

13. Jänner 2012

Endbericht über die Untersuchungen zur Entwicklung chromatographischer Analysenmethoden zur Charakterisierung von Auszügen aus Wirsingkohl

Problemstellung:

Spezielle, von **Dipl. Tzt. Simon Knafl** zur Verfügung gestellte fermentierte Auszüge aus Wirsingkohl (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *sabauda*) werden äußerlich als Kosmetikum angewendet, um eine pflegende und Hautirritationen vorbeugende Wirkung zu erzielen. Für eine reproduzierbare Herstellung ist eine Standardisierung der Extrakte erforderlich.

Es sollten für diese Extrakte daher erstmalig chromatographische Analysenmethoden entwickelt werden, um die Besonderheit der Zusammensetzung festzustellen und zu charakterisieren. Relevante Inhaltsstoffe sollen möglichst identifiziert werden.

Ergebnisse:

A. Dünnschichtchromatographische Analysen

Mit verschiedenen Trennsystemen wurden dünnschichtchromatographische Analysen bezüglich verschiedener pflanzlicher Inhaltsstoffklassen, welche in Kohlgewächsen vorkommen, durchgeführt und fermentierte und unfermentierte Auszüge verglichen.

Proben:

1: Auszug Ethanol 96% unfermentiert

2: Auszug Ethanol 96% fermentiert

Trennsysteme:

1. Chloroform: Methanol (9:1 v:v)
2. N-Butanol: Essigsäure: Wasser (4:1:5 v:v:v)
3. Chloroform: Methanol: Wasser (26:13:3 v:v:v)
4. N-Butanol: Ethanol: Wasser (4:1:4 v:v:v)
5. EtAc: MeOH: H₂O (100:13,5:10 v:v:v)
6. N-Propanol: 24% Ammoniak (6:4 v:v)

DC-Platten: Kieselgel 60 F₂₅₄- Fertigplatten (Merck)

Ad 1) a



1

2

1= ethanolischer Auszug, unfermentiert

2= ethanolischer Auszug, fermentiert

Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure (Detektionsmittel für höhere **Alkohole, Phenole, Steroide und ätherische Öle**)

Man sieht, dass Unterschiede festzustellen sind. Im fermentierten Auszug sind die gefärbten Banden im R_f -Bereich 0,73 – 0,86 stärker und im Startbereich wesentlich weniger als beim unfermentierten Auszug.

Ad 1) b



1

2

1= ethanolischer Auszug, unfermentiert

2= ethanolischer Auszug, fermentiert

Detektion mit Kaliumhexacyanoferrat(III)-Eisen(III)-chlorid (Detektionsmittel für **Isothiocyanate**)

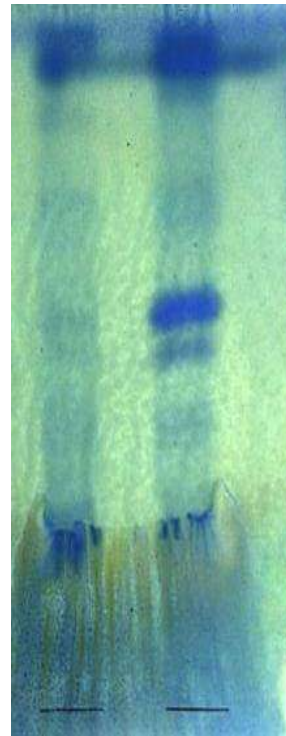
Auch bei diesem Chromatogramm sind deutliche Unterschiede zu sehen. Im fermentierten Auszug sind 2 starke dunkelblaue Banden ($R_f = 0,62$ und $R_f = 0,37$) zu sehen, im unfermentierten Auszug sind dagegen 2 schwächere Banden im R_f -Bereich 0,60 und im Bereich 0,22- 0,37 3 schwache Banden zu erkennen.

