

**METHODENENTWICKLUNG ZUR QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN
ANALYSE DER TRITERPENSÄUREN VON *BOSWELLIA SACRA* FLÜCK.
(BURSERACEAE) SOWIE VERWANDTER ARTEN**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Mitra Keusgen

aus Meragh (Iran)

Marburg/Lahn **2021**



Erstgutachter: Prof. Dr. Frank Runkel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li

Eingereicht am: 17.09.2021

Tag der münd-
lichen Prüfung am: 29.10.2021

Hochschulkennziffer: 1180

Titelbild: Modifiziert von *Köhler's Medizinal-Pflanzen*, Köhler, Hermann Adolph, Verlag von Eugen Köhler, Gera-Untermhaus, 1898

Meiner Mutter Zarin

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„METHODENENTWICKLUNG ZUR QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN ANALYSE DER TRITERPENSÄUREN VON *BOSWELLIA SACRA* FLÜCK. (BURSERACEAE) SOWIE VERWANDTER ARTEN“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 17.09.2021

.....
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen geliebten Eltern Zarrin und Eni für all ihre stetigen Zusprüche und Ermutigungen in allen Phasen meines Lebens und meiner einzigartigen, wunderbaren Tochter Daria.

Die Idee zu dem Promotionsprojekt zur umfassenden Charakterisierung von *Boswellia sacra* sowie daraus hergestellten Produkten entstand 2014, gemeinsam zwischen meinem Promotionsbetreuer Prof. Dr. Michael Keusgen und Herrn Emmerich Tetkov sowie Frau Elke Foltys, beide Oßmannstedt, und im weiteren Verlauf des Vorhabens ebenfalls Herrn Alex Moll, Solingen, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte. Die untersuchten Proben wurden dankenswertenweise von den Herren Tetkov und Moll sowie von Herrn Apotheker Günter Ottmar aus Fuldataal zur Verfügung gestellt. Herrn Apotheker Robert Müntz, Eisenstadt, Österreich, danke ich sehr herzlich für die Überlassung der HPTLC-Ausstattung.

Fernerhin danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen für die stets gute Zusammenarbeit, insbesondere Herrn Dr. Amir Balash für seine großartige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie Herrn Dr. Doru Vornicescu. Herrn Floris van Elsäcker danke ich für die sehr gute wissenschaftliche und technische Unterstützung, ebenso Herrn Matthias Brauschke für seine Unterstützung bei den Extraktionen und Nina Zitzer für die MS-Analysen. Weiterhin bedanke ich mich bei Andrea Schutte und bei Gabriele Lins für Ihre stets aufmunternden Worte sowie für ihre vielfältige Unterstützung.

Meinen Freunden Prof. Dr. Babury und Prof. Dr. Karimi aus Afghanistan und Privatdozentin Dr. Gudrun Abel danke ich sehr für ihre Anregungen und geschätzte Freundschaft. Ebenfalls bedanke ich mich bei der Promotionskommission, hier insbesondere bei den Professoren Dr. Frank Runkel und Dr. Shu-Ming Li für die Mitbetreuung und Erstellung der Gutachten.

Zusammenfassung

Seit der Frühgeschichte der Menschheit finden sich bildliche und verschriftliche Hinweise auf die Nutzung von Weihrauch, sei es für religiöse-rituelle Zwecke, als Heilmittel oder auch als Gewürz. Schon in der Antike bildete sich, ausgehend vom heutigen Oman, die Weihrauchstraße aus, über welche das kostbare Gut weiter nach Norden und Westen verteilt wurde und den Anrainerstaaten einen unbeschreiblichen Reichtum bescherten. Außerhalb der arabischen Halbinsel kommt Weihrauch aber auch im östlichen Afrika sowie in Indien vor. Die bekanntesten Weihraucharten sind der „Indische Weihrauch“, der von *Boswellia serrata* ROXB. (Burseraceae) gewonnen wird, sowie der sehr hochpreisige „Arabische Weihrauch“, der von *B. sacra* FLÜCK. stammt. Weitere Arten kommen hauptsächlich in Ostafrika vor, beispielsweise in Äthiopien [„Äthiopischer Weihrauch“, *B. papyrifera* (DELILE ex CAILL.) HOCHST].

Problematisch ist, dass die hochwertigen Sorten häufig mit minderwertigeren Sorten, zumeist aus Ostafrika, verschnitten werden. Auch wenn es in Deutschland kein zugelassenes Arzneimittel auf der Basis von Weihrauch gibt, wird die innerliche Einnahme zu medizinischen Zwecken im Internet heftig beworben, zumeist mit fraglichen Heilsversprechen. Dabei gibt es nicht wenige pharmakologische Studien, die sich mit den gesundheitsfördernden Wirkungen von Weihrauch, zumeist einer entzündungshemmenden Wirkung, befassen. Derzeit fehlen jedoch aussagekräftige klinische Studien.

Wegen der weiten Verbreitung von weihrauchhaltigen Zubereitungen und Präparaten sahen sich sowohl die amerikanische USP als auch das Europäische Arzneibuch veranlasst, Monographien zum Indischen Weihrauch (*B. serrata*; *Olibanum indicum*) auszuarbeiten. Bei näherer Betrachtung erscheinen diese Monographien aber unzulänglich. Zudem werden häufig Extrakte von zweifelhafter Qualität verarbeitet.

In Kooperation mit der Firma Floradex in Oßmannstedt / Thüringen wurden zunächst qualitativ hochwertige Extrakte auf Ethanol-Basis entwickelt, die neben Weihrauchproben aus unterschiedlichen Quellen mit in die Untersuchungen eingeflossen sind, wobei der Schwerpunkt der analytischen Untersuchungen auf dem qualitativ sehr hochwertigen „Arabischen Weihrauch“, *B. sacra*, lag. Übergeordnetes Ziel war es, Verbesserungsvorschläge für die existierenden Arzneibuchmonographien zu erarbeiten.

Als problematisch erwies sich schon die Probenvorbereitung für die Analysen. Ca. 50 % des Weihrauchs bestehen aus zumeist polymeren, quellfähigen Materialien, die sich kaum, aber eben doch teilweise, in Alkoholen lösen und somit eine chromatographische Analytik erheblich stören können. Um diese Probleme zu umgehen, wurde eine effiziente Extraktionsmethode sowie eine

einfache Probenaufbereitung erarbeitet. Geeignet ist eine Soxhlet-Extraktion mit anschließender Abtrennung der sauren Komponenten durch zweimaliges Ausschütteln. Diese Methode gelingt insbesondere mit *B. sacra* problemlos.

Im zweiten Schritt wurde die DC-Trennung zur Identifizierung der Materialien nachgearbeitet. Es zeigte sich, dass auch mit unterschiedlichen Fließmitteln eine weitgehende Trennung der Triterpensäuren nur schwer zu erreichen ist. Als optimal erwies sich ein saures Fließmittel, verbunden mit einer zweimaligen, kurzen Entwicklung auf HPTLC-Platten, und mit einer Auswertung bei UV 254 nm sowie nachfolgendem Entwickeln mit Anisaldehyd-Reagenz. Diese Methode ist den derzeitigen Arzneibuch-Monographien deutlich überlegen, da viele der wertbestimmenden Triterpensäuren getrennt identifiziert werden können.

Als großer Herausforderung erwies sich die Überarbeitung der HPLC-Methode. Von den ca. 20 Triterpensäuren, die in deutlichen Mengen im Weihrauch vorkommen, werden nur zwei Ketoboswelliasäuren betrachtet, die zudem einen nur mengenmäßig kleinen Teil ausmachen (ca. 1-3 %, bezogen auf das Rohmaterial). Zunächst wurde mit sehr zeitaufwändigen Experimenten versucht, die Säurefunktion oder die Alkoholfunktion der Triterpensäuren entweder über eine Esterbindung oder eine Säureamidbindung mit einem aromatischen Rest zu substituieren, der problemlos bei UV 254 nm und höher zu detektieren ist. Dieses Unterfangen erwies sich leider wegen der Komplexität der Proben als wenig erfolgreich. Hingegen verliefen die Versuche zur Findung eines geeigneten internen Standards (β -Glycyrrhetinsäure) sowie die quantitative Bestimmung weiterer Substanzen über Responsefaktoren erfolgreich.

So konnten insgesamt 11 Weihrauchproben (Extrakte plus Rohmaterialien) exemplarisch umfassend bearbeitet werden und viele offene Fragen zur chromatographischen Analytik geklärt werden. Ausgehend hiervon konnten Verbesserungsvorschläge für die existierenden Arzneibuchmonographien erstellt werden.

Summary

Since the early history of mankind there have been pictorial and written references about the use of incense, be it for religious-ritual purposes, as a remedy or as a spice. Already in ancient times, starting from today's Oman, the "Incense Trade Road" has been established, via which the precious goods were distributed further north and west and brought indescribable wealth to the neighbouring countries. Outside of the Arabian Peninsula, however, frankincense is also found in eastern Africa and India. The best-known types of incense are the "Indian incense", that is obtained from *Boswellia serrata* ROXB. (Burseraceae) is obtained, as well as the very high priced "Arabian incense", which derives from *B. sacra* FLÜCK. Other species occur mainly in East Africa, for example in Ethiopia ["Ethiopian frankincense", *B. papyrifera* (DELILE ex CAILL.) HOCHST].

The problem is that the high-priced varieties are often blended with inferior varieties, mostly from East Africa. Even if there is no approved (registered) medicinal product based on frankincense in Germany, internal consumption for medical purposes is heavily advertised on the Internet, mostly with questionable promises of salvation. There are quite a few pharmacological studies that deal with the health-promoting effects of frankincense, mostly an anti-inflammatory effect. However, there is currently a lack of meaningful clinical studies.

Because of the widespread use of incense-containing medicines and dietary supplements, both the American USP and the European Pharmacopoeia felt compelled to establish monographs on Indian incense (*B. serrata*; *Olibanum indicum*). On closer inspection, however, these monographs appear inadequate. In addition, extracts of dubious quality are often produced and marketed.

In cooperation with the company Floradex in Oßmannstedt / Thuringia, high-quality ethanol-based extracts were initially developed, which, in addition to incense samples from various sources, were included in these studies, with a focus on the analytical investigations of the high-quality "Arabian incense", *B. sacra*. The overriding goal was to develop suggestions for improving the existing pharmacopoeia monographs.

The preparation of the samples for physico-chemical analysis turned out to be problematic. Approx. 50% of frankincense consists of mostly polymeric, swellable materials, which hardly dissolve in alcohols, but in some cases, it can significantly interfere with the chromatographic analysis. To avoid these problems, an efficient extraction method and simple sample preparation were developed. A Soxhlet extraction with subsequent separation of the acidic components by solvent-extracting twice is suitable. This method works particularly well with *B. sacra*.

In the second step, the TLC separation was reworked to identify the materials. It was found that even with different mobile phases, extensive separation of the triterpene acids was difficult to achieve. An

acidic solvent, combined with a two-fold, short development on HPTLC plates, and with an evaluation at UV 254 nm followed by the development with anisaldehyde reagent, proved to be the most favourable. This method is clearly superior to the current pharmacopoeia monographs, as many of the value-determining triterpenic acids can be identified separately.

The revision of the HPLC method turned out to be a major challenge. Of the approx. 20 triterpene acids that occur in significant amounts in frankincense, only two keto-boswellic acids are considered, which also only make up a small proportion in terms of quantity (approx. 1-3%, based on the raw material). First of all, very time-consuming experiments attempted to derivatize the acid function or the alcohol function of the triterpenic acids either via an ester bond or an acid amide bond with an aromatic ring system that can be detected without problems at UV 254 nm and higher. Unfortunately, due to the complexity of the samples, this venture proved unsuccessful. In contrast, the attempts to find a suitable internal standard (β -glycyrrhetic acid) and the quantitative determination of other substances using response factors were successful.

A total of 11 frankincense samples (extracts plus raw materials) were processed comprehensively and many unresolved questions about chromatographic analysis could be clarified. On this basis, suggestions for the improvement of the existing pharmacopoeia monographs could be made.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ABA	Acetylboswelliasäure
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AKBA	Acetyl-keto-boswelliasäure (Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure)
amu	atomic mass units
Äq	Moläquivalente
Äth.	ätherisches (Öl)
BA	Boswelliasäure
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
Bpap	<i>Boswellia papyrifera</i>
Bsac	<i>Boswellia sacra</i>
Bser	<i>Boswellia serrata</i>
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CH	Cyclohexan
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Essigsäureethylester, Ethylacetat
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EI	Electron Impact
EMA	European Medicines Agency
EPC	Elektro Planar Chromatography
eq.	äquivalent
ESI	Elektro-Spray-Ionisation
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> , und andere
eth.	ethanolischer (Extrakt)
EtOH	Ethanol
ϵ	Extinktionskoeffizient
Extr.	Extrakt
FFPC	Forced-flow Planar Chromatography
g	Gramm
Glyc	Glycyrrhetinsäure
h	Hora (Stunde)
HLE	humanen Leukozytenelastase
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
12-HPETE	12-Hydroperoxy-eicosatetraensäure
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography (Hochleistungs Dünnschichtchromatographie)
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50 %
IST	Interner Standard
Jhd.	Jahrhundert
Kap.	Kapitel
KBA	11-Keto-boswelliasäure
konz.	konzentriert
Kor.-F.	Korrekturfaktor
LA	Lupansäure
LM	Lösungsmittel

LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
Lsg.	Lösung
MeOH	Methanol
M	Molar
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute, Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mol	Mol, Einheit der Stoffmenge
mod.	modifiziert
MS	Massenspektrometer
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmt
n. Chr.	Nach Christi Geburt
NHS	N-Hydroxysuccinimid
n.i.	nicht identifiziert
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspin-Resonanz)
OPLC	Overpressured Layer Chromatography
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch)
pKs	Säurekonstante
PTAD	4-Phenyl-1,2,4,-triazolin-3,5-dion
R	Reagenz des Arzneibuches
r	Korrelationskoeffizient
RA	Rubinsäure
RE	Rohextrakt
Ref.	Referenz
RF	Responsefaktor
R _f	R _f -Wert bei der DC-Chromatographie
RP	Reversed Phase
RPC	Rotation Planar Chromatography
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
SD	Standard Abweichung
SiO ₂	Silicagel
SN	Signal to Noise (Ratio); (Signal-Rausch-Verhältnis)
SST	System Suitability Test (Systemeignungstest)
STABW	Standardabweichung
STD	Standard(substanz)
Std.	Stunde
Subs.	Substanz
t	Zeit
t _m	Totzeit (bei der HPLC)
Tab.	Tabelle
TA	Tirucallensäure
TIC	Total Ion Current
TFA	Trifluoroacetic Acid (Trifluoressigsäure)
TLC	Thin Layer Chromatography (Dünnschichtchromatographie)
u.a.	unter anderem
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v. Chr.	Vor Christi Geburt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z.Z.	zur Zeit
λ	Wellenlänge

Inhaltsverzeichnis	
Zusammenfassung	i
Summary	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
Inhaltsverzeichnis	vii
1. Einleitung	1
1.1 Historische Anwendung des Weihrauchs	1
1.2 Botanische Aspekte zur Gattung <i>Boswellia</i>	5
1.3 Weihrauchharz	10
1.4 Historische Aspekte zur Chemie des Weihrauchs	12
1.5 Inhaltsstoffe des Weihrauchharzes	15
1.6 Analytik der Boswelliasäuren	17
1.6.1 Strukturformeln der Boswelliasäuren	20
1.6.2 Strukturformeln der Lupansäuren	22
1.6.3 Strukturformeln der Tirucallensäuren	23
1.6.4 Strukturformeln der Robursäuren	24
1.6.5 Weitere Triterpensäuren	24
1.7 Pharmakologie des Weihrauchs	25
1.8 Medizinische Verwendung von Weihrauch	29
1.9 Die Süßholzwurzel <i>Glycyrrhiza glabra</i>	30
2. Zielsetzung	34
3. Material und Methoden	35
3.1 Proben	35
3.2 Chemikalien	40
3.3 Verwendete Geräte	41
3.4 Verwendete HPLC-Gradienten	42
3.5 Extrakterstellung	43
3.6 Auftrennung der Rohextrakte in Säure- und Neutralfraktionen	43
3.7 Dünnschichtchromatographie	45
3.8 Derivatisierungsreaktionen	46
3.9 HPLC-Analytik	50
4. Ergebnisse	52
4.1 Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode	52
4.2 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Weihrauchextrakte, Methodenentwicklung	56
4.2.1 Untersuchungen mittels konventioneller DC	56
4.2.2 Untersuchungen mittels HPTLC	61
4.2 Vorsäulen-Derivatisierungen	67
4.2.1 Derivatisierungen der 3-Hydroxylgruppe der Boswelliasäuren	68
4.2.2 Derivatisierungen der 4-Carboxylgruppe der Boswelliasäure	69

4.3 HPLC-Untersuchungen	70
4.3.1 Methodenentwicklung.....	70
4.3.2 Ermittlung von Bestimmungs- und Nachweisgrenze.....	75
4.3.3 Berechnung der Response-Faktoren (RF).....	81
4.3.4 Quantitative Analyse der einzelnen Extrakte	90
5. Diskussion	114
5.1 Beurteilung der unterschiedlichen Extraktionsmethoden	114
5.2 Diskussion der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen.....	116
5.3 Diskussion zur Derivatisierungen	119
5.4 Diskussion der HPLC-Bestimmungen	121
5.5 Diskussion der gefundenen Inhaltsstoffe in Bezug auf mögliche, weitere Wirkungen	145
5.6 Diskussion der bestehenden Arzneibuchmonographien	146
6. Literatur.....	154
7. Experimentalteil - Appendix.....	162
7.1. Aufarbeitung des Weihrauchs	162
7.1.1 Entwicklung einer Methode zur Aufreinigung der Extrakte (Vorversuche).....	162
7.1.2 Entwicklung geeigneter Extraktionsverfahren und Extraktauftrennung	165
7.1.3 Weihrauch-Extraktionen	170
7.2 Entwicklung dünnschichtchromatographischer Methoden	175
7.3 Vorsäulen-Derivatisierungen	176
7.3.1 Umsetzung der alkoholischen Gruppe über aktivierte Carbonsäuren	178
7.3.2 Umsetzung der 3-Hydroxylgruppe mittels weiterer Aktivatoren.....	185
7.3.3 Umsetzung der Carbonsäurefunktion über die EDC-Methode	192
7.3.4 Derivatisierung der Boswelliasäuren nach Umsetzung zum Säurechlorid.....	193
7.3.5 Umsetzung von Boswelliasäuren mit enophilen Reagenzien	206
Lebenslauf	209

1. Einleitung

1.1 Historische Anwendung des Weihrauchs

Seit mindestens 5.000 Jahren ist Weihrauch ein wichtiges Handelsgut in der arabischen und afrikanischen Welt und seit der Antike eine begehrte Ware im Mittelmeerraum.^[1] Über diese Zeiten hinweg prägte Weihrauch Kulturen und spielt bis heute noch eine herausragende Rolle bei der Götterverehrung sowie als Räuchermittel für kirchliche, meditative und medizinische Zwecke (Abb. 1-1).



Abb. 1-1 Die Hauptverwendung von Weihrauch: Wie der Name es schon sagt, hauptsächlich als Räucherwerk (Bildquelle: M. Keusgen)

Über die „Weihrauchstraße“ - eine der ältesten Handelswege - wurde das kostbare Gut zusammen mit Gewürzen und Edelsteinen aus Indien, Südostasien und Arabien ans Mittelmeer transportiert. Über die mehr als 3.000 Kilometer lange Straße, die sich im Mittelmeerraum in mehrere Arme aufteilt, wurden zur Blütezeit der Route schätzungsweise jährlich 3.000 Tonnen gehandelt, wobei das ehemalige römische Reich ein Hauptabnehmer war.^[2]

Die historische Verwendung von Weihrauch und Myrrhe erkennt man bereits seit biblischen Zeiten. Neben Gold waren Weihrauch und Myrrhe die Gaben, die Jesus von den „Heiligen drei Königen“ Jesus zu seiner Geburt als königliche Gabe überbracht wurden.^[2] Über ihre beruhigende Wirkung als Zusatz im Wein gibt es Hinweise im Alten Testament.

Weihrauch wurde in den Tempeln fast aller Kulturen der antiken Welt so wie in Babylon als Heilmittel eingesetzt. In mesopotamischen Reliefs finden wir schon früh Darstellungen von Räucherwerk. Weitere, erste Hinweise auf die Verwendung von Weihrauch als Arzneimittel finden sich in dreieinhalbtausend Jahre alten Texten aus dem Niltal.

Neben den alten Ägyptern schätzten die Griechen und Römer seine vielfältige Anwendung. Beispielsweise bedienten sich die ägyptischen Pharaonen der Räucherung als zeremoniellem Bestandteil ihrer Kulturhandlungen (Abb. 1-2). Weiterhin ist die Geschichte der ägyptischen Zivilisation geprägt vom ständigen Sammeln und Domestizieren wichtiger Pflanzen sowie einer schriftlichen Dokumentation über ihren Nutzen. Der Weihrauch war schon wegen seines guten Geruches beliebt, wurde in Salben eingearbeitet und diente der Wundbehandlung. Weihrauch war so wichtig, dass beispielsweise die ägyptische Königin Hatschepsut im Jahr 1.495 v. Chr. eine Expedition an das Horn von Afrika schickte (Gebiet der heutigen Staaten Somalia, Äthiopien, Dschibuti und Eritrea), um duftenden Weihrauch und Myrrhe zu sammeln.^[3]



Abb. 1-2 Rauchopfer, wahrscheinlich Weihrauch, auf einer altägyptischen Darstellung im Grab von Ramses III, 12. Jhd. v. Chr. (Bildquelle: Nicholas Reeves, Richard H. Wilkinson: Das Tal der Könige. Geheimnisvolles Totenreich der Pharaonen. S. 160)

Der wohl früheste, schriftliche Nachweis über die arzneiliche Verwendung von Weihrauch in Mixturen befindet sich im "Papyrus Ebers" (16. Jahrhundert v. Chr.). Dabei handelt es sich um eine Rezeptur zur Behandlung von Hautwunden.^[4] Im antiken römischen Reich wurde Weihrauch als Räucher- und Heilmittel verwendet. Die wohlduftenden Harze waren auch für die alten Griechen für ihre Körper- und Haarpflege, auch für die Ausübung der Götter- und Grabkultur, von großer Bedeutung.

Hippokrates und weitere griechisch-römische Ärzte, Dioskurides (40-90 n. Chr.) oder Galen (129-199 n. Chr.) erwähnten ebenfalls Weihrauch als Heilmittel in den alten medizinischen Schriften. Bereits um 400 v. Chr. wurde das teure Harz als entzündungshemmendes Räucher- und Heilmittel zur Wundreinigung, gegen Krankheiten der Atemwege und bei Verdauungsproblemen eingesetzt.^[2]

Die Römer brachten Weihrauch als Räuchergabe ihren Göttern dar, aber auch beim Einzug des Kaisers in die Stadt als Zeichen der Huldigung. Weitere Anwendungen dieses Fumigants war die Überlagerung von üblen Gerüchen sowie desinfizierende Räucherungen. Weihrauch und insbesondere das Weihrauchkästchen (lat. Accera; Abb. 1-3) befinden sich auf vielen römischen Reliefs, insbesondere auf Grabreliefs.^[5]



Abb. 1-3 Weihrauchkästchen („Accera“) auf einem römischen Relief (Bildquelle: Valérie Huet, *Der Weihrauch auf den römischen Reliefs mit Opferdarstellungen*, <https://doi.org/10.4000/trivium.5651>)

In der mittelalterlichen Klostermedizin in Europa war Weihrauch eng mit den religiösen Ritualen verbunden. Weiterhin beschreibt Hildegard von Bingen die arzneiliche Anwendung bei Tinnitus und Schwerhörigkeit.

Im 11. Jahrhundert wurde das Harz vom persisch-arabischen Arzt und Philosoph Abū Alī al-Husain ibn Abd Allāh ibn Sīnā (Ibn Sina, später auch Avicenna) für die Behandlung von Wunden und gegen Infektionen eingesetzt.^[3] Im Kanon der Medizin „Abu Ali Sina“ wird die innere Anwendung von Weihrauchharz-Perlen zur Stärkung des Geistes und Verstandes empfohlen. In der islamischen Welt wurde es nicht zu religiösen, sondern nur zu medizinischen Zwecken eingesetzt.

1.2 Botanische Aspekte zur Gattung *Boswellia*

Weihrauchharz wird ausschließlich von den Arten der Gattung *Boswellia* gebildet, die zur Familie der Balsambaumgewächse (Burseraceae, Ordnung: Sapinales, Klasse: Rosopsida) gehören; zu den Burseraceae gehören etwa 20 Gattungen mit ca. 700 Arten, wobei es je nach Autor sehr unterschiedliche Angaben dazu gibt. Der Gattungsname *Boswellia* ehrt den schottischen Arzt und Botaniker John Boswell (1710-1780).^[3]

Tab. 1-1 gibt eine Übersicht über die *Boswellia*-Arten, wobei bei den derzeit gültigen Artnamen das Verbreitungsgebiet angegeben ist. Viele der in Tab. 1-1 aufgelisteten Namen sind Synonyme und derzeit nicht mehr gültig. Die Vielzahl der Synonyme beruht darauf, dass Weihrauch schon immer etwas Besonderes war und zahlreiche Botaniker der Meinung waren, sie hätten nun einen „ganz besonderen“ Weihrauch gefunden, der einen eigenen Namen verdiene. Nach derzeitiger taxonomischer Auffassung ist diese, eher historisch bedingte, Vielzahl an Arten aber nicht mehr zu rechtfertigen. Weiter unten sind in Tab. 1-2 einige wichtige Vertreter der Familie der Burseraceae zusammengefasst.^[6, 7]



Abb. 1-4 *Boswellia-sacra*-Population in Dhofar, Oman (Bildquelle: <http://powo.science.kew.org/>; Helen Pickering)

Einige der *Boswellia*-Arten und der daraus gewonnene Weihrauch tragen Trivialbezeichnungen, die Hinweise auf das Hauptverbreitungsgebiet geben: So kommt *B. serrata* hauptsächlich in Indien vor und der daraus gewonnene Weihrauch ist der „Indische Weihrauch“; *B. carterii* und *B. frereana* sind wichtige Ausgangspflanzen für den „Afrikanische Weihrauch“, und *B. sacra*, der typischerweise im Oman und in Jemen vorkommt, liefert den sehr hochpreisigen „Arabischen Weihrauch“, der auch

das Schwerpunktthema dieser Dissertation ist (Abb. 1-4, 1-5). *B. papyrifera* liefert sehr aromatisch duftenden Weihrauch und ist eine typische Quelle für den „Äthiopischen Weihrauch“.

Diese buchsartigen, harzliefernden Gewächse sind kleine Bäume mit Wuchshöhen von 1,5 bis 8 m und abblätternder Rinde, die, abhängig von der Art, vor allem in trockenen und subtropischen Gebieten Afrikas, Arabiens und Indiens beheimatet sind.^[8] Burseracaen bilden Harze, die sich durch ihre Hauptbestandteile wie Terpene und phenolische Verbindungen, ihre physiko-chemischen Eigenschaften und durch die Art der Exkret-Gewebe (schizogene Zentren) deutlich von anderen pflanzlichen Harzen wie Kolophonium, Peru- und Tolubalsam oder Mastix („Falscher Weihrauch“) unterscheiden. „Historische“ Hauptverfälschungen von nach Europa exportierter Ware und dort über Zwischenhändler weiter verkauften Weihrauchs sind oft Fichtenharze (*Picea spec.*) oder das Harz der Schwarzkiefer (*Pinus nigra*). Im Zeitalter der Globalisierung spielen diese Verfälschungen aber keine Rolle mehr; vielmehr werden hochwertige Weihrauchsorten (*B. sacra*, *B. serrata*) mit minderwertigerem, afrikanischem Weihrauch verschnitten oder es werden Harze und Fette anderer Bäume und Früchte, die vor Ort vorkommen, untergemischt. Weihrauchähnliche Harze gibt es z.B. in der Gattung *Canarium* mit den Arten *C. liebertianum* (Afrika), *C. bengalese* (Indien), welche auch zur Familie Burseracaen gehören.^[9]



Abb. 1-5 Weihrauchernte im Oman (Bildquelle: <https://www.omanobserver.om/>)

Das Weihrauchharz („Oleo-Resin“) ist in Reservoiren der Rinde enthalten. Das Harz wird durch Längsschnitte am Stamm gewonnen und in regelmäßigen Abständen abgezogen, wobei das zuerst austretende Harz vorwiegend minderwertig ist und erst das anschließend gewonnene, hellere Harz, als qualitativ hochwertig angesehen wird (Abb. 1-5).^[10] Das rohe Exsudat muss dann für zwei bis

drei Monate getrocknet werden, bevor es zum Verkauf angeboten wird; dabei führt starke Sonneneinstrahlung oder eine Lagerung in feuchtem Zustand zu unerwünschten, braunen Verfärbungen. Das mögliche Farbspektrum ist in Abb. 1-6 wiedergegeben.



Abb. 1-6 Bis zu 5 cm große „Weihrauchtränen“ von *B. sacra* in unterschiedlichen Farbvariationen; große, grünliche Stücke wie in der Mitte rechts dargestellt, erzielen die höchsten Marktpreise. Rechts außen: Der sehr große Tropfen ist wahrscheinlich bei der Lagerung feucht geworden und durch Quellen der Polysaccharide „aufgeplatzt“ (Bildquelle: M. Keusgen).

Auf dem südarabischen Festland (Oman, Jemen) wächst nur eine Weihrauchart *Boswellia sacra*, der „heilige Weihrauchbaum“, während auf der nahe gelegenen Insel Sokotra mehrere *Boswellia*-Arten anzutreffen sind. Der Weihrauchbaum heißt auf Arabisch „Shajarat al-Lubān“, kann aber, je nach Herkunft, auch andere Namen tragen.^[11, 26]

Der Begriff „Olibanum“ (hebräisch „Lebonak“, bedeutet Milch)^[13] wird in deutschen Arzneibüchern seit 1887 im DAB1 und dann seit 1944 im Ergänzungsband DAB 6 aufgeführt; der Begriff wird aber lediglich für das Harz von *B. carterii* genutzt. Der indische Begriff „Salai guggal“ wird für das Harz von *B. serrata* verwendet, welche die Stammpflanze des Indischen Weihrauchs ist.^[14, 15] Es ist ein traditionelles Arzneimittel aus der ayurvedischen Medizin, das zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen verwendet wird. Eine entsprechende Monographie wurde 2005 in den deutschen

Arzneimittel-Codex (DAC) und 2006 als „Indian Frankincense“ im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur. 5.7) beschrieben. Darüber hinaus findet Weihrauch in der Homöopathie Anwendung und ist auch im Arzneibuch der Vereinigten Staaten von Amerika (USP) monographiert (hier ebenfalls *B. serrata*).

Tab. 1-1 *Boswellia*-Arten und ihre Verbreitung^[7]

Art (mit Autorennamen)	Geographische Verbreitung (nur für derzeit gültige Namen)
<i>Boswellia ameero</i> BALF.F.	Insel Sokotra
<i>Boswellia balsamifera</i> SPRENG. (Synonym von <i>Canarium balsamiferum</i> WILLD.)	
<i>Boswellia bhaw-dajiana</i> BIRDW. (Synonym von <i>B. sacra</i>)	
<i>Boswellia bhaw-dajiana</i> var. <i>enicilla</i> ENGL. (Synonym von <i>B. sacra</i>)	
<i>Boswellia boranensis</i> ENGL. (Synonym von <i>B. rivae</i>)	
<i>Boswellia bricchettii</i> (CHIOV.) CHIOV. (Synonym von <i>Lannea obovate</i>)	
<i>Boswellia bullata</i> THULIN	Insel Sokotra
<i>Boswellia carterii</i> BIRDW. (Synonym von <i>B. sacra</i>)	
<i>Boswellia chariensis</i> GUILLAUMIN (Synonym von <i>B. papyrifera</i>)	
<i>Boswellia dalzielii</i> HUTCH.	Tropisches Westafrika
<i>Boswellia dioscoridis</i> THULIN	Insel Sokotra
<i>Boswellia elegans</i> ENGL. (Synonym von <i>B. neglecta</i>)	
<i>Boswellia elongata</i> BALF.F.	Insel Sokotra
<i>Boswellia frereana</i> BIRDW.	Somalia
<i>Boswellia glabra</i> ROXB. (Synonym von <i>B. serrata</i>)	
<i>Boswellia globosa</i> THULIN	Somalia
<i>Boswellia hildebrandtii</i> ENGL. (Synonym von <i>B. neglecta</i>)	
<i>Boswellia holstii</i> ENGL. (Synonym von <i>B. neglecta</i>)	
<i>Boswellia javanica</i> TURCZ. (Synonym von <i>Garuga floribunda</i>)	
<i>Boswellia madagascariensis</i> CAPURON (Synonym von <i>Ambilobeia madagascariensis</i>)	

Art (mit Autorennamen)	Geographische Verbreitung (nur für derzeit gültige Namen)
<i>Boswellia microphylla</i> CHIOV.	Äthiopien, Kenia, Somalia
<i>Boswellia enicillatete</i> ENGL. (Synonym von <i>B. neglecta</i>)	
<i>Boswellia nana</i> HEPPER	Insel Sokotra
<i>Boswellia neglecta</i> S.MOORE	Somalia, Kenia
<i>Boswellia occidentalis</i> ENGL. (Synonym von <i>B. papyrifera</i>)	
<i>Boswellia odorata</i> HUTCH. (Synonym von <i>B. papyrifera</i>)	
<i>Boswellia ogadensis</i> VOLLESEN	Äthiopien
<i>Boswellia ovalifoliolata</i> N.P.BALAKR. & A.N.HENRY	Indien
<i>Boswellia papyrifera</i> (CAILL. EX DELILE) HOCHST.	Äthiopien, Eritrea, Ostafrika
<i>Boswellia pirottae</i> CHIOV.	Äthiopien
<i>Boswellia popoviana</i> HEPPER	Insel Sokotra
<i>Boswellia rivae</i> ENGL.	Äthiopien, Kenia, Somalia
<i>Boswellia ruspoliana</i> ENGL. (Synonym von <i>B. rivae</i>)	
<i>Boswellia sacra</i> FLÜCK.	Oman, Jemen
<i>Boswellia serrata</i> ROXB. EX COLEBR.	Indien
<i>Boswellia socotrana</i> BALF.F.	Insel Sokotra
<i>Boswellia thurifera</i> ROXB. EX FLEMING (Synonym von <i>B. serrata</i>)	
<i>Boswellia undulatoacrenata</i> (ENGL.) ENGL. (Synonym von <i>B. sacra</i>)	

Tab. 1-2 Einige wichtige Vertreter der Familie *Burseraceae*^[6]

Gattung	Arten	Verwendete Pflanzenteile
Aucoumea	<i>A. klaineana</i>	Holz
Boswellia	<i>B. frereana</i> <i>B. serrata</i> <i>B. sacra</i> sowie weitere	Weihrauchharz, gelegentlich Holz
Bursera	<i>B. aloexylon</i> <i>B. enicillate</i> <i>B. simaruba</i> sowie ca. 100 weitere	Harz, Copale (Baumharze für Lacke und Räucherwerk), ätherisches Öl

Gattung	Arten	Verwendete Pflanzenteile
Canarium	<i>C. album</i> <i>C. luzonicum</i> <i>C. strictum</i> <i>C. schweinfurthii</i> sowie ca. 105 weitere	Holz, Harz, Früchte, ätherisches Öl
Commiphora	<i>C. Africana</i> <i>C. mukul</i> <i>C. myrrha</i> <i>C. opobalsamum</i> sowie ca. 190 weitere	Harz, ganze Pflanze
Caruga	<i>G. pinnata</i>	Holz, Früchte
Protium	<i>P. serratum</i> <i>P. copal</i> <i>P. cubense</i> <i>P. heptaphyllum</i> sowie ca.150 weitere	Holz, Harz, unechter copal (nicht ausgehärtete, Bernstein-ähnliche Masse)

1.3 Weihrauchharz

Der Zusammenhang zwischen Weihrauchbaum und Weihrauchharz wurde bereits im obigen Kapitel 1.2 erörtert. Im nachfolgenden Kapitel soll das Thema Weihrauchharz weiter vertieft werden.

Weihrauchharze sind grob in feste, glasartige „*Boswellia*-artige“ Harze und in viskose, kaugummiartige „Elemi-artige“ (Elemi, *Canarium luzonicum*) Harze aufgeteilt.^[6] Weihrauchharze sind recht unterschiedlich und weisen neben der breiten Konsistenz auch große Farbvariationen von zitronengelben über bernsteinfarbene, rötliche, Karamell-braune bis hin zu sehr dunkelbraunen Tönen auf. Die kleinen, splittrigen Brocken zeigen oft helle, glasartige und die größeren Stücke zumeist trübe Töne (Abb. 1-7). Ebenso variiert der Geruch der Weihrauchharze, welcher durch die Zusammensetzung des jeweiligen ätherischen Öls bestimmt wird. Der Weihrauch von *B. sacra* hat eine herbe Note und ist der Inbegriff von hochwertigem Weihrauch zu Räucherzwecken. Hingegen hat ostafrikanischer Weihrauch eine eher zitronenartige Note, die als angenehm empfunden wird. Gelegentlich treten Geruchsnoten auf, die an Nadelwald erinnern.

Weihrauch wird nach Merkmalen wie geographischer Herkunft, Farbe, Geruch, Größe der Harzbrocken, 1. (minderwertiger), 2., oder 3. Schnitt, Verunreinigungen, insbesondere Sand- und Rindenanteile, sowie Erntejahr eingeteilt. Dabei erzielen relativ große und homogene, weißlich-grüne Stücke von *B. sacra* die höchsten Erträge, wohingegen dunkelbraune und kleine Stücke die geringste Qualitätsstufe ergeben. Mischungen mit anderen *Boswellia*-Arten sind nur schwer zu erkennen; häufig werden kleiner Harz-Fragmente mit Fremdstoffen „zusammengekittet“.

Es ist sehr oft über Verfälschungen mit anderen Harzen oder Pflanzenteilen, einige unerwünschte Beimischungen wie Terpentin, Tannenharz, Fichtenharz, Mastix, Kolophonium, anderen Räuchermischungen usw. und sogar Fette berichtet worden. Diese ausgesprochen vielfältigen Beimischungen aus teilweise exotischen Quellen können eine korrekte Identifizierung erschweren. Jedoch sind noch sehr spärliche Angaben zur diesen Weihrauchmischungen in der klassischen und modernen Literatur zu finden.^[16, 17] Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher auch, die analytischen Grundlagen zu schaffen, um Verunreinigungen leichter zu erkennen.



Abb. 1-7 Bruchstücke von *B. sacra* vor der Sortierung; eher geringere Qualität, wie sie zur Herstellung von Extrakten verwendet wird. Gut erkennbar sind die „Harztropfen“ (Bildquelle: M. Keusgen).

Die Farbe der aus Extrakten (Abb. 1-8) gewonnenen Harzsäuren ist ein in der Regel schmutzig-weißes bis gelblich braunes, lockeres Pulver, das geruchsfrei ist. Bei einigen Proben (z.B. bei den Spezies *B. frereana*, *B. ameero*) liegen die Säuren als dunkelbraune, zähe Masse vor.^[6]



Abb. 1-8 Getrockneter, ethanolischer Extrakt von *B. sacra*, teilweise fragmentiert (Bildquelle: M. Keusgen)

Die nichtsauren Komponenten sind meist hellgelbe bis honigfarbene Massen von zähflüssiger Konsistenz, die oberhalb von ca. 40 °C dünnflüssig werden und unterhalb von ca. 20 °C erstarren. Es gibt aber auch Ausnahmen, wie bei *B. frereana*, welche fast nur Neutralkomponenten als feines, weißes, wohlriechendes Pulver enthält.^[6]

1.4 Historische Aspekte zur Chemie des Weihrauchs

Die ersten Untersuchungen der sauren Weihrauchbestandteile gehen auf die Jahre 1892-1899 zurück. TSCHIRCH und HALBEY (1898) veröffentlichten die Manuskripte „Untersuchungen über die Sekrete“ sowie „Die Harze und die Harzbehälter“. Sie zeigten erstmals die Auftrennung des Weihrauchharzes aus einem alkoholischen Extrakt in neutrale und saure Bestandteile und gaben dem sauren Produkt den Namen „Boswellinsäure“ (auch gelegentlich in der Literatur „Boswellinsäuren“ genannt) mit dem Summenformelvorschlag $C_{32}H_{52}O_4$.^[18, 19]

WINTERSTEIN und STEIN konnten 1932 belegen, dass es sich bei der isolierten Boswellinsäure um ein Gemisch aus α - und β -Boswelliasäure (BA) und deren 3-O- β -Acetyl-Derivate (α/β -ABA) handelte. Für die beiden BA's ermittelten sie die korrekte Summenformel $C_{32}H_{50}O_4$, sowie die Schmelzpunkte und Drehwerte.^[20]

In ihrer Forschungsarbeit hatten Sie das Harz mit Diethylether extrahiert, um die schwerlöslichen, polymeren Substanzen als Rückstand abzutrennen. Die im Extrakt enthaltenen Säuren wurden anschließend als Bariumsalze gefällt, mit Acetanhydrid acetyliert und abschließend die acetylierten Boswelliasäuren (β -ABA) durch fraktionierte Kristallisation und Aufreinigung mittels Chromatographie erhalten; dabei betrug die Ausbeute an „Boswellinsäure“ etwa 5 %.^[6]

Diese Isolierungsmethode wurde auch weiterhin verwendet, z.B. von SAFAYHI *et al.* ^[15], die aus *B. serrata* 1,7 % β -ABA, 0,05 % α -ABA und 0,2 % AKBA erhielten („K“ steht bei den üblichen Abkürzungen für „Keto“). SHAO *et al.* konnten über einen anderen Weg durch eine mehrfache Extraktion von Weihrauch mit Methanol, Überführung der Säuren in ihre wasserlöslichen Kaliumsalze und Säulenchromatographie 21,1 % β -BA, 7,69 % KBA, 0,0018 % AKBA und 0,00005% β -ABA gewinnen.^[10] Eine weitere Isolierungsmethode von Boswelliasäuren wurde nach CHEVRIER *et al.* durch Extraktion von Weihrauch mit Diethylether bzw. Ethanol und mehrfachen säulenchromatographischen Aufreinigung publiziert. Die erhaltenen Ausbeuten betragen 12,2 % α -ABA, 9,9 % β -ABA, 4 % AKBA, 2,2 % β -BA, 1,7 % α -BA und 1,1 % KBA. ^[10] Entsprechend einer Publikation von NIESEN sind alle diese Methoden sehr aufwendig und mit sehr geringer Ausbeute, insbesondere für AKBA, verbunden. Eine von diesen Autoren durchgeführte, optimierte Methode ist in Tab. 1-3 zusammengefasst.^[10]

Tab. 1-3 Ausbeuten an Boswelliasäuren bei unterschiedlichen Extraktions- und Isolationsmethoden.^[10]

Autor	SAFAYHI <i>et al.</i> WINTERSTEIN / STEIN	SHAO <i>et al.</i>	CHEVRIER <i>et al.</i>	CHEVRIER <i>et al.</i> , optimiert nach NIESEN
Methode	Etherischer Extrakt, Ausfällen der Säuren als Ba-Salze mit Bariumhydroxid, Überführung in gemischte Anhydride mit Acetanhydrid, fraktionierte Kristallisation, Säulenchromatographie	Überführung der Säuren in ihre wasserlöslichen Kalium-Salze, mehrfache Extraktionen, Überführung der Salze in die freien Säuren, Säulenchromatographie	Nur Extraktion mit nachfolgender Chromatographie	Etherischer Extrakt, Acetylierung, Säulenchromatographie, nachfolgende Oxidation von β -ABA zu AKBA
Ausbeute	0,24 % AKBA 2,1 % β -ABA	4,6 % AKBA 4,6 % β -ABA	4,0 % AKBA 1,1 % KBA 9,9 % β -ABA 2,2 % β -BA 12,2 % α -ABA 1,7 % α -BA	14,8 % AKBA 1,65 % (3-Acetoxy-urs-9,12-dien-24-säure)

RUZICKA und WIRZ berichteten 1939-1940 in einer Veröffentlichung über die strukturellen Ähnlichkeiten der Boswelliasäuren mit Amyrinen und beschrieben ihre Methode zur erfolgreichen Überführung der α -Boswelliasäure in β -Amyrin bzw. β -Boswelliasäure in α -Amyrin (Abb.1-9).^[21]

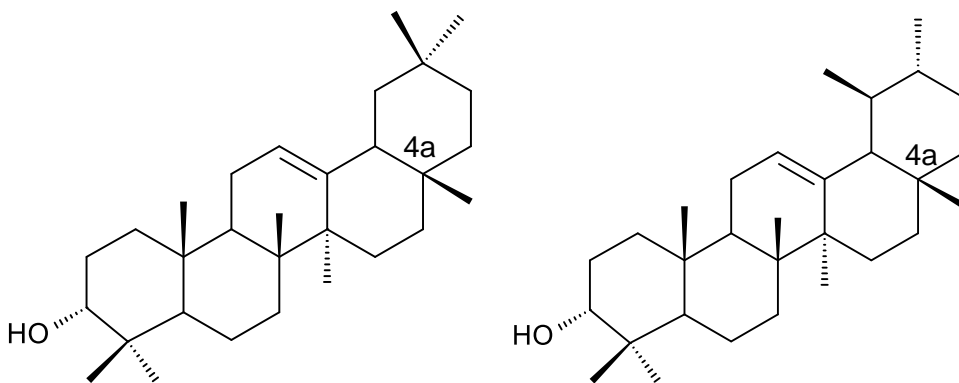


Abb. 1-9 Strukturen von β -Amyrin (analog zu Oleanolsäure, jedoch im Gegensatz zu BA Säurefunktion an Position 4a; links) und α -Amyrin (analog Ursolsäure, jedoch im Gegensatz zu BA Säurefunktion an Position 4a; rechts)

Im Jahr 1956 veröffentlichten BETON *et al.* die genaue Konfiguration der Hydroxy- (unterhalb der Ebene, axial, α) und Carboxyl-Gruppe (oberhalb der Ebene, axial, β) von β -BA. Fernerhin wurden in dieser Publikation die chemischen Eigenschaften der BA sowie deren Drehwerte und Absorptionsmaxima ϵ mit denen bekannter Triterpene und verwandter Verbindungen verglichen.^[22] Weiterhin wurden in den 1960ern die 11-Keto- β -boswelliasäure (β -KBA) und deren 3-O-Acetyl-Derivat (β -AKBA) entdeckt.^[23, 24]

Die ersten massenspektroskopischen Untersuchungen über Amyrin- und Lupan-Derivate wurden 1963 von BUDZIKIEWCZ *et al.* veröffentlicht. Sie lieferten zahlreiche Fragmentierungsmuster für gesättigte und ungesättigte, pentacyclische Triterpene und deren Derivate, die noch heute für die Charakterisierung unbekannter Terpene verwendet werden.^[25] PARDHY und BHATTACHARYYA haben 1978 zum ersten Mal Boswelliasäuren mittels Massenspektrometrie untersucht. Ihre Strukturanalyse, unterstützt durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Untersuchungen, trug zur Charakterisierung von zwei neuen Boswelliasäuren bei, nämlich 11-Keto- β -boswelliasäure (β -KBA) und 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (β -AKBA).^[26]

Die absolute Konfiguration von β -AKBA wurde im Jahr 2000 von AMMON *et al.* durch Röntgenstrukturen aufgeklärt, die von β -ABA durch GUPTA *et al.*^[27, 28] Im Jahr 2003 wurden die NMR-Daten für α -BA und β -BA mittels zweidimensionaler Techniken durch CULIOLI *et al.* sowie die vollständige NMR-Daten für β -ABA und β -AKBA durch die Gruppe SIMMET publiziert.^[29, 30] Somit sind die Strukturen der wichtigsten BA-Derivate aufgeklärt.

Wie im Folgenden noch erörtert wird, kommen viele weitere Triterpensäuren im Weihrauch vor, die bisher sowohl analytisch wie auch pharmakologisch kaum Beachtung finden. Auch nach mehr als 100 Jahren Forschung an Weihrauch befassen sich aktuelle Dissertationen vornehmlich mit den Boswelliasäuren, obwohl diese bisweilen nur einen geringen Prozentsatz in Bezug auf die ethanollöslichen Inhaltsstoffe ausmachen.^[31, 32]

1.5 Inhaltsstoffe des Weihrauchharzes

Die Verteilung der Inhaltsstoffe im Weihrauchharz wird in der Literatur uneinheitlich dargestellt. Die meisten Angaben beziehen sich auf ältere wissenschaftliche Quellen. Da Weihrauch eine komplexe Mischung aus sehr vielen verschiedenen, natürlichen Komponenten ist, die natürlichen Schwankungen ausgesetzt sind und daher keine konstante Werte aufweisen oder einfach nicht in allen Spezies auftreten.^[6, 33, 34] Dazu kommt die relativ unübersichtliche taxonomische Situation dieser Gattung (Tab. 1-1).

Aus Weihrauchharzen lassen sich folgende Fraktionen gewinnen:

A) Extrahierbarer, ethanollöslicher Anteil (ca. 60%)

Die Ethanolfraktion enthält nach bisherigen Erkenntnissen die im Kap. 1.7 beschriebenen, bioaktiven Stoffe, hauptsächlich unterschiedliche Triterpensäuren. Die Ethanolfraktion kann beispielsweise effizient über Soxhlet-Extraktion (Extraktionsdauer ca. 3 Stunden) gewonnen werden. Triterpensäuren lassen sich durch nachfolgendes Ausschütteln mit Natronlauge abtrennen, was aber wegen starker Emulsionsbildung wenig effizient und mit hohen Verlusten verbunden ist. Der ethanolische Extrakt enthält flüchtige und nichtflüchtige Terpenoide sowie phenolische Verbindungen:

- **Triterpensäuren** wie
 - Boswelliasäuren (pentazyklische Triterpensäuren)
 - Lupansäuren (pentazyklische Triterpensäuren)
 - Tirucallensäuren (tetrazyklische Triterpensäuren)
 - Robursäuren (tetrazyklische Triterpensäuren)
 - u.a. auch andere Säuren wie Canariensäure, Rubiniasäure

- **Neutrale Substanzen** einschließlich Ätherisch-Öl-Komponenten (5-10 %) wie
 - Terpenoide
 - Monoterpene (C₁₀): Estragol, α -Thujen, α/β -Pinen, Carvon, Cineol, Linalool, Limonen, Carven, Camphen, Thymol, und weitere Substanzen
 - Sesquiterpene (C₁₅): β -Humulen, β -Caryophyllen, α -Cubeben, α -Bergamoten
 - Diterpene (C₂₀): Incensol, Incensoloxid, Incensolacetat, Serratol, Verticillane, u.w.
 - Triterpene (C₃₀): α/β -Amyrin, Lupeol, und weitere Substanzen
 - Phenole: Carveol, Carvacrol, Thymol
 - Phenylpropanoide: Apiol, Zimtaldehyd, Anethol, Dillapiol, Estragol
 - Furanocumarine: Coriandrin
 - Bitterstoffe

B) Mit Ethanol nicht extrahierbare Fraktion, teilweise wasserlöslich (ca. 40%)

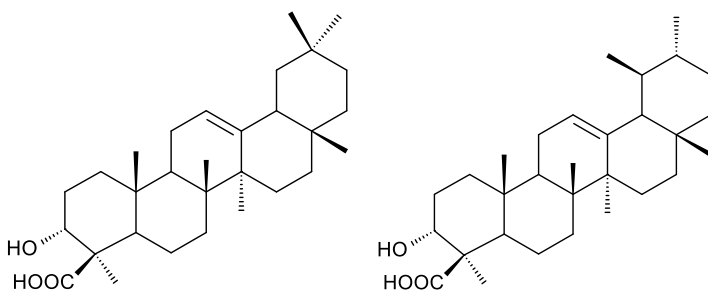
- Polysaccharide (25-30 %)
- Schleime (ca. 12 %), bestehend aus: Galactose, Arabinose, 4-O-Methylglucuronsäure im Verhältnis 7:1:4
- Gummi (ca. 20 %)
- Bassorin (6-8 %), bestehend aus: L-Arabinose, D-Galactose, L-Rhamnose und dem Methylester der D-Galacturonsäure)

1.6 Analytik der Boswelliasäuren

Die Boswelliasäuren sind eine Gruppe chemischer Verbindungen, die ausschließlich im Harz der Weihrauchbäume (*Boswellia*) vorkommen und sich nur schwer synthetisch herstellen lassen. Damit sind diese Bäume die derzeit einzige Ressource für diese aussichtsreiche Wirkstoffgruppe. Allerdings sind Weihrauchbäume in ihrem Bestand stark bedroht, einerseits wegen Übererntung oder andererseits, weil sie einfach als Brennmaterial verwendet werden. Da es jedoch nicht nur „die“ Boswelliasäure gibt, gestaltet sich die Trennung der einzelnen Säuren schwierig, die üblicherweise auch noch mit weiteren Triterpensäuren in komplexen Mischungen vorliegen.

Unter biogenetischen Gesichtspunkten sind die Boswelliasäuren formal aus 6 Isoprenbausteinen aufgebaut; diese bilden zunächst das offenkettige Triterpen Squalen $C_{30}H_{50}$, das einige Funktionalisierungen und Umlagerungen durchläuft. Die Boswelliasäuren gehören zur Gruppe der pentazyklischen Triterpene mit einem Ursan- bzw. Olean-Grundgerüst. Die α -Boswelliasäuren haben ein Oleanan-Gerüst, das am E-Ring an Position C_{30} zwei geminale Methylgruppen aufweist und leiten sich strukturell von der Oleanolsäure ab („ α -ständig“). Die β -Boswelliasäuren haben ein Ursan-Gerüst und werden somit zu den α -Amyrinen gerechnet; bei ihnen stehen die beiden Methylgruppen vicinal an C_{29} und C_{30} („ β -ständig“).^[22]

Sie unterscheiden sich untereinander in funktionellen Gruppen und mit anderen Terpensäuren auch im Grundgerüst (Abb.1-10).



α -Boswelliasäure **2** (α -BA) β -Boswelliasäure **4** (β -BA)

Abb. 1-10 Grundstrukturen der α -Boswelliasäure (Oleanan-Typ) und der β -Boswelliasäure (Ursan-Typ), je nach Anordnung der Methylgruppen am Ring E. Die Nummerierung der Substanzen bezieht sich auf die folgende Abb. 1-11.

Wie bereits oben erwähnt, lassen sich Boswelliasäuren nur mit größerem Aufwand chromatographisch voneinander trennen, wobei die HPLC eher geeignet ist als die GC. Aber auch die Dünnschichtchromatographie (DC, auf Englisch TLC, „Thin Layer Chromatography“) ist noch immer eine gängige Methode, wobei in den vergangenen Jahren die Methode als solche durch die

Einführung der High Performace TLC (HPTLC) verbessert wurde, aber auch eine Reihe unterschiedlich leistungsfähiger Fließmittelsysteme zur Analyse von Weihrauch entwickelt wurden. Zudem kann mittels DC eine leichte Abschätzung der Biopartitionierungseigenschaften von Substanzen vorgenommen werden.^[35] Weiterhin haben sich DC-Methoden in der Routineanalytik, speziell auch bei komplexeren Proben, und bei der Syntheseverfolgung bewährt.^[36] Von großem Vorteil ist, dass bei der DC Fließmittel verwendet werden können, die eine HPLC-Säule irreversibel schädigen würden. Zudem besteht bei harzigen Substanzen – und um genau solche geht es hier – die Gefahr, dass HPLC-Säulen „verstopft“ werden.

Die Fortschritte in der Planar-Chromatographie, beispielsweise mit erzwungenem Fluss (FFPC), demonstriert die Vielseitigkeit dieser Methode: Variationen der FFPC-Technik sind die Rotationsplanarchromatographie (RPC), die Elektroplanarchromatographie (EPC), die Überdruckschichtchromatographie (OPLC) sowie Techniken mit parallel- und seriell-gekoppelten Schichten, welche neue Perspektiven für die Naturstoffanalytik eröffnen.^[37, 38]

Auf den nachfolgenden Seiten (Abb. 1-11 bis 1-15) sind die Triterpensäuren abgebildet, die in Weihrauch erwartet werden können. Alleine deren strukturelle Vielfalt stellt eine aussagekräftige Analytik vor große Herausforderungen. *B. serrata* wird in Indien schon lange arzneilich verwendet; jedoch sind die dortigen Anforderungen an ein traditionelles pflanzliches Arzneimittel nicht immer mit den Anforderungen in der EU und in Deutschland vergleichbar.^[39, 40] Wie in Kapitel 1.7 noch näher erörtert, wird Weihrauch auch in Indien aufgrund seiner entzündungshemmenden Eigenschaften verwendet.

Da Weihrauch inzwischen im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) sowie in der „United States Pharmacopoeia“ (USP) monographiert ist, können die dort beschriebenen Methoden als Ausgangspunkt für diese Arbeit verwendet werden.^[41, 42] Nach einer vergleichsweise einfachen Probenaufbereitung erfolgt die Identifizierung über DC, bei der in der Ph. Eur. erwartungsgemäß ein saures Fließmittel verwendet wird, in der USP jedoch überraschenderweise ein neutrales. Bei der Gehaltsbestimmung werden nur die Keto-boswelliasäuren, Substanzen **8** und **9** (Kap. 1.6.1), berücksichtigt, alles andere bleibt unberücksichtigt. Die Gehaltsbestimmung wird mittels HPLC, einer „Reversed-Phase“-Säule (RP18), und einem sauren Fließmittel durchgeführt; die Detektion erfolgt UV-spektrometrisch bei $\lambda=254$ nm, wobei nur wenige der unten abgebildeten Substanzen berücksichtigt werden.

An dieser Stelle ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die genannten Monographien in ihren Methoden leider als unzureichend zu bewerten sind. Gründe hierfür sind:

- Die Probenvorbereitung von amorphen Ausgangsmaterialien mit einem hohen Anteil an polymeren Stoffen muss wohlüberlegt sein; üblicherweise ist eine weitere Aufbereitung der Probe erforderlich, da Reste der Polymere eine HPLC-Säule erheblich schädigen können.
- Zur Identifizierung wird eine DC verwendet, jedoch mit deutlich unterschiedlichen Fließmitteln. Ein Säurezusatz erscheint hier essentiell.
- Von der Vielzahl der Triterpensäuren werden nur zwei Substanzen berücksichtigt, von denen wahrscheinlich fälschlicherweise angenommen wird, dass diese die alleinigen wertbestimmenden Komponenten sind (siehe dazu weiter unten „Pharmakologie“). Diese Annahme erscheint aber wenig begründet, weshalb die Triterpensäuren insgesamt betrachtet werden sollten.
- Für die meisten dieser Substanzen ist eine UV-spektrometrische Detektion nur bei ca. 210 nm und nicht bei höheren Wellenlängen möglich. Dieses macht die Analytik aufwändig und störanfällig. Eine weitere Probenvorbereitung, bzw. Vorsäulenderivatisierung wären hier wünschenswert.
- Es ist keine Prüfung auf Verfälschungen in den beiden Monographien enthalten, was sehr ungewöhnlich ist.
- Es ist kein Systemeignungstest („System Suitability Test“, SST) beschrieben.
- Es fehlt eine Grenzwertprüfung auf Estragol, welches im äthärischen Öl des Weihrauchs vorkommt und im Verdacht steht, krebserregend zu sein.

Die oben aufgelisteten Punkte sind die Hauptmotivation für die nun vorliegende Arbeit.

1.6.1 Strukturformeln der Boswelliasäuren

Die nachfolgend in den Abb. 1-11 bis 1-15 dargestellten Triterpensäuren sind typisch für *Boswellia*-Arten, wobei die Substanz **1** (18- β -Glycyrrhetinsäure, Glyc oder auch Gly) als interner Standard verwendet wird und nicht in *Boswellia*, sondern in der Gattung *Glycyrrhiza* vorkommt. Die in den Legenden angegebenen Abkürzungen für die jeweiligen Substanzen werden bis auf einige Hauptverbindungen wie 3- α -Hydroxy- α -boswelliasäure (α -BA) **2**, 3- α -O-Acetyl- α -boswelliasäure (α -ABA) **3**, 3- α -Hydroxy- β -boswelliasäure (β -BA) **4**, 3- α -O-Acetyl- β -boswelliasäure (β -ABA), 3- α -Hydroxy-11-keto- β -boswelliasäure (β -KBA) **9** und 3- α -O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (β -AKBA) **10** in der Literatur uneinheitlich verwendet. Um Verwechslungen zu vermeiden, werden später im Ergebnisteil (Kapitel 4) und im Diskussionsteil (Kapitel 5) überwiegend die ausgeschriebenen Trivialnamen, wie in den nachfolgenden Abb. 1-11 bis 1-15 wiedergegeben, verwendet.

Die Strukturformeln der Boswelliasäuren (BAs) unterscheiden sich untereinander an folgenden Positionen (Abb. 1-11):

- Geminale Methylgruppen an Ring E, C₂₀: α -Reihe.
- Vicinale Methylgruppen an Ring E, C₁₉ und C₂₀: β -Reihe, kommt üblicherweise in höheren Konzentrationen vor als die α -Reihe.
- Ring C, C₁₂: Hier befindet sich üblicherweise eine Doppelbindung.
- Ring C, C₁₁: Hier kann sich eine Hydroxy- oder Keto-Gruppe befinden. Fehlt diese, so ist an C₁₁ auch eine weitere Doppelbindung möglich.
- Ring A, C₃: Immer eine Hydroxygruppe, die auch acetyliert sein kann.
- Ring A, C₄: Immer eine Säurefunktion sowie eine geminale Methylgruppe.

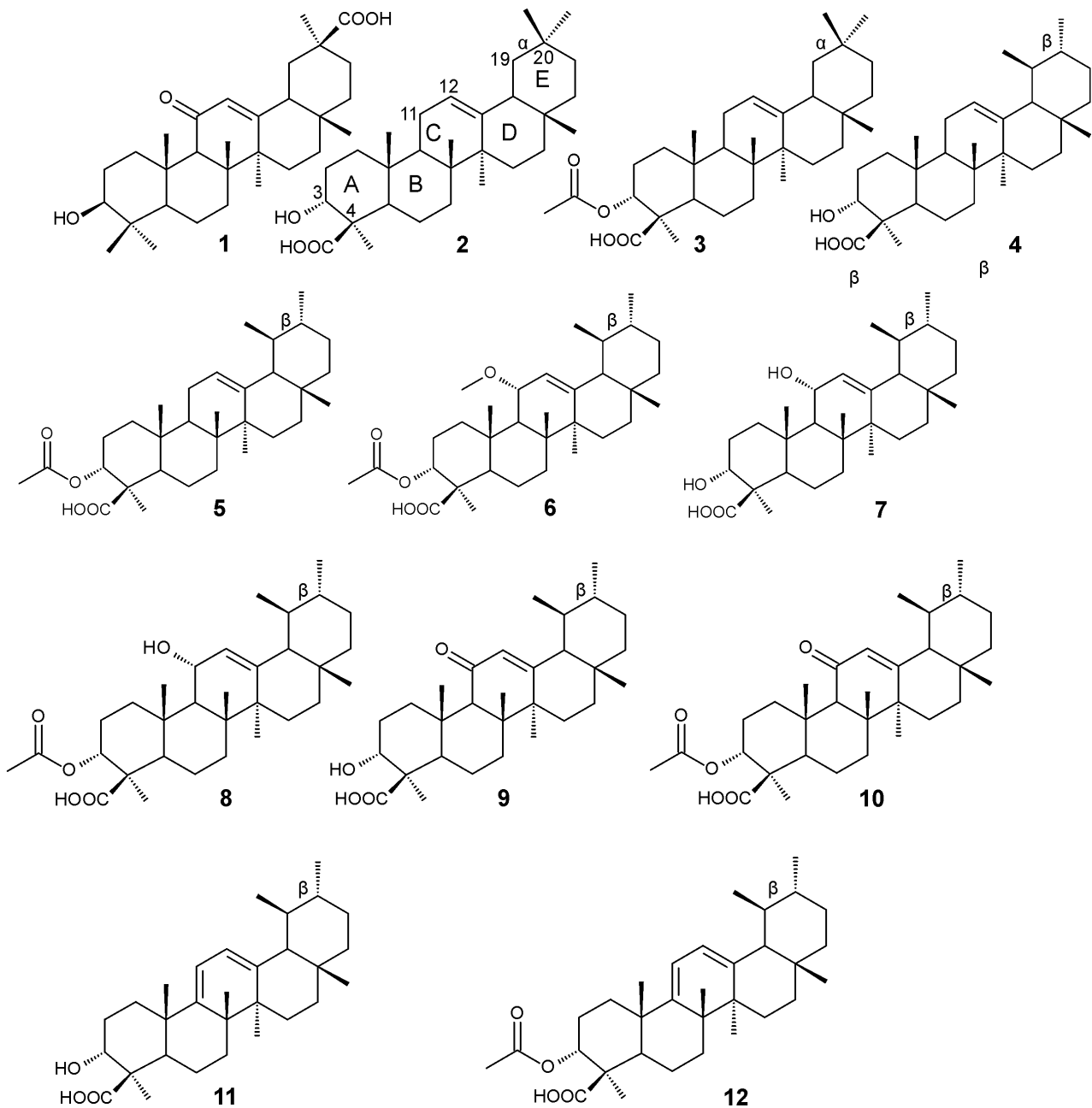


Abb. 1-11 18-β-Glycyrrhetinsäure **1** (Glyc; kommt nicht im Weihrauch vor, wurde bei den Analysen als interner Standard verwendet), 3-α-Hydroxy-α-boswelliasäure (α-BA) **2**, 3-α-O-Acetyl-α-boswelliasäure (α-ABA) **3**, 3-α-Hydroxy-β-boswelliasäure (β-BA) **4**, 3-α-O-Acetyl-β-boswelliasäure (β-ABA) **5**, 3-α-O-Acetyl-11-α-methoxy-β-boswelliasäure (11-OMe-β-ABA) **6**, 3-α-Hydroxy-11-α-hydroxy-β-boswelliasäure (11-OH-β-BA) **7**, 3-α-O-Acetyl-11-α-hydroxy-β-boswelliasäure (11-OH-β-ABA) **8**, 3-α-Hydroxy-11-keto-β-boswelliasäure (β-KBA) **9**, 3-α-O-Acetyl-11-keto-β-boswelliasäure (β-AKBA) **10**, 3-α-Hydroxy-9,11-dehydro-β-boswelliasäure (9,11-dehydro-β-BA) **11**, 3-α-O-Acetyl-9,11-dehydro-β-boswelliasäure (Ad-β-BA) **12**.

1.6.2 Strukturformeln der Lupansäuren

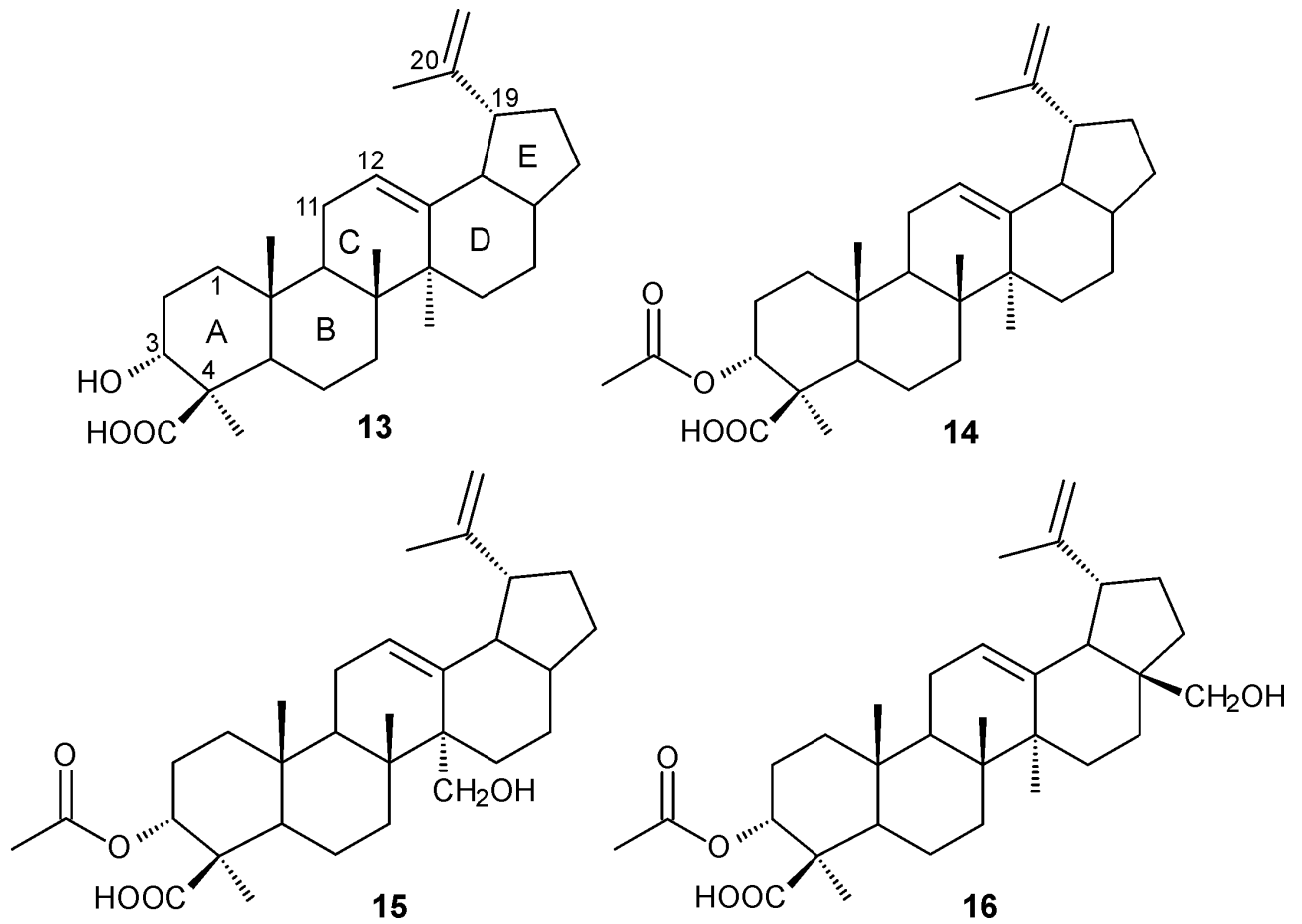


Abb. 1-12 Lupansäure (LA) **13**, 3- α -Acetyl-lupansäure (ALA) **14**, 3- α -O-Acetyl-27- α -hydroxy-lupansäure (27-OH-ALA) **15**, 3- α -O-Acetyl-28- β -hydroxy-lupansäure (28-OH-ALA) **16**.

1.6.3 Strukturformeln der Tirucallensäuren

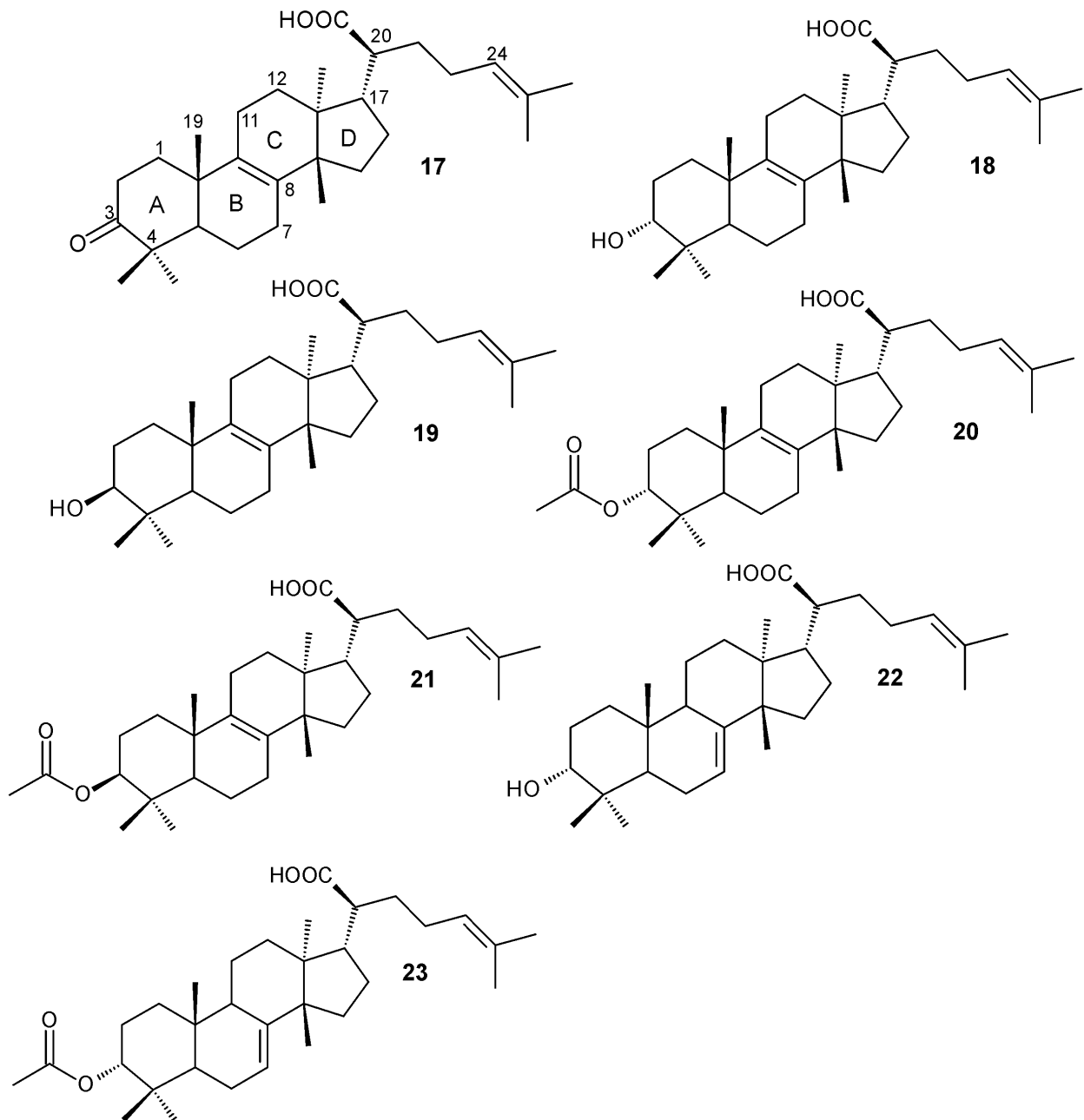


Abb. 1-13 3-Oxo-8,24-dien-tirucallensäure (3-Oxo-TA) **17**, 3- α -Hydroxy-8,24-dien-tirucallensäure (α -TA) **18**, 3- β -Hydroxy-8,24-dien-tirucallensäure (β -TA) **19**, 3- α -O-Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure (α -ATA) **20**, 3- β -O-Ac-8,24-dien-tirucallensäure (β -Ac-7,24-dien-TA) **21**, 3- α -Hydroxy-7,24-dien-tirucallensäure (α -7,24-dien-TA) **22**, 3- α -O-Acetyl-7,24-dien-tirucallensäure (α -Ac-7,24-dien-TA) **23**.

1.6.4 Strukturformeln der Robursäuren

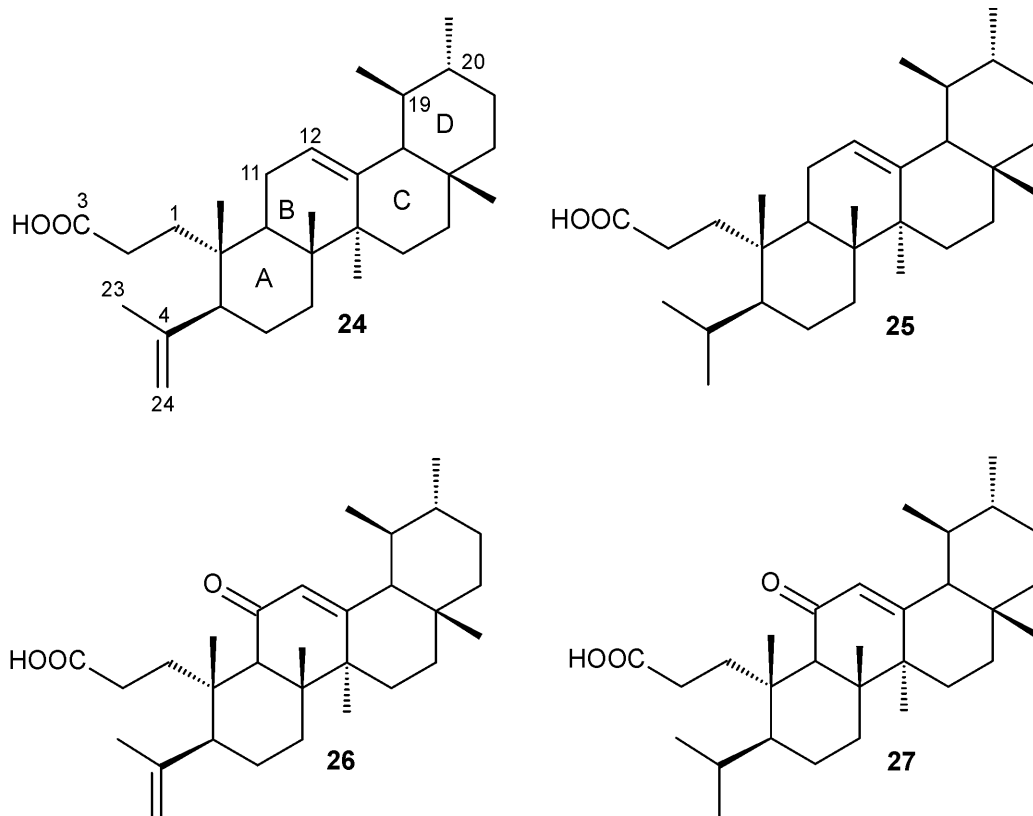


Abb.1-14 Robursäure **24**, 4(23)-Dihydro-robursäure **25**, 11-Keto-robursäure **26**, 4(23)-Dihydro-11-keto-robursäure **27**.

