



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Aktivitätsgeleitete Untersuchungen von
Scrophularia lucida L.“

Verfasserin

Lisa Schweighofer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin:

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

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmazie, für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und die Möglichkeit der Durchführung meiner praktischen Arbeit bedanken.

Ich möchte mich besonders bei Ao. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn bedanken, nicht nur für ihre Hilfeleistungen und sehr gute Betreuung, sondern auch für die Möglichkeit, die Diplomarbeit im Rahmen ihrer Arbeit zu erstellen.

Außerdem möchte ich mich auch noch beim ganzen Department der Pharmakognosie bedanken, allen voran, Dr. Martin Zehl für die MS-Messungen und die damit verbundene Zeit.

Weiters danke ich Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für Organische Chemie, für die Hilfe bei der Strukturaufklärung und Herrn Univ. Prof. Dr. Georg Krupitza mit seinem Dissertanten Chi Nguyen Huu für die Durchführung der CCID-Assays.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Familie, meinem Freund Lukas Eder und all meinen Freunden bedanken, die mir immer den Rücken gestärkt haben und mich im Laufe meines Studiums so sehr unterstützt haben. Danke.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. Material	3
2.2. Methoden	3
2.2.1. Vorreinigung des methanolischen Extraktes	3
2.2.2. Säulenchromatographie	3
2.2.3. HPCCC	4
2.2.4. Dünnschichtchromatographie.....	4
2.2.4.1. Stationäre und mobile Phasen.....	4
2.2.4.2. Detektionsverfahren.....	5
2.2.5. High Performance Liquid Chromatography	5
2.2.6. CCID-Assay	6
2.2.7. Massen-Spektrometrie	6
2.2.8. NMR-Spektroskopie	7
3. Ergebnisse	8
3.1. Durchführung der Vorreinigung des Extraktes	8
3.2. Fraktionierung der Chloroformfraktion	11
3.2.1. HPCCC (High Performance Current Counter Chromatography)	11
3.2.1.1. Wahl eines geeigneten Fließmittelsystems.....	11
3.2.1.2. HPCCC1	12
3.2.1.3. HPCCC2.....	13
3.2.2. Säulenchromatographie am Kieselgel.....	14
3.2.2.1. Säulenchromatographie 1.....	14
3.2.2.2. Säulenchromatographie 2.....	17
3.2.2.3. Vereinigung von Fraktionen aus SC1 und SC2 mit übereinstimmender Zusammensetzung.....	20
3.3. HPLC-Untersuchungen	22
3.4. Auftrennung der Fraktionen von SC1 und SC2	24
3.4.1. Fraktionierung von Fraktion B mittels HPCCC	24

3.4.2. Fraktionierung von Fraktion A mittels Säulenchromatographie	26
3.4.3. Fraktionierung von SF8_SC2 mit Säulenchromatographie.....	28
3.4.4. Fraktionierung von Fraktion E mit Säulenchromatographie.....	30
3.5. CCID-Assay	34
3.6. Strukturaufklärung mittels LC-MS und NMR-Spektroskopie	35
3.6.1. Strukturaufklärung von SL1 (=Koelziosid)	36
3.6.2. Strukturaufklärung von SL2 (=Scrovalentinosid)	38
3.6.3. Informationen über Fraktion E durch LC-MS	41
4. Diskussion	42
5. Zusammenfassung	44
6. Summary	45
7. Literaturverzeichnis.....	46
8. Abbildungsverzeichnis.....	48
9. Tabellenverzeichnis.....	49

Anhang

Curriculum vitae

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagens
C	Chloroformfraktion
CCID	Circular Chemorepellent Induced Defects Assay
CHCl ₃	Chloroform
DAD	Diode Array Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EtOAc	Ethylacetat
Fr	Fraktion
H ₂ O	Wasser
HPCCC	High Performance Current Counter Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography-Massenspektrometrie
MeOH	Methanol
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NL	Nachlauf
Nst A	Naturstoffreagens A
PEG	Polyethylenglykol
RP	reversed phase
SC	Säulenchromatographie
SF	Sammelfraktion

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Vertreter der Gattung *Scrophularia* zählen zu der Familie der Braunwurzgewächse (Scrophulariaceae), wovon in etwa 300 Arten bekannt sind. Sie kommen vor allem im Mittelmeergebiet vor, hier vorwiegend in Griechenland, Italien, Frankreich und der Türkei [1,2].

So stammt auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Art *Scrophularia lucida* L. aus der Türkei¹.

Abbildung 1: *Scrophularia lucida* L.²



Viele Vertreter der Gattung, wie auch *Scrophularia lucida* L., finden volksmedizinisch Anwendung bei entzündlichen Erkrankungen und Hauterkrankungen [1,2]. Für einige *Scrophularia*-Arten wurden antiinflammatorische, antibakterielle, immunmodulatorische und zytotoxische Wirkungen nachgewiesen [2,3].

¹ Für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials bedanke ich mich bei Herrn Dr. A. Özmen, Institute of Biology, Fen-Edebiyat Fakültesi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, Turkey.

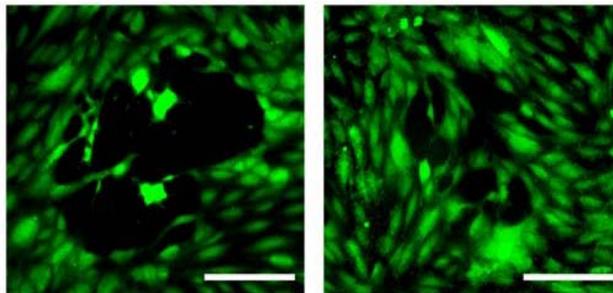
² Quelle: <http://www.inaturalist.org/observations/474046> (zuletzt aufgerufen am 2.6.14); ©Stefano Doglio

Dies nahm man zum Anlass, um fünf verschiedene Arten von *Scrophularia* auf ihre zytotoxische Wirkung auf, zur Metastasierung befähigte Brustkrebszellen zu untersuchen [3].

Die Voraussetzung zur Metastasierung von Tumoren ist die Bildung von sogenannten „gaps“ (Löcher) in den Zellschichten des Lymph- und/oder Blutgefäßendothels [3].

Zur Überprüfung wurde ein CCID-Assay (circular chemorepellent induced defects assay) angewendet, wobei MCF-7-Brustkrebszellsphäroide auf Lymphendothelzellschichten mit verschiedenen Extrakten der *Scrophularia*-Arten behandelt und die Zahl und Größe der „gaps“ bzw. deren Verhinderung durch die Extrakte vermessen wurden [3].

Abbildung 2: Verminderung der gap junctions von MCF-7 durch ein methanolisches Extrakt von *Scrophularia lucida* L.³



Dabei kam die Studie zu dem Ergebnis, dass das methanolische Extrakt aus *Scrophularia lucida* L. die beste Wirkung aufwies, um die gap-Bildung zu verhindern [3].

Basierend auf diesen Ergebnissen und da bisher keine Daten zu den Inhaltsstoffen von *Scrophularia lucida* L. vorlagen, wurde im Rahmen dieser und einer weiteren Diplomarbeit [4] der Schwerpunkt auf die Identifizierung und Isolierung der wirksamen Komponenten gelegt.

³ Quelle: 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

2. Material und Methoden

2.1. Material

Als Ausgangsmaterial standen 158 g methanolisches Extrakt, welches aus 2700 g getrocknetem Kraut von *Scrophularia lucida* L. (Scrophulariaceae) gewonnen worden war, zur Verfügung. Das Pflanzenmaterial stammte aus der Türkei.

2.2. Methoden

2.2.1. Vorreinigung des methanolischen Extraktes

Die Vorreinigung des methanolischen Extraktes wurde durchgeführt, um störende Gerbstoffe, Zucker, Fette, Wachse und Chlorophyll abzutrennen.

Zuerst wurde im Rahmen einer anderen Diplomarbeit [4] ein Vorversuch mit der Methode nach Wall et al. [5] durchgeführt, um Kenntnisse über voraussichtliche Ausbeuten zu erlangen.

Basierend auf der Vorgangsweise im Vorversuch, wurde die Vorreinigung mit dem restlichen Extrakt (140 g) durchgeführt.

Es wurden viermal je 35 g Extrakt in Methanol/Wasser gelöst und danach durch Ausschütteln mit verschiedenen polaren Lösungsmitteln aufgetrennt.

2.2.2. Säulenchromatographie

Zur weiteren Auftrennung und Fraktionierung bzw. Aufreinigung wurde die Säulenchromatographie verwendet.

Als stationäre Phase standen einerseits Kieselgel 60 Korngröße 0,063-0,200 mm (Merck), andererseits Sephadex® LH-20 (Sigma) zur Verfügung.

Mobile Phasen:

1. MeOH/H₂O Gemische unterschiedlicher Konzentrationen
2. MeOH
3. CHCl₃/MeOH/H₂O (75/15/1,5)

Zur Vereinigung zu Sammelfractionen wurde jede fünfte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie mit geeignetem Fließmittelsystem getestet.

Die verwendeten mobilen und stationären Phasen werden bei den einzelnen Kapiteln angeführt.

2.2.3. HPCCC

Zur weiteren Fraktionierung wurde auch die High Performance Current Counter Chromatography an einem HPCCC-Gerät der Firma Dynamic Extractions, Plymouth, UK verwendet.

Säule: Dynamic Extractions Spectrum HPCCC - Semi-Preparative Säule

(Volumen: 170 ml)

Fließmittelsysteme:

HEMWAT 24: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (5/1/5/1)

HEMWAT 20: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (2/1/2/1)

HEMWAT 18: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (6/5/6/5)

Als mobile Phase wurde die Unterphase und als stationäre Phase die Oberphase verwendet. Es wurde mit einer Flussrate von 1ml/min, bei einer Drehzahl von 1600 rpm gearbeitet.

Auch hier wurde zur Vereinigung jede fünfte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie untersucht.

2.2.4. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde zum Vereinigen von Fraktionen, aber auch zu Vergleichen mit Vergleichssubstanzen herangezogen.

2.2.4.1. Stationäre und mobile Phasen

Stationäre Phasen: a) Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

b) HPTLC-Fertigplatten RP-8 F_{254s} (Merck)

Mobile Phasen: a) Ethylacetat + Methanol + konz. Ameisensäure + Wasser

(75 + 15 + 4 + 4)

b) 90% Methanol

2.2.4.2. Detektionsverfahren

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AAS)

Das Reagens wird hergestellt, indem man 0,5 ml Anisaldehyd, 10 ml Essigsäure_{conc.} und 85 ml Methanol vermischt und danach vorsichtig mit 5 ml Schwefelsäure_{conc.} versetzt. Nach dem Besprühen der entwickelten DC-Platte mit dem Reagens wird diese bei 105°C für einige Minuten im Trockenschrank erhitzt. Anschließend kann die DC-Platte bei Tageslicht ausgewertet werden [6].

Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (Nst A/PEG)

Zuerst wird die entwickelte DC-Platte mit Naturstoffreagens A (1%ige Lösung in Methanol) und nach Übertrocknen mit PEG 400 (5%ige ethanolische Lösung) besprüht. Danach kann die DC-Platte unter UV-Licht bei 366 nm ausgewertet werden [6].

2.2.5. High Performance Liquid Chromatography

Verwendung fand die HPLC für die Überprüfung der Zusammensetzung einzelner Fraktionen.

Tabelle 1: HPLC – Gerät und Einstellungen

System	SHIMADZU
Pumpe	LC-20AD
Detektor	Diode Array Detektor: Shimadzu SPD-M20A Lichtstreuendetektor: Shimadzu ELSD-LT
Säulenofen	CTO-20AC
Autoinjektor	SIL-20AC HAT
Säule	Luna 5µ C-18
Mobile Phase	A: Wasser mit konz. Ameisensäure auf pH 3 eingestellt B: Acetonitril
Gradient	5% B auf 95% B in 60 min
Detektion	254 nm
Konzentration der Analysenlösung	1 mg/ml
Flussrate	1 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl
Druck	120 bar
Temperatur	25 °C

2.2.6. CCID-Assay ⁴

Das methanolische Extrakt, die Chloroformfraktion, die Ethylacetatfraktion sowie die wichtigsten Fraktionen wurden mittels CCID-Assay auf ihre Wirksamkeit getestet.

Der Assay besteht aus einer einlagigen Zellschicht aus Lymphendothelzellen, die mit Brustkrebszellkonglomerat (Sphäroide) inkubiert werden. Durch die Brustkrebszellen bilden sich Löcher, sogenannte gaps, in der Lymphendothelzellschicht. Dies ist die Voraussetzung zur Metastasierung der Krebszellen [3].

Die Zahl und Größe der gaps und deren Verminderung durch etwaige Testsubstanzen wie beispielsweise die Chloroformfraktion können gemessen werden [3].

2.2.7. Massen-Spektrometrie ⁵

Die Massenspektrometrie wurde zur Bestimmung molekularer Massen isolierter Verbindungen, und um Informationen über Hauptkomponenten einzelner Fraktionen zu erhalten, verwendet.

Durchgeführt wurden die LC-MS-Analysen auf einem UltiMate 3000 RSLC-Series System von der Firma Dionex, gekoppelt an ein, mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT, Bruker Daltonics) ausgestattetem 3D-Quadrupol-Ionenfallen Massenspektrometer. Der Elutionsfluss wurde vor der ESI-Quelle ungefähr 1:4 gesplittet.

Betrieben wurde die ESI-Quelle mit folgenden Parametern: Kapillarspannung: -3,7/+3,5 kV, Vernebelungsgas: 26 psi (N₂), Trockengasfluss: 9 L/min (N₂), und Trockengastemperatur: 340°C.

Positiv- und Negativ-Ionenmodus Mehrstufenmassenspektren bis zu MS⁴ wurden in einem automatischen data-dependent acquisition (DDA) Modus mit Helium als Kollisionsgas, einem Isolationsfenster von 4 Th und einer Fragmentierungsamplitude von 1,0 V gemessen.

⁴ Mein Dank gilt Univ. Prof. Dr. Georg Krupitza und Chi Nghuyen Huu für die Durchführung des Assays.

⁵ Für die Durchführung der LC-MS-Messungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Martin Zehl, Department für Pharmakognosie, Universität Wien.

Tabelle 2: LC-MS – Gerät und Einstellungen

Gerät	Dionex UltiMate 3000 RSLC-Series System
Säule	Luna 5 μ C-18
Mobile Phase	A: Aqua dest. mit Ameisensäure _{conc.} auf pH3 eingestellt B: Acetonitril
Gradient	5% auf 95% B in 60 min
Temperatur	25 °C
Flussrate	1 ml/min
Detektion	190-400 nm

Zur Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen wurden Mehrstufenmassenspektren bis zu MS³ im Positiv-Ionenmodus aufgenommen. Die Probelösung wurde mit einer Spritzenpumpe (5 μ L/min) direkt in das MS infundiert.

Betrieben wurde die ESI-Quelle wie folgt: Kapillarspannung: -3,7 kV, Vernebelungsgas: 7 psi (N₂), Trockengasfluss: 4 L/min (N₂), und Trockengastemperatur: 250°C.

Aufgenommen wurden die CID-Spektren mit einem Isolationsfenster von 2 Th und einer manuell optimierten Fragmentierungsamplitude, wobei Helium als Kollisionsgas eingesetzt wurde.

2.2.8. NMR-Spektroskopie ⁶

Die NMR-Messungen wurden auf einem Bruker Avance DRX 600 NMR-Spektrometer mit einem 5 mm QNP Probenkopf (1H, 13C, 19F, 31P) mit z-Gradientenspule und automatischer Tuning- und Matching-Einheit durchgeführt.

Messfrequenz: 600,13 MHz für ¹H-NMR bzw. 150,92 MHz für ¹³C-NMR

Messtemperatur: 298,1 K

Lösungsmittel: MeOH-d₄

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

⁶ Mein Dank gilt Herrn Ass. Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für organische Chemie, Universität Wien, für die Durchführung der NMR-Experimente.

3. Ergebnisse

3.1. Durchführung der Vorreinigung des Extraktes

Aufgrund der zufriedenstellenden Vorreinigung des methanolischen Extraktes im Vorversuch [4], wurde die Vorreinigung mit dem Hauptanteil des methanolischen Extraktes (140 g) ebenfalls wie folgt durchgeführt:

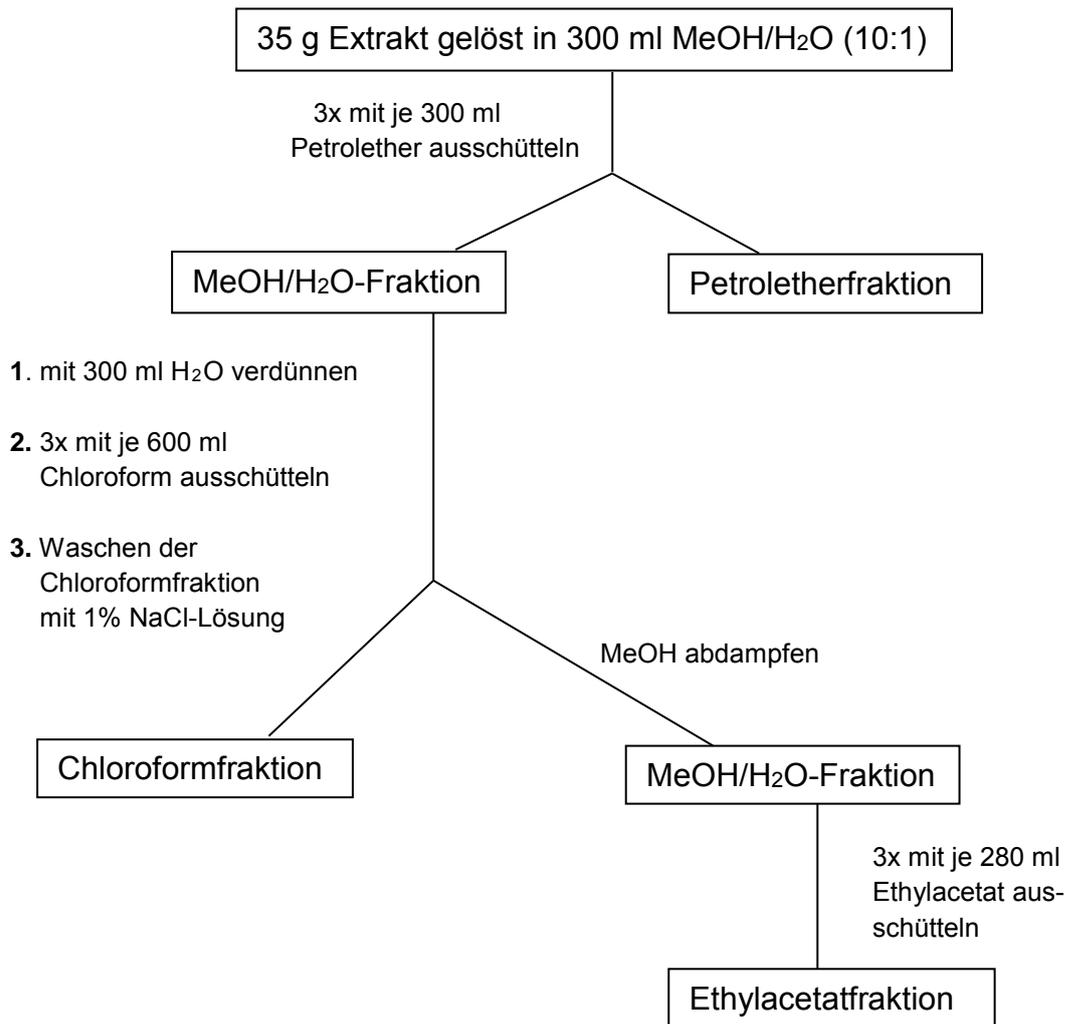
Die Vorreinigung wurde 4-mal mit je 35 g Extrakt durchgeführt. Wie Abbildung 3 (Seite 9) zeigt, wurde das Extrakt zuerst in 300 ml Methanol/Wasser (10:1) mittels Ultraschall gelöst. Danach wurde die Lösung 3-mal mit je 300 ml Petrolether ausgeschüttelt, um die Wachse, Fette und Chlorophyll zu entfernen. Entstandene Niederschläge wurden in der wäßrigen Phase belassen. Die Petroletherphasen wurden zur Trockene gebracht.

Danach wurde das Methanol/Wasser-Extrakt mit 300 ml Wasser verdünnt und die Suspension 3-mal mit je 600 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformfraktion wurde anschließend mit einer 1%igen NaCl-Lösung gewaschen und zur Entfernung von Wasser über Na_2SO_4 filtriert.

Danach wurde die Chloroformfraktion zur Trockene gebracht.

Anschließend wurde das Methanol aus der Methanol/Wasser-Fraktion abgedampft, um beim Ausschütteln mit 3-mal je 280 ml mit Ethylacetat eine gute Phasentrennung zu erhalten. Auch die Ethylacetatfraktion wurde zur Trockene gebracht.

Abbildung 3: Extraktionsschema



Die erhaltenen Chloroformfraktionen und Ethylacetatfraktionen wurden zum Ver-einen dünnschichtchromatographisch überprüft (Abbildung 4, Seite 10).

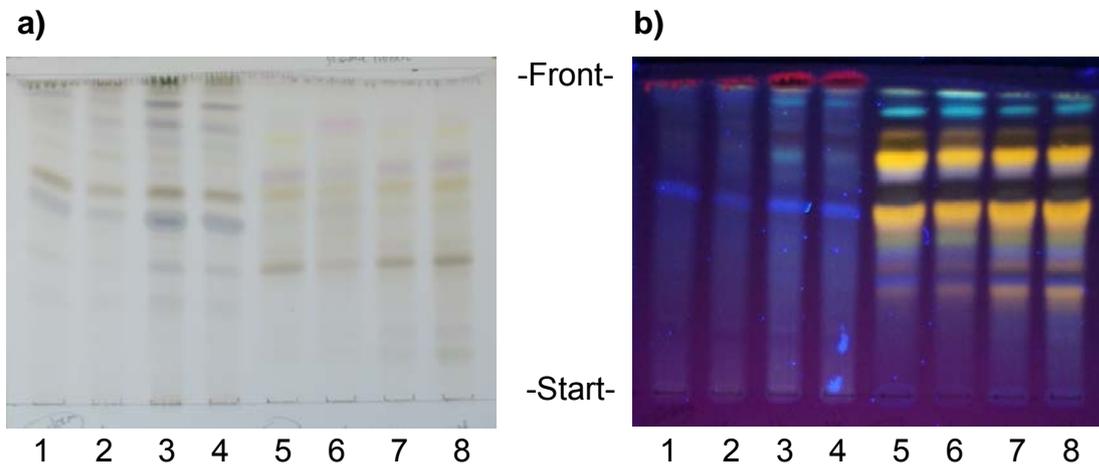
Abbildung 4: DC der Chloroform- und Ethylacetatfraktionen

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck)

Mobile Phase: Ethylacetat + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser (100 + 11 + 11 + 20)

Detektion: AAS (a) und Naturstoffreagens A/PEG (b)

Platte: 12x10 cm



Bahn	Substanz
1-4	Chloroformfraktionen
5-8	Ethylacetatfraktionen

Aufgrund des gleichen Inhaltsstoffmusters konnten sowohl die Chloroformfraktionen als auch die Ethylacetatfraktionen vereinigt werden. Die Petroletherphasen wurden nicht weiter untersucht, da sie vorwiegend Fette und Wachse enthielten. Die erhaltenen Mengen der Fraktionen sind in Tabelle 3 (Seite 11) aufgelistet.

Die DC ließ auf überwiegend apolare, terpenoide Inhaltsstoffe in den Chloroformfraktionen schließen (Abbildung 4a).

Die bei der Detektion mit Naturstoffreagens A/PEG 400 erhaltenen blau fluoreszierenden Banden sind ein Zeichen für Phenolcarbonsäuren und die rot fluoreszierenden Banden für Chlorophyllanteile (Abbildung 4b).

Die Ethylacetatfraktionen wiesen phenolische Inhaltsstoffe auf, vorwiegend orange- und dunkelbraun fluoreszierende Flavonoide [4].

Tabelle 3: Mengen der verschiedenen Fraktionen nach der Vorreinigung

Fraktion	Menge (g)
MeOH/H ₂ O	101,95
Chloroform	14,91
Ethylacetat	12,14
Petrolether	4,39

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Chloroformfraktion weitergearbeitet. Die Ethylacetatfraktion wurde im Rahmen der Diplomarbeit Lewenhofer phytochemisch untersucht [4].

3.2. Fraktionierung der Chloroformfraktion

Die DC der Chloroformfraktion zeigte 2 Hauptkomponenten bei einem R_f-Wert von 0,65 und 0,53 (Abbildung 4a, Seite 10). Ziel der Fraktionierung der Chloroformfraktion war es, die 2 Hauptkomponenten zu trennen und diese in einzelnen Fraktionen anzureichern.

3.2.1. HPLC (High Performance Current Counter Chromatography)

Um die Chloroformfraktion grob zu fraktionieren und durch Adsorptionsprozesse so wenig Fraktion wie möglich zu verlieren, wurde zuerst die HPLC als Trennverfahren eingesetzt, da diese eine reine Verteilungschromatographie ohne festen Träger ist und eine Trennung ohne Verluste ermöglicht.

