



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Beiträge zur Phytochemie von *Dianthus versicolor* FISCH.  
(Caryophyllaceae)  
einer Heilpflanze der traditionellen mongolischen Medizin

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Zita Swoboda
Matrikel-Nummer:	0202089
Studienrichtung	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Wien, im Oktober 2009



## Danksagung

*...ich danke dem Zufall, dass ich auf dieser Seite der Erde geboren wurde, wo es nicht nur ums Überleben geht...in dieses Land, dass auch Spätentschlossene mit einem Stipendium unterstützt...in diese Familie, die es durch ihre Einstellung zu Schule und Wissen ermöglichte, mir die Lust am Lernen und Entdecken zu erhalten...*

Ich danke Frau Univ-Prof. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung des Diplom-arbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie.

Meiner Betreuerin Fr. Univ-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter danke ich besonders. Danke Sabine für die herzliche und kompetente Betreuung.

Danke Astrid für die vielen Tipps und Hilfestellungen.

Danke Martin für die Messungen auf der HPLC-MS.

Danke allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Glasl-Tazreiter /

Reznicek und Kopp / Krenn für die freundliche Aufnahme.

Sylvia, Oliver und Paolo danke ich für die lässige Zeit auf der Exkursion.

Ich danke allen Babysitterinnen die mich während meines Studiums unterstützt haben.

Ich danke meiner Familie für die Ausdauer im Unterstützen und Verzichten

und **Danke Franco!**

Meinen Eltern...



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Allgemeine Einleitung .....	1
1.2	Traditionelle mongolische Medizin .....	3
1.3	<i>Dianthus versicolor</i> FISCH. ....	4
1.4	Fragestellung .....	6
2	Material und Methoden .....	7
2.1	Material .....	7
2.2	Verwendete Chemikalien .....	8
2.3	Chromatographische Methoden.....	9
2.3.1	Dünnschichtchromatographie .....	9
2.3.2	Säulenchromatographie.....	11
2.3.3	Hochleistungsflüssigchromatographie .....	13
2.3.4	Gaschromatographie .....	15
2.4	UV/VIS-Spektroskopie .....	16
2.5	Massenspektrometrie.....	17
2.6	Kern-Magnet-Resonanz-Spektroskopie .....	19
2.7	Polarimetrie.....	20
3	Experimenteller Teil .....	21
3.1	Präparative Isolierung.....	21
3.1.1	Optimierung der HPLC-Methode .....	21

3.1.2	Optimierung der Trennung mittels Säulenchromatographie .....	22
3.1.3	Säulenchromatographische Trennung: „Säule 1“ .....	24
3.1.4	Säulenchromatographische Trennung: „Säule 2“ .....	27
3.1.5	Isolierung mittels Semipräparativer HPLC .....	32
3.2	Analytik.....	33
3.2.1	Analyse des OWE 02/05 mittels HPLC .....	33
3.2.2	Vergleichsanalysen mittels DC.....	37
3.2.3	Vergleichsanalysen mittels HPLC .....	39
3.2.4	Analyse des OWE 02/05 mittels HPLC-MS.....	41
3.3	Charakterisierung und Strukturaufklärung.....	46
3.3.1	Identifizierung der Flavonoidgenine .....	46
3.3.2	Identifizierung einiger Flavonoidglykoside.....	53
3.3.3	Strukturaufklärung von Substanz ZS 1.....	56
4	Ergebnisse und Diskussion .....	66
5	Summary .....	69
6	Abbildungsverzeichnis.....	70
7	Tabellenverzeichnis.....	75
8	Curriculum vitae .....	77
9	Quellennachweis .....	78

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einleitung

Naturstoffe werden schon seit Jahrtausenden als Arzneimittel verwendet, vor allem Stoffe pflanzlichen und tierischen Ursprungs, aber auch Mineralien und Stoffe anderer Herkunft, wie z. B. aus Algen und anderen Mikroorganismen.

Im Lauf der Zeit gelang es immer mehr, die wirksamen Komponenten dieser Vielstoffgemische zu isolieren, identifizieren und den Wirkmechanismus zu erklären. Immer wieder wurden isolierte Naturstoffe und halbsynthetische Derivate als Arzneistoffe in die Therapie eingeführt.

Man weiß schon lange, dass die Strukturen von Naturstoffen eine hohe chemische Verschiedenheit, sehr spezifische biochemische Wirksamkeiten und andere molekulare Eigenschaften haben, die sie als geeignete Leitstrukturen auszeichnen. Es erscheint somit gerechtfertigt, ihnen eine spezielle Aufmerksamkeit zuteil werden zu lassen. Naturstoffe können als Stoffklasse mit privilegierten Strukturen gesehen werden, die durch den Druck der Evolution selektioniert wurden. Es ist so ein weites Feld von Stoffen entstanden, die mit vielen verschiedenen Proteinen interagieren können. So gibt es Arzneistoffe natürlichen Ursprungs für die meisten Indikationsgebiete.<sup>1</sup>

Vergleicht man Naturstoffe, die als Leitstrukturen verwendet werden, mit eben solchen synthetischen Stoffen, wird sichtbar, dass Naturstoffe eine höhere Zahl an chiralen Zentren und stereochemisch komplexere Strukturen haben. Auch haben synthetisch hergestellte Arzneistoffe und solche, die durch kombinatorische Synthese entwickelt wurden, einen höheren Gehalt an Stickstoff, Schwefel und Halogeniden, während Naturstoffen eine größere Zahl von Sauerstoffen enthalten. Statistische Vergleiche haben gezeigt, dass Naturstoffe eine niedrigere Zahl von aromatischen Ringen im Verhältnis zu ihrer Gesamtmasse haben; die Zahl an funktionellen Gruppen die Wasserstoffbrücken bilden können, ist höher und das alles bei größerer Beweglichkeit der Molekülstruktur.<sup>1</sup>

## Einleitung

---

Flavonoide bilden eine große Gruppe unter den Naturstoffen, genauer gesagt unter den Pflanzeninhaltsstoffen. Sie können in allen Pflanzenteilen vorkommen. Zu den Flavonoiden gehören: Flavanole, Flavanone, Flavone, Flavonole, Isoflavone, Anthocyane und Catechine. Sie unterscheiden sich am C-Ring, der verschieden aufgebaut ist. Er kann gesättigt sein, eine Keto-Gruppe tragen und in verschiedenen Positionen substituiert sein. Das gesamte Genin kann unterschiedlich hydroxyliert, acetyliert, methoxyliert sein und an verschiedenen Stellen unterschiedliche Zucker tragen. Flavonoide wurden in den letzten 20 Jahren intensiv untersucht, da ihnen viele positive Effekte für die Gesundheit des Menschen nachgesagt werden. Flavonoide sind in Nahrungsmitteln reichlich vorhanden, teilweise bioverfügbar, und wirken möglicherweise vorbeugend gegen Krebs, Herzkreislauferkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen. Wie auch immer diese Mechanismen genau ablaufen, sie haben mit zwei grundlegenden Eigenschaften von Flavonoiden zu tun: ihrer Fähigkeit mit Proteinen zu interagieren und als Antioxidans zu wirken. Es gibt mittlerweile einige Daten zu Flavonoid-Rezeptor- und Flavonoid-Enzym-Interaktionen, aber genaue Untersuchungen, die die gesamte Kinetik im menschlichen Körper, den Metabolismus und das Wirksamkeitsprinzip beschreiben, gibt es bis jetzt nicht.<sup>2</sup>

Es gibt Untersuchungen über die Wirksamkeit von Flavonoiden auf die Leber von Ratten in denen sich Flavonoide aus grünem Tee als wirksam erwiesen haben. Die in einer flavonoidreichen Fraktion enthaltenen Flavonoidglykosyle und Flavonoidtrisaccharide konnten den durch D-Galaktosamin ausgelösten Anstieg von Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase im Plasma unterdrücken.<sup>3</sup> Auch bei einer Pflanze aus Nordafrika wurde ein Flavonoidtriglykosid identifiziert, dieses hemmt in vitro die porcine Leber-Carboxylesterase. Diese Pflanze (*Deverra scoparia*, Apiaceae) wird in der arabischen Medizin als verdauungsförderndes Mittel verwendet.<sup>4</sup>

So ist ersichtlich, dass Flavonoide sehr potente Naturstoffe sind, die auch in den Metabolismus anderer Stoffe eingreifen können. Das kann wichtig sein, um die Wirksamkeit und die Pharmakokinetik wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoffe von pflanzlichen Vielstoffgemischen zu erklären.

### 1.2 Traditionelle mongolische Medizin

Die traditionelle mongolische Medizin ist ein System, das sich über lange Zeit hinweg aus vielen verschiedenen Einflüssen gebildet hat. Man kann die geschichtliche Entwicklung in vier wichtige Abschnitte unterteilen.

Die erste Epoche war von der Steinzeit bis zum 12. Jahrhundert, sie war gekennzeichnet durch eine sehr regionale Volksmedizin. Erfahrungen wurden gesammelt und viele Therapien entstanden in dieser Zeitperiode. Auch Akupunktur und Moxibustion sollen aus dieser Zeit stammen.<sup>5</sup>

Die zweite Epoche begann Anfang des 13. Jahrhunderts und dauerte bis ins 16. Jahrhundert. In diese Zeit fällt die Hochblüte der mongolischen Kultur. Es entwickelten sich Politik, Handel und wichtige gesellschaftliche Strukturen. Das war auch die Zeit, in der Dschingis Khan (1162-1227) das mongolische Reich vereinigte und ausdehnte wie nie zuvor. Das medizinische System festigte sich, viele grundlegende Theorien und Anwendungen wurden geschaffen.<sup>5</sup>

Ab dem 16. Jahrhundert wurde die mongolische Medizin durch das Wissen der buddhistischen Mönche beeinflusst. Die Mongolei wurde durch tibetische Lamas missioniert und die Tibetische Sprache wurde die medizinische und kulturelle Hochsprache. Jetzt wurden die Theorie der drei Körpersäfte und die Theorie von „heiß“ und „kalt“ aus dem Ayurveda und der traditionellen tibetischen Medizin in die mongolische Medizin aufgenommen. Die mongolischen Traditionen blieben erhalten, auch die mongolische Materia Medica. So entstand die traditionelle mongolische Medizin (TMM). Verschiedenste Behandlungsmethoden wie Ernährungsumstellung, Aderlass, Mineralbäder, heißer Sand, Schlammtherapie etc. fanden Anwendung.<sup>5</sup>

In den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde die TMM nach stalinistischer Unterdrückung wieder entdeckt. Sie wird sowohl in der Mongolei als auch in den mongolisch besiedelten Regionen der Volksrepublik China wieder angewandt, gelehrt und beforscht.<sup>5</sup>

Die TMM ist ein ganzheitliches medizinisches System, das den menschlichen Körper und seine Umgebung als Einheit sieht. Die Theorie der drei Körpersäfte beschreibt Gesundheit als das Gleichgewicht der drei Säfte: Wind (Khi), Galle (Shara) und Schleim (Badgan). Die Theorie der „heißen“ und „kalten“ Erkrankungen ordnet bestimmten Krankheitssymptomen diese Eigenschaften zu. Auch den Arzneien werden diese Eigenschaften und andere Qualitäten (wie z. B. Geschmack) zugeordnet. Gewöhnlich werden „heiße“ Erkrankungen mit kalten und kühlenden Arzneien behandelt und umgekehrt „kalte“ Erkrankungen mit heißen und wärmenden Arzneien. Als Untersuchungsmethoden werden eingehende Befragung, Pulsdiagnose und Zungendiagnose verwendet.<sup>6 7</sup>

Das grundlegende Werk der TMM ist das rGyud bži (mong. Dürben Ündüsün, wörtlich: „Die Vier Wurzeln“) das etwa zu Beginn des 14. Jahrhunderts aus dem Tibetischen in die mongolische Sprache übersetzt wurde. Dieses Werk beinhaltet die dem medizinischen System zugrunde liegende Philosophie gleichermaßen wie Pathologie und Pharmazie; durch Jahrhunderte wurde es von vielen Gelehrten aus der Mongolei und aus Tibet kommentiert.<sup>8</sup>

In der TMM werden in Arzneimischungen Kräuter, Mineralien und Stoffe tierischen Ursprungs verwendet. Die Arzneien werden meistens als Pulver mit Wasser aufgerührt und getrunken. In den größeren Zentren für TMM in der Mongolei werden auch Tabletten und Granulate hergestellt. Die dann auch nach westlichen Kriterien (z. B. Zerfallsgeschwindigkeit) kontrolliert werden.<sup>7</sup> Da die Ingredienzien für die Arzneimischungen meist aus Wildsammlung kommen, und die Rohstoffe auf diversen Märkten gehandelt werden, ist es das Ziel der staatlichen Regelungen, die Identität, die Wirksamkeit und die Sicherheit der gehandelten Stoffe zu gewährleisten.<sup>6</sup>

### **1.3 *Dianthus versicolor* FISCH.**

Die niedrige krautige Pflanze *Dianthus versicolor* FISCH. gehört zur Familie der Nelkengewächse (Caryophyllaceae). Die Pflanze kommt fast in der gesamten Mongolei vor. Die oberirdischen Teile werden in der TMM bei „heißen“ und „akuten“ Lebererkrankungen, die unter anderem durch übermäßigen Alkoholge-

## Einleitung

---

nuss, reichhaltiges Essen und andere schädliche Stoffe ausgelöst werden können und durch die Symptome auch in der westlichen Medizin als Lebererkrankungen zu sehen sind, in Arzneimischungen verwendet. *Dianthus versicolor* wird der Geschmack „bitter“, die Eigenschaft „kühlend“, die Qualität „kühl“ und die sekundären Qualitäten „rau“, „schneidend“, und „beweglich“ zugeschrieben.<sup>6 9</sup> In der mongolischen Volksmedizin wird *Dianthus versicolor* auch bei Frauenleiden, nach Geburten gegen Blutungen und als Uterus zusammenziehendes Mittel verwendet.<sup>10</sup>



**Abbildung 1: *Dianthus versicolor* FISCH (Bild: Dr. Christa Kletter, Department für Pharmakognosie)**

Extrakte von *Dianthus versicolor* wurden auf Cytotoxizität getestet. Es ließ sich keine Cytotoxizität feststellen. Es wurden auch verschiedene Extrakte, darunter *Dianthus versicolor*, in einem Leberperfusionsmodell auf ihre Wirkung auf den Gallenfluss getestet (s. Abb. 2, S.6). Es konnte festgestellt werden, dass sowohl wässrige Extrakte, als auch eine Flavonoidfraktion von *Dianthus versicolor* den Gallenfluss erhöhen.<sup>11 12 13</sup>

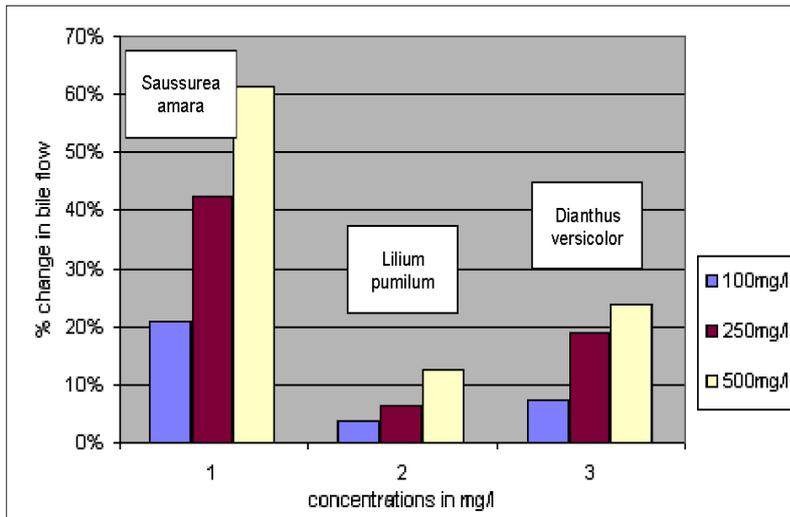
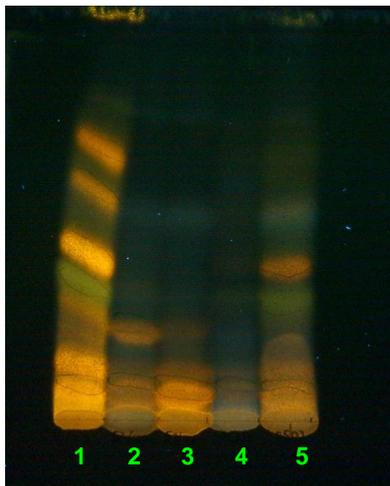


Abbildung 2: Zunahme des Gallenflusses bei Testung der Wasserextrakte von *Saussurea amara*, *Lilium pumilum* und *Dianthus versicolor* im Leberperusionsmodell in drei verschiedenen Konzentrationen <sup>14</sup>

## 1.4 Fragestellung

In einer parallel laufenden Dissertation wurden Extrakte verschiedener Chargen von *Dianthus versicolor*, die sich durch Erntejahr und Herkunft innerhalb der Mongolei unterscheiden, untersucht und charakterisiert. Es haben sich Unterschiede im Inhaltsstoffmuster zwischen den verschiedenen Chargen gezeigt. <sup>11</sup>



1	Charge 02/05
2	Charge 52/04
3	Charge 53/04
4	Charge 06/03
5	Charge 05/03

Abbildung 3: OWEs (s. Kap. 2.1, S.7) der verschiedenen Chargen im Vergleich (DC-System 2 s. Tab. 3, S.11)

Die Aufgabe vorliegender Arbeit war, den Original Water Extract (OWE) der Charge 02/05 (s. Abbildung 3, Bahn 1 und Kap. 2.1, S.7) von *Dianthus versicolor* zu untersuchen und die enthaltenen Flavonoide zu charakterisieren.



## Material und Methoden

Ein auf diese Weise hergestellter Extrakt, entspricht der in der traditionellen mongolischen Medizin gebräuchlichsten Einnahmeform, dem Schlucken der pulverisierten Droge und Nachtrinken von reichlich Wasser.<sup>6,9</sup>

## 2.2 Verwendete Chemikalien

In Tabelle 1 sind die am häufigsten verwendeten Chemikalien aufgelistet, eingeteilt nach chromatographischen Trennmethode.

<b>DC</b>	Ethylacetat (EtOAc)	p. a. VWR min. 99,5%
	Cyclohexan	p. a. Merck min. 99,5%
	Ethylformiat	zur Synthese Merck 98%
	Methanol (MeOH)	p. a. VWR min 99,5%
	Dichlormethan (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	p. a. VWR min 99,5%
	Ameisensäure conc.	Gatt-Koller ÖAB 98-100%
	Essigsäure conc.	Gatt-Koller ÖAB 99%
	Kieselgelplatten	Merck TLC Silicagel 60 F <sub>254</sub> , Korngr. 0,063-0,200 mm auf Aluminium-Folie
	Naturstoffreagenz A (NSA) = Diphenylborsäure-β- aminoethylesterkomplex	min 98% Carl Roth GmbH+Co
	Polyethylenglykol 400	p. a. Gatt-Koller
	Reinsubstanzen für Vergleiche, DC und HPLC	Carl Roth GmbH+Co HPLC-Qualität
<b>SC</b>	Ethylacetat	Institutseigenes Destillat, im Rotationsverdampfer aus technischer Qualität destilliert
	Methanol	Institutseigenes Destillat, s. oben
	Trifluoressigsäure	Riedel-de Haën 99%
	Kieselgel 60	Merck Korngr. 0,063-0,200 mm
<b>HPLC</b>	Methanol	VWR HiPerSolv Chromanorm 99,8%
	Acetonitril (ACN)	VWR HiPerSolv Chromanorm 99,9%
<b>GC</b>	Kiliani-Reagenz	3,5 ml Essigsäure conc. 1,0 ml HCl conc. 5,5 ml H <sub>2</sub> O
	Helium	5.0
	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid	p. a. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

## 2.3 Chromatographische Methoden

Chromatographische Methoden werden verwendet, um Substanzgemische zu trennen. Die Trennung erfolgt immer durch Wechselwirkungen der zu trennenden Substanzen mit einer ruhenden (stationäre) und einer fließenden (mobilen) Phase. Diese Wechselwirkungen können auf verschiedenen physikalischen Prinzipien beruhen. So kann unter anderem zwischen Adsorptions- und Verteilungschromatographie unterschieden werden. Adsorption ist eine Anlagerung an Grenzflächen, die durch chemische und physikalische Wechselwirkungen entsteht. Verteilungschromatographie arbeitet mit den verschiedenen Löslichkeiten der Stoffe. Meistens kommen in einem chromatographischen System beide Typen von Wechselwirkungen nebeneinander vor. Verschiedenste Parameter wie Länge der Trennstrecke, Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, Art des Lösungsmittels das als mobile Phase verwendet wird, Beschaffenheit der stationären Phase (z. B. Teilchengröße) und Temperatur bestimmen maßgebend die Trennleistung eines chromatographischen Systems. Mit speziellen Näherungsformeln lässt sich die Trennleistung errechnen, meist wird zur Optimierung eines Systems aber auch empirisch gearbeitet.<sup>16</sup>

### 2.3.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist eine spezielle Methode. Es wird ein inneres Chromatogramm erstellt, das heißt, die Substanzen befinden sich zur Zeit der Detektion auf der Trennstrecke, da die Entwicklung abgebrochen wird, bevor sie die Trennstrecke verlassen. Als Kennwert werden  $R_f$ -Wert und  $R_x$ -Wert verwendet, welche die Laufstrecke der Substanz im Verhältnis zur Fließmittelfront oder zum mitgelaufenen Standard angeben.

$$R_f\text{-Wert} = \frac{\text{Entfernung der Substanz vom Start}}{\text{Entfernung der Fließmittelfront vom Start}} = \frac{a}{c}$$

Als stationäre Phase werden feste Materialien verwendet, die in einer dünnen Schicht auf einer Glas- oder Aluminiumplatte aufgetragen werden. Als mobile Phase finden verschiedenste Lösungsmittel Einsatz, die nach den Eigenschaf-

## Material und Methoden

ten der zu trennenden Substanzen ausgewählt werden. Es wird das Substanzgemisch am Start aufgetragen, die DC-Platte in den DC-Trog mit dem Fließmittel gestellt und gewartet, bis die Fließmittelfront das Ende der Entwicklungsstrecke erreicht. Dann wird die Entwicklung abgebrochen, und die Substanzen werden detektiert. Die Detektion kann mit Hilfe verschiedenster Reagenzien bei Tageslicht, unter ultraviolettem Licht oder in Spezialexperimenten erfolgen.<sup>16</sup>



Abbildung 5: Entwicklung eines Dünnschichtchromatogramms

Die verwendeten DC-Systeme sind schematisch in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst.

Stationäre Phase:	TLC Kieselgel 60 F254
Mobile Phase:	Dichlormethan 30
	Cyclohexan 35
	Ameisensäure 5
	Ethylformiat 30
Detektion:	unter UV 365 nm nach Besprühen mit:
	Naturstoffreagenz A 1% in MeOH
	PEG 400 5% in MeOH

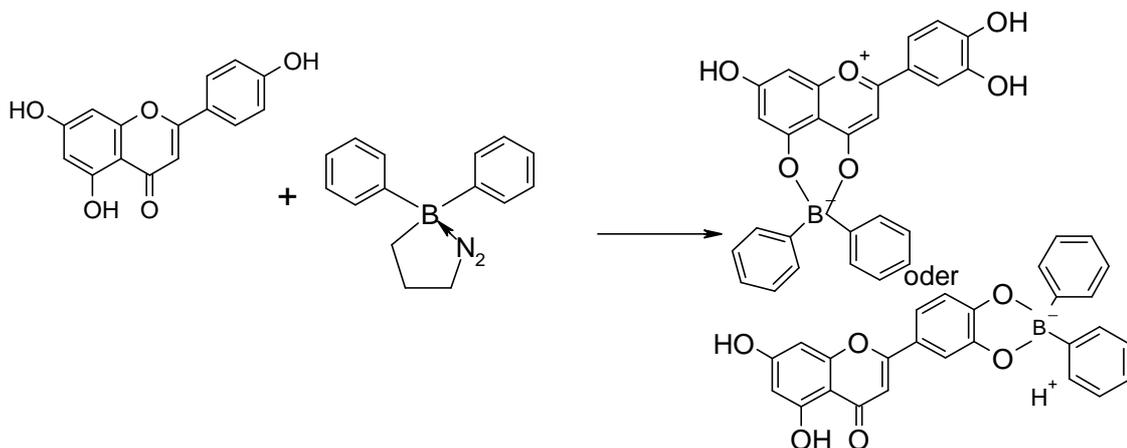
Tabelle 2: DC-System 1 für Flavonoid-Genine

## Material und Methoden

Stationäre Phase:	TLC Kieselgel 60 F254
Mobile Phase:	Ethylacetat 100
	Essigsäure 11
	Ameisensäure 11
	H <sub>2</sub> O 26
Detektion:	unter UV 365 nm nach Besprühen mit:
	Naturstoffreagenz A 1% in MeOH
	PEG 400 5% in MeOH

**Tabelle 3: DC-System 2 für Flavonoidmono- und diglykoside**

Es wurden je 3-8 µl Probenlösung in einer 0,7 cm breiten Zone als schmaler Streifen am Start aufgetragen und trocknen gelassen. Dann wurde die DC-Platte im jeweiligen Fließmittel ohne Kammersättigung bei Raumtemperatur entwickelt und danach getrocknet. Die getrocknete DC-Platte wurde mit Naturstoffreagenz A in 1% Lösung in Methanol besprüht, wieder kurz trocknen gelassen und mit PEG 400 5% in Methanol besprüht. Nach 10 Minuten wurde unter UV-Licht bei 365 nm detektiert. Durch die im Naturstoffreagenz A enthaltene Diphenylborsäure bilden sich Komplexe, die in verschiedenen Farben bei 365 nm fluoreszieren.<sup>17</sup>



**Abbildung 6: Komplexe von Flavonoiden mit Diphenylborsäuremethylester**

### 2.3.2 Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie (SC) ist eine wichtige Methode, um Substanzgemische zu trennen oder aufzureinigen. Als stationäre und mobile Phase kommen dieselben Stoffe zur Verwendung wie bei der DC. Für spezielle Methoden wie

## Material und Methoden

---

z. B. Ionenaustausch-Chromatographie oder Gel-Chromatographie werden andere Systeme verwendet.

Die stationäre Phase wird in ein Rohr, meistens aus Glas, gefüllt, das vertikal montiert ist. Die zu trennenden Substanzen werden entweder gelöst in der mobilen Phase, oder in einem eigenen Lösungsmittel sehr konzentriert auf die Säule aufgetragen. Es wird so lange Fließmittel nachgefüllt, bis alle Substanzen die Säule verlassen haben. Es entsteht ein äußeres Chromatogramm, die Substanzen werden detektiert, nachdem sie die Trennstrecke verlassen haben. Die Detektion erfolgt entweder kontinuierlich mit speziellen Detektoren z. B. UV/VIS-Durchflussphotometer oder diskontinuierlich. Bei der diskontinuierlichen Detektion werden Fraktionen gesammelt und einzeln untersucht. Als Untersuchungsmethoden werden unter anderem Farbreaktionen und DC eingesetzt.<sup>16</sup>

Bei der isokratischen Elution bleiben die Fließmittelparameter gleich, bei der Gradientenelution wird die Elutionskraft stetig erhöht. Die Vorteile der Gradientenelution sind Verkürzung der Analysenzeit, Verringerung des Lösungsmittelverbrauchs, Verbesserung des Trennergebnisses durch Zurückdrängen des „Tailing“, Verbesserung der Peakform (schmäler, höher). Das ist wichtig bei Peaks mit großer Retentionszeit. Als innere Gradienten bezeichnet man Polaritäts-, pH-, Konzentrations-, und Ionenstärke-Gradienten. Äußere Gradienten sind Temperatur und Durchflussrate.<sup>16</sup>

In der folgenden Tabelle sind die Bedingungen der in dieser Arbeit verwendeten Säulenchromatographischen-Systeme dargestellt.

<b>Säule 1</b>		<b>Säule 2</b>
Durchmesser	1 cm	2,5 cm
Stationäre Phase	Kieselgel 60	
Füllhöhe	10 cm	21 cm
Füllmenge	4,3 g	34 g
Mobile Phase	Ethylacetat	
Flussrate	ca. 1 ml/min	
Gradient	Methanol und TFA (s. Kap. 0, Tabelle 9, S.24 und Kap. 3.1.4, Tabelle 10, S.27)	
Überprüfung der Fraktionen	DC-System 2 (s.Tabelle 3, S.11)	

Tabelle 4: Parameter für die SC-Systeme „Säule 1“ und „Säule 2“

### 2.3.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist eine Methode der Säulenchromatographie, die sich durch eine wesentlich bessere Auflösung auszeichnet, auch führt sie zu gut reproduzierbaren Chromatogrammen. Das wird erreicht durch eine Verkleinerung der Teilchengröße, was zu einer Erhöhung der Oberfläche der stationären Phase führt. Durch das Arbeiten mit kleinen Teilchen steigen die Arbeitsdrücke an, es kommt zu Drücken bis 300 bar. Die Pumpen müssen das Fließmittel in der gewünschten Mischung gleichmäßig zur Verfügung stellen. Das wird z. B. durch gegenläufige Doppelkolbenpumpen erreicht.

