



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*“

verfasst von

Verena Lewenhofer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

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

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Univ.- Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an ihrem Department.

Bei Frau ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn bedanke ich mich sehr herzlich für die immer freundliche und äußerst lehrreiche Betreuung während der gesamten Arbeit.

Weiters bedanke ich mich bei Frau Mag. Andrea Lubich und den anderen Mitarbeitern des Departments für Pharmakognosie für die Unterstützung und angenehme Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, Freunden und meinem Freund bedanken, dass sie mich während des Studiums und in allen Lebenslagen immer unterstützt haben und mir dieses Studium überhaupt möglich gemacht haben.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	2
2.1. Material	2
2.2. Methoden	3
2.2.1. Vorreinigung des methanolischen Extraktes.....	3
2.2.2. Dünnschichtchromatographie.....	3
2.2.3. Säulenchromatographie.....	5
2.2.4. High Performance Liquid Chromatography.....	6
2.2.5. Solid Phase Extraction.....	7
2.2.6. Massen-Spektrometrie.....	8
2.2.7. NMR-Spektroskopie.....	9
2.2.8. Lyophilisation.....	9
2.2.9. Trocknung mittels Zentrifugaltrockner.....	10
3. ERGEBNISSE	10
3.1. Versuch zur Vorreinigung des Extraktes	10
3.2. DC-Überprüfung der erhaltenen Fraktionen nach der Vorreinigung ..	12
3.3. Säulenchromatographie 1 (SC 1)	15
3.4. Säulenchromatographie 2 (SC 2)	18
3.5. Säulenchromatographie 3 (SC 3)	23
3.6. Solid Phase Extraction (SPE)	26
3.6.1. Untersuchungen einzelner Fraktionen der SPE mittels HPLC.....	28
3.6.1.1. Fraktion 2.....	28
3.6.1.2. Fraktion 4.....	29
3.6.1.3. Niederschlag der Fraktionen 14 und 15.....	30
3.6.1.4. Fraktion 18.....	31
3.7. Vergleiche mit verschiedenen Referenzsubstanzen	32
3.7.1. Dünnschichtchromatographische Vergleiche.....	32
3.7.1.1. DC-Vergleiche mit der Ethylacetatfraktion.....	33
3.7.1.2. DC-Vergleiche mit Fraktionen von SC 1 und SC 2.....	35
3.7.2. HPLC-Vergleiche.....	45
3.8. Strukturaufklärung von isolierten Verbindungen	48
3.8.1. Strukturaufklärung von Substanz VL1 (= Homoplantagin).....	48
3.8.2. Strukturaufklärung von VL2 (= 2''-O-Acetyl-homoplantagin).....	51
3.8.3. Strukturaufklärung von VL3.....	53
3.8.4. Strukturaufklärung von VL4.....	53

3.9. Circular Chemorepellent Induced Defects-Assay (CCID-Assay)	55
4. DISKUSSION.....	56
5. ZUSAMMENFASSUNG	58
6. SUMMARY.....	59
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	60
8. TABELLENVERZEICHNIS.....	62
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	63

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz
DAD	Diode Array Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
EtOAc	Ethylacetat
Fr	Fraktion
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography- Massenspektrometrie
MeOH	Methanol
NL	Nachlauf
Ns	Niederschlag
NST A	Naturstoffreagenz A
PEG	Polyethylenglykol
SC	Säulenchromatographie
SF	Sammelfraktion
SPE	Solid Phase Extraction
Üs	Überstand

1. Einleitung und Problemstellung

Scrophularia lucida (L.) gehört zur Familie der Scrophulariaceae und ist vor allem im Mittelmeerraum, unter anderem in Italien, Frankreich, der Türkei und Griechenland beheimatet [1, 2, 3].

Abbildung 1: *Scrophularia lucida* (L.)¹



Es sind um die 300 verschiedenen Arten der Gattung *Scrophularia* bekannt [1, 4]. Zusammen mit anderen *Scrophularia*-Arten kommt *Scrophularia lucida* in der türkischen Volksmedizin zur Behandlung von Entzündungsprozessen und Hauterkrankungen zur Anwendung [1, 4].

Für Vertreter der Gattung *Scrophularia* wurden antiinflammatorische und antibakterielle Wirkungen nachgewiesen [4, 5].

¹ Quelle: <http://flora.nhm-wien.ac.at/Seiten-Arten/Scrophularia-lucida.htm> (letzter Zugriff 09.02.2014)

In einer vorausgegangenen Studie wurden fünf verschiedene *Scrophularia*-Arten mit Hilfe des CCID-Assays (circular chemorepellent induced defects assay), auf ihre Wirkung auf metastasierende Brustkrebszellen untersucht. Eine gap-Bildung in Zellschichten aus Lymphendothelzellen ist der ausschlaggebende Schritt, dass Krebszellen in das umliegende Gewebe einwandern können und Metastasen bilden. MCF-7-Brustkrebszellen wurden mit den verschiedenen Extrakten behandelt und anschließend die Größe der gaps in der Lymphendothelzellkultur vermessen. Dabei zeigte das methanolische Extrakt von *Scrophularia lucida* die höchste Aktivität zur Verhinderung der gap-Bildung [5].

Aufgrund dieser Erkenntnis sollten die wirksamen Inhaltsstoffe von *Scrophularia lucida* im Zuge dieser und einer weiteren Diplomarbeit isoliert werden [6].

Außerdem ist über die Inhaltsstoffe von *Scrophularia lucida* bisher nichts bekannt. Da die Gattung *Scrophularia* um 300 verschiedene, nicht immer deutlich voneinander unterscheidbare Arten umfasst, könnte eine Untersuchung der Inhaltsstoffe eventuell zur chemotaxonomischen Unterscheidung der einzelnen Arten beitragen.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit, vor allem die phenolischen Inhaltsstoffe aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Es standen 158 g methanolisches Extrakt von *Scrophularia lucida* L. (Scrophulariaceae), das aus 2700 g getrocknetem Kraut hergestellt worden war, zur Verfügung. Das Material stammte aus der Türkei².

² Mein Dank gilt Herrn Dr. A. Özmen für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

2.2. Methoden

2.2.1. Vorreinigung des methanolischen Extraktes

Störende Gerbstoffe, Fette und Wachse sollten vor der Aufarbeitung des Extraktes abgetrennt werden. Die Vorreinigung wurde weitestgehend nach der Methode von Wall et al. [7] durchgeführt.

Um einen Überblick über die möglichen Ausbeuten zu erhalten, wurde ein Vorversuch mit einer kleinen Menge Extrakt durchgeführt.

Hierzu wurden 10 g des Extraktes in 120 ml einer Mischung aus Methanol und Wasser (10:1) am Ultraschallbad gelöst und anschließend mit verschiedenen polaren Lösungsmitteln ausgeschüttelt, um einerseits die störenden Gerbstoffe abzutrennen und andererseits möglichst viele verschiedene Inhaltsstoffe des Extraktes herauszulösen.

Im Anschluss wurde im Zuge einer weiteren Diplomarbeit die Vorreinigung mit weiteren 140 g des methanolischen Extraktes durchgeführt [6].

2.2.2. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde zur Überprüfung einzelner Fraktionen und für Vergleiche mit verschiedenen Referenzsubstanzen angewendet. Es wurden DCs in unterschiedlichen Systemen angefertigt:

Stationäre Phase: Kieselgelfertigplatten 60 F₂₅₄ der Firma Merck

Mobile Phasen:

1. Ethylacetat-Ameisensäure_{conc.}-Essigsäure_{conc.}-H₂O (100+11+11+20)
2. Chloroform-Methanol-H₂O (90+3,5+0,2)
3. Cyclohexan-Dichlormethan-Ameisensäure_{conc.}-Ethylformiat (35+30+5+30)
4. Ethylacetat-Ameisensäure_{conc.}-Essigsäure_{conc.}-Ethylmethylketon-H₂O (50+7+3+30+10)
5. Chloroform-Essigsäure_{conc.}-Methanol-H₂O (60+32+12+18)

6. n-Butanol-Essigsäure_{conc.}-Ether-H₂O (9+6+3+1)

7. Dichlormethan-Methanol-Essigsäure_{conc.}-H₂O (20+6+10+4)

Detektion:

Bei den DC-Systemen 1-5 wurde mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz oder mit Naturstoffreagenz A/Polyethylenglycol detektiert:

- Naturstoffreagenz A/PEG (NST A/PEG):

Zur Detektion wird die DC-Platte zuerst mit einer 1%igen methanolischen Lösung von Naturstoffreagenz A und nach kurzem Zwischentrocknen mit einer 5%igen ethanolischen Lösung von Polyethylenglykol (PEG) 400 besprüht. Anschließend werden die DC-Platten unter UV-Licht bei 366 nm ausgewertet [8].

- Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (AAS):

Nach dem Besprühen mit AAS-Reagenz (0,5 ml Anisaldehyd, 10 ml Essigsäure_{conc.}, 85 ml Methanol und 5 ml Schwefelsäure_{conc.}) wird die DC-Platte für einige Minuten bei 105° C im Trockenschrank erhitzt und dann bei Tageslicht betrachtet [8].

Für die Zuckeranalytik wurden 2 verschiedene DC-Systeme verwendet:

- Beim DC-System 6 wurde mit einer 0,2%igen Lösung von Naphtoresorcin in Butanol, das 10% Phosphorsäure enthält, detektiert. Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht.
- Für das DC-System 7 wurde zur Detektion eine Mischung von Diphenylamin-Anilin-Aceton-Phosphorsäure_{conc.} (0,5+0,5+20+4) verwendet und anschließend bei Tageslicht ausgewertet.

2.2.3. Säulenchromatographie

Zur Grobfractionierung des Ethylacetatextraktes und zur Auftrennung zweier Fraktionen wurde die Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 angewendet, da diese stationäre Phase zur Trennung phenolischer Verbindungen besonders gut geeignet ist.

Abbildung 2: Säulenchromatographie



Stationäre Phase: Sephadex[®] LH-20 (Sigma)

Mobile Phase: Methanol/H₂O-Gemische

Durchmesser: 3 cm

Füllhöhe: 60 cm

Die jeweils verwendeten mobilen Phasen und aufgetragenen Substanzmengen sind in den einzelnen Kapiteln näher angeführt.

2.2.4. High Performance Liquid Chromatography

Die HPLC wurde verwendet, um die Reinheit isolierter Substanzen zu bestimmen, und um geeignete Fließmittelgradienten zur optimalen Auftrennung der Fraktionen für LC-MS-Untersuchungen zu ermitteln.

Die Messungen erfolgten mit einem HPLC-Gerät der Firma Shimadzu (s.Tab.1).

Tabelle 1: HPLC Parameter

Gerät		Einstellungen	
Pumpe:	LC-20AD	Injektionsvolumen:	10 µl
Detektor:	Diode Array Detektor SPD-M20A	Temperatur:	25°C
Säulenofen:	CTO-20AC	Konzentration der Analyselösungen:	1 mg/ml
Autosampler:	SIL-20AC HT	Flussrate:	1 ml/min
Säule:	Luna 5µ C18 100A 250x 4,6 mm, Phenomenex, USA	Detektion	350 nm 254 nm

Es wurde mit unterschiedlichen Gradienten gearbeitet.

Vor den HPLC-Messungen wurde jeweils für 10 min mit 95% Eluent B gespült und 20 min mit der Anfangskonzentration equilibriert.

Methode 1 [9]:

Fließmittel:

A: Aqua_{dest} mit Ameisensäure auf pH 3 angesäuert

B: Acetonitril/Aqua_{dest} pH 3 (80+20)

Gradient:

Konzentration	Zeit
5% B isokratisch	5 min
5%→ 20% B	10 min
20% B isokratisch	25 min
20%→ 26% B	20 min

Methode 2:

Fließmittel:

A: Aqua_{dest} mit Ameisensäure auf pH 3 angesäuert

B: Acetonitril/Aqua_{dest} pH 3 (80+20)

Gradient:

Konzentration	Zeit
5% → 95% B	60 min

Methode 3:

Fließmittel:

A: Aqua_{dest} mit Ameisensäure auf pH 3 angesäuert

B: Acetonitril/Aqua_{dest} pH 3 (80+20)

Gradient:

Konzentration	Zeit
5% → 20% B	15 min
20% B isokratisch	10 min
20% → 50% B	40 min
50% → 95% B	15 min

2.2.5. Solid Phase Extraction

Die SPE wurde zur Auftrennung von Fraktion 22/SC 2 verwendet, um die Flavonoide bei R_f 0,53-0,57 und bei R_f 0,71-0,77 getrennt voneinander darzustellen.

Als stationäre Phase wurde eine Megabond Elut[®] C18 Kartusche mit 12 ml Fassungsvermögen verwendet (s. Abb. 3, S. 8). Die Elutionsmittel waren verschiedene Methanol/H₂O- Gemische.

Abbildung 3: SPE-Apparatur



Vor der Elution musste die SPE-Kartusche konditioniert werden. Dies erfolgte durch sorgfältiges Waschen der Kartusche mit Methanol, Wasser und dem ersten Elutionsmittel, welche durch Anlegen von Vakuum durch die Kartusche gesaugt wurden. Anschließend wurde die gelöste Fraktion aufgetragen, und nachdem die Kartusche mit Luft trocken gesaugt worden war, beginnend mit dem ersten Lösungsmittel eluiert.

Jede Fraktion wurde mittels DC überprüft. Die MeOH-Konzentration des Elutionsmittels wurde in Abhängigkeit vom Verlauf der Elution schrittweise gesteigert.

2.2.6. Massen-Spektrometrie³

Zur Bestimmung der molekularen Massen isolierter Verbindungen wurde die LC-MS verwendet.

Die LC-MS-Analysen wurden auf einem Ultimate 3000 RSLC-Series System (Dionex), gekoppelt an ein 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT; Bruker Daltonics), durchgeführt. Das Eluat wurde ca. im Verhältnis 1:4 vor der ESI-Quelle gesplittet. Die ESI-Quelle wurde mit folgenden Parametern betrieben:

Kapillarspannung: -3,7/+3,5 kV, Vernebelungsgas: 26 psi (N₂), Trockengasfluss: 9 L/min (N₂), und Trockengastemperatur: 340°C.

³ Für die Durchführung der LC-MS-Messungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Martin Zehl, Institut für Pharmakognosie, Universität Wien.

Gemessen wurden Mehrstufenmassenspektren bis zu MS^4 im Positiv- und Negativ-Ionenmodus, die in einem data-dependent acquisition (DDA) Modus generiert wurden mit einem Isolationsfenster von 4 Th und einer Fragmentierungsamplitude von 1,0 V, wobei Helium als Kollisionsgas verwendet wurde.

2.2.7. NMR-Spektroskopie⁴

Zur Strukturaufklärung der isolierten Substanzen wurden NMR-Analysen an einem Bruker Avance DRX 600 NMR-Spektrometer mit einem 5 mm QNP Probenkopf (1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P) mit z-Gradientenspule und automatischer Tuning und Matching-Einheit durchgeführt.

Messfrequenzen: 1H -NMR: 600,13 MHz; ^{13}C -NMR: 150,92 MHz

Messtemperatur: 298,1 K

Lösungsmittel: DMSO

2.2.8. Lyophilisation

Mithilfe der Gefriertrocknung konnten die hohen Wasseranteile einiger Fraktionen schonend entfernt werden.

Gerät: Va CO 5-II Zirbus technology

Parameter: ca. $-80^{\circ}C$ bei rund 0,035 mbar

Abbildung 4: Gefriertrocknung



⁴ Für die Durchführung der NMR-Experimente bedanke ich mich bei Herrn Ass. Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für organische Chemie, Universität Wien.

2.2.9. Trocknung mittels Zentrifugaltrockner

Bei kleineren Mengen an Methanol-Wasser Gemischen wurde ein Gene Vac[®] Zentrifugaltrockner zur schnellen Trocknung eingesetzt.

Gerät: Gene Vac[®] EZ-2-Series Personal Evaporator

Temperatur: 40°C

Programm: Low BP Mixture/ HPLC-Programm

3. Ergebnisse

3.1. Versuch zur Vorreinigung des Extraktes

In einem Vorversuch wurden 10 g des methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* durch Verteilung vorgereinigt (s.Abb.5, S.11).

Zuerst wurden 10 g Extrakt in wässrig-methanolischer Lösung 3mal mit je 120 ml Petrolether ausgeschüttelt, um Wachse, Fette und Chlorophyll abzutrennen. Nach dem Ausschütteln wurde zur besseren Phasentrennung abzentrifugiert. Die vereinigten Petroletherphasen wurden mit dem Rotavapor zur Trockene gebracht.

Die Methanol/Wasser Phase wurde mit 120 ml Wasser verdünnt und anschließend dreimal mit je 240 ml Chloroform ausgeschüttelt.

Nach dem Vereinigen der Chloroformfraktionen wurde die Chloroformphase einmal mit 720 ml einer 1%igen NaCl-Lösung gewaschen und zur Trennung der Ober- von der Unterphase zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde über Natriumsulfat filtriert, um Wasserreste zu entfernen und am Rotavapor zur Trockene gebracht. Die Methanol/Wasserphase wurde am Gene-Vac[®] eingedampft. Die Ausbeute der Chloroformphase betrug 0,722 g und die Methanol/Wasserphase ergab 8,8 g Trockengewicht.

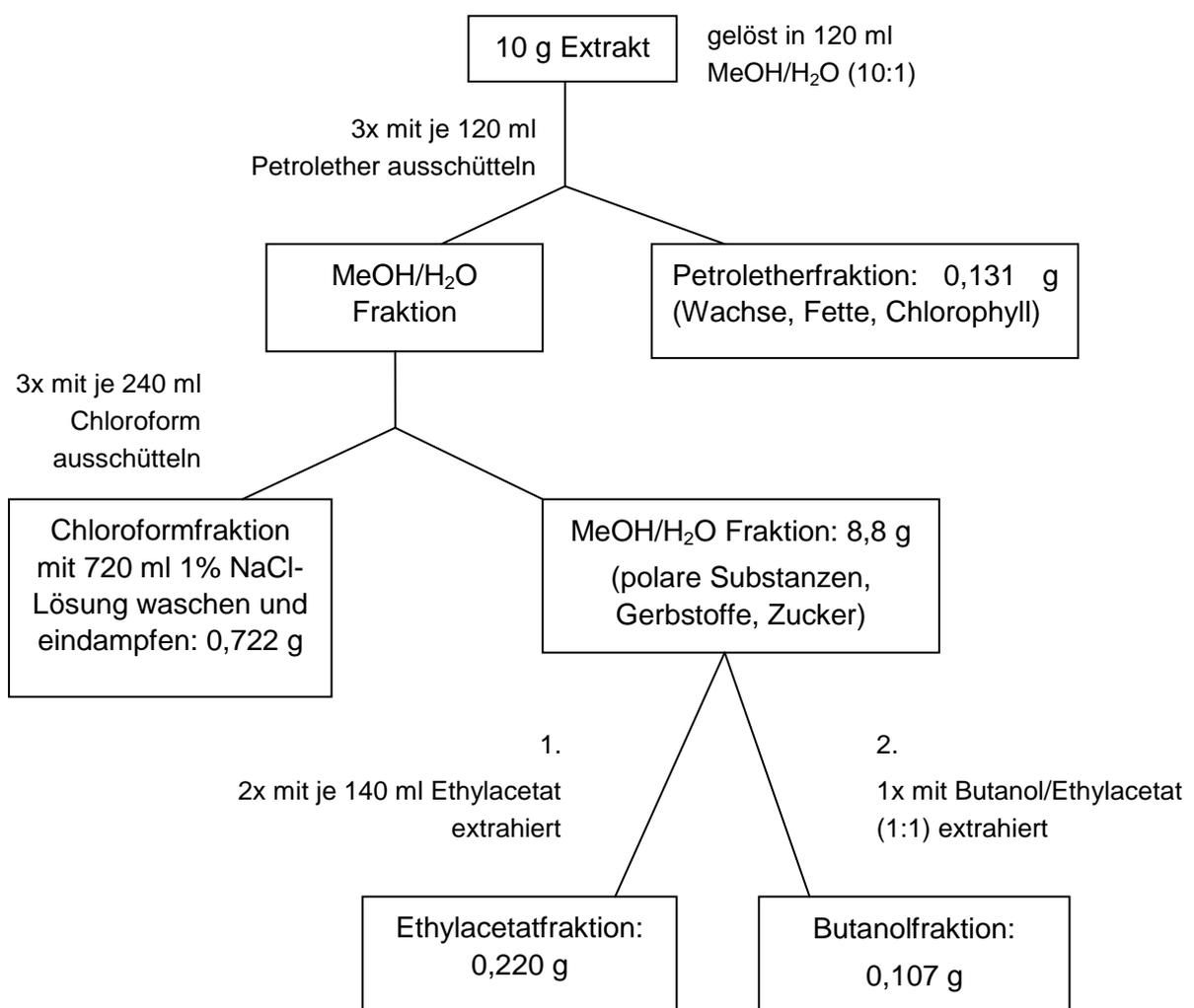
In der Methanol/Wasser-Fraktion befanden sich unter anderem Gerbstoffe, aber auch phenolische Inhaltsstoffe wie Flavonoide. Um mögliche Wirksubstanzen von den Gerbstoffen und anderen polaren Ballaststoffen zu trennen, wurde mit weiteren Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität extrahiert.

Zunächst wurde die Methanol/Wasser-Fraktion in 140 ml Ethylacetat aufgenommen und am Ultraschallbad extrahiert. Dieser Extraktionsschritt wurde einmal wiederholt.

Die beiden Ethylacetatextrakte wurden zur Trockene gebracht und nach der dünnschichtchromatographischen Überprüfung vereinigt (s.Abb.6, S.13).

Die verbliebene Methanol/Wasser-Fraktion wurde mit 100 ml einer Mischung aus Butanol und Ethylacetat im Verhältnis 1:1 extrahiert und ebenfalls mittels DC kontrolliert (s.Abb.6, S.13).

Abbildung 5: Extraktionsschema



Folgende Extraktmengen gingen aus der Vorfraktionierung hervor:

Tabelle 2:Extraktmengen der Vorfraktionierung

Fraktionen	Ausbeute
MeOH/H ₂ O	8,800 g
Chloroform	0,722 g
Ethylacetat	0,230 g
Petrolether	0,130 g
Butanol/Ethylacetat	0,107 g

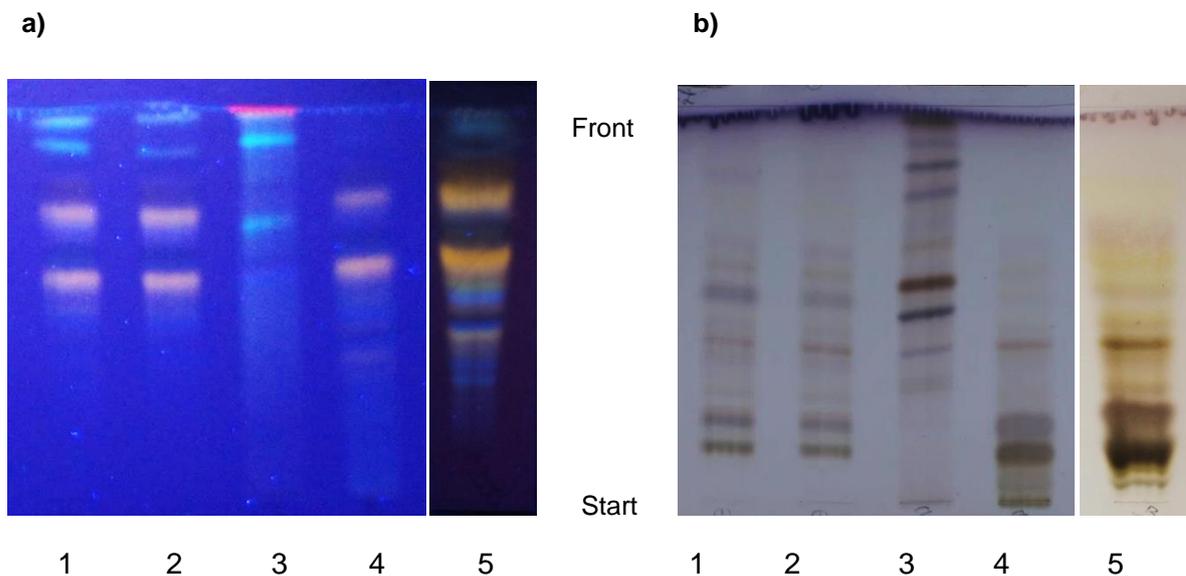
Da die Vorreinigung der kleinen Extraktmenge zufriedenstellende Ergebnisse und eine Anreicherung der phenolischen Komponenten in Ethylacetatextrakt 1 lieferte, wurde sie mit weiteren 140 g des methanolischen Extraktes, im Rahmen einer anderen Diplomarbeit [6] auf ähnliche Weise durchgeführt.

Daraus gingen 12,14 g Ethylacetatextrakt (Ethylacetatextrakt 2) hervor, welche im Zuge der vorliegenden Diplomarbeit näher untersucht wurden.

3.2. DC-Überprüfung der erhaltenen Fraktionen nach der Vorreinigung

Die bei der Vorfraktionierung erhaltenen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch überprüft (s.Abb.6, S.13).

Abbildung 6: DC der Fraktionen nach der Vorfraktionierung
Detektion a): Naturstofffragenz A/PEG; **b):** AAS DC-System 1 (s.S.3)



Bahn	Substanz
1	Ethylacetat-Fraktion 1
2	Ethylacetat-Fraktion 2
3	Chloroform-Fraktion
4	Methanol/H ₂ O-Fraktion
5	Ethylacetat/Butanol-Fraktion

Da die beiden Ethylacetatfraktionen auf der DC das gleiche Muster an phenolischen Inhaltsstoffen zeigten, konnten sie vereinigt werden. In der Chloroformfraktion waren außer terpenoiden Substanzen (s.Abb.6b), auch Reste von Chlorophyll enthalten, was an der rot fluoreszierenden Bande an der Front erkennbar war. Zusätzlich deuteten die blau fluoreszierenden Banden auf das Vorliegen von Phenolcarbonsäuren hin (s.Abb.6a). Die Methanol/H₂O-Fraktion und die EtOAc-Butanol-Fraktion enthielten vorwiegend Zucker und andere polare Substanzen.

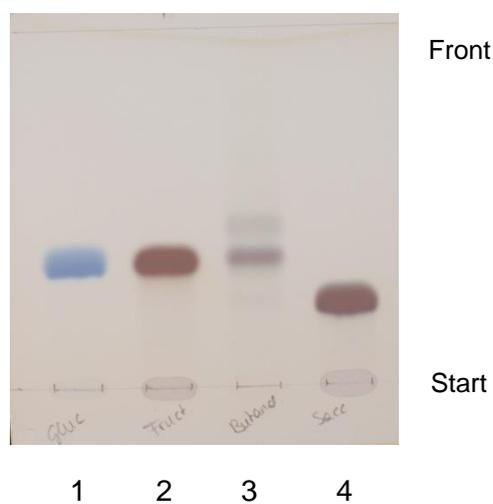
Die Petroletherfraktion wurde in einem apolareren DC-System überprüft.

Da diese Fraktion hauptsächlich Wachse und Fette enthielt, wurde sie nicht weiter untersucht.

Da die braunen Banden im unteren Bereich der Methanol/Wasser- und der Ethylacetat/Butanol-Fractionen auf das Vorliegen von Zuckern hindeuteten (s.Abb.6b, S.13), wurde ein DC-Vergleich mit Saccharose, Glucose und Fructose als Referenzsubstanzen durchgeführt (s.Abb.7).

Abbildung 7: DC-Vergleich der Ethylacetat/Butanol-Fraktion mit Zuckern

Detektion: 0,2%ige Naphtoresorcin-Lösung in Butanol, das 10% Phosphorsäure enthält
DC-System 6 (s.S.4)

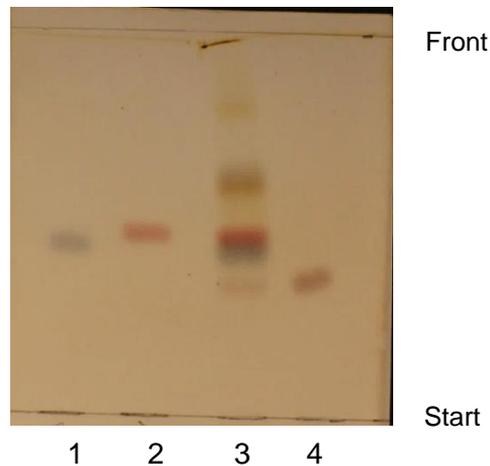


Bahn	Substanz
1	Glucose
2	Fructose
3	Ethylacetat/Butanol-Fraktion
4	Saccharose

Aufgrund dieser DC wurde vermutet, dass die untersuchten Zucker in der Ethylacetat/Butanol-Fraktion vorhanden waren. Zur Bestätigung wurde eine DC in einem weiteren System durchgeführt (s.Abb.8, S.15).