3.2.1.1. Wahl eines geeigneten Fließmittelsystems

Für die Auswahl eines geeigneten Fließmittelsystems ermittelte man den Verteilungskoeffizienten der Chloroformfraktion in mehreren Systemen. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis der Verteilung der Fraktion in der Ober- und der Unterphase des Systems. Für optimale Trennungen sollte der Verteilungskoeffizient zwischen 0,5 und 2 liegen.

Dazu wurden 2 mg der Chloroformfraktion in der Ober- und Unterphase eines Systems gelöst, die zwei Phasen anschließend getrennt und zur Trockene gebracht. Daraufhin wurde das Gewicht des Anteils des Extraktes bestimmt, welcher sich jeweils in der Ober- bzw. Unterphase gelöst hatte.

Im System Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (5/1/5/1) lag der Verteilungskoeffizient bei 0,3, aber aufgrund einer weiteren Untersuchung mittels DC wurde mit diesem Fließmittel gearbeitet.

3.2.1.2. HPCCC1

Methode und Gerät siehe Kapitel 2.2.3. (Seite 4)

Fließmittel: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (5/1/5/1)

Mobile Phase: Oberphase

Stationäre Phase: Unterphase

Auftragelösung: 50 mg Chloroformfraktion in 1ml Ober- und Unterphase des Fließmittels (3+7)

Mit dieser Methode konnte keine Trennung der beiden Hauptkomponenten erzielt werden, lediglich Chlorophyll konnte abgetrennt werden. Durch Spülen mit der stationären Phase wurde der Hauptanteil der Chloroformfraktion ungetrennt in zwei Fraktionen eluiert.

Es wurden 40 Fraktionen zu jeweils 3 ml gesammelt und zum Vereinen jede fünfte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

Abbildung 5: DC der Sammelfraktionen von HPCCC1

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck)

Mobile Phase: EtOAc + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser (100 + 11 + 11 + 20)

Detektion: AAS



Bahn	Substanz
C	Chloroformfraktion
1-8	Fraktionen der Oberphase
9-11	Fraktionen der Unterphase

Aufgrund der unzureichenden Trennung wurden die zwei Fraktionen, die den Hauptanteil der Chloroformfraktion enthielten, vereinigt und ein weiterer Versuch mit einem polareren Fließmittel vorgenommen.

3.2.1.3. HPCCC2

Methode und Gerät siehe Kapitel 2.2.3. (Seite 4)

Fließmittel: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (6/5/6/5)

Mobile Phase: Oberphase

Stationäre Phase: Unterphase

Auftragelösung: 28 mg Chloroformfraktion in 1 ml Ober- und Unterphase des Fließmittels (1+1)

Die zwei Hauptkomponenten der Chloroformfraktion wurden mit dieser Methode gut getrennt. In den ersten beiden Sammelfraktionen waren vorwiegend Chlorophyll und apolare Komponenten enthalten. In Sammelfraktion 4 lag die Hauptkomponente bei einem Rf von 0,51 angereichert vor. In Sammelfraktion 6 und 7 war der Hauptanteil der Chloroformfraktion mit der Hauptkomponente bei Rf 0,65 enthalten.

Auch hier wurden 40 Fraktionen mit je 3 ml gesammelt und mittels DC die zu vereinigenden Fraktionen ermittelt.

Tabelle 4: Sammelfraktionen von HPCCC2

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	5-7	1,9
2	8 + 9	2,3
3	10 + 11	0,6
4	12-17	3,7
5	18-27	2,7
6	28-30	6,4
7	31-40	10,2

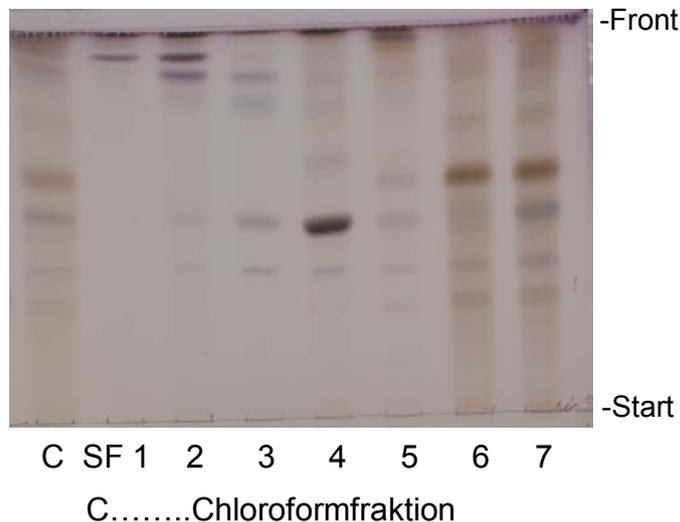
Abbildung 6: DC der Sammelfractionen von HPCCC2

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck)

Mobile Phase: Ethylacetat + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure +
Wasser (100 + 11 + 11 + 20)

Detektion: AAS

Platte: 12x10 cm



Die Trennung war zwar gut, jedoch war diese Methode für die Fraktionierung einer größeren Menge an Chloroformfraktion nicht geeignet, sodass entschieden wurde auf die Säulenchromatographie an Kieselgel als alternative Auftrennungsmethode zurückzugreifen.

3.2.2. Säulenchromatographie am Kieselgel

Die Säulenchromatographie an Kieselgel eignet sich gut für die Trennung apolarer Gemische, weshalb man diese Methode zur Auftrennung der Chloroformfraktion verwendet hat.

3.2.2.1. Säulenchromatographie 1

Zuerst wurde ein Versuch mit 500 mg Chloroformfraktion durchgeführt, um diese Trennmethode auf die Eignung zur Trennung dieses Gemisches zu testen.

Anhand von DC mit unterschiedlich polaren, mobilen Phasen wurde das geeignete Fließmittel zur Auftrennung der Chloroformfraktion ermittelt.

Anschließend wurde die Fraktion unter folgenden Bedingungen aufgetrennt:

Säule: Durchmesser: 2 cm

Füllhöhe: 95 cm

Stationäre Phase: Kieselgel 60

Mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser (75 + 15 + 1,5)

Auftragsmenge: 500 mg Chloroformextrakt gelöst in Chloroform

Flussrate: 6 ml / 30 min

Insgesamt wurden 239 Fraktionen gesammelt. Um die Fraktionen zu Sammelfrak-
tionen zu vereinigen, wurde jede fünfte Fraktion mittels DC überprüft.

Tabelle 5: Sammelfraktionen von SC1

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)	Weiterbearbeitung
1	1-13	30,4	
2	14-17	44,2	
3	18-27	29,4	vereinigt mit SF9_SC2 SC3 (Seite 26)
4	28-40	29,9	
5	41-52	31,9	vereinigt mit SF13_SC2 HPCCC (Seite 24)
6	53-57	19,2	vereinigt mit SF15_SC2 LC-MS, NMR (Seite 36)
7	58-67	98,0	vereinigt mit SF17_SC2 LC-MS, NMR (Seite 38)
8	68-77	21,6	
9	78-82	13,4	vereinigt mit SF20+21_SC2 SC5 (Seite 30) LC-MS (Seite 41)
10	83-87	10,0	
11	88-91	10,2	
12	92-112	17,2	
13	113-137	10,1	
14	138-185	11,0	
15	186-239	8,4	
16	Nachlauf	105,8	

Nach Vereinigen der Fraktionen wurde eine Dünnschichtchromatographie der Sammelfraktionen angefertigt.

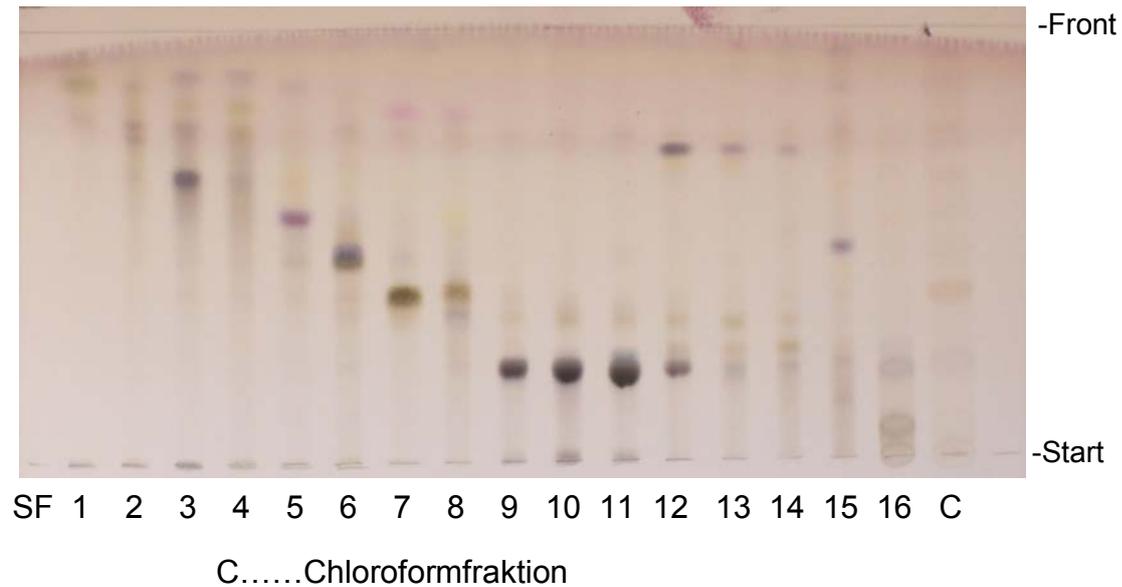
Abbildung 7: DC der Sammelfraktionen von SC1

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck)

Mobile Phase: Ethylacetat + Methanol + konz. Ameisensäure +
Wasser (70 + 8 + 4 + 4)

Detektion: AAS

Platte: 20x10 cm



Die Sammelfraktionen 3, 5, 6, 7 und 9+10 wurden weiter aufgetrennt, da bei diesen jeweils eine deutliche Hauptkomponente ersichtlich war. Die restlichen Fraktionen wurden nicht weiter bearbeitet. In den ersten beiden Fraktionen war überwiegend Chlorophyll vorhanden, weshalb eine weitere Auftrennung ebenfalls nicht zielführend war.

3.2.2.2. Säulenchromatographie 2

Nachdem die Chloroformfraktion in SC1 erfolgreich fraktioniert worden war, wurde eine zweite Säulenchromatographie unter denselben Bedingungen mit einer größeren Menge an Chloroformfraktion durchgeführt, um ausreichende Mengen der einzelnen Fraktionen für die Identifizierung der Inhaltsstoffe zu erhalten.

Abbildung 8: SC2



Säule: Durchmesser: 5,5 cm

Füllhöhe: 65 cm

Stationäre Phase: Kieselgel 60

Mobile Phase: Chloroform/Methanol/Wasser
(75 + 15 + 1,5)

Auftragsmenge: 3,4 g Chloroformextrakt gelöst in Chloroform (aufgezogen auf 10 g Kieselgel)

Flussrate: 6 ml / 30 min

Insgesamt wurden 662 Fraktionen gesammelt.

Um die Fraktionen zu Sammelfraktionen zu vereinigen, wurde jede fünfte Fraktion mittels DC überprüft (Tabelle 6, Seite 18).

Tabelle 6: Sammelfractionen von SC2

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge (mg)	Weiterbearbeitung
1	1-130	5,0	
2	131-137	4,9	
3	138-142	10,2	
4	143-162	114,0	
5	163-177	238,0	
6	178-180	38,0	
7	181-192	130,9	
8	193-202	81,9	SC4 (Seite 28)
9	203-222	97,3	vereinigt mit SF3_SC1 SC3 (Seite 26)
10	223-232	44,6	
11	233-242	42,6	
12	243-262	59,4	
13	263-297	118,9	vereinigt mit SF5_SC1 HPCCC (Seite 24)
14	298-307	29,8	
15	308-337	144,7	vereinigt mit SF6_SC1 LC-MS, NMR (Seite 36)
16	338-357	120,0	
17	358-427	532,5	vereinigt mit SF7_SC1 LC-MS, NMR (Seite 38)
18	428-462	76,1	
19	463-512	94,8	
20	513-557	56,7	vereinigt mit SF9+10_SC1 SC5 (Seite 30) LC-MS (Seite 41)
21	558-577	45,9	
22	578-622	98,2	
23	623-642	28,2	
24	643-662	31,2	
25	Nachlauf	1001,0	

Nach Vereinigen der Fraktionen wurde eine Dünnschichtchromatographie der Sammelfractionen angefertigt.

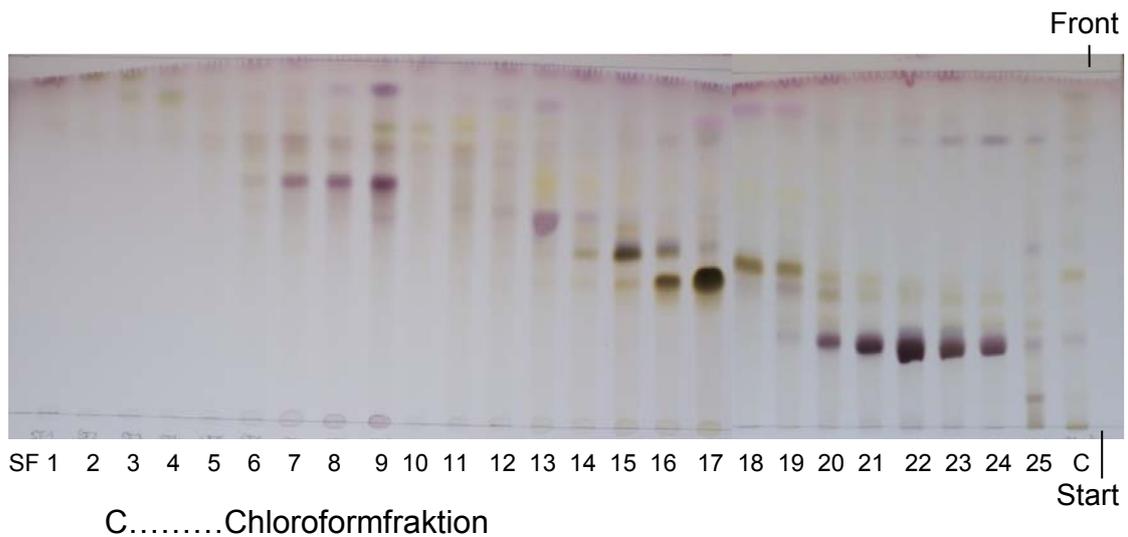
Abbildung 9: DC der Sammelfractionen von SC2

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck)

Mobile Phase: Ethylacetat + Methanol + konz. Ameisensäure +
Wasser (70 + 8 + 4 + 4)

Detektion: AAS

Platte: 20x10 cm



Der Vergleich mit der DC der Sammelfractionen von SC1 zeigte die Reproduzierbarkeit der Methode. Von SC2 wurden die Sammelfractionen 9, 13, 15, 17, 20, 21 zur weiteren Aufreinigung ausgewählt. Auch hier war in den ersten 5 Fraktionen überwiegend Chlorophyll vorhanden, deshalb wurden auch diese und die weiteren Fraktionen ohne deutliche Hauptkomponenten nicht weiter aufgearbeitet.

3.2.2.3. Vereinigung von Fraktionen aus SC1 und SC2 mit übereinstimmender Zusammensetzung

Die zur weiteren Fraktionierung herangezogenen Fraktionen wurden in zwei verschiedenen DC-Systemen chromatographiert, um Fraktionen zusammenzuführen. Dazu wurden RP-DC-Platten verwendet.

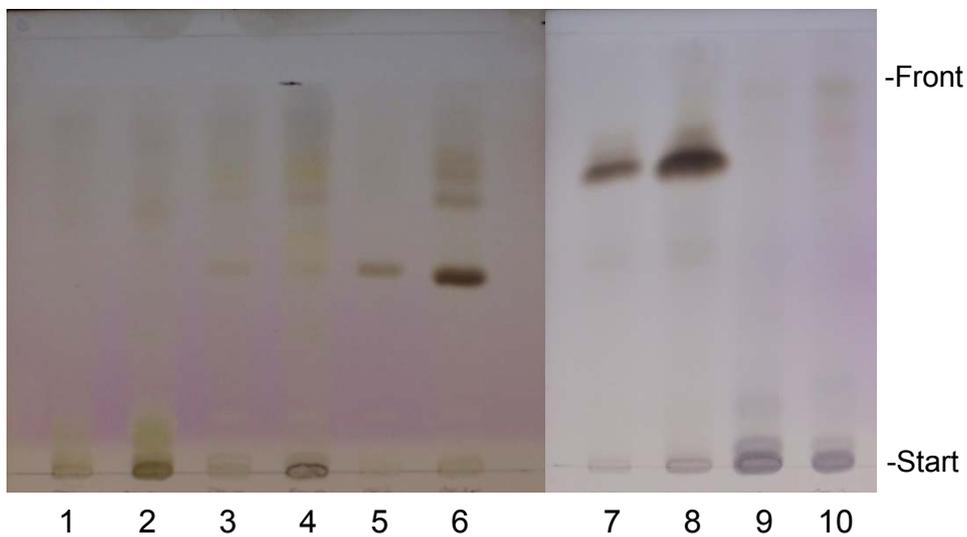
Abbildung 10: DC-Vergleiche der zu vereinigenden Fraktionen

Stationäre Phase: HPTLC-Fertigplatte RP-8 F₂₅₄S (Merck)

Mobile Phase: 80% MeOH

Detektion: AAS

Platte: 2-mal 10x10 cm



Banden	Substanzen
1	SF3_SC1
2	SF9_SC2
3	SF5_SC1
4	SF13_SC2
5	SF6_SC1
6	SF15_SC2
7	SF7_SC1
8	SF17_SC2
9	SF9+10_SC1
10	SF20+21_SC2

Die Fraktionen SF6_SC1 und SF15_SC2, sowie die Fraktionen SF7_SC1 und SF17_SC2 wurden aufgrund der identen Hauptkomponenten vereinigt.

Die Fraktionen SF3_SC1, SF9_SC2, SF5_SC1, SF13_SC2, SF9+10_SC1 und SF20+21_SC2 wurden in einer zweiten DC mit einer apolareren mobilen Phase nochmals kontrolliert.

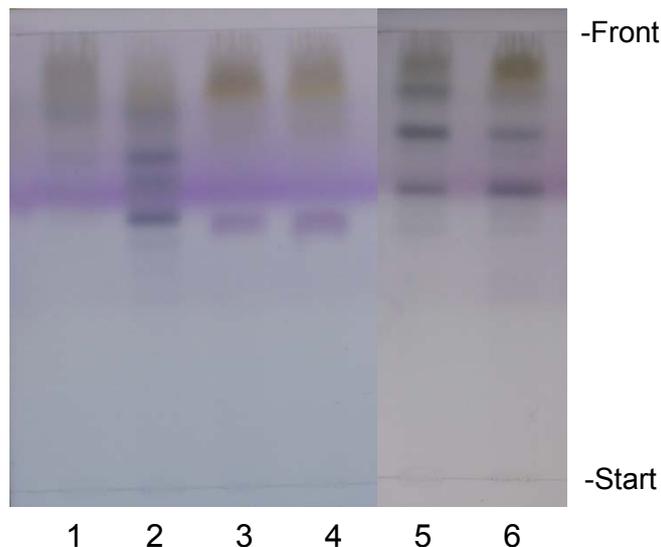
Abbildung 11: weiterer DC-Vergleich der zu vereinigenden Fraktionen

Stationäre Phase: HPTLC-Fertigplatte RP-8 F₂₅₄S (Merck)

Mobile Phase: 100% MeOH

Detektion: AAS

Platte: 10x10 cm



Banden	Substanzen
1	SF3_SC1
2	SF9_SC2
3	SF5_SC1
4	SF13_SC2
5	SF9+10_SC1
6	SF20+21_SC2

Dabei zeigte sich ein sehr gut übereinstimmendes Inhaltsstoffmuster der Fraktionen SF5_SC1 und SF13_SC2 und SF9+10_SC1 und SF20+21_SC2. Daher wurden auch diese Fraktionen vereinigt. Außerdem wurden die Fraktionen zum Vergleich auch mittels HPLC analysiert und die übereinstimmende Zusammensetzung bestätigt.

Aufgrund der HPLC-Vergleiche konnten auch die Fraktionen SF3_SC1 und SF9_SC2, die bei dem DC-Vergleich kein eindeutig übereinstimmendes Inhaltsstoffmuster aufwiesen, vereinigt werden.

Daraus ergaben sich folgende Fraktionen für die weitere Aufarbeitung:

Tabelle 7: vereinigte Sammelfraktionen (SC1 + SC2)

Kombinierte Sammelfraktionen	Sammelfraktionen	Menge (mg)
A	SF3_SC1 SF9_SC2	126,7
B	SF5_SC1 SF13_SC2	150,8
C	SF6_SC1 SF15_SC2	163,9
D	SF7_SC1 SF17_SC2	630,5
E	SF9+10_SC1 SF20+21_SC2	125,9

3.3. HPLC-Untersuchungen

Die 5 Sammelfraktionen wurden mittels HPLC auf ihr Inhaltsstoffmuster überprüft. Die Fraktionen A, B und E enthielten keine überwiegenden Hauptkomponenten. Diese wurden daher weiter fraktioniert (Kapitel 3.4., Seite 24-30).

In den Fraktionen C und D war jeweils eine Hauptkomponente bei den Retentionszeiten 37,9 min (Fraktion C; Abbildung 12, Seite 23) und 31,6 min (Fraktion D; Abbildung 13, Seite 23) erkennbar, sodass diese beiden Fraktionen zur Strukturklärung mittels LC-MS, MSⁿ und NMR-Spektroskopie untersucht wurden (Kapitel 3.6., Seite 35-41).

Abbildung 12: HPLC-Chromatogramm der Fraktion C
Gerät und Methode siehe Kapitel 2.2.5. (Seite 5)

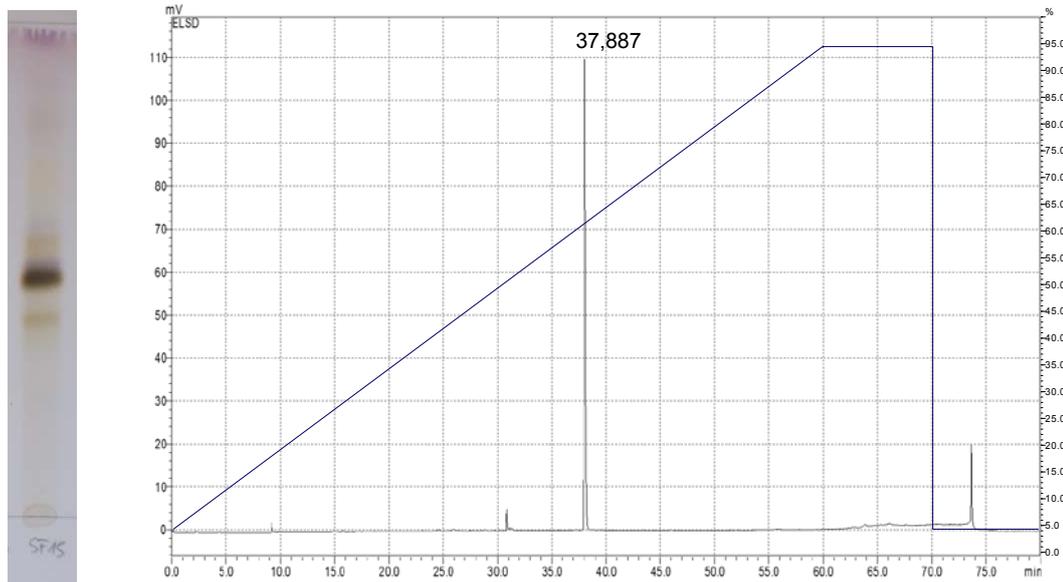
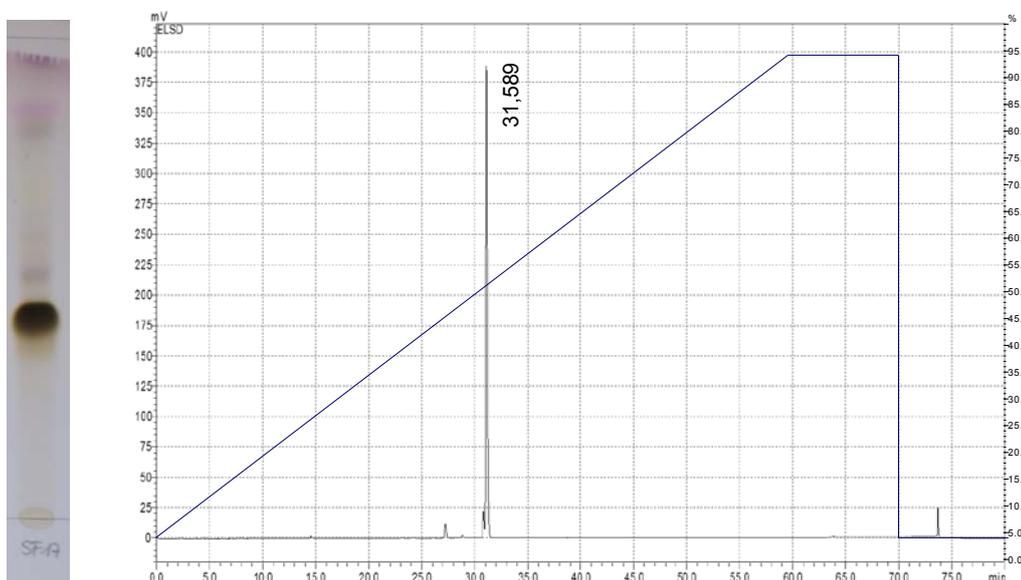


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm der Fraktion D
Gerät und Methode siehe Kapitel 2.2.5. (Seite 5)



3.4. Auftrennung der Fraktionen von SC1 und SC2

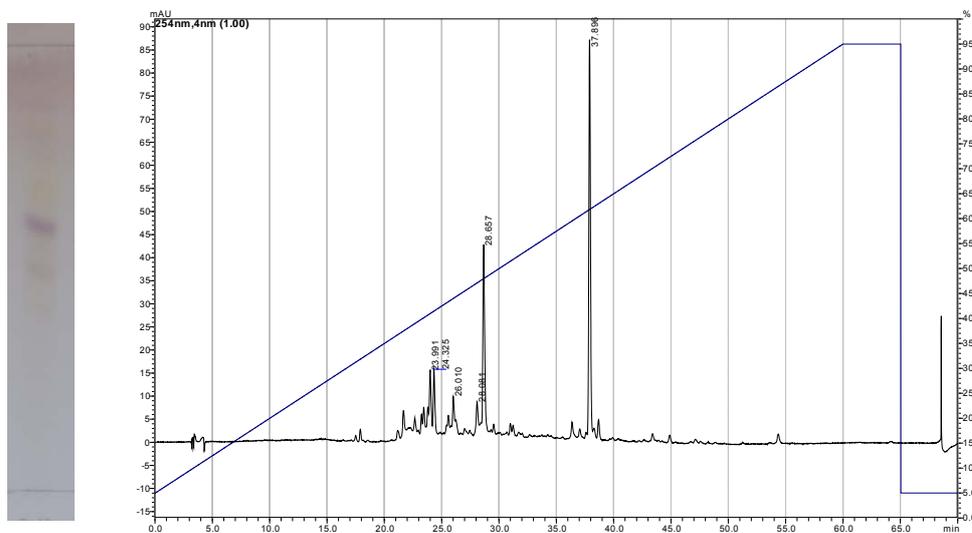
Die Fraktionen A, B und E sollten weiter aufgetrennt werden. Die Substanz, die als magentafarbene Bande bei einem Rf von 0,5 detektiert wurde, sollte aus Fraktion B isoliert werden.

