



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Untersuchung von Petrolether-Extrakten der Früchte
von *Sambucus racemosa* L.“

verfasst von / submitted by

Helene Hinterberger, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2024 / Vienna 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an all jene ausdrücken, die mich während meiner praktischen Arbeit als auch bei dem Schreibprozess meiner Masterarbeit unterstützt haben.

Zuerst gebührt mein großer Dank ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die Möglichkeit meine Masterarbeit in ihrer Arbeitsgruppe zu absolvieren und an diesem Projekt mitwirken zu dürfen. Ein besonderer Dank gilt auch meiner Mitbetreuerin Mag. Elisabeth Eichenauer, die mir stets bei allen Fragestellungen zur Seite stand und mir mit hilfreichen Tipps die Arbeit erleichterte.

Weiters möchte ich mich bei Mag. Dr. Andreas Wasilewicz und Mag. Dr. Benjamin Kirchweger bedanken, die mir bei der Arbeit mit der UHPLC eine große Hilfe waren. Danke auch an Mag. Sigrid Adelsberger für die Unterstützung bei meinem UHPSFC-Experiment und die Bereitstellung von vorgefertigten Substanzlösungen. Ein großes Danke geht an Dr. Ammar Tahir für die Durchführung und Auswertung der massenspektrometrischen Analyse.

Danke an all meine Freunde für ihre mentale Unterstützung! Nicht zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Mutter bedanken, die für mich während des Studiums meine wichtigste Stütze war.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	6
2	Zielsetzung	8
3	Material und Methoden	9
3.1	<i>Pflanzen- und Ausgangsmaterial</i>	9
3.2	<i>Extraktion</i>	9
3.3	<i>Fraktionierung</i>	10
3.4	<i>Chromatographische Methoden</i>	11
3.4.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	12
3.4.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC) und Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)	15
3.4.3	Supercritical Fluid Chromatography	18
3.5	<i>Massenspektrometrie</i>	19
3.6	<i>Lösungsmittel und Chemikalien</i>	21
4	Ergebnisse	22
4.1	<i>Dünnschichtchromatographische Analyse der Ausgangsfractionen</i>	22
4.1.1	Fließmitteloptimierung	23
4.1.2	Analytischer Vergleich mit ausgewählten Referenzsubstanzen	26
4.2	<i>Analyse von Fraktion 10 mittels präparativer DC und SFC</i>	29
4.3	<i>Analyse der methanolischen Fraktion</i>	33
4.3.1	Herstellung der methanolischen Fraktion	33
4.3.2	DC-Vergleich unterschiedlicher Extrakte	36
4.3.3	Analyse mittels HPLC	37
4.3.4	Analyse mittels UHPLC	39
4.3.5	Massenspektrometrische Auswertung	45
5	Diskussion und Schlussfolgerung/Ausblick	48
Zusammenfassung		51
Abstract		52
Abkürzungsverzeichnis		53
Literaturverzeichnis		54
Anhang		56

1 Einführung

Der Rote Holunder (*Sambucus racemosa* L.) ist ein sommergrüner Strauch mit lanzettförmigen, scharf gezähnten Blättern, die in Gruppen von fünf bis sieben Fiederblättern wachsen. Der 2-5 m hohe Strauch bildet im Spätfrühling kleine weiße Blüten (Losey, R. J. et al., 2003; Miljković V. et al., 2020). Die Gattung *Sambucus* ist seit langem ein umstrittenes Taxon bezüglich seiner Systematik und taxonomischer Zuordnung. Die Gattung ist für ihre morphologischen und genetischen Variationen bekannt, so dass die taxonomische Abgrenzung unklar bleibt (Waswa, E. N., 2022). *Sambucus* wurde traditionell zu der Familie der Caprifoliaceae gezählt. DNA-Sequenzdaten zeigten jedoch, dass *Viburnum* L., *Sambucus* L. und *Adoxa* L. eine monophyletische Gruppe bilden, welche sich deutlich von der Familie der Caprifoliaceae unterscheidet (Applequist, W. L., 2015). Nach aktuellem Wissenstand ist die bevorzugte Familienzuordnung für *Sambucus* die Pflanzenfamilie Viburnaceae. Sie umfasst die oben

genannten drei Gattungen

(<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30056767-2>, aufgerufen am 09.01.2024; Waswa, E. N. et al., 2022).

Das Verbreitungsgebiet von *Sambucus* erstreckt sich über Europa, Nord- und Südamerika, Asien und Australien (Waswa, E. N., 2022). Die Halbschatt-Lichtholzart wächst bis in die montane Stufe der Gebirge bis 1900 m und ist in Fichtenwäldern, Kahlschlägen und entlang der Waldränder und Forststraßen anzutreffen (Machatschek M., 2015).

Typische Merkmale des Roten Holunders sind die roten Früchte, traubenartigen Fruchtstände und das hirschbraune Astmark. Daraus abgeleitet sind Trauben- oder Hirschholunder weitere Bezeichnungen für den Strauch (Machatschek M., 2015). Die Früchte des roten Holunders sind auffällig scharlachrot und in einem traubigen Fruchtstand angeordnet. Die Erntezeit ist von Juli bis September, abhängig vom Witterungsverlauf und der Region (Machatschek M., 2015). Die „Beeren“ des Roten Holunders sind Steinfrüchte und enthalten jeweils 3-5 relativ große Samen. Die Kerne enthalten ein giftiges, Blausäure abspaltendes Glukosid namens Sambunigrin. Im Rohzustand sind die Früchte in größerer Menge nicht verträglich und die Einnahme kann zu Durchfall und Erbrechen führen. Der Gefährdungsgrad wird zwar als „gering giftig“ eingestuft, jedoch ist es ratsam die Früchte zu entkernen, wenn diese zum Verzehr verarbeitet werden. Grund dafür ist, dass sogar bei längerem Kochen nur ein Teil der Fruchtsamen von dem giftigen Glukosid befreit werden (Losey, R. J. et al., 2003; Machatschek M., 2015). Im Allgemeinen sind Holunderfrüchte reich an sekundären Pflanzenstoffen wie phenolischen Verbindungen, so auch die roten Früchte von *Sambucus racemosa* L. Diese wirken als Antioxidantien und tragen

zur Optimierung der menschlichen Gesundheit bei, indem sie freie Radikale neutralisieren. Zu den häufig vorkommenden Holunderphenolen zählen Anthocyane, Flavonolglykoside, Hydroxyzimtsäuren und Flavanole. Anthocyane bilden die vorherrschende Gruppe und tragen zu den attraktiven roten, orangen oder violett-blauen Farbtönen ihrer reifen Früchte bei (Mikulic-Petkovsek M. et al., 2015). Weiters enthält das Fruchtfleisch fettes Öl, Vitamin C, einige B-Vitamine, Vitamin A, Calcium, Natrium und Spurenelemente (Machatschek M., 2015). Die Holunderbeere dient für viele Tiere, insbesondere für Vögel und kleine Nagetiere als Futterquelle (Losey, R. J. et al., 2003).

Die traditionelle Anwendung von Zubereitungen aus den ausgereiften Früchten von *Sambucus racemosa* L. liegt vorwiegend, ähnlich wie beim schwarzen Holunder, aufgrund der schweißtreibenden Wirkung bei grippalen Infekten und Erkältungen mit oder ohne Fieber. Die schmerzlindernden und entzündungshemmenden Effekte der roten Früchte heilen verschiedene Magen-Darm-Krankheiten wie Entzündungen der Magenschleimhaut oder Koliken. Zusätzlich werden dem Holunder blutreinigende, Stoffwechsel- und Stuhlgangfördernde Wirkungen zugeschrieben und daher Kuren durchgeführt, die das Immunsystem stärken sollen. Weitere Indikationsgebiete sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen und rheumatische Krankheitsbilder. Die äußerliche Anwendung erfolgt bei braunfleckigen Hautkrankheiten (Machatschek M., 2015).

Die VOLKSMED-Datenbank beinhaltet volksmedizinisch verwendete Arzneipflanzen in Österreich. Laut dieser Datenbank wird das Öl gewonnen aus reifen Früchten des roten Holunders traditionell zur Wundheilung verwendet ((Eichenauer et al., Planta Medica, accepted for publication)).



Abbildung 1: Der Strauch *Sambucus racemosa* L. mit seinen scharlachroten Früchten in traubenförmigen Schirmrispen angeordnet

2 Zielsetzung

Die phytochemische Zusammensetzung des Öls der Früchte von *Sambucus racemosa* L. ist nach bisherigem Wissenstand noch nicht lückenlos aufgeklärt. Die Vorgängerarbeit von Stojanovic M. (2023) stellt die Grundlage dieser weiterführenden Forschungsarbeit dar und beschäftigte sich mit der Optimierung der Extraktionsmethode, Fraktionierung des Öls sowie Identifizierung der enthaltenen Fettsäuren.

Das Ziel dieser Masterarbeit war die Identifikation von weiteren Substanzen oder Substanzklassen aus dem Öl der Früchte von *Sambucus racemosa* L., um das phytochemische Profil aufzuklären. Hierzu wurden bereits in der Vorgängerarbeit hergestellte Fraktionen 10 und 11, sowie ein neu herstellter methanolischer Extrakt des Öls herangezogen. Der Nachweis von einzelnen Inhaltsstoffen oder -gruppen des Öls könnte plausible Erklärungen liefern für die volksmedizinische Verwendung des Öls zur Heilung von Wunden.

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird das verwendete Pflanzenmaterial genauer charakterisiert und die präparativen sowie analytischen Methoden, die zur Untersuchung des Ausgangsmaterials verwendet wurden, beschrieben.

3.1 Pflanzen- und Ausgangsmaterial

Die reifen Früchte von *Sambucus racemosa* L. wurden im Juli 2022 auf der Fosteralm geerntet. Dieser Standort befindet sich bei Gaflenz in Oberösterreich. Insgesamt gab es zwei Ernten, welche sich durch Datum und Örtlichkeit unterscheiden. Das Pflanzenmaterial, welches in dieser Arbeit extrahiert wurde, entstammt der 2. Ernte am 15.07.2022.

Das Ausgangsmaterial für diese Arbeit waren einerseits der Rohsaft der reifen Früchte von *Sambucus racemosa* L., der durch Auspressen der Früchte mittels einer „Flotten Lotte“ mit feinem Siebeinsatz gewonnen und anschließend in Gläsern bis zur Weiterverwendung eingefroren wurde. Andererseits wurden die aus dem Rohsaft gewonnenen Petrolether-Extrakte und dessen 14 HPCCC-Fraktionen, welche in der Vorgängerarbeit von Michaela Stojanovic (2023) generiert wurden, verwendet.

3.2 Extraktion

Die Extraktion erfolgte nach dem Arbeitsprotokoll Ansatz A (ohne Hitzebehandlung), welche der Vorgängerarbeit (Stojanovic M., 2023) entstammt. Hierfür wurden insgesamt 540 ml Rohsaft bei 30.000 U/min (Umdrehungen/min) 15 Minuten lang zentrifugiert. Von den drei entstandenen Phasen wurde die oberste Phase mit einem Löffel vorsichtig abgenommen. Diese wurde als Öl-Saft-Emulsion definiert und hat eine halbfeste Konsistenz. Darunter lagen die wässrige Phase und der feste Bodensatz.

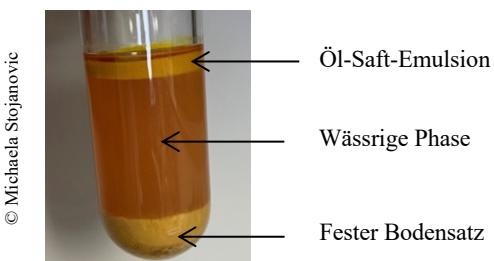


Abbildung 2: Phasentrennung des Rohsaftes nach Zentrifugation

Die Öl-Saft-Emulsion wurde anschließend in einen Erlenmeyerkolben überführt. Laut Arbeitsanweisung wurde die Öl-Saft-Emulsion mit je 30 ml Petrolether (PE) 11-mal extrahiert.

Die Mischung wurde dafür mit einem Magnetstäbchen auf einen Magnetrührer mindestens bei 1000 U/min gerührt. Dieser Schritt wurde 8-mal durchgeführt, jedoch stellte sich bei der 9. Extraktion keine Phasentrennung mehr ein. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass hier mit einer größeren Menge Rohsaft gearbeitet wurde, als in der Arbeitsanweisung und demnach eine größere Menge Petrolether erforderlich war. Daher wurden weitere 60 ml zu der Mischung zugesetzt. Weitere zwei Extraktionen wurden mit je 70 ml Petrolether durchgeführt. Die PE-Phasen wurden mit einer Pasteurpipette entnommen und in einem Becherglas gesammelt. Die vereinigten Phasen wurden anschließend filtriert und der Petrolether wurde unter Vakuum im Rotationsverdampfer bei 400 mbar und einer Wasserbadtemperatur von 43°C entfernt. Durch die Extraktion konnte eine Ausbeute 1,46 g PE-Extrakt erzielt werden.

3.3 Fraktionierung

Die Fraktionierung der methanolischen Fraktion erfolgte mittels Flüssig-Flüssig-Ausschüttelung des Roh-Öls und orientierte sich an der Publikation von Kouka et al. (2019). Die Vorgangsweise in der Publikation sah eine Mischung von 1 g Öl mit 1 ml n-Hexan vor. Anschließend wurde diese Mischung mit 2 ml Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 8:2 versetzt. Um die zwei Phasen zu trennen, wurde die Mischung 3 Minuten gevortext und bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die obere, organische Phase verblieb und die untere, wässrige Phase wurde entnommen und in einem Behältnis gesammelt. Die Prozedur wurde zweimal wiederholt. Diese Arbeitsvorschrift der Publikation wurde in Vorversuchen mit kleineren Volumina erprobt und entsprechend verändert. Eine Veränderung betraf den prozentualen Anteil des Methanols. Eine klarere Phasentrennung stellte sich mit erhöhtem Wassergehalt ein und daher fiel die Wahl auf 70-prozentigen MeOH. Eine weitere Adaption betraf das Verhältnis von Ober- zu Unterphase. 1 ml PE-Extrakt wurde in 2 ml Hexan aufgenommen und mit 2 ml 70%igen MeOH ausgeschüttelt. Dies entsprach einem Verhältnis von 1:1 und nicht dem ursprünglichen von 1:2. Die Anzahl der Ausschüttelungen erhöhte sich von drei auf 10 Durchgänge. Zum Schluss wurden die gesammelten unteren Phasen nochmal mit Hexan gegengeschüttelt, um Verunreinigungen, die durch das Mitschleppen der Oberphase gegebenenfalls entstanden sind, entgegenzuwirken.

Die Fraktionen trugen im Verlauf der Arbeit unterschiedliche Bezeichnungen, ehe sie gegen Ende der Laborarbeit zusammengeführt als „finale methanolische Fraktion“ bestehen. Die Zusammenführung der unterschiedlichen Extrakte erfolgte nach Vergleich ihres DC-Fingerprints, die ident waren. Insgesamt wurden ungefähr 3,2 ml von verschiedenen PE-

Extrakten zur Generierung der finalen methanolischen Fraktionen eingesetzt. Der nachstehenden Tabelle 1 kann man die verwendeten Extrakte mit zugehöriger Mengenangabe für die jeweiligen methanolischen Teilfraktionen entnehmen. Nach der Zusammenführung der methanolischen Teilfraktionen und dem Entfernen des Lösungsmittels konnte eine Ausbeute von 17,76 mg bestimmt werden. Dies entspricht 0,55 % des eingesetzten Ausgangsmaterials.

Tabelle 1: Für die Gewinnung der methanolischen Fraktionen verwendete PE-Extrakte und deren Mengen

MeOH-Fraktionen	Extrakt-Bezeichnung	Eingesetzte Menge
MeOH-Fr. 1	PE-Extrakt Auskochung 4 25.10.22 MS	0,25 ml
	PE-Extrakt III Auskochung Sam. Rac.	0,15 ml
	PE-Extrakt Auskochung 12.10.22	0,6 ml
MeOH-Fr. 2	2. PE-Extrakt 2. Ernte Rohsaft Sam. Rac	0,25 ml
	PE-Phase 2. Ernte Rohsaft Sam. Rac.	0,2 ml
	PE-Phase 2. Auskochung Sam. Rac.	0,1 ml
	PE-Extrakt III Auskochung Sam. Rac.	0,05 ml
	PE-Extrakt aus Rohsaft 11.10.22	0,05 ml
	PE-Extrakt Auskochung 4 25.10.22	0,05 ml
MeOH-Fr. 3	PE-Extrakt, welcher in dieser Masterarbeit extrahiert wurde	1,46 ml (ganze Ausbeute, siehe Kapitel 3.1.2)
MeOH-Fr. 4		

3.4 Chromatographische Methoden

Die Chromatographie stellt eine analytische Trennmethode dar, die auch im (semi)-präparativen Maßstab durchgeführt werden kann (Gey M., 2021). Zwei nicht miteinander mischbare Substanzen, die als Phasen bezeichnet werden, sind für alle chromatographischen Methoden notwendig. Eine Phase befindet sich stationär im Trennsystem (stationäre Phase), die zweite Phase (mobile Phase) transportiert das Substanzgemisch über die stationäre Phase (Rücker G. et al., 2013). Die chromatographische Trennung erfolgt somit durch Wechselwirkung der Analyten mit einer mobilen und einer stationären Phase (Gey M., 2021). In diesem Unterkapitel werden die verwendeten chromatographischen Methoden, wie die Dünnschichtchromatographie (DC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) und die Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography (UHPSFC) näher vorgestellt.

3.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie zählt neben der Papierchromatographie zu den planarchromatographischen Verfahren (Rücker G. et al., 2013). Als stationäre Phasen dienen polare, aber auch chemisch modifizierte Silicagele, Aluminiumoxid, Cellulose oder Polyamid (Gey M., 2021). Diese Materialien werden als dünne Schicht auf Träger aufgebracht. Dafür werden entweder Glasplatten oder Folien aus Kunststoff, Aluminium oder aluminiumbeschichteten Kunststoff verwendet (Rücker G. et al., 2013).

Polare Adsorbentien benötigen für die Elution in der Regel unpolare Fließmittelgemische, jedoch werden meist polare „Modifier“ wie Ethanol bis zu 30% zugesetzt. Zu beachten ist auch die Löslichkeit der Analyten (Gey M., 2021). Nach Auftragen der Probelösung wird die Platte in eine mit Fließmittel gesättigte Entwicklungskammer gestellt und diese verschlossen. Die mobile Phase steigt durch Kapillarkräfte nach oben und löst die Analyten aus der Startzone und transportiert diese weiter. Abhängig von der Affinität der Analyten erfolgt eine Auftrennung der einzelnen Substanzbanden, welche sich im besten Fall nicht überlappen sollten und scharfe Flecken bilden. Nachdem die mobile Phase die Fließmittelfront der Platte erreicht hat und somit die Entwicklung vollendet ist, wird die Platte aus der Kammer entnommen. Gefärbte Banden sind vorteilhaft und können unter Tageslicht ausgewertet werden, dazu werden oft Derivatisierungsreagenzien benötigt, um die Banden sichtbar zu machen. Danach kann eine Analyse bei Tageslicht beziehungsweise verschiedenen Wellenlängen, wie 254 nm oder 366 nm, stattfinden (Gey M., 2021).

Im Zuge dieser Masterarbeit wurde die DC für analytische Untersuchungen sowie präparativ zur Isolierung von ausgewählten Substanzbanden herangezogen.

3.4.1.1 Analytische DC

Im Fokus der Untersuchungen mittels analytischer DC standen die Analyse der ausgewählten Fraktionen und die Fließmittelloptimierung. Die Probelösungen wurden mittels Glaskapillare, welche ein Fassungsvolumen von 5 µl besaß, auf die DC-Platte strichförmig appliziert. Die verwendeten Platten waren von MERCK hergestellte Aluminiumplatten, welche mit Silicagel beschichtet und mit einem Fluoreszenzmarker ausgestattet waren und stellten die stationäre Phase dar.

In dieser Arbeit wurden viele Fließmittelgemische erprobt, siehe Kapitel 4.1.1 Fließmittelloptimierung (Seite 23). Drei Fließmittelsysteme wurden in dieser Arbeit für weiterführende Analysen verwendet und sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Fließmittelsysteme; Auszug aus Tabelle 19, Seite 56

Fließmittelsystem	Verhältnis
Hexan:Aceton	25:13
Chloroform/Methanol	99+1
Dichlormethan/Methanol	9+1

Tabelle 19 (Seite 56) beinhaltet eine vollständige Auflistung der erprobten Mischungen der mobilen Phasen und ist dem Anhang zu entnehmen. Tabelle 3 führt die chromatographischen Parameter für die analytische DC an. Tabelle 4 listet das Instrument auf, welches zur Dokumentation verwendet wurde.

