

**Neue Wirkstoffe aus der Flora des Himalaya?
Identifizierung von Diterpenalkaloiden aus *Aconitum*-Arten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Jakob Maier
aus Dornach (SO)

Basel, 2004

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag von

Professor Dr. W. Schaffner

Professor Dr. M. Oehme

Basel, den 06.04.2004

Prof. Dr. M. Tanner

Dekan

für meine Eltern und R.

*J'ai cueilli cette fleur pour toi sur la colline.
Dans l'âpre escarpement qui sur le flot s'incline,
Que l'aigle connaît seul et seul peut approcher,
Paisible, elle croissait aux fentes du rocher.*

Victor Hugo

*„... a supply of Aconite of known botanical origin is still a desideratum in pharmacy.“
(Dymock et al., 1890)*

*„The greatest needs are for improvements in the microscale (GC-MS, HPLC-MS) analysis of
the complex mixtures of alkaloids obtained from plant sources.“ (Benn, 1993)*

Dank

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Dr. A. Katz, Ehrendozent der Universität Basel, im Labor für Naturstoff-Forschung in Basel durchgeführt von 11.1993 bis 7.1998. Ich danke ihm für sein grosses Interesse bei der Begleitung der Arbeit und die Forschungsmöglichkeit.

Herrn Prof. W. Schaffner, pharmazeutische Biologie, Departement Pharmazie, danke ich, dass er sich im Mai 2003 bereit erklärt hat, mich für den Abschluss der Arbeit als Doktorvater zu unterstützen.

Herrn Prof. M. Oehme, organische-analytische Chemie, Universität Basel danke ich für die Übernahme des Korreferats, für die intensive und konstruktive Korrektur des Manuskripts und für seine Bereitschaft, den analytischen Teil mit HPLC-MS zusammen mit Stefan Kölliker durchführen zu können.

Stephan Kölliker, organische-analytische Chemie, Universität Basel danke ich für sein grosses Engagement und Interesse und die erfreuliche Zusammenarbeit zur Erstellung einer HPLC-MS-Methode zum Nachweis der *Aconitum*-Alkaloide.

Herrn Prof. H.H.A. Linde danke ich für die freundliche Unterstützung der Arbeit und für die Möglichkeit, Untersuchungen mit DC-Scanner und NMR am pharmazeutischen Institut der Universität Basel durchführen zu können.

Herrn Prof. J.C. Aschoff, Universität Ulm, danke ich für die Beschaffung und Zurverfügungstellen von *Aconitum*-Knollen aus Indien und von tibetischen Juwelenpillen (Byu-Dmar) aus dem ganzen Himalaja-Raum und den durch ihn erhaltenen Kontakt zur tibetischen Medizin.

Den Mitarbeiterinnen des pharmazeutischen Instituts Frau S. Spengel und Frau Dr. V. Dora danke ich für die Anleitung bei NMR-Messungen und Aufnahmen mit dem DC-Scanner.

Den Mitarbeitern des Labors für Naturstoff-Forschung, Basel - insbesondere Frau Dr. Hongmei Liu und Herrn Dr. Pradeep Shrestha – danke ich für die Unterstützung und freundschaftliche Atmosphäre.

Meiner Schwester Elisabeth danke ich für die Begleitung auf der Reise 1995 nach Indien und beim Sammeln von *Aconitum violaceum*. Meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung und Motivation zur Fertigstellung. Dr. Susan Grange bin ich hierfür ganz besonders zu Dank verpflichtet.

Mr. Prakash Dhama, Chamba, der die Trekking-Tour in Nordwest-Indien leitete und allen Kontaktpersonen in Indien.

Den Kolleginnen und Kollegen der Apotheke zum Wendelin in Riehen und der Weleda AG in Arlesheim.

Der Senglet-Stiftung (Förderung des pharmazeutischen Nachwuchses in Basel) für die Gewährung eines Stipendiums von Juni 1996 bis Mai 1998.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	1
A Allgemeiner Teil	4
A.1 Einleitung und Zielsetzung	4
A.2 Die Gattung <i>Aconitum</i>	5
A.2.1 <i>Aconitum</i> -Arten im Himalaja.....	6
A.2.1.1 <i>Aconitum</i> -Knollen und in Indien als ‘Ferox-Gruppe’ gehandelte Droge.....	8
A.2.1.2 Medizinische Verwendung von <i>Aconitum</i>	9
A.2.1.3 Gefährdete Eisenhut-Arten.....	10
A.3 Diterpenalkaloide.....	11
A.3.1 Diterpen- und Nordditerpenalkaloide	11
A.3.1.1 Weitere Unterteilung des Aconitin-Typs (sensu latiore) in Strukturtypen	13
A.3.1.2 Unterscheidung der Nordditerpenalkaloide nach Veresterungsgrad	15
A.3.1.3 Stabilität der Esteralkaloide.....	17
A.3.1.4 Basizität von Diterpenalkaloiden	18
A.3.2 Pharmakologie und Toxikologie der Nordditerpenalkaloide	19
A.3.2.1 Wirkungsmechanismus von Aconitin (20).....	19
A.3.2.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	19
A.3.2.3 Vergiftungen mit <i>Aconitum</i>	22
A.4 Untersuchte <i>Aconitum</i>-Arten und deren Alkaloide	22
A.5 Behandeln von <i>Aconitum</i>-Knollen.....	26
A.5.1 Behandlungsmethoden.....	26
A.5.2 Haupteffekte des „processings“	28
A.5.3 Pharmakologische und analytische Untersuchungen zu verschiedenen “Entgiftungsmethoden” der asiatischen Medizinalsysteme.....	28
A.5.3.1 Behandlungsmethoden in der Ayurveda.....	29
A.5.3.2 Behandlungsmethoden in der tibetischen Medizin.....	30
A.5.3.3 Behandlungsmethoden in der traditionellen chinesischen Medizin.....	31
A.5.3.4 Moderne Behandlungsmethoden wie Autoklavieren.....	32
A.5.3.5 Kommentare zum „processing“	33
A.6 Tibetische Juwelenpillen Byu-Dmar 25 und Byu-Dmar 13 und <i>Aconitum</i>	34
A.7 Analytik	38
A.7.1 Extraktionsmethode	38
A.7.2 Chromatographische Trennmethode.....	39
A.7.2.1 Dünnschichtchromatographie.....	40

A.7.2.1.1	<i>R_B</i> -Wert: Retention bezogen auf <i>Bikhaconitin</i>	40
A.7.2.2	Gaschromatographie (GC)	41
A.7.2.3	HPLC (hochauflösende Flüssigchromatographie).....	42
A.7.3	Spektroskopie und Detektionsmethoden	43
A.7.3.1	Kernresonanzspektrometrie (NMR)	44
A.7.3.2	UV-Absorptionsspektroskopie	44
A.7.3.3	Massenspektrometrie (MS)	45
A.7.3.3.1	Fragmentierung von Diterpenalkaloiden mit EI	45
A.7.3.3.2	HPLC-MS-Kopplung.....	46
A.7.3.3.2.1	ESI (Electrospray Ionisation)	47
A.7.3.3.2.2	APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation).....	47
A.7.3.3.3	Bisherige Untersuchungen an <i>Aconitum</i> mit HPLC-MS.....	48
A.7.3.4	Tandem- und multiple Massenspektrometrie (MS ⁿ).....	49
A.8	Aufgabenstellung und Wahl der Methoden	51
B	DC-Untersuchung indischer <i>Aconitum</i>-Arten	53
B.1	Einleitung.....	53
B.2	Ziel.....	53
B.3	Begründung	53
B.4	Material und Methoden	54
B.4.1	Auswahl der Referenzsubstanzen	54
B.4.2	Chemikalien.....	54
B.4.3	Proben	55
B.4.3.1	<i>Aconitum</i> -Knollen: Herkunft und Identifizierung	56
B.4.3.2	Tibetische Juwelenpillen	62
B.4.4	Geräte.....	63
B.4.5	Methoden	65
B.4.5.1	Extraktion der <i>Aconitum</i> -Knollen und Reinigung der Rohextrakte.....	65
B.4.5.2	Extraktion von Alkaloiden aus Juwelenpillen	70
B.4.5.3	DC-Trennung und Detektion (TLC-Scanner).....	73
B.4.5.3.1	DC-Systeme.....	73
B.4.5.3.2	Entwicklung der DC-Platten	73
B.4.5.3.3	DC-Trennungen.....	74
B.4.5.3.4	Detektion der Dünnschichtchromatogramme.....	74
B.4.5.3.4.1	DC-Scanner: In-situ-UV-Remissionsspektren und Mehrwellenlängen-Scan.....	75
B.4.5.3.5	Identifizierung der Alkaloide mit DC	76
B.4.5.4	Isolierung von Alkaloiden mit präparativer DC	76
B.4.5.4.1	NMR-Spektren zur Identifizierung der isolierten Alkaloide	79
B.5	Resultate und Diskussion	80
B.5.1	DC-Scanner-Detektion	80
B.5.1.1	In-situ-Remissionsspektren	80
B.5.1.1.1	Esterfunktionstypen	80
B.5.1.2	Unterscheidung der aromatischen Esterfunktion mit MWL.....	82
B.5.1.3	Unterscheidung überlagerter Substanzen	83
B.5.1.4	Einsatzgrenzen der DC-Scanner-Detektionsmethode.....	83
B.5.2	Kommentare zu Trennung und Detektion	85
B.5.3	Resultate des DC-Screenings	86
B.5.3.1	Ergebnisse der DC-Trennungen von <i>Aconitum</i> -Knollenproben	86

B.5.3.2	Mit DC identifizierte sowie tentativ identifizierte Alkaloide	93
B.5.3.3	Vergleich der <i>Aconitum</i> -Knollenproben AcK _{Del_3} / AcK _{Del_p} und AcK _{Del_1}	94
B.5.3.4	Hinweis auf weitere vorhandene Alkaloide.....	94
B.5.4	Isolierte Alkaloide	95
B.6	Daten zur ¹³C-Kernresonanzspektroskopie	96
B.7	Schlussfolgerungen zur DC-Untersuchung	100
C	HPLC-MSⁿ zum Nachweis von Norditerpenalkaloiden	101
C.1	Einleitung.....	101
C.2	Ziel.....	101
C.3	Begründung	101
C.4	Material und Methoden	102
C.4.1	Referenzsubstanzen	102
C.4.1.1	Auswahl der Referenzsubstanzen.....	102
C.4.1.2	Semisynthese von Ludaconitin und Falaconitin	103
C.4.2	Chemikalien	104
C.4.3	Proben	104
C.4.4	Geräte.....	105
C.4.5	Methoden	106
C.4.5.1	HPLC-Trennung und Detektion (multiple MS).....	106
C.4.5.1.1	<i>Trennsysteme</i>	106
C.4.5.1.2	<i>HPLC-Trennungen</i>	107
C.4.5.1.3	<i>Standards</i>	107
C.4.5.1.4	<i>Atmosphärendruck-Ionisierung</i>	109
C.4.5.1.5	<i>Multiple Massenspektrometrie zur Strukturauflösung</i>	109
C.4.5.2	Quantifizierung.....	110
C.4.5.2.1	<i>Reserpin als interner Standard und Herstellung der ISTD-Lösung</i>	110
C.4.5.2.2	<i>Herstellung von Standard IV mit Verdünnungs- und der Kalibrierreihe</i>	110
C.4.5.2.3	<i>Probenlösungen</i>	111
C.4.5.2.4	<i>Identifizierung und Integration der Signale</i>	112
C.4.5.2.5	<i>Berechnung der Kalibriergeraden und Ansprechfaktoren</i>	112
C.4.5.2.6	<i>Berechnung der Alkaloidgehalte in Proben</i>	115
C.4.5.2.7	<i>Linearität</i>	115
C.4.5.2.8	<i>Präzision</i>	115
C.5	Resultate und Diskussion	117
C.5.1	Ionisierungsmethode und Eignungsabklärung an Modellsubstanzen.....	117
C.5.2	Strukturauflösung mit multipler Massenspektrometrie.....	118
C.5.2.1	Wahl der Basisionen zur MS ⁿ -Fragmentierung.....	118
C.5.2.2	Relative Intensität der MS ² - und MS ³ -Fragmente	118
C.5.2.3	Grundsätzliche Kommentare zur Fragmentierung.....	122
C.5.2.3.1	<i>Bildung des MS²-Basisions:</i>	122
C.5.2.3.2	<i>Position von Hydroxylgruppen</i>	123
C.5.2.3.3	<i>Abspaltung von aromatischen Säuren und charakteristische Fragmente für Pseud- und Bikhacconitin-Typ</i>	127
C.5.2.4	Bildung einer C(8)-C(15)-Doppelbindung und Vergleich von Pseudoaconitin (16) und Falaconitin (27) 128	
C.5.2.5	Bildung des C(15)-Ketons und Vergleich von Aconitin (20) und Pseudoaconitin (16).....	130

C.5.2.6	Vergleich der sterischen Isomere Bikhaconitin (15) und 8-Acetylfalconerin (18).....	134
C.5.2.7	Tentativ identifizierte Alkaloide.....	135
C.5.2.7.1	<i>Hydrolyse- und Methanolyseprodukte</i>	140
C.5.2.7.2	<i>Lipoalkaloide</i>	141
C.5.2.7.3	<i>8,14-Diaroylalkaloide</i>	142
C.5.2.7.4	<i>Falconerin (12)</i>	144
C.5.2.7.5	<i>Falconeridin (14)</i>	145
C.5.2.7.6	<i>Chasmanin (3)</i>	146
C.5.3	Diskussion der Quantifizierung.....	148
C.5.4	HPLC-MS als Nachweismethode.....	151
C.5.5	Resultate des HPLC-MS-Trennungen.....	152
C.5.5.1	Vergleich von HPLC-Trennung 1 und 2.....	152
C.5.5.2	Zusammenhang der chromatographischen und pharmakologischen Eigenschaften.....	154
C.5.5.3	Alkaloidmuster der untersuchten Proben.....	155
C.5.5.3.1	<i>Alkaloide aus A. falconeri und A. spicatum</i>	155
C.5.5.3.2	<i>Alkaloide von A. violaceum (AcK_{violac})</i>	157
C.5.5.3.3	<i>Verhältnis von Monoester- zu Diesteralkaloidanaloga als Ansatz zur Abschätzung des „processing“-Effekts auf das Alkaloidmuster von Aconitum-Knollen</i>	158
C.5.5.3.4	<i>Knollenproben</i>	159
C.5.5.3.5	<i>Tibetische Juwelenpillen (Byu-Dmar)</i>	160
C.5.5.4	Pharmakologische Bedeutung der Verhältnisse zwischen Alkaloiden, insbesondere Mono- und Diesteralkaloidanaloga.....	162
C.6	Schlussfolgerung und Ausblick	164
D	Anhang	166
D.1	Quantifizierung von Diterpenalkaloiden mit HPLC-MS	166
D.1.1	Rohdaten zur Kalibrierreihe.....	166
D.1.2	Rohdaten zu den untersuchten Extrakten von <i>Aconitum</i> -Knollen und Byu-Dmar-Pillen.....	169
	Literaturverzeichnis	172
	Lebenslauf	178

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Grundgerüste der Diterpenalkaloide	12
Abbildung 2:	Einteilung der C ₁₉ -Norditerpenalkaloide in vier Strukturtypen mit typischen Oxidationszentren und weiteren Substituenten.	13
Abbildung 3:	Unterteilung des Aconitin-Typs (sensu latiore) in fünf Strukturtypen gemäss Hanuman & Katz (1994c).....	14
Abbildung 4:	Atisin (104) und Hetisin (105) als Beispiele stark basischer C ₂₀ -Diterpenalkaloide.....	18
Abbildung 5:	Strukturen zu Tabelle 5	20
Abbildung 6:	Aconitifforme Teilstruktur	21
Abbildung 7:	Lage von Chamba im indischen Himalaya.....	56
Abbildung 8:	<i>Aconitum violaceum</i> Jaquem. am Standort und ausgegrabene ganze Pflanze	58
Abbildung 9:	Herbarexemplar von <i>Aconitum violaceum</i> JACQUEM.	59
Abbildung 10:	Extraktionsschema für Aconitum-Knollen.....	66
Abbildung 11:	Charakteristische UV-Absorptionsmaxima von In-situ-UV-Remissionspektren zur Unterscheidung von Alkaloiden nach Esterfunktionstypen	82
Abbildung 12:	DC-Trennung I in MWL-Darstellung	90
Abbildung 13:	DC-Trennung II in MWL-Darstellung.....	91
Abbildung 14:	DC-Trennung III in MWL-Darstellung.....	92
Abbildung 15:	Strukturen zu Tabelle 33	96
Abbildung 16:	Struktur von Reserpin.....	104
Abbildung 17:	Darstellung der Linearität anhand der auf m normalisierten Ansprechfaktoren der Kalibrierreihen der verwendeten Referenzsubstanzen, geordnet nach Veresterungsgrad.....	114
Abbildung 18:	Kalibrierlösung KL-2: Ansprechfaktoren der 18 Referenzsubstanzen normalisiert auf den Mittelwert aus vier Messungen über drei Wochen (0, 8, 2x20 Tage), mit relativer Standardabweichung.....	116
Abbildung 19:	Bildung des Basisions in MS ² als Hinweise auf das Substitutionsmuster von Norditerpenalkaloiden.....	123
Abbildung 20:	Numerierung des Norditerpenalkaloid-Gerüsts.....	124
Abbildung 21:	Bildung von Falaconitin (27) aus Pseudaconitin (16) durch Essigsäure-Abspaltung im MS ² -Spektrum oder durch Pyrolyse.....	128
Abbildung 22:	Postulierte Essigsäure-Abspaltung von Aconitin (20) zu Pyroaconitin (103) im MS ² -Spektrum.....	130
Abbildung 23:	MS ⁿ -Fragmentierung von Pseudaconitin (16) als Beispiel für Diesteralkaloide vom Pseudaconitin-Typ	131
Abbildung 24:	MS ⁿ -Fragmentierung von Aconitin (20)	132
Abbildung 25:	Strukturen der Isomeren Bikhacoinin (15) und 8-Acetylfalconerin (18)	134
Abbildung 26:	ESI(+)-Basionenchromatogramm des Extrakts Pill _{Kat} getrennt mit Trennsystem 1. Die Masse des Basisions ist jeweils am Signal angeschrieben.	141
Abbildung 27:	8-Benzoyl-14-Veratroylpseudaconin (26).....	143
Abbildung 28:	Strukturen der Isomeren Veratroylbikhacoinin (9) und Falconerin (12).....	144
Abbildung 29:	Struktur von Falconeridin (14).....	145
Abbildung 30:	Strukturen der Isomere Chasmanin (3) und 1-epi-Methyl-Neolin (109).....	146
Abbildung 31:	ESI(+)-Basionenchromatogramme des Extrakts AcK _{Del_3} getrennt mit Trennsystem 1 (A) und Trennsystem 2 (B).	153
Abbildung 32:	ESI(+)-Basionenchromatogramm von AcK _{violac} (Alkaloidextrakts R pH 9 von <i>A. violaceum</i>) getrennt mit Trennsystem 2.	157

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Numerierung der Alkaloide.....	IX
Tabelle 2:	Vorkommen von Steinzellen zur Unterscheidung von Knollen einiger indischer <i>Aconitum</i> -Arten des Napellus-Typs.....	7
Tabelle 3:	Unterscheidung der Norditerpenalkaloide nach Veresterungsgrad in Estertypen.....	15
Tabelle 4:	Strukturen einiger C ₁₉ -Norditerpenalkaloide.....	16
Tabelle 5:	Toxizität und wichtige pharmakologische Eigenschaften von Norditerpenalkaloiden am Beispiel von Aconitin (20) und dessen Analoga, geordnet nach fallender Toxizität.....	20
Tabelle 6:	Übersicht zu Verbreitungsgebiet, Botanik und Verwendung der in dieser Arbeit untersuchten <i>Aconitum</i> -Arten:.....	23
Tabelle 7:	Bisher aus <i>A. falconeri</i> , <i>spicatum</i> und <i>violaceum</i> isolierte respektive nachgewiesene Norditerpenalkaloide.....	25
Tabelle 8:	Übersicht der Methoden in verschiedenen asiatischen Medizinalsystemen zur Behandlung von <i>Aconitum</i> -Knollen:.....	27
Tabelle 9:	Haupteffekte der Behandlung von <i>Aconitum</i> -Knollen.....	28
Tabelle 10:	Rezepturen der tibetischen Juwelenpillen Byu-Dmar 25 und der Variante Byu-Dmar 13.....	35
Tabelle 11:	Vergleich der in den Juwelenpillen Byu-Dmar 25 und Byu-Dmar 13 enthaltenen Mengen <i>Aconitum</i> -Knollen resp. Diterpenalkaloide und Tagesdosis.....	37
Tabelle 12:	Literaturübersicht über Extraktionsmethoden für <i>Aconitum</i> -Alkaloide.....	39
Tabelle 13:	Literaturübersicht über die Anwendung von HPLC-MS zum Nachweis von Diterpenalkaloiden:.....	48
Tabelle 14:	Übersicht über untersuchte Proben und verwendete Abkürzungen:.....	55
Tabelle 15:	Übersicht zu den in Indien gesammelten Exemplare von <i>A. violaceum</i> :.....	58
Tabelle 16:	Übersicht zur Identifizierung der <i>Aconitum</i> -Knollen und Aufteilung in Proben.....	62
Tabelle 17:	Herkunft und Konfektionierung der untersuchten Byu-Dmar-Pillenproben.....	63
Tabelle 18:	DC-Sorbentien.....	64
Tabelle 19:	DC-Horizontalkammern.....	65
Tabelle 20:	Übersicht der erhaltenen Knollenextrakte verschiedener <i>Aconitum</i> -Arten.....	69
Tabelle 21:	Übersicht über die erhaltenen Alkaloidextrakte der Byu-Dmar-Pillenproben.....	72
Tabelle 22:	DC-Systeme.....	73
Tabelle 23:	Übersicht über die DC-Trennungen I bis V mit verwendeten Referenzsubstanzen und untersuchten Proben.....	75
Tabelle 24:	Für Mehrwellenlängen-Scan (MWL) ausgewählte Wellenlängen.....	76
Tabelle 25:	Fraktionen aus der präparativen Trennung der Alkaloidextrakte der Probe AcK _{Del_2}	78
Tabelle 26:	Isolierung weiterer Alkaloide aus der Knollenprobe AcK _{Del_2}	79
Tabelle 27:	UV-Absorptionsmaxima und -minima der In-situ-Remissionsspektren (200-400 nm) einiger untersuchter Norditerpenalkaloide und Literaturvergleich.....	81
Tabelle 28:	Übersicht zu DC-Trennungen I-III von <i>Aconitum</i> -Knollenproben: R _B -Werte der getrennten Substanzen:.....	88
Tabelle 29:	Übersicht zu DC-Trennungen IV und V: R _B -Werte der getrennten Substanzen:.....	89
Tabelle 30:	Legende zur MWL-Überlagerungsdarstellung der DC-Trennungen I-III.....	89
Tabelle 31:	Mit Dünnschichtchromatographie identifizierte sowie tentativ identifizierte Alkaloide in <i>Aconitum</i> -Knollenproben.....	93
Tabelle 32:	Isolierte Alkaloide aus AcK _{Del_2} (<i>Aconitum falconeri</i>).....	95
Tabelle 33:	Chemische Verschiebung* in ¹³ C-NMR-Spektren einiger Norditerpenalkaloide im Vergleich mit Literaturwerten.....	97
Tabelle 34:	Übersicht über die HPLC-Trennungen mit verwendeten Trennsystemen, Referenzsubstanzen, Standards und untersuchten Proben.....	108
Tabelle 35:	Steigung m der Kalibriergeraden y = mx für 18 Norditerpenalkaloide, Verwendbarkeit für die Quantifizierung sowie Angabe von mittleren Ansprechfaktoren für Alkamine, Mono- und Diesteralkaloide.....	113
Tabelle 36:	MS ² -Spektren von Referenzsubstanzen: Fragmente mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:.....	119
Tabelle 37:	MS ³ -Spektren von Referenzsubstanzen (Teil 1): Fragmente mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:.....	120

Tabelle 38:	MS ³ -Spektren von Referenzsubstanzen (Teil 2): Charakteristische Fragmente nach Abspaltung der aromatischen Säure von Mono- und Diesteralkaloiden mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:.....	121
Tabelle 39:	Relative Intensität des Fragments [M+H-H ₂ O] ⁺ in den MS ² -Spektren und Substitution des Nordditerpenalkaloid-Gerüsts.....	124
Tabelle 40:	Relative Intensität des Fragments [M+H-H ₂ O-MeOH] ⁺ in den MS ² -Spektren in Abhängigkeit der Substitution:.....	125
Tabelle 41:	Relative Intensität des Fragments [M+H-Essigsäure-H ₂ O-MeOH] ⁺ im MS ³ -Spektrum als Indikator für das Vorhandensein einer C(3)-OH-Gruppe bei Diesteralkaloiden.....	126
Tabelle 42:	Ionen identischer Masse, welche durch Abspaltung von funktionellen Gruppen aus 16 und 27 entstehen und bei Weiterfragmentierung gleiche Massenspektren ergeben:.....	128
Tabelle 43:	Einige anhand ihrer MS ⁿ -Spektren tentativ identifizierte Alkaloide mit Angabe ihres Vorkommens in untersuchten Proben und des verwendeten Trennsystems:.....	136
Tabelle 44:	MS ² -Spektren von tentativ identifizierten Substanzen: Fragmente mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:.....	137
Tabelle 45:	MS ³ -Spektren von tentativ identifizierten Substanzen (Teil 1): Fragmente mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:.....	138
Tabelle 46:	MS ³ -Spektren von tentativ identifizierten Substanzen (Teil 2): Fragmente nach Abspaltung der aromatischen Säure von Mono- und Diesteralkaloiden mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:.....	139
Tabelle 47:	Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen in den MS ⁿ -Spektren der Methanolysenprodukte 13 und 19.....	140
Tabelle 48:	Tentativ identifizierte Lipoalkaloiden aus der Pillenprobe Pill _{Kat} , bei Trennung mit Trennsystem 1 mit Angabe der charakteristischen Massen und Abspaltungen in den MS ⁿ -Spektren.....	142
Tabelle 49:	MS ⁿ -Spektren von 8-Benzoyl-14-Veratroylpseudoaconin (26): Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen.....	143
Tabelle 50:	Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen in den MS ⁿ -Spektren von Falconerin (12):.....	144
Tabelle 51:	Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen in den MS ⁿ -Spektren von Falconeridin (14):.....	145
Tabelle 52:	Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen in den MS ⁿ -Spektren von Chasmanin (3):.....	147
Tabelle 53:	Identifizierte Alkaloide der in HPLC-Trennung I untersuchten Alkaloidextrakte mit Massen der [M+H] ⁺ Molekülonen und Retentionszeiten (RT) in Trennung 1 im Vergleich zu Referenzsubstanzen.....	152
Tabelle 54:	Retentionszeitbereiche der untersuchten Alkaloide in HPLC-Trennung 1 und 2: Elution nach Estertyp.....	154
Tabelle 55:	Identifizierte und tentativ identifizierte Alkaloide in Extrakten von Aconitum-Knollen und Juwelenpillen in HPLC-Trennung 2 mit gerundetem relativem Gehalt in Prozent vom Hauptalkaloid.....	156
Tabelle 56:	Paare von Mono- und Diesteralkaloiden.....	158
Tabelle 57:	Referenzsubstanzen des Standard IV. Angabe der bei APCI-Ionisierung zu detektierenden Massen der [M+H] ⁺ Ionen sowie der eingewogenen Mengen und der Konzentrationen in den Lösungen der Verdünnungs- und Kalibrierreihe.....	166
Tabelle 58:	Retentionszeiten der Referenzsubstanzen bei Aufnahme der Kalibrierreihe und Berechnung der mittleren Retentionszeit:.....	167
Tabelle 59:	Signalfächen der Kalibrierreihe:.....	168
Tabelle 60:	Einwaage der Alkaloidextrakte und deren Konzentration in den Stamm- und Messlösungen.....	169
Tabelle 61:	Retentionszeiten in HPLC-Trennung 2 der Alkaloide in den untersuchten Proben.....	170
Tabelle 62:	Signalfächen der Alkaloide in den untersuchten Proben.....	171

Abkürzungsverzeichnis

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation	LC	hier auch für HPLC
AUC	Area under the curve	[M+H]⁺	protoniertes Molekülion
CID	Collision induced dissociation	MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
DC	Dünnschichtchromatographie	MSⁿ	Multiple Massenspektrometrie (MS ² , MS ³ etc.)
DEPT	Distortionless Enhancement of NMR Signals by Polarization Transfer	MS/MS	MS ² , Tandem-Massenspektrometrie
E	Ost	MG	Molekulargewicht
EI	Elektronen-Ionisation	N	Nord
ESI	Elektrospray-Ionisation	NMR	Kernresonanzspektroskopie
FAB	Fast Atom Bombardment	R_f	DC-Retention bezogen auf Fließmittelfront
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie	R_{Bikh}	DC-Retention bezogen auf Bikhacoinitin
HPLC	Hochauflösende Flüssigchromatographie	RT	Retention Time (Retentionszeit)
HPLC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie	STL	Stammlösung
HPTLC	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie	TLC	Thin Layer Chromatographie (DC)
ISTD	interner Standard	TMS	Trimethylsilan, Trimethylsilyl-
KL	Kalibrierlösung	u	Atomare Masseneinheit

***Aconitum*-Knollenproben:**

AcK_{Del_1}	<i>A. spicatum</i> Knollen, unbehandelt, Lieferung 12/95
AcK_{Del_2}	<i>A. falconeri</i> Knollen unbehandelt, Lieferung 12/95
AcK_{Del_3}	<i>A. falconeri</i> Knollen unbehandelt, Lieferung 4/96
AcK_{Del_p}	<i>A. falconeri</i> Knollen behandelt, Lieferung 4/96
AcK_{violac}	<i>A. violaceum</i> Sammlung 9/95

Byu-Dmar Pillenproben:

Pill_{Del_92}	Delhi 1992
Pill_{Del_93}	Delhi 1993
Pill_{Del_94}	Delhi 1994
Pill_{Del_95}	Delhi 1995
Pill_{Dhr}	Dharamsala
Pill_{Kat}	Kathmandu
Pill_{Lad}	Ladakh (Nordwest-Indien)
Pill_{Leh}	Leh (Nordwest-Indien)
Pill_{Lha}	Lhasa

Tabelle 1: Numerierung der Alkaloide

Nr.	Alkaloid	Struktur siehe
1	Pseudaconin	X
2	Bikhaconin	X
3	Chasmanin	Abbildung 30, Seite 146
4	Senbusin A	X
5	Karakolin	X
6	Isotalatizidin	X
7	Veratroypseudaconin	X
8	Neolin	X
9	Veratroylbikhaconin	X
10	Ludaconitin	X
11	8-Deacetylyunaconitin	X
12	Falconerin	X
13	8-Deacetyl-8-O-Methyl-Pseudaconitin	Keine
14	Falconeridin	X
15	Bikhaconitin	X
16	Pseudaconitin	X
17	Falconericin	X
18	8-Acetylfalconerin	X
19	8-Deacetyl-8-O-Methyl-Indaconitin	Keine
20	Aconitin	X
21	Chasmaconitin	X
22	Crassicaulin A	X
23	Yunaconitin	X
24	Indaconitin	X
25	8-Deacetyl-8-Veratroyl-Yunaconitin	Keine
26	8-Benzoyl-14-Veratroypseudaconin	Abbildung 27, Seite 143
27	Falaconitin	X
28	Lipopseudaconitin_1 (m/z 928)	Keine
29	Linoleoylpseudaconitin	Keine
30	Palmitoylpseudaconitin	Keine
31	Lipopseudaconitin_2 (m/z 912)	Keine
32	Palmitoylindaconitin	Keine
101	Benzoylaconin	Tabelle 5, Seite 20
102	Aconin	Tabelle 5, Seite 20
103	Pyroaconitin	Tabelle 5, Seite 20
104	Atisin	Abbildung 4, Seite 18
105	Hetisin	Abbildung 4, Seite 18
106	Lipoaconitin	Tabelle 5, Seite 20
107	Lipomesaconitin	Tabelle 5, Seite 20
108	Mithaconitin	X
109	1-epi-1-O-Methyl-Neolin	Abbildung 30, Seite 146
110	Faleoconitin	X
111	3'-Methoxyacoforestinin	X
112	Mesaconitin	X
113	Hypaconitin	X
114	Pyrobikhaconin	Keine
ISTD	Reserpin (als interner Standard verwendet)	Abbildung 16, Seite 12

Nr. 1-32 in dieser Arbeit verwendete oder detektierte Alkaloide; Nr. 101-114: zum Vergleich erwähnte hier nicht detektierte Substanzen; X Tabelle 4, Seite 16.

Zusammenfassung

Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen haben Pflanzen als Rohstoffquelle eine wichtige Bedeutung. Im Interesse der Pharmazie steht unter diesem Aspekt auch die traditionelle Medizin verschiedener Kulturen, wobei die asiatischen Medizinsysteme in Europa eine steigende Bedeutung finden. Phytochemische Untersuchungen über die pharmakologisch und toxikologisch interessanten Diterpenalkaloide in *Aconitum*-Arten wurden seit über hundert Jahren durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, nach neuen Wirkstoffen in *Aconitum*-Arten des Himalaya zu suchen. Hierbei sollten Analysemethoden verwendet werden, welche eine rasche Detektion und Identifizierung von Diterpenalkaloiden in Extrakten, insbesondere bei geringer Probenmenge, ermöglichen. Es wurden die Knollen von den drei aus dem Himalaja stammenden Arten *A. falconeri*, *A. spicatum* und *A. violaceum* sowie tibetische Juwelenpillen, welche *Aconitum*-Knollen enthalten, untersucht.

Mit Dünnschichtchromatographie und Detektion mit dem DC-Scanner mittels Mehrwellenlängen-Scan konnten Extrakte von Knollenproben getrennt und die Hauptalkaloide im Vergleich zu Referenzsubstanzen identifiziert werden. Diese Methode ist für Routineprüfungen geeignet, die UV-inaktiven Alkamine wurden aber nicht zufriedenstellend detektiert.

Auf Basis der mit DC gewonnenen Resultate wurde die HPLC-MSⁿ-Technik mit Elektrospray-Ionisation eingesetzt. Diese ermöglicht eine optimale Trennung geringster Probenmengen und eine spezifische Detektion sowie eine quantitative Untersuchung. Die MS²- und MS³-Spektren von Norditerpenalkaloiden, insbesondere des Pseudoaconitin- und Bikhacoinitin-Typs,

ergaben charakteristische MSⁿ-Fragmentierungen. Mit deren Hilfe wurden weitere Substanzen tentativ identifiziert, für welche keine Referenzsubstanzen vorhanden waren. Diese Interpretationen konnten im Fall von 8-Acetylfalconerin (**18**), Ludaconitin (**10**) und Falaconitin (**27**) mit isolierten oder semisynthetisch hergestellten Referenzsubstanzen bestätigt werden. Ebenfalls tentativ identifiziert wurden die bisher nicht bekannten Alkaloide 8-Deacetyl-8-Veratroyl-Yunaconitin (**25**) und 8-Benzoyl-14-Veratroylpseudaconin (**26**), welche als besondere 8,14-Diaroylalkaloide in den Knollen von *A. falconeri* gefunden wurden, während 8-Deacetyl-8-O-Methyl-Pseudaconitin (**13**) und 8-Deacetyl-8-O-Methyl-Indaconitin (**19**) als in wässrig-methanolischer Lösung entstehende Artefakte nachgewiesen wurden.

Die Proben wurden qualitativ und quantitativ untersucht. Die quantitative Bestimmung, in welche vierzehn Alkaloide sowie zwei tentativ identifizierte Substanzen einbezogen wurden, konnte nicht mehrfach durchgeführt werden. Daher wurde statt des absoluten Gehalts der relative Gehalt im Verhältnis zum Hauptalkaloid angegeben. Hiermit liessen sich die Alkaloidmuster der verschiedenen Extrakte vergleichen.

In Knollenextrakten von *A. falconeri* und *A. spicatum* wurden mehrere Alkaloide für diese Arten erstmals detektiert und die jeweils bekannten Alkaloide meist bestätigt. Bei *A. violaceum* wurden neu als Hauptvertreter die wenig toxischen Alkamine detektiert. Dies ist bemerkenswert, da bei den anderen untersuchten Arten vorwiegend die stark toxischen Diesteralkaloide detektiert wurden.

In der tibetischen Medizin und in anderen asiatischen Medizinsystemen werden üblicherweise „entgiftete“ behandelte Knollen verwendet. Es wurde untersucht, ob ein „processing“-Effekt,

für welchen eine Verschiebung der Hauptalkaloide von den Diester- zu den Monoesteralkaloiden erwartet wurde, bei behandelten Knollen sowie diese Komponente enthaltende tibetischen Juwelenpillen festgestellt werden kann.. Bei Knollenextrakten von *A. falconeri* wurden im Alkaloidmuster keine Unterschiede zwischen tibetisch behandelten und unbehandelten Knollen festgestellt, was mit einer zu kurzen Behandlungsdauer zusammenhängen könnte. Bei tibetischen Pillenproben verschiedener Herkunft waren allerdings grosse Unterschiede in den Verhältnissen zwischen analogen Mono- und Diesteralkaloiden vorhanden, was bei einigen Proben auf ein effektives „processing“ zurückgeführt werden könnte.

Die Trennung der Alkaloidgemische mit Umkehrphasen-HPLC ergab eine tailingfreie Trennung der Alkaloide. Retentionszeitbereiche konnten klar unterschieden werden, in welchen mit abnehmender Polarität aufeinanderfolgend Alkamine, Monoesteralkaloide, Diesteralkaloide sowie schliesslich Lipoalkaloide gruppenweise eluierten. Die Giftigkeit dieser Substanzgruppen in dieser Elutionsfolge ist zuerst gering, gefolgt von mittel, dann maximal mit den giftigsten Alkaloiden überhaupt und schliesslich wieder mittel. Unterschiede im Veresterungsgrad der Norditerpenalkaloide, welche für ihre pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften ausschlaggebend sind, zeigten sich also auch in ihrem flüssigchromatographischen Verhalten!

A Allgemeiner Teil

A.1 Einleitung und Zielsetzung

Eine wichtige Aufgabe der Pharmazie ist es, neue Wirkstoffe zu entdecken. Hierbei haben Pflanzen als Rohstoffquelle eine wichtige Bedeutung. Unter diesem Aspekt stehen die traditionellen Medizinsysteme verschiedener Kulturen seit langem im Interesse der Pharmazie. Zudem finden die asiatischen Medizinsysteme in Europa eine steigende Bedeutung. Es besteht ein Bedürfnis, die Qualität und Sicherheit von Medikamenten aus Asien abzuklären, da diese in Europa wenig bekannt sind und die Gesundheitsbehörden mehrfach Massnahmen ergreifen mussten.

Die Gattung *Aconitum* fand zu verschiedenen Zeiten und an verschiedenen Orten der Welt Interesse. So war auch in der Schweiz *Aconiti Tuber* in der Pharmacopoeia Helvetica VI noch bis 1970 monographiert und weiterhin findet der Eisenhut in den traditionellen asiatischen Medizinsystemen oder in der Komplementärmedizin Verwendung. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Behandlung von Entzündungen und Schmerzen. In der medizinischen Forschung ist die Suche nach neuen Analgetika und deren Wirkmechanismen weiterhin ein wichtiges Thema. Neben der analgetischen Wirkung der Diterpenalkaloide zeigten einzelne Modellsubstanzen zudem ein antiepileptisches, andere ein antiarrhythmisches Potential (Ameri, 1998). Hauptsächlich bei den Diester-Diterpenalkaloiden muss jedoch deren Neuro- und Cardiotoxizität beachtet werden.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Norditerpenalkaloiden von Arten der Gattung *Aconitum* aus der Flora des Himalaya unter Einsatz der Dünnschichtchromatographie und HPLC-MSⁿ. Weiter sollte untersucht werden, ob im Alkaloidspektrum bei behandelten

Eisenhutknollen Veränderungen festgestellt werden können, welche auch in tibetischen Juwelentabletten wie Byu-Dmar 25 enthalten sind.

A.2 Die Gattung *Aconitum*

Die Gattung *Aconitum*, Eisenhut, gehört zur Familie der Ranunculaceae, den Hahnenfussgewächsen, und ist in Nordamerika, Europa sowie in Asien bis nach Japan weit verbreitet. Die Pflanze gedeiht in den nördlichen temperierten Zonen und den gebirgigen Regionen der Subtropen (Riedl & Nasir, 1991). Die Gattung ist sehr formenreich, je nach Auffassung werden weltweit zwischen 60 und 350 Arten gezählt (Seeger, 1994), da Arten weiter differenziert oder zusammengefasst werden (Katz & Staehelin, 1977).

Aconitum wird etymologisch u.a. vom griechischen *Acónai* (=steile Felsen) abgeleitet, was auf den harten Felsengrund als Standort hinweist (Genaust, 1996). Die englische Bezeichnung "wolf's bane" oder einige deutsche volkstümliche Namen des Eisenhuts wie "Wolfswurzel", "Hundstod" und "Giftheil" (van Wijk, 1911) weisen auf die Giftigkeit der Pflanze und deren Verwendung hin. Letztere Bezeichnung enthält die Ambivalenz zwischen Gift und Heilmittel, oder zwischen Risiko und Nutzen. *Aconitum*-Arten wurden auch als Pfeilgift im ganzen Verbreitungsgebiet eingesetzt, so z.B. in Indien *A. ferox* und *A. chasmanthum* (Bisset & Mazars, 1984). Die europäische Art *A. napellus*, der blaue Eisenhut, wird häufig als die giftigste Pflanze Europas bezeichnet (Seeger, 1994).

Die Giftigkeit und das pharmakologische Potential des Eisenhuts gehen auf die in allen Organen enthaltenen Diterpenalkaloide zurück. Die grössten Alkaloidmengen werden in den Knollen oder Tubera gefunden. Bei vielen *Aconitum*-Arten sind die Wurzeln rübenförmig (=napellus) zu Knollen verdickt (Deutschmann *et al.*, 1984).

A.2.1 *Aconitum*-Arten im Himalaja

In dieser Arbeit wurde mit drei *Aconitum*-Arten aus Indien gearbeitet, daher soll im Folgenden ein Blick auf die Botanik dieser artenreichen Gattung im Himalaja geworfen werden. Im heutigen Indien zählt man siebenundzwanzig *Aconitum*-Arten (Rau, 1993). Von den gut dreissig Arten, die in Nepal vorkommen (Hara, 1979), geben Dobremez & Shrestha (1980) auch deren Verbreitung im Himalaja von Afghanistan über Nepal bis Westchina an. Naithani (1990) erwähnt für den Himalaja-Raum von Indien, Nepal und Bhutan insgesamt fünfzig Arten.

Stapf (1905) erstellte für die *Aconitum*-Arten des damaligen indischen Himalajas die heute noch gültige Taxonomie. Diese löst die früheren Einteilungen von Brühl (1896), Goris (1901) und in klassischen botanischen Werken wie Hooker (1872) ab. In der Zwischenzeit sind zusätzliche Arten aus dem ganzen Himalaja beschrieben worden (Hara, 1979).

Anhand der Wurzelstruktur teilte Stapf (1905) die Gattung *Aconitum* in drei Sektionen ein. Von diesen ist die „*Sectio Napellus*“ die bedeutendste. Für diese Arbeit von Interesse ist deren Unterteilung in *Napellus*-, *Anthora*- und *Deinorrhizum*-Typ. Zum *Napellus*-Typ gehören u.a. die Arten *A. falconeri*, *spicatum* und *A. violaceum* sowie weitere medizinische wichtige Arten wie *A. chasmanthum*, *ferox*, *laciniatum*, während zum *Anthora*-Typ *A. heterophyllum* und *A. hookeri*, zum *Deinorrhizum*-Typ die beiden Arten *A. Balfourii* und *A. deinorrhizum* zählen.

Die Bezeichnung „*Napellus*“ verwendete Stapf erstens für die *Sectio Napellus* als Oberbegriff für rübenförmige Knollen, welche aus Knollenpaaren von Mutter- und Tochterknolle bestehen, und zweitens für den untergeordneten *Napellus*-Typ, dessen Vertreter

in den Knollen ein kontinuierliches Kambium aufweisen. Dies im Unterschied zum *Anthora*-Typ, bei welchem das Kambium in mehrere kleine Ringe aufgeteilt ist, oder zum *Deinorrhizum*-Typ, welcher an mehreren isolierten, langgezogenen oder hufeisenförmigen „Kambiumringen“ erkennbar ist. Mit „*Napellus*“ meint Stapf in diesem Zusammenhang die allgemeine Morphologie, nicht aber die europäische *Aconitum*-Art *A. napellus*, welche im Himalaja nicht vorkommt (Stapf, 1905; Mehra & Sobti, 1955; Puri, 1974), auch wenn gewisse indische Standardwerke wie Chopra *et al.* (1956) diese Art noch für Indien erwähnen, gestützt auf überholte botanische Werke wie Hooker (1872).

Die Knollen von *Aconitum*-Arten des Napellus-Typs unterschieden Mehra & Puri (1970) anhand des Vorkommens von Steinzellen in der primären Wurzelrinde der Knollen und den durch die Endodermis getrennten äusseren Schichten des Zentralzylinders (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Vorkommen von Steinzellen zur Unterscheidung von Knollen einiger indischer *Aconitum*-Arten des *Napellus*-Typs.

Vorkommen von Steinzellen*	<i>A. falconeri</i>	<i>A. spicatum</i>	<i>A. ferox</i>	<i>A. laciniatum</i>
• in primärer Wurzelrinde	+	+	-	-
• in äussersten Schichten des Zentralzylinders	+	-	+	-

* gem. Mehra & Puri (1970)

A.2.1.1 *Aconitum*-Knollen und in Indien als ‘Ferox-Gruppe’ gehandelte Droge

Auf dem Markt in Indien gehandelte *Aconitum*-Knollen wurden oft als Mischung verschiedener *Aconitum*-Arten (Stapf, 1905; Chakravarty & Chakravarti, 1954) oder als verfälscht beschrieben. Die von Händlern benutzten Begriffe reichen u.a. von „Indian Napellus Root“, „True Napellus“ respektive „European Aconite“, „Ferox Varieties“, „White Aconite“, „Black Aconite“, womit z.B. pechscharfe durch Kochen mit Eisensulfat und Kuhurin behandelte Knollen gemeint sind (Mehra & Puri, 1970), bis „Nepal Aconite“ und „Non-Poisonous Aconite“ (Chopra *et al.*, 1958). Die früher unter der Bezeichnung „*Aconitum ferox*“ exportierte Droge besteht aus Mischungen der sechs kommerziell wichtigen *Aconitum*-Arten *Aconitum falconeri*, *spicatum*, *laciniatum*, *deinorrhizum*, *Balfourii* und selten aus der Art *A. ferox* selber (Mehra & Puri, 1970). Die Wurzelknollen dieser Arten, welche die Autoren zusammenfassend „Ferox-Gruppe“ nennen, sind äusserlich ähnlich und werden alle - in den verschiedenen indischen Sprachen - als „Bikh“ / „Bish“ (Gift) / „Vish“ / „Vatsnabh“ / „Meetha Telia“ bezeichnet (Stapf, 1905; Mehra & Puri, 1970). Neben der „Ferox-Gruppe“ sollen in Indien auch die Knollen von *A. chasmanthum*, *heterophyllum*, *laciniatum* und *violaceum* kommerziellen Wert als Droge haben (Chakravarty & Chakravarti, 1954; Chopra *et al.*, 1958).

Anhand dieser Tatsachen wird deutlich, wie schwierig es ist, eine definierte Droge zu erhalten. Weiter spielt die Reinigung, Trocknung und gegebenenfalls Behandlung eine Rolle. Es stellt sich die Frage, ob eine erhältliche Droge überhaupt einen „ursprünglichem Zustand“ wiedergibt.

A.2.1.2 Medizinische Verwendung von *Aconitum*

In der westlichen Medizin gilt die Anwendung von *Aconitum*-Knollen heute als obsolet (Seeger, 1994), einerseits wohl wegen deren Toxizität und geringen therapeutischen Breite, andererseits weil gut untersuchte synthetische Analgetika zur Verfügung stehen. Noch in den 1970-er Jahren war die europäische *Aconitum*-Art *A. napellus* als Droge „Tuber Aconiti“ in den Arzneibüchern der Schweiz und verschiedener europäischer Länder monographiert. Als Indikationen wurden hierfür z.B. Neuralgien und Erkältungskrankheiten in der Schweiz offiziell angegeben (Büchi *et al.*, 1975). In der Komplementärmedizin sind jedoch Zubereitungen aus *Aconitum* weiterhin Teil des Arzneimittelschatzes. In der Homöopathie wird der Eisenhut meist als ganze frische Pflanze in potenziierter Form innerlich bei akuten Erkältungen oder fieberhaften Erkrankungen verwendet (Kommission D, 1985). Äusserlich wird in der anthroposophischen Medizin ein bis zu 10 %iges Öl aus Tuber Aconiti bei Schmerzzuständen wie Trigeminus- und Zosterneuralgien angewendet (Kommission C, 1986). Das in der Schweiz tibetische zugelassene Arzneimittel Padma 28[®] enthält Tuber Aconiti (1 mg/Tablette) als einen von achtundzwanzig pflanzlichen Bestandteilen und wird u.a. bei Durchblutungsstörungen mit Parästhesien und Wadenkrämpfen eingesetzt (Arzneimittelkompendium der Schweiz, 2003).

Als Ersatz für die europäische Art *A. napellus* wurden Eisenhutknollen aus Indien vermutlich auch nach dem Ende der Kolonialzeit in Grossbritannien oder im Commonwealth pharmazeutisch genutzt. So findet sich noch im British Pharmaceutical Codex 1973 die Monographie „Indian Aconite“, wobei hier *Aconitum chasmanthum*, *deinorrhizum* oder *spicatum* als zulässige Arten angeführt werden.

In Indien gehört *Aconitum* - hier global für die vorher erwähnte 'Ferox-Gruppe' - zu den ältesten Heilmitteln sowohl der Hindu- als auch der moslemischen Ärzte (Dymock *et al.*, 1890). Die medizinischen Anwendungen sind ähnlich wie früher in Europa. Äusserlich wurde eine Paste aus den pulverisierten Knollen bei Neuralgien und anderen schmerzhaften Erkrankungen wie bei Furunkeln eingesetzt. Die behandelten d.h. entgifteten Knollen setzten ayurvedische respektive Hindu-Ärzte intern meist in Kombination mit anderen Drogen ein bei Fieber, Rheuma, Husten, Asthma und Schlangenbissen. Auch als "Herzstimulans" wurden die Knollen verwendet (Dymock *et al.*, 1890; Chopra *et al.*, 1958).

A.2.1.3 Gefährdete Eisenhut-Arten

Aufgrund ihrer Bedeutung in den asiatischen Medizinsystemen sind *Aconitum*-Knollen auch kommerziell wertvoll. Daher ist es z.B. in Nordwest-Indien für nomadisierende Volksstämme wie die „Gujars“ und „Gaddis of Chamba“, welche den Sommer über mit ihren Viehherden auf die hochgelegenen Weiden der Himalaja-Vorgebirge ziehen (Negi, 1990), interessant, *Aconitum*-Knollen zu sammeln. Dies führte zu einer Übernutzung der Bestände, so dass *A. deinorrhizum* und *A. ferox* als „verwundbare Arten“ im Red Data Book of Indian Plants aufgeführt werden (Nayar & Sastry, 1987). Neben anderen Medizinalpflanzen wurden im Kumaon Himalaja (Uttar Pradesh, Indien) *A. ferox* und *A. heterophyllum* sowie die in dieser Arbeit untersuchte Art *A. falconeri* als „bedrohte Arten“ gemeldet (Joshi *et al.*, 1987). Das Sammeln in grösseren Mengen zum Handel soll verboten werden, jedoch wurden ausser in bestehenden Reservaten keine weiteren Schutzmassnahmen ergriffen (Nayar & Sastry, 1987). Es fragt sich, wie effektiv diese Massnahmen den Handel beeinflussen und die gefährdeten Arten vor der Ausrottung schützen, da sie doch in den traditionellen Medizinsystemen weiter eingesetzt werden. Der Gebrauch im Ausland sollte kritisch beurteilt oder z.B. mit gezieltem Anbau gekoppelt werden.

A.3 Diterpenalkaloide

Laut Definition sind Alkaloide Naturstoffe mit vorwiegend heterozyklisch eingebautem Stickstoff, die als sekundäre und tertiäre Amine, als Amide, Aminoxide und quartäre Ammoniumbasen vorkommen. Die N-Atome entstammen vorwiegend Aminosäuren. Nach Aufnahme wirken sie beim Menschen und bei Wirbeltieren in der Regel giftig (Hänsel & Sticher, 2004). Alkaloide gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen.

Alkaloide lassen sich nach verschiedenen Kriterien einteilen: Nach Herkunft (z.B. Opium-, Mutterkorn-, *Aconitum*-Alkaloide) oder nach Grundstruktur (z.B. Phenanthren-, Indol-, Diterpenalkaloide [Burger & Wachter, 1998]). Weiter werden Alkaloide biogenetisch wie folgt unterschieden. Bei *echten Alkaloiden* wird das Kohlenstoffgerüst einer meist decarboxylierten Aminosäure Teil eines heterozyklischen Systems, während es bei den *Proto-Alkaloiden* eine azyklische Einheit bildet (z.B. Ephedrin). Dagegen leiten sich *Pseudo-Alkaloide* - besser *Crypto-Alkaloide* genannt - nicht von Aminosäuren ab, sondern sind mit anderen Naturstoffen verwandt. Hierzu gehören *Steroidalkaloide* und *Terpenalkaloide* (Burger & Wachter, 1998; Benn, 1993). Terpenalkaloide werden weiter nach Isopreneinheiten unterteilt, wobei hier insbesondere die Diterpenalkaloide interessieren, deren Strukturen von C₂₀-Terpenen abzustammen scheinen (Benn, 1993).

A.3.1 Diterpen- und Norditerpenalkaloide

Bisher sind über 400 Diterpenalkaloide isoliert worden (Benn, 1993). Als Quellen sind in der Pflanzenwelt innerhalb der Hahnenfussgewächse (Ranunculaceae) die Gattungen *Aconitum*, *Delphinium* und *Consolida* sowie eine *Thalictrum* Art wichtig. Weiter ist die monogenerische Familie der Garryaceae von Bedeutung. Diterpenalkaloide wurden auch noch in vereinzelten

Arten anderer Familien gefunden wie *Anopterus* (Escalloniaceae), *Spiraea* (Rosaceae) und *Inula royleana* (Asteraceae) (Benn, 1993). In der Tierwelt dagegen wurden Diterpenalkaloide bisher nur in bestimmten Läusen gefunden, die sich an das Leben auf den auch insektizid wirkenden *Aconitum*-Pflanzen angepasst haben (Katz, 1990; Liu & Katz, 1996).

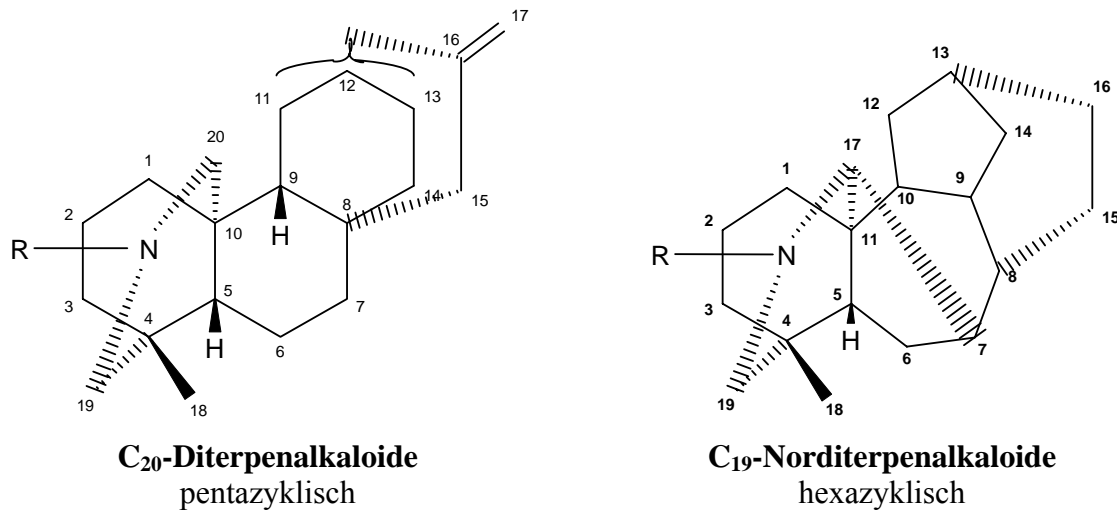


Abbildung 1: Grundgerüste der Diterpenalkaloide

Man unterscheidet die pentazyklischen C₂₀-Diterpenalkaloide sowie die hexazyklischen C₁₉-Norditerpenalkaloide (siehe Abbildung 1) und einige wenige C₁₈-Diterpenalkaloide. Die C₁₈- und C₁₉-Diterpenalkaloide werden auch als Norditerpenalkaloide bezeichnet (Hanuman & Katz, 1994c). Die C₂₀-Diterpenalkaloide sind weniger giftig während die stärker mit Sauerstoff substituierten C₁₉-Diterpenalkaloide stark giftig sind. Die Norditerpenalkaloide werden gewöhnlich in die in Abbildung 2 dargestellten vier Typen eingeteilt: Aconitin- (im Folgenden als „sensu latiore“ bezeichnet), Lycoctonin-, Pyrodelphinin- oder Pyro- sowie Heteratisin- oder Lacton-Typ (Wang & Liang 1992; Jacyno, 1996).