Weiters sollten aus Fraktion A die Substanz, die als violette Bande bei einem Rf von 0,66 und von Fraktion E die Substanz, die als violette Bande bei einem Rf von 0,19, zu sehen waren, isoliert werden (Abbildung 9, Seite 19).

3.4.1. Fraktionierung von Fraktion B mittels HPCCC

Der Grund für die Wahl der HPCCC zur Fraktionierung war die erhoffte bessere Trennleistung aufgrund der Verwendung eines unterschiedlichen Trennmechanismus im Vergleich zu SC1 und SC2, wobei das Fließmittelsystem in ähnlicher Polarität wie bei HPCCC1 und HPCCC2 gewählt wurde.

Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von Fraktion B
Gerät und Methode siehe Kapitel 2.2.5. (Seite 5)



HPCCC3:

Methode und Gerät siehe Kapitel 2.2.3. (Seite 4)

Fließmittel: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (2/1/2/1)

Mobile Phase: Oberphase

Stationäre Phase: Unterphase

Auftragelösung: 137 mg Fraktion B in 5 ml Ober- und Unterphase des Fließmittels (6+4)

Es wurden 100 Fraktionen zu jeweils 1 ml gesammelt und jede fünfte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

Tabelle 8: Sammelfraktionen von HPCCC3

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-10	1,4
2	11-22	1,9
3	23-37	2,5
4	38-47	1,4
5	48-54	0,7
6	55-56	0,8
7	57-71	2,1
8	72-76	1,3
9	77-79	2,2
10	80-86	93,0
11	87-100	1,4

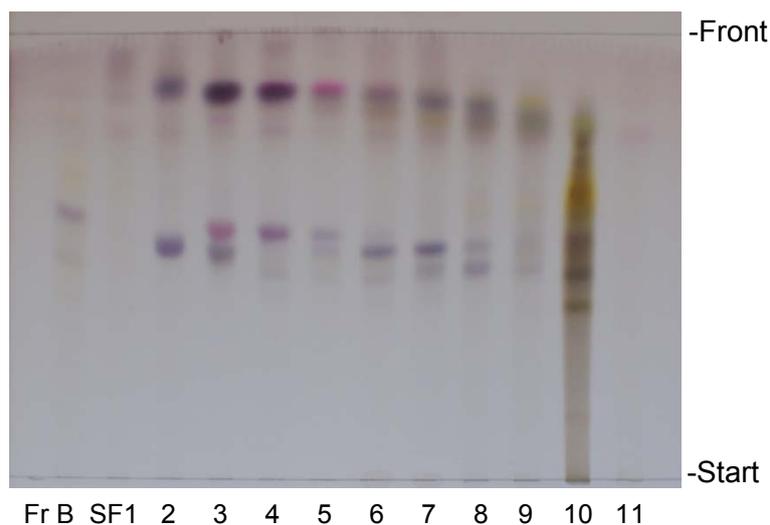
Abbildung 15: DC der Sammelfraktionen von HPCCC3

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck)

Mobile Phase: Ethylacetat + Methanol + konz. Ameisensäure + Wasser (70 + 8 + 4 + 4)

Detektion: AAS

Platte: 13,5 x 10 cm



Aus dieser Dünnschichtchromatographie wurde ersichtlich, dass sich die zu isolierende Substanz bei einem Rf-Wert von 0,5 während der Fraktionierung zersetzt hatte.

Aufgrund der Zersetzung und des fehlenden Materials für eine Auftrennung mit einer anderen Methode, konnten die Komponenten von Fraktion B nicht isoliert werden.

3.4.2. Fraktionierung von Fraktion A mittels Säulenchromatographie

Die violette Komponente bei einem Rf von 0,66 sollte mittels Säulenchromatographie isoliert werden (Abbildung 9, Seite 19).

SC3:

Säule: Durchmesser: 1,3 cm

Füllhöhe: 85 cm

Stationäre Phase: Kieselgel 60

Mobile Phase: Chloroform + MeOH + H₂O (85/8/0,5)

Auftragemenge: 114 mg Fraktion A gelöst in Chloroform

Flussrate: 4 ml / 30 min

Es wurden 37 Fraktionen gesammelt. Zum Vereinigen zu Sammelfraktionen wurde jede fünfte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

Nach Vereinigen der Fraktionen wurde eine Dünnschichtchromatographie der Sammelfraktionen angefertigt.

Tabelle 9: Sammelfraktionen von SC3

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-6	8,5
2	7 + 8	15,1
3	9-11	22,5
4	12-14	17,8
5	15-18	9,3
6	19-27	9,8
7	28-37	5,4
8	NL	10,2

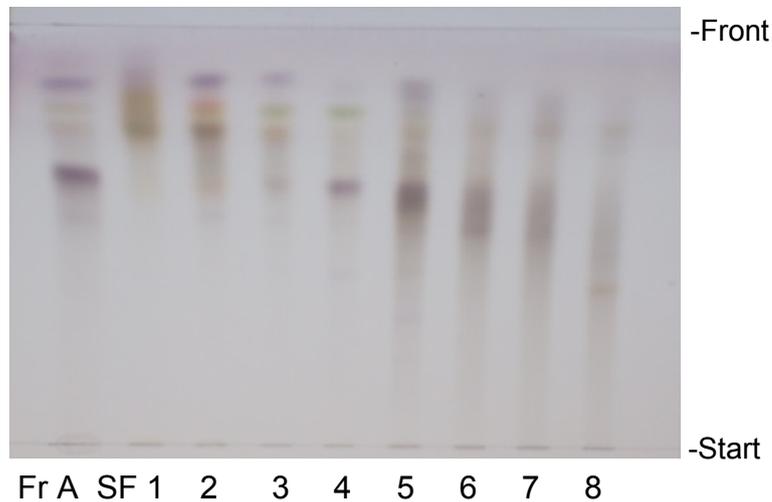
Abbildung 16: DC der Sammelfractionen von SC3

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

mobile Phase: EtOAc + MeOH + conc. Ameisensäure +
Wasser (70/8/4/4)

Detektion: AAS

Platte: 10,5 x 10 cm



HPLC-Untersuchung von SF4_SC3:

Die Fraktion SF4_SC3 zeigte nur 2 Hauptkomponenten bei der DC. Deshalb wurde diese mittels HPLC auf ihre Zusammensetzung überprüft. Diese ergab zwei Hauptkomponenten bei den Retentionszeiten 28,6 min und 63,0 min.

Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm von SF4_SC3

HPLC-Methode siehe Kapitel 2.2.5. (Seite 5)

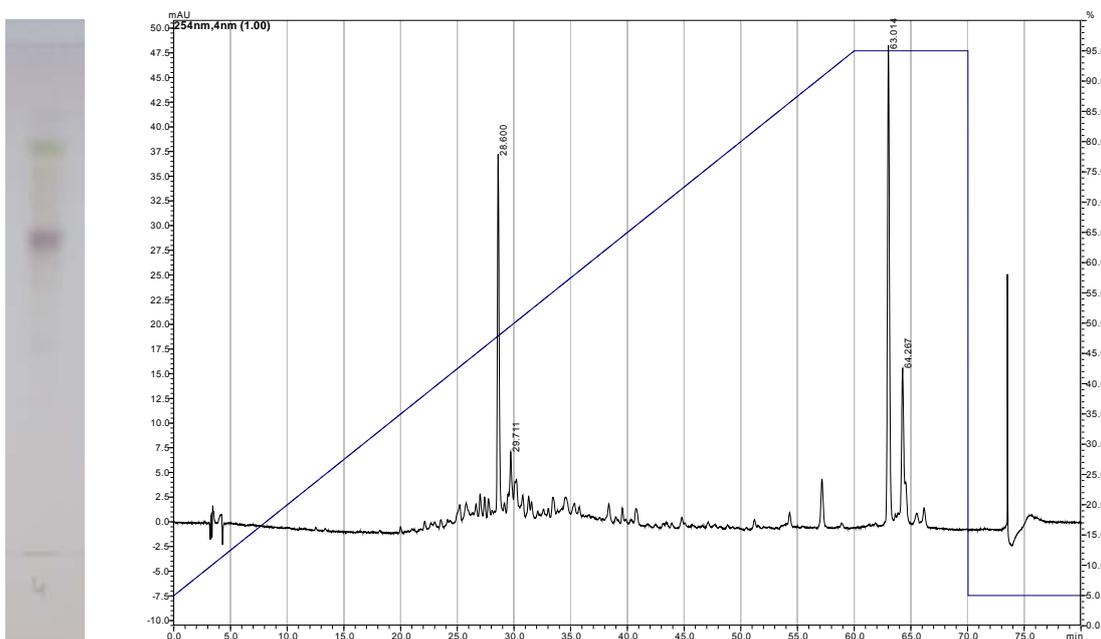
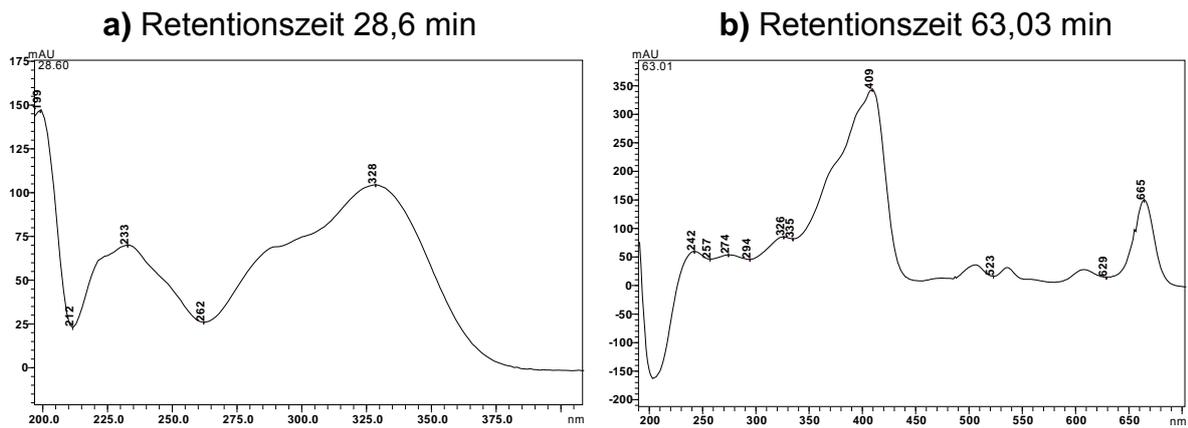


Abbildung 18: UV-Spektren von SF4_SC3



Das UV-Spektrum bei der Retentionszeit von 63,01 min zeigte auf, dass es sich bei dieser Komponente um Chlorophyll a handelte [7].

Da nur 17,8 mg SF4_SC3 vorhanden waren und eine große Menge der Fraktion Chlorophyll a war, wurde mit dieser Fraktion nicht weitergearbeitet.

Stattdessen wurde die Fraktion SF8_SC2, die ein ähnliches Inhaltsstoffspektrum wie Fraktion A enthielt (Abbildung 9, Seite 19), mit einer Säulenchromatographie (Sephadex[®] LH-20) weiter fraktioniert.

3.4.3. Fraktionierung von SF8_SC2 mit Säulenchromatographie

Aufgrund der nicht optimalen Auftrennung von Fraktion A mit Kieselgel 60, wurde für die Auftrennung von SF8_SC2 eine Sephadex[®] LH-20 als stationäre Phase verwendet, um eine Adsorption möglichst gering zu halten.

SC4:

Säule: Durchmesser: 1,3 cm

Füllhöhe: 40 cm

Stationäre Phase: Sephadex[®] LH-20

Mobile Phase: Methanol

Auftragsmenge: 81 mg SF8_SC2 in Methanol gelöst

Flussrate: 3 ml/ 30 min

Insgesamt wurden 20 Fraktionen gesammelt.

Um die Fraktionen zu Sammelfraktionen zu vereinigen, wurde jede fünfte mittels DC überprüft.

Tabelle 10: Sammelfraktionen von SC4

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-3	10,8
2	4	22,3
3	5	21,9
4	6	14,9
5	7	6,3
6	8-11	3,9
7	12-20	0,3
8	Nachlauf	0,4

Nach Vereinigen der Fraktionen wurde eine Dünnschichtchromatographie der Sammelfraktionen angefertigt.

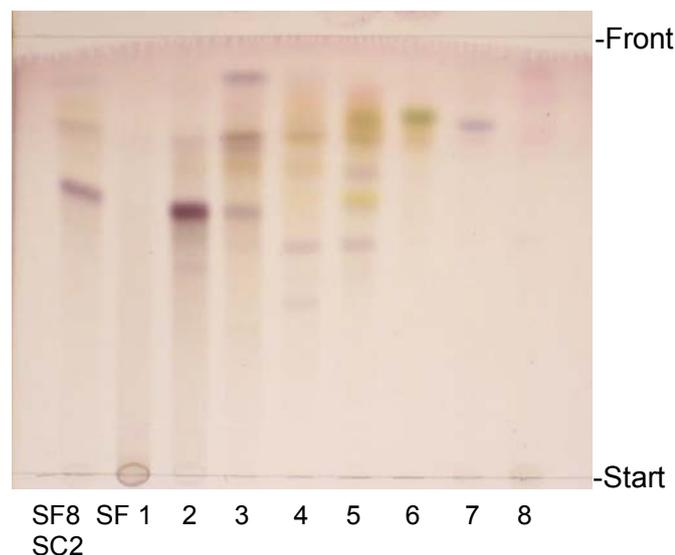
Abbildung 19: DC der Sammelfraktionen von SC4

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

mobile Phase: EtOAc + MeOH + conc. Ameisensäure + Wasser (70 + 8 + 4 + 4)

Detektion: AAS

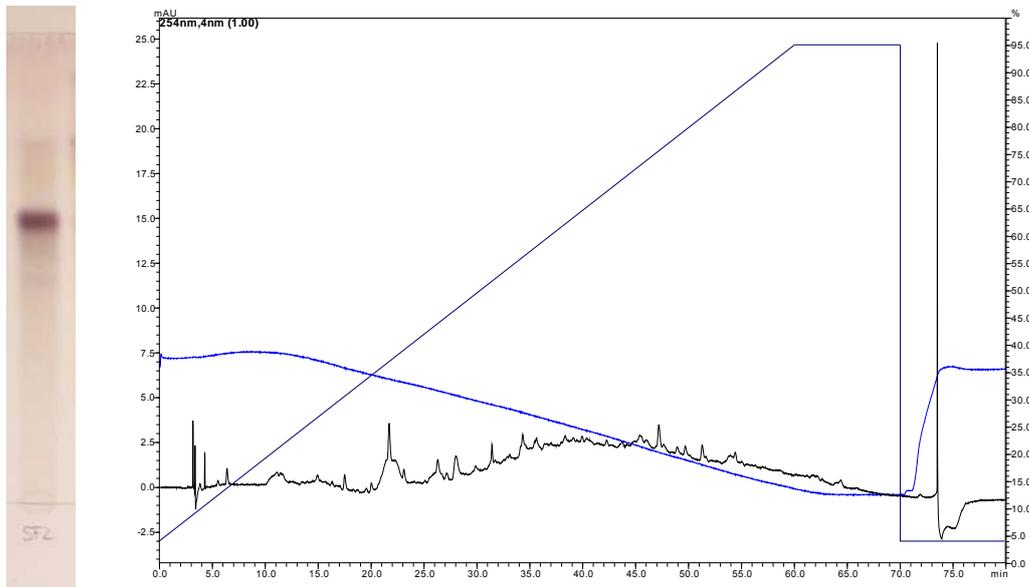
Platte: 10,5 x 10 cm



HPLC-Untersuchung von SF2_SC4:

Da SF2_SC4 bei der DC eine deutliche Hauptkomponente bei Rf 0,66 aufwies, wurde sie mittels HPLC auf ihre Zusammensetzung untersucht.

Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm von SF2_SC4
Gerät und Methode siehe Kapitel 2.2.5. (Seite 5)



Da in dem HPLC-Chromatogramm keine Hauptkomponente ersichtlich war, musste davon ausgegangen werden, dass sich die Substanz während der Analyse zersetzt hatte.

Aus Zeitgründen wurde diese Fraktion nicht weiter untersucht.

3.4.4. Fraktionierung von Fraktion E mit Säulenchromatographie

Die violette Komponente bei einem Rf von 0,19 sollte von Fraktion E mittels Säulenchromatographie isoliert werden (Abbildung 9, Seite 19).

SC 5:

Säule: Durchmesser 1 cm

Füllhöhe: 30 cm

Stationäre Phase: Sephadex® LH-20

Mobile Phase: isokratische Elution mit Methanol

Auftragsmenge: 110 mg Fraktion E in Methanol gelöst

Flussrate: 3 ml/30 min

Insgesamt wurden 10 Fraktionen gesammelt. Um die Fraktionen zu Sammelfraktionen zu vereinigen, wurde jede fünfte mittels DC überprüft.

Tabelle 11: Sammelfraktionen von SC5

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1 + 2	21,2
2	3	29,4
3	4	26,8
4	5	11,8
5	6-10	9,1
6	NL	11,5

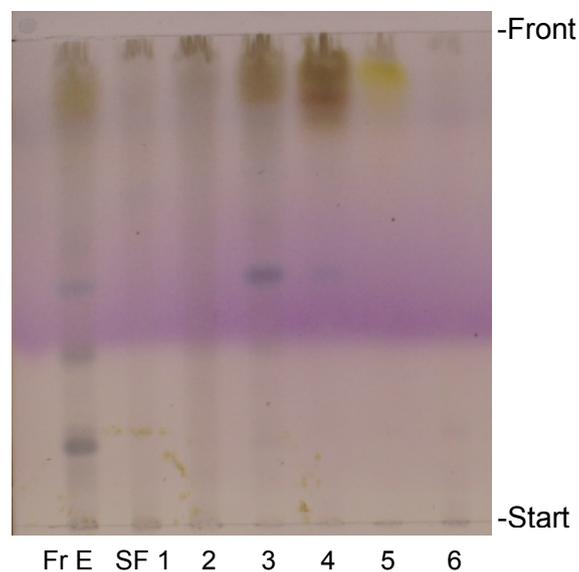
Nach Vereinigen der Fraktionen wurde eine Dünnschichtchromatographie der Sammelfraktionen angefertigt.

Abbildung 21: DC der Sammelfraktionen von SC5

Stationäre Phase: HPTLC-Fertigplatte RP-8 F₂₅₄s (Merck)

Mobile Phase: 90% Methanol

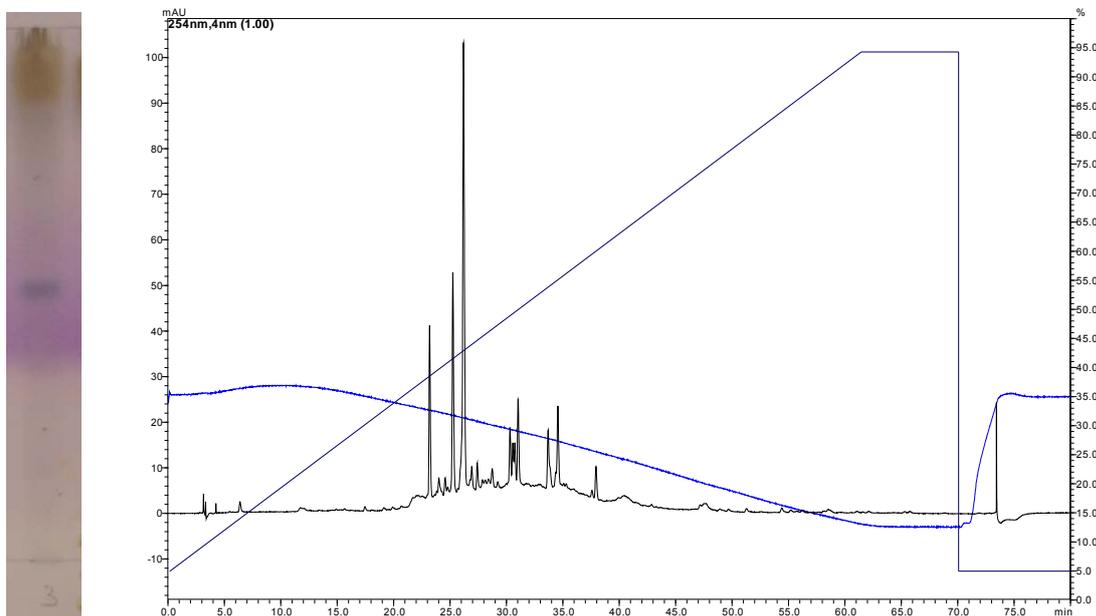
Detektion: AAS



In Sammelfraktion 3 konnte man nur noch eine Hauptkomponente erkennen, weshalb diese mittels HPLC auf ihre Zusammensetzung untersucht wurde.

HPLC-Untersuchung von SF3_SC5:

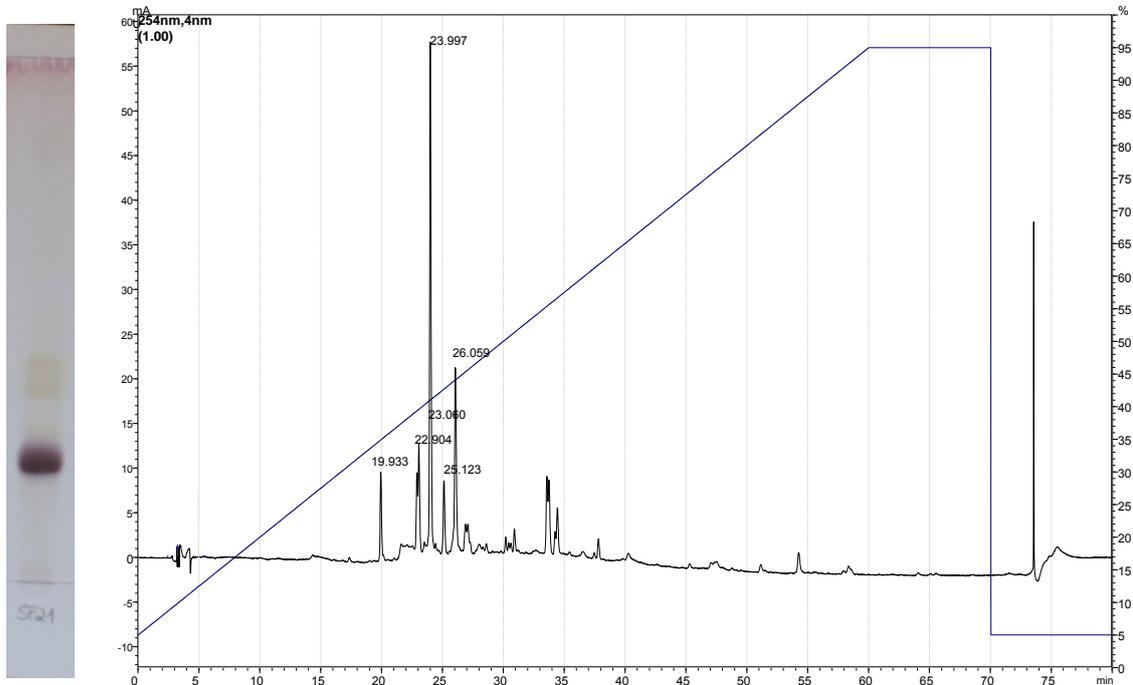
Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm von SF3_SC5
Gerät und Methode siehe Kapitel 2.2.5. (Seite 5)



Die Zone mit R_f 0,19 aus Fraktion E konnte in den Sammelfractionen von SC5 nicht detektiert werden. Es war daher davon auszugehen, dass es zur Zersetzung dieser Komponente während der säulenchromatographischen Trennung gekommen war. Um Hinweise über die Hauptkomponente zu erhalten, wurde Fraktion E mit LC-MS untersucht (Kapitel 3.6.3., Seite 41). Außerdem wurde Fraktion E nochmals mittels HPLC und das UV-Spektrum der Hauptkomponente näher analysiert (Abbildung 23 und 24, Seite 33).

