



universität
wien

DIPLOMARBEIT

„Chemische Untersuchungen von *Actinoalloteichus
hymeniacidonis*“

verfasst von

Yasemin Ayyildiz

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Frau Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie bedanken.

Danken möchte ich ebenfalls Dr. Martin Zehl und Ass. Prof. Dr. Hanspeter Kählig vom Institut für Organische Chemie der Universität Wien für die Ermittlung und Interpretation der MS- bzw. NMR Spektren.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Andrea Lubich und ao. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die kompetente fachliche Betreuung. Ich habe mich bei ihnen sehr gut aufgehoben gefühlt, vor allem die Herzlichkeit und die angenehme Atmosphäre werden mir gerne in Erinnerung bleiben.

Meiner Familie möchte ich einen großen Dank für die Ermöglichung des Studiums und für ihre grenzenlose Unterstützung aussprechen. Zuletzt noch ein Dankeschön an alle die mich während meiner Studienzeit begleitet und motiviert haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Marine Organismen	1
1.2 <i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i> sp. nov.	4
2. Material	5
2.1 Ausgangsmaterial	5
2.2 Lösungsmittel und Reagenzien.....	6
3. Methoden	7
3.1 Chromatographische Methoden.....	7
3.1.1 Solid Phase Extraction (SPE).....	7
3.1.2 Flash Chromatographie	8
3.1.3 Säulenchromatographie (SC)	9
3.1.4 Preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	9
3.1.5 Analytische HPLC	10
3.1.6 Dünnschichtchromatographie (DC)	11
3.2 Strukturaufklärung.....	12
3.2.1. Liquid Chromatography – Mass spectrometry (LC-MS).....	12
3.2.2 Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)	13
3.2.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)	13
4. Ergebnisse	14
4.1 Aufarbeitung des AH-XAD-Extraktes	14
4.2 HPLC-Analysen der Sammelfractionen	16
4.2.1 HPLC-Fingerprints der Sammelfractionen und UV-Spektren der Analyten aus dem Gesamtextrakt	18
4.3 Identifizierung der Substanz A	25
4.3.1 Isolierung der Substanz A	25

4.3.2	Strukturaufklärung von Substanz A (= 1-Methylthymin).....	28
4.4	Identifizierung der Substanzen D1 und E aus CF 3.....	31
4.4.1	Isolierung von Substanz E	31
4.4.2	Strukturaufklärung von Substanz E (= Methylparaben)	32
4.4.3	Aufreinigung der Substanz D1.....	35
4.4.4	Strukturaufklärung von Substanz D1 [= Cyclo(Phe-Pro)].....	37
4.5	Identifizierung der Substanz F aus CF 4 (= Daidzein)	39
5.	Diskussion	44
6.	Zusammenfassung.....	47
7.	Abstract.....	48
8.	Literaturverzeichnis	49
	Abbildungsverzeichnis	I
	Tabellenverzeichnis	III
	Curriculum Vitae	IV
	Anhang	V

Abkürzungsverzeichnis

ACN – Acetonitril

AH – *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. (Zhang H. et al., 2006)

CF – Cumulative Fractions (=Sammelfraktionen)

DC – Dünnschichtchromatographie

DCM – Dichlormethan

DDA – Data-Dependent Acquisition

dest. – destilliert

DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

ELSD – Evaporative Light Scattering Detector

ESI – Elektrosprayionisation

EtOH – Ethanol

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

konz. – konzentriert

LC-MS – Liquid Chromatography – Mass spectrometry

MeOD – deuteriertes Methanol

MeOH – Methanol

MP – Methylparaben (=Nipagin)

Phe – Phenylalanin

Pro – Prolin

QS – Quorum Sensing

RP – Reversed Phase (=Umkehrphase)

rpm – rounds per minute (=Umdrehungen per Minute)

Rt – Retentionszeit

SC – Säulenchromatographie

SEC – Size Exclusion Chromatography (= Gel-Permeations-Chromatographie)

SPE – Solid Phase Extraction

TSB – Trypticase Soy Broth

1. Einleitung

1.1 Marine Organismen

Naturstoffe sind ein großes Reservoir für pharmazeutische Leitsubstanzen und neue Wirkstoffe. Viele hochaktive Verbindungen wurden bisher aus Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen isoliert. Eine große Anzahl von neuen Sekundärmetaboliten konnte aus terrestrischen Mikroorganismen gewonnen werden. Derzeit konzentrieren sich Forschungen besonders auf die Ozeane, denn sie machen ca. 70 % der Erdoberfläche aus, weisen eine hohe Biodiversität auf und sind der Ursprung allen Lebens. Es konnte gezeigt werden, dass das Meer eine unerschöpfliche Quelle für neue Mikroorganismen ist (Subramani R. und Aalbersberg W., 2012; Manivasagan P. et al., 2013).

Die meisten Vertreter von marinen Bakterien konnten an der Meeresküste, aus Küstengewässern, Bodensedimenten, Fischen, Mollusken, Schwämmen, Seegras und Mangroven isoliert werden (Manivasagan P. et al., 2014). Durch ihre einzigartige Adaption an die extremen Bedingungen unter Wasser, wie hoher Druck, Temperaturschwankungen, starksaure Konditionen, Lichtmangel, etc. geht man davon aus, dass die dort lebenden Organismen neuartige Substanzen produzieren (Manivasagan P. et al., 2013). Viele dieser marinen Organismen sind immobile, weiche Organismen. Somit fehlt ihnen oft eine physikalische Abwehrfunktion. Sie schützen sich chemisch durch die Produktion von Sekundärmetaboliten gegen Angriffe von Feinden aus ihrer Umgebung. Die Substanzen sollen abschreckend, abwehrend oder abtötend wirken (Ebada S. et al., 2008).

Die Forschung unterstützt derzeit die Hypothese, dass marine Bakterien neue Arten von Sekundärmetaboliten produzieren, darunter vor allem die Ordnung Actinomycetales (Manivasagan P. et al., 2014). Marine Actinobakterien haben andere Eigenschaften als terrestrische Vertreter und produzieren offensichtlich auch andere Sekundärmetaboliten (Manivasagan P. et al., 2013). Obwohl die Erforschung von marinen Actinomyceten noch am Anfang steht, konnten in den letzten Jahren einige einzigartige Substanzen isoliert werden. Polyketide wie Daryamid mit zytotoxischer Aktivität aus *Streptomyces*-Stämmen, Abyssomiyin C mit antibakteriellen Eigenschaften aus *Verrucosispora*, Salinosporamid A, ein Proteasom-Inhibitor mit zytotoxischer Wirkung aus *Salinispora*; weiters Peptide, wie Mechercharmycin A mit zytotoxischen Effekten aus *Thermoactinomyces sp.* oder Alkaloide,

wie Lodopyridon aus *Saccharomonospora sp.* mit Antitumoraktivität u.v.m. konnten gewonnen werden (Subramani R. und Aalbersberg W., 2012; Manivasagan P. et al., 2014).

Unter den Actinobakterien ist der Stamm *Streptomyces* am bedeutendsten, da aus ihm eine große Vielzahl von Sekundärmetaboliten isoliert werden konnte (Manivasagan P. et al., 2014). Von den derzeit bekannten mikrobiellen Metaboliten wurden zwei Drittel aus unterschiedlichen Actinomyceten isoliert, 75 % dieser Substanzen aus *Streptomyces*-Stämmen und 25 % aus seltenen Actinomyceten. Die seltenen Actinomyceten, wie u.a. *Actinoalloteichus hymeniacidonis sp. nov.*, sollen neuartige, einzigartige und teilweise hochkomplexe Substanzen produzieren, die häufig biologische Aktivität bei geringer Toxizität zeigen (Manivasagan P. et al., 2013; Kurtböke D. I., 2012).

Ein wichtiger Lebensraum für seltene Actinomyceten sind vor allem marine Schwämme. Die gezielte Isolierung dieser Actinomyceten könnte eine Option für die Auffindung von neuen Leitstrukturen sein. Die Anzahl der neu entdeckten Spezies aus marinen Schwämmen wächst stetig. Unter diesen seltenen Stämmen befindet sich u.a. auch *Actinoalloteichus hymeniacidonis sp. nov.* (Abdelmohsen U. R. et al., 2014). Wie in Abbildung 1 (S. 3) zu sehen ist, stammen 58 % der Naturstoffe, die aus marinen Actinobakterien isoliert wurden, von solchen, die mit Schwämmen zusammenleben (Valliappan K. et al., 2014).

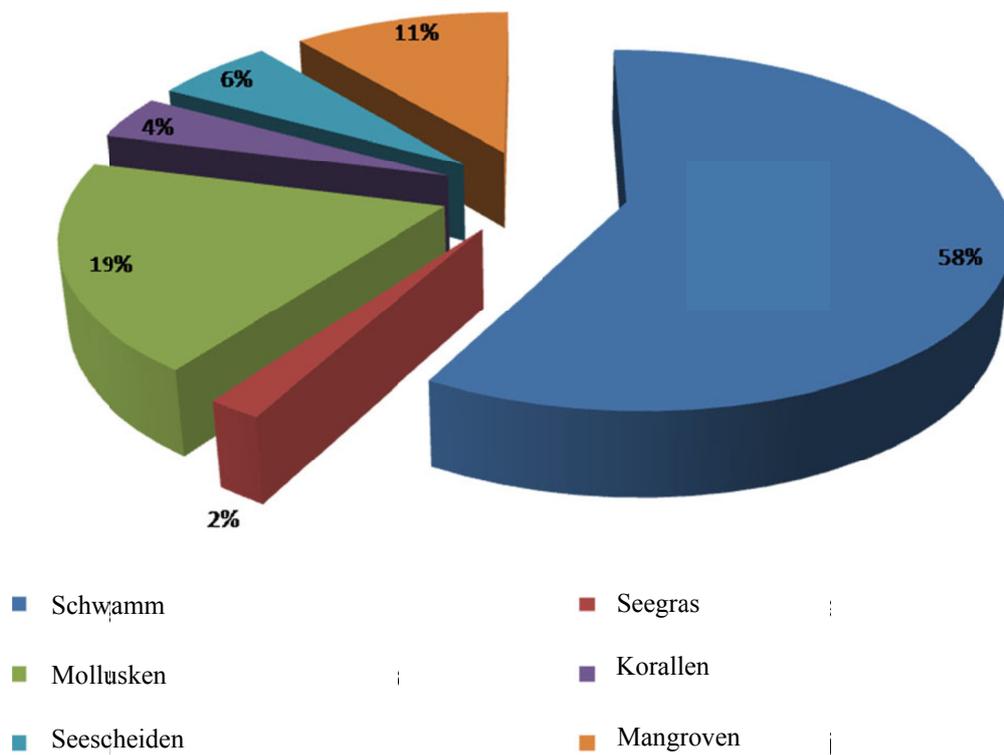


Abbildung 1: Verteilung der Naturstoffe aus Actinobakterien, die mit marinen Organismen assoziiert sind (Valliappan K. et al., 2014)

1.2 *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov.

Actinoalloteichus hymeniacidonis sp. nov., ein Actinomycete, der erstmals von Zhang H. et al. (2006) beschrieben wurde, konnte aus dem marinen Schwamm *Hymeniacidon perleve* isoliert werden.

Actinoalloteichus hymeniacidonis ist ein gram-positiver, aerober Stamm, der grau-schwarz verzweigte, nicht-fragmentierte vegetative Hyphen formt (Abbildung 2) und schwarze Pigmente produziert. Für die Kultivierung haben sich Trypticase Soy Broth (TSB) bei 28 °C oder ein Hefe-/Malzextrakt Agar bewährt (Zhang H. et al., 2006). Bisher ist über die Sekundärmetaboliten dieses Stammes wenig bekannt.

Neben *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. gibt es drei weitere Stämme die zu dieser Art gehören: *Actinoalloteichus cyanogriseus* (Tamura T. et al., 2000), *Actinoalloteichus spitiensis* (Singula A. K. et al., 2005) und *Actinoalloteichus nanshanensis* (Xiang W. et al., 2011). Da sie sich jedoch sowohl im Geno- als auch im Phänotyp unterscheiden, wurde eine neue Spezies eingeführt (Zhang H. et al., 2006).

Actinoalloteichus hymeniacidonis sp. nov. wurde aufgrund folgender Kriterien für die Untersuchung in einer Dissertation (Lubich A., in Vorbereitung) und in der vorliegenden Diplomarbeit ausgewählt: (1) die Sekundärmetaboliten wurden bisher kaum untersucht, (2) er ist nicht pathogen, (3) gut charakterisiert und (4) kommerziell erhältlich.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung der sekundären Metaboliten von *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. und deren Strukturaufklärung.

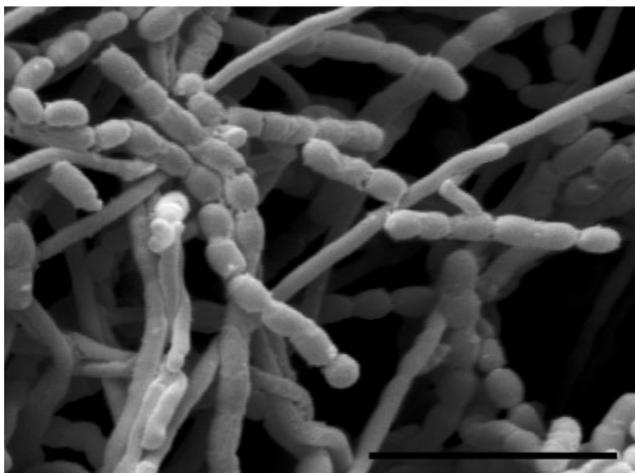


Abbildung 2: Elektronen-mikroskopische Aufnahme von AH, kultiviert auf Hefe-/Malzextrakt Agar für 14 Tage bei 28 °C (Zhang H. et al., 2006)

2. Material

2.1 Ausgangsmaterial

Der Stamm *Actinoalloteichus hymeniacidonis* wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Das Bakterium wurde bereits im Rahmen einer Dissertation (Lubich A., in Vorbereitung), in fünfmal 1 L Trypticase Soy Broth (TSB) Medium in 2 L – Schikanekolben entsprechend den Empfehlungen des DSMZ kultiviert. Das Wachstum wurde in regelmäßigen Abständen anhand der optischen Dichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Am Ende der stationären Wachstumsphase wurde geerntet, da hier die Produktion der Sekundärmetaboliten am größten ist (Subramani R. und Aalbersberg W., 2012). Die Reinheit der fünf Großkulturen wurde jeweils durch Ausstriche auf TSB-Agarplatten kontrolliert.

Die Kulturen wurden nach 19 Tagen zentrifugiert (10000 rpm, 15 min). Der Überstand wurde mit Amberlite XAD-16 (2x30 g/L) für 8 Tage auf einem Schüttler inkubiert, um die Sekundärmetaboliten von AH zu adsorbieren. Nach Filtration wurde das Amberlite XAD-16 mit jeweils 2x500 ml Aceton auf einen Schüttler (130 rpm) extrahiert. Alle fünf Ansätze wurden vereinigt, das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet. Für die vorliegende Arbeit standen 7,26 g lyophilisierter AH-XAD-Extrakt zur Verfügung. Abbildung 3 stellt die Herstellung des AH-XAD-Extraktes dar.



Abbildung 3: Ablauf der Extrahierung

(1) Inkubation von Amberlite XAD-16 mit dem Überstand; (2) Abnutschen von Amberlite XAD-16; (3) getrockneter AH-XAD-Extrakt

(Fotos 1 und 2 von A. Lubich zur Verfügung gestellt)

2.2 Lösungsmittel und Reagenzien

Alle Lösungsmittel wurden in Arzneibuch-Qualität bezogen, destilliertes Wasser wurde mit einer laboreigenen Destillationsapparatur hergestellt. Die Lösungsmittel Acetonitril und MeOH für die HPLC-Analysen wurden im HPLC grade verwendet.

CASO Bouillon (= Trypticase Soy Broth) wurde von Carl Roth GmbH und Co (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Zusammensetzung des Mediums: Trypticase Soy Broth 30.0 g, 1000.0 ml destilliertes Wasser (pH = 7,3), zusätzlich 15.0 g Agar für Platten. TSB wurde bei 121 °C und 2 bar für 40 min autoklaviert.

Folgende Adsorbentien und Vergleichssubstanzen wurden eingesetzt: Sephadex[®] LH 20 (Sigma, Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland), Amberlite-XAD-16 (Sigma), Kieselgel silanisiert (Merck, Darmstadt, Deutschland), Daidzein (Sigma) und Nipagin (Dr. Kolassa Arzneimittel, Wien, Österreich).

3. Methoden

3.1 Chromatographische Methoden

Für die Reindarstellung der Sekundärmetaboliten und für die Analysen zur Identifizierung wurden verschiedene chromatographische Techniken eingesetzt.

3.1.1 Solid Phase Extraction (SPE)

Zur Grobfractionierung des Gesamtextraktes AH-XAD wurden die in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen angewendet. Es wurden zweimal 500 mg des Extraktes aufgetrennt.

Tabelle 1: Bedingungen für SPE 1

Kartusche	Mega Bond Elut C18, 10GM, 60 ml
Mobile Phase	Wasser/Methanol; Ameisensäure
Gradient	0 %, 5 %, 10 % MeOH, dann in 10% Schritten bis 100 % MeOH 0,1 % Ameisensäure
Fraktionen pro Konzentration	3
Fraktionsvolumen	50 ml

In ähnlicher Weise wurden 500 mg des lyophilisierten Mediums behandelt (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Bedingungen für SPE 2 (Medium-Fraktionierung)

Kartusche	SPE Bond Elut C18, 10 GM, 60 ml
Mobile Phase	Wasser/Methanol - Mischungen
Gradient	0 %, 5 %, 10 % MeOH, dann in 10 % Schritten bis 100 % MeOH
Fraktionsvolumina	1. Wasserfraktion 50 ml 2. Wasserfraktion 100 ml jede weitere Fraktion 150 ml/ MeOH-Gehalt

Die Fraktionen von SPE 1 und 2 wurden mittels HPLC analysiert, um festzustellen, welche Komponenten im Gesamtextrakt AH-XAD aus dem Medium stammen könnten.

3.1.2 Flash Chromatographie

Im Laufe der Isolierung erwiesen sich die Ausbeuten an Sekundärmetaboliten als zu gering für die Strukturklärung. Daher erfolgte die Fraktionierung einer größeren Menge von Gesamtextrakt AH-XAD mit Hilfe der Flash Chromatographie. Die Auftrennung erfolgte auf einer PuriFlash 4250 Anlage (Interchim, Montulçon, Frankreich) mit ELSD.

Tabelle 3: Bedingungen für die Flash-Chromatographie

Dryload	Verreibung von 2,5 g AH-XAD-Gesamtextrakt mit 3 g stationärer Phase
Trennsäule	PF-DLE/40G PuriFlash Dry Load Column, 75 ml, 27 x 130 mm
Stationäre Phase	RP-C18 (Kieselgel silanisiert, Korngröße 0,065 – 0,2 mm; Merck, Darmstadt, Deutschland)
Mobile Phase	Wasser/MeOH - Mischungen
Equilibrierung	10 min
Gradient	je 10 min bei 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 und 100 % MeOH
Flussrate	26 ml/min
Fraktionsvolumina	200 – 260 ml
Detektion	205 nm, 254 nm, Scan 200 – 600 nm

Insgesamt wurden ca. 2,5 g des AH-XAD-Gesamtextraktes in sechs Durchgängen fraktioniert, wobei im ersten Durchgang als Vorversuch nur 100 mg AH-XAD-Gesamtextrakt aufgetrennt wurden und in allen weiteren Durchgängen jeweils ca. 500 mg. Die Eluate aller Fraktionierungen mit denselben MeOH-Gehalten wurden vereinigt und mit der HPLC auf die, in den SPE-Fractionen bereits definierten Substanzen, analysiert.

3.1.3 Säulenchromatographie (SC)

Die einzelnen Sammelfractionen aus der Grobfractionierung wurden mittels Sephadex[®] Säulen nach dem Prinzip der Size Exclusion Chromatography (SEC) weiter aufgereinigt.