Die Säulenbetten sind meist aus Edelstahl und weisen für analytische Zwecke Durchmesser zwischen 2-5 mm auf. Die Länge der Säule liegt in der Regel zwischen 5 und 50 cm. Die stationäre Phase muss druckstabil sein. Kieselgel und Aluminium erfüllen diese Anforderung. Es werden sehr häufig „reversed Phase“ (RP) Materialien verwendet. Das sind Kieselgele deren funktionelle Silanol Gruppen alkyliert sind. In der Bezeichnung z. B. C18 wird die Anzahl der Kohlenstoffe im Alkylrest angegeben. Diese RP-Materialien erlauben den Einsatz von Fließmitteln mit hohem Wassergehalt und ergeben sehr gut reproduzierbare Chromatogramme. Es findet meist eine Gradientenelution statt mit Mischungen von Wasser und/oder Acetonitril. Die polaren Substanzen werden zuerst eluiert, durch die Erhöhung der Komponente mit der höheren Elutionskraft im Fließmittel werden die apolaren Substanzen eluiert. Die verwendete Aquasil C18 Säule hat neben den Alkylresten noch eine bestimmte Anzahl an OH-Gruppen, so kommt es auch zu Wechselwirkungen mit stärker polaren Analyten, und das Trennverhalten ist anders als bei einer reinen RP-C18 Säule.

Als Kenngröße wird die Retentionszeit ( $R_t$ ) verwendet. Die Retentionszeit setzt sich zusammen aus der Zeit, die das Fließmittel braucht, um die Trennstrecke zu durchfließen (Totzeit) und der Zeit, die die Substanz mit der stationären Phase interagiert (netto Retentionszeit).

Es werden Detektoren verwendet, die ein äußeres Chromatogramm erstellen. Je nach Detektor, meistens schon mit Zusatzinformationen über die detektierten

## Material und Methoden

Substanzen. Als Detektoren werden UV-Detektoren, Fluoreszenzdetektoren, Dioden-Array-Detektoren (DAD), IR-Spektrometer, Leitfähigkeitszellen und Massenspektrometer eingesetzt. Sie arbeiten kontinuierlich und geben eine graphische Darstellung mit den Retentionszeiten und anderen Daten. Durch die Verwendung der HPLC werden kürzere Analysezeiten und Verringerung des Lösungsmittel Verbrauchs verbunden mit besserer Trennleistung erreicht.<sup>16</sup> Über die verwendeten HPLC-Methoden gibt die folgende Tabelle Auskunft.

<b>Gerät</b>	Shimadzu	Degasser DGU-20As Pumpe LC-20AD Auto sampler SIL-20AC HT Interface CBM-20A Säulenofen CTO-20AC		
Säule	d= 4,6 mm	Länge 250 mm		
Stationäre Phase	Aquasil C18			
Mobile Phase	H <sub>2</sub> O pH 2,8,	mit TFA		
Flussrate	1 ml/min			
Detektor	DAD	Shimadzu SPD-M20A		
Gradientenelution:				
<b>HPLC-Methode Genine</b>				
Injektionsvolumen:	10 µl			
Zeitpunkt:	0 min	60 min	65 min	
ACN-Konzentration:	15%	45%	95%	
Gradient:	0,5% /min	10% /min		
<b>HPLC-Methode Flavonoidglykoside</b>				
Injektionsvolumen:	10 µl			
Zeitpunkt	0 min	35 min	60 min	
ACN-Konzentration	15%	20,25%	29%	
Gradient:	0,15% /min	0,35% /min.		
<b>HPLC-Methode Semipräparativ</b>				
Injektionsvolumen:	10 bis 40 µl			
Zeitpunkt:	0 min	17,67 min	25 min	
ACN-Konzentration:	17%	19,65%	19,65%	
Gradient:	0,15% /min	isokratisch		

Tabelle 5: Parameter für die HPLC

### 2.3.4 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) ist eine chromatographische Methode, die speziell für leicht flüchtige und temperaturunempfindliche Substanzen geeignet ist. Die mobile Phase ist ein inertes Trägergas wie z. B. Helium oder Stickstoff. Die stationäre Phase ist in einer Kapillar-Säule als Schicht aufgebracht und kann fest oder flüssig sein. Als Beschichtung werden unter anderem Polydimethylsiloxan, Polyphenylmethylsiloxan, Polycyanopropylphenylsiloxan und Phenylmethylsiloxan mit unterschiedlicher Verteilung der endständigen Gruppen verwendet.<sup>19</sup>

Die Probe wird in den beheizten Injektorblock eingebracht, dort verdampft und mit dem Trägergas durch die Säule transportiert. Die Interaktionen zwischen den zu trennenden Substanzen und der stationären Phase finden an der Grenzfläche der stationären Phase statt und sind durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften (z. B. Verteilungskoeffizient zwischen den beiden Phasen) bestimmt. So kommt es zu einer unterschiedlichen Retention, und die Substanzen verlassen hintereinander die Säule. Die Trennung kann bei konstanter Temperatur durchgeführt werden oder mit einem Temperaturgradienten. Die Substanzen werden nach dem Verlassen der Säule detektiert, es entsteht ein äußeres Chromatogramm.

Es kommen verschiedene Detektoren zum Einsatz. Ein Wärmeleitfähigkeitdetektor misst mit beheizten Widerstanddrähten die Leitfähigkeit im Messkanal und in einem Referenzkanal, der von reinem Trägergas durchströmt wird. Durch die Differenz der Leitfähigkeit ist die Menge an Probe, die die Säule verlässt, messbar. Flammenionisationsdetektoren werden für organische Substanzen allgemein verwendet und zerstören die Substanzen. Direkt am Säulenende befindet sich die Brennerdüse. Je nach Trägergas ( $H_2$ , He,  $N_2$ ) mischt man vor dem Detektor Wasserstoff und synthetische Luft zu. In der Flamme bilden sich Ionen und freie Elektronen. Die geladenen Teilchen bewirken einen messbaren Strom zwischen Düse (Kathode) und der zylinderförmigen Anode. Es fließt ein erhöhter Strom im Vergleich zum Signal der reinen Trägergas/Brenngas-Flamme. Diese Signaldifferenz gibt Auskunft über die Probenmenge, die pro Zeiteinheit (mg/s) den Detektor passiert.

## Material und Methoden

In dieser Arbeit wurde ein Massenspektrometer (s. Kap. 2.5, S.17) als Detektor verwendet. Die Ionisierung erfolgt durch Elektronenstoß. Durch den Zusammenstoß mit beschleunigten Elektronen, wird ein Elektron aus dem Molekül geschleudert, es entsteht ein geladenes, instabiles Radikal welches zerfällt. Durch die Messung des Total-Ionenstroms wird die Probenmenge, die den Detektor durchströmt, bestimmt. Es finden weitere Detektoren Verwendung wie Elektreneinfangdetektor, Atomemissionsdetektor und andere.

Sollen Substanzen in einem gaschromatographischen System getrennt werden die nicht flüchtig oder thermolabil sind, gibt es die Möglichkeit sie zu derivatisieren. So werden z. B. Alkohole, Amine und Zucker soweit thermisch stabilisiert, dass sie verdampfbar sind und über GC getrennt werden können. Für Zucker bietet sich die Trimethylsilylierung mittels Spezialreagenzien an.<sup>18</sup>

<b>Gerät</b>	Shimadzu GC MS Serie QP2010		
Säule	Schichtdicke: 0,25 µm	d=0,25 mm	Länge: 60 m
Stationäre Phase	Phenomenex	ZB-5 (mittel polar)	
Trärgas	Helium 5.0	Druck: 247,4 kPa	
Flussrate: 25 ml/min	Säulenfluss: 2 ml/min	Geschwindigkeit: 37,2 cm / sec	
Temperaturgradient:	37 min bis 56,7 Min.	270°C für 10 Minuten	
Starttemperatur	100°C		
Einspritzmenge	1 µl		
Einspritztemperatur	270°C		
Detektor	Massenspektrometer	Shimadzu QP2010	
Ionisation	Elektronenstoß	250°C	
Interface Temp.	270°C		
Messbereich	40-500 m/z		

Tabelle 6: Parameter für die GC-MS

## 2.4 UV/VIS-Spektroskopie

Diese Methode arbeitet mit den Wechselwirkungen von Strahlung und Materie. Moleküle nehmen aus dem Licht Energie in Form von Photonen oder Lichtquanten auf. Dabei wird ein Elektron des Moleküls von seinem Energieniveau in ein höheres Energieniveau angehoben, dadurch wird eine bestimmte Menge Energie (Licht) absorbiert und später wieder abgegeben. Das geschieht durch

Strahlung, die entweder im sichtbaren, ultravioletten oder auch im infraroten Bereich liegt. Da für ein bestimmtes Molekül nur eine bestimmte Anzahl solcher Übergänge möglich ist und nur genau die Energie absorbiert wird, die für einen Übergang nötig ist, ist so ein Spektrum mit seinen Maxima und Minima für eine Substanz charakteristisch. So kann ein Spektrum zur Strukturaufklärung, als auch zum Vergleich mit anderen Spektren aus Datenbanken, um Substanzen identifizieren zu können, geeignet sein.<sup>19 20</sup> Ein Dioden-Array-Detektor (DAD) misst, durch die Verwendung einer Deuterium und einer Wolfram Lampe, kontinuierlich über den weiten Wellenlängenbereich von 190-800 nm. Es wird die Absorption im gesamten Bereich gemessen und graphisch dargestellt.

Zur Aufnahme der Spektren wurde ein DAD verwendet, der mit der HPLC gekoppelt war. So gibt es zu jedem Spektrum die Retentionszeit und die Angabe der Acetonitril-Konzentration zu dem Zeitpunkt der Aufnahme.

## 2.5 Massenspektrometrie

Ein Massenspektrum (MS) eines Moleküls kommt durch Ionisierung des neutralen Moleküls und anschließende Fragmentierung zustande. Die Probe wird in das Massenspektrometer eingebracht und dort ionisiert. Die Ionen werden gemäß ihres Verhältnisses Masse-zu-Ladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt und detektiert. Die Intensität der einzelnen Ionen wird gemessen und entweder in einer Zahlentabelle oder in einem Spektrum wiedergegeben. Verschiedene Arten der Ionisierung geben unterschiedliche Molekülionenpeaks und unterschiedliche Fragmentierungsmuster. Die Fragmentierung ist abhängig von der chemischen Struktur des Moleküls und lässt dadurch Rückschlüsse auf diese zu.

Es wurde ein Massenspektrometer verwendet, in dem die Ionenerzeugung mittels ESI geschieht. ESI steht für Elektrospray Ionisation, dabei wird eine Substanzlösung durch eine Kapillare in eine Kammer gesprüht. Diesem Sprühnebel entgegengerichtet strömt ein Gas ( $N_2$ ). Zwischen der Kapillare und der Kammerwand herrscht eine Spannung von einigen Kilovolt. Das Lösungsmittel verdampft, es entstehen kleine geladene Tröpfchen, die getrieben durch ein elekt-

## Material und Methoden

risches Feld, durch eine Glaskapillare in den Analysatorvorraum wandern. Das Gerät arbeitet mit einem Dual-Octopol als Analysator. Durch die Ausrichtung der elektrischen Felder können immer nur Ionen einer bestimmten Masse den Analysator durchqueren. Durch mehrere elektrische Linsen kommen die Ionen in die Ionenfalle. Die Ionenfalle (Iontrap, IT) besteht aus einer Ringelektrode, durch diese können bestimmte Ionen selektiv festgehalten oder durch gelassen werden (MS<sup>1</sup>). In der Ionenfalle werden diese Ionen durch Zusammenstöße mit Helium-Kernen fragmentiert. Die Fragmente werden einzeln ausgelassen, so dass man ein Massenspektrum der Fragmente erhält (MS<sup>2</sup>). Es ist möglich, ein Fragment bestimmt durch m/z auszuwählen und weiter zu fragmentieren, um wiederum ein Spektrum des Fragmentierungsmusters zu erhalten (MS<sup>3</sup>).<sup>21 22</sup>

Da Flavonoidglykoside aufgrund ihres phenolischen Charakters leicht Protonen abgeben, wurde im negativen Modus gemessen. Das bedeutet, die gemessene Masse des Molekülionenpeaks ist um eine Masseinheit weniger als die Molekülmasse:  $[M-H]^-$  (= Quasimolekülion).

<b>HPLC-Einheit</b>	Dionex UltiMate 3000 RSLC-series System
Methode siehe HPLC	Tabelle 5, S.14
Detektion	DAD
<b>Massenspektrometer</b>	Bruker Daltonics ESI-IT-MS
Ionisation	Elektrospray
Ionen Polarität	negativ
Trocknungstemperatur	365°C
Vernebler	60 psi (N <sub>2</sub> )
Trocknungsgasfluss	12 l/min (N <sub>2</sub> )
Kapillarenspannung	4,0 kV
Messbereich MS	130 m/z-1500 m/z
Messbereich MS (n)	40 m/z-1000 m/z
Durchschnittliche Anzahl	5 Spektren
MS(n) Durchschnittliche Anzahl	5 Spektren
Tiefe AutoMS (>2)	3
Ausgangionen AutoMS2	1
Ausgangionen AutoMS (>2)	2
Kollisionsgas	Helium 5.0
Fragmentierungsspannung	0,70 V

Tabelle 7: Parameter für die MS (Bruker Ionenfalle) gekoppelt mit HPLC

## 2.6 Kern-Magnet-Resonanz-Spektroskopie

Wie die Elektronen der Atomhülle haben auch die einzelnen Kernbausteine einen Eigendrehimpuls (Spin) und verhalten sich wie kleine Magnete. Bei Kernen mit gerader Nukleonenzahl können sich die magnetischen Momente der einzelnen Kernbausteine aufheben, bei ungerader Nukleonenzahl ist dies nicht der Fall. So ein Kern besitzt einen resultierenden Gesamtspin und ein magnetisches Moment. Bringt man einen Kern, der ein magnetisches Moment besitzt, in ein Magnetfeld, so kann sich sein Spin entweder parallel oder antiparallel zum Feld einstellen. Die beiden Einstellungen stellen verschiedene Energieniveaus dar, die Energiedifferenz hängt von der Stärke des Magnetfeldes und der Größe des magnetischen Moments, also von Spin und Masse des Kerns, ab. Mit einem kurzen Radiowellenimpuls, dessen Frequenz der Energiedifferenz entspricht, kann man den Kernspin aus dem energetisch niedrigeren in den energetisch höheren Zustand umklappen, dadurch entsteht ein zum äußeren Magnetfeld quer stehendes inneres Magnetfeld. Wenn die Kerne anschließend in ihre energetisch günstigere Orientierung zurückklappen, verändert sich das innere Magnetfeld, die longitudinale Magnetisierung steigt wieder bis zum Gleichgewicht an.<sup>24</sup>

Man misst den, nach dem Ende des einige  $\mu\text{s}$  dauernden Hochfrequenz-Impulses, auftretenden Abfall der Quermagnetisierung, genannt FID (free induction decay). Der FID wird durch ein komplexes Schwingungsmuster aus überlagerten und gedämpften Schwingungen dargestellt.

Durch eine mathematische Operation, die Fourier-Transformation, erhält man daraus ein Kernresonanz-Spektrum, aus dem man die Resonanzfrequenzen in Form der chemischen Verschiebung ablesen kann. Die Resonanzfrequenz hängt vom Magnetfeld am Ort des Kerns ab. Dieses wird einerseits durch das externe Magnetfeld, andererseits durch die von den Elektronen der Umgebung hervorgerufenen Magnetfelder bestimmt. Da in der Probe die analysiert werden soll, nicht ein Kern alleine vorkommt, und die Kerne eine unterschiedliche chemische Umgebung haben, werden viele Signale ausgesandt über die Zeitspanne verteilt, die es braucht, bis alle angeregten Kerne wieder in ihren Ausgangs-

zustand zurückgekehrt sind. Durch die Fourier-Transformation wird das Signal aus der Zeitskala in eine Frequenzskala umgerechnet.<sup>23</sup> Die Eigenschaften der Kernresonanzbanden wie Lage, Feinstruktur, Linienbreite und Intensität, lassen Rückschlüsse auf die Struktur der untersuchten Verbindung zu.<sup>23</sup> Zur Struktur- aufklärung größerer Moleküle werden mehrdimensionale Kernmagnetresonanz (NMR) Methoden verwendet:

**COSY** (COrelated SpectroscopY): Das ist eine zweidimensionale NMR- Methode bei der die Interaktionen von Protonen die über zwei kovalente Bin- dungen miteinander koppeln, in speziellen Abbildungen gezeigt werden.

**HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy): Bei dieser zweidimensionalen Methode werden die chemischen Verschiebungen von Koh- lenstoffatomen und den an sie gebundenen Protonen dargestellt.

**HBMC** (Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy): Diese Methode gibt Auskunft über die Interaktionen zwischen Protonen und Kohlenstoffatomen die über zwei bis vier kovalente Bindungen miteinander verbunden sind. In sol- chen Spektren findet man auch quartäre Kohlenstoffe.<sup>24</sup>

Die Aufnahme der in dieser Arbeit angeführten Spektren erfolgte an einem 400 MHz-Gerät (Varian-AM 400 WB), die Substanz wurde in deuteriertem Methanol bei 25°C vermessen, als interner Standard diente TM S.

## 2.7 Polarimetrie

Der Drehwert wurde mit einem Perkin Elmer 341 Polarimeter unter Verwendung von Natrium-D-Licht (589,3 nm) bestimmt. Die Thermostatisierung auf 20°C erfolgte mit einem Haake Thermostat.

Gerät	Perkin Elmer Polarimeter 341
Lichtquelle	Na Gasentladungslampe (589,3 nm)
Detektor	Photomultiplier 1P28A
Polarisator, Analysator	Calcit Glan Prismen
Meßzelle	1 ml, 100 mm Länge
Temperierung	Haake Thermostat Temperierteil C1, Badgefäß K15

Tabelle 8: Parameter zur Polarimetrie

## 3 Experimenteller Teil

Der experimentelle Teil gliedert sich in drei Kapitel, zuerst erfolgt die Darstellung von Flavonoiden (Kap. 3.1). Diese, die Sammelfractionen und der OWE 02/05 werden mittels analytischer Methoden charakterisiert (Kap. 3.2) und letztlich werden die dargestellten Flavonoide mittels GC-MS und HPLC-MS identifiziert (Kap. 3.3).

### 3.1 Präparative Isolierung

Dieser Teil behandelt die Darstellung von Reinsubstanzen ausgehend vom OWE 02/05 (s. Kap. 2.1, S.7). Zunächst war es wichtig, mittels HPLC einen Überblick über die Flavonoidkomponenten des OWE zu erhalten. Im Zuge einer parallel entstehenden Dissertation<sup>12</sup> war der OWE 02/05 erstmalig mittels HPLC untersucht worden, die vorhandene Methode war aber nicht geeignet, da die vielen Peaks nicht ausreichend getrennt waren. Dies erforderte eine Optimierung der HPLC-Methode.

#### 3.1.1 Optimierung der HPLC-Methode

Als Grundlage für die weitere Arbeit war eine HPLC-Methode gesucht, die den Bereich, in dem Flavonoidmono- und diglykoside liegen, gut trennt. Ausgehend von der vorhandenen Methode (Säule Aquasil-C18, Wasser pH 2,8, Gradient Acetonitril)<sup>12</sup> wurde in mehreren Schritten optimiert. Bei einem Acetonitril-Gradienten von 0,5% pro Minute zeigen sich die Gene gut getrennt. Diese Methode wird für die Analyse der im OWE enthaltenen Gene beibehalten (HPLC-Methode Gene, s. Tabelle 5, S.14 und Abbildung 24, S.45) und für diverse Sammelfractionen (s. Kap. 3.3.1, S.46) verwendet. In der folgenden Abbildung ist eine HPLC-Analyse des OWE 02/05 zu sehen, die gut getrennten Gene und der andere zu untersuchende Bereich sind farbig gekennzeichnet.

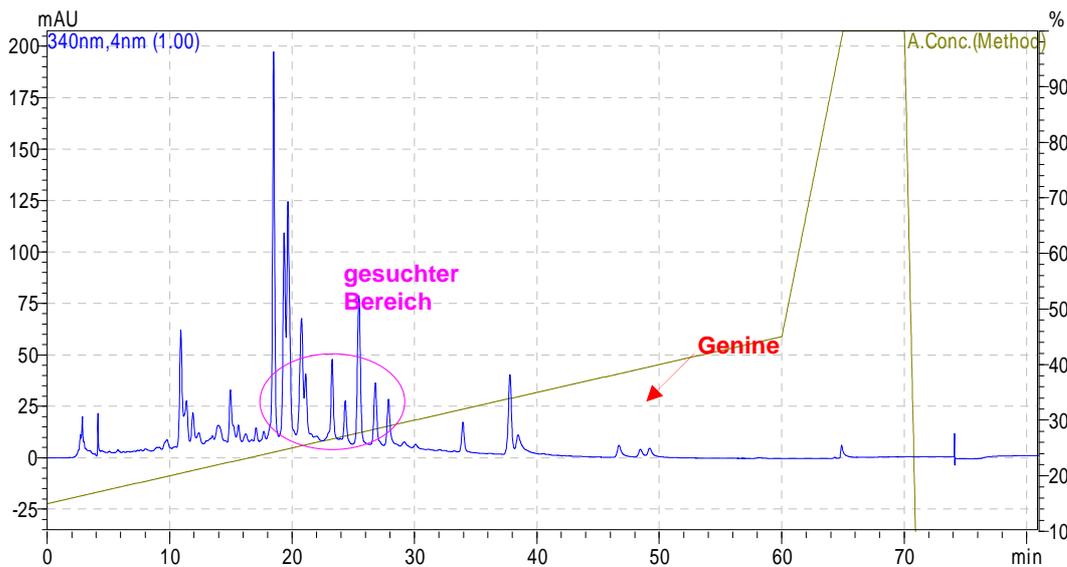


Abbildung 7: Analyse des OWE von *Dianthus versicolor* 02/05 (s. Abb. 3, S.6) mittels HPLC-Methode Genine (Parameter s. Tabelle 5, S.14), Chromatogramm aufgenommen bei 340 nm

Da die Trennung im Bereich der Glykoside, bei einer Acetonitril-Konzentration zwischen 20% und 30% nicht gut war, wurde weiter optimiert, indem der Gradient etwas flacher gewählt wurde. Die beste Trennung wurde erzielt, indem zuerst mit einem Gradienten von 0,15% / min für 35 Minuten und anschließend mit einer Steigerungsrate von 0,35% / min für 25 Minuten gefahren wurde (HPLC-Methode Flavonoidglykoside s. Tabelle 5, S.14). Diese Methode wurde verwendet, um den OWE mittels HPLC zu charakterisieren (s. Kap. 3.2.1, S.33), weiters für die HPLC-MS-Analyse (s. Kap. 3.2.4, S.41) und für die vergleichenden Analysen der Sammelfractionen (s. Kap. 3.3.2, S.52) mit den entsprechenden Reinsubstanzen (s. Kap. 3.2.3, S.41).

Um Substanzen zur Identifizierung zu isolieren, sollte der Extrakt noch effizienter aufgetrennt werden. Da die Isolierung mittels analytischer HPLC sehr aufwendig ist und nur eine geringe Ausbeute möglich ist, wurde nach einer effektiveren Vorgangsweise gesucht.

### 3.1.2 Optimierung der Trennung mittels Säulenchromatographie

Es wurde versucht, den OWE 02/05 (s. Abbildung 3, S.6) mittels Festphasenextraktion (SPE) zu fraktionieren. Zuerst wurden C-18 SPE Kartuschen verwendet. Da diese Fraktionierung nicht zufrieden stellend war, wurden für den nächsten Versuch C-2 Kartuschen verwendet, auch mit diesen kam keine ausreichende

## Experimenteller Teil

Fraktionierung zustande. Da in der DC mit dem vorhandenen DC-System 2 (s. Tabelle 3, S.11) eine gute Trennung sichtbar war (s. Abbildung 3, S.6), wurde versucht, die Methode der Dünnschichtchromatographie auf eine Kieselgel Säule zu adaptieren. Es wurde das Fließmittel angepasst und optimiert.

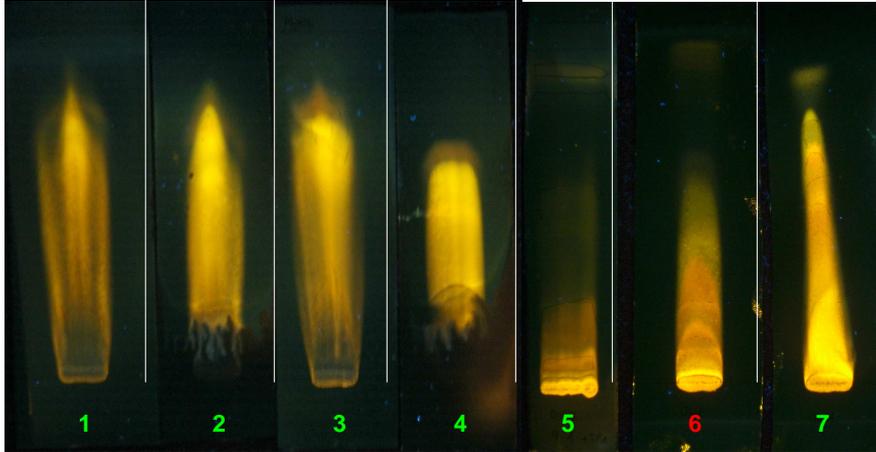


Abbildung 8: Testung verschiedener mobiler Phasen für die SC-Trennung des OWE 02/05 mittels DC, (Parameter s. Tabelle 3, S.11, mobile Phasen siehe Legende)

1	2	3	4	5	6	7
EtOAc-MeOH	EtOAc-MeOH	MeOH	MeOH-TFA	EtOAc-MeOH-TFA	EtOAc-MeOH	EtOAc-MeOH
1 + 1	50 + 50 + 0,1	100%	99,9 + 0,1	89,99 + 10 + 0,01	9 + 1 3-fach Entwicklung	8 + 2

Es wurden 4 µl OWE 02/05 (ca. 5%ig in 40% Methanol gelöst) aufgetragen, in den angegebenen Fließmitteln entwickelt und nach Besprühen mit NSA und PEG 400 unter UV 365 nm detektiert. Da sich die Elutionskraft durch das Übertragen von DC auf SC verstärkt, lässt sich durch eine dreifache Entwicklung das Trennverhalten gut Abschätzen. Das heißt die Banden sollten nach dreimaliger Entwicklung bis zu einem Rf-Wert von 0,5 verteilt sein. Das ist in Versuch sechs (in Abbildung 8 rot markiert) der Fall. Demnach wurde die SC-Trennung mit dem Verhältnis Ethylacetat-Methanol (9 + 1) begonnen, im Verlauf steigerten wir den Anteil an Methanol (s. Tabelle 9, S.24 und, S.27).

### 3.1.3 Säulenchromatographische Trennung: „Säule 1“

Zu erst wurden auf eine kleinere Säule 100 mg OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6 und Kap. 2.1, S.7) aufgetragen und nach folgendem Schema eluiert.

Sammelfraktion	Fraktionen	Größe der einzelnen Fraktionen	EtOAc-MeOH-TFA	Volumina
SF 1	1/1-4/1	2 ml	9 + 1 + 0	200 ml
SF 2	5/1-8/1	2 ml	9 + 1 + 0	
SF 3	9/1-12/1	2 ml	9 + 1 + 0	
SF 4	13/1-15/1	2 ml	9 + 1 + 0	
SF 5	16/1-21/1	2 ml	9 + 1 + 0	
SF 6	22/1-24/1	2 ml	9 + 1 + 0	
SF 7	1/2-19/2	5 ml	8 + 2 + 0	100 ml
SF 8	20/2-2/3	2 ml	1 + 1 + 0	120 ml
SF 9	3/3-18/3	2 ml	1 + 1 + 0	
SF 10	19/3-23/3	5 ml	50 + 50 + 0,01	120 ml
SF 11	1/4	70 ml	MeOH 100%	70 ml

Tabelle 9: Säulenchromatographische Trennung von OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6), Parameter: „Säule 1“ (s. Tab. 4, S.12)

Es wurde mit 200 ml Ethylacetat-Methanol (9 + 1) begonnen, weiter eluiert mit 100 ml (8 + 2), 120 ml (1 + 1), 120 ml (50 + 50 + 0,01) und mit 70 ml reinem Methanol abgeschlossen.

Es wurde ca. jede vierte Fraktion im Rotationsverdampfer eingedampft und in 100 µl 40% Methanol neuerlich gelöst. 5 µl dieser Lösung wurden mit DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11) entwickelt und detektiert. Die Fraktionen wurden, ausgewählt nach den gleichen Banden, zu Sammelfraktionen zusammengeführt.