Abbildung 8: DC-Vergleich mit Zuckern

Detektion: Diphenylamin-Anilin-Aceton-Phosphorsäure_{conc.} (0,5+0,5+20+4)
DC-System 7 (s.S.4)



Bahn	Substanz
1	Glucose
2	Fructose
3	Ethylacetat/Butanol-Fraktion
4	Saccharose

Mit dieser DC konnte bestätigt werden, dass die Zucker Glucose, Fructose und Saccharose in der Ethylacetat/Butanol-Fraktion enthalten waren.

3.3. Säulenchromatographie 1 (SC 1)

Zur Grobfractionierung wurden 10 g der Ethylacetatfraktion in 50%igem MeOH gelöst, auf eine Sephadex[®] LH-20 Säule aufgebracht und mit Wasser-Methanol-Gemischen eluiert.

Säulendurchmesser: 3 cm

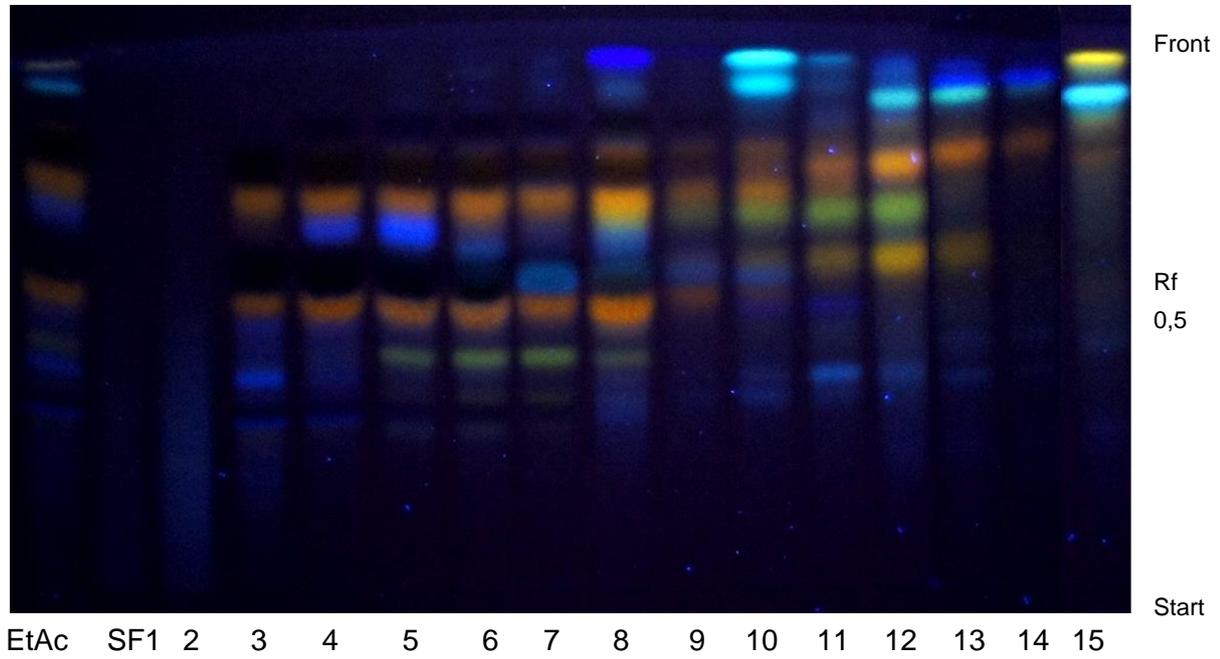
Füllhöhe: 60 cm

Insgesamt wurden 170 Fraktionen zu je 6ml/30 Minuten gesammelt.

Jede 5. Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch im DC-System 1 überprüft und Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung zu 15 Sammelfractionen vereinigt.

Abbildung 9: DC der Sammelfractionen von SC 1
Detektion: **a:** Natustoffreagenz A/PEG **b:** AAS DC-System 1 (s.S.3)

a)



b)

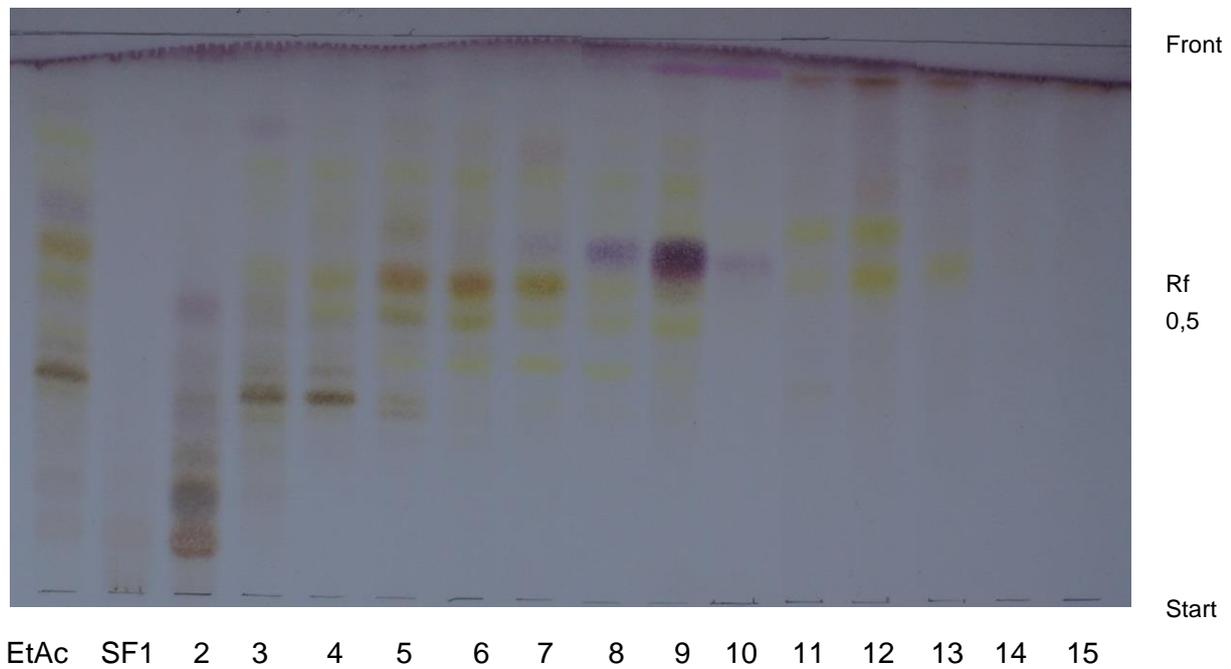


Tabelle 3: Sammelfractionen der SC 1

Sammelfraktion	Fraktionen	Ausbeute	Mobile Phase
1	1-22	78,8 mg	50% MeOH
2	23-31	609,5 mg	
3	32-38	2606,7 mg	
4	39-46	1635,6 mg	
5	47-61	1107,4 mg	
6	62-73	160,0 mg	
7	74-85	590,1 mg	
8	86-102	389,2 mg	
9	103-122	370,1 mg	
10	123-132	108,5 mg	
11	133-142	61,2 mg	
12	143-147	17,2 mg	
13	148-153	12,8 mg	
14	154-170	7,6 mg	
15	Nachlauf	72,1 mg	60% MeOH

Die DCs der Sammelfractionen (s.Abb.9a, S.16) zeigten beim Betrachten unter UV₃₆₆ komplexe Muster an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen.

Da vor allem in den Fraktionen 3-8 die dunkelbraunen und gelb fluoreszierenden Banden bei Rf 0,57-0,80 als Hauptinhaltsstoffe detektiert wurden, wurden diese zur Isolierung der Flavonoide herangezogen.

In den Fraktionen 10-15 wurden blau fluoreszierende Banden an der Front detektiert, welche auf Phenolcarbonsäuren hinwiesen und daher mit einigen solcher Verbindungen verglichen wurden.

Da die einzelnen Fraktionen noch zahlreiche Komponenten aufwiesen, wurden die Fraktionen 5 und 7 mittels Säulenchromatographie weiter aufgetrennt.

3.4. Säulenchromatographie 2 (SC 2)

Mit Fraktion 5 von SC 1 wurde eine weitere Säulenchromatographie durchgeführt. Diese Fraktion wurde ausgewählt, da sie die meisten Hauptkomponenten enthielt und eine ausreichende Menge vorhanden war.

1 g der Fraktion wurde in 25%igem MeOH gelöst und anschließend auf die Säule aufgebracht.

Die verwendeten Säulenparameter waren dieselben wie bei der SC 1.

Stationäre Phase: Sephadex[®] LH20

Füllhöhe: 60 cm

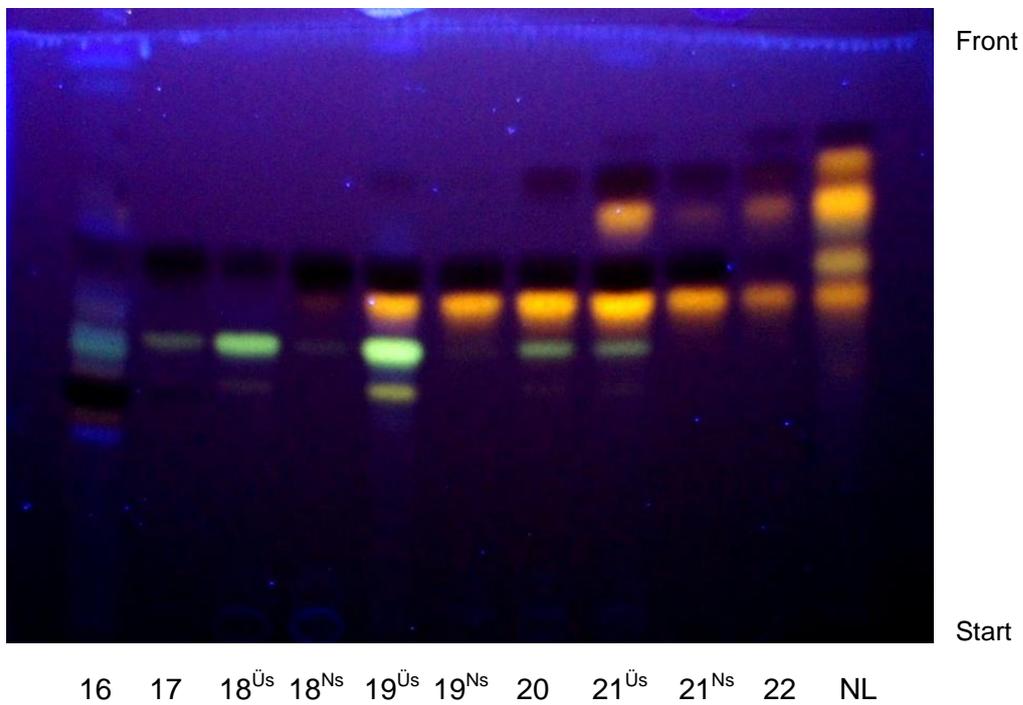
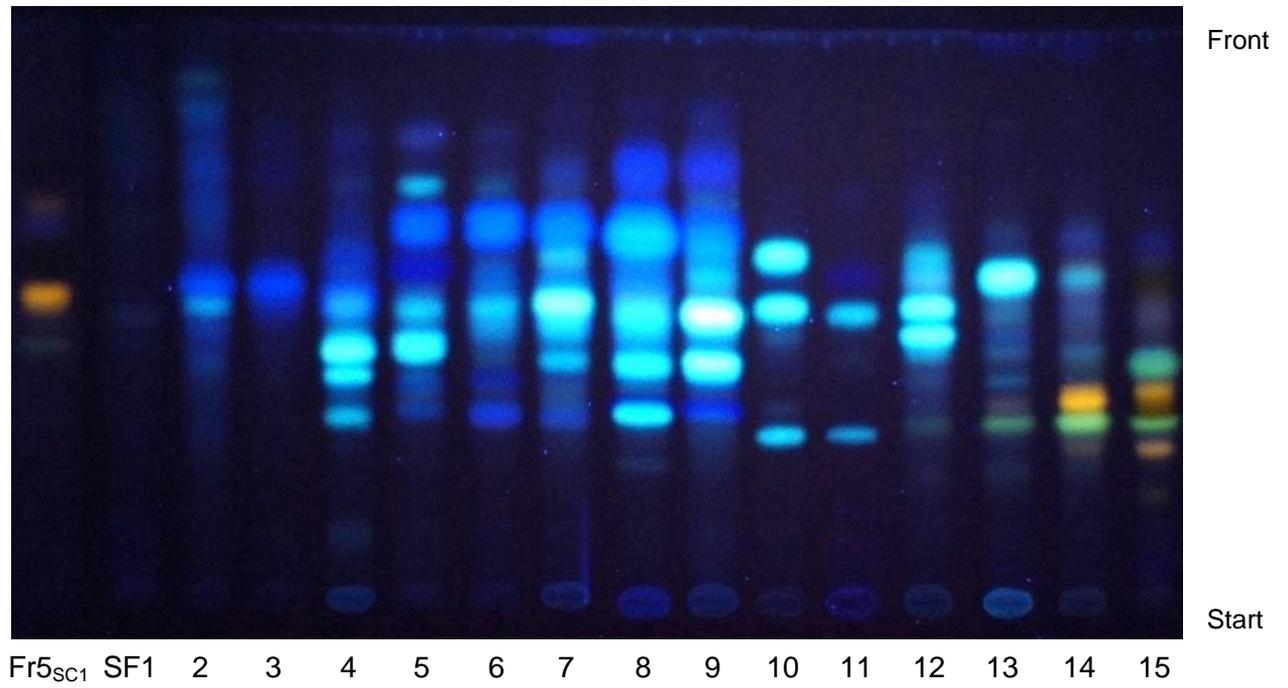
Säulendurchmesser: 3 cm

Als mobile Phase wurden Methanol-Wasser-Gemische verwendet.

Bis Fraktion 107 wurde jede 5., dann jede 10. Fraktion mittels DC im System 1 überprüft. Insgesamt wurden 820 Fraktionen gesammelt, die anhand der DC-Überprüfungen zu 22 Sammelfractionen vereinigt wurden.

Bei einigen Fraktionen fiel ein hellgelber Niederschlag aus, der abzentrifugiert wurde.

Abbildung 10: DC der Sammelfractionen der SC 2
Detektion: Naturstoffreagenz A/PEG DC-System 1 (s.S.3)



Üs= Überstand
 Ns= Niederschlag

Tabelle 4: Sammelfractionen der SC 2

Sammelfraktion	Fraktionen	Ausbeute	mobile Phase
1	1-150	17,2 mg	1-60 25 % MeOH
2	151-190	31,9 mg	61-790 30% MeOH
3	191-203	7,3 mg	
4	204-213	15,7 mg	
5	214-223	33,3 mg	
6	224-233	23,9 mg	
7	234-243	20,0 mg	
8	244-262	74,2 mg	
9	263-283	40,0 mg	
10	284-293	27,8 mg	
11	294-323	42,2 mg	
12	324-343	10,9 mg	
13	344-353	5,7 mg	
14	354-370	9,8 mg	
15	371-387	8,9 mg	
16	398-403	14,4 mg	
17	404-437	69,2 mg	
18 Üs	438-445 Üs	6,1 mg	
18 Ns	438-463 Ns	46,5 mg	
19 Üs	446-483 Üs	15,8 mg	
19 Ns	464-483 Ns	18,5 mg	
20	484-523	79,9 mg	
21 Üs	524-613	103,6 mg	
21 Ns	524-613 Ns	20,1 mg	
22	614-798	140,0 mg	790-798 40 % MeOH
	Nachlauf	40,8 mg	50 % MeOH

In den Fraktionen 1 bis 13 zeigten sich nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz A/PEG unter UV₃₆₆ zahlreiche blau fluoreszierende Banden (s.Abb.10, S.19), bei welchen es sich aufgrund ihrer Fluoreszenzfärbung vermutlich um Phenol-carbonsäuren handelte.

Jedoch waren die Mengen dieser Fraktionen zu gering, um Einzelkomponenten isolieren zu können.

Ab Fraktion 18 waren hauptsächlich die gelb fluoreszierenden und schwarzbraunen Banden bei Rf 0,53-0,82 erkennbar, wobei es sich aufgrund der Fluoreszenz wahrscheinlich um Flavonoide handelte. Obwohl die Flavonoide nur angetrennt wurden, erfolgte mit der SC 2 eine sehr gute Abtrennung der Phenolcarbonsäuren.

Aus der DC konnte man schließen, dass in dem Niederschlag aus Fraktion 18 die schwarzbraune Bande bei Rf 0,57 die Hauptkomponente war (s.Abb.10, S.19). Zur Bestätigung erfolgte eine HPLC-Analyse (s.Abb.11, S.22).

Die gelb fluoreszierende Substanz bei Rf 0,53, die ab Fraktion 18 eluiert wurde, konnte nicht rein dargestellt werden.

Da in Fraktion 22 auf der DC nur die vier gelb fluoreszierenden bzw. braunschwarzen Banden zu sehen waren, wurde diese Fraktion mittels SPE weiter fraktioniert, um die einzelnen Verbindungen voneinander zu trennen.

Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 18 Ns/SC 2
HPLC-Methode 2 (s.S.7)

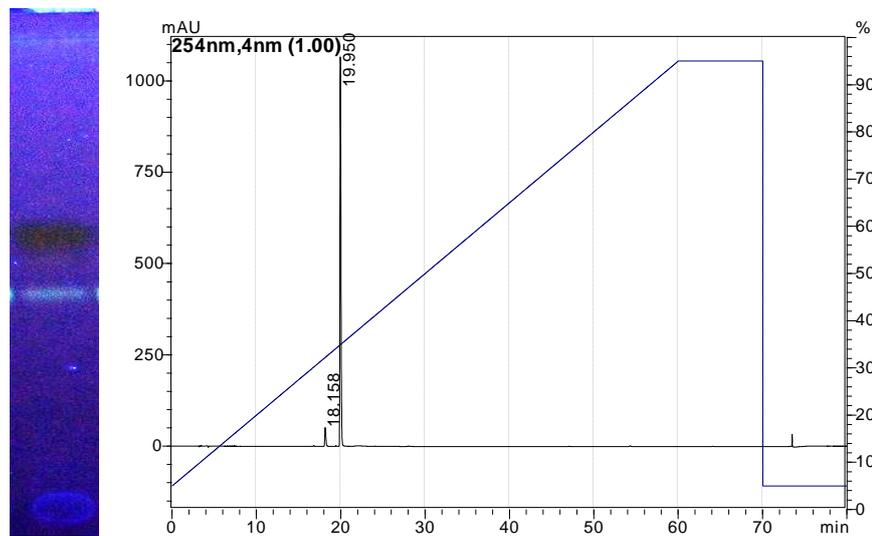


Abbildung 12: UV-Spektrum bei 19,95min

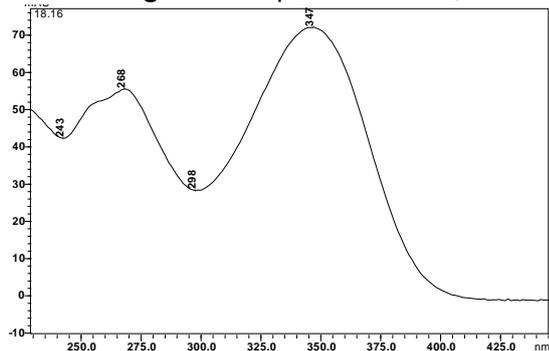
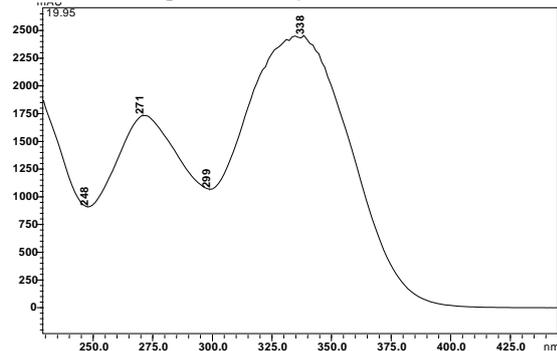


Abbildung 13: UV-Spektrum bei 18,16min



Mit der HPLC konnte gezeigt werden, dass der Niederschlag eine überwiegende Hauptkomponente bei der Retentionszeit von 19,95 min enthielt, wobei es sich um die braunschwarze Bande bei Rf 0,57 handelte.

Bei einer Retentionszeit von 18,16 min war noch eine Nebenkomponekte erkennbar, wobei es sich vermutlich um die gelb fluoreszierende Bande bei Rf 0,53 handelte.

Um die Struktur der Hauptkomponente aufzuklären, wurden LC-MS- und NMR-Messungen durchgeführt. Weiters wurden die Fraktionen 18 Üs, 19 Üs, 19 Ns, 21 Ns und 22 von SC 2 mittels HPLC analysiert. Diese Fraktionen enthielten jedoch alle mindestens 3 Komponenten, wobei die Hauptkomponente immer die Substanz aus Fraktion 18 Ns mit einer Retentionszeit von 19,95 min war.

Deshalb schienen weitere Untersuchungen dieser Fraktionen nicht zielführend.

3.5. Säulenchromatographie 3 (SC 3)

Die aus SC 1 erhaltene Fraktion 7 wurde unter denselben Bedingungen wie Fraktion 5 mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 fraktioniert. Der Grund für die Auftrennung einer zweiten ähnlich zusammengesetzten Fraktion mittels Säulenchromatographie war, größere Mengen der einzelnen Fraktionen für weitere Untersuchungen zu gewinnen.

582 mg der Fraktion 7/SC 2 wurden in 30%igem Methanol gelöst und auf die Säule aufgebracht.

Stationäre Phase: Sephadex® LH20

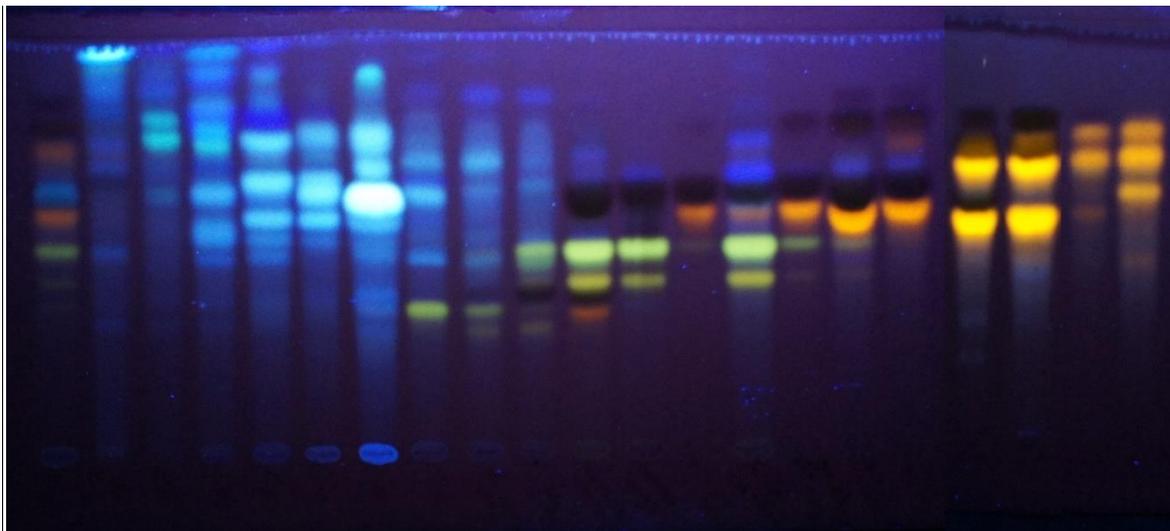
Füllhöhe: 60 cm

Säulendurchmesser: 3 cm

Insgesamt wurden 650 Fraktionen gesammelt, welche nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung zu 19 Sammelfractionen vereinigt wurden.

Abbildung 14: DC der Sammelfractionen von SC 3

Detektion: Naturstoffreagenz A/PEG DC-System 1 (s.S.3)



Fr7_{sc1} SF1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 NL

Auch in den Fraktionen dieser SC ist ein sehr komplexes Muster an phenolischen Inhaltsstoffen erkennbar, ähnlich jenem der SC 2 (s.Abb.14, S.23).

In den ersten Fraktionen wurden wieder hauptsächlich die unter UV_{366} blau fluoreszierenden Phenolcarbonsäuren eluiert. In den Einzelfraktionen 336-383 wurde jeweils das Ausfallen eines Niederschlags beobachtet, der abzentrifugiert wurde. In der DC stimmte die Zusammensetzung sehr gut mit Fraktion 18 Ns von SC 2 überein.

Fraktion 6 zeigte eine deutliche Hauptkomponente mit intensiv türkisblauer Fluoreszenz bei R_f 0,58. Die Isolierung dieser Substanz wäre aufgrund der vorhandenen Menge durchführbar. Aus zeitlichen Gründen war das im Rahmen dieser Diplomarbeit jedoch nicht mehr möglich.

Ab Fraktion 7 waren in der unteren Hälfte der DC mehrere grünlich fluoreszierende Banden detektierbar, bei denen es sich aufgrund der Färbung um Kämpferol-Derivate handeln könnte. Auch diese Fraktionen von SC 3 konnten aus Zeitgründen nicht weiter untersucht werden.

Tabelle 5: Sammelfraktionen der SC 3

Sammelfraktion	Fraktionen	Ausbeute	mobile Phase
1	1-90	8,3 mg	30% MeOH
2	91-154	12,5 mg	
3	155-192	5,6 mg	
4	193-214	21,8 mg	
5	215-224	5,9 mg	
6	225-254	63,2 mg	
7	255-274	3,6 mg	
8	275-284	1,5 mg	
9	285-294	8,4 mg	
10	295-314	36,2 mg	
11	315-325	31,9 mg	
12	336-383 Ns	24,5 mg	
13	326-353	23,7 mg	
14	354-383	40,1 mg	
15	384-413	41,8 mg	
16	414-434	20,4 mg	
17	435-524	44,6 mg	
18	525-629	28,8 mg	50% MeOH
19	630-650	1,6 mg	70% MeOH
	Nachlauf	25,3 mg	

3.6. Solid Phase Extraction (SPE)

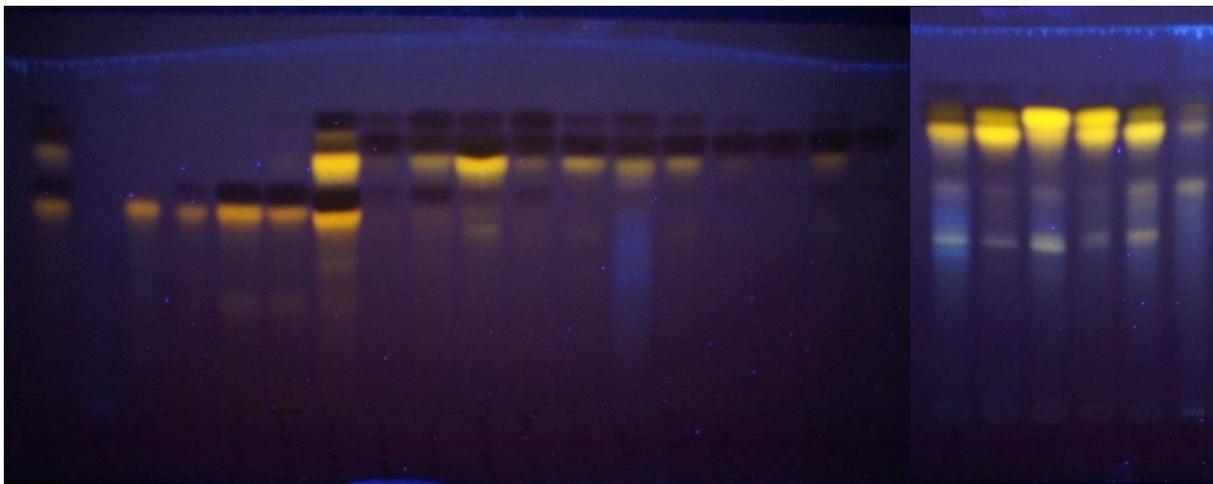
Die Sammelfraktion 22 der SC 2 (s.Abb.10, S.19) sollte mittels SPE weiter aufgetrennt werden. Fraktion 22 wurde deshalb ausgewählt, da hauptsächlich die gelborange fluoreszierenden Banden bei Rf 0,53 und 0,68 und geringere Mengen der braunschwarzen Banden bei Rf 0,57 und 0,73 detektiert wurden. Das Ziel der SPE war es, diese Inhaltsstoffe einzeln darzustellen, um sie anschließend zu identifizieren.