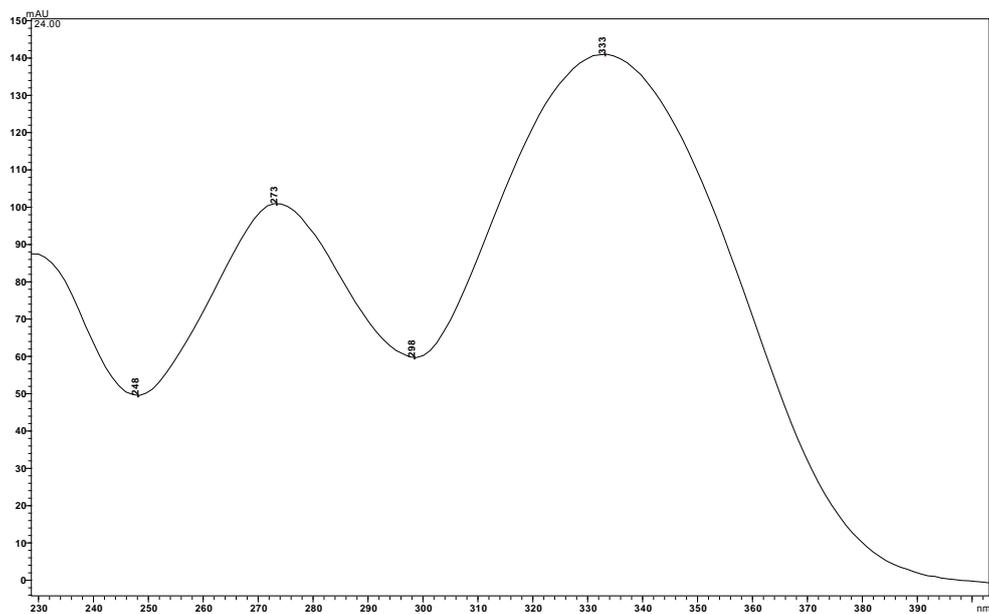
HPLC-Untersuchungen von Fraktion E:

Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm von Fraktion E
Gerät und Methode siehe Kapitel 2.2.5. (Seite 5)



Die Hauptkomponente war bei der Retentionszeit von 23,9 min zu sehen. Anhand des UV-Spektrums konnte man erkennen, dass es sich um ein Flavonoid handeln müsste.

Abbildung 24: UV-Spektrum bei 23,9 min

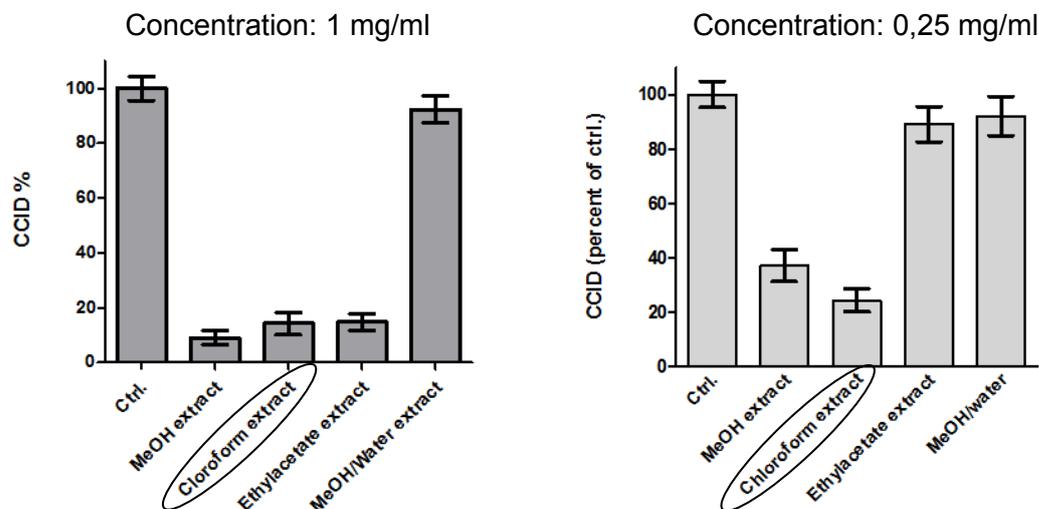


3.5. CCID-Assay

Das Methanolextrakt sowie die Chloroformfraktion, die Ethylacetatfraktion und die MeOH/H₂O-Fraktion wurden auf ihre Wirkung im CCID-Assays untersucht (Abbildung 25).

Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass das Methanolextrakt, wie auch schon in der vorangegangenen Studie [3] eine gute Wirkung aufwies. Auch die Chloroformfraktion wirkte in beiden Konzentrationen sehr gut, was darauf schließen ließ, dass hier die wirksamen Bestandteile von *Scrophularia lucida* L. angereichert wurden. Auch in der Ethylacetatfraktion sind wirksame Bestandteile enthalten, da diese Fraktion aber keine Wirkung in niedrigerer Konzentration zeigte, könnte sie andere Substanzen oder gleiche Bestandteile in niedrigerer Konzentration als die Chloroformfraktion enthalten [4]. Die MeOH/H₂O-Fraktion zeigte keinerlei Wirkung.

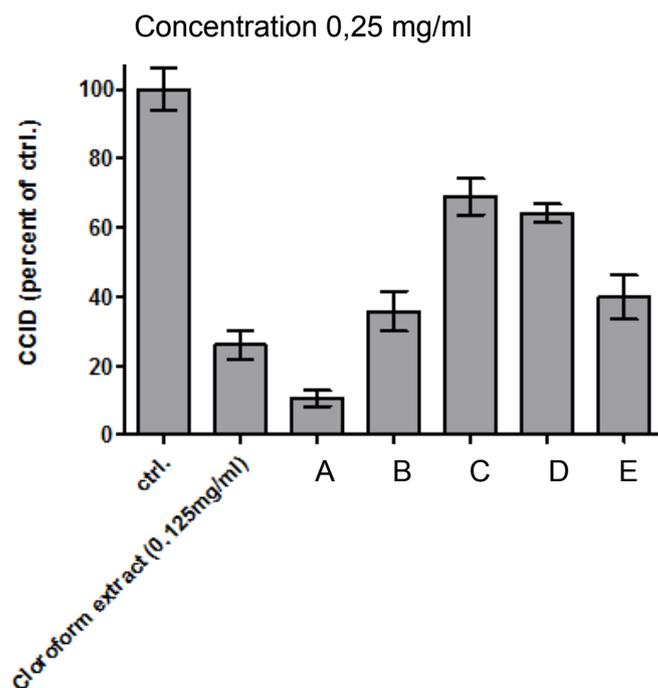
Abbildung 25: Wirksamkeit von Fraktionen aus dem methanolischen Extrakt von *Scrophularia lucida* im CCID-Assay



Nach der Fraktionierung durch SC1 und SC2 wurden die wichtigsten Fraktionen auch auf ihre Wirkung untersucht. Hierbei zeigten alle Fraktionen einen inhibierenden Effekt im CCID-Assay, der beste zeigte sich bei Fraktion A (Abbildung 26, Seite 35).

Aufgrund dieses Ergebnisses wird das Augenmerk weiterer Arbeiten auf diese Fraktion gerichtet sein, um die Substanzen zu isolieren, die für diese Wirkung verantwortlich sind.

Abbildung 26: Wirksamkeit von ausgewählten Fraktionen der Chloroformfraktion im CCID-Assay



3.6. Strukturaufklärung mittels LC-MS und NMR-Spektroskopie

Zur Strukturaufklärung wurden die Fraktionen C und D mittels LC-MS, MSⁿ und NMR- Spektroskopie analysiert ⁷.

Für die LC-MS Messungen wurden dieselbe Säule und derselbe Gradient wie bei den HPLC-Analysen (Tabelle 2, Seite 7) verwendet.

Abhängig von den zu untersuchenden Fraktionen wurden MSⁿ-Scan-Experimente automatisiert im DDA-Modus (data dependent acquisition) (Bedingungen siehe Kapitel 2.2.7., Seite 6) durchgeführt.

⁷ Die dazugehörigen Spektren der einzelnen Verbindungen befinden sich im Anhang.

3.6.1. Strukturaufklärung von SL1 (=Koelziosid)

Substanz SL1 war chromatographisch fast einheitlich in Fraktion C enthalten.

Die Substanz konnte mittels LC-MS im Positiv- und Negativionenmodus nicht fragmentiert werden und wurde direkt analysiert. Dazu wurde Ammoniumacetat hinzugefügt.

Durch die MS-Analyse konnte das Molekulargewicht von 810,4 Da ($[M+NH_4]^+ = 828,4$) bestimmt werden.

Im MS²-Scan trat ein Masseverlust von 379,2 Da auf, welcher, in Zusammenhang mit den NMR-Daten, auf eine Abspaltung des Iridoids mit dem Zucker hindeutete.

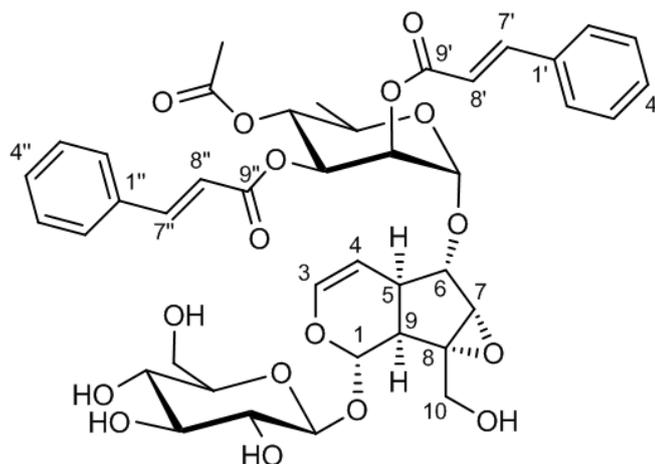
Im MS³-Scan war ein Verlust der Masse von 60 Da zu sehen, welcher typisch für einen Acetylrest ist. Weiters kam es zu einer Abspaltung eines Fragments mit 148 Da, was auf eine Zimtsäure hindeutete.

Mit NMR-Spektroskopie und der MS-Analyse konnte die Substanz SL1 als Koelziosid identifiziert werden (Abbildung 27).

Die gemessenen ¹H-NMR und ¹³C-NMR-Daten korrelierten weitgehend mit den Daten aus der Literatur [8].

Koelziosid wurde zuerst in *Scrophularia koelzii* nachgewiesen [8]. Weiters kommt es auch in *Scrophularia deserti* vor [9].

Abbildung 27: Koelziosid



Chemical Formula: C₄₁H₄₆O₁₇
Molecular Weight: 810,79

Tabelle 12: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten von Substanz SL1 in MeOH-d₄; 291,1 K

Position		¹ H (ppm)	J _{H,H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹³ C-Vergleich ⁸
1	CH	5.116	d 9.7	95.13	95.11
3	CH	6.409	d 5.9 / d 1.8	142.50	142.47
4	CH	5.108	d 5.9 / d 4.7	103.18	103.18
5	CH	2.522	d 7.6 / d 7.9 / d 4.5 / d 1.8	37.17	37.13
6	CH	4.105	d 8.2 / d 1.0	84.92	84.91
7	CH	3.707	d 1.0	59.45	59.43
8	C	---	---	66.55	66.53
9	CH	2.606	d 7.6 / d 9.7	43.28	43.23
10	CH ₂	4.168	d 13.2	61.43	61.40
		3.828	d 13.2		
β-Glc					
1	CH	4.786	d 7.9	99.71	99.68
2	CH	3.273	d 7.9 / d 9.2	74.82	74.77
3	CH	3.406	d 9.2 / d 8.8	77.67	78.58
4	CH	3.260	d 8.8 / d 9.8	71.78	71.71
5	CH	3.323	d 9.8 / d 2.1 / d 6.7	78.65	77.61
6	CH ₂	3.920	d 2.1 / d 11.9	62.96	62.91
		3.631	d 6.7 / d 11.9		
α-Rha					
1	CH	5.173	d 1.8	97.80	97.77
2	CH	5.501	d 1.8 / d 3.5	71.41	71.38
3	CH	5.454	d 3.5 / d 10.1	70.88	70.84
4	CH	5.262	d 10.1 / d 9.8	72.42	72.38
	CO	---	---	171.88	171.87
	CH ₃	2.048	s	20.73	20.74
5	CH	4.099	d 9.8 / q 6.3	68.07	68.03
6	CH ₃	1.270	d 6.3	17.74	17.74
1'	C	---	---	135.51	135.43
2'/6'	CH	7.638	m	129.52	130.04
3'/5'	CH	7.419	m	130.08	129.50
4'	CH	7.424	m	131.83	131.82
7'	CH	7.756	d 16.0	147.78	147.74
8'	CH	6.673	d 16.0	117.96	117.92
9'	C	---	---	167.37	162.32
1''	C	---	---	135.42	135.35
2''/6''	CH	7.506	m	129.37	129.98
3''/5''	CH	7.340	m	130.00	129.35
4''	CH	7.360	m	131.72	131.71
7''	CH	7.618	d 16.0	147.39	147.37
8''	CH	6.422	d 16.0	117.86	117.84
9''	C	---	---	167.17	167.14

⁸ Quelle: Bhandari S. P. S., Mishra A., Roy R., Garg H. S. (1992) Koelzioside, an iridoid diglycoside from *Scrophularia koelzii*. *Phytochemistry* 31, (2): 689-691.

3.6.2. Strukturaufklärung von SL2 (=Scrovalentinosid)

Substanz SL2 als Hauptkomponente in Fraktion D wurde mittels LC-MS, MSⁿ und NMR-Spektroskopie als Scrovalentinosid identifiziert.

In der LC-MS konnte die Substanz nicht fragmentiert werden, da diese protoniert und deprotoniert nicht stabil war. Man konnte dadurch nur das Molekulargewicht von 752,3 Da bestimmen.

SL2 wurde daraufhin direkt in die MS infundiert. Dazu wurde zu SL2 Ammoniumacetat hinzugefügt, damit sich die Substanz protonieren ließ und so eine Fragmentierung ermöglichte. Hier wurde das Molekulargewicht mit 752,3 Da ($[M+NH_4]^+ = 770,3$) nochmals bestätigt.

SL1 und SL2 fragmentierten ähnlich, wodurch man davon ausgehen konnte, dass sie eine ähnliche Struktur aufweisen.

Im MS²-Scan sah man den gleichen Massenverlust (von 379,2 Da) wie bei SL1. Dies wies auf das Iridoid mit dem Zucker hin. Zusätzlich wurde eine Masse von 162 Da abgespalten, was auf den Verlust des Zuckers allein schließen ließ.

Im MS³-Scan war ein Masseverlust von 60 Da zu sehen, was wiederum auf einen Acetylrest schließen ließ. Weitere 60 Da wurden abgespalten, was auf einen zweiten Acetylrest hinwies.

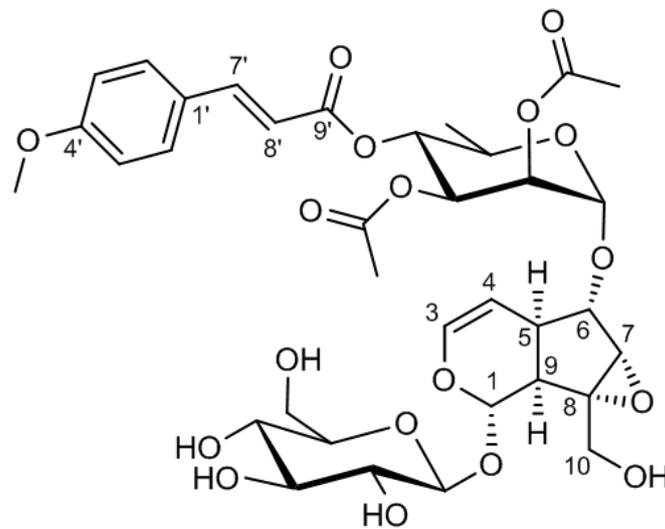
Ein Masseverlust von 178 Da wies auf die Abspaltung einer methoxylierten Zimtsäure und von 238 Da auf die Abspaltung von einem Acetylrest mit der methoxylierten Zimtsäure hin.

Aufgrund der Masse und des Fragmentierungsmusters konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei SL2 um Scrovalentinosid handelte (Abbildung 28, Seite 39). Bestätigt wurde dies mittels NMR-Spektroskopie.

Die $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von SL2 stimmten mit den aus der Literatur bekannten Daten weitgehend überein [10].

Scrovalentinosid wurde erstmals in *Scrophularia auriculata ssp. pseudoauriculata* nachgewiesen [10]. Weiters kommt es in *Scrophularia nodosa* vor [11]. Für die Substanz konnten antiinflammatorische Effekte nachgewiesen werden [12].

Abbildung 28: Scrovalentinosid



Chemical Formula: $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{O}_{18}$
Molecular Weight: 752,71

Tabelle 13: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten von Substanz SL2 in MeOH-d₄; 298,1 K

Position		¹ H (ppm)	J _{H,H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹³ C-Vergleich (ppm) ⁹
1	CH	5.099	d 9.6	95.12	95.20
3	CH	6.398	d 6.0 / d 1.8	142.49	142.40
4	CH	5.094	d 6.0 / d 4.5	103.18	103.20
5	CH	2.488	d 7.7 / d 7.9 / d 4.5 / d 1.8	37.17	37.10
6	CH	4.067	d 8.2 / d 1.0	84.91	85.10
7	CH	3.671	d 1.0	59.45	59.50
8	C	---	---	66.53	66.50
9	CH	2.589	d 7.7 / d 9.6	43.29	43.30
10	CH ₂	4.156	d 13.1	61.40	61.60
		3.820	d 13.1		
β-Glc					
1	CH	4.777	d 8.0	99.70	99.80
2	CH	3.265	d 8.0 / d 9.2	74.82	74.80
3	CH	3.401	d 9.2 / d 8.8	77.67	77.70
4	CH	3.253	d 8.8 / d 9.9	71.78	71.70
5	CH	3.319	d 9.9 / d 2.1 / d 6.7	78.65	78.50
6	CH ₂	3.919	d 2.1 / d 11.9	62.96	62.90
		3.628	d 6.7 / d 11.9		
α-Rha					
1	CH	5.076	d 1.8	97.77	97.80
2	CH	5.304	d 1.8 / d 3.4	71.23	71.40
	CO	---	---	171.67	171.60
	CH ₃	2.163	s	20.69	20.80
3	CH	5.361	d 3.4 / d 10.2	70.64	70.60
	CO	---	---	171.64	171.60
	CH ₃	1.928	s	20.61	20.80
4	CH	5.170	d 10.2 / d 9.9	71.99	72.10
5	CH	4.072	d 9.9 / q 6.3	68.28	68.40
6	CH ₃	1.217	d 6.3	17.77	18.00
1'	C	---	---	128.10	127.90
2'/6'	CH	7.571	d 8.8	131.24	131.20
3'/5'	CH	6.958	d 8.8	115.48	115.50
4'	C	---	---	163.42	163.30
	OCH ₃	3.832	s	55.90	55.80
7'	CH	7.677	d 15.9	147.39	147.40
8'	CH	6.375	d 15.9	115.06	115.10
9'	C	---	---	167.93	167.90

⁹ Quelle: Giner R. M., Villalba M. L., Recio M.-C., Salvador Máñez S., Gray A. I., Ríos J. L. (1998) A New Iridoid from *Scrophularia auriculata* ssp. *Pseudoauriculata*. Journal of natural products 61, (9): 1162-1163

3.6.3. Informationen über Fraktion E durch LC-MS

Um Informationen über die Hauptkomponente von Fraktion E zu erhalten, wurde diese mittels LC-MS analysiert. Dabei konnte ein Molekulargewicht von 504 Da bestimmt werden. Im Positivionen-MS³ sah man einen Masseverlust von 15 Da, was auf ein Methylradikal schließen ließ. Diese sind spezifisch für phenolische Methoxygruppen und kommen in Flavonoiden vor, sind sonst aber selten. Die verbleibende Masse von 285 Da deutete auf das radikalisierte Aglykon des Flavonoids hin. Weiters trat im Positivionen-MS² ein Verlust von 204 Da auf. Dies wies auf eine Acetylhexosylgruppe hin. Diese Ergebnisse deckten sich mit denen des Negativionenmodus.

Aufgrund des typischen UV-Spektrums und der Korrelation mit den MS-Spektren, konnte davon ausgegangen werden, dass die Hauptkomponente ein Flavonoid ist. Aufgrund des hohen Anteils von 2“-O-Acetyl-Homoplantagin in MeOH-Extrakt [4] und der Übereinstimmung des MS-Spektrums von Fraktion E mit dem MS-Spektrum von 2“-O-Acetyl-Homoplantagin, konnte man darauf schließen, dass es sich bei der Hauptkomponente von Fraktion E um 2“-O-Acetyl-Homoplantagin handelt [4].

Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Hauptkomponente von Fraktion E nicht um die violette Bande bei einem R_f von 0,19, sondern um die löschende Bande unter UV 366 nm bei R_f von 0,68 handelte (Abbildung 29).

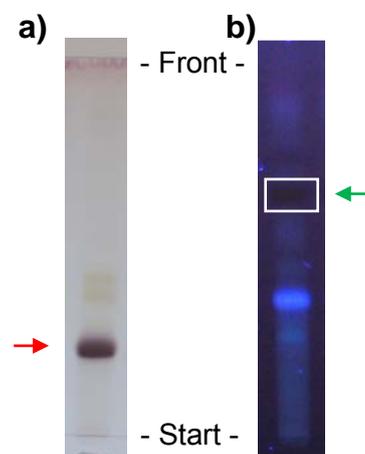
Abbildung 29: DC von Fraktion E

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck)

Mobile Phase: Ethylacetat + Methanol + konz. Ameisensäure + Wasser (70 + 8 + 4 + 4)

Detektion: AAS (a) und Naturstoffreagens A/PEG (b)

Platte: 20x10 cm



4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus der Chloroformfraktion eines methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* Inhaltsstoffe mit inhibierender Wirkung auf die gap-Bildung im CCID-Assay zu isolieren und identifizieren.

Es erfolgte eine Vorreinigung von 140 g methanolischem Extrakt durch Ausschüteln mit verschiedenen polaren Lösungsmitteln, um die störenden Inhaltsstoffe wie z.B. Chlorophyll, Fette und Wachse zu entfernen.

Daraus gingen 14,9 g Chloroformfraktion hervor, die im Zuge dieser Arbeit weiter mittels Säulenchromatographie (SC1 und SC2) fraktioniert wurde.

Dabei entstanden jeweils fünf Sammelfractionen, die zur weiteren Aufarbeitung verwendet wurden, da nur wenige Komponenten bei der Untersuchung mittels DC und HPLC nachweisbar waren. Die Fractionen von SC1 wurden aufgrund des identen Inhaltsstoffmusters mit den entsprechenden Fractionen von SC2 vereinigt. Mit Fraction B wurde eine HPCCC durchgeführt, um eine magentafarbene Komponente bei Rf 0,5 zu isolieren. Diese Komponente war aber nicht stabil und konnte nicht isoliert werden.

Fraction A wurde mittels Säulenchromatographie, mit Kieselgel 60 als stationäre Phase, weiter fraktioniert. Hierbei wurde eine Fraction (SF4_SC3) mit zwei Hauptkomponenten erhalten. Der Hauptanteil konnte als Chlorophyll a identifiziert werden. Diese Fraction wurde nicht weiter bearbeitet.

Die Fraction SF8_SC2 wurde zur weiteren Auftrennung auf Sephadex® LH-20 als stationäre Phase aufgetragen, um Adsorptionen zu vermeiden.

Allerdings konnte keine Komponente in ausreichender Menge und Reinheit für die Strukturaufklärung gewonnen werden.

Eine erneute Gewinnung und Aufarbeitung von Fraction A konnte aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden, wäre aber für weitere Arbeiten von Interesse.

Fraction E wurde ebenfalls mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 aufgetrennt. Das HPLC-Chromatogramm wies daraufhin, dass sich die zu isolierende Substanz während der HPLC-Analyse auf der Säule zersetzt hatte.

Aus Zeitgründen wurde Fraction E mittels LC-MS analysiert, um Informationen über ihre Inhaltsstoffe zu bekommen. Dabei wurde festgestellt, dass die Substanz mit einem Rf-Wert von 0,19 nicht die Hauptkomponente war, sondern eine löschende Bande unter UV 366 nm bei einem Rf-Wert von 0,68, die auch in der

Ethylacetatfraktion vorhanden war und als 2'-O-Acetyl-Homoplantaginin identifiziert wurde [4].

Die Fraktionen C und D wurden zur Identifizierung und Strukturaufklärung mittels LC-MS, MSⁿ und NMR-Spektroskopie untersucht. Hierbei konnte in der Fraktion C Koelziosid und in Fraktion D Scrovalentinosid als Hauptkomponente aufgeklärt werden. Es handelt sich bei beiden Substanzen um sehr seltene Iridoidglykoside.