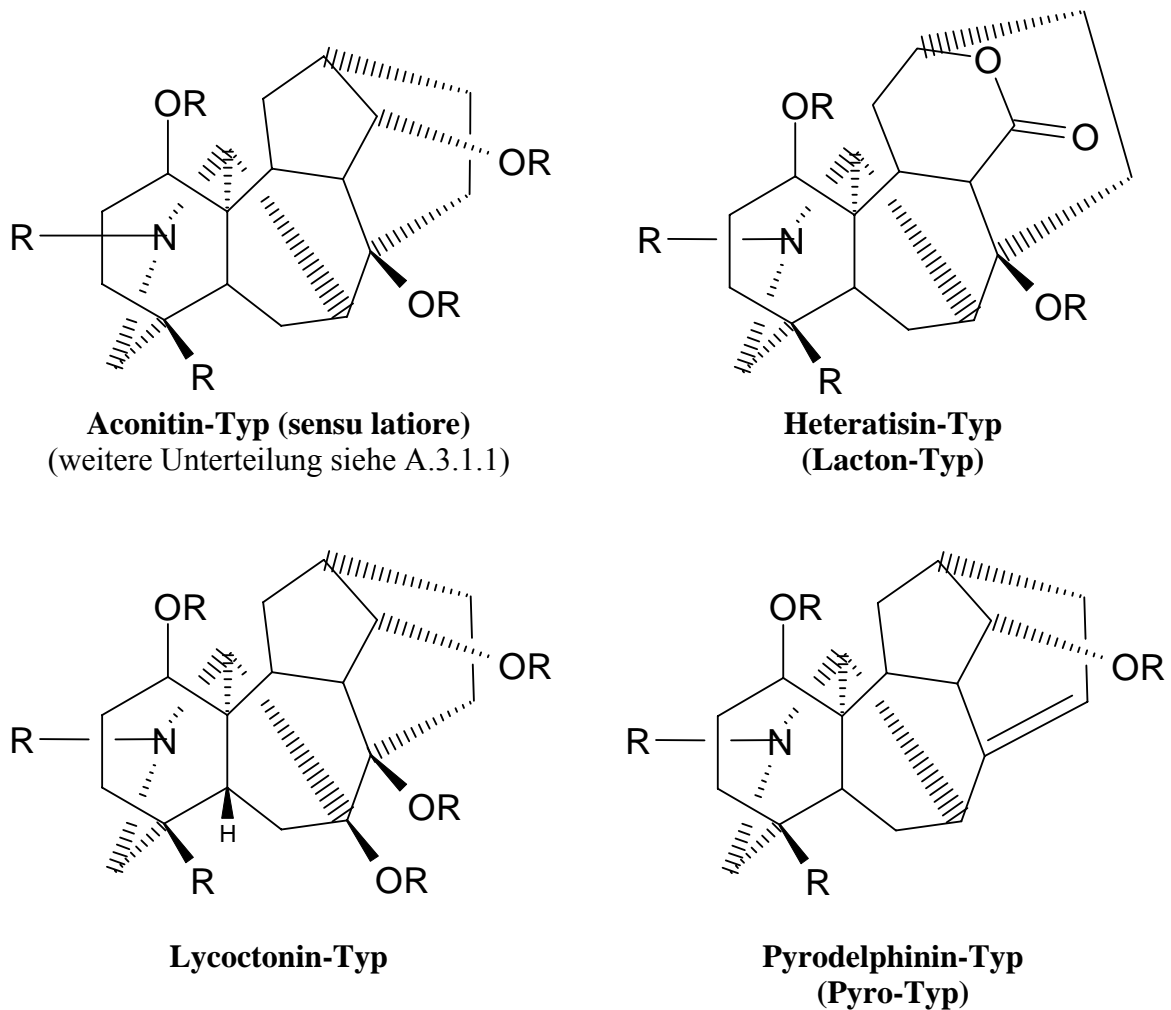
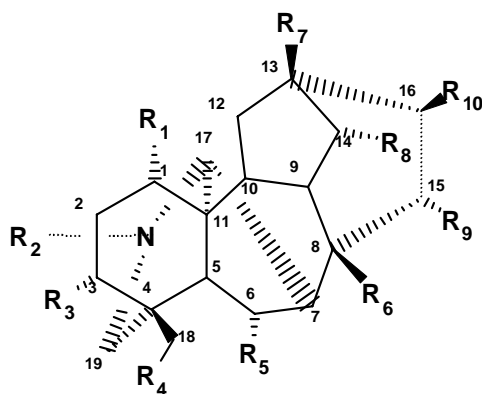


Abbildung 2: Einteilung der C₁₉-Norditerpenalkaloide in vier Strukturtypen mit typischen Oxidationszentren und weiteren Substituenten.

A.3.1.1 Weitere Unterteilung des Aconitin-Typs (sensu latiore) in Strukturtypen

In einer Übersicht der ¹H-NMR-Spektren von Norditerpenalkaloiden unterteilten Hanuman & Katz (1994c) den oben erwähnten Aconitin-Typ (sensu latiore) weiter in die folgenden fünf in Abbildung 3 dargestellten Strukturtypen I. Aconitin-Typ (im Folgenden „sensu strictu“), II. Pseudoaconitin-, III. Bikhacacitin-, IV. Neolin- und V. Isotalatizidin-Typ. Die



Strukturtyp:	O-substituiert an:						zusätzl. OH-Gruppen an:		
	R ₁	R ₅	R ₆	R ₈	R ₁₀	R ₄	R ₃	R ₇	R ₉
	C(1)	C(6)	C(8)	C(14)	C(16)	C(18)	C(3)	C(13)	C(15)
I Aconitin-Typ (sensu strictu)	+	+	+	+	+	+	+ ¹	+	+
II Pseudaconitin-Typ	+	+	+	+	+	+	+	+	—
III Bikhaconitin-Typ	+	+	+	+	+	+	—	+	—
IV Neolin-Typ	+	+	+	+	+	+	— ²	—	—
V Isotalatizidin-Typ	+	—	+	+	+	+	—	—	—

¹ ohne C(3)-OH-Gruppe: Hypaconitin (**113**)* und Analoge; ² mit C(3)-OH Gruppe: u.a. Falconerin (**12**)* und 8-Acetylfalconerin (**18**)*; * Strukturen siehe Tabelle 4.

Abbildung 3: Unterteilung des Aconitin-Typs (sensu latiore) in fünf Strukturtypen gemäss Hanuman & Katz (1994c)

gemeinsame Grundstruktur ist ein Diterpengerüst, welches beim Aconitin-Typ (sensu strictu), Pseudaconitin-, Bikhaconitin- und Neolin-Typ (Typen I-IV) in den Positionen 1, 6, 8, 14, 16 und 18 mit Sauerstoff substituiert ist. Beim Isotalatizidin-Typ (Typ V) fehlt dagegen die C(6)-O-Substitution. Die weitere Differenzierung in die einzelnen Strukturtypen erfolgt anhand der zusätzlichen Substitution mit Hydroxylgruppen.

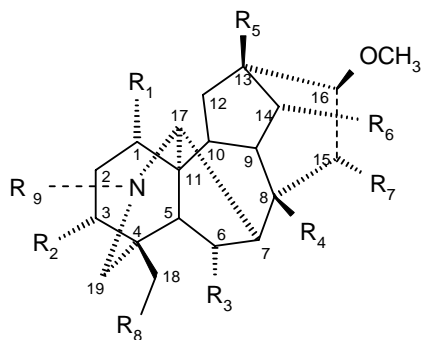
A.3.1.2 Unterscheidung der Norditerpenalkaloide nach Veresterungsgrad

In dieser Arbeit werden die *Aconitum*-Alkaloide einerseits nach ihrem Substitutionsmuster in Strukturtypen, andererseits nach ihrem Veresterungsgrad in Estertypen eingeteilt (siehe Tabelle 3). Alkamine sind die unveresterten Alkaloide. Sie sind natürlich vorhanden und lassen sich durch vollständige Hydrolyse aus Esteralkaloiden gewinnen. Esteralkaloide können nach dem Veresterungsgrad als Monoester- und Diesteralkaloide unterschieden werden. Die C(14)-OH-Gruppe ist in beiden Fällen mit einer aromatischen Säure (Benzoe-, Anis- oder Veratrumsäure) verestert. Bei Diesteralkaloiden ist zusätzlich die C(8)-OH-Gruppe mit Essigsäure verestert. In speziellen Fällen kann diese Hydroxylgruppe mit anderen aliphatischen Säuren verestert sein, wie mit langkettigen Fettsäuren im Falle der Lipoalkaloide oder mit Transhexensäure in Fall von Brachyaconitin, welches Liu & Katz (1996) aus Läusen isolierten, welche an das Leben auf *Aconitum napellus* angepasst sind.

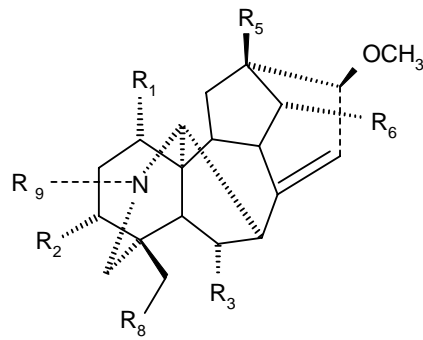
Tabelle 3: Unterscheidung der Norditerpenalkaloide nach Veresterungsgrad in Estertypen

Estertyp	Erläuterung
<i>unveresterte Alkaloide:</i>	
• Alkamine	
<i>Esteralkaloide:</i>	
• Monoesteralkaloide	14-Aroyl-Alkaloide
• Diesteralkaloide	8-O-Acetyl-14-Aroyl-Alkaloide
• Lipoalkaloide	spezielle Diesteralkaloide, welche von Kitagawa <i>et al.</i> (1982) wegen der Veresterung mit verschiedenen langkettigen Fettsäuren so benannt wurden. Die Fettsäure-Estergruppe sitzt an C(8) wie die Acetoxy-Gruppe bei den oben erwähnten Diesteralkaloiden.
• Pyroalkaloide	Monoesteralkaloide, welche entweder mit C(15)-Keton oder einer 8,15-Doppelbindung (Pyrodelphinin-Typ) aufweisen. Sie kommen einerseits natürlich vor (Pelletier <i>et al.</i> , 1977b) und werden andererseits durch Pyrolyse von Diesteralkaloiden gewonnen (siehe A.3.1.3).

Tabelle 4: Strukturen einiger C₁₉-Norditerpenalkaloide

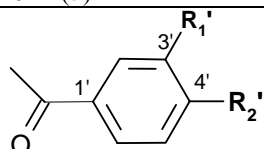


Grundgerüst für **1-26, 110-113**



Grundgerüst für **27 und 108**

Alkaloide #	R ₁ C(1)	R ₂ C(3)	R ₃ C(6)	R ₄ C(8)	R ₅ C(13)	R ₆ C(14)	R ₇ C(15)	R ₈ C(18)	R ₉ N	Summen- formel	MG*
I. Aconitin-Typ (sensu strictu)											
Aconitin (20)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OAc	OH	OBz	OH	OCH ₃	Et	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁	645,3
Mesaconitin (112)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OAc	OH	OBz	OH	OCH ₃	Me	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	631,3
Hypaconitin (113)	OCH ₃	H	OCH ₃	OAc	OH	OBz	OH	OCH ₃	Me	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	615,3
II. Pseudoaconitin-Typ											
Pseudoaconitin (16)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OAc	OH	OVr	H	OCH ₃	Et	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₂	689,3
Yunaconitin (23)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OAc	OH	OAs	H	OCH ₃	Et	C ₃₅ H ₄₉ NO ₁₁	659,3
Indaconitin (24)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OAc	OH	OBz	H	OCH ₃	Et	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₀	629,3
Faleoconitin (110)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OAc	OH	OVr	H	OCH ₃	CHO	C ₃₅ H ₄₇ NO ₁₃	689,3**
3'-Methoxyacoforestinin (111)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OEt	OH	OVr	H	OCH ₃	Et	C ₃₆ H ₅₃ NO ₁₁	675,3**
Veratroylpseudoaconin (7)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OVr	H	OCH ₃	Et	C ₃₄ H ₄₉ NO ₁₁	647,3
8-Deacetylyunaconitin (11)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OAs	H	OCH ₃	Et	C ₃₃ H ₄₇ NO ₁₀	617,3
Ludaconitin (10)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OBz	H	OCH ₃	Et	C ₃₂ H ₄₅ NO ₉	587,3
Pseudoaconin (1)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OH	H	OCH ₃	Et	C ₂₅ H ₄₁ NO ₈	483,3
III. Bikhaconitin-Typ											
Bikhaconitin (15)	OCH ₃	H	OCH ₃	OAc	OH	OVr	H	OCH ₃	Et	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₁	673,3
Crassicaulin A (22)	OCH ₃	H	OCH ₃	OAc	OH	OAs	H	OCH ₃	Et	C ₃₅ H ₄₉ NO ₁₀	643,3
Chasmaconitin (21)	OCH ₃	H	OCH ₃	OAc	OH	OBz	H	OCH ₃	Et	C ₃₄ H ₄₇ NO ₉	613,3
Veratroylbikhaconin (9)	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OH	OVr	H	OCH ₃	Et	C ₃₄ H ₄₉ NO ₁₀	631,3***
Bikhaconin (2)	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OH	OH	H	OCH ₃	Et	C ₂₅ H ₄₁ NO ₇	467,3
IV. Neolin-Typ											
8-Acetylfalconerin (18)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OAc	H	OVr	H	OCH ₃	Et	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₁	673,3
Falconericin (17)	OCH ₃	H	OCH ₃	OAc	H	OVr	H	OCH ₃	Et	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₀	657,3
Falconerin (12)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	H	OVr	H	OCH ₃	Et	C ₃₄ H ₄₉ NO ₁₀	631,3
Falconeridin (14)	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	H	OVr	H	OCH ₃	Et	C ₃₄ H ₄₉ NO ₉	615,3
Neolin (8)	OH	H	OCH ₃	OH	H	OH	H	OCH ₃	Et	C ₂₄ H ₃₉ NO ₆	437,3
Senbusin A (4)	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	OCH ₃	Et	C ₂₃ H ₃₇ NO ₆	423,3
V. Isotalatizidin-Typ											
Isotalatizidin (6)	OH	H	H	OH	H	OH	H	OCH ₃	Et	C ₂₃ H ₃₇ NO ₅	407,3
VI. Pyrodelphinin-Typ											
Falaconitin (27)	OCH ₃	OH	OCH ₃	-	OH	OVr	-	OCH ₃	Et	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₀	629,3
Mithaconitin (108)	OCH ₃	OH	OCH ₃	-	OH	OBz	-	OCH ₃	Et	C ₃₂ H ₄₃ NO ₈	569,3
Keinem der obigen Strukturtypen zugeordnet:											
Karakolin (5)	OH	H	H	OH	H	OH	OH	H	Et	C ₂₂ H ₃₅ NO ₄	377,3



Vr = Veratroyl- (R₁' = R₂' = OCH₃)
 As = Anisoyl- (R₁' = H, R₂' = OCH₃)
 Bz = Benzoyl- (R₁' = R₂' = H)

Ac = Acetyl-
 Et = Ethyl-
 Me = Methyl-
 CHO = Formyl-

geordnet 1. nach Strukturtypen, 2. nach Estertyp (Diester- vor Monoesteralkaloiden und Alkaminen); * Angaben gemäss Pelletier & Joshi (1991) wenn nicht anders vermerkt; ** Atta-ur-Rahman *et al.* (2000); *** Hanuman & Katz (1993b); Mit Ausnahme von **12, 14, 108, 110, 111, 112, 113** wurden die übrigen zwanzig hier aufgeführten Alkaloide in dieser Arbeit als Referenzsubstanzen eingesetzt; Nummern >100: Substanzen in der Literatur, hier nicht detektiert.

A.3.1.3 Stabilität der Esteralkaloide

Hydrolysen und Umsetzung mit Alkoholen

Es ist lange bekannt, dass aus dem Diesteralkaloid Aconitin (**20**) durch Kochen in Wasser das Monoesteralkaloid Benzoylaconin (**101**) (Struktur siehe Tabelle 5) durch Verseifung des C(8)-Essigsäureesters entsteht. Die weitere Hydrolyse des Monoesteralkaloids zum analogen Alkamin Aconin (**102**) (Struktur siehe Tabelle 5) erfolgt erst unter leicht basischen Bedingungen (Katz & Rudin, 1984). Das Diesteralkaloid Bikhaconitin (**15**) konnte dagegen mit kochendem Wasser nicht verseift werden, was durch die gegenüber **20** fehlende, zu C(8) benachbarte C(15)-OH-Gruppe begründet wird. Die Hydrolyse gelang bei **15** durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure im geschlossenen Rohr (Hanuman & Katz, 1993b).

Mit Methanol können Diesteralkaloide mit C(8)-Acetoxy-Gruppe zur C(8)-Methoxy-Verbindung umgesetzt werden (Methanolyse), was schon nach zwei Tagen bei 65 °C unter Rückfluss gelingt (Katz & Rudin, 1984). Werden Alkohole zur Extraktion des Pflanzenmaterials eingesetzt, ist daher Vorsicht vor Artefaktbildung geboten (Desai *et al.*, 1989).

Die Stabilität von Diesteralkaloid-Lösungen bei Raumtemperatur untersuchten Ohta *et al.* (1997) u.a. an Aconitin (**20**). In wässriger Ammoniak-Lösung (pH 10) betrug die Halbwertszeit vier Stunden, in 1 M Salzsäure fünf Monate, in Methanol und Ethanol sechzehn Tage sowie in trockenem Acetonitril und Tetrahydrofuran mehr als ein Jahr.

Pyrolyse

Die Pyrolyse der Diesteralkaloide zu Pyro-Alkaloiden lässt sich durch Erhitzen der trockenen Substanz auf ca. 200 °C im Vakuum (Mori *et al.*, 1989) oder bei Normaldruck durchführen.

Aus Diesteralkaloiden ohne C(15)-OH-Gruppe wie beim Pseudoaconitin- und Bikhaconitin-Typ, entsteht das $\Delta^{8(15)}$ -Alken. Zum Beispiel kann Falaconitin (**27**) durch Pyrolyse von Pseudoaconitin (**16**) hergestellt werden (Wang & Liang, 1992). Ist bei Diterpenalkaloiden zusätzlich die C(15)- α -OH-Gruppe vorhanden wie beim Aconitin-Typ (sensu strictu), wird unter Pyrolyse das C(15)-Keton gebildet wie z.B. Pyroaconitin (**103**) aus Aconitin (**20**) (Wang & Liang, 1992).

A.3.1.4 Basizität von Diterpenalkaloiden

Neben schwachen Basen unter den C₁₉- Norditerpenalkaloiden wie Aconitin (**20**) mit einem pK_s 8,1 [Moffat *et al.* (1986); keine Angabe zum Lösungsmittel], sind unter den C₂₀-Diterpenalkaloiden auch starke Basen bekannt. Beispiele hierfür sind aus der indischen *Aconitum*-Art *A. heterophyllum* Atisin (**104**) und Hetisin (**105**) mit tertiärem heterozyklisch gebundenem Stickstoff (siehe Abbildung 4), deren pK_s-Werte 10,0 respektive 12,8 in 50 % wässrigem Methanol betragen (Pelletier *et al.*, 1968).

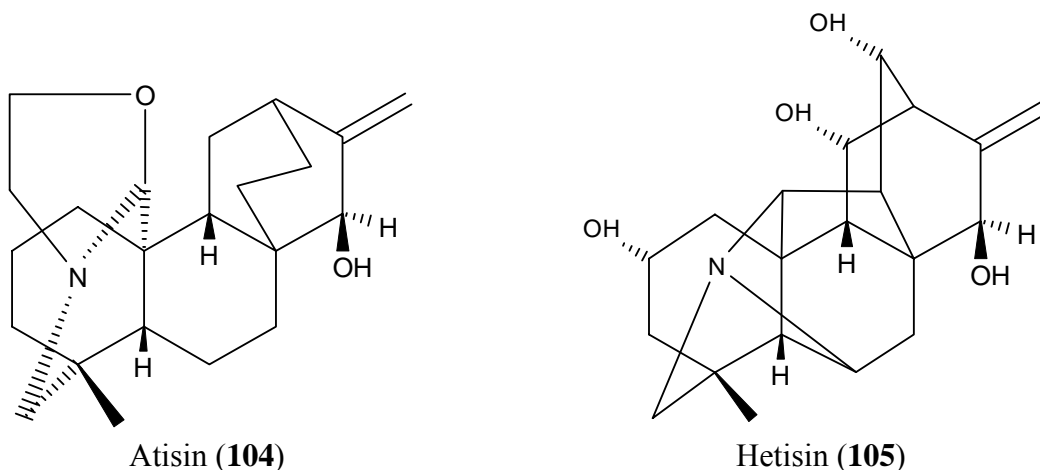


Abbildung 4: Atisin (**104**) und Hetisin (**105**) als Beispiele stark basischer C₂₀-Diterpenalkaloide.

A.3.2 Pharmakologie und Toxikologie der Norditerpenalkaloide

A.3.2.1 Wirkungsmechanismus von Aconitin (20)

Aconitin (**20**) ist ein partieller Agonist der spannungsabhängigen Natriumkanäle von erregbaren Membranen. Aconitin (**20**) bindet an den geöffneten Natriumkanal (Ameri *et al.*, 1996a) und bewirkt, dass nach einem Aktionspotential der Natriumkanal geöffnet bleibt, was zu einer verlängerten Depolarisation führt (Benn & Jacyno, 1983). Diese spannungsabhängigen Natriumkanäle sind in Synapsen von Nervenzellen des peripheren und zentralen Nervensystems sowie von Skelett- und Herzmuskelzellen zu finden. An Nervenzellen führt verlängerte Depolarisation zu Lähmung, wodurch der analgetische Effekt zustande kommt. Am Herz wirkt **20** arrhythmogen und wird hierfür auch als pharmakologische Modellsubstanz eingesetzt. Am Skelettmuskel wirkt **20** Curare-artig, was wahrscheinlich durch eine präsynaptische Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung zustande kommt. Die Erregbarkeit der Muskelzellen wird blockiert und die Skelettmuskulatur erschlafft. In höherer Dosis ist **20** neuro- und cardiotoxisch. Die akut letale Dosis von Aconitin (**20**) durch Herz- oder Atemstillstand liegt beim Menschen zwischen 1 bis 3 resp. 6 mg, von Eisenhutknollen zwischen 2 und 4 g. (Seeger, 1994).

A.3.2.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen

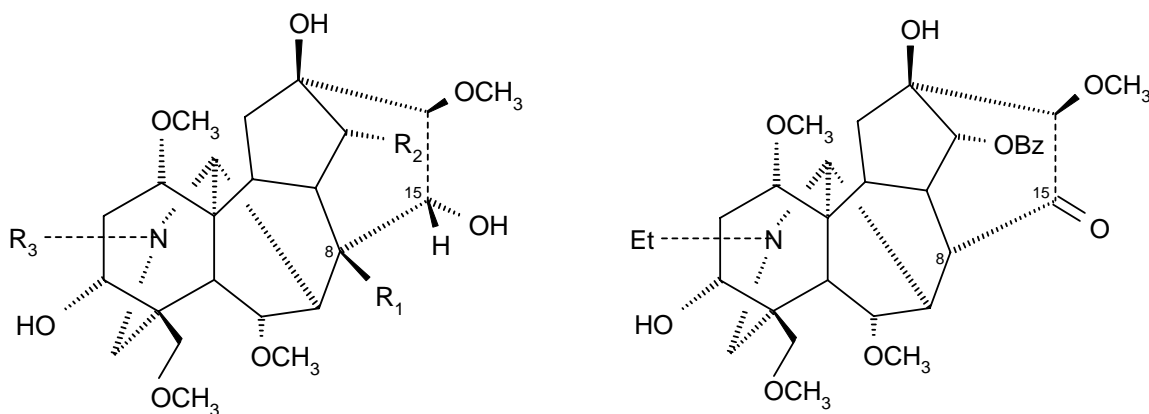
Pharmakologische Eigenschaften und Veresterungsgrad

Mit sinkendem Veresterungsgrad nimmt auch die Toxizität der Norditerpenalkaloide ab, während sich auch deren pharmakologische Eigenschaften verändern (siehe Tabelle 5). Vertreter eines Estertyps sind meist ähnlich in Bezug auf ihre pharmakologischen

Tabelle 5: Toxizität und wichtige pharmakologische Eigenschaften von Nordditerpenalkaloiden am Beispiel von Aconitin (**20**) und dessen Analoga, geordnet nach fallender Toxizität.

Estertyp Vertreter (Aconitin-Typ)	LD ₅₀ bei Mäusen (mg/kg)	Toxizität relativ zu Aconitin (20)	Pharmakologische Wirkungen (Auswahl)
Diesteralkaloide Aconitin (20)	0,27-0,55 (s.c.) ¹ 0,12-0,27 (i.v.) ¹	1	analgetisch, entzündungshemmend, arrhythmogen, atemdepressiv ² , schwächer analgetisch und entzündungshemmend als Aconitin (20) ²
Monoesteralkaloide Benzoylaconin (101)	10-23 (i.v.) ¹	ca. 1/85 (1/35-1/190)	analgetisch, entzündungshemmend ⁴
Pyroalkaloide Pyroaconitin (103)	>30 (s.c.) ⁴	< 1/55- 1/110	nicht analgetisch, nicht entzündungshemmend ³
Lipoalkaloide Lipoaconitin (106)	100-200 (s.c.) ³	ca. 1/370 (1/180-1/750)	analgetisch, entzündungshemmend ³
Lipomesaconitin (107)	10-40 (s.c.) ³	ca. 1/50 (1/18-1/150)	stark antiarrhythmisch: antagonisiert Aconitin (20) diesbezüglich ² ; blutdrucksenkend ¹
Alkamine Aconin (102)	116,5-120 (i.v.) ¹	ca. 1/450-1/1000	

¹ Jacyno (1996); ² Benn & Jacyno (1983); ³ Kitagawa *et al.* (1984a); ⁴ Murayama *et al.* (1991); i.v. intravenös; s.c. subcutan.



	R ₁	R ₂	R ₃
Aconitin (20)	Ac	OBz	Et
Benzoylaconin (101)	OH	OBz	Et
Aconin (102)	OH	OH	Et
Lipoaconitin (106)	lipoyl	OBz	Et
Lipomesaconitin (107)	lipoyl	OBz	Me

Pyroaconitin (**103**)

Ac Acetyl-; Et Ethyl-; Me Methyl-; OBz Benzoyl-; lipoyl Gemisch aus stearoyl-, palmitoyl-, linoleoyl-, oleoyl- und linolenoyl-.

Abbildung 5: Strukturen zu Tabelle 5

Eigenschaften und die akute Toxizität. Der Einfluss des Veresterungsgrad wird am Beispiel von Aconitin (**20**) und dessen Analogen dargestellt, da hier die vorhandenen Daten am besten vergleichbar sind (siehe Tabelle 5).

Auf der Zunge lösen Diesteralkaloide ein beissendes, dann anästhesierendes Gefühl aus, während die weniger giftigen Monoesteralkaloide, Alkamine und Pyroalkaloide dies nicht bewirken (Benn & Jacyno, 1983). Dieser organoleptische Test wird auch für die *Aconitum*-Knollen-Droge sowohl in einem westlichen Pharmakognosie-Standardwerk (Trease & Evans, 1983), als auch in der asiatischen Literatur angegeben (siehe auch A.5.3.2).

Aconitifforme Wirkung

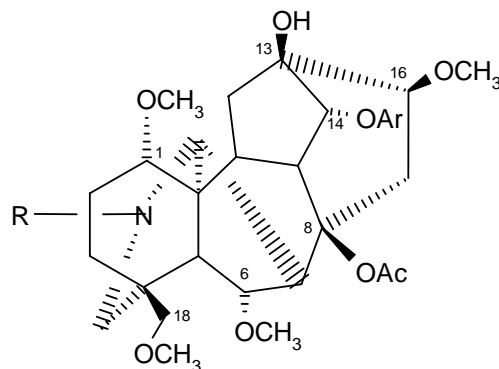


Abbildung 6: Aconitifforme Teilstruktur

Für Alkaloide mit Aconitin-artiger Wirkung ist nach Benn & Jacyno (1983) deren aconitifforme Teilstruktur verantwortlich (siehe Abbildung 6). Ist diese bei einem Alkaloid vorhanden, lässt sich auf eine Aconitin-artige Wirkung schliessen. Dieses Modell wurde u.a. mit synthetischen Derivaten der Nordditerpenalkaloide überprüft. So wurde z.B. der Einfluss der C(13)-OH-Gruppe in Diesteralkaloiden bezüglich Toxizität und Auslösung von Arrhythmien am Beispiel von Indaconitin (**24**) und dessen Acetylierungsprodukten 3-Acetylintaconitin und 3,13-Diacetylintaconitin untersucht, wobei letzteres keine freie OH-

Gruppe mehr besitzt. Mit zunehmendem Acetylierungsgrad nahm die Toxizität und das arrhythmogene Potential der Substanzen markant ab (Zhou *et al.*, 1984). Jacyno (1996) folgerte daraus, dass bei Diesteralkaloiden die freie C-(13)-OH-Gruppe eine signifikante Rolle spielt hinsichtlich deren Toxizität und Vermögen, Arrhythmien auszulösen.

A.3.2.3 Vergiftungen mit *Aconitum*

In einer Übersicht zu den weltweit publizierten Vergiftungen mit *Aconitum* (Chan, 1994) überwiegen Fälle aus asiatischen Ländern, in welchen diese Pflanze noch medizinisch verwendet wird. Über 652 Vergiftungsfälle wurden aus China zwischen 1958-1988 berichtet, wovon 23 letal verliefen. Ausserdem geht Chan (1994) von einer Dunkelziffer aus. Auch aus westlichen Ländern wurden zwei Fälle von letalen Vergiftungen durch chinesische Präparate berichtet. Weiter weist Chan (1994) darauf hin, wie wichtig für die Arzneimittelsicherheit ein effektives Behandeln (processing) der Knollen (siehe A.5) und die korrekte Anwendung der Medikamente ist, welche *Aconitum*-Knollen enthalten. Für entsprechende Traditionelle Chinesische Arzneimittel fordert Blaszczyk (2001), dass diese im Hinblick auf zitierte Todesfälle nur durch erfahrene Therapeuten angewendet werden sollen.

A.4 Untersuchte *Aconitum*-Arten und deren Alkaloide

Von den in dieser Arbeit untersuchten Arten *A. falconeri*, *spicatum* und *violaceum* wird in Tabelle 6 ein Überblick zu Botanik, Verbreitungsgebiet, Giftigkeit und Verwendung gegeben und anschliessend die bisherigen phytochemischen Untersuchungen zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht zu Verbreitungsgebiet, Botanik und Verwendung der in dieser Arbeit untersuchten *Aconitum*-Arten:

Kriterien	<i>A. falconeri</i> STAPF	<i>A. spicatum</i> STAPF	<i>A. violaceum</i> JACQUEM.
Bekanntes Verbreitungsgebiet im Himalaja	Uttar Pradesh ⁽⁴⁾ und Himachal Pradesh (Indien) ⁽⁸⁾	Nepal bis Bhutan, Südtibet ⁽⁵⁾	Kaschmir bis Nepal ⁽⁵⁾
Höhenzone	3'300-3'900 m ⁽⁴⁾	1'800-4'200 m ⁽⁵⁾	3'300-4'800m ^{(2), (5)}
Wuchsform der Pflanze			
• Höhe	bis 1 m ⁽¹⁾	bis 1,5 bis 2 m ⁽⁸⁾	10-35 cm ⁽⁸⁾
• Blütenstand	dichte Traube ⁽¹⁾	Steife Traube oder Rispe mit zahlreichen Blüten ⁽¹⁾	Traube oder bis auf eine Blüte reduziert ⁽¹⁾
• Blütezeit	Juli bis September ⁽⁸⁾ resp. Mai ⁽⁷⁾ bis Oktober ⁽¹⁾	Juli bis September ⁽⁸⁾	August bis September ⁽⁸⁾ resp. Juli ⁽³⁾ bis Oktober ⁽⁷⁾
• Blütenfarbe	blau ⁽⁸⁾	dunkelblau oder violett-blau ⁽⁸⁾ sowie rosa bis grünlich-weiss ⁽²⁾	blau oder violett ⁽⁸⁾
• Knollengrösse	L: bis 12 cm; B: bis 2,5 cm ⁽⁸⁾	L: 10-20 cm; B: 1,8-3 cm ⁽¹⁾	L: 0,75-1,8 cm; B: 4-6 mm ⁽¹⁾
Giftigkeit der Knollen	giftig ⁽¹⁾	giftig ⁽¹⁾	wird lokal von der Bevölkerung teils für giftig teils für ungiftig gehalten ⁽¹⁾
Verwendung der Knollen		medizinisch Anwendungsgebiete siehe allg. Anwendung der 'Ferox-Gruppe' (A.2.1.2)	<ul style="list-style-type: none"> Einnahme als „angenehmes Tonikum“; Kinnaur (Himachal Pradesh, Indien)⁽¹⁾ als Stomachicum sowie in Kombination mit anderen Drogen bei Nierenschmerzen und rheumatischen Erkrankungen; Ladakh (Jammu & Kaschmir, Indien)⁽⁶⁾

L Länge; B Breite; ¹ Stapf (1905); ² Polunin & Stainton (1987); ³ Riedl & Nasir (1991); ⁴ Puri (1974);

⁵ Hara (1979); ⁶ Singh *et al.* (1996); ⁷ Chowdhery & Wadhawa (1984); ⁸ Rau (1993)

Bisher wurden aus den Knollen der drei *Aconitum*-Arten *A. falconeri*, *spicatum* und *violaceum* ausschliesslich C₁₉-Norditerpenalkaloide als Alkaloide isoliert. Die Literaturangaben sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Aus den Knollen von *Aconitum falconeri* STAPF wurden bisher zwölf Diterpenalkaloide isoliert: Pseudaconitin (**16**), Veratroylpseudaconin (**7**), Indaconitin (**24**) (Pelletier *et al.*, 1977a), die beiden Pyrodelphinin-Typ-Alkaloide Falaconitin (**27**) und Mithaconitin (**108**) (Pelletier *et al.*, 1977b), 8-Acetylfalconerin (**18**), Falconerin (**12**) (Desai *et al.*, 1986), Falconericin (**17**) und Falconeridin (**14**) (Desai & Pelletier, 1989) sowie Faleoconitin (**110**), 3'-Methoxyacoforestinin (**111**) und Karakolin (**5**) (Atta-ur-Rahman *et al.*, 2000). Darüber hinaus fanden Singh *et al.* (1966) "Bishatisin" sowie "Bishaconitin". Letzteres beschrieben die Autoren als ein Benzoyl-Veratroyl-Diester-Norditerpenalkaloid mit der Summenformel C₄₁H₅₃NO₁₃. Bisher wurde das Vorkommen dieser beiden Alkaloide jedoch nicht bestätigt. Pelletier *et al.*, (1977b) halten "Bishaconitin" für eine Mischung aus mehreren Alkaloiden, welche Falaconitin (**27**) ähnlich seien.

Aus den Knollen von *Aconitum spicatum* STAPF wurden bisher zwei Alkaloide isoliert. Bikhaconitin (**15**) fanden Dunstan & Andrews (1905) in Droge aus Darjiling (West Bengal, Indien), während Tsuda & Marion (1963) aus identifizierter, kommerzieller Droge neben **15** auch Pseudaconitin (**16**) isolierten. In DC-Untersuchungen fanden Faugeras *et al.* (1973) in Droge aus Ostnepal ebenfalls **15** und **16**, während Jašek *et al.* (1973) zusätzlich Indaconitin (**24**) nachwies. Die Autoren liessen das Pflanzenmaterial an den Royal Botanic Gardens, Kew, London identifizieren, in deren Herbar die von Stapf (1905) beschriebenen indischen *Aconitum*-Arten noch zu finden sind.

Bisher wurden aus den Knollen von *Aconitum violaceum* Jaquem. zwei Alkaloide isoliert. Miana *et al.* (1971) fanden Indaconitin (**24**) in Droge aus Pakistan (Neelam Valley in Azad Kaschmir), während Tiwari & Masood (1977) Bikhaconitin (**15**) isolierten. In der letzteren Arbeit wird keine Sammellokalisierung angegeben. Den alkoholischen Extrakt der Knollen von *A. violaceum* beurteilten Kethwal & Verma (1990) nach Versetzen mit Dragendorff's, Mayer's und Wagner's Reagens als "reich an Alkaloiden". Die Droge stammte aus Uttar Pradesh, Indien (Pindari und Milam im Kumaon Himalaja) und wurde zusammen mit anderen potentiell medizinisch nutzbaren Pflanzen untersucht, welche gefährdete Arten ersetzen könnten.

Tabelle 7: Bisher aus *A. falconeri*, *spicatum* und *violaceum* isolierte respektive nachgewiesene Nordditerpenalkaloide

Alkaloide #	<i>A. falconeri</i>	<i>A. spicatum</i>	<i>A. violaceum</i>
Bikhaconitin (15)		+ ^{6,7} DC ^{8,9}	+ ¹⁰
Pseudoaconitin (16)	+ ¹	+ ⁷ DC ^{8,9}	
Indaconitin (24)	+ ¹	DC ⁹	+ ¹¹
Veratroylpseudoaconin (7)	+ ¹		
Falacconitin (27)	+ ²		
Mithaconitin (108)	+ ²		
8-Acetylfalconerin (18)	+ ³		
Falconerin (12)	+ ³		
Falconericin (17)	+ ⁴		
Falconeridin (14)	+ ⁴		
Faleoconitin (110)	+ ⁵		
3'-Methoxyacoforestinin (111)	+ ⁵		
Karakolin (5)	+ ⁵		

Strukturen siehe Tabelle 4, geordnet nach Erscheinen der Arbeiten zu *A. falconeri*, + isoliert; DC dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen;

¹ Pelletier *et al.* (1977a); ² Pelletier *et al.* (1977b); ³ Desai *et al.* (1986); ⁴ Desai & Pelletier (1989); ⁵ Atta-ur-Rahman *et al.* (2000); ⁶ Dunstan & Andrews (1905); ⁷ Tsuda & Marion (1963); ⁸ Faugeras *et al.* (1973); ⁹ Jašek *et al.* (1973); ¹⁰ Tiwari & Masood (1977); ¹¹ Miana *et al.* (1971)

A.5 Behandeln von *Aconitum*-Knollen

Bevor in den asiatischen Medizinalsystemen von Indien, Tibet, China und Japan giftige Ausgangsstoffe, darunter die *Aconitum*-Knollen, zum Einsatz kommen, werden diese meist mit bestimmten Methoden (vor)behandelt respektive „entgiftet“. In der englischsprachigen Literatur werden diese Behandlungen folglich unter anderem als „processing“ (Behandlung), „purification“ (Reinigung), „mitigation“ („Milderung“) und „detoxification“ (Entgiftung) bezeichnet.

A.5.1 Behandlungsmethoden

Die zur Behandlung von *Aconitum*-Knollen eingesetzten Methoden sind eigentliche pharmazeutische Prozesse und reichen von der Mazeration, über das Kochen und Autoklavieren bis zum Rösten und Räuchern und werden zum Teil auch kombiniert angewendet (siehe Tabelle 8). Allen diesen Behandlungsmethoden ist jedoch gemeinsam, dass die Droge einem Prozess in einem wässrigen Medium unterworfen und zum Schluss getrocknet wird. Das Ziel ist eine „gemilderte“ Droge zu erhalten, deren Toxizität also verringert ist, aber z.B. die analgetische Wirkung behält.

Tabelle 8: Übersicht der Methoden in verschiedenen asiatischen Medizinalsystemen zur Behandlung von *Aconitum*-Knollen:

Methode*	Zustand der Droge	Medium	Prozess	Dauer	Bedingungen, weitere Schritte	Literatur
Tibetische Medizin (siehe A.5.3.2):						
T	trocken, zerkleinert	Kuhurin	Mazerat	7 Tage	an der Sonne, täglich frisches Medium; Prozess-Endepunkt organoleptisch bestimmen; Wurzelrinde entfernen	1
Ayurveda (siehe A.5.3.1):						
A	trocken, zerkleinert	Kuhurin	Mazerat	3 Tage	an der Sonne, täglich frisches Medium	2, 3
B	Trocken, zerkleinert	Kuhurin	Decoct	24 h	am Rückfluss	2
C	trocken, zerkleinert	Kuhurin	1. Mazerat	3 Tage	an der Sonne	2
		Kuhurin	2. Decoct	1 h	Medium von Mazeration weiterverwendet	
D	trocken, ganz	Geissenmilch	Decoct	12 h	am Rückfluss	2
E	trocken, ganz	Kuhurin	Decoct	2 Tage je 7h	dann spülen und zerkleinern, trocknen	4
F	trocken, ganz	Kuhmilch	Decoct	2 Tage je 7h	dann spülen und zerkleinern, trocknen	4
G	trocken, ganz	1. Kuhurin	Decoct	2 Tage je 7h		4
		2. Kuh-Milch	Decoct	2 Tage je 7h	dann spülen und zerkleinern, trocknen	
Traditionelle chinesische Medizin (TCM) (siehe A.5.3.3):						
H	frisch, ganz	Salzlake	1. Mazerat	k.A.	Mazerat / Trocknen im Wechsel bis sich Salzkristalle an der Droge bilden; dann spülen	5
		+ Süssholzwurzel & Sojabohnen	2. Decoct	k.A.	Prozess-Endepunkt organoleptisch bestimmen; dann zerkleinern	
I	frisch, ganz	Salzlake	1. Mazerat	k.A.		5
		Salzlake	2. Decoct	k.A.	dann zerkleinern, dämpfen, rösten	
J	frisch, ganz	Salzlake	1. Mazerat	k.A.		5
		Salzlake	2. Decoct	k.A.	gar kochen, dann Wurzelrinde entfernen, zerkleinern, dämpfen, in Schwefeldämpfen räuchern, rösten	
Moderne Methoden in China und Japan (A.5.3.4):						
K	k.A.	Wasser	Autokl.	40 min	120 °C	6
L	k.A.	Wasser	Autokl.	40 min	110 °C	7
M	k.A.	Wasser	1. Mazerat	48 h		8
		Wasser	2. Autokl.	120 min	115 °C	
N	k.A.	Wasser	Decoct	4 h	Verhältnis Droge zu Medium (1:4)	6

1 Dash (1994); **2** Handa *et al.* (1951); **3** Hanuman & Katz (1993a); **4** Thorat & Dahanukar (1991); **5** Stöger (1991); **6** Hikino *et al.* (1977); **7** Mori *et al.* (1989); **8** Chen *et al.* (1995); * Abkürzungen A-T werden im Text verwendet (A.5.3); Mazerat Mazeration / Einlegen bei Umgebungstemperatur; Autokl. Autoklavieren; k.A. keine Angabe

A.5.2 Haupteffekte des „processings“

Anhand der Literatur zur Zusammensetzung von *Aconitum*-Knollen, welche mit unterschiedlichen Methoden behandelt wurden, können die in Tabelle 9 zusammengestellten Haupteffekte und chemische Umwandlungen festgehalten werden (siehe auch A.3.1.3).

Tabelle 9: Haupteffekte der Behandlung von *Aconitum*-Knollen

Effekte der Behandlung	Literatur
Abnahme des Gesamtalkaloidgehalts durch Extraktion (siehe A.5.3.1)	Hanuman & Katz (1993a und 1993b), Hanuman & Katz (1994a und 1994b), Handa <i>et al.</i> (1951), Hikino <i>et al.</i> (1977)
Hydrolyse der Diester- zu Monoesteralkaloiden	Hikino <i>et al.</i> (1977 und 1983), Mori <i>et al.</i> (1989)
Zunahme des Gehalts an Lipoalkaloiden	Kitagawa <i>et al.</i> (1984b)
Bildung von Pyrodelphinin-Typ-Alkaloiden	Mori <i>et al.</i> (1989)

A.5.3 Pharmakologische und analytische Untersuchungen zu verschiedenen “Entgiftungsmethoden” der asiatischen Medizinalsysteme

Im Folgenden werden verschiedene asiatische Behandlungsmethoden (siehe Tabelle 8) beschrieben und sowie falls möglich Angaben zu deren Auswirkung anhand von pharmakologischen und analytischen Untersuchungen dargestellt. Hinter diesen Untersuchungen steht auch das Bemühen, mit überprüften Herstellverfahren sicherere Präparate zu erhalten und dadurch Vergiftungsfälle zu vermeiden. Die für die Behandlungsmethoden verwendeten Abkürzungen finden sich in Tabelle 8.

A.5.3.1 Behandlungsmethoden in der Ayurveda

In der Ayurveda wird die Entgiftung als eine Verwandlung von “Gift” in “Nektar” angesehen (Singh *et al.* 1980). Meist werden *Aconitum*-Knollen in Kuhurin mazeriert d.h. kalt angesetzt oder gekocht (siehe Tabelle 8). Kuhurin ist normalerweise schwach basisch (pH 7,8) (McKinnon *et al.*, 1990). Der Autor vermutet, dass wegen der besonderen Stellung der Kuh in Indien die Verwendung von deren Milch und Urin hier auch eine symbolische Bedeutung zukommt.

Aus unbehandelten und nach Methode **A** mit Kuhurin ayurvedisch behandelten, kommerziell erhältlichen Knollen von “*A. ferox*” (identifiziert als *A. laciniatum*) isolierten Hanuman & Katz (1993a, 1994a, 1994b) zwanzig Diterpenalkaloide. Aus den behandelten Knollen wurde verglichen mit unbehandelten Knollen von den einzelnen Alkaloiden im Allgemeinen eine zwei- bis sechsmal geringere Menge isoliert. Eine relative Zu- oder Abnahme unter den Alkaloidgruppen ist nicht erkennbar. Andererseits fanden Hanuman & Katz (1993b) zusätzlich Quinolon-Derivate nur in den behandelten Knollen. Die Autoren nehmen daher an, dass diese aus dem Kuhurin stammen, andererseits sei nicht auszuschliessen, dass die Chinolone aus einer unbekanntem Substanz in den Knollen z.B. durch Enzyme im Kuhurin gebildet würden.

Handa *et al.* (1951) verglichen die ayurvedischen Standard-Behandlungsmethoden **A-D** an Knollen von *A. chasmanthum*. Gewicht und Alkaloidgehalt der Knollen waren jeweils durch die Extraktion reduziert (siehe Tabelle 9). An Hunden wurde die Dosis einer auf den Gesamtalkaloidgehalt standardisierten Tinktur bis zum Einsetzen des Kammerflimmerns sowie die letale Dosis gemessen. Verglichen mit unbehandelten Knollen hatten nach **A-D** behandelte eine geringere Toxizität. Besonders geeignet erscheint Methode **B** mit 24 h

Kochen unter Rückfluss, da die Tinktur aus so behandelten Knollen kein Herzkammerflimmern auslöste und die letale Dosis ca. viermal höher lag als von unbehandelten Knollen. Weiter untersuchten Handa *et al.* (1951) Proben aus Apotheken in Indien, welche auch aus Mischungen verschiedener *Aconitum*-Arten (ohne *A. chasmanthum*) bestanden. Meist waren die Knollen nach Methode **A** jedoch unzerkleinert behandelt, zudem variierten die Dauer der Behandlung oder die Intervalle des Austausch mit frischem Urin. Da diese Muster noch ähnlich toxisch waren wie unbehandelte Knollen, müssen diese nicht korrekt durchgeführten Behandlungen der ganzen Knollen als ineffektiv gewertet werden.

Thorat & Dahanukar (1991) untersuchten drei weitere ayurvedische Behandlungsmethoden **E** bis **G** an Tubera einer nicht weiter definierten *Aconitum*-Art. An Mäusen wurde die akute orale Toxizität der behandelten und unbehandelten Droge untersucht. Die nach Methode **E** und **G** behandelte Droge war auch in der Menge noch nicht akut toxisch, welche etwa der zehnfachen LD₅₀ der unbehandelten Droge entspricht. Nur in Kuhmilch gekochte Droge (Methode **F**) hatte dagegen bei Dosen, welche etwa der halben bis vierfachen LD₅₀ der unbehandelten Droge entsprechen, bereits eine Mortalität von einem Sechstel zur Folge. Muskeltonus und -koordination waren eingeschränkt, wenn eine Droge eingesetzt wurde, welche nach Methode **E** und insbesondere nach Methode **F** behandelt war. Diese Effekte traten dagegen nicht auf, wenn die Droge nach Methode **G** mit insgesamt 28 h Kochen behandelt wurde, welche deshalb in diesem Vergleich am besten zur Reduktion der Toxizität geeignet war.

A.5.3.2 Behandlungsmethoden in der tibetischen Medizin

Die Reinigung von *Aconitum*-Knollen gemäss der Tibetan Pharmacopoeia (Dash, 1994) (Methode **T**) wird ähnlich wie mit der ayurvedische Methode **A** mit Kuhurin durchgeführt (siehe Tabelle 8). Die Mazeration dauert allerdings mit mindestens sieben Tagen länger. Um

den Abschluss des „processings“ zu bestimmen, wird ein organoleptischer Test durchgeführt, wobei ein kleines Stück behandelte Droge auf der Zunge kein beissendes und anästhesierendes Gefühl mehr bewirken soll (siehe A.3.2.2). Andernfalls muss der Reinigungsprozess wiederholt werden.

A.5.3.3 Behandlungsmethoden in der traditionellen chinesischen Medizin

Im Unterschied zu ayurvedischen und tibetischen Behandlungsmethoden (siehe Tabelle 8) beginnt die Behandlung gemäss dem Arzneibuch der chinesischen Medizin (Stöger, 1991) bereits mit den frischen Knollen, den Tochterknollen von *A. carmichaeli*. Auf verschiedenen Wegen wird eine trockene Droge hergestellt, wie durch Einlegen in Salzlake und Trocknen im Wechsel. Die getrocknete Droge wird gekocht und zum Teil anschliessend noch weiter mit Hitze wie durch Dämpfen, Rösten und z.T. Räuchern in Schwefeldämpfen behandelt. Genaue Zeitangaben für die meisten Schritte fehlen in der Literatur.

Nach Methode **H** behandelte Drogenmuster hatten nur noch ein Viertel bis ein Achtel des Alkaloidgehalts verglichen mit unbehandelten Knollen (Hikino *et al.*, 1977). Der Gehalt an Diesteralkaloiden ging auf die Hälfte bis ein Sechstel zurück, während im Verhältnis zu diesen die Monoesteralkaloide erhöht waren. Gegenüber unbehandelter Droge war die akute Toxizität der behandelten je nach Applikationsart fünfzig- bis zweihundertfünzigmal geringer. Kitagawa *et al.* (1984b) stellten bei behandelten Knollen von *A. carmichaeli* aus China und Japan eine Abnahme von Aconitin (**20**), Mesaconitin (**112**), Hypaconitin (**113**) und einen erhöhten Gehalt von Lipoalkaloiden fest. Die hier vorausgegangenen Behandlungsmethoden sind jedoch nicht genau beschrieben.

A.5.3.4 Moderne Behandlungsmethoden wie Autoklavieren

An autoklavierten und gekochten Knollen von *A. japonicum* und *A. carmichaeli* untersuchten Hikino *et al.* (1977) den Zusammenhang zwischen Gesamtalkaloidgehalt, Alkaloidzusammensetzung und akuter Toxizität im Vergleich zu unbehandelten Knollen. Nach 4 h Kochen in Wasser (Methode **N**) respektive Autoklavieren bei 120 °C/40 min (Methode **K**) war der Gesamtalkaloidgehalt verringert. Die Diesteralkaloide gingen durch Kochen auf die Hälfte bis ein Viertel, respektive durch Autoklavieren auf ein Fünftel bis ein Zehntel zurück. Die Monoesteralkaloide stiegen dagegen in beiden Fällen um das Zwei- bis Vierfache an. Aus den Daten lässt sich das Verhältnis der einzelnen Monoester- zu den analogen Diesteralkaloiden bilden. Während dieses bei den unbehandelten Knollen 1:2,25 bis 1:3,7 betrug, stieg es nach dem Kochen auf 3:2 bis 3:1, nach dem Autoklavieren auf 4:1 bis 7:1 an. Gegenüber der unbehandelten Droge war die akute Toxizität bei Mäusen (intraperitoneal) um das Fünfzig- bis Hundertfache reduziert. Diese spiegelt auch den Toxizitätsunterschied zwischen Mono- und Diesteralkaloiden wider (siehe Tabelle 5).

Bei Drogen, welche nach Methode **L** (Autoklavieren bei 110 °C/40 min) behandelt wurden, fanden Mori *et al.* (1989) im Alkaloidextrakt 95 % Monoesteralkaloide, 3 % Diesteralkaloide und gut 1 % neugebildete 15-Keto-Pyroalkaloide. Die Mengen einzelner Monoesteralkaloide stieg auf das Fünfzehn- bis Sechzigfache der analogen Diesteralkaloide. Die Monoesteralkaloide machten dabei vier Fünftel der gesamten isolierten Alkaloide aus.

Die analgetische Wirkung von Knollen, welche nach Methode **M** 48 h eingeweicht und bei 115 °C/120 min autoklaviert wurde, war im Tierversuch gegenüber einer Droge überlegen, welche nach einer jedoch nicht näher beschriebenen offizinellen Methode der traditionellen chinesischen Medizin behandelt worden war (Chen *et al.*, 1995).

A.5.3.5 Kommentare zum „processing“

Zur Reduktion der Toxizität der Droge ist es von grosser Bedeutung, wie die Behandlung durchgeführt wird. Dauer und Temperatur der Behandlung spielen eine Rolle und ob die Droge ganz oder zerkleinert eingesetzt wurde. Am effektivsten scheint die Droge entgiftet zu werden, wenn diese über längere Zeit gekocht wird in Wasser (Methode **N**), Kuhurin oder Kuhmilch (Methoden **B** und **G**) oder gar autoklaviert wird (Methoden **K**, **L** und **M**).

Da getrocknete *Aconitum*-Knollen beispielsweise von *A. falconeri* hart wie Holz sind und schon nur zum Aufweichen einige Zeit benötigen (siehe B.4.3.1), ist es von Vorteil zerkleinerte Knollen einzusetzen. Dies scheint besonders wichtig, wenn eine Behandlung ohne Hitze effektiv durchgeführt werden soll.

Vierstündiges Kochen der Knollen mit Wasser (Methode **N**) hatte den erwünschten Umschwung von Diesteralkaloiden zu Monoesteralkaloiden zur Folge. Bei Behandlung mit Kochen könnte Kuhurin in dieser Hinsicht also durch Wasser ersetzt werden.

Obige Untersuchungen zeigen deutlich, dass eine wesentliche Senkung der Toxizität durch Hydrolyse der Diesteralkaloide und somit durch eine Veränderung der Alkaloidzusammensetzung erfolgt, indem feuchte Hitze angewandt wird, wodurch eine gemilderte und dennoch wirksame Droge als pharmakologisches Ziel der Behandlung resultiert. Meist wurde in den oben erwähnten Arbeiten jedoch nur die Toxizität und weniger die pharmakodynamischen Eigenschaften von behandelten Knollen untersucht. Dennoch war die nach Methode **M** behandelte Droge analgetisch sehr gut wirksam (Chen *et al.*, 1995). Sind nur analytische Untersuchungen vorhanden, so spricht z.B. ein Vorhandensein von

hauptsächlich Monoesteralkaloiden für eine weiterhin vorhandene analgetische Wirksamkeit der behandelten Droge.

Um zu beurteilen, ob die *Aconitum*-Knollen ausreichend behandelt wurden, schreibt die tibetische Methode **T** und die chinesische Methode **H** den organoleptische Test vor (siehe A.5.3.2). Entscheidend ist, ob auf der Zunge noch ein brennendes, anästhesierendes Gefühl auftritt, wofür die stark toxischen Diesteralkaloide verantwortlich sind (siehe auch A.3.2.2). Dieser einfache Test ist als In-Prozess-Kontrolle des Processings sehr aufschlussreich und leistet gleichzeitig einen grundlegenden Beitrag zur Anwendungssicherheit.

A.6 Tibetische Juwelenpillen Byu-Dmar 25 und Byu-Dmar 13 und *Aconitum*

Byu-Dmar 25 („dschu-mar“) ist eine der ca. dreissig verschiedenen tibetischen Juwelenpillen, welche in der englischen Literatur wegen ihrer z.T. wertvollen Bestandteile auch als „precious pills“ bezeichnet werden. Byu-Dmar 25 geht auf einen berühmten tibetischen Arzt aus dem 17. Jahrhundert zurück und wird in der tibetischen Medizin bei Fieber verschiedener Ursache sowie verschiedenen Leiden des Nervensystems eingesetzt. Hierzu zählen traditionelle Indikationen wie starkes Kopfwegh, „brain disorders“, Ohnmachtsanfälle, nervöse Unruhe sowie nervliche Störungen wie Gedächtnisverlust. Weiter wird Byu-Dmar 25 bei eingeschränkter Körperbeweglichkeit oder bei Versteifung wie z.B. Nackensteifigkeit verordnet (Dash, 1994; Aschoff *et al.*, 1997).

Byu-Dmar 25 enthält 25 Bestandteile, von welchen sechs mineralischen, vierzehn pflanzlichen und fünf tierischen Ursprungs sind. Ausgehend von diesem Rezept kreierte

Tabelle 10: Rezepturen der tibetischen Juwelenpillen Byu-Dmar 25 und der Variante Byu-Dmar 13

Nr. Bestandteile ¹	Ursprung	Pflanzenteil	Byu-Dmar 25 ²		Byu-Dmar 13 ³	
			MT	%	MT	%
1 <i>Terminalia chebula</i> (Kabul-Myrobalan), <i>Combretaceae</i>	P	Fructus	75	9,0	355	16,3
2 <i>Saussurea lappa</i> (Alpenscharte), <i>Asteraceae</i>	P	Radix	17,5	2,1	150	6,9
3 <i>Acorus calamus</i> (Kalmus), <i>Araceae</i>	P	Rhizoma	11,5	1,4	125	5,7
4 <i>Aconitum sp.</i> (Eisenhut), <i>Ranunculaceae</i> - behandelt (siehe A.5.3.2)	P	Tuber	37,5	4,5	75	3,4
5 Moschus (Drüsensekret des Moschustiers)	T		6	0,7	-	-
6 Perlmutter	T		30	3,6	162	7,4
7 Koralle	T		50	6,0	187	8,6
8 Perle	T		30	3,6	-	-
9 Lapis lazuli	M		50	6,0	-	-
10 <i>Syzygium aromaticum</i> (Nelke), <i>Myrtaceae</i>	P	Flos	25	3,0	87	4,0
11 <i>Myristica fragrans</i> (Muskatnuss), <i>Myristicaceae</i>	P	Semen	25	3,0	-	-
12 Magnetit (natürlicher Magnet Eisenstein)	M		25	3,0	63	2,9
13 <i>Aquillaria agalocha</i> (Adlerholz), <i>Thymelaeaceae</i>	P	Lignum	30	3,6	250	11,5
14 <i>Aster barbellatus</i> , <i>Asteraceae</i>	P	Flos	30	3,6	-	-
15 gelbes Ocker (eisenoxydhaltige Tonerde)	M		30	3,6	-	-
16 <i>Aegle marmelos</i> (bengalische Quitte), <i>Rosaceae</i>	P	Fructus	30	3,6	-	-
17 <i>Sesamum indicum</i> (Sesam), <i>Pedaliaceae</i>	P	Semen	30	3,6	-	-
18 <i>Swertia chirata</i> (indischer Tarant), <i>Gentianaceae</i>	P	Herba	30	3,6	175	8,0
19 Kalammin (Galmei = Kieselzinkerz oder Zinkspat)	M		50	6,0	63	2,9
20 Zinnober (natürl. HgS) – speziell behandelt	M		15	1,8	-	-
21 „Drachenknochen“	T		30	3,6	-	-
22 „Gehinförmiger“ Stein	M		30	3,6	-	-
23 <i>Carthamus tinctorius</i> (Färberdistel), <i>Asteraceae</i> ⁴	P	Flos	50	6,0	305	14,0
24 <i>Glycyrrhiza glabra</i> (Süßholz), <i>Fabaceae</i>	P	Radix	50	6,0	185	8,5
25 <i>Chrysanthemum tatsienense</i> , <i>Asteraceae</i>	P	Herba	50	6,0	-	-
Total Mischung:			837,5	100	2182	100

MT Massenteile; M mineralischer Ausgangsstoff; P pflanzlicher Ausgangsstoff; T tierischer Ausgangsstoff; ¹ Übersetzung der tibetischen Bezeichnungen wurde z.T. nach Parfionovitch *et al.* (1996) gegenüber den Angaben von Aschoff *et al.* (1997) ergänzt; ² „Byur dmar ñer lna“ ist das Rezept Nr. 113 der Pharmacopoeia of Tibetan Medicine (Dash, 1994); ³ Aschoff *et al.* (1997); ⁴ als Ersatz für Safran im Rezept bei Dash (1994)

Dr. Y. Tashigang vom Tibetan Medical Institute in Delhi die vereinfachte Variante Byu-Dmar 13, mit welcher in Deutschland eine klinische Pilotstudie zur Migräneprophylaxe (Aschoff *et al.*, 1997) durchgeführt wurde. Die beiden Rezepturen werden in Tabelle 10 angegeben. Zur Herstellung werden die gemischten pulverisierten Bestandteile mit Wasser

befeuchtet und aus der entstandenen Paste die Pillen geformt und anschliessend getrocknet. Nicht nur für die Eisenhutknollen schreibt die Tibetische Pharmakopöe (Dash, 1994) eine spezielle Vorbehandlung vor, sondern auch für Zinnober, was hier durch Erhitzen geschieht.