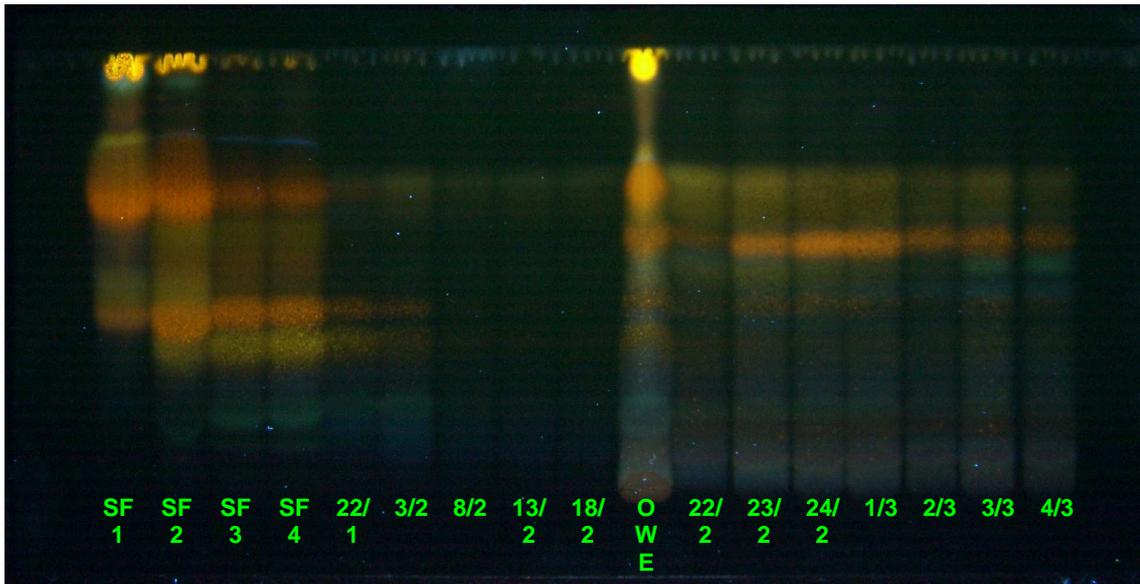


Abbildung 9: Analyse ausgewählter Fraktionen nach SC-Auftrennung (Parameter: „Säule 1“ s. Tab. 9, S. 24) des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6) mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11)

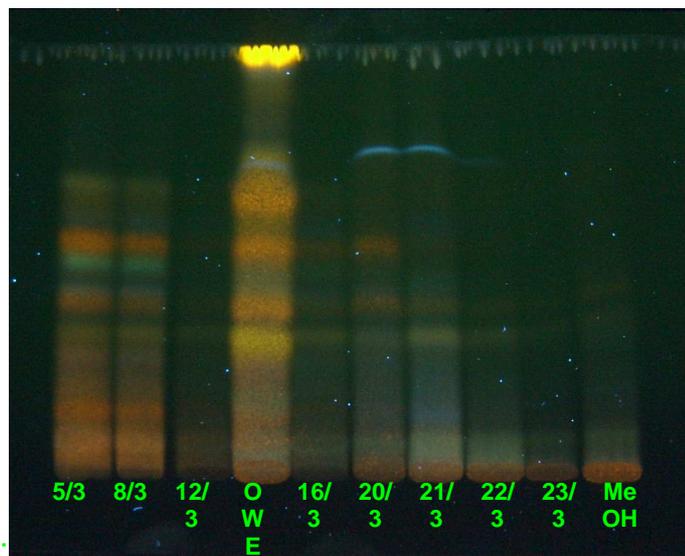


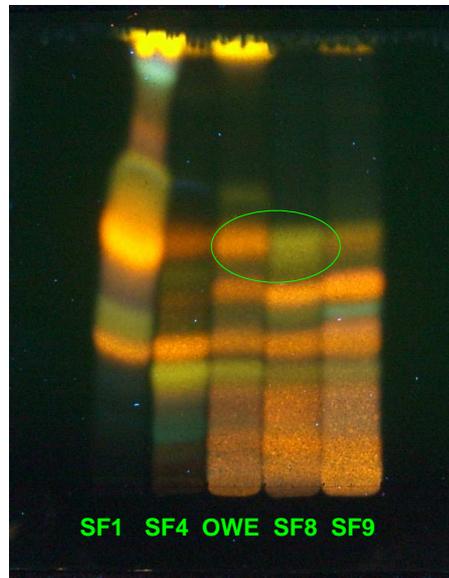
Abbildung 10: Analyse weiterer ausgewählter Fraktionen nach SC-Auftrennung (Parameter: „Säule 1“ s. Tab. 9, S. 24) des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6) mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S. 11)

In Abbildung 10 kann man sehen, dass viele Banden in den einzelnen Fraktionen sichtbar sind, die in der Bahn des OWE ineinander übergehen und nicht als klar begrenzte Banden zu sehen sind.

## Experimenteller Teil

---

Es wurden möglichst unterschiedliche Sammelfractionen ausgewählt und mittels DC und HPLC verglichen, um zu sehen, in welchen Sammelfractionen welche Banden und welche Peaks vorkommen.



**Abbildung 11:** Analyse ausgewählter Sammelfractionen nach SC-Auftrennung (Parameter: „Säule 1“ s. Tab. 9, S. 24), des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6), mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11)

In dem grün markierten Bereich in Abbildung 11 sind zwei verschieden fluoreszierende Banden mit dem gleichen  $R_f$ -Wert zu sehen, in der Bahn des OWE liegen sie übereinander, in den Sammelfractionen nach der SC liegen sie getrennt vor. Somit war es durch die säulenchromatographische Trennung gelungen, die orange fluoreszierende Verbindung bei  $R_f=0,6$  in früheren Fractionen anzureichern und von der grün fluoreszierenden Verbindung bei  $R_f=0,6$  (s. SF 8, Abb. 11) zu trennen. In Abbildung 12 ist dasselbe Phänomen zu erkennen, Substanzen mit ähnlicher Retentionszeit, sind nach der SC in verschiedenen Sammelfractionen zu sehen.

## Experimenteller Teil

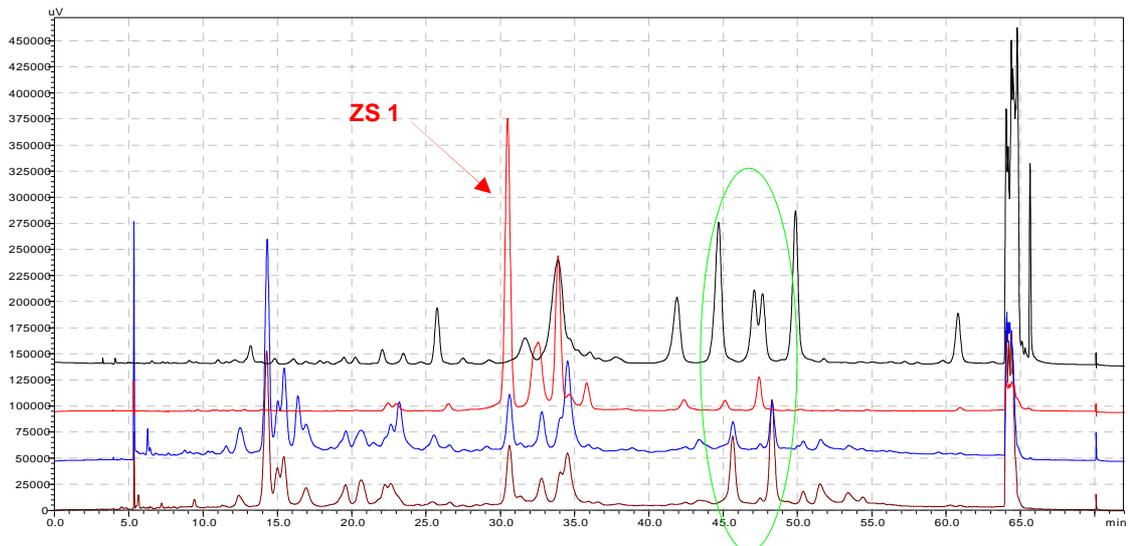


Abbildung 12: Vergleich von SF1, SF4, SF9 und SF8 (s. Abb. 11, S.26) mittels HPLC, mit der Methode für Flavonoidglykoside (Parameter s. Tab. 5, S.14) Chromatogramm aufgenommen bei 340 nm

Es war zu sehen, dass mit der Kieselgelsäule lediglich eine Vorfractionierung zu erzielen war, zur Isolierung sind noch weitere Schritte notwendig. Da es aber gelungen war, eine Anreicherung bestimmter Substanzen – vor allem die Substanz ZS1, mit einer Retentionszeit von 30 min (in Abb.12 mit einem Pfeil gekennzeichnet) in SF 4 – in einzelnen Fraktionen zu erreichen, wurde das Säulenchromatographie-System an einen größeren Maßstab angepasst.

### 3.1.4 Säulenchromatographische Trennung: „Säule 2“

Es wurden 625 mg OWE 02/05 (s. Abbildung 3, S.6) auf die Kieselgelsäule (s. Tabelle 4, S.12) aufgetragen und die Fraktionen F1 bis F 1521 nach folgendem Schema eluiert.

	EtOAc-MeOH-TFA			Volumina	
F 1	100	EtOAc	bis	F 24	150 ml
F 25	95	+ 5	bis	F 215	1000 ml
F 216	90	+ 10	bis	F 528	2000 ml
F 529	85	+15	bis	F 720	1000 ml
F 721	80	+ 20	bis	F 1035	1700 ml
F 1036	75	+ 25	bis	F 1179	800 ml
F 1180	70	+ 30	bis	F 1291	600 ml
F 1292	65	+ 35	bis	F 1345	500 ml
F 1346	60	+ 40	bis	F 1414	800 ml
F 1415	60	+ 40 + 0,01	bis	F 1445	400 ml
F 1446	50	+ 50 + 0,01	bis	F 1504	600 ml
F 1505	50	+ 50 + 0,1	bis	F 1520	200 ml
F 1521	100	MeOH			300 ml

Tabelle 10: Säulenchromatographische Trennung von OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6), Parameter: Säule 2 (s. Tab. 4, S.12)

## Experimenteller Teil

---

Auf dem folgenden Bild ist die Kieselgelsäule mit dem Fraktionssammler zusehen. Die braune Zone am Anfang der Säule ist das Kieselgel, auf dem der gelöste OWE zuerst aufgetragen wurde. Von dieser Zone ausgehend hat sich die Gelbfärbung über das gesamte Kieselgel verteilt. In der ersten Zeit der Elution waren verschiedene Zonen zu erkennen, die verschieden stark gelb gefärbt waren. Mit der Zeit lösten sich diese Zonen aber auf, und das Kieselgel war einheitlich gelb. Die Fraktionen, die die Säule verließen, waren leicht gelb. Das gesamte Kieselgel hat sich immer mehr nach bräunlich verfärbt. Mit der Methanolfraktion konnte der Großteil der noch verbleibenden braun gefärbten Stoffe eluiert werden.



Abbildung 13: „Säule 2“ (s. Tabelle 4, S.12 und Tabelle 10, S.27)

Der Fraktionssammler war je nach Flussgeschwindigkeit auf 5 bis 15 Minuten eingestellt. Die Volumina der Fraktionen betragen bis zur Fraktion F1305 je 5 ml, ab der Fraktion F 1306 10 ml. Es wurde jede fünfte Fraktion im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und in 0,5 ml 40%igem Methanol erneut gelöst. Von dieser Lösung wurden 5  $\mu$ l auf die DC-Platte aufgetragen und in DC-System 2 (s. Abbildung 15, S.31) entwickelt. Einige wenige Fraktionen, wiesen

eine helle Bande an der Fließmittelfront auf, diese wurden auch in DC-System 1 (s. Abbildung 14, S.29) entwickelt, da diese Bande auf Genine hinweist.

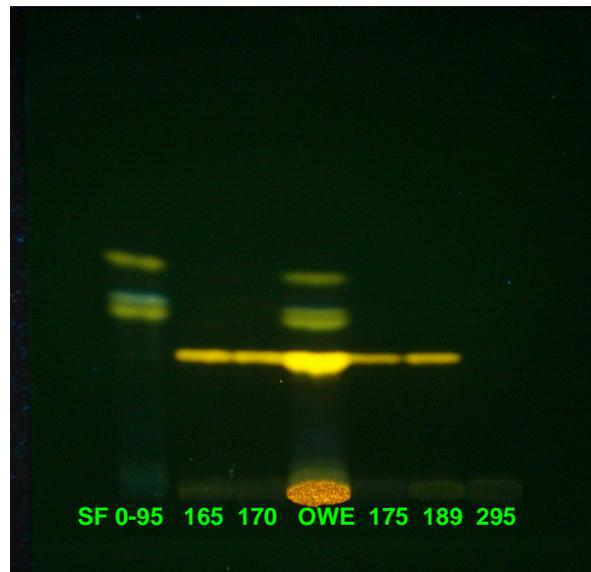


Abbildung 14: Analyse ausgewählter Fraktionen (s. Tab. 10, S.27) nach der säulenchromatischen Auftrennung (Parameter: „Säule 2“, s. Tabelle 4, S.12) des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6) mittels DC-System 1 (s. Tab. 2, S.10)

In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass es sich um mindestens vier Genine handelt, wovon drei in der ersten Sammelfraktion angereichert sind. Die stark fluoreszierende Substanz hat einen kleineren  $R_f$ -Wert, ist später eluiert und in späteren Fraktionen angereichert. In der Fraktion 295 sind keine Banden zu sehen, die auf Flavonoidgenine hinweisen.

Es wurden DC Vergleiche mit Reinsubstanzen durchgeführt, für die in der Literatur<sup>25</sup> ähnliche Fluoreszenzen und  $R_f$ -Werte angegeben sind. Die Identifizierung der Flavonoidgenine ist in Kapitel 3.3.1 S.46 beschrieben. Weiterführende Vergleiche mittels DC sind in Abb. 19 (S.37) zu sehen.

Jede fünfte Fraktion der aus „Säule 2“ resultierenden Fraktionen wurde im DC-System 2 überprüft. Die Fraktionen mit ähnlichen Banden wurden vereint und als Sammelfraktionen weiter untersucht (s. Abb. 15, S.31). Manche Sammelfraktionen hatten eine ölige Konsistenz und wiesen einen eigenartigen Geruch auf.

In Tabelle 11, S.30 sind die Sammelfraktionen aufgelistet, es ist angegeben welche Fraktionen sie enthalten, die Masse und allfällige Besonderheiten.

<b>Sammelfraktion</b>	<b>Menge in g</b>	<b>Besonderheiten</b>
SF 0-95	0,00993	
SF 96-155	0,042	ölig, Geruch ähnlich Isoamylacetat
SF 156-194	0,0526	
SF 205-244	0,0584	ölig, Geruch ähnlich Isoamylacetat
SF 246-280	0,032	
SF 281-299	-	
SF 300-400	0,0185	
SF 401-484	0,01361	
SF 486-533	0,009	
SF 534-644	0,0159	ölig, Geruch ähnlich Isoamylacetat
SF 646-724	0,01002	
SF 726-804	0,00853	
SF 806-854	0,00948	
SF 856-899	0,01109	
SF 901-914	0,00131	
SF 916-964	0,0098	
SF 966-977	0,00273	
SF 978-1030	0,00681	
SF 1031-1120	0,00785	
SF 1121-1295	0,00476	
SF 1296-1336	0,01319	ab F1305 Fraktionsgröße verdoppelt
SF 1337-1349	0,00554	
SF 1350-1400	0,02299	
SF 1401-1419	0,00519	
SF 1420-1434	0,08193	ölig, Geruch ähnlich Isoamylacetat
SF 1436-1449	0,0112	ölig, Geruch ähnlich Isoamylacetat
SF 1451-1474	0,09836	ölig, Geruch ähnlich Isoamylacetat
SF 1476-1499	0,06105	ölig, Geruch ähnlich Isoamylacetat
SF 1501-1520	0,0354	etwas ölig
SF MeOH	0,04883	etwas ölig
Gesamt	0,707	

Tabelle 11: Sammelfraktionen nach säulenchromatischer Auftrennung des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6), Parameter: „Säule 2“ (s. Tabelle 4, S.12 und Tabelle 10, S.27)

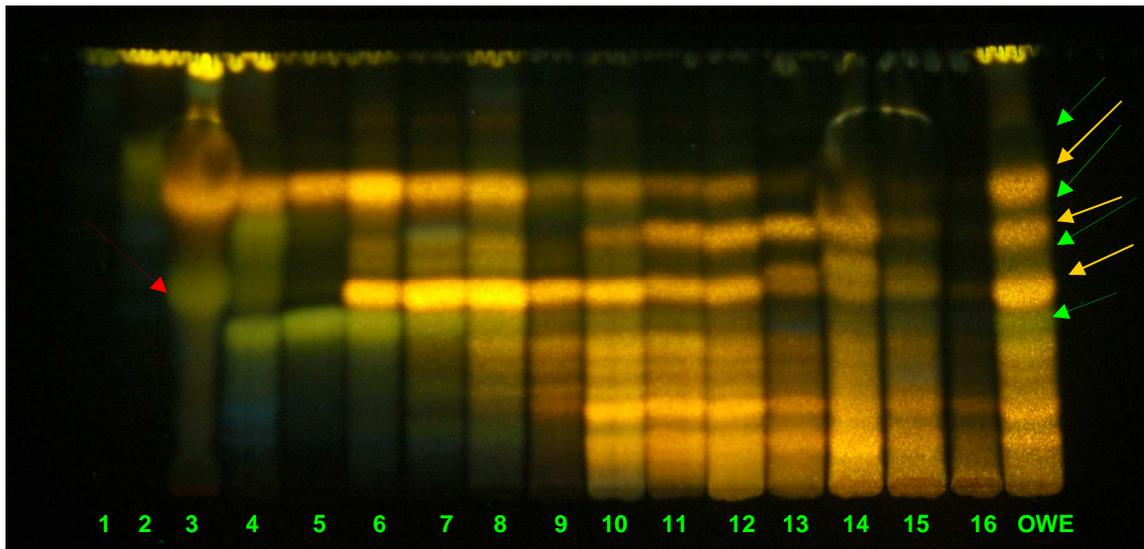


Abbildung 15: Analyse ausgewählter Sammelfractionen (s. Tabelle 10) nach säulenchromatischer Auftrennung (Parameter s. Tabelle 4, S.12) des OWE 02/05 mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S. 11)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
0-95	96-155	205-244	300-400	486-533	646-724	806-854	916-964	1031-1120	1121-1295	1296-1336	1337-1349	1435-1450	1477-1499	1501-1520	1521 MeOH

Tabelle 12: Bezeichnung der Bahnen in Abbildung 15 mit den aufgetragenen Sammelfractionen (s. Tab. 11)

Wenn man die Bahn des OWE 02/05 auf der DC in Abb. 15 betrachtet, sieht man, dass bis  $R_f$ -Wert 0,71 die ganze Bahn fluoresziert, in unterschiedlichen Farben und Intensitäten. Zwischen den ersten drei orangen Banden des OWE (mit den  $R_f$ -Werten: 0,71; 0,58; 0,44), darüber und darunter liegen jeweils grüne Banden (mit den  $R_f$ -Werten: 0,77; 0,61; 0,47; 0,38 siehe die jeweiligen Pfeile in Abb. 15). Die mit dem roten Pfeil markierte Bande in SF 205-244 (Bahn 3) zeigt wieder, dass in diesem Bereich im OWE 02/05 Banden übereinander liegen.

Diese ausgewählten Sammelfractionen wurden auch mittels HPLC analysiert, die Sammelfractionen 0-95 und 96-155 mit der Methode für Flavonoidgenine (s. Tabelle 5, S.14), und alle anderen ausgewählten Sammelfractionen mit der Methode für Flavonoidglykoside (s. Tabelle 5, S.14). Mit Hilfe einiger dieser Analysen gelang es, einzelne Flavonoide zu charakterisieren, sie werden in Kapitel 3.3.2 (S.52) besprochen.

### 3.1.5 Isolierung mittels Semipräparativer HPLC

Es wurden Substanzen die in der HPLC Analyse des OWE s. Abb. 18, S.33 eine Retentionszeiten zwischen 29 und 39 Minuten aufwiesen, aus den Sammelfraktionen in denen sie angereichert waren (SF 300-400, SF 401-484, SF 486-533 und SF 534-644, s. Tabelle 11, S.30) isoliert. Für diese Isolierung wurde die HPLC-Methode nochmals optimiert, um die Trennung zu verbessern und die Dauer der HPLC zu verkürzen.

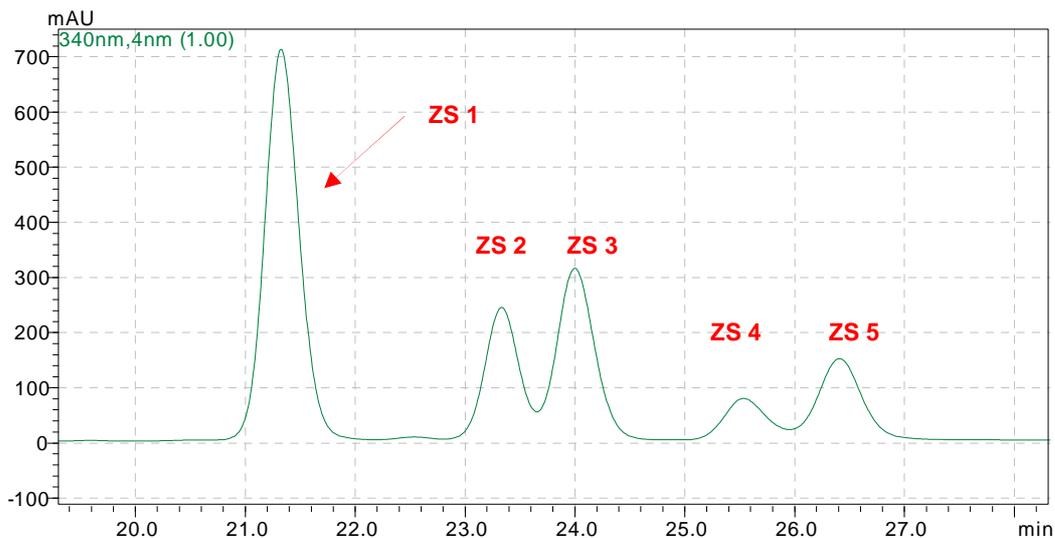
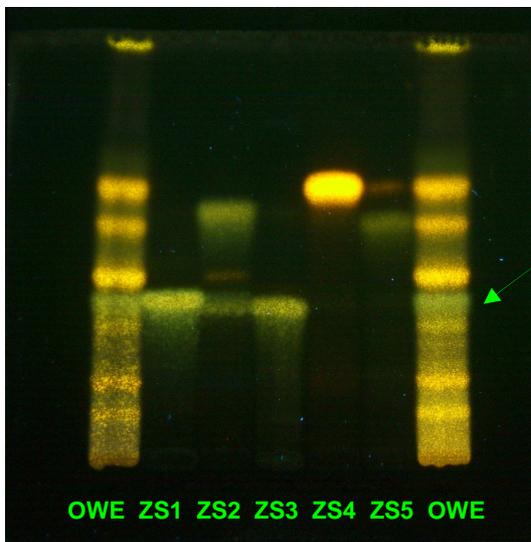


Abbildung 16: Analyse der SF 300-400 (s. Tab. 11, S.30) mittels HPLC-Methode Semipräparativ (Parameter s. Tabelle 5, S.14)

Es wurden von ZS1 1,62 mg, ZS2 0,5 mg, ZS3 1,21 mg, ZS4 0,89 mg und ZS5 0,58 mg in 75 Läufen isoliert und mittels DC-System 2 (s. Abbildung 17, S.11) analysiert.



ZS1	Rf: 0,36
ZS2	Rf: 0,58
ZS3	Rf: 0,35
ZS4	Rf: 0,65
ZS5	Rf: 0,56

Abbildung 17: Analyse der isolierten Substanzen ZS1-5 mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S. 11)

## Experimenteller Teil

Auf der DC in Abb. 17 ist sichtbar, dass es sich bei der grünen Bande (mit Pfeil markiert) im OWE ( $R_f$ : 0,36) um zwei Substanzen handelt: ZS1 und ZS3, sie wurden mittels NMR weiter analysiert. Die isolierten Verbindungen ZS2 und ZS5 waren in der Menge nicht ausreichend für NMR-Untersuchungen und nicht rein genug. ZS4 und ZS2 konnten als bekannte Substanzen identifiziert werden, und sind in Kap. 3.3.2 in Abbildung 35 (S.54) und Abbildung 36 (S.55) charakterisiert, die Strukturaufklärung von ZS1 ist in Kap. 3.3.3. (S.56) beschrieben.

## 3.2 Analytik

Zur Identifizierung der Inhaltstoffe wurden laufend Vergleiche mittels HPLC und DC mit am Institut vorhandenen Reinsubstanzen durchgeführt.

### 3.2.1 Analyse des OWE 02/05 mittels HPLC

Um eine Übersicht über die Flavonoid-Komponenten des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6, und Kap. 2.1, S.7) zu erhalten, wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt. Die dabei on-line aufgenommenen UV/VIS-Spektren können mit den Spektren von Reinsubstanzen verglichen werden, auch die Retentionszeiten lassen sich mit denen der Reinsubstanzen vergleichen.

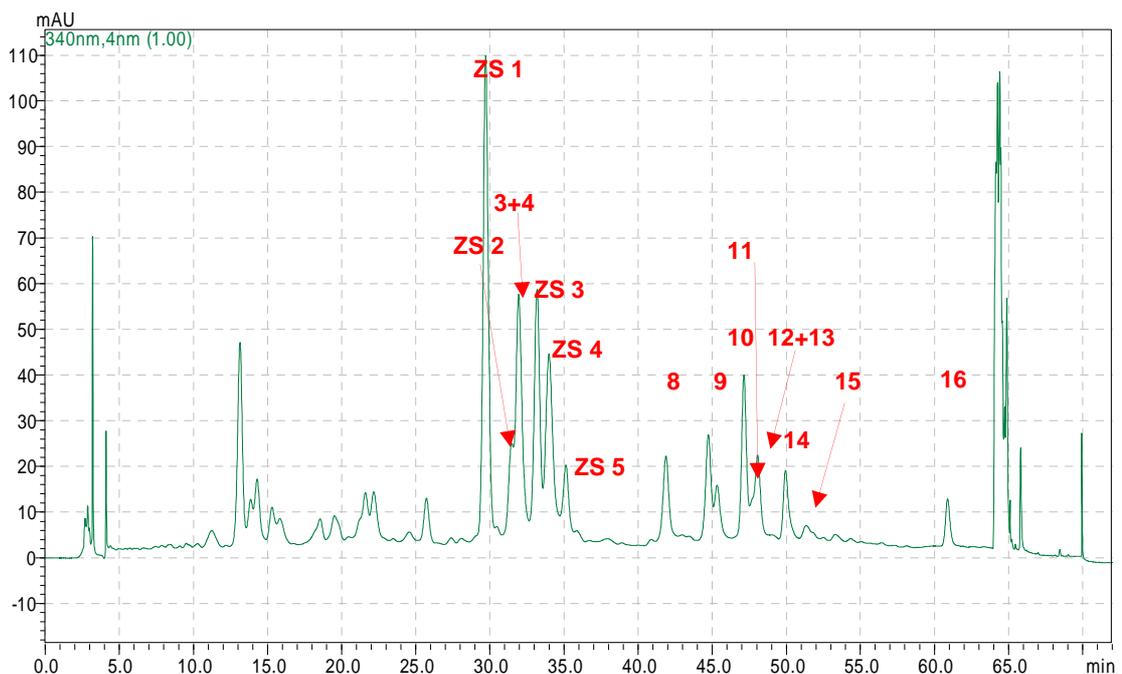
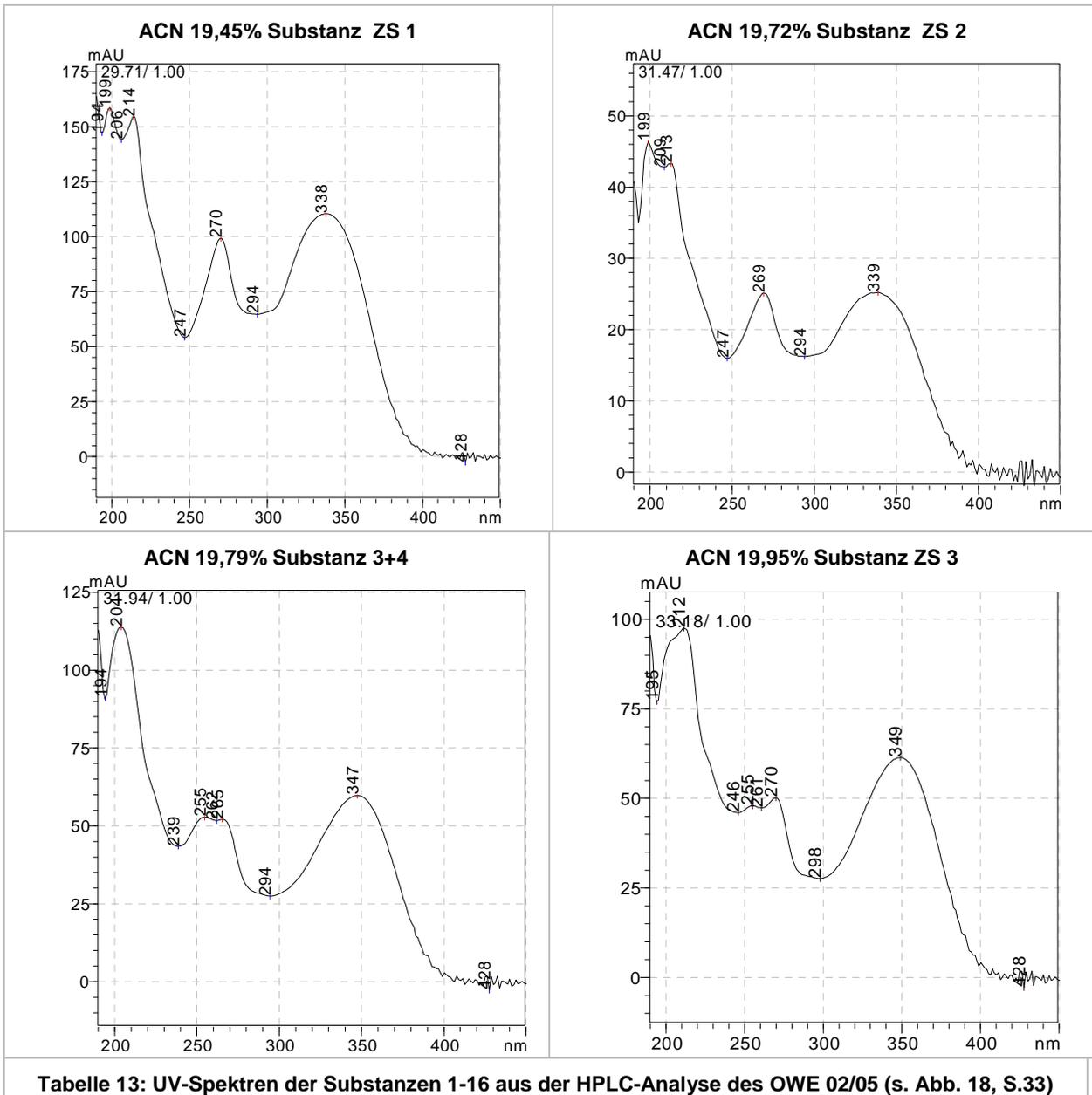


