

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Isolierung von Acetylcholinesterase-Hemmstoffen
aus *Ferula gummosa* Boiss.“

verfasst von

Veronika Fitz

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Ich danke Frau Univ. Prof. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie. Durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes hat sie diese Diplomarbeit erst möglich gemacht.

Weiters gilt mein Dank Dr. Hamid-Reza Adhami, der mich mit seiner kompetenten Einschulung sehr gut auf das selbstständige Arbeiten vorbereitet hat.

Ich bedanke mich bei Dr. Martin Zehl und Dr. Hanspeter Kählig für die Ermittlung und Interpretation der MS- bzw. NMR-Daten.

Ganz besonderer Dank gilt Frau ao. Univ. Prof. Liselotte Krenn. Sie hat mich während der Arbeit nicht nur fachlich hervorragend betreut, sondern mit ihrer ehrlichen Fürsorglichkeit auch eine familiäre und produktive Arbeitsatmosphäre geschaffen. Ich habe mich bei ihr gut aufgehoben gefühlt und werde mich gerne an diese Zeit erinnern.

Danke an meine Schwester und an meine Freunde, die mit mir durch Dick und Dünn gegangen sind. Danke an meine Familie für ihre grenzenlose Unterstützung.

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia among older people.

Dementia is a brain disorder that seriously affects a person's ability to carry out daily activities. [...]

People may not recognize family members or have trouble speaking, reading or writing. They may forget how to brush their teeth or comb their hair. Later on, they may become anxious or aggressive, or wander away from home. [...]

No treatment can stop the disease. However, some drugs may help keep symptoms from getting worse for a limited time.

[<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/alzheimersdisease.html>, 20.1.2014]

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A β	Amyloid- β -Protein
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChEI	Acetylcholinesterase-Inhibitor
ACN	Acetonitril
ATCI	Acetylthiocholinioidid
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CC	Column Chromatography (Säulenchromatographie)
Chel.	Chelidonin
CHCl ₃	Chloroform
d	Säulendurchmesser
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Säulenhöhe
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hRF	Relation zur Front = $\frac{\text{Laufstrecke der Substanzbande}}{\text{Laufstrecke des Fließmittels}} \times 100$
l	Liter
M	molar (Mol pro Liter)
MAO	Monoaminoxidase
MHz	Megahertz
mM	millimolar (Millimol pro Liter)

MeOD	deuteriertes Methanol
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
μm	Mikrometer
MS	Massenspektrometrie
N ₂	Stickstoff
NAC	1-Naphthylacetat
NaOH	Natronlauge
NL	Nachlauf
NP	Normalphasensystem
nm	Nanometer
p. a.	pro analysi
PAS	Peripheric Anionic Site
RP	Reversed-Phase System (Umkehrphasensystem)
S.	Seite
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
Tab.	Tabelle
VLC	Vacuum Liquid Chromatography
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Ferula gummosa</i> Boiss. und Galbanum.....	1
1.2	Acetylcholinesterase	4
1.3	Altersdemenz.....	4
1.4	Zielsetzung.....	7
2	Material.....	8
2.1	Ausgangsmaterial	8
2.2	Reagenzien und Lösungsmittel.....	9
3	Methoden.....	10
3.1	Chromatographische Methoden	10
3.1.1	Säulenchromatographie (CC)	10
3.1.2	Solid Phase Extraction (SPE).....	11
3.1.3	Dünnschichtchromatographie (DC)	11
3.1.4	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	12
3.2	Strukturaufklärung	13
3.2.1	Massenspektrometrie (MS)	13
3.2.2	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	14
3.3	Aktivitätsbestimmung	14
3.3.1	Bioautographie.....	14
3.3.2	Microplate-Assay.....	16
4	Ergebnisse	19
4.1	Aufarbeitung der Fraktion A8 - Isolierung der Substanzen VF1 und VF2 ...	20
4.2	Aufarbeitung der Fraktion A6 – Isolierung der Substanzen VF3 bis VF8	23
4.2.1	Auftrennung der Fraktion J aus CC2	25
4.2.2	Auftrennung der Fraktionen F und G aus CC2	28
4.2.3	Auftrennung der Fraktion I aus CC2.....	30
4.3	Strukturaufklärung	38
4.3.1	Strukturaufklärung von Substanz VF1.....	38
4.3.2	Strukturaufklärung von Substanz VF2.....	41
4.3.3	Strukturaufklärung von Substanz VF3.....	42

4.3.4	Strukturaufklärung von Substanz VF4.....	44
4.3.5	Strukturaufklärung von Substanz VF5.....	46
4.3.6	Strukturaufklärung von Substanz VF6.....	48
4.3.7	Strukturaufklärung von Substanz VF7.....	51
4.3.8	Strukturaufklärung von Substanz VF8.....	53
4.3.9	Aus Galbanum isolierte Substanzen.....	56
4.4	Aktivitätsbestimmung.....	57
5	Diskussion.....	58
6	Zusammenfassung.....	62
7	Summary	63
	Literaturverzeichnis.....	I
	Abbildungsverzeichnis.....	V
	Tabellenverzeichnis.....	VII
	Curriculum Vitae.....	VIII
	Anhang	IX

1 Einleitung

1.1 *Ferula gummosa* Boiss. und Galbanum

Ferula gummosa Boiss. (Synonym: *Ferula galbaniflua*, Abb. 1, S. 3) ist eine im Iran beheimatete Apiaceenart. Sie ist vor allem in den gebirgigen Regionen im Norden und Westen des Landes zu finden und erreicht eine Wuchshöhe von bis zu drei Metern. Alle Pflanzenteile, besonders der kräftig ausgeprägte Stamm und die fleischige Wurzel, sind von Sekretgängen durchzogen, die reichlich aromatisches Gummiharz führen. Wird die Pflanze durch Schnitte oder Insekten verletzt, tritt das Harz aus. Es wird als Galbanum (persisch *Barijeh*) bezeichnet. Aufgrund seiner industriellen Verwendung, etwa als Duftstoff in Parfums oder als Klebstoff für die Fertigung von Schmuckstücken, zählt es zu den gefragtesten landwirtschaftlichen Exportgütern des Iran. Die traditionelle Gewinnung der Droge erfolgt durch vorsichtiges Anritzen von Stamm oder Wurzel. Das gelbbraune Exkret ist zunächst klebrig, erhärtet dann an der Luft und kann abgekratzt werden [1]. Galbanum besteht zum Großteil aus Harzbestandteilen (löslich in organischen Lösungsmitteln), außerdem aus Gummibestandteilen und ätherischem Öl [2].

In der Traditionellen Iranischen Medizin wird Galbanum hoch geschätzt und gegen zahlreiche Beschwerden eingesetzt. Die Indikationen reichen von Diarrhoe und Magenschmerzen über Hauterkrankungen bis zu Bronchialkatarrhen und allgemeiner Schwäche [3–6]. In pharmakologischen Studien konnten während der letzten fünfzehn Jahre spasmolytische, antikonvulsive, antimikrobielle und antioxidative Wirkungen für verschiedene Extrakte aus *Ferula gummosa* nachgewiesen werden [4, 5, 7, 8]. Auch antiphlogistische und analgetische Effekte werden diskutiert [9, 10].

Mitte des 16. Jahrhunderts verfasste der deutsche Arzt und Botaniker Jacob Theodor in seinem Kräuterbuch eine umfassende Monographie „Von dem Galbenkraut und seinem Gummi“ [11]. Darin dokumentiert er die medizinische Anwendung von Galbanum gegen Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie Krampfleiden, Lähmungen oder Gedächtnisstörungen. Auch für den Orient existieren Belege für die Verwendung verschiedener *Ferula*-Arten gegen Störungen des

Einleitung

Nervensystems wie zittrige Hände, Epilepsie oder Hysterie [6, 12]. Die lange empirische Anwendung gegen derartige Beschwerden wurde als möglicher Hinweis auf zentral wirksame Inhaltsstoffe gewertet und bildete den Anstoß für bioaktivitätsgeleitete phytochemische Untersuchungen.

Die meisten Studien konzentrierten sich bisher auf die Zusammensetzung und pharmakologische Wirkung des ätherischen Öls. In einem Screening traditioneller iranischer Arzneipflanzen hatte das DCM-Extrakt von *Ferula gummosa*, welches auch die nicht flüchtigen Harzbestandteile enthielt, Acetylcholinesterase-inhibitorische Aktivität gezeigt. Das komplex zusammengesetzte Extrakt war mittels VLC in 10 Fraktionen getrennt und diese dünnschichtchromatographisch untersucht worden. Durch Detektion mittels Bioautographie hatten sich auf der DC mehrere Zonen mit AChE-hemmenden Eigenschaften nachweisen lassen. Die zwei aktivsten Banden waren isoliert und mittels MS und NMR als Aurapten und Farnesiferol A identifiziert worden. Zusätzlich war die AChE-Hemmwirkung der Substanzen quantifiziert worden [3]. Die folgende Arbeit galt der Isolierung und Strukturaufklärung weiterer aktiver Verbindungen aus dem genannten DCM-Extrakt.



Abbildung 1: *Ferula gummosa* Boiss.
Aus Köhlers Medizinal Pflanzen (1890)

1.2 Acetylcholinesterase

Der Neurotransmitter Acetylcholin (Abb. 2) ist an zellulären Kommunikationsprozessen in zahlreichen Geweben beteiligt. Im Gehirn ist Acetylcholin in Regionen anzutreffen, in denen Willkürmotorik, Lernen und Gedächtnis gesteuert werden. Acetylcholin wird im Zytoplasma der Nervenendigungen aus Cholin und Acetyl-Coenzym A synthetisiert und in Speichervesikel aufgenommen. Beim Eintreffen eines Aktionspotentials verschmelzen die Vesikel mit der präsynaptischen Membran und setzen ihren Inhalt in den synaptischen Spalt frei. Zwei Gruppen von Rezeptoren können das gesendete Acetylcholin-Signal über die postsynaptische Membran weiterleiten: Nicotinrezeptoren und Muscarinrezeptoren.

Um das Acetylcholin-Signal gezielt zu beenden, muss der Transmitter nach erfolgter Transmission rasch aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Die Acetylcholinesterase spaltet den Essigsäurerest von Cholin ab und inaktiviert dadurch das Molekül. Die Hemmung des abbauenden Enzyms führt zu einer Ansammlung von Acetylcholin im synaptischen Spalt und resultiert in einer verstärkten cholinergen Neurotransmission [13].

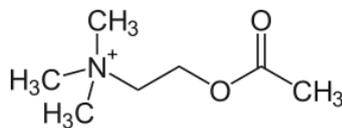


Abbildung 2: Acetylcholin

Quelle: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acetylcholin2.svg>

1.3 Altersdemenz

Als Demenz wird eine chronisch-progressive mentale Störung bezeichnet, die höhere kortikale Funktionen wie Denken, Sprechen, Orientierung, Lern-, Erinnerungs- und Urteilsvermögen beeinträchtigt. Die häufigste Form der Demenz ist die Alzheimer-Erkrankung [14].

Zwei charakteristische Veränderungen prägen das Alzheimer-demente Gehirn: Tau-Protein, ein physiologischer Bestandteil des Zytoskeletts, wird durch seine abnormale Struktur funktionsunfähig und lagert sich innerhalb der Nervenzelle ab. Extrazellulär bilden sich aus toxischem Amyloid- β -Protein (A β) sogenannte senile Plaques. A β ist das Spaltprodukt eines Membranproteins. Es entsteht, wenn der

Abbauprozess dieses Membranproteins gestört ist. Dass A β an der Zerstörung der Neuronen beteiligt ist, gilt als unumstritten. Zum Mechanismus der Schädigung gibt es allerdings mehrere Theorien. Unter anderem scheint A β Entzündungsprozesse und damit die Freisetzung neurotoxischer Zytokine, die Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren sowie Redoxprozesse zu fördern. Daneben sollen Zellstoffwechsel und Funktionsfähigkeit der Synapsen durch die Proteinablagerungen direkt beeinträchtigt werden. Am Ende steht der selektive Verlust von Nervenzellen in bestimmten Gehirnregionen. Die Dichte an cholinergen Neuronen ist im Alzheimer-dementen Gehirn nachweislich reduziert und damit einhergehend die cholinerge Neurotransmission [15].

Trotz einiger Ansätze ist bisher noch keine kausale Therapie zur Marktreife gelangt. Die derzeitige symptomatische Therapie richtet sich gegen die Hydrolyseaktivität der Acetylcholinesterase mit dem Ziel, die Acetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt zu erhöhen. Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChEI) ermöglichen den verbliebenen ungeschädigten Neuronen eine effektivere Kommunikation. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Aktivierung von Muscarinrezeptoren den Proteinstoffwechsel im Gehirn normalisiert und die Produktion und Ablagerung von A β vermindert [16–18]. Die derzeit gebräuchlichen AChEI für diese Indikation sind Donepezil, Galantamin und Rivastigmin. Sie gelten als Standardmedikation leichter bis mittelschwerer Alzheimer-Fälle. Bei der Anwendung von AChEI ist allerdings mit unangenehmen Nebenwirkungen zu rechnen. Häufig treten Schlaflosigkeit und Müdigkeit sowie Diarrhoe, Muskelkrämpfe, Übelkeit und Erbrechen auf [14].

Für die Hemmung des Enzyms sind zwei Regionen in diesem Protein interessant. Kompetitive Hemmstoffe konkurrieren mit Acetylcholin um das katalytische Zentrum der Esterase. Eine weitere, dem katalytischen Zentrum räumlich benachbarte Bindungsstelle ist die sogenannte *peripheric anionic site* (PAS). PAS-Liganden bewirken eine allosterische Umlagerung des katalytischen Zentrums, wodurch die hydrolytische Aktivität des Enzyms verloren geht [19]. Es handelt sich um nicht-kompetitive Hemmstoffe der Acetylcholinesterase. Auch A β hat eine hohe Affinität zu PAS. Dem AChE-A β -Komplex kommt neueren Untersuchungen zufolge eine noch größere Rolle in der Entstehung der Krankheit zu als A β alleine. Bei der

Einleitung

Bindung an A β verändert das Enzym die Konformation des Proteins offenbar derart, dass sich das zunächst lösliche Protein zu makromolekularen Komplexen zusammenlagert. Diese sind nicht mehr wasserlöslich, es kommt zur Ablagerung von senilen Plaques [20].

Ein weiteres Enzym, welches in die Entstehung dementieller Syndrome involviert zu sein scheint, ist die Monoaminoxidase (MAO). Sie katalysiert unter anderem den oxidativen Abbau der Neurotransmitter Noradrenalin, Serotonin und Dopamin. MAO existiert in zwei Isoformen, MAO-A und MAO-B, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. In den Gehirnen älterer Menschen wurde eine im Vergleich zu jüngeren Menschen erhöhte Konzentration des Isoenzym MAO-B gefunden [21]. In Alzheimer-dementen Gehirnen sind sowohl MAO-B als auch MAO-A erhöht [22]. Der gesteigerte Neurotransmitter-Turnover könnte für den hohen oxidativen Stress in altersdementen Gehirnen mitverantwortlich sein und eine Hemmung des Enzyms daher antioxidativ wirken. In der Tat wurden für einige handelsübliche MAO-B-Hemmer antioxidative und neuroprotektive Effekte nachgewiesen [23].

Für die Behandlung der Alzheimer-Erkrankung wären Wirkstoffe, die sowohl die Aktivität von AChE und MAO hemmen als auch die PAS-Bindestelle der AChE blockieren, wahrscheinlich besonders geeignet.

Einer Schätzung von Brookmeyer et al. zufolge lebten im Jahr 2007 weltweit 26,6 Millionen Menschen mit Alzheimer-Demenz. Bis zum Jahr 2050 soll sich diese Zahl wegen des stetig steigenden Durchschnittsalters vervierfachen. Alle Maßnahmen, die Ausbruch bzw. Voranschreiten der Demenz verzögern – selbst in bescheidenem Ausmaß – würden die Last durch die Erkrankung für künftige Generationen deutlich mindern [24].

1.4 Zielsetzung

In den vorangegangenen Untersuchungen war eine Reihe von Komponenten mit AChE-inhibierender Wirkung in Galbanum detektiert worden. Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Strukturklärung dieser Verbindungen. Durch den Nachweis von Acetylcholinesterase-Hemmstoffen sollte die Plausibilität der traditionellen Anwendung bei Demenzerkrankungen belegt werden.

2 Material

2.1 Ausgangsmaterial

Das Ausgangsmaterial für die Isolierung bildeten zwei Fraktionen eines Dichlormethanextraktes aus Galbanum, die im Zuge einer vorangegangenen Dissertation angefertigt worden waren [25].

30 Gramm des Gummiharzes waren über Nacht mit 200 ml Dichlormethan (DCM) unter Rühren mazeriert und anschließend im Ultraschallbad bei 40°C für 30 Minuten extrahiert worden. Das gewonnene Extrakt war unter vermindertem Druck bei 40°C eingeeengt worden. Das DCM-Extrakt war mittels Vakuum-Flüssigchromatographie (VLC) an Kieselgel mit DCM als Laufmittel in zehn Fraktionen getrennt worden. In Abbildung 3 ist das Schema der Aufarbeitung dargestellt.

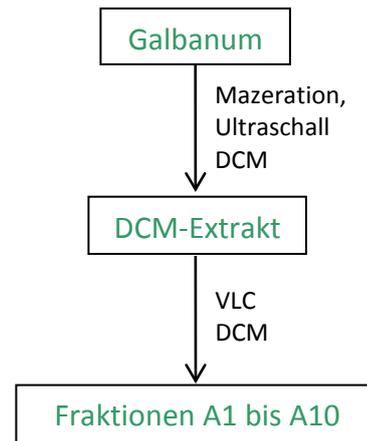


Abbildung 3: Gewinnung des Ausgangsmaterials

Abbildung 4 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm der zehn Fraktionen im Vergleich mit dem Gesamtextrakt.

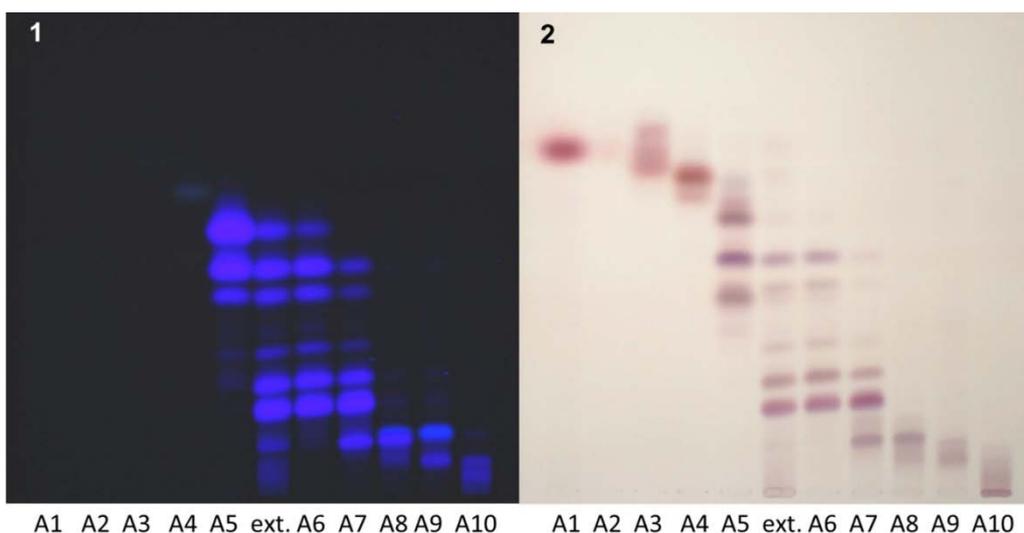


Abbildung 4: DC der Fraktionen A1 bis A10 des DCM-Extraktes [aus 25]

Links: UV 366 nm, rechts: Derivatisierung mit AAS

ext. = unfractioniertes DCM-Extrakt

Mobile Phase: CHCl_3 -EtOAc-MeOH (90 + 7 + 3)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Die Aktivität der Fraktionen A5, A6, A7 und A8 wurde mittels Bioautographie überprüft (Abb. 5, $c = 8 \text{ mg/ml}$). Als Positivkontrolle diente Chelidonin ($c = 0,35 \text{ mg/ml}$). Für die weitere Aufarbeitung wurden die Fraktionen A6 (11,5 g) und A8 (0,3 g) ausgewählt. Mit dieser Auswahl sollte ein möglichst weites Spektrum der enthaltenen Coumarinverbindungen bearbeitet werden.

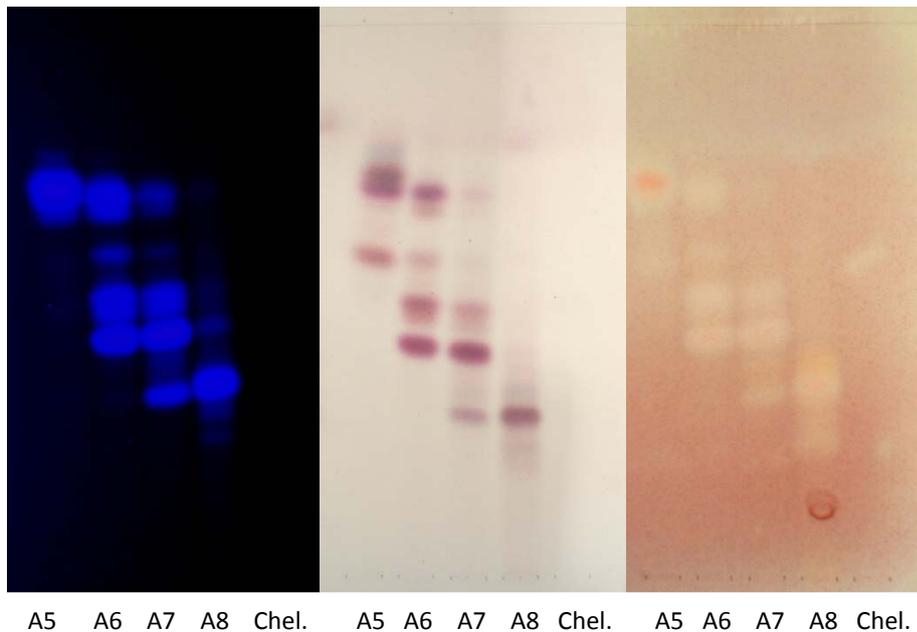


Abbildung 5: DC der Fraktionen A5 bis A8 im Vergleich mit Chelidonin (Chel.)
 Links: UV 366 nm, Mitte: Derivatisierung mit AAS, rechts: Bioautographie (siehe S. 14 f)
 Mobile Phase: $\text{CHCl}_3\text{-EtOAc-MeOH (90 + 7 + 3)}$
 Stationäre Phase: Kieselgel 60 F_{254}

2.2 Reagenzien und Lösungsmittel

Alle Lösungs- und Fließmittel wurden in p. a. Qualität bezogen, entionisiertes Wasser wurde in einer laboreigenen Destillationsapparatur bereitet. Des Weiteren wurden folgende Chemikalien eingesetzt: Acetylcholinesterase aus elektrischem Aal (Sigma), Acetylthiocholiniodid (BioChemica), Bovines Serumalbumin (Sigma), 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (Sigma), Echtblausalz B (Merck), 1-Naphthylacetat (Sigma), Physostigmin (Sigma), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma) und Umbelliferon (Extrasynthese).

3 Methoden

3.1 Chromatographische Methoden

3.1.1 Säulenchromatographie (CC)

Die drei Fraktionierungen mittels Säulenchromatographie wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tab. 1 bis Tab. 3).

Tabelle 1: Bedingungen für die CC1

Stationäre Phase	Sephadex® LH 20 (Sigma)
Mobile Phase	MeOH 40%
Dimensionen	d = 1 cm, h = 16 cm
Durchflussrate	2,5 ml / 30 min

Zur Kontrolle der Auftrennung wurde jede Fraktion mittels Normalphasen-DC überprüft und Fraktionen mit gleicher Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt.

Tabelle 2: Bedingungen für die CC2

Stationäre Phase	Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie (Merck)
Mobile Phase	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (95 + 1,5 + 0,1)
Dimensionen	d = 3 cm, h = 81 cm
Durchflussrate	6 ml / 30 min

Jede zehnte Fraktion wurde mittels Normalphasen-DC analysiert und Fraktionen mit übereinstimmender Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt.

Tabelle 3: Bedingungen für die CC3

Stationäre Phase	Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie (Merck)
Mobile Phase	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (95 + 1,5 + 0,1)
Dimensionen	d = 2 cm, h = 80,5 cm
Durchflussrate	7 ml / 30 min

Jede zehnte Fraktion, bei stark angereicherten Komponenten jede zweite, wurde mittels Normalphasen-DC analysiert und Fraktionen mit vergleichbarer Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt.

3.1.2 Solid Phase Extraction (SPE)

Tabelle 4: Bedingungen für SPE1 bis SPE3

Kartusche	Mega Bond Elut-C18 (Varian), 20 ml
Mobile Phase	MeOH 40% bis MeOH 100%
Gradient	5%-Schritte
Fraktionen pro MeOH-Konzentration	3 bis 4
Fraktionsvolumen	15 ml

Tabelle 5: Bedingungen für die SPE4

Kartusche	Mega Bond Elut-C18 (Varian), 12 ml
Mobile Phase	MeOH 40% bis MeOH 100%
Gradient	5%-Schritte
Fraktionen pro MeOH-Konzentration	3
Fraktionsvolumen	10 ml

Die erhaltenen Fraktionen wurden jeweils mittels DC analysiert und Fraktionen mit vergleichbarer Zusammensetzung vereinigt.

3.1.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Der Verlauf der Isolierung wurde mittels DC überprüft. Je nach Anforderung durch die Probe kamen dabei folgende Normalphasen-Systeme (NP) und Umkehrphasen-Systeme (RP) zum Einsatz (Tab. 6 und Tab. 7, S. 12).

Tabelle 6: Bedingungen für die Normalphasen-DC

Stationäre Phasen	(1) Kieselgel 60 F ₂₅₄ auf Alufolie (Merck)
	(2) HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F ₂₅₄ (Merck)
Mobile Phasen	CHCl ₃ -EtOAc-MeOH (100 + 10 + 2)
	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (90 + 3,5 + 0,2)
	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (95 + 1,5 + 0,1)
	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (100 + 10 + 2)
Konzentration der Probenlösungen	(1) 7 – 8 mg/ml
	(2) 1,5 mg/ml
Auftragemenge	5 µl strichförmig

Tabelle 7: Bedingungen für die Umkehrphasen-DC

Stationäre Phase	HPTLC-Fertigplatten RP-8 F _{254S} (Merck)
Mobile Phasen	MeOH-H ₂ O (80 + 20)
	MeOH-H ₂ O (85 + 20)
Konzentration der Probenlösungen	1,5 mg/ml
Auftragemenge	5 µl strichförmig

Die eluierten Substanzen wurden anhand ihrer Eigenfluoreszenz bei UV 366 nm bzw. nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens bei Tageslicht detektiert [26]. Das Screening auf AChEI-Aktivität wurde auf der DC-Platte mittels Bioautographie durchgeführt [27].

3.1.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Um die ausreichende Reinheit der isolierten Verbindungen für die Struktur- aufklärung sicherzustellen, wurden die betreffenden Fraktionen mittels HPLC analysiert. In den Tabellen 8 bis 11 (S. 12 und S. 13) sind Kenndaten zum HPLC- Gerät, den Analysebedingungen und den Gradientenprofilen für die HPLC-Analyse gelistet.