Für die in beiden Juwelenpillen enthaltenen *Aconitum*-Knollen werden in den Rezepturen verschiedene tibetische Bezeichnungen verwendet, deren Übereinstimmung mit einzelnen Arten z.T. noch nicht genug bekannt ist. „Btsan-dug“ in der Rezeptur von Byu-Dmar 25 (Dash, 1994) ordnen Parfionovitch *et al.* (1996) der Art *Aconitum fischeri* REICHENB. zu, welche jedoch im Himalaja nicht verbreitet ist (Hara, 1979), sondern von Nordostchina bis Ostsibirien vorkommt (Roth *et al.*, 1994). Die Bezeichnung „Sman-chen“ in der Rezeptur von Byu-Dmar 13 (Aschoff *et al.*, 1997) setzten Parfionovitch *et al.* (1996) der Spezies *Aconitum ferox* WALL gleich, für welche sie mindestens drei weitere tibetische Bezeichnungen nennen.

Als Standarddosierung werden von Byu-Dmar 25 der Tibetischen Pharmakopöe zweimal täglich zwei Pillen angegeben (Dash, 1994), während von Byu-Dmar 25 des Tibetan Medical Institute in Delhi täglich eine Pille eingenommen wird und von der Variante Byu-Dmar 13 zweimal täglich eine Pille in einer klinischen Pilotstudie mit verabreicht wurden (Aschoff *et al.*, 1997). In Tabelle 11 wird die theoretisch pro Pille enthaltene Menge an Eisenhutknollen verglichen sowie bei diesen Anwendungen verabreichte Dosis an *Aconitum*-Knollen und an Diterpenalkaloiden geschätzt. Obwohl die Pillen unterschiedliche Mengen an Knollen enthalten ist die Tagesdosis an *Aconitum*-Knollen überraschenderweise bei allen drei Rezepturen gleich.

Table 11: Vergleich der in den Juwelenpillen Byu-Dmar 25 und Byu-Dmar 13 enthaltenen Mengen *Aconitum*-Knollen resp. Diterpenalkaloide und Tagesdosis

Vergleichskriterien	Byu-Dmar 25 Tibetan Pharmacopoeia ¹	Byu-Dmar 25 Delhi ²	Byu-Dmar 13 Delhi ²
Pillengewicht	250 mg	1000 mg ³	630 mg ³
<i>Aconitum</i> -Knollen / Pille	4,5%; 11,25 mg	4,47%; 44,8 mg	3,4 %; 21,4 mg
Einzunehmende Pillen / Tag	2mal täglich 2	1	2
Dosis <i>Aconitum</i> -Knollen / Tag	45 mg	44,8 mg	42,8 mg
Theoret. Menge Gesamtalkaloide / Tag ¹	0,45 mg	0,45 mg	0,43 mg

¹ Dash (1994); ² Delhi, Tibetan Medicinal Institute (Aschoff *et al.*, 1997); ³ B.4.3.2; ⁴ bei 1% Gehalt der Droge gemäss Hanuman & Katz (1994a)

In dieser Arbeit beschränkt sich die Untersuchung der Juwelenpillen auf die in deren Bestandteil Eisenhutknollen enthaltenen Diterpenalkaloide. Bereits 1994 hat Frau Dr. H. Liu ebenfalls im Labor für Naturstoff-Forschung, Basel Proben von Byu-Dmar-Pillen dünnschichtchromatographisch auf Alkaloide hin untersucht und Pseudaconitin (**16**), Indaconitin (**24**) nachgewiesen sowie Bikhaconitin (**15**) wahrscheinlich gemacht (unveröffentlichte Resultate).

A.7 Analytik

In diesem Kapitel werden die verwendeten Extraktionsmethoden, die chromatographischen Trenn- und Detektionsmethoden sowie die Strukturaufklärung von Diterpenalkaloiden beschrieben und deren Wahl begründet.

Übersichten zum Stand der Methoden zur Isolierung und Strukturaufklärung von Alkaloiden wurden von Verpoorte & Schripsema (1994) und speziell zu Diterpenalkaloiden von Benn (1993) publiziert. Nach Benn (1993) ist die Isolierung und Strukturaufklärung der Diterpen- und Norditerpenalkaloide mit den existierenden Trennverfahren und spektroskopischen Methoden gut abgedeckt. Er schliesst seine Übersicht mit der Bemerkung, dass Weiterentwicklungen in der Mikroanalytik (GC-MS, HPLC-MS) komplexer Alkaloidmischungen aus Pflanzen am dringendsten seien.

A.7.1 Extraktionsmethode

Eine Auswahl verschiedener in der Literatur beschriebener Methoden zur Extraktion von Diterpenalkaloiden gibt Tabelle 12.

Das in dieser Arbeit verwendete im Folgenden beschriebene Extraktionsverfahren wurde nach den Arbeiten von Gauch (1992), Hanuman & Katz (1993a) und Liu (1995) kombiniert. Vor der eigentlichen Extraktion wird das Knollenpulver gemäss Gauch (1992) entfettet, um den Lipidanteil im Rohextrakt zu verringern und bei der Reinigung des Rohextrakts eine mögliche Störung wie Verseifung von Fetten und Emulsionsbildung vermeiden. Für die Extraktion werden Alkohole als Extraktionsmittel wegen der Instabilität der Diesteralkaloide vermieden, da die Gefahr von Artefaktbildung insbesondere beim Erwärmen besteht (Desai *et al.*, 1989).

Das Pflanzenmaterial wird bei Raumtemperatur mit CHCl_3 unter Zusatz von Ammoniak resp. NaOH extrahiert, um die Alkaloide als freie Basen in der organische Phase zu erhalten. Es wird nach pH 9 auch bei pH 12 extrahiert, um neben den schwachen Basen auch allfällig im Pflanzenmaterial vorhandene starke Basen extrahieren zu können (siehe A.3.1.4). Mit dem Ziel, auch hydrophilere Alkaloide wie die Alkamine vollständig zu erhalten, wird zusätzlich mit $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ (4+1) extrahiert.

Tabelle 12: Literaturübersicht über Extraktionsmethoden für *Aconitum*-Alkaloide

pH (Extraktions- medium)	Organisches Lösungsmittel	Temperatur	Technologie	Dauer	Literatur
Neutral	• Methanol	Rt	Mazeration	1 h	Ito <i>et al.</i> (1996)
	• Ethanol 80 %	Rt	Mazeration	5 Tage	Atta-ur-Rahman <i>et al.</i> (2000)
	• Ethanol 95 %	Rt	Mazeration	3 x 4 Tage	Yue <i>et al.</i> (1994)
	• Ethanol 95 % respektive 75 %	50-60 °C	Extraktion unter Wärmezufuhr	kA	Desai <i>et al.</i> (1986)
	• Ethanol	siedend	Soxhlet- Extraktion	kA	Miana <i>et al.</i> (1971); Manners & Ralphs (1989)
Basisch: Zusatz von NH_3 resp. NaOH	• Ether	Rt	Ausschütteln	30 min	Pharmacopoeia Helvetica VI
	• Chloroform	Rt	Ausrühren bei pH 9 und 12	7 x 45 min	Liu (1995)

kA keine Angabe in der Literatur, Rt Raumtemperatur

A.7.2 Chromatographische Trennmethode

Zur Trennung von Diterpenalkaloid-Gemischen wurden bisher verschiedene chromatographische Verfahren wie Dünnschicht-, hochauflösende Flüssig- und Gaschromatographie verwendet.

A.7.2.1 Dünnschichtchromatographie

In dieser Arbeit wurde die Dünnschichtchromatographie (DC) sowohl analytisch als auch präparativ zur Isolierung der Alkaloide eingesetzt. Die DC ist ohne grossen apparativen Aufwand durchführbar, dagegen ist die Trennleistung beschränkt. Sie bietet andererseits den Vorteil, dass nach Ende der Entwicklung das Chromatogramm erhalten bleibt und in unterschiedlicher Weise ausgewertet werden kann (z.B. im UV-Licht bei 254 nm, mit dem DC-Scanner oder durch Reaktion mit Dragendorff-Reagens bzw. Jod).

Dünnschichtchromatographisch wurden Eisenhut-Arten aus europäischer Herkunft u.a. durch Katz & Staehelin (1979), Staehelin & Katz (1980), Beul (1990) und Gauch (1992) und aus dem Himalaja von Faugeras *et al.* (1973) und Jašek *et al.* (1973) untersucht.

A.7.2.1.1 R_B -Wert: Retention bezogen auf Bikhaconitin

In der DC wird die Retention eines Fleckens meist durch den R_f -Wert ausgedrückt, in dem die Laufstrecke einer Verbindung auf die Fliessmittelfront bezogen wird. Beim Vergleich verschiedener DC-Trennungen sind die R_f -Werte nicht immer gleich und bereits auf einer Platte kann eine Substanz unter Umständen unterschiedlich weit laufen. Weiter kann bei Mehrfachentwicklung die Laufmittelfront derselben Platte nicht jedes Mal die genau gleiche Position erreichen, was die Berechnung des R_f -Werts erschwert. Daher wurde zur besseren Vergleichbarkeit der DC-Trennungen analog zu Katz & Staehelin (1979) vorgegangen, welche für Aconitin-haltige Extrakte den R_A -Wert einführten. Dieser berechnet sich durch Bezug der Laufstrecke eines Flecken relativ zu derjenigen von Aconitin (**20**). Für diese Arbeit wurde Bikhaconitin (**15**) als geeignete Bezugssubstanz gewählt und analog der „ R_B -Wert“ berechnet.

A.7.2.2 Gaschromatographie (GC)

Trennungen von Diterpenalkaloiden mittels GC sind aus der Literatur bekannt. Die Methode wird hier aufgeführt, da sie bei der Methodenwahl wichtig war, jedoch in dieser Arbeit nicht eingesetzt wurde.

Die Gaschromatographie bietet hohes Auflösungsvermögen, stellt aber die essentielle Anforderung, dass die zu chromatographierenden Substanzen verdampfbar sind. Die Flüchtigkeit ist im Falle der Diterpenalkaloide, besonders der Diesteralkaloide durch das Vorhandensein mehrerer OH-Gruppen sowie durch die relativ hohen Molekulargewichte herabgesetzt. Ausserdem sind die Substanzen thermolabil und beginnen sich beim Erhitzen zu zersetzen. Deshalb ist die GC generell nicht zur Trennung dieser Alkaloide geeignet. Diese Probleme lassen sich allerdings durch Derivatisierung der OH-Gruppen beheben. So untersuchten Mizugaki *et al.* (1988) Trimethylsilyl-Ether-Derivate der Diterpenalkaloide mit GC-MS. Trotz Derivatisierung traten bei Diesteralkaloiden Schwierigkeiten auf. So wurden pro Substanz zwei Signale beobachtet (Ito *et al.*, 1996, 1997). Die Autoren führten dies u.a. auf chemische Reaktionen und intramolekulare Umlagerungen während der GC zurück. Diese Prozesse wie auch die Pyrolyse von Diesteralkaloiden sind bereits im heissen Injektor möglich.

Für indische Eisenhut-Arten sind zudem auch Alkaloide bedeutend, welche entweder wie Falconericin (**17**) keine freien Hydroxylgruppen besitzen oder wie die Diesteralkaloide vom Bikhaconitin-Typ wie Bikhaconitin (**15**), welche nur die sterisch gehinderte C(13)-OH-Gruppe enthalten. Aus den Arbeiten von Ito *et al.* (1996; 1997) geht hervor, dass die C(13)-Hydroxylgruppe nicht silyliert werden konnte. Für Extrakte aus indischen *Aconitum*-Arten bedeutet dies, dass gewisse wichtige Diesteralkaloide gaschromatographisch nicht

erfasst werden könnten. Die GC kann also zum Nachweis von Diterpenalkaloiden auch nach deren Derivatisierung nur beschränkt eingesetzt werden und wurde daher für diese Arbeit nicht verwendet.

Folgende Arbeiten untersuchten mit GC dagegen underivatisierte Alkaloide jedoch nur im Molekulargewichtsbereich der Alkamine. Die Alkamine aus *A. septentrionale* identifizierten Sirotenko *et al.* (1989) mit GC-MS. Sie mussten jedoch zuvor das Haupt-Diesteralkaloid abtrennen, welches ansonsten die Detektion durch Zersetzung störte. Manners & Ralphs (1989) untersuchten underivatisierte Alkaloide vom Lycoctonin-Typ mit Molekulargewichten zwischen 449 und 535 u in Extrakten von *Delphinium sp.* mit Kapillar-GC und Flammenionisationsdetektor.

A.7.2.3 HPLC (hochauflösende Flüssigchromatographie)

Bei der klassischen Säulenchromatographie fließt die mobile Phase bei Atmosphärendruck oder geringen Überdruck durch Sorbentien mit Teilchengrößen von 100-200 µm. Die HPLC als Weiterentwicklung erreicht ein enorm verbessertes Auflösungsvermögen, indem Säulenmaterial mit viel kleineren Partikelgrößen von ca. 3-10 µm Durchmesser verwendet wird, wobei die mobile Phase mit einer Pumpe durch die Säule gedrückt werden muss. Die HPLC ist als hochauflösende Trennmethode für eine grössere Anzahl Substanzgruppen anwendbar als die GC, da das Problem der Verdampfbarkeit und der thermischen Zersetzung nicht besteht (Roth & Blaschke, 1989).

Zur HPLC-Analyse von Alkaloiden werden meistens als stationäre Phase die lipophilen Umkehrphasen (Reversed Phase, RP) zusammen mit einer polaren mobilen Phase verwendet. Als mobile Phase werden wässrige Gemische von Methanol oder Acetonitril für die

Umkehrphasen-HPLC von Diterpenalkaloiden vorgeschlagen (Verpoorte & Baerheim Svendsen, 1984).

Für das RP-Säulenmaterial werden meist Kieselgelpartikel verwendet, an deren Oberfläche die Silanolgruppen mit Alkylgruppen wie z.B. Octyl- oder Octadecyl- verethert sind. Dabei muss die Derivatisierung der Silanol-Gruppen möglichst vollständig sein. Andernfalls können basische Substanzen wie Alkaloide an den verbleibenden Silanol-Gruppen adsorbieren, was zu Signalstörungen oder Verlusten führen kann. Diese Störungen können durch folgenden Massnahmen reduziert werden:

- Zusatz von Aminen zur mobilen Phase
- Zugabe von Salzen zur wässrigen Phase (pH 4-7), um die Ionenbildung zu unterdrücken oder um Ionenpaare zu bilden.

A.7.3 Spektroskopie und Detektionsmethoden

Strukturen von reinen Substanzen werden normalerweise mit Kernresonanz- (NMR), Infrarot- (IR), UV- und Massenspektrometrie (MS) aufgeklärt. Zur Detektion werden die spektroskopischen Methoden auch mit chromatographischen Trennverfahren kombiniert wie z.B. bei der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) oder Flüssigchromatographie-UV-Detektion (LC-UV), bzw. -Massenspektrometrie (HPLC-MS) sowie LC-NMR und können so zur Strukturaufklärung zu Hilfe gezogen werden. Im Folgenden wird kurz auf die für diese Arbeit wichtigen Methoden und deren Anwendung auf Diterpenalkaloiden in der Literatur eingegangen.

A.7.3.1 Kernresonanzspektrometrie (NMR)

Zur Strukturaufklärung wurden in dieser Arbeit folgende klassische NMR-Aufnahmetechniken verwendet:

- $^1\text{H-NMR}$ (z.T. mit Protonenaustausch mit D_2O sowie Spin-Entkopplung)
- $^{13}\text{C-NMR}$ (z.T. mit DEPT)

Zusätzliche Information kann mit zweidimensionalen Techniken (2D-NMR) durch homo- und heteronukleare Korrelationen erhalten werden.

Übersichten für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen wurden für die ^{13}C -Atome von Diterpenalkaloiden von Pelletier *et al.* (1984) und Pelletier & Joshi (1991) sowie für ^1H -NMR von Norditerpenalkaloiden von Hanuman & Katz (1994c) veröffentlicht.

A.7.3.2 UV-Absorptionsspektroskopie

Norditerpenalkaloide als Mono- und Diester sind aufgrund ihres aromatischen Säureteils UV-aktiv. Säuren mit unterschiedlicher Substitution des aromatischen Rings können anhand der UV-Absorptionsspektren unterschieden werden. Die Alkamine enthalten dagegen keine der obigen UV-absorbierenden Strukturelemente und können mit der Standard-UV-Lampe bei 254 nm nicht detektiert werden. Eine Ausnahme im UV-Absorptionsverhalten bilden die Alkamine vom Pyrodelphinin-Typ (siehe Abbildung 2). So ist für Pyrobikhaconin (**114**) ein für Alkamine ungewöhnliches Absorptionsmaximum bei ca. 240 nm ($\log \varepsilon \sim 3,8$ in Ethanol) bekannt. Cookson *et al.* (1966) führen dies auf ein spezielles Chromophor zurück, welches von einem planaren System zwischen dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs und den p-Elektronen an C(8), gekoppelt über die C(17)-C(7)- σ -Bindung ausgebildet wird. C(15)-Keto-Pyroalkaloide wie Pyroaconitin (**103**) (siehe Tabelle 5) zeigen dieses Absorptionsphänomen dagegen nicht (Wang & Liang, 1992).

In dieser Arbeit wurde die UV-Absorptionsspektroskopie zur Detektion von Dünnschichtchromatogrammen eingesetzt, insbesondere mittels TLC-Scanning. Verglichen mit der Detektion bei 254 nm oder 366 nm einer Standard-UV-Lampe stehen bei einem DC-Scanner mehrere Detektionsmöglichkeiten zur Verfügung. Es können einerseits UV-Absorptionsspektren von getrennten Flecken aufgenommen werden. Diese Spektren werden auch in-situ-UV-Remissionsspektren genannt, im Unterschied zu Lösungen, bei welchen die Transmission registriert wird. Andererseits nimmt man sogenannte Densitogramme oder Remissionsgrad-Ortskurven auf, indem die DC-Platte durch einen Lichtstrahl einer frei gewählten Wellenlänge im UV/VIS-Bereich bewegt wird (Pachaly, 1991). Densitogramme können auch für quantitativ ausgewertet werden. Weiter können im Mehrwellenlängen-Scanmodus (MWL) bei verschiedenen Wellenlängen mehrere Densitogramme von demselben Dünnschichtchromatogramm aufgenommen und anschliessend überlagert werden. Zusätzlich zu den R_f -Werten der getrennten Flecken erhält man anhand des Absorptionsverhaltens gegebenenfalls auch Hinweise zu Strukturmerkmalen.

A.7.3.3 Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren von Diterpenalkaloiden wurden bisher meist EI und FAB aufgenommen. Zum Vergleich sind einige allgemeine Erkenntnisse aus solchen Massenspektren im Folgenden angegeben. In dieser Arbeit wurde dagegen hauptsächlich die multiple MS kombiniert mit HPLC für die Strukturaufklärung eingesetzt.

A.7.3.3.1 Fragmentierung von Diterpenalkaloiden mit EI

Die Strukturinformation, welche mit EI von Diterpenalkaloiden erhalten werden kann, ist nachfolgend kurz zusammengefasst:

Molekülionen sind besonders bei C₂₀-Diterpenalkaloiden vorhanden, seltener dagegen bei Norditerpenalkaloiden (Benn, 1993).

Basision-Signal:

- Bei Alkaminen sowie deren Methyl- respektive Acetylderivaten wurde [M-17]⁺, [M-31]⁺ respektive [M-59]⁺ als Basision beobachtet. Dieses wird durch eine Abspaltung einer Hydroxy-, Methoxy- oder Acetoxy-Gruppe von C(1) des Molekülions gebildet (Yunusov *et al.*, 1969).
- Das Basision von Diesteralkaloiden ist [M-CH₃COOH-CH₃]⁺, was [M-75]⁺ entspricht. Das Molekülion M⁺ ist meist nicht sichtbar (Mizugaki *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1996 und 1997)

Das Benzoylkation C₇H₅O⁺ (m/z 105) ist ein wichtiger Hinweis, dass aromatische Ester in einer Struktur vorliegen, was im Falle der Norditerpenalkaloide auf Mono- oder Diesteralkaloide hinweist.

A.7.3.3.2 HPLC-MS-Kopplung

Um Massenspektrometrie als Detektor für die HPLC einsetzen zu können, musste folgendes technische Problem gelöst werden: Bei üblichen Säulen beträgt das Eluat aus der HPLC 0,5 bis 2 ml/min und kann nicht direkt in das unter Hochvakuum arbeitende Massenspektrometer eingeleitet werden. Bei der Abtrennung des Analyten von der mobilen Phase entstehen durch deren Verdampfen grosse Gasvolumina, welche nicht mit den Vakuumpumpen ausreichend entfernt werden können. Als Kopplung oder Interface für die HPLC-MS werden heute fast ausschliesslich bei Atmosphärendruck arbeitenden Ionenquellen APCI („atmospheric pressure chemical ionization“) und ESI („electrospray ionization“) eingesetzt. Die Verdampfung des Lösungsmittels findet in diesen Ionenquellen statt und nur die geladenen Teilchen gelangen in

das Massenspektrometer. Übersichten zu diesen Methoden können bei Kölliker & Oehme (1997) und Berger (2000) gefunden werden.

A.7.3.3.2.1 ESI (Electrospray Ionisation)

ESI ist speziell für Verbindungen geeignet, welche bereits vorgeformte Ladungen oder eine Tendenz zur Protonierung/Deprotonierung aufweisen (z.B. Amine oder Säuren). Zur Bildung von "positiven Ionen" wird das Eluat durch eine positiv geladene Kapillare (Anode) mit N₂ zu einem Aerosol gesprayt. Das Verdampfen des Lösungsmittels führt zu einer Aufkonzentrierung der Ladungen auf den Tröpfchen, welche schliesslich zur Coulomb-Explosion führt. Die Ladungen werden dabei auf ionisierbare Moleküle übertragen. Die dabei gebildeten Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und durch eine geheizte Kapillare (Kathode) in das Hochvakuum des MS überführt.

A.7.3.3.2.2 APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)

APCI generiert durch eine Korona-Entladung ein Plasma, dessen Ionen Ladungen auf das Molekül übertragen oder Ion-Molekül-Addukte bilden können. Diese Technik ist speziell für relativ unpolare kleine Moleküle geeignet. Das Eluat aus einer HPLC-Säule wird in einen beheizten Gasstrom gesprayt, wobei das Lösungsmittel verdampft.

APCI-Massenspektren von Norditerpenalkaloiden mit C(8)-Acetylgruppe zeigten eine Abspaltung von Essigsäure, wobei $[M+H-CH_3COOH]^+$ z.T. auch Basision war (Wada *et al.* 1994).

A.7.3.3.3 Bisherige Untersuchungen an *Aconitum* mit HPLC-MS

Untersuchungen von Diterpenalkaloiden aus *Aconitum* mittels HPLC-MS sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Literaturübersicht über die Anwendung von HPLC-MS zum Nachweis von Diterpenalkaloiden:

Ionisierungsmethode / HPLC-MS-Untersuchungen	Autoren
APCI Bestimmung von Norditerpen- und C ₂₀ - Alkaloiden aus <i>Aconitum yesoense</i> und <i>A. japonicum</i> . Die Quantifizierung erfolgte z.T. mit $[M+H -CH_3COOH]^+$ als Basision	Wada <i>et al.</i> (1993) Wada <i>et al.</i> (1994)
Bestimmung von fünf Alkaloiden in geklonten Pflanzen von <i>Aconitum yesoense</i>	Wada <i>et al.</i> (1997)
In Position 6 stereoisomere Norditerpenalkaloide, darunter Neolin (8) und Chasmanin (3), unterscheiden sich in den relativen Intensitäten von Pseudomolekülion und Hauptfragment.	Wada <i>et al.</i> (2000 a)
Unterscheidung von in Position 1 stereoisomeren Norditerpenalkaloide, anhand der relativen Intensitäten von Pseudomolekülion und Hauptfragment.	Wada <i>et al.</i> (2000 b)
In Position 1 respektive 12 stereoisomere C ₂₀ -Diterpenalkaloide, unterscheiden sich in den relativen Intensitäten von Pseudomolekülion und Hauptfragment.	Wada <i>et al.</i> (2000 c)
Bestimmung von sechzehn Norditerpen- und fünf C ₂₀ -Diterpenalkaloiden in <i>Aconitum yesoense</i> .	Wada (2002)
ESI Nachweis von zwei Norditerpenalkaloiden in einer zu Vergiftung führenden Lebensmittelprobe, welche aus essbaren wilden Wurzeln und beigemischten <i>Aconitum</i> -Knollen bestand.	Kasahara <i>et al.</i> (1996)
MS ⁿ -Studie an isolierten Diterpenalkaloiden aus <i>Aconitum napellus</i> ssp. <i>vulgare</i>	Chen <i>et al.</i> (1999)
Bestimmung der drei Norditerpenalkaloide Aconitin (20), Hypaconitin (113), Mesaconitin (112) in Arzneimitteln der chinesischen Medizin, welche Radix Aconiti lateralis enthalten. Bezeichnung der wichtigsten MS/MS Fragmente.	Wong <i>et al.</i> (2002)
Fragmentierungsmechanismus von Aconitin-Typ Alkaloiden in den <i>Aconitum</i> -Knollen untersucht mit ESI und MS ⁿ und Nachweis neuer Lipoalkaloide.	Wang <i>et al.</i> (2002)
Ester-Austauschreaktionen von Diterpenalkaloiden beim Kochen von <i>Aconitum</i> -Knollen untersucht mit ESI und MS ⁿ	Wang <i>et al.</i> (2003a)
Fragmentierungsmechanismus von Aconitin-Typ Alkaloiden in Blüten von <i>A. Kusnezoffii</i> untersucht mit ESI und MS ⁿ	Wang <i>et al.</i> (2003b)
APCI Atmosphärendruck chemische Ionisation; ESI Elektrospray Ionisation	

A.7.3.4 Tandem- und multiple Massenspektrometrie (MSⁿ)

Bei ESI und APCI wird normalerweise noch keine Fragmentierung beobachtet. Dies ist ein Vorteil, da dadurch das Molekölion vorhanden ist. Andererseits fehlt dadurch Information zur Strukturaufklärung (Verpoorte & Schripsema, 1994).

Mit MS/MS respektive Tandem-Massenspektrometrie kann eine zusätzliche Fragmentierung induziert werden: Durch Nacheinanderschalten von zwei Quadrupolen war es möglich, im ersten Quadrupol von den Ionen des ersten Massenspektrums nur Ionen einer bestimmten interessierenden Masse in die zwischen den beiden Quadrupolen liegende Kollisionskammer zu leiten. Dort wird das ausgewählte Ion durch Zusammenstöße mit Gasmolekülen fragmentiert (Collision Induced Dissociation, CID). Die entstandenen Fragmente werden im zweiten Quadrupol getrennt, was zum MS/MS-Spektrum führt. (Hesse *et al.*, 1995).

In Ionenfallen-Massenspektrometern werden dabei Ionen bestimmter Masse isoliert und durch Energieeinstrahlung fragmentiert, wobei ein neues Massenspektrum entsteht. Dieser Prozess kann mehrfach für eine Verbindung über mehrere Stufen durchgeführt werden. Diese sogenannte multiple Massenspektrometrie (MSⁿ) ergibt eine Sequenz von Fragmentierungen, welche es erlaubt, Strukturinformation aus dem Massenspektrum von Fragmentationen abzuleiten.

Diterpenalkaloide wurden bisher aus *A. napellus* mit multipler Massenspektrometrie von Chen *et al.* (1999) ebenfalls am Labor für Naturstoff-Forschung Basel in Zusammenarbeit mit dem Institut für organische-analytische Chemie der Universität Basel untersucht.

Zur ESI-MSⁿ-Fragmentierung von Diterpenalkaloiden des Aconitin-Typs erschienen in jüngster Zeit umfangreiche Publikationen von Wang *et al.* (2002, 2003a, 2003b) (siehe Tabelle 13). Die Proben wurden jeweils ohne HPLC-Trennung direkt injiziert. Es wurden

Referenzsubstanzen und verschiedene Extrakte aus behandelten und unbehandelten Knollen von *Aconitum carmichaeli* sowie den Blüten von *Aconitum kusnezoffii* untersucht. Von sechs Diesteralkaloiden vom Aconitin-Typ wie Aconitin (**20**), Mesaconitin (**112**) und Hypaconitin (**113**) wurden die Fragmentierung anhand der MS²-, MS³- und MS⁴-Spektren angegeben (Wang *et al.*, 2002). Im MS²-Spektrum führte die Abspaltung von Essigsäure aus der C(8)-Acetylfunktion zum Basision, während im MS³-Spektrum $[M+H-CH_3COOH-CH_3OH-CO]^+$ als Basision auftrat. Das hierbei abgespaltene CO wurde auf das C(15)-Keton zurückgeführt, welches zuvor durch die Abspaltung der Essigsäure gebildet wurde. Anhand der Abspaltung der Fettsäuren im MS²-Spektrum wurden zahlreiche Lipoalkaloide identifiziert (Wang *et al.*, 2003a) und deren Neubildung konnte am Beispiel wässriger Decocte aus behandelten Knollen auf Umesterungsreaktionen zurückgeführt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte MSⁿ-Fragmentierung von Norditerpenalkaloiden vom Pseudoaconitin- und Bihaconitin-Typ wurde dagegen bisher nicht beschrieben.

A.8 Aufgabenstellung und Wahl der Methoden

Aufgabenstellung

Es ist das Ziel dieser Arbeit, Norditerpenalkaloide in Knollen von verschiedenen *Aconitum*-Arten aus Indien und in tibetischen Juwelenpillen, welche *Aconitum*-Knollen enthalten, zu identifizieren.

Andererseits soll der Frage nachgegangen werden, inwiefern ein Effekt des „processings“ (Entgiftung) der Knollen festgestellt werden kann.

Wahl der Methoden

Geeignete Methoden zur Trennung und Identifizierung sollen verwendet werden, welche es ermöglichen, Substanzen auch dann zu identifizieren, wenn diese wegen z.T. kleinen Probenmengen nicht isoliert werden können.

Alkaloidextrakte sollen einerseits mittels DC getrennt und die Hauptalkaloide im Vergleich zu Referenzsubstanzen mit möglichst selektiver Detektion identifiziert werden. Hierzu sollen die Möglichkeiten der Detektion mit dem DC-Scanner abgeklärt werden. Diese DC-Untersuchungen sollen gleichzeitig als Orientierung für Analysen mit HPLC-MS dienen.

Andererseits soll die Möglichkeiten der HPLC als am besten geeignete chromatographische Trennmethode zur hochauflösenden Trennung von Diterpenalkaloidgemischen untersucht werden. Die GC dagegen ist für die zu untersuchenden Alkaloide auch bei Derivatisierung wegen der thermischen Zersetzung wenig geeignet und soll daher nicht eingesetzt werden.

Mit der Massenspektrometrie steht die selektivste Detektionsmethode zur Verfügung, da hier Informationen zum Molekulargewicht, sowie durch Fragmente Hinweise auf die Konstitution erhalten werden können. Die Diterpenalkaloide sind für die Massenspektroskopie geeignet, da sie dank der basischen Aminogruppe leicht ionisiert werden können. Andere Begleitstoffe im Extrakt werden nur dann detektiert, wenn diese die positive Ladung stabilisieren können.

Zur Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie sollen die milden Atmosphärendruck-Ionisations-Methoden ESI und APCI verwendet werden. Zur Identifizierung der Alkaloide sollen die Möglichkeiten der multiplen Massenspektrometrie ausgenutzt werden.

B DC-Untersuchung indischer *Aconitum*-Arten

B.1 Einleitung

Neben ihrer botanischen Unterscheidung können Pflanzen anhand ihrer Inhaltsstoffe charakterisiert werden. Insbesondere für Medizinal- und Giftpflanzen, zu welchen der Eisenhut gehört, sind Untersuchungen von Inhaltsstoffen von Interesse, was weiter zum Verständnis der pharmakologischen Wirkung beitragen kann. Für verschiedene *Aconitum*-Arten, ihre Herkunft, die verschiedenen Pflanzenteile und deren Zustand ist aus der Literatur bekannt, dass das Muster der gefundenen Diterpenalkaloide und deren Gehalt sehr unterschiedlich sein kann. Mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Trennung wurden solche Unterschiede mehrfach beschrieben.

B.2 Ziel

Diterpenalkaloide aus verschiedenen indischen Eisenhut-Arten sollen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getrennt und die Hauptalkaloide im Vergleich zu Referenzsubstanzen identifiziert werden. Hierzu sollen die Detektionsmöglichkeiten des DC-Scanners abgeklärt werden. Wenn möglich sollen zudem Diterpenalkaloide isoliert werden.

B.3 Begründung

Die DC wurde für eine orientierende Untersuchung gewählt, da diese Methode ohne grossen apparativen Aufwand durchgeführt werden kann und sich zur Trennung und Isolierung von Diterpenalkaloiden eignet.

B.4 Material und Methoden

B.4.1 Auswahl der Referenzsubstanzen

Die verwendeten Referenzsubstanzen wurden durch die Gruppe von Dr. A. Katz, Laboratorium für Naturstoff-Forschung in Basel isoliert und mir zur Verfügung gestellt. Die folgenden elf Alkaloide isolierten Hanuman & Katz (1993a; 1993b; 1994b) aus der indischen Art *A. ferox* neben weiteren. Veratroylpseudaconin (**7**), Pseudaconitin (**16**), Falconericin (**17**) und Indaconitin (**27**) wurden als vier der zwölf auch für *A. falconeri* bisher bekannten Alkaloide gewählt (siehe A.4). Weiter standen Bikhaconin (**2**), Isotalatizidin (**6**), Neolin (**8**), Veratroylbikhaconin (**9**), Bikhaconitin (**15**), Chasmaconitin (**21**) und Yunaconitin (**23**) zur Verfügung. Zum Vergleich wurde Aconitin (**20**), das Hauptalkaloid der europäischen Art *A. napellus*, eingesetzt.

B.4.2 Chemikalien

Als Lösungsmittel wurden Pentan, Chloroform, Methylenchlorid, Methanol und Ethanol “zur Synthese” oder “zur Analyse” (Merck, Darmstadt, D) vor der Verwendung für Extraktion, Reinigung und Dünnschichtchromatographie destilliert. Na₂SO₄ wurde zum Trocknen der Fraktionen verwendet. Zur Detektion von Alkaloiden wurden Dünnschichtchromatogramme mit Dragendorff-Reagens nach Munier und Macheboef (Stahl, 1967) in Form der modifizierten Spraylösung (Katz & Staehelin, 1979) besprüht.

B.4.3 Proben

In dieser Arbeit wurden sowohl Knollen von drei *Aconitum*-Arten des indischen Himalajas als auch tibetische Juwelenpillen Byu-Dmar 25 und Byu-Dmar 13 untersucht, welche als einen Bestandteil *Aconitum*-Knollen unbekannter Herkunft enthalten. In Tabelle 14 ist eine Übersicht über die untersuchten Proben und die Abkürzungen gegeben, mit welchen sie bezeichnet wurden. Im Folgenden werden die Proben genauer beschrieben.

Tabelle 14: Übersicht über untersuchte Proben und verwendete Abkürzungen:

Probenbeschreibung und Herkunft und Erwerbsdatum	Abkürzung
1. <i>Aconitum</i>-Knollen	
• Vom Autor gesammelte Art:	
<i>A. violaceum</i> JAQUEM. (Chamba, H.P., Nordwest-Indien) (9.1995)	AcK_{violac}
• Kommerzielle Muster von <i>A. sp.</i> nicht identifiziert (aus Delhi, Indien):	
Erste Lieferung (12. 1995): nach Identifizierung unterteilt in:	
<i>A. spicatum</i> STAPF, Delhi (12.1995)	AcK_{Del_1}
<i>A. falconeri</i> STAPF, Delhi (12.1995)	AcK_{Del_2}
Zweite Lieferung (4. 1996): nach Identifizierung wurden verwendet:	
<i>A. falconeri</i> STAPF, unbehandelt, Delhi (4.1996)	AcK_{Del_3}
<i>A. falconeri</i> STAPF, behandelt, Delhi (4.1996)	AcK_{Del_p}
2. Byu-Dmar-Pillen: tibetische Juwelenpillen	
• Verschiedene Chargen aus Delhi:	
Delhi (9.1992).....	Pill_{Del_92}
Delhi (3.1993).....	Pill_{Del_93}
Delhi (1994).....	Pill_{Del_94}
Delhi (5.1995).....	Pill_{Del_95}
• Verschiedene Herkunft aus dem Himalaja:	
Dharamsala (Indien) (1994)	Pill_{Dhr}
Kathmandu (Nepal) (8.1994).....	Pill_{Kat}
Ladakh (Nordwest-Indien) (1993).....	Pill_{Lad}
Leh/Ladakh (Nordwest-Indien) (1993)	Pill_{Leh}
Lhasa (Tibet) (1993).....	Pill_{Lha}

B.4.3.1 *Aconitum*-Knollen: Herkunft und Identifizierung

Sammlung von *A. violaceum* in Chamba, Nordwest-Indien

Die Spezies *A. violaceum* Jaquem. wurde vom Verfasser im September 1995 in Nordwest-Indien im Distrikt Chamba (Bundesstaat Himachal Pradesh) auf einem geführten Trek am Pir Panjal-Gebirgszug des „lower Himalaya“ gefunden. Von dieser sehr kleinwüchsigen Art wurden etwa sechzig Exemplare gesammelt.

Von „Chamba“ (900 m) - der Hauptstadt des Distrikts Chamba - wurde das Sammelgebiet „Duggha Bhadrwah“ - ein das Alptal mit einfachen Hirtenunterständen (ca. 3'900 m) via die



Abbildung 7: Lage von Chamba im indischen Himalaya

Dörfer „Saho“ (1'000 m), „Sara“ (ca. 2'100 m), den Pass und die Alp „Ain Pukhar“ (ca. 3'300 m), und „Speka“ (ca. 3'800 m) erreicht. Im beweideten Nordhang der Talseite (ca. 4'000 m) wurden in einer zu dieser Jahreszeit trockenen Rinne die meisten Exemplare gefunden (siehe Abbildung 8). Die Sammelorte der Exemplare sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Die gesammelten Exemplare wurden als ganze Pflanze gepresst und die kleinen Knollen an der Luft getrocknet. Herbar-Exemplare befinden sich im Herbarium des Labors für Naturstoff-Forschung, Dr. A. Katz, Basel und beim Autor (siehe Abbildung 9). Die Knollen der Probe AcK_{violac} waren im Bruch mehlig weich und weiss. Bei jeder der sehr kleinen Knollen wurde die kontinuierliche Anlage des Kambium bestätigt.



Abbildung 8: *Aconitum violaceum* Jaquem. am Standort und ausgegrabene ganze Pflanze

Tabelle 15: Übersicht zu den in Indien gesammelten Exemplare von *A. violaceum*:

Sammelort	Höhe ⁽¹⁾ Koordinaten	Koll.-Nr.	Anzahl Exemplare	Datum (1995)
„Speka“ (Westhang des beweideten Gipfelplateaus)	ca. 3'600 m 32° 38' 00'' N, 76° 20' 30'' O	95-9-23-8	1	23.9.
		95-9-23-9	1	dito
		95-9-23-10	1	dito
		95-9-24-3 ⁽²⁾	15	24.9.
Berg südöstlich von „Duggha Bhadrawah“ (Nordhang, trockene Rinne)	ca. 4'000 m 32° 37' 00'' N, 76° 22' 00'' O	95-9-24-1 ⁽²⁾	23	24.9.
„Duggha Bhadrwah“ bis „Speka“ (Weg am Nordhang)	ca. 3'800 m 32° 37' 30'' N, 76° 21' 30'' O	95-9-24-2 ⁽²⁾	21	24.9.

¹ Koordinaten auf halbe Minute abgeschätzt anhand Tactical Pilotage Chart, Sheet TPC G-7D (1:500'000) photomechanisch vergrößert, sowie Himachal Pradesh, Ed. Leomann - Trekking Routes, Sheet 4 (1:200'000); ² gleiche Sammel-Nr. für alle Exemplare dieses Standorts



Abbildung 9: Herbarexemplar von *Aconitum violaceum* JACQUEM.

Identifizierung kommerzieller Muster von *Aconitum*-Knollen aus Indien

Zwei Muster von botanisch nicht identifizierten *Aconitum*-Knollen wurden im „crude drug market“ in Old Delhi von Prof. J.C. Aschoff, Departement Neurologie, Universität Ulm 1995 und 1996 erworben und mir zur Verfügung gestellt.

Die Identifizierung der Knollen erfolgte erstens anhand der Anlage des Kambiums im Querschnitt sowie zweitens durch die mikroskopische Untersuchung anhand von Vorkommen und Lage der Steinzellen zur Endodermis, um die Knollen von Arten innerhalb des Napellus-Typs unterscheiden zu können (siehe Tabelle 2). Im Abzug und mit Staubschutzmaske wurde in halber Höhe der Knolle eine ca. 5 mm dicke Scheibe herausgesägt und während einer Woche in einer Mischung aus Wasser/Ethanol 96%/Glycerin 85% (1+1+1) eingeweicht. Zur Mikroskopie (Vergrößerung vierzig- bis hundertfach) wurde von Querschnitten zuerst das Chloralhydrat-Präparat und anschliessend das Phloroglucin-Salzsäure-Präparat hergestellt. Die identifizierten Knollen wurden in die entsprechende Proben aufgeteilt.

Erste Lieferung Delhi 12.1995

Das Muster der ersten Lieferung vom 12.1995 bestand aus unbehandelten nicht identifizierten *Aconitum sp.* Knollen und war mit „BTSANDUG“ (tibetisch für *Aconitum*) beschriftet. Entsprechend der Identifizierung als zwei verschiedene Arten wurden die einzelnen Knollen in zwei Proben **AcK_{Del_1}** (*A. spicatum*) und **AcK_{Del_2}** (*A. falconeri*) aufgeteilt (siehe Tabelle 16).

Zweite Lieferung Delhi 4.1996: Behandelte und unbehandelte *Aconitum sp.*

Die zweite Lieferung *Aconitum*-Knollen bestand einerseits aus der käuflichen Droge, andererseits wurde ein Teil dieser Droge im April 1996 von Dr. T.Y. Tashigang am Institute of Tibetan Medicine in Delhi tibetisch behandelt. Für die Behandlung wurden die ganzen

Knollen in täglich frischem Kuhurin bei Umgebungstemperatur eingelegt und anschliessend getrocknet. Die gegenüber Dash (1994) auf fünf Tage verkürzte Behandlungsdauer war wegen der Aufenthaltszeit von Prof. Aschoff limitiert. Die behandelten Knollen hatten einen scharfem Geruch nach Kuhurin. Ein kleines Stück einer behandelten Knolle führte auf der Zunge zu einem beissenden und anschliessend einem tauben Gefühl der Mundschleimhaut. Dieser organoleptische Test zeigte, dass Diesteralkaloide im behandelten Knollenmaterial weiter anwesend waren (siehe A.3.2.2).

Die Identifizierung der Knollen anhand der Untersuchung auf kontinuierliches Kambium und Steinzellenvorkommen konnte sowohl für die unbehandelten als auch für die behandelten Knollen durchgeführt werden, da letztere im Unterschied zur Tibetan Pharmacopoeia (Dash, 1994) unzerkleinert und mit der intakten Wurzelrinde behandelt waren. Zur weiteren Untersuchung wurden vom behandelten und unbehandelten Muster nur die als *A. falconeri* identifizierten Knollen verwendet (siehe Tabelle 16). Nicht weiter untersucht wurden dagegen Knollen der zweiten Lieferung, welche als *A. spicatum* identifiziert wurden oder bei welchen die klare Zuordnung anhand des Steinzellvorkommens nicht möglich war.

Zusammenfassung der identifizierten *Aconitum*-Knollenproben

Die makroskopischen und mikroskopischen Befunde zur Identifizierung der verschiedenen Knollenproben sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die in dieser Arbeit weiter untersuchten Proben sind fett gedruckt.

Tabelle 16: Übersicht zur Identifizierung der *Aconitum*-Knollen und Aufteilung in Proben

Bezeichnung & Aufteilung der Proben	Behandelt	Identifizierung anhand	Identifizierung als	Knollengröße (cm)		Anzahl Knollen
				Länge	Breite	
Gesammelte <i>Aconitum</i>-Art aus Chamba (H.P., Indien):						
• <i>A. violaceum</i> AcK _{violac}	nein	ganze Pflanze	<i>A. violaceum</i>	0,5-2	0,2-0,5	~60 (Paare)
Kommerzielle <i>Aconitum</i>-Knollenproben:						
• <i>Aconitum</i> sp.: Erste Lieferung Delhi 12/95						
AcK _{Del_1}	nein	Stz	<i>A. spicatum</i>	5-6	1,8-2,5	4
AcK _{Del_2}	nein	Stz	<i>A. falconeri</i>	5-8	2,5-3,5	5
-	nein	Stz	n. id.	k.A.	k.A.	2
• <i>Aconitum</i> sp.: Zweite Lieferung Delhi 4/96: unbehandelte und behandelte Knollen						
AcK _{Del_3}	nein	Stz	<i>A. falconeri</i>	4,5-8	1,5-3	14
-	nein	Stz	<i>A. spicatum</i>	5-6,5	1,5-2	8
-	nein	Stz	n. id.	k.A.	k.A.	2
AcK _{Del_p}	ja	Stz	<i>A. falconeri</i>	k.A.	k.A.	13
-	Ja	Stz	<i>A. spicatum</i>	k.A.	k.A.	2
-	ja	Stz	n. id.	k.A.	k.A.	5

Stz Steinzellvorkommen (gem. A.2.1); n. id. nicht identifiziert; k.A. keine Angabe

B.4.3.2 Tibetische Juwelenpillen

Die untersuchten tibetischen Byu-Dmar Juwelenpillen stammten von verschiedenen Orten des Himalajas (Indien, Nepal und Tibet) sowie aus Delhi. Sie wurden von Prof. J.C. Aschoff, Departement Neurologie der Universität Ulm zwischen 1992 und 1995 vor Ort gesammelt und mir für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Es wurden Proben von Byu-Dmar-Pillen mit 25 wie auch mit 13 Komponenten untersucht (siehe Tabelle 10). Herkunft und Konfektionierung der Pillen sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Die kugelförmigen Pillen hatten einen Durchmesser von ca. 1 bis 1,3 cm und wogen ca. 0,8 bis 1,2 g (Byu-Dmar 25) respektive ca. 0,6 g (Byu-Dmar 13) (siehe Tabelle 21). Dies ist in

Tabelle 17: Herkunft und Konfektionierung der untersuchten Byu-Dmar-Pillenproben

Herkunft, Hersteller		besondere Bezeichnung	Stück zur Verfügung	Konfektionierung		
Probenbezeichnung	Erwerbsdatum			Vp	Sg	St
Delhi, Tibetan Medicinal Institute						
Pill _{Del_92}	9.1992	Byu-Dmar 25*	1	R	-	-
Pill _{Del_93}	3.1993	“	3	R	-	-
Pill _{Del_94}	1994	Byu-Dmar 13**	5	-	-	-
Pill _{Del_95}	5.1995	“	2	-	-	-
Dharamsala, Tibetan Medical & Astro Institute						
Pill _{Dhr}	1994	Byu-Dmar 25*	2	R	+	+
Kathmandu, Kunphen, Tibetan Medical Industry						
Pill _{Kat}	8.1993	Rinchen Jumar 25	1	R***	+	-
Leh/Ladakh, Branch Clinic Tibetan Medical & Astro Institute						
Pill _{Lad}	1993	Byu-Dmar 25*	1	R	+	
Pill _{Leh}	1993	“	1	R	+	+
Lhasa, The Pharmaceutical Factory of Tibetan Medicine						
Pill _{Lha}	8.1993	Rinchen Jumar 25 (Precious Coral 25)	5	****	-	-

Vp Verpackungsart; **Sg** bräunliche Versiegelung über dem Abschluss; **St** Stempel auf der Versiegelung; **R** einzeln in rosa Stoff eingepackt, zum Abschluss mit bunten Fäden zusammengebunden; * Rezept mit 25 Bestandteilen (siehe Tabelle 10); ** vereinfachtes Rezept mit 13 Bestandteilen (siehe Tabelle 10), verwendet für die klinische Pilotstudie (Aschoff *et al.*, 1997); *** zusätzlich einzeln verpackt in durchsichtigen Kunststoffwürfel mit Prägung „KUNPHEN“ und Etikette versehen; **** in Folie eingeschweisst mit Aufdruck des Herstellers.

jedem Fall wesentlich mehr als das von der Tibetischen Pharmakopöe (Dash, 1994) vorgegebene Pillengewicht von 250 mg (siehe A.6). Sie waren mit einer sehr harten rötlich-braunen Schicht überzogen. Die ocker-braune Pillenmatrix war dagegen weich und enthielt von Auge sichtbare faserige Teile pflanzlicher Herkunft. Unter dem Mikroskop waren mit vierzigfache Vergrößerung rote Bestandteile eventuell von der Koralle sichtbar (siehe Tabelle 10, Bestandteil No. 7). Die Pillen hatten einen aromatischen Geruch u.a. durch ätherische Öle (siehe Tabelle 10, Bestandteile No. 10 und 11).

B.4.4 Geräte

Mikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Mikroskop (Wild, Heerbrugg, CH) mit vierzig- und hundertfacher Vergrößerung durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde mit

einem Mahlgerät (Waring, USA) zerkleinert. Zur Einwaage von pflanzlichem Probenmaterial wurde eine Waage Typ P 1200, für Pillenproben, Fraktionen aus präparativer DC sowie für Referenzsubstanzen eine Analysenwaage H 51 benutzt (beide Mettler, Zürich, CH). Zur pH-Kontrolle während der Extraktion wurden angefeuchtete Alkalit[®] pH-Indikatorstäbchen (Merck, Darmstadt, D) eingesetzt. Extrakte und Alkaloidfraktionen wurde mit einem Rotavapor Typ RE 111 mit Wasserstrahlpumpe bei 30-35 °C in einem Wasserbad Typ 461 (beide Büchi, Flawil, CH) eingengt. Die analytische und präparative Dünnschichtchromatographie wurde mit in Tabelle 18 angegebenen Sorbentien durchgeführt.

Tabelle 18: DC-Sorbentien

DC-Sorbentien (auf Glasplatten 10x10 respektive 10x20 cm; Merck, Darmstadt, D)	Schichtdicke (mm)
Aluminiumoxid 60 (basisch) F₂₅₄	0,25
Kieselgel 60 F₂₅₄ (breite Korngrößenverteilung, mittlere Korngrösse ~12 µm)	0,25
Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC (schmale Korngrößenverteilung, mittlere Korngrösse 5 µm)	0,2

Die dünnschichtchromatographische Entwicklung erfolgte einerseits in Doppeltrogkammern (Camag, Muttenz, CH) für 10x10 cm respektive 10x20 cm DC-Platten, andererseits in zwei Typen von Horizontalkammern, wie in Tabelle 19 angegeben. Lösungen der Extrakte respektive Referenzsubstanzen wurden manuell mit Kapillaren à 1 oder 2 µl (Microcaps, Camag AG, Muttenz, CH) auf DC-Platten aufgetragen. Die Detektion der entwickelten

Tabelle 19: DC-Horizontalkammern

DC-Horizontalkammern (Camag, Muttenz, CH) Typ:	Gasraum in der Kammer	Kammerabdeckung (Begrenzung des Gasraums)
Camag HPTLC Linear im Folgenden „ Linearkammer “ <ul style="list-style-type: none"> • Typ 28510 (10x10 cm) • Typ 28520 (10x20 cm) 	„gross“ ca. 650 cm ³ ca. 980 cm ³	Kunststoffhaube über ganzer Kammer
Camag Horizontal Developing Chamber im Folgenden „ Horizontalkammer “ <ul style="list-style-type: none"> • (10x10 cm) • (10x20 cm) 	„klein“ ca. 60 cm ³ ca. 120 cm ³	Glasplatte auf Kammer ca. 5 mm oberhalb DC-Platte

Dünnschichtchromatogramme erfolgte einerseits mit einer Universal-UV-Lampe bei λ 254 nm (Camag, Muttenz, CH), andererseits am Pharmazeutischen Institut der Universität Basel mit einem DC-Scanner (TLC-Scanner II, Camag, Muttenz, CH), welcher mit einer Deuteriumlampe ausgerüstet war. Am gleichen Institut wurden auf einem Bruker 200 Spektrometer ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren aufgenommen.

B.4.5 Methoden

B.4.5.1 Extraktion der *Aconitum*-Knollen und Reinigung der Rohextrakte

Herstellung der Knollen-Rohextrakte

Die Extraktion erfolgte gemäss der unter A.7.1 allgemein beschriebenen Methode. Das Knollenpulver wurde mit dem entsprechenden Medium im Rundkolben durch Ausrühren mit dem Magnetprüher extrahiert und über eine Porzellan-Nutsche (Büchnertrichter) mit Papierfilter unter leichtem Vakuum filtriert. Der pH-Wert wurde bei jedem Extraktionsschritt mit einem angefeuchteten pH-Indikatorstäbchen kontrolliert. Die Lösungsmittelmengen sind pro 100 g ursprünglich extrahiertes Pflanzenmaterial angegeben.

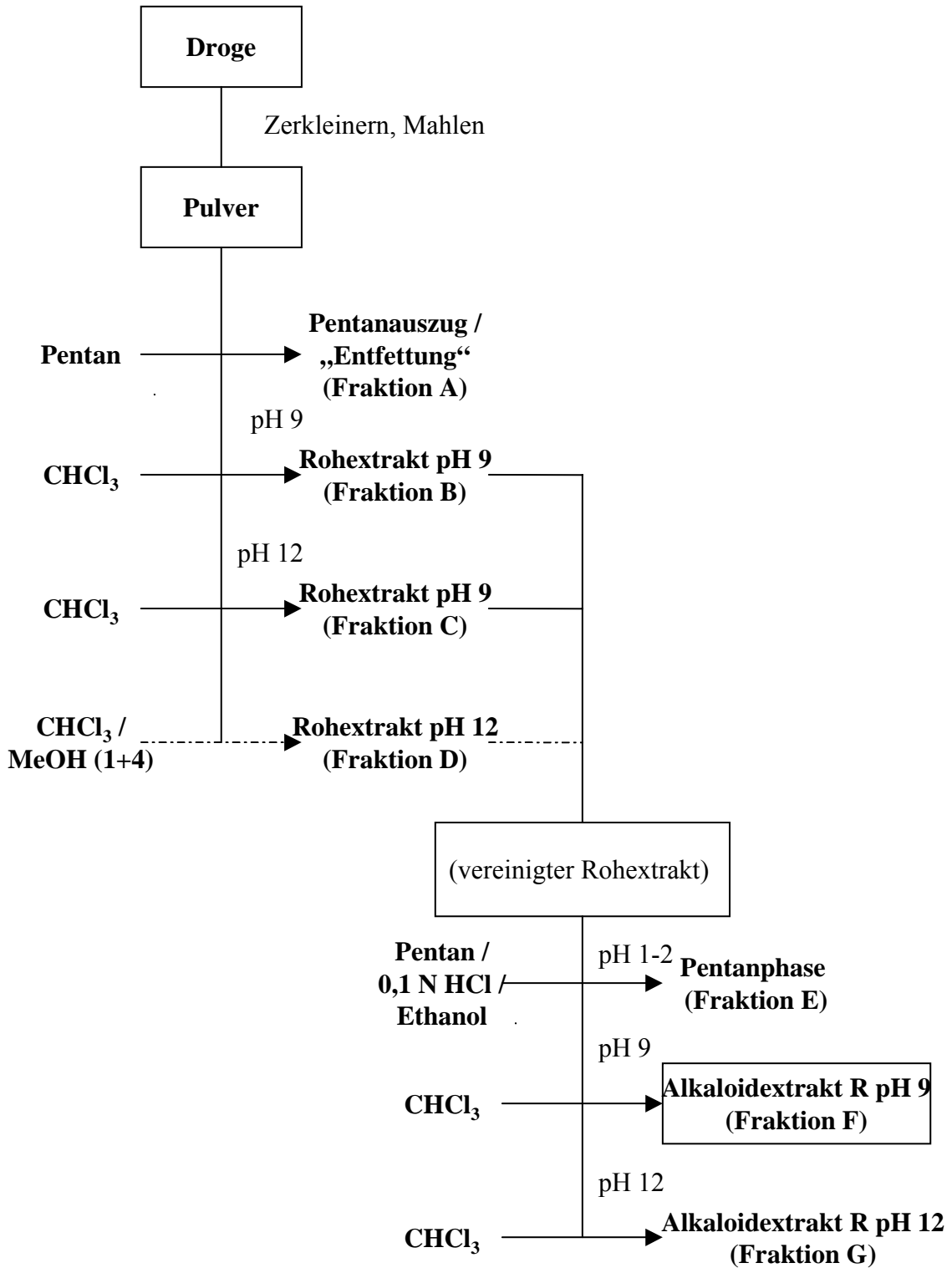


Abbildung 10: Extraktionsschema für *Aconitum*-Knollen

Zur *Pulverisierung* wurden die z.T. fast holzharten Knollen der Proben AcK_{Del_1}, AcK_{Del_2}, AcK_{Del_3} und AcK_{Del_p}, in ein Tuch eingeschlagen, mit dem Hammer zerkleinert und anschliessend mit einem Mahlgerät unter Vermeidung von Erwärmung gemahlen. Die

mehligen Knollen der Probe AcK_{violac} konnten direkt gemahlen werden. Zur *Entfettung* wurde das Knollenpulver dreimal mit 150 ml Pentan je 30-45 min im geschlossenen Erlenmeyerkolben mit dem Magnetrührer ausgerührt und abfiltriert. Der Rückstand nach Eindampfen der Pentanphase war ölig und goldgelb (Fraktion **A**, siehe Tabelle 20). Bei der ersten extrahierten Probe AcK_{Del_1} wurde die Entfettung nicht durchgeführt, wobei ein vergleichbarer Fettanteil bei der Reinigung des Rohextrakts erhalten wurde.