Tabelle 3: Chromatographische Parameter für die analytische DC

Stationäre Phase	Aluminium Silica 60 F ₂₅₄ Platten (durchschnittliche Teilchengröße 9,5 bis 11,5 µm)
Mobile Phase	variabel
Detektion	Weißes Licht und 366 nm
Derivatisierungsreagenz	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (bestehend aus 5 ml Anisaldehyd, 100 ml konz. Essigsäure, 845 ml Methanol, 50 ml konz. Schwefelsäure)

Tabelle 4: HPTLC Instrument

Instrument	CAMAG TLC Visualizer
	CAMAG Chromatogram Immersion Device (III)
Software	CAMAG Vision Cats

3.4.1.2 Präparative DC

Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurden spezielle HPTLC-Platten verwendet, die ebenfalls von MERCK bezogen wurden. Laut Hersteller sind diese Platten sensitiver als herkömmliche TLC-Platten. Im Gegensatz zur klassischen DC werden, zur Erhöhung der Trenneffizienz, dünnerne Schichten der stationären Phase (um die 100 µm) mit enger Korngrößenverteilung aufgetragen. Die Partikelgröße liegt zwischen 4 und 8 µm und schafft eine glatte Oberfläche der Platten. Mit der HPTLC wird somit eine schnelle und quantitative Analyse von komplexen Proben gewährleistet (Gey M., 2021;

https://www.merckmillipore.com/AT/de/product/HPTLC-Silica-gel-60-F254,MDA_CHEM-105642, aufgerufen am 07.01.2024).

Die Platten wurden zuerst mit dem Lösungsmittel (Petrolether) der Probe gewaschen. Anschließend wurde die Glasplatte ausreichend an der Luft getrocknet, um dann mit der ausgewählten mobilen Phase gewaschen zu werden. Nach erneuter Trocknung wurden die Platten bis zur Verwendung in Alufolie gelagert. Die Vorwäsche wurde durchgeführt, um die HPTLC-Platten von Feuchtigkeit und Verunreinigungen effektiv zu befreien.

Fraktion 10 wurde zu einer Konzentration von 2,5 mg/ml gelöst. Mittels Mikroliterspritze wurden 100 µl der Probe strichförmig mit der Hand auf die Platte aufgetragen. Nach Entwicklung der Platte wurden die Enden in das Derivatisierungsreagenz (siehe Tabelle 5, Seite 14) getaucht und mit einem Föhn erwärmt. Dieser Schritt war notwendig, um die Lage der Banden zu visualisieren, da die Banden underivatisiert unter UV-Licht schwer bis gar nicht erkennbar waren. Um ausgewählte Substanzflecken zu isolieren, wurde mit einem Skalpell die entsprechenden Zonen abgekratzt. Bei dieser Methode wichtig anzumerken, dass nur underivatisiertes Kieselgel abgekratzt wurde. Dies hatte den Grund, dass durch das Derivatisierungsreagenz chemischen Veränderungen an den einzelnen Substanzen entstehen könnten. Da die Kontrolle mittels UV-Licht in diesem Fall nicht möglich war, wurde hier „blind“ gearbeitet. Das bedeutet, dass davon auszugehen war, dass die Banden geradlinig verlaufen. Die Zonen, in der die Banden verlaufen sollten, wurden markiert und sorgfältig abgekratzt. Das gewonnene Silikagel wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt und anschließend mit dem Lösungsmittel (PE oder Aceton) versetzt. Um die Substanz vom Kieselgel zu eluieren wurde die Mischung am Magnetrührer 5 bis 10 Minuten gerührt. Das Gemisch wurde aus dem Erlenmeyerkolben filtriert und der Filter mit ausreichend Lösungsmittel gewaschen. Diese Anleitung zur Elution der Substanzen vom Kieselgel wurde insgesamt dreimal wiederholt. Zuletzt wurde die Lösung der Substanz am Rotavapor zur Trockene gebracht.

Der nachfolgenden Tabelle 5 können die exakten chromatographischen Parameter, welche bei der präparativen DC verwendet wurden, entnommen werden.

Tabelle 5: Chromatographische Parameter für die präparative DC

Stationäre Phase	Glas HPTLC Silica 60 F ₂₅₄ Platten (durchschnittliche Teilchengröße 4 bis 8 µm)
Mobile Phase	Hex:Ac (25:13), CHCl ₃ :MeOH (99+1)
Detektion	Sichtbares Licht, UV 366

Derivatisierungsreagenz	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (bestehend aus 5 ml Anisaldehyd, 100 ml konz. Essigsäure, 845 ml Methanol, 50 ml konz. Schwefelsäure)
--------------------------------	--

3.4.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) und Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ist eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenchromatographie (Gey M., 2021). Bei der Säulenchromatographie läuft die mobile Phase aufgrund des hydrostatischen Drucks von oben nach unten durch die mit der stationären Phase gefüllten Trennsäule. Resultierend aus der kleineren Partikelgröße und hohen Packungsdichte der Trennsäule wird dem Elutionsmittel ein Widerstand entgegengesetzt. Um trotzdem eine ausreichende Strömungsgeschwindigkeit des Laufmittels zu erhalten, wird bei der HPLC das Elutionsmittel mithilfe von Pumpen durch die Säule gedrückt. Die HPLC dient, wie alle chromatographischen Methoden, zur Trennung von Substanzgemischen sowie deren qualitativen und Analyse (Rücker G. et al., 2013).

Die Gradientenelution, welche bei dieser Methode verwendet wurde, bezeichnet eine konstante Veränderung in der Zusammensetzung des Elutionsmittels. Die Konzentrationsgradienten entstehen aus einem stärker eluierenden Lösungsmittel B in einem schwächer eluierenden Lösungsmittel A (%B in A) (Schwedt G., 2016). Detektoren registrieren die aus der Trennsäule eluierten Substanzen durch messbare Signale. Die Auswahl des passenden Detektors ist von den Substanzeigenschaften abhängig (Rücker G. et al., 2013). Zwei Detektoren werden im Folgenden beschrieben, welche bei der HPLC und UHPLC verwendet wurden und bei der analytischen Bewertung der Chromatogramme von großer Bedeutung waren.

Der Photodiodenarray-Detektor (PDA-Detektor) gehört zu den UV-Vis-Detektoren und misst die Absorption einer Substanz über den gesamten Wellenlängenbereich. Diese sogenannten Multikanalphotometer arbeiten mit nebeneinander angeordneten Photodioden. Jede einzelne Diode misst einen bestimmten kleinen Spektralbereich. Die Grundvoraussetzung für die Verwendung eines PDA-Detektors ist, dass die Analyten in der Probelösung chromophore Gruppen besitzen (Rücker G. et al., 2013). Es gibt aber Verbindungsklassen, die unter anderem mit UV-Detektoren nur schlecht oder gar nicht erfasst werden können, wie zum Beispiel Lipide und Zucker. Daher ist der Lichtstreuendetektor (ELSD, engl. Evaporative Light Scattering Detector) eine Alternative für UV-inaktive Substanzen. Das Eluat wird dabei in einer Düse

vernebelt und in einer geheizten Driftkammer in ein Aerosol umgewandelt. Die Partikelkonzentration kann über Streulichtmessung gemessen werden (Böcker J., 1997).

In dieser Masterarbeit wurde die HPLC für die Analyse der methanolischen Teilfraktionen verwendet. Als stationäre Phase kam eine RP-18e Säule zur Anwendung. Die mobile Phase war ein Gemisch aus Wasser + 0,1% Ameisensäure (Lösungsmittel A) und Acetonitril + 0,1% Ameisensäure (Lösungsmittel B).

Die vermessenen methanolischen Teilfraktionen wurden mit MeOH zu einer Konzentration von 5 mg/ml verdünnt und mittels SHIMADZU Auto Sampler in die HPLC-Anlage eingespritzt. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 1 ml/min. Die Auflistung der verwendeten HPLC-Instrumente ist Tabelle 6 zu entnehmen. Die Fließmittelgradienten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Diagramm 1 (Seite 17) ersichtlich.

Tabelle 6: Verwendete HPLC Instrumente und chromatographische Parameter

Instrumente	SHIMADZU Auto Sampler SIL-20AC AT SHIMADZU Communication Bus Module CBM-20A SHIMADZU Column Oven CTO-20AC SHIMADZU Degasser DGU-20A ₅ SHIMADZU Diode Array Detector SPD-M20A SHIMADZU Liquid Chromatograph LC-20AD SHIMADZU Low temperature-evaporative light scattering detector ELSD-LT
Software	SHIMADZU Lab solutions
Stationäre Phase	LiChrospher 100 RP18e, 5 µm, 250 mm x 4 mm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Mobile Phase	A – ddWasser + 0,1% Ameisensäure B – Acetonitril + 0,1% Ameisensäure
Gradienten	50-98% in 30 min, Rate: 1,6%/min 80-98% in 11,25 min, Rate: 1,6%/min

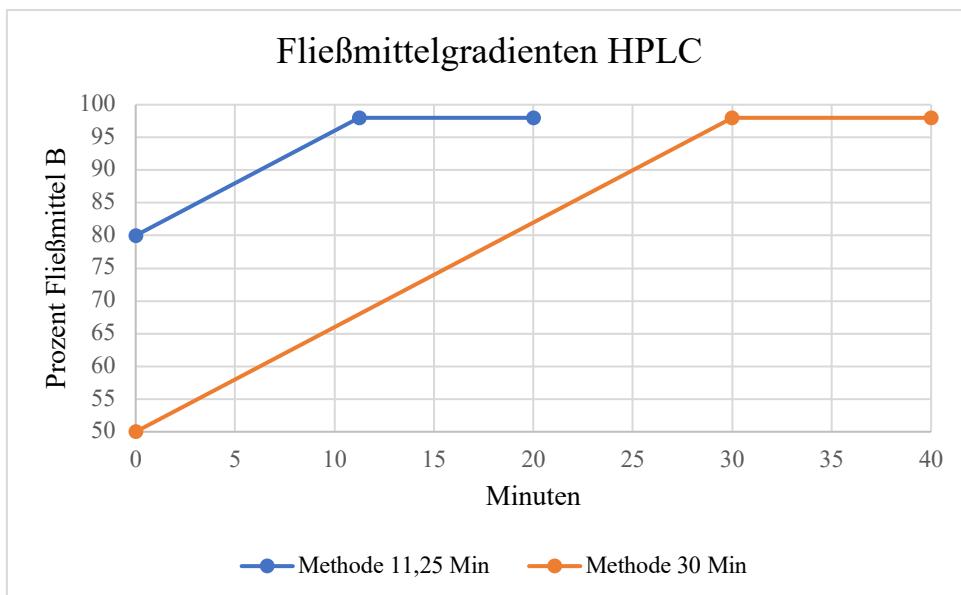


Diagramm 1: Fließmittelgradienten für die HPLC

Die Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) führt schnelle und hocheffiziente flüssig-chromatographische Trennungen durch. Im Vergleich zu der herkömmlichen HPLC werden Säulen mit Partikelgrößen um $2\text{ }\mu\text{m}$ und zum Teil kleiner ($1,3 - 1,7\text{ }\mu\text{m}$) eingesetzt. Daraus resultieren höhere apparative Anforderungen an einzelne Baugruppen der UHPLC-Anlage, denn diese Säulen erhöhen den Säulenvordruck auf mehrere Hundert Bar. Die Säulenlängen liegen im cm-Bereich und die Analysenzeiten betragen Sekunden bis einige Minuten (Gey M., 2021). Die UHPLC wurde in dieser Arbeit herangezogen, da die Methode gegenüber der HPLC einige Vorteile besitzt. Die Analysezeit wurde stark verringert und miteinhergehend konnte Lösungsmittel und Probenvolumen eingespart werden. Aufgrund der hohen Drücke und kleineren Partikeln kam es zu einer präziseren Trennung der Peaks. Ein entscheidender Grund mit der UHPLC zu arbeiten war, dass das für diese Masterarbeit verfügbare Gerät von WATERS einen Fraktionensammler besaß und somit präparativ gearbeitet werden konnte.

Als stationäre Phase wurde eine BEH-C18 Säule verwendet. Die mobile Phase war ein Gemisch aus Wasser (Lösungsmittel A) und Acetonitril (Lösungsmittel B). Sowohl die methanolischen Teilfraktionen als auch die finale methanolische Fraktion wurden mit MeOH verdünnt und mittels WATERS Sample Manager in die UHPLC-Anlage eingespritzt. Die Flussrate der mobilen Phase betrug $0,3\text{ ml/min}$. Die verwendeten UHPLC-Instrumente und chromatographischen Parameter sind in Tabelle 7 (Seite 18) aufgelistet. Der Fließmittelgradient der für die finalen Analysen verwendet wurde, ist Diagramm 2 (Seite 18) zu entnehmen.

Tabelle 7: Verwendete UHPLC Instrumente und chromatographische Parameter

Instrumente	WATERS Sample Manager
	WATERS Column Manager
	WATERS Quaternary Solvent manager
	WATERS Photodiode Array Detector
	WATERS Isocratic Solvent Manager
	WATERS Evaporative Light Scattering Detector
Software	Empower 3
Stationäre Phase	BEH-C18
Mobile Phase	A – Wasser
	B – Acetonitril
Gradient	70-98% in 6 Minuten, Rate 4,7%/min

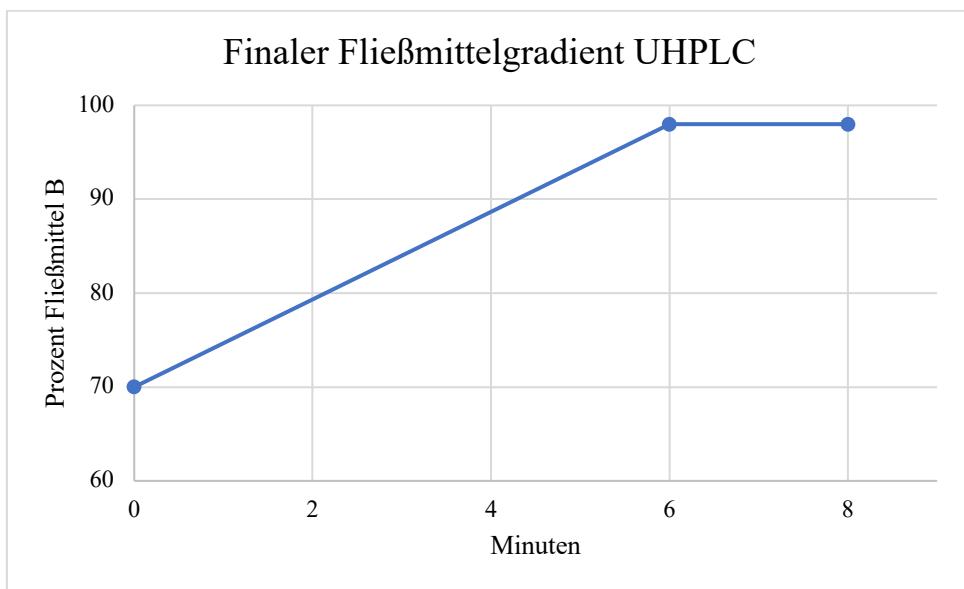


Diagramm 2: Finaler Fließmittelgradient der mobilen Phase, welcher für die UHPLC-Analyse verwendet wurde

3.4.3 Supercritical Fluid Chromatography

Die Supercritical Fluid Chromatography (SFC) ist bezüglich ihrer Funktion eine Art „Hybrid-Trenntechnik“ zwischen Gas- und Flüssigchromatographie. Das besondere Charakteristikum ist der Aggregatzustand von Kohlendioxid, das als mobile Phase dient und als überkritisches Fluid vorliegt. Das überkritische Fluid definiert einen Stoff, dessen Temperatur und Druck gleichzeitig über dem kritischen Punkt liegen. Das kann als eine Art Übergangszustand zwischen Gas und Flüssigkeit angesehen werden. Demzufolge besitzen überkritische Fluide Eigenschaften von Gasen als auch Flüssigkeiten. Sie können zum Beispiel wie ein Gas komprimiert werden und verfügen über variable Löslichkeit. Es gelingt mit dieser Methode Fragestellungen zu bearbeiten, die mit der HPLC nicht zielführend waren (Gey M., 2021).

In dieser Masterarbeit wurde die SFC zur Analyse der präparativ isolierten Substanz HH1 genutzt. Hierfür wurde das Instrument ACQUITY UPC² von WATERS verwendet (siehe Tabelle 8). Die Proben wurden jeweils in Hexan:Isopropanol (70:30) gelöst. Die Messung erfolgte mit der optimierten Methode der Vorgängerarbeit (Tabelle 9). Dafür wurde eine Torus 2-Picolylamin (2-PIC) Säule als stationäre Phase verwendet. Die mobile Phase war eine Mischung von CO₂ und einem Modifier (Methanol). Der Gradient des Modifiers war 1-7 % in 10 Minuten, daraufhin ein 1-minütiges Plateau bei 7 %. Anschließend wurde auf 1 % in 1 Minute äquilibriert (Tabelle 9). Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Tabelle 8: Verwendete UHPSFC Instrumente

Instrumente	WATERS ACQUITY UPC ² PDA Detector WATERS ACQUITY UPC ² Column Manager WATERS ACQUITY UPC ² Convergence Manager WATERS ACQUITY UPC ² Sample Manager WATERS ACQUITY UPC ² Binary Solvent Manager WATERS ACQUITY UPC ² QDA Detector WATERS ACQUITY UPC ² ELSD WATERS ACQUITY UPC ² Isocratic Solvent Manager
Software	Empower 3

Tabelle 9: UHPSFC-Methode von Vorgängerarbeit übernommen

Säule	Dimension (mm)	Modifier	Gradient (% Modifier)	ISM Modifier	Dauer
2-Picolylamin (2-PIC)	3,0 x 100	MeOH	1 – 7%	MeOH + H ₂ O (95+5) + 10 mM AA	11 min (10 min Anstieg + 1 min Plateau)

3.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie zählt zu der Spektroskopie, welche auf Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und des zu analysierenden Probematerials beruht. Diese Methode wird in Kombination mit der Chromatographie (GC-MS, LC-MS) vorwiegend für die Quantifizierung aufgetrennter Analyten aus komplexen Matrices verwendet. Neben der Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR) dient sie aber vor allem der Strukturaufklärung von organischen Molekülen. Die Moleküle in der zu analysierenden Probe werden mittels einer Ionenquelle in positiv und negativ geladene gasförmige Ionen transformiert. In Folge werden diese in einem Analysator nach Masse-zu-Ladungsverhältnis

(m/z) getrennt und anhand eines Detektors erfasst. Aufgrund dieser Ionentrennung im elektromagnetischen Feld stellt die Massenspektrometrie eine Trennmethode dar (Gey M., 2021).

In dieser Masterarbeit wurde die Massenspektrometrie zur qualitativen Analyse genutzt, um potenzielle Strukturen aus der finalen methanolischen Fraktion zu identifizieren. Das Ziel bei diesem Ansatz war, mithilfe von Datenbanken und Analyse von Fragmentierungsmustern, eine Struktur oder Strukturgruppe zu identifizieren.

In Tabelle 10 sind die chromatographischen Parameter und Instrumente aufgelistet mit denen die UHPLC durchgeführt wurde. Die im Anschluss gekoppelte Massenspektrometrie wurde mit dem X500 QTOF System von Sciex durchgeführt (Tabelle 11).

Von den drei häufigsten Ionen konnten durch kollisionsinduzierte Dissoziation TOF MS/MS-Scans aufgenommen werden. Genaue Informationen zu der Fragmentierungsmethode sind in der Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 10: Verwendete UHPLC Instrumente und chromatographische Parameter für die massenspektrometrische Analyse

Instrumente	ExionLC Controller ExionLC Degasser ExionLC AD Pump ExionLC AD Autosampler ExionLC AD Column oven
Software	Analyst Software
Stationäre Phase	RP-C18 Säule (Kinetex; 2.1 mm × 15 cm, 2.6 µm, C18 100 Å , Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)
Mobile Phase	A – Wasser:Ameisensäure (100:0,02) B – Acetonitril:MeOH:Ameisensäure (80:20:0,02)
Gradient	5-95% in 15 Minuten, Rate 6%/min

Tabelle 11: Verwendete Instrumente Massenspektrometer

Instrument	X500 QTOF System (Sciex)
Software	Analyst Software
Ionenquelle	ESI
Analysator	TOF-MS

Tabelle 12: Fragmentierungsmethode und weitere Parameter der massenspektrometrischen Messung

Fragmentierungsmethode	kollisionsinduzierte Dissoziation
Kollisionsenergie	35 V

Akkumulierungszeit	0,1 ms
Decluttering potential	-80 V

3.6 Lösungsmittel und Chemikalien

In Tabelle 13 und Tabelle 14 sind die Lösungsmittel und Feststoffe aufgelistet, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 13: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Spezifikation	Hersteller	Standort
Aceton	Aceton Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Acetonitril	Acetonitril HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Ameisensäure	Ameisensäure Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe
Ammoniak conc.	Ammoniaklösung Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe
Chloroform	AnalaR Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Dichlormethan	AnalaR Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Ethylacetat	Ethylacetat Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Ethylformiat	Ethyl formate for synthesis	Merck	Darmstadt
n-Hexan	Hexane (mixture of isomers) HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Isopropanol	2-Propanol HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Methanol	Methanol HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Petrolether	Petrolether ÖAB	destilliert	Wien
Toluol	AnalaR Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Wasser	doppelt destilliertes Wasser	Deionisiertes Wasser, destilliert mit GFL 2004	Wien

Tabelle 14: Verwendete Festsubstanzen

Substanz	Hersteller	Standort
Oleanolsäure	Sigma-Aldrich	St. Louis
Sitosterol	Sigma-Aldrich	St. Louis
Stigmasterin	Merck	Darmstadt
Ursolsäure	PhytoLab	<u>Vestenbergsgreuth</u>

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Masterarbeit dargestellt. Im ersten Teil steht die Analyse von Fraktion 10 und 11 der Vorgängerarbeit im Vordergrund. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der analytischen Charakterisierung der methanolischen Fraktion.