Ad 2)



1 2

Detektion: UV 366



1 2

Detektion mit Kaliumhexacyanoferrat(III)-
Eisen(III)-chlorid

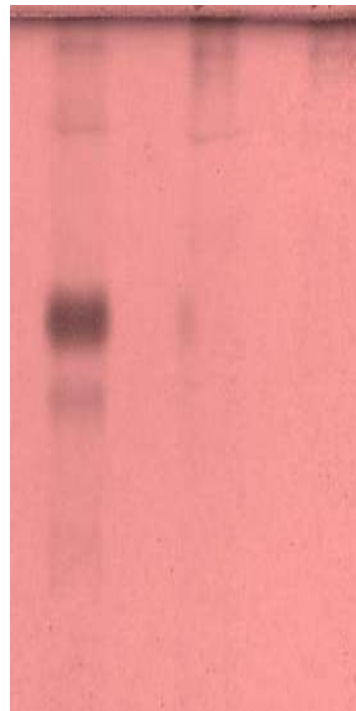
Das Laufmittel Nummer 2 ist nicht so gut geeignet, aber auch hier sieht man Unterschiede zwischen den beiden ethanolischen Auszügen, vor allem bei den Isothiocyanaten ist eine ganz starke Zone bei Rf- Wert 0,65 zu sehen.

Ad 3) a = Detektion NA; UV 366nm (für Flavonoide)

b = Detektion Vanillin-Schwefelsäure



1 2



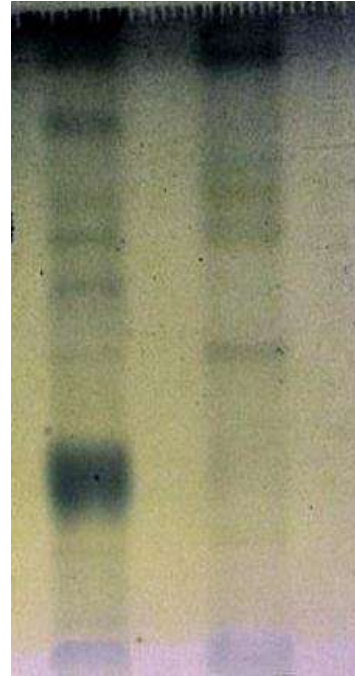
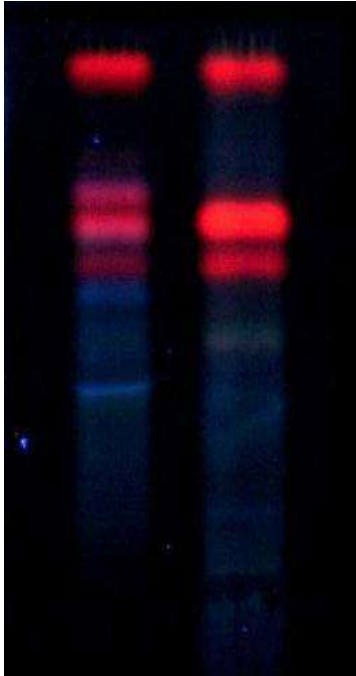
1 2 2

Auch das 3. Laufmittel ist nicht sehr aussagekräftig, aber auch hier ist ein Unterschied zwischen dem fermentierten und unfermentierten Auszug zu erkennen.

Ad 4) a = Detektion: UV 366nm

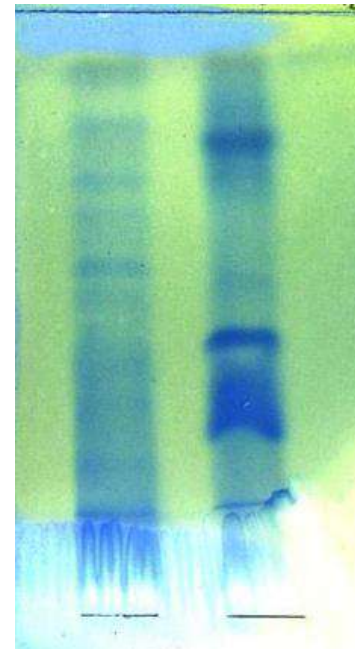
b = Detektion: Molybdatophosphorsäure
(vor allem für **Lipide, Sterine und Steroide**)

