



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Phytochemische Untersuchungen der Farbstoffe und  
Flavonoide aus *Justicia secunda* VAHL (Acanthaceae)“

verfasst von

Jasmin Kalkus

angestrebter akademischen Grades

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

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



## Danksagungen

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nützen und all denjenigen danken, die an der Entstehung dieser Diplomarbeit mitgewirkt haben.

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

Meinen größten Dank möchte ich Frau Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die Vergabe dieses interessanten Themas an mich aussprechen. Ich habe die kompetente Betreuung während der gesamten Dauer der praktischen Arbeit sehr zu schätzen gewusst. Ihr fachliches Wissen hat maßgeblich dazu beigetragen, dass meine Diplomarbeit nun so vorliegt. Vielen Dank für Ihre Zeit und Mühe!

DI Barbara Theiler danke ich für die Einführung in die Nutzung der Gerätschaften und die Unterstützung im Labor. Herrn Dr. Martin Zehl danke ich für die Aufnahme der Massenspektren, sowie Herrn Prof. Mag. Dr. Ernst Urban für die Durchführung der NMR-Analysen.

Mag. Sophie Schober möchte ich für die guten Verbesserungsvorschläge und das Korrekturlesen meiner Diplomarbeit danken.

Natürlich danke ich auch meinen Eltern, die mich die gesamte Studiendauer finanziell unterstützt haben und mir somit das Studium erst ermöglicht haben und meiner Schwester, Patricia Kalkus, die immer für mich da war!

Nicht zuletzt gebührt auch Elfriede und Ernst Schober Dank, die immer ein offenes Ohr hatten und aufmunternde, motivierende Worte gefunden haben sowie Sebastian Schober der mich durch die gesamte Studienzeit begleitet und unterstützt hat und in dem ich einen ganz besonderen Menschen kennengelernt habe.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
1.1	Einführung zu <i>Justicia secunda</i> VAHL (Acanthaceae)	1
1.2	Problemstellung und Zielsetzung	3
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>4</b>
2.1	Pflanzenmaterial	4
2.2	Extraktionsmethoden	6
2.2.1	Wässrige Extraktion des Kelchmaterials	6
2.2.2	Methanolische Extraktion und Aufreinigung der Blattmaterialien	7
2.3	Chromatographische Methoden	9
2.3.1	Säulenchromatographie	10
2.3.1.1	Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20	10
2.3.1.2	Aufreinigung mittels Adsorptionschromatographie an Silicagel	12
2.3.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	13
2.3.3	Dünnschichtchromatographie und Hochleistungsdünnschichtchromatographie	19
2.4	Strukturaufklärung	23
2.4.1	Massenspektrometrie	23
2.4.2	Kernresonanzspektroskopie	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	Ergebnisse der Farbstoffanalyse des Kelchmaterials	26
3.1.1	Ergebnisse der Untersuchung des Methanolpräzipitates JS-MP	26
3.1.1.1	Resultat der Methodenoptimierung	26
3.1.1.2	DC-Nachweis von Zuckern	28
3.1.1.3	MS-Identifizierung der mittels semipräparativer HPLC gewonnenen Substanzen und Verifizierung der Daten mittels DC	29
3.1.2	Stabilitätstests der Farbstofffraktion GD8c	31
3.2	Ergebnisse der Flavonoidanalyse des Blattmaterials	34
3.2.1	HPTLC- und HPLC-Vergleich der Blattextrakte	35
3.2.2	Ergebnis der Massenspektrometrie von JK1	38

3.2.3	Isolierung von JK1 .....	41
3.2.4	Beiträge zur Struktur des Flavonoides JK1 durch NMR .....	44
3.2.5	Flavonoidmustervergleich und Prüfung von <i>J. secunda</i> Herbarbelegen mittels HPTLC.....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>58</b>

## 1 Einleitung und Problemstellung

Dieses einführende Kapitel soll dazu dienen, die in dieser Diplomarbeit behandelte Art *Justicia secunda* VAHL botanisch einzuführen und deren Relevanz in der traditionellen Medizin aufzuzeigen.

### 1.1 Einführung zu *Justicia secunda* VAHL (Acanthaceae)

Die Gattung *Justicia* ist mit weit mehr als 600 Arten einer der größten Vertreter der Familie der Akantusgewächse (Acanthaceae), die zur Ordnung der Lippenblütlerartigen (Lamiales) zählen.

*Justicia secunda* VAHL (**Abbildung 1**) stammt ursprünglich aus Südamerika und gedeiht in Regionen mit tropischem bis subtropischem Klima, wo sie eine Größe von bis zu zwei Metern erreichen kann [1,2].