1.6.5 Weitere Triterpensäuren

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in der Säurefraktion eines Weihrauch-Extraktes noch weitere Säuren befinden. Nachfolgende Abbildung zeigt zwei Beispiele:

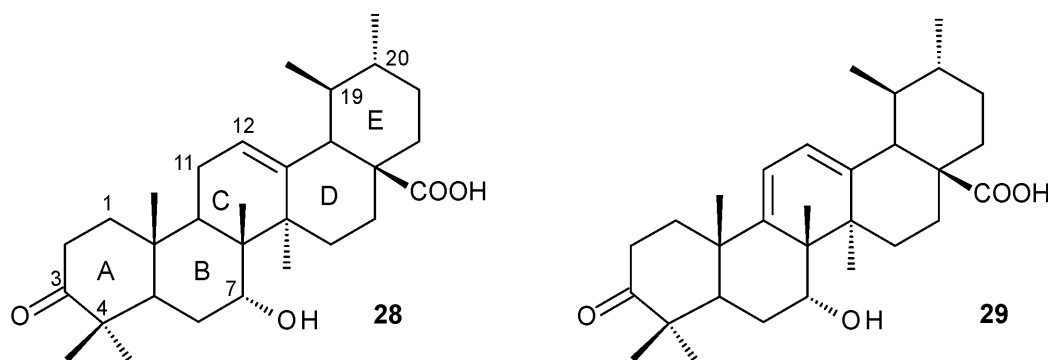


Abb.1-15 Rubinsäure (RA) (**28**), „Rubic acid“ ($C_{30}H_{46}O_4$, 7 α -Hydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic-acid, M_G : 470,7 g/mol) und Dehydro-rubinsäure (**29**, $C_{30}H_{44}O_4$, M_G : 468,7 g/mol)

1.7 Pharmakologie des Weihrauchs

Weihrauchpräparate, die in der Volksmedizin zur Heilung entzündlicher Erkrankungen eingesetzt werden, zeigten in *in-vitro*-Experimenten, in Tiermodellen, sowie in kleineren Humanstudien eine entzündungshemmende Wirkung. Die ersten wissenschaftlichen Studien über diese entzündungshemmende Wirkung von Weihrauchextrakten an Versuchstieren wurden 1986 von SINGH *et al.* durchgeführt.^[43]

An der Universität Tübingen berichteten 1991 AMMON *et al.* über pharmakologische Wirkungen der biologisch aktiven pentazyklischen Boswelliasäuren; beschrieben wurde eine Inhibierung der Leukotrien-Biosynthese sowie entzündungshemmende Eigenschaften. Die entzündungshemmende Wirkung der Boswelliasäuren wurde darauf zurückgeführt, dass sie als nicht redoxaktive Inhibitoren der 5-Lipoxygenase (5-LOX) wirken, dadurch gezielt in den Entzündungsprozess eingreifen und vermutlich die Leukotrienbiosynthese inhibieren (Abb. 1-16a, rot umrandeter Bereich, sowie im Detail Abb. 1-16b). Fernerhin zeigte sich bei Untersuchungen an Ratten, dass die 3- α -O-Acetyl-9,11-dehydro- β -boswelliasäure (Abb. 1-11, Substanz **12**, Ad- β -BA) mit einer IC₅₀ von 0,75 μ M der effektivste 5-LOX-Inhibitor ist, gefolgt von AKBA mit einer IC₅₀ von 1,5-7 μ M und β -KBA mit IC₅₀-Werten von 2,8-15 μ M. Die Substanzen β -BA und β -ABA zeigen nur eine partielle Inhibierung.^[44, 45] Allgemein werden aber die verschiedenen Keto-boswelliasäuren als die wertbestimmenden Komponenten von *B. serrata* angesehen (siehe auch Kap. 5.6).

Neben AMMON *et al.* berichteten auch SAFAYHI *et al.* mehrfach über die selektive, enzymgesteuerte, nicht redoxvermittelte, nicht kompetitive Inhibierung sowie den reversiblen Wirkmechanismus der 5-LOX durch AKBA (Abb. 1-16a,b).^[15, 46, 47]

Beim Screening auf zusätzliche Wirkungen von Boswelliasäuren auf weitere proinflammatorische Signalwege beobachteten sie 1997, dass AKBA als ein 5-LOX-Inhibitor ebenfalls die Aktivität der humanen Leukozytenelastase (HLE) *in vitro* mit einer IC₅₀ = 15 μ M verringert. Es wurde ebenso eine Enzymhemmung durch β -BA mit einer IC₅₀ = 20 μ M sowie für Amyrin und Ursolsäure beobachtet. Dieses weist darauf hin, dass die benötigten Konzentrationen an Boswelliasäuren zur HLE-Hemmung deutlich höher liegen als die zur Inhibierung der Leukotrien-Biosynthese benötigten. Es muss aber angemerkt werden, dass ein wirksames systemisches Therapeutikum IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich haben sollte und somit die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen fraglich ist.

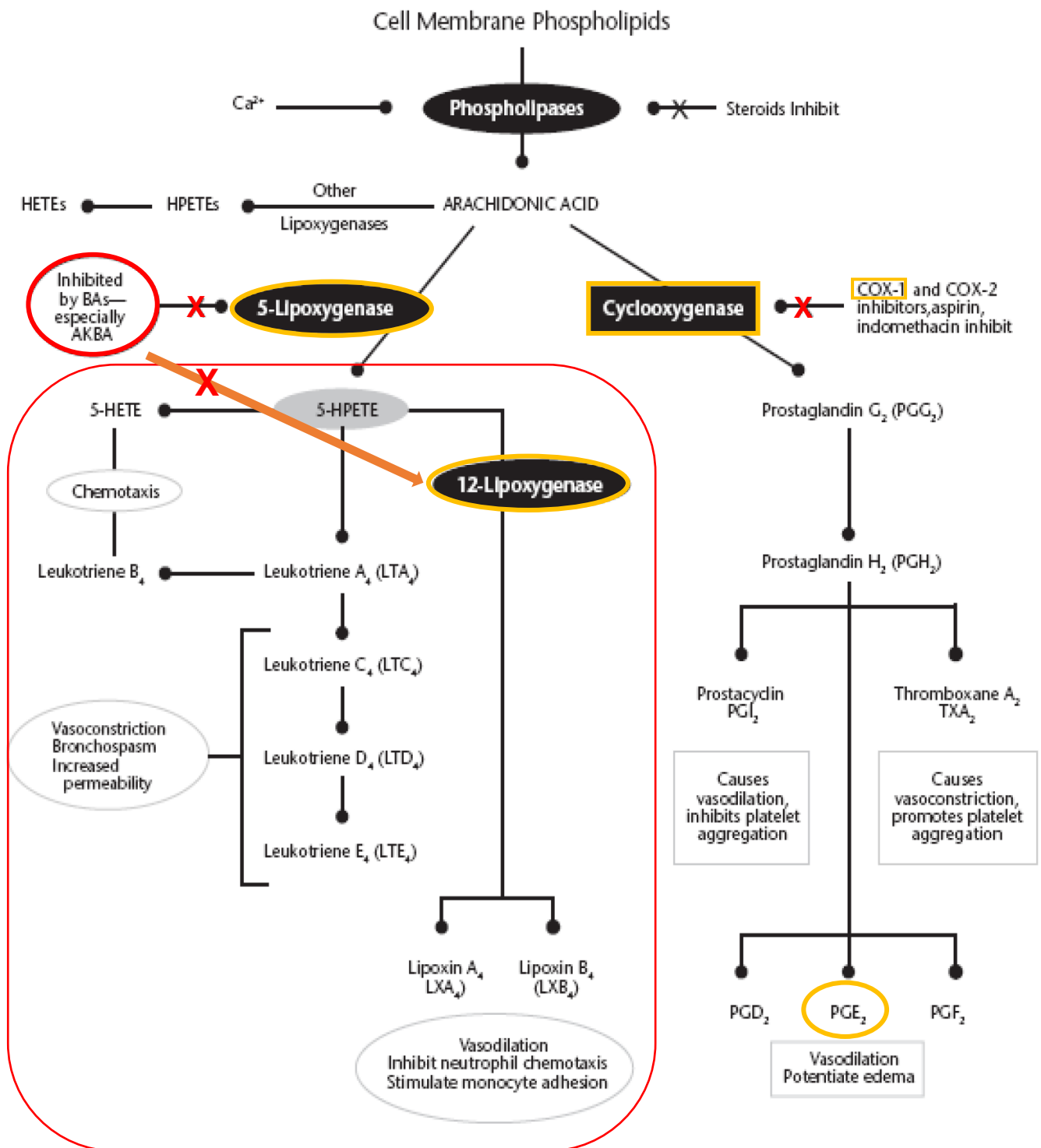


Abb. 1-16a Arachidonsäure-Kaskade mit den Angriffspunkten einiger entzündungshemmender Wirkstoffe (Ross Rentea, 2011, modifiziert). Potentielle Ansatzpunkte für BAs sind orange umrandet. Nähere Erklärungen siehe Text.

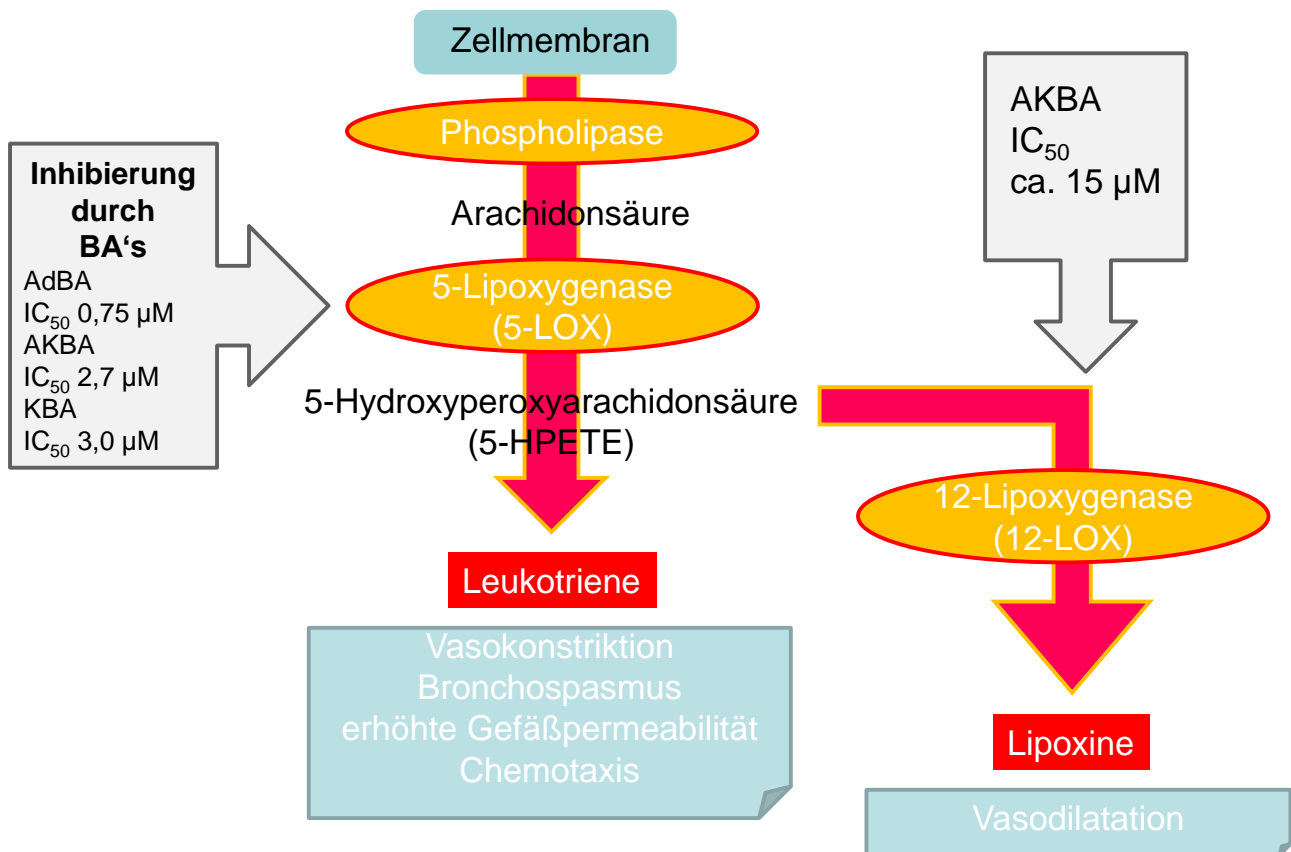


Abb. 1-16b Ausschnitt aus Abb. 1-16a. Hemmung der Lipoxygenasen durch Boswelliasäuren (BA's). IC₅₀-Werte: Literatur ^[45, 56].

Fernerhin konnte gezeigt werden, dass die duale Hemmung von (5-LOX) und (HLE) nur bei Boswelliasäuren auftritt und nicht bei den anderen, im Weihrauch enthaltenen Triterpensäuren.^[48, 49] Beide Enzyme spielen bei vielen chronischen Krankheiten wie Bronchitis und rheumatische Arthritis eine Rolle.

Es wurde oft über die antiproliferative Wirkung verschiedener pentazyklischer Triterpene berichtet, die neben der Aktivität als Lipoxygenase-Inhibitoren den Zelltod in verschiedenen Zellsystemen induzieren sollen. Die Arbeitsgruppe von AMMON legte im Jahr 1999 Daten vor, dass die Induktion der Apoptose in den menschlichen Blutzellkulturen HL-60 und CCRF-CM durch AKBA auf die Hemmung der Topoisomerase I in diesen Zellen zurückgeführt werden kann.^[50]

SYROVETS *et al.* untersuchten 2000 die Hemmung der Topoisomerasen I und IIa durch verschiedene Terpene und konnten zeigen, dass ABA diese beiden Enzyme stärker als AKBA hemmt. Darüber hinaus scheinen die Acetyl-Gruppe an C₃ und die freie Carboxylgruppe an C₄ eine wichtige Rolle für diese Inhibierung spielen, jedoch wirkt sich die Keto-Gruppe an C₄ negativ aus.^[51]

Untersuchungen von SAFAYHI *et al.* (2000) zufolge zeigten einige kommerziell erhältliche Extrakte von *B. serrata* paradoxe, konzentrationsabhängige, potenzierende aber auch hemmende Wirkungen

auf die 5-LOX; als Assay-System wurden stimulierte, menschliche und polymorphkernige Leukozyten (PMNL_S) verwendet. KBA und AKBA erhöhen die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in diesem *in vitro* Testsystem und aktivieren die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) p⁴²MARK und p³⁸; vermutet wird eine Blockade der Ca²⁺-Kanäle. Auch über diesen Wirkmechanismus lässt sich die entzündungshemmende Wirkung der Keto-boswelliasäuren partiell erklären.^[52] Für diese paradoxe Wirkung sind offensichtlich tetrazyklische Terpensäuren wie 3-Oxo-TA (Abb. 1-13, Substanz 17) mit verantwortlich – ein weiterer Grund, auch diese Gruppe der Triterpene quantitativ neben den BAs mit zu erfassen. Da TAs offensichtlich einen wesentlichen Beitrag zur biologischen Gesamtwirkung von *B. serrata* leisten, wurden weitere Analysen zur Standardisierung empfohlen, sofern *B.-serrata*-Präparate als Arzneimittel oder Nahrungsergänzungsmittel in Verkehr gebracht werden.^[53, 54]

Weiterhin berichten WERZ *et al.* über zwei weitere Enzyme, die beide durch BAs gehemmt werden: Das Enzym 12-Lipoxygenase (p12-LOX) in Thrombozyten, welches die freie Arachidonsäure in 12-Hydroperoxy-eicosatetraensäure (12-HPETE) umwandelt (Abb. 1-16) und ein Enzym aus der Klasse der Serinproteasen, namentlich Cathepsin G (CatG). CatG hat viele physiologische Funktionen, fördert allgemein Entzündungsvorgänge und vermittelt den Gewebeumbau bei Verletzungen, da Bestandteile der extrazellulären Matrix abgebaut werden. Sie konnten in ihren Docking-Experimenten zeigen, dass die BAs fest an das aktive Zentrum von CatG binden und deren proteolytische Aktivität auf kompetitive und reversible Weise unterdrücken. Andere verwandte Serinproteasen waren aber deutlich unempfindlicher gegenüber Boswelliasäuren. BAs unterdrückten offensichtlich auch die Ca²⁺-Mobilisierung in menschlichen Blutplättchen. Bei der oralen Verabreichung definierter Weihrauchextrakte ist die CatG-Aktivität im menschlichen Blut *ex vivo* gegenüber Placebo signifikant reduziert, was ebenfalls eine Erklärung für entzündungshemmende Eigenschaften wäre. Fernerhin wurde die Cyclooxygenase 1 (COX 1) als mögliches Target diskutiert. Trotz all dieser Untersuchungen ist der Wirkmechanismus des Weihrauchs als Ganzes und *in vivo* bisher nur unvollständig aufgeklärt.^[55, 56]

Nach einer 2012 an der Universität Jena erschienenen Studie hemmen die BAs ebenfalls die Synthese von Prostaglandin E₂, das ebenfalls ein Bestandteil der Entzündungskaskade ist (Abb. 1-16). Jüngste Studien zu Hirntumoren und Leukämiezellen bestätigen, dass BAs, insbesondere AKBA und KBA, neben der Hemmung der Leukotrienbiosynthese auch antiproliferative, antikarzinogene und apoptotische Wirkungen zeigen,^[57] was an bestimmten Krebszelllinien wie HAT-29 Zellen gezeigt werden konnte. Zudem wurde eine Hemmung der Leukozytenelastase beobachtet.^[58, 59]

Wie bereits oben erörtert, wird β-AKBA in zahlreichen Veröffentlichungen als 5-LOX-Inhibitor dargestellt, was hauptsächlich auf die Untersuchungen von AMMON *et al.* zurück geht (Tab. 1-4). Es

steht allerdings auch fest, dass zur Hemmung der 5-LOX in Zellhomogenaten höhere Konzentrationen als in intakten Zellen benötigt werden. In bestimmten Konzentrationen wurden sogar ein stimulierender Effekt von β -AKBA und β -KBA auf die 5-LOX-Aktivität beobachtet (paradoxe Wirkungen wie bereits oben beschrieben).^[60] Weiterhin ergaben sich Widersprüchlichkeiten bei den ermittelten Plasma-Werten, was das Erreichen effektiver Wirkspiegel für KBA und AKBA weiterhin in Frage stellt.^[61, 62] Die für β -AKBA gefundenen Plasma-Konzentrationen von 0,1 bis 0,56 μ M erscheinen für eine therapeutisch relevante Inhibierung des Enzyms als nicht ausreichend.^[63] Es liegt der Verdacht nahe, dass neben einer direkten Enzymhemmung weitere komplexe Mechanismen an der vermuteten entzündungshemmenden Wirkung beteiligt sind.^[52] Verwunderlich ist auch, dass die AdBA mit einer IC_{50} von 0,75 μ M offensichtlich nicht weiter verfolgt wurde.

Tab. 1-4 In der Literatur beschriebene IC_{50} -Werte für β -AKBA in Bezug auf eine 5-LOX-Hemmung.

IC_{50} β -AKBA (μ M)	Zelltyp
1,5	Intakte PMNL (Ratte) ^[15]
8	PMNL Zellhomogenat (Ratte) ^[47]
16	Isolierte humane 5-LOX ^[47]
50	Cytosolische Fraktion von humanen HL-60 & Monozyten (Mac 6 Zellen) ^[64, 65]

Obwohl die klinischen Studien im Hinblick auf eine therapeutische Wirksamkeit teilweise erfolgreich waren, könnten sie nicht die Anforderungen an die Zulassung eines Arzneimittels, die das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) stellt, erfüllen. Es ist nach wie vor nicht klar, welche Komponenten des Weihrauchextraktes für die beschriebenen Wirkungen tatsächlich verantwortlich sind („wertbestimmende Inhaltsstoffe“) und ob die postulierten antiinflammatorischen und antitumoralen Eigenschaften allein auf die BAs zurückzuführen sind. Darüber hinaus ist eine gegenseitige, synergistische Verstärkung der BAs in der Mischung ebenfalls möglich; dies konnte bereits durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden.^[66] All jenes untermauert die Annahme, dass die alleinige Betrachtung von KBA und AKBA als wirksamkeitsbestimmende Qualitätsmarker unzureichend ist und die entsprechenden Arzneibuch-Monographien revidiert werden sollten.

1.8 Medizinische Verwendung von Weihrauch

Weihrauchharz und daraus hergestellte Zubereitungen werden in der traditionellen Medizin vieler Länder gegen eine Reihe von Erkrankungen eingesetzt; dabei ist die Palette der behandelten

Krankheiten äußerst breit. Auch weitere Teile des Weihrauchbaumes (z.B. Rinde) wurden in unterschiedlicher Zubereitung eingesetzt, die heute noch traditionell zum Einsatz kommen. In der heutigen Zeit befinden sich Weihrauch-Präparate als Phytopharmaka mit standardisiertem Wirkstoffgehalt zur Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Polyarthrit auf dem Markt, jedoch nicht in Deutschland (siehe oben).

Daher ist momentan in keinem Land der Europäischen Union ein Medikament auf Weihrauchbasis – abgesehen von homöopathischen Zubereitungen – registriert oder zugelassen. Für die Exportvariante des indischen Medikamentes H15 (Gufic Ltd., Bombay/Indien; *B. serrata*) liegt zwar die Zulassung für einen Kanton in der Schweiz vor, welche aber von den deutschen Behörden nicht als Voraussetzung für eine Einfuhr gemäß § 73 Arzneimittelgesetz (AMG) akzeptiert wird. Die Zulassung des Medikamentes, die je 400 mg eines Trockenextraktes aus *B. serrata* mit einem Gehalt von mind.10 mg Boswelliasäuren enthält, wird für die Behandlung von chronischer Arthritis ausgelobt.^[39, 40] Daneben wurden noch Untersuchungen zur Wirksamkeit von Indischem Weihrauch bei peritumoralen Hirnödemen durchgeführt, für die in präklinischen Studien eine signifikante Reduktion des Ödemvolumens gezeigt wurde. Im Dezember 2002 wurde deshalb einem *B.-serrata*-Extrakt der „Orphan Drug Status“ für die Behandlung des peritumoralen Hirnödems durch die Europäische Zulassungsbehörde („European Medicines Agency“, EMA) zuerkannt.^[67]

1.9 Die Süßholzwurzel *Glycyrrhiza glabra*

Wie bereits obenerwähnt, hat die Glycyrrhetinsäure (Glyc, Substanz **1**) große strukturelle Ähnlichkeiten zu den Boswelliasäuren, insbesondere zu den Keto-boswelliasäuren. Deshalb wurde Glyc **1** mit in das Untersuchungsprogramm aufgenommen, insbesondere, um seine Eignung als interner Standard zu testen.

Glyc ist ein Triterpensaponin und kommt in hohen Konzentrationen in der Wurzel der *Glycyrrhiza glabra*-Pflanze (Süßholz) vor, ist aber auch in anderen Pflanzen wie in der Frucht des Grapefruitbaums enthalten. Die Gattung *Glycyrrhiza* gehört zur Familie der Fabaceae (=Leguminosae) und umfasst etwa 20 bis 30 Arten, darunter ebenso drogenliefernde Arten wie *G. inflata* und *G. uralensis*.

Glycyrrhiza glabra ist eine ausdauernde, 1 bis 1,5 m hohe Staude mit kräftigen Wurzeln und stark verholzendem, gelb gefärbtem Rhizom, die in subtropischen Ländern sowie im Mittelmeerraum, dem Nahen und Mittleren Osten, Australien und Amerika wächst oder kultiviert wird (Abb. 1-17).^[68]

Die Wurzel von *Glycyrrhiza glabra* enthält Terpenverbindungen, hauptsächlich pentazyklischen Triterpene mit einem Oleangerüst; weitere Inhaltsstoffe sind ca. 5 % Saccharose, ca. 2,5 % Glucose, 20 bis 30 % Stärke, Flavonoide, Cumarine, Phenole, Steroide sowie etwas ätherisches Öl.^[69] Die Hauptkomponente der Wurzel ist das „Glycyrrhizin“ (Glykosid) und kommt in der Droge als Kalium-, Ammonium- und Calciumsalz der Glyc oder als Gemisch dieser Salze vor.

Je nach Herkunft, verwendetem Pflanzenteil und klimatischen Bedingungen enthält die Droge 2 bis 15 % Glycyrrhizinsäure, die pro Molekül zwei Zuckerreste enthält. Durch saure oder enzymatische Hydrolyse der Glycyrrhizinsäure erhält man ihr Aglykon Glyc (Substanz 1), die auch in Spuren in der Droge vorkommt. Diese Substanz ist gut verfügbar und zu einem günstigen Preis erhältlich.

Die beiden Triterpenverbindungen Glycyrrhizinsäure und Glyc wurden als Leitsubstanzen zur Charakterisierung von Süßholzextrakten angenommen, da sie medizinisch-therapeutische sowie kosmetische Wirkungen zeigten.^[70] In den Wurzelextrakten können noch weitere Triterpenverbindungen vorkommen: u.a. Desoxyglabrolid, Glabrolid, Glycyrrhetinsäuremethylester und Glycyrrhetol.^[71]



Abb. 1-17 Blühende oberirdischen Teile von *Glycyrrhiza glabra* (Foto: M. Keusgen)

Die pharmazeutische Anwendung der Wurzel beschränkt sich in Europa vorwiegend auf die Herstellung von Arzneitees gegen Magenbeschwerden oder Erkältungskrankheiten. In der traditionellen chinesischen Heilkunde werden ebenfalls Wurzelextrakte in der Phytotherapie aufgrund ihrer entzündungshemmenden, antioxidativen, immunregulatorischen, antibakteriellen und antiviralen Wirkungen vielfältig eingesetzt.

Auf die Suche nach hochwirksamen, gut verträglichen Medikamenten für die Behandlung der Covid-19-Erkrankung wurde man neuerdings auch auf diese Arzneipflanze aufmerksam. Aktuell wurde der wässrige Süßholz-Wurzelextrakt in Computersimulationen auf seine hemmende Wirkung in Bezug auf die SARS-CoV.2-Hauptprotease (Mpro) analysiert. Der Extrakt wies bereits bei einer subtoxischen Konzentration von 2 mg/ml eine hemmende Wirkung auf.^[72]

Die Analytik der Glyc 1 ist in der Literatur recht gut beschrieben. Zur Charakterisierung der beiden Leitsubstanzen Glycyrrhizinsäure und Glyc existieren einige photometrische Untersuchungsmethoden, wobei typischerweise wässrig-methanolische Lösungen verwendet werden. Laut einiger Literaturzitate ergab sich keine Differenzierung der beiden Verbindungen mittels UV-Spektren; beide haben ein Maximum bei 255 nm.^[70]

Fernerhin liegen massenspektrometrische Untersuchungsergebnisse von wässrig-methanolischen Lösungen dieser beiden Substanzen im negativen Ionenmodus bei einer Kapillarspannung von 4.000 V vor; jedoch kann die Substanz auch im positiven Modus detektiert werden. Glycyrrhizinsäure wird im negativen Ionenmodus als $[M-H]^-$ und als $[M-H+22]^-$ ionisiert. 18- β -Glyc wurde massenspektrometrisch als $[M-H]^-$ Quasimolekülionen ionisiert. Das beobachtete Fragment mit einer Molekülmasse von 351 amu kann einer Abspaltung des Diglucuronsäure-Restes zugeordnet werden.

Anzumerken sei noch, dass Gehaltsbestimmungen von Glycyrrhizinsäure und der Glyc in unterschiedlichen Süßholzwurzel-Extrakten in Abhängigkeit vom Extraktionsverfahren sowie der Bezugsquelle deutlich unterschiedliche Werte ergaben.^[70]

2. Zielsetzung

Wie bereits eingangs erwähnt, wirft die derzeit publizierte Methodik zur Analyse von Weihrauch, vornehmlich dem Indischen Weihrauch *B. serrata*, erhebliche Fragen auf. Diese Problematik spiegelt sich auch in den Arzneibuchmonographien wieder, die wohl als unausgereift bezeichnet werden müssen. Dabei fokussieren sich die Untersuchungen auf die wertbestimmenden Triterpensäuren; der Ätherisch-Öl-Anteil bleibt in den nun vorgestellten Untersuchungen unberücksichtigt.

Aus diesen Gründen erscheint es dringend erforderlich, die derzeit bekannten Methoden zur Analyse von Weihrauch umfassend zu überarbeiten. Dazu wurde auch eine Kooperation mit der Firma Floradex in Oßmannstedt, Thüringen, eingegangen, die derzeit Produkte auf der Basis von Weihrauch aus dem Oman entwickelt, vorzugsweise aus *B. sacra*. Aufgrund dieser Kooperation standen zahlreiche Proben von *B. sacra* zur Verfügung, der sich in Bezug auf die qualitative Zusammensetzung der wertbestimmenden Triterpensäuren nur wenig von *B. serrata* unterscheidet, jedoch in quantitativer Hinsicht. Zudem ist Weihrauch von *B. sacra* die Ware mit dem höchsten Preis im Weihrauch-Segment.

In ersten HPLC-Vorversuchen zeigte sich, dass bei einer einfachen Extraktion des Weihrauchs mit einer alkoholischen Lösung die HPLC-Säule sehr schnell verstopft. Aus diesem Grund erschien es notwendig, auch die Probenaufbereitung grundlegend zu überarbeiten.

Weiterhin ergaben sich bei der Sichtung der bereits publizierten DC-Methoden zur Identifizierung des Weihrauchs grundsätzliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Fließmittel. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob der Zusatz einer Säure erforderlich ist oder nicht. Dazu sollten mehrere Referenzsubstanzen mit untersucht werden.

Die bisherige Weihrauch-Arzneibuchanalytik bezieht sich ausschließlich auf zwei Keto-boswelliasäuren, obwohl viele weitere Triterpensäuren enthalten sind, die möglicherweise eine deutliche Bioaktivität, vorzugsweise eine entzündungshemmende Wirkung, haben. Deshalb sollte versucht werden, über eine geschickte Vorsäulen-Derivatisierung möglichst alle Triterpensäuren bei einer Wellenlänge (254 nm und höher) detektierbar zu machen, was derzeit jedoch nicht möglich ist. Alternativ sollte eine Methode mit einem internen Standard entwickelt werden, mit deren Hilfe über so genannte „Response-Faktoren“ eine einfache und kostengünstige HPLC-Analytik möglich ist.

Letztendlich sollen sich aus dieser Arbeit Impulse für eine Überarbeitung der derzeitigen Arzneibuch-Monographien zu *B. serrata* (Indischer Weihrauch) ergeben.

3. Material und Methoden

Innerhalb der mehrjährigen Untersuchungen wurden zu allen Bereichen (Extraktionen, Vorsäulenderivatisierungen, Etablierung leistungsfähiger chromatographischer Systeme, quantitative Berechnungen) zahlreiche Versuchsreihen durchgeführt, die aber nicht immer zum Erfolg führten. Deshalb sind in diesem Kapitel nur die wesentlichen Vorschriften und Methoden erörtert, die auch für die Ergebnisse (Kap. 4) und die Diskussion (Kap. 5) einen maßgeblichen Beitrag lieferten. Alle weiteren Versuche und experimentellen Details, auch die nicht erfolgreichen, sind im Appendix Kap. 7 aufgeführt.

3.1 Proben

Es wurden Proben aus unterschiedlichen Quellen und in unterschiedlichem Verarbeitungsgrad verwendet; die Bezeichnungen für die nachfolgenden Untersuchungen wurden entsprechend Tab. 1-1 gewählt:

Tab. 3-1 Zusammenstellung der unterschiedlichen Weihrauch-Proben, die für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurden.

NR.	Probe	Jahr	Firma	Farbe / Eigenschaften
1	Indischer Weihrauch (<i>B. serrata</i>), Handelsware Best. Nr. 87302	25.06.2018	A. Galke Bad Grund	Hellgelb bis dunkelbraun
2	Weihrauch (<i>B. sacra</i>) Oman, Basarware	20.12.2018	Günter Ottmar Fuldatal	Grünlich bis hellgelb; relativ hochpreisige Basarware aus Salalah, Oman
3	Weihrauch (wahrscheinlich <i>B. papyrifera</i>), Artikelbezeichnung: „Reiner Weihrauch aus Äthiopien“	25.12.2018	Kirchen-Weihrauch Blaukirchen	Hellgelb, nachbearbeitet, künstlich verklebte Stücke
4	Weihrauch (<i>B. sacra</i>) Oman	26.06.2018	Floradex Oßmannstedt	Hellgelb, ausgesiebt für Äth.-Öl-Gewinnung
5	Weihrauch (<i>B. sacra</i>) Oman	26.01.2019	Floradex	Dunkelbraun, wohl starke Sonneneinstrahlung
6A	Weihrauch (<i>B. sacra</i>) Oman	26.01.2019	Floradex	Heller, gelblicher Anteil einer groben Probe
6B	Weihrauch (<i>B. sacra</i>) Oman	26.01.2019	Floradex	Dunkler Anteil einer groben Probe
7	Eth. Extrakt (<i>B. sacra</i>) Muster "Olimyrum"	12.02.2018	Floradex	Honigbraun
8	Eth. Extrakt (<i>B. sacra</i>) Oman	2015	Floradex	Honigbraun
9	Eth. Extrakt (<i>B. sacra</i>) Oman	2015	Floradex	Honigbraun
10	Eth. Extrakt (<i>B. sacra</i>) Oman	2015	Floradex	Honigbraun



Abb. 3-1 Probe-Nr. 1: Indischer Weihrauch (*B. serrata*), Galke-Katalogware. Gut erkennbar sind Rindenanteile.



Abb. 3-2 Probe-Nr. 2: Weihrauch aus dem Oman, Salalah, (*B. sacra*)



Abb. 3-3 Probe-Nr. 3: Weihrauch aus Äthiopien (wahrscheinlich *B. papyrifera*). Gut erkennbar sind die „zusammengekittete“ Teile in der Mitte.



Abb. 3-4 Probe-Nr. 4: Weihrauch, Oman, (*B. sacra*)



Abb. 3-5 Probe-Nr. 5: Weihrauch, Oman, (*B. sacra*). Kleiner Stücke sind bei der Lagerung miteinander „verbacken“, wahrscheinlich durch Hitzeeinwirkung.



Abb. 3-6a Probe-Nr. 6a: Weihrauch, Oman, (*B. sacra*). Die Probe enthielt relativ große Stücke, die sehr inhomogen waren. Hier ein helleres Stück.



Abb. 3-6b Probe-Nr. 6b: Weihrauch, Oman, (*B. sacra*). Die Probe enthielt relativ große Stücke, die sehr inhomogen waren. Hier ein dunkleres Stück.

Bei den Proben 7-10 handelt es sich um ethanolische Extrakte der Firma Floradex, Oßmannstedt, wie in Abb. 1-8 dargestellt.

3.2 Chemikalien

Referenzsubstanzen:

- 18- β -Glycyrrhetinsäure 97%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Boswellic acid, mixture of α & β BA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, German domestic
- 3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswellic acid, purity $\geq 98\%$, ROTICHROM HPLC & von Phytoflan
- 3-Acetyl-11-keto- β -boswellic acid, purity 96%, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH & von Phytoflan
- 11-Keto- β -boswellic acid, purity 99, 85%, Phytoflan
- 11-Keto- α & β –boswellinsäure, TH. Geyer (entsprechend Analyse Abb. 4-9 nur β -KBA)
- β -Demonic acid, purity $> 98\%$, Abmole (entspricht 3-Oxo- β -tirucallensäure).

Weitere Ausgangsstoffe und Derivatisierungsreagenzien (wie z.B. 4-Phenyl-1,2,4,-triazoline-3,5-dione, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hersteller: TCI Tokyo Chemical industry Co., oder p-Toluensulfonyl hydrazide 97%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) sowie Lösungsmittel wurden, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, in analytischer Qualität bei Sigma-Aldrich, Roth oder Merck bezogen. Reine Lösungsmittel, die für Extraktionen verwendet wurden, wurden nach dem Abziehen über den Rotationsverdampfer zurückgewonnen.

Für die **HPLC** wurden folgende Lösungsmittel verwendet:

- Acetonitril $\geq 99,9\%$ Fischer Scientific U.K. Limited, HPLC Gradient-grade
- Ethanol ROTIPURAN[®] $\geq 99,8\%$, P.A. Carl Roth GmbH + Co. KG
- Wasser, Assay (GC): 99,99 %, Fischer.

Für die **DC / HPTLC** wurden verwendet:

- DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ .Schicht 0,20 mm
- DC-Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄, Merck
- HPTLC-Platten Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄, Merck
- Mikrokapillare, 5 μ l, Desaga.

3.3 Verwendete Geräte

Neben den Laborstandardgeräten (Labor-Glasgeräte, Analysenwaagen, pH-Meter, Trockenschrank, Rotationsverdampfer) wurden folgende **HPLC-Anlagen** verwendet:

1. Merck Hitachi L7400 Detektor, L7200 Autosampler, L7100 Pumpe mit L7000 interface.

Die Flussrate war bei 1 ml/min. Die Säulentemperatur betrug 30 °C. Der verwendete Säulentyp war MACHEREY-NAGEL: EC 250/4 NUCLEODUR 100-5 C18_{ec}. Die Anlage wurde für Vorversuche verwendet.

2. Agilent 1100 Series (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) mit Autosampler und DAAD-Detektor. Die Flussrate war bei 1 ml/min. Die Säulentemperatur betrug 30 °C. Der verwendete Säulentyp war MACHEREY-NAGEL: EC 250/4 NUCLEODUR 100-5 C18_{ec} (250 mm x 4 mm mit passender Vorsäule).

Für die chromatographischen Läufe wurde üblicherweise mit einer Probenkonzentration von 10 mg/ml gearbeitet; es wurden jeweils 20 µl injiziert. Die quantitativen Bestimmungen wurden mit dieser Anlage durchgeführt.

3. Shimadzu LC 20 HPLC-System (Shimadzu, Kyoto, Japan) mit QTrap 2000, Turbolonspray Ion Source (ESI-MS; Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Kanada).

Die Flussrate betrug 150 µl/min. Die Säulentemperatur betrug 30°C. Der verwendete Säulentyp war MACHEREY-NAGEL: EC 250/2 NUCLEODUR 100-5 C18_{ec} (250 mm x 2 mm).

Für die chromatographischen HPLC-MS-Läufe wurde üblicherweise mit einer Probenkonzentration von 10 mg/ml gearbeitet; es wurden jeweils 2 µl sowie 3 µl injiziert.

HPTLC-Zubehör (Camag, Muttenz, Schweiz):

- CAMAG Automatic TLC Sampler III
- CAMAC TLC Visualizer.

Platten: Größe 10 x 10 cm, Höhe Auftrageline 1 cm, Laufstrecke 8 cm. Für die Analysen wurde typischerweise eine Konzentration von 0,5 mg/ml für die Standards genommen sowie 10 mg/ml für die Proben. Bandenbreite 8 mm; von den Standards wurden jeweils 20 µl aufgetragen und von den Proben 10 µl (Anmerkung: die Auftragemenge der Probe kann auch auf 5 µl reduziert werden, wahrscheinlich sind 7 µl optimal). Die Platten wurden mit Kammersättigung entwickelt.

Konventionelle Dünnschichtchromatographie (DC): Nicht instrumentiert, Kieselgel Si₆₀-Platten mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄, 20 x 20 cm, Höhe Auftragelinie 1 cm, Bandenbreite 10 mm. Für die Analysen wurde typischerweise eine Konzentration von 1 mg/ml für die Standards genommen sowie 10 mg/ml für die Proben. Bandenbreite 8 mm; von den Standards wurden jeweils 20 µl aufgetragen und von den Proben 10 µl. Die Platten wurden mit Kammersättigung entwickelt.

3.4 Verwendete HPLC-Gradienten

Tab. 3-2 HPLC-Gradient für die Trennung von Extrakten und Standard-Mischungen [Fließmittel gegebenenfalls mit 0,1 % TFA (V/V)].

Zeit [min]	Acetonitril [%]	Wasser [%]
0	65	35
15 (→ 25)	65 (→ 95)	35 (→ 5)
25	95	5
35	95	5
40 (→ 45)	95 (→ 100)	5 (→ 0)
45 (→ 50)	100 (→ 65)	0 (→ 35)
50	65	35
65	65	35

Tab. 3-3 Isokratisches HPLC-Fließmittelsystem zur Überprüfung einzelner Standards [Fließmittel gegebenenfalls mit 0,1 % TFA (V/V)].

Zeit [min]	Acetonitril [%]	Wasser [%]
0	65	35
25	65	35

3.5 Extraktherstellung

Um die in den meisten verwendeten Lösungsmittel unlöslichen und nicht-sauren Verbindungen sowie den Gummianteil abzutrennen, wurde das Harz in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Dabei lösen sich die Triterpensäuren sowie weitere, niedermolekulare Substanzen in Alkohol, vorzugsweise Ethanol oder auch Methanol.

Die Weihrauchharze wurden vor der Extraktion in einem Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt. Für die Gewinnung der Rohextrakte wurde einige Bruchstücke in einem elektrischen Küchenmixer (Philipps) fein zermahlen und davon ca. 40 g, genau abgewogen, in die Filterhülse der Soxhlet-Apparatur gegeben, mit Watte bedeckt und mit 200 ml Lösungsmittel (Methanol) in einem Rundkolben bei 65 °C über 3 h extrahiert. Nach erfolgter Extraktion musste der Trockenrückstand des Ablaufs vernachlässigbar gering sein, ansonsten wurde die Extraktion fortgesetzt.^[6]

Der erhaltene Rohextrakt war oft gelblich und klar, der nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bei 40 °C unter Vakuum zu einer gelblich bis braunen, aufgeschäumten Masse erstarrte, die sich bei einigen Proben zu feinem, trockenem Pulver zerreiben ließ, während andere Rohextrakte harte, klebrige Klumpen ergaben.

3.6 Auftrennung der Rohextrakte in Säure- und Neutralfraktionen

Die ersten Auftrennungen der Rohextrakte in Säure- und Neutral-Fractionen wurden von TSCHIRCH und HALBEY sowie von WINTERSTEIN und STEIN publiziert.^[19, 20]

Bei Anwendung der „klassischen“ Methode zur Trennung der Säurefraktion (hauptsächlich die gewünschten Triterpensäuren) von den Neutralverbindungen erhielt BERGMANN eine Säureanteil von 21 %, bzw. ein Verhältnis von Säurefraktion zu Neutralkomponenten von 1,44:1, welcher durch eine alternative Methode, nämlich dem Ionenaustauscher-Verfahren, auf 25 % Säureanteil und einem Verhältnis von 1,37:1 gesteigert werden konnte.^[6]

Ihnen zufolge wurde das letztere Verfahren (Ionenaustauscher) als alternative Methode zur Unterbindung der stark emulgierenden Eigenschaften, welche die meisten Harzproben besitzen, erwähnt, da keine HCl-Behandlung der Rohextrakte mit anschließendem Ausschütteln mehr erforderlich war. Diese Möglichkeit sei entsprechend den Autoren zeitsparender und könne höhere Ausbeuten liefern. Beide Verfahren ergeben ähnliche DC- und HPLC-Chromatogramme; in dieser Arbeit wurde aufgrund der Unwägbarkeiten der Ionenaustauscher-Methode (große Gefahr einer

Verharzung!) der „klassischen“ Aufarbeitungsmethode der Vorzug gegeben, wobei wegen möglicher Artefaktbildung durch Lauge- bzw. Säure-Behandlung sehr zügig gearbeitet werden musste.^[6]

Für die Analyse der Weihrauchinhaltsstoffe, insbesondere der Säurefraktionen in *Boswellia*-Spezies, wurde, basierend auf bereits publizierten Daten, ein Verfahren entwickelt, welches Proben ergibt, die für DC- und HPLC-Analysen gut handhabbar sind.^[16, 73, 74]

Der Extrakt kann zusätzlich durch klassische Flüssig-Flüssig-Extraktion zwischen organischen Lösungsmitteln und wässriger Alkalilauge effektiv aufgereinigt werden und somit die darin enthaltenen Boswelliasäuren aufkonzentriert werden. Das Ziel der Aufbereitung war es somit, aller störenden Stoffe wie z.B. Ätherisch-Öl-Bestandteile sowie Polymere abzutrennen und um anschließend nur die im Harz enthaltenen Säuren als Edukte für Derivatisierungsreaktionen und analytische Untersuchungen verwenden zu können. Es wurde angestrebt, nach der Aufreinigung möglichst reine, weiße Pulver zu erhalten. Nachfolgend die erarbeitete Versuchsvorschrift:

10 G des methanolischen Trockenextraktes, genau abgewogen, wurden in einem Kolben überführt und in 40 bis 50 ml 3 % NaOH Lösung (pH > 10) unter leichtem Rühren 30 min vorsichtig bei bis zu 60 °C im Wasserbad gelöst bzw. suspendiert. Insbesondere bei *B. serrata* bildete sich eine zähe Emulsion. Die erhaltene Lösung mit den darin enthaltenen Triterpensäuren wurde abdekantiert und der Rückstand wurde erneut in den Kolben mit 50 ml 3 % NaOH für 30 min bei bis zu 60 °C behandelt. Zur leichteren Abtrennung des amorphen Rückstands wurde der Rundkolben im Eisbad kurz abgekühlt und erneut abdekantiert. Die nicht-sauren Komponenten ergaben eine hellgelbe bis braune Masse von zähflüssiger, honigartiger Konsistenz, die oberhalb von ca. 40 °C flüssig ist und unterhalb von 20 °C erstarrte. Dieser Rückstand wurde 3-mal mit kleinen Portionen Wasser nachgewaschen, im Ultraschallbad resuspendiert und abfiltriert. Zur Abtrennung der Neutralstoffe wurden die vereinigten wässrigen Phasen (ca. 120 ml) im Scheidetrichter 3-mal mit dem gleichen Volumen Dichlormethan (DCM) ausgeschüttelt. Die vereinigten DCM-Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand ausgewogen (neutrale, niedermolekulare Fraktion).

Die wässrige, basische Phase (Volumen ca. 120 ml) wurde in einem Becherglas gegeben und mit einigen Tropfen konz. HCl unter Rühren auf pH 1 eingestellt. Am Umschlagspunkt wechselte die Farbe unter deutlicher Flockenbildung von orange-gelb nach zitronengelb. Es wurden etwa 120 ml DCM zugegeben, in welchem sich die Flocken sofort und vollständig lösten, und die Phasen im Schütteltrichter getrennt. Der Vorgang wurde 2-mal wiederholt und die DCM-Phasen zur Weiterverarbeitung vereinigt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, gefiltert, der Filter mit kleinen Portionen DCM nachgewaschen und das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer unter Vakuum vorsichtig zunächst bei 800 mbar

abgezogen, im Exsikkator unter Vakuum nachgetrocknet und der gelblich-bräunliche Rückstand ausgewogen.

3.7 Dünnschichtchromatographie

Die Beschreibung der allgemeinen DC-Bedingungen befindet sich weiter oben in Kap. 3.3. Die DC-Untersuchungen dienten einerseits zur Erstellung von „Fingerprints“ der Triterpensäuren, andererseits sollten über die DC die Umsetzungsprodukte der Derivatisierungsreaktionen nachgewiesen werden (siehe unten Kapitel 3.8). Zur Erstellung der Fingerprints wurden DC-Untersuchungen mit den Standards α/β BA, KBA, AKBA, und Glyc sowie den aufgereinigten Extrakten der Proben 1-10 durchgeführt. Das Harz bzw. der Extrakt wurde typischerweise in einer Konzentration von 10 mg/ml in Methanol gelöst und davon 10 μ l auf eine Länge von 10 mm (DC) bzw. 8 mm (HPTLC) aufgetragen; der Abstand zwischen den Auftragebenen betrug bei der DC typischerweise 10 mm. Bei der DC wurden die Standards und Proben manuell mit einer Mikrokapillare (5 μ l) aufgetragen, bei der HPTLC mit dem CAMAG-Auftragegerät.

Die Chromatogramme wurden dann in einer klassischen DC-Kammer vertikal entwickelt, die mit dem Elutionsmittel 3 Teile Aceton und 7 Teile Toluol (V/V) sowie einer Filterpapierauskleidung beschickt waren. Wie im Ergebnisteil dargestellt, wurden für die HPTLC unterschiedliche Lösungsmittel getestet; die Entwicklung erfolgte ebenfalls vertikal in einer größenmäßig angepassten Glaskammer unter Kammersättigung. Die Platten (DC und HPTLC) wurden nach dem Entwickeln im Abzug getrocknet, zunächst bei Tageslicht betrachtet und dann unter einer UV-Lampe bei den Wellenlängen 254 nm und 365 nm ausgewertet. Anschließend wurden die DCs mit einem universellen Detektionsreagenz (0,5 ml Anisaldehyd, 50 ml Eisessig, 1 ml Schwefelsäure) besprüht und schließlich 7 Minuten bei 103 °C im Trockenschrank bis zur Entwicklung gut sichtbarer, zumeist lila farbiger Zonen („Banden“) entwickelt und bei Tageslicht dokumentiert. Es ist zu beachten, dass bei einer längeren Entwicklungszeit bzw. höheren Temperaturen die Farbe der Zonen kurzzeitig intensiver wird, dann aber in wenig differenzierte, dunkelviolette-braune Töne umschlägt.

Für die unterschiedlichen Standards wurde zunächst eine Stammlösung von 1 mg/ml in MeOH angesetzt, die dann vor Gebrauch 1:1 verdünnt wurde, so dass sich eine abschließende Konzentration von 0,5 mg/ml ergab. Die Konzentration der Glyc-Standardlösung betrug 0,21 mg/ml in EtOH (eine höhere Konzentration war wegen der geringen Löslichkeit dieser Säure nicht realisierbar; höher konzentrierte Lösungen neigten zum Auskristallisieren) und die der Extrakte jeweils 10 mg/ml in MeOH.

3.8 Derivatisierungsreaktionen

Eine erste Überlegung zur Vorsäulenderivatisierung war es, die Triterpensäuren aus dem Weihrauchextrakt in gereinigter Form zu gewinnen und diese dann unter kontrollierten Bedingungen weiter umzusetzen. Mit der gleichen Zielsetzung wurde auch die Glyc als Modellsubstanz eingesetzt. Jedoch war eine quantitative Trennung der wichtigsten Boswelliasäuren in der vorgegebenen Zeit mit den zur Verfügung stehenden Geräten nicht zu realisieren, so dass zumeist mit dem Gesamtextrakt gearbeitet werden musste. Das Ziel sollte eine Derivatisierung der Triterpensäuren mit einem Aromaten sein, um eine bessere Sichtbarkeit bei der UV-Detektion mit einer Wellenlänge von mindestens $\lambda = 254 \text{ nm}$ zu erreichen.

Dazu wurden jeweils einige Milligramm eines aufgereinigten Weihrauchextraktes oder der Glyc sowie weitere Modellsubstanzen genommen und nach unterschiedlichen Verfahren entweder im Sinne einer Veresterung oder einer Säureamid-Bindung umgesetzt. Die erhaltenen Produkte wurden zunächst mittels DC im Vergleich zu den Edukten analysiert. Exemplarisch sind nachfolgend zwei Beispiele aufgelistet; eine vollständige Beschreibung aller Versuche zur Derivatisierung befindet sich im Kapitel 7 (Appendix).

Derivatisierung der 3-Hydroxygruppe

Diese Derivatisierung stellt eine Veresterung der 3-OH-Gruppe dar, in dem der sekundäre Alkohol mit einem aktivierten Carbonsäurederivat zu einem Ester umgesetzt wurde. Damit das Produkt eine ausreichende UV-Absorption besitzt, kommt als Nucleophil z.B. eine aromatische Carbonsäure in Frage.

Es wurde Benzoylchlorid oder 4-Nitrobenzoylchlorid als Carbonsäurederivat ausgewählt. Um das bei der Reaktion entstehende HCl abzufangen, wurde als Base Pyridin hinzugegeben, welches zum Pyridinium-Ion reagiert. Als Edukt wurde die im Vorfeld erwähnte aufgereinigte Boswelliasäure-Fraktion bzw. Glyc, gelöst in Dichlormethan, verwendet.

Die Umsetzung der Boswelliasäuren mit 4-Nitrobenzoylchlorid fand unter Anwesenheit katalytischer Mengen Dimethylaminopyridin (DMAP) statt.

Diese Methode fand bereits Anwendung in der Publikation „SEMISYNTHETIC HYBRIDS OF BOSWELLIC ACIDS: A NOVEL CLASS OF POTENTIAL ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-ARTHRITIC AGENTS“.^[17]

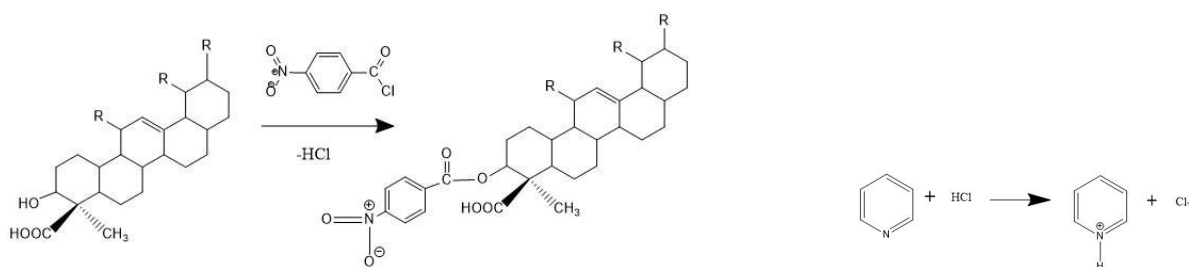


Abb. 3-7 Veresterung der 3-OH-Gruppe mit 4-Nitrobenzoylchlorid mit Pyridin als HCl-Fänger, formuliert mit BA

Tab. 3-4 Zusammenfassung der Reaktion 1

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	Stoffmenge (µmol)	Lösungsmittel	Tatsächliche Einwaage bzw. Volumina
Glycyrrhetinsäure (Glyc)	1	50	110	MeOH	50,32 mg
4-Nitrobenzoyl Chlorid	1,2	24	130	10 ml DCM	23,82 mg
DMAP		1		THF	164 µl (50 mmol/L Lsg.)

Glyc sollte als Modellsubstanz mit 4-Nitrobenzoylchlorid an der 3-OH-Gruppe zu einem Ester derivatisiert werden. In einem kleinen Mikro-Reaktionsgefäß (ca. 5 ml Volumen) wurde Glyc in Methanol (Ultraschallbad) gelöst. Unter Argon-Schutzgas-Atmosphäre wurde 4-Nitrobenzoylchlorid, gelöst in trockenem DCM, in Gegenwart von DMAP als Katalysator zur Reaktionslösung gegeben und für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel abgezogen und eine weiße Substanz blieb zurück.

Um eine dünnschichtchromatographische Kontrolle des Reaktionsverlaufes durchzuführen, wurden Referenzlösungen angefertigt. Dazu wurde 1 mg Glyc in einem Gemisch bestehend aus jeweils 1 ml Methanol, Ethanol und Chloroform gelöst sowie 1 mg 4-Nitrobenzoylchlorid in 1 ml Methanol gegeben. 1 Mg des Produktes wurde ebenfalls in einer Mischung aus jeweils 1 ml Methanol, Ethanol und Chloroform gelöst. Von den drei Lösungen wurden 5 µl mit einer Mikrokapillare auf eine Kieselgel G₆₀ F₂₅₄ Platte (Aluminiumträger) mit den Maßen 5 cm x 8 cm aufgetragen. Die Laufstrecke betrug 6 cm. Als Laufmittel dienten 30 ml eines 10:1 Gemisches aus n-Hexan und Ethylacetat (V/V). Die Auswertung erfolgte unter UV bei 254 nm sowie bei 366 nm. Zudem wurde Anisaldehyd-Schwefelsäure-Sprühreagenz zur Detektion verwendet, welches aus 0,05 ml Anisaldehyd, 8,5 ml Methanol, 1 ml Eisessig und 0,5 ml konz. Schwefelsäure frisch hergestellt wurde. Leider konnte beim Vergleich von Edukt zu Produkt keine Umsetzung festgestellt werden.

Derivatisierung der 4-Carbonsäure

Die Umsetzung des sekundären Alkohols ist, wie oben beschrieben, etwas ungünstig, da diese Gruppe teilweise acetyliert ist. Günstiger wäre es, die Carbonsäure-Funktion an C4 umzusetzen, die jedoch einige sterische Behinderungen aufweist.

Bei der hier beschriebenen Methode wird die Carbonsäure-Funktion der Boswelliasäure mit Thionylchlorid zum reaktiven Carbonsäurechlorid umgesetzt, welches meist in Gegenwart einer Base wie Pyridin oder Triethylamin (als Hilfsbase zum Abfangen der Protonen) mit einem entsprechenden Amin wie 8-Aminochinolin zum Carbonsäureamid umgesetzt wird. 8-Aminochinolin ist als Kopplungsreagenz gut geeignet, da es ein Absorptionsmaximum bei etwa 258 nm aufweist und somit in einer HPLC Anlage mit UV-Detektor gut sichtbar wäre. Bei der DC kann eine Detektion über UV, Anisaldehyd und Dragendorff's Reagenz stattfinden.

Da Säurechloride hydrolyseempfindlich sind, wurde das frisch gebildete Zwischenprodukt unter wasserfreien Bedingungen direkt weiterverarbeitet. Bei der Reaktion einesamins mit einem Säurechlorid wird ein Äquivalent Säure freigesetzt, welches noch nicht umgesetztes Amin protonieren würde.^[75]

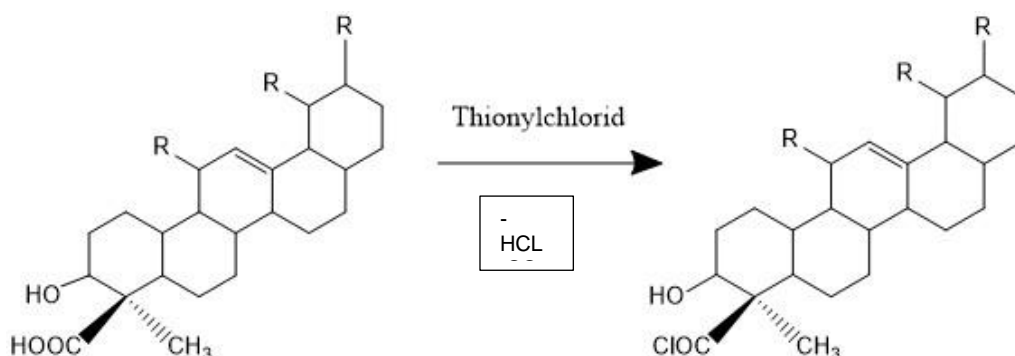


Abb. 3-8a Schematische Umsetzung der BAs mit Thionylchlorid; es entsteht das Säurechlorid

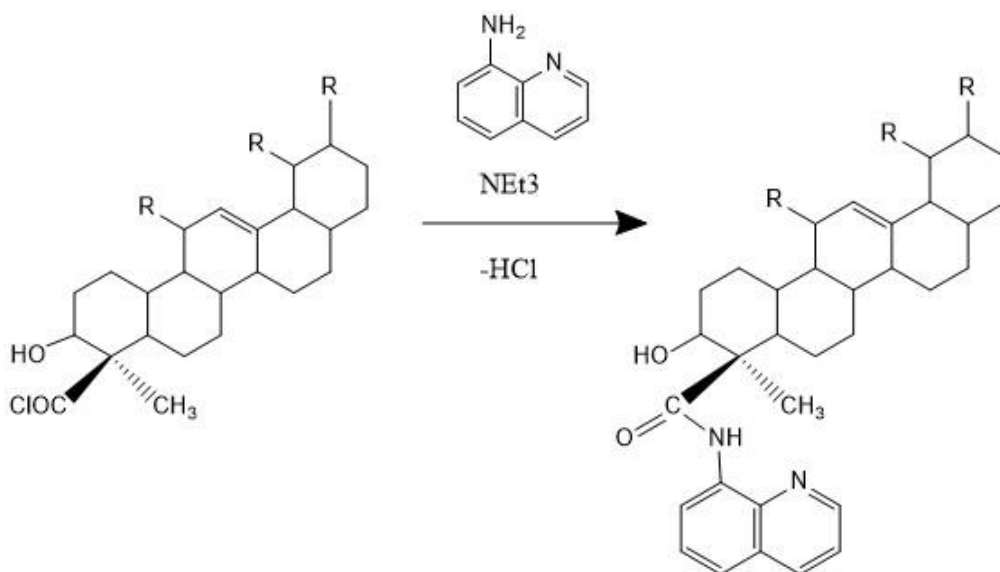


Abb. 3-8b Schematische Umsetzung der aktivierten BAs mit 8-Aminochinolin

Tab. 3-5 Umsetzung der BAs mit 8-Aminochinolin

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage / Volumen	Stoffmenge (μmol)	gelöst in: (ml)
Extrakt 9	1	100	102,5 mg	200	3 ml THF
Thionylchlorid	1,2	28,55	18 μl	240	
8-Aminochinolin	1	28,84	29,17 mg	200	5 ml DCM
Triethylamin	1	20,2	28 μl	200	DCM

Der aufgereinigte Weihrauchextrakt wurde in getrocknetem THF (3 ml) gelöst und unter Schutzgasatmosphäre in einen Dreihalskolben überführt. Dann wurde Thionylchlorid (18 μl) zur Aktivierung der Carbonsäure hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Evaporation des Lösungsmittels wurde der Rückstand in DCM (ca. 5 ml) resuspendiert und eine Lösung von 8-Aminochinolin in DCM (ca. 5 ml) unter Zusatz von Triethylamin (28 μl) hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von etwa 30 min wurde eine gesättigte Lösung von NaHCO₃ hinzugegeben (ca. 20 ml) und 3-mal mit DCM (3 x 10 ml) ausgeschüttelt. Anschließend wurde die gesammelte organische Phase über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Um eine dünnschichtchromatographische Kontrolle des Reaktionsverlaufes durchzuführen, wurden Referenzlösungen angefertigt. Dazu wurden 1 mg des Extraktes sowie 1 mg des Produktes in jeweils 1 ml THF gelöst. 100 mg 8-Aminochinolin wurden in 100 ml DCM gelöst und 1:100 verdünnt, so dass

ebenfalls eine Konzentration von 1 mg/ml resultierte. Vom Produkt sowie von beiden Referenzen wurden jeweils 5 µl auf eine Kieselgel G₆₀ F₂₅₄ Platte (Aluminiumträger) mit den Maßen 5 cm x 8 cm aufgetragen. Die Laufstrecke betrug 6 cm. Als Laufmittel dienten 30 ml eines 10:1 Gemisches aus n-Hexan und Ethylacetat. Die Auswertung geschah bei 254 nm sowie bei 366 nm Wellenlänge. Die Derivatisierung war auch bei diesem Ansatz nicht erfolgreich; es konnten schon unter UV 254 nm keinerlei Produkte festgestellt werden.

3.9 HPLC-Analytik

Die HPLC-Analytik (*High Performance Liquid Chromatography*) wird zur schnellen Trennung zwecks qualitativer und quantitativer Analyse verwendet. Der Grundaufbau einer HPLC-Apparatur besteht aus Fließmittelreservoirs, Degaser, einem Mischer, einer Hochdruckpumpe, Proben-Injektionsport, Trennsäule, Detektor und einem Aufzeichnungsgerät, typischerweise einem Computer.

Die Auftrennung des Probengemischs erfolgt durch die verschiedenen Wechselwirkungen der Substanzen mit der inneren Beschichtung der Säule. Das Säulenmaterial der stationären Phase ist meistens das apolare, C₁₈-funktionalisierte Kieselgel, was im Vergleich zu einer unbeschichteten Trennsäule eine „Reversed Phase“ (RP) ergibt. Um eine Trennung zu optimieren, müssen neben der Identifizierung einer geeigneten Säule der passende Detektor (üblicherweise UV/VIS, MS) und eine passende mobile Phase gefunden werden, wobei letzteres relativ aufwändig ist; üblicherweise wird für analytische Fragestellungen ein Gradient aus zwei Fließmitteln verwendet, wobei eine Komponente eine geringe Elutionskraft hat (in diesem Falle Wasser) und die andere eine hohe (in diesem Falle MeOH oder ACN).

Mit einem UV/VIS-Detektor können alle Verbindungen, die in diesem Spektralbereich Licht absorbieren, detektiert werden. Im kurzwelligeren Bereich sind mehr Verbindungen detektierbar als im langwelligeren (visuellen) Bereich, weswegen die Wahl einer längeren Wellenlänge oberhalb von etwa $\lambda = 230$ nm eine erhöhte Selektivität ermöglicht. Verbindungen, bei denen ein UV-aktiver Chromophor fehlt (viele BAs), können mit aromatischen Derivatisierungsreagenzien so derivatisiert werden, dass sie spezifisch detektierbar wären, was das Ziel der oben beschriebenen Derivatisierungsreaktion war. Wie weiter unten beschrieben, ist alternativ aber auch eine parallele Detektion bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen zielführend.

Für die Detektion der Triterpensäuren wurden parallel die Wellenlängen 210 nm und 254 nm verwendet, wobei die weit überwiegende Anzahl an Triterpensäuren bei der sehr unspezifischen Wellenlänge von 210 nm sichtbar ist (unselektive Miterfassung von Begleitstoffen; erkennbarer Einfluss der Fließmittel). Alle untersuchten Weihrauch-, Extrakt-, Referenz- und derivatisierten

Proben wurden bei diesen beiden Wellenlängen detektiert. Für die Kalibrationen wurden folgende Standards exakt eingewogen, in einen 10,00 ml Messkolben überführt und in getrocknetem Ethanol gelöst. Das Injektionsvolumen aller Standards und Proben war 20 µl.

Tab. 3-6 Verwendete Standards und deren Einwaagen

NR.	Standard	Einwaage [mg/10ml]	RT [min]
1	Glyc	2,012	14,2
2	11-Keto-β-BA	0,480	21,9
3	3-Acetyl-11-keto- β-BA	2,116	28,6
4	3-Oxo-β-tirucallensäure	2,018	30,0
5 & 6	α/β-Boswelliasäure	2,033	34,2 / 36,0
7	3-o-Acetyl-9-11-dehydro-β-BA	2,111	44,7

Liste der verwendeten Standards:

1. **Glyc:** 18-β-Glycyrrhetinsäure: 3β-Hydroxy-11-oxo-18β,20β-olean-12-en-29-säure, Enoxolon, Glycyrrhetin, Subglycyrrhelinsäure, Uralensäure, CAS 471-53-4
2. **β-KBA:** 11-Keto-β-boswelliasäure: 11-Oxo-β-boswelliasäure, 3α-Hydroxy-11-oxo-urs-12-en-24-säure, CAS 17019-92-0
3. **β-AKBA:** 3-Acetyl-11-keto-β-boswelliasäure: (3α,4β)-3-Acetoxy-urs-12-en-11-keto-23-säure, CAS 67416-61-9
4. **β-Demonic acid (3-Oxo-β-tirucallensäure):** (13α,14β,17α,20S)-3-Oxolanosta-8,24-dien-21-säure, 3-Oxo-tirucalla-8,24-dien-21-säure, Elemadienonsäure, CAS 28282-25-9
5. **α-BA:** α-Boswelliasäure, (3α,4β)-3-Hydroxyolean-12-en-23-säure, 3α-Hydroxy-oleanen-(12)-säure-(24), CAS 471-66-9
6. **β-BA:** β-Boswelliasäure, (3α,4β)-3-Hydroxy-urs-12-en-23-säure, 3α-Hydroxy-urs-12-en-24-säure, CAS 631-69-6
7. **3-O-Ac-9-11-dehydro-β-BA:** 3-O-Acetyl-9-11-dehydro-β-boswelliasäure, CAS 122651-20-1

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode

Wie in Kapitel 3.1. ausführlich beschrieben, wurden insgesamt 11 Proben für die Weihrauch-Reihenbestimmungen verwendet. Bei 7 Proben handelte es sich um Weihrauch-Rohware, die aus Indien, dem Oman und Äthiopien stammte. Die Ware aus dem Oman wurde zumeist über den Oman-Shop, Solingen, bezogen. Vier der Proben waren industriell hergestellte, ethanolische Extrakte der Firma Floradex, für die *B. sacra* aus dem Oman als Ausgangsmaterial gewählt wurde. Bei den Arten handelt es sich um *B. serrata*, „Indischer Weihrauch“, *B. sacra*, „Arabischer Weihrauch“ und *B. papyrifera*, „Äthiopischer Weihrauch“.

Die Extraktion und Aufreinigung der Harzproben 1-6a und 6b gestaltete sich als komplexe Aufgabe; die experimentellen Details befinden sich in Kap. 3.5 und 3.6 sowie weitere Details im Appendix Kap. 7.1. Problematisch ist insbesondere, dass Weihrauch sich ab etwa 50 °C langsam verflüssigt und zudem wegen des hohen Anteils an Polysacchariden feuchtigkeitsempfindlich ist. Kommen bei der Lagerung hohe Luftfeuchtigkeit und Erwärmung durch Sonneneinstrahlung zusammen, kann innerhalb kurzer Zeit ein ganzes Gebinde zu einem großen Block verklumpen, wodurch der Wert der Ware stark gemindert wird und eine Extraktion sehr erschwert wird.

Die Punkte Temperatur und Wassergehalt des Extraktionsmediums spielen auch eine große Rolle bei Extraktionen im nicht-industriellen Maßstab. Direktes Erwärmen, beispielsweise in einem Rundkolben mittels eines Heizpilzes, ist problematisch, da hierbei die Proben an der Kolbenwandung festkleben können. Falls ein Heizpilz verwendet wird, sind Vorversuche zur Ermittlung passender Bedingungen erforderlich. Unproblematischer ist ein Erwärmen im Wasserbad. Wie bei den in Kapitel 7.1 (Anhang) beschriebenen, umfangreichen Vorversuchen festgestellt wurde, ist die Soxhlet-Methode gut geeignet und es ergeben sich keine verfahrenstechnischen Probleme durch Verklumpung.

Problematisch ist aber bereits das Zerkleinern des Materials. Es ist unter allen Umständen zu vermeiden, dass sich die Probe beim Mahlen erwärmt, wodurch viele handelsüblichen Mühlen für diesen Vorgang ausscheiden. Für analytische Applikationen ist das Zerkleinern von kleinen Portionen trockenen und gekühlten Weihrauchs (zumindest Kühlschranktemperatur, besser gefroren oder nach Zugabe von flüssigem Stickstoff) mittels einer handelsüblichen Schlagkreuzmühle möglich. Damit ließen sich Partikelgrößen von unter 1 mm Durchmesser erzeugen, was absolut ausreichend ist. Möglich ist auch die Handvermörserung, gegebenenfalls unter Zusatz von gereinigtem Seesand. Fein pulverisiertes Material ist für die Extraktion nicht erforderlich.

Das gesamte Ablaufschema ist in Abb. 4-1 dargestellt. Bei Schritt 1 stellt sich insbesondere die Frage nach einem geeigneten Lösungsmittel. In Frage kommen Alkohole (Methanol oder Ethanol) mit einem Wasseranteil, der nicht höher als 10 % sein sollte, da sonst die Polysaccharide zum Teil mit extrahiert werden, die dann bei der nachfolgenden Analytik erhebliche Komplikationen bereiten könnten.

Erste Versuche wurden mit dem Indischen Weihrauch, *B. serrata*, unternommen. Ethanol und Methanol erbrachten beide unter gleichen Bedingungen eine Ausbeute von ca. 60 %. Zu Kontrollzwecken wurden auch Extrakte mit Diethylether hergestellt, der in älterer Literatur (siehe Einleitung Kap. 1.3 und folgende) durchweg für diesen Vorgang verwendet wurde. Mit Diethylether ließ sich die Ausbeute auf ca. 69 % steigern. Jedoch liefern Proben, von *B. sacra*, die mit Methanol extrahiert wurden, teilweise auch Ausbeuten von 69 % (Tab. 4-1). Aus Sicherheitsgründen verbietet sich aber der Einsatz von Diethylether; Methanol und Ethanol scheinen gleichwertige Ergebnisse zu liefern, wobei bei der Methanol-Extraktion der Gehalt an Polysacchariden etwas höher sein sollte, was aber nicht überprüft wurde.

Rohweihrauch enthält bis zu ca. 8 % ätherisches Öl, welches jedoch bei der Extraktion unter Wärme und anschließender Herstellung eines Trockenextraktes nahezu vollständig verloren geht. Will man das ätherische Öl ebenfalls isolieren, so müsste das Material zunächst mittels Wasserdampfdestillation abdestilliert werden und anschließend einer Extraktion unterzogen werden. Der Vorgang ist aber extrem anspruchsvoll, da bei der Wasserdampfdestillation die Polysaccharide zunächst aufquellen und dann verkleistern; dieses erschwert die anschließende Extraktion der alkohollöslichen Harzkomponenten enorm.

Aus diesen Gründen sind die hier untersuchten Extrakte nahezu frei von ätherischem Öl.

Wie in Abb. 4-1 dargestellt, schließt sich in Schritt 2 eine Aufreinigung der Triterpensäuren an. Dazu wird der getrocknete Extrakt in wenig Dichlormethan oder einem vergleichbaren Lösungsmittel gelöst und der pH auf 10 und höher mit einem geeigneten Salz oder NaOH eingestellt. Da der pKs-Wert der Triterpensäuren bei etwa 5 liegt, sollten diese bei diesem alkalischen pH-Wert nahezu vollständig deprotoniert vorliegen.

Theoretisch sollten die Triterpensäuren nun vollständig, gemeinsam mit ausreichend wasserlöslichen Neutralstoffen, in die wässrige Phase übergehen, was aber insbesondere bei *B. serrata* mit erheblichen Problemen verbunden ist. Durch den großen, lipophilen Molekülanteil neigen die Triterpensäuren des Weihrauchs zur Ausbildung von sehr stabilen Emulsionen, die selbst durch wiederholte Zentrifugation nur schwer gebrochen werden können. Erwärmen auf 40 °C und höher führt zur Ausbildung eines plastischen „Harzklumpens“, der auch nicht weiter aufgearbeitet werden

konnte. All diese Faktoren sind insbesondere bei *B. serrata* mit hohen Verlusten bei der Ausbeute verbunden.

Entsprechend Abb. 4-1, Schritt 3 werden nun durch Ausschütteln der alkalischen wässrigen Phase mit einem geeigneten Lösungsmittel, beispielsweise DCM, die Neutralstoffe abgetrennt; geringe Mengen in die organische Phase übergegangene Triterpensäuren werden dann durch Gegenausschütteln mit einer wässrig-alkalischen Lösung gegebenenfalls wieder in die wässrige Phase zurückgeholt. Abschließend werden alle wässrigen Phasen vereinigt und weiterverarbeitet; die organischen Phasen werden verworfen.

Soweit die Theorie; die Durchführung des recht komplexen Schrittes 3 entsprechend dieses Schemas war aber nahezu unmöglich, weil sich immer wieder aufs Neue starke und stabile Emulsionen bildeten, die nur schwer zu brechen waren. Deshalb muss dieser Schritt als problematisch angesehen werden. In der Regel kann auf das Gegenausschütteln der organischen Phase mit verdünnter NaOH verzichtet werden.

Der nächste Schritt 4 verläuft relativ problemlos. Durch Ansäuern wird der pH auf 2 und niedriger eingestellt; eine pH-Messung ist jedoch wegen verbliebener Reste der organischen Phase in den vereinigten wässrigen Phasen nicht ganz einfach. Es sollte unbedingt darauf geachtet werden, dass das pH-Papier oder die pH-Elektrode nicht mit einem Film des organischen Lösungsmittels „überzogen“ wird und damit die pH-Messung falsche Ergebnisse bildet. Es hat sich bewährt, das eingesetzte pH-Indikatorpapier vor der Messung anzufeuchten.

Der Umschlagspunkt von alkalisch nach sauer ist aber auch rein visuell klar nachzuvollziehen. Markant ist ein Farbumschlag der wässrigen Lösung von braun nach zitronengelb, der wahrscheinlich auf enthaltene phenolische Substanzen zurückzuführen ist. Zudem bildet sich bereits am Umschlagspunkt ein flockiger, weißer bis zitronengelber Niederschlag, der die protonierten Triterpensäuren enthält. Der Niederschlag kann entweder abfiltriert werden oder aber auch mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel, vorzugsweise DCM, ausgeschüttelt werden. Dieser Schritt verläuft in der Regel problemlos.

Die quantitative Auswertung ist in Tab. 4-1 zusammengefasst. Für Probe 1, *B. serrata*, konnten selbst über ein optimiertes Verfahren nur eine Ausbeute von maximal 17 % erzielt werden (Schritte 2-4); bei den Vorversuchen (Kapitel 7.1) betrug diese typischerweise nur ca. 10 %. Die anderen Proben ergaben deutlich höhere Ausbeuten (Probe 6a, *B. sacra*, helles Harz, bis zu 98,7 %). Probe 3, *B. papyrifera*, ergab in den Schritten 2-4 eine zufriedenstellende Ausbeute von 83,4 %.

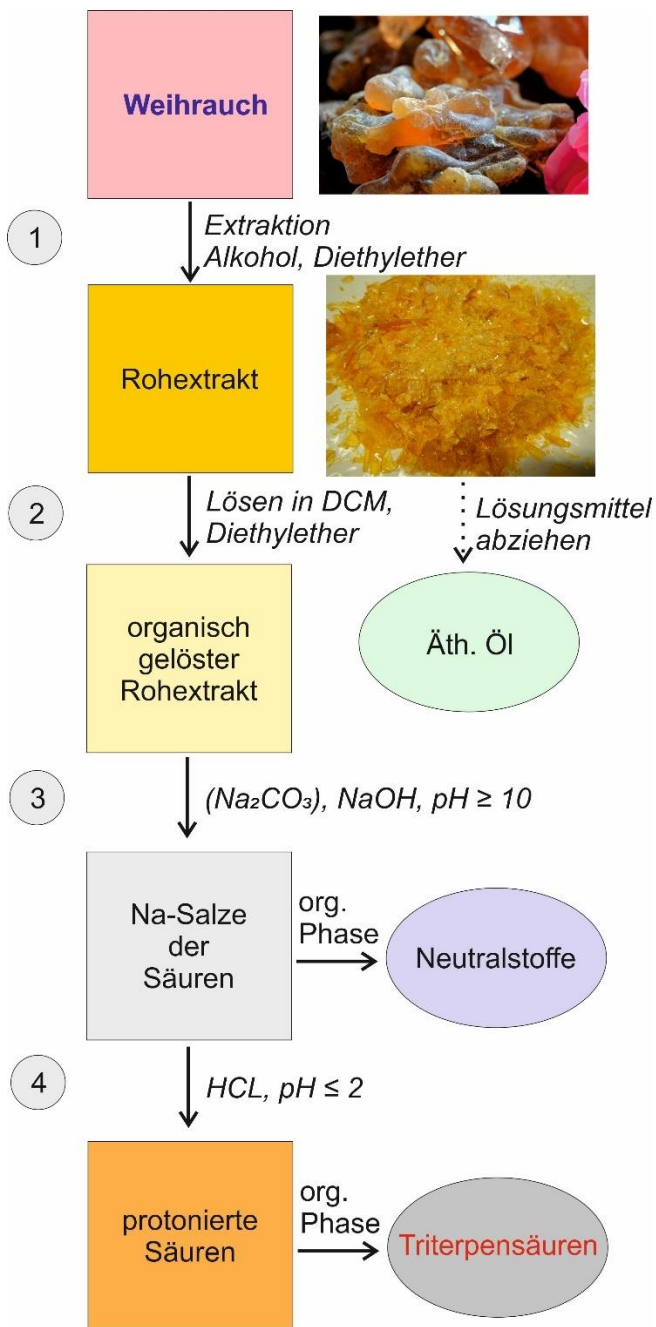


Abb. 4-1 Schematische Darstellung der Extraktion und Aufreinigung der Weihrauchextrakte. Am linken Rand in den Kreisen die Nummerierung der Schritte.