Hier sieht man eine intensive blau gefärbte Zone bei $R_f = 0,31$ und einen starken Fleck bei $R_f = 0,9$, im fermentierten Auszug sind die gefärbten Banden schwächer und die intensive Zone ist nicht zu sehen.



c = Detektion: Vanillin-Schwefelsäure

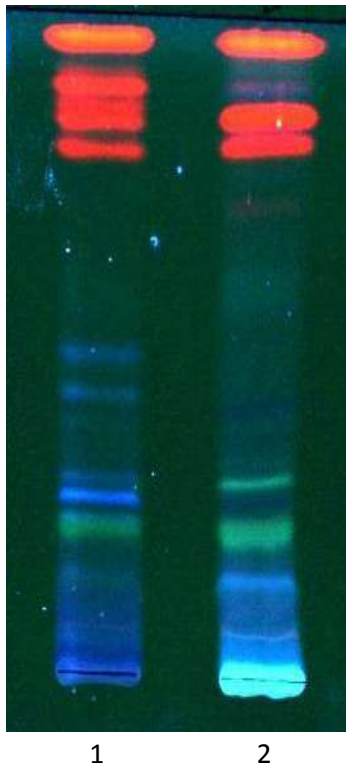
d = Detektion: Kaliumhexacyanoferrat(III)-Eisen(III)-chlorid



Bei der Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure (c) ist dieselbe intensive Zone zu sehen wie bei der Detektion mit Molybdato-Phosphorsäure. Bei den Isothiocyanaten im rechten Chromatogramm

(d) sieht man wieder deutlich Auszug die Unterschiede zwischen fermentierten und unfermentierten Auszug. Intensive blaue Banden im Bereich $R_f=0,30 - 0,44$ und $R_f= 0,75$.

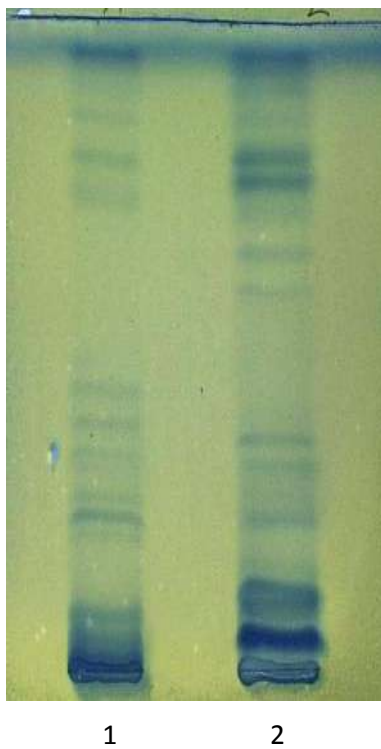
Ad 5) a = Detektion: UV366nm



b= Detektion: Vanillin-Schwefelsäure



c = Detektion: Kaliumhexacyanoferrat(III)-
Eisen(III)-chlorid



Auch bei diesem Laufmittel sind die Unterschiede zwischen den beiden ethanolischen Auszügen zu erkennen.

Ad 6) Detektion: Ninhydrin-Lösung (1g Ninhydrin in 10 ml Eisessig lösen und auf 100 ml mit Aceton auffüllen – für **Aminosäuren** und Amine und auch **Glucosinolate**).

Bei diesem Chromatogramm sind die Unterschiede am deutlichsten zu erkennen. Im Rf- Bereich von 0,37-0,75 sind sehr starke orangerote Banden zu erkennen, die im unfermentierten Auszug entweder ganz schwach oder gar nicht zu erkennen sind.



Für Probe **3** (Oleum lineum – unfermentiert **3** und Probe **4** (Oleum lineum – fermentiert).