5. Zusammenfassung

Die in dieser Diplomarbeit untersuchte Scrophularia-Art, *Scrophularia lucida* L., findet wie auch andere Arten dieser Gattung, Anwendung bei entzündlichen Erkrankungen und Hauterkrankungen, beispielsweise in der traditionellen türkischen Medizin [1,2].

Da bisher keine Daten zu den Inhaltsstoffen von *Scrophularia lucida* vorlagen, war es Ziel dieser Arbeit, Komponenten zu isolieren und zu identifizieren sowie ihre inhibierende Wirkung im CCID-Assay zu überprüfen.

Durch Ausschütteln mit verschiedenen polaren Lösungsmitteln wurde das vorhandene methanolische Extrakt des Krautes von *Scrophularia lucida* fraktioniert. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Chloroformfraktion weiter aufgetrennt.

Die Fraktionierung der Chloroformfraktion erfolgte mittels Säulenchromatographie. Dabei wurden zwei Fraktionen mit nur einer Hauptkomponente gewonnen. Diese Fraktionen wurden mittels LC-MS, MSⁿ und NMR-Spektroskopie auf ihre Identität hin untersucht, wobei die Hauptkomponente von Fraktion D als Hauptkomponente Scrovalentinosid, ein sehr seltenes Iridoidglykosid, aufwies. Fraktion C enthielt einen geringen Anteil von Scrovalentinosid, als Hauptkomponente wurde der seltene Naturstoff Koelziosid eindeutig identifiziert.

Vier weitere Fraktionen wurden mittels Säulenchromatographie und HPLC weiter aufgetrennt. Dabei konnten keine weiteren Substanzen isoliert werden. In einer Fraktion konnte 2“-O-Acetyl-Homoplantaginin als Komponente mittels LC-MS identifiziert werden.

Damit liegen erstmals Daten zum Iridoidmuster von *Scrophularia lucida* L. vor.

6. Summary

Scrophularia lucida L. as well as other kinds of this genus, are applied in inflammatory diseases and skin diseases, for example in the traditional Turkish medicine [1,2].

Due to the fact that no data on the secondary metabolites of *Scrophularia lucida* were available until now, the goal of this thesis was the isolation and identification of compounds with inhibitory effects in the CCID assay.

Fractions of a methanolic extract of the aerial parts of *Scrophularia lucida* were prepared by partition with different solvents. The chloroform fraction was further fractionated in this thesis.

The fractionation of the chloroform fraction was performed using column chromatography. Two fractions with only one main component were obtained during that process.

Those fractions were examined by LC-MS, MSⁿ and NMR spectroscopy, resulting in the identification of scrovalentinoside, a very rare iridoidglycoside, as the main component of fraction D. Fraction C contained a small amount of scrovalentinoside, but the rare natural compound koelziosid as the main component.

Four further fractions were separated via column chromatography and HPLC. However, no other pure substances were isolated during those processes. In one fraction 2'-O-acetyl-homoplantagin was identified by LC-MS.

This is the first report of iridoidglycosides in *Scrophularia lucida* L.

7. 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] Galindez J.D., Lanza A.M.D., Matellano L.F. (2002) Biologically Active Substances from the Genus *Scrophularia*. *Pharmaceutical Biology* 40, (1): 45-99.
- [3] 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.
- [4] Lewenhofer V. (2014) Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*, Diplomarbeit, Universität Wien.
- [5] 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.
- [6] Wagner H., Bladt S. (1996) *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin.
- [7] Heldt H. W., Piechulla B. (2008) *Pflanzenbiochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
- [8] Bhandari S. P. S., Mishra A., Roy R., Garg H. S. (1992) Koelzioside, an iridoid diglycoside from *Scrophularia koelzii*. *Phytochemistry* 31, (2): 689-691.

- [9] Ahmed B., Al-Rehaily A. J., Al-Howiriny T. A., Abdelatey El-Sayed K., Ahmad M. S. (2003) Scropolioside-D2 and harpagoside-B: Two new iridoid glycosides from *Scrophularia deserti* and their antidiabetic and antiinflammatory activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26, (4): 462-467.
- [10] Giner R. M., Villalba M. L., Recio M.-C., Salvador Máñez S., Gray A. I., Ríos J. L. (1998) A New Iridoid from *Scrophularia auriculata* ssp. *Pseudoauriculata*. *Journal of Natural Products* 61, (9): 1162-1163
- [11] Miyase T., Mimatsu A. (1998) Acylated Iridoid and Phenylethanoid Glycosides from the Aerial Parts of *Scrophularia nodosa*. *Journal of Natural Products* 62, (8): 1079-1084.
- [12] Giner R. M., Villalba M. L., Recio M.-C., Manez S., Cerda-Nicolas M., Rios J. L. (2000) Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. *European Journal of Pharmacology* 389, (2/3): 243-252.

8. Abbildungsverzeichnis

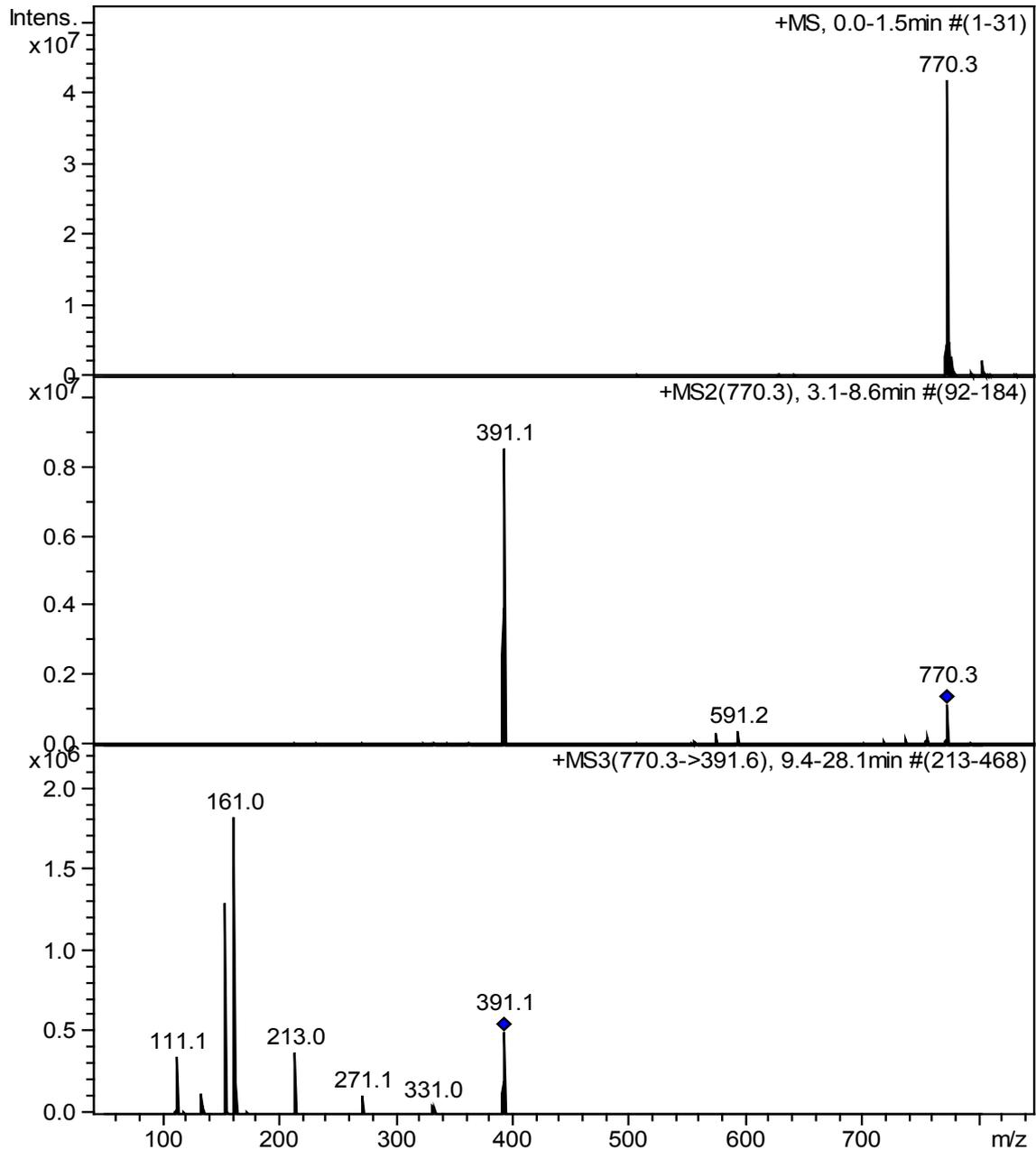
Abbildung 1: <i>Scrophularia lucida</i> L.	1
Abbildung 2: Verminderung der gap junctions von MCF-7 durch ein methanolisches Extrakt von <i>Scrophularia lucida</i> L	2
Abbildung 3: Extraktionsschema	9
Abbildung 4: DC der Chloroform- und Ethylacetatfraktionen	10
Abbildung 5: DC der Sammelfraktionen von HPCCC1	12
Abbildung 6: DC der Sammelfraktionen von HPCCC2	14
Abbildung 7: DC der Sammelfraktionen von SC1	16
Abbildung 8: SC2.....	17
Abbildung 9: DC der Sammelfraktionen von SC2.....	19
Abbildung 10: DC-Vergleiche der zu vereinigenden Fraktionen	20
Abbildung 11: weiterer DC-Vergleich der zu vereinigenden Fraktionen	21
Abbildung 12: HPLC-Chromatogramm der Fraktion C	23
Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm der Fraktion D	23
Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von Fraktion B	24
Abbildung 15: DC der Sammelfraktionen von HPCCC3	25
Abbildung 16: DC der Sammelfraktionen von SC3.....	27
Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm von SF4_SC3.....	27
Abbildung 18: UV-Spektren von SF4_SC3.....	28
Abbildung 19: DC der Sammelfraktionen von SC4.....	29
Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm von SF2_SC4.....	30
Abbildung 21: DC der Sammelfraktionen von SC5.....	31
Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm von SF3_SC5.....	32
Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm von Fraktion E	33
Abbildung 24: UV-Spektrum bei 23,9 min.....	33
Abbildung 25: Wirksamkeit von Fraktionen aus dem methanolischen Extrakt von <i>Scrophularia lucida</i> im CCID-Assay	34
Abbildung 26: Wirksamkeit von ausgewählten Fraktionen der Chloroformfraktion im CCID-Assay.....	35
Abbildung 27: Koelziosid	36
Abbildung 28: Scrovalentinosid	39
Abbildung 29: DC von Fraktion E	41

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HPLC – Gerät und Einstellungen.....	5
Tabelle 2: LC-MS – Gerät und Einstellungen	7
Tabelle 3: Mengen der verschiedenen Fraktionen nach der Vorreinigung	11
Tabelle 4: Sammelfraktionen von HPCCC2	13
Tabelle 5: Sammelfraktionen von SC1	15
Tabelle 6: Sammelfraktionen von SC2	18
Tabelle 7: vereinigte Sammelfraktionen (SC1 + SC2).....	22
Tabelle 8: Sammelfraktionen von HPCCC3	25
Tabelle 9: Sammelfraktionen von SC3	26
Tabelle 10: Sammelfraktionen von SC4	29
Tabelle 11: Sammelfraktionen von SC5	31
Tabelle 12: ¹ H-NMR- und ¹³ C-NMR-Daten von Substanz SL1	37
Tabelle 13: ¹ H-NMR- und ¹³ C-NMR-Daten von Substanz SL2	40

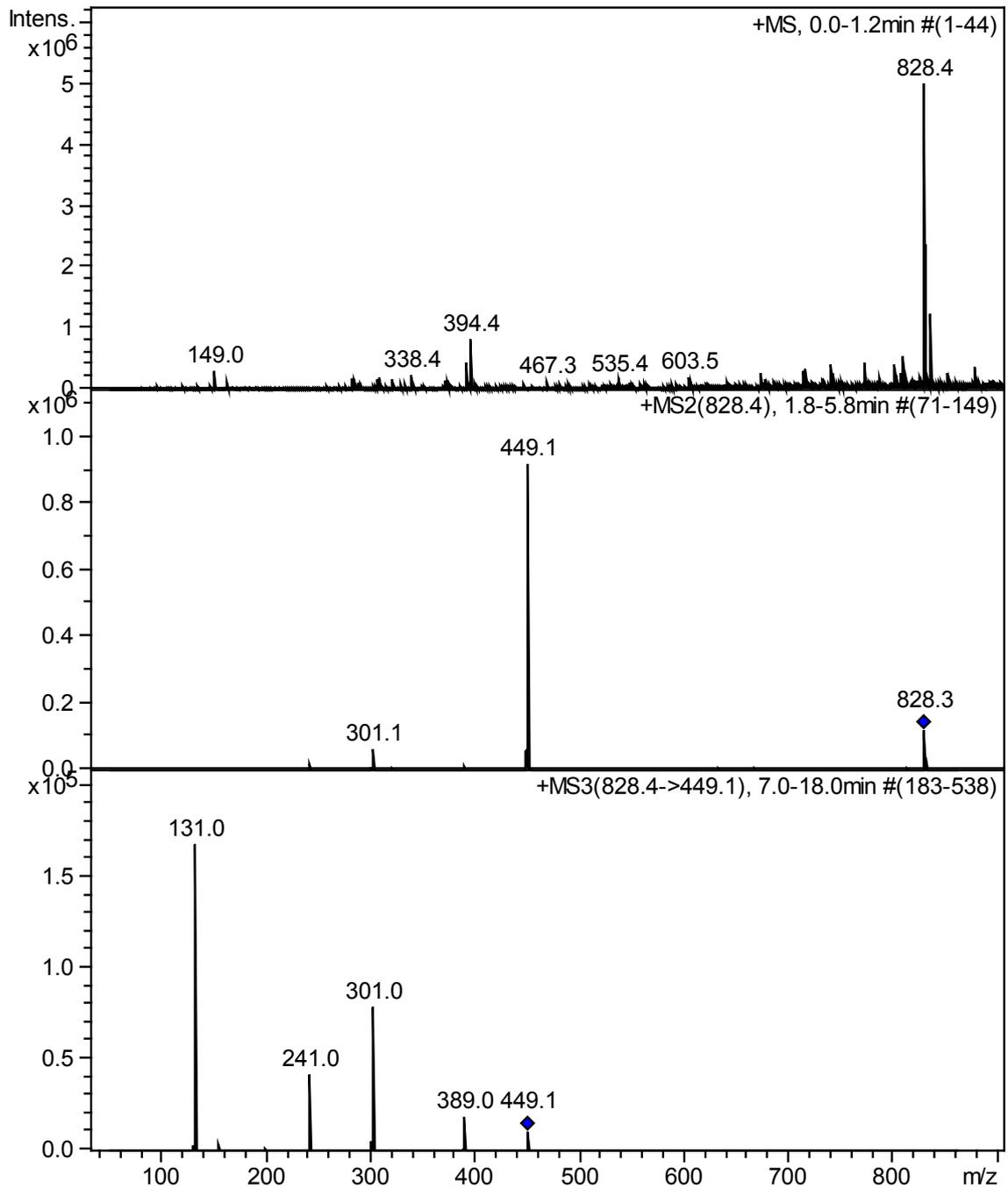
Anhang

Anhang 1: MS-Spektren im Positivionenmodus von SL2



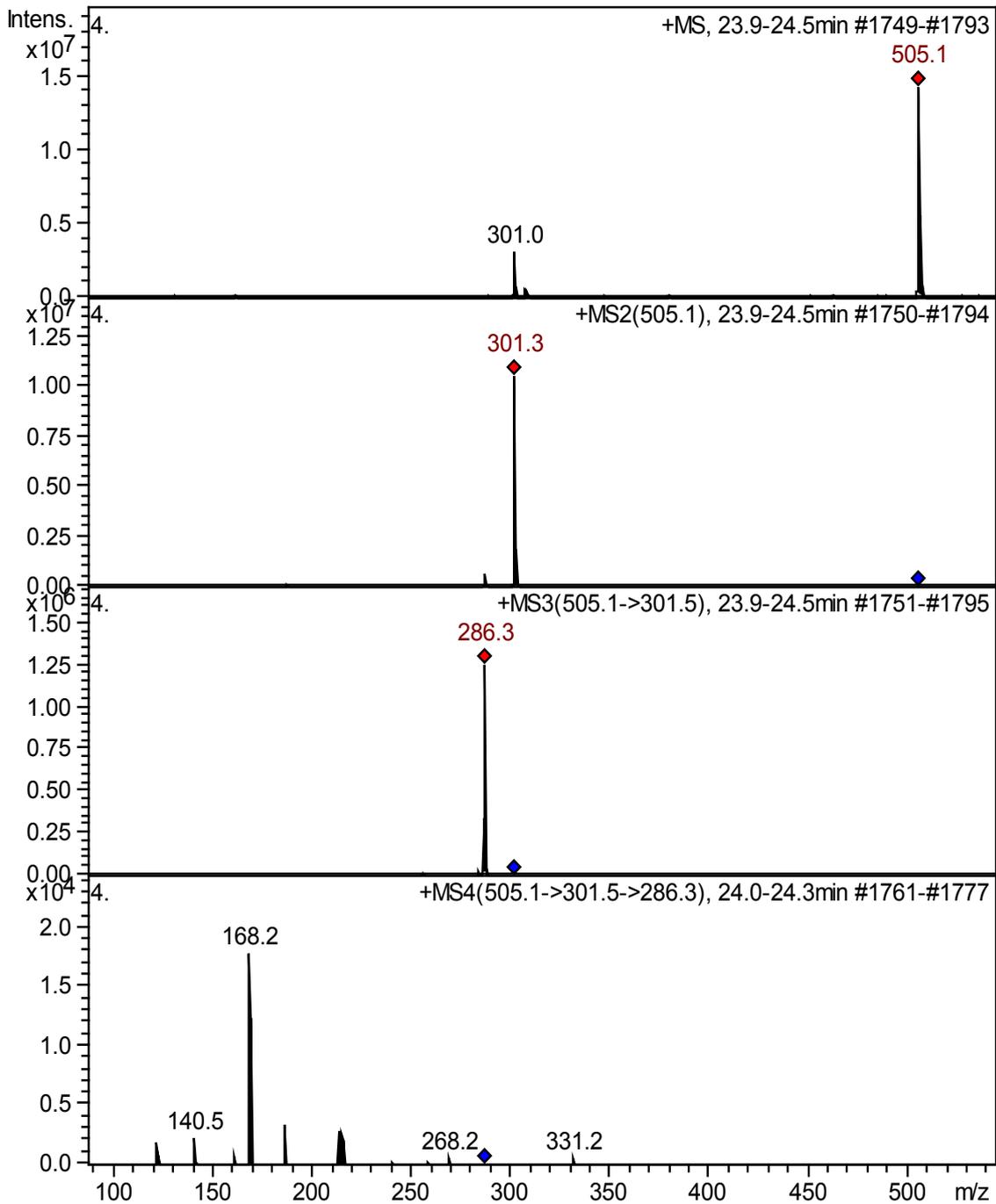
SL2, MS-Spektren von oben nach unten: Positionen-MS¹; MS² des [M+NH₄]⁺ bei m/z 770,3; MS³ (m/z 770,3 → 391,1 →)

Anhang 2: MS-Spektren im Positivionenmodus von SL1



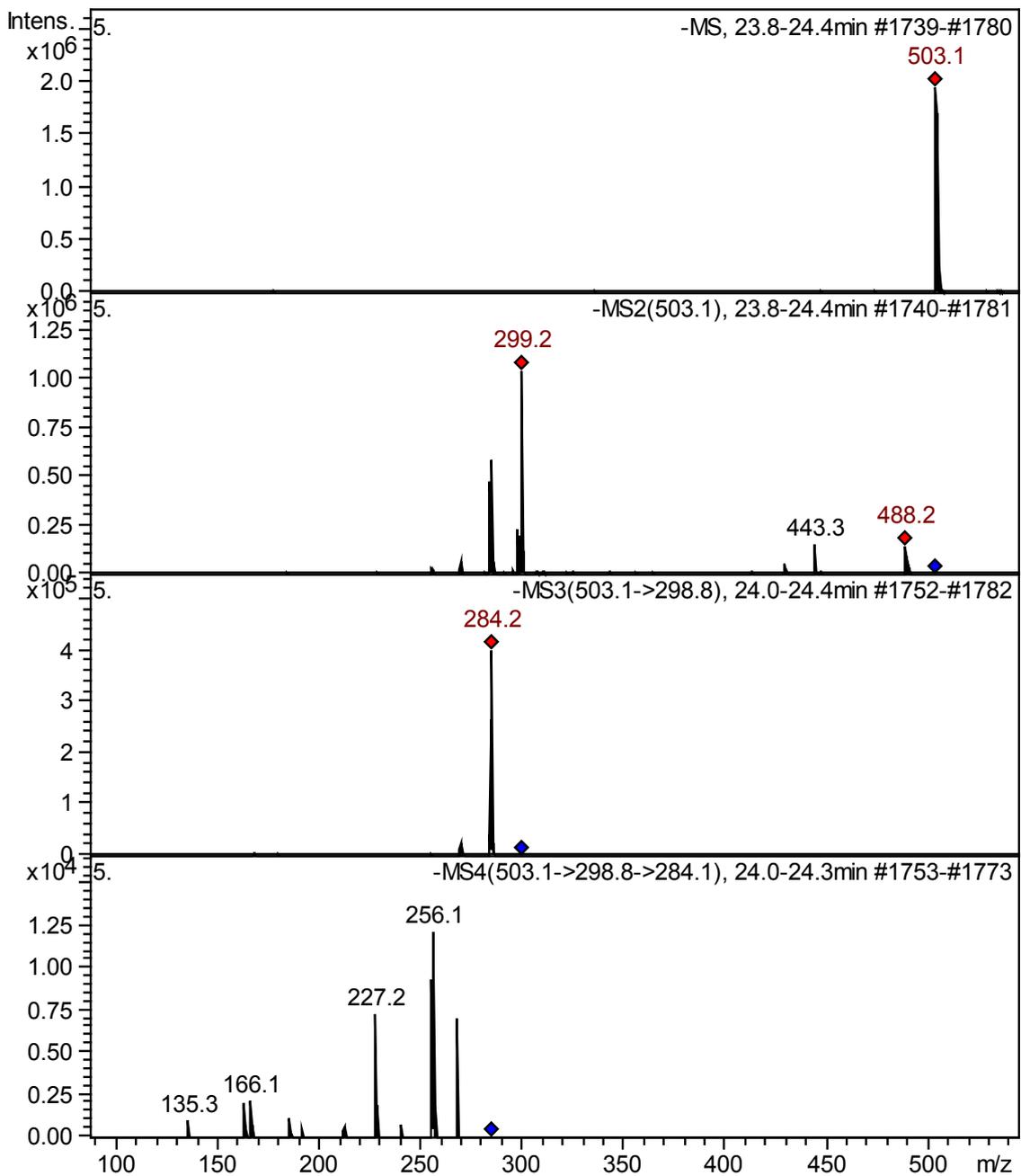
SL1, MS-Spektren von oben nach unten: Positivionen-MS¹; MS² des [M+NH₄]⁺ bei m/z 828,4; MS³ (m/z 828,4 → 449,1 →)

Anhang 3: MS-Spektren im Positionenmodus von Fraktion E



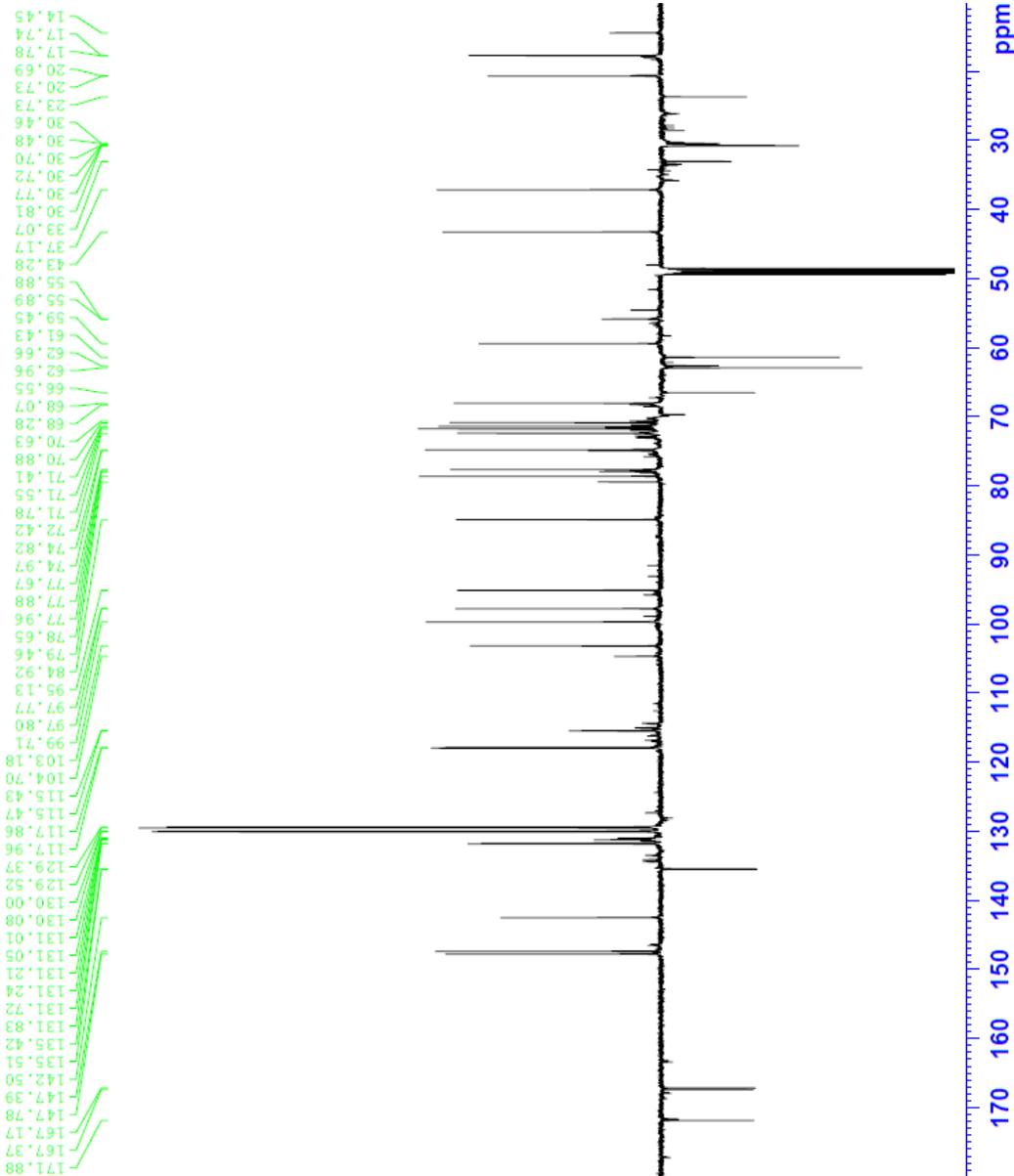
SF21SC2, LC-MS Spektren von oben nach unten: Positionen-MS¹; MS² des [M+H]⁺ bei m/z 505,1; MS³ (m/z 505,1 → 301,3 →); MS⁴ (m/z 505,0 → 301,3 → 286,3 →)