4.1 Dünnschichtchromatographische Analyse der Ausgangsfraktionen

Um einen Einblick in die Zusammensetzung der verschiedenen Fraktionen zu bekommen und später eine Auswahl treffen zu können, mit welchen Fraktionen weitergearbeitet werden soll, wurden die einzelnen Fraktionen der Vorgängerarbeit mittels DC analysiert. Dafür wurden diese zuerst auf eine Konzentration von 10 mg/ml mit Petrolether verdünnt und auf eine DC-Platte aufgebracht. Die mobile Phase, mit der die DC-Platte entwickelt wurde, entstammt der Vorgängerarbeit und war das System Hexan:Aceton 25:4 (Zweifachentwicklung).

Die entwickelte und mit Anisaldehyd derivatisierte DC-Platte ist in den nächsten Abbildungen ersichtlich, einmal bei Tageslicht (Abbildung 3), einmal bei UV 366 nm (Abbildung 4, Seite 23) aufgenommen. Dominant erscheinte die sogenannte „Fettwolke“ bei PE-Extrakt Abkochung 4, welche als Referenz aufgetragen wurde. Diese sehr breite, verschwommene Bande, die als Art Wolke interpretiert werden konnte, deutete auf sehr lipophile Substanzen hin. Daher konnte man davon ausgehen, dass die Banden darunterliegend Substanzen repräsentieren, die einen lipophilen Charakter aufweisen.

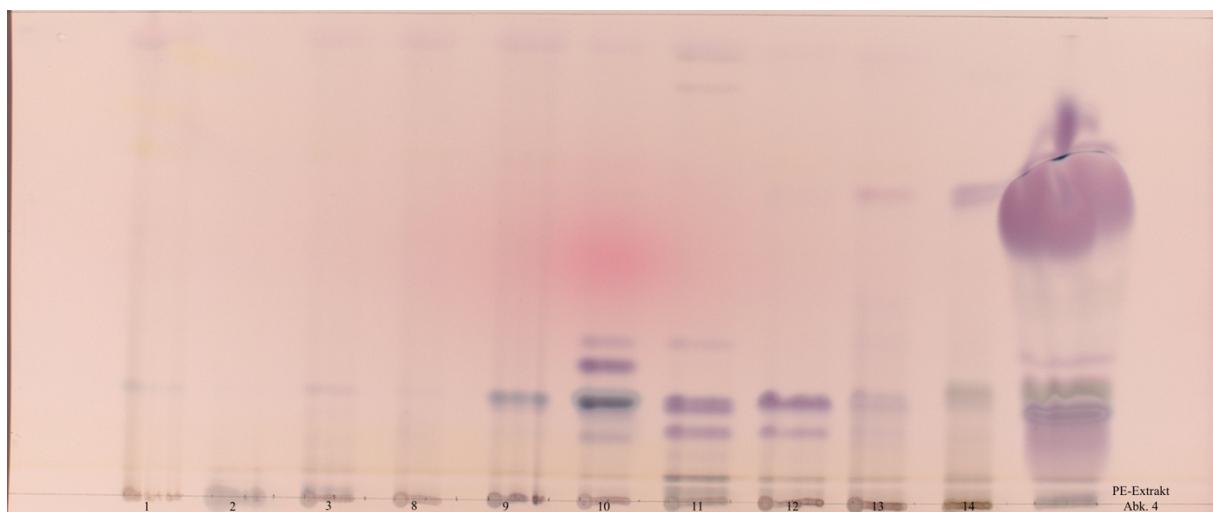


Abbildung 3: DC-Untersuchung von Fraktionen der Vorgängerarbeit
Mobile Phase Hex:Ac 25:4, 2x
Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurerereagenz: Weißes Licht

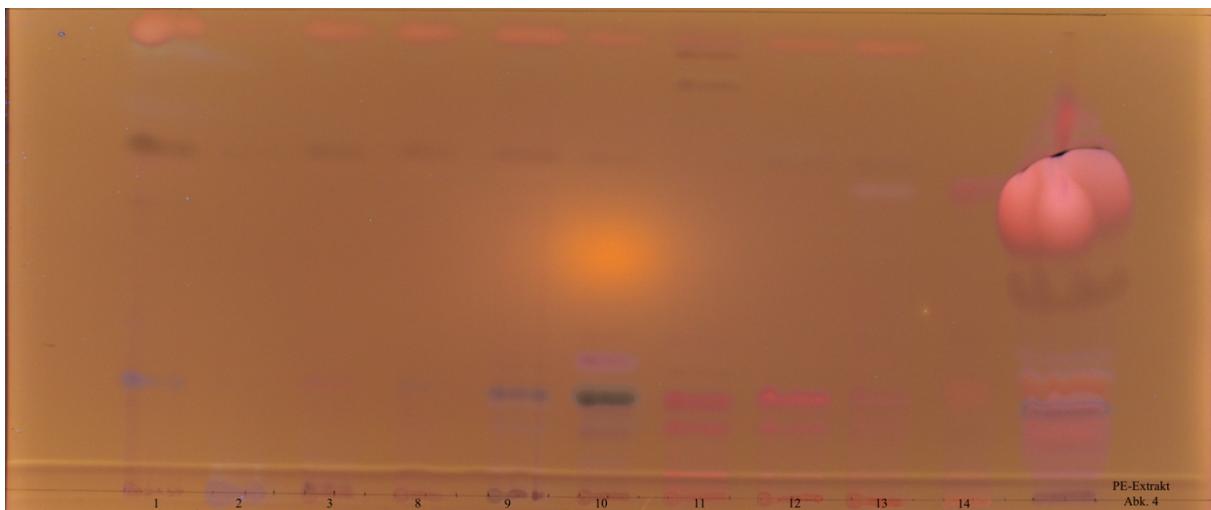


Abbildung 4: DC-Untersuchung von Fraktionen der Vorgängerarbeit
 Mobile Phase Hex:Ac 25:4, 2x
 Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurerereagenz: UV₃₆₆

Zuerst wurde die Fraktion 11 für die analytischen Versuche ausgewählt, da diese Fraktion eine Ausbeute von 17,9 mg erzielte und demnach das zweitmeiste Ausgangsmaterial für die Analysen zur Verfügung stand. Später wurde die Fraktion 10, aufgrund der Interpretation von Analysenergebnissen, in die Untersuchungen miteinbezogen.

4.1.1 Fließmitteloptimierung

In der Vorgängerarbeit wurde mit einem Fließmittelgemisch gearbeitet, welches für die Zwecke der vorangegangenen Arbeit ausreichende Trennung der Komponenten ermöglichte. Mit dem Aspekt in Folge Reinsubstanzen zu isolieren, erschien es sinnvoll eine mobile Phase zu finden, welche eine verbesserte Trennung der einzelnen Substanzen erzielte, um präparativ arbeiten zu können.

Bei der Methodenentwicklung eines geeigneten Fließmittels kann man einigen Hinweisen folgen. Bei der Verwendung von Kieselgel als stationäre Phase, welches am häufigsten und auch in dieser Arbeit erfolgt, werden die Substanzen in der Reihenfolge ihrer Polarität aufgetrennt. Unpolare Substanzen werden am Kieselgel, welches eine hohe Adsorptionskraft besitzt, wenig retiniert und wandern höher auf der DC-Platte als polare Substanzen. Deshalb ist es wichtig ein wenig polares Fließmittel mit geringer Elutionsstärke einzusetzen, um zu verhindern, dass die Substanzen bis zur Fließmittelfront gelangen.

Die zu analysierenden Substanzen sollten idealerweise im mittleren Bereich der DC-Platte liegen. Die Mischung des Fließmittels aus einer stärker und einer schwächer polaren Komponente ist geeigneter als ein einziges Lösungsmittel. Wenn die zu trennenden Substanzen auf der Platte zu hoch liegen, sollte der Anteil der polaren Komponente in der mobilen Phase

verringert werden. Im umgekehrten Fall, dass sich die Substanzen in der Nähe des Startflecks befinden, sollte die Polarität des Fließmittels erhöht werden (Rücker G. et al., 2013).

Die Fließmitteloptimierung umfasste die Austestung verschiedener Fließmittelsysteme. Insgesamt wurden 23 verschiedene Fließmittelmischungen unterschiedlicher Zusammensetzung getestet.

Das Fließmittelgemisch Hexan und Aceton in einem Verhältnis 25:4 diente als mobile Phase in der Vorgängerarbeit. Die DC-Platten wurden zweifach entwickelt, um die Trennung zu verbessern. Ausgehend von diesen Bedingungen wurden verschiedene Testsysteme angewendet. Wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt, startete die Fließmitteloptimierung mit Fraktion 11. Der PE-Extrakt Abkochung 4 wurde als Referenz mit auf die DC-Platte aufgetragen.

Der Fokus bei der Austestung unterschiedlicher Fließmittelgemische lag bei der Optimierung des bereits etablierten Systems. Demnach wurde das Verhältnis Hexan zu Aceton adaptiert. In Tabelle 15 werden die diversen Adaptionen der Mischung aufgelistet.

Tabelle 15: Auflistung der ausgetesteten Verhältnisse des Fließmittels Hexan:Aceton an F11 und PE-Extrakt Abkochung 4, Auszug aus Tabelle 19, Seite 56

Verhältnis Hexan:Aceton	Zusatz
25:4	1% Ameisensäure
25:6	-
	1% Ameisensäure
25:8	-
	1% Ameisensäure
	2% Ameisensäure
	1% Ameisensäure
	0.5 ml MeOH
	2% Ameisensäure
1:1	1 ml MeOH
	-
25:15	-
25:13	-
	2% Ameisensäure

Der Zusatz von mehr Aceton zur Mischung erhöhte die Polarität und bewirkte, dass die Banden weiter nach oben wanderten. In Abbildung 5 (Seite 25) wurde bei dem Vergleich zweier Platten der beschriebene Effekt verdeutlicht – die Banden der rechten Platte lagen näher an der Fließmittelfront als jene der linken Platte, bedingt durch die erhöhte Menge an Aceton.

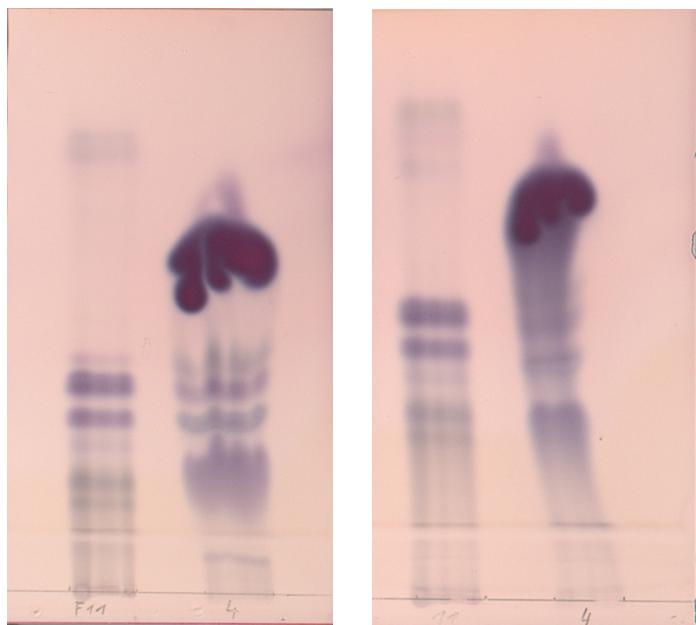


Abbildung 5: DC-Untersuchung von F11 und PE-Extrakt Abkochung 4
 links: Mobile Phase: Hex:Ac 25:6
 rechts: Mobile Phase: Hex:Ac 25:8
 Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurerereagenz: Weißes Licht

Wenn eine Substanz saure oder basische Eigenschaften besitzt, kann es zur Ausbildung von Dissoziationsgleichgewichten kommen. Die Dissoziation kann, durch Zusatz geringer Mengen (1 bis 2%) eines Modifiers zum Laufmittel, zurückgedrängt werden. Als Modifier eignen sich bei sauren Analysensubstanzen Essigsäure oder Ameisensäure, bei basischen Substanzen kommen konzentrierter Ammoniak oder Diethylamin zur Anwendung (Rücker G. et al., 2013). Bei der Methodenkonzeption wurde solch ein Ansatz nicht vernachlässigt und Ameisensäure (FA) in geringen Mengen zugesetzt. Das Ziel hierbei war, eine Schärfung der Banden zu erzielen, jedoch mit geringem Erfolg. Mit der weiterführenden Idee präparativ zu arbeiten, sollte ein Laufmittel gefunden werden, welches säurefrei ist. Der Hintergrund dafür war, dass die infolge der präparativen DC isolierten Substanzen unbekannt waren und daher auch nicht bekannt war, wie stabil diese waren. Das Ergebnis der Adaption der mobilen Phase der Vorgängerarbeit war ein Verhältnis Hexan zu Aceton von 25:13. Mit diesem Laufmittel wurde im nachfolgenden Kapitel 4.1.2 (Seite 26) gearbeitet und auch in die präparative Arbeit gestartet. Die praktische Arbeit zeigte eine unzureichende Trennung der zu analysierenden Banden auf den HPTLC-Platten und daher wurde nach einer Alternative gesucht.

Die Mischung Chloroform mit Methanol war eine weitere Option. Die Austestungen erfolgten an Fraktion 10 und 11. Hierfür wurden drei unterschiedliche Varianten der Mischung erprobt, doch 99 Teile Chloroform und 1 Teil Methanol erbrachte eine ausreichende Trennung der Banden mit einer guten Lage auf der DC-Platte (Abbildung 6, links). Demnach wurde die präparative Arbeit mit diesem Fließmittelgemisch fortgeführt.

Die Polarität wurde erhöht für den Versuch die Komponenten mittiger zu platzieren. (Abbildung 6, Mitte). Jedoch ergab diese Entwicklung unscharfe, verschwommene Banden und daher keine verbesserte Trennung. Ein weiterer Ansatz stellte die Mehrfachentwicklung dar, um die Banden weiter oben lokalisieren zu können (Abbildung 6, rechts). Die zweifache Entwicklung stellte im konkreten Fall aber keine Verbesserung des Systems dar und bedeutete nur mehr Zeitaufwand, welcher nicht gerechtfertigt war.

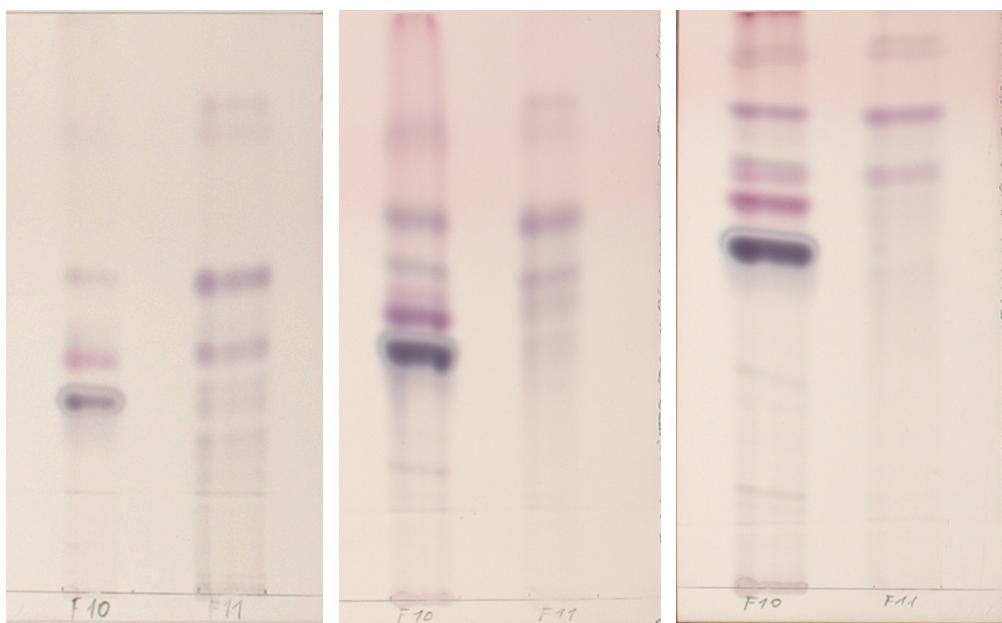


Abbildung 6: DC-Untersuchung von F11 und F10
 links: Mobile Phase: $\text{CHCl}_3+\text{MeOH}$ (99+1)
 Mitte: Mobile Phase: $\text{CHCl}_3+\text{MeOH}$ (97+3)
 rechts: Mobile Phase: $\text{CHCl}_3+\text{MeOH}$ (99+1), 2x
 Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurerereagenz: Weißes Licht

4.1.2 Analytischer Vergleich mit ausgewählten Referenzsubstanzen

Der analytische Vergleich mit ausgewählten Referenzsubstanzen wurde an Fraktion 10 und Fraktion 11 durchgeführt. Oleanolsäure und Ursolsäure sind Vertreter der Triterpene. Sitosterol und Stigmasterin sind Phytosterole. Das lipophile Profil der beiden Substanzklassen wurde als geeignet empfunden sie als Referenzsubstanzen zu selektieren. Ausgewählt wurden die Vertreter der Substanzklassen nach Vorrat der Abteilung für Pharmakognosie.

Der Vergleich wurde mittels analytischer Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Das Laufmittel bei diesem Versuch war Hexan:Aceton 25:13 (siehe Kapitel 4.1.1 Fließmitteloptimierung, Seite 23). Die Fraktionen 10 und 11 wurden in Petrolether gelöst und die Phytosterole in Ethanol zu einer Konzentration von 1 mg/ml. Die Triterpene wurden in gelöster Form (Hexan:Isopropanol 70:30) und unbekannter Konzentration von Vorversuchen einer anderen Arbeit der Abteilung für Pharmakognosie bezogen.

In Abbildung 7 sieht man die entwickelte und derivatisierte DC-Platte mit der Fraktion 11 und den Referenzen bei unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen. Die Substanzen wurden von links nach rechts aufgetragen: Oleanolsäure (Ol), Ursolsäure (U), Fraktion 11 (F11), Stigmasterin (St) und Sitosterol (Si).

Auffallend bei der Begutachtung unter UV-Licht mit der Wellenlänge 366 nm (Abbildung 7, rechts) war die Ursolsäure mit der intensiven gelben Fluoreszenz. Da die Fraktion 11 in ihren Banden keine vergleichbare Fluoreszenz aufwies, konnte Ursolsäure als Inhaltsstoff der Fraktion 11 ausgeschlossen werden.

Die beiden Phytosterole Stigmasterin und Sitosterol lagen auf der gleichen Höhe wie eine Bande der Fraktion 11, jedoch unterschied sich die Fluoreszenz. Die Phytosterole zeigten bei Tageslicht (Abbildung 7, links) einen Art „Schleier“ um ihre Banden und fluoreszierten dunkelgrün bei UV 366 nm (Abbildung 7, rechts). Beim Vergleich dieser Banden mit Fraktion 10 (Abbildung 3, Abbildung 4, Seite 22 und 23) wurde eine Ähnlichkeit zwischen den Phytosterolen und Fraktion 10 festgestellt. Somit wurde Fraktion 10 in weitere Analysen miteinbezogen.

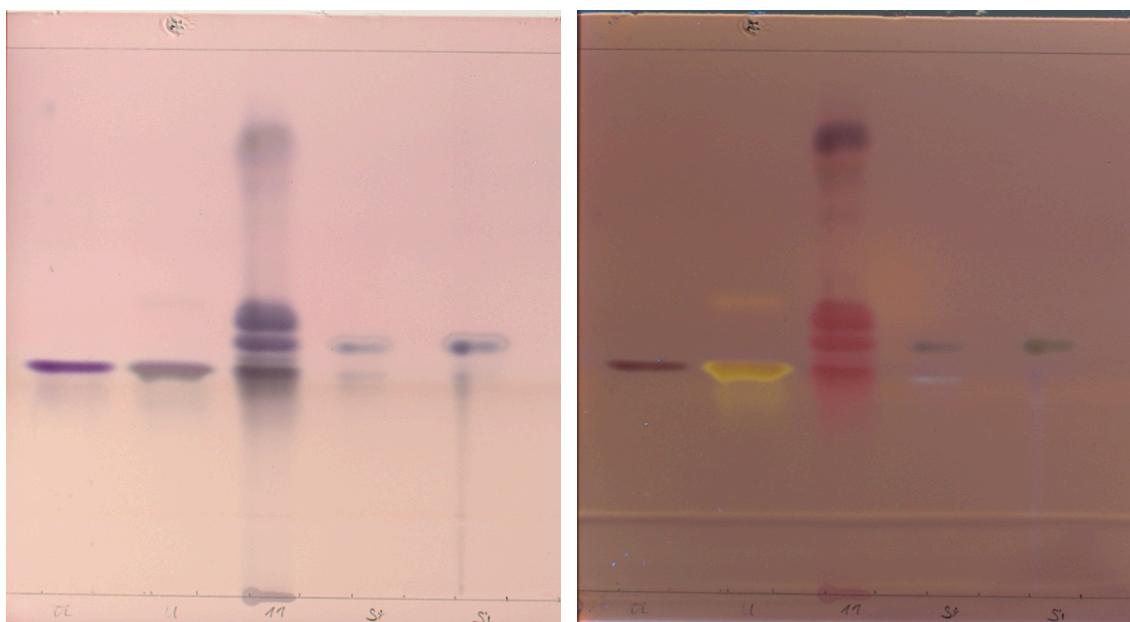


Abbildung 7: DC-Untersuchung von Ol, U, F11, St und Si (links nach rechts)

Mobile Phase: Hex:Ac 25:13 + 2% Ameisensäure

Derivatisierungsreagens: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagens; links: Weißes Licht, rechts: UV₃₆₆

Die Lage der Banden der Phytosterole deckte sich mit einer Bande von Fraktion 10 (siehe Abbildung 8, links, Seite 28). Bei Begutachtung unter UV 366 nm (Abbildung 8, rechts, Seite 28) erkannte man bei Fraktion 10 eine dunkelgrüne Fluoreszenz, die mit der Fluoreszenz der Phytosterole korrelierte. Man erkannte auch den charakteristischen „Schleier“ bei der entsprechenden Bande der Fraktion 10.