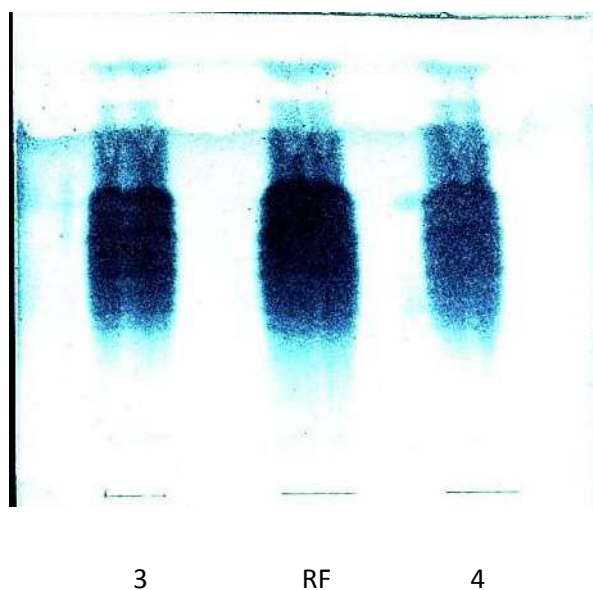
DC: Kieselgel RP 18 Platte

Laufmittel: 1. Ether (Laufstrecke 0,5 cm; 2x)

2. Dichlormethan/Essigsäure 99%/ Aceton 20:40:50 v:v:v: 2x

Detektion: Molybdätophosphorsäure in Ethanol 96% - 3 min bei 120 Grad C erhitzen.

Referenz (RF): Leinöl



In den öligen Extrakten (Proben 3 und 4) dominieren sehr stark die Inhaltsstoffe des Leinöles und überdecken die Wirsinginhaltstoffe. Für die Proben 3 und 4 konnten keine Laufmittel gefunden werden, die eine Detektion der Wirsinginhaltstoffe erlaubt.

Daher wurden die öligen Extrakten nicht weiter untersucht.

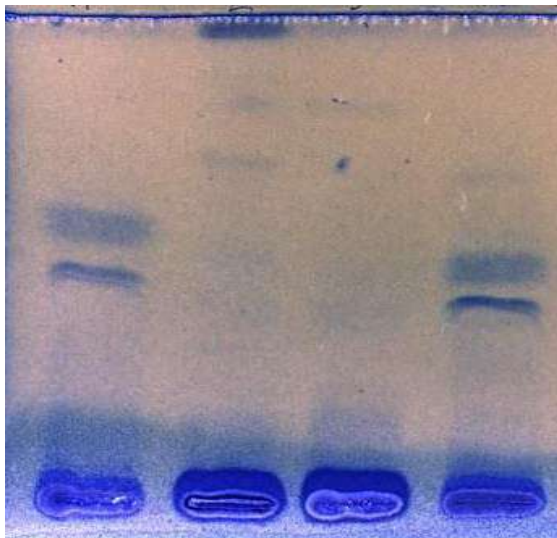
Untersuchung weiterer Proben:

- Kohl frisch- nicht erhitzt
- Kohl fermentiert- nicht erhitzt
- Kohl erhitzt- unfermentiert
- Kohl erhitzt und fermentiert
- fermentierte alkoholische Probe.

DC- Versuche mit verschiedenen Laufmitteln: für Kohl (Wasserextrakt) frisch und fermentiert, nicht erhitzt und erhitzt

