

Gruppe D 6: Clara Dees
Susanne Duncker
Anja Hartmann
Kristin Hofmann

Protokoll

Einleitung

Der heutige Kurs beschäftigte sich mit zwei Versuchen zur Analyse von sekundären Pflanzenstoffen. Ziel beider Versuche war der Nachweis von Cardenoliden in Zellen von *Digitalis lanata* (Wolliger Fingerhut). Cardenolide sind Glycoside, die die Herztätigkeit beeinflussen. Sie bestehen aus einem Steroidgrundgerüst, das an Position 17 mit einem ungesättigten Lactonring substituiert ist (Vgl. Abb. Im Skript S. 105). Im ersten Versuch sollte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) das Spektrum der in *Digitalis* vorhandenen Cardenolide erfasst werden, der zweite Versuch beschäftigte sich mit der Biotransformation von einer *Digitalis*-Zellkultur zugegebenem Digitoxin in das medizinisch am besten verträgliche Cardenolid Digoxin.

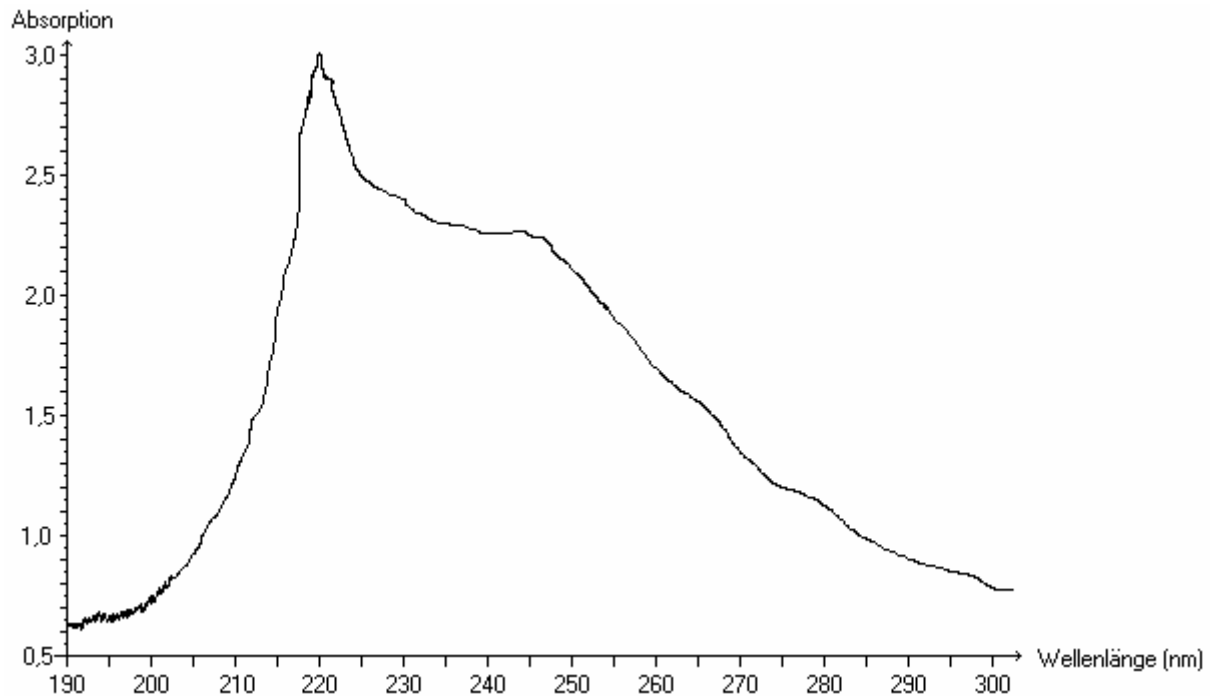
Material und Methoden

Für Versuch 1, die Bestimmung des Cardenolidspektrums von *Digitalis lanata*, wurden vier 100 mg schwere Proben getrockneter *Digitalis*-Blätter auf die im Skript beschriebene Weise aufgearbeitet, um Extrakte für die DC herzustellen. Die Dünnschichtchromatographie wurde in einer HPTLC-Kammer mit Hilfe des nach Skript hergestellten Fließmittels durchgeführt und die DC-Platte anschließend mit Jensen-Kny entwickelt. Der restliche Pflanzenextrakt wurde nach 1:100-Verdünnung für die Messung des Cardenolid-Spektrums im Photometer genutzt.

Bei Versuch 2 handelt es sich um einen Langzeitversuch über 24 Stunden. Zellsuspensionen von *Digitalis* in Flüssigmedium werden mit Digitoxin angereichert und die zu den Zeitpunkten 0h, 4h, 8h und 24h vorhandenen Cardenolide nach getrennter Aufarbeitung (siehe Anleitung Skript S. 108) von Zellen und Medium mittels DC (siehe Anleitung Skript S.108 f.) erfasst.