140 mg der Sammelfraktion 22 wurden in 2 ml 20%igem Methanol gelöst und nach dem Konditionieren der stationären Phase auf die SPE-Kartusche aufgetragen.

Es wurde beginnend mit 20% Methanol eluiert. Sobald kaum noch Substanzen in den Fraktionen erkennbar waren, wurde die MeOH-Konzentration des Elutionsmittels erhöht.

Abbildung 15: DC der Sammelfractionen der SPE

Detektion: Naturstoffreagenz A/PEG DC-System 1 (s.S.3)



22_{SC2} SF1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 14_{Ns} 15 15_{Ns} 16 17 18 19 20 21

Tabelle 6: Sammelfractionen der SPE

Sammelfraktion	Fraktionen	Ausbeute	mobile Phase
1	1-5	1,5 mg	1-2 20% MeOH
2	6	0,5 mg	3-13 30% MeOH
3	7	2,0 mg	
4	8-10	5,2 mg	
5	11-16 Ns	15,8 mg	
6	11-16 Üs	12,5 mg	14-21 40% MeOH
7	17-18 Ns	5,0 mg	
8	17-18 Üs	9,0 mg	
9	19-20 Ns	6,8 mg	
10	19-20 Üs	4,4 mg	
11	21 Ns	2,9 mg	
12	21 Üs	3,0 mg	22-26 50%MeOH
13	22 Üs	1,4 mg	
14	22 Ns	0,6 mg	
14 Ns	22 Ns-Kristalle	4,7 mg	
15	23 Ns	1,2 mg	
15 Ns	23 Ns-Kristalle	2,2 mg	
16	23 Üs	2,5 mg	
17	24-26 Ns	6,0 mg	
18	24-27 Üs	2,3 mg	27-30 60% MeOH
19	26-27 Üs	6,0 mg	
20	28-30	3,0 mg	100% MeOH
21	31-36	1,4 mg	

Die DC (s.Abb.15, S.26) machte deutlich, dass die Komponenten von SF 22 mit Rf 0,49-0,75 mittels SPE nicht optimal getrennt wurden.

Aus einigen der SPE-Fractionen war ein hellgelber Niederschlag ausgefallen, der abzentrifugiert werden konnte.

Besonders bei den Niederschlägen der Sammelfractionen 14 und 15 waren längliche, nadelförmige Kristalle erkennbar (s.Abb.16, S.28).

Abbildung 16: Niederschlag der Fraktion 15/SPE



Um die Kristalle zu gewinnen, wurden die Niederschläge dieser beiden Fraktionen nach dem Zentrifugieren mit eiskaltem Methanol gewaschen und abgenutscht.

Auf der DC (s.Abb.15, S.26) wiesen die abgenutschten Kristalle der Fraktionen 14 und 15 nur eine braunschwarze Bande mit einem R_f -Wert von 0,73 auf. Aufgrund der Laufstrecken konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um dieselbe Substanz handelte.

Aufgrund der DC-Analyse (s.Abb.15, S.26) wurde vermutet, dass Fraktion 2 nur eine gelb fluoreszierende Komponente mit R_f 0,49 enthielt. Da von dieser Fraktion nur 0,45 mg zur Verfügung standen, wurde sie mit der LC-MS untersucht.

3.6.1. Untersuchungen einzelner Fraktionen der SPE mittels HPLC

3.6.1.1. Fraktion 2

Wegen der geringen Menge von 0,45 mg wurde ein Versuch zur Identifizierung der Verbindung mittels LC-MS unternommen (s.S.53). Jedoch war aufgrund der geringen Substanzmenge eine Strukturaufklärung mit der NMR-Spektroskopie nicht möglich.

3.6.1.2. Fraktion 4

Bei dieser Fraktion waren auf der DC eine gelb fluoreszierende Bande bei Rf 0,49 und eine braunschwarze Bande bei Rf 0,53 erkennbar (s.Abb.15, S 26), wobei aufgrund der intensiven Fluoreszenz die gelb fluoreszierende Substanz die Hauptkomponente zu sein schien. Deshalb wurde diese Fraktion mittels HPLC untersucht.

Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 4/SPE
HPLC-Methode 3 (s.S.7)

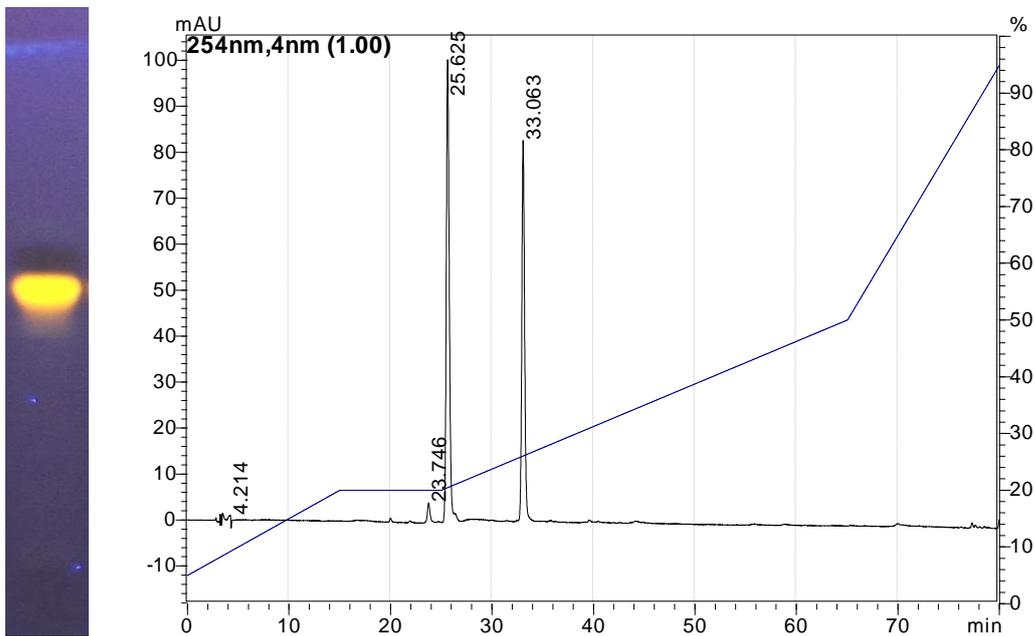


Abbildung 18: UV-Spektrum bei 25,63min

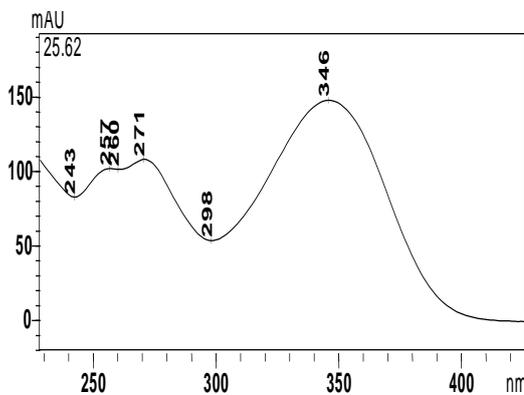
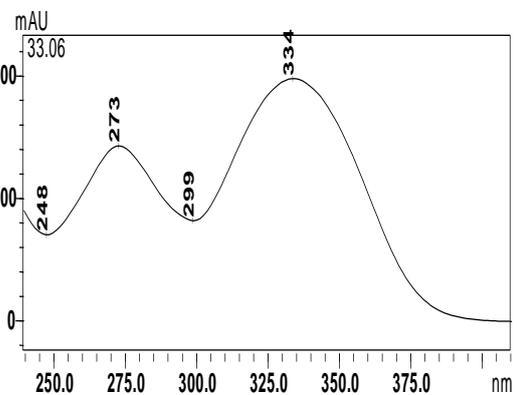


Abbildung 19: UV-Spektrum bei 33,06min



Es wurden 2 Komponenten zu annähernd gleichen Teilen detektiert. Der Peak bei 33,06 min konnte aufgrund des UV-Spektrums der gelb fluoreszierenden Komponente bei Rf 0,53 zugeordnet werden.

Da diese Substanzen nicht einzeln isoliert werden konnten, wäre es zielführend diese Fraktion weiteren Untersuchungen mittels LC-MS und NMR zu unterziehen, was aus Zeitgründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchführbar war.

3.6.1.3. Niederschlag der Fraktionen 14 und 15

Die Kristalle aus den Fraktionen 14 und 15 wurden mittels HPLC auf ihre Reinheit überprüft, wobei jeweils eine Hauptkomponente mit einer Retentionszeit von 43,9 min detektiert wurde. Die UV-Spektren stimmten völlig überein.

Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm des Niederschlags der Fraktion 15/SPE
HPLC-Methode 3 (s.S.7)

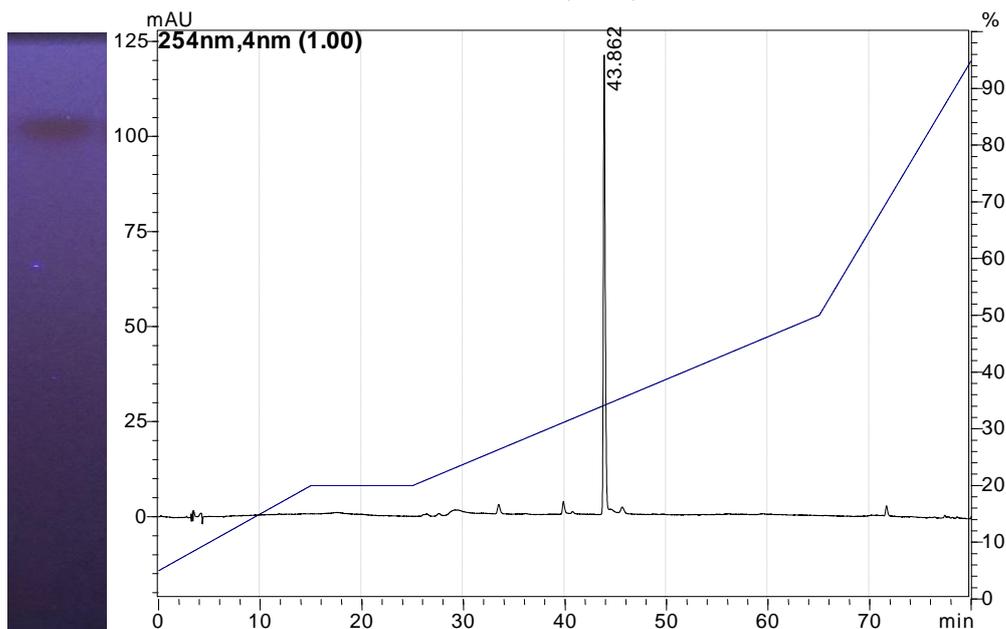
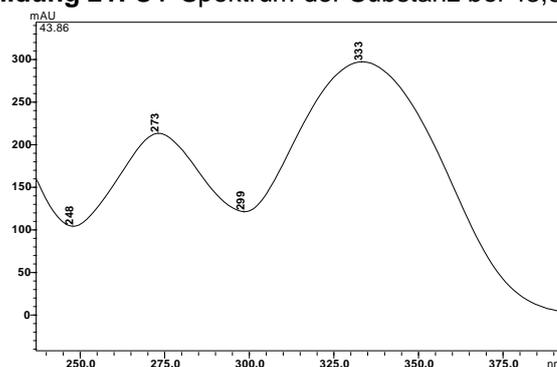


Abbildung 21: UV-Spektrum der Substanz bei 43,86min



Zur Strukturaufklärung wurde die Substanz mittels LC-MS und der NMR untersucht (s.S.51).

3.6.1.4. Fraktion 18

In dieser Fraktion wurden in der DC zwei Banden bei R_f 0,72 und 0,77 detektiert. Mit einer HPLC-DAD-Analyse sollten erste Strukturinformationen der Komponenten ermittelt werden.

Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 18/SPE

HPLC-Methode 3 (s.S.7)

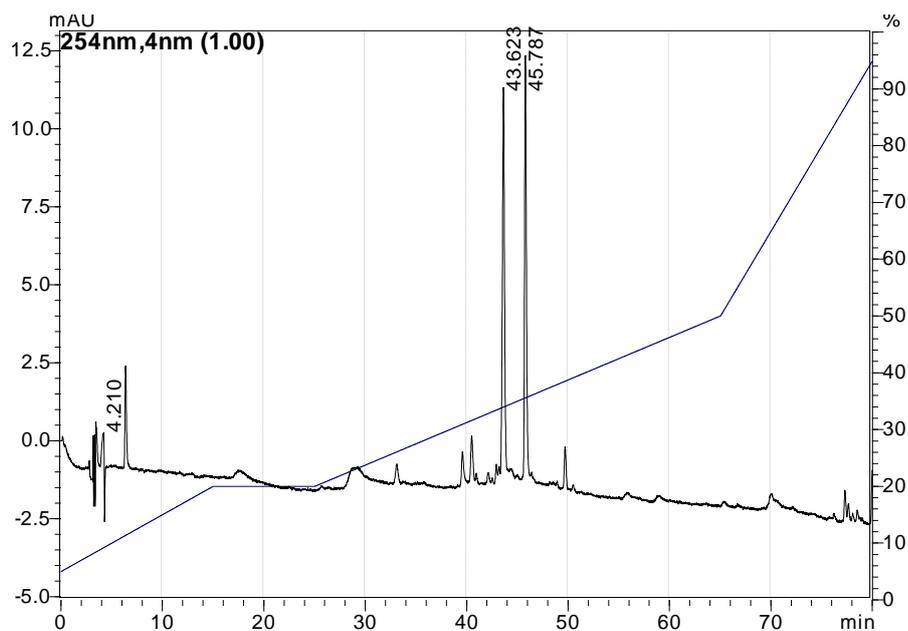


Abbildung 23: UV-Spektrum bei 43,62min

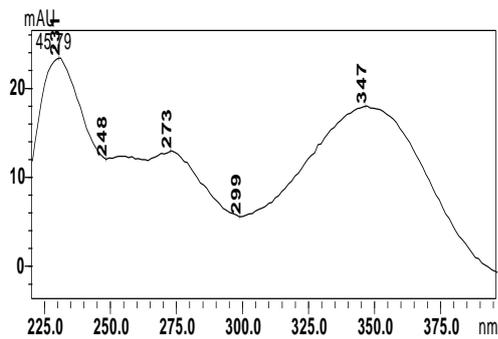
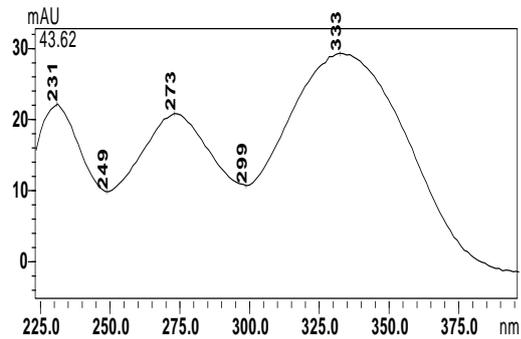


Abbildung 24: UV-Spektrum bei 45,79min



Im HPLC-Chromatogramm zeigten sich 2 deutliche Hauptkomponenten. Anhand der UV-Spektren war erkennbar, dass es sich um Flavonoide mit unterschiedlichen Aglyka handelte. Zur Strukturaufklärung wurde eine LC-MS Analyse durchgeführt (s.S.51).

3.7. Vergleiche mit verschiedenen Referenzsubstanzen

3.7.1. Dünnschichtchromatographische Vergleiche

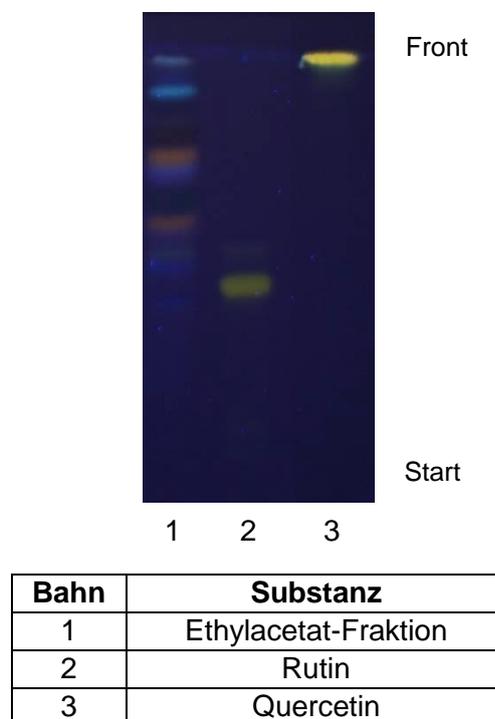
Aufgrund der Fluoreszenzfärbung zahlreicher Komponenten unter UV_{366} und der in einem DC-System für Flavonoide bestimmten Laufstrecken wurden Vergleichs-DCs mehrerer Fraktionen mit verschiedenen Referenzsubstanzen, vor allem mit Flavonoiden und Phenolcarbonsäuren, angefertigt. Man wollte die unter UV_{366} hellorange fluoreszierenden und die braunschwarzen Banden bei R_f 0,53-0,82 identifizieren.

3.7.1.1. DC-Vergleiche mit der Ethylacetatfraktion

Die aus der Vorreinigung hervorgegangene Ethylacetat-Fraktion wurde in einer orientierenden DC auf die weit verbreiteten Flavonoide Quercetin und Rutin untersucht (s.Abb.25).

Abbildung 25: DC-Vergleich der EtOAc-Fraktion mit Rutin und Quercetin

Detektion: NST A/PEG DC-System 1 (s.S.3)

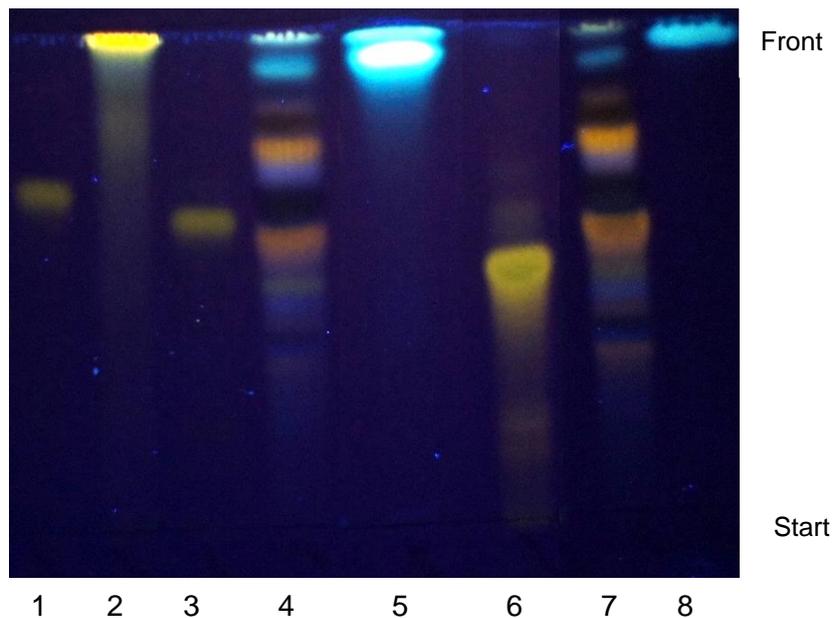


Anhand der DC konnten Quercetin und Rutin zumindest als Hauptinhaltsstoffe ausgeschlossen werden.

Unter Beachtung der Fluoreszenzfärbungen und der Polarität der Komponenten der EtOAc-Fraktion, wurden folgende phenolische Naturstoffe für weitere Vergleiche herangezogen.

Abbildung 26: DC der Fraktionen 1-3/SC 1

Detektion: NST A/PEG DC-System 1 (s.S.3)



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	Isoquercitrin	5	Kaffeesäure
2	Myricetin	6	Homoorientin
3	Hyperosid	7	EtOAc-Fraktion
4	EtOAc-Fraktion	8	Rosmarinsäure

Die DC zeigte, dass die Flavonoide Isoquercitrin, Myricetin, Hyperosid und Homoorientin aufgrund ihrer intensiv gelben Fluoreszenzfärbungen und ihrer Retentionswerte nicht mit Inhaltsstoffen der Ethylacetatfraktion korrelierten (s.Abb.26).

Da die Phenolcarbonsäuren Kaffeesäure und Rosmarinsäure in dieser DC annähernd mit der Front eluierten, war eine Überprüfung in einem anderen DC-System notwendig (s.Abb.32, S.39).

Auch das Vorliegen von Naringin und Eriodictyol-7-O-glucosid in dieser Fraktion konnte aufgrund von DC-Vergleichen ausgeschlossen werden.

3.7.1.2. DC-Vergleiche mit Fraktionen von SC 1 und SC 2

Aufgrund der braunen Banden bei den Fraktionen 1-3 von SC 1 im unteren Bereich der DC (s.Abb.27), konnte davon ausgegangen werden, dass in diesen Fraktionen Zucker angereichert wurden.

Wie bereits bei der Vorfraktionierung festgestellt wurde, waren in der Ethylacetatfraktion die Zucker Glucose, Fructose und Saccharose enthalten (s.Abb.8, S.15).

Abbildung 27: DC der Fraktionen 1-3/SC 1

Detektion: AAS
DC-System 1 (s.S.3)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 1/SC 1
2	Fraktion 2/SC 1
3	Fraktion 3/SC 1

Abbildung 28: DC-Vergleiche der SF 1-3/SC 1 mit Zuckern

Detektion: Diphenylamin- Anilin- Aceton-Phosphorsäure_{conc.} (0,5+ 0,5+20+4) DC-System 7 (s.S.4)



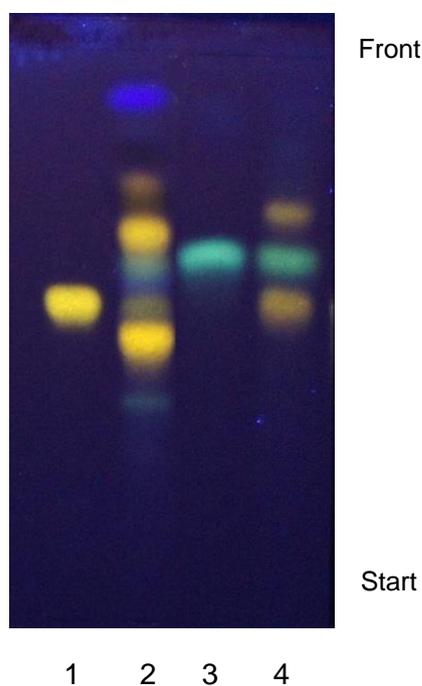
Bahn	Substanz
1	Ethylacetat-Fraktion
2	Saccharose
3	Fraktion 1/SC 1
4	Glucose
5	Fraktion 2/SC 1
6	Fructose
7	Fraktion 3/SC 1

Sowohl Glucose, Fructose und Saccharose wurden in den Fraktionen 1-3 der SC 1 nachgewiesen, wobei Fructose als Hauptkomponente vorzuliegen schien (s.Abb.28, S.35).

Einzelne Fraktionen der SC 1 wurden auf das Vorliegen phenolischer Naturstoffe überprüft. Fraktion 9 und 12 der SC 1 wurden auf Apigenin-7-O-glucosid und Luteolin-7-O-glucosid untersucht.

Abbildung 29: DC-Vergleich mit Flavonoiden

Detektion: NST A/PEG DC-System 4 (s.S.3)

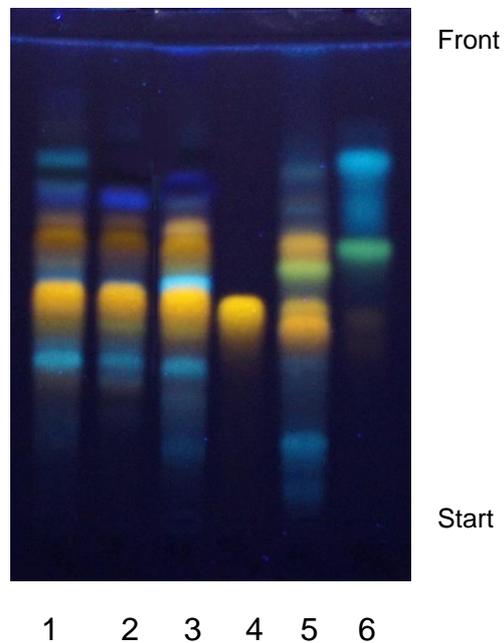


Bahn	Substanz
1	Luteolin-7-O-glucosid
2	Fraktion 9/SC 1
3	Apigenin-7-O-glucosid
4	Fraktion 12/SC 1

Aufgrund der Rf-Werte und ihrer Fluoreszenzfarbe konnten sowohl Apigenin-7-O-glucosid als auch Luteolin-7-O-glucosid in den Fraktionen nicht eindeutig detektiert werden (s.Abb.29). Deshalb wurde eine weitere DC mit diesen Verbindungen in einem anderen System angefertigt (s.Abb.30, S.37).

Abbildung 30: DC-Vergleich mit Flavonoiden

Detektion: NST A/PEG DC-System 5 (s.S.3)

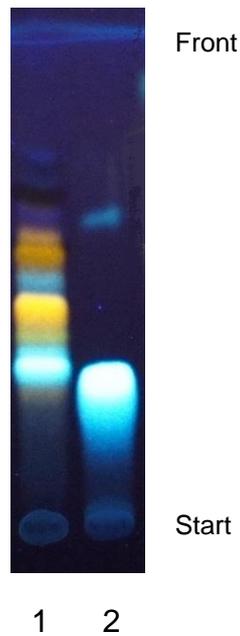


Bahn	Substanz
1	Ethylacetat-Fraktion
2	Fraktion 5/SC 1
3	Fraktion 9/SC 1
4	Luteolin-7-O-glucosid
5	Fraktion 12/SC 1
6	Apigenin-7-O-glucosid

Anhand der unterschiedlichen Laufstrecke konnte gezeigt werden, dass es sich bei der grünlich fluoreszierenden Substanz in Fraktion 12 bei R_f 0,56 (s.Abb.30) nicht um Apigenin-7-O-glucosid handelte. Auch der R_f -Wert von Luteolin-7-O-glucosid stimmte nicht ganz mit jener der gelborange fluoreszierenden Bande bei R_f 0,5 in Fraktion 5 und 9 der SC 1 überein.

Abbildung 31: DC-Vergleich mit Chlorogensäure

Detektion: NST A/PEG_DC-System 5 (s.S.3)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 7/SC 1
2	Chlorogensäure

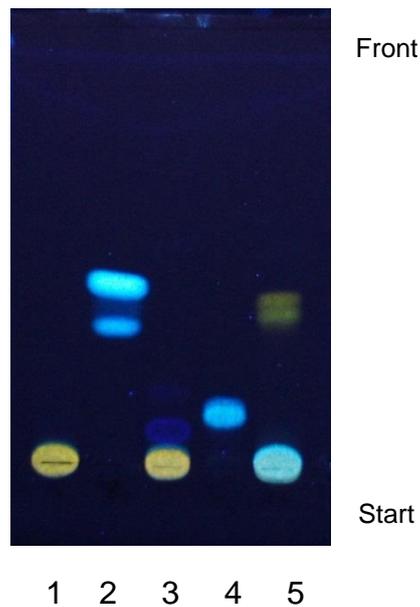
Die blau fluoreszierende Bande der Fraktion 7/SC 1 bei Rf 0,45 wurde mit Chlorogensäure verglichen. Da die Rf-Werte leicht voneinander abwichen, handelte es sich dabei nicht um Chlorogensäure (s.Abb.31).

Auch die Fraktionen 9 und 10 der SC 2 wurden mit Chlorogensäure verglichen, jedoch stimmten die Komponenten dieser Fraktionen nicht mit dem Vergleich überein.

