme-Borreliose, zu untersuchen. Die bisher häufig unzureichende Behandlung vor allem zu spät erkannter und chronischer Verlaufsformen der Borreliose macht die Suche nach neuen Therapieansätzen bedeutsam. Die übliche Antibiotikagabe hat nur den Erreger direkt als Angriffsziel und versagt teilweise. Dabei ist die Suche nach antibakteriellen Wirkstoffen nur ein wichtiger Schritt. Etwaige symptomatische Ansätze, die z. B. Entzündungen im Gelenkbereich oder immunologische Reaktionen beeinflussen, fehlen. Für *D. sylv.* existieren bisher weder eine Arzneibuchmonographie noch nachgewiesene Wirkungen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wirkung von Extrakten und Reinstoffen aus *D. sylv.* sowie aus der graubehaarten Zistrose (*Cistus creticus* L., *C. cret.*) auf *Bb*ss zu untersuchen. Dazu wurde ein *in-vitro-Bb*ss-Testmodell etabliert und an die Testung unterschiedlicher Extrakte angepasst. Die Extrakte mussten hergestellt, analysiert und fraktioniert sowie Reinstoffe isoliert werden.

Aufgrund der von erkrankten Menschen volksmedizinisch gegen Borreliose eingesetzten hydroethanolischen ($EtOH/H_2O$) Extrakte wurde die Hypothese aufgestellt, dass in $EtOH/H_2O$ oder methanolischen (MeOH) Fraktionen Komponenten mit Wirksamkeit gegen Borreliose enthalten sind. Besonderes Augenmerk wurde dabei zunächst auf Iridoide gelegt, da deren Vorkommen in *D. sylv.* bekannt und ihre Anreicherung in den polaren Extraktphasen anzunehmen war. Iridoide als charakteristische Inhaltsstoffe von *D. sylv.* wurden als aktivitätsbestimmend vermutet.

Da über die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe noch Unklarheit herrschte, waren arttypische analytische Leitsubstanzen zur Identitätsbestimmung und als Qualitätsindikator für den Aufarbeitungsprozess notwendig. Die charakteristischen Iridoidglykoside eigneten sich hierfür besonders. Zunächst mussten für die Analytik von *D. sylv.* dünnschichtchromato-

graphische (DC) Methoden etabliert werden, um Ausgangsmaterial und erhaltene Extrakte zu charakterisieren. Besonders aussagekräftig war dabei ein Stufenelutionsverfahren, das nach einer Trennung mit halber Laufstrecke in einem polaren Fließmittel eine Trennung mit einem apolaren Fließmittelsystem auf derselben DC-Platte folgen ließ. Die Wurzeln der wilden Karde wurden schonend mit EtOH/H_2O und vergleichend mit MeOH extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden mit Lösungsmitteln steigender Polarität ausgeschüttelt, um Substanzgruppen in unterschiedlichen Fraktionen zu konzentrieren. In der Restwasserphase des EtOH/H_2O-Extrakts konnten so iridoide Verbindungen angereichert werden. Mittels DC- und Säulen-Verfahren (Aluminiumoxid, Normal- und Umkehrphase) konnten daraus zwei Iridoide separiert werden. Die isolierten iridoiden DC-Hauptbanden Loganin und Cantleyosid eigneten sich als analytische Leitsubstanzen für die durchgeführten Untersuchungen mittels DC, Kapillarzonenelektrophorese und Mizellarer Elektrokinetischer Kapillarchromatographie (MEKC). Sie waren in den wässrigen und alkoholischen Extrakten von *D. sylv.* neben Chlorogen- und Kaffeesäure in ausreichend hoher Konzentration für eine instrumentelle Gehaltsbestimmung mithilfe der MEKC vorhanden. In den für die Isolierungen zur Testung im Bakterienmodell verwendeten *D. sylv.*-Wurzeln waren 0,27 ± 0,01 % Loganin und 1,02 ± 0,08 % Cantleyosid enthalten.

Die polaren Phasen der EtOH/H_2O- und MeOH-Wurzelextrakte wurden nach Ausschüttelung mit Lösungsmitteln steigender Polarität in drei verschiedenen Konzentrationen dem Bakterienmodell zugeführt. Jeweils drei Parallelansätze wurden mikroskopisch an drei Zähltagen ausgewertet. Alle Experimente wurden wiederholt. Die iridoidreichen Wasserphasen der Ausschüttelungen zeigten jedoch an *Bb*ss keine Wachstumshemmung. Ebenso inaktiv waren die ausgeschüttelten n-Butanol-Fraktionen. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den prognostizierten wachstumshemmenden Effekten von *D. sylv.* auf *Bb*ss und dem Vorhandensein iridoider analytischer Leitsubstanzen oder polarer *D. sylv.*-Phasen konnte somit ausgeschlossen werden.

Aufgrund obengenannter Ergebnisse wurde vermutet, dass sich die wirksamen Komponenten bei der Aufarbeitung der Extrakte in den apolaren Ausschüttelungsfraktionen angereichert hatten. Es wurde die Hypothese entwickelt, dass sich die wachstumshemmenden Effekte im Bakterienmodell bei Zugabe der apolaren Pflanzenextrakte sowie darin enthaltener Reinsubstanzen zeigen müssten. Damit ließe sich die Aktivität einzelner Extrakte und Reinstoffe

auf *Bb*ss *in vitro* konzentrationsabhängig nachweisen. Das Bakterienkulturmodell wurde zu diesem Zweck durch Zusatz von Polysorbat 80 für die Testung lipophiler Substanzen und Extrakte optimiert. Vergleiche von tensidfreien Kulturen mit solchen mit 5 %-iger wässriger Polysorbat 80-Lösung zeigten die Einsetzbarkeit des Emulgators.

Als analytische Marker im apolaren Spektrum wurden aus der Hexan- und Dichlormethan (DCM)-Phase des MeOH-Extrakts das Triterpen Ursolsäure und das Lignan Prinsepiol über mehrere chromatographische Zwischenstufen isoliert. Mit Prinsepiol wurde erstmals ein Lignan aus *D. sylv.* erhalten. In den apolaren Ausschüttelungen mit Ethylacetat, DCM und n-Hexan, insbesondere in der DCM-Phase, waren im Borrelienmodell wie vermutet deutliche wachstumshemmende Effekte erkennbar. Aus Zeit- und Kapazitätsgründen wurden als Reinstoffe stellvertretend Prinsepiol, β-Sitosterol und Ursolsäure jeweils in vier Konzentrationen untersucht. Während sich bei β-Sitosterol und Ursolsäure keine statistisch signifikanten Unterschiede im Wachstum feststellen ließen, waren die Borrelienkonzentrationen in den mit Prinsepiol versetzten *Bb*ss-Kulturen signifikant um bis zu 92,1 % (Zähltag 4, Zusatz von 0,2 mg/ml, $p \leq 0{,}01$) erniedrigt. Es zeigte sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Wachstumshemmung. Das Lignan Prinsepiol ist trotz dieses Effekts als alleinige Wirksubstanz der DCM-Phase unwahrscheinlich, da die DCM-Phase in vergleichbaren Konzentrationen die *Bb*ss-Konzentrationen um bis zu 99,9 % (Zähltag 4, Zusatz von 2,0 mg/ml, $p \leq 0{,}01$) reduzieren konnte.

Das für apolare Stoffe und Extrakte aus *D. sylv.* erfolgreich optimierte Bakterienmodell sollte anschließend Untersuchungen an lipophilen Phasen und Inhaltstoffen des ätherischen Öls von *C. cret.* und dessen Harz, dem Ladanum, verwendet werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich mit dem Borrelienmodell eine konzentrationsabhängige *in-vitro*-Aktivität ausgewählter Extrakte und Reinstoffe aus *C. cret.* gegen *Bb*ss nachweisen lässt und diese sich auf die Manoyloxide als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe von *C. cret.* zurückführen lässt.

Das Modell wurde für die Untersuchung von Ladanum, Carvacrol und vier Labdanditerpenen aus *C. cret.* eingesetzt. *Ent*-13-*epi*-Manoyloxid und Carvacrol hemmten das *Bb*ss-Wachstum um 99,7 % bzw. 99,2 % (jeweils Zähltag 4, Zusatz von 0,2 mg/ml, $p \leq 0{,}01$). Ein Ladanum-Chloroform-Extrakt, in dem sich mittels DC kein Carvacrol nachweisen ließ, wirkte

schwächer wachstumshemmend auf *Bb*ss (94,0 %, Zähltag 4, $p \leq 0{,}01$) als direkt gelöstes Ladanum (99,4 %, Zähltag 4, $p \leq 0{,}01$). Carvacrol scheint einen wichtigen Anteil am wachstumshemmenden Effekt des Ladanums auf *Bb*ss zu besitzen. Auch *ent*-13-*epi*-Manoyloxid besitzt einen wachstumshemmenden Effekt und trägt vermutlich zur Gesamtwirksamkeit bei. Anders substituierte und stereoisomere Manoyloxide hatten diesen Effekt nicht oder nur minimal.

Die wachstumshemmenden Effekte Prinsepiols und apolarer *D. sylv*.-Extrakte, insbesondere der DCM-Ausschüttelung, sowie von Ladanum, Carvacrol und *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (von *C. cret.*) auf *Bb*ss wären allein schon durch die bisherigen Grenzen der etablierten Therapie interessant für eine mögliche *in-vivo*-Anwendung bei Borreliose. Neben Experimenten an anderen Bakterienstämmen wären als nächster Schritt Zytotoxizitätsversuche an etablierten Zelllinien nötig, um die Selektivität der wachstumshemmenden Wirkung auf *Bb*ss oder Prokaryoten allgemein festzustellen. Vollkommen offen ist außerdem die Frage, ob sich die Wirkstoffe eines aus Pflanzenextrakt oder Reinstoff geschaffenen Arzneimittels in ausreichender Konzentration an den Wirkort befördern ließen. Dazu müssten pharmakokinetische Untersuchungen durchgeführt werden. Die beschriebenen weiterführenden Forschungsansätze waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit in absehbarem Umfang nicht durchführbar. Gezeigt werden konnten antibakterielle *in-vitro*-Effekte von *D. sylv.* und Ladanum sowie dreier Reinstoffe gegenüber *Bb*ss. Zusammen mit der erstmaligen Isolierung eines Lignans (Prinsepiol) aus *D. sylv.* wurden Anreize für weitere Forschungen zu pflanzlichen Wirksubstanzen bei Borreliose und zur Analytik von *D. sylv.* geschaffen.

11 Summary and theses

Teasel (*Dipsacus sylvestris* HUDS., *D. sylv.)*, been brought recently into public interest by the German ethnobotanist W.-D. STORL, was in the spotlight of the present study. On the basis of STORLS anthroposophical considerations, alcoholic aqueous root extracts of this plant were used by Lyme disease patients. Lay reports indicated an improvement in the symptoms of affected patients. These scientifically unexamined indications were the motivation to investigate *D. sylv.* on *Borrelia burgdorferi* s.s. (*Bb*ss) *in vitro*, the causative agent of Lyme disease. The up to now often insufficient treatment of Lyme disease, especially of late diagnosed and chronic forms of the disease, makes the search for new therapeutic approaches important. The usual administration of antibiotics targets the pathogen directly only, but fails from time to time. The search for antibacterial agents is only one important step. Possible symptomatic approaches, which for example influence inflammations in the joints or immunological reactions, are missing. For *D. sylv.* neither a Pharmacopoeia monograph nor proven effects exist so far. The aim of this work was therefore to investigate the effect of extracts and pure substances from *D. sylv*. and from the hoary rock-rose (*Cistus creticus* L., *C. cret.*) on *Bb*ss. For this purpose, an *in vitro Bb*ss test model was established and adapted to the testing of different extracts. The extracts had to be prepared, analysed and fractionated, and pure substances had to be isolated.

Based on the hydroethanolic (EtOH/H_2O) extracts that were used folk medicinally by people suffering from Lyme disease, it was hypothesised that EtOH/H_2O or methanolic (MeOH) fractions contain components with efficacy against Lyme disease. Special attention was initially paid to iridoids, since their occurrence in *D. sylv.* was known and their enrichment in the polar extract phases was expected. Iridoids as characteristic constituents of *D. sylv.* were assumed to determine the activity.

Since the active constituents were still unknown, species-specific analytical lead substances were necessary to determine identity and to serve as a quality indicator for the processing procedure. The characteristic iridoid glycosides were particularly suitable for this purpose. First, thin-layer chromatographic (TLC) methods had to be established for the analysis of *D. sylv.* in order to characterise the crude material and the extracts obtained. A step-wise elution method was particularly successful. The first step consisted of an elution with a polar

eluent for half the separation distance. This was followed, as a second step, by a separation with an apolar eluent on the same TLC plate. The roots of teasel were gently extracted with EtOH/H_2O and - for comparison - with MeOH. These extracts obtained were further partitioned with solvents of increasing polarity to concentrate substance groups in different fractions. Thus, iridoid compounds could be enriched in the residual water phase of the EtOH/H_2O extract. Using TLC and column chromatographic methods (aluminium oxide, normal and reversed phase), two iridoids could be separated. The isolated iridoids loganin and cantleyoside, as main iridoid zones on TLC, are suitable analytical markers for the TLC, CZE and MEKC analyses performed in this study. In addition to chlorogenic and caffeic acid, they were present in the aqueous and alcoholic extracts of *D. sylv.* in sufficiently high concentrations for instrumental quantification using MEKC. The *D. sylv.* roots used for the isolation and testing in the bacterial model contained 0.27 ± 0.01 % loganin and 1.02 ± 0.08 % cantleyoside.

The polar phases of the EtOH/H_2O and MeOH root extracts were examined in the bacterial model in three different concentrations after liquid-liquid extraction with solvents of increasing polarity. Three parallel preparations each were evaluated microscopically on three counting days. All experiments were repeated. However, the water phases rich in iridoids showed no growth inhibition on *Bb*ss. The n-butanol fractions from liquid-liquid extraction were equally inactive. A causal relationship between the predicted growth-inhibiting effects of *D. sylv.* on *Bb*ss and the presence of iridoid lead substances or polar *D. sylv.* phases could thus be excluded.

Based on the above-mentioned results, it was assumed that the active components had accumulated in the apolar fractions during the partitioning of the extracts. The hypothesis was developed that the growth-inhibiting effects in the bacterial model can be shown by the addition of apolar plant extracts or their pure constituents. This would allow to verify the dependence of the activity of individual extracts and pure substances on *Bb*ss *in vitro* in a concentration-dependent manner. The bacterial culture model was optimised for this purpose by adding polysorbate 80 for testing lipophilic substances and extracts. Comparisons of surfactant-free cultures with those with 5 % aqueous polysorbate 80 solution showed the applicability of the emulsifier.

As analytical markers in the apolar spectrum, the triterpene ursolic acid and the lignan prinsepiol were isolated from the hexane and dichloromethane (DCM) phases of the MeOH extract via several chromatographic steps. Prinsepiol was the first lignan obtained from *D. sylv.* In the apolar fractions from liquid-liquid extraction with ethyl acetate, DCM and n-hexane, especially in the DCM phase, clear growth-inhibiting effects were recognisable in the borrelia model, as suspected. For reasons of time and capacity, prinsepiol, β-sitosterol and ursolic acid as typical constituents of the apolar phases were investigated as pure substances for their antimicrobial properties in four concentrations each. While no statistically significant differences in growth were found for β-sitosterol and ursolic acid, the concentrations in the prinsepiol-containig *Bb*ss cultures were significantly reduced by up to 92.1 % (counting day 4, addition of 0.2 mg/ml, $p \leq 0.01$). There was a clear concentration dependence of the growth inhibition. Despite this, the lignan prinsepiol is unlikely to be the sole active substance of the DCM phase, since the DCM phase was able to reduce the *Bb*ss concentration by up to 99.9 % (counting day 4, addition of 2.0 mg/ml, $p \leq 0.01$) at comparable concentrations.

The bacterial model successfully optimised for apolar substances and extracts from *D. sylv.* was also used for studies on lipophilic phases and constituents of the essential oil of *C. cret.* and its resin, Ladanum. The hypothesis was formulated that a concentration-dependent *in vitro* activity of selected extracts and pure substances from *C. cret.* against *Bb*ss can be demonstrated with the Borrelia model and that this can be attributed to the manoyloxides as active constituents of *C. cret.*

The *Bb*ss model was subsequently used for the investigation of ladanum, carvacrol and four labdane diterpenes from *C. cret*. *Ent*-13-*epi*-manoyl oxide and carvacrol inhibited the growth of *Bb*ss by 99.7 % and 99.2 %, respectively (each day 4, addition of 0.2 mg/ml, $p \leq 0.01$). A carvacrol-free (TLC control) ladanum-$CHCl_3$ extract had a weaker growth inhibiting effect on *Bb*ss (94.0 %, day 4, $p \leq 0.01$) than a solution of ladanum (99.4 %, count day 4, $p \leq 0.01$). Carvacrol seems to play an important role in the growth-inhibiting effect of ladanum on *Bb*ss. Also, *ent*-13-*epi*-manoyl oxide has a growth-inhibiting effect and is thought to contribute to overall efficacy. Other substituted and stereoisomeric manoyloxides had no or only a minimal effect.

The growth-inhibiting effects of prinsepiol and apolar *D. sylv.* extracts, especially those of the DCM phase, as well as of ladanum, carvacrol, and *ent*-13-*epi*-manoyloxide (from *C. cret.*) on *Bb*ss are promising. These compounds and extracts are interesting candidates for further investigations, since the established therapy of Lyme disease is still limited to few antibiotics. In addition to experiments on other bacterial strains, cytotoxicity experiments on established cell lines will be necessary as a next step to determine the selectivity of the growth-inhibiting effect on *Bb*ss or prokaryotes in general. Another still unsolved question is whether active substances of the drug could be transported to the site of action in sufficient concentrations. For this purpose, pharmacokinetic investigations will have to be carried out. These further research approaches described above were not feasible in the context of the present study, since this would have exceeded the scope of this work. However, antibacterial properties against *Bb*ss were shown for *D. sylv.* extracts and ladanum as well as for three pure substances. Together with the first-time isolation of a lignan (prinsepiol) from *D. sylv.*, incentives for further research on active plant substances for the treatment of borreliosis and for the analysis of *D. sylv*. were established.

ANHANG

12 GC-MS-Chromatogramme und Massenspektren

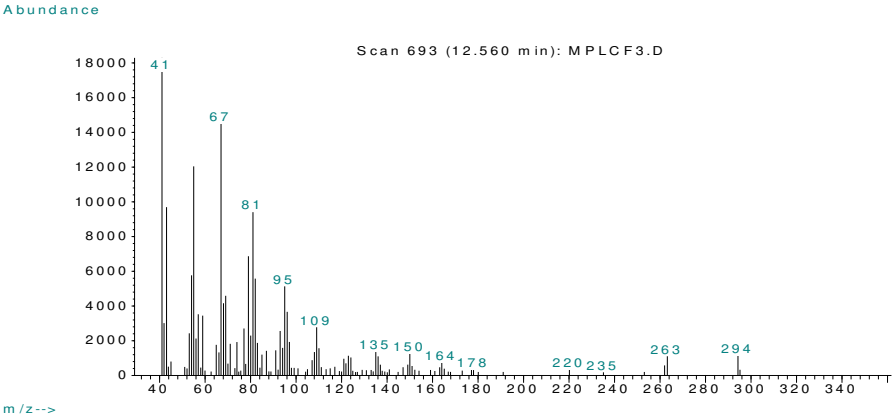


Abb. Anhang 12-1: Massenspektrum von „MPLC_Fr3“ 12,57 min ((*trans*, *trans*)-Octadeca-9,12-diensäuremethylester) der GC-MS-Untersuchung

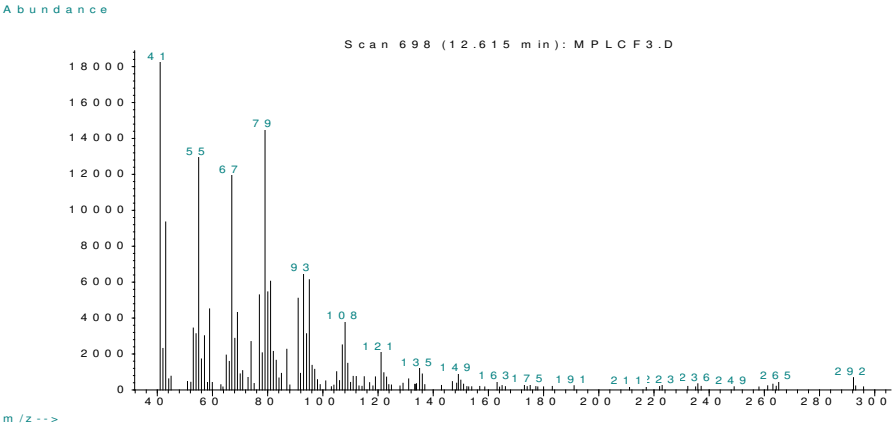


Abb. Anhang 12-2: Massenspektrum von „MPLC_Fr3“ 12,62 min (Linolsäuremethylester) der GC-MS-Untersuchung

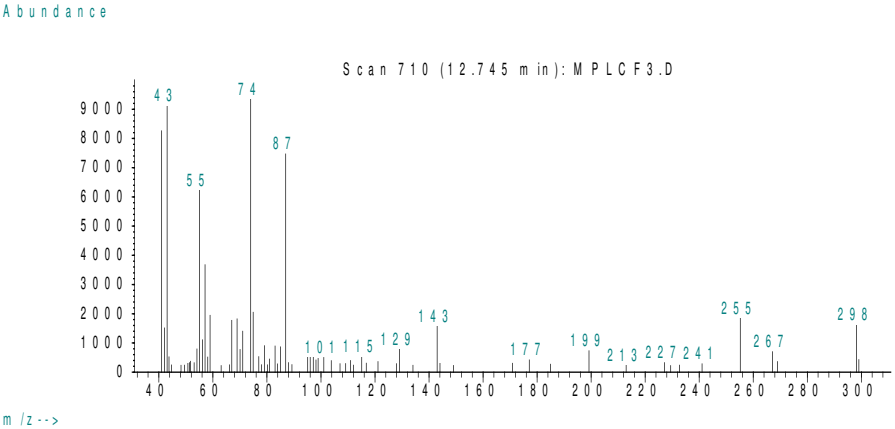


Abb. Anhang 12-3: Massenspektrum von „MPLC_Fr3“ 12,75 min (Stearinsäuremethylester) der GC-MS-Untersuchung

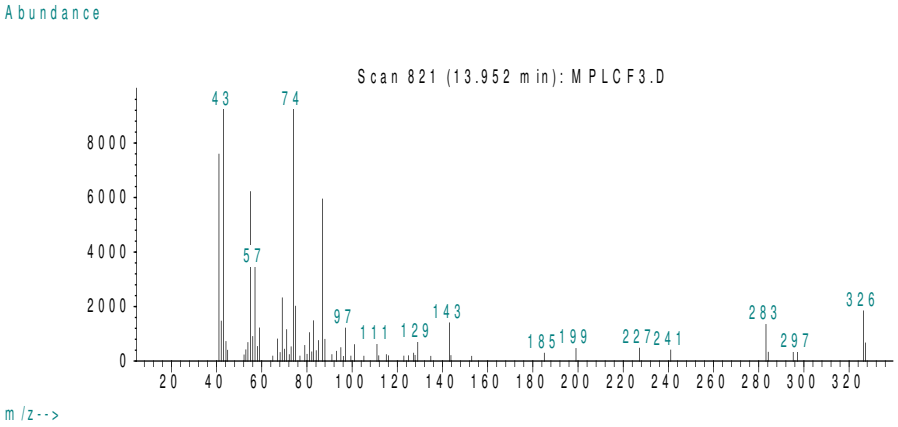


Abb. Anhang 12-4: Massenspektrum von „MPLC_Fr3“ 13,96 min (Arachinsäuremethylester) der GC-MS-Untersuchung

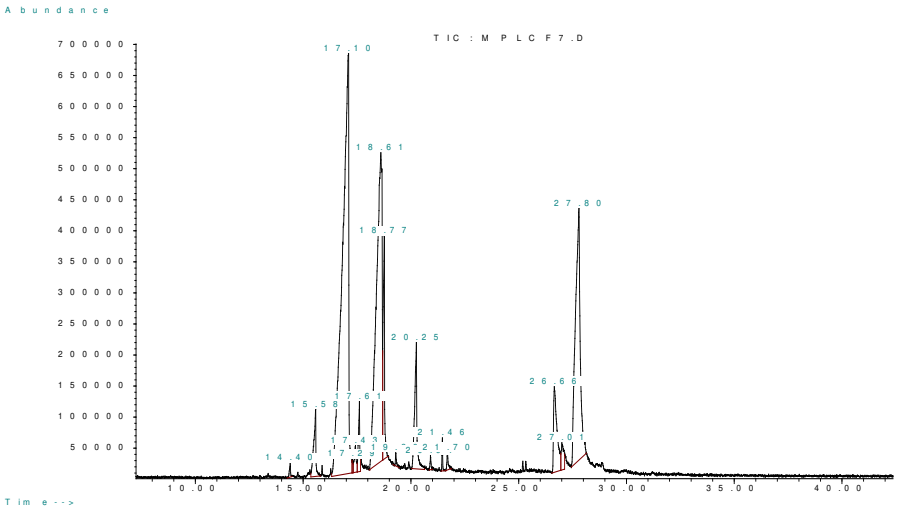


Abb. Anhang 12-5: GC-MS-Chromatogramm von Fraktion „MPLC_Fr7“

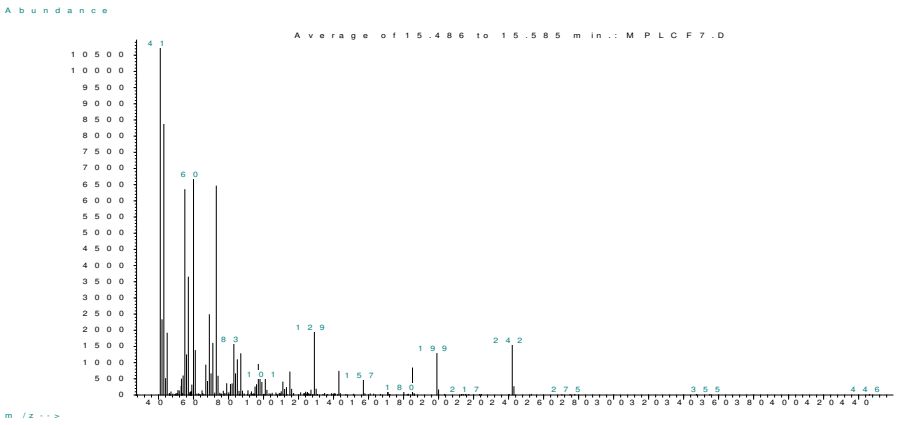


Abb. Anhang 12-6: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 15,58 min (Pentadecansäure) der GC-MS-Untersuchung

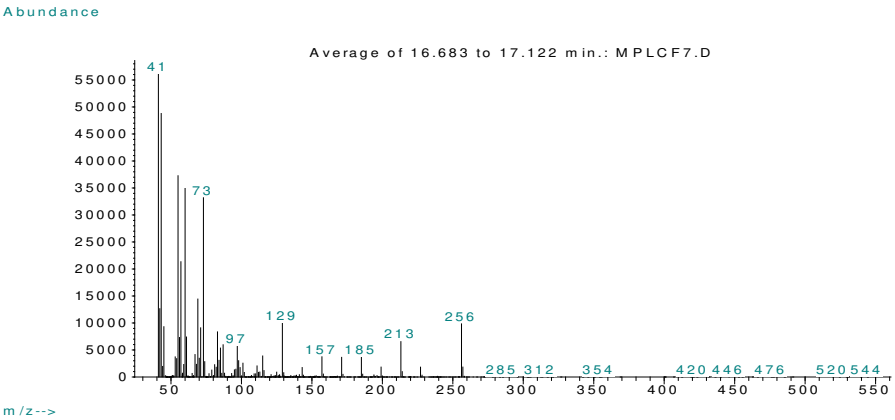


Abb. Anhang 12-7: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 17,10 min (Palmitinsäure) der GC-MS-Untersuchung

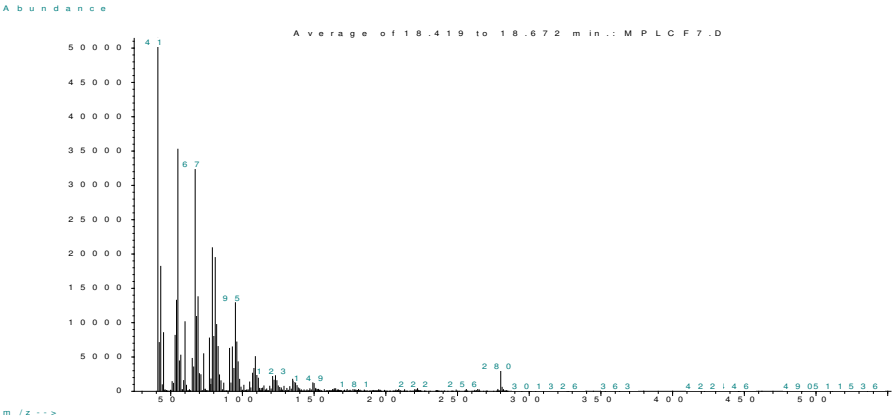


Abb. Anhang 12-8: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 18,61 min (Linolsäure) der GC-MS-Untersuchung

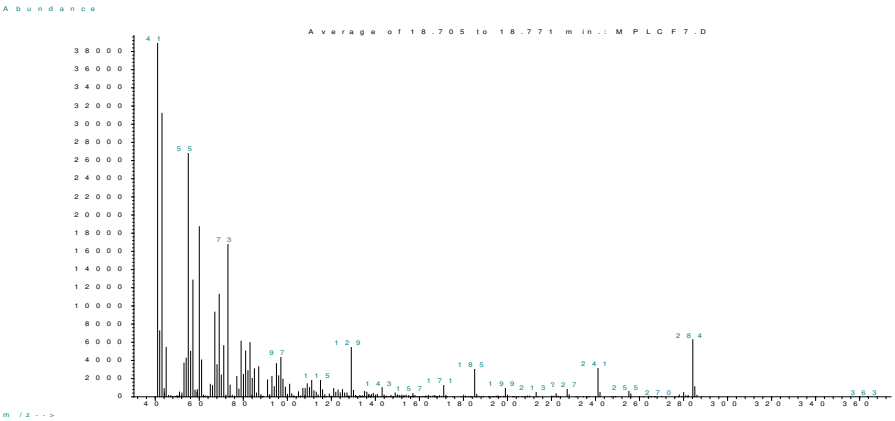


Abb. Anhang 12-9: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 18,77 min (Stearinsäure) der GC-MS-Untersuchung

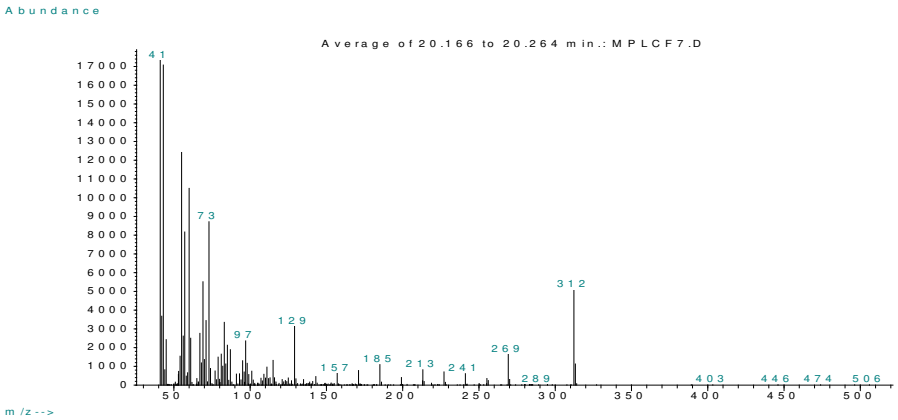


Abb. Anhang 12-10: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 20,25 min (Arachinsäure) der GC-MS-Untersuchung

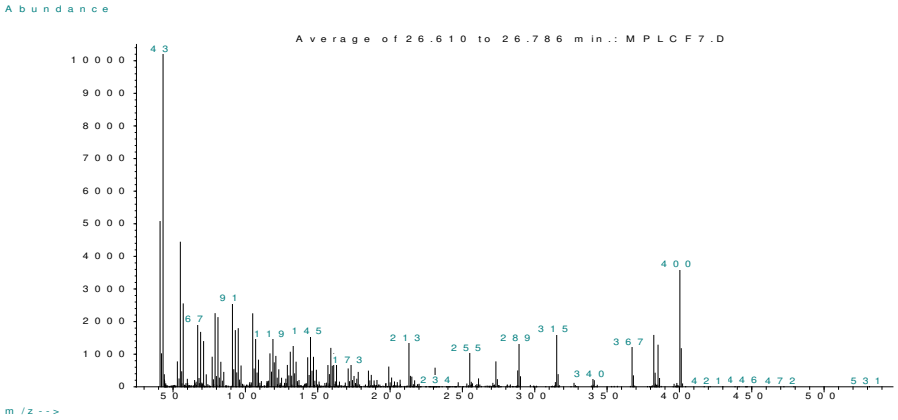


Abb. Anhang 12-11: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 26,66 min (Δ5-Ergostenol) der GC-MS-Untersuchung

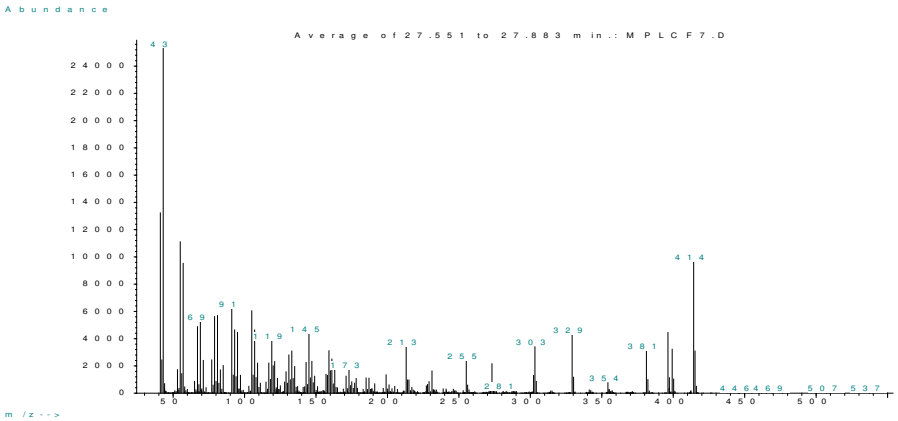


Abb. Anhang 12-12: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 27,80 min (Sitosterol) der GC-MS-Untersuchung

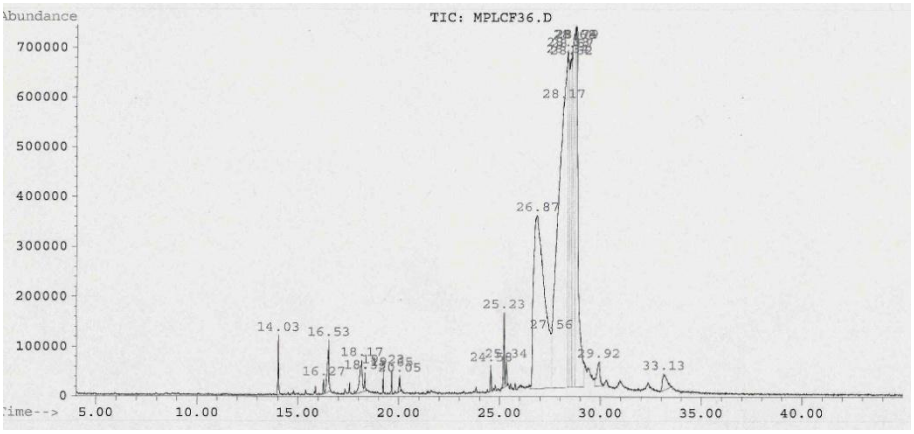


Abb. Anhang 12-13: GC-MS-Chromatogramm von Fraktion „MPLC_Fr36“

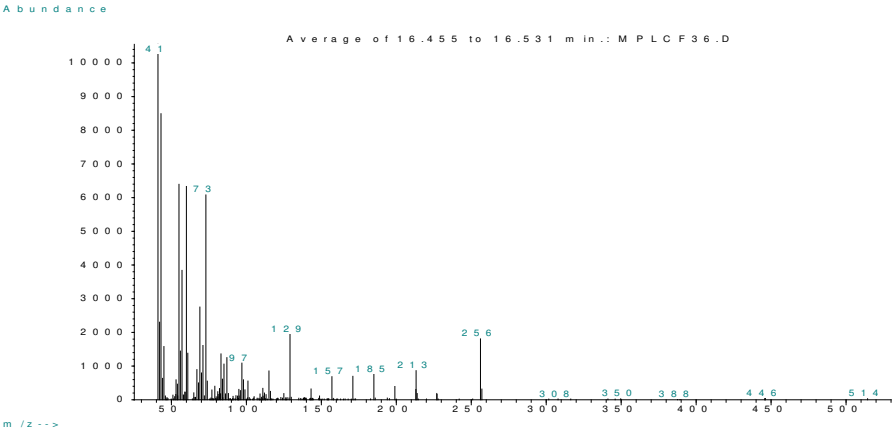


Abb. Anhang 12-14: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 16,53 min (Palmitinsäure) der GC-MS-Untersuchung

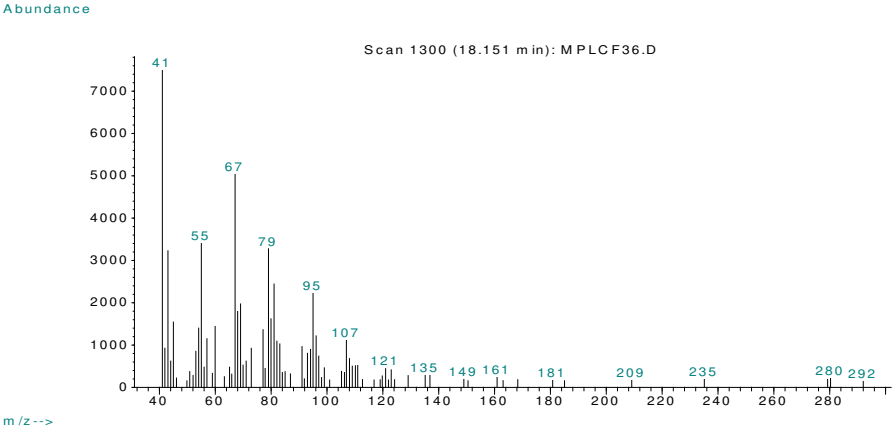


Abb. Anhang 12-15: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 18,15 min (Linolsäure) der GC-MS-Untersuchung

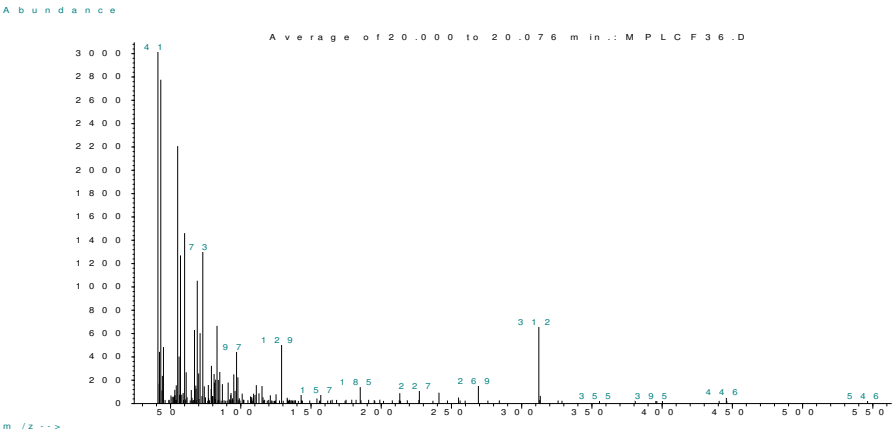


Abb. Anhang 12-16: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 20,05 min (eventuell Arachinsäure) der GC-MS-Untersuchung

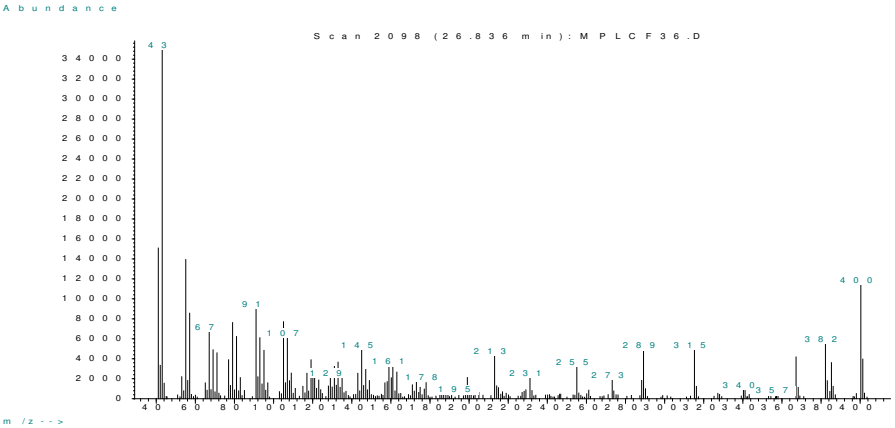


Abb. Anhang 12-17: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 26,87 min (eventuell Δ5-Ergostenol) der GC-MS-Untersuchung

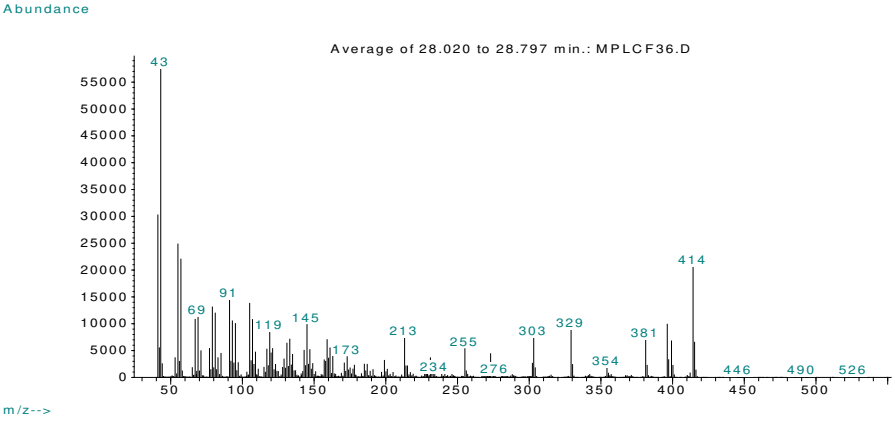


Abb. Anhang 12-18: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 28,54 min (Sitosterol) der GC-MS-Untersuchung

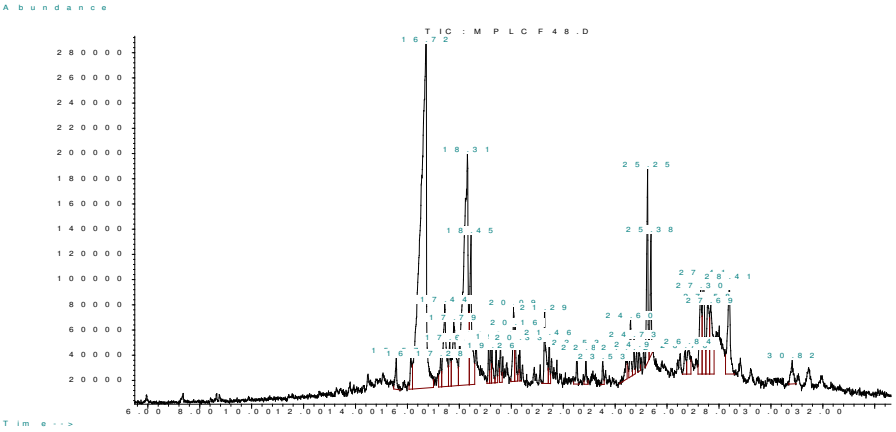


Abb. Anhang 12-19: GC-MS-Chromatogramm von Fraktion „MPLC_Fr48“

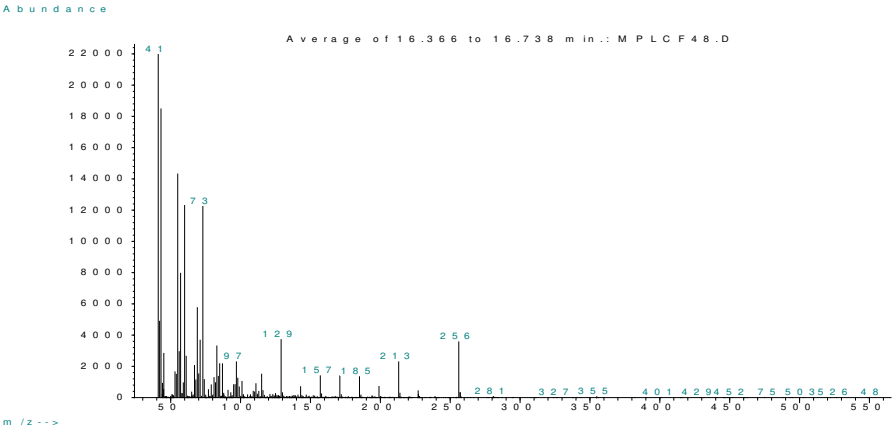


Abb. Anhang 12-20: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 16,72 min (Palmitinsäure) der GC-MS-Untersuchung

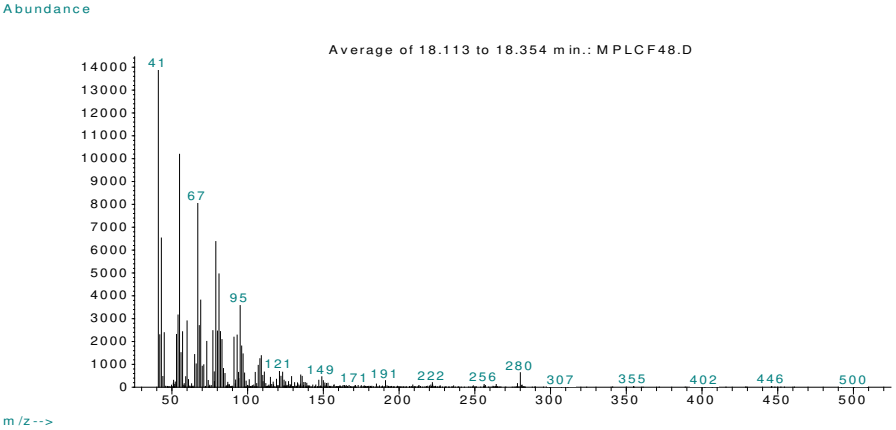


Abb. Anhang 12-21: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 18,31 min (Linolsäure) der GC-MS-Untersuchung

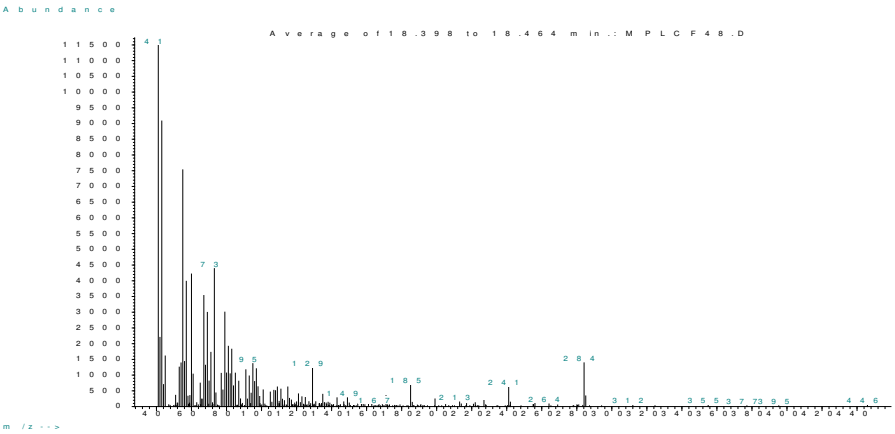


Abb. Anhang 12-22: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 18,45 min (Stearinsäure) der GC-MS-Untersuchung

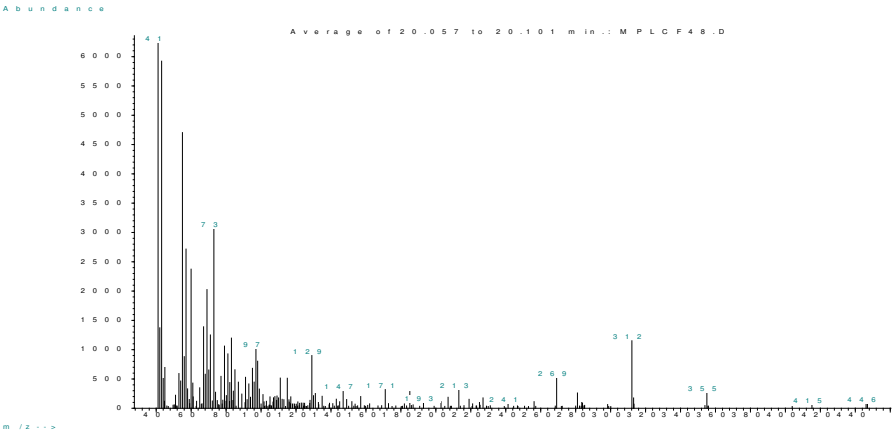


Abb. Anhang 12-23: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 20,09 min (Arachinsäure) der GC-MS-Untersuchung

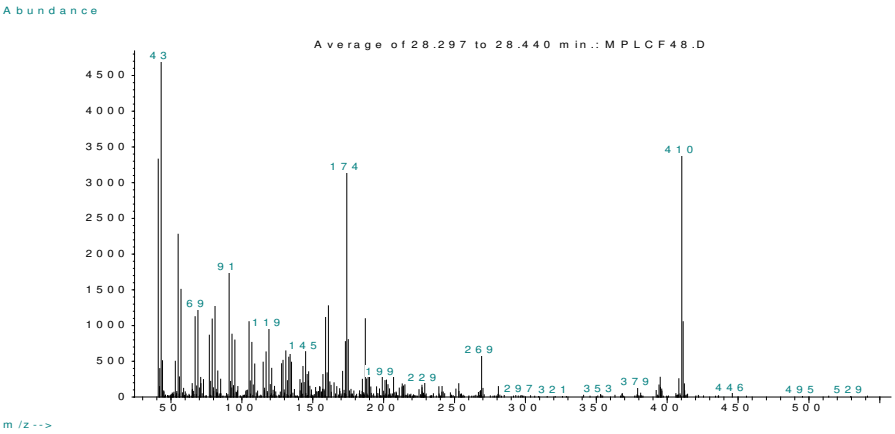


Abb. Anhang 12-24: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 28,41 min (Stigmasta-3,5-dien-7-on) der GC-MS-Untersuchung

13 CE-Daten, Spektren und Elektropherogramme

Tab. Anhang 13-1: Berechnung der relativen Migration von Loganin, CS und KS im Referenz-Gemisch „„Ref_CE1“ in der CZE-Methode. t = absolute Migrationszeit (bei MeOH: t = Totzeit t_0), t_{netto} = Netto-Migrationszeit, r = relative Migration, SD (r) = Standardabweichung von r, MW (r) = arithmetisches Mittel von r, SD % (r) = relative Standardabweichung von r

Substanz	Messung 1			Messung 2			Messung 3			Statistik		
	t [min]	t_{netto} [min]	r	t [min]	t_{netto} [min]	r	t [min]	t_{netto} [min]	r	SD (r) [min]	**MW (r) [min]**	SD % (r) [%]
MeOH	2,413	0,000	0,000	2,417	0,000	0,000	2,424	0,000	0,000	0	**0,000**	-
Loganin	2,504	0,091	0,013	2,517	0,100	0,014	2,517	0,093	0,013	0,001	**0,013**	4,603
CS	4,546	2,133	0,306	4,575	2,158	0,305	4,588	2,164	0,304	0,001	**0,305**	0,301
KS	6,287	3,874	0,555	6,363	3,946	0,557	6,387	3,963	0,557	0,001	**0,557**	0,176
PS	9,387	6,974	1,000	9,496	7,079	1,000	9,542	7,118	1,000	0	**1,000**	0,000

Tab. Anhang 13-2: Berechnung der absoluten Migrationszeiten aus den relativen Migrationen der drei Referenzgemische und Vergleich mit den tatsächlich gemessenen Zeiten aus dem jeweiligen in 7.4.2.2.2 abgebildeten CZE-Elektropherogramm von „DS_fW_CE1“, „DS_WD_CE1“ und „DA_CE1“ (t (ber.) = (berechnete) absolute Migrationszeit, t_{netto} (ber.) = (berechnete) Netto-Migrationszeit, r = relative Migration, MW (r) = durchschnittliche relative Migration der Referenzsubstanzen aus Tab. Anhang 13-1, %-Abweichung t = prozentuale Abweichung der gemessenen absoluten Migrationszeit von der berechneten absoluten Migrationszeit)

		t [min]	t_{netto} [min]	r		MW (r)	t_{netto} ber. [min]	t ber. [min]	t [min]	%-Abweichung t
„DS_fW_CE 1“	MeOH	2,428	0,000	0						
	Phth.sre.	9,604	7,176	1						
					Loganin	0,013	0,096	2,524	2,558	- 1,319 %
					CS	0,305	2,188	4,616	4,613	+ 0,065 %
					KS	0,557	3,994	6,422	6,363	+ 0,925 %
„DS_WD_CE 1“	MeOH	2,442	0,000	0						
	Phth.sre.	9,700	7,258	1						
					Loganin	0,013	0,097	2,539	2,571	- 1,231 %
					CS	0,305	2,213	4,655	4,671	- 0,343 %
					KS	0,557	4,039	6,481	6,363	+ 1,862 %
„DA_CE1“	MeOH	2,448	0,000	0						
	Phth.sre.	9,821	7,373	1						
					Loganin	0,013	0,099	2,547	2,583	- 1,398 %
					CS	0,305	2,248	4,696	4,704	- 0,169 %
					KS	0,557	4,103	6,551	6,529	+ 0,345 %

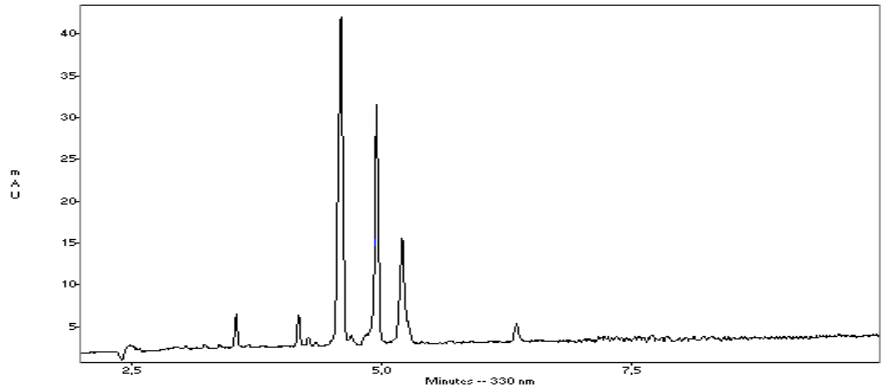


Abb. Anhang 13-1: CZE-Elektropherogramm von „DS_fW_CE1“ bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32

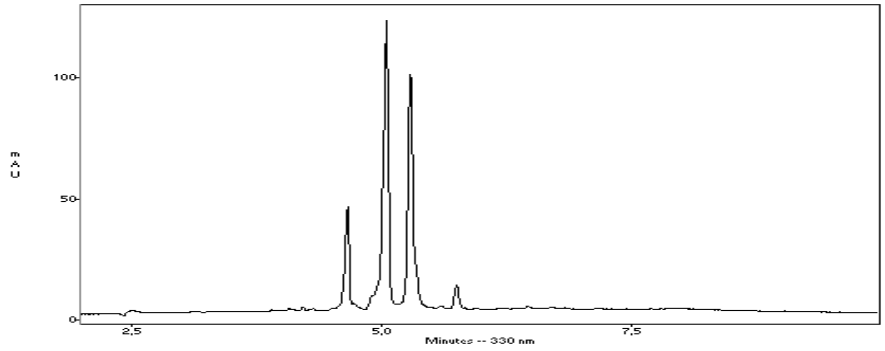


Abb. Anhang 13-2: CZE-Elektropherogramm von „DS_WD_CE1“ bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32

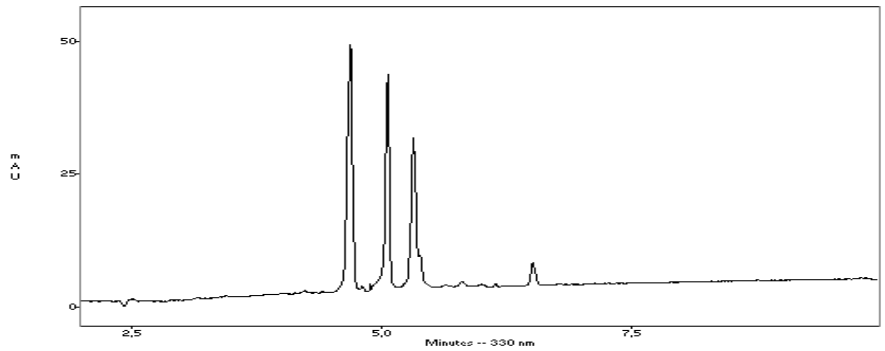


Abb. Anhang 13-3: CZE-Elektropherogramm von „DA_CE1“ bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32

Tab. Anhang 13-3: Berechnung der relativen Migration von Loganin, CS und KS im Referenz-Gemisch „Ref_CE1“ in der MEKC-Methode. t = absolute Migrationszeit (bei MeOH: t = Totzeit t_0), t_{netto} = Netto-Migrationszeit, r = relative Migration, SD (r) = Standardabweichung von r, MW (r) = arithmetisches Mittel von r, SD % (r) = relative Standardabweichung von r

Substanz	Messung 1			Messung 2			Messung 3			Statistik		
	t [min]	t_{netto} [min]	r	t [min]	t_{netto} [min]	R	t [min]	t_{netto} [min]	r	SD (r) [min]	**MW (r) [min]**	SD % (r) [%]
MeOH	2,729	0,000	0,000	2,775	0,000	0,000	2,754	0,000	0,000	0	**0,000**	-
Loganin	3,246	0,517	0,077	3,308	0,533	0,076	3,279	0,525	0,075	0,0007	**0,076**	0,964
CS	4,967	2,238	0,331	5,100	2,325	0,331	5,058	2,304	0,330	0,0009	**0,330**	0,279
KS	6,654	3,925	0,581	6,858	4,083	0,581	6,817	4,063	0,581	0,0003	**0,581**	0,056
PS	9,483	6,754	1,000	9,808	7,033	1,000	9,746	6,992	1,000	0	**1,000**	0

Tab. Anhang 13-4: Berechnung der absoluten Migrationszeiten aus den relativen Migrationen der drei Referenzgemische und Vergleich mit den tatsächlich gemessenen Zeiten aus dem jeweiligen in 7.4.2.3.2 abgebildeten MEKC-Elektropherogramm von „DS_fW_CE1“, „DS_WD_CE1“ und „DA_CE1“ (t (ber.) = (berechnete) absolute Migrationszeit, t_{netto} (ber.) = (berechnete) Netto-Migrationszeit, r = relative Migration, MW (r) = durchschnittliche relative Migration der Referenzsubstanzen aus Tab. Anhang 13-3, %-Abweichung t = prozentuale Abweichung der gemessenen absoluten Migrationszeit von der berechneten absoluten Migrationszeit)

		t [min]	t_{netto} [min]	r		MW (r)	t_{netto} ber. [min]	t ber. [min]	t [min]	%-Abweichung t
„DS_fW_CE 1“	MeOH	2,754	0,000	0						
	Phth.sre.	9,629	6,875	1						
					Loganin	0,076	0,521	3,275	3,279	+ 0,117 %
					CS	0,330	2,272	5,026	5,046	+ 0,396 %
					KS	0,581	3,994	6,748	6,746	- 0,028 %
„DS_WD_CE 1“	MeOH	2,771	0,000	0						
	Phth.sre.	9,867	7,096	1						
					Loganin	0,076	0,538	3,309	3,313	+ 0,123 %
					CS	0,330	2,345	5,116	5,171	+ 1,072 %
					KS	0,581	4,122	6,893	6,929	+ 0,519 %
„DA_CE1“	MeOH	2,754	0,000	0						
	Phth.sre.	9,629	6,875	1						
					Loganin	0,076	0,521	3,275	3,279	+ 0,117 %
					CS	0,330	2,272	5,026	5,033	+ 0,137 %
					KS	0,581	3,994	6,748	6,754	+ 0,091 %