Anhang 4: MS-Spektren im Negativionenmodus von Fraktion E

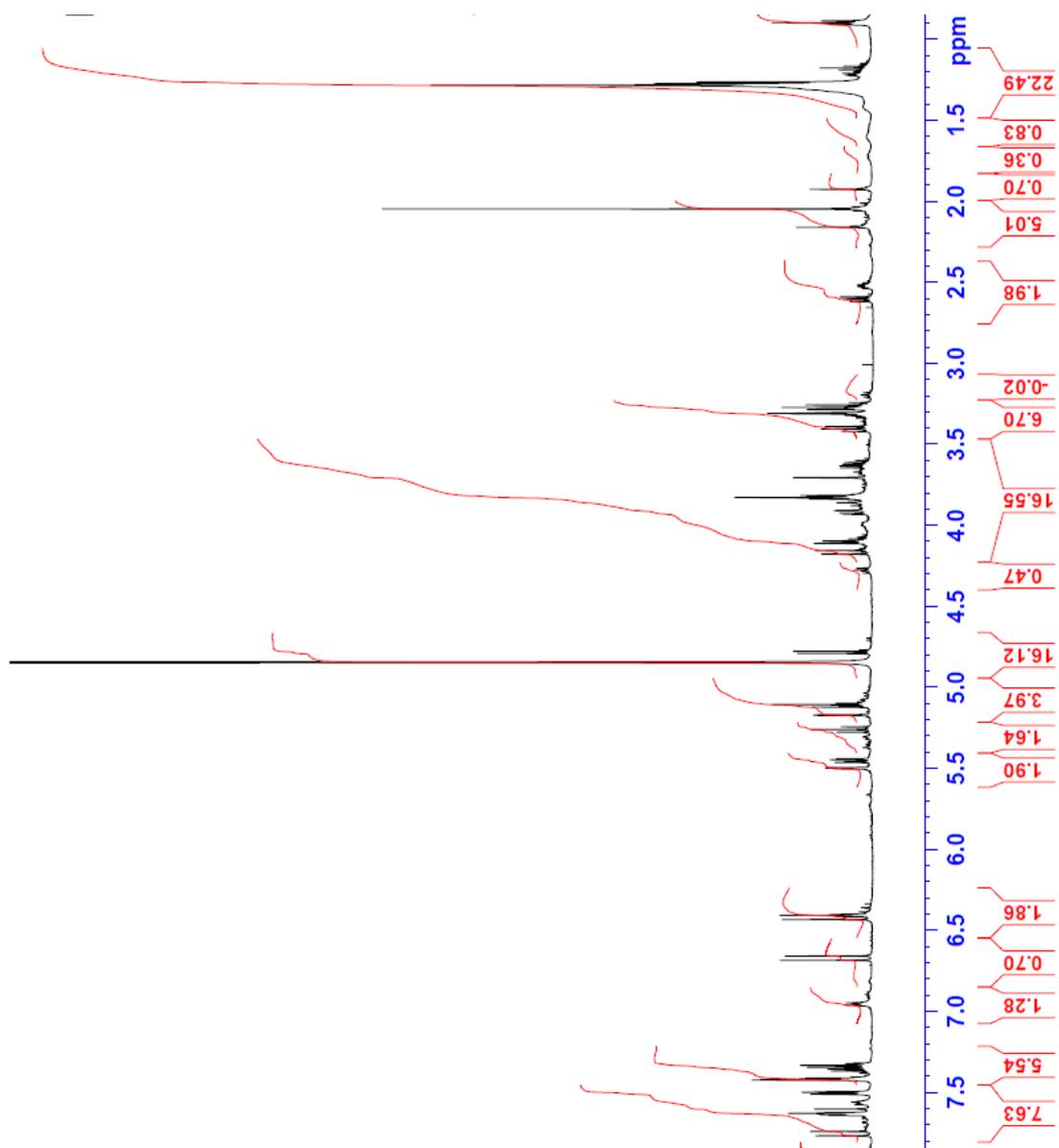


SF21SC2, LC-MS Spektren von oben nach unten: Negativionen-MS¹; MS² des [M-H]⁻ bei m/z 503,1; MS³ (m/z 503,1 → 299,2 →); MS⁴ (m/z 503,1 → 299,2 → 284,2 →)

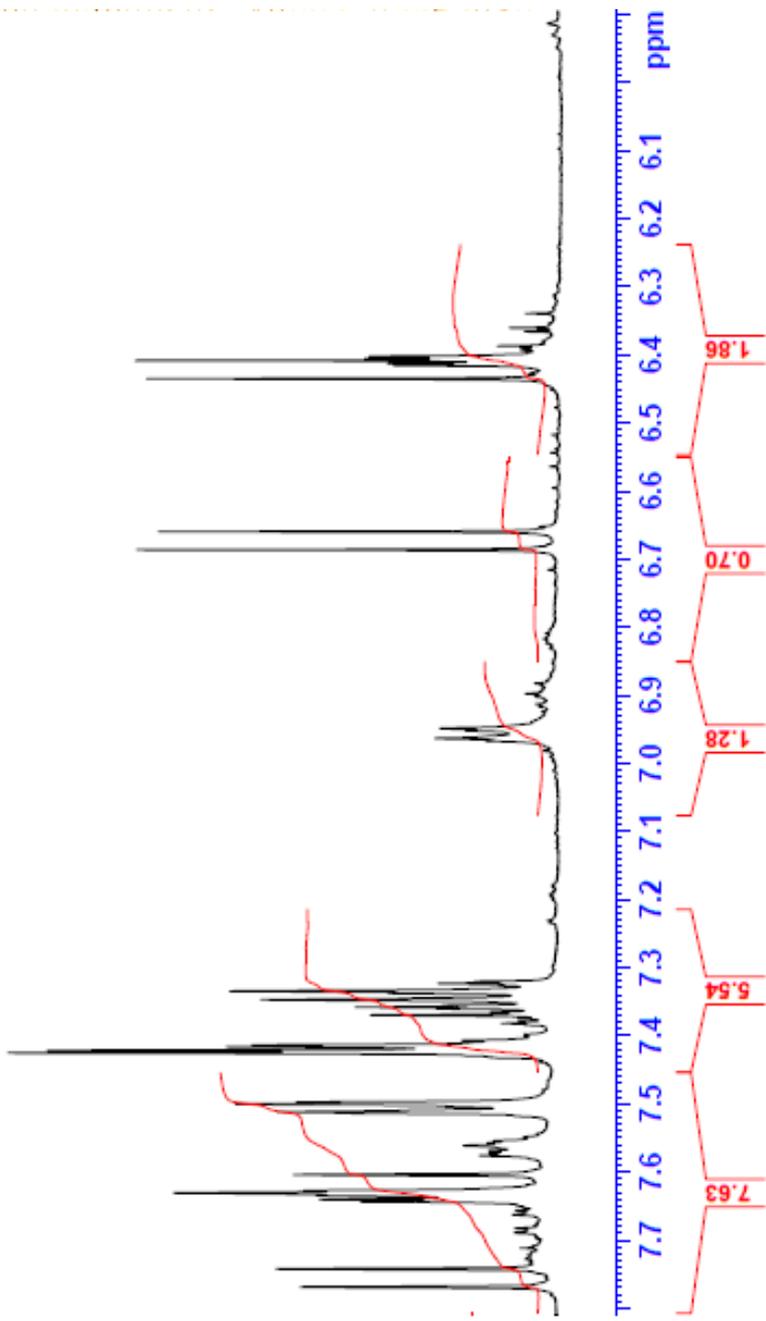
Anhang 5: ¹³C-NMR Spektrum von SL1 in MeOH



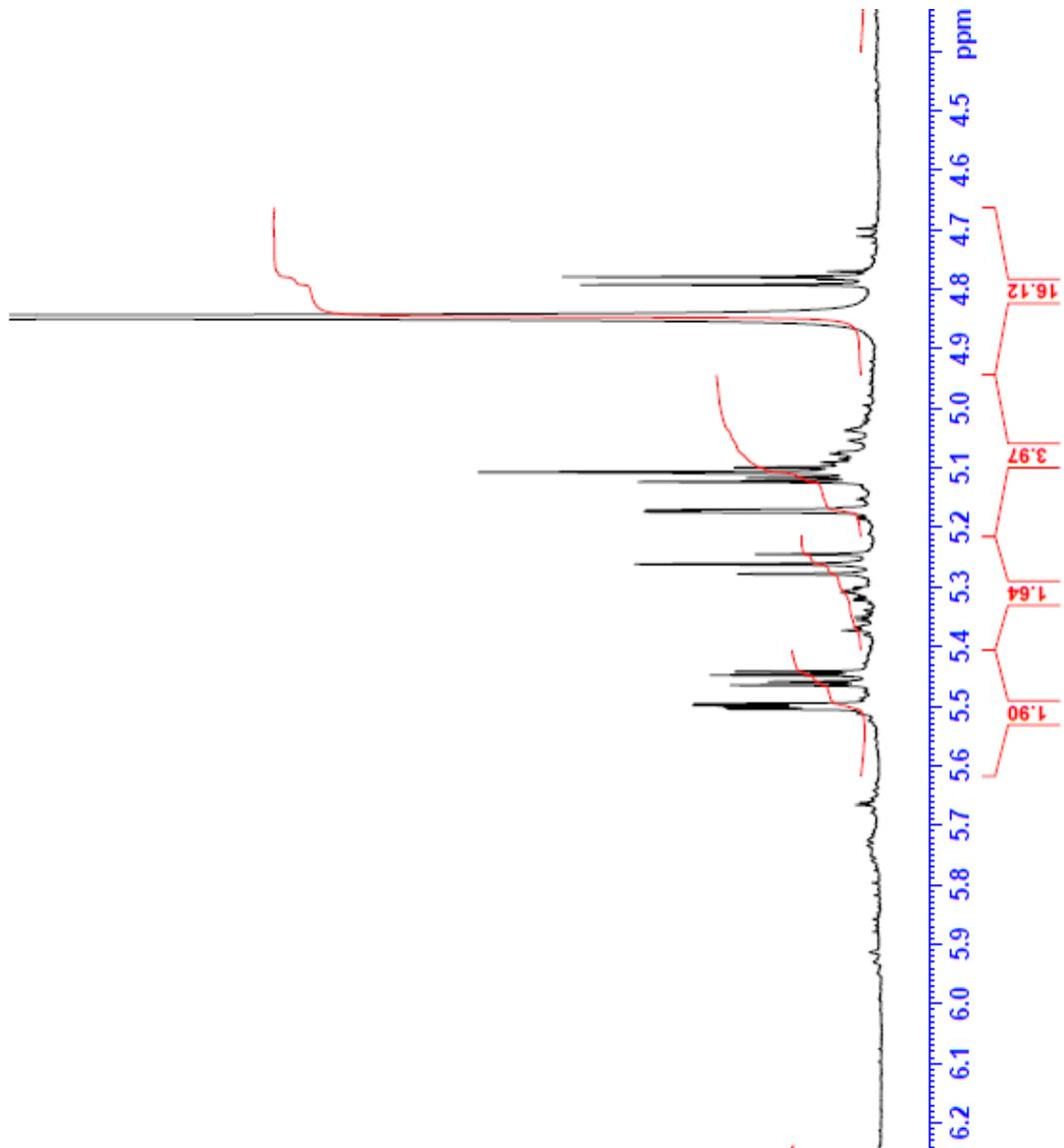
Anhang 6: ^1H -NMR Spektrum von SL1 in MeOH



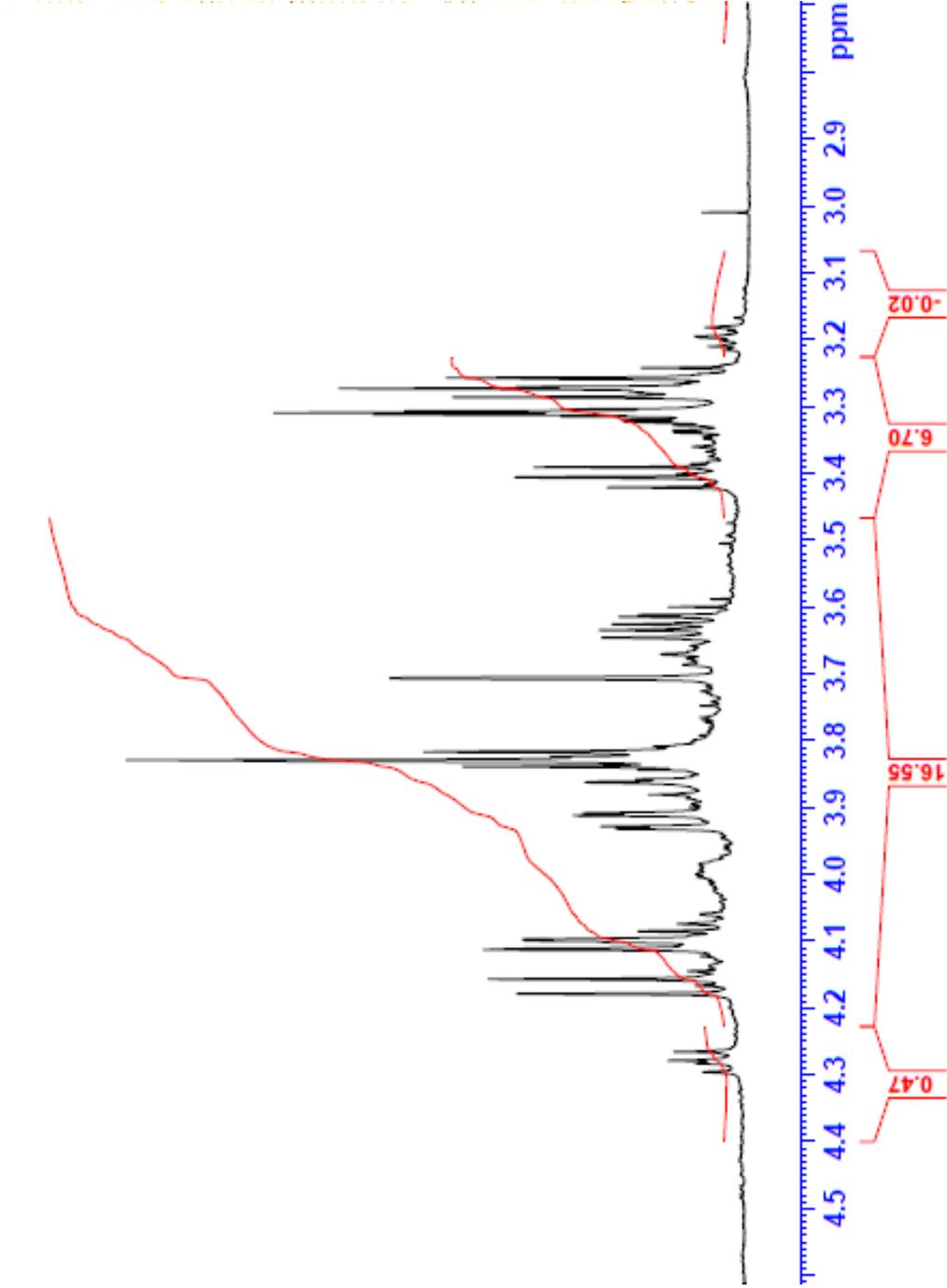
Anhang 7: Ausschnitt ¹H-NMR Spektrum von SL1
6,0-7,8 ppm



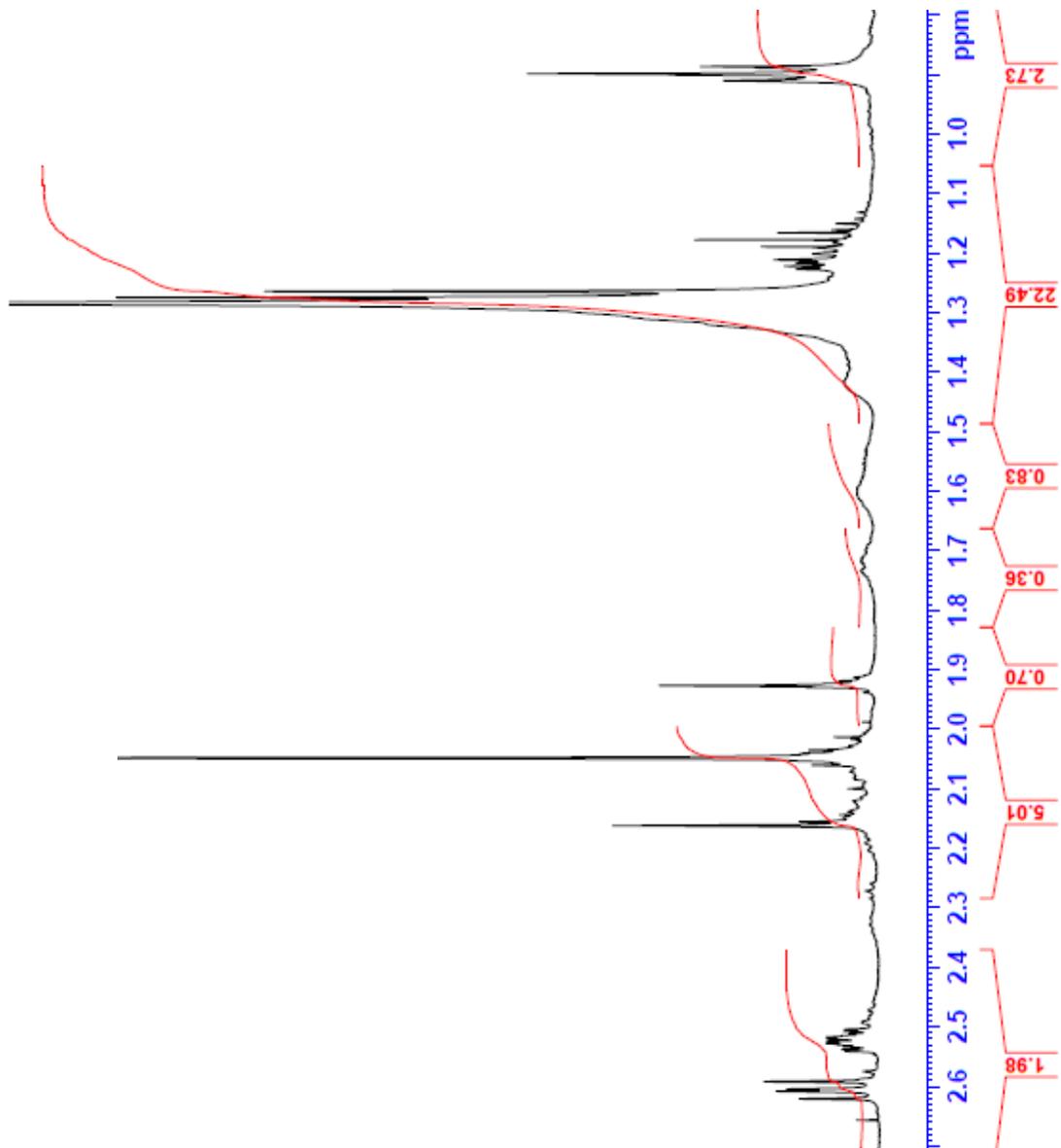
Anhang 8: Ausschnitt $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von SL1
4,4-6,2 ppm



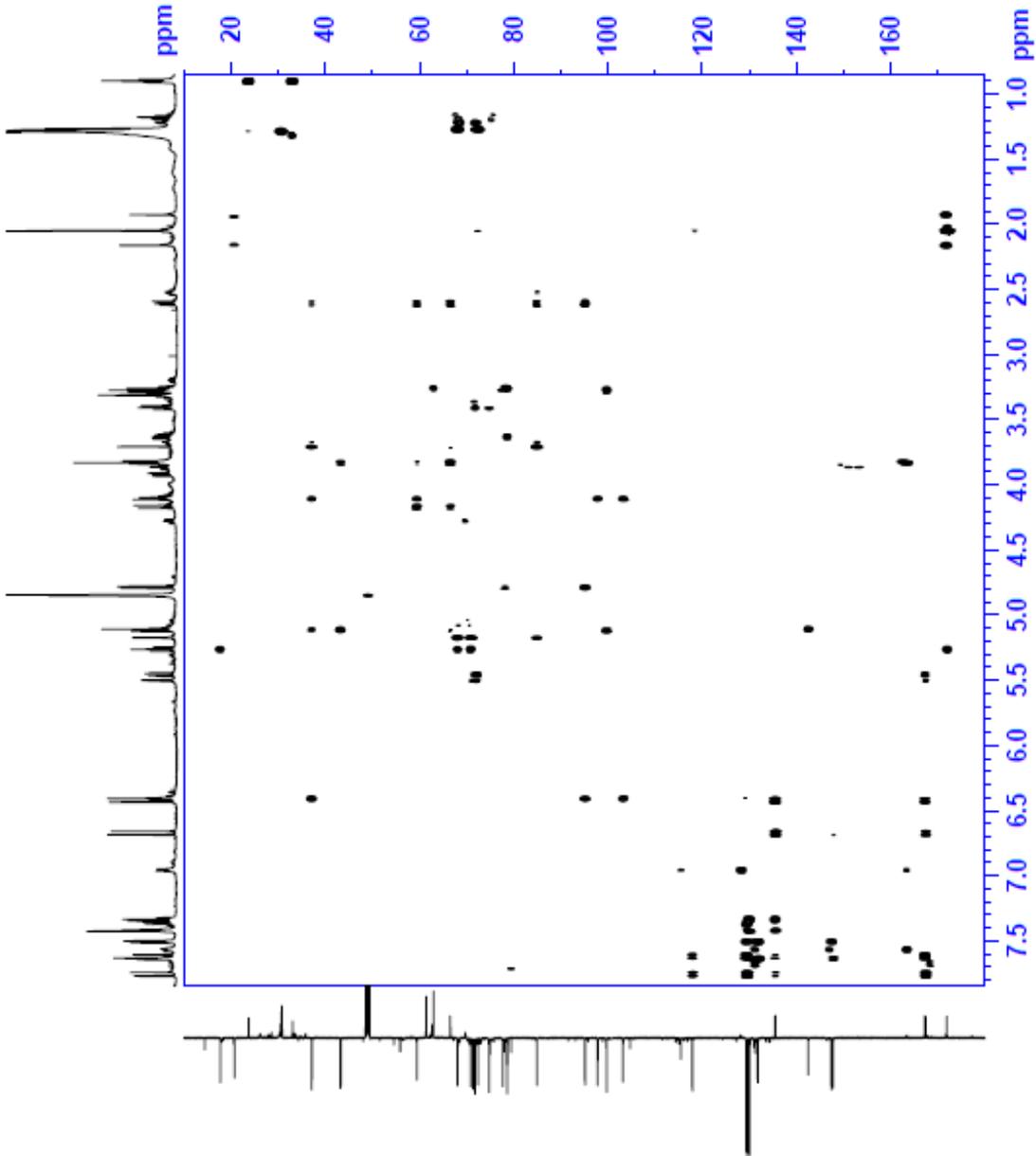
Anhang 9: Ausschnitt ¹H-NMR Spektrum von SL1
2,8-4,5 ppm



