



# DIPLOMARBEIT

Phytochemische Untersuchungen an einem Dichlormethan-  
extrakt der mongolischen Arzneipflanze

*Euphorbia pallasii* TURCZ.

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Anna Sigmund
Matrikel-Nummer:	0400668
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuerin:	Ao. Univ-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Wien, im Juli 2009

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>3</b>
<b>1 ALLGEMEINER TEIL.....</b>	<b>4</b>
1.1 Einleitung.....	4
1.2 Leberperfusionstest.....	5
1.3 Zielsetzung.....	6
1.4 <i>Euphorbia pallasii</i> TURCZ. ....	7
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>9</b>
2.1 Material.....	9
2.1.1 Pflanzenmaterial.....	9
2.1.2 Extrakterstellung.....	10
2.1.3 Fraktionierung mittels Ausschüttelung.....	10
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 Säulenchromatographie (SC).....	13
2.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC).....	17
2.2.3 High performance liquid chromatography (HPLC).....	19
2.2.4 Festphasenextraktion (SPE).....	23
2.2.5 Massenspektrometrie (MS).....	24
2.2.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	26
2.2.7 Infrarotspektroskopie (IR).....	26
<b>3 EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>28</b>
3.1 Auftrennung des Dichlormethanextraktes.....	31
3.1.1 Isolierung von AB2.....	32
3.1.2 Aufarbeitung der Fraktionen.....	36
3.1.3 Semi-präparative Isolierungen aus EP2C 1.....	39
3.2 Festphasenextraktion von EP2C 1.....	46
3.2.1 Analyse der 40%MeOH-Fractionen.....	48

3.2.2 Analyse der 60%MeOH-Fractionen.....	53
3.2.3 Analyse der 80%MeOH-Fractionen.....	55
3.3 Festphasenextraktion von EP2C 2.....	61
<b>4 DISKUSSION ZUR STRUKTUR VON AB2.....</b>	<b>65</b>
4.1 Analyse mittels MS.....	65
4.2Analyse mittels NMR.....	68
4.3 Analyse mittels IR.....	71
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>73</b>
<b>VERZEICHNISSE.....</b>	<b>74</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>80</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>81</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

AAR	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
CH <sub>3</sub> ·	Methan-Radikal
CH <sub>3</sub> COOH	Essigsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
∅	Durchmesser
EP2C	<i>Euphorbia pallasii</i> 2. Column Chromatography
etc.	Et cetera
Extr.	Extrakt
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	High performance liquid chromatography
IR	Infrarotspektroskopie
Kap.	Kapitel
MeOH	Methanol
Me <sub>2</sub> CO	Aceton
MS	Massenspektrometrie
n.d.	Nicht definiert
NMR	Nuclear magnetic resonance
ppm	Part per million
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (in der DC)
RP	Reversed Phase (in der HPLC)
R <sub>t</sub>	Retention time
s.	Siehe (Verweise auf andere Kapitel etc.)
S.	Seite
SC	Säulenchromatographie
SPE	Solid phase extraction
Tab.	Tabelle
TMM	Traditionelle Mongolische Medizin
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

# 1 ALLGEMEINER TEIL

## 1.1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten erfuhren traditionelle Heilmethoden, vornehmlich aus Asien stammende, einen starken Aufschwung in Europa. Sie können in Situationen, in denen die westliche Medizin keinen Ausweg mehr bietet, wie zum Beispiel bei chronischen Erkrankungen, eine weitere Alternative darstellen. Viele Praktiken der Traditionellen Chinesischen Medizin, der Tibetischen Medizin und Ayurveda sind in Europa bereits weit verbreitet und finden im Zuge der steigenden Popularität alternativer Heilmethoden viele Anhänger. <sup>1</sup>

Noch relativ unbekannt ist allerdings das Feld der Traditionellen Mongolischen Medizin (TMM). Sie ist aufgrund der historischen Entwicklung des Landes stark mit der Tibetischen Medizin verknüpft. Die Grundzüge der TMM folgen dadurch im Wesentlichen dem Gedankengut des Buddhismus, demzufolge der Gesundheitszustand eines Menschen durch das Gleichgewicht dreier Säfte/Prinzipien determiniert ist, die mit Wind (*hii*), Galle (*šar*) und Phlegma (*badgan*) übersetzt werden können. Ein Entgleiten dieser Balance führt zu Krankheit, die zu kurieren und vorzubeugen der TMM oberstes Ziel darstellt. <sup>2</sup>

Um dieses Ziel zu erreichen, muss der Patient erst seine Lebensgewohnheiten, die auch die Ernährung beinhalten, umstellen. Außerdem werden neben der Anwendung diverser Heilpraktiken, wie Massagen, Aderlass, Dampfbäder und Akupunktur, traditionelle (zumeist pflanzliche) Rezepturen verschrieben. Diese Rezepturen bestehen aus einer komplexen Mischung vieler verschiedener Pflanzen, wobei eine Pflanze die Hauptwirkung ausübt, die durch die anderen Bestandteile unterstützt wird.

Jeder Pflanze sind die Eigenschaften Geschmack, Natur, Primärqualität und Sekundärqualität zugeordnet, die ihren Einsatz bei bestimmten Erkrankungen rechtfertigen. Früher sammelte der traditionelle Arzt selbst die Pflanzen und

bereitete die Medizin laut medizinischen Texten oder mündlichen Überlieferungen für jeden Patienten individuell zu. Heutzutage werden traditionelle Rezepturen mit modernen Methoden hergestellt. Es werden auch Maßnahmen hinsichtlich Pflanzenidentifikation, Kontrolle des Drogenmaterials, Überprüfung der Wirkung und Unbedenklichkeit getroffen.

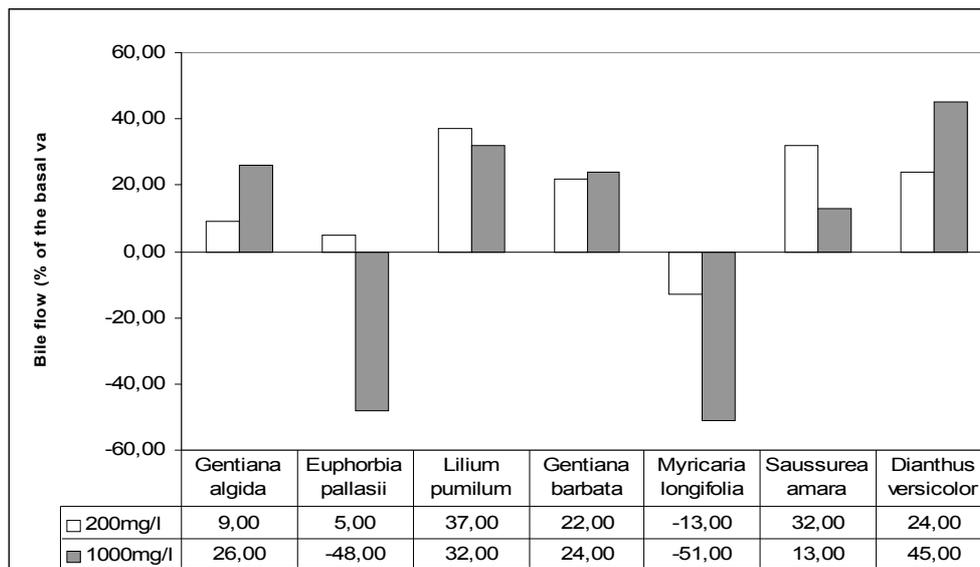
In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Bemühungen unternommen, die Wirkung der in der TMM eingesetzten Pflanzen wissenschaftlich zu belegen. Das Department für Pharmakognosie an der Universität Wien steht seit 1998 in engem Kontakt mit der Mongolei und leistet durch verschiedene Projekte ihren Beitrag zur Erforschung mongolischer Arzneipflanzen.

Eines dieser Projekte startete 2001 und beschäftigt sich mit der Untersuchung von Pflanzen, die von jeher bei Lebererkrankungen eingesetzt werden. Erkrankungen der Leber treten in der Mongolei besonders häufig auf. Das ist auf den hohen Fleisch- und Alkoholkonsum der mongolischen Bevölkerung zurückzuführen.<sup>1</sup>

## **1.2 Leberperfusionstest**

Im Rahmen des Projektes wurden sieben Pflanzen ausgewählt, die bei Erkrankungen der Leber eingesetzt werden. Aufgrund ihrer jahrelangen Verwendung ist davon auszugehen, dass diese Pflanzen pharmakologisch aktive Inhaltsstoffe aufweisen.

Ihre choloretische Wirkung wurde mit Hilfe eines Leberperfusionstests untersucht. In diesem Testsystem wurde der Gallenfluss einer isolierten Rattenleber erst bei physiologischen Bedingungen und anschließend unter Einsatz verschiedener Pflanzenextrakte bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessen. Abbildung 1 zeigt die unterschiedlich stark choloretische Wirkung von sieben ausgewählten Pflanzen (*Gentiana algida*, *Euphorbia pallasii.*, *Lilium pumilium*, *Gentiana barbata*, *Myricaria longifolia*, *Saussurea amara* und *Dianthus versicolor*) auf die isolierte Rattenleber.



**Abbildung 1:** Einfluss verschiedener Pflanzenextrakte zweier Konzentrationen auf den Gallenfluss einer isolierten Rattenleber

Auffällig ist die Verminderung des Gallenflusses unter der Einwirkung des Extraktes von *Euphorbia pallasii* und *Myricaria longifolia*. Weitere Untersuchungen in Toxizitätstest an HepG<sub>2</sub>-Hepatom-Zellen ergaben eine zytotoxische Wirkung für diese beiden Pflanzenextrakte.<sup>3</sup>

### 1.3 Zielsetzung

Aufgrund der positiv-zytotoxischen Effekte der mongolischen Arzneipflanze *Euphorbia pallasii* TURCZ. ist es von Interesse, das Inhaltsstoffmuster zu charakterisieren, insbesondere da die Pflanze schon seit vielen Jahren in der TMM eingesetzt wird.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Dichlormethan-Extrakt der unterirdischen Teile von *Euphorbia pallasii* aufzutrennen und zu analysieren, Inhaltsstoffe zu isolieren und zu charakterisieren, um einen Beitrag zur Gesamtaufklärung des Inhaltsstoffspektrums zu liefern.

## 1.4 *Euphorbia pallasii* TURCZ.

*Euphorbia pallasii* TURCZ. ist eine Gattung der Familie der Euphorbiaceae. Diese Familie, die zu deutsch Wolfsmilchgewächse heißt, ist eine sehr heterogene, biodiverse Gruppe.

Bei *Euphorbia pallasii* handelt es sich um eine 20 bis 50cm hohe perennierende



**Abbildung 2:** *Euphorbia pallasii* TURCZ.

Quelle: Boldsaikhan B.: *Encyclopedia of mongolian medicinal plants*

und krautige Pflanze. Die Sprossachse ist fest und dick, mit längs seitiger Furche. Die Stängelblätter sind ungestielt, stehen unten zu dritt, weiter oben zu fünft wirtelig angeordnet. Im unteren Bereich ist die Blattspreite oval, bei den Blättern im oberen Bereich ist sie eher herzförmig ausgebildet. Die Blätter sind hart und ungefähr ein bis zwei

Zentimeter dick.<sup>4</sup>

Den Blütenstand bildet ein Cyathium. Diese spezielle Form eines Pseudanthiums ist typisch für die Gattung *Euphorbia* und besteht aus kleinen, miteinander verwachsenen Hochblättern, die eine becherförmige Blütenhülle (Involukrum griechisch: Umhüllung) bilden. Auf dem Grund des Involukrums steht zentral eine weibliche Blüte, die nur aus einem kurz gestielten Fruchtknoten mit Griffel besteht, umrandet von den männlichen Blüten, die aus einem



**Abbildung 3:** Blüte von *Euphorbia pallasii*

Quelle: Boldsaikhan B.: *Encyclopedia of mongolian medicinal plants*

einzelnen, gestielten Staubfaden bestehen. Weibliche und männliche Blüten sind durch einen drei bis fünf Millimeter langen Stiel leicht aus dem Hüllkelch ausgefahren. Sowohl die vierzähligen Blüten, als auch die Blätter des

Involukrums sind weiß-flaumig behaart. Die Cyathien stehen in Trugdolden. Die Wurzel ist dick und bildet Knollen, an denen sie sich verzweigt.<sup>5 6</sup>

Das Verbreitungsgebiet von *Euphorbia pallasii* liegt in Khyangan und Dornod-Mongol. Sie gedeiht in Schluchten, in der Steppe und auf Stein- und Schotterböden. Es wird der unterirdische Teil der Pflanze verwendet. Die Hauptinhaltsstoffe sind im Genauen noch nicht bekannt, es handelt sich aber vorwiegend um ätherisches Öl, Saccharose, Sterole, Diterpene, Fette, Fettsäuren (Palmitin-, Stearin-, Linolensäure), Phenole und in kleinen Mengen Alkaloide.

Die unterirdischen Teile von *Euphorbia pallasii* finden als Bestandteil von 112 mongolischen und tibetischen Rezepturen Anwendung.<sup>4</sup> In der mongolischen Medizin steht sie an Stelle 17 der am meisten verwendeten Arzneipflanzen. Ihre Qualitäten, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind, rechtfertigen ihre Anwendung als Leber wirksames Mittel.

<b>Geschmack</b>	Heiß, scharf
<b>Natur</b>	Neutral
<b>Primärqualität</b>	Stumpf
<b>Sekundärqualität</b>	Stumpf, roh, grob

*Tabelle 1: Eigenschaften von Euphorbia pallasii in der TMM<sup>6</sup>*

Tibetanische Ärzte verwenden *Euphorbia adenochlora*, mongolische Ärzte *Euphorbia fischeriana* STEND., das ist ein Synonym für *Euphorbia pallasii*.

In der TMM wird der unterirdische Teil von *Euphorbia pallasii* hauptsächlich als Wirkstoff in antibakteriellen Salben gegen Krätze und Flechten eingesetzt. Außerdem wird sie auch in der Landwirtschaft als Pestizid verwendet.

Pharmakologische In-vitro Untersuchungen haben die antibakterielle Wirkung von *Euphorbia pallasii* bestätigt. Ein 10%-iger Extrakt kann sogar Tuberkuloseerreger am Wachstum hindern.<sup>4</sup>

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Drogenmaterial stammte aus Numrug sum, Provinz Dornod, im äußersten Osten der Mongolei, in der Nähe des Flusses Khalkh gol. Es wurde im August 2005 dort gesammelt, von Dr. G. Suran, Faculty of Biology, Mongolian National University, und von Prof. Sanchir identifiziert. Ein Herbarbeleg mit der Nummer 464-870626 befindet sich im Herbarium des Institute of Botany, Mongolian National University, Ulaanbaatar.



**Abbildung 4:** Das rot umrandete Gebiet auf der Landkarte der Mongolei kennzeichnet den Sammelort des verwendeten Drogenmaterials

Eine Exkursion in diesen entlegenen Teil der Mongolei war durch die geringe Straßenanbindung sehr aufwändig. Die Pflanze stand zum Erntezeitpunkt in voller Blüte, wächst allerdings eher spärlich, weshalb nicht mehr als 250g der unterirdischen Teile gesammelt werden konnten.

### 2.1.2 Extrakterstellung

Für die Extrakterstellung wurden ausschließlich die unterirdischen Anteile von *Euphorbia pallasii* verwendet. Das gesammelte Material wurde drei Wochen unter Abschirmung direkten Sonnenlichts an der Luft getrocknet und anschließend pulverisiert. 250g dieses Pulvers wurde drei mal 24 Stunden mit Methanol bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Evaporation des Extraktionsmittels bei einer Maximaltemperatur von 40°C



**Abbildung 5:** Unterirdische Anteile von *Euphorbia pallasii*  
Quelle: E. Ganbold<sup>i</sup>

blieben 25g eines stark zähflüssigen Extraktes dunkelbrauner Farbe.<sup>7</sup>

All diese Vorgänge fanden noch in der Mongolei statt. Die weitere Aufarbeitung des methanolischen Extraktes und alle im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden im Rahmen der Dissertation von Amarsanaa Badgaa und vorliegender Diplomarbeit, in Wien, am Department für Pharmakognosie durchgeführt.

### 2.1.3 Fraktionierung mittels Ausschüttelung

Die in diesem Kapitel beschriebenen Schritte wurden in Rahmen der Dissertation von Amarsanaa Badgaa durchgeführt.

Nachdem das Drogenmaterial weder Chlorophyll noch Wachse enthielt, konnten aufwendige Reinigungsschritte, die man benötigen würde, um diese Stoffe zu entfernen, entfallen.

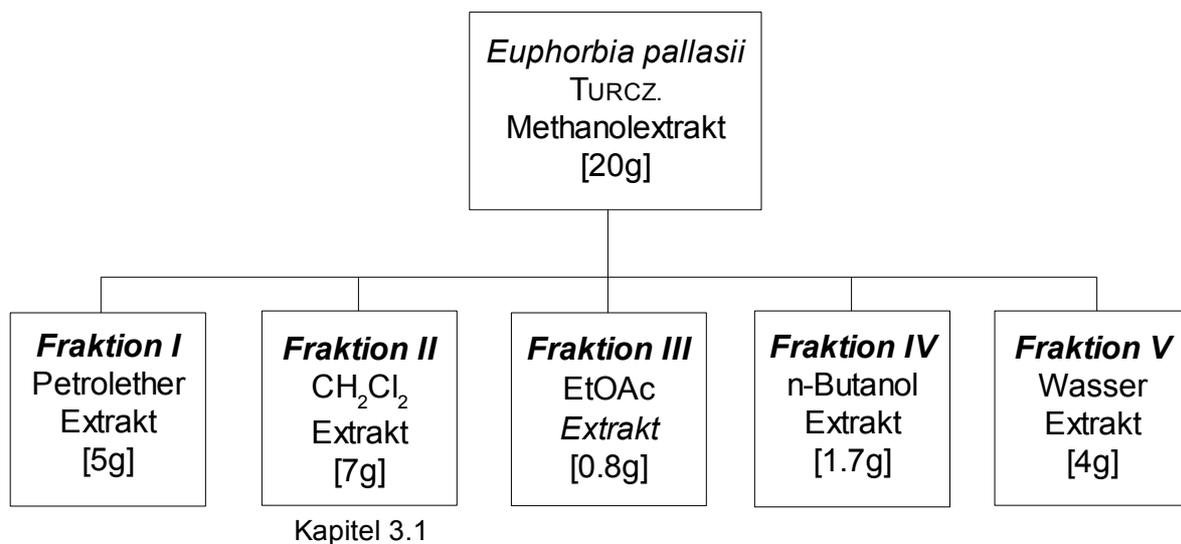
20g des zur Trockene gebrachten methanolischen Extraktes wurden in einer Methanol-Wasser-Mischung mit einem Anteil von 80% Methanol wieder gelöst und aufgearbeitet. Erst wurde das Extrakt zu gleichen Teilen mit Petrolether

<sup>i</sup> Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

versetzt, ausgeschüttelt und die unterschiedlich polaren Phasen wieder von einander getrennt. Dadurch wurde erreicht, dass sich die apolarsten Komponenten des Methanolextraktes in der Petroletherphase lösten. Die erhaltenen Extrakte wurden mittels Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht.

Ebenso wurde mit den Lösungsmitteln Dichlormethan, Ethylacetat, n-Butanol und Wasser verfahren und somit eine Auftrennung der Komponenten gemäß ihrer Polarität erzielt.

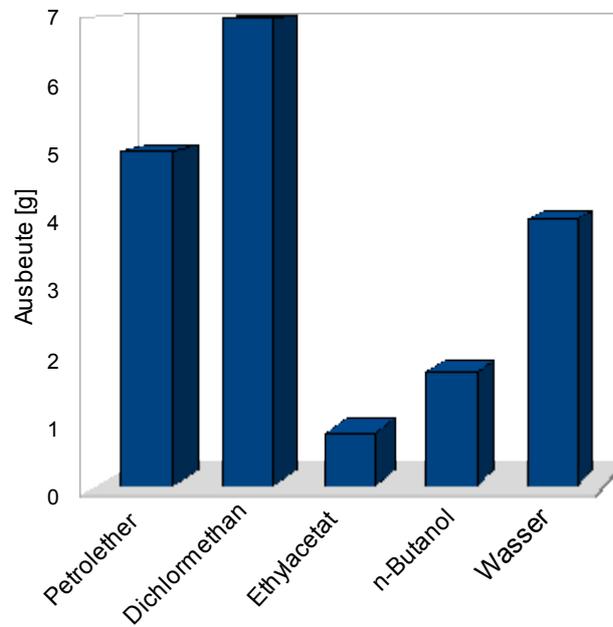
Abbildung 6 stellt diese Vorgänge schematisch dar. Die Polarität der Lösungsmittel steigt von Fraktion I bis Fraktion V an.



**Abbildung 6:** Schema der Auftrennung mittels Ausschüttelung des MeOH- Extraktes der unterirdischen Teile von *Euphorbia pallasii*

Die Fraktion II (Dichlormethanextrakt) war mit sieben Gramm Ausbeute jene, in der sich der Großteil der Inhaltsstoffe des Ursprungextraktes gelöst haben muss. Nach einem Vergleich dieses Extraktes mit dem Methanolextrakt mittels DC und HPLC (siehe Kapitel 3) wurde entschieden, sich dieser Fraktion weiter zu zuwenden. Alle weiteren Auftrennungsschritte, die ab Kapitel 3.1 in dieser Arbeit beschrieben sind, gehen von dieser CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Fraktion aus.

Fraktion I, III, IV und V wurden in dieser Arbeit nicht behandelt. Eine Verteilung der Ausbeuten der verschiedenen Fraktionen ist in Abbildung 7 dargestellt, um die Signifikanz des Dichlormethanextraktes nochmals zu verdeutlichen.



**Abbildung 7:** Ausbeuten der verschiedenen Fraktionen des MeOH-Extraktes (s. Abb. 6, S. 11)

## 2.2 Methoden

Im Rahmen der analytischen und semi-präparativen Arbeiten kamen folgende chromatographische und spektroskopische Methoden zum Einsatz:

- ◆ Säulenchromatographie (SC) zur Auftrennung der CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Fraktion
- ◆ Dünnschichtchromatographie (DC) wurde für Vergleiche und orientierende Zwischenanalysen verwendet
- ◆ High performance liquid chromatography (HPLC) für Reinheitskontrollen, Vergleiche und in Form semi-präparativer HPLC auch zur Isolierung
- ◆ Solid Phase Extraction (SPE) zur weiteren Fraktionierung
- ◆ Massenspektrometrie (MS) für die Charakterisierung der Inhaltsstoffe
- ◆ Kernresonanzspektroskopie (NMR) für die Charakterisierung der Inhaltsstoffe
- ◆ Infrarotspektroskopie (IR) für die Charakterisierung der isolierten Substanz AB2

In den folgenden Kapiteln werden Geräte und Parameter genauer beschrieben.

### **2.2.1 Säulenchromatographie (SC)**

Bei der SC handelt es sich um eine Adsorptionschromatographie, weshalb sie sich zur Auftrennung eines organischen Stoffgemisches in Grammmaßstab gut eignet. Das Säulenmaterial muss so beschaffen sein, dass es die zu trennenden Substanzen – je nach ihrer Polarität – unterschiedlich lang adsorbiert.

Das zu trennende Material wird in stark konzentrierter Form auf das Trägermaterial aufgebracht und mit geeigneten Elutionsmitteln von der stationären Phase wieder gelöst. Die getrennten Substanzen können nacheinander am Säulenende wieder aufgefangen und weiteren

Untersuchungen unterzogen werden.

In unserem Fall kam die SC zur Trennung des Dichlormethanextraktes (s. Abb. 6, S. 11) zum Einsatz. Sie wurde als „Kieselgelsäule EP2C“ bezeichnet. Es wurde eine Glassäule mit einem Vorratsreservoir verwendet. Die genauen Parameter sind in Tabelle 2 angeführt.

<b>Name der Säule</b>	EP2C
<b>Länge der Säule</b>	125 cm
<b>Säulen <math>\varnothing</math></b>	3.5 cm
<b>Probe</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakt
<b>Stationäre Phase</b>	Silica Gel 60 (Partikelgröße 0.063-0.2mm)
<b>Mobile Phase</b> (Details s. Tab. 3, S. 16)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ CHCl<sub>3</sub></li> <li>◆ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Aceton-Mischungen</li> <li>◆ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Methanol-Mischungen</li> </ul>

**Tabelle 2:** Allgemeine Parameter der säulenchromatographischen Auftrennung von Fraktion II (s. Abb. 6, S. 11)

Das Packen der Säule und Auftragen der Probe wurde noch von Amarsanaa Badgaa vorgenommen, während im Rahmen vorliegender Arbeit mit dem Eluieren der Säule begonnen wurde.

Das Lösungsmittel der Fraktion II (s. Abb. 6, S. 11) war Dichlormethan, welches relativ apolar war. Daher wurde als stationäre Phase das polare Kieselgel gewählt und mit apolarem Fließmittel eluiert. Es wurden 2.5g des zur Trockene gebrachten CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extraktes aufgetragen und die ersten sechs Fraktionen mit Chloroform eluiert. Danach wurde das Lösungsmittel auf Dichlormethan-Aceton-Mischungen geändert, wobei der Acetonanteil stetig gesteigert wurde. Um auch noch die sehr polaren Bestandteile zu eluieren, wurde das Fließmittel noch einmal geändert – und zwar auf Dichlormethan-Methanol-Mischungen, wobei wiederum der Methanolgehalt von Fraktion zu Fraktion erhöht wurde. Die

verwendeten Volumina und das genaue Mischungsverhältnis der verschiedenen Elutionsmittel sind aus Tabelle 3 (S. 16) ersichtlich.

Die Tropfgeschwindigkeit der Säule betrug 40-60 Tropfen pro Minute. Insgesamt wurden 27 Fraktionen erhalten. Diese wurden mit dem Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C zur Trockene gebracht und anschließend gewogen.

Die auf diese Weise erhaltenen Fraktionen wurden, je nach Polarität, in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und als 10%-ige Probelösungen auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen, um die vorangegangene Trennung zu überprüfen.

Name der Fraktion	Elutionsfolge	Volumina
EP2C 1	CHCl <sub>3</sub>	1l
EP2C 2	CHCl <sub>3</sub>	1l
EP2C 3	CHCl <sub>3</sub>	1l
EP2C 4	CHCl <sub>3</sub>	1l
EP2C 5	CHCl <sub>3</sub>	1l
EP2C 6	CHCl <sub>3</sub>	1l
EP2C 7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Me <sub>2</sub> CO (995+5)	1.3l
EP2C 8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Me <sub>2</sub> CO (900+100)	1l
EP2C 9	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Me <sub>2</sub> CO (900+100)	1l
EP2C 10	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Me <sub>2</sub> CO (700+300)	1l
EP2C 11	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Me <sub>2</sub> CO (700+300)	1.5l
EP2C 12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Me <sub>2</sub> CO (850+150)	1l
EP2C 13	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Me <sub>2</sub> CO (700+300)	0.5l
EP2C 14	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Me <sub>2</sub> CO (500+500)	1l
EP2C 15/1 EP2C 15/2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (900+100)	0.6l 0.4l
EP2C 16/1 EP2C 16/2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (800+200)	0.6l 0.6l
EP2C 17/1 EP2C 17/2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (700+300)	0.6l 0.5l
EP2C 18/1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (600+400)	1.3l
EP2C 19/1 EP2C 19/2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (500+500)	0.6l 0.5l
EP2C 20/1 EP2C 20/2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (400+600)	0.5l 0.5l
EP2C 21/1 EP2C 21/2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (300+700)	0.4l 0.6l
EP2C 22/1 EP2C 22/2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (200+800)	0.5l 0.5l
EP2C 23/1 EP2C 23/2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (100+900)	0.5l 0.5l
EP2C 24	MeOH	1l

**Tabelle 3:** Elutionsschema der säulenchromatographischen Auftrennung von Fraktion II (s. Abb.6, S.11). Allgemeine Parameter s. Tab. 2, S.14

### **2.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC)**

In der Dünnschichtchromatographie (DC) werden Substanzgemische durch unterschiedliche Verteilung der Komponenten zwischen einer mobilen und einer stationären Phase getrennt, wobei der Trennvorgang im Gegensatz zur Säulenchromatographie in einem offenem System – der planaren Trennschicht – abläuft. Am unteren Plattenrand wird eine Lösung der zu trennenden Probe mit einer Mikropipette aufgetragen. Als Laufmittel werden in der Normalphasen-DC in der Regel Mischungen aus unpolaren organischen Lösungsmittel und etwas stärker polaren Lösungsmitteln verwendet.

Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird die planare Dünnschichtplatte in eine Trennkammer gestellt, an deren Boden sich die mobile Phase befindet. Durch Kapillarkräfte steigt die mobile Phase von der Eintauchzone über den Startfleck nach oben auf und nimmt dabei die Substanzen mit, die durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit der stationären Phase retentiert werden.<sup>8</sup>

Die Dünnschichtchromatographie kam während der Arbeit laufend zum Einsatz. Da sie in der Durchführung wenig Zeit beanspruchte, wurde sie für vergleichende Analysen, Reinheitsprüfungen und zum Teil auch für Identifizierungen angewendet. Zudem ließen sich die Ergebnisse sehr gut dokumentieren.

Als stationäre Phase dienten immer mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck. Das Fließmittel bestand aus einer Mischung aus Chloroform, Aceton und Essigsäure. Die zusammengefassten Parameter sind aus Tabelle 4 (S.18) zu entnehmen.

Für die Auswertung der DC wurde die Platte nach Abtrocknen des Fließmittels bei zwei verschiedenen Wellenlängen unter UV-Licht betrachtet – bei 254nm und bei 366nm. Für die Dokumentation wurde jede entwickelte Dünnschichtplatte fotografiert.

DC-System	
Stationäre Phase	TLC Silica Gel 60 F <sub>254</sub>
Mobile Phase	CHCl <sub>3</sub> -Me <sub>2</sub> CO-CH <sub>3</sub> COOH (95+5+1)
Sprühreagens	Anisaldehydreagens (AAR)
Detektion	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Vor Besprühen</li> <li>◆ Nach Besprühen</li> </ul>
Auftragsmenge	5µl

**Tabelle 4:** Parameter der Dünnschichtchromatographie

Bei 254nm konnten Substanzen sichtbar gemacht werden, die die Fluoreszenz bei dieser Wellenlänge verminderten (löschten). Dieses Phänomen wurde als dunkle Zone auf der grün-fluoreszierenden DC-Platte sichtbar. Allfällige Fluoreszenzen, die bei der Betrachtung bei 366nm sichtbar wurden, stammten allerdings von den Substanzen selbst.

Zur fotografischen Detektion der DC-Platte bei 366nm wurde ein Rotfilter vor die Kamera montiert.

Sehr viele Verbindungen zeichneten sich nicht durch Eigenfarbe, starke Absorption oder Fluoreszenz aus. Deswegen wurden Derivatisierungsreaktionen durch Besprühen der Platte angewendet. Somit konnten Substanzen sichtbar gemacht werden, die auf UV-Strahlung nicht ansprachen oder deren Nachweisempfindlichkeit nicht ausreichte.<sup>7</sup>

Beim eingesetzten Sprühreagens handelte es sich um Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AAR).

Das Sprühreagens wurde nach folgender Vorschrift bereitet:

- ◆ *Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AAR)*

0.5ml Anisaldehyd werden mit 10ml Eisessig, 85ml Methanol, und 5ml konzentrierter Schwefelsäure in angegebener Reihenfolge gemischt.<sup>9</sup>

Nach kräftigem Besprühen der DC-Platte (ca. 10ml) wurde sie im Trockenschrank ungefähr fünf Minuten lang bei 120°C erhitzt, sodann bei Tageslicht und unter UV-Licht 366nm betrachtet und fotografiert.

Mit diesem Sprühreagens ließen sich ätherische Öle, Scharfstoffe, Bitterstoffe, Saponine u.a. sichtbar machen. Diese Unselektivität des AAR war in unserem Fall vorteilhaft, da noch wenig Kenntnis über die Inhaltsstoffe von *Euphorbia pallasii* vorlag.

### **2.2.3 High performance liquid chromatography (HPLC)**

Die HPLC ist eine etablierte Präzisionsmethode zur qualitativen und quantitativen Analyse löslicher Stoffe durch Chromatographie. Sie lässt sich auch zur präparativen Trennung einsetzen. Das mit der HPLC zu trennende Stoffgemisch muss sich in der Analyseflüssigkeit lösen. Im Gegensatz zur konventionellen Säulenchromatographie, bei der die Probe mittels Schwerkraft durch die stationäre Phase wandert, wird bei der HPLC die mobile Phase unter hohem Druck durch die Säule mit der stationären Phase gepumpt. Abhängig von der Stärke der Wechselwirkungen der Probe mit der stationären Phase, erscheinen die getrennten Substanzen bei verschiedenen Retentionszeiten am Ende der Säule, wo sie detektiert werden können.

Abhängig von der verwendeten stationären Phase unterscheidet man Normalphasen-Chromatographie und Umkehrphasenchromatographie (Reversed-phase-Chromatography [RP]). Wie der Name schon sagt, arbeitet man bei RP-Säulen mit den umgekehrten Bedingungen als bei herkömmlichen Flüssigchromatographien: die stationäre Phase ist unpolar und besteht zumeist aus mit verschiedenen langen Kohlenwasserstoffketten alkyliertem Kieselgel; die mobile Phase ist polar – es werden Wasser und polare organische Lösungsmittel (Methanol, Acetonitril) verwendet oder Mischungen aus diesen. Die Reversed-Phase Säulen sind für einen breiteren Anwendungsbereich geeignet als eine Normalphasensäule, da sich die überwiegende Anzahl von Substanzen in Wasser oder wasserhaltigen Lösungsmitteln lösen.<sup>7</sup>

Auch in vorliegender Arbeit kam die HPLC ausschließlich auf einer RP-Säule zum Einsatz. Die HPLC wurde sowohl zur Analyse der qualitativen Zusammensetzung und Reinheitsprüfung verschiedener Fraktionen eingesetzt, als auch zur Isolierung von Substanzen mittels semi-präparativer HPLC. Die Parameter des verwendeten Gerätes sind aus Tabelle 5 ersichtlich.

Detektiert wurde mit einem Diode-Array-Detector. Das Chromatogramm wurde gleichzeitig bei vielen Wellenlängen beobachtet. Neben der Mehrwellenlängendetektion wurde auch der ganze Spektralbereich simultan abgetastet. Diese erhaltene Information wurde in Form dreidimensionaler Graphiken dargestellt.

	Analytische HPLC	Semi-präparative HPLC
<b>Geräte</b>	Merck HITACHI Pump L-7100 Merck HITACHI Diode Array Detector L-7450 Merck HITACHI Interface D-7000	
<b>Software</b>	D-7000 HSM	
<b>Stationäre Phase</b>	RP-18e	
<b>Säule</b>	Ø 4.0mm x 250.0mm	
<b>Mobile Phase</b> (Details s. Tab. 6, S. 22)	ACN-Wasser-Mischungen	MeOH-Wasser-Mischungen
<b>Fluss</b>	1ml/min	
<b>Detektion</b>	250nm & 290nm	250nm & 290nm
<b>Einspritzvolumen</b>	5µl	10µl

*Tabelle 5: Allgemeine Parameter des verwendeten HPLC-Gerätes*

Die semi-präparative HPLC unterscheidet sich von ihrem analytischen Gegenpart insbesondere durch die Zielsetzung: Das Ziel der semi-präparativen HPLC ist das Sammeln von Fraktionen, um reine Produkte zu isolieren. Bei der Übertragung einer analytisch erfolgreichen Trennung auf den präparativen Maßstab soll sich die stationäre Phase möglichst wenig ändern. Die mobile Phase muss möglichst einfach vom Eluat abzutrennen sein, wofür ein Rotationsverdampfer eingesetzt wurde.

Für die analytische und semi-präparative Arbeit wurden zwei verschiedene Lösungsmittelgemische verwendet. Die analytischen Trennungen wurden mit ACN-Wasser-Gemischen durchgeführt. Der Vorteil des ACN gegenüber MeOH lag darin, dass ACN eine stärkere Elutionskraft besaß und somit bessere Trennungen zu Stande kamen.

Die semi-präparative Arbeit mit ACN würde sich aufgrund des hohen Siedepunktes und der Tatsache, dass ACN mit Wasser ein azeotropes Gemisch bildet, erschwerlich gestalten, weshalb für solche Zwecke MeOH-Wasser-Gemische verwendet wurden. Die genauen HPLC-Systeme sind in Tabelle 6 dargestellt, wobei die allgemeinen Parameter aus Tabelle 5 für alle diese Systeme gelten.