Auswertung Versuch 1

Eine beschriftete Abbildung der im Versuch erstellten DC-Platte unter UV-Belichtung (365nm) findet sich im Anhang 1 und, vergrößert sowie mit digital optimiertem Kontrast, im Anhang 2 an dieses Protokoll. Als Referenzwerte wurden die Banden von Digitoxin (ganz links im Bild) und einem Gemisch aus Digoxin und Lanatosid C (ganz rechts im Bild) benutzt. Die Banden für die vier hergestellten *Digitalis*-Extrakte befinden sich dazwischen. Sie zeigen an, dass sich in *Digitalis*-Blättern eine große Anzahl verschiedenster Cardenolide befinden, z.B. Digitoxin, Digoxin oder Gitoxin, um nur die wichtigsten zu nennen. Nicht alle dieser Cardenolide sind für den medizinischen Einsatz geeignet und aus den getrockneten Pflanzen lassen sich die gewünschten Stoffe oft nicht in industriell relevanten Mengen isolieren (z.B. machen die Cardenolide nur etwa 0,5% bis 1,5% der Pflanzeninhaltsstoffe aus). Leider konnte die im Photometer bei 190 bis 300nm erhaltene Kurve mangels Hardware nicht ausgedruckt werden. Sie sah aber ungefähr wie in der folgenden, von Hand erstellten Grafik aus:



Die Absorptionskurve bestätigt mit ihrem Maximum bei 220 nm den für Cardenolide erwarteten Wert. Leider macht die auch die Fehler bei der Herstellung des Extrakts deutlich. Bei etwa 250 nm befindet sich ein zweiter Peak, der eigentlich nicht sein sollte. Er entstand durch das Vorhandensein von Chlorophyll bzw. Protochlorophyll, das in diesem Bereich absorbiert. Normalerweise sollte es sich nicht in der Probe befinden, da aber die Extraktion zwei Mal durchgeführt wurde, wurde es teilweise mit extrahiert.

Im Bereich von 190 bis etwa 210 nm macht sich außerdem ein leichtes Rauschen bemerkbar, das auf die UV-Lampe im Spektrometer zurückzuführen ist, die in diesem Bereich noch nicht vollständig stabil ist.

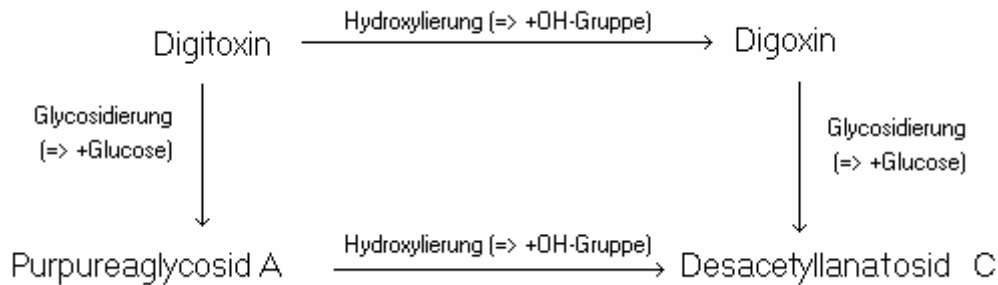
Zur genaueren Bestimmung der in den Blättern vorhandenen Cardenolide hätte im Anschluß an die Dünnschichtchromatographie eine HPLC (High Performance Liquid Chromatography) durchgeführt werden können, was jedoch aufgrund noch nicht ausgereifter Technik/Handhabung der HPLC-Anlagen nicht möglich war. Bei diesem Verfahren erhält man – wie in der Beispielgrafik Anhang 4 zu sehen ist – Absorptionslinien einzelner in der Probe vorhandener Stoffe bei einer bestimmten Wellenlänge. Durch Vergleich mit den Absorptionslinien reiner Proben kann man dann herausfinden, welche Stoffe sich in der Probe befinden. Mit der Höhe der Peaks kann man außerdem Aussagen über die vorhandene Menge dieser Stoffe treffen.

Auswertung Versuch 2

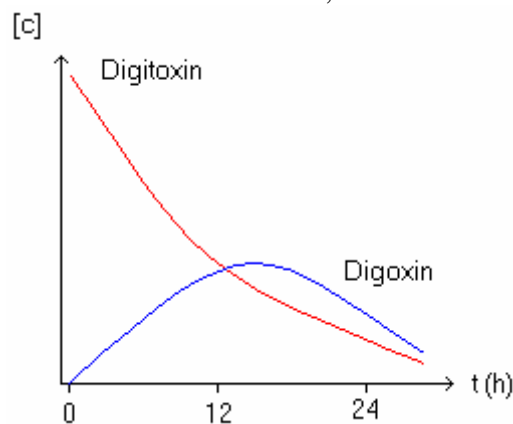
Abbildungen der in diesem Versuch hergestellten Chromatographien finden sich im Anhang 1 sowie vergrößert und beschriftet im Anhang 3.