Als stationäre Phase diente Sephadex[®] LH 20 Material (Sigma). Als mobile Phase wurde destilliertes Wasser verwendet. Die Säulen waren generell 50 cm lang und hatten einen Durchmesser von 1 cm. Nur bei der Auftrennung von Fraktion CF 1_Flash wurde eine Säule mit 2 cm Durchmesser verwendet, da eine größere Menge aufgetragen wurde. In Abhängigkeit des jeweiligen Trennungsproblems wurden die Fraktionen im Abstand von 2,5 – 10 min mit Hilfe eines automatischen Fraktionensammlers aufgefangen. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 3 – 5 ml/5 min. Es wurden je nach Trennungsproblem 46 – 180 Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels HPLC und DC analysiert.

3.1.4 Preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die präparative HPLC wurde zur Isolierung der Substanz A aus Fraktion CF 1.1 verwendet.

Tabelle 4: HPLC-Gerät

Pumpe	Shimadzu LC 8A preparative liquid chromatograph
Autoinjector	Shimadzu SIL-AD _{VP} auto sampler
Controller	Shimadzu CBM-20A prominence communication bus module
Detektor	Shimadzu SPD-M20A prominence diode array detector

Tabelle 5: Bedingungen zur Isolierung der Substanz A aus Fraktion CF 1.1

Stationäre Phase	LiChrospher [®] , 250 x 25 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) Porengröße 5 µm
Mobile Phase	A = dest. Wasser und B = ACN
Gradient	1 – 12,5 % B in 25 min
Equilibrierung	15 min
Durchflussrate	15,5 ml/min
Injektionsvolumen	500 µl
Detektion	254 nm, 272 nm

Es waren 9 Läufe nötig, um die gesamte Menge von CF 1.1 zu injizieren. Bei jedem Lauf wurde der Peak mit der Retentionszeit (Rt) 22,5 min aufgefangen. Die Eluate wurden vereinigt und lyophilisiert. Die Reinheit Substanz A wurde mittels HPLC und dünnschichtchromatographisch untersucht.

3.1.5 Analytische HPLC

Um einzelne Fraktionen und das Medium zu analysieren, wurden sie mit der HPLC untersucht.

Tabelle 6: HPLC-Gerät

Entgaser	Shimadzu DGU-20A ₅ prominence degasser
Pumpe	Shimadzu LC-20AD prominence liquid chromatograph
Autosampler	Shimadzu SIL-20AC prominence autosampler
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 7: Bedingungen für die HPLC-Analysen

Trennsäulen	Atlantis T3, 3.0 x 150 mm (Waters, Milford, USA) Porengröße 3 µm oder LiChrospher [®] , 250 x 4.0 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) Porengröße 5 µm
Mobile Phase	A = dest. Wasser und B = ACN
Gradient	siehe Abbildung der entsprechenden HPLC-Analysen; für Fraktionen der Flash-Chromatographie s. Tabelle 8, S. 11
Equilibrierung	10 min
Purge	10 min (bei 95 % B-Eluent)
Durchflussrate	0,75 ml/min bzw. 0,4 ml/min
Temperatur	25°C
Injektionsvolumen	10 µl
Detektion	205 nm, 254 nm bzw. ELSD

Tabelle 8: Gradient für die HPLC-Analyse der Fraktionen der Flash-Chromatographie

Minute	B-Eluent
0 – 40	0 – 40 %

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Tabelle 9: Bedingungen für den HPLC-Vergleich von Methylparaben und Substanz E

Trennsäule	LiChrospher [®] , 250 x 4.0 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) Porengröße 5 µm
Mobile Phase	A = 0,1 % CH ₃ COOH in dest. Wasser B = 0,1 % CH ₃ COOH in MeOH
Gradient	50 – 65 % B in 15 min
Equilibrierung	10 min
Purge	10 min (bei 95 % B-Eluent)
Durchflussrate	0,4 ml/min
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	5 µl Methylparaben (0,5 µg/ml) 10 µl Substanz E (gelöst in MeOH)
Detektion	254 nm

3.1.6 Dünnschichtchromatographie (DC)

Tabelle 10: DC-Bedingungen

Stationäre Phase	Kieselgel 60 F ₂₅₄ auf Alufolie (Merck)
Mobile Phase	Chloroform : MeOH : Wasser (60 + 40 + 10)
Laufstrecke	8 cm
Auswertung	Fluoreszenzlösung bei 254 nm

Zur Überprüfung der Reinheit von Substanz A wurden die Folien zusätzlich mit 50 % H₂SO₄ in Ethanol besprüht und nach 1 min bei 100 °C im Trockenschrank bei 254 nm und 366 nm ausgewertet.

3.2 Strukturaufklärung

3.2.1. Liquid Chromatography – Mass spectrometry (LC-MS)

Die molaren Massen der isolierten Substanzen wurden mittels LC-MS ermittelt. Die Messungen wurden mit einem UltiMate 3000 Rapid Separation LC System (Fa. Dionex, Germering, Deutschland), das an ein 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT; Fa. Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) gekoppelt ist, durchgeführt. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrosprayionisation.

Tabelle 11: LC-MS Gerät

Gerät	UltiMate 3000 Rapid Separation LC System
Controller	UltiMate 3000 Dionex
Pump	UltiMate 3000 RS Dionex Autosampler
Autosampler	UltiMate 3000 RS Dionex Pump
Ofen	UltiMate 3000 RS Dionex column compartment
Detektor	UltiMate 3000 RS Dionex Dioden Array Detector 190 – 400 nm

Tabelle 12: Methodenparameter für LC-MS-Messungen

Ionenmodus	Positivionen-Modus mit automatischen DDA
Ionisation	ESI
Temperatur des Trocknungsgases	340 °C
Fluss des Trocknungsgases	9.0 ml/min N ₂
Vernebler	26.0 N ₂
Kapillarspannung	3700 V
Kollisionsgas	Helium
Trennsäule	LiChrospher [®] , 250 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) Porengröße 5 µm
Mobile Phase	A = dest. Wasser und B = ACN
Temperatur	25 °C
Durchflussrate	0,4 ml/min
Gradient	siehe Abb. der entsprechenden LC-MS-Analysen
Injektionsvolumen	10 µl

3.2.2 Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Das HR-MS wurde zur Ermittlung der Summenformeln und der Fragmentierungsmuster der Substanzen verwendet.

Mit dem Massenspektrometer maXis HD ESI-Qq-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) wurden die Messungen durchgeführt. Die Probenlösungen wurden mit einer Flussrate von 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ direkt in die ESI-Quelle infundiert.

Tabelle 13: Methodenparameter für HR-MS Messungen

Kapillarspannung	2.0 – 4.0 kV
Vernebelungsgas	0,4 bar (N_2)
Trockengasfluss	4,0 L/min
Trockengastemperatur	200 °C
Messbereich	50 – 1550 m/z

Die Summenformeln wurden mit dem Programm Bruker Compass Data Analysis 4.2 ermittelt, basierend auf einer Massengenauigkeit von $\Delta\text{-m/z} \leq 2$ ppm und einem Isotopenmustervergleich.

3.2.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Messungen wurden auf einem Avance III HD 700 MHz NMR-Spektrometer (Firma Bruker, BioSpin, Rheinstetten, Deutschland) mit einem Breitband-Observe-Probenkopf bei einer Frequenz von 700,40 MHz für ^1H und 176,12 MHz für ^{13}C durchgeführt.

Lösungsmittel: MeOH-d_4

Es wurden 1D- (^1H -NMR, ^{13}C -NMR) und gradient enhanced 2D-Experimente (NOESY, HSQC, HMBC) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Aufarbeitung des AH-XAD-Extraktes

Um die Sekundärmetaboliten des AH-XAD-Gesamtextraktes zu isolieren bzw. identifizieren, war eine Auftrennung des Extraktes in weniger komplex zusammengesetzte Fraktionen nötig. Dazu wurden 2 x ca. 500 mg Extrakt in destilliertem Wasser gelöst, auf eine SPE Kartusche aufgebracht und anschließend fraktioniert (s. Tabelle 1, S. 7)

Die mittels SPE erhaltenen Fraktionen wurden mit der HPLC analysiert (s. Tabelle 6 und 7, S. 10) und die Fingerprints der einzelnen Fraktionen miteinander verglichen. Fraktionen mit übereinstimmenden Fingerprints wurden zu 11 Sammelfraktionen vereinigt.

Aus einer Dissertation (Lubich A., in Vorbereitung) waren bereits 500 mg dieses Extraktes über eine SPE fraktioniert worden. Diese Fraktionen (CF 1_L – CF7_L) wurden ebenfalls mit der HPLC untersucht und anhand ihrer Fingerprints mit den 11 Sammelfraktionen vereinigt (s. Tabelle 14, S. 15).

Insgesamt wurden 1,5 g des AH-XAD-Extraktes über SPE fraktioniert und die gewonnenen Sammelfraktionen für weitere Isolierungen herangezogen.

Tabelle 14: Sammelfractionen der SPE

Sammelfraktion	Elutionsmittel	zugefügte Fraktion¹	Ausbeute
CF 1	dest. Wasser (1)	---	374,9 mg
CF 2	dest. Wasser (2 und 3) 5 % MeOH (1 – 3)	CF 1_L	452,4 mg
CF 3	10 % MeOH (1 – 3) 20 % MeOH (1 und 2)	CF2_L	104,8 mg
CF 4	20 % MeOH (3) 30 % MeOH (1 – 3) 40 % MeOH (1)	CF 3_L	54,6 mg
CF 5	---	CF 4_L	9,6 mg
CF 6	40 % MeOH (2 und 3) 50 % MeOH (1)	---	23,2 mg
CF 7	50 % MeOH (2 und 3)	CF 5_L	14,7 mg
CF 8	---	CF 6_L und CF 7_L	56,4 mg
CF 9	60 % MeOH (1 und 2)	---	11,0 mg
CF 10	60 % MeOH (3) 70 % MeOH (1 – 3) 80 % MeOH (1 und 2)	---	54,0 mg
CF 11	80 % MeOH (3) 90 % MeOH (1 – 3) 100 % MeOH (1 – 3) 0,01 % Ameisensäure (1 – 3)	---	23,4 mg

¹SPE-Fractionen des AH-XAD-Gesamtexttraktes aus vorangegangener Auftrennung (Lubich A., in Vorbereitung)

4.2 HPLC-Analysen der Sammelfractionen

Mittels HPLC wurde das AH-XAD-Gesamtextrakt mit dem Medium (TSB) verglichen. Das AH-XAD-Gesamtextrakt wurde in einer Konzentration von 20 µg/ml und das Medium (TSB) in einer Konz. von 100 µg/ml injiziert. Zur Differenzierung wurden die UV-Spektren und die Retentionszeiten der Peaks herangezogen. Die einzelnen Sammelfractionen CF 1 – 11 wurden ebenfalls mit dem Medium verglichen. Wie in Abbildung 4 zu sehen, konnten im Gesamtextrakt einige Substanzen detektiert werden, die nicht aus dem Medium stammen. Weitere Substanzen waren in den einzelnen Sammelfractionen enthalten.

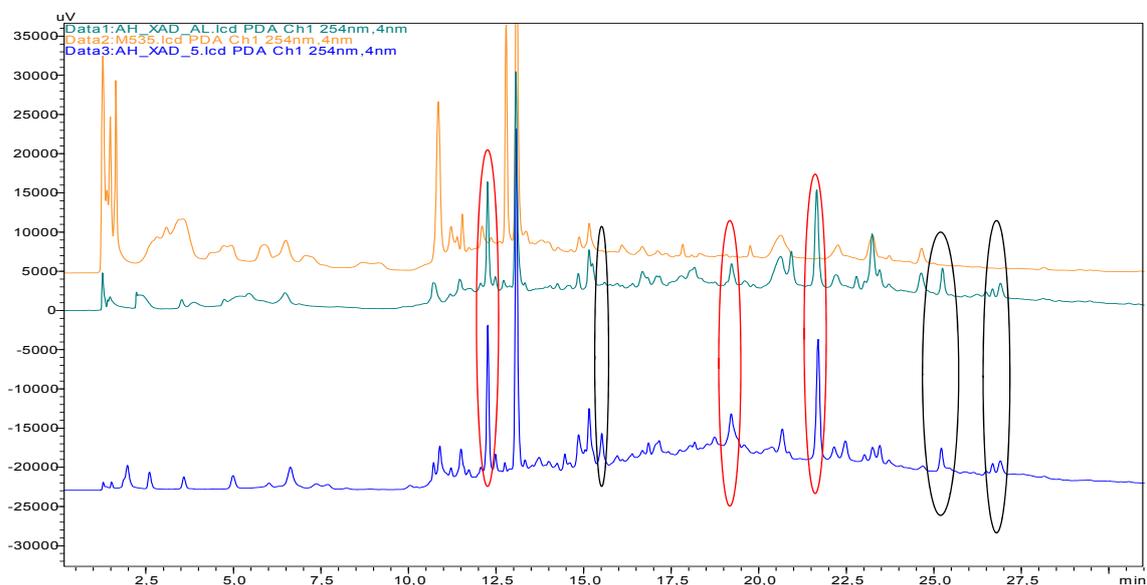


Abbildung 4: Chromatogramme von AH-XAD (blau; 5 und 10 µl) und dem Medium (orange)

Bedingungen s. Tabelle 7, S. 10

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Gradient: 0 % ACN isokratisch für 5 min, 0 % – 95 % ACN in 42,5 min

Die markierten Peaks sind Substanzen, die ausschließlich im Gesamtextrakt detektiert wurden. Die rot markierten sind jene, die im weiteren Verlauf näher untersucht wurden.

In Summe konnten elf Substanzen detektiert werden (s. Tabelle 15, S. 17), die aus dem AH-XAD-Extrakt stammten. Davon wurden acht Peaks mittels HPLC gewonnen (Abbildung 5-16, S. 18-23) und im Anschluss mittels HR-MS im Positivionen-Modus untersucht.

Tabelle 15: detektierte Substanzen in Sammelfractionen CF 1 – 11

Fraktionen	Anzahl der Substanzen	Weitere Bearbeitung
CF 1	1	HR-MS
CF 2	2	HR-MS
CF 3	2	HR-MS
CF 4	1	HR-MS
CF 5	2	---
CF 6	1	---
CF 7	1	HR-MS
CF 8	---	---
CF 9	1	HR-MS
CF 10	---	---
CF 11	---	---

Wie Tabelle 15 zu entnehmen ist, wurden die drei Substanzen aus den Fraktionen CF 5 und CF 6 nicht weiter bearbeitet, da nicht genügend Material zur Verfügung stand (s. Tabelle 14, S. 15), um weitere Analysen oder Isolierungen durchführen zu können.

In den Fraktionen CF 8, 10 und CF 11 waren keine Substanzen aus dem Gesamtextrakt erkennbar und sie wurden daher ebenfalls nicht weiter bearbeitet.

CF 1 – CF 4, CF 7 und CF 9 wurden mittels HR-MS genauer untersucht.

4.2.1 HPLC-Fingerprints der Sammelfractionen und UV-Spektren der Analyten aus dem Gesamtextrakt

CF 1:

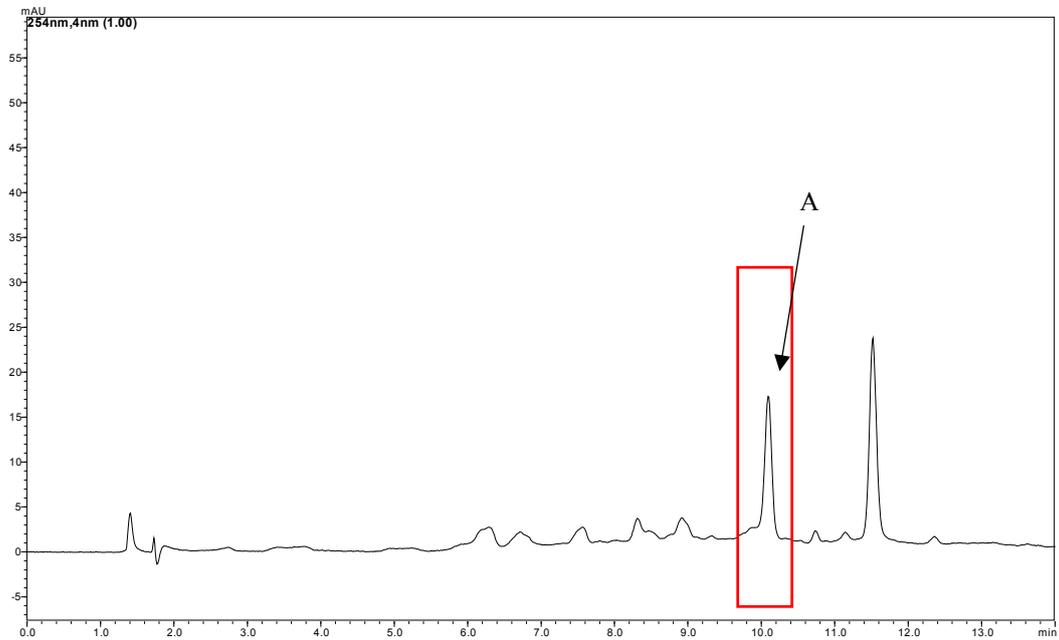


Abbildung 5: HPLC-Chromatogramm von CF 1 bei 254 nm

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Gradient: 0 % – 11 % ACN in 11 min

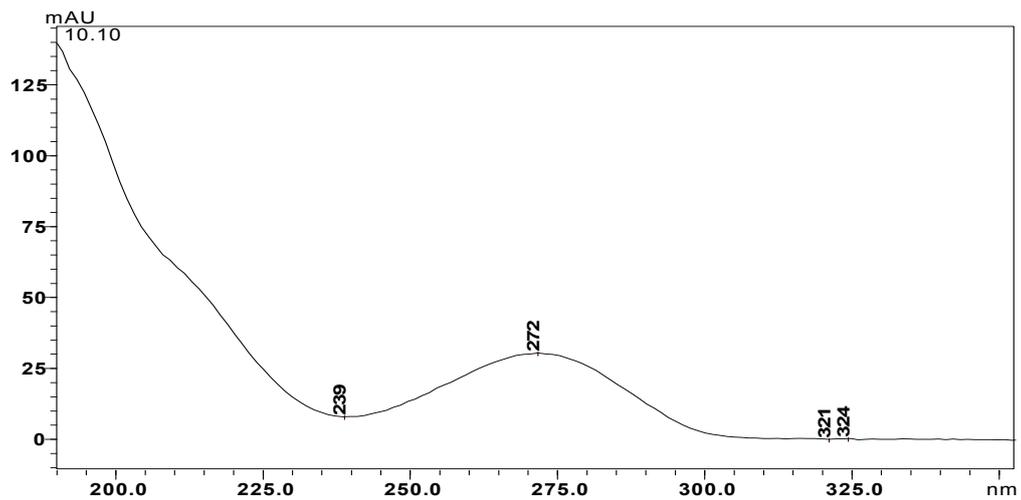


Abbildung 6: UV-Spektrum von Substanz A

CF 2:

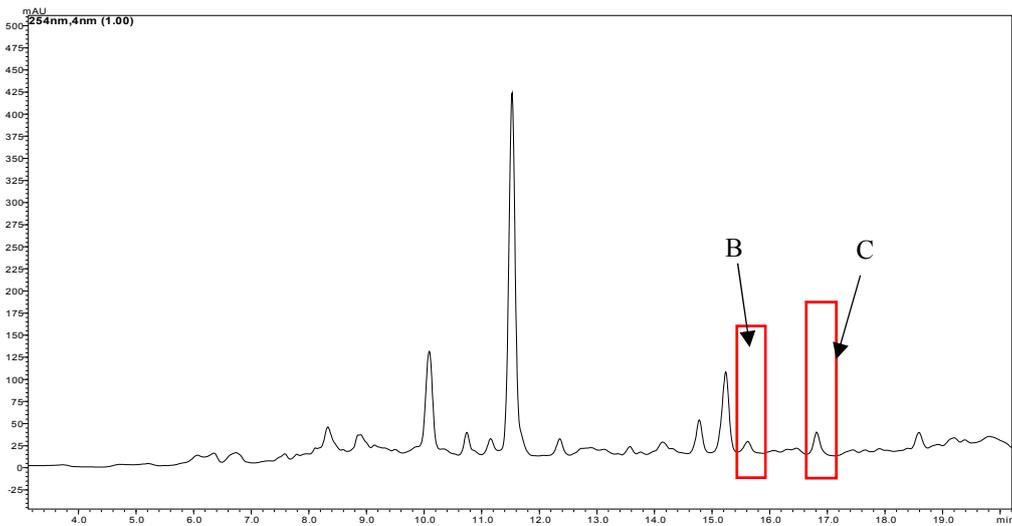


Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm von CF 2 bei 254 nm

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Gradient: 0 % – 20 % ACN in 20 min