Tabelle 8: HPLC-Gerät

Entgaser	Shimadzu DGU-20A ₅ prominence degasser
Pumpe	Shimadzu LC-20AD prominence liquid chromatograph
Autosampler	Shimadzu SIL-20AC prominence auto sampler
Controller	Shimadzu CBM-20A prominence communication bus module
Detektoren	Shimadzu SPD-M20A prominence diode array detector
	Shimadzu ELSD-LT low temperature evaporative light scattering detector
Ofen	Shimadzu CTO-20AC prominence column oven

Tabelle 9: Bedingungen für die HPLC-Analyse

Trennsäule	Hypersil BDS-C18, 5 µm, 4,0 x 250 mm (Agilent)
Fließmittel	A = Aqua dest., B = Acetonitril
Gradient	Siehe Tab. 10 und Tab. 11
Equilibrierung	10 min
Durchflussrate	0,75 ml/min
Temperatur	60°C
Injektionsvolumen	10 µl
Detektion	UV 322 nm

Tabelle 10: Gradientenprofil 1 der HPLC-Analyse

Minute	% B
0 – 10	35
10 – 50	35 – 75
50 – 55	75

Tabelle 11: Gradientenprofil 2 der HPLC-Analyse

Minute	% B
0 – 5	30
5 – 40	30 – 80
45 – 50	80

3.2 Strukturaufklärung

3.2.1 Massenspektrometrie (MS)

Um die molekularen Massen der einzelnen Verbindungen zu bestimmen, wurde eine LC-MS Analyse auf einem Ultimate 3000 RSLC-Series System (Dionex, Germering, Deutschland), das an ein 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT; Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) gekoppelt ist, durchgeführt. Der Elutionsfluss wurde ca. 1:4 vor der ESI-Quelle gesplittet, welche mit folgenden Einstellungen betrieben wurde: Kapillarspannung -3,7 kV, Vernebelungsgas 26 psi (N₂), Trockengasfluss 9 l/min (N₂), und Trockengas-temperatur 340°C. Mehrstufenmassenspektren bis zu MS⁴ wurden im Positionen-Modus in einem automatischen data-dependent acquisition (DDA) Modus mit

Methoden

Helium als Kollisionsgas, einem Isolationsfenster von 4 Th und einer Fragmentierungsamplitude von 1,0 V gemessen.

3.2.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden mit einem Avance III 600 MHz NMR Spektrometer (Bruker BioSpin) in deuteriertem Methanol (MeOD) aufgenommen. Die Resonanzfrequenzen betragen für die ^1H NMR 600 MHz und für die ^{13}C NMR 150 MHz.

3.3 Aktivitätsbestimmung

3.3.1 Bioautographie

Die AChE-Bioautographie nach Marston et al. erlaubt den Nachweis AChE-inhibitorischer Aktivität direkt auf der DC-Platte. Die Acetylcholinesterase deacetyliert 1-Naphthylacetat zu 1-Naphthol, welches mit Echtblausalz zu einem violetten Azofarbstoff reagiert (Reaktionsmechanismus siehe Abb. 6). AChE-hemmende Substanzen lassen sich als farblose Banden auf violettem Hintergrund detektieren [27]. Das Verfahren kam sowohl bei der Auswahl der aufzuarbeitenden Fraktionen als auch zur abschließenden Kontrolle der isolierten Substanzen zum Einsatz. Als Positivkontrolle diente Chelidonin.

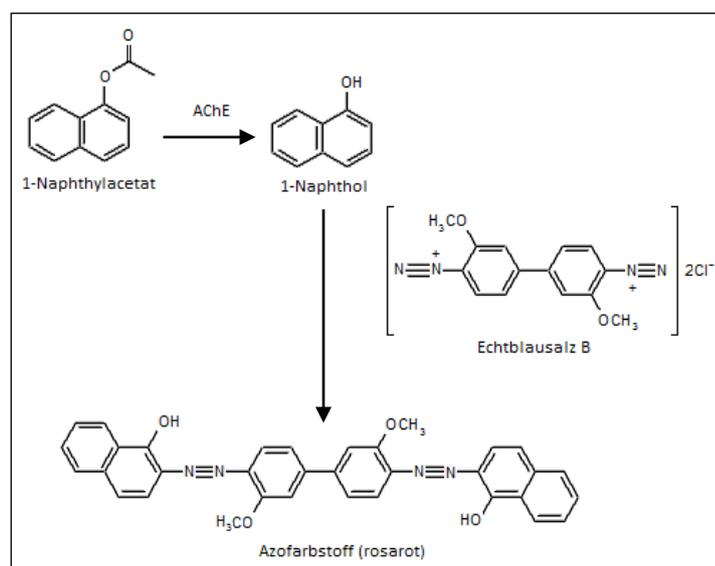


Abbildung 6: Reaktionsmechanismus der Bioautographie

Durchführung:

5 µl jeder Probenlösung wurden bandförmig aufgetragen und die DC-Platte unter den angegebenen Bedingungen (Tab. 12) entwickelt. Nachdem das Fließmittel vollständig abgedampft war, wurde die Platte fünf- bis sechsmal gleichmäßig mit der AChE-Lösung (siehe Tab. 13) besprüht. Die einzelnen Sprühdurchgänge erfolgten jeweils im Abstand von drei bis fünf Minuten, während derer die Platte bei 37°C und hoher Luftfeuchtigkeit in einem Trockenschrank inkubiert wurde. Auf diese Weise wurde das Kieselgel mit der Enzymlösung gut durchtränkt. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der AChE-Inhibition: Dazu wurden 5 ml 1-Naphthylacetatlösung und 20 ml Echtblausalzlösung (siehe Tab. 13) ad hoc gemischt und die gesamte DC-Platte ein- bis zweimal damit besprüht. Nach zwei Minuten war eine blass violette Färbung zu erkennen, die sich nach 20 Minuten im Inkubator deutlich intensivierte. Das Ergebnis wurde bei Tageslicht ausgewertet.

Tabelle 12: Material für die Bioautographie

Stationäre Phase	Kieselgel 60 F ₂₅₄ auf Alufolie (Merck)
Mobile Phase	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (95 + 1,5 + 0,1)
Proben- und Referenzlösungen	6 mg/ml für Reinsubstanzen 8 mg/ml für komplexere Fraktionen

Tabelle 13: Sprühlösungen für die Bioautographie

Reagens	Konzentration	Lösungsmittel
Acetylcholinesterase	6,6 U/ml	0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,8 mit 1 mg/ml BSA
1-Naphthylacetat	2,5 mg/ml	Ethanol
Echtblausalz	2,5 mg/ml	Aqua destillata

Methoden

3.3.2 Microplate-Assay

Die Aktivität der Verbindungen sollte anhand eines quantitativen colorimetrischen Assays basierend auf der Methode nach Ellman (modifiziert nach [3]) ermittelt werden. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 8 (S. 18) dargestellt.

Versuchsaufbau:

Der Versuch wurde in einer 96-Wellplatte durchgeführt (siehe Abb. 7). Pro Verbindung wurden jeweils 3 Parallelproben vermessen. Als Positivkontrolle diente Physostigmin ($c_{\text{Kontrolllösung}} = 1 \text{ mg/ml}$), als Negativkontrolle eine zehnpromzentige Lösung von DMSO in Puffer A. Positiv- und Negativkontrolle wurden in derselben Weise behandelt wie die zu vermessenden Verbindungen.

A/1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	VF1 1	Umb 1	VF4 1	VF6 1	VF7 1	VF8 1	Pos 1	Neg 1			
C	VF1 2	Umb 2	VF4 2	VF6 2	VF7 2	VF8 2	Pos 2	Neg 2			
D	VF1 3	Umb 3	VF4 3	VF6 3	VF7 3	VF8 3	Pos 3	Neg 3			
E											
F											
G											
H											

Abbildung 7: Microplate-Assay Versuchsaufbau (96-Wellplatte).

VF1 bis VF8: Isolierte Verbindungen, Umb: Umbelliferon,
Pos: Positivkontrolle (Physostigmin), Neg: Negativkontrolle (10 % DMSO in Puffer A)

Durchführung:

Die Substanzen wurden im DMSO-Anteil gelöst und mit Puffer A bis zur angegebenen Konzentration (siehe Tab. 14) verdünnt. Pro Well wurden 25 µl ATCI-Lösung, 125 µl DTNB-Lösung, 50 µl Puffer A und 25 µl der Proben- bzw. Kontrolllösung gemischt und die Absorption bei 405 nm fünfmal im Abstand von jeweils 15 Sekunden mit einem Genios® Microplaterereader (Tecan) gemessen. Die fünf erhaltenen Werte wurden für jedes Well gemittelt. Hierauf wurden jedem Well 25 µl AChE-Lösung zugegeben und die Platte im Microplaterereader für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach sorgfältigem Schütteln wurde die Absorption bei 405 nm erneut achtmal im Abstand von jeweils 15 Sekunden gemessen. Die acht erhaltenen Werte wurden für jedes Well gemittelt. Zuletzt wurden jeweils die Werte der drei Parallelproben gemittelt, sodass für jede Verbindung ein Wert *vor* und ein Wert *nach* Enzymzugabe erhalten wurde.

Tabelle 14: Reagenzien für den Microplate-Assay

Reagens	Lösungsmittel	Konzentration der Probenlösung	Konzentration im Well
Acetylthiocholiniodid (ATCI)	Aqua dest.	15 mM	1,5 mM
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Puffer B	3 mM	1,5 mM
Acetylcholinesterase (AChE)	Puffer A	0,22 U/ml	0,022 U/ml
Isolierte Verbindungen	Puffer A mit 10 % DMSO	1 mg/ml	100 µg/ml 1 % DMSO

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, 0,1 % BSA, pH = 7,9. Puffer B: 50 mM Tris-HCl, 0,1 % BSA, 0,1 M NaCl, 0,02 M MgCl₂·6H₂O, pH = 7,9. Die pH-Werteinstellung der Puffer erfolgte mittels pH-Elektrode unter Zugabe von 0,1 M HCl bzw. 0,1 M NaOH. Anstelle von Substanz VF2, die als Umbelliferon identifiziert werden konnte, wurde die Reinsubstanz (c = 1 mg/ml) vermessen.

Methoden

Berechnung der Hemmwirkung: $\text{Inhibition \%} = \left(1 - \frac{\Delta S}{\Delta \text{Neg}}\right) \times 100$

ΔS : Gemittelter Absorptionswert eines Wells *nach* Inkubation mit dem Enzym minus Absorptionswert des Wells *vor* Inkubation.

ΔNeg : Gemittelter Absorptionswert der Negativkontrolle *nach* Inkubation mit dem Enzym minus gemittelter Absorptionswert der Negativkontrolle *vor* Inkubation.

Modifikation zur vollständigen Lösung der Substanzen:

Anstelle von DMSO 10 % wurden die Probenlösungen in einem zweiten Versuch mit Methanol bereitet. Die Endkonzentration im Well beträgt 10 % Methanol.

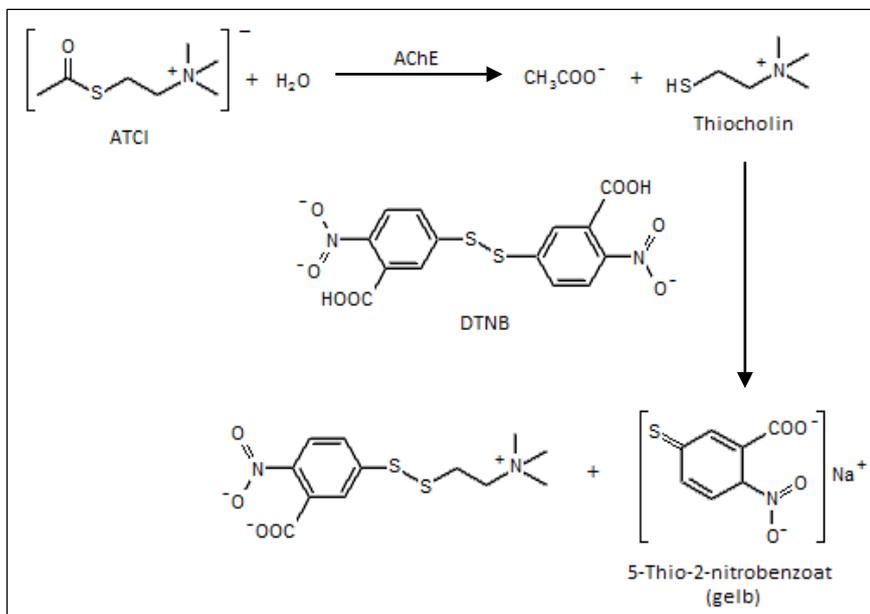


Abbildung 8: Reaktionsmechanismus des Microplate-Assays

4 Ergebnisse

In einer vorangegangenen phytochemischen Untersuchung waren bereits zwei Verbindungen mit AChE-inhibierender Wirkung aus dem DCM-Extrakt von Galbanum isoliert worden [3]: Aurapten (hRf-Wert = ca. 56) und Farnesiferol A (hRf-Wert = ca. 18, siehe Abb. 9). Nachdem die Aktivität der Fraktionen A5, A6, A7 und A8 aus diesem Extrakt mittels Bioautographie überprüft worden war (siehe S. 9), wurden die Fraktionen A6 und A8 des DCM-Extraktes für die weitere Isolierung ausgewählt.

In Abbildung 9 ist ein Dünnschichtchromatogramm der Fraktionen A6 und A8 zu sehen. Der linke Teil des Bildes zeigt die Detektion der enthaltenen Komponenten anhand ihrer Eigenfluoreszenz unter UV 366 nm, der rechte Teil des Bildes die Sichtbarmachung aktiver Verbindungen mittels Bioautographie (siehe S. 14 f). Jene Zonen, für die sich durch die Bioautographie AChEI-Aktivität nachweisen ließ, wiesen starke Fluoreszenz bei UV 366 nm auf und deuteten auf das Vorliegen von Coumarinderivaten hin. In der Folge wurde zur Überprüfung der einzelnen Isolierungsschritte die UV-Fluoreszenz der Komponenten in den Fraktionen herangezogen.

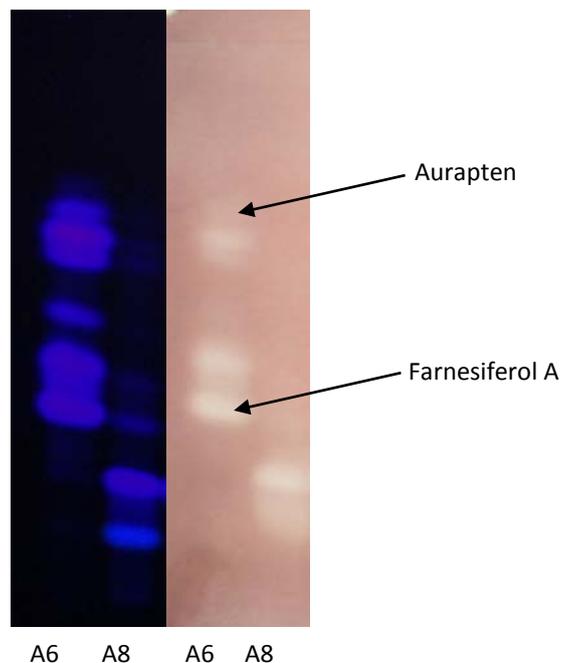


Abbildung 9: DC der Fraktionen A6 und A8
Links: UV 366 nm, rechts: Bioautographie
 Mobile Phase: CHCl₃-MeOH-H₂O (95 + 1,5 + 0,1)
 Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

4.1 Aufarbeitung der Fraktion A8 - Isolierung der Substanzen VF1 und VF2

Die dünnschichtchromatographische Analyse der Fraktion A8 zeigte unter UV 366 nm zwei Hauptkomponenten, die sich in ihrer Polarität deutlich unterschieden. Etwa 120 mg der Ausgangsfraktion wurden daher einer Festphasenextraktion auf RP-18-Material unterzogen (SPE1, Bedingungen siehe S. 11). Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung wurden zu insgesamt 15 Sammelfraktionen A bis O vereinigt (Tab. 15). Eine DC der Sammelfraktionen ist in Abbildung 10 (S. 21) zu sehen.

Tabelle 15: Sammelfraktionen der SPE1

Sammelfraktion	Fraktionen	Menge	Weitere Bearbeitung
A	40% MeOH 1-4 45% MeOH 1+2	23 mg	CC1
B	45% MeOH 3+4	2 mg	---
C	50% MeOH 1-4 55% MeOH 1	6 mg	---
D	55% MeOH 2+3	2 mg	---
E	55% MeOH 4	1 mg	---
F	60% MeOH 1	6 mg	---
G	60% MeOH 2-4	42 mg	Substanz VF1
H	65% MeOH 1-4	7 mg	---
I	70% MeOH 1	1 mg	---
J	70% MeOH 2	1 mg	---
K	70% MeOH 3+4 75% MeOH 1	8 mg	---
L	75% MeOH 2 80% MeOH 1	4 mg	---
M	80% MeOH 2	2 mg	---
N	100% MeOH 1	12 mg	---
O	100% MeOH 2	1 mg	---

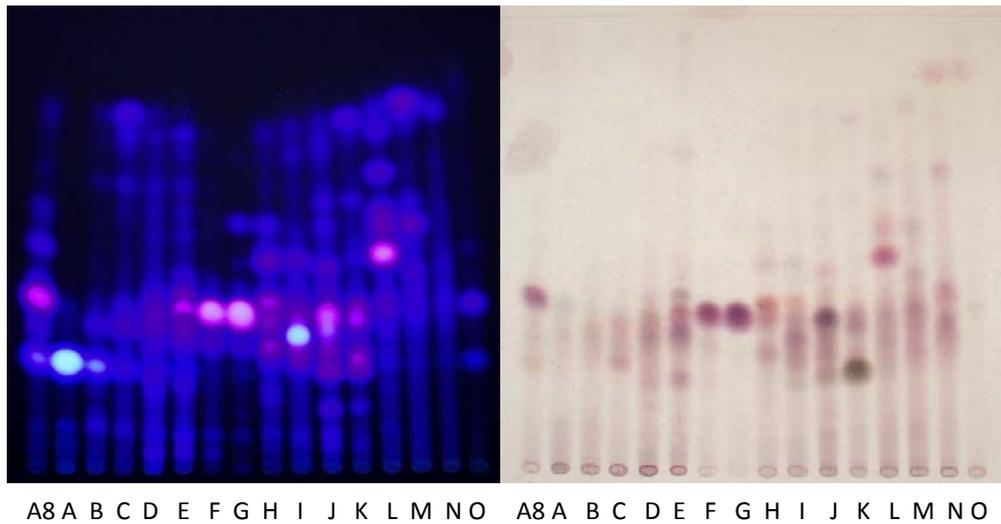


Abbildung 10: DC der Sammelfractionen A bis O der SPE1

Links: UV 366 nm, rechts: Derivatisierung mit AAS

Mobile Phase: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (90 + 3,5 + 0,2)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Die lipophilere Hauptkomponente wurde in Sammelfraktion G angereichert. Mittels HPLC (Abb. 11) konnte die Reinheit der Verbindung bestätigt werden (VF1; 23 mg).

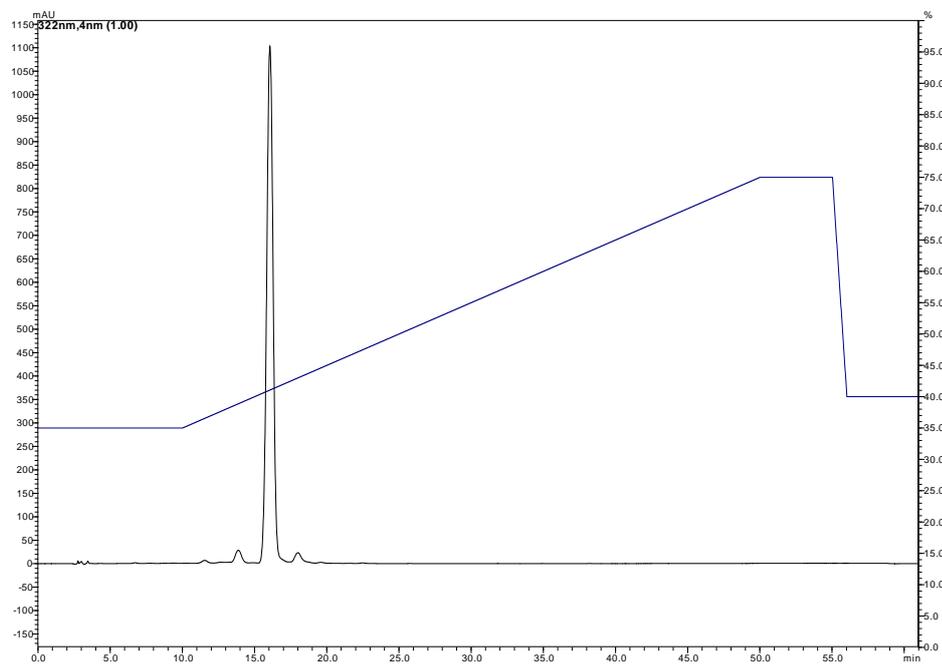


Abbildung 11: HPLC der Fraktion G der SPE1
(Gradient 1, Bedingungen siehe S.12 f)

Ergebnisse

Sammelfraktion A zeigte unter UV 366 nm eine intensiv hellblau fluoreszierende Bande und einige dunkelblau fluoreszierende Begleitsubstanzen (siehe Abb. 10, S. 21). Zur Reindarstellung der hellblau fluoreszierenden Verbindung wurde eine Säulenchromatographie an Sephadex® LH 20 durchgeführt (CC1, Bedingungen siehe S. 10). Die 24 Fraktionen wurden mittels Normalphasen-DC überprüft und Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung vereinigt (Tab. 16). Auf diese Weise konnte die polarere Hauptkomponente der Fraktion A8 gewonnen werden (VF2; 5 mg).

Tabelle 16: Sammelfractionen der CC1

Sammelfraktion	Fraktionen	Menge	Weitere Bearbeitung
A	1 – 4	11 mg	---
B	5 – 8	2 mg	---
C	9, 10	1 mg	---
D	11 – 14	5 mg	Substanz VF2
E	15 – 24	1 mg	---

4.2 Aufarbeitung der Fraktion A6 – Isolierung der Substanzen VF3 bis VF8

Fraktion A6 war komplexer zusammengesetzt als Fraktion A8 (siehe Abb. 9, S. 19). Daher wurden 10 g der Fraktion A6 einer Vortrennung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel unterworfen (CC2, Bedingungen siehe S. 10). Von den 315 resultierenden Fraktionen wurde jede zehnte im Normalphasensystem dünnschichtchromatographisch untersucht und ähnliche Fraktionen vereinigt, sodass 15 Sammelfraktionen A bis O erhalten wurden (Tab. 17). Abbildung 12 (S. 24) zeigt eine DC der Sammelfraktionen.

Tabelle 17: Sammelfraktionen der CC2

Sammelfraktion	Fraktionen	Menge	Weitere Bearbeitung
A	1 – 24	2 mg	---
B	25 – 34	3 mg	---
C	35 – 44	4 mg	---
D	45 – 54	31 mg	---
E	55 – 64	51 mg	Substanz VF3
F	65 – 77	236 mg	Vereinigung, SPE3
G	78 – 83	140 mg	
H	84 – 94	164 mg	---
I	95 – 107	1295 mg	CC3
J	108 – 114	1050 mg	SPE2
K	115 – 154	29 mg	---
L	155 – 164	5 mg	---
M	165 – 174	5 mg	---
N	175 – 315	31 mg	---
O	NL	13 mg	---

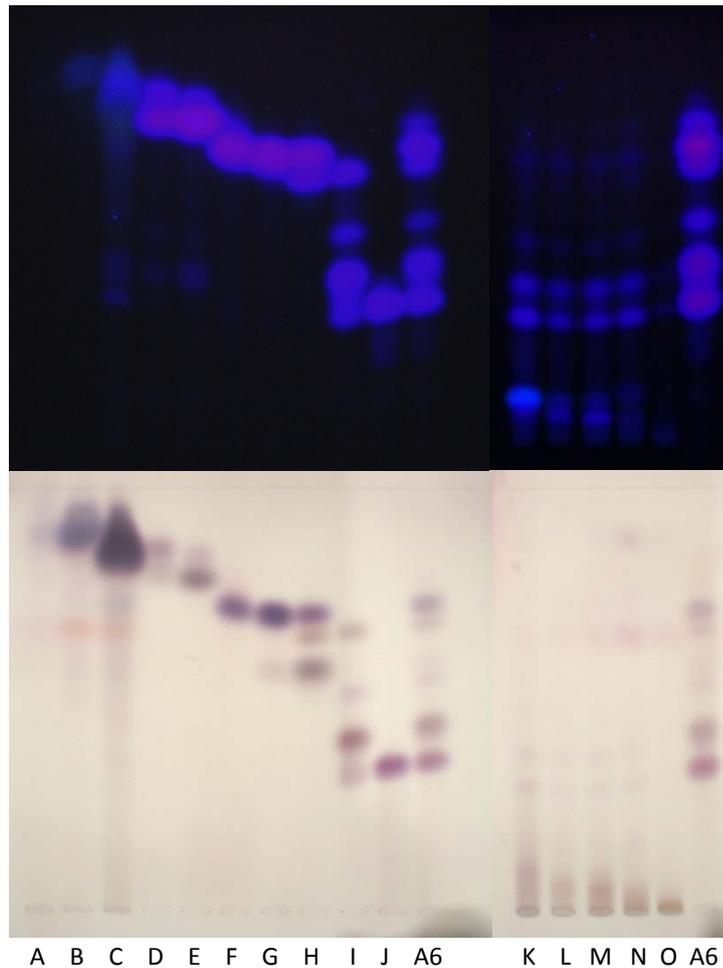


Abbildung 12: DC der Sammelfractionen A bis O der CC2

Oben: UV 366 nm, unten: Derivatisierung mit AAS

Mobile Phase: CHCl_3 -MeOH- H_2O (95 + 1,5 + 0,1)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Abbildung 12 ist zu entnehmen, dass in Fraktion E eine Substanz stark angereichert wurde (VF3; 51 mg). Die Lage der Bande im Dünnschichtchromatogramm bzw. die Retentionszeit in der HPLC legten nahe, dass es sich bei der angereicherten Substanz um Aurapten handelte. Mittels Rechromatographie konnte die Substanz als Aurapten identifiziert werden (Details siehe S. 42 f).

4.2.1 Auftrennung der Fraktion J aus CC2

Die Hauptkomponente der Fraktion J trennte sich im Umkehrphasen-DC-System in zwei Zonen auf (Abb. 13).

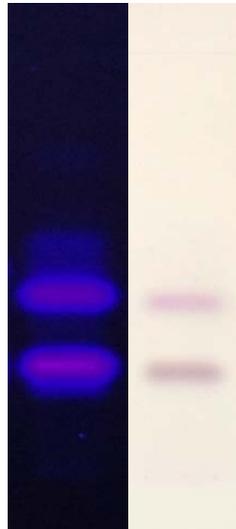


Abbildung 13: Fraktion J der CC2 auf der RP-DC
Links: UV 366 nm, rechts: Derivatisierung mit AAS
Mobile Phase: MeOH-H₂O (80 + 20)
Stationäre Phase: RP-8 F₂₅₄S

Die weitere Aufreinigung erfolgte daher mittels Festphasenextraktion an RP-18-Material (SPE2). 310 mg der Fraktion J wurden auf die Kartusche aufgetragen und nach der Elution jede fünfte Fraktion dünnschichtchromatographisch auf RP-8-Material überprüft. Fraktionen mit übereinstimmenden Komponenten wurden vereinigt (Tab. 18, S. 26) und die beiden Substanzen aus Fraktion J getrennt (VF4; 82 mg und VF5; 117 mg). Abbildung 14 (S. 27) zeigt eine DC der Sammelfraktionen im Vergleich mit der Ausgangsfraktion.