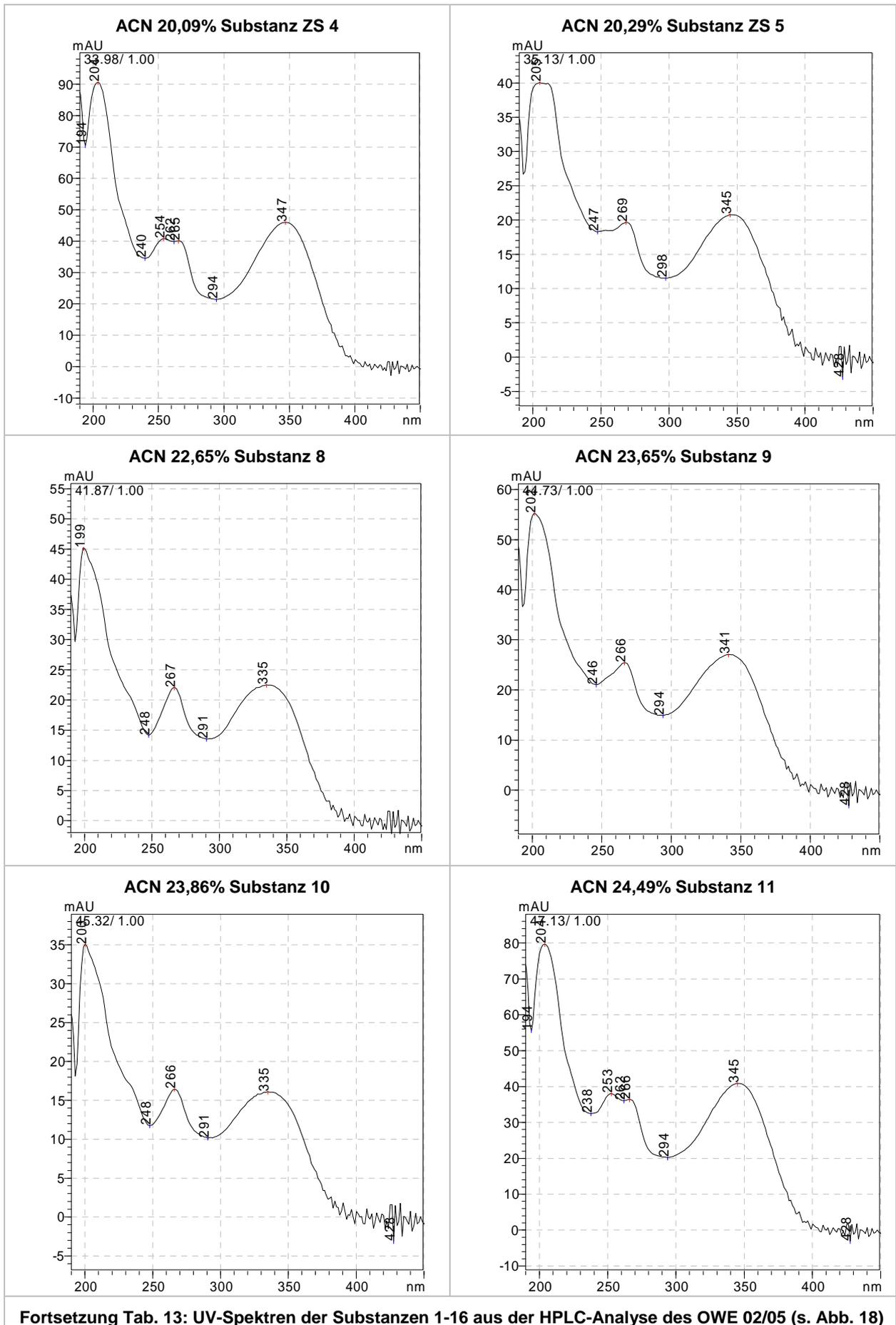
Abbildung 18: Analyse des OWE von *Dianthus versicolor* 02/05 (s. Kap. 2.1, S.7) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parameter s. Tabelle 5, S.14)

## Experimenteller Teil

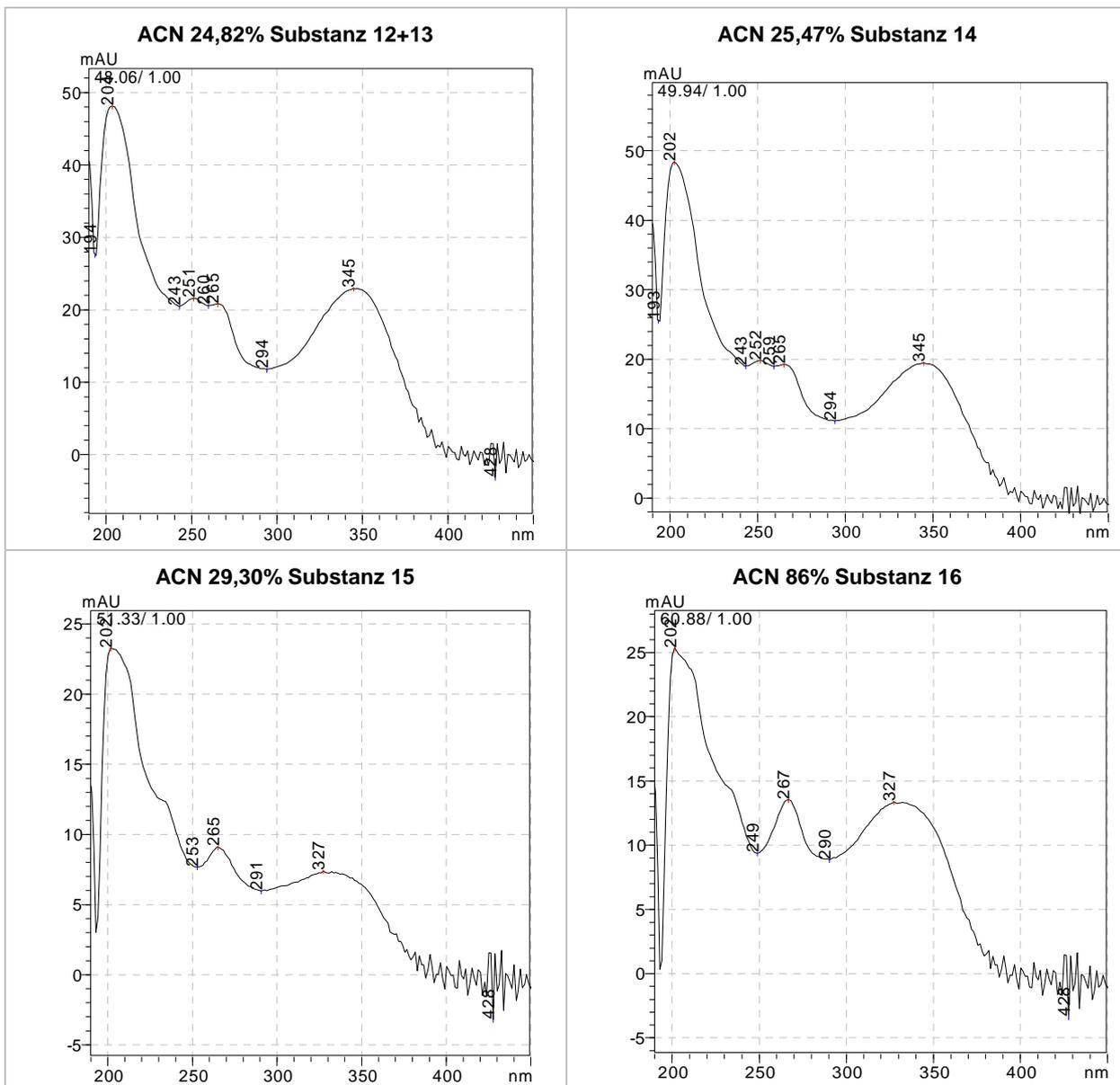
In der folgenden Tabelle (S.34-36) sind die, während der HPLC-Analyse des OWE 02/05 (s. Abb. 18) on-line aufgenommenen UV-Spektren der Substanzen 1-16 abgebildet.



Experimenteller Teil



## Experimenteller Teil

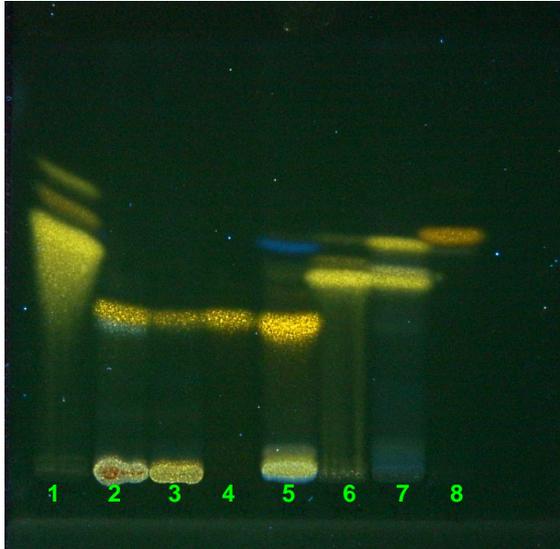


Fortsetzung Tabelle 13: UV-Spektren der Substanzen 1-16 aus der HPLC-Analyse des OWE 02/05 (s. Abb. 18, S.33)

Es sind drei verschiedene Typen von Spektren zu sehen. Da der Kurvenverlauf stark durch das Genin bestimmt ist, lässt sich daran erkennen, dass es sich um Flavonoid Genine handelt, die diese drei Arten von Spektren erzeugen. So geben die UV-Spektren einen Hinweis auf den Grundkörper. Die Maxima und Minima der UV-Kurven wurden mit Daten der Literatur verglichen.<sup>25</sup> Es dürfte sich um Apigenin, Chrysoeriol und Luteolin handeln. Hinweise auf die Zucker sind nur teilweise möglich, da sich deren Polarität hauptsächlich auf die Retentionszeit auswirkt. Der typische Verlauf der UV-Kurve wird durch die Zucker nur wenig verändert.

### 3.2.2 Vergleichsanalysen mittels DC

Anhand der Information aus den UV-Spektren wurden DCs der Genine Apigenin, Luteolin und Chrysin im DC-System 1 (s. Tab.2, S.10) angefertigt.

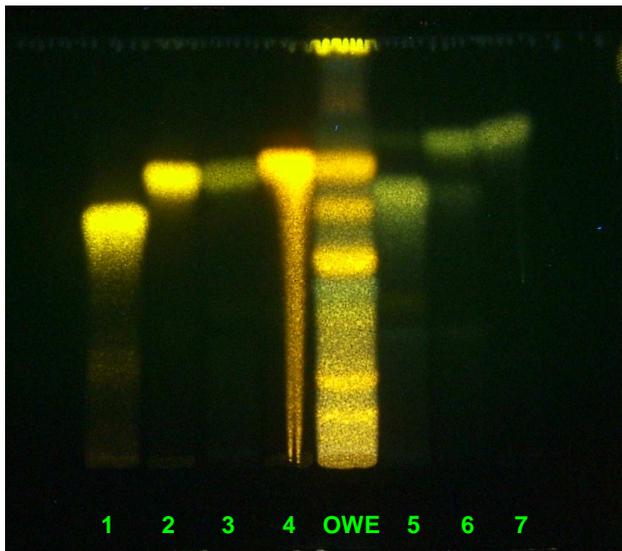


1	Apigenin $R_f$ : nicht messbar
2	SF 205-244 $R_f$ : 0,33 (S. Tab. 11, S.30)
3	SF 406-484 $R_f$ : 0,33 (S. Tab. 11, S.30)
4	Luteolin $R_f$ : 0,33
5	OWE 02/05
6	Apigenin $R_f$ : 0,44; 0,51
7	SF 0-95 $R_f$ : 0,44; 0,51 (S. Tab. 11, S.30)
8	Chrysin $R_f$ : 0,54

Abbildung 19: Analyse ausgewählter Sammelfraktionen (s. Tab. 10, S.30) und ausgewählter Reinstoffen mittels DC-System 1 (s. Tab. 2, S.10)

Auf dieser DC (Abb. 19) stimmt die Farbe der Fluoreszenz der Banden bei  $R_f$ : 0,33 in den Bahnen zwei und drei, mit der Bande des Vergleichs Luteolin in Bahn vier überein. In Bahn 7 treten mit den gleichen  $R_f$ -Werten wie in den Bahnen des Apigenins (1 und 6) grüne Banden auf. Die Identifizierung der Flavonoidgenine wird in Kapitel 3.3.1 (S.46) weitergeführt.

In DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11) wurden Flavonoidglykoside mit Apigenin und Luteolin Grundkörpern dünnschichtchromatographisch mit dem OWE 02/05 verglichen (s. Abb. 20 und Abb. 21, S.38). Flavonoidglykoside mit Chrysoeriol Grundkörpern waren als Vergleichssubstanzen nicht vorhanden.



1	Homoorientin Rf: 0,57
2	Orientin Rf: 0,67
3	Luteolin-4'-O-glucosid Rf: 0,68
4	Luteolin-7-O-glucosid Rf: 0,7
5	Isovitexin Rf: 0,63
6	Vitexin Rf: 0,76
7	Apigenin-7-O-glucosid Rf: 0,78

Abbildung 20: Vergleich ausgewählter Monoglykoside mit OWE 02/05 mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S. 11)

In Abbildung 20 ist die Übereinstimmung der Fluoreszenzfarben der Bande in Bahn 4 mit der obersten orangen Bande des OWE gut zu sehen, auch die  $R_f$ -Werte stimmen überein ( $R_f$ : 0,7). Wir vermuten Luteolin-7-O-glucosid in der Probe. Die grüne Bande des Isovitexins in Bahn 5 liegt zwischen den orangen Banden. Wie in Abbildung 15 (S.31) gut zu sehen ist, tritt auch im OWE eine grüne Bande in diesem Bereich auf. Da die grünen Banden von Apigenin-7-O-glucosid und Vitexin so nahe aneinander liegen, und im OWE eine grüne Bande in diesem Bereich auftritt, könnten beide Substanzen im OWE enthalten sein. In diesem Fall gab die HPLC-Analyse genauere Auskunft (Kap. 3.2.3, S.39).

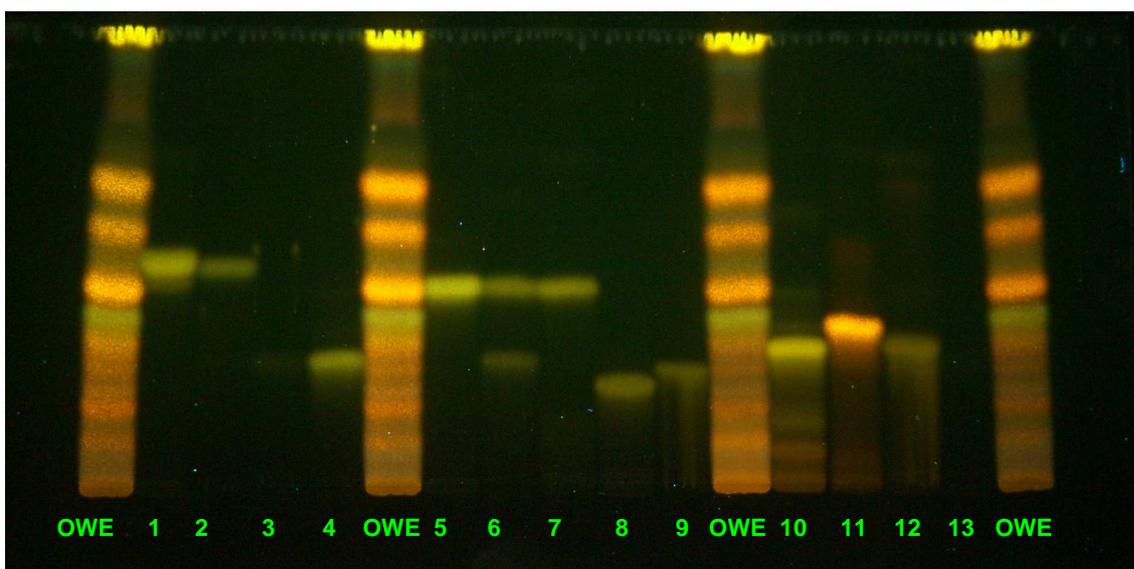


Abbildung 21: Vergleich ausgewählter Diglykoside mit OWE 02/05 mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11) Bezeichnung der Bahnen:

## Experimenteller Teil

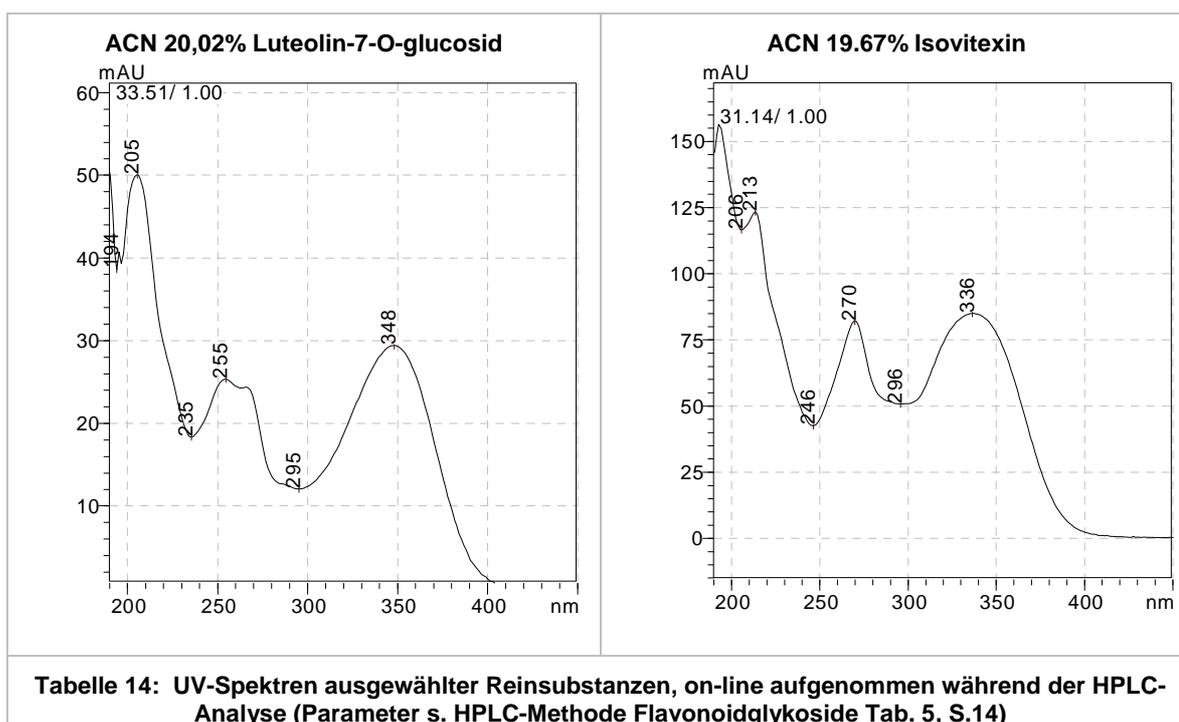
1 Apiin Rf: 0,2	5 Vitexin-4''-O-rhamnosid Rf: 0,412	9 Saponarin Rf: 0,23	13 Lucenin-2 Bande nicht sichtbar
2 Rhoifolin Rf: 0,2	6 Vitexin -4''-O-rhamnosid Rf: 0,412	10 Isovitexin-2''-O-glucosid Rf: 0,3	
3 Schaftosid	7 Vitexin -2''-O-rhamnosid Rf: 0,412	11 Luteolin 6-O-apiosylglucosid Rf: 0,33	
4 Isoschaftosid Rf: 0,26	8 Vicenin-2 Rf: 0,21	12 Luteolin 3-O-7-O-diglucosid Rf: 0,3	

Die Substanzen, die in  $R_f$ -Wert und Fluoreszenz annähernd mit Banden des OWE übereinstimmten, wurden mittels HPLC weiter verglichen.

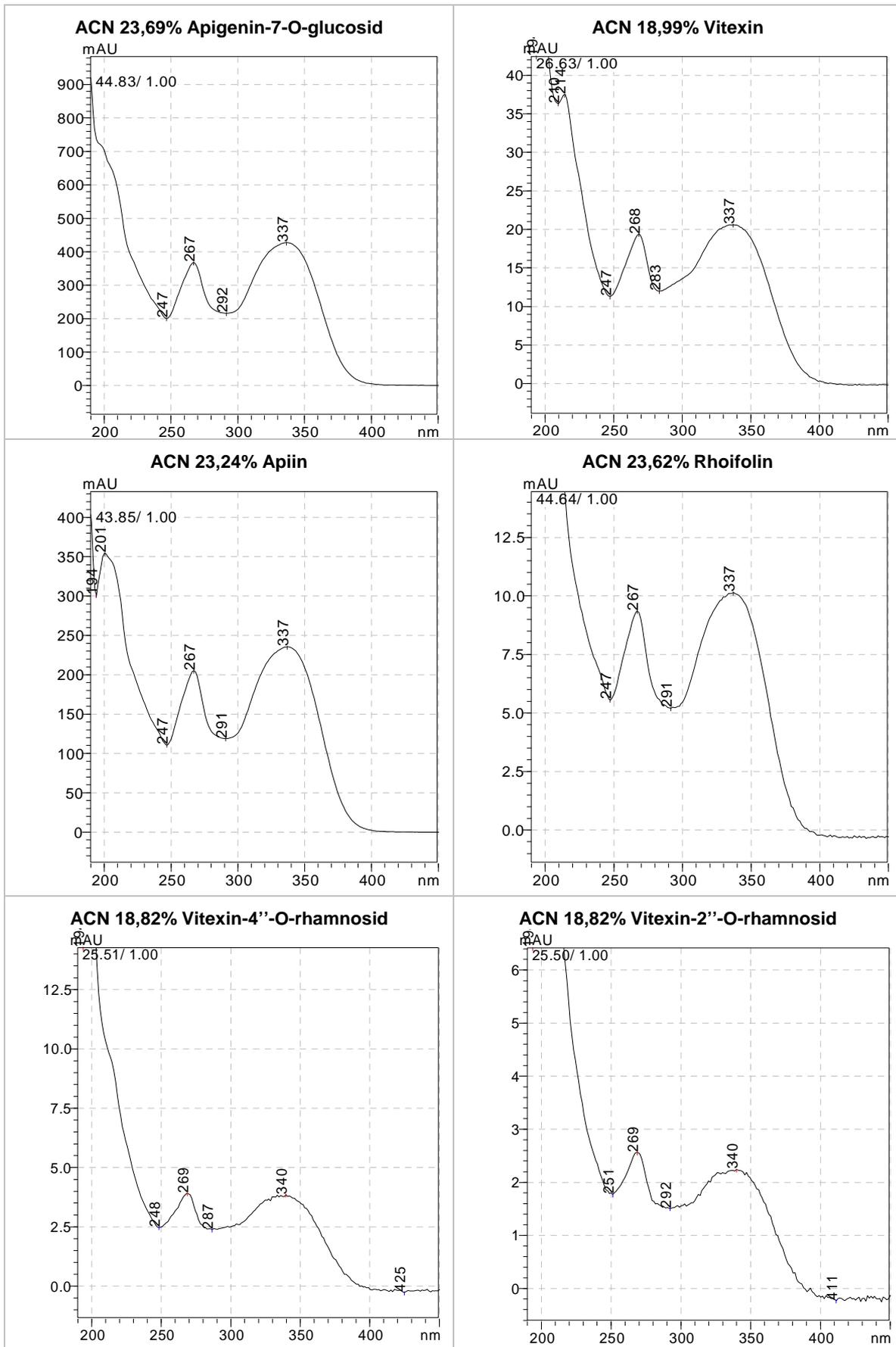
### 3.2.3 Vergleichsanalysen mittels HPLC

Die Vergleichsanalysen der Monosaccharide wurden mit der HPLC-Methode Flavonoidglykoside (s. Tabelle 5, S.14) durchgeführt. Es wurden Luteolin-7-O-glucosid (Rt 33,51), Isovitexin (Rt 31,14), Apigenin-7-O-glucosid (Rt 44,83), Vitexin (Rt 26,63), Apiin (Rt 43,85), Rhoifolin (Rt 44,64), Vitexin-4''-O-rhamnosid (Rt 25,51) und Vitexin-2''-O-rhamnosid (Rt 25,5) untersucht, um Retentionszeit und UV-Spektrum mit denen der gesuchten Substanzen zu vergleichen.

Es folgen die Abbildungen der während der HPLC-Analyse on-line aufgenommenen UV-Spektren der untersuchten Reinsubstanzen.



**Experimenteller Teil**



**Fortsetzung Tabelle 14: UV-Spektren ausgewählter Reinsubstanzen, on-line aufgenommen während der HPLC-Analyse (s. HPLC-Methode Flavonoidglykoside Tab. 5, S.14)**

Aufgrund des Vergleichs der UV-Spektren, der Retentionszeiten in der HPLC (Methode s. Tabelle 5, S.14) und des  $R_f$ -Wertes auf der DC, reduziert sich die Auswahl der in Frage kommenden Substanzen auf Luteolin-7-O-glucosid, Isovitexin, Apigenin-7-O-glucosid, Apigin und Rhoifolin. Da bei allen UV-Spektren mit Apigenin Grundgerüst ein eindeutiger Kurvenverlauf zu erkennen ist, aber sonst keine Besonderheiten, sind die Spektren alleine nicht sehr aussagekräftig, wesentlich ist hier die Retentionszeit. Vitexin-4“-O-rhamnosid und Vitexin-2“-O-rhamnosid fallen aufgrund der Retentionszeit nicht unter die zu untersuchenden Substanzen.

### 3.2.4 Analyse des OWE 02/05 mittels HPLC-MS

Nachdem uns eine geeignete HPLC-Methode zur Auftrennung des OWE 02/05 (s. Kap. 2.1, S.7) zur Verfügung stand (s. Abb. 18, S.33) koppelten wir das HPLC-System an einen Massenspektrometer. Somit konnten den einzelnen Verbindungen neben den UV-Daten auch bestimmte Massen zugeordnet werden. Mit dem Massenspektrometer (Parameter s. Tabelle 7, S.18) wurden Messungen mit der Methode für Flavonoidglykoside und mit der Methode für Genine gemacht (s. Tabelle 5, S.14). In den Abbildungen 22, S.42 und 23, S.45, zeigt der obere Graph das UV-Chromatogramm gemessen bei 340 nm. Der untere Graph zeigt das Base Peak-Chromatogramm. Es ist jeweils nur der Zielbereich ab 30 Minuten abgebildet.

## Experimenteller Teil

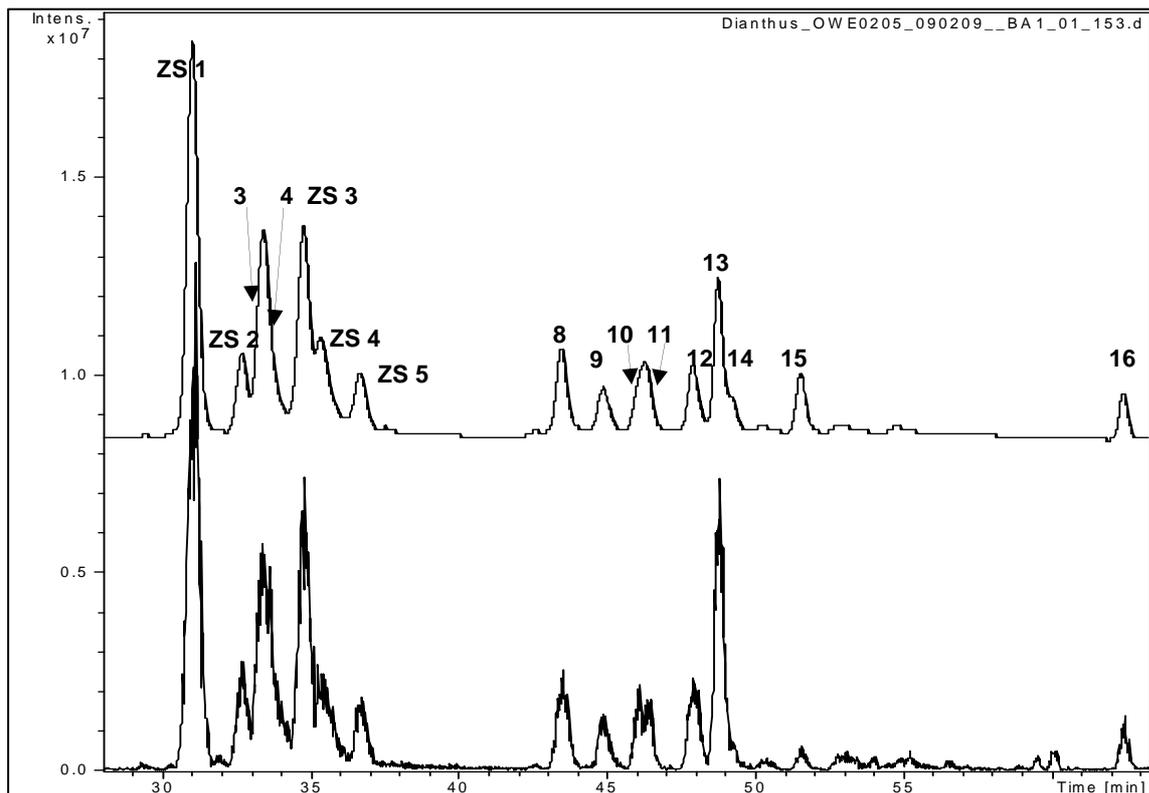


Abbildung 22: UV-Chromatogramm (oberer Graph) und Base Peak-Chromatogramm (unterer Graph) nach Analyse des OWE 02/05 (Abb. 3, S.6) mittels LC-DAD-MS (HPLC-Methode Flavonoidglykoside, Parameter s. Tabelle 5, S.14, MS-Parameter s. Tabelle 7, S.18)

Die Substanzen sind in der Reihenfolge ihrer Elution nummeriert (CNR: Compound number = Substanznummer). Die folgende Tabelle gibt die Substanznummer, die Retentionszeit, das Verhältnis  $m/z$  des Quasimolekülpeaks, die Hauptfragmente und von diesen abgeleitet eine angenommene Struktur an. Die angenommene Struktur gibt die Masse des Genins, z. B. A (270), den Verknüpfungsmodus zum Zucker (C = Glykosyl, O = Glykosid), die vorhandene Information über die Zucker (Hex = Hexose, Desoxyhex = Desoxyhexose) und eine Methylierung des Genins (-O-Me flav.) an.