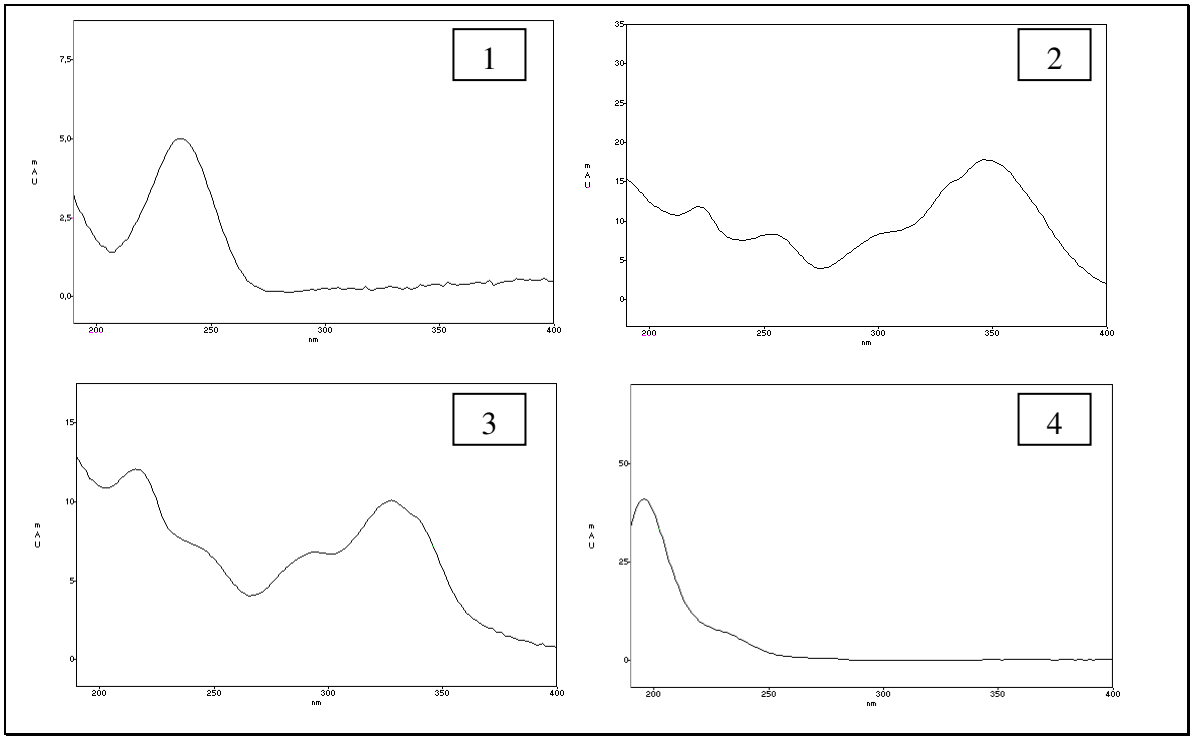


Abb. Anhang 13-4: UV-Spektren 190 - 400 nm von Loganin (1), CS (2), KS (3) und PS (4) extrahiert aus dem PDA-Elektropherogramm von „Ref_CE1“ (Boratpuffer pH 9,4; 45 mmol/l; 20 mmol/l SDS-Zusatz)

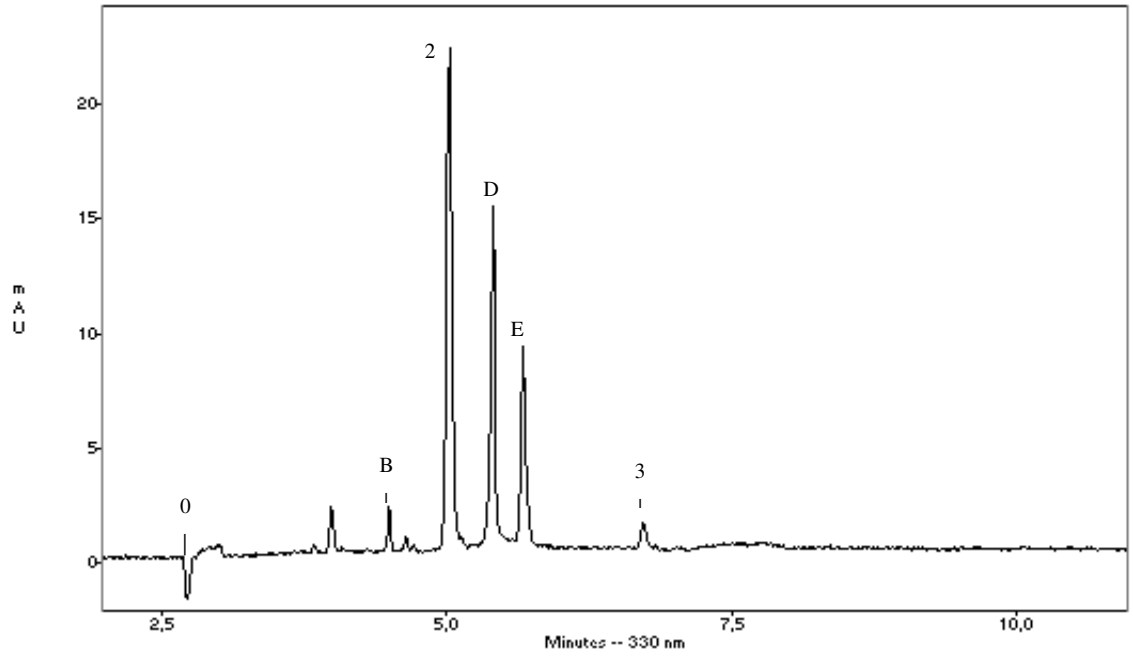


Abb. Anhang 13-5: MEKC-Elektropherogramm vom „DS_fW_CE1“ bei 330 nm; 0 - MeOH, 2 - CS, 3 - KS, B, D u. E = unbekannte Peaks, Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,4, 45 mmol/l, 20 mmol/l SDS-Zusatz, 30 °C, 15 kV, 11 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster

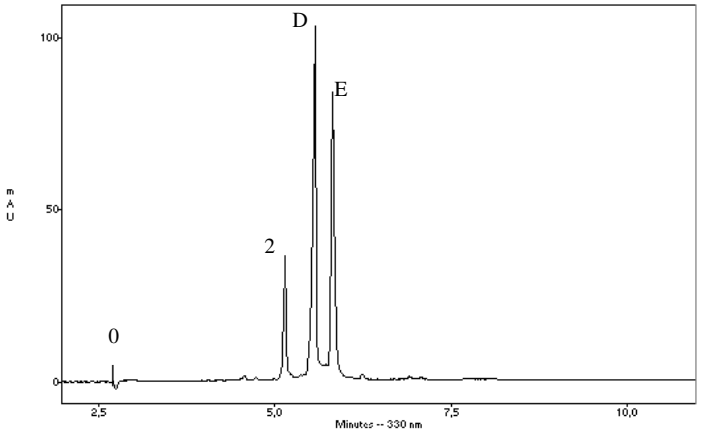


Abb. Anhang 13-6: MEKC-Elektropherogramm von „DS_WD_CE1“ bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. Anhang 13-5, zusätzlich: D, E = unbekannte Peaks

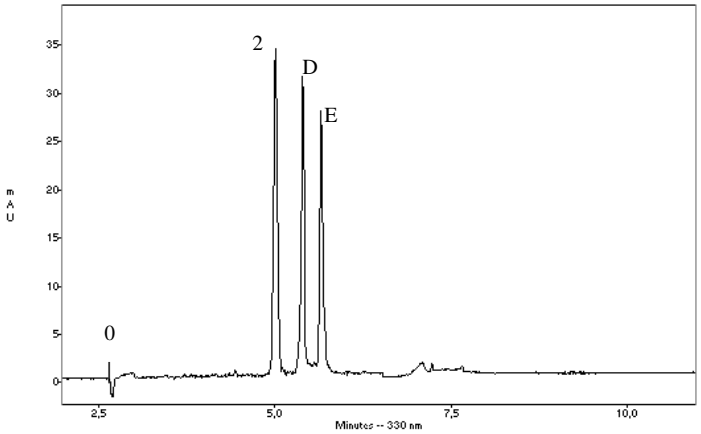


Abb. Anhang 13-7: MEKC-Elektropherogramm von D. Chin.-Gemisch CE bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. Anhang 13-5, zusätzlich: D, E = unbekannte Peaks

Tab. Anhang 13-5: Berechnung der relativen Retentionen der unbekannten Peaks in Abb. 8-37, Abb. 8-38 und Abb. 8-39 der MEKC-Fingerprintmethode. t = absolute Migrationszeit, t_{netto} = Netto-Migrationszeit, r = relative Migration

„DS_fW_CE1“	t [min]	t_{netto} [min]	r	„DS_WD_CE1“	t [min]	t_{netto} [min]	r	„DA_CE1“	t [min]	t_{netto} [min]	r
A	3,733	0,979	0,142	D	5,592	2,821	0,398	A^I	3,729	1,004	0,145
B	4,517	1,763	0,256	E	5,842	3,071	0,433	C^I	5,221	2,496	0,362
C_1	5,173	2,448	0,360	X	6,175	3,404	0,480	D	5,417	2,692	0,390
C_2	5,208	2,454	0,357					E	5,679	2,954	0,428
D	5,425	2,671	0,389					3^I	6,754	4,029	0,584
E	5,692	2,938	0,427					Y	6,975	4,250	0,616
F	7,196	4,442	0,646					F^I	7,113	4,388	0,636
G	7,775	5,021	0,730					Z	7,246	4,521	0,655

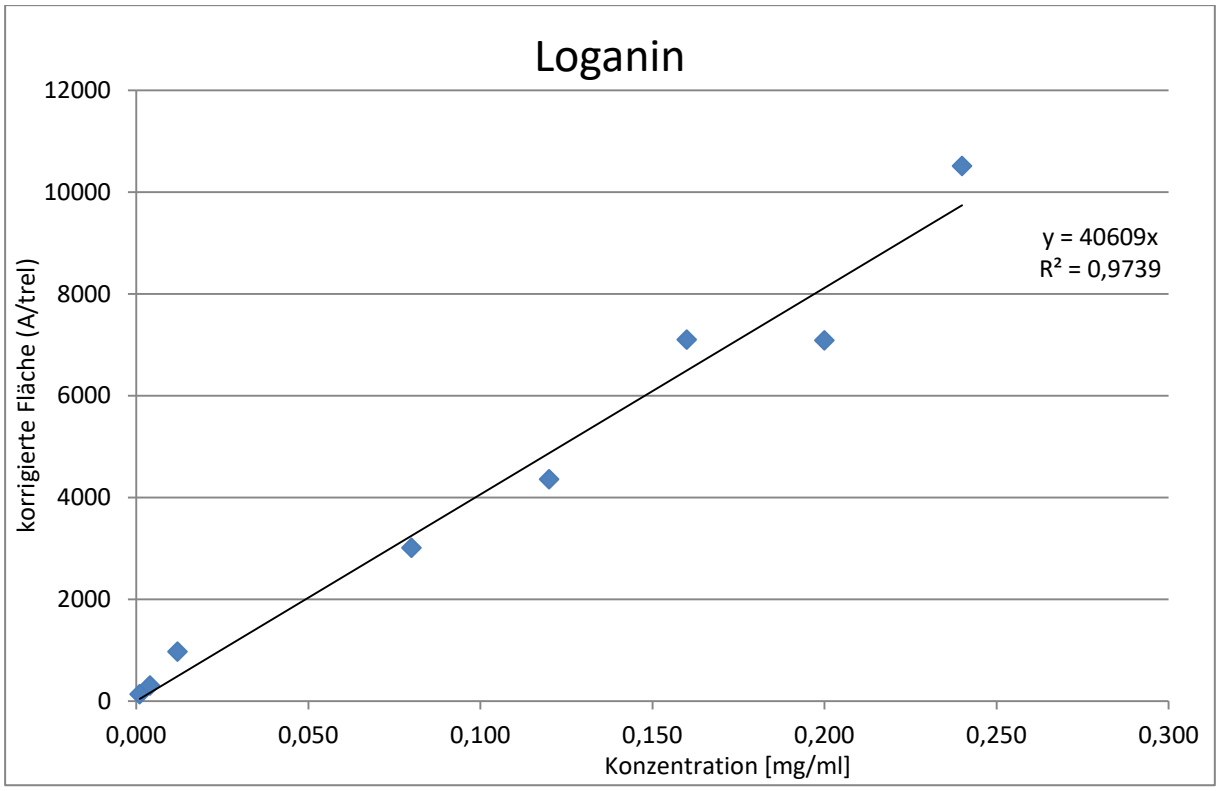


Abb. Anhang 13-8: Kalibriergerade Loganin von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3

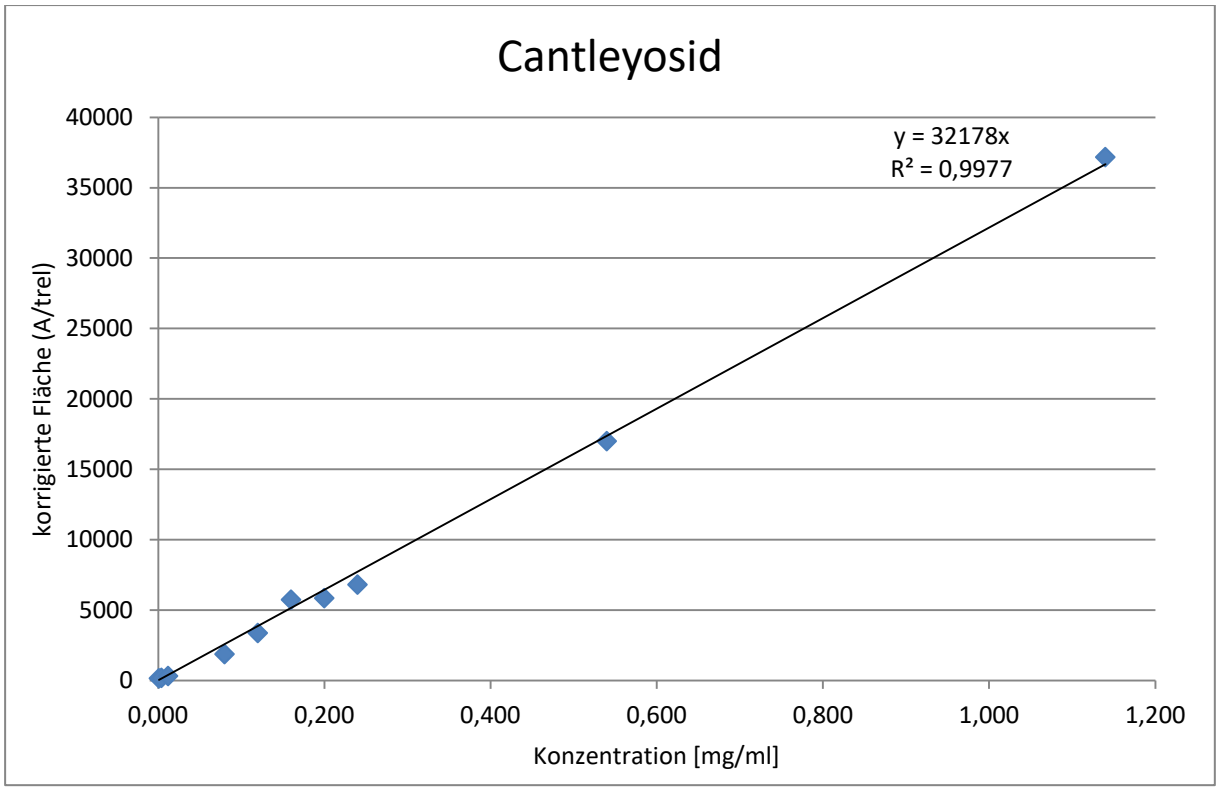


Abb. Anhang 13-9: Kalibriergerade Cantleyosid von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3

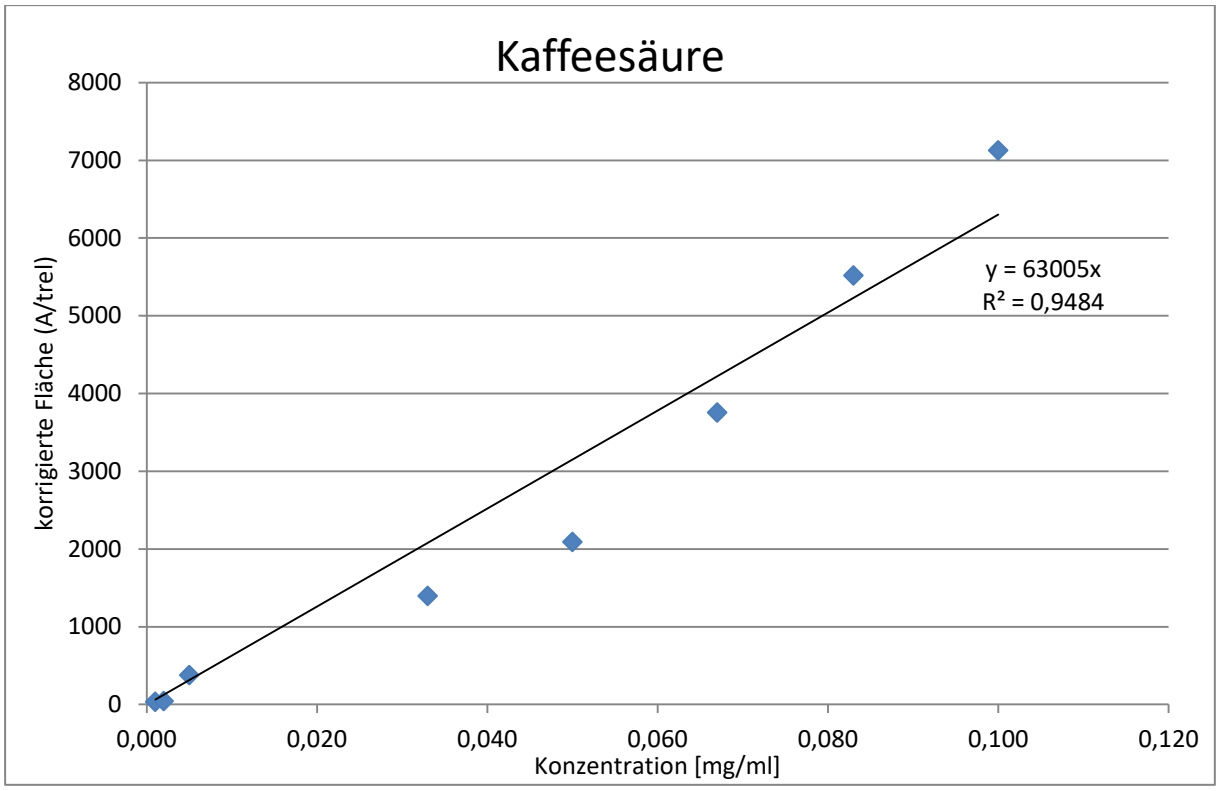


Abb. Anhang 13-10: Kalibriergerade KS von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3

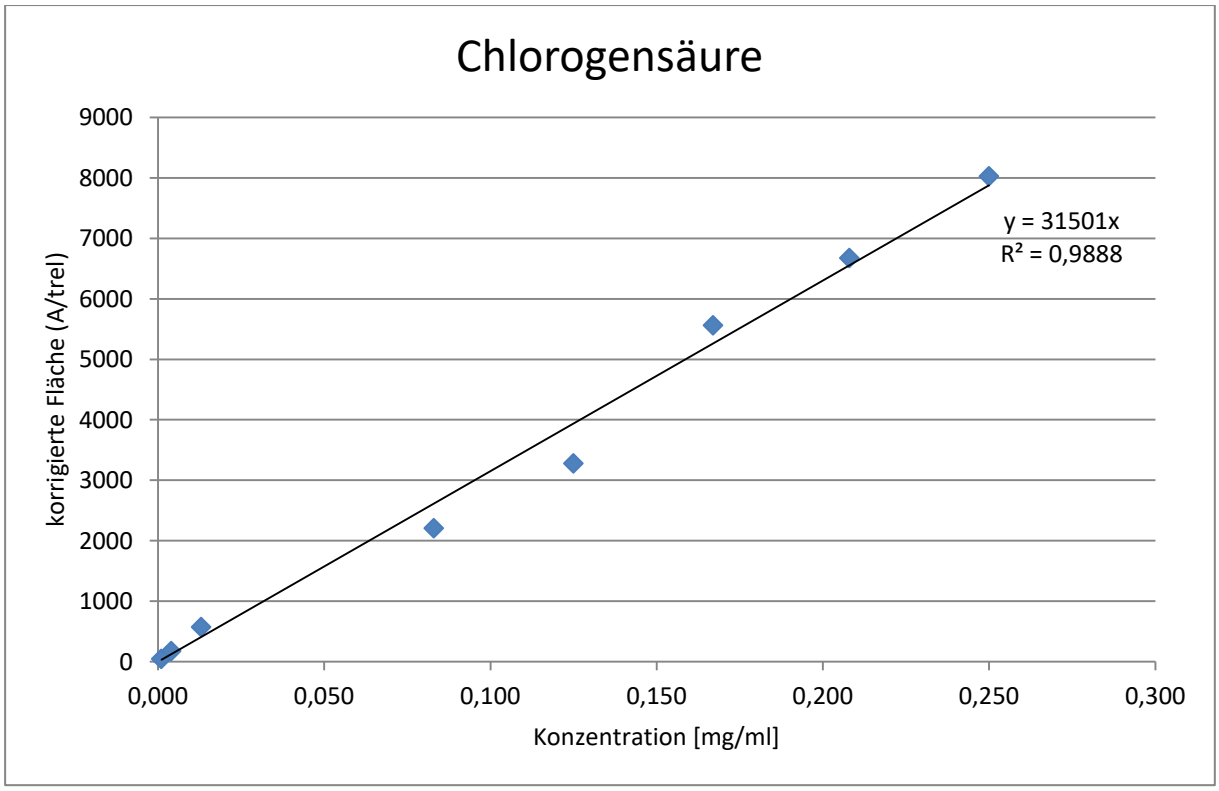


Abb. Anhang 13-11: Kalibriergerade CS von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3

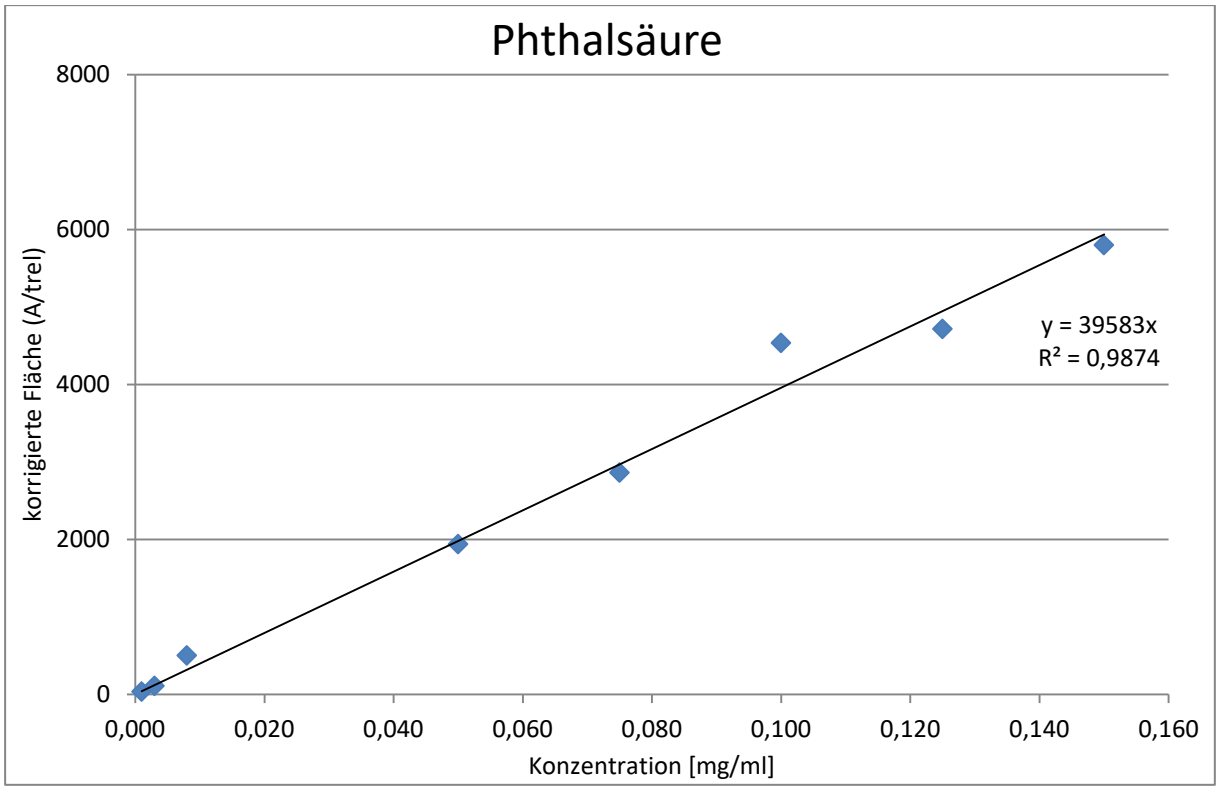


Abb. Anhang 13-12: Kalibriergerade PS von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3