Ergebnisse

Tabelle 18: Sammelfractionen der SPE2

Sammelfraktion	Fraktionen	Menge	Weitere Bearbeitung
A	40% MeOH 1-4 45% MeOH 1-4 55% MeOH 1-4	1 mg	---
B	60% MeOH 1+2	3 mg	---
C	60% MeOH 3+4	5 mg	---
D	65% MeOH 1-4	82 mg	Substanz VF4
E	70% MeOH 1+2	18 mg	---
F	70% MeOH 3+4	35 mg	---
G	75% MeOH 1-4	117 mg	Substanz VF5
H	80% MeOH 1+2	4 mg	---
I	80% MeOH 3+4	2 mg	---
J	85% MeOH 1-4 90% MeOH 1-4	10 mg	---
K	95% MeOH 1-4 100% MeOH 1-3	7 mg	---

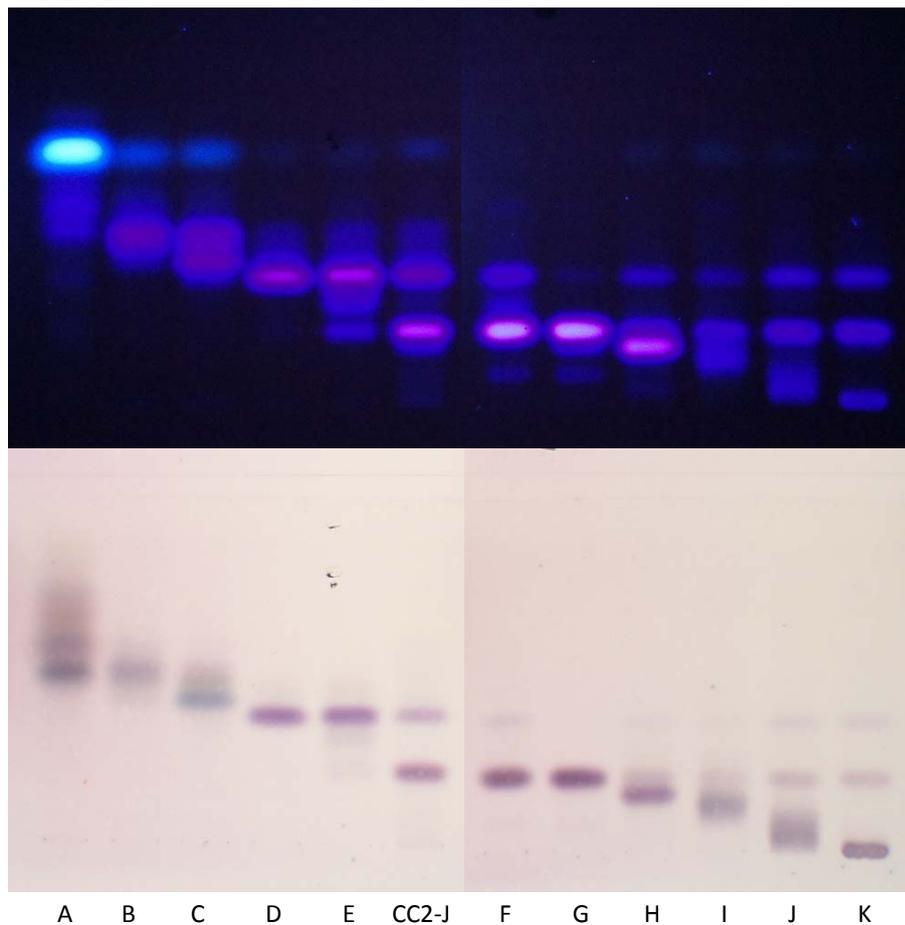


Abbildung 14: DC der Sammelfractionen A bis K der SPE2

Oben: UV 366 nm, unten: Derivatisierung mit AAS

CC2-J = Ausgangsfraction

Mobile Phase: MeOH-H₂O (80 + 20)

Stationäre Phase: RP-8 F₂₅₄S

Ergebnisse

4.2.2 Auftrennung der Fraktionen F und G aus CC2

Die HPLC-Analyse der Fraktionen F und G ergab eine sehr ähnliche Zusammensetzung, sodass die beiden Fraktionen vereinigt wurden (Fraktion FG). Auch hier zeigten sich im Umkehrphasensystem zwei Banden (Abb. 15).

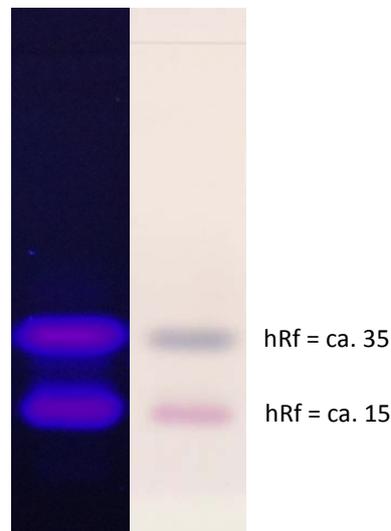


Abbildung 15: Fraktion FG der CC2 auf der RP-DC
Links: UV 366 nm, rechts: Derivatisierung mit AAS
Mobile Phase: MeOH-H₂O (80 + 20)
Stationäre Phase: RP-8 F_{254S}

Die lipophilere Bande (hRf-Wert = ca. 15) wurde mittels HPLC als Gemisch dreier sehr ähnlicher Substanzen identifiziert (siehe Abb. 16, S. 29, rot umrandet; Analysebedingungen siehe S. 12 f).

Die weitere Aufreinigung fokussierte folglich auf die Gewinnung der polareren Bande (hRf-Wert = ca. 35). Eine RP-18 SPE-Kartusche wurde mit 370 mg der Fraktion FG beladen und mit unterschiedlichen Konzentrationen Methanol eluiert (SPE3, Bedingungen siehe S. 11). Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels DC analysiert und ähnliche Fraktionen vereinigt (Tab. 19, S. 29). Es konnten 121 mg dieser Komponente isoliert werden (VF6). Abbildung 17 (S. 30) zeigt eine DC der Sammel-fraktionen im Vergleich mit der Ausgangsfraktion.

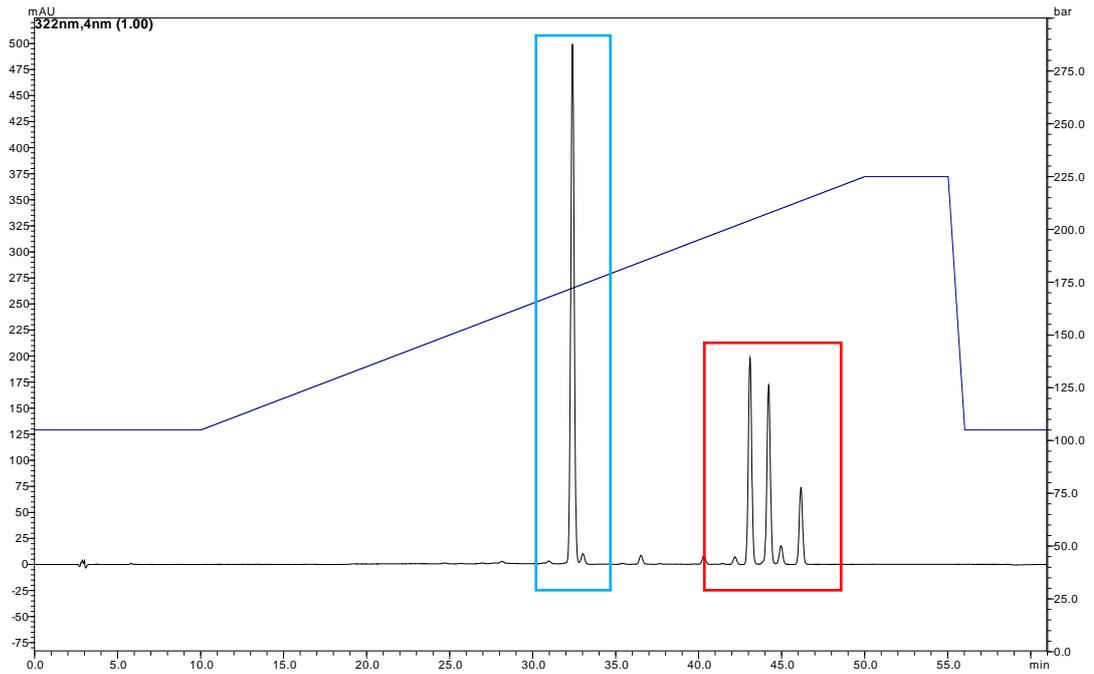


Abbildung 16: HPLC der Fraktion FG der CC2
Gradient 1 (Bedingungen siehe S.12 f)

Tabelle 19: Sammelfractionen der SPE3

Sammelfraktion	Fraktionen	Menge	Weitere Bearbeitung
A	40% MeOH 1-3 45% MeOH 1-3 50% MeOH 1-3 55% MeOH 1-3	3 mg	---
B	60% MeOH 1-3	1 mg	---
C	65% MeOH 1-3	6,5 mg	---
D	70% MeOH 1-3	121 mg	Substanz VF6
E	75% MeOH 1-3	26 mg	---
F	80% MeOH 1+2	35 mg	---
G	80% MeOH 3 85% MeOH 1	51 mg	---
H	85% MeOH 2	13 mg	---
I	85% MeOH 3	7 mg	---
J	90% MeOH 1-3 95% MeOH 1-3 100% MeOH 1-3	15 mg	---

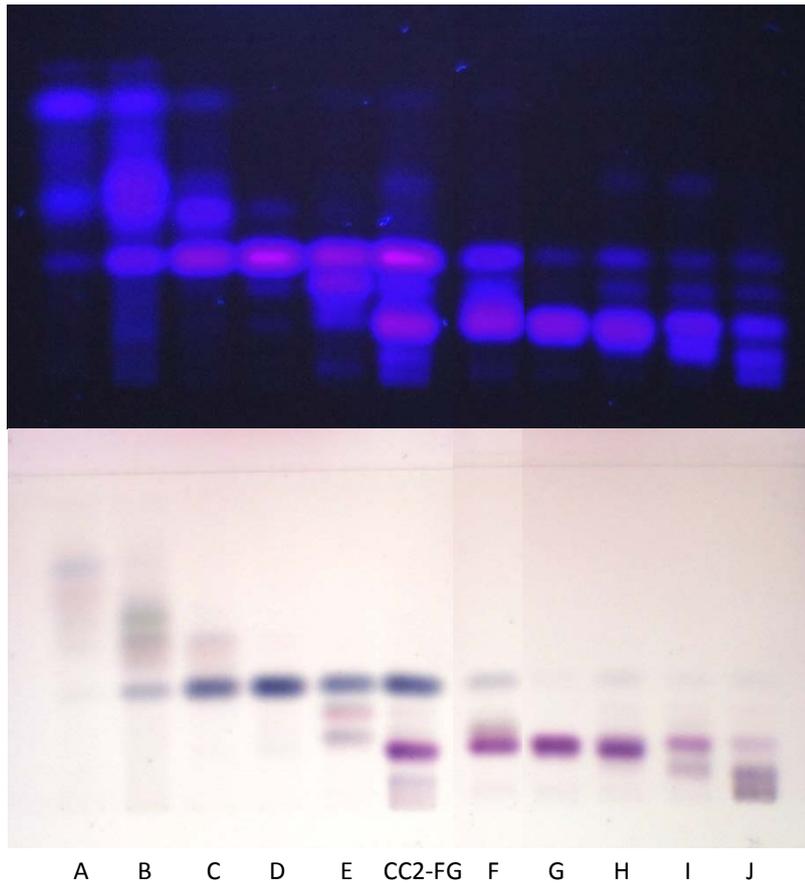


Abbildung 17: DC der Sammelfractionen A bis J der SPE3
Oben: UV 366 nm, unten: Derivatisierung mit AAS
CC2-FG = Ausgangsfraction
Mobile Phase: MeOH-H₂O (80 + 20)
Stationäre Phase: RP-8 F_{254S}

4.2.3 Auftrennung der Fraktion I aus CC2

Fraktion I der CC2 zeigte eine relativ komplexe Zusammensetzung (Abb. 12, S. 24). 1270 mg wurden mittels Säulenchromatographie auf Kieselgel in 96 Fraktionen getrennt (CC3), die nach dünnschichtchromatographischer Analyse entsprechend ihres Inhaltsstoffmusters zu 15 Sammelfractionen A bis M vereinigt wurden (Tab. 20, S. 31). Abbildung 18 (S. 31) zeigt eine DC der Sammelfractionen im Vergleich mit der Ausgangsfraction.

Tabelle 20: Sammelfractionen der CC3

Sammelfraktion	Fraktionen	Menge	Weitere Bearbeitung
A	1 – 29	2 mg	---
B	30 – 41	2 mg	---
C	42 – 44	3 mg	---
D	45	36 mg	Vereinigung
E	46	52 mg	
F	47	59 mg	---
G	48	99 mg	---
H	49	138 mg	---
I	50	125 mg	Vereinigung, SPE4
J	51	140 mg	
K	52 – 54	340 mg	---
L	55, 56	16 mg	---
M	57 – 95	2 mg	---

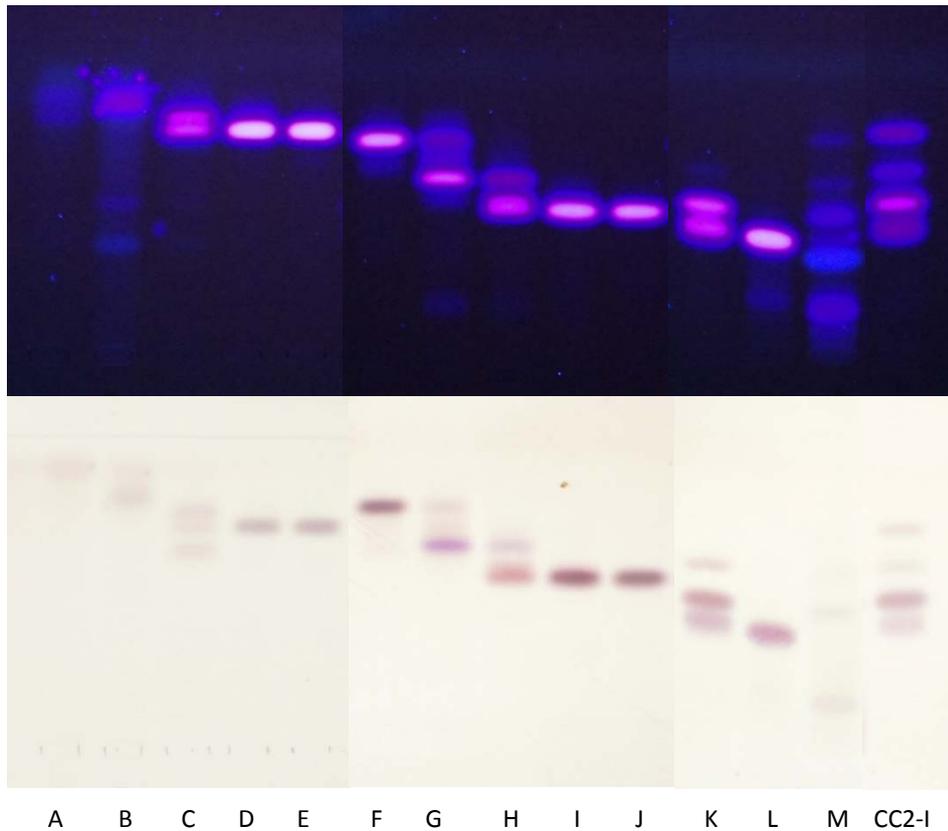


Abbildung 18: DC der Sammelfractionen A bis M der CC3

Oben: UV 366 nm, unten: Derivatisierung mit AAS

CC2-I = Ausgangsfraction

Mobile Phase: CHCl_3 -MeOH- H_2O (100 + 10 + 2)Stationäre Phase: Kieselgel F₂₅₄

Ergebnisse

Die Sammelfractionen D und E der CC3 lieferten sowohl auf der DC als auch in der HPLC-Analyse sehr ähnliche Muster und wurden nochmals vereinigt (Fraktion DE).

Aus der HPLC-Analyse wurde ersichtlich, dass es sich bei Fraktion DE um ein Gemisch aus mehreren Substanzen mit ähnlicher Polarität handelte (siehe Abb. 19), sodass keine weiteren Trennschritte unternommen wurden.

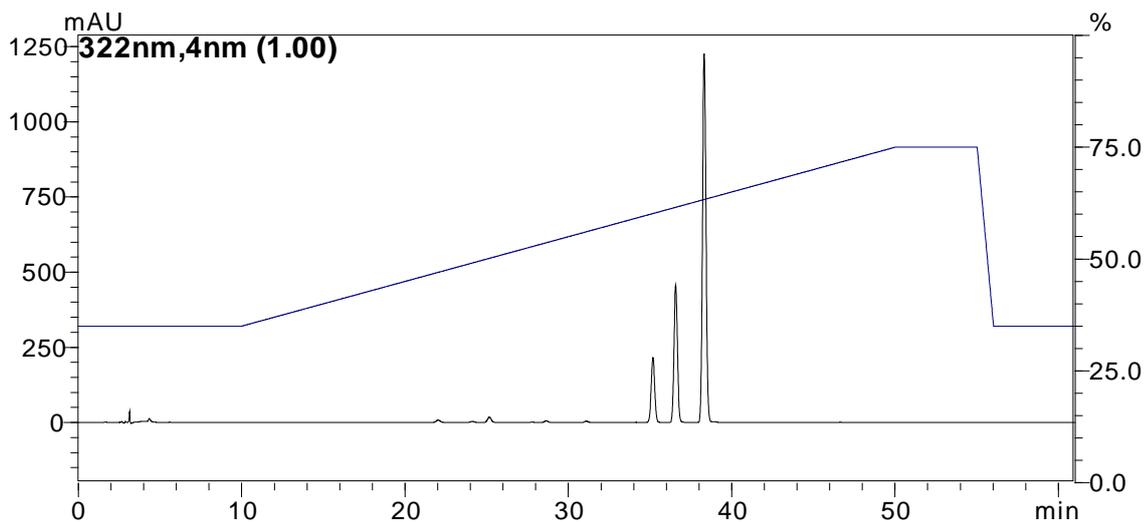


Abbildung 19: HPLC der Fraktion DE der CC3
Gradient 1 (Bedingungen siehe S.12 f)

Die Sammelfractionen I und J der CC3 lieferten sowohl auf der DC als auch in der HPLC-Analyse sehr ähnliche Muster und wurden nochmals vereinigt (Fraktion IJ). Im Umkehrphasensystem der HPLC wurden zwei Hauptpeaks detektiert (Abb. 20).

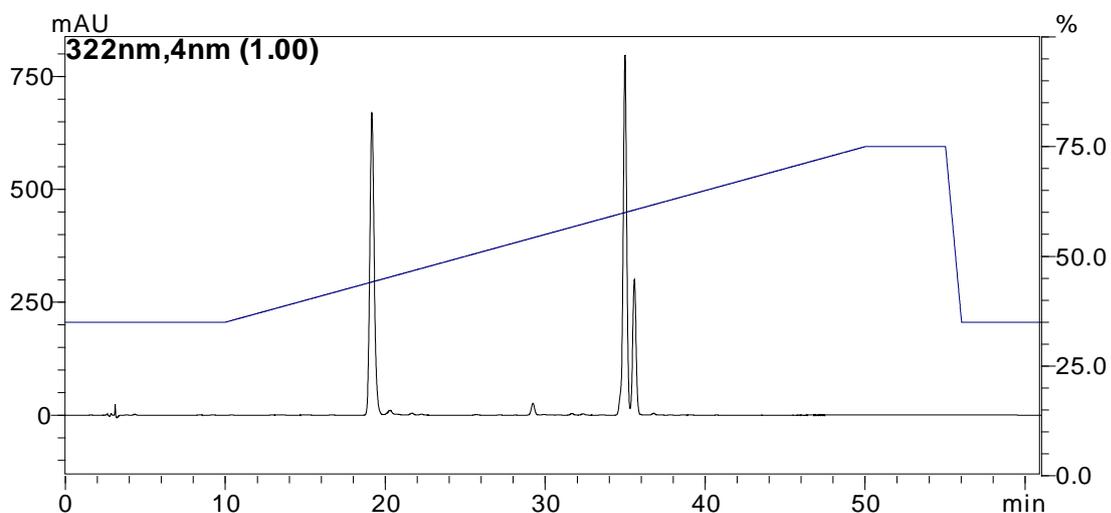
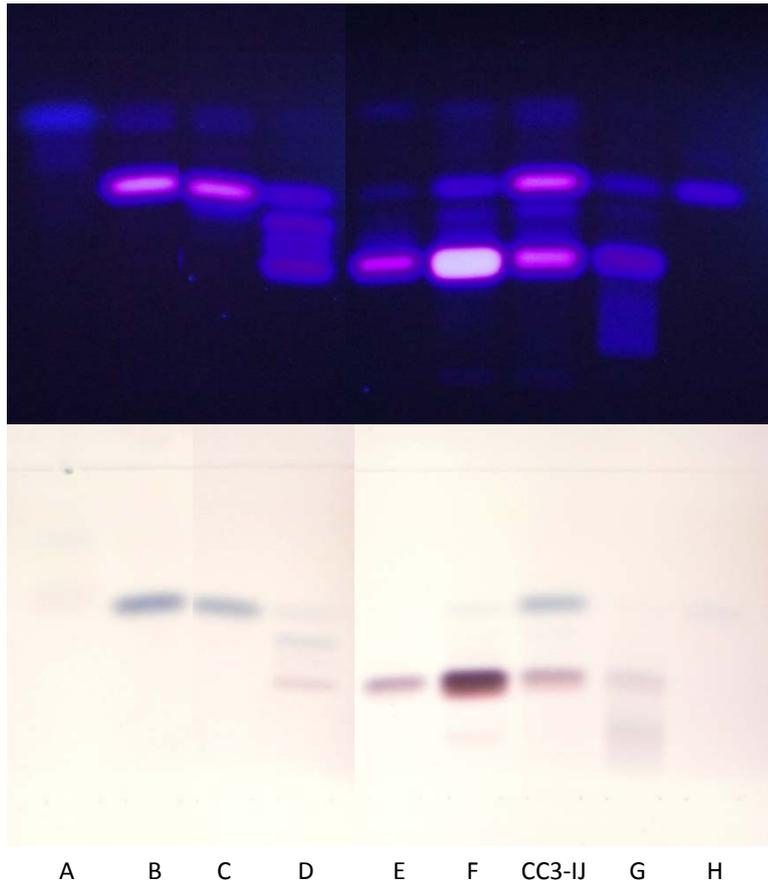


Abbildung 20: HPLC der Fraktion IJ der CC3
Gradient 1 (Bedingungen siehe S.12 f)

Um sie zu trennen wurden 120 mg der Fraktion IJ einer Festphasenextraktion an RP-18-Material unterworfen (SPE4, Bedingungen siehe S. 11) und Fraktionen mit vergleichbarer Zusammensetzung zu sieben Sammelfraktionen A bis G vereinigt (Tab. 21). Abbildung 21 (S. 34) zeigt eine DC der Sammelfraktionen im Vergleich mit der Ausgangsfraktion.

Tabelle 21: Sammelfraktionen der SPE4

Sammelfraktion	Fraktionen	Menge	Weitere Bearbeitung
A	40% MeOH 1-3 45% MeOH 1-3 50% MeOH 1+2	2 mg	---
B	50% MeOH 3 55% MeOH 1-3	28 mg	Substanz VF7
C	60% MeOH 1+2	6 mg	---
D	60% MeOH 3 65% MeOH 1+2	7 mg	---
E	65% MeOH 3	14 mg	Substanz VF8
F	70% MeOH 1-3 75% MeOH 1+2	45 mg	---
G	75% MeOH 3 80% MeOH 1-3 85% MeOH 1-3	7 mg	---



A B C D E F CC3-IJ G H
Abbildung 21: DC der Sammelfractionen A bis G der SPE4
Oben: UV 366 nm, unten: Derivatisierung mit AAS
CC3-IJ = Ausgangsfraction
Mobile Phase: MeOH-H₂O (85 + 15)
Stationäre Phase: RP-8 F_{254S}

Die beiden zu isolierenden Banden konnten in den Sammelfractionen B und E weitgehend rein dargestellt werden (VF7; 28 mg und VF8; 14 mg). Die Reinheit der Fractionen wurde mittels HPLC bestätigt (Abb. 22 und Abb. 23, S. 35).

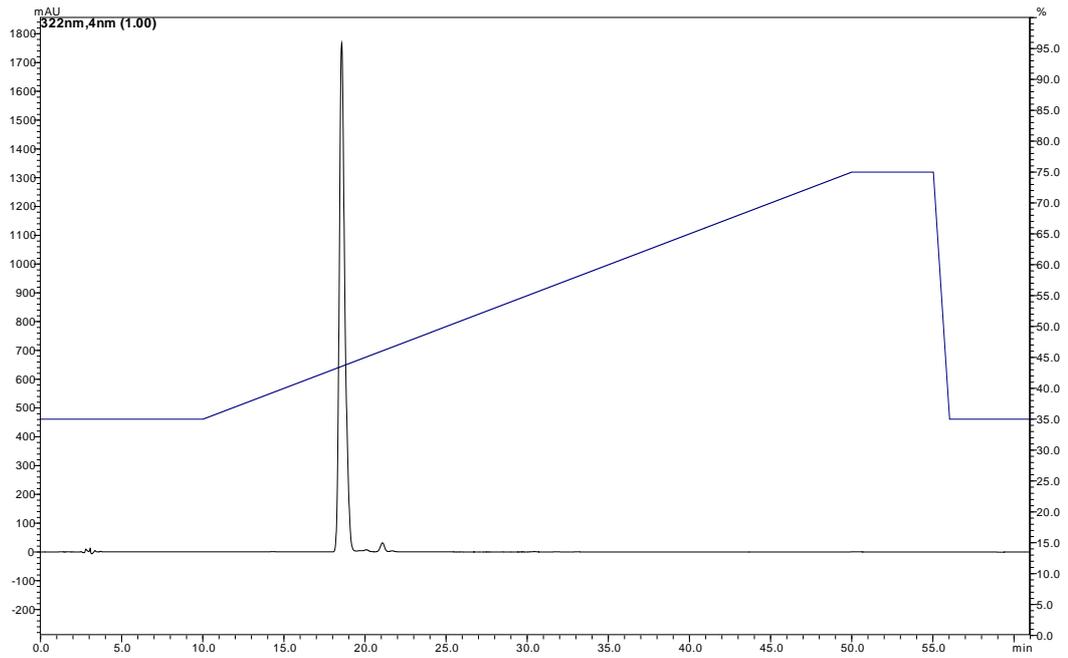


Abbildung 22: HPLC der Fraktion B der SPE4 (Substanz VF7)
(Gradient 1, Bedingungen siehe S.12 f)

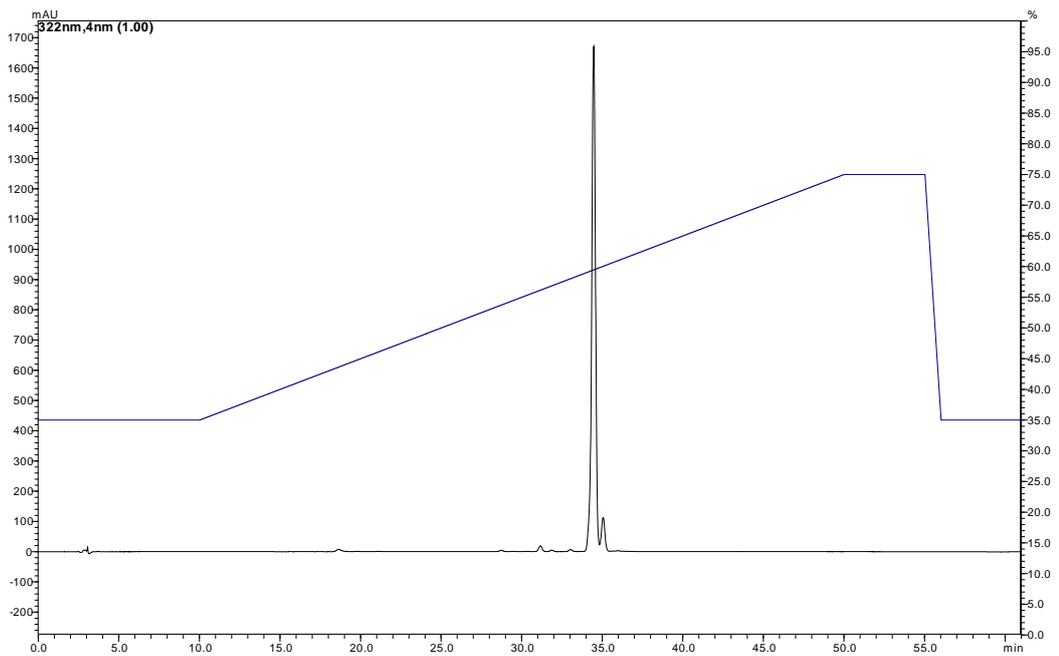


Abbildung 23: HPLC der Fraktion E der SPE4 (Substanz VF8)
(Gradient 1, Bedingungen siehe S.12 f)

Ergebnisse

Insgesamt konnten acht Substanzen in ausreichender Reinheit gewonnen werden.