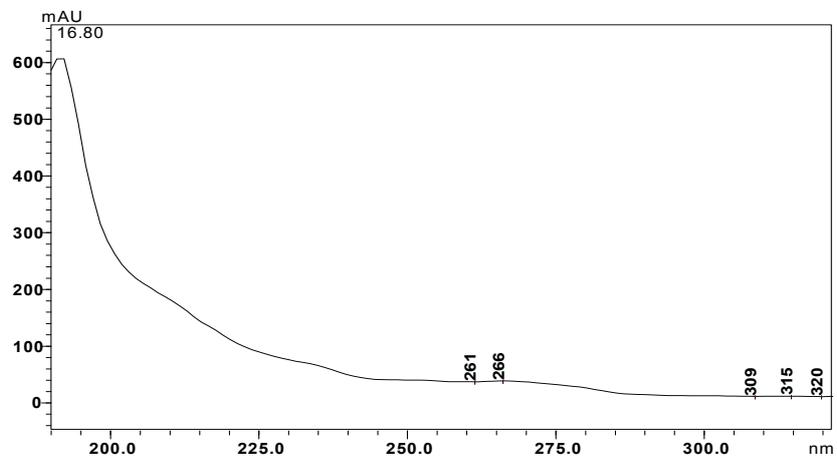
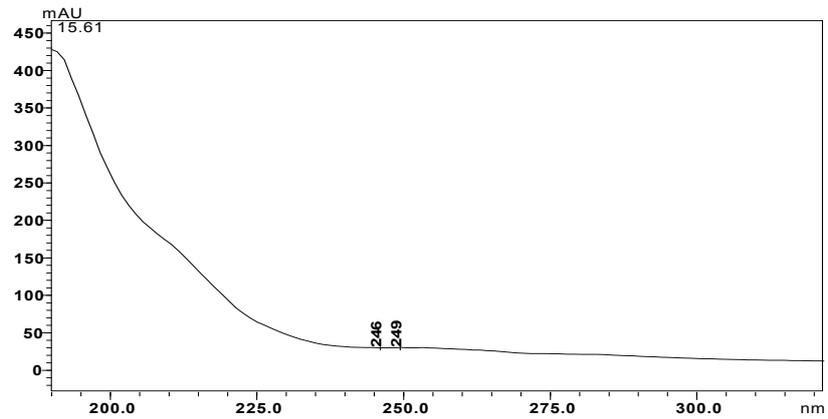


Abbildung 8: UV-Spektren von Substanz B (oben) und C (unten)

CF 3:

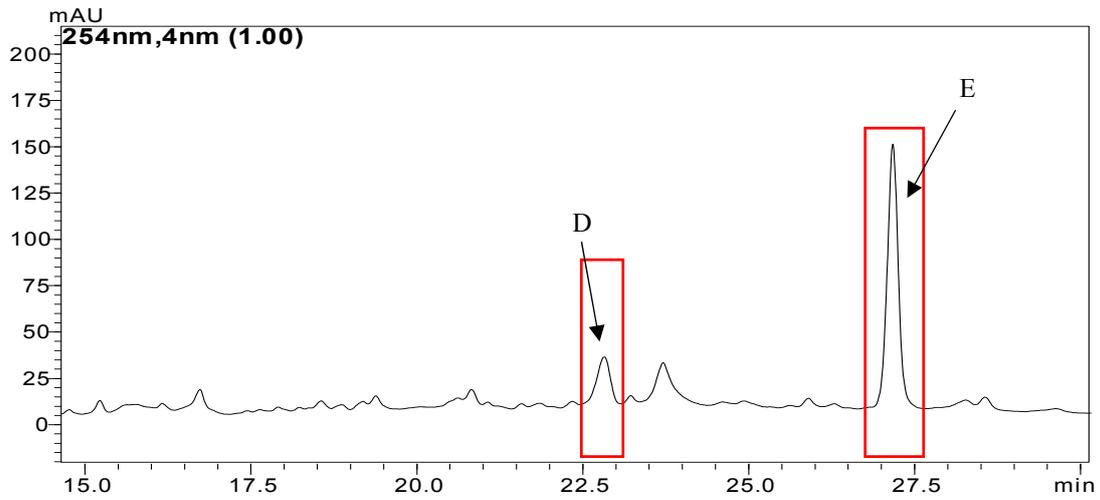


Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm von CF 3 bei 254 nm

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Gradient: 0 % – 30 % ACN in 30 min

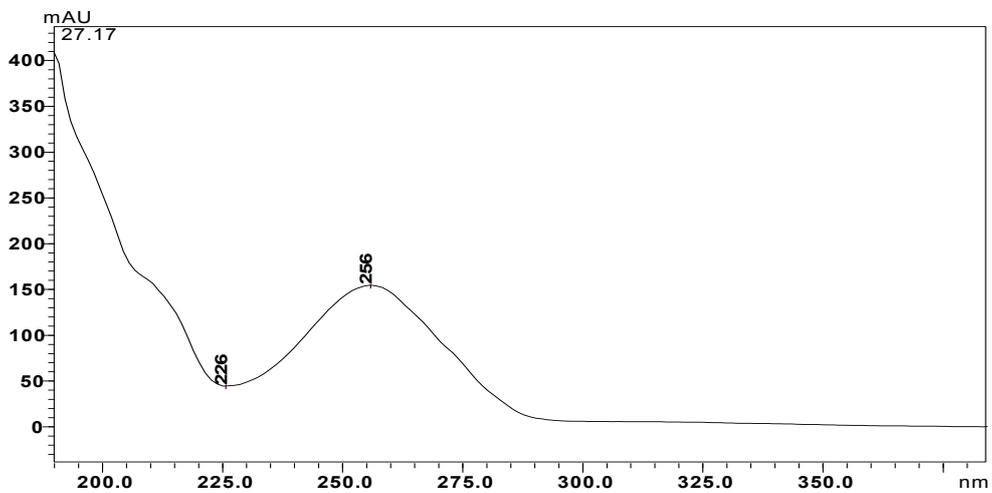
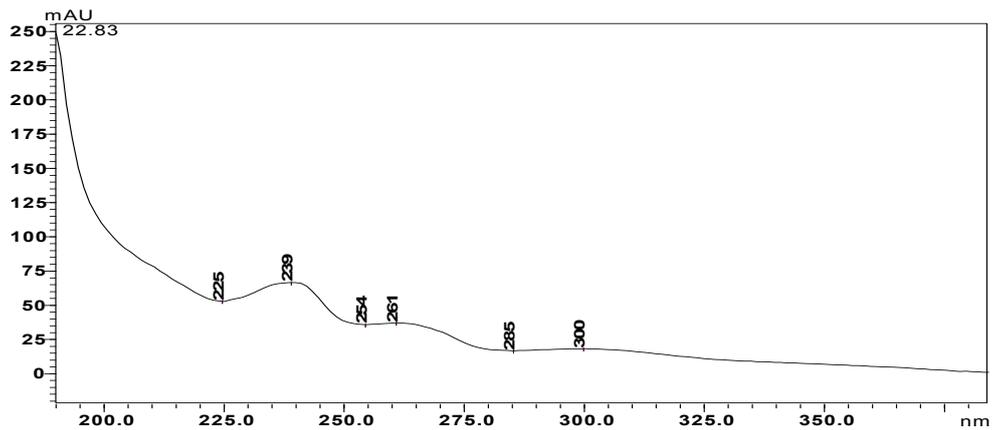


Abbildung 10: UV-Spektren von Substanz D (oben) und E (unten)

CF 4:

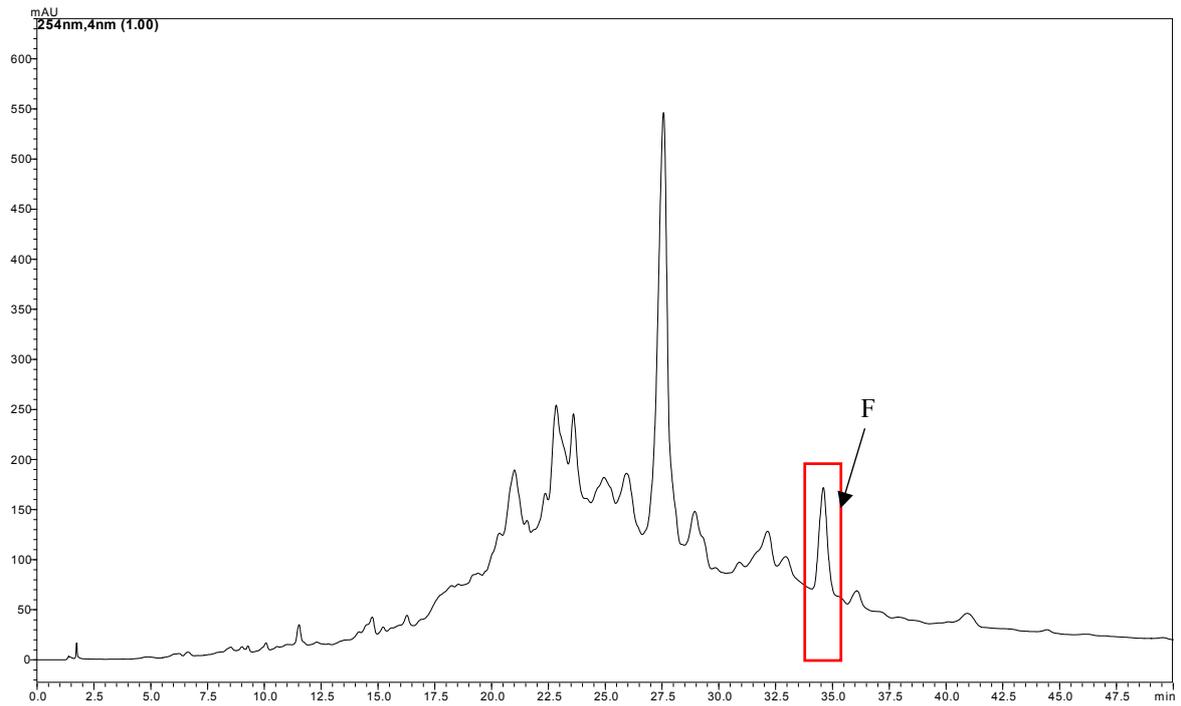


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm von CF 4 bei 254 nm

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Gradient: 0 % – 20 % ACN in 20 min, 20 % – 40 % ACN in 40 min

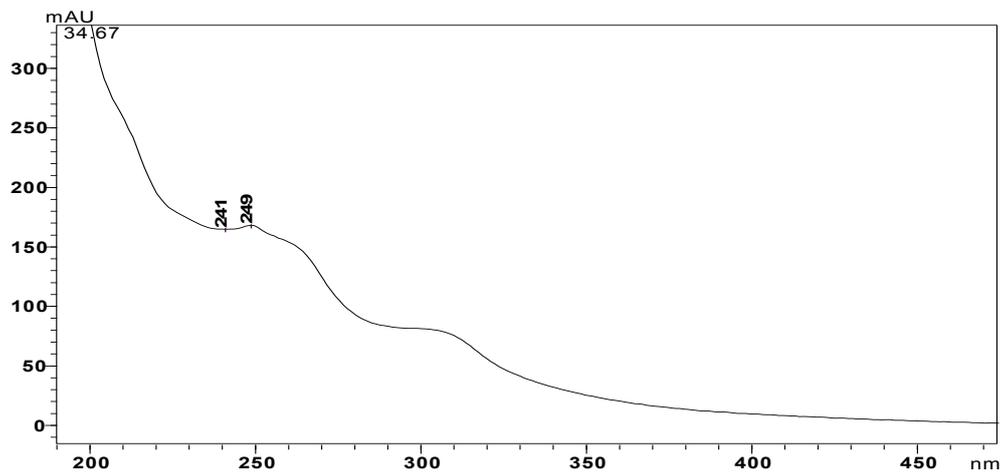


Abbildung 12: UV-Spektrum von Substanz F

CF 7:

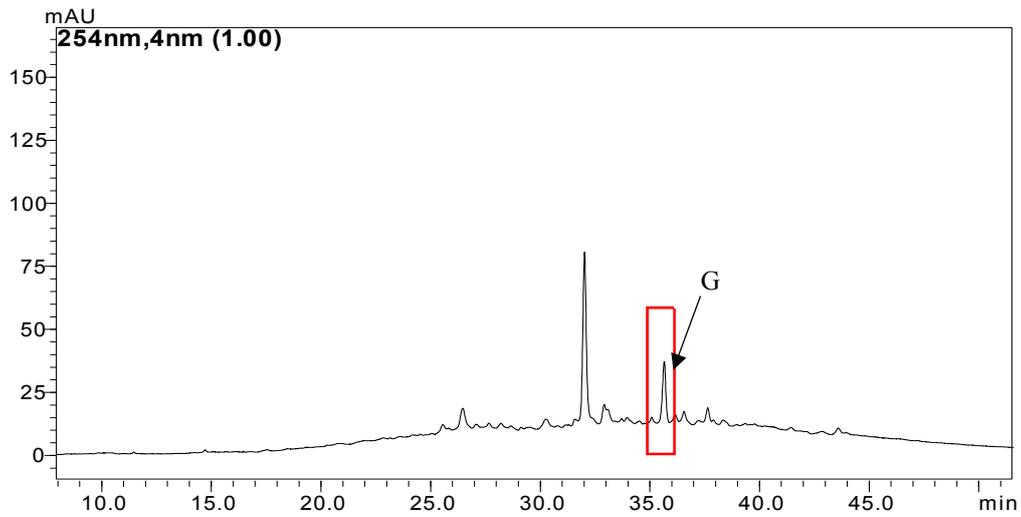


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm von CF 7 bei 254 nm

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Gradient: 0 % – 40 % ACN in 40 min

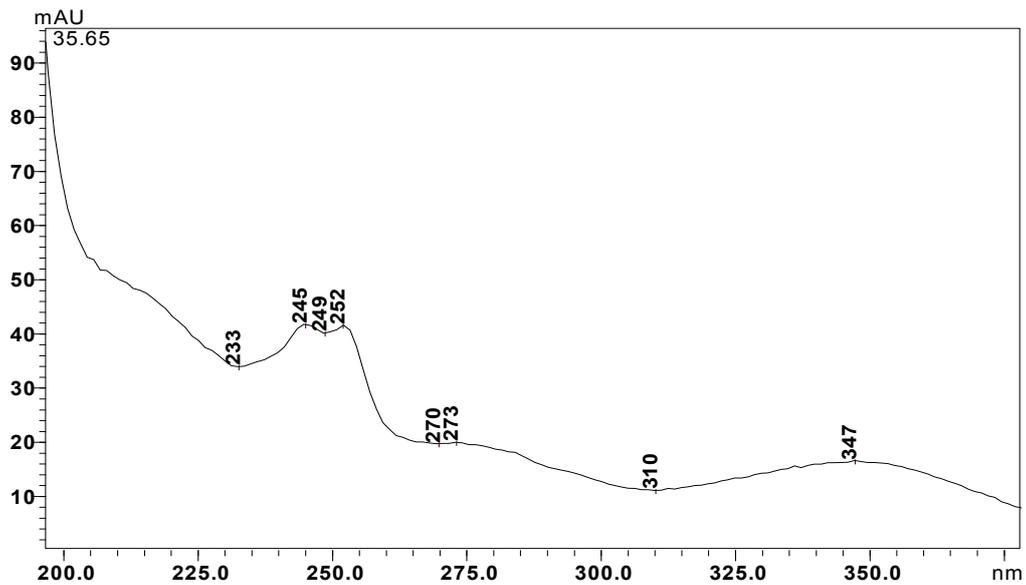


Abbildung 14: UV-Spektrum von Substanz G

CF 9:

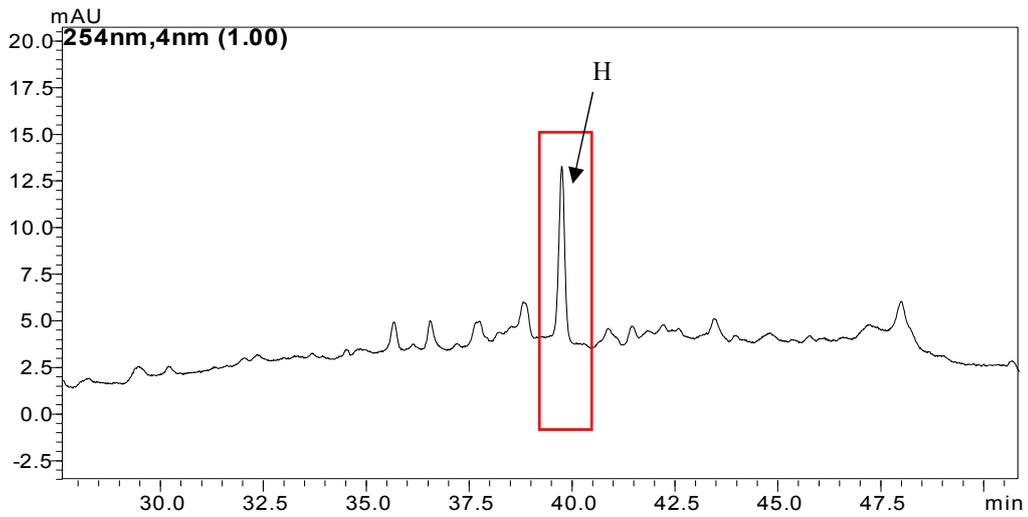


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm von CF 9 bei 254 nm

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Gradient: 0 % – 60 % ACN in 60 min

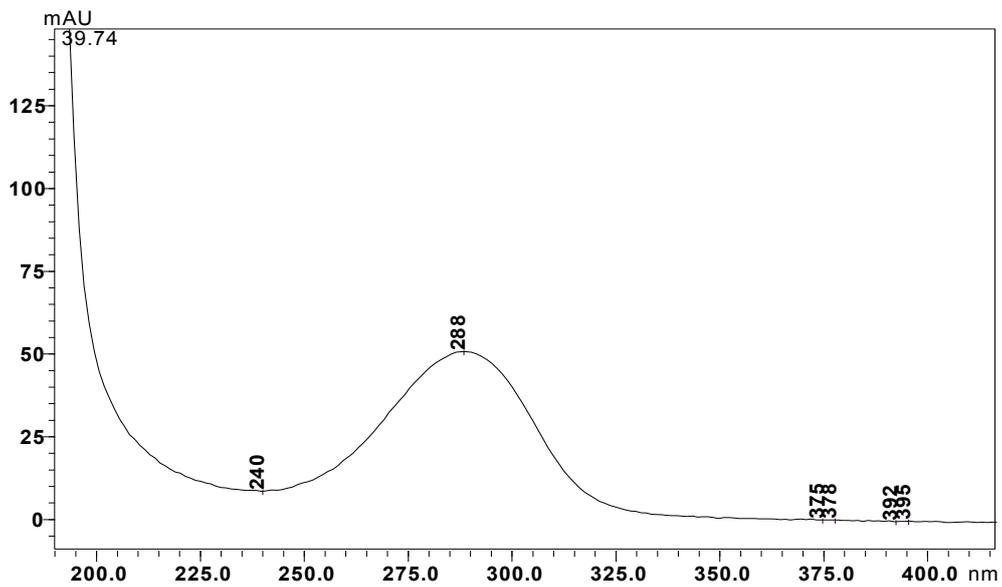


Abbildung 16: UV-Spektrum von Substanz H

Tabelle 16: weitere Bearbeitung der analysierten Sammelfractionen

Fractionen	Anzahl der detektierten Substanzen	Weitere Bearbeitung
CF 1	1	SC an Sephadex [®] LH 20, S. 25
CF 2	2	---
CF 3	2	SC an Sephadex [®] LH 20, S. 31
CF 4	1	HPLC-Analyse, S. 39
CF 7	1	---
CF 9	1	---

CF 2 wurde nicht weiter bearbeitet, da der Anteil der zu isolierenden Substanzen zu gering war (s. Abbildung 7, S. 19).