Zur *Extraktion* wurde das entfettete Ausgangsmaterial dreimal während 45 min mit 150–300 ml CHCl₃ bei pH 9 extrahiert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von je ca. 1 ml NH₄OH 25 % unter Rühren eingestellt. Während der Extraktion wurde der pH-Wert kontrolliert und bei Bedarf mit tropfenweiser Zugabe von NH₄OH 25 % korrigiert. Der Rückstand der Extraktion bei pH 9 war eine braune klebrige Masse oder ein ockerfarbiger, milchiger Film (Fraktion **B**, siehe Tabelle 20). Bei pH 11-12 wurde das Knollenpulver weiter dreimal 45 min lang mit 150–300 ml CHCl₃ extrahiert. Die pH-Einstellung erfolgte unter Rühren durch tropfenweise Zugabe von gesättigter NaOH (in H₂O/MeOH 1+1). Die Extrakte bei pH 12 wurden je dreimal mit 5 ml H₂O/100 ml CHCl₃ gewaschen. Der Rückstand der vereinigten pH 12-Extrakte war ocker-braun (Fraktion **C**, siehe Tabelle 20). Zuletzt wurde dreimal 45 min mit 150–300 ml CHCl₃/Methanol (4+1) ohne weitere Alkalizugabe extrahiert. Diese Extrakte wurden nicht gewaschen, damit nicht polarere, in Methanol lösliche Substanzen entfernt werden. Der Rückstand nach Vereinigen und Eindampfen des CHCl₃/Methanol (4+1)-Extrakts war rötlich braun bis gelb und teilweise geschäumt (Fraktion **D**, siehe Tabelle 20). Bei der Probe AcK_{Del_2} wurde dieser letzte Extraktionsschritt nicht durchgeführt.

DC-Kontrolle der Entfettung und Rohextrakte

Am Beispiel der Probe AcK_{Del_p} wurde gezeigt, dass in 100 µg Entfettungsrückstand (Fraktion A) nach Trennung im DC-System 1 keine Alkaloide mit Dragendorff-Reagens

detektiert werden konnten. Zum Vergleich der Rohextrakte (Fraktionen B-D) einer Knollenprobe wurde jeweils 100 µg mit DC-System 1 getrennt und mit UV bei 254 nm und Dragendorff-Reagens detektiert. In den Chromatogrammen waren die verschiedenen Rohextrakte einer Probe einander jeweils ähnlich und wurden daher für die anschließende Reinigung (siehe B.4.5.1) vereinigt. Lediglich bei der Probe AcK_{violac} zeigte der Rohextrakt mit CHCl₃/MeOH (4+1) im DC vergleichsweise wenige und nur schwach mit Dragendorff angefärbte Flecken, weshalb diese Fraktion nicht weiter untersucht wurde.

Reinigung der Knollen-Rohextrakte

Zur der Reinigung der Rohextrakte wurden zuerst im sauren Milieu Neutralstoffe mit Pentan ausgeschüttelt und anschliessend die Alkaloide basisch zurückgeschüttelt. Die Lösungsmittelmengen sind pro 100 g ursprünglich extrahiertes Pflanzenmaterial angegeben. Die organischen Phasen wurden je dreimal mit 2 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft.

Der vereinigte Rohextrakt wurde in einen Scheidetrichter mit 20-25 ml 0,1 N HCl, 25-30 ml Pentan und 5 ml Ethanol überführt. Insgesamt wurde dreimal mit 20-30 ml Pentan ausgeschüttelt. Der Rückstand der Pentanausschüttelung war ein goldgelbes bis braunes zähes Öl (Fraktion **E**, siehe Tabelle 20). Die saure wässrige Phase wurde in Eiswasser gekühlt, mit 2N NaOH neutralisiert und anschliessend auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Bei pH 9 wurde dreimal mit 20-30 ml CHCl₃ ausgeschüttelt. Der **Alkaloidextrakt R pH 9** war nach dem Eindampfen ein gelber bis leicht bräunlicher Film (Fraktion **F**, siehe Tabelle 20). Bei pH 12 wurde dreimal mit 20-30 ml CHCl₃ ausgeschüttelt. Nach dem Eindampfen blieb der **Alkaloidextrakt R pH 12** als gelbbrauner Film zurück (Fraktion **G**, siehe Tabelle 20).

DC-Kontrolle der Alkaloidextrakte R pH 9 und R pH 12

Innerhalb der einzelnen Proben AcK_{violac}, AcK_{Del_1}, AcK_{Del_2}, AcK_{Del_3} und AcK_{Del_p} zeigten die jeweiligen Alkaloidextrakte R pH 9 und R pH 12 bei Trennung mit DC-System 1 eine ähnliche qualitative Zusammensetzung.

Tabelle 20: Übersicht der erhaltenen Knollenextrakte verschiedener *Aconitum*-Arten

Die Prozent-Angaben sind auf die eingesetzte Menge Knollenpulver bezogen.

Abkürzungen: **A-G** Fraktionen der Extraktion respektive Reinigung.

Proben	AcK _{Del_1}	AcK _{Del_2}	AcK _{Del_3}	AcK _{Del_p}	AcK _{violac}
Pulver der Knollen (g)	20,8	37,4	112,6	108,5	7,6
Anzahl Knollen	3	4	13	12	~60 ⁽¹⁾
Durchschnittsgewicht pro Knolle (g)	6,9	9,4	8,7	9,0	ca. 0,12 ⁽²⁾
Extraktion	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %
A Entfettung Rohextrakte:	-(³) -	105 0,3	258 0,2	252 0,2	35 0,5
B - pH 9	185 0,9	166 0,4	207 0,2	254 0,2	76 ⁽⁴⁾ 1,0 ⁽⁴⁾
C - pH 12	37 0,2	104 0,3	95 0,1	193 0,2	
D - CHCl ₃ /MeOH (4+1) vereinigt Rohextrakt:	194 0,9	- -	1211 1,1	961 0,9	54 0,7
	415 2,0	233 0,6	1514 1,3	1408 1,3	76 ⁽⁴⁾ 1,0 ⁽⁴⁾
Zur Reinigung eingesetzte Rohextrakte:	B/C/D	B/C	B/C/D	B/C/D	B/C ⁽⁵⁾
Reinigung	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %
E Rückstand Pentanphase	126 0,6	81 0,2	429 0,4	413 0,4	20 0,3
F Alkaloidextrakt R pH 9	198 1,0	128 0,3	509 0,5	629 0,58	22 0,3
G Alkaloidextrakt R pH 12	20 0,1	3 <0,01	23 0,02	18 0,02	9 0,08

⁽¹⁾ Knollenpaare (Mutter- & Tochterknollen); ⁽²⁾ Angabe hier pro Knollenpaar; ⁽³⁾ bei der Probe AcK_{Del_1} wurde keine Entfettung des Knollenpulvers durchgeführt; ⁽⁴⁾ vereinigt Rohextrakt pH 9 und pH 12; ⁽⁵⁾ Rohextrakt D wurde nicht einbezogen (siehe B.4.5.1).

Ausbeute und Extraktionseffektivität

Die Mengen der eingesetzten Knollen sowie die Ausbeuten der Extraktion und Reinigung sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Von den durch Ausschütteln gereinigte Alkaloidextrakten machte jeweils der Alkaloidextrakt R pH 9 (Fraktion **F**) den Hauptanteil aus. Mit dieser Fraktion wurden die späteren Untersuchungen mit DC und HPLC-MS durchgeführt.

Die Extraktionseffektivität wurde am Beispiel der Probe AcK_{Del_3} überprüft. Die Ausbeute der drei Rohextrakte ist in Tabelle 20 ersichtlich. Die zuletzt erfolgte CHCl₃/MeOH (4+1)-Extraktion wurde fünf- statt dreimal durchgeführt. Die Ausbeute der einzelnen Fraktionen 1-5 betrug hierbei 435, 255, 302, 115 und 105 mg. Je ca. 150 µg der Rohextrakte bei pH 9 und pH 12 sowie von den fünf Fraktionen der CHCl₃/MeOH (4+1)-Extraktion wurden mit den DC-Systemen 1 und 2 getrennt. Während die Rohextrakte bei pH 9 und pH 12 sowie die erste Fraktion der CHCl₃/MeOH (4+1)-Extraktion mit Dragendorff-Reagens etwa gleich intensiv angefärbten Flecken aufwiesen, nahm die Grösse und Intensität der Alkaloid-Flecken mit fortschreitender CHCl₃/MeOH (4+1)-Extraktion ab. Dies zeigt, dass der Hauptteil der Alkaloide mit dem gewählten Extraktionsverfahren extrahiert wurde.

B.4.5.2 Extraktion von Alkaloiden aus Juwelenpillen

Die Kontrolle der Roh- und Alkaloidextrakte der *Aconitum*-Knollenproben mit DC zeigte, dass der pH-Wert keinen Einfluss auf die qualitative Zusammensetzung hat. Aus diesem Grunde wurde bei den Pillenproben die Extraktion und Reinigung vereinfacht und nur bei pH 12 durchgeführt. Die angegebenen Lösungsmittelmengen beziehen sich auf 0,9 bis 3,5 g eingesetztes Pillenpulver. Die organischen Phasen wurden mit 1 ml H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Eine Übersicht über die eingesetzten Mengen Pillenpulver sowie die Ausbeuten nach der Extraktion und Reinigung wird in Tabelle 21 gegeben.

Herstellung des Pillen-Rohextrakts

Zum *Pulverisieren* der Pillen wurden die Pillen im Porzellanmörser durch starkes Klopfen mit dem Pistill aufgebrochen und zu Pulver verrieben. Zur *Entfettung* wurden die pulverisierten Pillen dreimal 30 min mit je 10 ml Pentan im Erlenmeyerkolben mit dem Magnetrührer ausgerührt. Der Rückstand nach dem Eindampfen war ein öliger Film (Fraktion **A**, siehe

Tabelle 21). Bei den Proben Pill_{Del_94}, Pill_{Del_95} und Pill_{Leh} wurde die Entfettung nicht durchgeführt. Zur *Extraktion* wurde das gegebenenfalls entfettete Pillenpulver dreimal 30 min bei pH 12 mit je 10-15 ml CHCl₃ ausgerührt. Der pH-Wert des Gemischs wurde mit ca. 10 Tropfen 2N NaOH respektive ca. 2 Tropfen gesättigter ethanolischer NaOH auf pH 12 eingestellt. Nach dem Eindampfen war der Rohextrakt bräunlich (Fraktion **C**, siehe Tabelle 21). Bei den Proben Pill_{Del_95} und Pill_{Leh} wurde das Pillenmaterial zusätzlich dreimal 30 min mit 10 ml CHCl₃/MeOH (4+1) ausgerührt. Der Rückstand war nach dem Eindampfen bräunlich (Fraktion **D**, siehe Tabelle 21).

Reinigung des Pillen-Rohextrakts

Der Rohextrakt wurde in 10 ml Pentan und 10 ml 0,1N HCl aufgenommen. Bei der Probe Pill_{Leh} wurde zusätzlich 0,5 ml Ethanol verwendet, um den Rückstand des CHCl₃/MeOH (4+1)-Extrakts lösen zu können. Insgesamt wurde dreimal mit 10 ml Pentan bei pH 12 ausgeschüttelt. Der Rückstand war gelblich und von aromatischem Geruch (Fraktion **E**, siehe Tabelle 21). Die wässrige Phase wurde mit 2 N NaOH auf pH 12 gestellt und dreimal mit je 10 ml CHCl₃ ausgeschüttelt. Als Rückstand blieb ein bräunlicher **Alkaloidextrakt R pH 12** zurück (Fraktion **G**, siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Übersicht über die erhaltenen Alkaloidextrakte der Byu-Dmar-Pillenproben.

Die Prozent-Angaben sind auf die Menge der pulverisierten Pillen bezogen.

Abkürzungen: **A-G** Fraktionen der Extraktion respektive Reinigung. Abkürzungen der Byu-Dmar-Pillenproben siehe Tabelle 14.

Juwelenpillen Herkunft	Byu-Dmar 25 Delhi		Byu-Dmar 13 Delhi		Byu-Dmar 25 verschiedene Herkunft aus dem Himalaja													
	Pill _{Del_92}	Pill _{Del_93}	Pill _{Del_94}	Pill _{Del_95}	Pill _{Dhr}	Pill _{Kat}	Pill _{Lad}	Pill _{Leh}	Pill _{Lha}									
Probenbezeichnung																		
g																		
Pulver der Pillen (mg)	907	2'213	2'468	1'330	2'223	934	1'148	1'000	3'428									
Anzahl Pillen	1	2	4	2	2	1	1	1	4									
Durchschnittsgewicht pro Pille (mg)	912	1'107	623	669	1'115	941	1'156	1'001	862									
Extraktion	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%		
A Entfettung Rohextrakte:	24,2	2,7	60,0	2,7	-	-	-	-	70,4	3,2	23,6	2,5	41,4	3,6	-	-	110,8	3,2
C - pH 12	9,3	1,0	28,9	1,3	50,5	2,0	49,2	3,7	34,2	1,5	9,8	1,0	18,8	1,6	45,3	4,5	66,0	1,9
D - CHCl ₃ /MeOH (4+1)	-	-	-	-	-	-	24,1	1,8	-	-	-	-	-	-	13,8	1,4	-	-
vereinigter Rohextrakt: zur Reinigung einge- setzte Rohextrakte:	9,3	1,0	28,9	1,3	50,5	2,0	73,3	5,5	34,2	1,5	9,8	1,0	18,8	1,6	59,1	5,9	66,0	1,9
	C	C	C	C/D	C	C	C	C/D	C	C	C	C/D	C					
Reinigung	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
E Pentanphase	6,0	0,7	18,2	0,8	22,7	0,9	21,2	1,6	22,1	1,0	4,9	0,5	11,1	1,0	41,1	4,1	53,1	1,5
G Alkaloidextrakt	3,0	0,33	7,8	0,35	13,1	0,53	2,8	0,21	6,7	0,30	2,1	0,22	4,5	0,39	2,2	0,22	15,5	0,45
R pH 12 Alkaloidextrakt pro Pille (mg)	3,0		3,9		3,3		1,4		3,3		2,1		4,5		2,2		3,9	

B.4.5.3 DC-Trennung und Detektion (TLC-Scanner)

B.4.5.3.1 DC-Systeme

Für die analytische und präparative DC wurden die folgenden sechs DC-Systeme eingesetzt (siehe Tabelle 22). Die Sorbentien wurden - wenn nicht anders angegeben - in einer Schichtdicke von 0,25 mm eingesetzt.

Tabelle 22: DC-Systeme

DC-System	Fliessmittel (Angaben in Volumenteilen)	Sorbentien ¹	DC-Kammer	Referenz ²
1	Cyclohexan-Ethylacetat-Ethanol absolut (7+2+1)	Alox	H	Liu (1995)
2	Diethylether-Methanol (9,7+0,3), 2 <i>Entwicklungen</i>	Alox	H	
3	Cyclohexan-Ethylacetat-Diethylamin (7+2+1), 2 <i>Entwicklungen</i>	Kieselgel	H	
4	Cyclohexan-Ethylacetat-Diethylamin: 1.&2. <i>Entwicklung</i> : (7+2+1), 3. <i>Entwicklung</i> : (5+4+1)	Kieselgel HTLC	H	
5	Cyclohexan-Chloroform-EtOH abs. (2,3+7,5+0,2)	Kieselgel	DT	Liu (1995)
6	Cyclohexan-Chloroform-Diethylamin (5+4+1)	Kieselgel	H	Katz und Staehelin (1979)

¹ siehe Tabelle 18; ² Mengenverhältnisse z.T. gegenüber den Angaben der Referenz geändert; Alox Aluminiumoxid 60 (basisch) F₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm; Kieselgel Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm; Kieselgel HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC, Schichtdicke 0,2 mm; H Horizontalkammern; DT Doppeltrogkammer.

B.4.5.3.2 Entwicklung der DC-Platten

Von den Referenzsubstanzen wurden jeweils 10±2 µg, von den Alkaloidextrakten je 100±10 µg in CHCl₃ oder CH₂Cl₂ gelöst und in 1 oder 2 µl-Portionen manuell 10 mm vom unteren Plattenrand strichförmig 5 mm lang aufgetragen. Der Abstand zwischen den Strichen betrug 4-5 mm. In Doppeltrogkammern wurden DC-Platten (10x10 respektive 10x20 cm) mit

10 respektive 20 ml Fließmittel bei Kammersättigung über ca. 8 cm entwickelt. Bei Verwendung von Horizontalkammern wurde die DC-Platte vorher während 5 min in den Fließmitteldämpfen äquilibriert. Hierzu wurde die Platte in die Horizontalkammer gelegt mit der Sorbens-Schicht ca. 5 mm über einem Fließpapier gleicher Grösse, welches mit dem Fließmittel gleichmässig angefeuchtet war. Anschliessend wurde über eine Distanz von ca. 8 cm entwickelt. Als Fließmittelmengen wurden je 2 respektive 4 ml für die Konditionierung und ebenso für die Entwicklung der DC-Platten (10x10 respektive 10x20 cm) eingesetzt. Bei Mehrfachentwicklung wurden die DC-Platten jeweils in der gleichen Richtung entwickelt und zwischen den Entwicklungen mindestens 30 min im Abzug trocknen gelassen.

B.4.5.3.3 DC-Trennungen

Tabelle 23 gibt eine Übersicht über die mit DC in den DC-Trennungen I-V auf vier DC-Systemen getrennten Referenzsubstanzen und *Aconitum*-Knollenproben. Von letzteren wurde jeweils der Alkaloidextrakt **R pH 9** verwendet.

B.4.5.3.4 Detektion der Dünnschichtchromatogramme

Die entwickelten Dünnschichtchromatogramme wurden zuerst unter einer Universal-UV-Lampe bei λ 254 nm untersucht und manuell auf UV-durchlässige Folien kopiert. Mit einem DC-Scanner wurden Densitogramme (Remissionsortskurven) der Chromatogramme bei verschiedenen Wellenlängen im Mehrwellenlängen-Scan (MWL) aufgenommen. Zuletzt wurde die DC-Platte mit Dragendorff-Reagens besprüht. Die Retention wurde mit dem R_B -Wert durch Bezug auf Bikhaconitin (**15**) ausgedrückt (siehe A.7.2.1.1).

Tabelle 23: Übersicht über die DC-Trennungen I bis V mit verwendeten Referenzsubstanzen und untersuchten Proben.

		DC-Trennung	I	II	III	IV	V
		DC-System*	1	2	3	1	4
		DC-Kammer**	H_gr	H_kl	H_gr	H_kl	DT
Referenzsubstanzen ***			E&M	E&M	E&M	M	M
	Bikhaconin (2)		+	+	+		
	Isotalatizdin (6)		+	+	+		
	Veratroypseudaconin (7)		+	+	+	+	+
	Neolin (8)		+	+	+		
	Veratroylbikhaconin (9)		+	+	+	+	+
	Bikhaconitin (15)		+	+	+	+	+
	Pseudaconitin (16)		+	+	+	+	+
	Falconericin (17)					+	+
	Aconitin (20)		+	+	+		
	Chasmaconitin (21)		+	+	+	+	+
	Yunaconitin (23)		+	+	+	+	+
	Indaconitin (24)		+	+	+	+	+
Untersuchte Proben [#]							
AcK_{violac}	<i>A. violaceum</i>		+	+	+		
AcK_{Del_1}	<i>A. spicatum</i>		+	+	+		
AcK_{Del_3}	<i>A. falconeri</i> (unbehandelt)		+	+	+	+	+
AcK_{Del_p}	<i>A. falconeri</i> (behandelt)		+	+	+		

* B.4.5.3.1; ** siehe B.4.4; *** siehe B.4.1; H_gr Horizontalkammer mit grossem Gasraum; H_kl Horizontalkammer mit kleinem Gasraum; DT Doppeltrogkammer; E&M Referenzsubstanzen sowohl einzeln als auch im Mischpunkt aufgetragen; M Referenzsubstanzen nur im Mischpunkt aufgetragen.[#] Alkaloidextrakte R pH 9

B.4.5.3.4.1 DC-Scanner: In-situ-UV-Remissionsspektren und Mehrwellenlängen-Scan

Der DC-Scanner wurde generell auf Absorption/Reflexion, Spaltbreite 5, Spaltlänge 3 und Optik „Mikro“ eingestellt. In-situ-UV-Remissionsspektren wurden zwischen 200-400 nm von Referenzsubstanzen aufgenommen, welche einzeln aufgetragen und mit der DC-Trennung III entwickelt wurden. Die Aufnahme erfolgte jeweils am Signalmaximum der Flecken, welches anhand der Densitogramme bei 230 nm - λ_{\max} von Aconitin (20) (Liu, 1995) - bestimmt wurde. Für den Mehrwellenlängen-Scan (MWL) wurden hauptsächlich Wellenlängen ausgewählt, welche für die charakteristischen Absorptionsmaxima bei Veresterung mit Benzoe-, Anis- und Veratrumsäure typisch sind (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Für Mehrwellenlängen-Scan (MWL) ausgewählte Wellenlängen

λ (nm)	Charakteristisch für Esterfunktion oder Substanzklasse	Bemerkungen
210	(Alkamine)	Wellenlänge 210 nm an der unteren Grenze des messbaren Bereichs wurde für Alkamine gewählt
220	Veratroyl-	
233	Benzoyl-	zum Vergleich der Detektion mit der Universal-UV-Lampe bei gleicher Wellenlänge
254	—	
263	Anisoyl- und Veratroyl-	
273	Benzoyl-	
295	Veratroyl-	

Zur Überlagerung im MWL wurden die Densitogramme zuvor Basislinien-korrigiert. Die Absorption eines Flecken wurde in relativer Intensität ausgedrückt in Bezug auf den am intensivsten absorbierenden Flecken einer Platte.

B.4.5.3.5 Identifizierung der Alkaloide mit DC

Wenn ein Alkaloid aus einem Alkaloidextrakt in drei der fünf durchgeführten DC-Trennungen (siehe Tabelle 23) nachgewiesen werden konnte, wurde es als identifiziert betrachtet, sofern es mit der jeweiligen Referenzsubstanz vergleichbar war bezüglich R_B -Wert (innerhalb $\pm 6,5\%$), Überlagerung im MWL oder - bei fehlender UV-Absorption - durch Orangefärbung mit Dragendorff-Reagens. Alkaloide, für welche identische R_B -Werte mit Referenzsubstanzen nur für ein bis zwei DC-Systeme vorlagen, wurden dagegen als tentativ identifiziert bezeichnet.

B.4.5.4 Isolierung von Alkaloiden mit präparativer DC

Auf eine DC-Platte von 10x20 cm mit 0,25 mm Schichtdicke des Sorbens wurden jeweils 5 bis 10 mg Alkaloidextrakt oder zu reinigende Alkaloide manuell linear aufgetragen. Nach

Entwicklung wurden die im UV bei 254 nm detektierten Banden ausgekratzt, im Porzellanmörser pulverisiert, dreimal mit je 10-20 ml CH₂Cl₂/MeOH 5 % extrahiert, über Glasfritten (P3) filtriert und eingengt.

Isolierung von Alkaloiden aus Knollen von *A. falconeri* STAPF (Probe AcK_{Del_2})

Zur Isolierung von Alkaloiden wurde der Alkaloidextrakt der Knollenprobe AcK_{Del_2} ausgewählt, da weitere Proben von *A. falconeri* für andere Zwecke zur Verfügung standen. Hierzu wurden von den Alkaloidextrakten **R pH 9** und **R pH 12** mit 120 mg respektive 2,5 mg die nach DC-Vergleichen übrige Gesamtmenge eingesetzt. Da diese beiden Alkaloidextrakte im DC-Vergleich qualitativ ähnlich waren, konnten sie vereinigt werden. Durch mehrfache präparative Dünnschichtchromatographie wurden die sieben Alkaloide Veratroylpseudaconin (**7**), Bikhaconitin (**15**), Pseudaconitin (**16**), Falconericin (**17**), 8-Acetylfalconerin (**18**), Yunaconitin (**23**) und Indaconitin (**24**) isoliert.

Die Alkaloidextrakte **R pH 9** und **R pH 12** wurden mit dem DC-System 6 grob in fünf Banden (AcK_{Del_2}-1 bis AcK_{Del_2}-5) getrennt. Hiervon wurden die Fraktionen AcK_{Del_2}-2 bis -5 mit dem DC-System 1 weiter in je vier bis fünf Banden getrennt (siehe Tabelle 25).

Die siebzehn Fraktionen, welche aus der zweiten Trennung resultierten, wurden mit folgenden acht Referenzsubstanzen Veratroylpseudaconin (**7**), Veratroylbikhaconin (**9**), Bikhaconitin (**15**), Pseudaconitin (**16**), Falconericin (**17**), Chasmaconitin (**21**), Yunaconitin (**23**), und Indaconitin (**24**) in den drei DC-Systemen 1, 2 und 3 verglichen. Dadurch konnten einzelne Alkaloide z.T. gezielt isoliert werden, wie nachstehend beschrieben wird.

Tabelle 25: Fraktionen aus der präparativen Trennung der Alkaloidextrakte der Probe AcK_{Del_2}

1. Trennung: 5 Banden		2. Trennung: 17 Banden	
Bande*	Ausbeute (mg)	Banden*	Fraktionen
AcK _{Del_2} -1	11,7	—	—
AcK _{Del_2} -2	92,0	→	AcK _{Del_2} -2-1 bis AcK _{Del_2} -2-5
AcK _{Del_2} -3	5,1	→	AcK _{Del_2} -3-1 bis AcK _{Del_2} -3-4
AcK _{Del_2} -4	6,7	→	AcK _{Del_2} -4-1 bis AcK _{Del_2} -4-4
AcK _{Del_2} -5	4,3	→	AcK _{Del_2} -5-1 bis AcK _{Del_2} -5-4
Total:	119,8**		

* Numerierung der Banden steigen mit wachsender Laufstrecke, daraus gewonnene Unterfraktionen entsprechend ergänzt. ** entspricht 97,8% der eingesetzten Menge an Alkaloidextrakten RpH9 und RpH12; — nicht weiter getrennt.

Die Fraktion AcK_{Del_2}-2-2 (58 mg) wurde mit DC-System 5 getrennt, wobei hier die Hauptbande (AcK_{Del_2}-2-2-3; 55 mg) mit ¹H- und ¹³C-NMR als Pseudoaconitin (**16**) identifiziert wurde (Daten zu ¹³C-NMR siehe B.6).

Die Fraktionen AcK_{Del_2}-2-5 (5,6 mg), AcK_{Del_2}-3-1 (1,2 mg) und AcK_{Del_2}-3-2 (2,8 mg) enthielten Indaconitin (**24**) und wurden gemeinsam als Mischfraktion AcK_{Del_2}-C nochmals mit dem DC-System 1 chromatographiert. Das ¹³C-NMR Spektrum der Hauptbande AcK_{Del_2}-C-3 (7,1 mg) zeigte, dass es sich hierbei noch um eine Substanzmischung handelte. Mit DC-System 5 konnte Indaconitin (**24**) (AcK_{Del_2}-C-3-1: 4,1 mg) von der apolareren Bande (AcK_{Del_2}-C-3-2: 1,6 mg) getrennt werden. Letztere wurde mit ¹H- und ¹³C-NMR als 8-Acetylfalconerin (**18**) identifiziert (¹³C-NMR siehe B.6).

Zusätzlich wurden aus der Knollenprobe AcK_{Del_2} noch die folgenden Alkaloide Veratroylpseudoaconin (**7**), Bikhaconitin (**15**), Falconericin (**17**) und Yunaconitin (**23**) isoliert. Die verwendeten Fraktionen und DC-Systeme sind in Tabelle 26 angegeben. Die

Identifizierung dieser Alkaloide erfolgte durch Vergleich mit Referenzsubstanzen in den drei DC-Systemen 2, 3 und 6, bei letzterem auf HPTLC-Kieselgel.

Tabelle 26: Isolierung weiterer Alkaloide aus der Knollenprobe AcK_{Del_2}

Fraktionen aus 2. Trennung [*]	Trennung mit DC-System	isolierte Alkaloide ^{**}	Ausbeute
(mg)			(mg)
AcK _{Del_2} -2-1	12,1	2, dann 1 → Veratroylpseudaconin (7)	7,9
AcK _{Del_2} -2-4	9,3	2 → Yunaconitin (23)	7,8
AcK _{Del_2} -4-2	3,9	2 → Bikhaconitin (15)	3,5
AcK _{Del_2} -5-2	0,4		
AcK _{Del_2} -4-3	0,4	4 → Falconericin (17)	1,3
AcK _{Del_2} -5-3	2,6		

* siehe Tabelle 25; ** identifiziert durch Vergleich mit Referenzsubstanzen in drei DC-Systemen

B.4.5.4.1 NMR-Spektren zur Identifizierung der isolierten Alkaloide

Die Frequenzen zur Aufnahme der NMR-Spektren waren für ¹H-NMR 200 MHz und für ¹³C-NMR 50 MHz. Es wurden Lösungen in CDCl₃ verwendet. Die chemische Verschiebung wurde in ppm (δ), feldabwärts zu TMS (δ = 0 ppm) als internem Standard angegeben.

B.5 Resultate und Diskussion

B.5.1 DC-Scanner-Detektion

B.5.1.1 In-situ-Remissionsspektren

Von den zwölf in B.4.1 für die DC-Trennungen ausgewählten Referenzsubstanzen **2, 6, 7, 8, 9, 15, 16, 17, 20, 21, 23** und **24** wurden nach DC-Trennung UV-Absorptionsspektren oder sogenannte In-situ-Remissionsspektren zwischen 200-400 nm aufgenommen. Während bei den Alkaminen, die ja kein Chromophor enthalten, die Absorption bei Wellenlängen >200 nm rasch abfiel, unterschieden sich die Spektren der Mono- und Diesteralkaloide je nach aromatischem Säureteil, wie im Folgenden dargestellt wird.

B.5.1.1.1 Esterfunktionstypen

Anhand der für Benzoe-, Anis- sowie Veratrumsäure charakteristischen Absorptionsmaxima liessen sich mit diesen Säuren veresterte Alkaloide in drei Esterfunktionstypen einteilen (siehe Tabelle 27). Die gefundenen UV-Absorptionsmaxima sind mit den Literaturwerten vergleichbar. Von jedem Esterfunktionstyp ist in Abbildung 11 das charakteristische In-situ-UV-Remissionsspektrum eines Vertreters überlagert dargestellt. Anhand der typischen UV-Absorptionsmaxima konnten Alkaloide dieser drei Esterfunktionstypen unterschieden und geeignete Wellenlängen für den Mehrwellenlängen-Scan (MWL) ermittelt werden. Die Darstellung der relativen Absorption einer Substanz lässt keinen quantitativen Vergleich zu.

Tabelle 27: UV-Absorptionsmaxima und -minima der In-situ-Remissionsspektren (200-400 nm) einiger untersuchter Norditerpenalkaloide und Literaturvergleich.

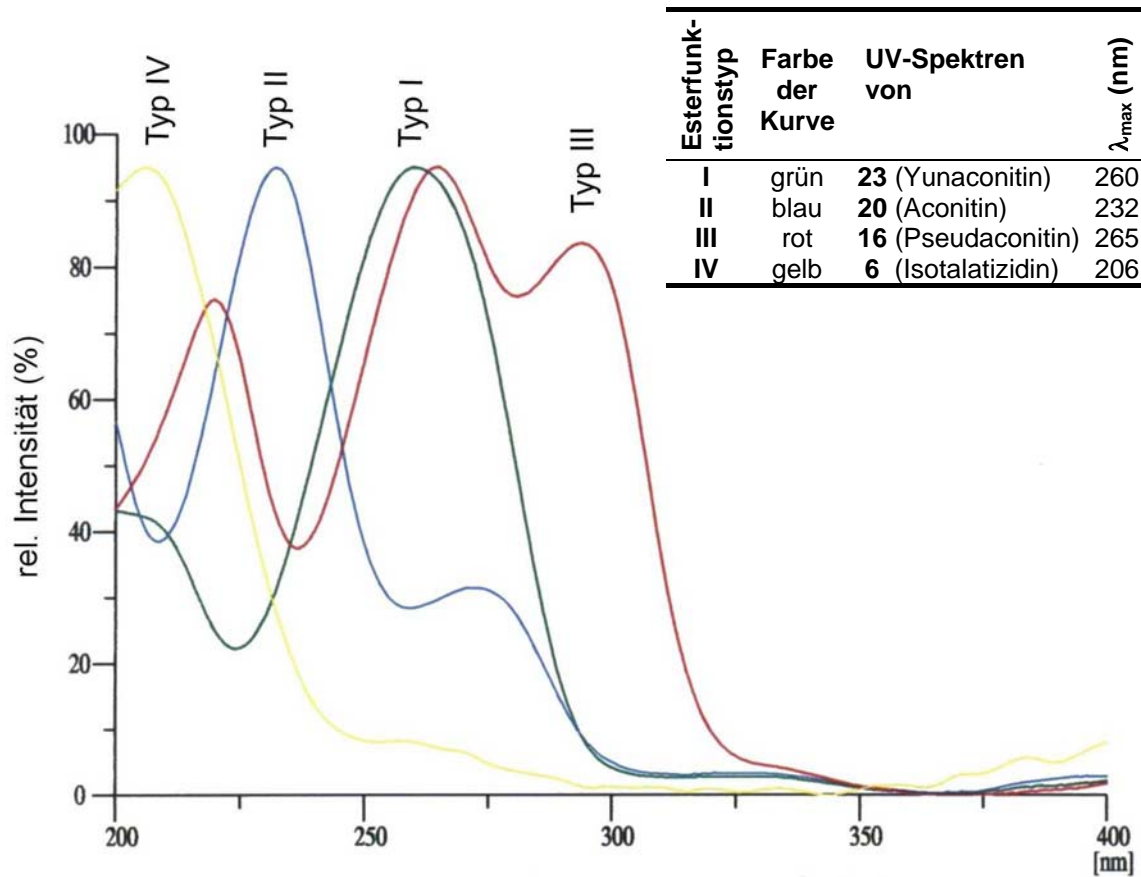
Hauptmaximum: **fett**, zweites Maximum: unterstrichen;

Hauptminimum: *kursiv fett*, zweites Minimum *kursiv*.

Esterfunktionstyp Alkaloide/Substanzen	UV-Absorptionsmaxima (nm) in Klammern: relative Absorption, resp. bei Literaturwerten Absorptionskoeffizient ($\log \epsilon$)			
Typ I (Anisoyl-):	ein Maximum <i>Minimum (23): 224 nm (22 %)</i>			
*Yunaconitin (23)	260 (95 %)			
<i>Zum Vergleich:</i> - p-Anissäure in MeOH ¹	253 (4,22)			
Typ II (Benzoyl-):	zwei Maxima <i>Minima: 207-209 nm (ca. 35-38 %); 258-260 nm (ca. 17-28 %)</i>			
*Aconitin (20)	232 (95 %)	<u>272</u> (32 %)		
Chasmaconitin (21)	231 (96 %)	<u>274</u> (21 %)		
Indaconitin (24)	231 (95 %)	<u>270</u> (25 %)		
<i>Zum Vergleich:</i> - 20 in wässriger Säure ²	234 (4,18)	<u>275</u> (kA)	—	
- 20 in EtOH ³	230 (4,23)	<u>273</u> (2,68)	<u>280</u> (2,49)	
- Benzoesäure in MeOH ²	227 (4,04)	<u>272</u> (2,95)	280 (2,87)	
- “ in wässriger Säure ²	230 (4,05)	<u>273</u> (3,02)	—	
Typ III (Veratroyl-):	drei Maxima <i>Minima: 235-238 nm (ca. 35-50 %); 280-284 nm (ca. 70-80 %)</i>			
Veratroylpseudaconin (7)	224 (77 %)	266 (95 %)	<u>296</u> (86 %)	
Veratroylbikhaconin (9)	218 (75 %)	263 (96 %)	<u>292</u> (82 %)	
Bikhaconitin (15)	219 (76 %)	264 (96 %)	<u>293</u> (83 %)	
*Pseudaconitin (16)	220 (75 %)	265 (95 %)	<u>293</u> (84 %)	
Falconericin (17)	220 (70 %)	264 (95 %)	<u>294</u> (76 %)	
<i>Zum Vergleich:</i> - Veratrumsäure in MeOH ¹	217 (4,35)	258 (3,06)	<u>290</u> (3,74)	
Typ IV (Alkamine) unverestert	Maximum: <200 nm, im Allg. keines zwischen 200-400 nm			
Bikhaconin (2)	< 200			
*Isotalatizidin (6)	206 (95%)			
Neolin (8)	< 200			

* Spektren dargestellt in Abbildung 11; ¹ Weast & Grasselli (1989); ² Moffat *et al.* (1986);

³ Liu (1995); ⁴ siehe B.5.1.1; kA keine Angabe



Esterfunktionstyp	Aromatischer Substituent	relative UV-Absorption bei		
		~ 233 nm	~ 260 nm	~ 295 nm
I	Anisoyl-	-	+++	-
II	Benzoyl-	+++	-	-
III	Veratroyl-	-	+++	++
IV	keiner (Alkamine)	-	-	-

+++ sehr intensiv; ++ intensiv; - gering

Abbildung 11: Charakteristische UV-Absorptionsmaxima von In-situ-UV-Remissionsspektren zur Unterscheidung von Alkaloiden nach Esterfunktionstypen

B.5.1.2 Unterscheidung der aromatischen Esterfunktion mit MWL

Für den Mehrwellenlängen-Scan (MWL) wurden mit dem DC-Scanner Densitogramme bei sieben Wellenlängen (siehe Tabelle 24) aufgenommen und anschliessend überlagert farbiger dargestellt. Für die rasche Erkennung respektive Differenzierung der oben beschriebenen Esterfunktionstypen waren vor allem die bei 233, 260 und 295 nm aufgenommenen

Densitogramme wichtig (siehe Abbildung 11) sowie ergänzend die Intensitätsverhältnisse bei den übrigen Wellenlängen.

B.5.1.3 Unterscheidung überlagerter Substanzen

Die bei der DC-Trennung I nicht getrennten Verbindungen Aconitin (**20**) und Veratroylbikhaconin (**9**) lassen sich durch die unterschiedlichen, charakteristischen MWL-Überlagerungen der Esterfunktionstypen II (Benzoyl-) und III (Veratroyl-) noch unterscheiden, da deren jeweilige Signalmaxima leicht voneinander abweichen (siehe Abbildung 12). In der DC-Trennung II (siehe Abbildung 13) kann Veratroylbikhaconin (**9**) bei 295 nm, wo der Esterfunktionstyp II (Veratroyl-) ein charakteristische zweites Maximum hat, im MWL noch detektiert werden, obwohl es von Yunaconitin (**23**) überlagert wird, welches bei der genannten Wellenlänge nur minimal absorbiert (siehe Abbildung 11, Tabelle 27).

B.5.1.4 Einsatzgrenzen der DC-Scanner-Detektionsmethode

Während für die Mono- und Diesteralkaloide, welche mit einer aromatischen Säure verestert sind, die UV-Detektion gut geeignet war, war dies wegen der geringer UV-Absorption zwischen 200 – 400 nm (siehe A.7.3.2) bei den unveresterten Alkaminen schwierig. Die Alkamine Bikhaconin (**2**), Isotalatizidin (**6**) und Neolin (**8**) konnten mit dem DC-Scanner nur detektiert werden, wenn diese Substanzen einzeln aufgetragen waren. In der Referenzmischung waren sie durch stark absorbierende Alkaloide oder weitere Alkamine überlagert. Beispiele hierfür sind die Co-elution von **2** mit **7** oder von **6** mit **7** und **16** in den DC-Trennungen I und III oder der beiden Alkamine **2** und **8** in den DC-Trennungen II und III (siehe Tabelle 28). Einzig bei der Knollenprobe AcK_{violac} konnte mit dem DC-Scanner das

Signal eines Alkamins, vermutlich Neolin (**8**), detektiert werden (DC-Trennungen I und III, siehe Tabelle 28).

Als Möglichkeit, Alkamine bei guter Trennung zu detektieren, blieb die Orange-Färbung mit Dragendorff. So wurde beispielsweise Isotalatizidin (**6**) in einigen Extrakten detektiert (siehe Tabelle 28).

Vergleich der Detektion bei 254 nm und mit dem DC-Scanner

Wie die Detektion mit MWL gegenüber der UV-Universallampe verbessert werden konnte, soll an folgendem Beispiel illustriert werden. Alkaloide vom Esterfunktionstyp II (Benzoyl-) haben ein Absorptionsminimum bei ca. 260 nm und absorbieren daher bei der Standardwellenlänge 254 nm relative gering (siehe Abbildung 11 und Tabelle 27). Bei 254 nm konnte beispielsweise Indaconitin (**24**) im Referenzgemisch in den DC-Trennungen I und II (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13) weder mit der UV-Universallampe, noch im Densitogramm zwischen den benachbarten Substanzen detektiert werden. Im MWL konnte dagegen Indaconitin (**24**) durch Überlagerung mit den Densitogrammen derjenigen Wellenlängen detektiert werden, bei welchen diese Substanz stärker respektive maximal absorbiert.

B.5.2 Kommentare zu Trennung und Detektion

Grösse des Gasraums von Horizontalkammern und Fliessmittelzusammensetzung

Zur horizontalen DC-Entwicklung wurden zwei Typen Kammern eingesetzt (siehe Tabelle 19). Die Kammern unterschieden sich hauptsächlich in der Grösse des Gasraums, in welchen das Fliessmittel verdampfen kann. Während das Volumen, welches der Sorbenschicht zugewandt ist, bei beiden Typen ähnlich ist, ist der Raum über der Rückseite der Platte bei der „Camag Linearkammer“ rund achtmal grösser als bei der „Camag Horizontalkammer“. Dieser Unterschied wirkte sich bei zwei DC-Systemen aus: Mit DC-System 2, welches Ether als Hauptteil der mobilen Phase enthält (siehe Tabelle 22), konnte nur mit der „Camag Horizontalkammer“ (kleiner Gasraum) sowie vertikal im Doppelkammertrog entwickelt werden, welcher mit dem Fliessmitteldampf gesättigt war. In der „Camag Linearkammer“ (grosser Gasraum) verdunstete das Fliessmittel dagegen zu rasch, so dass die Laufstrecke von ca. 8 cm nicht erreicht wurde. Eine geeignetere Äquilibrierung anstelle des angefeuchteten Fliesspapiers, welches im Falle von DC-System 2 rasch austrocknet, wäre die mobile Phase in den Tank unter der DC-Platte zu füllen (sogenannte Sandwich-Konfiguration).

Das DC-System 1 wurde sowohl für die DC-Trennungen I und IV verwendet, jedoch mit unterschiedlichen Horizontalkammern (siehe Tabelle 23). Dies könnte erklären, warum sich einerseits die R_B -Werte und andererseits sogar die Trennung unterschieden (siehe Tabelle 28 und Tabelle 29). Waren Veratroylbikhaconin (**9**) und Indaconitin (**24**) in den DC-Trennungen I noch gut getrennt (siehe Abbildung 12) so kam es bei Trennung IV praktisch zu einer Co-elution, obwohl hier Aconitin (**20**) weggelassen wurde, da es mit **9** co-eluierte.

Detektion mit Dragendorff und Diethylamin-haltige Fließmittel

Bei Verwendung von Kieselgelplatten und Diethylamin-haltigen Fließmitteln (DC-Systeme 3, 4 und 6) konnte die Detektion mit Dragendorff erst am folgenden Tag durchgeführt werden, wenn das Diethylamin kaum mehr geruchlich wahrnehmbar war. Ansonsten war die Detektion mit Dragendorff beeinträchtigt, da sich wegen des restlichen Diethylamins die ganze Platte beim Spraysen gelb färbte.

B.5.3 Resultate des DC-Screenings

B.5.3.1 Ergebnisse der DC-Trennungen von *Aconitum*-Knollenproben

Die aus vier *Aconitum*-Knollenproben extrahierten Alkaloide wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getrennt. Untersucht wurde jeweils der Alkaloidextrakt R pH 9 (siehe Tabelle 20). Im Vergleich zu Referenzsubstanzen wurden einige Alkaloide identifiziert und zusätzliche Alkaloide tentativ identifiziert (siehe Tabelle 31). Weiter wurden Hinweise auf hier nicht zugeordnete Alkaloide erhalten. Im Folgenden sind die Ergebnisse der DC-Trennungen der vier Knollenproben AcK_{Del_1}, AcK_{Del_3}, AcK_{Del_p} und AcK_{violac} anhand der R_B -Werte tabellarisch aufgeführt (siehe Tabelle 28 und Tabelle 29). Für die graphischen MWL-Darstellungen wurde hauptsächlich die Probe AcK_{Del_3} ausgewählt.

Versuche zur DC-Trennung der Extrakte aus tibetischen Juwelenpillen waren erfolglos, da Matrixreste die Detektion mit MWL störten und die Probenmengen nicht für weitere DC-Versuche ausreichten. Die HPLC-MSⁿ-Untersuchung dieser Proben wird in Teil C beschrieben.

R_B -Wert zur Darstellung der Retention

Die Retention der detektierten Flecken wurde in Bezug auf Bikhaconitin (**15**) mit dem R_B -Wert ausgedrückt (A.7.2.1.1). Bikhaconitin (**15**) wurde gewählt, da dieses Alkaloid einerseits mit den DC-Systemen 1 bis 4 jeweils gut von den anderen Alkaloiden abgetrennt war und somit leicht identifiziert werden konnte, andererseits wurde **15** zudem in allen untersuchten Knollenproben ausser AcK_{violac} gefunden. Zur Berechnung der Retention der übrigen Substanzflecken eines Extrakts wurden deren Laufstrecken auf die Laufstrecke des „internen Bikhaconitins“ bezogen. Für das „interne Bikhaconitin“ selber wurde in den Resultaten jedoch nicht der als 1,00 definierte R_B -Wert angegeben, sondern dessen Laufstrecke auf Bikhaconitin (**15**) in der mitentwickelten Referenzsubstanz-Mischung bezogen. Der so für eine Probe erhaltene R_B -Wert des „internen Bikhaconitins“ gibt ein Mass dafür, wie stark die Trennungen von Probe und Referenzsubstanz übereinstimmen.

Tabelle 28: Übersicht zu DC-Trennungen I-III von *Aconitum*-Knollenproben: R_B -Werte der getrennten Substanzen:

Abkürzungen der Proben siehe Tabelle 14, Strukturen der Alkaloide siehe Tabelle 4

Alkaloide #	DC-Trennung I (DC-System 1)					DC-Trennung II (DC-System 2)					DC-Trennung III (DC-System 3)						
	Ref_E	Ref_M	AcK _{Del_1}	AcK _{Del_3}	AcK _{violac}	Ref_E	Ref_M	AcK _{Del_1}	AcK _{Del_3}	AcK _{Del_P}	AcK _{violac}	Ref_E	Ref_M	AcK _{Del_1}	AcK _{Del_3}	AcK _{Del_P}	AcK _{violac}
?			—	—	1,34			—	—	—	1,38 ^D						
Chasmaconitin (21)	1,17	1,21	1,21 ^{Vk}	1,22 ^{Vk}	1,24 ^{VS}	1,29	1,33	1,32 ^V	1,34 ^V	1,32 ^V	—	1,59	1,53	1,52 ^V	1,53 ^V	1,52 ^V	1,51 ^{VS}
?*			1,15*	1,17*	1,16 ^{DB}	—	—	1,25*	1,28*	1,26*	1,28 ^D			1,28*	1,30*	1,30*	—
?																	1,20 ^D
Bikhaconitin (15) ^{\$}	0,97	1,00	1,01	0,99	—	0,96	1,00	1,01	0,98	1,00	—	1,05	1,00	1,02	1,01	1,01	—
Veratroylbikhaconin (9)	0,87	0,86	0,86 ^{Vk}	0,87 ^{Vk}	—	0,66	0,66 ^{V+}	—	—	—	—	0,92	0,92	—	—	—	—
Aconitin (20)	0,84	0,85	—	—	—	0,81	0,82	—	—	—	—	0,79	0,79	—	—	—	—
Indaconitin (24)	0,78	0,80	0,80	0,80	0,80 ^B	0,69	0,72	0,74	0,73	0,74	0,73 ^B	0,74	0,73	0,72	0,72	0,72	0,72
Yunaconitin (23)	0,72	0,73	0,74	0,73	—	0,64	0,63	0,63	0,63	0,64	—	0,61	0,60	0,60	0,59	0,60	—
?*									0,56 ^{VS**}	S	—						
Pseudoaconitin (16)	0,59	0,61	0,60	0,61	—	0,42	0,44	0,46	0,46	0,47	—	0,49	0,45 [!]	0,48 [!]	0,46 [!]	0,47 [!]	—
Neolin (8)	0,55 ^D	—	—	—	0,55	0,29	0,26 ^{D!}	—	0,27 ^{D!}	0,26 ^{D!}	0,26 ^{D!}	0,59	0,56 ^{D!}	—	—	—	0,55 [!]
Bikhaconin (2)	0,51	—	—	—	—	0,27	0,26 ^{D!}	—	0,27 ^{D!}	0,26 ^{D!}	0,26 ^{D!}	0,55	0,56 ^{D!}	—	—	—	0,55 [!]
Veratroylpseudoaconin (7)	0,49	0,51	0,51	0,50	—	0,29	0,31	0,31	0,30	0,31	—	0,45	0,45 [!]	0,48 [!]	0,46 [!]	0,47 [!]	—
Isotalatizdin (6)	0,40	0,39 ^D	—	0,39 ^D	0,39 ^D	0,20 ^D	0,16 ^D	—	0,17 ^D	0,17 ^D	0,16 ^D	0,46	—	—	—	—	—

Wenn nicht anders vermerkt: Detektion mit MWL und Dragendorff; internes Bikhaconitin der Proben **fett**.

nach fallendem R_B -Wert gemäss DC-Trennung I; \$ R_f -Wert der Referenzsubstanz Bikhaconitin (15) betrug 0,56 in DC-Trennung I (DC-System 1), 0,63 in DC-Trennung II (DC-System 2) respektive 0,38 in DC-Trennung III (DC-System 3); Ref_E Referenzsubstanzen einzeln aufgetragen; Ref_M Referenzsubstanzen als Mischpunkt aufgetragen; B breiter Fleck (mit Dragendorff); D Detektion nur mit Dragendorff; k kleines Signal (MWL); S Schulter (MWL); V Detektion nur im UV mit MWL; * Alkaloid vom Esterfunktionstyp III; ** Alkaloid vom Esterfunktionstyp I; + kann nur mit der Remissionsgrad-Ortskurve bei 295 nm von der Überlagerung durch Yunaconitin (23) unterschieden werden; — nicht detektiert; ! nicht identifizierbar wegen Co-elution respektive gleichem R_B -Wert von zwei Referenzsubstanzen; ? Substanz ohne Referenzsubstanz.

Tabelle 29: Übersicht zu DC-Trennungen IV und V: R_B -Werte der getrennten Substanzen: Abkürzungen der Proben siehe Tabelle 14, Strukturen der Alkaloide siehe Tabelle 4.

Alkaloide [#]	DC-Trennung IV (DC-System 1)		DC-Trennung V (DC-System 4)	
	Ref M	AcK _{Del 3}	Ref M	AcK _{Del 3}
Chasmaconitin (21)	1,21	1,22	1,18	1,17 ^{SK}
Falconericin (17)	1,15	1,15	1,14	1,14
Bikhaconitin (15) ^{\$}	1,00	0,97	1,00	1,00
Veratroylbikhaconin (9)	0,74!	0,73!	0,93	0,93
Indaconitin (24)	0,75!	0,74!	0,71	0,72
Yunaconitin (23)	0,64	0,63	0,65	0,65 ^S
Pseudaconitin (16)	0,49	0,46	0,60	0,62
Veratroylpseudaconin (7)	0,37	0,35	0,53	0,52

Wenn nicht anders vermerkt: Detektion mit MWL und Dragendorff; internes Bikhaconitin der Proben **fett**;

nach fallendem R_B -Wert gemäss DC-Trennung I; \$ R_f -Wert der Referenzsubstanz Bikhaconitin (**15**) betrug 0,64 in DC-Trennung IV (DC-System 1) respektive 0,65 in DC-Trennung V (DC-System 4); ! nicht identifizierbar wegen Co-elution respektive gleichem R_B -Wert von zwei Referenzsubstanzen; k kleines Signal (MWL); Ref_ **M** Referenzsubstanzen als Mischpunkt aufgetragen; S Schulter (MWL)

Tabelle 30: Legende zur MWL-Überlagerungsdarstellung der DC-Trennungen I-III (siehe Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14)

x-Achse: der Auftrageort entspricht auf der Skala 10 mm; Start- und Frontlinie wurden oft nicht aufgenommen, da die Bleistiftlinien die UV-Absorption störten. Die überlagerten Densitogramme sind Basislinien-korrigiert.

Abkürzungen:

Vr Verunreinigung aus Referenzsubstanzen; F Frontlinie; ? nicht resp. tentativ identifiziert [bei Falconericin (**17**) ohne direkten Vergleich mit einer Referenzsubstanz].