Mit einer MS1-Messung kann man das Quasimoleküllion bestimmen, für eine MS2-Messung wird ein bestimmtes Fragment in der Ionenfalle weiter fragmentiert für eine MS3-Messung wird wieder ein ausgewähltes Fragment weiter fragmentiert. In diesem Fall ist das häufigste Fragment weiter fragmentiert worden. Je nachdem, ob es sich um ein O-Glykosid oder um ein C-Glykosyl handelt, fallen die Fragmente nach den MS1–3-Messungen verschieden aus. Bei nicht methylierten Geninen, die O-glykosidisch mit einer Zuckerkomponente verknüpft sind, wird bei MS2 oder MS3 das Genin fragmentiert. Bei methylierten

## Experimenteller Teil

Geninen wird die Methylgruppe abgespaltet; C-Glykosyle haben ein eigenes Fragmentierungsmuster.

CNR	Rt	[M-H] <sup>-</sup>	Angenommene Struktur	Hauptfragmente (>10%)
ZS 1	31	577,3	A(270)-C-Hex-O-Desoxyhex	MS2: 457.2, 413.2, 293.1; MS3: 275.9, 265.0, 192.9, 174.9, 172.9, 131.0
ZS 2	33	431,2	A(270)-C-Hex	MS2: 341.1, 311.1, 283.1; MS3: 283.0
3	33	593,3	A(286)-O-(Hex, Desoxyhex)	MS2: 285.1; MS3: 240.9, 199.9, 198.9, 196.8, 174.9
4	34	461,2	A(286)-O-Glucuronyl	MS2: 285.0; MS3: 243.0, 240.9, 216.9, 201.9, 200.7, 198.9, 197.9, 197.0, 174.9, 154.7, 132.9
ZS 3	35	607,4	A(300)-C-Hex-O-Desoxyhex; O-Me flav.	MS2: 443.2, 323.1, 308.1; MS3: 308.0
ZS 4	35	447,2	A(286)-O-Hex	MS2: 285.0; MS3: 257.0, 242.9, 240.9, 238.9, 222.9, 216.9, 214.8, 212.9, 200.9, 198.9, 197.9, 175.9, 175.0, 168.7, 150.9, 132.9
ZS 5	37	461,2	A(300)-C-Hex	MS2: 371.1, 341.2, 298.1; MS3: 298.0
8	43	577,4	A(270)-O-(Hex, Desoxyhex)	MS2: 269.0; MS3: 226.8, 225.8, 224.9, 196.9, 196.1, 179.8, 169.0, 159.0, 155.0, 117.0
9	45	445,2	A(270)-O-Glucuronyl	MS2: 269.0, 174.9; MS3: 226.0, 224.8, 184.9, 168.9, 151.9
10	46	431,2	A(270)-O-Hex	MS2: 268.1, 269.0; MS3: 225.2, 223.9, 200.9
11	46	607,4	A(300)-O-(Hex, Desoxyhex); O-Me flav.	MS2: 299.1, 284.0; MS3: 284.0
12	48	475,2	A(300)-O-Glucuronyl; O-Me flav.	MS2: 299.1, 284.0; MS3: 284.0
13	49	607,3	A(300)-O-(Hex, Desoxyhex); O-Me flav.	MS2: 299.1, 284.0; MS3: 284.0
14	49	461,3	A(300)-O-Hex; O-Me flav.	MS2: 446.2, 313.0, 299.1, 298.1, 284.0; MS3: 284.0
15	52	461,2	A(300)-O-Hex; O-Me flav.	MS2: 299.1
16	62	591,3	A(284)-O-(Hex, Desoxyhex); O-Me flav.	MS2: 283.0; MS3: 268.0

Tabelle 14: Daten der HPLC-MS-Analyse des OWE 02/05 (s. Abbildung 22, S.42) mit der HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parameter s. Tabelle 5, S.14 und Tab. 7, S.18), CNR = Substanznummer

## Experimenteller Teil

Diesen Daten zeigen, dass in diesem Bereich - ab 30 Minuten - als Substituenten Hexosen, Desoxyhexosen und Glucuronsäure vorkommen. Ein Verlust von 162 Masseinheiten kennzeichnet den Verlust einer Hexose bei O-Glucosiden. Der Verlust 120 und 90 Masseinheiten ist charakteristisch für C-Glykosyle wie z. B. Isovitexin. Der Verlust von 176 ist zu erklären mit der Abspaltung einer Glucuronsäure. Ein Verlust von 180 wurde für Isovitexin-2''-glucopyranosid beschrieben.<sup>26, 27</sup>

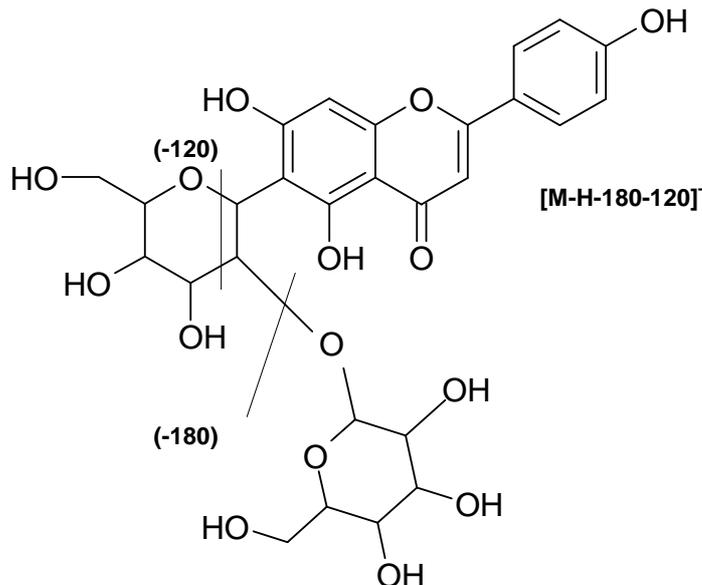


Abbildung 23: Fragmentierungsschema für das [M-H-180-120] Fragment<sup>28</sup>

Das ist möglicherweise wichtig, da es sich bei Substanz ZS 1 und Substanz ZS 3 um Substanzen mit einer ähnlichen Verknüpfung der Zucker handeln könnte. Wie aus dieser Abbildung zu erkennen ist, würde eine endständige Desoxyhexose eine Verringerung um 16 Masseneinheiten bedeuten. Demnach würde ein Fragment [M-H-164-120]<sup>-</sup> auf eine Desoxyhexose sowie ein C-Glykosyl hinweisen. Bei den Substanzen ZS 1 und ZS 3 sind solche Fragmente vorhanden.

Bei den Substanzen 11 und 13 (beide m/z: 607, s. Abbildung 22, S.42) handelt es sich, wie aus der Masse des Genins und aus der UV-Kurve (s. Tabelle 13, S.36) zu sehen ist, um Diosmetin bzw. um Chrysoeriol. Eine Unterscheidung der beiden konnte erst nach HPLC-Analyse der in SF 0-95 (s. Tabelle 11, S.30) angereicherten Genine erfolgen (s. Kap. 3.3.1, S.46). Beide Substanzen tragen die gleiche Glykosylierung, die Abspaltung von 308 Masseinheiten (amu) ist typisch für eine Hexose die O-glykosidisch mit einer Desoxyhexose verbunden ist.<sup>28</sup>

## Experimenteller Teil

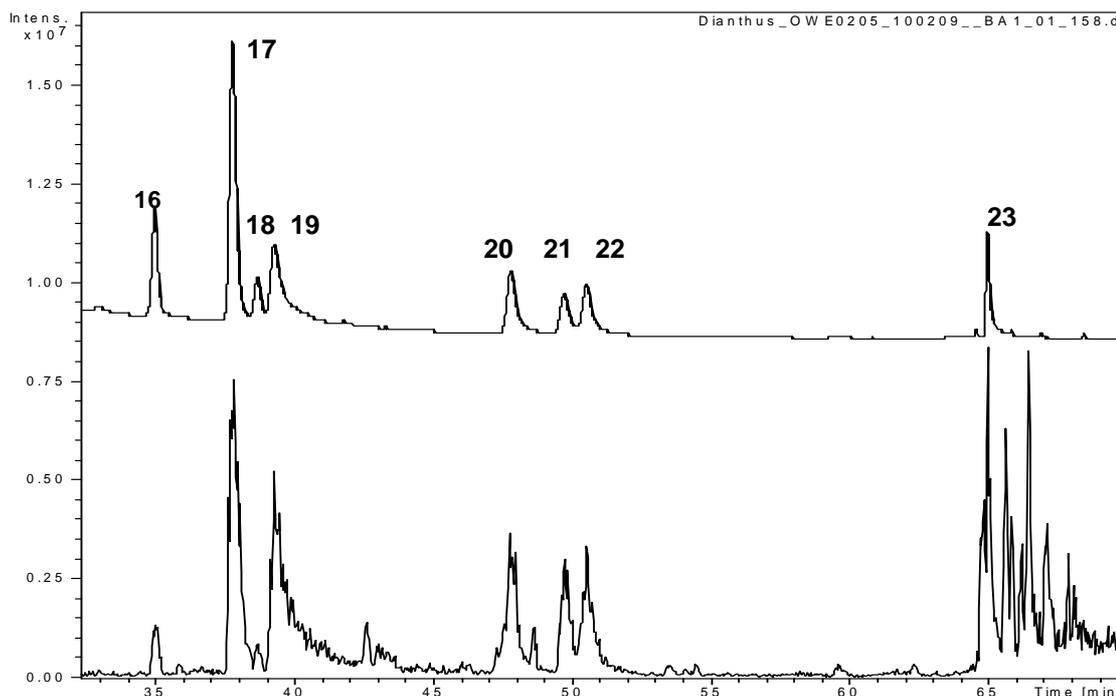


Abbildung 24: UV-Chromatogramm (oberer Graph) und Base Peak-Chromatogramm (unterer Graph) nach Analyse des OWE 02/05 (Abb. 3, S.6) mittels HPLC-DAD-MS (HPLC-Methode Flavonoidgenine, Parameter s. Tabelle 5, S.14, MS-Parameter s. Tabelle 7, S.18),

CNR	Rt	[M-H] <sup>-</sup>	Angenommene Struktur	Hauptfragmente (>10%)
16	35	591,3	A(284)-O-(Hex, Deoxyhex); O-Me flav.	MS2: 283.1, 267.9; MS3: 268.0
17	38	459,2	A(284)-O-Glucuronyl; O-Me flav.	MS2: 283.0, 174.9; MS3: 268.0
18	39	445,2	A(284)-O-Hex; O-Me flav.	MS2 (of [M+Ac] <sup>-</sup> at m/z 505.2): 445.1, 283.0; MS3: 268.0
19	39	285,1	A(286)	MS2: 268.0, 242.9, 241.0, 229.0, 216.9, 198.9, 196.9, 181.8, 175.4, 174.9, 150.9, 107.0
20	48	269,1	A(270)	MS2: 251.0, 226.0, 225.0, 224.1, 209.9, 201.1, 200.9, 196.0, 183.1, 159.0, 151.0, 150.0, 149.0, 148.7, 117.1, 107.1, 97.0
21	50	299,1	A(300); O-Me flav.	MS2: 284.0; MS3: 255.9
22	50	299,1	A(300); O-Me flav.	MS2: 284.0; MS3: 255.9, 221.1
23	65	283,2	A(284); O-Me flav.	MS2: 268.0

Tabelle 15: Daten der HPLC-MS-Analyse des OWE 02/05 (s. Abbildung 24, S.45) mit der HPLC-Methode Genine (Parameter s. Tabelle 5, S.14 und Tabelle 7, S.18), CNR=Substanznummer

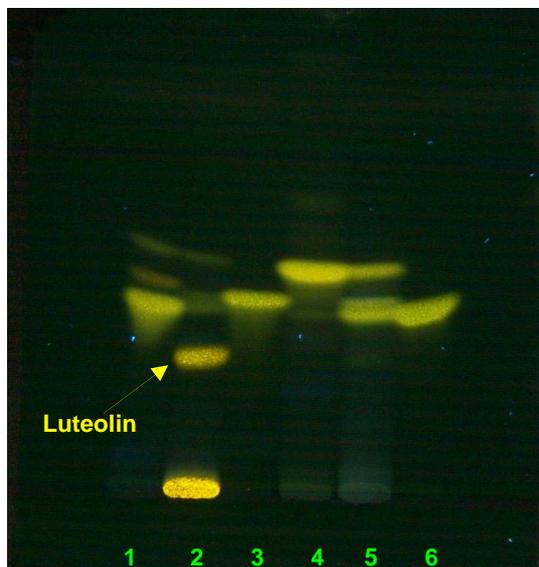
In Abbildung 24 sind die Peaks der Genine (20-23) gut getrennt. Es kommen Grundkörper mit den Verhältnissen  $m/z$  286 (Peak 19) und 270 (Peak 20) vor, methylierte Genine treten mit den Massen  $m/z$  284 (Peak 23) und 300 (Peaks 21 und 22) auf.

### 3.3 Charakterisierung und Strukturaufklärung

Im folgenden Kapitel wird die Identifizierung der einzelnen Flavonoidkomponenten behandelt. Im ersten Teil geht es um die Flavonoidgenine, im zweiten Teil um die Flavonoidglykoside und zuletzt um die Strukturaufklärung von ZS 1.

#### 3.3.1 Identifizierung der Flavonoidgenine

Es wurden mit den Informationen von HPLC, MS, DC und der UV-Spektren fünf Genine identifiziert: Acacetin, Luteolin, Diosmetin, Apigenin und Chrysoeriol. Da die Genine in der Sammelfraktion 0-95 (s. Tabelle 11, S.30) gut angereichert sind, wurde mit dieser weitergearbeitet.



1	Apigenin	Rf: 0,39
2	OWE 02/05	s. Abbildung 3, S.6
3	Chrysoeriol	Rf: 0,412
4	Acacetin	Rf: 0,46
5	SF 0-95	Tabelle 11, S.30 und Abb. 19, S.38
6	Diosmetin	Rf: 0,38

Abbildung 25: Vergleichende Analyse der SF 0-95 (s. Tab.11, S.30, Abbildung 14, S.29 und Abbildung 19, S.37) mit den Reinsubstanzen der vermuteten Genine mittels DC-System 1 (s. Tabelle 2, S.10)

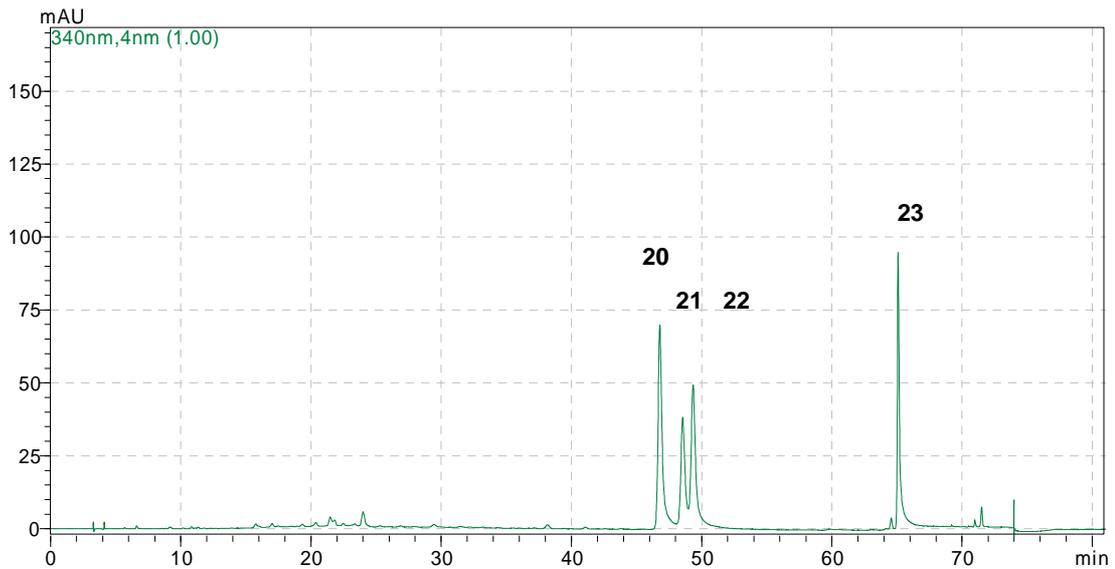
In Abbildung 25 lässt sich erkennen, dass die Banden von Apigenin und Diosmetin auf den Bahnen 1 und 6 in ihren Rf -Werten fast zusammen fallen. Weiters ist sichtbar, dass im OWE noch eine weitere Bande im Bereich der Genine

## Experimenteller Teil

---

vorkommt, welche bei den Vergleichsubstanzen nicht dabei ist und eine stark gelbe Fluoreszenz aufweist. Diese Bande ist schon auf Abbildung 19, S.37 zu sehen und stimmt dort in Fluoreszenzfarbe und  $R_f$ -Wert mit Luteolin überein.

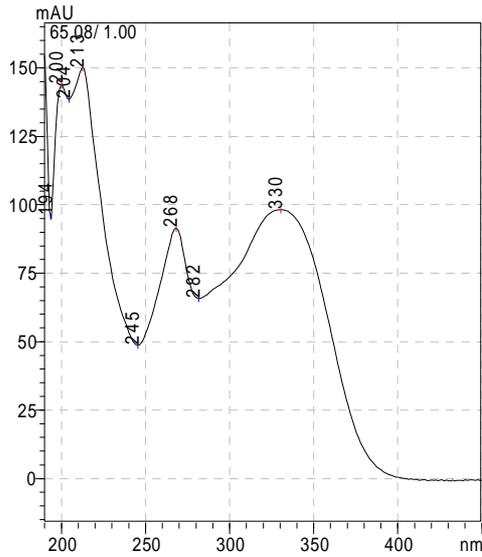
Die SF 0-95 wurde mittels HPLC mit den entsprechenden Reinsubstanzen verglichen (s. Abbildung 26). Die Nummerierung der Peaks im Chromatogramm korreliert mit jener der HPLC-MS-Analysen (s. Abbildung 24, S.45).



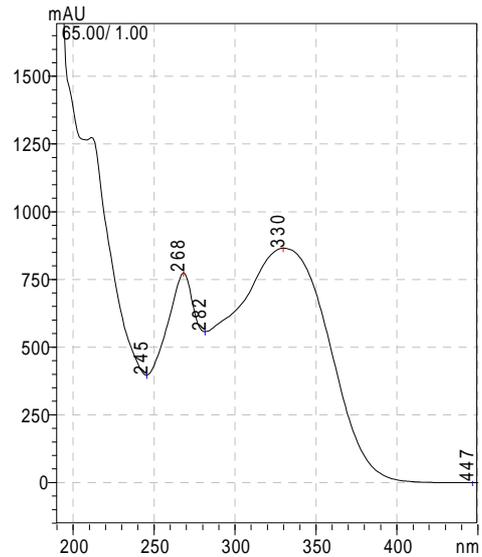
**Abbildung 26: Analyse der SF 0-95 (s. Abbildung 25, S.46 und Tabelle 11, S.30) mittels HPLC-Methode Genine (Parameter s. Tab. 5, S.14)**

Auf den Seiten 48 bis 51 werden die Daten zur Identifizierung der Genine zusammengefasst dargestellt.

## Experimenteller Teil



**Substanz 23**



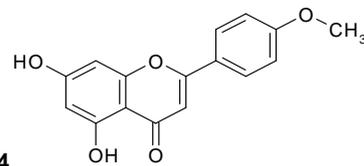
**Acacetin ACN 47,54%, Rt: 65,00 min**

**ACN 47,54%**

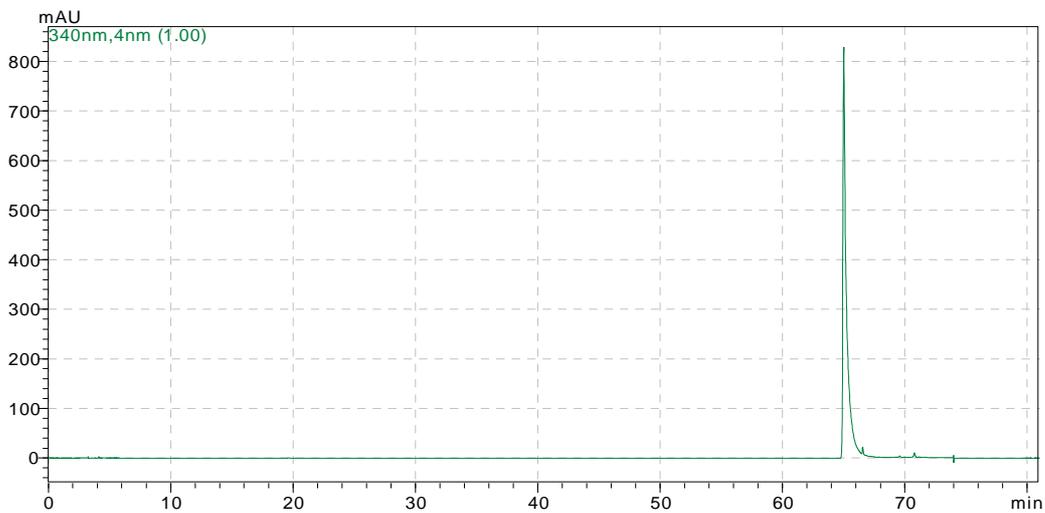
**Rt: 65,08 min**

**MS: 283.2 A(284); O-Meflav.**

**MS2: 268.0**

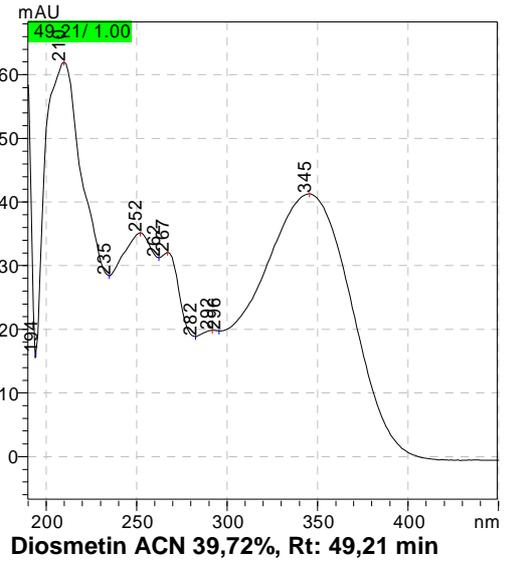
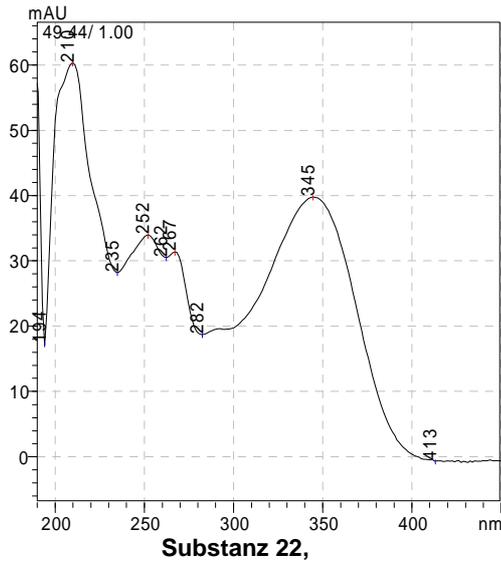


**MG: 284**



**Abbildung 27: Referenzanalyse von Acacetin mittels HPLC-Methode Genine (s.Tabelle 5, S.14)**

## Experimenteller Teil



ACN 39,72%

Rt: 49,44 min

MS: 299.1 A(300); O-Meflav

MS2: 284.0; MS3: 255.9, 221.1

MG: 300

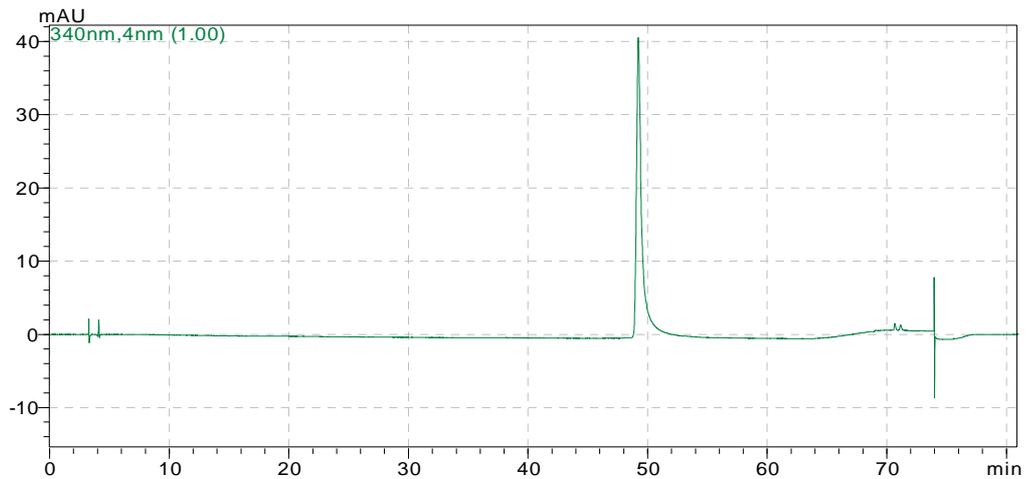
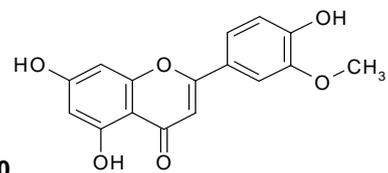
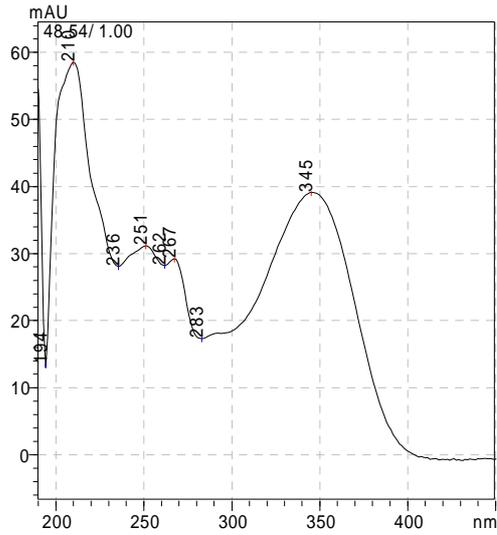
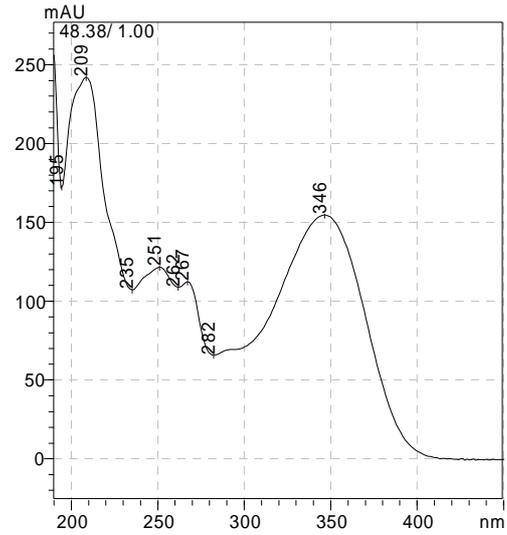


Abbildung 28: Referenzanalyse von Diosmetin mittels HPLC-Methode Genine (s.Tabelle 5, S.14)

## Experimenteller Teil



**Substanz 21**



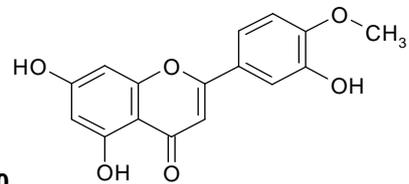
**Chrysoeriol ACN 39,27% Rt: 48,38 min**