Tab. 4-1 Zusammenfassung der Extraktionen / Aufreinigungen der Proben 1-10 entsprechend Abb. 4-1.

Probe	Einwaage [g]	Schritt 1, Auswaage [g]	Schritt 1, Ausbeute [%]	Schritte 2-4; 10g Rohextrakt [g]	Schritte 2-4, Ausbeute [%]
Probe 1	40,8	24,4	59,8	1,7	17,4
Probe 2	37,1	22,2	59,8	5,5	55,3
Probe 3	35,1	23,4	66,7	8,5	83,4
Probe 4	39,7	27,5	69,3	7,8	78,2
Probe 5	37,1	23,5	63,3	9,3	93,0
Probe 6a	29,1	18,3	62,9	9,9	98,7
Probe 6b	35,3	21,4	60,6	8,9	88,7
Eth. Extrakt 7		/	/	2,6	25,8
Eth. Extrakt 8		/	/	5,4	53,1
Eth. Extrakt 9		/	/	/	/
Eth. Extrakt 10		/	/	/	/

4.2 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Weihrauchextrakte, Methodenentwicklung

4.2.1 Untersuchungen mittels konventioneller DC

In den bestehenden Arzneibuch-Monographien wurden recht unterschiedliche Fließmittelsysteme für die DC-Untersuchungen verwendet.^[41, 42] Hierbei stellt sich zuerst einmal die generelle Frage, ob ein Säurezusatz zum Fließmittel erforderlich ist oder nicht. Es wurde zunächst einmal ohne Säurezusatz gearbeitet und das DC-Fließmittel unter der Vorgabe optimiert, dass die Substanzen in der Probe, die entweder bei UV-254 nm eine Absorption zeigen, oder sich mit Anisaldehyd anfärben lassen, bestmöglich getrennt sind. Als Referenzen wurden einige reine Boswelliasäuren (BAs), die kommerziell erhältlich sind, oder die strukturell sehr ähnliche 18- β -Glycyrrhetinsäure (Gly oder Glyc) verwendet.

Zunächst wurde, ausgehend von der USP-Monographie (im Gegensatz zu der Ph. Eur.-Monographie!) und den bereits in Kapitel 1 erwähnten, älteren Arbeiten zu Weihrauchanalytik, ein Fließmittel ohne Säurezusatz verwendet. Nach zahlreichen Vorversuchen ergab die recht einfache Lösungsmittel-Mischung Toluol : Aceton 7:3 (V/V) zufriedenstellende Ergebnis in Bezug auf die Auflösung der einzelnen Zone („Banden“). Das Auftragevolumen von 5 μ l bei einer Substanzkonzentration von 10 mg/ml war aber nicht immer optimal; in späteren Versuchen wurde dieses auf 10 μ l erhöht. Die experimentellen Details sind in Kapitel 3.7 beschrieben.

Die DCs aller Rohextrakte, obwohl sie von unterschiedlichen Spezies stammen, zeigten ganz ähnliche Banden-Muster. Alle hier diskutierten Proben haben die klassischen Boswelliasäuren

gemeinsam. Bei allen Proben sind KBA und AKBA bei UV 254 nm als fluoreszenzlöschende Banden sichtbar. Oberhalb dieser beiden Säuren sind viele weitere, unpolare Substanzen nach dem Entwickeln mit Anisaldehyd-Reagenz sichtbar; eine Zuordnung zu den Referenzen ist jedoch schwierig.

Die 1. Probe, bei der es sich um Handelsware von *B. serrata* handelt, zeigt unter UV 254 nm für KBA ($R_f=0,34$) und AKBA ($R_f=0,41$) gut sichtbare Banden, wobei die AKBA-Bande etwas intensiver ist (Abb. 4-2). Weitere Triterpensäuren wie α/β -BA und α/β -ABA zeigen keine Fluoreszenzlöschung, sind jedoch nach der Entwicklung mit Anisaldehyd-Reagenz sichtbar. Dabei ist eine intensiv violette Bande auf der Höhe von α/β -BA-Referenz bei einem R_f - Wert von 0,49 zu sehen. Intensiv violette Banden bei $R_f=0,91$ lassen sich entsprechend Literaturangaben (vergleiche Kapitel 1.6 sowie Kapitel 5.2) eventuell der α/β -ABA zuordnen und blau-violette Flecken bei R_f 0,65 – 0,69 weisen auf α -TA und O-TA hin. Der intensiv blaue Fleck für O-TA und eine weitere grüne Bande für das Diterpen Serratol, was bei den hier vorgestellten Analysen aber nicht klar zu erkennen war (evtl. bei der Extraktzubereitung abdestilliert), sind für *B. serrata* spezifisch.

Die Auftragemengen für die Extrakte wurden erhöht und das DC-System weiter optimiert (Abb. 4-3), wobei Abb. 4-3c das optimierte Resultat darstellt, welches dann auch überwiegend für die Auswertung verwendet wurde (Tab. 4-3). Die 2. Probe aus Oman ist als *B. sacra* deklariert. Unter UV 254 nm ist eine deutlich intensivere Bande für AKBA als für KBA zu erkennen; weitere Substanzen sind unter diesen Detektionsbedingungen nicht oder nur sehr schwach sichtbar. Nach dem Entwickeln mit dem Anisaldehyd-Rgz. sind viele weitere, rosa bis violett gefärbte Banden zu sehen, darunter die intensiven Banden für α/β -BA und α/β -ABA. Für *B. sacra* soll auf der DC laut Literaturangaben (Kapitel 5.2) eine rosa Bande für β -Caryophyllenoxid sichtbar sein, ebenso wie die grüne Bande für Serratol spezifisch sein. Wie bereits oben erwähnt, sind diese Banden nicht eindeutig zuzuordnen, da die Substanzen wahrscheinlich bei der Probenvorbereitung abdestilliert wurden.

Die 3. Probe aus Äthiopien ist als *B. papyrifera* deklariert. Erwartungsgemäß liefert diese Art laut Literaturangaben eine starke UV-Fluoreszenzlöschung für β -AKBA und eine schwächere für β -KBA. Nach dem Entwickeln mit Anisaldehyd sind auch hier intensivere Banden für α/β -BA und α/β -ABA erkennbar. Die Banden für TA und eine intensive blaue (Abb. 4-3b) bis lila (Abb. 4-3c) Bande für O-TA bei $R_f=0,69$ sind signifikant, was den erhaltenen HPLC- Ergebnissen (Kapitel 4.3) entspricht. Es sind auch braune Banden auf der DC zu sehen ($R_f > 0,8$), die evtl. Incensol und Incensolacetat zugeordnet werden könnten, zwei speziesspezifischen Substanzen. Da diese Substanzen ebenfalls flüchtig sind, stellt sich erneut die Frage, wie hoch deren Gehalt in der untersuchten Probe ist.

Als weitere Substanzen können vermutet werden: 3- α -OH-11-OH- β -Boswelliasäure mit einem $R_f=0,37$, 3- α -O-Acetyl-11-OH- β -Boswelliasäure mit einem $R_f=0,54$, α/β -OH-Tirucallensäuren (OH-TA) mit einem $R_f=0,65$. 3- α -O-Ac-tirucallensäure (O-ATA) und 3- α -O-Ac-Lupansäure (ALA) überlagern sich wahrscheinlich unter den gewählten DC-Bedingungen.

Alle Ergebnisse sind in Tab. 4-3. zusammengefasst. Die rotbraune Bande Nr. 14 ist in allen Proben mit gleicher Intensität zu finden. Diese sind vermutlich stark unpolare Terpene (z.B. Sesquiterpene) ohne ausgeprägt polare Gruppen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war jedoch nicht immer optimal, so dass, wie weiter unten in Kap. 4.2.2 beschrieben, die Versuche mittels instrumentierter HPTLC wiederholt und die Methodik nochmals überarbeitet wurde.

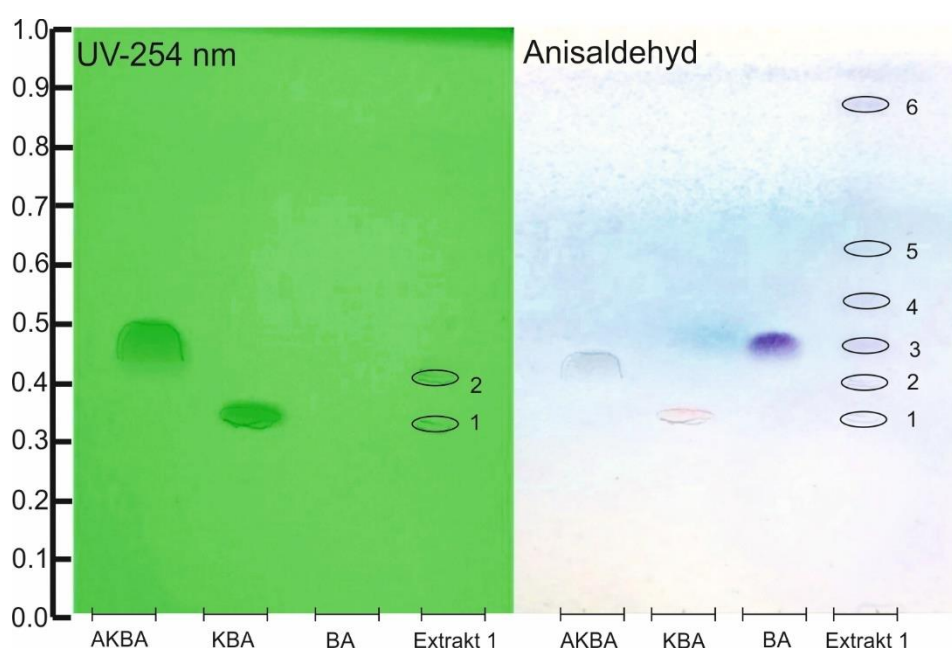


Abb. 4-2 Erste DC-Ergebnisse des Extraktes 1 (*B. serrata*); Auftragevolumen 5 μ l, was jedoch für den untersuchten Extrakt nicht ausreichend ist.

Tab. 4-2 Zusammenfassung der DC-Ergebnisse in Abb. 4-2

Substanz	Nummer	R_f	UV-254 nm / Intensität		Anisaldehyd/Farbe	
KBA	1	0,34	Sichtbar	+	Hellbraun	(+)
AKBA	2	0,41	Sichtbar	++	Hellbraun	+
α/β -BA	3	0,49	-	-	Violett	++
3- α -OH-TA	4	0,56	-	-	Violett	++
3-O-TA	5	0,65	-	-	Violett	(+)
ABA	6	0,91	-	-	Violett	++

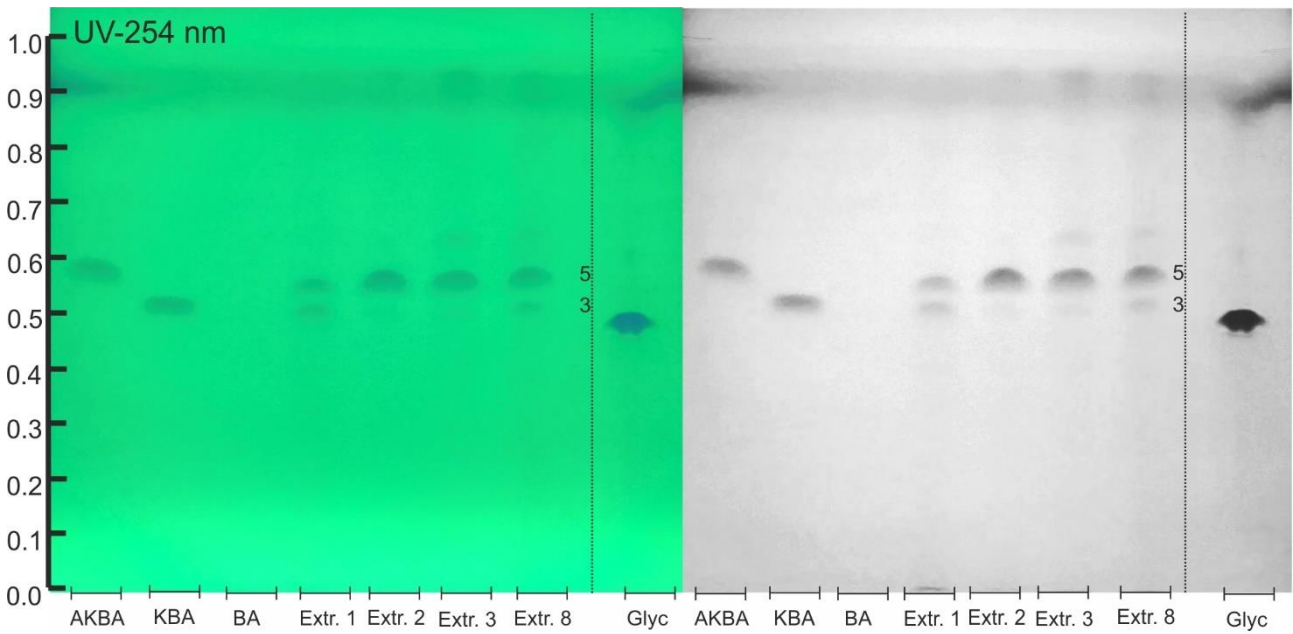


Abb. 4-3a DC-Analyse einiger Extrakte unter UV 254 nm, rechts zur besseren Sichtbarkeit der Banden monochrom. Verwendete Referenzen (von links nach rechts: Bahn 1: AKBA, Bahn 2: KBA, Bahn 3: BA, 4 Extrakte, Bahn 8: Glyc als interner Standard). Gleiches Fließmittel wie Abb. 4-2, Laufstrecke 12 cm. Verdoppelung der Auftragemenge im Vergleich zu Abb. 4-2.

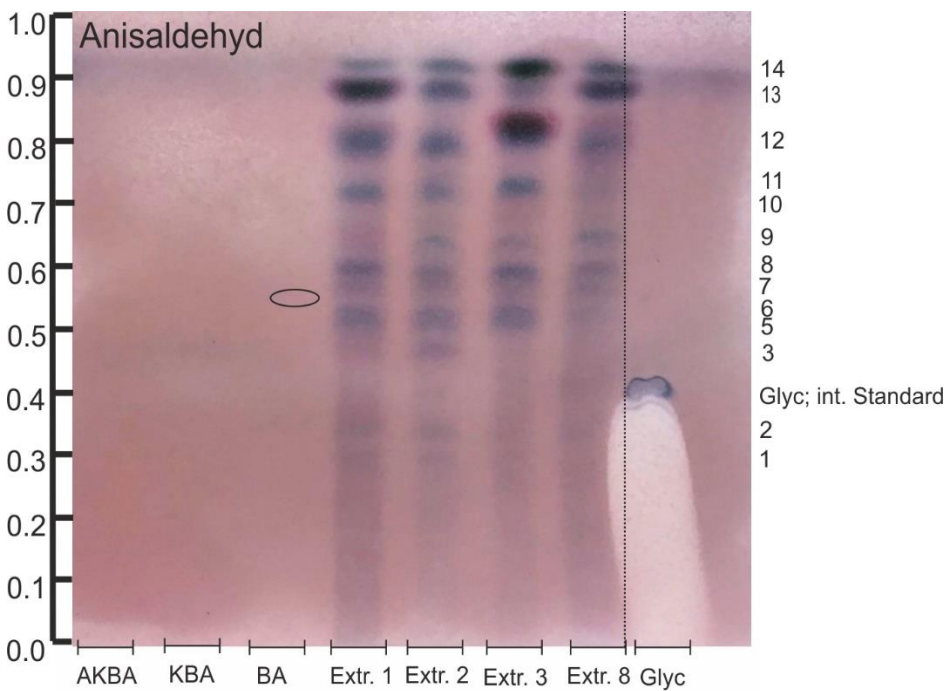


Abb. 4-3b DC-Analyse einiger Extrakte nach Entwickeln mit Anisaldehyd. Verwendete Referenzen (von links nach rechts: Bahn 1: AKBA, Bahn 2: KBA, Bahn 3: BA, 4 Extrakte, Bahn 8: Glyc als interner Standard).

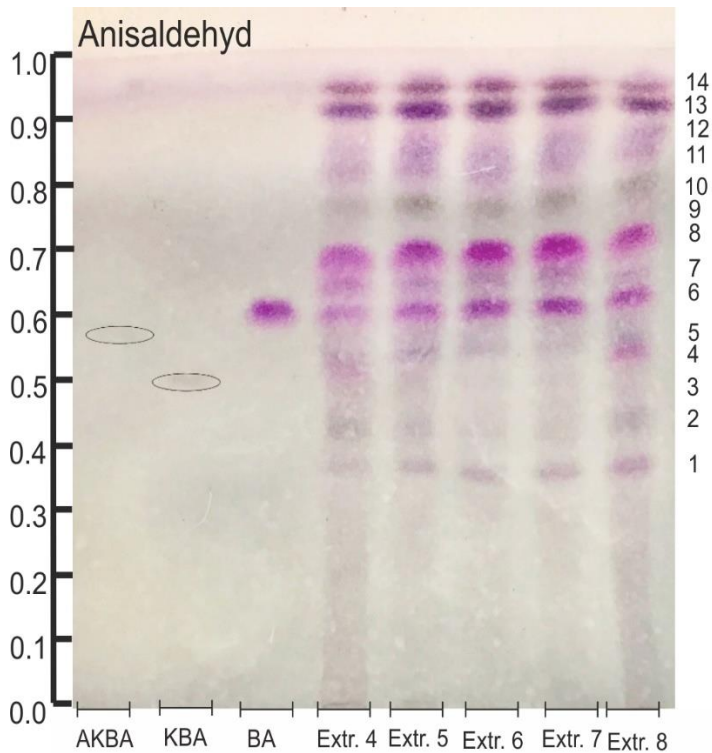


Abb. 4-3c DC-Analyse einiger Extrakte nach Entwickeln mit Anisaldehyd. Verwendete Referenzen (von links nach rechts: Bahn 1: AKBA, Bahn 2: KBA, Bahn 3: BA, 5 Extrakte,).

Tab. 4-3 Zusammenfassung der DC-Ergebnisse in Abb. 4-3

Substanz	Nr.	R _f	UV-254nm Intensität		Anisaldehyd/Farbe		Spezies
OH-BA	1	0,37	-		Lila	+	<i>B. ser.</i> , <i>B. sac.</i> , <i>B. pap.</i>
RA	2	0,43	-		Braun	(+)	<i>B. ser.</i> , <i>B. sac.</i> , <i>B. pap.</i>
β-KBA	3	0,50	Sichtbar	+	Hellgelb	(+)	<i>B. ser.</i> (stark)
OH-ABA	4	0,54	-		Lila	+	<i>B. ser.</i> , <i>B. sac.</i> , <i>B. pap.</i>
AKBA	5	0,57	Sichtbar	+++	Hellgelb	(+)	<i>B. pap.</i> , <i>B. sac.</i>
α/β-BA	6	0,61	-		Violett	+++	<i>B. ser.</i>
3-α-OH-TA	7	0,65	-		Lila	++	<i>B. ser.</i>
3-O-TA	8	0,69	-		Blau-lila	+++	<i>B. pap.</i> , <i>B. ser.</i> (stark)
Dien-TA	9	0,72	-		Hellblau	+	<i>B. ser.</i> , <i>B. sac.</i> , <i>B. pap.</i>
AdBA	10	0,77	-		Braun	++	Keine Angaben in Lit.
Ac-dien-TA	11	0,80	-		Violett	++	<i>B. ser.</i> , <i>B. sac.</i> , <i>B. pap.</i>
Ac-dien-LA	12	0,86	-		Violett	++	<i>B. ser.</i> , <i>B. sac.</i> , <i>B. pap.</i>
ABA	13	0,91	-		Dunkles Violett	+++	<i>B. ser.</i> , <i>B. sac.</i> , <i>B. pap.</i>
Äth. Öl	14	0,95	-		Rot-Braun	+++	<i>B. ser.</i> , <i>B. sac.</i> , <i>B. pap.</i>
β-Gly.	Int. Std.	0,47	Sichtbar	+++	Blau	+	Referenz / Standard

4.2.2 Untersuchungen mittels HPTLC

Ab Herbst 2020 stand der AG Keusgen ein CAMAG-HPTLC-System zur Verfügung, was eine reproduzierbare, automatische Auftragung von Proben und Referenzen ermöglichte sowie eine einheitliche Digitalisierung der Ergebnisse. Dieses wurde zum Anlass genommen, die Versuche aus Kapitel 4.2.1 zu wiederholen und gegeben falls weiter zu optimieren. Als Referenz wurde eine Mischung von 6 Standards verwendet (nach aufsteigenden R_f -Werten: Gly, KBA, AKBA, BA, O-TA, AdBA), wie sie bereits für die in Kapitel 4.3 beschriebenen HPLC-Methoden entwickelt wurde.

Es zeigte sich bei Verwendung der mobilen Phase Toluol / Aceton 7:3 (V/V) oder vergleichbarer Fließmittelsysteme ohne Säurezusatz, dass zwar die in den Arzneibuchmonographien als wertbestimmende Substanzen angeführten KBA und AKBA, die unter UV 254 nm sehr reproduzierbar sichtbar sind, immer voneinander getrennt sind und auch der für die HPLC-Versuche verwendete interne Standard Glyc immer deutlich abgetrennt wurde. Jedoch liefert das Chromatogramm nach dem Entwickeln mit Anisaldehyd in Bezug auf die verwendeten Standards weniger aussagekräftige DCs. Zwar zeigen sich viele deutlich voneinander getrennte Banden mit rosa bis violetter, teilweise auch mit oranger oder auch brauner Farbe, die jedoch den verwendeten Referenzen nicht zugeordnet werden können. Schlimmer noch: AKBA, BA, O-TA und AdBA werden praktisch nicht voneinander getrennt. Die sehr intensive Bande, die, wie in Kapitel 4.2.1 angegeben, ursprünglich der BA zugeordnet wurde, ist eine Mischung aus mehreren Triterpensäuren. Weiterhin ist in Abb. 4-4 gut sichtbar, dass die unter UV 254 nm gut sichtbaren KBA und AKBA nach Entwickeln mit Anisaldehyd bestenfalls eine schwach braune Farbe entwickelten, bei niedrigen Konzentrationen aber praktisch nicht anfärbbar sind.

Die HPTLC unter Abb. 4-4 ist aber trotzdem sehr aussagekräftig. Alle Banden, die einen höheren R_f als 0,4 haben, sind offensichtlich keine Triteropensäuren, sondern wahrscheinlich geringe Mengen von Ätherisch-Öl-Substanzen, die entsprechend den Literaturangaben (Kap. 1.6, 5.2) speziesspezifische Unterschiede aufweisen. Wie in Abb. 4-4 gut ersichtlich ist, weisen die Proben 1 (*B. serrata*) und Probe 3 (*B. papayifera*) in diesem Ätherisch-Öl-Bereich orange, braune und rosa Banden auf, die bei den anderen Proben von *B. sacra* nicht oder nur schwach sichtbar sind. Interessant ist auch die Probe 2, bei der es sich um hochpreisige Basarware handelt (120 Euro pro kg), bei der es sich offensichtlich um *B. sacra* handelt, der andere Weihraucharten beigemischt sein könnten. Wegen des aromatischen, fruchtigen Geruchs steht hier Ware aus Somalia im Verdacht (persönliche Information von Herrn A. Moll, Oman-Shop).

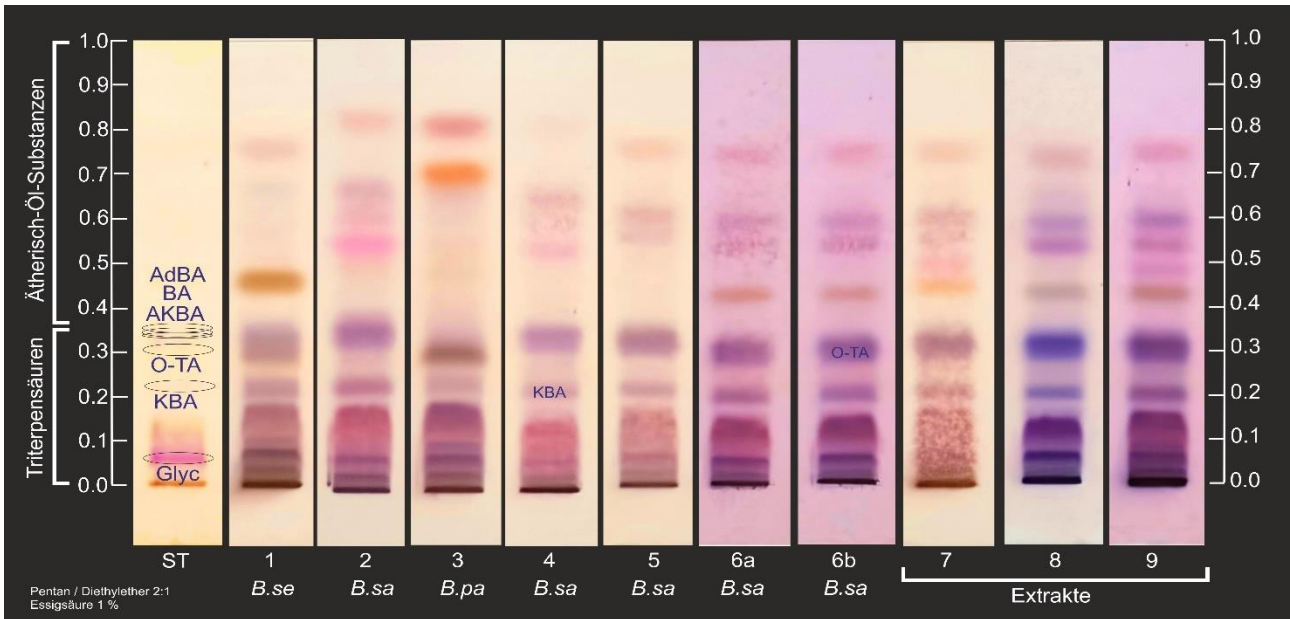


Abb. 4-4-Analyse der Extrakte 1-9 im Vergleich zu einer Mischung mit Referenzen (1. Bahn von links, ST) Fließmittel: Pentan / Diethylether 2:1 (V/V), 1 % Essigsäure.

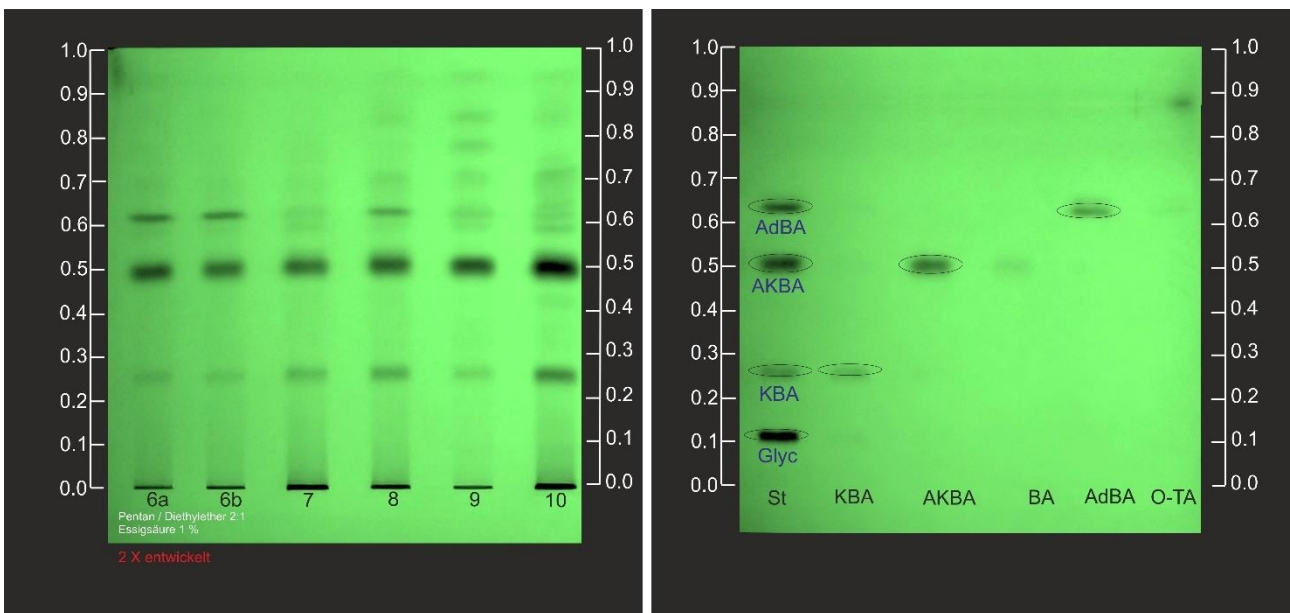


Abb. 4-5a-Analyse der Extrakte 6-10 im Vergleich zu einer Mischung mit Referenzen (UV 254 nm) Fließmittel: Pentan / Diethylether 2:1 (V/V), 1 % Essigsäure, 2-mal entwickelt.

Auch wenn dieses Fließmittelsystem nicht zur Trennung aller Triterpensäuren geeignet ist, scheint es aber sehr gut für die Identifizierung von *Boswellia*-Spezies sowie zum Nachweis von Verunreinigungen (Probe 2!) geeignet zu sein. Es würde somit die Anforderungen erfüllen, die an ein HPTLC-System zur Arzneibuch-Identitäts- und Reinheitsprüfung gestellt werden. Dabei sollte die aufgetragene Probenmenge zwischen 5 µl und 10 µl liegen. Die hier gewählte Menge von 10 µl kann reduziert werden.

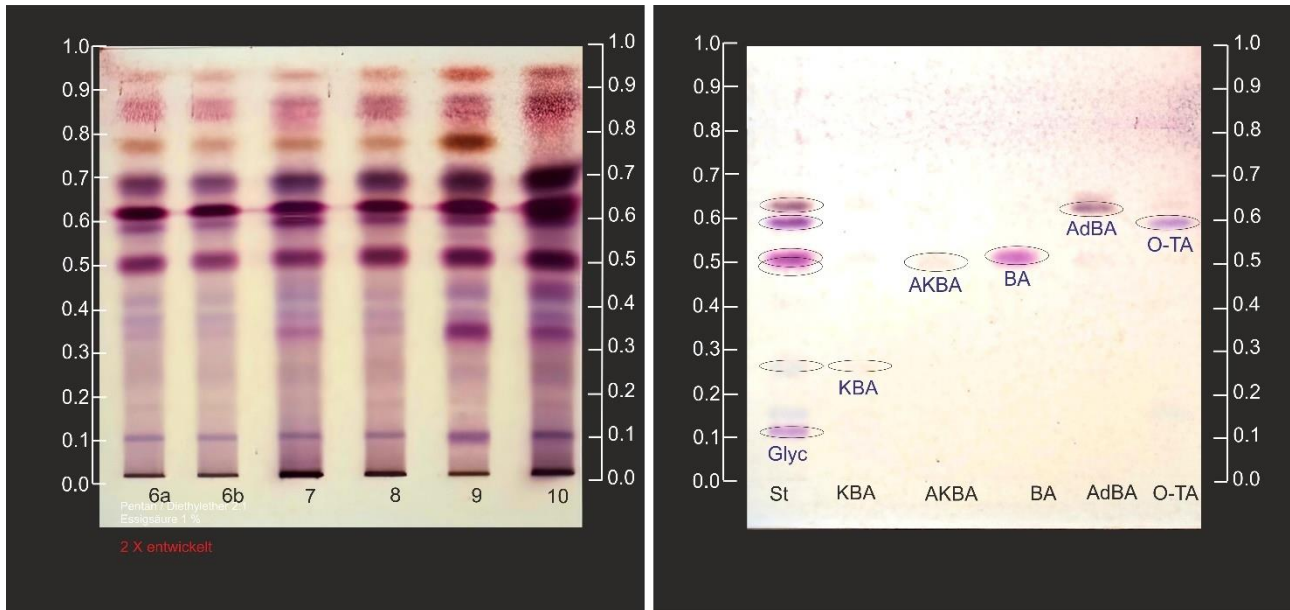


Abb. 4-5b-Analyse der Extrakte 6-10 im Vergleich zu einer Mischung mit Referenzen (Anisaldehyd) Fließmittel: Pentan / Diethylether 2:1 (V/V), 1 % Essigsäure, 2-mal entwickelt.

Nachdem andere Fließmittelgemische mit Säurezusatz keine Verbesserungen brachten, wurden Mehrfachentwicklungen der DC mit dem gleichen Fließmittel untersucht (Abb. 4-5). Die Triterpensäuren, die sich unterhalb R_f 0,7 befinden, sind in viele, scharf abgetrennte Banden aufgetrennt, wovon viele nur tendenziell Substanzen zugeordnet werden können. Logischerweise sind die Bereiche oberhalb R_f 0,7 weniger gut getrennt; trotzdem sind die speziesspezifischen Banden gut zu erkennen (Abb. 4-6).

Unter UV 254 nm sind Glyc, KBA, AKBA und AdBA gut zu erkennen; die anderen Standards BA und O-TA zeigen nur eine geringe Fluoreszenzlöschung (Abb. 4-5a). Nach der Entwicklung mit Anisaldehyd bietet sich ein sehr buntes Bild (Abb. 4-5b und Abb. 4-6). Wie bereits oben erwähnt, ergibt KBA nur eine sehr schwache braune Färbung; die von AKBA ist geringfügig stärker. Weil diese beiden Triterpensäuren nach Entwicklung mit Anisaldehyd nahezu unsichtbar sind, sind die Substanzen, welche den gleichen R_f -Wert wie diese beiden Keto-boswelliasäuren haben, trotzdem gut durch ihre rosa bis violette Färbung sichtbar. Glyc färbt sich mit Anisaldehyd charakteristisch bläulich-lila, BA je nach Konzentration rosa (geringe Konzentration) bis lila (hohe Konzentration) und O-TA ist eher bläulich. Hingegen gibt AdBA eine intensive, braune Bande.

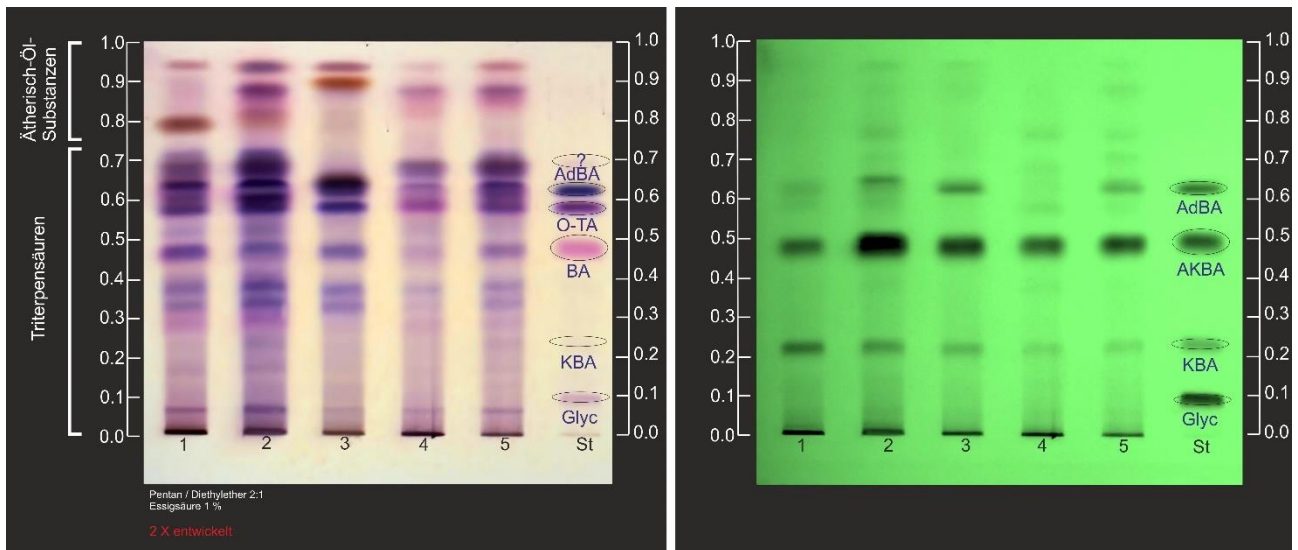


Abb. 4-6-Analyse der Extrakte 1-5 im Vergleich zu einer Mischung mit Referenzen (St) Links: UV 254 nm, rechts: UV-254 nm. Fließmittel: Pentan / Diethylether 2:1 (V/V), 1 % Essigsäure, 2-mal entwickelt.

Die oben beschriebenen Ergebnisse mit einer 2-fach-Entwicklung unter sauren Bedingungen sind die Besten dieser Versuchsreihe. Aus diesen Gründen wurden die Extrakte 1-3 detailliert ausgewertet und die Banden, die nicht über Referenzen zugeordnet werden konnten, wurden entsprechend Literaturangaben tendentiell zugeordnet. Extrakt 1 steht für *B. serrata*, Extrakt 2 für *B. sacra*, wahrscheinlich aber geringfügig verunreinigt, und Extrakt 3 für *B. papyrifera*. Dabei wurde der intensiven braunen Bande bei Extrakt 1 (R_f 0,8) Incensol zugeordnet und der orange-braune Fleck bei Extrakt 3 (R_f 0,9) könnte Acetylcensol sein.

Tab. 4-4a Zusammenfassung der DC-Ergebnisse in Abb. 4-6 (Extrakt 1)

Substanz	R _f	UV-254nm		Anisaldehyd / Farbe	
		Intensität			
OH-BA	0,08	-		Fliederviolett	++
RA	0,18	-		Violett	+
β-KBA	0,23	Sichtbar	+++	Violett	(+)
Dehydro-RA	0,30	-		Fliederviolett	++
OH-ABA	0,33	-		Violett	++
Dehydro-ABA	0,38	-		Violett	+++
AKBA	0,48	Sichtbar	+	-	-
α/β-BA	0,49	-		Fliederviolett	+++
3-α-OH-TA	0,52	-		Blau	+
3-O-TA	0,58	-		Fliederviolett	+++
Dien-TA	0,60	-		Fliederviolett	++
AdBA	0,63	Sichtbar	(+)	Dunkels Violett	+++
Ac-dien-TA	0,69	-		Fliederviolett	++
ABA	0,72	-		Purpur	+
Incensol	0,80	-		Braun	+++
Äth. Öl	0,90	-		Rosa	(+)
Incensol-Ac	0,94	-		Braun	+

Tab. 4-4b Zusammenfassung der DC-Ergebnisse in Abb. 4-6 (Extrakt 2)

Substanz	R _f	UV-254nm		Anisaldehyd / Farbe	
		Intensität			
OH-BA	0,08	-		Veilchen-violett	++
RA	0,18	-		Violett	+
β-KBA	0,23	Sichtbar	++	Violett	++
Dehydro-RA	0,30	-		Dunkels Violett	+++
OH-ABA	0,32	-		Veilchen-violett	+++
Dehydro-BA	0,38	-		Veilchen-violett	+++
AKBA	0,48	Sichtbar	+++	-	-
α/β-BA	0,49	-		Fliederviolett	+++
3-α-OH-TA	0,52	-		Veilchen-Violett	++
3-O-TA	0,58	-		Veilchen-Violett	+++
Dien-TA	0,60	-		Veilchen-Violett	+++
AdBA	0,63	Sichtbar	+	Dunkels Violett	+++
Ac-dien-TA	0,69	-		Veilchen-Violett	+++
ABA	0,72	-		Purpur	++
Incensol	0,82	-		Braun	++
Äth.Öl	0,88	-		Fliederviolett	+++
Äth.Öl	0,94	-		Veilchen-Violett	++

Tab. 4-4c Zusammenfassung der DC-Ergebnisse in Abb. 4-6 (Extrakt 3)

Substanz	R _f	UV-		Anisaldehyd/Farbe	
		254nm/Intensität			
OH-BA	0,08	-		Violett	+
RA	0,18	-		Violett	(+)
β-KBA	0,23	Sichtbar	++	Violett	(+)
Dehydro-RA	0,28	-		Violett	(+)
OH-ABA	0,32	-		Violett	++
Dehydro-BA	0,38	-		Violett	++
AKBA	0,48	Sichtbar	++	-	-
α/β-BA	0,48	-		Fliederviolett	+++
3-α-OH-TA	0,52	-		Blau	(+)
3-O-TA	0,58	-		Veilchen-Violett	+++
Dien-TA	0,60	-		Veilchen-Violett	++
AdBA	0,63	Sichtbar	+	Dunkels Violett	+++
Ac-dien-TA	0,69	-		Purpur	(+)
ABA	0,72	-		Purpur	(+)
Incensol	0,82	-		Gelb	(+)
Äth. Öl	0,90	-		Orange-braun	+++
Incensol-Ac	0,94	-		Dunkles Magenta	++

Als abschließendes Experiment wurde mit dem gleichen Fließmittelsystem eine 3-fach-Entwicklung durchgeführt (Abb. 4-7). Wie bei allen Mehrfachentwicklungen besteht die Gefahr, dass beim Zwischentrocknen es zu irreversiblen Reaktionen zwischen dem Kieselgel und den zu chromatographierten Substanzen kommt. Dieses ist offensichtlich bei der unten abgebildeten DC passiert. Es ist wichtig, dass die Zwischentrocknung zügig bei Raumtemperatur erfolgt und die nach visueller Kontrolle trockene Platte direkt ein weiteres Mal entwickelt wird; dadurch lässt sich Artefaktbildung zuverlässig vermeiden.

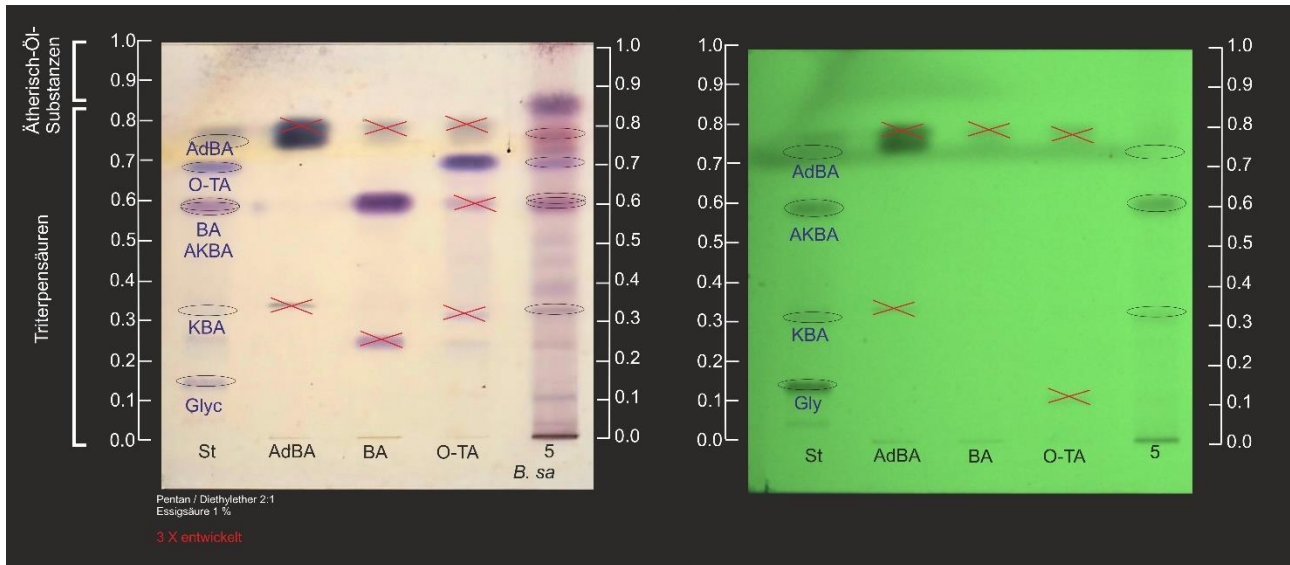


Abb. 4-7 Standards und Extrakt 5 nach 3-maligem Entwickeln in sauren Fließmittel und Detektion mit Amisaldehyd (links) bei UV 254 nm (rechts). Durch das zweimalige Zwischentrocknen, was mit großer Vorsicht erfolgen muss, ist es wahrscheinlich wegen zu hoher Temperatur zur Artefaktbildung gekommen; die entsprechenden Zonen sind mit einem roten Kreuz markiert.

4.2 Vorsäulen-Derivatisierungen

Den Vorsäulenderivatisierungen, wie im Kapitel 3.8 allgemein beschrieben, wurde in der Vorplanung dieser Promotionsarbeit ein großer Stellenwert beigemessen, denn durch die Einführung eines UV-aktiven Restes (Phenyl, Benzyl, etc.) wäre eine einfachere Detektion aller Triterpensäuren bei einer einheitlichen Wellenlänge von $\lambda=254$ nm möglich (oder auch darüber); anschließend könnte die chromatographische Trennung auch nur für diese Wellenlänge optimiert werden.

Für eine Vorsäulenderivatisierung ist grundsätzlich die Hydroxylgruppe in Position C-3 geeignet, die verestert werden kann. Ebenfalls möglich ist eine Veresterung oder Amidierung der Carbonsäure in Position C-4, beides einfache Reaktionen. Alternativ wäre noch eine Umsetzung der C-C-Doppelbindung möglich, die bei vielen Triterpensäuren an Ring C der Grundstruktur zu finden ist.

Als problematisch ist einzustufen, dass alle reaktiven Funktionalitäten stark bis sehr stark sterisch gehindert sind (Hydroxy- und Carboxylgruppen an benachbarten Positionen, zusätzlich Methylgruppe an C-4; Triterpen-Grundgerüst; auch teilweise Acetylierung der Hydroxygruppe). Zwischen den benachbarten Hydroxy- und Carboxylgruppen kann es zusätzlich noch zur Wasserstoffbrückenbindung kommen, was Reaktionen weiterhin erschwert. Zudem handelt es sich bei den zu derivatisierenden Proben um undefinierte Vielstoffgemische, bei denen es zu schwer kalkulierbaren Seitenreaktionen kommen kann.

Da die unter Kapitel 3.8 allgemein beschriebenen Versuche im Großen und Ganzen ergebnislos verliefen, wurden die erzielten Ergebnisse, die einen Wert für weiterführende Untersuchungen hätten, detailliert im Anhang Kapitel 7.3 mit Reaktionsformeln und DC-Ergebnissen beschrieben; die nachfolgenden Kapitel zu diesem Thema sind deshalb kurz gefasst.

4.2.1 Derivatisierungen der 3-Hydroxylgruppe der Boswelliasäuren

Die Reaktionen in Kapitel 3.8 sowie im Anhang 7.3.1, hier im Speziellen der Ansatz 1, waren in der Theorie als Veresterung leicht durchzuführen; praktisch stellte jedoch die schlechte Löslichkeit der zunächst als Modellsubstanz verwendeten 18- β -Glycyrrhetinsäure ein Hindernis dar. Bei der DC-Auswertung ist kein Produkt zu erkennen, dafür die Banden der Reaktanden 4-Nitrobenzoylchlorid und 18- β -Glycyrrhetinsäure, wie der Vergleich mit den Referenzen zeigte. An dem Ergebnis änderte auch eine Optimierung des DC-Fließmittels nichts. Fernerhin lieferten MS-Untersuchungen keinen Hinweis auf ein möglicherweise entstandenes Produkt (Details siehe Kapitel 7.3.1).

Ein weiterer Versuch wurde mit gereinigten Boswelliasäuren unternommen (Anhang 7.3.1, Ansatz 2). Hier wurde als Reaktionspartner Benzoylchlorid eingesetzt. Bei der DC-Analytik zeigte sich bei der Bande des Reaktionsgemisches nur eine einzige schwache Zone, die bei UV 254 nm sichtbar war. Das Massenspektrum des Produktes lieferte neben einem starken Signal für Benzoesäure und einer Boswelliasäure keine Peaks, die zu einer Masse möglicher Produkte gepasst hätten. Die Derivatisierung mit Benzoylchlorid ist daher als nicht erfolgreich anzusehen und sollte eher nicht weiterverfolgt werden.

In einem weiteren Ansatz 3 wurden gereinigte Boswelliasäuren mit 4-Nitrobenzoylchlorid als Derivatisierungs-Rgz. in Pyridin umgesetzt (Abb. 3-7). Die DC-Analytik dieses Versuches zeigte bei der Produkt-Bahn eine zusätzliche, sehr unscharfe Zone bei $R_f=0,4$ (Abb. 7-5), die sich jedoch nicht mit Anisaldehyd anfärben ließ. Vermutlich handelt es sich um ein anderes, direktes Reaktionsprodukt des Nitrobenzoylchlorids. Da die fragliche Zone ganz offensichtlich keine Triterpensäuren enthält, die auch bei deutlich höheren R_f -Werten zu erwarten gewesen wären, wurde auf eine MS-Analyse verzichtet und auch dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Der Ansatz 4 (Kapitel 3.8.1) beruhte auf der Annahme, dass möglicherweise ein Teil der Boswelliasäuren acetyliert vorliegt und deswegen nicht in Form einer Veresterung reagiert. Durch die Verseifung mit NaOH in Ansatz 4 wurde der Versuch unternommen, dieses mögliche Problem zu beseitigen und gleichzeitig eine Umsetzung mit 4-Nitrobenzoylchlorid unter Zugabe eines Aktivators bzw. eines HCl-Fängers (Dimethylaminopyridin, DMAP) zu versuchen. Die DC-Analytik des Versuches zeigte einige Banden unter UV-254 nm (Kapitel 7.3.1; Abb. 7-6); insgesamt waren 5

Banden auf der Platte sichtbar, welche auch mit Anisaldehyd angefärbt werden konnten. Das von diesem Ansatz angefertigte MS zeigte neben einigen Boswelliasäuren und 4-Nitrobenzoesäure als Edukte auch einige Massen von möglichen Produkten im Bereich von über 600 m/z. Eine Zuordnung der gefundenen Massen zu den theoretisch entstandenen Produkten konnte jedoch nicht erfolgen, so dass auch dieser Versuch zunächst als erfolglos gewertet werden muss.

Da das Ergebnis zunächst nicht ganz aussichtslos erschien, wurden im Anschluss an diesen Versuch 4 zahlreiche Experimente mit veränderten stöchiometrischen Verhältnissen der Reaktionspartner durchgeführt (Kapitel 7.3.1). Leider ergaben sich bei all diesen Versuchen, die im Anhang ausführlich beschrieben sind, kein klares Ergebnis, so dass eine Funktionalisierung der Hydroxylgruppe an C-3 letztendlich aufgegeben wurde.

4.2.2 Derivatisierungen der 4-Carboxylgruppe der Boswelliasäure

Derivatisierungen, wie in Kapitel 3.8 und im Anhang 7.3.3 und 7.3.4 detailliert beschrieben, erbrachten zunächst für die Ansätze 1 und 2 keine eindeutigen Ergebnisse. Zunächst wurde die Carbonsäure mit EDC oder über ein Säurechlorid aktiviert (Abb. 3-8). Als Aminkomponente wurde 8-Aminochinolin eingesetzt. Diese Verbindung hat den Vorteil, dass sie neben UV 254 nm auch mit Dragendorff's Reagenz detektiert werden kann. Bei der Auswertung der zugehörigen DC's in UV 254 nm zeigten sich zunächst nur Banden auf Höhe der Edukte (siehe 7.3.3, Abb. 7-14, 7-15). Die Versuche wurden aber mit anderen stöchiometrischen Verhältnissen fortgesetzt.

Hierbei zeigten sich bei 7.3.4 (Ansatz 3) schon erste positive Ergebnisse, die auf eine eventuelle Derivatisierung schließen ließen. In der DC-Analytik von Ansatz 3 ließen sich mehrere unter UV-Licht sichtbare, mögliche Produkte identifizieren. Die Behandlung mit Anisaldehyd zeigte jedoch auch, dass einige dieser Banden von den Edukten (Boswelliasäuren) stammen müssen (Abb. 7-16). Der Versuch, mögliche Produkte mit Dragendorff's Rgz. anzufärben, misslang. Nur 8-Aminochinolin als solches konnte mit Dragendorff's Rgz. angefärbt werden. Nach einer weiteren Behandlung der Platte mit Natriumnitrit (10 %ige Lösung) zeigten sich zwei weitere, sehr diffuse, orange-gelbe Zonen. Leider ließ sich das Ergebnis bei den nachfolgenden Versuchen unter Variation der stöchiometrischen Verhältnisse nicht reproduzieren. Abschließend wurde im 7. Versuch 8-Aminochinolin gegen Benzylalkohol ausgetauscht und die Reaktion als solche unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt (Abb. 7-20). Jedoch zeigte sich auch hier bei der DC-Analyse (Abb. 7-21) keine signifikante Änderung des Bandenmusters im Vergleich zu der eingesetzten Boswelliasäure-Mischung. Es muss bei dieser DC jedoch beachtet werden, dass mögliche Reaktionsprodukte durch Ausschütteln ankonzentriert wurden und damit die Mengenverhältnisse zwischen Edukt und Produkt nicht mehr stimmig sind.

4.3 HPLC-Untersuchungen

Da die Vorsäulen-Derivatisierungen, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, zum überwiegenden Teil nicht erfolgreich verlaufen sind und somit eingestellt wurden, musste zwangsläufig auf eine komplexe HPLC-Methode, verbunden mit einer parallelen Detektion bei $\lambda=210$ nm und $\lambda=254$ nm, ausgewichen werden. Erschwerend kommt hinzu, dass nicht alle Boswelliasäuren und artverwandter Substanzen kommerziell als Standards erhältlich sind sowie die häufig als Standard verwendeten Keto-boswelliasäuren sehr teuer sind. Deshalb sollte zusätzlich ein interner Standard etabliert werden, von dem sich dann über Kalibrationsfaktoren auch die übrigen, potentiell wertbestimmenden Substanzen im Weihrauch quantitativ bestimmen lassen.

4.3.1 Methodenentwicklung

Bei den zu untersuchenden Substanzen handelt es sich um relativ lipophile Triterpensäuren, die sich auf einer RP18-Säule mit einem binären Fließmittelsystem, bestehend aus Acetonitril und einer wässrigen Komponente, trennen, wobei der pKs für β -BA 4,57 beträgt (berechnet mit ChemAxon); was vergleichbar mit anderen Triterpensäuren sowie mit Essigsäure (4,76) ist. Sie sind somit schwache Säuren, die in wässriger Lösung nur teilweise dissoziiert vorliegen.

Damit erscheint eine pH-Kontrolle des Mediums unumgänglich; die Zusammenhänge sind in Abb. 4-8 dargestellt. Dabei wurde die gleiche Acetonitril-Wasser-Mischung, wie sie weiter unten auch für die quantitative Bestimmungen verwendet wird, einmal mit Wasser, was kontrolliert auf pH 7,0 eingestellt wurde (Abb. 4-8; blaues Chromatogramm 1) und dann mit einem Zusatz von 0.1 % TFA (V/V) in beiden Lösungsmittelkomponenten verwendet (Abb. 4-8, rotes Chromatogramm 2).

Bei zahlreichen Reihenuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass nur ein sehr geringer Säurezusatz erforderlich ist; in einigen Versuchsreihen erschien sogar die luftbedingte CO₂-Absättigung bzw. saure Zersetzungsprodukte des Acetonitrils ausreichend, um eine zufriedenstellende Trennung zu erzielen. Erwartungsgemäß waren derartige Ergebnisse ohne definierten Säurezusatz schlecht reproduzierbar.

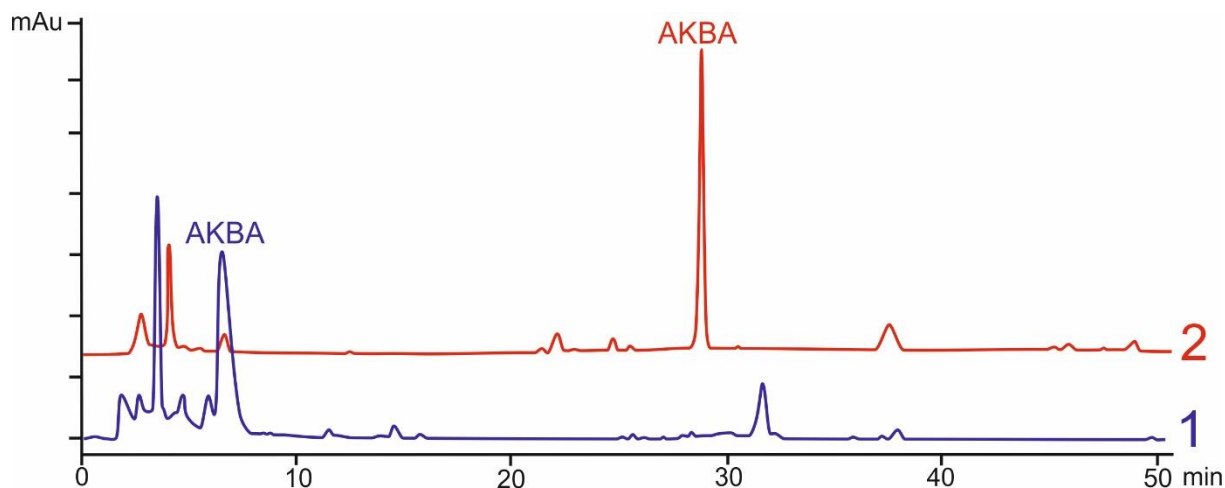


Abb. 4-8 HPLC-Chromatogramme des Extraktes 4 mit Acetonitril / Wasser als Fließmittel, Detektion bei 254 nm. Kurve 1 blau: Wasser mit NaHCO_3 eingestellt auf pH 7,0, Kurve 2 rot: 0,1 % TFA in beiden Lösungsmitteln.

Es ist klar zu sehen, dass durch den TFA-Zusatz die Dissoziation der Carbonsäure ausreichend zurückgedrängt wird, so dass diese nahezu vollständig undissoziiert vorliegt (rotes Chromatogramm 2) und daraus ein scharfer Peak für die AKBA existiert. Ohne TFA hingegen liegen bei pH 7,0 die Boswelliasäuren weitgehend, aber nicht vollständig dissoziiert vor, wobei sich einerseits die Retentionszeit deutlich verkürzt, aber trotz sehr kurzer Retentionszeit der Peak für AKBA relativ breit ist (blaues Chromatogramm 1).

Der ursprüngliche Ansatz der hier vorgestellten Arbeit war es, die Säuregruppe mit einem UV-aktiven Substituenten („Tag“) zu versehen, so dass die Detektion bei einer UV-Wellenlänge von 250 nm und darüber erfolgen kann. Da leider keine zuverlässige Derivatisierungsmethode gefunden werden konnte, wurde, wie auch in vorausgegangenen Arbeiten, bei $\lambda=210$ nm und bei $\lambda=254$ nm detektiert. Dabei zeigt die Mehrzahl der Triterpensäuren eine Absorption bei $\lambda=210$ nm und nur einige wenige, die über eine zusätzliche Doppelbindung („Dehydroxy“) oder / und ein zusätzliche Sauerstofffunktion („Keto“) verfügen, eine ausreichende Absorption bei 254 nm.

Ziel war es nun, unter Beachtung beider Wellenlängen möglichst viele der Triterpensäure so zu trennen, dass es nicht zu „Überlappungen“ zwischen beiden Wellenlängen kommt, da die Ketoboswelliasäuren auch bei $\lambda=210$ nm eine Absorption zeigen. Folgendes Fließmittelsystem mit dem Zusatz von 0.1 % TFA erbrachte die besten Ergebnisse:

Tab. 4-5 Zusammenfassung Optimiertes Fließmittelsystem zur quantitativen Bestimmung der Boswelliasäuren. Es wurde eine RP18-Säule (250 mm X 4 mm) bei einer Flussrate von 1,0 ml verwendet. Zwischen den Zeiten wurden die Konzentrationen als Rampe angefahren (Endpunkte der jeweiligen Rampe in Klammern).

Zeit [min]	Acetonitril [%]	Wasser [%]
0	65	35
15 (→25)	65 (→ 95)	35 (→ 5)
25	95	5
35	95	5
40 (→45)	95 (→ 100)	5 (→ 0)
45 (→50)	100 (→ 65)	0 (→ 35)
50	65	35
65	65	35

Wichtig ist, dass innerhalb des Programms, welches grundsätzlich „Rampen“ und keine Stufen verwendet, die Ausgangsbedingungen wiederhergestellt werden und ausreichend lange äquilibriert wird (in diesem Falle 15 min). Ein Beispielchromatogramm mit den verwendeten Standards ist in Abb. 4-9 wiedergegeben.

Weiterhin sollte ein interner Standard gefunden werden, der strukturell möglichst ähnlich ist, aber nicht mit den Boswelliasäuren interferiert und sowohl bei 210 nm wie auch bei 254 nm eine ausreichende Absorption hat, um eine Kalibration bei beiden Wellenlängen über Kalibrationsfaktoren („Responsefaktoren“, RF) zu ermöglichen. Als geeignete Substanz konnte mit β -Glycyrrhetinsäure (Glyc) gefunden werden, die ebenfalls eine Triterpensäure ist und deren pKs von 4,44 (ChemAxon) mit dem der Boswelliasäuren vergleichbar ist. Unter den oben angegebenen Trennbedingungen kam es bei keinem der untersuchten Extrakte zu einer Überlagerung einer Substanz mit Glyc, weder bei $\lambda=254$ nm noch bei $\lambda=210$ nm.

In dieser Arbeit wurden zunächst etwa 30 zumeist saure Triterpene berücksichtigt (vergl. Abb. 1-11 bis 1-15). Der große Anteil von Aromaten wie Phenole, Phenylpropanoide oder Furanocumarine wurden wahrscheinlich durch die flüssig-flüssig-Extraktion abgetrennt und nicht selektiv bestimmt. Wie bereits erwähnt wurde, stellte sich die selektive Quantifizierung der einzelnen Peaks als schwierig dar. Aufgrund der fehlenden spezifischen Chromophore zeigen die meisten Terpenverbindungen eine UV-Detektion lediglich bei $\lambda=210$ nm. Erschwerend kam hinzu, dass ihre Detektionen in sehr engen Retentionszeit-Intervallen von ca. 1 min lagen (schwierige Basislinientrennung zwischen den einzelnen Substanzen); bei den jeweiligen α - und β -Isomeren waren es ca. 2 min Retentionszeitunterschied. Die in sehr kurzen Abständen zu detektierenden

Peaks hatten daher eine exakte Bestimmung von den einzelnen Verbindungen ziemlich erschwert und müssten recht zeitaufwändig mit Hilfe von HPLC-MS voneinander differenziert und sicher zugeordnet werden. Bei den HPLC-MS-Versuchen zeigte sich noch eine weitere Besonderheit der Boswelliasäuren: Eigentlich würde man erwarten, dass eine Ionisation im „Negative-Mode“ wegen des Säurecharakters der Substanzen deutlich größere Signalintensitäten liefern würde, was aber nicht der Fall war. Eindeutig bessere Ergebnisse, die auch reproduzierbar waren, wurden im „Positive-Mode“ erzielt.

Bei allen 10 Extrakten konnten durchschnittlich 23 Säure-Komponenten mittels HPLC-MS identifiziert sowie quantifiziert werden, von denen 15 pentazyklische Triterpene und 8 tetrazyklische Triterpene waren. Die Säuren wie der interne Standard (IST) Glyc, 11-Keto- α/β -boswelliasäuren, 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure, 4(23)-Dihydro-keto-robursäure und 3-OH-9-11-Dehydro- β -boswelliasäure konnten neben der MS-Analyse relativ leicht bei einer Wellenlänge von $\lambda=254$ nm detektiert und zugeordnet werden. Alle anderen sauren Komponenten waren bei der unspezifischen Detektionswellenlänge von $\lambda=210$ nm in einer recht komplexen Matrix mehr oder weniger gut sichtbar, wobei zur Minimierung der Matrix-Effekte eine pH-abhängige, flüssig-flüssig-Extraktion durchgeführt wurde (siehe Kap. 4.1). Deshalb ist insbesondere bei diesen Substanzen eine Identifizierung mittels HPLC-MS und, soweit möglich, mittels Standards erforderlich (Abb. 4-9).

Das Massenspektrum der Proben zeigt auch einige Peaks, die vermutlich auf Diterpensäuren wie Abietinsäuren $C_{20}H_{30}O_2$ (M_G : 302.45), Dihydroabietinsäure $C_{20}H_{28}O_2$ (M_G : 304.), und Canariensäuren $C_{29}H_{46}O_2$ (M_G : 426) zurückzuführen sind. Da Weihrauch bis zu 8 % ätherisches Öl enthält, können diese Substanzen auch nach der in Kap. 4.1 beschriebenen Aufreinigung noch in Spuren vorhanden sein.

Es wurden auch Peaks identifiziert, die auf einige Fettsäuren wie Arachidonsäuren $C_{20}H_{32}O_2$ (M_G 304.46) hindeuten. Fettsäuren können als Abbauprodukte von Glyceriden grundsätzlich erwartet werden.

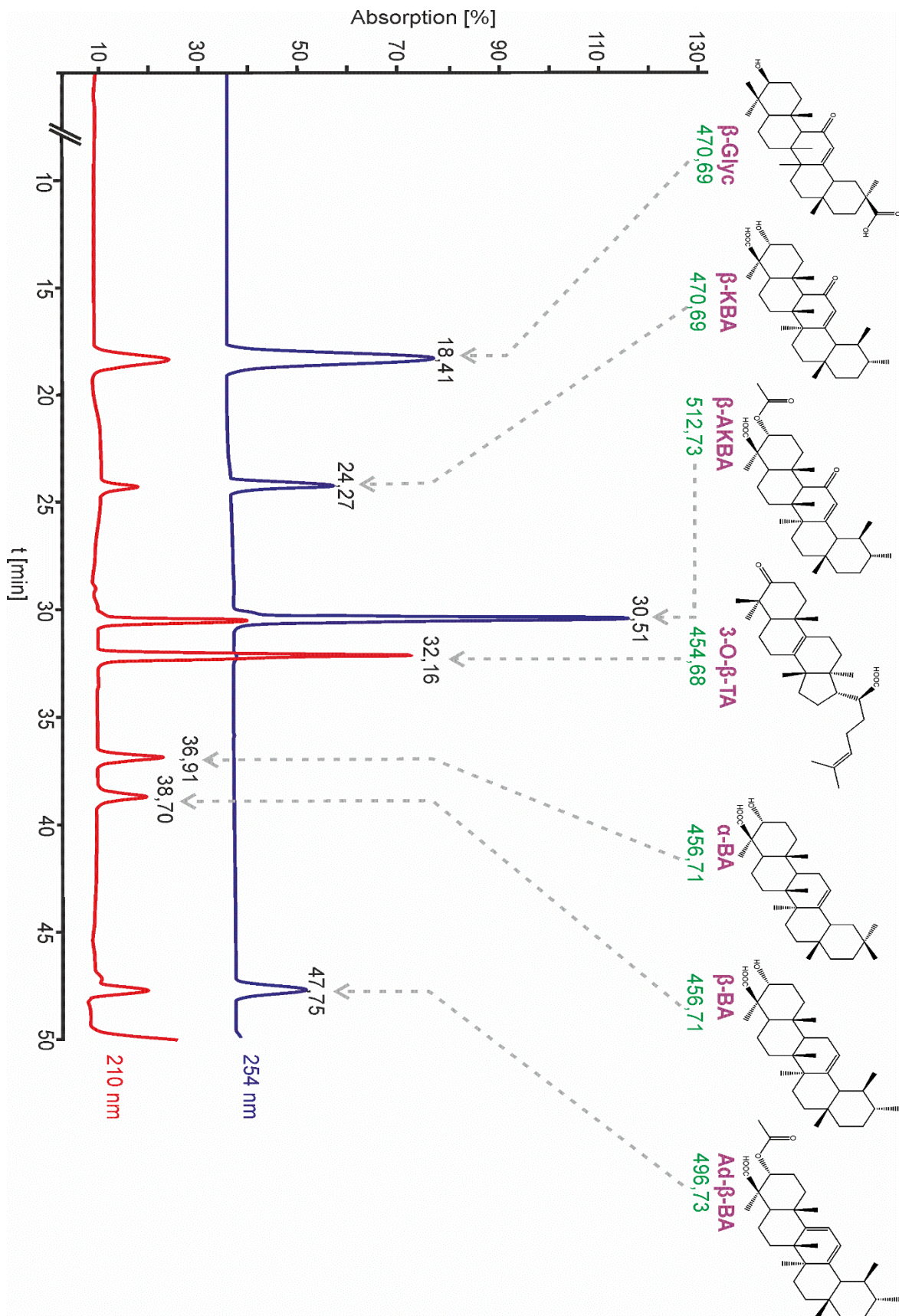


Abb. 4-9 HPLC-Musterchromatogramm der verwendeten Standards. Unterhalb der Strukturformeln sind die M_0 's angegeben. Kleinere Abweichungen zu den R_t -Werten in Tab. 4-17 ergeben sich dadurch, dass die HPLC-MS-Anlage eine andere Chromatographie-Einheit (Shimadzu) als diejenige hat, welche zur quantitativen Bestimmung verwendet wurde (Agilent).

4.3.2 Ermittlung von Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (Nachweisgrenze: „Limit of Detection“, LOD; Bestimmungsgrenze: „Limit of Quantification“, LOQ) ist für eine komplexe Matrix mit zahlreichen wertbestimmenden Substanzen eine große Herausforderung. Eigentlich müsste man für jede Substanz einzeln die Bestimmungs- und Nachweisgrenze ermitteln, was mit einem mehrjährigen experimentellen Aufwand verbunden wäre. Aus diesem Grund wird hier modellhaft ein neuer Ansatz vorgestellt, der auch auf andere komplexe Naturstoffextrakte anwendbar ist.

Grundlage ist zunächst die Etablierung eines geeigneten internen Standards (IST), der den zu bestimmenden wertbestimmenden Inhaltsstoffen i) möglichst ähnlich ist, ii) von den wertbestimmenden Inhaltsstoffen chromatographisch vollständig und robust abtrennbar ist und iii) eine gute Verfügbarkeit zu akzeptablen Preisen hat.

Für die hier vorgestellten Analysen konnte β -Glycyrrhetinsäure (Glyc) alle drei Voraussetzungen vollständig erfüllen. Mit einer Retentionszeit von 14,4 min wird β -Glycyrrhetinsäure vor nahezu allen wertbestimmenden Triterpensäuren eluiert (Abb. 4-10). Auch wenn sich mit leicht veränderten Parametern die Retentionszeit verlängern kann (Abb. 4-9), bleibt ein mehrminütiger Abstand zu den Triterpensäuren.

Es ist empfehlenswert, den Abstand zwischen β -Glycyrrhetinsäure (Glyc) und β -Keto-boswelliasäuren (β -KBA) als Kriterium für den „System Suitability Test“ (SST) zu verwenden; hier bietet sich der Trennfaktor α an. Entsprechend Abb. 4-9 ergibt sich folgendes Ergebnis:

$$\alpha = \frac{R_t(\beta\text{-KBA}) - t_m}{R_t(\text{Glyc}) - t_m}$$

$$\alpha = \frac{24,27 - 1,48 \text{ min}}{18,41 - 1,48 \text{ min}}$$

$$\alpha = 1,35$$

t_m : Totzeit (1,48 min)

SST-Kriterium: Der Trennfaktor α sollte sein: $\alpha \geq 1,30$

Ist das SST-Kriterium erfüllt, können die Bestimmungs- und Nachweisgrenze ermittelt werden. Da β -KBA und Glyc beide sowohl bei $\lambda=254$ nm wie auch $\lambda=210$ nm eine Absorption zeigen, kann der SST bei beiden Wellenlängen durchgeführt werden, wobei 254 nm geeigneter ist. Dafür werden umfangreiche Verdünnungsreihen des internen Standards Glyc chromatographisch vermessen. Um die erhaltenen Werte auf die anderen Substanzen zu übertragen, kann der so genannte „Response Faktor“ (RF) verwendet werden (siehe nachfolgendes Kapitel 4.3.3). Die hier ermittelten Werte für

Bestimmungs- und Nachweisgrenze können durch Multiplikation des spezifischen RF auf die anderen Referenzen übertragen werden.

Nachfolgend ein Beispiel: Die Bestimmungsgrenze für Glyc, Detektion bei $\lambda=210$ nm, liegt bei 0,025 mg/ml (siehe unten). Bei der gleichen Wellenlänge liegt der RF für β -Boswelliasäure (β -BA), ermittelt über die Steigung der Kalibrationsgeraden (Kapitel 4.3.3), bei 0,71. Daraus ergibt sich für die Bestimmungsgrenze von β -BA folgende Berechnung:

$$\text{Bestimmungsgrenze } \beta\text{-BA} = LOQ (\text{Glyc}) 0,025 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times RF (\text{BA}) 0,71$$

$$\text{Bestimmungsgrenze } \beta\text{-BA} = 0,018 \text{ mg/ml}$$

Die Berechnungen sind für die anderen Substanzen, für die RF-Faktoren bestimmt wurden, analog durchzuführen. Für Substanzen, für die keine definierte Referenzsubstanz verfügbar war, können die Bestimmungsgrenzen näherungsweise durch Verrechnung des Molekulargewichtes in Relation zu dem Standard, der der zu bestimmenden Substanz am nächsten kommt (siehe weiter unten Kapitel 4.3.3), ermittelt werden.

Die Bestimmungs- und Nachweisgrenze wurde für die hier vorgestellten Untersuchungen über das Signal-Rausch-Verhältnis (Signal to Noise Ratio), S/N, berechnet:

$$S/N = 2hS/hN$$

hS: Höhe des Signals (mm, cm, etc.)

hN: Höhe des Rauschens (Noise; mm, cm, etc.)

Die graphische Auswertung ist in den Abb. 4-11 bis 4-13 verdeutlicht. Dabei liegt die Nachweisgrenze (LOD) bei einer S/N von ca. 3 und die Bestimmungsgrenze (LOQ) bei einer S/N von ca. 9.

Unter Berücksichtigung i) umfangreicher Verdünnungsreihen des IST Glyc, ii) einer möglichst exakten Ermittlung von Bestimmungs- und Nachweisgrenze über S/N bei $\lambda=210$ nm und $\lambda=254$ nm, iii) der Ermittlung von RF's und iv) der jeweiligen Molekulargewichte der zu quantifizierenden Substanzen lassen sich mit dem hier erstmalig publizierten System auch komplexe Naturstoffmischungen mit übersehbarem Zeitaufwand quantitativ analysieren.

Für die erforderlichen Versuche wurde zunächst Glyc in einer Konzentration von 5,20 mg / 10 ml EtOH in einem Maßkolben exakt eingewogen, um eine Stammlösung für Verdünnungsreihen

herzustellen (Tab. 4-8). Dabei richtete sich die Konzentration i) nach der Löslichkeit der Substanz in EtOH (mehr als ca. 5 mg ist bei Raumtemperatur nicht möglich) sowie ii) nach der Absorption bei $\lambda=254$ nm und $\lambda=210$ nm, die im gleichen Bereich wie die zu analysierenden Substanzen liegen muss (Abb. 4-10).

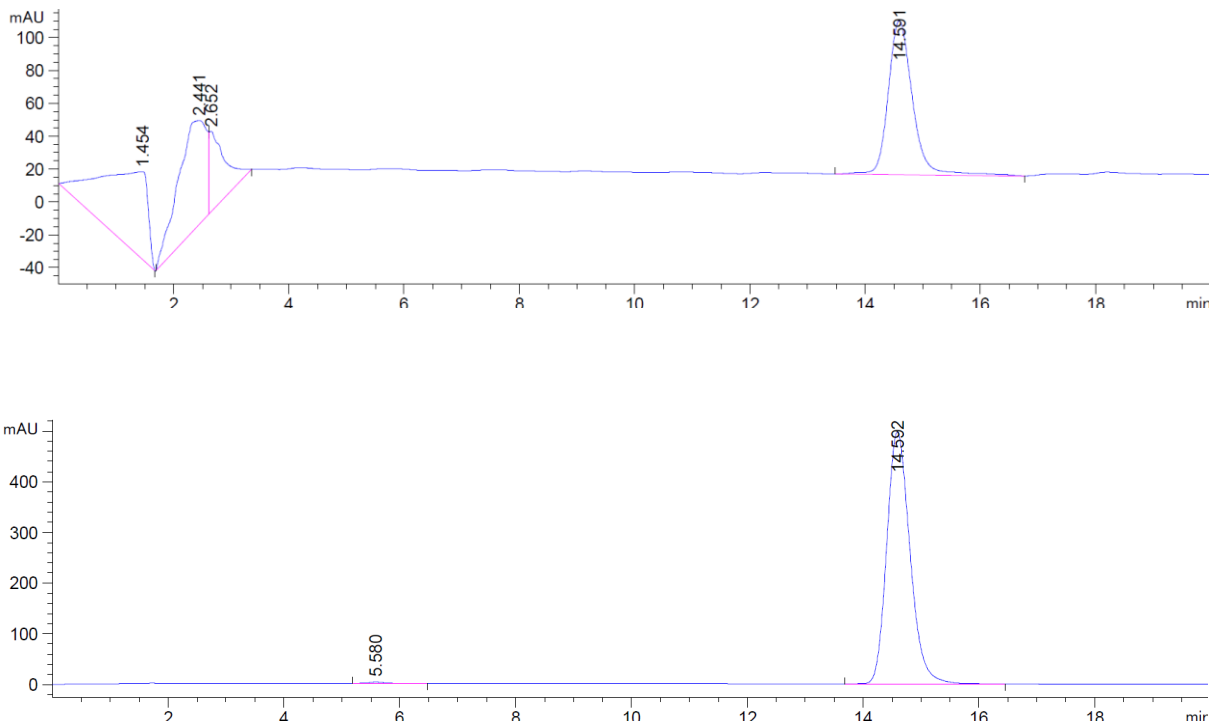


Abb. 4-10 HPLC-Chromatogramme von β -Glycyrrhetinsäure (Glyc; 0,5 mg/ml) bei $\lambda=210$ nm (oben) und $\lambda=254$ nm (unten)

Wie in Abb. 4-10 zu erkennen ist, ergeben sich bei der gewählten Konzentration sowohl bei 210 nm als auch bei $\lambda=254$ nm ausreichend große Peaks, die auch von ihren Integralen im Bereich der zu analysierenden Proben liegen. Anschließend wurden die in Tab. 4-6 zusammengefassten Verdünnungsreihen hergestellt und die resultierenden Glyc-Lösungen jeweils bei $\lambda=254$ nm und $\lambda=210$ nm vermessen.