Aufgrund blau fluoreszierender Komponenten mit hohen R_f-Werten wurden die Fraktionen 12, 13 und 15 von SC 1 mit Rosmarin- und Kaffeesäure verglichen, wobei ein apolares DC-System verwendet wurde (s.Abb.32).

Abbildung 32: DC-Vergleich mit Phenolcarbonsäuren

Detektion: NST A/PEG DC-System 3 (s.S:3)



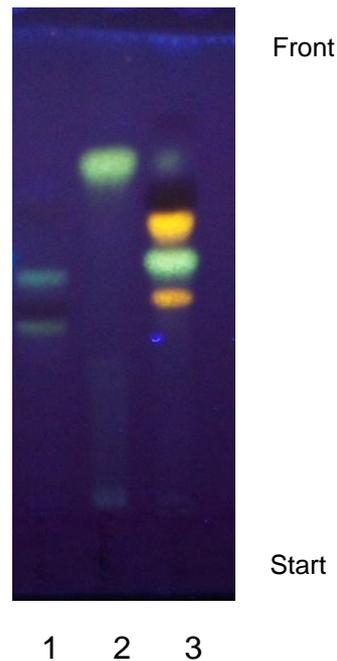
Bahn	Substanz
1	Fraktion 12/SC 1
2	Kaffeesäure
3	Fraktion 13/SC 1
4	Rosmarinsäure
5	Fraktion 15/SC 1

Es konnte eindeutig festgestellt werden, dass weder Rosmarinsäure noch Kaffeesäure in den untersuchten Fraktionen vorhanden waren, denn im Gegensatz zu den Phenolcarbonsäuren wurden die Komponenten der Fraktionen nicht vom Start eluiert (s.Abb.32).

Die grün fluoreszierenden Substanzen in den Fraktionen 15 und 19 der SC 2 wurden aufgrund ihrer Fluoreszenzfärbung mit Astragalin (Kämpferol-3-O-glucosid) verglichen.

Abbildung 33: DC-Vergleich von Fr. 15 und 19/SC 2 mit Astragalin

Detektion: Naturstoffreagenz A/PEG DC-System 1 (s.S.3)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 15/SC 2
2	Astragalin
3	Fraktion 19/SC 2

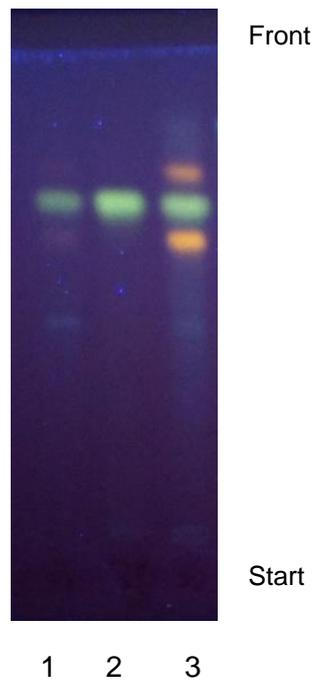
Die Laufstrecke des Astragalins unterschied sich deutlich von jener der grün fluoreszierenden Substanz in Fraktion 19/SC 2 bei einem Rf-Wert von ca. 0,5, aber es lag aufgrund der Fluoreszenzfärbung die Vermutung nahe, dass es sich um ein anderes Kämpferolglykosid handelt (s.Abb.33).

Auf Höhe des Astragalins war in Fraktion 19 eine schwach grün fluoreszierende Bande erkennbar. Deshalb wurden zwei Fraktionen der SC 1, die auch eine ähnlich grün fluoreszierende Bande mit einem vergleichbaren Rf-Wert aufwiesen, mit Astragalin verglichen (s.Abb.34, S.41).

Da die Fraktionen 11 und 12 der SC 1 bei Rf 0,74 eine grün fluoreszierende Substanz zeigten, wurden sie mit mit Astragalin chromatographiert (s.Abb.34).

Abbildung 34: DC-Vergleich mit Astragalin

Detektion: NST A/PEG DC-System 1 (s.S.3)



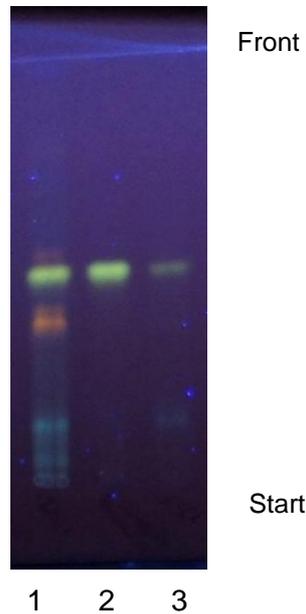
Bahn	Substanz
1	Fraktion 11/SC 1
2	Astragalin
3	Fraktion 12/SC 1

Die Vermutung, dass es sich bei der grün fluoreszierenden Substanz bei Rf 0,74 in den Fraktionen 11 und 12 von SC 1 um Astragalin handeln könnte, wurde durch diesen DC-Vergleich bestätigt.

Um beweisen zu können, dass Astragalin in den Fraktionen 11 und 12 vorliegt, wurde ein weiterer DC-Vergleich im DC-System 5 gemacht (s.Abb.35, S.42).

Abbildung 35: DC-Vergleich mit Astragalin in einem weiteren DC-System

Detektion: NST A/PEG DC-System 5 (s.S.3)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 12/SC 1
2	Astragalin
3	Fraktion 11/SC 1

Auch in diesem DC-System stimmten die Laufstrecken und die Fluoreszenzfärbung der Banden mit Astragalin überein.

Zur eindeutigen Identifizierung wurde eine HPLC-Analyse von Fraktion 12 und Astragalin gemacht (s.S.45).

Wegen der grünlichen Fluoreszenzfärbung einer Substanz in Fr. 7/SC 1 und in Fr. 18 Üs/SC 2 bei einem Rf von 0,5, wurde ein DC-Vergleich mit einem weiteren Kämpferolglykosid angefertigt (s.Abb.36, S.43).

Abbildung 36: DC-Vergleich mit Kämpferol-7-O-neohesperidosid

Detektion: NST A/PEG DC-System 1 (s.S.3)



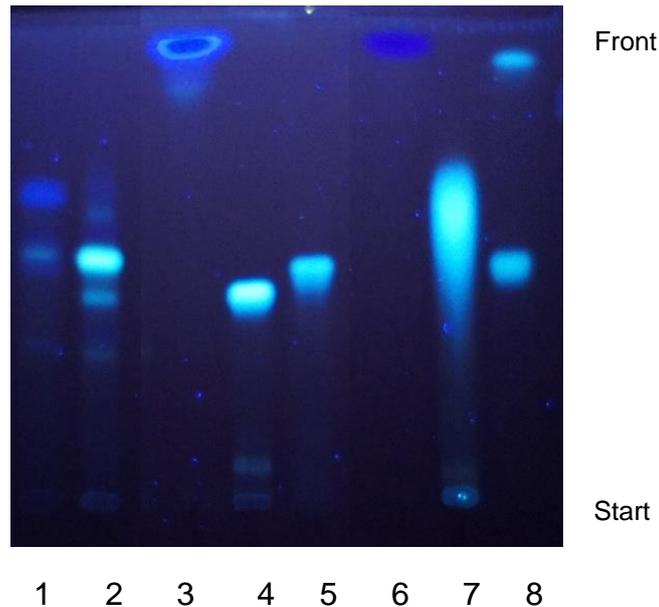
Bahn	Substanz
1	Fraktion 18 Üs/SC 2
2	Fraktion 7/SC 1
3	Kämpferol-7-O-neohesperidosid

Bei der DC-Analyse stellte sich jedoch heraus, dass dieses Kämpferolderivat eine andere Fluoreszenzfärbung als die Komponente von Fr. 18 Üs/SC 2 aufwies, bei der es sich somit nicht um Kämpferol-7-O-neohesperidosid handelte.

Da in den ersten 13 Fraktionen der SC 2 zahlreiche Komponenten mit blauer Fluoreszenz auftraten, wurden für einen DC-Vergleich weitere Phenolcarbonsäuren mit ähnlicher Polarität und Färbung herangezogen (s.Abb.37).

Abbildung 37: DC-Vergleich mit Phenolcarbonsäuren

Detektion: NST A/PEG DC-System 1 (s.S.3)



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	Fraktion 7/SC 2	5	Neochlorogensäure
2	Fraktion 9/SC 2	6	p-Cumarsäure
3	Ferulasäure	7	Ellagsäure
4	Chlorogensäure	8	Cryptochlorogensäure

Aufgrund der unterschiedlichen Laufstrecken konnte man die meisten aufgetragenen Phenolcarbonsäuren ausschließen. Bei der hellblau fluoreszierenden Substanz bei Rf 0,51 in Fraktion 9 könnte es sich aufgrund der ähnlichen Laufstrecken um ein Chlorogensäurederivat handeln, wobei die Fluoreszenzfarbe nicht ganz mit jener der Neochlorogensäure und Cryptochlorogensäure übereinstimmte.

Für die zweifelsfreie Identifizierung wären weitere Untersuchungen notwendig.

3.7.2. HPLC-Vergleiche

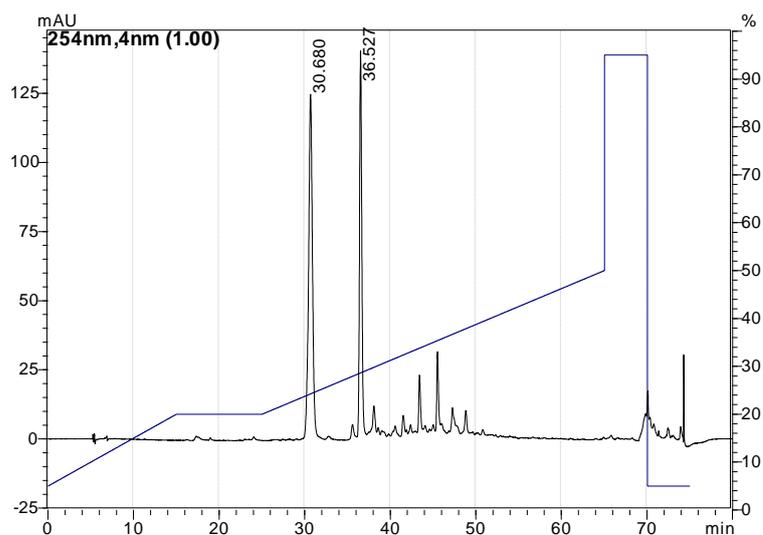
Bei DC-Vergleichen in 2 verschiedenen Fließmittelsystemen wurde Astragalin (Kämpferol-3-O-glucosid) in den Fraktionen 11 und 12 der SC 1 nachgewiesen.

Um das Vorliegen von Astragalin eindeutig zu beweisen, wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt.

Die Fraktion 12 der SC 1 und Astragalin wurden mit der HPLC-Methode 3 chromatographiert (s.Abb.38+39). Anschließend wurde eine Mischung der Fraktion 12 und Astragalin untersucht (s.Abb.40, S.47).

Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektrum von Fr. 12/SC 1

HPLC-Methode 3 (s.S.7)



UV-Spektrum bei 36,52min

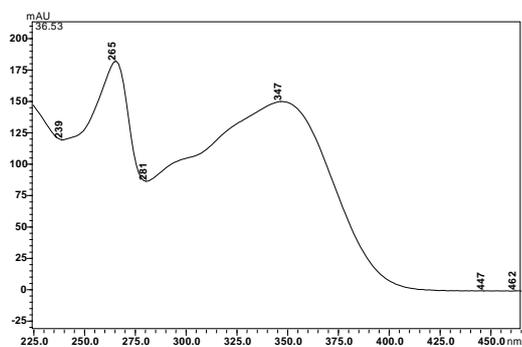
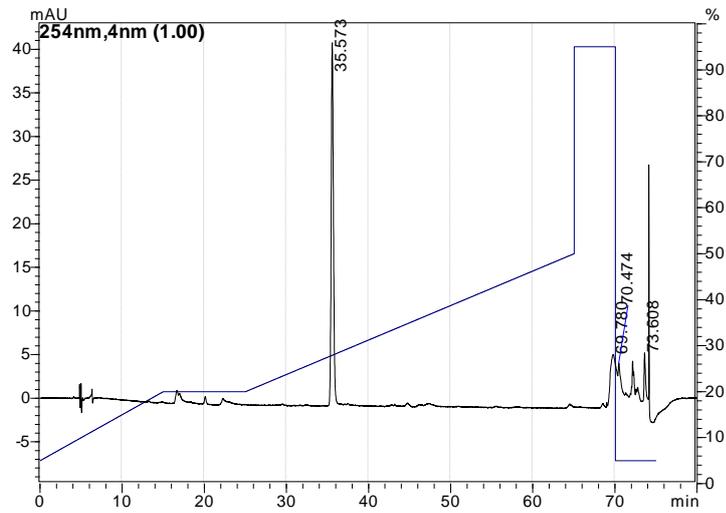
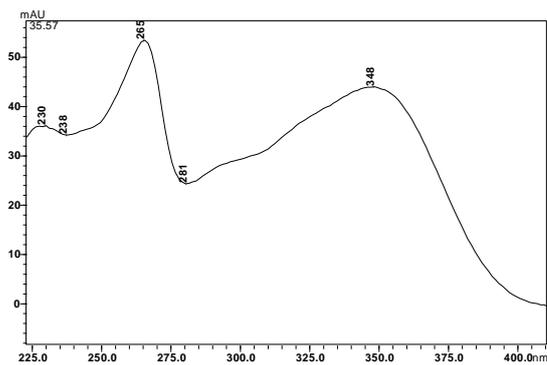


Abbildung 39: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektrum von Astragalin
HPLC-Methode 3 (s.S.7)

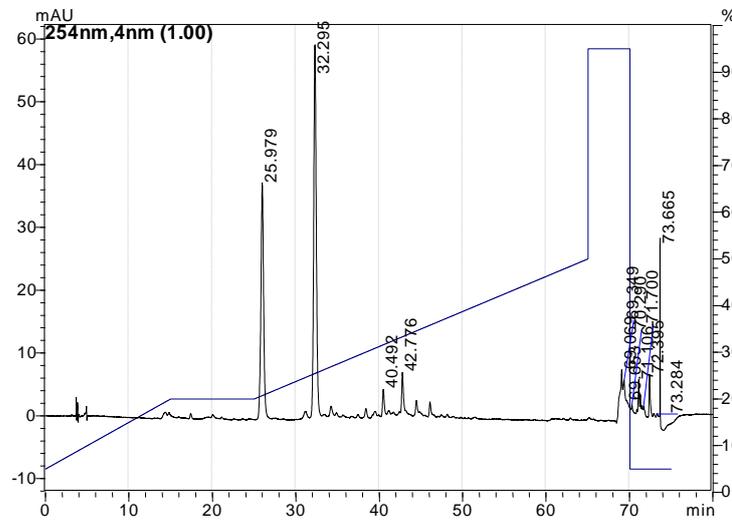


UV-Spektrum bei 35,57min



Die Retentionszeiten und UV-Spektren von Astragalin stimmten gut mit der Komponente aus Fraktion 12 bei der Retentionszeit von 36,52 min überein.

Abbildung 40: HPLC-Chromatogramm der Mischung aus Fr. 12/SC 1 und Astragalin
HPLC-Methode 3 (s.S.7)



Die Analyse der Mischung zeigte keinen zusätzlichen Peak, sondern eine Vergrößerung der Peakfläche des Peaks bei einer Retentionszeit von 32,3 min.

Somit konnte die grün fluoreszierende Substanz bei Rf 0,74 in den Fraktionen 11 und 12 der SC 1 eindeutig als Astragalin identifiziert werden.

Es wurden auch vergleichende HPLC-Analysen mit Apigenin-7-O-glucosid, Luteolin-7-O-glucosid, Rutin, Hyperosid und Chlorogensäure als Referenzsubstanzen durchgeführt.

Keine der genannten Substanzen konnte in den untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden.

Das Vorhandensein dieser Verbindungen in den einzelnen Fraktionen in geringen Mengen kann dennoch nicht ausgeschlossen werden.

3.8. Strukturaufklärung von isolierten Verbindungen

Verbindungen, die im Laufe dieser Diplomarbeit isoliert werden konnten, sollten mittels LC-MS und NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt werden⁵.

Die bei den HPLC-Analysen ausgearbeiteten Methoden wurden auch für die LC-MS-Analysen eingesetzt.

Es wurden in Abhängigkeit der Proben mehrere MSⁿ-Scan-Experimente durchgeführt, die automatisiert im DDA-Modus (data dependent acquisition) ausgeführt wurden.

3.8.1. Strukturaufklärung von Substanz VL1 (= Homoplantaginin)

Bei VL1 handelte es sich um Fraktion 18 Ns von SC 2.

Bei der MS-Analyse konnte für VL1 ein Molekulargewicht von 462 Da ermittelt werden. Das Positivionen-MS² zeigte, dass ein Fragment mit einer Masse von 162 Da abgespalten wurde, wobei es sich vermutlich um eine Hexose handelte. Im MS³-Scan trat ein Masseverlust von 15 Da auf, was auf ein Methylradikal hindeutet.

Methylradikale treten nicht häufig auf, sind aber spezifisch für phenolische Methoxygruppen, wie sie in Flavonoiden vorkommen. Das MS⁴ im Negativionenmodus zeigte das Fragmentierungsmuster des Aglykons, wobei das Genin ein Molekulargewicht von 285 Da aufwies.

Aus dem Fragmentierungsmuster konnte man annehmen, dass es sich um ein methoxyliertes Flavonoid handelte, wobei das Vorliegen von Homoplantaginin vermutet wurde.

Da von dieser Fraktion eine ausreichende Menge (46,5 mg) vorhanden war, konnten zur eindeutigen Strukturaufklärung Analysen mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt werden.

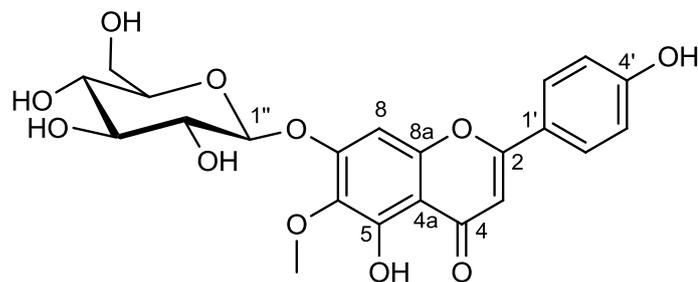
⁵ Die Spektren der NMR- und LC-MS- Analysen der einzelnen Verbindungen befinden sich im Anhang.

Es wurden $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ -, HBMQ-, TOCSY-, COSY- und HSQC- Spektren aufgenommen. Durch die NMR-Spektroskopie konnte eindeutig bestätigt werden, dass es sich bei VL1 um Homoplantaginin (s.Abb.41) handelte.

Die gemessenen $^1\text{H-NMR}$ -Daten stimmten weitgehend mit den Literaturdaten überein [10], und auch die $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten stimmten sehr gut mit den aus der Literatur bekannten Verschiebungen überein [11].

Homoplantaginin ist ein selten vorkommendes Flavonoid, das bereits in *Scrophularia ningpoensis* (Hemsl) nachgewiesen worden war [12]. Außerdem kommt es in *Salvia plebea* (R.Br.), *Salvia officinalis* (L.), *Saussurea medusa* (DC.), einigen *Plantago*-Arten und wenigen anderen Species vor [10, 11, 13].

Abbildung 41: VL1 (=Homoplantaginin)



Chemical Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$

Molecular Weight: 462,40

Tabelle 7: ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Daten von Homoplantagin in DMSO

^1H (ppm)		$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	^1H [10]	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	^{13}C [11]
2	C	---		---	164.29	164.8
3	CH	6.861	6.83	s	102.67	102.6
4	C	---		---	182.31	182.1
4a	C	---		---	105.71	105.6
5	C	---		---	152.45	152.0
	OH	12.959	12.95	s	---	
6	C	---		---	132.50	132.5
	CH ₃	3.767	3.75	s	60.30	60.2
7	C	---		---	156.47	156.3
8	CH	7.017	6.99	s	94.35	94.3
8a	C	---		---	152.13	152.3
1'	C	---		---	121.05	121.1
2'/6'	CH	7.952	7.94	d 8.8	128.57	128.4
3'/5'	CH	6.938	6.93	d 8.8	115.99	115.9
4'	C	---		---	161.40	161.3
1''	CH	5.114	5.09	d 7.1	100.18	100.2
2''	CH	3.337	3.48	d 7.1 / d 9.6	73.16	73.1
3''	CH	3.318	3.44	d 9.6 / d 9.2	76.72	76.7
4''	CH	3.207	3.34	d 9.2 / d 9.6	69.55	69.6
5''	CH	3.467		d 9.6 / d 6.0 / d 2.1	77.27	77.2
6''a	CH ₂	3.730	3.71	d 2.1 / d 11.6	60.60	60.6
b		3.493	3.44	d 6.0 / d 11.6		

weitere OH-Signale:
 10.404 (sehr breit)
 5.427 (breit)
 5.118 (breit)
 4.63 (breit)

3.8.2. Strukturaufklärung von VL2 (= 2''-O-Acetyl-homoplantaginin)

Bei VL2 handelte es sich um die hellgelben, nadelförmigen Kristalle aus den Fraktionen 14 und 15 der SPE.

Die MS-Analyse zeigte für VL2 ein Molekulargewicht von 504 Da.

Anhand des Fragmentierungsmusters im Positivionen-MS³-Scan war zu sehen, dass VL2 dasselbe Aglykon wie VL1, mit einer Masse von 285 Da, aufzuweisen schien.

Im MS³-Scan kam es wieder zu einem Masseverlust von 15 Da, was auf das Vorliegen einer phenolischen Methoxygruppe hindeutete. Der einzige Unterschied zu VL1 zeigte der Positivionen- MS¹-Scan, wo ein Masseverlust von 204 Da anstatt von 162 Da bei VL1 zu sehen war.

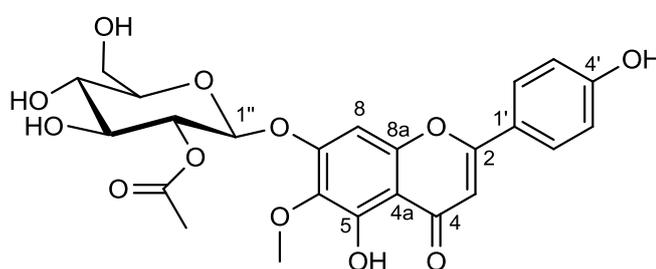
Die um 42 Da höhere Masse wies auf einen Acetylrest hin, der aufgrund des Fragmentierungsmusters an der Hexose verknüpft sein musste.

Der Negativionenmodus deutete auf dieselbe Struktur.

Aufgrund des gleichen Fragmentierungsmusters des Aglykons wurde angenommen, dass ein am Zucker einfach acetyliertes Homoplantagininderivat vorliegen könnte. Dabei würde es sich um einen neuen Naturstoff handeln.

Um die Struktur eindeutig zu klären wurde eine NMR-Analyse durchgeführt.

Abbildung 42: VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantaginin)



Chemical Formula: C₂₄H₂₄O₁₂

Molecular Weight: 504,44

Tabelle 8: ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Daten von Substanz VL2
(=2''-O-Acetyl-homoplantagin) in DMSO

^1H (ppm)		$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	^{13}C (ppm)	
2	C	---	---	164.39
3	CH	6.874	s	102.72
4	C	---	---	182.33
4a	C	---	---	106.11
5	C	---	---	152.61
	OH	12.974	s	---
6	C	---	---	132.55
	CH ₃	3.652	s	60.22
7	C	---	---	155.87
8	CH	7.026	s	94.71
8a	C	---	---	152.04
1'	C	---	---	120.94
2'/6'	CH	7.942	d 8.9	128.57
3'/5'	CH	6.939	d 8.9	116.03
4'	C	---	---	161.51
1''	CH	5.352	d 8.1	97.90
2''	CH	4.887	d 8.1 / d 9.6	73.27
	C	---	---	169.26
	CH ₃	2.038	s	20.82
3''	CH	3.539	d 9.6 / d 9.1	73.77
4''	CH	3.312	d 9.1 / d 9.7	69.64
5''	CH	3.578	d 9.7 / d 6.0 / d 2.1	77.48
6''a	CH ₂	3.772	d 2.1 / d 11.8	60.42
b		3.530	d 6.0 / d 11.8	
weitere OH-Signale:		10.435 (sehr breit)		
		5.390 (breit)		
		4.755 (breit)		

Die ^1H -NMR-Verschiebungen von Substanz VL2 stimmten weitgehend mit jenen von Homoplantagin überein. Allerdings war das Signal der Protonen an C-2'' der Zuckerkomponente um 1,55 ppm nach tieferem Feld verschoben. Die Signale von C-1'' und C-3'' zeigten Tieffeldverschiebungen von jeweils 0,22 ppm. Zusätzlich wurde das Signal von Methylprotonen einer Acetylgruppe bei $\delta = 2,038$ ppm als Singulett detektiert.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum war ebenfalls sehr gute Übereinstimmung der Signale des Genins mit jenen des Genins von VL1 gegeben, während im Zuckerteil Unterschiede beobachtet wurden. C-1'' war um 2,2 ppm und C-3'' um 3 ppm nach höherem Feld verschoben. Signale einer Acetylgruppe traten bei $\delta = 169,26$ (quartäres C) und bei $\delta = 20,8$ ppm (Methyl-C) auf. Damit konnte die Struktur von VL2 eindeutig als 2''-O-Acetyl-homoplantagin (s. Abb. 42, S. 51) aufgeklärt werden.

3.8.3. Strukturaufklärung von VL3

Da Fraktion 2 der SPE bei der dünnschichtchromatographischen Überprüfung nur eine gelborange fluoreszierende Bande aufwies, wurde das Vorliegen einer Reinsubstanz vermutet. Aufgrund der geringen Menge von 0,45 mg wurden LC-MS-Untersuchungen durchgeführt.

Die Analysen zeigten jedoch, dass mehrere Komponenten in dieser Fraktion enthalten waren. Es sollte die Struktur der gelb fluoreszierenden Komponente bei R_f 0,53 geklärt werden. Da diese Substanz auch in geringen Mengen in Fraktion 18 Ns von SC 2 vorhanden war, konnte anhand der MS-Daten ein Molekulargewicht von 478 Da bestimmt werden.

Das Fragmentierungsverhalten des Aglykons war ähnlich jenem von VL1 und VL2 und im Positivionen- MS^2 war wieder der Verlust eines Methylradikals (-15 Da) ersichtlich.

Aufgrund des Molekulargewichtes wurde vermutet, dass diese Substanz eine OH-Gruppe mehr aufweist als Homoplantagin, was die Vermutung nahe legte, dass es sich um Nepitrin handeln könnte.

Nepitrin wurde wie Homoplantagin unter anderem in *Scrophularia ningpoensis* gefunden [12].

Für eine eindeutige Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie war jedoch zu wenig Substanz vorhanden.

3.8.4. Strukturaufklärung von VL4

In Fraktion 18 der SPE waren 2 intensiv gelb fluoreszierende Banden als Hauptkomponenten detektierbar.

Da die beiden Peaks in der HPLC (s.Abb.22, S.31) gut voneinander getrennt waren, wurde ein Versuch zur Strukturaufklärung mittels LC-MS unternommen.

Beim Peak mit einer Retentionszeit von 43,62 min wurde aufgrund des Fragmentierungsmusters und der Masse von 504 Da angenommen, dass es sich um 2''-O-Acetyl-homoplantaginin handelte.

Die Substanz mit einer Retentionszeit von 45,79 min wies ein deutlich höheres Molekulargewicht von 644 Da auf. Das Molekulargewicht konnte keinem bekannten Naturstoff zugeordnet werden.

Ab dem MS³-Scan glich das Fragmentierungsmuster jenem von VL3. Es schien jedoch kein einfacher Zucker vorhanden zu sein, sondern ein Rest mit einer Masse von 328 Da, der im Negativionenmodus als Ganzes abgespalten wurde. Der Verlust der Methylgruppe und das Fragmentierungsverhalten des Aglykons, stimmte wieder mit den zuvor beschriebenen Strukturen überein.

Es könnte sich bei dieser Substanz um ein prenyliertes Nepitrinderivat oder ein Nepitrinderivat mit einem anderen, größeren Rest handeln.

Um die vorliegende Struktur mittels NMR aufzuklären, müsste die Fraktion aufgetrennt werden, was im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht mehr möglich war.

