



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Analyse und Isolierung sulfatierter und glykosylierter Flavonoide aus der mongolischen Arzneipflanze *Myricaria longifolia* EHRENB.

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Barbara Kubasa
Studienrichtung /Studienzweig Pharmazie
(lt. Studienblatt):
Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Wien, im Februar 2011

FREUE DICH MIT MIR,

ES IST SO TRAUIG, SICH ALLEIN ZU FREUEN.

G.E. LESSING

Danksagung

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

Mein größter Dank gilt an dieser Stelle Ao. Univ.-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter. Danke für die fabelhafte Betreuung während meiner praktischen Arbeiten und beim Verfassen dieser Diplomarbeit. Danke für die vielen lehrreichen und wertvollen Erfahrungen, die ich bei euch gesammelt habe. DANKE!

In gleicher Weise danke ich Dr. Astrid Obmann für die stets offene Tür, die Geduld und für die vielen, vielen beantworteten Fragen. Danke für alles, was ich bei dir lernen durfte.

„Bei euch scheint immer die Sonne“

Herzlichen Dank an Dr. Martin Zehl für die Aufnahmen der MS-Spektren und Dr. Armin Presser für die Durchführung der NMR-Analysen.

Danke allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Glasl/Resnizcek und Kopp/Krenn für die freundliche Aufnahme und die wundervolle Zeit bei euch. Ich werde mich immer gerne daran erinnern.

Danke meinen Kolleginnen, die mir so oft Antrieb und Motivation in meinem Studium waren und die in den letzten Jahren wertvolle Freundinnen für mich geworden sind.

Danke meinen Freundinnen, die mich schon lange auf meinem Weg begleiten, für eure wahre und aufrichtige Freundschaft und dass ich immer auf euch zählen kann.

Es heißt, seine Familie kann man sich nicht aussuchen. Aber wenn ich wählen könnte, würde ich mich für meine Familie entscheiden! Ich danke meinen Tanten, Onkeln, Cousins und Cousins für eure Unterstützung und die unzähligen lustigen Stunden, die wir immer wieder miteinander verbringen.

Ich danke meinem Bruder. Er ist der beste Bruder den man sich vorstellen kann!

Ganz besonders danke ich meiner Mutter, die mir nie Grenzen gesetzt, mir immer alles ermöglicht hat und mir immer ein großes Vorbild war. Ich bin stolz, deine Tochter sein zu dürfen!

Ich danke meinem Freund Philipp – meinem EDV-Fachmann, meinem Koch, meinem „Gut-zu-Redner“ – für deine Hilfe bei so mancher technischer Problemstellung, für dein Verständnis und deine wertvolle Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1. Traditionelle Mongolische Medizin	1
1.2. <i>Myricaria longifolia</i> EHRENB.....	2
1.3. Flavonoide	4
1.4. Problemstellung	6
2. MATERIAL UND METHODEN.....	6
2.1. Material	6
2.2. Pflanzenmaterial	6
2.2.1. Originales Wasserextrakt 48/04 und Fraktion S5	7
2.2.2. Blätterextrakt 48/04 und Fraktion IIIc.....	8
2.3. Methoden.....	11
2.3.1. Dünnschichtchromatographie	11
2.3.2. Festphasenextraktion	12
2.3.3. High Performance Liquid Chromatography	14
2.3.4. Gaschromatographie	16
2.3.5. UV/VIS – Spektroskopie	17
2.3.6. Massenspektrometrie	20
2.3.7. Kernresonanzspektroskopie	22
2.3.8. Hydrolyse und Umsetzung mit chiralem Butanol	23
3. EXPERIMENTELLER TEIL UND ERGEBNISSE	26
3.1. Isolierung von BK1 aus Fraktion S5.....	26
3.1.1. Analytik.....	26
3.1.2. Isolierung mittels SPE und präparativer DC	33
3.2. Isolierung von BK3, BM und BK2.....	36
3.2.1. Analytik.....	37
3.2.2. Isolierung mittels semipräparativer HPLC	41
3.3. Charakterisierung und Identifizierung der Substanzen	45
3.3.1. Charakterisierung von BK1	45
3.3.1.1. UV/VIS-Analyse	45
3.3.1.2. NMR-Analyse	48

3.3.2.	Charakterisierung von BK3.....	49
3.3.2.1.	UV/VIS-Analyse	49
3.3.2.2.	NMR-Analyse	51
3.3.3.	Charakterisierung von BK2.....	55
3.3.3.1.	UV/VIS-Analyse	55
3.3.3.2.	NMR-Analyse	58
3.3.4.	Charakterisierung von BM	62
3.3.4.1.	UV/VIS-Analyse	62
3.3.4.2.	NMR-Analyse	65
3.3.4.3.	Hydrolyse	69
4.	ZUSAMMENFASSUNG	70
5.	VERZEICHNISSE	73
5.1.	Literaturverzeichnis.....	73
5.2.	Tabellenverzeichnis	75
5.3.	Abbildungverzeichnis.....	77
6.	LEBENS LAUF	80

1. Einleitung und Problemstellung

Die *Myricaria longifolia* ist eine Arzneipflanze, die in der traditionellen mongolischen Medizin zur Behandlung von Lebererkrankungen eingesetzt wird.

1.1. Traditionelle Mongolische Medizin

Die Traditionelle Mongolische Medizin (TMM) erfährt wie viele andere östliche Heilmethoden durch steigenden Tourismus und die Verbreitung im Internet einen Aufschwung in der westlichen Welt. Sie wird wie die Traditionelle Chinesische Medizin, die Tibetische Medizin oder Ayurveda dort eingesetzt, wo die westliche Schulmedizin an ihre Grenzen stößt, wie zum Beispiel bei chronischen Krankheitsverläufen.

Die Medizin des mongolischen Volkes vermischte sich im Laufe der Zeit mit den Lehren der Tibetischen Medizin und bildete so die Grundlage der heute bekannten TMM. Sie zeigt aufgrund ihrer Entstehungsgeschichte viele Ähnlichkeiten mit der Tibetischen Medizin. Während der kommunistischen Ära war es verboten, TMM anzuwenden. Mönche, die in Klöstern in der Ausbildung zu Ärzten, so genannten „emchi“, standen, wurden verfolgt. Doch im Untergrund lebte das Wissen über die Arzneipflanzen und ihre Anwendung weiter. Nach dem Fall des kommunistischen Regimes besann man sich wieder auf den Arzneimittelschatz der TMM.¹ Das mongolische Gesundheitsministerium fördert den Einsatz von TMM besonders unter der ländlichen Bevölkerung vor allem zur Vorbeugung von Krankheiten. Heute werden an mongolischen Universitäten sowohl die TMM als auch die westliche Schulmedizin unterrichtet.²

Als holistische Methode betrachtet die TMM nicht nur einzelne Symptome, sondern den ganzen Menschen mit seiner Lebensweise und seinen Gefühlen wie etwa Hass oder Trauer. Deshalb ist es auch sehr schwierig, mongolische Krankheitsbilder mit westlichen zu vergleichen. Die TMM versteht Krankheit als das Ungleichgewicht der drei Grundprinzipien Wind (hii), Galle (sär) und Schleim (badgan). Nur

wenn diese im Einklang sind, ist der Mensch gesund. Der Diagnose dienen Methoden wie Pulsmessung, der eine besondere Bedeutung zukommt, Betrachtungen der Zunge und des Urins und die intensive Befragung des Patienten.³

Die Arzneipflanzen werden meist als Pulver geschluckt, dazu wird reichlich Wasser nachgetrunken. Die Anwendung einzelner Drogen ist unüblich, man bedient sich Mischungen verschiedener Pflanzen.

Die Health Sciences University of Mongolia in Ulaanbaatar ist bemüht in Kooperation mit westlichen Hochschulen an einigen Arzneipflanzen der TMM zu arbeiten. Einer dieser wissenschaftlichen Partner ist das Department für Pharmakognosie der Universität Wien. Im Jahr 2001 startete ein Projekt, das sich auf Pflanzen bezog, die in der TMM bei Lebererkrankungen eingesetzt werden. Lebererkrankungen treten in der Mongolei sehr häufig auf. Dies könnte auf einen hohen Alkoholkonsum und den übermäßigen Verzehr von Fleisch zurückzuführen sein.¹ Eine Pflanze, die im Zuge dieses Projekts an der Universität Wien untersucht wird, ist die *Myricaria longifolia*, deren Extrakt im Zelltest einen zytotoxischen Effekt auf Leberzellen aufzeigt.⁴

1.2. *Myricaria longifolia* EHRENB.

Myricaria longifolia gehört zu der Familie der Tamaricaceae (Tamariskengewächse). Die Familie umfasst drei große Gattungen (*Myricaria*, *Reamurea* und *Tamarix*) und ca. 110 Arten, die über Afrika, Asien und Europa weit verbreitet sind.⁵ Die Vertreter der Familie wachsen als Sträucher, Halbsträucher und Bäume. Sie tragen kleine, oft schuppenförmige, in der Regel unbestielte Blätter.⁶ Auf ihrer Oberfläche finden sich häufig Salzdrüsen, welche Sulfate und Chloride sezernieren.⁷ Die Blüten stehen für gewöhnlich in Trauben oder Rispen, selten alleine. Kelch und Krone sind vier- bis fünf-zählig, ebenso die Staubblätter, die aber auch zahlreich vorkommen können. Sie stehen meist frei, sind in der Gattung *Myricaria* aber oft zu einem Drittel oder zur Hälfte miteinander verwachsen. Der Stempel besteht aus zwei bis fünf Fruchtblättern. Die zahlreichen Samen in den Kapseln sind immer

behaart.⁶ Die Tamariskengewächse sind in den Steppen Eurasiens beheimatet.

Myricaria longifolia wächst als Strauch und erreicht eine Höhe von zwei bis drei Meter. Ihre Rinde ist leicht gelblich gefärbt. Die kleinen, nadelförmigen Blätter sind 0,8-1,5cm lang und 1-1,5mm breit. Die Blüten der Pflanze sind traubig angeordnet. In der TMM werden junge Zweige inklusive Blätter und Blüten angewendet.⁸



Abbildung 1: *Myricaria longifolia*¹

Aus drei *Myricaria*-Arten wurden bereits einige Inhaltsstoffe isoliert und charakterisiert. Der Arbeitsgruppe um Li, Chen und Yu gelang es, aus *Myricaria paniculata* im Jahr 2005 Myricanol, 28-Hydroxy-14-taraxeren-3-on, Epi-Friedelanol, β -Sitosterol, 4-Methyl-stigmast-7-en-3-ol, 12-Hentriaconatol und 1-Triacontanol⁹ und im Jahr 2008 die

Flavonoidderivate Rhamnazin, 7-Methoxy-kämpferol, Rhamnetin und Quercetin, die Ellagsäurederivate 3,4,3'-Trimethoxy-ellagsäure, 3,3'-Dimethoxy-ellagsäure, 3'-Methoxy-ellagsäure-4-rhamnosid und 3,3'-Dimethoxy-ellagsäure-4-glucosid sowie Daucosterol¹⁰ zu isolieren. Weitere Flavon- und Gallussäurederivate konnten Zhou, Wang und Du 2006 aus *Myricaria bracteata* gewinnen. Hierbei handelte es sich um Rhamnetin, 3,5,4'-Trihydroxy-7,3'-dimethoxy-flavon, 3,5,4'-Trihydroxy-7-methoxy-flavon, Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosid, Kämpferol, Quercetin, Chrysoeriol, Gallussäure, Gallussäureethylester. Zusätzlich konnten β -Sitosterol und Daucosterol isoliert werden.¹¹ Aus *Myricaria alopecuroides* gelang der Arbeitsgruppe um Li, Xue, Li und Xie im Jahr 2010 die Isolierung von Ellagsäure-3,3',4'-trimethylether, Ellagsäure-3,3'-trimethylether, Isorhamnetin, Kämpferol, 3,5-Dihydroxy-4-methoxybenzoesäure, Daucosterol, 6,7,10-Trihydroxy-8-octadecensäure, Quercetin, Gallussäure, Palmitinsäure und Hexadecansäure-2,3-dihydroxy-propyl-ester.¹²

1.3. Flavonoide

Bei Flavonoiden handelt es sich um Derivate des 2-Phenylbenzopyrans. Man unterscheidet aufgrund verschiedener Oxidationsstufen Flavanole, Flavanone, Flavononole, Flavonole und Flavone. Die Verbindungen können weitere Substituenten, wie Hydroxy- oder Methoxygruppen, an den Ringen A und/oder B tragen. Die bevorzugten Positionen sind 3, 5, 7, 3' und 4'.

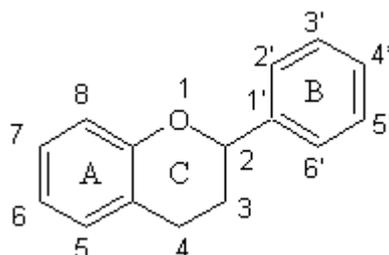


Abbildung 2: 2-Phenyl-benzopyran

Flavonoide liegen nicht nur frei vor, sondern auch an Zucker gebunden. Glykosidische Bindungen treten meist an den Positionen 3, 7, und 4' auf. C-glykosidische Bindungen findet man gewöhnlich an C6 und C8.

In Tabelle 1 (siehe Seite 5) sind Quercetin und zwei methylierte Derivate davon, Rhamnetin und Isorhamnetin, aufgelistet.

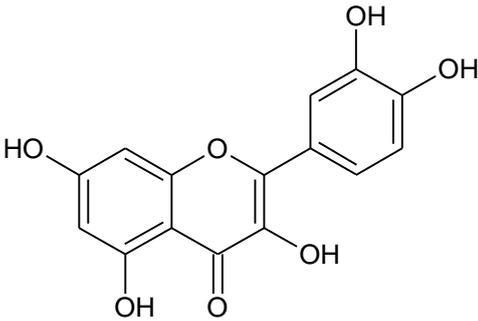
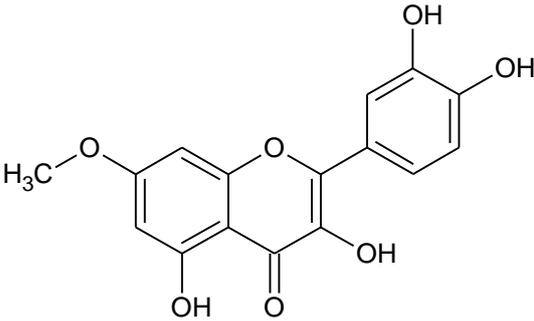
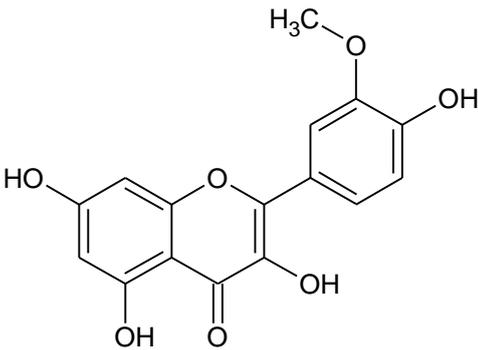
Bezeichnung	Strukturformel
Quercetin	
Rhamnetin	
Isorhamnetin	

Tabelle 1: Strukturformeln von Quercetin , Rhamnetin und Isorhamnetin

1.4. Problemstellung

Bei Untersuchungen, die 2005 im Zuge einer Diplomarbeit⁷ an *Myricaria longifolia* durchgeführt wurden, gab es Hinweise auf das Vorliegen von sulfatierten Verbindungen. Nach der Hydrolyse substituierter Flavonoide mit Trifluoressigsäure (TFA) erfolgte ein nasschemischer Versuch mit BaCl₂, der einen positiven Sulfatnachweis brachte. Dieses Ergebnis wurde durch eine massenspektrometrische Analyse bestätigt. Sie zeigte eine für Sulfat typische Abspaltung von 80 Masseneinheiten.⁷

In einer weiteren Diplomarbeit¹³ wurden in einer Fraktion des wässrigen Extraktes von *Myricaria longifolia* Verbindungen gefunden, von denen man vermutete, dass sie als Sulfate vorlagen. An dieser Stelle setzten die Arbeiten vorliegender Diplomarbeit ein, mit dem Ziel, verschiedene sulfatierte Substanzen zu isolieren und ihre Struktur aufzuklären. Die Substitutions-Positionen der Sulfatgruppen sollten mittels verschiedener Methoden ermittelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Im folgenden Kapitel wird ein Überblick über das im Zuge dieser Diplomarbeit verwendete Pflanzenmaterial und der daraus gewonnenen Fraktionen gegeben.

2.2. Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial stammt aus gemeinsamen Sammlungen der Universität Wien und der Health Sciences University of Mongolia in Ulaanbaatar, die im Zuge von Exkursionen im Sommer 2004 in der Region Arkhangai durchgeführt wurden.¹⁴ Herbarbelege befinden sich am Department für Pharmakognosie in Wien.



Abbildung 3: Sammelgebiet von *Myricaria longifolia* 48/04 in der Mongolei¹⁵ (rot markiert: Provinz Akrhangai)

Bei diesen Exkursionen wurde das gesammelte Pflanzenmaterial mit einer fortlaufenden Nummer und dem Jahr der Sammlung gekennzeichnet.² Die in dieser Arbeit verwendete Droge trägt die Bezeichnung 48/04. Ebenso wurden die beiden daraus gewonnenen Extrakte benannt: Es wurde ein „Originales Wasserextrakt 48/04“ (siehe Kapitel 2.2.1, Seite 7) aus allen oberirdischen Organen der Pflanze bereitet (siehe Abbildung 4, Seite 10). Für den „Blätterextrakt 48/04“ (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 8) wurden ausschließlich die grünen Blätter verwendet (siehe Abbildung 4, Seite 10).

2.2.1. Originales Wasserextrakt 48/04 und Fraktion S5

Das „Originale Wasserextrakt 48/04“ (OWE 48/04) diente bereits bei vorangegangenen Untersuchungen an *Myricaria longifolia* als wichtige Grundlage.

Traditionell wird die Droge gepulvert geschluckt und mit genügend Wasser eingenommen. Bei der Herstellung des OWE 48/04 wurde darauf geachtet, den natürlichen Einnahmebedingungen zu entsprechen. Es wurden 2g frische, gepulverte Droge mit 50ml Wasser versetzt. Um den sauren pH-Wert des Magens zu simulieren, wurde das Wasser zuvor mit 0,1N TFA auf einen pH-Wert von 2 eingestellt.

Nach einer Stunde am Wasserbad bei 40°C und unter häufigem Schütteln wurde abfiltriert und mittels Lyophilisation getrocknet.⁷

Das so gewonnene OWE wurde mittels Säulenchromatographie getrennt. Als stationäre Phase wurde Sephadex LH-20 verwendet und als mobile Phase diente ein Gradient aus Methanol-Wasser (siehe Tabelle 2, Seite 8).¹⁶

Bezeichnung der Fraktion	Elutionsmittel: Methanol-Wasser Volumen: 200ml/Fraktion
C1	0-100
C2	0-100
S2	20-80
S3	20-80
S4	40-60
S5	40-60
S6	60-40
S7	60-40
S8	80-20
S9	80-20
S10	100-0
S11	100-0

Tabelle 2: Säulenchromatographische Fraktionierung des OWE 48/04 an Sephadex LH 20 (rot markiert: verwendetet Fraktion S5)¹⁶

Die gewonnenen Fraktionen waren an primären Rattenhepatocyten getestet worden. Die Fraktionen S5-S11 hatten eine deutliche Wirkung gezeigt.¹⁴

Daher wurde mit Fraktion S5 gearbeitet, die mit einem Gradienten von 40% Methanol eluiert worden war. Es standen rund 150mg der Fraktion zu Verfügung.

2.2.2. Blätterextrakt 48/04 und Fraktion IIIc

Im Gegensatz zum OWE 48/04, das aus allen oberirdischen Teilen der Pflanze bereitet wurde, bestand das Blätterextrakt 48/04 (BE 48/04) ausschließlich aus grünen Blättern. Die Gewinnung des BE 48/04

erfolgte analog zur Gewinnung des OWE 48/04. Ansatzverhältnis und Extraktionsbedingungen waren ident (siehe Kapitel 2.2.1, Seite 7). Im Zuge einer vorangegangenen Diplomarbeit¹³ war dieser Extrakt bereitet und mit einem Gradienten aus Methanol-Wasser fraktioniert worden.

Bezeichnung der Fraktion	Elutionsmittel: Methanol-Wasser Volumen: 200ml/Fraktion
Ia, Ib, Ic	0-100
IIa, IIb,IIc	20-80
IIIa, IIIb,IIIc	40-60
IVa, IVb, IVc, IVd	60-40
Va, Vb	80-20
VIa, VIb, VIc, VId, Vie, VI f, VIg, VIh	100-0

Tabelle 3: Fraktionierung des BE 48/04 mittels SC an Sephadex LH20 (rot markiert: verwendete Fraktion IIIc)¹³

In der folgenden Abbildung wird eine Übersicht über das Ausgangsmaterial, der daraus gewonnenen Extrakte und deren Fraktionen sowie der isolierten Substanzen gegeben.

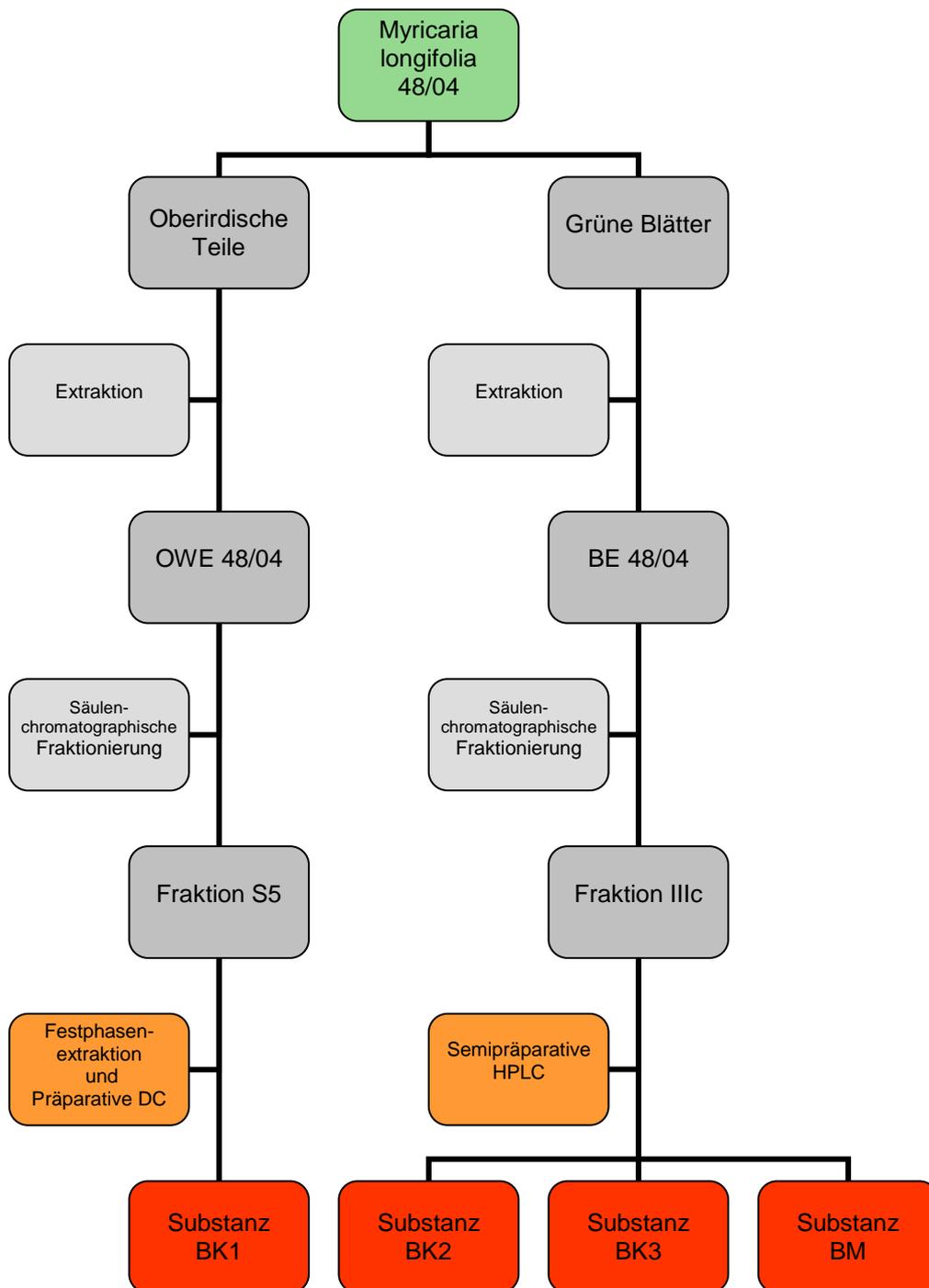


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ausgangsmaterial und der daraus gewonnen Extrakte und Fraktionen sowie der im Zuge dieser Arbeit isolierten Substanzen

2.3. Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Methoden kurz beschrieben und die Parameter erläutert.