Abbildung 24 zeigt die Auftrennungs- und Isolierungsschritte im Überblick.

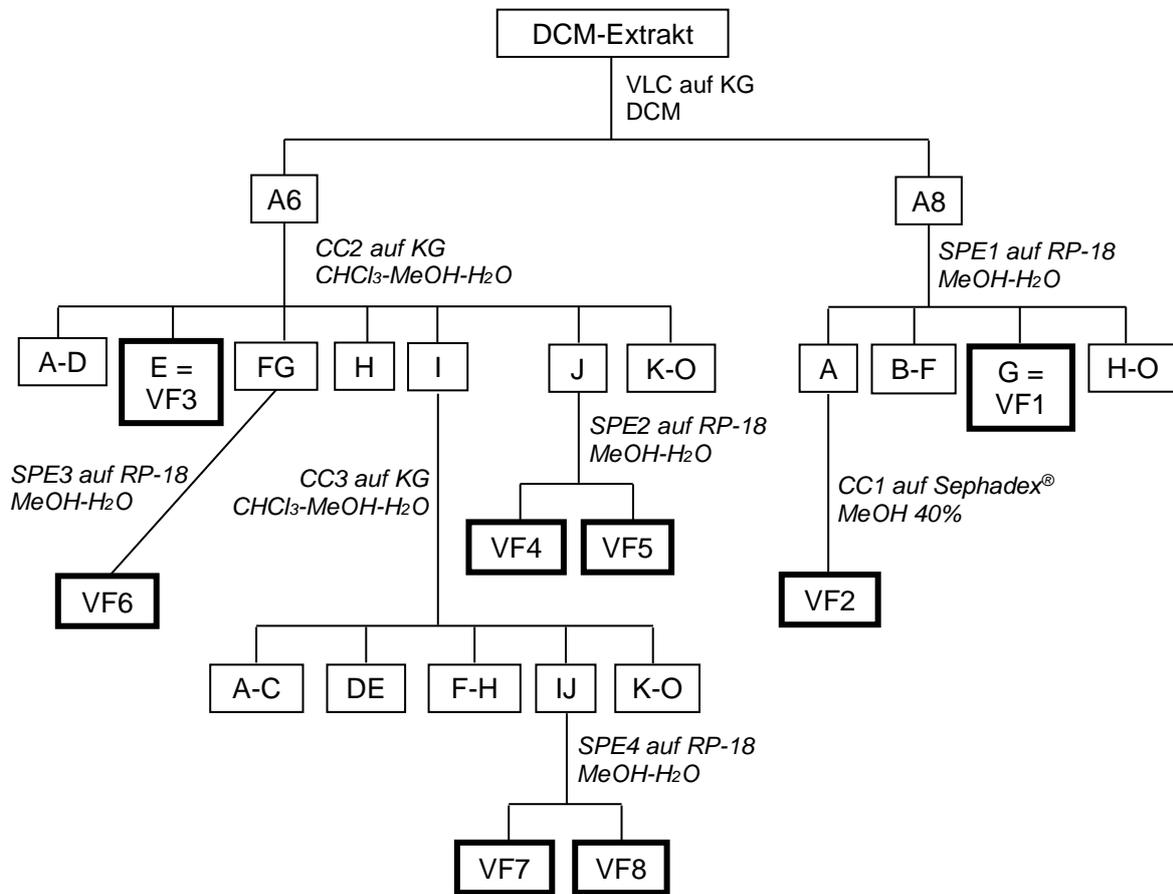


Abbildung 24: Trennschema
Isolierte Verbindungen sind dick umrandet.

In Abbildung 25 ist ein Dünnschichtchromatogramm der isolierten Verbindungen zusammen mit den Ausgangsfractionen A6 und A8, dem DCM-Extrakt und der Positivkontrolle Chelidonin (Chel.) zu sehen. Die Reinsubstanzen wurden nach ihrer Polarität geordnet aufgetragen. Die Konzentration der Auftragelösungen betrug 10 mg/ml für die komplexeren Fractionen (A6, A8 und DCM-Extrakt), 5 mg/ml für die isolierten Verbindungen (VF1 bis VF8) und 0,35 mg/ml für Chelidonin.

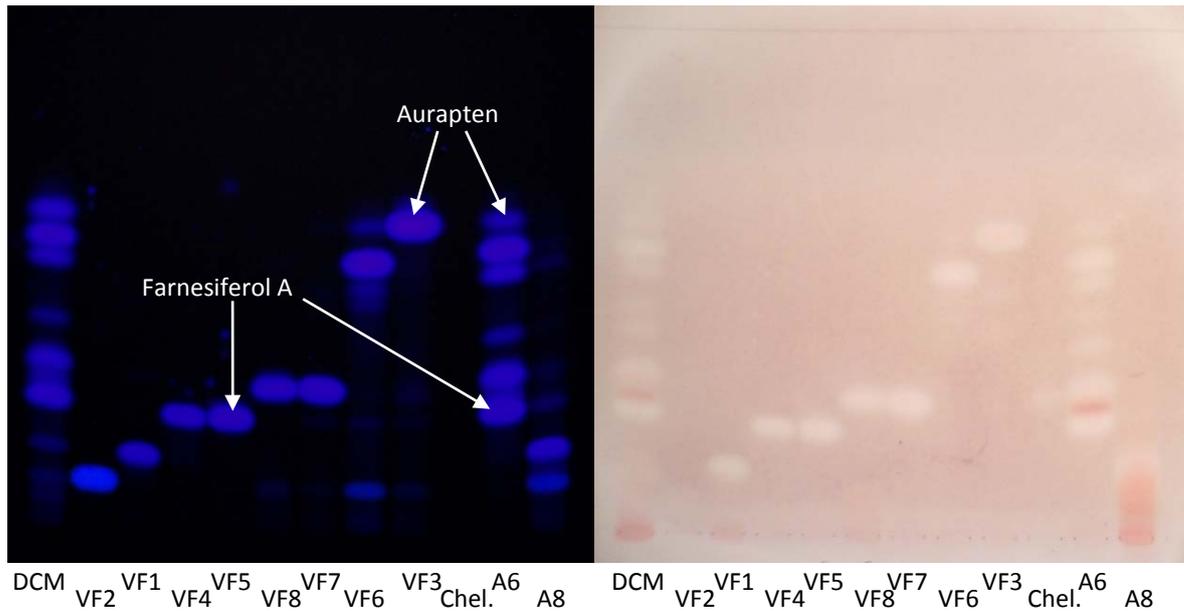


Abbildung 25: DC der isolierten Verbindungen VF1 bis VF8

Links: UV 366 nm, rechts: Bioautographie

Auraptin und Farnesiferol A sind markiert.

Mobile Phase: CHCl_3 -MeOH- H_2O (95 + 1,5 + 0,1)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

4.3 Strukturaufklärung

Alle isolierten Verbindungen wurden mittels HPLC unter massenspektrometrischer Detektion im Positivionen-Modus untersucht. Ausgewählte Verbindungen wurden zusätzlich mittels NMR vermessen.

4.3.1 Strukturaufklärung von Substanz VF1

Substanz VF1 konnte in einer Menge von 23 mg gewonnen werden. Auf der DC zeigte die Substanz eine intensiv dunkelblaue Fluoreszenz bei UV 366 nm. Mit AAS-Reagens bildete sich eine rosa-violette Färbung. Der hRF-Wert betrug 14,5 im System $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (95 + 1,5 + 0,1) auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (siehe Abb. 25, S. 37).

Das ESI-MS zeigte einen $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ -Peak bei m/z 383,2 und einen $[\text{M} + \text{K}]^+$ -Peak bei m/z 439,2. Das Fragmentierungsmuster beinhaltete das charakteristische Fragmentation von Hydroxycoumarin bei m/z 163,3 (+MS²-Spektrum). Der Verlust von 14 und 12 Dalton im +MS³-Spektrum zeigte die Fragmentierung einer Kohlenwasserstoff-Seitenkette. Ein Vergleich der ESI-MS-Daten mit aus *Ferula*-Arten bekannten Verbindungen ergab als wahrscheinliche Struktur ein O-substituiertes Sesquiterpencoumarin mit dem MG = 400 Da.

¹H NMR-Spektrum: Die Protonen an C-3, C-4, C-5, C-6 und C-8 treten als Teil des aromatischen Coumarin-Grundgerüsts bei charakteristischen Verschiebungen zwischen $\delta = 6,23$ ppm und $\delta = 7,87$ ppm als Doubletts auf. C-7 trägt kein Proton, was auf die Substitution mit einer Seitenkette an dieser Position schließen lässt. Die Verschiebung der Protonen an C-1' bis C-15' mit $\delta = 0,88$ ppm bis $\delta = 2,02$ ppm beweist das Vorliegen einer aliphatischen Seitenkette. Die Protonen an C-3' und C-11' sind vergleichsweise stärker entschirmt ($\delta = 3,35$ ppm und $\delta = 4,32$ ppm), woraus sich die Nachbarschaft zu einer Hydroxyl- bzw. Ethergruppe ableiten lässt.

¹³C NMR-Spektrum: Analog zu den Wasserstoffen weisen die Kohlenstoffatome des aromatischen Grundgerüsts eine deutlich größere chemische Verschiebung auf als jene der aliphatischen Seitenkette. C-2 ist als Lacton-C besonders stark entschirmt ($\delta = 163,4$ ppm). Ebenso C-4, welches in Konjugation zur Lactonfunktion vorliegt ($\delta = 145,8$ ppm), und C-8a ($\delta = 157,2$ ppm), das dem Lacton-Sauerstoff direkt benachbart ist. Aus der Tieffeldverschiebung von C-7 ($\delta = 163,9$ ppm) lässt sich die

Substitution mit einem Sauerstoffatom ableiten, über welches die Seitenkette etherartig an das Coumarin-Grundgerüst gebunden ist. Das Signal von C-3' ($\delta = 77,1$ ppm) ist im Vergleich zu den anderen Kohlenstoffen der Seitenkette deutlich tieffeldverschoben, genauso das Signal von C-8' ($\delta = 74,2$ ppm). Aus der Entschirmung dieser beiden Positionen lässt sich die Substitution mit je einer Hydroxylgruppe ablesen. C-11' ist mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 69,5$ ppm der Etherbrücke zum Grundgerüst direkt benachbart.

Durch Klärung der Stereochemie und Vergleich mit der Literatur konnte die Verbindung als Deacetylkellerin (Abb. 26) identifiziert werden [28]. Die Substanz ist bereits aus den Wurzeln von *Ferula sinaica* und *Ferula kokanica* bekannt [29, 30] und konnte zum ersten Mal in *Ferula gummosa* nachgewiesen werden.

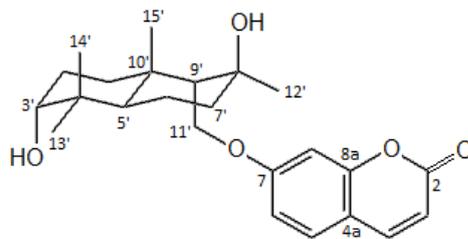


Abbildung 26: Struktur von Deacetylkellerin

Ergebnisse

Tabelle 22: ^1H NMR- und ^{13}C NMR-Daten von Substanz VF1 in MeOD

Position		NMR-Messwerte VF1 (MeOD)			Literaturdaten [28] (CDCl ₃)	
		^1H (ppm)	JH.H (Hz)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	
2	C	---	---	163,4	160,0	
3	CH	6,23	d 9,4	113,2	112,8	
4	CH	7,87	d 9,4	145,8	143,3	
4a	C	---	---	113,9	112,3	
5	CH	7,51	d 8,5	130,3	128,6	
6	CH	6,93	d 8,5; d 2,4	114,5	112,7	
7	C	---	---	163,9	161,8	
8	CH	6,95	d 2,4	102,4	101,3	
8a	C	---	---	157,2	155,6	
1' ax/eq	CH ₂	2,02/1,01	m	31,1	39,1	
2' ax/eq	CH ₂	2,09/1,53	m	26,3	25,0	
3'	CH	3,35	t 2,7	77,1	75,9	
4'	C	---	---	38,6	37,5 ^a	
5'	CH	1,72	m	43,4	42,1	
6' ax/eq	CH ₂	1,72/1,43	m	19,4	17,9	
7'	CH ₂	1,72	m	39,5	29,6	
8'	C	---	---	74,2	73,4	
9'	CH	1,59	d 3,5; d 3,1; d 1,6	59,6	58,0	
10'	C	---	---	39,1	37,6 ^a	
11'	CH ₂	4,32	d 10,6; d 3,5	69,5	67,8	
12'	CH ₃	4,06	d 10,6; d 3,1	31,5	31,3 ^b	
13'	CH ₃	1,27	s	29,2	28,4 ^b	
14'	CH ₃	0,97	s	22,7	25,0 ^b	
15'	CH ₃	0,88	s	24,8	21,8 ^b	

^{ab} Mit dem gleichen Hochbuchstaben versehene Werte sind gegeneinander austauschbar.

4.3.2 Strukturaufklärung von Substanz VF2

Substanz VF2 konnte in einer Menge von 5 mg gewonnen werden. Auf der DC zeigte sich eine Bande mit intensiv hellblauer Fluoreszenz bei UV 366 nm, die sich mit AAS-Reagens nicht anfärben ließ. Der R_F -Wert betrug ca. 10 im System CHCl_3 - $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (95 + 1,5 + 0,1) auf Kieselgel 60 F_{254} (siehe Abb. 25, S. 37).

Das ESI-MS zeigte einen $[\text{M} + \text{H}]^+$ -Peak bei m/z 163,0 und einen $[\text{M} + \text{Na}]^+$ -Peak bei m/z 184,9. Das MG beträgt 162 Da. Ein Vergleich der ESI-MS-Daten mit der Literatur ließ auf 7-Hydroxyauraptin (Umbelliferon) schließen, ein in vielen Apiaceen-Arten verbreitetes Monoterpen coumarin [31].

VF2 wurde auf der DC mit Umbelliferon verglichen. R_F -Wert, Fluoreszenzverhalten und mangelnde Anfärbbarkeit durch AAS stimmten mit den Eigenschaften der authentischen Substanz überein (Abb. 27) und die Verbindung wurde als Umbelliferon (Abb. 28) identifiziert.

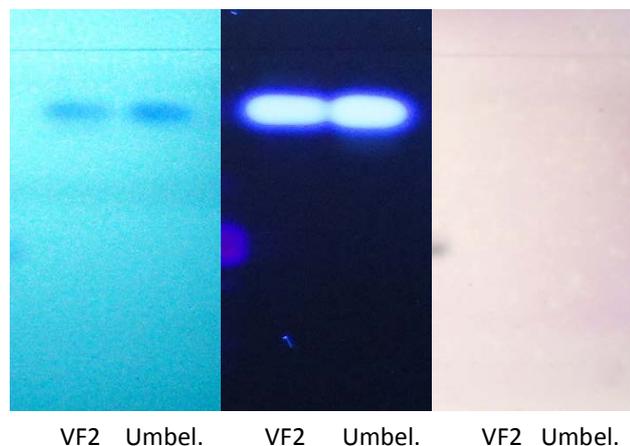


Abbildung 27: DC-Vergleich von Substanz VF2 und Umbelliferon
 Links: UV 254 nm, Mitte: UV 366 nm, rechts: Derivatisierung mit AAS
 Mobile Phase: $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (85 + 15)
 Stationäre Phase: RP-8 F_{254S}

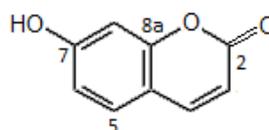


Abbildung 28: Struktur von Umbelliferon

Ergebnisse

4.3.3 Strukturaufklärung von Substanz VF3

Substanz VF3 konnte in einer Menge von 51 mg isoliert werden. Auf der DC zeigte die Substanz eine intensiv dunkelblaue Fluoreszenz bei UV 366 nm. Mit AAS-Reagens bildete sich eine braun-violette Färbung. Der hRF-Wert betrug 60 im System $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (95 + 1,5 + 0,1) auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (siehe Abb. 25, S. 37).

Das ESI-MS zeigte einen $[\text{M} + \text{H}]^+$ -Peak bei m/z 299,1 und einen $[\text{M} + \text{K}]^+$ -Peak bei m/z 337,1. Das Fragmentierungsmuster beinhaltet den charakteristischen Ionenpeak für Hydroxycoumarin bei $m/z = 163,3$ (+MS²-Spektrum). Die Ergebnisse wurden mit einer Datenbank verglichen.

Das MG von VF3 stimmte mit dem von Aurapten überein, einem Monoterpen-coumarin, das bereits bei einer vorherigen Aufarbeitung des Ausgangsmaterials [3] isoliert worden war. Die Identifizierung von VF3 erfolgte mittels Rechromatographie des DCM-Extraktes (siehe Abb. 30 und Abb. 31, S.43). Der Peak von VF3 wurde in Übereinstimmung mit den ESI-MS-Daten als Aurapten (Abb. 29) identifiziert.

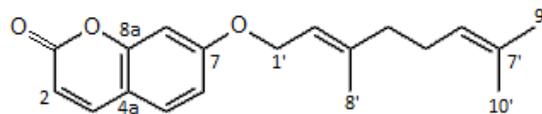


Abbildung 29: Struktur von Aurapten

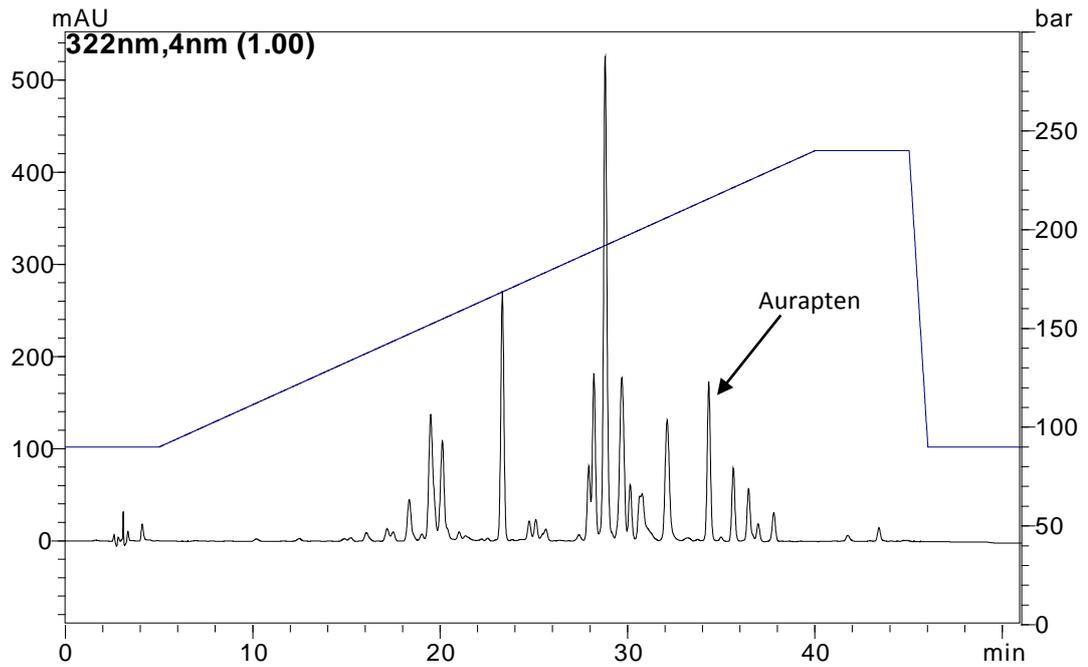


Abbildung 30: HPLC des DCM-Extraktes
 Gradient 2 (Bedingungen siehe S.12 f)
 Der Auraptenpeak (RT = ca. 34,5 min) ist markiert.

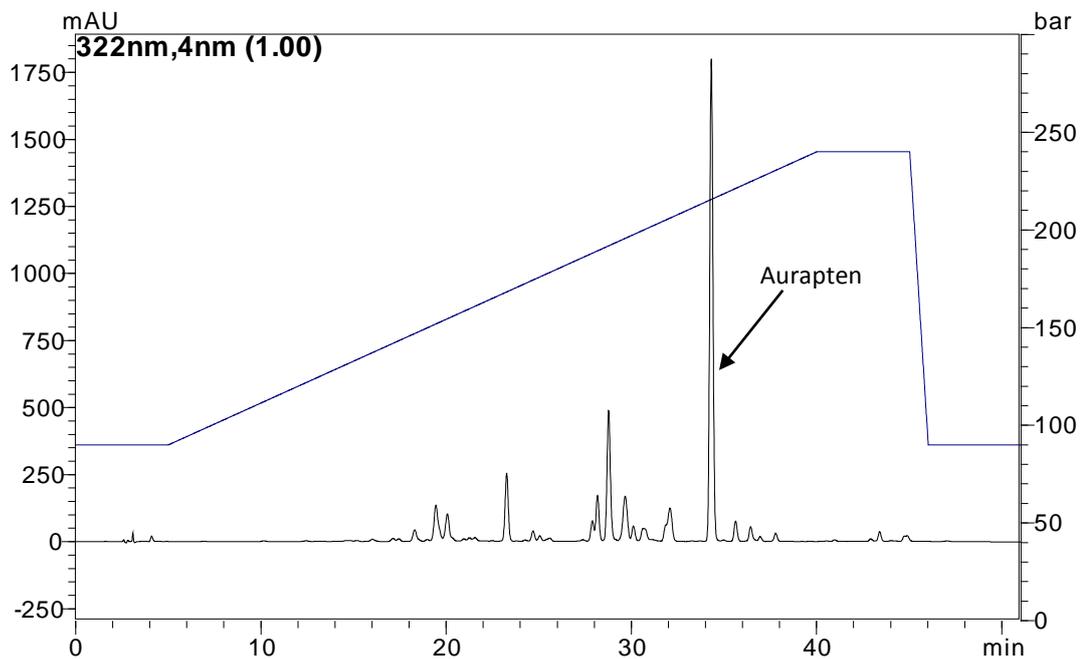


Abbildung 31: HPLC von DCM-Extrakt + Substanz VF3
 Gradient 2 (Bedingungen siehe S.12 f)
 Der Auraptenpeak (RT = ca. 34,5 min) ist markiert.

Ergebnisse

4.3.4 Strukturaufklärung von Substanz VF4

Substanz VF4 konnte in einer Menge von 82 mg isoliert werden. Auf der DC zeigte sich eine intensiv dunkelblau fluoreszierende Bande bei UV 366 nm. Mit AAS-Reagens entstand eine rosa-violette Färbung. Der hRF-Wert betrug 21 im System $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (95 + 1,5 + 0,1) auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (siehe Abb. 25, S. 37).

Das ESI-MS zeigte einen sehr schwachen $[\text{M} + \text{H}]^+$ -Peak bei m/z ca. 443 und einen $[\text{M} + \text{K}]^+$ -Peak bei m/z 481,2. Der Peak bei m/z 383,2 war dem Fragmention $[\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}]^+$ zuzuordnen. Das Fragmentierungsmuster ähnelte dem von Substanz VF1 und beinhaltete das für Hydroxycoumarin charakteristische Fragmention bei m/z 163,3 (+MS²-Spektrum). Der Vergleich der ESI-MS-Ergebnisse mit aus anderen *Ferula*-Arten bekannten Verbindungen wies auf ein acetyliertes, O-substituiertes Sesquiterpencoumarin mit dem MG = 442 Da hin.

¹H NMR-Spektrum: Die erhaltenen Werte stimmten weitgehend mit denen von Substanz VF1 überein (siehe Punkt 4.3.1, S. 38). Bei $\delta = 1,73$ ppm wurde ein zusätzliches, intensives Singulett detektiert. Intensität und fehlende Kopplung des Signals ließen auf eine isolierte Methylgruppe schließen. Die relative Tieffeldverschiebung wies auf eine benachbarte elektronenziehende Gruppe hin. Daneben erschien bei $\delta = 4,59$ ppm ein Triplett, während die Intensität des Triplets bei $\delta = 3,35$ im Vergleich zu VF1 verringert war. Beide Signale ließen sich dem Proton an C-3' zuordnen, wobei von einer hydrolysierbaren funktionellen Gruppe am benachbarten Kohlenstoff auszugehen war.

¹³C NMR-Spektrum: Die erhaltenen Werte stimmten weitgehend mit denen von Substanz VF1 überein (siehe Punkt 4.3.1, S. 38 f). Bei $\delta = 20,9$ ppm und $\delta = 172,3$ ppm erscheinen zwei zusätzliche Signale. Sie ließen sich als Methyl-(C-17') bzw. Carboxyl-C (C-16') eines Acetylrestes interpretieren, der über C-3' OH an die aliphatische Seitenkette gebunden ist.

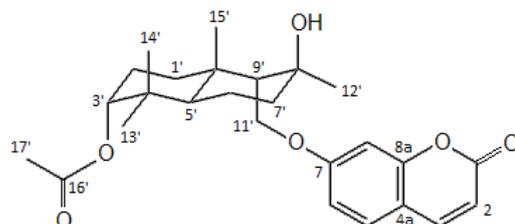


Abbildung 32: Struktur von Kellerin

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten konnte die Verbindung als Kellerin (Abb. 32, S. 44) identifiziert werden. Die Verbindung war bereits in den Wurzeln von *Ferula kokanica* und *Ferula kelleri* nachgewiesen worden [30, 32] und konnte hier zum ersten Mal aus *Ferula gummosa* isoliert werden.