**ACN 39,27%**

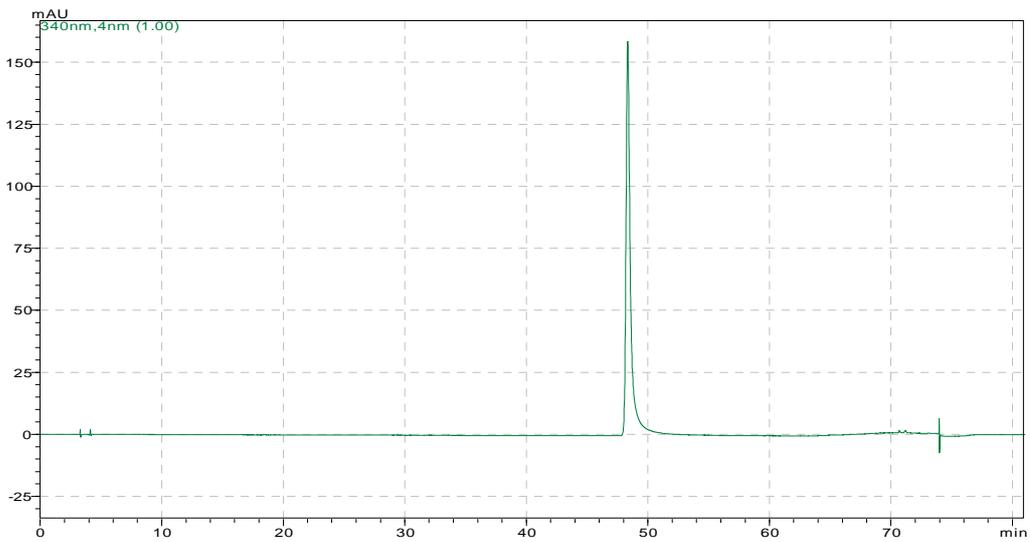
**Rt: 48,45 min**

**MS: 299.1 A(300); O-Me flav.**

**MS2: 284.0; MS3: 255.9**

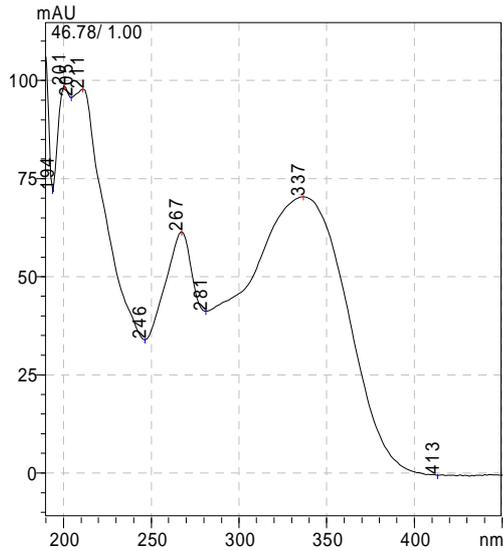


**MG: 300**

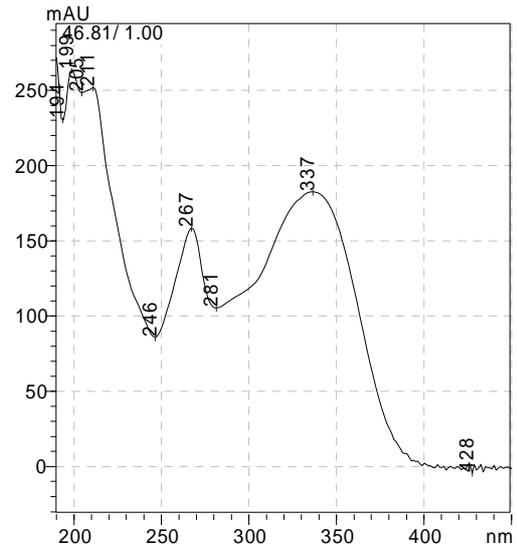


**Abbildung 29: Referenzanalyse von Chrysoeriol mittels HPLC-Methode Genine (s.Tabelle 5, S.14)**

## Experimenteller Teil



Substanz 20,



Apigenin ACN 38,39% Rt: 46,81 min

ACN 38,39%

Rt: 46,78 min

MS:269.1 A(270)

MS2: 251.0, 226.0, 225.0, 224.1, 209.9,

201.1, 200.9, 196.0, 183.1, 159.0, 151.0,

150.0, 149.0, 148.7, 117.1, 107.1, 97.0

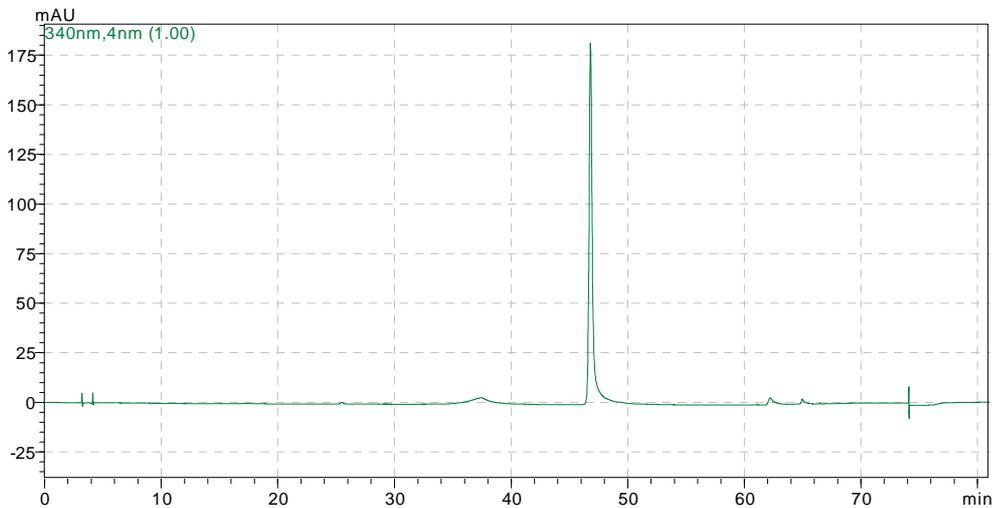
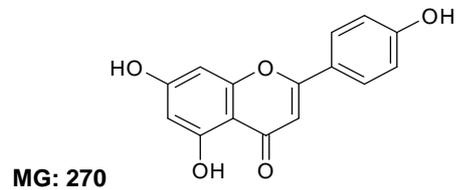


Abbildung 30: Referenzanalyse von Apigenin mittels HPLC-Methode Genie (s.Tabelle 5, S.14)

Das sind die vier Gene die in SF 0-95 angereichert wurden. In SF 96-155 wurde ein Genin angereichert, die Daten zur Identifizierung sind auf der folgenden Seite angeführt.

## Experimenteller Teil

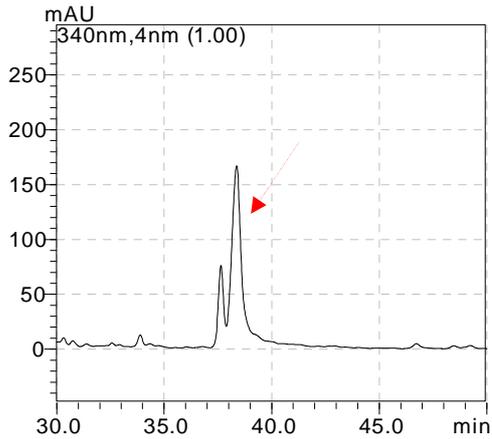


Abbildung 31: Ausschnitt aus der Analyse der SF 96-155 mittel HPLC-Methode Genine (s. Tab. 5, S.14)

Substanz 19

Rt: 38,36 min

MS: 285,1

A(286)

MS2: 268.0, 242.9, 241.0, 229.0, 216.9, 198.9, 196.9, 181.8, 175.4, 174.9, 150.9, 107.0

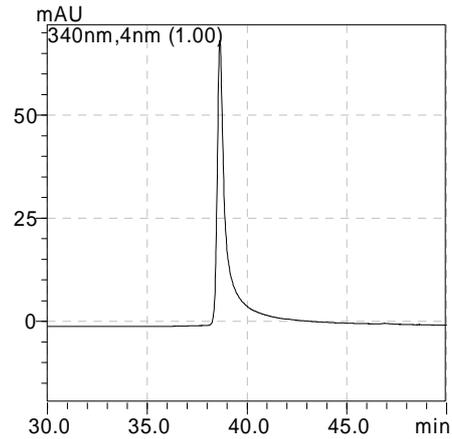
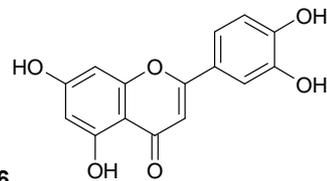
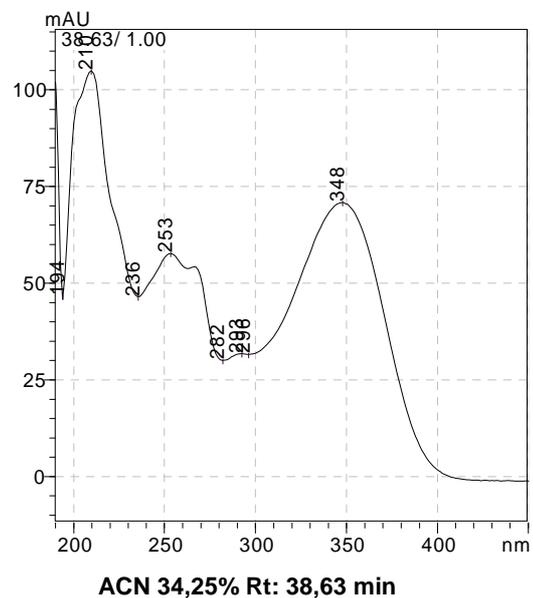
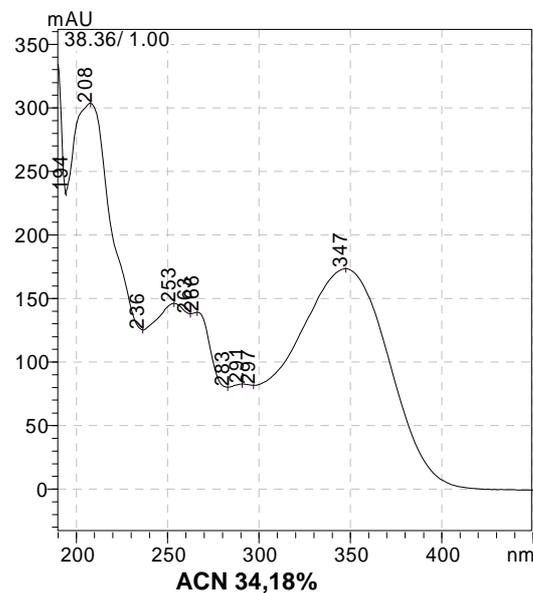


Abbildung 32: Referenzanalyse von Luteolin mittels HPLC-Methode Genine (s. Tab. 5, S.14)



MG: 286



Es gelang der qualitative Nachweis der fünf Genine Acacetin, Apigenin, Chrysoeriol, Diosmetin und Luteolin im OWE 02/05.

### 3.3.2 Identifizierung einiger Flavonoidglykoside

Auch Luteolin-7-O-glucosid, Apigenin-7-O-glucosid und Isovitexin ließen sich in den Sammelfractionen und im OWE durch Vergleiche identifizieren. In der folgenden Zusammenfassung zu diesen Flavonoidglykosiden, sind die Analysen der Sammelfractionen abgebildet, in denen diese Flavonoidglykoside angereichert sind. Die Substanzen sind entsprechend der HPLC-Analyse des OWE 02/05 Kap. 3.2.1, S.33 nummeriert (s. Abbildung 18, S.33, Abbildung 22, S.42), und es ist jeweils auf die Referenzanalysen (DC und HPLC) verwiesen.

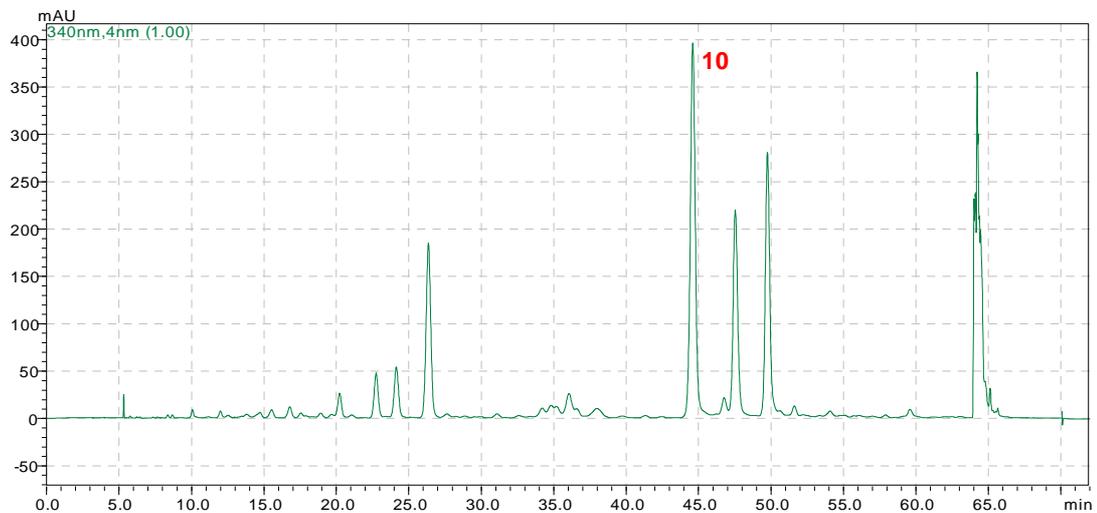
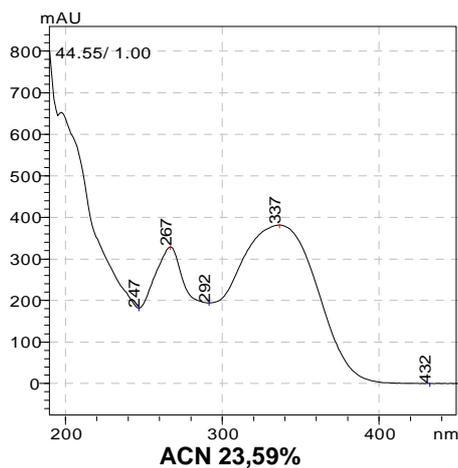


Abbildung 33: Analyse der SF 96-155 (s. Abbildung 15, S.31, Abbildung 22, S.42 und Tab. 11, S.31) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parameter s. Tab. 5, S.14)



**Substanz 10**

**Rt: 44,55 min**

**MS: 431,2**

**Apigenin-7-O-glucosid**

**A(270)-O-Hex**

**MS2: 268.1, 269.0;**

**MS3: 225.2, 223.9, 200.9**

**HPLC: Apigenin 7-O-glucosid s. Kap. 3.2.3, S.39**

## Experimenteller Teil



1 Apigenin-7-O-glucosid  $R_f$  0,78

2 Luteolin-7-O-glucosid  $R_f$  0,7

3 Homoorientin  $R_f$  0,57

Abbildung 34: Vergleich des OWE 02/05 mit Referenzsubstanzen mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11)

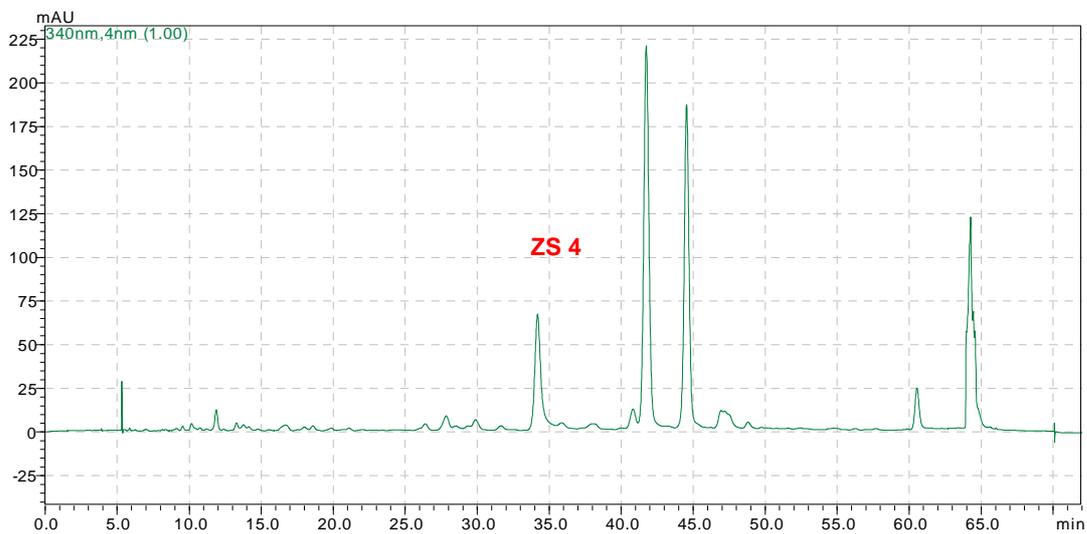
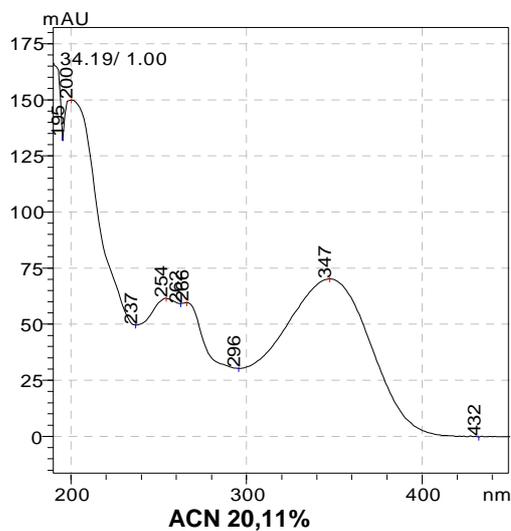


Abbildung 35: Analyse der SF 205-244 (s. Abbildung 15, S.31, Abbildung 22, S.42 und Tab. 11, S.30.) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parameter s. Tab.5, S.14)



Substanz ZS4

MS: 447,2

A(286)-O-Hex

Luteolin-7-O-glucosid

MS2: 285.0;

MS3: 257.0, 242.9, 240.9, 238.9, 222.9, 216.9, 214.8, 212.9, 200.9, 198.9, 197.9, 175.9, 175.0, 168.7, 150.9, 132.9

s. DC in Abbildung 34, S.54, und HPLC in Kap. 3.2.3, S.39

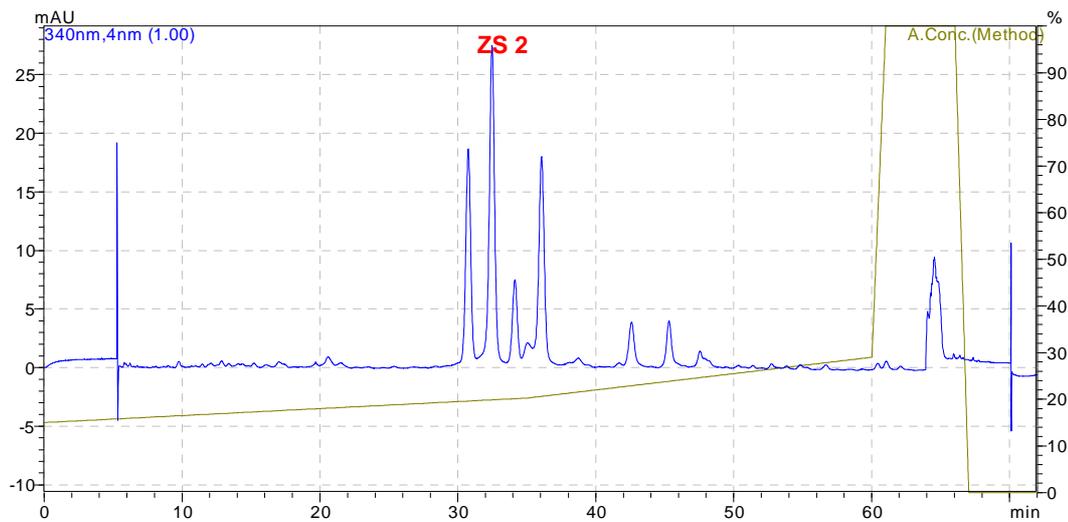
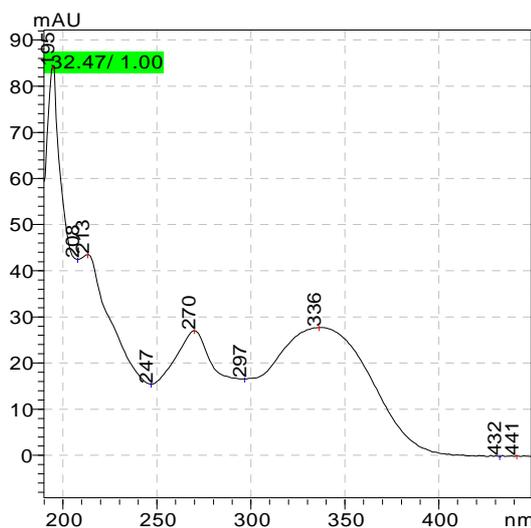


Abbildung 36: Analyse der SF 300-400 (s. Abbildung 15, S.31, Abbildung 22, S.42 und Tabelle 11, S.30) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parameter s. Tabelle 5 S.14)



**Substanz ZS 2**

**Rt: 32,47 min**

**MS: 431,2**

**A(270)-C-Hex**

**Isovitexin**

**MS2: 341.1, 311.1, 283.1;**

**MS3: 283.0**

**s. HPLC in Kap. 3.2.3, S.39 und DC in Kap. 3.2.2, S.37**

**ACN 19,87%**

Im Massenspektrum von Substanz 2 ( $m/z$ : 431,2) kommt es zu den typischen Abspaltungen von 90 und 120 Masseinheiten die C-Glykosyle kennzeichnen.<sup>26</sup> Die UV-Kurve und die Masse des Genins zeigen, dass es sich hier um einen Apigeninrunkörper handelt. Über die Vergleiche mittels HPLC (s. Kap. 3.2.3. S.39) und mittels DC (s. Kapitel 3.2.2. S.37) konnte Substanz 2 als Isovitexin identifiziert werden.

Es gelang die Identifizierung der Substanzen Isovitexin (ZS 2), Luteolin-7-O-glucosid (ZS 4) und Apigenin-7-O-glucosid (Substanz 10) im OWE 02/05.

### 3.3.3 Strukturaufklärung von Substanz ZS 1

Die über semipräparative HPLC gewonnene Substanz ZS 1 ist in Abbildung 18 (S.33) und in Tabelle 14, (S.43) als Substanz 1 gekennzeichnet. Um die Reinheit zu prüfen, wurde die isolierte Substanz mit HPLC und HPLC-MS analysiert, weiters wurde der Drehwert (ORD) bestimmt. Für diese Messung wurden 0,7 mg in 500 µl MeOH gelöst und bei 20°C mit einem Per kin Elmer 341 Polarimeter vermessen. Der ORD beträgt -24,3°.

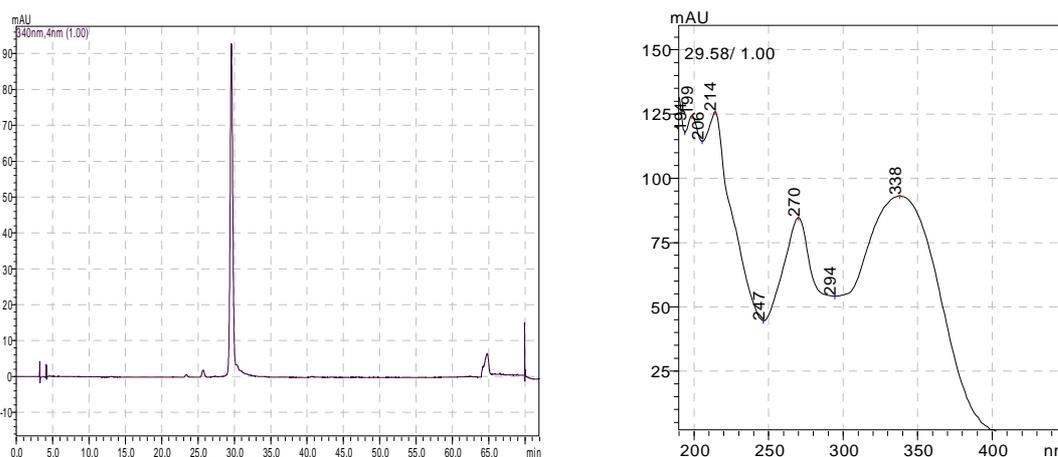


Abbildung 37: Analyse von ZS 1 (s. Abbildung 17, S.32) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (s.Tabelle 5, S.14)

**MS 577,3**

**A(270)-C-Hex-O-Desoxyhex**

**MS2: 457.2, 413.2, 293.1;**

**MS3: 275.9, 265.0, 192.9, 174.9,172.9, 131.0**

Im Massenspektrum von Substanz ZS 1 ( $m/z$ : 578) kommt es zur Abspaltung von 120, 164 und 284, das weist auf auf eine 1→2 verknüpfte Desoxyhexose hin (s. Kap. 3.2.4., S.43). Das Spektrum in Abbildung 37 zeigt die typische Kurve eines Apigenin Grundkörpers. Die Differenz der Masse von 270 des Apigenins auf  $m/z$  = 578 von Substanz ZS 1 beträgt 308, das entspricht einer C-gebundenen Hexose die O-glykosidisch mit einer Desoxyhexose verbunden ist.

Ein Teil der isolierten Substanz wurde hydrolysiert, um die Zucker Komponenten zu bestimmen. Die Hydrolyse wurde mit Kiliani-Reagenz (s. Tabelle 1. S.8), über zwei Stunden bei 100°C im Trockenschrank durch geführt.<sup>11</sup> Dann wurde

## Experimenteller Teil

mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wurde mittels HPLC weiter analysiert (s. Abbildung 40, S.58). Die Wasserphase wurde mittels GC-MS (Parameter s. Tabelle 6, S.16) auf die Zuckerkomponenten untersucht.

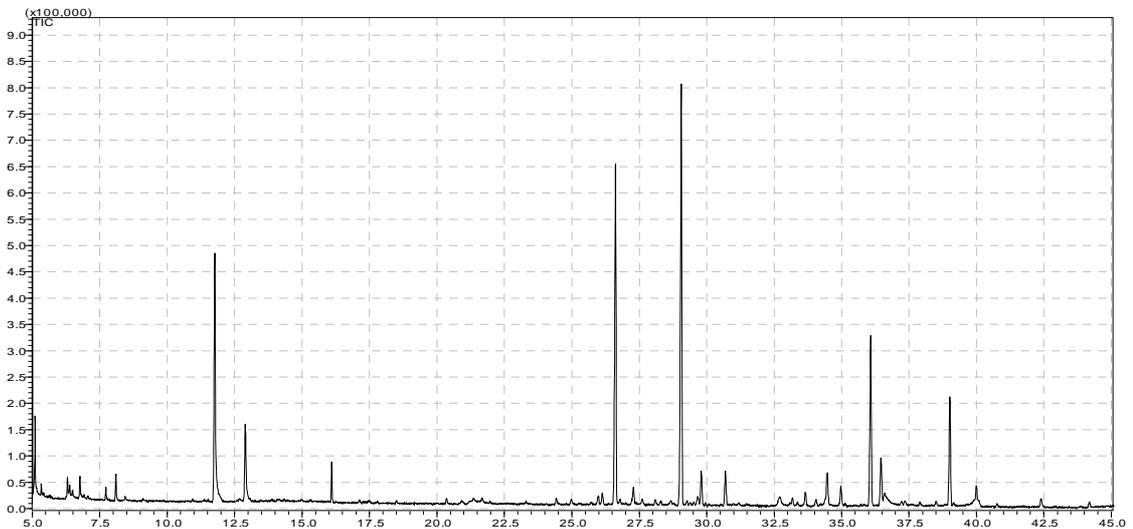


Abbildung 38: Analyse der Wasserphase von ZS1 (s. Kap.3.1.5, S.32) nach Hydrolyse mittels GC-MS (GC-MS-Parameter: s. Tabelle 6, S.16)

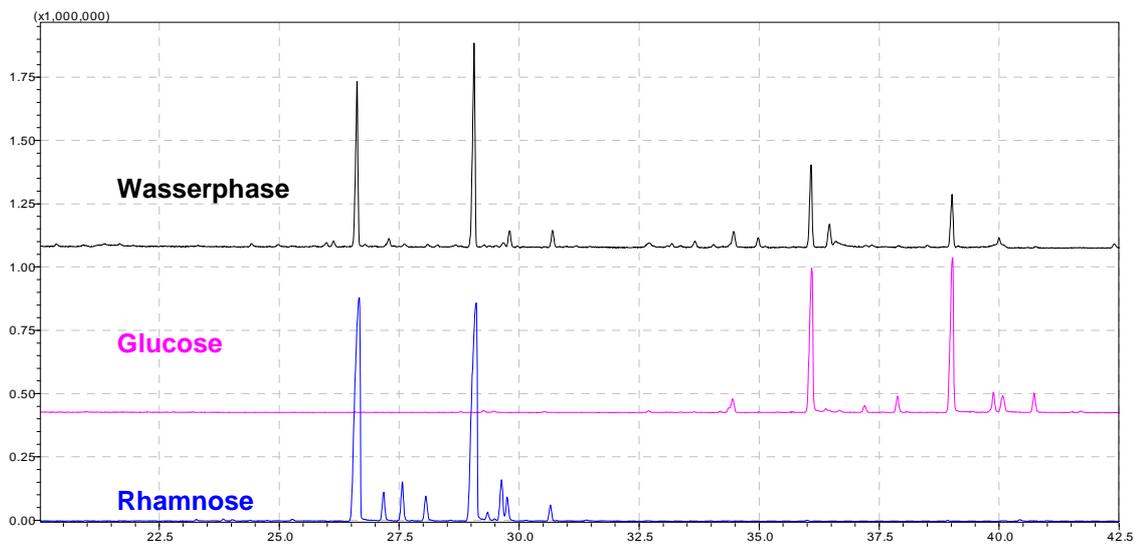


Abbildung 39: Vergleichende GC-MS-Analyse der Wasserphase nach Hydrolyse von ZS1 mit den Reinsubstanzen Rhamnose und Glucose (Parameter s. Tabelle 6, S. 16)

In Abbildung 39 (S.57) ist ersichtlich, dass die Retentionszeiten der Zuckerkomponenten mit denen von Rhamnose und Glucose übereinstimmen. Da es sich bei Substanz 1 um ein C-Glykosyl mit einem weiteren Zucker handelt, ist das Auftreten von zwei Zuckerkomponenten in diesen Verhältnissen durch Isomerisierung (s. S.60) und den Verlust kleiner Mengen Glucose zu erklären.

## Experimenteller Teil

Neben der Analyse der Wasserphase erfolgte auch die Untersuchung der Ethylacetatphase, in der wir das Genin samt gebundenem C-Glykosyl erwarteten (s. Abbildung 40, S.57).