2.3.1. Dünnschichtchromatographie

Als chromatographisches Trennverfahren wird die Dünnschichtchromatographie (DC) zur Auftrennung von Substanzgemischen verwendet. Zwischen einer festen stationären Phase, meist Kieselgel, die bei der DC plan auf einer geeigneten Unterlage, wie Glas oder Aluminium, aufgebracht ist, und einer flüssigen mobilen Phase, werden die Substanzen nach ihren unterschiedlichen Wechselwirkungen zu den beiden Phasen aufgetrennt.¹⁷

Wenige μl der gelösten Substanzmischung werden am unteren Ende der Dünnschichtplatte bandenförmig aufgetragen. Nach dem Trocknen wird die Platte in einen DC-Trog von geeigneter Größe gestellt, in dem sich das Fließmittel befindet. Dieses wandert aufgrund des Kapillareffekts an der DC-Platte hinauf und trennt das Substanzgemisch auf. Die Trennung wird abgebrochen, bevor die Substanzen die DC-Platte verlassen haben. Es entsteht ein sogenanntes inneres Chromatogramm. Mithilfe der R_f -Werte wird die Platte ausgewertet. Detektiert werden die Substanzen unter sichtbarem Licht und unter UV 254nm und UV 366nm.¹⁸

Im Zuge dieser Arbeit wurde die DC sowohl analytisch als auch präparativ genutzt. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 4 aufgelistet.

DC-SYSTEME		
	System 1	System 2
	Analytisch	Präparativ
Stationäre Phase	DC KG F ₂₅₄	HPTLC KG F ₂₅₄
Mobile Phase	Ethylacetat-Ameisensäure _{conc.} - Essigsäure _{conc.} -Wasser 100-11-11-26	
Aufgetragene Menge	5µl, 10µl	250µl
Laufstrecke	7-8cm	
Sprühreagenzien	Naturstoffreagens A (NSTRA) 1%ige Lösung von Diphénylborsäure-2-aminoethylester in Methanol 5%iges Polyethylenglykol in Ethanol (PEG 400)	Kein Sprühreagens
Detektion	Tageslicht 254nm 366nm	

Tabelle 4: Parameter der verwendeten DC-Systeme

Für die präparative Isolierung wurden HPTLC-Platten (High Performance Thin Layer Chromatography) verwendet, die sich durch eine kleinere Partikelgröße und gleichmäßigere Korngrößenverteilung auszeichnen und somit ein besseres Trennergebnis liefern.¹⁸ Der mobilen Phase wurden konzentrierte Säuren zugesetzt, um ein Tailing der phenolischen Inhaltsstoffe gering zu halten.⁷ Polyethylenglykol (PEG) wird im Anschluss an das Besprühen mit Naturstoffreagens A (NSTR-A) zur Fixierung aufgesprüht.

2.3.2. Festphasenextraktion

Auch die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die stationäre Phase

allerdings nicht wie bei der DC auf einer planen Unterlage aufgebracht ist, sondern in Kartuschen aus Kunststoff gefüllt ist. Das zu trennende Substanzgemisch wird auf die Säule aufgetragen und mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert. Es können auch Lösungsmittelgemische unterschiedlicher Konzentrationen eingesetzt werden, um somit einen Gradienten zu erzeugen. An die Kartuschen wird ein Vakuum angelegt, um die Elution zu beschleunigen und ein besseres Trennergebnis zu erzielen



Abbildung 5: Vakuumkammer mit SPE-Kartuschen

Für die Trennung der Fraktion S5 (siehe Tabelle 1, Seite 8) wurden Varian Mega Bond Elut C18 Kartuschen mit einem Durchmesser von 1,3cm verwendet, die 1,2cm hoch mit stationärer Phase gefüllt sind. Es handelt sich hierbei um RP18-Material. Das Volumen des Reservoirs beträgt 6ml.



Abbildung 6: SPE-Kartusche

Eluiert wurde mit einem Gradienten aus Methanol und Wasser. Die erhaltenen Fraktionen, eingesetzten Reservoirvolumina und Gradienten sind in Tabelle 5 aufgezeigt.

Fraktion	Reservoirvolumina	Gradient: Methanol-Wasser
Ia	1	0-100
Ib	2	0-100
II	3	20-80
III	3	40-60
IV	3	60-40
V	3	80-20
VI	3	100-0

Tabelle 5: Fraktionierung von Fraktion S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) mittels SPE an RP18

2.3.3. High Performance Liquid Chromatography

Bei der High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenchromatographie, bei der die stationäre Phase in eine Säule aus Glas gefüllt ist und das Elutionsmittel entlang der Schwerkraft durch die Säule wandert.¹⁸ Die stationäre Phase der HPLC befindet sich in einer Säule aus Edelstahl. Bedingt durch die feinen Partikel der stationären Phase, deren Durchmesser nur 2-5µm betragen, steigen die Drücke in der Säule exponentiell an.¹⁷ Sie können bis zu 300bar betragen. Das Lösungsmittel oder das Lösungsmittelgemisch wird durch die Säule gepumpt.¹⁸ Der Druck in der Säule ist abhängig von der Packungsdichte der stationären Phase, der Länge der Säule sowie der Viskosität des Fließmittels.

Die Säule befindet sich meist in einem Säulenofen. Die Möglichkeit der Temperaturregulierung dient zum Einen der Reproduzierbarkeit, zum Anderen kann man durch Veränderung der Temperatur auch die Trennleistung beeinflussen. Diese Möglichkeit wird auch in dieser Arbeit genutzt um ein besseres Ergebnis zu erzielen. Das zu trennende Substanzgemisch wird entweder per Hand oder mittels Autosampler in die Säule injiziert. Die Volumina betragen in der Regel nur wenige µl. Bei der HPLC wird meist mit Gradient eluiert. Die Pumpen mischen die

Lösungsmittel in der bestimmten Konzentration, und die Substanzen werden nach ihren Affinitäten zu stationärer und mobiler Phase getrennt.¹⁸ Abhängig von ihren Wechselwirkungen zu den Phasen verlassen die Substanzen die Säule bei unterschiedlichen Retentionszeiten. Detektiert werden sie nach Verlassen der Säule mittels UV-Detektoren oder Lichtstredetektoren. Auch die Massenspektrometrie (Kapitel 2.3.6, Seite 20) kann dafür zum Einsatz kommen.¹⁷

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde die HPLC sowohl analytisch als auch präparativ verwendet.

Als stationäre Phase wurden RP-Säulen verwendet. Bei der semipräparativen Isolierung der Substanzen BK2, BK3 und BM wurde sogenanntes Aquasil[®]-Material eingesetzt, in deren RP-Phase zusätzliche polare Gruppen eingearbeitet sind. Die mobile Phase bildete immer ein Gradient aus Acetonitril und Wasser das mit konzentrierter Ameisensäure auf pH 2,8 angesäuert wurde.

Für die HPLC-Analysen von S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) und den daraus gewonnen Fraktionen mittels SPE wurde Methode 1 (Tabelle 6, Seite 16) auf RP-18 verwendet. Der semipräparativen Isolierung der Substanzen BK2, BK3 und BM diente Methode 4 (Tabelle 14, Seite 44) mit Aquasil[®]-Material als stationäre Phase.

Methode 1															
Gerät	Shimadzu DGU-20As Prominence Degaser Shimadzu LC-20AD Prominence Liquid Chromatograph Shimadzu SIL-20AC HT Prominence Auto Sampler Shimadzu CTO-20AC Prominence Column Oven Shimadzu SPD-M20A Prominence Diod Array Detektor Shimadzu CMB-20A Prominence Communications Bus Module														
Säulenparameter	Acclaim® RP-18e Durchmesser: 2,1cm Länge: 15cm Partikelgröße: 3µm														
Methode	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Min.</th> <th style="width: 70%;">Konzentration in Acetonitril [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>00.00 → 13.00</td> <td>5 → 15</td> </tr> <tr> <td>13.00 → 19.00</td> <td>isokratisch 15</td> </tr> <tr> <td>19.00 → 30.00</td> <td>15 → 35</td> </tr> <tr> <td>30.00 → 38.00</td> <td>35 → 55</td> </tr> <tr> <td>38.00 → 39.00</td> <td>55 → 100</td> </tr> <tr> <td>39.00 → 44.00</td> <td>Isokratisch</td> </tr> </tbody> </table>	Min.	Konzentration in Acetonitril [%]	00.00 → 13.00	5 → 15	13.00 → 19.00	isokratisch 15	19.00 → 30.00	15 → 35	30.00 → 38.00	35 → 55	38.00 → 39.00	55 → 100	39.00 → 44.00	Isokratisch
Min.	Konzentration in Acetonitril [%]														
00.00 → 13.00	5 → 15														
13.00 → 19.00	isokratisch 15														
19.00 → 30.00	15 → 35														
30.00 → 38.00	35 → 55														
38.00 → 39.00	55 → 100														
39.00 → 44.00	Isokratisch														
Säulentemperatur	25°C														
Flussrate	0,4ml/min														
Einspritzvolumen	3,5µl														
Detektion	Diode Array Detektor, Lichtstreuendetektor (ELSD) Massenspektrometrie														

Tabelle 6: HPLC-Methode 1

2.3.4. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) stellt ein chromatographisches Trennverfahren für flüchtige und verdampfbare Stoffe dar.¹⁷ Wenige µl des Substanzgemisches werden mit einer Injektionsspritze in den Injektor eingebracht. Dort wird es vom Trägergasstrom, meist Stickstoff oder Helium, erfasst und durch die Säule transportiert. Diese befindet sich in einem Säulenofen, der auf 350°C geheizt werden kann. Es gibt zwei verschiedene Arten von Säulen: gepackte Säulen, die mit festem Trägermaterial gefüllt sind und Kapillarsäulen, deren Innenwände mit einer dünnen Schicht flüssiger stationärer Phase ausgekleidet sind. Mit Kapillarsäulen können deutlich bessere Trennergebnisse erzielt werden. Die Trennung des Substanzgemisches beruht auf unterschiedlichen Wechselwirkungen der einzelnen Substanzen mit stationärer und mobiler Phase. Ein Detektor am Ende der Säule erfasst die getrennten Substanzen.¹⁸ Zur Auswertung werden die Retentionszeiten der Verbindungen herangezogen. Eine quantitative Bewertung ist über den Vergleich der Peakflächen möglich. Bei der GC

ist es von großer Bedeutung, dass die zu analysierenden Substanzen im gasförmigen Zustand vorliegen. Nicht gasförmige Substanzen sind dann für die GC geeignet, wenn sie durch Derivatisierung in solche unzersetzt überführbar sind. In dieser Arbeit wurde für die Derivatisierung der Zucker (Kapitel 3.3.4.3, Seite 69) N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (MSTFA) verwendet.

GC-Parameter	
Gerät	Shimadzu QP2010 GC-MS
Stationäre Phase	Kapillarsäule: Phenomenex ZB-5 Durchmesser: 0,25mm Länge: 65m Schichtdicke: 0,25µm
Mobile Phase	Helium 5.0
Ofentemperatur	100°C
Injektionstemperatur	270°C
Temperaturgradient	von 100°C auf 270°C mit 3°C/Minute
Säulenfluss	2,17ml/Minute
Split ratio	10.0
Injektionsvolumen	1µl
Detektion	MS

Tabelle 7: Parameter der Gaschromatographie

2.3.5. UV/VIS – Spektroskopie

Wenn Substanzen Strahlung im Bereich von ultraviolettem (400-800nm) oder sichtbarem (200-400nm) Licht ausgesetzt werden, absorbieren sie unterschiedlich viel Energie. Die Strahlung, die wieder abgegeben wird, kann gemessen werden.¹⁷ Der Messung dienen meist Dioden Array Detektoren (DAD), bei dem mehrere Photodioden auf einer Platte aufgebracht sind, die kontinuierlich in einem Wellenlängenbereich von 190-800nm messen. So entstehen eindeutige UV/VIS-Spektren, die für jede einzelne Substanz charakteristisch sind. Die gewonnen UV/VIS-Spektren können mit Datenbanken verglichen werden und so zur Identifizierung einer Substanz beitragen.

In dieser Arbeit kam die UV/VIS Spektroskopie einerseits zur Identifizierung von Substanzen nach der HPCL-Analyse mittels DAD zum Einsatz. Weiters wurde sie auch zur Unterstützung der Strukturaufklärung der Reinsubstanzen verwendet. Zur Identifizierung von Flavonoiden hat sich der Einsatz sogenannter Shift-Reagenzien als

eine wichtige Methode durchgesetzt. Durch ihre Zugabe kommt es zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima entweder zum höheren Wellenlängenbereich (bathochromer Shift) oder zum niedrigeren Wellenlängenbereich (hypsochromer Shift). Aufgrund dieser Veränderungen der Maxima lässt sich die Position z.B. eines Zuckers oder einer Methylgruppe ermitteln.¹⁹ Die erhaltenen Ergebnisse können auch mit weiterführender Literatur²⁰ verglichen werden.

Ein typisches UV-Spektrum eines Flavonoids zeigt zwei Maxima. Bande II erscheint in einem Bereich von 240-285nm und Bande I bei 300-350nm. Veränderungen der Bande II weisen für gewöhnlich auf Substitutionen des Rings A hin, während sich Veränderungen in Bande I auf den B-Ring des Flavonoids beziehen. Methylierungen und Glycosidierungen der Moleküle verschieben die Maxima in der Regel zum niedrigeren Wellenbereich.¹⁹

Verwendet wurden in dieser Arbeit Lösungen von 0,1mg Substanz in 10ml MeOH. Als Shiftreagenzien wurden Natriummethanolat (NaOMe), alternativ dazu Natronlauge (NaOH), Aluminiumchlorid (AlCl_3) und Salzsäure (HCl) verwendet (siehe Tabelle 8, Seite 19).

Nach Zugabe von NaOMe liegen alle Hydroxyl-Gruppen zu einem bestimmten Grad ionisiert vor. Dies dient der Erfassung des Hydroxylierungsmusters des Flavonoids und lässt unsubstituierte Hydroxyl-Gruppen erkennen. AlCl_3 bildet mit Hydroxyl-Gruppen in Nachbarschaft mit Ketogruppen einen stabilen Komplex, der durch die Zugabe von HCl nicht zerstört wird. Zwei Hydroxyl-Gruppen in ortho-Stellung hingegen bilden mit AlCl_3 einen HCl-labilen Komplex. Das AlCl_3 -Spektrum zeigt die Einflüsse aller Komplexe auf das Spektrum, während das AlCl_3/HCl -Spektrum nur die der Hydroxy-Keto-Komplexe darlegt.¹⁹

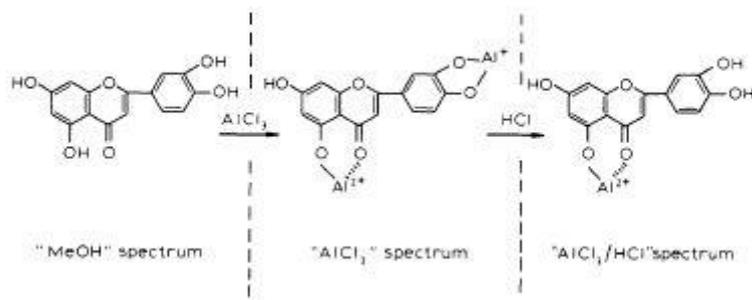


Abbildung 7: Komplexbildung von Flavonoiden mit AlCl_3 und HCl ¹⁹

Es wurden Spektren im Wellenlängenbereich von 200nm bis 800nm aufgenommen. Zuerst wurde ein MeOH-Spektrum der Substanz vermessen und die $\log \epsilon$ -Werte ermittelt. Anschließend wurden die Shiftreagenzien laut Literatur²⁰ zugegeben und die einzelnen Spektren aufgenommen.

Reagens	Herstellung	Verwendung
NaOMe-Lösung	NaOMe-Festschubstanz versetzt mit MeOH bis zur gesättigten Lösung	3 Tropfen
NaOH-Lösung	2M NaOH	3 Tropfen
AlCl_3 -Lösung	5g AlCl_3 in 100ml MeOH	6 Tropfen
HCl-Lösung	50ml konzentrierte HCl in 100ml destilliertem Wasser	3 Tropfen

Tabelle 8: Herstellung und Verwendung von Shift-Reagenzien¹⁹

Der frischen Stammlösung wurden 3 Tropfen NaOMe zugesetzt und ein Spektrum aufgenommen. Ebenso wurde mit NaOH verfahren. Diese beiden Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse. Diese Lösung wurde im Anschluss verworfen. Nach der Aufnahme des Spektrums der Stammlösung mit 6 Tropfen AlCl_3 wurden dieser Lösung noch 3 Tropfen HCl zusetzt und erneut ein Spektrum vermessen.

2.3.6. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine der wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung von unbekanntem Substanzen. Nach der Auftrennung, die z.B. mittels HPLC oder Gaschromatographie (GC) erfolgen kann, werden die Substanzen ionisiert und anschließend im elektrischen Feld beschleunigt. Die Moleküle werden nach ihrem Ladungs-Masse-Verhältnis in der Ionenfalle aufgetrennt und anschließend detektiert.¹⁸

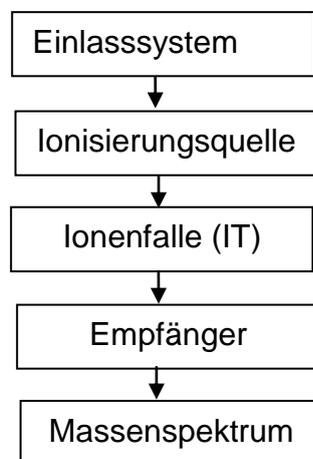


Abbildung 8: Schematische Anordnung bei der IT-MS

Die erhaltenen Daten können mit Datenbanken verglichen werden. Die in der MS verwendeten Ionisationsmaßnahmen sind abhängig von der Probe und den gewünschten Informationen. Die verschiedenen Techniken können das Aussehen der MS beeinflussen. Wenn die MS, wie in dieser Diplomarbeit, an eine HPLC gekoppelt wird, verwendet man für die Ionisation der Moleküle die Elektronenspray Ionisation (ESI). Diese Methode ist sowohl für niedermolekulare als auch für hochmolekulare Verbindungen geeignet. Die Substanz wird durch eine Kapillare als feines Aerosol in die sogenannte Ionisationskammer gesprüht, wo die Tröpfchen aufgrund einer angelegten Spannung von 3-5kV geladen werden. Wenn das Lösungsmittel verdampft, was durch Zufuhr von Stickstoff noch beschleunigt werden kann, verbleiben geladene Quasimolekülonen. Nur selten kommt es bei dieser Methode

zu Fragmentierung. Die Spektren vorliegender Arbeit wurden sowohl im positiven als auch im negativen Modus vermessen, das bedeutet, es wurden sowohl positive als auch negativ geladene Quasimolekülonen gebildet.¹⁸ Die ionisierten Moleküle wurden mit Hilfe einer Ionenfalle (Iontrap) aufgetrennt. In der Ionenfalle werden die Moleküle zunächst gefangen gehalten und mit steigender Spannung in der Ringelektrode eines nach dem anderen, nach steigender Masse freigesetzt und detektiert (MS¹-Spektrum). Hier können die Moleküle auch fragmentiert werden und die Teilchen nach Freisetzung vermessen werden. Dieses Spektrum wird als MS² bezeichnet. Wenn die Molekülteilchen noch weiter fragmentiert werden, spricht man von MSⁿ-Spektren.²¹

Massenspektrometrie	
Gerät	Bruker Daltonics ESI-IT-MS
Ionisation	Elektrospray
Ionen Polarität	Negativ
Trocknungstemperatur	320°C
Trocknungsgasfluss	8l/min (N2)
Vernebler	22psi (N2)
Kapillarenspannung	4,0kV
Messbereich MS	100-1000m/z
Messbereich MS (n)	40-1000m/z
Durchschnittliche Anzahl MS	5 Spektren
Durchschnittliche Anzahl MS (n)	3 Spektren
Kollisionsgas	Helium 5.0
HPLC	
Gerät	Dionex UltiMate 3000 RSLC-Series System
Methode	HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16)

Tabelle 9: Parameter der MS

2.3.7. Kernresonanzspektroskopie

Auch die Kernresonanzspektroskopie (NMR) wird zur Strukturaufklärung von unbekanntem Substanzen eingesetzt. Im Gegensatz zur MS werden die Substanzen bei dieser Methode nicht zerstört. Die Kerne von Atomen mit ungerader Protonen- und/ oder Neutronenzahl besitzen einen Kernspin, der sich entlang eines homogenen Magnetfeldes B_0 anordnet. Die wichtigsten verwendeten Kerne sind ^1H und ^{13}C . Mittels elektromagnetischer Strahlung aus einer Senderspule können die Kerne angeregt und in ein höheres Energieniveau gehoben werden. Das Zurückkehren in den ursprünglichen Zustand nennt man Relaxation, wobei die Kerne Signale aussenden. Eine Empfängerspule misst die emittierte Energie. Diese wird von der Stärke des Magnetfeldes, der Art der Kerne und deren Nachbarschaft beeinflusst. Die gemessene Frequenz wird gegen die Feldstärke des Magnetfeldes aufgetragen und man erhält das NMR-Spektrum.²¹

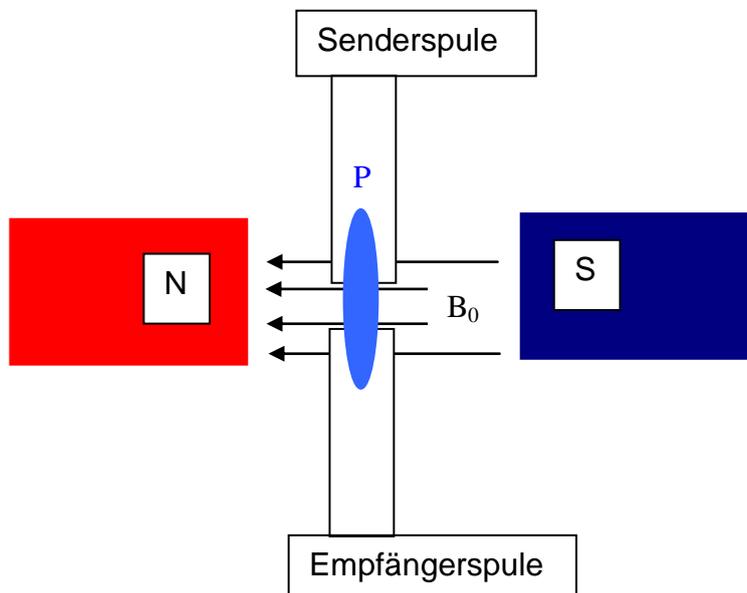


Abbildung 9: Schematische Darstellung der NMR mit einer Probe (P) in einem Magnetfeld (B_0) zwischen den beiden Polen (N,S) eines Magneten

Die chemische Verschiebung, die die Größe der zur Resonanz notwendigen Energie beschreibt, bestimmt die Lage des Signals im

Spektrum und wird in ppm angegeben. Wenn H-Atome mit benachbarten Kernen koppeln, spalten sich die Signale in Teilsignale auf. Aus der Lage der Signale und ihrer Aufspaltung lässt sich auf die Nachbarschaft der Kerne schließen.²¹ Heute wird nicht mehr das Continuous - Waves - Verfahren eingesetzt, sondern mit der Puls Fourier Transformation gearbeitet, bei der alle Kerne gleichzeitig angeregt werden und ein Interferogramm ermittelt wird. Das NMR-Spektrum erhält man dann durch die mathematische Fourier Transformation.¹⁸

Man kann 1-dimensionale (1D) und 2-dimensionale (2D) Spektren vermessen. 1D-Spektren sind das ^1H NMR-Spektrum und das ^{13}C NMR-Spektrum, die die Anzahl der Protonen bzw. der Kohlenstoffatome und ihre chemische Umgebung wiedergeben. Als 2D-Spektrum zeigt das H,H-COSY, welche Protonen miteinander koppeln. Durch das HSQC-Spektrum (Heteronuclear single Quantum Coherence) lassen sich ^1H - ^{13}C -Kopplungen über eine Bindung detektieren. Im HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) erkennt man ^1H - ^{13}C -Kopplungen über zwei oder drei Bindungen.¹⁷

Die im Zuge dieser Arbeit isolierten Substanzen wurden in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO- d_6) gelöst und im Anschluss an 400MHz Geräten vermessen.

2.3.8. Hydrolyse und Umsetzung mit chiralem Butanol

Unter Hydrolyse versteht man in der organischen Chemie das Spalten einer Esterbindung in eine Säure und einen Alkohol.²¹ Zur Bestimmung der Absolutkonfiguration des Zuckers der Substanz BM (Kapitel 3.3.4.3., Seite 69) musste dieser zuerst mittels Hydrolyse vom Aglykon abgespalten werden, um anschließend mit Hilfe der GC analysiert zu werden. Als Hydrolysereagens wurde Kiliani-Reagens (siehe Tabelle 10, Seite 24) verwendet.

Kiliani-Reagens	
3,5 ml	Konzentrierte Essigsäure
1,0 ml	Konzentrierte Salzsäure
5,5 ml	Wasser

Tabelle 10: Kiliani-Reagens

Die Reaktionszeit beträgt zwei Stunden bei 100°C. Die Reaktionslösung wird mit Ethylacetat ausgeschüttelt, wobei das Aglykon in die Ethylacetatphase übergeht und der Zucker in der Wasserphase zu finden ist. Die Wasserphase wird zur Trockene gebracht und der Rückstand der wässrigen Phase wird mit (S)-(+)-2-Butanol und konzentrierter Salzsäure versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 15 Stunden bei 100°C wird die Substanz vollständig zur Trockene gebracht und mit MSTFA für die im Anschluss durchgeführte GC-Analyse derivatisiert.²³

Zucker können in D- oder L-Form vorliegen. Durch Umsetzung mit racemischem Butanol würden vier Derivate (DS, DR, LS, LR siehe Abbildung 10, Seite 25) vorliegen, von denen sich jeweils zwei (DS und LR sowie DR und LS) wie Bild und Spiegelbild verhalten und die gleichen physikalischen Eigenschaften aufweisen. Die Enantiomere können mittels GC nicht voneinander unterschieden werden. Werden die abgespaltenen Zucker allerdings mit chiralem Butanol umgesetzt, entstehen zwei Diastereomere (DS und LS) mit unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften, die man auf diesem Weg voneinander trennen kann.