Nach jedem HPLC-Lauf wurde die Säule mit 100%iger organischer Phase 15 Minuten lang gespült, um restliche Verunreinigungen auf der Säule zu entfernen. Danach wurde zehn Minuten mit der Anfangskonzentration der nächsten HPLC-Methode equilibriert, bevor die neue Probenlösung injiziert wurde.

	HPLC-Methode	Mobile Phase	Gradient											
<b>A N A L Y T I S C H</b>	1	Fließmittel A = ACN	Steigerungsrate 1%/min. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>FM A [%]</th> <th>FM B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]	0	10	90	90	100	0		
	Zeit [min]		FM A [%]	FM B [%]										
0	10	90												
90	100	0												
2	Fließmittel B = H <sub>2</sub> O	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>FM A [%]</th> <th>FM B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table> Anschließend isokratisch	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]	0	25	75	13	25	75	18	30	70
Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]												
0	25	75												
13	25	75												
18	30	70												
<b>S E M I - P R Ä P A R A T I V</b>	3	Fließmittel A = MeOH	Steigerungsrate 1%/min. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>FM A [%]</th> <th>FM B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]	0	10	90	90	100	0		
	Zeit [min]		FM A [%]	FM B [%]										
	0		10	90										
	90		100	0										
	4		Fließmittel B = H <sub>2</sub> O	Steigerungsrate 1%/min. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>FM A [%]</th> <th>FM B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>65</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]	0	35	65	65	100	0	
Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]												
0	35	65												
65	100	0												
5	Fließmittel A = ACN	Isokratisch 40% <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>FM A [%]</th> <th>FM B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]	0	40	60	90	40	60			
Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]												
0	40	60												
90	40	60												
6	Fließmittel B = H <sub>2</sub> O	Isokratisch 60% <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>FM A [%]</th> <th>FM B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]	0	60	40	90	60	40			
Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]												
0	60	40												
90	60	40												
7	Fließmittel A = ACN	Isokratisch 65% <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>FM A [%]</th> <th>FM B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]	0	65	35	90	65	35			
Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]												
0	65	35												
90	65	35												

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten analytischen und semi-präparativen HPLC-Systeme

### **2.2.4 Festphasenextraktion (SPE)**

Die Festphasenextraktion (*engl.* **solid phase extraction**, kurz **SPE**) ist eine Probenvorbereitungsmethode in Bezug auf eine mögliche Anreicherung, Aufkonzentration oder Isolation eines Analyten. Das Entfernen störender Probenmatrix oder das Konzentrieren von Spurenkomponenten ist oft notwendig, um entweder eine Peaküberlagerung in der HPLC oder eine zu geringe Konzentration einer Spurenkomponente zu vermeiden.

Es handelt sich dabei um einen physikalischen Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase stattfindet, ähnlich wie bei der Säulenchromatographie.<sup>10</sup> Die „Säulen“, die während der Arbeit in Verwendung kamen, sind wesentlich kleiner, als jene der Säulenchromatographie und werden in der SPE als Kartuschen bezeichnet. Zudem bestehen sie nicht aus Glas, sondern aus Kunststoff und sind bereits mit dem Sorbensmaterial gefüllt. Die Elution des Probenmaterials wird durch Anlegen eines Vakuums beschleunigt.

In vorliegendem Fall kam die SPE zwei Mal zur weiteren Auftrennung und Reinigung von Fraktionen zum Einsatz. Die aufzutragende Probe wurde entweder in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  oder in MeOH gelöst. Die Kartusche wurde erst mit 100%-igem MeOH gespült und danach mit der Anfangskonzentration der Elutionsfolge equilibriert. Dann wurde mit MeOH-Wassermischungen eluiert, wobei der Anteil an MeOH stetig erhöht wurde. Die Elutionsschemata sind in Tabelle 7 (S. 24) dargestellt.

Bei System 1 wurden von jeder Polaritätsstufe jeweils sechs Fraktionen zu 20ml gesammelt, sodass sich eine Gesamtzahl von 24 Fraktionen ergab.

Die Tropfgeschwindigkeit betrug 40-60 Tropfen pro Minute. Die gesammelten Fraktionen wurden mit dem Rotationsverdampfer eingeeengt und die Auftrennung durch die SPE mittels DC überprüft.

	System 1	System 2
<b>Kartusche</b>	Mega Bond Elute-C 18, 5cm <sup>3</sup> , 20ml	
<b>Probe</b>	100mg EP2C 1 in 500µl CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (s.Tab. 3, S. 16)	20mg EP2C 2 in 50µl MeOH (s.Tab. 3, S. 16)
<b>Stationäre Phase</b>	RP 18e	
<b>Anzahl der Fraktionen</b>	24	6
<b>Fraktionsvolumen</b>	20ml	60ml
<b>Elutionsfolge</b>	40% MeOH 60% MeOH 80% MeOH 100% MeOH	10% MeOH 20% MeOH 40% MeOH 60% MeOH 80% MeOH 100% MeOH

*Tabelle 7: Allgemeine Parameter der verwendeten Festphasenextraktionen*

### 2.2.5 Massenspektrometrie (MS)

Die bisher besprochenen Methoden waren allesamt chromatographische Methoden, das heißt, sie dienen zur Trennung von Fraktionen bzw. zur Isolierung einzelner Substanzen.

Die Massenspektrometrie ist eine Methode, die zur Strukturaufklärung und Identifizierung von Substanzen dient. Dabei wird das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) gemessen. Die zu untersuchende Substanz wird in der Ionenquelle in die Gasphase überführt und positiv bzw. negativ ionisiert. Die entstandenen Ionen werden im Analysator mittels elektrischer oder magnetischer Felder nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis aufgetrennt und detektiert. Im resultierenden Massenspektrum sind die  $m/z$ -Werte der Ionen gegen ihre relative Intensität dargestellt.<sup>11</sup>

Bei komplexen Proben ist es sinnvoll, diese vor der Massenspektrometrie durch ein geeignetes Trennverfahren zu trennen, da es sonst zu Peaküberlagerungen kommen kann, die ein Auswerten des Spektrums schwierig gestalten würden. In unserem Fall wurde dazu die HPLC verwendet. Diese Methode wird als LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) bezeichnet. Die verwendete Apparatur bestand aus einer UHPLC, an die ein Massenspektrometer gekoppelt

war. Die allgemeinen Parameter sind in Tabelle 8 dargestellt. Der pH-Wert des Wassers in der mobilen Phase wurde mit Ammonacetat eingestellt.

LC/MS-Methode		1			2			3		
HPLC	Stationäre Phase	LiChrospher®100 RP-18e								
	Mobile Phase A= MeOH B= H <sub>2</sub> O pH 7.5	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]	Zeit [min]	FM A [%]	FM B [%]
		0	40	60	0	40	60	0	65	35
		60	100	0	40	40	60	60	65	35
	Säule	Ø4.0mm x 250.0mm								
	Säulentemperatur	25°C								
	Probenkonzentration	1mg/ml								
	Einspritzvolumen	10µl								
Fluss	1.0ml/min (für MS gesplittet auf 200µl/min)									
MS	Kollisionsgas	Helium								
	Fragmentierungsamplitude	1.0V in MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup>								
	Kapillarspannung	4.0kV								
	Spray (nebulizer)	30psi (N <sub>2</sub> )								
	Trockengasfluss	7l/min (N <sub>2</sub> )								
	Trockengas-temperatur	350°C								

**Tabelle 8:** Parameter der verwendeten LC/MS-Systeme

Die Analyse wurde an einem UltiMate 3000 RSLC-series System (Dionex, Germering, Deutschland), gekoppelt an ein Elektrospray-Ionisations-3D-Ionenfalle-Massenspektrometer (ESI-IT-MS) (HCT, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) durchgeführt.

Die LC/MS-Messungen erfolgten im DDA (data-dependent acquisition) Modus.

Dabei wurden von der Software automatisch die intensivsten Vorläuferionen selektiert und mittels CID (collision induced dissociation) fragmentiert. Aufgrund des Fragmentierungsverhaltens konnten Rückschlüsse auf Strukturmerkmale gezogen werden.

Jedem MS-scan ( $m/z$  150-750, Mittelwert von fünf scans) folgten MS/MS-scans der intensivsten Vorläuferionen ( $m/z$  40-750, Mittelwert von fünf scans) und jeweils ein  $MS^3$ -scan des intensivsten Fragmentions ( $m/z$  40-750, Mittelwert von fünf scans).

Die Darstellungen der Spektren in vorliegender Arbeit bestehen aus drei Teilen:

- ◆ Die oberste Spur (rot) stellt das Base peak-Chromatogramm im positiven Ionenmodus,
- ◆ die mittlere Spur (blau) das Base peak-Chromatogramm im negativen Ionenmodus und
- ◆ die unterste Spur (grün) das UV-Chromatogramm bei 190-400nm dar.

### **2.2.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)**

Die NMR-Spektroskopie wurde zur Strukturaufklärung von AB2 verwendet. Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem 400MHz-Gerät der Firma Varian am Institut für pharmazeutische Wissenschaften der Universität Graz. Die Substanz wurde in Pyridin gelöst und bei 40°C vermessen.

### **2.2.7 Infrarotspektroskopie (IR)**

Die IR-Spektroskopie ist ein Analyseverfahren, dass mit infrarotem Licht (800–500.000nm) arbeitet. Molekülschwingungen und -rotationen werden durch Absorption von Strahlung im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums angeregt. Die Absorption wird als reziproker Wert der Wellenlänge, in der Wellenzahl  $\tilde{\nu}$  (gemessen in  $cm^{-1}$ ) angegeben. Der normale Bereich eines IR-Spektrums liegt zwischen den Wellenzahlen 4000 und  $400cm^{-1}$ .<sup>11</sup>

Viele funktionelle Gruppen zeigen charakteristische Schwingungen, denen Absorptionsbanden in definierten Bereichen des IR-Spektrums entsprechen. Dadurch können funktionelle Gruppen durch ihre Absorptionsbande identifiziert werden.

Bei uns kam die IR-Spektroskopie als ATR (abgeschwächte Totalreflexion) im Rahmen der Strukturaufklärung der Substanz AB2 zum Einsatz. Bei ATR-Spektroskopie wird die Strahlung durch einen Lichtwellenleiter totalreflektiert. Hinter der Grenzfläche des Lichtwellenleiters bilden sich durch die Totalreflexion evaneszente Wellen aus, deren Reichweite ungefähr eine Wellenlänge beträgt.

Die zu vermessende Probe wird so nahe an den Lichtwellenleiter platziert, dass sie mit dem evaneszenten Feld wechselwirken kann. Dabei treten die evaneszenten Wellen in die Probe ein und können von ihr absorbiert werden. Die Intensität des entstandenen IR-Spektrums steht im Zusammenhang mit der Eindringtiefe der evaneszenten Welle in die Probe.<sup>12</sup>

Allgemeine Parameter zur Infrarotspektroskopie sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

<b>Gerät</b>	Bruker Tensor
<b>Messeinheit</b>	Pike MIRacle™
<b>Messbereich</b>	4000-600cm <sup>-1</sup>
<b>Auflösung</b>	4cm <sup>-1</sup>
<b>Messzeit der Probe</b>	16 scans

*Tabelle 9: Allgemeine Parameter der Infrarotspektroskopie*

Die Probenplatte des Gerätes verfügte über ein Messfenster aus Diamant, auf das die Probe aufgebracht wurde. Der Durchmesser dieses Fensters betrug 1.8mm und erlaubte somit die Vermessung von sehr geringen Mengen an Probe.

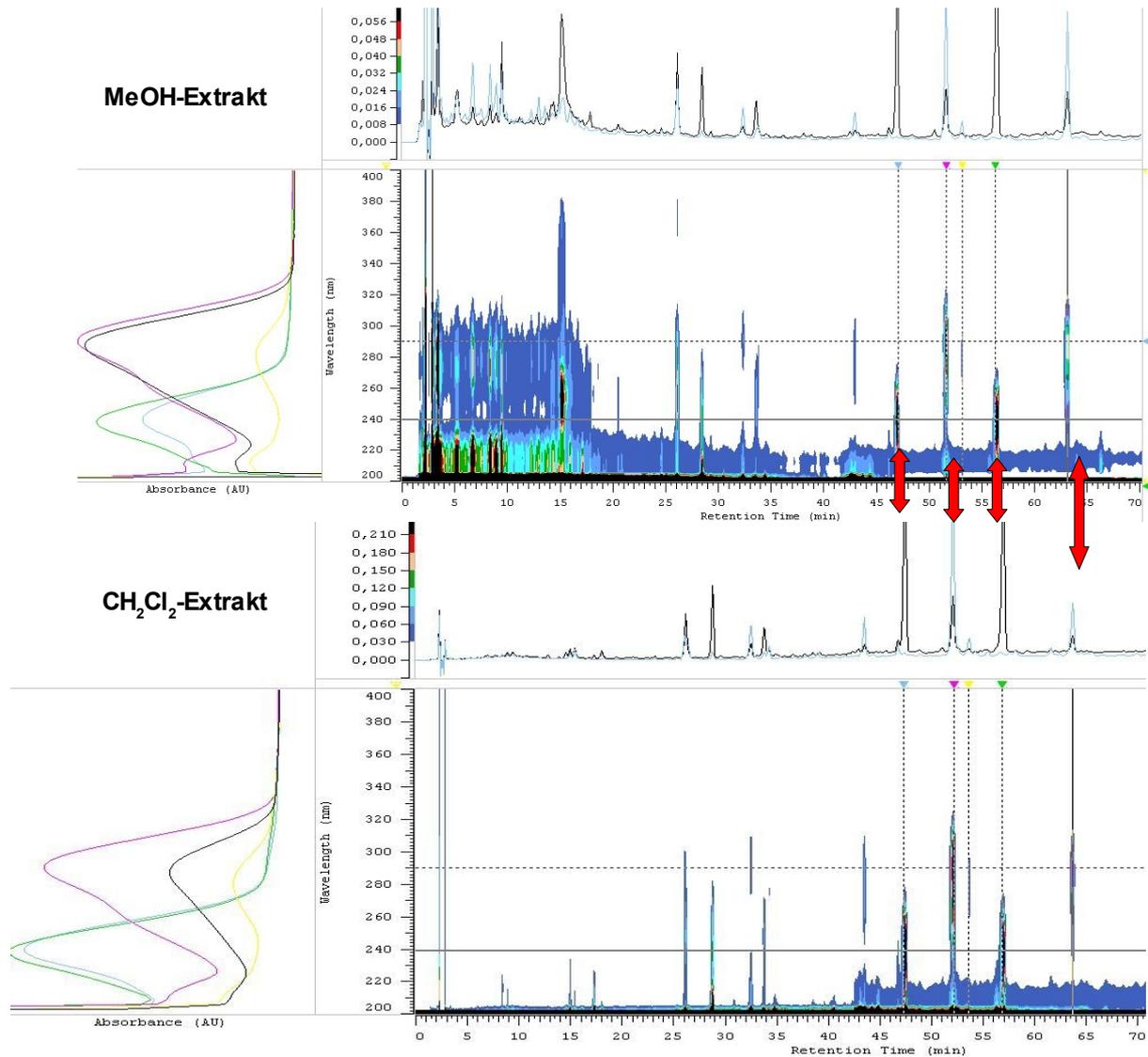
## **3 EXPERIMENTELLER TEIL**

In diesem Teil vorliegender Arbeit werden die praktischen Arbeitsschritte, die während fünf Monaten bewerkstelligt wurden, geschildert.

Ausgangspunkt des praktischen Teils der Diplomarbeit war ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme des methanolischen Extraktes und des CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extraktes (s. Abb. 6, S. 11). In beiden zeigte sich im eher apolaren Bereich vier prägnante Peaks (in Abb. 8, S. 29 mit vier roten Pfeilen gekennzeichnet), die auf ein mengenmäßig großes Vorkommen der zugrunde liegenden Substanzen schließen ließen. Ziel war es, die Substanzen, die diesen vier Peaks entsprachen, zu isolieren und Rückschlüsse auf deren Strukturen ziehen zu können.

Zur Erreichung dieser Zielsetzung kamen sowohl präparative als auch analytische Methoden zum Einsatz. Präparative Techniken dienten der Auftrennung und Reinigung von Substanzgemischen, sowie der Isolierung von Reinsubstanzen. Die verwendeten Substanzen blieben erhalten, während sie bei analytischen Methoden in Folge der Messung verloren gehen.

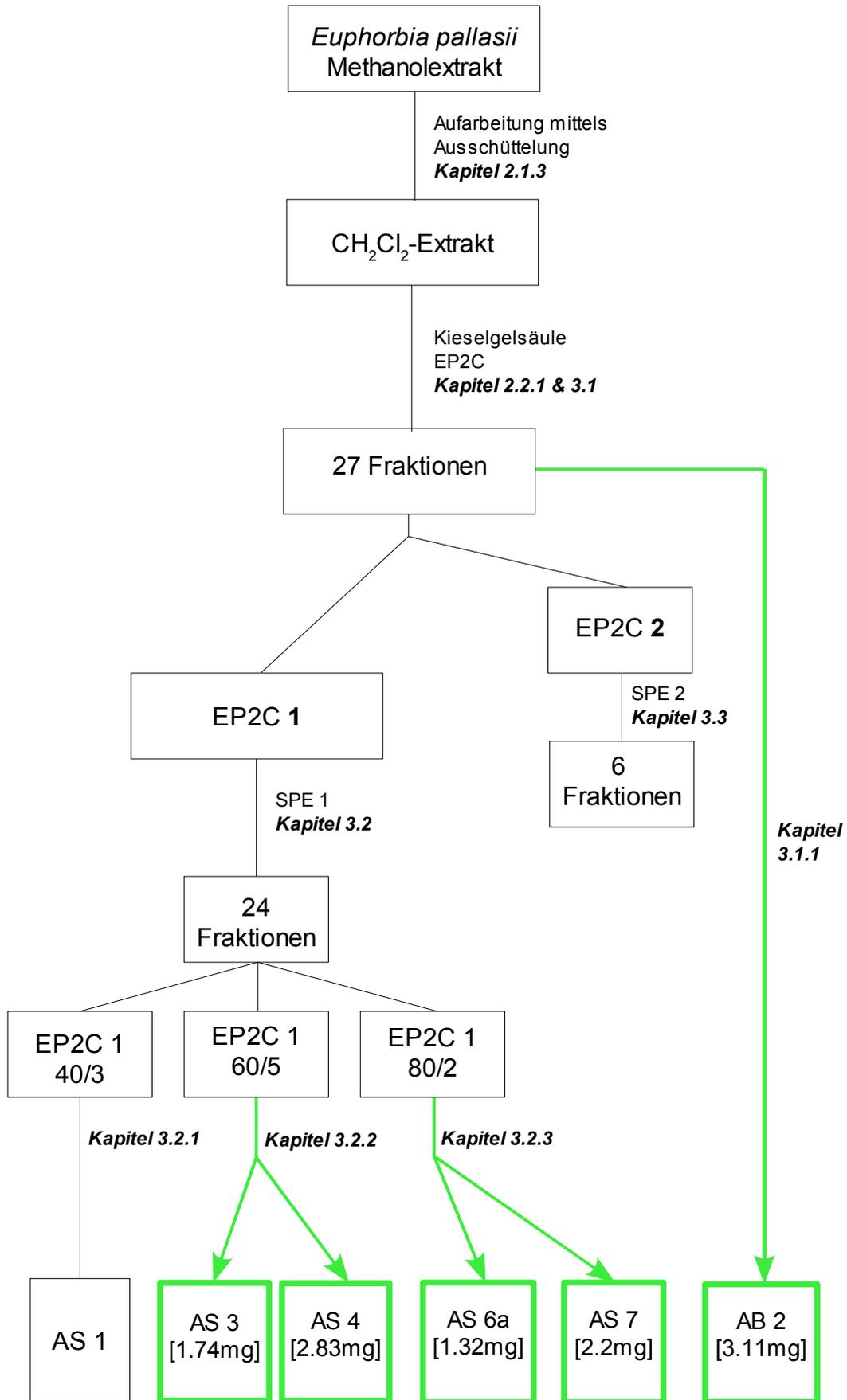
Die Trennungs- und Isolierungsschritte wurden mit verschiedenen Geräten und Methoden durchgeführt. Es kamen SC, SPE und semi-präparative HPLC zum Einsatz. Die verwendeten Methoden sind in Kapitel 2 genau beschrieben.



**Abbildung 8:** Analyse des MeOH-Extraktes (s. Abb. 6, S. 11, oberes Chromatogramm) und des  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktes (s. Abb. 6, S. 11, unteres Chromatogramm) nach HPLC-System 1 (s. Tab. 6, S. 22). Mit roten Pfeilen markiert: vier ausgewählte Peaks

Die verwendeten Pflanzenextrakte waren nach Arbeiten von Amarsanaa Badgaa bereits vorhanden (s. Kapitel 2.1.2 & 2.1.3). Der  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt musste zur Isolierung der erwähnten Substanzen erst weiter aufgetrennt werden, um Überlagerungen diverser Peaks im apolaren Bereich einzuschränken und die Fraktion von unerwünschten Verunreinigungen zu säubern. Die polaren Bestandteile wurden mit einer SPE abgetrennt.

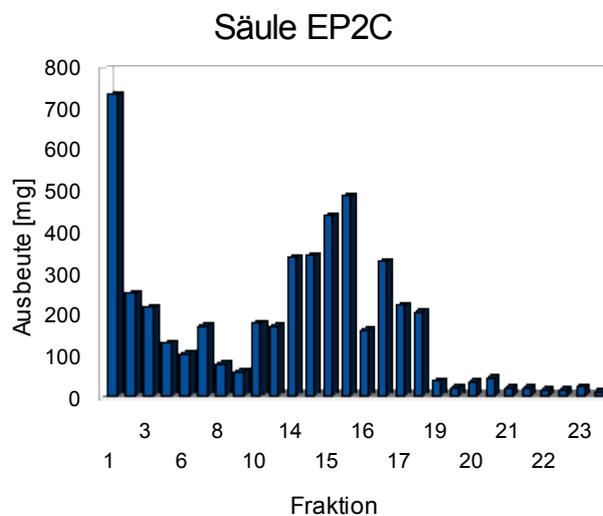
Zur Übersicht ist ein Schema aller durchgeführten Schritte auf Seite 30 dargestellt. Jene Substanzen, die in ausreichendem Maßstab isoliert werden konnten, sind grün markiert.



**Abbildung 9:** Schema der Aufarbeitungsschritte des methanolischen Extraktes (s. Kapitel 2.1.2) von *Euphorbia pallasii*

### 3.1 Auftrennung des Dichlormethanextraktes

Zur Reinigung der  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Fraktion (s. Abb. 6, S. 11) wurde die Säulenchromatographie, wie sie in Kapitel 2.2.1 beschrieben ist, verwendet. Aus der Trennung gingen 27 Fraktionen hervor, deren Massenverteilung in Abbildung 10 dargestellt ist.



**Abbildung 10:** Massenverteilung der Fraktionen der Säule EP2C (s. Tab. 3, S. 16)

Da die Volumina der gesammelten Fraktionen zwischen 400 und 1300ml betragen (s. Tab. 3, S. 16), waren die Ausbeuten dementsprechend hoch und die Trennung eher grob. Die anteilmäßig höchste Masse lag mit 736mg in der ersten Fraktion – EP2C 1.

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels DC und zum Teil auch mit HPLC überprüft:

- ◆ Für die DC wurden die trockenen Fraktionen in MeOH gelöst und nach dem in Kapitel 2.2.2 beschriebenen System entwickelt und detektiert.
- ◆ Für die HPLC-Analyse wurden die Lösungen, wie sie für die DC verwendet wurden, nochmals 1:10 verdünnt und nach HPLC-System 1 (s. Tab. 6, S. 22) verfahren.

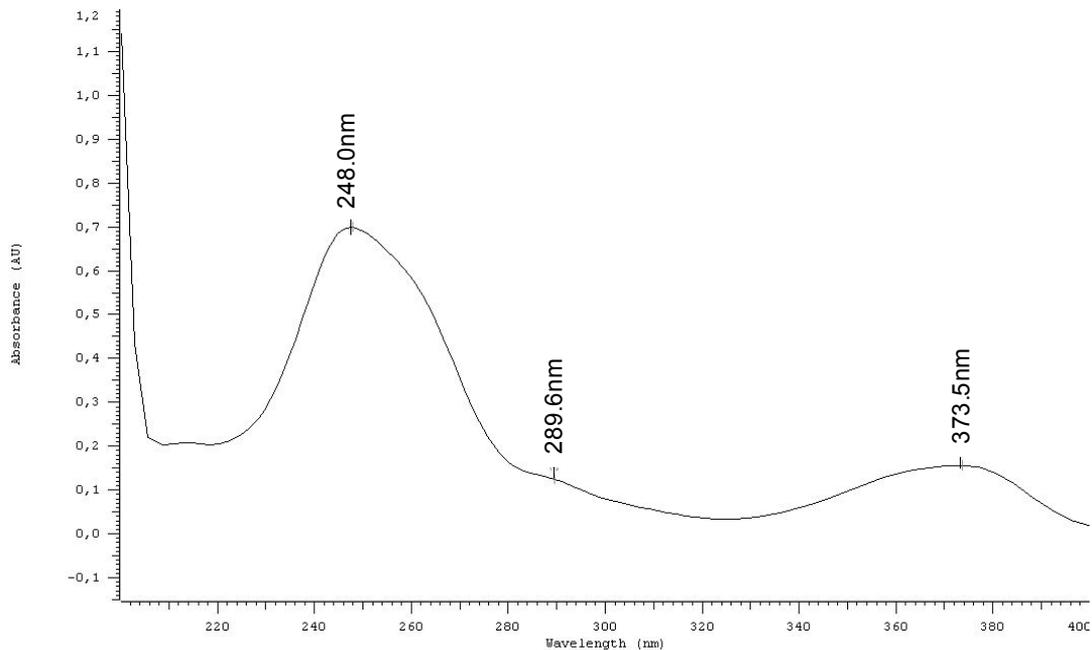
### **3.1.1 Isolierung von AB2**

Für die DC- und HPLC-Analysen mussten die trockenen Fraktionen, wie bereits erwähnt, in MeOH gelöst werden. Während der Lagerung der gelösten Fraktionen bei 4°C flockten in den ersten neun Fraktionen weiß-kristalline Niederschläge aus. Aus Fraktion eins (EP2C 1) und aus Fraktion drei (EP2C 3) konnte dieser Niederschlag im Maßstab von einigen Milligramm gewonnen werden: Es wurde das überstehende Lösungsmittel abgenommen, der Niederschlag drei mal mit kaltem MeOH gewaschen und das verbleibende Lösungsmittel durch Überblasen mit Druckluft entfernt.

Die Niederschläge wurden HPLC-Untersuchungen unterzogen, wobei sich die Löslichkeit als problematisch erwies: Erst unter Einwirkung von Ultraschall und Wärme lösten sich die Niederschläge in einer 1:1-Mischung von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und MeOH.

Bei Vergleichen der HPLC-Chromatogramme und vor allem der UV-Spektren mit jenen der Arbeiten von Amarsanaa Badgaa stellte sich heraus, dass es sich bei dem Niederschlag von Fraktion drei (EP2C 3) hauptsächlich um AB2 aus Amarsanaa Badgaas Ausführungen handelte. Er gewann diese Substanz mittels semi-präparativer HPLC aus Fraktionen einer vorhergegangenen SPE. Jedoch konnte er nicht genügend isolieren, um die Substanz einer NMR zu unterziehen.

Die Identifizierung als AB2 erfolgte mittels UV-Spektrenvergleich. Die Kurve wies drei charakteristische Maxima auf und ist in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** UV-Kurve von AB 2, aufgenommen on-line (36% ACN) während einer HPLC-Analyse nach HPLC-System 1 (s. Tab. 6, S. 22)

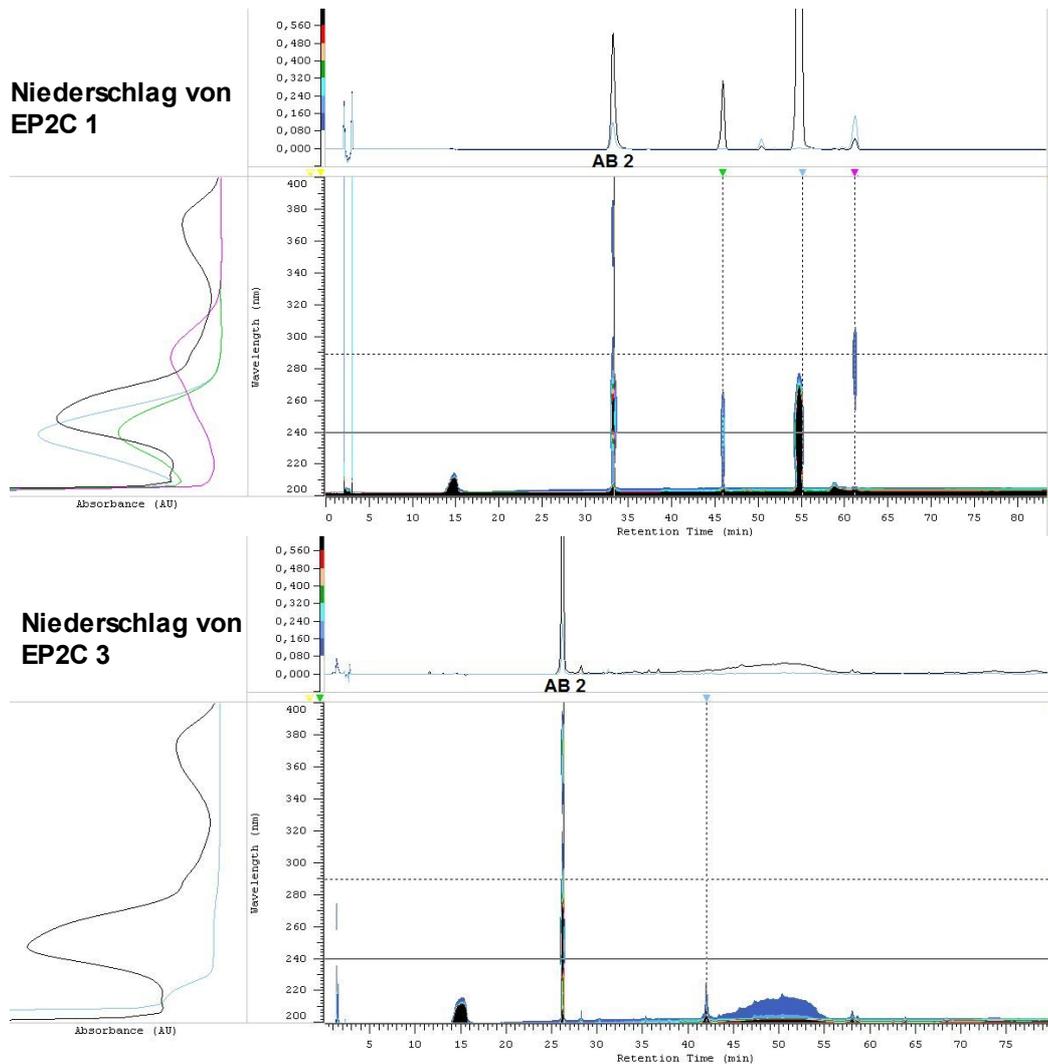
Im Niederschlag von EP2C 3 stellte AB2 die Hauptkomponente dar, andere Substanzen waren in kaum nennenswerten Mengen enthalten. Die Kristalle aus EP2C 1 zeigten hingegen in der HPLC-Analyse neben dem Peak von AB2 noch einige andere Peaks. Ein Vergleich der Chromatogramme der beiden Niederschläge in Abbildung 12 (S. 34) machte den Unterschied deutlich.

Die Retentionszeiten waren trotz Verwendung des gleichen HPLC-Systems (HPLC-Methode 1, [s. Tab. 6, S. 22]) unterschiedlich. Der Grund dafür konnte in einer zu kurzen vorangegangenen Equilibrierungszeit oder an einem unsteten pH-Wert des Fließmittels gelegen haben. Die Identifizierung als AB2 konnte jedoch in beiden Fällen durch die UV-Kurve (in der Abbildung schwarz gezeichnet) zweifelsfrei festgestellt werden.

Die folgenden Bilder der Abbildung 12 seien kurz erklärt:

Der obere Teil der Darstellung ist das HPLC-Chromatogramm. Auf der Abszisse ist die Zeit aufgetragen, wodurch die Retentionszeiten jeder Substanz abgelesen werden können; die Ordinate stellt ein Maß für die Intensität des

Peaks dar. Der untere Teil ist eine 3D-Ansicht des UV-Spektrums und besitzt die selbe Zeitskala, wie das Chromatogramm. Auf der y-Achse des 3D-UV-Spektrums ist der Wellenlängenbereich aufgetragen, bei dem detektiert wurde.



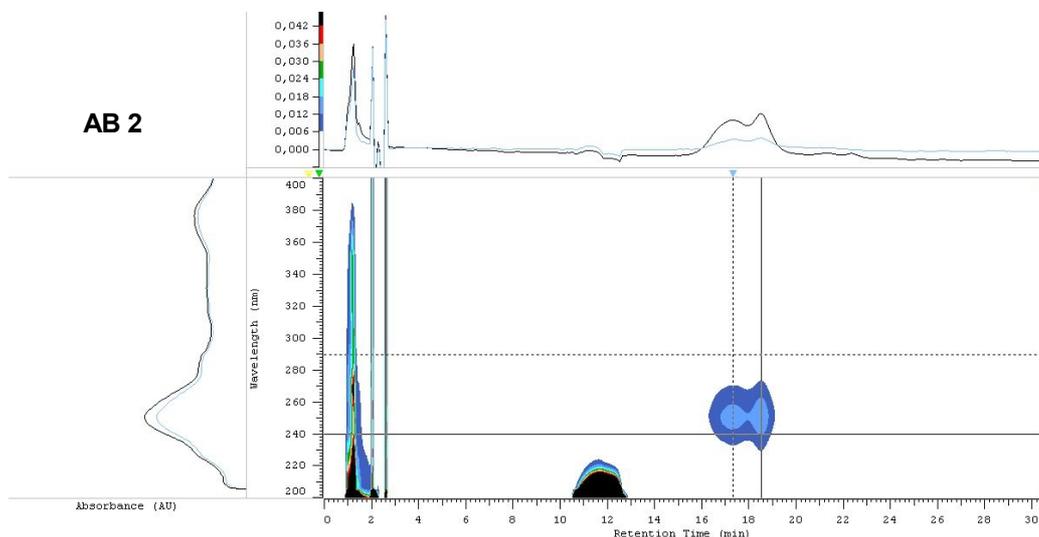
**Abbildung 12:** Analyse der Niederschläge aus EP2C 1 (oberes Chromatogramm) und EP2C 3 (unteres Chromatogramm, s. Tab. 3, S. 16) nach HPLC-System 1 (s. Tab. 6, S. 22).

Die Peaks des Chromatogramms, sowie die 3D-Darstellung des UV-Spektrums sind durch ein buntes Dreieck unterhalb des Chromatogramms gekennzeichnet. Die UV-Kurve auf der linken Seite der Darstellung zeigt sich in der gleichen Farbe wie das Dreieck, das dem entsprechenden Peak zugeordnet ist.

Die horizontal-verlaufenden Linien durch das 3D-UV-Spektrum zeigen die unterschiedlichen Wellenlängen, bei denen das Chromatogramm dargestellt ist. Das bunte Dreieck zur rechten Seite des 3D-UV-Spektrums korreliert hier wiederum mit der Farbe, in der das Chromatogramm angezeigt wird. Die Peaks sind bei jener Wellenlänge am höchsten, bei der sie ein Absorptionsmaximum haben.

Es musste geklärt werden, ob es sich bei AB2 um eine Reinsubstanz handelte, oder ob sich gerade in diesem Bereich des Chromatogramms zwei Peaks überlagerten und somit eine Reinsubstanz nur vorgetäuscht wurde.

Zur Klärung dieser Frage wurde ein geeignetes HPLC-System entwickelt, das in dem Bereich, in dem AB2 retentiert wurde, einen flacheren Gradienten besaß. Die resultierende Methode war HPLC-Methode 2 (s. Tab. 6, S. 22), mit der gezeigt werden konnte, dass der Peak von AB2 noch weiter aufgetrennt werden konnte. Somit war klar, dass es sich bei AB2 um ein Substanzgemisch handelte. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 13 zu sehen.