14 NMR-Spektren

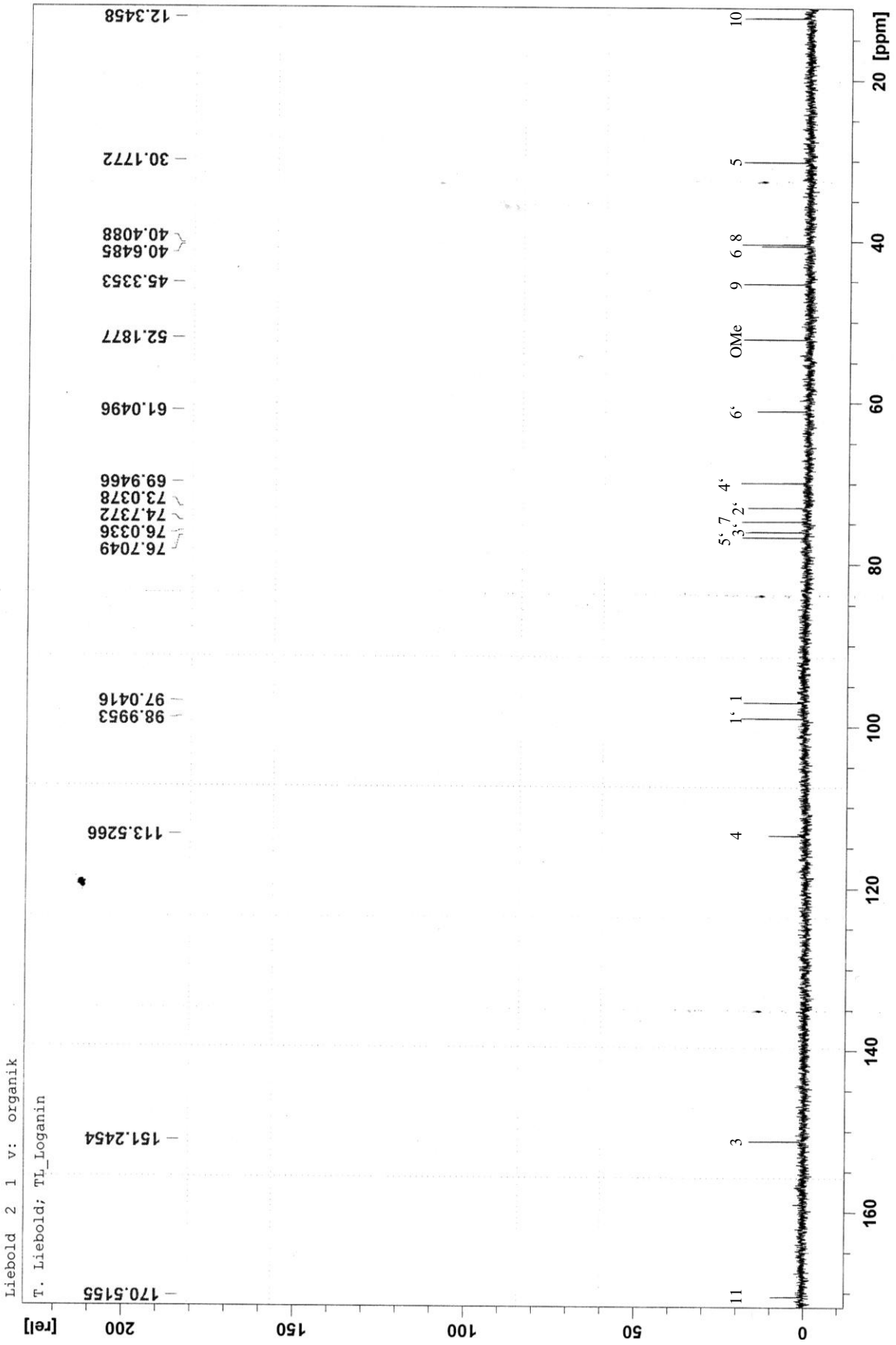


Abb. Anhang 14-1: Loganin ^{13}C-NMR

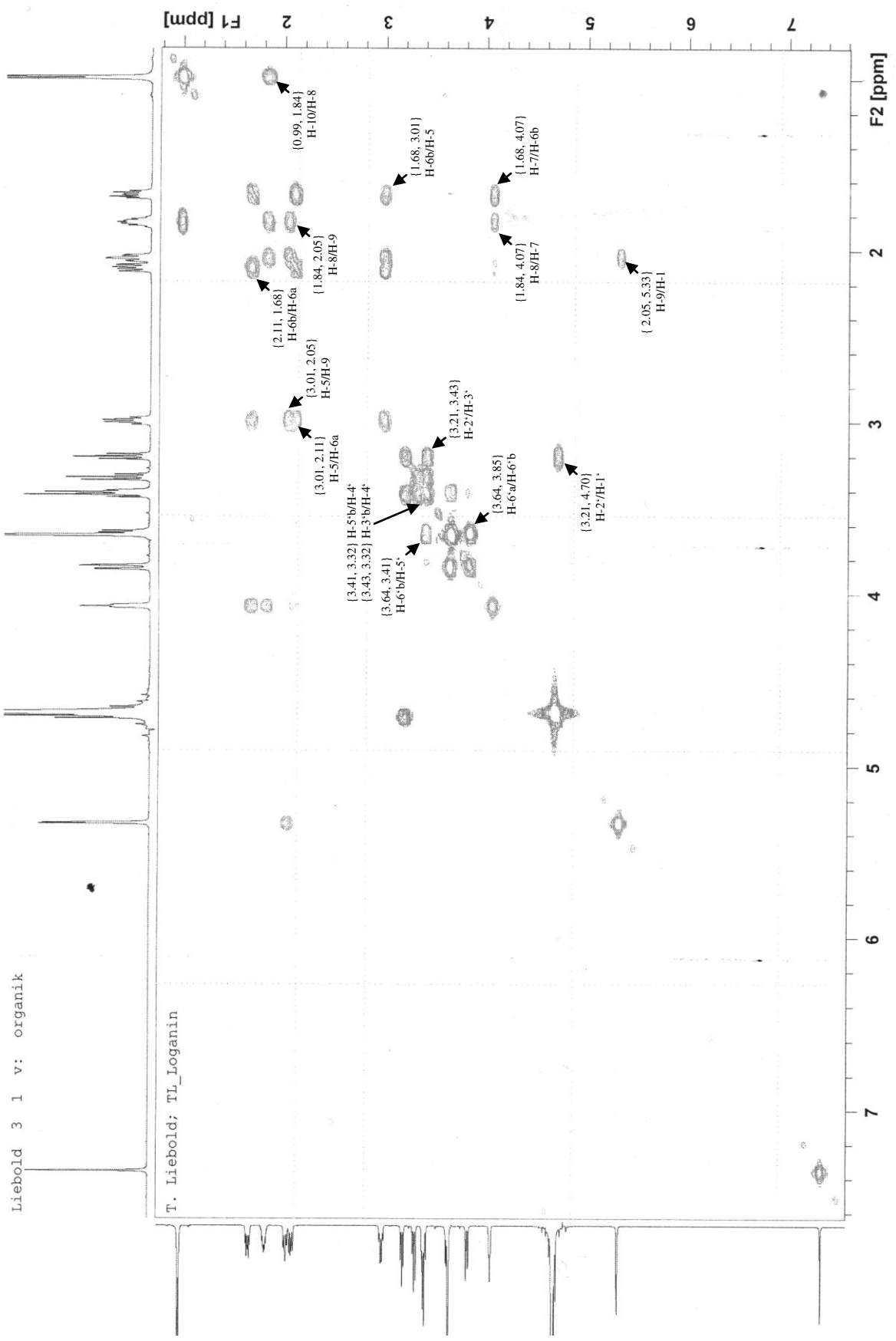


Abb. Anhang 14-2: Loganin COSY

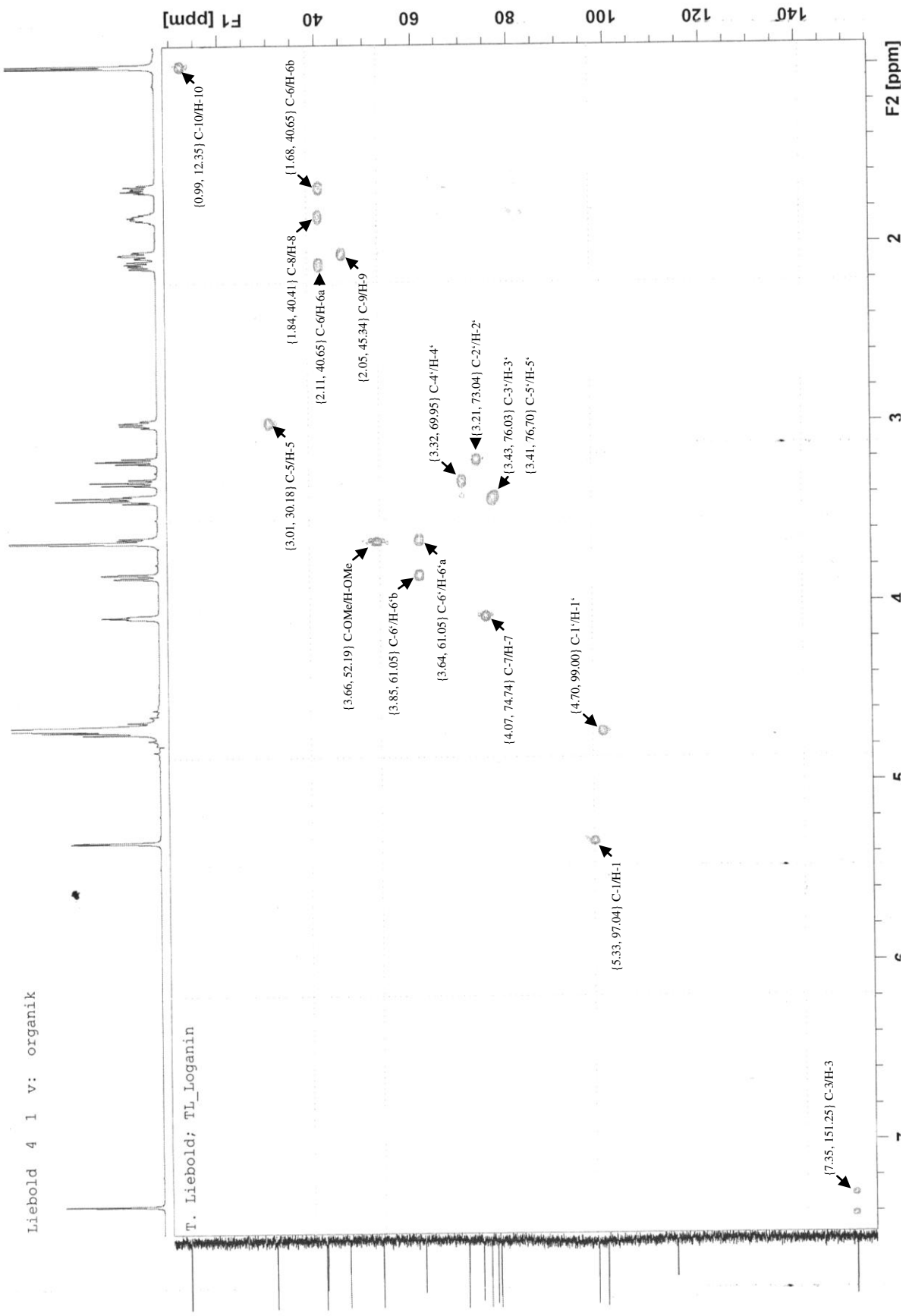


Abb. Anhang 14-3: Loganin HSQC

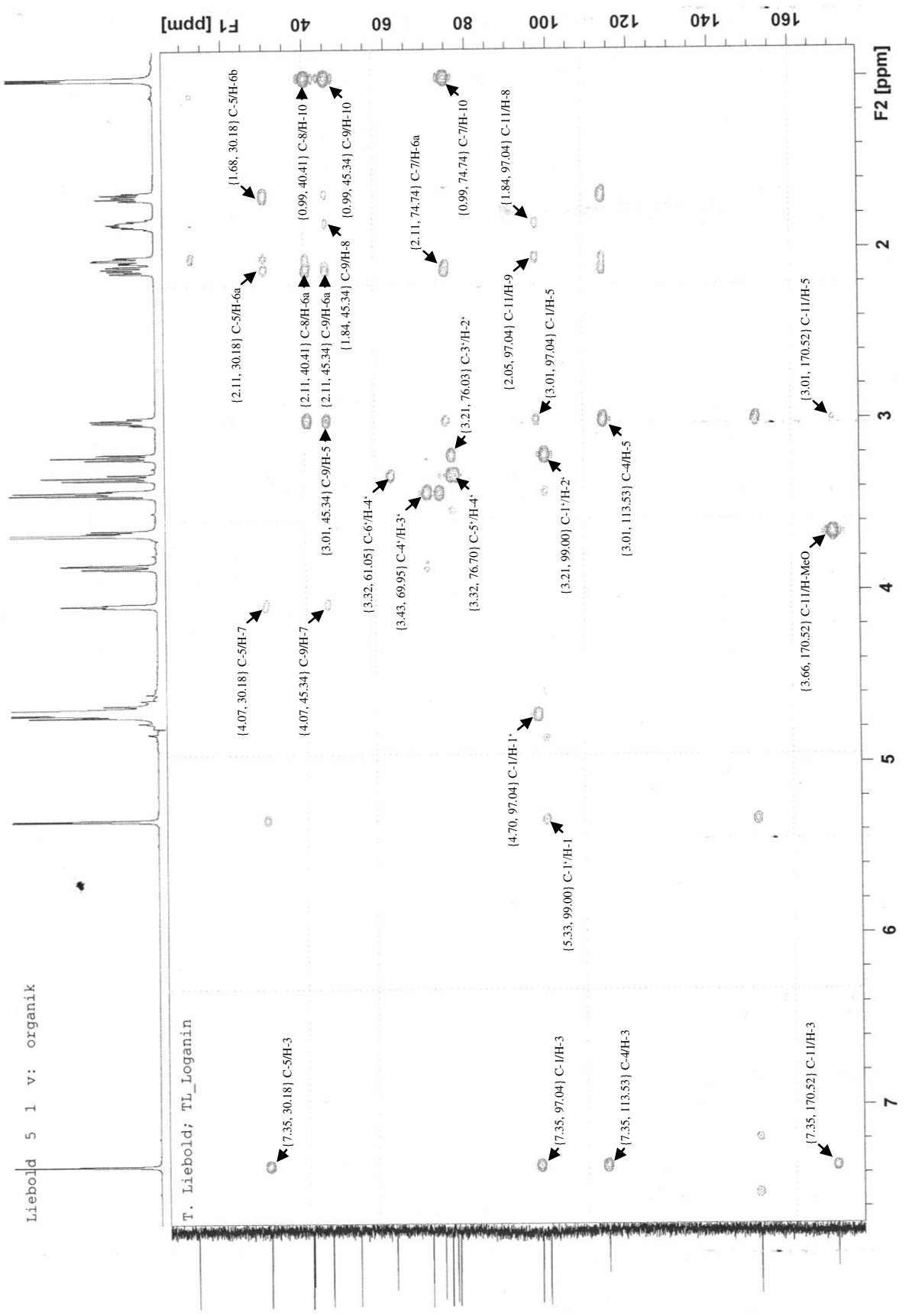


Abb. Anhang 14-4: Loganin HMBC

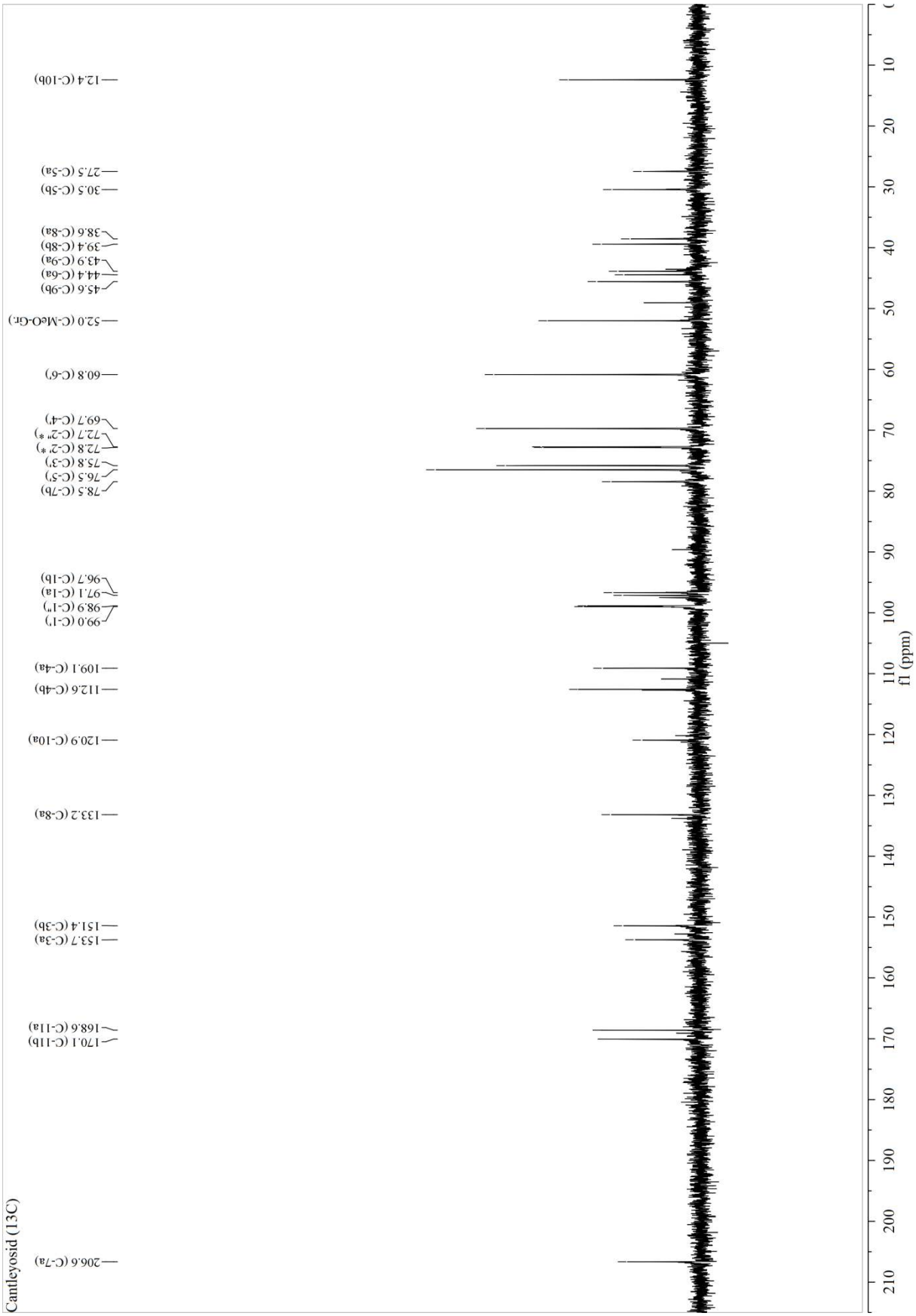


Abb. Anhang 14-5: Cantleyosid ^{13}C-NMR

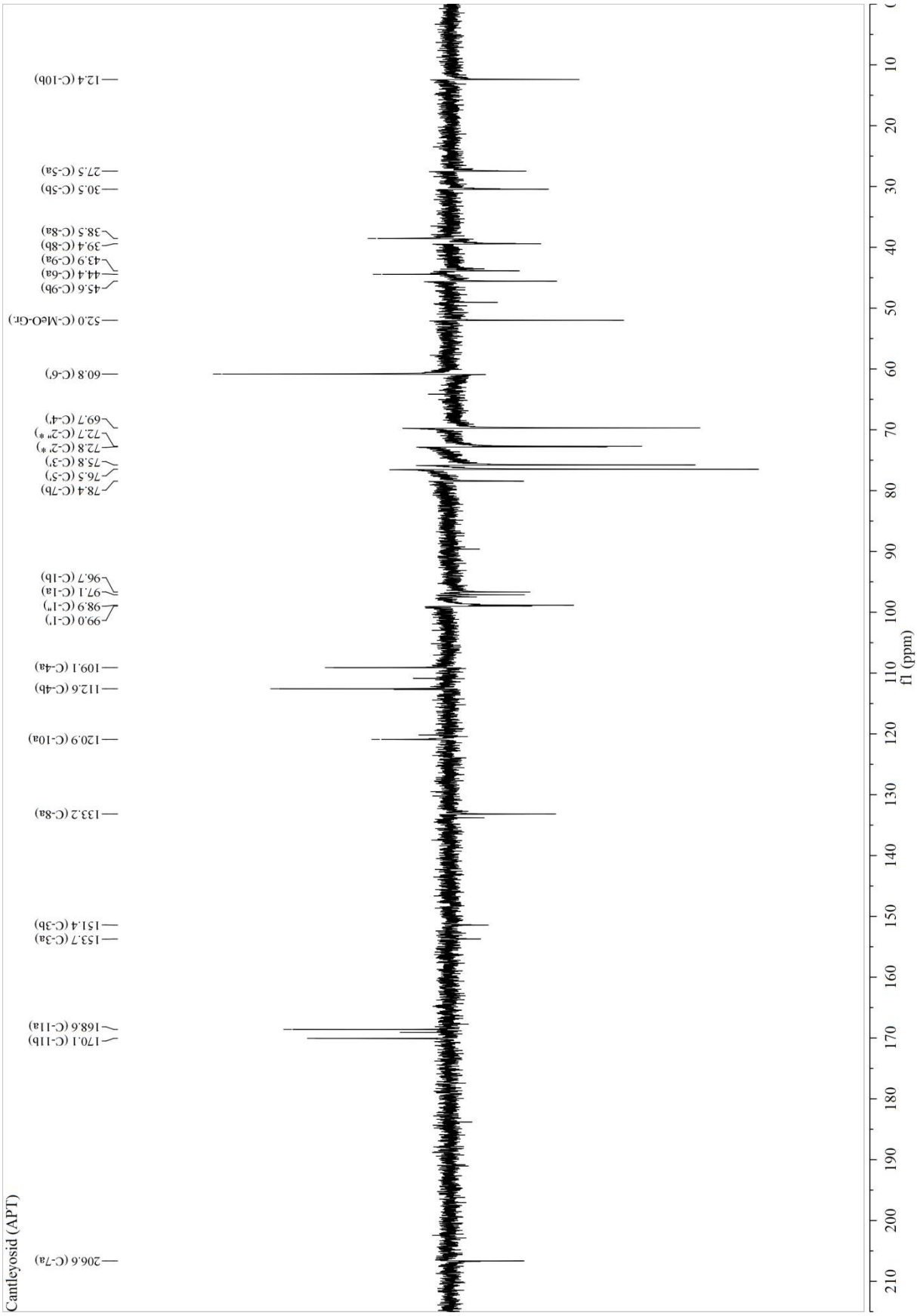


Abb. Anhang 14-6: Cantleyosid APT

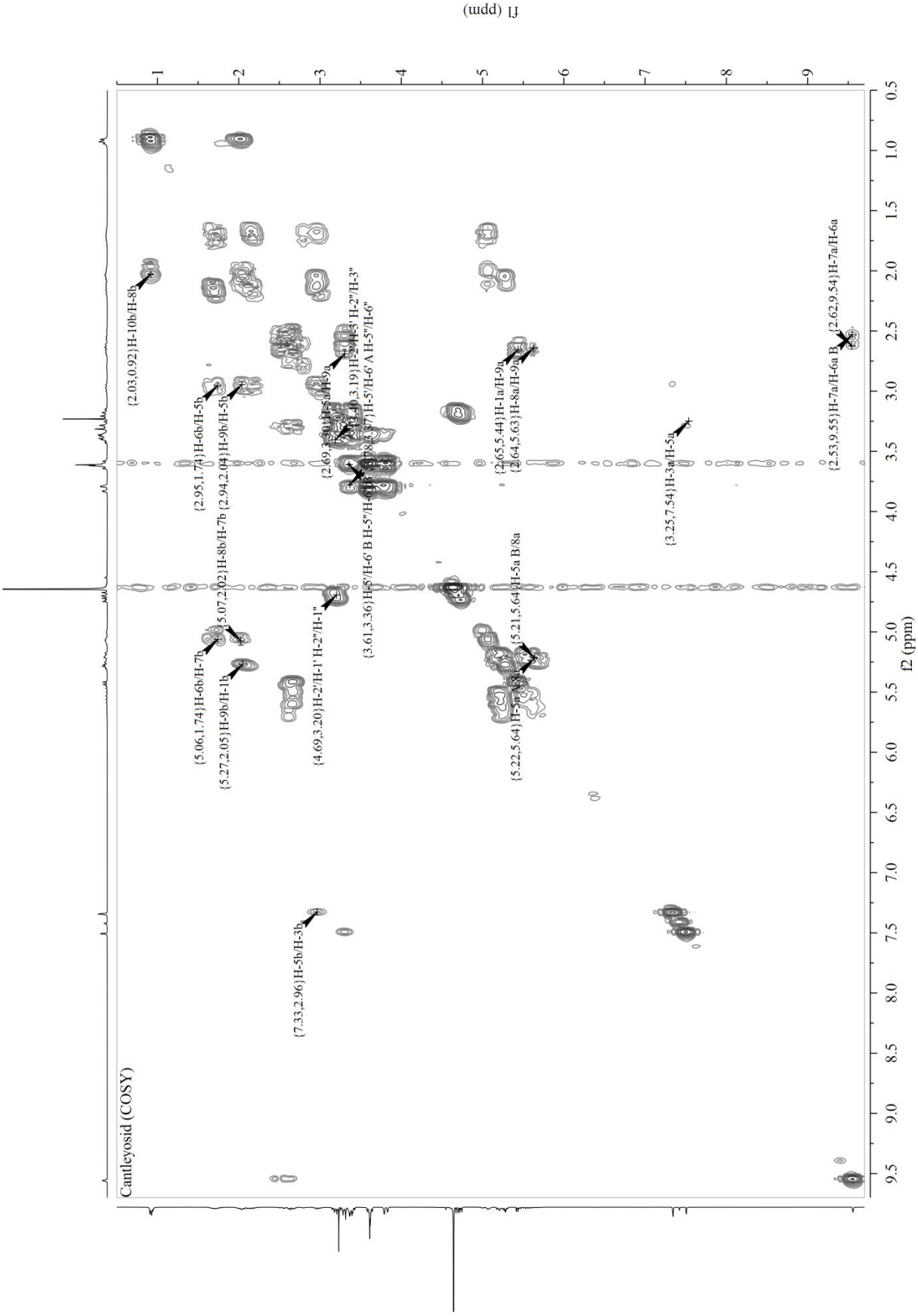


Abb. Anhang 14-7: Cantleyosid COSY

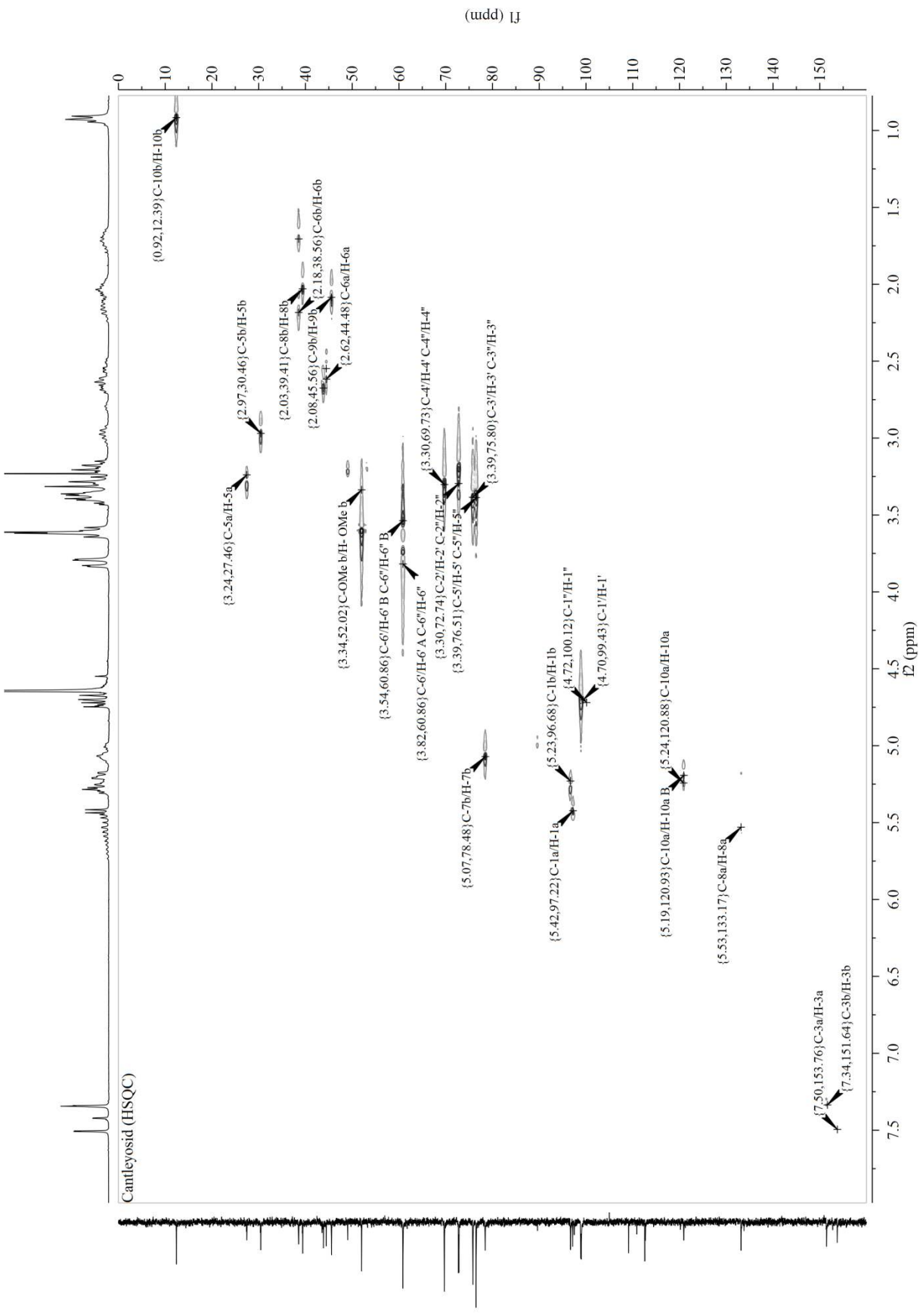


Abb. Anhang 14-8: Cantleyosid HSQC

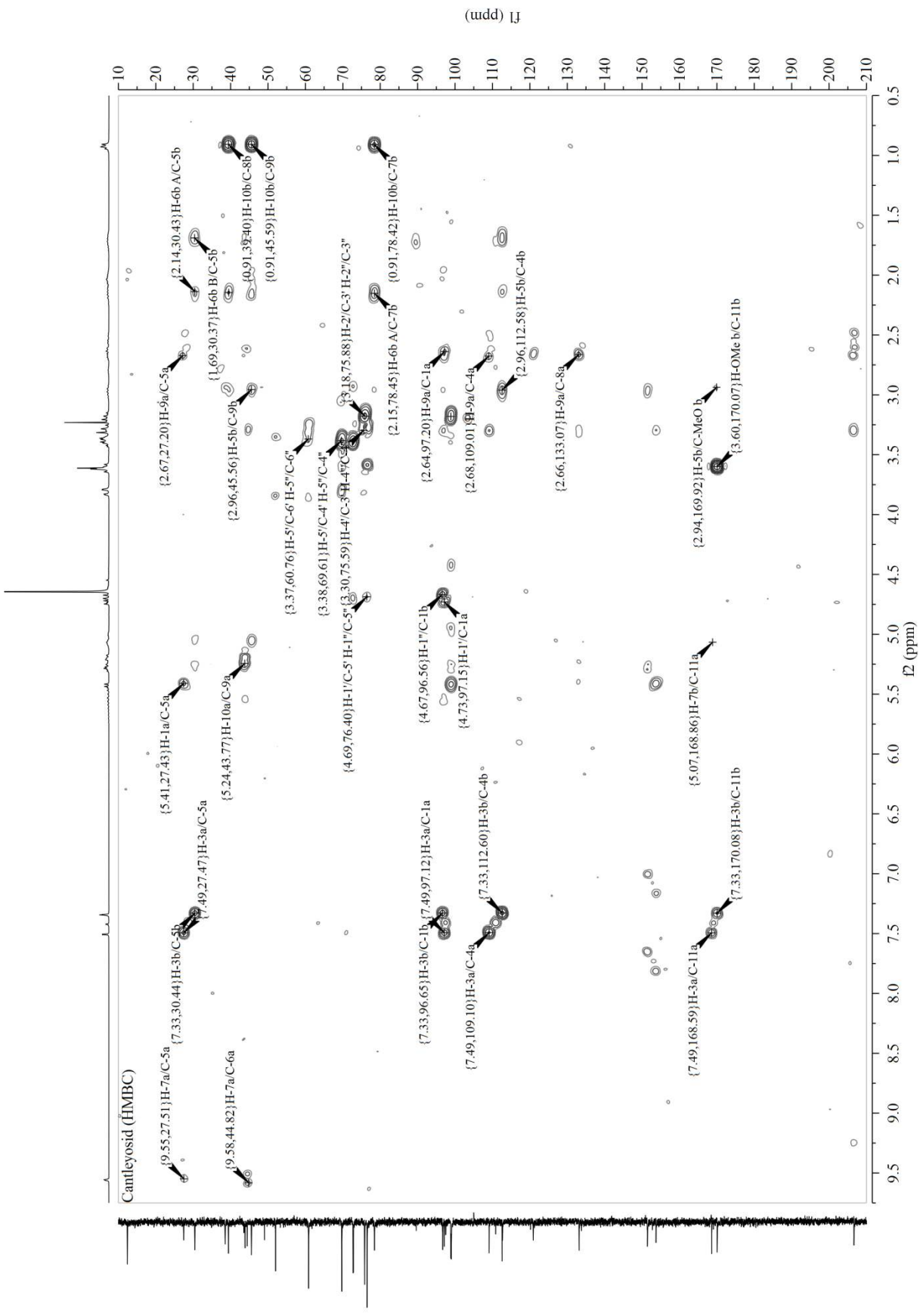


Abb. Anhang 14-9: Cantleyosid HMBC

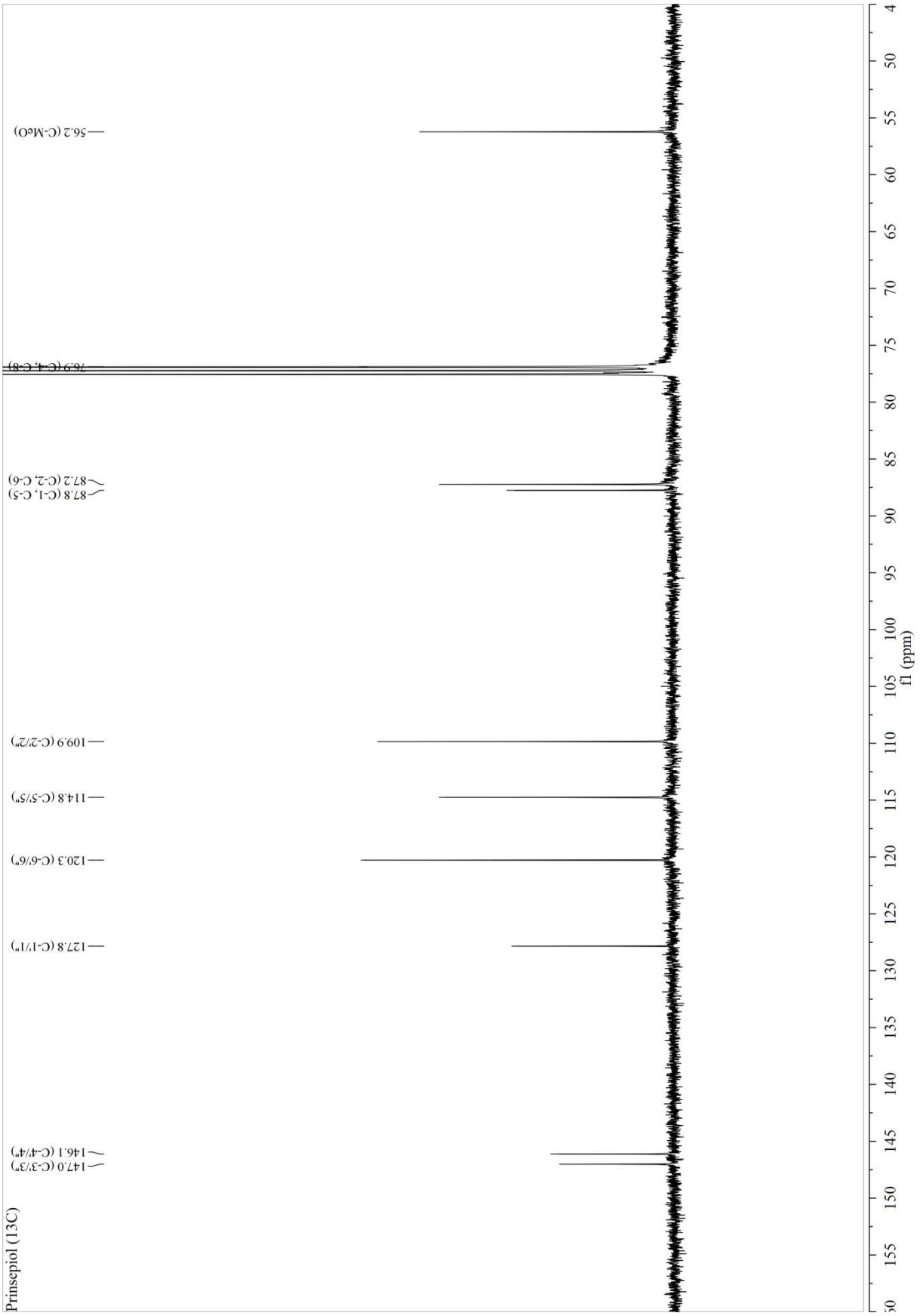


Abb. Anhang 14-10: Prinsepiol ^{13}C-NMR

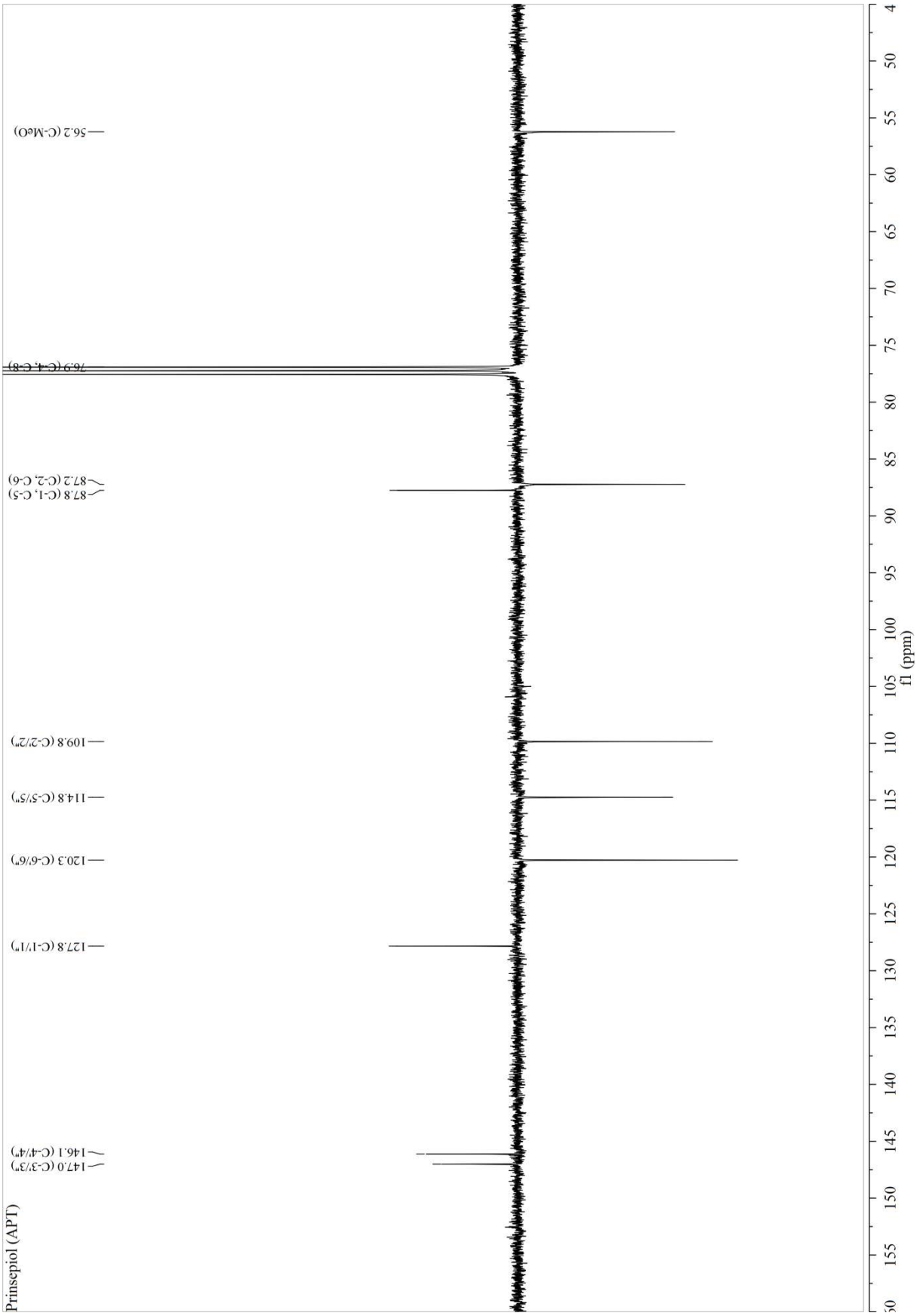


Abb. Anhang 14-11: Prinsepiol APT

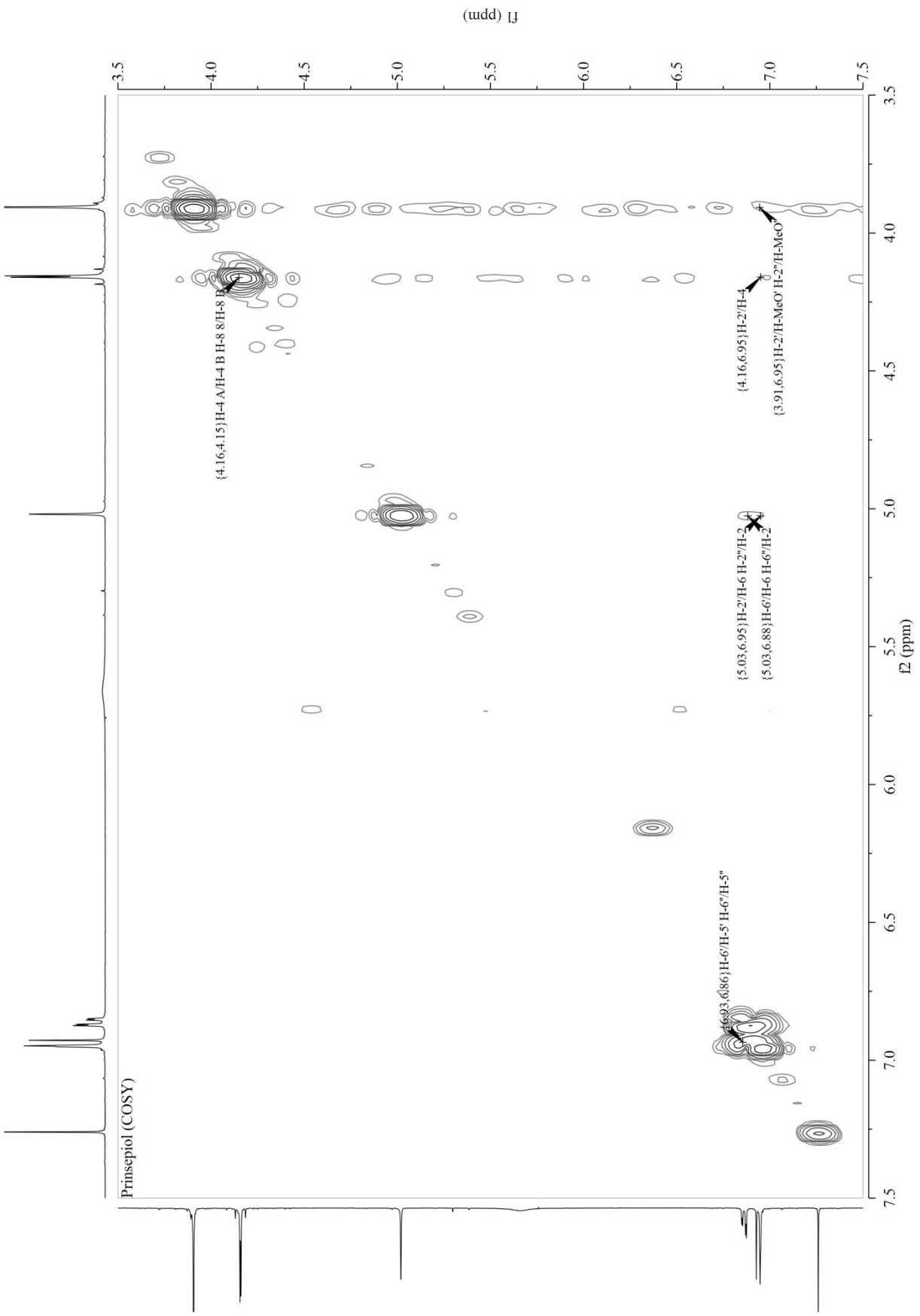


Abb. Anhang 14-12: Prinsepiol COSY

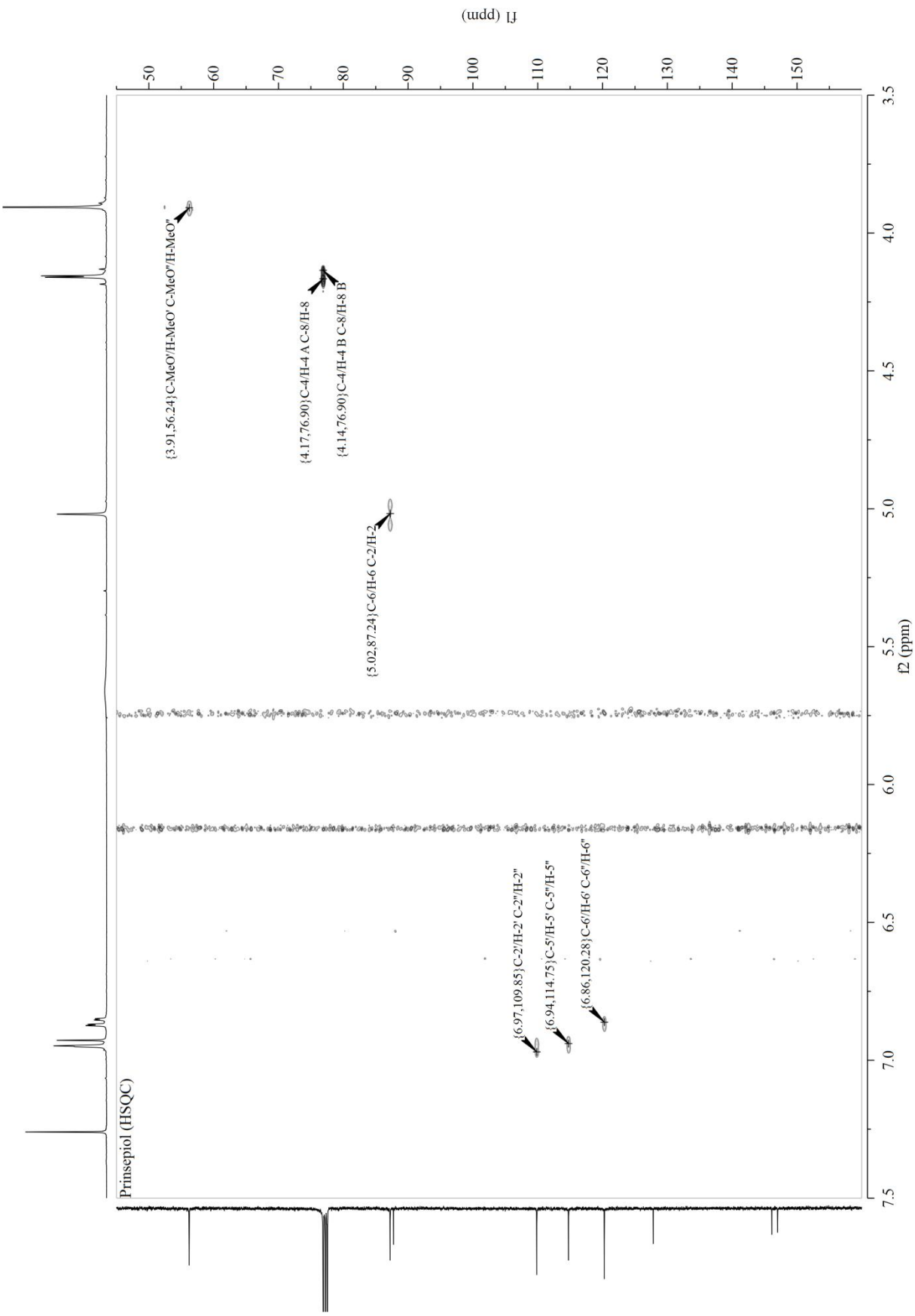


Abb. Anhang 14-13: Prinsepiol HSQC

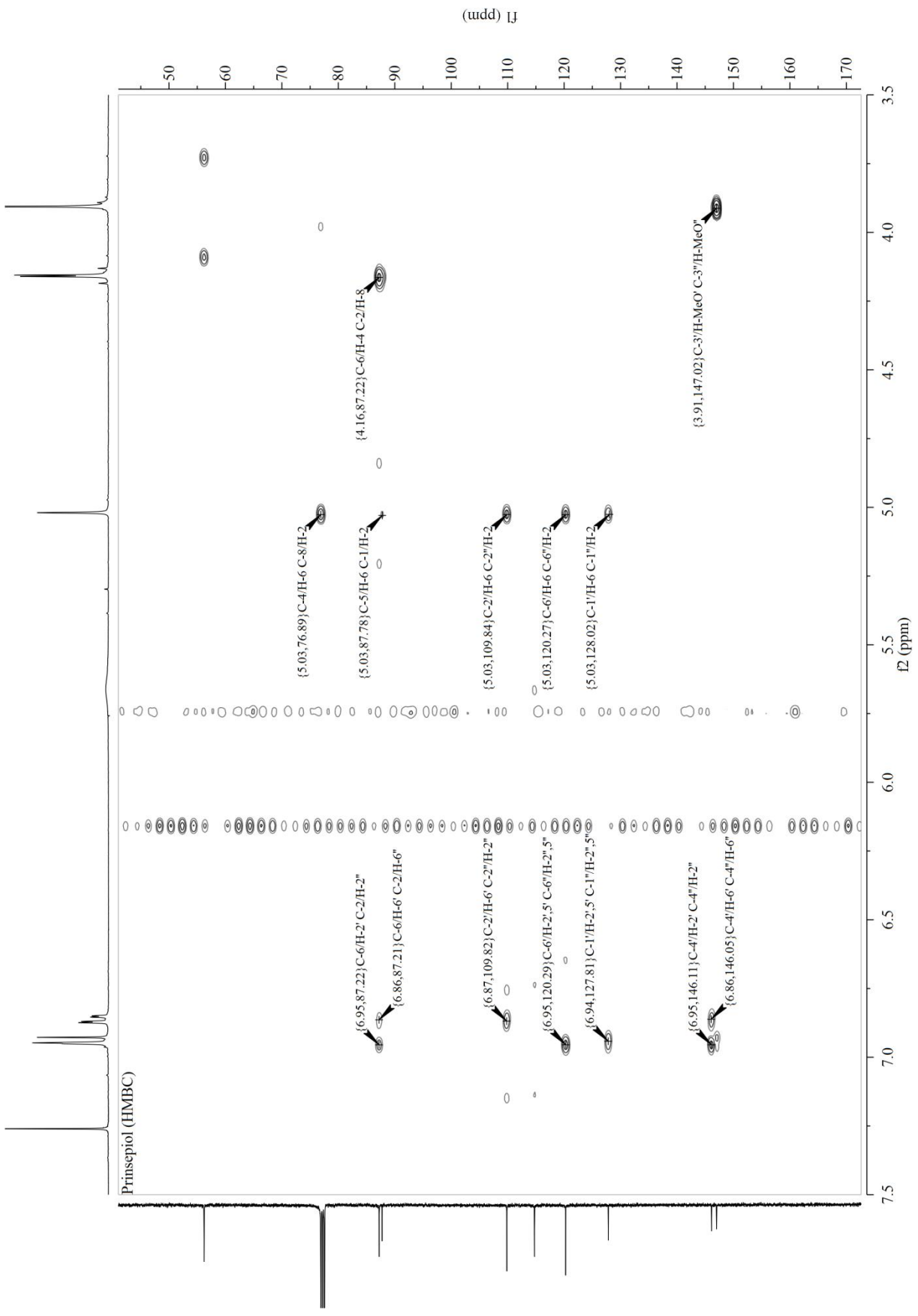


Abb. Anhang 14-14: Prinsepiol HMBC

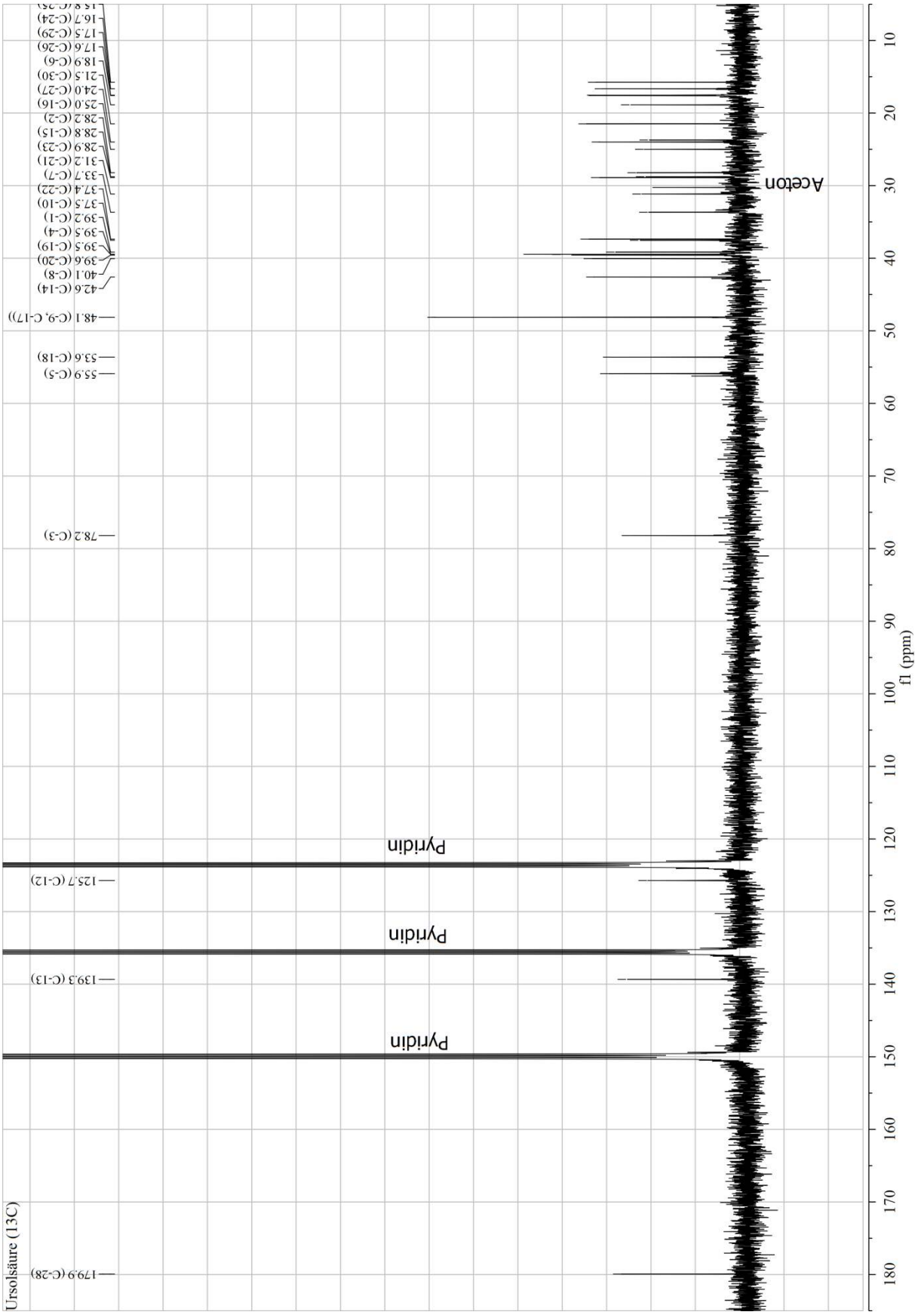


Abb. Anhang 14-15: Ursolsäure ^{13}C-NMR

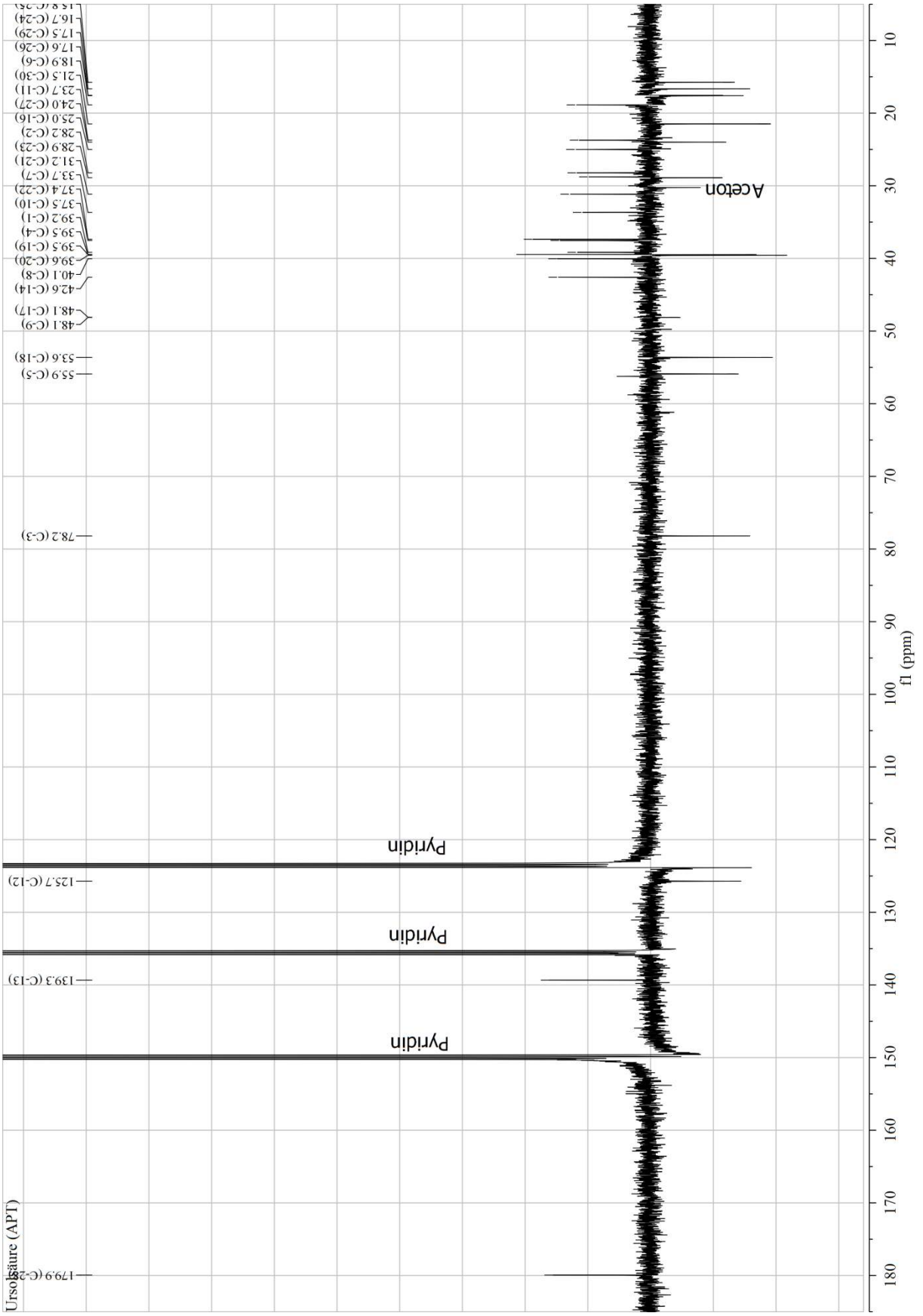


Abb. Anhang 14-16: Ursolsäure APT

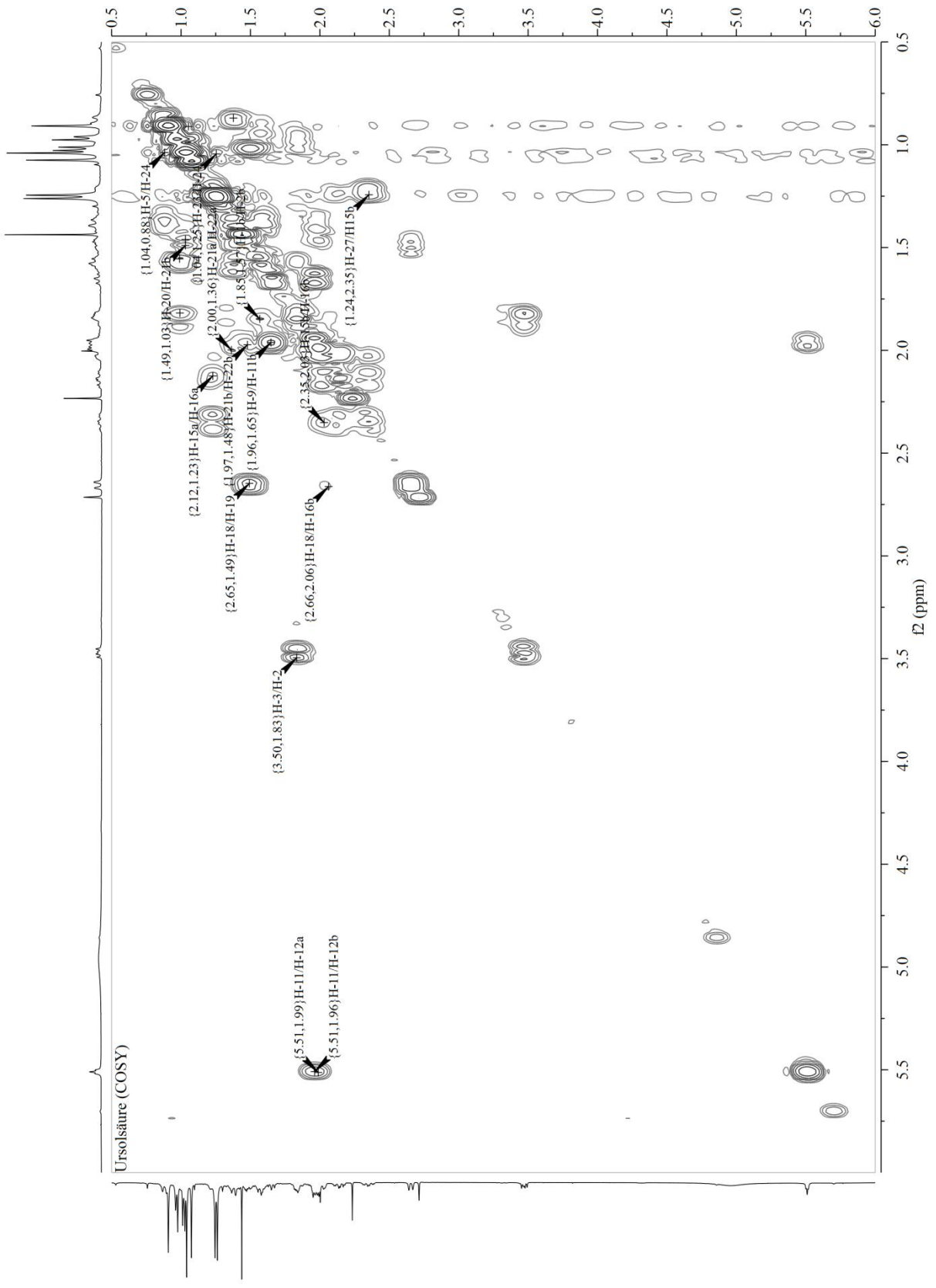


Abb. Anhang 14-17: Ursolsäure COSY

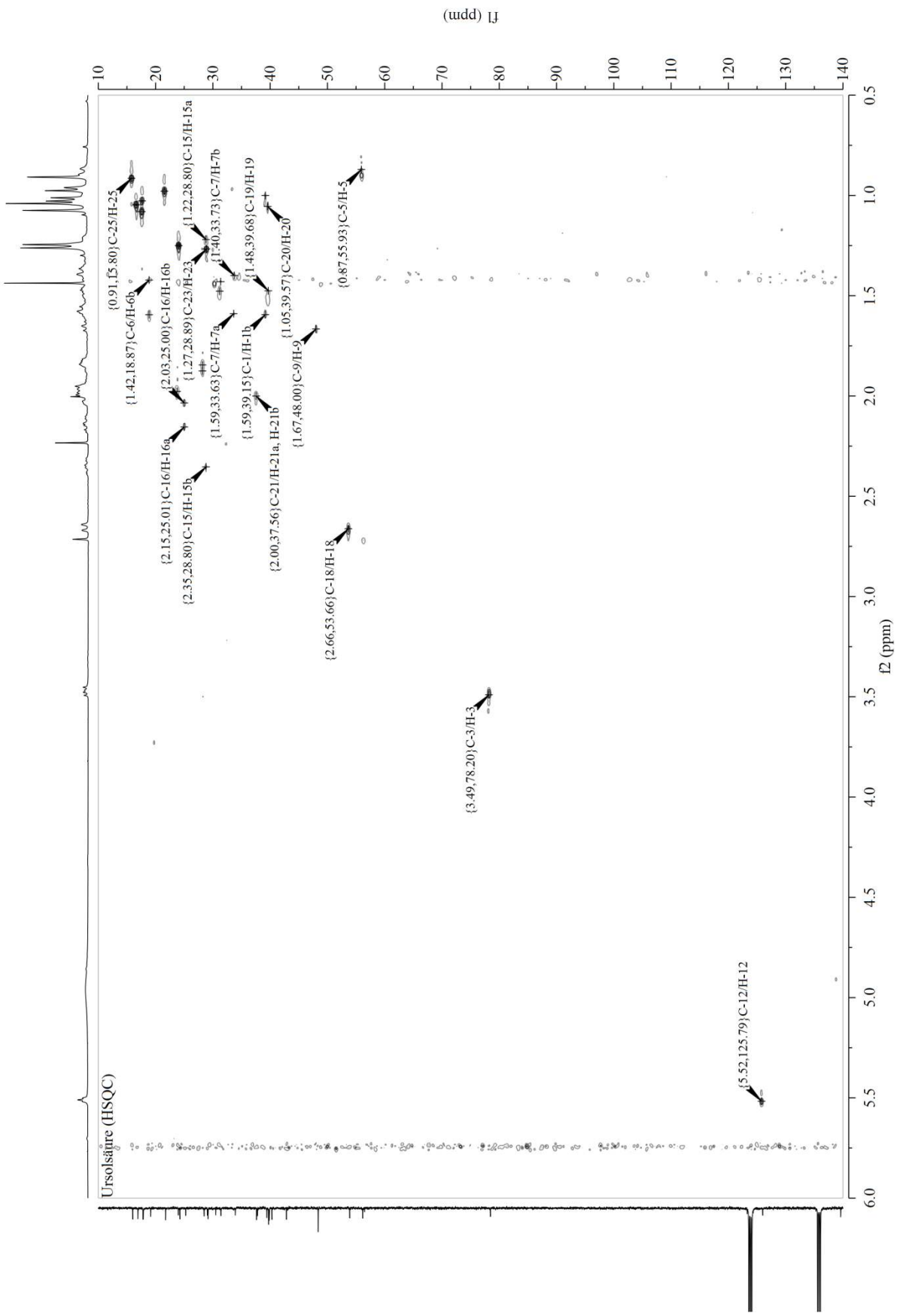


Abb. Anhang 14-18: Ursolsäure HSQC

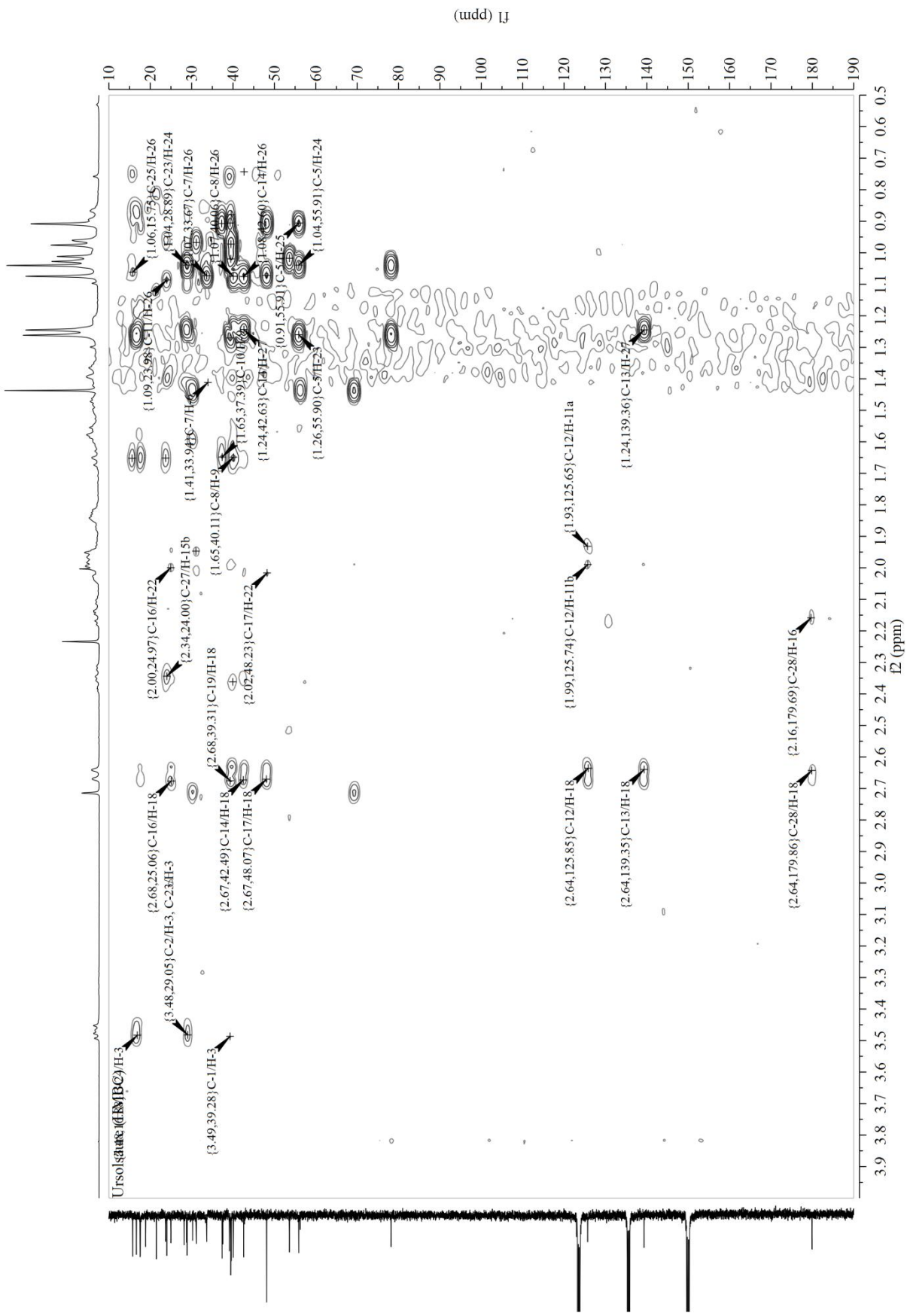


Abb. Anhang 14-19: Ursolsäure HMBC

15 Zähldaten der Bbss-Bestimmungen

Tab. Anhang 15-1: Mikroskopische Zähldaten für zwei Wachstumskurven

	Kultur 1a			Kultur 1b						Kultur 2				
Tag	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Konzentration [ml^{-1}] von Kulturen 1a,1b, Mittelwert	Standard-abweichung Kulturen 1	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Konzentration [ml^{-1}]
0	**27**	4		**24**	4					**30**	4			
	26	4		**20**	4			5,70E+06		**24**	4			
	32	4		**33**	4			4,90E+06		**25**	4			
	29	4	114	**21**	4	98	1	**5,30E+06**	5,66E+05	**25**	4	104	1	**5,20E+06**
1	**58**	4		**67**	4					**75**	4			
	69	4		**53**	4			1,27E+07		**65**	4			
	56	4		**48**	4			1,08E+07		**65**	4			
	71	4	254	**48**	4	216	1	**1,18E+07**	1,34E+06	**75**	4	280	1	**1,40E+07**
2	**67**	4		**54**	4					**36**	4			
	64	4		**38**	4			6,18E+07		**49**	4			
	53	4		**46**	4			4,68E+07		**42**	4			
	63	4	247	**49**	4	187	5	**5,43E+07**	1,06E+07	**34**	4	161	10	**8,05E+07**
3	**80**	4		**106**	4					**42**	4			
	58	4		**120**	4			2,95E+08		**54**	4			
	80	4		**92**	4			4,22E+08		**29**	4			
	77	4	295	**104**	4	422	20	**3,59E+08**	8,98E+07	**38**	4	163	50	**4,08E+08**
4	**23**	4		**26**	4					**46**	4			
	35	4		**22**	4			5,95E+08		**47**	4			
	24	4		**40**	4			5,70E+08		**51**	4			
	37	4	119	**26**	4	114	100	**5,83E+08**	1,77E+07	**40**	4	184	100	**9,20E+08**
5	**51**	4		**49**	4					**24**	4			
	53	4		**59**	4			2,05E+09		**21**	4			
	58	4		**50**	4			1,93E+09		**31**	4			
	43	4	205	**35**	4	193	200	**1,99E+09**	8,49E+07	**33**	4	109	250	**1,36E+09**
6	**23**	4		**21**	4					**36**	4			
	29	4		**20**	4			2,53E+09		**34**	4			
	26	4		**29**	4			2,23E+09		**27**	4			
	23	4	101	**19**	4	89	500	**2,38E+09**	2,12E+08	**23**	4	120	200	**1,20E+09**
7	**31**	4		**24**	4					**27**	4			
	33	4		**21**	4			1,43E+09		**32**	4			
	28	4		**21**	4			1,08E+09		**28**	4			
	22	4	114	**20**	4	86	250	**1,25E+09**	2,47E+08	**30**	4	117	200	**1,17E+09**
8	**55**	4		**53**	4					**63**	16			
	50	4		**40**	4			1,03E+09		**49**	16			
	51	4		**47**	4			9,55E+08		**36**	16			
	50	4	206	**51**	4	191	100	**9,93E+08**	5,30E+07	**63**	16	52,8	200	**5,28E+08**
9	**45**	4		**71**	4					**91**	4			
	42	4		**64**	4			8,50E+08		**65**	4			
	40	4		**68**	4			1,28E+09		**53**	4			
	43	4	170	**52**	4	255	100	**1,06E+09**	3,01E+08	**69**	4	278	50	**6,95E+08**
10	**43**	4		**77**	4					**89**	4			
	34	4		**65**	4			7,50E+08		**77**	4			
	48	4		**48**	4			1,21E+09		**67**	4			
	25	4	150	**52**	4	242	100	**9,80E+08**	3,25E+08	**62**	4	295	50	**7,38E+08**
11	**46**	4		**36**	4					**31**	4			
	25	4		**15**	4			7,40E+08		**42**	4			
	46	4		**15**	4			4,10E+08		**48**	4			
	31	4	148	**16**	4	82	100	**5,75E+08**	2,33E+08	**42**	4	163	100	**8,15E+08**

Tab. Anhang 15-2: Mikroskopische Zähldaten der polaren Kardenfraktionen aus dem EtOH-H_2O-Extrakt

Tag 0

Kontrolle mit H_2O (b)			Kontrolle mit Tween (c)			H_2O-Phase 2mg/ml (b)			H_2O-Phase 0,02mg/ml (a)			n-But-Phase 2mg/ml (b)			n-But-Phase 0,2mg/ml (c)			
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor
22	16		26	16		38	16		27	16		44	16		25	16		
19	16		30	16		37	16		34	16		36	16		35	16		
19	16		34	16		31	16		29	16		30	16		33	16		
23	16	20,75	19	16	27,25	34	16	35	31	16	30,25	24	16	33,5	34	16	31,75	1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit H_2O (b)	1,04E+06	
Kontrolle mit PS80 (c)	1,36E+06	
H_2O-Phase 2mg/ml (b)	1,75E+06	
H_2O-Phase 0,02mg/ml (a)	1,51E+06	
n-But-Phase 2mg/ml (b)	1,68E+06	
n-But-Phase 0,2mg/ml (c)	1,59E+06	
	MW: 1,49E+06	2,58E+06

Tag 1

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit H_2O	53	16		60	16		43	16			a	3,21E+06	
	72	16		56	16		55	16			b	2,93E+06	
	76	16		55	16		51	16			c	2,53E+06	
	56	16	64,25	63	16	58,5	53	16	50,5	1		2,89E+06	3,45E+05
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	73	16		61	16		65	16			a	3,31E+06	
	56	16		59	16		68	16			b	3,08E+06	
	70	16		73	16		55	16			c	3,63E+06	
	66	16	66,25	53	16	61,5	102	16	72,5	1		3,34E+06	2,76E+05
H_2O-Phase 2mg/ml	67	16		76	16		68	16			a	3,16E+06	
	63	16		57	16		70	16			b	3,19E+06	
	66	16		67	16		62	16			c	3,39E+06	
	57	16	63,25	55	16	63,75	71	16	67,75	1		3,25E+06	1,23E+05
H_2O-Phase 0,2mg/ml	56	16		76	16		95	16			a	3,46E+06	
	70	16		73	16		71	16			b	3,99E+06	
	68	16		88	16		77	16			c	4,08E+06	
	83	16	69,25	82	16	79,75	83	16	81,5	1		3,84E+06	3,31E+05
H_2O-Phase 0,02mg/m	56	16		56	16		69	16			a	3,18E+06	
	69	16		68	16		69	16			b	3,23E+06	
	63	16		75	16		66	16			c	3,59E+06	
	66	16	63,5	59	16	64,5	83	16	71,75	1		3,33E+06	2,25E+05
n-But-Phase 2mg/ml	90	16		47	16		81	16			a	3,60E+06	
	68	16		62	16		72	16			b	2,74E+06	
	74	16		52	16		66	16			c	3,64E+06	
	56	16	72	58	16	54,75	72	16	72,75	1		3,33E+06	5,09E+05

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
n-But-Phase 0,2mg/ml	44	16		74	16		80	16			a	3,26E+06	
	76	16		77	16		72	16			b	3,76E+06	
	77	16		78	16		80	16			c	3,59E+06	
	64	16	65,25	72	16	75,25	55	16	71,75	1		3,54E+06	2,54E+05
n-But-Phase 0,02mg/ml	55	16		74	16		81	16			a	2,79E+06	
	56	16		66	16		64	16			b	3,25E+06	
	59	16		59	16		73	16			c	3,66E+06	
	53	16	55,75	61	16	65	75	16	73,25	1		3,23E+06	4,38E+05
Tag 4													
Kontrolle mit H_2O	42	16		26	16		28	16			a	5,16E+07	
	47	16		32	16		22	16			b	3,91E+07	
	33	16		32	16		31	16			c	3,59E+07	
	43	16	41,25	35	16	31,25	34	16	28,75	25		4,22E+07	8,27E+06
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	19	16		29	16		42	16			a	2,69E+07	
	22	16		28	16		29	16			b	3,81E+07	
	24	16		43	16		31	16			c	3,97E+07	
	21	16	21,5	22	16	30,5	25	16	31,75	25		3,49E+07	6,99E+06
H_2O-Phase 2mg/ml	27	16		39	16		34	16			a	3,25E+07	
	27	16		28	16		27	16			b	4,38E+07	
	33	16		37	16		33	16			c	4,09E+07	
	17	16	26	36	16	35	37	16	32,75	25		3,91E+07	5,85E+06
H_2O-Phase 0,2mg/ml	47	16		46	16		36	16			a	6,56E+07	
	57	16		76	16		27	16			b	7,19E+07	
	52	16		52	16		33	16			c	4,75E+07	
	54	16	52,5	56	16	57,5	56	16	38	25		6,17E+07	1,27E+07
H_2O-Phase 0,02mg/m	48	16		64	16		62	16			a	4,72E+07	
	31	16		59	16		56	16			b	7,50E+07	
	34	16		61	16		39	16			c	6,13E+07	
	38	16	37,75	56	16	60	39	16	49	25		6,11E+07	1,39E+07
n-But-Phase 2mg/ml	37	4		41	4		38	4			a	8,25E+06	
	38	4		46	4		38	4			b	8,45E+06	
	49	4		36	4		49	4			c	8,75E+06	
	41	4	165	46	4	169	50	4	175	1		8,48E+06	2,52E+05
n-But-Phase 0,2mg/ml	14	16		23	16		22	16			a	2,78E+07	
	19	16		31	16		25	16			b	3,09E+07	
	30	16		26	16		23	16			c	2,94E+07	
	26	16	22,25	19	16	24,75	24	16	23,5	25		2,94E+07	1,56E+06
n-But-Phase 0,02mg/ml	42	16		32	16		40	16			a	4,44E+07	
	40	16		40	16		38	16			b	4,34E+07	
	31	16		33	16		31	16			c	4,25E+07	
	29	16	35,5	34	16	34,75	27	16	34	25		4,34E+07	9,38E+05
Tag 8													
Kontrolle mit H_2O	83	16		92	16		90	16			a	1,92E+08	
	66	16		68	16		69	16			b	2,06E+08	
	82	16		95	16		69	16			c	2,01E+08	
	76	16	76,75	75	16	82,5	94	16	80,5	50		2,00E+08	7,30E+06
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	62	16		89	16		79	16			a	1,71E+08	
	74	16		85	16		77	16			b	2,00E+08	
	64	16		82	16		68	16			c	1,89E+08	
	74	16	68,5	64	16	80	79	16	75,75	50		1,87E+08	1,45E+07

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
H_2O-Phase 2mg/ml	80	8		81	8		70	8			a	3,59E+08	
	68	8		83	8		98	8			b	4,11E+08	
	75	8		78	8		103	8			c	4,28E+08	
	64	8	143,5	87	8	164,5	71	8	171	50		3,99E+08	3,59E+07
H_2O-Phase 0,2mg/ml	93	8		65	8		68	8			a	3,74E+08	
	71	8		92	8		65	8			b	3,63E+08	
	68	8		78	8		65	8			c	3,33E+08	
	67	8	149,5	55	8	145	68	8	133	50		3,56E+08	2,13E+07
H_2O-Phase 0,02mg/m	57	8		55	8		72	8			a	2,34E+08	
	47	8		64	8		84	8			b	3,00E+08	
	48	8		55	8		65	8			c	3,69E+08	
	35	8	93,5	66	8	120	74	8	147,5	50		3,01E+08	6,75E+07
n-But-Phase 2mg/ml	25	16		38	16		40	16			a	1,91E+07	
	18	16		48	16		36	16			b	3,13E+07	
	27	16		46	16		30	16			c	2,66E+07	
	32	16	25,5	35	16	41,75	36	16	35,5	15		2,57E+07	6,15E+06
n-But-Phase 0,2mg/ml	101	16		53	8		46	8			a	2,31E+08	
	100	16		52	8		56	8			b	2,54E+08	
	90	16		43	8		45	8			c	2,36E+08	
	79	16	92,5	55	8	101,5	42	8	94,5	50		2,40E+08	1,18E+07
n-But-Phase 0,02mg/ml	44	8		46	8		42	8			a	2,50E+08	
	58	8		49	8		51	8			b	2,41E+08	
	40	8		47	8		61	8			c	2,80E+08	
	58	8	100	51	8	96,5	70	8	112	50		2,57E+08	2,03E+07

Tab. Anhang 15-3: Mikroskopische Zähldaten der polaren Kardenfraktionen aus dem EtOH-H_2O-Extrakt (Wiederholung)

Tag 0																				
Kontrolle mit H_2O (a)			Kontrolle mit Tween (c)			H_2O-Phase 2mg/ml (c)			H_2O-Phase 0,2mg/ml (b)			n-But-Phase 0,2mg/ml (b)			n-But-Phase 0,02mg/ml (a)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor
23	16		33	16		28	16		32	16		34	16		29	16		
27	16		28	16		25	16		23	16		22	16		22	16		
24	16		30	16		32	16		29	16		28	16		23	16		
30	16	26	24	16	28,75	21	16	26,5	20	16	26	23	16	26,75	20	16	23,5	1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit H_2O (a)	1,30E+06	
Kontrolle mit PS80 (c)	1,44E+06	
H_2O-Phase 2mg/ml (c)	1,33E+06	
H_2O-Phase 0,2mg/ml (b)	1,30E+06	
n-But-Phase 0,2mg/ml (b)	1,34E+06	
n-But-Phase 0,02mg/ml (a)	1,18E+06	
	MW: 1,31E+06	8,44E+04

Tag 1													
Probe Nr.	a			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit H_2O	68	16		65	16		45	16			a	2,95E+06	
	63	16		73	16		54	16			b	3,41E+06	
	49	16		71	16		65	16			c	2,75E+06	
	56	16	59	64	16	68,25	56	16	55	1		3,04E+06	3,40E+05
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	72	16		61	16		72	16			a	3,96E+06	
	63	16		60	16		82	16			b	3,30E+06	
	100	16		83	16		57	16			c	3,69E+06	
	82	16	79,25	60	16	66	84	16	73,75	1		3,65E+06	3,33E+05
H_2O-Phase 2mg/ml	66	16		71	16		72	16			a	3,35E+06	
	68	16		74	16		60	16			b	3,46E+06	
	73	16		69	16		56	16			c	3,04E+06	
	61	16	67	63	16	69,25	55	16	60,75	1		3,28E+06	2,20E+05
H_2O-Phase 0,2mg/ml	64	16		73	16		52	16			a	2,99E+06	
	58	16		65	16		51	16			b	3,49E+06	
	59	16		71	16		74	16			c	2,86E+06	
	58	16	59,75	70	16	69,75	52	16	57,25	1		3,11E+06	3,31E+05
H_2O-Phase 0,02mg/ml	71	16		55	16		60	16			a	3,31E+06	
	74	16		70	16		71	16			b	3,10E+06	
	63	16		67	16		62	16			c	3,28E+06	
	57	16	66,25	56	16	62	69	16	65,5	1		3,23E+06	1,13E+05
n-But-Phase 2mg/ml	54	16		70	16		61	16			a	3,08E+06	
	61	16		64	16		72	16			b	3,56E+06	
	71	16		71	16		67	16			c	3,41E+06	
	60	16	61,5	80	16	71,25	73	16	68,25	1		3,35E+06	2,50E+05
n-But-Phase 0,2mg/ml	66	16		63	16		70	16			a	3,38E+06	
	63	16		68	16		72	16			b	3,16E+06	
	70	16		55	16		61	16			c	3,68E+06	
	71	16	67,5	67	16	63,25	91	16	73,5	1		3,40E+06	2,57E+05
n-But-Phase 0,02mg/ml	71	16		56	16		84	16			a	3,49E+06	
	65	16		64	16		67	16			b	3,06E+06	
	68	16		69	16		69	16			c	3,65E+06	
	75	16	69,75	56	16	61,25	72	16	73	1		3,40E+06	3,03E+05
Tag 4													
Kontrolle mit H_2O	27	16		43	16		45	16			a	3,69E+07	
	32	16		39	16		40	16			b	4,72E+07	
	34	16		35	16		31	16			c	4,88E+07	
	25	16	29,5	34	16	37,75	40	16	39	25		4,43E+07	6,45E+06
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	37	16		31	16		28	16			a	4,03E+07	
	26	16		39	16		31	16			b	4,84E+07	
	30	16		45	16		27	16			c	3,59E+07	
	36	16	32,25	40	16	38,75	29	16	28,75	25		4,16E+07	6,34E+06
H_2O-Phase 2mg/ml	33	16		28	16		46	16			a	4,97E+07	
	49	16		32	16		37	16			b	4,13E+07	
	38	16		27	16		54	16			c	5,94E+07	
	39	16	39,75	45	16	33	53	16	47,5	25		5,01E+07	9,07E+06
H_2O-Phase 0,2mg/ml	51	16		48	16		36	16			a	5,63E+07	
	45	16		33	16		37	16			b	4,41E+07	
	49	16		29	16		44	16			c	4,66E+07	
	35	16	45	31	16	35,25	32	16	37,25	25		4,90E+07	6,44E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
H_2O-Phase 0,02mg/ml	47	16		39	16		41	16			a	5,09E+07	
	46	16		38	16		43	16			b	4,78E+07	
	36	16		32	16		49	16			c	5,53E+07	
	34	16	40,75	44	16	38,25	44	16	44,25	25		5,14E+07	3,77E+06
n-But-Phase 2mg/ml	47	4		41	4		39	4			a	8,80E+06	
	39	4		49	4		35	4			b	8,95E+06	
	48	4		45	4		54	4			c	8,10E+06	
	42	4	176	44	4	179	34	4	162	1		8,62E+06	4,54E+05
n-But-Phase 0,2mg/ml	14	16		26	16		21	16			a	2,13E+07	
	14	16		25	16		24	16			b	2,91E+07	
	21	16		23	16		28	16			c	3,09E+07	
	19	16	17	19	16	23,25	26	16	24,75	25		2,71E+07	5,14E+06
n-But-Phase 0,02mg/ml	42	16		28	16		41	16			a	4,34E+07	
	35	16		39	16		38	16			b	4,63E+07	
	33	16		36	16		41	16			c	4,94E+07	
	29	16	34,75	45	16	37	38	16	39,5	25		4,64E+07	2,97E+06
Tag 8													
Kontrolle mit H_2O	45	8		33	8		38	8			a	2,09E+08	
	39	8		37	8		33	8			b	1,85E+08	
	46	8		35	8		36	8			c	1,79E+08	
	37	8	83,5	43	8	74	36	8	71,5	50		1,91E+08	1,58E+07
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	36	8		40	8		34	8			a	1,64E+08	
	30	8		42	8		30	8			b	1,90E+08	
	35	8		38	8		35	8			c	1,64E+08	
	30	8	65,5	32	8	76	32	8	65,5	50		1,73E+08	1,52E+07
H_2O-Phase 2mg/ml	70	8		93	8		73	8			a	3,70E+08	
	91	8		99	8		73	8			b	4,55E+08	
	70	8		105	8		80	8			c	3,96E+08	
	65	8	148	67	8	182	91	8	158,5	50		4,07E+08	4,35E+07
H_2O-Phase 0,2mg/ml	55	8		56	8		50	8			a	3,28E+08	
	64	8		71	8		81	8			b	3,76E+08	
	76	8		83	8		97	8			c	3,83E+08	
	67	8	131	91	8	150,5	78	8	153	50		3,62E+08	3,01E+07
H_2O-Phase 0,02mg/ml	56	8		66	8		61	8			a	2,68E+08	
	56	8		38	8		37	8			b	2,91E+08	
	57	8		57	8		64	8			c	2,80E+08	
	45	8	107	72	8	116,5	62	8	112	50		2,80E+08	1,19E+07
n-But-Phase 2mg/ml	18	16		38	16		22	16			a	1,85E+07	
	15	16		31	16		38	16			b	3,00E+07	
	21	16		26	16		19	16			c	2,75E+07	
	20	16	18,5	25	16	30	31	16	27,5	20		2,53E+07	6,05E+06
n-But-Phase 0,2mg/ml	41	8		39	8		50	8			a	2,25E+08	
	39	8		48	8		46	8			b	2,18E+08	
	48	8		41	8		51	8			c	2,45E+08	
	52	8	90	46	8	87	49	8	98	50		2,29E+08	1,42E+07
n-But-Phase 0,02mg/ml	38	8		68	8		72	8			a	2,83E+08	
	64	8		45	8		39	8			b	2,88E+08	
	50	8		54	8		43	8			c	2,48E+08	
	74	8	113	63	8	115	44	8	99	50		2,73E+08	2,18E+07

Tab. Anhang 15-4: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Kardenfraktionen aus dem EtOH-H_2O-Extrakt

Tag 0																
Kontrolle mit Tween (b)			EE-Phase 0,02mg/ml (c)			DCM-Phase 0,2mg/ml (a)			DCM-Phase 0,02mg/ml (c)			Hex-Phase 0,02mg/ml (b)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
23	16		20	16		24	16		25	16		25	16			
15	16		29	16		51	16		33	16		27	16			
11	16		28	16		38	16		20	16		35	16			
27	16	19	28	16	26,25	23	16	34	24	16	25,5	37	16	31		19

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (b)	9,50E+05	
EE-Phase 0,02mg/ml (c)	1,31E+06	
DCM-Phase 0,2mg/ml (a)	1,70E+06	
DCM-Phase 0,02mg/ml (c)	1,28E+06	
Hex-Phase 0,02mg/ml (b)	1,55E+06	
	MW: 1,36E+06	2,87E+05

Tag 1													
Probe Nr.	a			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	39	16		30	16		36	16			a	2,36E+06	
	59	16		30	16		25	16			b	1,65E+06	
	49	16		39	16		33	16			c	1,51E+06	
	42	16	47,25	33	16	33	27	16	30,25	1		1,84E+06	4,56E+05
EE-Phase 2mg/ml	23	16		23	16		17	16			a	1,19E+06	
	18	16		18	16		14	16			b	1,09E+06	
	26	16		21	16		27	16			c	1,00E+06	
	28	16	23,75	25	16	21,75	22	16	20	1		1,09E+06	9,38E+04
EE-Phase 0,2mg/ml	34	16		46	16		33	16			a	1,65E+06	
	31	16		49	16		37	16			b	2,01E+06	
	36	16		32	16		50	16			c	2,31E+06	
	31	16	33	34	16	40,25	65	16	46,25	1		1,99E+06	3,32E+05
EE-Phase 0,02mg/ml	45	16		50	16		34	16			a	2,55E+06	
	47	16		51	16		33	16			b	2,51E+06	
	55	16		49	16		37	16			c	1,76E+06	
	57	16	51	51	16	50,25	37	16	35,25	1		2,28E+06	4,44E+05
DCM-Phase 2mg/ml	10	16		21	16		9	16			a	6,63E+05	
	19	16		8	16		22	16			b	6,75E+05	
	7	16		15	16		18	16			c	8,50E+05	
	17	16	13,25	10	16	13,5	19	16	17	1		7,29E+05	1,05E+05
DCM-Phase 0,2mg/ml	26	16		27	16		26	16			a	1,60E+06	
	27	16		29	16		24	16			b	1,89E+06	
	48	16		40	16		29	16			c	1,28E+06	
	27	16	32	55	16	37,75	23	16	25,5	1		1,59E+06	3,06E+05