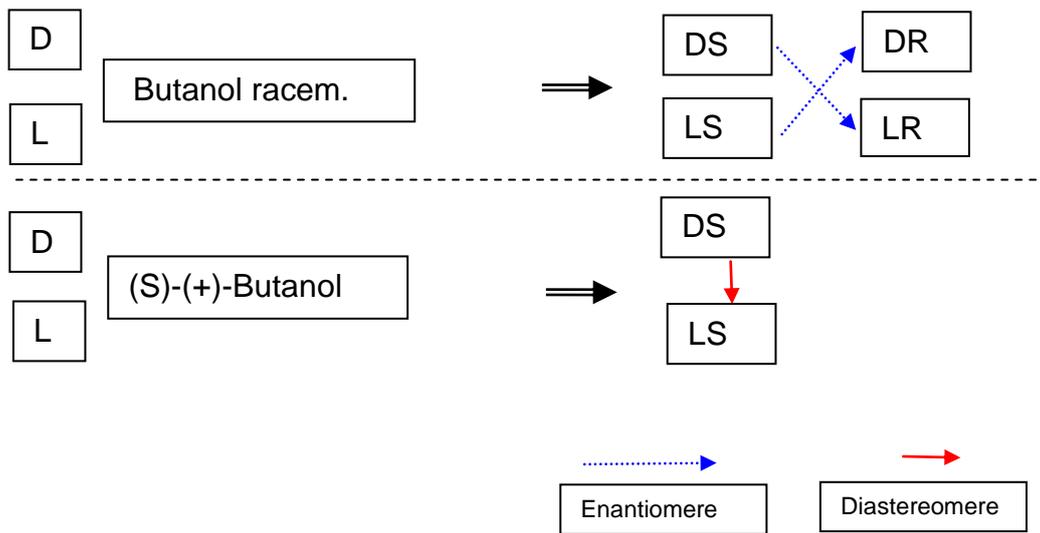


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Umsetzung mit chiralem Butanol

3. Experimenteller Teil und Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln wird die Isolierung der sulfatierten Flavonoide BK1, BK2 und BK3, sowie des glucuronidierten Flavonoids BM beschrieben. Den Isolierungen vorangegangen sind Analysen der Ausgangsfraktionen S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) und IIIc (siehe Tabelle 3, Seite 9).

3.1. Isolierung von BK1 aus Fraktion S5

Das folgende Kapitel behandelt die Analytik der Fraktion S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) sowie die darauffolgende Isolierung der Substanz BK1.

3.1.1. Analytik

In einer vorangegangenen Diplomarbeit¹³ wurde nach Auftrennung der Fraktionen S2-S11 (siehe Tabelle 2, Seite 8) mittels DC in der Fraktion S5 bei einem Rf von ca. 0,8 eine blau-grün fluoreszierende Bande identifiziert (siehe Abbildung 11, Seite 27). Es wurde vermutet, dass es sich bei dieser Substanz um eine sulfatierte Verbindung handelte. Um diese Annahme zu überprüfen, sollte die Substanz isoliert werden, um weitere Untersuchungen durchzuführen

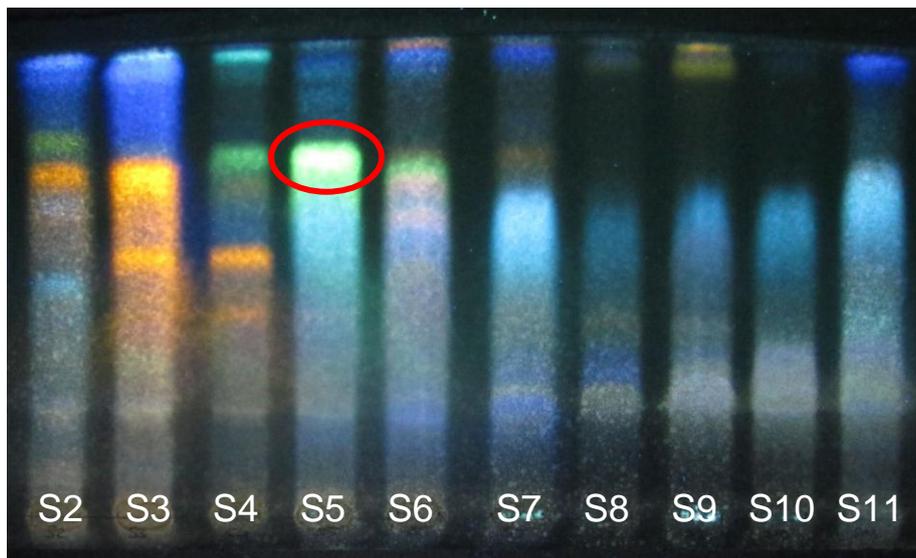


Abbildung 11: Auftrennung der Fraktionen S2-S11 des OWE 48/04 (siehe Tabelle 2, Seite 5) mittels DC-System 1 (siehe Tabelle 4, Seite 12)¹³

Für die Isolierung sollte die präparative DC zum Einsatz kommen. Um festzustellen, ob diese Methode ausreichend gute Resultate liefern würde, wurde ein erster Versuchansatz im analytischen Maßstab erprobt.

Es wurden zunächst 250µl einer 5%igen methanolischen Lösung der Fraktion S5 in einer 8cm langen Bande mit Hilfe einer spitzen Hamiltonspritze auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde die Bande bei einem Rf von ca. 0,8 unter UV-Licht bei 254nm markiert (siehe Abbildung 12, Seite 28) und im Anschluss vorsichtig mit einem spitzen Spatel von der Glasplatte gekratzt.

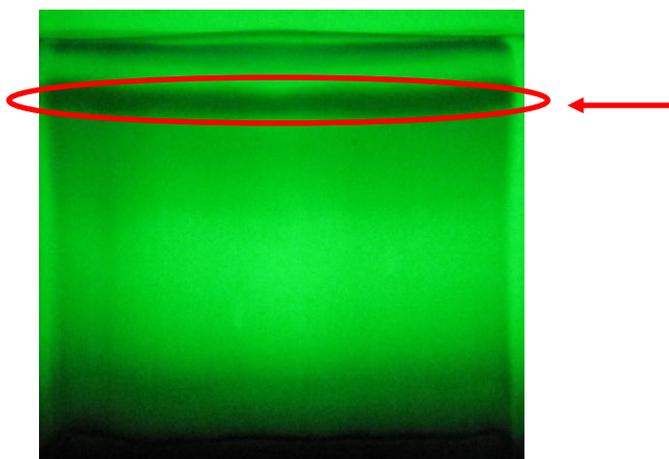


Abbildung 12: Auftrennung der Fraktion S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) mittels DC System 2 (siehe Tabelle 4, Seite 12)

Das gewonnene Material wurde in einen kleinen Kolben übergeführt. Um die Substanz von der stationären Phase zu trennen, wurde mit drei verschiedenen Lösungsmitteln nacheinander eluiert. Diese sind in Tabelle 11 (siehe Seite 28) zusammengefasst.

Eluate	Volumen	Lösungsmittel
E1	5ml	Ethylacetat
E2	5ml	Methanol
E3	5ml	Methanol mit 1 Tropfen Ameisensäure

Tabelle 11: Lösungsmittel für die Elution der mittels präparativer DC gewonnenen Substanz (siehe Abbildung 12, Seite 28) vom Kieselgel

Die Mischung von Kieselgel und dem entsprechenden Lösungsmittel wurde 30 Minuten unter ständigem Rühren stehen gelassen. Nachdem sich die unlöslichen Teilchen abgesetzt hatten, wurde der Überstand abpipettiert und zweimal zentrifugiert. Die drei auf diese Weise erhaltenen Eluate wurden für die Weiterbehandlung zur Trockene gebracht. Die Rückstände wurden in Methanol aufgenommen und auf einer DC-Platte aufgetragen. Als Vergleich diente die Ausgangsfraktion S5 (siehe Abbildung 12, Seite 28).

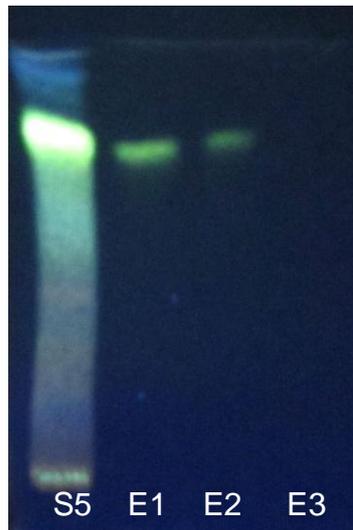


Abbildung 13: Analyse von E1-E3 (siehe Tabelle 11, Seite 28) sowie von S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) mittels DC-System 1 (siehe Tabelle 4, Seite 12)

Wie aus der DC ersichtlich ist, enthalten die Eluate E1 und E2 die gesuchte Substanz, während sie in E3 kaum vorhanden ist. Das Eluat E2 (siehe Tabelle 11, Seite 28) wurde mittels HPLC analysiert (siehe Abbildung 14, Seite 30). Es ist die Anreicherung der Substanz, die als BK1 bezeichnet wurde, deutlich zu erkennen. Ihre Retentionszeit beträgt 34,60 Minuten.

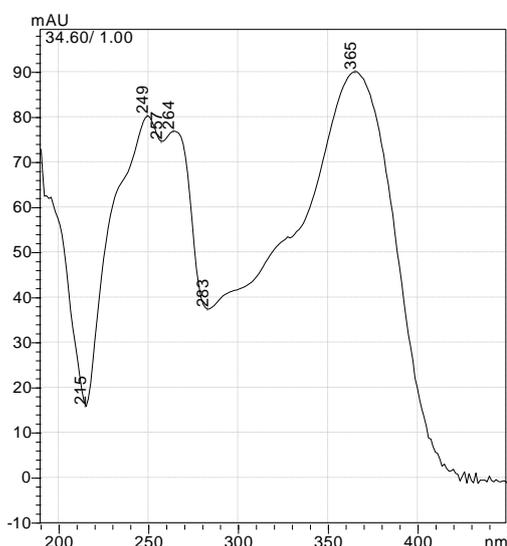
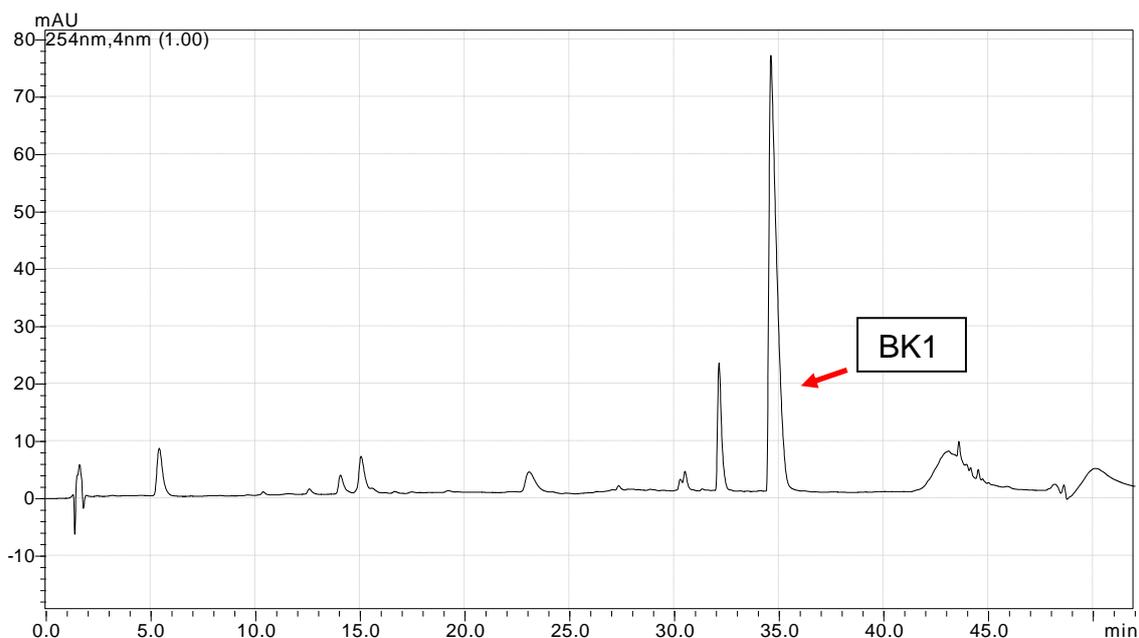


Abbildung 14: Analyse von E2 (siehe Tabelle 11, Seite 28) mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16) detektiert bei 254nm und UV-Spektrum von BK1

Parallel zur Auftrennung von E2 mittels HPLC erfolgte die Aufnahme eines Massenspektrums. Durch den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit der Datenbank konnte das Aglykon der Substanz als Rhamnetin bestimmt werden. Das Spektrum zeigte eine Massenabspaltung von 80, welche auf eine Sulfatgruppe schließen lässt. Ihre Position konnte allerdings mit dieser Methode nicht bestimmt werden. In Kapitel 3.3 (siehe Seite 45) wird die Strukturaufklärung der Substanz beschrieben.

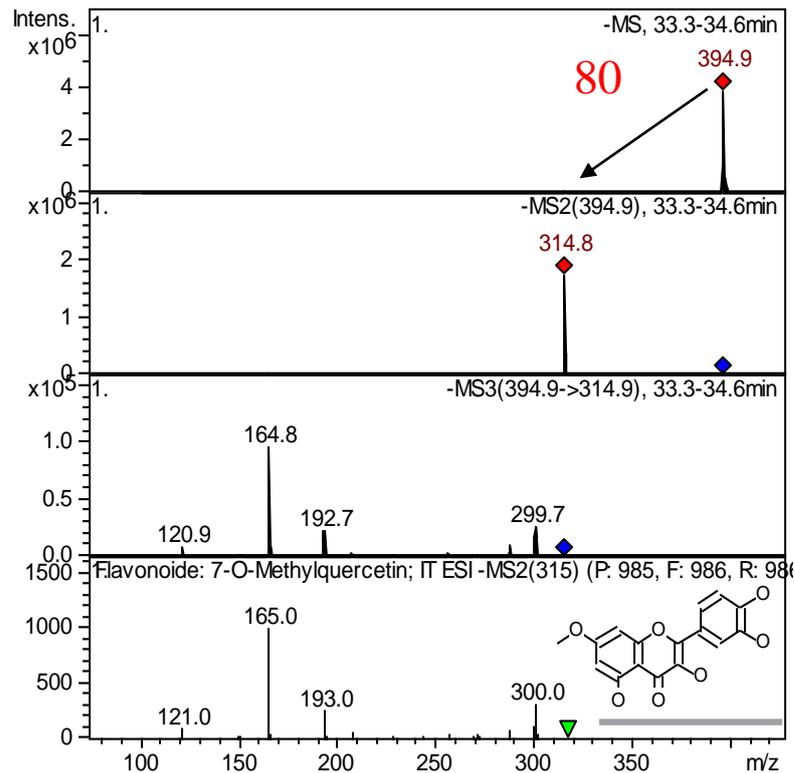


Abbildung 15: MS¹-MS³-Spektren der Substanz BK1 nach Analyse mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16), und Datenbankvergleich mit Rhamnetin, MS-Parameter: Tabelle 9 (siehe Seite 21)

Alternativ zu diesem Versuch wurde eine SPE an RP18-Material (siehe Kapitel 2.3.2, Seite 12) durchgeführt. 15mg der Fraktion S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) wurden in 200µl Wasser gelöst und auf die Kartusche aufgetragen. Mit einem Gradienten aus Methanol-Wasser wurden insgesamt 7 Fraktionen (siehe Tabelle 5, Seite 14) eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden zur Trockene gebracht. Eine DC-Analyse zeigte das Vorliegen von BK1 in den Fraktionen II und III (siehe Abbildung 16, Seite 32).

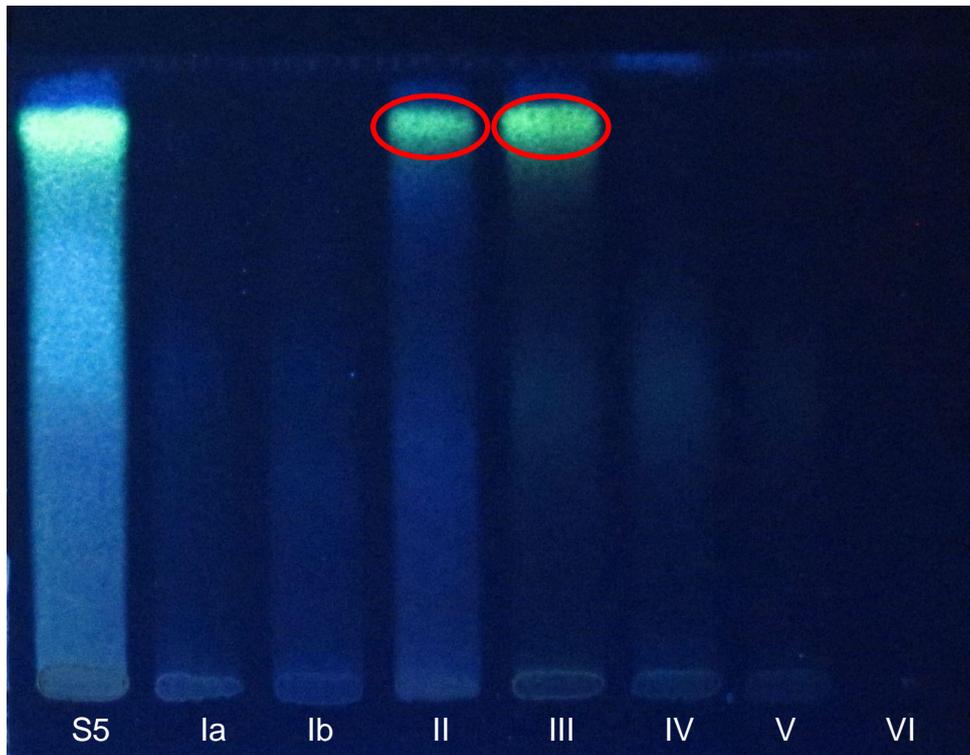


Abbildung 16: Vergleich der mittels SPE gewonnenen Fraktionen I – IV (siehe Tabelle 5, Seite 14) und der Fraktion S5 (siehe Tabelle 2, Seite 5) mittels DC-System 1 (siehe Tabelle 4, Seite 12)

Dieses Ergebnis wurde durch eine HPLC-Analyse bestätigt. In Abbildung 17 sind die Chromatogramme der Fraktionen I-VI bei 254nm aufgezeigt. Die gesuchte Substanz verlässt die Säule bei einer Retentionszeit von 35 Minuten und ist selektiv in den Fraktionen II und III angereichert. Das UV-Spektrum dieser Verbindung entspricht dem, der mittels präparativer DC gesammelten Substanz (siehe Abbildung 14, Seite 30).

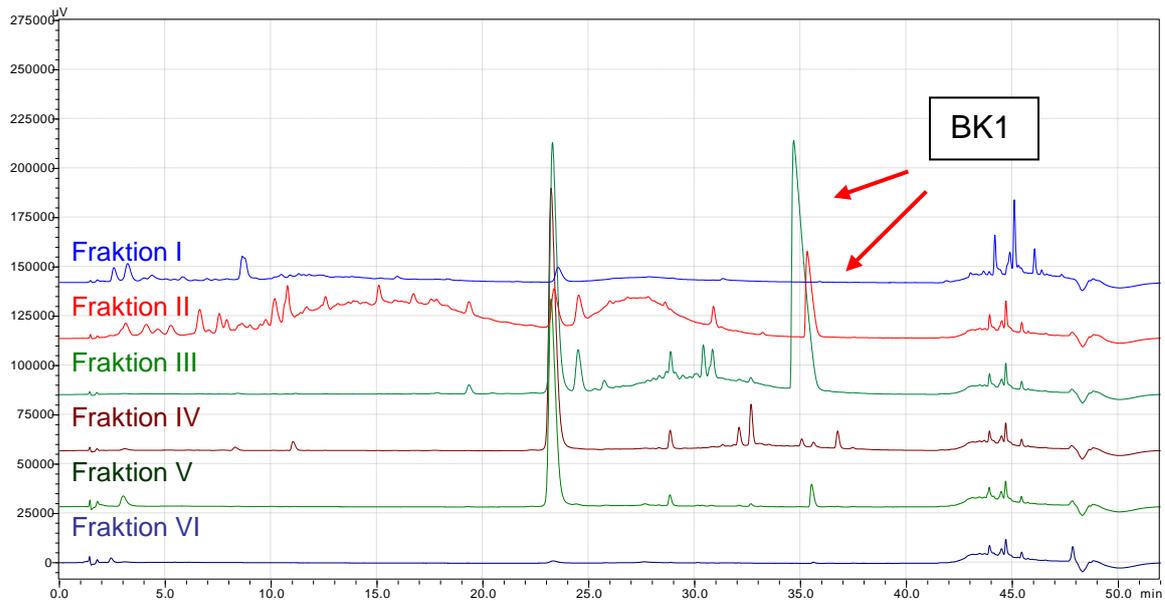


Abbildung 17: Analysen der SPE-Fractionen I–VI (siehe Tabelle 5, Seite 14) mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16), Detektion: 254nm

Auffällig ist die Asymmetrie der Peaks im Chromatogramm. Dies ist darin begründet, dass BK1 als ionische Verbindung vorliegt. Eine Möglichkeit, das starke Tailing zu vermindern, wäre die Zugabe von Salzen zur Ionenpaarbildung gewesen. Davon wurde allerdings Abstand genommen, um weitere Analysen mittels MS durchführen zu können. Des Weiteren wären mit dieser Methode zusätzliche Entsalzungsschritte nach der Isolierung notwendig gewesen.

In diesen Untersuchungen zeigte sich auch eine Verkürzung der Retentionszeiten mit zunehmender Konzentration der Substanz.

3.1.2. Isolierung mittels SPE und präparativer DC

Bisher wurden zwei Wege aufgezeigt, um BK1 anzureichern. Es wurde sowohl mit präparativer DC gearbeitet, als auch mit SPE der Ausgangsfraction S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8). In folgender Abbildung sind nochmals die nach SPE erhaltenen Fractionen II und III (siehe Tabelle 5, Seite 14) dem BK1-hältigen Eluat nach präparativer DC (siehe Abbildung 12, Seite 28) gegenübergestellt.

Während nach präparativer DC nur ein Peak mit einer Retentionszeit von ca. 32,5 Minuten auftritt, erkennt man nach Fraktionierung mittels SPE in beiden Fraktionen deutlich mehr Verunreinigungen durch Peaks mit zwischen 24-33 Minuten.

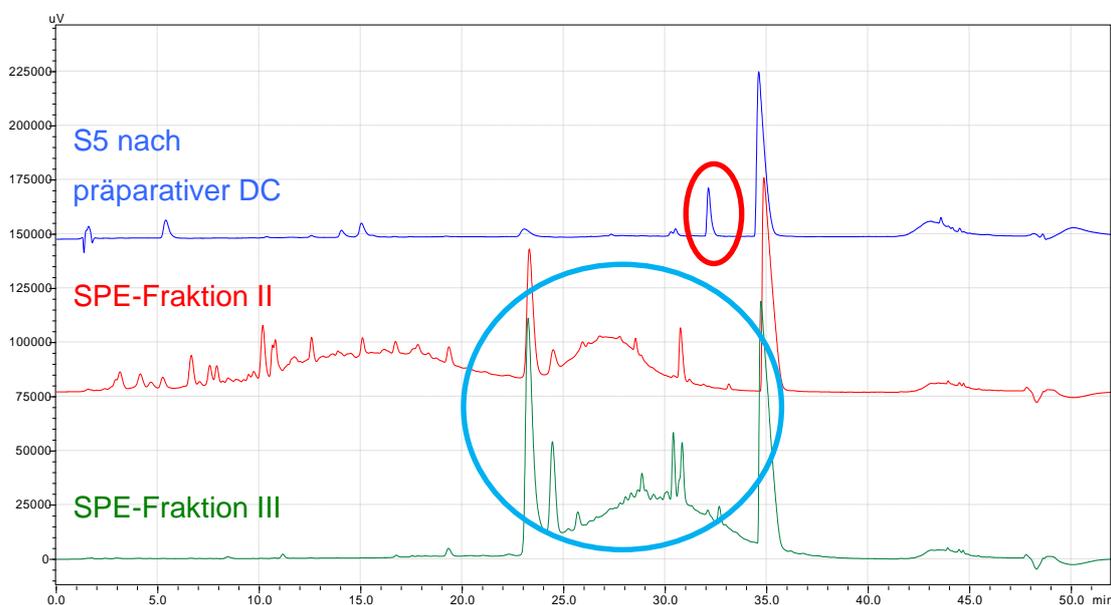


Abbildung 18: Vergleich der Chromatogramme der durch präparativer DC gewonnen Substanz (siehe Abbildung 12, Seite 28) mit den nach SPE erhaltenen Fraktionen II und III (siehe Tabelle 5, Seite 14) mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16) Detektion: 254 nm

Für die endgültige Isolierung der Substanz BK1 wurden die beiden Methoden kombiniert. Es wurden je 15mg der Fraktion S5 auf drei SPE-Kartuschen aufgetragen und mit bereits beschriebenen Gradienten (siehe Tabelle 5, Seite 14) eluiert. Die Fraktionen II der drei Kartuschen wurden vereinigt und zur Trockene gebracht, ebenso die Fraktionen III. Ihre Auswagen betragen 13,63mg (Fraktion II) und 8,75mg (Fraktion III). Die beiden Fraktionen wurden bei der anschließenden dünnschichtchromatographischen Trennung auf verschiedenen Platten behandelt. Jede Fraktion wurde in Methanol gelöst und die Kolben sorgfältig ausgespült. Auf insgesamt acht HPTLC-Platten wurden die Lösungen aufgetragen und die Platten entwickelt. Nach der Entwicklung der Chromatogramme, wurden die entsprechenden Banden bei einem Rf-Wert von ca. 0,8 nach Markierung unter UV 254nm vom Glas gekratzt. Die Substanz wurde sorgfältig vom Kieselgel eluiert, um eine

möglichst vollständige Ausbeute zu erzielen. Dafür wurden drei mal 20ml und zwei mal 10ml reines Methanol verwendet, bis das verbleibende Kieselgel wieder seine ursprüngliche Farbe zeigte, und der Überstand nach dem Zentrifugieren farblos war. Die abpipettierten Überstände wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Es wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt.