Dadurch konnte bei beiden Wellenlängen der Bereich, in dem Bestimmungs- und Nachweisgrenze liegen, ermittelt werden. Für $\lambda=210$ nm lag dieser Bereich zwischen den Verdünnungen 1 und 2 und für $\lambda=254$ nm zwischen den Verdünnungen 3 und 4 (z.B. 300 μ l Verdünnung 3 plus 700 μ l EtOH, ergibt 3:7, oder 500 μ l Verdünnung 3 plus 500 μ l EtOH, ergibt 1:1). Zur genaueren Ermittlung wurden innerhalb dieser Intervalle weitere Verdünnungen hergestellt.

Tab. 4-6 Verdünnungsreihe der β -Glycyrrhetinsäure (Glyc) zur Ermittlung von Bestimmungs- und Nachweisgrenze (LOQ und LOD).

Stammlösung	Glyc. 0,52 mg/ml	1000 μ l	0 μ l
Verdünnungen	Konzentration mg/ml	Standard	EtOH
1	0,05	100 μ l	900 μ l
2	0,005	10 μ l	990 μ l
3	0,0005	100 μ l von 2	900 μ l
4	0,00005	100 μ l von 3	900 μ l
5	0,000005	100 μ l von 4	900 μ l

Entsprechend Abb. 4-11 liegt das S/N-Verhältnis bei Verdünnung 1 (0,05 mg/ml), 210 nm, bei 10,5. Um ein S/N von ca. 9 zu erreichen, muss die Verdünnung 1 nochmals 1:1 verdünnt werden, so dass sich für die Bestimmungsrenze eine Konzentration von 0,025 mg/ml bei $\lambda=210$ nm ergibt. Entsprechend den untenstehenden Chromatogrammen Abb. 4-12 und Abb. 4-13 ergibt sich eine Nachweisgrenze im Bereich von 0,005 mg/ml bei $\lambda=210$ nm (S/N von mindestens 3). Als problematisch erwies sich bei der Wellenlänge von $\lambda=210$ nm, dass die Pulse der Magnetventile des HPLC-Niederdruckmischers ebenfalls im Grundrauschen mit abgebildet wurden (regelmäßig wiederkehrendes Wellenmuster), wodurch die Sensitivität deutlich negativ beeinträchtigt wurde.

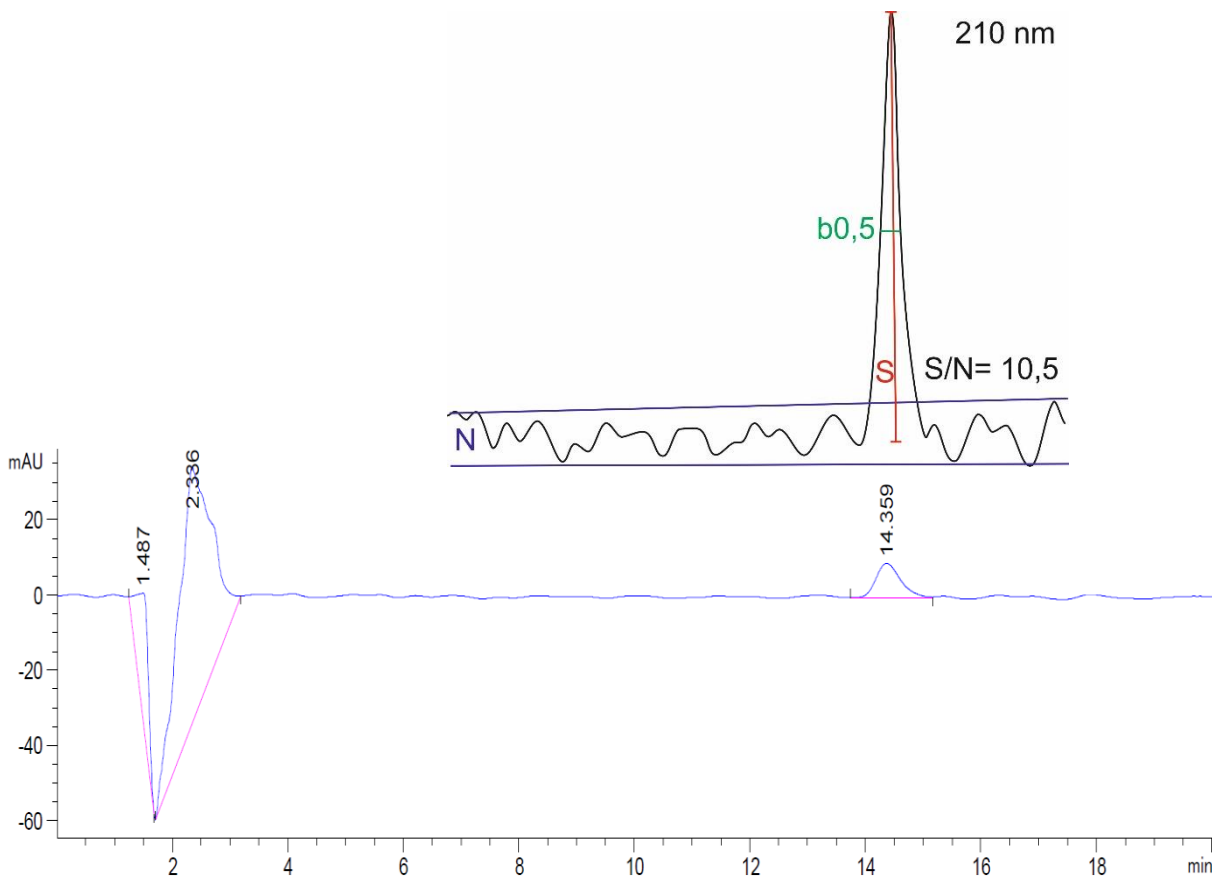


Abb. 4-11 HPLC-Chromatogramm der Glyc ($R_t=14,4$ min) in einer Konzentration von 0,05 mg/ml bei 210 nm zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze. Oben: Vergrößerung des Peaks. S: Signal; N: Rauschen (Noise), markiert durch oberen und unteren Begrenzungsbalken, b0,5: Peakbreite auf halber Höhe.

Da Glyc bei $\lambda=254$ nm eine wesentlich höhere spezifische Absorption hat als bei $\lambda=210$ nm, liegen die Bestimmungs- und Nachweisgrenze deutlich niedriger und befinden sich im Bereich zwischen den Verdünnungen 3 und 4 (Tab. 4-6), was Konzentrationen von 0,0005 – 0,00005 mg/ml entspricht (500 ng/ml – 50 ng/ml). Die zugehörigen Chromatogramme sind in Abb. 4-12 und Abb. 4-13 dargestellt.

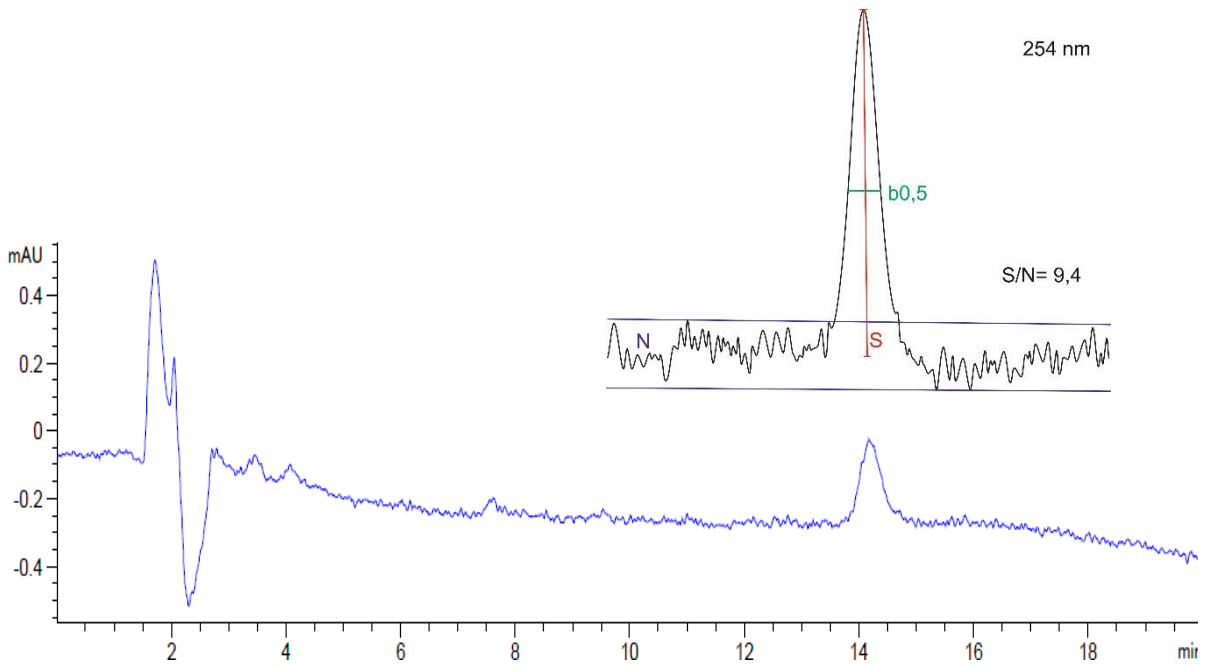


Abb. 4-12 HPLC-Chromatogramm der Glyc ($R_t=14,4$ min) in einer Konzentration von 0,00025 mg/ml bei $\lambda=254$ nm zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze. Oben: Vergrößerung des Peaks. S: Signal; N: Rauschen (Noise), markiert durch oberen und unteren Begrenzungsbalken, $b_{0,5}$: Peakbreite auf halber Höhe.

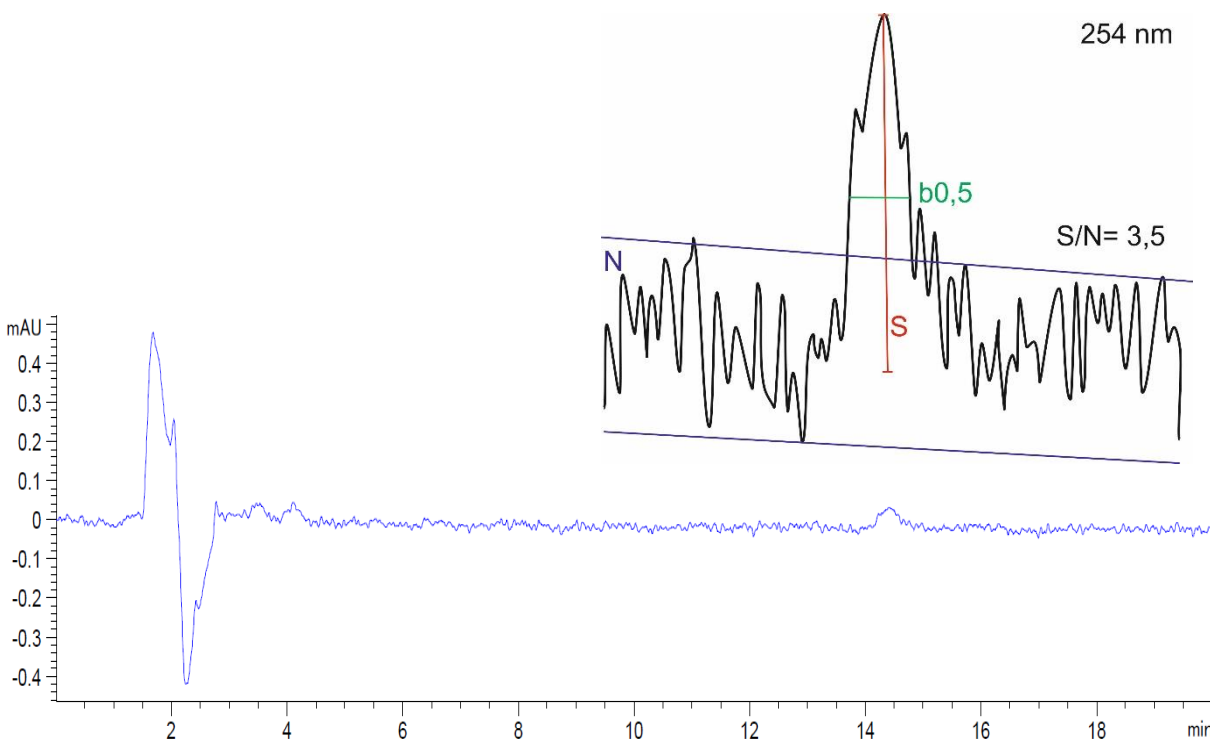


Abb. 4-13 HPLC-Chromatogramm der Glyc ($R_t=14,4$ min) in einer Konzentration von 0,00005 mg/ml bei $\lambda=254$ nm zur Ermittlung der Nachweisgrenze. Oben: Vergrößerung des Peaks. S: Signal; N: Rauschen (Noise), markiert durch oberen und unteren Begrenzungsbalken, $b_{0,5}$: Peakbreite auf halber Höhe.

Gut ermittelbar und von besonderer Wichtigkeit ist die Bestimmungsgrenze (LOQ) bei $\lambda=254$ nm, die sich relativ sauber bestimmen lässt (Abb. 4-12). Um das erhaltene Ergebnis zu verifizieren, wurde die Messung 7-mal wiederholt und in gleicher Weise ausgewertet (Tab. 4-7). Da bei solchen Messungen immer mit Ausreißern gerechnet werden muss, wurde der Median ermittelt, welcher bei $S/N=9,6$ liegt. Der arithmetische Mittelwert liegt unwesentlich höher bei 10,1 und die Standardabweichung bei 0,99. Damit kann die ermittelte Bestimmungsgrenze als abgesichert gelten.

Tab. 4-7 Zusammenfassung der Vielfachmessungen zur Bestimmung des S/N

Messung	S/N
Messung 1	9,1
Messung 2	10,6
Messung 3	9,4
Messung 4	9,6
Messung 5	9,6
Messung 6	12,2
Messung 7	10,6
Messung 8	10,0
Median/Mittelwert	9,6/10,1
Standardabweichung	0,99

Zusammenfassend ergeben sich aus den Messungen mit Referenzsubstanzen und den Verdünnungsreihen mit Glyc folgende Leistungsparameter (Tab. 4-8):

Tab. 4-8 Zusammenfassung der Leistungsparameter des verwendeten HPLC-Systems

	210 nm	254 nm
SST über β -KBA / β -Glyc	$\geq 1,30$	$\geq 1,30$
LOQ β -Glyc [$\mu\text{g/ml}$]	25	0,25
LOD β -Glyc [$\mu\text{g/ml}$]	5	0,05

4.3.3 Berechnung der Response-Faktoren (RF)

Das Prinzip des „Internen Standards“ (IST) bei quantitativen HPLC-Bestimmungen setzt voraus, dass es einen Umrechnungsfaktor zwischen dem IST, in unserem Falle Glyc, und den zu bestimmenden Substanzen, vornehmlich Triterpensäuren, gibt. Dafür ist es erforderlich, dass

innerhalb der Methodenentwicklung möglichst viele der zu bestimmenden Substanzen in kleinen Mengen als Standards zur Verfügung stehen. Innerhalb dieser Untersuchungen konnten 6 der Substanzen in Reinform kommerziell erworben werden (α und β -BA, β -KBA, AKBA, AdBA, O-TA), wobei von diesen Standards die beiden Boswelliasäuren (BAs) als chromatographisch trennbares Isomerengemisch vorlagen, jedoch die α - und β - Isomere anhand von Vergleichschromatogrammen sicher zugeordnet werden konnten.

Von allen Substanzen wurden zunächst Kalibrationsmessungen (3-fach-Messungen) bei 5 verschiedenen Konzentrationen und den Wellenlängen $\lambda=254$ nm sowie $\lambda=210$ nm durchgeführt. Bis auf den IST Glyc erfolgte die finale Auswertung bei der jeweils besseren Wellenlänge, wobei in der Zusammenfassung Tab. 4-9 gut zu erkennen ist, dass einige Substanzen bei beiden Wellenlängen quantitativ ausgewertet werden können. Nachfolgend sind in den Abb. 4-14 bis 4-20 die jeweiligen Kalibrationsgeraden dargestellt.

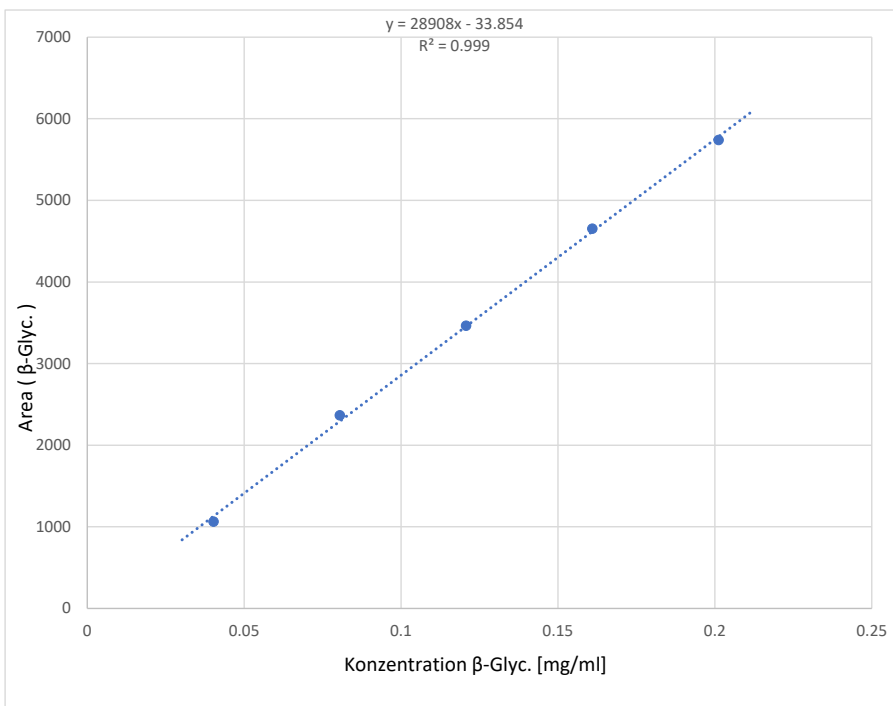


Abb. 4-14 Kalibrationsgerade (Beispiel) der Glyc bei $\lambda=254$ nm (jeweils 3-fach-Messungen)

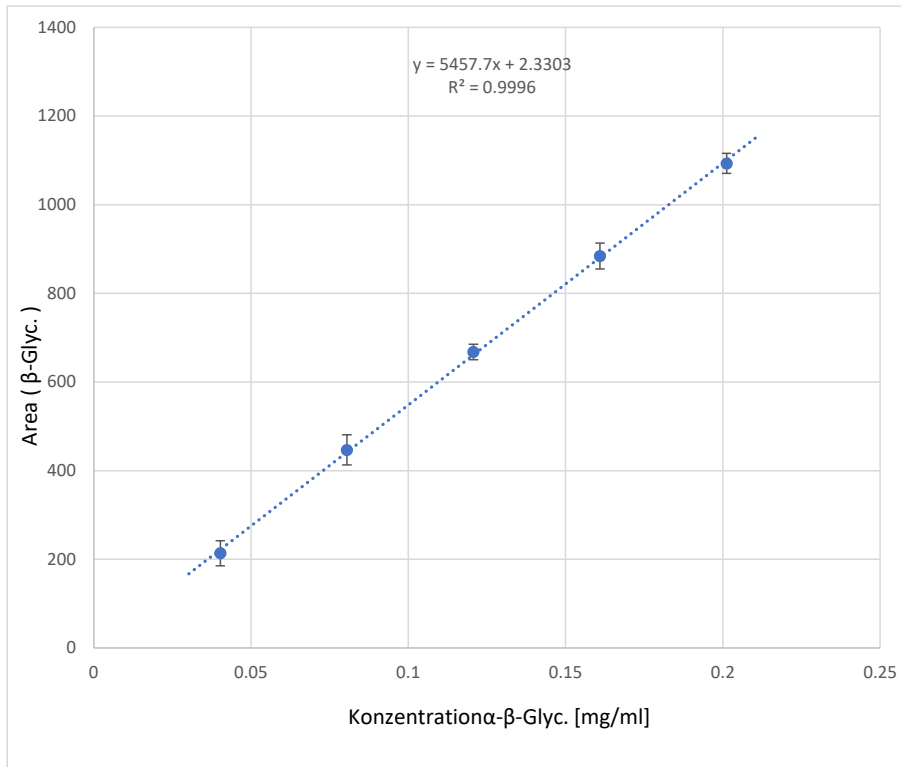


Abb. 4-15 Kalibrationsgerade (Beispiel) der Glyc bei $\lambda=210$ nm (jeweils 3-fach-Messungen)

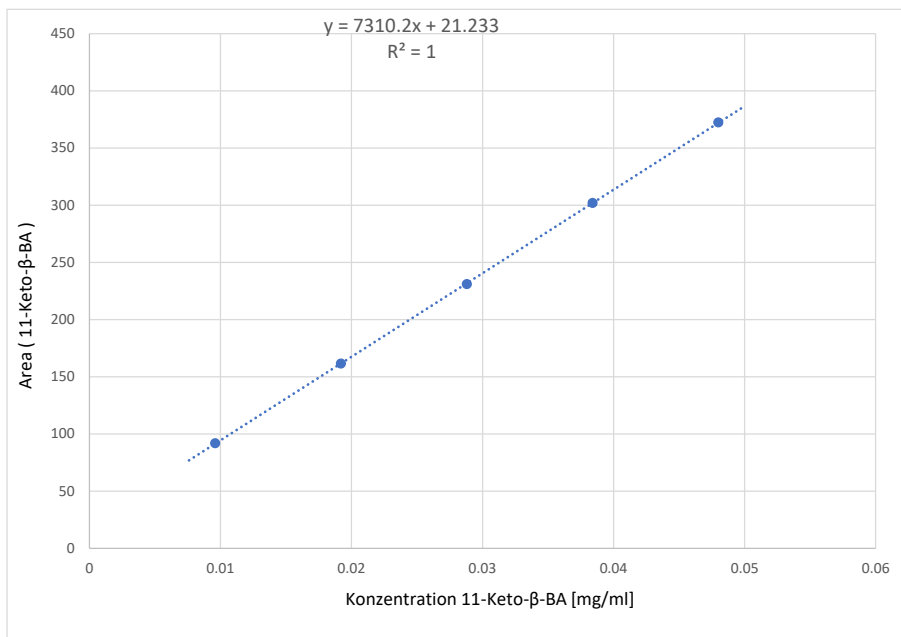


Abb. 4-16 Kalibrationsgerade (Beispiel) der 11-Keto-β-BA bei $\lambda=254$ nm (jeweils 3-fach-Messungen)

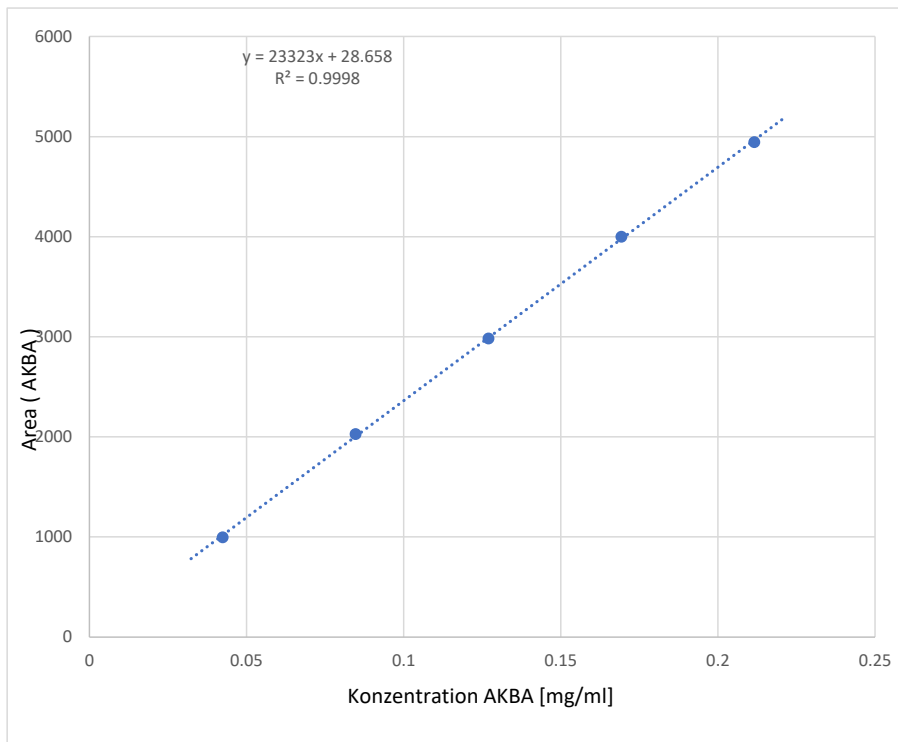


Abb. 4-17 Kalibrationsgerade (Beispiel) der AKBA bei $\lambda=254$ nm (jeweils 3-fach-Messungen)

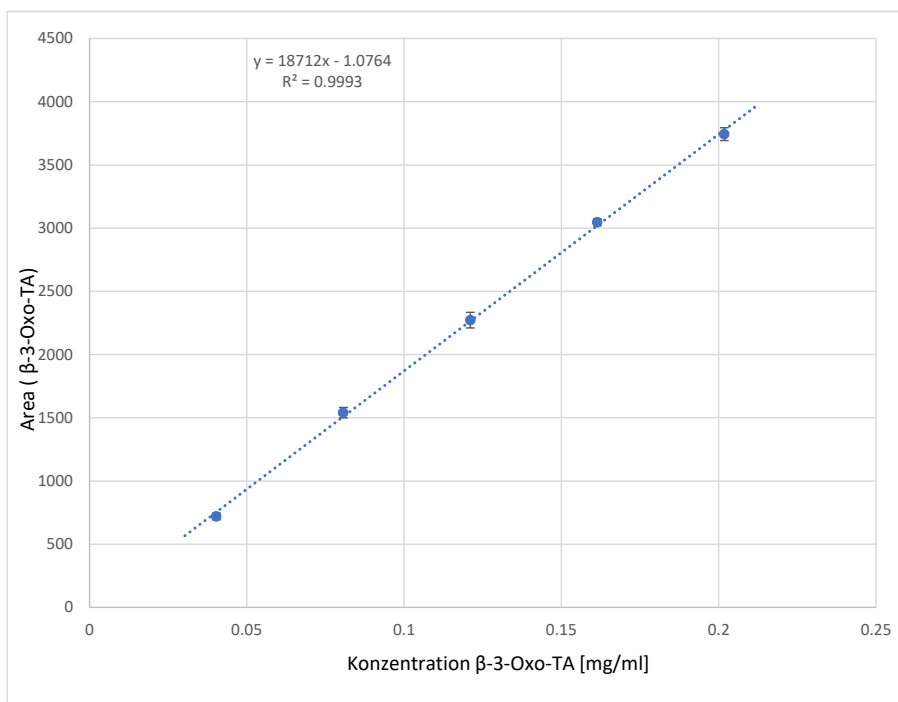


Abb. 4-18 Kalibrationsgerade (Beispiel) der 3-Oxo-tirucallensäure (3-O-TA) bei $\lambda=210$ nm (jeweils 3-fach-Messungen)

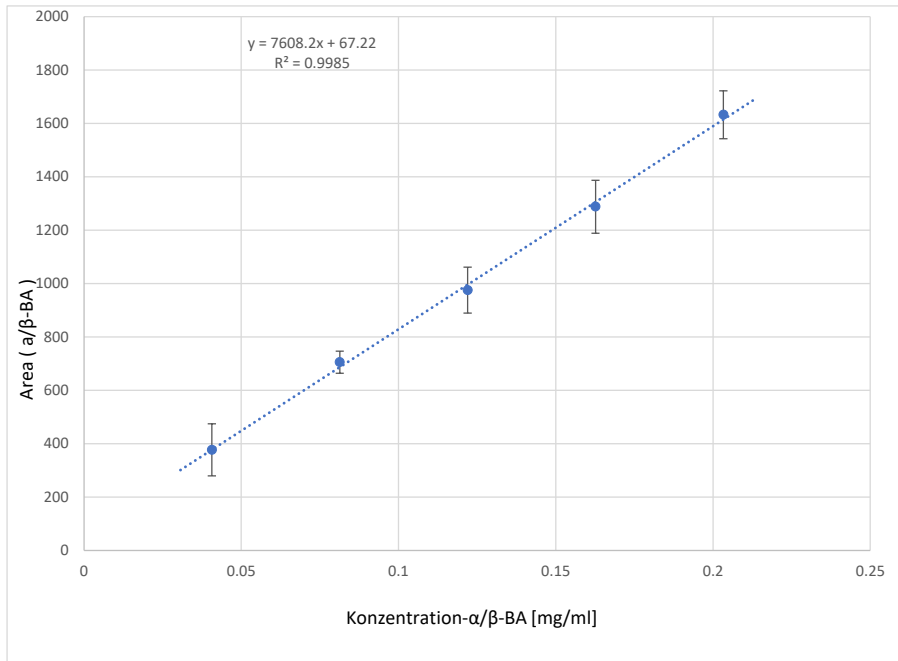


Abb. 4-19 Kalibrationsgerade (Beispiel) der α/β-BA bei λ=210 nm (jeweils 3-fach-Messungen)

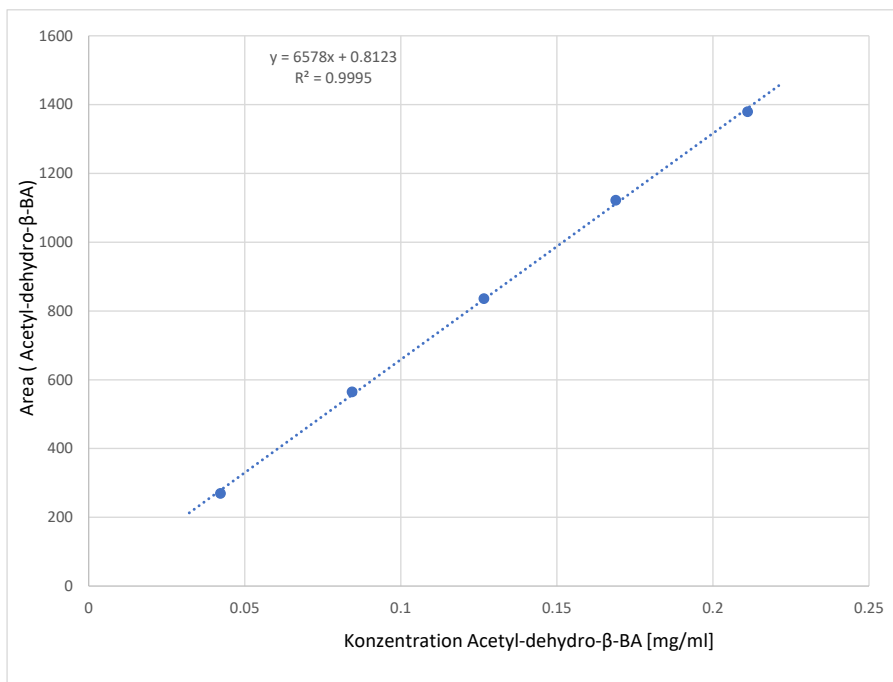


Abb. 4-20 Kalibrationsgerade (Beispiel) der Ac-dehydro-β-BA (Ad-β-BA) bei λ=254 nm (jeweils 3fach-Messungen)

Tab. 4-9 Zusammenfassung der Ergebnisse aus allen Kalibrationsmessungen, wobei „a“ den Achsenabschnitt der Kalibrationsgleichung wiedergibt und „St“ die Steigung der Kalibrationsgerade. „Konz.“ gibt die Konzentration der eingesetzten Stammlösung an, die etwa bei 0,2 mg/ml liegen sollte. Bei Keto-β-BA konnte nur etwa 0,05 mg/ml erreicht werden, da nicht mehr Referenzmaterial zur Verfügung stand. Da Keto-β-BA aber üblicherweise in geringen Mengen in den Analysen vorkommt, sollte dieses die Präzision der Ergebnisse nur unwesentlich beeinflussen.

	Substanz	M _G	a / 254 nm	St / 254 nm	a / 210 nm	St / 210 nm	Konz. [mg/ml]
Kalibration 1	β-Glyc	470,69	-33,854	28907,938	2,33	5457,7	0,2012
Kalibration 2	α/β-BA	456,71	***	***	67,220	7664,709	0,2033
Kalibration 3	Keto-β-BA	470,69	-12,133	33610,128	21,330	7310,200	0,048
Kalibration 4	β-AKBA	512,73	19,927	24346,224	335,01	4240,9	0,2116
Kalibration 5	Ad-β-BA	496,73	9,606	6545,957	-52,91	4142,7	0,2111
Kalibration 6	3-O-TA	454,68	***	***	31,323	18728,104	0,2018

Die weiteren Berechnungen wurden mit den in Tab. 4-9 zusammengefassten Werten durchgeführt. Beispielsweise beträgt der numerische Wert für die Steigung der Kalibriergerade vom internen Standard Glyc bei

$$\lambda = 210 \text{ nm} = 5457,7 \text{ und bei } \lambda = 254 \text{ nm} = 28907,9.$$

Um nun die anderen Substanzen auf Glyc zu referenzieren, wird folgende Formel zur Ermittlung der Response Faktoren (RF) angewandt:

$$RF = \frac{\text{Steigung (Glyc)}}{\text{Steigung (Referenzsubstanz)}}$$

Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tab. 4-10 zusammengefasst. Für die spätere Auswertung wird jeweils die Wellenlänge genommen, bei der der numerische Wert der Steigung höher ist. Dieses erlaubt eine sensitive Auswertung, da die Sensitivität einer Messmethode proportional mit der Steigung der Kalibrationsgerade zunimmt. Aus diesem Grunde sind auch die Messungen des IST Glyc bei $\lambda=210$ nm deutlich unempfindlicher als bei $\lambda=254$ nm (vergleiche Tab. 4-8).

Tab. 4-10 Zusammenfassung der RF-Werte, ermittelt über die Steigung der Kalibrationsgeraden.

Einheit [mg/ml]	Substanz	R-Faktor Steigung 254 nm	R-Faktor Steigung 210 nm
Kalibration 1	Glyc	1.00	1.00
Kalibration 2	α/β -BA		0.71
Kalibration 3	β -KBA	0.86	
Kalibration 4	β -AKBA	1.19	
Kalibration 5	Ad- β -BA	4.42	
Kalibration 6	3-O-TA		0.29

Alternativ besteht die Möglichkeit, die RF über die normierte Fläche bei einer bestimmten Konzentration zu berechnen; dazu wurden die unverdünnten Stammlösungen der Referenzsubstanzen verwendet (jeweils 3-fach-Messung). Für die fiktive Konzentration von 1 mg/ml gilt:

$$\text{Area (Substanz)} = \frac{\text{Area (Subs.)}}{\text{Einwaage (Subs.)}} \quad \text{Korrigierte Area (IST)} = \frac{\text{Area (IST)}}{\text{Einwaage (IST)}}$$

Somit ergibt sich folgende Berechnungsformel für den RF, abgeleitet aus den Peak-Flächen (Area):

$$\text{RF} = \frac{\text{Area (IST)} \times \text{Einwaage (Subs.)}}{\text{Area (Subs.)} \times \text{Einwaage (IST)}}$$

Tab. 4-11 Zusammenfassung der Berechnungen zu den RF-Werten. IST: Interner Standard, in diesem Falle Glyc.

Substanz	Konz. [mg/ml]	Area [Mittelwert] (bis auf Glyc. immer besser passende Wellenlänge)	RF über Steigung $\lambda=254$ nm	RF über Steigung $\lambda=210$ nm	RF über Area $\lambda=254$ nm	RF über Area $\lambda=210$ nm
Glyc (IST) (254 nm)	0,2012	5737,206	1,00		1,00	
β -Glyc (210 nm)	0,2012	1093,137		1,00		1,00
α/β -BA	0,2033	1632,156		0,71		0,68
Keto- β -BA	0,0480	1588,248	0,86		0,86	
β -AKBA	0,2116	4945,171	1,19		1,22	
Ad- β -BA	0,2111	1379,069	4,42		4,36	
3-O-TA	0,2018	3743,477		0,29		0,29

Die erhaltenen Werte sind, zusammen mit den Berechnungen aus der Steigungs-Methode (Tab. 4-10), vergleichend in Tab. 4-11 aufgelistet. Bei einer gut validierten Methode, wie das bei den vorliegenden Untersuchungen der Fall ist, ergeben sich nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Berechnungsmethoden, so dass bei beiden Verfahren zur Ermittlung des RF-Wertes als gleichwertig angesehen werden können.

Wie bereits exemplarisch weiter oben in Kapitel 4.3.2 erörtert, können über die RF-Werte auch die LOD und LOQ der weiteren Substanzen näherungsweise ermittelt werden. Dieses ist für die Bestimmungsgrenze (LOQ) in Tab. 4-12 zusammengefasst. Man kann gut erkennen, dass bei $\lambda=254$ nm wesentlich sensitivere Messungen als bei $\lambda=210$ nm möglich sind (bei 254 nm deutlich niedrigerer LOQ als bei 210 nm).

Tab. 4-12 Zusammenfassung der Bestimmungsgrenzen (LOQ), abgeleitet von Tabelle 4-8 und den RF-Werten aus Tab. 4-11.

Substanz	LOQ (Steigung) $\lambda=254$ nm [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ (Steigung) $\lambda=210$ nm [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ (Area) $\lambda=254$ nm [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ (Area) $\lambda=210$ nm [$\mu\text{g/ml}$]
Glyc (254 nm und 210 nm)	0,25	25	0,25	25
α/β -BA		18		17
Keto- β -BA	0,22		0,22	
β -AKBA	0,30		0,31	
Ad- β -BA	1,11		1,09	
3-O-TA		7		7

Für die anderen Säuren, deren Gehalt in den untersuchten Weihrauchharzen unbekannt war, wurden weitere Korrekturfaktoren (Kor.-F.) über ihre molekulare Masse erstellt, um eine spätere quantitative Bestimmung zu erlauben. Die Berechnung passender Kor.-F. hätte relativ präzise erfolgen können, wenn in der zur Verfügung stehenden Literatur die spezifischen Absorptionen $\epsilon_{(\lambda)}$ zur Verfügung gestanden hätten, was aber leider nicht der Fall ist.

Deshalb wurde folgender Ansatz gewählt:

- 1) Zunächst wurden die Substanzen, für die keine Standards zur Verfügung standen, die verfügbaren Referenzsubstanzen (α/β -BA, Keto- β -BA, β -AKBA, Ad- β -BA, 3-O-TA) zugeordnet, zu denen sie die größtmögliche molekulare Ähnlichkeit haben und auch bei der gleichen Wellenlänge quantitativ ausgewertet werden können. Beispiel aus Tab. 4-1: Substanz Nr. 7 (11-OH-BA) unterscheidet sich nur durch eine Hydroxygruppe von α/β -BA, wobei die Hydroxygruppen keinen signifikanten Einfluss auf die UV-spektroskopischen Eigenschaften bei $\lambda=210$ nm haben. Deshalb kann näherungsweise 11-OH-BA über die Kalibrationsgerade von α/β -BA bestimmt werden ODER unter Verwendung des RF von α/β -BA über den IST Glyc bestimmt werden, wobei das Ergebnis um den Quotienten aus den beiden Molekulargewichten korrigiert werden muss. Der Zusammenhang ist in den nachfolgenden Formeln wiedergegeben, wobei sich RF(neu) auf die zu bestimmende Substanz bezieht:

$$RF(\text{neu}) = \frac{RF(\text{Standard}) \times MG(\text{zu bestimmende Subst.})}{MG(\text{Standard})}$$

- 2) Da für die in Kapitel 4.3.4 erörterten Gehaltsberechnungen die Kalibrationsgeraden für alle verfügbaren Referenzen bereits erstellt wurden, kann auf eine Berechnung über den IST und den RF verzichtet werden; es wird lediglich der Quotient der M_G s aus den jeweiligen Substanzen und des jeweiligen Standards benötigt, um das über die Regressionsgleichung erzielte Ergebnis stoffspezifisch zu korrigieren. Diese Kor.-F. sind in den nachfolgenden Tab. 4-13 bis 4-15 zusammengefasst.

Tab. 4-13 Triterpensäuren, die näherungsweise über die α/β -BA-Referenz quantifiziert werden können, wobei die Messungen bei $\lambda=210$ nm durchgeführt wurden. Die Nummerierung der Substanzen bezieht sich auf die Einleitung, Abb. 1-11 bis 1-15. Der Kor.-F. bildet den Quotienten der jeweiligen Molekulargewichte ab.

NR.	Substanz	M_G g/mol	Kor.-F.
7	11-OH-BA	472,71	1,035
8	11-OH-ABA	514,75	1,127
13	LA	456,71	1,000
24	Robursäure	440,71	0,965
6	11-OMe-ABA	528,77	1,158
14	ALA	498,75	1,092
8	11- β -OH-3-ABA	514,75	1,092

Tab. 4-14 Triterpensäuren, die näherungsweise über die β -KBA-Referenz quantifiziert werden können, wobei die Messungen bei $\lambda=254$ nm durchgeführt wurden. Die Nummerierung der Substanzen bezieht sich auf die Einleitung, Abb. 1-11 bis 1-15. Der Kor.-F. bildet den Quotienten der jeweiligen Molekulargewichte ab.

NR.	Substanz	M_G g/mol	Kor.-F.
26	Keto-Robursäure	454,70	0,966
27	Dihydro-keto-robursäure	456,71	0,970

Tab. 4-15 Triterpensäuren, die näherungsweise über die 3-O-TA-Referenz quantifiziert werden können, wobei die Messungen bei $\lambda=210$ nm durchgeführt wurden. Die Nummerierung der Substanzen bezieht sich auf die Einleitung, Abb. 1-11 bis 1-15. Der Kor.-F. bildet den Quotienten der jeweiligen Molekulargewichte ab.

NR.	Substanz	M _G g/mol	Kor.-F.
28	RA	470,71	1,034
29	Dehydro-RA	468,71	1,029
11	Dehydro- β -BA	454,68	1,000
18	α -TA	456,71	1,005
19	β -TA	456,71	1,005
22	7-24-Dien-TA	456,71	1,005
23	α/β -Ac-8,24-dien-TA	498,75	1,097

Mit den in diesem Kapitel beschriebenen Berechnungsmethoden steht ein leistungsfähiges Instrumentarium zur Verfügung, Weihrauch-Proben umfassend zu untersuchen, auch wenn nicht für alle Substanzen als Standards, bzw. als Referenzen verfügbar sind.

4.3.4 Quantitative Analyse der einzelnen Extrakte

Die in Kapitel 4.1 erhaltenen Extrakte wurden anschließend mittels HPLC analysiert und quantitativ ausgewertet; dabei wurden alle Messungen mindestens im Triplikat durchgeführt. Vor den Messungen wurde der IST Glyc in gleichbleibender Menge zugesetzt. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Kalibrationsgeraden nachfolgenden Formeln, die gegebenenfalls um den molaren Kor.-F sowie den RF ergänzt werden kann (für Details siehe Kap. 4.3.3).

Kalibrationsgerade: y [Fläche] = $a + x$ [Gehalt mg/ml] * s [Steigung]

$$\text{Gehalt [mg/ml]} = \frac{(y-a)}{s}$$

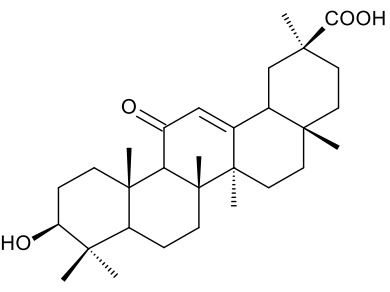
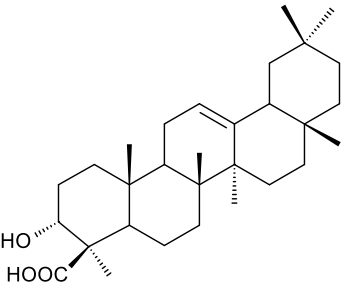
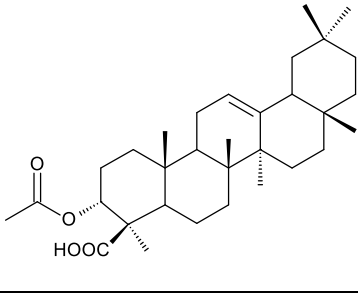
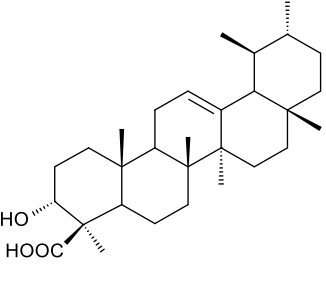
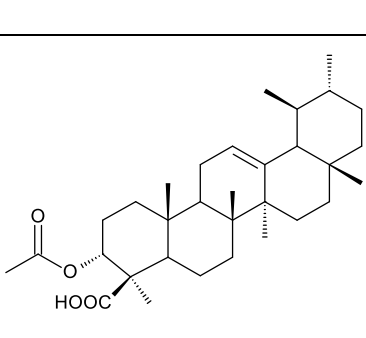
Da für den IST Glyc auch eine Kalibrationsgerade erstellt wurde (Abb. 4-14, 4-15), konnte zunächst überprüft werden, ob dessen Zugabe fehlerfrei erfolgte bzw. systematische Fehler vorlagen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-16 zusammengefasst. Sichtbar ist ein leichter Abfall der Konzentrationen, was durch geringfügige Kristallisation des schlecht löslichen Glyc erklärt werden kann. Die Proben wurden über mehrere Wochen in der Reihenfolge Extrakt 1 bis 9 vermessen. Da der Abfall der β -Glyc-Konzentration über die Zeit aber gering ist (vergl. Abb. 5-7), dürften sich die daraus bedingten Abweichungen bei den Gehaltsberechnungen in Grenzen halten.

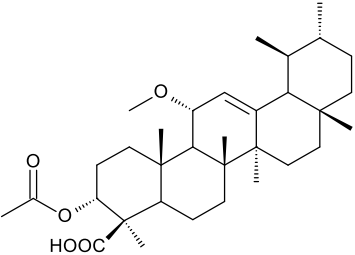
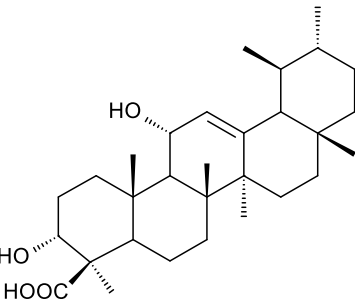
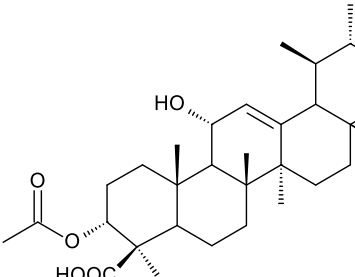
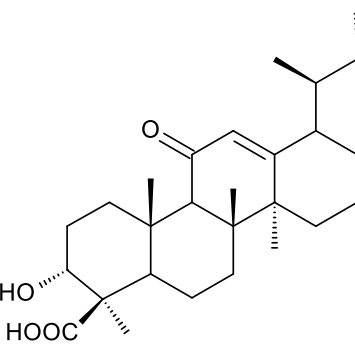
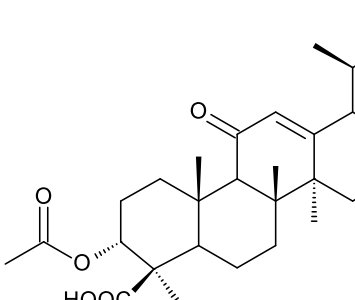
Tab. 4-16 Bestimmung des IST Glyc in den Proben 1-9 über die Kalibrationsfunktion, die in Abb. 4-14 wiedergegeben ist. STABW: Standardabweichung.

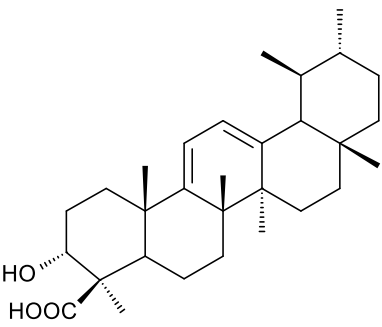
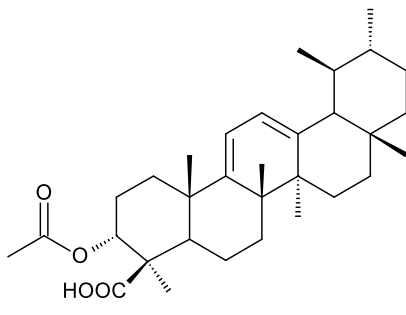
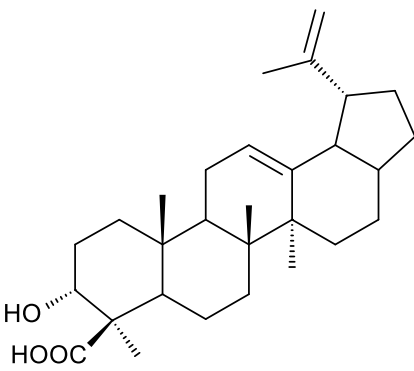
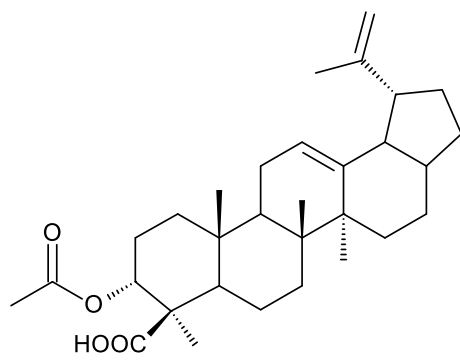
	β -Glyc. [%]	STABW
Extrakt 1	2.44	0.0017
Extrakt 2	2.39	0.0044
Extrakt 3	2.35	0.0054
Extrakt 4	2.34	0.0003
Extrakt 5	2.37	0.0013
Extrakt 6a	2.37	0.0056
Extrakt 6b	2.37	0.0033
Extrakt 7	2.27	0.0052
Extrakt 8	2.37	0.0033
Extrakt 9	2.27	0.0060

In der nachfolgenden Tab. 4-17 sind die Triterpensäuren mit den zugehörigen Retentionszeiten (Rt) aufgelistet, die bei der quantitativen Auswertung berücksichtigt wurden. Dabei beziehen sich die Rt-Werte auf die Agilent-HPLC-Anlage (Serie 1100), welche für die quantitativen Bestimmungen verwendet wurde.

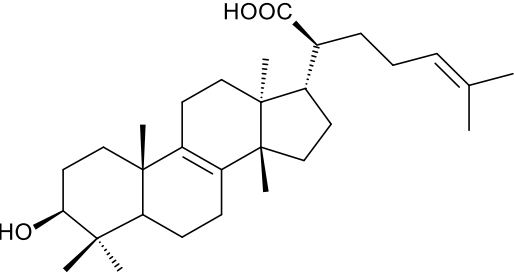
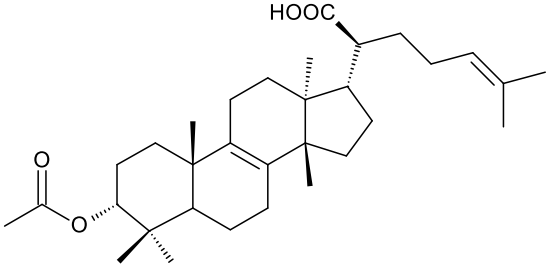
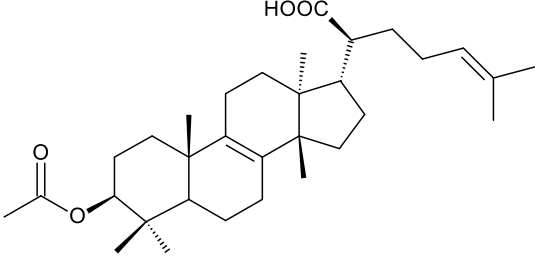
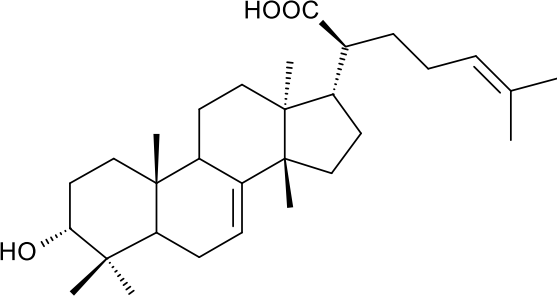
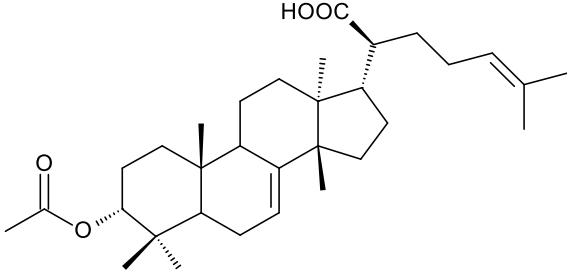
Tab. 4-17 Retentionszeiten der in den Abb. 1-11 bis Abb. 1-15 genannten Triterpensäuren

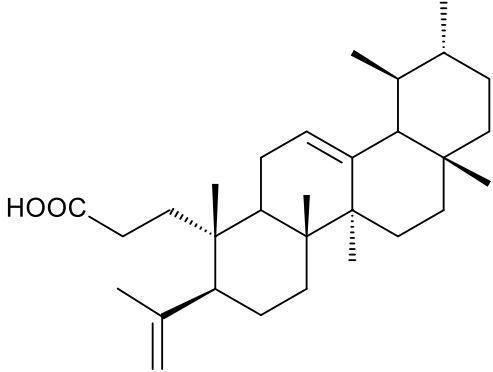
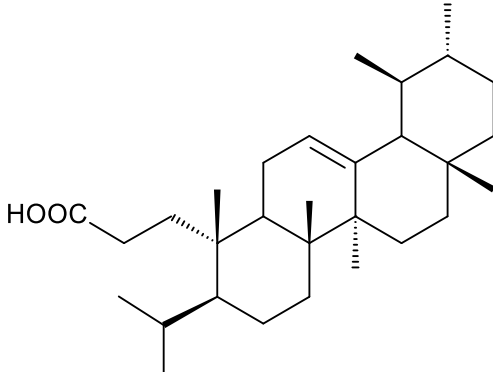
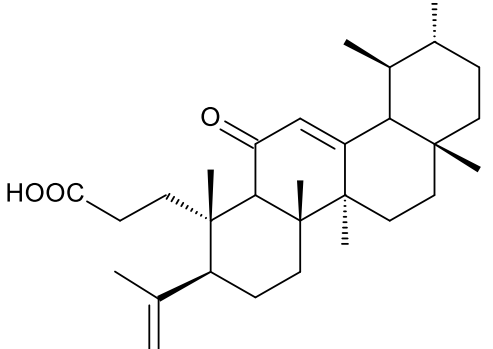
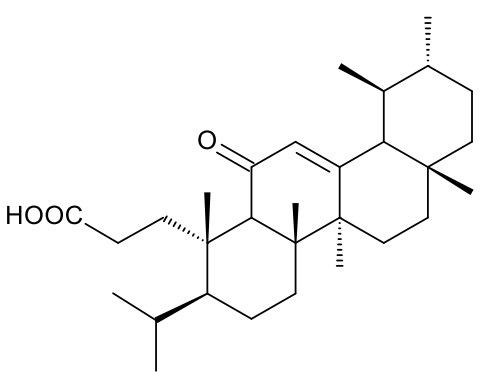
Substanz	Retentionszeit [min]	Strukturformel
18- β -Glycyrrhetinsäure (β -Glyc) M_G : 470,69 g/mol	14,2	
3- α -Hydroxy- α -boswelliasäure (α -BA) M_G : 456,71 g/mol	34,2	
3- α -O-Acetyl- α -boswelliasäure (α -ABA) M_G : 498,75 g/mol	42,3	
3- α -Hydroxy- β -boswelliasäure (β -BA) M_G : 456,71 g/mol	36,0	
3- α -O-Acetyl- β -boswelliasäure (β -ABA) M_G : 498,75 g/mol	44,0	

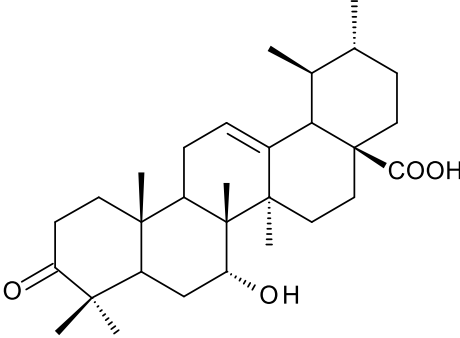
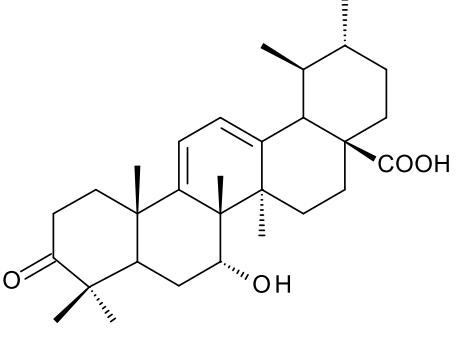
Substanz	Retentionszeit [min]	Strukturformel
3- α -O-Acetyl-11- α -methoxy- β -boswelliasäure (11-OMe- β -ABA) M_G : 528,77 g/mol	38,8	
3- α -Hydroxy-11- α -hydroxy- β -boswelliasäure (11-OH- β -BA) M_G : 472,71 g/mol	21,4	
3- α -O-Acetyl-11- α -hydroxy- β -boswelliasäure (11-OH- β -ABA) M_G : 514,75 g/mol	27,6	
3- α -Hydroxy-11-keto- β -boswelliasäure (β -KBA) M_G : 470,69 g/mol	21,9	
3- α -O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (β -AKBA) M_G : 512,73 g/mol	28,6	

Substanz	Retentionszeit [min]	Strukturformel
3- α -Hydroxy-9,11-dehydro- β -boswelliasäure (9,11-dehydro- β -BA) M_G : 454,68 g/mol	28,3	
3- α -O-Acetyl-9,11-dehydro- β -boswelliasäure (Ad- β -ABA) M_G : 496,73 g/mol	44,7	
Lupansäure (LA) M_G : 456,71 g/mol	32,1	
3- α -Acetyl-lupansäure (ALA) M_G : 498,75 g/mol	39,9	

Substanz	Retentionszeit [min]	Strukturformel
3- α -O-Acetyl-27- α -hydroxy-lupansäure (27-OH-ALA) M_G : 514,75 g/mol	37,1	
3- α -O-Acetyl-28- β -hydroxy-lupansäure (28-OH-ALA) M_G : 514,75 g/mol	3,3	
3-Oxo-8,24-dien-tirucallensäure (3-O-TA) M_G : 454,68 g/mol	30,0	
3- α -Hydroxy-8,24-dien-tirucallensäure (α -TA) M_G : 456,71 g/mol	29,4	

Substanz	Retentionszeit [min]	Strukturformel
3- β -Hydroxy-8,24-dien- tirucallensäure (β -TA) M_G : 456,71 g/mol	28,9	
3- α -O-Acetyl-8,24-dien- tirucallensäure (α -ATA) M_G : 498,75 g/mol	33,7	
3- β -O-Acetyl-8,24-dien- tirucallensäure (β -ATA) M_G : 498,75 g/mol	35,3	
3- α -Hydroxy-7,24-dien- tirucallensäure (α -7,24-dien-TA) M_G : 456,71 g/mol	30,9	
3- α -O-Acetyl-7,24-dien- tirucallensäure (α -Ac-7,24-dien-TA) M_G : 498,75 g/mol	39,6	

Substanz	Retentionszeit [min]	Strukturformel
Robursäure M _G : 440,71 g/mol	38,2	
4(23)-Dihydro-robursäure M _G : 442,73 g/mol	38,6	
11-Keto-robursäure M _G : 454,70 g/mol	21,3	
4(23)-Dihydro-11-keto-robursäure M _G : 456,71 g/mol	37,4	

Substanz	Retentionszeit [min]	Strukturformel
7 α -Hydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic-acid Rubiniasäure (RA) M_G : 470,71 g/mol $C_{30}H_{46}O_4$	25,1	
Dehydro-rubiniasäure (dehydro-RA) M_G : 468,71 g/mol $C_{30}H_{44}O_4$	26,2	

Wie in Kapitel 4.3.3 ausführlich beschrieben, wurden Substanzen, für die keine Standards vorliegen, auf die nächst verwandten Triterpensäuren mit vergleichbaren UV-spektroskopischen Eigenschaften referenziert und die Ergebnisse mit den Quotienten aus den Molekulargewichten korrigiert (siehe Kap. 4.3.3). Wie in Kapitel 4.2 bereits erörtert, befinden sich auch Terpene als Neutralsubstanzen in den Extrakten; diese Terpene hätten eigentlich durch die Aufreinigung der Proben entfernt werden müssen, was aber offensichtlich nicht vollständig der Fall war. Auch wenn derartige Substanzen gelegentlich detektierbar sind, fokussiert sich die nachfolgende Auswertung auf die oben genannten Triterpensäuren. Es muss aber angemerkt werden, dass die meisten dieser Triterpensäuren bei den einzelnen Proben nur in Spuren oder gelegentlich auch gar nicht nachweisbar waren, wobei es zwischen den Proben große individuelle Unterschiede gibt.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Extrakte vorgestellt. Dabei werden zur besseren und eindeutigen Verständlichkeit die Triterpensäuren mit den allgemein üblichen Trivialnamen und nicht mit den Abkürzungen aufgelistet sowie diskutiert; die in der internationalen Literatur üblichen Abkürzungen, wie in Tab. 4-17 zusammengestellt, sind nicht immer selbsterklärend und werden uneinheitlich verwendet.

Extrakt 1

Laut Angaben der Bezugsquelle (A. Galke) soll es sich bei der Probe 1 um „Indischen Weihrauch“, Bezugsdatum 25.06.2018, Ch/Lot: 3196, Spezies *B. serrata*, handeln.

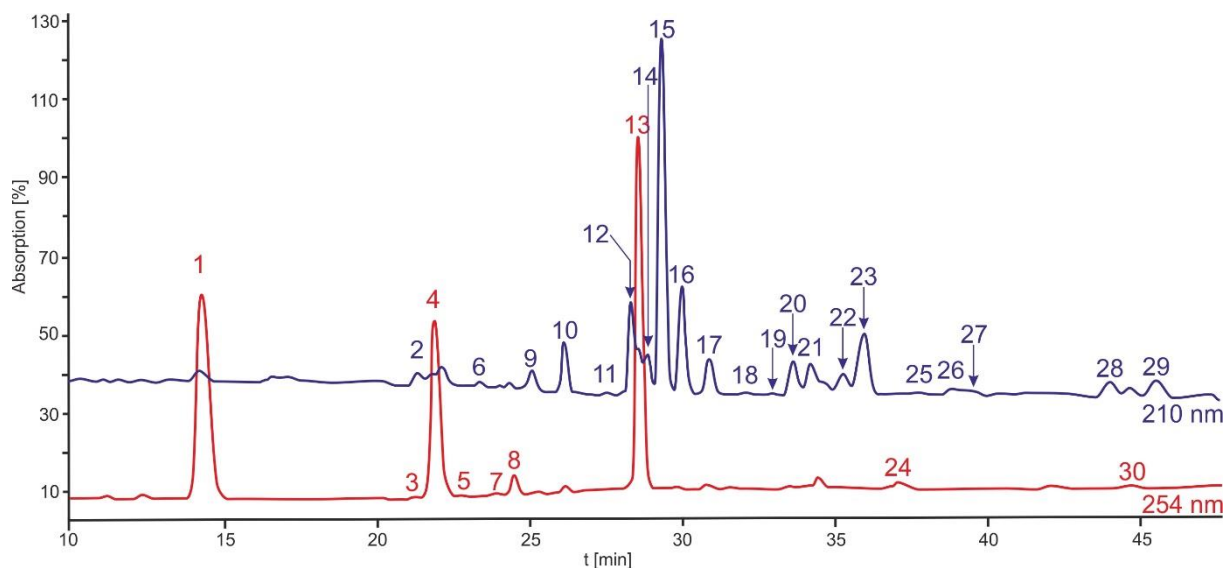


Abb. 4-21 Musterchromatogramm des Extraktes 1. Folgende Substanzen konnten identifiziert werden: **1.** β -Glyc, **2.** 11-OH-BA **3.** 11-Keto-Robursäure, **4.** KBA, **5.** Nicht identifiziert, M_G 456,71, **6.** Incensol, **7.** Iso-Serratol, **8.** 11-Keto- α -BA, **9.** RA, **10.** Dehydro-RA, **11.** 11-OH-ABA / 210 nm, **12.** 9,11-dehydro- β -BA, **13.** AKBA, **14.** β -TA, **15.** α -TA, **16.** 3-Oxo- β -TA, **17.** 7-24-Dien-TA, **18.** LA, **19.** $C_{15}H_{26}O$, Sesquiterpen z.B. Cubenol, **20.** α -Ac-8,24-dien-TA, **21.** α -BA, **22.** β -Ac-8,24-dien-TA, **23.** β -BA, **24.** Keto-dihydro-robursäure, **25.** Robursäure, **26.** OMe-ABA, **27.** 3-O-Ac-LA, **28.** α -ABA, **29.** β -ABA, **30.** Ad- β -BA. Zuordnung der Abkürzungen siehe Tab. 4-17.

Tab. 4-18 Zusammenfassung der Aufreinigung des Extraktes, alle Werte bezogen auf die Einwaage der Soxhlet-Extraktion.

Ausbeute Soxhlet [%]	59,80
Ausbeute Aufreinigung [%]	10,39

Für den aufgereinigten Extrakt ergab sich als Summe aller bestimmbarer Triterpenensäuren ein Gehalt von 57,01 %. Die quantitative Bestimmung mittels Kalibration über die Referenzen und unter Anwendung der Korrr.-F. zeigte bei dieser Probe ziemlich hohe Peak-Intensitäten für die folgenden pentacyklischen Triterpene (Abb. 4-21, Tab. 4-19): α -Boswelliasäure (3,93 %) und β -Boswelliasäure (8,57 %) sowie ihre beiden acetylierten Derivate 3-O-Acetyl- α -boswelliasäure (2,56 %) und 3-O-Acetyl- β -boswelliasäure (3,13 %).

Weiterhin ließen sich relativ große Anteile für 3-OH-9-11-Dehydro- β -boswelliasäure (3,24 %) und 3-OH-11-OH- β -Boswelliasäure (1,67 %) nachweisen. Die Berechnung ergab einen im Vergleich zu den anderen Proben relativ hohen Gehalt an 11-Keto- β -boswelliasäure (1,40 %) und überraschend niedrige Werte mit nur 2,67 % für 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure.

Es wurden zusätzlich noch zwei Peaks bei 25,1 min und 26,2 min detektiert, die eine isomere Form der β -Keto-boswelliasäure darstellen könnten, nämlich die „Rubiniasäure“ (0,84 %, 25,1 min) und die „Dehydro-rubiniasäure“ (1,64 %, 26,2 min). Die exakte Absicherung dieser Strukturen bedarf aber noch weiterführender Untersuchungen.

Spuren an 3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure (0,98 %), 3-O-Acetyl-11-OH- β -boswelliasäure (0,20 %), Lupansäure (0,22 %) und 3-O-Acetyl-lupansäure (0,96 %) ließen sich ebenfalls nachweisen. Die sonst übliche Substanz 3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswelliasäure konnte nicht in der Probe detektiert werden.

Weiterhin wurden 8 tetrazyklische Triterpene in dem Extrakt gefunden, wobei die Substanzen 3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure mit 14,89 % als Hauptkomponente des Extrakts, 3- β -OH-8,24-dien-tirucallensäure mit 1,38 % und 3-Oxo- β -tirucallensäure (4,15 %) die dominanten Verbindungen waren. Das Isomer 3- α -OH-7,24-dien-tirucallensäure (1,46 %) und die beiden acetylierten Isomere 3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure (1,59 %), 3- β -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure (1,20 %) waren auch in relativ hohen Konzentrationen nachzuweisen. Insgesamt konnten 6 Tirucallensäuren mittels HPLC-MS identifiziert werden und es wurde vermutet, dass es noch einige Isomere gibt. Die 3-Oxo- β -tirucallensäure (3-O-TA) wurde zusätzlich zu den HPLC-MS-Untersuchungen als Referenzsubstanz eingesetzt.

Tab. 4-19 Zusammenfassung der analytischen Daten zu den wichtigsten Triterpensäuren aus Extrakt 1.

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	14,89	0,091
3- β -OH-8,24-dien-tirucallensäure	1,38	0,063
3- α -OH-7,24-dien-tirucallensäure	1,46	0,010
3- β -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure	1,20	0,059
3-Oxo- β -tirucallensäure	4,15	0,011
α -Boswelliasäure	3,93	0,252
β -Boswelliasäure	8,57	0,018
3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure	2,76	0,006
11-Keto- β -boswelliasäure	1,40	0,010
3-O-Acetyl- α -boswelliasäure	2,56	0,112
3-O-Acetyl- β -boswelliasäure	3,13	0,023
3-OH-9-11-dehydro- β -boswelliasäure	3,24	0,040
3-OH-11-OH- β -boswelliasäure	1,67	0,190

Die zwei tetrazyklischen Triterpene Robursäure (0,09 %) und 4(23)-Dihydro-keto-Robursäure (0,09 %) waren in sehr geringen Spuren enthalten, wobei diese keine spezifischen Inhaltsstoffe laut Literaturangaben für *B. serrata* sind.^[10] Die Analysenergebnisse für die Triterpensäuren (ohne die vermuteten Robursäuren) sind in Tab. 4-19 zusammengefasst.

Das HPLC Chromatogramm zeigte auch (Abb. 4-21), dass einige Neutral-Komponenten wie Mono- und Diterpene im Bereich der Retentionszeit der Tirucallensäuren (27 – 37 min) eluiert wurden. Die Vermutung liegt nahe, dass einige Diterpensäuren wie Abietinsäure, Dehydroabietinsäure, oder auch Pimarinsäure im Weirauchharz dieser Probe enthalten sein können. Laut Literaturangaben lagen die Retentionszeiten von Dehydroabietinsäure kurz vor β -KBA bei $\lambda=210$ nm und die der Abietinsäure kurz hinter β -KBA.^[6] Die Identität und der Gehalt dieser Säuren ist deshalb nur schwer zu bestimmen, denn es kann von einer Koelution mit KBA ausgegangen werden.

Für die Spezies *B. serrata* sind laut Literaturangaben die Diterpene Serratol und Isoserratol typisch und es kommen auch Verbindungen wie Methyl-Eugenol und -Chavicol vor. Diese waren aber in dieser Probe unter den gegebenen Umständen mit einer gewissen analytischen Unsicherheit nur in Spuren massenspektroskopisch nachzuweisen. Incencol und sein Acetat sind allgemein bei den Spezies *B. serrata*, *B. sacra* und *B. carterii* nur in geringen Mengen nachzuweisen, auch, weil diese Substanzen relativ instabil sind.

Extrakt 2

Es soll sich bei den Proben 2 sowie 4-10 laut ihrer Bezugsquellen um die Spezies *B. sacra* handeln; die Probe 2 stammt aus dem Oman und wurde von Herrn Apotheker Günter Ottmar am 20.12.2018 käuflich erworben. Entsprechend publizierter GC-Experimente sind Sesquiterpene wie β -Caryophyllen und sein Monooxidationsprodukt Caryophyllenoxid spezifisch für diese Spezies.^[76, 77] Flüchtige Sequiterpene wären nach der Extraktion und Aufreinigung des Weihrauchs höchstens in Spuren nachzuweisen und wurden bei den hier vorgestellten Analysen auch nicht weiter berücksichtigt. Diterpenoide Verbindungen wie Serratol und Iso-Serratol kommen laut Literatur auch in *B. sacra* vor. Die nachfolgend untersuchten Proben weisen allgemein signifikant größere Gehälter an BAs und acetylierten BAs sowie Lupansäuren im Vergleich zu Probe 1 auf. Dafür lag der Tirucallensäure-(TA)-Gehalt und auch der Gehalt an β -KBA bei allen Proben deutlich unter dem von *B. serrata* (Probe 1).

Ohne die Abtrennung der Rohsäuren von Neutralbestandteilen könnten die Gehälter für die Boswellia- und Tirucallensäuren höher erscheinen lassen, da verschiedene Mono- und Diterpene wie Serratol, Iso-Serratol und Incensol in ihrem Bereich bei der HPLC-Analyse koeluierten. Spuren dieser Substanzen waren jedoch auch in den hier verwendeten, aufgereinigten Proben massenspektrometrisch detektierbar, jedoch zumeist in vernachlässigbar geringen Mengen. Andernfalls wäre der in Abb. 4-21 dargestellte, chromatographische Bereich zwischen Peak 4, KBA und Peak 26, OMe-ABA, insbesondere bei einer Detektion von $\lambda=210$ nm, stark mit anderen Terpenen überlagert.

Tab. 4-20 Zusammenfassung der Aufreinigung des Extraktes 2, alle Werte bezogen auf die Einwaage der Soxhlet-Extraktion.

Ausbeute Soxhlet [%]	59,84
Ausbeute Aufreinigung [%]	32,78

Die quantitative Berechnung der mittels HPLC, unter Verwendung der Kalibrationsgeraden und den Korr.-F. (Kapitel 4.3.3), bestimmbaren Triterpensäuren ergab einen mittleren Säuregehalt von 32,52 % für diesen Extrakt.

Die Verbindung 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (7,85 %) ist die Hauptkomponente des Extrakts. Ein auffällig geringer Anteil von 0,52 % konnte für die 11-Keto- β -boswelliasäure gefunden werden, jedoch ein höherer Anteil für das 11-Keto- α -boswelliasäure-Isomer (1,12 %). Relativ hohe Gehaltsanteile ließen sich für α -Boswelliasäure (1,93 %), β -Boswelliasäure (3,62 %), Lupansäure (0,52 %), 3-O-Acetyl-lupansäure (1,67 %) und 3-OH-11-OH- β -Boswelliasäure (1,04 %) nachweisen.

Bemerkenswert ist, dass ein ziemlich großer Peak bei ca. 26,2 min zu sehen war, der zur Masse von „Dehydro-rubinasäure“ (2,37 %) nach MS-Analyse passte. Fernerhin konnten einige Tirucallensäuren (TA) nachgewiesen werden; prominent ist der Peak von 3-Oxo- β -tirucallensäure (2,59 %). Die Anteile für acetylierten α - (0,54 %) und β -Boswelliasäuren (0,91 %) sollten eigentlich spezifisch für die Spezies *B. sacra* höher liegen als hier bestimmt. Die Ergebnisse der Triterpensäuren-Analyse sind in Tab. 4-21 zusammengefasst.

Tab. 4-21 Zusammenfassung der wichtigsten in der Probe 2 identifizierten Triterpensäuren

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure	7,85	0,018
α -Boswelliasäure	1,93	0,015
β -Boswelliasäure	3,62	0,031
3-Oxo- β -tirucallensäure	2,59	0,051
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	2,07	0,107
3- β -OH-8,24-dien-tirucallensäure	1,42	0,035
Dehydro-rubiniensäure	2,37	0,016
11-Keto- α -boswelliasäure	1,12	0,003
11-Keto- β -boswelliasäure	0,52	0,002
3-O-Acetyl-lupansäure	1,67	0,017
3-OH-11-OH- β -boswelliasäure	1,04	0,006

Extrakt 3

Der Weihrauch, aus dem Extrakt 3 gewonnen wurde, wurde über die Firma „Kirchen Weihrauch“ (Bezugsdatum 25.06.2018, Ernte 2017) bezogen und stammte laut Produktangaben aus Äthiopien, wobei es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Spezies *B. papyrifera* handelt.

Tab. 4-22 Zusammenfassung der Aufreinigung von Extrakt 3, alle Werte bezogen auf die Einwaage der Soxhlet-Extraktion.

Ausbeute Soxhlet [%]	66,67
Ausbeute Aufreinigung [%]	55,62

Die quantitative Berechnung mittels Kalibration und über die Referenzsubstanzen ergab einen mittleren Säuregehalt von 55,32 % für den aufgereinigten Extrakt.

Die Verbindung Rubiniensäure mit den höchsten Gehaltsanteilen von 10,56 % ist die Hauptkomponente des Extrakts. Die zweit- bzw. dritthäufigste Komponente sind 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (6,49 %) und 3-Oxo- β -tirucallensäure (5,29 %). Auch die Anteile der anderen Tirucallensäuren, α/β -Boswelliasäuren, acetylierten α/β -Boswelliasäuren, 3-O-Acetyl-11-OH- β -boswelliasäure sind bei dem Extrakt im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben bemerkenswert groß (Tab. 4-23), was insgesamt interessante Bioaktivitäten vermuten lässt (siehe Kap. 5).

Auffällig war, dass die Anteile für α/β -Keto-boswelliasäuren erneut relativ gering ausfielen. Ebenso konnten nur geringe Mengen von 3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure (0,92 %) und Robursäure (0,77 %) gefunden werden.

Tab. 4-23 Zusammenfassung der wichtigsten Triterpensäuren in Probe 3

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure	6,49	0,016
α -Boswelliasäure	4,20	0,050
β -Boswelliasäure	3,79	0,103
3-Oxo- β -tirucallensäure	5,29	0,064
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	2,32	0,055
3- β -OH-8,24-dien-tirucallensäure	1,90	0,049
3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure	2,29	0,022
3- α -OH-7,24-dien-tirucallensäure	1,46	0,093
Rubinasäure	10,56	0,032
Dehydro-rubinasäure	1,77	0,046
3-O-Acetyl- α -boswelliasäure	1,50	0,063
3-O-Acetyl- β -boswelliasäure	4,84	0,003
3-OH-11-OH- β -boswelliasäure	1,19	0,001
3-O-Acetyl-11-OH- β -boswelliasäure	0,69	0,007
3-O-Acetyl-lupansäure	1,01	0,029

Extrakt 4

Der Weihrauch mit dem Ursprung Oman, Bezugsdatum 26.1.2019, aus dem Extrakt 4 gewonnen wurde, wurde über die Firma Floradex bezogen; Importeur des Weihrauchs war der „Oman-Shop“, Solingen. Bei der Probe handelt es sich um ausgesiebtetes, feinkörniges Material, was für die Ätherisch-Öl-Gewinnung vorgesehen war.

Tab. 4-24 Zusammenfassung der Aufreinigung von Extrakt 4, alle Werte bezogen auf die Einwaage der Soxhlet-Extraktion.

Ausbeute Soxhlet [%]	69,27
Ausbeute Aufreinigung [%]	54,14

Die quantitative Berechnung über die Kalibrationsgeraden und unter Anwendung der Korrekturfaktoren ergab einen mittleren Säuregehalt von 24,91 % für den aufgereinigten Extrakt (Summe aller bestimmbarer Peaks bei der HPLC-Analyse). Mit einem Gehaltsanteil von 6,02 % ist wiederum die Verbindung 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure die Hauptkomponente des Extrakts. Die eher metastabile 3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure (3,72 %) und Robursäure (3,04 %) konnten in nennenswerten Mengen gefunden werden.