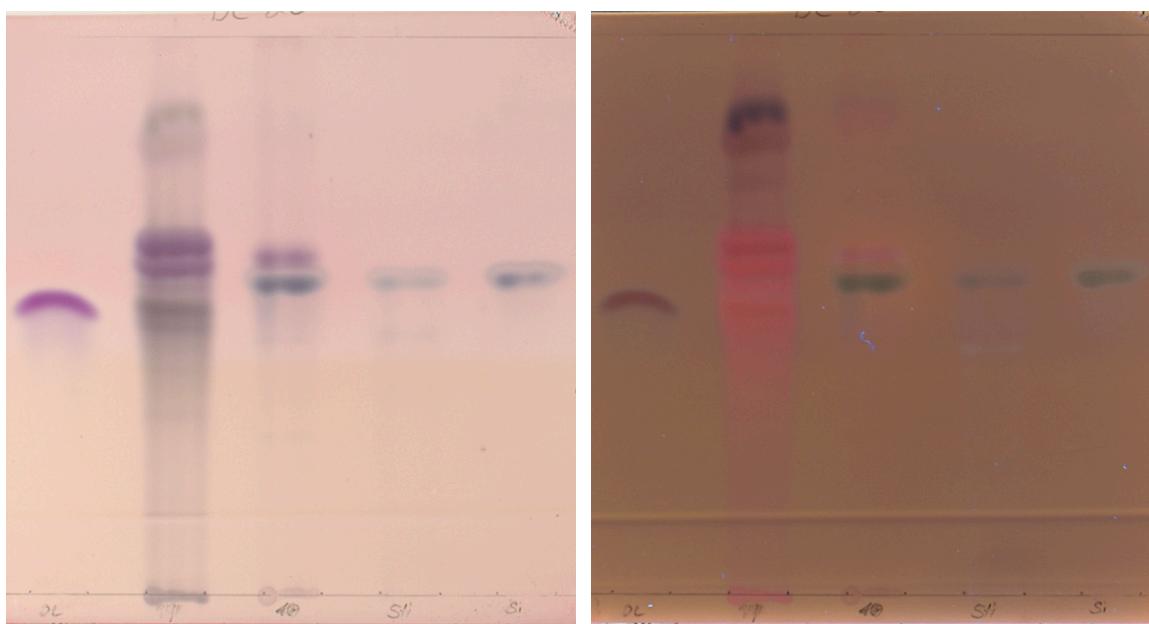


Abbildung 8: DC-Untersuchung von Ol, F11, F10, St und Si (links nach rechts)

Mobile Phase: Hex:Ac 25:13

Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz; links: Weißes Licht, rechts: UV₃₆₆

Somit wurde bei einem weiteren Versuch die Fraktion 10 mit den beiden Phytosterolen überlappend aufgetragen (Abbildung 9, Seite 29). Überlappend bedeutet, dass die Referenzsubstanzen so appliziert werden, dass sich die resultierenden Banden mit jenen aus Fraktion 10 überschnitten. Der Schleier zog sich über alle drei Banden und somit war der Verdacht naheliegend, dass es sich bei dieser Bande der Fraktion 10 um ein Phytosterol handeln könnte. Die Erkenntnis war Grundlage für die weiteren Analysen mittels präparativer DC und SFC (Kapitel 4.2, Seite 29).

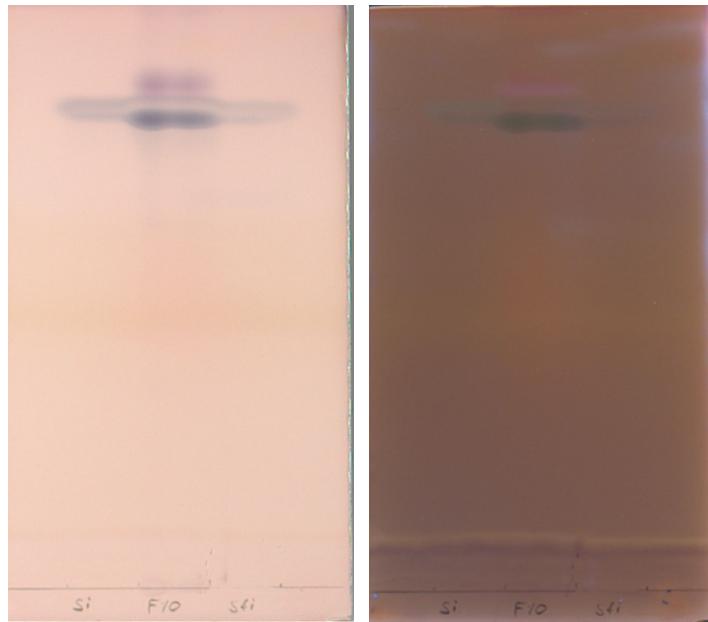


Abbildung 9: DC-Untersuchung von Si, F10 und St (links nach rechts)

Mobile Phase: Hex:Ac 25:13, 2x

Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz; links: Weißes Licht, rechts: UV₃₆₆

4.2 Analyse von Fraktion 10 mittels präparativer DC und SFC

Grundlage der präparativen Dünnschichtchromatographie und der anschließenden Analyse mittels SFC war die Annahme, dass es sich bei einer Bande um ein Phytosterol handeln könnte. Somit war das Ziel der präparativen DC, die mutmaßliche Bande zu isolieren, um sie später leichter analysieren zu können. Die darübergelegene Bande wurde zusätzlich isoliert.

Die präparative Dünnschichtchromatographie wurde, wie in Kapitel 3.4.1.2 (Seite 13) beschrieben, durchgeführt und startete unter Verwendung des Fließmittelgemisches Hexan:Aceton 25:13. Die Abbildung 10 (Seite 30) zeigt die entwickelte DC-Platte, welche am rechten Rand derivatisiert wurde, um die Position der Banden zu lokalisieren. Die untere Bande wurde als HH1 und die darüberliegende, obere Bande als HH2 bezeichnet. Wie schon im Kapitel 4.1.1 Fließmitteloptimierung (Seite 23) diskutiert, waren die zu analysierenden Banden HH1 und HH2 unzureichend voneinander getrennt (siehe Abbildung 10, Seite 30).

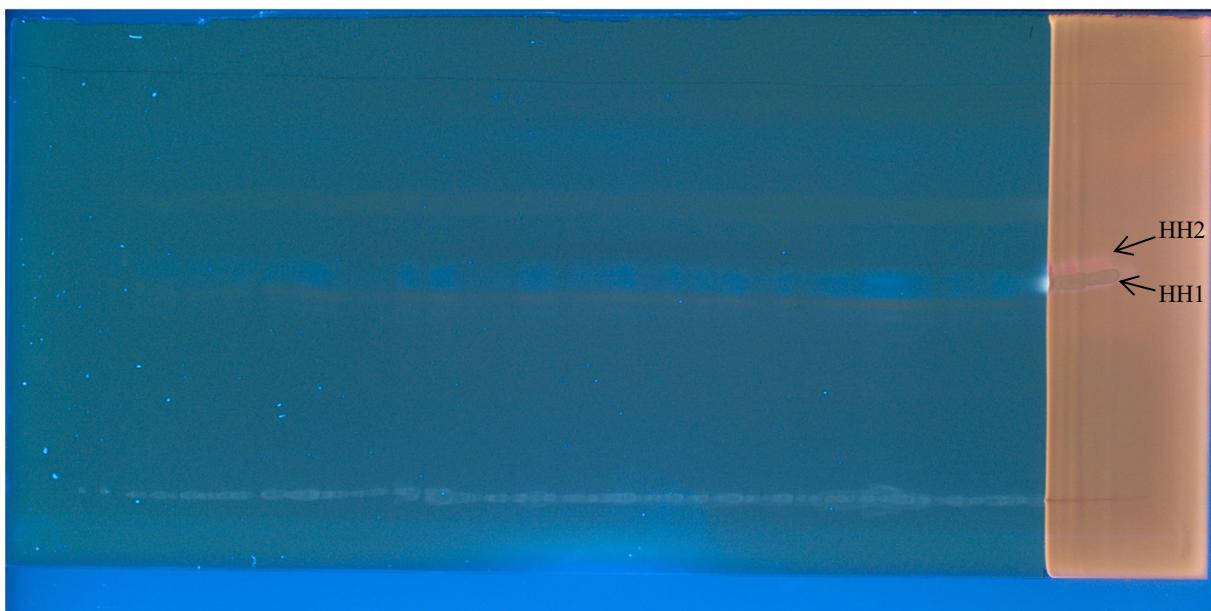


Abbildung 10: präparative DC von F10

DC-Methode: siehe Tabelle 5, Seite 14

Mobile Phase: Hex:Ac 25:13

Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurerereagenz: UV₃₆₆

Mittels analytischer DC wurde die Isolierung von HH1 und HH2 überprüft (Abbildung 11, Seite 31). Die unzureichende Isolierung zeigte sich dadurch, dass die unterste Bande in beiden Isolierungen enthalten war. Dies war durch die schlechte Abgrenzung der beiden Banden auf der HPTLC-Platte zueinander bedingt. Daher kam es zu dem Ergebnis, dass die Probe HH2 nicht rein isoliert werden konnte und Reste von HH1 mit abgekratzt wurden.

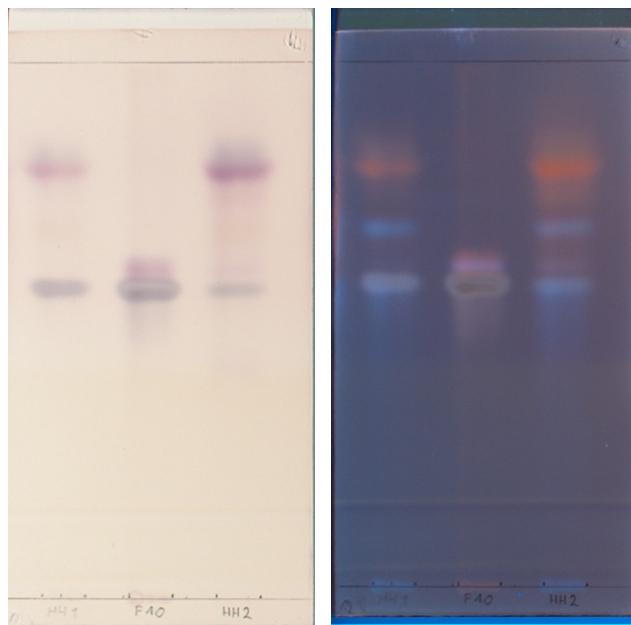


Abbildung 11: Analytische DC: Kontrolle von HH1 (links) HH2 (rechts), F10 (Mitte) als Referenz aufgetragen
 Mobile Phase Hex:Ac 25:13
 Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz; links: Weißes Licht, rechts: UV₃₆₆

Der Wechsel auf ein anderes Fließmittel war daher unumgänglich, da die unzureichende Trennung der Komponenten die präparative Arbeit erschwerte. Die Nutzung eines polareren Lösungsmittels (Chloroform mit Methanol 99+1) führte zu einer besseren Trennung der zu erforschenden Banden (siehe Abbildung 6 links, Seite 26). Bei der analytischen Kontrolle nach der Isolierung der Banden war in beiden Proben, HH1 und HH2, eine unter 366 nm orange-braun fluoreszierende Bande zu sehen. Es wurde vermutet, dass es sich um eine Verunreinigung im Petrolether handeln könnte. Daher wurde nach einem anderen Lösungsmittel gesucht, welches Petrolether ersetzen konnte. Aceton wurde als passendes Lösungsmittel gefunden, in dem Fraktion 10 ebenfalls gut löslich war. Daher wurden vier weitere präparative DC-Läufe zur Isolierung von HH1 und HH2 mit Aceton anstelle von Petrolether durchgeführt. Die Kontrolle von HH1 und HH2 mittels analytischer DC ergab, dass in HH1 nach Isolierung mit Aceton noch weitere, als nur die orange-braun fluoreszierende Bande, vorhanden waren (siehe Abbildung 12, Seite 32). Somit konnte Petrolether als Verursacher dieser Bande ausgeschlossen werden.



Abbildung 12: Analytische DC: Kontrolle der aufgereinigten Banden HH1 (links), HH2 (rechts) und F10 als Referenz (Mitte)

Mobile Phase: CHCl₃+MeOH (99+1)

Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: Weißes Licht

Um festzustellen, ob die Substanz, die als HH1 isoliert wurde, instabil war und sich zersetzte, wurde HH1 selbst nochmals per präparativer DC mit Petrolether aufgetragen und nur die ursprünglich zu isolierende Bande erneut abgekratzt, die weiteren in HH1 auftretenden Banden wurden hierbei vernachlässigt. Die analytische Kontrolle beider HPTLC-Platten zeigte eine erkennbare Bande der zu isolierenden Bande HH1 (Abbildung 13, Seite 33). Daher wurden die separaten Ausbeuten anschließend zusammengefügt und dienten damit als Probe HH1 für die weiterführende Analyse durch die SFC.



Abbildung 13: Analytische DC: Kontrolle der aufgereinigten Bande HH1 (links) und F10 als Referenz (rechts)
 Mobile Phase Hex:Ac 25:13
 Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurerreagenz: Weißes Licht

Anschließend wurde die Probe HH1 zusätzlich mit der Fraktion 10 mittels SFC analysiert. Die Phytosterole Stigmasterin und Sitosterol wurden in die Analyse miteinbezogen.

Die dafür angewandte Methode wurde bereits in der Vorgängerarbeit optimiert und verwendet. Da auch in der Vorgängerarbeit eine Fraktion mit dieser Methode vermessen wurde, schien es adäquat dieselbe Methode hier anzuwenden. Die Parameter zu der SFC-Methode können im Kapitel 3.4.3 (Seite 18) nachgelesen werden.

In den Chromatogrammen der SFC-Analyse waren Peaks zwar erkennbar, jedoch brachte ein sehr hohes Rauschen Unsicherheit. Weiters lieferte der gekoppelte Massenspektrometer keine nutzbaren Ergebnisse. Daher führte diese Analyse zu keinen Ergebnissen und es wurden keine weiteren Untersuchungen in diese Richtung unternommen.

Die Chromatogramme liegen der Vollständigkeit dem Anhang bei (Abbildung 30-Abbildung 34, Seite 57-61).

4.3 Analyse der methanolischen Fraktion

Dieses Kapitel verschafft einen Überblick über die Analyse der methanolischen Fraktion mittels DC, HPLC, UHPLC und Massenspektrometrie.

4.3.1 Herstellung der methanolischen Fraktion

Wie bereits im Kapitel 3.3 (Seite 10) erwähnt, wurden im Laufe der praktischen Arbeit mehrere methanolische Fraktionen erstellt. Diese Teilfraktionen trugen unterschiedliche

Bezeichnungen, ehe sie nach Vergleich ihrer DC-Fingerprints zusammengeführt wurden. Diese Vereinigung lief unter dem Namen „finale methanolische Fraktion“ und diente als Ausgangsmaterial für die Analyse mittels UHPLC und Massenspektrometer.

Insgesamt bestand die finale methanolische Fraktion aus vier Teilfraktionen. Diese nannten sich MeOH-Fr. 1, 2, 3 und 4.

Tabelle 1 (Seite 11) listet die PE-Extrakte und die jeweiligen Mengenangaben auf, die für die entsprechenden Teilfraktionen verarbeitet wurden.

Der unabdingbare Wechsel auf ein anderes Fließmittel wurde bei der ersten Überprüfung des Inhaltsstoffmusters mittels analytischer DC deutlich. Die zu diesem Zeitpunkt verwendete mobile Phase Hexan:Aceton in einem Verhältnis von 25:13 (Abbildung 14) zeigte eine unzureichende Auf trennung der Komponenten. Die Banden waren nicht scharf voneinander getrennt und verliefen teilweise ineinander.

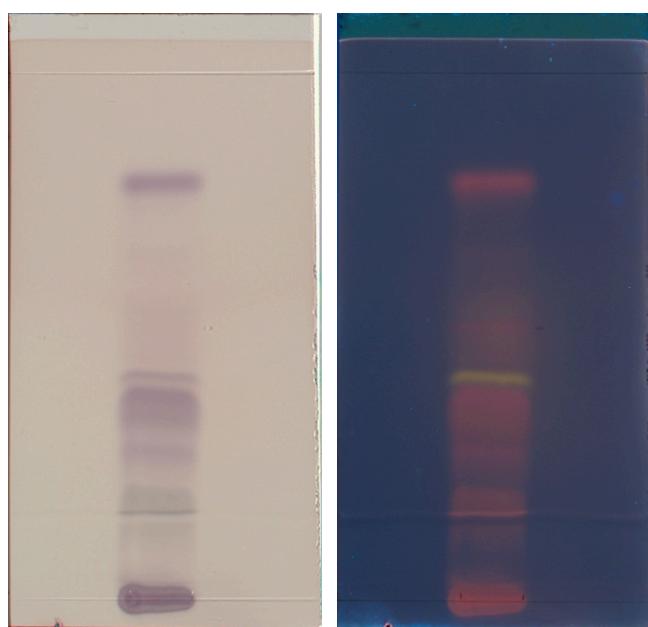


Abbildung 14: DC-Untersuchung von methanolischer Fraktion 1
Mobile Phase Hex:Ac 25:13

Derivatisierungsreagens: Anisaldehyd/Schwefelsäurerereagens; links: Weißes Licht, rechts: UV₃₆₆

Infolge wurde ein Fließmittel mit erhöhter Polarität ausgetestet. Das Laufmittel Dichlormethan gemischt mit Methanol im Verhältnis 9+1 ergab die erwünschte Trennung der Substanzen (Abbildung 15, Seite 35). Fortan war dieses Lösungsmittelgemisch die mobile Phase der Wahl bei der analytischen Kontrolle der Inhaltsstoffe der methanolischen Teilfraktionen.



Abbildung 15: DC-Untersuchung von methanolischer Fraktion 1

Mobile Phase DCM+MeOH (9+1)

Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz; links: Weißes Licht, rechts: UV₃₆₆

Die methanolischen Fraktionen 3 und 4 wurden von dem in dieser Masterarbeit erstellten PE-Extrakt erstellt, um das Inhaltsstoffmuster dieses Extraktes zu überprüfen.

In nachstehender Abbildung 16 sind die methanolischen Fraktionen 1, 2 und 3 aufgetragen (von links nach rechts). Die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe war qualitativ ähnlich mit geringen Unterschieden in der Quantität. Für die Zusammenführung der Teilfraktionen zu einer war die qualitative Zusammensetzung entscheidend.

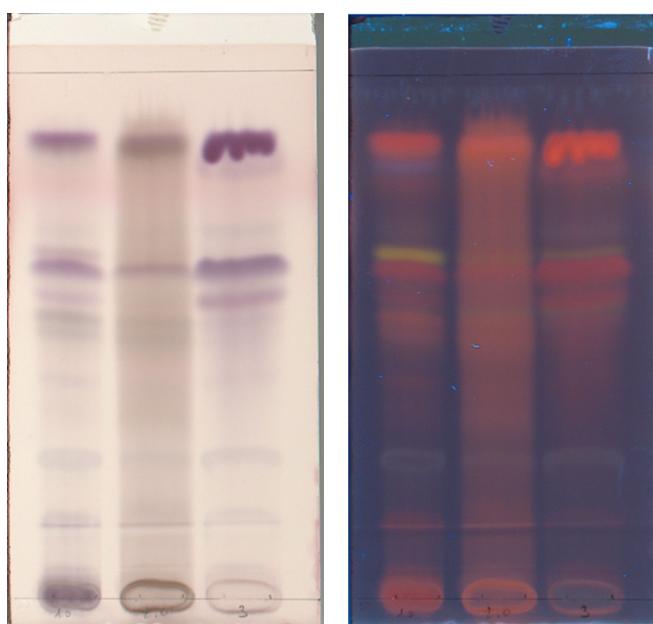


Abbildung 16: DC-Untersuchung von MeOH-Fr 1, 2 und 3 (links nach rechts)

Mobile Phase DCM+MeOH (9+1)

Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz; links: Weißes Licht, rechts: UV₃₆₆

Zur Vollständigkeit wurde der DC-Fingerprint der Fraktion 4 überprüft. Die Zusammensetzung entsprach den anderen Teilfraktionen und daher konnten alle vier Fraktionen zu der finalen methanolischen Fraktion zusammengeführt werden.