**Abbildung 13:** Analyse von AB 2 mittels HPLC-System 2 (s. Tab. 6, S. 22).

Die Peaks waren zwar nicht basisliniengetrennt, die Tendenz einer Trennung war aber deutlich zu sehen. Eine bessere Trennung konnte nicht mehr erreicht

werden. Die zwei Peaks hatten jedoch genau den gleichen UV-Kurven-Verlauf, sodass der Verdacht nahe lag, dass es sich bei den Substanzen um Isomere handelte.

Eine Abbildung von AB2 auf einer Dünnschichtplatte war nicht möglich. Es wurden verschiedene DC-Systeme und auch unterschiedliche Sprühreagenzien (Anisaldehydreagens, Naturstoffreagens, Echtblausalz B, Gibbs Reagens) verwendet, jedoch konnte die aufgetragene Probe weder im sichtbaren Licht, noch unter UV-Licht detektiert werden.

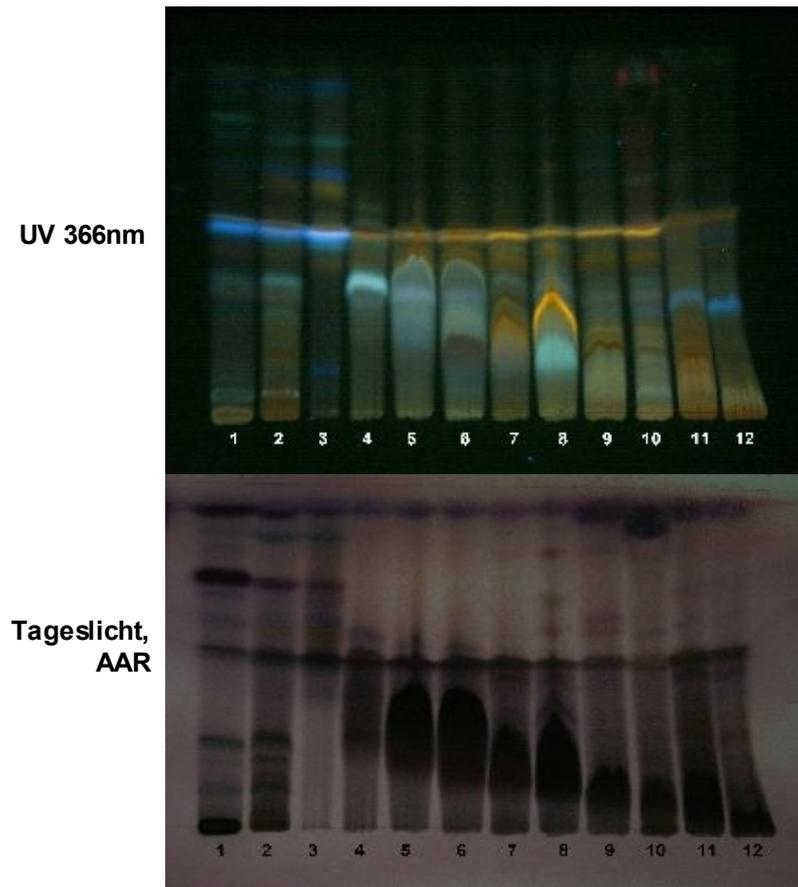
Es konnten 3.11mg der Substanz AB2 isoliert werden, die zur Aufklärung der Struktur verschiedenen Methoden unterzogen wurde. Die Ergebnisse sind im Rahmen der Diskussion in Kapitel 4 erörtert.

#### ***3.1.2 Aufarbeitung der Fraktionen***

Die Fraktionen der Säule EP2C (s. Tab. 3, S. 16) wurden in MeOH gelöst und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen, die nach dem DC-System entwickelt wurde, wie es in Kapitel 2.2.2 beschrieben ist (Tab. 4, S. 18).

In Abbildung 14 ist eine DC der ersten elf Fraktionen unter UV-Licht 366nm und nach Besprühen mit Anisaldehydreagens im Tageslicht zu sehen.

Alle weiteren Fraktionen der Säule (ab EP2C 12) zeigten auf der DC-Platte keine bedeutenden Banden, sodass sie für diese Arbeit vernachlässigt werden konnten. Ein HPLC-Screening dieser Fraktionen wurde auch aus diesem Grund nicht durchgeführt.



Bahn	Probe (s. Abb. 9, S. 30)
1	MeOH Extr.
2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Extr.
3	EP2C 1
4	EP2C 2
5	EP2C 3
6	EP2C 4
7	EP2C 6
8	EP2C 7
9	EP2C 8
10	EP2C 9
11	EP2C 10
12	EP2C 11

**Abbildung 14:** Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der ersten elf Fraktionen der Säule EP2C (s. Tab.3, S. 16)

**Anm.** Die Fraktion EP2C 5 konnte nicht analysiert werden, da sie im Zuge der Aufräumarbeiten von Amarsanaa Badgaa verloren ging. Deshalb fehlt sie auch in diesem Chromatogramm.

Der Vergleich auf der DC zwischen dem ursprünglichen methanolischen Extrakt (Bahn 1), dem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakt (Bahn 2) und der ersten Fraktion der EP2C-Säule (Bahn 3) bewog uns, aus folgenden Gründen mit der Fraktion EP2C 1 weiter zu arbeiten:

- ◆ Die störenden polaren Stoffe konnten durch die Säulenchromatographie gut abgetrennt werden. Das war durch das Fehlen der dunklen Banden auf der DC-Platte nach Besprühen mit Anisaldehydreagens am Start der EP2C 1-Fraktion zu erkennen. Sowohl bei dem MeOH- als auch bei dem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakt waren jene schwarzen Zonen schon noch vorhanden.

- ◆ Durch die steigende Polarität des Elutionsmittels waren eben diese polaren Stoffe ab der dritten Fraktion in großem Ausmaß sehr wohl zu finden, was sie für unsere Zwecke uninteressant machte.
- ◆ Viele prägnante Banden des MeOH- und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extraktes im apolaren Bereich (ab einem R<sub>f</sub>-Wert von 0.46) waren am deutlichsten in der ersten Fraktion wieder zu finden.
- ◆ Die erste Fraktion EP2C 1 war jene, die die größte Ausbeute hervorbrachte. Dieser Umstand ließ darauf schließen, dass hier die größte Substanzmenge enthalten war.

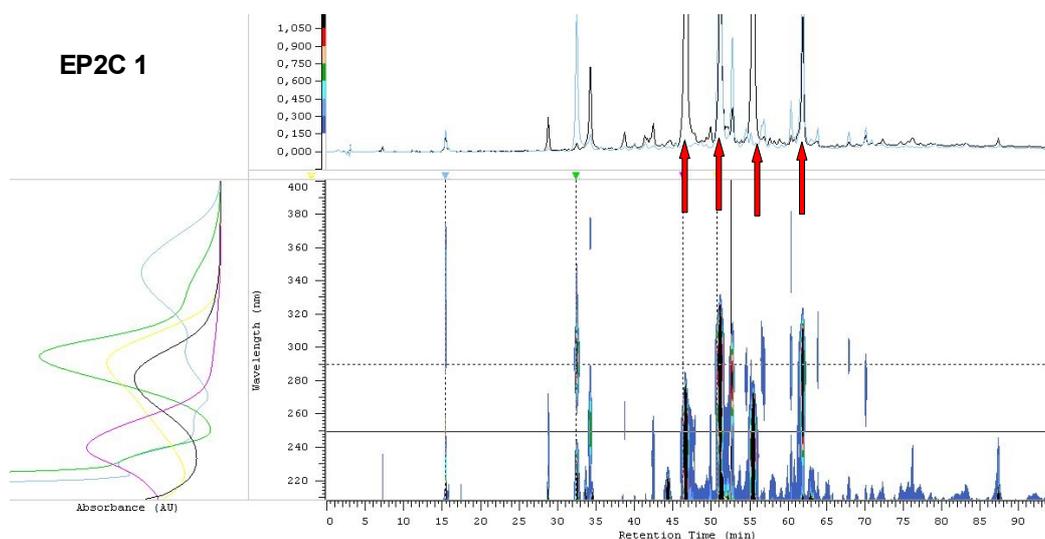
Um die Ergebnisse dieser DC zu erhärten, wurde ein HPLC-Screening der ersten elf Fraktionen durchgeführt. Eine durchgehende Analyse der weiteren Fraktionen der Säule wurde aufgrund der DC-Bilder in der obigen Ausführung unterlassen.

Gesucht wurde nach einem ähnlichen HPLC-Chromatogramm im apolaren Bereich, wie es bei den MeOH- und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakten der Fall war (s. Abb. 8, S. 29). Das Screening der Fraktionen war vor allem in den ersten paar Fraktionen interessant. Die gewünschten vier Peaks fanden sich in größtem Ausmaß in der ersten Fraktion – EP2C 1 – wieder.

Abbildung 15 zeigt das HPLC-Chromatogramm, das UV-Spektrum und ein 3D-UV-Spektrum der Fraktion EP2C 1.

Durch die HPLC konnten die bereits durch die DC erhaltenen Ergebnisse verifiziert werden:

- ◆ Das HPLC-Chromatogramm von EP2C 1 zeigte sich dem des MeOH-Extraktes und des CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extraktes im apolaren Bereich ident (s. Abb. 8, S. 29): Die gesuchten vier Peaks waren hier bei den gleichen Retentionszeiten zu sehen. Sie sind in der Abbildung mit roten Pfeilen markiert.
- ◆ Die Maxima des UV-Spektrums dieser vier Peaks stimmten mit jenen des MeOH- und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extraktes überein.



**Abbildung 15:** Analyse von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16) mittels HPLC-System 1 (s. Tab. 6, S. 22).

Aufgrund der Ergebnisse dieser HPLC-Serie, wurden die Substanzen, die die größten Peaks erzeugten, aus der Fraktion EP2C 1 mittels semi-präparativer HPLC isoliert.

### 3.1.3 Semi-präparative Isolierungen aus EP2C 1

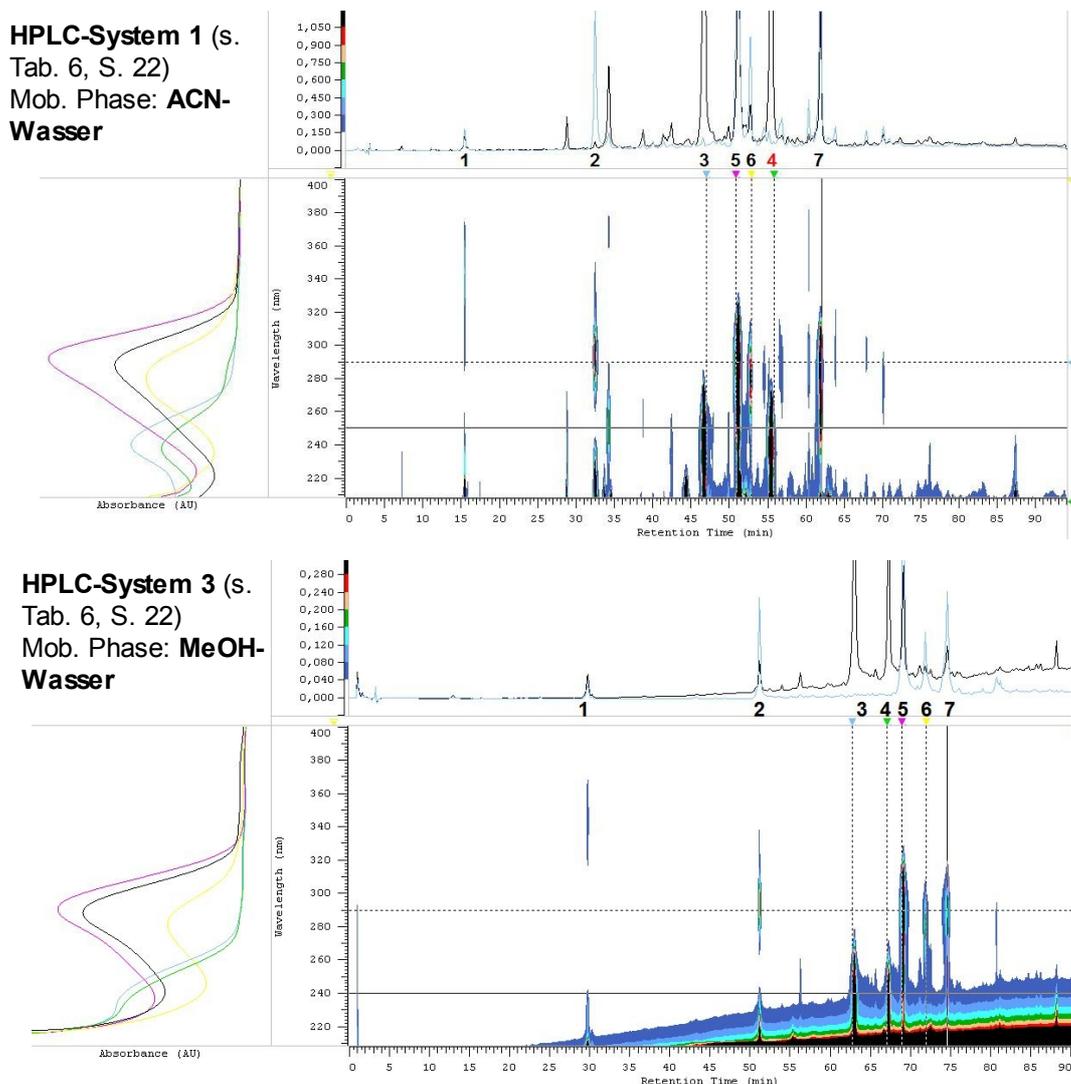
Für die semi-präparativen Arbeiten mittels HPLC musste erst das bisher verwendete ACN-System auf ein MeOH-System umgestellt werden, da es sehr schwierig ist, mit ACN nach einer semi-präparativen Isolierung weiter zu arbeiten. Es wurde ACN durch MeOH ersetzt, das Gradientensystem und auch die sonstigen Aufarbeitungsschritte wurden aber beibehalten.

Bei der Änderung des Fließmittels auf MeOH-Wasser-Gemische zeigte sich, dass die Retentionszeiten des Analyten im Vergleich zu dem ACN-Wasser-System um ungefähr 15 Minuten nach hinten verschoben waren.

Es musste festgestellt werden, ob es im Zuge der Systemänderungen zu einer Änderung in der Retentionsfolge der einzelnen Substanzen gekommen war. Zu diesem Zweck wurden die sieben größten Peaks im MeOH-System nummeriert.

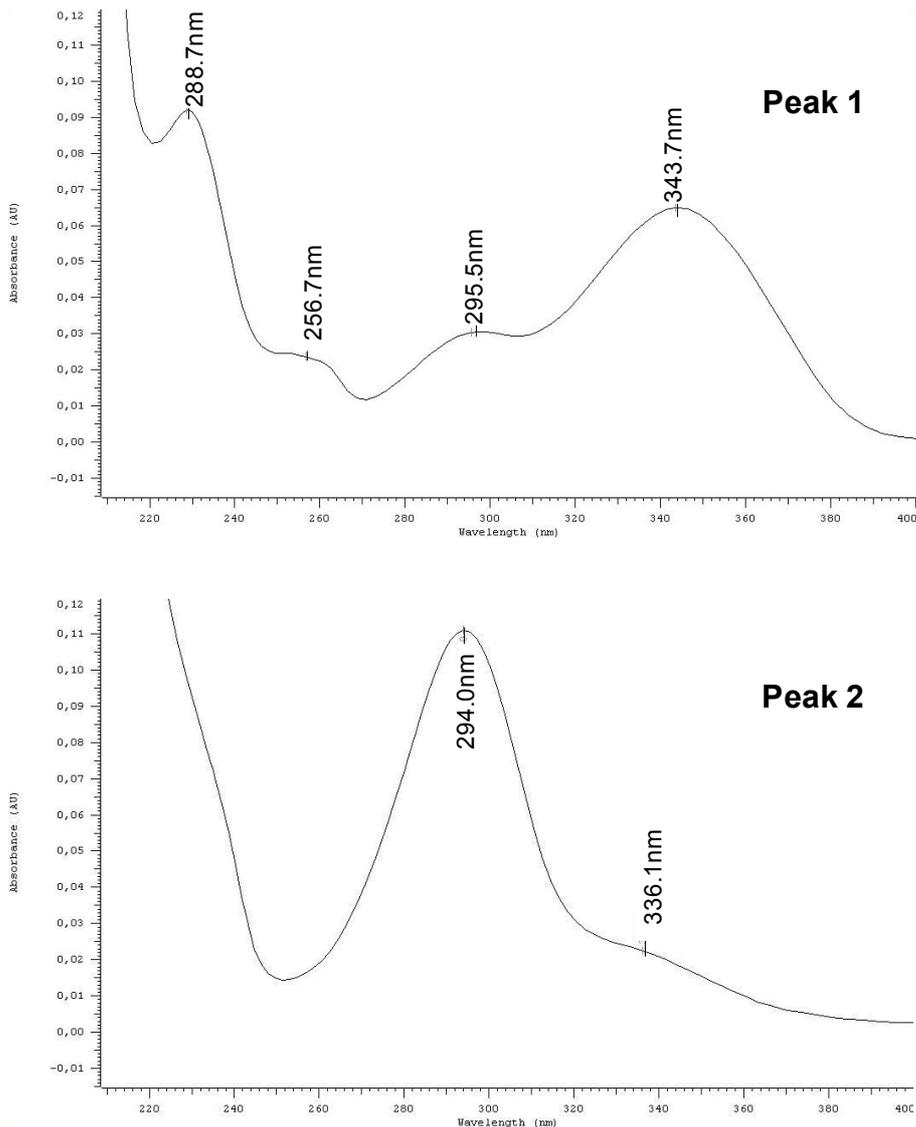
Bei der Umstellung der apolaren Phase des Fließmittels von ACN zu MeOH zeigten sich zwei Änderungen im Retentionsverhalten der eingespritzten Fraktion EP2C 1:

- ◆ Die ausgesuchten Peaks wurden im MeOH-System um ungefähr 15 Minuten später retentiert, als im ACN-System. Das lag an der geringeren Elutionskraft des MeOH.
- ◆ Die Substanzen eluierten im MeOH-System in einer anderen Reihenfolge, als im ACN-System. Dieser Sachverhalt lässt sich am besten durch eine Gegenüberstellung der beiden Chromatogramme in Abbildung 16 zeigen.

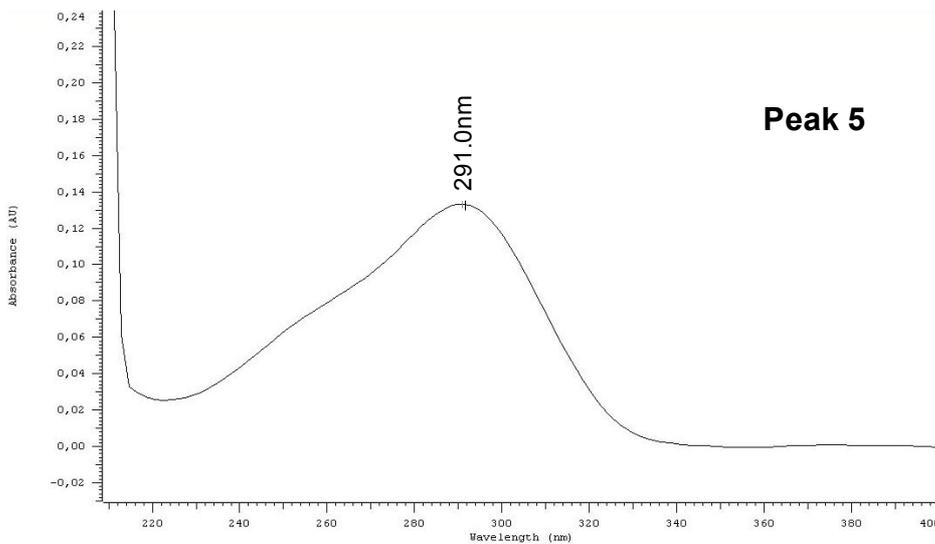
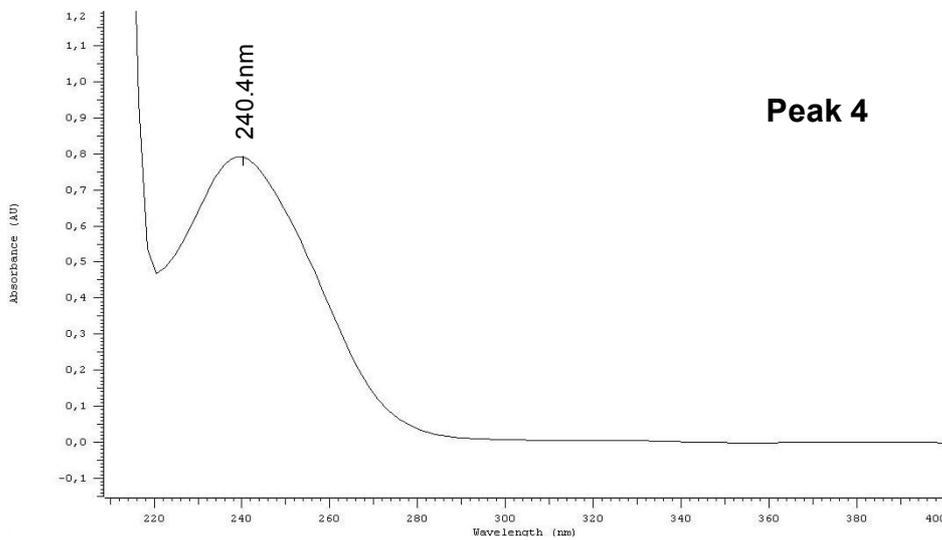
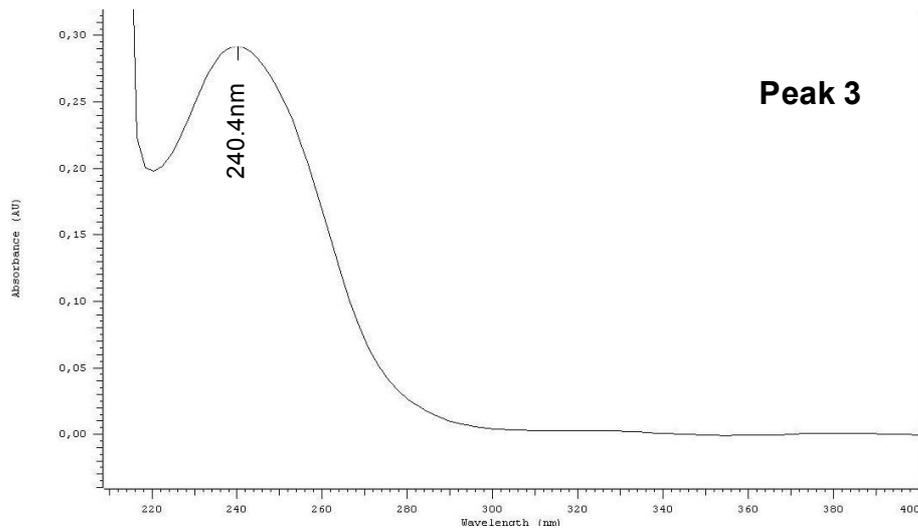


**Abbildung 16:** Analyse von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16) mittels HPLC-System 1 (oberes Chromatogramm) und HPLC-System 3 (unteres Chromatogramm) s. Tab. 6, S. 22

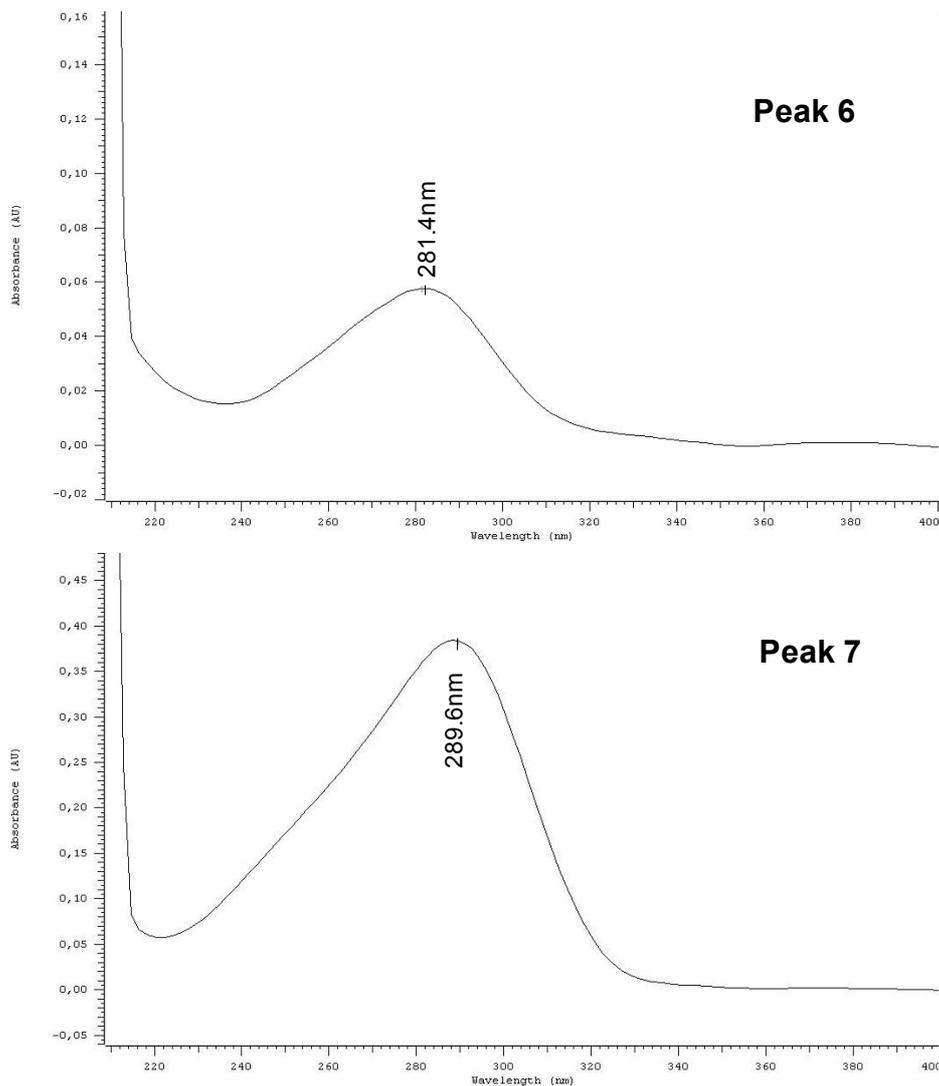
Im ACN-System wurde Peak 4 erst nach Peak 5 und Peak 6 retentiert. Das ist in Abb. 16 durch eine Rotmarkierung der entsprechenden Peak-Beschriftung verdeutlicht. Die Zuordnung und Identifizierung der Peaks konnte anhand der UV-Spektren erfolgen. Eine Auflistung aller on-line aufgenommenen UV-Kurven zu den entsprechenden Peaks findet sich in Abb. 17 (S. 41-43).



**Abbildung 17:** UV-Kurve von Peak 1 (oben) und Peak 2 (unten) aufgenommen on-line (43% MeOH und 49% MeOH) während einer HPLC-Analyse von EP2C 1 nach HPLC-System 4 (s. Tab. 6, S. 22)



**Fortsetzung Abb. 17:** UV-Kurve von Peak 3 (oben), Peak 4 (Mitte) und Peak 5 (unten), aufgenommen on-line (60% MeOH, 64% MeOH und 67% MeOH) während einer HPLC-Analyse von EP2C 1 nach HPLC-System 4 (s. Tab. 6, S. 22)



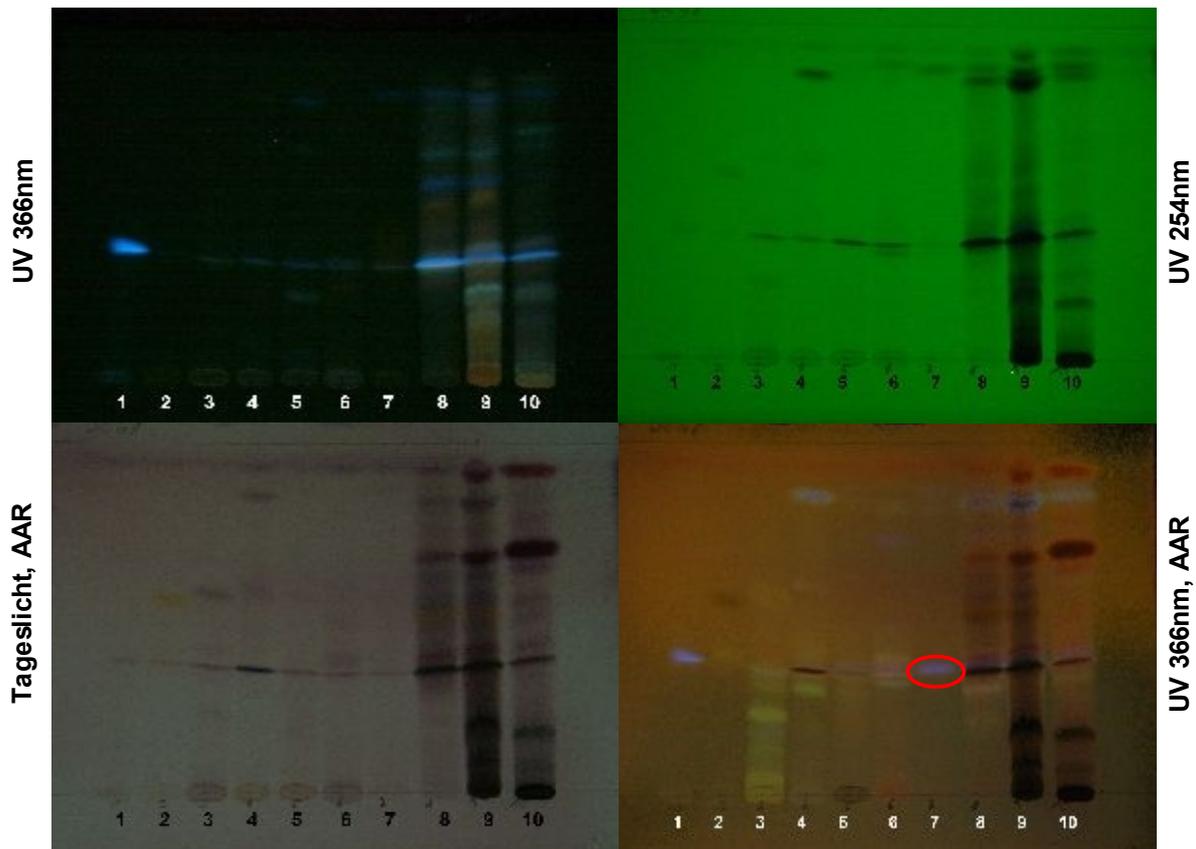
**Fortsetzung Abb. 17:** UV-Kurve von Peak 6 (oben) und Peak 7 (unten) aufgenommen on-line (70% MeOH und 73% MeOH) während einer HPLC-Analyse von EP2C 1 nach HPLC-System 4 (s. Tab. 6, S. 22)

Auffällig war, dass Peak 3 und 4 das gleiche UV-Maximum, Peak 5 und 7 ähnliche UV-Maxima hatten.

Um den nunmehr über 70 Minuten dauernden Lauf zu verkürzen, wurde mit einer höheren Methanolprozentigkeit begonnen, sodass eine Anfangskonzentration von 35% Methanol (HPLC-System 4, s. Tab. 6, S. 22) resultierte. Die Steigerungsrate blieb sonst gleich, wodurch das MeOH-System insgesamt um 25 Minuten verkürzt werden konnte, ohne an der Trennungsqualität Einbußen zu erleiden.

Zur Isolierung wurden die in Abbildung 16 (S. 40) nummerierten Peaks im MeOH-System ausgewählt, während elf Läufe gesammelt und deren Reinheit im Vergleich zur Gesamtfraktion EP2C 1, zu dem methanolischen Extrakt und dem Dichlormethanextrakt mittels DC überprüft.

Die angefertigte DC ist in Abbildung 18 zu sehen.



**Abbildung 18:** Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) von Peak 1-7 (s. Abb. 16, S. 40) nach semi-präparativen Isolierungen aus EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16)

Bahn	Probe (Details s. Abb. 16, S. 40)
1	Peak 1
2	Peak 2
3	Peak 3
4	Peak 4
5	Peak 5
6	Peak 6
7	Peak 7
8	EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16)
9	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extr.
10	MeOH-Extr.

Auffällig war, dass auf Bahn sieben eine blau-violett fluoreszierende Bande unter UV-Licht 366nm bei einem R<sub>f</sub>-Wert von 0.35 erst nach Besprühen mit Anisaldehyd reagens auftrat. Die Zone ist in Abbildung 18 rot umrandet. Diese Fluoreszenz war vor dem Besprühen mit Anisaldehyd

Reagens unter UV-Licht 366nm nicht zu sehen. Unter Tageslicht zeigte diese Bande nach Besprühen eine leichte Orangefärbung.

Ein ähnliches Verhalten wies die Bande auf Bahn eins auf: Zwar fluoreszierte hier die Bande sowohl bei 366nm, als auch bei 254nm (bei dieser Wellenlänge ist die Fluoreszenz in Abb. 18 nicht zu sehen, da sie nur schwach ausgeprägt war) bei einem  $R_f$ -Wert von 0.37 auch schon vor dem Besprühen mit Anisaldehyd, sie zeigte aber die gleiche Orangefärbung unter Tageslicht.

Das ähnliche Farbverhalten und auch die Nähe der Retentionsfaktoren der oben diskutierten Banden ließen bei früheren Betrachtungen des Dünnschichtchromatogramms der Gesamtfraktion EP2C 1 (Bahn 8 in Abb. 18) den Eindruck entstehen, dass es sich um nur eine Substanz handelte. Durch die semi-präparativen Isolierungen und anschließenden DC-Analysen konnte dieser Verdacht zerstreut werden.

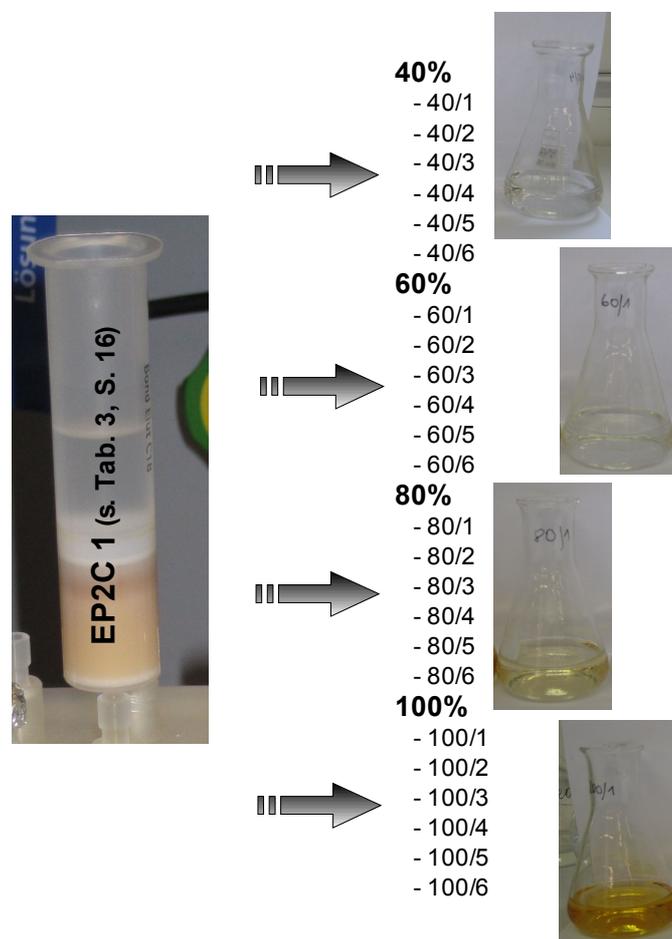
Aufgrund der Ähnlichkeiten der Banden auf Bahn eins und sieben war eine strukturelle Verwandtschaft der Substanzen, die diese verursachten, nicht auszuschließen.