Tabelle 23: ^1H NMR- und ^{13}C NMR-Daten von Substanz VF4 in MeOD

Position		NMR-Messwerte VF4 (MeOD)		
		^1H (ppm)	JH.H (Hz)	^{13}C (ppm)
2	C	---	---	163,3
3	CH	6,25	d 9,5	113,4
4	CH	7,88	d 9,5	145,7
4a	C	---	---	114,1
5	CH	7,56	d 8,5	130,6
6	CH	6,97	d 8,5 / d 2,4	114,2
7	C	---	-	163,6
8	CH	6,96	d 2,4	102,0
8a	C	---	---	157,3
1' ax/eq	CH ₂	1,81/1,10	m / d 12,8; t 3,2	31,1
2' ax/eq	CH ₂	2,05/1,56	m / m	23,8
3'	CH	4,59	t 2,7	80,2
4'	C	---	---	38,0
5'	CH	2,07	m	44,8
6' ax/eq	CH ₂	1,76/1,48	m	19,2
7'	CH ₂	1,78	m	40,2
8'	C	---	---	74,1
9'	CH	1,55	m	58,8
10'	C	---	---	39,0
11'	CH ₂	4,29/4,23	d 10,8; d 2,5 / d 10,8; d 3,2	70,0
12'	CH ₃	1,30	s	31,5
13'	CH ₃	0,91	s	28,8
14'	CH ₃	0,96	s	22,2
15'	CH ₃	1,38	d 0,6	24,7
16'	C=O	---	---	172,3
17'	CH ₃	1,73	S	20,9

Ergebnisse

4.3.5 Strukturaufklärung von Substanz VF5

Substanz VF5 konnte in einer Menge von 117 mg isoliert werden. Auf der DC zeigte sich eine intensiv dunkelblau fluoreszierende Bande bei UV 366 nm, die sich mit AAS-Reagens braun-violett färbte. Der hRf-Wert betrug 21 im System CHCl_3 -MeOH- H_2O (95 + 1,5 + 0,1) auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (siehe Abb. 25, S. 37).

Das ESI-MS zeigte einen $[\text{M} + \text{H}]^+$ -Peak bei m/z 383,2 und einen $[\text{M} + \text{K}]^+$ -Peak bei m/z 421,1. Das MG der Substanz betrug 382 Da. Im MS^2 -Spektrum war das für Hydroxycoumarin charakteristische Fragmentation bei $m/z = 163,3$ zu sehen. Aus dem Verlust von 14 und 12 Dalton im $+\text{MS}^3$ -Spektrum konnte die Fragmentierung einer Kohlenwasserstoff-Seitenkette abgeleitet werden. Die Ergebnisse wurden mit einer Datenbank verglichen.

MG, hRf-Wert (siehe Abb. 25, S. 37) und Retentionszeit in der HPLC (Abb. 34 und Abb. 35, S. 47) wurden mit der Literatur verglichen und stimmten mit den Werten von Farnesiferol A überein, das im verwendeten Ausgangsmaterial bereits nachgewiesen worden war [3]. Die Substanz VF5 wurde folglich als Farnesiferol A (Abb. 33) identifiziert.

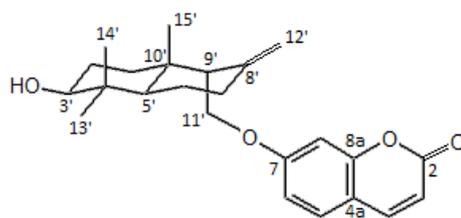


Abbildung 33: Struktur von Farnesiferol A

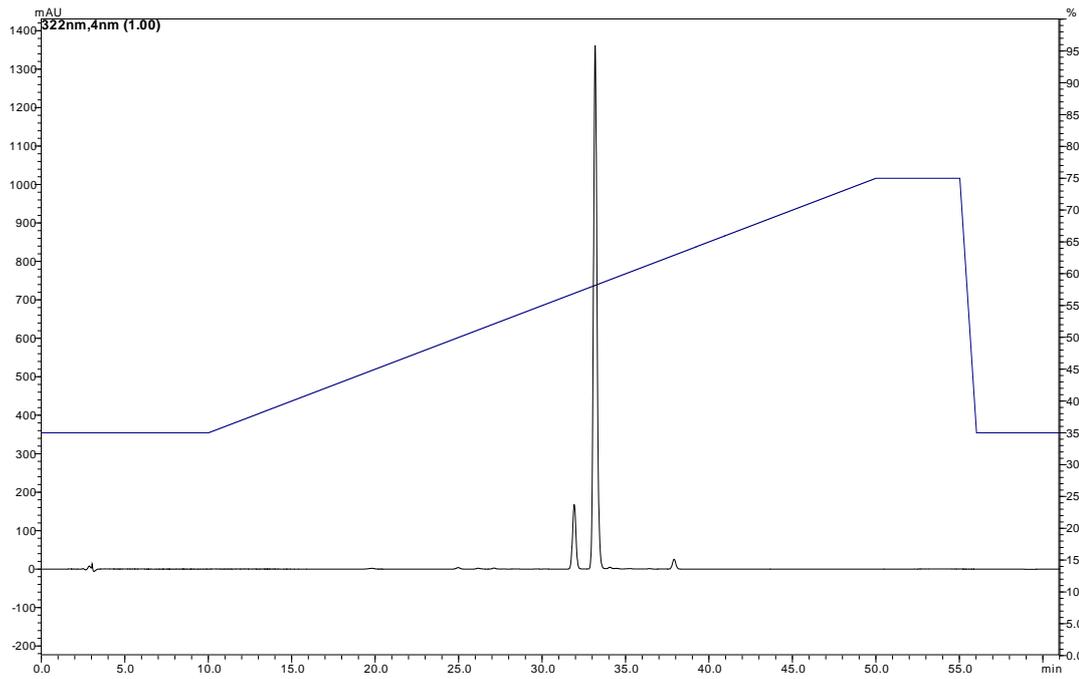


Abbildung 34: HPLC von Substanz VF5
 Gradient 1 (Bedingungen siehe S.12 f)

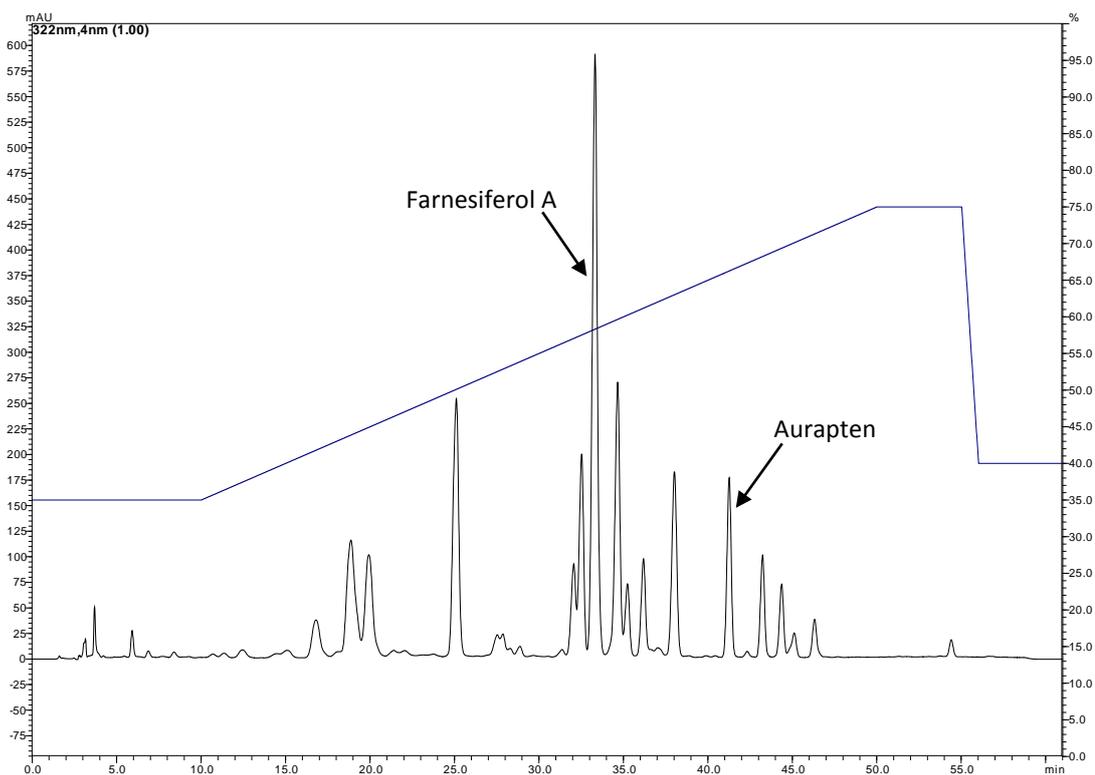


Abbildung 35: HPLC des DCM-Extraktes
 Gradient 1 (Bedingungen siehe S.12 f)
 Farnesiferol A (RT = ca. 33,5 min) und Auraptin (RT = ca. 41,5 min) sind markiert.

Ergebnisse

4.3.6 Strukturaufklärung von Substanz VF6

Substanz VF6 konnte in einer Menge von 121 mg isoliert werden. Auf der DC zeigte sich eine intensiv dunkelblau fluoreszierende Bande bei UV 366 nm. Mit AAS-Reagens entstand eine grau-violette Färbung. Der hRF-Wert betrug 52 im System $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (95 + 1,5 + 0,1) auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (siehe Abb. 25, S. 37).

Das ESI-MS zeigte einen $[\text{M} + \text{K}]^+$ -Peak bei m/z 395,1. Der Peak bei $m/z = 297,1$ konnte dem Fragmentation $[\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}]^+$ zugeordnet werden. Das Fragmentierungsmuster ähnelte dem von Substanz VF7 und beinhaltete das für Hydroxycoumarin charakteristische Fragmentation bei m/z 163,2 (+MS²-Spektrum). Der Vergleich der ESI-MS-Ergebnisse mit aus anderen *Ferula*-Arten bekannten Verbindungen wies auf das acetylierte, O-substituierte Monoterpenocoumarin Acetoxyaurapten mit dem MG = 356 Da hin.

¹H NMR-Spektrum: Die Signale der Protonen an C-1 bis C-8a stimmten mit jenen von Substanz VF1 weitgehend überein (siehe Punkt 4.3.1, S. 38). In der Seitenkette wurden Verschiebungen zwischen $\delta = 1,67$ ppm und $\delta = 1,92$ ppm für die Protonen an primären Kohlenstoffatomen (C-8', C-9', C-10', C-12') gemessen. Die Protonen an C-12' gaben im Gegensatz zu jenen an C-8', C-9' und C-10' Singulettts. Aufgrund des Fehlens einer Kopplung mit anderen Protonen musste diese Methylgruppe räumlich isoliert vorliegen. Die Wasserstoffe an C-4' wiesen mit $\delta = 2,24$ ppm bzw. $\delta = 2,41$ ppm typische Werte einer Methylenbrücke auf. Die Tieffeldverschiebung der Protonen an C-2' und C-6' ($\delta = 5,50$ ppm bzw. $\delta = 5,11$ ppm) ließ sich durch die Beteiligung an je einer Doppelbindung erklären, jene der Protonen an C-1' und C-5' durch die Substitution mit Sauerstoffatomen.

¹³C NMR-Spektrum: Die Signalwerte des Coumarinringgrundgerüsts (C-1 bis C-8a) stimmten mit jenen von Substanz VF1 weitgehend überein (siehe Punkt 4.3.1, S. 38 f). Die vier Signale zwischen $\delta = 17,1$ ppm und $\delta = 25,7$ ppm lagen im typischen Bereich für primäre Kohlenstoffe und waren den Methylgruppen der Seitenkette zuzuordnen. Die Signale von C-1' und C-5' ($\delta = 66,6$ ppm bzw. $\delta = 70,8$ ppm) wurden durch die Sauerstoffsubstitution tieffeldverschoben. Die Verschiebungen von C-2', C-3', C-6' und C-7' ($\delta = 123,7$ ppm bis $\delta = 138,7$ ppm) zeigten das Vorliegen von zwei Doppelbindungen. Bei C-11' handelte es sich aufgrund der besonders starken

Tieffeldverschiebung von $\delta = 172,2$ ppm um ein Carboxyl-C, welches mit der C-12'-Methylgruppe einen Acetylrest ergab.

Insgesamt ließ sich aus den Signalen eine C-5'-acetylierte Seitenkette mit allylischer Struktur konstruieren, die über C-1' etherartig an das Coumarinringgrundgerüst gebunden ist. Die HH-Kopplungskonstanten aus Tabelle 24 (S. 50) wurden über Spinsimulation mit DAISY ermittelt. Durch Vergleich der NMR-Daten mit der Literatur konnte die Substanz als 5'-Acetoxyaurapten (Abb. 36) identifiziert werden [33]. Die Stereochemie von C-5' konnte nicht geklärt werden. 5'-Acetoxyaurapten war bereits aus *Zanthoxylum schinifolium* bekannt [33]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Substanz erstmals innerhalb der Gattung *Ferula* nachgewiesen werden.

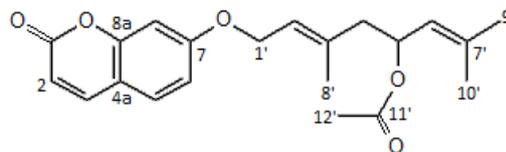


Abbildung 36: Struktur von 5'-Acetoxyaurapten

Ergebnisse

Tabelle 24: ^1H NMR- und ^{13}C NMR-Daten von Substanz VF6 in MeOD

Position		NMR-Messwerte VF6 (MeOD)			Literaturdaten [33] (CDCl_3)	
		^1H (ppm)	JH.H (Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	JH.H (Hz)
2	C	---	---	163,3	---	---
3	CH	6,23	d 9,4	113,3	6,25	d 9,4
4	CH	7,87	d 9,4; d 0,6	145,8	7,64	d 9,4
4a	C	---	---	114,0	---	---
5	CH	7,52	d 8,6	130,4	7,37	d 8,2
6	CH	6,90	d 8,6; d 2,4	114,5	6,82	d 2,4
7	C	---	---	163,7	---	---
8	CH	6,85	d 2,4; d 0,6	102,5	6,80	d 2,4
8a	C	---	---	157,1	---	---
1'	CH_2	4,66	d 12,3; d 6,5; t 0,7; q 0,7	66,3	4,59	d 6,4
2'	CH	5,50	t 6,5; t 1,0; q 1,3	123,7	5,50	t 6,4
3'	C	---	---	138,7	---	---
4'	CH_2	2,41	d 7,9; d 13,6; d 1,0; t 0,7	46,0	2,43	d 7,7; d 13,6
		2,24	d 5,9; d 13,6; d 1,0; t 0,7		2,23	d 6,0; d 13,6
5'	CH	5,68	d 5,9; d 7,9; d 9,1	70,8	5,68	d 6,0; d 7,7; d 9,0
6'	CH	5,11	d 9,1; q 1,4; q 1,4	124,6	5,12	d 9,0; t 1,4
7'	C	---	---	138,4	---	---
8'	CH_3	1,81	d 1,3; t 0,7	17,1	1,71	d 1,4
9'	CH_3	1,67	d 1,4	25,7	1,80	d 0,8
10'	CH_3	1,70	d 1,4	18,5	1,72	d 1,4
11'	C	---	---	172,2	---	---
12'	CH_3	1,92	s	21,1	1,99	s

4.3.7 Strukturaufklärung von Substanz VF7

Substanz VF7 konnte in einer Menge von 28 mg isoliert werden. Auf der DC zeigte sich eine intensiv dunkelblau fluoreszierende Bande bei UV 366 nm. Mit AAS-Reagens entstand eine violette Färbung. Der hRF-Wert betrug 27,5 im System $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (95 + 1,5 + 0,1) auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (siehe Abb. 25, S. 37).

Das ESI-MS zeigte einen $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ -Peak bei $m/z = 297,1$ und einen $[\text{M} + \text{K}]^+$ -Peak bei $m/z = 353,1$. Das Fragmentierungsmuster ähnelte dem von Substanz VF6 und beinhaltete das für Hydroxycoumarin charakteristische Fragmentation bei $m/z = 163,2$ (+MS²-Spektrum). Der Peak bei $m/z = 135,4$ im +MS²-Spektrum war dem Fragmentation der Seitenkette zuzuordnen. Der Vergleich der ESI-MS-Ergebnisse mit aus anderen *Ferula*-Arten bekannten Verbindungen ergab Hinweise auf das hydroxylierte, O-substituierte Monoterpenocoumarin Hydroxyaurapten mit dem MG = 314 Da.

¹H NMR-Spektrum: Die Werte der Protonen an C-1 bis C-8a stimmten mit jenen von Substanz VF1 weitgehend überein (siehe Punkt 4.3.1, S. 38). Die Signale der Seitenkettenprotonen ähnelten denen von Substanz VF6 (siehe Punkt 4.3.6, S. 48). Allerdings fehlte das Singulett bei $\delta = 1,92$ ppm.

¹³C NMR-Spektrum: Die Werte des Coumarinringgrundgerüsts (C-1 bis C-8a) stimmten mit jenen von Substanz VF1 weitgehend überein (siehe Punkt 4.3.1, S. 38 f). Die Signale der übrigen Kohlenstoffe ähnelten jenen von Substanz VF6. Im Unterschied zu VF6 fehlten allerdings die Signale des Acetylrestes ($\delta = 21,1$ ppm bzw. $\delta = 172,2$ ppm, siehe Punkt 4.3.6, S. 48).

Die HH-Kopplungskonstanten aus Tabelle 25 (S. 52) wurden über Spinsimulation mit DAISY ermittelt. Durch Vergleich der NMR-Daten mit der Literatur konnte die Substanz als 5'-Hydroxyaurapten (Synonym: Anisocoumarin H, Abb. 37) identifiziert werden [34, 35]. Die Stereochemie von C-5' konnte nicht geklärt werden. 5'-Hydroxyaurapten wurde erstmals innerhalb der Gattung *Ferula* nachgewiesen.

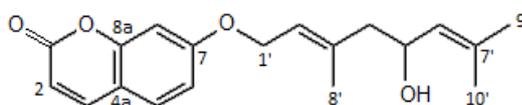


Abbildung 37: Struktur von 5'-Hydroxyaurapten

Tabelle 25: ^1H NMR- und ^{13}C NMR-Daten von Substanz VF7 in MeOD

Position		NMR-Messwerte VF7 (MeOD)			Literaturdaten [34] (CDCl_3)	
		^1H (ppm)	JH.H (Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	JH.H (Hz)
2	C	---	---	163,4	---	---
3	CH	6,23	d 9,5	113,2	6,24	d 9,5
4	CH	7,87	d 9,5; d 0,6	145,8	7,62	d 9,5
4a	C	---	---	113,9	---	---
5	CH	7,51	d 8,6	130,4	7,36	d 8,0
6	CH	6,91	d 8,6; d 2,4	114,5	6,83	d 1,5; d 8,0
7	C	---	---	163,8	---	---
8	CH	6,87	d 2,4; d 0,6	102,5	6,79	d 1,5
8a	C	---	---	157,1	---	---
1'	CH_2	4,67/4,66	d 12,2; d 6,5; t 0,7; q 0,7	66,5	4,60	d 6,5
2'	CH	5,50	t 6,5; t 1,0; q 1,3	122,9	5,56	br t 6,5
3'	C	---	---	139,6	---	---
4'	CH_2	2,33/2,16	d 6,9; d 13,4; d 1,0; t 0,7	48,7	2,30/2,22	d 8,0; d 14,0
5'	CH	4,49	d 8,8; t 6,8	67,7	4,51	d 14,0; d 8,0; d, d
6'	CH	5,12	d 8,8; q 1,4; q 1,4	129,0	5,17	br d 8,0
7'	C	---	---	135,3	---	---
8'	CH_3	1,80	d 1,3; t 0,7	17,3	1,70	br s
9'	CH_3	1,66	d 1,4	25,9	1,69	br s
10'	CH_3	1,65	d 1,4	18,3	1,80	br s

4.3.8 Strukturaufklärung von Substanz VF8

Substanz VF8 konnte in einer Menge von 14 mg isoliert werden. Auf der DC zeigte sich eine intensiv dunkelblau fluoreszierende Bande bei UV 366 nm, die sich mit AAS-Reagens violett färbte. Der hRF-Wert betrug 29 im System $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (95 + 1,5 + 0,1) auf Kieselgel 60 F₂₅₄ (siehe Abb. 25, S. 37).

Das ESI-MS zeigte einen $[\text{M} + \text{H}]^+$ -Peak bei m/z 383,2 und einen $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ -Peak bei m/z 365,2. Im $+\text{MS}^2$ -Spektrum ist das für Hydroxycoumarin charakteristische Fragmentation bei m/z 163,2 zu sehen. Der Verlust von 14 und 12 Dalton war mit der Fragmentierung einer Kohlenwasserstoff-Seitenkette erklärbar ($+\text{MS}^3$ -Spektrum). Der Vergleich der ESI-MS-Ergebnisse mit aus anderen *Ferula*-Arten bekannten Verbindungen ergab Hinweise auf ein Sesquiterpencoumarin mit dem MG 382 Da.

^1H NMR-Spektrum: Die Werte der Protonen an C-1 bis C-8a ($\delta > 6,2$ ppm) stimmten mit jenen von Substanz VF1 weitgehend überein (siehe Punkt 4.3.1, S. 38). Die meisten Signale der Seitenkettenprotonen zeigten Hochfeldverschiebungen. Die Signale zwischen $\delta = 4,6$ ppm und $\delta = 5,4$ ppm waren den Protonen an C-1', C-2' und C-12' zuzuordnen. In Kombination mit den Daten der ^{13}C NMR erklärte sich die Tieffeldverschiebung dieser Protonen durch die Substitution mit einem Sauerstoffatom (C-1') bzw. durch das Vorliegen von Doppelbindungen (C-2', C-12'). Das Signal bei $\delta = 3,22$ ppm war der Methylengruppe eines sekundären Alkohols und somit dem Proton an C-8' zuzuordnen. Die Verschiebungen zwischen $\delta = 0,68$ ppm und $\delta = 2,29$ ppm korrelierten mit den Protonen der aliphatischen bzw. alicyclischen C-Atome der Seitenkette.

^{13}C NMR-Spektrum: Die Werte des Coumarinringgrundgerüsts (C-1 bis C-8a) stimmten mit jenen von Substanz VF1 weitgehend überein (siehe Punkt 4.3.1, S. 38 f). Die Signale bei $\delta = 66,4$ ppm und $\delta = 77,8$ ppm lagen im Bereich primärer bzw. sekundärer alkoholischer Gruppen. Über die Korrelation im COSY erfolgte die Zuordnung von C-1' bzw. C-8'. C-2' ($\delta = 120,5$ ppm) kam mit der typischen Verschiebung eines tertiären Kohlenstoffs als Teil einer Doppelbindung von C-2' nach C-3' zur Resonanz. Diese Annahme wurde durch das Signal bei $\delta = 143,7$ ppm unterstützt, welches einem quartären Kohlenstoff in einer Doppelbindung entspricht und damit C-3' zuzuordnen war. C-12' konnte mit einer Verschiebung von

Ergebnisse

$\delta = 108,6$ ppm und der Kopplung an zwei Protonen als exocyclische Methylengruppe bestätigt werden. C-11' gab mit einer Verschiebung von $\delta = 148,8$ ppm das Signal eines quartären Kohlenstoffs in einer Doppelbindung. Die Signale zwischen $\delta = 15,8$ ppm und $\delta = 26,4$ ppm stammten von den Methylgruppen C-13', C-14' und C-15', die Signale bei $\delta = 33,1$ ppm und $\delta = 34,4$ ppm von den alicyclischen Methylengruppen C-9' und C-10'. Das Signal bei $\delta = 51,7$ ppm war sowohl aus der Lage der ^{13}C NMR-Signale als auch aus dem Kopplungsmuster der entsprechenden Protonen (siehe 2D-NMR-Spektren im Anhang) dem tertiären C-6' zuzuordnen.

Insgesamt ergab sich aus den NMR-Daten eine über C-1' etherartig an das Coumarinringgrundgerüst gebundene Seitenkette mit einem hydroxylierten Cyclohexanring, der eine exocyclische Methylengruppe trägt.

Durch Vergleich der NMR-Daten mit der Literatur konnte die Substanz als Farnesiferol B (Abb. 38) identifiziert werden [36, 37]. Farnesiferol B war bereits in *Ferula gummosa* und in mehreren anderen *Ferula*-Arten nachgewiesen worden [38–43]. Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals die zweifelsfreie Zuordnung der ^{13}C NMR-Daten (siehe Tab. 26, S. 55).

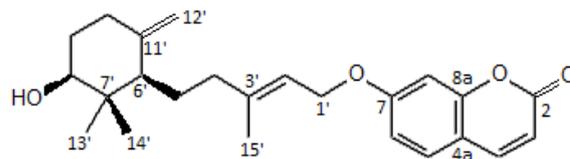


Abbildung 38: Struktur von Farnesiferol B

Tabelle 26: ^1H NMR- und ^{13}C NMR-Daten von Substanz VF8 in MeOD

Position		NMR-Messwerte VF8 (MeOD)			Literaturdaten [36, 37] (CDCl_3)
		^1H (ppm)	JH.H (Hz)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)
2	C	---	---	163,4	161,3
3	CH	6,24	d 9,4	113,2	112,4
4	CH	7,88	d 9,4	145,8	143,5
4a	C	---	---	113,9	113,0
5	CH	7,53	d 8,6	130,4	128,7
6	CH	6,92	d 8,6; d 2,4	114,7	113,3
7	C	---	---	163,8	162,1
8	CH	6,89	d 2,4	102,6	101,5
8a	C	---	---	157,1	155,8
1'	CH_2	4,70/4,66	d 12,0; d 6,5	66,4	65,5
2'	CH	5,42	t 6,5; q 1,4; t 1,3	118,4	X
3'	C	---	---	143,7	142,8
4'	CH_2	2,19/1,97	m	39,3	38,4
5'	CH_2	1,72/1,63	m	24,2	23,4
6'	CH	1,63	m	51,7	51,0
7'	C	---	---	41,6	40,5
8'	CH	3,22	d 10,1; d 4,3	77,8	77,2
9' ax/eq	CH_2	1,47/1,75	m	33,1	32,1
10' ax/eq	CH_2	1,89/2,29	m / d 13,1; d 4,7; d 4,7	34,4	32,7
11'	C	---	---	148,8	147,0
12'	CH_2	4,87/4,58	m	108,6	108,5
13'	CH_3	0,99	s	26,4	25,9
14'	CH_3	0,68	s	15,8	15,8
15'	CH_3	1,78	m	16,7	16,5

Ergebnisse

4.3.9 Aus Galbanum isolierte Substanzen

Aus dem DCM-Extrakt von *Ferula gummosa* waren bei einem aktivitätsgeleiteten Screening auf AChE-Hemmwirkung bereits Auraptin und Farnesiferol A als aktive Verbindungen isoliert worden [3]. Das Vorliegen dieser Substanzen konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus gelang die Isolierung von fünf weiteren Acetylcholinesterase-Inhibitoren und Umbelliferon sowie die zweifelsfreie Zuordnung der ¹³C NMR-Daten von Farnesiferol B. In Tabelle 27 sind wichtige Kenndaten zu den isolierten Verbindungen zusammengefasst.