CF 7 und CF 9 wurden ebenfalls nicht weiter bearbeitet, da zu geringe Ausbeuten für weitere Aufreinigungen oder Isolierungen zur Verfügung gestanden sind (s. Tabelle 14, S. 15).

4.3 Identifizierung der Substanz A

4.3.1 Isolierung der Substanz A

Fraktion CF 1 wurde zur weiteren Aufreinigung auf eine Sephadex[®] Säule aufgebracht. Dazu wurde CF 1 in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und aufgetragen. Jede fünfte Fraktion wurde mittels HPLC auf Substanz A analysiert.

Mit Hilfe der Retentionszeit und dem UV-Spektrum (Abbildung 6, S. 18) konnte Substanz A in den Fraktionen 11 – 14 (= CF 1A) detektiert werden. Diese Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 41,3 mg. Da die Reinheit nicht ausreichend für eine NMR-Analyse war, wurde die Fraktion CF 1A in 0,5 ml destilliertem Wasser gelöst und nochmals über eine Sephadex[®] Säule aufgereinigt. Mittels HPLC konnte Substanz A in den Fraktionen 37 – 41 (= CF 1B) detektiert werden, welche vereinigt und mittels HPLC nochmals auf Reinheit untersucht wurden.

Die Ausbeute von CF 1B betrug 7,5 mg. Da Substanz A jedoch nicht rein vorlag und die Menge für weitere Aufreinigungsschritte nicht ausreichend war, wurden weitere 2,5 g des AH-XAD-Gesamtextraktes mit der Flash-Chromatographie fraktioniert (s. Tabelle 3, S. 8).

Um die gewünschten Substanzen A – H detektieren zu können, wurden die Fraktionen der Flash-Chromatographie in der HPLC untersucht (s. Tabelle 7, S. 10 und Tabelle 8, S. 11). Anschließend wurden die Fraktionen eingengt und lyophilisiert. Tabelle 17 zeigt die detektierten Substanzen und Ausbeuten.

Tabelle 17: Fraktionen der Flash-Chromatographie

MeOH Gehalt	Detektierte Substanz	Ausbeute	Bezeichnung
5 %	Substanz aus CF 1, Rt: 10,0 min	1280,0 mg	CF 1_Flash
10 %	Substanz aus CF 3, Rt: 22,5 min	158,0 mg	---
15 %	Substanz aus CF 3, Rt: 26,9 min	79,2 mg	CF 3_Flash
30 %	Substanz aus CF 4, Rt: 31,8 min	60,4 mg	---
35 %	Substanz aus CF 7, Rt: 35,7 min	66,4 mg	---
40 %	Substanz aus CF 9, Rt: 39,7 min	53,8 mg	---

Substanz A wurde in der Fraktion CF 1_Flash mittels HPLC und anhand ihrer Retentionszeit und ihres UV-Spektrums (Abbildung 6, S. 18) detektiert.

Die Fraktion CF 1_Flash wurde ebenfalls mit einer Sephadex[®] Säule aufgereinigt (s. S. 9). Substanz A konnte in den Fraktionen 21 – 23 detektiert werden, welche vereinigt und lyophilisiert wurden. Die Gesamtausbeute der Fraktionen, in denen Substanz A hoch angereichert war, betrug 85,5 mg (= Fraktion CF 1.1).

Zur Isolierung von Substanz A (Abbildung 17) aus Fraktion CF 1.1 wurde die präparative HPLC verwendet. Zur Berechnung der Flussrate wurde der Scale-up-Faktor herangezogen.

„Linear-Scale-up Fractor“ = Verhältnis der Säulenquerschnitte

$$f = (d_{\text{prep}}/2)^2 / (d_{\text{analyt}}/2)^2 = (25/2)^2 / (4/2)^2 = 39$$

Um den Faktor f entsprechend wurde die Flussrate von 0,4 auf ca. 15,5 ml/min erhöht.

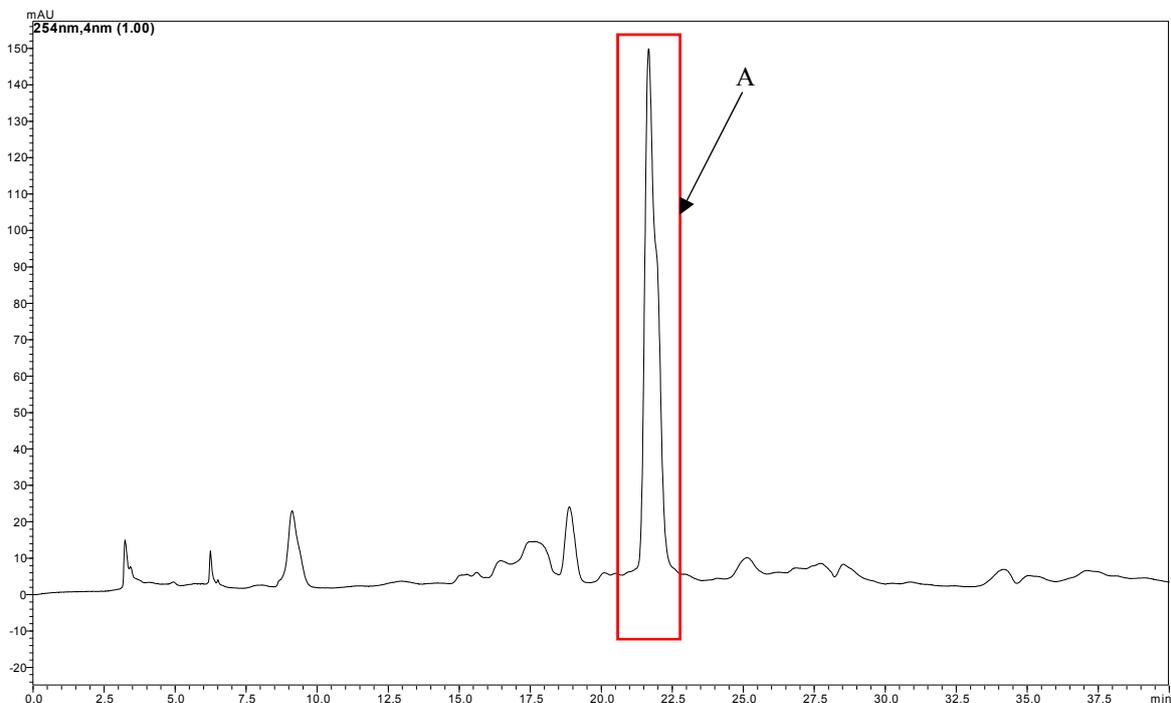


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm von Fraktion CF 1.1 bei 254 nm

stationäre Phase: LiChrospher[®] (Merck)

Flussrate: 0,4 ml/min

Gradient: 1 % – 12,5 % ACN in 25 min

Nach der Isolierung mittels präparativer HPLC wurden in den 8,2 mg der Substanz A bei der dünnschichtchromatographischen Reinheitsprüfung nach dem Besprühen mit 50 %iger H₂SO₄ in EtOH weitere Banden sichtbar, daher war ein weiterer Aufreinigungsschritt nötig.

Dazu wurde die Substanz A in 750 μl destilliertem Wasser gelöst und über eine weitere Sephadex[®] Säule aufgetrennt. Jede vierte Fraktion wurde mittels HPLC analysiert. In den Fraktionen 16 und 17 konnte Substanz A detektiert werden, für die bei der Reinheitsprüfung mittels DC und HPLC eine ausreichende Reinheit festgestellt werden konnte.

Es standen 3,3 mg Substanz A für die Strukturklärung zu Verfügung.



Abbildung 18: DC von Substanz A

Substanz A gelöst in MeOH
stationäre Phase: Kieselgel 60, F₂₅₄
mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : Wasser (60 + 40 + 10)
Detektion: 254 nm

4.3.2 Strukturaufklärung von Substanz A (= 1-Methylthymin)

Das Ergebnis der LC-MS-Analyse von Substanz A zeigte einen Hauptpeak mit $m/z = 141,1$ im Positivionen-Modus (Abbildung 19). Die Summenformel des Massenpeaks von $m/z = 141,0659$ im Positivionen-Modus wurde mittels HR-MS als $C_6H_9O_2N_2$ (Abbildung 20, S. 29) bzw. $C_6H_8O_2N_2$ für die Substanz ermittelt.

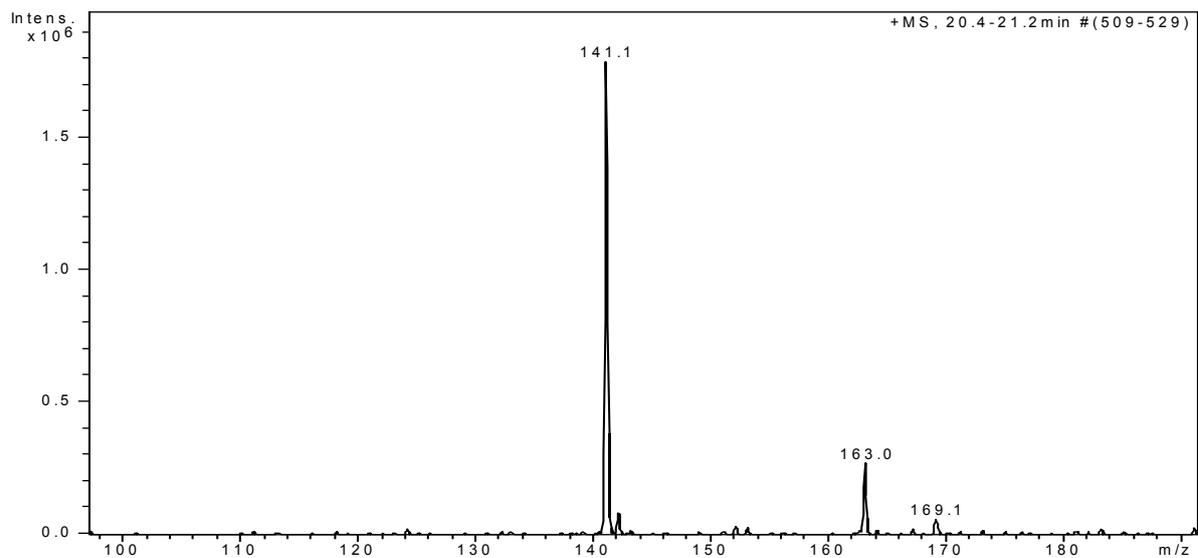


Abbildung 19: Massenpeak von Substanz A

aufgenommen mit der LC-MS im Positivionen-Modus

stationäre Phase: LiChrospher® (Merck)

Flussrate: 0,4 ml/min

Gradient: 1 % – 12,5 % ACN in 25 min



Abbildung 20: HR-Massenspektren von Substanz A

oben: Substanz A protoniert, **unten:** Natrium-Addukt von Substanz A aufgenommen im Positivionen-Modus (Bedingungen s. Tabelle 13, S. 13)

Mithilfe der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren* konnte Substanz A als 1-Methylthymidin identifiziert werden (s. Tabelle 18, S. 30).

*Für die Aufnahme und Interpretation der NMR-Spektren danke ich Ass. Prof. Dr. Kählig vom Institut für Organische Chemie der Universität Wien.

Tabelle 18: ^1H NMR- und ^{13}C NMR-Daten von Substanz A in MeOD

Position		NMR-Werte von Substanz A (in MEOD)			Literaturdaten* (in DMSO- d_6)
		^1H (ppm)	$J_{\text{h,h}}$ (Hz)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm) Literatur
1'	CH ₃	3,307	s	35.83	36.80
2	C	-	-	153.29	154.00
4	C	-	-	167.07	168.17
5	C	-	-	110.07	111.44
5'	CH ₃	1,862	d 1.2	12.13	12.32
6	CH	7,395	q 1.2	143.97	145.32

* Quelle: Faggiani R. et al., 1987

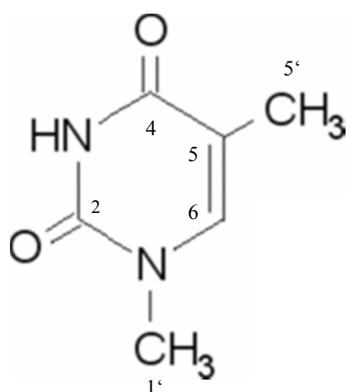


Abbildung 21: 1-Methylthymine

http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure6/193/mfcd00047494.png/_jcr_content/renditions/mfcd00047494-medium.png abgerufen am 11.07.2015

4.4 Identifizierung der Substanzen D1 und E aus CF 3

4.4.1 Isolierung von Substanz E

Zur Aufreinigung wurde Sammelfraktion CF 3 (s. Tabelle 14, S. 15) in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und über eine Sephadex[®] Säule fraktioniert. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels HPLC und DC nach Substanz D und E untersucht (s. Abbildung 10, S. 20). Dazu wurde jede fünfte Fraktion analysiert.

Nach Auswertung der HPLC- und DC-Analysen wurden die Fraktionen 70 – 74 vereinigt, die Substanz E enthielten. Die Ausbeute betrug ca. 500 µg.

Nachdem größere Mengen des AH-XAD-Gesamtextraktes fraktioniert worden waren, wurde die Fraktion CF 3_Flash, in der Substanz E detektiert werden konnte, ebenfalls über eine Sephadex[®] Säule aufgereinigt. Die Fraktionen dieser Säulenchromatographie wurden mittels DC und HPLC analysiert.

Diese Analyse zeigte, dass Substanz E in den Fraktionen 49 – 53 in chromatographisch einheitlicher Form vorhanden war (s. Abbildung 22). Die Ausbeute von Substanz E betrug 1,3 mg.

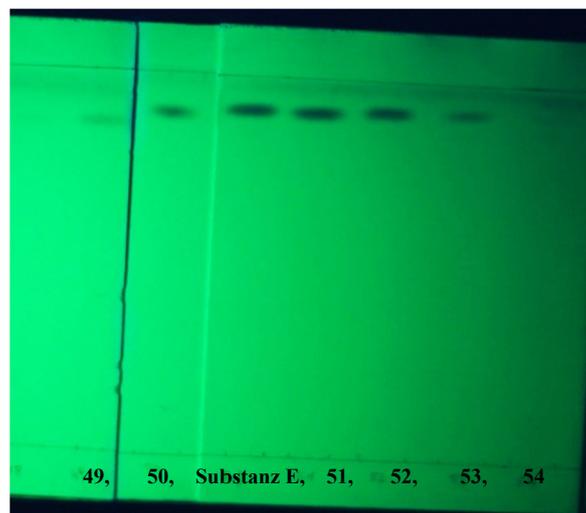


Abbildung 22: DC der Fraktionen von CF 3_Flash nach SC an Sephadex[®]

stationäre Phase: Kieselgel 60, F₂₅₄
mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : Wasser (60 + 40 + 10)
Detektion: 254 nm

4.4.2 Strukturaufklärung von Substanz E (= Methylparaben)

Substanz E wurde mittels LC-MS und HR-MS vermessen.

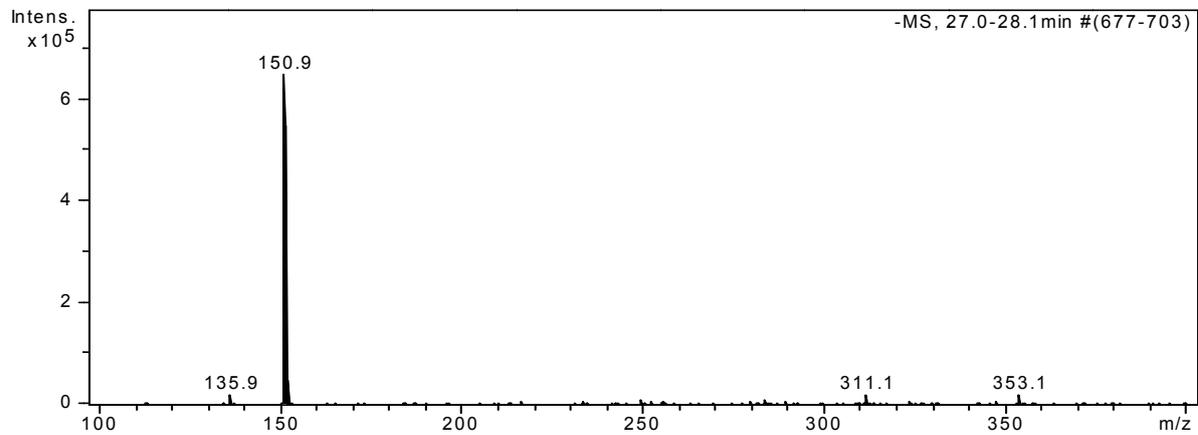


Abbildung 23: LC-MS von Substanz E

aufgenommen im Negativionen-Modus
stationäre Phase: LiChrospher[®] (Merck)
Flussrate: 0,4 ml/min
Gradient: 10 % – 40 % ACN in 30 min

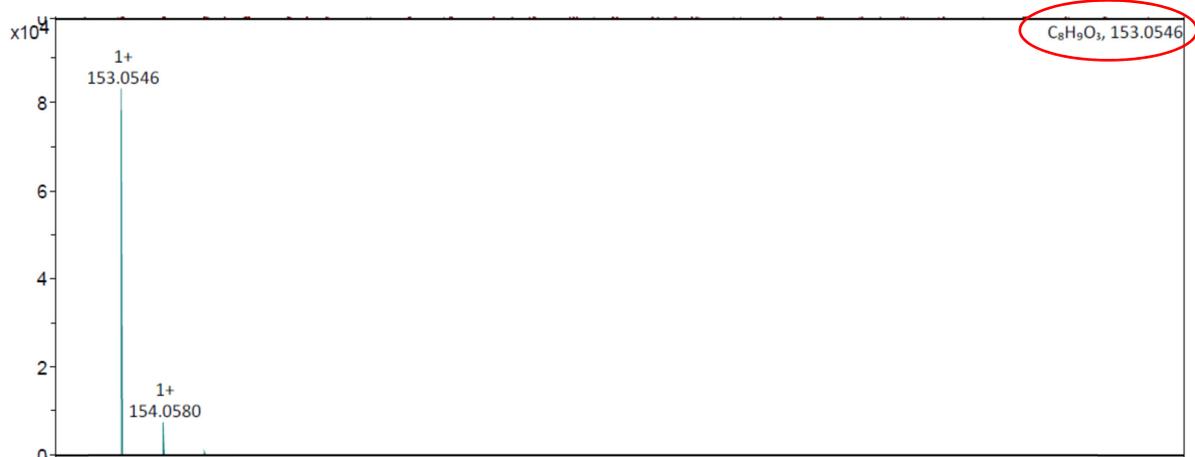


Abbildung 24: HR-Massenspektrum von Substanz E

aufgenommen mittels HR-MS im Positivionen-Modus (s. Tabelle 13, S. 13)

Das Ergebnis der LC-MS-Analyse zeigte einen Hauptpeak mit $m/z = 150.9$ im Negativionen-Modus (Abbildung 23, S. 32). Aufgrund der molekularen Masse und der damit verbundenen Summenformel, die mittels HR-MS ermittelt werden konnte (Abbildung 24, S. 32), bestand der Verdacht, dass es sich bei Substanz E um Methylparaben (MP) handeln könnte. Deswegen wurde ein Vergleich mit der authentischen Referenzsubstanz (Nipagin, Fa. Dr. Kolossa Arzneimittel) durchgeführt.

Die Retentionszeiten und UV-Spektren der HPLC-Analyse und auch die Laufstrecken der DC (Bedingungen s. Tabelle 10, S. 11) waren ident. Somit konnte Substanz E als Methylparaben identifiziert werden (Abbildung 25 und 26, S. 34).