Auch bei diesem Extrakt fallen die prozentualen Gehaltsanteile für die 11-Keto- β -boswelliasäure (0,42 %) und das 11-Keto- α -boswelliasäure Isomer (0,18 %) ziemlich gering aus. Die Gehälter für die α/β -Boswelliasäuren und auch alle Tirucallensäuren sind im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben eher niedrig (Tab. 4-25).

Tab. 4-25 Zusammenfassung der wichtigsten Triterpensäuren in Probe 4

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto-boswelliasäure	6,02	0,023
α -Boswelliasäure	1,32	0,063
β -Boswelliasäure	1,85	0,119
3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure	3,72	0,063
Robursäure	3,04	0,041
3-O-Acetyl-lupansäure	1,54	0,018
Dehydro-rubiniensäure	1,52	0,029
3-Oxo- β -tirucallensäure	0,85	0,000
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	1,13	0,012
3- β -OH-8,24-dien-tirucallensäure	0,42	0,007
3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure	0,43	0,043

Extrakt 5

Der Weihrauch, der ebenfalls aus Oman stammte und von der Firma Oman-Shop importiert wurde, zeigte viele dunkelbraune Anteile; wohlmöglich war er starker Sonneneinstrahlung ausgesetzt. Es wurden größere Bruchstücke (Unterschied zu Probe 4!) einschließlich Rindenfragmente für die Soxhlet-Extraktion ausgewählt.

Tab. 4-26 Zusammenfassung der Aufreinigung von Extrakt 5, alle Werte bezogen auf die Einwaage der Soxhlet-Extraktion.

Ausbeute Soxhlet [%]	63,34
Ausbeute Aufreinigung [%]	58,88

Die quantitative Berechnung über die Kalibration und unter Anwendung der Korrekturfaktoren ergab einen mittleren Säuregehalt von 32,66 % (Summe aller bestimmbarer Peaks nach HPLC-Analyse). Die Analysen lieferten sehr hohe Werte für die Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (5,78 %), und α - (2,02 %) - und β - (3,86 %) -boswelliasäure. Weitere, in nennenswerten Mengen nachzuweisende Triterpensäuren sind: 3-O-Acetyl- β -boswelliasäure (1,40 %), 3-O-Acetyl-lupansäure (1,50 %), 3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure (1,85 %), 3-Oxo- β -tirucallensäure (2,77 %) und 3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure (1,83 %). Die Gehaltsanteile der anderen Tirucallensäuren wie 3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure mit 1,04 % fielen hingegen relativ gering aus (Tab. 4-27).

Ein signifikant großer Peak bei ca. 26,2 min, zugeordnet zur Dehydro-rubiniensäure, ergab einen auffällig hohen Wert von 2,17 %. Die ziemlich unpolare 3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswelliasäure ließ sich gut bei Rt 45,2 min (254 nm) detektieren und konnte von weiteren Substanzen zufriedenstellend abgetrennt werden. Es ergab sich ein bemerkenswert hoher Gehalt von 2,29 % für

diesen potenten 5-LOX-Inhibitor (IC_{50} : 0,75 μ M; vergleiche Kap. 1.7). Da diese Boswelliasäure auch als Referenz eingesetzt wurde, kann die Identifikation des zugehörigen Peaks als sicher gelten.

Tab. 4-27 Zusammenfassung der wichtigsten Triterpensäuren in Probe 5

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure	5,78	0,002
α -Boswelliasäure	2,02	0,014
β -Boswelliasäure	3,86	0,185
11-Keto- α -boswelliasäure	1,00	0,051
3-Oxo- β -tirucallensäure	2,77	0,001
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	1,04	0,001
3- β -OH-8,24-dien-tirucallensäure	1,13	0,0001
3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure	1,83	0,045
3- α -OH-7,24-dien-tirucallensäure	1,12	0,002
3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswelliasäure	2,29	0,057
Dehydro-rubiniensäure	2,17	0,026
3-O-Acetyl- α -boswelliasäure	0,18	0,043
3-O-Acetyl- β -boswelliasäure	1,40	0,032
3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure	1,85	0,116
3-O-Acetyl-lupansäure	1,50	0,162

Extrakt 6a

Der Weihrauch Nr. 6, der ebenfalls aus dem Oman mit Datum vom 26.01.2019 stammte (Bezug über Floradex, Import durch Oman-Shop), bestand aus sehr hellen und eher dunkelbraunen Anteilen; hieraus wurden die hellen Bruchstücke selektiert und als Probe 6a weiter untersucht.

Bemerkenswert ist, dass bei dem Extraktionsvorgang eine relativ hohe Ausbeute von über 60 % erzielt wurde und nahezu nichts bei der nachfolgenden alkalischen Aufreinigung verloren ging (Abb. 4-28).

Tab. 4-28 Zusammenfassung der Aufreinigung von Extrakt 6a, alle Werte bezogen auf die Einwaage der Soxhlet-Extraktion.

Ausbeute Soxhlet [%]	62,89
Ausbeute Aufreinigung [%]	62,09

Die quantitative Berechnung mittels der Kalibrationen und Korrekturfaktoren ergab einen mittleren Säuregehalt von 37,26 % für diesen Extrakt (Summer aller über HPLC quantifizierbaren Substanzen). Die Berechnungen lieferten sehr hohe Werte für Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (5,49 %), α -(2,90 %)- und β -(4,77 %)-boswelliasäure, 3-O-Acetyl-lupansäure (2,77 %), auch

verhältnismäßig hohe Werte für die acetylierten α/β - Boswelliasäuren sowie für viele Tirucallensäuren wie 3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure mit 4,22 % Gehaltsanteil (Tab. 4-29).

Der signifikant große Peak bei Rt 26,2 min, zugeordnet für Dehydro-rubiniensäure, ergab 1,92 %. Wie bereits für den Extrakt 5 beschrieben, konnte erneut die bioaktive 3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswelliasäure mit einem ungewöhnlich hohen Anteil von 3,96 % nachgewiesen werden.

Tab. 4-29 Zusammenfassung der wichtigsten Triterpensäuren in Probe 6a

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure	5,49	0,059
α -Boswelliasäure	2,90	0,126
β -Boswelliasäure	4,77	0,090
3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswelliasäure	3,96	0,011
3-Oxo- β -tirucallensäure	1,58	0,000
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	4,22	0,019
3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure	1,51	0,028
3- α -OH-7,24-dien-tirucallensäure	1,12	0,001
3-O-Acetyl-lupansäure	2,77	0,232
Dehydro-rubiniensäure	1,92	0,036
3-O-Acetyl- α -boswelliasäure	0,89	0,001
3-O-Acetyl- β -boswelliasäure	1,14	0,013

Extrakt 6b

Aus dem Weihrauch Nr. 6b wurden im Gegensatz zur Proben 6a (siehe oben) nun die überwiegend dunklen Bruchstücke analysiert. Es ergab sich ebenfalls eine sehr hohe Ausbeute bei der Soxhlet-Extraktion von etwas über 60 %; jedoch konnten im Gegensatz zur Probe 6a ein etwas höherer Anteil Neutralstoffe durch die Aufreinigung abgetrennt werden, was eventuell der dunklen Farbe geschuldet ist (Tab. 4-30).

Tab. 4-30 Zusammenfassung der Aufreinigung von Extrakt 6b, alle Werte bezogen auf die Einwaage der Soxhlet-Extraktion.

Ausbeute Soxhlet [%]	60,62
Ausbeute Aufreinigung [%]	53,76

Die quantitative Berechnung mittels Kalibration und Korrekturfaktoren ergab einen mittleren Säuregehalt von 40,94 % für diesen Extrakt (Summe der mittels HPLC quantifizierbare Substanzen). Die Analysen lieferten sehr hohe Werte für Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (6,39 %), α -(2,69 %)- und β -(4,93 %)-boswelliasäure und 3-O-Acetyl-lupansäure (2,77 %), auch hohe Werte für die

acetylierten α/β - Boswelliasäuren und für viele Tirucallensäuren wie 3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure mit einem Gehaltsanteil von 3,87 % (Tab. 4-31).

Die Integration des signifikant großen Peaks, der Dehydro-rubinasäure bei Rt 26,2 min zugeordnet werden konnte, lieferte einen Gehalt von 1,63 %. 3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswelliasäure bei Rt 45,2 min ergab erneut einen auffällig hohen Gehaltsanteil von 4,79 %.

Tab. 4-31 Zusammenfassung der wichtigsten Triterpensäuren in Probe 6b

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure	6,39	0,005
α -Boswelliasäure	2,69	0,052
β -Boswelliasäure	4,93	0,069
3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswelliasäure	4,79	0,007
3-Oxo- β -tirucallensäure	1,91	0,063
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	3,87	0,117
3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure	1,81	0,014
3- α -OH-7,24-dien-tirucallensäure	1,03	0,002
Lupansäure	0,82	0,029
3-O-Acetyl-lupansäure	2,77	0,012
Dehydro-rubinasäure	1,63	0,012
3-O-Acetyl- α -boswelliasäure	1,23	0,000
3-O-Acetyl- β -boswelliasäure	1,51	0,000
3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure	1,25	0,049

Extrakt 7

Der Weihrauch aus dem Oman mit Datum vom 12.2.2018 wurde von der Firma Floradex unter dem Warennamen „Olimyrum“ bezogen. Da die Probe bereits als Extrakt vorlag (Auszugsmittel Ethanol), konnte auf die Soxhlet-Extraktion verzichtet werden und es erfolgte direkt die alkalische Aufreinigung (Tab. 4-32). Auffällig war, dass nur ein relativ geringer Anteil an sauren Komponenten von etwas mehr als 25 % gewonnen werden konnte.

Tab. 4-32 Zusammenfassung der Aufreinigung von Extrakt 7, Wert bezogen auf die Einwaage des Aufreinigungsschrittes.

Ausbeute Soxhlet [%]	bereits von der Firma Floradex extrahiert
Ausbeute Aufreinigung [%]	25,75

Die quantitative Berechnung über die Kalibrationsfunktionen ergab einen mittleren Säuregehalt von 31,74 % (Summe aller quantifizierbaren Peaks bei der HPLC-Analyse). Dabei wird das Chromatogramm dominiert von Acetyl-11-keto-boswelliasäure (4,71 %), α -(2,76 %)- und β -(4,96 %)-boswelliasäure, 3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure (4,10 %) und 3-Oxo- β -tirucallensäure (2,33 %)

sowie 3-O-Acetyl-lupansäure (1,56 %). Der Anteil von 1,45 % für 3-OH-11-OH- β -boswelliasäure kann im Vergleich zu den anderen Proben als relativ hoch bezeichnet werden (Tab. 4-33).

Für Acetyl- α/β -boswelliasäure ließen sich geringe Anteile von 0,06 % und 0,27 % berechnen. Ein Anteil von 0,82 % für die Dehydro-rubinasäure fällt im Vergleich zu den Proben 5 und 6 überraschend niedrig aus.

Tab. 4-33 Zusammenfassung der wichtigsten Triterpensäuren in Probe 7

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto-boswelliasäure	4,71	0,083
α -Boswelliasäure	2,76	0,002
β -Boswelliasäure	4,96	0,004
3-Oxo- β -tirucallensäure	2,33	0,032
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	4,10	0,037
3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure	1,13	0,003
3- α -OH-7,24-dien-tirucallensäure	1,15	0,017
3-O-Acetyl-lupansäure	1,56	0,002
Dehydro-rubinasäure	0,82	0,022
3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure	1,15	0,054

Extrakt 8

Der ethanolische Extrakt der Firma Floradex war von honigbrauner Farbe aus dem Jahr 2015, Ausgangsmaterial Weihrauch aus dem Oman, und wurde noch einer Aufreinigung unterzogen (Tab. 4-34) sowie anschließend mittels HPLC vermessen. Dabei war der nach der Aufreinigung verbliebene Anteil mit 53 % deutlich höher als bei Probe 7.

Tab. 4-34 Zusammenfassung der Aufreinigung von Extrakt 8, Wert bezogen auf die Einwaage des Aufreinigungsschrittes.

Ausbeute Soxhlet [%]	bereits von der Firma Floradex extrahiert
Ausbeute Aufreinigung [%]	53,14

Die quantitative Berechnung über die Kalibrationsfunktionen und Korrekturfaktoren ergab einen mittleren Säuregehalt von 38,32 % für diesen Extrakt (Summe aller mittels HPLC bestimmbarer Peaks). Erneut war der Peak für Dehydro-rubinasäure überragend groß (4,66 %) und ihm folgten mengenmäßig ähnlich große Peaks für 3-Acetyl-11-keto-boswelliasäure (5,17 %) und 3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure (3,25 %). Es schließen sich noch hohe Gehaltsanteile für α -Boswelliasäure (3,32 %), β -Boswelliasäure (5,01 %), Lupansäure (1,13 %) und für 3-O-Acetyl-lupansäure (1,86 %) an (Tab. 4-35).

Es konnten zwei weitere interessante Verbindungen bei 254 nm detektiert werden: Dihydro-ketoboswellsäure (0,38 %) bei Rt 37,3 min und 3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswellsäure (2,08 %) bei Rt 45,0 min, die im Chromatogramm mit einem Abstand von nur 1 min der Acetyl- β -boswellsäure folgt, wobei letztere jedoch nur bei $\lambda=210$ nm sichtbar ist. Für 3-O-Acetyl-11-OH- β -boswellsäure bei Rt 27,8 min konnten nur Spuren gefunden werden.

Tab. 4-35 Zusammenfassung der gefundenen Triterpensäuren in Probe 8

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto-boswellsäure	5,17	0,003
α -Boswellsäure	3,32	0,201
β -Boswellsäure	5,01	0,069
Dehydro-rubinasäure	4,66	0,001
3-Oxo- β -tirucallensäure	1,23	0,003
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	3,25	0,030
3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure	1,07	0,032
Lupansäure	1,13	0,005
3-O-Acetyl-lupansäure	1,86	0,032
3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswellsäure	2,08	0,025
3-O-Acetyl- α -boswellsäure	0,80	0,001
3-O-Acetyl- β -boswellsäure	1,06	0,001

Extrakt 9

Bei dieser Probe handelt es sich ebenfalls um einen älteren Extrakt der Firma Floradex aus dem Jahr 2015, Ursprung des Rohmaterials war der Oman. Da nur eine sehr kleine Menge verfügbar war, musste auf die Aufreinigung verzichtet werden; es war nur eine HPLC-Analyse möglich.

Die quantitative Berechnung mittels Kalibrationsfunktionen und Korrekturfaktoren ergab einen mittleren Säuregehalt von 44,07 % (Summe der mittels HPLC quantifizierbaren Säuren), was ein relativ hoher Wert ist. Dafür sind die relativ hohen Werte für α -(4,65 %)- und β -(3,98 %)-boswellsäure, 3-Acetyl-11-keto-boswellsäure (4,45 %), 3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure (11,02 %), 3-Oxo- β -tirucallensäure (1,82 %), Lupansäure (2,97 %) und 3-O-Acetyl-lupansäure (2,43 %) verantwortlich (Tab. 4-36).

Der relativ große Peak bei Rt 26,2 min konnte der Dehydro-rubinasäure zugeordnet werden (1,48 %). Geringere Gehälter für 3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswellsäure (1,09 %), 3-OH-11-OH- β -Boswellsäure (0,96 %) und der auffällig niedrige Wert für 3-O-Acetyl- β -boswellsäure (0,91 %) charakterisieren diese Probe.

Tab. 4-36 Zusammenfassung der wichtigsten Triterpensäuren in Probe 9

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure	4,45	0,036
α -Boswelliasäure	4,65	0,368
β -Boswelliasäure	3,98	0,086
Dehydro-rubinasäure	1,48	0,052
9-11-Dehydro- β -boswelliasäure	1,13	0,064
3-Oxo- β -tirucallensäure	1,82	0,034
3-OH-8,24-Dien- α -tirucallensäure	11,02	0,336
3-OH-8,24-Dien- β -tirucallensäure	0,80	0,008
3-Acetyl-8,24-dien- α -tirucallsäure	1,08	0,063
3-OH-7,24-Dien- α -tirucallensäure	1,07	0,040
Lupansäure	2,97	0,064
3-O-Acetyl-lupansäure	2,43	0,002
3-O-Acetyl- α -boswelliasäure	0,64	0,002
3-O-Acetyl- β -boswelliasäure	0,91	0,003
3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure	1,09	0,001

Extrakt 10

Genauso wie die Probe 9 stammt dieser ethanolische Extrakt aus dem Jahr 2015 und wurde von der Firma Floradex aus omanischem Weihrauch mit dem firmeneigenen Verfahren hergestellt. Der Extrakt hatte eine honigbraune Farbe und es lag nur eine kleine Probe vor, so dass eine Aufreinigung nicht möglich war. Auch diese Probe wurde ohne weitere Behandlung direkt mittels HPLC analysiert.

Die quantitative Berechnung mittels Kalibrationen und Korrekturfaktoren ergab einen mittleren Säuregehalt von 25,08 % für diesen Extrakt ((Summe der mittels HPLC quantifizierbaren Säuren) und der Gehalt lag damit deutlich unter dem Wert für Probe 9. Wie bei den meisten hier untersuchten Proben waren folgende Verbindungen dominant: 3-Acetyl-11-keto-boswelliasäure (4,26 %) sowie α - (2,81%)- und β -Boswelliasäure mit (3,11 %). Ebenfalls konnte Dehydro-rubinasäure mit einem Gehalt von 1,76 % detektiert werden (Tab. 4-37).

Die Gehaltsberechnung für die α/β -Tirucallensäuren und 3-O-Acetyl-lupansäure ergab keine sonderlich hohen Werte; besonders niedrig waren die Ergebnisse für die α -OH-7,24-dien-tirucallensäure (0,59 %) und die 3- β -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure (0,09 %). Ein sehr geringer Wert von 0,32 % konnte für die eher metastabile Verbindung 3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure gefunden werden. Das seltener vorkommende, tetrazyklische Triterpen 4(23)-Dihydro-keto-robursäure wurde in kleine Mengen von 0,45 % gefunden.

Tab. 4-37 Zusammenfassung der wichtigsten Triterpensäuren in Probe 10

Triterpensäuren	Mittelwert-Gehalt %	STABW
3-Acetyl-11-keto-boswelliasäure	4,26	0,006
α -Boswelliasäure	2,81	0,205
β -Boswelliasäure	3,11	0,139
Dehydro-rubiniensäure	1,76	0,020
11-Keto- β -boswelliasäure	0,80	0,001
11-Keto- α -boswelliasäure	0,93	0,001
3-Oxo- β -tirucallensäure	1,48	0,117
3- α -OH-8,24-dien-tirucallensäure	1,0	0,103
3- β -OH-8,24-dien-tirucallensäure	0,85	0,108
3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure	1,09	0,178
Lupansäure	1,29	0,117
3-O-Acetyl-lupansäure	0,93	0,109
3-O-Acetyl- α -boswelliasäure	0,75	0,007
3-O-Acetyl- β -boswelliasäure	1,0	0,010

Zusammenfassende Betrachtungen der Extrakte

Stellt man die prozentualen Summen der identifizierbaren Substanzen bei den untersuchten Proben gegenüber, so lässt sich folgendes Muster erkennen (Abb. 4-22): Bei den Proben von *B. serrata* (1) und *B. papyrifera* (3) liegt die Summe oberhalb von 50 %, bei den anderen Proben, die *B. sacra* zugeordnet werden, liegt der Gehalt durchweg unter 50 %. Damit enthält insbesondere *B. sacra* viele organische Säuren, die mit dem hier vorgestellten Verfahren nur unzulänglich quantifiziert werden konnten. Die MS-Untersuchungen legen aber nahe, dass es sich hierbei möglicherweise um Diterpensäuren handelt, für die aber keine Referenzen zur Verfügung standen. Werden die in Frage kommenden Peaks testweise unter Anwendung der Korrekturfaktoren wie Triterpensäuren quantitativ ausgewertet, so ergeben sich Gehälter, die teilweise sogar über 100 % liegen (Summe aller Peaks). Diese überhöhten Werte sind leicht zu erklären: Die für Triterpene ermittelten Korrekturfaktoren sind nicht auf andere Terpene anwendbar. Mangels chemisch definierter Referenzsubstanzen konnte diese Fragestellung aber nicht weiter bearbeitet werden.

Wie oben in den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.3 beschrieben, wurden umfassende Kalibrationen vorgenommen und aus den erhaltenen Funktionen Response-Faktoren (RFs) abgeleitet, wobei diese einerseits über die Steigung der Kalibrationsgeraden, andererseits über die normierten Peakflächen berechnet wurden. Bezugspunkt ist immer die β -Glycyrrhetinsäure (Glyc), die sowohl eine Absorption bei $\lambda=210$ nm wie auch bei $\lambda=254$ nm zeigt. Dieses Verfahren ist bei $\lambda=254$ nm unproblematisch, jedoch ist bei $\lambda=210$ nm die Grundlinie des Chromatogramms wesentlich welliger, so dass bei dieser Wellenlänge die Integration des Peaks für Glyc sehr sorgfältig mit manueller Korrektur erfolgen muss. Die automatische Integration lieferte wegen dieses Problems häufig Werte, die für die bei $\lambda=210$ nm zu bestimmenden Substanzen zu niedrige prozentuale Gehälter ergaben.

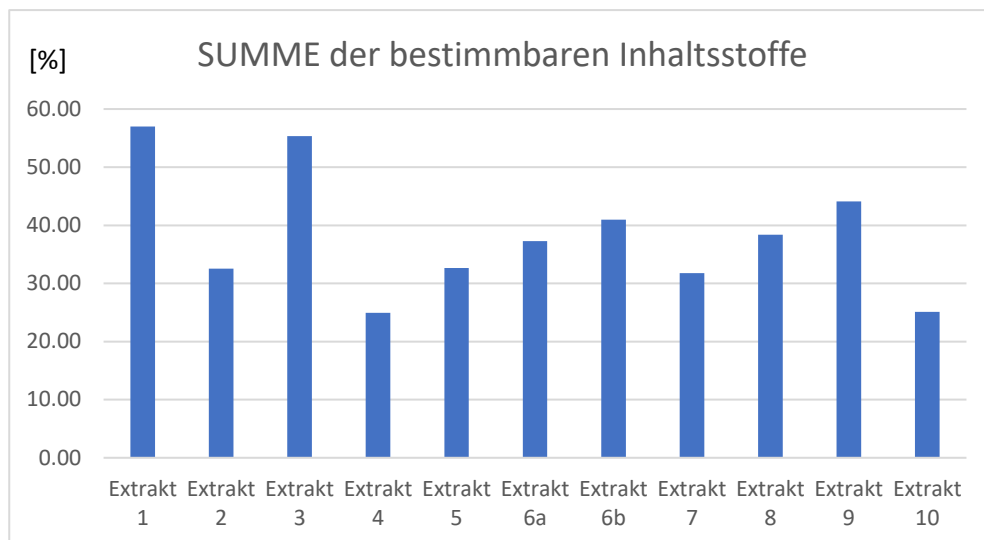


Abb. 4-22 Prozentuale Summe der identifizierbaren Inhaltsstoffe in den Extrakten 1-10.

Die angewandten Berechnungsmethoden (direkt über Kalibration sowie die zwei RF-Verfahren) sind in Tab. 4-38 zusammengefasst. Bei allen drei Berechnungsmethoden ergeben sich bei den Mittelwerten kaum Unterschiede, jedoch sind die Standardabweichungen (STAW) bei den RF-Verfahren tendenziell höher, jedoch wird der als kritisch zu betrachtende Wert von 5,00 % bei keiner Probe auch nur annäherungsweise überschritten. Entsprechend Tab. 4-38 kann den verwendeten Methoden zur Quantifizierung eine Äquivalenz bescheinigt werden.

Tab. 4-38 Zusammenfassung der mittels HPLC quantifizierbaren Peaks (Summe aller Peaks), berechnet über die Kalibrationsgeraden und den beiden RF-Methoden (Steigung, Flächen). Alle Werte in Prozent [%].

	Gehalt / Kalibration	STABW	Gehalt RF/Steigung	STABW	Gehalt RF/Area	STABW
Extrakt 1	57,01	0,808	54,63	3,188	53,99	3,110
Extrakt 2	32,52	0,022	35,57	0,182	35,23	0,178
Extrakt 3	55,32	0,258	56,91	1,077	56,29	1,071
Extrakt 4	24,91	0,345	34,98	0,277	34,23	0,259
Extrakt 5	32,66	0,362	35,97	0,367	35,53	0,365
Extrakt 6A	37,26	0,391	42,81	0,640	42,15	0,622
Extrakt 6B	40,94	0,193	41,32	1,869	40,73	1,822
Extrakt 7	31,74	0,157	35,26	0,308	34,73	0,303
Extrakt 8	38,32	0,189	41,11	0,224	41,11	0,224
Extrakt 9	44,07	0,175	50,39	0,091	49,56	0,078
Extrakt 10	25,08	0,325	28,31	0,245	27,87	0,220

5. Diskussion

5.1 Beurteilung der unterschiedlichen Extraktionsmethoden

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, konnte ein praktikables Verfahren zur Extraktion und Aufreinigung von Weihrauch-Proben erarbeitet werden. Insbesondere die Soxhlet-Extraktion konnte gut reproduzierbar sowie problemlos durchgeführt werden und kann daher uneingeschränkt empfohlen werden. Der früher häufig verwendete Diethylether kann durch Methanol oder Ethanol ersetzt werden, was gleichwertige oder nur geringfügig schlechtere Ergebnisse liefert.

Jedoch bedürfen die nachfolgenden Schritte 3 und 4 einer Diskussion. Insbesondere bei *B. serrata* kommt es beim Überführen der sauren Triterpene in die korrespondierenden Natriumsalze zu einer starken Emulsionsbildung, die aber interessanterweise bei *B. sacra* nahezu vollständig ausbleibt. Als Ursache können hier die Tirucallensäuren (TAs) vermutet werden, deren Summe ca. 20 % beträgt, was bei keiner der anderen Proben erreicht wird (siehe Kapitel 4.3.4). Für *B. sacra* liegt die Summe der Tirucallensäure typischerweise bei etwa 5 %. Das Problem der Emulsionsbildung bei *B. serrata* wurde bereits früher beobachtet.^[78]

Somit ist für *B. serrata*, wahrscheinlich aufgrund des hohen TA-Gehaltes, eine Aufreinigung des Extraktes nicht empfehlenswert, stellt jedoch für die übrigen untersuchten Proben kein Problem dar.

Auffällig ist bei *B. sacra*, dass insbesondere bei den Proben 5 und 6a, 6b durch die Schritte 3 und 4 nahezu keine Neutralkomponenten abgetrennt wurden, was bedeutet, dass in dem Soxhlet-Extrakt auch nur in geringem Umfang nicht-saure Substanzen enthalten sind. Hingegen bestand der Soxhlet-Extrakt von *B. serrata*, Probe 1, offensichtlich überwiegend aus Neutralstoffen, die sich durch die Überführung in die Natriumsalze (Schritt 3) und anschließender Protonierung (Schritt 4) abtrennen lassen. Dadurch ließe sich die in Tab. 4-18 angegebene, geringe Ausbeute erklären.

Abschließend kann festgestellt werden, dass schon die Soxhlet-Extraktion einen Extrakt liefert, der eine problemlose HPLC-Analyse erlaubt. Jedoch werden die Neutralstoffe überwiegend auf eine RP-Säule „aufgezogen“, so dass ein gründliches Spülen der Säule unbedingt erforderlich ist. In dem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, wo die nicht über HPLC-MS identifizierbaren Substanzen eigentlich „abgeblieben“ sind; je nach Probe konnten in der Summe nur 25 - 57 % der extrahierten und aufgereinigten Substanzen identifiziert werden. Wie in Kap. 4.3.4 abschließend aufgeführt, könnten die nicht näher spezifizierten Peaks Diterpensäuren mit einem M_E von ca. 300 amu zugeordnet werden, für die aber keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen.

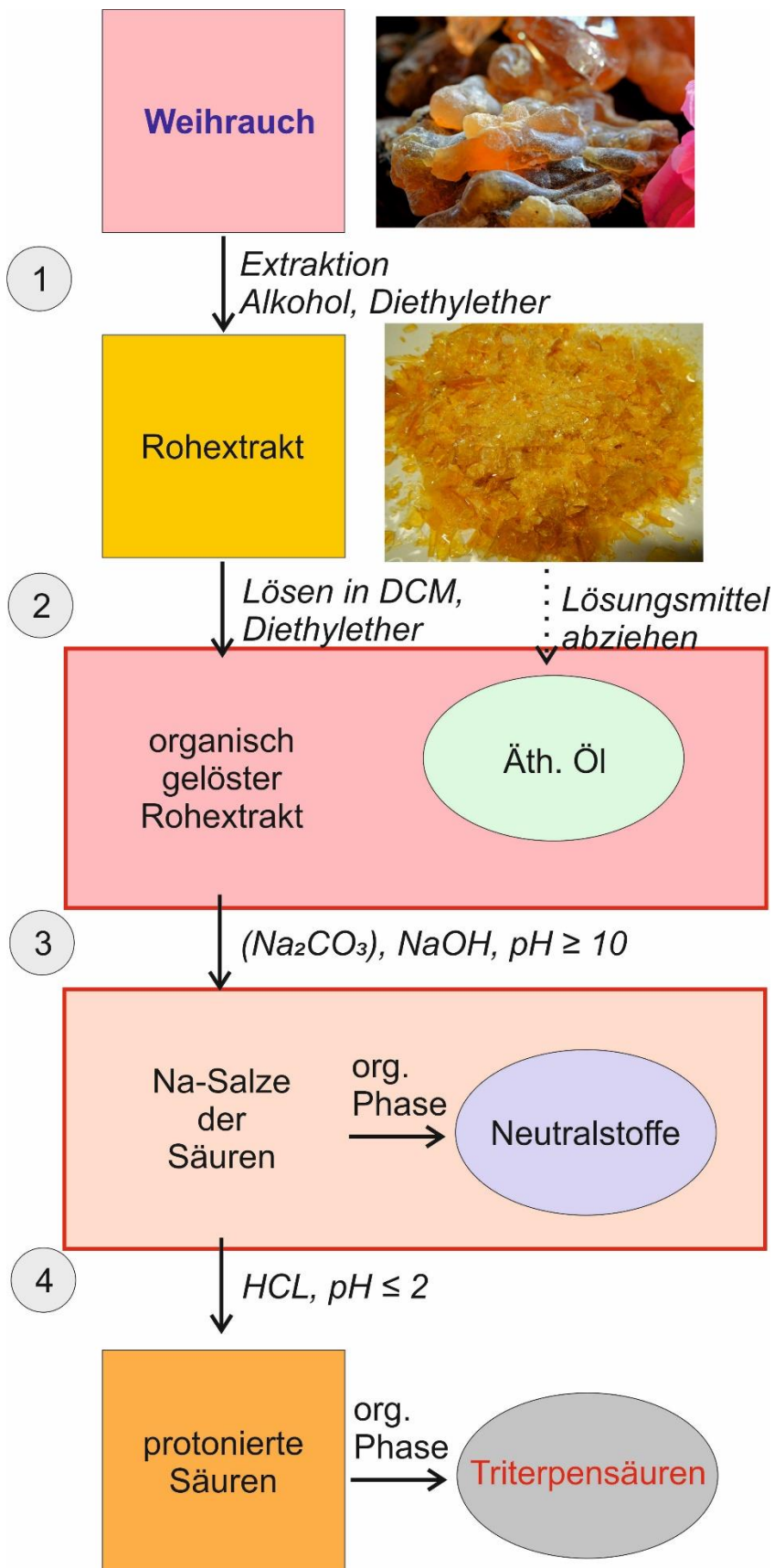


Abb. 5-1 Zusammenfassung der Extraktion und Aufreinigung der Weihrauchproben. Rot umrandet sind die Schritte 3 und 4, die als kritisch einzustufen sind.

5.2 Diskussion der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen

Die DCs der untersuchten Extrakte zeigten eine große Anzahl von Substanzbanden oberhalb der AKBA (Abb. 4-4), die sich aber wahrscheinlich wegen ihres sehr unpolaren Charakters mittels HPLC auf einer RP-Säule mit einem sauren Fließmittel nicht trennen ließen. Diese Substanzen ließen sich alle relativ gut mit Anisaldehyd-Sprühreagenz anfärben. Aus zeitlichen Gründen war es jedoch nicht möglich, diese unpolaren Substanzen innerhalb dieser Arbeit eindeutig zu identifizieren. Vermutlich handelt es sich dabei zumindest teilweise um Ätherisch-Öl-Komponenten.

Die Identifizierung der einzelnen Triterpene allein aufgrund ihrer R_f -Werte erschien nicht möglich, was einen Vergleich mit bereits publizierten DC-Untersuchungen schwierig macht.^[31, 78, 79] Wie bereits in Kapitel 4.2. erörtert, gibt es auch eine Vielzahl von unterschiedlichen Fließmitteln, so dass eine Referenzierung allein über die R_f -Werte wenig sinnvoll erscheint. Aus diesen Gründen wurden die Untersuchungen mit einem Set an Referenzsubstanzen durchgeführt, die auch für die HPLC-Untersuchungen verwendet wurden. An diesen wurde dann hauptsächlich entsprechend den Datensätzen von PAUL und BASAR die übrigen Substanzen zugeordnet.^[78, 79]

Die R_f -Werte der einzelnen Substanzen sind in Kapitel 4.2 in den Tab. 4-3 (DC) und 4-4 (HPTLC) zusammengefasst. Da unterschiedliche Fließmittelsysteme sowie unterschiedliche Platten verwendet wurden, lassen sich die individuellen Substanzen nicht allein durch einen R_f -Wert beschreiben; hilfreich ist jedoch eine Einteilung nach Substanzen, die bei UV 254 nm eine Fluoreszenzlöschung ergeben, sowie die unterschiedlichen Färbungen nach dem Entwickeln mit Anisaldehyd-Reagenz.

Es erscheint möglich, einzelne *Boswellia*-Arten anhand von bestimmten Markersubstanzen zu identifizieren. Bei der Beschreibung der DCs wurde auf diesen Punkt bei den entsprechenden Proben bereits Bezug genommen. Es ergibt sich folgende Diskussion dieser Marker unter Bezugnahme auf Literaturangaben:

Zwei intensive, blauviolette Banden für die Spezies *B. serrata* konnten in Verbindung mit den Substanzen O-TA und insbesondere 11-OH- α -TA gebracht werden. Die hohe Intensität der Banden ist auch durch den insgesamt hohen Gehalt an Tirucallensäuren (TAs) dieser Probe zu erklären.^[79, 80] Spezifisch für *B. serrata* sind besonders Diterpene wie Serratol und Iso-Serratol, die sich durch eher grünliche Banden bemerkbar machen. Diese waren jedoch auf den in dieser Arbeit präsentierten DCs nicht eindeutig identifizierbar.

Als spezifische Marker für die Spezies *B. sacra* und *B. carterii* (hier nicht analysiert) ist β -Caryophyllen als pinkfarbene Bande oberhalb der grünen Serratol-Bande in der Literatur genannt.^[76] Eine rosafarbene Bande war auch in den hier untersuchten Proben sichtbar, jedoch ist wegen der

gewählten Extraktionsmethoden, verbunden mit einer Aufreinigung, die Anwesenheit von β -Caryophyllen in den untersuchten Proben eher unwahrscheinlich. Intensiv violette Banden für α/β -BA und ABA sowie für Lupansäure waren in den untersuchten Proben sichtbar und konnten mittels HPLC bestätigt werden; diese sind auch in der Literatur beschrieben.^[78]

Eindeutige Markersubstanz für *B. papyrifera* sind die Diterpene Incensol und Incensolacetat, die nach dem Entwickeln mit Anisaldehyd-Reagenz eine braune Färbung ergeben sollen. Incensolacetat ist entsprechend Literaturangaben bisher nur in der Spezies *B. papyrifera* nachgewiesen worden.^[81, 82, 83, 84, 85] Fernerhin sind für diese Spezies die blaue Bande für O-TA und die intensive Bande bei UV 254 nm für β -AKBA sowie eine schwächere für β -KBA typisch, was mit den erhaltenen HPLC-Ergebnissen korreliert. Es sei an dieser Stelle nochmals auf Zusammenfassung der DC-Untersuchungen in den Tab. 4-3 und 4-4 verwiesen.

Es muss jedoch nochmals betont werden, dass Monoterpene, Sesquiterpene und Diterpene, sofern sie nicht eine Carboxylfunktion tragen oder aufgrund anderer struktureller Merkmale (z.B. Phenole) eher sauer sind, durch die Aufreinigung entfernt werden und deshalb nur in geringen Mengen verfügbar sind. Jedoch lässt bei der Entwicklung mit Anisaldehyd die Intensität der unterschiedlich gefärbten Banden keinen unbedingten Rückschluss auf deren Konzentration zu.

In der Literatur gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Fließmittelgemischen, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen: i) Solche, die mehr oder weniger komplexe Mischungen aus unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln darstellen (z.B. Toluol/Aceton 7:3 (V/V) und ii) solche, die entweder Ameisensäure oder Essigsäure als Zusatz haben (z.B. Pentan/Diethylether 2:1 (V/V) plus Essigsäure 1 %; Abb. 5-2).

Wenn es nur um die Trennung und Identifikation von KBA und AKBA geht, ist dieses mit allen publizierten Fließmittelsystemen, egal ob sauer oder neutral, möglich. Soll jedoch das volle Spektrum der Triterpensäuren aufgetrennt werden, geht dieses entsprechend der hier vorgestellten Untersuchungen nur mit einem sauren Fließmittel (Abb. 5-2). Dabei führt eine zweifache Entwicklung mit schneller Lufttrocknung zwischen den Läufen zu akzeptablen Ergebnissen. Hierfür ist es wichtig, dass das Fließmittelsystem leicht flüchtig ist, um eine Lufttrocknung in Sekundenschnelle zu ermöglichen; dieses ist bei einer Pentan-Diethylether-Mischung in optimaler Weise gegeben. Durch eine Trocknung der HPTLC-Platte, die nur einige Sekunden benötigt, wird eine Artefaktbildung auf der Platte zuverlässig vermieden.

Anzumerken ist noch, dass KBA und AKBA sehr gut unter UV 254 nm sichtbar sind, mit Anisaldehyd jedoch nur eine sehr schwache braune Färbung ergaben. Hingegen zeigen sich die anderen Boswellia- und Tirucallensäuren nur schwach unter UV 254 nm, geben jedoch eine sehr intensive Färbung nach dem Entwickeln mit dem Anisaldehyd-Reagenz.

Jedoch ist diese Entwicklungsmethode nicht ganz problemlos: Auch wenn bei der in Abb. 5-2 möglichst präzise gearbeitet wurde, zeigen sich durch leicht unterschiedliche Temperaturen bei der Entwicklung (rechte Hälfte wohl etwas wärmer entwickelt) doch unterschiedliche Ergebnisse.

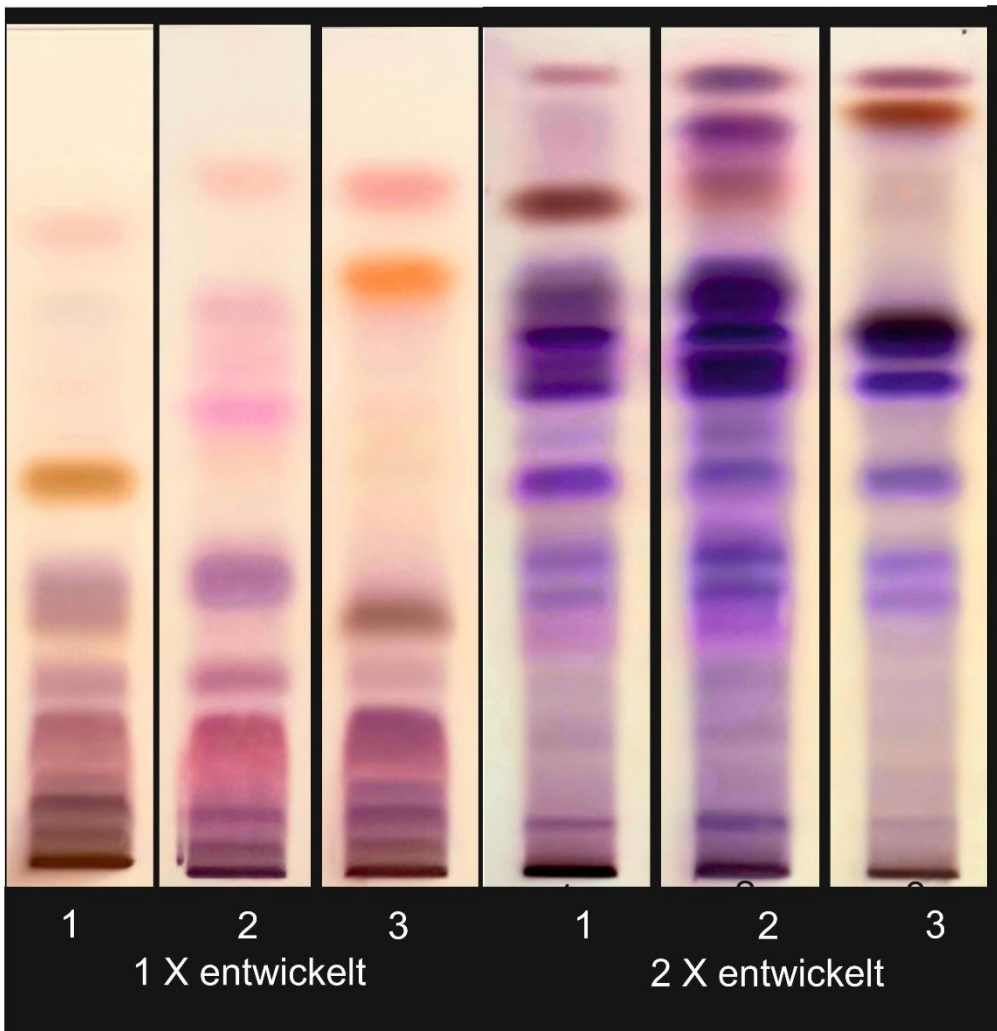


Abb. 5-2 HPTLC-Analyse der Probe 1 (*B. serrata*), 2 (*B. sacra*) und 3 (*B. papyrifera*) in Pentan / Diethylether 2:1 mit Essigsäure 1 % entwickelt. Links: einfache Entwicklung, rechts doppelte Entwicklung.

5.3 Diskussion zur Derivatisierungen

Eine erfolgreiche Derivatisierung von vielen unpolaren bis mittelpolaren Terpenen in Mischung konnte trotz zahlreicher Versuche nicht eindeutig realisiert werden. Der Nachweis eines eindeutigen Derivatisierungsproduktes aus der Mischung heraus hat sich als komplex und daher sehr schwierig herausgestellt.

Es wurde ein sehr breites Screening an Reaktionen unter verschiedensten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Davon wurden einige Reaktionen unten in Tab. 5-1 zusammengefasst, welche nach einer weiteren Optimierung eventuell zum Erfolg führen könnten; es konnten in den Versuchsreihen jedoch neben Hinweisen auf eine erfolgreiche, zumindest partielle Derivatisierung keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden.

Tab. 5-1 Zusammenstellung der erfolgversprechendsten Derivatisierungsreaktionen

Nummer	Reaktion der Triterpensäuren
Kapitel 7.3.1- Ansatz 4	Hydrolyse und anschließende Derivatisierung der C ₃ -OH mit 4-Nitrobenzoylchlorid /DMAP
Kapitel 7.3.4- Ansatz 3	Umsetzung zum Säurechlorid, danach Derivatisierung der C ₄ -Carbonsäure mit 8-Aminochinolin unter Zusatz von Triethylamin
Kapitel 7.3.4- Ansatz 7	Umsetzung zum Säurechlorid, danach Deriv. der C ₄ -Carbonsäure mit Benzylalkohol

Die Aktivierung der Carbonsäuren zum Säurechlorid und anschließender Derivatisierung mit einem geeigneten Alkohol oder Amin hat sich als vielversprechend herausgestellt und könnte evl. weiterverfolgt werden. Wahrscheinlich konnten einige der Triterpensäuren des Weihrauchs, wenn auch nicht alle, zum Ester oder Säureamid umgesetzt werden. Jedoch macht eine Vorsäulenderivatisierung nur Sinn, wenn auch alle Triterpensäuren, die von Interesse sind, in gleicher Weise umgesetzt werden.

Ein Grund für die offensichtlich schlechte Reaktivität der Positionen C-3 und C-4 ist die Möglichkeit, in unterschiedlicher Weise intramolekulare Wasserstoffbrücken auszubilden; eine Möglichkeit ist in Abb. 5-3 wiedergegeben. Durch die blau und gestrichelt eingezeichnete Wasserstoffbrücke entsteht ein Sechsering, der relativ stabil ist und somit neben der ohnehin schon vorhandenen sterischen Hinderung (Terpengrundgerüst, Methylgruppen, sekundäre Alkohol, Acetylierung,...) die Reaktivität der beteiligten Sauerstofffunktionen weiter reduziert, so dass letztendlich bei relativ kurzen Reaktionszeiten (nicht länger als 2 h) keine Umsetzung stattfindet. WERTZ *et al.* konnten jedoch

zeigen, dass bei Reaktionszeiten von 7 h für Reinsubstanzen (z.B. Veresterung von KBA in Pyridin) durchaus ein Produkt erhalten werden kann.^[56] Eine derartig lange Reaktionszeit scheidet aber für analytische Applikationen aus, da mit einer erheblichen Rate an Nebenprodukten gerechnet werden muss.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten letztendlich nicht zur Entwicklung einer neuen und komfortablen analytischen Methode beitragen. Jedoch können Sie als Ausgangspunkt für Untersuchungen zur weiteren Derivatisierung von Reinsubstanzen der Triterpensäuren dienen, beispielsweise zur Entwicklung innovativer Wirkstoffe (Verknüpfung der BAs über die Säure- oder Alkohol-Funktion mit weiteren, chemisch-definierten Wirkstoffen)^[17] oder für das „Ligand Fishing“.^[56]

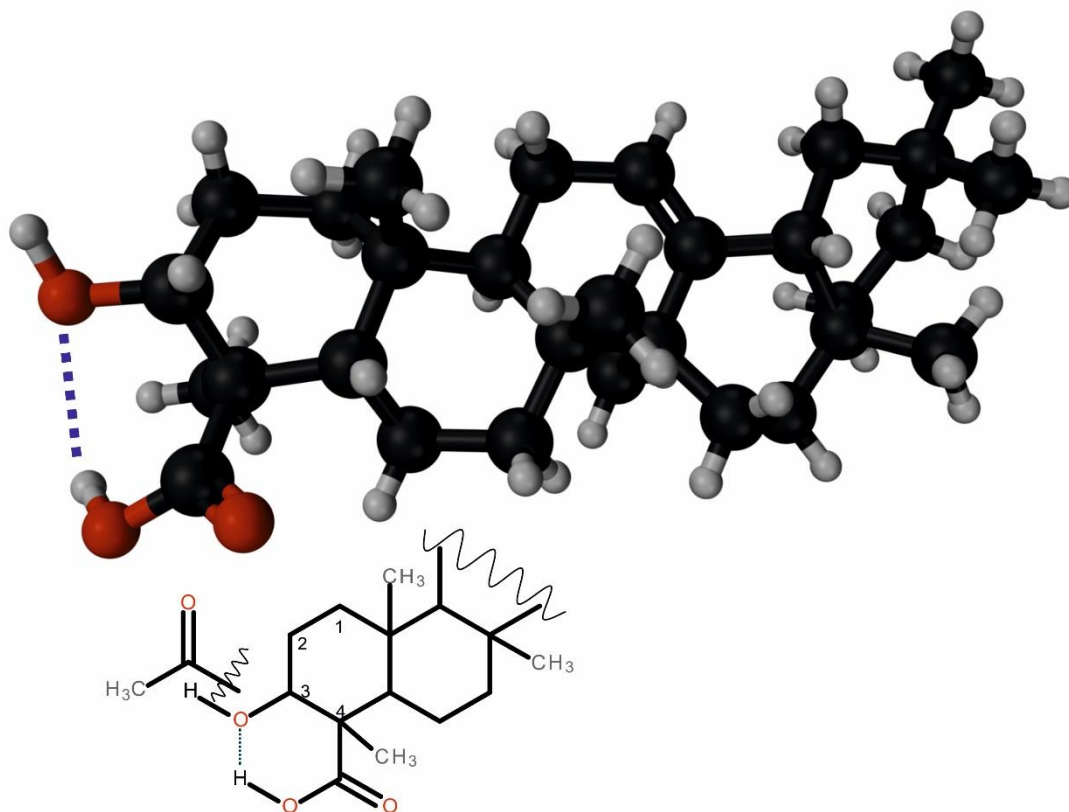


Abb. 5-3 Molekülmodell der α -Boswelliasäure. Zwischen den Substituenten an Positionen 3 und 4 kann sich eine wahrscheinlich sehr stabile Wasserstoffbrückenbindung (gestrichelt, blau) ausbilden. Die Hydroxylgruppe an Position 3 kann zusätzlich acetyliert sein. Teile der Abbildung von: <https://kouzlovuni.cz/wp-content/uploads/2017/08/Alpha-BoswellicAcid3D-1.png>.

5.4 Diskussion der HPLC-Bestimmungen

In diesem Kapitel werden die aufgetretenen Phänomene bei den HPLC-Untersuchungen nochmals herausgearbeitet und probenübergreifend diskutiert.

Problem Koelution

Das Vorkommen von einigen Diterpenen (C_{20}) wie Serratol und Iso-Serratol in vielen *Boswellia*-Spezies, die sich auch bei den hier untersuchten Proben noch in Spuren in den aufgereinigten Proben befinden, kann möglicherweise die quantitativen Bestimmungen der Tirucallensäuren (TAs) erschweren.^[78] Diese Diterpene haben eine Retentionszeit von ca. 27-37 min und können durch Koelution mit den Tirucallensäuren zu erhöhten Werten führen (vergleiche Tab. 4-17). Diese sind in den Untersuchungen bei $\lambda=210$ nm detektiert worden und die Identität der verschiedenen TA wurde mittels HPLC-MS bestätigt (Abb. 5-4); zudem wurde die Trennung auf möglichst hohe Peakreinheit auch bei $\lambda=210$ nm optimiert. Da diese Wellenlänge relativ sensitiv für die unspezifische Erfassung vieler Sekundärmetabolite ist, ist bei unzureichender Abtrennung der Diterpene eine selektive quantitative Erfassung mittels HPLC-MS/MS erforderlich, was aber nicht Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen ist. Im Einzelnen handelt es sich um eine Koelution von α -TA mit Serratol-OH (Rt: 29,4 min) und Oxo-TA (Rt: 30,0 min) sowie β -TA (Rt: 28,9 min) mit Iso-Serratol.

Bei *B. papyrifera* besteht dieses Problem offensichtlich nicht, da der Gehalt der oben genannten Diterpene gering sein soll.^[78] Jedoch ist bei *B. papyrifera* laut Literaturangaben eine Koelution des Diterpens Incensolacetat mit β -Ac-8-24-dien-TA (RT: 35,3 min.) gegeben.^[84] Eine ähnliche Retentionszeit hat das Diterpenen Verticillia-4(20),7,11-trien, was ein spezifischer Marker für *B. papyrifera* sein soll.^[77, 84] In diesen Publikationen wurde auch ebenfalls erwähnt, dass die Terpene α -Humulen, β -Caryophyllen und 3-OH- β -Tirucallol im HPLC-Chromatogramm von *B. sacra* ein „Triplett“ bilden sowie Spuren von *t*-Cardinol und Caryophyllenoxid enthalten sein können.

Wird die Extraktion und Aufreinigung wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben durchgeführt, werden die flüchtigen Terpene bereits bei der Soxhlet-Extraktion abdestilliert und später durch Ausschütteln entfernt. Bei sorgfältigem Arbeiten, gegebenenfalls mit Gegenausschütteln, sollten die oben beschriebenen Koelutionen erst gar nicht auftreten. Bei den hier vorgestellten Untersuchungen stellten die oben erwähnten Mono-, Sesqui- und Diterpene keine größeren Probleme dar. Jedoch sind komplexe, mehrfache Ausschüttelungen zu vermeiden, da hiermit auch der Gehalt der zu bestimmenden Triterpene etwas erniedrigt wird. Sollen die Ätherisch-Öl-Verbindungen präzise bestimmt werden, bieten sich GC-MS-Methoden an; HPLC-Methoden sind hier weniger geeignet.^[77]

In Abb. 5-4 ist nochmals der besonders kritische Bereich um $R_t=30$ min für die untersuchten *Boswellia*-Spezies dargestellt. Insbesondere bei *B. papyrifera* und *B. sacra* ist der Peak für O-TA

neben anderen TAs signifikant, womit sich die Frage stellt, ob die biologische Aktivität von Weihrauch nur auf die Boswelliasäuren (BAs) zurückzuführen ist; dieser Punkt wird am Ende des Kapitels nochmals aufgegriffen.

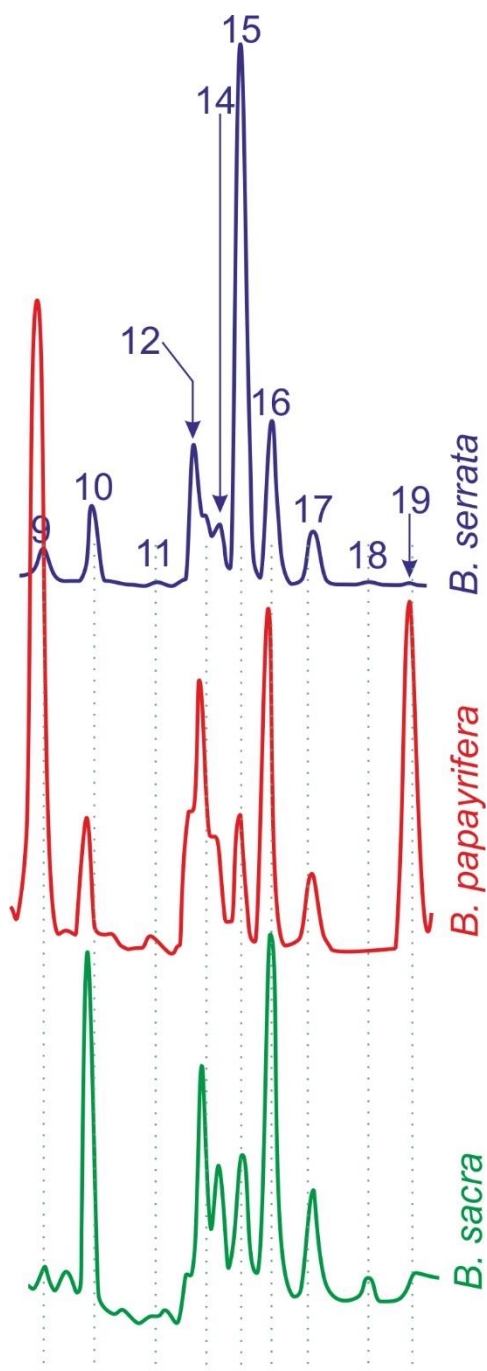


Abb. 5-4 Musterchromatogramm der Extrakte 1 – 3 (*B. serrata*, *B. sacra*, *B. papyrifera*) bei 210 nm. Folgende Substanzen konnten identifiziert werden: **9.** RA, **10.** Dehydro-RA, **11.** 11-OH-ABA / 210 nm, **12.** 9,11-dehydro- β -BA, **14.** β -TA, **15.** α -TA, **16.** 3-Oxo- β -TA, **17.** 7-24-Dien-TA, **18.** LA, **19.** $C_{15}H_{26}O$, Sesquiterpen z.B. Cubenol. Zuordnung der Abkürzungen siehe Tab. 4-17.

Nachfolgend werden die erhaltenen Chromatogramme vergleichend, zunächst bei $\lambda=210$ nm, dann bei $\lambda=254$ nm diskutiert.

Detektion bei $\lambda=210$ nm:

Bei einer Detektionswellenlänge von $\lambda=210$ nm werden eine Vielzahl von Triterpensäuren erfasst (Abb. 5-5). Durch die mehrstufige Reinigung können in den untersuchten Proben nur saure Substanzen sowie in sehr geringem Umfang unpolare Neutralstoffe vorliegen, die durch "Verschleppung" in den Extrakt gelangt sind. Für alle Extrakte ist die Peakgruppe zwischen 27 min und 32 min sehr markant (vergleiche Abb. 5-4), in der sich eine Mischung aus unterschiedlichen TAs befindet, die nur schwer chromatographisch aufgetrennt werden können. Die Identifizierung wird zudem durch zahlreiche Isomere mit identischem Molekulargewicht erschwert. Zwischen den einzelnen Proben sind zwar im Muster („Fingerprint“) Unterschiede erkennbar; diese folgen jedoch keinem klar erkennbaren Schema, über welches sie zweifelsfrei einer bestimmten Spezies zugeordnet werden könnten. So konnten aus den vorliegenden Daten keine eindeutigen Markersubstanzen aus dem TA-Komplex identifiziert werden.

Jedoch gibt es bei der Probe 3 (Weihrauch aus Äthiopien; *B. papyrifera*) eine Besonderheit: Hier zeigen sich die auffällig große Peaks 9 und 19 (siehe auch Abb. 5-4). Da die Probe gut erkennbare, künstlich hergestellte Agglomerate enthält, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die hier vermuteten Substanzen überhaupt aus dem Weihrauch stammen. Dieses unterstützt den Verdacht, dass bei Probe 3 Materialien zum "Verkleben" der kleinen Weihrauchpartikel zu größeren Agglomeraten (die zu einem höheren Preis verkauft werden können) verwendet wurden, die wohlmöglich nicht von *Boswellia*-Arten stammen (siehe Foto Probe 3; Abb. 3-3).

Wird die chromatographische Trennung bei $\lambda=254$ nm (vergleiche Abb. 5-6) detektiert, so zeigt sich eine große Ähnlichkeit zwischen den Proben 3 und 10. Bei der Detektionswellenlänge $\lambda=210$ nm zeigt die Probe 10 jedoch keine auffällig großen Peaks 9 und 19; im Bereich zwischen 27 min und 32 min des zugehörigen Chromatogramms zeigt sich bei dieser Probe ein Peakmuster, welches sehr an den Extrakt 7 erinnert (Abb. 5-5). Aus diesen Chromatogrammen bei Detektionswellenlänge $\lambda=210$ nm kann deshalb nicht der zwingende Schluss gezogen werden, dass die Probe 3 von *B. papyrifera* stammt; laut Deklaration sollte sie aus Äthiopien stammen. Wie bereits oben erwähnt, sind die Chromatogramme bei einer Detektionswellenlänge von $\lambda=210$ nm insgesamt relativ uneinheitlich.

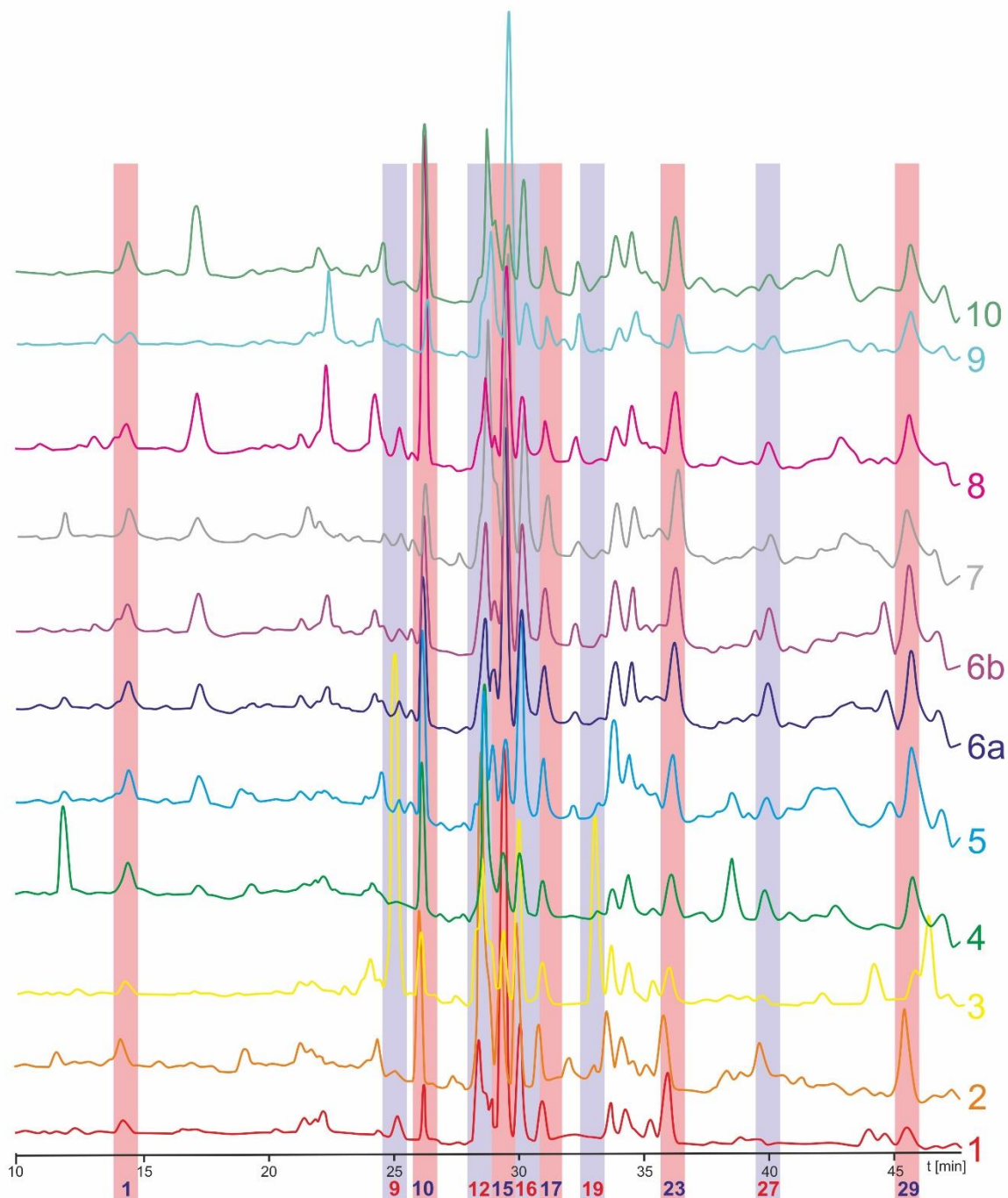


Abb. 5-5 Vergleichende Darstellung aller untersuchten Extrakte bei 210 nm. Folgende Substanzen, bei denen zwischen den einzelnen Proben teils signifikante Unterschiede auftraten, konnten identifiziert werden: **1.** β -Glyc, **9.** RA, **10.** Dehydro-RA, **12.** 9,11-dehydro- β -BA, **15.** α -TA, **16.** 3-Oxo- β -TA, **17.** 7-24-Dien-TA, **19.** $C_{15}H_{26}O$, Sesquiterpen z.B. Cubenol, **23.** β -BA, **27.** 3-O-Ac-LA, **29.** β -ABA. Zuordnung der Abkürzungen siehe Tab. 4-17.

Detektion bei $\lambda=254$ nm:

Die Extrakte 4 bis 6 und der Extrakt 8 sind nahezu identisch und stehen wohl für *B. sacra*; die Identität der Proben wurde durch Herrn Alex Moll, Oman-Shop, belegt. Alle diese Extrakte haben den gleichen Fingerprint (Abb. 5-6); das Muster der detektierbaren Substanzen ist sehr konstant und sehr ähnlich. Hauptkomponente ist die AKBA (Peak Nr. 13); der Gehalt an KBA (Peak Nr. 4) ist relativ gering. Zudem bilden die Peaks 3 und 4 einen charakteristischen Doppelpeak. Ebenfalls ist der Peak 30 gut sichtbar.

Die Extrakte 3 und 9 haben ein identisches Muster; die Herkunft von Extrakt 3 ist mit Äthiopien angegeben, wo *B. papyrifera* die vorherrschende Spezies ist. Wie bereits oben ausgeführt, fiel bei Probe 3 auf, dass kleinere, nur wenige Millimeter große Weihrauchfragmente zu größeren Aggregaten "zusammengekittet" wurden (siehe Foto Probe 3; Abb. 3-3). Mit größeren Stücken lässt sich ein höherer Marktpreis erzielen. Hier wurde offensichtlich Ware mit einem zunächst niedrigen Verkaufswert aufgewertet. Gut sichtbar sind die Peaks 5, 24 sowie ein bisher nicht identifizierbarer Peak bei $R_t=42,4$ min; die Diskussion weiterer Einzelpeaks erfolgt im nächsten Absatz. Im Massenspektrum zeigt sich bei dieser Retentionszeit keine der bekannten Triterpensäuren. Auch ist im „Total Ion Current“ (TIC) im untersuchten Massenbereich von 100 bis 700 amu kein spezifisches Massensignal erkennbar; somit handelt es sich entweder um ein sehr kleines Molekül oder die Substanz konnte unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht ionisiert werden, was gelegentlich bei deutlich sauren Naturstoffen der Fall ist; Versuche im „Negative Mode“ verliefen ebenfalls wenig aussagekräftig. Jedoch konnten alle für Weihrauch typischen Triterpensäuren unter den gewählten experimentellen Bedingungen („positive Mode“) sicher identifiziert werden.

Bemerkenswert ist, dass sich um den Bereich von $R_t=44$ min ein relativ flacher und breiter Peak befindet, dessen berechnete Masse von m/z 430,38 zu Cholesterolacetat ($C_{29}H_{48}O_2$) passt, was eine durchaus erwartbare, sehr unpolare Substanz ist. Da Cholesterolacetat bei $\lambda=254$ nm keine nennenswerte Absorption hat, ist die Substanz nicht für den scharf begrenzten Peak bei $R_t=42,3$ min verantwortlich.

Die oben genannten drei Peaks der Extrakte 3 und 9 (Substanzen 5 und 24 sowie Peak bei 42,4 min), verbunden mit der Abwesenheit des Peak-Paares 3 und 4 (Peak 3, 11-OH-BA, fehlt!) ist ein sicheres Indiz für Weihrauch aus Afrika. Weiterhin auffällig ist, dass der Gehalt an KBA (Peak 4) relativ gering ist und der an AKBA (Peak 13) der relativ höchste in den hier vorgestellten Untersuchungen ist.

Ein deutlicher Doppelpeak der Substanzen 3 und 4 fehlt auch bei *B. serrata*. Im Gegensatz zum afrikanischen Weihrauch zeigen die oben erwähnten drei Markerpeaks nur eine geringe Intensität.

Charakteristisch für diese Art ist zudem, dass der Gehalt an 13 (AKBA) relativ gering ist und der Gehalt an KBA (Peak 4) relativ zu den anderen untersuchten Arten der höchste war.

Die Probe 2 stellt so genannten "Grünen Weihrauch" dar, der eine sehr hochpreisige Handelsqualität von *B. sacra* darstellt. Im Dezember 2018 wurde diese Probe in der Stadt Salalah (Oman) für einen Preis von 120 Euro pro Kg erworben. Der hohe Preis macht die Ware attraktiv für Verfälschungen. So zeigte Probe 2 nicht vollständig das für *B. sacra* typische Peakmuster (Fingerprint). Der geringe Gehalt an KBA (Peak 4) und der sehr hohe Gehalt an AKBA (Peak 13) lassen eher den Schluss zu, dass dieser Weihrauch mit afrikanischer Ware „gestreckt“ wurde. Die Probe 2 ähnelt auch dem Extrakt 10 der Firma Floradex. Das Material zur Herstellung dieses Extraktes sollte aus dem Oman kommen, jedoch wurde die Identität nicht weiter verifiziert. Zu beachten ist aber auch, dass *B. sacra* im Vergleich zu *B. serrata* wesentlich schlechter untersucht ist und die Literaturdaten wahrscheinlich auch unvollständig sind.

Interessant ist auch ein Vergleich der Proben 6a und 6b. Beide stammen von *B. sacra*. Die Probe 6a besteht aus sehr hellen, einheitlichen Fragmenten, die Probe 6b aus inhomogenem, teilweise sehr dunklem Material. Interessanterweise hat das sehr unterschiedliche Aussehen keinerlei Einfluss auf das hier gezeigte Inhaltsstoff-Spektrum. Offensichtlich ist das Spektrum an Boswelliasäuren und weiteren Triterpensäuren nicht abhängig von der Färbung des Materials und steht damit wohl auch nicht in direktem Zusammenhang mit der Handelsqualität. Tendenziell sieht es aber so aus, dass helleres Material bei *B. sacra* einen etwas höheren Gehalt an Triterpensäuren hat.

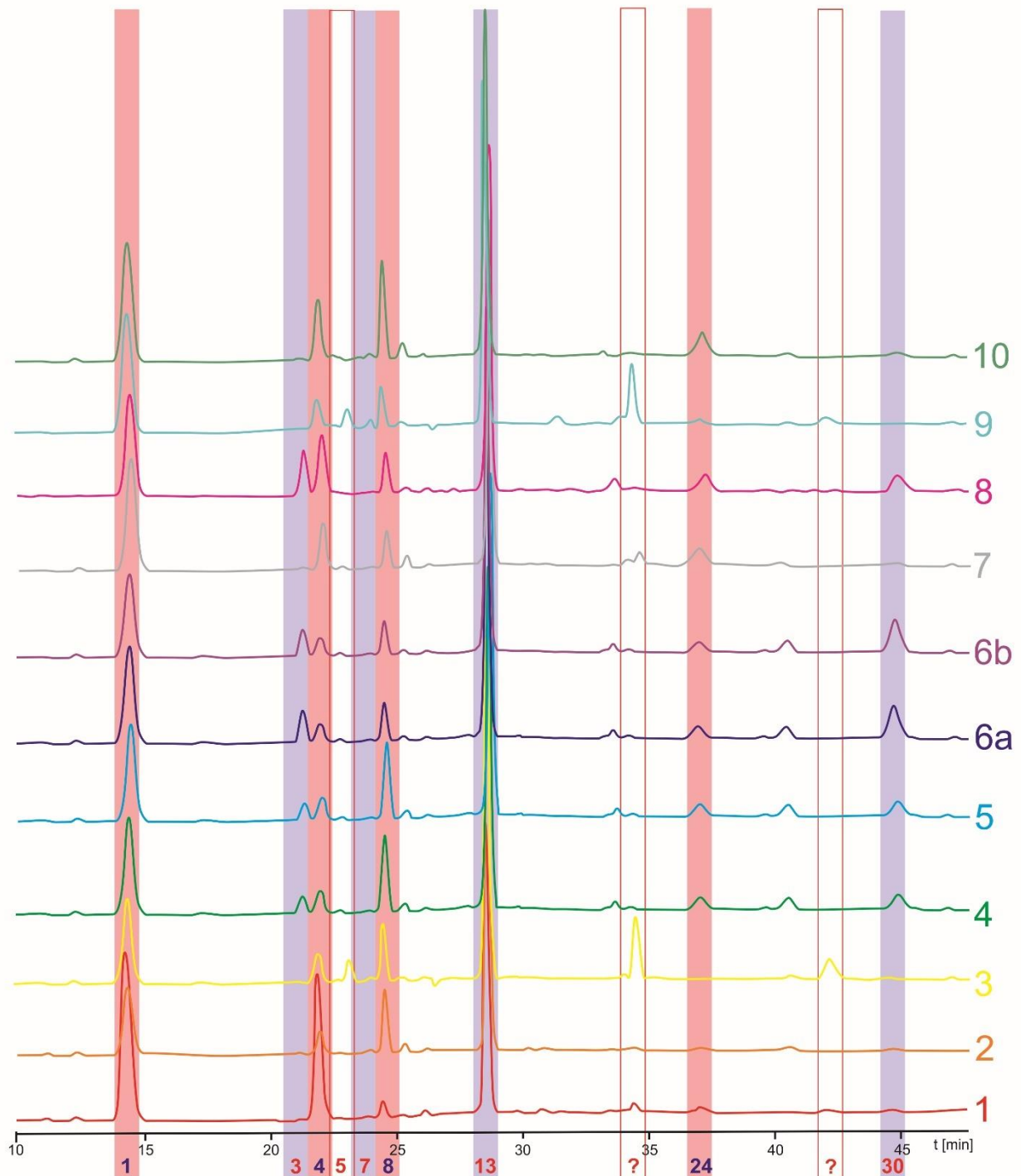


Abb. 5-6 Vergleichende Darstellung aller untersuchten Extrakte bei 254 nm. Folgende Substanzen, bei der sich zwischen den Proben teils signifikante Unterschiede ergaben, konnten identifiziert werden: **1.** β -Glyc, **3.** 11-Keto-Robursäure, **4.** KBA, **5.** Nicht identifiziert, M_G 456,71, **7.** Iso-Serratol, **8.** 11-Keto- α -BA, **13.** AKBA, **24.** Keto-dihydro-robersäure, **30.** Ad- β -BA. Zuordnung der Abkürzungen siehe Tab. 4-17.

Nachfolgend werden weitere, auffällige Einzelpeaks für beide Wellenlängen diskutiert.

Peaks bei $R_t=25,1$ min (bei 210 nm) und $R_t=34,7$ min (bei 254 nm), Extrakt 3 (Weihrauch aus Äthiopien, wahrscheinlich *B. papyrifera*)

Eine massenspektrometrische Auswertung des Chromatogramms des Extrakts 3 ergab auffällig und ungewöhnlich großen Peaks bei einer Retentionszeit von 25,1 min und 34,7 min, die besonders gut bei einer Wellenlänge von 210 nm sichtbar waren. Unter diesen Peaks verbergen sich massenspektrometrische Signale, die auf flüchtige Terpene wie Serratol (M_G 290,6) oder Hydroxyserratol hinweisen. Wurden diese Substanzen in eine theoretische Gehaltsberechnung mit einbezogen, so ergab sich ein Summengehalt aller Peaks von ca. 107 %, was unwahrscheinlich ist. Aus diesem Grund wurden diese Peaks nicht in die Gehaltsberechnung mit einbezogen.

Dieses Rechenbeispiel ist ein Hinweis darauf, dass in dieser Weihrauchprobe Substanzen enthalten sind, die für dieses Baumharz atypisch sind. Leider gestaltet sich die Auswertung der Massenspektren als sehr komplex, da die Peaks im MS erkennbar aus mehreren Substanzen bestehen. Nachfolgend werden die beiden Peaks einzeln betrachtet.

Peak bei $R_t=25,1$ min

Es konnten folgende Massen detektiert werden: $m/z = 469$ (geringe Intensität); 387; 305

$[M+H]^+$ 469 amu: Diese m/z passt theoretisch zu Dehydro-rubinasäure, M_G 468,71, $C_{30}H_{44}O_4$, die aber später bei 26,2 min eluiert wird. Dieser Peak könnte also eine isomere Struktur repräsentieren, die in Spuren vorkommt; das zugehörige Massensignal ist äußerst schwach.

$[M+H]^+$ 387 amu: Dieses Massensignal kann Cholesterol, M_G 386,35, $C_{27}H_{46}O$, zugeordnet werden. Cholesterol ist bei $\lambda=210$ nm gut und bei $\lambda=254$ nm fast gar nicht detektierbar, was also gut zu dem beobachteten Peak bei $\lambda=210$ nm passen würde. Zudem weist das Massensignal bei 387 amu eine relativ hohe Intensität auf.

$[M+H]^+$ 305 amu: Mehrere bekannte Substanzen passen auf dieses Massensignal; möglich sind Arachidonsäure, $C_{20}H_{32}O_2$, M_G 304,5, oder Dihydroabietinsäure, $C_{20}H_{32}O_2$, M_G 304,4. Beide Substanzen wären bei 210 nm detektierbar, Arachidonsäure auch bei 254 nm. Beide Substanzen sind nicht für Weihrauch beschrieben.

Peak bei Rt=34,7 min

Es konnten folgende Massen detektiert werden: $m/z = 497; 371; 227$

$[M+H]^+$ 497 amu: Diese m/z passt theoretisch zu 3-O-Acetyl-dehydro-boswelliasäure, M_G 496,7, $C_{32}H_{48}O_4$, die als Referenzsubstanz zur Verfügung stand und eine Rt von 44,7 min aufweist; damit scheidet diese Verbindung als Möglichkeit aus. Diese Boswelliasäure und ihre Isomere sollten auch bei $\lambda=210$ nm im Chromatogramm sichtbar sein; jedoch ist das Massensignal ausgesprochen schwach. Die Substanz bzw. eine isomere Struktur, kommen also höchstens in Spuren vor.

$[M+H]^+$ 371 amu: Dieses Massensignal kann Cholest-3-en, M_G 370,35, $C_{27}H_{46}$, zugeordnet werden. Cholest-3-en ist bei $\lambda=210$ nm gut und bei $\lambda=254$ nm fast gar nicht detektierbar, was also zu dem beobachteten Peak bei $\lambda=210$ nm passen würde. Zudem weist das Massensignal bei m/z 371, genauso wie das bei m/z 387 (Cholesterol), eine relativ hohe Intensität auf, was auf eine gewisse Beziehung der beiden Substanzen hinweist.

$[M+H]^+$ 227 amu: Hier wäre Myrestoleinsäure, $C_{14}H_{26}O_2$, M_G 226,36, möglich. Myrestoleinsäure ist in der Natur als Bestandteil von halbfesten Triglyceriden durchaus häufig. Zu erwähnen wäre hier das Fett der Sägepalme (*Serenoa repens*; IGUCHI, K, *et al.*, 2001) sowie das Coaba-Öl von *Swietenia macrophylla* oder afrikanischem Mahogoni *Khaya senegalensis* (IBRAHIM, H. *et al.*, 2018).^[86, 87] Im Öl der Früchte von *Khaya senegalensis* stellte Myrestoleinsäure mit 35% die Hauptkomponente dar. Bei der Herstellung des untersuchten Extraktes könnten Fettsäuren durch die Behandlung mit NaOH aus Triglyceriden hydrolytisch freigesetzt werden (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.6).

Diese beiden Peaks, welche sich nicht in sinnvoller Weise über die Referenzsubstanzen quantifizieren lassen (Berechnung entsprechend Kap. 4.3.3); bezieht man sie unter Berücksichtigung des vermuteten Molekulargewichtes mit ein, so ergibt sich ein Summengehalt von 215 % für Extrakt 3, was völlig unrealistisch ist. Die Ergebnisse könnten aber ein Hinweis auf eine neuartige Verfälschung mit einem pflanzlichen, halbfesten Fett sein. In der Literatur beschrieben sind Verfälschungen mit Fichtenharzen,^[6] die sich über den Nachweis von Abietinsäure und seine Derivate nachweisen lassen; hierdurch kann ein höherer Gehalt an 11-Keto-boswelliasäuren vorgetäuscht werden (Koelution!). Abietinsäure als solche konnte aber in dem untersuchten Extrakt nicht gefunden werden, sondern nur eventuell Dehydroabietinsäure.