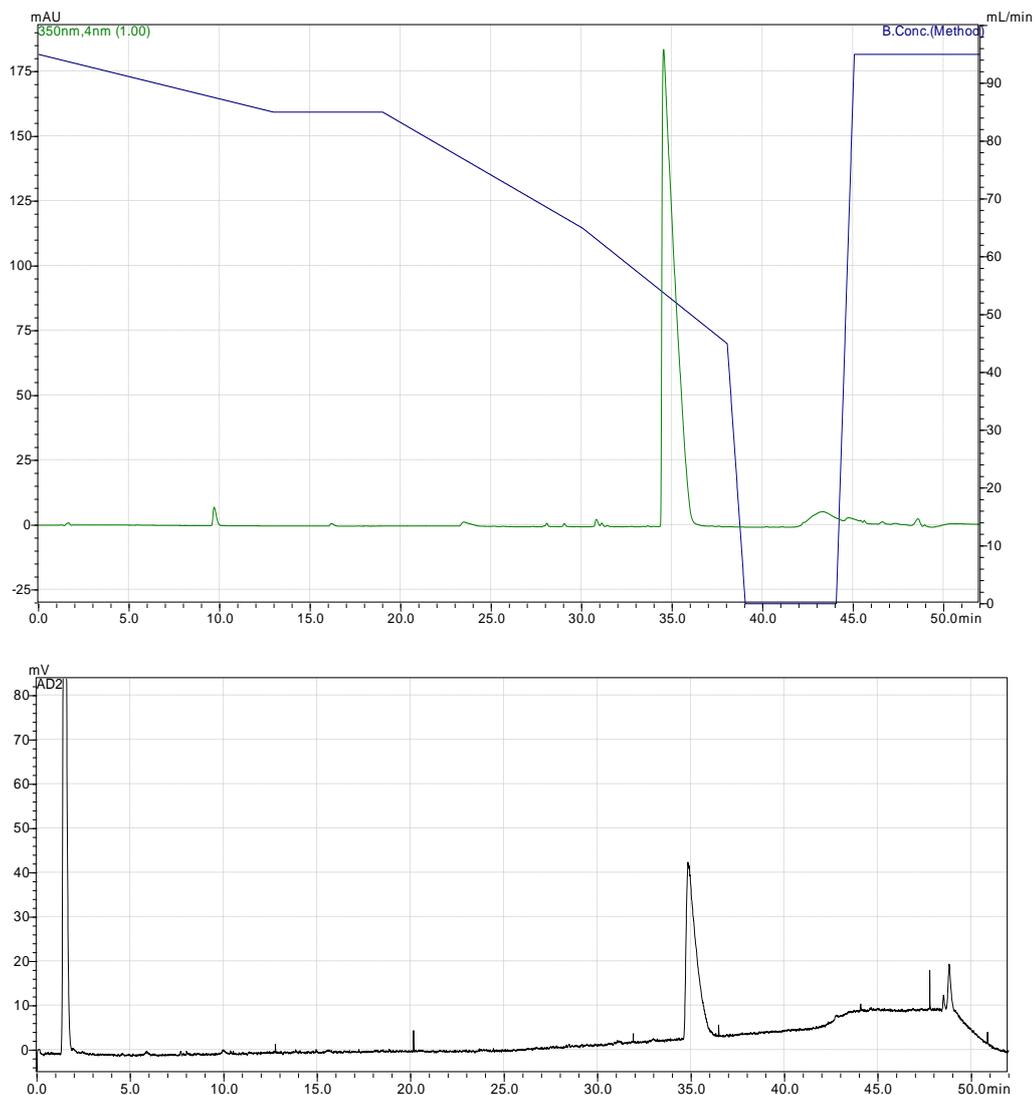


Abbildung 19: Analyse von BK1 mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16) Detektion: 350nm und ELSD

Um noch vorhandene Kieselgelreste endgültig abzutrennen wurde über Sephadex gereinigt. Es wurde eine Pasteurpipette 5cm hoch mit Sephadex LH-20, gequollen in MeOH, befüllt und mit Methanol gewaschen. Eine Spatelspitze gereinigter Seesand verhinderte das

Aufwirbeln des Sephadex-Gels bei Lösungsmittelzugabe. Auf diese Säule wurde die gewonnene Substanz aufgetragen.



Abbildung 20: Säulenchromatographische Aufreinigung von BK1 an Sephadex LH-20 im Miniaturmaßstab

Mit Methanol wurde die Substanz von der Säule eluiert. Man konnte das Wandern der Substanz durch die Säule auf Grund ihrer intensiven gelben Farbe sehr gut beobachten und sie nach dem Verlassen des Sephadex-Säulchens in einer einzigen Fraktion sammeln. Auf diesem Weg konnten 3,14mg gewonnen werden. BK1 wurde in weiterer Folge mit NMR und UV/VIS-Spektroskopie analysiert (siehe Kapitel 3.3.1, Seite 45).

3.2. Isolierung von BK3, BM und BK2

Dieses Kapitel behandelt die Analytik der Fraktion IIIc, sowie die darauf folgende Isolierung von BK2, BK3 und BM.

3.2.1. Analytik

Zunächst wurden fünf Fraktionen des BE mit Hilfe der DC und LCMS analysiert. Die Wahl fiel auf die BE-Fraktionen Ib, IIa, IIIb, IIIc und IVa, (siehe Tabelle 3, Seite 8), da diese in genügender Menge für eine Isolierung vorlagen.

Für die DC-Analyse wurden je 5µl der 5%igen Lösungen der ausgewählten Fraktionen aufgetragen.

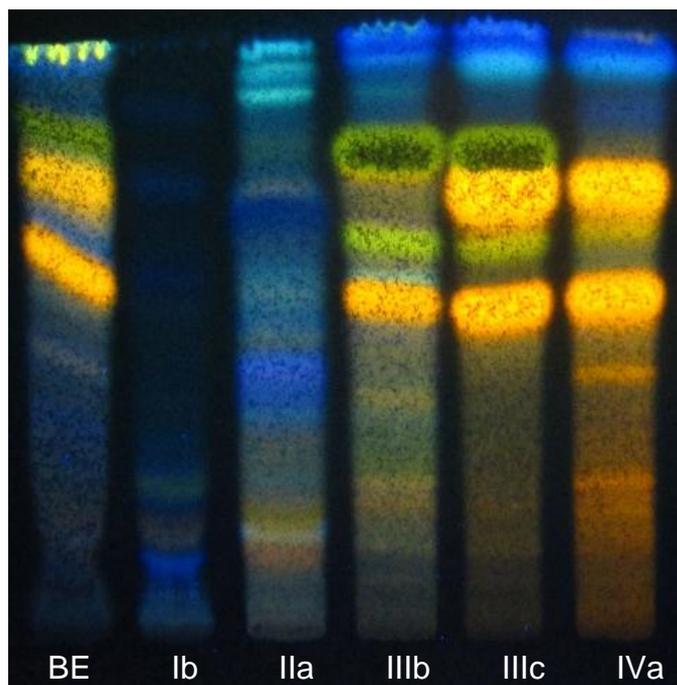


Abbildung 21: Vergleich der Fraktionen Ib, IIa, IIIb, IIIc, und IVa des BE (siehe Tabelle 3, Seite 9) mit dem BE (siehe Kapitel 2.2.1, Seite 8) mittels DC-System 1 (siehe Tabelle 4, Seite 5)

Da die einzelnen Banden in der DC sehr nahe beieinander lagen, konnten die einzelne Substanzen nicht wie in Kapitel 3.1.1 (siehe Seite 26) beschrieben, durch präparative DC und anschließender Elution gewonnen werden. Sie sollten mittels semipräparativer HPLC isoliert werden (siehe Kapitel 3.2.2, Seite 41).

Für die LCMS wurden 2,5%ige Lösungen der einzelnen Fraktionen verwendet. Mit Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16) wurden die Substanzen in der HPLC aufgetrennt und im Anschluss mittels MS (siehe Tabelle 9, Seite 21) identifiziert. Deutlich erkennt man in der MS-Analyse die Masse und die typischen Abspaltungsmuster der

Verbindungen. Eine Abspaltung von 80 Masseneinheiten ließ auf eine Sulfatgruppe schließen. Eine Massendifferenz von 176 bedeutete, dass die Verbindung als Glucuronid vorlag.

In Fraktion II und III konnten sulfatierte und glucuronidierte Flavonoide identifiziert werden. Das Spektrum der Fraktion IIIb zeigt einen prominenten Peak mit einer Retentionszeit von 25,6-26,4 Minuten. Durch den Datenbankvergleich der MS-Ergebnisse konnte die Verbindung als sulfatiertes Isorhamnetin identifiziert werden. Diese Substanz ist neben zwei weiteren bedeutenden Peaks auch in Fraktion IIIc enthalten. In dieser Fraktion wurden weiters ein sulfatiertes und ein glucuronidiertes Quercetin detektiert. Für die Isolierung der sulfatierten Verbindungen war die Fraktion IIIc am besten geeignet, da in ihr insgesamt drei Substanzen zur Isolierung und Charakterisierung vorlagen und sie in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

Abbildung 22 (siehe Seite 38) zeigt das LC-Chromatogramm der Fraktion IIIc mit den drei prominenten Peaks der Substanzen BK3, BM und BK2. Erneut erkennt man das starke Tailing der sulfatierten Verbindungen BK3 und BK2. Aufgrund weiterführender Analysen mittels MS und der darauf folgenden Isolierung wurde auch in diesem Fall auf den Einsatz von Salzen zur Ionenpaarbildung verzichtet.

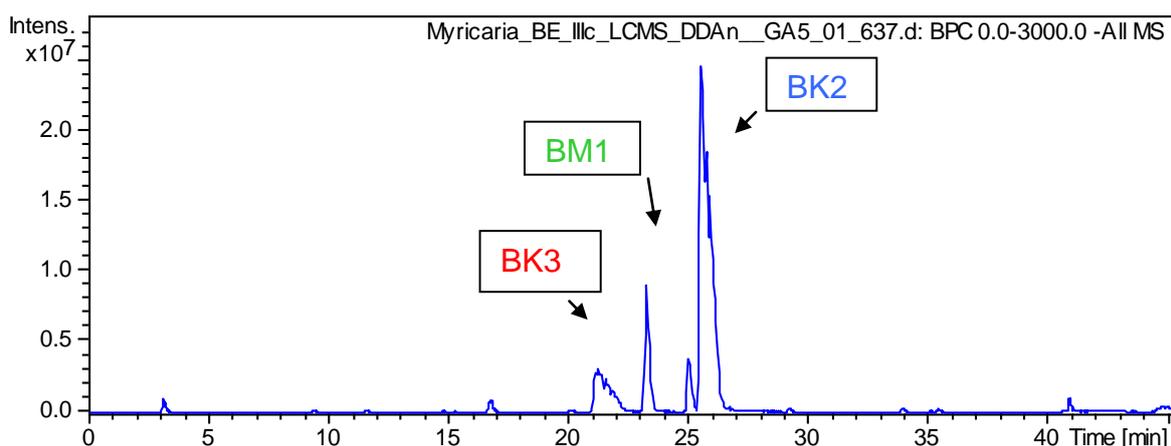


Abbildung 22: LC-MS-Analyse der Fraktion IIIc (siehe Tabelle 3, Seite 9) mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16)

Im Folgenden werden die Massenspektren der Substanzen BK3 (siehe Abbildung 23, Seite 39), BM (siehe

Abbildung 24, Seite 39) und BK2 (siehe Abbildung 25, Seite 40) aufgezeigt.

Die Substanz BK3 wies ein Molekulargewicht von 381,8Da auf. Das MS²-Spektrum zeigte eine Abspaltung von 80 Masseneinheiten, was bedeutete, dass die Verbindung sulfatiert vorlag. Der Vergleich mit der Datenbank lies eine Identifizierung des Aglykon als Quercetin zu.

Substanz BM konnte aufgrund des Molekulargewichts von 478Da und der Abspaltung von 176 Masseneinheiten mittels Datenbankvegleich als glucuronidiertes Quercetin bestimmt werden.

In gleicher Weise gelang es auch, das Aglykon von BK2 als Isorhamnetin zu identifizieren. Die typische Massendifferenz von 80 im MS² ließ auf eine Sulfatierung schließen. Das Molekulargewicht der Verbindung beträgt 396Da.

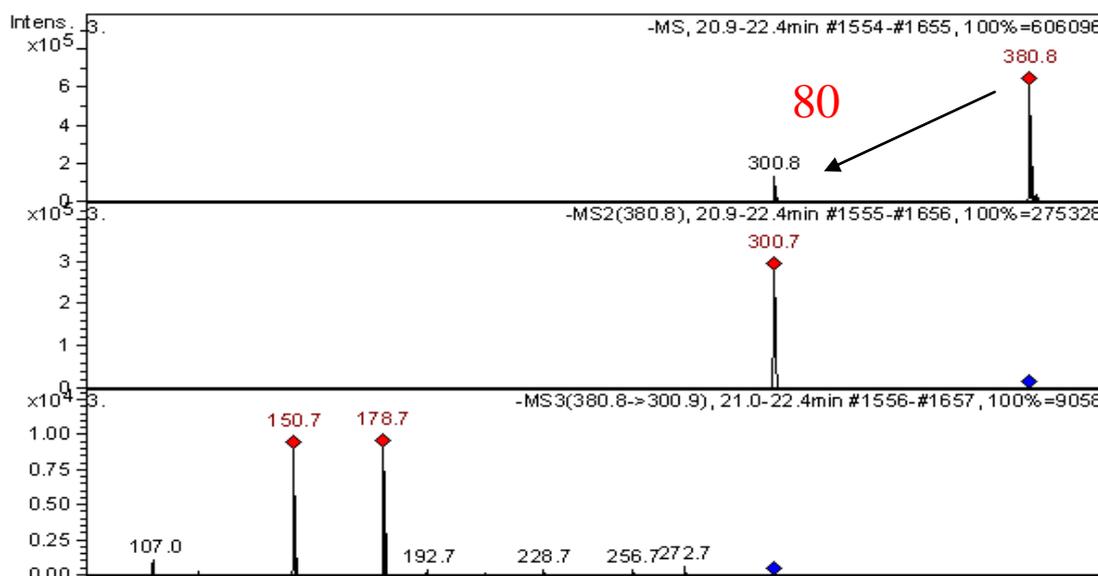


Abbildung 23: MS¹-MS³-Spektrum der Substanz BK3 nach LC-MS-Analyse mittels HPLC Methode 1 (siehe Abbildung 22, Seite 38), MS-Parameter: Tabelle 9 (siehe Seite 21)

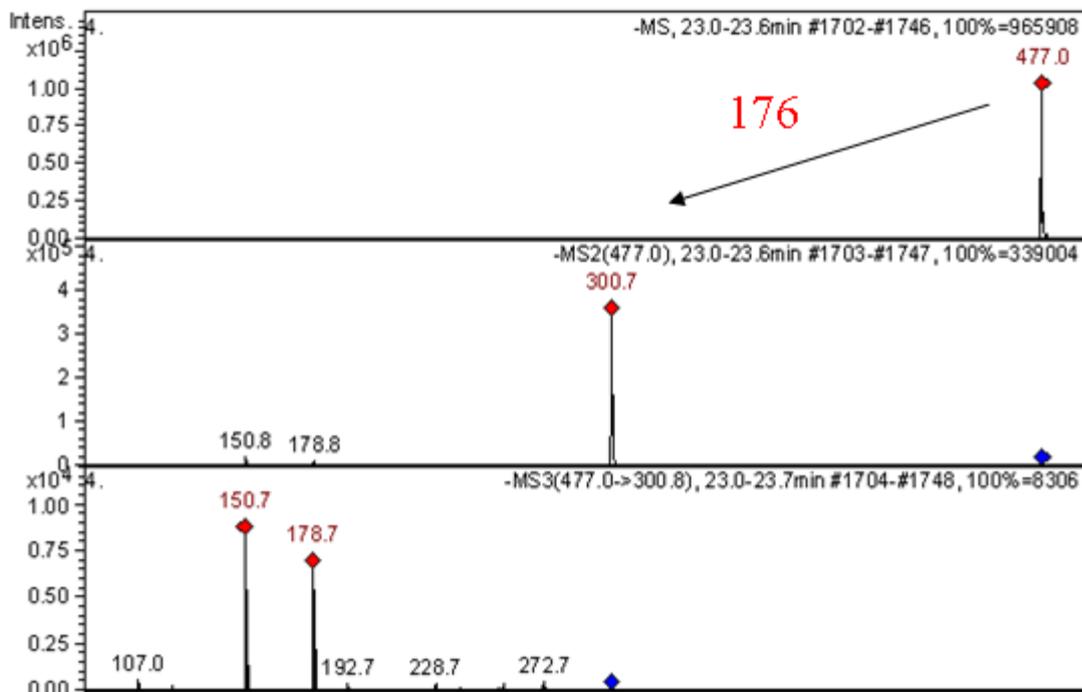


Abbildung 24: MS¹-MS³-Spektrum der Substanz BM nach LC-MS-Analyse mittels HPLC Methode 1 (siehe Abbildung 22, Seite 38), MS-Parameter: Tabelle 9 (siehe Seite 21)

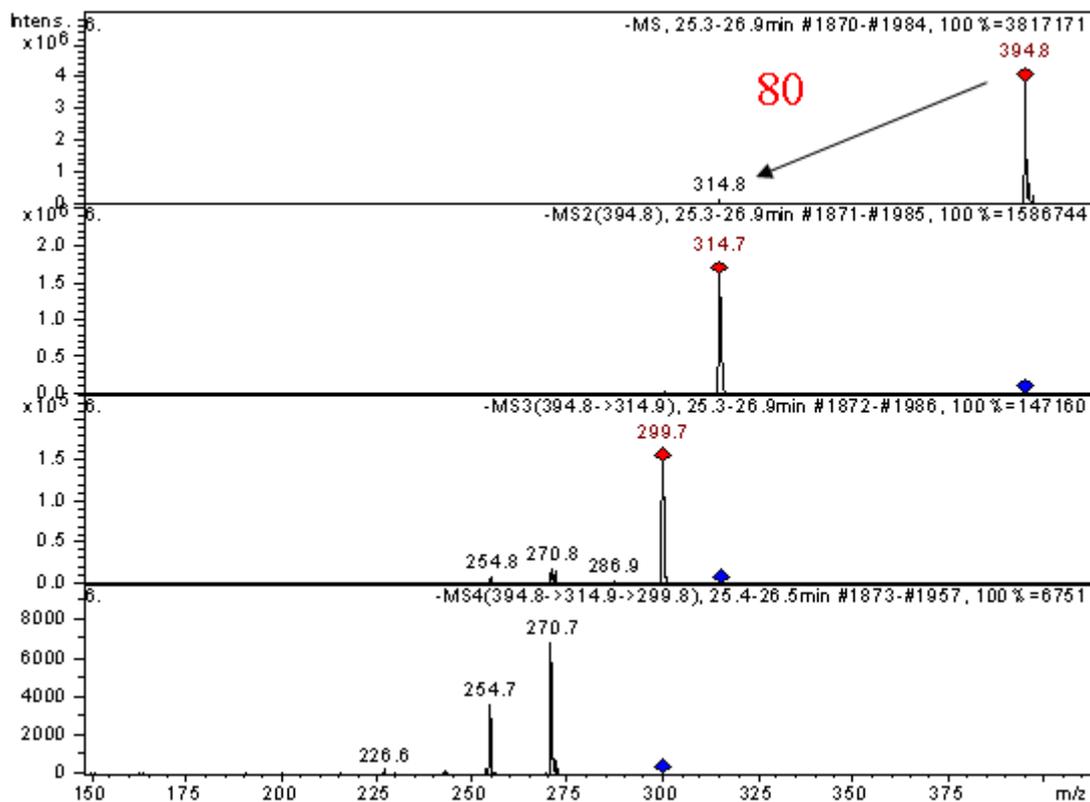


Abbildung 25: MS¹-MS³-Spektrum der Substanz BK2 nach LC-MS-Analyse mittels HPLC Methode 1 (siehe Abbildung 22, Seite 38), MS-Parameter: Tabelle 9 (siehe Seite 21)

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der LCMS-Analyse der Fraktion IIIc zusammen gefasst. Ihr können Peakbezeichnung, Retentionszeit und Ergebnis des Datenbankvergleiches entnommen werden.

Bezeichnung	Retentionszeit [Minuten]	Molekulargewicht [Da]	Ergebnis des Datenbankvergleichs
BK3	20,9-22,4	382	Quercetin-sulfat
BM	23,0-23,6	478	Quercetin-glucuronid
BK2	25,3-26,9	396	Isorhamnetin-sulfat

Tabelle 12: Bezeichnung, Retentionszeit, Molekulargewicht und Ergebnisse des Datenbankvergleichs der Peaks nach LC-MS-Analyse (siehe Abbildung 22, Seite 38) der Fraktion IIIc (siehe Tabelle 3, Seite 9)

3.2.2. Isolierung mittels semipräparativer HPLC

Die Substanzen BK2, BK3 und BM wurden aus der Fraktion IIIc des Blätterextraktes (siehe Tabelle 3, Seite 9) mittels präparativer HPLC gewonnen.

Die Fraktion wurde über HPLC aufgetrennt, und die einzelnen Substanzen konnten nach dem Verlassen der Säule gesammelt werden. Dafür war es notwendig, die HPLC-Methode zu optimieren, um die Substanzen in ausreichendem Maße getrennt voneinander von der Säule zu eluieren.

Mit Methode 1, die für die Analysen verwendet wurde, konnten noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden (siehe Abbildung 22, Seite 38). Deshalb wurde die Methode verändert, um eine passende zu ermitteln. Einige der Optimierungsschritte werden im folgenden Absatz beschrieben. Die Parameter der Methoden sind in Tabelle 13 (siehe Seite 43) ersichtlich.

Der erste Schritt der Optimierung bestand darin, die Säule zu wechseln. Statt einer Acclaim®-Säule, mit der die bisherigen Untersuchungen durchgeführt wurden, wurde eine Aquasil®-Säule eingesetzt. Es handelt sich hierbei ebenfalls um eine RP-18-Säule, sie enthält aber zusätzliche hydrophile Gruppen, die auch Wechselwirkungen mit

stärker polaren Gruppen eingehen. Der Gradient entsprach dem der zuvor durchgeführten Analysen (siehe Methode 1, Tabelle 6, Seite 16). Das Chromatogramm zeigte, dass die Peaks sehr eng beisammen lagen und die Methode deshalb für eine präparative Isolierung nicht verwendet werden konnte. Deshalb wurde im folgenden Optimierungsschritt die Startkonzentration des Acetonitrils statt 5% auf 15% festgesetzt. Auch der Gradient wurde geändert. In 20 Minuten wurde die Acetonitrilkonzentration von 15% auf 35% gesteigert (Methode 2, siehe Tabelle 13, Seite 43). Diese Maßnahme verringerte die Retentionszeiten, ergab aber keine optimale Trennung der einzelnen Peaks. In Methode 3 wurde die Acetonitrilkonzentration in 27 Minuten von 15% auf 35% angehoben. Diese Veränderung führte zum bis dahin schlechtesten Ergebnis, da die beiden Peaks mit den höchsten Retentionszeiten erneut coeluierten. Die Trennung wurde deutlich durch die Änderung der Temperatur beeinflusst. Während bei Methode 2 durch eine Erniedrigung der Temperatur auf 15°C keine bedeutende Verbesserung zu erzielen war, brachte eine Erhöhung auf 35°C ein gutes Ergebnis, das für die weiteren Arbeiten geeignet war.

Diese Methode, die bis dahin auf einer Säule von 15cm Länge, einem Durchmesser von 2,1cm und einem Säulenmaterial mit einer Partikelgröße von 3µm zur Anwendung kam, wurde nun an eine größere Aquasilsäule mit einer Länge von 25cm, einem Durchmesser von 4,6mm und einer Partikelgröße von 3µm angepasst. Das Chromatogramm der Methode 4 (siehe Tabelle 14, Seite 44) zeigte, dass die Substanzen die Säule mit geringer Retentionszeit verließen, was für das Sammeln von Vorteil war (siehe Abbildung 26, Seite 44). Außerdem war die Trennung sehr gut, die Substanzen konnten einzeln gesammelt werden.