Farbe der Kurve (Densitogramm)	aufgenommen bei Wellenlänge (nm)
dunkelblau	295
schwarz	273
rot-violett	263
gelb	254
rot	233
hellblau	220
grün	210

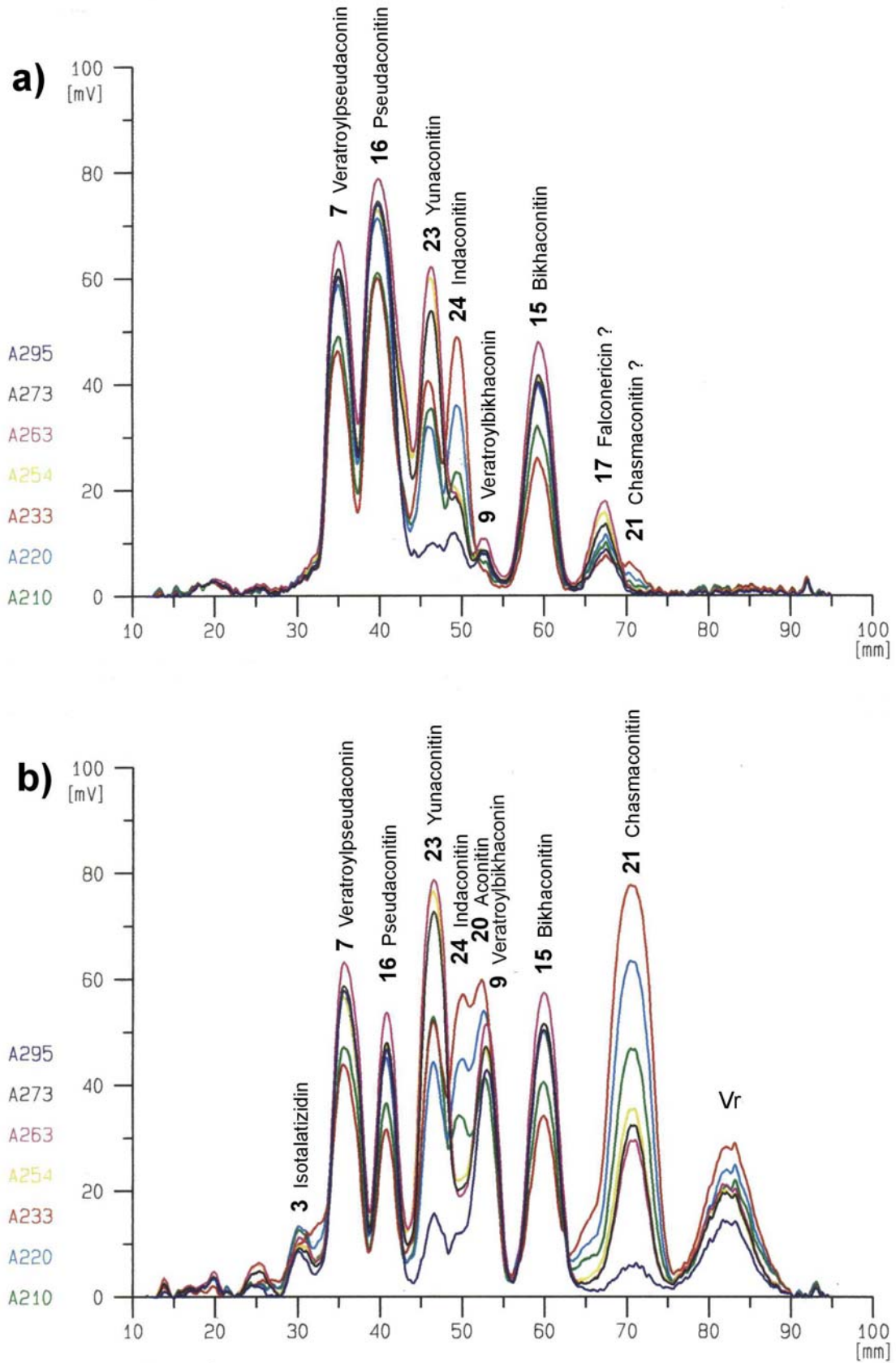


Abbildung 12: DC-Trennung I in MWL-Darstellung

a) Probe AcK_{Del_3}; b) Mischung der Referenzsubstanzen; Legende siehe Tabelle 30

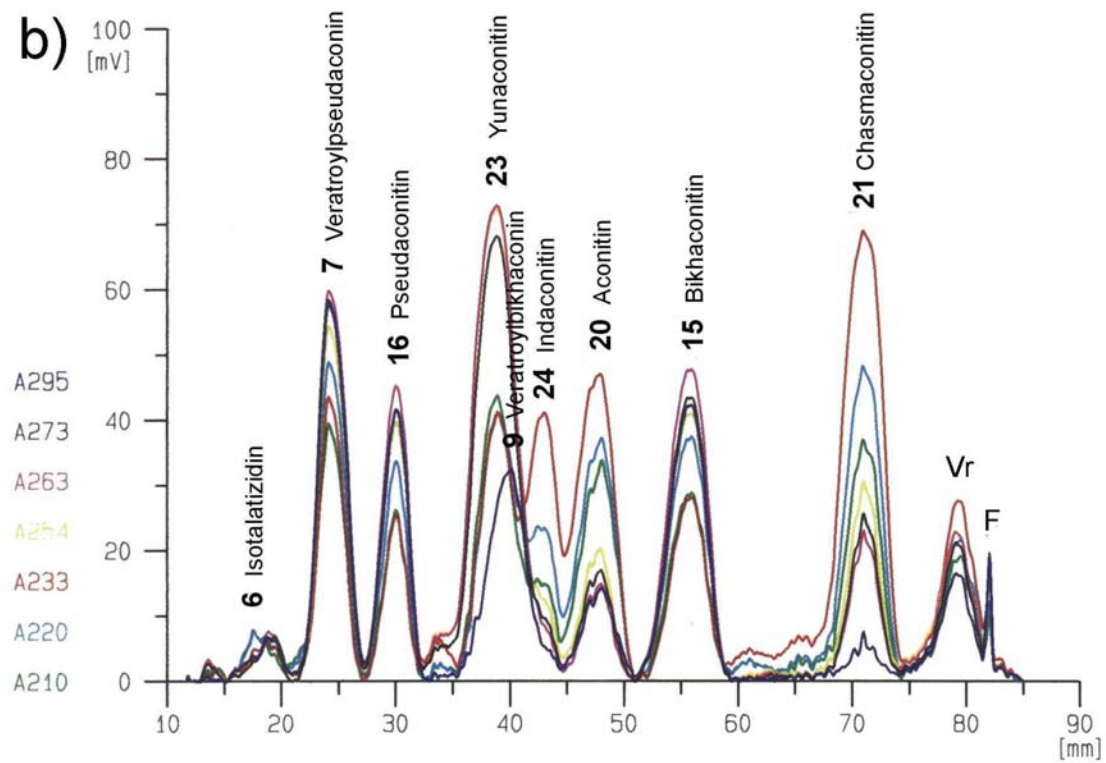
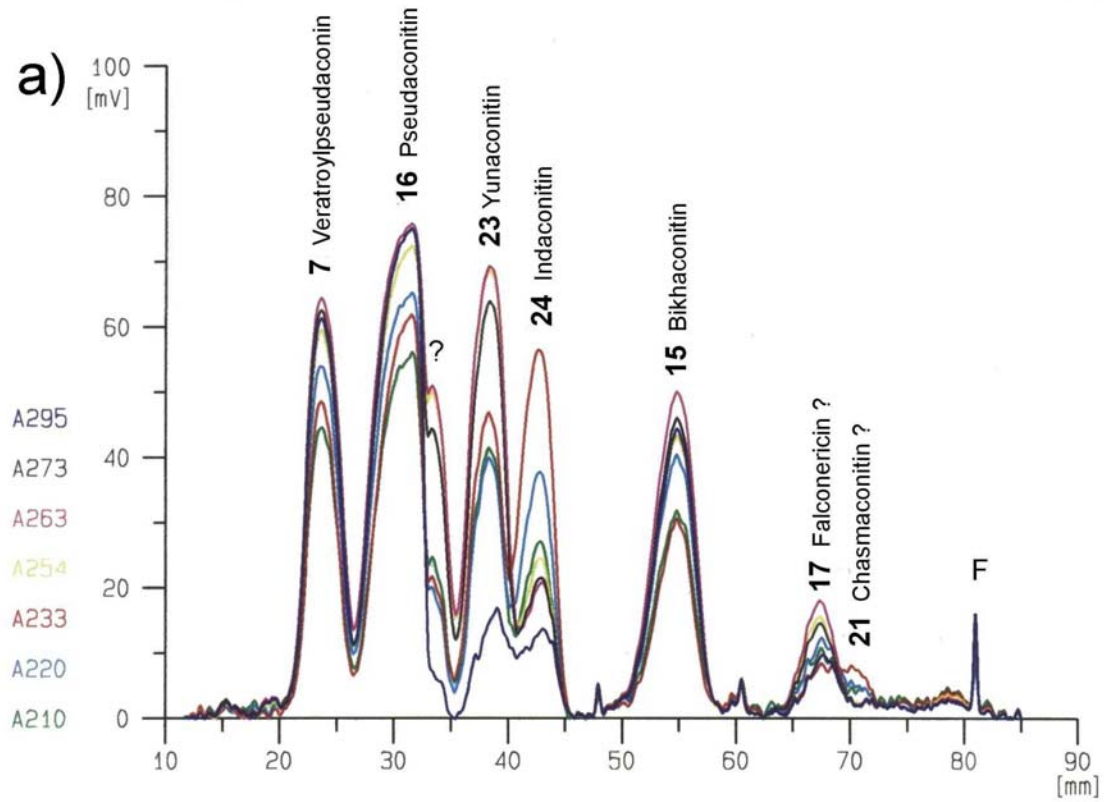


Abbildung 13: DC-Trennung II in MWL-Darstellung

a) Probe AcK_{Del}_3; b) Mischung der Referenzsubstanzen; Legende siehe Tabelle 30

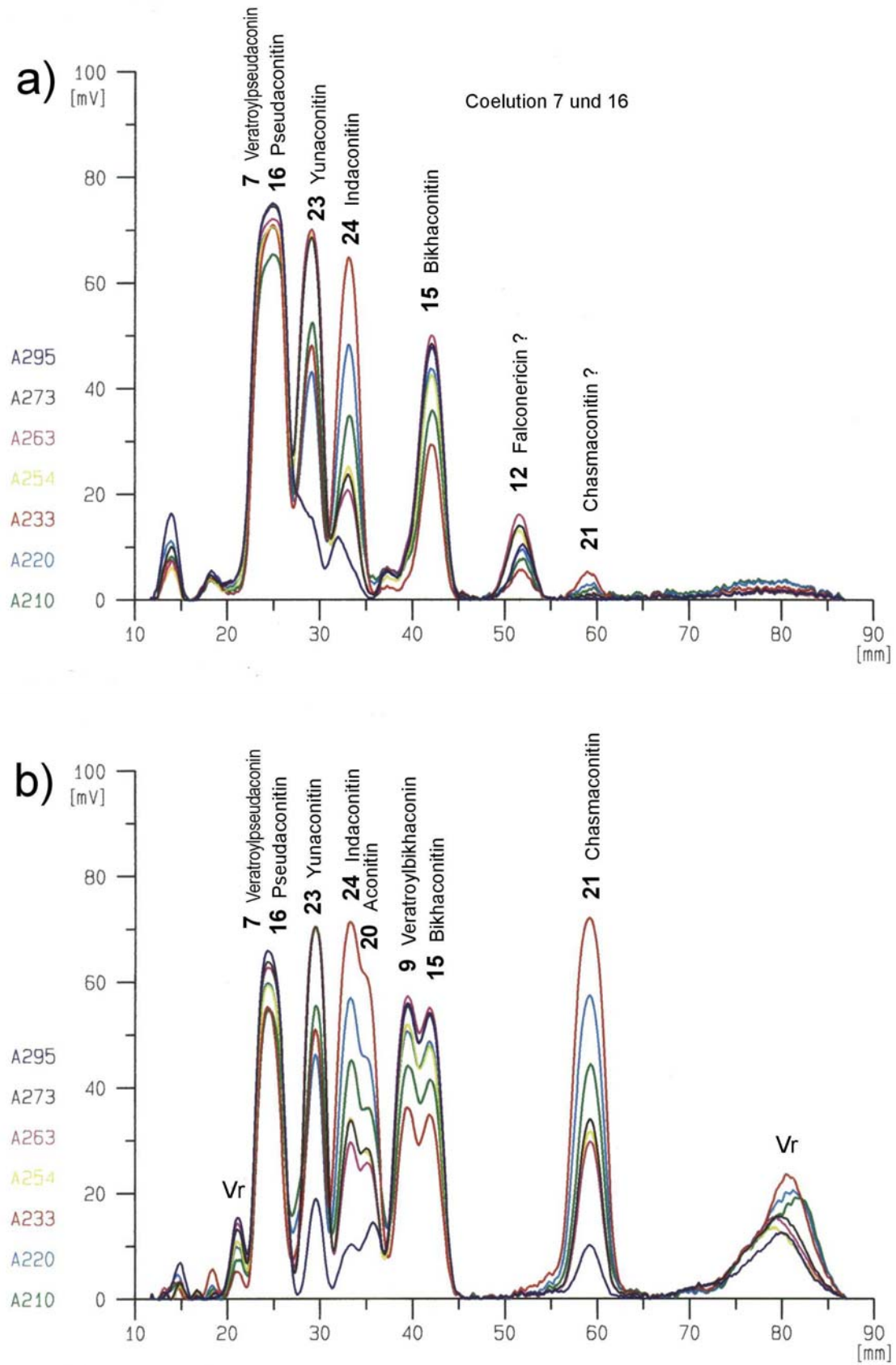


Abbildung 14: DC-Trennung III in MWL-Darstellung

a) Probe AcK_{Del}_3; b) Mischung der Referenzsubstanzen; Legende siehe Tabelle 30

B.5.3.2 Mit DC identifizierte sowie tentativ identifizierte Alkaloide

Die in vier *Aconitum*-Knollenproben mit DC identifizierten und tentativ identifizierten Alkaloide sind in Tabelle 31 zusammengefasst und mit der Literatur verglichen. Die Kriterien zur Identifizierung sind in B.4.5.3.5 angegeben.

Gegenüber der Literatur wurden neu Veratroylpseudaconin (**7**) und Indaconitin (**24**) für *A. falconeri* sowie Bikhaconitin (**15**) und Yunaconitin (**23**) für *A. spicatum* nachgewiesen. Bei *A. violaceum* konnte neu Neolin (**8**) nachgewiesen und **24** nicht aber **15** bestätigt werden.

Tentativ identifiziert wurden beispielsweise die bisher für *A. falconeri* und *A. spicatum* nicht beschriebenen Alkaloide Veratroylbikhaconin (**9**) und Chasmaconitin (**21**). Ebenfalls Falconericin (**17**) wurde tentativ identifiziert, da die Referenzsubstanz nur in den beiden DC-Trennungen IV und V mit der Probe AcK_{Del_3} entwickelt wurde. Ein entsprechendes Signal

Tabelle 31: Mit Dünnschichtchromatographie identifizierte sowie tentativ identifizierte Alkaloide in *Aconitum*-Knollenproben.

Abkürzungen der Proben siehe Tabelle 14, Strukturen der Alkaloide siehe Tabelle 4

Alkaloide #	<i>A. spicatum</i>		<i>A. falconeri</i>			<i>A. violaceum</i>	
	AcK _{Del_1} unbehandelt	Lit.	AcK _{Del_3} unbehandelt	AcK _{Del_p} behandelt	Lit.	AcK _{violac}	Lit.
Veratroylpseudaconin (7)	+		+	ti	X		
Isotalatizidin (6)			ti	ti		ti	
Neolin (8)						+	
Veratroylbikhaconin (9)	ti		ti	ti			
Bikhaconitin (15)	+	X	+	ti			X
Pseudaconitin (16)	+	X	+	ti	X		
Falconericin (17)	ti, F		ti	ti, F	X		
Chasmaconitin (21)	ti		ti	ti		ti	
Yunaconitin (23)	+	X	+	ti			
Indaconitin (24)	+		+	ti	X	+	X

geordnet nach Nummer; + identifiziert; ti tentativ identifiziert; F Kommentar zu Falconericin (**17**) siehe Text; Lit. Literatur; X von den in der Literatur genannten Alkaloide (siehe Tabelle 7) sind hier nur die übereinstimmenden erwähnt.

wurde bereits in den DC-Trennungen I-III dieser und weiterer Knollenproben mit der MWL-Überlagerungsdarstellung detektiert (siehe Tabelle 28, Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14). Da die R_B -Werte dieses Signals in den beiden mit DC-System 1 entwickelten DC-Trennungen I und IV vergleichbar waren, wurde **17** auch für *A. falconeri* und *A. spicatum* als tentativ identifiziert betrachtet.

B.5.3.3 Vergleich der *Aconitum*-Knollenproben AcK_{Del_3} / AcK_{Del_p} und AcK_{Del_1}

Wie aus der Übersicht in Tabelle 31 hervorgeht, wurden in der DC-Untersuchung dieselben Alkaloide in den - unbehandelten und behandelten - Knollen von *A. falconeri* (Knollenproben AcK_{Del_3} und AcK_{Del_p}) sowie von *A. spicatum* (Knollenprobe AcK_{Del_1}) detektiert. Somit konnten diese Arten weder unterschieden werden, noch ein Unterschied bei behandelten *Aconitum*-Knollen nachgewiesen werden.

B.5.3.4 Hinweis auf weitere vorhandene Alkaloide

In den DC-Trennungen der Knollenextrakte traten weiter auch Hinweise auf Alkaloide auf, welche mit den verwendeten Referenzsubstanzen nicht identifiziert werden konnten. Diese DC-Flecken sind in Tabelle 28 nur mit dem R_B -Wert aufgeführt. Solche DC-Flecken wurden einerseits mit Dragendorff als Alkaloide detektiert, andererseits zeigten sich im MWL weitere Hinweise. So wurde z.B. bei der Probe AcK_{Del_3} in der DC-Trennung II eine Signalschulter (R_B -Wert 0.56) sichtbar (siehe Abbildung 13). Diese entspricht in der Überlagerung im MWL dem Esterfunktionstyp I, so dass eine Substanz vermutet wird, welche mit Anissäure verestert ist. Es könnte sich um das Anisoyl-Typ-Alkaloid Deacetylyunaconitin (**11**) handeln, das später mit HPLC-MS in derselben Probe detektiert wurde (siehe C.5.5.3.1).

B.5.4 Isolierte Alkaloide

Aus der Knollenprobe AcK_{Del_2}, welche als *Aconitum falconeri* STAPF identifiziert wurde, wurden sieben Alkaloide isoliert. Tabelle 32 führt diese mit der Art der Identifizierung und im Vergleich zur Literatur auf. Bikhaconitin (**16**) und Yunaconitin (**23**) wurden bisher in der Literatur für *Aconitum falconeri* nicht beschrieben.

Tabelle 32: Isolierte Alkaloide aus AcK_{Del_2} (*Aconitum falconeri*)

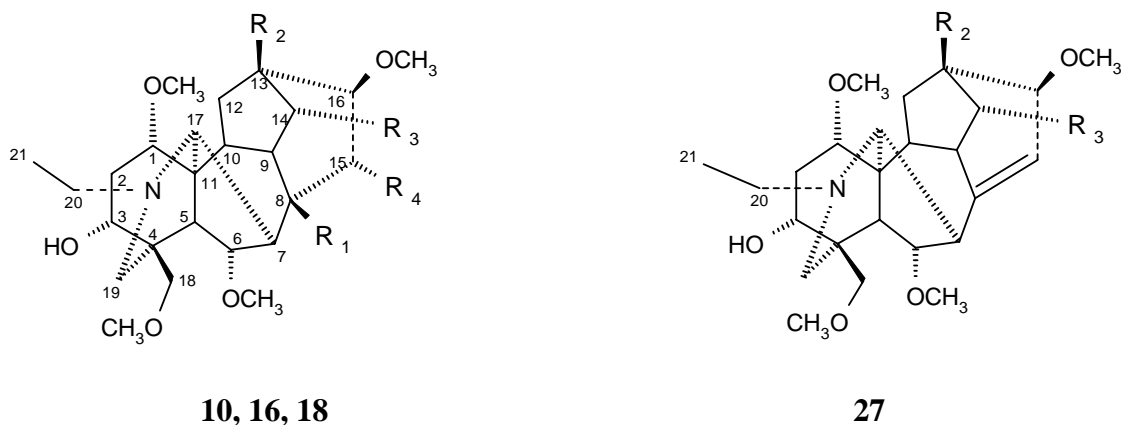
Isolierte Alkaloide	Ausbeute (mg)	Identifizierung mittels	Aus der Literatur für <i>A. falconeri</i> bekannt
Veratrolypseudaconin (7)	7,9	DC*	1
Bikhaconitin (15)	3,5	DC*	---
Pseudaconitin (16)	55	¹ H- und ¹³ C-NMR	1
Falconericin (17)	1,3	DC*	3
8-Acetylfalconerin (18)	1,6	¹ H- und ¹³ C-NMR	2
Indaconitin (24)	4,1	¹ H- und ¹³ C-NMR	1
Yunaconitin (23)	7,8	DC*	---

* identifiziert durch Vergleich mit Referenzsubstanzen in drei DC-Systemen

¹ Pelletier *et al.* (1977a); ² Desai *et al.* (1986); ³ Desai & Pelletier (1989)

B.6 Daten zur ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie

Zur Identitätsbestätigung von einigen isolierten sowie zwei semisynthetisch hergestellten Substanzen wurden ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen, letztere jeweils mit ^1H -Breitband-Entkopplung sowie teilweise mit DEPT-Technik. In Tabelle 33 sind nur die ^{13}C -NMR-Daten von 8-Acetylfalconerin (**18**) und Pseudoaconitin (**16**) angegeben, welche aus AcK_{Del_2} isoliert wurden (siehe B.4.5.4), sowie der semisynthetisch durch Hydro- respektive Pyrolyse hergestellten Alkaloide Ludaconitin (**10**) und Falaconitin (**27**) (siehe C.4.1.2). Die in Tabelle 33 angegebenen Daten der selbst gemessenen ^{13}C -NMR-Spektren stimmten meist gut mit den Literaturdaten überein. Im Folgenden werden Änderungen in der Zuordnung und weitere Unterschiede gegenüber Literatur kommentiert.



Alkaloide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	C(8)	C(13)	C(14)	C(15)
Ludaconitin (10)	OH	OH	OBz	H
Pseudoaconitin (16)	OAc	OH	OVr	H
8-Acetylfalconerin (18)	OAc	H	OVr	H
Falaconitin (27)	-	OH	OVr	-

	Vr = Veratroyl- (R ₁ ' = R ₂ ' = OCH ₃) Bz = Benzoyl- (R ₁ ' = R ₂ ' = H)	Ac = Acetyl-
--	--	--------------

Abbildung 15: Strukturen zu Tabelle 33

Tabelle 33: Chemische Verschiebung* in ¹³C-NMR-Spektren einiger Norditerpenalkaloide im Vergleich mit Literaturwerten

Kohlenstoff [#]	10		16		18		27	
	eM	A	eM	B	eM	C	eM	D
1	82,68	82,67	82,34 ^a	82,33 ^a	83,57	83,5	83,92	83,8
2	33,76	33,74	33,67	33,65	33,46	33,4	*33,39	38,0
3	72,02	72,04	71,64	71,62	71,89	71,6	72,07	71,4
4	43,40	43,40	43,26	43,22	43,17	43,1	44,07	44,0
5	48,09	48,10	48,83	48,69	48,87	48,6	48,16	48,0
6	82,58	82,56	83,19 ^a	83,16 ^a	82,44 ^a	82,4 ^a	83,67	83,7
7	53,54	53,41	47,51	47,33	44,93	44,8	49,82	49,5
8	73,87	73,88	85,56	85,55	85,84	85,8	146,74	146,6
9	48,09	48,10	44,81	44,67	47,11	46,9	48,34	48,2
10	*42,11	42,19	40,91	40,87	43,63	43,5	46,31	46,2
11	50,36	50,36	50,32	50,28	50,53	50,4	51,78	51,6
12	36,07	36,06	35,23	35,19	28,32	28,2	*38,04	33,4
13	76,08	76,09	74,85	74,83	39,37	39,3	77,48	77,4
14	80,33	80,32	78,63	78,61	75,36	75,3	78,17	78,1
15	*42,17	42,12	39,76	39,76	38,27	38,2	116,16	116,1
16	83,23	83,23	83,82	83,77	82,85 ^a	82,8 ^a	83,21	83,1
17	61,84	61,89	61,68	61,70	61,39	61,3	77,97	77,8
18	77,45	77,51	77,24	77,03	77,36	77,0	76,73	76,1
19	47,53	47,54	47,51	47,46	*47,68	48,6	*47,80	49,7
20	48,98	49,01	48,88	48,82	*48,67	47,6	*49,82	47,7
21	13,56	13,56	13,34	13,36	13,30	13,3	13,61	13,5
1'	56,02	56,06	56,05	56,05	55,65	55,6	56,37	56,2
6'	57,55	57,58	57,81	57,81	57,86	57,9	58,12	58,0
16'	58,36	58,36	58,85	58,84	56,65	56,6	57,46	57,3
18'	59,22	59,23	59,17	59,16	59,16	59,1	59,31	59,2
O=C	—	—	169,86	169,87	169,76	169,7	—	—
.....	—	—	—	—	—	—	—	—
CH ₃	—	—	21,68	21,68	21,77	21,7	—	—
Aromatisch:								
C=O	166,82	166,83	165,99	166,00	165,97	165,9	167,68	167,5
1	130,12	130,12	122,78	122,72	123,02	122,9	123,04	122,9
2	129,75	129,77	110,51	110,46	110,46	110,4 ^b	110,36	110,3
3	128,56	128,57	148,78	148,74	148,77	148,7	148,62	148,5
4	133,15	133,18	153,16	153,11	153,08	152,9	153,10	153,0
5	128,56	128,57	112,13	112,03	112,22	112,0 ^b	112,65	112,5
6	129,75	129,77	123,77	123,75	123,70	123,6	124,17	kA
3'	—	—	55,90	55,88	56,04	55,9	56,05	55,9
4'	—	—	55,84	55,88	55,94	56,0	56,05	55,9

* δ in ppm relativ zu TMS; # Numerierung siehe Abbildung 15; eM eigene Messung; kA keine Angabe; **A** Hanuman & Katz (1994a); **B** Hanuman & Katz (1993a); **C** Desai *et al.* (1986); **D** Pelletier *et al.* (1977c); **a** resp. **b** Zuordnung kann innerhalb einer Kolonne ausgetauscht werden (gemäss obigen Arbeiten A und B); * Zuordnungswechsel gegenüber der Literatur siehe auch Kommentar im Text.

Ludaconitin (10)

Bei Hanuman & Katz (1994a) und der eigenen Messung sind C(5) und C(9) bei ^1H -Breitbandentkopplung isochron, während im DEPT 135°-Spektrum zwei sehr nahe gelegene CH-Signale von 48.00 ppm und 48.07 ppm erhalten wurden. Die Zuordnung von C(10) und C(15) wurde gegenüber Hanuman & Katz (1994a) anhand des DEPT 135°-Spektrums umgekehrt: 42,11 ppm konnte als CH₂-Gruppe dem Kohlenstoff C(10) und 42,17 ppm als CH-Gruppe C(15) zugeordnet werden. Das Signal 77,45 ppm für C(18) war im CDCl₃-Triplet gerade noch sichtbar. Im DEPT 135°-Spektrum konnte dieses Signal mit 77.48 ppm als CH₂-Gruppe bestätigt werden und liegt nun nur noch 0,03 ppm unter der Messung von Hanuman & Katz (1994a).

Pseudaconitin (16)

Wegen Überlagerung mit dem CDCl₃-Triplet ist für das Signal 77.24 ppm, welches C(18) zugeordnet wird, eine grössere Abweichung von der Literatur festzustellen, liegt dieses doch 0,21 ppm über den Messung von Hanuman & Katz (1993a) respektive praktisch 1 ppm über 76,2 ppm von Pelletier *et al.* (1977c). Da von **16** nicht zusätzlich ein DEPT-Spektrum aufgenommen wurde, konnte dieser Wert selber nicht weiter überprüft werden. Weiter sind in der eigenen Messung die Signale 48,88 und 48,83 ppm für C(7) und C(19) praktisch isochron, könnten aber mit DEPT-Technik als CH- respektive CH₂-Gruppe unterschieden werden.

8-Acetylfalconerin (18)

Desai *et al.* (1986) geben 48,6 ppm als isochrones Signal von C(5) und C(19) an. In der eigenen Messung wurden zwei Signale erhalten, wobei mit Hilfe des DEPT 135°-Spektrums 48,87 ppm C(5) als CH-Gruppe zugeordnet werden konnte. Dagegen steht das zweite Signal 48,67 ppm für eine CH₂-Gruppe, welche jedoch C(20) zugeordnet wird. Dies erfolgt analog

zur Interpretation von Hanuman & Katz (1993a) bei Pseudaconitin (**16**). Das Signal C(18) konnte in der eigenen Messung wegen Überschneidung mit dem CDCl_3 -Triplet erst im DEPT 135°-Spektrum als CH_2 -Gruppe bei 77,36 ppm detektiert werden, während Desai *et al.* (1986) 77,0 ppm angeben. Die Signale für die beiden aromatischen Methylgruppen wurden analog zu den Veratroyl-Estern **7**, **9**, **15** und **16** gemäss Hanuman & Katz (1993a) zugeordnet und sind somit gegenüber Desai *et al.* (1986) umgekehrt.

Falaconitin (27)

Die Signale für C(2) und C(12) sowie für C(19) und C(20) wurden in Anlehnung an Hanuman & Katz (1993a) respektive Hanuman & Katz (1994a) analog zu **10** und **16** zugeordnet und sind somit gegenüber Pelletier *et al.* (1977c) umgekehrt. Für die aromatischen C-Atome 1'' bis 6'' werden bei Pelletier *et al.* (1977c) nur fünf nicht zugeordnete Werte angegeben, welche hier analog zu Pseudaconitin (**16**) gemäss Hanuman & Katz (1993a) aufgeführt wurden.

B.7 Schlussfolgerungen zur DC-Untersuchung

Mit der einfach durchzuführenden Dünnschichtchromatographie und DC-Scanner-Detektion war es möglich, die Extrakte der Knollenproben AcK_{Del_1}, AcK_{Del_3} und AcK_{Del_p} zu trennen und die Hauptalkaloide im Vergleich mit Referenzsubstanzen zu identifizieren. Die Methode eignet sich auch für Routineuntersuchungen.

Trotz der mit Dünnschichtchromatographie erhaltenen Resultate waren die Trennungs- und Detektionsmöglichkeiten beschränkt. Insbesondere für Alkamine sowie sämtliche Pillenproben und die Knollenprobe AcK_{violac} wurde keine zufriedenstellende Detektion mit MWL erreicht. Die verfügbaren Extraktmengen dieser Proben waren zudem zu gering für weitere DC-Untersuchungen. Aus diesen Gründen wurden diese Extrakte mit HPLC-MS untersucht, womit auch kleine Probenmengen aufgetrennt und spezifisch detektiert werden können.

C HPLC-MSⁿ zum Nachweis von Norditerpenalkaloiden

C.1 Einleitung

Pflanzliche Extrakte sind typischerweise Vielstoffgemische. Ebenso enthalten die Alkaloidextrakte aus *Aconitum*-Arten eine Vielzahl von Diterpenalkaloiden. Meistens werden Substanzen zur Strukturaufklärung mit spektroskopischen Methoden präparativ isoliert, was jedoch bei geringen Probenmengen nicht möglich ist. In der vorangehenden DC-Untersuchung wurden einige wichtige Norditerpenalkaloide in Extrakten aus *Aconitum*-Knollen anhand von Referenzsubstanzen identifiziert. Ohne Referenzsubstanzen konnten weitere Substanzen dagegen nicht identifiziert werden. Zudem war die Trennleistung der DC sowie die Detektion beispielsweise der UV-inaktiven Alkamine begrenzt.

C.2 Ziel

HPLC-MS soll zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von Norditerpenalkaloiden in Extrakten von indischen *Aconitum*-Arten und Byu-Dmar-Pillen eingesetzt werden. Zur Identifizierung sollen die Möglichkeiten der Strukturaufklärung mit MSⁿ untersucht werden.

C.3 Begründung

Bei der Kopplung der sehr effizienten HPLC-Trennung mit den Detektionsmöglichkeiten der multiplen Massenspektrometrie handelt es sich um die modernste Analysetechnik zur Untersuchung von nichtflüchtigen Substanzen auch im Spurenbereich. Norditerpenalkaloide sind Basen und als protonierte Moleküle ionisiert für die Massenspektrometrie geeignet.

C.4 Material und Methoden

C.4.1 Referenzsubstanzen

Insgesamt wurden für HPLC-Trennungen zwanzig Referenzsubstanzen eingesetzt, wobei fünfzehn für die Trennung mit Trennsystem 1 und achtzehn mit Trennsystem 2 untersucht wurden.

C.4.1.1 Auswahl der Referenzsubstanzen

Als Referenzsubstanzen für die HPLC-Trennungen wurden einerseits diejenigen Mono- und Diesteralkaloide eingesetzt, welche in der vorangehenden DC-Untersuchung in den *Aconitum*-Knollenproben entweder identifiziert oder tentativ identifiziert werden konnten (siehe B.5.3.2). Es handelt sich um Veratroylpseudaconin (**7**), Veratroylbikhaconin (**9**), Bikhaconitin (**15**), Pseudaconitin (**16**), Falconericin (**17**), Yunaconitin (**23**), Indaconitin (**24**) und Chasmaconitin (**21**). Zum Vergleich diente weiter Aconitin (**20**) aus der europäischen Art *Aconitum napellus*. Ausserdem wurden Pseudaconin (**1**), Bikhaconin (**2**), Senbusin A (**4**), Karakolin (**5**), Isotalatizidin (**6**) und Neolin (**8**) als Alkamine ausgewählt, da diese unveresterten Alkaloide in der DC-Untersuchung generell schwierig detektiert und identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurden Ludacontin (**10**), 8-Deacetylyunaconitin (**11**), 8-Acetylfalconerin (**18**), Crassicaulin A (**22**) und Falaconitin (**27**) eingesetzt, welche zuvor in Proben mit Trennsystem 1 und MSⁿ-Spektren tentativ identifiziert wurden. Hierfür wurde **10** durch Hydrolyse aus Indaconitin (**24**) und **27** durch Pyrolyse aus Pseudaconitin (**16**) hergestellt (siehe C.4.1.2) sowie **18** aus der Knollenprobe AcK_{Del_2} isoliert (siehe B.4.5.4). Die verwendeten Referenzsubstanzen wurden mit Ausnahme von **10**, **16**, **18**, und **27** durch die Gruppe von Dr. A. Katz, Laboratorium für Naturstoff-Forschung in Basel isoliert und mir zur

Verfügung gestellt. Die Reinheit der Referenzsubstanzen wurde jeweils mit DC und DC-Scanner-Detektion, dann mit HPLC-MS unter Verwendung von Trennsystem 1 überprüft.

C.4.1.2 Semisynthese von Ludaconitin und Falaconitin

Ludaconitin (**10**) und Falaconitin (**27**) wurden semisynthetisch hergestellt, um sie als Referenzsubstanzen einsetzen zu können. Die zur präparativen Reinigung eingesetzten DC-Systeme sind in B.4.5.3 beschrieben. Die Identität wurde jeweils mit ^{13}C -NMR bestätigt. Die zugehörigen Daten sind unter B.6 zu finden.

Teilhydrolyse von Indaconitin (24) zu Ludaconitin (10)

Als Ausgangsmaterial wurde Indaconitin (**24**) von Hanuman & Katz (1994a) verwendet und mit dem DC-System 1 nachgereinigt. 8,4 mg hiervon wurden nach der Methode von Mori *et al.* (1989) mit 1,5 ml Dioxan und 1,5 ml H₂O während 4 h am Rückfluss erhitzt. Nach Trennen mit dem DC-System 1 wurde neben restlichem **24** (1,2 mg) die Hauptbande (6,6 mg) als die gesuchte Deacetylverbindung Ludaconitin (**10**) erhalten.

Pyrolyse von Pseudaconitin (16) zu Falaconitin (27)

Von Hanuman & Katz (1993b) isoliertes Pseudaconitin (**16**) wurde eingesetzt und mit dem DC-System 2 nachgereinigt. 11 mg hiervon wurden in mehreren Portionen zwischen zwei Deckgläsern auf dem Koflerblock bis zum Schmelzen auf 195-200 °C erhitzt. Die Temperatur wurde während 5 min weiter zwischen 203-215 °C gehalten. Beim Schmelzen bildeten sich Bläschen, was als Austritt von Essigsäure interpretiert wurde. Das Pyrolyseprodukt wurde präparativ zweimal mit DC-System 1 mit je zwei Entwicklungen und anschliessend mit DC-System 5 gereinigt. Aus der gegenüber Pseudaconitin (**16**) apolareren Bande wurden 4,3 mg Falaconitin (**27**) gewonnen.

C.4.2 Chemikalien

Als organische Lösungsmittel wurden Methanol pestipur (SDS, Peypin, France) und Acetonitril grade “far UV 90” (Romil, Cambridge, GB) eingesetzt. Das Wasser für die HPLC wurde aus einer „Elgastat maxima HPLC“-Wasserdeionisationsanlage (Elga Ltd., Bucks, GB) erhalten und hatte einen totalen organischen Kohlenstoffgehalt < 2 ppb. Ammoniumacetat reinst (Merck, Darmstadt, D) wurde zur Pufferung verwendet. Als Gase wurden für die HPLC-MS Helium und Stickstoff je mit 99,999 % Reinheit (beide Carbagas, CH) eingesetzt, ersteres auch zum Entgasen der Lösungsmittel. Reserpin (Sigma, Lot. 33H1198) wurde als interner Standard für die Quantifizierung eingesetzt (Struktur siehe Abbildung 16).

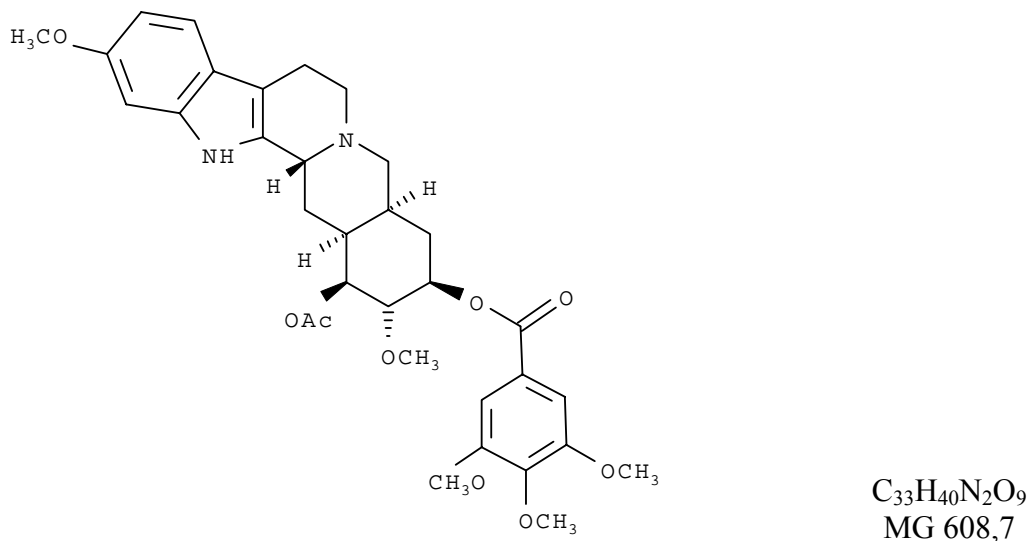


Abbildung 16: Struktur von Reserpin

C.4.3 Proben

Wie in der vorangehenden DC-Untersuchung wurden von den *Aconitum*-Knollen die vier Proben AcK_{violac}, AcK_{Del_1}, AcK_{Del_3}, AcK_{Del_p} und von den tibetischen Juwelenpillen die neun Proben Pill_{Del_92}, Pill_{Del_93}, Pill_{Del_94}, Pill_{Del_95}, Pill_{Dhr}, Pill_{Kat}, Pill_{Lad}, Pill_{Leh}, Pill_{Lha} untersucht. Daher wird hier für deren Herkunft, Beschreibung und Extraktion auf das Kapitel

B.4.3 verwiesen und auf Tabelle 14, welche eine Übersicht zu allen Proben und den verwendeten Abkürzungen gibt.

Von den *Aconitum*-Knollenproben wurde jeweils der Alkaloidextrakt **R pH 9** (siehe Tabelle 20) und von den tibetischen Juwelenpillen jeweils der Alkaloidextrakt **R pH 12** (siehe Tabelle 21) untersucht.

C.4.4 Geräte

Zur Einwaage von μg -Mengen von Referenzsubstanzen und Extrakten zur Herstellung der Standardlösungen wurde eine Microwaage M3 (Mettler, Zürich, CH) verwendet. Die Abmessung der Volumina für die Herstellung der Lösungen von Standards und Proben wurden mit Hamilton-Spritzen abgemessen. Proben wurden vor der Messung durch eine Polyesterfiltermembran (Chromafil PES-20/15, Macherey & Nagel, Oensingen, CH) filtriert. Der Schmelzpunkt für die Pyrolyse von Pseudoaconitin (**16**) wurde mit dem Koflerblock gemessen und ist nicht korrigiert. Die Massenspektren wurden am Departement Chemie, organische-analytische Chemie, Universität Basel von Herrn S. Kölliker auf folgender HPLC-MS-Instrumentierung aufgenommen. Der HPLC-Teil bestand aus einer binären Niederdruck-Pumpe (Rheos 4000, Flux Instruments, Basel, CH) und den unten angegebenen Säulen. Die Proben wurden mit einem Valco Cheminert Ventil injiziert, welches mit einer 5 μl -Stahlkapillarschleife mit 0,25 mm ID ausgerüstet war. Die Trennung erfolgte über eine mit hohem C-Gehalt C_{18} -polymerbelegte Phase (Nucleosil, 100 Å Porengrösse, Macherey & Nagel, Oensingen, CH), welche mit folgenden Varianten verwendet wurde:

- Säule I (5 μm Partikel, 250 mm Länge, 3 mm ID)
- Säule II (3 μm Partikel, 125 mm Länge, 3 mm ID)
- Vorsäule (5 μm Partikel, 8 mm Länge, 3 mm ID)

Der HPLC-Teil war mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ, Finnigan MAT, San José, California, USA) über dessen Atmosphärendruck-Ionenquellen APCI und ESI im Positivionenmodus gekoppelt.

C.4.5 Methoden

C.4.5.1 HPLC-Trennung und Detektion (multiple MS)

C.4.5.1.1 Trennsysteme

Mit Hilfe von Herrn S. Kölliker wurden am Departement Chemie, organische-analytische Chemie, Universität Basel die Trennsysteme entwickelt und die Trennungen aufgenommen.

Das Trennsystem 1 bestand aus Säule I mit Vorsäule und dem Gradienten 1. Die totale Chromatographiedauer betrug 30 min. Der Gradient 1 ging von MeOH / 0,01 M Ammoniumacetat (4+6 Volumenteile) aus und wurde linear innerhalb 20 min nach 90 % MeOH gefahren. Anschliessend wurde während 10 min isokratisch mit 100 % MeOH chromatographiert. Der Fluss war 500 µl/min.

Für das Trennsystem 2 wurden Vorsäule, Säule II und Säule I nacheinander geschaltet und mit dem Gradienten 2 eluiert. Die totale Chromatographiedauer betrug 60 min. Der Gradient 2 verlief linear von 40% MeOH auf 95 % MeOH während 40 min mit 0,05 M Ammoniumacetat als wässriger Phase. Anschliessend wurde während 20 min isokratisch mit 95% MeOH eluiert. Der Fluss war 300 µl/min.

Die Säulen wurden jeweils mit der Startzusammensetzung der mobilen Phase während 15 min äquilibriert.

C.4.5.1.2 HPLC-Trennungen

Tabelle 34 gibt eine Übersicht über die mit HPLC getrennten Proben mit Angabe der verwendeten Referenzsubstanzen, Standards und Trennsysteme. Weiter wird angegeben, ob zur Detektion Basisionenchromatogramme oder MSⁿ-Spektren aufgenommen wurden. In HPLC-Trennung I wurde pro Referenzsubstanz je ca. 40 ng injiziert, von den Proben je ca. 1 µg. Für HPLC-Trennung II sind letztere Angaben unter C.4.5.2.2 resp. C.4.5.2.3 zu finden.

C.4.5.1.3 Standards

Die Referenzsubstanzen wurden jeweils als Mischungen in vier Standards gelöst eingesetzt. Die jeweils enthaltenen Referenzsubstanzen sind in Tabelle 34 ersichtlich. Standard I enthielt die Alkaloide Veratroylpseudaconin (**7**), Veratroylbikhaconin (**9**), II und III aufgeteilt, wie in Tabelle 34 ersichtlich ist. Die Standards I bis III enthielten pro Alkaloid je ca. 20 ng/µl in Methanol gelöst. Vor der Untersuchung wurden die Standards I bis III frisch mit Wasser 1+1 zu den entsprechenden Messlösungen I bis III verdünnt, je mit einer Konzentration von ca. 10 ng/µl des einzelnen Alkaloids. Standard IV enthielt achtzehn Referenzsubstanzen und diente auch für die Quantifizierung (siehe C.4.5.2.2).

Tabelle 34: Übersicht über die HPLC-Trennungen mit verwendeten Trennsystemen, Referenzsubstanzen, Standards und untersuchten Proben.

HPLC-Trennung Trennsystem *	I 1	II 2
Referenzsubstanzen **	in Standard #	in Standard #
Pseudoaconin (1)	+ III	+ IV
Bikhaconin (2)	+ III	+ IV
Senbusin A (4)	+ II, III	
Karakolin (5)	+ III	
Isotalatizidin (6)	+ II, III	+ IV
Veratroylpseudoaconin (7)	+ I	+ IV
Neolin (8)	+ II, III	+ IV
Veratroylbikhaconin (9)	+ I	+ IV
Ludaconitin (10)		+ IV
8-Deacetylyunaconitin (11)		+ IV
Bikhaconitin (15)	+ I	+ IV
Pseudoaconitin (16)	+ I	+ IV
Falconericin (17)	+ II, III	+ IV
8-Acetylfalconerin (18)		+ IV
Aconitin (20)	+ I	+ IV
Chasmaconitin (21)	+ II, III	+ IV
Crassicaulin A (22)		+ IV
Yunaconitin (23)	+ I	+ IV
Indaconitin (24)	+ I	+ IV
Falaconitin (27)		+ IV
Untersuchte Proben	Detektion	Detektion
AcK_{Del_1}		+ B
AcK_{Del_2}		+ B
AcK_{Del_3}	+ B, MS ⁿ	+ B, MS ⁿ
AcK_{Del_p}		+ B
AcK_{violac}		+ B, MS ⁿ
Pill_{Del_92}		+ B
Pill_{Del_93}		+ B
Pill_{Del_94}	+ B	+ B, MS ⁿ
Pill_{Del_95}		+ B
Pill_{Dhr}	+ B	+ B
Pill_{Kat}	+ B, MS ⁿ	+ B
Pill_{Lad}		+ B
Pill_{Leh}		+ B
Pill_{Lha}		+ B

* siehe C.4.5.1.1; ** siehe C.4.1.1; + eingesetzte Referenzsubstanz resp. detektierte Alkaloide; # Standards I-IV (siehe C.4.5.1.3): Aufnahme jeweils von B und MSⁿ; B Basisenchromatogramm; MSⁿ MS²- und MS³-Spektren.

C.4.5.1.4 Atmosphärendruck-Ionisierung

Für die Aufnahme von Basisionenchromatogrammen und MSⁿ-Spektren erfolgte die Ionisierung mit ESI im Positivionenmodus bei einer Spray-Spannung von 4 kV und einer Kapillarentemperatur von 240 °C. Der Schiessgassfluss betrug 20 willkürliche Einheiten.

Für die Quantifizierung wurde mit APCI im Positivionenmodus ionisiert, wobei die Verdampfer Temperatur 350 °C, die Kapillarentemperatur 150 °C und der Ionisationsstrom 5 µA betrug. Der Schiessgassfluss betrug 20 willkürliche Einheiten. Es wurden Basisionenchromatogramme im Massenbereich 300-1000 u aufgenommen.

C.4.5.1.5 Multiple Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung

Zur Aufnahme von MSⁿ-Spektren wurden MSⁿ-Experimente mit Ionenfallen-CID nach Elektrospray-Ionisation im Positivionenmodus durchgeführt. Referenzsubstanzen wurden einerseits einzeln zu ca. 0,1 µg in 2 µl Methanol/Wasser (1+1) einem Fluss von 100 µl/min direkt über die Spritzenpumpe injiziert. Die Kollisionsenergie betrug 35 %. Andererseits wurden MSⁿ-Spektren (bis n=3) nach HPLC-Trennung von Standards und Proben „on-line“ aufgenommen. Die Kollisionsenergie lag bei Kopplung mit Trennsystem 1 zwischen 0 und 20 min bei 35 % und wurde ab 20 min auf 45 % erhöht, während sie bei Kopplung mit Trennsystem 2 während der ganzen Chromatographiedauer bei 35 % konstant gehalten wurde. Zur automatischen Fragmentierung wurde das jeweilige Basision ausgewählt. So wurde das im MS Full Scan als [M+H]⁺ erhaltene Basision im MS²-Experiment fragmentiert und das so erhaltene MS²-Basision im MS³-Experiment weiter fragmentiert.

C.4.5.2 Quantifizierung

Für die Quantifizierung wurden achtzehn Referenzsubstanzen ausgewählt und als Standard IV eingesetzt (siehe C.4.5.1.3). Die daraus hergestellte Kalibrierreihe und die Probenmesslösungen enthielten Reserpin als internen Standard und wurden mit Trennsystem 2 getrennt. Es wurde APCI im Positivionenmodus verwendet. Von jeder Referenzsubstanz wurde der Ansprechfaktor berechnet und damit die entsprechenden Substanzen in den Proben quantifiziert.

C.4.5.2.1 Reserpin als interner Standard und Herstellung der ISTD-Lösung

Das Indolalkaloid Reserpin aus *Rauwolfia serpentina*, welches als Testsubstanz zur Kontrolle der Empfindlichkeit des Ionenfallen-Massenspektrometers (Finnigan MAT, 1996) sowie zur Optimierung verschiedener experimenteller Parameter wie Verdampfer Temperatur oder Kapillarspannung (Zhou & Hamburger, 1996) bekannt ist, wurde hier als interner Standard eingesetzt, um Detektions-Schwankungen während der Messzeit in der Berechnung ausgleichen zu können. Lösungen in Ethanol sowie Wasser bei pH 3–4 sind stabil (Roth *et al.*, 1990). Zur Herstellung der ISTD-Lösung wurden 631 µg Reserpin in 6,30 ml Methanol / Essigsäure 1 % (3+7) gelöst, was einer Konzentration von 100 µg/ml entspricht.

C.4.5.2.2 Herstellung von Standard IV mit Verdünnungs- und der Kalibrierreihe

Zur Herstellung von Standard IV wurde von jeder der achtzehn Referenzsubstanzen (siehe Tabelle 34) je ca. 40 µg eingewogen und gemeinsam in 400 µl Acetonitril gelöst, was einer Konzentration von ca. 100 ng/µl pro Alkaloid entspricht. Ausgehend von Standard IV wurde eine Verdünnungsreihe mit vier Verdünnungslösungen (Vd-1 bis Vd-4) durch schrittweise

Verdünnung mit Acetonitril hergestellt, was den Standard IV eingeschlossen fünf Konzentrationen entsprechend ca. 100, 20, 5, 1 und 0,2 ng/µl pro Alkaloid ergab.

Frisch vor der Messung wurde die Kalibrierreihe mit sechs Kalibrierlösungen (KL-1 bis KL-6) aus Standard IV und den Lösungen der Verdünnungsreihe hergestellt. Jeweils 100 µl einer Lösung der Verdünnungsreihe, 100 µl ISTD-Lösung und 300 µl Wasser wurden gemischt. Für die schwächste Konzentrationsstufe Kalibrierlösung KL-6 wurden nur 20 µl Vd-4 verwendet, welche mit 80 µl Acetonitril ergänzt wurden. Die Blindlösung bestand aus 100 µl Acetonitril, 100 µl ISTD-Lösung und 300 µl Wasser. Bei der Messung der Kalibrierreihe wurde zuerst die Blindlösung, dann die Kalibrierlösungen in steigender Konzentrationfolge entsprechend ca. 0,04 bis 100 ng/5 µl injiziert. Die genauen Einwaagen der einzelnen Referenzsubstanzen sowie die in der Verdünnungs- und Kalibrierreihe resultierenden Konzentrationen sind in D.1.1 angegeben.

C.4.5.2.3 Probenlösungen

Von jeden Alkaloidextrakten der Knollen- und Pillenproben wurde jeweils eine Stammlösung hergestellt. Hierfür wurde je ca. 100 bis 500 µg Extrakt mit 500 µl Acetonitril versetzt und zur raschen Auflösung 3 min ins Ultraschallbad gestellt. Analog zur Herstellung der Kalibrierreihe wurden die Messlösungen aus 100 µl Stammlösung, 100 µl ISTD-Lösung mit 300 µl Wasser hergestellt. Zur Entfernung von Schwebestoffen wurden die Messlösungen vor der Messung durch eine Polyesterfiltermembran filtriert. D.1.2 gibt eine Übersicht über Alkaloidextrakte und deren Konzentration in den Stamm- und Messlösungen.

C.4.5.2.4 Identifizierung und Integration der Signale

Die automatische Signalidentifizierung erfolgte anhand des protonierten Moleküliions $[M+H]^+$, welches ausser bei Falaconitin (**27**) das Basisions darstellte. Die Retentionszeiten wurden am Signalmaximum gemessen und zur erwarteten Retentionszeit ein Fenster von ± 20 sec für die Kalibrierreihe und ± 25 -35 sec für die Proben festgelegt. Von den so identifizierten Signalen wurde ebenfalls automatisch die Signalflächen integriert mit den Vorgaben „Valley Detection“ und „5 smoothing points“. Es wurde anschliessend kontrolliert, ob Signalanfang und -ende jeweils korrekt erkannt wurde. Die Retentionszeiten und Signalflächen der Kalibrierreihe respektive der Proben sind unter D.1.1 resp. D.1.2 zu finden. Die mittlere Standardabweichung der Retentionszeiten war bei den untersuchten Proben mit 1,1 % (bei bis zu 14 Durchgängen) doppelt so gross, als bei Aufnahme der Kalibrierreihe mit 0,6 % (bei 6 Durchgängen).

C.4.5.2.5 Berechnung der Kalibriergeraden und Ansprechfaktoren

Nach dem internen Standardverfahren wurde das Flächenverhältnis **R** gemäss (Gl. 1) durch Bezug der Signalflächen auf die Fläche des Internen Standards (Reserpin) berechnet.

$$R = \frac{\text{Fläche}_{\text{Alkaloid}}}{\text{Fläche}_{\text{ISTD}}} \quad (\text{Gl. 1})$$

Mit Ausnahme der vier Messungen von Kalibrierlösung KL-2 konnte pro Kalibrierlösung nur ein Messpunkt aufgenommen werden. Daher ist es bei der Beschreibung der Kalibriergeraden nicht sinnvoll, zusätzlich zur Steigung **m** den Achsenabschnitt **b** als weitere Variable einzubeziehen, also die Geradenfunktion $y = mx + b$ als Modell anzunehmen. Vielmehr wurde **b = 0** gesetzt und so die Geradengleichung auf $y = \mathbf{m}\mathbf{x}$ vereinfacht. Hiermit werden alle

Tabelle 35: Steigung m der Kalibriergeraden $y = mx$ für 18 Norditerpenalkaloide, Verwendbarkeit für die Quantifizierung sowie Angabe von mittleren Ansprechfaktoren für Alkamine, Mono- und Diesteralkaloide

No.	Referenzsubstanzen	m	S_{rel}^*	S_{rel}^{**}	Verwendet für Quantifizierung (siehe C.5.3)
			%	%	
Alkamine					
1	Pseudoaconin	0,094	28,4		-
2	Bikhaconin	0,104	34,6		-
6	Isotalatizidin	0,046	11,8		-
8	Neolin	0,136	9,5		+
	<i>mittlerer Ansprechfaktor Alkamine</i>	<i>0,095</i>		<i>39</i>	
Monoesteralkaloide					
7	Veratroylpseudoaconin	0,148	14,4		+
9	Veratroylbikhaconin	0,116	10,4		+
10	Ludaconitin	0,205	8,7		+
11	8-Deacetylyunaconitin	0,144	9,2		+
	<i>mittlerer Ansprechfaktor Monoesteralkaloide</i>	<i>0,153</i>		<i>24</i>	
Diesteralkaloide					
15	Bikhaconitin	0,316	5,3		+
16	Pseudoaconitin	0,260	8,1		+
17	Falconericin	0,279	7,1		+
18	8-Acetylfalconerin	0,304	4,5		+
20	Aconitin	0,286	4,7		+
21	Chasmaconitin	0,304	6,4		+
22	Crassicaulin A	0,292	9,1		+
23	Yunaconitin	0,301	7,0		+
24	Indaconitin	0,319	6,0		+
	<i>mittlerer Ansprechfaktor Diesteralkaloide</i>	<i>0,296</i>		<i>6</i>	
Pyrodelphinin-Typ-Alkaloide					
27	Falaconitin (als m/z 630: $[M+H]^+$)	0,133	11,2		-

* relative Standardabweichung der einzelnen Wertepaare; ** relative Standardabweichung bei Berechnung des Mittelwerts „mittlerer Ansprechfaktors“ von Vertretern eines Estertyps.

Messwerte gleich gewogen. Die so berechnete jeweilige Steigung m , welche dem Ansprechfaktor entspricht, ist für die einzelnen Referenzsubstanzen in Tabelle 35 angegeben. Zusätzlich wurde für jeden Estertyp ein mittlerer Ansprechfaktor berechnet. Die Rohdaten der injizierten Mengen (x) eines Alkaloids und die Signalflächen sind unter D.1.1 zu finden.

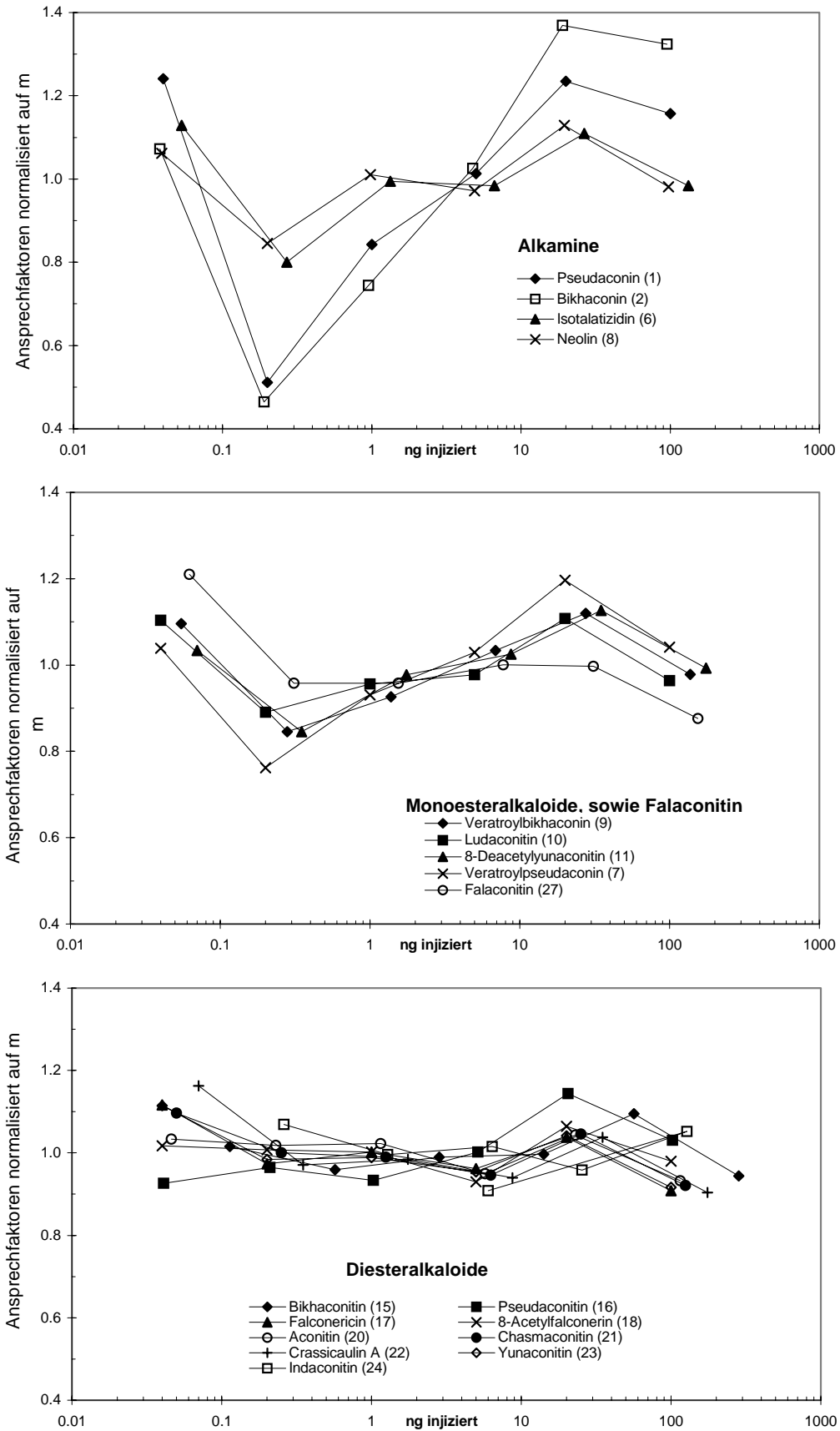


Abbildung 17: Darstellung der Linearität anhand der auf m normalisierten Ansprechfaktoren der Kalibrierreihen der verwendeten Referenzsubstanzen, geordnet nach Veresterungsgrad.

C.4.5.2.6 Berechnung der Alkaloidgehalte in Proben

Ausgehend von der Kalibriergeraden $y = mx$ wurde die in Proben gefundenen Alkaloidmengen in ng / 5 μ l injizierter Messlösung berechnet. Entsprechend Gl. 2 wurde das Flächenverhältnis (siehe Gl.1) durch den jeweiligen in Tabelle 35 angegebenen Ansprechfaktor **m** geteilt.

$$\text{Alkaloid gefunden (ng/ 5 } \mu\text{l)} = \frac{R}{m} \quad (\text{Gl. 2})$$

C.4.5.2.7 Linearität

Die Linearität über den Kalibrierbereich wurde anhand der Abweichung dargestellt, welche die Ansprechfaktoren aus den einzelnen Kalibrierpunkten bezogen auf die Steigung **m** aufwiesen (siehe Abbildung 17).

C.4.5.2.8 Präzision

Zur Überprüfung der Präzision der Messung mit HPLC-MS und APCI wurde die Kalibrierlösung KL-2 als Kontrolle während der dreiwöchigen Messzeit viermal gemessen: Zu Beginn, nach acht Tagen sowie nach zwanzig Tagen am Ende der Messserie als frisch hergestellte Lösung zweimal gemessen. Die ganze Kalibrierreihe konnte dagegen aus zeitlichen Gründen nur einmal zu Beginn der Messperiode aufgenommen werden. Die Präzision der Ansprechfaktoren bei Kalibrierlösung KL-2 über den Zeitraum von drei Wochen war sehr gut (siehe Abbildung 18).