Kieselgel 60 F₂₅₄- Platten

1. Chloroform: Methanol(9:1v:v)
2. EtAc: MeOH: H₂O (100:13,5:10 v:v:v)
3. N-Propanol: 24% Ammoniak (6:4 v:v)



1= fermentiert- nicht erhitzt

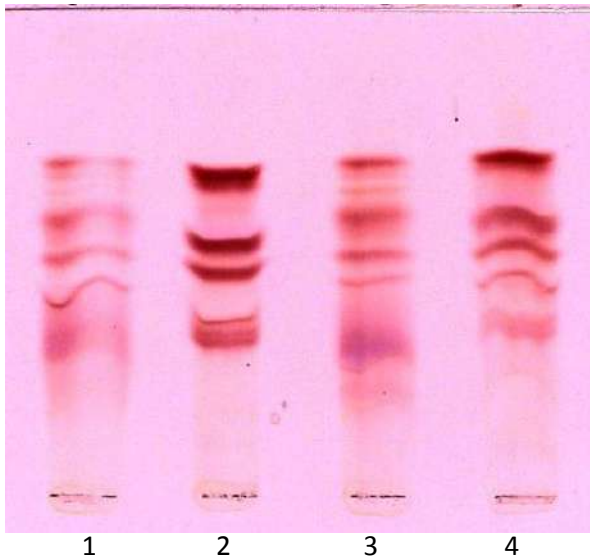
2= frisch- nicht erhitzt

3= erhitzt

4= fermentiert- erhitzt

Detektion: Kaliumhexacyanoferrat(III)-Eisen(III)- chlorid

Wie bei den ethanolischen Auszügen, so kann man auch hier die Unterschiede deutlich erkennen. In den fermentierten Auszügen sind sowohl erhitzt, wie auch nicht erhitzt, bei den Isothiocyanaten im R_f- Bereich 0,33- 0,4 3 starke blaue Banden sichtbar, die im unfermentierten Auszug nur sehr schwach zu erkennen sind.



1= frisch – nicht erhitzt

2= fermentiert- nicht erhitzt

3= erhitzt

4= fermentiert und erhitzt

Laufmittel: n-Propanol/24% Ammoniak

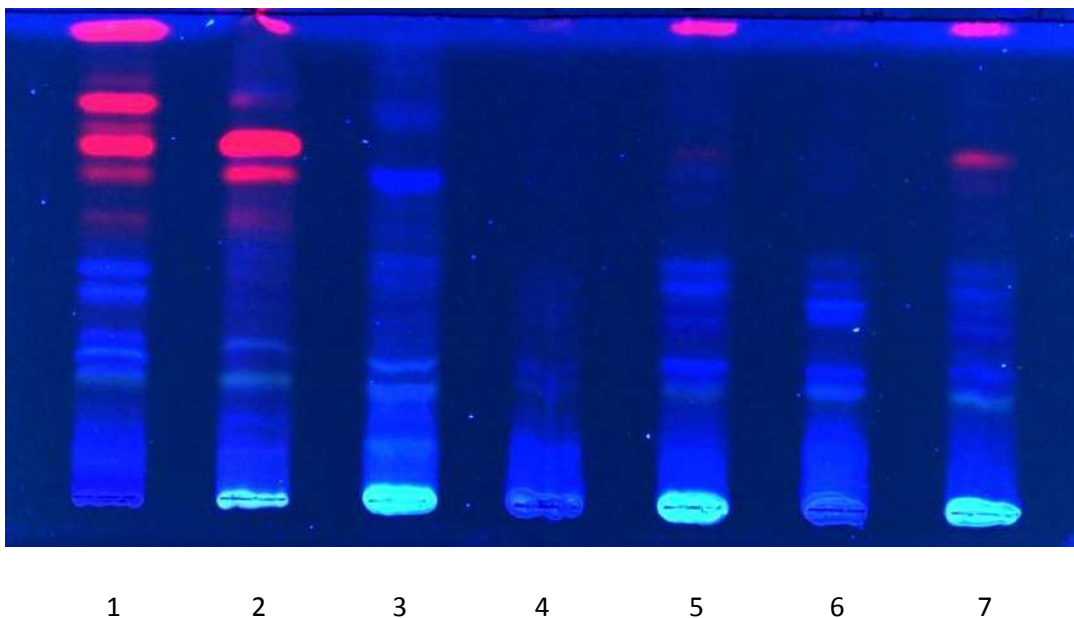
30:20 v:v

Detektion: Ninhydrin-Lösung

Auch hier sind in den fermentierten Auszügen die sichtbaren Banden wesentlich stärker, als in den unfermentierten. Man kann aber auch erkennen, dass im erhitzten Zustand die Banden im fermentierten Zustand etwas schwächer werden.