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
DCM-Phase 0,02mg/ml	31	16		37	16		31	16			a	1,64E+06	
	24	16		21	16		43	16			b	1,49E+06	
	44	16		28	16		37	16			c	1,73E+06	
	32	16	32,75	33	16	29,75	27	16	34,5	1		1,62E+06	1,20E+05
Hex-Phase 2mg/ml	18	16		18	16		19	16			a	9,88E+05	
	24	16		24	16		14	16			b	1,03E+06	
	15	16		19	16		24	16			c	1,10E+06	
	22	16	19,75	21	16	20,5	31	16	22	1		1,04E+06	5,73E+04
Hex-Phase 0,2mg/ml	21	16		36	16		39	16			a	1,29E+06	
	24	16		34	16		46	16			b	2,05E+06	
	25	16		47	16		33	16			c	1,85E+06	
	33	16	25,75	47	16	41	30	16	37	1		1,73E+06	3,95E+05
Hex-Phase 0,02mg/ml	41	16		39	16		29	16			a	1,96E+06	
	39	16		49	16		37	16			b	2,15E+06	
	45	16		32	16		39	16			c	1,86E+06	
	32	16	39,25	52	16	43	44	16	37,25	1		1,99E+06	1,46E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	22	16		42	16		45	16			a	2,40E+07	
	31	16		35	16		34	16			b	2,66E+07	
	41	16		31	16		33	16			c	2,57E+07	
	34	16	32	34	16	35,5	25	16	34,25	15		2,54E+07	1,33E+06
EE-Phase 2mg/ml	9	16		11	16		13	16			a	4,25E+05	
	9	16		10	16		11	16			b	4,50E+05	
	10	16		4	16		18	16			c	6,13E+05	
	6	16	8,5	11	16	9	7	16	12,25	1		4,96E+05	1,02E+05
EE-Phase 0,2mg/ml	16	16		25	16		20	16			a	1,22E+07	
	12	16		25	16		10	16			b	1,67E+07	
	18	16		17	16		14	16			c	1,03E+07	
	19	16	16,25	22	16	22,25	11	16	13,75	15		1,31E+07	3,28E+06
EE-Phase 0,02mg/ml	26	16		33	16		41	16			a	1,89E+07	
	19	16		32	16		31	16			b	2,63E+07	
	24	16		37	16		27	16			c	2,38E+07	
	32	16	25,25	38	16	35	28	16	31,75	15		2,30E+07	3,72E+06
DCM-Phase 2mg/ml	6	16		3	16		8	16			a	2,38E+05	
	4	16		7	16		10	16			b	2,50E+05	
	5	16		4	16		8	16			c	3,88E+05	
	4	16	4,75	6	16	5	5	16	7,75	1		2,92E+05	8,32E+04
DCM-Phase 0,2mg/ml	29	16		24	16		22	16			a	2,34E+07	
	31	16		28	16		22	16			b	2,01E+07	
	32	16		33	16		20	16			c	1,61E+07	
	33	16	31,25	22	16	26,75	22	16	21,5	15		1,99E+07	3,66E+06
DCM-Phase 0,02mg/ml	32	16		43	16		34	16			a	2,46E+07	
	34	16		44	16		32	16			b	2,93E+07	
	33	16		22	16		46	16			c	2,83E+07	
	32	16	32,75	47	16	39	39	16	37,75	15		2,74E+07	2,48E+06
Hex-Phase 2mg/ml	5	16		9	16		14	16			a	4,75E+05	
	11	16		7	16		9	16			b	5,63E+05	
	8	16		21	16		9	16			c	5,13E+05	
	14	16	9,5	8	16	11,25	9	16	10,25	1		5,17E+05	4,39E+04

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Hex-Phase 0,2mg/ml	41	16		20	16		30	16			a	2,64E+07	
	30	16		28	16		32	16			b	1,73E+07	
	31	16		22	16		37	16			c	2,40E+07	
	39	16	35,25	22	16	23	29	16	32	15		2,26E+07	4,76E+06
Hex-Phase 0,02mg/ml	36	16		44	16		38	16			a	2,93E+07	
	36	16		53	16		30	16			b	3,62E+07	
	36	16		45	16		16	16			c	2,12E+07	
	48	16	39	51	16	48,25	29	16	28,25	15		2,89E+07	7,51E+06
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	55	8		35	8		45	8			a	2,30E+08	
	54	8		46	8		43	8			b	2,34E+08	
	45	8		49	8		43	8			c	2,09E+08	
	30	8	92	57	8	93,5	36	8	83,5	50		2,24E+08	1,35E+07
EE-Phase 2mg/ml	8	16		10	16		9	16			a	5,00E+05	
	8	16		6	16		7	16			b	3,50E+05	
	11	16		5	16		6	16			c	4,13E+05	
	13	16	10	7	16	7	11	16	8,25	1		4,21E+05	7,53E+04
EE-Phase 0,2mg/ml	36,5	8		41	8		28	8			a	1,75E+08	
	35	8		35	8		34	8			b	1,84E+08	
	32	8		29	8		35	8			c	1,64E+08	
	36,5	8	70	42	8	73,5	34	8	65,5	50		1,74E+08	1,00E+07
EE-Phase 0,02mg/ml	40	8		46	8		40	8			a	1,96E+08	
	31	8		52	8		38	8			b	2,44E+08	
	38	8		50	8		34	8			c	2,01E+08	
	48	8	78,5	47	8	97,5	49	8	80,5	50		2,14E+08	2,61E+07
DCM-Phase 2mg/ml	4	16		4	16		5	16			a	2,75E+05	
	7	16		5	16		6	16			b	2,13E+05	
	7	16		3	16		7	16			c	2,88E+05	
	4	16	5,5	5	16	4,25	5	16	5,75	1		2,58E+05	4,02E+04
DCM-Phase 0,2mg/ml	48	8		55	8		47	8			a	2,36E+08	
	51	8		43	8		51	8			b	2,28E+08	
	47	8		35	8		45	8			c	2,21E+08	
	43	8	94,5	49	8	91	34	8	88,5	50		2,28E+08	7,53E+06
DCM-Phase 0,02mg/ml	47	8		46	8		43	8			a	2,49E+08	
	47	8		48	8		62	8			b	2,51E+08	
	55	8		53	8		63	8			c	2,78E+08	
	50	8	99,5	54	8	100,5	54	8	111	50		2,59E+08	1,59E+07
Hex-Phase 2mg/ml	8	16		6	16		11	16			a	3,75E+05	
	9	16		11	16		5	16			b	3,63E+05	
	5	16		7	16		9	16			c	4,75E+05	
	8	16	7,5	5	16	7,25	13	16	9,5	1		4,04E+05	6,17E+04
Hex-Phase 0,2mg/ml	61	8		41	8		55	8			a	2,56E+08	
	51	8		56	8		40	8			b	2,48E+08	
	52	8		55	8		49	8			c	2,25E+08	
	41	8	102,5	46	8	99	36	8	90	50		2,43E+08	1,61E+07

Tab. Anhang 15-5: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Kardenfraktionen aus dem EtOH-H_2O-Extrakt (Wiederholung)

Tag 0

Kontrolle mit Tween (a)			EE-Phase 0,2mg/ml (b)			DCM-Phase 2mg/ml (a)			DCM-Phase 0,02mg/ml (c)			Hex-Phase 0,2mg/ml (c)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
33	16		12	16		23	16		19	16		24	16			
29	16		26	16		16	16		33	16		16	16			
23	16		20	16		30	16		34	16		16	16			
22	16	26,75	30	16	22	27	16	24	15	16	25,25	25	16	20,25		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (a)	1,34E+06	
EE-Phase 0,2mg/ml (b)	1,10E+06	
DCM-Phase 2mg/ml (a)	1,20E+06	
DCM-Phase 0,02mg/ml (c)	1,26E+06	
Hex-Phase 0,2mg/ml (c)	1,01E+06	
	MW: 1,18E+06	1,29E+05

Tag 1

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	31	16		31	16		22	16			a	1,76E+06	
	33	16		35	16		27	16			b	1,66E+06	
	38	16		31	16		29	16			c	1,31E+06	
	39	16	35,25	36	16	33,25	27	16	26,25	1		1,58E+06	2,36E+05
EE-Phase 2mg/ml	19	16		28	16		12	16			a	1,10E+06	
	26	16		15	16		19	16			b	1,14E+06	
	20	16		26	16		21	16			c	8,38E+05	
	23	16	22	22	16	22,75	15	16	16,75	1		1,03E+06	1,63E+05
EE-Phase 0,2mg/ml	22	16		33	16		24	16			a	1,38E+06	
	33	16		30	16		24	16			b	1,49E+06	
	35	16		23	16		34	16			c	1,44E+06	
	20	16	27,5	33	16	29,75	33	16	28,75	1		1,43E+06	5,64E+04
EE-Phase 0,02mg/ml	43	16		38	16		36	16			a	1,89E+06	
	33	16		27	16		35	16			b	1,74E+06	
	34	16		36	16		45	16			c	1,83E+06	
	41	16	37,75	38	16	34,75	30	16	36,5	1		1,82E+06	7,53E+04
DCM-Phase 2mg/ml	21	16		20	16		14	16			a	7,13E+05	
	12	16		6	16		25	16			b	7,63E+05	
	10	16		24	16		12	16			c	9,38E+05	
	14	16	14,25	11	16	15,25	24	16	18,75	1		8,04E+05	1,18E+05
DCM-Phase 0,2mg/ml	31	16		27	16		28	16			a	1,49E+06	
	38	16		38	16		30	16			b	1,61E+06	
	24	16		39	16		27	16			c	1,35E+06	
	26	16	29,75	25	16	32,25	23	16	27	1		1,48E+06	1,31E+05
DCM-Phase 0,02mg/ml	39	16		30	16		28	16			a	1,74E+06	
	35	16		27	16		36	16			b	1,51E+06	
	32	16		32	16		32	16			c	1,58E+06	
	33	16	34,75	32	16	30,25	30	16	31,5	1		1,61E+06	1,16E+05

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Hex-Phase 2mg/ml	25	16		15	16		13	16			a	9,63E+05	
	21	16		12	16		24	16			b	9,38E+05	
	14	16		30	16		21	16			c	1,05E+06	
	17	16	19,25	18	16	18,75	26	16	21	1		9,83E+05	5,91E+04
Hex-Phase 0,2mg/ml	23	16		18	16		36	16			a	1,56E+06	
	40	16		25	16		35	16			b	1,20E+06	
	33	16		18	16		31	16			c	1,70E+06	
	29	16	31,25	35	16	24	34	16	34	1		1,49E+06	2,58E+05
Hex-Phase 0,02mg/ml	35	16		32	16		38	16			a	1,45E+06	
	20	16		36	16		36	16			b	1,60E+06	
	40	16		24	16		25	16			c	1,63E+06	
	21	16	29	36	16	32	31	16	32,5	1		1,56E+06	9,46E+04
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	34	16		28	16		21	16			a	2,12E+07	
	20	16		39	16		43	16			b	2,48E+07	
	22	16		38	16		28	16			c	2,34E+07	
	37	16	28,25	27	16	33	33	16	31,25	15		2,31E+07	1,80E+06
EE-Phase 2mg/ml	5	16		7	16		13	16			a	4,38E+05	
	8	16		16	16		5	16			b	5,75E+05	
	12	16		14	16		13	16			c	5,25E+05	
	10	16	8,75	9	16	11,5	11	16	10,5	1		5,13E+05	6,96E+04
EE-Phase 0,2mg/ml	17	16		16	16		14	16			a	1,16E+07	
	20	16		20	16		12	16			b	1,41E+07	
	15	16		18	16		18	16			c	1,14E+07	
	10	16	15,5	21	16	18,75	17	16	15,25	15		1,24E+07	1,46E+06
EE-Phase 0,02mg/ml	35	16		21	16		38	16			a	2,25E+07	
	33	16		18	16		37	16			b	1,69E+07	
	27	16		27	16		28	16			c	2,36E+07	
	25	16	30	24	16	22,5	23	16	31,5	15		2,10E+07	3,62E+06
DCM-Phase 2mg/ml	8	16		8	16		9	16			a	3,50E+05	
	3	16		4	16		4	16			b	2,88E+05	
	8	16		6	16		9	16			c	3,50E+05	
	9	16	7	5	16	5,75	6	16	7	1		3,29E+05	3,61E+04
DCM-Phase 0,2mg/ml	31	16		29	16		27	16			a	2,10E+07	
	25	16		26	16		21	16			b	1,76E+07	
	27	16		17	16		26	16			c	1,74E+07	
	29	16	28	22	16	23,5	19	16	23,25	15		1,87E+07	2,00E+06
DCM-Phase 0,02mg/ml	32	16		33	16		36	16			a	2,49E+07	
	42	16		26	16		27	16			b	2,21E+07	
	26	16		35	16		29	16			c	2,29E+07	
	33	16	33,25	24	16	29,5	30	16	30,5	15		2,33E+07	1,46E+06
Hex-Phase 2mg/ml	15	16		20	16		12	16			a	5,63E+05	
	8	16		8	16		9	16			b	6,38E+05	
	9	16		14	16		10	16			c	5,00E+05	
	13	16	11,25	9	16	12,75	9	16	10	1		5,67E+05	6,88E+04
Hex-Phase 0,2mg/ml	30	16		22	16		34	16			a	1,99E+07	
	24	16		26	16		29	16			b	1,88E+07	
	21	16		25	16		33	16			c	2,31E+07	
	31	16	26,5	27	16	25	27	16	30,75	15		2,06E+07	2,24E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Hex-Phase 0,02mg/ml	32	16		30	16		33	16			a	2,33E+07	
	30	16		38	16		34	16			b	2,70E+07	
	29	16		46	16		29	16			c	2,57E+07	
	33	16	31	30	16	36	41	16	34,25	15		2,53E+07	1,90E+06
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	50	8		46	8		32	8			a	2,15E+08	
	35	8		34	8		51	8			b	1,95E+08	
	41	8		35	8		40	8			c	1,98E+08	
	46	8	86	41	8	78	35	8	79	50		2,03E+08	1,09E+07
EE-Phase 2mg/ml	9	16		10	16		6	16			a	3,63E+05	
	8	16		8	16		9	16			b	3,75E+05	
	5	16		6	16		11	16			c	3,88E+05	
	7	16	7,25	6	16	7,5	5	16	7,75	1		3,75E+05	1,25E+04
EE-Phase 0,2mg/ml	32	8		36	8		40	8			a	1,60E+08	
	39	8		32	8		31	8			b	1,73E+08	
	27	8		34	8		27	8			c	1,58E+08	
	30	8	64	36	8	69	28	8	63	50		1,63E+08	8,04E+06
EE-Phase 0,02mg/ml	42	8		31	8		41	8			a	1,94E+08	
	36	8		40	8		39	8			b	1,95E+08	
	40	8		37	8		37	8			c	2,03E+08	
	37	8	77,5	48	8	78	45	8	81	50		1,97E+08	4,73E+06
DCM-Phase 2mg/ml	5	16		8	16		2	16			a	2,88E+05	
	6	16		2	16		3	16			b	2,25E+05	
	6	16		5	16		8	16			c	2,13E+05	
	6	16	5,75	3	16	4,5	4	16	4,25	1		2,42E+05	4,02E+04
DCM-Phase 0,2mg/ml	44	8		35	8		46	8			a	1,96E+08	
	39	8		31	8		31	8			b	1,75E+08	
	35	8		34	8		30	8			c	1,86E+08	
	39	8	78,5	40	8	70	42	8	74,5	50		1,86E+08	1,06E+07
DCM-Phase 0,02mg/ml	43	8		40	8		50	8			a	2,11E+08	
	49	8		33	8		49	8			b	1,78E+08	
	47	8		30	8		41	8			c	2,31E+08	
	30	8	84,5	39	8	71	45	8	92,5	50		2,07E+08	2,72E+07
Hex-Phase 2mg/ml	4	16		13	16		5	16			a	3,63E+05	
	8	16		6	16		9	16			b	4,75E+05	
	7	16		10	16		9	16			c	3,63E+05	
	10	16	7,25	9	16	9,5	6	16	7,25	1		4,00E+05	6,50E+04
Hex-Phase 0,2mg/ml	28	8		42	8		48	8			a	1,76E+08	
	43	8		33	8		35	8			b	2,04E+08	
	32	8		40	8		54	8			c	2,36E+08	
	38	8	70,5	48	8	81,5	52	8	94,5	50		2,05E+08	3,00E+07
Hex-Phase 0,02mg/ml	62	8		50	8		51	8			a	2,38E+08	
	49	8		63	8		48	8			b	2,71E+08	
	37	8		48	8		37	8			c	2,21E+08	
	42	8	95	56	8	108,5	41	8	88,5	50		2,43E+08	2,55E+07

Tab. Anhang 15-6: Mikroskopische Zähldaten der polaren Kardenfraktionen aus dem MeOH-Extrakt

Tag 0																	
Kontrolle mit H_2O (a)			Kontrolle mit Tween (c)			H_2O-Phase 0,2 mg/ml (b)			H_2O-Phase 0,02 mg/ml (c)			n-But-Phase 0,02 mg/ml (a)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
15	16		27	16		20	16		10	16		16	16			
14	16		30	16		22	16		17	16		19	16			
26	16		30	16		28	16		11	16		11	16			
18	16	18,25	19	16	26,5	27	16	24,25	17	16	13,75	27	16	18,25		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit H_2O (a)	9,13E+05	
Kontrolle mit PS80 (c)	1,33E+06	
H_2O-Phase 0,2 mg/ml (b)	1,21E+06	
H_2O-Phase 0,02 mg/ml (c)	6,88E+05	
n-But-Phase 0,02 mg/ml (a)	9,13E+05	
	MW: 1,01E+06	2,57E+05

Tag 1													
Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit H_2O	68	16		37	16		35	16			a	2,21E+06	
	34	16		29	16		27	16			b	1,65E+06	
	43	16		34	16		23	16			c	1,56E+06	
	32	16	44,25	32	16	33	40	16	31,25	1		1,81E+06	3,53E+05
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	45	16		39	16		35	16			a	1,75E+06	
	35	16		44	16		30	16			b	1,96E+06	
	28	16		34	16		32	16			c	1,64E+06	
	32	16	35	40	16	39,25	34	16	32,75	1		1,78E+06	1,65E+05
H_2O-Phase 2mg/ml	35	16		38	16		28	16			a	2,00E+06	
	36	16		34	16		46	16			b	1,83E+06	
	42	16		44	16		38	16			c	1,79E+06	
	47	16	40	30	16	36,5	31	16	35,75	1		1,87E+06	1,13E+05
H_2O-Phase 0,2mg/ml	34	16		37	16		40	16			a	1,80E+06	
	39	16		34	16		37	16			b	1,95E+06	
	29	16		41	16		43	16			c	1,99E+06	
	42	16	36	44	16	39	39	16	39,75	1		1,91E+06	9,92E+04
H_2O-Phase 0,02mg/m	41	16		35	16		40	16			a	2,14E+06	
	41	16		45	16		36	16			b	1,84E+06	
	46	16		31	16		34	16			c	1,78E+06	
	43	16	42,75	36	16	36,75	32	16	35,5	1		1,92E+06	1,94E+05
n-But-Phase 2mg/ml	23	16		25	16		19	16			a	1,23E+06	
	26	16		33	16		19	16			b	1,20E+06	
	20	16		19	16		22	16			c	1,09E+06	
	29	16	24,5	19	16	24	27	16	21,75	1		1,17E+06	7,32E+04
n-But-Phase 0,2mg/ml	37	16		26	16		36	16			a	1,79E+06	
	33	16		26	16		43	16			b	1,66E+06	
	34	16		32	16		47	16			c	1,98E+06	
	39	16	35,75	49	16	33,25	32	16	39,5	1		1,81E+06	1,57E+05

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
n-But-Phase 0,02mg/ml	41	16		42	16		51	16			a	1,93E+06	
	35	16		42	16		35	16			b	1,95E+06	
	42	16		32	16		43	16			c	2,06E+06	
	36	16	38,5	40	16	39	36	16	41,25	1		1,98E+06	7,32E+04
Tag 4													
Kontrolle mit H_2O	42	16		48	16		40	16			a	4,20E+07	
	39	16		39	16		38	16			b	4,05E+07	
	37	16		39	16		30	16			c	3,58E+07	
	50	16	42	36	16	40,5	35	16	35,75	20		3,94E+07	3,26E+06
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	38	16		46	16		28	16			a	3,75E+07	
	35	16		33	16		29	16			b	3,73E+07	
	38	16		31	16		42	16			c	3,23E+07	
	39	16	37,5	39	16	37,25	30	16	32,25	20		3,57E+07	2,96E+06
H_2O-Phase 2mg/ml	37	16		40	16		25	16			a	3,58E+07	
	30	16		25	16		27	16			b	3,18E+07	
	37	16		34	16		37	16			c	3,05E+07	
	39	16	35,75	28	16	31,75	33	16	30,5	20		3,27E+07	2,74E+06
H_2O-Phase 0,2mg/ml	46	16		35	16		45	16			a	4,15E+07	
	42	16		41	16		33	16			b	3,88E+07	
	44	16		37	16		34	16			c	3,95E+07	
	34	16	41,5	42	16	38,75	46	16	39,5	20		3,99E+07	1,42E+06
H_2O-Phase 0,02mg/m	39	16		47	16		46	16			a	4,18E+07	
	42	16		40	16		33	16			b	3,95E+07	
	44	16		29	16		33	16			c	3,83E+07	
	42	16	41,75	42	16	39,5	41	16	38,25	20		3,98E+07	1,77E+06
n-But-Phase 2mg/ml	57	16		50	16		61	16			a	2,85E+06	
	54	16		73	16		85	16			b	3,21E+06	
	55	16		60	16		53	16			c	3,35E+06	
	62	16	57	74	16	64,25	69	16	67	1		3,14E+06	2,58E+05
n-But-Phase 0,2mg/ml	17	16		24	16		23	16			a	1,93E+07	
	20	16		19	16		20	16			b	2,05E+07	
	16	16		23	16		24	16			c	2,25E+07	
	24	16	19,25	16	16	20,5	23	16	22,5	20		2,08E+07	1,64E+06
n-But-Phase 0,02mg/ml	39	16		41	16		39	16			a	3,53E+07	
	33	16		38	16		30	16			b	4,15E+07	
	38	16		47	16		35	16			c	3,45E+07	
	31	16	35,25	40	16	41,5	34	16	34,5	20		3,71E+07	3,84E+06
Tag 8													
Kontrolle mit H_2O	26	16		19	16		25	16			a	1,31E+08	
	26	16		25	16		26	16			b	1,16E+08	
	27	16		19	16		39	16			c	1,39E+08	
	26	16	26,25	30	16	23,25	21	16	27,75	100		1,29E+08	1,15E+07
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	16	16		37	16		28	16			a	1,11E+08	
	25	16		38	16		25	16			b	1,65E+08	
	18	16		34	16		29	16			c	1,35E+08	
	30	16	22,25	23	16	33	26	16	27	100		1,37E+08	2,69E+07
H_2O-Phase 2mg/ml	22	16		23	16		18	16			a	1,16E+08	
	22	16		25	16		20	16			b	8,88E+07	
	26	16		11	16		25	16			c	1,08E+08	
	23	16	23,25	12	16	17,75	23	16	21,5	100		1,04E+08	1,40E+07

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
H_2O-Phase 0,2mg/ml	27	16		28	16		23	16			a	1,39E+08	
	25	16		22	16		27	16			b	1,59E+08	
	30	16		40	16		25	16			c	1,18E+08	
	29	16	27,75	37	16	31,75	19	16	23,5	100		1,38E+08	2,06E+07
H_2O-Phase 0,02mg/m	26	16		19	16		22	16			a	1,25E+08	
	22	16		20	16		22	16			b	1,08E+08	
	27	16		28	16		25	16			c	1,15E+08	
	25	16	25	19	16	21,5	23	16	23	100		1,16E+08	8,78E+06
n-But-Phase 2mg/ml	48	8		42	8		41	8			a	5,20E+06	
	53	8		35	8		41	8			b	4,50E+06	
	52	8		54	8		42	8			c	4,00E+06	
	55	8	104	49	8	90	36	8	80	1		4,57E+06	6,03E+05
n-But-Phase 0,2mg/ml	26	16		22	16		29	16			a	1,31E+08	
	24	16		16	16		27	16			b	1,15E+08	
	25	16		33	16		28	16			c	1,31E+08	
	30	16	26,25	21	16	23	21	16	26,25	100		1,26E+08	9,38E+06
n-But-Phase 0,02mg/ml	31	16		26	16		29	16			a	1,83E+08	
	39	16		33	16		24	16			b	1,56E+08	
	36	16		35	16		26	16			c	1,25E+08	
	40	16	36,5	31	16	31,25	21	16	25	100		1,55E+08	2,88E+07

Tab. Anhang 15-7: Mikroskopische Zähldaten der polaren Kardenfraktionen aus dem MeOH-Extrakt (Wiederholung)

Tag 0																
Kontrolle mit H_2O (b)			Kontrolle mit Tween (c)			H_2O-Phase 2 mg/ml (a)			H_2O-Phase 0,02 mg/ml (c)			n-But-Phase 0,2 mg/ml (a)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
17	16		24	16		21	16		16	16		20	16			
19	16		20	16		18	16		10	16		17	16			
14	16		21	16		29	16		22	16		24	16			
23	16	18,25	19	16	21	24	16	23	23	16	17,75	18	16	19,75		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit H_2O (b)	9,13E+05	
Kontrolle mit PS80 (c)	1,05E+06	
H_2O-Phase 2 mg/ml (a)	1,15E+06	
H_2O-Phase 0,02 mg/ml (c)	8,88E+05	
n-But-Phase 0,2 mg/ml (a)	9,88E+05	
	MW: 9,98E+05	1,07E+05

Tag 1													
Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit H_2O	39	16		46	16		32	16			a	1,83E+06	
	27	16		30	16		34	16			b	1,86E+06	
	44	16		45	16		47	16			c	2,04E+06	
	36	16	36,5	28	16	37,25	50	16	40,75	1		1,91E+06	1,13E+05
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	43	16		29	16		33	16			a	2,00E+06	
	42	16		44	16		28	16			b	1,69E+06	
	39	16		31	16		44	16			c	1,71E+06	
	36	16	40	31	16	33,75	32	16	34,25	1		1,80E+06	1,74E+05
H_2O-Phase 2mg/ml	41	16		30	16		32	16			a	1,85E+06	
	32	16		45	16		34	16			b	1,95E+06	
	37	16		35	16		35	16			c	1,64E+06	
	38	16	37	46	16	39	30	16	32,75	1		1,81E+06	1,60E+05
H_2O-Phase 0,2mg/ml	34	16		40	16		51	16			a	1,76E+06	
	39	16		48	16		47	16			b	2,05E+06	
	36	16		32	16		34	16			c	2,19E+06	
	32	16	35,25	44	16	41	43	16	43,75	1		2,00E+06	2,17E+05
H_2O-Phase 0,02mg/m	38	16		45	16		39	16			a	2,18E+06	
	53	16		34	16		30	16			b	2,09E+06	
	42	16		52	16		35	16			c	1,86E+06	
	41	16	43,5	36	16	41,75	45	16	37,25	1		2,04E+06	1,61E+05
n-But-Phase 2mg/ml	31	16		23	16		21	16			a	1,29E+06	
	20	16		30	16		24	16			b	1,15E+06	
	26	16		19	16		20	16			c	1,23E+06	
	26	16	25,75	20	16	23	33	16	24,5	1		1,22E+06	6,88E+04
n-But-Phase 0,2mg/ml	25	16		39	16		45	16			a	1,70E+06	
	30	16		40	16		36	16			b	1,96E+06	
	45	16		41	16		32	16			c	1,78E+06	
	36	16	34	37	16	39,25	29	16	35,5	1		1,81E+06	1,35E+05
n-But-Phase 0,02mg/ml	37	16		39	16		50	16			a	1,81E+06	
	44	16		34	16		44	16			b	1,74E+06	
	36	16		34	16		33	16			c	2,18E+06	
	28	16	36,25	32	16	34,75	47	16	43,5	1		1,91E+06	2,34E+05
Tag 4													
Kontrolle mit H_2O	38	16		34	16		28	16			a	3,75E+07	
	43	16		50	16		35	16			b	4,03E+07	
	36	16		43	16		49	16			c	3,90E+07	
	33	16	37,5	34	16	40,25	44	16	39	20		3,89E+07	1,38E+06
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	47	16		46	16		45	16			a	4,00E+07	
	46	16		39	16		34	16			b	4,20E+07	
	37	16		41	16		47	16			c	3,90E+07	
	30	16	40	42	16	42	30	16	39	20		4,03E+07	1,53E+06
H_2O-Phase 2mg/ml	31	16		36	16		33	16			a	3,10E+07	
	34	16		28	16		33	16			b	3,15E+07	
	33	16		38	16		35	16			c	3,40E+07	
	26	16	31	24	16	31,5	35	16	34	20		3,22E+07	1,61E+06
H_2O-Phase 0,2mg/ml	32	16		46	16		38	16			a	3,73E+07	
	46	16		45	16		37	16			b	4,28E+07	
	39	16		39	16		34	16			c	3,68E+07	
	32	16	37,25	41	16	42,75	38	16	36,75	20		3,89E+07	3,33E+06

Probe Nr.	A			B			C						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
H_2O-Phase 0,02mg/m	45	16		32	16		38	16			a	3,90E+07	
	31	16		37	16		31	16			b	4,05E+07	
	38	16		44	16		43	16			c	3,75E+07	
	42	16	39	49	16	40,5	38	16	37,5	20		3,90E+07	1,50E+06
n-But-Phase 2mg/ml	37	8		26	8		30	8			a	3,68E+06	
	43	8		27	8		34	8			b	2,85E+06	
	33	8		25	8		25	8			c	2,95E+06	
	34	8	73,5	36	8	57	29	8	59	1		3,16E+06	4,50E+05
n-But-Phase 0,2mg/ml	25	16		27	16		24	16			a	2,20E+07	
	19	16		23	16		26	16			b	2,60E+07	
	25	16		27	16		26	16			c	2,30E+07	
	19	16	22	27	16	26	16	16	23	20		2,37E+07	2,08E+06
n-But-Phase 0,02mg/ml	33	16		29	16		49	16			a	4,00E+07	
	48	16		45	16		43	16			b	3,83E+07	
	46	16		33	16		38	16			c	4,40E+07	
	33	16	40	46	16	38,25	46	16	44	20		4,08E+07	2,95E+06
Tag 8													
Kontrolle mit H_2O	28	16		37	16		18	16			a	1,34E+08	
	29	16		31	16		31	16			b	1,60E+08	
	19	16		33	16		19	16			c	1,08E+08	
	31	16	26,75	27	16	32	18	16	21,5	100		1,34E+08	2,63E+07
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	30	16		17	16		15	16			a	1,40E+08	
	27	16		19	16		16	16			b	9,88E+07	
	16	16		19	16		39	16			c	1,34E+08	
	39	16	28	24	16	19,75	37	16	26,75	100		1,24E+08	2,22E+07
H_2O-Phase 2mg/ml	14	16		11	16		25	16			a	8,63E+07	
	19	16		20	16		24	16			b	1,05E+08	
	26	16		27	16		13	16			c	1,08E+08	
	10	16	17,25	26	16	21	24	16	21,5	100		9,96E+07	1,16E+07
H_2O-Phase 0,2mg/ml	18	16		24	16		20	16			a	1,26E+08	
	30	16		21	16		23	16			b	1,39E+08	
	24	16		36	16		26	16			c	1,25E+08	
	29	16	25,25	30	16	27,75	31	16	25	100		1,30E+08	7,60E+06
H_2O-Phase 0,02mg/m	27	16		25	16		27	16			a	1,21E+08	
	21	16		26	16		19	16			b	1,21E+08	
	24	16		20	16		20	16			c	1,10E+08	
	25	16	24,25	26	16	24,25	22	16	22	100		1,18E+08	6,50E+06
n-But-Phase 2mg/ml	55	8		35	8		47	8			a	4,65E+06	
	38	8		37	8		40	8			b	4,13E+06	
	43	8		42	8		42	8			c	4,53E+06	
	50	8	93	51	8	82,5	52	8	90,5	1		4,43E+06	2,74E+05
n-But-Phase 0,2mg/ml	26	16		21	16		23	16			a	1,10E+08	
	19	16		24	16		33	16			b	1,05E+08	
	23	16		22	16		24	16			c	1,25E+08	
	20	16	22	17	16	21	20	16	25	100		1,13E+08	1,04E+07
n-But-Phase 0,02mg/ml	25	16		26	16		44	16			a	1,44E+08	
	47	16		47	16		24	16			b	1,83E+08	
	22	16		42	16		21	16			c	1,54E+08	
	21	16	28,75	31	16	36,5	34	16	30,75	100		1,60E+08	2,01E+07

Tab. Anhang 15-8: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Kardenfraktionen aus dem MeOH- Extrakt

Tag 0

Kontrolle mit Tween (b)			EE-Phase 0,02mg/ml (c)			DCM-Phase 0,2mg/ml (a)			DCM-Phase 0,02mg/ml (c)			Hex-Phase 0,02mg/ml (b)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
23	16		24	16		22	16		33	16		24	16			
27	16		20	16		18	16		27	16		22	16			
27	16		28	16		18	16		18	16		18	16			
36	16	28,25	48	16	30	18	16	19	25	16	25,75	25	16	22,25		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (b)	1,41E+06	
EE-Phase 0,02mg/ml (c)	1,50E+06	
DCM-Phase 0,2mg/ml (a)	9,50E+05	
DCM-Phase 0,02mg/ml (c)	1,29E+06	
Hex-Phase 0,02mg/ml (b)	1,11E+06	
	MW: 1,25E+06	2,23E+05

Tag 1

Probe Nr.	A			B			c							
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	37	16		40	16		42	16			a	2,00E+06	
	57	16		39	16		33	16			b	1,90E+06	
	33	16		38	16		38	16			c	1,86E+06	
	33	16	40	35	16	38	36	16	37,25	1		1,92E+06	7,11E+04
EE-Phase 2mg/ml	22	16		27	16		30	16			a	1,29E+06	
	28	16		26	16		31	16			b	1,39E+06	
	30	16		29	16		28	16			c	1,44E+06	
	23	16	25,75	29	16	27,75	26	16	28,75	1		1,37E+06	7,64E+04
EE-Phase 0,2mg/ml	46	16		52	16		58	16			a	2,05E+06	
	42	16		41	16		57	16			b	2,21E+06	
	39	16		38	16		47	16			c	2,78E+06	
	37	16	41	46	16	44,25	60	16	55,5	1		2,35E+06	3,80E+05
EE-Phase 0,02mg/ml	45	16		59	16		55	16			a	2,35E+06	
	45	16		51	16		50	16			b	2,51E+06	
	55	16		53	16		37	16			c	2,28E+06	
	43	16	47	38	16	50,25	40	16	45,5	1		2,38E+06	1,21E+05
DCM-Phase 2mg/ml	20	16		12	16		18	16			a	9,13E+05	
	18	16		27	16		16	16			b	1,04E+06	
	20	16		21	16		17	16			c	8,50E+05	
	15	16	18,25	23	16	20,75	17	16	17	1		9,33E+05	9,55E+04
DCM-Phase 0,2mg/ml	36	16		37	16		40	16			a	2,25E+06	
	43	16		38	16		43	16			b	1,65E+06	
	52	16		23	16		34	16			c	2,04E+06	
	49	16	45	34	16	33	46	16	40,75	1		1,98E+06	3,04E+05
DCM-Phase 0,02mg/ml	45	16		50	16		39	16			a	2,39E+06	
	38	16		50	16		46	16			b	2,34E+06	
	55	16		37	16		52	16			c	2,29E+06	
	53	16	47,75	50	16	46,75	46	16	45,75	1		2,34E+06	5,00E+04

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Hex-Phase 2mg/ml	30	16		21	16		30	16			a	1,20E+06	
	18	16		30	16		28	16			b	1,33E+06	
	26	16		31	16		22	16			c	1,38E+06	
	22	16	24	24	16	26,5	30	16	27,5	1		1,30E+06	9,01E+04
Hex-Phase 0,2mg/ml	39	16		46	16		33	16			a	2,16E+06	
	46	16		37	16		43	16			b	2,01E+06	
	40	16		42	16		39	16			c	1,89E+06	
	48	16	43,25	36	16	40,25	36	16	37,75	1		2,02E+06	1,38E+05
Hex-Phase 0,02mg/ml	49	16		43	16		57	16			a	2,41E+06	
	54	16		38	16		56	16			b	2,03E+06	
	47	16		41	16		37	16			c	2,44E+06	
	43	16	48,25	40	16	40,5	45	16	48,75	1		2,29E+06	2,31E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	39	16		41	16		51	16			a	3,88E+07	
	32	16		43	16		55	16			b	3,90E+07	
	37	16		40	16		47	16			c	5,58E+07	
	47	16	38,75	32	16	39	70	16	55,75	20		4,45E+07	9,74E+06
EE-Phase 2mg/ml	35	16		27	16		30	16			a	2,80E+07	
	24	16		30	16		27	16			b	2,68E+07	
	30	16		33	16		24	16			c	2,55E+07	
	23	16	28	17	16	26,75	21	16	25,5	20		2,68E+07	1,25E+06
EE-Phase 0,2mg/ml	32	16		58	16		37	16			a	3,45E+07	
	39	16		42	16		38	16			b	5,15E+07	
	33	16		57	16		32	16			c	3,60E+07	
	34	16	34,5	49	16	51,5	37	16	36	20		4,07E+07	9,41E+06
EE-Phase 0,02mg/ml	36	16		42	16		48	16			a	4,08E+07	
	44	16		42	16		51	16			b	4,13E+07	
	43	16		38	16		41	16			c	4,50E+07	
	40	16	40,75	43	16	41,25	40	16	45	20		4,23E+07	2,32E+06
DCM-Phase 2mg/ml	2	16		2	16		2	16			a	1,63E+05	
	3	16		6	16		3	16			b	1,63E+05	
	4	16		4	16		4	16			c	1,63E+05	
	4	16	3,25	1	16	3,25	4	16	3,25	1		1,63E+05	0,00E+00
DCM-Phase 0,2mg/ml	45	16		33	16		29	16			a	4,05E+07	
	38	16		26	16		30	16			b	3,03E+07	
	35	16		31	16		27	16			c	3,00E+07	
	44	16	40,5	31	16	30,25	34	16	30	20		3,36E+07	5,99E+06
DCM-Phase 0,02mg/ml	45	16		30	16		38	16			a	4,28E+07	
	34	16		48	16		36	16			b	4,18E+07	
	37	16		39	16		41	16			c	3,88E+07	
	55	16	42,75	50	16	41,75	40	16	38,75	20		4,11E+07	2,08E+06
Hex-Phase 2mg/ml	33	8		48	8		31	8			a	4,15E+06	
	41	8		57	8		48	8			b	5,08E+06	
	46	8		54	8		35	8			c	3,75E+06	
	46	8	83	44	8	101,5	36	8	75	1		4,33E+06	6,80E+05
Hex-Phase 0,2mg/ml	54	16		40	16		38	16			a	4,28E+07	
	39	16		25	16		36	16			b	3,53E+07	
	38	16		36	16		42	16			c	4,13E+07	
	40	16	42,75	40	16	35,25	49	16	41,25	20		3,98E+07	3,97E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Hex-Phase 0,02mg/ml	50	16		47	16		48	16			a	5,00E+07	
	53	16		61	16		41	16			b	4,55E+07	
	46	16		36	16		47	16			c	4,28E+07	
	51	16	50	38	16	45,5	35	16	42,75	20		4,61E+07	3,66E+06
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	34	16		24	16		33	16			a	2,13E+08	
	50	16		30	16		27	16			b	1,28E+08	
	43	16		19	16		29	16			c	1,51E+08	
	43	16	42,5	29	16	25,5	32	16	30,25	100		1,64E+08	4,39E+07
EE-Phase 2mg/ml	32	16		38	16		36	16			a	1,56E+08	
	34	16		36	16		38	16			b	1,60E+08	
	30	16		28	16		32	16			c	1,80E+08	
	29	16	31,25	26	16	32	38	16	36	100		1,65E+08	1,28E+07
EE-Phase 0,2mg/ml	42	16		39	16		30	16			a	1,43E+08	
	22	16		41	16		29	16			b	1,81E+08	
	27	16		32	16		40	16			c	1,60E+08	
	23	16	28,5	33	16	36,25	29	16	32	100		1,61E+08	1,94E+07
EE-Phase 0,02mg/ml	30	16		46	16		36	16			a	1,48E+08	
	31	16		50	16		27	16			b	2,15E+08	
	25	16		34	16		29	16			c	1,48E+08	
	32	16	29,5	42	16	43	26	16	29,5	100		1,70E+08	3,90E+07
DCM-Phase 2mg/ml	4	16		6	16		3	16			a	2,13E+05	
	4	16		4	16		3	16			b	1,88E+05	
	3	16		2	16		6	16			c	1,75E+05	
	6	16	4,25	3	16	3,75	2	16	3,5	1		1,92E+05	1,91E+04
DCM-Phase 0,2mg/ml	31	16		30	16		40	16			a	1,50E+08	
	31	16		26	16		30	16			b	1,49E+08	
	34	16		33	16		21	16			c	1,45E+08	
	24	16	30	30	16	29,75	25	16	29	100		1,48E+08	2,60E+06
DCM-Phase 0,02mg/ml	51	16		35	16		53	16			a	2,29E+08	
	44	16		25	16		28	16			b	1,46E+08	
	41	16		23	16		37	16			c	1,88E+08	
	47	16	45,75	34	16	29,25	32	16	37,5	100		1,88E+08	4,13E+07
Hex-Phase 2mg/ml	52	16		38	16		30	16			a	1,94E+06	
	38	16		24	16		34	16			b	1,33E+06	
	35	16		28	16		31	16			c	1,65E+06	
	30	16	38,75	16	16	26,5	37	16	33	1		1,64E+06	3,06E+05
Hex-Phase 0,2mg/ml	37	16		39	16		31	16			a	1,75E+08	
	42	16		40	16		33	16			b	1,93E+08	
	35	16		34	16		30	16			c	1,45E+08	
	26	16	35	41	16	38,5	22	16	29	100		1,71E+08	2,40E+07
Hex-Phase 0,02mg/ml	27	16		32	16		37	16			a	1,53E+08	
	25	16		30	16		39	16			b	1,53E+08	
	36	16		34	16		36	16			c	1,78E+08	
	34	16	30,5	26	16	30,5	30	16	35,5	100		1,61E+08	1,44E+07

Tab. Anhang 15-9: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Kardenfraktionen aus dem MeOH-Extrakt (Wiederholung)

Tag 0																
Kontrolle mit Tween (b)			EE-Phase 0,02mg/ml (c)			DCM-Phase 0,2mg/ml (a)			DCM-Phase 0,02mg/ml (c)			Hex-Phase 0,02mg/ml (b)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
26	16		31	16		17	16		22	16		25	16			
27	16		34	16		19	16		25	16		19	16			
19	16		28	16		22	16		19	16		27	16			
28	16	25	26	16	29,75	18	16	19	27	16	23,25	28	16	24,75		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (b)	1,25E+06	
EE-Phase 0,02mg/ml (c)	1,49E+06	
DCM-Phase 0,2mg/ml (a)	9,50E+05	
DCM-Phase 0,02mg/ml (c)	1,16E+06	
Hex-Phase 0,02mg/ml (b)	1,24E+06	
	MW: 1,22E+06	1,93E+05

Tag 1														
Probe Nr.	A			B			c							
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	45	16		43	16		42	16			a	1,93E+06	
	37	16		44	16		32	16			b	1,91E+06	
	32	16		35	16		33	16			c	1,85E+06	
	40	16	38,5	31	16	38,25	41	16	37	1		1,90E+06	4,02E+04
EE-Phase 2mg/ml	25	16		22	16		25	16			a	1,38E+06	
	26	16		30	16		26	16			b	1,30E+06	
	28	16		26	16		25	16			c	1,29E+06	
	31	16	27,5	26	16	26	27	16	25,75	1		1,32E+06	4,73E+04
EE-Phase 0,2mg/ml	40	16		56	16		41	16			a	2,18E+06	
	47	16		47	16		44	16			b	2,49E+06	
	46	16		38	16		57	16			c	2,45E+06	
	41	16	43,5	58	16	49,75	54	16	49	1		2,37E+06	1,71E+05
EE-Phase 0,02mg/ml	43	16		37	16		41	16			a	2,31E+06	
	53	16		45	16		53	16			b	2,15E+06	
	52	16		51	16		59	16			c	2,64E+06	
	37	16	46,25	39	16	43	58	16	52,75	1		2,37E+06	2,48E+05
DCM-Phase 2mg/ml	14	16		17	16		25	16			a	7,00E+05	
	13	16		27	16		26	16			b	9,63E+05	
	15	16		13	16		22	16			c	1,20E+06	
	14	16	14	20	16	19,25	23	16	24	1		9,54E+05	2,50E+05
DCM-Phase 0,2mg/ml	47	16		34	16		30	16			a	1,71E+06	
	26	16		41	16		40	16			b	1,86E+06	
	36	16		39	16		53	16			c	2,00E+06	
	28	16	34,25	35	16	37,25	37	16	40	1		1,86E+06	1,44E+05
DCM-Phase 0,02mg/ml	47	16		40	16		39	16			a	2,06E+06	
	38	16		48	16		54	16			b	2,23E+06	
	39	16		36	16		46	16			c	2,36E+06	
	41	16	41,25	54	16	44,5	50	16	47,25	1		2,22E+06	1,50E+05

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Hex-Phase 2mg/ml	20	16		27	16		29	16			a	9,38E+05	
	18	16		30	16		33	16			b	1,41E+06	
	20	16		22	16		21	16			c	1,46E+06	
	17	16	18,75	34	16	28,25	34	16	29,25	1		1,27E+06	2,90E+05
Hex-Phase 0,2mg/ml	36	16		44	16		41	16			a	1,90E+06	
	42	16		45	16		35	16			b	2,23E+06	
	34	16		41	16		37	16			c	1,84E+06	
	40	16	38	48	16	44,5	34	16	36,75	1		1,99E+06	2,08E+05
Hex-Phase 0,02mg/ml	34	16		46	16		49	16			a	2,06E+06	
	38	16		52	16		40	16			b	2,46E+06	
	39	16		43	16		38	16			c	2,24E+06	
	54	16	41,25	56	16	49,25	52	16	44,75	1		2,25E+06	2,01E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	24	8		25	8		22	8			a	5,10E+07	
	27	8		28	8		26	8			b	4,85E+07	
	21	8		25	8		35	8			c	5,45E+07	
	30	8	51	19	8	48,5	26	8	54,5	20		5,13E+07	3,01E+06
EE-Phase 2mg/ml	25	16		39	16		22	16			a	2,98E+07	
	34	16		29	16		38	16			b	3,55E+07	
	28	16		36	16		36	16			c	3,45E+07	
	32	16	29,75	38	16	35,5	42	16	34,5	20		3,33E+07	3,07E+06
EE-Phase 0,2mg/ml	23	8		21	8		18	8			a	4,60E+07	
	22	8		25	8		18	8			b	4,50E+07	
	25	8		23	8		23	8			c	4,20E+07	
	22	8	46	21	8	45	25	8	42	20		4,43E+07	2,08E+06
EE-Phase 0,02mg/ml	24	8		22	8		27	8			a	4,80E+07	
	28	8		18	8		24	8			b	4,30E+07	
	18	8		25	8		29	8			c	5,05E+07	
	26	8	48	21	8	43	21	8	50,5	20		4,72E+07	3,82E+06
DCM-Phase 2mg/ml	2	16		5	16		3	16			a	1,88E+05	
	3	16		1	16		3	16			b	1,75E+05	
	4	16		6	16		4	16			c	1,50E+05	
	6	16	3,75	2	16	3,5	2	16	3	1		1,71E+05	1,91E+04
DCM-Phase 0,2mg/ml	44	16		36	16		46	16			a	3,88E+07	
	41	16		38	16		46	16			b	4,20E+07	
	31	16		43	16		33	16			c	3,90E+07	
	39	16	38,75	51	16	42	31	16	39	20		3,99E+07	1,81E+06
DCM-Phase 0,02mg/ml	54	16		54	16		47	16			a	4,85E+07	
	39	16		51	16		36	16			b	4,75E+07	
	46	16		46	16		52	16			c	4,45E+07	
	55	16	48,5	39	16	47,5	43	16	44,5	20		4,68E+07	2,08E+06
Hex-Phase 2mg/ml	32	8		36	8		55	8			a	3,53E+06	
	35	8		44	8		51	8			b	4,05E+06	
	42	8		49	8		54	8			c	4,93E+06	
	32	8	70,5	33	8	81	37	8	98,5	1		4,17E+06	7,07E+05
Hex-Phase 0,2mg/ml	48	16		49	16		55	16			a	4,10E+07	
	42	16		37	16		38	16			b	4,70E+07	
	33	16		50	16		52	16			c	4,83E+07	
	41	16	41	52	16	47	48	16	48,25	20		4,54E+07	3,88E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Hex-Phase 0,02mg/ml	27	8		26	8		28	8			a	5,15E+07	
	19	8		30	8		25	8			b	5,40E+07	
	32	8		24	8		19	8			c	4,85E+07	
	25	8	51,5	28	8	54	25	8	48,5	20		5,13E+07	2,75E+06
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	35	16		21	16		40	16			a	2,01E+08	
	47	16		45	16		28	16			b	1,71E+08	
	36	16		41	16		25	16			c	1,64E+08	
	43	16	40,25	30	16	34,25	38	16	32,75	100		1,79E+08	1,98E+07
EE-Phase 2mg/ml	28	16		35	16		37	16			a	1,40E+08	
	27	16		38	16		32	16			b	1,69E+08	
	27	16		26	16		26	16			c	1,61E+08	
	30	16	28	36	16	33,75	34	16	32,25	100		1,57E+08	1,49E+07
EE-Phase 0,2mg/ml	36	16		38	16		33	16			a	1,51E+08	
	29	16		36	16		40	16			b	1,79E+08	
	25	16		29	16		37	16			c	1,90E+08	
	31	16	30,25	40	16	35,75	42	16	38	100		1,73E+08	1,99E+07
EE-Phase 0,02mg/ml	31	16		35	16		32	16			a	1,94E+08	
	46	16		43	16		31	16			b	1,85E+08	
	38	16		41	16		45	16			c	1,69E+08	
	40	16	38,75	29	16	37	27	16	33,75	100		1,83E+08	1,27E+07
DCM-Phase 2mg/ml	2	16		3	16		5	16			a	1,38E+05	
	4	16		2	16		3	16			b	1,50E+05	
	2	16		2	16		2	16			c	1,63E+05	
	3	16	2,75	5	16	3	3	16	3,25	1		1,50E+05	1,25E+04
DCM-Phase 0,2mg/ml	27	16		30	16		32	16			a	1,74E+08	
	34	16		35	16		24	16			b	1,54E+08	
	39	16		33	16		33	16			c	1,50E+08	
	39	16	34,75	25	16	30,75	31	16	30	100		1,59E+08	1,28E+07
DCM-Phase 0,02mg/ml	29	16		37	16		50	16			a	1,69E+08	
	35	16		29	16		36	16			b	1,79E+08	
	35	16		37	16		38	16			c	2,06E+08	
	36	16	33,75	40	16	35,75	41	16	41,25	100		1,85E+08	1,94E+07
Hex-Phase 2mg/ml	42	16		41	16		49	16			a	1,84E+06	
	39	16		20	16		44	16			b	1,68E+06	
	37	16		36	16		29	16			c	1,99E+06	
	29	16	36,75	37	16	33,5	37	16	39,75	1		1,83E+06	1,56E+05
Hex-Phase 0,2mg/ml	31	16		44	16		44	16			a	1,55E+08	
	37	16		31	16		42	16			b	1,73E+08	
	30	16		37	16		39	16			c	1,88E+08	
	26	16	31	26	16	34,5	25	16	37,5	100		1,72E+08	1,63E+07
Hex-Phase 0,02mg/ml	39	16		39	16		41	16			a	1,80E+08	
	36	16		34	16		49	16			b	1,73E+08	
	28	16		29	16		46	16			c	2,06E+08	
	41	16	36	36	16	34,5	29	16	41,25	100		1,86E+08	1,77E+07

Tab. Anhang 15-10: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Karden-Hex-Subfraktionen aus dem MeOH-Extrakt

Tag 0

Kontrolle mit Tween (a)			Hex-Phase II 0,1mg/ml (b)			Hex-Phase V 1mg/ml (a)			Hex-Phase V 0,1mg/ml (c)			Amoxicillin 0,5µg/ml (c)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
27	16		32	16		24	16		16	16		26	16			
19	16		38	16		19	16		22	16		18	16			
16	16		18	16		16	16		21	16		17	16			
18	16	20	17	16	26,25	20	16	19,75	25	16	21	19	16	20		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (a)	1,00E+06	
Hex-Phase II 0,1mg/ml (b)	1,31E+06	
Hex-Phase V 1mg/ml (a)	9,88E+05	
Hex-Phase V 0,1mg/ml (c)	1,05E+06	
Amoxicillin0,5µg/ml (c)	1,00E+06	
	MW: 1,07E+06	1,38E+05

Tag 1

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	33	16		47	16		39	16			a	1,75E+06	
	28	16		30	16		33	16			b	1,80E+06	
	46	16		37	16		27	16			c	1,63E+06	
	33	16	35	30	16	36	31	16	32,5	1		1,73E+06	9,01E+04
Hex-Phase II 1mg/ml	29	16		28	16		32	16			a	1,76E+06	
	32	16		26	16		36	16			b	1,43E+06	
	47	16		27	16		35	16			c	1,73E+06	
	33	16	35,25	33	16	28,5	35	16	34,5	1		1,64E+06	1,85E+05
Hex-Phase II 0,1mg/ml	40	16		33	16		35	16			a	2,69E+06	
	58	16		41	16		41	16			b	1,94E+06	
	59	16		43	16		37	16			c	1,79E+06	
	58	16	53,75	38	16	38,75	30	16	35,75	1		2,14E+06	4,82E+05
Hex-Phase IV 1mg/ml	23	16		20	16		27	16			a	1,10E+06	
	22	16		26	16		21	16			b	1,34E+06	
	18	16		26	16		24	16			c	1,14E+06	
	25	16	22	35	16	26,75	19	16	22,75	1		1,19E+06	1,28E+05
Hex-Phase IV 0,1mg/ml	29	16		39	16		34	16			a	1,78E+06	
	34	16		38	16		54	16			b	1,88E+06	
	38	16		37	16		56	16			c	2,21E+06	
	41	16	35,5	36	16	37,5	33	16	44,25	1		1,95E+06	2,29E+05
Hex-Phase V 1mg/ml	32	16		30	16		23	16			a	1,41E+06	
	30	16		38	16		24	16			b	1,51E+06	
	28	16		23	16		27	16			c	1,19E+06	
	23	16	28,25	30	16	30,25	21	16	23,75	1		1,37E+06	1,66E+05
Hex-Phase V 0,1mg/ml	36	16		31	16		35	16			a	1,81E+06	
	34	16		28	16		30	16			b	1,49E+06	
	37	16		26	16		33	16			c	1,66E+06	
	38	16	36,25	34	16	29,75	35	16	33,25	1		1,65E+06	1,63E+05

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Hex-Phase VI 1mg/ml	25	16		28	16		20	16			a	1,30E+06	
	28	16		20	16		26	16			b	1,24E+06	
	25	16		26	16		33	16			c	1,26E+06	
	26	16	26	25	16	24,75	22	16	25,25	1		1,27E+06	3,15E+04
Hex-Phase VI 0,1mg/ml	40	16		42	16		50	16			a	2,91E+06	
	68	16		31	16		62	16			b	1,81E+06	
	69	16		27	16		48	16			c	2,53E+06	
	56	16	58,25	45	16	36,25	42	16	50,5	1		2,42E+06	5,58E+05
Amoxicillin 0,5µg/ml	21	16		25	16		17	16			a	9,50E+05	
	23	16		24	16		22	16			b	1,18E+06	
	18	16		18	16		17	16			c	8,88E+05	
	14	16	19	27	16	23,5	15	16	17,75	1		1,00E+06	1,51E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	23	16		38	16		40	16			a	2,27E+07	
	32	16		35	16		30	16			b	2,66E+07	
	31	16		29	16		41	16			c	2,83E+07	
	35	16	30,25	40	16	35,5	40	16	37,75	15		2,59E+07	2,89E+06
Hex-Phase II 1mg/ml	16	16		24	16		24	16			a	1,31E+07	
	22	16		19	16		28	16			b	1,50E+07	
	15	16		19	16		20	16			c	1,67E+07	
	17	16	17,5	18	16	20	17	16	22,25	15		1,49E+07	1,78E+06
Hex-Phase II 0,1mg/ml	28	16		35	16		37	16			a	1,74E+07	
	22	16		40	16		28	16			b	2,53E+07	
	21	16		29	16		33	16			c	2,61E+07	
	22	16	23,25	31	16	33,75	41	16	34,75	15		2,29E+07	4,78E+06
Hex-Phase IV 1mg/ml	23	16		27	16		15	16			a	4,65E+06	
	29	16		21	16		22	16			b	4,75E+06	
	22	16		19	16		17	16			c	4,20E+06	
	19	16	23,25	28	16	23,75	30	16	21	4		4,53E+06	2,93E+05
Hex-Phase IV 0,1mg/ml	29	16		27	16		20	16			a	1,93E+07	
	21	16		26	16		23	16			b	2,03E+07	
	28	16		28	16		18	16			c	1,67E+07	
	25	16	25,75	27	16	27	28	16	22,25	15		1,88E+07	1,85E+06
Hex-Phase V 1mg/ml	31	16		18	16		20	16			a	7,31E+06	
	34	16		16	16		22	16			b	6,06E+06	
	24	16		33	16		18	16			c	5,06E+06	
	28	16	29,25	30	16	24,25	21	16	20,25	5		6,15E+06	1,13E+06
Hex-Phase V 0,1mg/ml	43	16		31	16		32	16			a	2,79E+07	
	35	16		39	16		36	16			b	2,27E+07	
	33	16		26	16		22	16			c	2,55E+07	
	38	16	37,25	25	16	30,25	46	16	34	15		2,54E+07	2,63E+06
Hex-Phase VI 1mg/ml	2	16		3	16		4	16			a	7,50E+04	
	1	16		4	16		4	16			b	1,25E+05	
	1	16		1	16		3	16			c	1,50E+05	
	2	16	1,5	2	16	2,5	1	16	3	1		1,17E+05	3,82E+04
Hex-Phase VI 0,1mg/ml	42	16		32	16		42	16			a	2,64E+07	
	29	16		36	16		39	16			b	2,27E+07	
	35	16		34	16		37	16			c	2,98E+07	
	35	16	35,25	19	16	30,25	41	16	39,75	15		2,63E+07	3,56E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Amoxicillin 0,5µg/ml	4	16		2	16		5	16			a	1,63E+05	
	5	16		1	16		2	16			b	5,00E+04	
	2	16		1	16		4	16			c	1,75E+05	
	2	16	3,25	0	16	1	3	16	3,5	1		1,29E+05	6,88E+04
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	43	16		34	16		48	16			a	2,06E+08	
	69	16		29	16		56	16			b	1,25E+08	
	48	16		28	16		42	16			c	1,69E+08	
	60	16	55	42	16	33,25	34	16	45	75		1,67E+08	4,08E+07
Hex-Phase II 1mg/ml	47	16		40	16		58	16			a	1,28E+08	
	49	16		55	16		60	16			b	1,28E+08	
	53	16		44	16		48	16			c	1,31E+08	
	56	16	51,25	66	16	51,25	44	16	52,5	50		1,29E+08	1,80E+06
Hex-Phase II 0,1mg/ml	34	16		30	16		48	16			a	1,49E+08	
	45	16		39	16		35	16			b	1,25E+08	
	45	16		30	16		48	16			c	1,67E+08	
	35	16	39,75	34	16	33,25	47	16	44,5	75		1,47E+08	2,12E+07
Hex-Phase IV 1mg/ml	15	16		19	16		14	16			a	3,40E+07	
	18	16		18	16		23	16			b	3,95E+07	
	16	16		16	16		26	16			c	3,85E+07	
	19	16	17	26	16	19,75	14	16	19,25	40		3,73E+07	2,93E+06
Hex-Phase IV 0,1mg/ml	33	16		44	16		40	16			a	1,48E+08	
	34	16		35	16		39	16			b	1,43E+08	
	49	16		33	16		34	16			c	1,46E+08	
	42	16	39,5	40	16	38	43	16	39	75		1,46E+08	2,86E+06
Hex-Phase V 1mg/ml	11	16		12	16		9	16			a	4,31E+07	
	10	16		12	16		7	16			b	4,31E+07	
	13	16		11	16		11	16			c	3,38E+07	
	12	16	11,5	11	16	11,5	9	16	9	75		4,00E+07	5,41E+06
Hex-Phase V 0,1mg/ml	41	16		55	16		34	16			a	1,28E+08	
	27	16		57	16		25	16			b	2,20E+08	
	36	16		67	16		34	16			c	1,19E+08	
	33	16	34,25	56	16	58,75	34	16	31,75	75		1,56E+08	5,59E+07
Hex-Phase VI 1mg/ml	5	16		3	16		2	16			a	3,50E+05	
	3	16		4	16		2	16			b	1,75E+05	
	7	16		5	16		2	16			c	1,00E+05	
	13	16	7	2	16	3,5	2	16	2	1		2,08E+05	1,28E+05
Hex-Phase VI 0,1mg/ml	29	16		22	16		29	16			a	9,94E+07	
	21	16		40	16		33	16			b	1,17E+08	
	26	16		28	16		38	16			c	1,20E+08	
	30	16	26,5	35	16	31,25	28	16	32	75		1,12E+08	1,12E+07
Amoxicillin 0,5µg/ml	0	16		1	16		0	16			a	1,25E+04	
	1	16		0	16		0	16			b	1,25E+04	
	0	16		0	16		0	16			c	1,25E+04	
	0	16	0,25	0	16	0,25	1	16	0,25	1		1,25E+04	0,00E+00