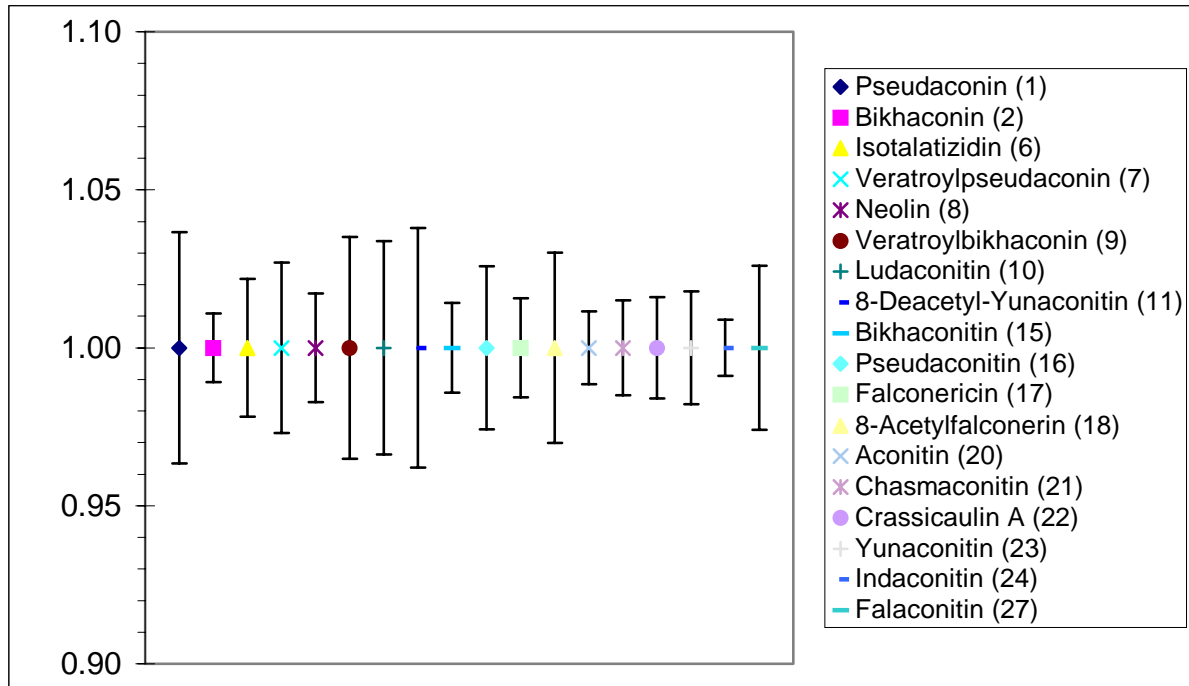


Abbildung 18: Kalibrierlösung KL-2: Ansprechfaktoren der 18 Referenzsubstanzen normalisiert auf den Mittelwert aus vier Messungen über drei Wochen (0, 8, 2x20 Tage), mit relativer Standardabweichung

Bei den untersuchten Proben konnte aus zeitlichen Gründen jeweils nur eine Messung durchgeführt werden, ausser im Fall der Probe AcK_{Del_p} mit zwei Messungen. Bei der Doppelmessung von AcK_{Del_p} wichen die Signalfächen im Mittel um 3 % vom Mittelwert ab. Nach Korrektur mit dem internen Standard war die mittlere Abweichung bei den Flächenverhältnissen auf 1,3 % reduziert.

C.5 Resultate und Diskussion

C.5.1 Ionisierungsmethode und Eignungsabklärung an Modellsubstanzen

Für den Nachweis von Diterpenalkaloiden mit HPLC-MS wurden als Ionisierungsmethoden bisher sowohl APCI als auch ESI eingesetzt (siehe A.7.3.3.3). Um zu entscheiden, welche dieser beiden Ionisierungsmethoden für Norditerpenalkaloide geeigneter ist, wurde mit den Modellsubstanzen Aconitin (**20**) als Diesteralkaloid und dem Alkamin Aconin (**102**) (Struktur siehe Tabelle 5) untersucht.

Bei der Direktinjektion von Aconitin (**20**) in methanolischer Lösung und APCI-Ionisierung (Temperaturen: Verdampfer: 350 °C, Kapillare: 200 °C) wurde neben dem Pseudomolekülion $[M+H]^+$ das Fragment $[M+H-CH_3COOH]^+$ als Basision beobachtet, was auch von Wada *et al.* (1994) beschrieben wurde. Das Alkamin Aconin (**102**) zeigte dagegen mit APCI kaum Fragmentierung.

Mit ESI wurde dagegen von Aconitin (**20**) das Pseudomolekülion $[M+H]^+$ als Basision ohne Fragmentierung erhalten (Bedingungen siehe C.4.5.1). Zudem war die Ionisierungsausbeute höher als bei APCI. Daher wurde die Elektrospray-Ionisierung zur Aufnahme insbesondere der MS^n -Spektren gewählt.

C.5.2 Strukturaufklärung mit multipler Massenspektrometrie

C.5.2.1 Wahl der Basisionen zur MSⁿ-Fragmentierung

Ausgehend von verschiedenen Fragmenten des MS²-Spektrums von Veratroylpseudoaconin (**7**) wurden MS³-Spektren aufgenommen. Es zeigte sich, dass bei der Fragmentierung des MS²-Basisions $[M+H-H_2O-MeOH]^+$ sowie der Fragmente $[M+H-H_2O]^+$ und $[M+H-MeOH]^+$ jeweils MS³-Spektren mit denselben Massen entstanden. Wurde das MS²-Basion und das daraus entstandene MS³-Basion fragmentiert, war die absolute Ionenhäufigkeit der entstehenden Fragmente am höchsten, weshalb dieses Vorgehen gewählt wurde.

C.5.2.2 Relative Intensität der MS²- und MS³-Fragmente

Für die achtzehn Referenzsubstanzen, welche für Trennung 2 verwendet wurden, sowie für Senbusin A (**4**) und Karakolin (**5**) sind die Fragmente der MS²- und MS³-Spektren mit relativer Intensität und Zuordnung in Tabelle 36 und Tabelle 37 dargestellt. Die Alkaloide sind hierbei nach Strukturtyp (gemäss A.3.1.1) und Anzahl funktioneller Gruppen geordnet.

Die MSⁿ-Spektren von Norditerpenalkaloiden des Bikhaconitin- und Pseudoaconitin-Typs enthalten relativ wenige Fragmente, wobei die Abspaltungen gut zugeordnet werden können. Durch zusätzliche Substituenten wie die Hydroxylgruppe an C(15) beim Aconitin-Typ werden die Spektren dagegen komplizierter. Daher soll an Alkaloiden mit geringerem Substitutionsgrad, welche in indischen *Aconitum*-Arten vorkommen, der Einfluss einzelner Substituenten auf das Fragmentierungsverhalten diskutiert werden. Es sollte ausserdem untersucht werden, inwiefern es möglich ist, strukturähnliche Alkaloide anhand von MSⁿ-Spektren unterscheiden zu können.

Tabelle 36: MS²-Spektren von Referenzsubstanzen: Fragmente mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:

No	Referenzsubstanzen	[M+H] ⁺ (m/z)	P ₁ -W	P ₁ -Me	P ₁ -2W	P ₁ -W-Me	P ₁ -3W	P ₁ -A ₁	P ₁ -2Me	P ₁ -2W -Me	P ₁ -W -2Me	P ₁ -3Me	P ₁ -A ₁ -W	P ₁ -A ₁ -Me	P ₁ -A ₁ -W-Me
Pseudaconitin-Typ:															
1	Pseudaconin	484	466 (23)	452 (47)		434 (100)			420 (18)	416 (1)	402 (25)	388 (5)			
7	Veratroylpseudaconin	648	630 (27)	616 (55)		598 (100)			584 (12)		566 (15)	552 (3)			
10	Ludaconitin	588	570 (24)	556 (46)		538 (100)			524 (13)		506 (19)	492 (4)			
11	8-Deacetylyunaconitin	618	600 (25)	586 (52)		568 (100)			554 (13)	550 (1)	536 (17)	522 (3)			
16	Pseudaconitin	690		658 (2)		640 (2)		630 (100)					612 (1)	598 (5)	580 (3)
23	Yunaconitin	660		628 (2)		610 (3)		600 (100)					582 (1)	568 (5)	550 (3)
24	Indaconitin	630		598 (2)		580 (3)		570 (100)					552 (1)	538 (5)	520 (4)
Bikhaconitin-Typ:															
2	Bikhaconin	468		436 (100)		418 (2)			404 (19)		386 (4)	372 (5)			
9	Veratroylbikhaconin	632		600 (100)		582 (1)			568 (15)		550 (3)	536 (3)			
15	Bikhaconitin	674		642 (4)				614 (100)						582 (9)	
21	Chasmaconitin	614		582 (3)				554 (100)						522 (10)	
22	Crassicaulin A	644		612 (5)				584 (100)						552 (11)	
Aconitin-Typ:															
20	Aconitin	646		614 (2)		596 (3)		586 (100)						554 (5)	546 (2)
Isotalatizidin-Typ:															
6	Isotalatizidin	408	390 (100)		372 (8)	358 (5)				340 (3)					
Neolin-Typ:															
4	Senbusin A	424	406 (100)		388 (65)	374 (8)	370 (22)			356 (31)					
8	Neolin	438	420 (100)		402 (4)	388 (37)				370 (10)	356 (10)				
17	Falconericin	658		626 (6)				598 (100)						566 (13)	
18	8-Acetylfalconerin	674		642(2)		624 (3)		614 (100)					596 (2)	582 (7)	564 (3)
Pyrodelphinin-Typ:															
27	Falaconitin	630	612 (10)	598 (100)		580 (92)			566 (12)		548 (8)	534 (1)			
Alkamine (weitere):															
5	Karakolin	378	360 (100)		342 (16)	328 (6)				310 (6)					

P₁: [M+H]⁺; W: 18 u (H₂O); Me: 32 u (MeOH); A₁: 60 u (CH₃COOH) die in MS² von C(8) abgespaltene Säure.

Tabelle 37: MS³-Spektren von Referenzsubstanzen (Teil 1): Fragmente mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:

No	Referenzsubstanzen	P ₂	P ₂ -W	P ₂ -28	P ₂ -Me	P ₂ -W -Me	P ₂ -Me -28	P ₂ -2 Me	P ₂ -W -2 Me	P ₂ -Me -CO-Me	P ₂ -3 Me	P ₂ -3 Me -W
Pseudaconitin-Typ:												
		(<i>m/z</i>)										
1	Pseudaconin	[M+H-W-Me] ⁺	434	416 (2)	402 (100)	384 (6)		370 (22)	352 (7)		338 (6)	320 (4)
7	Veratroylpseudaconin	[M+H-W-Me] ⁺	598	580 (2)	566 (100)	548 (5)		534 (14)	516 (2)		502 (1)	
10	Ludaconitin	[M+H-W-Me] ⁺	538	520 (2)	506 (100)	488 (5)		474 (17)	456 (3)		442 (3)	
11	8-Deacetylyunaconitin	[M+H-W-Me] ⁺	568	550 (2)	536 (100)	518 (6)		504 (16)	486 (2)		472 (2)	
16	Pseudaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	630	612 (10)	598 (100)	580 (94)		566 (12)	548 (7)			516 (2)
23	Yunaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	600	582 (13)	568 (100)	550 (96)		536 (13)	518 (7)		504 (3)	486 (2)
24	Indaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	570	552 (10)	538 (94)	520 (100)		506 (12)	488 (9)		474 (2)	456 (3)
Bikhaconitin-Typ							-28 = et					
2	Bikhaconin	[M+H-Me] ⁺	436	418 (10)	404 (100)	386 (26)	376 (4)*	372 (30)	354 (12)		340 (5)	
9	Veratroylbikhaconin	[M+H-Me] ⁺	600	582 (8)	568 (100)	550 (26)	540 (1)*	536 (22)	518 (4)		504 (2)	
15	Bikhaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	614		582 (100)		554 (2)	550 (5)			518 (1)	
21	Chasmaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	554		522 (100)		494 (2)	490 (6)			458 (2)	
22	Crassicaulin A	[M+H-A ₁] ⁺	584		552 (100)		524 (2)	520 (6)			488 (1)	
Aconitin-Typ:							-28 = CO					
20	Aconitin	[M+H-A ₁] ⁺	586	568 (2)	554 (38)	536 (14)	526 (100)	522 (5)	504 (3)	494 (12)		
Isotalatizidin-Typ:												
6	Isotalatizidin	[M+H-W] ⁺	390	372 (54)	362 (35)	358 (100)	340 (32)		326 (14)			
Neolin-Typ:												
8	Neolin	[M+H-W] ⁺	420	402 (11)	388 (100)	370 (38)		356 (32)	338 (13)		324 (5)	306 (6)
17	Falconericin	[M+H-A ₁] ⁺	598		566 (100)		358 (3)	534 (5)			502 (1)	
18	8-Acetylfalconerin	[M+H-A ₁] ⁺	614	596 (10)	582 (100)	564 (81)		550 (13)	532 (12)			500 (2)
Pyrodelphinin-Typ:												
27	Falaconitin	[M+H-Me] ⁺	598	580 (100)	566 (26)	548 (11)		534 (5)	516 (3)			

P₂: Vorläufer-Ion (Parent Ion) = Basision aus MS²; W: 18 u (H₂O); CO: 28 u (CO); et: 28 u (C₂H₄); Me: 32 u (MeOH); A₁: 60 u (CH₃COOH) die in MS² von C(8) abgespaltene Säure; * stärkeres Signal nach Abspaltung von Δm 26 u.

Table 38: MS³-Spektren von Referenzsubstanzen (Teil 2): Charakteristische Fragmente nach Abspaltung der aromatischen Säure von Mono- und Diesteralkaloiden mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:

No	Referenzsubstanzen	P ₂	X	Y	A ₂ (u)	P ₂ -X -A ₂	P ₂ -X -W-A ₂	P ₂ -X -Me-A ₂	P ₂ -Y -Me-A ₂	P ₂ -X -Me-W -A ₂	P ₂ -X -2 Me -A ₂	P ₂ -Y -2 Me -A ₂	P ₂ -X -2 Me -W-A ₂	P ₂ -X -3 Me -A ₂	P ₂ -X -3 Me -W-A ₂
Pseudaconitin-Typ:															
7	Veratroylpseudaconin	[M+H-W-Me] ⁺	/	/	182	416 (4)		384 (4)		366 (1)	352 (3)		334 (2)	320 (2)	302 (1)
10	Ludaconitin	[M+H-W-Me] ⁺	/	/	122	416 (2)		384 (3)		366 (2)	352 (4)		334 (2)	320 (3)	302 (2)
11	8-Deacetylyunaconitin	[M+H-W-Me] ⁺	/	/	152	416 (4)		384 (5)		366 (2)	352 (3)		334 (2)	320 (2)	302 (1.5)
16	Pseudaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	/	182		398 (1.5)			366 (3)			334 (3)		302 (1.5)
23	Yunaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	/	152		398 (1.5)			366 (3)			334 (4)		302 (1.5)
24	Indaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	/	122		398 (2)			366 (2.5)			334 (3)		302 (1.5)
Bikhaconitin-Typ															
9	Veratroylbikhaconin	[M+H-Me] ⁺	/	W	182	418 (2.5)	400 (2)	386 (11)	368 (9)		354 (5)	336 (5)			
15	Bikhaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	Me	182	400 (9)*			368 (10)*			336 (7)*			
21	Chasmaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	Me	152	400 (10)*			368 (11)*			336 (10)*			
22	Crassicaulin A	[M+H-A ₁] ⁺	Me	Me	122	400 (9)*			368 (11)*			336 (10)*			
Aconitin-Typ:															
20	Aconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me-CO	Me	122	404 (4)		376 (2)	368 (15)						
Neolin-Typ:															
17	Falconericin	[M+H-A ₁] ⁺	/	/	182			384 (2)*			352 (2)*				320 (1)*
18	8-Acetylfalconerin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	Me	182		382 (2)		368 (1)	350 (4)			318 (5)		
Pyrodelphinin-Typ:															
27	Falaconitin	[M+H-Me] ⁺			182		398 (1.5)	384 (0.8)		366 (2.5)	352 (0.8)		334 (2)		

A₁: 60 u (CH₃COOH) die in MS² von C(8) abgespaltene Säure; A₂: in MS³ von C(14) abgespaltene Säure: aromatische Säuren (182 u: Veratrumsäure, 152 u: Anissäure, 122 u: Benzoesäure); CO: 28 u (CO); Me: 32 u (MeOH); W: 18 u (H₂O); P₂: Vorläufer-Ion (Parent Ion) = Basision aus MS²; P₂-X resp. P₂-Y: Fragment vor Abspaltung von A₂; * relative Intensitäten aus MS⁴ übernommen, da im MS³-Spektrum <1%; / keine Abspaltung.

C.5.2.3 Grundsätzliche Kommentare zur Fragmentierung

Für die folgenden Kommentare zur Fragmentierung der untersuchten Referenzsubstanzen wurden die relativen Intensitäten bestimmter Fragmente in den MS²- und MS³-Spektren miteinander verglichen (siehe Tabelle 36 und Tabelle 37).

C.5.2.3.1 Bildung des MS²-Basisions:

In den MS²-Spektren der untersuchten Alkaloide wurden in Bezug auf das MS²-Basion die im Folgenden dargestellten Unterschiede festgestellt.

Diesteralkaloide und C(8)-O-Acetylfunktion

Die hier untersuchten Diesteralkaloide bilden das MS²-Basion durch Verlust von Δm 60 u, was auf die Abspaltung von Essigsäure aus der C(8)-O-Acetylfunktion zu $[M+H-CH_3COOH]^+$ zurückgeführt wird.

Monoesteralkaloide und Alkamine

Bei Alkaloiden ohne C(8)-O-Acetyl-Funktion wird das Basion in den MS²-Spektren folgendermassen gebildet:

- durch Abspaltung von Δm 18 u als Wasser, wenn eine C(1)-Hydroxylgruppe vorhanden ist, wie dies meistens beim Neolin- und Isotalatizidin-Typ der Fall ist (siehe Tabelle 4),
- durch Abspaltung von Δm 32 u als Methanol, wenn keine C(3)-Hydroxylgruppe vorhanden ist, wie beim Bikhaconitin-Typ (siehe Abbildung 3),
- durch kombinierte Abspaltung von Δm 32 u und Δm 18 u als Methanol und Wasser, wenn eine C(3)-Hydroxylgruppe vorhanden ist, wie beim Pseudoaconitin-Typ (siehe Abbildung 3).

Die Bildung des Basisions in MS²-Spektrum wird in Abbildung 19 zusammengefasst mit den daraus erhältlichen Hinweisen auf das Substitutionsmuster von Norditerpenalkaloiden.

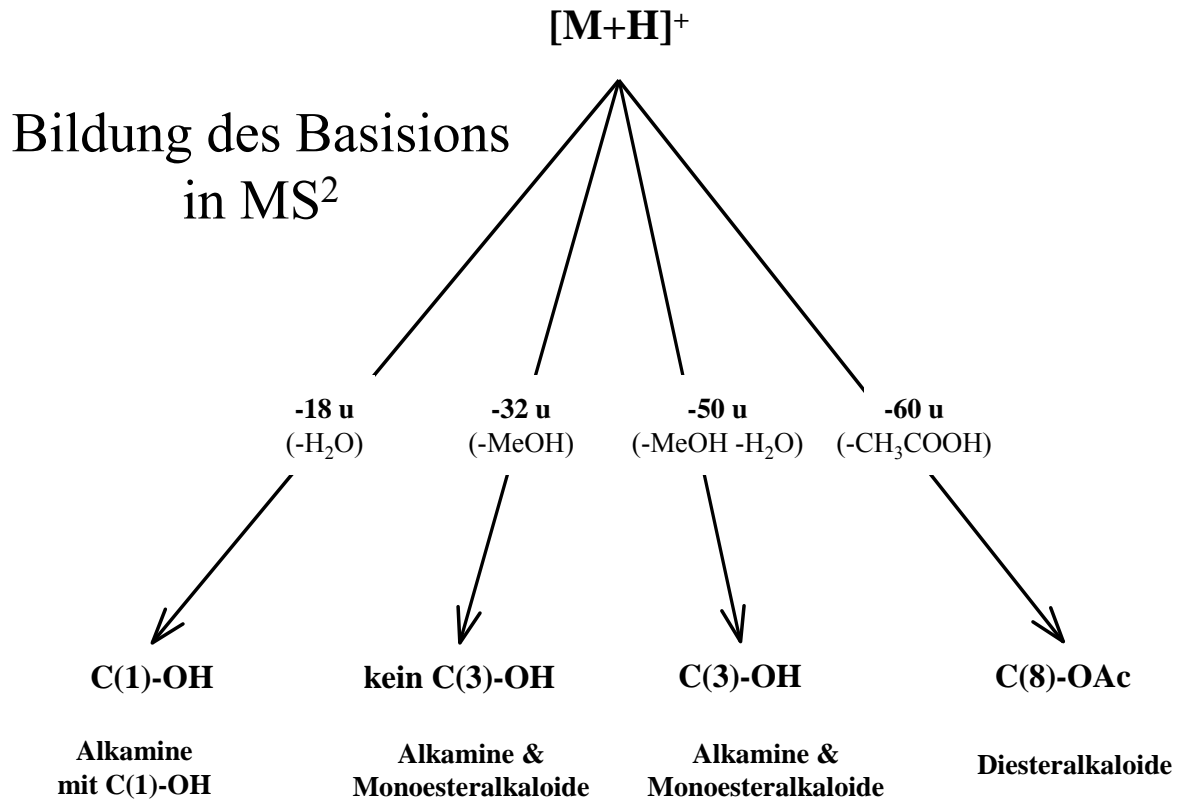


Abbildung 19: Bildung des Basisions in MS² als Hinweise auf das Substitutionsmuster von Norditerpenalkaloiden.

C.5.2.3.2 Position von Hydroxylgruppen

Der Einfluss der Position der verschiedenen Hydroxylgruppen auf die Bildung des Fragments $[M+H-H_2O]^+$ lässt sich anhand der Unterschiede in den Spektren der Alkamine Bikhaconin (**2**) und Pseudaconin (**1**) sowie Isotalatizidin (**6**) und Neolin (**8**) darstellen (siehe Tabelle 39). Weitere Alkaloide mit unterschiedlichem Hydroxylierungsgrad sind dort zum Vergleich ergänzt.

Tabelle 39: Relative Intensität des Fragments $[M+H-H_2O]^+$ in den MS^2 -Spektren und Substitution des Nordditerpenalkaloid-Gerüsts.

Alkaloide [#]	Substitution* Stellung des Substituenten							Rel. Int. von $[M+H-H_2O]^+$
	C(1) α	C(3) β	C(6) α	C(8)	C(13)	C(14) α	C(18)	
Bikhaconitin (15)	OCH ₃	H	OCH ₃	OAc	OH	OVr	OCH ₃	<1
Veratroylbikhaconin (9)	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OH	OVr	OCH ₃	<1
Bikhaconin (2)	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OH	OH	OCH ₃	<1
Pseudoaconitin (16)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OAc	OH	OVr	OCH ₃	1
Veratroylpseudoaconin (7)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OVr	OCH ₃	27
Pseudoaconin (1)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OH	OCH ₃	23
Neolin (8)	OH	H	OCH ₃	OH	H	OH	OCH ₃	100
Isotalatizidin (6)	OH	H	H	OH	H	OH	OCH ₃	100
Karakolin (5)	OH	H	H	OH	H	OH	H	100
Senbusin A (4)	OH	H	OH	OH	H	OH	OCH ₃	100

[#] geordnet nach steigender relativer Intensität von $[M+H-H_2O]^+$; * siehe Abbildung 20; Hydroxylgruppen **fett** hervorgehoben.

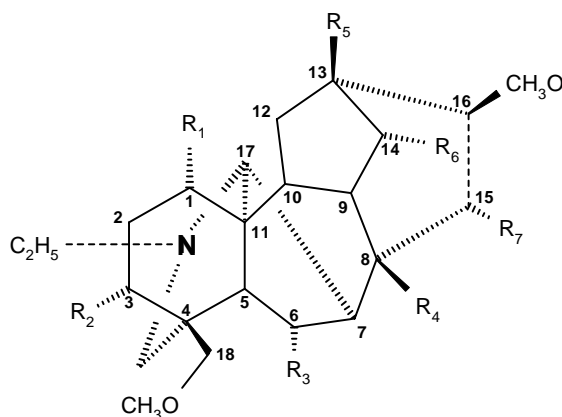


Abbildung 20: Numerierung des Nordditerpenalkaloid-Gerüsts

An der Bildung des Fragments $[M+H-H_2O]^+$ im MS^2 -Spektrum sind weder die beiden tertiären Hydroxylgruppen an C(8) und C(13) noch die sekundäre C(14)-OH-Gruppe beteiligt, wie bei Bikhaconin (2) zu sehen ist (siehe Tabelle 39). Bei einer zusätzlichen sekundären C(3)-OH-Gruppe, wie in 1 und 4, erreicht dieses Fragment relative Intensität von ca. 25 %. Sitzt dagegen die OH-Gruppe am sekundären C(1), wird durch die Wasserabspaltung sogar das Basision gebildet. Sind sowohl die Hydroxylgruppen an C(1) als auch an C(8) vorhanden, kann aus diesem Vergleich geschlossen werden, dass nur die C(1)-OH-Gruppe zur Bildung von $[M+H-H_2O]^+$ beiträgt, was nicht mit der Interpretation von Chen *et al.* (1999)

übereinstimmt, wonach die Bildung von $[M+H-H_2O]^+$ durch Abspaltung der Hydroxylgruppen an C(1) oder C(8) bewirkt wird.

Die C(13)-Hydroxylgruppe, welche bei **1** und **2** vorhanden ist, wird weder im MS²- noch MS³-Experiment abgespalten. Letzteres bestätigt sich auch am Verhalten der Diesteralkaloide **15**, **21** und **22** vom Bikhaconitin-Typ, bei welchen diese C(13)-OH-Gruppe die einzige freie Hydroxylgruppe ist. Insofern entzieht sich diese Hydroxylgruppe der bei Chen *et al.* (1999) beschriebenen Möglichkeit, die Art und Anzahl aller oxygenierter Gruppen mittels MSⁿ bestimmen zu können. Auf die Anwesenheit der C(13)-OH-Gruppe kann nur indirekt geschlossen werden, beispielsweise durch Spektrenvergleich entsprechender sterischer Isomere, wie **15** und **18** (siehe C.5.2.6), oder wenn Verbindungen eine analoge

Tabelle 40: Relative Intensität des Fragments $[M+H-H_2O-MeOH]^+$ in den MS²-Spektren in Abhängigkeit der Substitution:

Alkaloide [#]	Substitution*				Relative Intensität von $[M+H-H_2O-MeOH]^+$
	Stellung des Substituenten				
	C(3) β	C(8)	C(13)	C(15) α	
Falconericin (17)	H	OAc	H	H	<1
Bikhaconitin (15)	H	OAc	OH	H	<1
Chasmaconitin (21)	H	OAc	OH	H	<1
Crassicaulin A (22)	H	OAc	OH	H	<1
8-Acetylfalconerin (18)	OH	OAc	H	H	2,9
Pseudaconitin (16)	OH	OAc	OH	H	2
Yunaconitin (23)	OH	OAc	OH	H	2,5
Indaconitin (24)	OH	OAc	OH	H	2,5
Aconitin (20)	OH	OAc	OH	OH	2,9
Karakolin (5)	H	OH	H	H	6
Senbusin A (4)	H	OH	H	OH	8
Bikhaconin (2)	H	OH	OH	H	2,5
Veratroylbikhaconin (9)	H	OH	OH	H	1
Pseudaconin (1)	OH	OH	OH	H	100
Veratroylpseudaconin (7)	OH	OH	OH	H	100
Ludaconitin (10)	OH	OH	OH	H	100
8-Deacetylyunaconitin (11)	OH	OH	OH	H	100

[#] gruppiert nach Substitution und steigender relativer Intensität von $[M+H-H_2O-MeOH]^+$;

* siehe Abbildung 20; Hydroxylgruppen **fett** hervorgehoben.

Fragmentierung aufweisen, wobei die Massen aber z.B. jeweils um 16 u verschoben sind, wie bei **15** und **17** (siehe Tabelle 36 und Tabelle 37).

Kommen Hydroxylgruppen ausser an C(1) auch an C(6) wie bei Senbusin (**4**) vor, so nimmt auch die Intensität der Fragmente, die durch zwei und drei Wasserabspaltungen gebildet werden sowie von $[M+H-H_2O-MeOH]^+$ (siehe Tabelle 40) bedeutend zu.

Bei den Diesteralkaloiden wird im MS^2 -Spektrum wie erwähnt hauptsächlich Essigsäure abgespalten. Nur Verbindungen mit einer C(3)-OH-Gruppe wie Pseudoaconitin (**16**), zeigen zusätzlich das Fragment $[M+H-H_2O]^+$ mit niedriger Intensität. Im MS^3 -Spektrum dagegen ergibt die Wasserabspaltung Intensitäten des Fragments $[M+H-CH_3COOH-MeOH-H_2O]^+$ von ca. 80-100 %. Bei Diesteralkaloiden ohne C(3)-OH-Gruppe fehlt das letztere Fragment dagegen gänzlich. Beide Diesteralkaloide bilden das Fragment $[M+H-CH_3COOH-MeOH]^+$ als Basision oder mit hoher Intensität >90 %.

Tabelle 41: Relative Intensität des Fragments $[M+H-Essigsäure-H_2O-MeOH]^+$ im MS^3 -Spektrum als Indikator für das Vorhandensein einer C(3)-OH-Gruppe bei Diesteralkaloiden.

Alkaloide	Substitution Stellung des Substituenten				Relative Intensität im MS^3 -Spektrum von: $[M+H-Essigsäure-H_2O-MeOH]^+$
	C(3) β	C(8)	C(13)	C(15) α	
Falconericin (17)	H	OAc	H	H	<1
Bikhaconitin (15)	H	OAc	OH	H	<1
Crassicaulin A (22)	H	OAc	OH	H	<1
Chasmaconitin (21)	H	OAc	OH	H	<1
8-Acetylfalconerin (18)	OH	OAc	H	H	80
Pseudoaconitin (16)	OH	OAc	OH	H	95
Yunaconitin (23)	OH	OAc	OH	H	95
Indaconitin (24)	OH	OAc	OH	H	100
Aconitin (20)*	OH	OAc	OH	OH	15

* hier ist $[M+H-Essigsäure-MeOH-CO]^+$ das Basision; Hydroxylgruppen **fett** hervorgehoben.

C.5.2.3.3 Abspaltung von aromatischen Säuren und charakteristische Fragmente für Pseud- und Bikhaconitin-Typ

Die Abspaltung einer aromatischen Säure an C(14) von Mono- und Diesteralkaloiden wird erst in den MS³-Spektren sichtbar mit einer relativen Intensität <5 %. Werden jedoch weitere MSⁿ-Spektren aufgenommen, so nimmt die relative Intensität dieser Fragmente zu. Je nach aromatischer Säure mit welcher die untersuchten Mono- und Diesteralkaloide verestert sind, wurden in den MS³-Spektren die Abspaltungen von Δm 122 u, 152 u oder 182 u beobachtet. Dies entspricht den abgespaltenen Säuren Benzoe-, Anis- resp. Veratrumsäure. (siehe Tabelle 4 für die Strukturen der Säurereste).

Die Abspaltung der aromatischen Säure ergab wiederkehrende Fragmentsequenzen. Im Falle des Pseudoaconitin-Typs waren dies bei den Diesteralkaloiden die Fragmente m/z 398, 366 und 334 und zusätzlich bei den Monoesteralkaloiden die Fragmente m/z 384, 352 und 320. Beim Bikhaconitin-Typ war die Fragmentsequenz m/z 400, 368 und 336 charakteristisch für Diesteralkaloide, während bei den Monoesteralkaloiden zusätzlich die Fragmente m/z 386 und 354 auftraten.

Die nach Abspaltung der aromatischen Säure erhaltenen Massen sind für die Zuordnung zu einer gemeinsamen Struktur erst dann als charakteristisch für einen bestimmten Typ einzustufen, wenn dessen Fragmentierungsmerkmale ebenfalls im MS²- und MS³-Spektrum vor der Abspaltung der aromatischen Säure vorhanden sind.

C.5.2.4 Bildung einer C(8)-C(15)-Doppelbindung und Vergleich von Pseudoaconitin (16) und Falaconitin (27)

Betrachtet man die Fragmentierung von Pseudoaconitin (16) nach Abspaltung der Essigsäure, so entspricht dessen MS³-Spektrum genau dem MS²-Spektrum von Falaconitin (27), dem Pyrolyseprodukt von 16 (siehe A.3.1.3, C.4.1.2). Die weitere Fragmentierung beider Substanzen verläuft jeweils um eine MSⁿ-Stufe versetzt gleich. Die Fragmentierung von Vorläufer-Ionen gleicher Masse ergeben hierbei dieselben Massenspektren (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42: Ionen identischer Masse, welche durch Abspaltung von funktionellen Gruppen aus 16 und 27 entstehen und bei Weiterfragmentierung gleiche Massenspektren ergeben:

Pseudoaconitin (16)		(m/z)	Falaconitin (27)	
MS ⁿ	Basion		MS ⁿ	Basion
MS ²	[M+H-CH ₃ COOH] ⁺	630	MS	[M+H] ⁺
MS ³	[M+H-CH ₃ COOH-MeOH] ⁺	598	MS ²	[M+H-MeOH] ⁺
MS ⁴	[M+H-CH ₃ COOH-MeOH-H ₂ O] ⁺	580	MS ³	[M+H-MeOH-H ₂ O] ⁺
MS ⁵	[M+H-CH ₃ COOH-2 MeOH-H ₂ O] ⁺	548	MS ⁴	[M+H-2 MeOH-H ₂ O] ⁺

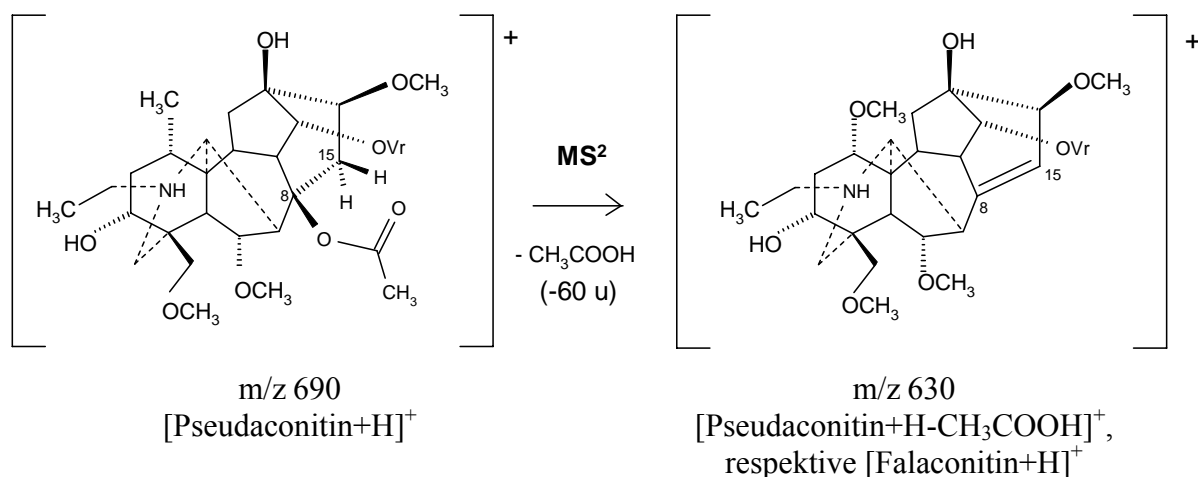


Abbildung 21: Bildung von Falaconitin (27) aus Pseudoaconitin (16) durch Essigsäure-Abspaltung im MS²-Spektrum oder durch Pyrolyse.

Da das MS³-Spektrum von Pseudoaconitin (**16**) dem MS²-Spektrum von Falaconitin (**27**) entspricht, kann man annehmen, dass bei **16** die Essigsäure aus der C(8)-O-Acetylgruppe mit dem C(15)-β-H und über die Bildung eines sechsgliedrigen Übergangszustands eliminiert wird (McLafferty-Umlagerung). Diese sogenannte syn-Eliminierung ist typisch für die Pyrolyse von Estern (Latscha & Klein, 1982). Daher kann man annehmen, dass das Basision [M+H-CH₃COOH]⁺ im MS²-Spektrum von **16** dieselbe Struktur hat wie das protonierte Molekül [M+H]⁺ im MS von Falaconitin (**27**). Dies bedeutet, dass bei der Fragmentierung von **16** ebenfalls die C(8)-C(15)-Doppelbindung ausgebildet wird, wie dies bei der Pyrolyse von **16** zu **27** geschieht (siehe Abbildung 21).

Bei den übrigen Diesteralkaloiden des Pseudoaconitin- und Bikhaconitin-Typs, welche die Partialstruktur C(8)-Acetyl-/C(15)-H₂ gemeinsam haben, kann man davon ausgehen, dass nach Abspaltung von Essigsäure analoge Strukturen des Pyrodelphinintyps mit der C(8)-C(15)-Doppelbindung gebildet werden. Beispielsweise ist Mithaconitin (**108**) das C(8)-C(15)-ungesättigte Analoge zu Indaconitin (**24**), wurde in dieser Arbeit aber nicht untersucht (Struktur siehe Tabelle 4).

C.5.2.5 Bildung des C(15)-Ketons und Vergleich von Aconitin (20) und Pseudoaconitin (16)

Aconitin (**20**) unterscheidet sich von Pseudoaconitin (**16**) durch eine zusätzliche α -OH-Gruppe an C(15). Bei Pyrolyse von **20** wird Pyroaconitin (**103**) gebildet. Die Eliminierung der Essigsäure verläuft wie bei **16** ab. Die Doppelbindung stabilisiert sich aber nicht als Enol, sondern als C(15)-Keton (siehe Abbildung 22).

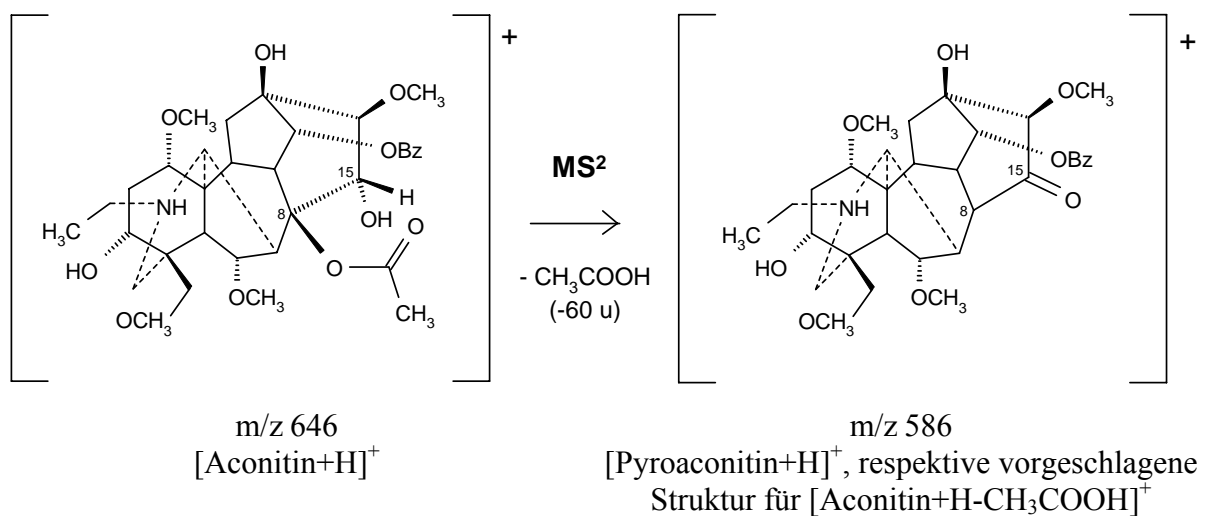


Abbildung 22: Postulierte Essigsäure-Abspaltung von Aconitin (**20**) zu Pyroaconitin (**103**) im MS^2 -Spektrum

In der MS^n -Fragmentierungen unterscheiden sich Pseudoaconitin (**16**) und Aconitin (**20**) ab dem MS^3 -Spektrum (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24). Wenn man bei Aconitin (**20**) für $[M+H-CH_3COOH]^+$, das Basision im MS^2 -Spektrum, als Struktur protoniertes Pyroaconitin (**103**) oder wie Wang *et al.* (2002) das Keto-Enol annimmt, so könnte dies eine Erklärung sein, warum sich das MS^3 -Fragmentierungsmuster von demjenigen der Diesteralkaloide des Pseudoaconitin- und auch des Bikhaconitin-Typs unterscheidet (siehe auch Tabelle 37).

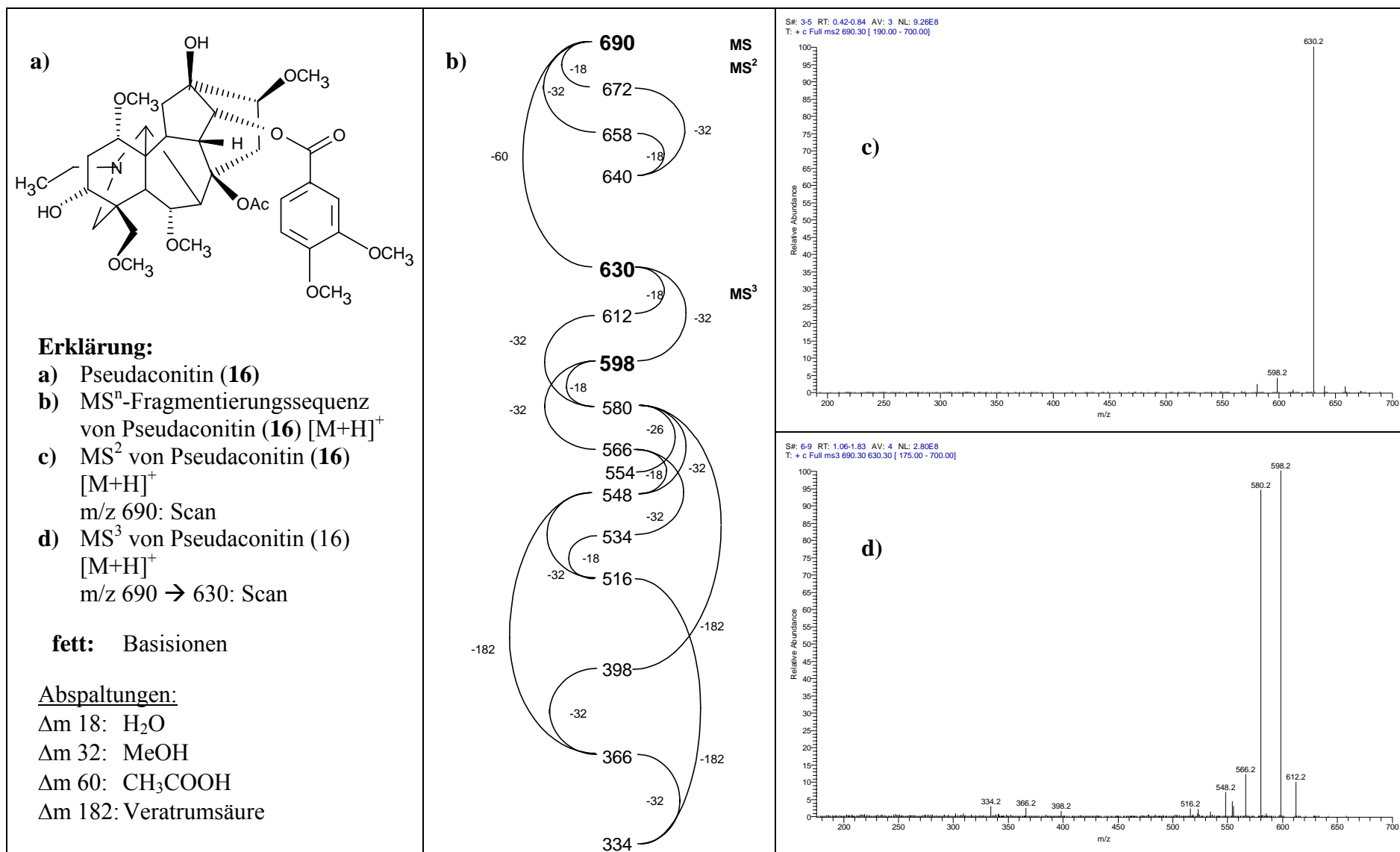


Abbildung 23: MSⁿ-Fragmentierung von Pseudoaconitin (**16**) als Beispiel für Diesteralkaloide vom Pseudoaconitin-Typ

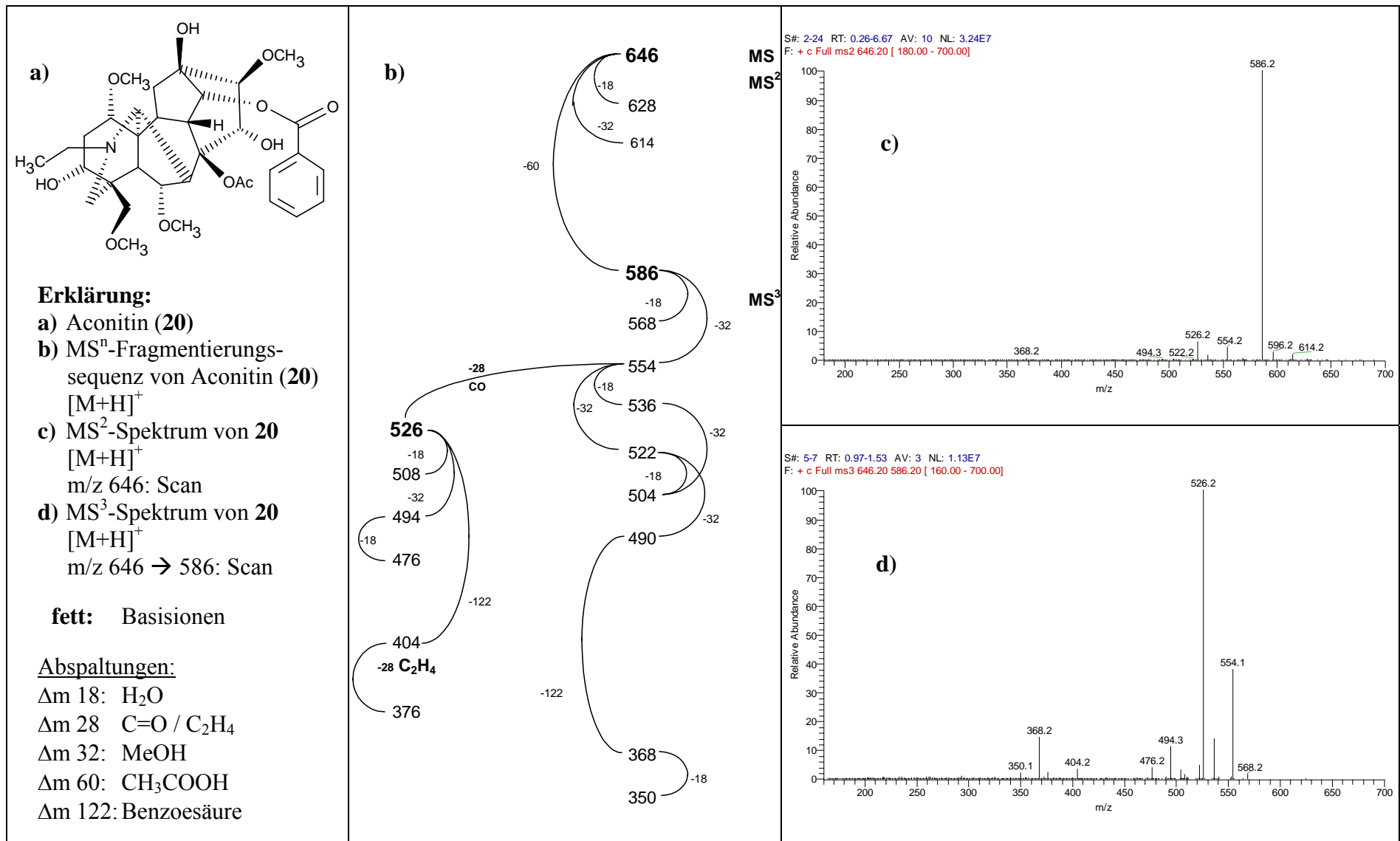


Abbildung 24: MSⁿ-Fragmentierung von Aconitin (**20**)

Das Basision m/z 526 im MS^3 -Spektrum von Aconitin (**20**) entspricht formal $[M+H-2 \times 60 \text{ u}]^+$, was als $[M+H-2 \text{ CH}_3\text{COOH}]^+$ interpretiert werden könnte. **20** hat allerdings nur eine C(8)-O-Acetylgruppe, welche im MS^2 -Spektrum schon eliminiert wurde. Deshalb wird postuliert, dass m/z 526 durch Verlust von Δm 32 u und anschliessend Δm 28 u aus dem C(15)-Keton entsteht und wird daher als $[M+H-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{MeOH}-\text{CO}]^+$ interpretiert, was auch Wang *et al.* (2002) entspricht. Dieses MS^3 -Basion wurde dagegen bei Diesteralkaloiden des Pseudoaconitin- und Bikhaconitin-Typs nie beobachtet.

Im unteren Bereich des MS^3 -Spektrums nach Abspaltung von Benzoesäure wird bei **20** zum zweiten Mal eine Abspaltung von Δm 28 u sichtbar (siehe Abbildung 24 oder Tabelle 36 und Tabelle 37). Es kommen also zwei verschiedene Abspaltungen von Δm 28 u in Serie vor, einmal vor und einmal nach Abspaltung der aromatischen Säure. Die zweite Abspaltung von Δm 28 u tritt am Ende desjenigen Asts der Fragmentierungssequenz auf, welche nur bei Aconitin (**20**) beobachtet wurde. Der Übergang von m/z 404 nach m/z 376 wird hier als Ethylen-Abspaltung der N-Ethyl-Gruppe interpretiert. Statt des Verlustes von Δm 29 u für eine Ethyl-Gruppe, werden hier Δm 28 u vermutlich deswegen abgespalten, weil ein Proton der Ethyl-Kette zum verbleibenden Gerüst umgelagert wird, welches nach mehreren Abspaltungen einige Doppelbindungen trägt. Bei Diesteralkaloiden des Pseudoaconitin- und des Bikhaconitin-Typs wurde ebenfalls eine Δm 28 u-Abspaltung kleiner Intensität jedoch nur vor Eliminierung der aromatischen Säure beobachtet (siehe Tabelle 37).

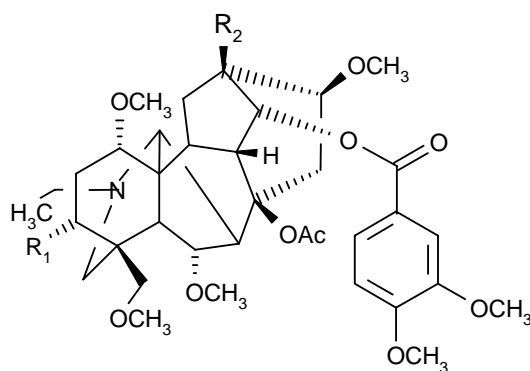
Im MS^3 -Spektrum von **20** teilt sich die Fragmentierungssequenz des Ions $[M+H-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{MeOH}]^+$ (m/z 554) in zwei Zweige auf. Neben der Fragmentierung, welche Alkaloide des Pseudoaconitin- oder Bikhaconitin-Typs zeigen, tritt zusätzlich ein zweites Fragmentierungsmuster durch die CO-Abspaltung auf, welche das Basision im MS^3 -Spektrum

bildet (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24). MS³-Spektren von Alkaloiden des Bikhaconitin- und Pseudoaconitin-Typs zeigen dagegen nur Fragmentierungssequenzen mit Abspaltungen von Δm 32 u respektive 18 u und 32 u. Am Beispiel von Aconitin (**20**) wird somit der Einfluss der C(15)-OH-Gruppe im MS³-Spektrum deutlich.

C.5.2.6 Vergleich der sterischen Isomere Bikhaconitin (**15**) und 8-Acetylfalconerin (**18**)

Die beiden sterischen Isomere Bikhaconitin (**15**) und 8-Acetylfalconerin (**18**) unterscheiden sich in der Lage der einzigen freien OH-Gruppe, welche bei **15** an C(13) und bei **18** an C(3) sitzt. Die MSⁿ-Fragmentierung unterscheidet sich folgendermassen:

18 verhält sich im MS²-Spektrum wie ein Diesteralkaloid vom Pseudoaconitin-Typ (siehe Tabelle 36). Neben Essigsäure zum Basision wird Wasser abgespalten, was zu Signalen mit geringer Intensität führt. Im MS³-Spektrum zeigt sich die Wasserabspaltung im Fragment $[M+H-CH_3COOH-MeOH-H_2O]^+$, welches wie $[M+H-CH_3COOH-MeOH]^+$ relative Intensitäten von ca. 80-100 % erreicht.



$[M+H]^+$ m/z 674:	R ₁	R ₂
Bikhaconitin (15)	H	OH
8-Acetylfalconerin (18)	OH	H

Abbildung 25: Strukturen der Isomeren Bikhaconitin (**15**) und 8-Acetylfalconerin (**18**)

Bei **15** tritt dagegen im MS²-Spektrum keine Wasserabspaltung auf (siehe C.5.2.3.2). Die Fragmentierung verläuft wie bei den anderen Diesteralkaloiden vom Bikhacnitin-Typ ab. Im MS³-Spektrum fehlt das Fragment [M+H-CH₃COOH-MeOH-H₂O]⁺ und daher auch die C(3)-OH-Gruppe, während [M+H-CH₃COOH-MeOH]⁺ das Basision ist. Die Fragmente im MS²- und MS³-Spektrum entsprechen jenen von Falconericin (**17**), sind aber um 16 u zu höheren Massen verschoben. Dies ist der einzige Hinweis auf die C(13)-OH-Gruppe bei **15**, welche ja an der Fragmentierung nicht teilnimmt (siehe C.5.2.3.2).

C.5.2.7 Tentativ identifizierte Alkaloide

Neben den mit Referenzsubstanzen identifizierten Alkaloiden wurden in getrennten Extrakten weitere Substanzen detektiert und zum Teil anhand ihrer MSⁿ-Spektren tentativ identifiziert (siehe Tabelle 43). Hierzu zählen auch Abbauprodukte, welche in der zwei Monate bei 2-8 °C gelagerten Messlösung I von Standard I (siehe C.4.1.1) detektiert wurden. Die Fragmente der MS²- und MS³-Spektren sind in Tabelle 44, Tabelle 45 und Tabelle 46 wiedergegeben. Ihre Spektren werden diskutiert, wenn es sich entweder um neue Substanzen handelt oder wenn die Alkaloide für einen bestimmten Extrakt von Bedeutung sind.

Die zunächst tentative Identifizierung von folgenden fünf Alkaloiden konnte anschliessend mit Reinsubstanzen bestätigt werden. Somit wurden Ludaconitin (**10**), 8-Deacetylyunaconitin (**11**), 8-Acetylfalconerin (**18**), Crassicaulin A (**22**) und Falaconitin (**27**) als zusätzliche Referenzsubstanzen für die weiteren Trennungen mit Trennsystem 2 einbezogen (siehe C.4.1.1). Ihre Massenspektren wurden daher unter C.5.2.2 beschrieben.

Table 43: Einige anhand ihrer MSⁿ-Spektren tentativ identifizierte Alkaloide mit Angabe ihres Vorkommens in untersuchten Proben und des verwendeten Trennsystems:

Tentativ identifizierte Alkaloide	[M+H] ⁺ m/z	RT (min) ^{a)}		Proben					
		Trennsystem 1	Trennsystem 2	ML_1	AcK _{Del_3}	AcK _{violac}	Pill _{Del_94}	Pill _{Dhr} ^{b)}	Pill _{Kat}
Chasmanin (3)	452		11,3			+			
Ludaconitin (10)*	588	9,3		+	+		+	+	+
8-Deacetylyunaconitin (11)*	618	9,7		+	+				+
Falconerin (12)	632		22,7				+		
8-Deacetyl-8-O-Methyl-Pseudaconitin (13)	662	10,6		+					
Falconeridin (14)	616		24,5				+		
8-Acetylfalconerin (18)*	674	12,6					+	+	c)
8-Deacetyl-8-O-Methyl-Indaconitin (19)	602	12,8		+					
Crassicaulin A (22)*	644	13,1			+				+
8-Deacetyl-8-Veratroyl-Yunaconitin (25)	782	14,5			+				
8-Benzoyl-14-Veratroyl-pseudaconin (26)	752	14,8			+				
Falaconitin (27)*	630	17,9			+				
Lipopseudaconitin_1 (28)	928	23,8							+
Linoleoylpseudaconitin (29)	910	26,5			+				+
Palmitoylpseudaconitin (30)	886	27,8							+
Lipopseudaconitin_2 (31)	912	28,2							+
Palmitoylindaconitin (32)	826	30,5							+

a) RT als gemittelte Werte der untersuchten Proben; b) detektiert ohne MSⁿ-Spektren anhand RT und Masse des [M+H]⁺ Basisions; c) Co-elution mit **17**; ML_1 Messlösung I aus Standard I nach zwei Monaten Lagerung bei 2-8 °C erneut getrennt; + mit Hilfe von MSⁿ-Spektren tentativ identifiziert; * in Trennsystem 2 als Referenzsubstanzen eingesetzt.