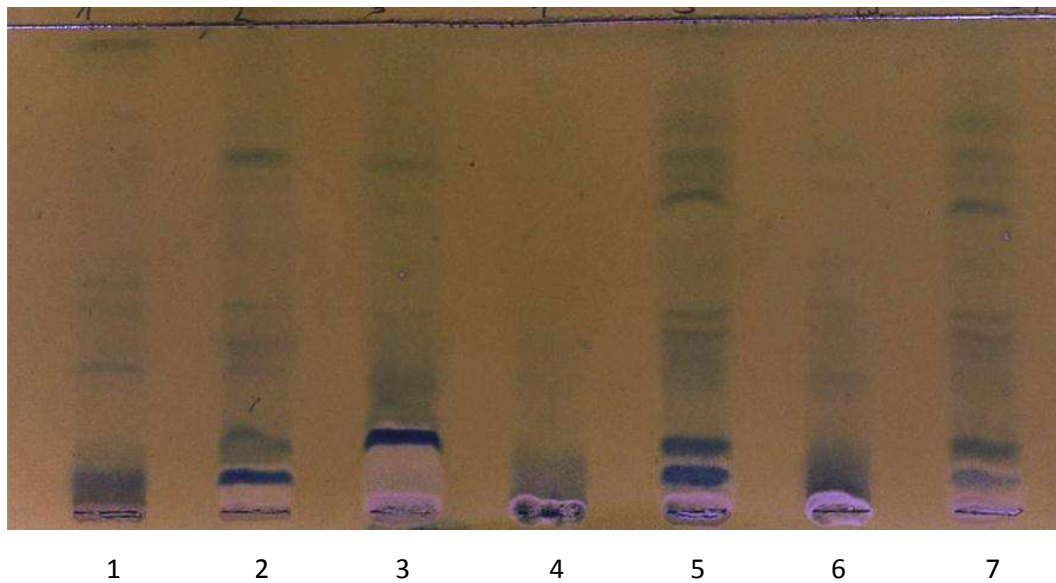
DC-Vergleich: ethanolische und wäßrige Auszüge

Laufmittel: Ethylacetat/Methano/Wasser(100:13,5:10 v:v:v)- UV 366 nm



Laufmittel: Ethylacetat/Methanol/Wasser(100:13,5:10 v:v:v)

Detektion: Kaliumhexacyanoferrat(III)-Eisen(III)-chlorid



1= Alkohol unfermentiert (erste Sendung)

2= Alkohol fermentiert (erste Sendung)

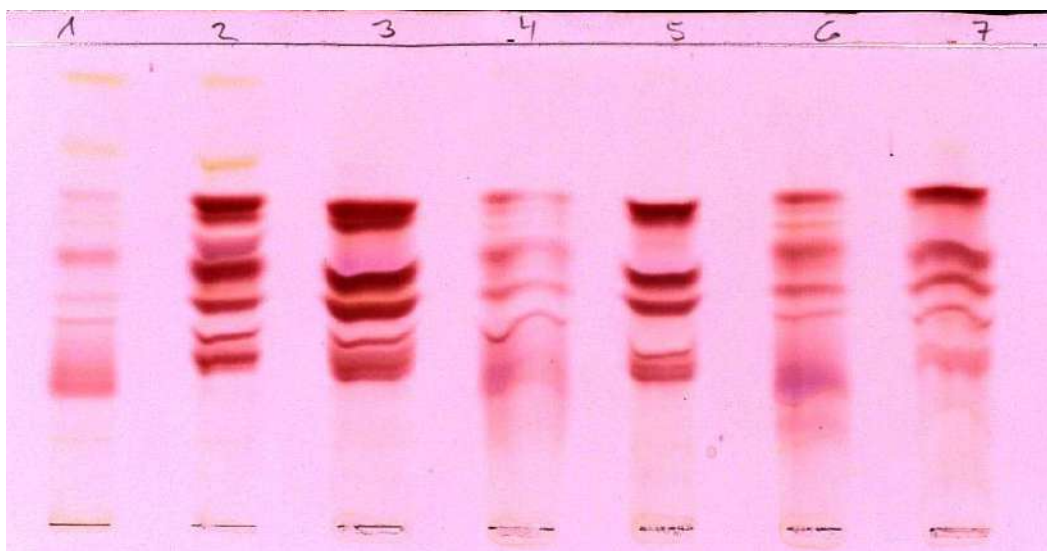
3= Alkohol fermentiert (neue Sendung)