Tab. Anhang 15-11: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Karden-Hex-Subfraktionen aus dem MeOH-Extrakt (Wiederholung)

Tag 0

Kontrolle mit Tween (b)			Hex-Phase II 1mg/ml (a)			Hex-Phase IV 0,1mg/ml (c)			Hex-Phase V 0,1mg/ml (b)			Amoxicillin 0,5µg/ml (a)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
19	16		22	16		17	16		19	16		25	16			
17	16		18	16		20	16		20	16		21	16			
20	16		18	16		16	16		24	16		20	16			
18	16	18,5	21	16	19,75	18	16	17,75	21	16	21	26	16	23		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (b)	9,25E+05	
Hex-Phase II 1mg/ml (a)	9,88E+05	
Hex-Phase IV 0,1mg/ml (c)	8,88E+05	
Hex-Phase V 0,1mg/ml (b)	1,05E+06	
Amoxicillin 0,5µg/ml (a)	1,15E+06	
	MW: 1,00E+06	1,04E+05

Tag 1

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	42	16		42	16		35	16			a	1,64E+06	
	28	16		20	16		41	16			b	1,63E+06	
	34	16		34	16		42	16			c	1,86E+06	
	27	16	32,75	34	16	32,5	31	16	37,25	1		1,71E+06	1,34E+05
Hex-Phase II 1mg/ml	35	16		33	16		35	16			a	1,83E+06	
	37	16		36	16		32	16			b	1,40E+06	
	39	16		22	16		28	16			c	1,59E+06	
	35	16	36,5	21	16	28	32	16	31,75	1		1,60E+06	2,13E+05
Hex-Phase II 0,1mg/ml	32	16		48	16		45	16			a	1,96E+06	
	46	16		57	16		45	16			b	2,60E+06	
	39	16		51	16		29	16			c	1,95E+06	
	40	16	39,25	52	16	52	37	16	39	1		2,17E+06	3,72E+05
Hex-Phase IV 1mg/ml	28	16		35	16		16	16			a	1,29E+06	
	26	16		20	16		22	16			b	1,36E+06	
	17	16		28	16		24	16			c	1,01E+06	
	32	16	25,75	26	16	27,25	19	16	20,25	1		1,22E+06	1,84E+05
Hex-Phase IV 0,1mg/ml	33	16		42	16		27	16			a	1,89E+06	
	43	16		36	16		26	16			b	1,91E+06	
	35	16		43	16		45	16			c	1,58E+06	
	40	16	37,75	32	16	38,25	28	16	31,5	1		1,79E+06	1,88E+05
Hex-Phase V 1mg/ml	30	16		26	16		31	16			a	1,54E+06	
	33	16		23	16		27	16			b	1,13E+06	
	28	16		25	16		19	16			c	1,31E+06	
	32	16	30,75	16	16	22,5	28	16	26,25	1		1,33E+06	2,07E+05
Hex-Phase V 0,1mg/ml	45	16		29	16		35	16			a	1,83E+06	
	36	16		44	16		44	16			b	1,56E+06	
	36	16		30	16		24	16			c	1,69E+06	
	29	16	36,5	22	16	31,25	32	16	33,75	1		1,69E+06	1,31E+05

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Hex-Phase VI 1mg/ml	34	16		20	16		22	16			a	1,53E+06	
	25	16		27	16		19	16			b	1,15E+06	
	37	16		19	16		28	16			c	1,19E+06	
	26	16	30,5	26	16	23	26	16	23,75	1		1,29E+06	2,07E+05
Hex-Phase VI 0,1mg/ml	40	16		44	16		37	16			a	2,16E+06	
	43	16		39	16		30	16			b	2,00E+06	
	47	16		37	16		35	16			c	1,65E+06	
	43	16	43,25	40	16	40	30	16	33	1		1,94E+06	2,62E+05
Amoxicillin 0,5µg/ml	19	16		24	16		25	16			a	1,06E+06	
	22	16		22	16		16	16			b	1,20E+06	
	23	16		27	16		17	16			c	9,88E+05	
	21	16	21,25	23	16	24	21	16	19,75	1		1,08E+06	1,08E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	22	16		34	16		42	16			a	2,31E+07	
	35	16		29	16		49	16			b	2,59E+07	
	29	16		37	16		38	16			c	3,04E+07	
	37	16	30,75	38	16	34,5	33	16	40,5	15		2,64E+07	3,69E+06
Hex-Phase II 1mg/ml	25	16		26	16		23	16			a	1,74E+07	
	24	16		25	16		20	16			b	1,84E+07	
	27	16		25	16		15	16			c	1,46E+07	
	17	16	23,25	22	16	24,5	20	16	19,5	15		1,68E+07	1,95E+06
Hex-Phase II 0,1mg/ml	20	16		30	16		20	16			a	2,27E+07	
	33	16		39	16		30	16			b	2,74E+07	
	40	16		41	16		20	16			c	1,69E+07	
	28	16	30,25	36	16	36,5	20	16	22,5	15		2,23E+07	5,26E+06
Hex-Phase IV 1mg/ml	20	16		21	16		16	16			a	5,19E+06	
	17	16		24	16		17	16			b	5,63E+06	
	24	16		27	16		19	16			c	4,81E+06	
	22	16	20,75	18	16	22,5	25	16	19,25	5		5,21E+06	4,07E+05
Hex-Phase IV 0,1mg/ml	26	16		23	16		30	16			a	1,67E+07	
	19	16		20	16		29	16			b	1,78E+07	
	19	16		29	16		30	16			c	2,06E+07	
	25	16	22,25	23	16	23,75	21	16	27,5	15		1,84E+07	2,03E+06
Hex-Phase V 1mg/ml	29	16		23	16		21	16			a	6,13E+06	
	29	16		27	16		20	16			b	6,19E+06	
	20	16		25	16		26	16			c	5,63E+06	
	20	16	24,5	24	16	24,75	23	16	22,5	5		5,98E+06	3,08E+05
Hex-Phase V 0,1mg/ml	45	16		25	16		34	16			a	2,83E+07	
	37	16		35	16		27	16			b	2,31E+07	
	33	16		34	16		26	16			c	2,21E+07	
	36	16	37,75	29	16	30,75	31	16	29,5	15		2,45E+07	3,33E+06
Hex-Phase VI 1mg/ml	4	16		4	16		1	16			a	1,13E+05	
	2	16		1	16		4	16			b	1,38E+05	
	2	16		4	16		3	16			c	1,50E+05	
	1	16	2,25	2	16	2,75	4	16	3	1		1,33E+05	1,91E+04
Hex-Phase VI 0,1mg/ml	31	16		25	16		26	16			a	2,36E+07	
	22	16		42	16		34	16			b	2,93E+07	
	33	16		45	16		20	16			c	2,25E+07	
	40	16	31,5	44	16	39	40	16	30	15		2,51E+07	3,62E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Amoxicillin 0,5µg/ml	5	16		0	16		0	16			a	1,75E+05	
	5	16		0	16		1	16			b	1,00E+05	
	2	16		4	16		5	16			c	7,50E+04	
	2	16	3,5	4	16	2	0	16	1,5	1		1,17E+05	5,20E+04
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	25	8		28	8		26	8			a	1,65E+08	
	16	8		24	8		19	8			b	1,84E+08	
	27	8		21	8		21	8			c	1,71E+08	
	20	8	44	25	8	49	25	8	45,5	75		1,73E+08	9,62E+06
Hex-Phase II 1mg/ml	46	16		38	16		41	16			a	1,33E+08	
	34	16		44	16		34	16			b	1,59E+08	
	30	16		50	16		24	16			c	1,23E+08	
	32	16	35,5	38	16	42,5	32	16	32,75	75		1,38E+08	1,89E+07
Hex-Phase II 0,1mg/ml	30	16		38	16		36	16			a	1,44E+08	
	37	16		49	16		34	16			b	1,66E+08	
	45	16		40	16		47	16			c	1,51E+08	
	42	16	38,5	50	16	44,25	44	16	40,25	75		1,54E+08	1,11E+07
Hex-Phase IV 1mg/ml	30	16		30	16		34	16			a	3,38E+07	
	26	16		28	16		30	16			b	3,81E+07	
	27	16		28	16		27	16			c	3,94E+07	
	25	16	27	36	16	30,5	35	16	31,5	25		3,71E+07	2,95E+06
Hex-Phase IV 0,1mg/ml	42	16		39	16		39	16			a	1,52E+08	
	40	16		31	16		35	16			b	1,35E+08	
	41	16		38	16		38	16			c	1,38E+08	
	39	16	40,5	36	16	36	35	16	36,75	75		1,42E+08	9,04E+06
Hex-Phase V 1mg/ml	10	16		12	16		13	16			a	3,38E+07	
	8	16		9	16		8	16			b	4,22E+07	
	11	16		13	16		12	16			c	4,03E+07	
	7	16	9	11	16	11,25	10	16	10,75	75		3,88E+07	4,43E+06
Hex-Phase V 0,1mg/ml	69	16		46	16		49	16			a	1,84E+08	
	44	16		36	16		29	16			b	1,43E+08	
	36	16		32	16		34	16			c	1,30E+08	
	47	16	49	39	16	38,25	27	16	34,75	75		1,53E+08	2,78E+07
Hex-Phase VI 1mg/ml	5	16		4	16		4	16			a	2,38E+05	
	8	16		2	16		8	16			b	1,75E+05	
	4	16		5	16		12	16			c	3,88E+05	
	2	16	4,75	3	16	3,5	7	16	7,75	1		2,67E+05	1,09E+05
Hex-Phase VI 0,1mg/ml	34	16		27	16		35	16			a	1,13E+08	
	30	16		25	16		26	16			b	9,84E+07	
	27	16		27	16		24	16			c	1,04E+08	
	29	16	30	26	16	26,25	26	16	27,75	75		1,05E+08	7,08E+06
Amoxicillin 0,5µg/ml	0	16		0	16		1	16			a	0,00E+00	
	0	16		2	16		0	16			b	2,50E+04	
	0	16		0	16		0	16			c	1,25E+04	
	0	16	0	0	16	0,5	0	16	0,25	1		1,25E+04	1,25E+04

Tab. Anhang 15-12: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe I

Tag 0																		
Kontrolle mit Tween (b)			Carvacrol 0,05mg/ml (b)			Carvacrol 0,005mg/ml (a)			*epi*-MO 0,2mg/ml (c)			*epi*-MO 0,05mg/ml (a)			*epi*-MO 0,005mg/ml (c)			
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor
18	16		18	16		21	16		15	16		26	16		20	16		
19	16		21	16		31	16		21	16		18	16		15	16		
20	16		15	16		26	16		24	16		16	16		23	16		
24	16	20,25	19	16	18,25	22	16	25	18	16	19,5	23	16	20,75	22	16	20	1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (b)	1,01E+06	
Carvacrol 0,05mg/ml (b)	9,13E+05	
Carvacrol 0,005mg/ml (a)	1,25E+06	
epi-MO 0,2mg/ml (c)	9,75E+05	
epi-MO 0,05mg/ml (a)	1,04E+06	
epi-MO 0,005mg/ml (c)	1,00E+06	
MW:	1,03E+06	1,15E+05

Tag 1													
Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	29	16		36	16		23	16			a	1,10E+06	
	12	16		27	16		29	16			b	1,46E+06	
	29	16		16	16		29	16			c	1,28E+06	
	18	16	22	38	16	29,25	21	16	25,5	1		1,28E+06	1,81E+05
Carvacrol 0,2mg/ml	7	16		5	16		8	16			a	2,75E+05	
	4	16		4	16		3	16			b	2,50E+05	
	6	16		6	16		3	16			c	2,25E+05	
	5	16	5,5	5	16	5	4	16	4,5	1		2,50E+05	2,50E+04
Carvacrol 0,05mg/ml	9	16		13	16		11	16			a	5,00E+05	
	6	16		6	16		10	16			b	4,25E+05	
	12	16		9	16		11	16			c	4,75E+05	
	13	16	10	6	16	8,5	6	16	9,5	1		4,67E+05	3,82E+04
Carvacrol 0,02mg/ml	22	16		22	16		12	16			a	9,50E+05	
	20	16		15	16		17	16			b	8,75E+05	
	11	16		22	16		14	16			c	7,00E+05	
	23	16	19	11	16	17,5	13	16	14	1		8,42E+05	1,28E+05
Carvacrol 0,005mg/ml	28	16		19	16		23	16			a	1,11E+06	
	17	16		18	16		18	16			b	1,09E+06	
	15	16		18	16		24	16			c	9,88E+05	
	29	16	22,25	32	16	21,75	14	16	19,75	1		1,06E+06	6,61E+04
epi-MO 0,2mg/ml	2	16		1	16		0	16			a	3,75E+04	
	0	16		0	16		1	16			b	5,00E+04	
	1	16		1	16		0	16			c	2,50E+04	
	0	16	0,75	2	16	1	1	16	0,5	1		3,75E+04	1,25E+04
epi-MO 0,05mg/ml	14	16		13	16		19	16			a	6,63E+05	
	9	16		21	16		23	16			b	7,50E+05	
	16	16		18	16		13	16			c	8,50E+05	
	14	16	13,25	8	16	15	13	16	17	1		7,54E+05	9,38E+04

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
epi-MO 0,02mg/ml	17	16		29	16		24	16			a	9,00E+05	
	25	16		12	16		39	16			b	9,38E+05	
	9	16		18	16		17	16			c	1,20E+06	
	21	16	18	16	16	18,75	16	16	24	1		1,01E+06	1,63E+05
epi-MO 0,005mg/ml	18	16		25	16		19	16			a	1,10E+06	
	22	16		16	16		25	16			b	1,13E+06	
	33	16		20	16		29	16			c	1,26E+06	
	15	16	22	29	16	22,5	28	16	25,25	1		1,16E+06	8,75E+04
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	10	16		11	16		9	16			a	1,03E+07	
	12	16		11	16		8	16			b	8,75E+06	
	12	16		7	16		11	16			c	9,25E+06	
	7	16	10,25	6	16	8,75	9	16	9,25	20		9,42E+06	7,64E+05
Carvacrol 0,2mg/ml	2	16		1	16		1	16			a	6,25E+04	
	2	16		2	16		2	16			b	1,13E+05	
	0	16		2	16		1	16			c	6,25E+04	
	1	16	1,25	4	16	2,25	1	16	1,25	1		7,92E+04	2,89E+04
Carvacrol 0,05mg/ml	6	16		6	16		5	16			a	3,25E+05	
	8	16		3	16		8	16			b	3,00E+05	
	7	16		6	16		3	16			c	2,50E+05	
	5	16	6,5	9	16	6	4	16	5	1		2,92E+05	3,82E+04
Carvacrol 0,02mg/ml	19	4		18	4		18	4			a	3,05E+06	
	14	4		17	4		8	4			b	3,45E+06	
	12	4		18	4		13	4			c	2,70E+06	
	16	4	61	16	4	69	15	4	54	1		3,07E+06	3,75E+05
Carvacrol 0,005mg/ml	9	16		21	16		22	16			a	5,75E+06	
	16	16		10	16		8	16			b	7,00E+06	
	10	16		17	16		13	16			c	7,25E+06	
	11	16	11,5	8	16	14	15	16	14,5	10		6,67E+06	8,04E+05
epi-MO 0,2mg/ml	0	16		2	16		0	16			a	0,00E+00	
	0	16		0	16		1	16			b	3,75E+04	
	0	16		1	16		0	16			c	3,75E+04	
	0	16	0	0	16	0,75	2	16	0,75	1		2,50E+04	2,17E+04
epi-MO 0,05mg/ml	22	4		22	4		19	4			a	3,55E+06	
	18	4		18	4		10	4			b	4,10E+06	
	16	4		25	4		17	4			c	3,20E+06	
	15	4	71	17	4	82	18	4	64	1		3,62E+06	4,54E+05
epi-MO 0,02mg/ml	4	16		15	16		8	16			a	3,38E+06	
	9	16		14	16		18	16			b	1,04E+07	
	5	16		28	16		9	16			c	6,13E+06	
	9	16	6,75	26	16	20,75	14	16	12,25	10		6,63E+06	3,53E+06
epi-MO 0,005mg/ml	9	8		6	8		18	8			a	1,03E+07	
	13	8		6	8		13	8			b	7,00E+06	
	9	8		7	8		16	8			c	1,50E+07	
	10	8	20,5	9	8	14	13	8	30	10		1,08E+07	4,02E+06
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	20	16		17	16		8	16			a	1,00E+08	
	22	16		12	16		19	16			b	5,75E+07	
	24	16		9	16		12	16			c	6,75E+07	
	14	16	20	8	16	11,5	15	16	13,5	100		7,50E+07	2,22E+07

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Carvacrol 0,2mg/ml	5	16		2	16		1	16			a	1,88E+05	
	2	16		3	16		2	16			b	1,13E+05	
	3	16		2	16		1	16			c	8,75E+04	
	5	16	3,75	2	16	2,25	3	16	1,75	1		1,29E+05	5,20E+04
Carvacrol 0,05mg/ml	4	16		6	16		2	16			a	2,00E+05	
	5	16		5	16		5	16			b	2,75E+05	
	4	16		6	16		5	16			c	2,38E+05	
	3	16	4	5	16	5,5	7	16	4,75	1		2,38E+05	3,75E+04
Carvacrol 0,02mg/ml	39	16		34	16		39	16			a	3,03E+07	
	25	16		46	16		35	16			b	3,15E+07	
	28	16		25	16		33	16			c	3,53E+07	
	29	16	30,25	21	16	31,5	34	16	35,25	20		3,23E+07	2,60E+06
Carvacrol 0,005mg/ml	29	16		24	16		24	16			a	6,19E+07	
	31	16		11	16		16	16			b	5,19E+07	
	16	16		23	16		24	16			c	5,56E+07	
	23	16	24,75	25	16	20,75	25	16	22,25	50		5,65E+07	5,05E+06
epi-MO 0,2mg/ml	0	16		1	16		1	16			a	2,50E+04	
	1	16		0	16		0	16			b	2,50E+04	
	1	16		0	16		0	16			c	2,50E+04	
	0	16	0,5	1	16	0,5	1	16	0,5	1		2,50E+04	0,00E+00
epi-MO 0,05mg/ml	31	16		54	16		40	16			a	3,40E+07	
	24	16		36	16		29	16			b	4,15E+07	
	39	16		34	16		41	16			c	3,43E+07	
	42	16	34	42	16	41,5	27	16	34,25	20		3,66E+07	4,26E+06
epi-MO 0,02mg/ml	17	16		29	16		27	16			a	3,81E+07	
	19	16		22	16		19	16			b	6,75E+07	
	12	16		30	16		25	16			c	5,19E+07	
	13	16	15,25	27	16	27	12	16	20,75	50		5,25E+07	1,47E+07
epi-MO 0,005mg/ml	12	16		15	16		10	16			a	6,50E+07	
	10	16		13	16		11	16			b	6,00E+07	
	15	16		9	16		15	16			c	5,50E+07	
	15	16	13	11	16	12	8	16	11	100		6,00E+07	5,00E+06

Tab. Anhang 15-13: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe I (Wiederholung)

Tag 0

Kontrolle mit Tween (a)			Carvacrol 0,2mg/ml (c)			Carvacrol 0,05mg/ml (a)			Carvacrol 0,005mg/ml (b)			*epi*-MO 0,05mg/ml (a)			*epi*-MO 0,02mg/ml (b)			
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor
25	16		22	16		17	16		25	16		24	16		25	16		
20	16		17	16		20	16		20	16		23	16		28	16		
22	16		25	16		18	16		22	16		18	16		27	16		
21	16	22	20	16	21	20	16	18,75	23	16	22,5	18	16	20,75	20	16	25	1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (a)	1,10E+06	
Carvacrol 0,2mg/ml (c)	1,05E+06	
Carvacrol 0,05mg/ml (a)	9,38E+05	
Carvacrol 0,005mg/ml (b)	1,13E+06	
epi-MO 0,05mg/ml (a)	1,04E+06	
epi-MO 0,02mg/ml (b)	1,25E+06	
	MW: 1,08E+06	1,04E+05

Tag 1

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	32	16		32	16		25	16			a	1,19E+06	
	20	16		25	16		23	16			b	1,46E+06	
	20	16		24	16		15	16			c	1,01E+06	
	23	16	23,75	36	16	29,25	18	16	20,25	1		1,22E+06	2,27E+05
Carvacrol 0,2mg/ml	3	16		7	16		4	16			a	2,13E+05	
	4	16		3	16		7	16			b	2,25E+05	
	6	16		5	16		3	16			c	2,50E+05	
	4	16	4,25	3	16	4,5	6	16	5	1		2,29E+05	1,91E+04
Carvacrol 0,05mg/ml	8	16		6	16		7	16			a	4,50E+05	
	9	16		5	16		11	16			b	3,88E+05	
	10	16		9	16		12	16			c	4,75E+05	
	9	16	9	11	16	7,75	8	16	9,5	1		4,38E+05	4,51E+04
Carvacrol 0,02mg/ml	19	16		12	16		16	16			a	9,13E+05	
	16	16		19	16		11	16			b	8,88E+05	
	18	16		21	16		19	16			c	7,13E+05	
	20	16	18,25	19	16	17,75	11	16	14,25	1		8,38E+05	1,09E+05
Carvacrol 0,005mg/ml	16	16		18	16		19	16			a	1,15E+06	
	26	16		27	16		23	16			b	1,20E+06	
	27	16		25	16		17	16			c	1,01E+06	
	23	16	23	26	16	24	22	16	20,25	1		1,12E+06	9,71E+04
epi-MO 0,2mg/ml	2	16		2	16		0	16			a	6,25E+04	
	0	16		1	16		1	16			b	6,25E+04	
	2	16		1	16		2	16			c	5,00E+04	
	1	16	1,25	1	16	1,25	1	16	1	1		5,83E+04	7,22E+03
epi-MO 0,05mg/ml	14	16		14	16		19	16			a	8,50E+05	
	19	16		10	16		15	16			b	7,63E+05	
	20	16		21	16		9	16			c	6,63E+05	
	15	16	17	16	16	15,25	10	16	13,25	1		7,58E+05	9,38E+04

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
epi-MO 0,02mg/ml	25	16		20	16		22	16			a	1,18E+06	
	27	16		15	16		30	16			b	9,25E+05	
	23	16		22	16		25	16			c	1,14E+06	
	19	16	23,5	17	16	18,5	14	16	22,75	1		1,08E+06	1,35E+05
epi-MO 0,005mg/ml	18	16		20	16		31	16			a	1,15E+06	
	24	16		27	16		15	16			b	1,06E+06	
	24	16		21	16		25	16			c	1,23E+06	
	26	16	23	17	16	21,25	27	16	24,5	1		1,15E+06	8,13E+04
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	19	16		21	16		18	16			a	8,63E+06	
	13	16		18	16		18	16			b	8,88E+06	
	24	16		18	16		15	16			c	8,75E+06	
	13	16	17,25	14	16	17,75	19	16	17,5	10		8,75E+06	1,25E+05
Carvacrol 0,2mg/ml	0	16		2	16		0	16			a	6,25E+04	
	2	16		0	16		2	16			b	7,50E+04	
	3	16		1	16		2	16			c	7,50E+04	
	0	16	1,25	3	16	1,5	2	16	1,5	1		7,08E+04	7,22E+03
Carvacrol 0,05mg/ml	4	16		8	16		7	16			a	2,50E+05	
	6	16		5	16		6	16			b	3,38E+05	
	3	16		6	16		9	16			c	3,25E+05	
	7	16	5	8	16	6,75	4	16	6,5	1		3,04E+05	4,73E+04
Carvacrol 0,02mg/ml	16	4		17	4		10	4			a	3,05E+06	
	15	4		18	4		14	4			b	3,30E+06	
	19	4		19	4		13	4			c	2,75E+06	
	11	4	61	12	4	66	18	4	55	1		3,03E+06	2,75E+05
Carvacrol 0,005mg/ml	11	16		21	16		14	16			a	7,63E+06	
	21	16		16	16		15	16			b	7,00E+06	
	10	16		9	16		8	16			c	6,13E+06	
	19	16	15,25	10	16	14	12	16	12,25	10		6,92E+06	7,53E+05
epi-MO 0,2mg/ml	0	16		1	16		1	16			a	3,75E+04	
	0	16		2	16		2	16			b	8,75E+04	
	2	16		2	16		2	16			c	6,25E+04	
	1	16	0,75	2	16	1,75	0	16	1,25	1		6,25E+04	2,50E+04
epi-MO 0,05mg/ml	21	4		10	4		16	4			a	3,15E+06	
	12	4		12	4		22	4			b	2,35E+06	
	13	4		14	4		22	4			c	4,05E+06	
	17	4	63	11	4	47	21	4	81	1		3,18E+06	8,50E+05
epi-MO 0,02mg/ml	13	16		8	16		22	16			a	7,75E+06	
	17	16		12	16		15	16			b	4,88E+06	
	5	16		8	16		18	16			c	9,00E+06	
	27	16	15,5	11	16	9,75	17	16	18	10		7,21E+06	2,12E+06
epi-MO 0,005mg/ml	25	16		25	16		17	16			a	9,50E+06	
	16	16		24	16		22	16			b	1,13E+07	
	13	16		28	16		15	16			c	8,25E+06	
	22	16	19	13	16	22,5	12	16	16,5	10		9,67E+06	1,51E+06
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	12	16		19	16		8	16			a	8,63E+07	
	20	16		13	16		21	16			b	7,25E+07	
	19	16		16	16		20	16			c	8,50E+07	
	18	16	17,25	10	16	14,5	19	16	17	100		8,13E+07	7,60E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Carvacrol 0,2mg/ml	5	16		3	16		1	16			a	1,88E+05	
	2	16		5	16		5	16			b	1,50E+05	
	3	16		2	16		2	16			c	1,13E+05	
	5	16	3,75	2	16	3	1	16	2,25	1		1,50E+05	3,75E+04
Carvacrol 0,05mg/ml	7	16		4	16		7	16			a	2,75E+05	
	7	16		6	16		5	16			b	2,25E+05	
	5	16		3	16		6	16			c	2,75E+05	
	3	16	5,5	5	16	4,5	4	16	5,5	1		2,58E+05	2,89E+04
Carvacrol 0,02mg/ml	34	16		35	16		37	16			a	3,60E+07	
	28	16		25	16		36	16			b	2,93E+07	
	39	16		32	16		26	16			c	3,13E+07	
	43	16	36	25	16	29,25	26	16	31,25	20		3,22E+07	3,47E+06
Carvacrol 0,005mg/ml	30	16		29	16		19	16			a	6,06E+07	
	24	16		19	16		24	16			b	6,19E+07	
	17	16		27	16		21	16			c	5,38E+07	
	26	16	24,25	24	16	24,75	22	16	21,5	50		5,88E+07	4,38E+06
epi-MO 0,2mg/ml	0	16		1	16		0	16			a	1,25E+04	
	0	16		0	16		0	16			b	2,50E+04	
	0	16		0	16		1	16			c	2,50E+04	
	1	16	0,25	1	16	0,5	1	16	0,5	1		2,08E+04	7,22E+03
epi-MO 0,05mg/ml	14	8		25	8		26	8			a	3,55E+07	
	23	8		26	8		16	8			b	4,30E+07	
	19	8		13	8		21	8			c	4,00E+07	
	15	8	35,5	22	8	43	17	8	40	20		3,95E+07	3,77E+06
epi-MO 0,02mg/ml	31	16		17	16		18	16			a	6,31E+07	
	27	16		18	16		27	16			b	4,63E+07	
	19	16		20	16		28	16			c	6,44E+07	
	24	16	25,25	19	16	18,5	30	16	25,75	50		5,79E+07	1,01E+07
epi-MO 0,005mg/ml	9	16		17	16		14	16			a	5,63E+07	
	12	16		11	16		13	16			b	7,38E+07	
	15	16		15	16		18	16			c	8,00E+07	
	9	16	11,25	16	16	14,75	19	16	16	100		7,00E+07	1,23E+07

Tab. Anhang 15-14: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe II

Tag 0																
Kontrolle mit Tween (c)			AcO-*epi*-MO 0,05mg/ml (b)			AcO-*epi*-MO 0,005mg/ml (a)			OH-*epi*-MO 0,2mg/ml (b)			OH-*epi*-MO 0,02mg/ml (c)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
23	16		44	16		38	16		35	16		26	16			
41	16		34	16		34	16		28	16		44	16			
39	16		19	16		36	16		41	16		31	16			
38	16	35,25	50	16	36,75	35	16	35,75	34	16	34,5	38	16	34,75		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (c)	1,76E+06	
AcO-*epi*-MO 0,05mg/ml (b)	1,84E+06	
AcO-*epi*-MO 0,005mg/ml (a)	1,79E+06	
OH-*epi*-MO 0,2mg/ml (b)	1,73E+06	
OH-*epi*-MO 0,02mg/ml (c)	1,74E+06	
	MW: 1,77E+06	4,47E+04

Tag 1													
Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	41	16		39	16		48	16			a	2,11E+06	
	43	16		45	16		49	16			b	2,10E+06	
	48	16		41	16		48	16			c	2,18E+06	
	37	16	42,25	43	16	42	29	16	43,5	1		2,13E+06	4,02E+04
AcO-*epi*-MO 0,2mg/ml	33	16		33	16		32	16			a	1,70E+06	
	33	16		34	16		38	16			b	1,51E+06	
	34	16		26	16		34	16			c	1,65E+06	
	36	16	34	28	16	30,25	28	16	33	1		1,62E+06	9,71E+04
AcO-*epi*-MO 0,05mg/ml	29	16		42	16		44	16			a	1,65E+06	
	39	16		36	16		38	16			b	1,83E+06	
	38	16		30	16		39	16			c	2,04E+06	
	26	16	33	38	16	36,5	42	16	40,75	1		1,84E+06	1,94E+05
AcO-*epi*-MO 0,02mg/ml	47	16		45	16		38	16			a	2,04E+06	
	34	16		44	16		33	16			b	2,16E+06	
	35	16		45	16		36	16			c	1,89E+06	
	47	16	40,75	39	16	43,25	44	16	37,75	1		2,03E+06	1,38E+05
AcO-*epi*-MO 0,005mg/ml	47	16		37	16		37	16			a	1,93E+06	
	44	16		42	16		36	16			b	1,91E+06	
	33	16		36	16		39	16			c	1,79E+06	
	30	16	38,5	38	16	38,25	31	16	35,75	1		1,88E+06	7,60E+04
OH-*epi*-MO 0,2mg/ml	57	16		46	16		38	16			a	2,35E+06	
	44	16		40	16		38	16			b	1,93E+06	
	35	16		34	16		41	16			c	1,83E+06	
	52	16	47	34	16	38,5	29	16	36,5	1		2,03E+06	2,79E+05
OH-*epi*-MO 0,05mg/ml	29	16		51	16		40	16			a	1,73E+06	
	31	16		41	16		37	16			b	2,38E+06	
	40	16		55	16		38	16			c	1,91E+06	
	38	16	34,5	43	16	47,5	38	16	38,25	1		2,00E+06	3,35E+05

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
OH-*epi*-MO 0,02mg/ml	47	16		44	16		54	16			a	2,30E+06	
	50	16		28	16		41	16			b	1,80E+06	
	42	16		33	16		41	16			c	2,28E+06	
	45	16	46	39	16	36	46	16	45,5	1		2,13E+06	2,82E+05
OH-*epi*-MO 0,005mg/ml	50	16		44	16		31	16			a	1,94E+06	
	35	16		57	16		37	16			b	2,55E+06	
	33	16		45	16		43	16			c	1,90E+06	
	37	16	38,75	58	16	51	41	16	38	1		2,13E+06	3,65E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	17	16		24	16		21	16			a	2,08E+07	
	21	16		32	16		19	16			b	2,55E+07	
	19	16		25	16		21	16			c	2,03E+07	
	26	16	20,75	21	16	25,5	20	16	20,25	20		2,22E+07	2,90E+06
AcO-*epi*-MO 0,2mg/ml	14	16		15	16		17	16			a	1,28E+07	
	11	16		17	16		15	16			b	1,70E+07	
	11	16		16	16		14	16			c	1,45E+07	
	15	16	12,75	20	16	17	12	16	14,5	20		1,48E+07	2,14E+06
AcO-*epi*-MO 0,05mg/ml	28	16		17	16		21	16			a	2,08E+07	
	21	16		15	16		30	16			b	1,50E+07	
	16	16		11	16		17	16			c	2,20E+07	
	18	16	20,75	17	16	15	20	16	22	20		1,93E+07	3,73E+06
AcO-*epi*-MO 0,02mg/ml	20	16		16	16		18	16			a	2,00E+07	
	25	16		26	16		22	16			b	2,20E+07	
	13	16		20	16		19	16			c	1,85E+07	
	22	16	20	26	16	22	15	16	18,5	20		2,02E+07	1,76E+06
AcO-*epi*-MO 0,005mg/ml	24	16		27	16		37	16			a	2,30E+07	
	19	16		28	16		14	16			b	2,43E+07	
	27	16		22	16		19	16			c	2,33E+07	
	22	16	23	20	16	24,25	23	16	23,25	20		2,35E+07	6,61E+05
OH-*epi*-MO 0,2mg/ml	20	16		28	16		17	16			a	2,33E+07	
	22	16		22	16		14	16			b	2,30E+07	
	30	16		17	16		18	16			c	1,70E+07	
	21	16	23,25	25	16	23	19	16	17	20		2,11E+07	3,54E+06
OH-*epi*-MO 0,05mg/ml	20	16		16	16		25	16			a	1,95E+07	
	16	16		20	16		15	16			b	1,93E+07	
	23	16		20	16		14	16			c	1,80E+07	
	19	16	19,5	21	16	19,25	18	16	18	20		1,89E+07	8,04E+05
OH-*epi*-MO 0,02mg/ml	22	16		21	16		23	16			a	2,18E+07	
	26	16		27	16		18	16			b	2,05E+07	
	18	16		20	16		13	16			c	1,75E+07	
	21	16	21,75	14	16	20,5	16	16	17,5	20		1,99E+07	2,18E+06
OH-*epi*-MO 0,005mg/ml	26	16		13	16		15	16			a	2,13E+07	
	18	16		17	16		27	16			b	1,73E+07	
	17	16		19	16		28	16			c	2,43E+07	
	24	16	21,25	20	16	17,25	27	16	24,25	20		2,09E+07	3,51E+06
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	17	16		16	16		7	16			a	6,88E+07	
	10	16		11	16		10	16			b	5,75E+07	
	14	16		13	16		17	16			c	6,63E+07	
	14	16	13,75	6	16	11,5	19	16	13,25	100		6,42E+07	5,91E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
AcO-*epi*-MO 0,2mg/ml	9	16		11	16		14	16			a	4,50E+07	
	5	16		7	16		12	16			b	4,63E+07	
	13	16		10	16		8	16			c	5,63E+07	
	9	16	9	9	16	9,25	11	16	11,25	100		4,92E+07	6,17E+06
AcO-*epi*-MO 0,05mg/ml	9	16		18	16		7	16			a	4,88E+07	
	6	16		13	16		11	16			b	6,38E+07	
	14	16		11	16		14	16			c	4,88E+07	
	10	16	9,75	9	16	12,75	7	16	9,75	100		5,38E+07	8,66E+06
AcO-*epi*-MO 0,02mg/ml	10	16		14	16		8	16			a	5,13E+07	
	12	16		13	16		19	16			b	5,63E+07	
	9	16		11	16		13	16			c	6,88E+07	
	10	16	10,25	7	16	11,25	15	16	13,75	100		5,88E+07	9,01E+06
AcO-*epi*-MO 0,005mg/ml	11	16		1	16		9	16			a	4,88E+07	
	8	16		16	16		12	16			b	5,38E+07	
	7	16		12	16		10	16			c	5,25E+07	
	13	16	9,75	14	16	10,75	11	16	10,5	100		5,17E+07	2,60E+06
OH-*epi*-MO 0,2mg/ml	11	16		11	16		8	16			a	5,50E+07	
	13	16		8	16		13	16			b	4,25E+07	
	8	16		3	16		11	16			c	5,38E+07	
	12	16	11	12	16	8,5	11	16	10,75	100		5,04E+07	6,88E+06
OH-*epi*-MO 0,05mg/ml	11	16		13	16		12	16			a	4,63E+07	
	7	16		12	16		6	16			b	5,00E+07	
	12	16		6	16		12	16			c	5,13E+07	
	7	16	9,25	9	16	10	11	16	10,25	100		4,92E+07	2,60E+06
OH-*epi*-MO 0,02mg/ml	11	16		11	16		8	16			a	4,25E+07	
	9	16		9	16		12	16			b	5,38E+07	
	5	16		8	16		10	16			c	4,63E+07	
	9	16	8,5	15	16	10,75	7	16	9,25	100		4,75E+07	5,73E+06
OH-*epi*-MO 0,005mg/ml	8	16		11	16		6	16			a	5,13E+07	
	11	16		11	16		10	16			b	6,75E+07	
	11	16		15	16		12	16			c	4,75E+07	
	11	16	10,25	17	16	13,5	10	16	9,5	100		5,54E+07	1,06E+07

Tab. Anhang 15-15: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe II (Wiederholung)

Tag 0

Kontrolle mit Tween (a)			AcO-*epi*-MO 0,2mg/ml (c)			AcO-*epi*-MO 0,02mg/ml (a)			OH-*epi*-MO 0,05mg/ml (b)			OH-*epi*-MO 0,005mg/ml (c)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
42	16		28	16		41	16		31	16		27	16			
35	16		45	16		33	16		46	16		34	16			
26	16		36	16		38	16		33	16		39	16			
39	16	35,5	35	16	36	44	16	39	36	16	36,5	44	16	36		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (a)	1,78E+06	
AcO-*epi*-MO 0,2mg/ml (c)	1,80E+06	
AcO-*epi*-MO 0,02mg/ml (a)	1,95E+06	
OH-*epi*-MO 0,05mg/ml (b)	1,83E+06	
OH-*epi*-MO 0,005mg/ml (c)	1,80E+06	
	MW: 1,83E+06	6,94E+04

Tag 1

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	43	16		47	16		37	16			a	2,16E+06	
	46	16		41	16		37	16			b	2,24E+06	
	45	16		49	16		37	16			c	1,94E+06	
	39	16	43,25	42	16	44,75	44	16	38,75	1		2,11E+06	1,56E+05
AcO-*epi*-MO 0,2mg/ml	30	16		30	16		34	16			a	1,54E+06	
	31	16		33	16		34	16			b	1,73E+06	
	31	16		38	16		34	16			c	1,73E+06	
	31	16	30,75	37	16	34,5	36	16	34,5	1		1,66E+06	1,08E+05
AcO-*epi*-MO 0,05mg/ml	43	16		38	16		45	16			a	1,81E+06	
	35	16		33	16		35	16			b	1,68E+06	
	37	16		33	16		39	16			c	2,03E+06	
	30	16	36,25	30	16	33,5	43	16	40,5	1		1,84E+06	1,76E+05
AcO-*epi*-MO 0,02mg/ml	51	16		42	16		37	16			a	2,06E+06	
	37	16		33	16		41	16			b	1,89E+06	
	43	16		41	16		35	16			c	1,91E+06	
	34	16	41,25	35	16	37,75	40	16	38,25	1		1,95E+06	9,46E+04
AcO-*epi*-MO 0,005mg/ml	51	16		42	16		37	16			a	2,20E+06	
	40	16		35	16		41	16			b	2,01E+06	
	47	16		46	16		35	16			c	1,91E+06	
	38	16	44	38	16	40,25	40	16	38,25	1		2,04E+06	1,46E+05
OH-*epi*-MO 0,2mg/ml	35	16		45	16		48	16			a	1,78E+06	
	43	16		42	16		36	16			b	2,11E+06	
	33	16		36	16		43	16			c	2,13E+06	
	31	16	35,5	46	16	42,25	43	16	42,5	1		2,00E+06	1,99E+05
OH-*epi*-MO 0,05mg/ml	40	16		37	16		31	16			a	1,98E+06	
	43	16		48	16		45	16			b	2,14E+06	
	41	16		45	16		47	16			c	2,09E+06	
	34	16	39,5	41	16	42,75	44	16	41,75	1		2,07E+06	8,32E+04

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
OH-*epi*-MO 0,02mg/ml	46	16		44	16		39	16			a	2,25E+06	
	44	16		39	16		41	16			b	2,06E+06	
	52	16		40	16		42	16			c	1,98E+06	
	38	16	45	42	16	41,25	36	16	39,5	1		2,10E+06	1,40E+05
OH-*epi*-MO 0,005mg/ml	51	16		36	16		41	16			a	2,21E+06	
	39	16		37	16		38	16			b	2,00E+06	
	49	16		42	16		45	16			c	2,13E+06	
	38	16	44,25	45	16	40	46	16	42,5	1		2,11E+06	1,07E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	25	16		22	16		16	16			a	2,30E+07	
	17	16		20	16		21	16			b	2,48E+07	
	30	16		26	16		26	16			c	2,15E+07	
	20	16	23	31	16	24,75	23	16	21,5	20		2,31E+07	1,63E+06
AcO-*epi*-MO 0,2mg/ml	13	16		12	16		16	16			a	1,50E+07	
	18	16		17	16		18	16			b	1,50E+07	
	14	16		11	16		16	16			c	1,73E+07	
	15	16	15	20	16	15	19	16	17,25	20		1,58E+07	1,30E+06
AcO-*epi*-MO 0,05mg/ml	13	16		16	16		23	16			a	2,00E+07	
	23	16		24	16		19	16			b	2,18E+07	
	19	16		25	16		15	16			c	1,80E+07	
	25	16	20	22	16	21,75	15	16	18	20		1,99E+07	1,88E+06
AcO-*epi*-MO 0,02mg/ml	22	16		24	16		14	16			a	2,05E+07	
	24	16		17	16		20	16			b	2,20E+07	
	17	16		25	16		19	16			c	1,93E+07	
	19	16	20,5	22	16	22	24	16	19,25	20		2,06E+07	1,38E+06
AcO-*epi*-MO 0,005mg/ml	17	16		25	16		19	16			a	2,25E+07	
	27	16		19	16		27	16			b	2,20E+07	
	25	16		27	16		24	16			c	2,43E+07	
	21	16	22,5	17	16	22	27	16	24,25	20		2,29E+07	1,18E+06
OH-*epi*-MO 0,2mg/ml	16	16		20	16		22	16			a	1,88E+07	
	15	16		21	16		23	16			b	1,98E+07	
	24	16		16	16		24	16			c	2,35E+07	
	20	16	18,75	22	16	19,75	25	16	23,5	20		2,07E+07	2,50E+06
OH-*epi*-MO 0,05mg/ml	24	16		24	16		22	16			a	1,95E+07	
	19	16		23	16		19	16			b	2,10E+07	
	21	16		18	16		15	16			c	1,85E+07	
	14	16	19,5	19	16	21	18	16	18,5	20		1,97E+07	1,26E+06
OH-*epi*-MO 0,02mg/ml	23	16		22	16		24	16			a	2,15E+07	
	18	16		17	16		22	16			b	2,23E+07	
	25	16		27	16		15	16			c	1,95E+07	
	20	16	21,5	23	16	22,25	17	16	19,5	20		2,11E+07	1,42E+06
OH-*epi*-MO 0,005mg/ml	25	16		25	16		19	16			a	2,13E+07	
	24	16		22	16		25	16			b	2,23E+07	
	17	16		25	16		23	16			c	2,13E+07	
	19	16	21,25	17	16	22,25	18	16	21,25	20		2,16E+07	5,77E+05
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	18	16		17	16		17	16			a	6,38E+07	
	10	16		11	16		10	16			b	5,63E+07	
	7	16		7	16		8	16			c	6,00E+07	
	16	16	12,75	10	16	11,25	13	16	12	100		6,00E+07	3,75E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
AcO-*epi*-MO 0,2mg/ml	8	16		10	16		8	16			a	4,50E+07	
	7	16		7	16		12	16			b	5,38E+07	
	11	16		14	16		11	16			c	4,50E+07	
	10	16	9	12	16	10,75	5	16	9	100		4,79E+07	5,05E+06
AcO-*epi*-MO 0,05mg/ml	7	16		8	16		11	16			a	4,38E+07	
	14	16		12	16		13	16			b	4,75E+07	
	8	16		8	16		13	16			c	6,13E+07	
	6	16	8,75	10	16	9,5	12	16	12,25	100		5,08E+07	9,21E+06
AcO-*epi*-MO 0,02mg/ml	11	16		11	16		7	16			a	4,75E+07	
	6	16		15	16		12	16			b	6,00E+07	
	9	16		12	16		7	16			c	5,13E+07	
	12	16	9,5	10	16	12	15	16	10,25	100		5,29E+07	6,41E+06
AcO-*epi*-MO 0,005mg/ml	9	16		6	16		8	16			a	5,63E+07	
	13	16		15	16		12	16			b	5,00E+07	
	12	16		11	16		10	16			c	4,63E+07	
	11	16	11,25	8	16	10	7	16	9,25	100		5,08E+07	5,05E+06
OH-*epi*-MO 0,2mg/ml	11	16		7	16		4	16			a	5,13E+07	
	9	16		11	16		9	16			b	4,75E+07	
	13	16		8	16		12	16			c	4,38E+07	
	8	16	10,25	12	16	9,5	10	16	8,75	100		4,75E+07	3,75E+06
OH-*epi*-MO 0,05mg/ml	10	16		7	16		8	16			a	4,25E+07	
	8	16		15	16		9	16			b	5,75E+07	
	6	16		10	16		12	16			c	5,00E+07	
	10	16	8,5	14	16	11,5	11	16	10	100		5,00E+07	7,50E+06
OH-*epi*-MO 0,02mg/ml	12	16		6	16		7	16			a	5,63E+07	
	14	16		12	16		9	16			b	4,25E+07	
	9	16		6	16		11	16			c	4,63E+07	
	10	16	11,25	10	16	8,5	10	16	9,25	100		4,83E+07	7,11E+06
OH-*epi*-MO 0,005mg/ml	14	16		7	16		10	16			a	5,25E+07	
	8	16		11	16		14	16			b	4,38E+07	
	11	16		9	16		12	16			c	6,13E+07	
	9	16	10,5	8	16	8,75	13	16	12,25	100		5,25E+07	8,75E+06

Tab. Anhang 15-16: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe III

Tag 0

Kontrolle mit Tween (b)			MO 0,2mg/ml (b)			MO 0,02mg/ml (c)			β-Sitosterol 0,05mg/ml (b)			β-Sitosterol 0,005mg/ml (c)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
19	16		23	16		20	16		26	16		25	16			
20	16		17	16		21	16		18	16		27	16			
25	16		14	16		24	16		16	16		16	16			
25	16	22,25	24	16	19,5	16	16	20,25	21	16	20,25	24	16	23		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (b)	1,11E+06	
MO 0,2mg/ml (b)	9,75E+05	
MO 0,02mg/ml (c)	1,01E+06	
β-Sitosterol 0,05mg/ml (b)	1,01E+06	
β-Sitosterol 0,005mg/ml (c)	1,15E+06	
	MW: 1,05E+06	7,47E+04

Tag 1

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	24	16		29	16		33	16			a	1,29E+06	
	26	16		23	16		35	16			b	1,33E+06	
	30	16		26	16		34	16			c	1,60E+06	
	23	16	25,75	28	16	26,5	26	16	32	1		1,40E+06	1,71E+05
MO 0,2mg/ml	16	16		20	16		12	16			a	7,13E+05	
	15	16		27	16		19	16			b	1,29E+06	
	14	16		28	16		17	16			c	9,13E+05	
	12	16	14,25	28	16	25,75	25	16	18,25	1		9,71E+05	2,92E+05
MO 0,05mg/ml	22	16		30	16		28	16			a	1,29E+06	
	29	16		28	16		26	16			b	1,38E+06	
	26	16		20	16		19	16			c	1,23E+06	
	26	16	25,75	32	16	27,5	25	16	24,5	1		1,30E+06	7,53E+04
MO 0,02mg/ml	23	16		30	16		20	16			a	1,28E+06	
	29	16		25	16		26	16			b	1,35E+06	
	24	16		25	16		23	16			c	9,75E+05	
	26	16	25,5	28	16	27	9	16	19,5	1		1,20E+06	1,98E+05
MO 0,005mg/ml	31	16		25	16		31	16			a	1,89E+06	
	39	16		23	16		28	16			b	1,34E+06	
	37	16		24	16		33	16			c	1,50E+06	
	44	16	37,75	35	16	26,75	28	16	30	1		1,58E+06	2,83E+05
β-Sitosterol 0,2mg/ml	30	16		10	16		33	16			a	1,46E+06	
	32	16		20	16		24	16			b	8,63E+05	
	33	16		16	16		25	16			c	1,36E+06	
	22	16	29,25	23	16	17,25	27	16	27,25	1		1,23E+06	3,21E+05
β-Sitosterol 0,05mg/ml	29	16		22	16		25	16			a	1,14E+06	
	25	16		23	16		22	16			b	1,20E+06	
	16	16		25	16		26	16			c	1,05E+06	
	21	16	22,75	26	16	24	11	16	21	1		1,13E+06	7,53E+04

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
β-Sitosterol 0,02mg/ml	27	16		16	16		27	16			a	1,45E+06	
	33	16		14	16		21	16			b	8,50E+05	
	25	16		18	16		29	16			c	1,28E+06	
	31	16	29	20	16	17	25	16	25,5	1		1,19E+06	3,09E+05
β-Sitosterol 0,005mg/ml	18	16		29	16		30	16			a	1,13E+06	
	28	16		35	16		20	16			b	1,50E+06	
	20	16		30	16		25	16			c	1,36E+06	
	24	16	22,5	26	16	30	34	16	27,25	1		1,33E+06	1,90E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	26	16		31	16		24	16			a	1,74E+07	
	21	16		15	16		23	16			b	1,46E+07	
	17	16		11	16		19	16			c	1,68E+07	
	23	16	21,75	16	16	18,25	18	16	21	16		1,63E+07	1,47E+06
MO 0,2mg/ml	8	16		4	16		4	16			a	7,80E+06	
	5	16		7	16		3	16			b	4,80E+06	
	15	16		10	16		4	16			c	3,00E+06	
	11	16	9,75	3	16	6	4	16	3,75	16		5,20E+06	2,42E+06
MO 0,05mg/ml	16	16		15	16		13	16			a	1,34E+07	
	15	16		19	16		16	16			b	1,28E+07	
	13	16		13	16		17	16			c	1,38E+07	
	23	16	16,75	17	16	16	23	16	17,25	16		1,33E+07	5,03E+05
MO 0,02mg/ml	15	16		25	16		17	16			a	1,42E+07	
	23	16		35	16		16	16			b	1,94E+07	
	14	16		20	16		17	16			c	1,46E+07	
	19	16	17,75	17	16	24,25	23	16	18,25	16		1,61E+07	2,89E+06
MO 0,005mg/ml	18	16		24	16		18	16			a	1,34E+07	
	15	16		26	16		23	16			b	1,98E+07	
	17	16		16	16		22	16			c	1,52E+07	
	17	16	16,75	33	16	24,75	13	16	19	16		1,61E+07	3,30E+06
β-Sitosterol 0,2mg/ml	23	16		21	16		17	16			a	1,64E+07	
	17	16		27	16		12	16			b	1,76E+07	
	24	16		20	16		20	16			c	1,40E+07	
	18	16	20,5	20	16	22	21	16	17,5	16		1,60E+07	1,83E+06
β-Sitosterol 0,05mg/ml	22	16		37	16		12	16			a	1,78E+07	
	22	16		21	16		22	16			b	2,02E+07	
	23	16		22	16		14	16			c	1,42E+07	
	22	16	22,25	21	16	25,25	23	16	17,75	16		1,74E+07	3,02E+06
β-Sitosterol 0,02mg/ml	24	16		27	16		20	16			a	1,74E+07	
	22	16		19	16		15	16			b	1,68E+07	
	19	16		23	16		23	16			c	1,52E+07	
	22	16	21,75	15	16	21	18	16	19	16		1,65E+07	1,14E+06
β-Sitosterol 0,005mg/ml	24	16		18	16		22	16			a	1,64E+07	
	18	16		22	16		23	16			b	1,48E+07	
	24	16		17	16		26	16			c	1,80E+07	
	16	16	20,5	17	16	18,5	19	16	22,5	16		1,64E+07	1,60E+06
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	22	16		24	16		27	16			a	3,38E+07	
	22	16		40	16		25	16			b	3,69E+07	
	38	16		26	16		22	16			c	3,16E+07	
	26	16	27	28	16	29,5	27	16	25,25	25		3,41E+07	2,67E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
MO 0,2mg/ml	13	16		19	16		10	16			a	2,06E+07	
	13	16		16	16		9	16			b	1,78E+07	
	14	16		10	16		12	16			c	1,31E+07	
	26	16	16,5	12	16	14,25	11	16	10,5	25		1,72E+07	3,79E+06
MO 0,05mg/ml	18	16		29	16		24	16			a	2,97E+07	
	25	16		32	16		12	16			b	3,09E+07	
	24	16		20	16		29	16			c	2,66E+07	
	28	16	23,75	18	16	24,75	20	16	21,25	25		2,91E+07	2,25E+06
MO 0,02mg/ml	24	16		19	16		21	16			a	2,50E+07	
	19	16		24	16		19	16			b	2,72E+07	
	14	16		21	16		32	16			c	3,22E+07	
	23	16	20	23	16	21,75	31	16	25,75	25		2,81E+07	3,68E+06
MO 0,005mg/ml	26	16		27	16		16	16			a	2,97E+07	
	26	16		21	16		25	16			b	2,88E+07	
	23	16		23	16		20	16			c	2,59E+07	
	20	16	23,75	21	16	23	22	16	20,75	25		2,81E+07	1,95E+06
β-Sitosterol 0,2mg/ml	25	16		21	16		30	16			a	3,25E+07	
	25	16		27	16		20	16			b	2,78E+07	
	23	16		19	16		27	16			c	3,00E+07	
	31	16	26	22	16	22,25	19	16	24	25		3,01E+07	2,35E+06
β-Sitosterol 0,05mg/ml	27	16		24	16		20	16			a	3,19E+07	
	24	16		31	16		29	16			b	3,38E+07	
	24	16		28	16		16	16			c	2,78E+07	
	27	16	25,5	25	16	27	24	16	22,25	25		3,11E+07	3,04E+06
β-Sitosterol 0,02mg/ml	17	16		24	16		22	16			a	2,38E+07	
	29	16		13	16		23	16			b	2,53E+07	
	19	16		26	16		24	16			c	3,13E+07	
	11	16	19	18	16	20,25	31	16	25	25		2,68E+07	3,96E+06
β-Sitosterol 0,005mg/ml	19	16		17	16		23	16			a	2,53E+07	
	15	16		22	16		27	16			b	2,72E+07	
	29	16		23	16		22	16			c	3,06E+07	
	18	16	20,25	25	16	21,75	26	16	24,5	25		2,77E+07	2,69E+06

Tab. Anhang 15-17: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe III (Wiederholung)

Tag 0

Kontrolle mit Tween (a)			MO 0,05mg/ml (b)			MO 0,005mg/ml (a)			β-Sitosterol 0,2mg/ml (c)			β-Sitosterol 0,005mg/ml (b)				
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder		Verdünnungs-faktor
17	16		19	16		18	16		19	16		24	16			
19	16		21	16		19	16		20	16		18	16			
21	16		22	16		15	16		26	16		21	16			
18	16	18,75	20	16	20,5	20	16	18	18	16	20,75	26	16	22,25		1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (a)	9,38E+05	
MO 0,05mg/ml (b)	1,03E+06	
MO 0,005mg/ml (a)	9,00E+05	
β-Sitosterol 0,2mg/ml (c)	1,04E+06	
β-Sitosterol 0,005mg/ml (b)	1,11E+06	
	MW: 1,00E+06	8,45E+04

Tag 1

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	33	16		26	16		24	16			a	1,60E+06	
	36	16		33	16		31	16			b	1,38E+06	
	30	16		24	16		22	16			c	1,28E+06	
	29	16	32	27	16	27,5	25	16	25,5	1		1,42E+06	1,66E+05
MO 0,2mg/ml	27	16		17	16		18	16			a	1,19E+06	
	23	16		19	16		12	16			b	9,88E+05	
	19	16		23	16		17	16			c	7,25E+05	
	26	16	23,75	20	16	19,75	11	16	14,5	1		9,67E+05	2,32E+05
MO 0,05mg/ml	27	16		25	16		23	16			a	1,23E+06	
	22	16		21	16		31	16			b	1,14E+06	
	21	16		22	16		24	16			c	1,33E+06	
	28	16	24,5	23	16	22,75	28	16	26,5	1		1,23E+06	9,38E+04
MO 0,02mg/ml	28	16		31	16		26	16			a	1,25E+06	
	24	16		29	16		15	16			b	1,53E+06	
	22	16		28	16		27	16			c	1,13E+06	
	26	16	25	34	16	30,5	22	16	22,5	1		1,30E+06	2,05E+05
MO 0,005mg/ml	25	16		25	16		23	16			a	1,70E+06	
	34	16		32	16		33	16			b	1,54E+06	
	36	16		35	16		24	16			c	1,20E+06	
	41	16	34	31	16	30,75	16	16	24	1		1,48E+06	2,55E+05
β-Sitosterol 0,2mg/ml	23	16		29	16		18	16			a	1,20E+06	
	14	16		24	16		15	16			b	1,39E+06	
	31	16		27	16		26	16			c	9,63E+05	
	28	16	24	31	16	27,75	18	16	19,25	1		1,18E+06	2,13E+05
β-Sitosterol 0,05mg/ml	20	16		32	16		19	16			a	1,01E+06	
	24	16		29	16		14	16			b	1,48E+06	
	21	16		26	16		16	16			c	8,25E+05	
	16	16	20,25	31	16	29,5	17	16	16,5	1		1,10E+06	3,35E+05