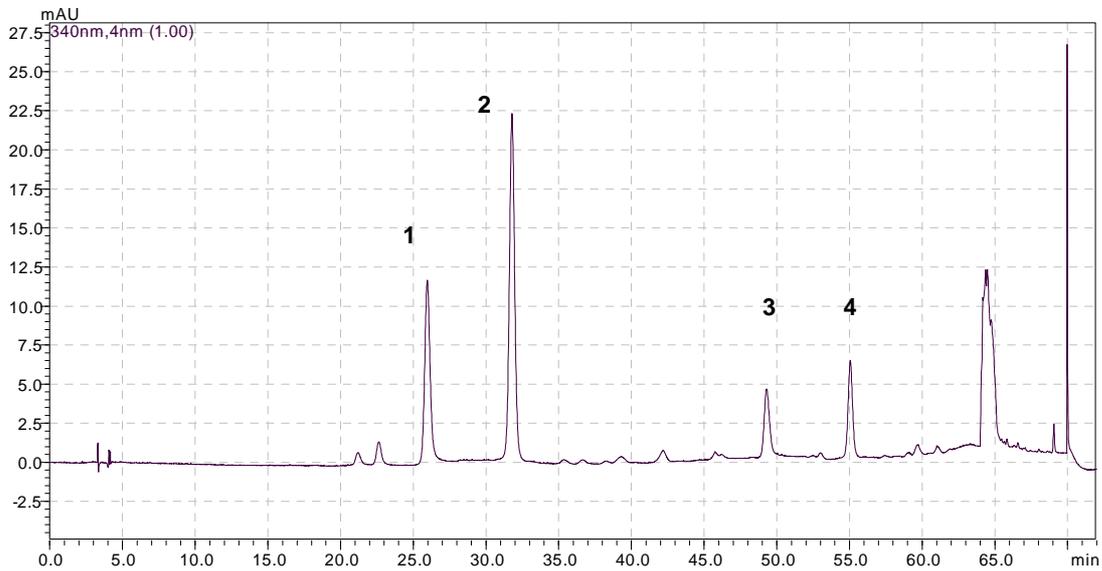
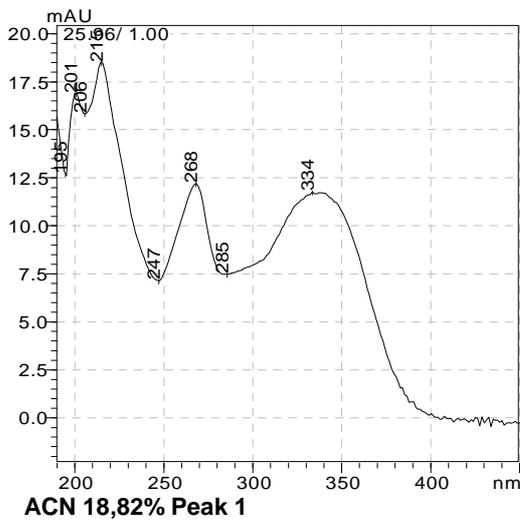
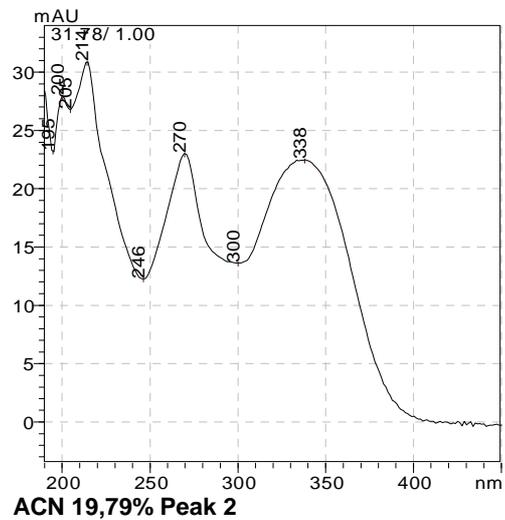


Abbildung 40: Analyse der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS1 (s. Kap.3.1.5, S.32) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parametr: s.Tabelle 5, S.14)



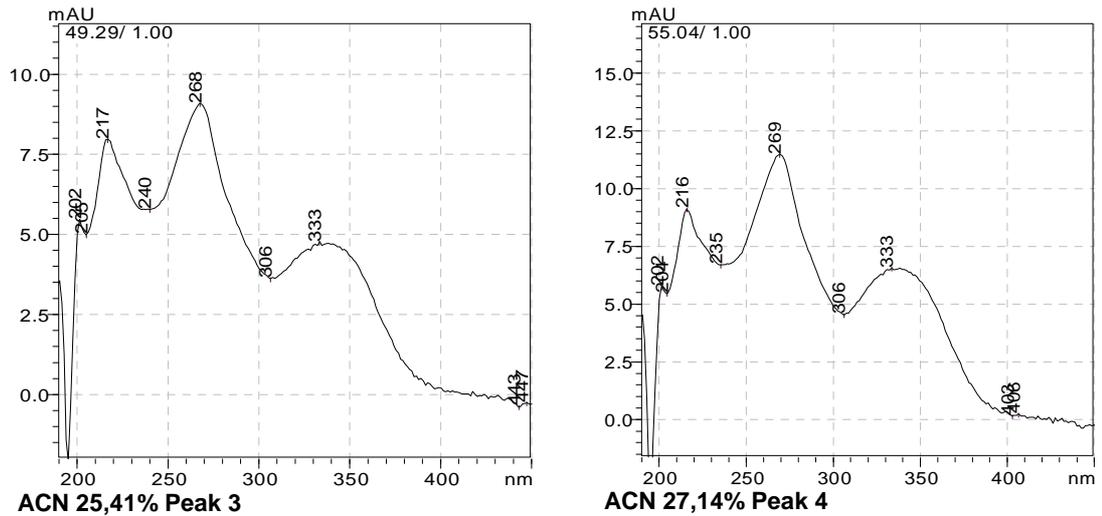
ACN 18,82% Peak 1



ACN 19,79% Peak 2

Abbildungen der während der HPLC-Analyse der Ethylacetatphase nach Hydrolyse von ZS1 on-line aufgenommenen UV-Spektren

## Experimenteller Teil



In der Ethylacetatphase sind nach der Hydrolyse vier Peaks zu sehen, nach weiteren Analysen mittels HPLC-MS und dem Vergleich mit Reinsubstanzen können diese Peaks wie folgt erklärt werden: Peak 1 = Vitexin, Peak 2 = Isovitexin (HPLC-Analysen der Reinsubstanzen s. Kap. 3.2.3, S.39). Das kann durch Isomerisierung (Wessely-Moser-Umlagerung) unter Säureeinwirkung, die bei C-Glykosylen vorkommen kann, entstehen.<sup>29, 30</sup> Die zwei weiteren Peaks ließen sich mit den Daten der MS-Analyse erklären, es dürfte sich um acetyliertes Vitexin und Isovitexin handeln.

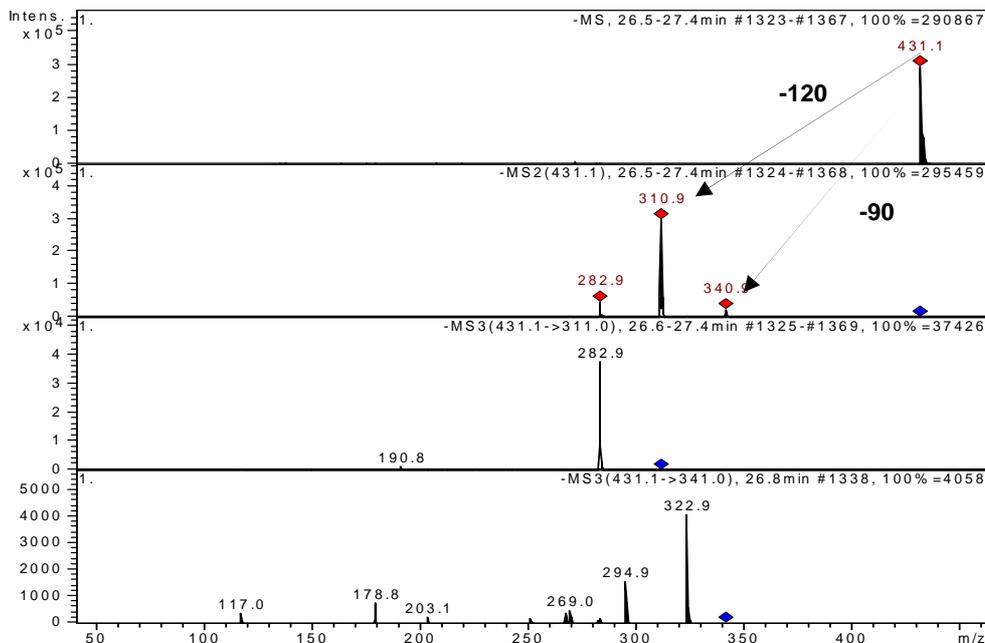


Abbildung 41: Massenspektrum Peak 1 (Abbildung 40, S.58) der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS 1 (s. Kap.3.1.5, S.32), HPLC-MS-Parameter: s. Tabelle 7, S.18

## Experimenteller Teil

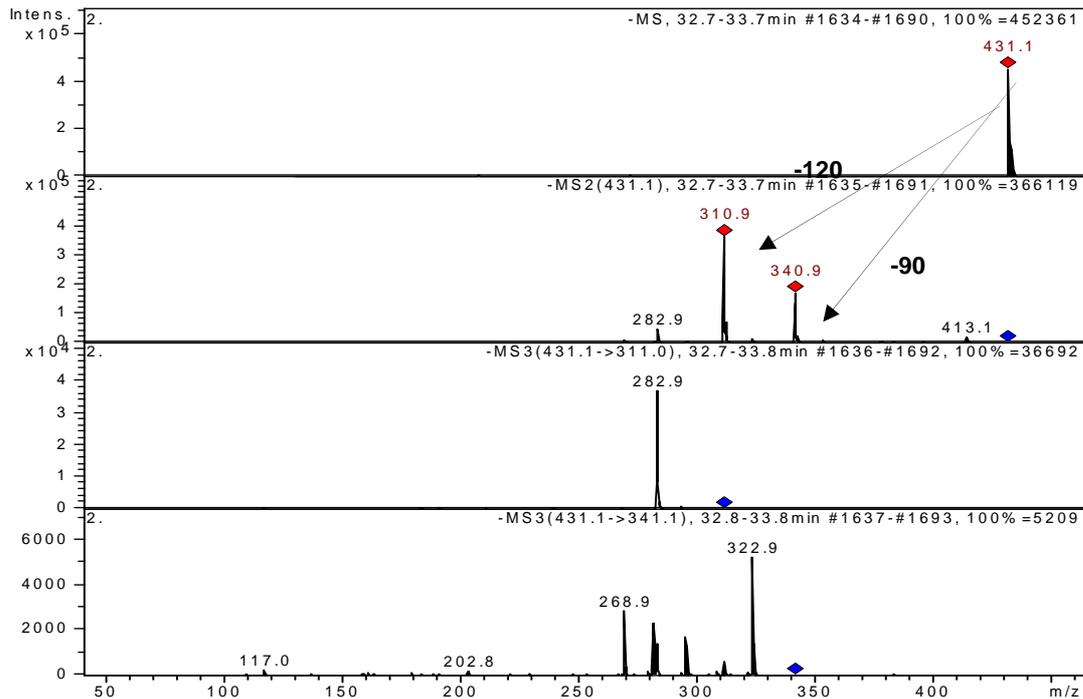


Abbildung 42: Massenspektrum Peak 2 (Abbildung 40, S.58) der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS 1 (s. Kap.3.1.5, S.32), HPLC-MS-Parameter: s. Tabelle 7, S.18

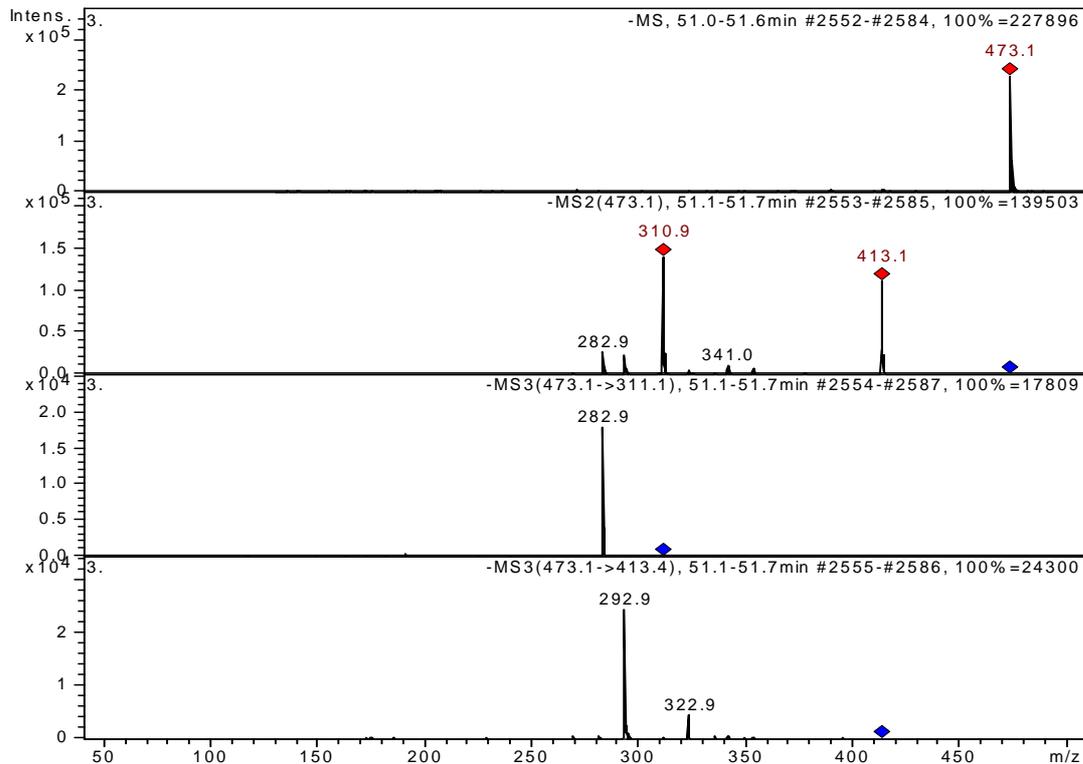


Abbildung 43: Massenspektrum Peak 3 (Abbildung 40, S.58) der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS1 (s. Kap.3.1.5, S.32), HPLC-MS-Parameter: s. Tabelle 7, S.18

## Experimenteller Teil

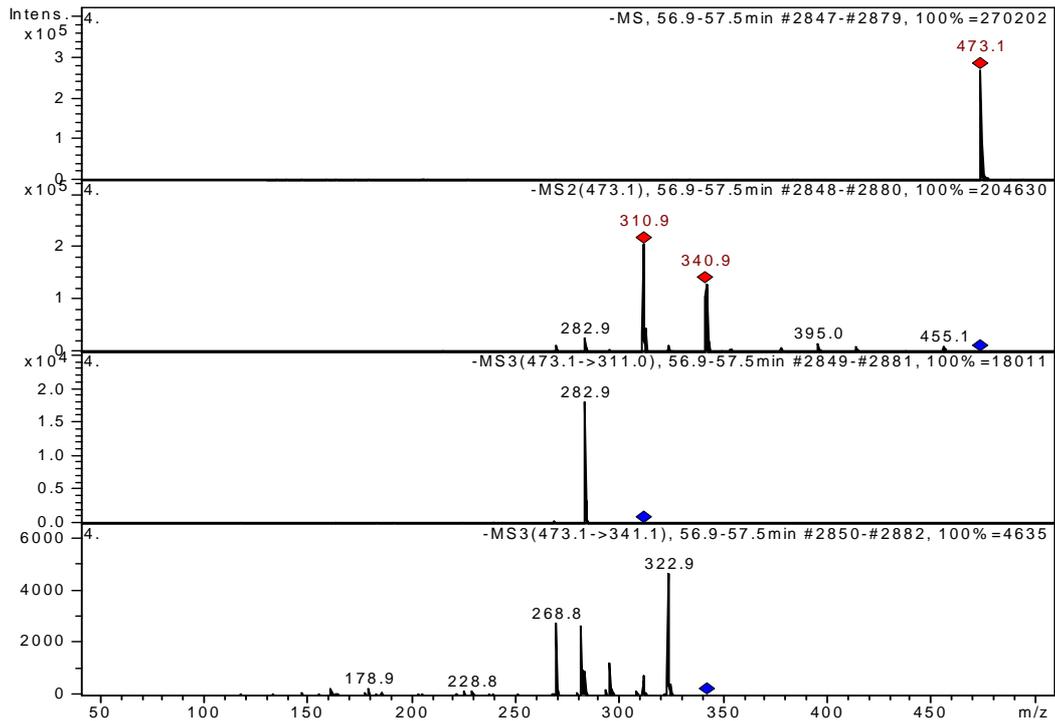


Abbildung 44: Massenspektrum Peak 4 (Abbildung 40, S.58) der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS 1 (s. Kap.3.1.5, S.32), HPLC-MS-Parameter: s. Tabelle 7, S.18

Anhand den Daten der HPLC-MS-Analyse (s. Kap. 3.2.4, S.41) und den Ergebnissen nach der Hydrolyse ist diese Struktur anzunehmen.

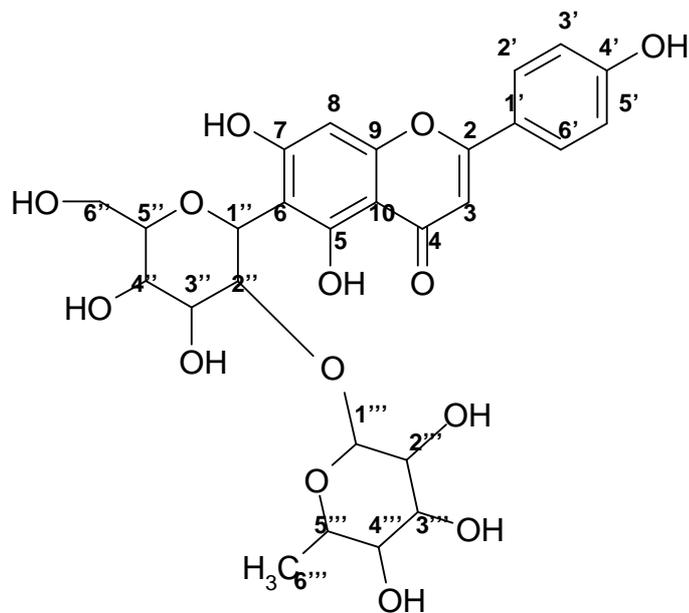


Abbildung 45: Vorgeschlagenen Struktur ZS1 – Isovitexin-2''-O-rhamnosid

## Experimenteller Teil

Eine Absicherung dieser Struktur wurde von den Ergebnissen der NMR-Analyse erwartet.

Diese ist an der Universität Graz am Institut für Pharmakognosie von Univ.-Prof. Dr. Armin Presser durchgeführt worden.

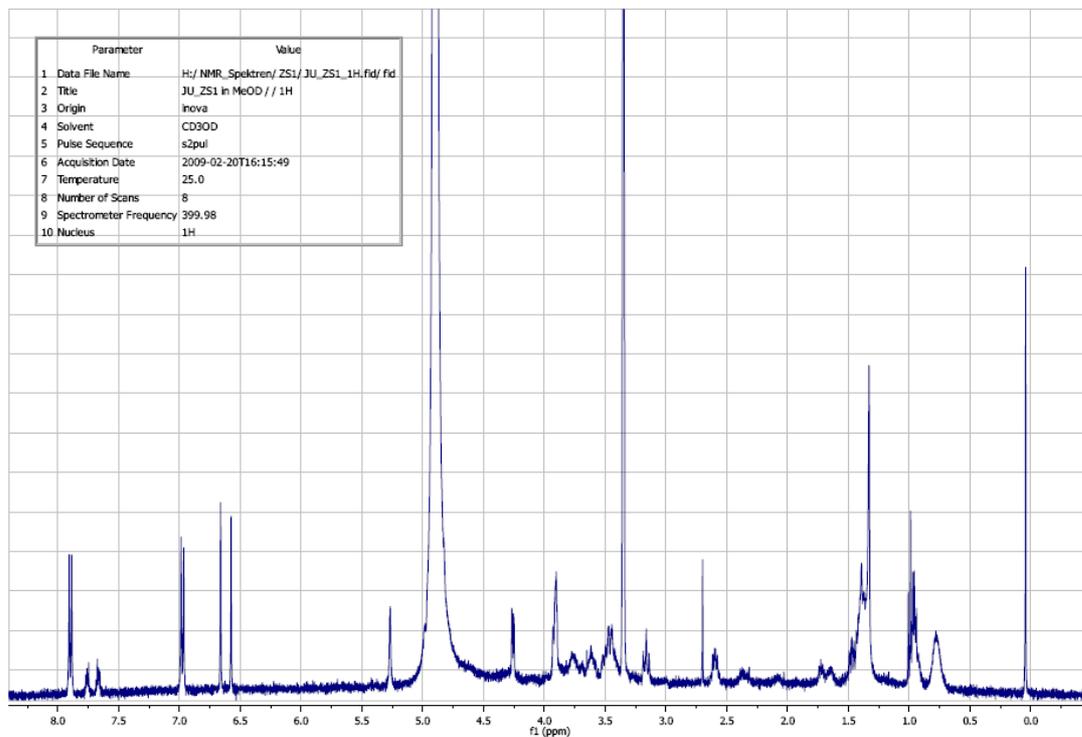


Abbildung 46:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von ZS1 gemessen in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei  $25^\circ\text{C}$  in 8 Scans (Parameter s. Kap. 2.6, S.19)

## Experimenteller Teil

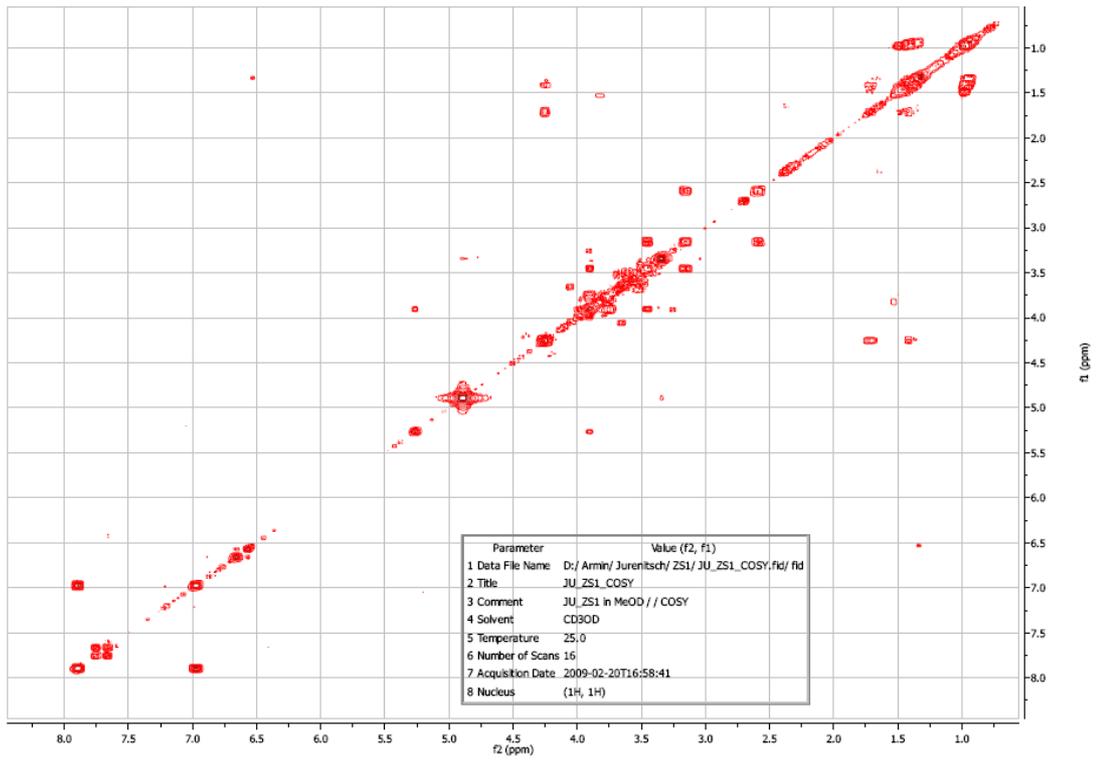


Abbildung 47: COSY (1H, 1H) Spektrum von ZS1 gemessen in CD<sub>3</sub>OD bei 25°C in 16 Scans (Parameter s. Kap. 2.6, S.19)

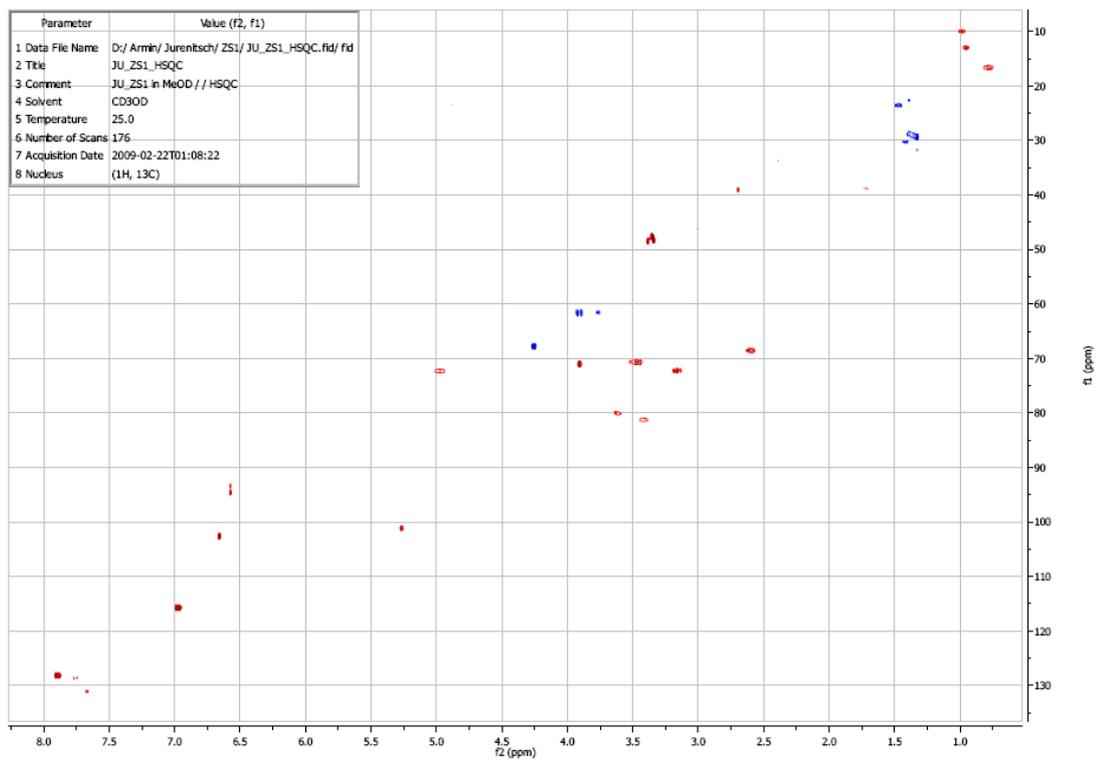


Abbildung 48: HSQC (1H, 13C) Spektrum von ZS1 gemessen in CD<sub>3</sub>OD bei 25°C in 176 Scans (Parameter s. Kap. 2.6, S.19)

## Experimenteller Teil

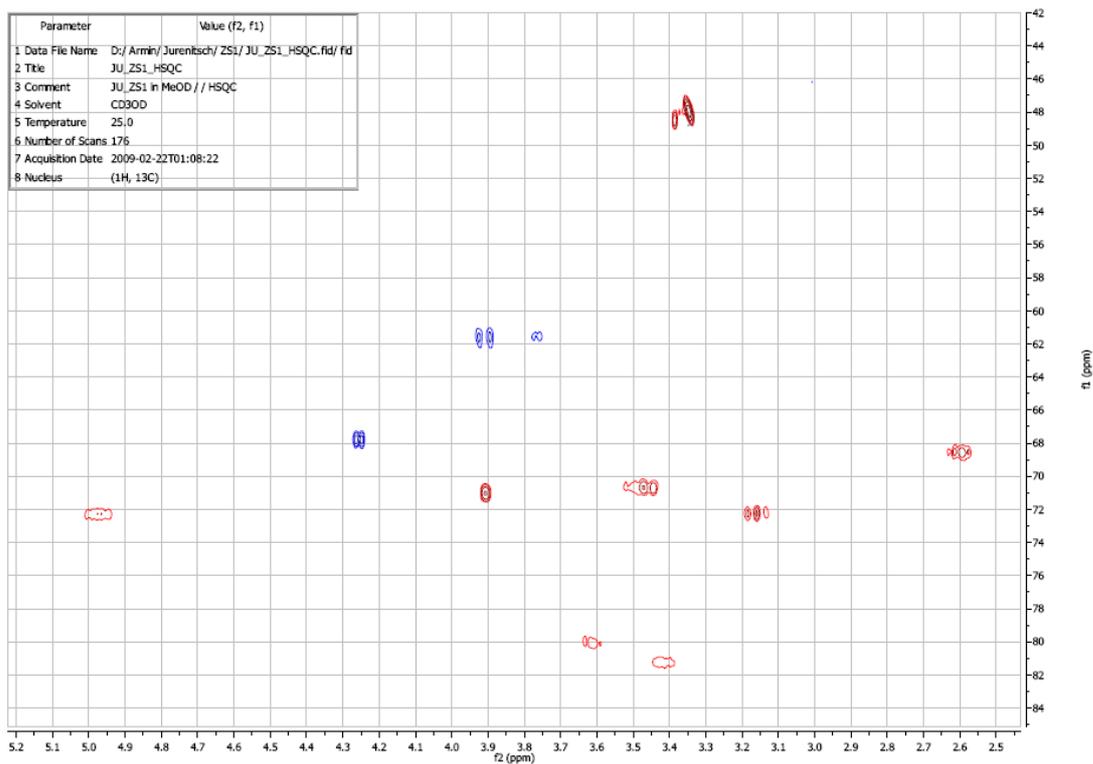


Abbildung 49: Vergrößerung des HSQC (1H, 13C) Spektrums von ZS1 gemessen in CD<sub>3</sub>OD bei 25°C in 176 Scans (Parameter s. Kap. 2.6, S.19)

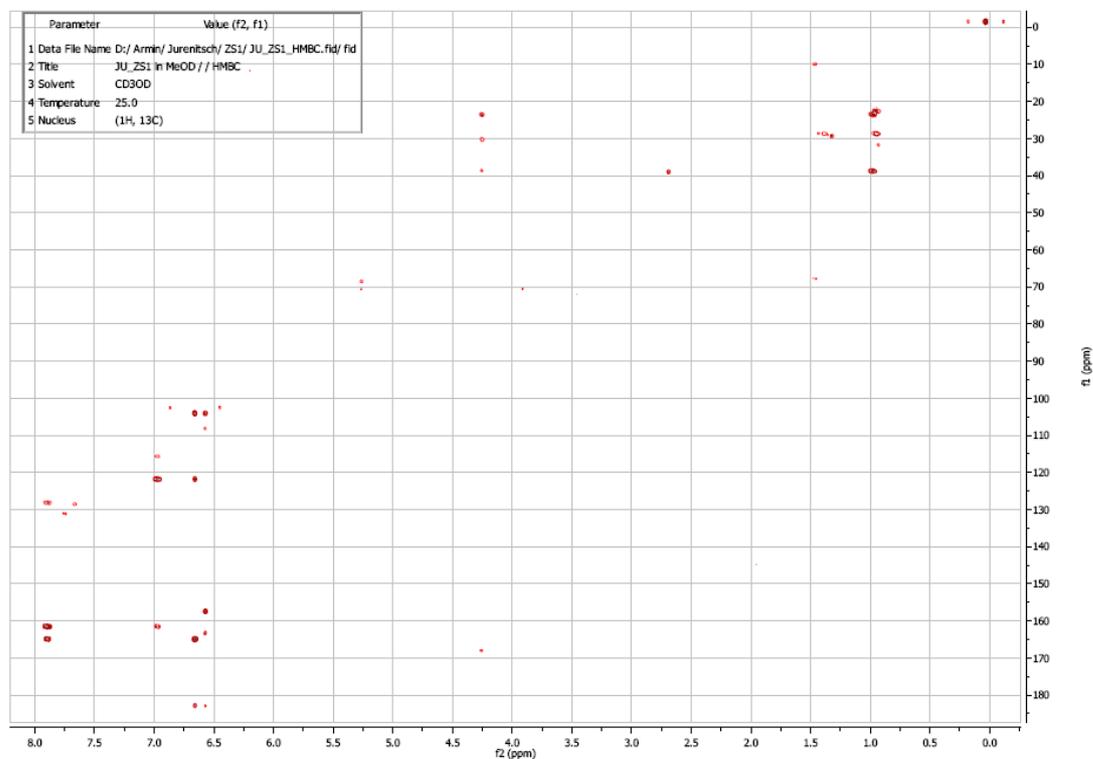


Abbildung 50: HMBC (1H, 13C) Spektrum von ZS1 gemessen in CD<sub>3</sub>OD bei 25°C (Parameter s. Kap. 2.6, S.19)

## Experimenteller Teil

---

Die Spektren wurden analysiert, und die Information ist in der folgenden Tabelle aufgearbeitet. Es sind die Position der Kohlenstoffe mit den dazugehörigen Wasserstoffen und die chemische Verschiebung in ppm angegeben.