Durch das Fehlen von Abietinsäure (M_G 302,45) ist eine Verfälschung mit Fichtenharz eher unwahrscheinlich (Abietinsäure ist die Markersubstanz für Fichtenharz). Auch die gelegentlich zitierte Verunreinigung durch Kolophonium erscheint heutzutage eher unwahrscheinlich.^[32] Zudem ist davon auszugehen, dass Verfälschungen eher im Erzeugerland und nicht im Importland stattfinden. Deshalb sind die oben zitierten, eher historischen Hinweise auf Verfälschungen, wohl

nicht mehr zeitgemäß. Wie beispielsweise von HASSAN *et al.*, 2019 ausgeführt, gibt es eine Fülle von afrikanischen Baumharzen, die als Verfälschungen in Frage kommen.^[88] Wie bereits oben aufgeführt, wäre noch eine beliebige Anzahl an Fetten als mögliche Verfälschungen in Betracht zu ziehen.

Mögliche Artefaktbildung bei der Extraktion und Aufreinigung

Laut Literatur kann die natürlich vorkommende 3- α -O-Acetyl-11-hydroxy- β -boswelliasäure durch thermische Behandlung, Säurezusatz oder auch durch die Ionisation innerhalb eines Massenspektrometers zur thermodynamisch stabileren Artefakt 3- α -O-Acetyl-9,11-dehydro- β -boswelliasäure dehydratisiert werden (siehe Strukturen Tab. 4-17).^[22, 27] Diese Verbindung kann folglich in unterschiedlichen Maßen entstehen. Es wird auch berichtet, dass innerhalb der HPLC-Analysen bei Verwendung der säurefreien Eluenten das metastabile Artefakt 3- α -O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure gebildet werden kann (siehe Struktur Tab. 4-17).^[10] Ein möglicher Zusammenhang ist auch weiter unten in Abb. 5-14 graphisch dargestellt.

Nachfolgend werden die sicher identifizierten Peaks probenübergreifend diskutiert; dabei bezieht sich die Nummerierung der Substanzen auf die Chromatogramme in den Abb. 5-4, 5-5 und 5-6.

β -Glycyrrhetinsäure (Glyc, interner Standard, IST)

In Abb. 5-7 ist deutlich zu erkennen, dass der Gehalt an Glycyrrhetinsäure einer leichten Abnahme von Probe 1 zu Probe 10 hin unterworfen ist, wobei der Gehalt nach zwei unterschiedlichen Verfahren berechnet wurde (siehe insbesondere Legende Abb. 5-7). Dabei ergibt sich zwischen den Verfahren kein signifikanter Unterschied, d.h. der zufällige Fehler ist klein.

Da die Proben 1-10 über mehrere Wochen genau in der numerischen Reihenfolge vermessen wurden, kommt es offensichtlich zu einer geringfügigen Gehaltsabnahme der Glycyrrhetinsäure über die Zeit (Abnahme des Gehalts um ca. 0,2 %). Die Stammlösung der Substanz wurde aber im Gefrierschrank gelagert und Glycyrrhetinsäure ist zudem relativ stabil. Probleme bereitet jedoch die Löslichkeit in Alkohol. Deshalb ist die wahrscheinlichste Erklärung für diese Abnahme über die Zeit, dass Glycyrrhetinsäure bei der Lagerung von ca. -20 °C in geringem Umfang ausgefallen (auskristallisiert) ist. Um dieses Phänomen zu klären, welches aber keinen großen Einfluss auf die erhaltenen Messergebnisse hat, wären umfangreiche Experimente bei unterschiedlichen Lagertemperaturen der gelösten Substanz erforderlich. Bis dahin empfiehlt es sich, die Stammlösung, die vor den Messungen jeweils frisch zu der zu untersuchenden Probe hinzugegeben wird, innerhalb von einer Woche aufzubrauchen. Ansonsten ließ sich die β -Glycyrrhetinsäure bei der Wellenlänge von 254 nm und Rt von 14,2 min mit einer hohen Peak-Intensität sichtbar gut detektieren, so dass es sich um einen brauchbaren IST handelt.

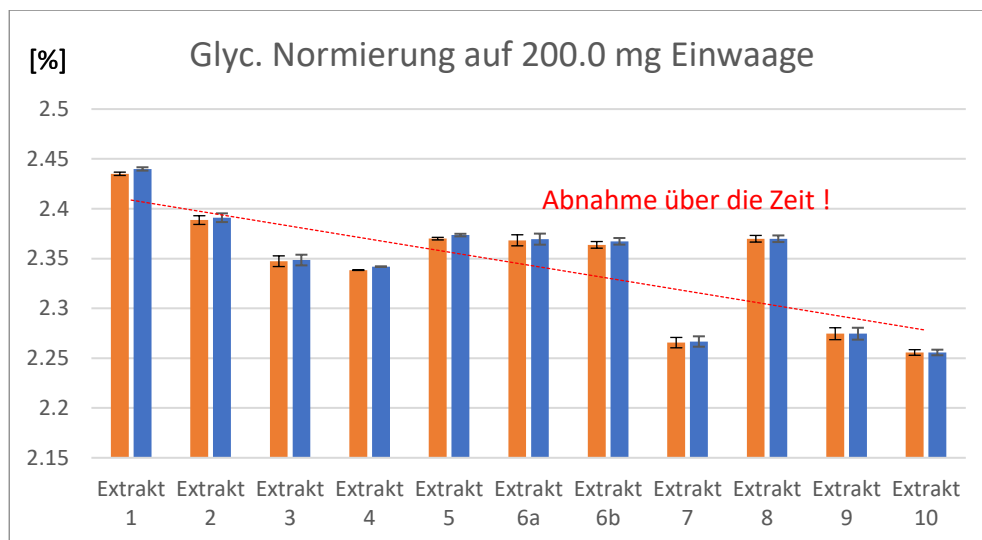


Abb. 5-7 Vergleichende Darstellung der Glycyrrhetinsäure (Glyc) in den Proben 1-10. Bei den orangen Säulen ist der Gehalt auf 200,0 mg Einwaage pro 10 ml normiert; die blauen Säulen geben den tatsächlich ermittelten Gehalt an. Theoretisch müsste der Gehalt bei beiden Messreihen gleich groß sein; die sehr kleinen Unterschiede sind ein Indikator für zufällig aufgetretene, experimentelle Fehler. Die Trendlinie ist die rote, gestrichelte Gerade.

Vom IST abgesehen unterscheiden sich die erhaltenen HPLC-Chromatogramme signifikant zwischen den einzelnen Proben (siehe nachfolgende Abb. 5-8 bis 5-27). Die entsprechend des Musterchromatogramms Abb. 4-21 detektierbaren Substanzen werden anschließend in Abhängigkeit ihrer Detektionswellenlänge diskutiert.

Triterpensäuren, die bei der Wellenlänge $\lambda=254$ nm quantitativ bestimmt wurden:

Die Verbindung 11-Keto- β -boswelliasäure (M_G : 470,69) – ein signifikanter Peak bei $R_t=21,9$ min mit sehr hohen Peak-Intensität – kommt hauptsächlich im Extrakt 1 ($1,40 \pm 0,010$ %), aber ebenso in den Extrakten 8 (0,9 %) und 10 (0,8 %) vor. Alle zeigen sehr geringe Standardabweichungen von ca. 0,01 %. Interessant ist dabei, dass das Isomer 11-Keto- α -boswelliasäure, ein Peak bei einer R_t von 24,5 min (Abb. 5-9), üblicherweise in geringeren Konzentrationen vorkommt, in einigen Extrakten jedoch eher dominant ist, wie z.B. im Extrakt 2 ($1,12 \pm 0,003$ %), Extrakt 5 ($1,00 \pm 0,051$ %), Extrakt 10 ($0,93 \pm 0,001$ %) und Extrakt 3 ($0,79 \pm 0,013$ %). Der Anteil des α -Isomers war in den Extrakten 1 (0,12 %) und 4 (0,18 %) eher gering. Insgesamt dominieren im Extrakt 1, der *B. serrata* zugeordnet werden kann, mehr unpolare bis mittelpolare Triterpensäuren (eher Substanzen mit kürzerer Retentionszeit), wobei *B. sacra* (Proben 2 und 4-10) eher mittelpolare bis unpolare Triterpensäuren enthält (Abb. 5-8, 5-9).

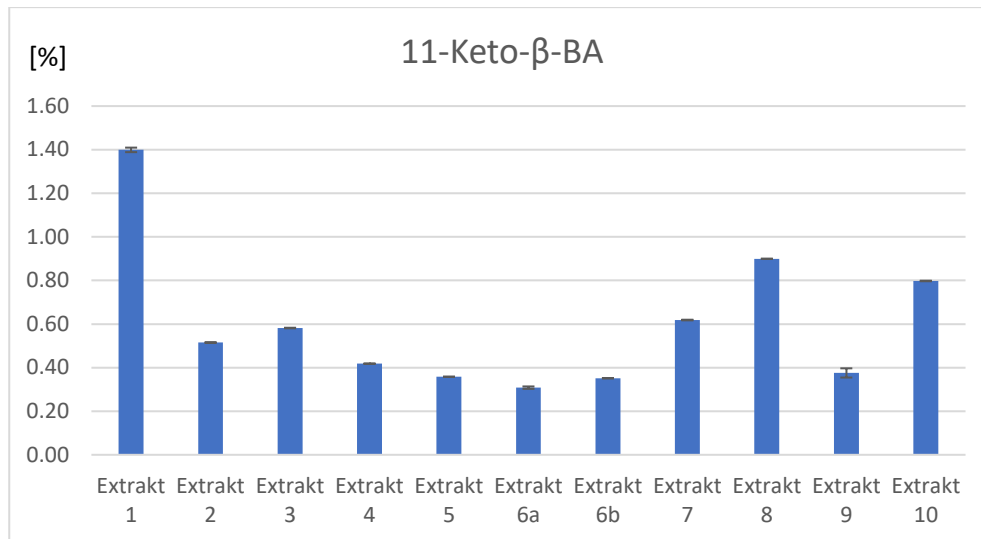


Abb. 5-8 Vergleichende Darstellung der Gehälter an 11-Keto-β-boswelliasäure in den Extrakten 1-10

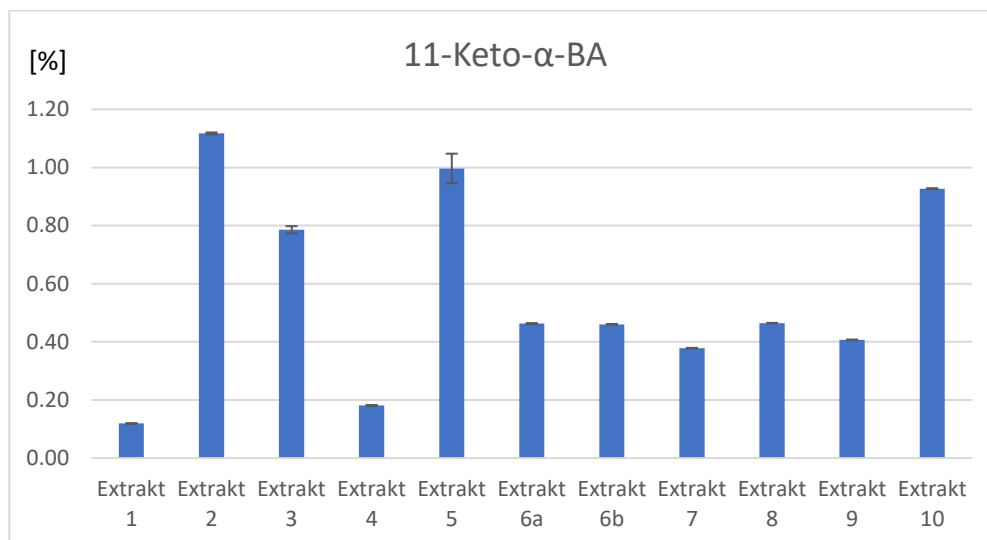


Abb. 5-9 Vergleichende Darstellung der Gehälter an 11-Keto-α-boswelliasäure in den Extrakten 1-10

Für die Verbindung 3-Acetyl-11-keto-β-boswelliasäure (M_G : 512,73) wurde der Peak bei $R_t=28,6$ min mit einer sehr hohen Intensität zugeordnet (Abb. 5-10). Außer bei Extrakt 1 (*B. serrata*), bei dem der Gehalt mit 2,67 % recht gering war, wiesen aller anderen Extrakte sehr hohe Anteile von Acetyl-keto-boswelliasäure auf, wie beispielsweise Extrakt 2 mit 7,85 %. Dieses entspricht auch den Literaturangaben für die Spezies *B. papyrifera* (siehe auch weiter oben).

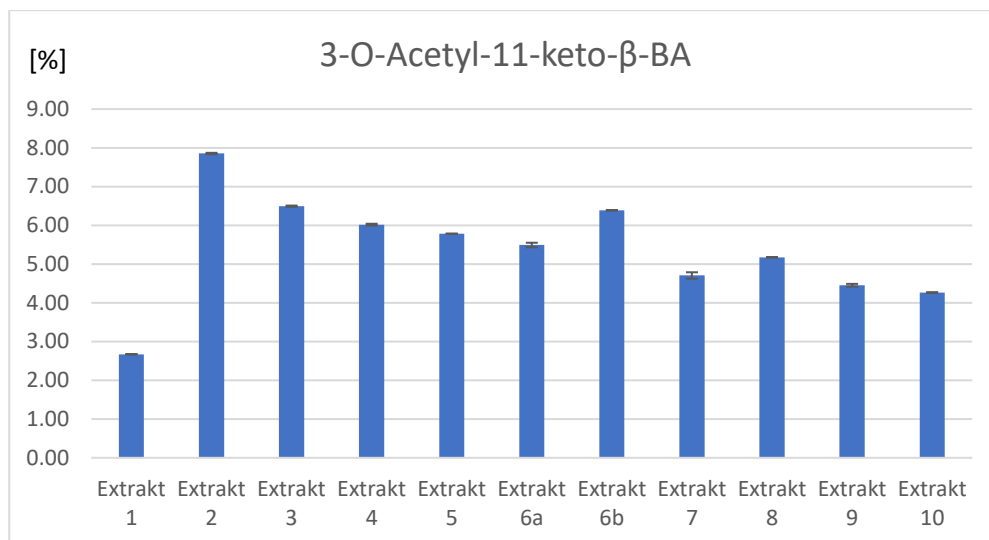


Abb. 5-10 Vergleichende Darstellung der Gehälter an 3-Acetyl-11-keto-β-boswelliasäure in den Extrakten 1-10

Eine präzise Detektion bzw. Identifizierung von 3-O-Acetyl-9-11-dehydro-β-boswelliasäure wäre ohne den Einsatz mehrerer Standards nur schwer möglich gewesen, da der zugehörige Peak bei ca. $R_t=45$ min nur 5 min vor dem Ende der Messung detektiert werden konnte und zudem 3-O-Acetyl-β-boswelliasäure mit $R_t=44$ min eine ähnliche Retentionszeit zeigt. Jedoch ist letztere Verbindung nur bei $\lambda=210$ nm zu detektieren, wohingegen 3-O-Acetyl-9-11-dehydro-β-boswelliasäure bei beiden Wellenlängen $\lambda=210$ nm und $\lambda=254$ nm eine Absorption zeigt. Es wurde aber für die quantitative Berechnung die Wellenlänge von $\lambda=254$ nm genommen, da hier die Absorption höher war und somit genauere (und spezifischere) Werte erhalten wurden. Jedoch bereitete die Integration der Peaks für 3-O-Acetyl-α/β-boswelliasäure bei fast allen Extrakten bei $\lambda=210$ nm Probleme, da diese bei Präsenz von 3-O-Acetyl-9-11-dehydro-β-boswelliasäure zu Peak-Überlappungen führte.

Die höchsten Anteile von 3-O-Acetyl-9-11-dehydro-β-boswelliasäure ($M_G: 496,73$) wurden in den Extrakten 6b (4,79 %) und 6a (3,96 %), auch in Extrakt 5 (2,29 %) und Extrakt 8 (2,08 %) gefunden (Abb. 5-11). Wie in Kap. 1.7 beschrieben, hemmt diese Substanz die 5-LOX mit einer IC_{50} von 0,75 und ist somit deutlich wirksamer als die Keto-boswelliasäuren.^[45] *B. sacra* scheint diese Verbindung in relativ hohen Konzentrationen zu enthalten, was dessen medizinische Verwendung interessant erscheinen lässt.

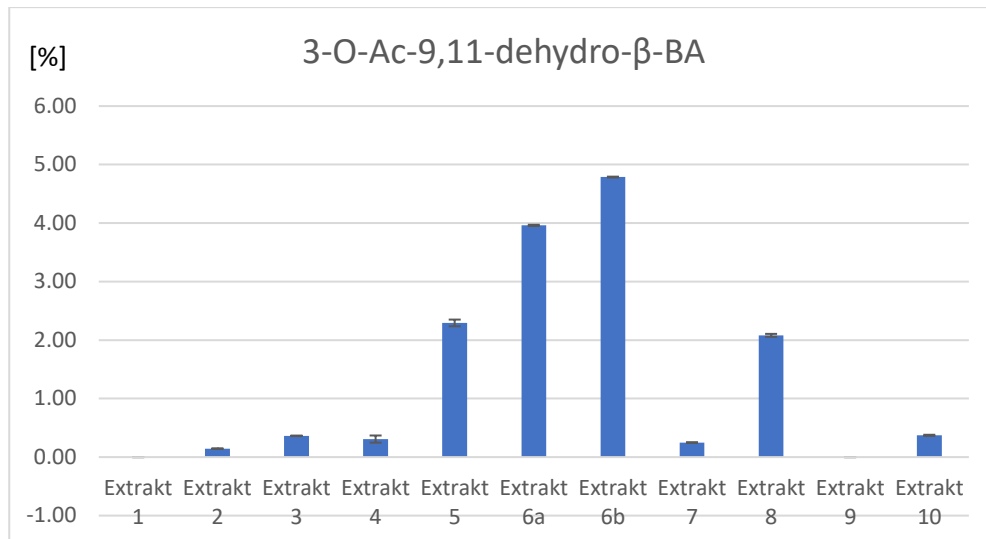


Abb. 5-11 Vergleichende Darstellung der 3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswelliasäure in den Extrakten 1-10

Es wurde vielfach noch ein kleinerer Peak bei $R_t=37,4$ min, Detektion $\lambda=254$ nm, beobachtet, der entsprechend MS-Analysen zu 4(24)-Dihydro-11-keto-Rubursäure (M_G : 456,72 g/mol) passen würde. Diese Substanz wurde aber nur in Spuren in einigen Extrakten gefunden. Nennenswerte Menge ergaben sich in Extrakt 10 mit 0,45 %, in Extrakt 8 mit 0,38 % und Extrakt 7 mit 0,36 %. Laut Literaturangaben ist diese Substanz charakteristisch für die Spezies *B. Socotrana*.^[31] Bei $\lambda=254$ nm sind in den Chromatogrammen noch weitere, zumeist kleine Peaks zu erkennen, die sich aber nicht zweifelsfrei zuordnen ließen (z.B. $R_t=21,3$ min, evtl. Keto-rubursäure) und in den Auswertungen auch nicht weiter berücksichtigt wurden.

Es waren noch einige weitere Peaks bei der Wellenlänge $\lambda=254$ nm zu sehen, die sich massenspektroskopisch nicht eindeutig erfassen ließen.

Triterpensäuren, die bei der Wellenlänge $\lambda=210$ nm quantitativ bestimmt wurden:

Alle anderen Triterpensäuren wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda=210$ nm quantitativ ausgewertet. Die entsprechenden Chromatogramme waren aber im Vergleich zur Detektionswellenlänge $\lambda=254$ nm sehr komplex und die Peaks waren häufig nicht Base-Line-getrennt, was zu einer höheren Standardabweichung führte (Abb. 5-4, 5-5, 5-6). Eine Identifizierung der einzelnen Substanzen war nur über die verwendeten Standards sowie über HPLC-MS möglich.

Die Verbindung 3-OH-11-OH- β -Boswelliasäure (M_G : 472,71) wurde bei ca. $R_t=21,4$ min, kurz vor dem Peak von Keto- β -boswelliasäure (Detektion bei $\lambda=254\text{nm}$), hauptsächlich in den Extrakten 1 ($1,67\pm 0,190$ %), 7 ($1,45\pm 0,169\%$) sowie 2, 3 und 9 gefunden. Ansonsten kommt diese Triterpensäure nur in Spuren vor (Abb. 5-12).

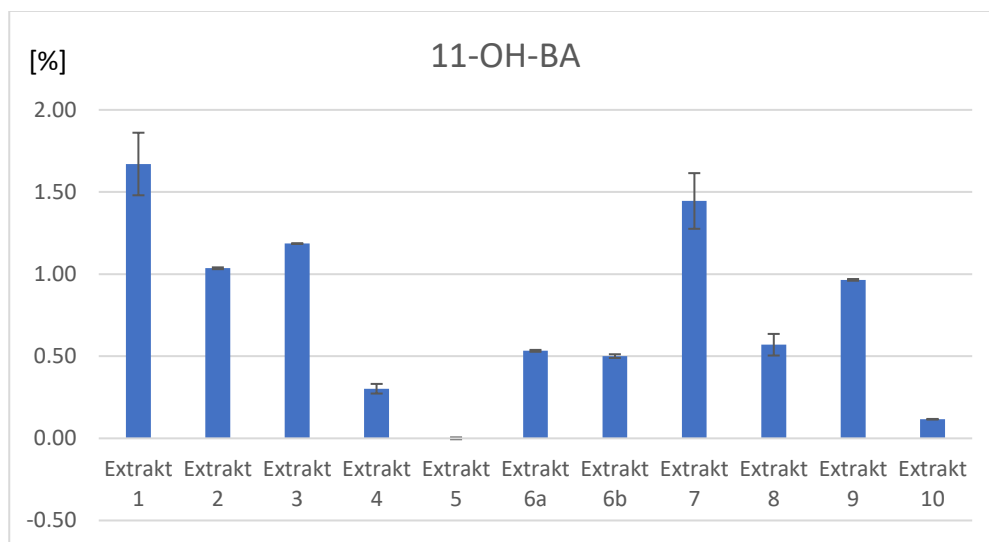


Abb. 5-12 Vergleichende Darstellung der 3-OH-11-OH- β -Boswelliasäure in den Extrakten 1-10

Weiterhin waren bei ca. $R_t=25$ min 2 Peaks mit einem Abstand von einer Minute auffällig, die praktisch in allen Extrakten zu beobachten waren. Der erste, eher kleinere Peak dieses Dubletts bei $R_t=25,2$ min, wurde der Substanz „Rubiniasäure“, einem Isomer von 11-Keto- β -boswelliasäure, mit der Molekülmasse von 470,71, $C_{30}H_{46}O_4$, zugeordnet. Der Gehalt war nur bei Extrakt 3 (*B. papyrifera*) mit $10,56 \pm 0,032$ % auffällig hoch und bei den anderen Extrakten eher niedrig oder sogar nur in Spuren von unterhalb 0,5 % nachweisbar.

Der zweite intensivere Peak bei $R_t=26,2$ min wurde für die Dehydro-rubiniasäure mit der Molekülmasse von 468,71, $C_{30}H_{44}O_4$, zugeordnet. Diese Substanz war in allen Extrakten, typischerweise mit einem Gehalt zwischen 1 % und 2 %, nachweisbar (Abb. 5-13). Besonders hohe Werte wurden im Extrakt 8 ($4,66 \pm 0,001$ %) gefunden; der zugehörige Peak könnte jedoch „verunreinigt“ sein, da bei den HPLC-MS-Untersuchungen bei der gleichen Retentionszeit auch die Massen $m/z=369,35$ und $m/z=371,65$ (positive Mode) gefunden wurden, die zu Cholesterol bzw. Cholesterol-3-en passen. Cholesterole sind ebenfalls Triterpene, die typischerweise in Fetten vorkommen, aber auch ansonsten in der Natur häufig sind. Es muss sich also nicht zwangsweise um eine Verunreinigung durch Fremdmaterialien handeln.

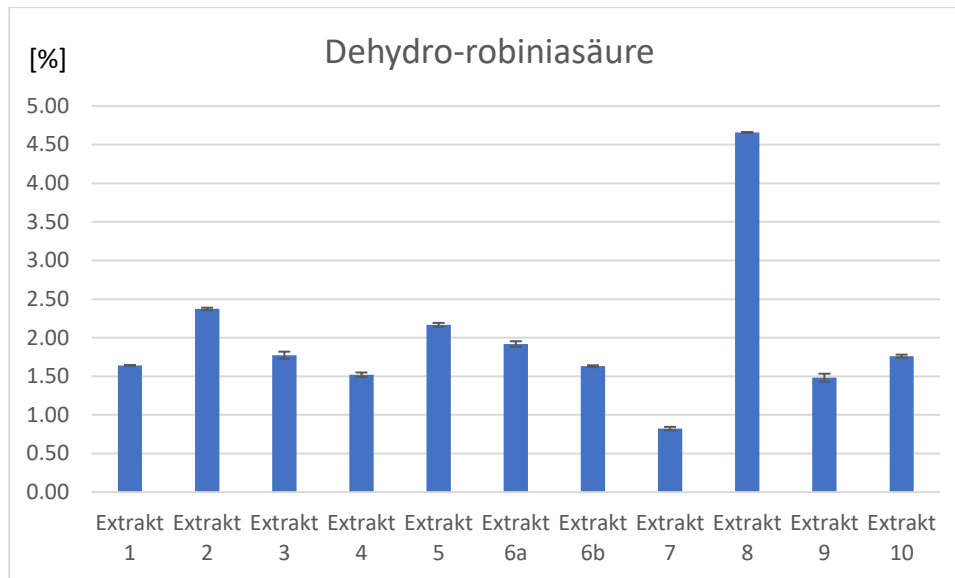


Abb. 5-13 Vergleichende Darstellung der Gehalte von Dehydro-robiniasäure in den Extrakten 1-10

Bei einer Retentionszeit von ca. 28 min konnte ein weiteres Peak-Dublett detektiert werden: Der kleine Peak bei $R_t=27,6$ min wurde der acetylierten Form von β -Boswelliasäure, nämlich der Substanz 3-O-Acetyl-11-OH- β -boswelliasäure (M_G : 514,75), zugeordnet, deren höchster Gehalt bei Extrakt 3 mit $0,69 \pm 0,070$ % lag, während andere Extrakten wie 6b, 8 und 10 geringe Mengen oder nur Spuren enthielten. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Verbindung möglicherweise während der Extraktion und Aufarbeitung zum thermodynamisch stabileren 3-O-Ac-9,11-dehydro- β -boswelliasäure (M_G : 496,73) umgewandelt werden kann (siehe weiter oben „Artefakte“).

Es folgte kurz danach bei $R_t=28,5$ min ein Peak von 3-OH-9-11-Dehydro- β -boswelliasäure (M_G : 454,68), der in die aufsteigende Schulter des Peaks für 3-Acetyl-11-keto-boswelliasäure (jedoch Detektion bei $\lambda=254$ nm!) übergeht, aber bei $\lambda=210$ nm hinreichend genau integriert werden konnte (Abb. 5-14). Der höchste Gehalt für 3-OH-9-11-Dehydro- β -boswelliasäure wurde mit $3,24 \pm 0,040$ % bei Extrakt 1, bei Extrakt 3 (1,46 %) und bei Extrakt 9 (1,13 %) gefunden. Es konnte eine gewisse Korrelation der Gehälter von 3-OH-11-OH- β -Boswelliasäure (Abb. 5-14, graue Säulen) zur 3-OH-9-11-Dehydro- β -boswelliasäure (Abb. 5-14, blaue Säulen) festgestellt werden; letzteres könnte ebenfalls ein Artefakt sein (siehe weiter oben); beide Boswelliasäuren kommen jedoch in vergleichsweise hohen Mengen in Extrakt 1 (*B. serrata*) vor.

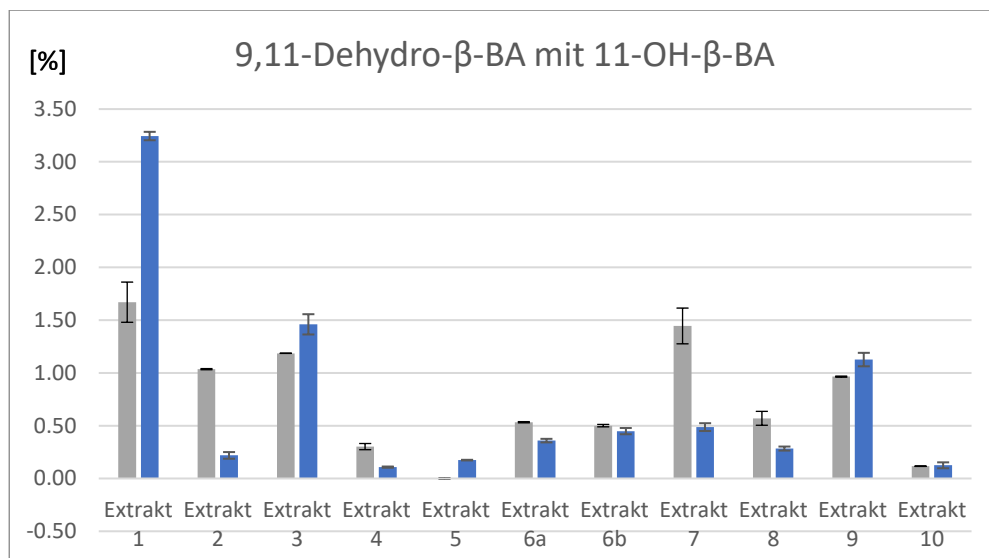


Abb. 5-14 Vergleichende Darstellung der 3-OH-9-11-Dehydro-β-boswelliasäure (blaue Säulen) mit dem eventuellen Präkursor 3-OH-11-OH-β-Boswelliasäure (graue Säulen)

Der Peak bei $R_t=29,1$ min, der in der abfallenden Flanke von Acetyl-11-keto-boswelliasäure (jedoch Detektion bei $\lambda=254$ nm!) liegt, wurde als 3-β-OH-8,24-Dien-tirucallensäure ($M_G: 456,71$) identifiziert, der in allen Extrakten in unterschiedlich großen Mengen mit dem höchsten Gehalt von $1,90 \pm 0,049$ % erneut beim Extrakt 3 (*B. papyrifera*) enthalten war (Abb. 5-15). Das α-Isomer der entsprechenden Tirucallensäure konnte bei $R_t=29,4$ min mit der 3-α-OH-8,24-Dien-tirucallensäure identifiziert werden. Für den Extrakt 1 konnte ein sehr hoher Gehalt von $14,89 \pm 0,091$ %, für Extrakt 9 ein Gehalt von $11,02$ % und für Extrakt 7 ein Gehalt von $4,10$ % ermittelt werden. Ebenfalls sind Extrakte 6a ($4,22$ %) und 6b ($3,87$ %) reich an dieser Tirucallensäure. Wegen des im Vergleich zu den Boswelliasäuren relativ hohen Gehalts an Tirucallensäuren können diese bei der Beurteilung der pharmakologischen Gesamtwirkung von Weihrauchprodukten nicht unberücksichtigt bleiben (siehe weiter unten Kapitel 5.5.).

3-β-OH-8,24-dien-tirucallensäure kommt in den Untersuchungen typischerweise in einer Konzentration unter $1,5$ % vor (Abb. 5-15). Einzige Ausnahme ist mit $1,9$ % Probe 3 (*B. papyrifera*). Der Gehalt an 3-α-OH-8,24-dien-tirucallensäure bewegt sich normalerweise zwischen 1 und 4 % (Abb. 5-16). Es gab bei den hier vorgestellten Untersuchungen jedoch zwei Ausnahmen: In der Probe 1 (*B. serrata*) ergab sich ein Gehalt von fast 15 %; bei Probe 9, die laut Deklaration ein Extrakt aus *B. sacra* sein sollte, wurden 11 % gefunden. Da 3-α-OH-8,24-dien-tirucallensäure offensichtlich eine Markersubstanz für *B. serrata* ist, liegt der Verdacht nahe, dass Probe 9 eine Mischung aus *B. sacra* und *B. serrata* ist.

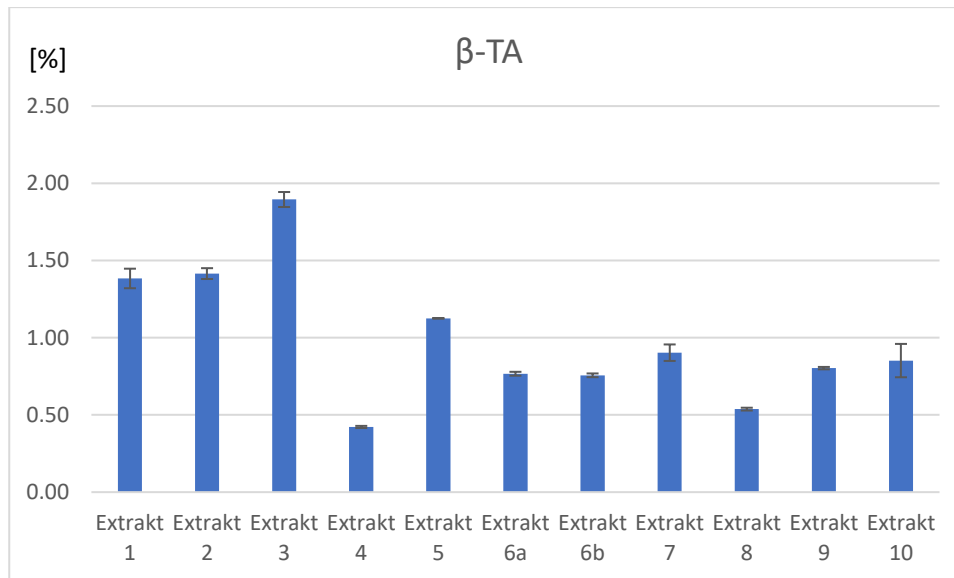


Abb. 5-15 Vergleichende Darstellung der 3-β-OH-8,24-dien-tirucallensäure in den Extrakten 1-10

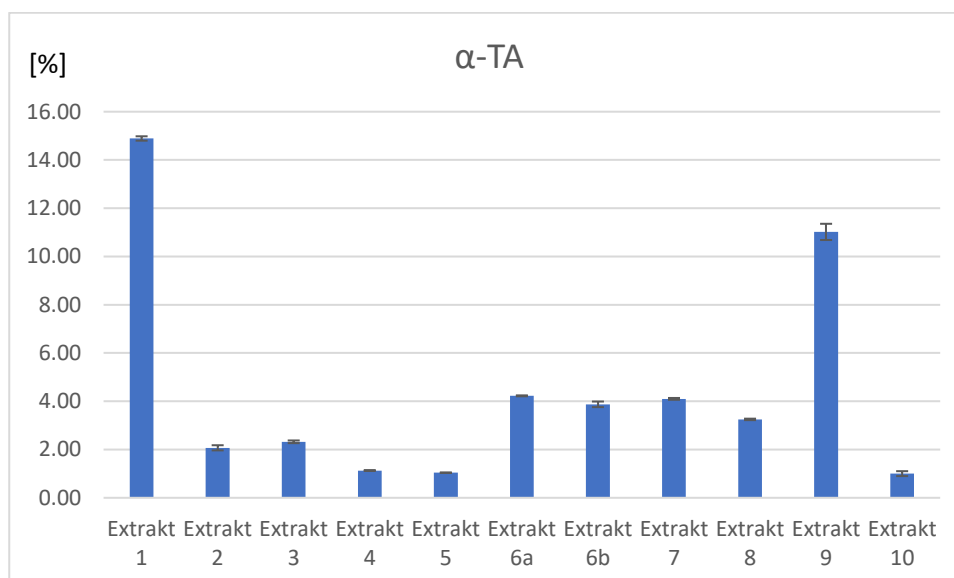


Abb. 5-16 Vergleichende Darstellung der 3-α-OH-8,24-dien-tirucallensäure in den Extrakten 1-10

Ab etwa $R_t=30$ min eluieren eher unpolare Verbindungen; der Gehalt an Acetonitril am Eluenten beträgt dann 95 % und mehr. Der nächste, recht große Peak bei $R_t=30,2$ min wurde der 3-Oxo-β-tirucallensäure ($M_G: 454,68$) zugeordnet (Abb. 5-17). Diese wichtige Triterpensäure, für die es auch einige pharmakologische Untersuchungen gibt (siehe Kap. 5.5), lag ebenfalls als Referenz vor, so dass die Identifizierung als sicher gelten kann und diese Substanz in Verbindung mit den MS-Untersuchungen als Referenzpunkt zur Identifizierung weiterer Triterpensäuren dienen kann. Die höchsten Gehälter wurden in Extrakt 3 (*B. papyrifera*; $5,29 \pm 0,011$ %), Extrakt 1 (*B. serrata*; 4,15 %) und Extrakt 5 mit (*B. sacra*; 2,77 %) gefunden.

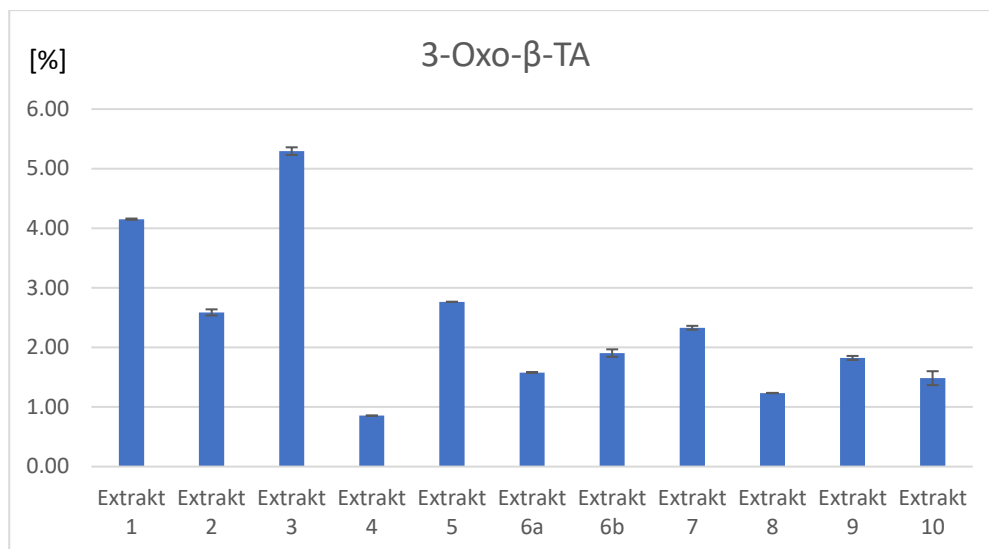


Abb. 5-17 Vergleichende Darstellung der 3-Oxo-β-tirucallensäure in den Extrakten 1-10

In Folge dessen wurde noch das Isomer 3-α-OH-7,24-dien-tirucallensäure (M_G : 456,71) bei $R_t=31,2$ min identifiziert, die bei fast allen Extrakten mit einem Gehalt von 0,8 % - 1,2 % enthalten war, besonders bei den beiden Extrakten 1 und 3 mit 1,46 %, wobei die Extrakt 10 und 4 mit einem Anteil von weniger als 0,6 % deutlich darunter lag (Abb. 5-18).

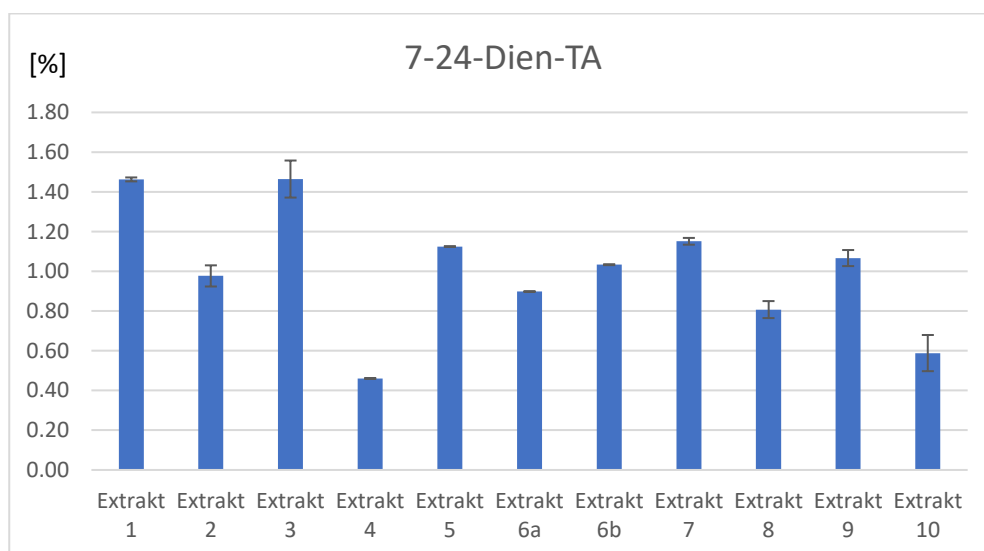


Abb. 5-18 Vergleichende Darstellung der 3-α-OH-7,24-dien-tirucallensäure in den Extrakten 1-10

Der Anteil der Triterpensäure Lupansäure (M_G : 456,71) mit einer $R_t=32,3$ min betrug bei den meisten Extrakten weniger als 1 %, außer beim Extrakt 9 mit $2,97 \pm 0,064$ % (Abb. 5-19), was im Einklang mit Literaturdaten steht.^[89]

Im Chromatogramm folgen der Lupansäure eine eng gedrängte Gruppe weiterer Peaks (Abb. 4-21), beginnend mit einem sehr kleinen Peak bei $R_t=33,2$ min. Dieser wurde nicht Triterpenen, sondern

Sesquiterpenen wie z.B. Cubenol zugeordnet, die aber in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt werden. Dieser Peak war bei Extrakt 3 relativ groß, konnte aber mangels geeigneter Referenzsubstanzen nicht quantifiziert werden (vergleiche auch weiter oben in diesem Kapitel, Diskussion nicht sicher identifizierbarer Peaks).

Es folgt weiterhin im Chromatogramm der Peak für 3-O-Acetyl-lupansäure bei ca. $R_t=40$ min. Dominant ist diese Substanz in den Extrakten 6a und 6b, (2,77 %), wobei die STABW bei 6a (0,232 %) etwas höher liegt als bei 6b (0,012 %). Die Extrakte 1 (0,96 %), 3 (1,01 %) und 10 (0,93 %) wiesen recht geringen Mengen dieses Lupansäure-Derivates auf (Abb. 5-20).

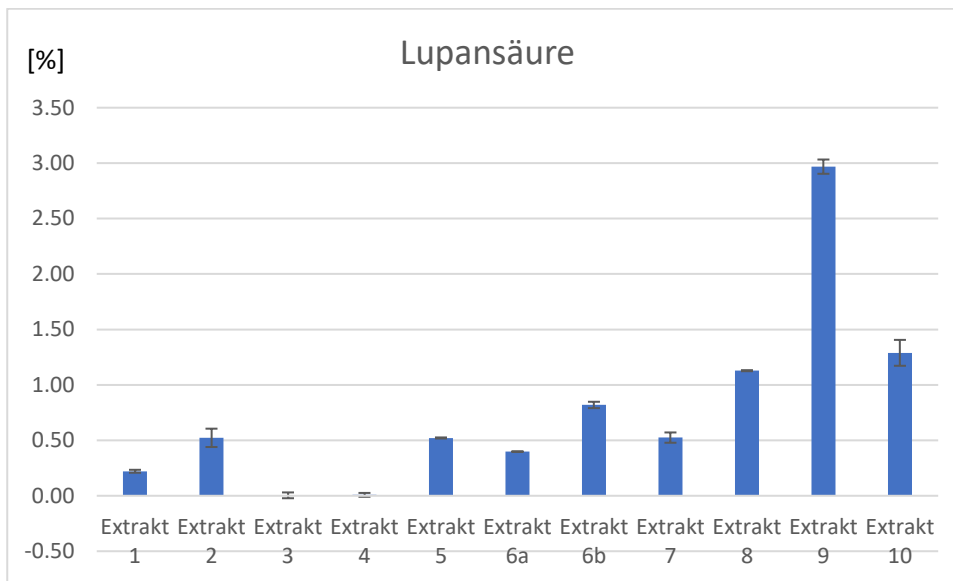


Abb. 5-19 Vergleichende Darstellung der Lupansäure in den Extrakten 1-10

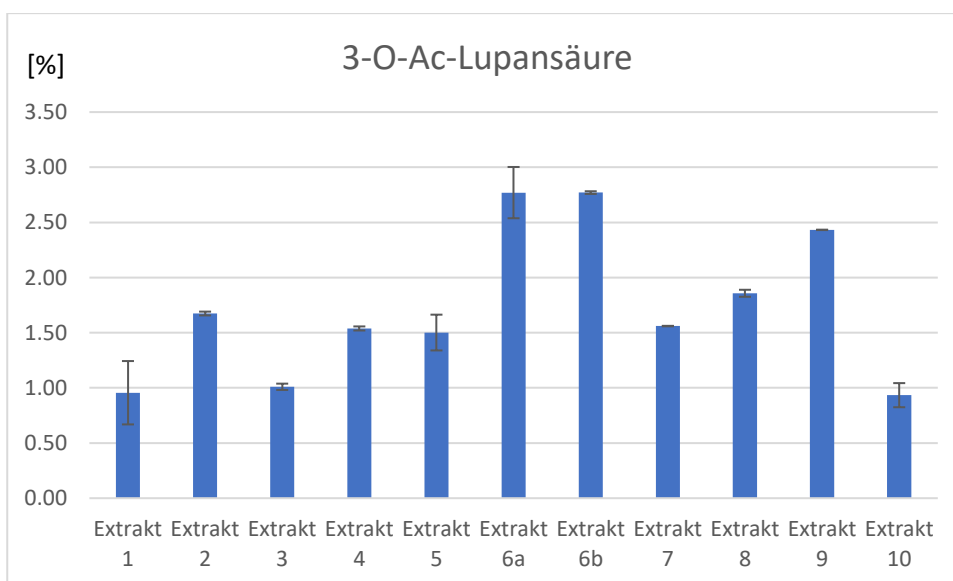


Abb. 5-20 Vergleichende Darstellung der 3-O-Acetyl-lupansäure in den Extrakten 1-10

In diesem Bereich des Chromatogramms sind auch weitere Tirucallensäuren zu finden; bei $R_t=33,7$ min konnte 3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure (M_G : 498,75) identifiziert werden. Die Anteile liegen bei den meisten Extrakten bei annähernd 1 %. Die Extrakte 3 (2,29 %), 5 (1,83 %) und 6b (1,81 %) zeigten höhere Gehälter (Abb. 5-21).

Weiterhin konnte 3- β -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure bei $R_t=35,3$ min identifiziert werden, welche im Extrakt 1 mit 1,20 % vorkommt, neben sehr geringen Anteilen bei den Extrakten 2 (0,15 %), 4 (0,08 %), 9 (0,35 %) und 10 (0,09 %) (Abb. 5-22).

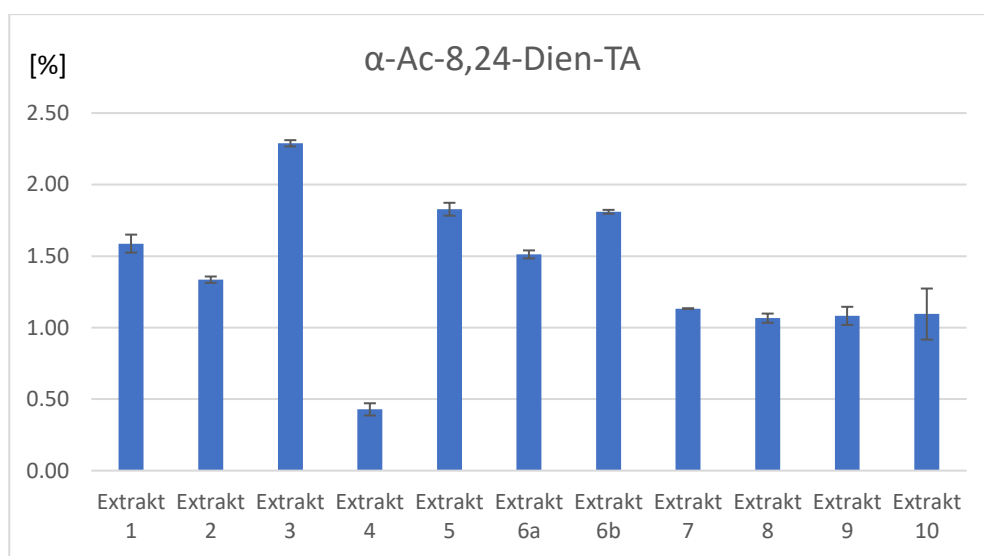


Abb. 5-21 Vergleichende Darstellung der 3- α -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure bei den Extrakten 1-10

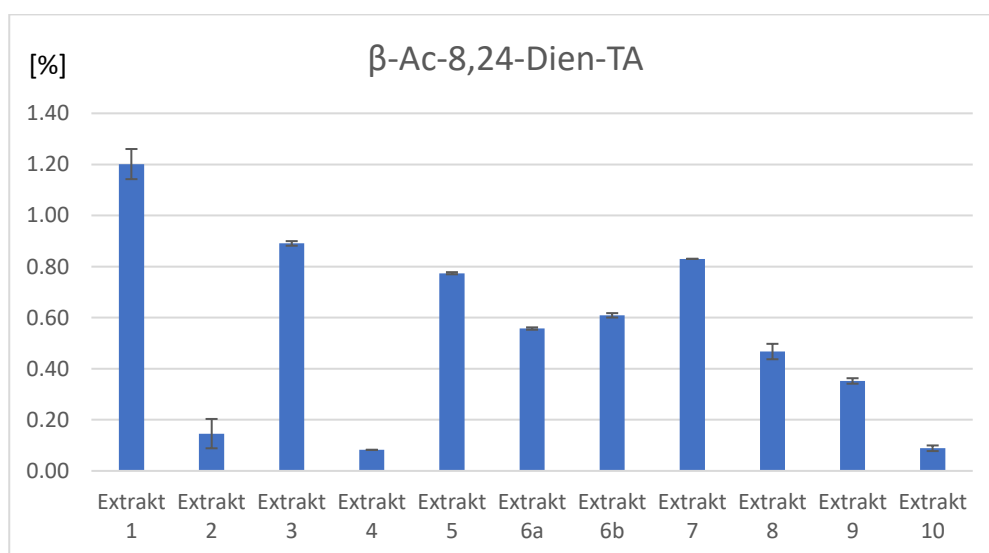


Abb. 5-22 Vergleichende Darstellung der 3- β -Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure bei den Extrakten 1-10

Typische Inhaltsstoffe für die drei untersuchten Weihrauch-Spezies sind die α -Boswelliasäure (Abb. 5-23) bei $R_t=34,2$ min und β -Boswelliasäure (Abb. 5-24) bei $R_t= 36,0$ min. Das α -Isomer kommt in größeren Mengen in Extrakt 9 ($4,65 \pm 0,368$ %), Extrakt 3 (4,20 %), Extrakt 1 (3,93 %), Extrakt 8 (3,32 %) und in geringen Mengen in den Extrakten 2 (1,93 %) und 4 (1,32 %) vor. Der größere β -Boswelliasäure-Peak kam in allen Extrakten in größeren Mengen mit 4-5 % vor, insbesondere aber in Extrakt 1 (*B. serrata*; $8,57 \pm 0,018$ %). Es ist auch eine gewisse Korrelation mit den β -Boswelliasäure-Derivaten in Abb. 5-14 erkennbar, die offensichtlich eine ähnliche Biogenese haben.

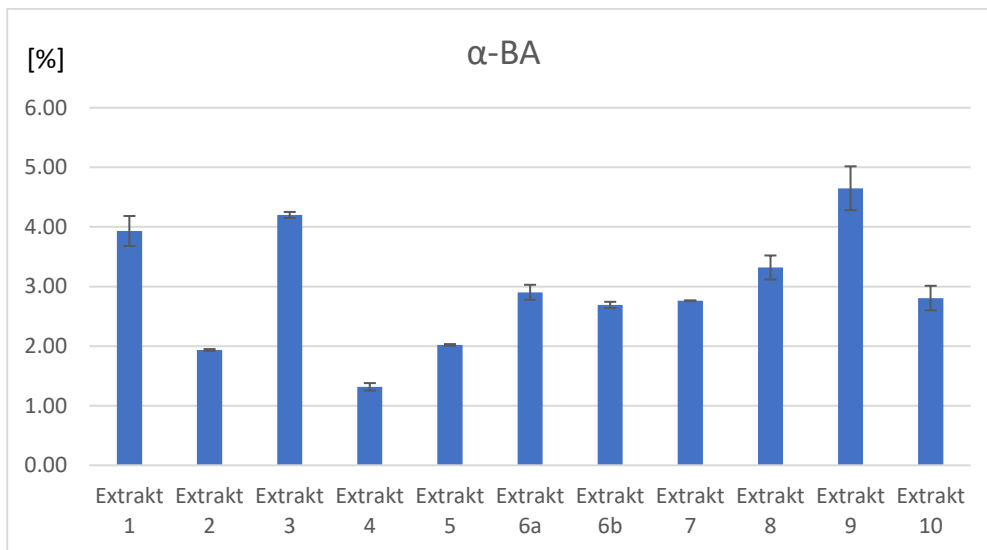


Abb. 5-23 Vergleichende Darstellung der α -Boswelliasäure in den Extrakten 1-10

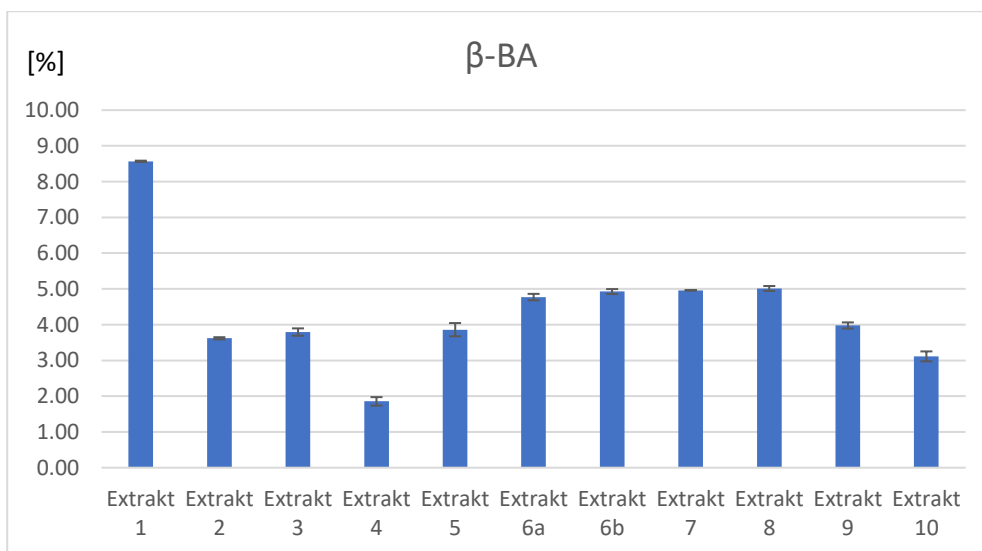


Abb. 5-24 Vergleichende Darstellung der β -Boswelliasäure in den Extrakten 1-10

Im Chromatogramm folgen dann Dreier- oder Vierergruppen kleinerer Peaks. Der Peak bei $R_t=38,2$ min wurde Robursäure ($M_G: 440,71$) zugeordnet. Es wurden recht hohe Gehälter beim

Extrakt 4 (3,04 %) nachgewiesen, obwohl diese Substanz bisher für *B. sacra* als nicht artspezifisch beschrieben wurde. Hingegen wurden sehr geringe Mengen in den Extrakten 1 (0,09 %) und 6a (0,06%) gefunden.

Der nachfolgende Peak bei $R_t=38,8$ min wurde 3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure (M_G : 528,77) zugewiesen; der höchste Gehalt wurde mit $3,72 \pm 0,063$ % bei Extrakt 4 und sehr geringe Konzentrationen bei Extrakt 2 (0,25 %) sowie Extrakt 10 (0,32 %) gefunden (Abb. 5-25). Die MS-Untersuchung ließ auch an dieser Stelle des Chromatogramms noch Spuren der Isomere Acetyldien-tirucallensäure oder Acetyl-methoxy- α -boswelliasäure erkennen.

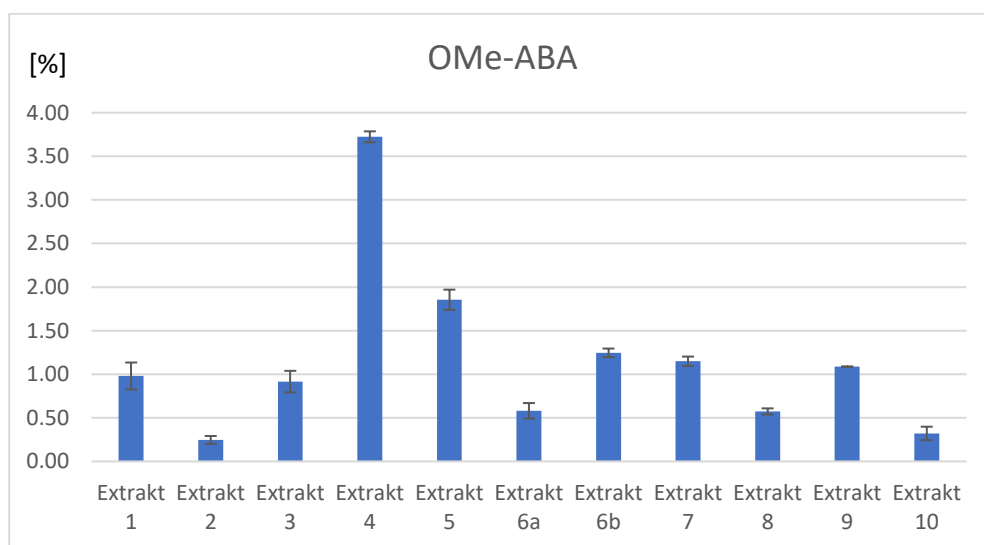


Abb. 5-25 Vergleichende Darstellung der 3-O-Acetyl-11-methoxy- β -boswelliasäure in den Extrakten 1-10

Die Trennung der beiden Isomere 3-O-Acetyl- α -boswelliasäure (ca. $R_t=42$ min) und 3-O-Acetyl- β -boswelliasäure (ca. $R_t=44$ min) sowie die Integration der zugehörigen Peaks gestaltete sich wegen der in diesem Bereich recht welligen Grundlinie als schwierig; in diesem Bereich werden bei einem Acetonitril-Gehalt von ca. 100 % im Eluenten auch solche unpolaren Substanzen eluiert, die über den chromatographischen Lauf auf dem RP-Säulenmaterial absorbiert wurden. Wie schon weiter oben erörtert, ergab die Koelution von 3-O-Ac-9,11-dehydro- β -boswelliasäure (Detektion bei $\lambda=254$ nm) mit der Acetyl- β -boswelliasäure (Detektion bei $\lambda=210$ nm) eine weitere Integrations-Problematik der Peaks, weil die Acetyl-9,11-dehydro- β -boswelliasäure auch bei $\lambda=210$ nm eine schwache Absorption zeigt. Für beide Substanzen, deren Gehalt bei *B. sacra* typischerweise unterhalb von 1,5 % liegt, konnten nur für Probe 1 (*B. serrata*) und Probe 3 (*B. papyrifera*) deutlich erhöhte Werte von bis zu 5 % gefunden werden (Abb. 5-26, Abb. 5-27).

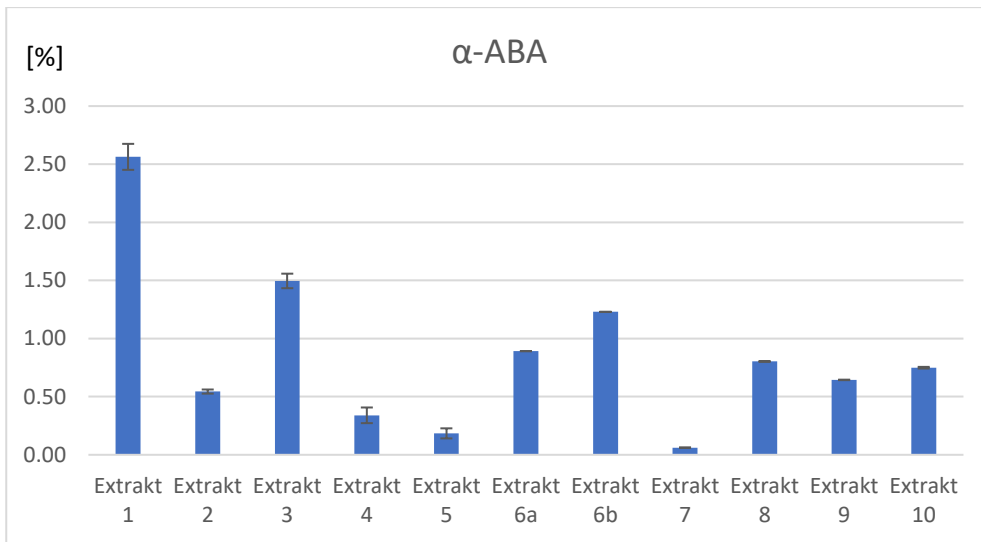


Abb. 5-26 Vergleichende Darstellung der 3-O-Acetyl- α -boswelliasäure in den Extrakten 1-10

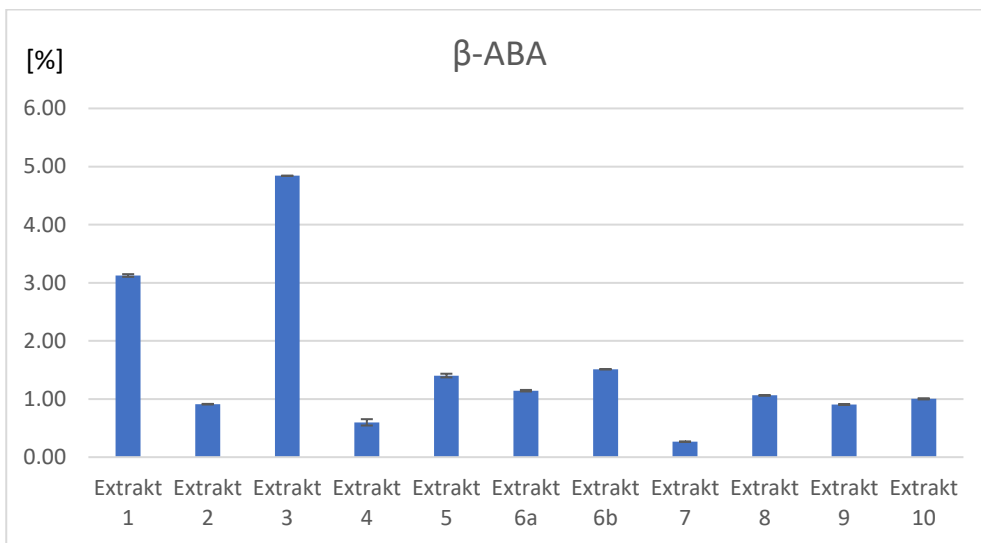


Abb. 5-27 Vergleichende Darstellung der 3-O-Acetyl- β -boswelliasäure in den Extrakten 1-10

5.5 Diskussion der gefundenen Inhaltsstoffe in Bezug auf mögliche, weitere Wirkungen

Wie bei einer HPLC-Detektionswellenlänge von $\lambda=210$ nm gut ersichtlich ist (Abb. 5-5), weisen Weihrauchextrakte neben den Boswelliasäuren eine Vielzahl von weiteren Triterpensäuren auf, die in der Summe einen wesentlich höheren Anteil als die Keto-boswelliasäuren (KBAs) ausmachen. Letztere, die üblicherweise nur im unteren einstelligen Prozentbereich vorkommen (bezogen auf das Weihrauch-Rohmaterial), wurden umfangreich in Bezug auf ihre entzündungshemmenden (antiinflammatorischen) Wirkungen untersucht (siehe Einleitung, Kapitel 1.7).

Hier stellt sich aber die berechtigte Frage, ob die Keto-boswelliasäuren für den rohen Weihrauch oder einem daraus hergestellten Gesamtextrakt die alleinig wertbestimmenden Komponenten sind. Mengemäßig haben beispielsweise die Tirucallensäuren (TAs) bei *B. serrata* den höchsten Anteil in Bezug auf die sauren Inhaltsstoffe. Aber auch der relativ hohe Gehalt an ätherischem Öl, der sich um 10 % bewegt, darf keinesfalls ignoriert werden. Um die Vielfältigkeit möglicher Wirkungen von Weihrauch zu beleuchten, werden nachfolgend die Tirucallane näher betrachtet.

Tirucallane sind Triterpene und gehören zur großen Gruppe der Dammarane, deren bekannteste Vertreter die Ginsenoside von *Panax ginseng* und verwandter Arten sind.^[90] Diese weisen vielfältige Wirkungen auf, beispielsweise eine Modulation des Immunsystems. Tirucallane als solche konnten aus zahlreichen Pflanzen isoliert werden, vorzugsweise aus dem Latex oder auch aus holzigen Pflanzenteilen. Erwähnt werden müssen in diesem Zusammenhang die Gattung *Euphorbia* (z.B. *Euphorbia mellifera*). Im Genus *Euphorbia* ist die Untergattung *Tirucalli* (heute Untergattung *Esula*) namensgebend für diese Gruppe der Triterpensäuren. Weitere Arten sind: *Aphanamixis grandiflora*, *Dysoxylum lenticellatum*, *D. hainanense*, *Ixora coccinea*, *Araliopsis synopsis*, *Capuronianthus mahafalensis*, *Melia toosendan*, *Salacia hainanensis*, *Chisocheton paniculatus*, *Walsura trifoliata* und *Toona cliata*.

Ein anderes afrikanisches Balsambaumgewächs (Burseraceae) ist *Canarium schweinfurthii*. Dieser Baum sondert, genauso wie die nahe verwandten *Boswellia*-Arten, ein Harz ab. Das Harz ist reich an Tirucallensäuren. Für verschiedene Pflanzenteile des Baumes wurden in der Literatur antioxidative, antimikrobielle und entzündungshemmende Wirkungen beschrieben.^[91] Fernerhin konnte gezeigt werden, dass die 3- α -O-Acetyl-8,24-dien-tirucallensäure in einer Konzentration von 10 μ M das Wachstum von Leukämie-HL-60-Zellen zu 42 % hemmt.

In einer weiteren Untersuchung wurden die einzelnen Triterpensäuren aus *Boswellia carterii* (auch Schreibweise *B. carteri*; teilweise gelistet als Synonym von *B. sacra*; kommt jedoch nicht im Oman, sondern in Somalia vor) isoliert und auf ihre antivirale Aktivität hin getestet.^[92] Interessanterweise zeigte der Gesamtextrakt, dessen Hauptbestandteile Boswellia- und Tirucallensäuren waren, die

beste Wirkung (100 %ige Hemmung von *Herpes simplex* Typ I in einer Konzentration von 20 mg/ml). Aber auch die isolierten Tirucallensäuren zeigten noch eine deutliche Wirkung; in höheren Dosen wirkten die Substanzen jedoch zytotoxisch. Für den Gesamtextrakt aus *B. carterii* konnte zudem eine Leukotrien-Inhibierung belegt werden, wodurch ein positiver Effekt in der Therapie von Bronchialasthma erklärt werden kann.^[93] Die gleiche Arbeitsgruppe führte auch Untersuchungen zur Immunmodulation eines Extraktes aus *B. carterii* durch und kam erneut zu dem Ergebnis, dass der Gesamtextrakt wirksamer ist als die isolierten Substanzen, unter anderem Tirucallensäuren.^[94]

Weiterhin konnten in einer chinesischen Arbeitsgruppe ebenfalls aus *B. carterii* 10 neue Triterpene vom Tirucallan-Typ isoliert werden (Boscartene A–J). Einige dieser Substanzen zeigten in einem Modell-Assay in einer Konzentration von 10 µM hepatoprotektive Wirkungen.^[95]

In einer weiteren Untersuchung zu *B. carterii* wird die chemopräventive Wirkung von isolierten Triterpenen, unter ihnen auch vier Tirucallensäuren, in zwei unterschiedlichen Testsystemen untersucht; dabei erwiesen sich die Tirucallensäuren als teilweise wirksam. Ebenfalls wurde für zwei der gefundenen Tirucallensäuren eine cytotoxische Wirkung gegen humane Neuroblastome beschrieben.^[96]

5.6 Diskussion der bestehenden Arzneibuchmonographien

Indischer Weihrauch, *Olibanum indicum*, ist sowohl im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.), Deutsche amtliche Ausgabe 10.0, Monographie 2310, beschrieben,^[41] als auch in der United States Pharmacopoeia (USP) als *Boswellia serrata*.^[42] Somit ist nur eine Spezies offizinell und die nachfolgenden Diskussionen beziehen sich hauptsächlich auf die Probe 1.

Überprüfung auf Identität:

In der USP sind keine genauen Charakteristika aufgeführt; der Text in der Ph. Eur. lautet: „*Indischer Weihrauch besteht aus durchscheinenden, gelblich oder rötlich braun gefärbten, rundlichen oder unregelmäßig geformten Körnern oder Stücken, die in unterschiedlicher Größe von bis zu 3 cm vorliegen. Ihre Oberfläche ist mit einem grauen Staub bedeckt. Die Bruchstelle ist matt oder leicht glänzend.*“ Im Vergleich mit den Abbildungen in Kap. 3.1 erscheint die Beschreibung zutreffend, jedoch wurden für *B. sacra* „Weihrauchtränen von bis zu 5 cm Größe gefunden, wobei es sich jedoch um Ausnahmen handelt (Abb. 1-6). Hinterfragt werden muss auch, ob der bedeckende Staub immer „grau“ ist. Aus den Erfahrungen dieser Untersuchung sowie entsprechend Abb. 3-1 handelt es sich dabei um Weihrauch-Abrieb von eher gelblicher Farbe.

Herstellung der Untersuchungslösung:

Der Text in der USP lautet: „*Transfer about 2.0 g of crushed Boswellia serrata to a round-bottom flask, and reflux in 50 mL of methanol in a water bath for 15 min, stirring with a magnetic stirrer. Repeat till the last extract turns colorless. Evaporate the combined extracts to about 50 mL, transfer to a 100-mL volumetric flask, and dilute with methanol to volume. Before injection, pass through a filter of 0.45- μ m pore size, and discard the first few mL of the filtrate.*”

Der Text in der Ph. Eur. lautet: „*1,0 g pulverisierte Droge (355) (2.9.12) wird mit 90 ml Methanol R versetzt. Die Mischung wird 10 min lang mit Ultraschall behandelt, dabei 3- oder 4-mal kräftig geschüttelt und anschließend mit Methanol R zu 100ml verdünnt. Nach dem Zentrifugieren wird der klare Überstand verwendet.*“

Die Vorschrift der USP erscheint deutlich besser, die Ph.-Eur.-Vorschrift liefert nur eine unvollständige Extraktion. Ebenfalls ist eine Pulverisierung der Droge wohl nur nach der Behandlung mit flüssigem Stickstoff oder Trockeneis möglich. Nach den Erfahrungen aus dieser Untersuchung ist die Soxhlet-Extraktion sicherlich die zu bevorzugte Methode.

Wenn eine Soxhlet-Extraktion wie in Kap. 3.5 beschrieben nicht möglich ist, wäre folgende Vorgehensweise praktikabel:

1,0 g Droge werden mit 3 g Sand R (gereinigter Seesand) versetzt und im Mörser fein zerrieben (Anmerkung: Zusatz von Seesand erforderlich, um Verklumpung bei der Extraktion zu vermeiden). Der Inhalt des Mörsers wird vollständig in einen 100 ml Rundkolben überführt, der Mörser mit wenig Methanol R 3-mal nachgewaschen und der Rundkolben auf 50 ml mit Methanol R aufgefüllt. Anschließend wird der Rundkolben in einem passenden Heizpilz für 30 min unter Rückfluss erhitzt (Anmerkung: Der Sand soll auch hier ein Verklumpen des Weihrauchs verhindern. Alternativ kann aber auch ein Wasserbad verwendet werden). Der noch warme Extrakt wird abfiltriert und der Filter 3-mal mit geringen Volumina Methanol R nachgewaschen. Es wird das klare, schwach gelblich bis bräunliche Filtrat weiterverwendet.

Wünschenswert wäre eine Abtrennung der Neutralbestandteile durch zweistufiges Ausschütteln, wie in der Arbeit beschrieben, doch leider kam es bei *B. serrata* im Gegensatz zu den anderen Arten zu einer starken Emulsionsbildung, vermutlich durch bestimmte Tirucallensäuren. Sind viele Neutralbestandteile in der Probe enthalten, so erschwert dieses die Detektion bei $\lambda=210$ nm. Wegen der zu erwartenden Verluste durch diese Aufarbeitungsschritte erscheint es aber derzeit sinnvoll, diese weitere Aufarbeitung der Proben nicht in eine Arzneibuchmonographie mit aufzunehmen.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen:

In der USP wird als Fließmittel Hexan / Ethylacetat (6:4) verwendet; die Detektion erfolgt unter UV 254 nm und nach Besprühen mit 10 %iger Schwefelsäure in Methanol, frisch zubereitet. Die Entwicklung der DC erfolgt für 5-10 min bei 100 °C.

In der Ph. Eur. wird ein wesentlich komplexeres Fließmittel bestehend aus wasserfreier Ameisensäure / Heptan / Ethylacetat / Toluol (3:10:20:80) verwendet; die Auswertung erfolgt ausschließlich bei UV 254 nm.

Das Ergebnis wird in der USP wie folgt beschrieben: *“Under UV light at 254 nm, the Sample solution exhibits two main zones due to 11-keto- β -boswellic acid and 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid at RF values of about 0.30 and 0.36, respectively, corresponding to zones from the Standard solution. Under visible light, the Sample solution exhibits two additional zones due to β -boswellic acid and 3-acetyl- β -boswellic acid at RF values of about 0.49 and 0.58, respectively, corresponding to zones from the Standard solution. Other, less intense zones are observed for the Sample solution and the Standard solution.”*

In der Ph. Eur. wird das Ergebnis der DC-Untersuchungen mit dem so genannten „DC-Kasten“ beschrieben (Abb. 5-28):

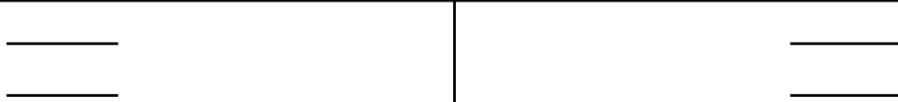
Oberer Plattenrand	
	
Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure: eine fluoreszenzmindernde Zone	eine fluoreszenzmindernde Zone (Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure)
11-Keto- β -boswelliasäure: eine fluoreszenzmindernde Zone	eine fluoreszenzmindernde Zone (11-Keto- β -boswelliasäure)
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Abb. 5-28 DC-Kasten der Ph.-Eur.-Monographie 2310 (Indischer Weihrauch). Die detektierten Substanzen befinden sich alle im unteren Drittel der Platte (Teilstriche jeweils bei 1/3 und 2/3 der DC).

Um die Keto- β -boswelliasäuren voneinander zu trennen, ist ein einfaches Fließmittelsystem wie in der USP beschrieben völlig ausreichend; eine Säurezusatz ist nicht erforderlich. Aus toxikologischen Gründen sollte man aber Hexan gegen Heptan oder Cyclohexan ersetzen. Mit dem USP-

Fließmittelsystem ist es jedoch nach eigenen Untersuchungen nicht möglich, 3-O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure von β -Boswelliasäure zu trennen. β -Boswelliasäure ist jedoch bei der Detektion bei UV 254 nm unsichtbar, färbt sich jedoch mit dem Detektionsreagenz an.

Ebenfalls ist es für eine Arzneibuchmonographie inakzeptabel, dass ohne zwingenden Grund alle zu bestimmende Substanzen im unteren Drittel der DC liegen.

Die komplexe Zusammensetzung des Ph.-Eur.-Fließmittels erscheint nicht gerechtfertigt; geht es alleinig um die Trennung der Keto- β -boswelliasäuren, so sind binäre Systeme, wie das in der USP, absolut ausreichend. Ebenfalls muss kritisiert werden, dass bei dem Ph.-Eur.-System alle nachzuweisenden Substanzen sich im unteren Drittel der DC befinden, was sich entsprechend Kap. 4.2 problemlos korrigieren lässt (z.B. Toluol / Aceton 7:3). Auch führt dieses komplexe Fließmittelsystem nach eigenen Untersuchungen nicht dazu, dass 3-O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure von β -Boswelliasäure ausreichend getrennt wird.

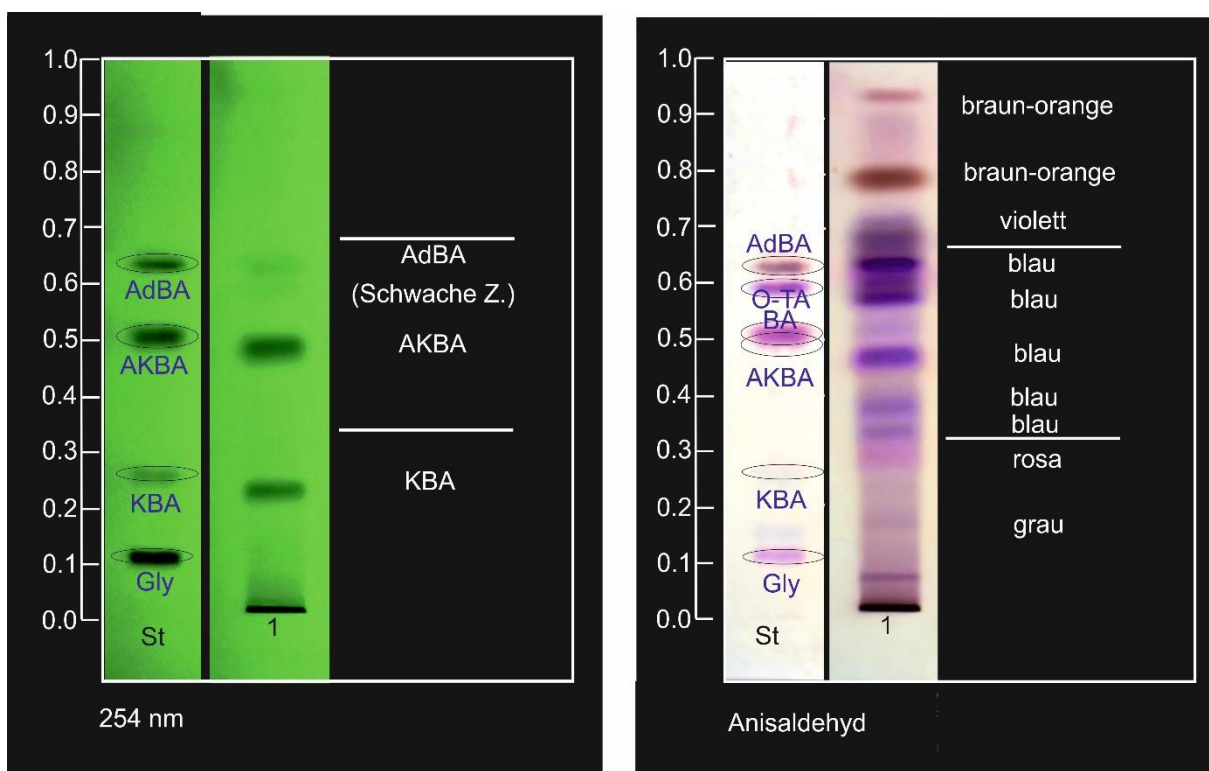


Abb. 5-29 DC-Kasten von Extrakt 1, *B. serrata*. Fließmittel: Pentan / Diethylether 2:1 (V/V), 1 % Essigsäure, 2-mal entwickelt (Teilstriche jeweils bei 1/3 und 2/3 der HPTLC).