Methode 2		
Säule	Aquasil [®]	
Säulenparameter	2,1cm Durchmesser 15cm Länge 3µm Partikelgröße	
Gradient	Zeitpunkt in Min	Konzentration Acetonitril [%]
	00.00 → 20.00	15 → 35
	20.00 → 28.00	35 → 55
	28.00 → 29.00	55 → 100
	29.00 → 34.00	isokratisch 100
Temperatur	25°C	
Injektionsvolumen	2µl	
Fluss	0,4ml/min	
Methode 3		
Säule	Aquasil [®]	
Säulenparameter	2,1cm Durchmesser 15cm Länge 3µm Partikelgröße	
Gradient	Zeitpunkt in Min	Konzentration Acetonitril [%]
	00.00 → 20.00	15 → 35
	20.00 → 28.00	35 → 55
	28.00 → 29.00	55 → 100
	29.00 → 34.00	isokratisch 100
Temperatur	25°C	
Injektionsvolumen	2µl	
Fluss	0,4ml/min	
Methode 2_15°C bzw. Methode 2_15		
Säule	Aquasil [®]	
Säulenparameter	2,1cm Durchmesser 15cm Länge 3µm Partikelgröße	
Gradient	Zeitpunkt in Min	Konzentration Acetonitril [%]
	00.00 → 20.00	15 → 35
	20.00 → 28.00	35 → 55
	28.00 → 29.00	55 → 100
	29.00 → 34.00	isokratisch 100
Temperatur	15°C bzw. 35°C	
Injektionsvolumen	2µl	
Fluss	0,4ml/min	

Tabelle 13: Methoden der HPLC-Optimierung für die semipräparative Trennung der Substanzen BK2, BK3 und BM

Methode 4											
Gerät	Shimadzu DGU-20As Prominence Degaser Shimadzu LC-20AD Prominence Liquid Chromatograph Shimadzu SIL-20AC HT Prominence Auto Sampler Shimadzu CTO-20AC Prominence Column Oven Shimadzu SPD-M20A Prominence Diod Array Detektor Shimadzu CMB-20A Prominence Communications Bus Module										
Säulenparameter	Aquasil® RP-18e mit zusätzlichen hydrophilen Gruppen Durchmesser: 4,6mm Länge: 25cm Partikelgröße: 5µm										
Methode	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Min.</th> <th style="width: 50%;">Konzentration in Acetonitril [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>00.00 → 55.00</td> <td>15 → 35</td> </tr> <tr> <td>55.00 → 77.00</td> <td>35 → 55</td> </tr> <tr> <td>77.00 → 78.00</td> <td>55 → 95</td> </tr> <tr> <td>78.00 → 88.00</td> <td>Isokratisch 95</td> </tr> </tbody> </table>	Min.	Konzentration in Acetonitril [%]	00.00 → 55.00	15 → 35	55.00 → 77.00	35 → 55	77.00 → 78.00	55 → 95	78.00 → 88.00	Isokratisch 95
Min.	Konzentration in Acetonitril [%]										
00.00 → 55.00	15 → 35										
55.00 → 77.00	35 → 55										
77.00 → 78.00	55 → 95										
78.00 → 88.00	Isokratisch 95										
Säulentemperatur	35°C										
Flussrate	1ml/min										
Einspritzvolumen	5µl										
Detektion	Diode Array Detektor, Lichtstreuendetektor (ELSD) Massenspektrometrie										

Tabelle 14: HPLC-Methode 4

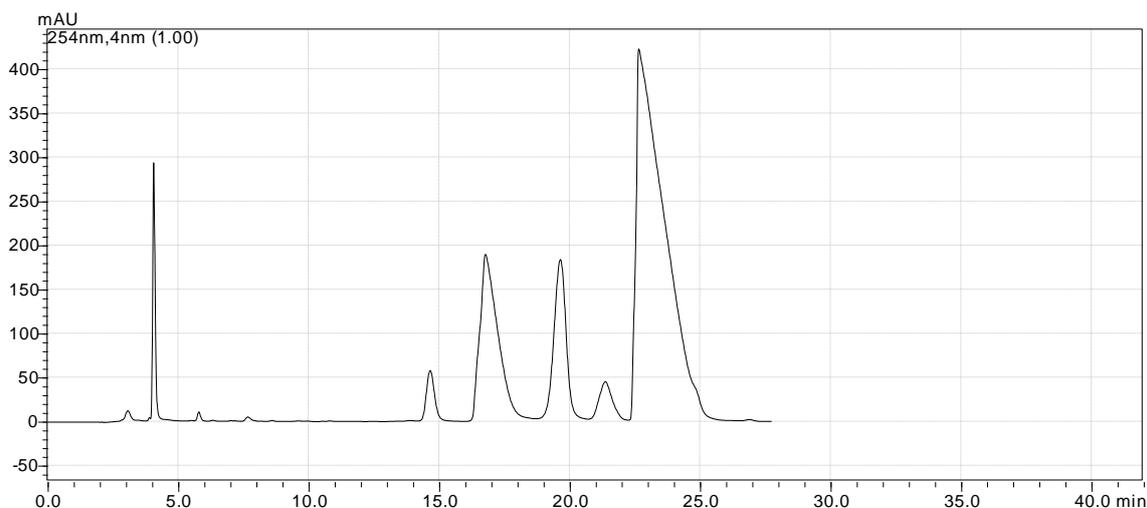


Abbildung 26: Auftrennung von Fraktion IIIc (siehe Tabelle 3, Seite 9) mittels Methode 4 (siehe Tabelle 14, Seite 44)

Es wurden pro Lauf 5µl einer 2,5%igen Lösung der Fraktion IIIc injiziert. Es konnte nicht mit höheren Konzentrationen gearbeitet werden, da dies auf Grund einer zu geringen Säulenkapazität zu einer Verschlechterung der Trennung der einzelnen Peaks führte. In 96 HPLC-Läufen wurden 2mg der Substanz BK2 gewonnen. Eine Ausbeute von 2mg der Substanz BK3 konnte nach 228 Läufen erzielt werden. 146 Läufen waren für die Isolierung von 1mg der Substanz BM

erforderlich. Mit diesen drei Substanzen wurde eine NMR-Analyse zur genaueren Strukturanalyse durchgeführt. Für UV/VIS-Analyse und Hydrolyse wurden in weiteren HPLC-Läufen noch 1,4mg BK2 und 0,2mg BK3 gesammelt.

3.3. Charakterisierung und Identifizierung der Substanzen

In Kapitel 3.1.1 und 3.2.1 wurden bereits die LCMS-Analysen der isolierten Substanzen aufgezeigt. Neben der Identifizierung der Aglyka konnte auch auf das Vorliegen von Sulfatgruppen durch die typische 80er Abspaltung bei den Substanzen BK1, BK2 und BK3 geschlossen werden. BM zeigte eine Abspaltung von 176, was auf das Vorliegen einer Glucuronsäure schließen ließ. Allerdings kann mit der MS die Bindungsstelle der Substituenten an das Aglykon nicht ermittelt werden. Dafür kamen UV/VIS-Spektroskopie (Kapitel 2.3.5, Seite 17) und NMR (Kapitel 2.3.7, Seite 22) zum Einsatz, deren Ergebnisse in folgendem Kapitel behandelt werden.

3.3.1. Charakterisierung von BK1

Die Ergebnisse der LCMS-Analyse wiesen auf das Vorliegen eines sulfatierten Rhamnetins hin (siehe Abbildung 15, Seite 31).

3.3.1.1. UV/VIS-Analyse

0,1mg der Substanz BK1 wurden in 10ml Methanol gelöst. Nach Vermessung von reinem Methanol als Blindprobe und der Lösung der Probe wurden die Shiftreagenzien wie in Kapitel 2.2.5 dargestellt, zugegeben, und die einzelnen Spektren vermessen. Aus dem methanolischen Spektrum wurden die $\log \epsilon$ -Werte ermittelt. Die Lage der UV-Maxima und -minima der in Methanol gelösten Substanz BK1 nach Zugabe der Shift-Reagenzien sind in Tabelle 15 (siehe Seite 46) zusammengestellt.

BK1						
Spektrum	200- 250nm	250- 270nm	270- 300nm	300- 350nm	350- 400nm	400- 450nm
MeOH (log ϵ)	249 (0,55488)		270sh (0,49072)		365 (0,34663)	
AlCl ₃			268	307sh	351	429
AlCl ₃ /HCl			261	307sh	349	426
NaOMe		253			354	416
NaOH	239		268	338sh		426

Tabelle 15: Absorptionsmaxima bzw. -minima der Substanz BK1 in Methanol sowie nach Zugaben der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19) in einem Wellenlängenbereiche von 200-450nm

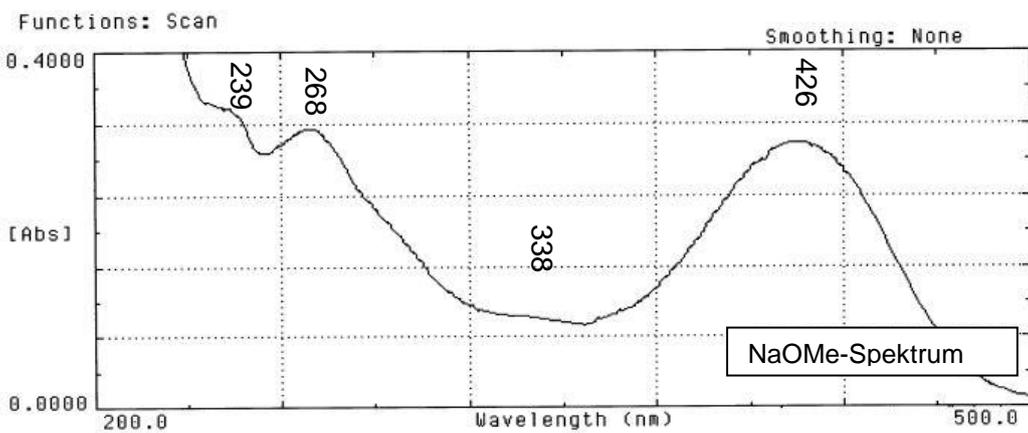
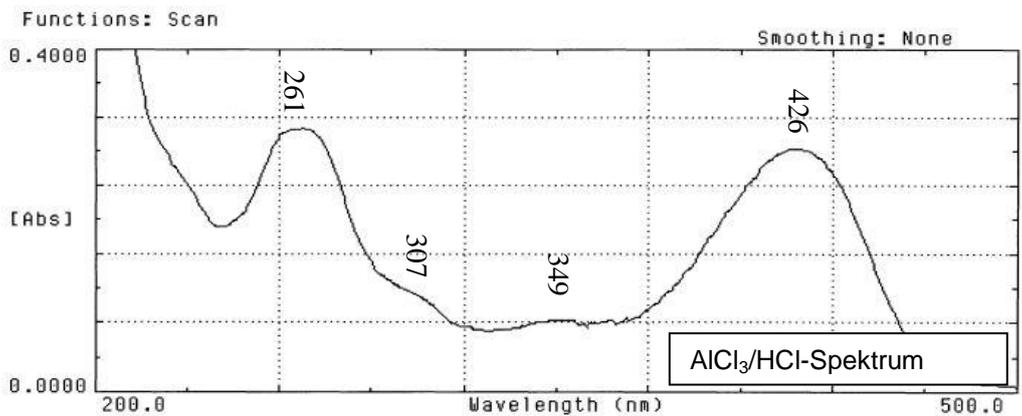
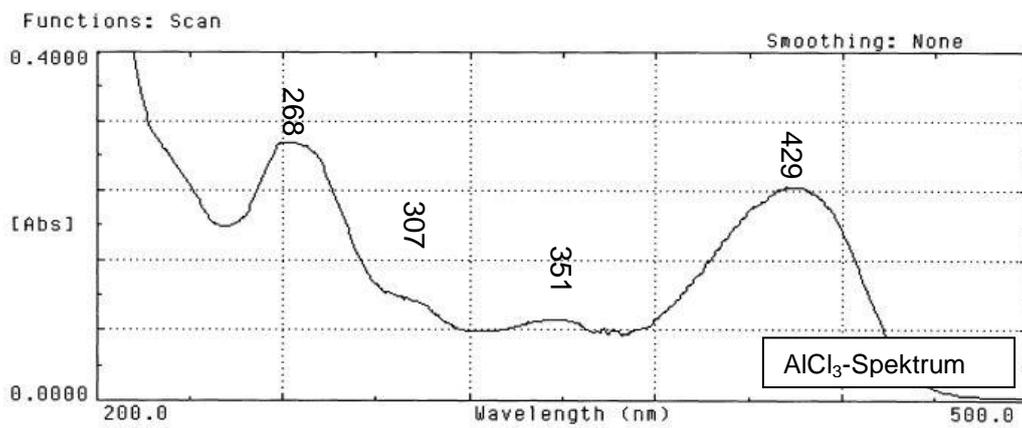
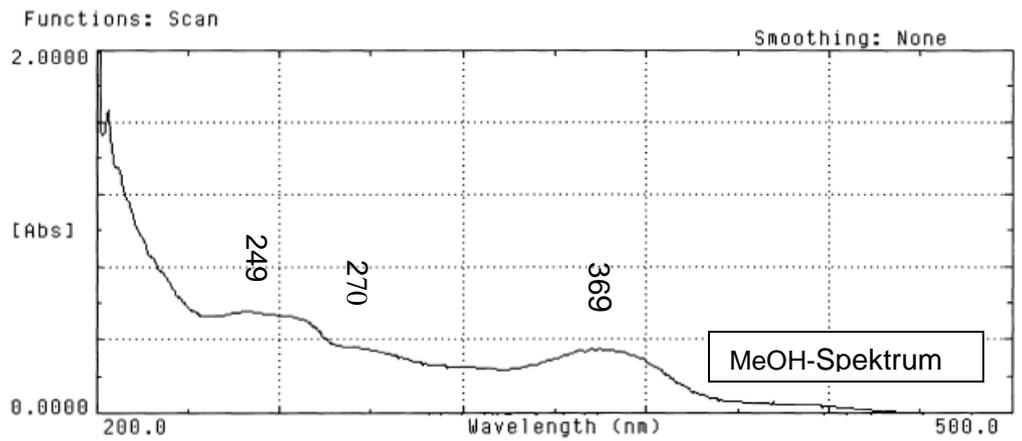


Abbildung 27: UV-Spektren der Substanz BK1 nach Zugabe der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19)

Die Verschiebung der Bande I im NaOMe bzw. NaOH-Spektrum um ca. 60nm deutete auf eine freie Hydroxyl-Gruppe in Position 4'. Da sich die Verschiebung der Bande I im AlCl₃-Spektrum kaum von der im AlCl₃/HCl-Spektrum unterschied, konnte das Vorliegen zweier benachbarter Hydroxyl-Gruppen am B-Ring ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse ließen eine Sulfatgruppe an Position 3' vermuten (Formelbild siehe Tabelle 1, Seite 5). Über die Substitution der Hydroxyl-Gruppen an Ring A und C konnte aber keine eindeutige Aussage getroffen werden. Ein genaueres Ergebnis sollte die NMR-Analyse bringen.

Nach dem Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit dem unsubstituierten Rhamnetin aus der Literatur²⁰ konnte die Bindungsstelle der Sulfatgruppe noch nicht eindeutig bestimmt werden.

3.3.1.2. NMR-Analyse

Bei der NMR-Analyse zeigte sich ein massives Löslichkeitsproblem. BK1 ließ sich nur zu einem sehr geringen Anteil in Methanol lösen, was dazu führte, dass sich die Signale der Substanz nicht von dem Untergrundrauschen abhoben. Es erfolgte ein zweimaliger Wechsel des Lösungsmittels, zunächst auf Pyridin, danach auf DMSO-d₆. Dies war mit mehrmaliger Lösungsmittelzugabe und darauf folgendem Entfernen des jeweils vorher verwendeten Lösungsmittels verbunden. Dieses Verfahren führte zu einer Zersetzung von BK1, dessen Farbe sich von neongelb zu dunkelbraun veränderte. Offensichtlich war die Substanz nicht stabil genug, um die Wechsel der Lösungsmittel und die anschließende Behandlung unter Luft unbeschadet zu überstehen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse der LC-MS-Analyse konnte BK1 als sulfatiertes Rhamnetin bestimmt werden, die Bindungsstelle der Sulfatgruppe blieb allerdings ungeklärt. Es kann aufgrund der UV/VIS-Ergebnisse vermutet werden, dass es sich hier um die Position 3' handelt. Eine Nachisolierung der Substanz BK1 ist notwendig, um die Vermutungen zu bestätigen.

3.3.2. Charakterisierung von BK3

Mittels LCMS konnte Quercetin als Aglykon der Substanz BK3 identifiziert werden (siehe Abbildung 23, Seite 39). Die Bindungsstelle der Sulfatgruppe wurde mit UV/VIS und NMR ermittelt.

3.3.2.1. UV/VIS-Analyse

Für die UV/VIS-Analyse wurden 0,19mg BK3 in 100µl Methanol gelöst. Diese Lösung wurde in eine mit ca. 1ml Methanol befüllte Küvette pipettiert. Es wurde der Blindwert des reinen Methanols vermessen und nach Aufnahme des Methanol-Spektrums und Bestimmung der log ϵ -Werte wurden die Reagenzien zugegeben und die einzelnen Spektren aufgenommen.

BK3						
Spektrum	200-255nm	255-280nm	280-300nm	300-350nm	350-400nm	400-450nm
MeOH1 (log ϵ)	255 (0,51083)	270sh (0,40155)	298 (0,23117)		352 (0,45765)	
NaOMe			271	327		409
NaOH			270	326		407
AlCl ₃		275	305sh	337		433
AlCl ₃ /HCl		268	299sh	316	362	401

Tabelle 16: Absorptionsmaxima bzw. -minima der Substanz BK3 in MeOH nach Zugaben der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19) in einem Wellenlängenbereiche von 200-450nm

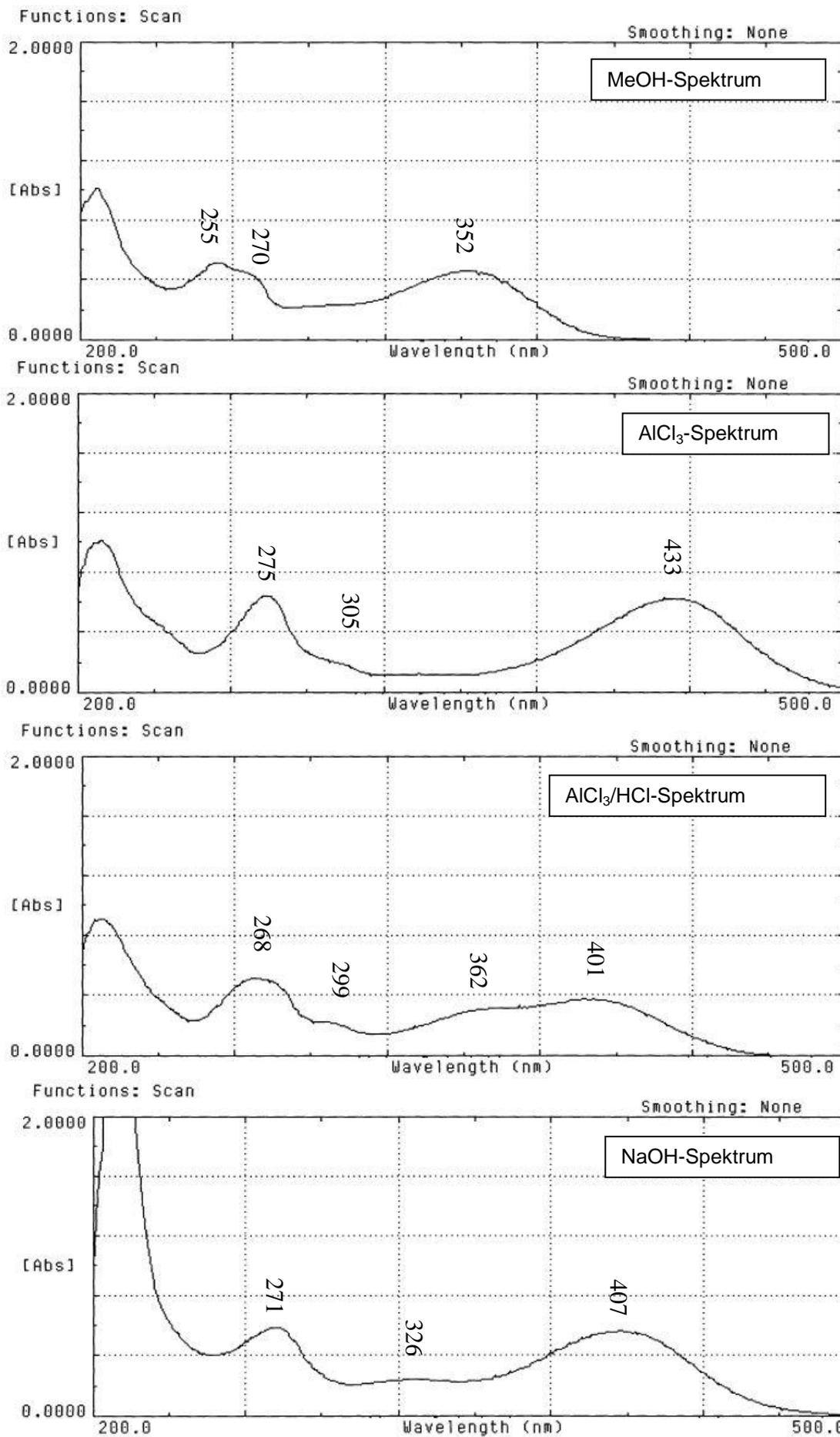


Abbildung 28: UV-Spektren der Substanz BK3 nach Zugabe der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19)

Die Verschiebung der Bande I im NaOH-Spektrum um ca. 50nm in den höheren Wellenlängenbereich lässt auf das Vorliegen einer freien 4'-Hydroxyl-Gruppe schließen. Eine zusätzliche Bande bei 326nm verweist auf eine freie Hydroxyl-Gruppe in Position 7. Die Zugabe von HCl zur AlCl_3 -haltigen Probelösung führte zur Zerstörung des säurelabilen o-Dihydroxykomplexes am B-Ring des Quercetins, was durch einen Shift der Maxima im AlCl_3 -Spektrum um ca. 30nm in den hypsochromen Wellenlängenbereich sichtbar wurde. Die Ergebnisse dieser Analysen ließen die Bindungsstelle der Sulfatgruppe an Position 3 vermuten. Eine Bestätigung der Ergebnisse sollte in weiterer Folge die NMR-Analyse bringen.

3.3.2.2. NMR-Analyse

Die isolierte Substanz wurde für die NMR-Analyse in DMSO-d_6 gelöst und die Spektren aufgenommen.