Es zeigte sich, dass die Isolierungen zwar hinsichtlich der gewonnenen Ausbeuten erfolgreich waren, jedoch war die Reinheit der gesammelten Substanzen nicht hinreichend genug. Anhand der DC-Platte war gut zu erkennen, dass auf einer Laufbahn mehrere Banden, nach Besprühen mit Anisaldehyd sogar teilweise unterschiedlich gefärbte, vorhanden waren. Einzig der Isolierungsrückstand des ersten Peaks (Bahn 1) schien rein zu sein, da hier nur eine, bereits oben angesprochenen Bande, bei einem  $R_f$ -Wert von 0.37 zu sehen war.

Um den Reinheitsgrad der zu isolierenden Substanzen zu steigern, gleichzeitig deren Anreicherung zu erzielen und eine bessere Trennung zu erreichen, wurde mit Fraktion EP2C 1 eine Festphasenextraktion durchgeführt.

## 3.2 Festphasenextraktion von EP2C 1

Bei der Festphasenextraktion wurde nach System 1 (s. Tab. 7, S. 24) gearbeitet. Als stationäre Phase verwendeten wir, äquivalent zur HPLC, RP 18-Material. Die Anfangskonzentration der Methanol-Wassermischungen wurde mit 40%-Methanolanteil gewählt, da die ins Auge gefassten Substanzen in der HPLC erst bei einer Methanolkonzentration von ca. 50% retentiert wurden. Die Methanolprozentigkeit wurde in 20%-Einheiten gesteigert, um eine Anreicherung verschiedener Substanzen in diversen Fraktionen zu erzielen. Ein Schema der Elutionsfolge ist in Abbildung 19 dargestellt.

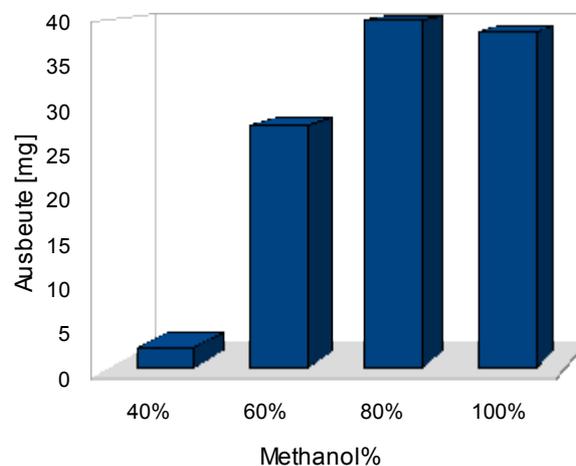


**Abbildung 19:** Schema der SPE (s. Tab. 7, S. 24) von EP2C 1 (s. Tab 3, S. 16)

Mit jeder Methanolprozentigkeit wurden sechs Raumvolumina eluiert, die getrennt von einander gesammelt wurden. Das Resultat dieser SPE waren 24

Fraktionen, von denen jeweils sechs in eine Methanolstufe fielen.

Die Fraktionen waren unterschiedlich gefärbt, wobei die am stärksten polaren Fraktionen am schwächsten gefärbt waren. Die intensivste Farbe trat bei den 100% Methanolfraktionen auf und bewegte sich von stark orange-braun in der ersten Fraktion – 100/1 – bis hin zu gelblich in der letzten Fraktion – 100/6. Ein Ausbeutendiagramm ist in Abbildung 20 zu sehen, wobei die Ausbeuten aller jeweiligen sechs Unterfraktionen einer Methanolprozentigkeitsstufe in einem Balken addiert sind.



**Abbildung 20:** Ausbeuten nach Fraktionierung von EP2C 1 (s. Abb. 9, S. 30) mittels SPE (s. Abb. 19, S. 46)

Die größte Anteil an Masse fand sich mit 40mg Trockengewicht in den 80% Methanol-Fraktionen.

Die Fraktionen wurden erst einem HPLC-Screening unterzogen, bei dem immer das selbe HPLC-System verwendet wurde, nämlich HPLC-System 4 (s. Tab 6, S. 22). Somit konnten die Fraktionen gut untereinander verglichen werden. Zur semi-präparativen Isolierung wurde aber für jede Polaritätsstufe eigene HPLC-Methoden entwickelt, um eine optimale Trennung zu erreichen.

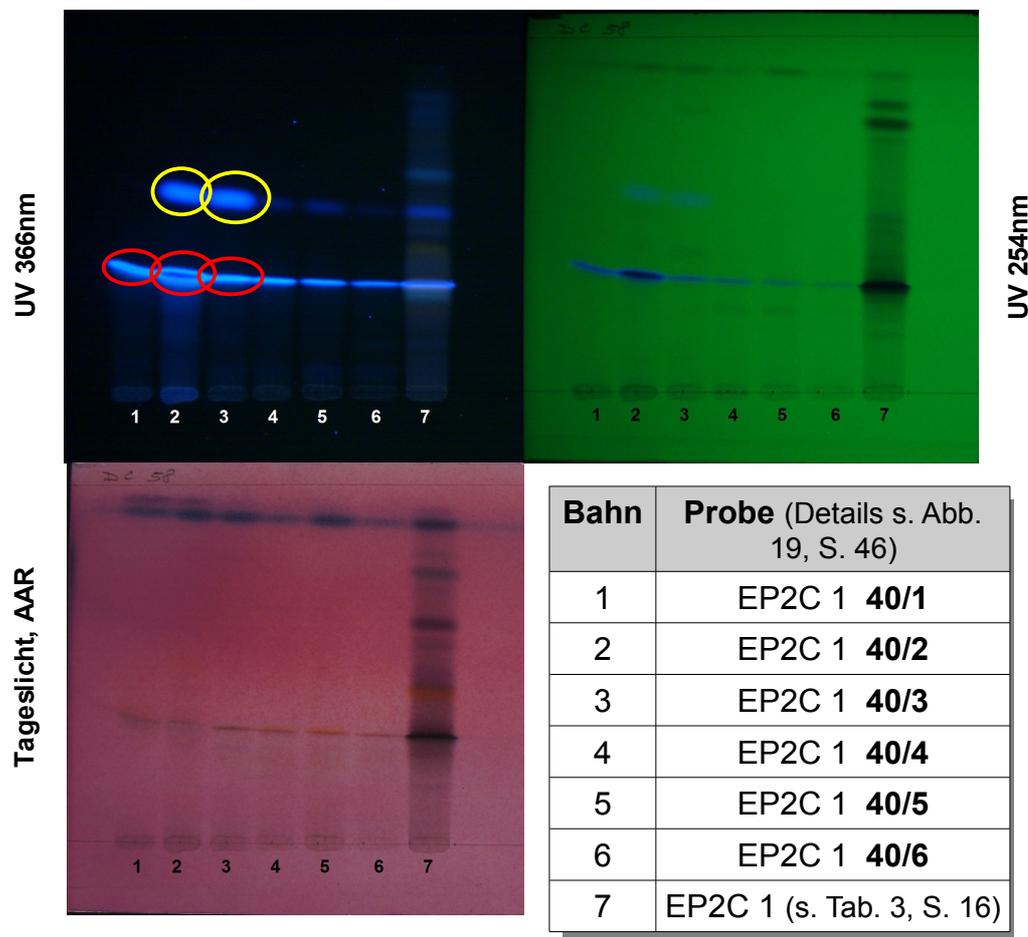
In den folgenden drei Unterkapiteln wird auf die jeweiligen Fraktionen genau eingegangen. Die 100%Methanol-Fraktionen werden nicht genauer diskutiert, da die HPLC-Chromatogramme keine relevanten Peaks zeigten.

### 3.2.1 Analyse der 40%MeOH-Fractionen

In den 40%MeOH-Fractionen waren die am stärksten polaren Substanzen enthalten, da hier der Wasseranteil am größten war.

Auf dem Dünnschichtchromatogramm fand sich in allen sechs Fraktionen die stark blau fluoreszierende Bande bei einem  $R_f$ -Wert von 0.37 wieder (vgl. DC in Abb. 18, S. 44), die im Zuge der früheren semi-präparativen Arbeiten (s. Kapitel 3.2) bereits rein isoliert und Peak 1 im HPLC-Chromatogramm (s. Abb. 16, S. 40) mit einem charakteristischen UV-Spektrum zugeordnet werden konnte.

In Abbildung 21 ist ein Dünnschichtchromatogramm der sechs 40%-Methanolfraktionen im Vergleich zur Gesamtfraktion EP2C 1 zu erkennen.



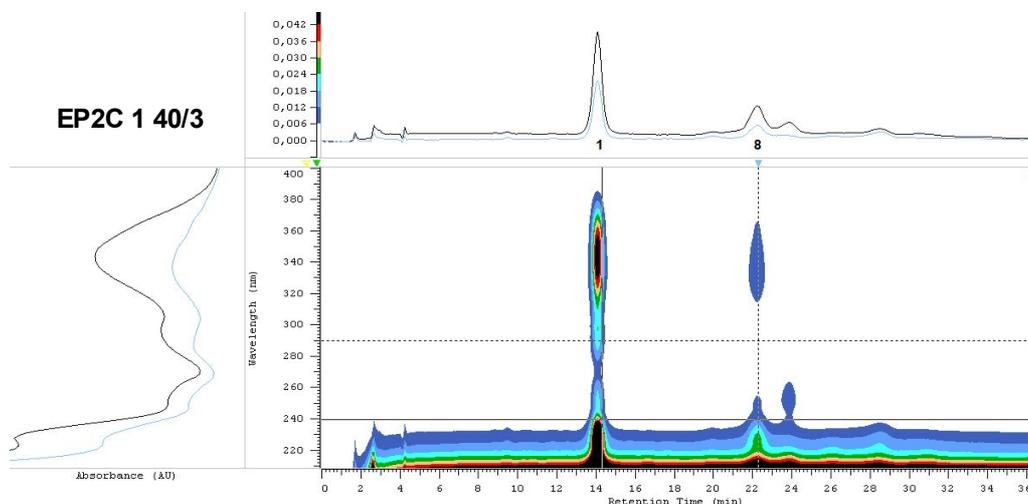
**Abbildung 21:** Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der 40%MeOH-Fractionen nach SPE (s. Abb. 19, S. 46 und Tab. 7, S. 24) von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16) Kennzeichnung charakteristischer Banden durch gelbe und rote Umrandungen

Besonders an Bahn zwei und drei war deutlich zu sehen, dass es neben der bereits bekannten blau fluoreszierenden Zone bei einem  $R_f$ -Wert von 0.37 (in Abbildung 21 rot umrandet), noch eine zweite blau-fluoreszierende Bande bei einem  $R_f$ -Wert von 0.51 (in Abbildung 21 gelb umrandet) gab. Die blaue Fluoreszenz zeigte sich unter UV-Licht sowohl bei 366nm, als auch bei 254nm. Nach Besprühen mit Anisaldehydreagens färbten sich die Banden leicht orange. Beim Vergleich mit der Gesamtfraktion EP2C 1 (Bahn 7) wurde deutlich, dass diese beiden fluoreszierenden Substanzen durch die SPE gut angereichert werden konnten, da sie in den Fraktionen 40/2 und 40/3 intensiver in Erscheinung traten, als in 40/1 und in der Gesamtfraktion.

Die intensive Fluoreszenz gleicher Farbe der beiden Banden ließ vermuten, dass es sich um ähnliche Verbindungen, eventuell Isomere handeln könnte.

Diese Annahme wurde durch die UV-Spektren der Substanzen verstärkt: Wie man an dem HPLC-Chromatogramm (Abbildung 22) aus der dritten Fraktion – EP2C1 40/3 – erkennen konnte, hatten zwei Peaks – bei Minute 14 und bei Minute 22 – idente UV-Spektren. Der erste Peak konnte als Peak 1 identifiziert werden, der bereits aus Kapitel 3.2 bekannt war (s. Abb. 16, S. 40). Der zweite Peak (bei Minute 22) war noch nicht bekannt und wurde als Peak 8 bezeichnet.

Die UV-Maxima der Peaks waren sehr charakteristisch und verliefen annähernd parallel. Das ursprünglich verwendete HPLC-System 3 wurde so verändert, dass diese zwei Peaks besser getrennt werden konnten, was in HPLC-Methode 5 (s. Tab. 6, S. 22) resultierte.

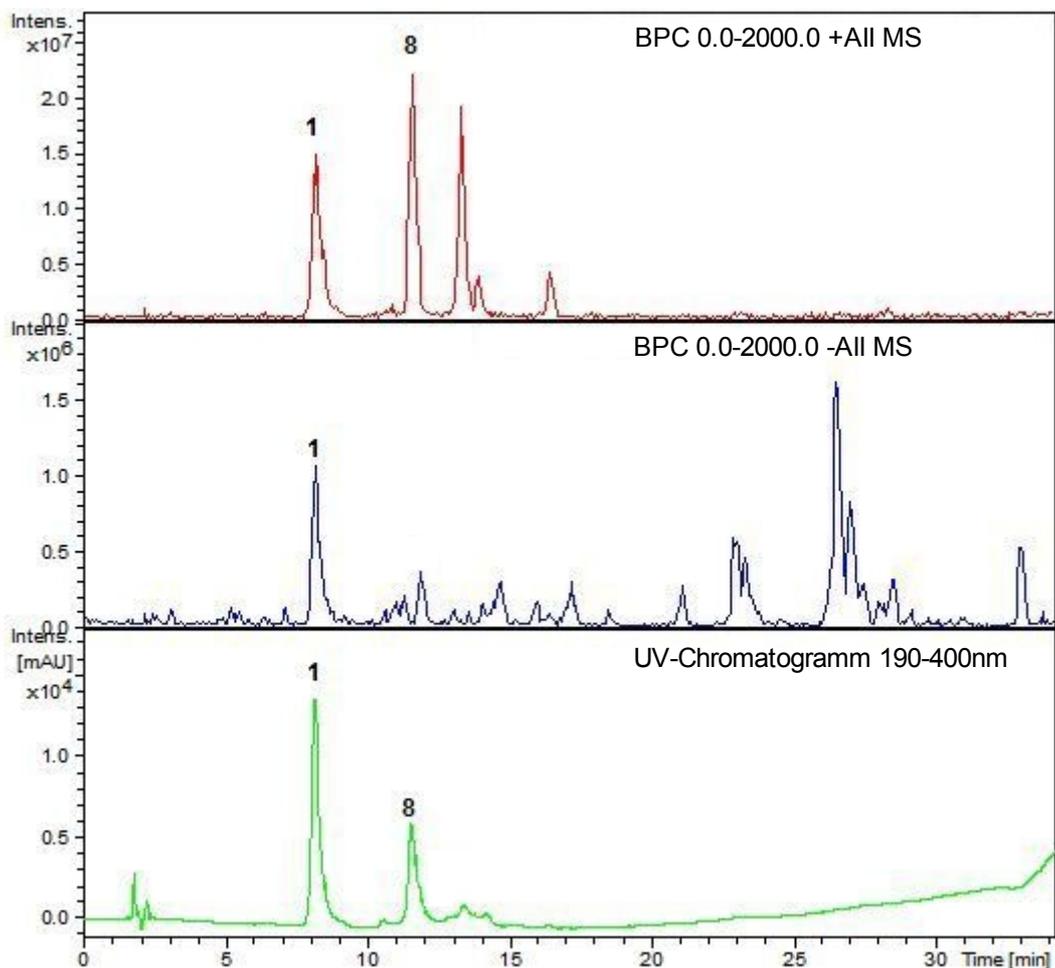


**Abbildung 22:** Analyse von EP2C 1 40/3 (s. Abb. 19, S. 46) mittels HPLC-System 5 (s. Tab. 6, S. 22)

Zur weiteren Aufklärung dieser zwei Substanzen wurde versucht, sie mittels semi-präparativer HPLC zu isolieren. Die Substanzmengen in den einzelnen Fraktionen waren jedoch sehr gering, sodass nicht genügend Ausbeute erzielt werden konnte, um sie einer NMR (s. S. 27) zu unterziehen. Es war aber noch genügend Fraktion EP2C 1 40/3 vorhanden, um eine LC/MS-Analyse durchzuführen.

### 3.2.1.1 LC/MS-Analyse

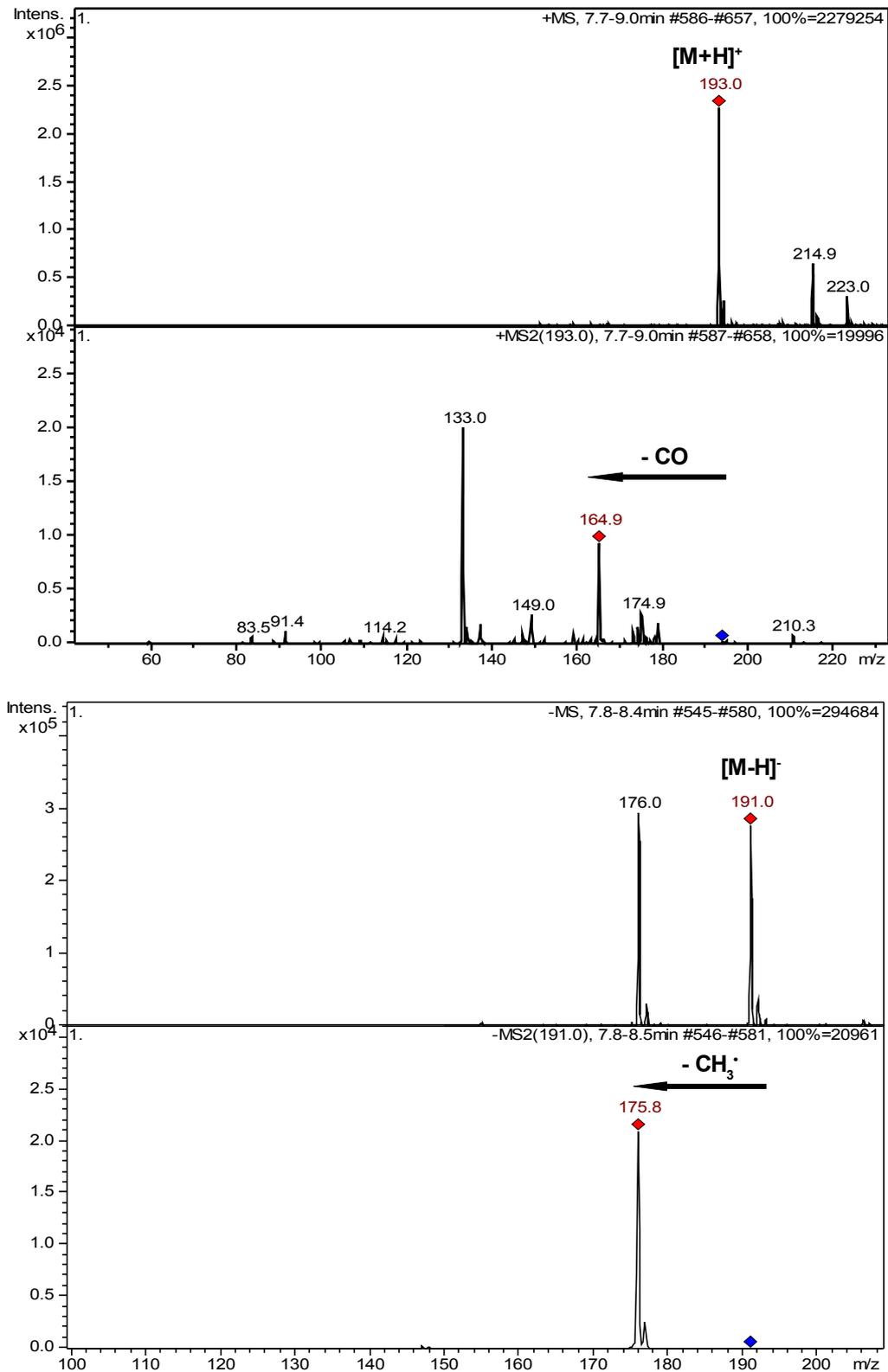
Die Messung erfolgte nach LC/MS-Methode 2 (s. Tab. 8, S. 25). Der verbliebene Rest der Fraktion EP2C 1 40/3 wurde dafür in MeOH gelöst. Die entstandenen Spektren sind in Abbildung 23 zu sehen.



**Abbildung 23:** LC-DAD-MS<sup>n</sup> Analyse von EP2C 1 40/3 (s. Abb. 19, S. 46) mittels LC/MS-System 2 (s. Tab 8, S. 25)

Die in Abbildung 23 gekennzeichnete Substanz 1 wurde sowohl im positiven, als auch im negativen Ionenmodus weiter fragmentiert. Die ESI-MS<sup>n</sup>-Spektren

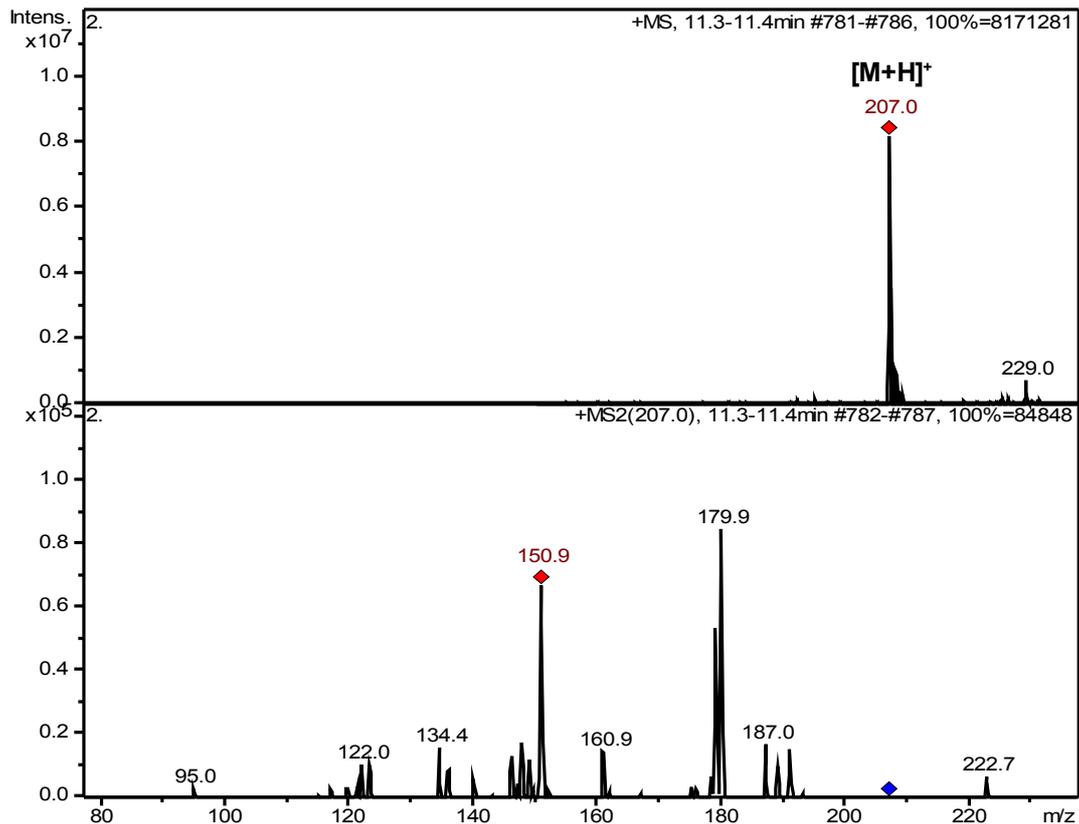
sind in Abbildung 24 zu sehen.



**Abbildung 24:** Analyse der Substanz 1 (s. Abb. 23) mittels ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus (s. Tab. 8, S. 25)

Die Messungen ergaben, dass das Molekulargewicht von Substanz 1 192 betrug. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es bei  $-MS^2$  zu einer  $CH_3^-$ -Abspaltung und im  $+MS^2$  zu einer Abspaltung von CO gekommen ist.

Auch Substanz 8 (s. Abb. 23, S. 50) wurde weiter fragmentiert. Die Spektren sind in Abbildung 25 zu sehen.



**Abbildung 25:** Analyse der Substanz 8 (s. Abb. 23) mittels ESI-MS<sup>n</sup> ( $n=1-2$ ) im positiven Ionenmodus

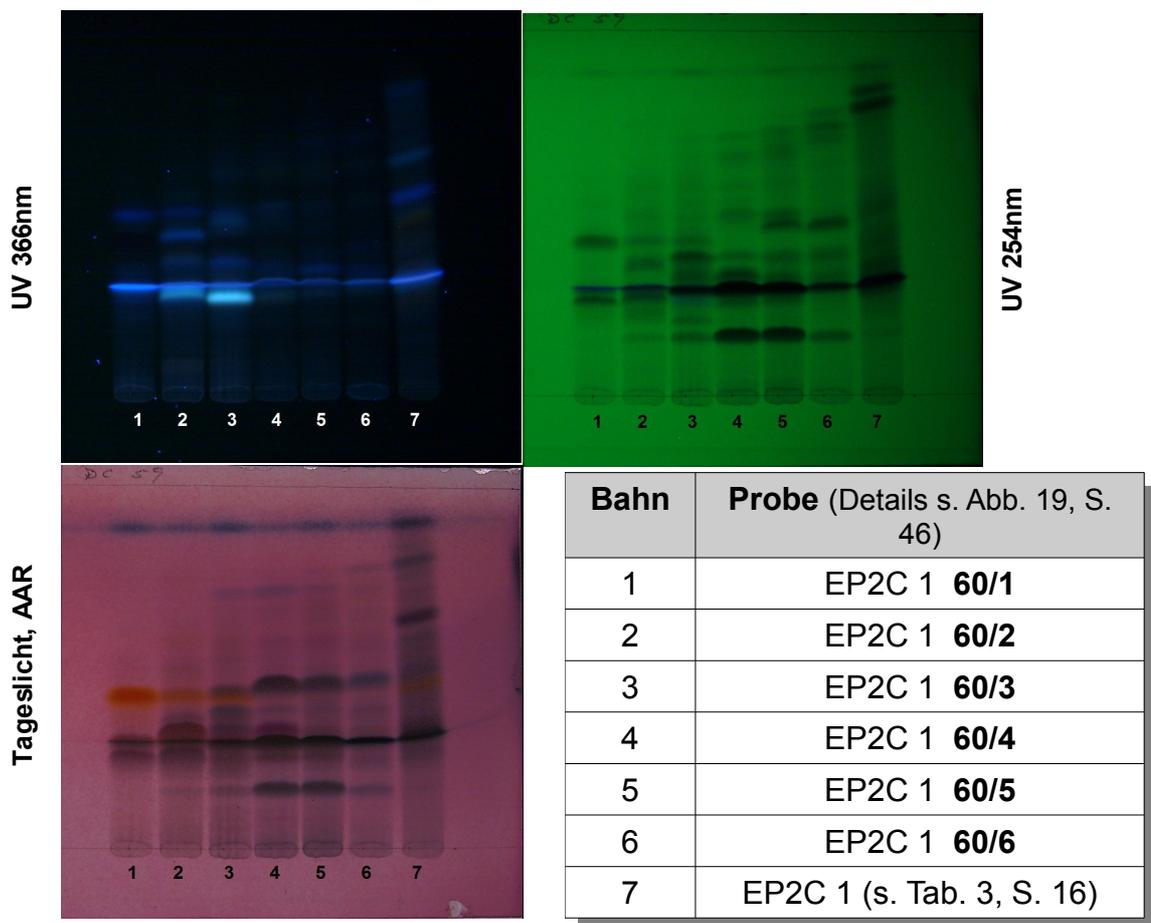
Der Molekülionenpeak der Substanz 8 stimmte im positiven und negativen Ionenmodus nicht überein. Somit ist die zuvor geäußerte Vermutung, bei Substanz 1 und 8 handle es sich um Isomere, widerlegt worden.

Bei Substanz 1 könnte es sich um ein Cumarin handeln. Dieser Umstand beruhte allerdings auf Spekulationen und konnte nicht sicher nachgewiesen werden.

Weitere MS-Ergebnisse dieser Fraktion, die für diese Arbeit nicht relevant waren, befinden sich im Anhang. Für weitere Untersuchungen könnten sie von Interesse sein.

### 3.2.2 Analyse der 60%MeOH-Fractionen

Das Bandenspektrum der 60%-Methanolfractionen auf der Dünnschichtplatte zeigte sich um einiges vielfältiger, als jenes der 40%-Methanolfractionen. Wegen der vielen Banden des Dünnschichtchromatogramms konnte keine Zuordnung zu den bereits sieben definierten Peaks im HPLC-Chromatogramm (s. Abb. 16, S. 40) getroffen werden.

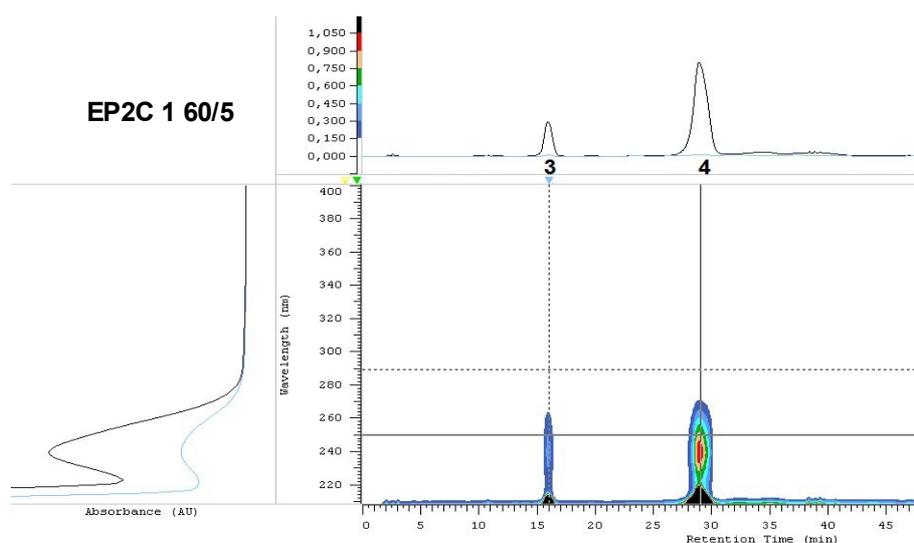


**Abbildung 26:** Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der 60%MeOH-Fractionen nach SPE (s. Abb. 19, S. 44 und Tab. 7, S. 24) von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16)

Nach einem HPLC-Screening stellte sich anhand der UV-Kurven heraus, dass in den ersten drei 60%Methanol-Fractionen noch Spuren der Substanz des Peak 1 (s. Abb. 16, S. 40 und Kap. 3.2.3) enthalten waren, jedoch wiederum zu wenig, um sie im rentablen Maßstab semi-präparativ zu isolieren.

Peak 2, 3 und 4 konnten in verschiedenen Fraktionen gut durch die SPE (s. Abb. 19, S. 46) angereichert werden. Das wurde durch die erhöhte Intensität der Peaks erkennbar. Es wurde ein HPLC-System entwickelt, mit dem diese drei Peaks von den ihnen Umgebenden gut getrennt werden konnten, was ja durch vorangegangene semi-präparativen Isolierungen aus der Gesamtfraktion EP2C 1 (s. Abb. 18, S. 44 und Kapitel 3.2.2) nicht erreicht worden war.

Die verwendete Methode war schließlich HPLC-System 6 (s. Tab. 6, S. 22). Aus Fraktion 60/5 (s. Abb. 19, S. 46) konnten die Substanzen des Peaks 3 und 4 (s. Abb. 16, S. 40) mit diesem System gut getrennt und semi-präparativ isoliert werden. Die Identifizierung als Peak 3 und Peak 4 erfolgte aufgrund der UV-Spektren. Ein HPLC-Chromatogramm inklusive UV-Spektren ist in Abbildung 27 zu sehen.



**Abbildung 27:** Analyse von EP2C 1 60/5 (s. Abb. 19, S. 46) mittels HPLC-System 6 (s. Tab. 6, S. 22)

Im Vergleich zu den ersten semi-präparativen Isolierungen aus der Gesamtfraktion EP2C 1 (s. Abb. 16, S. 40) konnten Peak 3 und 4 viel besser getrennt werden und somit reiner isoliert werden. Letztendlich konnten 1.74mg von Peak 3 und 2.83mg von Peak 4 mittels semi-präparativer HPLC gewonnen werden. Die Reinsubstanzen wurden nach Graz zur NMR-Vermessung geschickt. Die Ergebnisse waren noch ausständig.

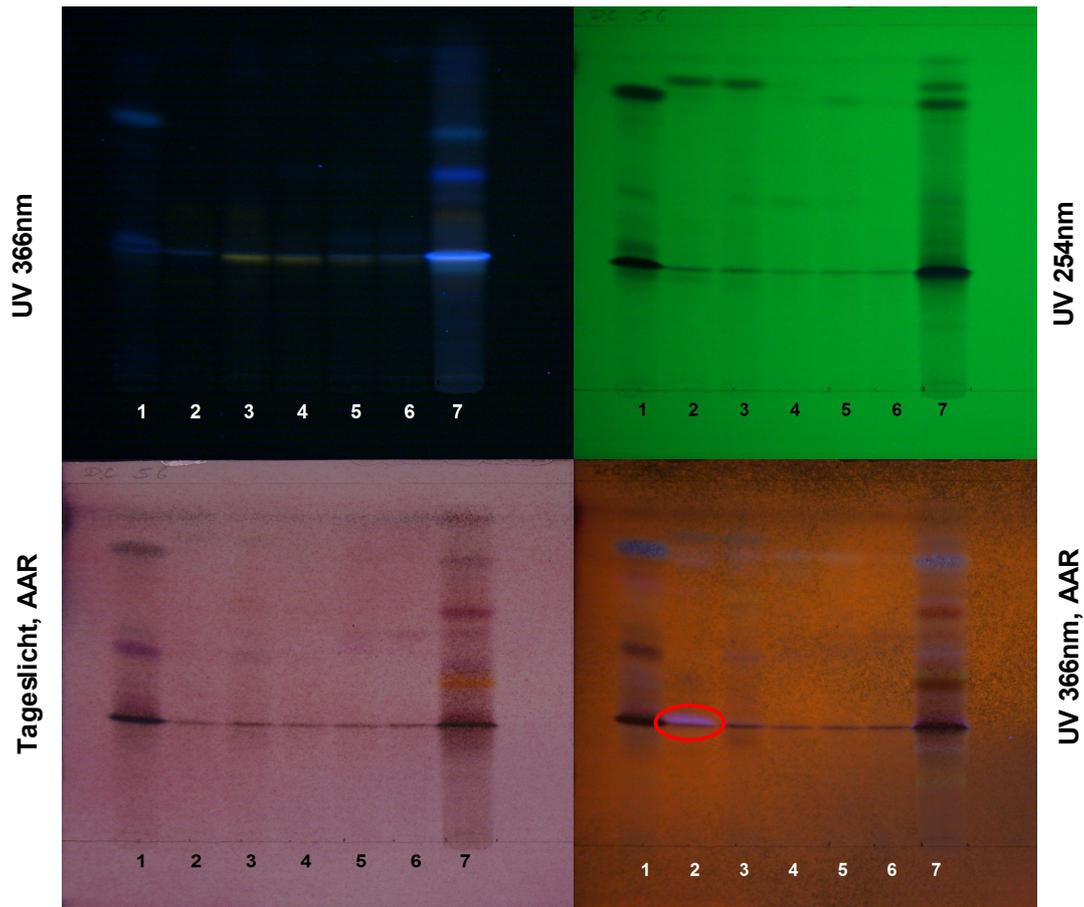
### **3.2.3 Analyse der 80%MeOH-Fractionen**

Die 80%MeOH Fractionen waren in ihrer Gesamtheit jene mit der größten Ausbeute. Hier fanden sich auch die meisten interessanten Substanzen. Um den Vergleich mit den Fractionen der anderen MeOH-Prozentigkeiten zu verdeutlichen, ist in Abbildung 28 eine DC der 80%MeOH-Fractionen im Vergleich zur Gesamtfraction EP2C 1 dargestellt.

Interessant war, dass es in Fraction 80/2 (Bahn 2) eine Substanz gab, die erst nach Besprühen mit Anisaldehydreagens eine blau-violette Fluoreszenz unter UV-Licht 366nm ausbildet. In Abbildung 28 ist die Zone rot umrandet. Diese Bande lag bei einem  $R_f$ -Wert von 0.35 und war vor dem Besprühen mit Anisaldehydreagens unter UV-Licht 366nm nicht zu sehen gewesen. Unter Tageslicht hatte diese Bande nach Besprühen eine leichte Orangefärbung, die jedoch wegen ihrer geringen Intensität auf Abbildung 28 nicht erkennbar war und nur auf der Originalplatte zu sehen war.

Dieses Phänomen war bereits einmal im Zuge der semi-präparativen Isolierungen aus EP2C 1 aufgetreten (siehe Kapitel 3.2). Dort war dieses Charakteristikum bei der Substanz von Peak 7 (s. Abb. 16, S. 40) zu beobachten gewesen.