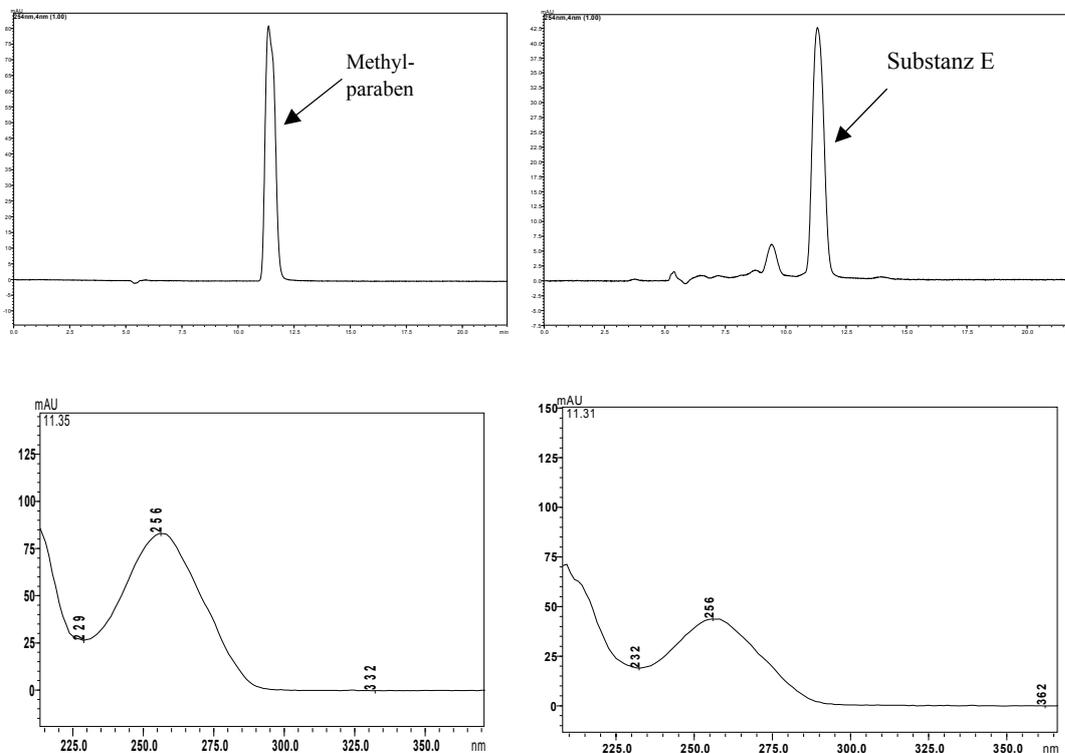


Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektren von MP und Substanz E

Links oben: Referenz MP, Rt: 11,35; **Rechts oben:** Substanz E, Rt: 11,31
Links unten: UV Spektrum von MP; **Rechts unten:** UV-Spektrum von Substanz E
 Bedingungen s. Tabelle 9, S. 11



Abbildung 26: DC von Methylparaben und Substanz E

stationäre Phase: Kieselgel 60, F₂₅₄
mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : Wasser (60 + 40 + 10)
Detektion: 254 nm

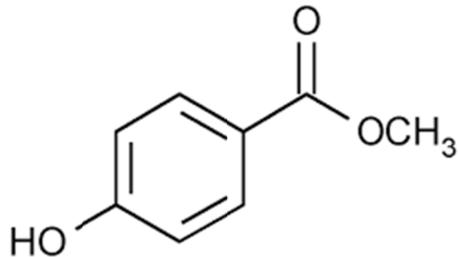


Abbildung 27: Methylparaben (p-Hydroxybenzoesäuremethylester; Nipagin)

<http://www.pharmacopeia.cn/v29240/images/v29240/g-1146.gif> abgerufen am 11.07.2015

4.4.3 Aufreinigung der Substanz D1

Nach Säulenchromatographie von CF 3 an Sephadex[®] konnte in den Fraktionen 30 und 35 zwei Substanzen (D und D1) mit ähnlichen Retentionszeiten in der HPLC-Analyse detektiert werden.

Daher wurden die Fraktionen 27 – 40 mittels Dünnschichtchromatographie untersucht, um jene mit gleichen Fingerprints vereinigen zu können.

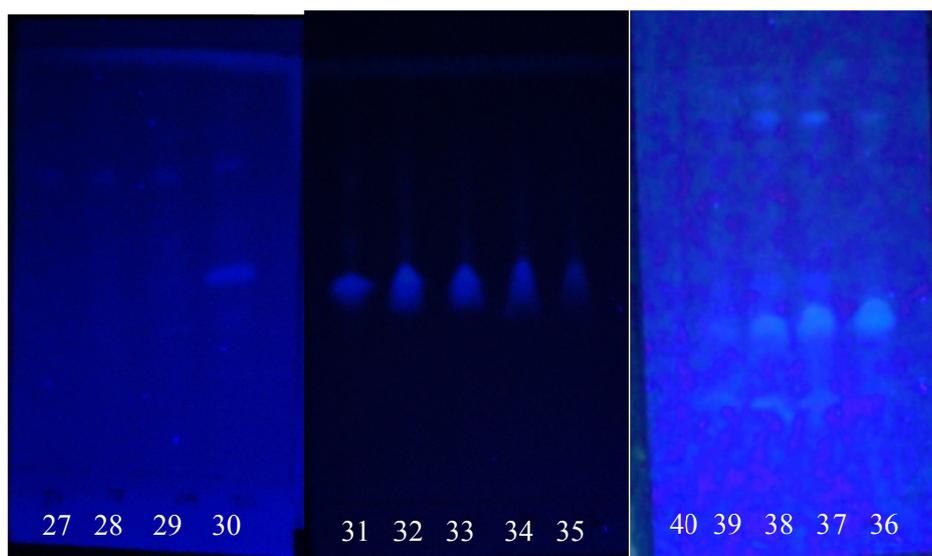


Abbildung 28: DC der Fraktionen von CF 3 nach SC an Sephadex[®]

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄
mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : Wasser (60 + 40 + 10)
Detektion: 366 nm

Die dünnschichtchromatographische Analyse zeigte, dass Substanz D in den Fraktionen 35 – 40 vorhanden war (Abbildung 28), welche zu Fraktion CF 3_3 vereinigt wurden. CF 3_3 wurde mittels HPLC analysiert. Abbildung 29 (S. 36) zeigt das aufgenommene Chromatogramm. Es handelte sich bei dem markierten Peak um Substanz D (Abbildung 10, S. 20). Diese wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter behandelt, da sie nicht ausreichend rein für die NMR-Analyse und eine zu geringe Ausbeute für weitere Aufreinigungsschritte vorhanden war.

Zusätzlich konnte in den Fraktionen 30 – 34 eine weitere Substanz D1 detektiert werden, die in der HPLC (Abbildung 9, S. 20) mit Substanz D koeluierte. Diese wurden zu Fraktion CF 3_2 vereinigt und ebenfalls mittels HPLC analysiert (Abbildung 30, S. 36)

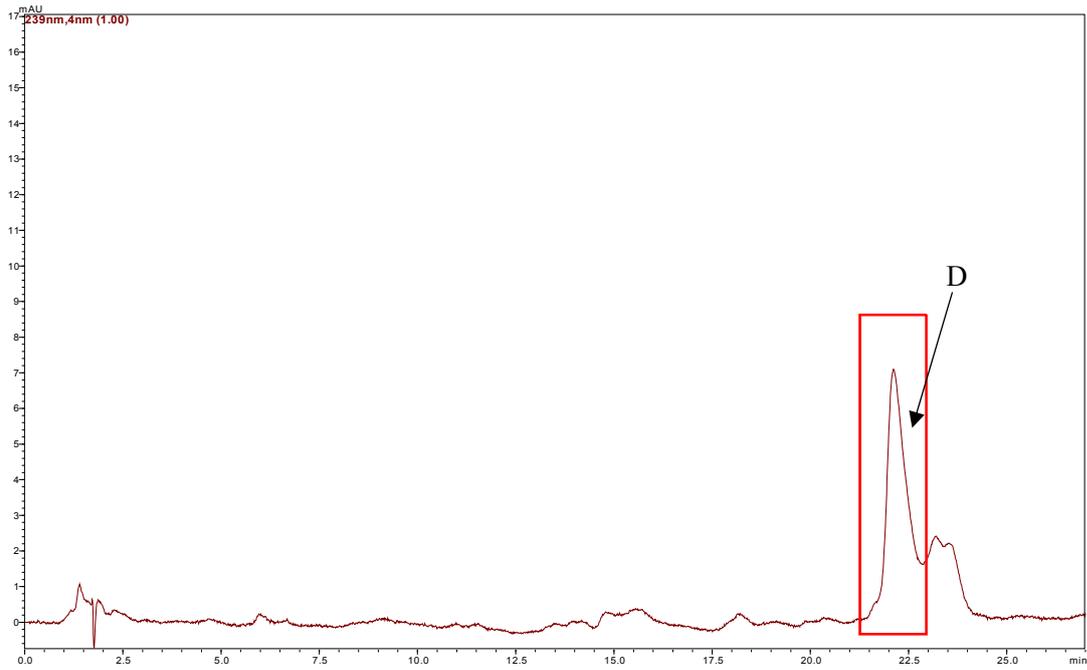


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm von CF 3_3 bei 239 nm

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Gradient: 0 % – 30 % ACN in 30 min

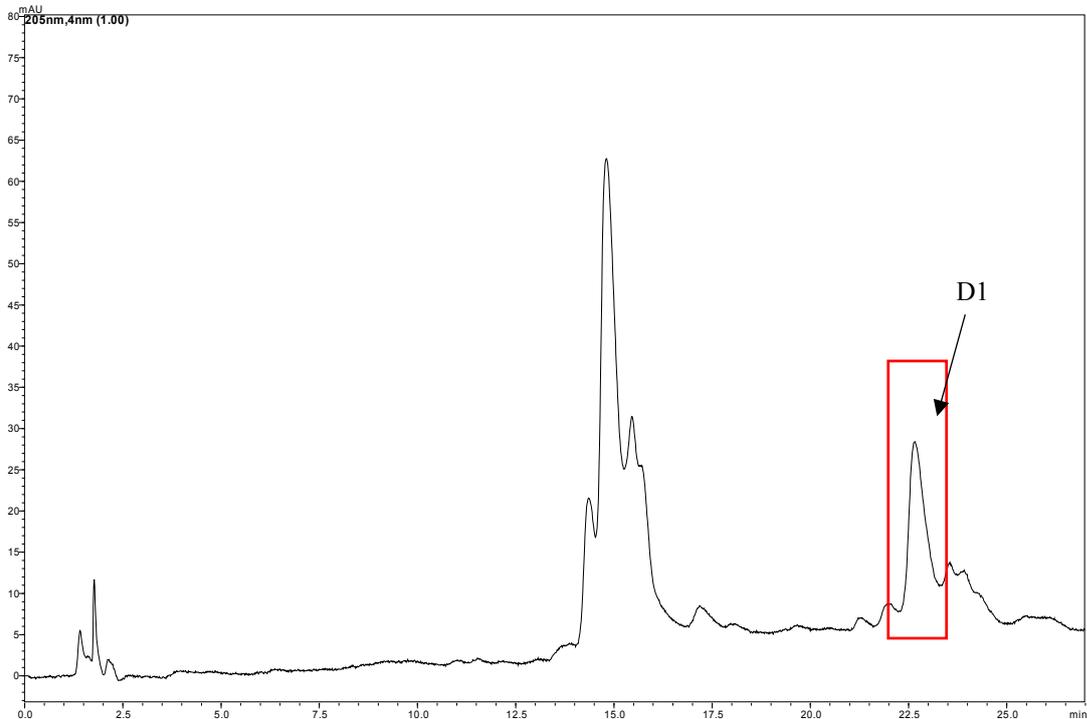


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm von CF 3_2 bei 205 nm

stationäre Phase: Atlantis T3 (Waters)

Flussrate: 0,75 ml/min

Gradient: 0 % – 30 % ACN in 30 min

4.4.4 Strukturaufklärung von Substanz D1 [= Cyclo(Phe-Pro)]

Substanz D1 mit der Rt von 22,66 min aus Fraktion CF 3_2 (Abbildung 30, S. 36) wurde mittels HPLC angereichert und mittels HR-MS im Positivionen-Modus auf die molekulare Masse untersucht und fragmentiert (Bedingungen s. Tabelle 13, S. 13).

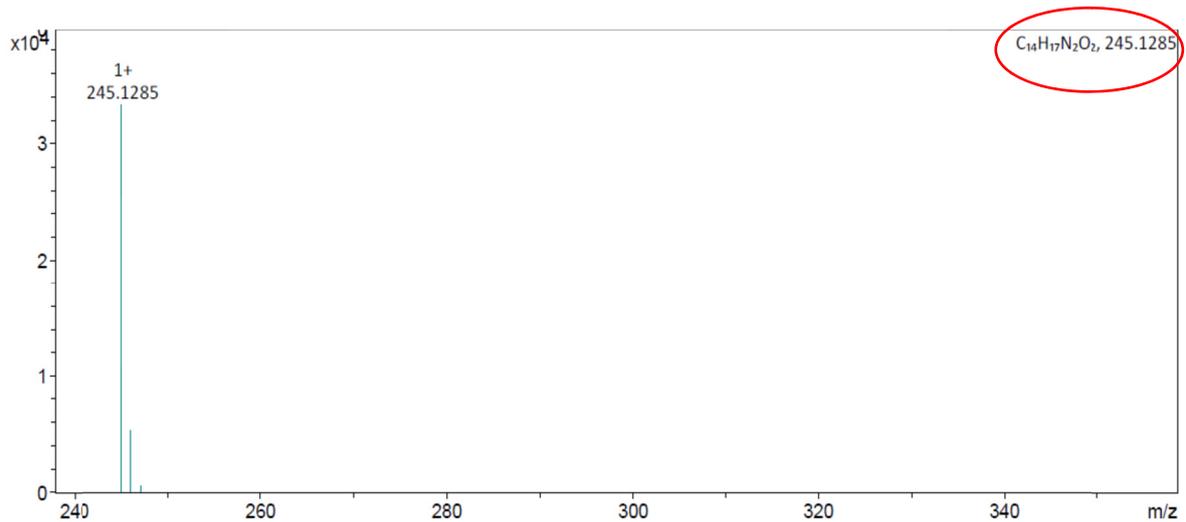


Abbildung 31: HR-Massenspektrum von Substanz D1 im Positivionen-Modus

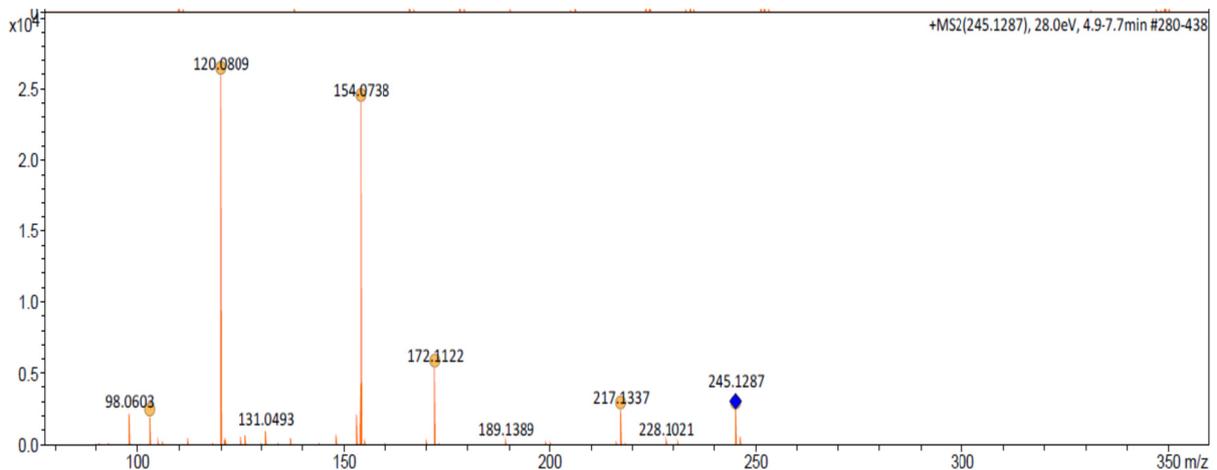


Abbildung 32: +MS2-Spektrum von Substanz D1

Fragmentierung bei 28.0 eV , aufgenommen mittels HR-MS im Positivionen-Modus

Die ermittelte molekulare Masse von $m/z = 245,1285$ im Positivionen-Modus, die Summenformel der Substanz $C_{14}H_{16}N_2O_2$ (Abbildung 31, S. 37) und das Fragmentierungsmuster (Abbildung 32, S. 37) deuteten auf das zyklische Dipeptid Cyclo(Phe-Pro) hin (s. Tabelle 19).

Zum eindeutigen Nachweis müsste man eine Vergleichsanalyse mit der authentischen Referenz durchführen.

Tabelle 19: ESI-MS-Analyse von Substanz D1

	Substanz D1	Cyclo(Phe-Pro) Chen Y. H. et al., 2003	Cyclo(Phe-Pro) Schuhmann I., 2005
[M+H]⁺	245,1287	245	245
Fragmente	228,1021	-	228
	217,1337	217	217
	189,1389	-	189
	172,1122	172	172
	154,0738	154	-
	131,0493	-	131
	120,0809	120	120
	98,0603	98	-

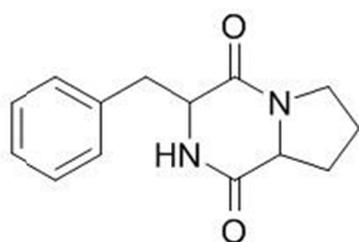


Abbildung 33: Cyclo(Phe-Pro)

<http://www.chemfaces.com/structural/Cyclo-Phe-Pro--CFN90271.jpg> abgerufen am 11.07.2015

4.5 Identifizierung der Substanz F aus CF 4 (= Daidzein)

Der Peak mit der Retentionszeit von 34,67 min aus der Sammelfraktion CF 4 (Abbildung 11 und 12, S. 21) wurde während einer HPLC-Analyse aufgefangen und in der HR-MS vermessen.

Das HR-Massenspektrum ergab einen dominanten Peak bei $m/z = 255,0652$ im Positivionen-Modus und die Summenformel $C_{15}H_{11}O_4$ (Abbildung 37, S. 41). Die Summenformel der Substanz $C_{15}H_{10}O_4$ und das Fragmentierungsmuster deuten darauf hin, dass es sich um das Isoflavon Daidzein handelt. Für einen eindeutigen Nachweis wurden eine DC- und HPLC-Analyse mit der authentischen Referenz durchgeführt. Es zeigte sich, dass sowohl die Retentionszeiten und UV-Spektren als auch die Laufstrecken in der DC ident waren (s. Abbildung 34, 35 und 36, S. 40).