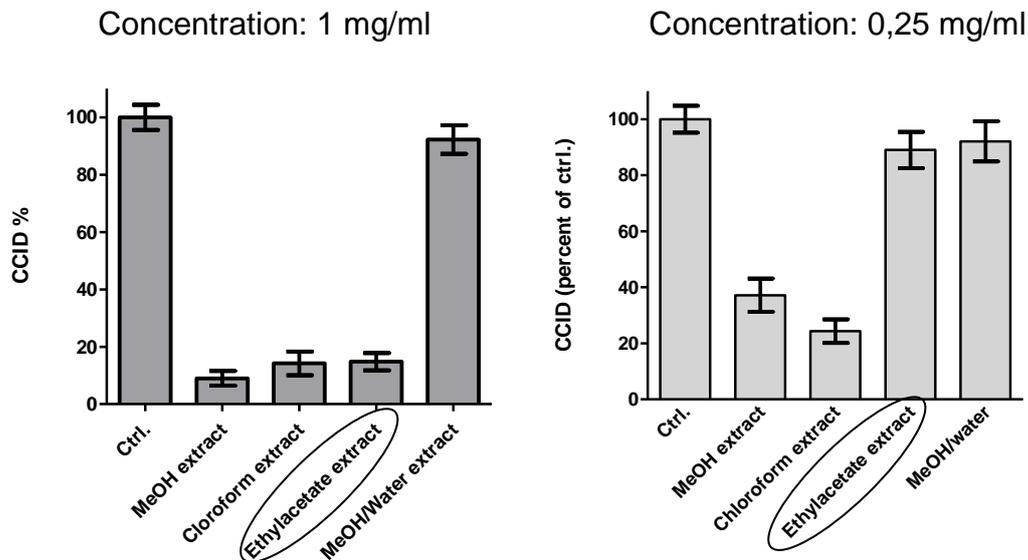
3.9. Circular Chemorepellent Induced Defects-Assay (CCID-Assay)

Die Ethylacetatfraktion wurde im CCID-Assay⁶ (Circular Chemorepellent Induced Defects-Assay) bezüglich der Wirkung auf die Metastasierung von Brustkrebszellen untersucht.

Dabei wurde zuerst eine Konzentration von 1 mg/ml getestet, wobei die Ethylacetatfraktion eine ähnlich gute Wirkung wie die Chloroformfraktion [6] zeigte (s.Abb. 43).

Bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml war für die Ethylacetatfraktion jedoch kaum eine Wirkung erkennbar. Daraus kann man schließen, dass in der Ethylacetatfraktion wirksame Inhaltsstoffe enthalten sind, jedoch offensichtlich in viel geringerer Konzentration als in der Chloroformfraktion, oder dass andere Substanzen mit geringerer Wirkung als die Komponenten der Chloroformfraktion auftreten.

Abbildung 43: Wirksamkeit verschiedener Fraktionen aus dem methanolischen Extrakt aus *Scrophularia lucida* im CCID-Assay



⁶ Mein Dank gilt Herrn ao. Prof. Dr. Georg Krupitza und Chi Nguyen Huu für die Durchführung des CCID-Assays.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, aus einer Ethylacetatfraktion eines methanolischen Extrakts von *Scrophularia lucida*, phenolische Inhaltsstoffe zu isolieren und zu identifizieren.

Im Zuge eines Vorversuchs wurden 10 g des methanolischen Extraktes mit verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität extrahiert, um störende Gerbstoffe, Fette und Wachse abzutrennen. Dieser Vorgang wurde dann auf ähnliche Weise mit weiteren 140 g des zur Verfügung stehenden Extraktes wiederholt [6].

10 g der daraus hervorgegangenen Ethylacetatfraktion wurden mit einer Säulen-chromatographie an Sephadex[®] LH-20 fraktioniert (SC 1). Da in der DC ein sehr komplexes Muster an phenolischen Inhaltsstoffen erkennbar war, wurden zwei der 15 erhaltenen Sammelfraktionen weiter an Sephadex[®] LH-20 aufgetrennt (SC 2 und 3). Zur Isolierung einzelner Flavonoide wurde mit Fraktion 22 der SC 2 eine Solid Phase Extraktion durchgeführt.

Einzelne Fraktionen von SC 1 und 2 wurden mit verschiedenen phenolischen Referenzsubstanzen und Zuckern dünnschichtchromatographisch bzw. in HPLC-Messungen untersucht.

Es konnten die Zucker Glucose, Fructose und Saccharose in der Ethylacetatfraktion und in den ersten drei Fraktionen der SC 1 nachgewiesen werden.

In den Fraktionen 11 und 12 der SC 1 gelang es, die grün fluoreszierende Bande bei Rf 0,74 durch mehrere DC-Vergleiche und HPLC-Analysen eindeutig als Astragalin zu identifizieren.

In einigen Fraktionen der SC 2 und der SPE kam es zu einer Niederschlagsbildung. Die Niederschläge wurden abgetrennt und untersucht.

Der Niederschlag der Fraktion 18 von SC 2 und die Niederschläge der Fraktionen 14 und 15 der SPE erschienen auf der DC und bei anschließenden HPLC-Untersuchungen als chromatographisch einheitlich. Daher sollten die Substanzen mittels LC-MS und NMR-Spektroskopie identifiziert werden.

Auch zwei weitere Fraktionen der SPE wurden mittels LC-MS analysiert.

Durch LC-MS und NMR-Analysen gelang es den Niederschlag der Fraktion 18 von SC 2 eindeutig als Homoplantagin zu identifizieren. Bei der auf der DC gelb fluoreszierenden Nebenkomponente mit einem Rf-Wert von 0,53 wurde aufgrund von LC-MS-Daten angenommen, dass es sich um Nepitrin handeln könnte. Jedoch war aufgrund der geringen Menge keine eindeutige Identifizierung mittels NMR-Spektroskopie durchführbar.

Homoplantagin und Nepitrin sind wenig verbreitete Flavonoide, die in *Scrophularia ningpoensis*, *Salvia plebea*, *Rosmarinus officinalis* und wenigen anderen Pflanzen vorkommen.

Bei den Niederschlägen der Fraktionen 14 und 15 waren hellgelbe, nadelförmige Kristalle erkennbar, die abgenutscht wurden, und anschließend ebenfalls mit LC-MS- und NMR- Analysen untersucht wurden.

Diese Substanz (=VL2) konnte als 2''-O-Acetyl-homoplantagin identifiziert werden, wobei es sich um einen neuen Naturstoff handelt.

5. Zusammenfassung

Scrophularia lucida (Scrophulariaceae) findet gemeinsam mit anderen *Scrophularia*-Arten bei diversen Haut- und Entzündungserkrankungen, unter anderem in der traditionellen türkischen Medizin Anwendung.

Bisher ist noch nichts über die Inhaltsstoffe dieser Pflanze bekannt und deshalb war das Ziel dieser Diplomarbeit, einen Teil der phenolischen Inhaltsstoffe aufzuklären, um eventuelle Unterschiede zu anderen *Scrophularia*-Arten zu ermitteln.

Aus einem methanolischen Extrakt des Krautes von *Scrophularia lucida* wurden mit verschiedenen polaren Lösungsmitteln Fraktionen hergestellt. Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Ethylacetatfraktion untersucht.

Zunächst wurde die Ethylacetatfraktion mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt und die dabei erhaltenen Fraktionen mittels SC und SPE weiter fraktioniert. Die daraus gewonnenen Fraktionen und isolierten Verbindungen wurden mit DC, HPLC, MS und NMR untersucht.

In der Ethylacetatfraktion und mehreren Fraktionen konnten die Zucker Fructose, Glucose und Saccharose nachgewiesen werden.

Mittels DC- und HPLC- Analysen wurde Astragalin (Kämpferol-3-O-glucosid) eindeutig identifiziert.

Ein in mehreren Fraktionen ausgefallener Niederschlag konnte durch NMR- und LC-MS- Untersuchungen eindeutig als Homoplantaginin identifiziert werden.

Es wurde eine weitere Reinsubstanz isoliert, deren Struktur ebenfalls mittels LC-MS- und NMR-Analysen als 2''-O-Acetyl-homoplantaginin aufgeklärt werden konnte. Es handelt sich dabei um einen neuen Naturstoff.

6. Summary

Together with other species of the same genus, *Scrophularia lucida* (Scrophulariaceae) since long has been used for skin as well as inflammatory diseases in traditional Turkish medicine.

Due to the lack of knowledge about the secondary metabolites of this species, the aim of this diploma thesis was the isolation and structure elucidation of phenolic compounds to reveal differences between the numerous *Scrophularia* species.

After fractionation of a methanolic extract of the aerial parts of *Scrophularia lucida* with solvents of different polarity, the object of the present diploma thesis was the analysis of the ethylacetate fraction.

The ethylacetate fraction was fractionated with size exclusion chromatography. Some of the resulting fractions were further separated with column chromatography or solid phase extraction (SPE). Selected fractions and isolated substances were analysed by thin layer chromatography, HPLC, LC-MS and NMR.

The sugars glucose, fructose and saccharose were detected in the ethylacetate fraction and in some other fractions.

Astragalin (kaempferol-3-O-glucoside) was definitely identified by thin layer chromatography and HPLC-analyses.

The structure of a precipitate in several fractions was identified by NMR and LC-MS analyses as homoplantaginine.

With the same methods the structure of another isolated substance as 2''-O-acetyl-homoplantaginine, was unambiguously elucidated, which comprises a new natural compound.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Scrophularia lucida</i> (L.)	1
Abbildung 2: Säulenchromatographie	5
Abbildung 3: SPE-Apparatur.....	8
Abbildung 4: Gefriertrocknung	9
Abbildung 5: Extraktionsschema	11
Abbildung 6: DC der Fraktionen nach der Vorfraktionierung	13
Abbildung 7: DC-Vergleich der Ethylacetat/Butanol-Fraktion mit Zuckern	14
Abbildung 8: DC-Vergleich mit Zuckern	15
Abbildung 9: DC der Sammelfractionen von SC 1	16
Abbildung 10: DC der Sammelfractionen der SC 2	19
Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 18 Ns/SC 2	22
Abbildung 12: UV-Spektrum bei 19,95min.....	22
Abbildung 13: UV-Spektrum bei 18,16min.....	22
Abbildung 14: DC der Sammelfractionen von SC 3.....	23
Abbildung 15: DC der Sammelfractionen der SPE	26
Abbildung 16: Niederschlag der Fraktion 15/SPE.....	28
Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 4/SPE	29
Abbildung 18: UV-Spektrum bei 25,63min.....	29
Abbildung 19: UV-Spektrum bei 33,06min.....	29
Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm des Niederschlags der Fraktion 15/SPE	30
Abbildung 21: UV-Spektrum der Substanz bei 43,86min.....	30
Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 18/SPE	31
Abbildung 23: UV-Spektrum bei 43,62min.....	32
Abbildung 24: UV-Spektrum bei 45,79min.....	32
Abbildung 25: DC-Vergleich der EtOAc-Fraktion mit Rutin und Quercetin	33
Abbildung 26: DC der Fraktionen 1-3/SC 1	34
Abbildung 27: DC der Fraktionen 1-3/SC 1	35
Abbildung 28: DC-Vergleiche der SF 1-3/SC 1 mit Zuckern	35
Abbildung 29: DC-Vergleich mit Flavonoiden	36
Abbildung 30: DC-Vergleich mit Flavonoiden	37
Abbildung 31: DC-Vergleich mit Chlorogensäure	38
Abbildung 32: DC-Vergleich mit Phenolcarbonsäuren.....	39
Abbildung 33: DC-Vergleich von Fr. 15 und 19/SC 2 mit Astragalin.....	40
Abbildung 34: DC-Vergleich mit Astragalin.....	41
Abbildung 35: DC-Vergleich mit Astragalin in einem weiteren DC-System.....	42
Abbildung 36: DC-Vergleich mit Kämpferol-7-O-neohesperidosid.....	43

Abbildung 37: DC-Vergleich mit Phenolcarbonsäuren	44
Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektrum von Fr. 12/SC 1	45
Abbildung 39: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektrum von Astragalin	46
Abbildung 40: HPLC-Chromatogramm der Mischung aus Fr. 12/SC 1 und Astragalin	47
Abbildung 41: VL1 (=Homoplantaginin).....	49
Abbildung 42: VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantagin).....	51
Abbildung 43: Wirksamkeit verschiedener Fraktionen aus dem methanolischen Extrakt aus <i>Scrophularia lucida</i> im CCID-Assay	55

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HPLC Parameter	6
Tabelle 2: Extraktmengen der Vorfraktionierung.....	12
Tabelle 3: Sammelfractionen der SC 1	17
Tabelle 4: Sammelfractionen der SC 2	20
Tabelle 5: Sammelfractionen der SC 3	25
Tabelle 6: Sammelfractionen der SPE	27
Tabelle 7: ¹ H-NMR und ¹³ C-NMR-Daten von Homoplantagin in DMSO.....	50
Tabelle 8: ¹ H-NMR und ¹³ C-NMR-Daten von Substanz VL2.....	52

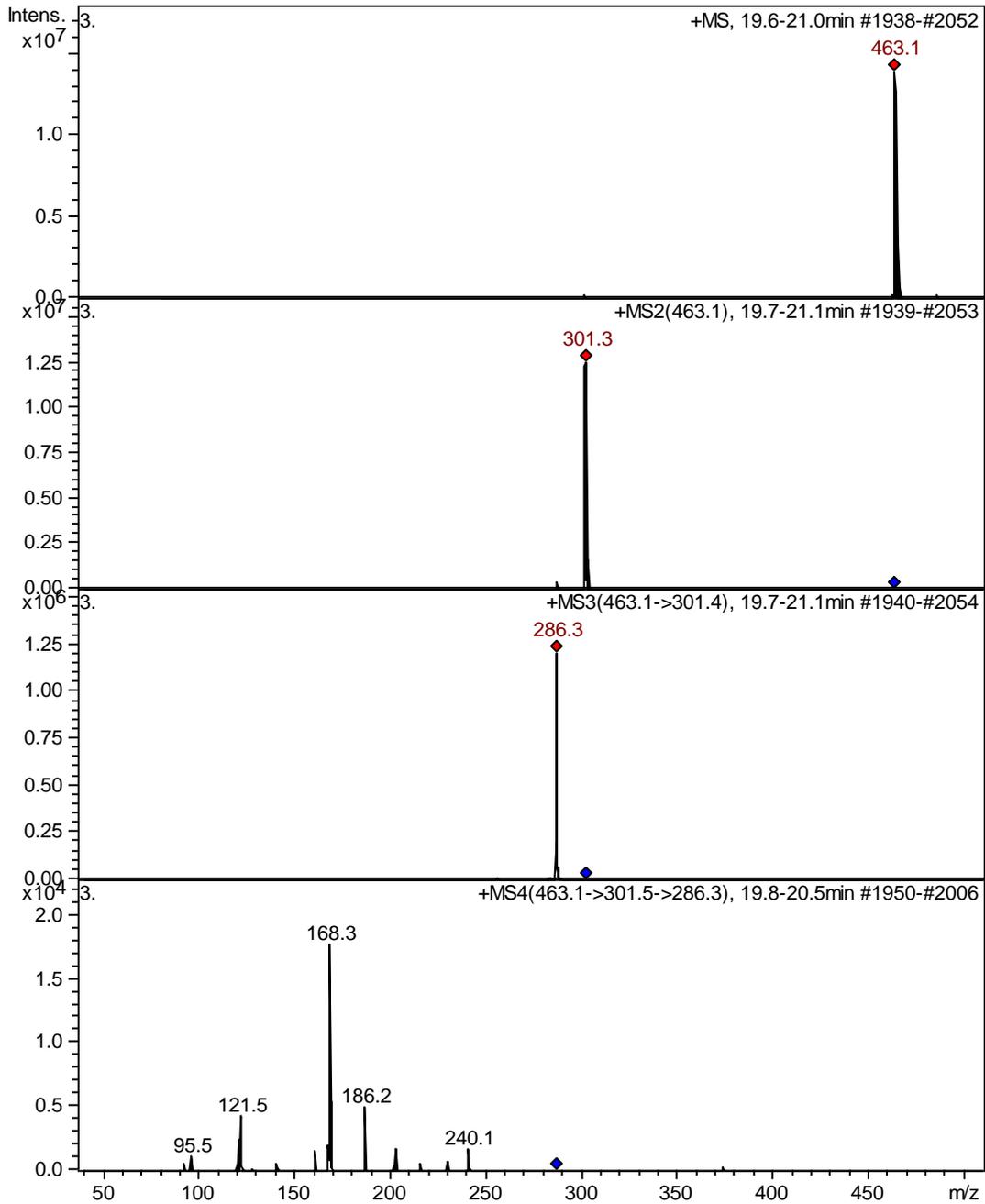
9. Literaturverzeichnis

- [1] Makbul S., Coskuncelebi K., Türkmen Z., Beyazoglu O. (2006) Morphology and Anatomy of *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) taxa from NE Anatolia. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA SERIES BOTANICA* **48**, (1): 33-43
- [2] <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?33420>, zuletzt abgerufen am 07.02.2014
- [3] http://crdp.ac-besancon.fr/flore/scrophulariaceae/especes/scrophularia_lucida.htm, zuletzt abgerufen am 07.02.2014
- [4] Galindez J.D., Lanza A.M.D., Matellano L.F. (2002) Biologically Active Substances from the Genus *Scrophularia*. *PHARMACEUTICAL BIOLOGY* **40**, (1): 45-99
- [5] Giessrigl B., Yazici G., Teichmann M., Kopf S., Ghassemi S., Atanasov A., Dirsch V., Grusch M., Jäger W., Özmen A., Krupitza G. (2012) Effects of *Scrophularia* Extracts on Tumor Cell Proliferation, Death and Intravasation through Lymphoendothelial Cell Barriers. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* **40**, (6): 2063-2074
- [6] Schweighofer L. Diplomarbeit, Universität Wien, in Vorbereitung
- [7] Wall M.E., Wani M.C., Brown D.M., Fullas F., Olwald J.B., Josephson F.F., Thornton N.M., Pezzuto J.M., Beecher C.W.W., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Kinghorn A.D. (1996) Effect of tannins on screening plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *PHYTOMEDICINE* **3**, (3): 281-285
- [8] Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M. (1983) Drogenanalyse, Dünnschicht-chromatographische Analyse von Arzneistoffen. Springer-Verlag, Berlin: 299, 304
- [9] Pemp E. (2005) Analytik pharmazeutisch relevanter Flavonoide mittels HPLC/ UV, HPLC/ MS und HPLC/ UV/ MS. Dissertation, Universität Wien
- [10] Dhawa Z., Bai Y., Zhou Y., Gesang S., Ping A., Ding L. (2009) Chemical constituents of the whole plants of *Saussurea medusa*. *JOURNAL OF NATURAL MEDICINES* **63**: 327-330

- [11] Wang M., Li J., Meera R., Shao Y., LaVoie E.J., Huang T., Ho C. (1998) Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY **46**, (12): 4869-4873
- [12] Li J., Huang X., Du X., Sun., Zhang Y. (2008) Study of chemical composition and antimicrobial activity of leaves and roots of *Scrophularia ningpoensis*. NATURAL PRODUCT RESEARCH **23**, (8): 775-780
- [13] Abd-Alla H.I., Abu Gabal N.S., Hassan A.Z., El-Safty M.M., Shalaby N.M. M. (2011) Antiviral Activity of *Aloe hijazensis* against some Haemagglutinating Viruses Infection and its Phytoconstituents. ARCHIVES OF PHARMACAL RESEARCH **35**, (8): 1347-1354

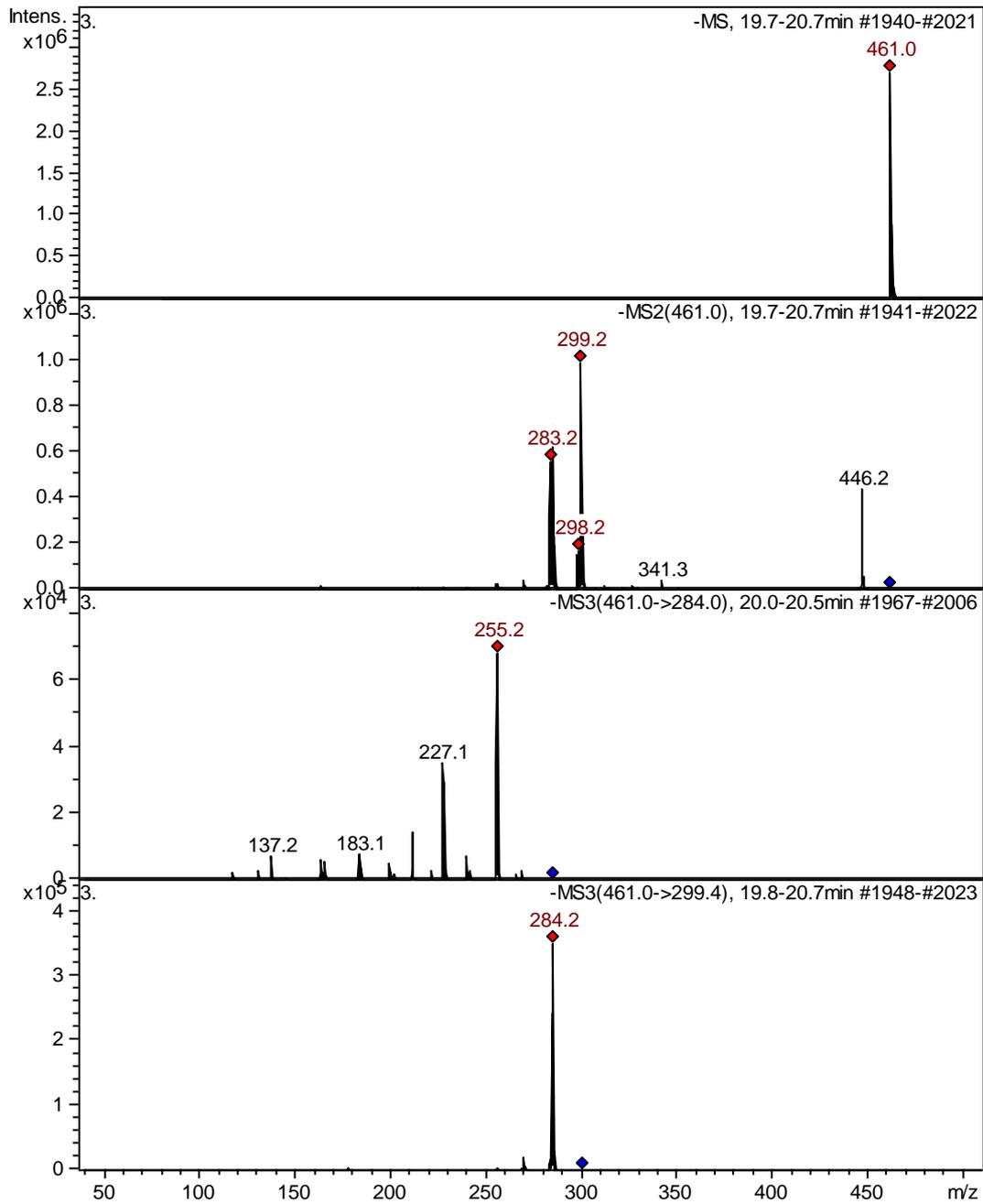
Anhang

Anhang 1: MS-Spektren von VL1 (=Homoplantagin) im Positivionenmodus



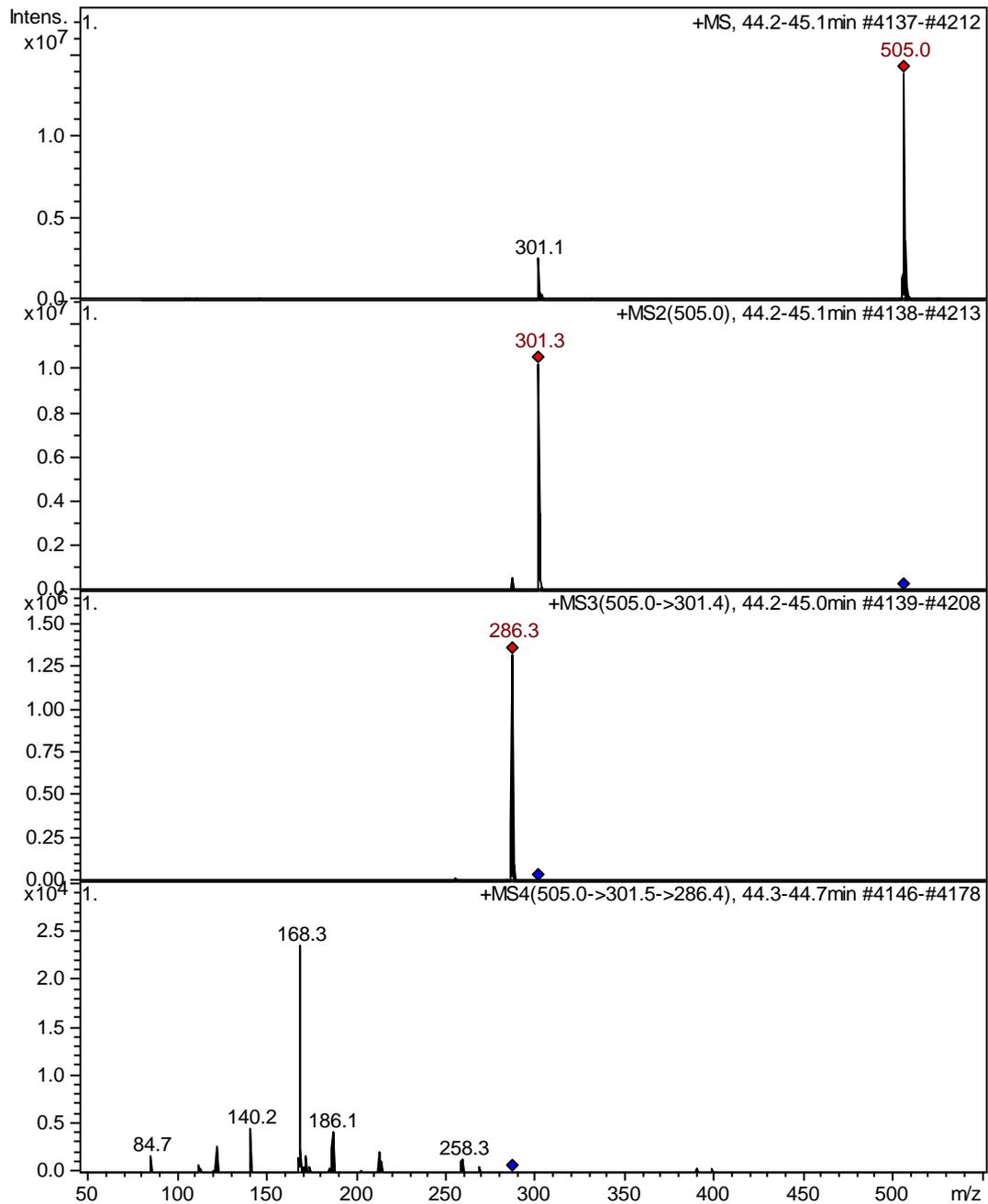
Positivionen-MS¹; MS² des [M+H]⁺ bei m/z 463,1; MS³ (m/z 463,1 → 301,3 →); MS⁴ (m/z 463,1 → 301,3 → 286,3 →)