Bei der Biotransformation, die in den Digitalis-Zellen stattfindet, soll das zugegebene Digitoxin durch Hydroxylierung oder Glucosidierung in anderen Herzglycoside umgebaut werden. Es ergibt sich ein Schema der möglichen Transformationswege des Digitoxins:

Kurs 8 – Naturstoffanalyse

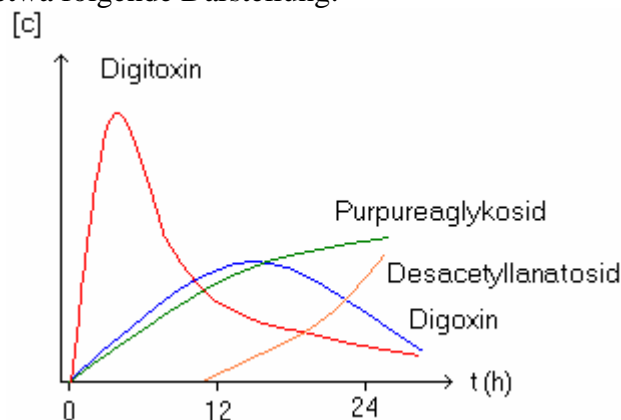


Die DC-Platte des Mediums zeigt an, dass zu jeder Zeit im Medium Digitoxin vorhanden war. Erst bei der Probe zum Zeitpunkt $t = 24$ h ist durch eine schwache Bande das Vorhandensein von Digoxin im Medium nachweisbar, da es durch Diffusion in geringen Mengen aus den Zellen in das Medium gelangt. Purpureaglycosid A und Desacetylkanatosid C werden dagegen nicht im Medium gefunden. Leider gibt die DC in diesem Fall nur wenig Aufschluss über den Verlauf der Konzentrationen während des Versuchs, der müsste aber ungefähr so aussehen:



Die Konzentration von Digitoxin nimmt im Laufe des Versuchs kontinuierlich ab, während die Digoxin-Konzentration im gleichen Maße immer mehr zunimmt. Nach Erreichen einer höchsten Konzentration nimmt die Konzentration wieder ab, da das in das Medium diffundierte Digoxin in die Zellen zurückdiffundiert, weil das dort vorhandene zu Desacetylkanatosid C glycosidiert wurde.

Das DC-Bild des Zellinhalts zeigt für den gesamten Versuchsverlauf das Vorhandensein von Digitoxin an. Außerdem befinden sich in den Zellen noch andere Cardenolide, genauer gesagt Digoxin, Purpureaglykosid A und Desacetylkanatosid C, deren Banden im Laufe des Versuchs immer deutlicher hervortreten. Eine Konzentrationsbestimmung über den gesamten Verlauf des Versuchs ergäbe etwa folgende Darstellung:



Die Konzentration von Digitoxin in der Zelle steigt erst ziemlich stark an, da es aus dem Medium aufgenommen wird. Später sinkt die Konzentration wieder nach und nach, da es von den Zellen weiterverarbeitet wird. Während und nach der Aufnahme von Digitoxin steigen die

Konzentrationen von Purpureaglykosid und Digoxin an, da sie durch die Biotransformation aus dem Ausgangsstoff Digitoxin entstehen (siehe Schema Transformationswege Seite 3). Die Konzentration von Desacetyllanatosid C beginnt erst relativ spät im Laufe des Versuchs zu steigen, da erst Digoxin und Purpureaglykosid vorhanden sein müssen, damit es entstehen kann. Etwa im gleichen Maße wie die Lanatosid-Konzentration steigt, sinkt die Digoxin-Konzentration, da letzteres Ausgangsstoff für ersteres ist.

Bei anderer Zielstellung wäre ein Überdenken des gefütterten Cardenolids nötig. Eine höhere Ausbeute an Digoxin würde nämlich durch Einsatz von Methyldigitoxin anstelle von Digitoxin erreicht, da ersteres über eine Methylgruppe an der Glycosidierungsstelle verfügt. Dadurch kann an Methyldigitoxin und das daraus entstehende Methyldigoxin keine Glucose mehr angehängt werden, das heißt, sie könnten nicht mehr zu den (unerwünschten) Nebenprodukten Purpureaglykosid und Desacetyllanatosid transformiert werden.

Über die Fehlerquellen dieses Versuchs kann unsere Gruppe keine genauen Aussagen treffen, da wir nur den Versuch 1 durchführten. Wir vermuten aber, dass besonders dort, wo genaues Pipettieren gefragt war, sowie beim Extrahieren und beim Auftragen der Extrakte auf die DC-Platten gehäuft Fehler auftraten bzw. auftreten können.