Eine Trennung vieler der wertbestimmenden Substanzen erscheint nur mit einer 2-fachen Entwicklung und schnellem Zwischentrocknen an der Luft möglich (Abb. 5-29). Ebenfalls erscheint es empfehlenswert, das erhaltene DC-Chromatogramm wie in der USP mit einem farbgebenden Reagenz zu entwickeln. Jedoch ergibt die Verwendung von Anisaldehyd-Reagenz *R1* entsprechend Ph. Eur. eine bessere Farbentwicklung als „nur“ mit 10 %iger Schwefelsäure. Wie in Kap. 4.2.2

beschrieben, ist mit diesem Fließmittelsystem auch eine Abgrenzung von anderen *Boswellia*-Arten möglich.

Wie in Kap. 1.7 beschrieben, zeigt die 3-O-Acetyl-9-11-dehydro- β -boswelliasäure (AdBA) die beste Hemmung der 5-LOX (IC_{50} : 0,75 μ M) und ist somit eine entscheidende, wertbestimmende Substanz. Wie in Abb. 5-29 (links) erkennbar, wird diese Boswelliasäure mit einem $R_f=0,65$ deutlich von anderen Verbindungen abgetrennt und ist bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm klar sichtbar.

Beide Monographien weisen bisher keine Prüfung auf andere *Boswellia*-Arten auf. Wie in Abb. 5-2 dargestellt, ist eine Unterscheidung der Arten mittels HPTLC aber durchaus möglich. Ist beispielsweise die braune Bande bei $R_f=0,78$ nicht vorhanden, so handelt es sich um eine andere *Boswellia*-Art. Diffuse, braune oder orange Zonen oberhalb von $R_f=0,8$ weisen auf *B. sacra* oder *B. papyrifera* hin. Zudem ist bei *B. serrata* die Bande für 11-Keto- β -boswelliasäure ($R_f=0,25$) deutlich intensiver als bei den anderen untersuchten *Boswellia*-Proben.

Quantitative Bestimmung der Keto- β -boswelliasäuren mittels HPLC:

In der USP wird ein isokratisches System bestehend aus Acetonitril / Wasser / Eisessig (900:100:0.1) beschrieben, wobei jedoch über die Zeit die Flussrate von 1,0 ml auf bis zu 2,0 ml erhöht wird, was je nach technischer Ausstattung zu einem deutlichen Druckanstieg innerhalb der Anlage führt.

In der Ph. Eur. wird ein binäres System bestehend aus Wasser und Acetonitril mit jeweils 0,1 % Phosphorsäure 85 % *R* verwendet, was dem in Tab. 4-5 wiedergegebenen Gradienten nicht unähnlich ist, jedoch insgesamt kürzer ausfällt. Um möglichst viele Triterpensäuren zu trennen, ist nach den Erfahrungen aus diesen Untersuchungen aber ein HPLC-Lauf von etwa 60 min (einschließlich Rückführung des Gradienten) erforderlich.

Die quantitative Auswertung erfolgt sowohl in der USP als auch in der Ph. Eur. über Referenzlösungen, die jedoch relativ teuer sind. Hier bietet der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz unter Einbindung eines internen Standards β -Glycyrrhetinsäure erhebliche Vorteile, zumal sich damit auch leicht ein aussagekräftiger „System Suitability Test“ (SST) realisieren lässt. Über die in Kap. 4.3.3 ermittelten Responsefaktoren lassen sich auch weitere Triterpensäuren mit überschaubarem Aufwand berechnen.

Der Prozentgehalt an 11-Keto- β -boswelliasäure wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A_1 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot p_1}{A_2 \cdot m}$$

A_1 = Fläche des Peaks von 11-Keto- β -boswelliasäure im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Fläche des Peaks von 11-Keto- β -boswelliasäure im Chromatogramm der Referenzlösung

m = Einwaage der Droge in Gramm

m_1 = Masse von 11-Keto- β -boswelliasäure R in der Referenzlösung in Gramm

p_1 = Prozentgehalt an 11-Keto- β -boswelliasäure in 11-Keto- β -boswelliasäure R

Abb. 5-30 Berechnung des Gehaltes der 11-Keto- β -boswelliasäure in der Ph.-Eur.-Monographie 2310 (Indischer Weihrauch)

Der in Abb. 5-30 enthaltene Faktor „5“ ist auf die unterschiedlichen Verdünnungen von Untersuchungs- und Referenzlösung in dieser Monographie zurückzuführen.

$$x = \frac{A_1 \cdot RF \cdot m_1 \cdot F \cdot p_1}{A_2 \cdot m}$$

Abb. 5-31 Berechnung des Gehaltes der 11-Keto- β -boswelliasäure über eine Korrekturfaktor RF

Legende zu Abb. 5-31:

x = Prozentgehalt

A_1 = Fläche des Peaks von 11-Keto- β -boswelliasäure im Chromatogramm der Untersuchungslösung

RF = Response Factor (0,86 für 11-Keto- β -boswelliasäure)

A_2 = Fläche der β -Glycyrrhetinsäure im Chromatogramm der Referenzlösung

F = Faktor zur Korrektur der unterschiedlichen Volumina und Gehälter bei Untersuchungs- und Referenzlösung

m = Einwaage der Droge in Gramm

m_1 = Masse von β -Glycyrrhetinsäure R in der Referenzlösung in Gramm

p_1 = Prozentgehalt an der β -Glycyrrhetinsäure in der β -Glycyrrhetinsäure R (Reinheit der Referenz)

Über diese Formel lassen sich dann durch Austauschen der RF auch weitere Verbindungen berechnen.

Schlussbemerkungen:

Abschließend muss festgestellt werden, dass insbesondere die Monographie der Ph. Eur. einer Überarbeitung bedarf. Fernerhin konnte in dieser Arbeit aufgeführt werden, dass nicht nur die 11-Keto- β -boswelliasäuren maßgeblich für eine pharmakologische Wirkung des Weihrauchs sind. Insbesondere sollten die reichhaltig vorhandenen Tirucallensäuren mitberücksichtigt werden, die sich auch über die in Abb. 5-31 angegebene Formel einfach berechnen ließen. Zudem hat 3-Oxo- β -tirucallensäure als Referenzsubstanz eine gute kommerzielle Verfügbarkeit.

Weiterer zentraler Mangel der beiden bestehenden Monographien: Wie in Tab. 1-1 aufgelistet, gibt es neben *B. serrata* noch ca. 18 weitere Arten (die Anzahl lässt sich nicht genau ermitteln, da relativ viele Synonyme im Umlauf sind und die taxonomische Aufarbeitung der Gattung *Boswellia* wohl noch nicht abgeschlossen ist). Da nur *B. serrata* als Art zugelassen ist, müssen die anderen Arten ausgeschlossen werden. Dieses gelingt aber nicht über die alleinige Prüfung auf die beiden Keto- β -boswelliasäuren, die auch in den anderen Arten in ähnlichen Konzentrationen enthalten sein müssten.

Anhaltspunkte für eine mögliche Reinheitsprüfung bietet die HPTLC-Analyse in Abb. 5-29. Gut zu erkennen ist, dass bei *B. serrata* die Bande für 11-Keto- β -boswelliasäure deutlich intensiver ist als bei den anderen untersuchten *Boswellia*-Proben. Dieser Befund konnte auch mittels HPLC-Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 5-6). Zudem zeigt das HPTLC-Bandenmuster deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Arten, so dass diese für eine sichere Identifizierung verwendet werden können. Charakteristisch für *B. serrata* scheint z.B. eine braune Bande bei $R_f=0,8$ sein, wobei es sich um Incensol handeln sollte.

Verfälschungen sind auch deshalb wahrscheinlich, weil die natürlichen Ressourcen für *B. serrata* begrenzt sind und die ostafrikanische Ware deutlich billiger ist als arabische oder indische. Wenn das Arzneibuch keine Prüfung auf Reinheit und Verfälschungen vorsieht, sind möglichen Verfälschungen zur Gewinnmaximierung beim Verkauf der Rohware Tür und Tor geöffnet.

Mittels HPTLC scheint also eine Identitätsprüfung, verbunden mit einer Prüfung auf Verfälschungen und Verunreinigen, möglich zu sein. Prüfungen auf Verfälschungen und Verunreinigungen entsprechen den internationalen Arzneibuch-Standards. Es ist sehr verwunderlich, dass beide Aspekte, die lösbar erscheinen, bei den bestehenden Monographien einfach ausgeklammert wurden.

Es sollte noch ein weiterer Aspekt in den Monographien berücksichtigt werden: Die Analyse des ätherischen Öls, welches bis zu 10 % des Weihrauchs ausmachen kann (vergl. Kap. 1.5), ist zwar nicht Gegenstand dieser Untersuchungen. Ein typischer Inhaltsstoff dieses Öls ist aber Estragol, was im Verdacht steht, karzinogen zu sein. Deshalb erscheint eine Grenzwertprüfung auf Estragol mittels GC angebracht. Da die toxikologischen Daten zu Weihrauch eher unvollständig sind, solle überlegt werden, ob nicht noch weitere Grenzwertprüfungen erforderlich sind. Eine Überarbeitung der existierenden Weihrauch-Monographien erscheint also aus unterschiedlichen Gründen (unzureichende Identitätsprüfung, fehlende Prüfung auf Verunreinigungen und Verfälschungen, Berücksichtigung von nur zwei Boswelliasäuren, fehlende Grenzwertprüfungen auf toxische Substanzen) dringend erforderlich.

6. Literatur

- [1] Hussain, H., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., & Hussain, J. (2013). Chemistry and biology of essential oils of genus *Boswellia*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- [2] Leutzsch, M., Roth, A., Steinke, K., Sicker, D., Siehl, H. U., Schmid, M., ... & Berger, S. (2013). Eine Boswelliasäure aus Weihrauch: Kein blauer Dunst. *Chemie in unserer Zeit*, 47(6), 344-354.
- [3] Ruzicka, R. (2015) Weihrauch im Laufe der Geschichte, Schwerpunkt: Südarabien vor dem Islam. <http://www.ronald.ruzicka.name/arbeiten/orientalistik/weihrauch-201506.pdf>
- [4] De Rapper, S., Van Vuuren, S. F., Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., & Dagne, E. (2012). The additive and synergistic antimicrobial effects of select frankincense and myrrh oils—a combination from the pharaonic pharmacopoeia. *Letters in applied microbiology*, 54(4), 352-358.
- [5] Dentzer, J. M. (2008). Les Nabatéens et l'eau: technologie et culture. La conduite d'eau du Jebel Ithlib à Medain Saleh (Arabie Saoudite). *Syria. Archéologie, art et histoire*, (85), 5-17.
- [6] Bergmann, J. H. (2004). Untersuchungen zum Harz des Weihrauchbaums (*Boswellia* spp.) unter besonderer Berücksichtigung der Säurefraktion. *Dissertation, Technische Universität München*.
- [7] Kalwij, J. M. (2012). Review of 'The Plant List, a working list of all plant species'. *Journal of Vegetation Science*, 23(5), 998-1002. Sowie *Internet-Datenbank*: <http://www.theplantlist.org>
- [8] Blaschek, W., Hänsel, R., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., & Schneider, G. (Eds.). (2013). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Folgeband 2: Drogen A-K*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- [9] Lohs, K., & Janzen, J. (1989). *Weihrauch und Myrrhe: Kulturgeschichte und wirtschaftliche Bedeutung: Botanik, Chemie, Medizin*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 236 pp.
- [10] Niesen, A. (2008). Biologisch wirksame Boswelliasäure-Derivate. *Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [11] Morris, M. (2012). The aloe and the frankincense tree in southern Arabia: different approaches to their use. In: I. Hehmeyer, H. Schönig (Hrg.): *Herbal medicine in Yemen: Traditional knowledge and practice and their value for today's world*, Leiden/Boston, 103-126.
- [12] Miller, A. G., & Morris, M. (1988) Plants of Dhofar, The Southern Region of Oman: Traditional, Economic, and Medicinal Uses. *Office of the Adviser for Conservation of the Environment, Diwan of Royal Court, Sultanate of Oman*, 361 pp.
- [13] Lohs, K., & Martinetz, D. (1983) Duft-Wohlgeruch als gottesdienstliches Symbol. *Naturwissenschaftliche Rundschau* 36, 97-102.
- [14] Ammon, H. P. (2002). Boswellic acids (components of frankincense) as the active principle in treatment of chronic inflammatory diseases. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 152(15-16), 373-378.

- [15] Safayhi, H., Mack, T., Sabieraj, J., Anazodo, M. I., Subramanian, L. R., & Ammon, H. P. (1992). Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261(3), 1143-1146.
- [16] Niphadkar, S. S., Bokhale, N. B., & Rathod, V. K. (2017). Extraction of acetyl 11-keto- β -boswellic acid (AKBA) from *Boswellia serrata* plant oleo gum resin using novel three phase partitioning (TPP) technique. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 7, 41-47.
- [17] Chaturvedi, D., Dwivedi, P. K., Chaturvedi, A. K., Mishra, N., Siddiqui, H. H., & Mishra, V. (2015). Semisynthetic hybrids of boswellic acids: a novel class of potential anti-inflammatory and anti-arthritic agents. *Medicinal Chemistry Research*, 24(7), 2799-2812.
- [18] Rawer, D. (2011). Synthese und Strukturaufklärung von pharmakologisch aktiven Derivaten der Boswelliasäure. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- [19] Tschirch, A. (1898). Untersuchungen über die Sekrete. Über das Olibanum. *Archiv der Pharmazie*, 236(5-8), 487-503.
- [20] Winterstein, A., & Stein, G. (1932). Untersuchungen in der Saponinreihe. X. Mitteilung. Zur Kenntnis der Mono-oxy-triterpensäuren. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 208(1-3), 9-25.
- [21] Ruzicka, L., & Wirz, W. (1940). Zur Kenntnis der Triterpene. (Mitteilung) Umwandlung der α -Boswellinsäure in β -Amyrin. *Helvetica Chimica Acta*, 23(1), 132-135.
- [22] Beton, J. L., Halsall, T. G., & Jones, E. R. H. (1956). 564. The chemistry of triterpenes and related compounds. Part XXVIII. β -Boswellic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2904-2909.
- [23] Corsano, S., & Iavarone, C. (1964). Isolation of 3-acetyl-11-hydroxy- β -boswellic acid from incense. *Gazzetta Chimica Italiana*, 94(3-4), 328-39.
- [24] Savoir, R., Tursch, B., & Huneck, S. (1967). Triterpènes XI (I): Présence d'acide 11-ceto- β -boswellique dans l'encens. *Bulletin des Sociétés chimiques belges*, 76(5-6), 368-370.
- [25] Budzikiewicz, H., Wilson, J., & Djerassi, C. (1963). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. 1 Pentacyclic triterpenes. *Journal of the American Chemical Society*, 85(22), 3688-3699.
- [26] Pardhy, M.R.S., & Bhattacharyya, S.C. (1978). Structure of Serratol, a new diterpene cembranosid alcohol from *Boswellia serrata* Roxb. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* 16(3), 171-173.
- [27] Schweizer, S., von Brocke, A. F., Boden, S. E., Bayer, E., Ammon, H. P., & Safayhi, H. (2000). Workup-dependent formation of 5-lipoxygenase inhibitory boswellic acid analogues. *Journal of Natural products*, 63(8), 1058-1061.
- [28] Rajnikant, V., Gupta, V. K., Rangari, V. D., Bapat, S. R., Agarwal, R. B., & Gupta, R. (2001). Crystallographic Analysis of Acetyl β -boswellic acid. *Crystal Research and Technology: Journal of Experimental and Industrial Crystallography*, 36(1), 93-100.
- [29] Culioli, G., Mathe, C., Archier, P., & Vieillescazes, C. (2003). A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae). *Phytochemistry*, 62(4), 537-541.

- [30] Belsner, K., Büchele, B., Werz, U., Syrovets, T., & Simmet, T. (2003). Structural analysis of pentacyclic triterpenes from the gum resin of *Boswellia serrata* by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 41(2), 115-122.
- [31] Seitz, S. (2008). Isolierung und Strukturaufklärung von entzündungshemmenden Inhaltsstoffen aus Weihrauchharz, *Nat. Math. Diss. Universität des Saarlandes*.
- [32] Jauch, J., & Bergmann, J. (2003). An efficient method for the large-scale preparation of 3-O-acetyl-11-oxo- β -boswellic acid and other Boswellic acids. *European Journal of Organic Chemistry*, 2003(24), 4752-4756.
- [33] Blaschek, W., Hänsel, R., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., & Schneider, G. (1998) *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Folgeband 2: Drogen A-K*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- [34] Tucker, A. O. (1986). Frankincense and myrrh. *Economic botany*, 40(4), 425-433.
- [35] Poole, C. F. (2003). Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), 963-984.
- [36] Sherma, J. (2000). Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), 129-147.
- [37] Nyireddy, S. (2001). The bridge between TLC and HPLC: overpressured layer chromatography (OPLC). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 20(2), 91-101.
- [38] Nyireddy, S. (2003). Progress in forced-flow planar chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), 985-999.
- [39] C. Jänicke, J. Grünwald, T. Brendler, Handbuch Phytotherapie, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, 2003, 73-74.
- [40] V. N. Gupta, C. K. Atal, P. D'Souza, B.G. Nagavi, *Indian Drugs*, 1985, 22, 222-224.
- [41] Europäisches Arzneibuch (Ph. Eur.), Deutsche Amtliche Ausgabe 10.0, Monographie 2310 „Indischer Weihrauch“, *Olibanum indicum*, 2501-2502.
- [42] USP35–NF30 *Boswellia serrata*, Page 1214; Pharmacopeial Forum: Volume No. 35(4) Page 890.
- [43] Singh, G. B., & Atal, C. K. (1986). Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Agents and Actions*, 18(3), 407-412.
- [44] Ammon, H. P. T., Mack, T., Singh, G. B., & Safayhi, H. (1991). Inhibition of leukotriene B4 formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. *Planta medica*, 57(03), 203-207.
- [45] Ammon, H. P. T. (2006). Boswellic acids in chronic inflammatory diseases. *Planta medica*, 72(12), 1100-1116.
- [46] Safayhi, H., Sailer, E. R., & Ammon, H. P. T. (1996). 5-Lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA) by a novel mechanism. *Phytomedicine*, 3(1), 71-72.
- [47] Safayhi, H., Sailer, E. R., & Ammon, H. P. (1995). Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid. *Molecular pharmacology*, 47(6), 1212-1216.

- [48] Safayhi, H., & Sailer, E. R. (1997). Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta medica*, 63(06), 487-493.
- [49] Safayhi, H., Rall, B., Sailer, E. R., & Ammon, H. P. T. (1997). Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281(1), 460-463.
- [50] Hoernlein, R. F., Orlikowsky, T. H., Zehrer, C., Niethammer, D., Sailer, E. R., Simmet, T., ... & Ammon, H. P. T. (1999). Acetyl-11-keto- β -boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288(2), 613-619.
- [51] Syrovets, T., Büchele, B., Gedig, E., Slupsky, J. R., & Simmet, T. (2000). Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and II α . *Molecular pharmacology*, 58(1), 71-81.
- [52] Poeckel, D., & Werz, O. (2006). Boswellic acids: biological actions and molecular targets. *Current medicinal chemistry*, 13(28), 3359-3369.
- [53] Boden, S. E., Schweizer, S., Bertsche, T., Düfer, M., Drews, G., & Safayhi, H. (2001). Stimulation of leukotriene synthesis in intact polymorphonuclear cells by the 5-lipoxygenase inhibitor 3-oxo-tirucallic acid. *Molecular pharmacology*, 60(2), 267-273.
- [54] Altmann, A., Fischer, L., Schubert-Zsilavecz, M., Steinhilber, D., & Werz, O. (2002). Boswellic acids activate p42MAPK and p38 MAPK and stimulate Ca²⁺ mobilization. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(1), 185-190.
- [55] Siemoneit, U., Hofmann, B., Kather, N., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Franke, L., ... & Werz, O. (2008). Identification and functional analysis of cyclooxygenase-1 as a molecular target of boswellic acids. *Biochemical pharmacology*, 75(2), 503-513.
- [56] Tausch, L., Henkel, A., Siemoneit, U., Poeckel, D., Kather, N., Franke, L., ... & Werz, O. (2009). Identification of human cathepsin G as a functional target of boswellic acids from the anti-inflammatory remedy frankincense. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3433-3442.
- [57] Huang, M. T., Badmaev, V., Ding, Y., Liu, Y., Xie, J. G., & Ho, C. T. (2000). Anti-tumor and anti-carcinogenic activities of triterpenoid, β -boswellic acid. *Biofactors*, 13(1-4), 225-230.
- [58] Liu, J. J., Nilsson, Å., Oredsson, S., Badmaev, V., Zhao, W. Z., & Duan, R. D. (2002). Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. *Carcinogenesis*, 23(12), 2087-2093.
- [59] Xia, L., Chen, D., Han, R., Fang, Q., Waxman, S., & Jing, Y. (2005). Boswellic acid acetate induces apoptosis through caspase-mediated pathways in myeloid leukemia cells. *Molecular cancer therapeutics*, 4(3), 381-388.
- [60] Altmann, A., Poeckel, D., Fischer, L., Schubert-Zsilavecz, M., Steinhilber, D., & Werz, O. (2004). Coupling of boswellic acid-induced Ca²⁺ mobilisation and MAPK activation to lipid metabolism and peroxide formation in human leucocytes. *British journal of pharmacology*, 141(2), 223-232.
- [61] Büchele, B., & Simmet, T. (2003). Analysis of 12 different pentacyclic triterpenic acids from frankincense in human plasma by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *Journal of Chromatography B*, 795(2), 355-362.

- [62] Sterk, V., Büchele, B., & Simmet, T. (2004). Effect of food intake on the bioavailability of boswellic acids from a herbal preparation in healthy volunteers. *Planta medica*, 70(12), 1155-1160.
- [63] Safayhi, H., Boden, S. E., Schweizer, S., & Ammon, H. P. (2000). Concentration-Dependent Potentiating and Inhibitory Effects of Boswellia Extracts on 5-Lipoxygenase Product Formation in Stimulated PMNL. *Planta medica*, 66(02), 110-113.
- [64] Smith, W. G., Shaffer, A. F., Currie, J. L., Thompson, J. M., Kim, S., Rao, T., & Isakson, P. C. (1995). Characterization of 5-lipoxygenase inhibitors in biochemical and functional in vivo assays. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275(3), 1332-1338.
- [65] Werz, O., & Steinhilber, D. (2005). Development of 5-lipoxygenase inhibitors—lessons from cellular enzyme regulation. *Biochemical pharmacology*, 70(3), 327-333.
- [66] Hostanska, K., Daum, G., & Saller, R. (2002). Cytostatic and apoptosis-inducing activity of boswellic acids toward malignant cell lines in vitro. *Anticancer research*, 22(5), 2853-2862.
- [67] Krüger, P. (2008). Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren in vitro und in vivo mittels LC-MS. *Nat. Math. Diss. der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main*.
- [68] Blaschek, W., Hänsel, R., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., & Schneider, G. (Eds.). (2013). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Folgeband 2: Drogen A-K*. Springer-Verlag, 931 pp.
- [69] Lim, T. K. (2016). *Glycyrrhiza glabra*. In *Edible medicinal and non-medicinal plants* (pp. 354-457). Springer, Dordrecht.
- [70] Frauen, M. (2001). Analytik kosmetisch wirksamer Pflanzenextrakte mit der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS), *Nat. Math. Dissertation der Universität Hamburg*.
- [71] Lutomski, J. (1983). Chemie und therapeutische Verwendung von Süßholz (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Pharmazie in unserer Zeit*, 12(2), 49-54.
- [72] van de Sand, L., Bormann, M., Alt, M., Schipper, L., Heilingloh, C. S., Todt, D., ... & Krawczyk, A. (2020). Glycyrrhizin effectively neutralizes SARS-CoV-2 in vitro by inhibiting the viral main protease. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.18.423104>
- [73] Mathe, C., Culioli, G., Archier, P., & Vieillescazes, C. (2004). High-performance liquid chromatographic analysis of triterpenoids in commercial frankincense. *Chromatographia*, 60(9), 493-499.
- [74] Sharma, N., Bhardwaj, V., Singh, S., Ali, S. A., Gupta, D. K., Paul, S., ... & Verma, M. K. (2016). Simultaneous quantification of triterpenoic acids by high performance liquid chromatography method in the extracts of gum resin of *Boswellia serrata* obtained by different extraction techniques. *Chemistry Central Journal*, 10(1), 1-10.
- [75] Bosshard, H. H., Mory, R., Schmid, M., & Zollinger, H. (1959). Eine Methode zur katalysierten Herstellung von Carbonsäure- und Sulfosäure-chloriden mit Thionylchlorid. *Helvetica Chimica Acta*, 42(5), 1653-1658.
- [76] Al-Harrasi, A., & Al-Saidi, S. (2008). Phytochemical analysis of the essential oil from botanically certified oleogum resin of *Boswellia sacra* (Omani Luban). *Molecules*, 13(9), 2181-2189.

- [77] Hamm, S., Bleton, J., Connan, J., & Tchaplá, A. (2005). A chemical investigation by headspace SPME and GC–MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples. *Phytochemistry*, 66(12), 1499-1514.
- [78] Paul, M. (2012). Chemotaxonomic investigations on resins of the frankincense species *Boswellia papyrifera*, *Boswellia serrata* and *Boswellia sacra*, respectively, *Boswellia carterii*: a qualitative and quantitative approach by chromatographic and spectroscopic methodology.
- [79] Basar, S. (2005). Phytochemical investigations on *Boswellia* species. *Dissertation, Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky*.
- [80] Paul, M., Brüning, G., Bergmann, J., & Jauch, J. (2012). A Thin-layer Chromatography Method for the Identification of Three Different Olibanum Resins (*Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera* and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*). *Phytochemical Analysis*, 23(2), 184-189.
- [81] Paul, M., & Jauch, J. (2012). Efficient preparation of incensole and incensole acetate, and quantification of these bioactive diterpenes in *Boswellia papyrifera* by a RP-DAD-HPLC method. *Natural product communications*, 7(3), 1934578X1200700303.
- [82] Hairfield, E. M., Hairfield Jr, H. H., & Pentz, L. H. (1984). A rapid test for the identification of incense resins. *Perfumer & Flavorist*, 9(4), 33-36.
- [83] Hairfield, E. M., Hairfield, H. H., & McNair, H. M. (1989). GC, GC/MS, and TLC of β -Boswellic Acid and O-Acetyl- β -Boswellic Acid from *B. serrata*, *B. carterii*, and *B. papyrifera*. *Journal of chromatographic science*, 27(3), 127-133.
- [84] S. Hamm, J. Bleton, J. Connan, A. Tchaplá, A chemical investigation by headspace SPME and GC–MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples, *Phytochemistry*, 2005, 66,1499-1514.
- [85] Camarda, L., Dayton, T., Di Stefano, V., Pitonzo, R., & Schillaci, D. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of some oleogum resin essential oils from *Boswellia* spp.(Burseraceae). *Annali di Chimica: Journal of Analytical, Environmental and Cultural Heritage Chemistry*, 97(9), 837-844.
- [86] Iguchi, K., Okumura, N., Usui, S., Sajiki, H., Hirota, K., & Hirano, K. (2001). Myristoleic acid, a cytotoxic component in the extract from *Serenoa repens*, induces apoptosis and necrosis in human prostatic LNCaP cells. *The prostate*, 47(1), 59-65.
- [87] Ibrahim, H., Fasanya, O. O., Hayatudeen, A., & Osa-Benedict, E. O. (2018). Fatty Acid Composition of Mahogany Seed Oil and its Suitability for Biodiesel Production. *Nigerian Journal of Technological Research*, 13(1), 45-49.
- [88] Hassan, B. A., Glover, E. K., Luukkanen, O., Kanninen, M., & Jamnadass, R. (2019). *Boswellia* and *Commiphora* Species as a Resource Base for Rural Livelihood Security in the Horn of Africa: A Systematic Review. *Forests*, 10(7), 551.
- [89] Büchele, B., Zugmaier, W., & Simmet, T. (2003). Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene. *Journal of Chromatography B*, 791(1-2), 21-30.
- [90] Hill, R. A., & Connolly, J. D. (2017) Triterpenoids. *Natural product reports*, 34(1), 90-122.

- [91] Maffo, T., Takou, M., Tabekoueng, G. B., Langat, M. K., Vardamides, J. C., Wafo, P., ... & Waffo, A. F. K. (2019). Triterpenoid derivatives from *Canarium schweinfurthii* Engl.(Burseraceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 3064-3067.
- [92] Badria, F. A., Abu-Karam, M., Mikhaeil, B. R., Maatooq, G. T., & Amer, M. M. (2016). Anti-herpes activity of isolated compounds from frankincense. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 1(1), 1-10.
- [93] Badria, F. A., Mohammed, E. A., El-Badrawy, M. K., & El-Desouky, M. (2004). Natural leukotriene inhibitor from *Boswellia*: a potential new alternative for treating bronchial asthma. *Alternative & Complementary Therapies*, 10(5), 257-265.
- [94] Badria, F. A., Mikhaeil, B. R., Maatooq, G. T., & Amer, M. M. (2003). Immunomodulatory triterpenoids from the oleogum resin of *Boswellia carterii* Birdwood. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(7-8), 505-516.
- [95] Wang, Y.-G., Ma, Q.-G., Tianc, J., Ren, Ji., Wang, A.-G., Ji, T.-F., Yang, J.-B., Su, Y.-L. (2016). Hepatoprotective triterpenes from the gum resin of *Boswellia carterii*. *Fitoterapia* 109, 266-273.
- [96] Akkhisa, T., Tabata, K., Banno, N., Tokuda, H., Nishihara, R., Nakamura, Y., Kimura, Y., Yasukawa, K., & Suzuki, T. (2006). Cancer chemopreventive Effects and cytotoxic activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(9), 1976-1979.
- [97] Cade, J. A., & Gerrard, W. (1953). Action of Thionyl Chloride on Carboxylic Acids in Presence of Pyridine. *Nature*, 172(4366), 29-29.
- [98] Vetter, W., & Meister, W. (1981). Nicotinates as derivatives for the mass spectrometric investigation of long chain alcohols. *Organic Mass Spectrometry*, 16(3), 118-122.
- [99] Gerrard, W., & French, K. H. V. (1947). Influence of Tertiary Bases on the Interaction of Thionyl Chloride and Hydroxy Compounds. *Nature*, 159(4034), 263-264.
- [100] Keusgen, M., Curtis, J. M., & Ayer, S. W. (1996). The use of nicotinates and sulfoquinovosyl monoacylglycerols in the analysis of monounsaturated n-3 fatty acids by mass spectrometry. *Lipids*, 31(2), 231-238.
- [101] Höfle, G., Steglich, W., & Vorbrüggen, H. (1978). 4-Dialkylaminopyridine als hochwirksame Acylierungskatalysatoren. *Angewandte Chemie*, 90(8), 602-615.
- [102] Miwa, H., Hiyama, C., & Yamamoto, M. (1985). High-performance liquid chromatography of short-and long-chain fatty acids as 2-nitrophenylhydrazides. *Journal of Chromatography A*, 321, 165-174.
- [103] Degener, I. (2004). Entwicklung von Methoden zur Immobilisierung an Polymersinterkörpern: Immunoassays für die pharmazeutische und lebensmittelchemische Qualitätskontrolle, *Nat. Math. Diss. der Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn*.
- [104] Iwata, T., Inoue, K., Nakamura, M., Yamaguchi M., Simple and highly sensitive Determination of Free Fatty Acids in human by High performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Biochemical Chromatogr.*, 1992, 6(3):120-123.
- [105] Iwata, T., Hirose, T., Nakamura, M., & Yamaguchi, M. (1994). Determination of urinary glucuronide conjugates by high-performance liquid chromatography with pre-column

fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 654(2), 171-176.

- [106] Adam, W., De Lucchi, O., & Hill, K. (1982). Reaction of 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione (PTAD) with bicyclic monoterpenes. *Chemische Berichte*, 115(5), 1982-1989.
- [107] Domingo, L. R., Chamorro, E., & Pérez, P. (2008). Understanding the reactivity of captodative ethylenes in polar cycloaddition reactions. A theoretical study. *The Journal of organic chemistry*, 73(12), 4615-4624.
- [108] Jensen, F., & Foote, C. S. (1987). Reaction of 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione with substituted butadienes. A nonconcerted Diels-Alder reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 109(21), 6376-6385.
- [109] Cookson, R. C., Gilani, S. S. H., & Stevens, I. D. R. (1967). Diels–Alder reactions of 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1905-1909.

7. Experimentalteil - Appendix

In diesem Kapitel werden die entwickelten Verfahren zur Extraktion, Aufreinigung und Trennung im Detail beschrieben. Da die Methodenentwicklung ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist, wurde hierfür, ergänzend zu „Material und Methoden“, ein eigenes Kapitel als Appendix eingerichtet.

7.1. Aufarbeitung des Weihrauchs

7.1.1 Entwicklung einer Methode zur Aufreinigung der Extrakte (Vorversuche)

Der erste Aufreinigungsversuch wurde mit dem Extrakt Nr. 9 (ethanolischer Extrakt der Firma Floradex) durchgeführt (siehe Material und Methoden, Tab. 3-1):

200 Mg Extrakt wurden in einem kleinen Gefäß eingewogen und in 5 ml Diethylether gelöst. Die Lösung wurde 3-mal mit je 5 ml 0,5 M NaOH ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden danach mit 6 N Salzsäure angesäuert (pH=1), womit möglichst alle Säuren - im Idealfall als weißer Feststoff - ausfallen sollten. Hier fiel eine weißlich-gelbe Substanz aus, was aber leider mit dieser Probe schwer reproduzierbar war. Anschließend wurde die wässrige Lösung 3-mal mit je 5 ml Diethylether ausgeschüttelt und die vereinigten Diethyletherphasen vorsichtig einrotiert. Das aufgereinigte Produkt war von klebriger, gelblicher bis klarer Konsistenz und wurde anschließend über Nacht bei -20 °C gelagert; danach ergab sich ein fester Stoff. Die Ausbeute betrug ca. 50 %, bezogen auf die Einwaage, was aber schwer reproduzierbar war; Grund hierfür könnte die geringe Einwaage sein.

Die Aufreinigungen wurden 3-mal wiederholt (mit den Extrakten 9 und 10). Die Ergebnisse der Versuche waren unter qualitativen Gesichtspunkten identisch, wobei einige praktische Schritte leicht modifiziert wurden, um das Verfahren zu optimieren, zum Beispiel die Benutzung kleinvolumiger Glasgeräte und daran angepasste Lösungsmittelvolumina zur Reduktion der Verluste. Es ergab sich final folgende Vorgehensweise:

200 Mg Weihrauchextrakt wurde zuerst genau abgewogen und in 5 ml Diethylether gelöst. Die erhaltene Lösung wurde filtriert und das Filtrat einrotiert. Der gelblich-orange Rückstand wurde erneut in 10 ml Diethylether gelöst. Die Lösung wurde einmal mit 5 %iger Na₂CO₃-Lösung gewaschen. Die Phasen wurden in einem Scheidetrichter voneinander getrennt. Es wurde dann mit der Etherphase weitergearbeitet. Die Etherphase wurde 3-mal mit 0,5 molarer NaOH-Lösung ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und die Diethyletherphase wurde verworfen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit konzentrierter Salzsäure angesäuert (pH=1), wobei

sich ein flockiger Niederschlag bildete. Die wässrige, saure Lösung wurde nun 3-mal mit Diethylether ausgeschüttelt, um alle Säuren wieder in die organische Phase zu überführen, die abschließend 3- bis 4-mal über einem mit Na_2SO_4 gefüllten Filter filtriert wurde, bis sich eine klare Lösung ergab, die in einem tarierten Kolben am Rotationsverdampfer abgezogen wurde. Nach dem Trocknen im Exsikkator unter Vakuum wurde der Kolben gewogen und das Gewicht des gelblich bis bernsteinfarbenen, aufgereinigten Extrakt ermittelt. Dabei wurde für Kalkulationen der Stoffmengen ein durchschnittliches Molekulargewicht der enthaltenen Triterpensäuren von 500 g/mol angenommen (z.B. AKBA: M_G 512,7; KBA: M_G 470,7).

Tab. 7-1 Zusammenfassung der Aufreinigung des Extraktes 9, 1. Versuch.

Stoff	eq	M [g/mol]	m	V
Extrakt 9	1	ca. 500	0,5148 g	
Ether				10 ml
Na_2CO_3	5 %			5 ml
NaOH	0,5 M			30 ml
H_2O				10 ml
Ether				40 ml

Tab. 7-2 Zusammenfassung der Aufreinigung des Extraktes 9, 2. Versuch.

Stoff	eq	M [g/mol]	m	V
Extrakt 9	1	ca. 500	0,206 g	
Ether				10 ml
Na_2CO_3	5 %			5 ml
NaOH	0,5 M			30 ml
H_2O				10 ml
Ether				40 ml

Tab. 7-3 Zusammenfassung der Aufreinigung des Extraktes 10, 3. Versuch.

Stoff	eq	M [g/mol]	m	V
Extrakt 10	1	ca. 500	4,096 g	
Ether				10 ml
Na_2CO_3	5 %			5 ml
NaOH	0,5 M			30 ml
H_2O				10 ml
Ether				40 ml

Tab. 7-4 Zusammenfassung der Aufreinigung des Extraktes 10, 4. Versuch.

Stoff	eq	M [g/mol]	m	V
Extrakt 10	1	ca. 500	8,3850 g	
Ether				10 ml
Na ₂ CO ₃	5 %			5 ml
NaOH	0,5 M			30 ml
H ₂ O				10 ml
Ether				40 ml

Tab. 7-5 Übersicht der Ausbeuten, Versuche 1-4.

Aufreinigung	m	Ausbeute
1.	Spuren	Spuren
2.	0,02 g	9,7 %
3.	0,31 g	7,6 %
4.	0,72 g	8,6 %

Bei diesem Verfahren konnte man zunächst beobachten, dass sich die Weihrauchextrakte 9 und 10 in ihrer Beschaffenheit unterscheiden. Der Weihrauchextrakt 10 war sehr viel flüssiger und weniger klebrig als der Extrakt 9; allerdings waren Farbe und Geruch vergleichbar.

Die Lösung des Extraktes 9 war gelblich-orange gefärbt und roch angenehm aromatisch. Die Lösung war nach dem ersten Einrotieren und erneutem Lösen leicht milchig eingetrübt und leicht gelblich-bräunlich gefärbt. Nach dem Zugabe der Na₂CO₃-Lösung kam es zu einer deutlichen Phasentrennung. Die obere Phase war leicht bräunlich und klar, die untere Phase war tief braun und milchig trüb. Zwei Stunden nach der Phasentrennung konnte man beobachten, dass die wässrige Phase gallertartig wurde, was wohl auf das Quellen der enthaltenen Polymere zurückzuführen ist. Nach dem Ansäuern der wässrigen Phase bildete sich ein flockiger Niederschlag, wobei fraglich war, ob der Niederschlag nur Triterpensäuren enthielt. Vor dem Trocknen der Etherphase konnte man kleine Wassertröpfchen an den Glasgeräten beobachten. Das Einrotieren des Diethylethers dauerte jedes Mal ungewöhnlich lange. Das Produkt, was bei der ersten Aufreinigung im Kolben ausgefallen war, war klar und äußerst klebrig. Es sah aus wie ein Ölfilm im Kolben; bis es aushärtete, dauerte es ungefähr fünf Stunden; außerdem wurde das Produkt bei -20 °C gelagert, um diesen Vorgang zu beschleunigen. Nach dem Abkratzen von der Kolbenwandung erschien das gebildete Produkt weiß. Bei Extrakt 10 ergab sich ein bernsteinfarbenes Produkt.

Es muss angemerkt werden, dass Diethylether für größere Ansätze wegen seiner Neigung zur Peroxidbildung ungeeignet ist.

Ausbeuten:

Die Ausbeute bei allen Aufreinigungen war relativ gering, wenn man bedenkt, dass je nach *Boswellia*-Art der extrahierbare Harzanteil ungefähr 55-66 % beträgt, dieser jedoch nicht vollständig aus Triterpensäuren besteht. Die Extrakte 7-10 waren bereits fertige alkoholische Extrakte, aus denen dann in dem oben beschriebenen, mehrstufigen Verfahren die Säuren gewonnen wurden.

Im Durchschnitt wurde nach der Aufreinigung ein prozentualer Gehalt von 8,6 % erzielt. Wie in der Einleitung erwähnt, sind aber Gehälter von durchaus 28 % möglich. Gründe hierfür können sein: Verwendung minderwertiger Ware (die Extrakte wurden bereits fertig bezogen!), Zersetzung der Triterpensäuren bei der Lagerung (Raumtemperatur), Verschleppung zwischen den Phasen, auch wenn angepasste Volumina verwendet wurden. Deshalb erscheint es empfehlenswert, das Verfahren mit einer Einwaage von mindestens 4 g Extrakt durchzuführen. Da aber nur kleine Extraktproben von einigen Gramm vorlagen, konnte die Methodik nicht weiter optimiert werden.

7.1.2 Entwicklung geeigneter Extraktionsverfahren und Extraktauftrennung

Neben den Extraktproben 7-10 gab es weitere Proben (1-6a, 6b) von rohem Weihrauch. Um die oben beschriebene Aufreinigung zur Anreicherung der Säuren durchführen zu können, mussten diese erst in geeigneter Weise extrahiert werden; dazu bot sich eine Soxhlet-Apparatur an.

1. Versuch

Weihrauchprobe Nr. 1 (Indischer Weihrauch, *B. serrata*, Handelsmuster) wurde fein pulverisiert und davon 50,1 g in die Filterhülse der Soxhlet-Apparatur eingewogen sowie mit 200 ml Methanol in einem Rundkolben bei 65 °C über 3 h extrahiert. Der gelbliche Extrakt wurde danach bei 45 °C und 337 mbar vorsichtig am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach dem Trocknen im Exsikkator unter Vakuum wurden 30,37 g eines braunen Rückstands mit fester Konsistenz erhalten.

Zu diesem Rückstand wurden anschließend tropfenweise eine 3 %ige NaOH-Lösung (pH > 10) bis zur vollständigen Lösung des Rückstands hinzugegeben. Es bildete sich eine milchige Lösung, wobei die Emulsionsbildung entsprechend Literaturangaben abhängig vom Ausgangsmaterial, Temperaturen, Schütteln sowie Laugenkonzentration ist.^[6]

Die Emulsion wurde in einem Scheidetrichter überführt und mit DCM (3 x 50 ml) ausgeschüttelt, wobei sich drei Phasen ausbildeten:

Die untere, hell cremefarbene, organische Phase, die wahrscheinlich die nicht basischen Neutralkomponenten enthielt, wurde einer DC-Analyse zur Kontrolle auf evtl. mögliche vorhandene

Harzsäuren unterzogen. Da dies negativ ausgefallen war, wurde die entsprechende Phase verworfen.

Die mittlere, dunkelbraune und etwas gallertartige Phase wurde separat erneut mit 3 % NaOH gewaschen, mit Dichlormethan (2 x 20 ml) ausgeschüttelt und die organische Phase verworfen. Anschließend wurde der wässrige Anteil dieser mittleren Phase im Eisbad unter Rühren angesäuert. Es bildete sich eine cremefarbene, milchige Emulsion, die filtriert und zentrifugiert wurde. Es konnte eine geringe Menge eines gelblichen, braunen Rückstands abgetrennt werden, der bei der DC-Analyse nur eine, nicht näher identifizierbare Bande ergab. Da erkennbar keine Boswelliasäuren enthalten waren, wurde diese mittlere Phase nicht weiterbearbeitet.

Die obere, orange gefärbte, wässrige Phase, in der sich die sauren Komponenten (Triterpensäuren, BA, etc.) befinden sollten, wurde daraufhin in ein Becherglas überführt und vorsichtig tropfenweise mit 37% HCL auf pH=1 angesäuert sowie über die Nacht in den Kühlschrank (4 °C) zur vollständigen Ausfällung der Säuren gestellt. Leider bildete sich nur ein sehr amorpher Niederschlag. Die hellgelbe Lösung mit orangefarbenen Schlieren wurde filtriert und der Rückstand mehrmals mit H₂O bis zu einem neutralen pH ausgewaschen. Der erhaltene Niederschlag wurde abschließend im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 1,13 g, 3,72 % eines orangefarbenen, wachsartigen Feststoffes.

Tab. 7-6 Übersicht über die Aufarbeitung von Probe 1; 1. Versuch.

Stoff	eq	M [g/mol]	m	V
Rohextrakt 1	1	ca. 500	30,37g	
NaOH	3 %			250 ml
DCM				150 ml

Die Bedingungen der Extraktreinigung wurden im folgenden 2. Versuch einem Optimierungsversuch unterworfen:

2. Versuch

40,0 G pulverisierter Weihrauchprobe Nr. 1 wurde mit 200 ml wasserfreiem Ethanol (100 %), wie in Kap. 3.5 beschrieben, unter gleichen Bedingungen in der Soxhlet-Apparatur extrahiert.

Es wurden 24,25 g eines gelblichen, schaumartigen, aber festen Extraktes erhalten.

Es wurde zunächst genau wie beim vorherigen Versuch verfahren. Es bildeten sich hier ebenso 3 Phasen (starke Emulsionsbildung); die mittlere Phase wurde durch wiederholtes Rotieren des

Scheidetrichters und mehrstündiges Ruhen lassen weitgehend in eine Ober- und eine Unter-Phase aufgespalten.

Die gesammelten wässrigen Phasen wurden mit 6 N HCl angesäuert und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C belassen. Diese wurde am darauffolgenden Tag mit Diethylether (3 x 50 ml) ausgeschüttelt, die vereinigten Phasen getrocknet und das Lösungsmittel vorsichtig am Rotationsverdampfer abgezogen. Der erhaltene Rückstand wurde im Exsikkator unter Vakuum nachgetrocknet.

Ausbeute: 1,16 g, 4,78 % eines orangefarbenen, amorphen Feststoffes.

Tab. 7-7 Übersicht über die Aufarbeitung von Probe 1; 2. Versuch.

Stoff	eq	M [g/mol]	m	V
Rohextrakt 1	1	ca. 500	24,25 g	
NaOH	3 %			200 ml
DCM				150 ml
Ether				15 ml

Da die Ausbeute noch deutlich von Literaturwerten abweicht, wurden weitere Versuche zur Optimierung unternommen.

3. Versuch

40,0 G pulverisierten Weihrauchs, Probe Nr. 1, wurden mit 200 ml trockenem Diethylether in einer Soxhlet-Apparatur unter sonst gleichen Bedingungen (siehe auch Kapitel 3.5) extrahiert. Der erhaltene Rohextrakt (28,2 g) war gelblich und klar, wobei dieser nach dem Abrotieren des Lösungsmittels zu einem gelblich, sehr harten Schaum erstarrte.

Der so erhaltene Rohextrakt wurde in etwas Diethylether gelöst und mit 1 M NaOH (3 x 60 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 6 N HCl angesäuert und über Nacht in den Kühlschrank belassen. Diese Fraktion wurde am nächsten Tag 3-mal mit je 50 ml Diethylether ausgeschüttelt, die gesammelten Diethyletherphasen einrotiert und schließlich das gereinigte Harz im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 1,642 g, 5,82 % eines orangefarbenen Feststoffes.

Tab. 7-8 Übersicht über die Aufarbeitung von Probe 1; 3. Versuch.

Stoff	eq	M [g/mol]	m	V
Rohextrakt 1	1	ca. 500	28,2 g	
NaOH	1 M			180 ml
Ether				150 ml

Da sich kein signifikanter Unterschied zu den Vorversuchen ergab, wurden weitere Versuche unternommen.

4. Versuch

Die Weihrauchprobe 1 wurde fein pulverisiert und davon 32,5 g in eine Filterhülse der Soxhlet-Apparatur eingewogen sowie mit 150 ml MeOH analog zu Versuch 1 extrahiert. Nachdem das Lösungsmittel bei $T = 30\text{ °C}$, Druck 40 mbar, abgezogen wurde, wurde der Extrakt für einige Stunden im Kühlschrank gelassen sowie im Exsikkator unter Vakuum nachgetrocknet. Es wurden 19,7 g Rohextrakt mit einer klaren, goldgelben Farbe erhalten. Für die Auftrennung des Rohextraktes in eine Säure- und Neutralfraktion wurde hier der gesamte Rohextrakt in zwei gleiche Portionen aufgeteilt und nachfolgend mit zwei verschiedenen Verfahren aufgereinigt:

10 g des erhaltenen Rohextraktes wurde zermörsert, in einen Kolben überführt und mit 3 % NaOH unter Rühren auf $\text{pH} > 10$ eingestellt; hierbei bilden sich die Na-Salze der Säuren, wobei sich der Rohextrakt auch bei vorsichtigem Erwärmen auf 30 °C im Wasserbad nicht vollständig löste. Die gelbe, milchige Suspension wurde filtriert und das basische, wässrige Filtrat wurde entsprechend Literaturangaben mit Diethylether (3 x 100 ml) ausgeschüttelt.^[6]

Die organische Phase (Neutralkomponente) wurde verworfen und die in dem Erlenmeyerkolben gesammelte, wässrige, basische Phase wurde mit konz. HCl auf $\text{pH}=1$ eingestellt. Es bildete sich ein weißer Niederschlag und der Erlenmeyerkolben wurde für einige Stunden bei 4 °C zur Vervollständigung der Fällung belassen. Abschließend wurde der Niederschlag von der gelben Lösung über eine Glasfritte abgetrennt; das Filtrat wurde mehrmals mit warmem Wasser gewaschen. Der weiße Niederschlag wurde in einem tarierten, kleinen Kolben im Exsikkator getrocknet und anschließend das Gewicht mit 1,1 g bestimmt.

Ausbeute: 11 % weißer Feststoff.

Tab. 7-9 Übersicht über die Aufarbeitung von Probe 1; 4. Versuch.

Stoff	eq	M [g/mol]	m	V
Rohextrakt 1	1	ca. 500	10 g	
NaOH	3 %			100 ml
Ether				300 ml

5. Versuch

Die Aufreinigung der restlichen 9,7 g Rohextrakt wurde analog zu den in der Literatur beschriebenen Methoden durchgeführt.^[6, 19, 20] Diese Menge wurde in 250 ml Diethylether gelöst und in einen großen Scheidetrichter überführt. Nach der Zugabe von 10 ml 5 %iger Na₂CO₃-Lösung und Schütteln bildeten sich 2 Phasen aus. Es wurden ca. 50 ml einer 0,5 M NaOH hinzugegeben, ausgeschüttelt und die alkalische, wässrige Phase in einem Becherglas abgelassen. Die Diethylether-Phase wurde noch mit 0,5 % NaOH (2 x 50 ml) ausgeschüttelt, aber nicht weiter verarbeitet (Neutralstoffe). Die gesammelten, alkalischen Phasen wurden mit HCl auf pH=1 angesäuert, wodurch die Triterpensäuren ausgefällt wurden. Die wässrige, saure Lösung wurde mit Diethylether (3 x 100 ml) ausgeschüttelt und alle organischen Fraktionen vereinigt; die gelbe Lösung wurde über einen mit Na₂SO₄ gefüllten Faltenfilter in einen Rundkoben filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen sowie im Exsikkator nachgetrocknet.

Die Ausbeute der Säurefraktion war sehr gering: 0,2 g Feststoff, was 2,1 % Ausbeute entspricht.

Tab. 7-10 Übersicht über die Aufarbeitung von Probe 1; 5. Versuch.

Stoff	eq	M [g/mol]	m	V
Rohextrakt 1	1	ca. 500	9,7 g	
Ether				250 ml
Na ₂ CO ₃	5 %			10 ml
NaOH	0,5 M			150 ml

Tab. 7-11 Zusammenfassung der Versuche 1-5

Versuch	Einwaage	Ausbeute Soxhlet	Rohextrakt Ausbeute	Aufreinigung von etwa 10g Rohextrakt	Rohsäure Ausbeute, bezogen auf Ausbeute Soxhlet
1	50,1 g	30,4 g	60,6 %	1,1 g	3,7 %
2	40,0 g	24,3 g	60,6 %	1,2 g	4,8 %
3	40,0 g	28,2 g	70,2 %	1,6 g	5,8 %
4	32,5 g	19,7 g	60,6 %	1,1 g	11,0 %
5	32,5 g	19,7 g	60,6 %	0,2 g	2,1 %

Abschließende Bemerkung: Im Versuch 3 wurde Diethylether zur Soxhlet-Extraktion eingesetzt. Bei Diethylether handelt es sich um einen Gefahrstoff, der mit besonderer Vorsicht zu behandeln ist. Diethylether bildet leicht Peroxide, die zur spontanen Explosion neigen. Auch wenn diese Versuche eine relativ hohe Ausbeute lieferten, kann Diethylether aus Sicherheitsgründen nicht für die nachfolgend beschriebenen Reihenuntersuchungen eingesetzt werden! Zwischen den eingesetzten Alkoholen bestehen offensichtlich keine Unterschiede.

7.1.3 Weihrauch-Extraktionen

Wie bereits oben erörtert, konnte der eigentlich gut geeignete Diethylether für Reihenuntersuchungen nicht weiter verwendet werden. Es wurde aus den oben geschilderten Erkenntnissen eine praktikable Vorschrift abgeleitet.

Probe Nr. 1

Die Probe wurde fein pulverisiert und 40,8 g in die Filterhülse der Soxhlet-Apparatur eingewogen sowie 150 ml Methanol in einem 250 ml Rundkolben gegeben. Die Extraktion erfolgte unter Rühren (Verhinderung von Temperaturgradienten und „Anbacken“ des Extraktes) mit Heizpilz bei 65 °C, 3 h. Das Lösungsmittel wurde anschließend bei 40 °C und 33 mbar am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand im Exsikkator unter Vakuum nachgetrocknet; es blieb ein bernsteinfarbener, schaumiger Rohextrakt zurück.

Die Auswaage von Rohextrakt betrug 24,4015 g, was einer Ausbeute von 59,8 % entspricht.

Aufreinigung:

10 G des methanolischen Rohextraktes wurde in einem Kolben mit 50 ml 3 %iger NaOH unter leichtem Rühren für 30 min bei 60 °C im Wasserbad gelöst (suspendiert). Da sich eine klumpige, klebrige Emulsion bildete, wurde der klar gelöste Teil abdekantiert und nachfolgend zentrifugiert. Der emulgierte Rückstand wurde erneut mit 50 ml einer 3 %igen NaOH für weitere 30 min bei 60 °C unter Rühren aufgelöst. Zur leichteren Abtrennung des verbliebenen amorphen Rückstands wurde der Rundkolben kurz im Eisbad abgekühlt und erneut abdekantiert. Der verbliebene Rückstand wurde kurz im Ultraschallbad behandelt, 3-mal mit 60 °C heißen Wasser in kleinen Portionen nachgewaschen und dekantiert. Die wässrigen Phasen wurden in einem Becherglas vereinigt, wobei die Ausbildung nadelförmige Kristalle beobachtet werden konnte. Das finale Gesamtvolumen der gelblichen Lösung betrug etwa 120 ml. Anschließend wurde die Lösung tropfenweise unter Rühren mit 32 % HCl angesäuert. Am Umschlagspunkt ändert sich die Farbe der Lösung von orange-gelb nach zitronengelb, wobei es zu deutlichen, weiß bis zitronengelben Ausflockungen kommt. Danach wurden noch 3 Tropfen HCl zugegeben, um einen pH-Wert von unter 1 zu erzielen. Abschließend

wurde die gelbliche Lösung mit dem gleichen Volumen DCM (3 x 120 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Trocknungsmittel $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im schwachen Vakuum bei 800 mbar sowie bei 40 °C am Rotationsverdampfer abgezogen und schonend unter Vakuum im Exsikkator getrocknet. Die erhaltene Fraktion war zitronengelb und von brüchiger Konsistenz.

Auswaage des aufgereinigten Extraktes: 1,7309 g, was 17,37 % Ausbeute entspricht. Damit konnte das Ergebnis der oben geschilderten Vorversuche zur Entwicklung der Methode klar übertroffen werden.

Probe Nr. 2

Die Gewinnung des Rohextraktes und die Aufreinigung wurde nach der oben beschriebenen Vorschrift für Probe 1 durchgeführt. Die Besonderheiten sind nachfolgend beschrieben.

Die Einwaage der pulverisierten Probe betrug 37,1 g; die Auswaage von Rohextrakt betrug 22,2 g, was einer Ausbeute von 59,8 % entspricht.

Aufreinigung

Wie bereits oben beschrieben, wurden 10 g des methanolischen Rohextraktes in einen Erlenmeyerkolben überführt und sukzessive 2-mal mit 3 %iger NaOH-Lösung (2 x 50 ml) unter leichtem Rühren 30 min bei 60 °C im Wasserbad suspendiert. Es wurde eine feine Suspension erhalten, die im Eisbad gekühlt und abzentrifugiert wurde. Die erhaltene, klare Lösung wurde angesäuert und wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Insgesamt musste festgestellt werden, dass die Verarbeitung dieser Probe deutlich einfacher war als die der Probe 1 (nur schwache Emulsionsbildung).

Es wurde eine Auswaage von 5,478 g erhalten, was einer Ausbeute von 54,8 % entspricht.

Probe Nr. 3

Die Einwaage der pulverisierten Probe betrug 35,1 g; die Auswaage von Rohextrakt betrug 23,4 g, was einer Ausbeute von 66,7 % entspricht.

Aufreinigung:

Wie bereits oben beschrieben, wurden 10 g vom methanolischen Rohextrakt in einen Erlenmeyerkolben überführt und sukzessive 2-mal mit 3 %iger NaOH-Lösung (2 x 50 ml) unter leichtem Rühren für 30 min bei 60 °C im Wasserbad suspendiert; der Verlauf war analog zur Probe 2.

Es wurde eine Auswaage von 8,501 g erhalten, was einer Ausbeute von 83,42 % entspricht.

Probe Nr. 4

Die Einwaage der pulverisierten Probe betrug 39,7 g; die Auswaage von Rohextrakt betrug 27,5 g, was einer Ausbeute von 69,3 % entspricht.

Aufreinigung:

Wie bereits oben beschrieben, wurden 10 g vom methanolischen Rohextrakt in einen Erlenmeyerkolben überführt und sukzessive 2-mal mit 3 %iger NaOH-Lösung (2 x 50 ml) unter leichtem Rühren für 30 min bei 60 °C im Wasserbad suspendiert; der Verlauf war analog zu Probe 2. Jedoch zeigte sich nahezu kein Rückstand, so dass die Lösung ohne Zentrifugation weiterverarbeitet werden konnte. Nach Einstellung des pHs mit HCl wurden 100 ml DCM direkt zu dieser Lösung gegeben und nachfolgend nochmals 2-mal mit jeweils 100 ml DCM ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

Es wurde eine Auswaage von 7,8200 g erhalten, was einer Ausbeute von 78,20 % entspricht.

Probe Nr. 5 (*B. sacra*, sehr dunkle Stücke)

Die Einwaage der pulverisierten Probe betrug 37,1 g; die Auswaage von Rohextrakt betrug 23,5 g, was einer Ausbeute von 63,3 % entspricht.

Aufreinigung:

Die Aufreinigung erfolgte analog zur Probe 4. Anzumerken wäre, dass die alkalische Lösung im Vergleich zur Probe 4 intensiv braun gefärbt war und der Niederschlag nach Ansäuerung zitronengelb war.

Es wurde eine Auswaage von 9,2955 g erhalten, was einer Ausbeute von 92,96 % entspricht.

Es wurde an dieser Probe, die eine sehr hohe Ausbeute lieferte, nochmals eine Alternative ausgetestet.^[6] In einer bereits publizierten Methode wird die alkalische, wässrige Lösung mit einem

organischen Lösungsmittel ausgeschüttelt, um evtl. Neutralstoffe bereits an dieser Stelle zu entfernen. Dazu wurde die alkalische Lösung mit DCM (3 x 10 ml) extrahiert; die vereinigten organischen Phasen wurden mit 0,5 %iger NaOH-Lösung (2 x 20 ml) gegengewaschen. Die alkalischen Phasen wurden vereinigt und die organische Phase verworfen. Wie bereits im Vorversuch gab es im Verlauf dieser Partitionierung keine signifikante Niederschlagsbildung.

Die erhaltene Ausbeute betrug jedoch nur 1,2167 g, was 12,2 % entspricht; offensichtlich werden durch das „Gegengewaschen“ mit DCM nicht nur Neutralstoffe abgetrennt.

Probe Nr. 6a (*B. sacra*, Rohware, grünlich-gelbliche Stücke der Probe 6)

Die Einwaage der pulverisierten Probe betrug 29,1 g; die Auswaage von Rohextrakt betrug 18,3 g, was einer Ausbeute von 62,9 % entspricht.

Aufreinigung:

Wie bereits oben beschrieben, wurden 10 g vom methanolischen Rohextrakt in einen Erlenmeyerkolben überführt und sukzessive 2-mal mit 3 %iger NaOH-Lösung (2 x 50 ml) unter leichtem Rühren für 30 min bei 60 °C im Wasserbad suspendiert; der Verlauf war analog zu Probe 4.

Es wurde eine Auswaage von 9,8730 g erhalten, was einer Ausbeute von 98,73 % entspricht.

Probe Nr. 6b (*B. sacra*, Rohware, dunkel gefärbte Stücke der Probe 6)

Die Einwaage der pulverisierten Probe betrug 35,3 g; die Auswaage von Rohextrakt betrug 21,4 g, was einer Ausbeute von 60,6 % entspricht.

Aufreinigung:

Wie bereits oben beschrieben, wurden 10 g vom methanolischen Rohextrakt in einen Erlenmeyerkolben überführt und sukzessive 2-mal mit 3 %iger NaOH-Lösung (2 x 50 ml) unter leichtem Rühren für 30 min bei 60 °C im Wasserbad suspendiert; der Verlauf war analog zu Probe 4.

Es wurde eine Auswaage von 8,8673 g erhalten, was einer Ausbeute von 88,67 % entspricht.

Probe Nr. 7 Ethanolischer Extrakt, entsprechend Deklaration von *B. sacra*

Da die Proben 7-10 schon als ethanolischer Extrakt zur Verfügung standen, konnte die Soxhlet-Extraktion entfallen. Von den Proben 9 und 10 gab es nur sehr kleine Mengen, die nahezu vollständig bei den oben geschilderten Vorversuchen verbraucht worden sind (siehe Tab. 7-5).

Aufreinigung

10 G des ethanolischen Rohextraktes wurde in einem Kolben in 10 ml MeOH suspendiert. Anschließend wurde eine 3 %ige NaOH-Lösung (100 ml) in 3 Portionen unter leichtem Rühren zugegeben. Der Extrakt wurde für 30 min bei 30 °C im Wasserbad belassen. Hierbei entwickelte sich eine stark viskose, rötliche Emulsion. Die Lösung wurde in ein Becherglas abdekantiert und der amorphe Rückstand erneut jeweils mit der 2. Portion der NaOH-Lösung bei 60 °C weiterbehandelt. Da anschließend noch immer ein verklumpeter, amorpher Rückstand übrig blieb, wurde der Kolben im Eisbad abgekühlt und erneut abdekantiert. Anschließend wurde der Rückstand 3-mal mit 80 °C heißem H₂O in kleinen Portionen nachgewaschen und dazwischen im Ultraschallbad resuspendiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt. Die vereinigten Phasen wurden, wie unter Probe 2 beschrieben, weiterverarbeitet.

Die Ausbeute betrug 2,5748 g, was 25,75 % entspricht.

Probe Nr. 8 (Eth. Extrakt)

Diese Probe wurde entsprechend Probe 7 aufgearbeitet.

Die Ausbeute betrug 5,4321 g, was 53,14% entspricht.

Proben Nummern 9 und 10 (Eth. Extrakte)

Da von diesen ethanolischen Extrakten, die zudem schon einige Jahre alt waren, nur geringe Mengen zur Verfügung standen, musste auf eine weitere Aufarbeitung verzichtet werden. Diese beiden Proben wurden direkt in der vorliegenden Form für die chromatographischen Untersuchungen verwendet.

Tab. 7-12 Zusammenfassung der Extraktionen / Aufreinigungen der Proben 1-10

Probe	Soxhlet Weihrauch Einwaage [g]	Soxhlet Rohextrakt, Auswaage [g]	Rohextrakt Ausbeute %	Ausbeute von 10g Rohextrakt [g]	Extrakt Ausbeute %
Probe 1	40,8	24,4	59,8	1,7	17,4
Probe 2	37,1	22,2	59,8	5,5	55,3
Probe 3	35,1	23,4	66,7	8,5	83,4
probe 4	39,7	27,5	69,3	7,8	78,2
Probe 5	37,1	23,5	63,3	9,3	93,0
Probe 6a	29,1	18,3	62,9	9,9	98,7
Probe 6b	35,3	21,4	60,6	8,9	88,7
Eth. Extrakt 7		/	/	2,6	25,8
Eth. Extrakt 8		/	/	5,4	53,1
Eth. Extrakt 9		/	/	/	/
Eth. Extrakt 10		/	/	/	/

7.2 Entwicklung dünnschichtchromatographischer Methoden

Alle Proben sowie die weiter unten beschriebenen Edukte der Vorsäulen-Derivatisierung wurden mittels traditioneller Dünnschicht-Chromatographie untersucht. Dabei wurden mit Hilfe einer Glaskapillare typischerweise 5 µl der Probe über eine Länge von 10 mm aufgetragen. Das Fließmittel für die „klassische“ DC war Toluol / Aceton 8:2 (V/V) und Kammersättigung. Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht, bei UV 256 nm und 366 nm sowie bei Tageslicht nach Besprühen mit Anisaldehyd-Reagenz.

Für die HPTLC-Analysen betragen die Probenvolumina für die Extrakte 10 µl und für die Referenzlösungen 20 µl, die automatisch mit dem CAMAG Automatic TLC Sampler III bandförmig über 8 mm auf Kieselgelplatten aufgetragen wurden. Die Proben wurden in einer konventionellen DC-Kammer unter Kammersättigung über 8 cm 1-3-mal entwickelt. Zu beachten ist, dass zwischen den einzelnen Läufen die Platten kurz im Abzug bei Raumtemperatur ohne Erwärmung getrocknet wurden. Die Platten wurden anschließend in einem Camag TLC-Visualizer unter eine UV-Lampe bei $\lambda=254$ nm ausgewertet, nochmals mit Anisaldehyd-Reagenz entwickelt und erneut bei Tageslicht ausgewertet.

Alle Extrakte wurden unter den gleichen Bedingungen analysiert. Die Konzentration der Extrakt-Proben betrug 20 mg/ml EtOH. Die Konzentration der einzelnen Standards betrug 0,5 mg/ml; zusätzlich wurden Mischstandards eingesetzt.

Das Laufmittel für die Entwicklung der HPTLC-Platten bestand typischerweise aus:

Pentan / Diethylether 2:1 plus 1 % Essigsäure (V/V).

7.3 Vorsäulen-Derivatisierungen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, zeigen viele Triterpensäuren nur bei relativ kurzen Wellenlängen im UV-Spektrum eine Absorption. Deshalb wurde überlegt, die Säurefunktion, alternativ die alkoholische Gruppe der Triterpensäuren, mit einem aromatischen Rest zu substituieren, so dass sich eine einheitliche Detektierbarkeit aller Triterpensäuren bei einer Wellenlänge von $\lambda=254$ nm oder höher ergibt. Der Syntheserfolg wurde zunächst mittels DC überprüft, wobei die Edukte mit chromatographiert wurden. Erst wenn sich ein eindeutiger Unterschied zwischen den Edukten und den Produkten zeigt, waren weiterführende Analysen geplant (z.B. HPLC).

Als funktionelle Gruppen bieten sich bei den Boswelliasäuren die Carbonsäurefunktion in Position 4 (C₄), die Hydroxylgruppe in Position 3 (C₃) und die Carbonylgruppe in Position 11 zur Derivatisierung an. Falls vorhanden, kann auch die Carboxylgruppe C₂₄ funktionalisiert werden. Ebenfalls sind die Doppelbindungen für eine Funktionalisierung zugänglich.

Die Carbonsäuregruppe kann mit verschiedenen Reagenzien aktiviert werden und anschließend zu Estern, Amiden, Aminen und Hydrazonen umgesetzt werden. Die Aktivierung kann z.B. als Carbonsäurechlorid, Carbonsäureanhydrid und als O-Acylisoharnstoff erfolgen. Als Nukleophil bieten sich z.B. Amine an; grundsätzlich muss das Nukleophil eine UV-aktive Gruppe (z.B. einen Aromaten) tragen.

Was aber eine Derivatisierung der Carbonsäure erschweren könnte, ist die sterische Hinderung durch die Methylgruppe in Position 4 sowie die Nähe der Säure zur 3-OH-Gruppe, wodurch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Säure und Alkohol entstehen können; was die Reaktivität zusätzlich reduziert. Auch der +I Effekt der Methylgruppe in Position 4 könnte die Carbonylaktivität erniedrigen (Abb. 7-1).

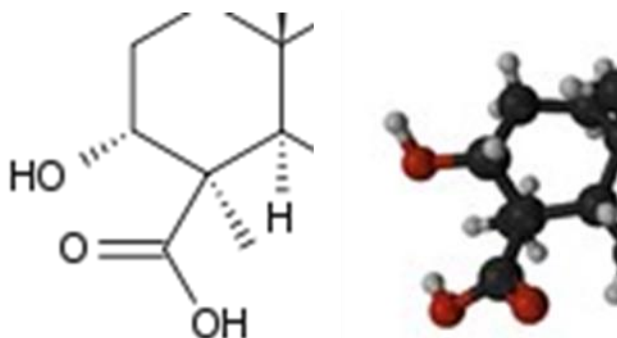


Abb. 7-1 Sterisch eingeschränkte Carbonsäure und alkoholische Gruppe an Ring A der Boswelliasäuren

Eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung stellt die Modifizierung an der Hydroxylgruppe in Position (C₃) dar; hier sind eine Veresterung mit einem Carbonsäure- oder Sulfonsäurechlorid in Gegenwart von Pyridin und katalytischen Mengen DMAP oder die Bildung eines Ethers mit einem Alkylhalogenid denkbar. Hier ergibt sich allerdings das Problem, dass die 3-OH-Gruppe teilweise acetyliert ist und vorher hydrolysiert werden müsste, was die geplante Vorsäulenderivatisierung zusätzlich erschweren würde. Deshalb ist diese Variante nicht zu bevorzugen, wurde aber trotzdem getestet. Ebenfalls ist es möglich, im Bereich der Ketogruppe, sofern vorhanden, an der Position (C₁₁) Derivatisierungen vorzunehmen; auch diese Variante wäre wegen strukturellen Unterschieden in diesem Bereich ebenfalls nicht die bevorzugte Lösung. Fernerhin haben die Triterpensäuren typischerweise eine oder zwei Doppelbindungen in Ring C, beispielsweise an Position C₁₂, die als weitere Alternative derivatisiert werden könnten.

Für alle Derivatisierungsversuche wurden zunächst einfachere Carbonsäuren als Modellsubstanzen und später Glycyrrhetinsäure (Glyc), die strukturell den Boswelliasäuren sehr nahekommt und im Gegensatz zu den BAs gut verfügbar ist, eingesetzt. Weiterhin wurden aufgereinigte Weihrauchextrakte und alternativ die Rohextrakte zur Methodenentwicklung verwendet.

Bei den Reaktionen wurden unterschiedliche Parameter variiert, die nachfolgend in den jeweiligen Tabellen zusammengefasst sind. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden getrocknet, um mögliche Rückreaktionen durch Wasser zu vermeiden. Als Reaktionsgefäße wurden Mikroschraubreagenzgläser (Fisher-Scientific) verwendet, die bei jeder Reaktion dicht verschlossen wurden und in einem Heizblock temperiert werden konnten.

7.3.1 Umsetzung der alkoholischen Gruppe über aktivierte Carbonsäuren

Derivatisierung der 3-Hydroxygruppe

Diese Derivatisierung stellt eine Veresterung der 3-OH-Gruppe dar, in dem der sekundäre Alkohol mit einem aktivierten Carbonsäurederivat zu einem Ester umgesetzt wurde. Damit das Produkt eine ausreichende UV-Absorption besitzt, kommt als Nucleophil z.B. eine aromatische Carbonsäure in Frage.

Es wurden Benzoylchlorid oder 4-Nitrobenzoylchlorid als Carbonsäurederivat ausgewählt. Um das bei der Reaktion entstehende HCl abzufangen, wurde als Base Pyridin hinzugegeben, welches zum Pyridinium-Ion reagiert. Als Edukt wurde die im Vorfeld erwähnte aufgereinigte BA-Fraktion bzw. Glyc, gelöst in Dichlormethan, verwendet.

Die Umsetzung der BAs mit 4-Nitrobenzoylchlorid fand unter Anwesenheit katalytischer Mengen Dimethylaminopyridin (DMAP) statt. Diese Methode fand bereits Anwendung in der Publikation „SEMISYNTHETIC HYBRIDS OF BOSWELLIC ACIDS: A NOVEL CLASS OF POTENTIAL ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-ARTHRITIC AGENTS“.[17]

Ansatz 1

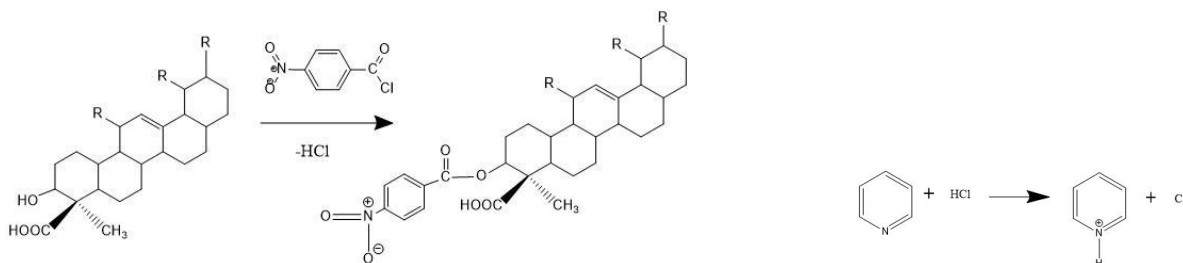


Abb. 7-2 Veresterung der 3-OH-Gruppe mit 4-Nitrobenzoylchlorid mit Pyridin als HCl-Fänger, formuliert mit BA

Tab. 7-13 Zusammenfassung der Reaktion 1

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel	Tatsächliche Einwaage / Volumina
Glyc	1	50	110	MeOH	50,32 mg
4-Nitrobenzoylchlorid	1,2	24	130	10 ml DCM	23,82 mg
DMAP		1		THF	164 μl (50 mmol/L Lsg.)

Glyc sollte als Modellsubstanz mit 4-Nitrobenzoylchlorid an der 3-OH-Gruppe zu einem Ester derivatisiert werden. In einem kleinen Mikro-Reaktionsgefäß wurden 50 mg Glyc in Methanol (Ultraschallbad) gelöst. Unter Schutzgas-Atmosphäre (Argon) wurde 4-Nitrobenzoylchlorid, gelöst in trockenem DCM, in Gegenwart von DMAP als Katalysator zur Reaktionslösung gegeben und für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel abgezogen und eine weiße Substanz blieb zurück.

Um eine dünnschichtchromatographische Kontrolle des Reaktionsverlaufes durchzuführen, wurden Referenzlösungen angefertigt. Dazu wurde 1mg Glyc in einem Gemisch von jeweils 1 ml Methanol, Ethanol und Chloroform gelöst sowie 1 mg 4-Nitrobenzoylchlorid in 1 ml Methanol gegeben. 1 mg des Produktes wurde ebenfalls in einer Mischung aus jeweils 1 ml Methanol, Ethanol und Chloroform gelöst. Von den drei Lösungen wurden 5 μl mittels einer Mikrokapillare auf eine Kieselgel G₆₀ F₂₅₄ Platte (Aluminiumträger) mit den Maßen 5 cm x 8 cm aufgetragen. Die Laufstrecke betrug 6 cm. Als Laufmittel dienten 3 ml eines 10:1-Gemisches aus n-Hexan und Ethylacetat (V/V). Die Auswertung erfolgte unter UV bei 254 nm und 366 nm. Zudem wurde Anisaldehyd-Schwefelsäure-Sprühreagenz zur Detektion verwendet, welches aus 0,05 ml Anisaldehyd, 8,5 ml Methanol, 1 ml Eisessig und 0,5 ml konz. Schwefelsäure frisch hergestellt wurde. Leider konnte beim Vergleich von Edukt zu Produkt keine Umsetzung festgestellt werden.

Ansatz 2

Als Modellsubstanzgemisch wurde hier der aufgereinigte Extrakt 9 genommen.