Tabelle 27: Kenndaten der isolierten Verbindungen

	Verbindung	MG (Da)	Summenformel	CAS-Registry-Nummer
VF 1	Deacetylkellerin	400	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	54165-75-2
VF 2	Umbelliferon	162	C ₉ H ₆ O ₃	93-35-6
VF 3	Auraptin	298	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	495-02-3
VF 4	Kellerin	442	C ₂₆ H ₃₄ O ₆	54594-05-7
VF 5	Farnesiferol A	382	C ₂₄ H ₃₀ O ₄	511-33-1
VF 6	5'-Acetoxyauraptin	356	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	168001-91-0
VF 7	5'-Hydroxyauraptin (Anisocoumarin H)	314	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	107390-19-2
VF 8	Farnesiferol B	382	C ₂₄ H ₃₀ O ₄	54990-68-0

4.4 Aktivitätsbestimmung

Zur Ermittlung der AChEI-Aktivität wurde wie im Methodenteil unter Punkt 3.3.2 (S. 16 ff) beschrieben vorgegangen. Beim Bereiten der Probenlösungen waren die meisten der zu vermessenden Verbindungen in wässrigem Puffer mit 10 % DMSO allerdings nicht löslich. Auch eine zweistündige Behandlung im Ultraschallbad unter mildem Erwärmen auf etwa 50°C brachte kein zufriedenstellendes Ergebnis.

In einem zweiten Versuch wurden die Probenlösungen mit Methanol bereitet. Die Endkonzentration im Well betrug 10 % Methanol. Methanol beeinträchtigt in dieser Konzentration die Aktivität des Enzyms nicht und wäre dem AChE-Inhibitor DMSO diesbezüglich sogar vorzuziehen [44]. Alle Verbindungen waren in Methanol leicht löslich. Nach Zugabe der Probenlösung zum wässrigen Reaktionsgemisch im Well fielen allerdings die meisten Verbindungen unter Trübung wieder aus. Die erhaltenen Messwerte waren nicht auswertbar und die Aktivität der Verbindungen konnte nicht ermittelt werden.

5 Diskussion

Altersdemenz ist eine chronisch-progressive mentale Störung, deren Prävalenz sich in den kommenden drei Jahrzehnten wegen des stetig steigenden Durchschnittsalters der Bevölkerung vervierfachen soll [24]. Trotz intensiver Untersuchungen und verschiedener Ansätze ist eine Heilung zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich. In der symptomatischen Alzheimertherapie werden Acetylcholinesterase-Hemmstoffe wie Galantamin, Rivastigmin und Donepezil erfolgreich eingesetzt. Die Anwendung dieser Arzneistoffe geht allerdings mit unangenehmen Nebenwirkungen einher [14]. Darüber hinaus sind industriell erzeugte Medikamente einem großen Teil der Weltbevölkerung nicht zugänglich. Die Erforschung von Medikamenten aus der traditionellen pflanzlichen Medizin könnte neue Therapieansätze liefern.

Ferula gummosa Boiss. ist eine im Iran heimische Apiaceenart. Galbanum, das Gummiharz von *Ferula gummosa*, wird in der Traditionellen Iranischen Medizin gegen Erkrankungen des zentralen Nervensystems eingesetzt [6, 12]. Zusammensetzung und pharmakologische Wirkung von Galbanum waren bereits Gegenstand zahlreicher Studien. Bisher lag das Hauptaugenmerk auf der Erforschung des ätherischen Öls. In einem Screening traditioneller iranischer Arzneipflanzen zeigte das DCM-Extrakt von *Ferula gummosa*, welches auch die nicht flüchtigen Harzbestandteile enthält, Acetylcholinesterase-inhibitorische Aktivität [3]. Diese Eigenschaft lässt die Anwendung von Galbanum zur Verlangsamung des Gedächtnisverlustes plausibel erscheinen. Welche Inhaltsstoffe für die Wirkung verantwortlich sind, sollte anhand bioaktivitätsgeleiteter Fraktionierungen geklärt werden. In vorangegangenen Untersuchungen waren bereits zwei Acetylcholinesterase-Hemmstoffe, Aurapten und Farnesiferol A, aus dem DCM-Extrakt von *Ferula gummosa* isoliert worden [3]. Daneben war eine Reihe weiterer aktiver Komponenten detektiert worden, deren Untersuchung Gegenstand dieser Arbeit war. Das Vorliegen von Aurapten und Farnesiferol A konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus gelang die Isolierung von fünf weiteren Acetylcholinesterase-Inhibitoren, nämlich 5'-Acetoxyaurapten, 5'-Hydroxyaurapten, Kellerin, Deacetylkellerin und Farnesiferol B, sowie von Umbelliferon.

Kellerin und Deacetylkellerin waren bisher nur in den Wurzeln anderer *Ferula*-Arten nachgewiesen worden [29, 30, 32] und wurden erstmals aus Galbanum isoliert. 5'-Acetoxyaurapten und 5'-Hydroxyaurapten wurden noch nie als Inhaltsstoffe der Gattung *Ferula* beschrieben und konnten ebenfalls zum ersten Mal aus Galbanum isoliert werden. Aurapten, Farnesiferol A und Umbelliferon waren als Inhaltsstoffe von *Ferula gummosa* bereits bekannt [3, 45]. Farnesiferol B war ebenfalls schon in *Ferula gummosa* nachgewiesen worden [38] und im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang erstmals die zweifelsfreie Zuordnung der ¹³C-NMR Daten.

2010 hat die Arbeitsgruppe um Karimi et al. Coumarinderivate aus verschiedenen *Ferula*-Arten isoliert und hinsichtlich ihres AChEI-Potentials getestet. Aurapten, Farnesiferol A und Umbelliferon zeigten sich im Microplate-Assay nur wenig wirksam. Das Ausmaß der Hemmung betrug für die aktivste Verbindung Farnesiferol A bei einer Konzentration von 100 µM (ca. 300 µg/ml) etwa 20 Prozent [45]. Zu den übrigen fünf Verbindungen liegen bezüglich der AChE-Hemmwirkung noch keine Literaturdaten vor. Bei den isolierten Substanzen handelt es sich mit Ausnahme von Umbelliferon um sehr apolare Verbindungen, die im Puffer des Microplate-Assays nach Ellman nur unzureichend löslich waren. Eine denkbare Modifikation wäre die Verwendung von methanolischen Probenlösungen, die 10 % DMSO enthalten. Untersuchungen zur Aktivität sind zurzeit im Gange.

Zur Bedeutung des Substituenten in Position C-7 finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben. Nach einer von Anand et al. (2012) erstellten Struktur-Aktivitäts-Beziehung führen größere Substituenten an C-6 und C-7 des Coumarinringes wegen der sterischen Hinderung zu Affinitätsverlusten [46]. Für die vorliegenden Verbindungen wäre demnach keine starke AChE-Inhibition zu erwarten, sie würden sich als Template für das gezielte Design hochpotenter AChEI wenig eignen. Demgegenüber hat eine Untersuchung von Brühlmann et al. (2001) gezeigt, dass einfache 7-benzyloxysubstituierte Coumarine sowohl AChE als auch MAO-B in mikromolaren Konzentrationen hemmen. Die AChE-Hemmung nimmt mit Verlängerung der Alkylkette zwischen Ethergruppe und Benzolring allerdings ab [47].

Diskussion

Coumarine binden vorwiegend über PAS (*peripheric anionic site*) an die Acetylcholinesterase, blockieren also nicht direkt das katalytische Zentrum des Enzyms. Daher stellt sich die Frage, ob die Affinität der isolierten Verbindungen zu dem Enzym mit dem colorimetrischen Assay nach Ellman überhaupt ermittelt werden kann. Durch Bindung an PAS kommt es zu einer allosterischen Umlagerung im katalytischen Zentrum mit einer nichtkompetitiven Abnahme der hydrolytischen Aktivität. Mit dem colorimetrischen Assay nach Ellman lässt sich daher auch für PAS-Liganden eine quantitative Aussage über die Affinität zu dem Enzym treffen. Die erwünschten Effekte der PAS-Blockade umfassen aber nicht nur die Reduktion der hydrolytischen Aktivität, sondern auch die Verdrängung von A β aus der PAS-Bindestelle und damit Verminderung der A β -Aggregation und –Ablagerung [46]. Über den therapeutischen Nutzen von Coumarinderivaten in der Alzheimertherapie lässt der Assay nach Ellman alleine also kein Urteil zu. Eine direkte Verdrängungsstudie mit A β wäre vermutlich aussagekräftiger.

Prenyloxyphenylpropanoide wie die isolierten Coumarine können die Toxizität exzitatorischer Aminosäuren mindern, indem sie NMDA-Rezeptoren blockieren. Ein entsprechender Effekt wurde 2008 von Epifano et al. für Aurapten nachgewiesen [48]. Andere Inhaltsstoffe von Galbanum, vor allem aus dem ätherischen Öl, wirken antioxidativ und begegnen damit dem erhöhten oxidativen Stress im dementen Gehirn [49].

Viele Coumarinderivate hemmen außerdem die Monoaminoxidase. B. 7-Benzoyloxystubstituierte Coumarine hemmen das Enzym in mikromolaren Konzentrationen [50]. Aus der strukturellen Ähnlichkeit alleine lässt sich die MAO-Hemmwirkung der isolierten Verbindungen nicht abschätzen. Wegen des potentiellen neuroprotektiven Effekts der MAO-Inhibition wäre es interessant, die isolierten Verbindungen auf diese Aktivität zu untersuchen.

In Coumarinderivaten lassen sich AChE-Hemmung, MAO-Hemmung und PAS-Blockade in einem Molekül vereinen. Sie besitzen damit nicht nur das Potential, die kognitive Leistung zu verbessern, sondern könnten auch eine Verlangsamung des Absterbens der Neuronen bewirken. Eine Aktivitätssteigerung ließe sich möglicherweise durch partialsynthetische Modifikation erzielen [46]. In der Droge

Galbanum liegen zahlreiche potentiell wirksame Inhaltsstoffe in einem komplexen Gemisch vor, die bei Alzheimer-Demenz auf vielfältige Weise in das Krankheitsgeschehen eingreifen können. Die traditionelle Anwendung gegen dementielle Symptome erscheint daher trotz der eher schwachen AChE-Inhibition plausibel. Zur Evaluierung des tatsächlichen Nutzens wäre eine kontrollierte in vivo Untersuchung notwendig.

6 Zusammenfassung

Altersdemenz ist eine chronisch-progressive mentale Störung, deren Prävalenz sich wegen der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung in den kommenden Jahrzehnten vervielfachen wird. Bisher sind keine kurativen Maßnahmen bekannt. In der symptomatischen Therapie werden vor allem Acetylcholinesterase-Hemmstoffe eingesetzt, deren Anwendung allerdings mit Nebenwirkungen einhergeht. Die Erforschung der traditionellen pflanzlichen Medizin könnte neue Ansätze liefern.

Ferula gummosa Boiss. ist eine im Iran beheimatete Apiaceenart, deren Gummiharz Galbanum in der Traditionellen Iranischen Medizin unter anderem zur Behandlung von Gedächtnisstörungen angewendet wird. In einem Screening waren in Galbanum mehrere Komponenten mit Acetylcholinesterase-hemmenden Eigenschaften detektiert und die aktiven Verbindungen Aurapten und Farnesiferol A isoliert worden.

Das Vorliegen von Aurapten und Farnesiferol A konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus gelang mittels Säulenchromatographie an Kieselgel und SPE an RP-Phasen die Isolierung von fünf weiteren coumarinartigen Acetylcholinesterase-Inhibitoren, nämlich 5'-Acetoxyaurapten, 5'-Hydroxyaurapten, Kellerin, Deacetylkellerin und Farnesiferol B, sowie von Umbelliferon. Die Strukturklärung erfolgte mittels MS und NMR. 5'-Acetoxyaurapten, 5'-Hydroxyaurapten, Kellerin und Deacetylkellerin wurden zum ersten Mal aus Galbanum isoliert. Aurapten, Umbelliferon sowie Farnesiferol A und B waren als Inhaltsstoffe von *Ferula gummosa* bereits bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang erstmals die zweifelsfreie Zuordnung der ¹³C-NMR Daten von Farnesiferol B.

In Galbanum liegen somit zahlreiche Inhaltsstoffe mit AChE-hemmender Wirkung vor, die bei Alzheimer-Demenz in das Krankheitsgeschehen eingreifen könnten. Die traditionelle Anwendung gegen dementielle Symptome erscheint daher plausibel.

7 Summary

Dementia in elderly people is a progressive chronic mental disease. Due to the increasing life span, the number of people affected is expected to multiply during the next decades. No curative treatment is available yet, only attempts to improve the symptoms. In current symptomatic treatment inhibitors of the enzyme acetylcholine esterase, such as galantamine and rivastigmine, are used. These drugs are also causing adverse effects, though. Traditional herbal medicine might provide new therapeutic approaches.

Ferula gummosa Boiss. is an umbelliferous plant growing in Iran. Its oleogum-resin is called galbanum. Among other indications, galbanum is used for treating mental disorders in Traditional Iranian Medicine. A screening had identified several components with acetylcholine esterase inhibitory activity, two of which had been isolated and identified as auraptene and farnesiferol A.

Auraptene and farnesiferol A were confirmed within this study. Furthermore, five other compounds with acetylcholine esterase inhibitory activity were isolated using column chromatography on silica gel and solid phase extraction on RP-material. Their structures were elucidated as 5'-acetoxyauraptene, 5'-hydroxyauraptene, kellerine, deacetylkellerine and farnesiferol B via MS and NMR. Additionally, umbelliferone was isolated.

5'-Acetoxyauraptene, 5'-hydroxyauraptene, kellerine and deacetylkellerine were detected in galbanum for the first time. Auraptene and umbelliferone as well as farnesiferol A and B were known to be compounds of *Ferula gummosa*. This trial allowed the unambiguous assignment of ^{13}C NMR data for farnesiferol B for the first time.

Galbanum thus contains several active components which could alleviate mental disorders. The traditional use of galbanum in the treatment of mental disorders is therefore plausible.

Literaturverzeichnis

- [1] Mortazaienezhad F, Sadeghian MM. Investigation of Compounds from Galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.). Asian Journal of Plant Sciences, 5: 905-906, 2006
- [2] Efimenko OM. The chemical composition of *Ferula* spp. Zhurnal Prikladnoi Khimii (Sankt Petersburg, Russische Föderation), 12: 102 – 104, 1939
- [3] Adhami HR, Scherer U, Kaehlig H, Hettich T, Schlotterbeck G, Reich E, Krenn L. Combination of bioautography with HPTLC-MS/NMR: A fast identification of acetylcholinesterase inhibitors from galbanum. Phytochemical Analysis, 24: 395-400, 2013
- [4] Sadraei H, Asghari GR, Hajhashemi V, Kolagar A, Ebrahimi M. Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. Phytomedicine, 8: 370–376, 2001
- [5] Sayyah M, Mandgary A, Kamalinejad M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the seed acetone extract of *Ferula gummosa* Boiss. against seizures induced by pentylenetetrazole and electroconvulsive shock in mice. Journal of Ethnopharmacology, 82: 105-109, 2002
- [6] Howes FN. Age-Old Resins of the Mediterranean Region and Their Uses. Economic Botany, 4: 307-316, 1950
- [7] Abedi D, Jalali M, Asghari G, Sadeghi N. Composition and antimicrobial activity of oleogumresin of *Ferula gummosa* Boiss. essential oil using Alamar Blue™. Research in Pharmaceutical Sciences, 3: 41-45, 2008
- [8] Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Eslami B. Antioxidant activity of flower, stem and leaf extracts of *Ferula gummosa* Boiss. Grasas Y Aceites, 61: 244-250, 2010
- [9] Fazly Bazzaz BS, Haririzadeh G, Imami SA, Rashed MH. Survey of Iranian Plants for Alkaloids, Flavonoids, Saponins, and Tannins [Khorasan Province]. International Journal of Pharmacognosy 35: 17–30, 1997
- [10] Mandegary A, Sayyah M, Heidari MR. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity of the Seed and Root Extracts of *Ferula gummosa* Boiss. in Mice and Rats. DARU 12: 58–62, 2004
- [11] Theodorus J (Tabernaemontanus). Neu vollkommen Kräuter-Buch. Gedruckt zu Basel 1731. Stiftung der Werke von C.G.Jung, Zürich.
Quelle: <http://dx.doi.org/10.3931/e-rara-8510>, August 2013
- [12] Iranshahy M, Iranshahi M. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (*Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin) – A review. Journal of Ethnopharmacology, 134: 1–10, 2011
- [13] Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, 2009

- [14] NICE technology appraisal guidance 217. Donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of NICE technology appraisal guidance 111). National Institute for Health and Clinical Excellence, 2011
- [15] Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, 10: S2–S9, 2004
- [16] Mori F, Lai CC, Fusi F, Giacobini E. Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport*, 6: 633-636, 1995
- [17] Haroutunian V, Ahlers SA, Greig N, Wallace WC. Induction, secretion, and pharmacological regulation of β -APP in animal model systems. *Advances in Behavioral Biology* 49: 695–698, 1998
- [18] Giacobini E. Cholinesterases: New Roles in Brain Function and in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, 28: 515–522, 2003
- [19] Radic Z, Reiner E, Taylor P. Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Molecular Pharmacology*, 39: 98–104, 1991
- [20] De Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC. A Structural Motif of Acetylcholinesterase That Promotes Amyloid β -Peptide Fibril Formation. *Biochemistry*, 40: 10447–10457, 2001
- [21] Fowler CJ, Wiberg, A, Orelund L, Marcusson J, Winblad B. The effect of age on the activity and molecular properties of human brain monoamine oxidase. *Journal of Neural Transmission*, 49: 1–20, 1980
- [22] Emilsson L, Saetre P, Balciuniene J, Castensson A, Cairns N, Jazin EE. Increased monoamine oxidase messenger RNA expression levels in frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience Letters*, 326: 56–60, 2002
- [23] Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Review Neuroscience*, 7: 295–309, 2006
- [24] Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the Global Burden of Alzheimer's Disease. From the Selected Works of Ron Brookmeyer, University of California, Los Angeles, 2007
- [25] Adhami HR. Bioassay guided isolation of compounds with acetylcholinesterase inhibitory activity from selected medicinal plants used in Iranian Traditional Medicine. Dissertation, Universität Wien, 2012
- [26] Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, S. 299, 1983
- [27] Marston A, Kissling J, Hostettmann K. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochemical Analysis*, 13: 51–54, 2002

- [28] Nassar MI, Abu-Mustafa EA, Ahmed AA. Sesquiterpene coumarins from *Ferula assfoetida* L. *Pharmazie*, 11: 766–767, 1995
- [29] Ibraheim Z, Abdallah OM. Coumarins and other constituents from *Ferula sinaica* Boiss. growing in Egypt. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences (Assiut University)*, 19: 15–20, 1996
- [30] Nabiev AA, Khasanov T, Malikov VM. Terpenoid coumarins from *Ferula kokanica*. *Khimija Prirodnikh Soyedineniy*, 5: 578–81, 1982
- [31] Vialart G, Hehn A, Olry A, Ito K, Krieger C, Larbat R, Paris C, Shimizu B, Sugimoto Y, Mizutani M, Bourgaud F. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. *The Plant Journal*, 70: 460–470, 2012
- [32] Andrianova VB, Sklyar YE, Perel'son ME, Pimenov MG. Kellerin, a new coumarin from *Ferula kelleri* roots. *Khimija Prirodnikh Soyedineniy*, 6: 795–796, 1973
- [33] Chen IS, Lin YC, Tsai IL, Teng CM, Ko FN, Ishikawa T, Ishij H. Coumarins and Anti-Platelet Aggregation Constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry*, 39: 1091–1097, 1995
- [34] Zdero C, Bohlmann F, King RM, Robinson H. Diterpene Glycosides And Other Constituents From Argentinian *Baccharis* Species. *Phytochemistry*, 25: 2841–2855, 1986
- [35] Trani M, Delle Monache F, Delle Monache G, Yunes RA, Falkenberg DB. Chemistry of *Esenbeckia* genus. IV. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *grandiflora*. *Gazzetta Chimica Italiana*, 127: 415–418, 1997
- [36] Yadav JS, Satyanarayana K, Sreedhar P, Srihari P, Shaik TB, Kalivendi SV. Total synthesis of (±)-elegansidiol, (±)-farnesiferol B, and (±)-farnesiferol D. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 20: 3814–3817, 2010
- [37] Nassar MI. Spectral study of farnesiferol B from *Ferula asa foetida* L. *Pharmazie*, 49: 542–543. 1994
- [38] Saidkhodzhaev AI, Mukumova DU, Kamilov KM, Malikov VM, Pimenov MG. Terpenoid coumarins of *Ferula gummosa*. *Khimija Prirodnikh Soyedineniy*, 2: 283–284, 1991
- [39] Teng L, Ma GZ, Li L, Ma LY, Xu XQ. Karatavicinol a, a new anti-ulcer sesquiterpene coumarin from *Ferula sinkiangensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49: 606–609, 2013
- [40] Dastan D, Salehi P, Gohari AR, Zimmermann S, Kaiser M, Hamburger M, Khavasi HR, Nejad ES. Disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea*, and determination of their absolute configurations. *Phytochemistry*, 78: 170–178, 2012
- [41] Cha MR, Choi YH, Choi CW, Kim YS, Kim YK, Ryu SY, Kim YH, Choi SU. Galbanic acid, a cytotoxic sesquiterpene from the gum resin of *Ferula*

- asafoetida*, blocks protein farnesyltransferase. *Planta Medica*, 77: 52–54, 2011
- [42] Iranshahi M, Amin G, Shafiee A. A New Coumarin from *Ferula persica*. *Pharmaceutical Biology*, 42: 440–442, 2004
- [43] Iranshahi M, Kalategi F, Sahebkar A, Sardashti A, Schneider B. New sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula flabelliloba*. *Pharmaceutical Biology*, 48: 217–220, 2010
- [44] Obregon ADC, Schetinger MRC, Correa MM, Morsch VM, da Silva JEP, Martins MAP, Bonacorso HG, Zanatta N. Effects per se of Organic Solvents in the Cerebral Acetylcholinesterase of Rats. *Neurochemical Research*, 30: 379–384, 2005
- [45] Karimi G, Iranshahi M, Hosseinalizadeh F, Riahi B, Sahebkar A. Screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of terpenoid and coumarin derivatives from the genus *Ferula*. *Pharmacologyonline*, 1: 566–574, 2010
- [46] Anand P, Singh B, Singh N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 20: 1175–1180, 2012
- [47] Bruehlmann C, Ooms F, Carrupt PA, Testa B, Catto M, Leonetti F, Altomare C, Carotti A. Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 3195–3198, 2001
- [48] Epifano F, Molinarob G, Genovesec S, Ngomba RT, Nicoletti F, Curini M. Neuroprotective effect of prenyloxy coumarins from edible vegetables. *Neuroscience Letters*, 443: 57–60, 2008
- [49] Jalali HT, Petronilho S, Villaverde JJ, Coimbra MA, Domingues MRM, Ebrahimian ZJ, Silvestre AJD, Rocha SM. Assessment of the sesquiterpenic profile of *Ferula gummosa* oleo-gum-resin (galbanum) from Iran. Contributes to its valuation as a potential source of sesquiterpenic compounds. *Industrial Crops and Products*, 44: 185–191, 2013
- [50] Gnerre C, Catto M, Leonetti F, Weber P, Carrupt PA, Altomare C, Carotti A, Testa B. Inhibition of Monoamine Oxidases by Functionalized Coumarin Derivatives: Biological Activities, QSARs, and 3D-QSARs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43: 4747–4758, 2000

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Ferula gummosa</i> Boiss.....	3
Abbildung 2: Acetylcholin	4
Abbildung 3: Gewinnung des Ausgangsmaterials.....	8
Abbildung 4: DC der Fraktionen A1 bis A10 des DCM-Extraktes	8
Abbildung 5: DC der Fraktionen A5 bis A8 im Vergleich mit Chelidonin	9
Abbildung 6: Reaktionsmechanismus der Bioautographie.....	14
Abbildung 7: Microplate-Assay Versuchsaufbau.	16
Abbildung 8: Reaktionsmechanismus des Microplate-Assays.....	18
Abbildung 9: DC der Ausgangsfraktionen A6 und A8	19
Abbildung 10: DC der Sammelfraktionen A bis O der SPE1	21
Abbildung 11: HPLC der Fraktion G der SPE1.....	21
Abbildung 12: DC der Sammelfraktionen A bis O der CC2.....	24
Abbildung 13: Fraktion J der CC2 auf der RP-DC.....	25
Abbildung 14: DC der Sammelfraktionen A bis K der SPE2.....	27
Abbildung 15: Fraktion FG der CC2 auf der RP-DC	28
Abbildung 16: HPLC der Fraktion FG der CC2	29
Abbildung 17: DC der Sammelfraktionen A bis J der SPE3	30
Abbildung 18: DC der Sammelfraktionen A bis M der CC3.....	31
Abbildung 19: HPLC der Fraktion DE der CC3	32
Abbildung 20: HPLC der Fraktion IJ der CC3	32
Abbildung 21: DC der Sammelfraktionen A bis G der SPE4	34
Abbildung 22: HPLC der Fraktion B der CC3 (Substanz VF7).....	35
Abbildung 23: HPLC der Fraktion E der CC3 (Substanz VF8).....	35
Abbildung 24: Trennschema	36
Abbildung 25: DC der isolierten Verbindungen VF1 bis VF8.....	37
Abbildung 26: Struktur von Deacetylkellerin	39
Abbildung 27: DC-Vergleich von VF2 und Umbelliferon.....	41
Abbildung 28: Struktur von Umbelliferon.....	41
Abbildung 29: Struktur von Aurapten.....	42
Abbildung 30: HPLC des DCM-Extraktes	43
Abbildung 31: HPLC von DCM-Extrakt + Substanz VF3	43
Abbildung 32: Struktur von Kellerin.....	44

Abbildung 33: Struktur von Farnesiferol A.....	46
Abbildung 34: HPLC von Substanz VF5.....	47
Abbildung 35: HPLC des DCM-Extraktes	47
Abbildung 36: Struktur von 5'-Acetoxyaurapten	49
Abbildung 37: Struktur von 5'-Hydroxyaurapten.....	51
Abbildung 38: Struktur von Farnesiferol B.....	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bedingungen für die CC1	10
Tabelle 2: Bedingungen für die CC2	10
Tabelle 3: Bedingungen für die CC3	10
Tabelle 4: Bedingungen für SPE1 bis SPE3	11
Tabelle 5: Bedingungen für die SPE4	11
Tabelle 6: Bedingungen für die Normalphasen-DC.....	11
Tabelle 7: Bedingungen für die Umkehrphasen-DC.....	12
Tabelle 8: HPLC-Gerät	12
Tabelle 9: Bedingungen für die HPLC-Analyse	13
Tabelle 10: Gradientenprofil 1 der HPLC-Analyse.....	13
Tabelle 11: Gradientenprofil 2 der HPLC-Analyse.....	13
Tabelle 12: Material für die Bioautographie.....	15
Tabelle 13: Sprühlösungen für die Bioautographie	15
Tabelle 14: Reagenzien für den Microplate-Assay.....	17
Tabelle 15: Sammelfraktionen der SPE1.....	20
Tabelle 16: Sammelfraktionen der CC1	22
Tabelle 17: Sammelfraktionen der CC2	23
Tabelle 18: Sammelfraktionen der SPE2.....	26
Tabelle 19: Sammelfraktionen der SPE3.....	29
Tabelle 20: Sammelfraktionen der CC3	31
Tabelle 21: Sammelfraktionen der SPE4.....	33
Tabelle 22: ¹ H NMR- und ¹³ C NMR-Daten von VF1 in MeOD	40
Tabelle 23: ¹ H NMR- und ¹³ C NMR-Daten von VF4 in MeOD	45
Tabelle 24: ¹ H NMR- und ¹³ C NMR-Daten von VF6 in MeOD	50
Tabelle 25: ¹ H NMR- und ¹³ C NMR-Daten von VF7 in MeOD	52
Tabelle 26: ¹ H NMR- und ¹³ C NMR-Daten von VF8 in MeOD	55
Tabelle 27: Kenndaten der isolierten Verbindungen.....	56