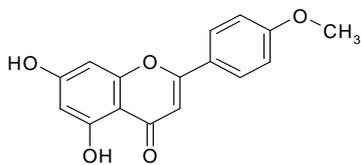
Position	C	H
C <sub>2</sub>	165	-
C <sub>3</sub>	104	6,66
C <sub>4</sub>	183	-
C <sub>5</sub>	168	-
C <sub>6</sub>		-
C <sub>7</sub>	163,4	-
C <sub>8</sub>	93,5	6,58
C <sub>9</sub>	157,5	-
C <sub>10</sub>	108	-
C <sub>1'</sub>	122	-
C <sub>2'+6'</sub>	116	6,98
C <sub>3'+5'</sub>	128	7,85
C <sub>4'</sub>	161,8	-
C <sub>1''</sub>	68	4,26
C <sub>2''</sub>		
C <sub>3''</sub>		
C <sub>4''</sub>		
C <sub>5''</sub>		
C <sub>6''</sub>	62	3,74+3,9
C <sub>1'''</sub>	102	5,26
C <sub>2'''</sub>	71	3,9
C <sub>3'''</sub>	70,5	3,47
C <sub>4'''</sub>	72	3,16
C <sub>5'''</sub>	69	2,6
C <sub>6'''</sub>	16,5	0,75

**Tabelle 16: Chemische Verschiebung in ppm der <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C Kerne von ZS1**

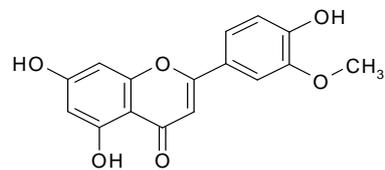
Für eine Strukturaufklärung anhand der NMR-Spektren sind die abgebildeten Analysen nicht ausreichend, da nicht allen Kohlenstoffen eine chemische Verschiebung zu geordnet werden kann. Anhand der MS-Daten ist für Substanz ZS 1 Isovitexin-2''-O-rhamnosid zu vermuten (s. Abbildung 45, S.61).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

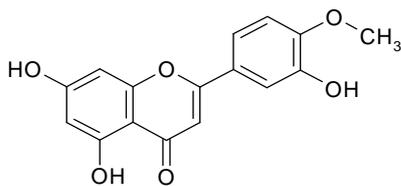
Im analytischen Maßstab ist es gelungen, im OWE 02/05 von *Dianthus versicolor* FISCH. und in einzelnen Sammelfractionen fünf Genine: Acacetin, Chrysoeriol, Diosmetin, Apigenin und Luteolin zu identifizieren. Bisher wurden aus *Dianthus versicolor* nur Flavonoide mit Apigenin, Luteolin und Chrysoeriol Grundkörper isoliert<sup>11</sup>, die Genine Acacetin und Diosmetin wurden in *Dianthus versicolor* zum ersten mal beschrieben.



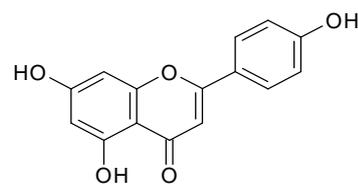
Acacetin



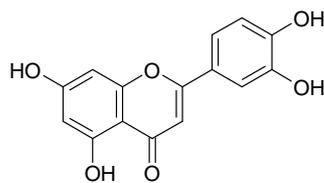
Diosmetin



Chrysoeriol



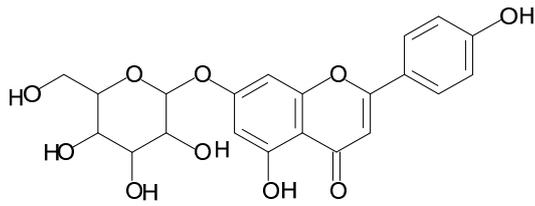
Apigenin



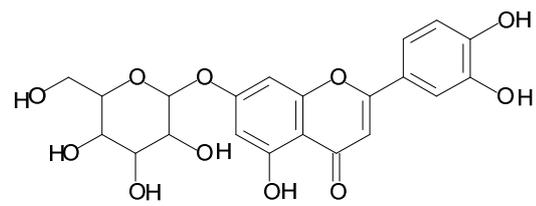
Luteolin

Weiters wurden die Flavonoidglykoside: Apigenin-7-O-glucosid, Luteolin-7-O-glucosid und Isovitexin identifiziert.

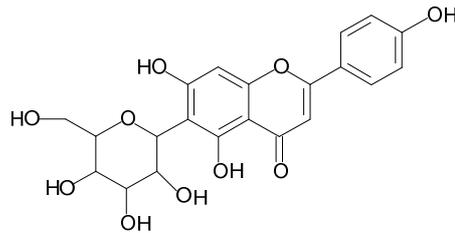
Darüber hinaus wurden fünf Substanzen isoliert von denen zwei als Isovitexin (ZS 2) und Luteolin-7-O-glucosid (ZS 4) identifiziert werden konnten.



Apigenin-7-O-glucosid

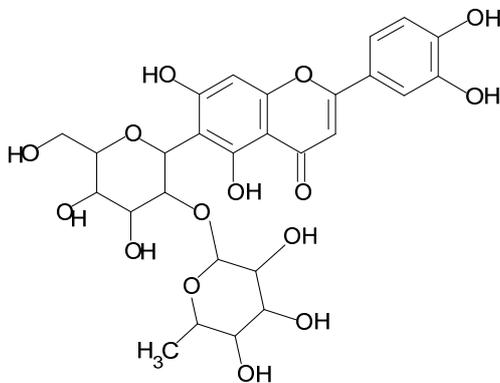


Luteolin-7-O-glucosid

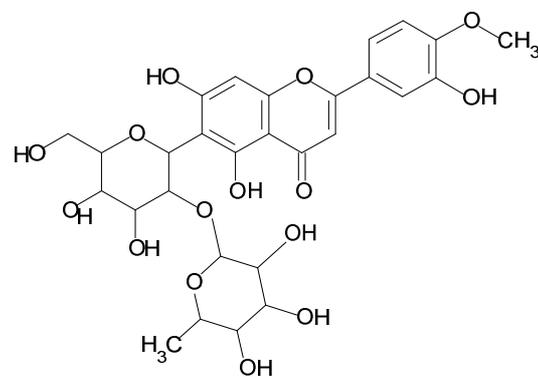


Chrysoeriol-6-C-glykosyl

Substanz ZS 1 konnte anhand von HPLC-DAD-MS und Hydrolyse mit nachfolgender GC-MS als Isovitexin-2''-O-rhamnosid charakterisiert werden. Eine Absicherung der Rhamnose-Verknüpfungsstelle anhand der NMR-Daten muss noch erfolgen.

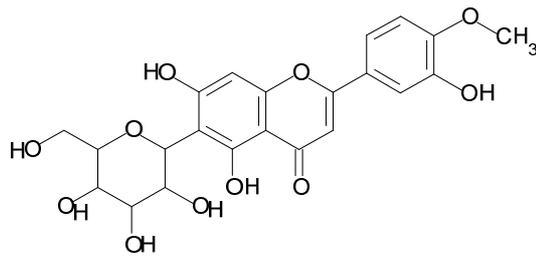


Substanz ZS 1



Substanz ZS 3

Aus den bisherigen Daten lässt sich ableiten, dass es sich bei Substanz ZS 3 um ein Flavonoid-diglykosid handelt. Ein Chrysoeriol oder Diosmetin Grundgerüst, welches C-glykosidisch mit einer Glucose, und diese O-glykosidisch mit einer Rhamnose verbunden ist. Die Untersuchungen zu Substanz ZS 3 sind noch nicht abgeschlossen.



Substanz ZS 5

Substanz ZS 5 hat ein Chrysoeriol oder Diosmetin Grundgerüst mit einer 6-C gebundenen Hexose. Schon 1985 wurde ein Chrysoeriol-6-C-glucosid als Inhaltsstoff von *Dianthus versicolor* FISCH. beschrieben.<sup>31</sup>

Anhand der Daten der HPLC-MS-Analyse ist zu erkennen, dass die fünf Genine mit den gleichen Glykosylierungsmustern vorkommen.

So ist mit dieser Arbeit eine Bestätigung der schon vorhandenen Daten<sup>32</sup> und eine Erweiterung des Wissens zu den Inhaltsstoffen von *Dianthus versicolor* gelungen.

## 5 Summary

*Dianthus versicolor* Fisch. is known as an Asian plant used in traditional Mongolian medicine. It is an ingredient of mixtures used for acute liver disease. Extracts of these plants were tested in a Liver-perfusion-model and an increase of the bile-flow was investigated.

Separation of an Original Water Extract of the aerial parts of *Dianthus versicolor* by LC and HPLC-MS allowed the identification of the five Aglykons: Acacetin, Diosmetin, Chrysoeriol, Apigenin and Luteolin. Further Flavonoidglycosides were identified by comparison with reference substances: Luteolin-7-O-glucoside, Apigenin-7-O-glucoside and Isovitexin. One compound was hydrolysed and further analysed by GC-MS. It seems to be Isovitexin-2''-O-rhamnosid. Two compounds were analyzed by <sup>1</sup>H-NMR and 2D-NMR, which includes <sup>1</sup>H, HMQC and HMBC experiments. The analysis is not finished yet.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Dianthus versicolor</i> FISCH (Bild: Dr. Christa Kletter, Department für Pharmakognosie) .....	5
Abbildung 2: Zunahme des Gallenflusses bei Testung der Wasserextrakte von <i>Saussurea amara</i> , <i>Lilium pumilum</i> und <i>Dianthus versicolor</i> im Leberperfusionsmodell in drei verschiedenen Konzentrationen .....	6
Abbildung 3: OWEs (s. Kap. 2.1, S.7) der verschiedenen Chargen im Vergleich (DC-System 2 s. Tab. 3, S.11) .....	6
Abbildung 4: Landkarte der Mongolei mit der Herkunft von <i>Dianthus versicolor</i> 02/05 .....	7
Abbildung 5: Entwicklung eines Dünnschichtchromatogramms.....	10
Abbildung 6: Komplexe von Flavonoiden mit Diphenylborsäuremethylester ....	11
Abbildung 7: Analyse des OWE von <i>Dianthus versicolor</i> 02/05 (s. Abb. 3, S.6) mittels HPLC-Methode Genine (Parameter s. Tabelle 5, S.14), Chromatogramm aufgenommen bei 340 nm .....	22
Abbildung 8: Testung verschiedener mobiler Phasen für die SC-Trennung des OWE 02/05 mittels DC, (Parameter s. Tabelle 3, S.11, mobile Phasen siehe Legende).....	23
Abbildung 9: Analyse ausgewählter Fraktionen nach SC-Auftrennung (Parameter: „Säule 1“ s. Tab. 9, S. 24) des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6) mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11) .....	25
Abbildung 10: Analyse weiterer ausgewählter Fraktionen nach SC-Auftrennung (Parameter: „Säule 1“ s. Tab. 9, S. 24) des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6) mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S. 11) .....	25

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 11: Analyse ausgewählter Sammelfractionen nach SC-Auftrennung (Parameter: „Säule 1“ s. Tab. 9, S. 24), des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6), mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11).....	26
Abbildung 12: Vergleich von SF1, SF4, SF9 und SF8 (s. Abb. 11, S.26) mittels HPLC, mit der Methode für Flavonoidglykoside (Parameter s. Tab. 5, S.14) Chromatogramm aufgenommen bei 340 nm.....	27
Abbildung 13: „Säule 2“ (s. Tabelle 4, S.12 und Tabelle 10, S.27).....	28
Abbildung 14: Analyse ausgewählter Fraktionen (s. Tab. 10, S.27) nach der säulenchromatischen Auftrennung (Parameter: „Säule 2“, s. Tabelle 4, S.12) des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6) mittels DC-System 1 (s. Tab. 2, S.10)...	29
Abbildung 15: Analyse ausgewählter Sammelfractionen (s. Tabelle 10) nach säulenchromatischer Auftrennung (Parameter s. Tabelle 4, S.12) des OWE 02/05 mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S. 11).....	31
Abbildung 16: Analyse der SF 300-400 (s. Tab. 11, S.30) mittels HPLC-Methode Semipräparativ (Parameter s. Tabelle 5, S.14) .....	32
Abbildung 17: Analyse der isolierten Substanzen ZS1-5 mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S. 11) .....	32
Abbildung 18: Analyse des OWE von Dianthus versicolor 02/05 (s. Kap. 2.1, S.7) mittels HPLC- Methode Flavonoidglykoside (Parameter s. Tabelle 5, S.14) .....	33
Abbildung 19: Analyse ausgewählter Sammelfractionen (s. Tab. 10, S.30) und ausgewählter Reinsubstanzen mittels DC-System 1 (s. Tab. 2, S.10).....	37
Abbildung 20: Vergleich ausgewählter Monoglykoside mit OWE 02/05 mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S. 11) .....	38
Abbildung 21: Vergleich ausgewählter Diglykoside mit OWE 02/05 mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11): .....	38

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 22: UV-Chromatogramm (oberer Graph) und Base Peak-Chromatogramm (unterer Graph) nach Analyse des OWE 02/05 (Abb. 3, S.6) mittels LC-DAD-MS (HPLC-Methode Flavonoidglykoside, Parameter s. Tabelle 5, S.14, MS-Parameter s. Tabelle 7, S.18) .....	42
Abbildung 23: Fragmentierungsschema für das [M-H-180-120] <sup>28</sup> Fragment ...	44
Abbildung 24: UV-Chromatogramm (oberer Graph) und Base Peak-Chromatogramm (unterer Graph) nach Analyse des OWE 02/05 (Abb. 3, S.6) mittels HPLC-DAD-MS (HPLC-Methode Flavonoidgenine, Parameter s. Tabelle 5, S.14, MS-Parameter s. Tabelle 7, S.18), .....	45
Abbildung 25: Vergleichende Analyse der SF 0-95 (s. Tab.11, S.30, Abbildung 14, S.29 und Abbildung 19, S.37) mit den Reinsubstanzen der vermuteten Genine mittels DC-System 1 (s. Tabelle 2, S.10) .....	46
Abbildung 26: Analyse der SF 0-95 (s. Abbildung 25, S.46 und Tabelle 11, S.30) mittels HPLC-Methode Genine (Parameter s. Tab. 5, S.14).....	47
Abbildung 27: Referenzanalyse von Acacetin mittels HPLC-Methode Genine (s.Tabelle 5, S.14) .....	48
Abbildung 28: Referenzanalyse von Diosmetin mittels HPLC-Methode Genine (s.Tabelle 5, S.14) .....	49
Abbildung 29: Referenzanalyse von Chrysoeriol mittels HPLC-Methode Genine (s.Tabelle 5, S.14) .....	50
Abbildung 30: Referenzanalyse von Apigenin mittels HPLC-Methode Genine (s.Tabelle 5, S.14) .....	51
Abbildung 31: Ausschnitt aus der Analyse der SF 96-155 mittel HPLC-Methode Genine (s. Tab. 5, S.14) .....	52
Abbildung 32: Referenzanalyse von Luteolin mittels HPLC-Methode Genine (s. Tab. 5, S.14).....	52

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 33: Analyse der SF 96-155 (s. Abbildung 15, S.31, Abbildung 22, S.42 und Tab. 11, S.31 ) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parameter s. Tab. 5, S.14).....	53
Abbildung 34: Vergleich des OWE 02/05 mit Referenzsubstanzen mittels DC-System 2 (s. Tab. 3, S.11) .....	54
Abbildung 35: Analyse der SF 205-244 (s. Abbildung 15, S.31, Abbildung 22, S.42 und Tab. 11, S.30,) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parameter s. Tab.5, S.14).....	54
Abbildung 36: Analyse der SF 300-400 (s. Abbildung 15, S.31, Abbildung 22, S.42 und Tabelle 11, S.30) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parameter s. Tabelle 5 S.14).....	55
Abbildung 37: Analyse von ZS 1 (s. Abbildung 17, S.32) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (s.Tabelle 5, S.14) .....	56
Abbildung 38: Analyse der Wasserphase von ZS1 (s. Kap.3.1.5, S.32) nach Hydrolyse mittels GC-MS (GC-MS-Parameter: s. Tabelle 6, S.16).....	57
Abbildung 39: Vergleichende GC-MS-Analyse der Wasserphase nach Hydrolyse von ZS1 mit den Reinsubstanzen Rhamnose und Glucose (Parameter s. Tabelle 6, S. 16).....	57
Abbildung 40: Analyse der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS1 (s. Kap.3.1.5, S.32) mittels HPLC-Methode Flavonoidglykoside (Parameter: s.Tabelle 5, S.14).....	58
Abbildung 41: Massenspektrum Peak 1 (Abbildung 40, S.59) der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS 1 (s. Kap.3.1.5, S.32), HPLC-MS-Parameter: s. Tabelle 7, S.18.....	59
Abbildung 42: Massenspektrum Peak 2 (Abbildung 40, S.59) der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS 1 (s. Kap.3.1.5, S.32), HPLC-MS-Parameter: s. Tabelle 7, S.18.....	60

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 43: Massenspektrum Peak 3 (Abbildung 40, S.59) der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS1 (s. Kap.3.1.5, S.32), HPLC-MS-Parameter: s. Tabelle 7, S.18 .....	60
Abbildung 44: Massenspektrum Peak 4 (Abbildung 40, S.59) der Ethylacetatphase nach der Hydrolyse von ZS 1 (s. Kap.3.1.5, S.32), HPLC-MS-Parameter: s. Tabelle 7, S.18 .....	61
Abbildung 45: Vorgeschlagenen Struktur ZS1 – Isovitexin-2''-O-rhamnosid ....	61
Abbildung 46: <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von ZS1 gemessen in CD <sub>3</sub> OD bei 25°C in 8 Scans (Parameter s. Kap. 2.6, S.19).....	62
Abbildung 47: COSY (1H, 1H) Spektrum von ZS1 gemessen in CD <sub>3</sub> OD bei 25°C in 16 Scans (Parameter s. Kap. 2.6, S.19) .....	63
Abbildung 48: HSQC (1H, 13C) Spektrum von ZS1 gemessen in CD <sub>3</sub> OD bei 25°C in 176 Scans (Parameter s. Kap. 2.6, S.19) .....	63
Abbildung 49: Vergrößerung des HSQC (1H, 13C) Spektrums von ZS1 gemessen in CD <sub>3</sub> OD bei 25°C in 176 Scans (Parameter s. Kap. 2.6, S. 19) .....	64
Abbildung 50: HMBC (1H, 13C) Spektrum von ZS1 gemessen in CD <sub>3</sub> OD bei 25°C (Parameter s. Kap. 2.6, S.19).....	64

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.....	8
Tabelle 2: DC-System 1 für Flavonoid-Genine.....	10
Tabelle 3: DC-System 2 für Flavonoidmono- und diglykoside.....	11
Tabelle 4: Parameter für die SC-Systeme „Säule 1“ und „Säule 2“ .....	12
Tabelle 5: Parameter für die HPLC .....	14
Tabelle 6: Parameter für die GC-MS.....	16
Tabelle 7: Parameter für die MS (Bruker Ionenfalle) gekoppelt mit HPLC .....	18
Tabelle 8: Parameter zur Polarimetrie.....	20
Tabelle 9: Säulenchromatographische Trennung von OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6), Parameter: „Säule 1“ (s. Tab. 4, S.12).....	24
Tabelle 10: Säulenchromatographische Trennung von OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6), Parameter: Säule 2 (s. Tab. 4, S.12).....	27
Tabelle 11: Sammelfractionen nach säulenchromatischer Auftrennung des OWE 02/05 (s. Abb. 3, S.6), Parameter: „Säule 2“ (s. Tabelle 4, S.12 und Tabelle 10, S.27).....	30
Tabelle 12: Bezeichnung der Bahnen in Abbildung 15 mit den aufgetragenen Sammelfractionen (s. Tab. 11).....	31
Tabelle 13: UV-Spektren der Substanzen 1-16 aus der HPLC-Analyse des OWE 02/05 (s. Abb. 18).....	36
Tabelle 14: UV-Spektren ausgewählter Reinsubstanzen, on-line aufgenommen während der HPLC-Analyse (s. HPLC-Methode Flavonoidglykoside Tab. 5, S.14) .....	40

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 15: Daten der HPLC-MS-Analyse des OWE 02/05 (s. Abbildung 24, S.45) mit der HPLC-Methode Genine (Parameter s. Tabelle 5, S.14 und Tabelle 7, S.18), CNR=Substanznummer ..... 45

Tabelle 16: Chemische Verschiebung in ppm der  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Kerne von ZS165

## 8 Curriculum vitae

### Zita Swoboda

Geboren 13.11.1972 in Wien

Mutter von vier Kindern

Magdalena 16.07.95

Aeneas 16.01.97

Jelscha 21.09.2004

Serafin 01.03.2007



### Bildungsweg

Rudolf-Steiner-Schule Wien-Maurer 1979-1990

Apothekenhelfer-Anlernling 1991-1993 Schlangen-Apotheke 1020 Wien

Abendgymnasium für Berufstätige 1150 Wien 1991-1993

Abendgymnasium für Berufstätige 8000 Graz 1993-1996

Matura Jänner 1996

Lehrabschlußprüfung für PKA Juni 1999

Augustinus Apotheke 2380 Perchtoldsdorf 1999-2002

Pharmaziestudium ab WS 2002

## 9 Quellennachweis

---

- <sup>1</sup>Koehn F.E. and Carter G.T. Review: The evolving role of natural products in drug discovery, *Nature* (2004) 4: 206-220
- <sup>2</sup>Dangles O. and Dufour C. Flavonoid-Protein Interactions, *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*, Ed. by Andersen Ø. and Markham K., CRC Taylor & Francis, Boca Raton, 2006
- <sup>3</sup>Wada S., He P., Hashimoto I., Watanabe N., Sugiyama K. Glycosidic Flavonoids as Rat-Liver Injury Preventing Compounds from Green Tea, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2000) 64: 2262-2265
- <sup>4</sup>Djeridane A., Brunel J.M., Vidal N., Yousfi M., Ajandouz E.H., Stocker P. Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavone glucoside isolated from *Deverra scoparia*, *Chemico-Biological Interactions* (2008) 172: 22-26
- <sup>5</sup>Jigmed B. Survey on Mongolian Medical Science History, *Die traditionelle mongolische Medizin*, Ed. by International Trust for Traditional Medicine, Ayur Vijnana (2002) 8: 106
- <sup>6</sup>Kletter C., Glasl S., Thalhammer Th., Narntuya S. Traditional Mongolian Medicine – A Potential for Drug Discovery, *Sci. Pharm.* (2008) 76: 49-63,
- <sup>7</sup>Boldsaikan B. Reconstruction of Traditional Theory and Methodology in Indo-Tibetan-Mongolian Medicine, Ed. by International Trust for Traditional Medicine, Ayur Vijnana (2002) 8: 58-65
- <sup>8</sup>Unkrieg W.A. An Introduction, Ed. by International Trust for Traditional Medicine, Ayur Vijnana (2002) 8: 9-27
- <sup>9</sup>Boldsaikan B. *Encyclopedia of Mongolian Medical Plants*, Mongolian University of Science and Technology, System Science Research Institute, Ulaanbaatar, 2004
- <sup>10</sup>Carey S. Searching for Mongolian Medicine in the Gobi Desert, Ed. by International Trust for Traditional Medicine, Ayur Vijnana (2002) 8: 86-92
- <sup>11</sup>Obmann A. Dissertation in Vorbereitung, Department für Pharmakognosie, Universität Wien

## Quellennachweis

---

---

- <sup>12</sup> Holec N. Diplomarbeit Biologische Wirkungen ausgewählter mongolischer Arzneipflanzen. Studien an der isolierten perfundierten Rattenleber und an der humanen Tumorzelllinie MCF-7, Universität Wien, 2005
- <sup>13</sup> Obmann A. Tsendayush D. Thalhammer Th. Nha Vo T.P. Purevsuren S. Narantuya S. Kletter Ch. Glasl S. Extracts from the Mongolian Traditional Medicinal Plants *Dianthus versicolor* FISCH. and *Lilium pumilum* DC. Stimulate Bile Flow in an Isolated Perfused Rat Liver Model, Phytomedicine, zur Publikation eingereicht
- <sup>14</sup> Mayr K. Diplomarbeit Charakterisierung von Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden aus *Saussurea amara* DC. (Asteraceae), Universität Wien, 2006
- <sup>15</sup> <http://www.ub-mongolia.mn/map-of-mongolia/general-maps-mongolia/administrative-map-of-mongolia.html>, besucht am 16. 02. 2009, 9. 30
- <sup>16</sup> Schwendt G., Chromatographische Trennmethode, Thieme Verlag, Stuttgart, 1994
- <sup>17</sup> Wagner H., Blatt S., Zgainski E. M. Drogenanalyse, Springer Verlag Berlin, 1983
- <sup>18</sup> Schomburg G. Gaschromatographie, Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik. Verlag Chemie, Weinheim 1987.
- <sup>19</sup> Williams D. und Fleming I. Strukturaufklärung in der organischen Chemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 1991
- <sup>20</sup> Gauglitz G. Wechselwirkung zwischen Strahlung und Materie, Untersuchungsmethoden in der Chemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 1997
- <sup>21</sup> Zeller K. -P. Massenspektrometrie, Untersuchungsmethoden in der Chemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 1997
- <sup>22</sup> Hesse M., Meier H., Zeeh B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 2005
- <sup>23</sup> Breitmeier E. Kernmagnetische Resonanz, Untersuchungsmethoden in der Chemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 1997
- <sup>24</sup> Friebolin H. Ein und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Wiley-VCH GmbH & Co.KGaA, Weinheim, 2006

- <sup>25</sup> Pemp E. Dissertation Analytik pharmazeutisch relevanter Flavonoide mittels HPLC/UV, HPLC/MS und HPLC/UV/MS, Universität Wien, 2005
- <sup>26</sup> Marston A. and Hostettmann K. Separation and Quantification of Flavonoids, Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications, Ed. by Andersen Ø. and Markham K., CRC Taylor & Francis, Boca Raton, 2006
- <sup>27</sup> Quimin L., Van den Heuvel H., Delorenzo O., Corhout J., Pieters L.A.C., Vlietinck A.J., Claeys M. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*), *Journal of Chromatography* (1991) 562: 435-446
- <sup>28</sup> Justensen U. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collisionactivation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *Journal of Chromatography A* (2000) 902: 369-379
- <sup>29</sup> Harborn J.B. *Comparativ Biochemistry of Flavonoids*, Academic Press, London-New York, 1967
- <sup>30</sup> Chopin J. *Synthesis of C-Glykosyflavones, Pharmacognosy and Phytochemistry*, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1971, 111-128
- <sup>31</sup> Boguslavskaya L.I., Dem'janenko S.I., Dzhamilyi K.S., Soboleva V.A. C-Glycosides of *Dianthus versicolor*, Translated from *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* (1983) No. 6: 783-784,