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
β-Sitosterol 0,02mg/ml	34	16		22	16		25	16			a	1,45E+06	
	21	16		25	16		23	16			b	1,00E+06	
	29	16		14	16		31	16			c	1,21E+06	
	32	16	29	19	16	20	18	16	24,25	1		1,22E+06	2,25E+05
β-Sitosterol 0,005mg/ml	30	16		21	16		29	16			a	1,33E+06	
	18	16		27	16		33	16			b	1,23E+06	
	34	16		29	16		30	16			c	1,54E+06	
	24	16	26,5	21	16	24,5	31	16	30,75	1		1,36E+06	1,60E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	23	16		18	16		22	16			a	1,64E+07	
	18	16		20	16		18	16			b	1,72E+07	
	19	16		24	16		26	16			c	1,72E+07	
	22	16	20,5	24	16	21,5	20	16	21,5	16		1,69E+07	4,62E+05
MO 0,2mg/ml	3	16		8	16		10	16			a	3,20E+06	
	6	16		9	16		3	16			b	6,80E+06	
	5	16		14	16		8	16			c	5,40E+06	
	2	16	4	3	16	8,5	6	16	6,75	16		5,13E+06	1,81E+06
MO 0,05mg/ml	21	16		13	16		16	16			a	1,38E+07	
	16	16		16	16		20	16			b	1,18E+07	
	19	16		18	16		21	16			c	1,52E+07	
	13	16	17,25	12	16	14,75	19	16	19	16		1,36E+07	1,71E+06
MO 0,02mg/ml	14	16		24	16		17	16			a	1,48E+07	
	24	16		21	16		23	16			b	1,76E+07	
	17	16		21	16		25	16			c	1,78E+07	
	19	16	18,5	22	16	22	24	16	22,25	16		1,67E+07	1,68E+06
MO 0,005mg/ml	18	16		19	16		18	16			a	1,60E+07	
	25	16		24	16		25	16			b	2,02E+07	
	21	16		31	16		17	16			c	1,48E+07	
	16	16	20	27	16	25,25	14	16	18,5	16		1,70E+07	2,84E+06
β-Sitosterol 0,2mg/ml	28	16		17	16		15	16			a	1,76E+07	
	31	16		20	16		20	16			b	1,50E+07	
	12	16		25	16		22	16			c	1,66E+07	
	17	16	22	13	16	18,75	26	16	20,75	16		1,64E+07	1,31E+06
β-Sitosterol 0,05mg/ml	25	16		26	16		15	16			a	1,90E+07	
	22	16		12	16		16	16			b	1,38E+07	
	20	16		13	16		23	16			c	1,58E+07	
	28	16	23,75	18	16	17,25	25	16	19,75	16		1,62E+07	2,62E+06
β-Sitosterol 0,02mg/ml	21	16		23	16		18	16			a	1,54E+07	
	17	16		19	16		22	16			b	1,62E+07	
	16	16		17	16		26	16			c	1,78E+07	
	23	16	19,25	22	16	20,25	23	16	22,25	16		1,65E+07	1,22E+06
β-Sitosterol 0,005mg/ml	25	16		20	16		20	16			a	1,74E+07	
	23	16		26	16		18	16			b	1,74E+07	
	19	16		18	16		23	16			c	1,66E+07	
	20	16	21,75	23	16	21,75	22	16	20,75	16		1,71E+07	4,62E+05
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	26	16		40	16		23	16			a	3,31E+07	
	29	16		34	16		27	16			b	4,06E+07	
	24	16		27	16		33	16			c	3,72E+07	
	27	16	26,5	29	16	32,5	36	16	29,75	25		3,70E+07	3,75E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
MO 0,2mg/ml	13	16		24	16		20	16			a	1,88E+07	
	12	16		17	16		9	16			b	2,31E+07	
	11	16		23	16		10	16			c	1,69E+07	
	24	16	15	10	16	18,5	15	16	13,5	25		1,96E+07	3,21E+06
MO 0,05mg/ml	33	16		27	16		16	16			a	3,34E+07	
	27	16		14	16		22	16			b	2,84E+07	
	19	16		23	16		26	16			c	2,59E+07	
	28	16	26,75	27	16	22,75	19	16	20,75	25		2,93E+07	3,82E+06
MO 0,02mg/ml	15	16		35	16		28	16			a	2,34E+07	
	17	16		31	16		26	16			b	3,56E+07	
	24	16		19	16		18	16			c	2,91E+07	
	19	16	18,75	29	16	28,5	21	16	23,25	25		2,94E+07	6,10E+06
MO 0,005mg/ml	25	16		29	16		24	16			a	2,91E+07	
	19	16		32	16		23	16			b	3,19E+07	
	23	16		19	16		32	16			c	3,25E+07	
	26	16	23,25	22	16	25,5	25	16	26	25		3,11E+07	1,83E+06
β-Sitosterol 0,2mg/ml	20	16		28	16		29	16			a	3,00E+07	
	22	16		20	16		31	16			b	3,06E+07	
	28	16		28	16		28	16			c	3,47E+07	
	26	16	24	22	16	24,5	23	16	27,75	25		3,18E+07	2,55E+06
β-Sitosterol 0,05mg/ml	25	16		26	16		24	16			a	2,84E+07	
	24	16		31	16		26	16			b	3,41E+07	
	16	16		28	16		28	16			c	3,13E+07	
	26	16	22,75	24	16	27,25	22	16	25	25		3,13E+07	2,81E+06
β-Sitosterol 0,02mg/ml	28	16		15	16		29	16			a	3,41E+07	
	18	16		26	16		30	16			b	2,84E+07	
	34	16		26	16		25	16			c	3,34E+07	
	29	16	27,25	24	16	22,75	23	16	26,75	25		3,20E+07	3,08E+06
β-Sitosterol 0,005mg/ml	18	16		26	16		36	16			a	2,84E+07	
	17	16		29	16		26	16			b	3,06E+07	
	29	16		19	16		24	16			c	3,72E+07	
	27	16	22,75	24	16	24,5	33	16	29,75	25		3,21E+07	4,55E+06

Tab. Anhang 15-18: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe IV

Tag 0

Kontrolle mit Tween (a)			Ursolsäure 0,05mg/ml (b)			Ursolsäure 0,02mg/ml (c)			Prinsepiol 0,2mg/ml (a)			Prinsepiol 0,05mg/ml (c)			Prinsepiol 0,02mg/ml (b)			
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor
14	16		16	16		10	16		13	16		12	16		11	16		
17	16		13	16		14	16		12	16		13	16		11	16		
15	16		9	16		13	16		15	16		10	16		17	16		
17	16	15,75	15	16	13,25	13	16	12,5	10	16	12,5	10	16	11,25	13	16	13	1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (b)	7,88E+05	
Ursolsäure 0,2mg/ml (c)	6,63E+05	
Ursolsäure 0,05mg/ml (c)	6,25E+05	
Ursolsäure 0,005mg/ml (a)	6,25E+05	
Prinsepiol 0,05mg/ml (b)	5,63E+05	
Prinsepiol 0,005mg/ml (b)	6,50E+05	
	MW: 6,52E+05	7,48E+04

Tag 1

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	21	16		17	16		13	16			a	9,50E+05	
	20	16		14	16		16	16			b	8,25E+05	
	21	16		19	16		16	16			c	7,88E+05	
	14	16	19	16	16	16,5	18	16	15,75	1		8,54E+05	8,51E+04
Ursolsäure 0,2mg/ml	16	16		9	16		12	16			a	7,88E+05	
	18	16		10	16		12	16			b	5,13E+05	
	19	16		13	16		9	16			c	5,63E+05	
	10	16	15,75	9	16	10,25	12	16	11,25	1		6,21E+05	1,46E+05
Ursolsäure 0,05mg/ml	14	16		9	16		14	16			a	9,75E+05	
	20	16		10	16		10	16			b	5,88E+05	
	23	16		16	16		11	16			c	5,25E+05	
	21	16	19,5	12	16	11,75	7	16	10,5	1		6,96E+05	2,44E+05
Ursolsäure 0,02mg/ml	21	16		15	16		14	16			a	8,00E+05	
	14	16		15	16		8	16			b	6,25E+05	
	8	16		8	16		15	16			c	6,25E+05	
	21	16	16	12	16	12,5	13	16	12,5	1		6,83E+05	1,01E+05
Ursolsäure 0,005mg/ml	12	16		16	16		12	16			a	8,88E+05	
	16	16		17	16		15	16			b	7,63E+05	
	19	16		13	16		11	16			c	6,88E+05	
	24	16	17,75	15	16	15,25	17	16	13,75	1		7,79E+05	1,01E+05
Prinsepiol 0,2mg/ml	12	16		6	16		11	16			a	3,63E+05	
	4	16		12	16		6	16			b	3,75E+05	
	6	16		8	16		6	16			c	4,63E+05	
	7	16	7,25	4	16	7,5	14	16	9,25	1		4,00E+05	5,45E+04
Prinsepiol 0,05mg/ml	15	16		9	16		10	16			a	6,25E+05	
	14	16		14	16		13	16			b	5,75E+05	
	12	16		9	16		17	16			c	6,00E+05	
	9	16	12,5	14	16	11,5	8	16	12	1		6,00E+05	2,50E+04

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Prinsepiol 0,02mg/ml	10	16		13	16		15	16			a	6,38E+05	
	13	16		17	16		14	16			b	7,00E+05	
	14	16		14	16		19	16			c	8,63E+05	
	14	16	12,75	12	16	14	21	16	17,25	1		7,33E+05	1,16E+05
Prinsepiol 0,005mg/ml	15	16		15	16		16	16			a	7,13E+05	
	16	16		11	16		15	16			b	6,25E+05	
	10	16		13	16		14	16			c	7,75E+05	
	16	16	14,25	11	16	12,5	17	16	15,5	1		7,04E+05	7,53E+04
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	12	16		9	16		7	16			a	6,75E+06	
	7	16		5	16		6	16			b	5,63E+06	
	11	16		6	16		6	16			c	5,44E+06	
	6	16	9	10	16	7,5	10	16	7,25	15		5,94E+06	7,10E+05
Ursolsäure 0,2mg/ml	9	16		7	16		7	16			a	5,44E+06	
	4	16		9	16		9	16			b	5,81E+06	
	11	16		7	16		6	16			c	4,88E+06	
	5	16	7,25	8	16	7,75	4	16	6,5	15		5,38E+06	4,72E+05
Ursolsäure 0,05mg/ml	9	16		7	16		10	16			a	5,63E+06	
	5	16		6	16		8	16			b	6,38E+06	
	8	16		7	16		6	16			c	5,81E+06	
	8	16	7,5	14	16	8,5	7	16	7,75	15		5,94E+06	3,90E+05
Ursolsäure 0,02mg/ml	5	16		12	16		7	16			a	6,94E+06	
	11	16		12	16		5	16			b	6,94E+06	
	10	16		10	16		6	16			c	4,31E+06	
	11	16	9,25	3	16	9,25	5	16	5,75	15		6,06E+06	1,52E+06
Ursolsäure 0,005mg/ml	11	16		4	16		8	16			a	7,50E+06	
	8	16		9	16		9	16			b	4,88E+06	
	12	16		5	16		7	16			c	6,19E+06	
	9	16	10	8	16	6,5	9	16	8,25	15		6,19E+06	1,31E+06
Prinsepiol 0,2mg/ml	15	16		9	16		12	16			a	6,38E+05	
	14	16		11	16		9	16			b	5,00E+05	
	9	16		11	16		9	16			c	5,25E+05	
	13	16	12,75	9	16	10	12	16	10,5	1		5,54E+05	7,32E+04
Prinsepiol 0,05mg/ml	7	16		11	16		8	16			a	6,56E+06	
	8	16		7	16		8	16			b	5,06E+06	
	12	16		3	16		11	16			c	6,19E+06	
	8	16	8,75	6	16	6,75	6	16	8,25	15		5,94E+06	7,81E+05
Prinsepiol 0,02mg/ml	7	16		8	16		11	16			a	4,88E+06	
	7	16		6	16		10	16			b	5,44E+06	
	6	16		7	16		8	16			c	6,56E+06	
	6	16	6,5	8	16	7,25	6	16	8,75	15		5,63E+06	8,59E+05
Prinsepiol 0,005mg/ml	6	16		6	16		11	16			a	5,06E+06	
	8	16		10	16		7	16			b	6,00E+06	
	5	16		10	16		8	16			c	5,81E+06	
	8	16	6,75	6	16	8	5	16	7,75	15		5,63E+06	4,96E+05
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	9	16		12	16		11	16			a	1,41E+07	
	12	16		12	16		16	16			b	1,63E+07	
	8	16		12	16		11	16			c	1,50E+07	
	16	16	11,25	16	16	13	10	16	12	25		1,51E+07	1,10E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Ursolsäure 0,2mg/ml	12	16		7	16		15	16			a	1,53E+07	
	10	16		12	16		12	16			b	1,22E+07	
	15	16		10	16		12	16			c	1,50E+07	
	12	16	12,25	10	16	9,75	9	16	12	25		1,42E+07	1,72E+06
Ursolsäure 0,05mg/ml	9	16		7	16		8	16			a	1,38E+07	
	13	16		9	16		7	16			b	1,13E+07	
	12	16		10	16		9	16			c	1,16E+07	
	10	16	11	10	16	9	13	16	9,25	25		1,22E+07	1,36E+06
Ursolsäure 0,02mg/ml	11	16		10	16		15	16			a	1,22E+07	
	8	16		9	16		10	16			b	1,09E+07	
	12	16		9	16		6	16			c	1,31E+07	
	8	16	9,75	7	16	8,75	11	16	10,5	25		1,21E+07	1,10E+06
Ursolsäure 0,005mg/ml	13	16		8	16		8	16			a	1,41E+07	
	9	16		7	16		11	16			b	1,06E+07	
	10	16		11	16		10	16			c	1,19E+07	
	13	16	11,25	8	16	8,5	9	16	9,5	25		1,22E+07	1,74E+06
Prinsepiol 0,2mg/ml	11	16		16	16		13	16			a	6,15E+06	
	11	16		9	16		7	16			b	7,05E+06	
	9	16		9	16		9	16			c	5,70E+06	
	10	16	10,25	13	16	11,75	9	16	9,5	12		6,30E+06	6,87E+05
Prinsepiol 0,05mg/ml	10	16		16	16		6	16			a	1,22E+07	
	9	16		9	16		10	16			b	1,44E+07	
	14	16		10	16		9	16			c	1,03E+07	
	6	16	9,75	11	16	11,5	8	16	8,25	25		1,23E+07	2,03E+06
Prinsepiol 0,02mg/ml	10	16		12	16		10	16			a	1,00E+07	
	4	16		13	16		10	16			b	1,50E+07	
	12	16		10	16		8	16			c	1,25E+07	
	6	16	8	13	16	12	12	16	10	25		1,25E+07	2,50E+06
Prinsepiol 0,005mg/ml	7	16		10	16		18	16			a	1,16E+07	
	12	16		10	16		10	16			b	1,09E+07	
	10	16		8	16		7	16			c	1,38E+07	
	8	16	9,25	7	16	8,75	9	16	11	25		1,21E+07	1,48E+06

Tab. Anhang 15-19: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe IV (Wiederholung)

Tag 0

Kontrolle mit Tween (a)			Ursolsäure 0,05mg/ml (b)			Ursolsäure 0,02mg/ml (c)			Prinsepiol 0,2mg/ml (a)			Prinsepiol 0,05mg/ml (c)			Prinsepiol 0,02mg/ml (b)			
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor
12	16		14	16		17	16		12	16		15	16		18	16		
15	16		11	16		15	16		14	16		16	16		15	16		
16	16		15	16		13	16		11	16		13	16		19	16		
12	16	13,75	16	16	14	13	16	14,5	12	16	12,25	16	16	15	14	16	16,5	1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Kontrolle mit PS80 (a)	6,88E+05	
Ursolsäure 0,05mg/ml (b)	7,00E+05	
Ursolsäure 0,02mg/ml (c)	7,25E+05	
Prinsepiol 0,2mg/ml (a)	6,13E+05	
Prinsepiol 0,05mg/ml (c)	7,50E+05	
Prinsepiol 0,02mg/ml (b)	8,25E+05	
	MW: 7,17E+05	7,06E+04

Tag 1

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	14	16		17	16		18	16			a	9,00E+05	
	19	16		14	16		16	16			b	7,63E+05	
	21	16		13	16		19	16			c	8,25E+05	
	18	16	18	17	16	15,25	13	16	16,5	1		8,29E+05	6,88E+04
Ursolsäure 0,2mg/ml	9	16		10	16		11	16			a	5,00E+05	
	13	16		12	16		16	16			b	6,00E+05	
	10	16		11	16		14	16			c	7,38E+05	
	8	16	10	15	16	12	18	16	14,75	1		6,13E+05	1,19E+05
Ursolsäure 0,05mg/ml	15	16		15	16		13	16			a	6,88E+05	
	14	16		17	16		14	16			b	7,50E+05	
	16	16		15	16		8	16			c	5,75E+05	
	10	16	13,75	13	16	15	11	16	11,5	1		6,71E+05	8,87E+04
Ursolsäure 0,02mg/ml	19	16		18	16		8	16			a	7,50E+05	
	15	16		12	16		20	16			b	6,13E+05	
	12	16		11	16		8	16			c	6,88E+05	
	14	16	15	8	16	12,25	19	16	13,75	1		6,83E+05	6,88E+04
Ursolsäure 0,005mg/ml	16	16		12	16		14	16			a	8,63E+05	
	18	16		17	16		16	16			b	8,25E+05	
	19	16		18	16		13	16			c	6,75E+05	
	16	16	17,25	19	16	16,5	11	16	13,5	1		7,88E+05	9,92E+04
Prinsepiol 0,2mg/ml	11	16		7	16		8	16			a	4,13E+05	
	8	16		8	16		7	16			b	3,88E+05	
	6	16		10	16		5	16			c	3,63E+05	
	8	16	8,25	6	16	7,75	9	16	7,25	1		3,88E+05	2,50E+04
Prinsepiol 0,05mg/ml	13	16		14	16		11	16			a	5,88E+05	
	11	16		12	16		14	16			b	5,63E+05	
	8	16		10	16		15	16			c	6,50E+05	
	15	16	11,75	9	16	11,25	12	16	13	1		6,00E+05	4,51E+04

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Prinsepiol 0,02mg/ml	16	16		12	16		15	16			a	7,50E+05	
	14	16		15	16		10	16			b	7,00E+05	
	12	16		13	16		14	16			c	6,50E+05	
	18	16	15	16	16	14	13	16	13	1		7,00E+05	5,00E+04
Prinsepiol 0,005mg/ml	11	16		11	16		17	16			a	6,00E+05	
	13	16		15	16		15	16			b	7,13E+05	
	13	16		13	16		19	16			c	8,25E+05	
	11	16	12	18	16	14,25	15	16	16,5	1		7,13E+05	1,13E+05
Tag 4													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	12	16		9	16		12	16			a	7,50E+06	
	8	16		7	16		6	16			b	6,94E+06	
	9	16		9	16		6	16			c	6,38E+06	
	11	16	10	12	16	9,25	10	16	8,5	15		6,94E+06	5,63E+05
Ursolsäure 0,2mg/ml	6	16		11	16		11	16			a	5,81E+06	
	10	16		10	16		8	16			b	6,56E+06	
	10	16		5	16		7	16			c	7,13E+06	
	5	16	7,75	9	16	8,75	12	16	9,5	15		6,50E+06	6,58E+05
Ursolsäure 0,05mg/ml	8	16		11	16		9	16			a	5,63E+06	
	11	16		13	16		7	16			b	7,88E+06	
	6	16		8	16		10	16			c	6,38E+06	
	5	16	7,5	10	16	10,5	8	16	8,5	15		6,63E+06	1,15E+06
Ursolsäure 0,02mg/ml	8	16		11	16		11	16			a	6,56E+06	
	6	16		8	16		12	16			b	7,50E+06	
	9	16		12	16		6	16			c	7,13E+06	
	12	16	8,75	9	16	10	9	16	9,5	15		7,06E+06	4,72E+05
Ursolsäure 0,005mg/ml	9	16		10	16		9	16			a	6,00E+06	
	12	16		11	16		13	16			b	6,94E+06	
	6	16		8	16		12	16			c	8,06E+06	
	5	16	8	8	16	9,25	9	16	10,75	15		7,00E+06	1,03E+06
Prinsepiol 0,2mg/ml	7	16		10	16		11	16			a	4,88E+05	
	9	16		15	16		10	16			b	6,38E+05	
	11	16		16	16		11	16			c	5,13E+05	
	12	16	9,75	10	16	12,75	9	16	10,25	1		5,46E+05	8,04E+04
Prinsepiol 0,05mg/ml	7	16		4	16		11	16			a	5,25E+06	
	6	16		10	16		10	16			b	5,44E+06	
	8	16		7	16		6	16			c	6,94E+06	
	7	16	7	8	16	7,25	10	16	9,25	15		5,88E+06	9,25E+05
Prinsepiol 0,02mg/ml	12	16		9	16		8	16			a	8,06E+06	
	8	16		7	16		8	16			b	6,38E+06	
	13	16		8	16		6	16			c	6,19E+06	
	10	16	10,75	10	16	8,5	11	16	8,25	15		6,88E+06	1,03E+06
Prinsepiol 0,005mg/ml	8	16		8	16		10	16			a	5,81E+06	
	6	16		12	16		12	16			b	7,31E+06	
	10	16		10	16		11	16			c	7,88E+06	
	7	16	7,75	9	16	9,75	9	16	10,5	15		7,00E+06	1,07E+06
Tag 8													
Kontrolle mit 5%-PS80-lsg	11	16		14	16		14	16			a	1,38E+07	
	13	16		8	16		14	16			b	1,59E+07	
	8	16		14	16		10	16			c	1,44E+07	
	12	16	11	15	16	12,75	8	16	11,5	25		1,47E+07	1,13E+06

Probe Nr.	a			b			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Ursolsäure 0,2mg/ml	12	16		7	16		15	16			a	1,53E+07	
	10	16		12	16		12	16			b	1,22E+07	
	15	16		10	16		12	16			c	1,50E+07	
	12	16	12,25	10	16	9,75	9	16	12	25		1,42E+07	1,72E+06
Ursolsäure 0,05mg/ml	9	16		7	16		8	16			a	1,38E+07	
	13	16		9	16		7	16			b	1,13E+07	
	12	16		10	16		9	16			c	1,16E+07	
	10	16	11	10	16	9	13	16	9,25	25		1,22E+07	1,36E+06
Ursolsäure 0,02mg/ml	11	16		10	16		15	16			a	1,22E+07	
	8	16		9	16		10	16			b	1,09E+07	
	12	16		9	16		6	16			c	1,31E+07	
	8	16	9,75	7	16	8,75	11	16	10,5	25		1,21E+07	1,10E+06
Ursolsäure 0,005mg/ml	13	16		8	16		8	16			a	1,41E+07	
	9	16		7	16		11	16			b	1,06E+07	
	10	16		11	16		10	16			c	1,19E+07	
	13	16	11,25	8	16	8,5	9	16	9,5	25		1,22E+07	1,74E+06
Prinsepiol 0,2mg/ml	11	16		16	16		13	16			a	6,15E+06	
	11	16		9	16		7	16			b	7,05E+06	
	9	16		9	16		9	16			c	5,70E+06	
	10	16	10,25	13	16	11,75	9	16	9,5	12		6,30E+06	6,87E+05
Prinsepiol 0,05mg/ml	10	16		16	16		6	16			a	1,22E+07	
	9	16		9	16		10	16			b	1,44E+07	
	14	16		10	16		9	16			c	1,03E+07	
	6	16	9,75	11	16	11,5	8	16	8,25	25		1,23E+07	2,03E+06
Prinsepiol 0,02mg/ml	10	16		12	16		10	16			a	1,00E+07	
	4	16		13	16		10	16			b	1,50E+07	
	12	16		10	16		8	16			c	1,25E+07	
	6	16	8	13	16	12	12	16	10	25		1,25E+07	2,50E+06
Prinsepiol 0,005mg/ml	7	16		10	16		18	16			a	1,16E+07	
	12	16		10	16		10	16			b	1,09E+07	
	10	16		8	16		7	16			c	1,38E+07	
	8	16	9,25	7	16	8,75	9	16	11	25		1,21E+07	1,48E+06

Tab. Anhang 15-20: Mikroskopische Zähldaten Lösungsmittel und Ladanum

Tag 0

Reines BSK-II (b)			5% H_2O (a)			5% Tween (c)			2,5% DMSO (c)			Ladanum 2mg/ml (a)			$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml (b)			
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor
16	16		22	16		20	16		14	16		18	16		19	16		
21	16		24	16		17	16		22	16		20	16		23	16		
31	16		22	16		17	16		20	16		22	16		20	16		
19	16	21,75	30	16	24,5	25	16	19,75	23	16	19,75	21	16	20,25	14	16	19	1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Reines BSK-II (b)	1,09E+06	
5% H_2O (a)	1,23E+06	
5% PS80 (c)	9,88E+05	
Ladanum 2mg/ml (a)	9,88E+05	
2,5% DMSO (c)	1,01E+06	
$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml (b)	9,50E+05	
	MW: 1,04E+06	1,01E+05

Tag 1

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Reines BSK-II	19	8		15	8		14	8			a	1,55E+06	
	13	8		20	8		22	8			b	1,53E+06	
	13	8		12	8		20	8			c	1,83E+06	
	17	8	31	14	8	30,5	17	8	36,5	1		1,63E+06	1,66E+05
H_2O	12	8		14	8		18	8			a	1,40E+06	
	12	8		15	8		19	8			b	1,53E+06	
	15	8		15	8		16	8			c	1,60E+06	
	17	8	28	17	8	30,5	11	8	32	1		1,51E+06	1,01E+05
PS80 0,125%	16	8		10	8		9	8			a	1,40E+06	
	11	8		12	8		14	8			b	1,30E+06	
	14	8		10	8		17	8			c	1,33E+06	
	15	8	28	20	8	26	13	8	26,5	1		1,34E+06	5,20E+04
PS80 0,25%	16	8		12	8		10	8			a	1,48E+06	
	8	8		18	8		17	8			b	1,58E+06	
	14	8		20	8		13	8			c	1,40E+06	
	21	8	29,5	13	8	31,5	16	8	28	1		1,48E+06	8,78E+04
DMSO 0,125%	22	8		18	8		14	8			a	1,40E+06	
	11	8		11	8		17	8			b	1,53E+06	
	11	8		13	8		14	8			c	1,60E+06	
	12	8	28	19	8	30,5	19	8	32	1		1,51E+06	1,01E+05
DMSO 0,25%	16	8		17	8		11	8			a	1,50E+06	
	19	8		14	8		13	8			b	1,55E+06	
	10	8		17	8		18	8			c	1,43E+06	
	15	8	30	14	8	31	15	8	28,5	1		1,49E+06	6,29E+04
Ladanum 2,0mg/ml	10	8		12	8		9	8			a	8,00E+05	
	8	8		14	8		10	8			b	1,13E+06	
	6	8		9	8		10	8			c	1,03E+06	
	8	8	16	10	8	22,5	12	8	20,5	1		9,83E+05	1,66E+05

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Ladanum 0,2mg/ml	15	8		9	8		14	8			a	1,33E+06	
	11	8		13	8		12	8			b	1,10E+06	
	8	8		14	8		12	8			c	1,20E+06	
	19	8	26,5	8	8	22	10	8	24	1		1,21E+06	1,13E+05
$CHCl_3$-Extr. Lad. 2,0mg/ml	10	8		12	8		13	8			a	1,00E+06	
	8	8		9	8		12	8			b	1,10E+06	
	7	8		9	8		10	8			c	1,08E+06	
	15	8	20	14	8	22	8	8	21,5	1		1,06E+06	5,20E+04
$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml	10	8		7	8		11	8			a	1,35E+06	
	16	8		14	8		7	8			b	1,13E+06	
	14	8		10	8		9	8			c	9,75E+05	
	14	8	27	14	8	22,5	12	8	19,5	1		1,15E+06	1,89E+05
Tag 4													
Reines BSK-II	18	16		28	16		32	16			a	2,05E+07	
	21	16		23	16		30	16			b	2,55E+07	
	21	16		22	16		19	16			c	2,65E+07	
	22	16	20,5	29	16	25,5	25	16	26,5	20		2,42E+07	3,21E+06
H_2O	21	16		21	16		25	16			a	1,90E+07	
	15	16		21	16		21	16			b	2,18E+07	
	18	16		30	16		17	16			c	2,18E+07	
	22	16	19	15	16	21,75	24	16	21,75	20		2,08E+07	1,59E+06
PS80 0,125%	13	16		34	16		27	16			a	1,85E+07	
	19	16		32	16		21	16			b	2,78E+07	
	23	16		23	16		19	16			c	2,08E+07	
	19	16	18,5	22	16	27,75	16	16	20,75	20		2,23E+07	4,82E+06
PS80 0,25%	23	16		17	16		13	16			a	2,10E+07	
	19	16		14	16		23	16			b	1,45E+07	
	21	16		14	16		23	16			c	2,08E+07	
	21	16	21	13	16	14,5	24	16	20,75	20		1,88E+07	3,68E+06
DMSO 0,125%	34	16		29	16		29	16			a	2,15E+07	
	11	16		17	16		24	16			b	2,33E+07	
	24	16		24	16		25	16			c	2,73E+07	
	17	16	21,5	23	16	23,25	31	16	27,25	20		2,40E+07	2,95E+06
DMSO 0,25%	17	16		22	16		27	16			a	1,90E+07	
	22	16		21	16		21	16			b	2,00E+07	
	18	16		24	16		29	16			c	2,48E+07	
	19	16	19	13	16	20	22	16	24,75	20		2,13E+07	3,07E+06
Ladanum 2,0mg/ml	3	16		2	16		3	16			a	1,00E+05	
	1	16		2	16		3	16			b	1,50E+05	
	0	16		5	16		1	16			c	1,13E+05	
	4	16	2	3	16	3	2	16	2,25	1		1,21E+05	2,60E+04
Ladanum 0,2mg/ml	14	16		25	16		19	16			a	2,15E+07	
	14	16		14	16		15	16			b	1,75E+07	
	30	16		19	16		20	16			c	1,70E+07	
	28	16	21,5	12	16	17,5	14	16	17	20		1,87E+07	2,47E+06
$CHCl_3$-Extr. Lad. 2,0mg/ml	32	16		11	16		38	16			a	1,36E+06	
	29	16		12	16		27	16			b	5,50E+05	
	25	16		10	16		27	16			c	1,49E+06	
	23	16	27,25	11	16	11	27	16	29,75	1		1,13E+06	5,09E+05

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml	15	16		9	16		14	16			a	1,33E+07	
	14	16		18	16		17	16			b	1,53E+07	
	12	16		19	16		12	16			c	1,40E+07	
	12	16	13,25	15	16	15,25	13	16	14	20		1,42E+07	1,01E+06
Tag 8													
Reines BSK-II	22	16		19	16		22	16			a	3,80E+07	
	17	16		19	16		27	16			b	3,65E+07	
	18	16		15	16		20	16			c	4,50E+07	
	19	16	19	20	16	18,25	21	16	22,5	40		3,98E+07	4,54E+06
H_2O	24	16		17	16		14	16			a	3,85E+07	
	21	16		18	16		16	16			b	3,65E+07	
	18	16		18	16		16	16			c	3,15E+07	
	14	16	19,25	20	16	18,25	17	16	15,75	40		3,55E+07	3,61E+06
PS80 0,125%	15	16		19	16		15	16			a	3,95E+07	
	26	16		22	16		20	16			b	3,95E+07	
	25	16		20	16		26	16			c	4,00E+07	
	13	16	19,75	18	16	19,75	19	16	20	40		3,97E+07	2,89E+05
PS80 0,25%	20	16		14	16		15	16			a	4,20E+07	
	24	16		22	16		17	16			b	3,80E+07	
	21	16		22	16		14	16			c	3,10E+07	
	19	16	21	18	16	19	16	16	15,5	40		3,70E+07	5,57E+06
DMSO 0,125%	21	16		25	16		27	16			a	4,20E+07	
	18	16		20	16		18	16			b	4,20E+07	
	24	16		15	16		22	16			c	4,10E+07	
	21	16	21	24	16	21	15	16	20,5	40		4,17E+07	5,77E+05
DMSO 0,25%	15	16		22	16		6	16			a	3,10E+07	
	16	16		18	16		14	16			b	3,60E+07	
	15	16		18	16		22	16			c	2,90E+07	
	16	16	15,5	14	16	18	16	16	14,5	40		3,20E+07	3,61E+06
Ladanum 2,0mg/ml	0	16		2	16		1	16			a	5,00E+04	
	1	16		1	16		0	16			b	8,75E+04	
	2	16		4	16		3	16			c	7,50E+04	
	1	16	1	0	16	1,75	2	16	1,5	1		7,08E+04	1,91E+04
Ladanum 0,2mg/ml	23	16		26	16		22	16			a	4,90E+07	
	26	16		17	16		14	16			b	4,95E+07	
	28	16		30	16		14	16			c	3,35E+07	
	21	16	24,5	26	16	24,75	17	16	16,75	40		4,40E+07	9,10E+06
$CHCl_3$-Extr. Lad. 2,0mg/ml	39	16		21	16		31	16			a	6,75E+06	
	31	16		12	16		41	16			b	3,15E+06	
	30	16		14	16		37	16			c	7,45E+06	
	35	16	33,75	16	16	15,75	40	16	37,25	4		5,78E+06	2,31E+06
$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml	10	16		20	16		15	16			a	2,25E+07	
	17	16		12	16		16	16			b	3,10E+07	
	8	16		16	16		16	16			c	3,20E+07	
	10	16	11,25	14	16	15,5	17	16	16	40		2,85E+07	5,22E+06

Tab. Anhang 15-21: Mikroskopische Zähldaten Lösungsmittel und Ladanum (Wiederholung)

Tag 0																		
Reines BSK-II (b)			5% H_2O (a)			5% Tween (c)			2,5% DMSO (c)			Ladanum 2mg/ml (a)			$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml (b)			
Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor
23	16		22	16		17	16		22	16		20	16		15	16		
24	16		26	16		18	16		24	16		22	16		22	16		
22	16		17	16		15	16		19	16		19	16		23	16		
18	16	21,75	16	16	20,25	19	16	17,25	23	16	22	20	16	20,25	20	16	20	1

Probe	Konzentration [1/ml]	Standardabweichung
Reines BSK-II (b)	1,09E+06	
5% H_2O (a)	1,01E+06	
5% PS80 (c)	8,63E+05	
Ladanum 2mg/ml (a)	1,10E+06	
2,5% DMSO (c)	1,01E+06	
$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml (b)	1,00E+06	
	MW: 1,01E+06	8,48E+04

Tag 1													
Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Reines BSK-II	20	8		19	8		19	8			a	1,58E+06	
	18	8		18	8		17	8			b	1,68E+06	
	12	8		16	8		20	8			c	1,88E+06	
	13	8	31,5	14	8	33,5	19	8	37,5	1		1,71E+06	1,53E+05
H_2O	12	8		19	8		18	8			a	1,50E+06	
	19	8		14	8		14	8			b	1,65E+06	
	11	8		16	8		12	8			c	1,48E+06	
	18	8	30	17	8	33	15	8	29,5	1		1,54E+06	9,46E+04
PS80 0,125%	11	8		14	8		14	8			a	1,53E+06	
	15	8		12	8		17	8			b	1,43E+06	
	19	8		16	8		17	8			c	1,58E+06	
	16	8	30,5	15	8	28,5	15	8	31,5	1		1,51E+06	7,64E+04
PS80 0,25%	14	8		18	8		14	8			a	1,50E+06	
	20	8		16	8		20	8			b	1,58E+06	
	15	8		12	8		16	8			c	1,58E+06	
	11	8	30	17	8	31,5	13	8	31,5	1		1,55E+06	4,33E+04
DMSO 0,125%	20	8		16	8		17	8			a	1,60E+06	
	11	8		14	8		17	8			b	1,53E+06	
	16	8		13	8		19	8			c	1,68E+06	
	17	8	32	18	8	30,5	14	8	33,5	1		1,60E+06	7,50E+04
DMSO 0,25%	13	8		12	8		18	8			a	1,55E+06	
	14	8		17	8		16	8			b	1,45E+06	
	16	8		13	8		15	8			c	1,65E+06	
	19	8	31	16	8	29	17	8	33	1		1,55E+06	1,00E+05
Ladanum 2,0mg/ml	7	8		13	8		10	8			a	8,25E+05	
	13	8		11	8		11	8			b	1,08E+06	
	7	8		12	8		14	8			c	1,10E+06	
	6	8	16,5	7	8	21,5	9	8	22	1		1,00E+06	1,52E+05

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
Ladanum 0,2mg/ml	10	8		15	8		10	8			a	1,30E+06	
	16	8		11	8		11	8			b	1,25E+06	
	9	8		11	8		9	8			c	1,18E+06	
	17	8	26	13	8	25	17	8	23,5	1		1,24E+06	6,29E+04
$CHCl_3$-Extr. Lad. 2,0mg/ml	15	8		13	8		7	8			a	1,33E+06	
	15	8		10	8		15	8			b	1,13E+06	
	14	8		15	8		7	8			c	1,10E+06	
	9	8	26,5	7	8	22,5	15	8	22	1		1,18E+06	1,23E+05
$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml	12	8		12	8		14	8			a	1,13E+06	
	13	8		16	8		15	8			b	1,35E+06	
	13	8		15	8		11	8			c	1,30E+06	
	7	8	22,5	11	8	27	12	8	26	1		1,26E+06	1,18E+05
Tag 4													
Reines BSK-II	23	16		18	16		21	16			a	2,25E+07	
	24	16		31	16		23	16			b	2,28E+07	
	25	16		23	16		26	16			c	2,50E+07	
	18	16	22,5	19	16	22,75	30	16	25	20		2,34E+07	1,38E+06
H_2O	21	16		16	16		16	16			a	2,13E+07	
	18	16		26	16		19	16			b	2,18E+07	
	25	16		25	16		23	16			c	1,95E+07	
	21	16	21,25	20	16	21,75	20	16	19,5	20		2,08E+07	1,18E+06
PS80 0,125%	28	16		13	16		22	16			a	2,10E+07	
	22	16		16	16		33	16			b	1,88E+07	
	13	16		26	16		29	16			c	2,48E+07	
	21	16	21	20	16	18,75	15	16	24,75	20		2,15E+07	3,03E+06
PS80 0,25%	19	16		22	16		18	16			a	1,90E+07	
	20	16		19	16		21	16			b	2,00E+07	
	17	16		21	16		16	16			c	1,85E+07	
	20	16	19	18	16	20	19	16	18,5	20		1,92E+07	7,64E+05
DMSO 0,125%	17	16		27	16		28	16			a	2,18E+07	
	15	16		21	16		21	16			b	2,50E+07	
	30	16		29	16		13	16			c	2,13E+07	
	25	16	21,75	23	16	25	23	16	21,25	20		2,27E+07	2,04E+06
DMSO 0,25%	22	16		22	16		22	16			a	2,23E+07	
	28	16		16	16		18	16			b	1,78E+07	
	18	16		14	16		23	16			c	2,13E+07	
	21	16	22,25	19	16	17,75	22	16	21,25	20		2,04E+07	2,36E+06
Ladanum 2,0mg/ml	0	16		1	16		3	16			a	1,38E+05	
	3	16		2	16		0	16			b	1,00E+05	
	3	16		1	16		5	16			c	1,63E+05	
	5	16	2,75	4	16	2	5	16	3,25	1		1,33E+05	3,15E+04
Ladanum 0,2mg/ml	24	16		21	16		25	16			a	2,03E+07	
	21	16		15	16		16	16			b	1,78E+07	
	17	16		17	16		12	16			c	1,85E+07	
	19	16	20,25	18	16	17,75	21	16	18,5	20		1,88E+07	1,28E+06
$CHCl_3$-Extr. Lad. 2,0mg/ml	31	16		11	16		33	16			a	1,24E+06	
	15	16		11	16		36	16			b	9,13E+05	
	30	16		20	16		35	16			c	1,78E+06	
	23	16	24,75	31	16	18,25	38	16	35,5	1		1,31E+06	4,36E+05

Probe Nr.	A			B			c						
	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Anzahl	Felder	MW bezogen auf 16 Felder	Verdünnungs-faktor	Probe Nr.	Konzentration [ml^{-1}]	Standard-abweichung
$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml	19	16		15	16		12	16			a	1,48E+07	
	17	16		18	16		18	16			b	1,63E+07	
	10	16		17	16		9	16			c	1,35E+07	
	13	16	14,75	15	16	16,25	15	16	13,5	20		1,48E+07	1,38E+06
Tag 8													
Reines BSK-II	24	16		27	16		24	16			a	4,25E+07	
	16	16		22	16		25	16			b	4,55E+07	
	20	16		15	16		23	16			c	4,90E+07	
	25	16	21,25	27	16	22,75	26	16	24,5	40		4,57E+07	3,25E+06
H_2O	18	16		25	16		20	16			a	3,85E+07	
	21	16		23	16		22	16			b	4,50E+07	
	18	16		24	16		17	16			c	3,90E+07	
	20	16	19,25	18	16	22,5	19	16	19,5	40		4,08E+07	3,62E+06
PS80 0,125%	22	16		16	16		22	16			a	4,00E+07	
	18	16		25	16		26	16			b	4,30E+07	
	16	16		20	16		25	16			c	4,70E+07	
	24	16	20	25	16	21,5	21	16	23,5	40		4,33E+07	3,51E+06
PS80 0,25%	19	16		24	16		19	16			a	3,95E+07	
	16	16		20	16		18	16			b	4,65E+07	
	24	16		26	16		23	16			c	4,20E+07	
	20	16	19,75	23	16	23,25	24	16	21	40		4,27E+07	3,55E+06
DMSO 0,125%	23	16		19	16		19	16			a	4,65E+07	
	25	16		22	16		22	16			b	4,35E+07	
	24	16		23	16		21	16			c	4,10E+07	
	21	16	23,25	23	16	21,75	20	16	20,5	40		4,37E+07	2,75E+06
DMSO 0,25%	19	16		20	16		19	16			a	3,70E+07	
	16	16		23	16		20	16			b	3,90E+07	
	19	16		17	16		15	16			c	3,50E+07	
	20	16	18,5	18	16	19,5	16	16	17,5	40		3,70E+07	2,00E+06
Ladanum 2,0mg/ml	2	16		0	16		2	16			a	7,50E+04	
	0	16		1	16		0	16			b	3,75E+04	
	3	16		1	16		0	16			c	6,25E+04	
	1	16	1,5	1	16	0,75	3	16	1,25	1		5,83E+04	1,91E+04
Ladanum 0,2mg/ml	30	16		21	16		18	16			a	5,10E+07	
	16	16		17	16		19	16			b	3,95E+07	
	28	16		22	16		24	16			c	3,90E+07	
	28	16	25,5	19	16	19,75	17	16	19,5	40		4,32E+07	6,79E+06
$CHCl_3$-Extr. Lad. 2,0mg/ml	23	16		30	16		15	16			a	6,10E+06	
	35	16		23	16		22	16			b	5,30E+06	
	25	16		28	16		19	16			c	3,50E+06	
	39	16	30,5	25	16	26,5	14	16	17,5	4		4,97E+06	1,33E+06
$CHCl_3$-Extr. Lad. 0,2mg/ml	18	16		20	16		14	16			a	3,00E+07	
	9	16		15	16		13	16			b	2,75E+07	
	19	16		12	16		20	16			c	3,05E+07	
	14	16	15	8	16	13,75	14	16	15,25	40		2,93E+07	1,61E+06

16 Weitere Diagramme der Bbss-Bestimmungen (Wiederholungsexperimente)

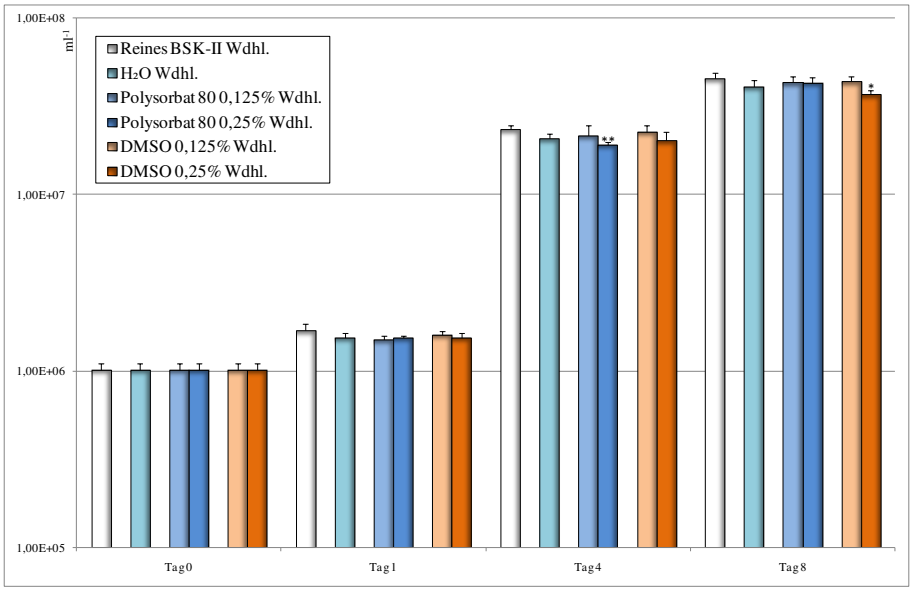


Abb. Anhang 16-1: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Aqua dest., PS80 und DMSO an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

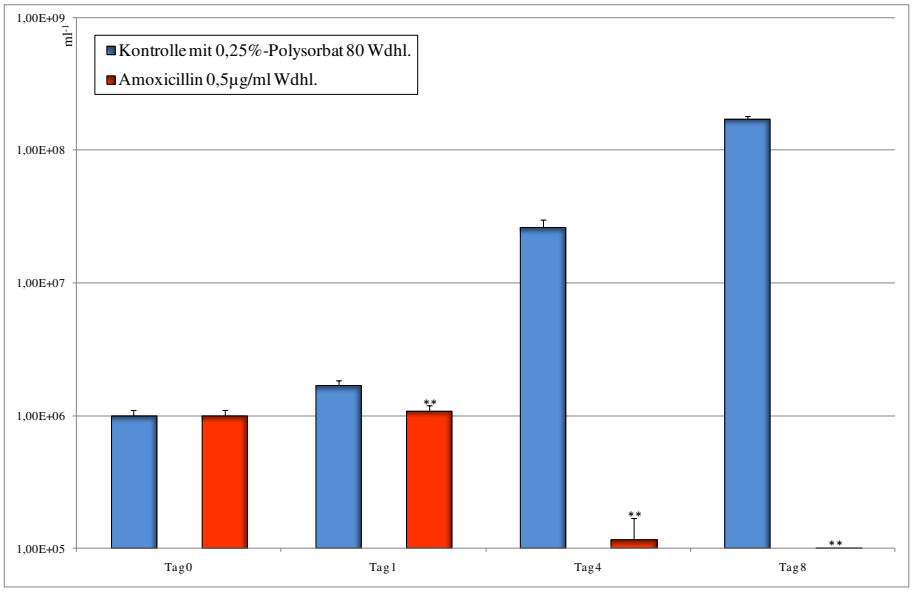


Abb. Anhang 16-2: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in „PS80-BSK-II-Medium“ und solchem mit Zusatz von Amoxicillin an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

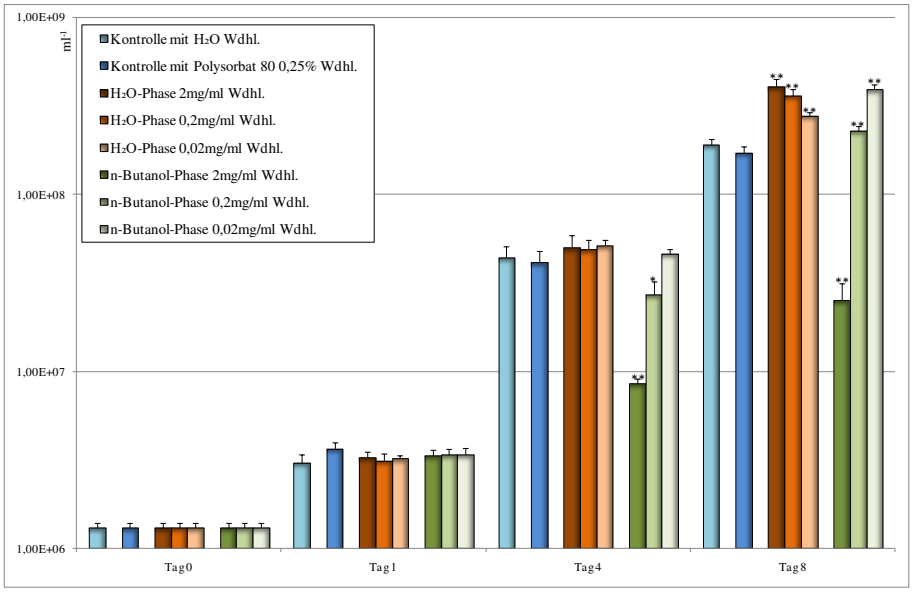


Abb. Anhang 16-3: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von PS80, H_2O- und n-But-Phase aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

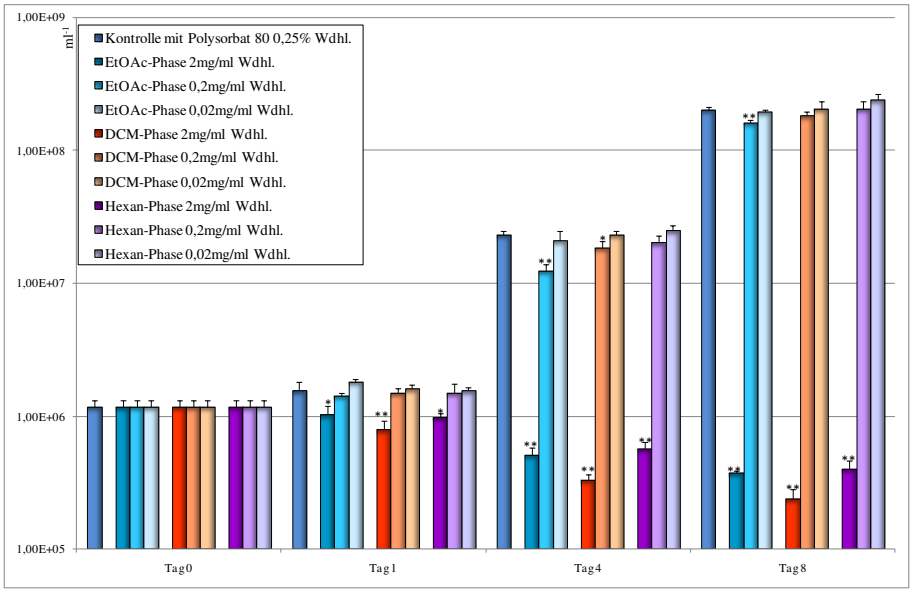


Abb. Anhang 16-4: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit EE-, DCM- und Hex-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

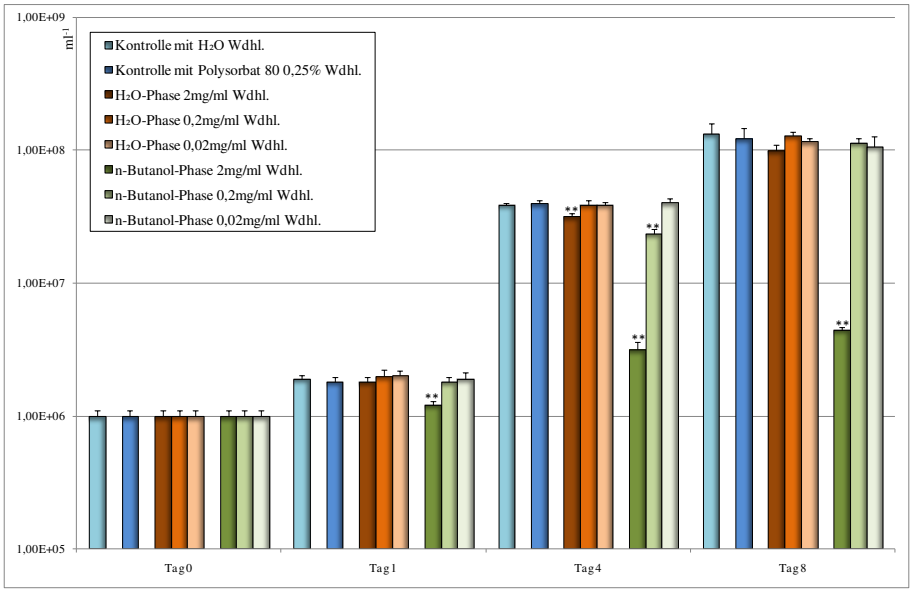


Abb. Anhang 16-5: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von PS80, H_2O- und n-But-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

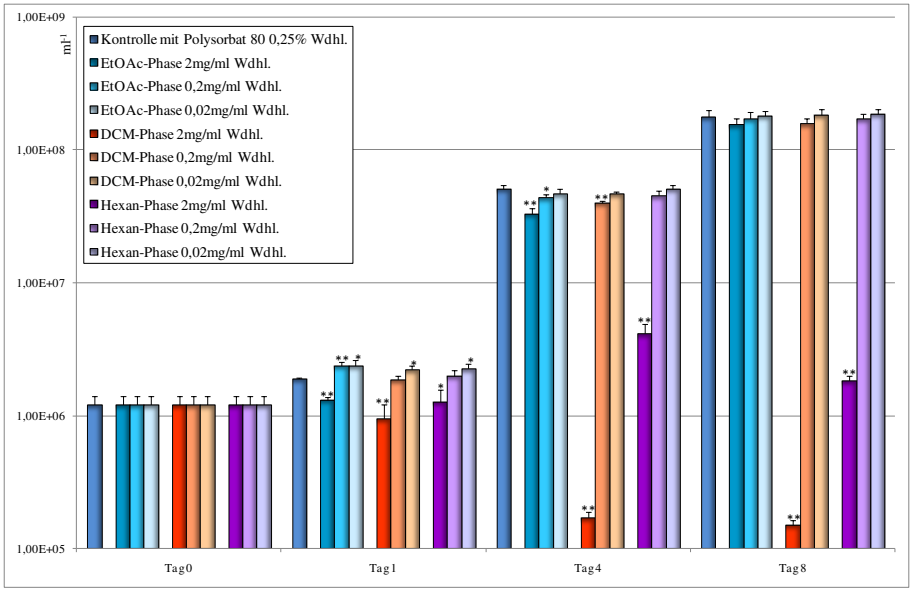


Abb. Anhang 16-6: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit EE-, DCM- und Hex-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

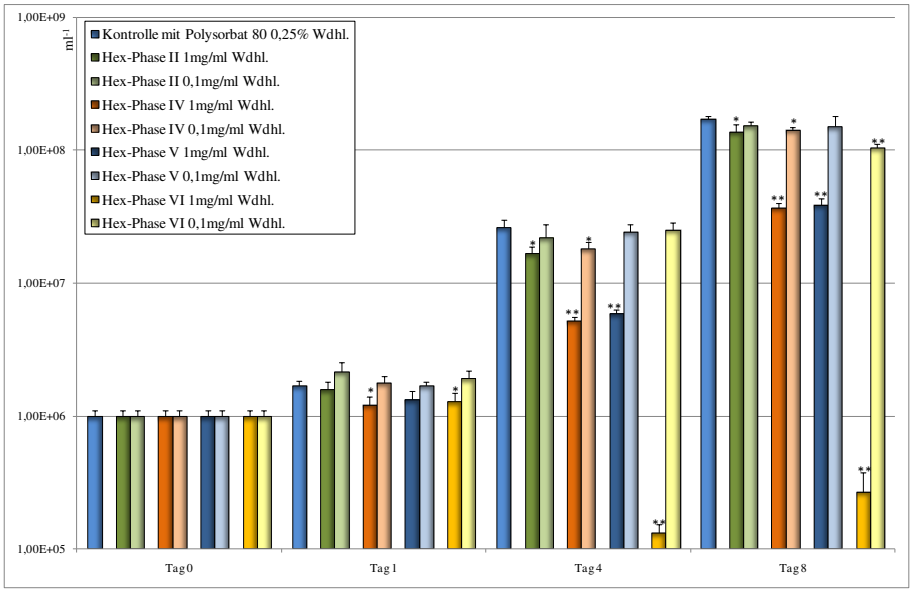


Abb. Anhang 16-7: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz der Hex-Subfraktionen II, IV, V und VI aus dem MeOH-Extrakt (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungs-experiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

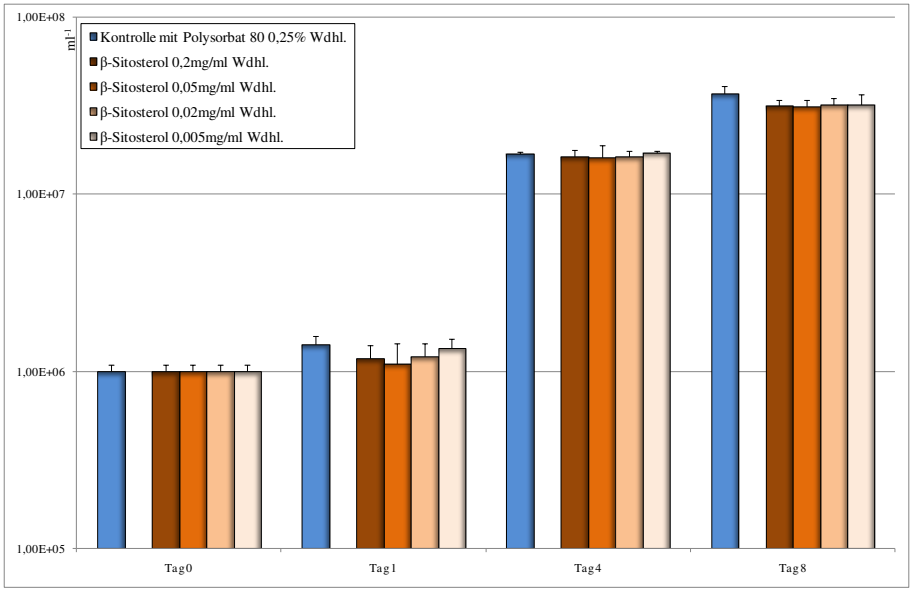


Abb. Anhang 16-8: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von β-Sitosterol (mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

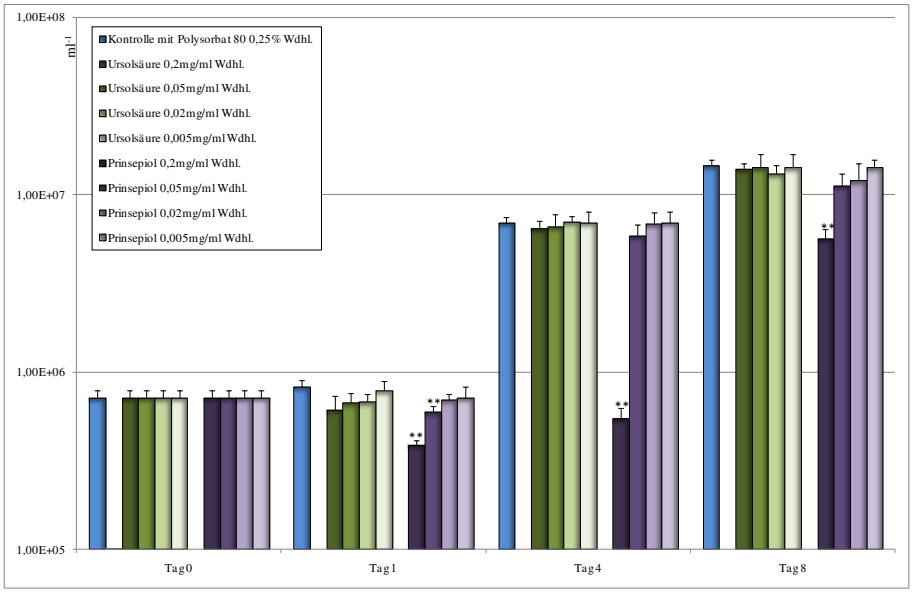


Abb. Anhang 16-9: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Ursolsäure und Prinsepiol (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

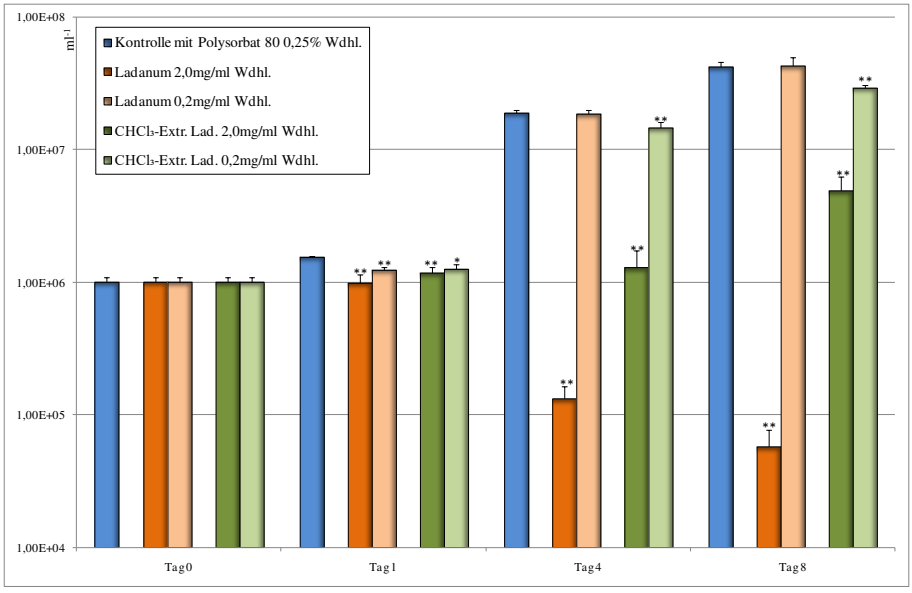


Abb. Anhang 16-10: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Ladanum und $CHCl_3$-Extrakt aus Ladanum ($CHCl_3$-Extr. Lad.) (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

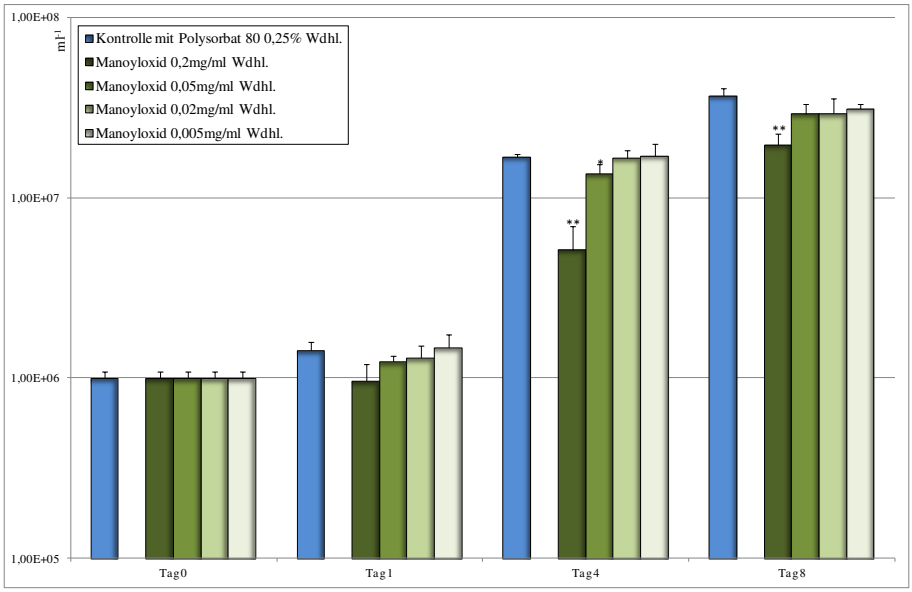


Abb. Anhang 16-11: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von *ent*-Manoyloxid (mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

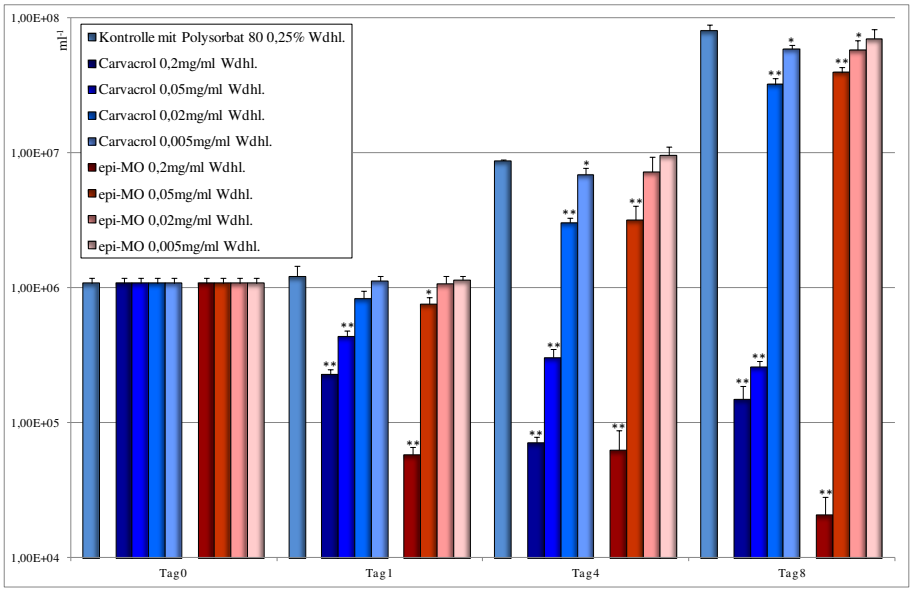


Abb. Anhang 16-12: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Carvacrol und *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

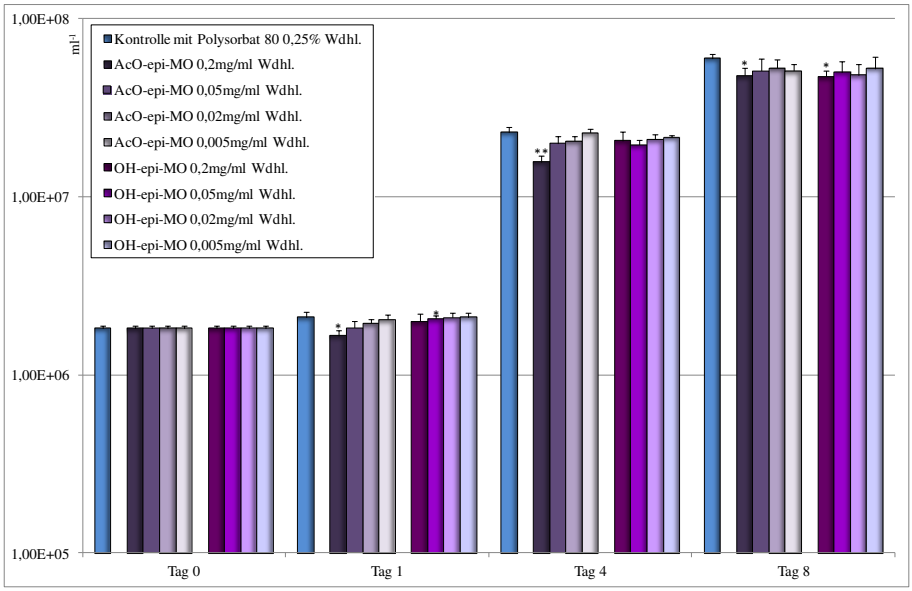


Abb. Anhang 16-13: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*- und *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

VERZEICHNISSE

17 Literaturverzeichnis

[1] W. Rothmaler und E. Jäger, Exkursionsflora von Deutschland, 19. Hrsg., Bd. 2, München: Elsevier, 2005, pp. 376-377.