Allgemein ist zu erwähnen, dass bei der Flüssig-Flüssig-Ausschüttelung der methanolischen Fraktion die Trennung der organischen und wässrigen Phase viel Zeit in Anspruch nahm. Eine sogenannte „Mischphase“, welche sich gelb-milchig zeigte, bestand je nach verwendetem Volumen der Phasen, bis zu mehreren Stunden. In Abbildung 17 ist diese Mischphase deutlich ersichtlich. Die Auflösung dieser speziellen Phase und die beginnende Abgrenzung der beiden Phasen voneinander zeigt Abbildung 18. Jedoch ist die vollständige Phasentrennung noch nicht eingetreten.

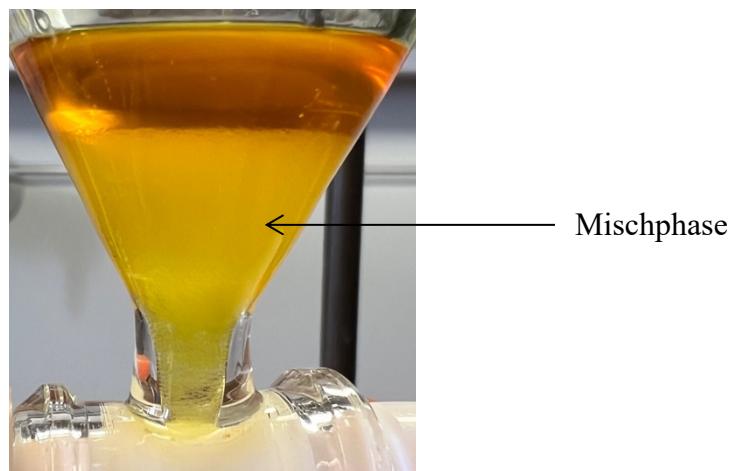


Abbildung 17: Entstandene gelb-milchige „Mischphase“ beim Fraktionierungsprozess der MeOH-Fraktion



Abbildung 18: Auflösung der „Mischphase“ und beginnende Abgrenzung von wässriger und organischer Phase

4.3.2 DC-Vergleich unterschiedlicher Extrakte

Auffallend bei der analytischen Kontrolle der methanolischen Teilfraktionen 1 und 2 war eine unter UV-Licht bei 366 nm fluoreszierende gelbe Bande. Diese hervorstechende Bande

erinnerte an Ursolsäure, welche als Referenzsubstanz im Kapitel 4.1.2 (Seite 26) nicht zielführend erschien. Beruhend auf dieser Entdeckung wurde erneut Ursolsäure als Referenz getestet. Abbildung 19 zeigt die beiden methanolischen Teilfraktionen mit Referenzsubstanz Ursolsäure und zusätzlich einem Phytosterol. Stigmasterin wurde aufgrund des bereits vorhandenen Verdachts, dass Phytosterole eine mögliche Inhaltsstoffklasse darstellen, in die Analyse miteinbezogen.

Die DC-Platte zeigte unter UV 366 nm eine Übereinstimmung von Lage und Fluoreszenz von Ursolsäure und MeOH-Fr. 1. Die methanolische Fraktion 2 zeigte hier keine gelbe Fluoreszenz, jedoch beruhte das mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen Konzentrationsunterschied. Stigmasterin scheinte bei den methanolischen Fraktionen als Inhaltstoff ausgeschlossen.

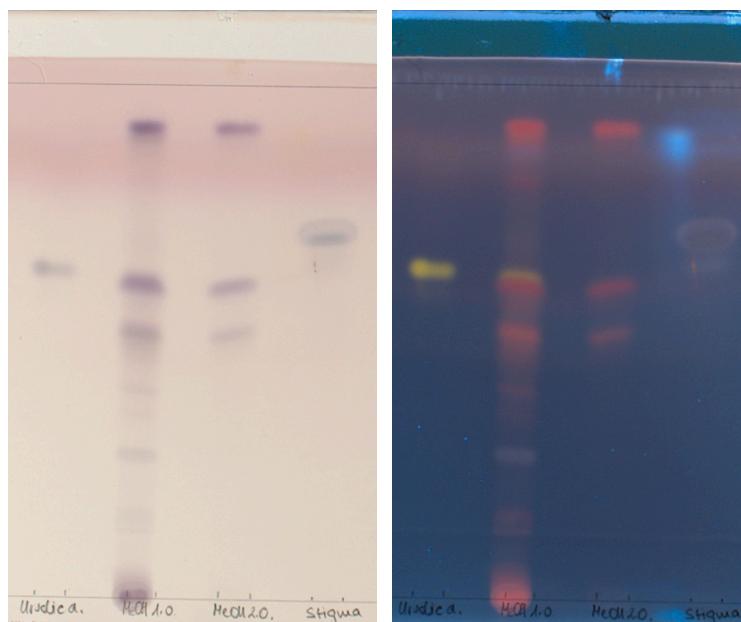


Abbildung 19: DC-Untersuchung von Ursolsäure, MeOH-Fr 1, 2 und Stigmasterin (links nach rechts)
Mobile Phase DCM+MeOH (9+1)
Derivatisierungsreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz; links: Weißes Licht, rechts: UV₃₆₆

4.3.3 Analyse mittels HPLC

Der etablierten Methode gingen einige HPLC-Messungen mit einer Vorgängermethode voraus. Diese wurde entsprechend adaptiert und führte schließlich zu der finalen Methode (siehe Kapitel 3.4.2, Seite 15).

Die ersten Messungen wurden mit einem Gradienten 50-95% in 30 Minuten vermessen. Dies entspricht 1,6% pro Minute. Folgende Abbildung 20 (Seite 38) zeigt das Chromatogramm der MeOH-Fr. 1. Die Ergebnisse konnten auf die finale methanolische Fraktion übertragen werden, da das Inhaltsstoffmuster ident war.

Die rote Linie zeigte die Absorptionen aufgenommen mittels PDA-Detektor bei einer Wellenlänge von 190 nm. Die untere, orangene Linie zeigte die Detektion mittels ELSD.

Drei Peaks rückten nach der Betrachtung des Chromatogramms in den Mittelpunkt der weiteren Analysen. Zwei markante Peaks bei Minute 22,5 und 26,5 und ein kleinerer Peak bei Minute 30. Da diese Peaks nicht nur bei 190 nm sichtbar waren, sondern auch in der ELSD- Spur erschienen, kann davon ausgegangen werden, dass diese Peaks quantitativ auch für Isolierungsversuche interessant wären.

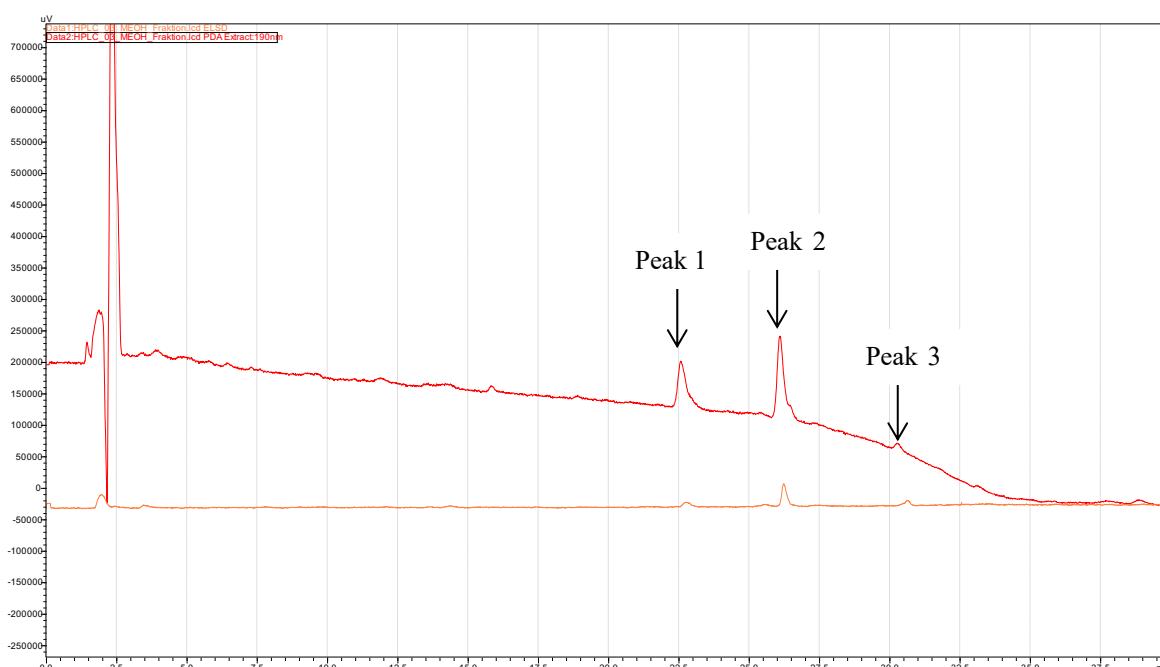


Abbildung 20: Analyse von MeOH-Fr. 1 mittels HPLC, Detektion: PDA (rote Linie) und ELSD (orangene Linie), HPLC-Methode 30 Minuten, siehe Tabelle 6 (Seite 16), Diagramm 1 (Seite 17)

Da die Substanzen von Interesse erst ab Minute 22,5 eluierten, wurde eine Verkürzung der Methode vorgenommen. Dadurch wurde Analysezeit eingespart und gleichzeitig der Lösungsmittelverbrauch reduziert. Durch die späte Elution der Komponenten, konnte die Anfangskonzentration des apolaren Lösungsmittels B auf 80% erhöht werden. Der Gradient von 1,6% pro Minute wurde belassen, da die Trennung der Substanzen zufriedenstellend war. Somit wurde der Fließmittelgradient 80-98% in 11,25 Minuten überwunden. Das erfolgreiche Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 21 (Seite 39) zu sehen. Das Chromatogramm war mit der kürzeren Methode reproduzierbar. Die Elution der lipophilen Substanzen erfolgte schneller bei gleichbleibender Trennqualität.

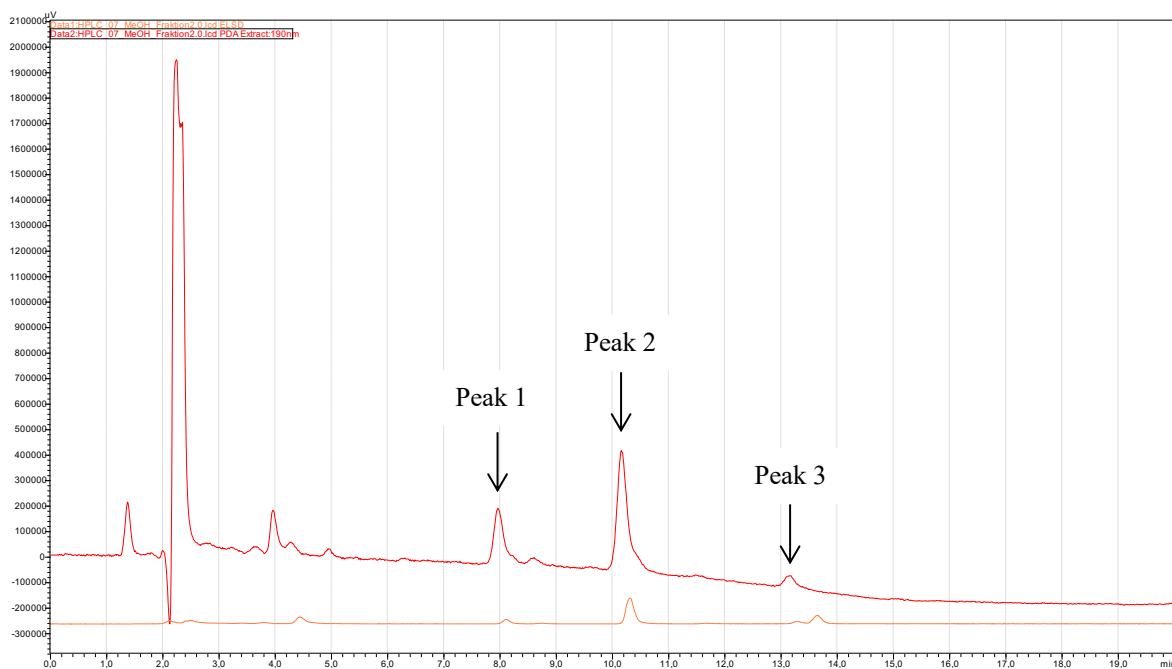


Abbildung 21: Analyse von MeOH-Fr. 2 mittels HPLC, Detektion: PDA (rote Linie) und ELSD (orangene Linie), HPLC-Methode 11,25 Minuten, siehe Tabelle 6 (Seite 16), Diagramm 1 (Seite 17)

Nach Etablierung der verkürzten Methode, wurden auch die Teilfraktionen 1 und 3 mit dieser vermessen. Die Messungen aller Teilfraktionen waren untereinander vergleichbar. Dieses Ergebnis bestätigte die Konformität der Inhaltsstoffe in den einzelnen Teilfraktionen.

4.3.4 Analyse mittels UHPLC

Die Firma Thermo Fisher Scientific präsentierte auf ihrer Website einen Methodentransfer-Kalkulator für die Flüssigkeitschromatographie (<https://appslab.thermofisher.com/lc-method-transfer-calculator>, aufgerufen am 07.01.2024). Dieser bot Hilfestellung für die Einstellung der optimalen Parameter für die UHPLC mit der Voraussetzung, dass eine etablierte HPLC-Methode bereits existierte. Die geschätzten neuen Parameter waren eine Empfehlung von Thermo Fisher Scientific und sollten eine Übertragbarkeit der qualitativen Trennung gewährleisten. Mit diesem Programm wurden unter anderem folgende Parameter errechnet: Säulendurchmesser, -länge, Partikelgröße der Säule, Druckeinstellungen, Flussrate oder Injektionsvolumen. Interessant für die Umstellung von HPLC auf UHPLC war vor allem in welcher Zeit der Gradient überwunden wurde. Die erste Schätzung des Rechners ist in Tabelle 16 (Seite 40) zusammengefasst. Dieser Entwurf konnte genutzt werden, um die finale UHPLC-Methode zu konfigurieren.

Tabelle 16: Erste Schätzung der UHPLC-Methode von Thermo Fisher Scientific

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	%A	%B
0.00 (Initial)	0.5	20.0	80.0
1.98	0.5	2.0	98.0
3.52	0.5	2.0	98.0
3.53	0.5	20.0	80.0
4.40	0.5	20.0	80.0

Um einen Eindruck von der Methode zu erhalten, wurde die methanolische Fraktion 1 mit den errechneten Parametern vermessen. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 (Seite 41) ersichtlich.

Die Abbildung 22 zeigt das Chromatogramm, aufgenommen mittels PDA-Detektor, bei der Wellenlänge 200 nm. Die drei Peaks, die im Fokus der HPLC-Analyse standen, fanden sich in diesem Chromatogramm wieder und ließen sich leicht zuordnen. Eine Veränderung in der Trennung mittels UHPLC ließ sich bei Peak 1 feststellen. Hier kam es zu einer verbesserten qualitativen Trennung und ein weiteres Signal (siehe roter Pfeil) war erkennbar.

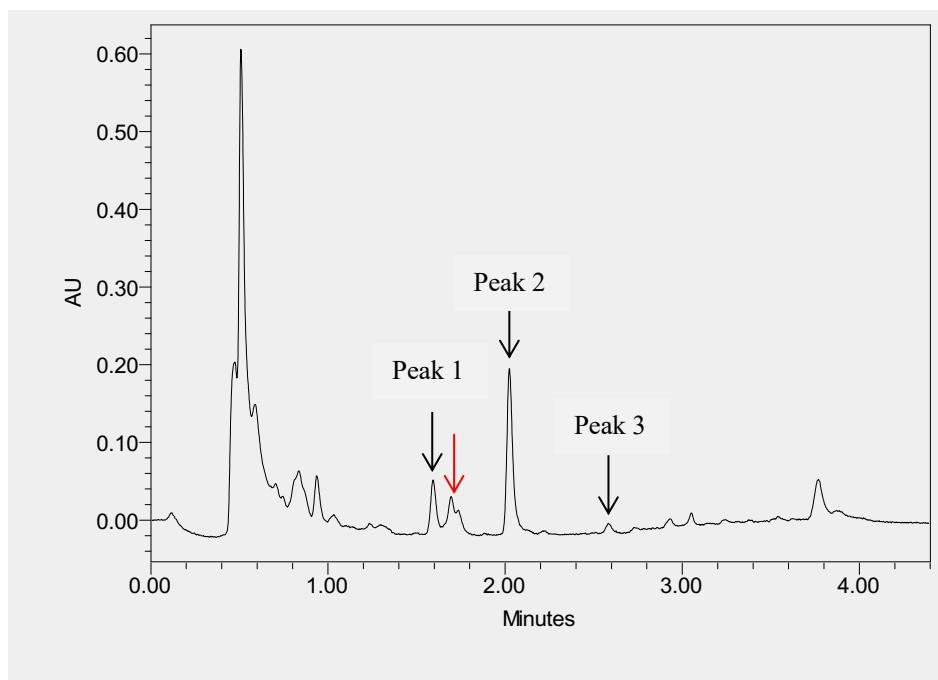


Abbildung 22: Analyse von MeOH-Fr. 1 mittels UHPLC, Detektion: PDA 200 nm, UHPLC-Methode: Tabelle 16 (Seite 40)

Das dazugehörige Chromatogramm, welches vom ELSD detektiert wurde, ist in Abbildung 23 (Seite 41) zu sehen. Die Signale der drei Peaks zeigten geringe Intensität. Ein Signal für Peak 1 konnte in diesem Chromatogramm nicht zugeordnet werden.

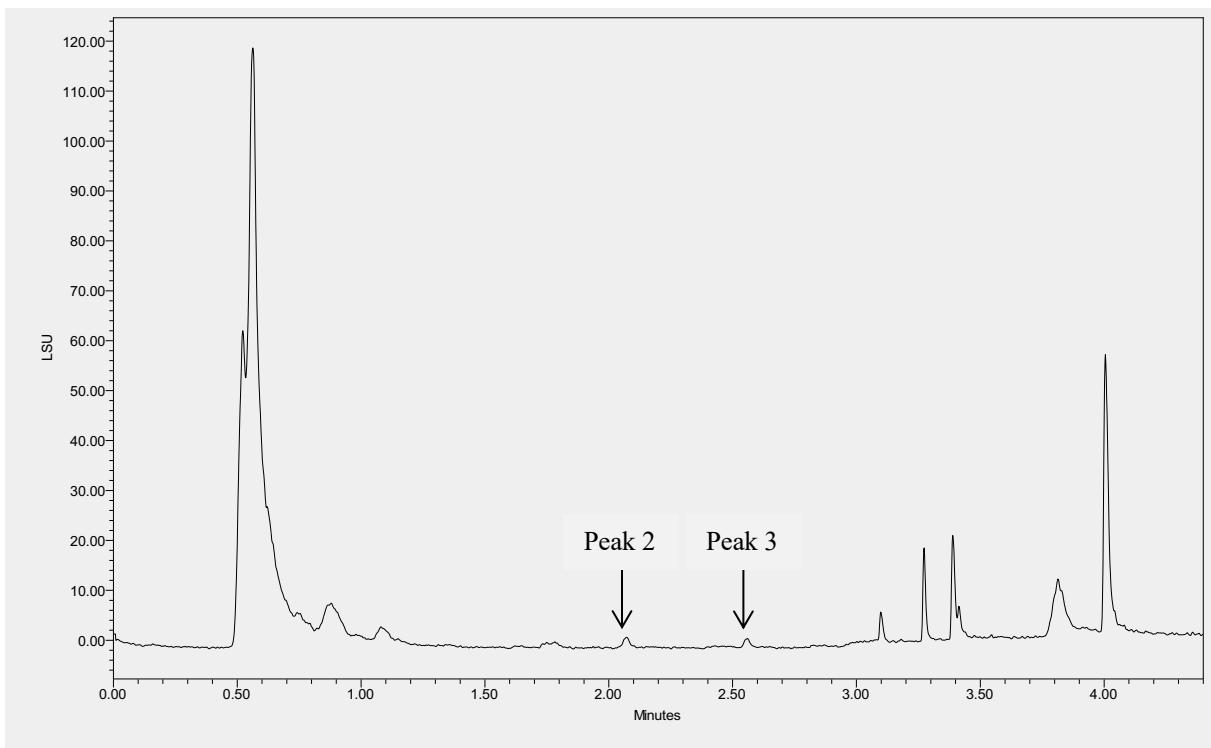


Abbildung 23: Analyse von MeOH-Fr. 1 mittels UHPLC, Detektion: ELSD, UHPLC-Methode: Tabelle 16 (Seite 40)

Die Methode wurde in einem nächsten Schritt adaptiert. Hierbei wurde die Flussrate auf 0.3 ml/min verändert, da die vorherige Flussrate eine enorme Belastung für die Säule bedeutete und unüblich für Messungen mit einer UHPLC war. Bei einer niedrigeren Flussrate hat die Probe eine bessere Möglichkeit, mit der stationären Phase Wechselwirkungen einzugehen und dies kann einen positiven Einfluss auf die Trennqualität ausüben. Die Weiterentwicklung der Methode ist in Tabelle 17 dokumentiert und wurde an der MeOH-Fr. 1 (Abbildung 24, Seite 42) erprobt.