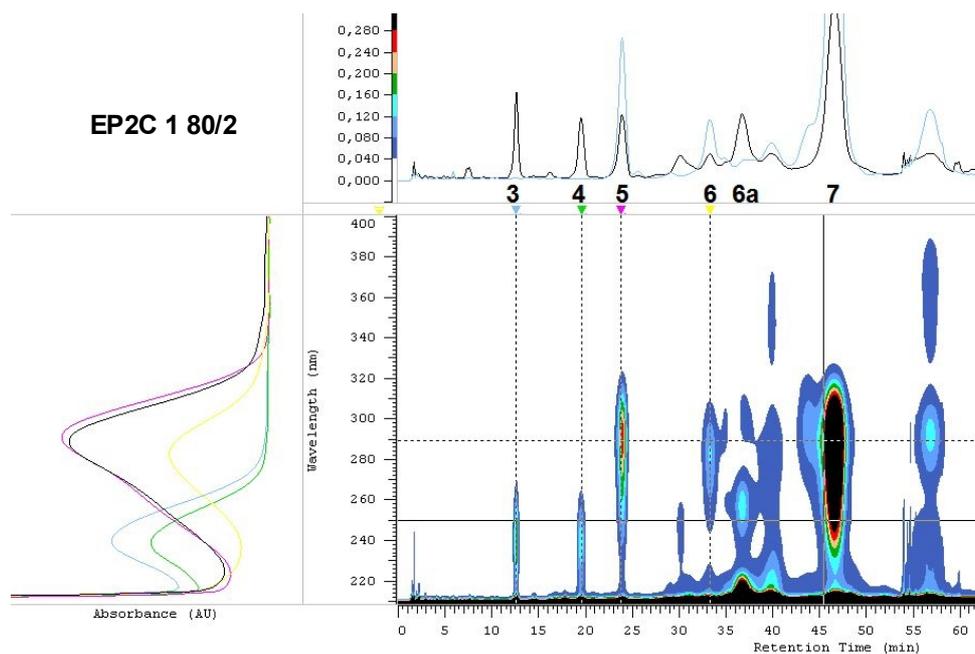
Dass hier nun das gleiche Farbverhalten wieder auftrat, ließ darauf schließen, dass sich die Substanz von Peak 7 besonders in Fraction 80/2 angereichert hat. Diese Vermutung konnte durch das HPLC-Chromatogramm (Abbildung 29, S. 57) bestätigt werden.



**Abbildung 28:** Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der 80%MeOH-Fractionen nach SPE (s. Abb. 19, S. 46 und Tab. 7, S. 24) von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16)

Bahn	Probe (Details s. Abb.19, S. 46)
1	EP2C 1 <b>80/1</b>
2	EP2C 1 <b>80/2</b>
3	EP2C 1 <b>80/3</b>
4	EP2C 1 <b>80/4</b>
5	EP2C 1 <b>80/5</b>
6	EP2C 1 <b>80/6</b>
7	EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16)

In diesem HPLC-Chromatogramm, das nach HPLC-System 7 (s. Tab. 6, S. 22) entwickelt wurde, stellte Peak 7 den höchsten dar. Dieser Peak war in keiner anderen der 80%MeOH-Fractionen derartig stark angereichert. Im HPLC-Chromatogramm der Fraktion 80/3 war er kaum noch zu sehen.



**Abbildung 29:** Analyse mittels HPLC von EP2C 1 80/2 (s. Abb. 19, S. 46) nach HPLC-System 7 (s. Tab. 6, S. 22)

In dem Chromatogramm war außerdem zu sehen, dass Peak 6, der in vorhergehenden semi-präparativen Isolierungen (s. Kapitel 3.2) als ein einzelner, reiner Peak angenommen wurde, durch den flacheren Gradienten der verwendete HPLC-Methode 7 von den ihn umgebenden Peaks noch weiter getrennt werden konnte. Somit stand fest, dass es sich bei der Substanz von Peak 6 nicht um eine Reinsubstanz handelte. Von diesen umgebenden Peaks konnte noch eine weitere Substanz semi-präparativ isoliert werden: 6a

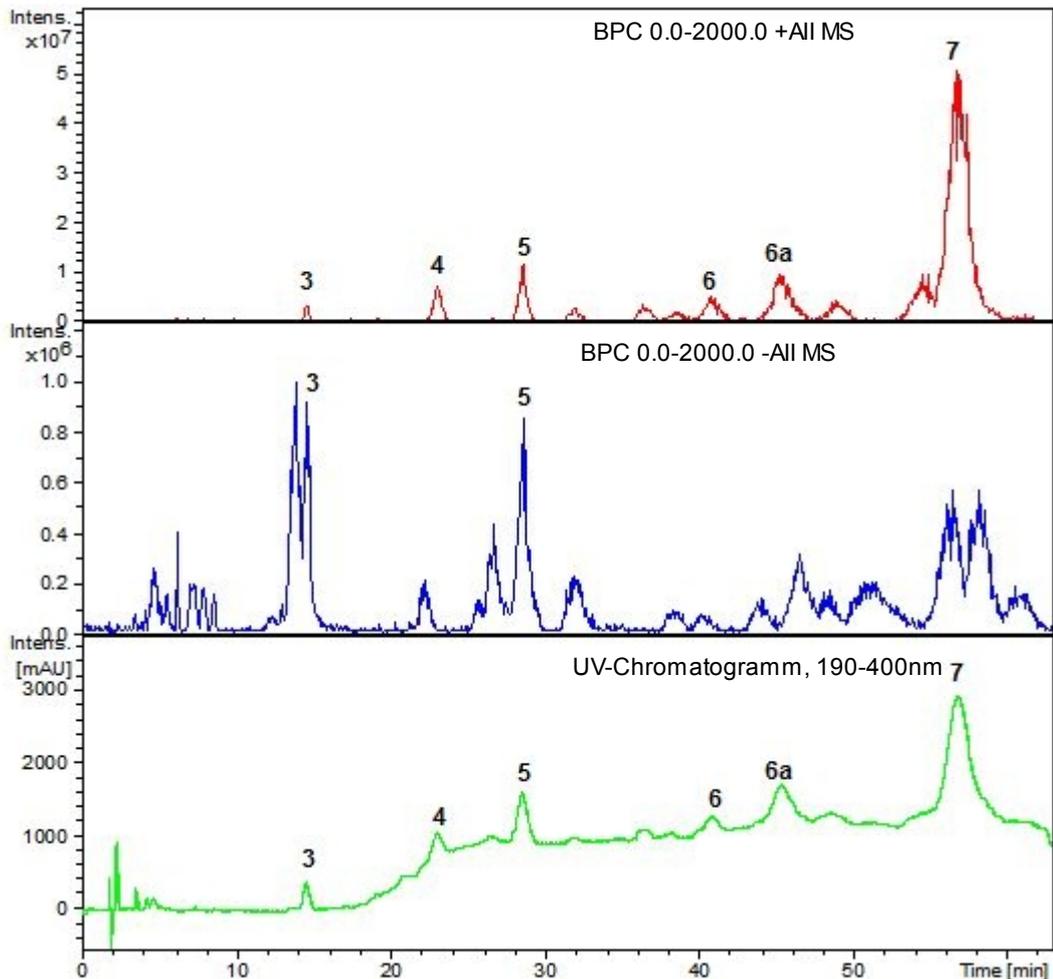
Aus der Fraktion EP2C 1 80/2 konnten 1.32mg AS6a und 2.2mg AS7 isoliert werden. Sie wurden zur Vermessung einer NMR nach Graz geschickt.

Des weiteren wurde mit dem Rest dieser Fraktion eine LC/MS-Messung durchgeführt.

### 3.2.3.1 LC/MS-Analyse

Zur Strukturcharakterisierung oben nummerierter Substanzen wurde eine UHPLC durchgeführt, die on-line an ein Massenspektrometer gekoppelt war. Es wurde LC/MS-System 3 verwendet (s. Tab. 8, S. 25). Die von den semi-präparativen Isolierungen zurückbehaltene Fraktion wurde in MeOH gelöst,

mittels UHPLC getrennt und in dem Massenspektrometer analysiert. Die entstandenen Spektren sind Abbildung 30 zu sehen. Die Nummerierung der folgenden Spektren entspricht jener, die bereits oben verwendet wurde (s. Abb. 29, S. 57).

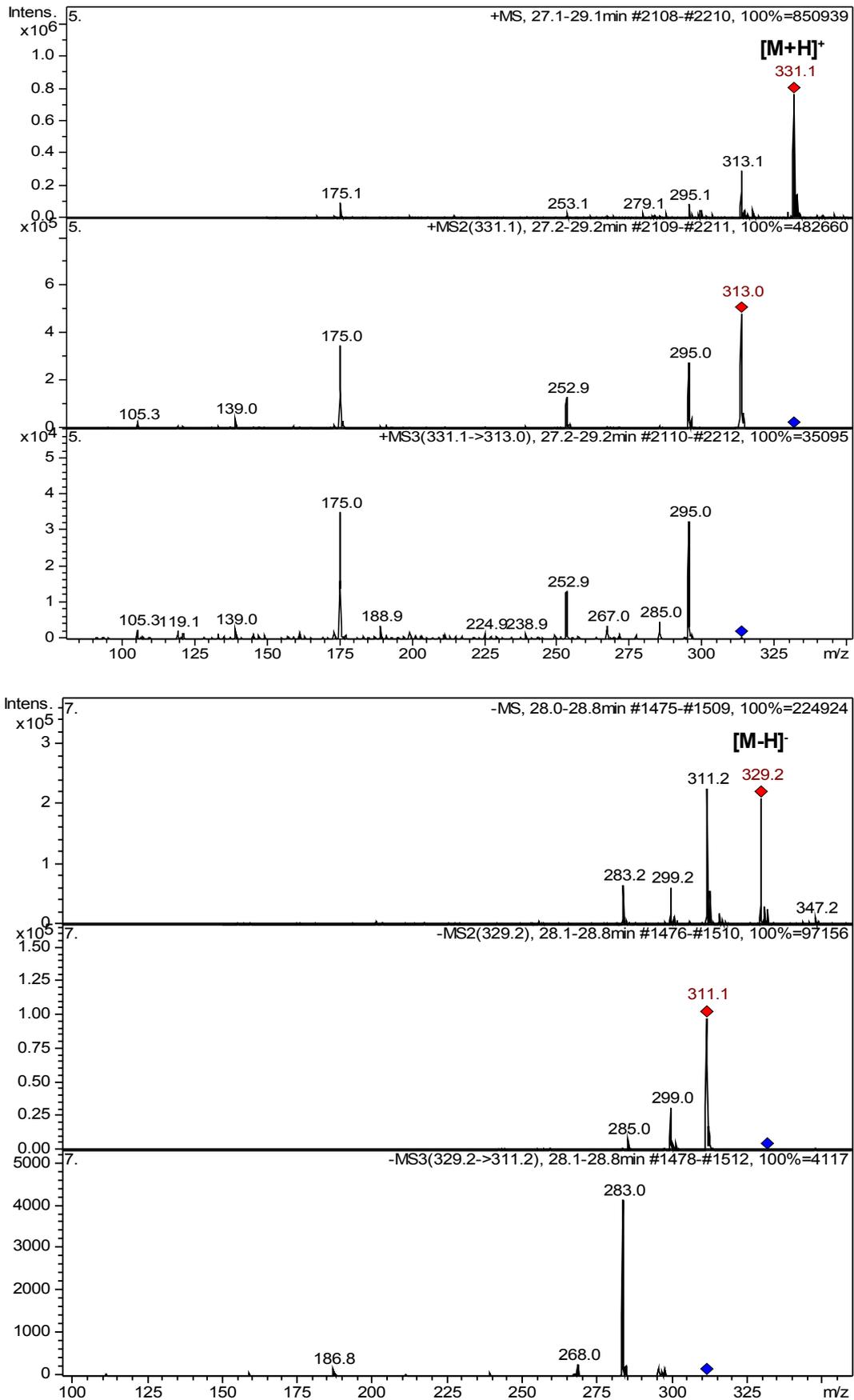


**Abbildung 30:** LC-DAD-MS<sup>n</sup> Analyse von EP2C 1 80/2 (s. Abb. 19, S. 46) mittels LC/MS-System 3 (s. Tab 8, S. 25)

Die Ergebnisse der MS<sup>n</sup>-Analysen sind in Tabelle 10, S. 60 aufgelistet. Die dazugehörigen Spektren befinden sich im Anhang.

Nach Literaturrecherche fand sich das Fragmentierungsmuster von Substanz 5 in einer Studie zur Identifizierung der chinesischen Droge Langdu, die auch *Euphorbia fischeriana* enthält, wieder.<sup>13</sup> Die Spektren des positiven und des negativen Modus finden sich in Abbildung 31.

### 3 Experimenteller Teil



**Abbildung 31:** Analyse von Substanz 5 (s. Abb. 30, S. 58) mittels ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus

In benannter Studie wurde diese Substanz als Fischeriana A bezeichnet. Es handelte sich dabei um ein Diterpenoid. Die Struktur ist in Abbildung 32 zu sehen. Das Molekulargewicht betrug 330.

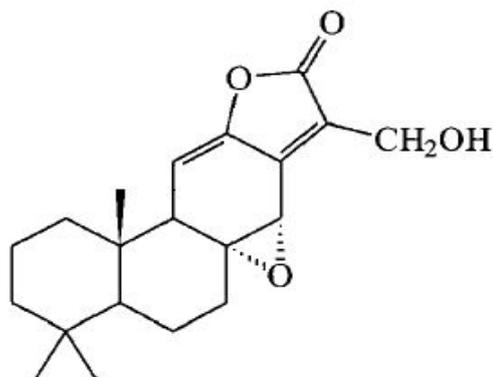


Abbildung 32: Struktur von Fischeriana A <sup>13</sup>

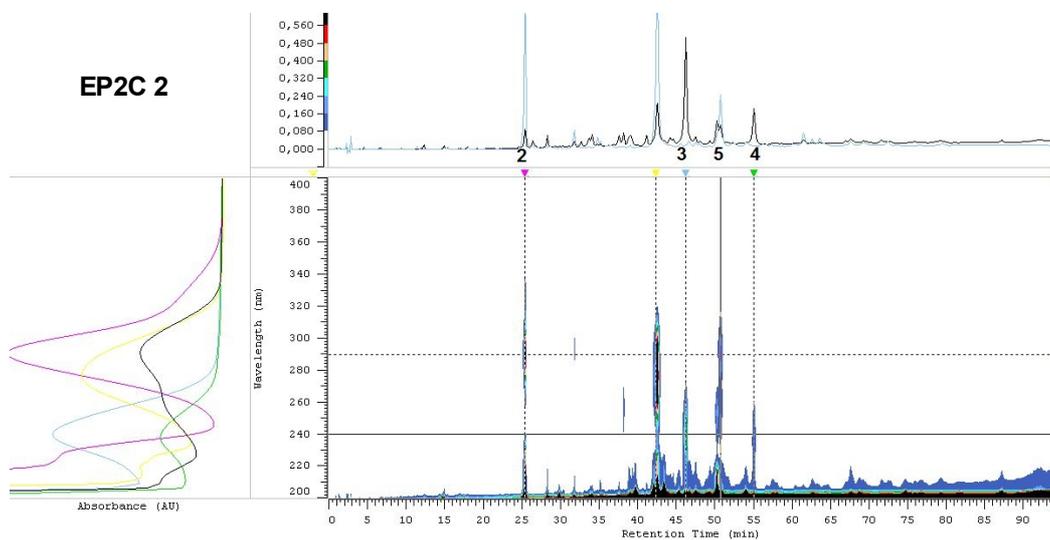
Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Substanz 5 mit großer Wahrscheinlichkeit um das Diterpenoid Fischeriana A <sup>13</sup> handelte.

Nr.	Rt [min.]	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	Struktur	Kommentare und Informationen
3	14.4	347.1	345.2	unbekannt	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ fortlaufende Abspaltung von zwei CO<sub>2</sub> in -MS<sup>n</sup> (n=2-3)</li> <li>◆ fortlaufende Abspaltung von H<sub>2</sub>O und CO in +MS<sup>n</sup> (n=2-3)</li> </ul>
4	22.9	331.1	n.d.	unbekannt	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ fortlaufende Abspaltung von CO und H<sub>2</sub>O</li> <li>◆ prägnante Fragmentationen bei m/z 165 und m/z 137 in +MS<sup>2</sup></li> </ul>
5	28.4	331.1	329.2	ent-Abietan	Annähernd gleiches Fragmentierungsmuster, wie Fischeriana A (s. Text)
6	40.7	317.1	315.3	ent-Abietan	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ fortlaufende Abspaltung von H<sub>2</sub>O und CO</li> <li>◆ Bildung von Fragmentation bei m/z 175 in +MS<sup>2</sup></li> </ul>
6a	45.2	301.1	n.d.	unbekannt	
7	56.6	315.1	n.d.	ent-Abietan	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ fortlaufende Abspaltung von H<sub>2</sub>O und CO in +MS<sup>n</sup> (n=2-3)</li> <li>◆ Bildung von Fragmentation bei m/z 175 in +MS<sup>3</sup></li> </ul>

Tabelle 10: Zusammenfassung der Analyse mittels ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) von EP2C 1 80/2 (s. Abb. 19, S. 46)

### 3.3 Festphasenextraktion von EP2C 2

Da nicht von allen gekennzeichneten Peaks (s. Abb. 16, S. 40) aus Fraktion EP2C 1 genügend Substanz isoliert werden konnte, um sie einer NMR-Analyse zu unterziehen, wurden eben diese Substanzen auch noch in EP2C 2 (s. Tab. 3, S. 16) gesucht. Das HPLC-Chromatogramm von EP2C 2 zeigte manche dieser Substanzen auf. Die Zuordnung der Peaks des in Abbildung 33 abgebildeten Chromatogramms erfolgte durch Vergleiche mit EP2C 1. (s. Abb. 16, S. 40)



**Abbildung 33:** Analyse mittels HPLC von EP2C 2 (S. Tab. 3, S. 16) nach HPLC-System 1 (s. Tab. 6, S.22)

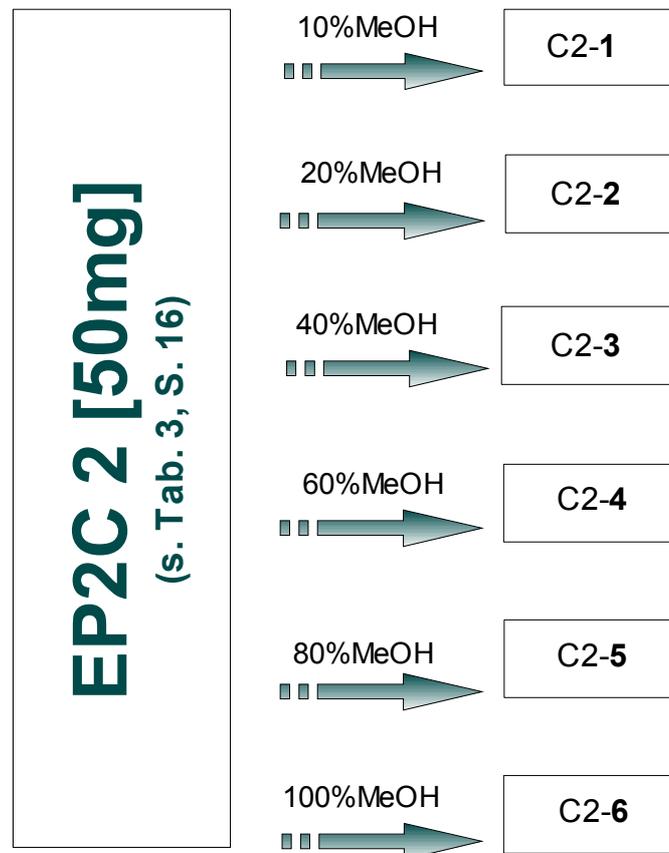
Es wurden Retentionszeiten und UV-Kurven zur Identifizierung herangezogen. Bei diesen Vergleichen stellte sich heraus, dass die Substanzen 2, 3, 4 und 5 in EP2C 2 enthalten waren. Des Weiteren waren auch andere Substanzen enthalten, die bis jetzt noch nicht vorgekommen sind und in Folge dessen nicht zugeordnet werden konnten.

Zur Isolierung dieser Substanzen wurde eine Festphasenextraktion nach System 2 (s. Tab. 7, S. 24) durchgeführt. Dadurch sollte eine weitere Aufreinigung stattfinden.

Das System für diese SPE wurde im Gegensatz zur Kartuschenfraktionierung

von EP2C 1 in weniger Fraktionen unterteilt, da von EP2C 2 weniger Ausgangssubstanz vorhanden war. 20mg EP2C 2 wurden in 50µl MeOH gelöst und auf die Kartusche aufgetragen.

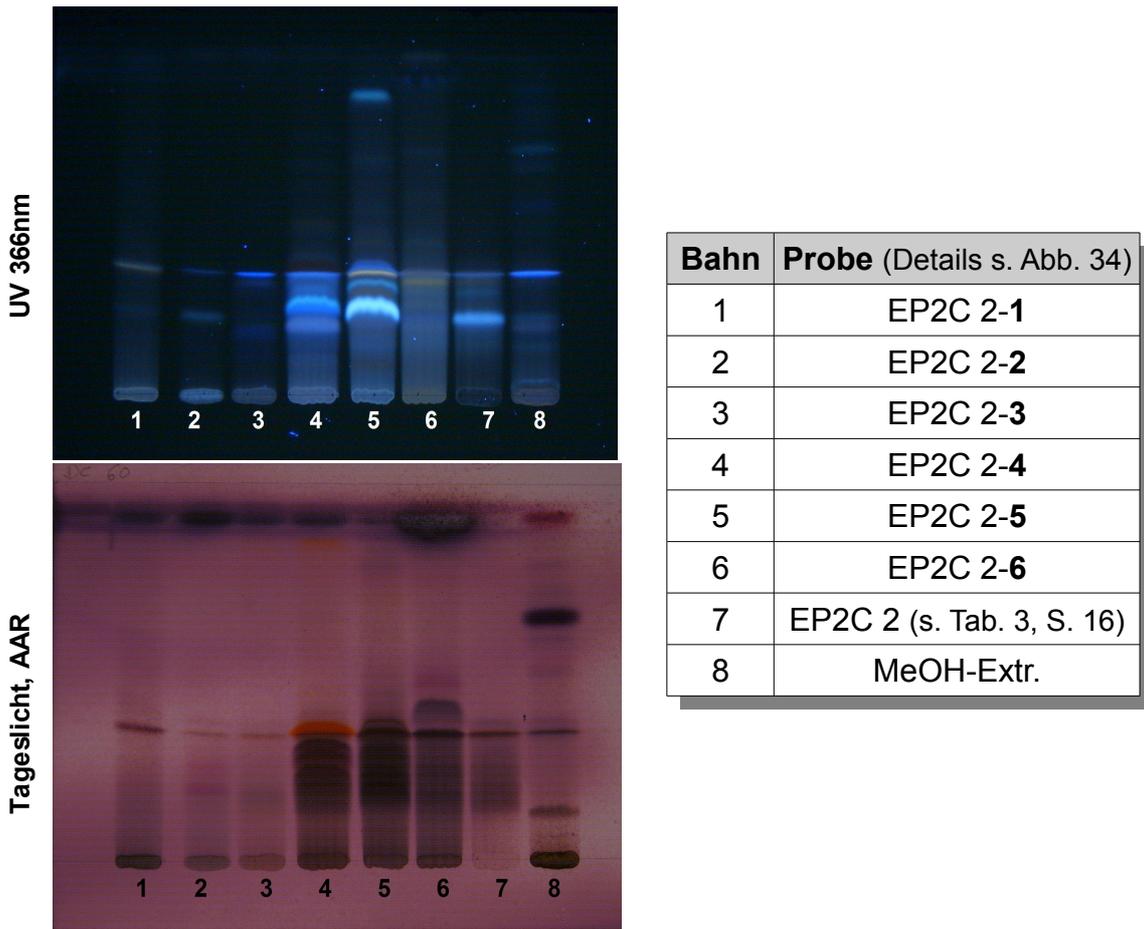
Der Gehalt an MeOH des Elutionsmittels wurde in fünf Schritten von 10% bis 100% gesteigert. Pro Polaritätsstufe wurden drei Raumvolumina eluiert und in einem Behältnis gesammelt. Ein Schema der Fraktionierung von EP2C 2 ist in Abbildung 34 zu sehen.



**Abbildung 34:** Schema der SPE (s. Tab. 7, S. 24) von EP2C 2 (s. Tab. 3, S.16)

Es resultierten sechs Fraktionen zu jeweils 60ml, die mit C2-1 bis C2-6 bezeichnet wurden.

Die erhaltenen Fraktionen wurden mit EP2C 2 und dem methanolischen Gesamtextrakt dünnschichtchromatographisch (s. Tab 4, S. 18) verglichen. Die Dünnschichtplatte ist in Abbildung 35 zu sehen.



**Abbildung 35:** Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der Fraktionen C2-1 bis C2-6 nach SPE (s. Tab. 7, S. 24) von EP2C 2 (s. Tab. 3, S. 16)

Gut zu erkennen war, dass in den verschiedenen Fraktionen diverse Anreicherungen stattgefunden haben: So war zum Beispiel die stark orangegefärbte Bande der unteren Platte auf Bahn vier bei einem R<sub>f</sub>-Wert von 0.35 in der Gesamtfraktion EP2C 2 kaum zu sehen.

Zwischen den DC-Platten der Fraktionen aus EP2C1 (s. Kapitel 3.2) und dieser DC waren keine sichtbaren Gemeinsamkeiten zu finden, da sich hier viele Banden zum Teil stark überlagerten. Ein HPLC-Screening der Fraktionen aus EP2C 2 sollte Aufschluss über die enthaltenen Substanzen geben und zeigen, ob die gewünschte Reinigung stattgefunden hat.

Die HPLC-Chromatogramme zeigten zwar in den Fraktionen EP2C 2-4 und EP2C 2-5 einige Peaks gut getrennt, jedoch konnte aufgrund der geringen Intensität der Peaks keine aussagekräftige UV-Kurve gezeigt werden. Die

Eigenabsorption der mobile Phase störte zu stark, eine Identifizierung konnte nicht erfolgen. Demnach konnten auch keine semi-präparativen Isolierungen vorgenommen werden.

## 4 DISKUSSION ZUR STRUKTUR VON AB2

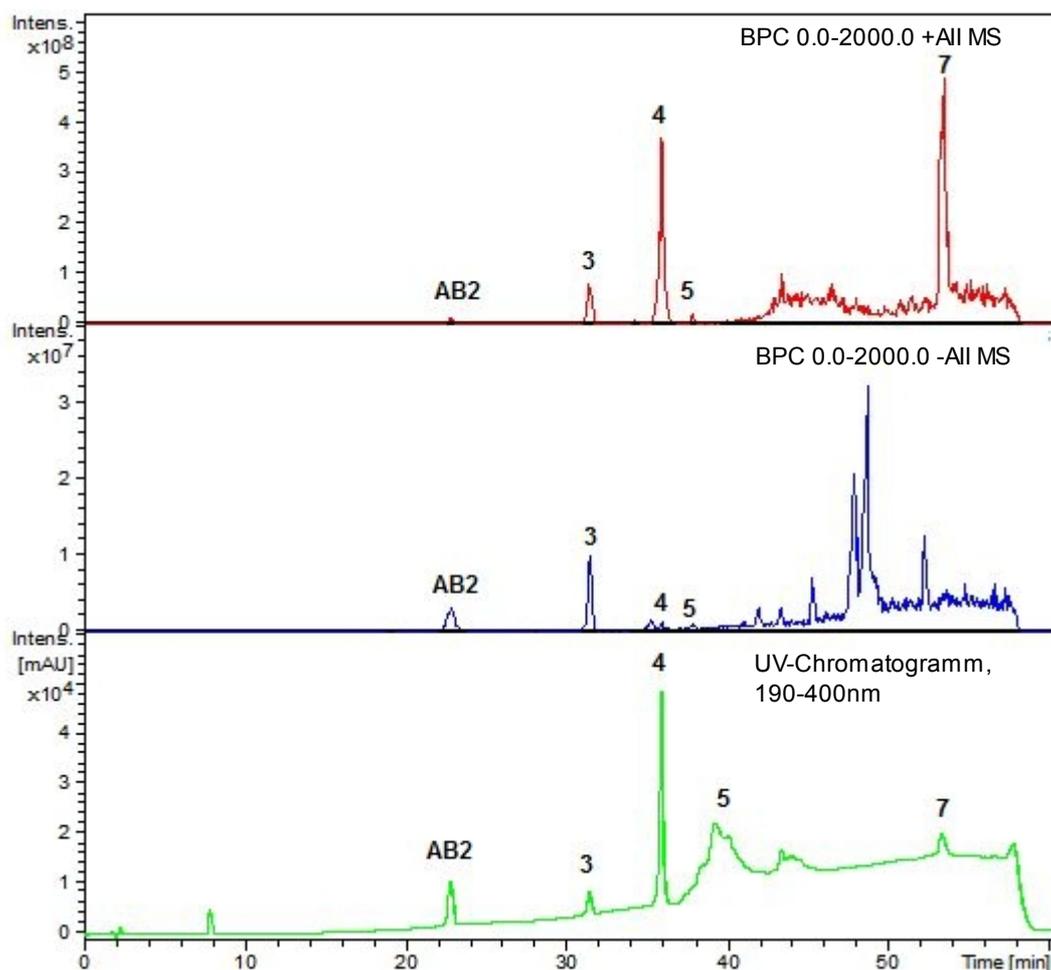
In Kapitel 3.1.1 wurde beschrieben, wie AB2 isoliert wurde. Es kam in Niederschlägen von Fraktion EP2C 1 und Fraktion EP2C 3 (s. Tab. 3, S. 16) vor. Es konnten 3.11mg dieser Substanz gewonnen werden. Um näheren Aufschluss über die Struktur zu erhalten, wurden eine MS, ein NMR und ein IR vermessen. Die Parameter der jeweiligen Methoden sind Kapitel 2.2 zu entnehmen.

Die entsprechenden Spektren und Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargelegt.

### 4.1 Analyse mittels MS

Für die massenspektrometischen Untersuchungen von AB2 wurde der Niederschlag der Fraktion EP2C 1 in einer 1:1-Mischung von MeOH und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Einwirkung von Wärme und Ultraschall gelöst und in das UHPLC-Gerät eingespritzt, das on-line an ein Massenspektrum gekoppelt war (s. Kap. 2.2.5). Es wurde LC/MS-Methode 1 (s. Tab 8, S. 25) verwendet.

In Abbildung 36 sind die LC-DAD-MS<sup>n</sup> (n=1-3) Spektren von AB2 dargestellt. Neben AB2 waren noch andere, bereits in vorigen Kapiteln (s. Kap. 3.2.3) erwähnte Substanzen enthalten, die in dieser Abbildung auch beschriftet wurden, jedoch nicht näher diskutiert, da dies schon zu einem früheren Zeitpunkt geschehen ist.



**Abbildung 36:** LC-DAD-MS<sup>n</sup> Analyse des Niederschlags von EP2C 1 (s. Tab 3, S. 16) mittels LC/MS-System 1 (s. Tab 8, S. 25)

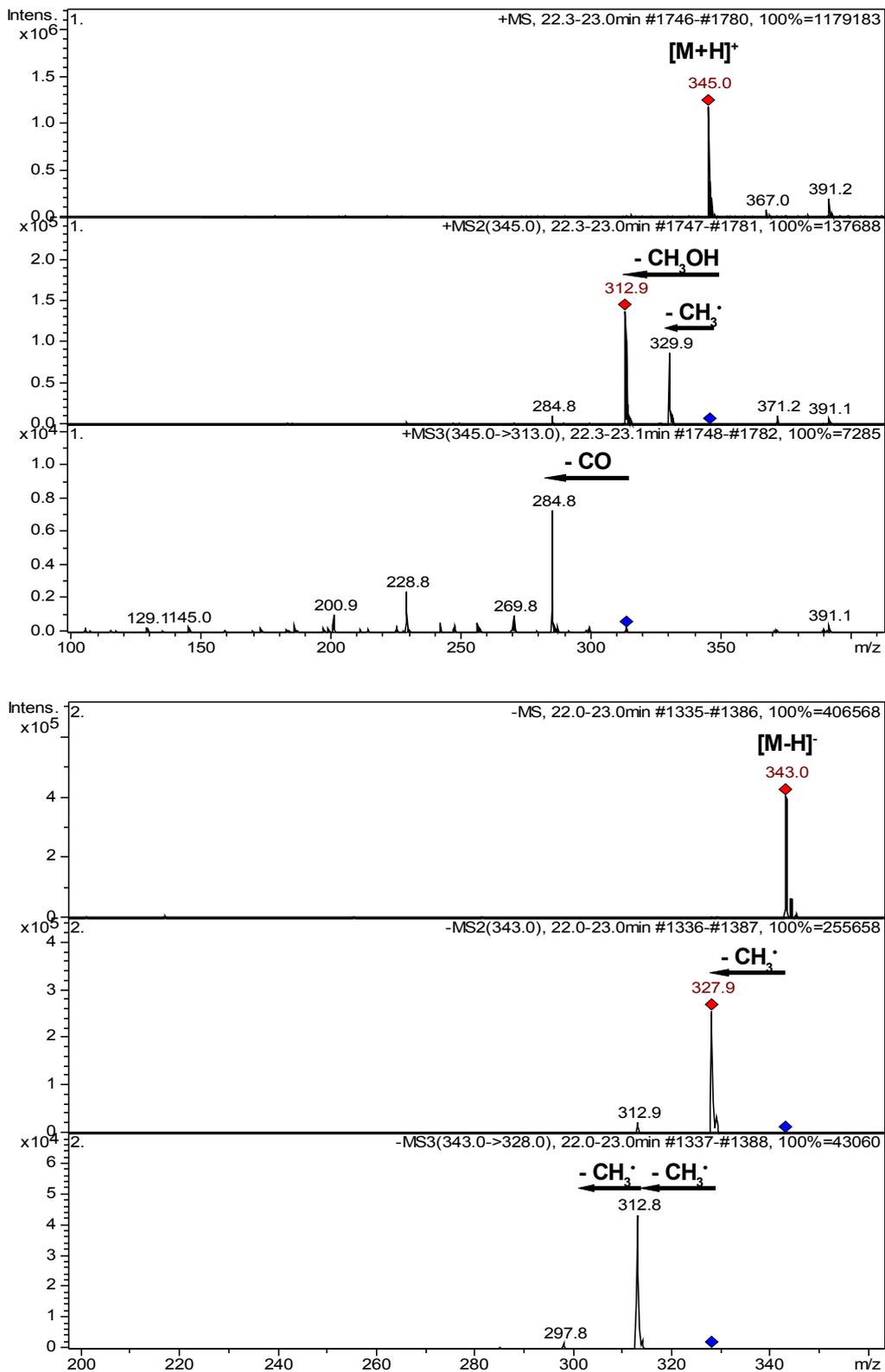
Zur Charakterisierung von AB2 wurden die MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Spektren im positiven und negativen Modus herangezogen, die in Abbildung 37 zu sehen sind.

Durch die Molekülionenpeaks im positiven und negativen Modus konnte das Molekulargewicht von AB2 ermittelt werden, das 344 betrug.

Des weiteren konnten einige abgespaltenen Fragmente festgestellt werden. In Abbildung 37 sind diese Abspaltung eingetragen. Es kam der Verdacht auf, es könnte sich bei dieser Verbindung um ein trimethoxyliertes Flavonoid handeln.

Nach intensiver Literaturrecherche konnte das auf diesem Wege nicht bestätigt werden. Weitere Nachforschungen dazu sind noch vonnöten.

#### 4 Diskussion zur Struktur von AB2



**Abbildung 37:** Analyse der Substanz AB2 (s. Abb. 36) mittels ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus

## 4.2 Analyse mittels NMR

Die NMR wurde in Graz, am Institut für Pharmazeutische Chemie, durchgeführt. Die entstandenen Spektren sind in Abbildung 38 dargestellt.