[2] W. Blaschek, S. Ebel, E. Hackenthal, U. Holzgrabe, K. Keller, J. Reichling und V. Schulz, „Dipsacus," in s *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, 6. Hrsg., Bd. 6, Stuttgart u. Heidelberg, WVG u. Springer, 2007, pp. 193-194.

[3] P. A. Werner, „Predictions of fate from rosette size in teasel (Dipsacus fullonum L.)," *Oecologia,* Bd. 20, Nr. 3, pp. 197-201, 1975.

[4] H. Lenz, „Familie Karden-Pflanzen, Dipsaceen," in s *Botanik der alten Griechen und Römer*, Gotha, E.F.Thienemann, 1859, p. 467.

[5] E. Marbach, „Karde," 2012. [Online]. Available: http://pflanzen.org/pflanzen/karde.htm. [Zugriff am 10 12. 2012].

[6] K. Hiller und M. Melzig, „Dipsacus sativus (L.) Scholler und Dipsacus silvestris Huds.," in s *Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen*, Heidelberg, Spektrum, 1999, p. 253.

[7] H. Marzell, „Dipsacus fullonum L. Weber-Karde und Dipsacus silvester L. Schutt-Karde," in s *Wörterbuch der deutschen Pflanzennamen*, Bd. 2, Leipzig, Hirzel, 1972, pp. 141-152.

[8] R. Hänsel und O. Sticher, „Codebaum," in s *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, 8. Hrsg., Heidelberg, Springer, pp. 1497-1504.

[9] T. M. B. Garden., „Tropicos - Dipsacus sylvestris Huds.," [Online]. Available: http://www.tropicos.org/Name/11200148. [Zugriff am 01 06 2019].

[10] NCBI, „Taxonomy browser - Dipsacus fullonum," [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=183561&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock. [Zugriff am 01 06 2019].

[11] unbekannt, „Liste der dokumentierten traditionellen asiatischen Stoffe (Liste TAS)," 2011. [Online]. Available: http://www.swissmedic.ch. [Zugriff am 23 1. 2013].

[12] G.-C. Zhou, K. Komatsu, S. Yamaji und T. Namba, „Pharmacognostical studies on the traditional drugs used by Chinese mitority race, called 'Yi' (I) on 'A-ji-ba-mo' derived

from Dipsacus plants," *NAT. MED.,* Bd. 48, Nr. 2, pp. 131-140, 1994.

[13] H. Ullrich, „Möglichkeiten der Weberkardenzüchtung," *Theor. Appl. Genet.,* Bd. 11, Nr. 2, pp. 44-47, 1939.

[14] E. Reichl, „Kardenanbau," 2013. [Online]. Available: http://members.aon.at/heimatvereinkatsdorf/page_5_3.html. [Zugriff am 22 1. 2013].

[15] G. Hegi, „Dipsacus L. Karde," in s *Illustrierte Flora von Mitteleuropa mit besonderer Berücksichtigung von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, 1. Hrsg., Bd. 6/2, München, J. F. Lehmanns Verlag, 1914, pp. 281-286.

[16] H. Meyer, „Dipsăcus," in s *Meyers Konversations-Lexikon: Eine Encyklopädie des allgemeinen Wissens*, 6. Hrsg., Bd. 4, Leipzig und Wien, Verlag des Bibliographischen Instituts, 1885, pp. 1009-1010.

[17] J. Berendes, 1902. [Online]. Available: http://buecher.heilpflanzen-welt.de/Dioskurides-Arzneimittellehre/270.htm. [Zugriff am 22 1. 2013].

[18] U. Stoll, Das ‚Lorscher Arzneibuch', Stuttgart: Franz Steiner Verlag, 1992.

[19] G. Madaus, „Dipsacus silvester - Wilde Karde," in s *Lehrbuch der botanischen Heilmittel*, Leipzig, Thieme Verlag, 1935.

[20] E. Geissler, J. Moeller und H. Thoms, „Dipsacus," in s *Realenzyklopädie der gesamten Pharmazie*, Bd. 4, Berlin und Wien, Urban & Schwarzenberg, 1905, p. 418.

[21] M. Wood, The book of herbal wisdom, Berkeley: North Atlantic Books, 1997.

[22] W.-D. Storl, Borreliose natürlich heilen - Ethnomedizinisches Wissen, ganzheitliche Behandlung und praktische Anwendungen, Baden u. München: AT-Verlag, 2007.

[23] T. Liebold, R. Straubinger und H. Rauwald, „Growth inhibiting activity of lipophilic extracts from Dipsacus sylvestris Huds. roots against Borrelia burgdorferi s. s. in vitro.," *Pharmazie,* Bd. 66, Nr. 8, pp. 628-630, 2011.

[24] MDR-Fernsehen, 2007. [Online]. Available: http://www.mdr.de/hauptsache-gesund/4464834-hintergrund-4464614.html. [Zugriff am 2 5. 2008].

[25] A. Klott, „Fahrlässige Tipps gegen Borreliose," *Neue Zürcher Zeitung am Sonntag,* 26 8. 2007.

[26] M. Koradi, „Heilungsversprechen der fragwürdigsten Art, Pressemitteilung vom 19.08.2007," 2007. [Online]. Available: http://www.news4press.com/Karde-gegen-Borreliose---Heilungsversprechungen-der-fragwuerdigsten-Art-N_273466.html.

[Zugriff am 15 11. 2012].

[27] Borreliose Bund Deutschland e.V., „Strohhalme und andere Hoffnungsschimmer," *Borreliose Magazin,* Bd. 13, p. 5, 2006.

[28] V. Picci, „The exploitation of medicinal plants of the Mediterranean area," *J. Ethnopharmacol.,* Bd. 2, Nr. 1, pp. 81-89, 1980.

[29] M. Leporatti und A. Pavesi, „New or uncommon uses of several medicinal plants in some areas of central Italy," *J. Ethnopharmacol.,* Bd. 29, Nr. 2, pp. 213-223, 1990.

[30] A. Kowalczyk und J. Krzyzanowska, „Preliminary antifungal activity of some Dipsacaceae family plants.," *Herba Polonica,* Bd. 45, pp. 101-107, 1999.

[31] F. Tillequin, R. Tundis, B. Deguin, M. Loizzo, M. Bonesi, F. Menichini, F. Conforti, M. Marrelli, G. Statti und F. Menichini, „The in vitro screening for hypoglycemic and antihypertensive activities of Dipsacus fullonum L," *Planta Med.,* Bd. 74, Nr. 9, pp. 956-957, 2008.

[32] multi MED vision GbR, 2012. [Online]. Available: http://buecher.heilpflanzen-welt.de/BGA-Kommission-E-Monographien/. [Zugriff am 2 8. 2012].

[33] C. Hempen und T. Fischer, „Dipsaci Radix Xuduan," in s *Leitfaden Chinesische Phytotherapie*, 2 Hrsg., München, Jena, Urban & Fischer/Elsevier, 2006, pp. 762-763.

[34] A. Körfers und Y. Sun, „Dipsaci Radix - Chinesische Kardenwurzelv - Xù Duán," in s *Traditionelle Chinesische Medizin*, Stuttgart, WVG, 2009, pp. 274-275.

[35] H. Wagner, R. Bauer, D. Melchart, P.-G. Xiao und A. Staudinger, „Dipsaci Radix," in s *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines*, Wien, Springer, 2011, pp. 677-689.

[36] E. Stöger, „Dipsaci Radix - Chinesische Kardenwurzel Xuduan," in s *Arzneibuch der Chinesischen Medizin*, Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag, 2003, pp. 1-4.

[37] T. Hung, M. Na, P. Thuong, N. Su, D. Sok, K. Song, Y. Seong und K. Bae, „Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of Dipsacus asper Wall," *J. Ethnopharmacol.,* Bd. 108, Nr. 2, pp. 188-192, 2006.

[38] S.-S. Kim, R.-Y. Park, H.-J. Jeon, Y.-S. Kwon und W. Chun, „Neuroprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells," *Phytother. Res.,* Bd. 19, Nr. 3, pp. 243-245, 2005.

[39] Z.-J. Zhang, Y.-H. Qian, H.-T. Hu, J. Yang und G.-D. Yang, „The herbal medicine

Dipsacus asper Wall extract reduces the cognitive deficits and overexpression of ?-amyloid protein induced by aluminum exposure," *Life Sci.,* Bd. 73, Nr. 19, pp. 2443-2454, 2003.

[40] Y. Qian, Y. Liu, H. Hu, H. Ren, X. Chen und J. Xu, „The effects of the total saponin of Dipsacus asperoides on the damage of cultured neurons induced by beta-amyloid protein 25-35.," *Anat Sci Int,* Bd. 77, Nr. 3, pp. 196-200, 2002.

[41] Y. Qian, J. Yang, H. Hu, Y. Liu, G. Yang, Y. Cao und H. Ren, „The protective effects of the total saponin of Dipsacus asperoides on the apoptosis of hippocampal neurons induced by β-amyloid protein," *Acad. J. Xi'An Jiaotong Univ.,* Bd. 16, Nr. 1, pp. 30-34, 2004.

[42] Q. Yihua, R. Huimin, H. Haitao, L. Yong, Y. Guangde und W. Chunmei, „Effect of the total saponin of dipsacus asper on intracellular free calcium concentration in the cellular model of Alzheimer's disease - Scanning confocal microscopy," *J. Xi'An Med. Univ. Engl. Ed.,* Bd. 13, Nr. 2, pp. 159-163, 2001.

[43] H.-W. Suh, D.-K. Song, S.-O. Huh, K.-H. Son und Y.-H. Kim, „Antinociceptive mechanisms of Dipsacus saponin C administered intrathecally in mice," *J. Ethnopharmacol.,* Bd. 71, Nr. 1-2, pp. 211-218, 2000.

[44] H.-W. Suh, D.-K. Song, K.-H. Son, M.-B. Wei, K.-H. Lee, K.-Y. Jung, J.-C. Do und Y.-H. Kim, „Antinociceptive mechanisms of Dipsacus saponin C administered intracerebroventricularly in the mouse," *Gen. Pharmacol.,* Bd. 27, Nr. 7, pp. 1167-1172, 1996.

[45] T. Hung, Y. Wen, T. Phuong, S. Kyung, H. Yeon und K. Bae, „Cytotoxic saponins from the root of Dipsacus asper wall," *Arch. Pharmacal Res.,* Bd. 28, Nr. 9, pp. 1053-1056, 2005.

[46] R. Wong, A. Rabie und E. Hägg, „The effect of crude extract from Radix Dipsaci on bone in mice," *Phytother. Res.,* Bd. 21, Nr. 6, pp. 596-598, 2007.

[47] C.-H. Yao, H.-M. Tsai, Y.-S. Chen und B.-S. Liu, „Fabrication and evaluation of a new composite composed of tricalcium phosphate, gelatin, and Chinese medicine as a bone substitute," *J. Biomed. Mater. Res., Part B,* Bd. 75B, Nr. 2, pp. 277-288, 2005.

[48] S.-R. Oh, K. Jung, K. Son, S. Park, I. Lee, K. Ahn und H.-K. Lee, „In vitro anticomplementary activity of hederagenin saponins isolated from roots of Dipsacus asper," *Arch. Pharmacal Res.,* Bd. 22, Nr. 3, pp. 317-319, 1999.

[49] Y. Zhang, H. Kiyohara, T. Matsumoto und H. Yamada, „Fractionation and chemical properties of immunomodulating polysaccharides from roots of dipsacus asperoides," *PLANTA MED.,* Bd. 63, Nr. 5, pp. 393-399, 1997.

[50] W.-D. Storl, „Kein Kraut gegen Borreliose," *Natürlich,* Bd. 4, pp. 48-54, 2004.

[51] P. Lys, „Recherches biochimiques sur les Dipsacacées du Liban et de la Syrie," *Notes et Mém. sur le Moyen-Orient,* Nr. 5, pp. 1-136, 1951-1954.

[52] V. Plouvier, „β-Methyl glucoside in some Dipsacaceae and Rhamnaceae.," *Compt. Rend.Compt. Rend.,* Bd. 256, pp. 1397-1399, 1963.

[53] R. Hegnauer, „Dipsacaceae," in s *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 4, Basel u. Stuttgart, Birkhäuser Verlag, 1966, pp. 23-31.

[54] S. Nolasco, O. Quiroga, B. Wiese und M. Vigo, „Chemical study of medicinal plant seeds.," *Acta Horticulturae,* Bd. 501, pp. 209-217, 1999.

[55] O. Aurich, S. Danert, K. Puiahl, A. Romeike, H. Rönsch, K. Schreiber und G. Sembdner, „Phytochemische Untersuchungen an Pflanzen der einheimischen Flora und des Gaterslebener Sortiments," *Genetic Resources and Crop Evolution (Die Kulturpflanze),* Bd. 14, pp. 447-494, 1966.

[56] H. Ripperger, „Formation of cantleyine as an artifact in the workup of Dipsacus silvestris.," *Pharmazie,* Bd. 35, p. 235, 1980.

[57] T. Tammes, „Dipsacan and Dipsacotin, a new chromogen and a new colouring-matter of Dipsaceae," *Proc. Sect. Sc. Kon. Ak. Wet. Amst,* Bd. 11, pp. 509-511, 1909.

[58] R. Hegnauer, „Die Pseudoindikane der Dikotyledonen und einige ihnen nahestehende Verbindungen," in s *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 3, Basel u. Stuttgart, Birkhäuser Verlag, 1964, pp. 29-33.

[59] S. Jensen, S. Lyse-Petersen und B. Nielsen, „Novel bis-iridoid glucosides from Dipsacus sylvestris.," *Phytochemistry,* Bd. 18, pp. 273-277, 1979.

[60] D. Frohne und U. Jensen, „Systematik des Pflanzenreichs," 5. Hrsg., Stuttgart, WVG, 1998, p. 268.

[61] X. Y. Tian, Y. H. Wang, S. S. Yu und W. S. Fang, „Two novel tetrairidoid glucosides from Dipsacus asper," *Organic Letters,* Bd. 8, Nr. 10, pp. 2179-2182, 2006.

[62] G. Barger, „Saponarin, ein neues, durch Jod blau gefärbtes Glykosid aus Saponaria.," *Colloid & Polymer Science,* Bd. 1, Nr. 8, p. 249, 1902.

[63] V. Plouvier, „Flavone heterosides: kaempferol 3-rhamnoglucoside, myricitrin, linarin, and saponarin.," *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences, Serie D: Sciences Naturelles,* Bd. 262, pp. 1368-1371, 1966.

[64] R. Hegnauer, „Dipsacaceae," in s *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 8, Basel und Boston und Berlin, Birkhäuser Verlag, 1989, pp. 389-392.

[65] M. Kuhtinskaja und M. Vaher, „Extraction and Analysis of Bioactive Compounds from Dipsacus Fullonum and Galium Verum for Lyme Borreliosis Treatment," *Biomed J Sci & Tech Res,* Bd. 11, Nr. 4, pp. 8614-8616, 2018.

[66] K. Jung, K. Son und J. Do, „Triterpenoids from the roots of Dipsacus asper," *Arch. Pharmacal Res.,* Bd. 16, Nr. 1, pp. 32-35, 1993.

[67] K. Jung, J. Do und K. Son, „Triterpene glycosides from the roots of Dipsacus asper," *J Nat Prod,* Bd. 56, Nr. 11, pp. 1912-1916, 1993.

[68] Z.-C. Miao, R. Feng und F. Wei, „Application of novel selective 1H NMR techniques to the structural determination of a new triterpenoid glycoside," *J. Chin. Chem. Soc.,* Bd. 57, Nr. 7, pp. 806-807, 1999.

[69] Y. Zhang und Z. Xue, „Studies on the chemical constituents of Dipsacus asper Wall," *Yao Xue Xue Bao = Acta pharmaceutica Sinica,* Bd. 26, Nr. 9, pp. 676-681, 1991.

[70] Y. Zhang und Z. Xue, „Structure determination of saponin IX and X from Dipsacus asper Wall," *Yao Xue Xue Bao = Acta pharmaceutica Sinica,* Bd. 27, Nr. 12, pp. 912-917, 1992.

[71] Y. Zhang und Z. Xue, „Structure determination of saponin XI, XII and XIII from Dipsacus asper Wall," *Yao Xue Xue Bao = Acta pharmaceutica Sinica,* Bd. 28, Nr. 5, pp. 358-363, 1993.

[72] X.-Y. Tian, Y.-H. Wang, H.-Y. Liu, S.-S. Yu und W.-S. Fang, „On the chemical constituents of Dipsacus asper," *Chem. Pharm. Bull.,* Bd. 55, Nr. 12, pp. 1677-1681, 2007.

[73] H.-G. Tan, S. Lin, Q.-W. Zhang und L. Ji, „Determination of akebia saponin D in root of Dipacus asperoides by HPLC," *Zhongguo Zhongyao Zazhi,* Bd. 31, Nr. 9, pp. --, 2006.

[74] I. Kauno, A. Tsuboi, M. Nanri und N. Kawano, „Acylated triterpene glycoside from roots of Dipsacus asper," *Phytochemistry,* Bd. 29, Nr. 1, pp. 338-339, 1990.

[75] I. Schönfelder und P. Schönfelder, „Graubehaarte Zistrose," in s *Das neue Handbuch der Heilpflanzen*, Stuttgart, Kosmos, WVG, 2004, p. 133.

[76] J. Velenovský, „Dauer der Blüten," in s *Vergleichende Morphologie der Pflanzen*, Bd. 3, Prag, Verlagsbuchhandlung von Fr. Rivnac, 1910, p. 1036.

[77] F. Hayne, J. Brandt und J. Ratzeburg, „Cistus creticus," in s *Getreue Darstellung und Beschreibung der in der Arzneykunde gebräuchlichen Gewächse, wie auch solcher, welche mit ihnen verwechselt werden können*, Bd. 13, Berlin, 1837.

[78] hortipedia, 2013. [Online]. Available: http://de.hortipedia.com/wiki/Cistus_creticus. [Zugriff am 4. 11. 2012].

[79] R. Sweet, „Cistus creticus. Creten Rock-Rose.," in s *Cistinae: The natural order of cistus, or rock-rose*, London, James Ridgway, 1830, pp. 112-113.

[80] MathKnight, „(Eigenes Werk) [CC-BY-SA-3.0 (http://creativecommons.org/licenses /by-sa/3.0) oder GFDL (http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html)], via Wikimedia Commons".

[81] E. Reinhard, T. K. W. Dingermann und H. Rimpler, „Abteilung: Spermatophyta," in s *Pharmazeutische Biologie*, 6 Hrsg., Stuttgart, WVG, 2001, pp. 545-594.

[82] NCBI, „Taxonomy browser - Cistus creticus," [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info &id=191224&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock. [Zugriff am 01 06 2019].

[83] T. M. B. Garden., „Tropicos - Cistus creticus L.," [Online]. Available: http://www.tropicos.org/Name/7600218. [Zugriff am 01 06 2019].

[84] H. Genaust, „ladánifer(Cistus)," in s *Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen*, 3 Hrsg., Basel, Boston, Berlin, Birkhäuser, 1996, p. 322.

[85] J.-P. Demoly, „Notes taxonomiques, chronologiques et nouveautés nomenlaturales pour le genre Cistus L. élargi, includant Halimium (Dunal) Spach (Cistaceae)," *Acta Bot. Gallica,* Bd. 153, Nr. 3, pp. 309-323, 2006.

[86] K. Hiller und M. Melzig, „Cistus-Arten," in s *Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen*, Heidelberg, Spektrum, 1999, p. 197.

[87] Info Flora, [Online]. Available: http://www.infoflora.ch/de/flora/546-cistus-salviifolius.html#map. [Zugriff am 3 2. 2013].

[88] „1. Mose 37, 25," in s *Die Bibel (Einheitsübersetzung)*, Stuttgart, Katholisches

Bibelwerk, 1962-1980.

[89] „1. Mose 43, 11," in s *Die Bibel (Einheitsübersetzung)*, Stuttgart, Katholisches Bibelwerk, 1962-1980.

[90] J. Berendes, 1902. [Online]. Available: http://buecher.heilpflanzen-welt.de/Dioskurides-Arzneimittellehre/112.htm. [Zugriff am 22 1. 2013].

[91] X. Landerer, „Ueber den Unterschied zwischen Labdanum creticum und Labdanum cypricum," in s *Archiv der Pharmacie*, 7 Hrsg., Hannover, Hahn'sche Hofbuchhandlung, 1857.

[92] E. Anthon, „Labdanum," in s *Handwörterbuch der chemisch-pharmazeutischen und pharmakognostischen Nomenklaturen oder Uebersicht aller lateinischen, deutschen und französischen Benennungen der chemisch-pharmazeutischen Präparate, so wie der im Handel vorkommenden rohen Arzneistoffe*, Nürnberg, J. L. Schrag, 1833, pp. 194-195.

[93] P. Geiger, „Zweihundertachtundvierzigste Gattung: Cistus (Cist-Rose)," in s *Handbuch der Pharmacie*, Heidelberg, A. Osswald, 1829, pp. 1126-1130.

[94] X. Landerer, „Pharmakologische Notizen: Über die Bereitung des Labdanums auf der Insel Cypern," *Archiv der Pharmacie,* pp. 163-165, 1852.

[95] E. Winkler, „Ladanum," in s *Vollständiges Real-Lexikon der medicinisch-pharmaceutischen Naturgeschichte und Rohwaarenkunde*, Leipzig, F.A.Brockhaus, 1840, pp. 880-881.

[96] C. Kissel, „Gummi ladanum," in s *Handbuch der physiologischen Arzneiwirkungslehre*, Tübingen, Laupp & Siebeck, 1856, p. 430.

[97] W. Lustig, 2003. [Online]. Available: http://www.staff.uni-mainz.de/lustig/kolokasia/xronika.pdf. [Zugriff am 26 12 2012].

[98] J. Berendes, 1902. [Online]. Available: http://buecher.heilpflanzen-welt.de/Dioskurides-Arzneimittellehre/111.htm. [Zugriff am 9 1. 2012].

[99] G. Madaus, 1938. [Online]. Available: http://212.185.118.226/publlehrbuch/xml/Frame.asp?D=10031006.xml&S=CISTUS. [Zugriff am 27 1. 2013].

[100] E. Geissler, J. Moeller und H. Thoms, „Cistus," in s *Realenzyklopädie der gesamten Pharmazie*, Bd. 4, Berlin und Wien, Urban & Schwarzenberg, 1905, pp. 13-14.

[101] T. Hückel, „Welche wissenschaftlich belegten Anwendungsgebiete existieren für

Zistrosentee bzw. -zubereitungen?," *Informationsblatt der Sächsischen Landesapothekerkammer,* Nr. 1, pp. 34-37, 2009.

[102] K. Dimas, C. Demetzos, D. Angelopoulou, A. Kolokouris und T. Mavromoustakos, „Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro," *Pharmacol. Res.,* Bd. 42, Nr. 5, pp. 475-478, 2000.

[103] D. Angelopoulou, C. Demetzos, C. Dimas, D. Perdetzoglou und L. A., „Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of Cistus monspeliensis. Cytotoxic activity of ent-13-epi-manoyl oxide and its isomers," *Planta Med,* Bd. 67, Nr. 2, pp. 168-171, 2001.

[104] E. Küpeli, D. Orhan und E. Yesilada, „Effect of Cistus laurifolius L. leaf extracts and flavonoids on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice," *J Ethnopharmacol.,* Bd. 103, Nr. 3, pp. 455-460, 2006.

[105] F. Petereit, A. Nahrstedt, B. Innerlich, N.-P. Lüpke, N. Theissen, F. Kemper und H. Winterhoff, „Antiinflammatory activity of the traditionally used herb of Cistus incanus," *Planta Med.,* Bd. 55, Nr. 7, p. 650, 1989.

[106] M. Loizzo, M. Jemia, F. Senatore, M. Bruno, F. Menichini und R. Tundis, „Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five Cistus species essential oils," *Food Chem Toxicol.,* Bd. 59, pp. 586-594, 2013.

[107] A. Güvenç, S. Yıldız, A. M. Özkan, C. S. Erdurak, M. Coşkun, G. Yılmaz, G. Okuyama und Y. Okada, „Antimicrobiological Studies on Turkish Cistus Species," *Pharmaceutical Biology,* Bd. 43, Nr. 2, pp. 178-183, 2005.

[108] S. Ferreira, J. Santos, A. Duarte, A. Duarte, J. Queiroz und F. Domingues, „Screening of antimicrobial activity of Cistus ladanifer and Arbutus unedo extracts," *Nat Prod Res.,* Bd. 26, Nr. 16, pp. 1558-1560, 2012.

[109] E. Guinoiseau, V. Lorenzi, A. Luciani, F. Tomi, J. Casanova und L. Berti, „Susceptibility of the multi-drug resistant strain of Enterobacter aerogenes EA289 to the terpene alcohols from Cistus ladaniferus essential oil," *Nat Prod Commun.,* Bd. 6, Nr. 8, pp. 1159-1162, 2011.

[110] O. Ustün, B. Ozçelik, Y. Akyön, U. Abbasoglu und E. Yesilada, „Flavonoids with anti-Helicobacter pylori activity from Cistus laurifolius leaves," *J Ethnopharmacol.,* Bd. 108, Nr. 3, pp. 457-461, 2006.

[111] L. Tomás-Menor, A. Morales-Soto, E. Barrajón-Catalán, C. Roldán-Segura, A. Segura-Carretero und V. Micol, „Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish Cistus species," *Food Chem Toxicol,* Bd. 55, pp. 313-322, 2013.

[112] C. Demetzos, H. Katerinopoulos, A. Kouvarakis, N. Stratigakis, A. Loukis, C. Ekonomakis, V. Spiliotis und J. Tsaknis, „Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Cistus creticus subsp. eriocephalus," *Planta Med,* Bd. 63, Nr. 5, pp. 477-479, 1997.

[113] I. Chinou, C. Demetzos, C. Harvala, C. Roussakis und J. Verbist, „Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of Cistus incanus subsp. creticus," *Planta Med,* Bd. 60, Nr. 1, pp. 34-36, 1994.

[114] H. Bouamama, T. Noël, J. Villard, A. Benharref und M. Jana, „Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan Cistus L. species," *J Ethnopharmacol,* Bd. 104, Nr. 1-2, pp. 104-107, 2006.

[115] A. Hutschenreuther, C. Birkemeyer, K. Grötzinger, R. Straubinger und H. Rauwald, „Growth inhibiting activity of volatile oil from Cistus creticus L. against Borrelia burgdorferi s.s. in vitro," *Pharmazie,* Bd. 65, Nr. 4, pp. 290-295, 2010.

[116] J. Berzelius, Lehrbuch der Chemie, aus dem Schwedischen übersetzt von Wöhler, F., Bd. 3, Dresden: Arnoldische Buchhandlung, 1827.

[117] W. Blaschek, S. Ebel, E. Hackenthal, U. Holzgrabe, K. Keller, J. Reichling und V. Schulz, „Cistus," in s *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, 6 Hrsg., Stuttgart u. Heidelberg, WVG u. Springer, 2007, pp. 764-766.

[118] E. Kalpoutzakis, I. Chinou, S. Mitaku, A. Skaltsounis und C. Harvala, „Antibacterial Labdane-type Diterpenes from the Resin "Ladano" of Cistus creticus subsp. creticus," *Nat Prod Lett,* Bd. 11, Nr. 3, pp. 173-179, 1998.

[119] H. Greche, N. Mrabet, S. Zrira, M. Ismaïlli-Alaoui, B. Benjilali und A. Boukir, „The Volatiles of the Leaf Oil of Cistus ladanifer L. var. albiflorus and Labdanum Extracts of Moroccan Origin and their Antimicrobial Activities," *J Essent Oil Res,* Bd. 21, Nr. 2, pp. 166-173, 2009.

[120] J. Alías, A. Simonet, A. Torres, T. Sosa, N. Chaves und F. Macías, „Determination of the allelopathic activity of diterpenes of the exudate of Cistus ladanifer," in s *Fourth World Congress on Allelopathy*, Charles Sturt University, Australia, 2005.

[121] A. Danne, F. Petereit und A. Nahrstedt, „Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from Cistus salvifolius," *Phytochemistry,* Bd. 37, Nr. 2, pp. 533-538, 1994.

[122] E. Barrajón-Catalán, S. Fernández-Arroyo, C. Roldán, E. Guillén, D. Saura, A. Segura-Carretero und V. Micol, „A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several Cistus genus species: evolutionary relationship," *Phytochem Anal.,* Bd. 22, Nr. 4, pp. 303-312, 2011.

[123] R. Hegnauer, „Cistaceae," in s *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 8, Basel und Boston und Berlin, Birkhäuser Verlag, 1989, pp. 246-249.

[124] J. Alías, T. Sosa, C. Valares, J. Escudero und N. Chaves, „Seasonal Variation of Cistus ladanifer L. Diterpenes," *Plants,* Bd. 1, Nr. 1, pp. 6-15, 2012.

[125] T. Sosa, J. Alías, J. Escudero und N. Chaves, „Oxocativic acid: the diterpene possibly responsible for the allelopathic activity of Cistus ladanifer," 2005.

[126] J. Alías, A. Simonet, A. Torres, T. Sosa, N. Chaves und F. Macías, „Determination of the allelopathic activity of diterpenes of the exudate of Cistus ladanifer," 2005.

[127] D. Angelopoulou, C. Demetzos und D. Perdetzoglou, „Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from Cistus monspeliensis L. leaves," *Biochemical Systematics and Ecology,* Bd. 30, Nr. 3, pp. 189-203, 2002.

[128] C. Demetzos, T. Anastasaki und D. Perdetzoglou, „A chemometric interpopulation study of the essential oils of Cistus creticus L. growing in Crete (Greece)," *Z Naturforsch C,* Bd. 57, Nr. 1-2, pp. 89-94, 2002.

[129] J. Paolini, A. Falchi, Y. Quilichini, J. Desjobert, M. Cian, L. Varesi und J. Costa, „Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of Cistus creticus L. (C. creticus subsp. eriocephalus and C. creticus subsp. corsicus)," *Phytochemistry,* Bd. 70, Nr. 9, pp. 1146-1160, 2009.

[130] K. Grötzinger, C. Birkemeyer, M. Kuzminska und H. Rauwald, „Isolation and identification of antispirochetal labdane-type manoyloxides from Cistus creticus L. by novel TLC-extractor/MS and GC/MS," *Planta Med,* Bd. 76, p. P245, 2010.

[131] J. Cocker und T. Halsall, „The chemistry of gum labdanum. Part II. The structure of labdanolic acid," *J. Chem. Soc.,* pp. 4262-4271, 1956.

[132] P. Weyerstahl, H. Marschall, M. Weirauch, K. Thefeld und H. Surburg, „Constituents of commercial Labdanum oil," *Flavour Frag J,* Bd. 13, Nr. 5, pp. 295-318, 1998.

[133] W. Burgdorfer, A. Barbour und S. Hayes, „Lyme disease - A tick-borne spirochetosis?," *SCIENCE,* Bd. 216, Nr. 4552, pp. 1317-1319, 1982.

[134] A. Barbour, W. Burgdorfer und S. Hayes, „Isolation of cultivable spirochete from Ixodes ricinus ticks of Switzerland," *CURR. MICROBIOL.,* Bd. 8, Nr. 2, pp. 123-126, 1983.

[135] U. Fischer und B. Siegmund, Borreliose - Zeckeninfektion mit Tarnkappe, 5 Hrsg., Stuttgart: Hirzel, 2007.

[136] M. Sievers, T. Wermelinger, C. Tanner, A. Stein, P. Keller, R. Jaeggi, M. Dobec, F. Käppeli und R. Geertsen, „Zecken! Gefahr und Schutz," *Zecken,* pp. 1-8, 5 2006.

[137] Z. Hubálek und J. Halouzka, „Prevalence rates of Borrelia burgdorferi sensu lato in host-seeking Ixodes ricinus ticks in Europe," *Parasitol. Res.,* Bd. 84, Nr. 3, pp. 167-172, 1998.

[138] R. Straubinger, „Durch Zecken übertragene Infektionen: Lyme-Borreliose, Anaplasmose, ...," 2007.

[139] G. Wang, A. van Dam, I. Schwartz und J. Dankert, „Molecular typing of Borrelia burgdorferi sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications.," *Clin. Microbiol. Rev.,* Bd. 12, Nr. 4, pp. 633-653, 1999.

[140] T. Masuzawa, „Terrestrial distribution of the lyme borreliosis agent Borrelia burgdorferi sensu lato in East Asia," *Jpn. J. Infect. Dis.,* Bd. 57, Nr. 6, pp. 229-235, 2004.

[141] M. Ferdows und A. Barbour, „Megabase-sized linear DNA in the bacterium Borrelia burgdorferi, the Lyme disease agent," *PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A.,* Bd. 86, Nr. 15, pp. 5969-5973, 1989.

[142] M. Redenbach und J. Altenbuchner, „Warum haben einige Bakterien lineare Chromosomen und Plasmide?," *Biospektrum,* Bd. 8, Nr. 2, pp. 158-163, 2002.

[143] C. Eggers, B. Kimmel, J. Bono, A. Elias, P. Rosa und D. Samuels, „Transduction by ΦBB-1, a bacteriophage of Borrelia burgdorferi," *J. Bacteriol.,* Bd. 183, Nr. 16, pp. 4771-4778, 2001.

[144] I. Krupka, Infektionen mit Borrelia burgdorferi sensu lato und deren serologischer Nachweis mittels spezifischer C6-Peptide bei Hunden sowie im murinen Infektionsmodell, Leipzig, 2010.

[145] I. Chary-Valckenaere, B. Jaulhac, J. Champigneulle, Y. Piemont., D. Mainard und J. Pourel, „Ultrastructural demonstration of intracellular localization of Borrelia burgdorferi in Lyme arthritis," *Br. J. Rheumatol.,* Bd. 37, Nr. 4, pp. 468-470, 1998.

[146] J. Livengoo und R. Gilmore Jr, „Invasion of human neuronal and glial cells by an infectious strain of Borrelia burgdorferi," *Microbes Infect.,* Bde. %1 von %214-15, Nr. 8, pp. 2832-2840, 2006.

[147] R. Kelly, „Cultivation of Borrelia hermsi," *Science,* Bd. 173, Nr. 3995, pp. 443-444, 1971.

[148] H. Stoenner, T. Dodd und C. Larsen, „Antigenic variation of Borrelia hermsii," *J. Exp. Med.,* Bd. 156, Nr. 5, pp. 1297-1311, 1982.

[149] A. Barbour, „Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes," *Yale J. Biol. Med.,* Bd. 57, Nr. 4, pp. 521-525, 1984.

[150] E. Güner, N. Hashimoto, T. Kadosaka, Y. Imai und T. Masuzawa, „A novel, fast-growing Borrelia sp. isolated from the hard tick Hyalomma aegyptium in Turkey," *Microbiology,* Bd. 149, Nr. 9, pp. 2539-2544, 2003.

[151] A. Steere, S. Malawista, D. Snydman, R. Shope, W. Andiman, M. Ross und F. Steele, „Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities," *Arthritis Rheum.,* Bd. 20, Nr. 1, pp. 7-17, 1977.

[152] M. Maiwald, „Lyme-Borreliose - ein neues "Chamäleon" unter den Infektionskrankheiten," *BIOforum,* Bd. 16, pp. 102-107, 1993.

[153] Robert-Koch-Institut, „Lyme-Borreliose - RKI-Ratgeber für Ärzte," *Epidemiologisches Bulletin,* Nr. 17, pp. 147-151, 4 2007.

[154] Deutsche Gesellschaft für Neurologie (S. Rauer et al.), 09 2012. [Online]. Available: http://www.dgn.org/component/content/article/45-leitlinien-der-dgn-2012/2394-ll-36-2012-neuroborreliose.html?q=borreliose. [Zugriff am 03 09 2014].

[155] R. v. Baehr, W. Berghoff, H. Bennefeld, H. Gabel, F. Hartmann und W. Heesch, 2008. [Online]. Available: http://www.borreliose.me/mediapool/77/776837/data/Empfehlungen.pdf. [Zugriff am 20 12. 2012].

[156] Rote Liste® Service GmbH, 2012. [Online]. Available: www.rote-liste.de. [Zugriff am 24 1. 2013].

[157] Robert-Koch-Institut, „Empfehlungen der ständigen Impfkommission (STIKO) am

Robert-Koch-Institut," *Epidem. Bull.,* Nr. 30, pp. 267-286, 7 2007.

[158] Beckman Coulter, Inc., 2013. [Online]. Available: http://www.beckmancoulter.de/beckman2_media/Life+Sciences/Produkte/Instrumente/Kapillarelektrophorese/Analyse+kleiner+Molek%C3%BCle/Produkte/PACE+MDQ+(DAD)/Brosch%C3%BCren/CE+Katalog.pdf. [Zugriff am 1 3. 2013].

[159] Ph. Eur. 9 Ausgabe, Grundwerk, 2017, pp. 397-398.

[160] K. Bauer, L. Gros und W. Sauer, Dünnschicht-Chromatographie - Eine Einführung, Heidelberg: Hüthig, 1989, p. 6.

[161] L. Zechmeister und L. v. Cholnoky, „Dreißig Jahre Chromatographie," *Monatshefte für Chemie,* Bd. 68, Nr. 1, pp. 68-80, 1936.

[162] W. C. Still, M. Kahn und A. Mitra, „Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution," *J. Org. Chem.,* Bd. 43, Nr. 14, pp. 2923-2925, 1978.

[163] A. J. P. Martin und R. L. M. Synge, „A new form of chromatogram employing two liquid phases," *Biochem. J.,* Bd. 35, Nr. 12, pp. 1358-1368, 1941.

[164] R. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, „Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper," *Biochem. J.,* Bd. 38, Nr. 3, pp. 224-232, 1944.

[165] A. James und A. Martin, „Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid," *Biochem. J.,* Bd. 50, Nr. 5, pp. 679-690, 1952.

[166] E. Stahl, „Thin-layer chromatography; methods, influencing factors and an example of its use," *Pharmazie,* Bd. 11, Nr. 10, pp. 633-637, 1956.

[167] R. Störmann, 2003. [Online]. Available: http://chem.uft.uni-bremen.de/Chromatography/ chromhis.htm. [Zugriff am 30 11. 2012].

[168] K. P. Adam und H. Becker, Analytik biogener Arzneistoffe, 1 Hrsg., Stuttgart: WVG, 2000.

[169] H. Jork, W. Funk, W. Fischer und H. Wimmer, Dünnschicht-Chromatographie - Reagenzien und Nachweismethoden, Weinheim: VCH, 1989.

[170] Le Club de Chromatographie sur Couche Mince, [Online]. Available: http://www.clubdeccm.com/PDF/Dyeing_Reagents_TLC.pdf. [Zugriff am 20 2. 2013].

[171] K. Hostettmann, M. Hostettmann und A. Marston, Preparative Chromatography Techniques - Applications in Natural Product Isolation, Berlin, Heidelberg, New York, London, Tokyo: Springer, 1986, pp. 6-18.

[172] E. Stahl und W. Schild, Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen, Stuttgart, New York: G. Fischer, 1986.

[173] „Andornkraut," in s *Deutscher Arzneimittel Codex - Ergänzungsbuch zum Arzneibuch*, Stuttgart und Eschborn, DAV und GOVI, 1999, pp. A-140 (1-3).

[174] P. Rodewald, G. Rücker und K. W. Glombitza, „Weißdornblätter mit Blüten," in s *Apothekengerechte Prüfvorschriften*, 9. Auflage Hrsg., Stuttgart, DAV, 2002, pp. 1055-1060.

[175] I. Saracoglu, M. Varel, J. Hada, N. Hada, T. Takeda, A. A. Donmez und I. Calis, „Phenylethanoid glycosides from Phlomis integrifolia Hub.-Mor.," *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal for Biosciences,* Bd. 58c, Nr. 11-12, pp. 820-825, 2003.

[176] K. Melichar, „Untersuchungen zur Wirksamkeit eines pflanzlichen Antiarrhythmikums am isolierten Kaninchenherzen," 2007.

[177] H. Wagner und S. Bladt, Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas, 2. Auflage Hrsg., Heidelberg und New York: Springer, 1996, p. 126.

[178] „Angelikawurzel," in s *Europäisches Arzneibuch*, 4.00 Hrsg., Bd. 1, Stuttgart, Eschborn, DAV, Govi, 2002, pp. 1203-1204.

[179] H. Wagner und S. Bladt, Drogenanalyse - Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, Berlin und Heidelberg und New York: Springer, 1983, p. 146.

[180] „Herzgespannkraut," in s *Europäisches Arzneibuch*, 5.0 Hrsg., Bd. 2, Stuttgart, Eschborn, DAV, Govi, 2005, pp. 2324-2326.

[181] „Bitterkleeblätter," in s *Europäisches Arzneibuch*, 5.0 Hrsg., Bd. 2, Stuttgart, Eschborn, DAV, Govi, 2005, p. 1540.

[182] M. Golay, „Gas Chromatographic Terms and Definitions," *Nature,* Bd. 182, pp. 1146-1147, 1958.

[183] „Gaschromatographie," in s *Europäisches Arzneibuch*, 7 Hrsg., Bd. 1, Stuttgart, Eschborn, DAV, Govi, 2011, pp. 58-60.

[184] John Wiley & Sons, „Wiley Registry™ of Mass Spectral Data, 6th Edition".

[185] National Institute of Standards and Technology, „NIST "Mass Spectral Libary" und

"Standard Reference Database"“.

[186] K. Hostettmann, A. Marston und M. Hostettmann, Preparative Chromatography Techniques - Applications in Natural Product Isolation, 2 Hrsg., Berlin, Heidelberg: Springer, 1997, p. 135.

[187] L. Craig, „Partition Chromatography and Countercurrent Distribution,“ *Anal. Chem.,* Bd. 22, Nr. 11, pp. 1346-1352, 1950.

[188] Y. Ito und R. Bowman, „Countercurrent Chromatography: Liquid-Liquid Partition Chromatography without Solid Support,“ *Science,* Bd. 167, Nr. 3916, pp. 281-283, 1970.

[189] H. Rauen und W. Stamm, „Die Gegenstromverteilung (counter current distribution),“ *Chemie Ingenieur Technik,* Bd. 21, Nr. 13-14, pp. 259-266, 1949.

[190] Eyela Tokyo Rikakikai Co. Ltd., *How to send the mobile phase to column,* 1984, p. 15.

[191] J. Snyder, K. Nakanishi, K. Hostettmann und M. Hostettmann, „Applications of Rotation Locular Countercurrent Chromatography in Natural Products Isolation,“ *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.,* Bd. 7, Nr. 2, pp. 243-256, 1984.

[192] B. Domon und K. Hostettmann, „New Saponins from Phytolacca dodecandra l'HERIT,“ *Helvet. Chim. Acta,* Bd. 67, Nr. 5, pp. 1310-1315, 1984.

[193] R. Chaudhuri, O. Salama und O. Sticher, „Preparative Separation of Diastereoisomeric lridoid Glucosides by Droplet Counter-Current Chromatography,“ *Planta Med.,* Bd. 40, Nr. 10, pp. 164-167, 1980.

[194] K. Hostettmann und M. Hostettmann, „Neuere Gegenstrom-Chromatographie-Verfahren für die präparative Trennung von Naturstoffen,“ *GIT Suppl. Chrom.,* pp. 22-24, 1981.

[195] S. Strahler und T. Liebold, „Eine kurze Einführung in die Kapillarelektrophorese,“ Leipzig, 2006.

[196] J. Jorgenson und K. Lukacs, „Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries,“ *Anal. Chem.,* Bd. 67, pp. 1298-1302, 1981.

[197] J. Jorgenson und K. Lukacs, „Capillary zone electrophoresis,“ *Science,* Bd. 222, Nr. 4621, pp. 266-272, 1983.

[198] F. Matysik, „Introduction to capillary electrophoresis - basic concepts and applications,“ Leipzig, 2006.

[199] H. Engelhardt, W. Beck und T. Schmitt, Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten, Wiesbaden: Vieweg, 1994.

[200] „Kapillarelektrophorese," in s *Europäisches Arzneibuch*, 7 Hrsg., Bd. 1, Stuttgart, Eschborn, DAV, Govi, 2011, pp. 106-113.

[201] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya und T. Ando, „Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries," *Anal. Chem.,* Bd. 56, Nr. 1, pp. 111-113, 1984.

[202] H.-K. Wu, W.-C. Chuang und S.-J. Sheu, „Separation of nine iridoids by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography," *J. Chromatogr. A,* Bd. 803, Nr. 1-2, pp. 179-187, 1998.

[203] F. Buiarelli, S. di Berardino, F. Coccioli, R. Jasionowska und M. Russo, „Determination of phenolic acids in olive oil by capillary electrophoresis," *Ann. Chim.,* Bd. 94, Nr. 9-10, pp. 699-705, 2004.

[204] M. Bonoli, M. Montanucci, T. Gallina Toschi und G. Lercker, „Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection," *J. Chromatogr. A,* Bd. 1011, Nr. 1-2, pp. 163-172, 2003.

[205] J. Lü, Q.-J. Wang, X. Cheng, H.-Y. Liu, P.-G. He und Y.-Z. Fang, „Determination of four active ingredients in Vc Yinqiao tablets by capillary zone electrophoresis with amperometric detection," *Chin. J. Chem.,* Bd. 24, Nr. 9, pp. 1117-1121, 2006.

[206] J. Šafra, M. Pospíšilová und A. Kavalírová, „Development of a stacking-CZE method for the analysis of phenolic acids," *J. Pharm. Biomed. Anal.,* Bd. 41, Nr. 3, pp. 1022-1024, 2006.

[207] D. Štěrbová, J. Vlček und V. Kubáň, „Capillary zone electrophoretic determination of phenolic compounds in chess (Bromus inermis L.) plant extracts," *J. Sep. Sci.,* Bd. 29, Nr. 2, pp. 308-313, 2006.

[208] N. Volpi, „Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis," *Electrophoresis,* Bd. 25, Nr. 12, pp. 1872-1878, 2004.

[209] A. Wang, Y. Zhou, F. Wu, P. He und Y. Fang, „Determination of active ingredients in Huangdan Yinchen Keli by CZE with amperometric detection," *J. Pharm. Biomed. Anal.,* Bd. 35, Nr. 4, pp. 959-964, 2004.

[210] Beckman Coulter Inc., 2013. [Online]. Available: https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/capillary-electrophoresis/ce-expert-lite/index.htm. [Zugriff am 21 2. 2013].

[211] T. Liebold, S. Strahler und H. Rauwald, „Separation of diastereomeric anthrone-C-glucosyls of aloes by micellar electrokinetic capillary chromatography," *Pharmazie,* Bd. 62, Nr. 12, pp. 955-957, 2007.

[212] S. Sturm und H. Struppner, „Analysis of iridoid glycosides from Picrorhiza kurroa by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography - Mass spectrometry," *Chromatographia,* Bd. 53, Nr. 11-12, pp. 612-618, 2001.

[213] S. Zhao, Q. Liu, X. Chen und Z. Hu, „Separation and determination of gentiopicroside and swertiamarin in Tibetan medicine by micellar electrokinetic electrophoresis," *Biomed. Chromatogr.,* Bd. 18, Nr. 1, pp. 10-15, 2004.

[214] A. Müller, M. Ganzera und H. Stuppner, „Analysis of the Aerial Parts of Verbena officinalis L. by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography," *Chromatographia,* Bd. 60, Nr. 3-4, pp. 193-197, 2004.

[215] S.-J. Sheu, C.-L. Chieh und W.-C. Weng, „Capillary electrophoretic determination of the constituents of Artemisiae Capillaris Herba," *J. Chromatogr. A,* Bd. 911, Nr. 2, pp. 285-293, 2001.

[216] X.-K. Wang, Y.-Z. He und L.-L. Qian, „Determination of polyphenol components in herbal medicines by micellar electrokinetic capillary chromatography with Tween 20," *Talanta,* Bd. 74, Nr. 1, pp. 1-6, 2007.

[217] C. Ding, L. Wang, X. Zhao, Y. Li, H. Wang, J. You und Y. Suo, „Analysis of five pharmacologically active compounds from the Tibetan medicine Elsholtzia with micellar electrokinetic capillary chromatography," *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.,* Bd. 30, Nr. 20, pp. 3069-3083, 2007.

[218] R. Pomponio, R. Gotti, M. Hudaib und V. Cavrini, „Analysis of phenolic acids by micellar electrokinetic chromatography: application to Echinacea purpurea plant extracts," *J. Chromatogr. A,* Bd. 945, Nr. 1-2, pp. 239-246, 2002.

[219] B. Bales, L. Messina, A. Vidal, M. Peric und O. Nascimento, „Precision Relative Aggregation Number Determinations of SDS Micelles Using a Spin Probe. A Model of Micelle Surface Hydration," *J. Phys. Chem. B.,* Bd. 102, Nr. 50, pp. 10347-10358, 1998.

[220] F. Bloch, W. Hansen und M. Packard, „Nuclear induction," *Phys. Rev.,* Bd. 69, p. 127, 1946.

[221] F. Bloch, „Nuclear induction," *Phys. Rev.,* Bd. 70, Nr. 7 + 8, pp. 460-474, 1946.

[222] E. Purcell, H. Torrey und R. Pound, „Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid," *Phys. Rev.,* Bd. 69, pp. 37-38, 1946.

[223] R. Ernst, „Nuclear Magnetic Double Resonance with an Incoherent Radio-Frequency Field," *J. Chem. Phys.,* Bd. 45, Nr. 10, pp. 3845-3861, 1966.

[224] A. Dominik und D. Steinhilber, „UV/VIS-Spektroskopie," in s *Instrumentelle Analytik - Kurzlehrbuch und kommentierte Originalfragen für Pharmazeuten*, 2 Hrsg., Stuttgart, DAV, 2002, pp. 44-60.

[225] E. Ehlers, „Grundlagen der Lichtabsorption durch Moleküle im UV- und VIS-Bereich," in s *Analytik II - Kurzlehrbuch quantitative und instrumentelle Analytik*, 10 Hrsg., Stuttgart, DAV, 2002, pp. 338-344.

[226] R. Straubinger, A. Straubinger, B. Summers, H. Erb, L. Härter und M. Appel, „Borrelia burgdorferi Induces the Production and Release of Proinflammatory Cytokines in Canine Synovial Explant Cultures," *Infect. Immun.,* Bd. 66, Nr. 1, pp. 247-–258, 1998.

[227] Leibniz-Institut DSMZ, 2012. [Online]. Available: http://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/Kultivierungshinweise/Borrelia.pdf. [Zugriff am 12 1. 2013].

[228] A. Lakos, G. Nagy, I. Jankovics und M. Csík, „First isolation of Borrelia burgdorferi (Lyme spirochaeta) from ticks in Hungary," *Orv Hetil,* Bd. 132, Nr. 3, pp. 129-130, 133, 1991.

[229] O. Péter, A. Bretz und D. Bee, „Occurrence of different genospecies of Borrelia burgdorferi sensu lato in ixodid ticks of Valais, Switzerland," *Eur. J. Epidemiol.,* Bd. 11, Nr. 4, pp. 463-467, 1995.

[230] R. Straubinger, Y. Chang, R. Jacobson und M. Appel, „Sera from OspA-vaccinated dogs, but not those from tick-infected dogs, inhibit in vitro growth of Borrelia burgdorferi," *J. Clin. Microbiol.,* Bd. 33, Nr. 10, pp. 2745-2751, 1995.

[231] R. Baradaran-Dilmaghani und G. Stanek, „In vitro susceptibility of thirty borrelia strains from various sources against eight antimicrobial chemotherapeutics," *Infection,* Bd. 24, Nr. 1, pp. 60-63, 1996.

[232] D. Stünzner, Z. Hubalek, J. Halouzka, D. Postic, K. Pierer und E. Marth, „Prevalence of Borrelia burgdorferi s.l. in Ixodes ricinus ticks from Styria (Austria) and species identification by PCR-RFLP analysis," *Zentralbl. Bakteriol.,* Bd. 288, Nr. 4, pp. 471-478, 1998.

[233] V. Nefedova, E. Korenberg, L. Nesterenko, A. Gintsburg, I. Kovalevskiĭ und N. Gorelova, „Comparative evaluation of the efficacy of Borrelia indication in ixodes ticks (Ixodidae) using dark field microscopy and polymerase chain reaction (PCR)," *Parazitologiia,* Bd. 35, Nr. 1, pp. 3-8, 2001.

[234] N. Fiehn und J. Westergaard, „Nutrient and environmental growth factors for eight small-sized oral spirochetes," *Scand. J. Dent. Res.,* Bd. 94, Nr. 3, pp. 208-218, 1986.

[235] Hausser Scientific Company, [Online]. Available: http://www.hausserscientific.com/products/petroff_hausser_counter.html. [Zugriff am 2 3. 2013].

[236] Electron Microscopy Sciences, 2011. [Online]. Available: http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/magnifier/counting.aspx. [Zugriff am 4 12. 2012].