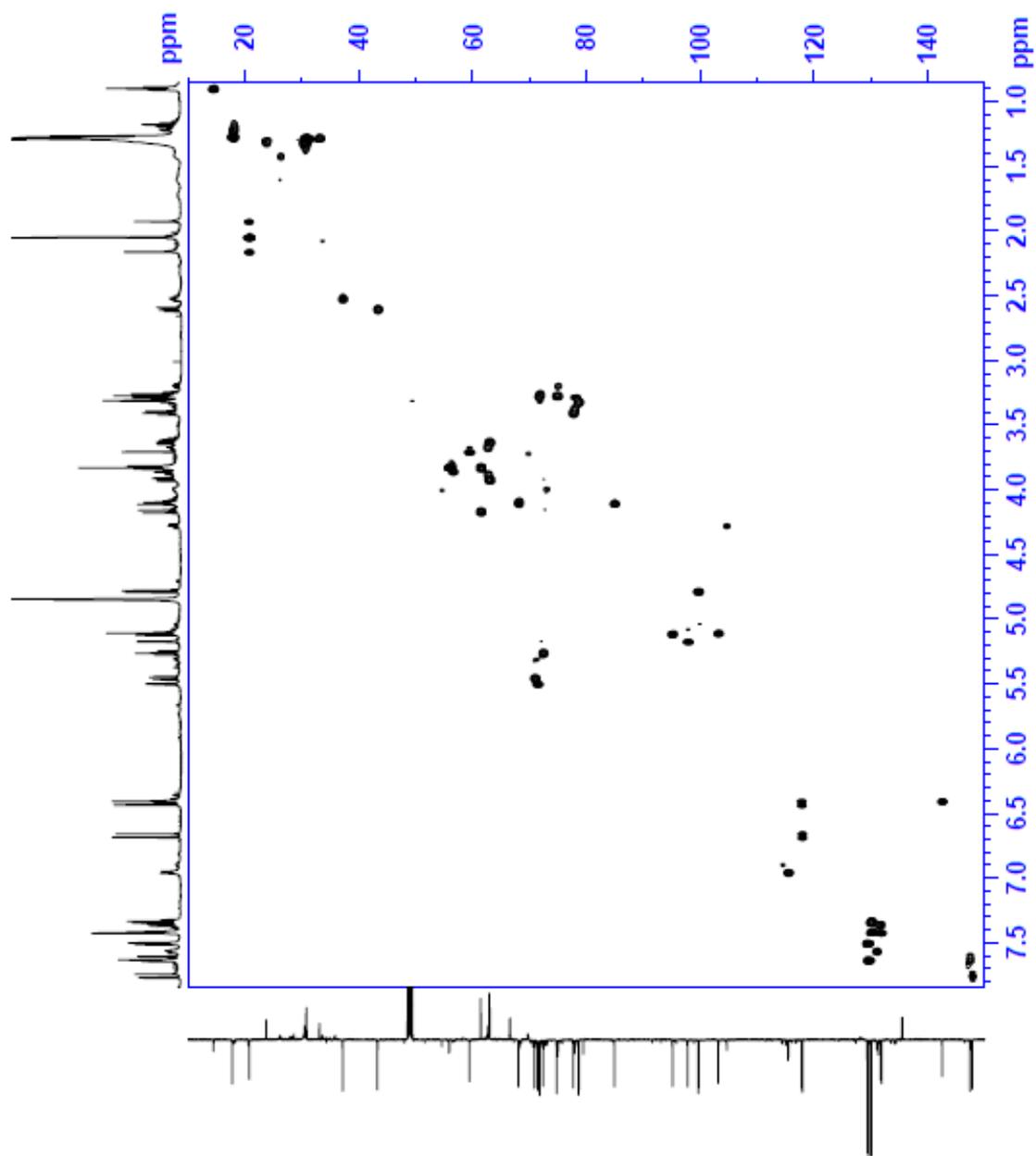
Anhang 10: Ausschnitt $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von SL1
0,9-2,6 ppm



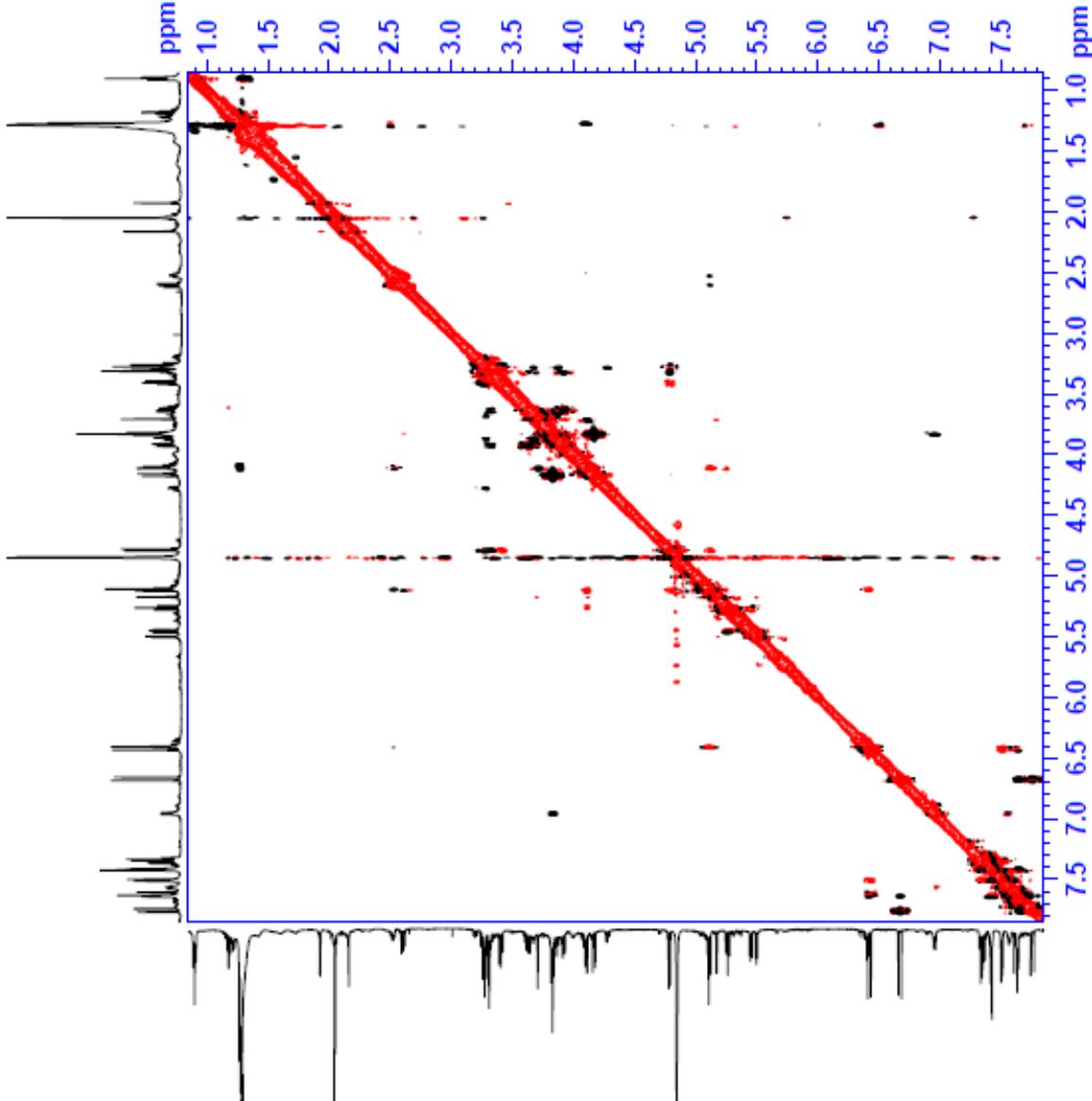
Anhang 11: HMBC-Spektrum von SL1 in MeOH



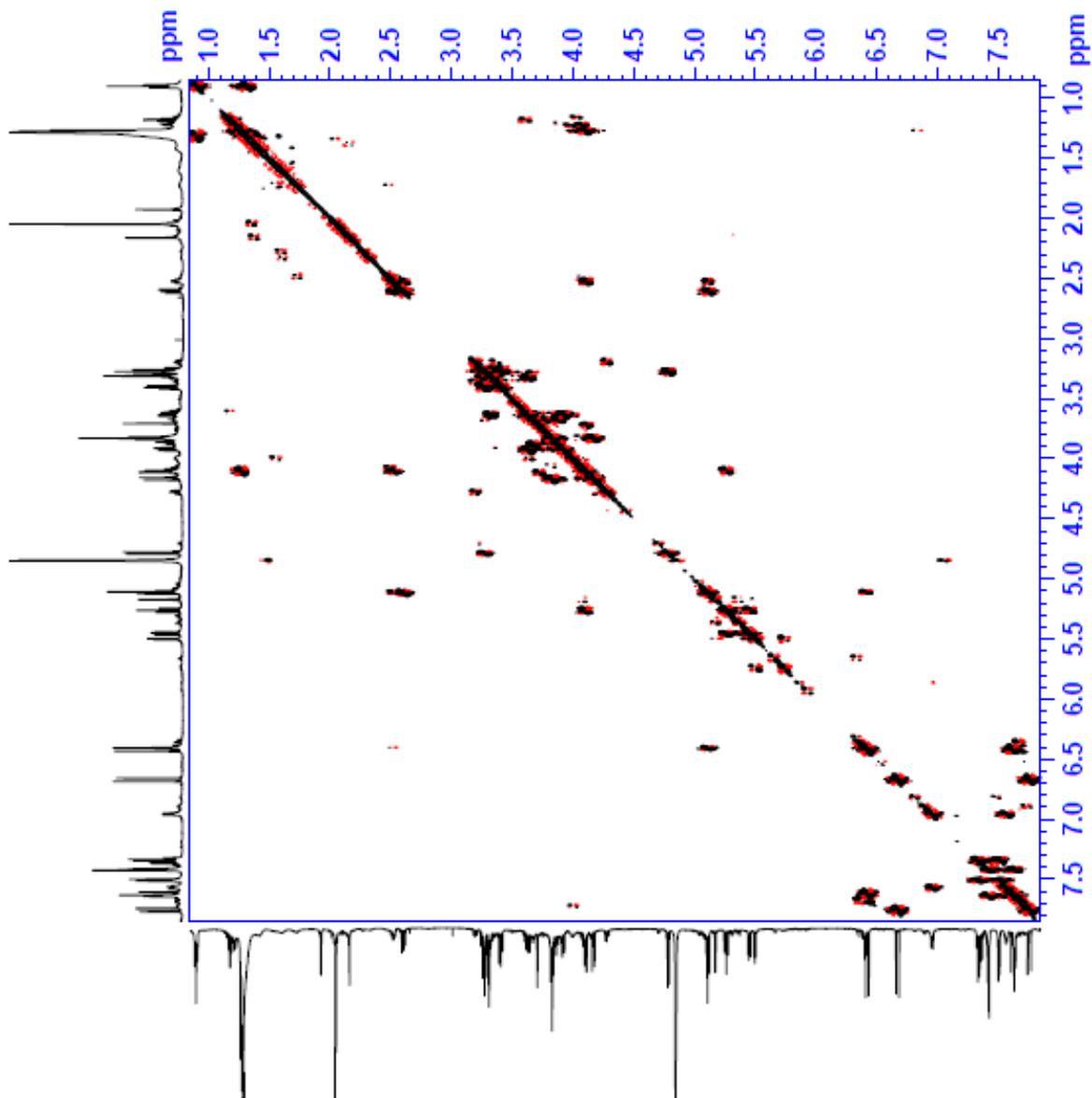
Anhang 12: HSQC-Spektrum von SL1 in MeOH



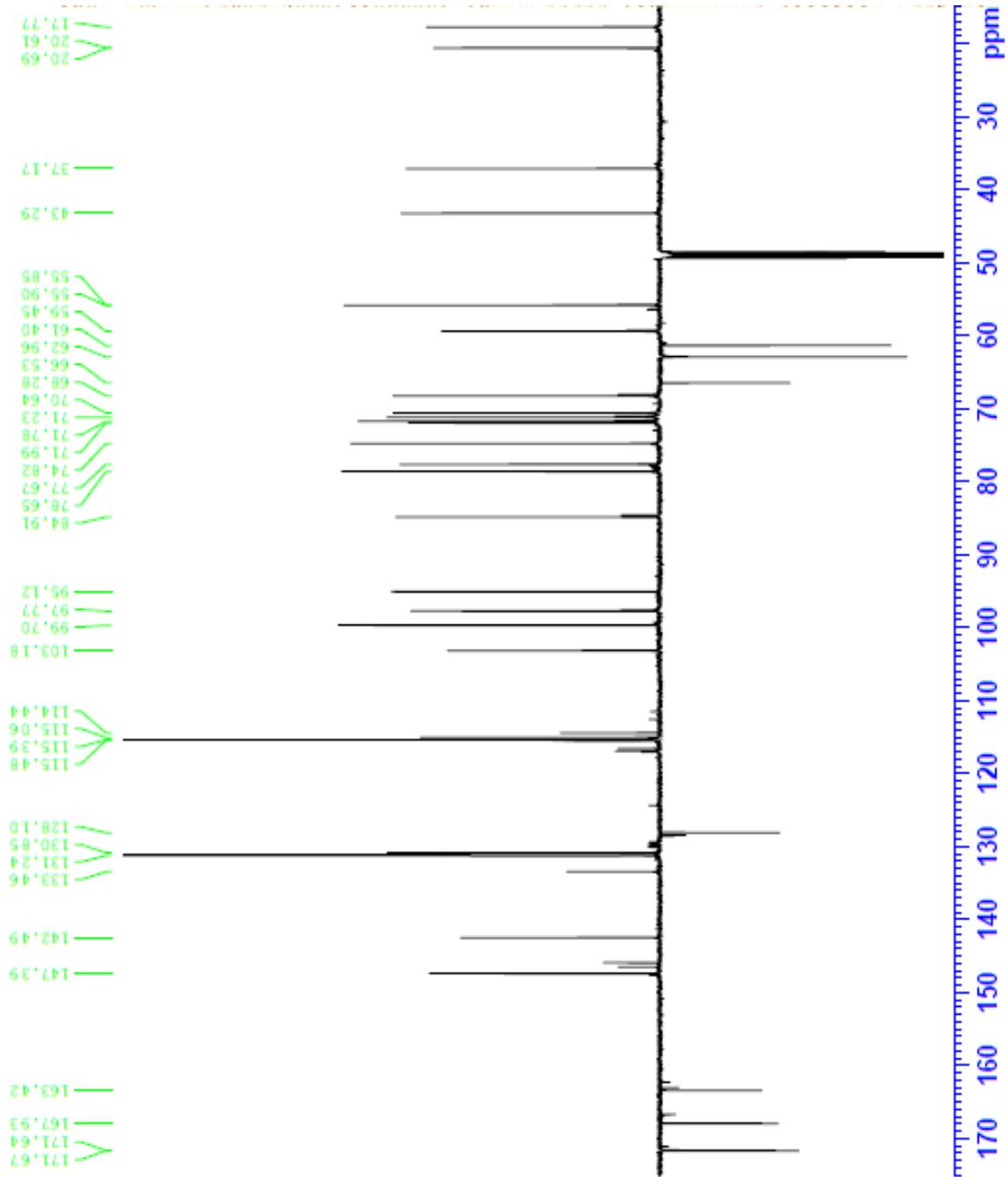
Anhang 13: NOESY-Spektrum von SL1 in MeOH



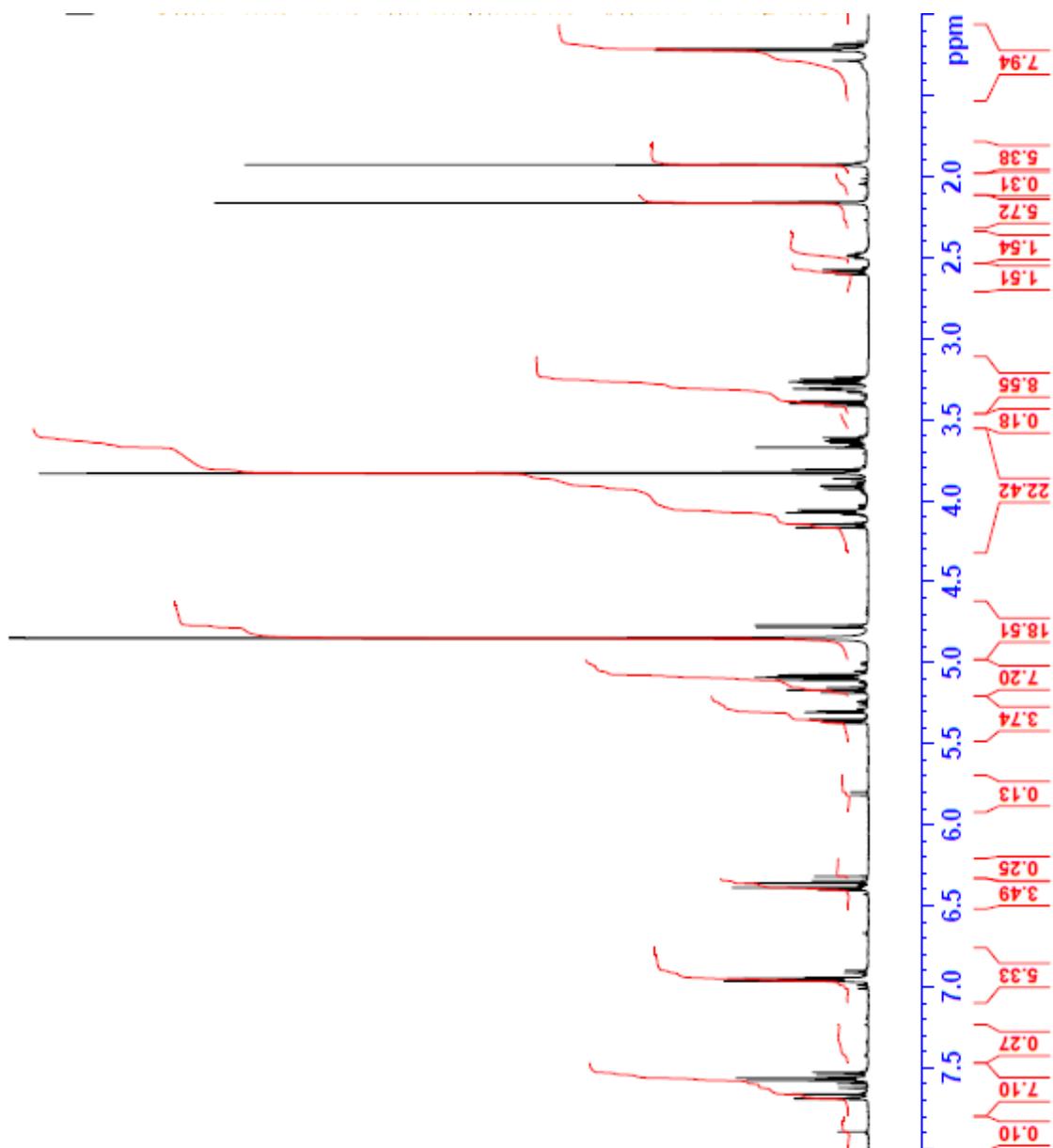
Anhang 14: COSY-Spektrum von SL1 in MeOH



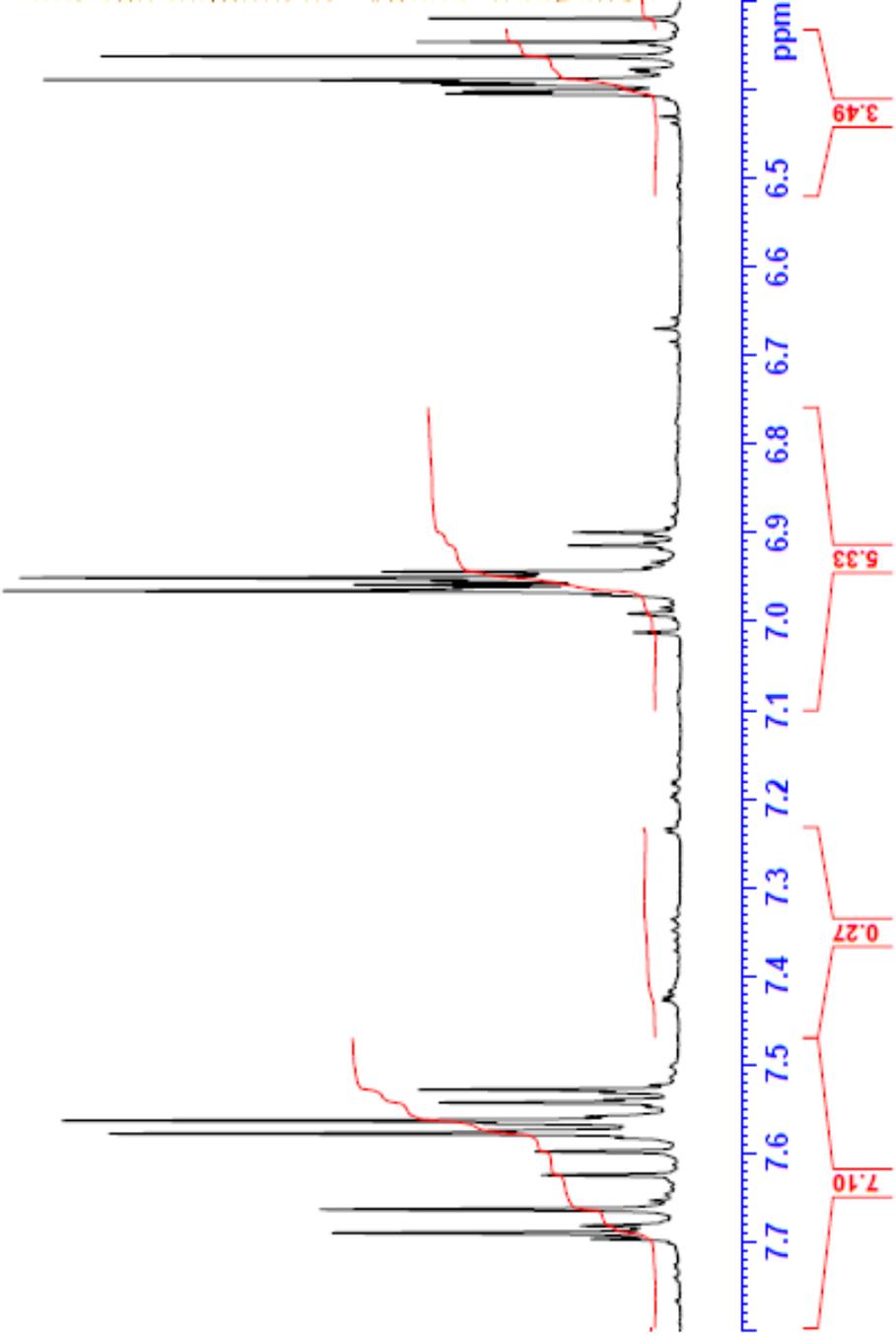
Anhang 15: ¹³C-NMR-Spektrum von SL2 in MeOH



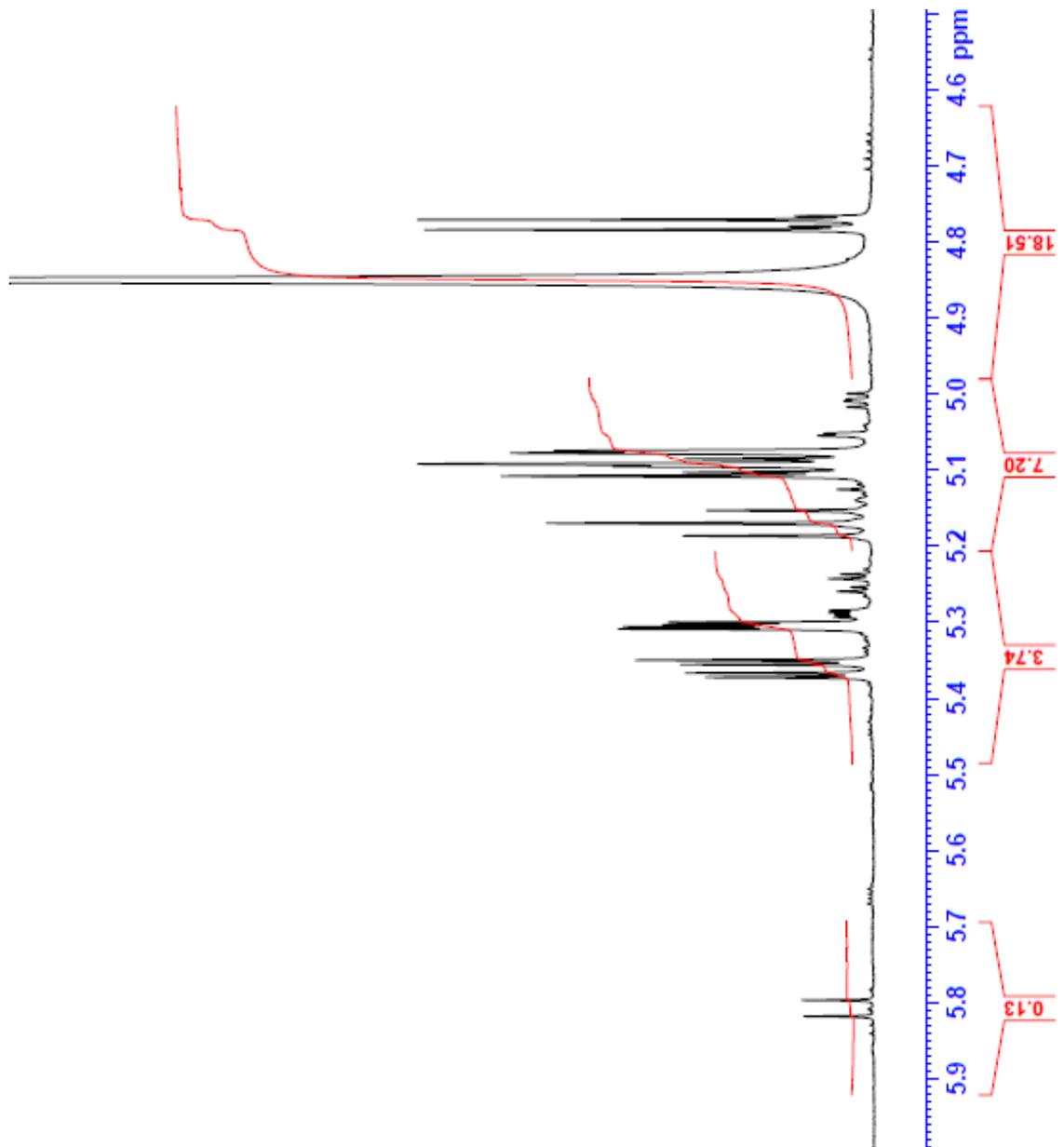
Anhang 16: ^1H -NMR Spektrum von SL2 in MeOH