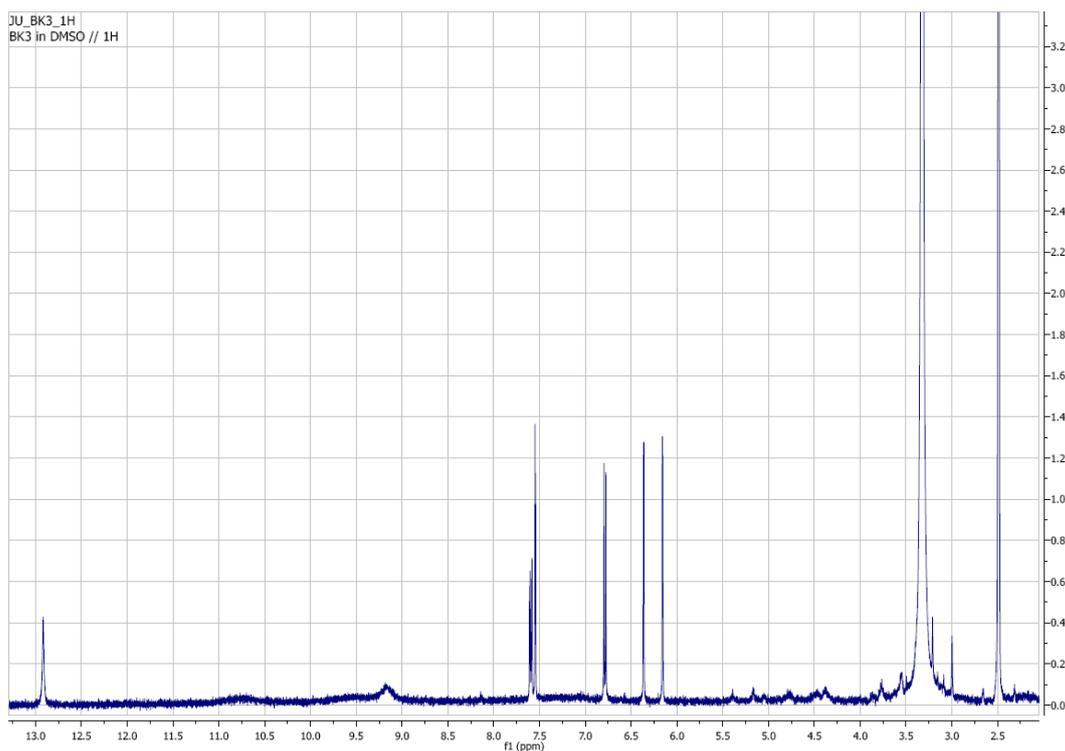


Abbildung 29: Fortsetzung Seite 52

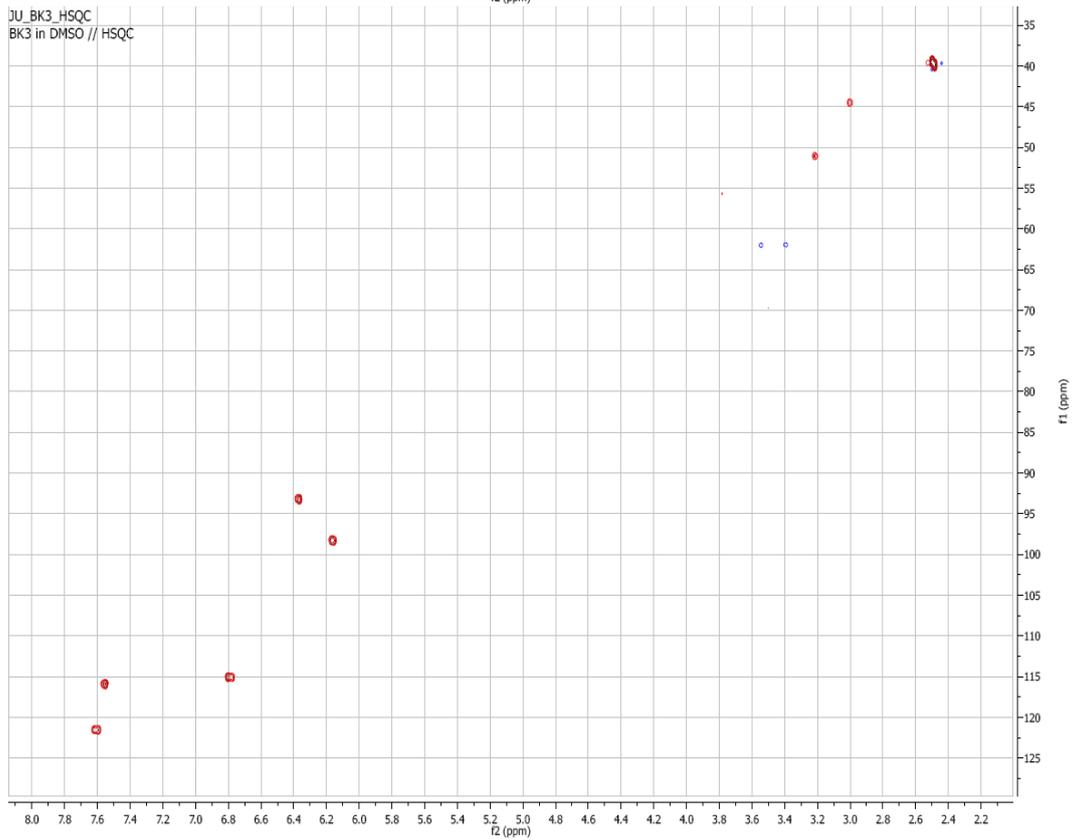
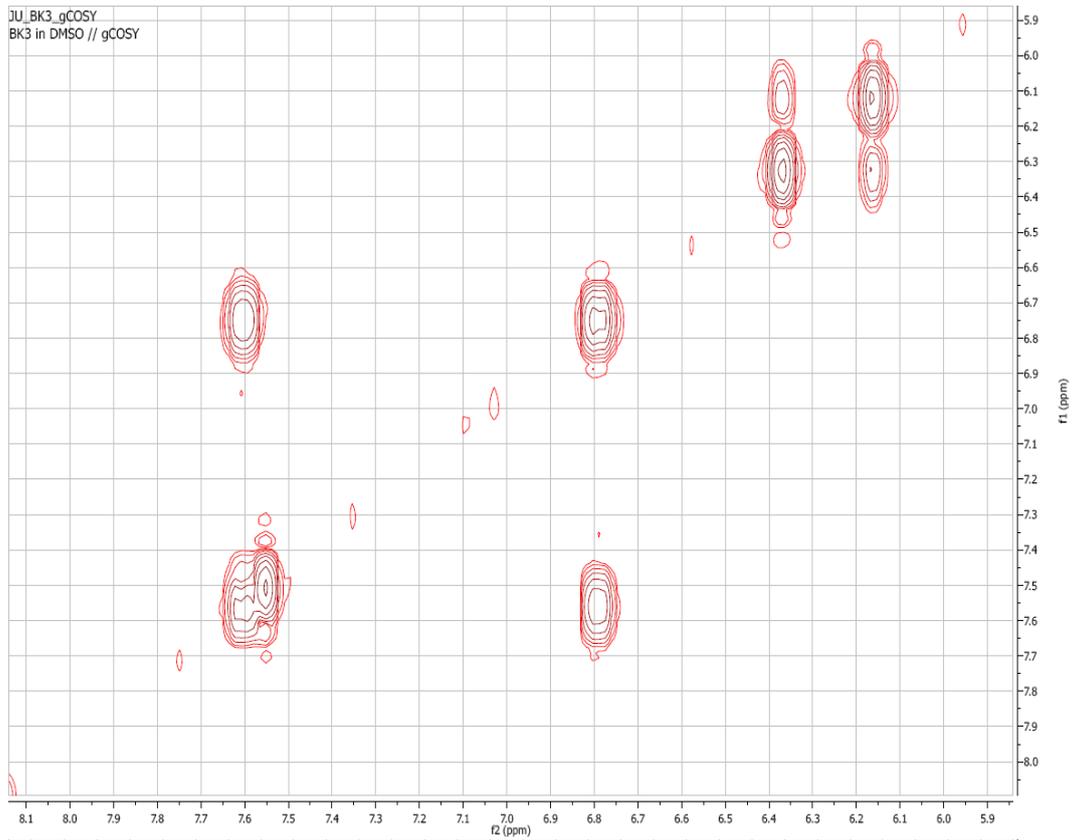


Abbildung 30: Fortsetzung Seite 53

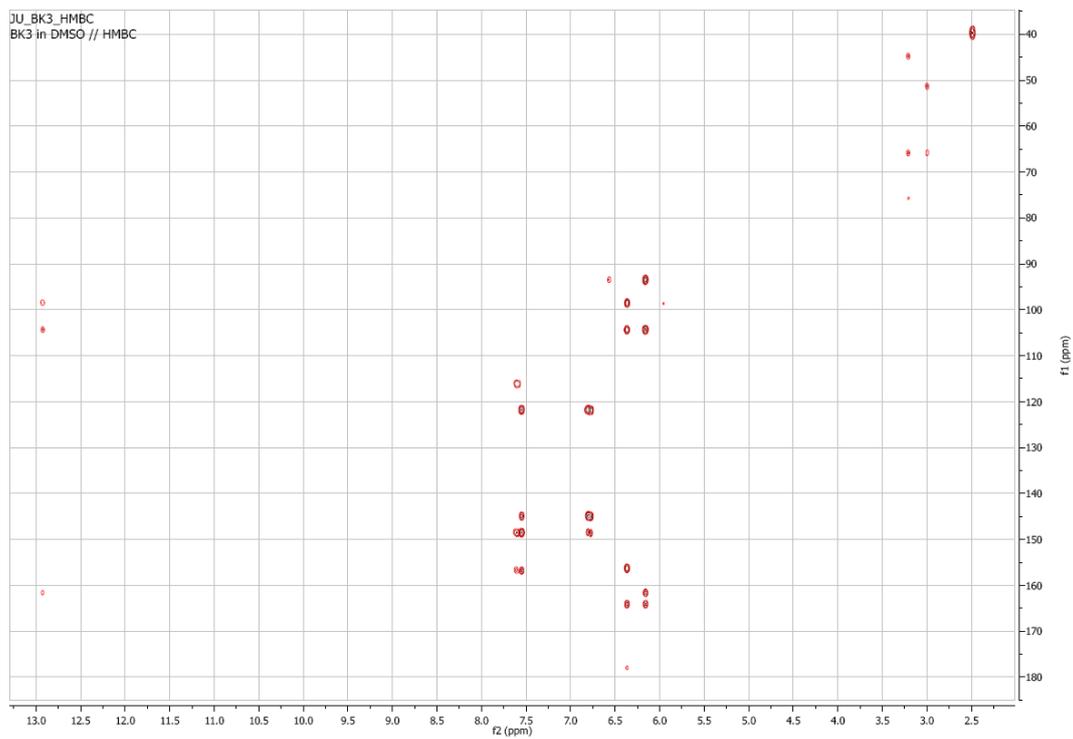


Abbildung 31: ^1H -, COSY-, HSQC- und HMBC-Spektrum der Substanz BK3 in DMSO-d_6

Die Werte der Verschiebungen der H und C-Atome sind in Tabelle 17 (siehe Seite 54) aufgezeigt und werden mit Daten eines unsubstituierten Quercetins vermessen in DMSO-d_6 aus der Literatur²⁴ verglichen.

BK3 in DMSO-d ₆				Quercetin ²⁴ in DMSO-d ₆		
Position	δ _C	δ _H	HMBC	Position	δ _C	δ _H
2	157.1	--	--	2	146.7	--
3	n.d.	--	--	3	138.6	--
4	178.3	--	--	4	175.8	--
5	161.7	--	--	5	160.7	--
6	98.2	6.16	5, 7, 8, 10	6	98.1	6.17, d (1.6)
7	163.8	-	--	7	163.6	--
8	92.5	6.37	6, 7, 9, 10	8	93.3	6.40, d (1.7)
9	155.8	--	--	9	156.1	--
10	105.0	--	--	10	102.9	--
1'	122.0	--	--	1'	121.9	--
2'	116.1	7.55	2, 3', 4', 6'	2'	114.9	7.66, d (1.8)
3'	145.0	--	--	3'	145.0	--
4'	148.8	--	--	4'	147.8	--
5'	115.0	6.78	, 3', 4', 6'	5'	115.5	6.87, d (8.5)
6'	121.7	7.60	2, 2', 4'	6'	119.9	7.53, dd (8.4)
5-OH		12.91	5, 6, 10			

Tabelle 17: Zuordnung der 1H- und 13C-Signale der Substanz BK3 in DMSO-d₆ im Vergleich zu Quercetin²⁴ in DMSO-d₆ (n.d. ... nicht detektierbar)

Es ist nicht gelungen, das Signal des C-Atoms an Position 3 zu detektieren. Mögliche Positionen für einen Substituenten sind 3, 5, 7, 3' und 4'. Aufgrund der UV/VIS-Analyse können die Positionen 7 und 4' ausgeschlossen werden, da das Vorliegen freier Hydroxyl-Gruppen bestätigt wird (Formelbild siehe Abbildung 32).

Aus der Literatur²⁵ ist bekannt, dass es bei Flavonoiden, die in Position 3 sulfatiert sind, zu einer Hochfeldverschiebung des C3 um 3,3ppm kommt. C2 zeigt eine Tieffeldverschiebung um 9,7ppm und C4 ist um 2 ppm tieffeldverschoben. Vergleicht man nun die gemessenen Daten der Substanz BK3 mit den Daten eines unsulfatierten Quercetins²⁴, ist das Signal des C2 der Substanz BK3 um ca. 10ppm tieffeldverschoben. Auch das Signal des C4 erfährt im Vergleich mit demselben Atom eines unsubstituierten Quercetins²⁴ eine Tieffeldverschiebung um 2,5ppm. Die übrigen Werte der Messungen sind im Vergleich mit den Literaturdaten nicht maßgeblich verändert.

Trotz des Fehlens der Daten von C3 gelang es, aufgrund der Ergebnisse der MS, der UV/VIS-Analyse und der NMR, BK3 als Quercetin-3-sulfat (siehe Abbildung 32) zu identifizieren.

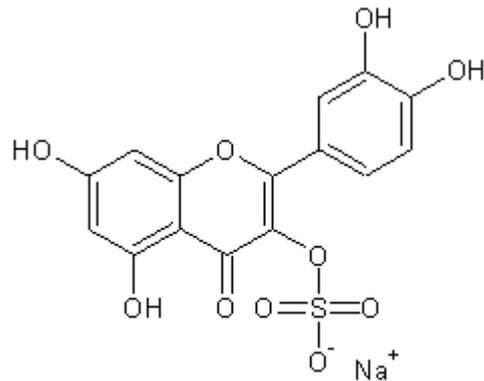


Abbildung 32: BK3, Quercetin-3-sulfat

3.3.3. Charakterisierung von BK2

Aufgrund der Ergebnisse der LCMS-Analyse konnte BK2 als Isorhamnetin-sulfat bestimmt werden (siehe Abbildung 25, Seite 40). Die Bindungsstelle der Sulfatgruppe sollte mit UV/VIS-Spektroskopie und NMR ermittelt werden.

3.3.3.1. UV/VIS-Analyse

Wie in Kapitel 2.3.5 (siehe Seite 17), angegeben, wurde der Versuch mit einer 1%igen Lösung der Substanz durchgeführt.

Die Ergebnisse der UV/VIS-Analyse werden in Tabelle 18 wiedergegeben.

BK2						
Spektrum	200-250nm	250-280nm	280-300nm	300-350nm	350-400nm	400-450nm
MeOH (log ϵ)	252 (0,99579)	268sh (0,75526)		300 (0,45407)	384 (0,85753)	
NaOMe	271			324		407
NaOH	270			328		405
AlCl ₃	267	275sh	298		357	401
AlCl ₃ /HCl	266	279sh		302	358	401

Tabelle 18: Absorptionsmaxima bzw. -minima der Substanz BK2 in Methanol sowie nach Zugaben der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19) in einem Wellenlängenbereiche von 200-450nm

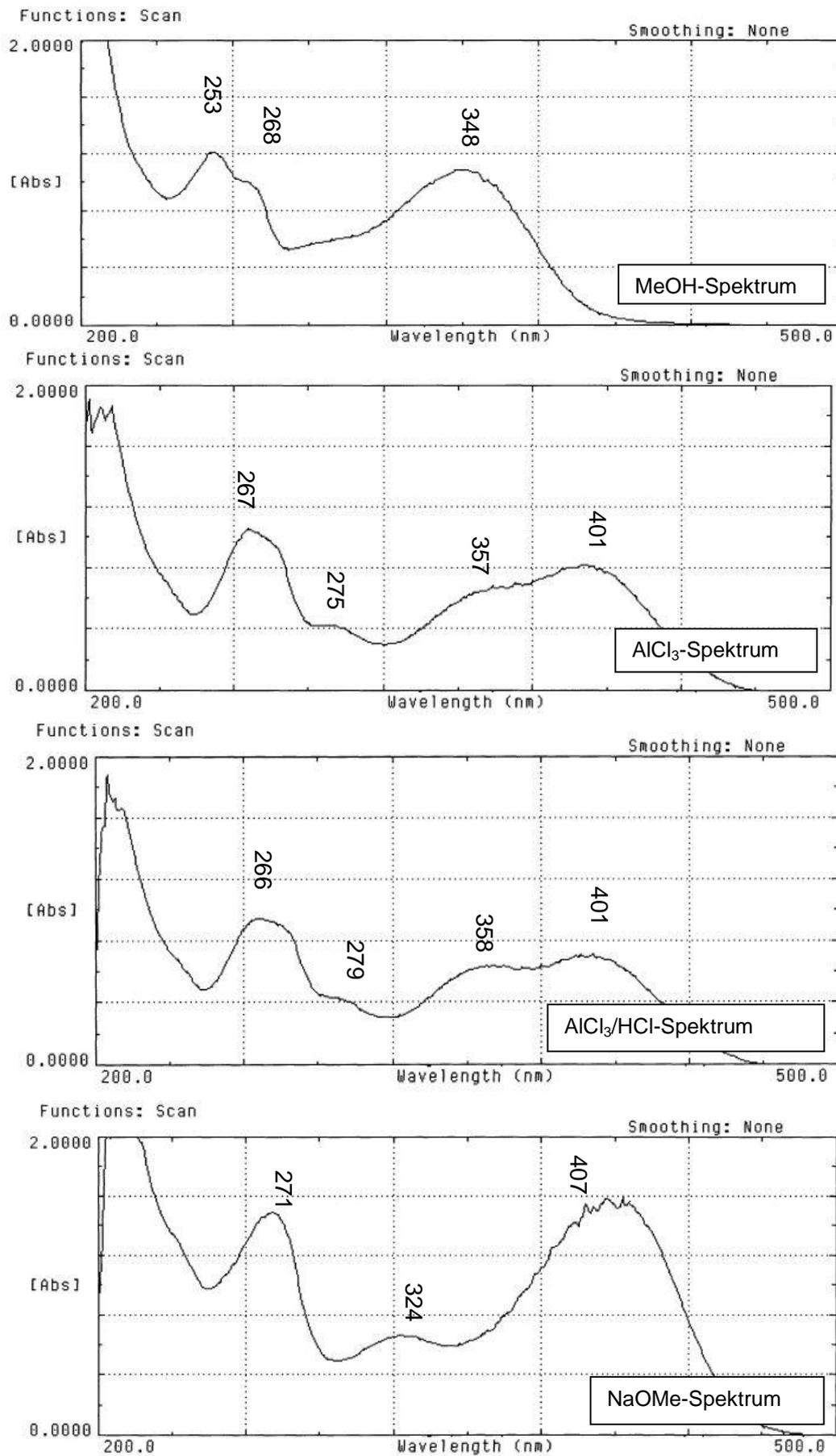


Abbildung 33: UV-Spektren der Substanz BK2 nach Zugabe der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19)

Der Shift der Bande I im NaOMe-Spektrum um ca. 50nm in den bathochromen Bereich zeigt das Vorliegen einer freien Hydroxylgruppe in Position 4' am B-Ring des Isorhamnetins (Formelbild siehe Abbildung 37, Seite 62). In diesem Spektrum tritt eine zusätzliche Bande im Bereich von 324nm auf, was auf eine freie Hydroxyl-Gruppe in Position 7 hindeutet. Die Verschiebung der Bande I im AlCl_3/HCl -Spektrum könnte ein Indiz für eine freie Hydroxyl-Gruppe an Position 3, aber auch an 5 sein. Die Sulfatgruppe könnte aufgrund dieser Ergebnisse an den Positionen 3 oder 5 liegen.

3.3.3.2. NMR-Analyse

Die Substanz wurde in DMSO-d_6 gelöst und mittels NMR vermessen. Die aufgenommenen Spektren werden angeführt.

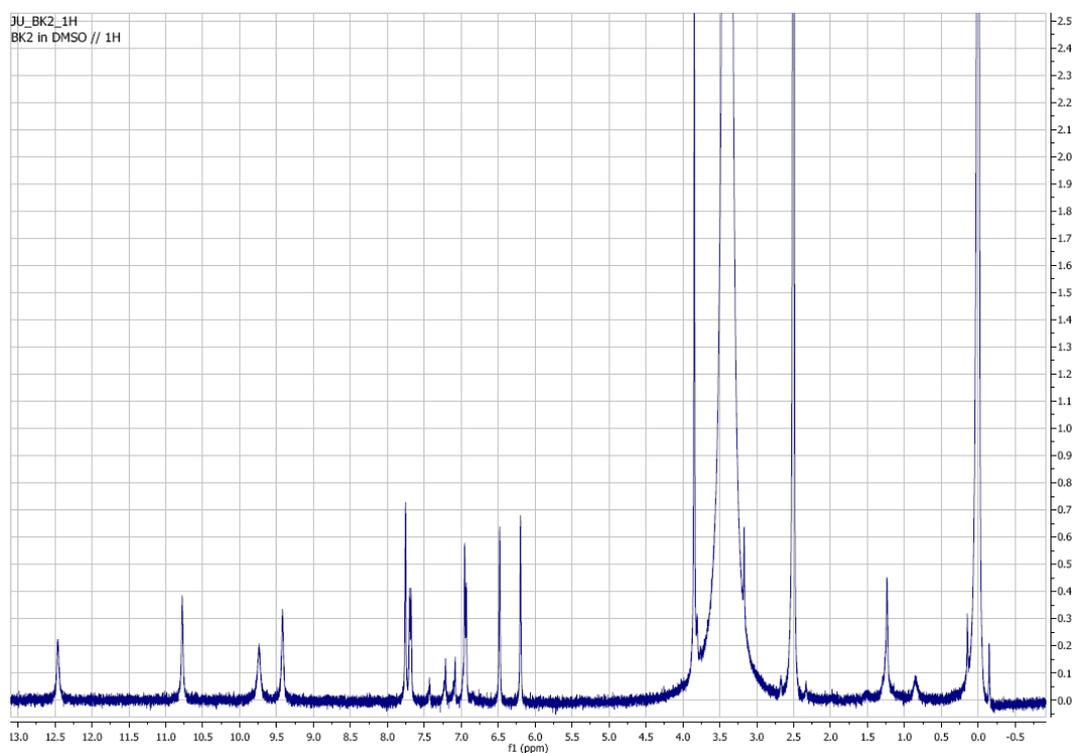


Abbildung 34: Fortsetzung Seite 59

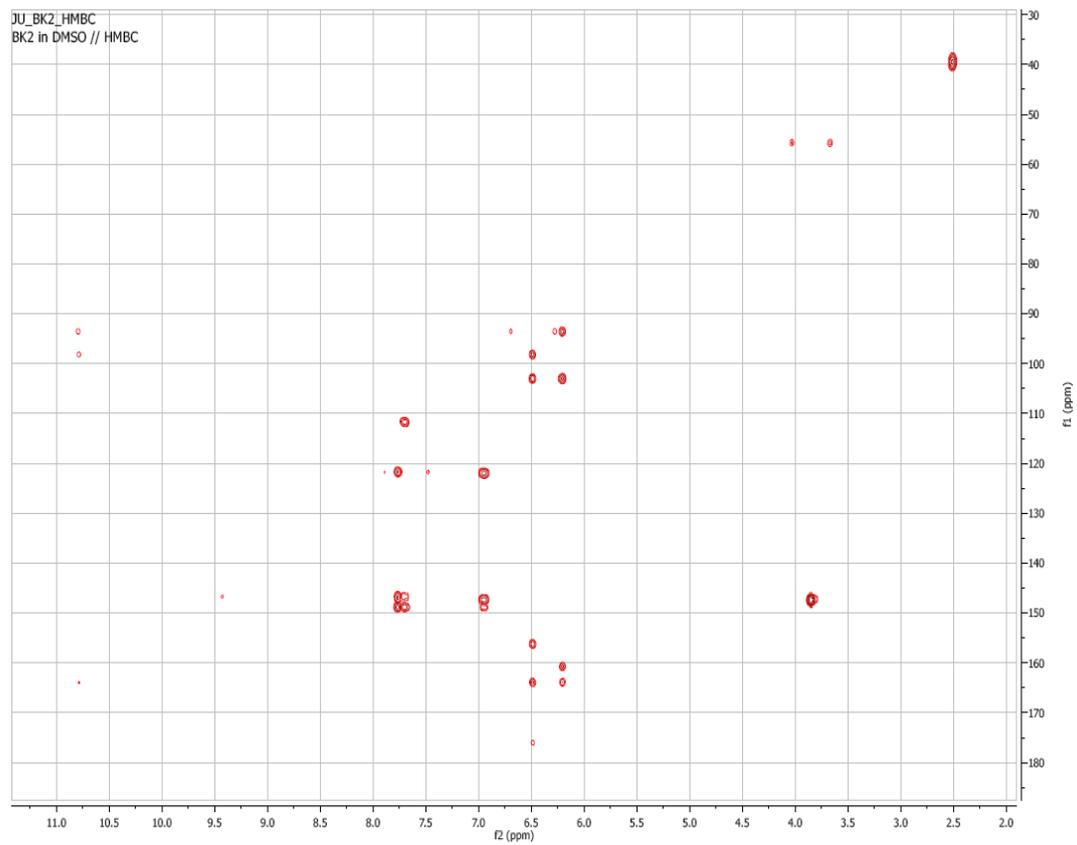
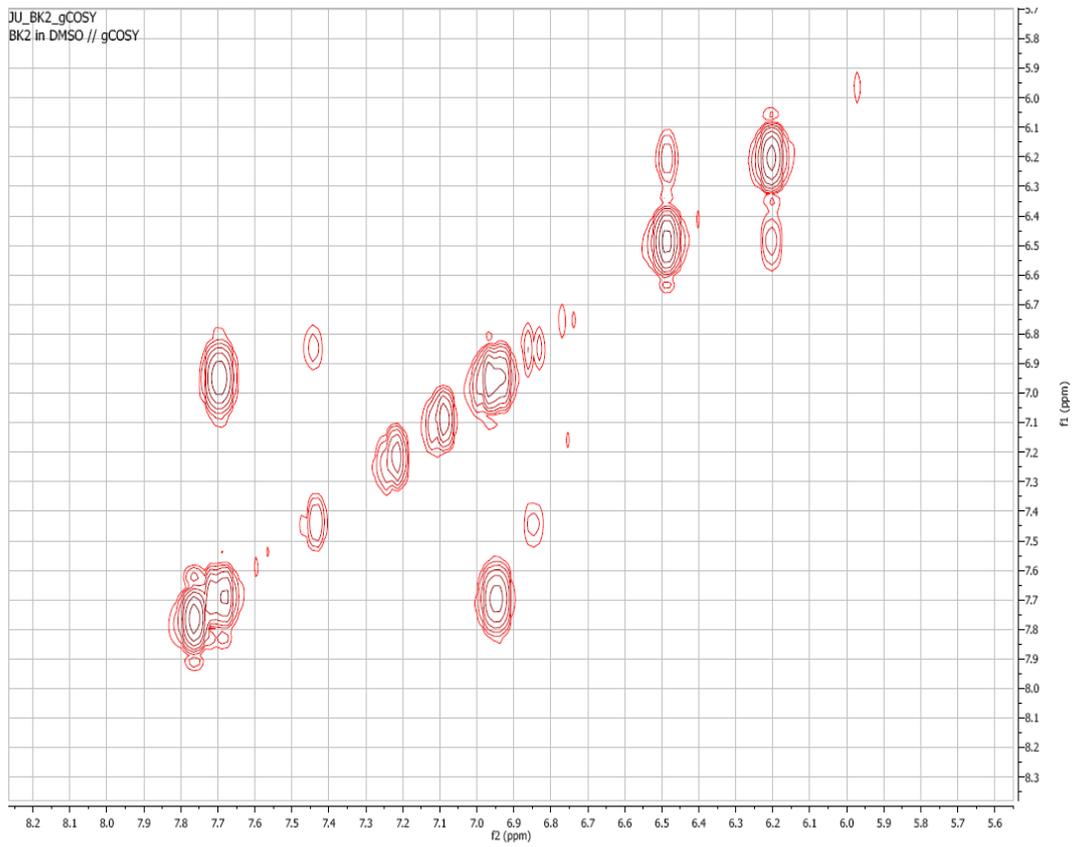


Abbildung 35: Fortsetzung Seite 60

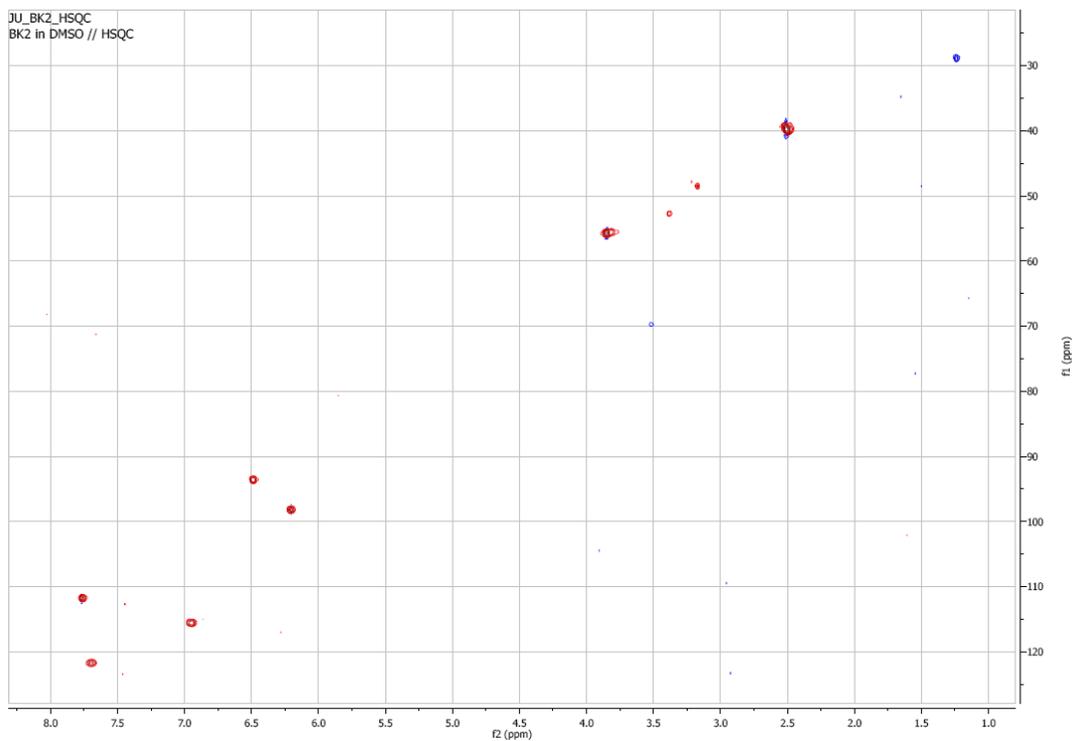


Abbildung 36: ^1H -, COSY-, HSQC- und HMBC-NMR der Substanz BK2 in DMSO-d_6

Die Zuordnungen der chemischen Verschiebungen zu den H- und C-Atomen der Verbindung sind in folgender Tabelle aufgelistet. Die erhaltenen Daten von BK2 werden mit Daten eines in DMSO-d_6 gelösten, unsubstituierten Isorhamnetins aus der Literatur²⁶ verglichen.