Tabelle 17: Weiterentwicklung der UHPLC-Methode mit einem Fließmittelgradienten von 80-98% in 5 Minuten

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	%A	%B
0.00 (Initial)	0.3	20.0	80.0
5.00	0.3	2.0	98.0
6.00	0.3	2.0	98.0
6.01	0.3	20.0	80.0
7.00	0.3	20.0	80.0

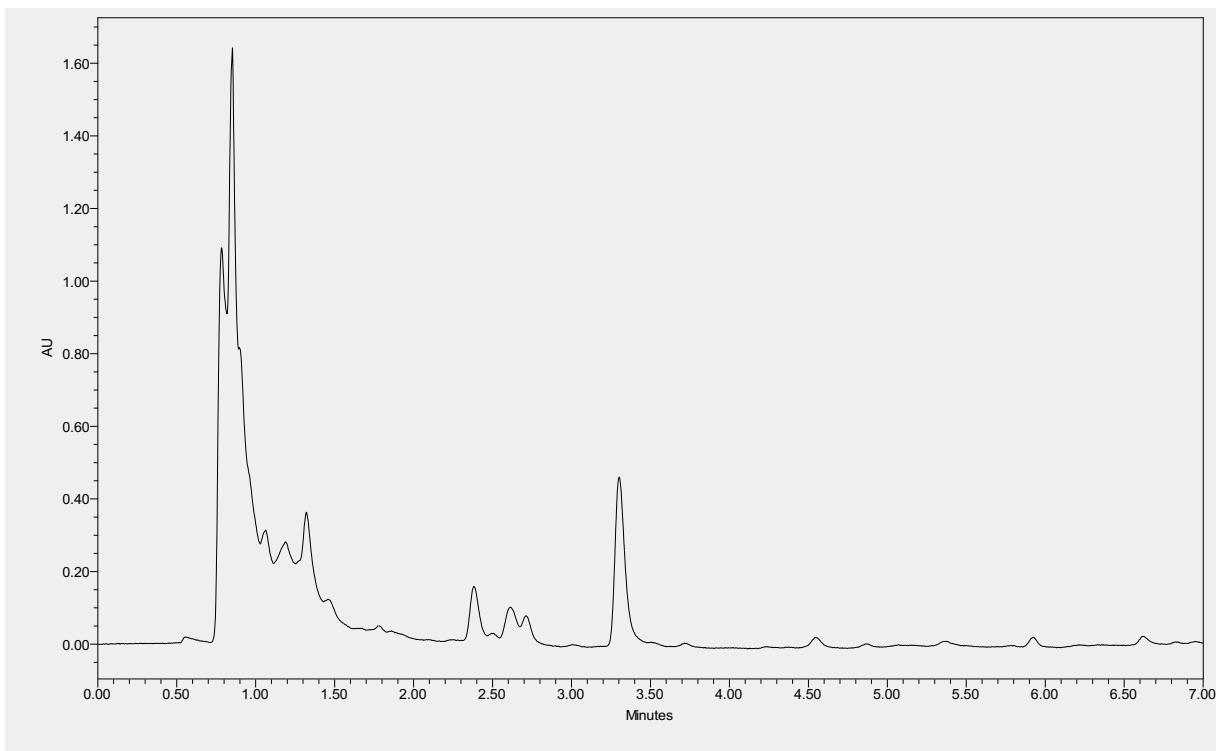


Abbildung 24: Analyse von MeOH-Fr. 1 mittels UHPLC, Detektion: PDA 200 nm, UHPLC-Methode: Tabelle 17 (Seite 41)

Nach Zusammenführung der methanolischen Teilfraktionen zu der finalen methanolischen Fraktion wurden erneut Messungen an einem anderen Tag durchgeführt. Eine unerwartete Problematik ergab sich – die Chromatogramme waren nicht reproduzierbar. Die Peaks konnten nicht eindeutig zugeordnet werden und die Retentionszeiten unterschieden sich von den bisherigen Messungen.

Daher war die erste Maßnahme das System von Kontaminationen zu befreien. Da mehrere Projekte mit der Maschine analysiert und somit unterschiedliche Substanzen aufgetrennt wurden, konnten Rückständen fremder Substanzen in der Säule nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde die Säule bei verschiedenen Polaritäten mit ausreichend Fließmittel gespült und gereinigt. Nach diesem Schritt ergaben neue Messungen keine Verbesserung und das Chromatogramm unterschied sich noch immer von den ersten. Dieser Umstand erforderte eine erneute Adaption der Methode. Da die Elution der Komponenten sichtlich früher erfolgte, wurde die Anfangskonzentration des Fließmittels B verändert. Versuche mit einem Fließmittelgradienten von 70-98% in 6 Minuten (Tabelle 18, Seite 43) brachten den zufriedenstellenden Erfolg. Das Chromatogramm unterschied sich trotzdem von den ersten Chromatogrammen, ersichtlich in Abbildung 25 (Seite 43).

Tabelle 18: Erneute Adaption der UHPLC-Methode mit einem Fließmittelgradienten von 70-98% in 6 Minuten

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	%A	%B + 0,01% Ameisensäure
0.00 (Initial)	0.3	30.0	70.0
6.00	0.3	2.0	98.0
7.00	0.3	2.0	98.0
7.01	0.3	30.0	70.0
8.00	0.3	30.0	70.0

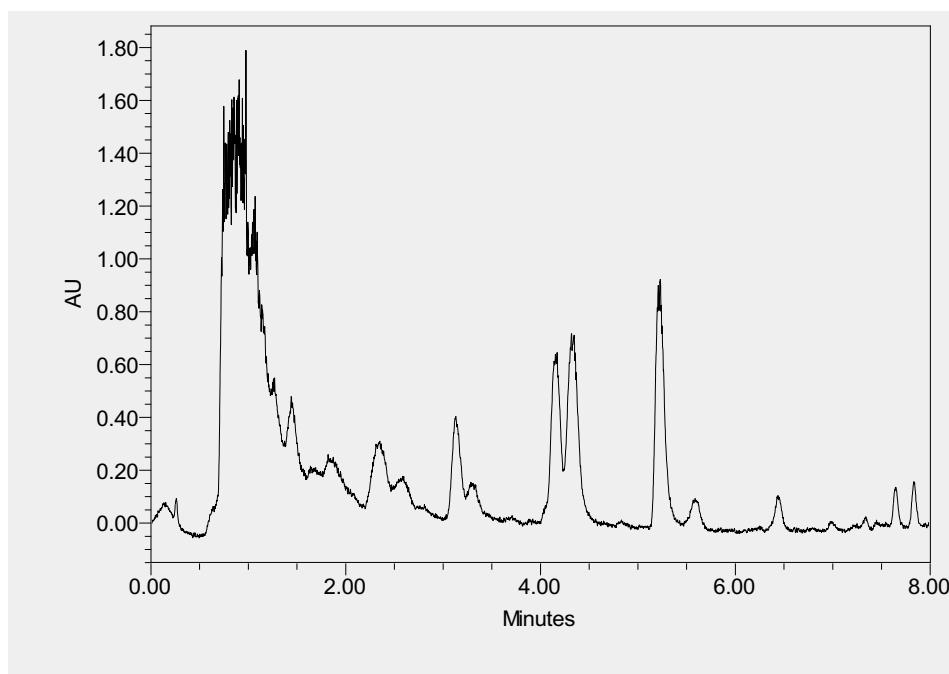


Abbildung 25: Analyse von finaler MeOH-Fr. mittels UHPLC, Detektion: PDA 200 nm, UHPLC-Methode: Tabelle 18 (Seite 43)

Wichtig zu erwähnen ist, dass bei diesen Messungen das Lösungsmittel B mit 0,01% Ameisensäure versetzt war. Die Überlegung, in weiterer Folge mittels UHPLC-Fractioncollector einzelne Peaks separat zu sammeln, um diese eventuellen NMR-Messungen zu unterziehen, war zu diesem Zeitpunkt präsent. Jedoch wäre bei diesem Unterfangen die Ameisensäure bezüglich der Lagerung und Stabilität der gesammelten Peaks hinderlich. Somit war der nächste Schritt die Reproduktion des Chromatogramms mit letzter Methode ohne den Zusatz der Säure zu Lösungsmittel B. Die Methode in Tabelle 18 wurde zugunsten der Absicht der Verwendung des Fractioncollectors leicht adaptiert und ist als finale Methode in Tabelle 7 (Kapitel 3.4.2, Seite 18) angeführt.

Die Chromatogramme vom PDA-Detektor (Abbildung 26, Seite 44) und ELSD (Abbildung 27, Seite 45) waren die Grundlage für die massenspektrometrische Auswertung, welche im Anschluss durchgeführt wurde.

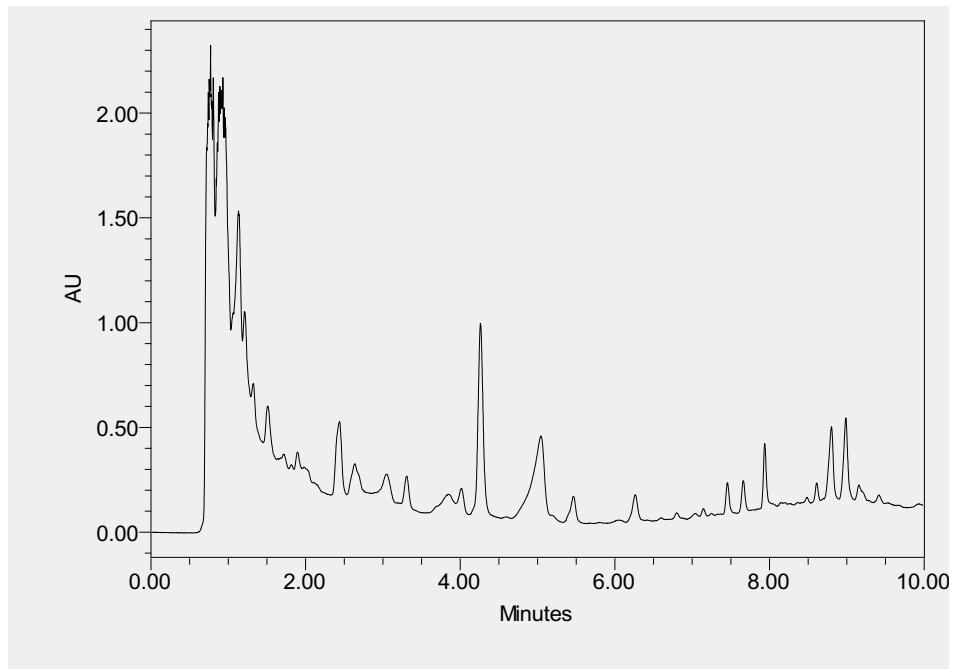


Abbildung 26: Analyse von finaler MeOH-Fr. mittels UHPLC als Grundlage für die massenspektrometrische Auswertung, Detektion: PDA 200 nm, UHPLC-Methode: Tabelle 7 (Seite 18), Diagramm 2 (Seite 18)

Vor allem die eindeutigen Signale des ELS-Detektors waren für die Analyse mittels Massenspektrometer von bedeutender Relevanz. Diese vier Signale sind in Abbildung 27 mit Pfeilen markiert.

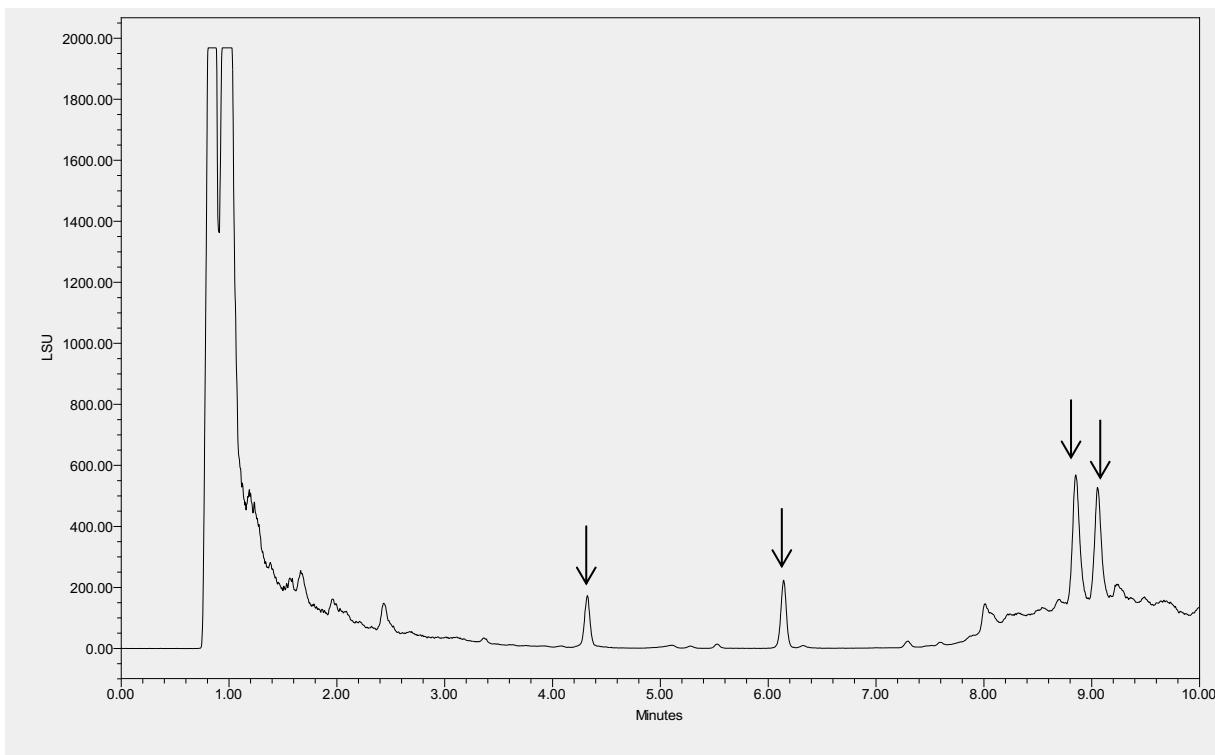


Abbildung 27: Analyse von finaler MeOH-Fr. mittels UHPLC als Grundlage für die massenspektrometrische Auswertung, Detektion: ELSD, UHPLC-Methode: Tabelle 7 (Seite 18), Diagramm 2 (Seite 18)

4.3.5 Massenspektrometrische Auswertung

Die massenspektrometrische Analyse der finalen methanolischen Fraktion erfolgte mit der präzisierten, finalen UHPLC-Methode, die in Kapitel 3.5 (Seite 19) angeführt ist. Dr. Ammar Tahir führte die Messung und Auswertung durch und die Ergebnisse werden in diesem Kapitel präsentiert.

Die Peaks von Interesse, markiert in Abbildung 27 (Kapitel 4.3.4, Seite 45) dienten als Grundlage für die massenspektrometrische Untersuchung. Insgesamt konnten sechs Peaks in die Auswertung miteinbezogen werden. Davon zeigten zwei Peaks (Peak 3 und Peak 4) schlechte Ionisierung und konnten nicht weiterführend analysiert werden. Abbildung 28 (Seite 46) zeigt das Chromatogramm der vollständigen Messung vom PDA-Detektor (blaue Linie) und CAD (grüne Linie). Einige Peaks, welche vom PDA-Detektor registriert wurden, konnten den zugehörigen Peaks des CAD zugeordnet werden. Da der CAD dem PDA-Detektor räumlich nachgeschalten war, sind die Retentionszeiten der Peaks zeitlich leicht versetzt. Die zusammengehörenden Peaks tragen die gleiche Nummer im Chromatogramm.

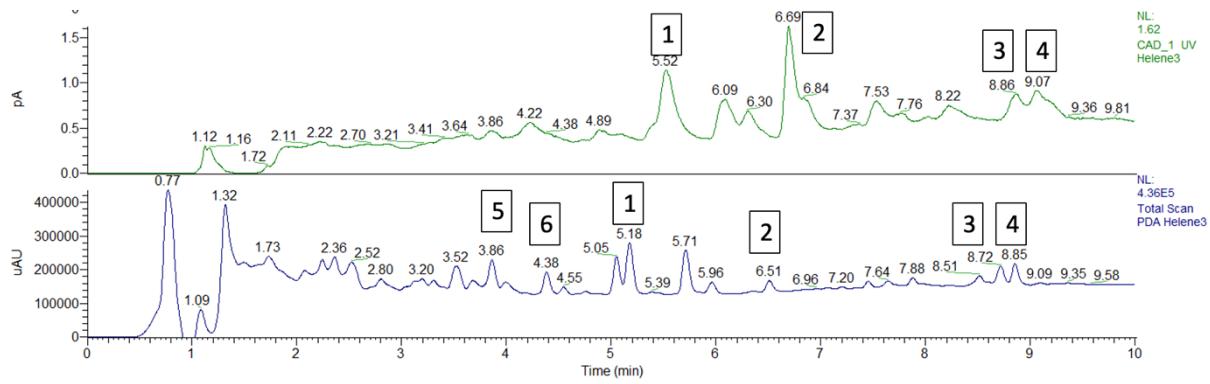


Abbildung 28: Vollständige massenspektrometrische Analyse von finaler methanolischen Fraktion, Methode siehe Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12, Detektion: PDA, CAD

Lediglich bei Peak 6 (siehe Abbildung 29, Seite 46) konnte mittels Datenbank eine Summenformel ermittelt werden: $C_{30}H_{48}O_7$. Die Online-Recherche für diese Formel ergab einige Treffer für diverse Substanzen, häufig tetracyclische Triterpene. In Verbindung mit der Gattung *Sambucus* konnte jedoch keine gebracht werden.

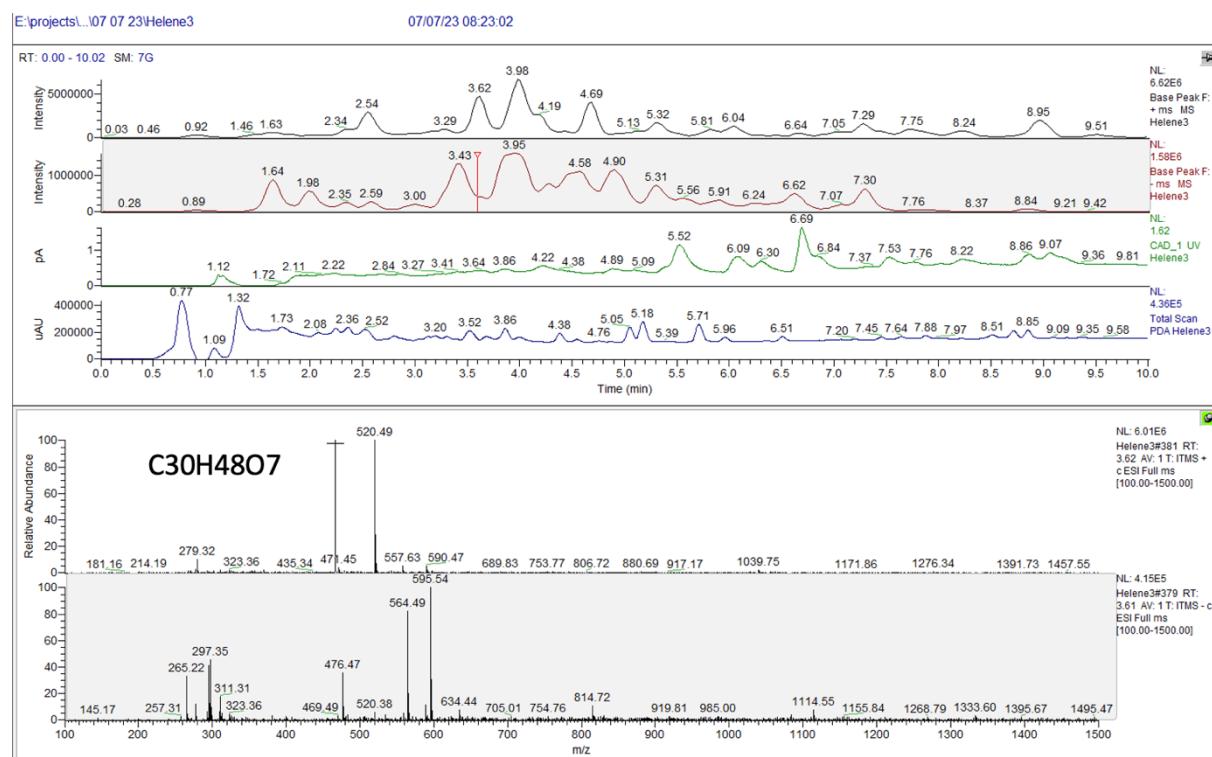


Abbildung 29: Massenspektrometrische Analyse von Peak Nr. 6, Methode siehe Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12

Der Versuch, die Fragmentierungsmuster der Abspaltprodukte von Peak 1, 2 und 5 Molekülen zuzuordnen, um Substanzen zu identifizieren, scheiterte. Daher sind die weiteren massenspektrometrischen Analysen von Peak 1 (Abbildung 35, Seite 61), Peak 2 (Abbildung 36, Seite 62) und Peak 5 (Abbildung 37, Seite 62) der Vollständigkeit dem Anhang beigefügt.