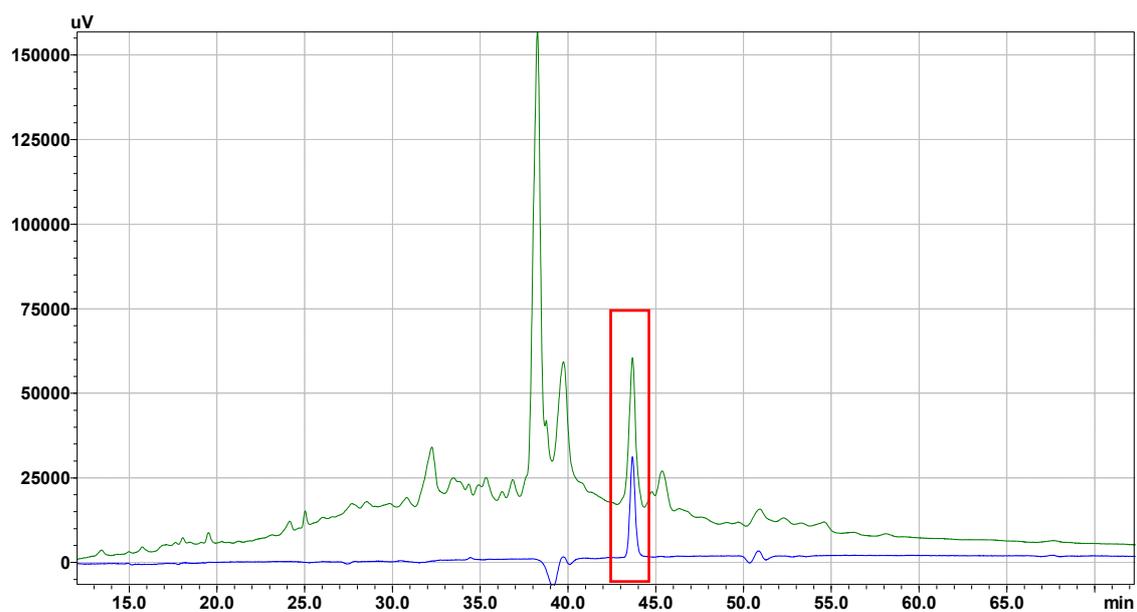


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme von CF 4 (Rt: 43,67 min) und Daidzein (Rt: 43,67 min)

grün = CF 4; blau = Daidzein

stationäre Phase: LiChrospher® (Merck)

Flussrate: 0,4 ml/min

Gradient: 1 % – 25 % ACN in 25 min, 25 % – 50 % ACN in 50 min

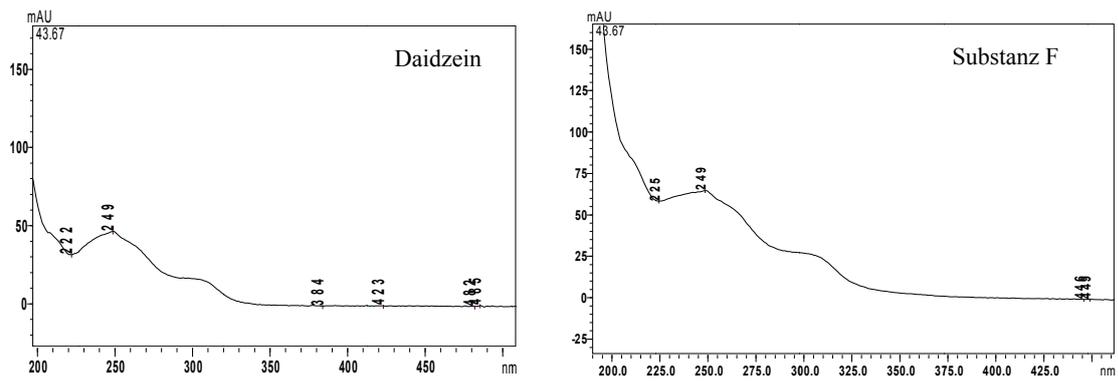


Abbildung 35: UV-Spektren von Daidzein (links) und der Substanz F (rechts)

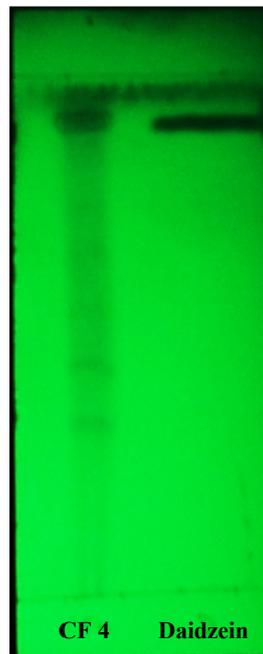


Abbildung 36: DC von CF 4 und Daidzein

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄
mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : Wasser (60 + 40 + 10)
Detektion: 254 nm

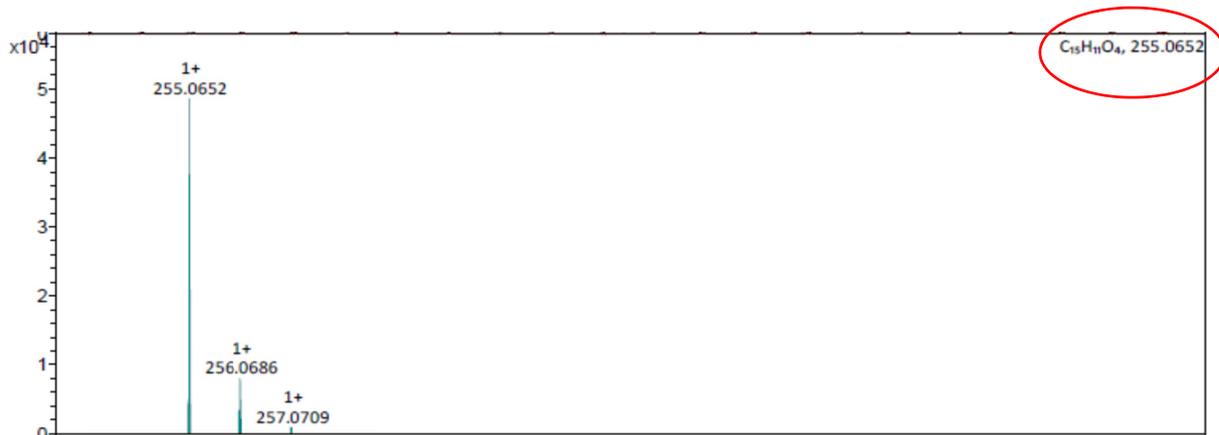


Abbildung 37: HR-Massenspektrum der Substanz F aufgenommen im Positivionen-Modus

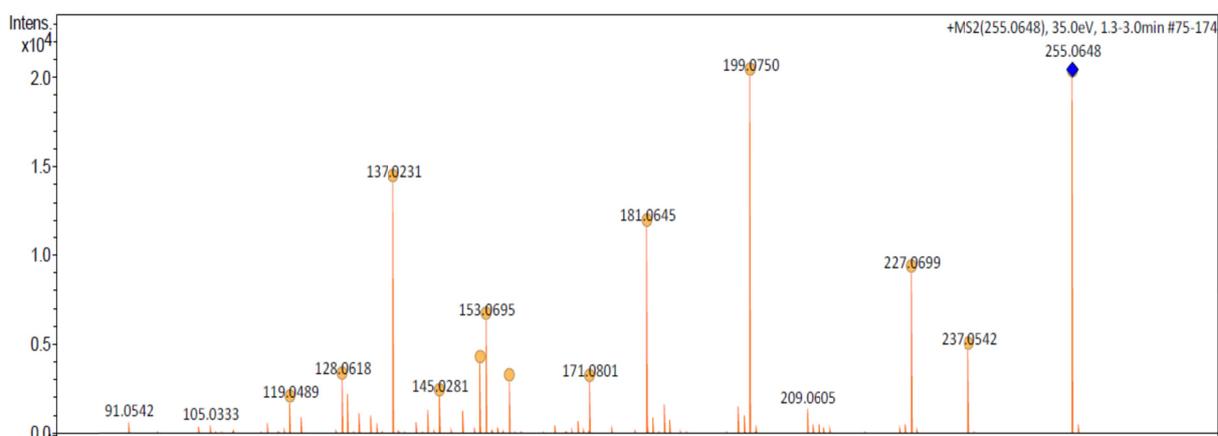


Abbildung 38: +MS2-Spektrum der Substanz F
Fragmentierung bei 35.0 eV, aufgenommen mittels HR-MS im Positivionen-Modus

Das Fragmentierungsmuster von Substanz F (Abbildung 38) korrelierte mit dem von Daidzein aus der Literatur (s. Tabelle 20, S. 42). Dieses Ergebnis, zusammen mit der DC- und HPLC-Analyse der authentischen Referenz bestätigt, dass es sich bei Substanz F um Daidzein handelt.

Tabelle 20: ESI-MS-Analyse der Substanz F aus CF 4

	Substanz F bei 35.0 eV	Authentisches Daidzein bei 40 V (https://metlin.scripps.edu/metabo_info.php?molid=43572 abgerufen am 11.07.2015)
[M+H]⁺	255,0648	255.0637
Fragmente	237.0542	237.0552
	227.0699	227.0701
	209.0605	209.0564
	199.0750	199.0742
	181.0645	181.0642
	171.0801	171.0782
	153.0695	153.0691
	145.0281	145.0259
	137.0231	137.0229
	128.0681	128.0620
	119.0489	119.0487
	105.0333	105.0343
	91.0542	91.0543

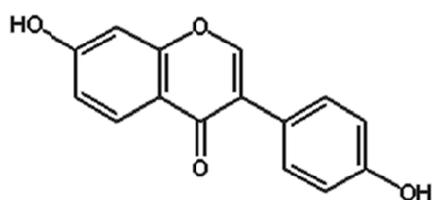


Abbildung 39: Daidzein

<http://www.rdchemicals.com/molimg/big/7678.gif> abgerufen am 13.07.2015

Da im Medium, welches zur Kultivierung von *Actinoalloteichus hymeniacidonis* verwendet wurde, Soja enthalten ist, lag der Verdacht nahe, dass es sich bei Daidzein um eine Komponente des Mediums handelt. Zur Überprüfung wurden 500 mg des lyophilisierten Mediums (TSB) ebenfalls mit Hilfe der SPE fraktioniert (s. Tabelle 2, S. 7). Die gesammelten Fraktionen wurden zur Detektion von Daidzein in der HPLC analysiert. Die Substanz konnte in den Fraktionen des Mediums jedoch nicht detektiert werden.

5. Diskussion

Marine Actinobakterien synthetisieren neue Leitstrukturen mit einzigartigen chemischen Strukturen und besitzen dadurch ein hohes Potenzial als neue Ressource für die Wirkstofffindung.

Neue pharmakologisch aktive Komponenten aus marinen Mikroorganismen wiesen unterschiedliche Strukturtypen auf, wie Polyketide, Peptide, Makrolide, Terpene, Quinone, Alkaloide u.v.m. (Manivasagan P. et al., 2014; Valliappan K. et al., 2014).

Unter den Actinomyceten synthetisiert die Spezies *Streptomyces* die bisher größte Anzahl von sekundären Metaboliten. Für diese wurden u.a. antimikrobielle, antiphlogistische, zytotoxische und antivirale Wirkungen nachgewiesen (Manivasagan P. et al., 2014).

Actinoalloteichus hymeniacidonis sp. nov., ein Stamm der Gattung Actinomycetales, der erstmals aus einem marinen Schwamm isoliert wurde, ist ein seltener Actinomycete, über dessen Sekundärmetaboliten noch wenig bekannt ist. Diese Arbeit setzte sich näher mit diesem Actinomyceten auseinander, wobei ein XAD-Extrakt des Kulturmediums von *Actinoalloteichus hymeniacidonis* untersucht wurde. Es gelang die Identifizierung von vier Substanzen. Bei diesen Substanzen handelt es sich um 1-Methylthymine, Methylparaben, Cyclo(Phe-Pro) und Daidzein, alle konnten erstmals in dieser Spezies beschrieben werden.

1-Methylthymine konnte bisher nur aus der Molluske *Haliotis discus hannai* Ino. isoliert werden (Liu L. et al., 2011). In dieser Arbeit wurde die Substanz erstmals aus einem marinen Actinomyceten isoliert. Die genauen Aktivitäten dieser Substanz sind noch nicht bekannt.

Methylparaben wurde bisher nur von Xing Y. et al. (2013) aus einem marinen Actinomyceten isoliert und konnte in dieser Arbeit erstmals aus *Actinoalloteichus hymeniacidonis* beschrieben werden. Methylparaben wird aufgrund seiner antimikrobiellen Wirkung in Kosmetika, (dick)flüssigen Arzneien u.v.m. eingesetzt, um deren Haltbarkeit zu verlängern. Andererseits wird Methylparaben noch hinsichtlich anderer Wirkungen untersucht, wie z.B. neuroprotektive Effekte gegen 6-Hydroxydopamin-induzierte Neurotoxizität (Kopalli S. R. et al., 2013).

2,5-Diketopiperazine (=zyklische Dipeptide) besitzen verschiedenste biologische Eigenschaften. Die Wirkungen reichen von antitumoral über antibakteriell bis zu

antihyperglykämisch. Ihr besonderer Heterozyklus konnte in diversen Naturstoffen gefunden werden (Martins M. B. und Carvalho I., 2007).

Die Arbeitsgruppe um Bellezza I. (2014) belegte, dass zyklische Dipeptide eine Rolle bei „Quorum Sensing“ (QS) spielen. Dabei handelt es sich um eine Zell-Zell-Kommunikation über sezernierte Signalmoleküle. Durch diese Signalmoleküle wird die Expression von bestimmten Genen reguliert. QS wird von Bakterien u.a. dazu verwendet, Informationen über die Dichte der Zellpopulation zu übermitteln. Cyclo(Phe-Pro) ist ein Signalmolekül, das die Expression von relevanten Genen für die Pathogenität von *Vibrio*-Stämmen kontrollieren kann. Cyclo(Phe-Pro), produziert von *V. cholerae*, inhibiert die virulenten Faktoren durch die Aktivierung der Expression von bestimmten Genen. Die Substanz kann somit die Produktion von virulenten Faktoren in pathogenen Bakterien abschwächen.

Cyclo(Phe-Pro) ist bereits aus verschiedenen Actinomyceten isoliert worden, u.a. aus *Micromonospora*-Arten (Huang Z. et al., 2011; Li Y. et al., 2010) oder *Streptomyces sp.* (Hamza A. A. et al., 2013), wurde aber in dieser Arbeit erstmals in *Actinoalloteichus hymeniacidonis* beschrieben. Die Substanz besitzt eine antimikrobielle Aktivität gegen Vancomycin-resistente Enterococcen, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* und *Saccharomyces cerevisiae* (Rhee, K.-H. et al., 2001).

Das Isoflavon Daidzein konnte ebenfalls identifiziert werden. Trotz einiger Berichte, dass Daidzein von Actinomyceten produziert wird (Pham L. H. et al., 2005) kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Produktion mit dem im Kulturmedium enthaltenen Soja zusammenhängt. Aus diesem Grund wurde das verwendete Medium (TSB) fraktioniert und genauer untersucht. Daidzein konnte dabei nicht detektiert werden. Auch Osada H. et al. (1988) haben Daidzein aus Actinomyceten isoliert, führten das Vorliegen aber darauf zurück, dass Daidzeinglykoside aus dem im Medium enthaltenen Sojabohnenmehl hydrolysiert wurden. Das könnte auch in der vorliegenden Arbeit der Fall gewesen sein.

Neben den identifizierten Substanzen konnten noch weitere Sekundärmetaboliten im AH-XAD-Gesamtextrakt detektiert werden, jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht isoliert werden. In weiteren Arbeiten könnte man sich auf die Isolierung der Substanzen B, C, D, G und H konzentrieren.

Die Ausbeuten der isolierten Sekundärmetaboliten waren mit 656 µg 1-Methylthymin/L bzw. 250 µg Methylparaben/L gering, was vielleicht darauf zurückzuführen ist, dass die natürlichen Feinde sowie die extremen Einflüsse aus ihrer natürlichen Umgebung bei der

Kultivierung gefehlt haben. Um die Substanzmengen zu erhöhen, könnte man einerseits mehr Ausgangsmaterial herstellen und fraktionieren. Andere Möglichkeiten bestehen darin, die Bakterien dazu anzuregen, größere Mengen von Sekundärmetaboliten zu produzieren. Dafür könnte man z.B. die Bedingungen der Kultivierung verändern, die Großkulturen mit Stressoren elizitieren oder andere Medien verwenden.

Aufgrund des großen Interesses an neuen Leitstrukturen werden in den nächsten Jahren marine Organismen und dabei v.a. marine Actinomyceten für intensivere Forschungen in den Fokus rücken.

Zwei neue Möglichkeiten auf dem Forschungsgebiet „Sekundärmetaboliten aus marinen Organismen“ sind (I) die Entwicklung von neuen Isolierungs- bzw. Kultivierungsmethoden, da die einzelnen Spezies spezielle Anforderungen für die Produktion von sekundären Metaboliten benötigen und (II) die Genom-basierte Analyse der Bakterien (Zotchev S. B., 2012). Große Mengen von Gensequenzdaten machen ersichtlich, dass viele Genome, vor allem jene von Pflanzen und Mikroorganismen, eine Reihe von Genen enthalten, die für Proteine codieren, die bei der Produktion von komplexen bioaktiven Naturstoffen eine Rolle spielen. Diese Gendaten spielen eine essentielle Rolle bei der Entdeckung von neuen Naturstoffen (Kurtböke D. I., 2012).

6. Zusammenfassung

Marine Actinobakterien erlangten ein großes Interesse, da sie ein hohes Potenzial für die Produktion von neuartigen Sekundärmetaboliten besitzen. Sie sind eine wichtige Quelle für die Entdeckung von pharmazeutisch aktiven Naturstoffen, die als Wirkstoffe oder Leitstrukturen dienen könnten. Unter den Actinobakterien ist besonders der Stamm *Streptomyces* hervorzuheben, aber auch andere seltenere Arten produzieren einzigartige Sekundärmetaboliten.

Actinoalloteichus hymeniacidonis sp. nov., ein Actinomycete, der aus einem marinen Schwamm isoliert wurde, könnte eine potentielle Quelle für neue, unbekannte Metaboliten sein. In der vorliegenden Arbeit wurde der XAD-Extrakt des Kulturmediums von *Actinoalloteichus hymeniacidonis* auf abgegebene Sekundärmetaboliten überprüft. Dabei wurde der Gesamtextrakt mittels Festphasenextraktion an RP-Phasen in weniger komplex zusammengesetzte Fraktionen aufgetrennt, die mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und HR-MS analysiert wurden. Die Fraktionen CF 1, CF 3 und CF 4 wurden für tiefergehende Analysen ausgewählt. In Folge wurden vier Substanzen, 1-Methylthymidin, Methylparaben, Cyclo(Phe-Pro) und Daidzein in diesen Fraktionen identifiziert.

1-Methylthymidin (enthalten in CF 1) wurde mittels Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH 20 und präparativer HPLC isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels MS und NMR. Methylparaben wurde in gleicher Weise aus CF 3 isoliert und die molekulare Masse mittels LC-MS und HR-MS bestimmt. Den eindeutigen Strukturbeweis lieferte der Vergleich mit der authentischen Referenz. Das zyklische Dipeptid Cyclo(Phe-Pro) wurde durch eine HR-MS-Analyse identifiziert. Daidzein konnte durch Analysen mit der HPLC, DC, HR-MS und den Vergleich mit der authentischen Referenz identifiziert werden.

Alle identifizierten Sekundärmetaboliten wurden erstmals aus *Actinoalloteichus hymeniacidonis* beschrieben. 1-Methylthymidin konnte überhaupt das erste Mal aus einem Bakterium isoliert werden.

7. Abstract

Marine actinobacteria gained a lot of interest, since they have an enormous potential in the production of novel secondary metabolites. They are an important resource for the discovery of pharmaceutically active natural products which might be used as active agents or lead compounds. Among actinobacteria the phylum *Streptomyces* is the most interesting one, however other rare species also produce unique secondary metabolites.

Actinoalloteichus hymeniacidonis sp. nov., an actinomycete, which has been isolated from a marine sponge, could be a potential resource for novel, unknown metabolites. The main focus of this diploma thesis was the search for excreted secondary metabolites of an XAD-extract from the culture broth of *Actinoalloteichus hymeniacidonis*. The extract was fractionated by solid phase extraction on RP-material, the fractions were analyzed using High Performance Liquid Chromatography and HR-MS. Fractions CF 1, CF 3 and CF 4 were chosen for in-depth analysis. Subsequently, four compounds were identified: 1-methyltyramine, methylparaben, cyclo(phe-pro) and daidzein.

1-Methyltyramine (from CF 1) was isolated using column chromatography on Sephadex[®] LH 20 and preparative HPLC. The structure was elucidated via MS and NMR. Methylparaben was isolated in the same way and analyzed via LC-MS and HR-MS. The unambiguous identification was reached by a comparison with the authentic substance. The cyclic dipeptide cyclo(Phe-Pro) was identified using HR-MS. Daidzein was identified via HPLC-, DC- and HR-MS-analysis and by the comparison with the authentic substance.