Tabelle 44: MS²-Spektren von tentativ identifizierten Substanzen: Fragmente mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:

Nr. Alkaloid	Probe	[M+H] ⁺ m/z	A ₁ (u)	P ₁ -W	P ₁ -Me	P ₁ -W-Me	P ₁ -A ₁	P ₁ -2Me	P ₁ -W -2Me	P ₁ -3Me	P ₁ -A ₁ -W	P ₁ -A ₁ -Me	P ₁ -A ₁ -W-Me
Pseudaconitin-Typ:													
13	8-Deacetyl-8-O-Methyl-Pseudaconitin	ML_1	662 (21)		644 (25)	630 (67)	612 (100)		598 (21)	580 (22)	566 (31)		
19	8-Deacetyl-8-O-Methyl-Indaconitin	ML_1	602		584 (27)	570 (59)	552 (100)		538 (24)	520 (28)	506 (42)		
25	8-Deacetyl-8-Veratroyl-Yunaconitin	AcK _{Del_3}	782 (53)	182		750 (6) [#]							
26	8-Benzoyl-14-Veratroyl-pseudaconin*	AcK _{Del_3}	752 (12)	122	734 (1) [#]	720 (2) [#]							
28	Lipopseudaconitin_1	Pill _{Kat}	928	298									598 (3) [#]
29	Linoleoylpseudaconitin	Pill _{Kat}	910	280		878 (3)	860 (2)				612 (1) [#]	598 (2)	580 (3)
30	Palmitoylpseudaconitin	Pill _{Kat}	886	256	868 (1)	854 (2)	836 (1)					598 (5)	580 (1)
31	Lipopseudaconitin_2	Pill _{Kat}	912	282	894 (1)	862 (1)					612 (2)	598 (3)	580 (6)
32	Palmitoylindaconitin	Pill _{Kat}	826	256							552 (0.5) [#]	538 (2) [#]	520 (6)
Neolin-Typ:													
3	Chasmanin	AcK _{violac}	452			420 (100)	402 (3)		388 (22)	370 (10)	356 (8)		
12	Falconerin	Pill _{Del_94}	632		614 (24)	600 (48)	582 (100)		568 (12)	550 (20)	536 (6)		
14	Falconeridin	Pill _{Del_94}	616			584 (100)	566 (3)		552 (19)	534 (6)	520 (4)		

P₁: [M+H]⁺; **W:** 18 u (H₂O); **Me:** 32 u (MeOH); **W:** 18 u (H₂O); **A₁:** in MS² von C(8) abgespaltene Säure: aromatische Säuren (182 u: Veratrumsäure, 122 u: Benzoesäure) sowie diverse Fettsäuren (280 u: Linolensäure; 282 u: Palmitinsäure; 298 u resp. 282 u: nicht zugeordnete Fettsäuren); ML_1 Messlösung I aus Standard I nach zwei Monaten Lagerung bei 2-8 °C erneut getrennt; # Ionen-Häufigkeit bei Aufnahme <10⁵; * die relative Intensität der Fragmente war vergleichbar mit den MS²- und MS³-Spektren, welche mit Ionen-Häufigkeit >10⁵ von derselben Verbindung als Verunreinigung in Standard I erhalten wurden.

Tabelle 45: MS³-Spektren von tentativ identifizierten Substanzen (Teil 1): Fragmente mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:

Nr. Alkaloid	Probe	P ₂ (m/z)	A ₁ (u)	P ₂ -W	P ₂ -Me	P ₂ -W -Me	P ₂ -2 Me	P ₂ -W -2 Me	P ₂ -3 Me	P ₂ -3 Me -W
Pseudaconitin-Typ:										
13	8-Deacetyl-8-O-Methyl-Pseudaconitin	ML_1	[M+H-W-Me] ⁺ 612		580 (100)		548 (19)			
19	8-Deacetyl-8-O-Methyl-Indaconitin	ML_1	[M+H-W-Me] ⁺ 552		520 (100)		488 (40)			
25	8-Deacetyl-8-Veratroyl-Yunaconitin	AcK _{Del_3}	[M+H-A ₁] ⁺ 600	182	582 (5) [#]	568 (100)	550 (40) [#]	536 (10) [#]		
26	8-Benzoyl-14-Veratroyl-pseudaconin	AcK _{Del_3}	[M+H-A ₁] ⁺ 630	122	612 (13) [#]	598 (100)	580 (85)	566 (14) [#]	548 (16) [#]	
28	Lipopseudaconitin_1	Pill _{Kat}	[M+H-A ₁] ⁺ 630	298	612 (6) [#]	598 (49)	580 (100)	566 (3) [#]	548 (23) [#]	
29	Linoleoylpseudaconitin	Pill _{Kat}	[M+H-A ₁] ⁺ 630	280	612 (2) [#]	598 (79)	580 (100)	566 (30)	548 (25)	
30	Palmitoylpseudaconitin	Pill _{Kat}	[M+H-A ₁] ⁺ 630	256	611,9 (16)	598 (98)	580 (100)	566 (22)	548 (14)	516 (7)
31	Lipopseudaconitin_2	Pill _{Kat}	[M+H-A ₁] ⁺ 630	282	612 (7) [#]	598 (15) [#]	580 (100)	566 (50)	548 (11) [#]	516 (4) [#]
32	Palmitoylindaconitin	Pill _{Kat}	[M+H-A ₁] ⁺ 570	256	552 (1.5) [#]	538 (61)	520 (100)	506 (15) [#]	488 (39)	
Neolin-Typ:										
3	Chasmanin	AcK _{violac}	[M+H-Me] ⁺ 420		402 (11)	388 (100)	370 (40)	356 (35)	338 (16)	324 (6) 306 (6)
12	Falconerin	Pill _{Del_94}	[M+H-Me-W] ⁺ 582			550 (100)	532 (3) [#]	518 (10)	500 (1) [#]	
14	Falconeridin	Pill _{Del_94}	[M+H-Me] ⁺ 584		566 (18) [#]	552 (100)	534 (45)	520 (18) [#]	502 (2) [#]	

P₂: Vorläufer-Ion (Parent Ion) = Basision aus MS²; W: 18 u (H₂O); Me: 32 u (MeOH); A₁: in MS² von C(8) abgespaltene Säure: hier aromatische Säuren (182 u: Veratrumssäure, 122 u: Benzoessäure) sowie diverse Fettsäuren (280 u: Linolensäure; 256 u: Palmitinsäure; 298 resp. 282 u: nicht zugeordnete Fettsäuren); ML_1 Messlösung I aus Standard I nach zwei Monaten Lagerung bei 2-8 °C erneut getrennt; # Ionen-Häufigkeit bei Aufnahme < 10⁵; * die relative Intensität der Fragmente war vergleichbar mit den MS²- und MS³-Spektren, welche mit Ionen-Häufigkeit >10⁵ von derselben Verbindung als Verunreinigung in Standard I erhalten wurden.

Tabelle 46: MS³-Spektren von tentativ identifizierten Substanzen (Teil 2): Fragmente nach Abspaltung der aromatischen Säure von Mono- und Diesteralkaloiden mit relativer Intensität in Klammern und Zuordnung:

Nr. Alkaloid	P ₂	X	Y	A ₁ (u)	A ₂ (u)	P ₂ -Y -A ₂	P ₂ -X -A ₂	P ₂ -X -W-A ₂	P ₂ -X -Me-A ₂	P ₂ -X -Me-W -A ₂	P ₂ -X -2 Me -A ₂	P ₂ -X -2 Me -W-A ₂	P ₂ -X -3 Me -W-A ₂
Pseudoaconitin-Typ:													
13	8-Deacetyl-8-O-Methyl-Pseudoaconitin	[M+H-W-Me]	Me	/	182			398 (7)	384 (4)**	366 (6)			
19	8-Deacetyl-8-O-Methyl-Indaconitin	[M+H-W-Me]	Me	/	122	430 (4) [#]		398 (15)		366 (8)			
25	8-Deacetyl-8-Veratroyl-Yunaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	/	182	152			384 (4) [#]	366 (3) [#]		334 (9) [#]	
26	8-Benzoyl-14-Veratroyl-pseudoaconin*	[M+H-A ₁] ⁺	Me	/	122	182		398 (1) [#]		366 (2) [#]		334 (2) [#]	302 (1) [#]
28	Lipopseudoaconitin_1	[M+H-A ₁] ⁺	Me	W	298	182	430 (4) [#]	398 (2) [#]					
29	Linoleoylpseudoaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	/	280	182			384 (2) [#]	366 (2) [#]		334 (10) [#]	
30	Palmitoylpseudoaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	/	256	182		398 (3) [#]		366 (6)		334 (8)	
31	Lipopseudoaconitin_2	[M+H-A ₁] ⁺	Me	W	282	182	430 (3) [#]						
32	Palmitoylindaconitin	[M+H-A ₁] ⁺	Me	/	256	122		398 (5) [#]		366 (5) [#]		334 (5) [#]	302 (12) [#]
Neolin-Typ:													
12	Falconerin	[M+H-Me-W]	Me	/	182			400 (5) [#]	368 (5) [#]		336 (5) [#]	318 (3) [#]	
14	Falconeridin	[M+H-Me] ⁺	Me	/	182			402 (5) [#]	370 (16) [#]	352 (15) [#]	338 (4) [#]	320 (5) [#]	

A₁: in MS² von C(8) abgespaltene Säure: aromatische Säuren (182 u: Veratrumsäure, 122 u: Benzoesäure) sowie diverse Fettsäuren (280 u: Linolensäure; 256 u: Palmitinsäure; 298 resp. 282 u: nicht zugeordnete Fettsäuren); A₂: in MS³ von C(14) abgespaltene Säure: aromatische Säuren (182 u: Veratrumsäure, 152 u: Anissäure, 122 u: Benzoesäure); Me: 32 u (MeOH); W: 18 u (H₂O); P₂: Vorläufer-Ion (Parent Ion) = Basision aus MS²; P₂-X resp. P₂-Y: Fragment vor Abspaltung von A₂; [#] Ionen-Häufigkeit < 10⁵; * aus Intensitätsgründen fehlen diese Fragmente der Verbindung aus AcK_{Del_3} bis auf m/z 334 (3)[#], weshalb jene derselben Verbindung angegeben werden, welche als Verunreinigung in Standard I detektiert wurde; ** nur im MS²-Spektrum sichtbar als Abspaltung von m/z 566 [M+H-3 MeOH]⁺ das nur in MS² gebildet wird, nicht aber in MS³-Spektrum; / keine Abspaltung.

C.5.2.7.1 Hydrolyse- und Methanolyseprodukte

In der gelagerten Messlösung I aus Standard I wurden Ludaconitin (**10**) und 8-Deacetylyunaconitin (**11**) als Hydrolyseprodukte der Referenzsubstanzen Indaconitin (**24**) und Yunaconitin (**23**) identifiziert. Auch in Knollen- und Pillenproben wurden **10** und **11** detektiert, deren natürliches Vorkommen für gewissen asiatischen *Aconitum*-Arten bekannt ist (Pelletier *et al.*, 1984; Pelletier & Joshi, 1991). Als zusätzlich entstandene Methanolyseprodukte wurden 8-Deacetyl-8-O-Methyl-Pseudaconitin (**13**) und 8-Deacetyl-8-O-Methyl-Indaconitin (**19**) tentativ identifiziert. Die fehlende Wasserabspaltung in den MS³-Spektren von **13** und **19** ist ein auffälliger Unterschied gegenüber Substanzen, welche an C(8) mit einer OH-Gruppe substituiert sind. Da Diterpenalkaloide in wässrigen und alkoholischen Lösungen nicht stabil sind (siehe A.3.1.3), war zu erwarten, dass Abbauprodukte aus den Referenzsubstanzen in Messlösung I durch Hydrolyse und Methanolyse entstehen.

Tabelle 47: Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen in den MSⁿ-Spektren der Methanolyseprodukte **13** und **19**

MS ⁿ	Vorläufer-Ion	Fragmente / Abspaltungen	Schlussfolgerung	Verweis
MS ²	[M+H] ⁺	<ul style="list-style-type: none"> • [M+H-H₂O]⁺: ~25 % relative Intensität • Basision: [M+H-H₂O-MeOH]⁺ • Die Fragmentierung im MS² bis hierher wie bei den Monoesteralkaloiden 4, 10 und 11 vom Pseudaconitin-Typ • [M+H-3 MeOH]⁺: 30-40 % relative Intensität statt <5 % wie bei den Monoesteralkaloiden 10 und 11 	<p>C(3)-OH vorhanden</p> <p>C(8)-O-Acetyl nicht vorhanden</p> <p>Dieser Unterschied scheint auf die zusätzliche Methoxygruppe an C(8) zurückzugehen.</p>	<p>C.5.2.3.2</p> <p>C.5.2.3.1</p> <p>Tabelle 36</p>
MS ³	[M+H-H ₂ O-MeOH] ⁺	<ul style="list-style-type: none"> • keine weitere Wasserabspaltung im Unterschied zu den erwähnten Monoesteralkaloiden 	Die C(3)-OH-Gruppe wurde schon im MS ² -Spektrum abgespalten, keine weitere abspaltbar	C.5.2.3.2

C.5.2.7.2 Lipoalkaloide

Verschiedene Lipoalkaloide wurden in den Proben AcK_{Del_3} und insbesondere Pill_{Kat} detektiert, wie auch aus dem ESI(+)-Basionenchromatogramm in Abbildung 26 sichtlich ist. Diese Substanzen eluierten mit Trennsystem 1 mit 100 % MeOH. Die Kollisionsenergie für die MSⁿ-Fragmentierung der Lipoalkaloide wurde für diesen Retentionszeitbereich von 35 % auf 45 % erhöht, da sonst keine ausreichende Fragmentierung eintrat.

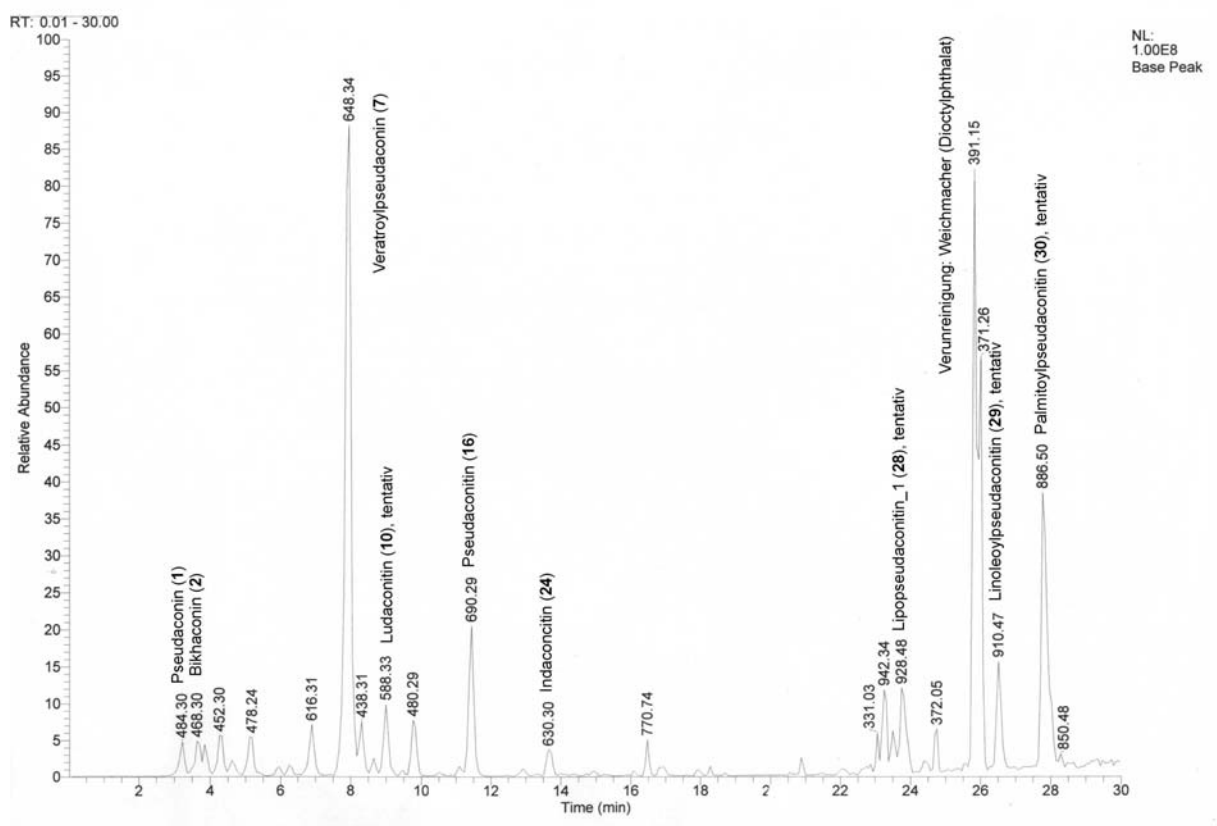


Abbildung 26: ESI(+)-Basionenchromatogramm des Extrakts Pill_{Kat} getrennt mit Trennsystem 1. Die Masse des Basisions ist jeweils am Signal angeschrieben.

Tabelle 48 gibt eine Übersicht der in der Pillenprobe Pill_{Kat} detektierten Lipoalkaloide mit Retentionszeit und charakteristischen Fragmenten. Die MS²- und MS³-Spektren entsprachen nach Abspaltung des Lipidrestes (z.B. Δm 280 u, Linolsäure) im MS²-Spektrum denjenigen der analogen 8-O-acetylierten Diesteralkaloiden nach Verlust von Δm 60 u (Essigsäure). Somit konnte die Anwesenheit von Lipoalkaloiden angenommen werden.

Tabelle 48: Tentativ identifizierte Lipoalkaloiden aus der Pilleprobe Pill_{Kat}, bei Trennung mit Trennsystem 1 mit Angabe der charakteristischen Massen und Abspaltungen in den MSⁿ-Spektren.

Nr. Lipoalkaloid	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ² - Basion (m/z)	Abgespaltene Säure in MS ²		MS ³ -Spektrum gleich wie bei:
			Abspaltung von	Zuordnung	
28 Lipopseudaconitin_1	928	630	Δm 298 u	?	Pseudaconitin (16)
29 Linoleoylpseudaconitin	910	630	Δm 280 u	Linolsäure	16
30 Palmitoylpseudaconitin	886	630	Δm 256 u	Palmitinsäure	16
31 Lipopseudaconitin_2	912	630	Δm 282 u	Ölsäure ?/ Elaidinsäure?	16
32 Palmitoylindaconitin	826	570	Δm 256 u	Palmitinsäure	Indaconitin (24)

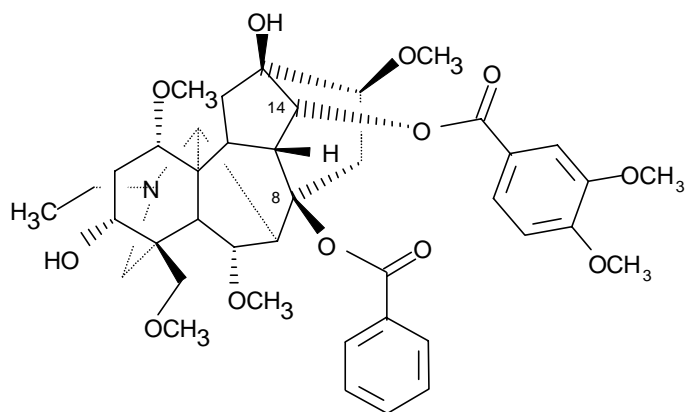
? nicht zugeordnet.

Von einigen Pseudaconitin-Derivaten, vermutlich ebenfalls Lipoalkaloiden, konnten die in den MS²-Spektren zum Basion der Masse 630 abgespaltenen Säuren noch keiner Fettsäure zugeordnet werden, jedoch z.T. solche vorgeschlagen werden. Beispiele hierzu sind die in Tabelle 48 als Lipopseudaconitin_1 (**28**) respektive Lipopseudaconitin_2 (**31**) bezeichneten Substanzen mit Abspaltungen von Δm 298 u respektive Δm 282 u (siehe Tabelle 48).

C.5.2.7.3 8,14-Diaroylalkaloide

Diesteralkaloide, welche mit zwei aromatischen Säuren verestert sind, werden hier 8,14-Diaroylalkaloide genannt. Das von Sing *et al.* (1966) beschriebene Benzoyl-Veratroyl-Diester-Norditerpenalkaloid „Bishaconitin“ kann hierzu gezählt werden (vergl. A.4). Mit spektroskopischen Methoden wurden bisher keine Vertreter identifiziert.

Im Extrakt aus der Knollenprobe AcK_{Del_3} (*A. falconeri* unbehandelt) wurden zwei 8,14-Diaroylalkaloide in Spuren detektiert (siehe Tabelle 43): 8-Deacetyl-8-Veratroyl-Yunaconitin (**25**) und 8-Benzyl-14-Veratroylpseudaconin (**26**). Im Folgenden werden die MSⁿ-Spektren von **26** beschrieben.



$[M+H]^+$ 752, RT 14,8 min (Trennsystem 1)

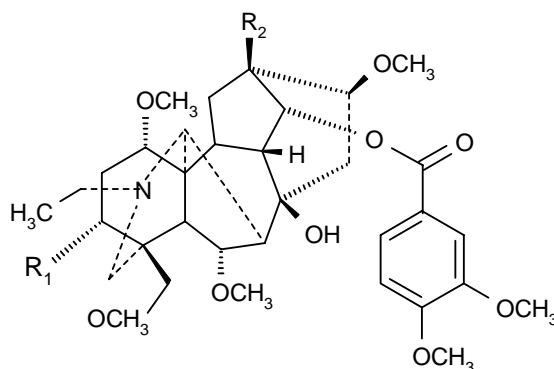
Abbildung 27: 8-Benzoyl-14-Veratroylpseudoaconin (**26**)

Die Hauptabspaltung im MS^2 -Spektrum ist hier nicht wie bei Diesteralkaloiden üblich Essigsäure, sondern die aromatische Benzoesäure. Das MS^3 -Spektrum ist identisch mit demjenigen von **16**, jeweils ausgehend vom Vorläufer-Ion m/z 630. Im MS^3 -Spektrum ist auch die Abspaltung der zweiten aromatischen Säure (Veratrumsäure) sichtbar. Da bei allen untersuchten Diesteralkaloiden im MS^2 -Spektrum die Säure aus dem C(8)-Ester und im MS^3 -Spektrum jene aus dem C(14)-Ester abgespalten wird, kann hier die Substanz mit $[M+H]^+$ m/z 752 als 8-Benzoyl-14-Veratroylpseudoaconin (**26**) interpretiert werden.

Tabelle 49: MS^n -Spektren von 8-Benzoyl-14-Veratroylpseudoaconin (**26**): Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen.

MS^n	Vorläufer-Ion	Fragmente / Abspaltungen	Schlussfolgerungen	Verweis
MS^2	$[M+H]^+$ (m/z 752)	<ul style="list-style-type: none"> • Basision: $[M+H-122]^+$ (m/z 630) • Abspaltung: Δm 122 u 	kein C(8)-O-Acetyl als Benzoesäure interpretiert: C(8)-O-Benzoyl	C.5.2.3.1 C.5.2.3.1
MS^3	$[M+H-182]^+$ (m/z 630)	<ul style="list-style-type: none"> • Gleiches Spektrum wie MS^3-Spektrum von 16 mit Vorläufer-Ion $[M+H-CH_3COOH]^+$ (ebenfalls m/z 630) • Abspaltung: Δm 182 u 	als Veratrumsäure interpretiert: C(14)-O-Veratroyl	C.5.2.3.3

C.5.2.7.4 Falconerin (12)



$[M+H]^+$ m/z 632:	R ₁	R ₂
Falconerin (12)	OH	H
Veratroylbikhaconin (9)	H	OH

Abbildung 28: Strukturen der Isomeren Veratroylbikhaconin (9) und Falconerin (12)

Falconerin (12) wurde als Hauptsignal in der Pillenprobe Pill_{Del_94} mit RT 22,7 min (Trennsystem 2) detektiert und anhand der MSⁿ-Fragmentierung tentativ identifiziert. Die gesamte Fragmentierung von 12 verläuft in den MS²- und MS³-Spektren analog zu Veratroylpseudaconin (7). Dabei sind die Massen jeweils um 16 u niedriger, was auf eine grosse Strukturähnlichkeit der beiden Alkaloide hinweist. Der Unterschied von 16 u erklärt sich durch Fehlen von O in Form einer OH-Gruppe, welche in 12 gegenüber 7 an C(13) fehlt analog zu 8-Acetylfalconerin (18) (siehe C.5.2.6). Das Hauptsignal im Extrakt der Pillenprobe

Tabelle 50: Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen in den MSⁿ-Spektren von Falconerin (12):

MS ⁿ	Vorläufer-Ion	Fragmente / Abspaltungen	Schlussfolgerungen	Verweis
MS ²	$[M+H]^+$ (m/z 632)	<ul style="list-style-type: none"> Basion: $[M+H-H_2O-MeOH]^+$ (m/z 582) 	kein C(8)-O-Acetyl kein C(1)-OH C(3)-OH vorhanden	C.5.2.3.1 C.5.2.3.2 Dito
MS ³	$[M+H-H_2O-MeOH]^+$ (m/z 582)	<ul style="list-style-type: none"> Abspaltung: Δm 182 u 	Abspaltung von Veratrumssäure: C(14)-O-Veratroyl	C.5.2.3.3

Pill_{Del_94} wurde daher als Falconerin (**12**) interpretiert. Es ist ein Stellungsisomer von Veratroylbikhaconin (**9**) und das analoge Monoesteralkaloid zum Diesteralkaloid 8-Acetylfalconerin (**18**), welches ebenfalls in dieser Probe detektiert wurde (siehe C.5.5.3).

C.5.2.7.5 Falconeridin (**14**)

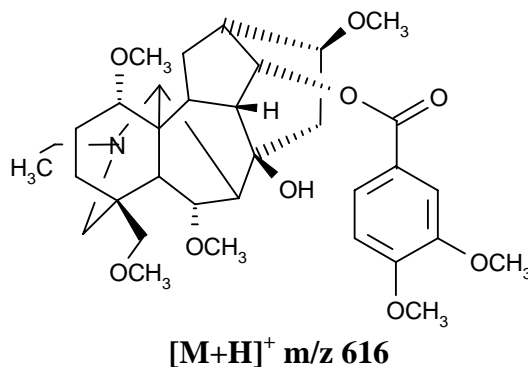


Abbildung 29: Struktur von Falconeridin (**14**)

Falconeridin (**14**) wurde unter anderem in der Pillenprobe Pill_{Del_94} mit RT 24,5 min (Trennsystem 2) detektiert und anhand der MSⁿ-Fragmentierung tentativ identifiziert.

Tabelle 51: Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen in den MSⁿ-Spektren von Falconeridin (**14**):

MS ⁿ	Vorläufer-Ion	Fragmente / Abspaltungen	Schlussfolgerungen	Verweis
MS ²	[M+H] ⁺ (m/z 616)	<ul style="list-style-type: none"> Basion: [M+H-MeOH]⁺ 	kein C(8)-O-Acetyl kein C(3)-OH kein C(1)-OH	C.5.2.3.1 C.5.2.3.2 C.5.2.3.2
MS ³	[M+H-MeOH] ⁺ (m/z 584)	<ul style="list-style-type: none"> Fragmente mit Wasserabspaltung: [M+H-MeOH-H₂O]⁺ [M+H-MeOH-H₂O-MeOH]⁺ → die relativen Intensitäten sind entsprechend wie bei 9 Abspaltung: Δm 182 u 	C(8)-OH wird abgespalten Abspaltung von Veratrumssäure: C(14)-O-Veratroyl	Tabelle 37 C.5.2.3.3

Die in Tabelle 51 aufgeführten Massen und Abspaltungen von Falconeridin (**14**) deuten auf ein Monoesteralkaloid vom Bikhacotin-Typ. Die Wasserabspaltung tritt erst im MS³-Spektrum mit den oben genannten Fragmenten auf, wie dies auch bei Veratroylbikhacotin (**9**) der Fall ist. Die Massenspektren von **14** entsprechen im Übrigen genau denjenigen von Veratroylbikhacotin (**9**) (siehe Tabelle 36 und Tabelle 37), nur dass die Massen bei **14** jeweils um 16 u tiefer liegen. Analog zur Interpretation bei Falconerin (**12**) (siehe C.5.2.7.4) wird die Massendifferenz mit O in Form der C(13)-OH-Gruppe erklärt, welches bei **14** gegenüber **9** fehlt. Falconeridin (**14**) ist das analoge Monoesteralkaloid zum Diesteralkaloid Falconericin (**17**).

C.5.2.7.6 Chasmanin (**3**)

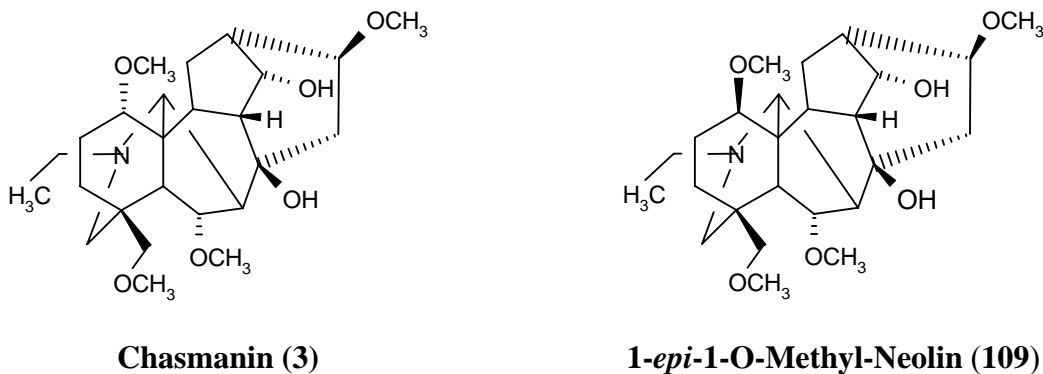


Abbildung 30: Strukturen der Isomere Chasmanin (**3**) und 1-*epi*-Methyl-Neolin (**109**)

[M+H]⁺ m/z 452 wurde mit RT 11,3 min (Trennsystem 2) als Hauptsignal der Knollenprobe AcK_{violac} (*A. violaceum*) detektiert (HPLC-Chromatogramm siehe C.5.5.3.2). Das MS²-Basion (m/z 420) von Chasmanin (**3**) wird durch CH₃OH-Abspaltung von [M+H]⁺ gebildet, bei Neolin (**8**) dagegen durch Abspaltung der C(1)-Hydroxyl-Gruppe zu [M+H-H₂O]⁺ (m/z 420) (siehe Tabelle 39). Trotz unterschiedlicher Molekülmasse treten bei beiden Substanzen im MS²-Spektrum dieselben Fragmente mit vergleichbaren Intensitäten auf.

Ebenso ist deren MS³-Fragmentierung vergleichbar (Tabelle 52). Dies führt zur Interpretation, dass es sich beim Hauptalkaloid in *A. violaceum* um Chasmanin (**3**) handelt, welches als Analoges von Neolin (**8**) an C(1) statt der Hydroxyl- eine Methoxygruppe trägt.

Tabelle 52: Übersicht charakteristischer Fragmente und Abspaltungen in den MSⁿ-Spektren von Chasmanin (**3**):

MS ⁿ	Vorläufer-Ion	Fragmente / Abspaltungen	Schlussfolgerungen	Verweis
MS ²	[M+H] ⁺ (m/z 452)	<ul style="list-style-type: none"> • Basision: [M+H-MeOH]⁺ • ab Basision gleiches MS²-Spektrum wie bei 8 (Vorläufer-Ion [M+H]⁺, m/z 438) 	kein C(3)-OH kein C(1)-OH kein C(8)-O-Acetyl	C.5.2.3.2 dito C.5.2.3.1 Tabelle 36
MS ³	[M+H-MeOH] ⁺ (m/z 420)	<ul style="list-style-type: none"> • MS³-Spektrum entspricht 8 (Vorläufer-Ion [M+H-H₂O]⁺, m/z 420) 		Tabelle 37

Zur Stereochemie an C(1)

Von den bekannten Isomeren mit protonierter Molekülmasse m/z 452 ist einzig Chasmanin (**3**) an C(1) α -substituiert und so diastereoisomer zur synthetisch hergestellten Verbindung 1-*epi*-1-O-Methyl-Neolin (**109**) (siehe Abbildung 30). Natürlich kommen dagegen von den ca. 220 bekannten Norditerpenalkaloiden nur drei Verbindungen vor, welche C(1)- β -substituiert sind (Pelletier & Etse, 1989). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Grundstruktur von Chasmanin (**3**) mit multipler MS und Vergleich mit den Spektren von Neolin (**8**) aufgeklärt werden konnte. Die sterischen Verhältnisse an C(1) konnten jedoch mit MSⁿ nicht geklärt werden. In Anbetracht, dass 1-*epi*-Verbindungen in der Natur sehr rar sind und im Fall von Chasmanin (**3**) das 1-*epi*-Analoge nur aus der Synthese bekannt ist (Pelletier & Etse, 1989), wird postuliert, dass es sich bei *A. violaceum* bei [M+H]⁺ mit der Molekülmasse m/z 452 um Chasmanin (**3**) handelt.

C.5.3 Diskussion der Quantifizierung

Zur Quantifizierung mit HPLC-MS empfehlen Kölliker & Oehme (1997), einen Konzentrationsbereich von zwei Zehnerpotenzen zu kalibrieren. Cunniff *et al.* (1996) geben für das in dieser Arbeit verwendete HPLC-MS Gerät sogar einen linearen dynamischen Bereich an, der drei Zehnerpotenzen übersteigt. Um einen möglichst breiten Konzentrationsbereich der Alkaloide in den untersuchten Proben erfassen zu können, wurde die Kalibrierreihe mit Injektionsmengen von ca. 0,04 bis 100 ng, also über knapp vier Zehnerpotenzen aufgenommen. Um Detektions-Schwankungen während der Messzeit korrigieren zu können, wurde bei quantitativen Bestimmung Reserpin als interner Standard verwendet. Als Ionisierungsmethode wurde APCI im Positivionenmodus gewählt, welche auch von Wada *et al.* (1993, 1994 und 1997) für die Quantifizierung verwendet wurde (siehe Tabelle 13). Eine mit ESI erstellte Kalibrierkurve war dagegen schon innerhalb von zwei Zehnerpotenzen nicht linear und flachte mit zunehmender Menge ab.

Über den Kalibrierbereich waren praktisch alle Referenzsubstanzen innerhalb des Abweichungsbereichs von $\pm 20\%$ linear (siehe C.4.5.2.7). Ausnahmen waren Pseudoaconin (**1**), Bihhaconin (**2**) sowie Falaconitin (**27**), bei welchen einzelne Kalibrierpunkte ausserhalb dieses Abweichungsbereichs lagen. Bei den Diesteralkaloiden waren die meisten Kalibrierpunkte innerhalb des Bereichs von $\pm 10\%$ linear. Als mögliche Gründe für Linearitätsabweichungen insbesondere bei den relativ polaren Alkaminen könnte Adsorption am Säulenmaterial und an den Glas-Innenflächen von Probengläsern und Hamilton-Spritzen bei der Herstellung der Verdünnungs- und Kalibrierreihe eine Rolle spielen. Die Präzision wurde über die dreiwöchige Messperiode viermal mit der Kalibrierlösung der zweithöchsten Konzentration (ca. 20 ng/5 μ l) überprüft und war mit einer relativen Standardabweichung $<5\%$ sehr gut (siehe C.4.5.2.8).

Bei den berechneten Ansprechfaktoren (siehe Tabelle 35) fiel auf, dass mit steigendem Veresterungsgrad die Steigung, d.h. das Verhältnis Signalfläche zu injizierter Menge zunimmt: So hatten die Monoesteralkaloide etwa zweifach respektive die Diesteralkaloide etwa dreifach grössere Ansprechfaktoren als die Alkamine. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Alkamine die Ladung weniger gut stabilisieren können, da hierum mehr freie Hydroxylgruppen mit dem Stickstoff konkurrieren, als bei den veresterten Alkaloiden.

Für die eingesetzten vier Monoester- und besonders bei den neun Diesteralkaloiden wurden jeweils ähnliche Ansprechfaktoren der einzelnen Vertreter festgestellt und hiermit der mittlere Ansprechfaktor eines Estertyps berechnet (siehe Tabelle 35). Die mittleren Ansprechfaktoren könnten zur quantitativen Abschätzung der Menge einer Substanz des entsprechenden Estertyps verwendet werden, wenn keine Referenzsubstanz zur Verfügung steht. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die tentativ identifizierten Monoesteralkaloide Falconerin (**12**) und Falconeridin (**14**) sowie das Alkamin Chasmanin (**3**) als wichtige Zielsubstanzen die quantitative Untersuchung einbeziehen zu können. Bei Chasmanin (**3**) wurde zudem die grosse relative Standardabweichung von 39 % in Kauf genommen, mit welchem der mittlere Ansprechfaktor der untersuchten Alkamine behaftet war.

Einschluss / Ausschluss von Zielsubstanzen und Resultaten

Von den in Standard IV enthaltenen 18 Referenzsubstanzen wurden die folgenden vier Alkaloide von der quantitativen Bestimmung ausgeschlossen (siehe Tabelle 35), aber für den qualitativen Nachweis beibehalten. Einzelne Ansprechfaktoren der Alkamine Pseudoaconin (**1**) und Bikhaconin (**2**) sowie des Pyrodelphinin-Typ-Alkaloids Falaconitin (**27**) der Kalibrierreihe lagen ausserhalb des Abweichungsbereichs von $\pm 20\%$ (siehe Abbildung 17). Die Ansprechfaktoren von Isotalatizidin (**6**) lagen zwar innerhalb dieses

Abweichungsbereichs, aber das Signal im Massenchromatogramm wies eine asymmetrische Signalform auf und wurde deshalb ebenfalls ausgeschlossen. Eventuell handelte es sich um ein Tailing, was aber bei den anderen Alkaloiden nie beobachtet wurde. Bei Veratroylpseudaconin (**7**) wich der Kalibrierpunkt für die zweitschwächste Konzentration um 24 % vom Mittelwert m ab. **7** wurde dennoch für die quantitative Bestimmung einbezogen, da dieses Alkaloid in relativ hohen Alkaloidmengen in den Extrakten vorkam.

Die Quantifizierung wurde also mit vierzehn der achtzehn eingesetzten Referenzsubstanzen sowie zusätzlich mit den oben erwähnten tentativ identifizierten Zielsubstanzen Chasmanin (**3**), Falconerin (**12**) und Falconeridin (**14**) durchgeführt. Der breite Kalibrierbereich deckte die meisten der gemessenen Konzentrationen ab. Ausnahmen waren Pseudaconitin (**16**) in den Knollenproben AcKDel_1, AcK_{Del_3} und AcK_{Del_p}, welche den obersten Kalibrierpunkt bis dreifach überschritten. Diese Werte wurden extrapoliert. Bei der Probe AcK_{Del_p} lag die Menge an Veratroylpseudaconin (**7**) nur knapp über dem obersten Kalibrierwert und wurde ebenfalls extrapoliert. Analog wurde bei den Pillenproben verfahren, bei welchen einige Werte unterhalb des Kalibrierbereichs lagen. In einigen Proben wurde die protonierte Molekülmasse 646 u detektiert (siehe D.1.2), es waren aber keine MSⁿ-Spektren dieses Signals vorhanden, um es als Aconitin (**20**) zu identifizieren.

Verwendung der Messresultate

Die verwendete Extraktionsmethode der Alkaloide aus *Aconitum*-Knollen war für den Zweck der Quantifizierung nicht validiert worden. Mit DC-Kontrollen wurden jedoch die Fraktionen der Rohextrakte auf die Extraktionseffektivität überprüft (siehe B.4.5.1). Die folgenden Resultate beziehen sich auf die Alkaloidextrakte und stehen streng genommen nicht für das Ausgangsmaterial, z.B. µg eines Alkaloids / Pille. Für eine korrekte Angabe der einzelnen Alkaloidmengen im Ausgangsmaterial müssten von jeder Probe mehrere Muster aufgearbeitet

werden. Hierbei würde am besten ein interner Standard vor der Extraktion zugesetzt, um die Wiederfindungsrate zu bestimmen. Weiter war eine mehrfache Aufnahme der Kalibrierreihe im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da dies einen Tag beanspruchte und die HPLC-MS-Apparatur stark ausgelastet war.

Aus diesen Gründen wurde auf eine Angabe der absoluten Gehalte im Ausgangsmaterial verzichtet. Die gewonnenen Resultate wurden für Vergleiche der Alkaloidextrakte herangezogen. Hierfür wurde der Gehalt eines Alkaloids in Prozent vom jeweiligen Hauptalkaloid ausgedrückt.

C.5.4 HPLC-MS als Nachweismethode

Die hier untersuchten Alkaloide konnten als Referenzsubstanzen in Standards und in den untersuchten Extrakten auf den verwendeten Umkehrphasen-HPLC-Säulen gut getrennt werden. Beim eingesetzten Säulenmaterial Nucleosil HD (High Density) handelt es sich um Kieselgel, dessen Oberfläche in hoher Dichte durch Derivatisierung der freien Silanol-Gruppen zu C₁₈-Alkylsiloxanen und „Endcapping“ modifiziert wurde (Kohlenstoffgehalt von 20 %). Die basischen Diterpenalkaloide konnten aber nur durch Pufferung (siehe C.4.5.1.1) tailingfrei getrennt werden.

Bei Aufnahme der HPLC-MS-Chromatogramme von Alkaloidextrakten wurde der Weichmacher Dioctyl-Phthalat, mit dem charakteristischen Fragment der Masse 391 u (protoniert) gegen Ende des Trennung (RT in Trennsystem 1 respektive 2 bei ca. 25 respektive 60 min) gegenüber den Alkaloiden - z.T. mit hoher Intensität detektiert. Die Proben mussten während der Extraktion und Aufarbeitung mit dem Weichmacher (z.B. in PVC-Schläuchen) kontaminiert worden sein.

C.5.5 Resultate des HPLC-MS-Trennungen

C.5.5.1 Vergleich von HPLC-Trennung 1 und 2

Die mit HPLC-Trennung 1 identifizierten Alkaloide der untersuchten Proben sind in Tabelle 53 zusammengefasst. Die zusätzlichen tentativ identifizierten Alkaloide wurden bereits unter C.5.2.7 beschrieben. Abbildung 31 vergleicht die ESI(+)-Massenchromatogramme der Probe AcK_{Del_3} aus den HPLC-Trennungen 1 und 2. Die Chromatogramme sind trotz doppelter Chromatographiedauer mit Trennsystem 2 vergleichbar, es fehlen hier aber die Lipoalkaloide, welche nur in HPLC-Trennung 1 mit 100% MeOH eluierten.

Tabelle 53: Identifizierte Alkaloide der in HPLC-Trennung I untersuchten Alkaloidextrakte mit Massen der $[M+H]^+$ Molekülonen und Retentionszeiten (RT) in Trennung 1 im Vergleich zu Referenzsubstanzen.

Alkaloide	$[M+H]^+$ m/z	RT* (min)	Gefunden in Alkaloidextrakten			
			AcK _{Del_3}	Pill _{Del_94}	Pill _{Dhr}	Pill _{Kat}
Pseudaconin (1)	484	3,2	+	+	+	+
Bikhaconin (2)	468	3,7	+	+	+	+
Senbusin A (4)	424	4,5				
Karakolin (5)	378	5,7				
Isotalatizidin (6)	408	6,1	+		+	+
Veratroylpseudaconin (7)	648	8,1	+	+	+	+
Neolin (8)	438	8,2	+	+		+
Veratroylbikhaconin (9)	632	8,9				
Bikhaconitin (15)	674	11,2	+	+	+	+
Pseudaconitin (16)	690	11,5	+	+	+	+
Falconericin (17)	658	12,5	+		+ ^{a)}	
Aconitin (20)	646	13,0				
Chasmaconitin (21)	614	12,9				+
Yunaconitin (23)	660	13,8	+	+		
Indaconitin (24)	630	13,7			+	+

* Retentionszeit der Referenzsubstanzen; + identifiziert; a) Co-elution mit **18** (siehe Tabelle 43)

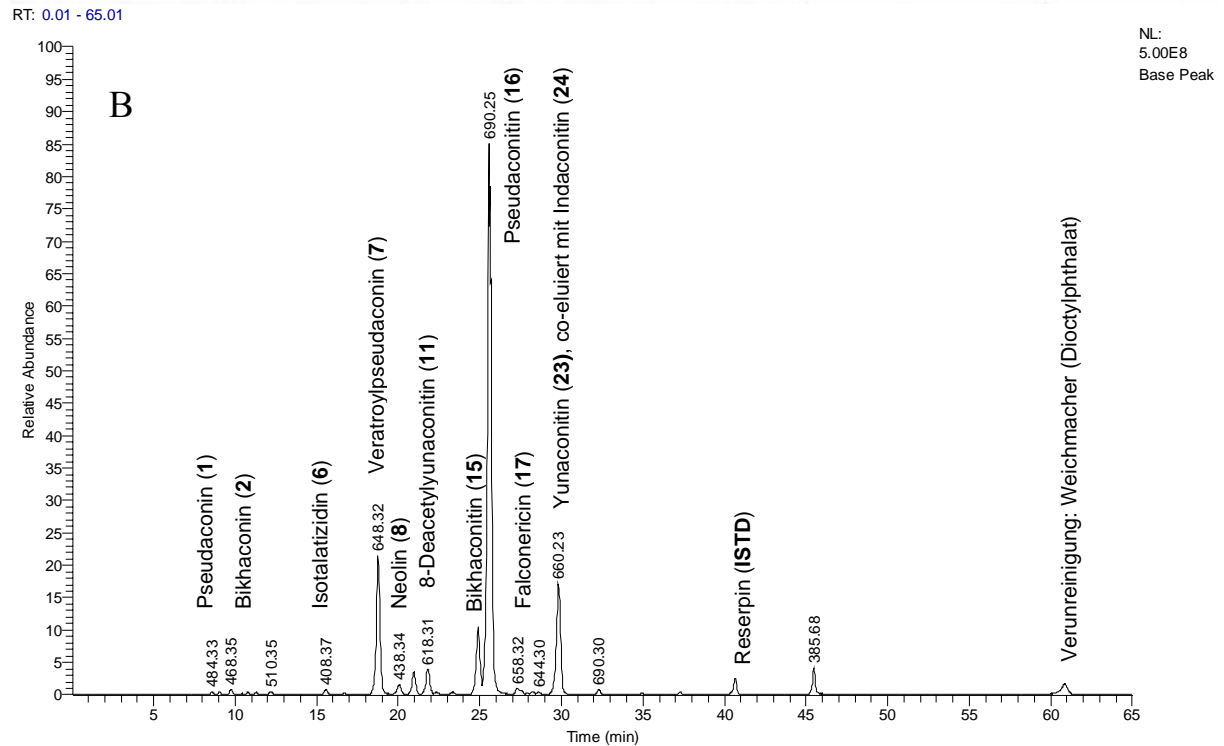
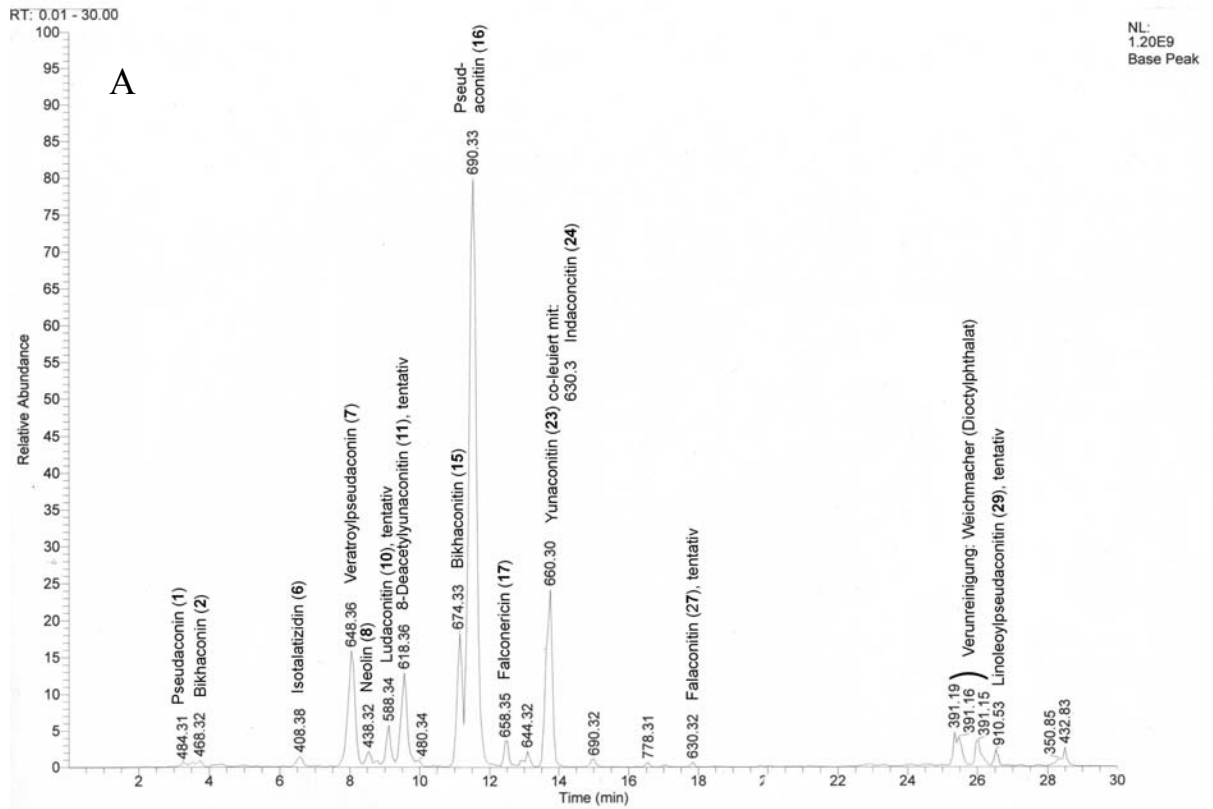


Abbildung 31: ESI(+)-Basischromatogramme des Extrakts AcK_{Del_3} getrennt mit Trennsystem 1 (A) und Trennsystem 2 (B).

Die Masse des Basisions ist jeweils am Signal angeschrieben.

C.5.5.2 Zusammenhang der chromatographischen und pharmakologischen Eigenschaften

Retentionszeit der untersuchten Alkaloide in der Umkehrphasen-HPLC

Betrachtet man die Reihenfolge der mit Umkehrphasen-HPLC getrennten Alkaloide, so eluierten erwartungsgemäss apolarere Alkaloide generell später (Retentionszeiten in Trennsystem 2 siehe D.1.1). Nach den relativ polaren Alkaminen folgten die Monoesteralkaloide, die Diesteralkaloide sowie ein Pyroalkaloid und schliesslich die relativ apolaren Lipoalkaloide (siehe Tabelle 54). Die Vertreter der fünf Estertypen eluierten also in fünf aufeinander folgenden Retentionszeitbereichen, wenngleich sich diese teilweise überlappten. Diese Beobachtung ist insofern bedeutsam, als der Estertyp der einzelnen Norditerpenalkaloide einerseits das chromatographische Verhalten und andererseits gerade auch die pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften stark beeinflusst (siehe Tabelle 5). Hypothetisch könnten so unbekannte Norditerpenalkaloide, welche mit HPLC-MSⁿ zumindest einem Estertyp zugeordnet werden können, pharmakologisch klassifiziert werden.

Tabelle 54: Retentionszeitbereiche der untersuchten Alkaloide in HPLC-Trennung 1 und 2: Elution nach Estertyp.

Bereich	Retentionszeitbereiche		Alkaloide nach Estertyp	Vertreter in Elutionsfolge aufgeführt
	Trennsystem 1 (min)	Trennsystem 2 (min)		
1	3,2-8,3	8,5-21	Alkamine	1, 2, 6, 8
2	8,1-9,8	18,5-24,5	Monoesteralkaloide	7, 9, 10, 11, 21, 22
3	11,2-13,8	24,9-30	Diesteralkaloide	15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24
4	z.B. 17,9	z.B. 37,5	Pyroalkaloide	27
5	23,2-30,5	---*	Lipoalkaloide	z.B. Palmitoylpseudaconitin (30) (siehe C.5.2.7.2)

* nicht erfasst wegen zu schwacher Elutionsstärke am Ende der Chromatographie: 95 % MeOH, statt 100 % MeOH wie in Trennsystem 2 (siehe C.4.5.1).

Die Retentionszeitbereiche der Estertypen überlappten teilweise bei Umkehrphasen-HPLC. So eluierte zum Beispiel das Monoesteralkaloid Veratrolypseudaconin (**7**) bereits vor dem letzten identifizierten Alkamin Neolin (**8**).

Mit (Normalphasen-)Dünnschichtchromatographie konnte dagegen keine vergleichbare Trennung der Alkaloide nach Estertyp beobachtet werden (siehe Tabelle 28, Tabelle 29).

C.5.5.3 Alkaloidmuster der untersuchten Proben

Die identifizierten sowie tentativ identifizierten Alkaloide der untersuchten Proben werden in Tabelle 55 zusammengefasst. Bei den quantifizierten Alkaloiden wird zusätzlich der relative Gehalt in Prozent vom Hauptalkaloid angegeben. Hiermit wird die Bedeutung der einzelnen Alkaloide im Alkaloidmuster ("pattern") ersichtlich. Im Folgenden basieren sämtliche Interpretationen auf dieser Übersicht.

C.5.5.3.1 Alkaloide aus *A. falconeri* und *A. spicatum*

Es wurden die meisten Norditerpenalkaloide gefunden, welche für *A. falconeri* und *A. spicatum* bekannt sind. Darüber hinaus wurden mehrere Alkaloide anhand von Referenzsubstanzen detektiert, welche in diesen Arten bisher noch nicht beschrieben wurden (siehe Tabelle 55).

Table 55: Identifizierte und tentativ identifizierte Alkaloide in Extrakten von *Aconitum*-Knollen und Juwelenpillen in HPLC-Trennung 2 mit gerundetem relativem Gehalt in Prozent vom Hauptalkaloid.

Alkaloide #	<i>A. spicatum</i>		<i>A. falconeri</i>			<i>A. violaceum</i>		Juwelenpillen								
	AcK _{Del_1}	Lit.	AcK _{Del_3}	AcK _{Del_P}	Lit.	AcK _{violac}	Lit.	Pill _{Del_92}	Pill _{Del_93}	Pill _{Del_94}	Pill _{Del_95}	Pill _{Dhr}	Pill _{Kat}	Pill _{Lad}	Pill _{Leh}	Pill _{Lha}
Pseudaconin (1)	+	*	+	+	*	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bikhaconin (2)	+	*	+	+	*	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chasmanin (3) ^{ti}						100	*									
Isotalatizidin (6)	+	*	+	+	*	+	*	+	+	+	+	+	+	+		
Neolin (8)	0.2	*	4	7	*	26	*	7	11	21	9	13	7	5	8	
Veratroypseudaconin (7)	17	*	40	35	A			12	35	55	100	20	100	45	46	0.6
Veratroylbikhaconin (9)	1	*	1	1	*			0.5	0.8	3	2	0.5	3	2	2	0.6
Ludaconitin (10)	4	*	5	4	*	1	*	7	7	7	15	7	10	10	14	3
8-Deacetylyunaconitin (11)	3	*	9	6	*			6	11	13	24	6	2	18	24	7
Falconerin (12) ^{ti}			0.1	0.5	B			100	100	100	46	95	1	1	2	2
Falconeridin (14) ^{ti}				0.1	C	0.2	*	12	12	8	2	11	0.6	0.4		1
Bikhaconitin (15)	21	E	10	8		n.d.	G	1	8	3	3	2	3	9	5	2
Pseudaconitin (16)	100	F	100	100	A			13	69	18	94	29	23	100	100	1
Falconericin (17)	0.2	*	1	1	C			23	17	5	7	39	0.7	2	1	1
8-Acetylfalconerin (18)	0.1	*	0.7	1	B			69	54	10	33	100	0.8	1.5	1	
Chasmaconitin (21)	1	*	0.5	0.4	*	6	*	0.6	1	0.4	0.2	1	1	8	7	6
Crassicaulin A (22)	0.7	*	0.5	0.3	*			0.5	1	0.5	0.2	0.4	0.7	3	1	17
Yunaconitin (23)	11	*	17	14	*			4	18	4	20	9	1	37	44	70
Indaconitin (24)	21	*	13	12	A	29	H	8	14	3	19	14	4	35	49	100
Falaconitin (27)	+	*	+	+	D			+	+				+	+		+

+ detektiert, aber nicht in quantitative Bestimmung einbezogen (siehe C.5.3); A Pelletier *et al.* (1977a); B Desai *et al.* (1986); C Desai & Pelletier (1989); D Pelletier *et al.* (1977b); E Dunstan & Andrews (1905); F Tsuda & Marion (1963); G Tiwari & Masood (1977); H Miana *et al.* (1971); # geordnet nach Estertyp dann nach Elutionsfolge; n.d. nicht detektiert; * in der Literatur bisher nicht für diese *Aconitum*-Art beschrieben; ti tentativ identifiziert; **grau unterlegt** wichtigstes Paar analoger Mono- und Diesteralkaloide.

C.5.5.3.2 Alkaloide von *A. violaceum* (AcK_{violac})

Das Alkaloidmuster des Knollenextrakts von *Aconitum violaceum* unterscheidet sich stark sowohl von den weiteren untersuchten Arten *A. falconeri* und *A. spicatum*, als auch von den Extrakten der verschiedenen Byu-Dmar-Pillen. Abbildung 32 stellt das HPLC-MS-Chromatogramm dar, in welchem als Hauptalkaloide Indaconitin (**24**) neben dem tentativ identifizierten Alkamin Chasmanin (**3**) (siehe C.5.2.7.6) ersichtlich sind. Die identifizierten sowie tentativ identifizierten Alkaloide sind in Tabelle 55 aufgeführt. Weiter wurden mehrere Alkaloide detektiert, welche als Alkamine interpretiert wurden, aber anhand der MSⁿ-Spektren nicht sicher einem der bekannten Isomeren zugeordnet werden konnten. Im Vergleich zum Alkaloidmuster der anderen untersuchten *Aconitum*-Knollen, bei welchem das Diesteralkaloid Pseudoaconitin (**16**) das dominiert, kann angenommen werden, dass *Aconitum violaceum* weniger toxisch ist.

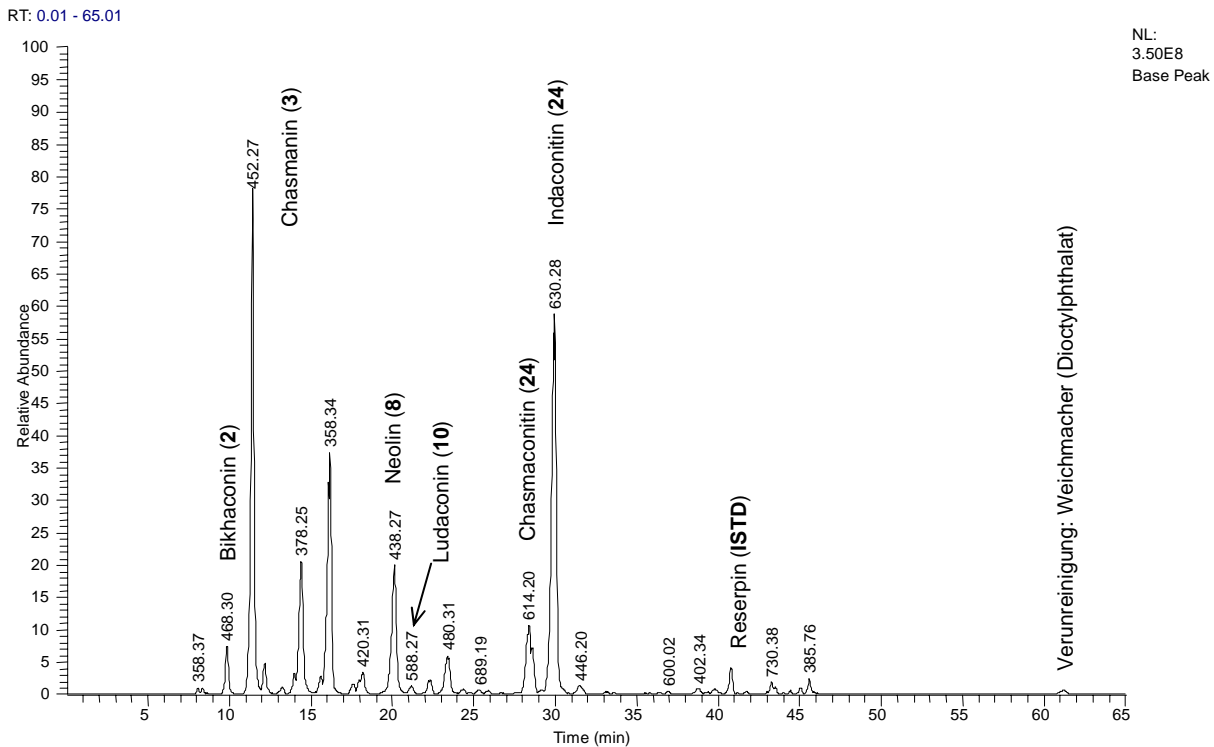


Abbildung 32: ESI(+)-Basionenchromatogramm von AcK_{violac} (Alkaloidextrakts R pH 9 von *A. violaceum*) getrennt mit Trennsystem 2.