BK 2 in DMSO-d ₆				Isorhamnetin ²⁶ in DMSO-d ₆			
Position	δ _C	δ _H	HMBC	Position	δ _C	δ _H	HMBC
2	n.d	--	--	2	146.7	--	--
3	n.d	--	--	3	135.9	--	--
4	175.7	--	--	4	175.9	--	--
5	160.9	--	--	5	160.7	--	--
6	97.9	6.21	5, 7, 8, 10	6	98.3	6.18 (d, 2.0)	5, 7, 8, 10
7	164.3	--	--	7	164.1	--	--
8	93.7	6.49	4, 6, 7, 9, 10	8	93.7	6.46 (d, 2.0)	6, 7, 9, 10
9	156.1	--	--	9	156.3	---	--
10	102.6	--	--	10	103.1	--	--
1'	n.d	--	--	1'	122.1	--	--
2'	111.8	7.76	3', 4', 6'	2'	111.8	7.75 (d, 2.0)	2, 4', 6'
3'	147.4	--	--	3'	147.5	--	--
4'	148.7	--	--	4'	148.9	--	--
5'	115.2	6.94	3', 4', 6'	5'	115.6	6.93 (d, 8.5)	1', 3'
6'	121.5	7.70	2', 3', 4'	6'	121.8	7.68 (dd, 2.0, 8.5)	2, 2'
3'-OCH ₃	55.5	3.83	3'	3'-OCH ₃	55.9	3.83 (s)	3'

Tabelle 19: Zuordnung der 1H- und 13C-Signale der Substanz BK2 in DMSO-d₆ im Vergleich zu Isorhamnetin²⁶ in DMSO-d₆ (n.d. ... nicht detektierbar)

Die Signale der C-Atome 2, 3 und 1' konnten aufgrund zu geringer Konzentration in den erhaltenen Spektren nicht detektiert werden. Die möglichen Positionen für einen Sulfat-Substituenten stellen 3, 5, 7, und 4' dar. Die Positionen 7 und 4' können aufgrund der Ergebnisse der UV/VIS-Analyse ausgeschlossen werden. Laut Literatur²⁵ hat eine Substitution an Position 3 auch Auswirkungen auf die Verschiebungen der Atome C2 und C4. Da diese allerdings nicht detektierbar sind, kann keine Aussage über die Bindungsstelle der Sulfatgruppe getroffen werden. Aufgrund der UV-Daten wird vermutet, dass die Verbindung den Substituenten an Position 3 trägt.

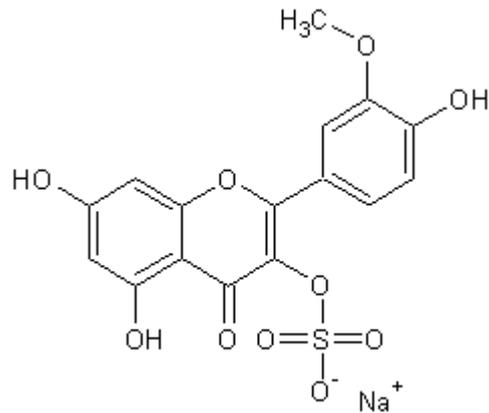


Abbildung 37: Strukturvorschlag für BK2, Isorhamnetin-3-sulfat

3.3.4. Charakterisierung von BM

Das typische Aufspaltungsmuster der MS-Analyse (siehe Abbildung 24, Seite 40) deutet auf das Vorliegen eines Quercetins-Grundgerüsts hin. Die Abspaltung von 176 lässt auf eine Glucuronidierung schließen. Da die Bestimmung der Bindungsstelle mittels LCMS nicht möglich ist, wurden UV/VIS und NMR-Analysen durchgeführt. Die Umsetzung mit chiralem Butanol nach erfolgter Hydrolyse sollte Aufschluss über die absolute Konfiguration des Zuckers geben.

3.3.4.1. UV/VIS-Analyse

1,8mg der Substanz BM wurden in 100µl Methanol gelöst. Davon wurden 3 Tropfen in eine halb mit Methanol befüllte Küvette überführt und Spektren nach Zugabe der einzelnen Shiftreagenzien vermessen.

BM						
Spektrum	200-255nm	255-280nm	280-300nm	300-350nm	350-400nm	400-450nm
MeOH (logε)	256 (1,18839)	270sh (0,77076)	281 (0,37386)	304 (0,46014)	357 (0,90911)	
NaOMe		271	296	382	400	409
AlCl ₃		268	301	321	389	433
AlCl ₃ /HCl		270	298		361	401

Tabelle 20: Absorptionsmaxima bzw. -minima der Substanz BM in Methanol nach Zugaben der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19) in einem Wellenlängenbereiche zwischen 200-450nm

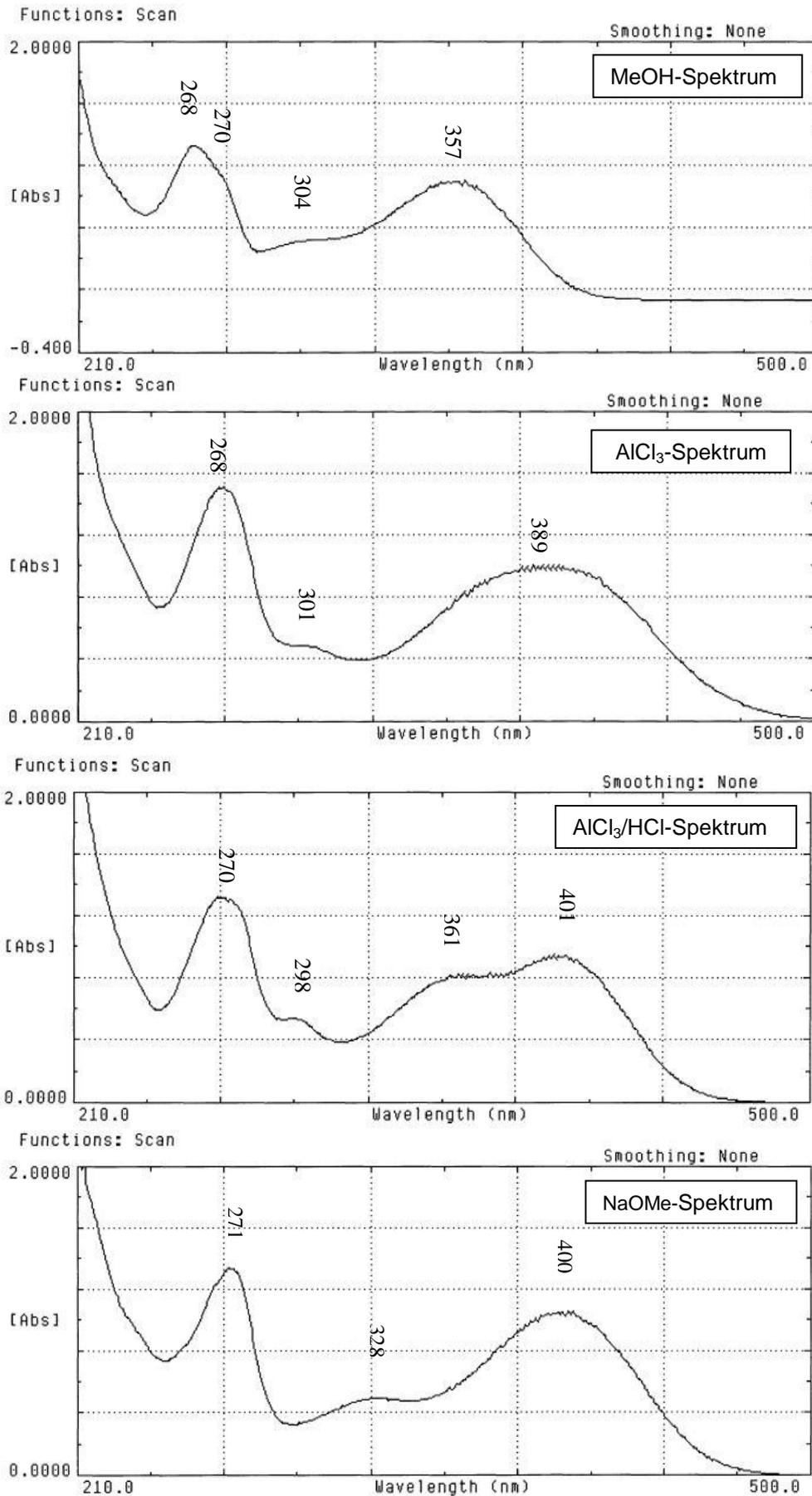


Abbildung 38: UV-Spektren der Substanz BM in Methanol nach Zugabe der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19)

Die Bande I ist im NaOMe-Spektrum im Vergleich zum MeOH-Spektrum um ca. 40nm in den höheren Wellenlängenbereich verschoben. Dies lässt auf eine freie Hydroxyl-Gruppe in Position 4' schließen. Bei 328nm erscheint eine zusätzliche Bande, die im MeOH-Spektrum nicht vorhanden ist. Sie zeigt, dass die Hydroxyl-Gruppe an Position 7 keinen Substituenten trägt. Die Zugabe von HCl zur mit AlCl_3 versetzten Probe verschiebt das Maximum der Bande I nicht, es kommt aber zu einer Veränderung der Kurve durch ein zusätzliches Maximum bei 361nm. Das Vorliegen einer o-Dihydroxygruppe am B-Ring hätte eine Verschiebung des Maximums zur Folge. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte die Position des Zuckers nicht genau definiert werden. Die Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass der Zucker an Position 3 oder an Position 5 substituiert sein könnte. Es wurde eine NMR-Analyse durchgeführt, um eine genaue Aussage treffen zu können.

3.3.4.2. NMR-Analyse

Es wurde ein NMR-Spektrum der zuvor in DMSO-d_6 gelösten Substanz BM aufgenommen.

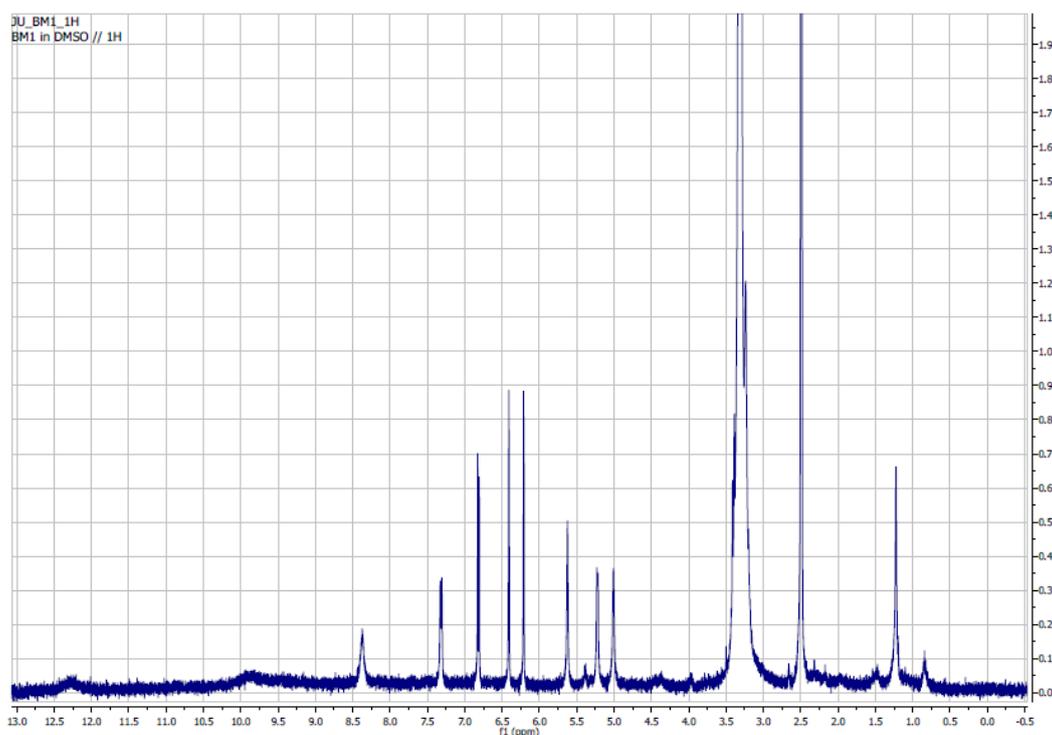


Abbildung 39: Fortsetzung Seite 66

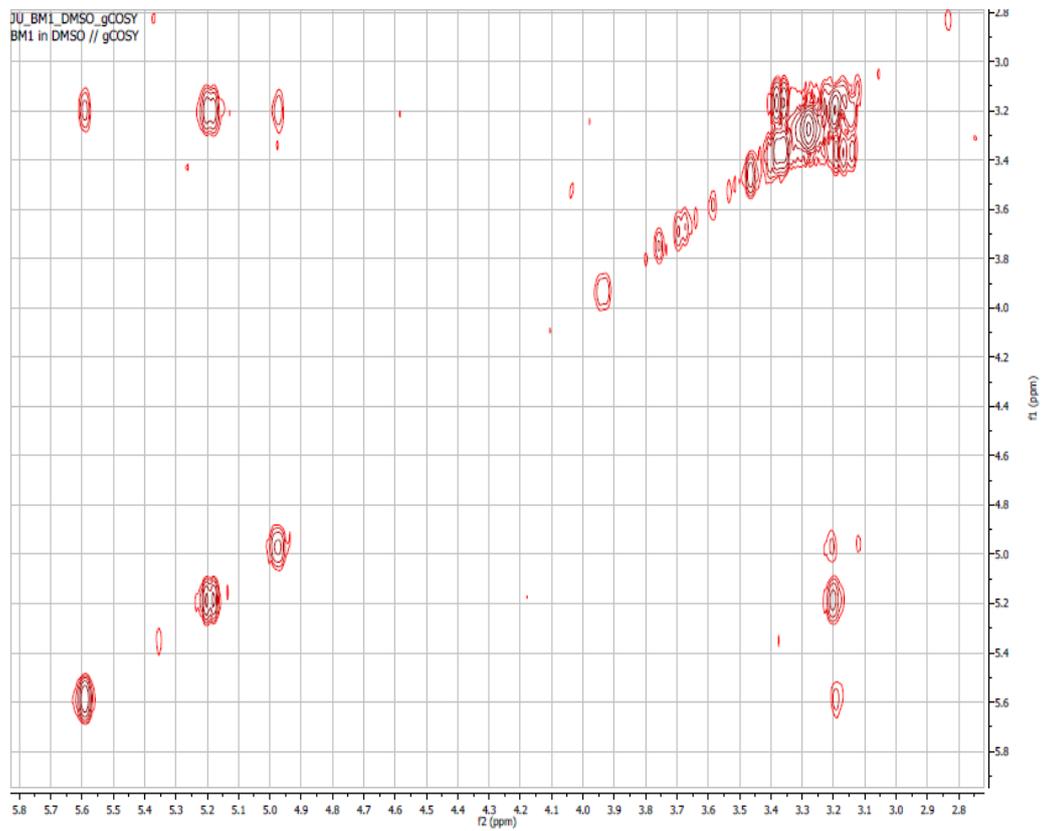
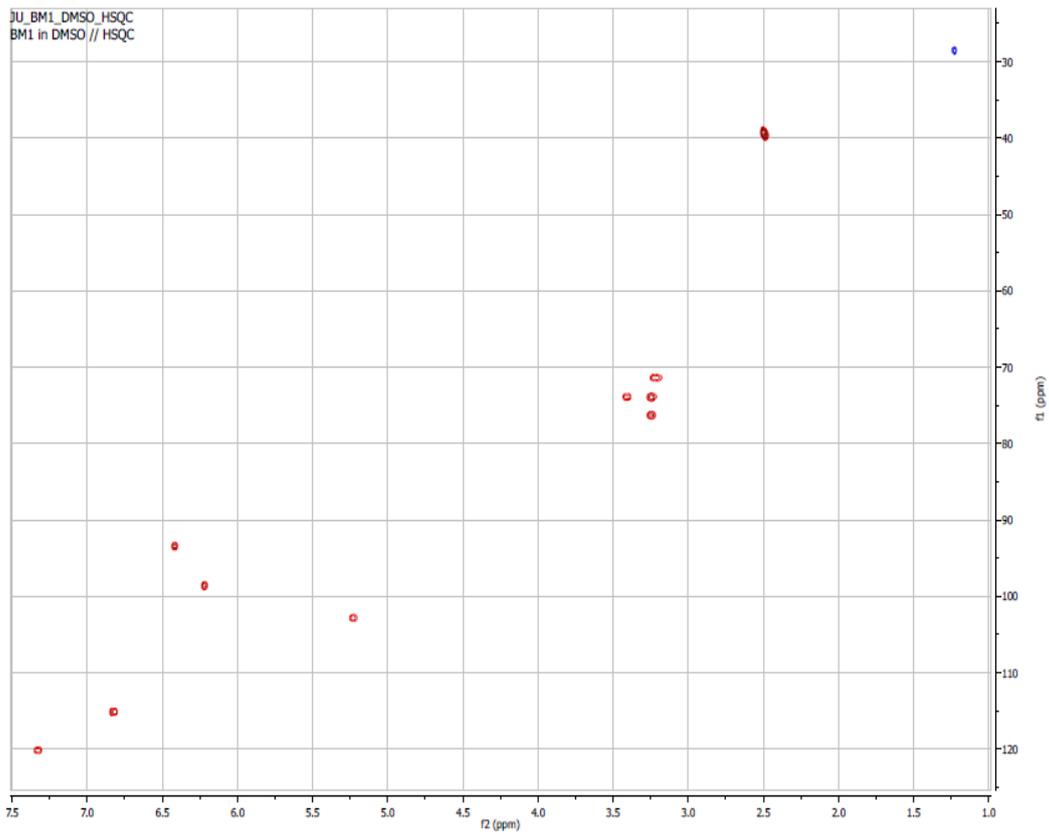


Abbildung 40: Fortsetzung Seite 67

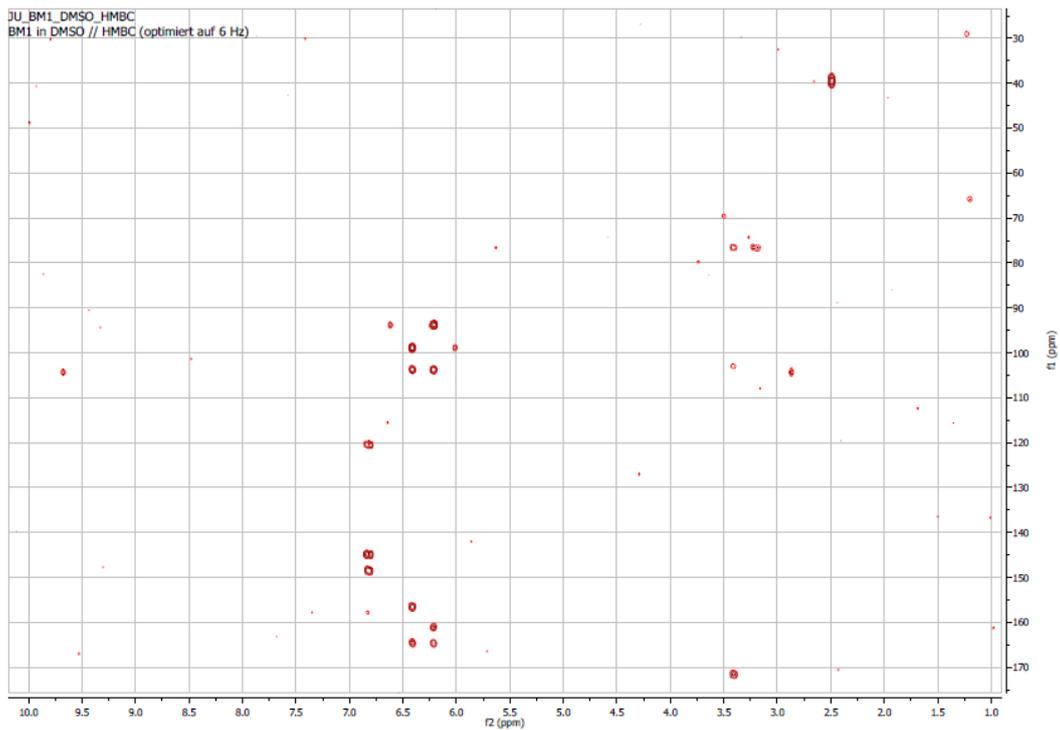


Abbildung 41: ^1H -Spektrum, COSY, HSQC und HMBC der Substanz BM in DMSO-d_6

Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 21 (siehe Seite 68) zusammengefasst und werden mit Daten eines Quercetin-3-O-glucuronid aus der Literatur²⁷ verglichen.

BM in DMSO-d ₆				Quercetin-3-O-glucuronid ²⁷ in DMSO-d ₆		
Position	δ _C	δ _H	HMBC	Position	δ _C	δ _H
2	157.8	--	--	2	157.6	--
3	n.d.	--	--	3	134.0	--
4	177.6	--	--	4	177.5	--
5	161.1	--	--	5	161.0	--
6	98.6	6.21 d (1.7)	5, 7, 8, 10	6	99.0	6.17
7	164.6	--	--	7	165.1	--
8	93.4	6.41 d (1.7)	6, 7, 9, 10	8	93.9	6.36
9	156.6	--	--	9	156.7	--
10	103.8	--	--	10	103.5	--
1'	n.d.	--	--	1'	120.6	--
2'	115.1	6.82 d (8.5)	--	2'	115.4	8.47
3'	144.9	--	--	3'	144.8	--
4'	148.5	--	--	4'	148.4	--
5'	117.9	8.37 m	2, 3', 4', 6'	5'	115.4	6.82
6'	120.2	7.32 d (8.5)	2	6'	120.0	7.29
1''	102.9	5.22 m	--	1''	102.9	5.23
2''	73.9	3.25 m	--	2''	74.3	3.24-3.27
3''	76.3	3.25 m	2''	3''	76.7	3.24-3.27
4''	71.4	3.21 m	3''	4''	71.9	3.22
5''	73.9	3.41 m	1'', 2'', 6''	5''	74.0	3.40
6''	171.6	--	--	6''	172.2	--

Tabelle 21: Zuordnung der 1H- und 13C- Signale der Substanz BM in DMSO-d₆ im Vergleich zu Quercetin-3-O-glucuronid²⁷ in DMSO-d₆ (n.d. ... nicht detektierbar)

Die Signale der Atome in Position 3 und 1' konnten nicht detektiert werden. Mögliche Bindungsstellen für die Glucuronsäure stellen die Positionen 3, 5, 7, 3' und 4' dar. Vergleicht man die erhaltenen Daten mit jenen aus der Literatur²⁷ erkennt man Übereinstimmungen in den Verschiebungen sowohl der Kohlenstoffe, als auch der Protonen. Auch die Verschiebungen der C-Atome und der Protonen des Zuckers entsprechen den Literaturdaten²⁷. Es ist bekannt, dass es bei Flavonoiden, die in Position 3 eine Glucuronsäure tragen, ebenso wie bei sulfatierten Derivaten (siehe Kapitel 3.3.2, Seite 49 und Kapitel 3.3.3, Seite 55) zu einer Tieffeldverschiebung des Nachbaratoms C2 um ca. 10ppm kommt. Vergleicht man die detektierten Verschiebungen von BM mit jenen eines unsubstituierten Quercetins²⁴ (siehe Tabelle 17, Seite 54) zeigt sich eine Tieffeldverschiebung um ca. 11ppm. Aufgrund der Übereinstimmung der Werte mit Quercetin-3-O-glucuronid, kann als

Bindungsstelle für die Sulfatgruppe die Hydroxyl-Gruppe an Position 3 bestimmt werden. Dieses Ergebnis entspricht auch der UV/VIS-Analyse.