All identified secondary metabolites were described in *Actinoalloteichus hymeniacidonis* for the first time. 1-Methyltyramine was isolated from a bacterium for the first time.

8. Literaturverzeichnis

- Abdelmohsen U. R., Bayer K., Hentschel U.** (2014) Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, 31(3), 381-399
- Bellezza I., Peirce M. J., Minelli A.** (2014) Cyclic dipeptides: from bugs to brain. *Trends Mol. Med.*, 20(10), 551-558
- Chen Y., Liou S., Chen C.** (2004) Two-step mass spectrometric approach for the identification of diketopiperazines in chicken essence. *Eur. Food Res. Technol.*, 218(6), 589-597
- Ebada S., Edrada R., Lin W., Proksch P.** (2008) Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*, 3(12), 1820-1831
- Faggiani R. Haword-Lock H. E., Lock C. J. L., Turner M. A.** (1987) The reaction of chloro(triphenylphosphine)gold(I) with 1-methylthymine. *Can. J. Chem.*, 65(7), 1568-1575
- Hamza A. A., Ali H. A., Clark B. R., Murphy C. D., Elobied E. A.** (2013) Cyclo(l-phenyl, l-prolyl). Diketopiperazines from a newly isolated *Streptomyces sudanensis* A4.4. *E3 J. Biotechnol. Pharm. Res.*, 4(1), 1-7, 7 pp.
- Huang Z., Tang J., Gao H, Li Y., Hong K.; Li J., Yao X.** (2011) Studies on the cytotoxic constituents from marine actinomycete *Micromonospora* sp. (M2DG17). *Zhongguo Haiyang Yaowu*, 30(4), 29-33
- Kopalli S. R., Noh S., Koppula S., Suh Y.** (2013) Methylparaben protects 6 hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and improved behavioral impairments in mouse model of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, 34, 25-32
- Kurtböke D. I.** (2012) Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93(5), 1843-1852

- Li L., Li P., Li B.** (2011) Studies on the compounds from n-butanol extract of gonad in *Haliotis discus hannai* Ino. *Zhongguo Haiyang Yaowu*, 30(4), 38-41
- Li Y., Tang J., Gao H., Lin H., Hong K., Yao X.** (2010) Study of anti-MRSA bioactive constituents from a marine actinomycete *Micromonospora* sp. (No.69). *Zhongguo Haiyang Yaowu*, 29(5), 16-21
- Lubich A.** (2013), Dissertation, in Vorbereitung, Universität Wien
- Manivasagan P., Kang K., Sivakumar K., Li-Chan E. C. Y., Oh H., Kim S.** (2014) Marine actinobacteria: An important source of bioactive natural products, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 38(1), 172-188
- Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., Kim S.** (2013) Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiol. Res.*, 168(6), 311-332
- Martins M. B. and Carvalho I.** (2007) Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, 63(40), 9923-9932
- Osada H., Magae J., Watanabe C., Isoni K.** (1988) Rapid screening method for inhibitors of Protein Kinase C. *J. Antibiotics*, 41(7), 925-931
- Pham L. H., Vater J., Rotard W., Mügge C.** (2005) Identification of secondary metabolites from *Streptomyces violaceoruber* Tü22 by means of on-flow LC-NMR and LC-DAD-MS. *Magn. Reson. Chem.*, 43(9), 710-723
- Rhee K.-H., Choi K., Kim C., Kim C.-H.** (2001) Identification of *Streptomyces* sp. AMLK-335 producing antibiotic substance inhibitory to vancomycin-resistant enterococci. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11(3), 469-474
- Schuhmann I.** (2005) Aufbau einer HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank und ihre Anwendung im Screening arktischer und antarktischer Meeresbakterien, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen

- Singla A. K., Mayilraj S., Kudo T., Krishnamurthi S., Prasad G. S., Vohra R. M. (2005)** *Actinoalloteichus spitiensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a cold desert of the Indian Himalayas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55(6), 2561-2564
- Subramani R. and Aalbersberg W. (2012)** Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.*, 167(10), 571-580
- Tamura T., Liu Z., Zhang Y., Hatano K., (2000)** *Actinoalloteichus cyanogriseus* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50(4), 1435-1440
- Valliappan K., Sun W., Li Z. (2014)** Marine actinobacteria associates with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(17), 7365-7377
- Xiang W., Liu C., Wang X., Du J., Xi L., Huang Y. (2011)** *Actinoalloteichus nanshanensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of a fig tree (*Ficus religiosa*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61(5), 1165-1169
- Xing Y., Ma Y., Lu Y., Xi T. (2013)** Taxonomy and characterization of bioactive metabolites from a new marine microorganism strain MLA-21. *Asian J. Chem.*, 25(1), 220-224
- Zhang H., Zheng W, Huang J, Luo H., Jin Y., Zhang W., Liu Z., Huang Y. (2006)** *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov., an actinomycete isolated from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56(10), 2309-2312
- Zotchev S. B. (2012)** Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J. Biotechnol.*, 158, 168-176

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der Naturstoffe aus Actinobakterien, die mit marinen Organismen assoziiert sind (Valliappan K. et al., 2014)	3
Abbildung 2: Elektronen-mikroskopische Aufnahme von AH, kultiviert auf Hefe-/Malzextrakt Agar für 14 Tage bei 28 °C (Zhang H. et al., 2006)	4
Abbildung 3: Ablauf der Extrahierung	5
Abbildung 4: Chromatogramme von AH-XAD und dem Medium	16
Abbildung 5: HPLC-Chromatogramm von CF 1 bei 254 nm	18
Abbildung 6: UV-Spektrum von Substanz A	18
Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm von CF 2 bei 254 nm	19
Abbildung 8: UV-Spektren von Substanz B und C	19
Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm von CF 3 bei 254 nm	20
Abbildung 10: UV-Spektren von Substanz D und E	20
Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm von CF 4 bei 254 nm	21
Abbildung 12: UV-Spektrum von Substanz F	21
Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm von CF 7 bei 254 nm	22
Abbildung 14: UV-Spektrum von Substanz G	22
Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm von CF 9 bei 254 nm	23
Abbildung 16: UV-Spektrum von Substanz H	23
Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm von Fraktion CF 1.1 bei 254 nm	26
Abbildung 18: DC von Substanz A	27
Abbildung 19: Massenpeak von Substanz A	28
Abbildung 20: HR-Massenspektren von Substanz A	29
Abbildung 21: 1-Methylthymin	30
Abbildung 22: DC der Fraktionen von CF 3_Flash nach SC an Sephadex [®]	31
Abbildung 23: LC-MS von Substanz E	32
Abbildung 24: HR-Massenspektrum von Substanz E	32
Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektren von MP und Substanz E	33
Abbildung 26: DC von Methylparaben und Substanz E	34
Abbildung 27: Methylparaben (p-Hydroxybenzoesäuremethylester; Nipagin)	34
Abbildung 28: DC der Fraktionen von CF 3 nach SC an Sephadex [®]	35
Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm von CF 3_3 bei 239 nm	36
Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm von CF 3_2 bei 205 nm	36

Abbildung 31: HR-Massenspektrum von Substanz D1 im Positivionen-Modus.....	37
Abbildung 32: +MS2-Spektrum von Substanz D1	37
Abbildung 33: Cyclo(Phe-Pro).....	38
Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme von CF 4 und Daidzein.....	39
Abbildung 35: UV-Spektren von Daidzein und der Substanz F	40
Abbildung 36: DC von CF 4 und Daidzein.....	40
Abbildung 37: HR-Massenspektrum der Substanz F aufgenommen im Positivionen-Modus	41
Abbildung 38: +MS2-Spektrum der Substanz F	41
Abbildung 39: Daidzein	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bedingungen für SPE 1	7
Tabelle 2: Bedingungen für SPE 2 (Medium-Fraktionierung).....	7
Tabelle 3: Bedingungen für die Flash-Chromatographie	8
Tabelle 4: HPLC-Gerät	9
Tabelle 5: Bedingungen zur Isolierung der Substanz A aus Fraktion CF 1.1	9
Tabelle 6: HPLC-Gerät	10
Tabelle 7: Bedingungen für die HPLC-Analysen	10
Tabelle 8: Gradient für die HPLC-Analyse der Fraktionen der Flash-Chromatographie	11
Tabelle 9: Bedingungen für den HPLC-Vergleich von Methylparaben und Substanz E.....	11
Tabelle 10: DC-Bedingungen.....	11
Tabelle 11: LC-MS Gerät.....	12
Tabelle 12: Methodenparameter für LC-MS-Messungen	12
Tabelle 13: Methodenparameter für HR-MS Messungen	13
Tabelle 14: Sammelfraktionen der SPE	15
Tabelle 15: detektierte Substanzen in Sammelfraktionen CF 1 – 11	17
Tabelle 16: weitere Bearbeitung der analysierten Sammelfraktionen.....	24
Tabelle 17: Fraktionen der Flash-Chromatographie	25
Tabelle 18: ¹ H NMR- und ¹³ C NMR-Daten von Substanz A in MeOD	30
Tabelle 19: ESI-MS-Analyse von Substanz D1	38
Tabelle 20: ESI-MS-Analyse der Substanz F aus CF 4	42

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Yasemin Ayyildiz
Geburtsdatum	24. April. 1991
Geburtsort	Wien



Ausbildung

1997 – 2001	Volksschule Selzergasse, Wien
2001 – 2009	Gymnasium, GRg15 Auf der Schmelz, Wien
Juni 2009	Matura am GRg15 Auf der Schmelz, Wien
Oktober 2009	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien
März 2015	Praktischer Teil der Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie