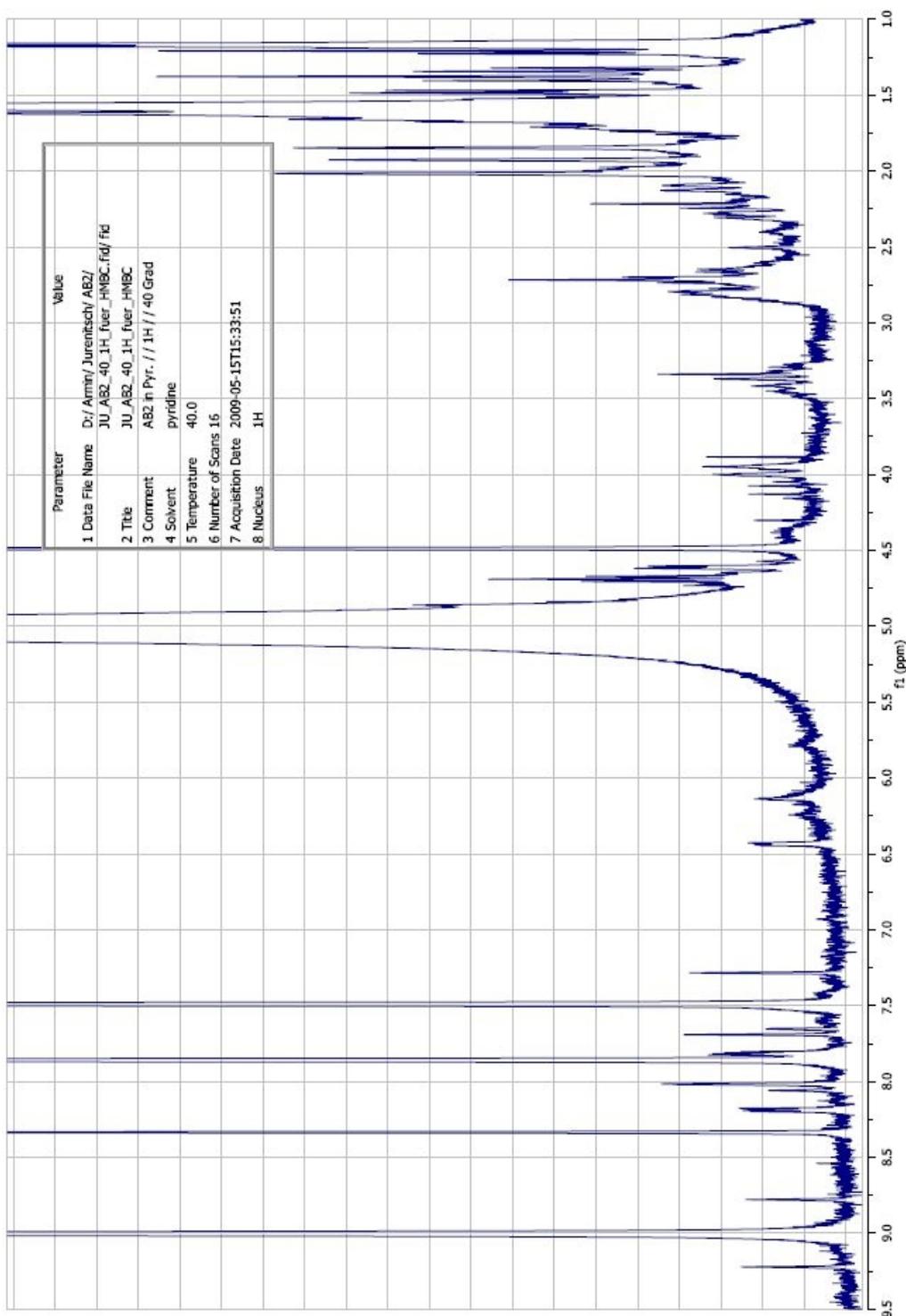
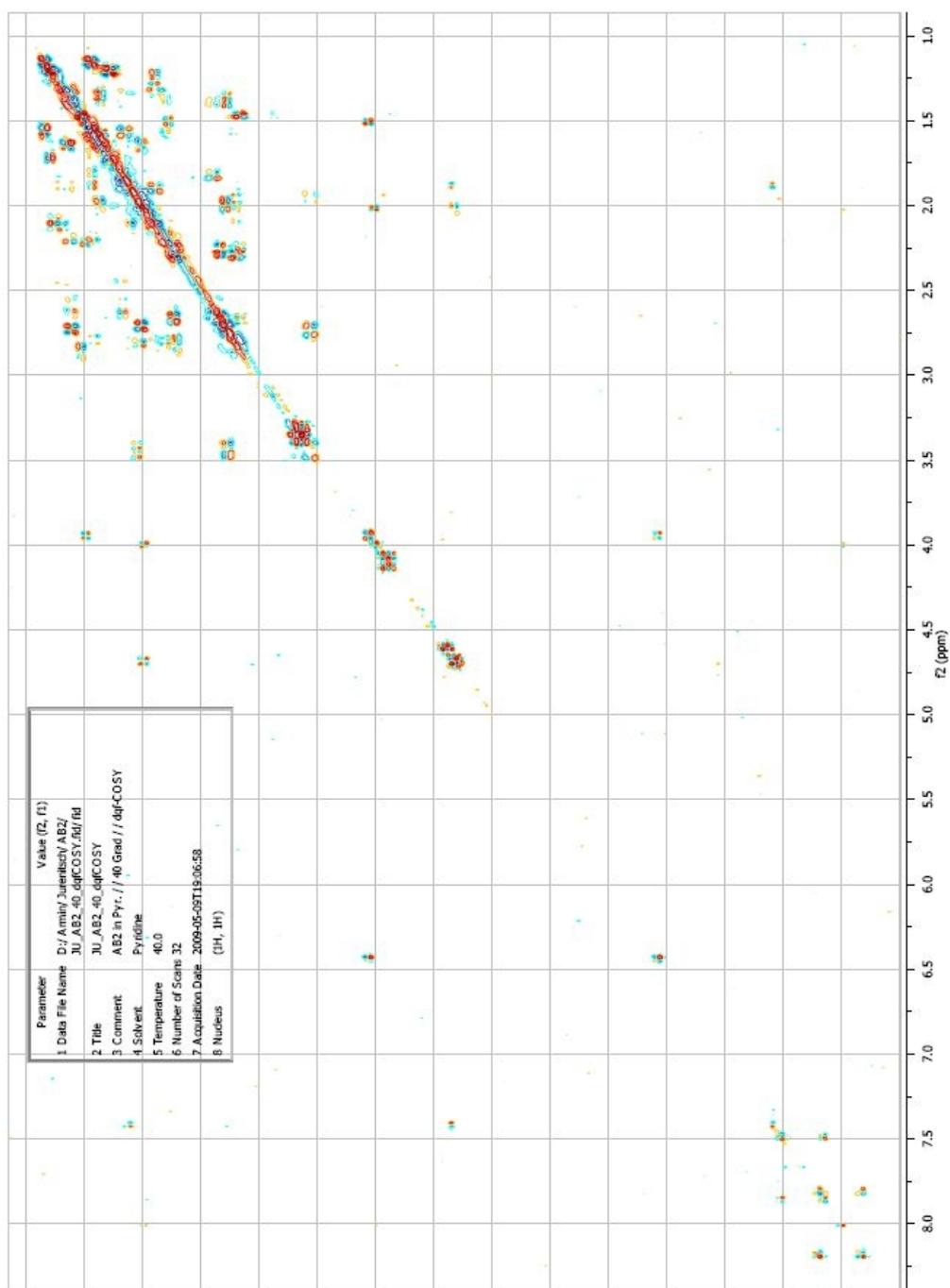


Abbildung 38: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von AB2 (allgemeine Parameter s. S. 27)



**Fortsetzung Abb. 38:** H,H-COSY-NMR-Spektrum von AB2 (allgemeine Parameter s. S. 27)

Die großen Peaks des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums bei 9.0ppm, 8.25ppm, 7.75ppm und 7.5ppm stammen von dem Lösungsmittel Pyridin und wurden in die Auswertung nicht miteinbezogen. Ebenso verhielt es sich mit dem Peak, der sich von 4.75ppm bis 5.5ppm erstreckte und Wasser zugeordnet wurde.

Anhand des COSY-Spektrums konnte das Kopplungsverhalten der Peaks im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ermittelt werden. Eine Auflistung der Kopplungen findet sich in Tabelle 11.

Peak bei	Kopplung mit Peak bei
8.23ppm	7.85ppm
8.00ppm	2.00ppm
6.43ppm	3.87ppm
4.71ppm	2.18ppm
4.69ppm	1.94ppm
3.92ppm	1.66ppm
3.81ppm	1.51ppm
3.54ppm	2.00ppm
3.42ppm	2.75ppm, 2.14ppm
2.87ppm	1.96ppm, 1.53ppm
2.75ppm	1.43ppm
2.76ppm	2.18ppm
2.60ppm	2.27ppm
2.61ppm	1.83ppm, 1.36ppm
2.2ppm	1.5ppm, 1.36ppm
2.14ppm	1.19ppm
1.97ppm	1.58ppm
1.88ppm	1.52ppm
1.72ppm	1.34ppm
1.63ppm	1.85ppm
1.55ppm	1.13ppm

**Tabelle 11:** Chemische Verschiebungen der miteinander koppelnden Wasserstoffe

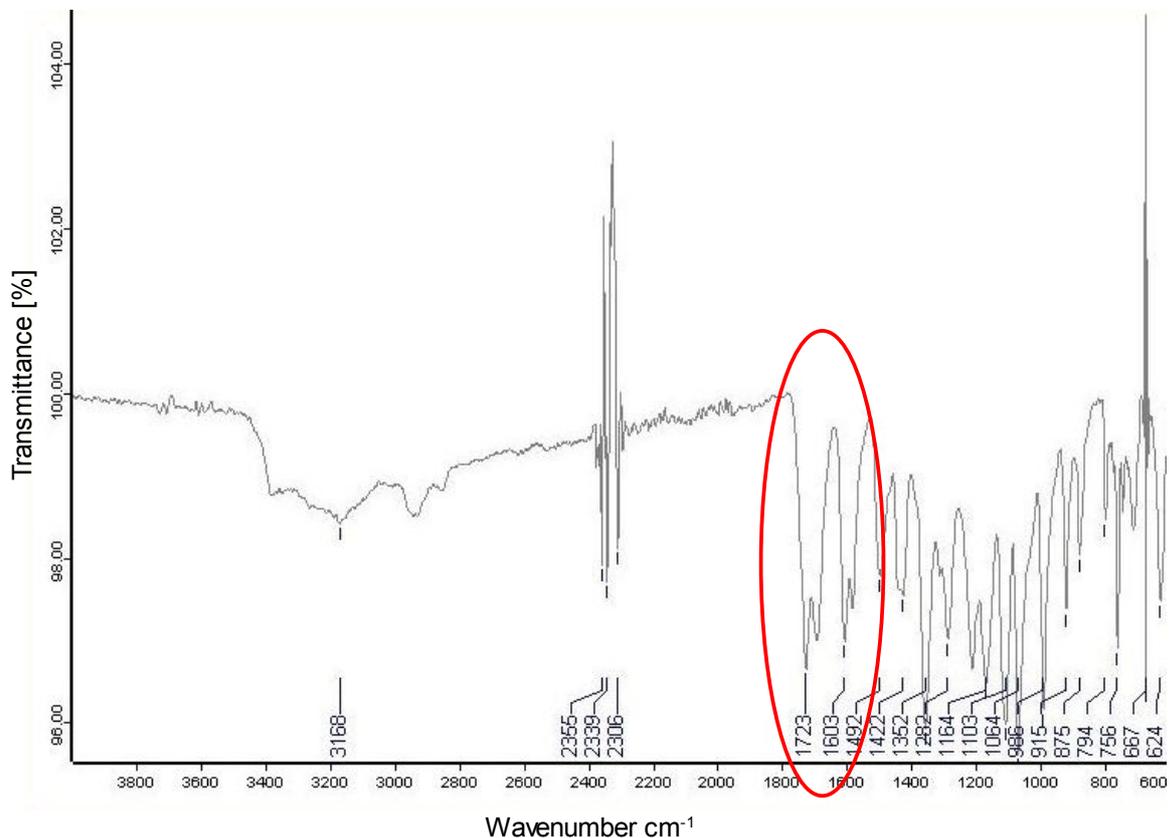
Da das Spektrum von 1.0 bis 5.0ppm relativ stark überlagert war, konnte in diesem Bereich des Spektrums keine eindeutige Zuweisung der Peaks erfolgen. Im Abschnitt über 6.0ppm war dies leichter möglich, da hier weniger Überlagerungen statt gefunden hatten.

### 4.3 Analyse mittels IR

Da das Messfenster der IR mittels ATR relativ klein war (s. Kap. 2.2.7, S. 27) wurde nur sehr wenig der Substanz zur Vermessung gebraucht.

Erst wurde eine Hintergrundmessung durchgeführt, um die Eigenabsorptionen des Materials des Messfensters aus der Messung auszuschließen. Ein Kristall der Substanz AB2 wurde in fester Form auf das Messfenster aufgebracht, durch eine Vorrichtung in der Messeinheit auf das Diamantfenster gepresst und vermessen.

Das entstandene Spektrum ist in Abbildung 39 zu sehen.



**Abbildung 39:** Analyse von AB2 mittels IR (s. Tab. 9, S. 27)

Von 4000 bis 1500cm<sup>-1</sup> lag jener Bereich, der für die Auswertung des Spektrums relevant war und Valenzschwingungen funktioneller Gruppen erkennen ließ. Ab der Wellenzahl 1500cm<sup>-1</sup> abwärts lag der Fingerprint-Bereich.

Dieser ist für jede Substanz spezifisch, jedoch nicht interpretierbar.

Die Banden zwischen  $1603$  und  $1723\text{cm}^{-1}$  mit relativ starker Absorption (in Abbildung 39 rot markiert) ließen auf das Vorhandensein von C=O-Doppelbindungen schließen. Die Anwesenheit eines Heteroatoms z.B. in Form eines Säurechlorids, war eher unwahrscheinlich, da in diesem Fall die Banden bei etwas höheren Wellenzahlen liegen mussten.

Es war aber durchaus möglich, dass eine der C=O-Doppelbindungen z.B. als Aryl-Keton oder  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Keton vorgelegen ist. Auch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken war durchaus möglich.

Die Banden bei  $2300\text{cm}^{-1}$  könnten von einer Nitril-oder Alkin-Gruppierung stammen. Die Absorption war jedoch relativ gering und die Banden unregelmäßig, sodass dies nicht hinreichend belegt werden konnte.

Die leichte Absorptionsbande bei  $3168\text{cm}^{-1}$  war vermutlich auf eine C-H-Valenzschwingung zurückzuführen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel vorliegender Arbeit war es, Inhaltsstoffe eines  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktes der mongolischen Arzneipflanze *Euphorbia pallasii* zu isolieren und einen Beitrag zur Aufklärung der Struktur von enthaltenen Wirkstoffen zu leisten. Das war vor allem deswegen von Interesse, da sich Extrakte dieser Pflanze in früheren Untersuchungen als zytotoxisch erwiesen hatten.

Zur Isolierung von ausgesuchten Inhaltsstoffen wurden eine Reihe von Fraktionierungen vorgenommen, die zumeist in semi-präparativen Arbeiten mittels HPLC mündeten und den Großteil der praktischen Arbeiten ausmachten. Insgesamt konnten fünf verschiedene Komponenten gewonnen werden. Dabei handelte es sich um AB2 (3.11mg), AS3 (1.74mg), AS4 (2.83mg), AS6a (1.32mg) und AS7 (2.2mg).

Auf AB2 wurde hinsichtlich Strukturaufklärung besonderes Augenmerk gelegt, da die Isolierung hier mittels Fällung erfolgen konnte und somit die größte Menge an Material vorhanden war. Die Untersuchungen resultierten in der Vermutung, es könnte sich um ein Dihydroxy-Trimethoxy-Flavonoid handeln, die allerdings nicht bestätigt werden konnte, da noch weitere Messungen ausständig waren.

Von zwei weiteren Komponenten konnte zwar nicht genügend Material isoliert werden, um eine NMR durchzuführen, es konnte aber mittels der erhaltenen ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) Spektren einige Aussagen getroffen werden: Durch vergleichende Literaturrecherche konnte Substanz AS5 identifiziert werden. Es handelte sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Diterpenoid Fischerina A.

Bei einer weiteren Substanz – AS1 – könnte es sich eventuell um ein Cumarin gehandelt haben. Dieser Verdacht beruhte wiederum auf den ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) Daten und wurde jedoch noch nicht bestätigt.

Des weiteren wurden im Laufe diverser Messungen und Analysen zahlreiche Informationen betreffend Molekulargewicht, Löslichkeitsverhalten, Retentions-

verhalten, Verlauf von UV-Spektren, Farbverhalten bei Derivatisierungsreaktionen und Fluoreszenzverhalten auf der DC erhalten.

Die meisten der isolierten Substanzen konnten den benötigten Analysen nicht mehr vollständig unterzogen werden, sodass ein möglicher Ansatzpunkt zur Weiterführung der Arbeiten an dieser Pflanze in der Strukturaufklärung von eben diesen Komponenten liegen könnte.

# VERZEICHNISSE

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Einfluss verschiedener Pflanzenextrakte zweier Konzentrationen auf den Gallenfluss einer isolierten Rattenleber.....	6
<b>Abbildung 2:</b> Euphorbia pallasii Turcz. Quelle: Boldsaikhan B.: Encyclopedia of mongolian medicinal plants.....	7
<b>Abbildung 3:</b> Blüte von Euphorbia pallasii Quelle: Boldsaikhan B.:Encyclopedia of mongolian medicinal plants.....	7
<b>Abbildung 4:</b> Das rot umrandete Gebiet auf der Landkarte der Mongolei kennzeichnet den Sammelort des verwendeten Drogenmaterials.....	9
<b>Abbildung 5:</b> Unterirdische Anteile von Euphorbia pallasii Quelle: E. Ganbold .....	10
<b>Abbildung 6:</b> Schema der Auftrennung mittels Ausschüttelung des MeOH-Extraktes der unterirdischen Teile von Euphorbia pallasii.....	11
<b>Abbildung 7:</b> Ausbeuten der verschiedenen Fraktionen des MeOH- Extraktes (s. Abb. 6, S. 11).....	12
<b>Abbildung 8:</b> Analyse des MeOH-Extraktes (s. Abb. 6, S. 11, oberes Chromatogramm) und des CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extraktes (s. Abb. 6, S. 11, unteres Chromatogramm) nach HPLC-System 1 (s.Tab. 6, S. 22). Mit roten Pfeilen markiert: vier ausgewählte Peaks.....	29
<b>Abbildung 9:</b> Schema der Aufarbeitungsschritte des methanolischen Extraktes (s. Kapitel 2.1.2) von Euphorbia pallasii.....	30
<b>Abbildung 10:</b> Massenverteilung der Fraktionen der Säule EP2C.....	31
<b>Abbildung 11:</b> UV-Kurve von AB 2, aufgenommen on-line (36% ACN) während einer HPLC-Analyse nach HPLC-System 1 (s. Tab. 6, S. 22).....	33
<b>Abbildung 12:</b> Analyse der Niederschläge aus EP2C 1 (oberes Chromatogramm) und EP2C 3 (unteres Chromatogramm, s. Tab. 3, S. 16) nach HPLC-System 1 (s.Tab. 6, S. 22). .....	34
<b>Abbildung 13:</b> Analyse von AB 2 mittels HPLC-System 2 (s.Tab. 6, S. 22). ...	35

<b>Abbildung 14:</b> Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der ersten elf Fraktionen der Säule EP2C (s. Tab.3, S. 16).....	37
<b>Abbildung 15:</b> Analyse von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16) mittels HPLC-System 1 (s.Tab. 6, S. 22). .....	39
<b>Abbildung 16:</b> Analyse von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16) mittels HPLC-System 1 (oberes Chromatogramm) und HPLC- System 3 (unteres Chromatogramm) s. Tab. 6, S. 22.....	40
<b>Abbildung 17:</b> UV-Kurve von Peak 1 (oben) und Peak 2 (unten) aufgenommen on-line (43% MeOH und 49% MeOH) während einer HPLC-Analyse von EP2C 1 nach HPLC-System 4 (s. Tab. 6, S. 22).....	41
<b>Abbildung 18:</b> Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) von Peak 1-7 (s. Abb. 16, S. 40) nach semi-präparativen Isolierungen aus EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16) .....	44
<b>Abbildung 19:</b> Schema der SPE (s. Tab. 7, S. 24) von EP2C 1 (s. Tab 3, S. 16) .....	46
<b>Abbildung 20:</b> Ausbeuten nach Fraktionierung von EP2C 1 (s. Abb. 9, S. 30) mittels SPE (s. Abb. 19, S. 46) .....	47
<b>Abbildung 21:</b> Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der 40%MeOH-Fraktionen nach SPE (s. Abb. 19, S. 46 und Tab. 7, S. 24) von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16) Kennzeichnung charakteristischer Banden durch gelbe und rote Umrandungen .....	48
<b>Abbildung 22:</b> Analyse von EP2C 1 40/3 (s. Abb. 19, S. 46) mittels HPLC-System 5 (s. Tab. 6, S. 22).....	49
<b>Abbildung 23:</b> LC-DAD-MSn Analyse von EP2C 1 40/3 (s. Abb. 19, S. 46) mittels LC/MS-System 2 (s. Tab 8, S. 25).....	50
<b>Abbildung 24:</b> Analyse der Substanz 1 (s. Abb. 23) mittels ESI-MSn (n=1-2) im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus (s.Tab. 8, S. 25).....	51
<b>Abbildung 25:</b> Analyse der Substanz 8 (s. Abb. 23) mittels ESI-MSn (n=1-2) im positiven Ionenmodus.....	52
<b>Abbildung 26:</b> Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der 60%MeOH-Fraktionen nach SPE (s. Abb. 19, S. 44 und Tab. 7, S. 24) von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16) .	53
<b>Abbildung 27:</b> Analyse von EP2C 1 60/5 (s. Abb. 19, S. 46) mittels HPLC-System 6 (s. Tab. 6, S. 22).....	54

**Abbildung 28:** Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der 80%MeOH-Fractionen nach SPE (s. Abb. 19, S. 46 und Tab. 7, S. 24) von EP2C 1 (s. Tab. 3, S. 16) .56

**Abbildung 29:** Analyse mittels HPLC von EP2C 1 80/2 (s. Abb. 19, S. 46) nach HPLC-System 7 (s. Tab. 6, S. 22).....57

**Abbildung 30:** LC-DAD-MSn Analyse von EP2C 1 80/2 (s. Abb. 19, S. 46) mittels LC/MS-System 3 (s. Tab 8, S. 25).....58

**Abbildung 31:** Analyse von Substanz 5 (s. Abb. 30,S. 58) mittels ESI-MSn (n=1-3) im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus.....59

**Abbildung 32:** Struktur von Fischeriana A 13.....60

**Abbildung 33:** Analyse mittels HPLC von EP2C 2 (S. Tab. 3, S. 16) nach HPLC-System 1 (s. Tab. 6, S.22).....61

**Abbildung 34:** Schema der SPE (s. Tab. 7, S. 24) von EP2C 2 (s. Tab. 3, S.16) .....62

**Abbildung 35:** Analyse mittels DC (s. Tab. 4, S. 18) der Fraktionen C2-1 bis C2-6 nach SPE (s.Tab. 7, S. 24) von EP2C 2 (s. Tab. 3, S. 16) .....63

**Abbildung 36:** LC-DAD-MSn Analyse des Niederschlags von EP2C 1 (s. Tab 3, S. 16) mittels LC/MS-System 1 (s. Tab 8, S. 25).....66

**Abbildung 37:** Analyse der Substanz AB2 (s. Abb. 36) mittels ESI-MSn (n=1-3) im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus.....67

**Abbildung 38:** Analyse mittels NMR (s. S. 27).....68

**Abbildung 39:** Analyse mittels IR (s. Tab. 9, S. 27).....71

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Eigenschaften von <i>Euphorbia pallasii</i> in der TMM 6.....	8
<b>Tabelle 2:</b> Allgemeine Parameter der säulenchromatographischen Auftrennung von Fraktion II (s. Abb. 6, S. 11).....	14
<b>Tabelle 3:</b> Elutionsschema der säulenchromatographischen Auftrennung von Fraktion II (s. Abb.6, S.11) Allgemeine Parameter s. Tab. 2.....	16
<b>Tabelle 4:</b> Parameter der Dünnschichtchromatographie.....	18
<b>Tabelle 5:</b> Allgemeine Parameter des verwendeten HPLC-Gerätes.....	20
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht der verwendeten analytischen und semi-präparativen HPLC-Systeme.....	22
<b>Tabelle 7:</b> Allgemeine Parameter der verwendeten Festphasenextraktionen...	24
<b>Tabelle 8:</b> Parameter der verwendeten LC/MS-Systeme.....	25
<b>Tabelle 9:</b> Allgemeine Parameter der Infrarotspektroskopie.....	27
<b>Tabelle 10:</b> Zusammenfassung der Analyse mittels ESI-MS <sub>n</sub> (n=1-3) von EP2C 1 80/2 (s. Abb. 19, S. 46).....	60
<b>Tabelle 11:</b> Chemische Verschiebungen der miteinander koppelnden Wasserstoffe.....	70

## Literaturverzeichnis

- 1 Kletter Ch., Glasl S., Thalhammer T., Narantuya S.: Traditional Mongolian Medicine- A Potential for Drug Discovery, *Scientia Pharmaceutica*. 2008; 76. 49-63
- 2 Tserensodnom: Einige Quellen früher mongolische Medizin. Aus: Die Traditionelle Monolische Medizin. Übersetzung aus dem Englischen von Mund A., Schuessler, Mannheim 2005
- 3 Holec N.: Studien an der isolierten perfundierten Rattenleber und an der humanen Tumorzelllinie MCF-7, Diplomarbeit, Universität Wien 2005
- 4 Ligaa U., Davaasuren B., Ninjiil N. In: Medicinal Plants of Mongolia used in Western and Eastern Medicine. Ulaanbaatar 2006. Übersetzung aus dem Mongolischen von Odonchimeg Batsukh, Innsbruck
- 5 Fischer M. A., Adler W., Oswald K.: Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. - 2<sup>nd</sup> ed. - Land Oberösterreich, Biologiezentrum der OÖ Landesmuseen, Linz 2005
- 6 Neusch L.: Charakterisierung von phenolischen Inhaltsstoffen der mongolischen Heilpflanzen *Euphorbia pallasii* TURCZ., Diplomarbeit, Universität Wien 2007
- 7 Badгаа A.: Bericht über die Arbeiten an *Euphorbia pallasii* TURCZ., Wien 2008
- 8 Böcker J. Dünnschichtchromatographie.: Chromatographie: instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese. Vogel Buchverlag, Würzburg 1997
- 9 Wagner H., Blatt S., Zgainski E.M.: Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1983
- 10 <http://de.wikipedia.org/wiki/Festphasenextraktion> 8.2.2009
- 11 Hesse M., Meier H., Zeeh B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Thieme Verlag, Stuttgart 2005
- 12 MIRacle Accessory User Guide. PIKE Technologies, Madison 2004
- 13 Xiao-Li S, Rui-Chao L, Siu-Kay W, Shu-Ki T und Sik-Yiu K.: Identification and Characteristication of the Chinese Herb Langdu by LC-MS/MS Analysis, *Phytochemical Analysis*. 2003; 14. 40-47

---

# CURRICULUM VITAE

## Persönliche Daten:

Vorname: Anna  
Nachname: Sigmund  
Geburtsdatum: 27. April 1986  
Geburtsort: Wien  
Staatsbürgerschaft: Österreich

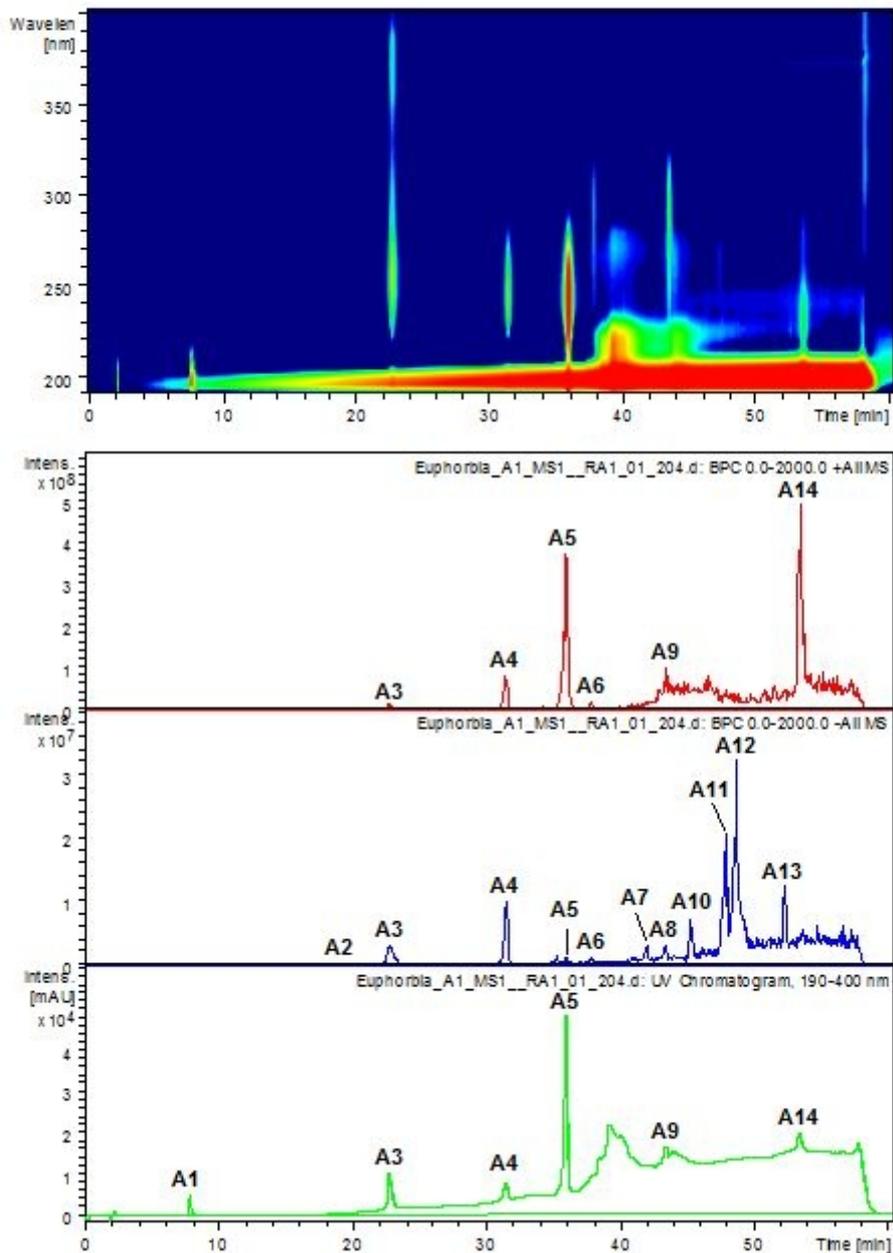


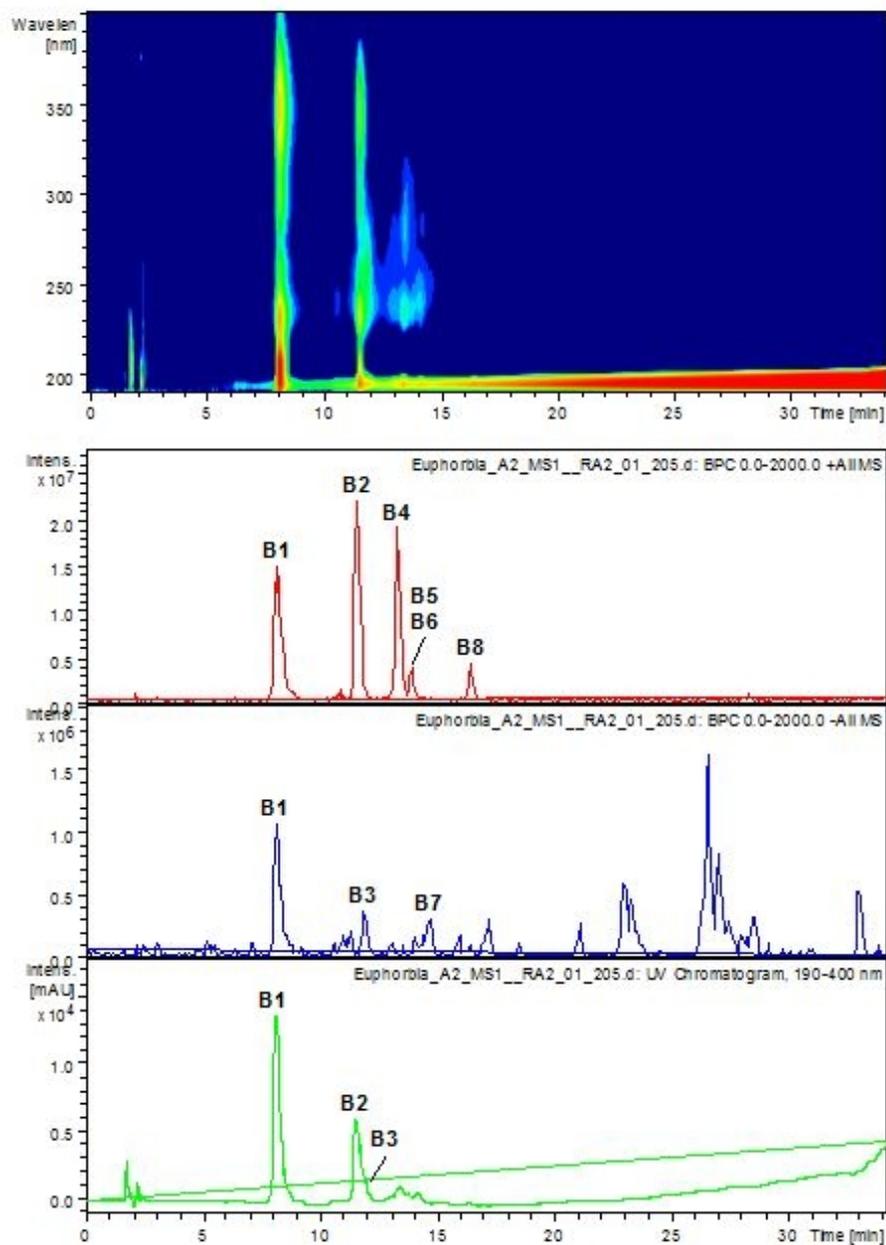
## Ausbildung:

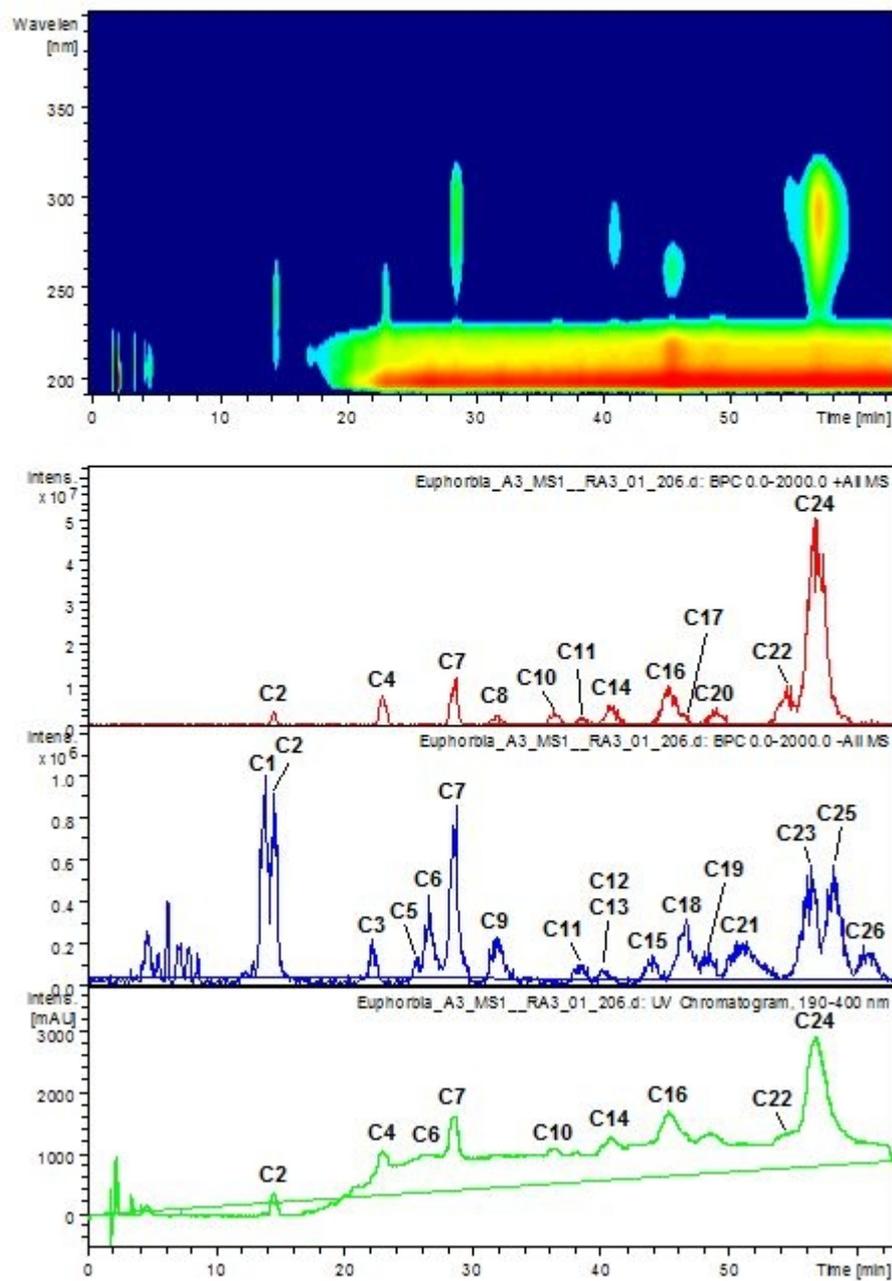
1992-1996	Volksschule in Laxenburg
1996-2004	Bundesrealgymnasium Untere Bachgasse, Mödling
ab 1998	„Wirtschaftskundliches Realgymnasium mit biologisch-chemischem Schwerpunkt“
Juni 2004	Reifeprüfung mit Gutem Erfolg
Seit WS 2004	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
WS 2007 & WS 2008	Tätigkeit als Tutorin des Praktikums „Allgemeine Mikrobiologie“
November 2008-März 2009	Durchführung der praktischen Arbeiten zur Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie, Universität Wien
SS 2009	Tätigkeit als Tutorin des Praktikums „Gewinnung und instrumentelle Analytik biogener Arzneimittel“

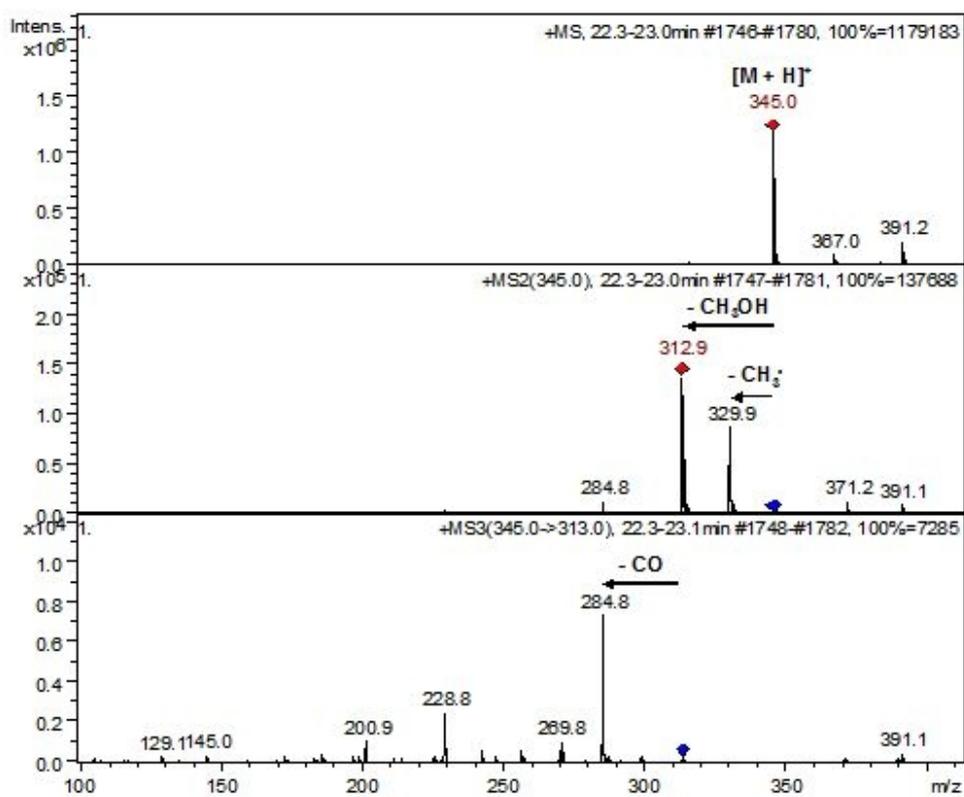
# ANHANG

## LC-DAD-MS<sup>n</sup> analysis of fraction A1 from *Euphorbia* spp

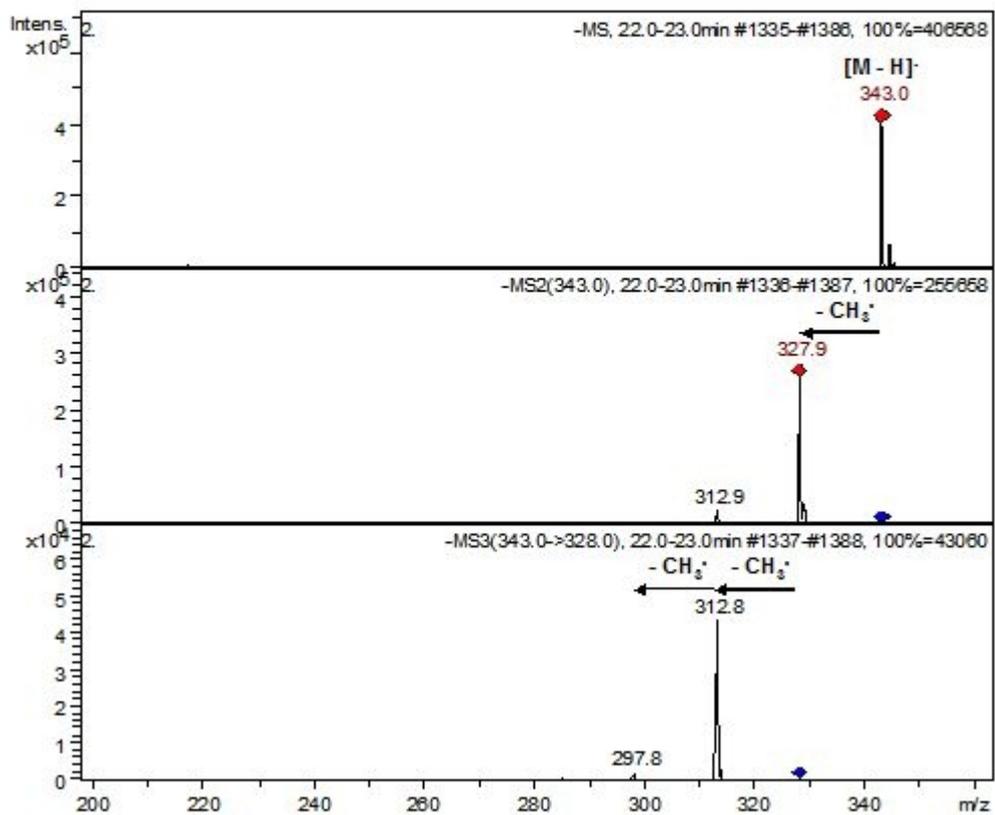


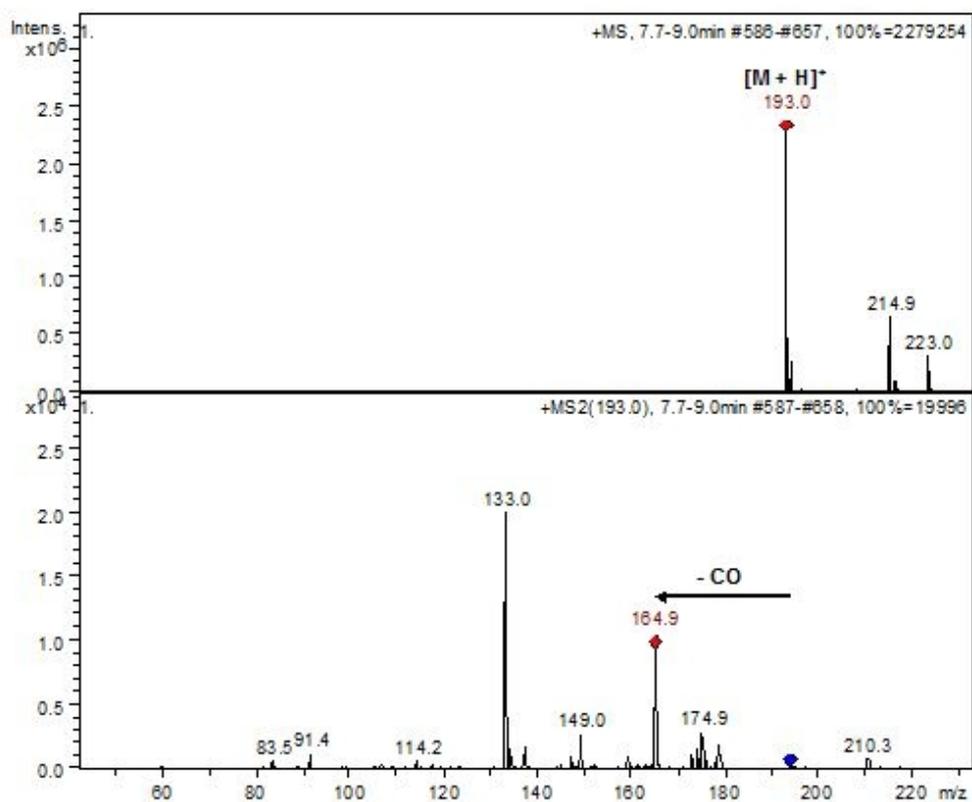
LC-DAD-MS<sup>n</sup> analysis of fraction A2 from *Euphorbia* spp

**LC-DAD-MS<sup>n</sup> analysis of fraction A3 from *Euphorbia* spp**

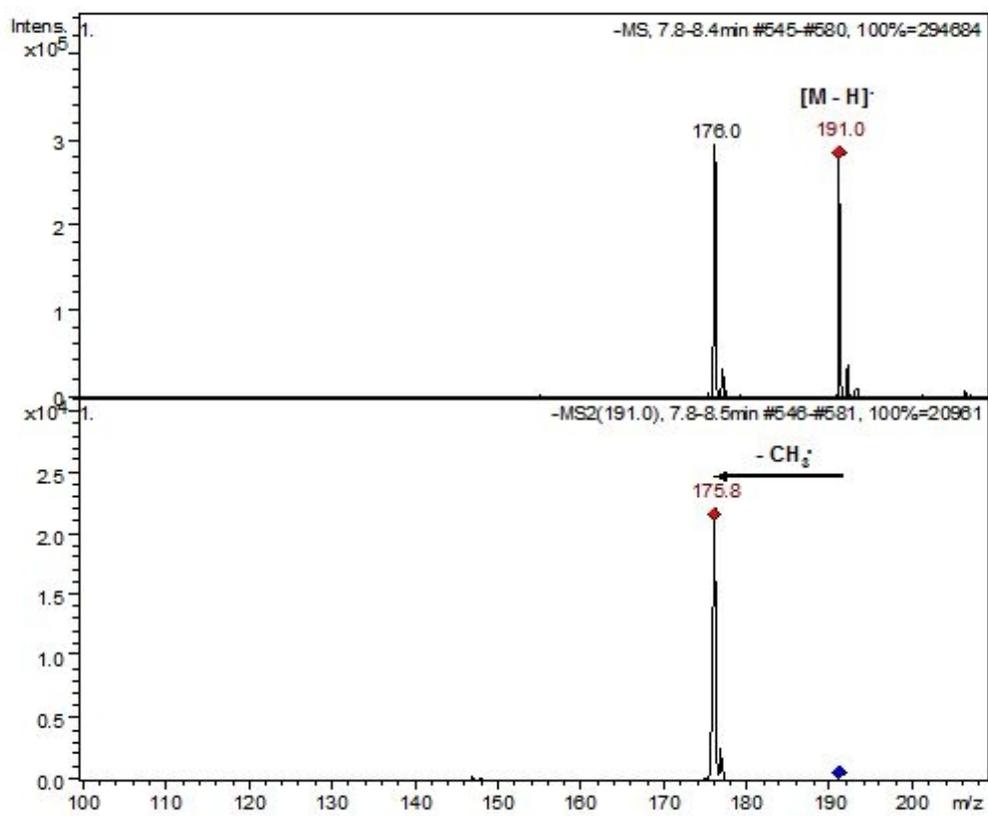
Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound A3

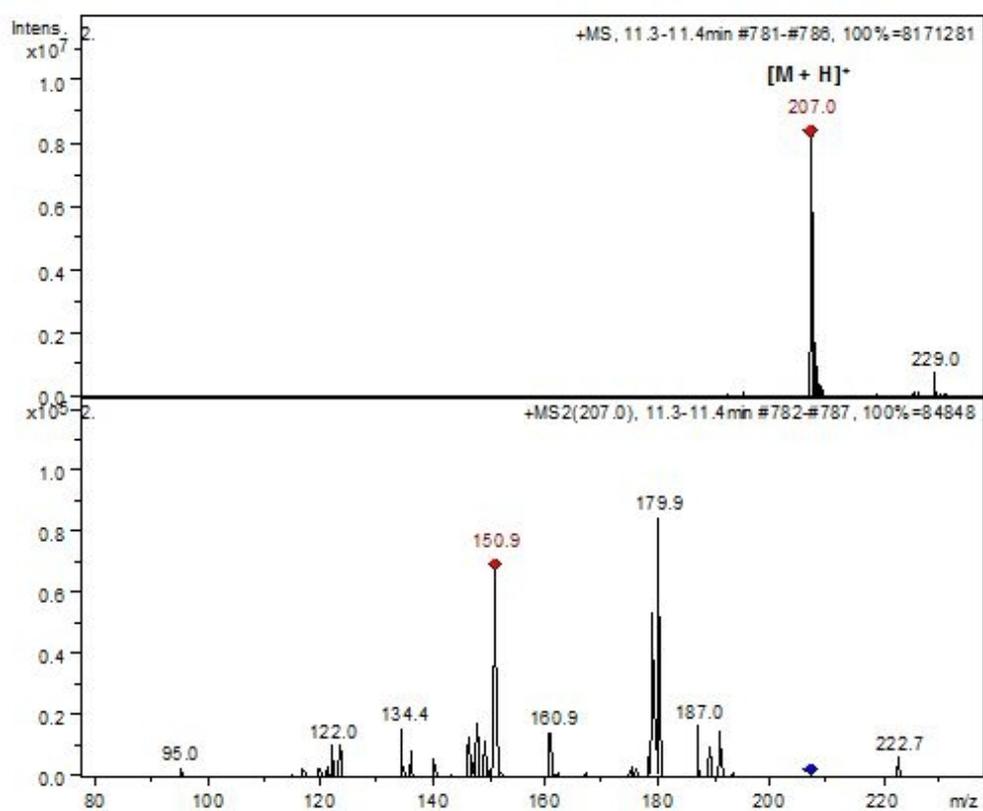
### Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound A3



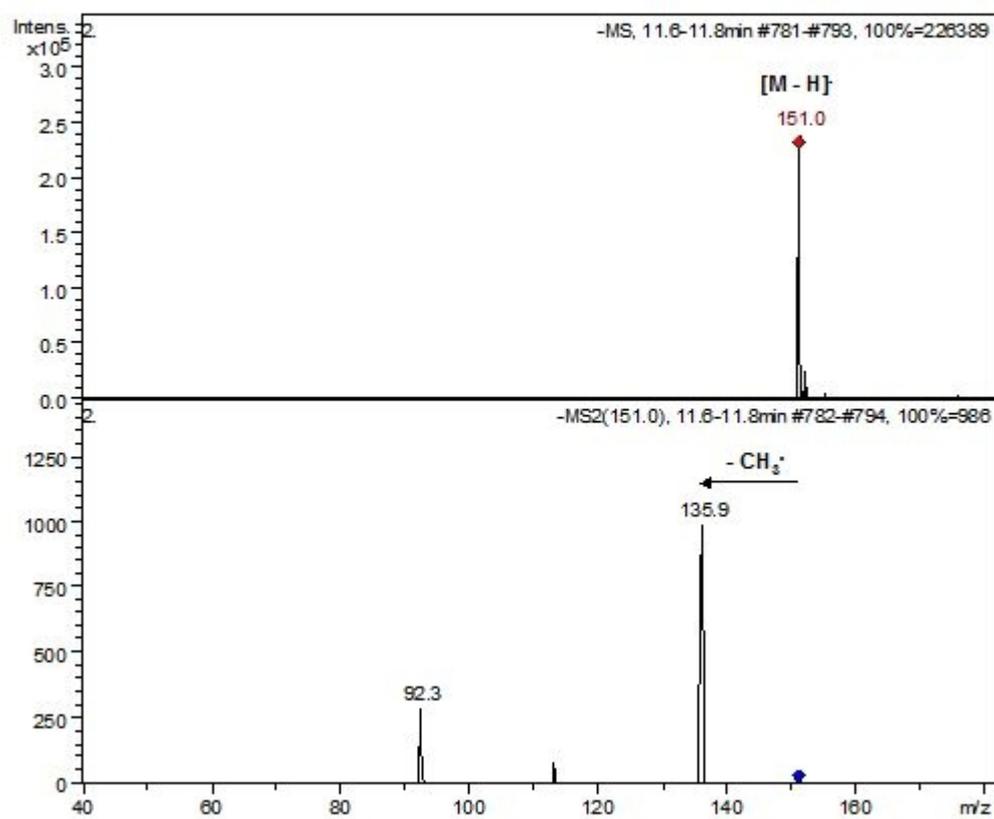
**Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) spectra of compound B1**

## Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) spectra of compound B1

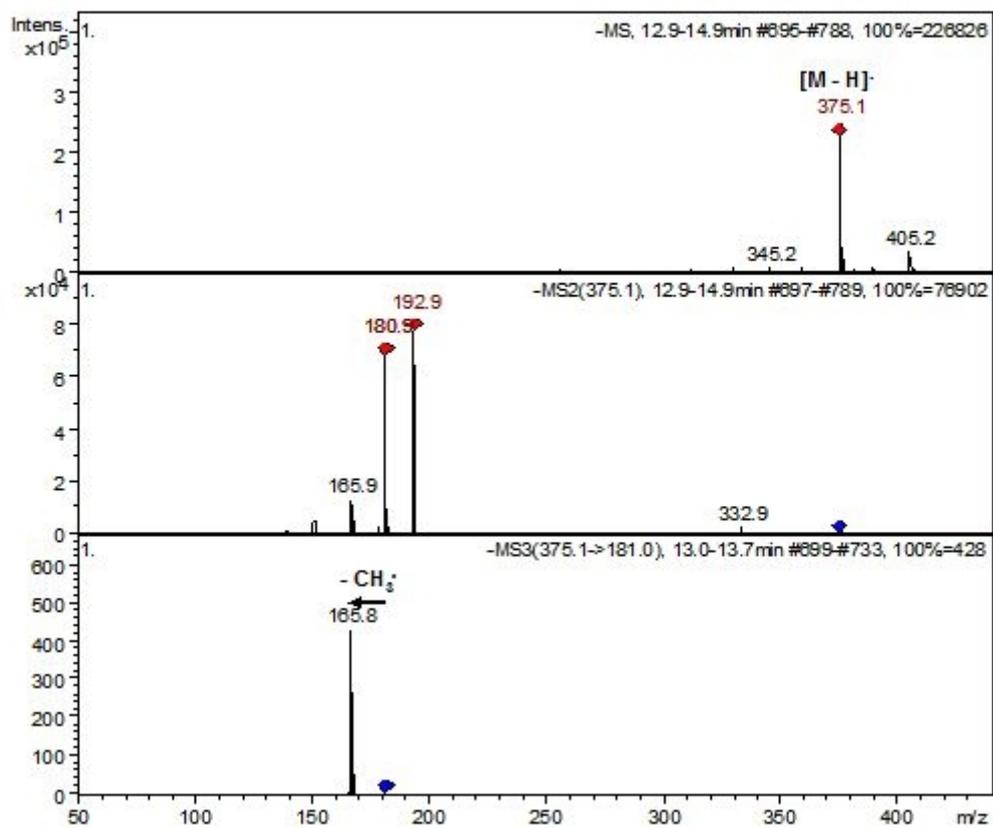


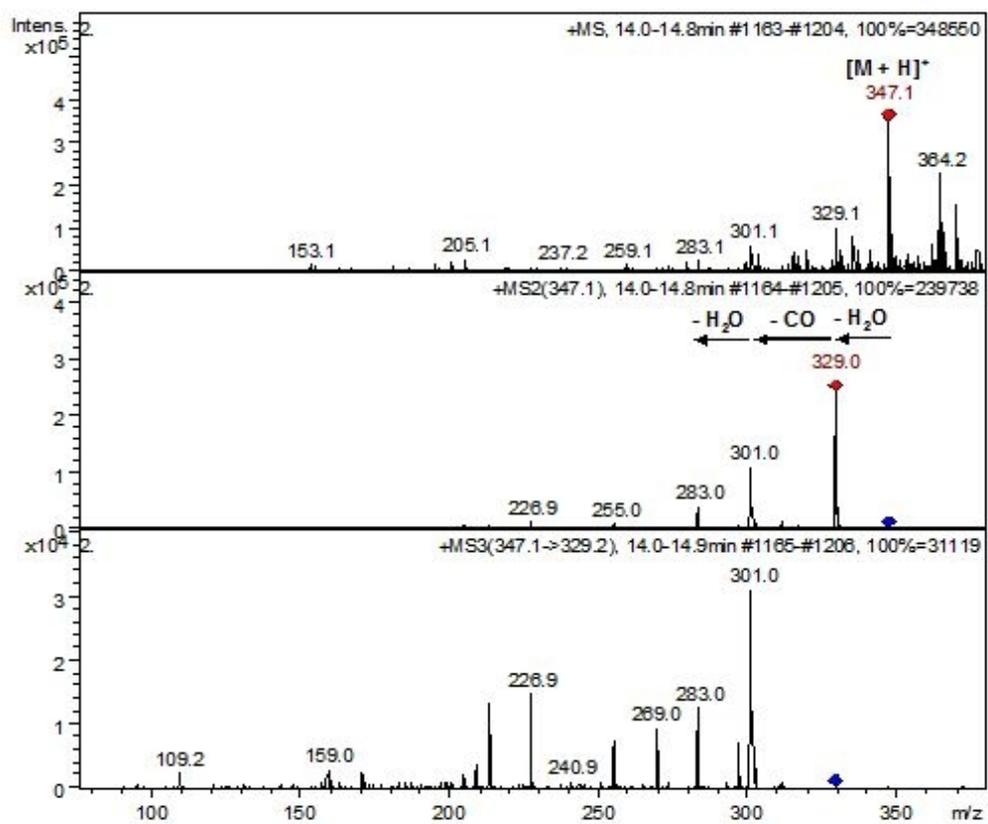
**Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) spectra of compound B2**

### Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) spectra of compound B3

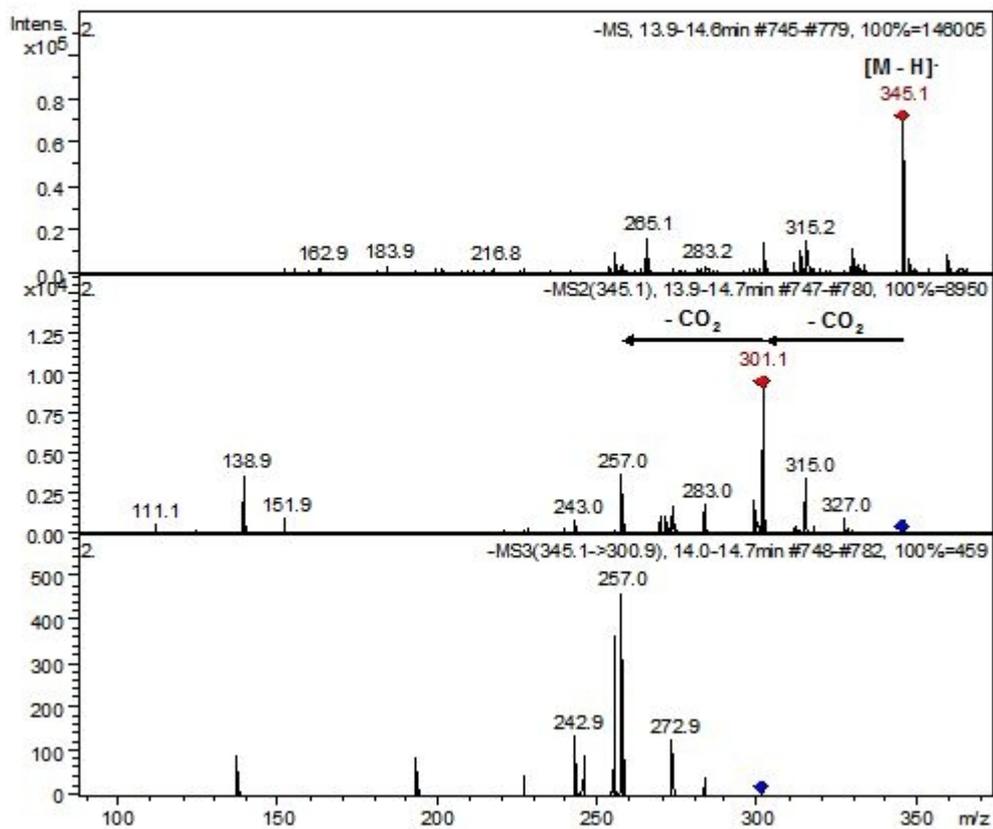


## Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C1

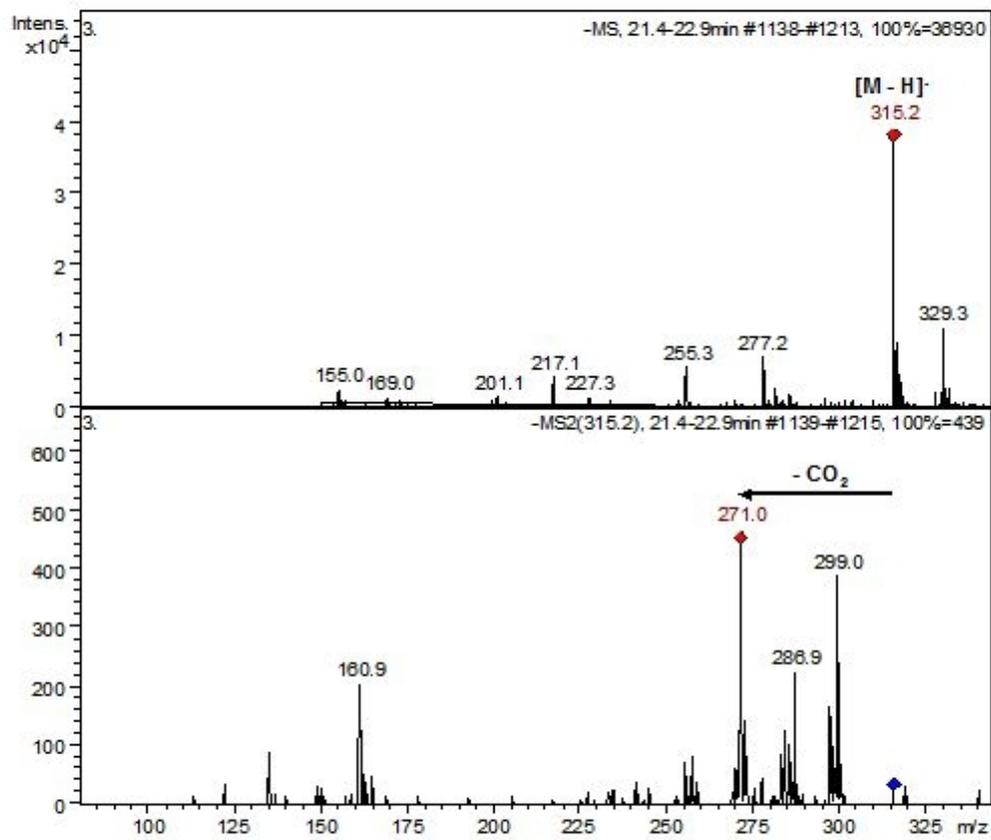


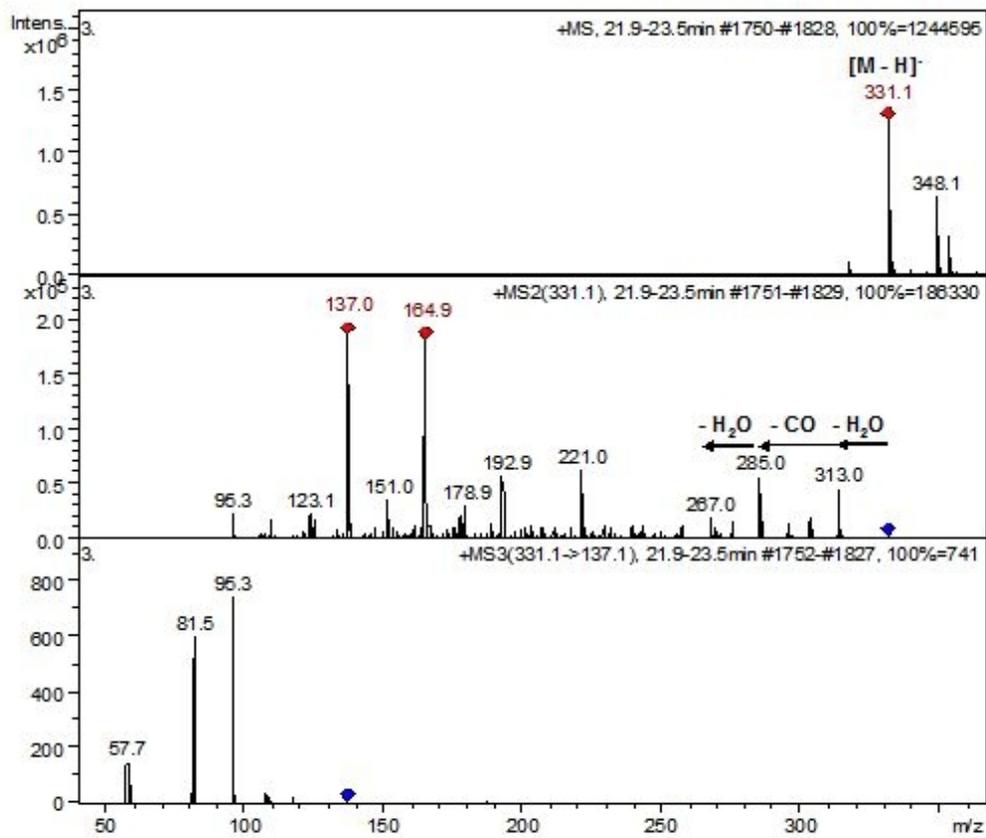
**Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C2**

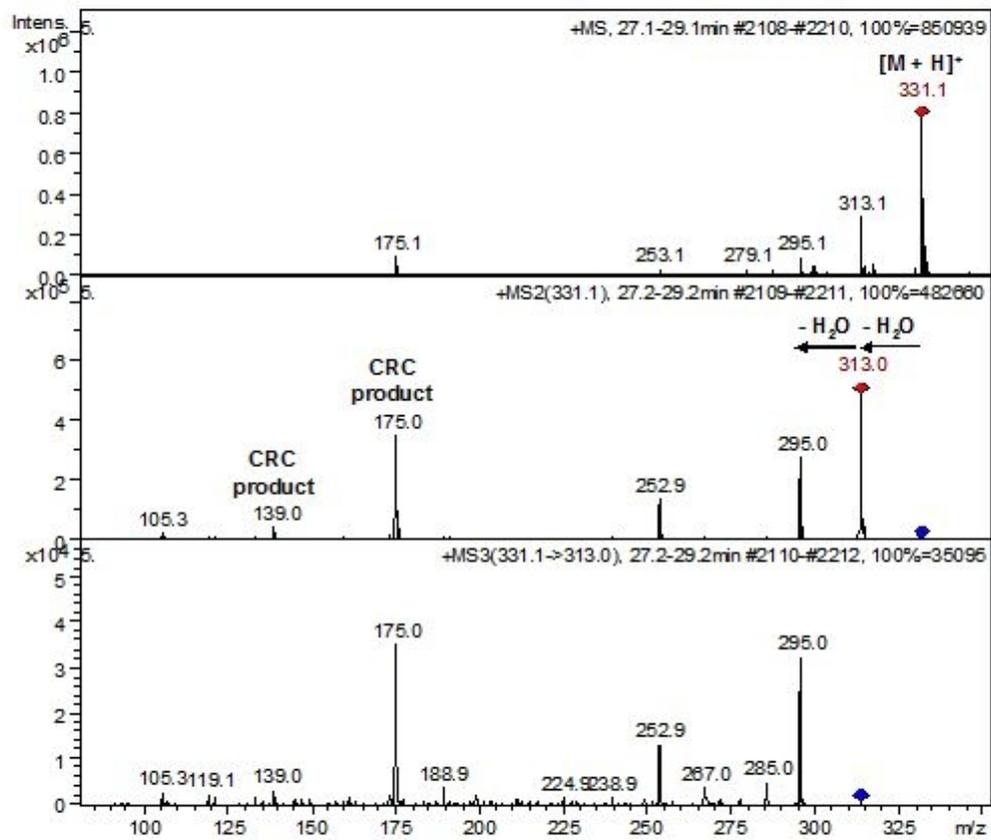
## Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C2



### Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) spectra of compound C3

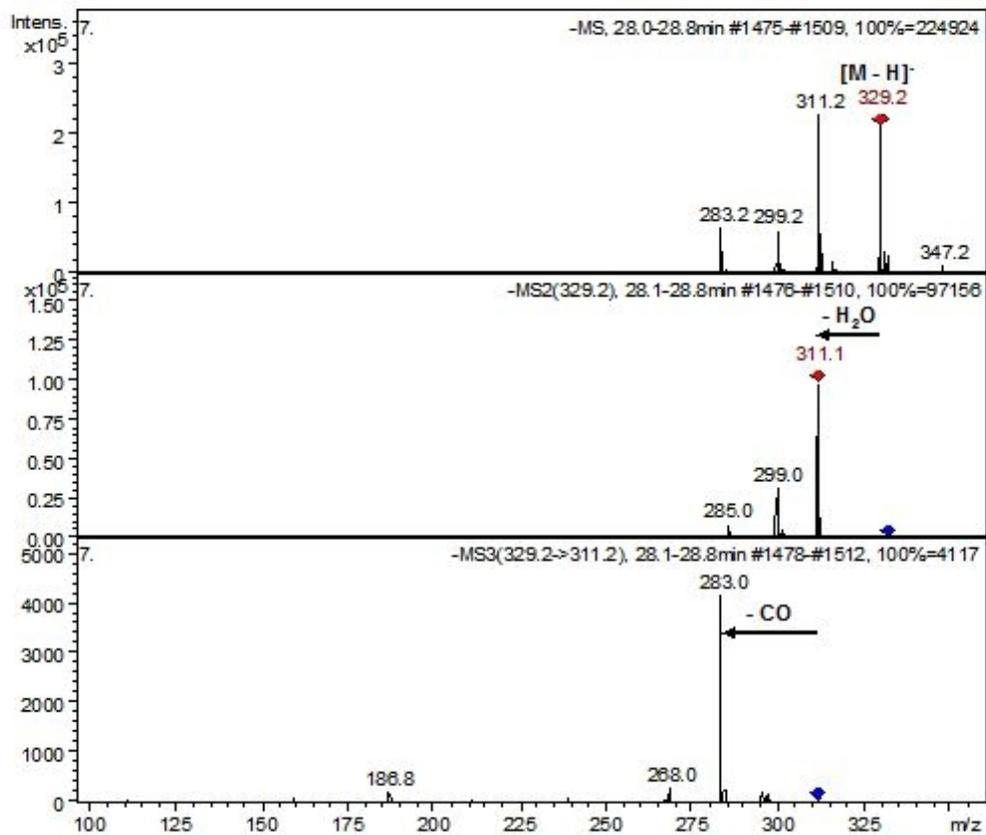


**Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C4**

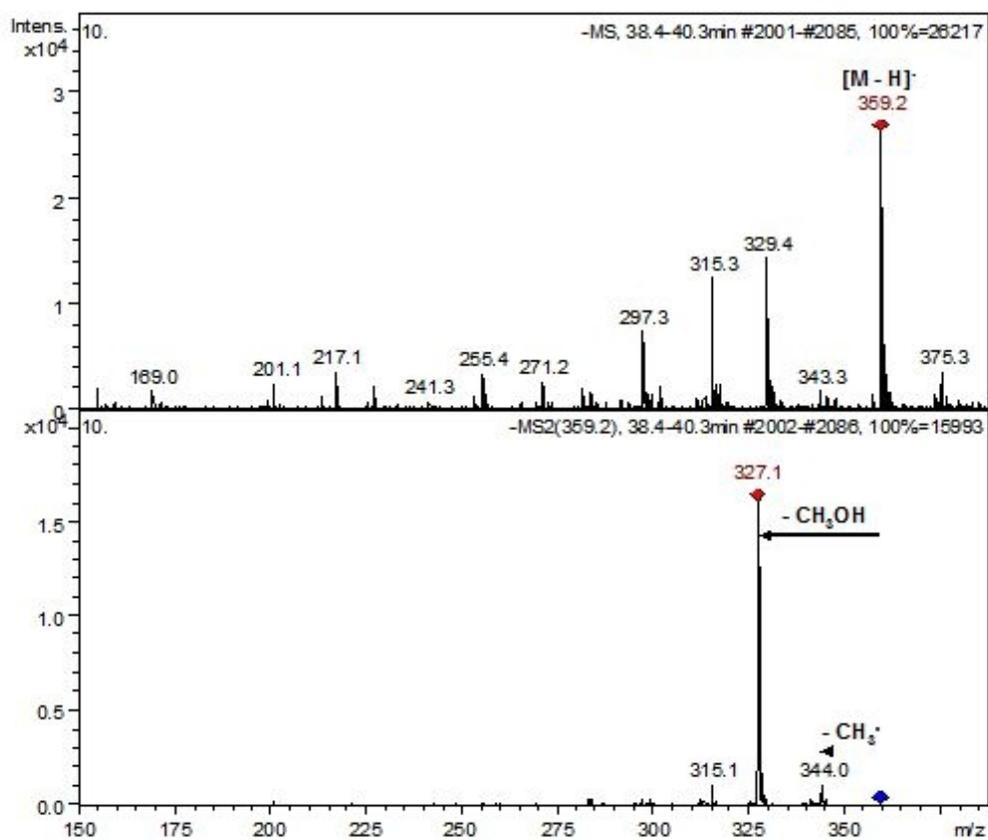
**Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C7**