Anhang 2: MS-Spektren von VL1 (=Homoplantaginin) im Negativionenmodus



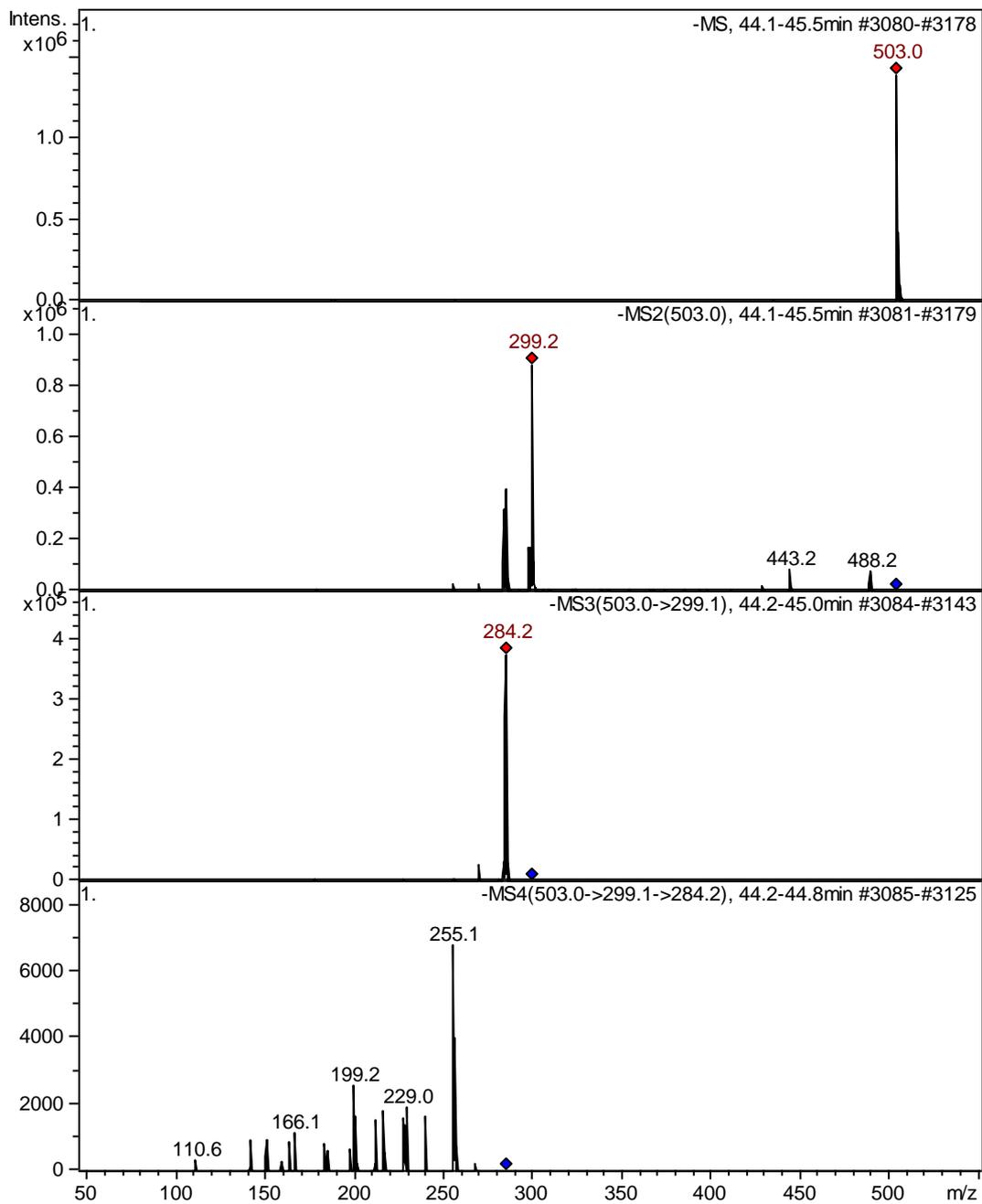
Negativionen-MS¹; MS² des [M-H]⁻ bei m/z 461,0; MS³ (m/z 461,0 → 283,2 →);
MS³ (m/z 461,0 → 299,2 →)

Anhang 3: MS-Spektren von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantagin) im Positivenmodus



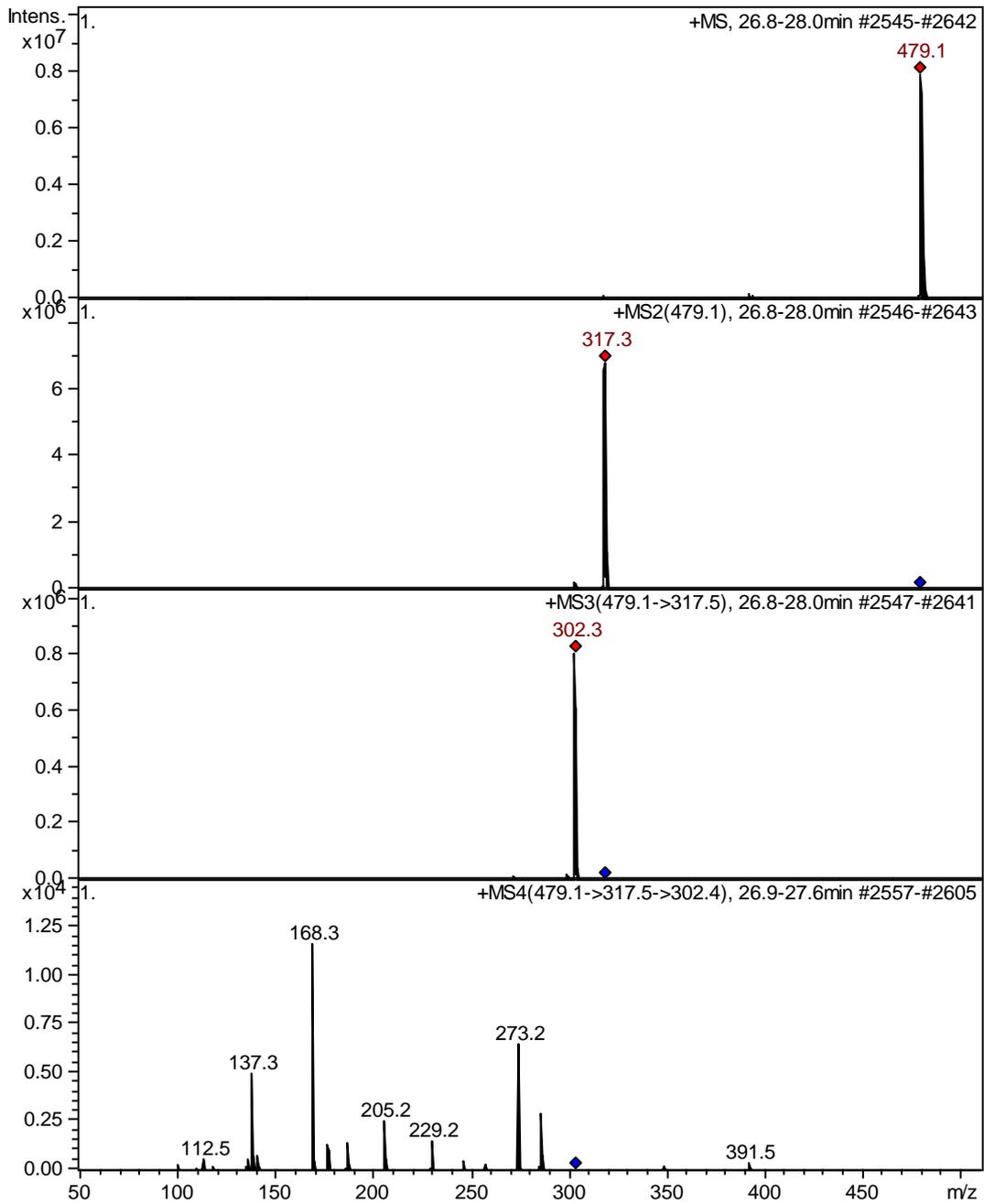
Positiven-MS¹; MS² des [M+H]⁺ bei m/z 505,0; MS³ (m/z 505,0 → 301,3 →); MS⁴ (m/z 505,0 → 301,3 → 286,3 →)

Anhang 4: MS-Spektren von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantaginin) im Negativionenmodus



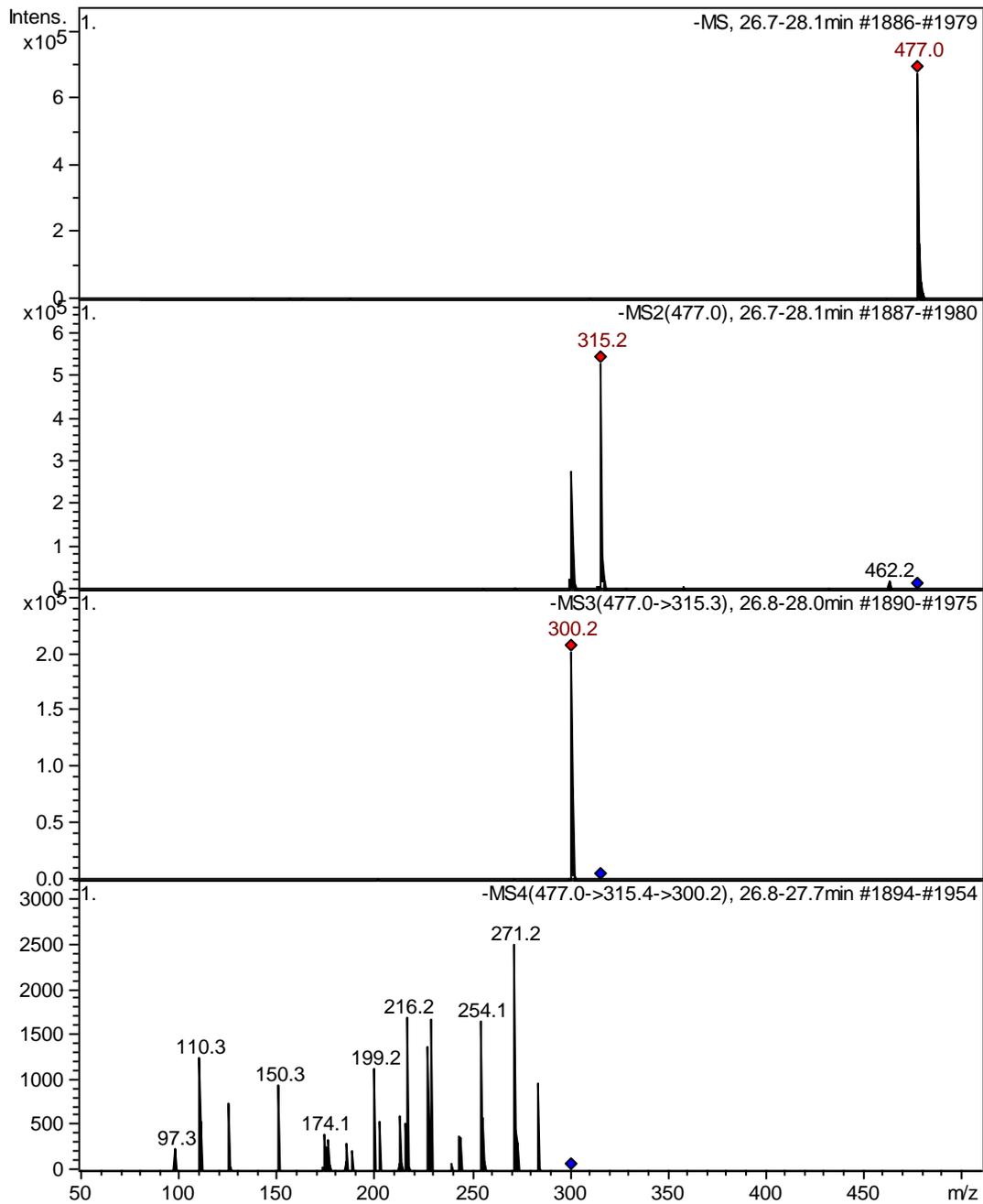
Negativionen-MS¹; MS² des [M-H]⁻ bei m/z 503,0; MS³ (m/z 503,0 → 299,2 →); MS⁴ (m/z 503,0 → 299,2 → 284,2 →)

Anhang 5: MS-Spektren von VL3 im Positivionenmodus



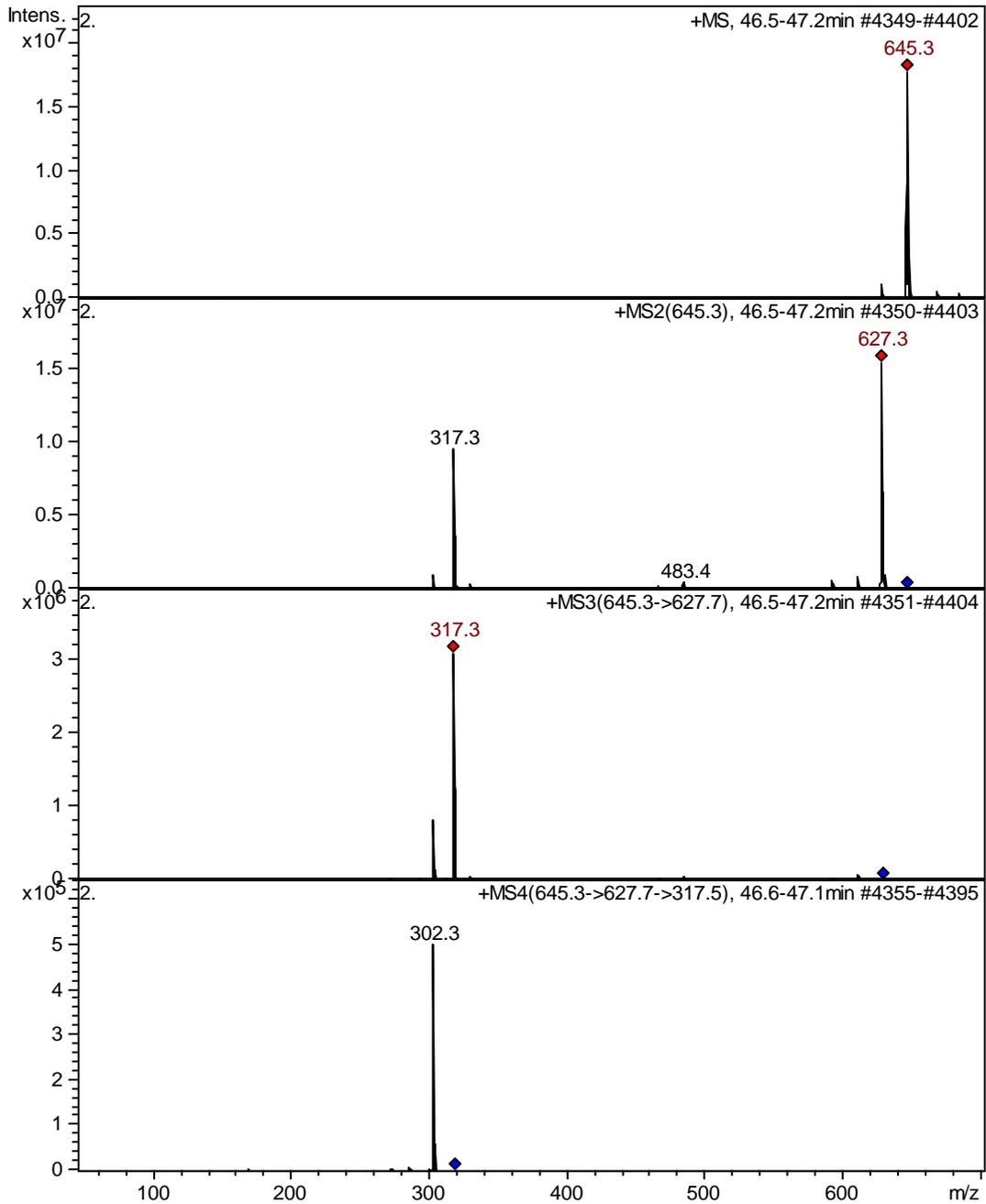
Positivionen-MS¹; MS² des [M+H]⁺ bei m/z 479,1; MS³ (m/z 479,1 → 317,3 →); MS⁴ (m/z 479,1 → 317,3 → 302,3 →)

Anhang 6: MS-Spektren von VL3 im Negativionenmodus



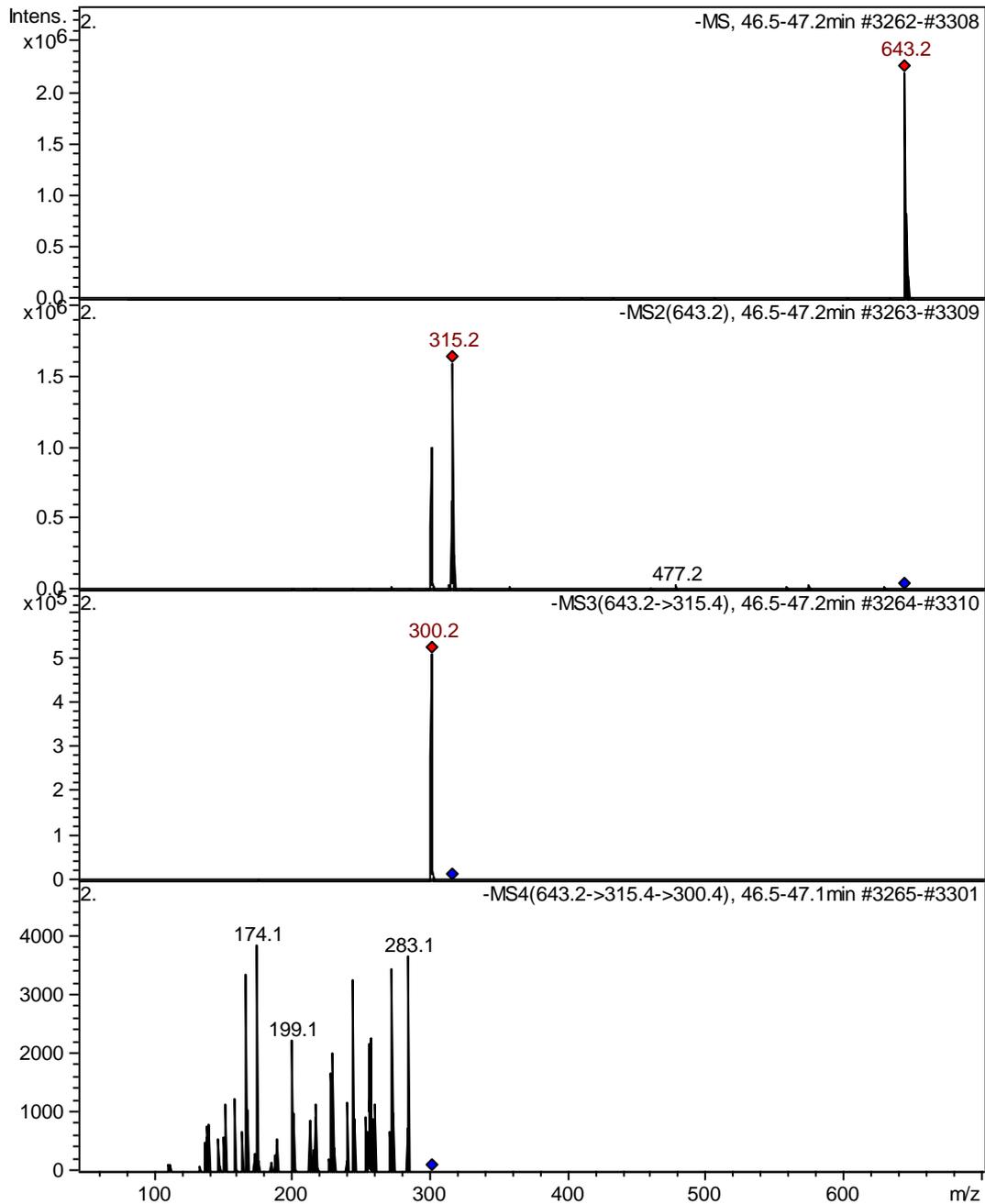
Negativionen-MS¹; MS² des [M-H]⁻ bei m/z 477,0; MS³ (m/z 477,0 → 315,2 →); MS⁴ (m/z 477,0 → 315,2 → 300,2 →)

Anhang 7: MS-Spektren von VL4 im Positivionenmodus



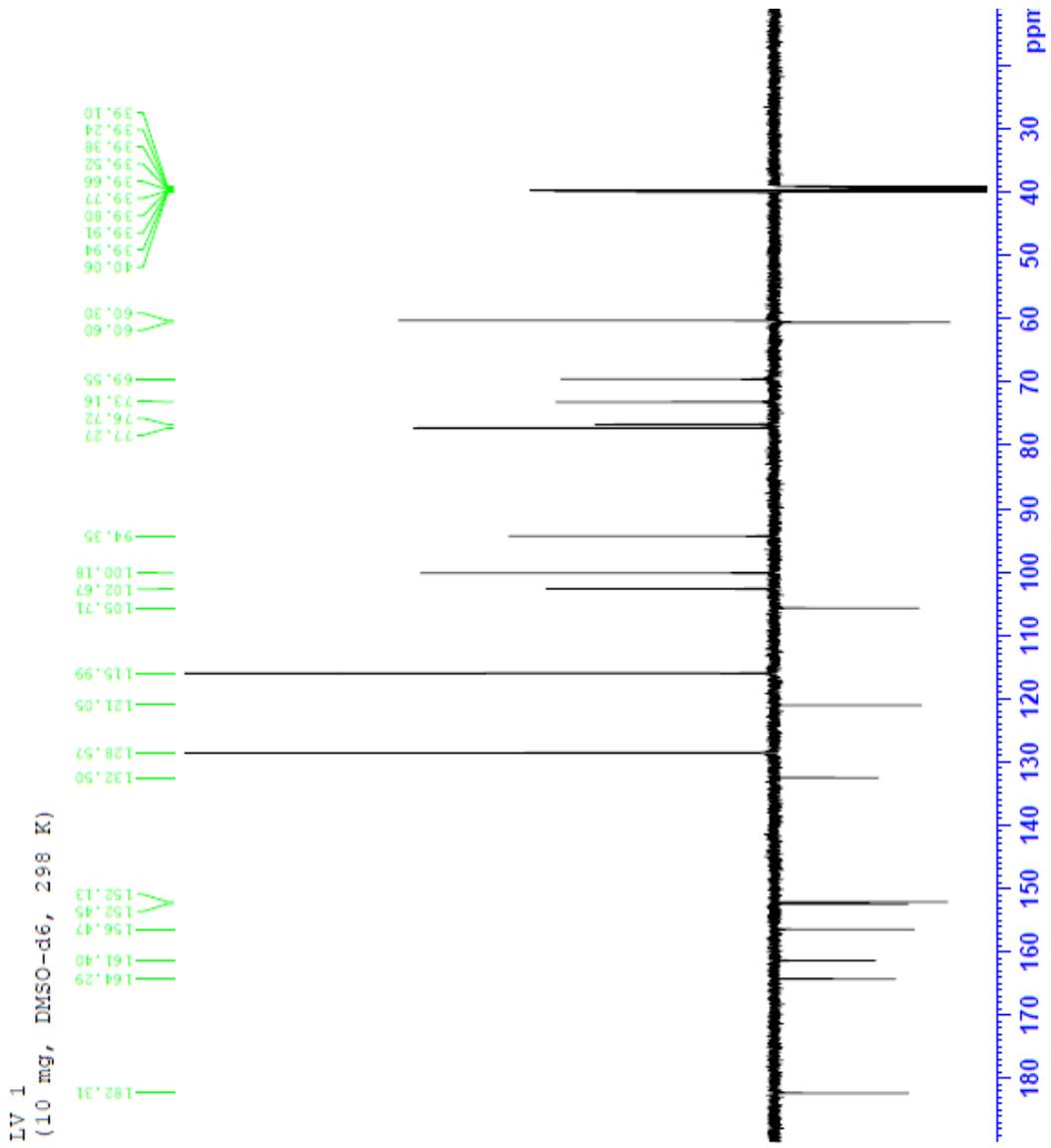
Positivionen-MS¹; MS² des [M+H]⁺ bei m/z 645,3; MS³ (m/z 645,3 → 627,3 →); MS⁴ (m/z 645,3 → 627,3 → 317,3 →)

Anhang 8: MS-Spektren von VL4 im Negativionenmodus

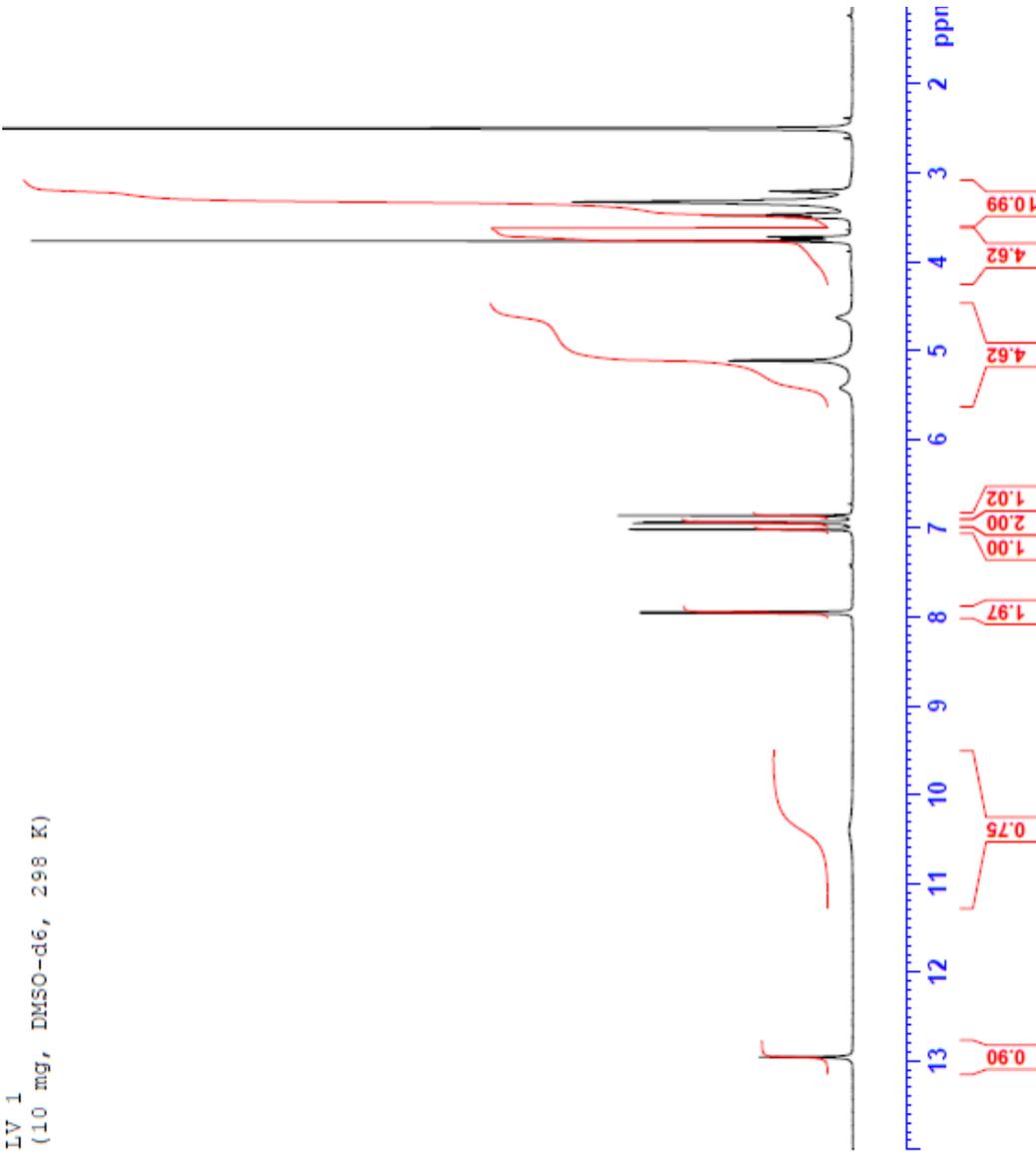


Negativionen-MS¹; MS² des [M-H]⁻ bei m/z 643,2; MS³ (m/z 643,2 \rightarrow 315,2 \rightarrow); MS⁴ (m/z 643,2 \rightarrow 315,2 \rightarrow 300,2 \rightarrow)