Die massenspektrometrische Analyse bot sich als Möglichkeit, Substanzen auf schnellere Weise zu identifizieren. Für genaue Identifizierungen der Peaks in der finalen methanolischen Fraktion ist allerdings zunächst eine weitere Aufreinigung und Charakterisierung der Fraktion nötig.

5 Diskussion und Schlussfolgerung/Ausblick

Diese Masterarbeit befasste sich mit verschiedenen Ansätzen zur Aufklärung der phytochemischen Zusammensetzung des Öls der Früchte von *Sambucus racemosa* L.

Die praktische Arbeit begann mit der Auswahl geeigneter Fraktionen der Vorgängerarbeit für die weiteren Analysen. Fraktion 11 wurde aufgrund ihrer großen Ausbeute und somit ausreichendem Ausgangsmaterial als nützlich für die anfänglichen Versuche ausgewählt. Sie diente vor allem für die Entwicklung eines geeigneten Fließmittels für qualitativen und später präparativen Untersuchungen. Die Testung von insgesamt 23 Fließmittelgemische brachte das Ergebnis, dass drei Fließmittel sich als passende Laufmittelgemische für verschiedene Zwecke erwiesen. Hexan und Aceton in einem Verhältnis 25:13 lieferte eine gute Trennung der Fraktion 11 und später auch bei Fraktion 10 und wurde als Fließmittel bei der Untersuchung mittels Referenzsubstanzen verwendet. Das Gemisch Chloroform mit Methanol 99+1 wurde bei der präparativen Arbeit eingesetzt. Für die zahlreichen qualitativen Analysen der methanolischen Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie zeigte die Mischung Dichlormethan mit Methanol 9+1 die besten Ergebnisse.

Die Entwicklung der Fließmittelgemische nahm viel Zeit in Anspruch, jedoch wurden im Laufe der Arbeit geeignete und zufriedenstellende Systeme erarbeitet, die für die verschiedenen Zwecke individuell passend waren. Der Ausschluss von 20 anderen Fließmittelgemischen, die in der Literatur häufig verwendet werden, war für die weiterführende Arbeit essenziell.

Für den analytischen Vergleich von Fraktion 11 wurden Referenzsubstanzen aufgrund ihres lipophilen Profils ausgewählt. Die Wahl fiel auf zwei Substanzklassen mit jeweils zwei Vertreter. Ursolsäure und Oleanolsäure, zwei Vertreter der Triterpene und zwei Phytosterole, Sitosterol und Stigmasterin wurden in die Untersuchungen miteinbezogen. Ursolsäure konnte auf ersten Blick, aufgrund der fehlenden gelben Fluoreszenz unter UV₃₆₆ in Fraktion 11, weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Spätere analytische Untersuchungen der methanolischen Fraktionen mittels analytischer DC brachten die Referenzsubstanz Ursolsäure wieder in den Fokus. Aufgrund der auffallenden gelb fluoreszierenden Bande bei gleichem Rf-Wert ist es wahrscheinlich, dass Ursolsäure in der methanolischen Fraktion vorhanden ist, jedoch muss dies noch mit weiteren Analysen bestätigt werden.

Das Erscheinungsbild der Banden unter Tageslicht als auch UV₃₆₆ der beiden Phytosterole ähnelte einer Bande der Fraktion 10. Somit wurde Fraktion 10 in weitere Versuche inkludiert. Das Ergebnis hierbei ließ die Vermutung zu, dass es sich bei Fraktion 10 um ein Phytosterol

handeln könnte. Um den Verdacht bestätigen zu können, wurde die Fraktion 10 mittels präparativer DC und SFC weiterführend analysiert. Das Ziel der präparativen DC war somit, die Bande, welche das vermutliche Phytosterol sein könnte, zu isolieren. Die darübergelegene Bande wurde zusätzlich isoliert. Dieses Vorhaben sollte weitere Analysen erleichtern, da eine Reinsubstanz mit anderen Methoden einfacher identifiziert werden kann. Mit dem Wechsel des Fließmittels auf Chloroform/Methanol 99+1 konnte die Probe HH1 mittels präparativer DC gesammelt werden. Anschließende Vermessung dieser Probe und den Phytosterolen von Interesse mittels UHPSFC ergaben keine verwertbaren Ergebnisse. Die Chromatogramme der Messungen waren nicht von ausreichender Qualität und zeigten keine klare Messung, sondern eine „rauschende“ Linie. Dies konnte durch Druckschwankungen des Systems oder einer nicht passenden Methode für die vermessenen Substanzen entstehen. Die Ergebnisse wurden daher nicht weiterverwertet und es wurde ein neuer Ansatz entworfen.

Die Flüssig-Flüssig-Ausschüttelung der methanolischen Fraktion bot einen neuen Ansatz für die analytische Untersuchung des phytochemischen Profils von *Sambucus racemosa* L. Die neue Zusammensetzung der Inhaltsstoffe durch die Fraktionierung mit 70-prozentigen Methanol diente als Grundlage für die potenzielle Identifizierung von Substanzen. Jedoch darf man die negativen Seiten dieser Methode nicht vernachlässigen und diese dürfen erwähnt werden. Die beiden Phasen, also organische und wässrige Phase brauchten viel Zeit, bis sie voneinander getrennt vorlagen – lange besteht eine sogenannte „Mischphase“, die sich gelbmilchig zeigte, siehe Abbildung 17 (Seite 36). Die langen Wartezeiten bis sich die Phasen vollständig voneinander trennten und die häufigen Durchgänge schränkten die Effizienz dieser Methodik ein. Weiters war die erreichte Ausbeute, für den betriebenen Zeitaufwand, als sehr gering zu bewerten.

Die Adaption der HPLC-Methode erwies sich sinnvoll für die spätere Vermessungen der methanolischen Teilfraktionen. Neben ökologischen Vorteilen wie die Reduktion von Lösungsmittel wurde zudem auch wertvolle Analysenzeitz eingespart.

Die HPLC-Analysen zeigten vielversprechende Ergebnisse, denn die drei Peaks von Interesse waren reproduzierbar in jeder Teilfraktion und präsentierten deutliche Signale im ELSD. Daher war der nächste Schritt die Analysen an der UHPLC weiterzuführen, um die Trennleistung zu erhöhen, um Peaks von erhöhter Präzision zu erhalten. Die drei Peaks, welche im Fokus der HPLC-Analysen standen, fanden sich in den ersten UHPLC-Chromatogrammen wieder. Sogar eine Verbesserung der Trennung bei Peak 1 fand bei den UHPLC-Analysen statt. Weitere

Messungen an verschiedenen Tagen ergaben keine Reproduzierbarkeit der ersten Chromatogramme, daher war die Adaptierung der UHPLC-Methode unumgänglich. Jedoch war keine weitere Messung annähernd deckungsgleich mit der anfänglichen, vielversprechenden Messung – sowohl die Peaks als auch die Retentionszeiten unterschieden sich von den bisherigen Messungen. Da die Messungen nicht am gleichen Tag durchgeführt wurden und verschiedene Proben von anderen Projekten auf demselben Gerät analysiert werden, wurde das System gründlich gespült. Die Reinigung des Systems brachte jedoch keine Verbesserung, daher diente eine zuletzt aufgenommene Messung als Grundlage für die massenspektrometrische Analyse.

Die massenspektrometrische Auswertung ergab trotz Einbezug von Datenbanken, welche Fragmentierungsmuster gespeichert und diese zu Substanzen zuordnen können, nur einen Treffer. Das gefundene Molekül, C₃₀H₄₈O₇, ist nach weiterer Online-Recherche nicht in Zusammenhang mit der Gattung *Sambucus* zu bringen. Die Bemühung, die anderen Fragmentierungen zu Substanzen oder Abspaltungsprodukten zuzuordnen, war erfolglos. Daher erbrachte die massenspektrometrische Untersuchung keine klaren Ergebnisse, welche zu einer sinnvollen weiterführenden Analyse nützlich waren.

Durch diese Masterarbeit konnten geeignete Fließmittelsysteme für verschiedene Zwecke bezüglich der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien erarbeitet werden. Die weiteren analytischen Untersuchungen zur Entschlüsselung des phytochemischen Zusammensetzung des Öls aus den Früchten von *Sambucus racemosa* L. ließen lediglich Vermutungen zu, welche für weitere Experimente nicht zu vernachlässigen sind.

Weiters konnte die Erstellung der methanolischen Fraktion als neuer Ansatz etabliert werden. Der beträchtliche Zeitaufwand, welcher für die Fraktionierung benötigt wurde und die geringe Ausbeute sind Schwächen dieser Methode. Diese Erkenntnisse sind dienlich für weitere analytischen Versuche in diese Richtung. Eine geeignete und stabile UHPLC-Methodenentwicklung ist unerlässlich, falls die methanolische Fraktion weiter untersucht wird. Diese Masterarbeit konnte keine Substanz oder Substanzklasse eindeutig bestätigen und trägt daher kaum zur Aufklärung des phytochemischen Profils bei. Die Kompliziertheit des analytischen Nachweises von Inhaltsstoffen von *Sambucus racemosa* L. kann durch diese Arbeit erahnt werden. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind jedoch für weitere Aufklärungsversuche des Inhaltsstoffmusters des roten Holunders nicht zu vernachlässigen und dienen als Hilfestellung für weitere Überlegungen.

Zusammenfassung

Der Rote Holunder (*Sambucus racemosa* L.) ist ein 2-5 m hoher, sommergrüner Strauch aus der Pflanzenfamilie der Viburnaceae. In den Sommermonaten trägt der Holunderstrauch auffällig scharlachrote Früchte, welche in einem traubigen Behang angeordnet sind. Im deutschen Sprachraum existieren die Begriffe Trauben- oder Hirschholunder als weitere Bezeichnungen für den Strauch.

Das Fruchtfleisch ist reich an fettem Öl, das traditionelle Anwendung bei verschiedensten Krankheitsbildern findet, wie unter anderem bei grippalen Infekten und Hautkrankheiten. Die für die Wirkungen entscheidende Inhaltsstoffe sind daher besonders spannend für weiterführende Untersuchungen bezüglich wundheilender Wirkung.

Die phytochemische Zusammensetzung des Öls ist bis zum heutigen Wissenstand noch nicht vollständig aufgeklärt, weshalb das Ziel dieser Masterarbeit die Identifizierung von Inhaltsstoffen und Substanzklassen war.

Für diesen Zweck wurden zwei ausgewählte Fraktionen der Vorgängerarbeit mit verschiedenen chromatographischen Methoden analysiert. Die Resultate ließen nur Vermutungen für Substanzklassen zu und keine eindeutige Identifizierung von Inhaltsstoffen.

Später wurde ein neuer Ansatz getestet, der die Etablierung der methanolischen Fraktion beinhaltet. Hierfür wurde die Extraktion der methanolischen Fraktion erprobt und präzisiert um diese weiterführend chromatographisch zu analysieren.

Zusammenfassend konnten die umfassenden Analysen keinen eindeutigen Nachweis von einzelnen Inhaltsstoffen erbringen. Die Vermutung von Substanzklassen lässt Raum für weitere Analysen in diese Richtung. Weitere Untersuchungen hinsichtlich des Inhaltsstoffmusters sind unabdingbar, um weitere Testungen auf die wundheilungsfördernde Wirkung durchführen zu können.

Abstract

The red elderberry (*Sambucus racemosa* L.) is a 2-5 m tall, deciduous shrub and belongs to the Viburnaceae plant family. During the summer months, the shrub carries bright red fruits, which are grouped in clusters. The pulp is rich in fatty oil, which is traditionally used to treat a wide range of diseases, including flu-like infections and skin diseases. The ingredients that are essential for the effects are therefore particularly interesting for further research into wound-healing effects. The phytochemical composition of the oil has not yet been fully understood, which is why the aim of this master's thesis was to identify ingredients and substance classes.

For this purpose, two selected fractions from the previous work were analyzed using different chromatographic methods. The results only allowed assumptions to be made about substance classes and no clear identification of constituents.

Later, a new approach was tested that included the establishment of the methanolic fraction. For this purpose, the extraction of the methanolic fraction was tested and improved for further chromatographic analysis.

In summary, the analyses did not provide any clear evidence of single ingredients. The assumption of substance classes leaves room for further analyses in this direction. Further investigations regarding the composition of the compounds are essential in order to be able to carry out further tests on the wound-healing effect.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Ammoniumacetat
Ac	Aceton
CAD	collision activated dissociation
CHCl ₃	Chloroform
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DCM	Dichlormethan
dd	doppeldestilliert
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
F, Fr	Fraktion
GC	Gaschromatographie
H ₂ O	Wasser
Hex	Hexan
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
ISM	Isocratic Solvent Manager
LC	Liquid Chromatography
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunden
Nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
Ol	Oleanolsäure
PDA	Photodiodenarray
PE	Petrolether
PTLC	Preparative Thin Layer Chromatography
SFC	Supercritical Fluid Chromatography
Si	Sitosterol
St	Stigmasterin
TLC	Thin Layer Chromatography
TOF	Time of flight
U	Ursolsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
V	Volt

Literaturverzeichnis

Applequist, W. L. (2015) A brief review of recent controversies in the taxonomy and nomenclature of *Sambucus nigra* sensu lato. *Acta Hortic.* 1061, 25-33

Böcker, J. (1997) Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, 1. Auflage, Vogel, Würzburg

Eichenauer, E., Saukel, J., Glasl, S. (2024) VOLKS MED Database: A Source for Forgotten Wound Healing Plants in Austrian Folk Medicine. *Planta Med.* in press, doi 10.1055/a-2225-7545

Gey, M. (2021) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen, 4. Auflage, Springer-Verlag, Imprint: Springer Spektrum, Berlin

Kouka, P. Tsakiri, G. Tzortzi D, Dimopoulou, S. Sarikaki, G. Stathopoulos, P. Veskoukis, AS. Halabalaki, M. Skaltsounis, AL. Kouretas, D. (2019) The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 1870965

Losey, R. J., Stenholm, N., Whereat-Phillips, P., & Vallianatos, H. (2003) Exploring the use of red elderberry (*Sambucus racemosa*) fruit on the southern Northwest Coast of North America. *Journal of Archaeological Science* 30(6), 695-707

Machatschek, M. (2015) Der Rote oder Trauben-Holunder (*Sambucus racemosa*) liefert ein wertvolles Kernöl und die heilsame Hollersülze. In Machatschek M. (Hrsg.), *Nahrhaft Landschaft 3*, Bohlau Verlag GmbH & Cie, Köln/Wien

Merck,

https://www.merckmillipore.com/AT/de/product/HPTLC-Silica-gel-60-F254,MDA_CHEM-105642, abgerufen am 07.01.2024

Mikulic-Petkovsek, M. Ivancic, A. Todorovic, B. Veberic, R. Stampar, F. (2015) Fruit Phenolic Composition of Different Elderberry Species and Hybrids. *Journal of Food Science* 80(10), C2180-90

Miljković, V. Đorđević, B. Arsić, B. Marković, M. Nikolić, L. Todorović, Z. Nikolić, G. (2020) Sambucus Racemosa L. Fruit Extracts Obtained With Conventional And Deep Eutectic Solvents. *Facta universitatis - series: Physics, Chemistry and Technology* 18(2), 89-97

Plants of the world online,

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30056767-2>, aufgerufen am 09.01.2024

Rücker, G. Neugebauer, M. Willems, G. (2013) Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

Stojanovic, M. (2023) Phytochemische Aufarbeitung von Öl gewonnen aus den reifen Früchten von Sambucus racemosa, Masterarbeit, Universität Wien.

Schwedt, G. Schmidt, T. Schmitz, O. (2016) Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis, 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim

Thermo Fisher Scientific

<https://appslab.thermofisher.com/lc-method-transfer-calculator>, aufgerufen am 07.01.2024

Waswa, E. N. Mutinda, E. S. Mkala, E. M. Katumo, D. M. Oulo, M. A. Odago, W. O. Amenu, S. G. Ding, S.-X. Hu, G.-W. (2022) Understanding the Taxonomic Complexes and Species Delimitation within Sambucus L. (Viburnaceae). *Diversity* 14(11), 906

Anhang

Tabelle 19: Auflistung der probierten DC-Systeme

Fließmittelsystem	Verhältnis	Zusatz
Fließmittelsysteme, die für weiterführende Analysen verwendet wurden		
Hex:Ac	25:13	-
CHCl ₃ +MeOH	99+1	-
DCM+Methanol	9+1	-
Fließmittelsysteme, die zu unzureichender Trennung geführt haben		
CHCl ₃ +MeOH	97+3	-
CHCl ₃ +MeOH	99+1 (2x)	-
CHCl ₃ +MeOH+H ₂ O	95+1,5+0,1	-
DCM+Aceton+Ameisensäure	80+18+2	-
Hex:Ac	1:1	-
Hex:Ac	25:4 (2x) System aus Vorgängerarbeit	-
Hex:Ac	25:4	1 % Ameisensäure
Hex:Ac	25:6	-
Hex:Ac	25:6	1% Ameisensäure
Hex:Ac	25:8	2% Ameisensäure
Hex:Ac	25:8	1% Ameisensäure 1ml MeOH
Hex:Ac	25:8	1% Ameisensäure 0.5 ml MeOH
Hex:Ac	25:8	1% Ameisensäure
Hex:Ac	25:8	-
Hex:Ac	25:13	2% Ameisensäure
Hex:Ac	25:15	-
Hex+EtOAc	6+4	-
Hex+EtOAc	99+1	-
Toluol+Ac+MeOH+NH ₃ _{conc}	45+45+7+3	-
Toluol+Ethylformiat+ Ameisensäure	10+4+1	-

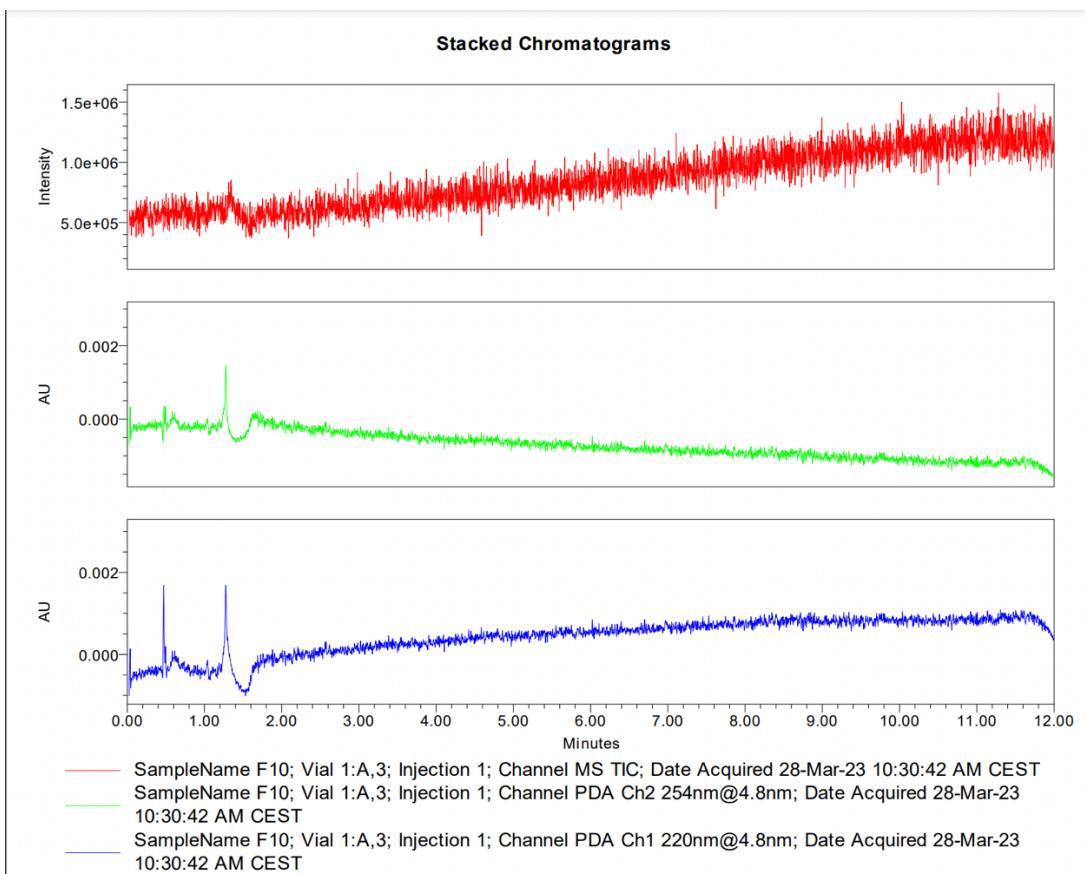


Abbildung 30: UHPSFC-Analyse von Fraktion 10, stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und Acetonitril, Detektion: PDA 254 nm und 220 nm, ELSD; UHPSFC-Methode: siehe Tabelle 9, Seite 19