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Veronika Fitz
Geburtsdatum	31. Jänner 1989
Geburtsort	Wien



Ausbildung

1995 - 1999	Volksschule Bisamberg
1999 - 2007	Gymnasium, GRg Franklinstraße 21, Wien
Juni 2007	Matura am GRg Franklinstraße 21, Wien
Oktober 2007	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien
Sommersem. 2013	Praktischer Teil der Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie, Wien
Februar 2014	Abschluss des Pharmaziestudiums

Anhang

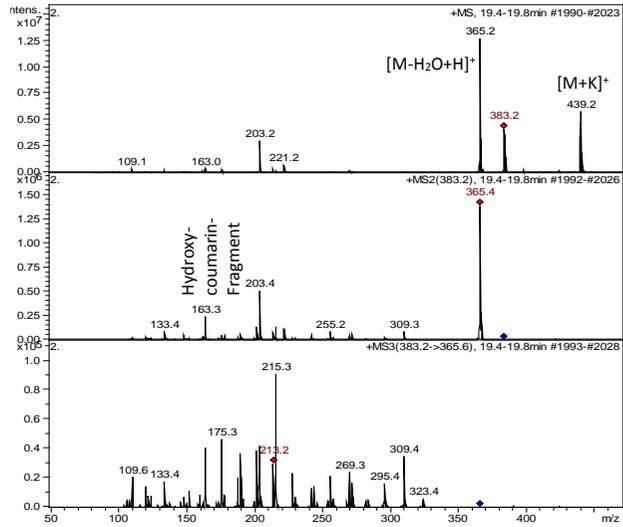


Abbildung I: ESI-MS Spektren von Deacetylkellerin (VF1)

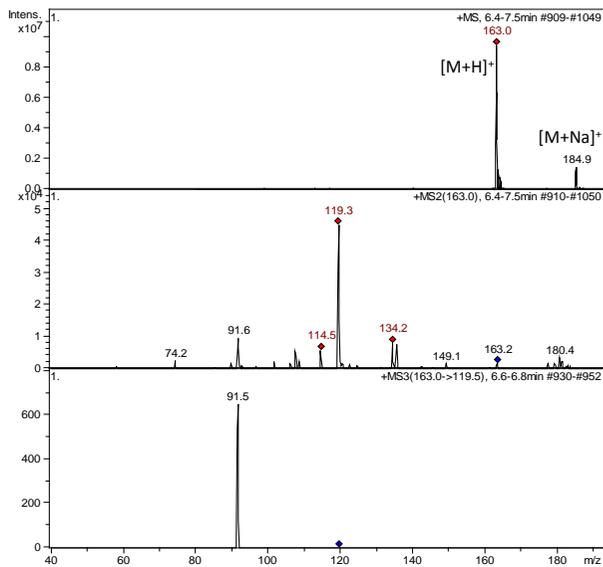
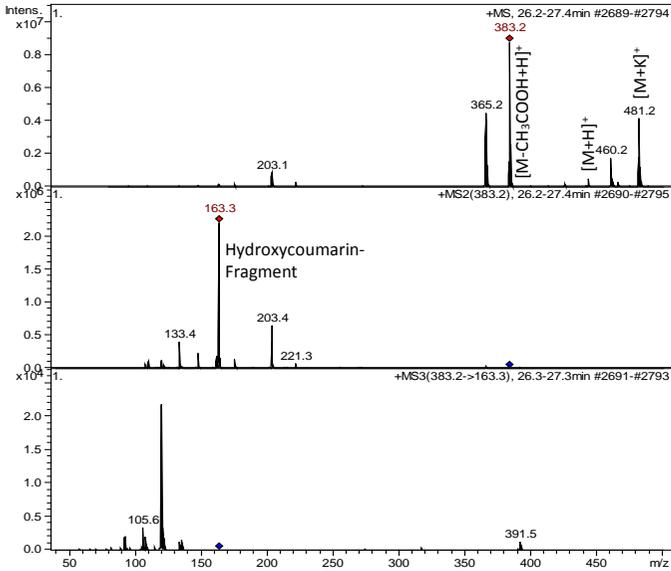
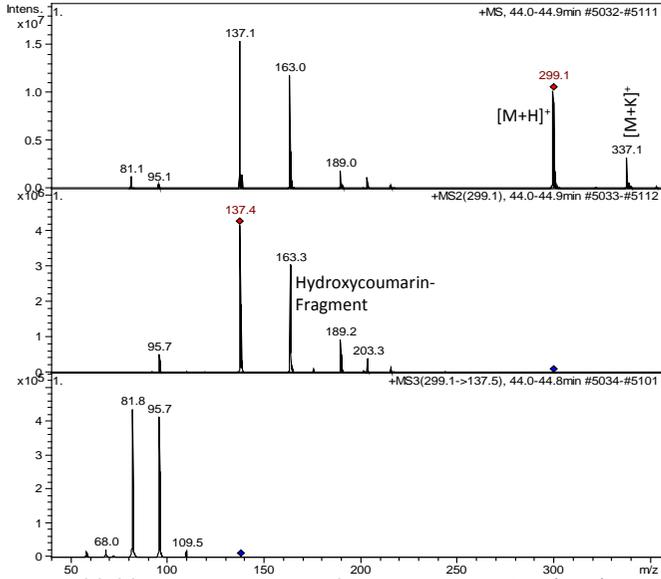
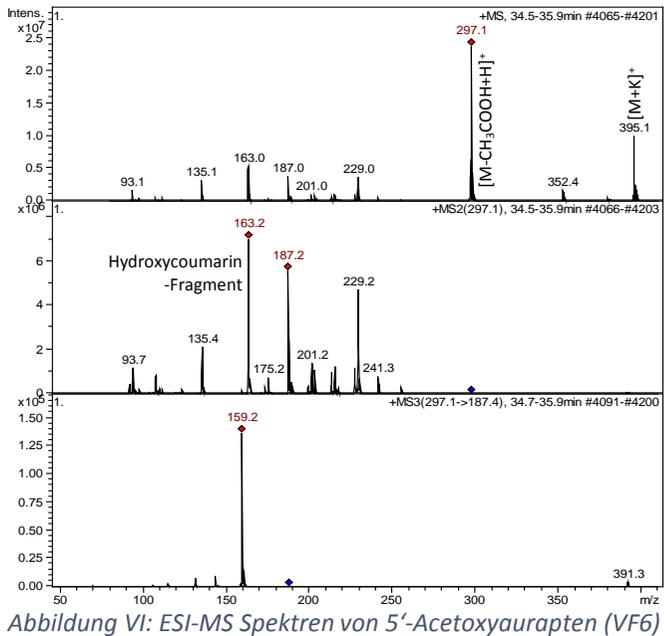
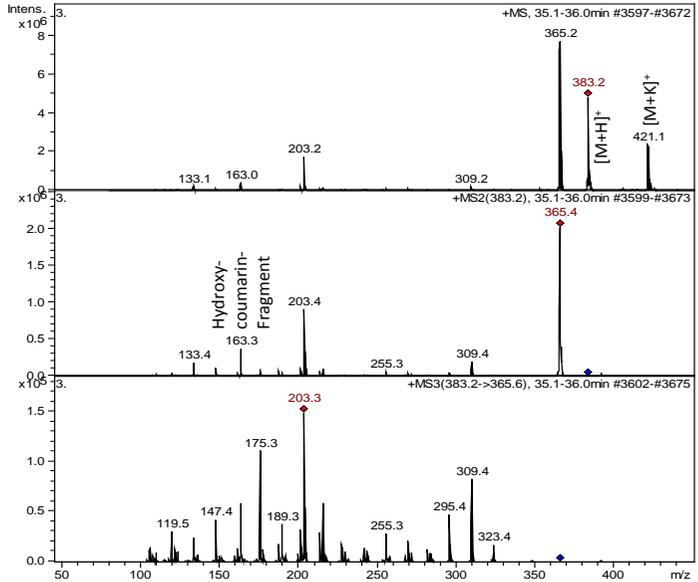
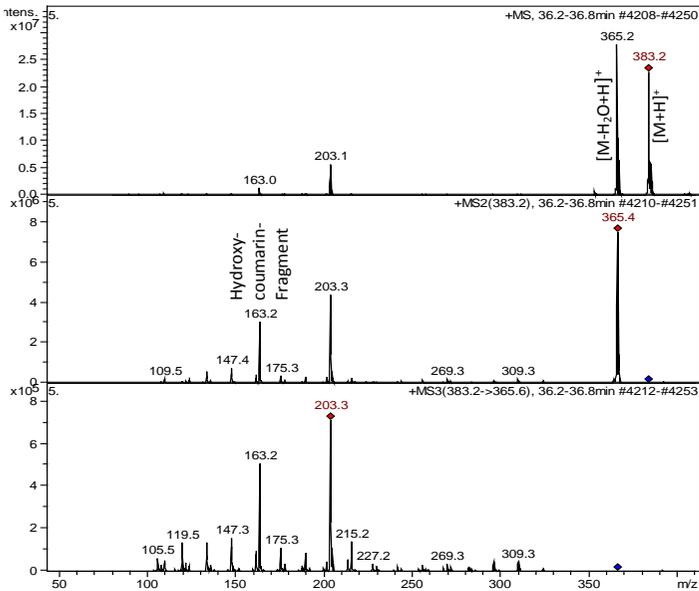
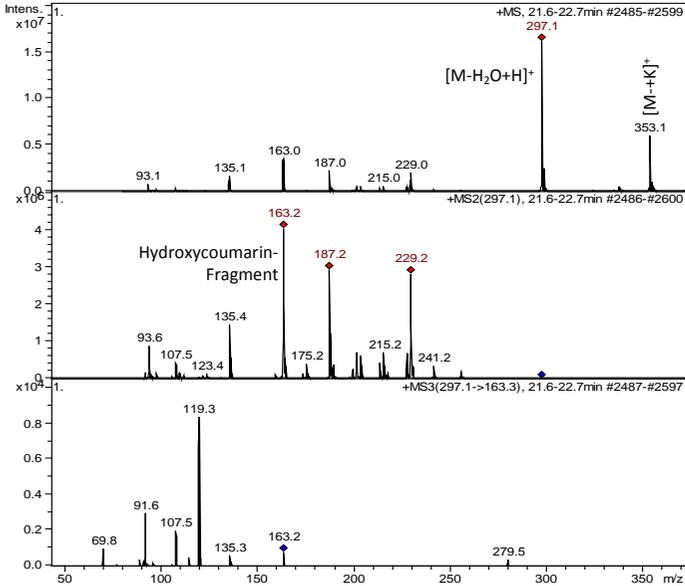


Abbildung II: ESI-MS Spektren von Umbelliferon (VF2)







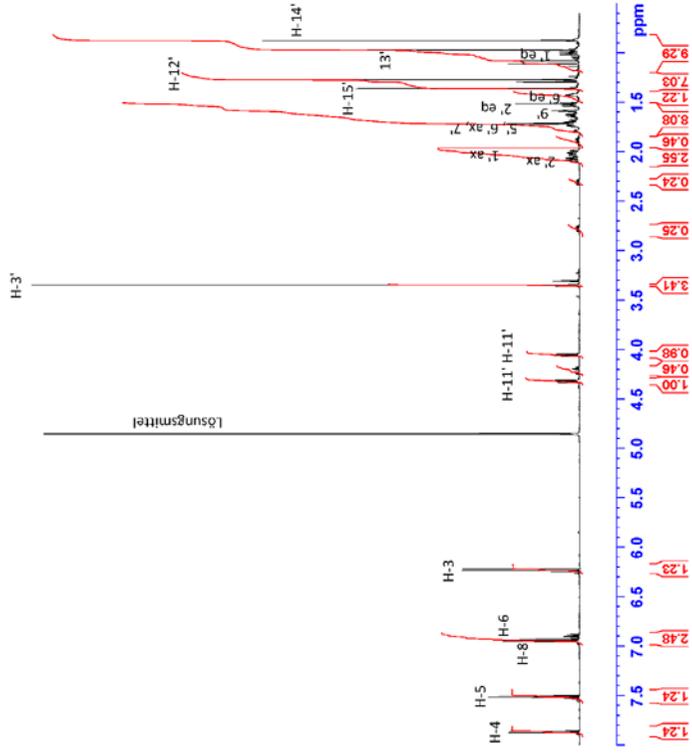


Abbildung IX: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von Deacetylkellerin (VF1) in MeOD

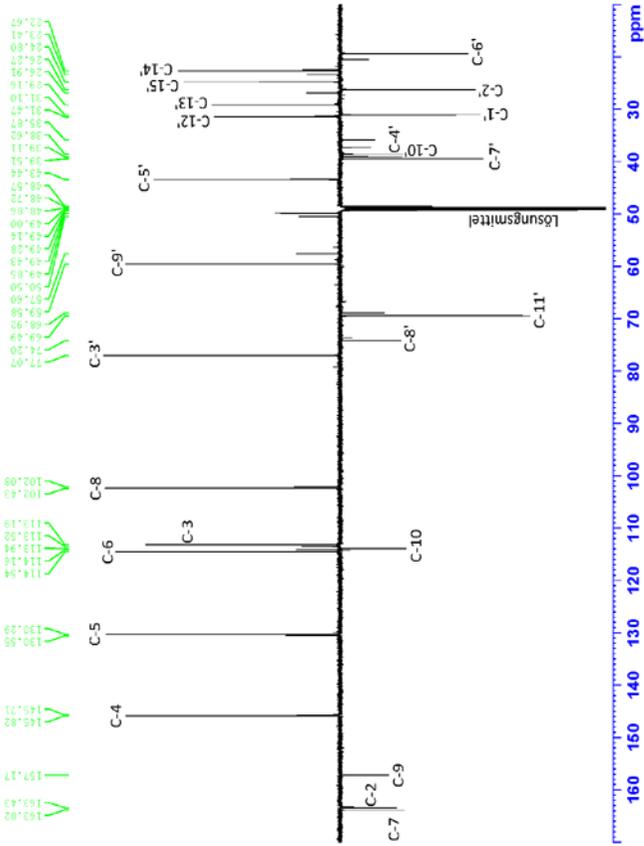


Abbildung X: 150 MHz ^{13}C NMR-Spektrum von Deacetylkellerin (VF1) in MeOD

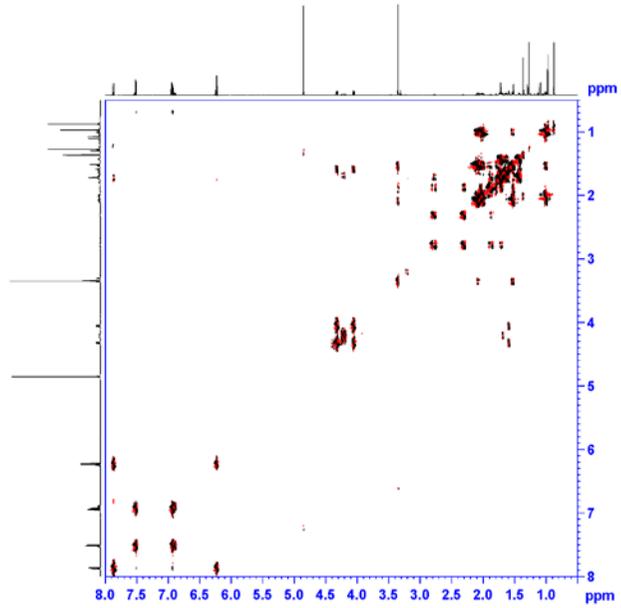


Abbildung XI: COSY von Deacetylkellerin (VF1) in MeOD

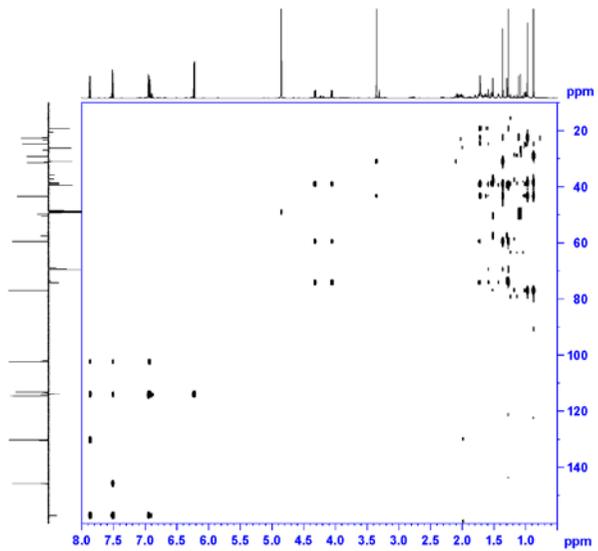


Abbildung XII: HMBC-Spektrum von Deacetylkellerin (VF1) in MeOD

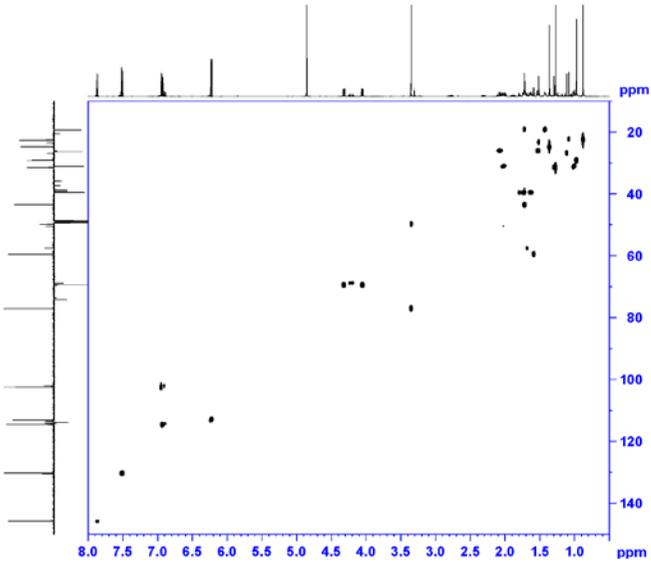


Abbildung XIII: HSQC-Spektrum von Deacetylkellerin (VF1) in MeOD

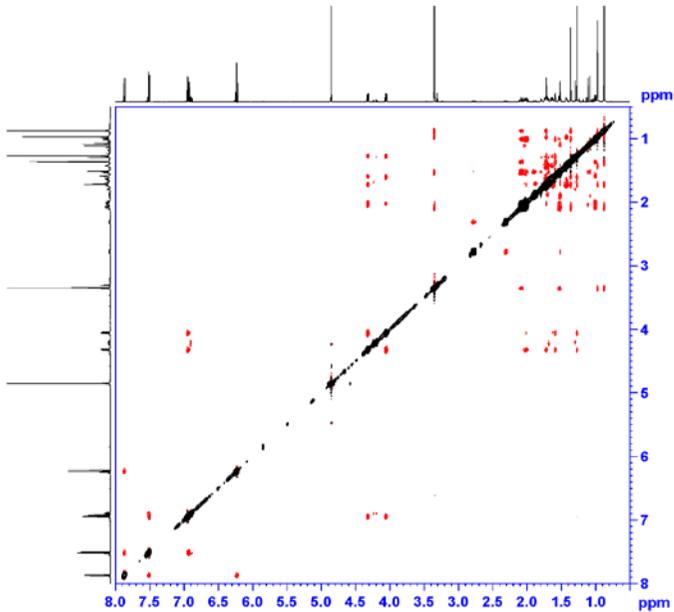


Abbildung XIV: NOESY von Deacetylkellerin (VF1) in MeOD

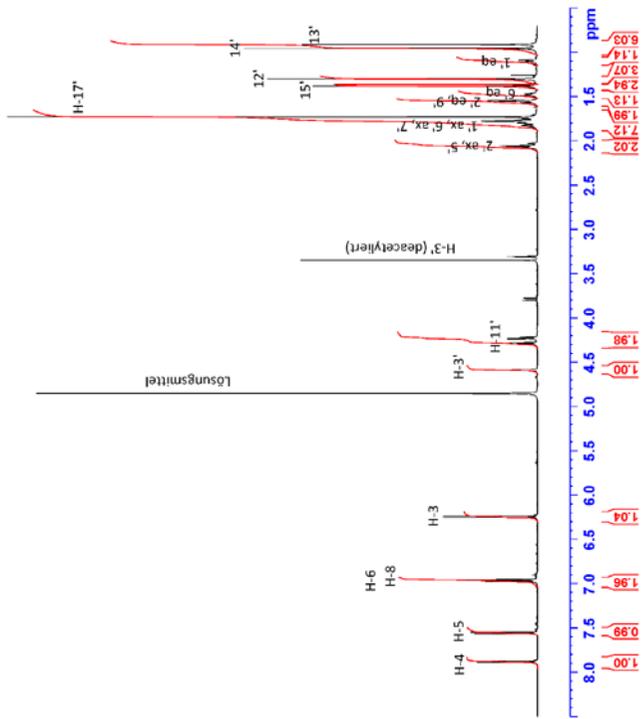


Abbildung XV: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von Kellerin (VF4) in MeOD

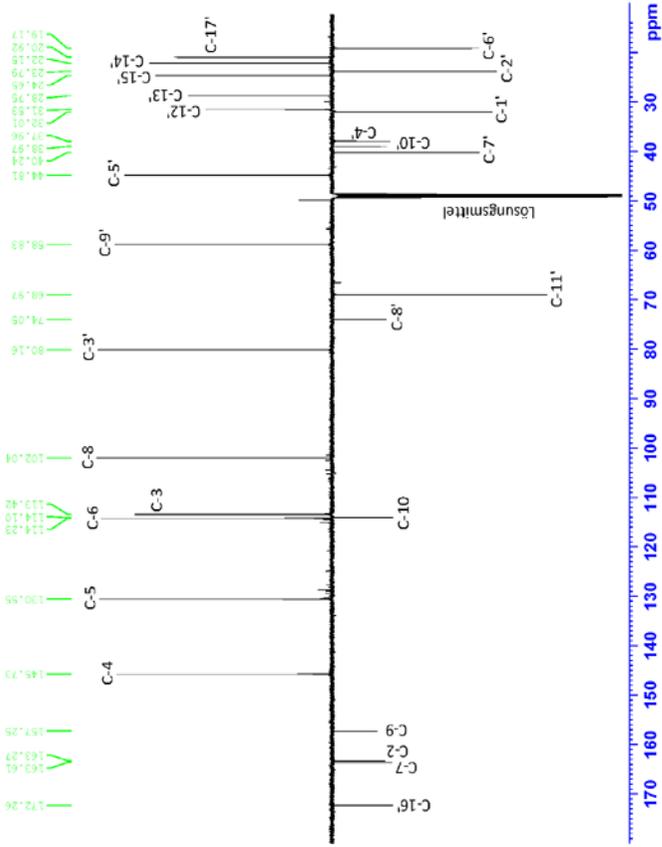


Abbildung XVI: 150 MHz ¹³C NMR-Spektrum von Kellerin (VF4) in MeOD

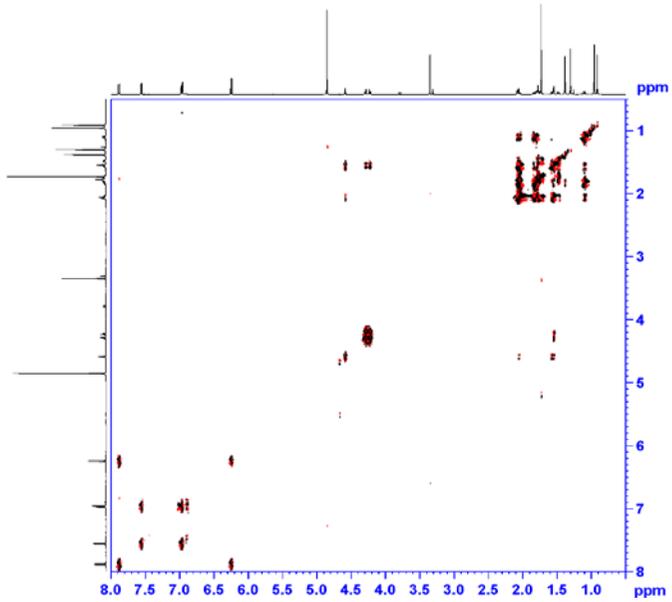


Abbildung XVII: COSY von Kellerin (VF4) in MeOD

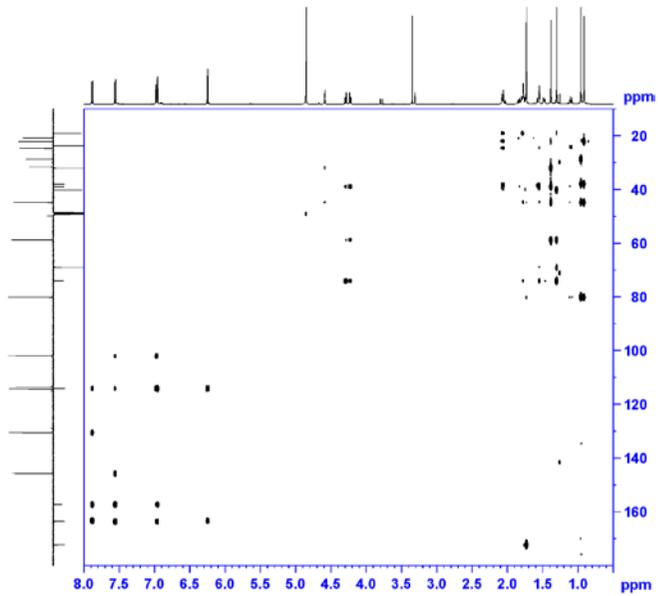


Abbildung XVIII: HMBC-Spektrum von Kellerin (VF4) in MeOD

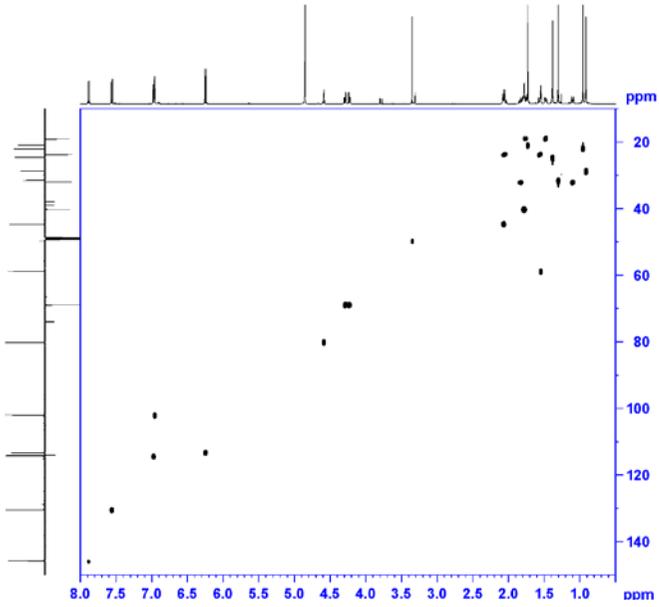


Abbildung XIX: HSQC-Spektrum von Kellerin (VF4) in MeOD

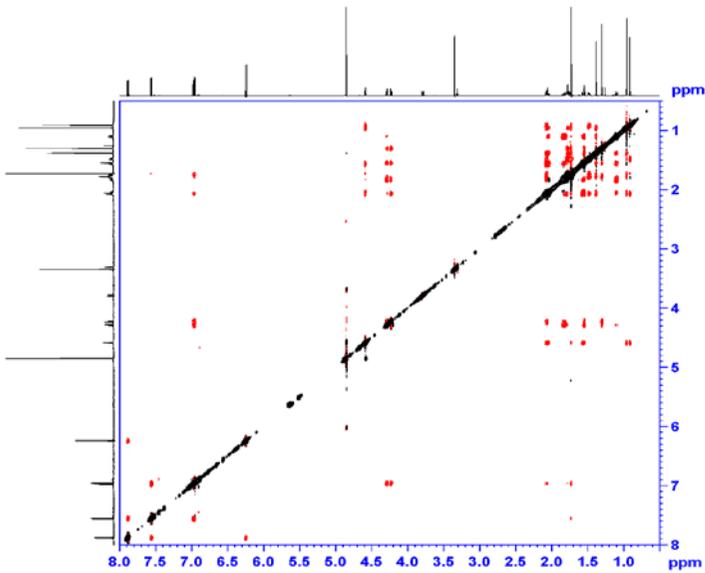


Abbildung XX: NOESY von Kellerin (VF4) in MeOD

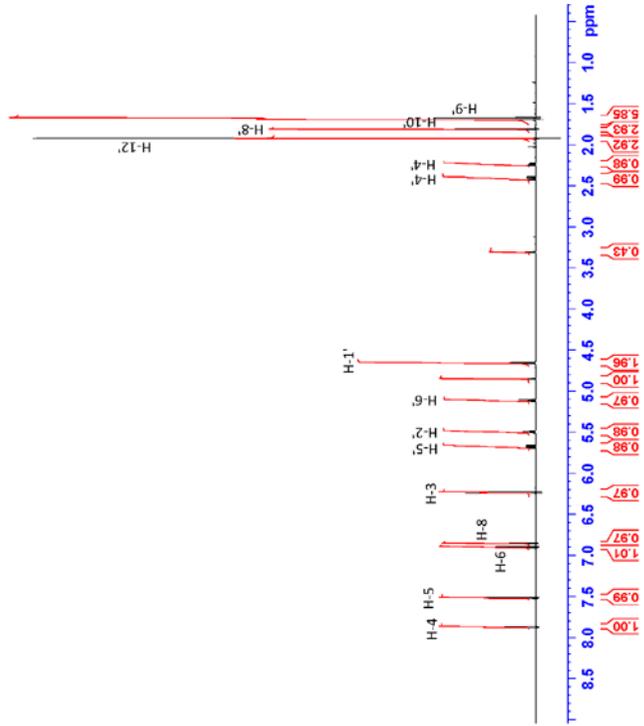


Abbildung XXI: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von 5'-Acetoxyauraptin (VF6) in MeOD