[237] M. Wójciak-Kosior, „Separation and determination of closely related triterpenic acids by high perform-ance thin-layer chromatography after iodine derivatization," *J. Pharm. Biomed. Anal.,* Bd. 45, Nr. 2, pp. 337-340, 2007.

[238] J. Yan, 2001. [Online]. Available: http://yanjunhua.tripod.com/pattern.htm. [Zugriff am 23 09 2011].

[239] A. K. Pandey, S. A. Siddiqui, A. Dwivedi, K. Raj und N. Misra, „Density functional theory study on the molecular structure of loganin," *Spectroscopy,* Bd. 25, pp. 287-302, 2011.

[240] I. Calis, M. Lahloub und O. Sticher, „Loganin, loganic acid and periclymenoside, a new biosidic ester iridoid glucoside from Lonicera periclymenum L. (Caprifoliaceae)," *Helv Chim Acta,* Bd. 67, Nr. 1, pp. 160-165, 1984.

[241] C. Boros und F. Stermitz, „Iridoids. An Updated Review. Part I.," *J Nat Prod,* Bd. 53, Nr. 5, p. 1055–1147, 1990.

[242] S. Damtoft, S. Jensen und B. Nielsen, „13C and1H NMR spectroscopy as a tool in the configurational analysis of iridoid glucosides," *Phytochemistry,* Bd. 20, Nr. 12, pp. 2717-2732, 1981.

[243] P. Cuadra und V. Fajardo, „A new lignan from the patagonian Valeriana carnosa Sm.,"

Bol Soc Chil Quím, Bd. 47, Nr. 4, 2002.

[244] S. P. M. Kilidhar und P. Sharma, „Prinsepiol, a lignan from stems of Prinsepia utilis," *Phytochemistry,* Bd. 21, Nr. 3, pp. 796-797, 1982.

[245] W. Seebacher, N. Simic und R. Weis, „Complete assignments of 1H and 13C NMR resonances of oleanolic acid, 18a-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives," *Magn Reson Chem,* Bd. 41, Nr. 8, pp. 636-638, 2003.

[246] T. Sévenet, C. Thal und P. Potier, „Isolement et structure du cantleyoside : Nouveau glucoside terpénique de Cantleya corniculata (Becc.) Howard, (Icacinacées).," *Tetrahedron,* Bd. 27, Nr. 3, pp. 663-668, 1971.

[247] W. R. Dunstan und F. W. Short, „a new glucoside from strychnos nux-vomica," *American Journal of Pharmacy,* Bd. 431, 1884.

[248] K. Sheth, E. Ramstad und J. Wolinsky, „The structure of loganin," *Tetrahedron Letters,* Bd. 2, Nr. 12, pp. 394-397, 1961.

[249] K. Graikou, N. Aligiannis, I. B. Chinou und C. Harvala, „Cantleyoside-dimethyl-acetal and Other Iridoid Glucosides from Pterocephalus perennis - Antimicrobial Activities," *Z. Naturforsch.,* Bd. 57c, pp. 95-99, 2002.

[250] T. Liebold und H. Rauwald, „Micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) for rapid analysis of Dipsacus sylvestris HUDS. (Dipsacaceae) and differentiation from other Dipsacus species.," *Planta Med,* Bd. 76, p. 523, 2010.

[251] C. Tang, G. Fan, Q. Li, J.-S. Su, X.-L. Meng und Y. Zhang, „Simultaneous determination of ten compounds in two main medicinal plant parts of Tibetan herb, Pterocephalus hookeri (CB Clarke) Höeck, by ultra-high performance liquid chromatography-photodiode array," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research,* Bd. 16, Nr. 6, pp. 1407-1416, 2017.

[252] X. Sun, G. Ma, D. Zhang, W. Huang, G. Ding und H. Hu, „New Lignans and Iridoid Glycosides from Dipsacus asper Wall.," *molecules,* pp. 2165-2175, 2015.

[253] B. Pickel, M.-A. Constantin, J. Pfannstiel, J. Conrad, U. Beifuss und A. Schaller, „An Enantiocomplementary Dirigent Protein for the Enantioselective Laccase-Catalyzed Oxidative Coupling of Phenols," *Angewandte Chemie,* Bd. 49, Nr. 1, pp. 202-204, 2010.

[254] L. B. Davin, H.-B. Wang, A. L. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkanen und

N. G. Lewis, „Stereoselective Bimolecular Phenoxy Radical Coupling by an Auxiliary (Dirigent) Protein Without an Active Center," *Science,* Bd. 275, Nr. 5298, pp. 362-367, 1997.

[255] P. . Mugford, U. G. Wagner, Y. Jiang, K. Faber und R. J. Kazlauskas, „Enantiokomplementäre Enzyme: Klassifizierung, molekulare Grundlage der Enantiopräferenz und Prognosen für spiegelbildliche Biotransformationen," Bd. 120, Nr. 46, pp. 8912-8923, 2008.

[256] S. Pasi, N. Aligiannis, A.-L. Skaltsounis und I. B. Chinou, „A New Lignan Glycoside and Other Constituents from Cephalaria Ambrosioides," *Natural Product Letters,* Bd. 16, Nr. 6, pp. 365-370, 2002.

[257] Y.-C. Wu, Y.-J. Ying, F.-J. Guo und G.-F. Zhu, „Bis-iridoid and lignans from traditional Tibetan herb Pterocephalus hookeri," *Biochemical Systematics and Ecology,* Bd. 56, pp. 209-212, 2014.

[258] U. Bodesheim und J. Hölzl, „Isolierung, Strukturaufklärung und Radiorezeptorassays von Alkaloiden und Lignanen aus Valeriana officinalis L.," *Pharmazie,* Bd. 52, pp. 386-391, 1997.

[259] J. M. J. Favela-Hernández, A. García, E. Garza-González, V. M. Rivas-Galindo und M. R. Camacho-Corona, „Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from Larrea tridentata," *Phytotherapy Research,* Bd. 26, Nr. 12, pp. 1957-1960, 2012.

[260] J. M. J. Favela-Hernández, A. F. Clemente-Soto, I. Balderas-Rentería, E. Garza-González und M. d. R. Camacho-Corona, „Potential Mechanism of Action of 3′-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin on Methicillin Resistant Staphylococcus aureus," *Molecules,* Bd. 20, pp. 12450-12458, 2015.

[261] W. M. K. Al-Ani und F. M. Aziz, „Antimicrobial Activity of HMR lignans," *Iraqi J Pharm Sci,* Bd. 22, Nr. 2, pp. 30-34, 2013.

[262] H. Tromssdorff, „Urson, ein neuer Stoff von den Blättern der Bärentraube," *Archiv der Pharmazie,* Bd. 80, Nr. 3, pp. 273-275, 1954.

[263] A. W. v. d. Haar, „Untersuchungen über die Saponine und Verwandte Körper," *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas banner,* Bd. 43, Nr. 8, pp. 542-549, 1924.

[264] O. M. Abdallah, „Phenolic glucoside and other constituents of Dipsacus laciniatus," *Phytochemistry,* Bd. 30, Nr. 8, pp. 2805-2806, 1991.

[265] Y.-M. Zhao und Y.-P. Shi, „Phytochemicals and Biological Activities of Dipsacus Species," *Chemistry & Biodiversity,* Bd. 8, Nr. 3, pp. 414-430, 2011.

[266] S. Fontanay und J. M. C. F. R. E. D. M. Grare, „Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes," *Journal of Ethnopharmacology,* Bd. 120, Nr. 2, pp. 275-276, 2008.

[267] L. Meriläinen, A. Herranen, A. Schwarzbach und L. Gilbert, „Morphological and biochemical features of Borrelia burgdorferi pleomorphic forms," *Microbiology,* Bd. 161, Nr. 3, pp. 516-527, 2015.

[268] D. Ji, Y. Wu, B. Zhang, C.-F. Zhang und Z.-L. Yang, „Triterpene saponins from the roots of Dipsacus asper and their protective effects against the Aβ25–35 induced cytotoxicity in PC12 cells," *Fitoterapia,* Bd. 83, Nr. 5, pp. 843-848, 2012.

[269] J. Posey und F. Gherardini, „Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen," *Science,* Bd. 288, Nr. 5471, pp. 1651-1653, 2 06 2000.

[270] L. Wang, Z.-Y. Chen, C.-Q. Jiang, Z. Liao, G. Yang und Y.-K. Chzn, „Lignans from Daphne feddei Levl. var and their cytotoxicity," *Asian Journal of Chemistry,* Bd. 10, pp. 8162-8166, 2010.

[271] J. Feng, S. Zhang, W. Shi, N. Zubcevik, J. Miklossy und Y. Zhang, „High Activity Of Selective Essential Oils Against Stationary Phase Borrelia burgdorferi As A Persister Model," *Frontiers in Medicine,* Bd. 4, Nr. 169, 2017.

[272] L. Austgulen, E. Solheim und S. R.R., „Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol.," *Pharmacol Toxicol.,* Bd. 61, Nr. 2, pp. 98-102, 1987.

[273] R. Dong, Z. Fang, Z. L.L., G. Ge, Y. Cao, X. Li, C. Hu, L. Yang und Z. Liu, „Identification of CYP isoforms involved in the metabolism of thymol and carvacrol in human liver microsomes (HLMs).," *Pharmazie,* Bd. 67, Nr. 12, pp. 1002-1006, 2012.

[274] J. C. M. A. Z. E. Suntres, „The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol," *Food Science and Nutrition,* Bd. 55, pp. 304-318, 2013.

[275] ÄrzteZeitung, „Azithromycin-Gel gegen Borrelien in Phase-III-Studie," 3 12 2011. [Online]. Available: https://www.aerztezeitung.de/Medizin/Azithromycin-Gel-gegen-Borrelien-in-Phase-III-Studie-283472.html. [Zugriff am 15 03 2020].

[276] M. Schwameis, T. Kündig, G. Huber, L. v. Bidder, L. Meinel, R. Weisser, E. Aberer, G. Härter, T. Weinke, T. Jelinek, G. Fätkenheuer, U. Wollina, G.-D. Burchard, R. Aschoff,

R. Nischi und G. Sattl, „Topical azithromycin for the prevention of Lyme borreliosis: a randomised, placebo-controlled, phase 3 efficacy trial," *The Lancet Infectious Diseases,* Bd. 17, Nr. 3, pp. 322-329, 03 2017.

[277] R. Hänsel und O. Sticher, „Iridoidglykoside," in s *Pharmakognosie Phytopharmazie*, 9 Hrsg., Berlin Heidelberg, Springer, 2010, p. 745.

18 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Typischer Habitus der Wilden Karde 15
Abb. 2-2: Wassergefüllte Becken um die Sprossachse am Grund der gegenständigen Blätter der Wilden Karde 15
Abb. 2-3: Wilde Karde Anfang Mai im zweiten Jahr im Botanischen Garten Leipzig 2008 16
Abb. 2-4: Ansammlung vieler blühender Wilder Karden auf einer lehmigen Schuttfläche in Dessau 2007 17
Abb. 2-5: Strukturformeln von Cantleyin (a), Loganin (b), Swerosid (c), Cantleyosid (d), Sylvestrosid I (e), Sylvestrosid II (f), Sylvestrosid III (g) und Sylvestrosid IV (h) 21
Abb. 2-6: Strukturformeln von KS (a), CS (b) und Saponarin (c) 22
Abb. 2-7: Frische Wurzel von *D. sylv.* nach der Ernte 22
Abb. 2-8: Geschnittene und gefriergetrocknete Wurzelstücke von *D. sylv.* 23
Abb. 3-1: einzelne fünfzählige Blüte von *C. cret.* [80] 23
Abb. 3-2: Strukturformeln ausgewählter Inhaltsstoffe aus dem ätherischen Öl von *C. cret.*: Carvacrol (a), Hexahydrofarnesylaceton (Phyton) (b), Nonacosan (c), Calamenen (d), *ent*-Manoyloxid (e), *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (f), 3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid (g), und *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-Manoyloxid (h) 29
Abb. 4-1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Borrelia burgdorferi* 30
Abb. 4-2: Weiblicher Holzbock (*Ixodes ricinus* L.) 30
Abb. 4-3: Morphologie von *Borrelia burgdorferi* sensu lato mit periplasmatischen Flagellen 31
Abb. 4-4: Bbss im BSK-II-Medium unter dem Dunkelfeldmikroskop (400-fache Vergrößerung) 31
Abb. 7-1: RLCC-A Apparatur von Eyela [190] 68
Abb. 7-2: schematische Detailzeichnung einer einzelnen Glasröhre bei einer Neigung von etwa 37° im aufsteigenden Modus: Kompartimentbildung 69
Abb. 7-3: Schematischer Aufbau einer CE-Anlage 71
Abb. 7-4: Durch Überlagerung von elektroosmotischem Fluss und elektrophoretischer Mobilität ergibt sich die Gesamtbewegung der zu analysierenden Teilchen 73
Abb. 7-5: Verdünnungsreihe für Sensitivitätstests zur Ermittlung der Nachweisgrenze von *Bb*ss 86
Abb. 7-6: Darstellung des geätzten Zählrasters der Petroff-Hausser-Zählkammer (Improved Neubauer-Raster) von Hausser Scientific mit Detailfoto eines Zählfeldes mit 4 x 4 Kleinfeldern 87
Abb. 8-1: DC-Übersicht von *C. cret.*: 1 – Carvacrol, 2 – *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid, 3 – *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-Manoyloxid, 4 – *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, 5 – „Lad_$CHCl_3$_DC", 6 – „CI_MeOH_DC", Abbildung A – Detektion: UV_{365nm} / VanS, Abbildung B – Detektion : Vis / VanS 95
Abb. 8-2: Analytische Stufen-DC zur Identifizierung von *Dipsacus*: 1 – KS und CS, 2 – „DS_fW_MeOH_DC", 3 – „DS_WD_MeOH_DC", 4 – „DA_MeOH_DC", 5 – Loganin, 6 – „DS_fW_EtOH_DC", 7 – „DS_WD_EtOH_DC, 8 – „DA_EtOH_DC", 9 – Oleanolsäure, 10 – β-Sitosterol, 11 – Fructose, 12 – Saccharose ; Bandenzuordnung : β – β-Sitosterol, O – Oleanolsäure, K – KS, C – CS, L – Loganin, F –

Fructose, S – Saccharose ; zweistufige Entwicklung mit FM6 (6 cm) + FM2b (15 cm), Abbildung A – Detektion: UV_{365nm} / VanS, Abbildung B – Detektion : Vis / VanS 96
Abb. 8-3: DC-Übersicht der EtOH-H_2O-Ausschüttelungsfraktionen von „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“: 1 – wasserlöslicher Anteil von „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“, 2 – wasserunlöslicher Anteil von „DS_fW_EtOH-H_2O-TE“, 3 – „DS_fW_Frak-H_2O“, 4 – Referenzen KS (K), CS (C), Loganin (L), 5 – „DS_fW_Frak-n-But“, 6 – EE-Direktextrakt aus *D. sylv.*, 7 – „DS_fW_Frak-EE“,, 8 – DCM-Direktextrakt aus *D. sylv.*, 9 – H_2O- und MeOH-unlöslicher Zentrifugationsrückstand bei der Herstellung von 8 , 10 – „DS_fW_Frak-DCM“ , 11 – 5 %ige wässrige PS80 Stammlösung, 12 - Oleanolsäure, 13 - β-Sitosterol, 14 - „DS_fW_Frak-Hex“, Abbildung A – FM2b, Detektion: UV_{365nm} / VanS, Abbildung B –FM6, Detektion: Vis nach VanS 99
Abb. 8-4: DC-Übersicht der KG-Säulen-Fraktionen von „DS_WD_Fr-Hex“ mit FM7: 1 bis 7 – Sammelfraktionen 1 – 7, 8 – DS_WD_Fr-Hex, 9 – Oleanolsäure, 10 – β-Sitosterol; Abbildung A – Vis nach VanS, B – UV_{365nm} / VanS 100
Abb. 8-5: DC-Übersicht der Al_2O_3-Säulen-Fraktionen von „Ds_fW_Frak-H_2O“ mit FM6: Bahnen 1 – n-But-Phase „DS_fW_Frak-n-But“, 2 – H_2O-Phase „DS_fW_Frak-H_2O“, 3 – „Al_Fr1“, 4 – „Al_Fr2“, 5 – „Al_Fr3“, 6 – „Al_Fr4“, 7 – Loganin, 8 – KS/CS; Abbildung A – UV_{254nm}, B – UV_{365nm}, C – UV_{365nm} / VanS, D – Vis nach VanS 102
Abb. 8-6: DC-Übersicht der KG-Säulen-Fraktionen von „Al_Fr1“ mit FM6: 1 – als „KG1_FrB“ vereinigte Säulenfraktionen 63 - 71, 2 – H_2O-Phase „DS_fW_Frak-H_2O“; Abbildung A – UV_{365nm} / VanS, B – Vis nach VanS 102
Abb. 8-7: DC-Übersicht der RP-Pipettensäulen-Fraktionen von „DC-B_Fr2“ mit FM6: 1 – Sammelfraktion 4, 2 – Sammelfraktion 6 ; Abbildung A – UV_{254nm}, B – UV_{365nm} / VanS 104
Abb. 8-8: DC-Übersicht der Sammelfraktionen 1 - 7 der KG-Säule von „DS_WD_Frak-DCM“ mit FM2b: 1 bis 7 – Sammelfraktionen 1 – 7 (davon 3 = „KG-DCM_Fr3“), 8 – Oleanolsäure, 9 – β-Sitosterol, 10 - „DS_WD_Frak-DCM“, 11 - KS; Abbildung A – UV_{365nm} / VanS, B – Vis nach VanS 106
Abb. 8-9: DC-Übersicht der Sammelfraktionen 1 – 10 der KG-Säule von „KG-DCM_Fr3“ mit FM2b: 1 bis 10 – Sammelfraktionen 1 – 10 (davon 4 = „KG3_Fr4“ und 5 = „KG3_Fr5“), 11 – Oleanolsäure, 12 - „DS_WD_Frak-DCM“; Abbildung A – UV_{254nm}, B – UV_{365nm} / VanS, C – Vis nach VanS 106
Abb. 8-10: DC-Übersicht der Banden 1 – 6 der präparativen DC von „KG3_Fr5“ mit FM2b: „1“ bis „6“ – 1. bis 6. präp. DC-Bande (hervorgehoben: 2. = Prinsepiol), 7 – Oleanolsäure, 8 - „DS_WD_Frak-DCM“; Abbildung A – UV_{254nm}, B – Vis nach VanS 107
Abb. 8-11: DC-Übersicht der Banden 1 – 6 der präparativen DC von „KG3_Fr4“ mit FM2b: 1 bis 6 – 1. bis 6. präp. DC-Bande (hervorgehoben: 2. = Prinsepiol), 7 – Oleanolsäure, 8 - „DS_WD_Frak-DCM“; Abbildung A – UV_{254nm}, B – Vis nach VanS 108
Abb. 8-12: DC-Übersicht der Fraktionen 1 bis 56 der MPLC von „DS_WD_Frak-Hex“ mit FM7 (gelb hervorgehoben: Fraktionen 3, 7, 36 und 48, die einer GC-MS-Untersuchung zugeführt wurden; hellblau hervorgehoben: Fraktion 44, die mittels NP-KG-Säule weiterfraktioniert wurde); oben – UV_{254nm} nach VanS, unten – VIS nach VanS 109
Abb. 8-13: DC-Übersicht der Fraktionen der präparativen KG-Säule von „MPLC_Fr44“ mit FM7: 17 bis 24 – Fraktionen 17 – 24 der KG-Säule, A bis E – Sammelfraktionen A – E, O – Oleanolsäure, S – β-Sitosterol, Fr –„MPLC_Fr44“; Abbildung A, B – Vis nach VanS, C – UV_{365nm} / VanS 110
Abb. 8-14: ^{1}H-und ^{13}C-Verschiebungen (links) und ausgewählte long-range-Kopplungen aus dem HMBC (rechts) von Loganin 115
Abb. 8-15: ESI-MS-Spektrum (m/z 40 – 1050, +MS, 6 Scans) von Loganin in MeOH 116
Abb. 8-16: ESI-MS-Spektrum (m/z 400 – 443, +MS, 6 Scans) von Loganin in MeOH: Detailvergrößerung für das Isotopenmuster 116

Abb. 8-17: Loganin ^{1}H-NMR 118
Abb. 8-18: ^{1}H-und ^{13}C-Verschiebungen (links) und ausgewählte long-range-Kopplungen aus dem HMBC (rechts) von Cantleyosid 120
Abb. 8-19: ESI-MS-Spektrum (m/z 200 – 1300, +MS, 5 Scans) von Cantleyosid in MeOH 121
Abb. 8-20: ESI-MS-Spektrum (m/z 755 – 806, +MS, 5 Scans) von Cantleyosid in MeOH: Detailvergrößerung für das Isotopenmuster 121
Abb. 8-21: Cantleyosid ^{1}H-NMR 124
Abb. 8-22: ^{1}H-und ^{13}C-Verschiebungen (oben) und ausgewählte long-range-Kopplungen aus dem HMBC (unten) von Prinsepiol. Die HMBC-Kopplungen sind aufgrund der Punktsymmetrie des Prinsepiols nur für eine Molekülhälfte dargestellt. 126
Abb. 8-23: ESI-MS-Spektrum (m/z 40 – 900, +MS, 42 Scans) von Prinsepiol in Aceton 127
Abb. 8-24: ESI-MS-Spektrum (m/z 380 – 436, +MS, 42 Scans) von Prinsepiol in Aceton: Detailvergrößerung für das Isotopenmuster 127
Abb. 8-25: Prinsepiol ^{1}H-NMR 129
Abb. 8-26: ^{1}H-und ^{13}C-Verschiebungen (oben) und ausgewählte long-range-Kopplungen aus dem HMBC (unten) von Ursolsäure. 131
Abb. 8-27: ESI-MS-Spektrum (m/z 40 – 900, -MS, 23 Scans) von Ursolsäure in Aceton 132
Abb. 8-28: ESI-MS-Spektrum (m/z 430 – 480, -MS, 23 Scans) von Ursolsäure in Aceton: Detailvergrößerung für das Isotopenmuster 132
Abb. 8-29: Ursolsäure ^{1}H-NMR 135
Abb. 8-30: GC-MS-Chromatogramm von Fraktion „MPLC_Fr3“ 136
Abb. 8-31: Vergleich der Massenspektren des mittels GC aufgetrennten Palmitinsäuremethylesters (oben) mit der NIST-Referenz (unten) 137
Abb. 8-32: CZE-Elektropherogramm vom Referenz-Gemisch „Ref_CE1“ bei 234 nm; 1 - Loganin, 2 - CS, 3 - KS, 4 - PS; Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,6, 45 mmol/l, 15 °C, 18 kV, 10 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster 140
Abb. 8-33: CZE-Elektropherogramm vom „DS_fW_CE1“ bei 234 nm; 1 - Loganin-haltiger „Neutralpeak“, weitere Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32, zusätzlich: I - IV = unbekannte Peaks 141
Abb. 8-34: CZE-Elektropherogramm vom „DS_WD_CE1“ bei 234 nm; 1 - Loganin-haltiger „Neutralpeak“, weitere Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32, zusätzlich: III - IV = unbekannte Peaks 141
Abb. 8-35: CZE-Elektropherogramm vom „DA_CE1“ bei 234 nm; 1 - Loganin-haltiger „Neutralpeak“, 3^{I} - unbekannter Peak, weitere Bezifferung und Trennbed. siehe Abb. 8-32, zusätzlich: I, III - IV = unbekannte Peaks 142
Abb. 8-36: MEKC-Elektropherogramm von „Ref_CE1“ bei 234 nm; 0 - MeOH, 1 - Loganin, 2 - CS, 3 - KS, 4 - PS; Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,4, 45 mmol/l, 20 mmol/l SDS-Zusatz, 30 °C, 12 kV, 11 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster 143
Abb. 8-37: MEKC-Elektropherogramm von „DS_fW_CE1“ bei 234 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-36, zusätzlich: A - G = unbekannte Peaks 144
Abb. 8-38: MEKC-Elektropherogramm von “DS_WD_CE1“ bei 234 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-36, zusätzlich: D, E, X = unbekannte Peaks 144
Abb. 8-39: MEKC-Elektropherogramm von „DA_CE1“ bei 234 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-36, zusätzlich: A^{I}, C^{I}, D, E, 3^{I}, Y, F^{I}, Z = unbekannte Peaks 145
Abb. 8-40: MEKC-Elektropherogramm vom Referenz-Gemisch „Ref_CE2_3“ bei 234 nm; 1 - Loganin, 2 - CS, 3 - Cantleyosid, 4 - KS, 5 - PS; Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,4, 45 mmol/l, SDS-Zusatz 20 mmol/l,

25 °C, 12 kV, 15 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster 146
Abb. 8-41: MEKC-Elektropherogramm vom Referenz-Gemisch „Ref_CE2_3“ in PDA-Ansicht von 190 bis 300 nm; 1 - Loganin, 2 - CS, 3 - Cantleyosid, 4 - KS, 5 - PS; Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,4, 45 mmol/l, SDS-Zusatz 20 mmol/l, 25 °C, 12 kV, 15 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster 146
Abb. 8-42: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Aqua dest., PS80 und DMSO an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 149
Abb. 8-43: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in „PS80-BSK-II-Medium“ und solchem mit Zusatz von Amoxicillin an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 150
Abb. 8-44: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit H_2O, PS80, DMSO sowie Amoxicillin + 0,25 % PS80 versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in reinem BSK-II-Medium. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 151
Abb. 8-45: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von PS80, H_2O- und n-But-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01) 152
Abb. 8-46: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit H_2O- und n-But-Phase aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus H_2O-Zusatz (für die H_2O-Phase) bzw. plus PS80-Zusatz (für die n-But-Phase). Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01) 153
Abb. 8-47: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit EE-, DCM- und Hex-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 154
Abb. 8-48: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit EE-, DCM- und Hex-Phase aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 155
Abb. 8-49: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von PS80, H_2O- und n-But-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 156
Abb. 8-50: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit H_2O- und n-But-Phase aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus H_2O-Zusatz (für die H_2O-Phase) bzw. plus PS80-Zusatz (für die n-But-Phase). Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01) 158
Abb. 8-51: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit EE-, DCM- und Hex-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 159
Abb. 8-52: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit EE-, DCM- und Hex-Phase aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-

Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 160
Abb. 8-53: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz der Hex-Subfraktionen II, IV, V und VI aus dem MeOH-Extrakt (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 161
Abb. 8-54: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit den Hex-Subfraktionen II, IV, V und VI aus dem MeOH-Extrakt versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 163
Abb. 8-55: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von β-Sitosterol (mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). ... 165
Abb. 8-56: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Ursolsäure und Prinsepiol (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 165
Abb. 8-57: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit β-Sitosterol, Ursolsäure und Prinsepiol versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 166
Abb. 8-58: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Ladanum und $CHCl_3$-Extrakt aus Ladanum ($CHCl_3$-Extr. Lad.) (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 167
Abb. 8-59: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede von mit Ladanum und $CHCl_3$-Extrakt aus Ladanum (CHCl3-Extr. Lad.) versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz. Die Prozentwerte beziehen sich auf die jeweilige Mediumkontrolle des entsprechenden Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 168
Abb. 8-60: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von *ent*-Manoyloxid (mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 170
Abb. 8-61: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Carvacrol und *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 171
Abb. 8-62: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*- und *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 172
Abb. 8-63: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-Manoyloxid und Carvacrol versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz am ersten Messtag. Die Prozentwerte beziehen sich auf die Mediumkontrolle desselben Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 173
Abb. 8-64: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-Manoyloxid und Carvacrol versetzten *Bb*ss-Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz am vierten Messtag. Die Prozentwerte beziehen sich auf die Mediumkontrolle desselben Messtages (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 174
Abb. 8-65: Gesamtübersicht der relativen Wachstumsunterschiede der mit *ent*-13-*epi*-Manoyloxid, *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid, *ent*-Manoyloxid und Carvacrol versetzten *Bb*ss-

Kulturen gegenüber *Bb*ss in BSK-II-Medium plus PS80-Zusatz am achten Messtag. Die Prozentwerte beziehen sich auf die Mediumkontrolle desselben Messtages (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). 175
Abb. 9-1: Strukturformeln von Prinsepiol (a), Pinoresinol (b), 4-*epi*-Larreatricin (c), Dihydroguaiaretsäure (d), 3′-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin (e), Dipsalignan A (f), Dipsalignan B (g), Dipsalignan C (h), und Dipsalignan D (i) 180

Abb. Anhang 12-1: Massenspektrum von „MPLC_Fr3“ 12,57 min ((*trans*, *trans*)-Octadeca-9,12-diensäuremethylester) der GC-MS-Untersuchung 198
Abb. Anhang 12-2: Massenspektrum von „MPLC_Fr3“ 12,62 min (Linolsäuremethylester) der GC-MS-Untersuchung .. 198
Abb. Anhang 12-3: Massenspektrum von „MPLC_Fr3“ 12,75 min (Stearinsäuremethylester) der GC-MS-Untersuchung 198
Abb. Anhang 12-4: Massenspektrum von „MPLC_Fr3“ 13,96 min (Arachinsäuremethylester) der GC-MS-Untersuchung 199
Abb. Anhang 12-5: GC-MS-Chromatogramm von Fraktion „MPLC_Fr7“ 199
Abb. Anhang 12-6: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 15,58 min (Pentadecansäure) der GC-MS-Untersuchung 199
Abb. Anhang 12-7: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 17,10 min (Palmitinsäure) der GC-MS-Untersuchung 200
Abb. Anhang 12-8: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 18,61 min (Linolsäure) der GC-MS-Untersuchung 200
Abb. Anhang 12-9: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 18,77 min (Stearinsäure) der GC-MS-Untersuchung 200
Abb. Anhang 12-10: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 20,25 min (Arachinsäure) der GC-MS-Untersuchung 201
Abb. Anhang 12-11: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 26,66 min (Δ5-Ergostenol) der GC-MS-Untersuchung 201
Abb. Anhang 12-12: Massenspektrum von „MPLC_Fr7“ 27,80 min (Sitosterol) der GC-MS-Untersuchung 201
Abb. Anhang 12-13: GC-MS-Chromatogramm von Fraktion „MPLC_Fr36“ 202
Abb. Anhang 12-14: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 16,53 min (Palmitinsäure) der GC-MS-Untersuchung 202
Abb. Anhang 12-15: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 18,15 min (Linolsäure) der GC-MS-Untersuchung 202
Abb. Anhang 12-16: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 20,05 min (eventuell Arachinsäure) der GC-MS-Untersuchung 203
Abb. Anhang 12-17: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 26,87 min (eventuell Δ5-Ergostenol) der GC-MS-Untersuchung 203
Abb. Anhang 12-18: Massenspektrum von „MPLC_Fr36“ 28,54 min (Sitosterol) der GC-MS-Untersuchung 203
Abb. Anhang 12-19: GC-MS-Chromatogramm von Fraktion „MPLC_Fr48“ 204
Abb. Anhang 12-20: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 16,72 min (Palmitinsäure) der GC-MS-Untersuchung 204
Abb. Anhang 12-21: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 18,31 min (Linolsäure) der GC-MS-Untersuchung 204
Abb. Anhang 12-22: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 18,45 min (Stearinsäure) der GC-MS-Untersuchung 205
Abb. Anhang 12-23: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 20,09 min (Arachinsäure) der GC-MS-Untersuchung 205
Abb. Anhang 12-24: Massenspektrum von „MPLC_Fr48“ 28,41 min (Stigmasta-3,5-dien-7-on) der GC-MS-Untersuchung 205
Abb. Anhang 13-1: CZE-Elektropherogramm von „DS_fW_CE1“ bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32 207
Abb. Anhang 13-2: CZE-Elektropherogramm von „DS_WD_CE1“ bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32 207
Abb. Anhang 13-3: CZE-Elektropherogramm von „DA_CE1“ bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. 8-32 207
Abb. Anhang 13-4: UV-Spektren 190 - 400 nm von Loganin (1), CS (2), KS (3) und PS (4) extrahiert aus dem PDA-Elektropherogramm von „Ref_CE1“ (Boratpuffer pH 9,4; 45 mmol/l; 20 mmol/l SDS-Zusatz) 209

Abb. Anhang 13-5: MEKC-Elektropherogramm vom „DS_fW_CE1“ bei 330 nm; 0 - MeOH, 2 - CS, 3 - KS, B, D u. E = unbekannte Peaks, Trennbedingungen: Boratpuffer pH 9,4, 45 mmol/l, 20 mmol/l SDS-Zusatz, 30 °C, 15 kV, 11 min; Injektion 0,2 psi, 3,0 s; 40 cm uncoated fused-silica, effektive Trennstrecke 30 cm, 100 x 800 µm Detektorfenster 209
Abb. Anhang 13-6: MEKC-Elektropherogramm von „DS_WD_CE1“ bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. Anhang 13-5, zusätzlich: D, E = unbekannte Peaks 210
Abb. Anhang 13-7: MEKC-Elektropherogramm von D. Chin.-Gemisch CE bei 330 nm; Bezifferung und Trennbedingungen siehe Abb. Anhang 13-5, zusätzlich: D, E = unbekannte Peaks 210
Abb. Anhang 13-8: Kalibriergerade Loganin von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3 211
Abb. Anhang 13-9: Kalibriergerade Cantleyosid von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3 211
Abb. Anhang 13-10: Kalibriergerade KS von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3 212
Abb. Anhang 13-11: Kalibriergerade CS von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3 212
Abb. Anhang 13-12: Kalibriergerade PS von MEKC-Methode aus Kapitel 7.4.2.3.3 213
Abb. Anhang 14-1: Loganin ^{13}C-NMR 214
Abb. Anhang 14-2: Loganin COSY 215
Abb. Anhang 14-3: Loganin HSQC 216
Abb. Anhang 14-4: Loganin HMBC 217
Abb. Anhang 14-5: Cantleyosid ^{13}C-NMR 218
Abb. Anhang 14-6: Cantleyosid APT 219
Abb. Anhang 14-7: Cantleyosid COSY 220
Abb. Anhang 14-8: Cantleyosid HSQC 221
Abb. Anhang 14-9: Cantleyosid HMBC 222
Abb. Anhang 14-10: Prinsepiol ^{13}C-NMR 223
Abb. Anhang 14-11: Prinsepiol APT 224
Abb. Anhang 14-12: Prinsepiol COSY 225
Abb. Anhang 14-13: Prinsepiol HSQC 226
Abb. Anhang 14-14: Prinsepiol HMBC 227
Abb. Anhang 14-15: Ursolsäure ^{13}C-NMR 228
Abb. Anhang 14-16: Ursolsäure APT 229
Abb. Anhang 14-17: Ursolsäure COSY 230
Abb. Anhang 14-18: Ursolsäure HSQC 231
Abb. Anhang 14-19: Ursolsäure HMBC 232
Abb. Anhang 16-1: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Aqua dest., PS80 und DMSO an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$) 292
Abb. Anhang 16-2: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in „PS80-BSK-II-Medium“ und solchem mit Zusatz von Amoxicillin an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$) 292
Abb. Anhang 16-3: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von PS80, H_2O- und n-But-Phase aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). .. 293
Abb. Anhang 16-4: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit EE-, DCM- und Hex-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem hydroethanolischen Extrakt aus frischer Kardenwurzel an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$) 293

Abb. Anhang 16-5: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in reinem BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von PS80, H_2O- und n-But-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 294
Abb. Anhang 16-6: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit EE-, DCM- und Hex-Phase (jeweils mit PS80-Zusatz) aus dem MeOH-Extrakt aus geschnittener Kardenwurzeldroge an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 294
Abb. Anhang 16-7: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz der Hex-Subfraktionen II, IV, V und VI aus dem MeOH-Extrakt (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 295
Abb. Anhang 16-8: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von β-Sitosterol (mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 295
Abb. Anhang 16-9: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Ursolsäure und Prinsepiol (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 296
Abb. Anhang 16-10: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Ladanum und $CHCl_3$-Extrakt aus Ladanum ($CHCl_3$-Extr. Lad.) (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 296
Abb. Anhang 16-11: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von *ent*-Manoyloxid (mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01)..... 297
Abb. Anhang 16-12: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von Carvacrol und *ent*-13-*epi*-Manoyloxid (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). 297
Abb. Anhang 16-13: Halblogarithmische Darstellung der absoluten *Bb*ss-Konzentrationen in BSK-II-Medium und solchem mit Zusatz von *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*- und *ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid (jeweils mit PS80-Zusatz) an den Zähltagen 0, 1, 4 und 8 (Wiederholungsexperiment) (n = 3; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01). ... 298

19 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Systematische Einordnung der Karden nach [1], [8], [9], [10] 17
Tab. 3-1: Systematische Einordnung der Zistrosen nach [8], [81], [82], [83] 24
Tab. 4-1: Systematische Einordnung von Bbss 31
Tab. 7-1: Präparative DC von „KG3_Fr5“ 56
Tab. 7-2: Präparative DC von „KG3_Fr4“ 56
Tab. 7-3: Präparative DC von „KG44_FrC“ 57
Tab. 7-4: Präparative DC von „KG1_FrB“ 57
Tab. 7-5: Vergleich der beiden Durchgänge der präparativen KG-Säulen von „DS_WD_Frak-DCM“ 59
Tab. 7-6: Präparative KG-Säule von „KG-DCM_Fr3“ 60
Tab. 7-7: Präparative KG-Säule von „DS_fW_Frak-H_2O“ 61
Tab. 7-8: Präparative KG-Säule von „Al_Fr1“ 62
Tab. 7-9: Präparative RP-Säule von „DC-B_Fr2“ 63

Tab. 7-10: Präparative KG-Säule von „MPLC_Fr44“ 64
Tab. 7-11: Präparative KG-Säule von „DS_WD_Frak-Hex“ 65
Tab. 7-12: NP-MPLC von „DS_WD_Frak-Hex“ 65
Tab. 7-13: Säulenofen-Temperaturgradient der GC/MS-Messungen 67
Tab. 7-14: Potentielle RLCC Trennsysteme in der Voruntersuchung 70
Tab. 7-15: Herstellung der SDS-haltigen Boratpuffer 75
Tab. 7-16: Verwendete Referenzgemische für die MEKC-Quantifizierung ausgewählter Inhaltsstoffe von *Dipsacus* aus methanolischen Direktextrakten 82
Tab. 7-17: Mittels NMR vermessene Proben mit ihren jeweiligen Lösungsmitteln und ^{1}H-Messfrequenzen 83
Tab. 7-18: Herstellung BSK-II-Medium (Teil 1) 85
Tab. 8-1: Messwerte und berechneter Gehalt an Gerbstoffen 92
Tab. 8-2: Bestimmung des Trocknungsverlustes der Kardenwurzel durch Gefriertrocknung 93
Tab. 8-3: Zusammenfassung DC-Inhaltstoffscreening von *D. sylv.* 93
Tab. 8-4: Zonenfolge dreier *Dipsacus*-Proben („DS_fW_MeOH_DC“, „DS_WD_MeOH_DC“, „DA_MeOH_DC“) im UV_{365nm} nach Stufenentwicklung in FM6 über 6 cm und FM2b über 15 cm, Detektion mit VanS (* - vor dem Besprühen mit VanS bei UV_{365nm} markiert; charakteristische Zonen fett hervorgehoben); weitere Zonen können vorhanden sein, die gepunktete Linie markiert die 6 cm der ersten Entwicklung 96
Tab. 8-5: Zonenfolge dreier *Dipsacus*-Proben („DS_fW_MeOH_DC“, „DS_WD_MeOH_DC“, „DA_MeOH_DC“) im Vis nach Stufenentwicklung in FM6 über 6 cm und FM2b über 15 cm, Detektion mit VanS (charakteristische Zonen fett hervorgehoben); weitere Zonen können vorhanden sein, die gepunktete Linie markiert die 6 cm der ersten Entwicklung 97
Tab. 8-6: Fraktionsmassen der Sammelfraktionen der präparativen KG-Säule von „DS_WD_Frak-Hex“ 100
Tab. 8-7: Trockenmasse und Droge-Extrakt-Verhältnisse der Extrakte für die CE 101
Tab. 8-8: Fraktionsmassen der präparativen KG-Säule von „Al_Fr1“ (Sammelfraktionen) 103
Tab. 8-9: erhaltene Fraktionsmassen der präparativen RP-Säule von „DC-B_Fr2“ (Sammelfraktionen) 104
Tab. 8-10: erhaltene Fraktionsmassen der präparativen KG-Säule der DCM-Ausschüttelung „DS_WD_Frak-DCM“ (Sammelfraktionen) 105
Tab. 8-11: Erhaltene Fraktionsmassen der präparativen KG-Säule von „„KG-DCM_Fr3“ (Sammelfraktionen) 106
Tab. 8-12: erhaltene Fraktionsmassen der MPLC von „DS_WD_Frak-Hex“ 108
Tab. 8-13: Erhaltene Fraktionsmassen der präparativen KG-Säule von „MPLC_Fr44“ 110
Tab. 8-14: Erhaltene Sammelfraktionen der beiden präparativen RLCC-Durchläufe von „DS_fW_Frak-n-But“ 111
Tab. 8-15: Mischfraktionen aus beiden präparativen RLCC-Durchläufen von „DS_fW_Frak-n-But“ 112
Tab. 8-16: mittels NMR identifizierte Substanzen 113
Tab. 8-17: ^{1}H-NMR-Daten des isolierten Loganins mit Literaturvergleich 117
Tab. 8-18: ^{13}C-NMR-Daten des isolierten Loganins mit Literaturvergleich 117
Tab. 8-19: ^{1}H-NMR des isolierten Cantleyosids mit Literaturvergleich 122
Tab. 8-20: ^{13}C-NMR des isolierten Cantleyosids mit Literaturvergleich 123
Tab. 8-21: ^{1}H-NMR des isolierten Prinsepiols mit Literaturvergleich 128
Tab. 8-22: ^{13}C-NMR des isolierten Prinsepiols mit Literaturvergleich 128
Tab. 8-23: ^{1}H-NMR der isolierten Ursolsäure mit Literaturvergleich 133
Tab. 8-24: ^{13}C-NMR der isolierten Ursolsäure mit Literaturvergleich 134
Tab. 8-25: Datenbankzuordnung von GC-MS-Peaks von Fraktion „MPLC_Fr3“ 137
Tab. 8-26: Datenbankzuordnung von GC-MS-Peaks der Fraktionen „MPLC_Fr7“, „MPLC_Fr36“ und „MPLC_Fr48“ 139
Tab. 8-27: Gehaltsbestimmung ausgewählter Inhaltsstoffe von *Dipsacus* mittels MEKC 147

Tab. Anhang 13-1: Berechnung der relativen Migration von Loganin, CS und KS im Referenz-Gemisch „„Ref_CE1“ in der CZE-Methode. t = absolute Migrationszeit (bei MeOH: t = Totzeit t_0), t_{netto} = Netto-Migrationszeit, r = relative Migration, SD (r) = Standardabweichung von r, MW (r) = arithmetisches Mittel von r, SD % (r) = relative Standardabweichung von r 206
Tab. Anhang 13-2: Berechnung der absoluten Migrationszeiten aus den relativen Migrationen der drei Referenzgemische und Vergleich mit den tatsächlich gemessenen Zeiten aus dem jeweiligen in 7.4.2.2.2 abgebildeten CZE-Elektropherogramm von „DS_fW_CE1“, „DS_WD_CE1“ und „DA_CE1“ (t (ber.) = (berechnete) absolute Migrationszeit, t_{netto} (ber.) = (berechnete) Netto-Migrationszeit, r = relative Migration, MW (r) = durchschnittliche relative Migration der Referenzsubstanzen aus Tab. Anhang 13-1, %-Abweichung t = prozentuale Abweichung der gemessenen absoluten Migrationszeit von der berechneten absoluten Migrationszeit) 206
Tab. Anhang 13-3: Berechnung der relativen Migration von Loganin, CS und KS im Referenz-Gemisch „Ref_CE1“ in der MEKC-Methode. t = absolute Migrationszeit (bei MeOH: t = Totzeit t_0), t_{netto} = Netto-Migrationszeit, r = relative Migration, SD (r) = Standardabweichung von r, MW (r) = arithmetisches Mittel von r, SD % (r) = relative Standardabweichung von r 208
Tab. Anhang 13-4: Berechnung der absoluten Migrationszeiten aus den relativen Migrationen der drei Referenzgemische und Vergleich mit den tatsächlich gemessenen Zeiten aus dem jeweiligen in 7.4.2.3.2 abgebildeten MEKC-Elektropherogramm von „DS_fW_CE1“, „DS_WD_CE1“ und „DA_CE1“ (t (ber.) = (berechnete) absolute Migrationszeit, t_{netto} (ber.) = (berechnete) Netto-Migrationszeit, r = relative Migration, MW (r) = durchschnittliche relative Migration der Referenzsubstanzen aus Tab. Anhang 13-3, %-Abweichung t = prozentuale Abweichung der gemessenen absoluten Migrationszeit von der berechneten absoluten Migrationszeit) 208
Tab. Anhang 13-5: Berechnung der relativen Retentionen der unbekannten Peaks in Abb. 8-37, Abb. 8-38 und Abb. 8-39 der MEKC-Fingerprintmethode. t = absolute Migrationszeit, t_{netto} = Netto-Migrationszeit, r = relative Migration 210
Tab. Anhang 15-1: Mikroskopische Zähldaten für zwei Wachstumskurven 233
Tab. Anhang 15-2: Mikroskopische Zähldaten der polaren Kardenfraktionen aus dem EtOH-H_2O-Extrakt 234
Tab. Anhang 15-3: Mikroskopische Zähldaten der polaren Kardenfraktionen aus dem EtOH-H_2O-Extrakt (Wiederholung) 236
Tab. Anhang 15-4: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Kardenfraktionen aus dem EtOH-H_2O-Extrakt 239
Tab. Anhang 15-5: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Kardenfraktionen aus dem EtOH-H_2O-Extrakt (Wiederholung) 242
Tab. Anhang 15-6: Mikroskopische Zähldaten der polaren Kardenfraktionen aus dem MeOH-Extrakt 245
Tab. Anhang 15-7: Mikroskopische Zähldaten der polaren Kardenfraktionen aus dem MeOH-Extrakt (Wiederholung) 247
Tab. Anhang 15-8: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Kardenfraktionen aus dem MeOH- Extrakt 250
Tab. Anhang 15-9: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Kardenfraktionen aus dem MeOH-Extrakt (Wiederholung) 253
Tab. Anhang 15-10: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Karden-Hex-Subfraktionen aus dem MeOH-Extrakt 256
Tab. Anhang 15-11: Mikroskopische Zähldaten der apolaren Karden-Hex-Subfraktionen aus dem MeOH-Extrakt (Wiederholung) 259
Tab. Anhang 15-12: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe I 262
Tab. Anhang 15-13: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe I (Wiederholung) 265
Tab. Anhang 15-14: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe II 268
Tab. Anhang 15-15: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe II (Wiederholung) 271

Tab. Anhang 15-16: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe III 274
Tab. Anhang 15-17: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe III (Wiederholung) 277
Tab. Anhang 15-18: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe IV 280
Tab. Anhang 15-19: Mikroskopische Zähldaten ausgewählter Reinstoffe IV (Wiederholung) 283
Tab. Anhang 15-20: Mikroskopische Zähldaten Lösungsmittel und Ladanum 286
Tab. Anhang 15-21: Mikroskopische Zähldaten Lösungsmittel und Ladanum (Wiederholung) 289

20 Formelverzeichnis

Formel 1: Anteil an Gerbstoffen 43
Formel 2: Verzögerungsfaktor 49
Formel 3: temperaturabhängige Stoffkonstante für zwei definierte Flüssigkeiten 68
Formel 4: elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit 72
Formel 5: Wanderungsgeschwindigkeit durch EOF 72
Formel 6: Absorption 84
Formel 7: Borrelien-Konzentration 88
Formel 8: Konzentrationsbestimmung mittels MEKC 147

21 Abkürzungsverzeichnis

Abb. .....Abbildung
ACE .....Angiotensin-Converting-Enzyme
Ac. form. .....Ameisensäure
AcO-*epi*-MO *ent*-3β-Acetoxy-13-*epi*-manoyloxid
AcOH .....Essigsäure
Al_2O_3 .....Aluminiumoxid
APT .....Attached Proton Test
BfArM .....Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BGA .....Bundesgesundheitsamt
BSK-II-Medium, BSK .....Barbour-Stoenner-Kelly-Medium zur Borrelienanzucht
CCC .....countercurrent chromatography (Flüssig-Flüssig-Gegenstromchromatographie)
CCE .....Chirale Kapillarelektrophorese
CD .....Circulardichroismus
CE .....Kapillarelektrophorese
CGE .....Kapillar-Gelelektrophorese
CH_3-Gruppe .....Methylgruppe
$CHCl_3$ .....Chloroform
C. cret. .....*Cistus creticus*
CMC .....kritische mizellare Konzentration
COSY .....Correlated Spectroscopy

CPC.....centrifugal partition chromatography (zentrifugale Verteilungschromatographie)
CS.....Chlorogensäure
CZE.....Kapillarzonenelektrophorese
D. asp. .....*Dipsacus asperoides*
DC.....Dünnschichtchromatographie
DCCC.....droplet-countercurrent chromatography (Tröpfchen-Gegenstromchromatographie)
DCM .....Dichlormethan, Methylenchlorid
DEV .....Droge-Extrakt-Verhältnis
DMSO.....Dimethylsulfoxid
DNA.....Desoxyribonukleinsäure
D. sylv. .....*Dipsacus sylvestris*
EchtB/NaOH .....Echtblausalz B / Natronlauge
EchtR/NH3.....Echtrotsalz B / Ammoniakdämpfe
EE (EtOAc).....Ethylacetat, Essigester
Ehr.....Ehrlichs-Reagenz
EMA.....European Medicines Agency
EOF.....Elektroosmotischer Fluss
ent-13-*epi*-MO *ent*-13-*epi*-Manoyloxid
ESCOP.....European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESI .....Elektrosprayionisation
EtOEt .....Diethylether
EtOH.....Ethanol
EtOH-KOH .....Ethanolische Kalilauge
FCPC.....fast centrifugal partition chromatography (schnelle zentrifugale Verteilungschromatographie)
FM.....Fließmittel
GC.....Gaschromatographie
GC/MS .....Gaschromatographie mit Massenspektrometer als Detektor
H_2O .....Wasser
H_2O (bidest.) .....bidestilliertes Wasser
Hex.....n-Hexan
HMBC.....Heteronuclear Multi Bond Correlation
HMPC .....Committee on Herbal Medicinal Products
HPLC .....high performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
HSCC.....high-speed countercurrent chromatography (Hochgeschwindigkeits-Gegenstromchromatographie)
HSQC.....Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC_{50}.....mittlere inhibitorische Konzentration
IR .....Infrarot
IEF .....Isoelektrische Fokussierung

ITP .....Isotachophorese

KG.....Kieselgel

KS .....Kaffeesäure

LIF .....laserinduzierte Fluoreszenz

MEK.....Methylethylketon, Butanon

MEKC.....Mizellare Elektrokinetische Kapillarchromatographie

MeOH .....Methanol

MO .....*ent*-Manoyloxid

MS.....Massenspektrometrie

MPLC.....Mitteldruckchromatographie

n-But .....n-Butanol

NP .....Normalphase

NMR .....Kernresonanzspektroskopie

NSR/PEG .....Naturstoffreagenz A-Polyethylenglycol 400-Reagenz

OH-Gruppe .....Hydroxygruppe

OH-*epi*-MO.....*ent*-3β-Hydroxy-13-*epi*-manoyloxid

PDA .....photo diode array (Photodiodenzeile)

Pharm. Bio. .....Labore der Pharmazeutischen Biologie, Universität Leipzig

präp. .....präparativ(e)

PS .....Phthalsäure

PS80.....Polysorbat 80, Tween® 80

R_f-Wert.....Retentionsfaktor

RL .....Referenzlösung(en)

RLCC.....rotation locular countercurrent chromatography (rotierende, gekammerte Gegenstromchromatochrophie)

RP.....reversed phase (Umkehrphase)

SC.....Säulenchromatographie

SCPC.....spot centrifugal partition chromatography (punktuelle zentrifugale Verteilungschromatographie)

SDS .....Natriumdodecylsulfat

SiO_2.....Siliciumdioxid

SL.....Stammlösung(en)

s. o. .....siehe oben

Tab. .....Tabelle

TCM.....traditionelle chinesische Medizin

ThyS.....Thymol-Schwefelsäure-Reagenz

UL .....Untersuchungslösung(en)

UV_{254nm} .....254 nm Lichtwellenlänge

UV_{365nm} .....365 nm Lichtwellenlänge

UV/Vis .....ultraviolett und sichtbar (visible), auf Lichtwellenlänge bezogen

VanS.....Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz

Vis.....sichtbares (visible) Licht

Wdhl. .....Wiederholung

z. B. .....zum Beispiel

WEITERE INFORMATIONEN

22 Lebenslauf, Publikationen

22.1 Lebenslauf

Tobias Liebold, * 05.09.1983, verheiratet, ein Sohn: Richard Oliver

Schulbildung

09/1990 - 08/1992:	Friedrich-Schiller Grundschule, Chemnitz
09/1992 - 08/1994:	Dr. Theodor-Neubauer Grundschule, Chemnitz
09/1994 - 07/2002:	Johann-Wolfgang-von-Goethe-Gymnasium, Chemnitz
	Abitur (Note 1,1)

Zivildienst

09/2002 - 06/2003:	ASB Wohnzentrum Chemnitz

Studium

10/2003 - 09/2007:	Pharmaziestudium an der Universität Leipzig
	1. Staatsexamen (Note 1,5)
	2. Staatsexamen (Note 1,0)
03/2004:	4 Wochen Famulatur Paracelsus-Apotheke Chemnitz
08/2004 - 09/2004:	4 Wochen Famulatur Salutas Pharma GmbH, Barleben
11/2006:	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
10/2007 - 06/2008:	1. Halbjahr des praktischen Jahres nach §4 AappO:
	Diplomstudium Pharmazie
08/2008:	Diplom (Note 1,0)
07/2008 - 11/2008:	2. Halbjahr des praktischen Jahres nach §4 AappO:
	Paracelsus-Apotheke Chemnitz
12/2008:	Studienpreis der Fakultät
	für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
12/2008 - 01/2009:	3. Staatsexamen (Note 2,0),
	Pharmazeutische Prüfung (Gesamtnote 1,42)
ab 12/2008:	Promotionsstudium an der Universität Leipzig
01/2009:	Approbation zum Apotheker

Nebentätigkeit im Studium

04/2004 – 06/2004: Studentische Hilfskraft, Pharmazeutische Chemie, Leipzig
09/2006 – 11/2006: Studentische Hilfskraft, Pharmazeutische Biologie, Leipzig
05/2007 – 09/2007: Studentische Hilfskraft, Pharmazeutische Biologie, Leipzig
11/2007 – 12/2007: Wissenschaftliche Hilfskraft, Pharmazeutische Biologie, Leipzig

Beruf

01/2009 – 06/2013: angestellter Apotheker, Paracelsus-Apotheke Chemnitz
seit 07/2013: Inhaber der Paracelsus-Apotheke Chemnitz

22.2 Veröffentlichungen und Poster

03/2007: Poster und Vortrag „Auftrennung der diastereomeren Anthron-C-Glucosyle in Aloe (Ph Eur.) mittels mizellarer elektrokinetischer Kapillarchromatographie“ (Tobias Liebold, Sabine Strahler) beim „1. Young Researcher Meeting”, 30. – 31.03.2007, Münster

12/2007: Short Communication „Separation of diastereomeric anthrone-C-glucosyls of aloes by micellar electrokinetic capillary chromatography” (Tobias Liebold, Sabine Strahler, Hans Wilhelm Rauwald) in “Die Pharmazie 12/2007” Volume 62, Number 12, December 2007, pp. 955-957

08/2008: Poster (PA226, Planta. Med. 9, Vol. 74, July 2008, p. 995) „Antibacterial activities of *Dipsacus sylvestris* HUDS. against *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Bb*ss) *in vitro*” (Tobias Liebold, Reinhard K. Straubinger, Hans Wilhelm Rauwald) beim „7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF” (Natural Products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical interest), 03. – 08.08.2008, Athen, Griechenland

03/2009: Poster „Growth inhibiting activities of *Dipsacus sylvestris* HUDS. against *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Bb*ss) in vitro” (Tobias Liebold, Reinhard K. Straubinger, Hans Wilhelm Rauwald) beim „2. Young Researcher Meeting” (Phytotherapie in der aktuellen Forschung), 13. – 14.03.2009, Münster

11/2009: Vortrag “Karde und Zistrose, Ölbaum und Herzgespann: Wirkungen, phytochemische Implikationen und pharmazeutischer Stellenwert antiker Heilpflanzen“ (Teilthema Kardenwurzel) bei der Veranstaltung „Ein Streifzug

durch die Geschichte und Gegenwart der Pharmazie an der Universität Leipzig – Praxis trifft wissenschaftlichen Nachwuchs“ der DPhG - Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, 07.11.2009, Leipzig

08-09/2010: Poster (P523, Planta. Med. 12, Vol. 76, August 2010, p. 1326) „Micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) for rapid analysis of *Dipsacus sylvestris* HUDS. (Dipsacaceae) and differentiation from other *Dipsacus* species” (Tobias Liebold, Hans Wilhelm Rauwald) beim „58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medical Plant and Natural Product Resaerch”, 29.08. – 02.09.2010, Berlin

12/2010: Poster (Nr. 333) „Micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) for rapid analysis of *Dipsacus sylvestris* HUDS. (Dipsacaceae) and differentiation from other *Dipsacus* species” (Tobias Liebold, Hans Wilhelm Rauwald) beim „9th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2010”, 17.12.2010, Leipzig

05/2011: Poster (P83) „Iridoids of *Dipsacus sylvestris*: Isolation Using Rotation Locular Countercurrent Chromatography” (Tobias Liebold, Lothar Hennig, Hans Wilhelm Rauwald) auf der „Terpnet 2011” (10th International Meeting: Biosynthesis and function of isoprenoids in plants, microorganisms and parasites) 22. – 26.05.2011, Kalmar, Schweden

08/2011: Short Communication „Growth inhibiting activity of lipophilic extracts from *Dipsacus sylvestris* HUDS. roots against *Borrelia burgdorferi* s. s. in vitro” (Tobias Liebold, Reinhard K. Straubinger, Hans Wilhelm Rauwald) in „Die Pharmazie 08/2011” Volume 66, Number 8, August 2011, pp. 628-630

03/2012: Poster „Rotation Locular Countercurrent Chromatography for the isolation of mono- and bis-iridoids from *Dipsacus sylvestris* HUDS.” (Tobias Liebold, Hans Wilhelm Rauwald) beim „3. Young Researcher Meeting” (Phytotherapie in der aktuellen Forschung: Phytochemie, Pharmakologie und klinische Anwendungen), 02. – 03.03.2012, Münster

09/2013: Mitautor auf Poster „On the antispirochaetal activity of manoyloxides and carvacrol from the oleoresin labdanum of *Cistus creticus* L.” (Hans Wilhelm Rauwald, Tobias Liebold, Kristina Grötzinger, Kenny Kuchta, Jörg Lehmann) beim „61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research), 01. – 05.09.2013, Münster

12/2014 Poster (Nr. 46) „Growth inhibiting effects of the lignan prinsepiol isolated from *Dipsacus sylvestris* HUDS. against *Borrelia burgdorferi* s. s. *in vitro*" (Tobias Liebold, Lothar Hennig, Hans Wilhelm Rauwald, Jens Lehmann) beim „13th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2014", 18.12.2014, Leipzig

07/2019: Mitautor von Artikel „Labdanum and Labdanes of *Cistus creticus* and *C. ladanifer*: Anti-*Borrelia* activity and its phytochemical profiling" (Hans Wilhelm Rauwald, Tobias Liebold, Kristina Grötzinger, Jörg Lehmann, Kenny Kuchta) in „Phytomedicine" Volume 60, Juli 2019, 152977

23 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen an entsprechender Stelle genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren: Prof. Dr. Karin Fester, Prof. Dr. Hans Wilhelm Rauwald, Dr. Jens Lehmann, Dr. Jens Knauer, Dr. Lothar Hennig, Jutta Ortwein, Ramona Oehme und Dr. Sabine Liebold. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Chemnitz, den _____ _____

Tobias Liebold

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.