4= frisch- nicht erhitzt

5= fermentiert- nicht erhitzt

6= erhitzt

7= fermentiert-erhitzt



1-7 = gleich wie oben

Laufmittel: n-Propanol/24% Ammoniak(30:20 v:v)

Detektion: Ninhydrin-Lösung

B) Hochleistungsflüssigchromatographische Analysen

Trennparameter:

Gerät: Merck-Hitachi D-7000 mit
Diode Array Detector L-7455

Säule: LiChroCart 125-4 mit
LiChrospher 100 RP 18 (5µm)
Merck

Vorsäule: LiChroCart 125-4 mit
LiChrospher 100 RP 18 (5µm),
Merck

Mobile Phase: A: Wasser + 0,1% o- Phosphorsäure
B: Acetonitril

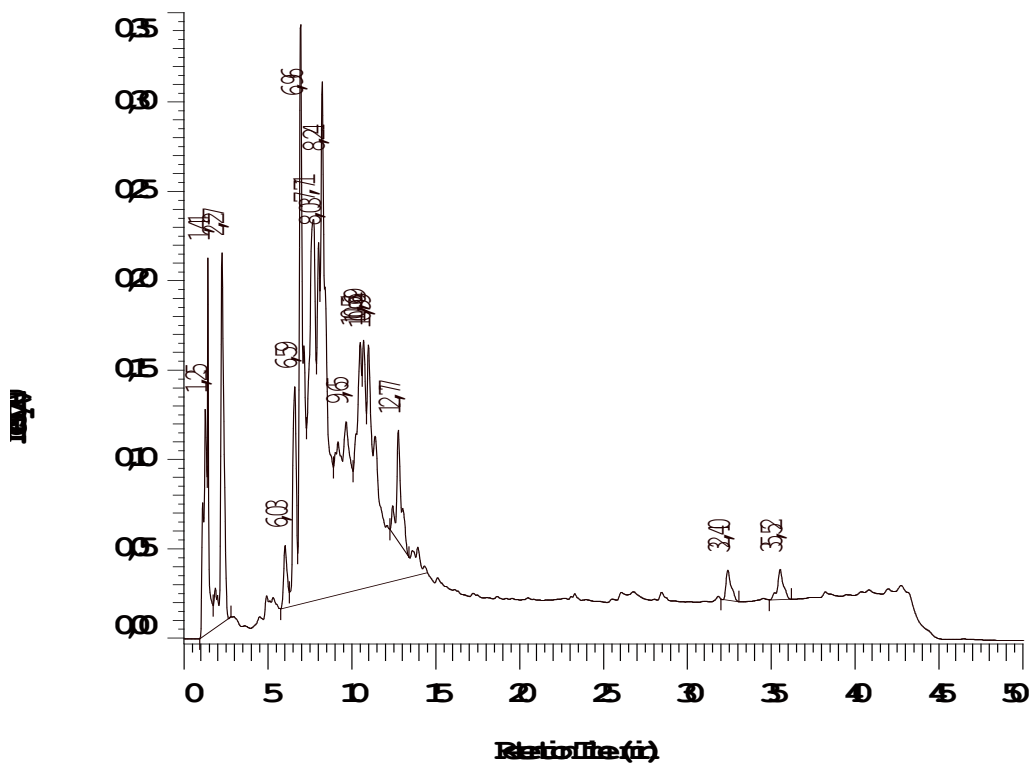
Gradient:	Time	LM A	LM B
	0,0	95,0	5,0
	40,0	5,0	95,0
	41,0	95,0	5,0
	50,0	95,0	5,0