Die Masse des Basisions ist jeweils am Signal angeschrieben

C.5.5.3.3 Verhältnis von Monoester- zu Diesteralkaloidanaloga als Ansatz zur Abschätzung des „processing“-Effekts auf das Alkaloidmuster von *Aconitum*-Knollen

Da von gewissen Behandlungsmethoden ist bekannt, dass der Gehalt an Monoesteralkaloiden aus den analogen Diesteralkaloiden durch Hydrolyse erhöht wird (siehe A.5.2; A.3.1.3), wurde das Verhältnis von Monoester- zu den zugehörigen Diesteralkaloiden als Indikator zur Abklärung eines „processing“-Effekts gewählt. Als Vergleichsbasis können die unbehandelten Knollen von *Aconitum falconeri* und *A. spicatum* (Probe AcK_{Del_3} und AcK_{Del_1}) herangezogen werden, bei welchen der Anteil des Monoesteralkaloids Veratroylpseudaconin (**7**) bis 50 % des Haupt-Diesteralkaloids Pseudaconitin (**16**) ausmachte. In den untersuchten Proben traten die analogen Mono- und Diesteralkaloide meist beide auf. Paare dieser analogen Alkaloide sind in Tabelle 56 aufgeführt.

Tabelle 56: Paare von Mono- und Diesteralkaloiden

	Monoesteralkaloide	Diesteralkaloide
	<u>Pseudaconitin-Typ:</u>	
A)	Veratroylpseudaconin (7)	Pseudaconitin (16)
B)	8-Deacetylyunaconitin (11)	Yunaconitin (23)
C)	Ludaconitin (10)	Indaconitin (24)
	<u>Bikhaconitin-Typ:</u>	
D)	Veratroylbikhaconin (9)	Bikhaconitin (15)
	<u>Neolin-Typ:</u>	
E)	Falconerin (12)	8-Acetylfalconerin (18)
F)	Falconeridin (14)	Falconericin (17)

Extraktionsausbeute und mögliche Verluste bei der Aufarbeitung beeinflussen den Extrakt-Gehalt als Ganzes und damit die absoluten Gehalte der einzelnen Alkaloide. Es wird hier jedoch davon ausgegangen, dass die Verhältnisse unter den einzelnen Komponenten nicht durch diese experimentellen Fehlerquellen verändert wurden.

Während z.B. das Paar Veratroylpseudaconin (**7**) / Pseudaconitin (**16**) bei den Knollenproben von *A. falconeri* und *A. spicatum* sowie bei den Pillenproben Pill_{Lad} und Pill_{Leh} das wichtigste Mono-/ Diesteralkaloid-Paar ist, spielt demgegenüber Falconerin (**12**) / 8-Acetylfalconerin (**18**) bei den Pillen aus Delhi und Dharamsala eine in etwa gleich starke Rolle. In *A. falconeri* und *A. spicatum* beträgt **18** jedoch nur ca. 1 % vom Hauptalkaloid (siehe Tabelle 55). Daraus lässt sich ableiten, dass zur Herstellung der verschiedenen Pillen unterschiedliche *Aconitum*-Arten verwendet wurden, die aus dem ganzen Himalaja-Raum stammen. Andererseits ist es hier nicht möglich, die verwendete Art anhand des Alkaloidmusters und dessen Hauptalkaloide zu identifizieren, da nur von zwei wichtigen Arten - *A. falconeri* und *A. spicatum*, *nebst* *A. violaceum* Basisionenchromatogramme zum Vergleich vorhanden sind. Andererseits wurden die relativen Gehalte zwischen den Alkaloiden durch die Behandlung zum Teil verändert. Weiter sind innerhalb einer Art zudem auch Schwankungen im Alkaloidmuster je nach Standort oder lokaler Varietät und Jahreszeit denkbar.

C.5.5.3.4 Knollenproben

Die Proben AcK_{Del_3} und AcK_{Del_p} wurden durch mikroskopische Untersuchung der Knollen als *A. falconeri* und AcK_{Del_1} als *A. spicatum* identifiziert. Das Alkaloidmuster wurde bei allen drei Proben vom Hauptalkaloid Pseudaconitin (**16**) dominiert.

Vergleich von unbehandelten und behandelten Knollen von *A. falconeri*

Von *A. falconeri* wurde ausgehend von demselben Knollenmaterial ein Teil behandelt und ein Teil nicht behandelt erhalten. Somit konnten die beiden Proben AcK_{Del_p} und AcK_{Del_3} direkt verglichen werden. Bemerkenswerterweise war kaum ein Unterschied auszumachen. Dies bestätigte die Resultate, welche schon in den DC-Trennungen diesbezüglich erhalten wurden (siehe Tabelle 31). Bereits die organoleptische Prüfung der behandelten Droge machte deutlich,

dass die Probe AcK_{Del_p} nicht der Pharmacopoeia of Tibetan Medicine (Dash, 1994) entspricht, da die anästhesierende Wirkung noch vorhanden war (siehe A.5.3.2). Für eine effektive Behandlung müsste die Droge zerkleinert und länger behandelt werden.

Vergleich der beiden Arten *A. falconeri* und *A. spicatum*

Die Knollenextrakte AcK_{Del_3} (*A. falconeri*) und AcK_{Del_1} (*A. spicatum*) zeigten ein ähnliches Muster bezüglich der vorkommenden Hauptalkaloide, wie auch bei der DC-Untersuchung (siehe Tabelle 31) festgestellt wurde. In der Knollenprobe AcK_{Del_1} wurde dagegen Falconerin (**12**) und Falconeridin (**14**) nicht nachgewiesen. Bezogen auf das Verhältnis von Veratroylpseudoaconin (**7**) zum Hauptalkaloid Pseudoaconitin (**16**) fällt auf, dass dies bei der Probe AcK_{Del_1} etwa halb so gross war wie bei AcK_{Del_3}, während bei Bikhaconitin (**15**) das Verhältnis doppelt so gross war.

C.5.5.3.5 Tibetische Juwelenpillen (Byu-Dmar)

Das Alkaloidmuster in Extrakten von tibetischen Juwelenpillen kann einerseits durch das eventuelle Behandeln der enthaltenen Knollen geprägt sein. Andererseits ist ein Einfluss denkbar, welchen das Verfahren der Pillenherstellung auf das Alkaloidmuster hat. Für diese Fragestellung lagen aber keine entsprechenden Muster von Pillen und der hierfür eingesetzten Charge an Knollendroge vor. Die Prozesse, welche bei der Pillenherstellung eingesetzt werden, wie Pulverisieren der Komponenten, Mischen, Befeuchten, Formen der Pillen und Trocknen, werden als insgesamt relativ mild und ohne wesentlichen Einfluss auf die Alkaloidzusammensetzung eingeschätzt und können im Folgenden vernachlässigt werden. Die Behandlung der Knollen erfolgt dagegen mit Mazerieren bis Kochen unter Bedingungen, die einen weitaus dagegen ein weitaus grösseren Einfluss auf das Alkaloidmuster haben können.

Bei den Byu-Dmar-Pillenproben wurde der Alkaloidmuster der verschiedenen Herstellungen aus Delhi (Tibetan Medical Institute) sowie derjenige von verschiedenen Orten des Himalaja miteinander verglichen.

Vergleich mehrerer Chargen von Byu-Dmar-Pillen aus Delhi

Pillen desselben Herstellers in Delhi zeigten Unterschiede hinsichtlich des Alkaloidmusters und der Konzentrationsverhältnisse zwischen den Mono- und Diesteralkaloidanaloga. Verglichen mit den *Aconitum*-Knollenproben AcK_{Del_1} und AcK_{Del_3}, bei welchen das gesamte Alkaloidmuster von Pseudoaconitin (**16**) beherrscht wurde, war bei den vier untersuchten Pillenproben aus Delhi das Hauptalkaloid ein Monoesteralkaloid. Dieses war Veratroylpseudoaconin (**7**) im Fall von Pill_{Del_95} und bei den übrigen drei Proben aus Delhi jeweils Falconerin (**12**). Der relative Gehalt der 1-2 wichtigsten Diesteralkaloide war dagegen sehr unterschiedlich. Bei der Pillenprobe Pill_{Del_94} lag dieser unter 30 %, was als effektives „processing“ der verwendeten *Aconitum*-Knollen interpretiert wird. Bei den übrigen Pillenproben aus Delhi waren die Diesteralkaloide noch stark vertreten. Der relative Gehalt der 1-2 wichtigsten Diesteralkaloide lag je zwischen ca. 50 und 90 %, was auf ein weniger effektives „processing“ zurückgeführt wird.

Vergleich von Pillen und Knollen von Delhi

Die Knollenproben AcK_{Del_3} und AcK_{Del_1} wurden vom selben Hersteller der Pillen in Delhi gekauft, zeigten aber gegenüber den in vorangehenden Jahren hergestellten Pillenchargen ein anderes Alkaloidmuster. In den Pillen gehörte 8-Acetylfalconerin (**18**) respektive das analoge Monoesteralkaloid Falconerin (**12**) zu den Hauptalkaloiden, während diese In den Knollenproben AcK_{Del_1}, AcK_{Del_3}, AcK_{Del_p} nur von geringer Bedeutung waren. Dies könnte von unterschiedlicher Ware der Händler kommen. Die Droge ist ja oft schon eine Mischung verschiedener *Aconitum*-Arten (siehe A.2.1.1; B.4.3.1)

Vergleich der Byu-Dmar-Pillen von verschiedenen Orten des Himalaja

Unter den Pillenproben aus Dharamsala, Kathmandu, Ladakh/Leh und Lhasa fiel jenes aus Kathmandu auf. Das Alkaloidmuster wurde hier vom Monoesteralkaloid Veratroylpseudaconin (**7**) dominiert, was auf ein effektiv durchgeführtes „processing“ zurückgeführt wird.

Das Alkaloidmuster der Pillenproben aus Dharamsala und Delhi'92 sind ähnlich: Falconerin (**12**) und 8-Acetylfalconerin (**18**) – ein Mono- und Diesteralkaloid-Paar - waren hier als Hauptalkaloide etwa gleich bedeutend.

Pill_{Leh} und Pill_{Lad}, zwei Pillenproben des selben Herstellers in Nordwestindien, hatten ein übereinstimmendes Alkaloidmuster, welches dem der unbehandelten Knollenprobe AcK_{Del_3} sehr ähnlich ist, mit Pseudaconitin (**16**) als Hauptalkaloid.

Bei den Pillen aus Lhasa waren dagegen die Alkaloide Indaconitin (**24**) und Yunaconitin (**23**) beherrschend und kein „processing“-Effekt war ersichtlich. Dies deckt sich mit dem Hinweis, dass in Lhasa für die hier untersuchten Juwelentpillen unbehandelte *Aconitum*-Knollen eingesetzt wurden (Aschoff *et al.*, 1997).

C.5.5.4 Pharmakologische Bedeutung der Verhältnisse zwischen Alkaloiden, insbesondere Mono- und Diesteralkaloidanaloga

Die Toxizität von *Aconitum*-Knollen geht im überwiegenden Mass auf die Diesteralkaloide zurück (siehe A.3.2.2). Mit Behandeln der Knollen können der Alkaloidgehalt sowie die quantitativen Verhältnisse unter den Alkaloiden beeinflusst werden. Als effektiv wird das „processing“ bezeichnet, wenn z.B. das natürliche Verhältnis zwischen Mono- und

Diesteralkaloiden umgekehrt wird, also die Monoester- gegenüber den Diesteralkaloiden überwiegen. Anhand von Toxizitätsdaten der betreffenden Substanzen (siehe Tabelle 5) lässt sich annehmen, dass die Gesamtoxizität verglichen mit unbehandelten Knollen reduziert ist. Dies wird auch unterstützt durch pharmakologische Untersuchungen, welche z.B. mit gekochten Knollen durchgeführt wurden [Handa *et al.* (1951), siehe A.5.3.1]. Neben der Reduktion der Toxizität wird auch angenommen, dass auch das arrhythmogene Potential sinkt, während jedoch die erwünschten Wirkungen wie Analgesie und Entzündungshemmung erhalten bleiben kann (siehe Tabelle 5). Die Gesamtoxizität von in dieser Hinsicht effektiv behandelten Drogen bleibt dennoch eine Frage der Dosis.

Toxizitätsabschätzung bei den Juwelenpillen

Mit ca. 5 % in der Pillenmischung sind - bei einem Pillengewicht z.B. von Byu-Dmar 13 Pillen von ca. 600 mg (siehe Tabelle 21) - gemäss den Rezepturen (siehe Tabelle 10) theoretisch ca. 30 mg *Aconitum*-Knollen pro Pille enthalten. Die in den Pillen enthaltene Menge *Aconitum*-Knollen entspricht ohne „Prozessing-Effekt“ somit 1/100 der toxischen Dosis von 2-4 g (Seeger, 1994; siehe A.3.2.1).

Für den Einsatz von *Aconitum*-Knollen als Einzelbestandteil in phytopharmazeutischen Präparaten ist gerade die geringe therapeutische Breite der Diesteralkaloide das Hauptproblem für den sicheren Einsatz in der Therapie. Dies ist auch der Grund, warum *Aconitum* im Westen aus der westlichen Schulmedizin praktisch verschwunden ist (ausser z.B. einem Präparat in Deutschland: Aconitysat[®] Bürger, welches bei Neuralgien eingesetzt wird).

Andererseits ist das Interesse an *Aconitum*-Alkaloiden in der letzten Zeit durch neue pharmakologische Untersuchungen gestiegen, z.B. Effekte von Diterpenalkaloiden in

Hirnschnitten (Ameri *et al.*, 1996a; 1996b), Untersuchung des antiarrhythmischen Potentials von Lappaconitin (Heubach & Schnüle, 1998) und zur Migräneprophylaxe (Aschoff *et al.*, 1997).

Falls in diesem Hinblick *Aconitum*-Extrakte bei bestimmten Indikationen eingesetzt werden sollten, wäre eine reduzierte Toxizität wünschenswert. Durch validierte Verfahren könnten die Wirkstoffverhältnisse eingestellt werden und die pharmazeutische Qualität und Arzneimittelsicherheit gewährleistet werden. Ein so standardisiertes Präparat würde eine sichere Therapie ermöglichen.

C.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die HPLC-MSⁿ-Technik am Beispiel von Norditerpenalkaloiden indischer *Aconitum*-Arten angewendet, ist eine sehr potente Methode zur Analyse im Spurenbereich mit gleichzeitig maximaler Trennung und Identifizierungsmöglichkeiten und somit eine revolutionäre jedoch sehr anspruchsvolle Technik.

Bei den untersuchten *Aconitum*-Arten konnten die für sie in der Literatur beschriebenen Alkaloide meist bestätigt werden. Andererseits wurden einige bekannte Alkaloide erstmals in Extrakten dieser Arten detektiert.

Um Entgiftungsmethoden mit reproduzierbaren Ergebnissen sicher einsetzen zu können, müssten diese validiert werden, um zum Beispiel bestimmte Alkaloidverhältnisse zu erreichen. Zu standardisierten Methoden gibt es zwar einige chinesische Arbeiten wie Chen *et al.* (1995) meist hinsichtlich der pharmakologischen und toxikologischen Parameter, wobei die analytische Bestimmung der Alkaloide jedoch fehlt.

Die Strukturen der mit multipler Massenspektrometrie gebildeten Fragmente nach der Bildung des MS²-Basisions bleiben weitgehend aufzuklären.

D Anhang

D.1 Quantifizierung von Diterpenalkaloiden mit HPLC-MS

D.1.1 Rohdaten zur Kalibrierreihe

Tabelle 57: Referenzsubstanzen des Standard IV. Angabe der bei APCI-Ionisierung zu detektierenden Massen der $[M+H]^+$ Ionen sowie der eingewogenen Mengen und der Konzentrationen in den Lösungen der Verdünnungs- und Kalibrierreihe

Referenzsubstanzen	Masse der $[M+H]^+$ Ionen	Einwaage (μg)	Verdünnungsreihe: ng/ μl					
			Standard IV	Vd-1	Vd-2	Vd-3	Vd-4	--- ^{a)}
			Kalibrierreihe:		ng/5 μl der injizierten Lösung			
			KL-1	KL-2	KL-3	KL-4	KL-5	KL-6
Pseudoaconin (1)	484,3	40	100,0	20,0	5,00	1,00	0,20	0,040
Bikhaconin (2)	468,3	38	95,0	19,0	4,75	0,95	0,19	0,038
Isotalatizidin (6)	408,3	53	132,5	26,5	6,63	1,33	0,27	0,053
Veratroylpseudoaconin (7)	648,3	40	100,0	20,0	5,00	1,00	0,20	0,040
Neolin (8)	438,3	39	97,5	19,5	4,88	0,98	0,20	0,039
Veratroylbikhaconin (9)	632,3	55	137,5	27,5	6,88	1,38	0,28	0,055
Ludaconitin (10)	588,3	40	100,0	20,0	5,00	1,00	0,20	0,040
8-Deacetylyunaconitin (11)	618,3	70	175,0	35,0	8,75	1,75	0,35	0,070
Bikhaconitin (15)	674,3	113	282,5	56,5	14,13	2,83	0,57	0,113
Pseudoaconitin (16)	690,3	41	102,5	20,5	5,13	1,03	0,21	0,041
Falconericin (17)	658,3	40	100,0	20,0	5,00	1,00	0,20	0,040
8-Acetylfalconerin (18)	674,3	40	100,0	20,0	5,00	1,00	0,20	0,040
Aconitin (20)	646,3	46	115,0	23,0	5,75	1,15	0,23	0,046
Chasmaconitin (21)	614,3	50	125,0	25,0	6,25	1,25	0,25	0,050
Crassicaulin A (22)	644,3	70	175,0	35,0	8,75	1,75	0,35	0,070
Yunaconitin (23)	660,3	40	100,0	20,0	5,00	1,00	0,20	0,040
Indaconitin (24)	630,3	51	127,5	25,5	6,38	1,28	0,26	0,051
Falaconitin (27) ^{b)}	630,3	62	155,0	31,0	7,75	1,55	0,31	0,062
Reserpin (ISTD)	609,7	--- ^{c)}	je 100 ng/5 μl der injizierten Lösung					

Vd Verdünnungslösung; KL Kalibrierlösung; ISTD interner Standard; ^{a)} KL-6 aus Vd-4;

^{b)} $[M+H]^+$ Ion war nicht Basision; ^{c)} als ISTD-Lösung Bestandteil der Kalibrierlösungen.

Tabelle 58: Retentionszeiten der Referenzsubstanzen bei Aufnahme der Kalibrierreihe und Berechnung der mittleren Retentionszeit:

Kalibrierlösung No.: <i>ungefähre Menge injiziert in 5 µl</i>	KL-6	KL-5	KL-4	KL-3	KL-2	KL-1	RT_{mittel}	S_{rel}
	~0,04 ng	~0,2 ng	~1 ng	~4 ng	~20 ng	~100 ng		
Referenzsubstanzen	Retentionszeit (min)						(min)	(%)
Pseudaconin (1)	8,88	8,75	8,87	8,85	8,96	8,94	8,9	1,6
Bikhaconin (2)	10,1	9,91	10,05	10,1	10,17	10,13	10,1	1,9
Isotalatizidin (6)	15,72	15,76	15,79	15,78	15,98	16	15,9	1,5
Veratroylpseudaconin (7)	19,17	19,04	19,09	19,31	19,2	19,19	19,2	0,7
Neolin (8)	20,22	20,23	20,26	20,33	20,52	20,49	20,4	1,0
Veratroylbikhaconin (9)	20,61	20,47	20,5	20,79	20,62	20,6	20,6	0,6
Ludaconitin (10)	21,35	21,25	21,3	21,54	21,42	21,41	21,4	0,5
8-Deacetylyunaconitin (11)	22,22	22,08	22,17	22,4	22,22	22,24	22,2	0,4
Bikhaconitin (15)	25,21	25,13	25,16	25,32	25,34	25,29	25,2	0,4
Pseudaconitin (16)	25,84	25,82	25,84	26,04	25,99	25,96	25,9	0,3
Falconericin (17)	27,63	27,55	27,61	27,82	27,71	27,69	27,7	0,3
8-Acetylfalconerin (18)	27,81	27,76	27,82	28,03	27,91	27,91	27,9	0,3
Aconitin (20)	28,29	28,21	28,24	28,4	28,36	28,34	28,3	0,2
Chasmaconitin (21)	28,56	28,48	28,51	28,68	28,68	28,63	28,6	0,3
Crassicaulin A (22)	28,89	28,84	28,86	29,07	28,98	28,99	28,9	0,3
Yunaconitin (23)	30,09	30,07	30,09	30,28	30,18	30,19	30,1	0,3
Indaconitin (24)	30,0	30,01	30,02	30,2	30,16	30,16	30,1	0,3
Falaconitin (27)	37,47	37,41	37,45	37,64	37,44	37,51	37,5	0,3
Reserpin (ISTD)	40,81	40,71	40,82	41,0	40,71	40,82	40,8	0,3
							Mittelwert:	0,6

RT ∅ mittlere Retentionszeit

Tabelle 59: Signalflächen der Kalibrierreihe:

Kalibrierlösung No.:	KL-6	KL-5	KL-4	KL-3	KL-2	KL-1
<i>ungefähre Menge iniiziert in 5 µl:</i>	<i>~0,04 ng</i>	<i>~0,2 ng</i>	<i>~1 ng</i>	<i>~4 ng</i>	<i>~20 ng</i>	<i>~100 ng</i>
Referenzsubstanzen	Signalflächen					
Pseudaconin (1)	1,31E+06	2,30E+06	1,92E+07	1,20E+08	5,69E+08	3,09E+09
Bikhaconin (2)	1,18E+06	2,19E+06	1,78E+07	1,27E+08	6,61E+08	3,71E+09
Isotalatizidin (6)	7,64E+05	2,36E+06	1,46E+07	7,49E+07	3,29E+08	1,69E+09
Veratroypseudaconin (7)	1,72E+06	5,42E+06	3,34E+07	1,92E+08	8,69E+08	4,39E+09
Neolin (8)	1,57E+06	5,49E+06	3,25E+07	1,61E+08	7,30E+08	3,68E+09
Veratroylbikhaconin (9)	1,96E+06	6,59E+06	3,59E+07	2,08E+08	8,76E+08	4,44E+09
Ludaconitin (10)	2,53E+06	8,75E+06	4,74E+07	2,52E+08	1,11E+09	5,62E+09
8-Deacetylyunaconitin (11)	2,92E+06	1,02E+07	5,97E+07	3,25E+08	1,39E+09	7,12E+09
Bikhaconitin (15)	1,01E+07	4,14E+07	2,14E+08	1,12E+09	4,79E+09	2,39E+10
Pseudaconitin (16)	2,76E+06	1,26E+07	6,05E+07	3,36E+08	1,49E+09	7,81E+09
Falconericin (17)	3,17E+06	1,34E+07	6,75E+07	3,25E+08	1,45E+09	7,76E+09
8-Acetylfalconerin (18)	3,79E+06	1,41E+07	7,35E+07	3,66E+08	1,54E+09	7,83E+09
Aconitin (20)	3,80E+06	1,60E+07	8,13E+07	3,92E+08	1,68E+09	8,72E+09
Chasmaconitin (21)	4,65E+06	1,82E+07	9,08E+07	4,50E+08	1,94E+09	9,92E+09
Crassicaulin A (22)	6,65E+06	2,38E+07	1,22E+08	6,03E+08	2,60E+09	1,31E+10
Yunaconitin (23)	3,74E+06	1,42E+07	7,18E+07	3,60E+08	1,53E+09	7,82E+09
Indaconitin (24)	4,86E+06	1,98E+07	1,00E+08	4,90E+08	2,09E+09	1,05E+10
Falaconitin (27)	2,79E+06	9,46E+06	4,77E+07	2,59E+08	1,01E+09	5,13E+09
Reserpin (ISTD)*	2,79E+08	2,39E+08	2,42E+08	2,51E+08	2,45E+08	2,84E+08

* durchschnittliche Fläche ISTD: 2,57E+08 (s_{rel.} 7,7 %)

D.1.2 Rohdaten zu den untersuchten Extrakten von *Aconitum*-Knollen und Byu-Dmar-Pillen

Tabelle 60: Einwaage der Alkaloidextrakte und deren Konzentration in den Stamm- und Messlösungen.

Alkaloidextrakte der untersuchten Proben	Einwaage Alkaloidextrakt µg	Stammlösung µg/µl	Messlösung µg/µl	injizierte Menge µg/5 µl
Knollen (R pH 9):				
AcK _{Del_3}	136	0,272	0,054	0,272
AcK _{Del_p}	304	0,608	0,121	0,608
AcK _{Del_1}	550	1,100	0,220	1,100
Pillen (R pH 12):				
Pill _{Del_92}	518	1,036	0,207	1,036
Pill _{Del_93}	530	1,06	0,212	1,060
Pill _{Del_94}	319	0,638	0,127	0,638
Pill _{Del_95}	344	0,688	0,137	0,688
Pill _{Dhr}	537	1,074	0,215	1,074
Pill _{Kat}	200	0,4	0,08	0,400
Pill _{Lad}	310	0,62	0,124	0,620
Pill _{Leh}	197	0,394	0,078	0,394
Pill _{Lha}	218	0,436	0,087	0,436

R pH 9 respektive R pH 12: bei pH 9 respektive 12 ausgeschüttelter Alkaloidextrakt

Tabelle 61: Retentionszeiten in HPLC-Trennung 2 der Alkaloide in den untersuchten Proben

Angabe der Retentionszeit in min

Alkaloid	Aconitum-Knollen					Byu-Dmar-Pillen									RT _{mittel} (min)	S _{rel} (%)
	AcK _{Del_3}	AcK _{Del_P}	AcK _{Del_P}	AcK _{Del_1}	AcK _{violac}	Pill _{Del_92}	Pill _{Del_93}	Pill _{Del_94}	Pill _{Del_95}	Pill _{Dhr}	Pill _{Kat}	Pill _{Lad}	Pill _{Leh}	Pill _{Lha}		
Pseudaconin (1)	8,56	8,76	8,84	8,69	8,63	8,86	8,63	8,55	8,85	8,93	9,15	8,74	8,80	8,61	8,8	1,9
Bikhaconin (2)	9,74	9,98	10,08	9,87	9,85	10,11	9,85	9,74	10,07	10,14	10,43	9,99	10,00	9,78	10,0	1,9
Chasmanin (3) ^{ti}					11,32											
Isotalatizidin (6)	15,55	15,70	15,74	15,91		16,26	15,78	15,78	15,75	16,24	16,14	16,03			15,9	1,5
Veratroylpseudaconin (7)	18,76	19,11	19,15	18,54		19,39	19,00	18,82	19,05	19,41	19,36	19,16	19,07	19,65	19,1	1,6
Neolin (8)	20,06	20,22	20,22	20,18	20,62	20,83	20,29	20,35	20,28	20,77	20,66	20,56	20,23		20,4	1,2
Veratroylbikhaconin (9)	20,16	20,55	20,59	20,01		20,77	20,41	20,22	20,44	20,83	20,75	20,53	20,48	20,88	20,5	1,3
Ludaconitin (10)	20,96	21,32	21,33	20,83		21,54	21,19	20,99	21,21	21,60	21,55	21,36	21,22	21,55	21,3	1,2
8-Deacetylyunaconitin (11)	21,78	22,18	22,18	21,80		22,37	22,02	21,85	22,07	22,46	22,41	22,16	22,07	22,32	22,1	1,0
Falconerin (12) ^{ti}	22,36	22,76	22,76			22,90	22,59	22,39	22,63	23,00	22,99	22,74	22,60	22,97	22,7	1,0
Falconeridin (14) ^{ti}		24,27				24,36	24,08	23,87	24,11	24,48	24,47	24,22		24,02	24,2	0,9
Bikhaconitin (15)	24,90	25,17	25,12	25,05		25,47	25,10	25,07	25,10	25,55	25,55	25,35	25,11	26,27	25,3	1,4
Pseudaconitin (16)	25,58	25,87	25,88	25,74		26,14	25,79	25,74	25,80	26,24	26,22	26,03	25,82	26,82	26,07	1,2
Falconericin (17)	27,29	27,63	27,56	27,31		27,81	27,50	27,36	27,51	27,87	27,91	27,66	27,50	27,99	27,6	0,8
8-Acetylfalconerin (18)	27,51	27,83	27,82	27,48		28,03	27,71	27,61	27,72	28,11	28,09	27,91	27,78		27,8	0,8
Aconitin (20)*				27,89		28,40	28,08				28,65	28,34	28,15		28,3	0,9
Chasmaconitin (21)	28,26	28,52	28,46	28,20	28,07	28,74	28,40	28,34	28,43	28,85	28,87	28,68	28,43	28,18	28,5	0,8
Crassicaulin A (22)	28,61	28,89	28,80	28,55		29,08	28,74	28,68	28,74	29,16	29,21	28,96	28,76	28,49	28,8	0,8
Yunaconitin (23)	29,81	30,13	30,12	29,78		30,29	29,99	29,89	29,98	30,36	30,48	30,20	29,99	29,63	30,1	0,8
Indaconitin (24)	29,79	30,05	30,01	29,76	29,49	30,26	29,95	29,89	29,94	30,31	30,42	30,15	29,96	29,65	30,0	0,7
Falaconitin (27)	37,30	37,50	37,43	37,20		37,58	37,34				38,07	37,42		36,85	37,4	0,9
Reserpin (ISTD)	40,67	40,86	40,83	40,54		40,63	40,68	40,52	40,63	40,81	41,40	40,78	40,69	40,07	40,7	0,7
	Mittelwert:														1,1	

ti tentativ identifiziert; * m/z 646 mit RT passen zu $[M+H]^+$ Aconitin (20), aber keine Identitätsbestätigung mit MSⁿ! Mehrere Substanzen mit gleicher Molekülmasse.

Literaturverzeichnis

- AMERI A, SHI Q, ASCHOFF JC, PETERS, T** (1996a). Electrophysiological Effects of Aconitine in Rat Hippocampal Slices. *Neuropharmacology* **35**: 13-22
- AMERI A, GLEITZ J, PETERS T** (1996b). Bicuculline-Induced Epileptiform Activity in Rat Hippocampal Slices: Suppression by *Aconitum* Alkaloids. *Planta Med.* **63**: 228-232
- ARZNEIMITTELKOMPENDIUM DER SCHWEIZ** (2003). Documed, Basel, 25. Auflage, 2083-84
- ASCHOFF JC, TASHIGANG TY, MAIER J** (1997). Clinical Trial in Migraine Prophylaxis with a Multicomponent Tibetan Jewel-Pill. Transfer Problems of Tibetan into Western Medicine, Demonstrated ‚pars pro toto‘ on Aconite Plants in our Tibetan Prescription. In ASCHOFF JC, RÖSING I (Eds.), *Tibetan Medicine, Proceedings of the International Symposium University of Ulm/Germany, 19./20.7.1996*, Ulm, Fabri Verlag, 21-38
- ATTA-UR-RAHMAN, FATIMA N, AKTHAR F, CHOUDHARY MI, KHALID A** (2000). New Norditerpenoid Alkaloids from *Aconitum falconeri*. *J. Nat. Prod.* **63**: 1393-1395
- BEUL M** (1990). Diterpenalkaloide der in der Schweiz vorkommenden Subspecies von *Aconitum lycoctonum* L. *Dissertation, Universität Basel*, 120-126
- BENN MH** (1993). Diterpenoid Alkaloids. In WATERMAN PG (Ed.)/DEY PM, HARBORNE JB (Series Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol.8, Academic Press, London, 451-472
- BENN MH, JACYNO JM**(1983). The Toxicology and Pharmacology of Diterpenoid Alkaloids. In PELLETIER W.S. (Ed.), *Alkaloids, Chemical and Biological Perspectives*, Vol. 1, John Wiley & Sons, New York, 153-210
- BERGER U** (2000). Structure Elucidation and Quantification of Trichlotheceenes an Bisphenol Diglycidyl Ether Derivates in Food by HPLC Combined with Multiple Mass Spectrometry. *Dissertation, Universität Basel*, 5-12
- BISSET NG, MAZARS G** (1984). Arrow Poisons in South Asia. Part 1. Arrow Poisons in Ancient India. *J. Ethnopharmacol.* **12**: 1-24
- BLASZCZYK T** (2001). Gefahr durch chinesische Arzneimittel? – Die Toxizität der Traditionellen Chinesischen Arzneien. *Deutsche Apotheker Zeitung* **141**: 1687-1696
- BRITISH PHARMACEUTICAL CODEX** (1973). The Pharmaceutical Society of Great Britain, The Pharmaceutical Press, London, 7-8
- BRÜHL P, KING G** (1896). A Century of New and Rare Indian Plants. *Annals Roy. Bot. Garden, Calcutta*, **V(II)**: 109-114
- BÜCHI J ET AL.** (1975). Kommentar zur Pharmacopoeia Helvetica Editio Sexta. Schweiz. Apothekerverein, Bern, 764
- BURGER A, WACHTER H** (1998). Hunnius - Pharmazeutisches Wörterbuch, 8.Aufl., W. de Gruyter, Berlin, 40-43
- CHAKRAVARTY HL, CHAKRAVARTI D** (1954). Indian Aconites. *Economic Botany* **8**: 366-376
- CHAN TYK** (1994). Aconitine Poisoning: A Global Perspective. *Vet. Human Toxicol.* **36**: 326-328
- CHEN L, CAI B, MA C, ZENG X, YE D** (1995). *Zhugguo Zhungyao Zaazhe*, **20**: 20-22
- CHEN Y, KÖLLIKER S, OEHME M, KATZ A** (1999). „Isolation of Diterpenoid Alkaloids from Herb and Flowers of *Aconitum napellus* ssp. *vulgare* and Elektrospray Ion Trap Multiple MS Study of these Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **62**: 701-704
- CHOPRA RN, NAYAR SL, CHOPRA IC** (1956). Glossary of Indian Medicinal Plants, CSIR, New Delhi, 4-5
- CHOPRA RN, CHOPRA IC, HANDA KL, KAPOOR LD** (1958). Chopra's Indigenous Drugs of India, U.N. Dhur & Sons, Calcutta, 52-61

- CHOWDHERY HJ, WADHWA BM** (1984). Flora of Himachal Pradesh (Flora of India, Series 2), Botanical Survey of India, Howrah, **1**: 1-3
- CUNNIFF J, TILLER P, LAND A** (1996). Quadrupole Ion Trap Analysis: Dynamic Range and the Effects of Coeluters on the LCQ. LCQ, Technical Report 622, Finnigan USA,
- DASH VB** (1994). Pharmacopoeia of Tibetan Medicine. Sri Satguru Publications/Indian Books Centre, Delhi, 122-123, 227ff., 252
- DESAI HK, JOSHI BS, PELLETIER SW** (1986). Structures of Falconerine and Falconerine 8-Acetate, Two New C₁₉-Diterpenoid Alkaloids. *Heterocycles* **24**: 1061-1066
- DESAI HK, PELLETIER SW** (1989). Falconericine and Falconeridine: Two New Alkaloids from *Aconitum falconeri*. *Heterocycles* **29**: 225-230
- DEUTSCHMANN F, HOHMANN B, SPRECHER E, STAHL E** (1984). Pharmazeutische Biologie 3. Teil, Drogenanalyse: 1. Morphologie und Anatomie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **29**, 64-67
- DOBREMEZ JF, SHRESTHA TB** (1980). Carte Ecologique du Népal, VII.- Région Jumla-Saipal 1:250'000. *Cahiers népalais* **9**: 10-11
- DUNSTAN WR, ANDREWS AE** (1905). Contributions to our Knowledge of the Aconite Alkaloids. Part XVII. Bikhaconitine, the Alkaloid of *Aconitum spicatum*. *J. Chem. Soc.* **87**: 1636-1650
- DYMOCK W, WARDEN CJH, HOOPER D** (1890). Pharmacographia Indica, A History of the Principal Drugs of Vegetable Origin Met within British India. Kegan, Paul, Trench, Trübner & Co. London, **1**: 1-11 (Reprint in: *Hamdard* (1972) **15**: 9-11)
- FAUGERAS G, DOBREMEZ JF, BOURGEOIS J, PARIS RR** (1973). Sur les Aconits du Népal, étude préliminaire de six espèces récoltées en 1972. *Plantes médicinales et phytothérapie* **7**: 151-162
- FINNIGAN MAT** (1996). LCQ, Benchtop LC/MSⁿ Detector. Firmenprospekt CS 94-568, 3-96
- GAUCH U** (1992). Über die Diterpenalkaloide der Samen und Wurzeln von *Aconitum napellus* L. verschiedener schweizerischer Standorte. *Dissertation, Universität Basel*
- GENAUST H** (1996). Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen, 3. Aufl., Birkhäuser Verlag, Basel, 36
- GORIS A** (1901). De la structure des Aconits et de son utilisation pour la détermination spécifique des Aconits de l'Inde. *Bull. Sc. Pharm.* **3**: 102-122
- HAENSEL R, STICHER O** (2004). Pharmakognosie - Phytopharmazie, 7. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg, 891
- HANDA KL, CHOPRA IC, KOHLI JD** (1951). Mitigation of Aconite. A Preliminary Note. *Ind. Jour. Med. Res.* **39**: 89-98
- HANUMAN JB, KATZ A** (1993a). Isolation of Quinolines from Ayurvedic Processed Root Tubers of *Aconitum Ferox*. *Nat. Prod. Lett.* **3**: 227-231
- HANUMAN JB, KATZ A** (1993b). Isolation and Identification of Four Norditerpenoid Alkaloids from Processed and unprocessed Root Tubers of *Aconitum Ferox*. *J. Nat. Prod.* **56**: 801-809
- HANUMAN JB, KATZ A** (1994a). New Lipo Norditerpenoid Alkaloids from Root Tubers of *Aconitum Ferox*. *J. Nat. Prod.* **57**: 105-115
- HANUMAN JB, KATZ A** (1994b). Diterpenoid Alkaloids from Ayurvedic Processed and Unprocessed *Aconitum Ferox*. *Phytochemistry* **36**: 1527-1535
- HANUMAN JB, KATZ A** (1994c). ¹H-NMR Spectra of Norditerpenoid Alkaloids. A Review. *J. Nat. Prod.* **57**: 1473-1483
- HARA H** (1979). Ranunculaceae. In HARA H, WILLIAMS LHJ (Eds.), An Enumeration of the Flowering Plants of Nepal, British Museum, London, **II**: 9-11
- HESSE M, MEIER H, ZEEH B** (1995). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 5. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 247, 261

- HEUBACH J, SCHNÜLE A** (1998). Cardiac Effects of Lappaconitine and N-deacetyl-Lappaconitine, two Diterpenoid Alkaloids from Plants of the *Aconitum* and *Delphinium* species. *Planta med.* **64**: 22-26
- HIKINO J, YAMADA C, NAKAMURA K, SATO H, OHIZUMI Y, ENDO K** (1977). Change of Alkaloid Composition and Acute Toxicity of *Aconitum* During Processing. *Yakugaku Zasshi* **97**: 359-366
- HIKINO H, MURAKAMI M, KONNO C, WATANABE H** (1983). Determination of Aconitine Alkaloids in *Aconitum* Roots. *Planta med.* **48**: 67-71
- HOOKEER JD** (1872). Flora of British India. L. Reeve & Co., London, **1**: 26-29
- ITO K, OHYAMA, Y, HISHINUMA T, MIZUGAKI M** (1996). Determination of *Aconitum* Alkaloids in Tubers of *Aconitum japonicum* using GC/SIM. *Planta med.* **62**: 57-59
- ITO K, OHYAMA Y, KONISHI Y, TANAKA S, MIZUGAKI M** (1997). Method for Simultaneous Determination of *Aconitum* Alkaloids and their Hydrolysis Products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Human Serum. *Planta med.* **63**: 75-79
- JACYNO JM** (1996). Chemistry and Toxicology of Diterpenoid Alkaloids. In BLUM MS (Ed.), Chemistry and Toxicology of Diverse Classes of Alkaloids, Alaken Inc., Fort Collins, 301-336
- JAŠEK J, KLAŠEK A, ŠIMANEK V, ŠANTAVÝ F** (1973). Alkaloids from *Aconitum* Plants Part II. TLC-Comparison of Alkaloidal Mixtures from some *Aconitum* Roots. *Acta Univ. Palack. Olomouc.* **65**: 19-24
- JOSHI GC, PANDE NK, TIWARY DN** (1987). Depleting Plant Resources - A Case Study from Kumaun Himalaya. *J. Econ. Tax. Bot.* **11**: 13-16
- KASAHARA Y, KUMAKI K, KATAGIRI S** (1996). Identification and Determination of Food Poisoning Components in *Aconitum* Roots and Their Toxicity in Mice. *J. Food Hygienic. Soc. Japan (Shokuhin-eiseigaku-zasshi)* **37**: 202-209
- KATZ A** (1990). Detection of Diterpenoid Alkaloids in Aphids Feeding on *Aconitum napellus* and *Aconitum paniculatum*. *J. Nat. Prod.* **57**: 204-206
- KATZ A, RUDIN H** (1984). Milde alkalische Hydrolyse von Aconitin. *Helv. Chim. Acta* **67**: 2017-2022
- KATZ A, STAEHELIN E.** (1979). DC-Untersuchungen der Europäischen *Aconitum-napellus*-Gruppe. *Pharm. Acta Helv.* **54**: 253-265
- KETHWAL KS, VERMA DL** (1990). Chemical Screening of some Potential Medicinal Plants of High Altitude Kumaon Himalayan Glaciers. *Indian Drugs* **28**: 99-100
- KITAGAWA I, YOSHIKAWA M, CHEN ZL, KOBAYASHI K** (1982). Four New Lipo-Alkaloids from *Aconiti* Tuber. *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 756-761
- KITAGAWA I, CHEN ZL, YOSHIHARA M, KOBAYASHI K, YOSHIKAWA M, ONO N, YOSHIMURA Y** (1984a). Chemical Studies on Crude Drug Processing. III. *Aconiti* Tuber (2). On the Constituents of "Pao-fuzi", the Processed Tuber of *Aconitum carmichaeli* DEBX. and Biological Activities of Lipoalkaloids. *Yakugaku Zasshi* **104**: 858-866
- KITAGAWA I, CHEN ZL, YOSHIHARA M, YOSHIKAWA M** (1984b). Chemical Studies on Crude Drug Processing. IV. *Aconiti* Tuber (3). Quantitative Determination of Aconitine Alkaloids in *Aconiti* Tuber by Means of High Performance Liquid Chromatography. *Yakugaku Zasshi* **104**: 867-872
- KÖLLIKER S, OEHME M** (1997). HPLC-MSⁿ: HPLC kombiniert mit multipler Ionenfallen-Massenspektrometrie (MSⁿ), ein Durchbruch für die Spurenanalytik und Strukturaufklärung im ng-Bereich? *Labo Trend* **8**: 20-26
- KOMMISSION C** (1986). Monographie *Aconitum napellus*. *BAnz* **99a** vom 4.6.1986
- KOMMISSION D** (1985). Monographie *Aconitum napellus*. *BAnz* **190a** vom 10.10.1985
- LATSCHA HP, KLEIN HA** (1982). Organische Chemie. Springer-Verlag, Berlin, 134

- LEOMANN MAPS.** Himachal Pradesh - Trekking Routes, Indian Himalaya Maps, Sheet 4 (Chamba, Passes of Dauladhar, Pangi Valley & Western Lahaul) 1:200'000. Manmohan Singh Bawa, New Delhi
- LIU, H.** (1995), "Diterpenoid Alkaloids from Aphids *Bradycaudus aconiti* MORDV. and *Bradycaudus napelli* SCHRK. and from Seeds of Their Host Plant *Aconitum napellus* L." Dissertation, Universität Basel
- LIU H, KATZ A** (1996). Diterpenoid Alkaloids from Aphids *Brachycaudus aconiti* and *Brachycaudus napelli* Feeding on *Aconitum napellus*. *J. Nat. Prod.* **59**: 135-138
- MANNERS GD, RALPHS MH** (1989). Capillary Gas Chromatography of *Delphinium* Diterpenoid Alkaloids. *J. Chromatogr.* **466**: 427-432
- McKINNON JJ, CHRISTENSEN DA, LAARVELD B** (1990). The influence of bicarbonate buffers on milk production and acid-base balance in lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* **70**: 875-886
- MEHRA PN, PURI H**, (1970). Pharmacognostic Investigations on Aconites of 'Ferox' Group. *Res. Bull. (N.S.) Punjab Univ.* **21**: 473-493
- MEHRA PN, SOBTI SN** (1955). Cytology of Indian Medicinal Plants; II. Aconites, Valerians and Senna. *Res. Bull. Punjab Univ.* **80**: 159-171
- MIANA GA, IKRAM K, ISRAR KHAN M, SULTANA F** (1971). Alkaloids of *Aconitum violaceum*. *Phytochemistry* **10**: 3320-3322
- MIZUGAKI M, OHYAMA Y, KIMURA K, ISHIBASHI M, OHNO Y, UCHIMA E, NAGAMORI H, SUZUKI Y** (1988). Analysis of *Aconitum* Alkaloids by Means of Gas Chromatography/SIM. *Eisei Kagaku* **34**: 359-365
- MOFFAT AC, JACKSON JV, MOSS MS, WIDDOP B** (Eds.) (1986). Clarke's Isolation and Identification of Drugs, 2nd Edn., The Pharmaceutical Press, London, 319, 384
- MORI T, OHSAWA T, MURAYAMA M, BANDO H, WADA K, AMIYA T** (1989). Studies on *Aconitum* Species. VIII. Components of 'Kako-Bushi-Matsu'. *Heterocycles*, **29**: 873-885
- MURAYAMA M, MORI T, BANDO H, AMIYA T** (1991). Studies on the Constituents of *Aconitum* Species. IX. The Pharmacological Properties of Pyro-type Aconitine Alkaloids, Components of Processed Aconite Powder 'Kako-Bushi-Matsu': Analgesic, Anti-inflammatory and Acute Toxic Activities. *J. Ethnopharmacology* **35**: 159-164
- NAITHANI HB** (1990). Flowering Plants of India, Nepal & Bhutan (not recorded in Sir J.D. Hooker's Flora of British India). Surya Publications, Dehra Dun, 1-5
- NAYAR MP, SASTRY ARK** (1987). Red Data Book of Indian Plants, Vol. 1, Botanical Survey of India, Calcutta, 311-313
- NEGI SS** (1990). A Handbook of the Himalaya. Indus Publishing Company, New Delhi, 208-209
- PACHALY P** (1991). Dünnschichtchromatographie. In NÜRNBERG, E., SURMANN P. (Eds.), Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 5. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, **2**: 421-427
- PARFIONOVITCH Y, DORJE G, MEYER F** (Eds.) (1996). Klassische Tibetische Medizin, Illustrationen der Abhandlung 'Blauer Beryll' von Sangye Gyamtso (1653-1705), Vol. 2, Verlag Paul Haupt, Bern, 329-334
- PELLETIER SW, ANEJA R, GOPINATH KW** (1968). The Alkaloids of *Aconitum heterophyllum* Wall.: Isolation and Characterization. *Phytochemistry* **7**: 625-635
- PELLETIER SW, MODY NV, PURI HS** (1977a). The C₁₉-Diterpenoid Alkaloids from *Aconitum falconeri*. *Phytochemistry* **16**: 623-4
- PELLETIER SW, MODY NV, PURI HS** (1977b). Structures of Falaconitine and Mithaconitine, Two Novel Diterpenoid Alkaloids from *Aconitum falconeri* STAPF. *Chem. Comm.* 12-13
- PELLETIER SW, MODY NV, SAWHNEY RS, BHATTACHARYYA J** (1977c). Application of Carbon-13 NMR Spectroscopy to the Structural Elucidation of C₁₉-Diterpenoid Alkaloids from *Aconitum* and *Delphinium* Species. *Heterocycles* **7**: 327-339

- PELLETIER SW, MODY NV, JOSHI BS, SCHRAMM LC** (1984). ^{13}C and Proton NMR Shift Assignments and Physical Constants of C_{19} -Diterpenoid Alkaloids. In PELLETIER SW (Ed.), Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, Vol. 2, John Wiley, New York, 205-462
- PELLETIER SW, ETSE JT** (1989). The Synthesis of 1-*epi*-Delphisine and 1-*epi*-Neoline Analogues. *J. Nat. Prod.* **52**: 145-152
- PELLETIER SW, JOSHI BS** (1991). Carbon-13 and Proton NMR Shift Assignments and Physical Constants of Norditerpenoid Alkaloids. In PELLETIER SW (Ed.), Alkaloids, Chemical and Biological Perspectives, Vol. 7, Springer Verlag, New York, 297-564
- PHARMAKOPOEIA HELVETICA VI (PH.HELV. VI)** (1971). Monographie „Tuber Aconiti“. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern
- POLUNIN O, STAINTON A** (1987). Concise Flowers of the Himalaya. Oxford University Press, Delhi, 1
- PURI HS** (1974). Distribution of Aconites in India. *J. Res. Ind. Med.* **9**: 40-43
- RAU MA** (1993). Ranunculaceae. In SHARMA BD, BALAKRISHNAN NP, RAO RR; HAJRA PK (Eds.), Flora of India, Vol. 1, Botanical Survey of India, Calcutta, 1-23
- RIEDL H, NASIR YJ** (1991). Ranunculaceae. In ALI SJ, NASIR YJ (Eds.), Flora of Pakistan. **193**: 30-40
- ROTH HJ, BLASCHKE G** (1989). Pharmazeutische Analytik, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 351-361
- ROTH HJ, EGER K, TROSCHÜTZ R** (1990). Pharmazeutische Chemie II: Arzneistoffanalyse, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 592-598
- ROTH L, DAUNDERER M, KORMANN K** (Eds.) (1994). Giftpflanzen / Pflanzengifte, 4. Aufl., Ecomed, Landsberg, 88-91
- SEEGER R** (1994). Aconitin und verwandte Diterpenalkaloide (Giftlexikon). *Dtsch Apoth Ztg* **134**: 2749-2758
- SINGH N, BAJWA GS, SING MG** (1966). Diterpene Alkaloids: Isolation and Study of Two New Alkaloids from *Aconitum falconeri* STAPF. *Indian J. Chem.* **4**: 39-42
- SINGH V, KAPAH I BK, SRIVASTAVA TN** (1996). Medicinal Herbs of Ladakh especially used in Home Remedies. *Fitoterapia* **67**: 38-48
- SINGH LB, SINGH RS, BOSE R, SEN SP** (1980). The Use of the Poisonous Plant ‘Aconite’ in the Indian System of Medicine. *J. Sci. Res. Pl. Med.* **1**: 48-49
- SIROTENKO EG, RASHKES YV, PLUGAR VN** (1989). GC-MS Analysis of Total Diterpene Alkaloids from Roots of *Aconitum septentrionale*. *Khim. Prir. Soedin.* **4**: 538-543
- STAEHELIN E, KATZ A** (1980). Dünnschichtchromatographische Sichtung der europäischen *Aconitum-variegatum*-Gruppe sowie Isolierung und Teilkonstitution von Paniculatin. *Pharm. Acta Helv.* **55**: 221-227
- STAHL E** (1967). Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag, Berlin, 829
- STAPF O** (1905). The Aconites of India: A Monograph. *Annals of the Roy. Bot. Garden, Calcutta*, **X**, Part II, 115 ff.
- STÖGER EA** (Ed.) (1991). Arzneibuch der chinesischen Medizin, Monographien des Arzneibuches der Volksrepublik China 1985 und 1990. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Monographie „Aconiti radix lateralis praeparata / Fuzi“
- TACTICAL PILOTAGE CHART**, No. TPC G-7D, Ed.3 (China, Indian, Pakistan) 1:500'000, Defense Mapping Agency Aerospace Center, St. Louis, Missouri (1986)
- THORAT S, DAHANUKAR S** (1991). Can We Dispense with Ayurvedic Samskaras? *J. Postgrad. Med.* **37**: 157-159
- TIWARI KP, MASOOD M** (1977). Chemical Constituents of *Aconitum violaceum* and *Polygonum tomentosum*. *J. Indian. Chem. Soc.* **56**: 924-925
- TREASE GE, EVANS WC** (1983). Pharmacognosy, 12th Edn., Bailliere Tindall, London, 625

- TSUDA Y, MARION L** (1963). The Structure of Bikhaconitine. *Can. J. Chem.* **41**: 1485
- VERPOORTE R, BAERHEIM SVENDSEN A** (1984). Chromatography of Alkaloids, Part B: GC and HPLC, Vol. 23B. Journal of Chromatography Library, Elsevier, Amsterdam, 223-233, 415-416
- VERPOORTE R, SCHRIPEMA J** (1994). Isolation, Identification and Structure Elucidation of Alkaloids, A General Overview. In LINSKENS HF, JACKSON JF (Eds.), Alkaloids, Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 15, Springer Verlag, Berlin, 1-24
- WADA K, BANDO H, KAWAHARA N** (1993). Determination and Quantitative Analysis of *Aconitum* Alkaloids in Plants by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.* **644**: 43-48
- WADA K, BANDO H, KAWAHARA N, MORI T, MURAYAMA M** (1994). Determination and Quantitative Analysis of Alkaloids in *Aconitum japonicum* by Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Biol. Mass Spectr.* **23**: 97-102
- WADA K, BANDO H, KAWAHARA N** (1997). Analysis of *Aconitum* Alkaloids in Clonally Propagated *Aconitum yesoense* var. *macroyesoense* by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry. *Natural Medicines* **51**: 37-39
- WADA K, MORI T, KAWAHARA N** (2000a). Stereochemistry of Norditerpenoid Alkaloids by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35**: 432-439
- WADA K, MORI T, KAWAHARA N** (2000b). Application of Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry to the Differentiation of Stereoisomeric C₁₉-Norditerpenoid Alkaloids. *Chem. Pharm. Bull.* **48**: 660-668
- WADA K, MORI T, KAWAHARA N** (2000c). Application of Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry to the Differentiation of Stereoisomeric Diterpenoid Alkaloids. *Chem. Pharm. Bull.* **48**: 1065-1074
- WANG FP, LIANG XT** (1992). Chemistry of the Diterpenoid Alkaloids. In CORDELL GA, (Ed.), The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology, Academic Press, Inc. San Diego, **42**: 165-167
- WANG Y, LIU Z, SONG F, LIU S** (2002). Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Study of Aconitines in the Root of Aconite. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**: 2075-82
- WANG Y, SHI L, SONG F, LIU Z, LIU S** (2003a). Exploring the Ester-Exchange Reactions of Diester-Diterpenoid Alkaloids in the Aconite Decoction Process by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**: 279-84
- WANG Y, SONG F, XU Q, LIU Z, LIU S** (2003b). Characterization of Aconitine-Type Alkaloids in the Flowers of *Aconitum kusnezoffii* by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **38**: 962-70
- WEAST RC, GRASSELLI JG** (Eds.) (1989). Handbook of Data on Organic Compounds, 2nd Edn., Vol. 2, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1010, 1070, 1115
- WONG SK, TSUI SK, KWAN SY** (2002). Analysis of Proprietary Chinese Medicines for the Presence of Toxic ingredients by LC/MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**: 161-170
- YUE J, XU J, CHEN Y, CHEN S** (1994). Diterpenoid alkaloids from *Aconitum talassicum*. *Phytochemistry* **37**: 1467-1470
- YUNUSOV MS, RASHKES YV, TEL'NOV VA, YUNUSOV SY** (1969). Mass Spectra of Diterpene Alkaloids with the Lycoponine Skeleton. *Khim. Prir. Soedin.* **5**: 515-519
- ZHOU S, HAMBURGER M** (1996). Application of Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Ionization, Mass Spectrometry in Natural Product Analysis; Evaluation and Optimization of Electrospray and Heated Nebulizer Interfaces. *J. Chromatogr. A* **755**: 189-204
- ZHOU Y, LIU W, ZENG G, CHEN D, LI H, SONG W** (1984). Toxicity of Aconitine and its Analogs and their Effect on Cardiac Contractive Function. *Acta Pharm. Sinica* **19**: 641-646

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jakob Maier
Geburtsdatum: 24. Januar 1966 in Jülich (D)
Heimatort: Dornach (SO)

Ausbildung:

1972-1984 R. Steiner-Schule, Basel

1984-1986 Real-Gymnasium, Basel
Matura Typus B, Frühling 1986

1987-1992 Pharmaziestudium an der Universität Basel
Praktikum in der Engel-Apotheke Basel bei Dr. M. Eggenberger
und Dr. K. Steiger
Abschluss mit eidgenössischem Staatsexamen, Herbst 1992

11.1993-7.1998 Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation an der Phil. II-
Fakultät der Universität Basel unter der Leitung von Dr. A. Katz
im Labor für Naturstoff-Forschung in Basel

Berufliche Tätigkeit:

1993-1996 Apotheke zum Wendelin, Riehen
Seit 8.1998 Zulassungsabteilung, Weleda AG, Arlesheim

Während meiner Studien- und Doktorandenzeit besuchte Vorlesungen folgender Dozenten:

Barras JP, Bruppacher R, Bühler FR, Dettli LC, Durrer H, Eckert V, Erb P, Fallab S, Güntert TW, Haefeli WE, Haegeli A, von Hahn HP, Hersberger K, Hofbauer KG, Kress A, Leuenberger H, Linde HHA, Maître L, Meyer UA, Monard D, Moroni C, Mutter U, Nicholls JG, Nissen C, Oehme M, Pfeilschifter J, Plattner GR, Rüegg UTh, Schaffner W, Scholer A, Seiler H, Séquin U, Spornitz U; Vozech S, Weiss P.