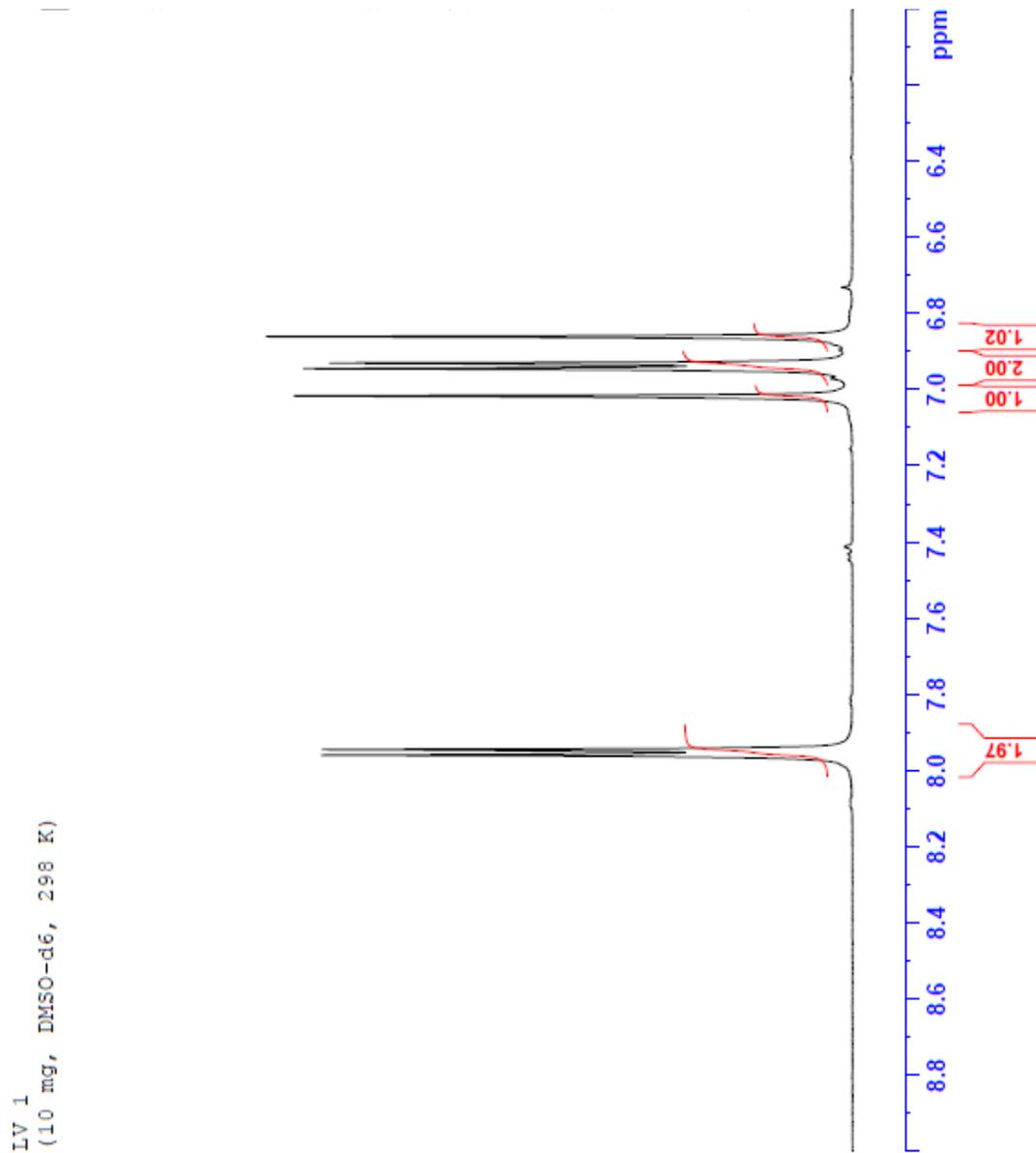
Anhang 9: ^{13}C -NMR- Spektrum von VL1 (=Homoplantaginin) in DMSO



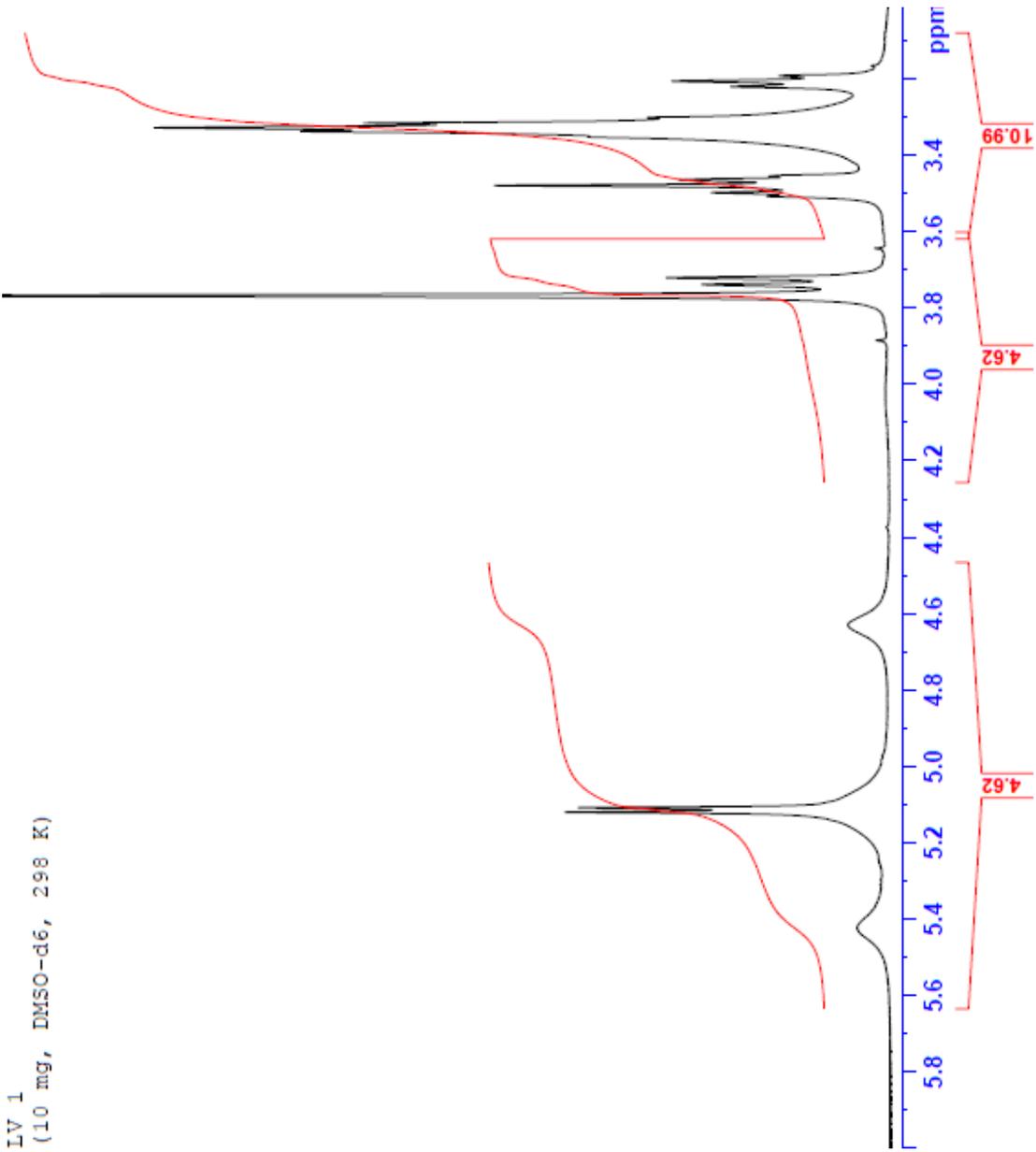
Anhang 10: ¹H-NMR-Spektrum von VL1 (=Homoplantagin) in DMSO



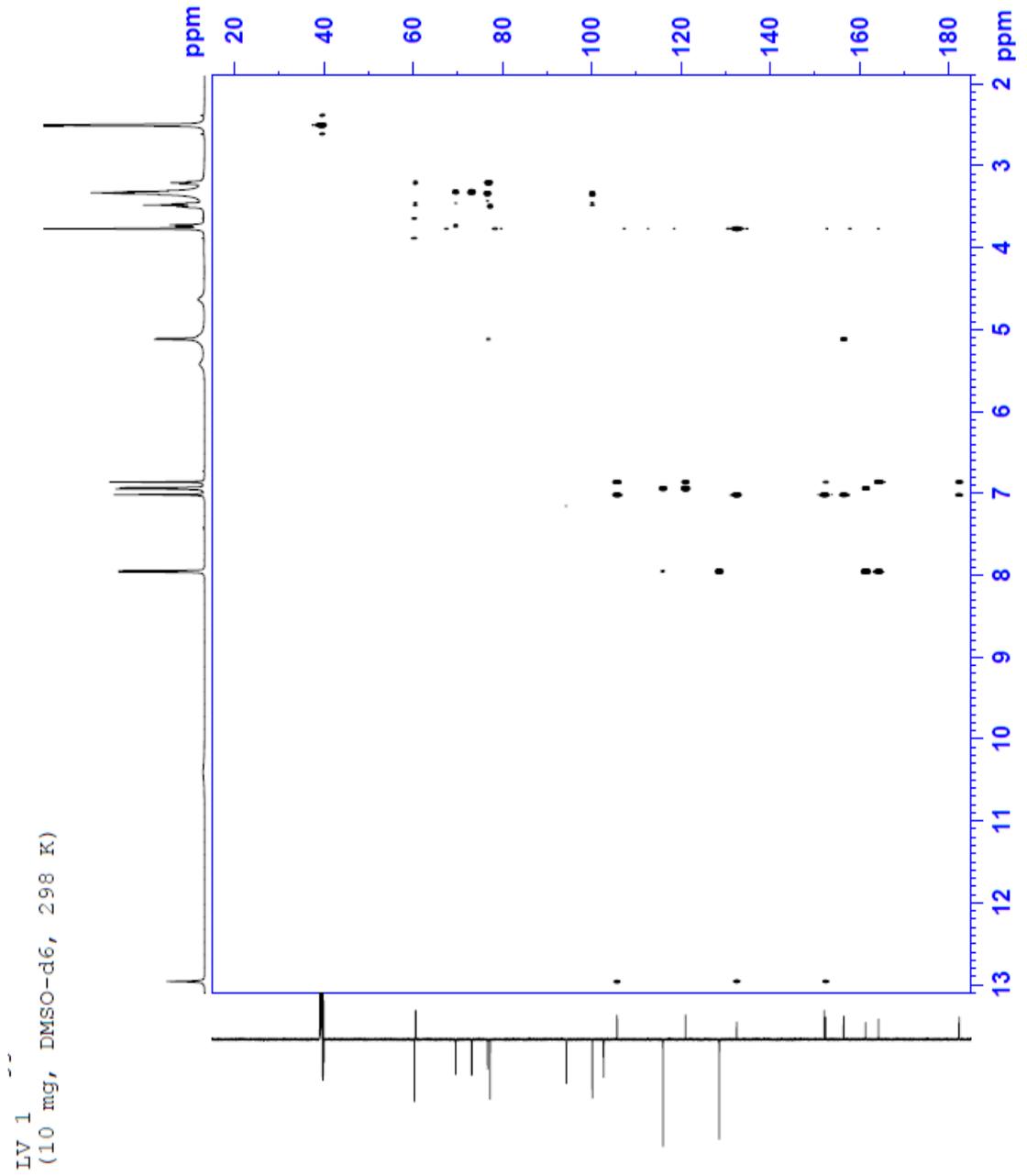
Anhang 11: Ausschnitt $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von VL1 (=Homoplantaginin)
6,2-9 ppm



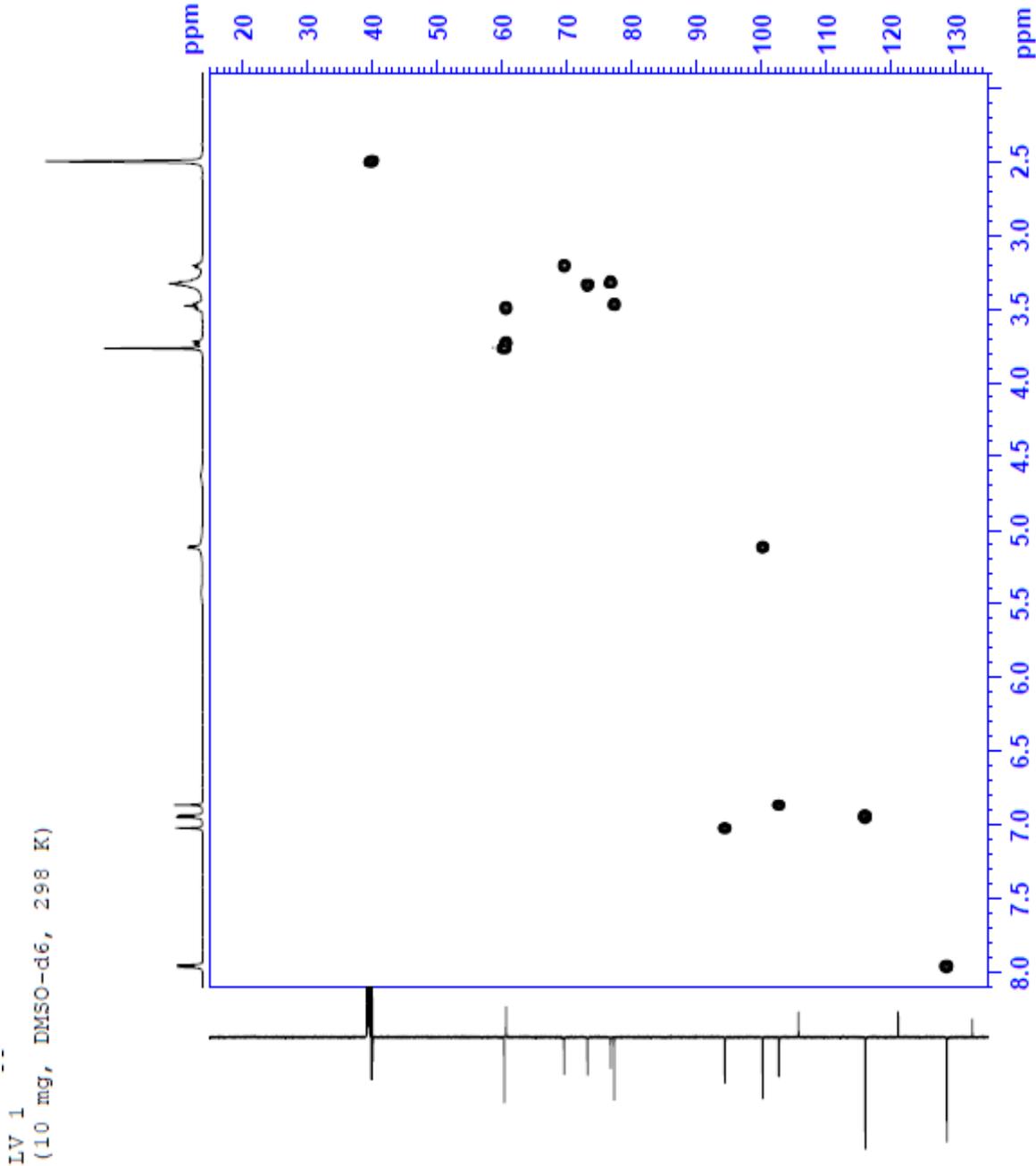
Anhang 12: Ausschnitt ¹H-NMR-Spektrum von VL1 (=Homoplantagin)
3,2-6 ppm



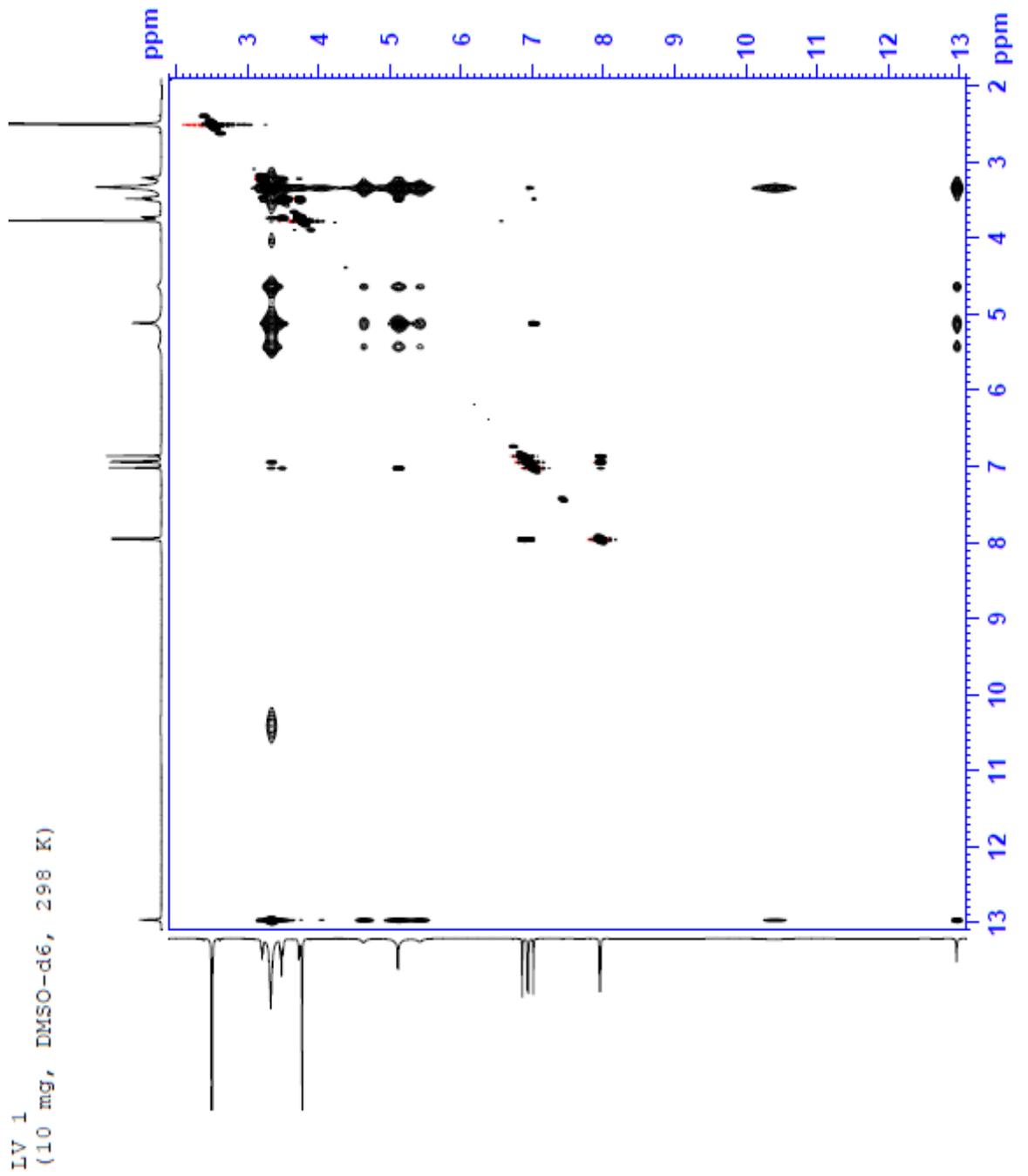
Anhang 13: HMBC-Spektrum von VL1 (=Homoplantaginin) in DMSO



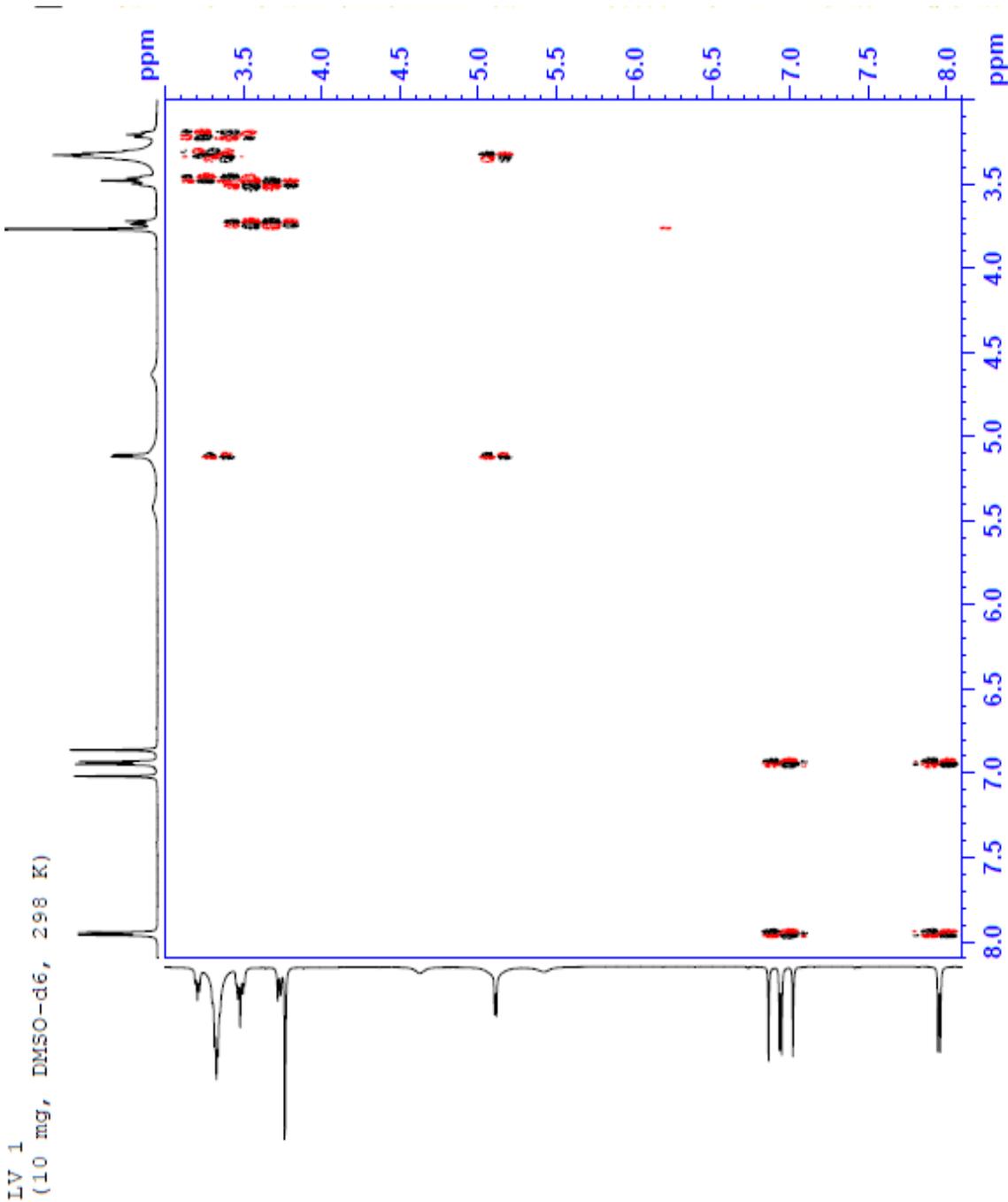
Anhang 14: HSQC-Spektrum von VL1 (=Homoplantaginin) in DMSO



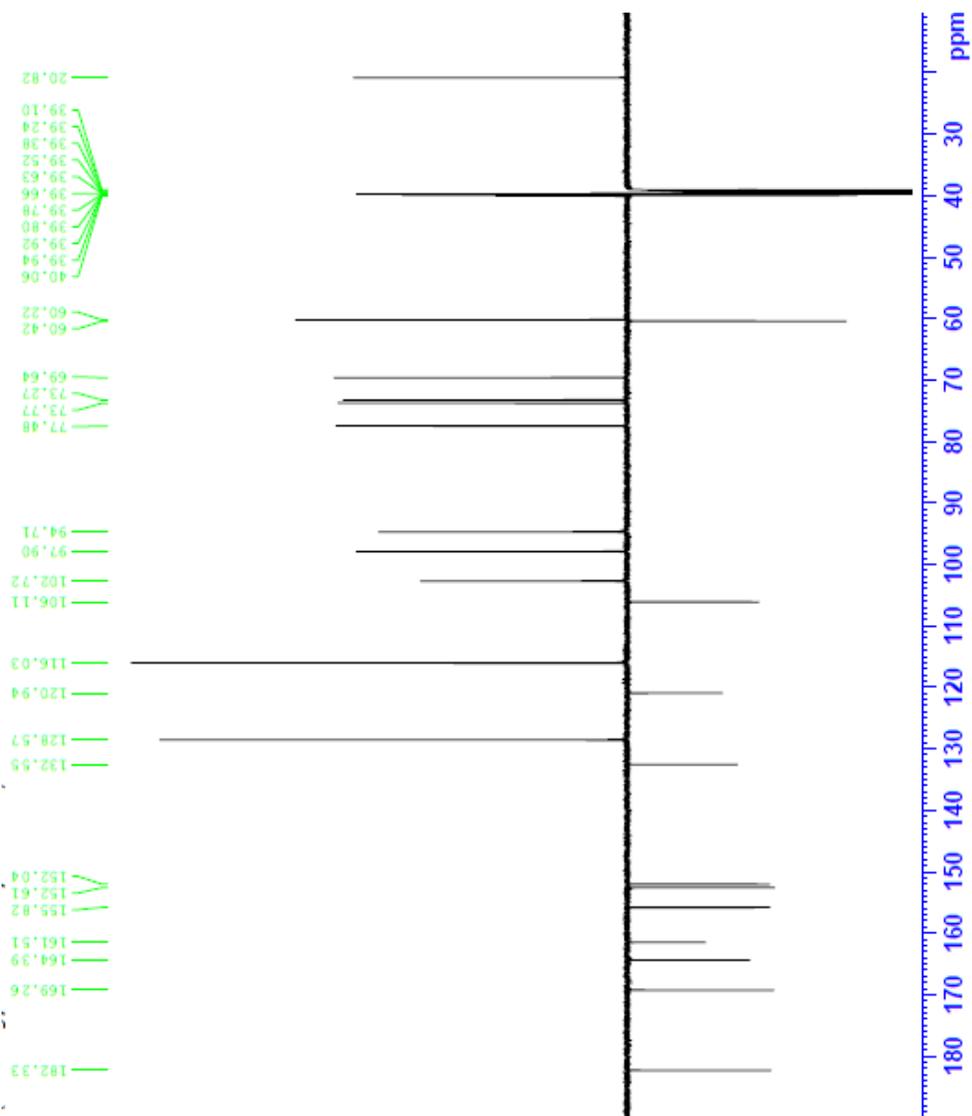
Anhang 15: NOESY- Spektrum von VL1 (=Homoplantaginin) in DMSO



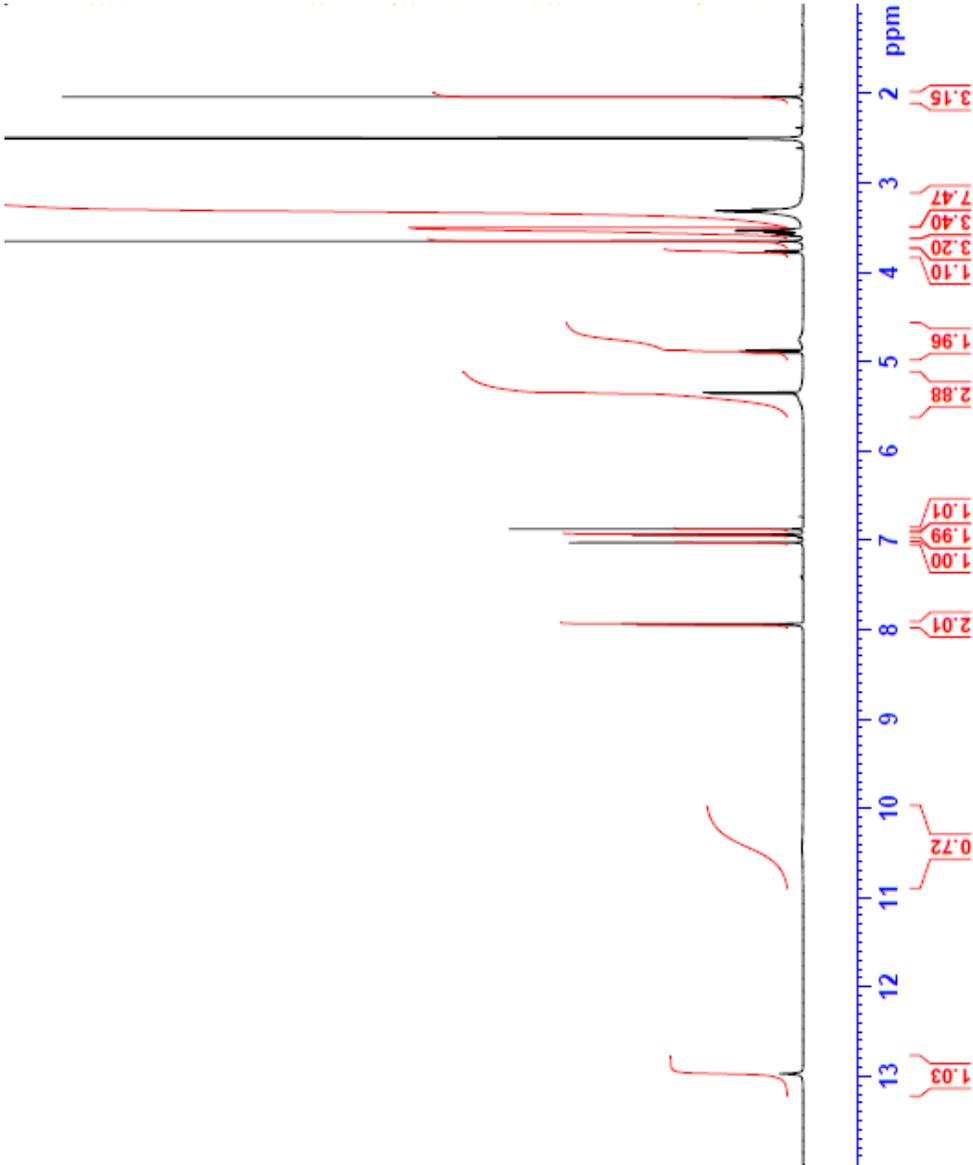
Anhang 16: COSY-Spektrum von VL1 (=Homoplantaginin) in DMSO