Fluss: 1,0 ml/min

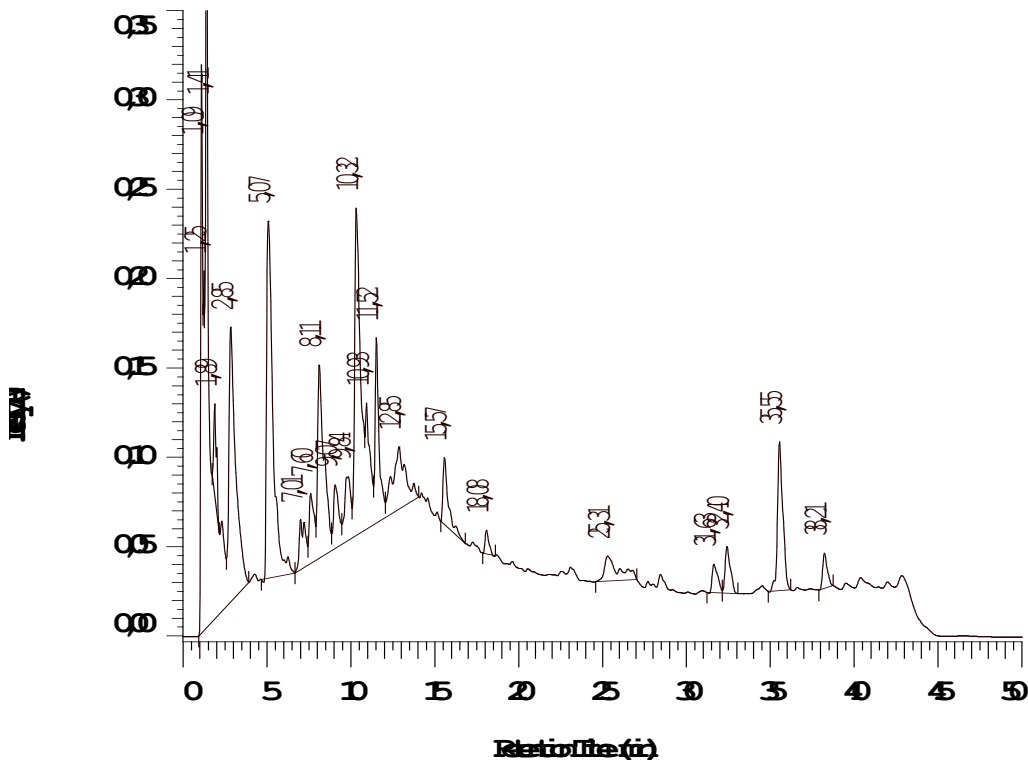
Detektion: 210nm

Injektion: 10µl

Probe 1- unfermentiert



Probe 2-fermentiert



Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die fermentierten und unfermentierten Auszüge unterscheiden. Beim fermentierten Auszug sind zusätzliche intensive Peaks (Substanzen) bei der Retentionszeit von 2,85 min und 5,07 min zu erkennen, und der Peak bei 35,55 min hat an Intensität zugenommen.

Fermentierte und unfermentierte Auszüge sind somit auch mittels HPLC zu unterscheiden und eine Standardisierung könnte entsprechend erfolgen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass große Unterschiede zwischen fermentierten und unfermentierten Auszügen feststellbar sind. Die Isothiocyanate und Glucosinolate bzw. Aminosäuren sind im fermentierten Auszug stärker sichtbar als im unfermentierten. Im erhitzten Zustand sind sie aber weniger stark ausgeprägt, als im alkoholischen und im nicht erhitzten wässrigen Auszug.

Die gefundenen typischen Inhaltsstoffe könnten nun isoliert und die pharmakologische Wirkung untersucht werden um daraus ein Präparat zu entwickeln.

R. Bauer

Univ.-Prof. Dr. Rudolf Bauer