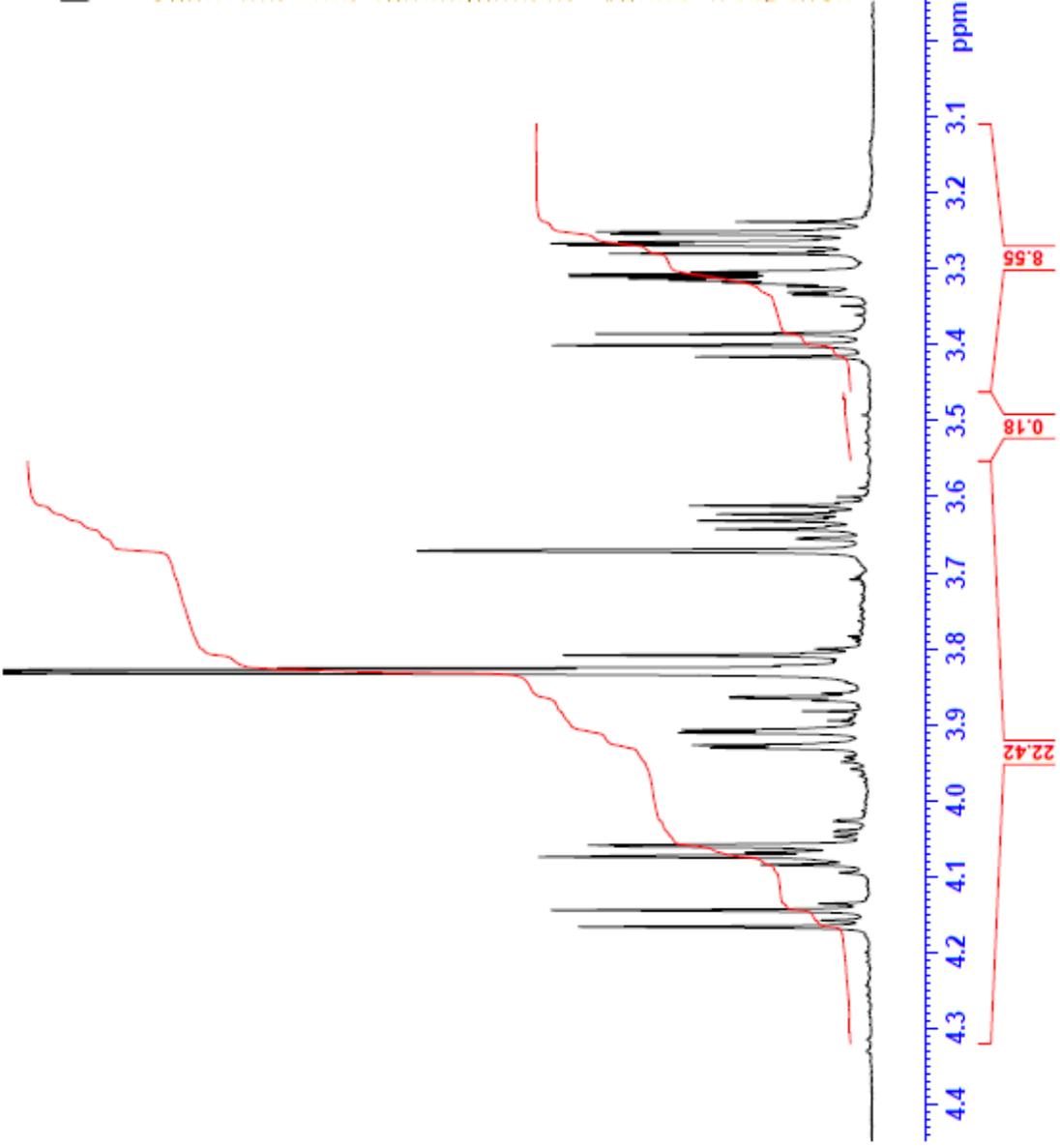
Anhang 17: Ausschnitt ¹H-NMR Spektrum von SL2
6,4-7,8 ppm



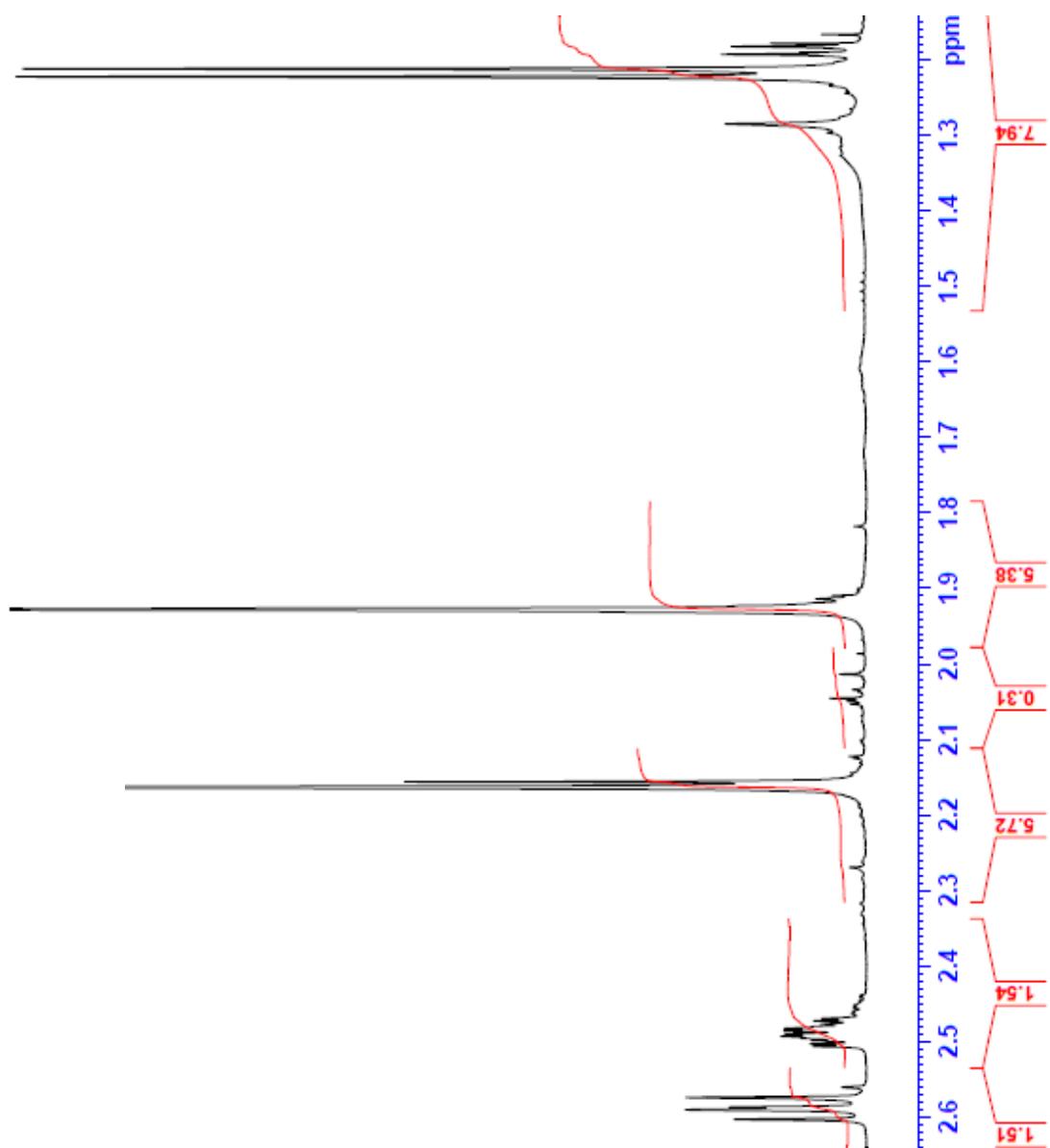
Anhang 18: Ausschnitt $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von SL2
4,6-5,9 ppm



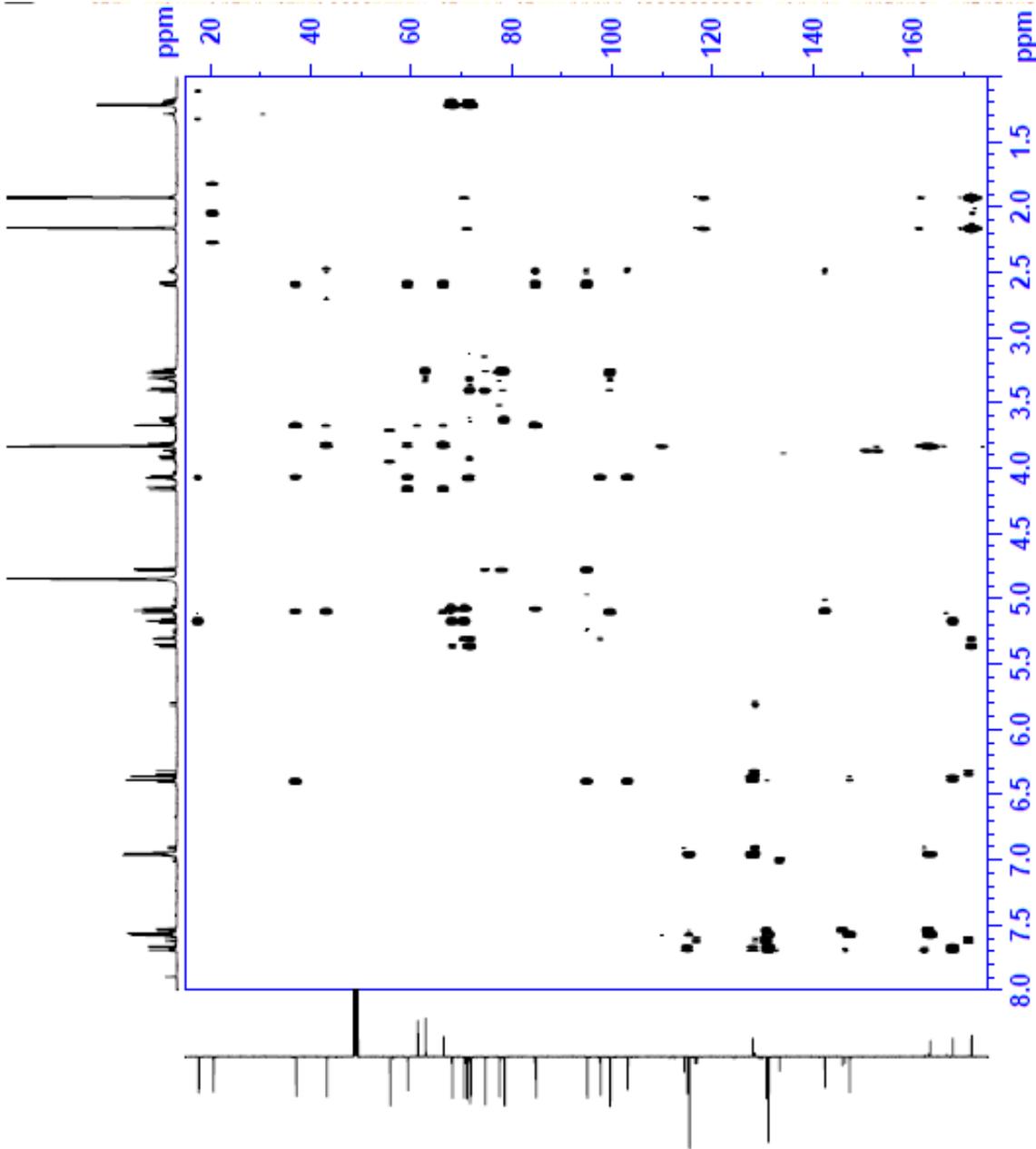
Anhang 19: Ausschnitt ¹H-NMR Spektrum von SL2
3,0-4,4 ppm



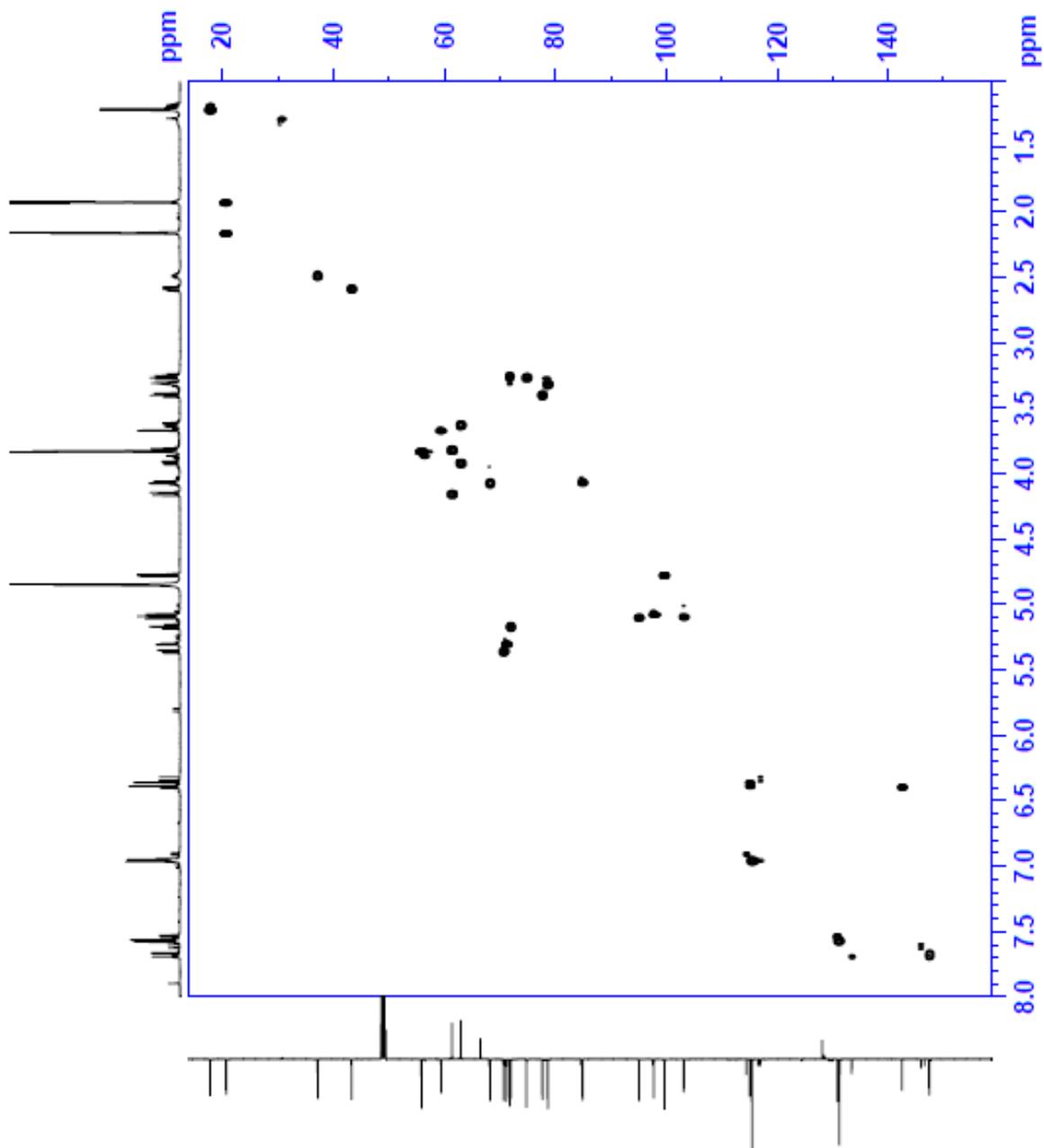
Anhang 20: Ausschnitt $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von SL2
1,2-2,6 ppm



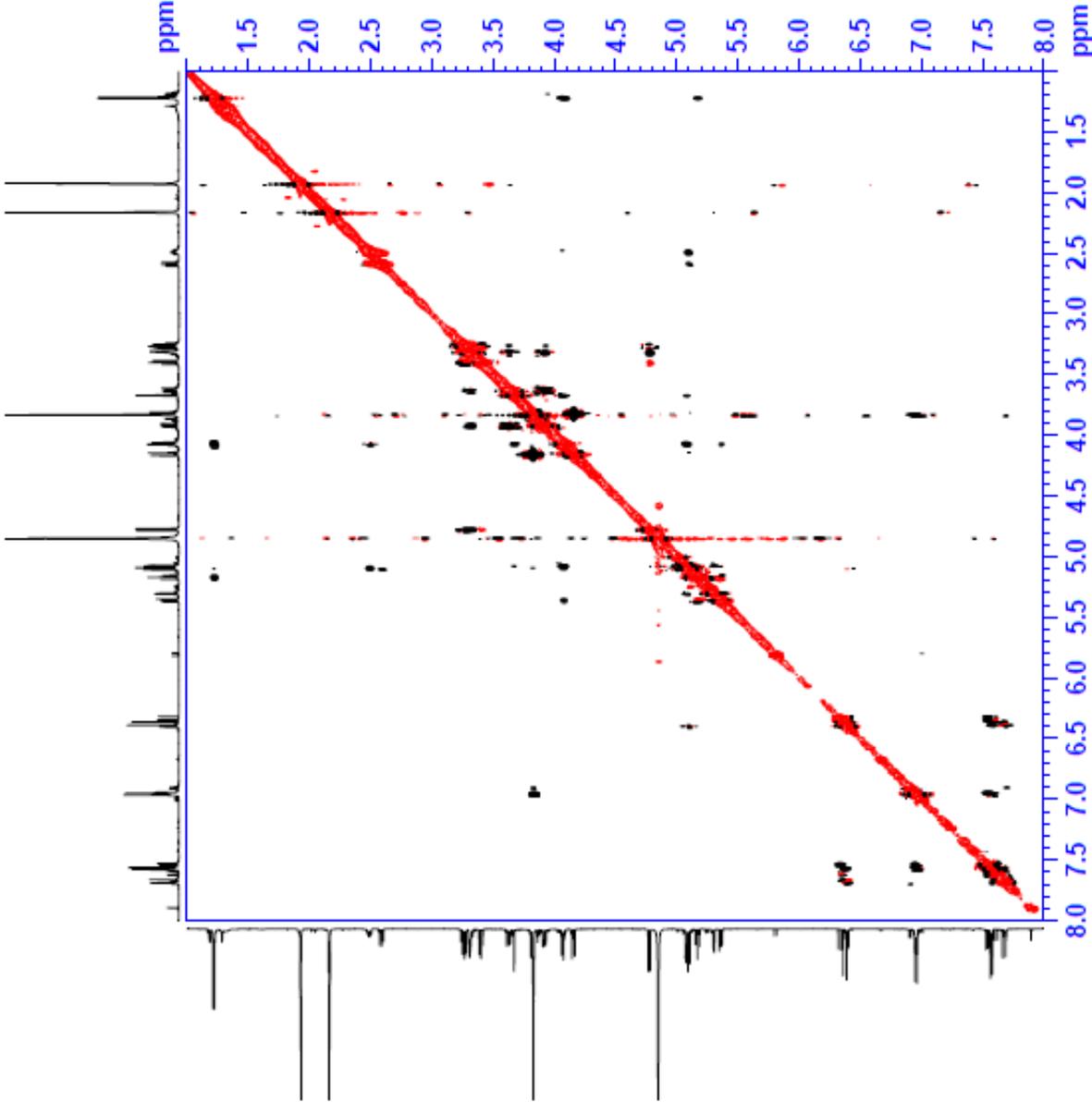
Anhang 21: HMBC-Spektrum von SL2 in MeOH



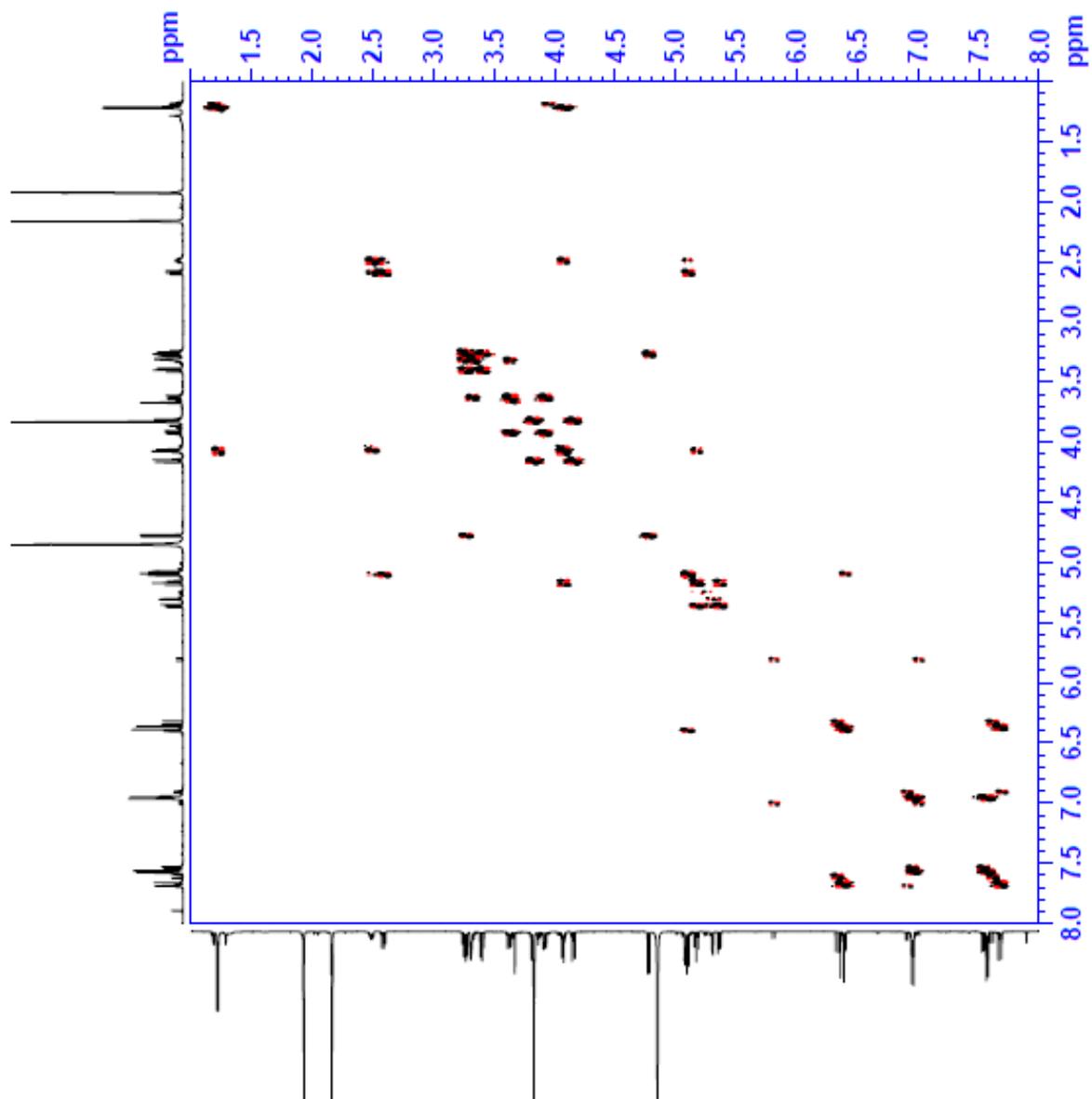
Anhang 22: HSQC-Spektrum von SL2 in MeOH



Anhang 23: NOESY-Spektrum von SL2 in MeOH



Anhang 24: COSY-Spektrum von SL2 in MeOH



Curriculum vitae

Name: Lisa Schweighofer
Geburtsort: Melk
Staatsangehörigkeit: Österreich
Eltern: Reinhard Schweighofer
Angelika Schweighofer

Ausbildung

1996-2000 Volksschule Melk
2000-2008 Stiftsgymnasium Melk
09.06.2008 Matura
seit 01.10.2008 Universität Wien - Diplomstudium Pharmazie
Oktober-Jänner 2013/14 Praktische Arbeit der Diplomarbeit am
Department für Pharmakognosie der
Universität Wien

Praktika

Sommer 2005 Sommerspiele Melk
Sommer 2006 Ardex Loosdorf
Sommer 2007 EVN Melk
Sommer 2008 Finanzamt Amstetten-Melk-Scheibbs
Sommer 2009 Krankenhaus Melk
Sommer 2009, 2010 Herz-Jesu-Apotheke St. Pölten
Sommer 2011, 2012, 2013 Landschaftsapotheke Melk