Anhang

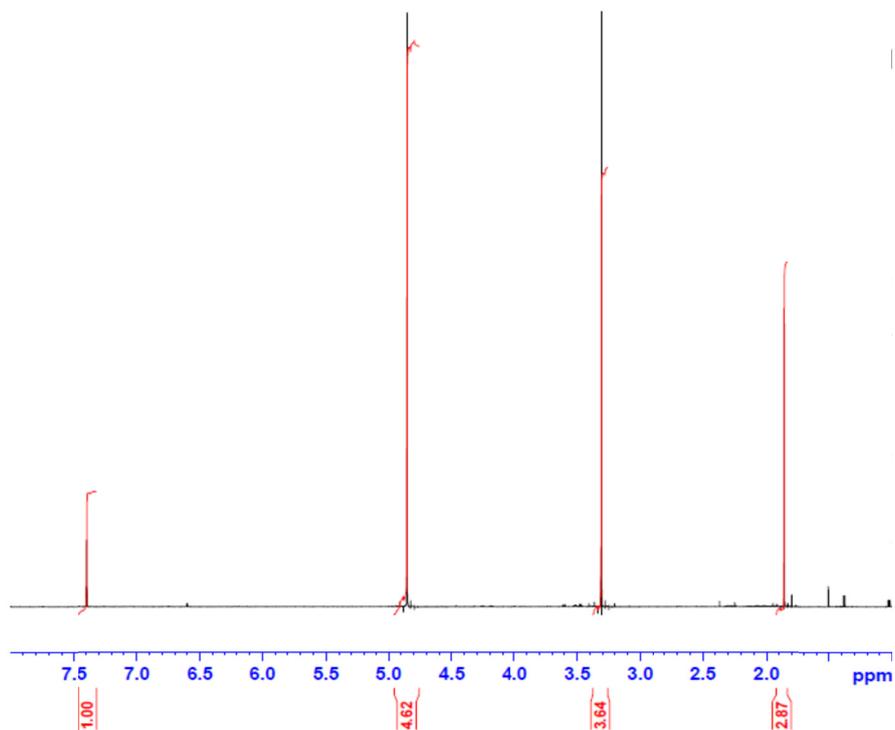


Abbildung I: ^1H NMR-Spektrum von 1-Methylthymine (Substanz A) in MeOD

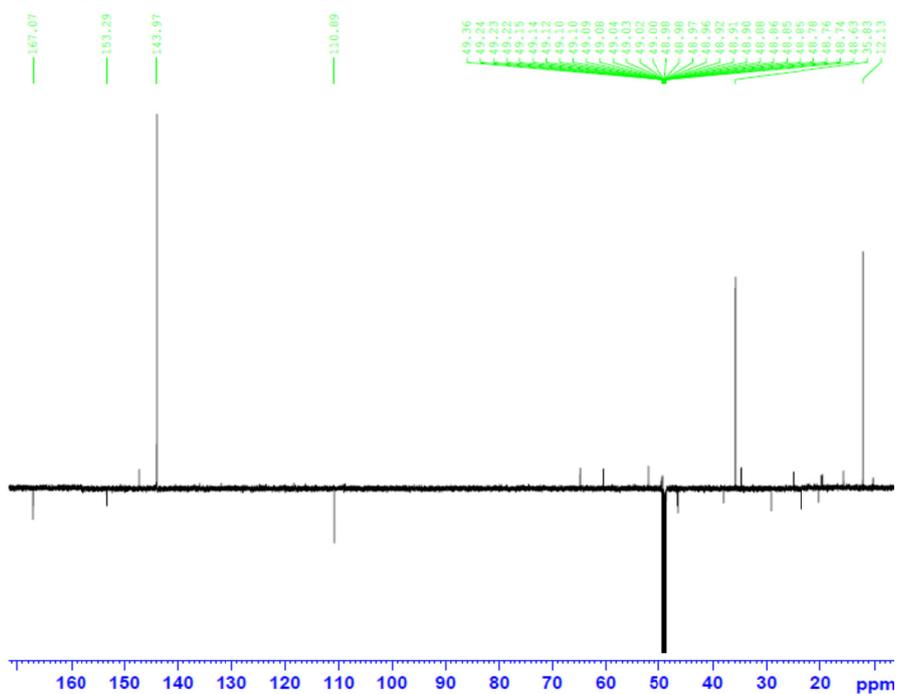


Abbildung II: ^{13}C NMR-Spektrum von 1-Methylthymine (Substanz A) in MeOD

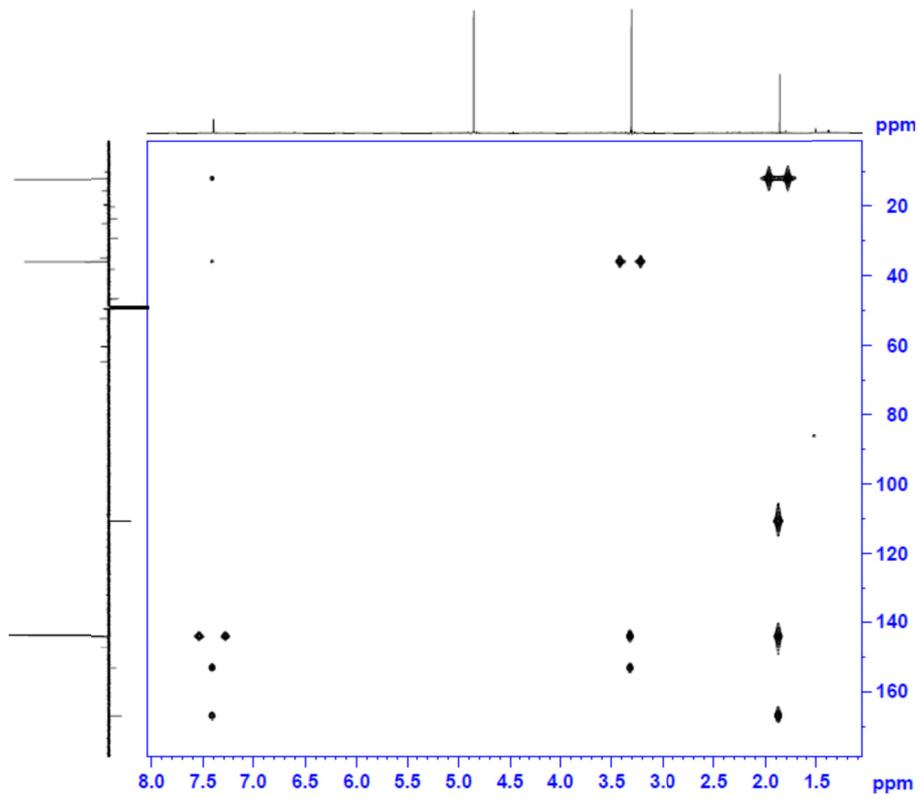


Abbildung III: HMBC-Spektrum von 1-Methylthymine (Substanz A) in MeOD

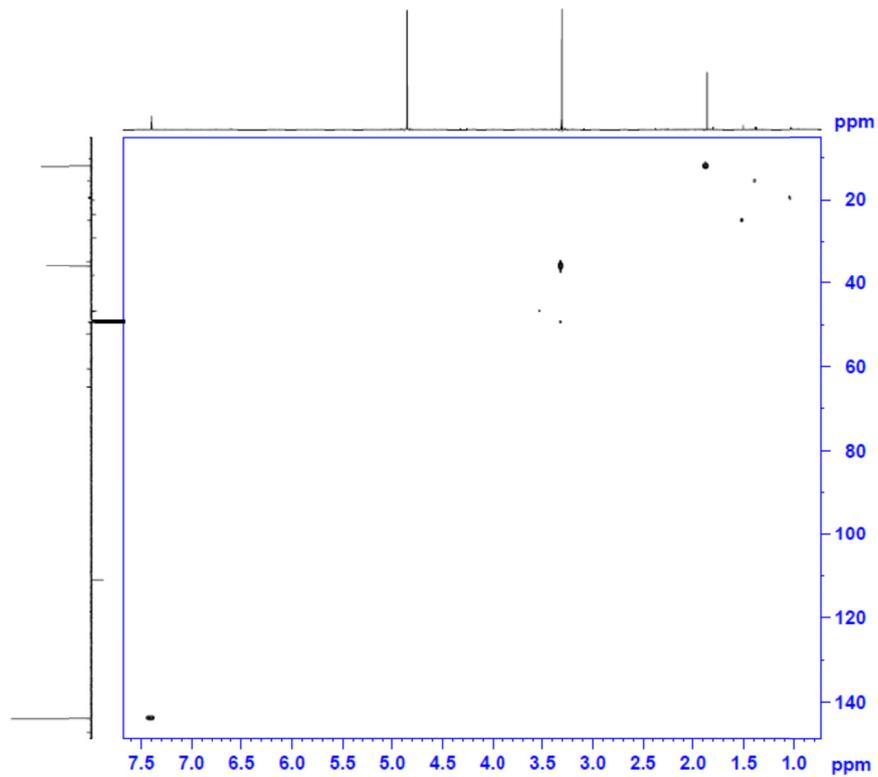


Abbildung IV: HSQC-Spektrum von 1-Methylthymine (Substanz A) in MeOD

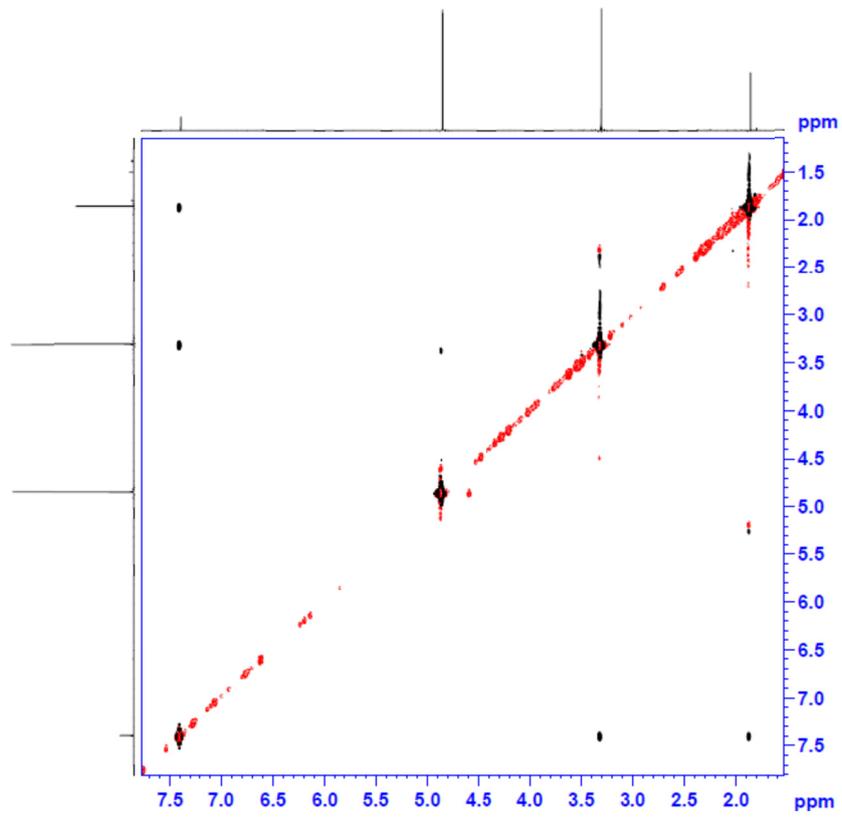


Abbildung V: NOESY-Spektrum von 1-Methylthymine (Substanz A) in MeOD

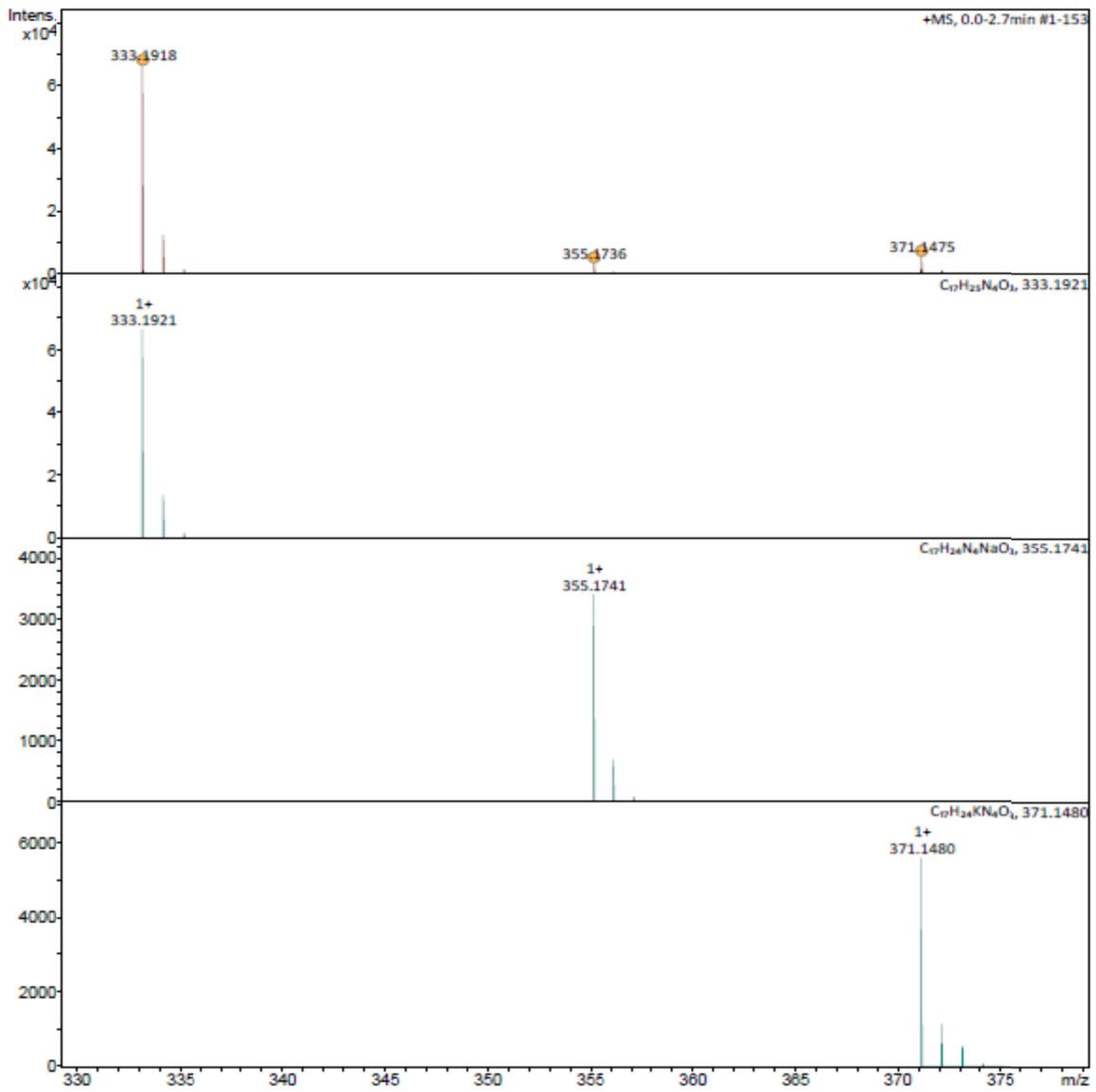


Abbildung VI: HR-Massenspektrum von Substanz B aus CF 2, aufgenommen im Positiven-Modus

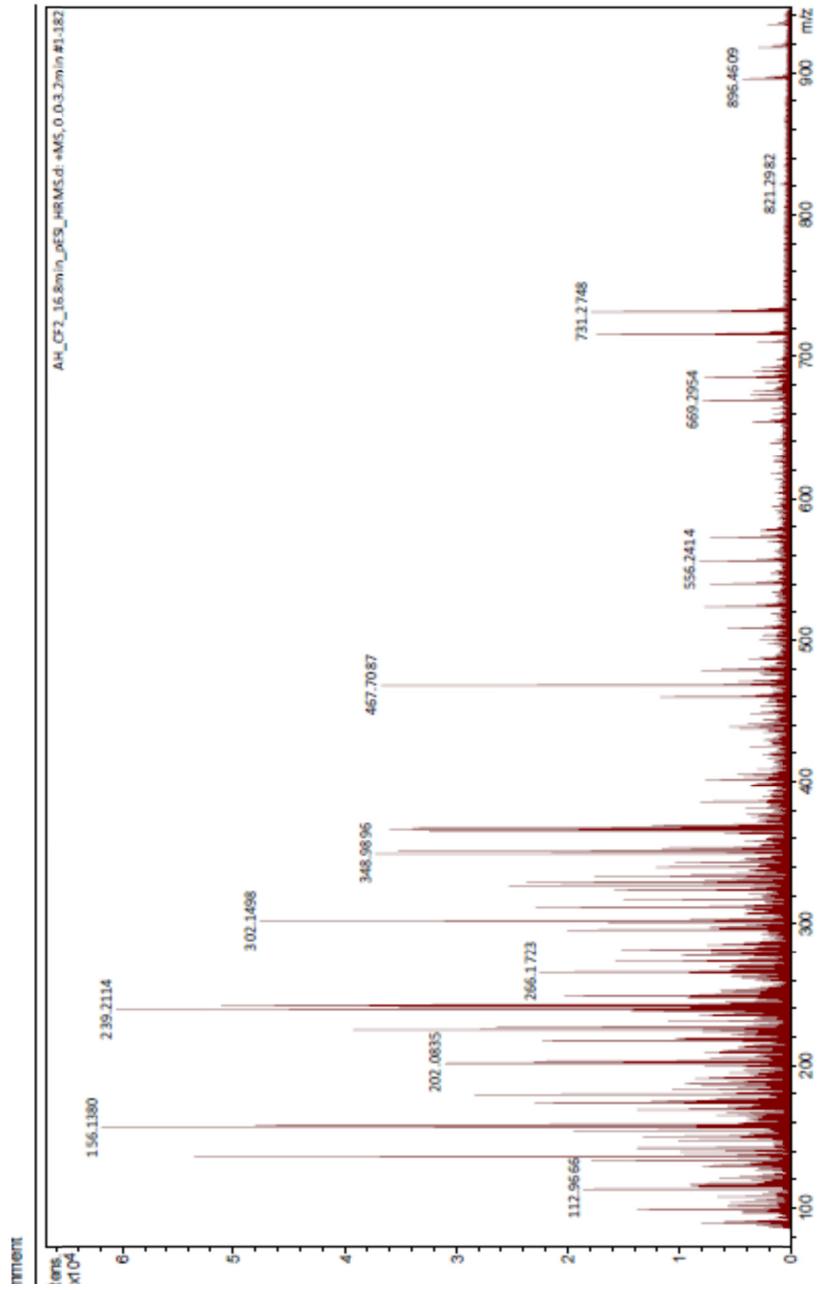


Abbildung VII: HR-Massenspektrum von Substanz C aus CF 2, aufgenommen im Positiven-Modus

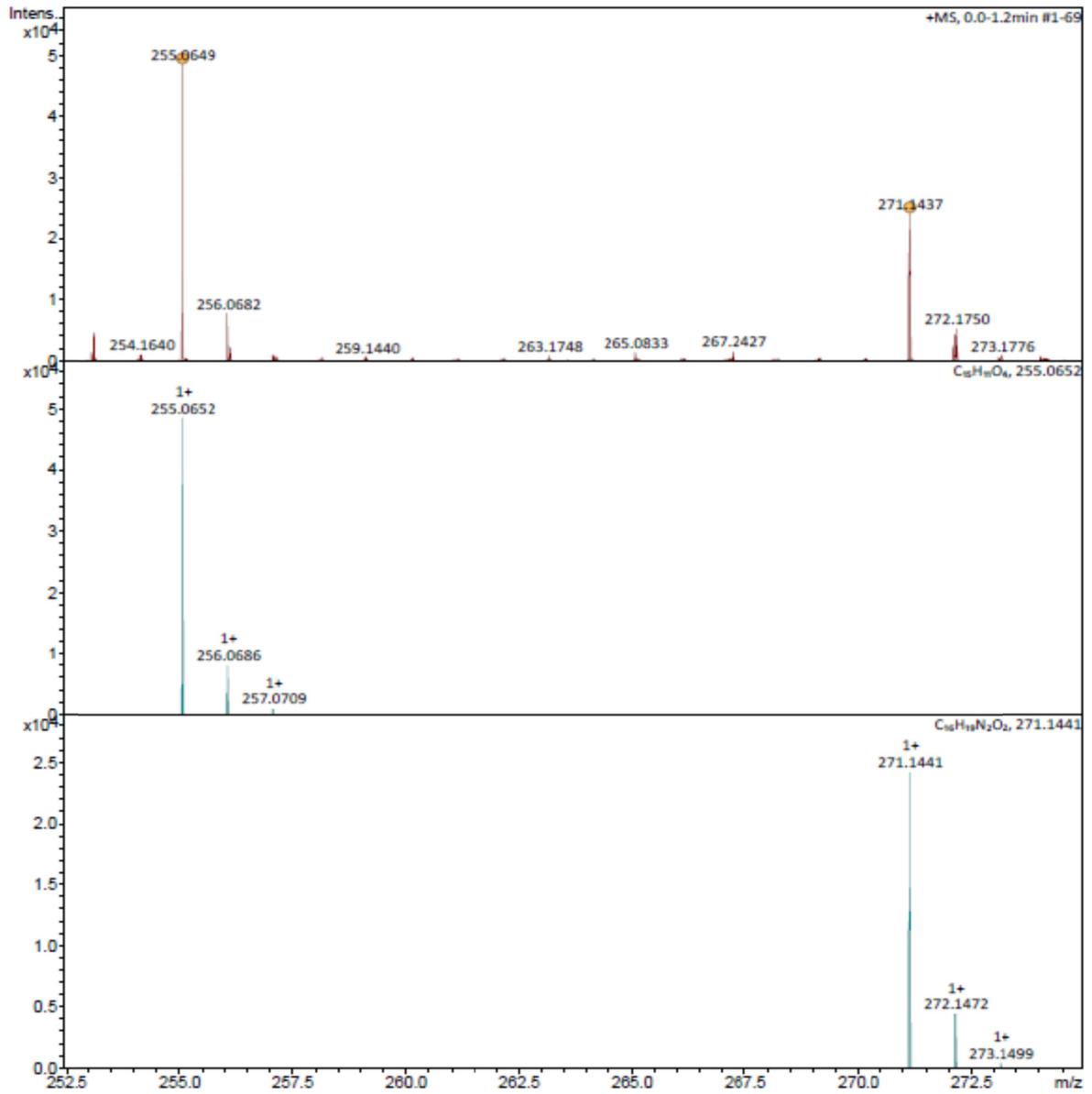


Abbildung VIII: HR-Massenspektrum von Substanz F aus CF 4, aufgenommen im Positivionen-Modus

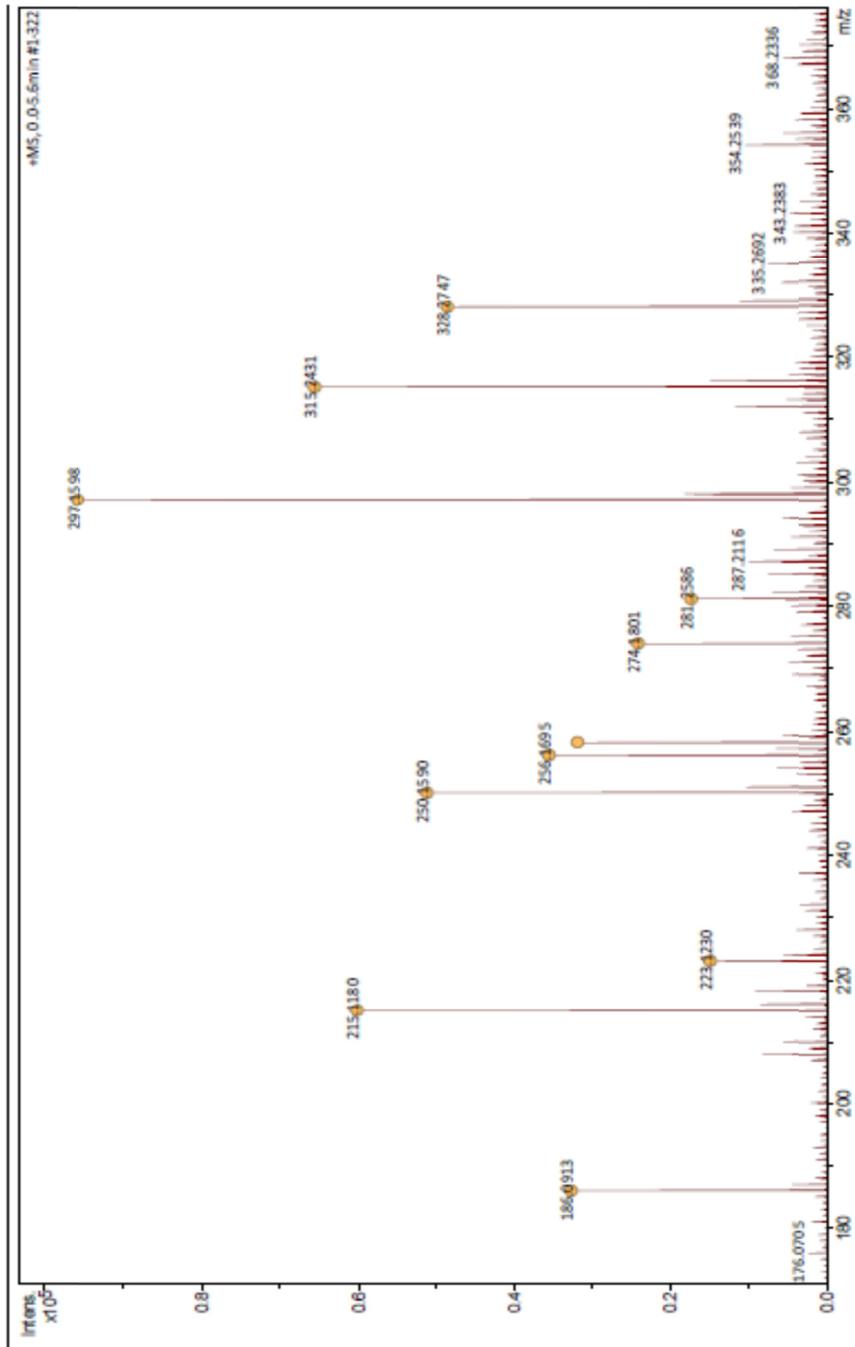


Abbildung IX: HR-Massenspektrum von Substanz G aus CF 7, aufgenommen im Positionen-Modus

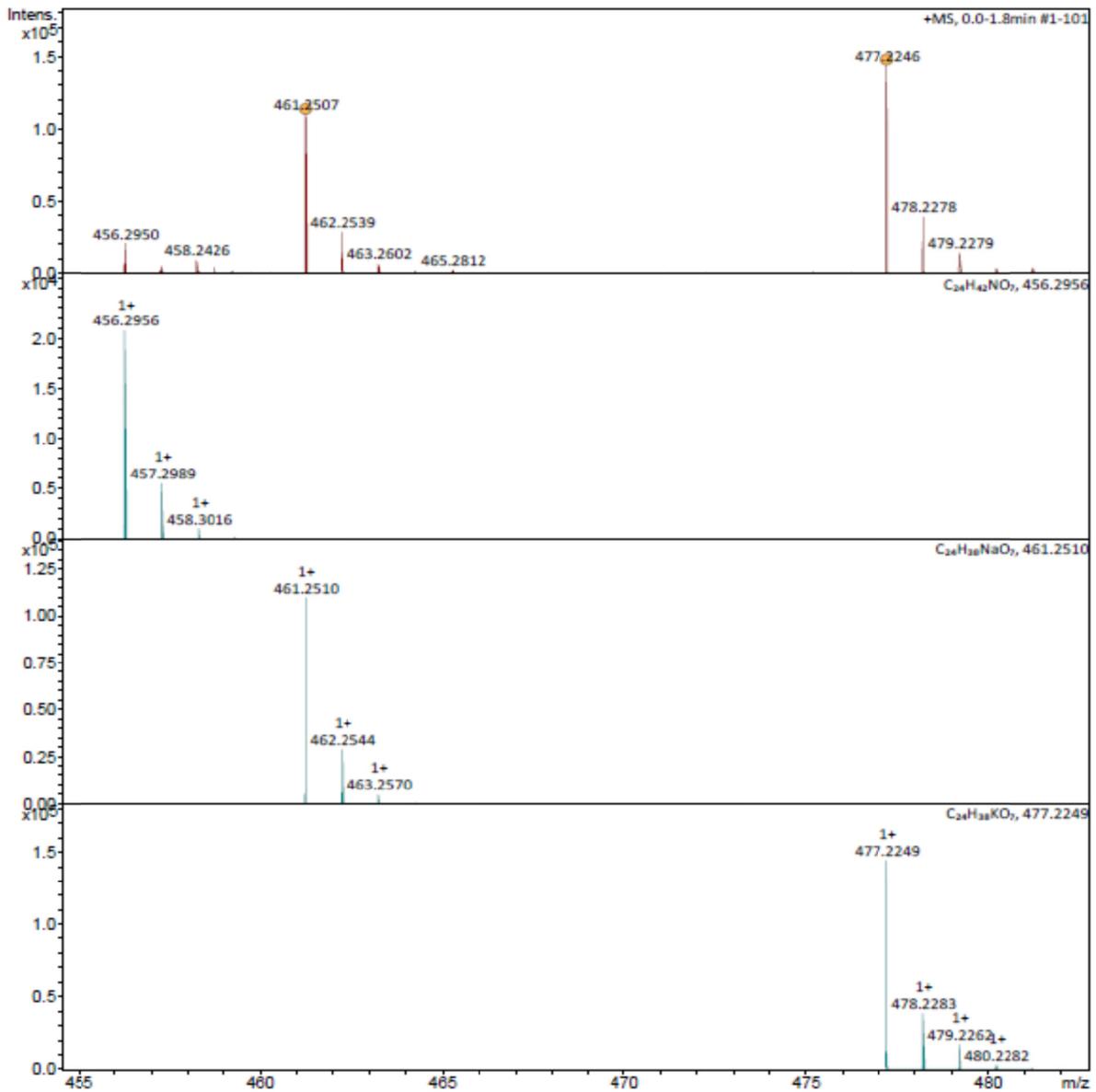


Abbildung X: HR-Massenspektrum von Substanz H aus CF 9, aufgenommen im Positivionen-Modus