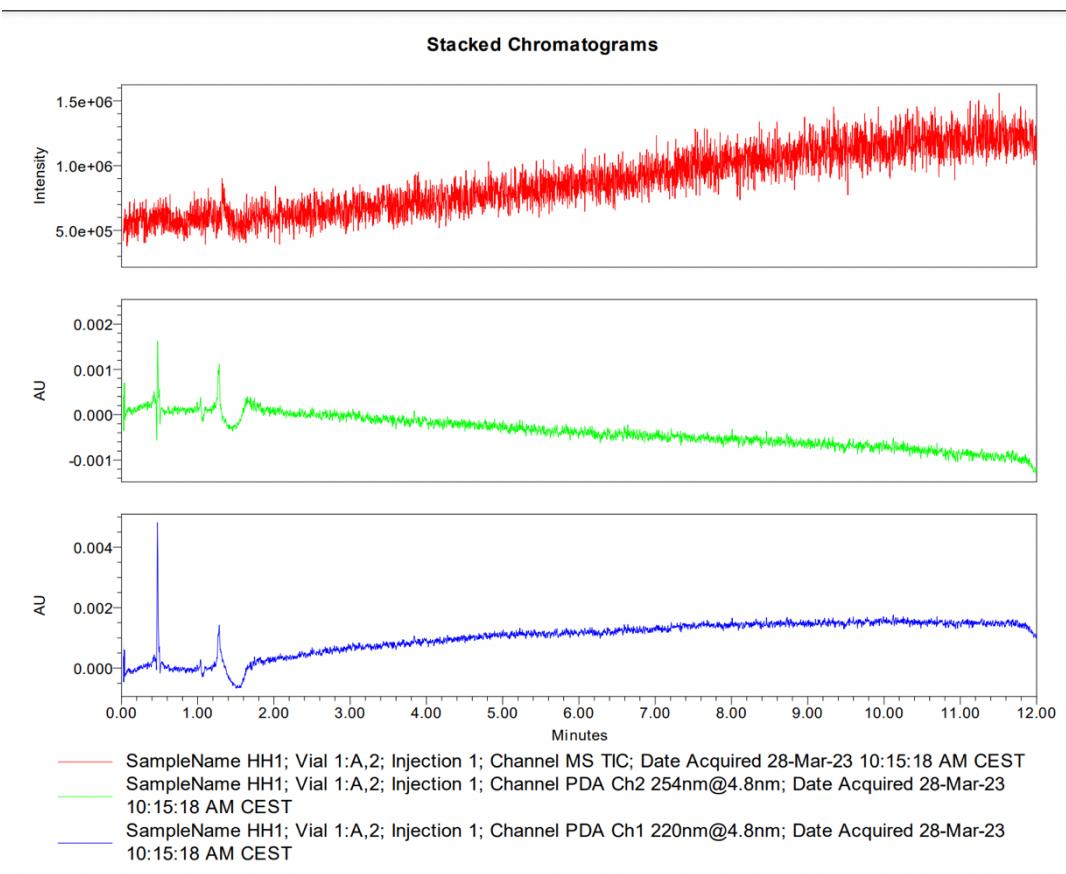


Abbildung 31: UHPSFC-Analyse von HH1, stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und Acetonitril, Detektion: PDA 254 nm und 220 nm, ELSD; UHPSFC-Methode: siehe Tabelle 9, Seite 19

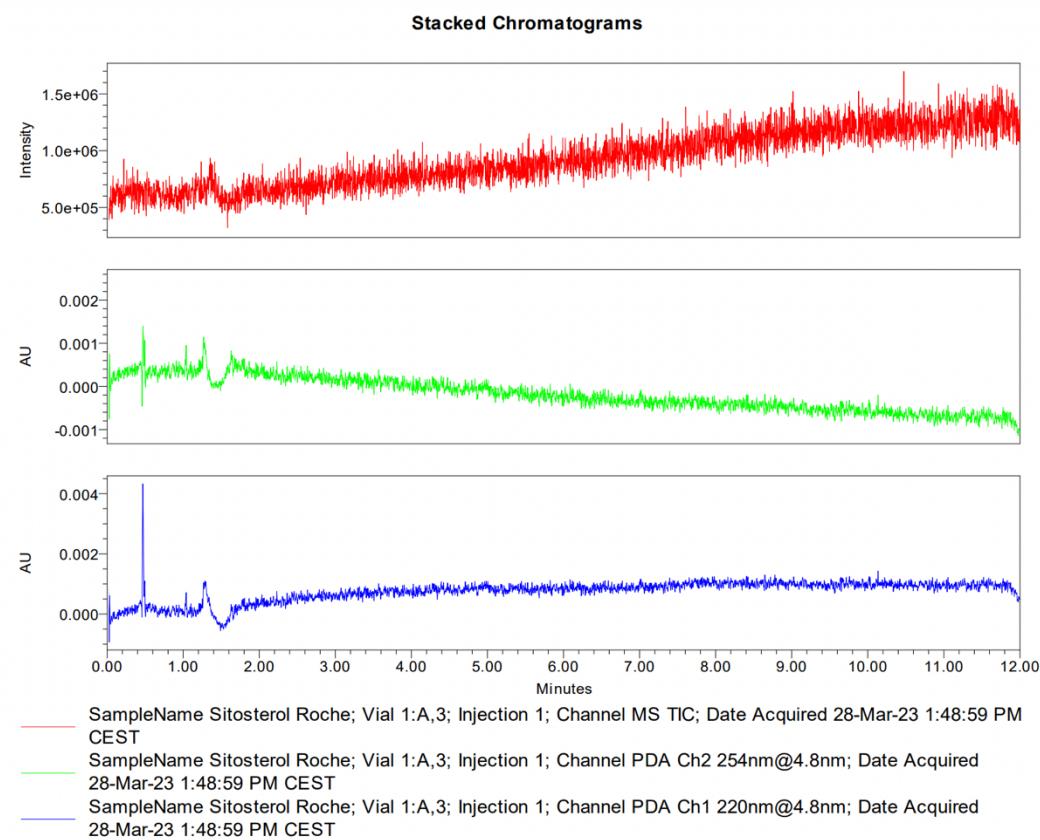


Abbildung 32: UHPSFC-Analyse von Sitosterol La Roche, stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und Acetonitril, Detektion: PDA 254 nm und 220 nm, ELSD; UHPSFC-Methode: siehe Tabelle 9, Seite 19

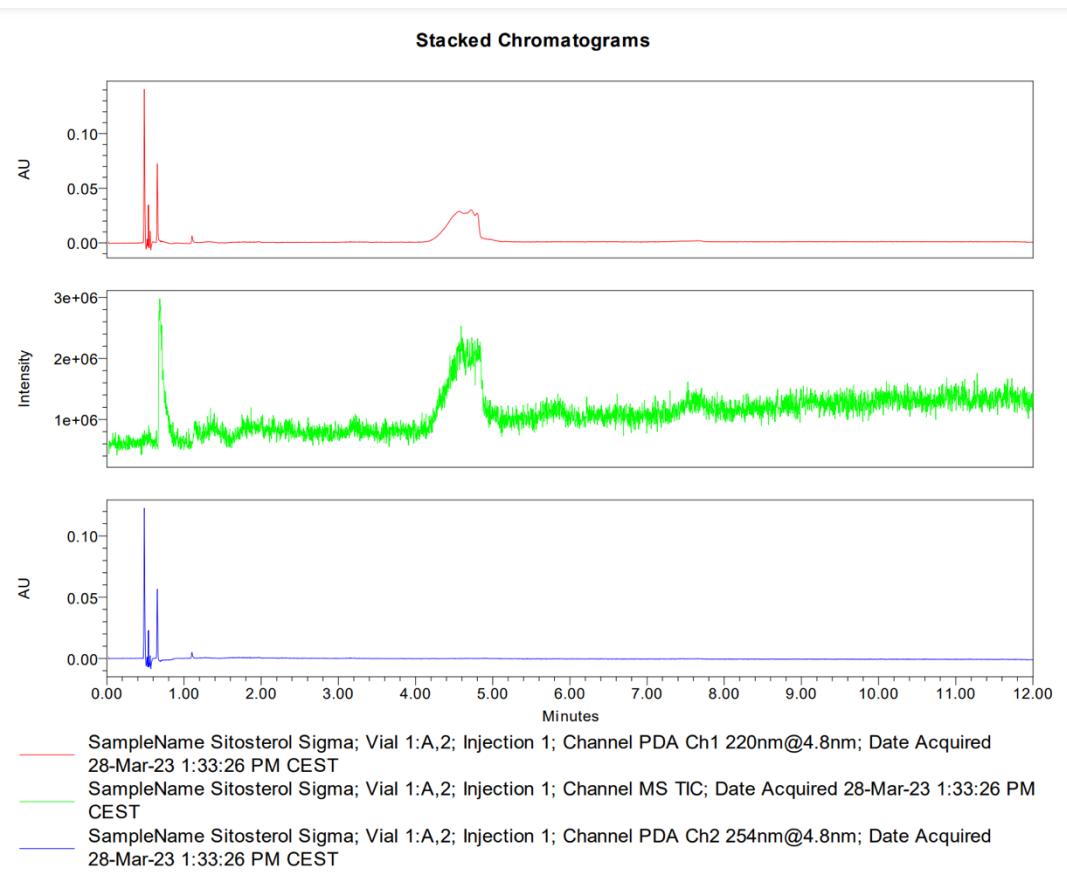


Abbildung 33: UHPSFC-Analyse von Sitosterol Sigma, stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und Acetonitril, Detektion: PDA 254 nm und 220 nm, ELSD; UHPSFC-Methode: siehe Tabelle 9, Seite 19

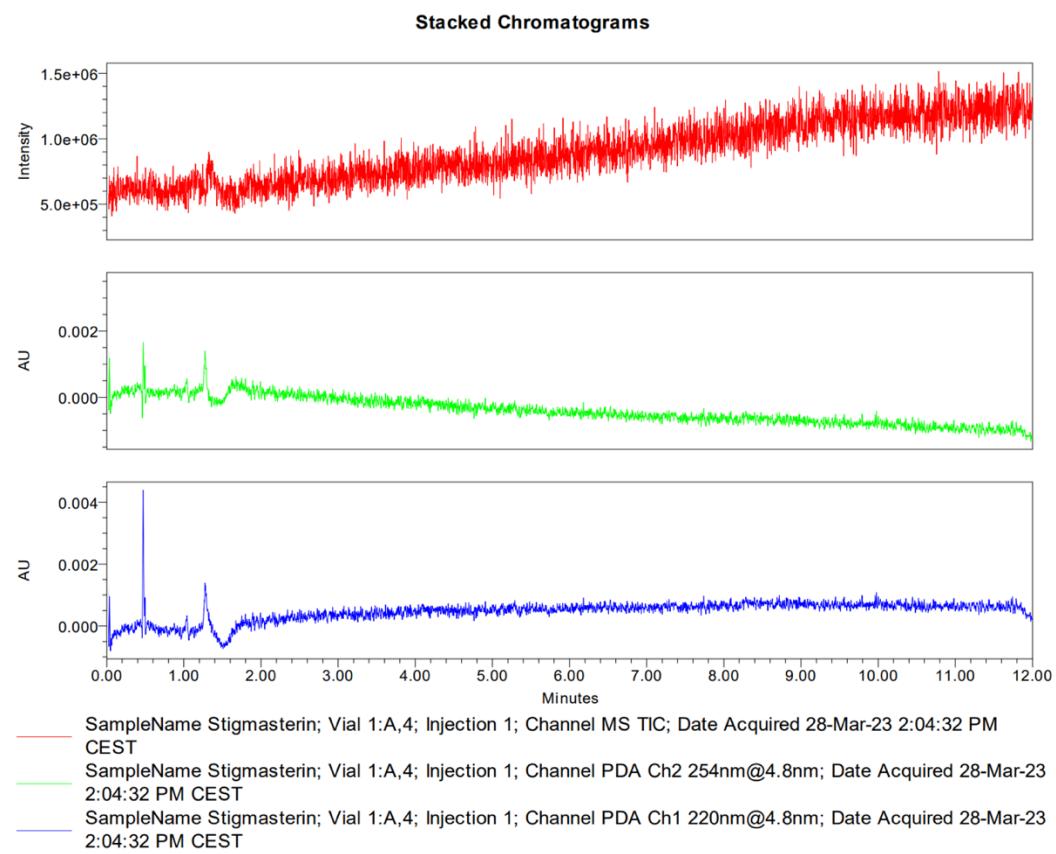


Abbildung 34: UHPSFC-Analyse von Stigmasterin, stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und Acetonitril, Detektion: PDA 254 nm und 220 nm, ELSD; UHPSFC-Methode: siehe Tabelle 9, Seite 19

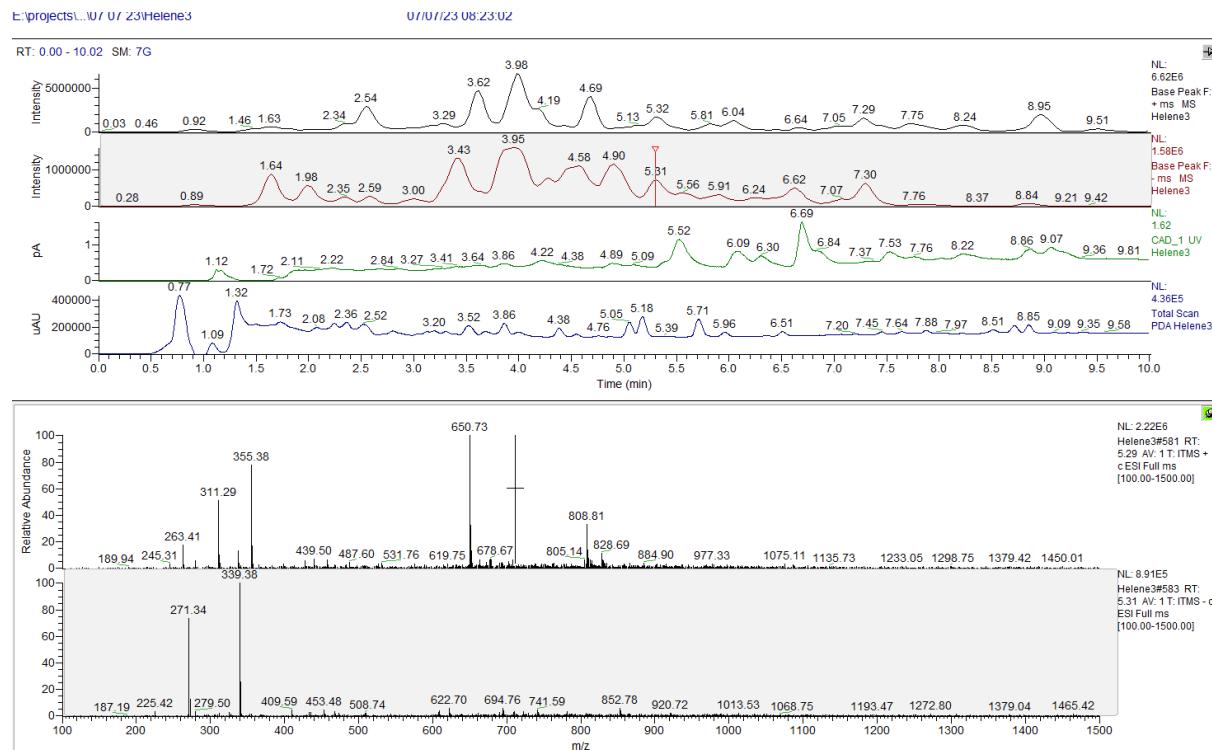


Abbildung 35: Massenspektrometrische Analyse von Peak Nr. 1, Methode siehe Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12, S. 20

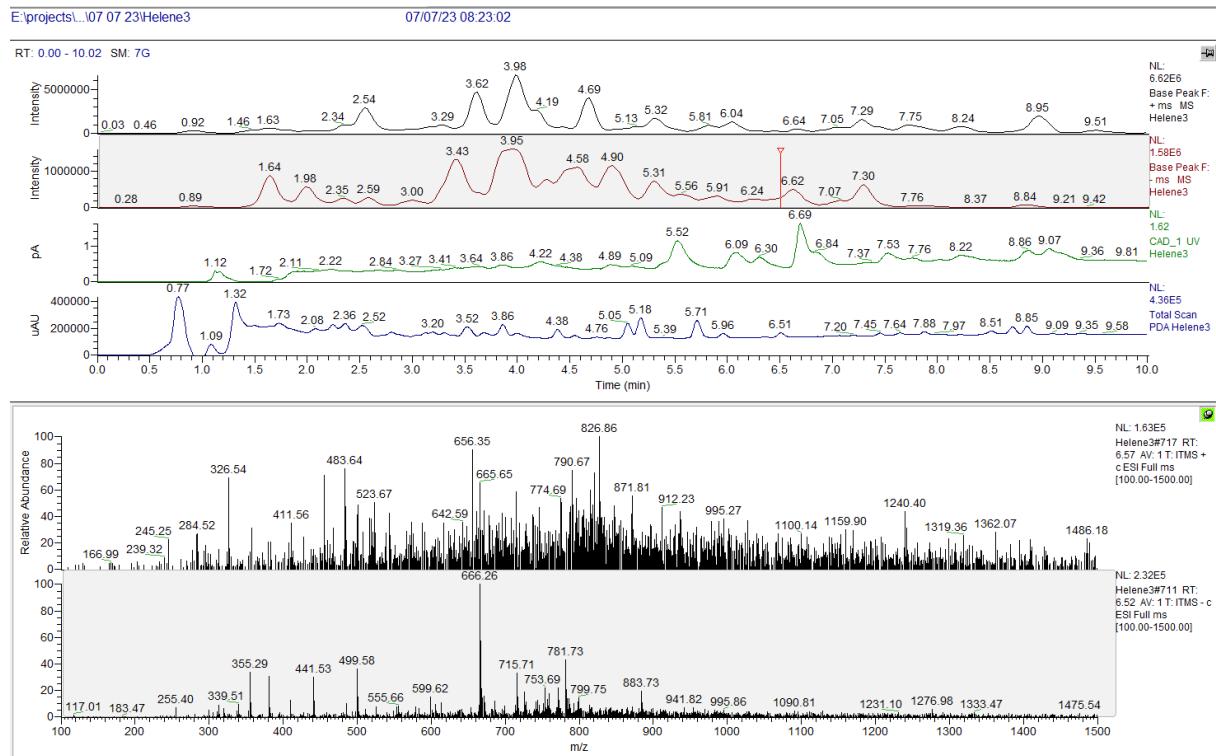


Abbildung 36: Massenspektrometrische Analyse von Peak Nr. 2, Methode siehe Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12, S. 20

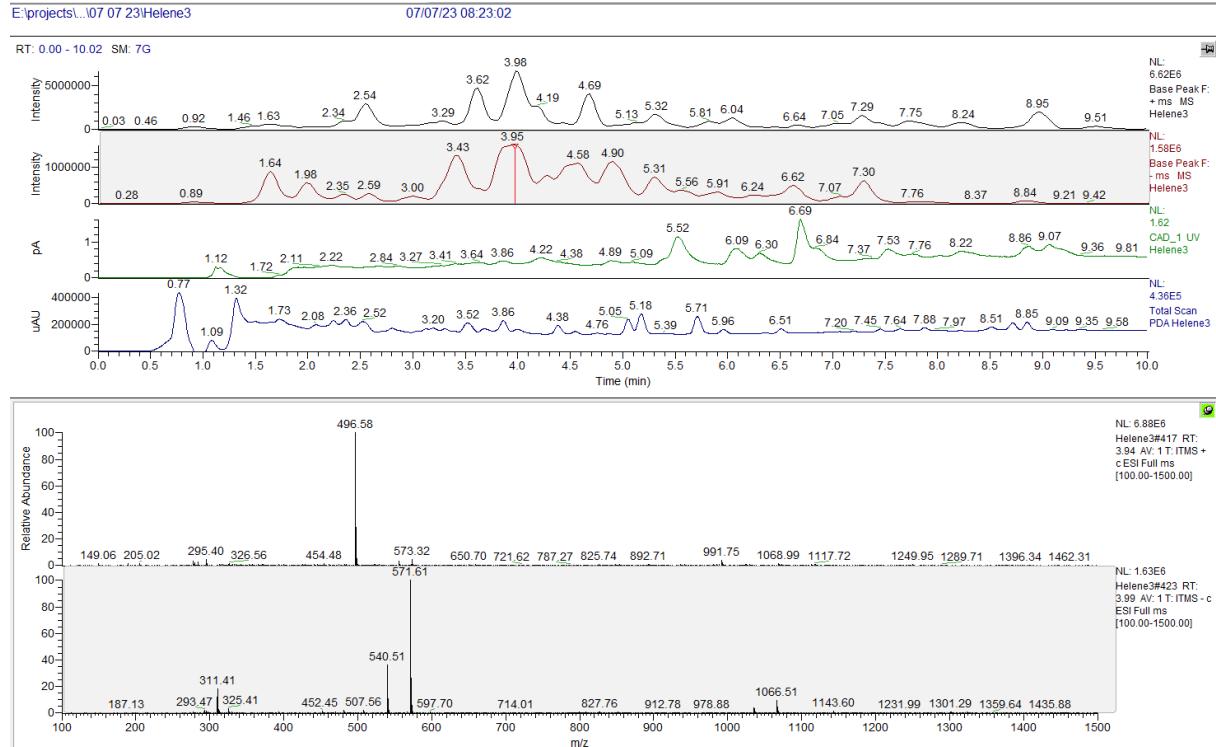


Abbildung 37: Massenspektrometrische Analyse von Peak Nr. 5, Methode siehe Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12, S. 20