CRC = cross-ring cleavage

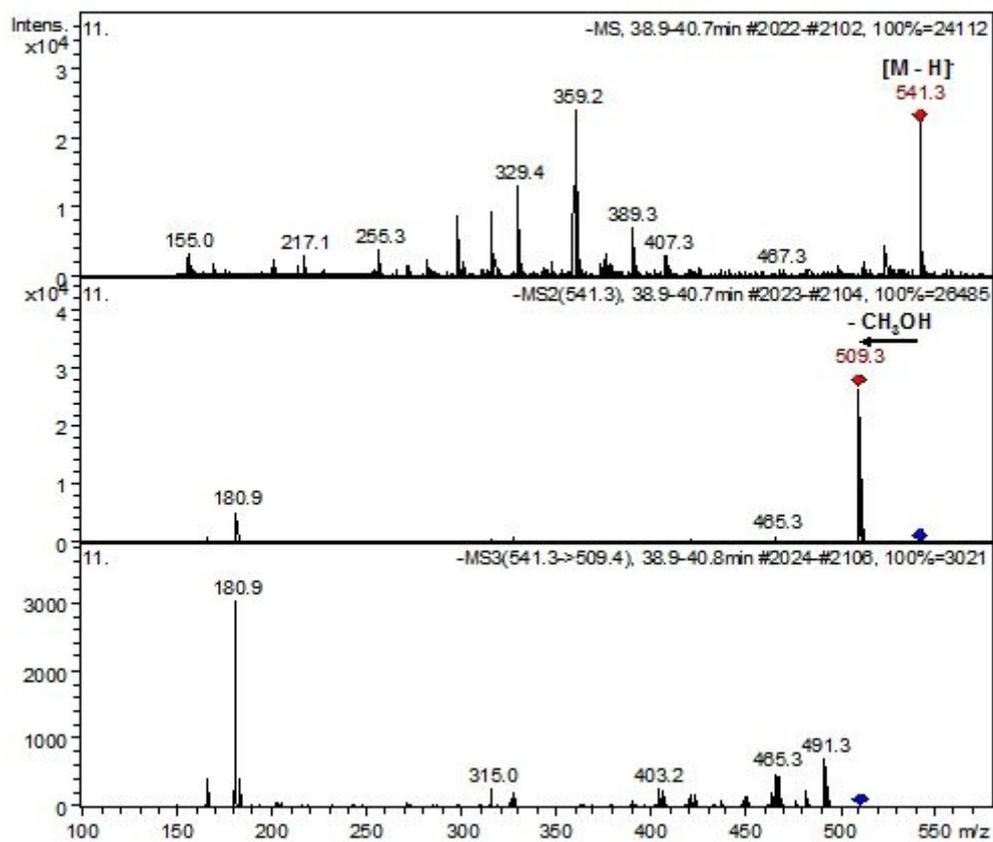
## Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C7



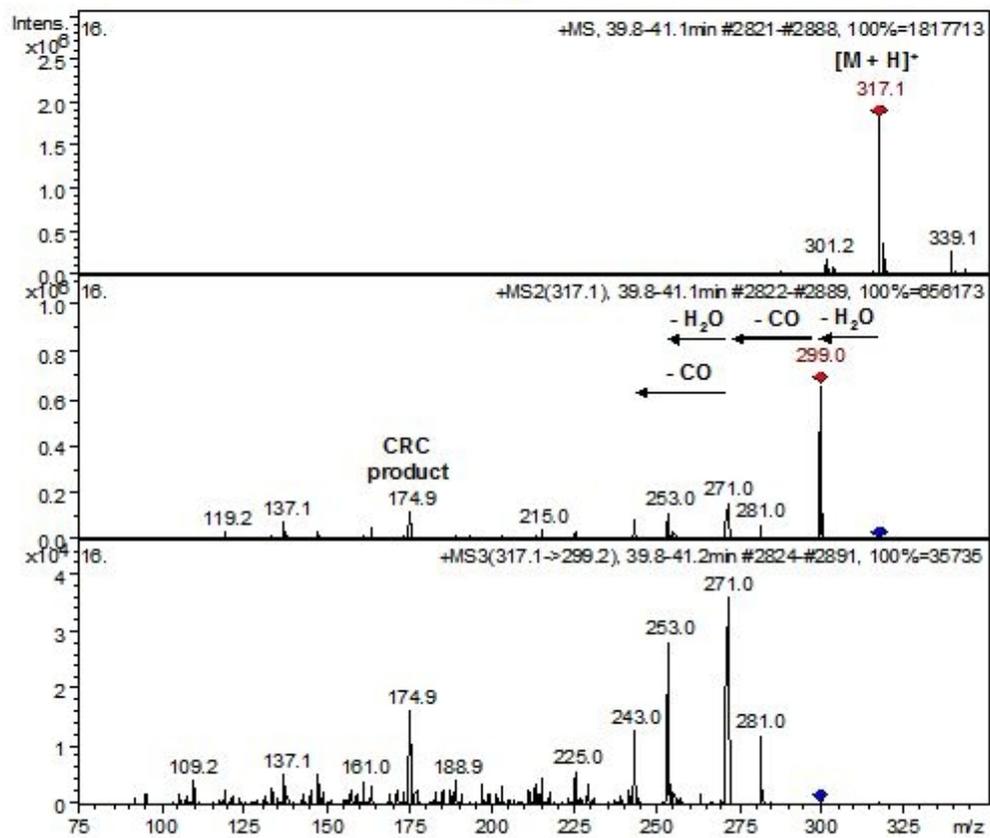
## Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) spectra of compound C12



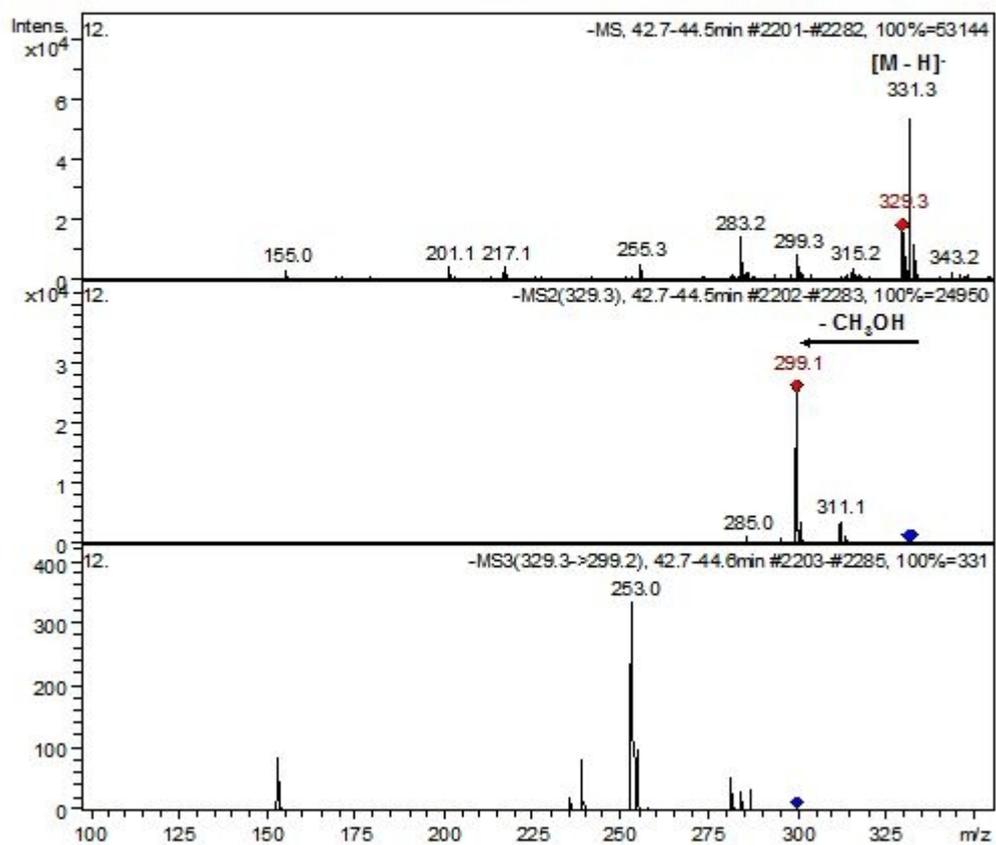
## Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C13



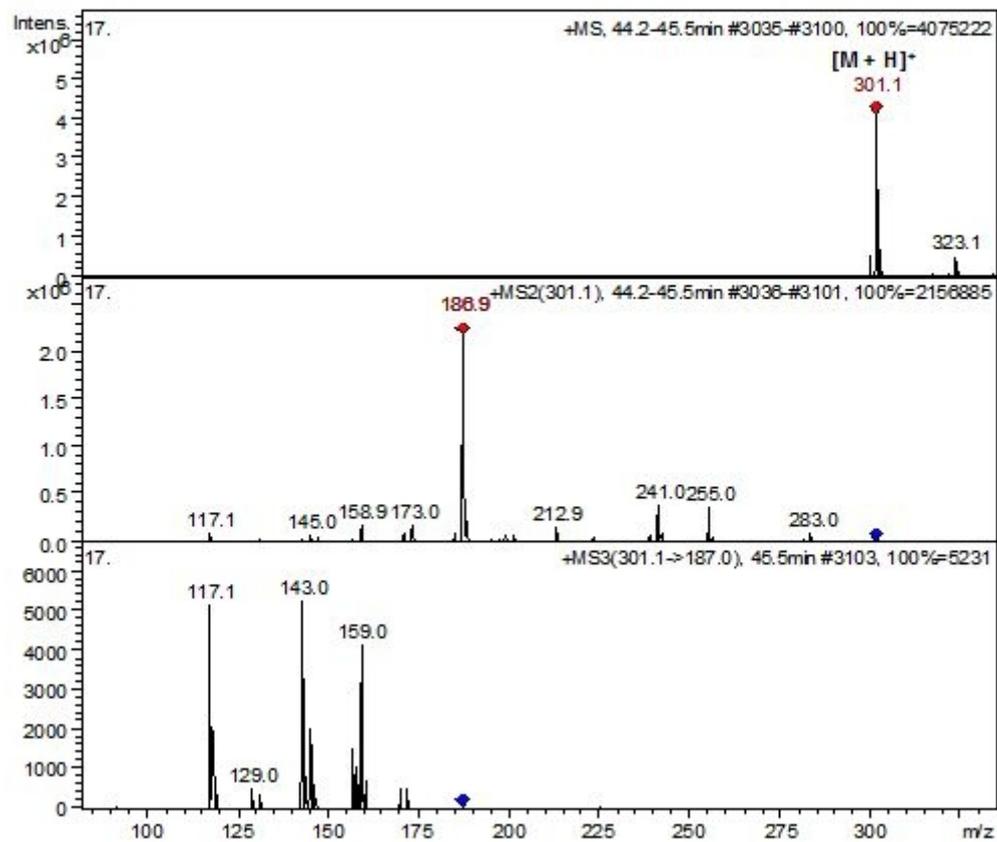
## Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C14



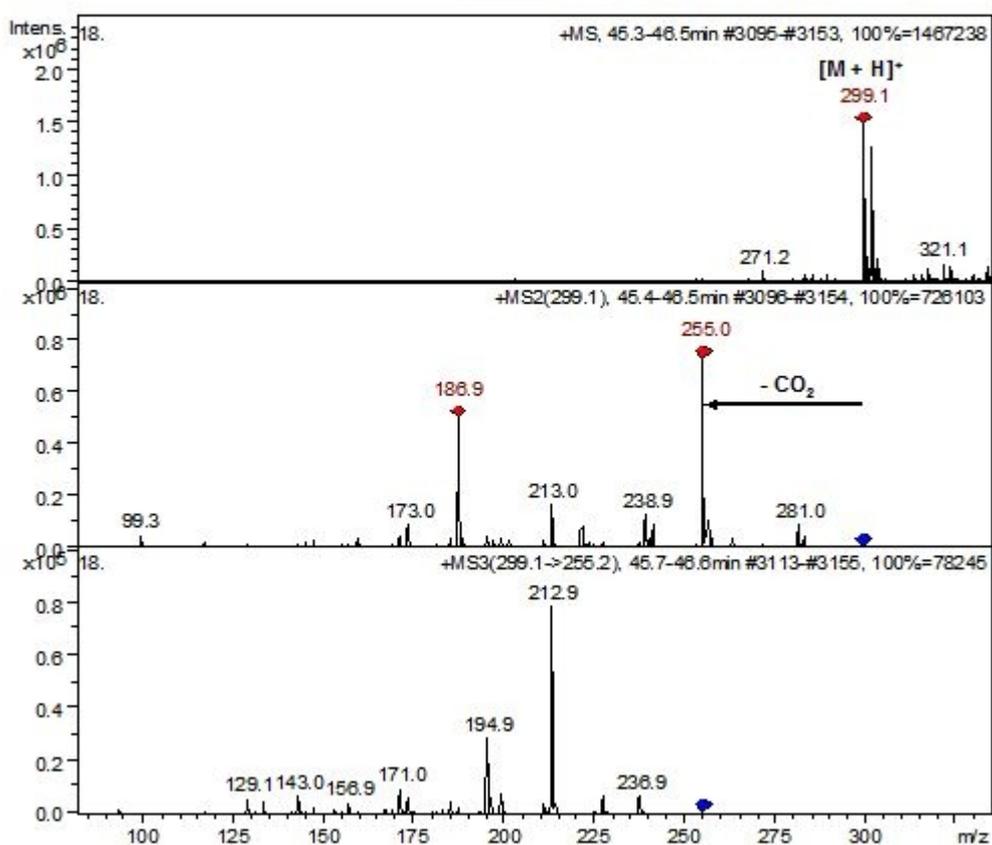
## Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C15



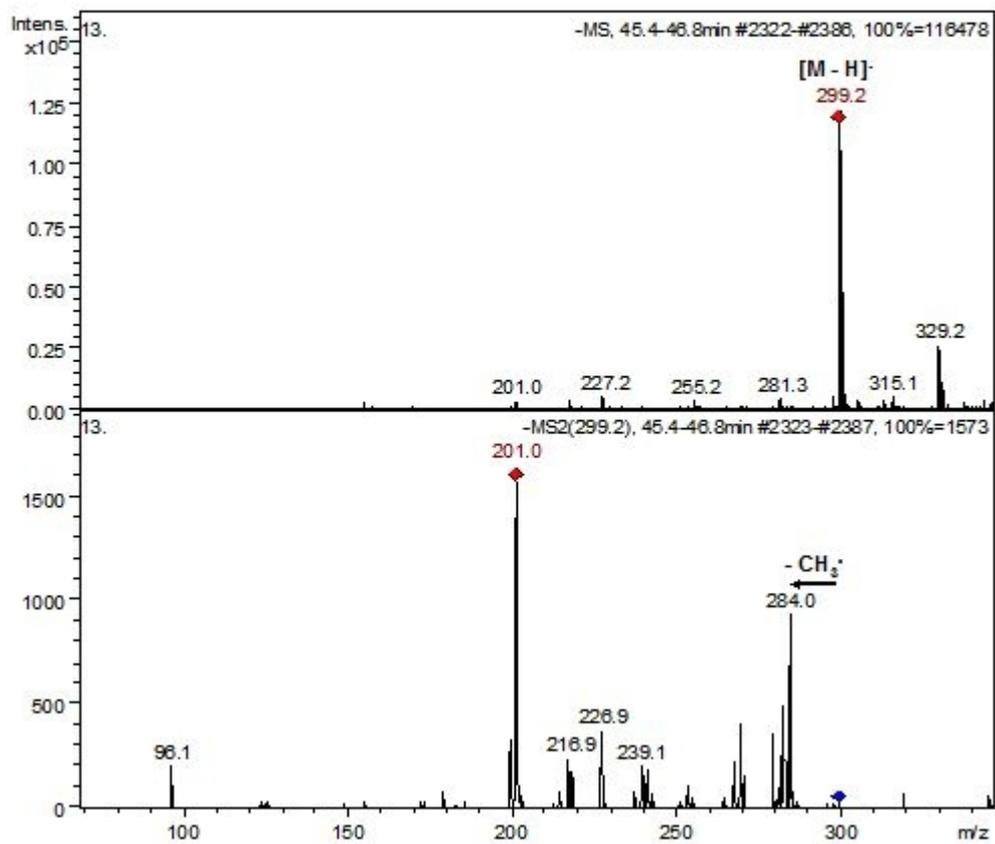
## Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C16



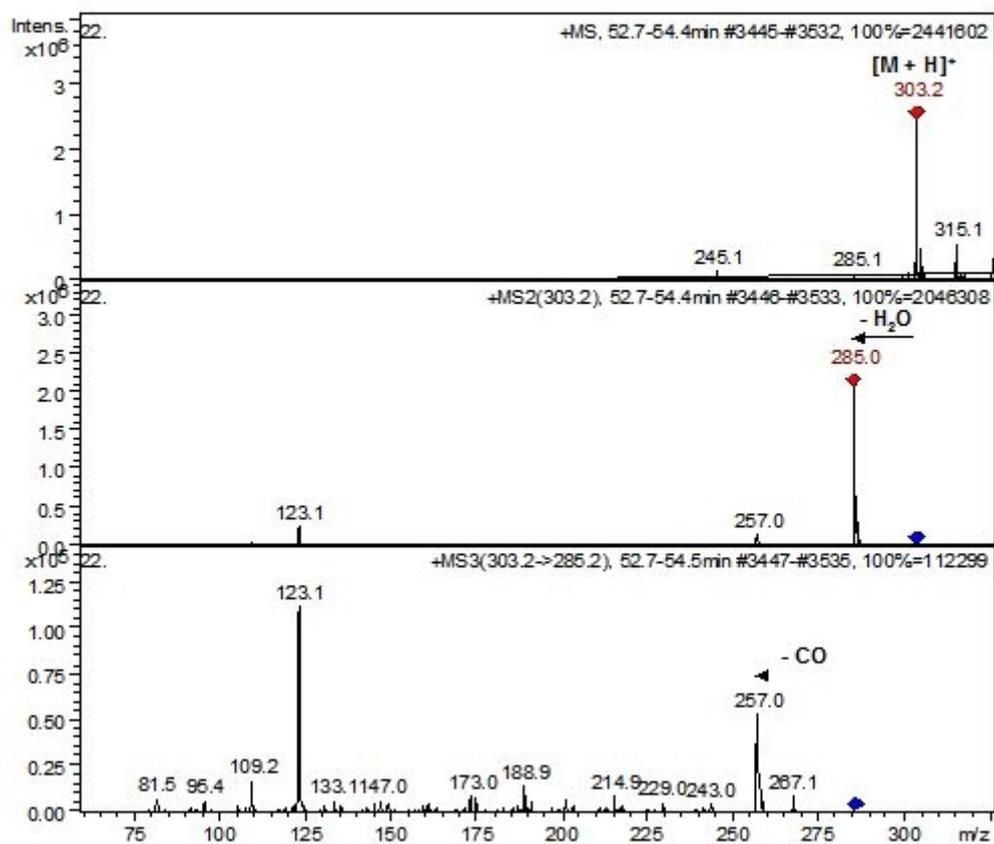
## Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C17



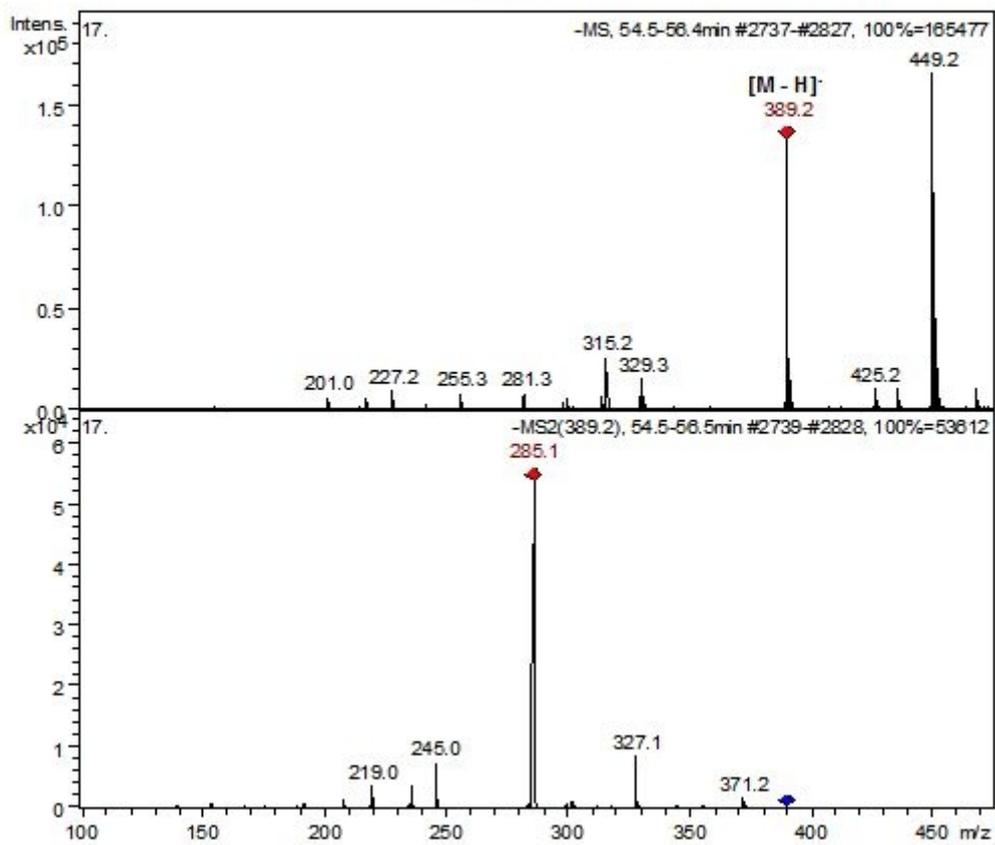
## Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) spectra of compound C18



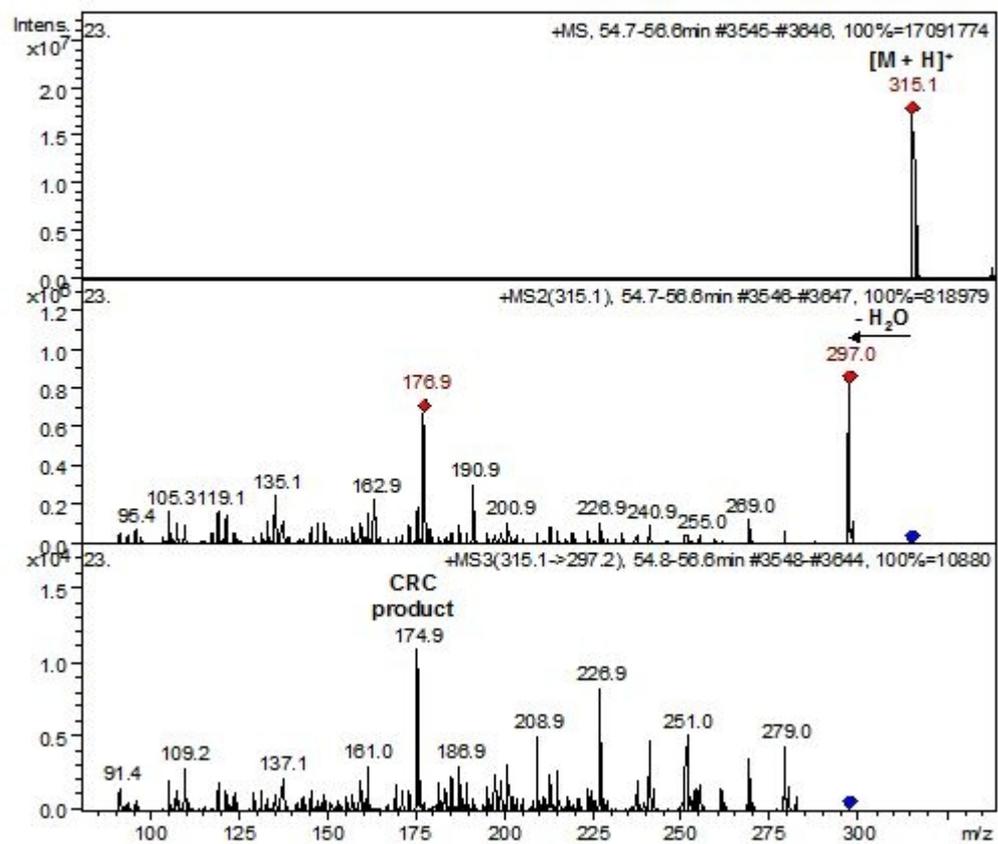
## Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C22



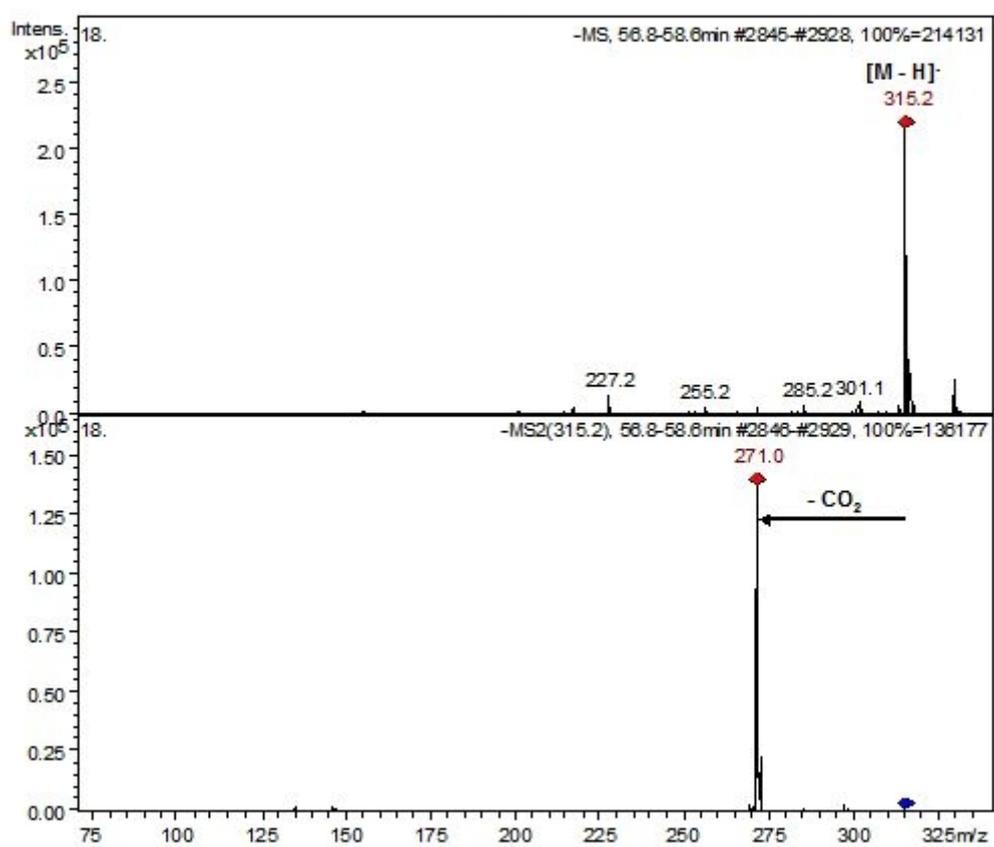
### Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) spectra of compound C23



## Positive ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-3) spectra of compound C24



## Negative ion mode ESI-MS<sup>n</sup> (n=1-2) spectra of compound C25



Obs. m/z	[M-H] <sup>-</sup> [M-H] <sup>-</sup> Proposed Structure	Comments and Information from MSn
<b>Sample A1</b>		
A1	7.7 n.d. n.d. unknown	loses one CH <sub>3</sub> • in -MS2
A2	19.0 n.d. 195.0 unknown	consecutive loss of three CH <sub>3</sub> • in -MSn (n=2-3); loss of CH <sub>3</sub> • in -MS2 and consecutive loss of CH <sub>3</sub> OH and CO in -MSn (n=2-3)
A3	22.6 345.0 343.0 a trimethylated flavonoid?	(nearly) identical fragmentation like <b>C2</b>
A4	31.3 347.1 345.1 unknown	(nearly) identical fragmentation like <b>C4</b>
A5	35.8 331.1 329.2 unknown	(nearly) identical fragmentation like <b>C7</b>
A6	37.7 331.1 329.2 an ent-abi-tanin?	low intensity in MS2
A7	41.8 n.d. 227.2 unknown	low intensity in MS2
A8	43.2 n.d. 253.2 unknown	(nearly) identical fragmentation like <b>C24</b>
A9	43.3 315.1 n.d. unknown	low intensity in MS2, loses one H <sub>2</sub> O in -MS2
A10	45.2 n.d. 279.2 unknown	low intensity in MS2
A11	47.7 n.d. 255.2 unknown	low intensity in MS2, loses one H <sub>2</sub> O in -MS2
A12	48.5 n.d. 281.2 unknown	low intensity in MS2, loses one H <sub>2</sub> O in -MS2
A13	52.1 n.d. 283.2 unknown	by comparison with published CID spectra
A14	53.3 391.1 n.d. bis(2-ethylhexyl)phthalate	loses one CH <sub>3</sub> • in -MS2, loss of CO in -MS2
<b>Sample A2</b>		
B1	8.1 103.0 191.0 scopoletin or related comp.?	loses one CH <sub>3</sub> • in -MS2
B2	11.5 207.0 n.d. unknown	loses one CH <sub>3</sub> • in -MS2
B3	11.8 n.d. 151.0 unknown	consecutive loss of two H <sub>2</sub> O and H <sub>2</sub> O and CO in -MSn (n=2-3)
B4	13.3 157.0 n.d. unknown	loss of CH <sub>3</sub> •, H <sub>2</sub> O and CH <sub>3</sub> OH in -MS2
B5	13.8 237.0 n.d. unknown	loss of CH <sub>3</sub> OH and consecutive loss of two times 86 Da in -MS2
B6	13.9 291.1 n.d. unknown	loss of CO <sub>2</sub> or CH <sub>3</sub> CHO in -MS2
B7	14.6 n.d. 287.1 unknown	consecutive loss of two H <sub>2</sub> O and CO in -MSn (n=2-3)
B8	16.4 333.1 331.2 unknown	the compound eluting later and detected in negative ion mode are most probably PEG-related impurities
<b>Sample A3</b>		
C1	13.7 377.0 375.1, 1,1-bis(2,6-dihydroxy-3-acetyl-4-methoxyphenyl)ethane?	yields two, presumably complementary fragment ions at m/z 133 and m/z 181 in -MS2
C2	14.4 347.1 345.2 unknown	consecutive loss of two CO <sub>2</sub> in -MSn (n=2-3); consecutive loss of H <sub>2</sub> O, CO, H <sub>2</sub> O and CO in -MSn (n=2-3)
C3	21.1 317.2 315.2 unknown	loses one CO <sub>2</sub> in -MS2
C4	21.9 331.1 n.d. unknown	consecutive loss of H <sub>2</sub> O, CO and H <sub>2</sub> O and prominent fragment ions at m/z 185 and m/z 137 in -MS2
C5	25.6 n.d. 383.2 structurally related to <b>C1</b> ?	yields fragment ions at m/z 195, m/z 177 and m/z 153 in -MS2
C6	26.5 n.d. 329.2 unknown	loses one CH <sub>3</sub> OH in -MS2
C7	28.4 331.1 329.2 an ent-abi-tanin?	(nearly) identical fragmentation like "Flachertiana A" in Phytolchem. Anal. 34, 40-47 (2003)
C8	31.8 465.2 n.d. unknown	loss of H <sub>2</sub> O, 148 Da and consecutive loss of 148 Da and 1 and 2 H <sub>2</sub> O in -MSn (n=2-3)
C9	31.8 n.d. 329.2 unknown	loss of H <sub>2</sub> O and CO <sub>2</sub> in -MS2
C10	35.3 347.2 n.d. an ent-abi-tanin?	consecutive loss of CH <sub>3</sub> OH and H <sub>2</sub> O and formation of fragment ion at m/z 175 (presumably cross-ring cleavage) in -MS2
C11	38.3 317.2 315.2 unknown	loss of CO <sub>2</sub> in -MS2; consecutive loss of H <sub>2</sub> O and CO in -MSn (n=2-3)
C12	40.1 n.d. 359.2 unknown	loss of CH <sub>3</sub> OH in -MS2
C13	40.2 n.d. 541.3 structurally related to <b>C1</b> ?	loss of CH <sub>3</sub> OH and formation of fragment ion at m/z 181 and 166 in -MS2
C14	40.7 317.1 315.3 an ent-abi-tanin?	consecutive loss of H <sub>2</sub> O, CO and H <sub>2</sub> O/CO and formation of fragment ion at m/z 175 (presumably cross-ring cleavage) in -MSn (n=2-3)
C15	43.8 n.d. 331.3 unknown	loss of CH <sub>3</sub> OH in -MS2
C16	45.2 301.1 n.d. unknown	loses one CH <sub>3</sub> • in -MS2
C17	46.1 299.2 n.d. unknown	loses one CH <sub>3</sub> • in -MS2
C18	46.3 n.d. 299.2 unknown	consecutive loss of CO and CO <sub>2</sub> in -MSn (n=2-3)
C19	48.3 n.d. 329.2 unknown	loss of H <sub>2</sub> O and HCOOH in -MS2
C20	48.9 317.2 n.d. unknown	consecutive loss of H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> and CH <sub>3</sub> • in -MSn (n=2-3)
C21	50.9 n.d. 525.3 unknown	

---

C22	54.3	303.2	n.d.	unknown	consecutive loss of H <sub>2</sub> O and CO in $m/z$ (n=2-3)
C23	55.1	n.d.	389.2	unknown	
C24	56.6	315.1	n.d.	an em-abilistane?	consecutive loss of H <sub>2</sub> O and CO in $m/z$ (n=2-3); formation of fragment ion at $m/z$ 275 (presumably cross-ring cleavage) in $m/z$
C25	58.0	n.d.	315.2	unknown	loss of CO <sub>2</sub> in -MS2
C26	60.6	n.d.	285.2	unknown	