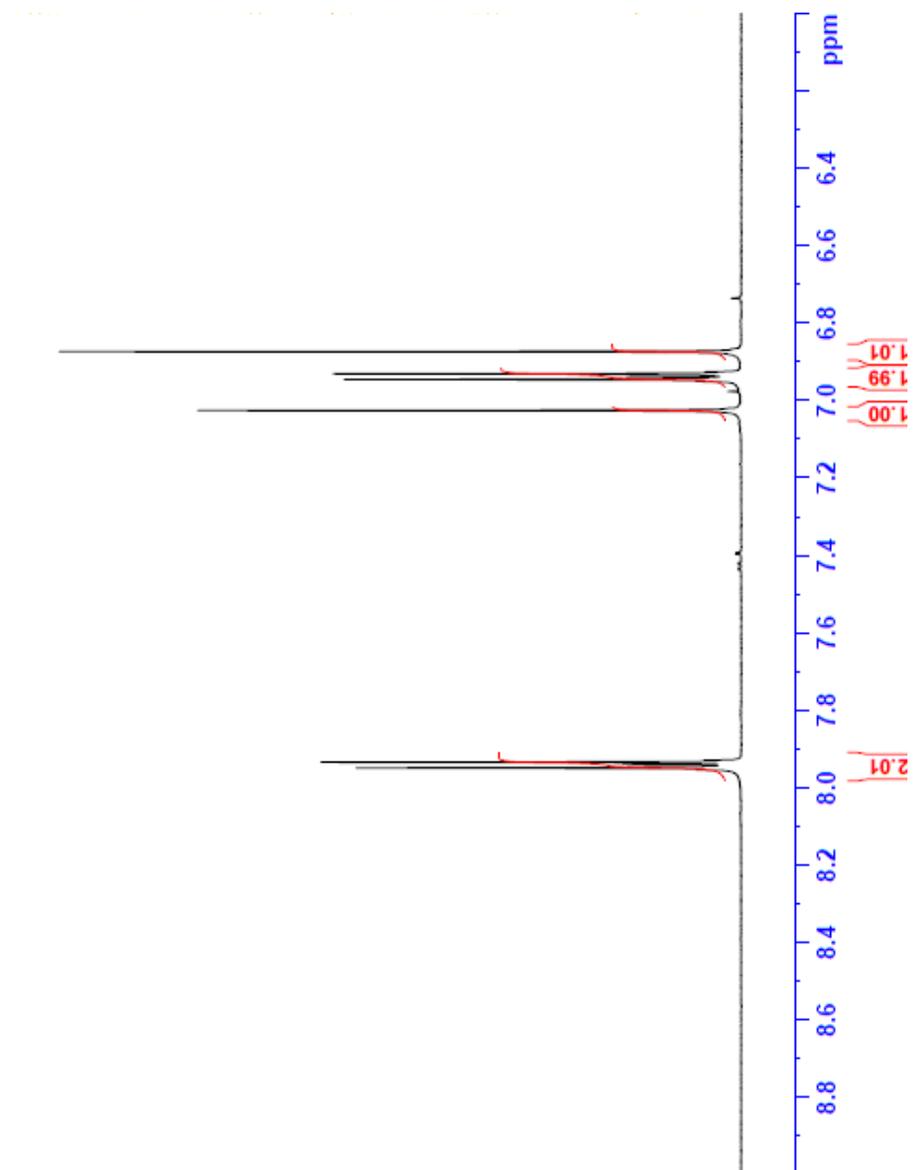
Anhang 17: ^{13}C -NMR- Spektrum von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantaginin)
in DMSO



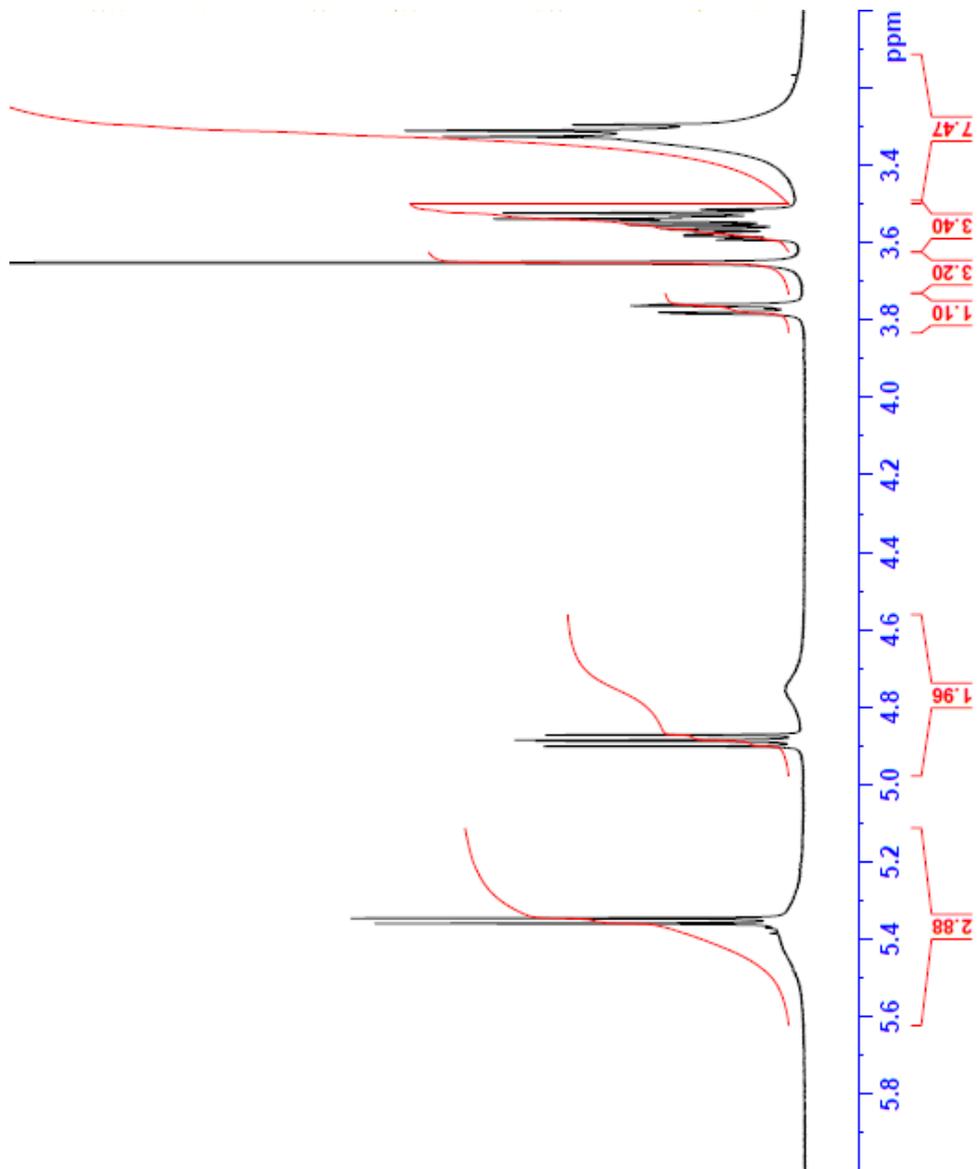
Anhang 18: ¹H-NMR-Spektrum von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantagin) in DMSO



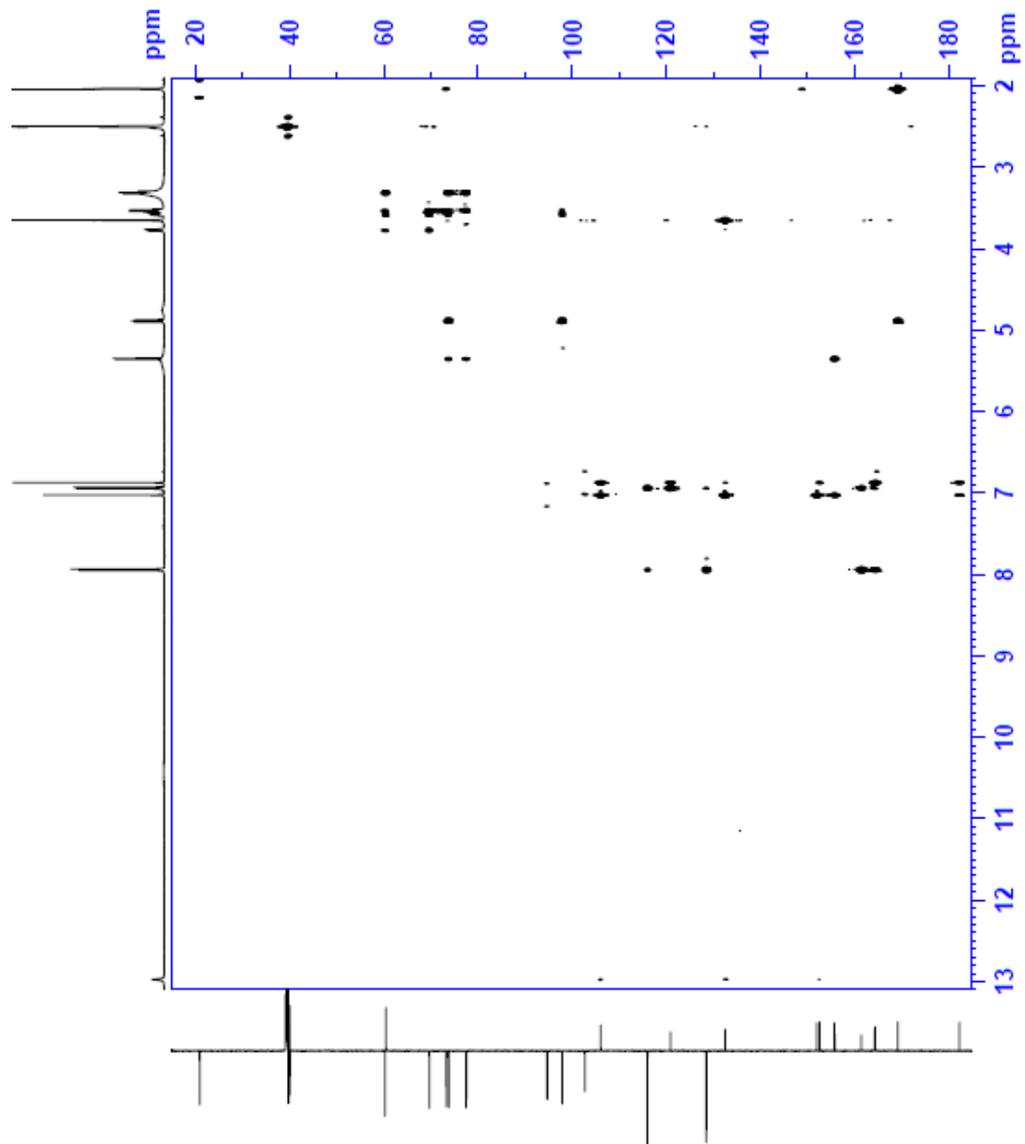
Anhang 19: Ausschnitt ^1H -NMR-Spektrum von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantaginin) in DMSO 6,4-8,8 ppm



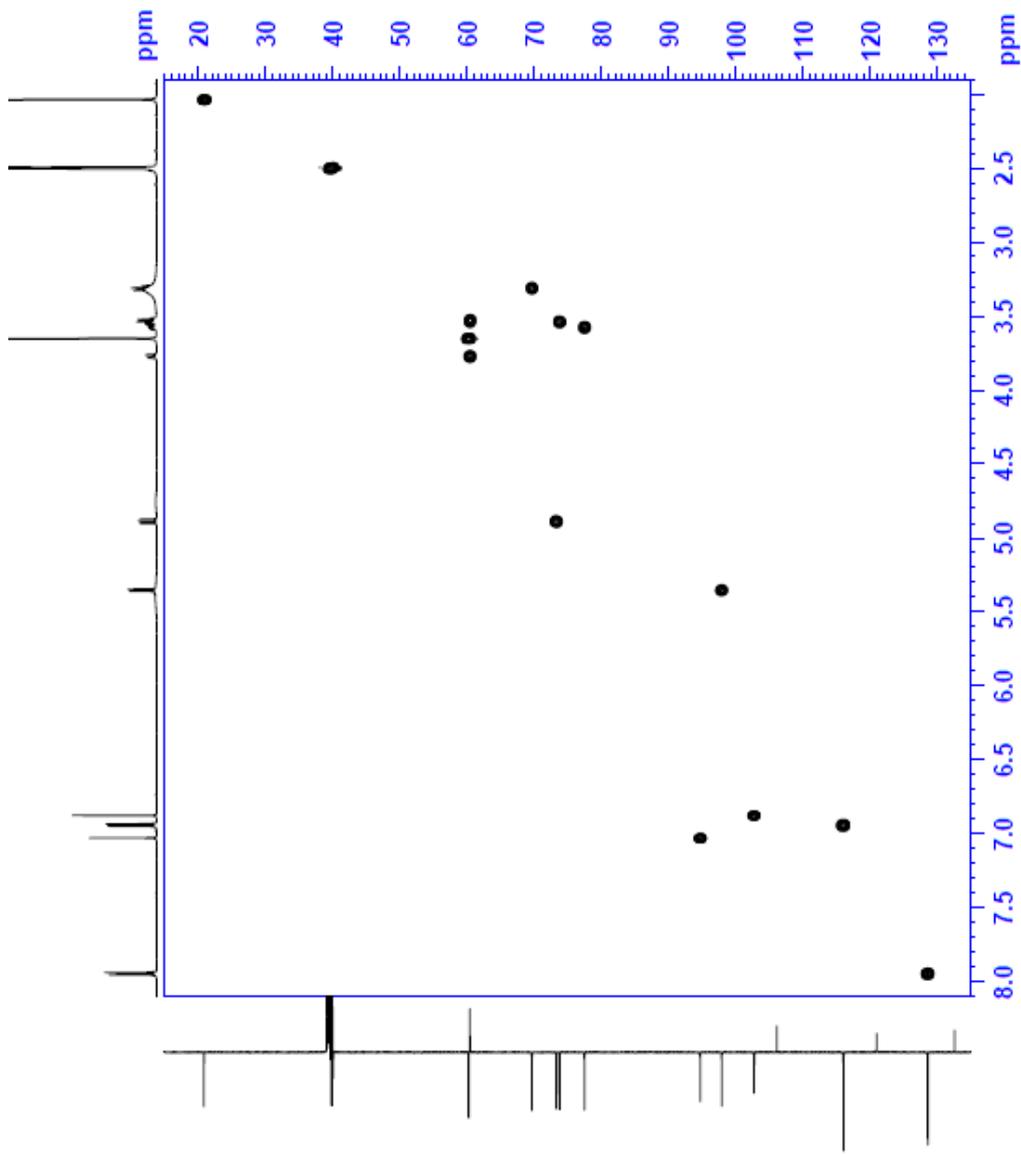
Anhang 20: Ausschnitt ¹H-NMR-Spektrum von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantaginin) in DMSO 3,4-5,8 ppm



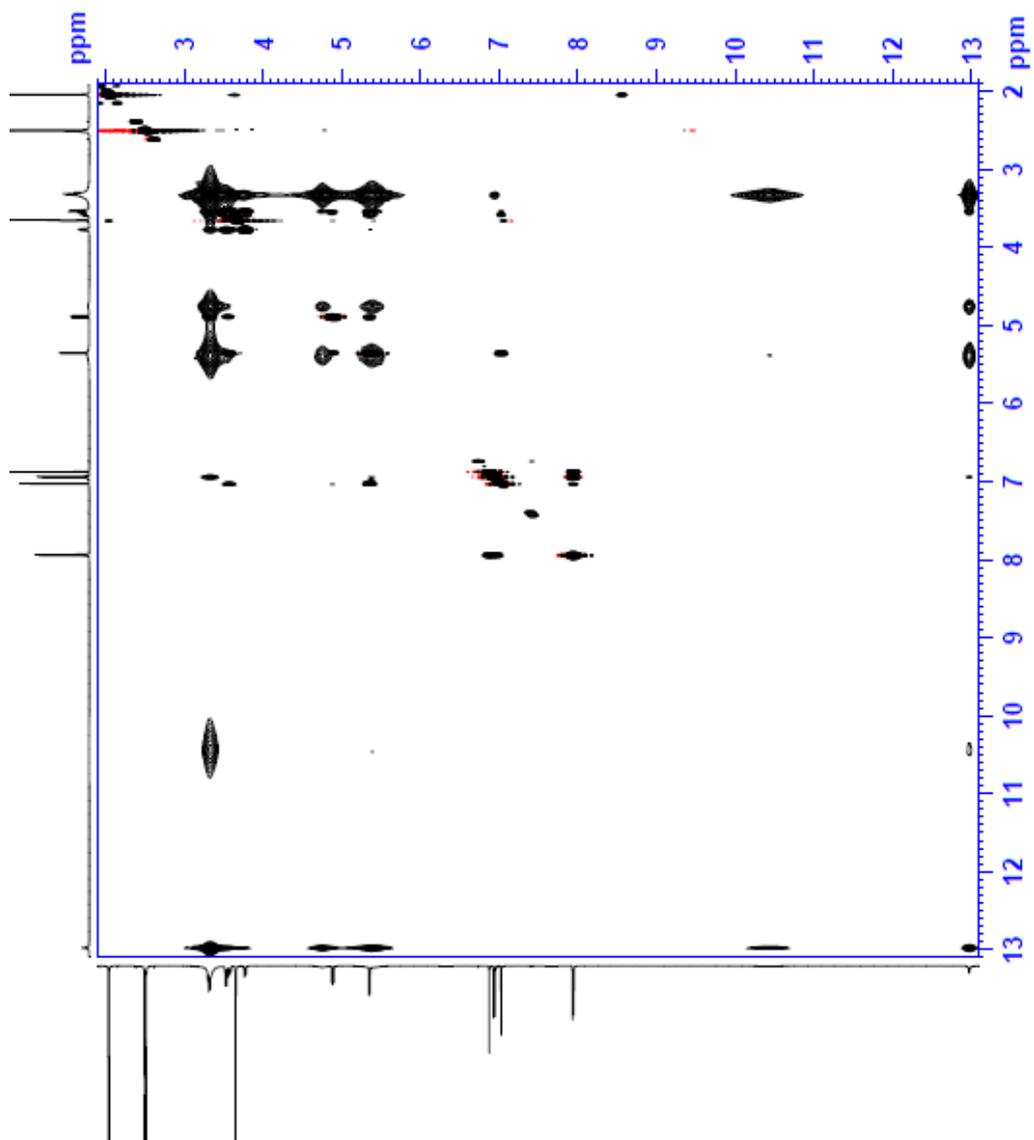
Anhang 21: HMBC-Spektrum von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantaginin) in DMSO



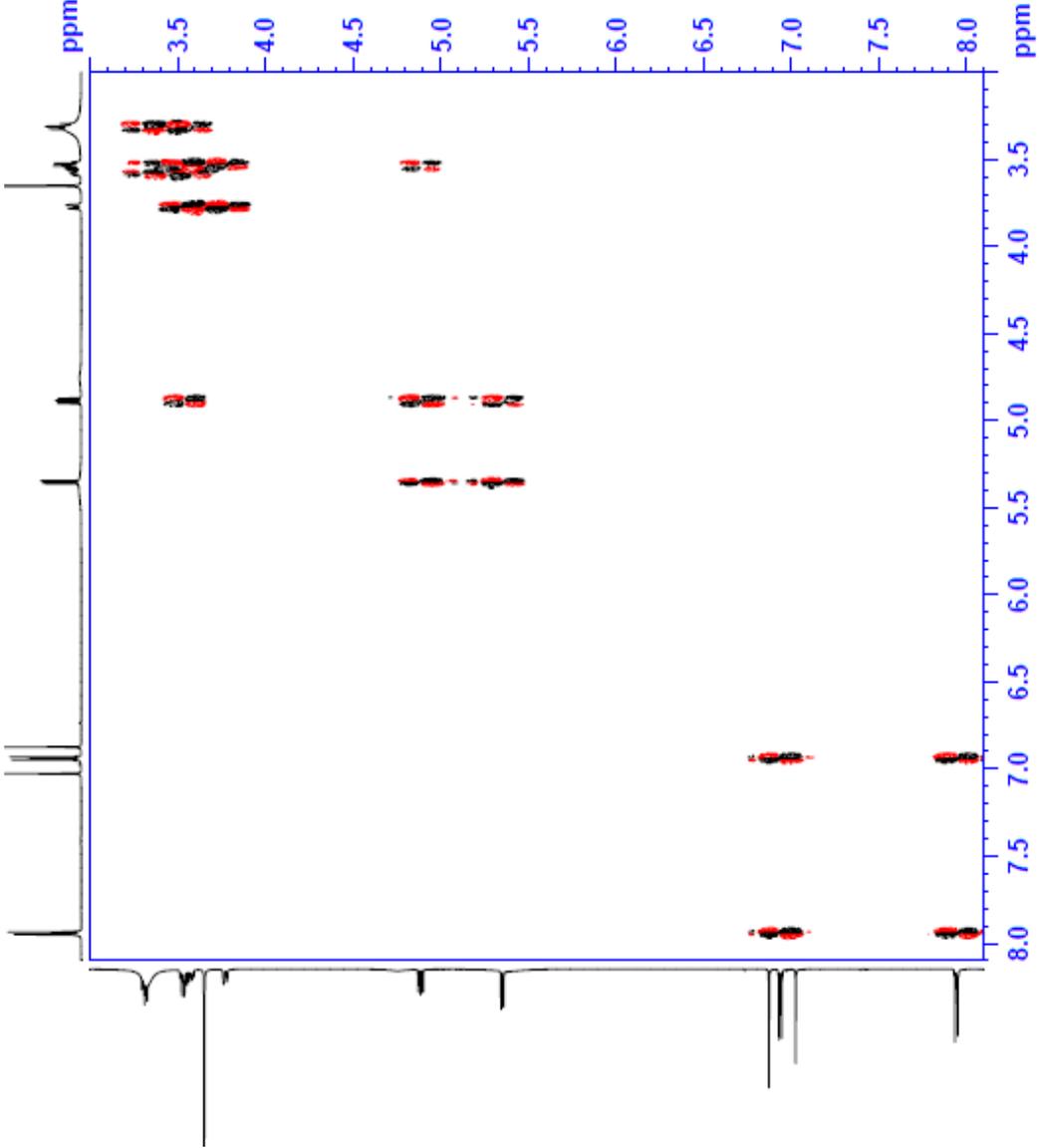
Anhang 22: HSQC-Spektrum von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantagin) in DMSO



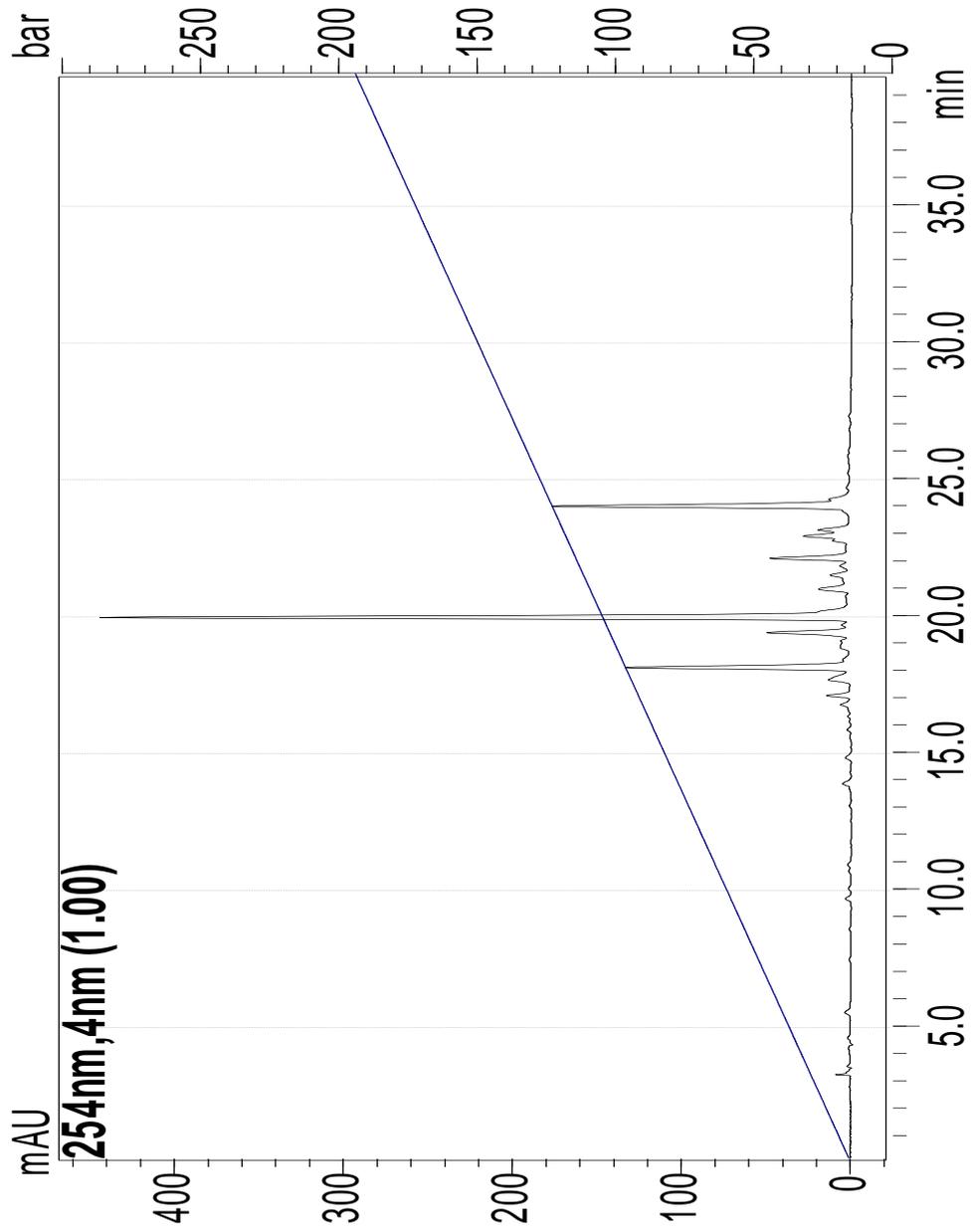
Anhang 23: NOESY-Spektrum von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantagin) in DMSO



Anhang 24: COSY-Spektrum von VL2 (=2''-O-Acetyl-homoplantaginin) in DMSO



Anhang 25: HPLC-Chromatogramm der Ethylacetatfraktion



Curriculum vitae

Name: Verena Lewenhofer
Geburtsdatum: 25. September 1990
Geburtsort: Fürstenfeld
Staatsangehörigkeit: Österreich
Eltern: Anna Lewenhofer (geb. Goger)
Günter Lewenhofer

Ausbildung

1996-2000 Volksschule, 8282 Loipersdorf
2000-2008 BG/ BRG Fürstenfeld
Schulzweig Gymnasium
2008 Matura
Oktober 2008 Beginn des Studiums der Pharmazie an der Universität
Wien

Praktika

August 2010 St. Anna Apotheke, 1120 Wien
Juli 2011 St. Anna Apotheke, 1120 Wien
Februar- August 2012 Apotheke zum weißen Hirschen, 1070 Wien