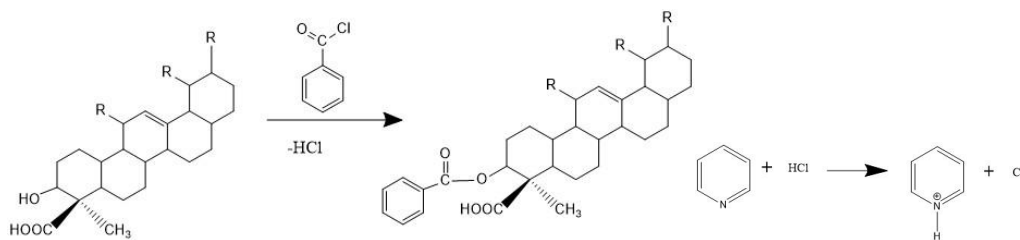


Abb. 7-3 Veresterung der 3-OH-Gruppe mit Benzoylchlorid, formuliert mit BA und Pyridin als HCl-Fänger

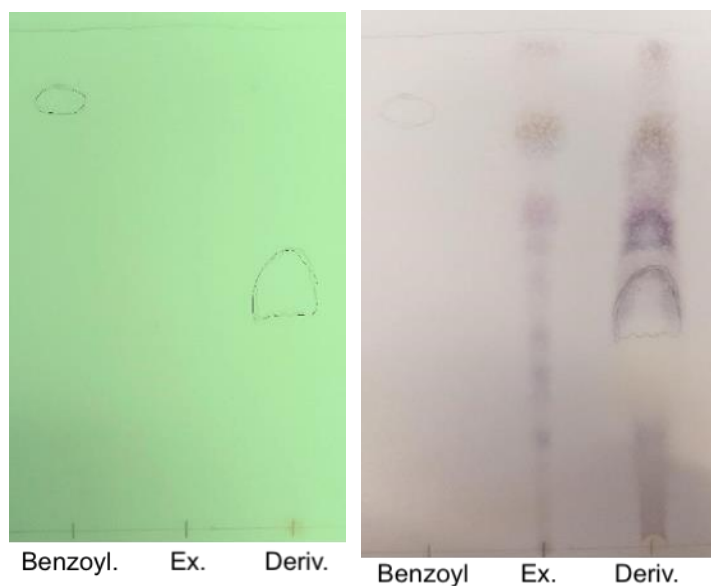
Tab. 7-14 Zusammenfassung der Reaktion 2

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage / Volumina	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 9	1	100	99,97 mg	200	1 ml DCM
Benzoylchlorid	2		46 μl	400	2 ml Pyridin

Die Probe wurde in 1 ml Dichlormethan gelöst und in einem Mikro-Schraubdeckelreagenzglas mit Argon überlagert. Als Derivatisierungsreagenz wurde Benzoylchlorid in 2 ml Pyridin gelöst und in das Reagenzglas getropft. Der Ansatz wurde wieder mit Argon überlagert und eine Stunde bei 40 °C im Heizblock temperiert. Nach Einrotieren wurde ein Rückstand erhalten.

Ausbeute: 240,3 mg, gelblich, dickflüssig.

Die Probe wurde, wie unter Ansatz 1 beschrieben, dünnschichtchromatographisch untersucht. Unter UV-Licht (254 nm) war eine unscharfe Bande für ein mögliches Produkt bei einem R_f von 0,5 schwach sichtbar, was aber nicht den Erwartungen entsprach. Das vermutete Ergebnis wäre eine Verschiebung der Triterpenbanden, oder zumindest einiger dieser Banden, zu höheren R_f-Werten. Deshalb wurde auch dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.



UV 254 nm

Anisaldehyd

Abb. 7-4 DC-Ergebnisse der Reaktion 2**Ansatz 3**

Analog zum Ansatz 1 wurde dieser mit einer aufgereinigten Probe 9 wiederholt.

Tab. 7-15 Zusammenfassung der Reaktion 3

Reaktanden	Äquivalent	Masse, soll (mg)	Tatsächliche Einwaage (mg)	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 9	1	100	102,07	200	1 ml DCM
4-Nitrobenzoylchlorid	3	111,34	115,4	600	2 ml Pyridin

Die Probe wurde in 1 ml Dichlormethan gelöst und im Mikro-Schraubdeckelreagenzglas mit Argon überlagert. 4-Nitrobenzoylchlorid wurde in einem Schnappdeckelglas in 2 ml Pyridin unter Erwärmen gelöst und in das Reaktionsgefäß tropfenweise hinzugegeben. Der Ansatz wurde erneut mit Argon überlagert und eine Stunde dicht verschlossen bei 60-70 °C im Heizblock temperiert.

Um die Reaktion zu stoppen, wurden 2 ml Wasser zugegeben. Anschließend wurde 3-mal mit je 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die gesammelten Dichlormethanphasen wurden einrotiert und es wurde ein fester Rückstand erhalten.

Ausbeute: 224,2 mg Produkt, gelblich, kristallin.

Unter UV-Licht war eine Bande bei R_f 0,4 oberhalb des 4-Nitrobenzoylchlorids sichtbar; jedoch ist es fraglich, ob es sich dabei um ein Boswelliasäurederivat handelt. Die Bande ließ sich nicht mit Anisaldehyd anfärben und lässt so auf ein Nebenprodukt schließen.

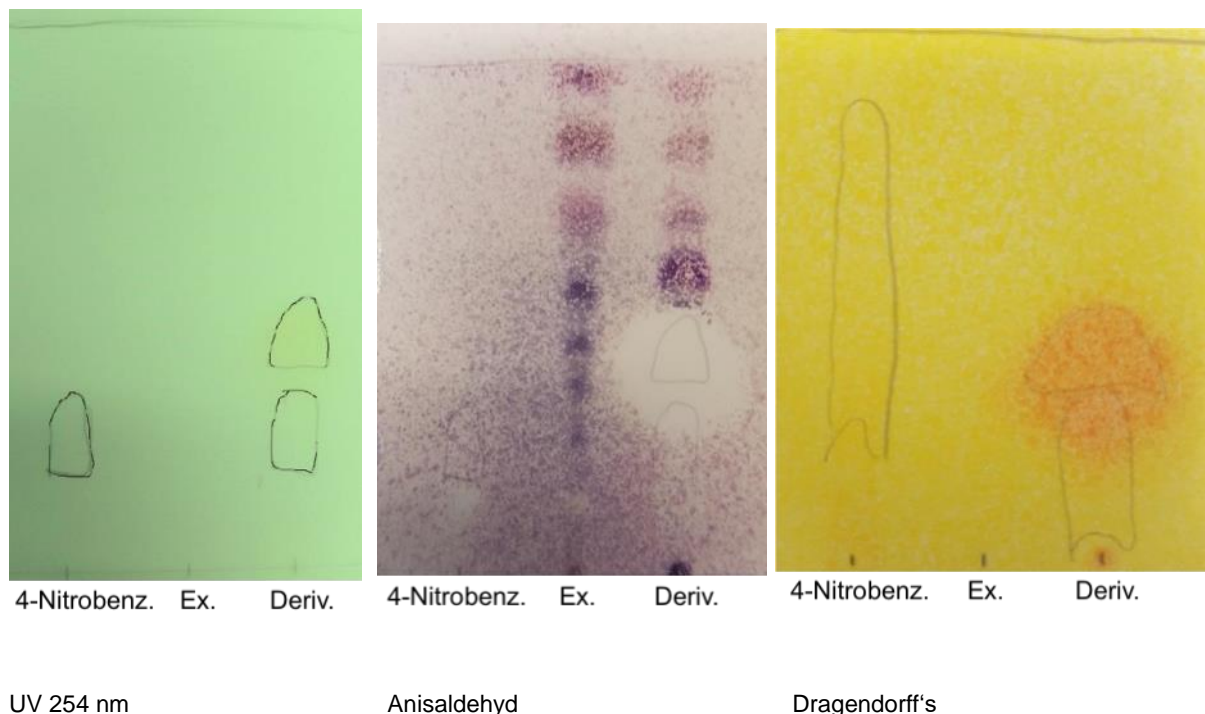


Abb. 7-5 DC-Ergebnisse der Reaktion 3

Ansatz 4

Hydrolyse der acetylierten Boswelliasäuren und anschließende Derivatisierung mit 4-Nitrobenzoylchlorid.

Tab. 7-16 Zusammenfassung der Reaktion 4

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage (mg)	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 9	1	100	102,06	200	1 ml DCM
4-Nitrobenzoylchlorid	1	37,11	40,01	200	2 ml DCM
DMAP			1		

Da, wie vorhin erwähnt wurde, einige Boswelliasäuren (z.B. AKBA) an der 3-Position acetyliert vorliegen, wurde bei diesem Ansatz angestrebt, diese zunächst zu deacetylieren und anschließend vollständig zu derivatisieren:

Ca. 250 mg des Weihrauch-Extraktes Nr. 9 wurden in ein Schnappdeckelglas eingewogen und in 5 ml Diethylether gelöst. Es wurde 3-mal mit je 5 ml 0,5 M NaOH ausgeschüttelt und die vereinigten NaOH-Phasen in einem Schraubdeckelreagenzglas 1,5 Stunden auf 70 °C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde das Reagenzglas vor Licht geschützt und über Nacht ruhen gelassen. Danach wurde die Lösung nun mit 3 ml 6N HCl angesäuert und 3-mal mit je 5 ml Diethylether ausgeschüttelt. Abschließend wurde das Lösungsmittel der Diethyletherphasen am Rotationsverdampfer abgezogen und ca. 100 mg des Produktes abgewogen.

Diese Probe wurde in einem Mikroreaktionsglas in 1 ml Dichlormethan gelöst. 4-Nitrobenzoylchlorid wurde zusammen mit Dimethylaminopyridin (DMAP) in 2 ml Dichlormethan gelöst und langsam zur Probe zugetropft. Das Reaktionsgefäß wurde mit Argon gefüllt und für eine Stunde dicht verschlossen bei 40 °C im Heizblock erwärmt. Abschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen.

Ausbeute: 128,6 mg eines gelblichen Feststoffes.

Bei der DC-Analyse waren unter UV-Licht neben dem Derivatisierungsreagenz fünf weitere Banden zu erkennen, welche sich auch mit Anisaldehyd anfärben ließen. Die Banden des möglichen Produktes sind breiter und unpolarer als die des Extraktes, was zunächst auf eine erfolgreiche Derivatisierung hindeutet (Abb. 7-6).

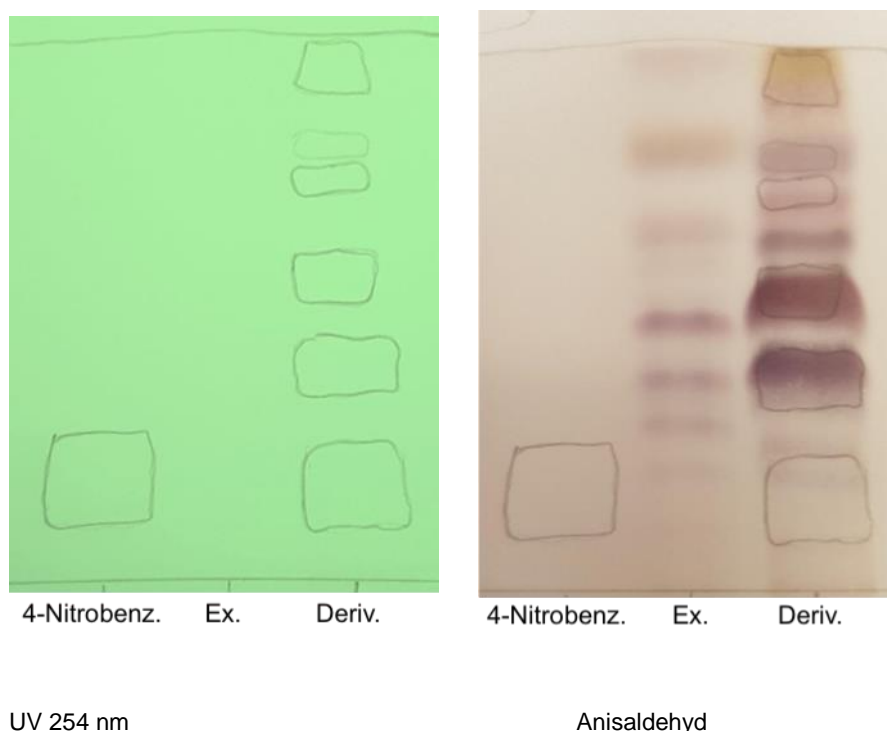


Abb. 7-6 DC-Ergebnisse der Reaktion 4

Bei genauerer Auswertung der DC wird jedoch sichtbar, dass die vermeintlichen Produktbanden durch die Eduktbande des 4-Nitrobenzoylchlorides nach oben gedrückt werden, insbesondere, weil die Konzentration höher ist als bei den Edukten. Deshalb erbrachte auch dieser Ansatz nicht das gewünschte Ergebnis.

Ansatz 5

Zur Optimierung von Ansatz 4 wurden drei Wiederholungen mit etwas veränderten Mengenverhältnissen nach dem vorher beschriebenen Versuchsablauf durchgeführt.

Tab. 7-17 Zusammenfassung des 5. Reaktionsansatzes

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage / Volumen	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 9	1	100	101,95 mg	200	1 ml MeOH
Natriumhydroxid	3	0,03375	0,03576 mg	602	1 ml MeOH
Salzsäure 32 %			Ca. 1 ml		
4-Nitrobenzoylchlorid	1	37,11	37,9 mg	400	1 ml DCM
DMAP		1	1 mg		1 ml DCM

Das erzielte Ergebnis unterschied sich leider nicht signifikant von dem in Abb. 7-6; ein eindeutiger Beweis für eine Umsetzung konnte nicht erbracht werden.

Ansatz 6

Ausgehend von Versuch 5 wurden die stöchiometrischen Verhältnisse weiter modifiziert.

Tab. 7-18 Zusammenfassung des 6. Reaktionsansatzes

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage (mg)	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 9	1	100	90	200	
Natriumhydroxid	1		204,76	5000	10 ml MeOH
4-Nitrobenzoyl Chlorid	1	37,11	37,8	200	
DMAP		2	2		

Das erzielte Ergebnis unterschied sich leider nicht signifikant von dem in Abb. 7-6; ein eindeutiger Beweis für eine Umsetzung konnte nicht erbracht werden.

Ansatz 7

Ausgehend von Versuch 5 wurden die stöchiometrischen Verhältnisse weiter modifiziert.

Tab. 7-19 Zusammenfassung des 7. Reaktionsansatzes

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage (mg)	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 10	1	100	105,29	200	
Natriumhydroxid	1	200	191,06	5000	10 ml MeOH
4-Nitrobenzoyl Chlorid	1	37,11	37,8	200	2 ml MeOH
DMAP		1	1,05		1

Das erzielte Ergebnis unterschied sich leider nicht signifikant von dem in Abb. 7-6; ein eindeutiger Beweis für eine Umsetzung konnte nicht erbracht werden.

7.3.2 Umsetzung der 3-Hydroxylgruppe mittels weiterer Aktivatoren

Es wurde noch eine weitere Derivatisierung der 3-OH-Gruppe entsprechend einer Patentschrift zur Derivatisierung der BA unternommen.^[17] Dabei wurde Nicotinsäure oder eine andere geeignete organische Säure mit Thionylchlorid / Sulfurylchlorid unter Zusatz von Pyridin zum Carbonsäurechlorid aktiviert und dann mit der 3-OH-Gruppe der BA umgesetzt.^[97, 98] Unter diesen Bedingungen ist die Reaktion auf Carbonsäuren beschränkt, die von GERRARD *et* FRENCH auf die Erleichterung der „Broadside-Collision“ durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen Carboxyl-H und Pyridin zurückgeführt wird (Abb. 7-7).^[99] Die Reaktion wurde entsprechend KEUSGEN *et al.* modifiziert.^[100] Alternativ könnte für die Veresterung der sekundären Alkoholfunktion DMAP als nukleophiles Hilfsreagenz verwendet werden; dieser Ansatz wurde im Ansatz 4 weiterverfolgt.^[101]

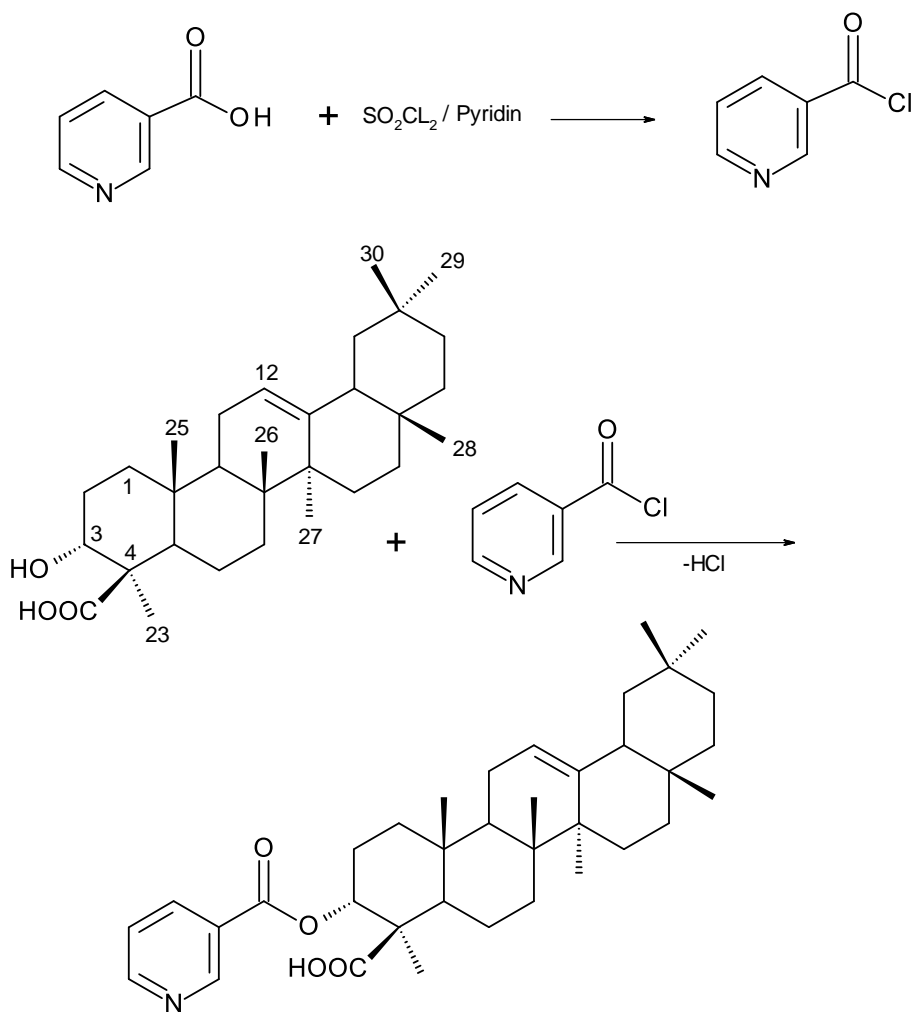


Abb. 7-7 Reaktionsschema zur Umsetzung von Nicotinsäure mit BAs

Ansatz 1

Entsprechend des Schemas in Abb. 7-7 wurde folgender Versuch geplant:

Tab. 7-20 Versuchsplanung der 1. Reaktion mit Nicotinsäure

Stoff	Äquivalent	M [g/mol]	N	m	V
Extrakt 1	1		0,011 mmol	0,5 g	
Nicotinsäure	1	123,11	1,6 mmol	0,2 g	0,5 ml
Sulfurylchlorid	1	134,965	6,2 mmol	0,835 g	

Da vom Extrakt 9 keine ausreichende Menge mehr zur Verfügung stand, wurden die weiteren Experimente mit Extrakt 1 durchgeführt; dazu wurde die Probe (5 mg) unter Stickstoff in wasserfreiem Pyridin (0,5 ml) in einem verschraubbaren Mikro-Reaktionsgefäß gelöst. Sulfurylchlorid wurde gemeinsam mit Nicotinsäure hinzugegeben und Reste von Sulfurylchlorid

wurden mit einem N₂-Strom entfernt. Das Reaktionsgefäß wurde dicht verschlossen und im Heizblock bei 100 °C für 10 min mit einem Mikro-Magnettisch gerührt. Die braune Reaktionslösung wurde in 10 ml gesättigte NaCl Lösung gegeben und anschließend 3-mal mit 10 ml Cyclohexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Es wurde eine leicht braune, ölige Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 6,1 mg

Die wässrige Reaktionslösung wurde anschließend nochmals mit 10 ml Ethylacetat extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck abgezogen. Es wurde ein schmutzig-weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5,6 mg

Obwohl die Methode zuvor von KEUSGEN erfolgreich mit aliphatischen Carbonsäuren getestet wurde, lassen sich zwischen dem Extrakt und der Cyclohexan-(CH)-Phase keine nennenswerten Unterschiede erkennen; die Ethylacetat-(EE)-Phase zeigt nur eine verschwommene Bande oberhalb der Startbande (Abb. 7-8).

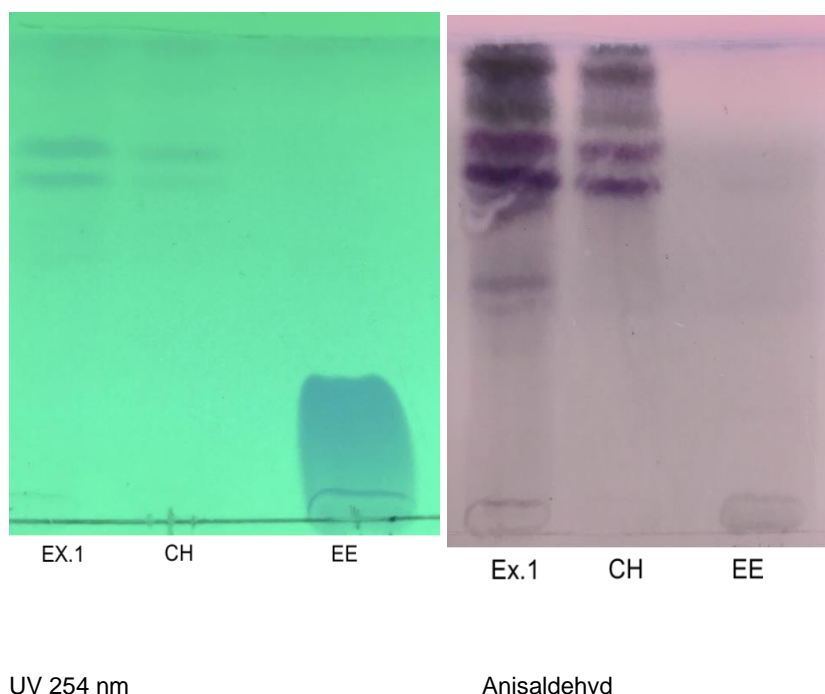


Abb. 7-8 DC-Ergebnisse des 1. Reaktionsansatzes

Ansatz 2

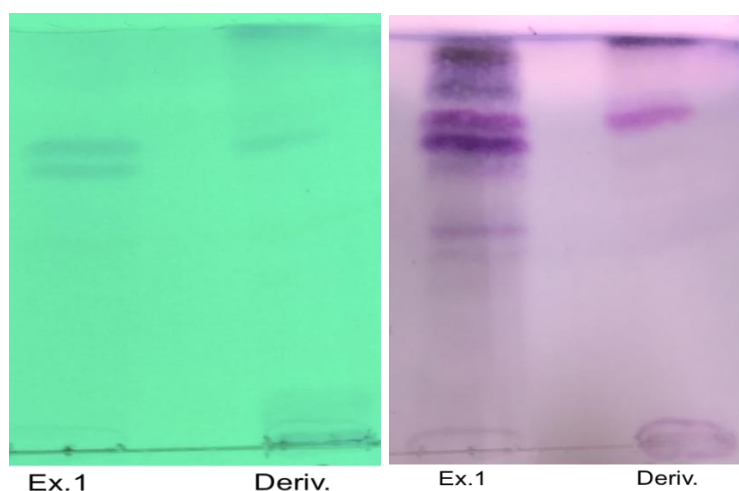
Bei dem 2. Ansatz wurde nur die Versuchsdurchführung geändert aber gleiche Mengen an Substanzen eingesetzt.

Tab. 7-21 Versuchsplanung der 2. Reaktion mit Nicotinsäure

Stoff	Äquivalent	M [g/mol]	n	m	V
Nicotinsäure	1	123,11	1,6 mmol	0,2 g	0,5 ml
Sulfurylchlorid	1	134,965	6,2 mmol	0,835 g	
Extrakt 1	1		0,011 mmol	0,5 g	

In einem Mikro-Reaktionsgefäß, wurde 200 mg Nicotinsäure unter N₂ als Schutzgas vorgelegt und 0,5 ml Sulfurylchlorid dazu gegeben. Extrakt 1 (5 mg) wurde in 0,5 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und zur Reaktionslösung hinzugegeben. Überschüssiges SO₂Cl₂ wurde mit einem N₂-Strom entfernt. Das Gefäß wurde dicht verschlossen und im Heizblock für 1 h bei 100 °C mit einem Mikro-Rührfisch gerührt. Die braune Reaktionslösung wurde mit 10 ml gesättigte NaCl Lösung versetzt und 3-mal mit 10 ml Cyclohexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck abgezogen.

Ausbeute: 9,8 mg als dunkelbraune, ölige Flüssigkeit.



UV 254 nm

Anisaldehyd

Abb. 7-9 DC-Ergebnisse des 2. Reaktionsansatzes

Berücksichtigt man, dass von dem Extrakt (Ex. 1) eine mengenmäßig größere Menge aufgetragen wurde als von dem Reaktionsansatz (Deriv.), ergeben sich zwischen beiden Proben keine signifikanten Unterschiede (Abb. 7-9).

Ansatz 3

Der Ansatz 2 wurde nochmals exakt wiederholt. Es wurde eine Ausbeute von 11 mg in Form weißer Kristalle erhalten. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gegenüber Ansatz 2 festgestellt (Abb. 7-10).

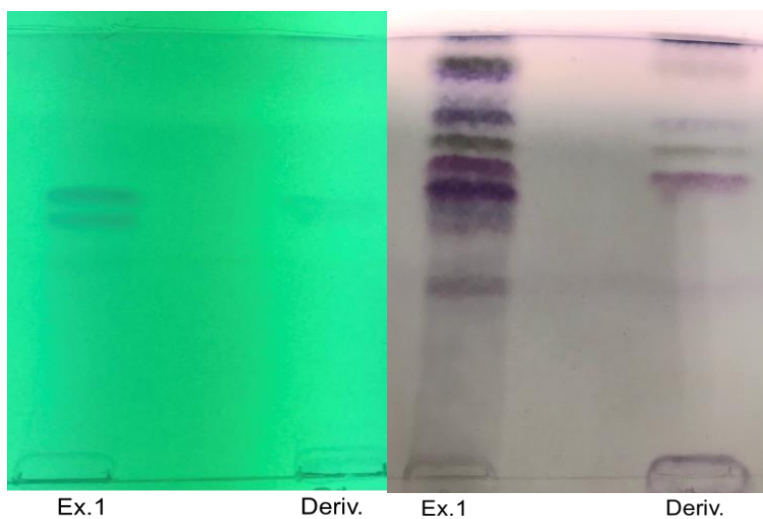


Abb. 7-10 DC-Ergebnisse des 3. Reaktionsansatzes

Ansatz 4

In diesem Ansatz wurde Nicotinsäure durch Salicylsäure ersetzt (Abb. 7-11). Anstelle des Pyridins wurde jedoch DMAP verwendet; die Lösungsmittel waren wasserfreies Dichlormethan (DCM) und Toluol.^[17]

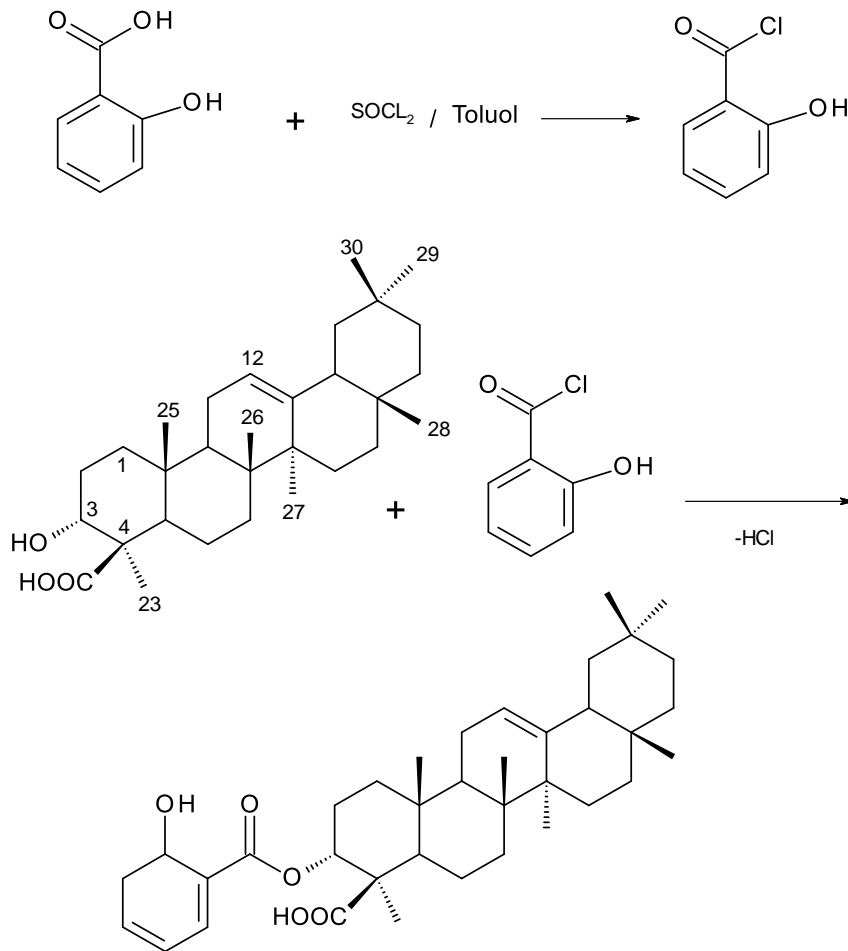


Abb. 7-11 Derivatisierungsschema der BAs mit Salicylsäure

Tab. 7-22 Versuchsplanung der 4. Reaktion mit Salicylsäure und DMAP

Stoff	Äquivalent	M [g/mol]	m	V
Salicylsäure	1	138,121	2000 mg	30 ml (in Toluol)
Thionylchlorid	10	118,97		11 ml
DMAP	1		1 mg	
Extrakt 1	1		300 mg	

Salicylsäure (2 g) wurde in 30 ml wasserfreiem Toluol in einem Rundkolben gelöst. Thionylchlorid (11 ml) wurde tropfenweise zugegeben. Die Reste des Thionylchlorids wurden mit einem N₂-Gasstrom entfernt. Das Reaktionsgefäß wurde dicht verschlossen und im Heizblock bei 100 °C erhitzt; um den Reaktionsverlauf zu überprüfen, wurden in regelmäßigen Abständen kleine Proben genommen und mittels DC untersucht. Nach 3 Stunden wurde die Reaktion beendet und das gesamte Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein ölig-brauner Rückstand erhalten. Der ölige Rückstand wurde dann in ca. 10 ml wasserfreiem

Dichlormethan gelöst. DMAP (1 mg) und Extrakt 1 (500 mg) wurden zugegeben und 1 Stunde erhitzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute an Säurechlorid: 2,72 g

Ausbeute an Produkt: 2,47 g

Es konnte mittels DC keinerlei Umsetzung der BAs detektiert werden.

Ansatz 5

Es wurde der Versuch 4 mit einer anderen Stöchiometrie wiederholt.

Tab. 7-23 Versuchsplanung der 4. Reaktion mit Salicylsäure und DMAP

Stoff	Äquivalent	M [g/mol]	m	V
Salicylsäure	1	138,121	1019,6mg	15 ml (in Toluol)
Thionylchlorid	1	118,97	0,5 ml	5,5 ml
DMAP	1		1,5 mg	
Extrakt 3	1		200 mg	

Salicylsäure (1 g) wurde in 30 ml trockenem Toluol in einem Rundkolben gelöst. Thionylchlorid (5,5 ml) wurde zugegeben. Die Reste des Thionylchlorids wurden mit einem N₂-Strom entfernt. Das Reaktionsgefäß wurde dicht verschlossen und im Heizblock 3 Stunden bei 100 °C erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und es wurde ein ölig-brauner Rückstand erhalten.

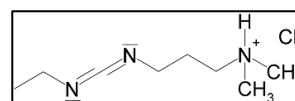
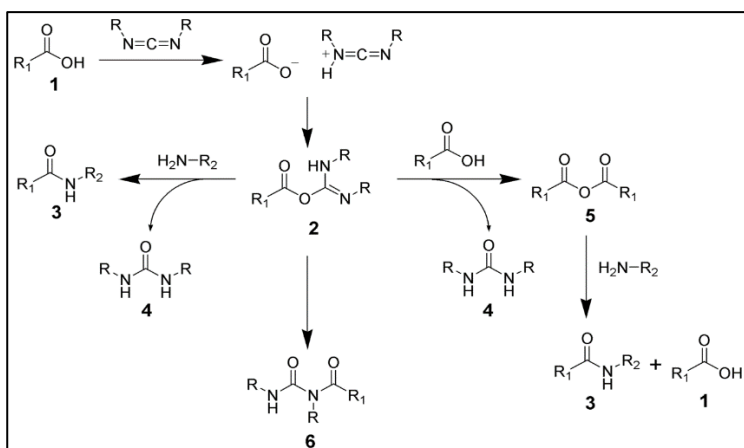
Der ölige Film wurde anschließend in ca. 5 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. DMAP (1,5 mg) und Extrakt 3 (207,5 mg) wurden zugegeben und 1 Stunde erhitzt. Es wurden während der Reaktion in konstanten Zeitabständen (2 min, 4 min, 10 min) Proben genommen und DCs durchgeführt. Abschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 1,264 g

Auch dieser Ansatz erbrachte in der DC-Analyse keine verwertbaren Ergebnisse. Das erhaltene Produkt hatte eine sehr dunkle Farbe; auf der DC bildeten sich nur Schlieren ohne abgegrenzte Banden.

7.3.3 Umsetzung der Carbonsäurefunktion über die EDC-Methode

Es wurde zuerst mehrfach versucht, die einfacheren Carbonsäuren wie Ferulasäure, Salicylsäure und Phenyllessigsäure in 3-4 %iger Pyridin-Lösung über EDC*HCl [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid] oder alternativ über DCC+NHS zu aktivieren und anschließend mit einem entsprechenden UV-aktiven Nucleophil wie *p*-Toluolsulfonylhydrazin unter Bildung eines Amids umzusetzen (Abb. 7-12).^[102, 103, 104, 105]



EDC; 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
MW: 191.70

Abb. 7-12 Derivatisierungsschema der BAs über Carbodiimid-Aktivierung der Carbonsäurefunktion an C₄.

Nach erfolgreicher Umsetzung der einfachen Testsubstanzen wurden die Untersuchungen mit dem Extrakt Nr. 9 fortgesetzt.

Tab. 7-24 Umsetzung der BAs mit *p*-Toluolsulfonylhydrazin

Stoff	Äquivalent	M [g/mol]	n	m	P [g/cm]	V
Extrakt Nr. 9	1	456,7	$2,2 \times 10^{-5}$ mol	0,01g	-	10 ml EtOH
Pyridin	3 %	-	-	-	0,98	0,3 ml
EDC * HCl	25	191,7	$5,5 \times 10^{-4}$ mol	0,11 g	-	-
P-Tol.hydrazin	5	186,23	$1,1 \times 10^{-4}$ mol	0,02 g	-	-

Extrakt Nr. 9 (10 mg in 10 ml Ethanol) wurde mit einem 25-fachen Überschuss an (EDC * HCl) in 3%igem Pyridin (V/V) für 5 Minuten bei 60 °C im Wasserbad erhitzt, danach in 5-fachem Überschuss *p*-Toluolsulfonylhydrazin zugesetzt und weitere 15 Minuten bei 60 °C erhitzt.

Leider wurde kein verwertbares Produkt erhalten; die DC-Analyse lieferte keine Ergebnisse, die auf eine erfolgreiche Reaktion hindeuteten. Deshalb wurde dieser experimentelle Ansatz nicht weiterverfolgt.

7.3.4 Derivatisierung der Boswelliasäuren nach Umsetzung zum Säurechlorid

Die oben beschriebene EDC-Methode wurde ausgewählt, da diese unter relativ milden Reaktionsbedingungen abläuft. Alternativen Methoden, wie beispielsweise die Umsetzung der BAS zum Säurechlorid, sind wesentlich drastischer und es muss auch mit mehr Nebenprodukten gerechnet werden.

Bei der hier beschriebenen Methode wird die Carbonsäure-Funktion der Boswelliasäure mit Thionylchlorid zum reaktiven Carbonsäurechlorid umgesetzt, welches meist in Gegenwart einer Base wie Pyridin oder Triethylamin (als Hilfsbase zum Abfangen der Protonen) mit einem entsprechenden Amin wie 8-Aminochinolin zum Carbonsäureamid umgesetzt wird. 8-Aminochinolin ist als Kopplungsreagenz gut geeignet, da es ein Absorptionsmaximum bei etwa 258 nm zeigt und somit in einer HPLC Anlage mit UV-Detektor gut zu detektieren wäre. Eine DC-Detektion ist mittels UV, Anisaldehyd und Dragendorff's Reagenz möglich.

Da Säurechloride hydrolyseempfindlich sind, wurde das frisch gebildete Zwischenprodukt unter wasserfreien Bedingungen weiterverarbeitet. Bei der Reaktion einesamins mit einem Säurechlorid wird ein Äquivalent Säure freigesetzt, welches noch nicht umgesetztes Amin protonieren würde.^[75]

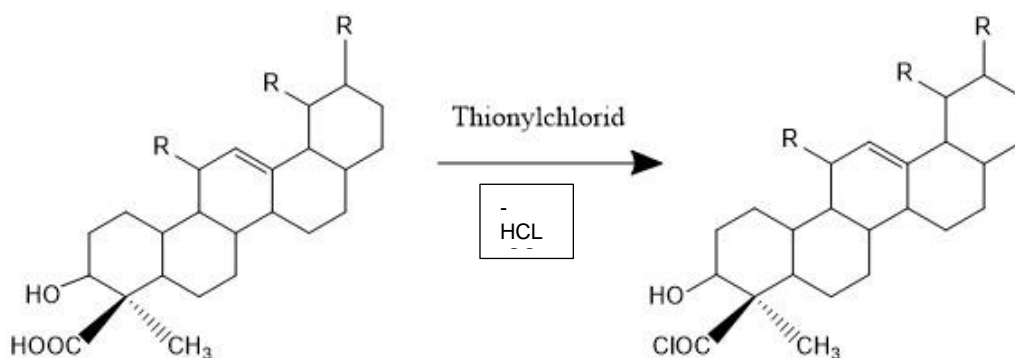


Abb. 7-13a Schematische Umsetzung der BAs mit Thionylchlorid; es entsteht das Säurechlorid

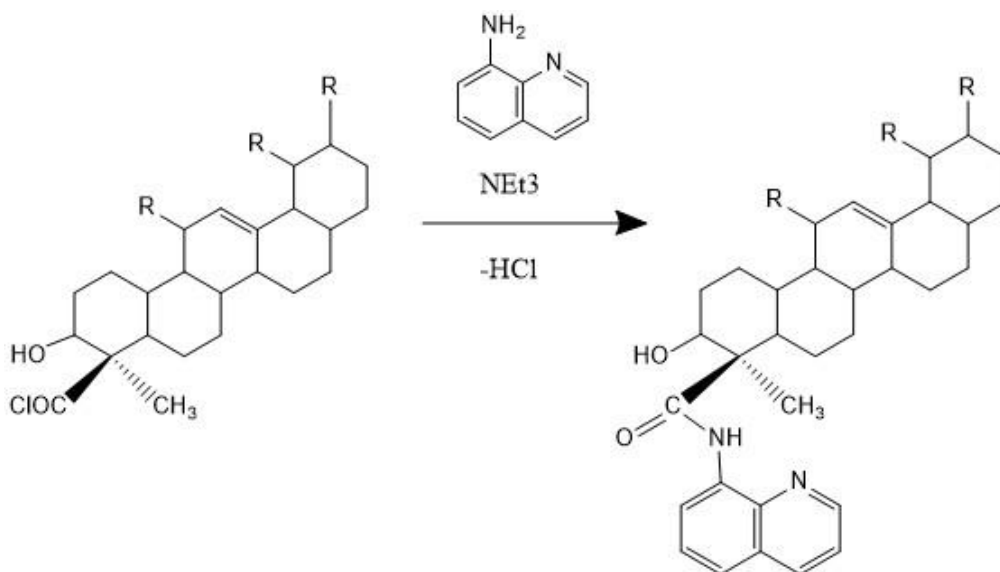


Abb. 7-13b Schematische Umsetzung der aktivierten BAs mit 8-Aminochinolin

1. Ansatz

Tab. 7-25 Umsetzung der BAs mit 8-Aminochinolin

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage / Volumina	Stoffmenge (μmol)	gelöst in:
Extrakt 9	1	100	102,5 mg	200	THF
Thionylchlorid	1,2	28,55	18 μl	240	
8-Aminochinolin	1	28,84	29,17 mg	200	DCM
Triethylamin	1	20,2	28 μl	200	DCM

Der aufgereinigte Weihrauchextrakt wurde in getrocknetem THF (3 ml) gelöst und unter Schutzgasatmosphäre in einen Dreihalskolben überführt. Dann wurde Thionylchlorid (18 μl) zur Aktivierung der Carbonsäure hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in DCM (ca. 5 ml) resuspendiert und eine Lösung von 8-Aminochinolin in DCM (ca. 5 ml) unter Zusatz von Triethylamin (28 μl) hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von etwa 30 min wurde eine gesättigte Lösung von NaHCO₃ hinzugegeben (ca. 20 ml) und 3-mal mit DCM (3 x 10 ml) ausgeschüttelt. Anschließend wurde die gesammelte organische Phase über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Um eine dünnschichtchromatographische Kontrolle des Reaktionsverlaufes durchzuführen, wurden Referenzlösungen angefertigt. Dazu wurden 1 mg des Extraktes sowie 1 mg des Produktes in je 1

ml THF gelöst. 100 mg 8-Aminochinolin wurden in 100 ml DCM gelöst und 1:100 verdünnt, so dass ebenfalls eine Konzentration von 1 mg/ml resultierte. Vom Produkt sowie von beiden Referenzen wurden jeweils 5 µl auf eine Kieselgel G₆₀ F₂₅₄ Platte (Aluminiumträger) mit den Maßen 5 cm x 8 cm aufgetragen. Die Laufstrecke betrug 6 cm. Als Laufmittel dienen 30 ml eines 10:1 Gemisches aus n-Hexan und Ethylacetat. Die Auswertung erfolgte bei UV 254 nm sowie bei 366 nm. Die Derivatisierung war auch bei diesem Ansatz nicht erfolgreich; es konnten schon bei der Auswertung unter UV 254 nm keinerlei Produktbanden festgestellt werden.



UV 254 nm

Abb. 7-14 DC-Analyse des 1. Reaktionsansatzes

2. Ansatz

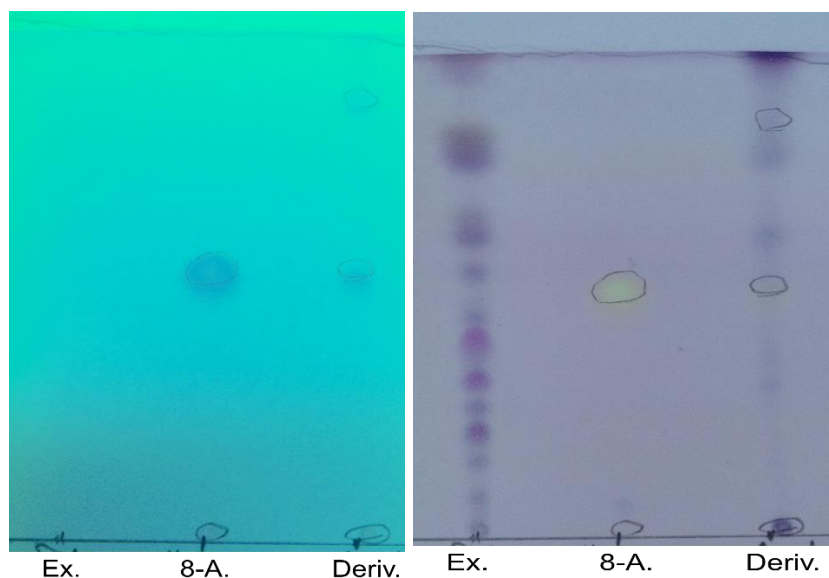
Bei diesem Ansatz wurde die gleiche Vorschrift wie bei Ansatz 1 angewendet und dabei das Äquivalent von Thionylchlorid um nahezu das 10-fache erhöht.

Tab. 7-26 Umsetzung der BAs mit 8-Aminochinolin, 2. Ansatz.

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage / Volumen	Stoffmenge (µmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 9	1	100	99,6 mg	200	3 ml THF
Thionylchlorid	10		300 µl	2000	
8-Aminochinolin	1	29	29,3 mg	200	DCM
Triethylamin	1	20mg → 28 µl		200	DCM

Ausbeute: 133,49 mg

Wie in Abb. 7-15 dargestellt, konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Das 8-Aminochinon ist sowohl bei UV 254 nm sowie nach Besprühen mit Anisaldehyd-Reagenz gut zu erkennen.



UV 254

Anisaldehyd

Abb. 7-15 DC-Analyse des 2. Ansatzes. Im Vergleich zum 1. Ansatz wurde das Fließmittel modifiziert: Aceton / Toluol 1:4 (V/V)

3. Ansatz

Im 3. Ansatz wurde der Anteil an Thionylchlorid nochmals erhöht.

Tab. 7-27 Umsetzung der BAs mit 8-Aminochinolin, 3. Ansatz.

Stoff	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage / Volumen	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 9	1	100	92,1 mg	200	1,2 ml THF
Thionylchlorid	20		300 μl	4000	
8-Aminochinolin	1	29	30,69 mg	200	1 ml DCM
Triethylamin	1	20mg → 30 μl	30 μl	200	1 ml DCM

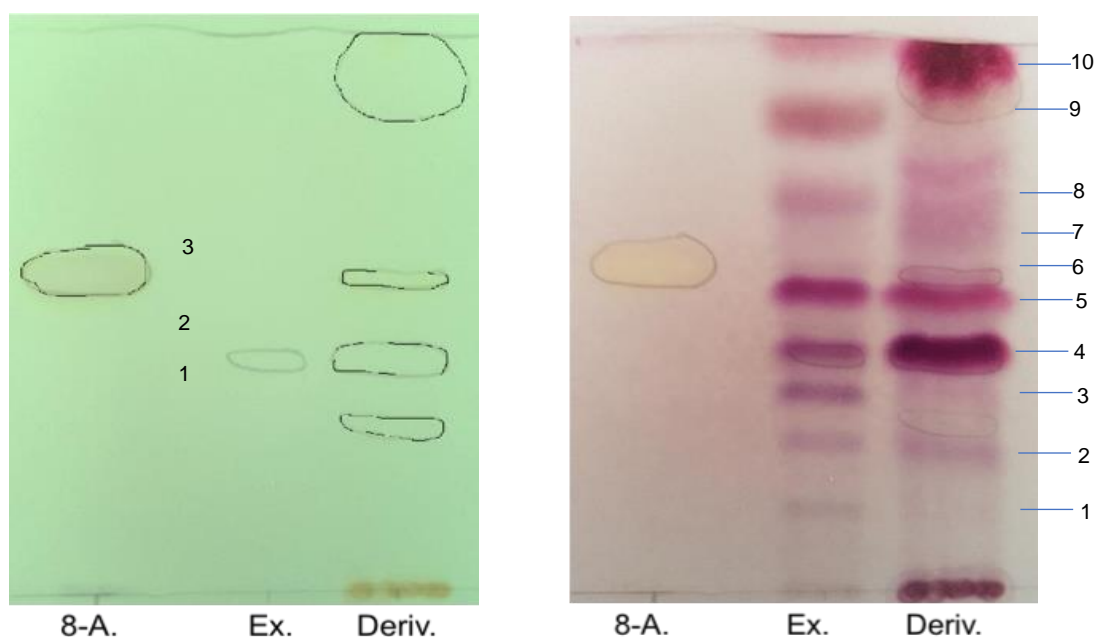
Der aufgearbeitete Extrakt 9 (angereicherte Boswelliasäure) wurde zunächst in 1,2 ml THF in einem Schraubreagenzglas gelöst und mit Argon überlagert. Das Thionylchlorid wurde langsam zugetropft

und unter Argon 1 h bei 40 °C in einem dicht verschlossenen Mikro-Reaktionsgefäß erwärmt. Anschließend wurde das THF mit einem Argonstrom nahezu vollständig entfernt. Anschließend wurde eine Lösung aus 8-Aminochinolin und Triethylamin in DCM hinzugegeben und erneut 1 h bei 40 °C unter Argon im dicht verschlossenen Reaktionsgefäß erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung gestoppt und 3-mal mit je 1 ml DCM ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Ausbeute: 92,3 mg eines braunen und klebrigen Produktes.

Die Auswertung wurde mittels DC durchgeführt (Abb. 7-16).

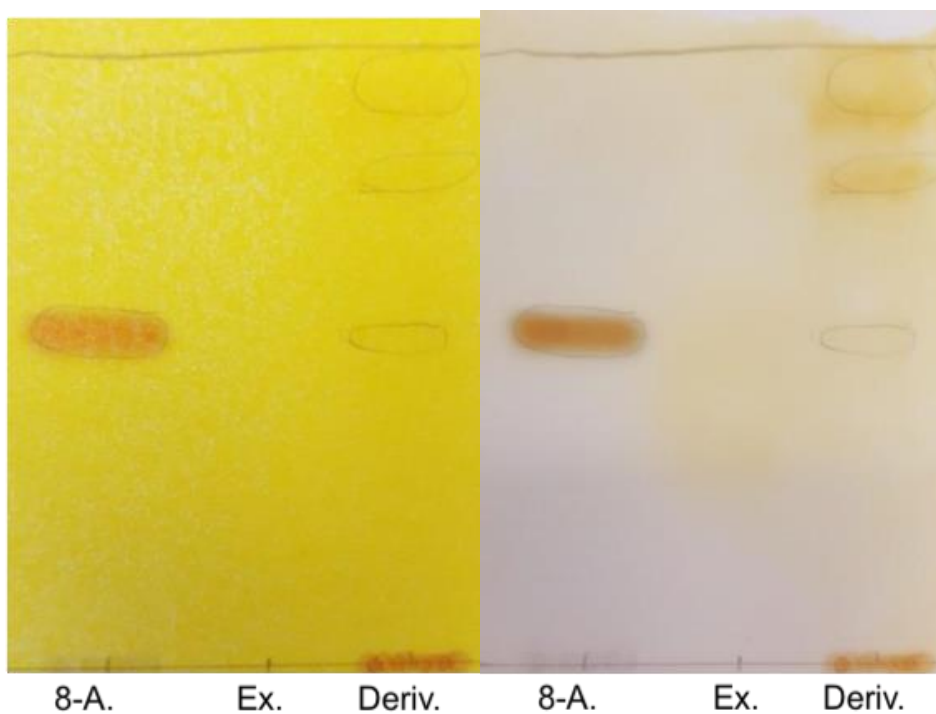
Die Ausgangssubstanzen Weihrauchextrakt und 8-Aminochinolin wurden neben der Produktprobe aufgetragen; es wurden jeweils Lösungen in einer Konzentration von 1 mg/ml in DCM verwendet. Als Laufmittel diente eine Mischung aus 8 Teilen Toluol und 2 Teilen Aceton. Verwendete Kieselgelplatte: Kieselgel₆₀ F₂₅₄. Als Sprühreagenzien wurden Anisaldehyd-Sprühreagenz, Dragendorff's Sprühreagenz und eine Kombination von Dragendorff's Sprühreagenz mit Natriumnitrit 10% verwendet.



Markierung: UV 254 nm

Anisaldehyd

Abb. 7-16a DC-Analyse des 3. Ansatzes; Auswertung des Ansatzes bei UV 254 nm (markierte Banden zeigen eine Fluoreszenzlöschung), Auswertung bei UV 254 nm (8-Aminochinolin schwach gelb) sowie nach dem Besprühen mit Anisaldehyd. Aceton / Toluol 1:4 (V/V)



Dragendorff's Rgz.

NaNO₂ nach Dragendorff's Rgz.

Abb. 7-16b DC-Analyse des 3. Ansatzes; Auswertung mit Dragendorff's Reagenz sowie Nachbehandlung mit NaNO₂

Bemerkenswert ist, dass nach der Detektion mit Dragendorff's Reagenz und der Verstärkung mit NaNO₂ in der oberen Hälfte der DC mehrere unscharfe Banden auftreten, die eventuell für das gewünschte Produkt stehen. Deshalb wurde dieser Versuch mehrmals mit leicht veränderten Reaktionsbedingungen wiederholt.

Tab. 7-28a Auswertung der DCs in Abb. 7-16a, UV 254 nm

Tageslicht/ UV 254 nm	Extrakt	Derivatisiert			
		1.	2.	3.	4.
Nummer	2.	1.	2.	3.	4.
R _f	0,4	0,29	0,4	0,56	0,89
Farbe				hellbraun	
Intensität	+	++	++	+	+++

Tab. 7-28b Auswertung der DCs in Abb. 7-16a, Anisaldehyd.

Tageslicht/ Anisaldehyd	Edukt (Ex)							
Nummer	1	2	3	4	5	8	9	10
R _f	0,13	0,27	0,35	0,44	0,53	0,71	0,85	0,97
Farbe	helllila	helllila	lila	Lila	pink	rosa	braunrot	lila
Intensität	+	+	++	+++	+++	++	++	+

Tageslicht/ Anisaldehyd	Produkt (Deriv.)							
Nummer	2	3	4	5	6	7	8	10
R _f	0,27		0,44	0,52	0,56	0,67	0,73	0,89
Farbe	rosa	lila	dunkellila	Lila	rosa	rosa	rosa	dunkellila
Intensität	+	+	+++	++	+	++	+	+++

4. Ansatz

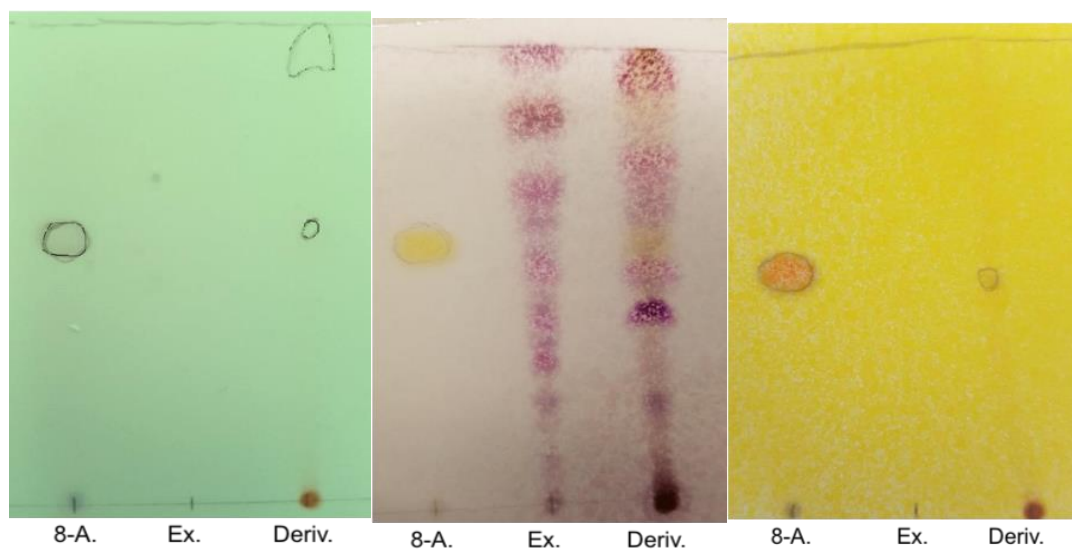
Es wurde die gleiche Vorschrift wie beim 3. Ansatz verwendet, jedoch wurden die Mengenverhältnisse etwas verändert (Tab. 7-29).

Tab. 7-29 Umsetzung der BAs mit 8-Aminochinolin, 4. Ansatz.

Stoffe	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage / Volumen	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 9	1	100	96,90 mg	200	1.2 THF
Thionylchlorid	20		300 μl	4000	
8-Aminochinolin	2	58	61,70 mg	400	1 ml DCM
Triethylamin	2	40mg → 60μl	60 μl	400	1 ml DCM

Ausbeute: 120,9 mg eines klebrigen, braunen Produktes.

Die DC-Analyse brachte leider kein eindeutiges Ergebnis; die Analyse des Reaktionsansatzes zeigte keine klar abgegrenzten Banden, welche mit Dragendorff's Reagenz angefärbt werden konnten. Es war lediglich eine langgestreckte, unscharfe Zone zu erkennen (Abb. 1-17).



UV-254 nm

Anisaldehyd

Dragendorff's Rgz.

Abb. 7-17 DC-Analyse des 4. Ansatzes mit unterschiedlichen Detektionsmethoden

5. Ansatz

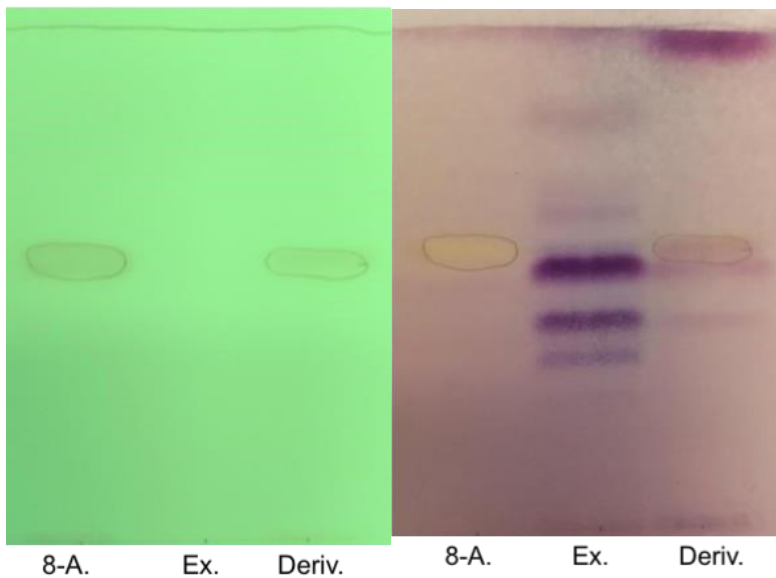
Da bei Ansatz 3 schon teilweise ein Erfolg zu verbuchen war, wurde die Reaktion hier bei veränderten Bedingungen nochmals im Gegensatz zum vorherigen bei Raumtemperatur durchgeführt (Tab. 7-30). Die Vorschrift wurde ansonsten wie bei Ansatz 3 eingehalten.

Tab. 7-30 Umsetzung der BAs mit 8-Aminochinolin, 5. Ansatz.

Stoffe	Äquivalent	Masse, soll (mg)	tatsächliche Einwaage / Volumina	Stoffmenge (μmol)	Lösungsmittel (ml)
Extrakt 9	1	100	104,92 mg	200	1.2 THF
Thionylchlorid	20		300 μl	4000	
8-Aminochinolin	1	29	30,40 mg	200	1 ml DCM
Triethylamin	1	20mg \rightarrow 30 μl	30 μl	200	1 ml DCM

Ausbeute: 160,2 mg eines bräunlich-gelben Feststoffes.

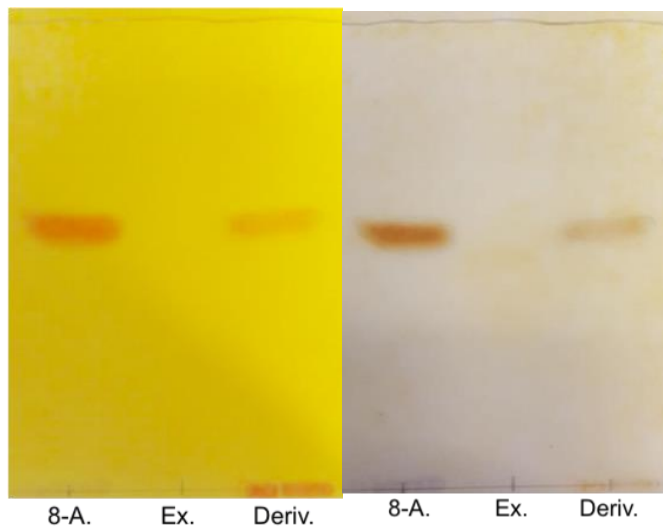
Wie in Abb. 7-18b sichtbar, befinden sich nicht wie bei Ansatz 3 aminhaltige Banden bzw. chinolinhaltige Banden in der oberen Hälfte der DC.



UV 254 nm

Anisaldehyd

Abb. 7-18a DC-Analyse des 5. Ansatzes nach Detektion bei UV 254 nm sowie mit Anisaldehyd



Dragendorff's

NaNO₂ nach Dragendorff's Rgz.

Abb. 7-18b DC-Analyse des 5. Ansatzes nach Detektion mit Dragendorff's Reagenz sowie Nachentwicklung mit NaNO₂

6. Ansatz

Bei diesem Versuch gibt es zwei wesentliche Unterschiede zu dem 3. Ansatz: Einerseits wurde hier anstelle eines Extraktes von *B. sacra* der Extrakt 1 verwendet, welcher aus *B. serrata* (Indischer

Weihrauch) hergestellt wurde. Andererseits fand die Umsetzung der BAs mit Thionylchlorid in Gegenwart von DMF statt. Zudem wurde wasserfreies Ethanol verwendet.

Tab. 7-31 Umsetzung der BAs mit 8-Aminochinolin, 6. Ansatz.

Stoffe	Äquivalent	tatsächliche Einwaage / Volumina	Lösungsmittel (ml)
Extrakt Nr. 1	1	3,030 g	DMF
Thionylchlorid	10	510 µl	
8-Aminochinolin	5	4,8 g	1 ml EtOH, wasserfrei
Na-Ethanolat	10	4,5 g	20 ml EtOH, wasserfrei

In einer trockenen Reaktionsapparatur, bestehend aus einem Dreihalskolben (100 ml Volumen), Magnetrührer, Rückflusskühler mit Trockenrohr, Tropftrichter und einem Stutzen für die Zufuhr eines Schutzgases wurde Thionylchlorid gelöst in DMF unter Argon-Schutzgas vorgelegt und der Extrakt hinzugegeben; dabei färbte sich der Ansatz sofort schwarz. Die Reaktionsmischung wurde unter Rühren langsam auf 50 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für 2 h gehalten; es blieb ein schwarzer Feststoff übrig. Das noch vorhandene Thionylchlorid wurde mit einem Argon-Strom innerhalb von 30 min entfernt.

Anschließend wurde 8-Aminochinolin in ca. 1 ml trockenem Ethanol gelöst (geringe Löslichkeit des Stoffes, gelbe Lösung), in den Tropftrichter überführt und langsam zugetropft. Fernerhin wurde Na-Ethanolat in 20 ml wasserfreiem Ethanol gelöst und zugetropft. Die Lösung blieb weiterhin schwarz. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Abschließend wurde der Rückstand über einen Büchnertrichter abfiltriert und mit Eisessig auf pH 6 eingestellt. Rückstand und Filtrat wurden auf Anwesenheit möglicher Produkte mit DC überprüft.

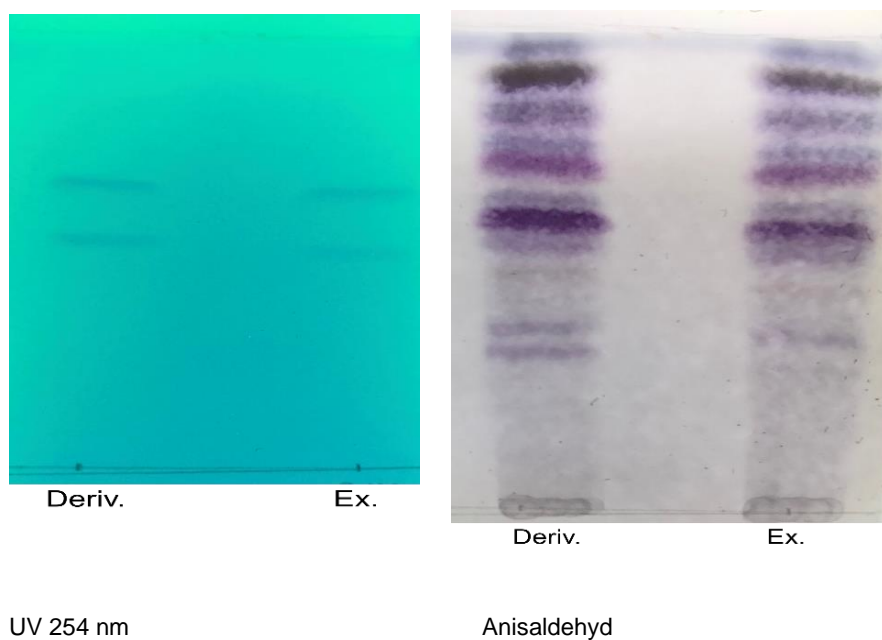


Abb. 7-19 DC-Analyse des 6. Ansatzes nach Detektion unter UV 254 nm und Anisaldehyd

Zwischen dem Ausgangsmaterial (Ex) und dem Produkt (Deriv.) konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 7-19).

7. Ansatz

Im Gegensatz zu den obigen Ansätzen wurde 8-Aminochinolin gegen Benzylalkohol ausgetauscht. Dieses Molekül bildet mit den BAs einen Ester (Abb. 7-20).

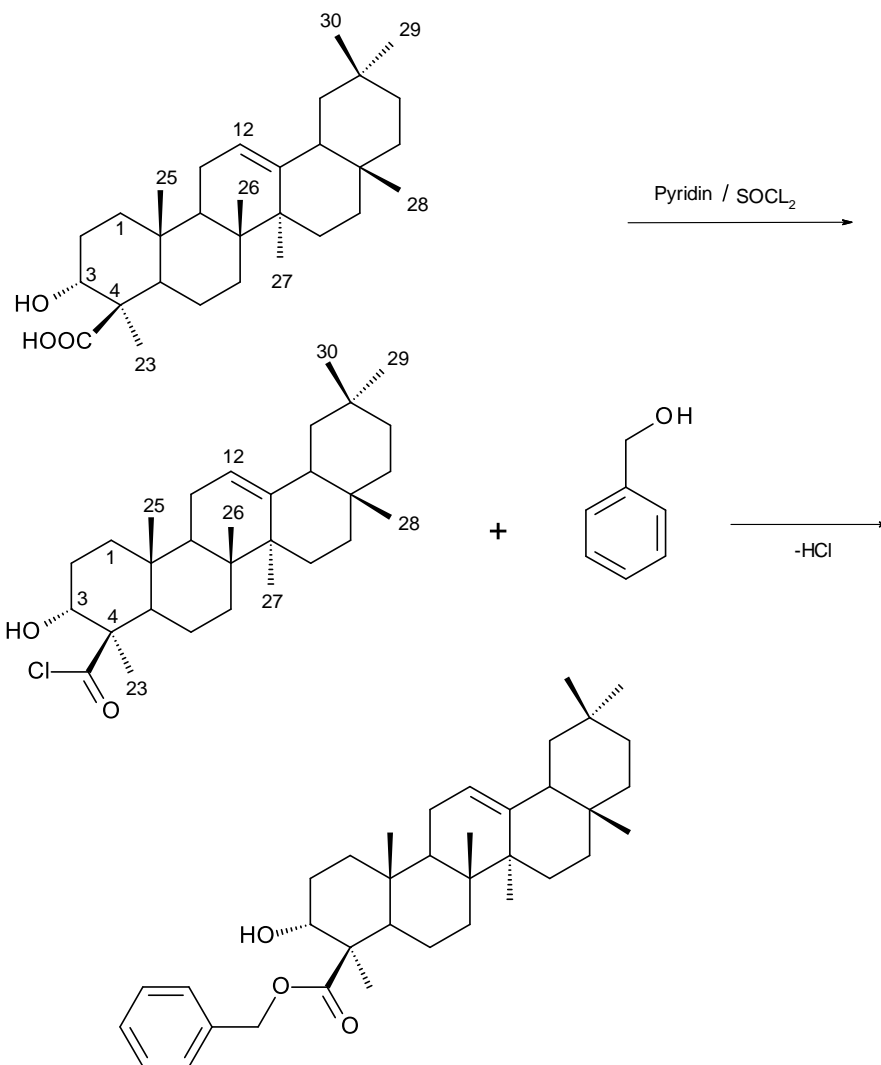


Abb. 7-20 Umsetzung der BA mit Benzylalkohol zu einem Ester

Tab. 7-32 Umsetzung der BAs mit Benzylalkohol, 7. Ansatz.

Stoff	Äquivalent	M [g/mol]	m	V
Extrakt 3	1		200 mg	in 0,5 ml Pyridin
Thionylchlorid		118,97	500 µl	0,1 ml
Benzylalkohol				2 Tropfen

Diese Versuche wurden mit äthiopischem Weihrauch; Extrakt 3, durchgeführt. Die Weihrauchprobe wurde unter Stickstoff als Schutzgas in wasserfreiem Pyridin (0,5 ml) in einem Mikro-Reaktionsgefäß gelöst und Thionylchlorid (0,5 ml) zugegeben. Die Reste von Thionylchlorid wurden mit einem N₂-Strom entfernt. Benzylalkohol wurde zugetropft, das Reaktionsgefäß wurde dicht verschlossen und im Heizblock auf 100 °C erwärmt. Es wurden nach 5- 10- 15- 20 min kleine Proben entnommen und

mittels DC untersucht (leider waren zwischen den Proben keine signifikanten Unterschiede zu erkennen). Nach 20 min wurde die Reaktion beendet und mit N_2 das gesamte Lösungsmittel entfernt. Das braune Reaktionsprodukt wurde mit 10 ml gesättigter NaCl-Lösung versetzt und 3-mal mit 10 ml Cyclohexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Es wurde eine schwach braune, ölige Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 63,2 mg

Die wässrige Reaktionslösung wurde zusätzlich mit 10 ml Ethylacetat extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Es wurde ein schmutzig-weißer Feststoff erhalten. Alle Fraktionen wurden mittels DC untersucht (Abb. 7-21).

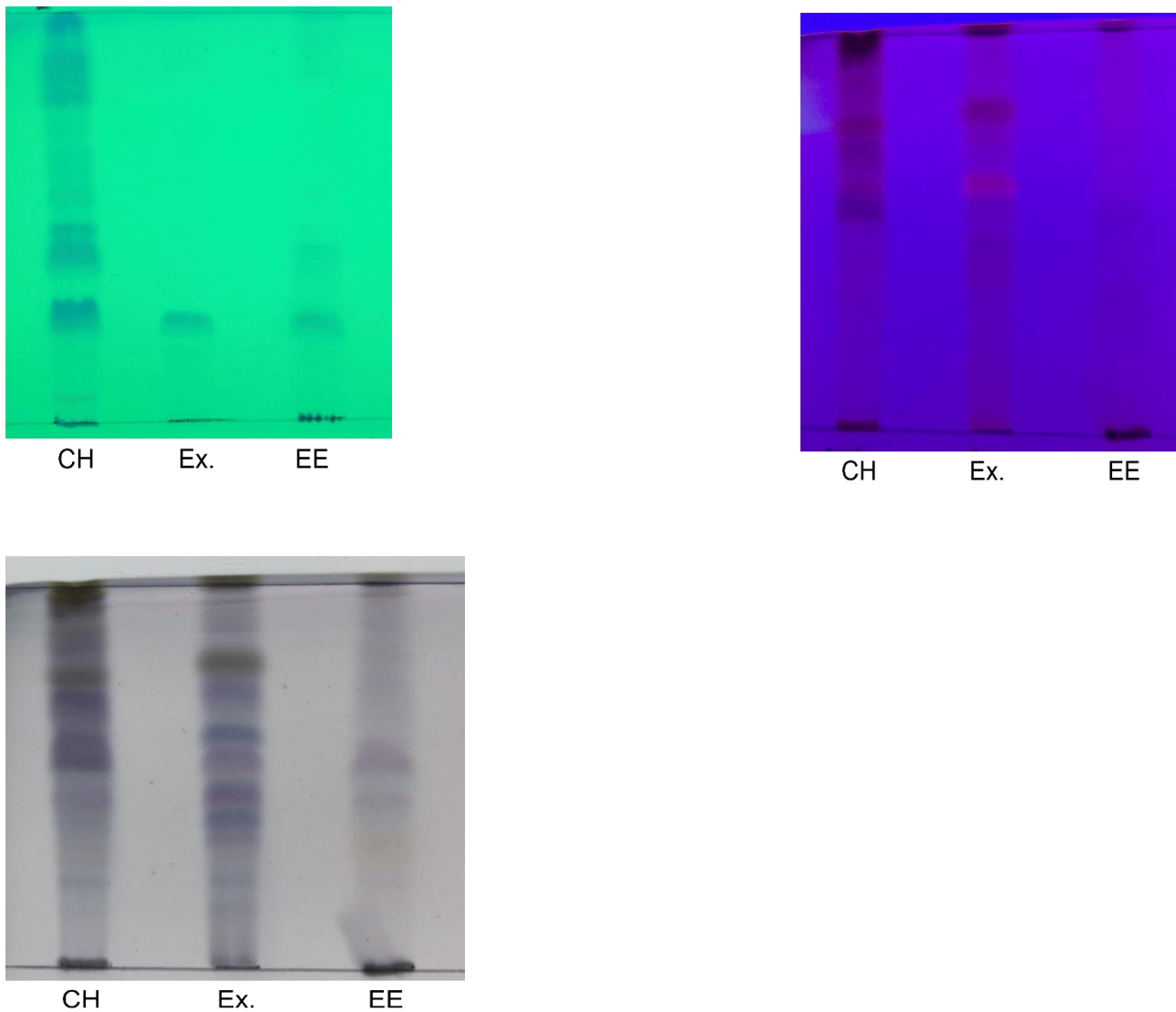


Abb. 7-21 DC-Analyse des 7. Ansatzes (oben links: UV 254 nm; rechts 366 nm; unten Anisaldehyd). Ex: Extrakt 3; CH: Cyclohexan; EE: Ethylacetat.

7.3.5 Umsetzung von Boswelliasäuren mit enophilen Reagenzien

Alle BAs weisen zumindest eine Doppelbindung auf, zumeist an Ring C (z.B. Position C₁₂). In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob das enophile Reagenz 4-Phenyl-1,2,4,-triazolin-3,5-dion (PTAD) an diese Doppelbindung addiert werden kann. Typischerweise reagiert PTAD mit Dienen, etwas schlechter mit isolierten Doppelbindungen, wie das bei den meisten BAs der Fall ist (Abb. 7-22).

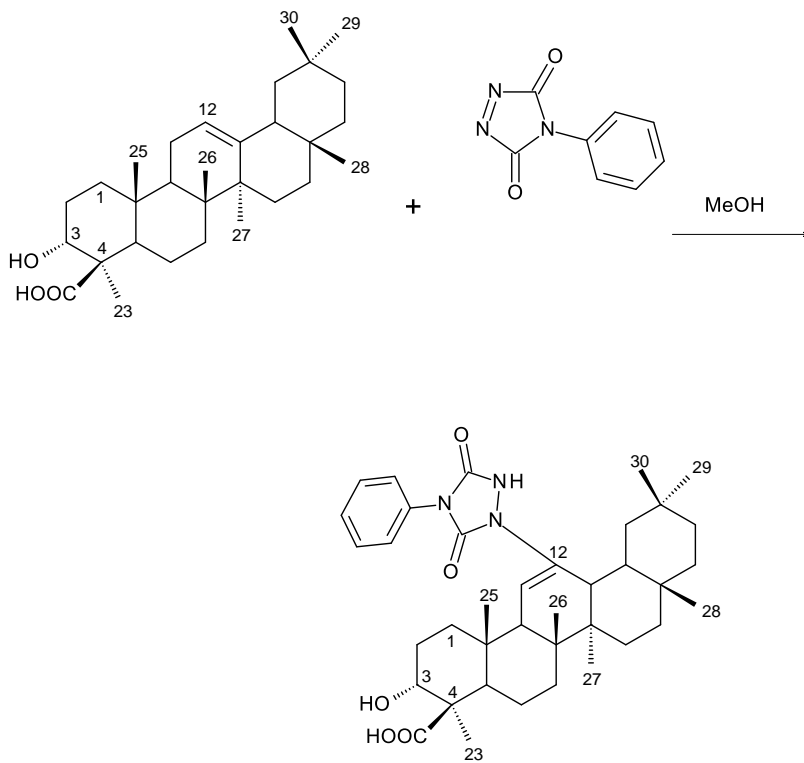


Abb. 7-22 Schematische Umsetzung von PTAD mit BAS

Tab. 7-33 Umsetzung der BAs mit PTAD in drei unterschiedlichen Konzentrationen.

Stoff	Äquivalent	M [g/mol]	n	m	V
Extrakt 3	1	ca. 500	2×10^{-4} mol	100 mg	1 ml MeOH
PTAD	1	175,16	4×10^{-6} mol	2,0 mg	1 ml MeOH
PTAD	2		8×10^{-6} mol	1,4 mg	
PTAD	3		$1,2 \times 10^{-5}$ mol	3,2 mg	

In einem Mikro-Reaktionsgefäß wurde Extrakt 3 (100 mg) in 1 ml MeOH gelöst. Es wurde PTAD (200 µl) zugegeben und unter Lichtausschluss sowie fest verschlossen für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 min und 60 min wurden kleine Proben genommen. Diese Reaktion wurde mit verschiedenen Äquivalenten an PTAD wiederholt.^[106, 107, 108, 109]

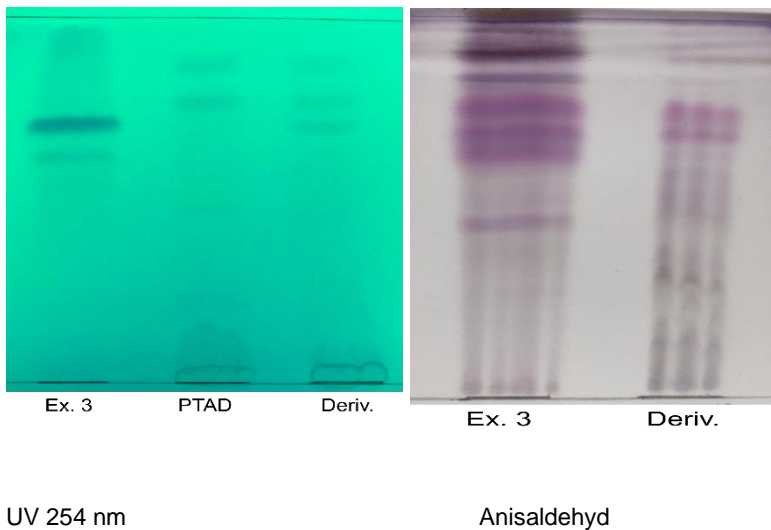


Abb. 7-23 DC-Analyse des Versuchansatzes nach Detektion unter UV 254 nm und Anisaldehyd

Das Ergebnis der DC-Analysen ist in Abb. 7-23 abgebildet. Berücksichtigt man, dass vom Extrakt 3 eine deutlich höhere Menge als von dem Produkt (Bande Deriv.) auf die DC-Platte aufgetragen wurde, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede, die eine Weiterverfolgung dieser Methode rechtfertigt hätten.

Lebenslauf

Die Seite 209 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Diese Seite ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.