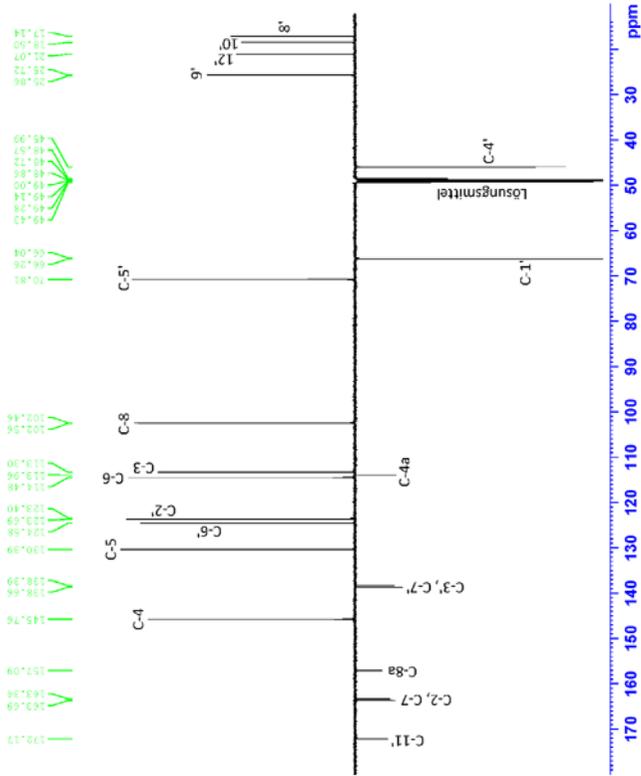


Abbildung XXII: 150 MHz ^{13}C NMR-Spektrum von 5'-Acetoxyauripten (VF6) in MeOD

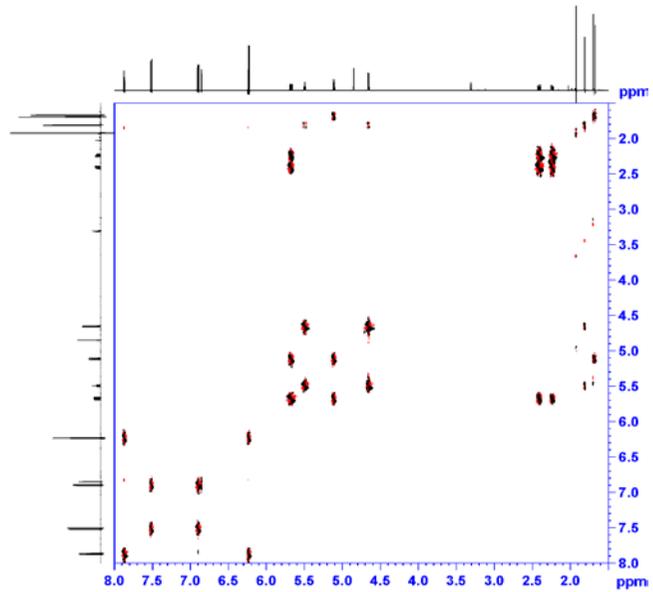


Abbildung XXIII: COSY von 5'-Acetoxyauraptin (VF6) in MeOD

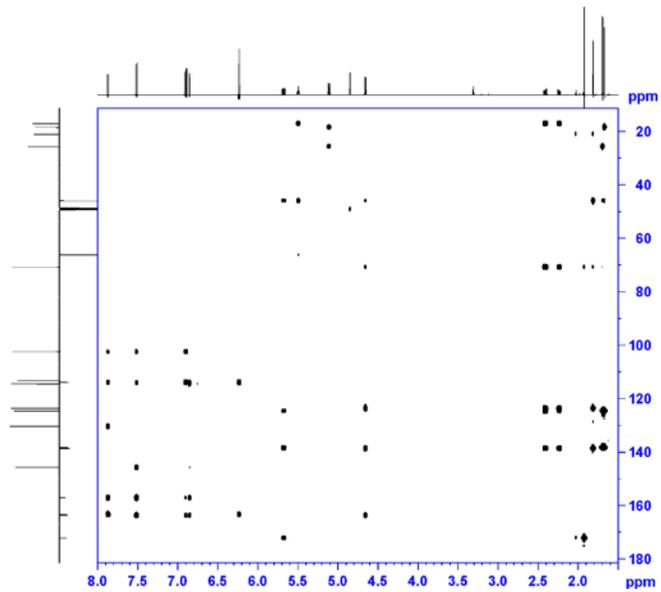


Abbildung XXIV: HMBC-Spektrum von 5'-Acetoxyauraptin (VF6) in MeOD

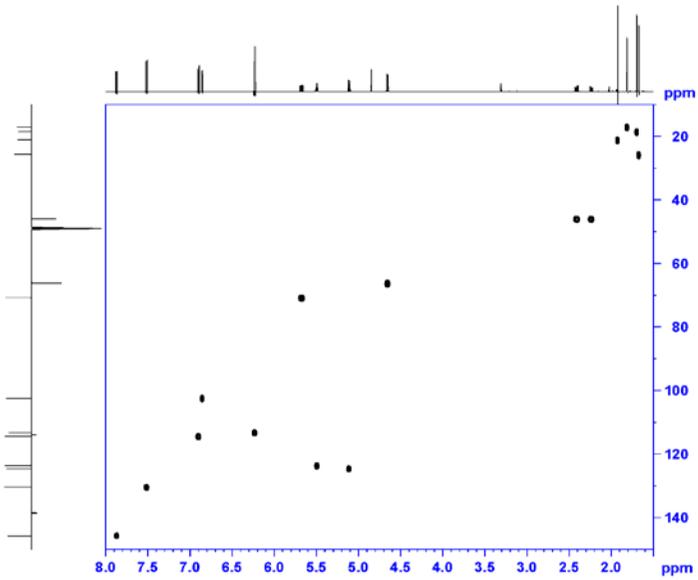


Abbildung XXV: HSQC-Spektrum von 5'-Acetoxyauraptin (VF6) in MeOD

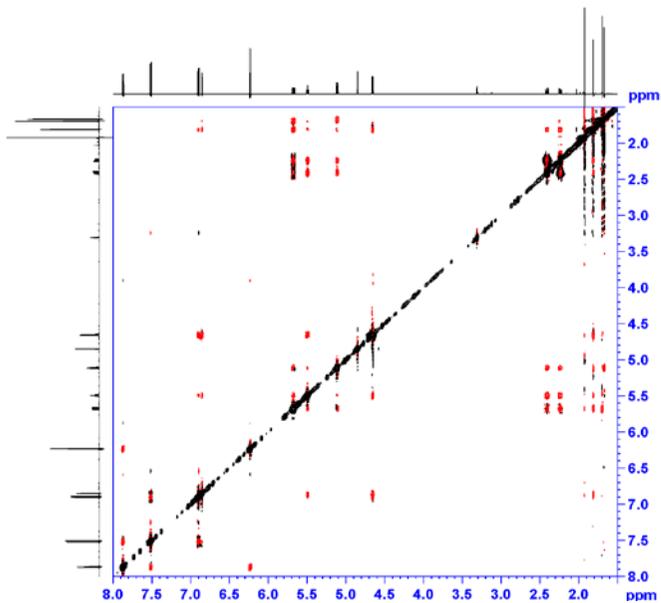


Abbildung XXVI: NOESY von 5'-Acetoxyauraptin (VF6) in MeOD

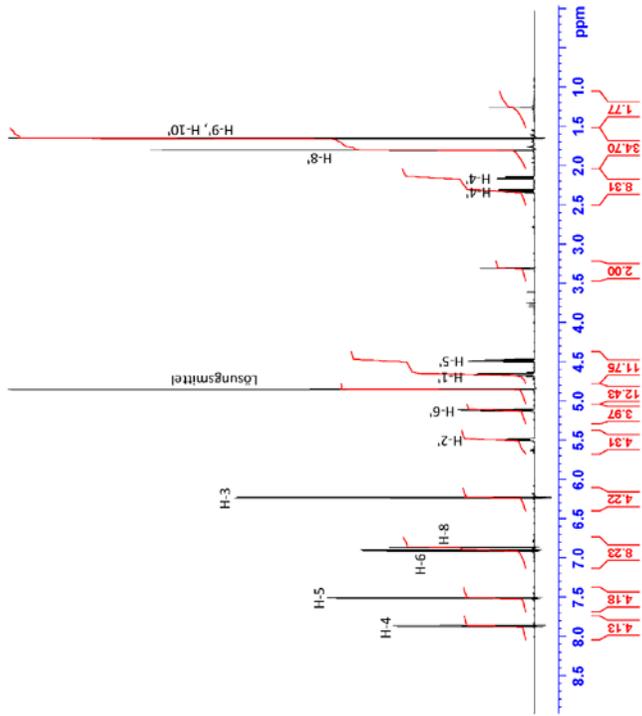


Abbildung XXVII: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von 5'-Hydroxyauraptin (VF7) in MeOD

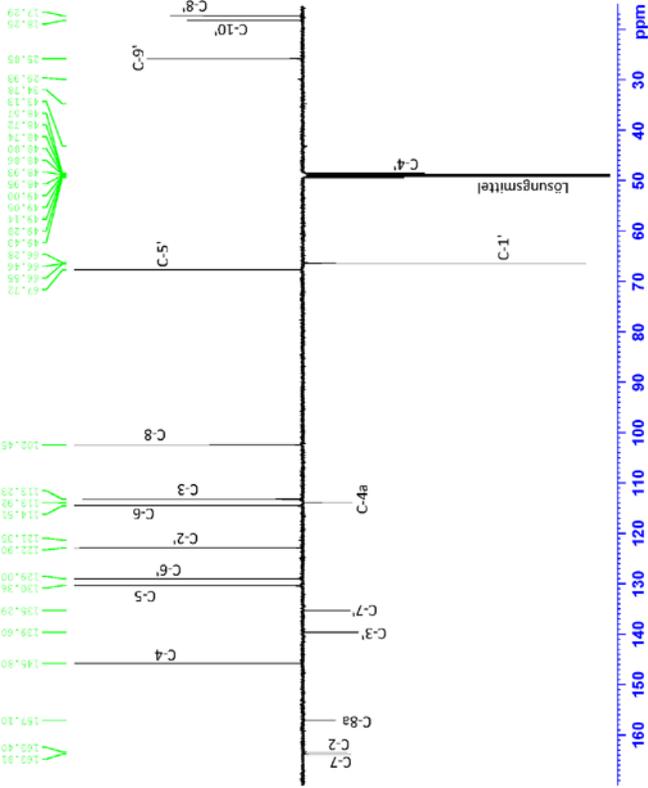


Abbildung XXVIII: 150 MHz ^{13}C NMR-Spektrum von 5'-Hydroxyauraptin (VF7) in MeOD

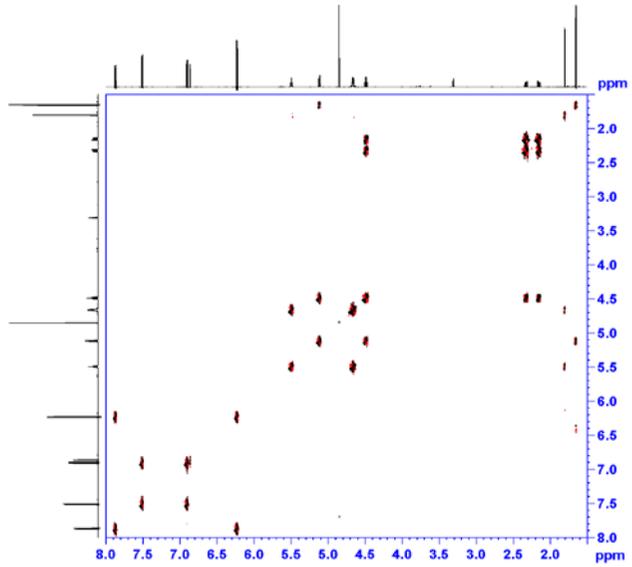


Abbildung XXIX: COSY von 5'-Hydroxyauraptin (VF7) in MeOD

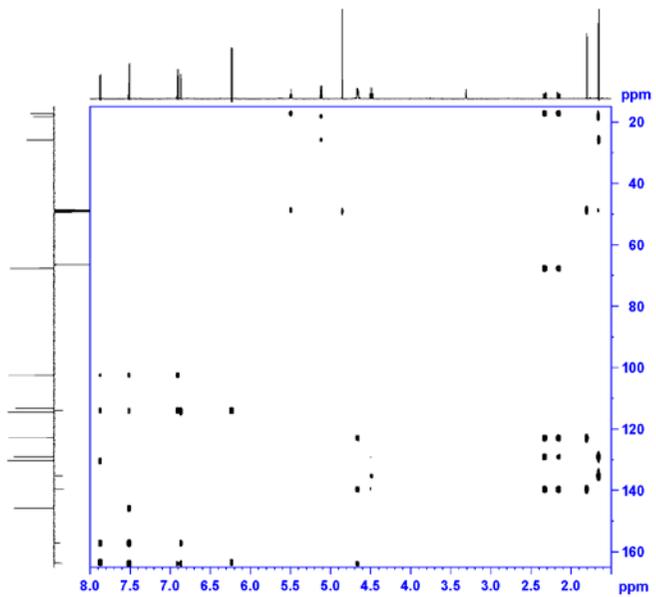


Abbildung XXX: HMBC-Spektrum von 5'-Hydroxyauraptin (VF7) in MeOD

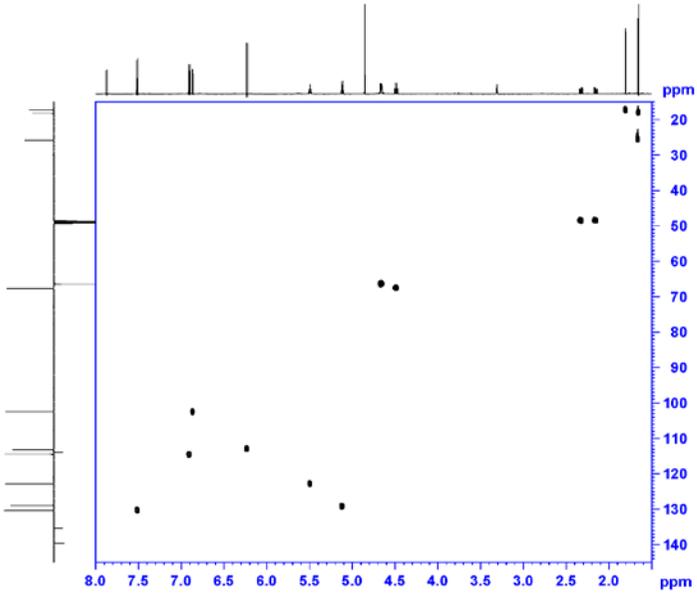


Abbildung XXXI: HSQC-Spektrum von 5'-Hydroxyauraptin (VF7) in MeOD

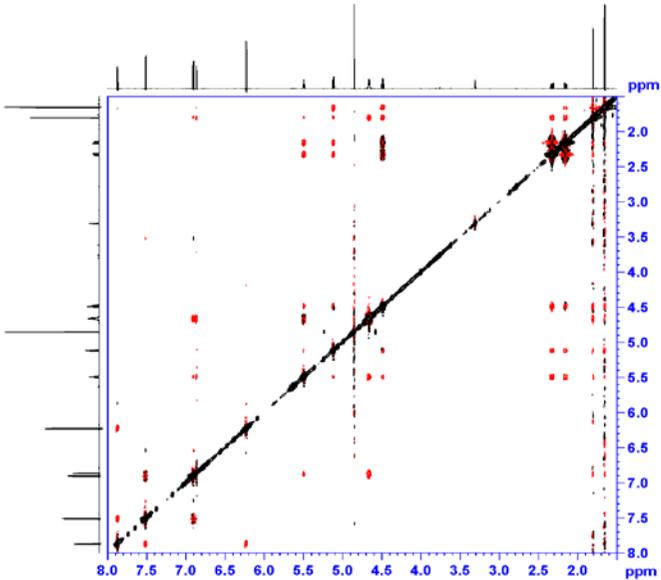


Abbildung XXXII: NOESY von 5'-Hydroxyauraptin (VF7) in MeOD

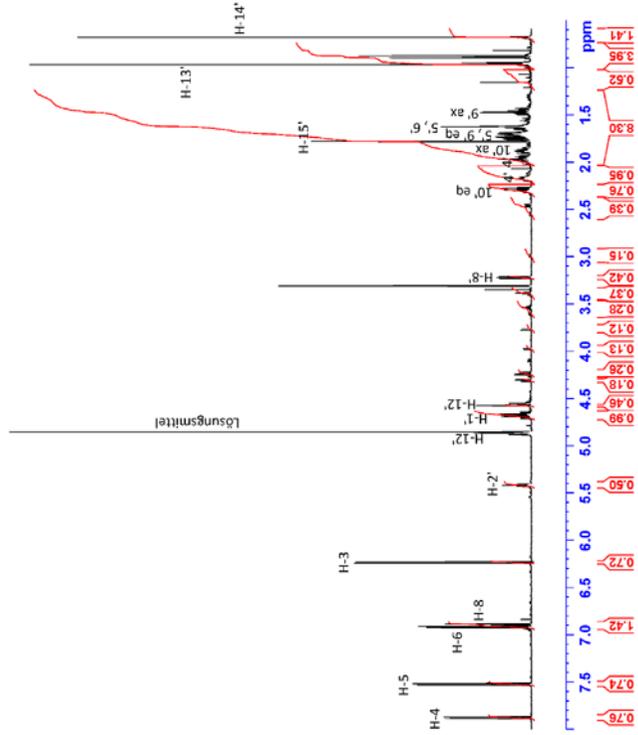


Abbildung XXXIII: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von Farnesiferol B (VF8) in MeOD

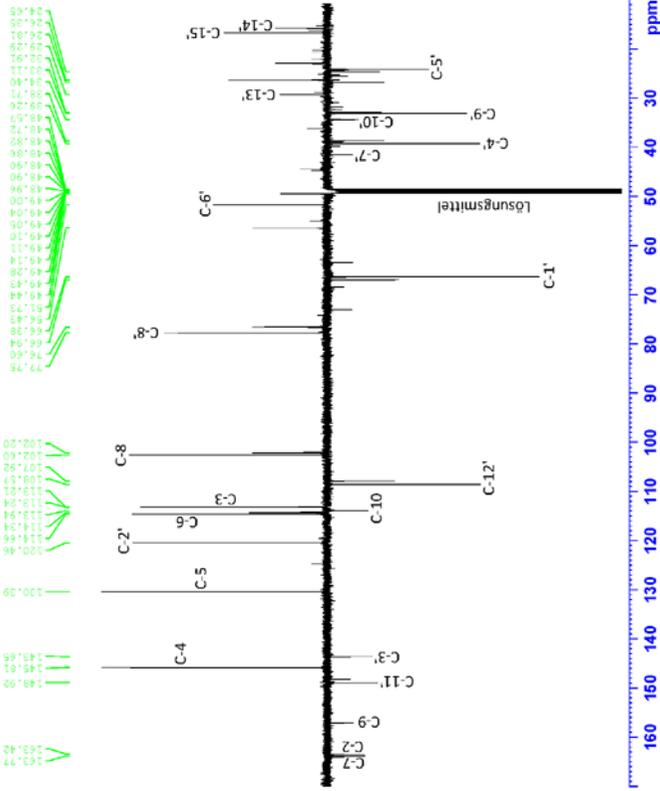


Abbildung XXXIV: 150 MHz ¹³C NMR-Spektrum von Farnesiferol B (VF8) in MeOD

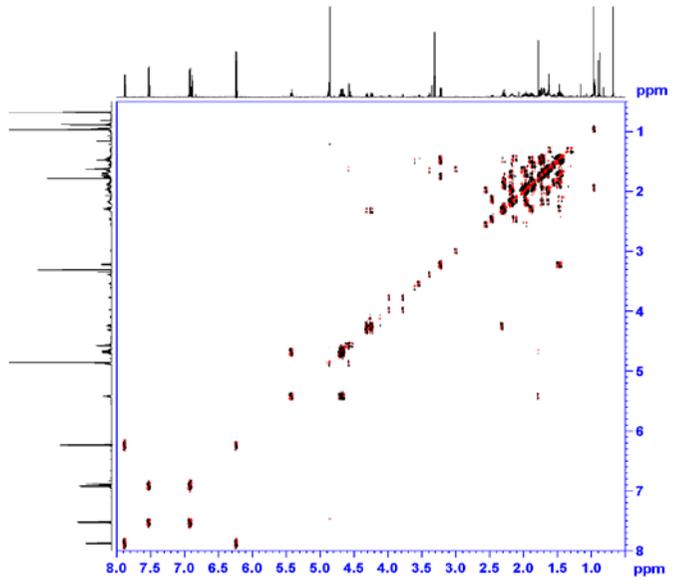


Abbildung XXXV: COSY von Farnesiferol B (VF8) in MeOD

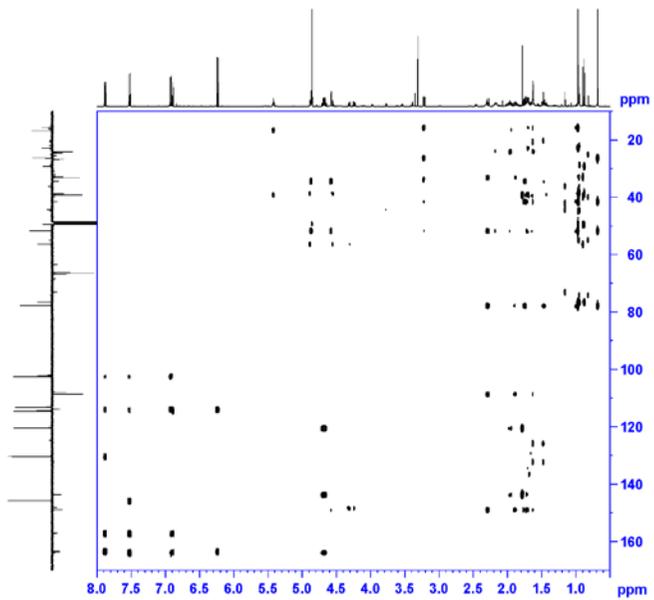


Abbildung XXXVI: HMBC-Spektrum von Farnesiferol B (VF8) in MeOD

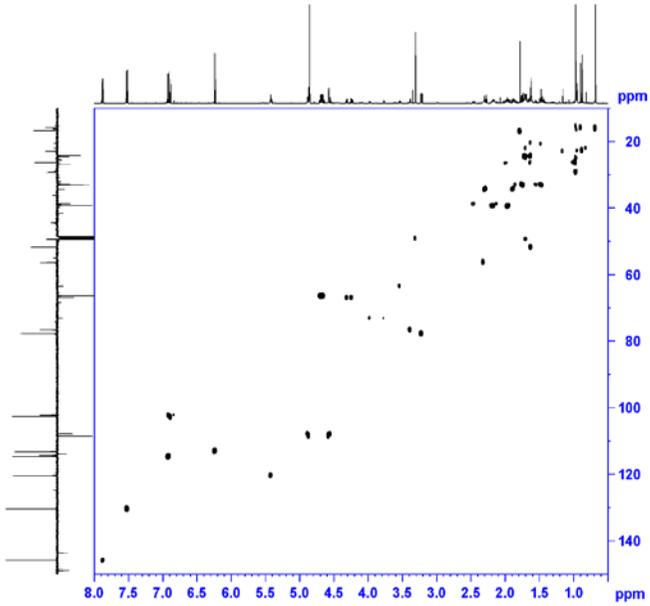


Abbildung XXXVII: HSQC-Spektrum von Farnesiferol B (VF8) in MeOD

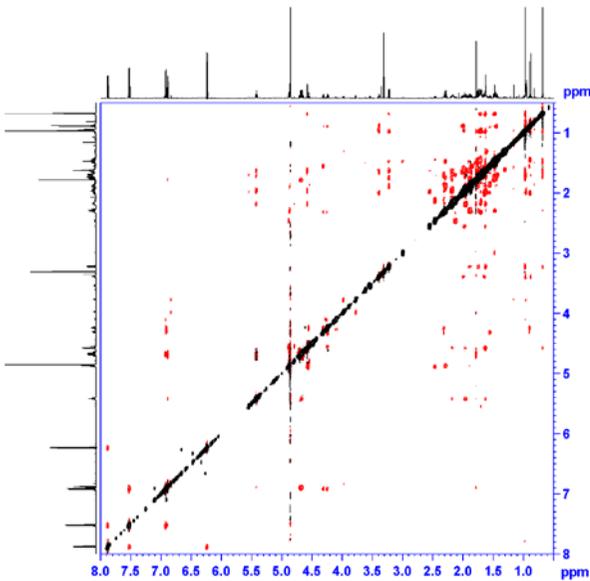


Abbildung XXXVIII: NOESY von Farnesiferol B (VF8) in MeOD