3.3.4.3. Hydrolyse

Die isolierte Substanz wurde mit Kiliani-Reagens (siehe Tabelle 10, Seite 24) versetzt. Dadurch wurde der Zucker vom Aglykon gespalten. Nach zweistündiger Reaktion wurde die Lösung mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde zur Trockene gebracht und mit (S)-(+)-2-Butanol und konzentrierter Salzsäure versetzt und für 15 Stunden bei 100°C im Trockenschrank gelagert (siehe Kapitel 2.3.8, Seite 23). Im Anschluss wurde die Probe vollständig zur Trockene gebracht, mit 50µl MSTFA versetzt, und die Lösung für fünf Minuten bei 80°C in den Trockenschrank gestellt. Mit 1µl dieser Lösung wird eine GC-Analyse durchgeführt. Als Vergleich wurde dieselbe Reaktion mit Glycyrrhizin, welches ebenfalls eine mit β -D-Glucuronsäure enthält, durchgeführt.

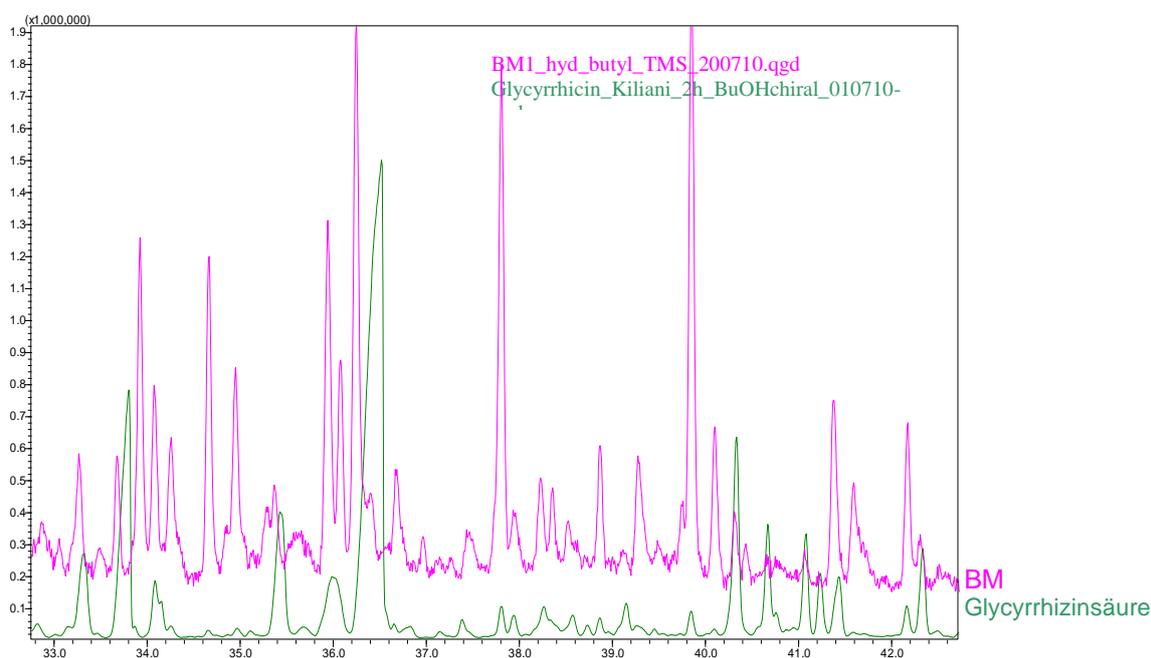


Abbildung 42: Gaschromatographische Analyse von BM und Glycyrrhizin nach Hydrolyse (siehe Kapitel 2.3.8, Seite 23) und Umsetzung mit chiralem Butanol (siehe Abbildung 10, Seite 25)

Die Peaks mit einer Retentionszeit von ca. 33,6 Minuten und ca. 36,2 Minuten konnten als Glucuronolacton identifiziert werden. Bei dem Peak bei ca. 40,2 Minuten handelt es sich um eine Glucuronsäure. Diese Peaks im Chromatogramm des Glycyrrhizins entsprachen jenen im Chromatogramm von BM, sowohl in den Retentionszeiten als auch in den Massen. Mit Hilfe dieses Vergleiches konnte die Glucuronsäure der Substanz BM der D-Reihe zugeordnet werden.

Mittels der angeführten Methoden gelang es, BM als Quercetin-3-O- β -D-glucuronid zu identifizieren.

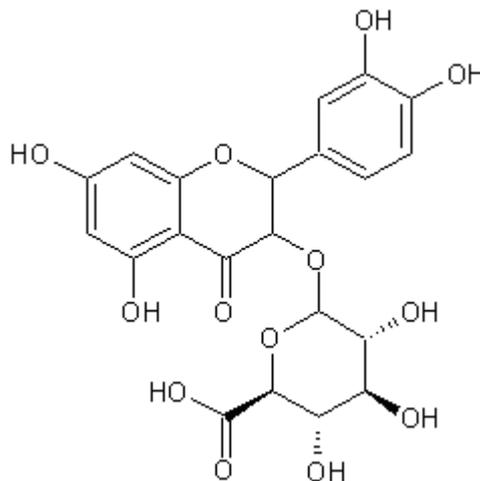


Abbildung 43: BM, Quercetin-3-O- β -D-glucuronid

4. Zusammenfassung

In vorliegender Diplomarbeit wurden drei sulfatierte und eine glucuronidierte Substanz aus wässrigen Extrakten von *Myricaria longifolia* isoliert.

Die Substanz BK1 wurde aus einer Fraktion, die aus einem wässrigen Extrakt der gesamten oberirdischen Teile stammte, gewonnen. Dafür wurden die Fraktion über SPE aufgetrennt und die daraus gewonnenen Fraktionen mittels präparativer DC aufgetrennt. Die gewonnene Substanz BK1 wurde mittels MS, UV/VIS-Spektroskopie und NMR-Spektroskopie analysiert. Mit den Ergebnissen der MS konnte das Aglykon der Substanz BK1 als sulfatiertes Rhamnetin identifiziert

werden. Auf Grund der Labilität der Verbindung konnte allerdings keine Aussage über die Position der Sulfatgruppe mittels NMR getroffen werden. In einer folgenden Arbeit soll die Substanz erneut isoliert werden, um die Sulfatbindungsstelle eindeutig bestimmen zu können.

Die Substanzen BK2, BK3 und BM wurden aus einer Fraktion eines Wasserextrakts, der ausschließlich aus Blättern hergestellt worden war, isoliert. Dafür kam die semipräparative HPLC zur Anwendung. Für die Identifizierung der Substanzen wurden MS, UV/VIS-Spektrometrie und NMR-Spektroskopie verwendet. Für die Substanz BK2 konnte mittels MS Isorhamnetin als Aglykon bestimmt werden, das sulfatiert vorlag. Es gelang nicht, mit Hilfe der NMR eine genaue Aussage über die Position der Substituierung zu treffen. Es wird vermutet, dass es sich bei der Bindungsstelle der Sulfatgruppe um die Position 3 handelt. Die Ergebnisse der MS der Substanz BK3 zeigten das Vorliegen eines sulfatierten Quercetins. Mittels NMR konnte die Position 3 als Sulfatbindungsstelle ermittelt werden. Nachdem mittels MS die Substanz BM als Quercetin, das als Glucuronid vorlag, identifiziert werden konnte, wurde neben einer NMR-Analyse eine Hydrolyse mit anschließender Umsetzung mit chiralem Butanol und GC-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse der NMR ließen darauf schließen, dass der Zucker an Position 3 mit dem Aglykon verknüpft war. Aufgrund der Resultate der GC konnte der Zucker der D-Reihe zugeordnet werden.

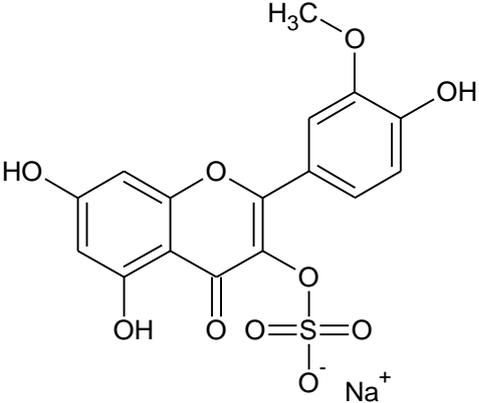
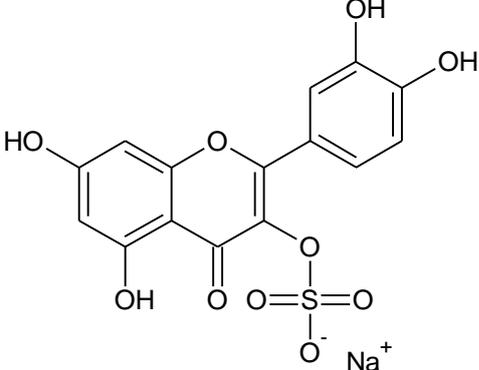
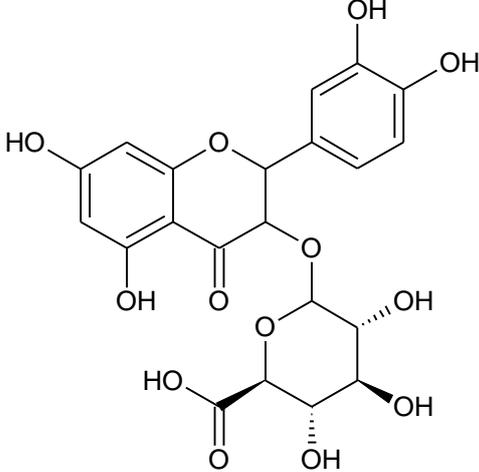
BK2	Isorhamnetin-3-sulfat	
BK3	Quercetin-3-sulfat	
BM	Quercetin-3-O-β-D-glucuronid	

Tabelle 22: Vorläufige Strukturformeln und Bezeichnungen der isolierten Substanzen BK2, BK3 und BM

5. Verzeichnisse

5.1. Literaturverzeichnis

- 1 Kletter Ch., Glasl S., Thalhammer T., Narantuya S.: Traditional Mongolian Medicine – Potential for Drug Discovery, *Sci Pharm* 2008, 76: 49-63
- 2 Mayer K.: Charakterisierung von Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden aus *Saussurea amara* DC. (Asteraceae), Diplomarbeit, Universität Wien 2006
- 3 Sigmund A.: Phytochemische Untersuchungen an einem Dichlormethanextrakt der mongolischen Arzneipflanze *Euphoriba pallasii* TRUCZ., Diplomarbeit, Universität Wien 2009
- 4 Holec N.: Studien an isolierten, perfundierten Rattenleber und an der humanen Tumorzelllinie MCF-7, Diplomarbeit, Universität Wien 2005
- 5 Wang Y., Liu Y., Liu S., Huang H.: Molecular phylogeny of *Myricaria* (Tamaricaceae) implications for taxonomy and conversation in China, *Botanical Studies* 2009, 50: 343-352
- 6 <http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume13/Tamaricaceae.pdf> verfügbar am 10 Juni 2010, 10:11
- 7 Donath O.: Charakterisierung von phenolischen Inhaltsstoffen der mongolischen Arzneipflanze *Myricaria Longifolia* EHRENB. Diplomarbeit, Universität Wien 2006
- 8 Ligaa U., Davaasuren B., Ninjiil N.: Medicinal Plants of Mongolia used in Western and Eastern Medicine, Ulaanbaatar 2006
Übersetzung aus dem Mongolischen von Sarantuya Jav
- 9 Li S., Dai S. J. Chen R. Y., Yu D.Q.: Triterpenoids from the stems of *Myricara paniculata*, *J Asian Nat Prod Res.* 2005, 7: 253-257
- 10 Li S., Chen R., Yu D. Chemical Constituents in *Myricaria paniculata*, *Zhongcaoyao* 2008, 39: 1459-1461
- 11 Zhou R., Wang T., Du X.Z.: Studies on chemical constituents in herb of *Myricaria bracteata*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2006, 31: 474-476
- 12 Li Z., Xue P., Xie H., Li X., Xie M.: Chemical constituents from *Myricaria alopecuoides*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2010, 35: 865-868
- 13 Mraz B., Beiträge zur phytochemischen Analyse der mongolischen Heilpflanze *Myricaria longifolia* EHRENB., Diplomarbeit, Universität Wien August 2010

- 14 Vogl C., Krencker D., Bresgen N., Eckl P. M., Glasl S., Kletter Ch.: In vitro toxicological properties of selected Mongolian traditional medicinal plants
Posterbeitrag anlässlich der Tagung "50 Years of the Phytochemical Society of Europe", Churchill College, Cambridge UK, 11.-14. April 2007,
Tagungsunterlagen
- 15 www.weltatlas.de
- 16 Badgaa A.: Bericht über die Arbeiten an *Euphorbia palasii* und *Myricaria longifolia*, Universität Wien 2007-2008
- 17 Adam K.P., Becker H: Analytik biogener Arzneistoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2000
- 18 Rücker G., Neugebauer M., Willems G.: Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2001
- 19 Markham K.R. Techniques of flavonoid identification, Academic Press London 1982
- 20 Marby T.J., Markham K.R., Thomas M. B.: The systematic Identification of flavonoids, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1970
- 21 Hesse M., Maier H. Zeeh B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme Verlag Stuttgart 2005
- 22 Hunnius: Pharmazeutisches Wörterbuch, 9. neu bearbeitete und erweiterte Auflage herausgegeben von Hermann P.T. Ammon, Walter der Gruyter Berlin New York 2004
- 23 Reznicek G., Susman O., Böhm K.: Bestimmung der Reihenzugehörigkeit von Monosacchariden aus pflanzlichen Glykosiden mittels GC-MS, Scientia Pharmaceutica 1993, 61: 35-45
- 24 Op de Beck P., Dijoux M., Cartier G., Mariotte A.: Quercitrin 3'-Sulphate from Leaves of *Leea guinensis*, Phytochemistry 1998, 47: 1171-1173
- 25 Barron D., Varin L., Ibrahim R. K., Harborne J. B., Williams Ch. A.: Sulfated Flavonoids – an update, Phytochemistry 1988, 27: 2375-2395
- 26 Kim B., Lee Y., Hur H., Lim Y. Ahn J.: Flavonoid 3'-O-methyltransferase from rice: cDNA cloning, characterization and functional expression, Phytochemistry 2006, 67: 387-394
- 27 Satake T., Kamiya K., An Y., Oishi T., Yamamoto J.: The Anti-thromboic active constituents from *Centella asiatica*, Biological and Pharmaceutical Bulletin 2007, 30: 935-940 (2007)

5.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Strukturformeln von Quercetin , Rhamnetin und Isorhamnetin	5
Tabelle 2: Säulenchromatographische Fraktionierung des OWE 48/04 an Sephadex LH 20 (rot markiert: verwendetet Fraktion S5) ¹⁶	8
Tabelle 3: Fraktionierung des BE 48/04 mittels SC an Sephadex LH20 (rot markiert: verwendete Fraktion IIIc) ¹³	9
Tabelle 4: Parameter der verwendeten DC-Systeme	12
Tabelle 5: Fraktionierung von Fraktion S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) mittels SPE an RP18	14
Tabelle 6: HPLC-Methode 1	16
Tabelle 7: Parameter der Gaschromatographie	17
Tabelle 8: Herstellung und Verwendung von Shift-Reagenzien ¹⁹	19
Tabelle 9: Parameter der MS	21
Tabelle 10: Kiliani-Reagens.....	24
Tabelle 11: Lösungsmittel für die Elution der mittels präparativer DC gewonnenen Substanz (siehe Abbildung 12, Seite 28) vom Kieselgel	28
Tabelle 12: Bezeichnung, Retentionszeit, Molekulargewicht und Ergebnisse des Datenbankvergleichs der Peaks nach LC-MS-Analyse (siehe Abbildung 22, Seite 38) der Fraktion IIIc (siehe Tabelle 3, Seite 9)	41
Tabelle 13: Methoden der HPLC-Optimierung für die semipräparative Trennung der Substanzen BK2, BK3 und BM	43
Tabelle 14: HPLC-Methode 4	44
Tabelle 15: Absorptionsmaxima bzw. -minima der Substanz BK1 in Methanol sowie nach Zugaben der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19) in einem Wellenlängenbereiche von 200-450nm	46
Tabelle 16: Absorptionsmaxima bzw. -minima der Substanz BK3 in MeOH nach Zugaben der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19) in einem Wellenlängenbereiche von 200-450nm	49
Tabelle 17: Zuordnung der 1H- und 13C-Signale der Substanz BK3 in DMSO-d ₆ im Vergleich zu Quercetin ²⁴ in DMSO-d ₆ (n.d. ... nicht detektierbar)	54
Tabelle 18: Absorptionsmaxima bzw. -minima der Substanz BK2 in Methanol sowie nach Zugaben der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19) in einem Wellenlängenbereiche von 200-450nm	56

Tabelle 19: Zuordnung der ¹ H- und ¹³ C-Signale der Substanz BK2 in DMSO-d ₆ im Vergleich zu Isorhamnetin ²⁶ in DMSO-d ₆ (n.d. ... nicht detektierbar)	61
Tabelle 20: Absorptionsmaxima bzw. -minima der Substanz BM in Methanol nach Zugaben der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19) in einem Wellenlängenbereiche zwischen 200-450nm.....	63
Tabelle 21: Zuordnung der ¹ H- und ¹³ C- Signale der Substanz BM in DMSO-d ₆ im Vergleich zu Quercetin-3-O-glucuronid ²⁷ in DMSO-d ₆ (n.d. ... nicht detektierbar)	68
Tabelle 22: Vorläufige Strukturformeln und Bezeichnungen der isolierten Substanzen BK2, BK3 und BM.....	72

5.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Myricaria longifolia</i> ¹	3
Abbildung 2: 2-Phenyl-benzopyran.....	4
Abbildung 3: Sammelgebiet von <i>Myricaria longifolia</i> 48/04 in der Mongolei ¹⁵ (rot markiert: Provinz Akrhangai)	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ausgangsmaterial und der daraus gewonnen Extrakte und Fraktionen sowie der im Zuge dieser Arbeit isolierten Substanzen.....	10
Abbildung 5: Vakuumkammer mit SPE-Kartuschen	13
Abbildung 6: SPE-Kartusche	13
Abbildung 7: Komplexbildung von Flavonoiden mit AlCl ₃ und HCl ¹⁹	19
Abbildung 8: Schematische Anordnung bei der IT-MS	20
Abbildung 9: Schematische Darstellung der NMR mit einer Probe (P) in einem Magnetfeld (B ₀) zwischen den beiden Polen (N,S) eines Magneteten	22
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Umsetzung mit chiralem Butanol	25
Abbildung 11: Auftrennung der Fraktionen S2-S11 des OWE 48/04 (siehe Tabelle 2, Seite 5) mittels DC-System 1 (siehe Tabelle 4, Seite 12) ¹³	27
Abbildung 12: Auftrennung der Fraktion S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) mittels DC System 2 (siehe Tabelle 4, Seite 12)	28
Abbildung 13: Analyse von E1-E3 (siehe Tabelle 11, Seite 28) sowie von S5 (siehe Tabelle 2, Seite 8) mittels DC-System 1 (siehe Tabelle 4, Seite 12)	29
Abbildung 14: Analyse von E2 (siehe Tabelle 11, Seite 28) mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16) detektiert bei 254nm und UV-Spektrum von BK1	30
Abbildung 15: MS ¹ -MS ³ -Spektren der Substanz BK1 nach Analyse mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16), und Datenbankvergleich mit Rhamnetin, MS-Parameter: Tabelle 9 (siehe Seite 21)	31

Abbildung 16: Vergleich der mittels SPE gewonnen Fraktionen I – IV (siehe Tabelle 5, Seite 14) und der Fraktion S5 (siehe Tabelle 2, Seite 5) mittels DC-System 1 (siehe Tabelle 4, Seite 12)	32
Abbildung 17: Analysen der SPE-Fraktionen I–VI (siehe Tabelle 5, Seite 14) mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16), Detektion: 254nm	33
Abbildung 18: Vergleich der Chromatogramme der durch präparativer DC gewonnen Substanz (siehe Abbildung 12, Seite 28) mit den nach SPE erhaltenen Fraktionen II und III (siehe Tabelle 5, Seite 14) mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16) Detektion: 254 nm	34
Abbildung 19: Analyse von BK1 mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16) Detektion: 350nm und ELSD	35
Abbildung 20: Säulenchromatographische Aufreinigung von BK1 an Sephadex LH-20 im Miniaturmaßstab	36
Abbildung 21: Vergleich der Fraktionen Ib, IIa, IIIb, IIIc, und IVa des BE (siehe Tabelle 3, Seite 9) mit dem BE (siehe Kapitel 2.2.1, Seite 8) mittels DC-System 1 (siehe Tabelle 4, Seite 5)	37
Abbildung 22: LC-MS-Analyse der Fraktion IIIc (siehe Tabelle 3, Seite 9) mittels HPLC-Methode 1 (siehe Tabelle 6, Seite 16)	38
Abbildung 23: MS ¹ -MS ³ -Spektrum der Substanz BK3 nach LC-MS-Analyse mittels HPLC Methode 1 (siehe Abbildung 22, Seite 38), MS-Parameter: Tabelle 9 (siehe Seite 21)	39
Abbildung 24: MS ¹ -MS ³ -Spektrum der Substanz BM nach LC-MS-Analyse mittels HPLC Methode 1 (siehe Abbildung 22, Seite 38), MS-Parameter: Tabelle 9 (siehe Seite 21)	40
Abbildung 25: MS ¹ -MS ³ -Spektrum der Substanz BK2 nach LC-MS-Analyse mittels HPLC Methode 1 (siehe Abbildung 22, Seite 38), MS-Parameter: Tabelle 9 (siehe Seite 21)	40
Abbildung 26: Auftrennung von Fraktion IIIc (siehe Tabelle 3, Seite 9) mittels Methode 4 (siehe Tabelle 14, Seite 44)	44
Abbildung 27: UV-Spektren der Substanz BK1 nach Zugabe der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19)	47
Abbildung 28: UV-Spektren der Substanz BK3 nach Zugabe der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19)	50

Abbildung 29: Fortsetzung Seite 52.....	51
Abbildung 30: Fortsetzung Seite 53.....	52
Abbildung 31: ¹ H-, COSY-, HSQC- und HMBC-Spektrum der Substanz BK3 in DMSO-d ₆	53
Abbildung 32: BK3, Quercetin-3-sulfat	55
Abbildung 33: UV-Spektren der Substanz BK2 nach Zugabe der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19).....	57
Abbildung 34: Fortsetzung Seite 59.....	58
Abbildung 35: Fortsetzung Seite 60.....	59
Abbildung 36: ¹ H-, COSY-, HSQC- und HMBC-NMR der Substanz BK2 in DMSO-d ₆	60
Abbildung 37: Strukturvorschlag für BK2, Isorhamnetin-3-sulfat	62
Abbildung 38: UV-Spektren der Substanz BM in Methanol nach Zugabe der Shiftreagenzien (siehe Tabelle 8, Seite 19).....	64
Abbildung 39: Fortsetzung Seite 66.....	65
Abbildung 40: Fortsetzung Seite 67.....	66
Abbildung 41: ¹ H-Spektrum, COSY, HSQC und HMBC der Substanz BM in DMSO-d ₆	67
Abbildung 42: Gaschromatographische Analyse von BM und Glycyrrhizin nach Hydrolyse (siehe Kapitel 2.3.8, Seite 23) und Umsetzung mit chiralem Butanol (siehe Abbildung 10, Seite 25)	69
Abbildung 43: BM, Quercetin-3-O-β-D-glucuronid.....	70

6. Lebenslauf

Name: Barbara Kubasa

Geburtsdatum: 2. März.1987

Geburtsort: Leoben



Staatsbürgerschaft: Österreich

Schulische Ausbildung:

1993 – 1997 Toni- Schruf-Volksschule Mürzzuschlag

1997 – 2005 BG/BRG Mürzzuschlag

Juni 2005 Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg

Seit Oktober 2005 Studium der Pharmazie in Wien

März – Juli 2010 Praktische Arbeiten für die Diplomarbeit
am Department für Pharmakognosie