**Abb. 1: *Justicia secunda* VAHL (Acanthaceae); Thyrsoider Blütenstand mit magentafarbenen Röhrenblüten im beginnenden Blühstadium**

Die 5-15 cm langen Blütenstände werden als thyrsoid bis rispenartig beschrieben. Sie tragen magentafarbene Röhrenblüten, die über eine etwa 32 mm lange Ober- und eine etwa 35 mm lange Unterlippe mit einem fünfzähligen Kelch verfügen (**Abbildung 1**). Die krautige Pflanze besitzt morphologisch betrachtet oval bis lanzettlich geformte Blätter. Diese sind kreuzgegenständig angeordnet und erreichen

ein Längenausmaß von bis zu 15,5 cm und eine Breite von 6,5 cm [2] (**Abbildung 2**).



**Abb. 2: Kreuzgegenständige Blätter von *J. secunda***

Aufgrund der in der Pflanze enthaltenen Farbstoffe, werden beim Auskochen der Blätter und Blüten die wässrigen Extrakte purpur gefärbt. Indigene Völker in Trinidad assoziieren die Farbe dieser Auszüge mit Blut und nutzen sie ethnopharmakologisch gegen Amenorrhoe [3]. Ein weiteres Einsatzgebiet stellt die Behandlung von Sichelzellenanämie dar. In vitro konnte gezeigt werden, dass ethanolische Extrakte von *J. secunda* die Form von Sichelzellen normalisieren, die Löslichkeit von Desoxyhämoglobin S verbessern und die osmotische Fragilität von Sichelzellen vermindern können [4]. Außerdem wird die Pflanze im Kongo von Zeugen Jehovas, die Bluttransfusionen ablehnen, zur Behandlung von Anämie eingesetzt [4]. In der Elfenbeinküste werden wässrige Extrakte von *J. secunda* zur Therapie von Hypertonie eingesetzt. Im Tierversuch konnte ein blutdrucksenkender Effekt des wässrigen Gesamtextraktes der Blätter nachgewiesen werden [5]. Weiters wurde der Einsatz bei Patienten mit Diabetes mellitus in Trinidad und Tobago beschrieben [6]. Diese Indikation gab Anlass für eine Dissertation am Department für Pharmakognosie der Universität Wien, die die ethnopharmakognostischen Aspekte im Zusammenhang mit dieser Pflanze beleuchten soll [7]. Parallel zu dieser Dissertation wurden die Arbeiten zur vorliegenden Diplomarbeit durchgeführt.

## 1.2 Problemstellung und Zielsetzung

Die vorliegende Diplomarbeit gliedert sich in zwei Bereiche. Einerseits sollen die Farbstoffe, die sich im Blatt- und vor allem im Kelchmaterial von *J. secunda* befinden und sich fast zur Gänze in den wässrigen Extrakten anreichern, erfasst werden. Da sich diese bereits im Vorfeld als sehr instabil erwiesen hatten, wurde der Zerfall nachverfolgt und versucht, Abbauprodukte zu identifizieren. Andererseits soll in der vorliegenden Arbeit das Flavonoidmuster der methanolischen Blattextrakte beschrieben werden, um festzustellen, ob dieses als verlässliches Identifizierungsmuster für *J. secunda* herangezogen werden kann.

## 2 Material und Methoden

Dieses Kapitel soll einen Überblick über das verwendete Pflanzenmaterial geben, sowie die angewandten phytochemischen und strukturbasierten Methoden näher erläutern. Im **Anhang** auf **Seite 58** ist ein Abkürzungsverzeichnis, das alle in der Folge verwendeten Arbeitsbezeichnungen und Abkürzungen beinhaltet. Darüber hinaus sind in dieser Arbeit all jene Arbeitsschritte, Extraktionen und Aufreinigungen zusammengefasst, die Herr Dr. Disan Gunbilig im Rahmen eines dreimonatigen Forschungsaufenthaltes am Department für Pharmakognosie durchgeführt hat. Mit den von ihm hergestellten Fraktionen wurden die Isolierungsarbeiten im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit vorgenommen. Die **Abbildungen 3 (Seite 6)**, **4 (Seite 7)**, **8 (Seite 11)** und **11 (Seite 13)** wurden von ihm übernommen und adaptiert.

### 2.1 Pflanzenmaterial

Für die phytochemischen Analysen wurde Pflanzenmaterial von *J. secunda* (**JS**) aus verschiedenen Ländern herangezogen. Verwendet wurden sowohl getrocknete Kelche, als auch Blätter (**Tabelle 1**).

**Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Pflanzenmaterialien**

	Herkunftsland	Sammeldatum	Geographische Daten	Bearbeitetes Material	Arbeitsbezeichnung
<b>JS_FG</b>	Französisch Guyana (FG)	3. Okt. 2012	04°56'57"N, 52°18'29"W Alt.: 10 m	Kelch Blatt	<b>JS_FG_cal</b> <b>JS_FG_fol</b>
<b>JS_EC</b>	Ecuador (EC)	2011	0°56'30"S, 79°00'28"W	Blatt	<b>JS_EC_fol</b>
<b>JS_BGV</b>	Venezuela (BGV)	29. Okt. 2014	Wildherkunft: Venezuela: SW San Cristobal, bei Las Navajas, alt: 400 m, 1990- leg.: Lohse s.n.),	Blatt	<b>JS_BGV_fol</b>
<b>Herbarbelege</b>	Siehe <b>Tabelle 2, Anhang, Seite 59</b>			Blatt	Siehe <b>Tabelle 2, Anhang, Seite 59</b>

Die Aufsammlung des Pflanzenmaterials aus Französisch Guyana (**JS\_FG**) war am 3. Oktober 2012 an folgenden Koordinaten erfolgt: 04°56'57"N, 52°18'29"W Alt.: 10 m. Es diente nach morphologischer und anatomischer Begutachtung als Referenzmaterial [18, 19]. Die Kelche dieses Materials wurden als **JS\_FG\_cal** bezeichnet und für die Farbstoffanalyse, die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführt wurde, verwendet. Andererseits wurde Blattmaterial, welches als **JS\_FG\_fol** bezeichnet wurde, für die Flavonoidanalyse herangezogen.

Das aus Ecuador angelieferte Pflanzenmaterial (**JS\_EC**) war 2011 an folgenden Koordinaten aufgesammelt worden: 0°56'30"S, 79°00'28"W. Im Rahmen der Flavonoidanalyse wurden Blätter dieses getrockneten Materials herangezogen, die in Folge als **JS\_EC\_fol** bezeichnet wurden.

Des Weiteren wurde Blattmaterial von einer ursprünglich aus Venezuela stammenden Pflanze (**JS\_BGV**) verwendet. Die Pflanze war bereits 1990 von Lohse südwestlich von San Cristobal, bei Las Navajas, in einer Höhe von 400 m gesammelt worden und gelangte an den Botanischen Garten Berlin. Seit März 2014 wird diese Pflanze aus Stecklingen, die von Berlin geschickt wurden, im Glashaus der Universität Wien weitergezogen. Wissenschaftlich bestimmt als *J. secunda* VAHL war die Pflanze von Herrn Leuenberger am 15.10.2003 (Bezug: [225-15-95-30] Gartenherbarbeleg 34322) worden. Für die phytochemische Analyse des Flavonoidmusters wurden von dieser Pflanze getrocknete Blätter verwendet, die Ende Oktober 2014 abgenommen wurden und in der Folge als **JS\_BGV\_fol** bezeichnet werden.

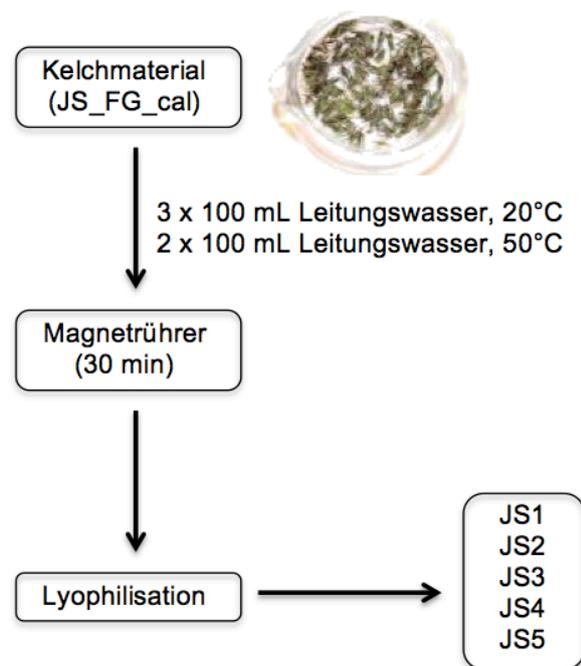
Folgende Herbarbelege (**Tabelle 2, Seite 59**), die im Rahmen der botanischen Charakterisierung in vorangegangenen Diplomarbeiten bereits morphologisch und anatomisch untersucht worden waren, wurden ebenso für die phytochemischen Analysen herangezogen. Verwendet wurde hierbei nur zusätzlich beigelegtes Blattmaterial aus den beigefügten Blattdaschen der Belege. Angeführt werden diese unter der jeweiligen Arbeitsnummer, welche bereits in den Diplomarbeiten [16-19] vergeben worden waren. Sie setzen sich aus dem Kürzel „**JS**“ und der jeweiligen Arbeitsnummer zusammen (**Tabelle 2, Seite 59**).

## 2.2 Extraktionsmethoden

Das Kelchmaterial von **JS\_FG\_cal** (Tabelle 1, Seite 4) wurde wässrig extrahiert (Kapitel 2.2.1, Seite 6). Im Gegensatz dazu wurde das Blattmaterial methanolisch extrahiert, worauf ein kleingeschriebenes „m“ im Namen verweist (Kapitel 2.2.2, Seite 7).

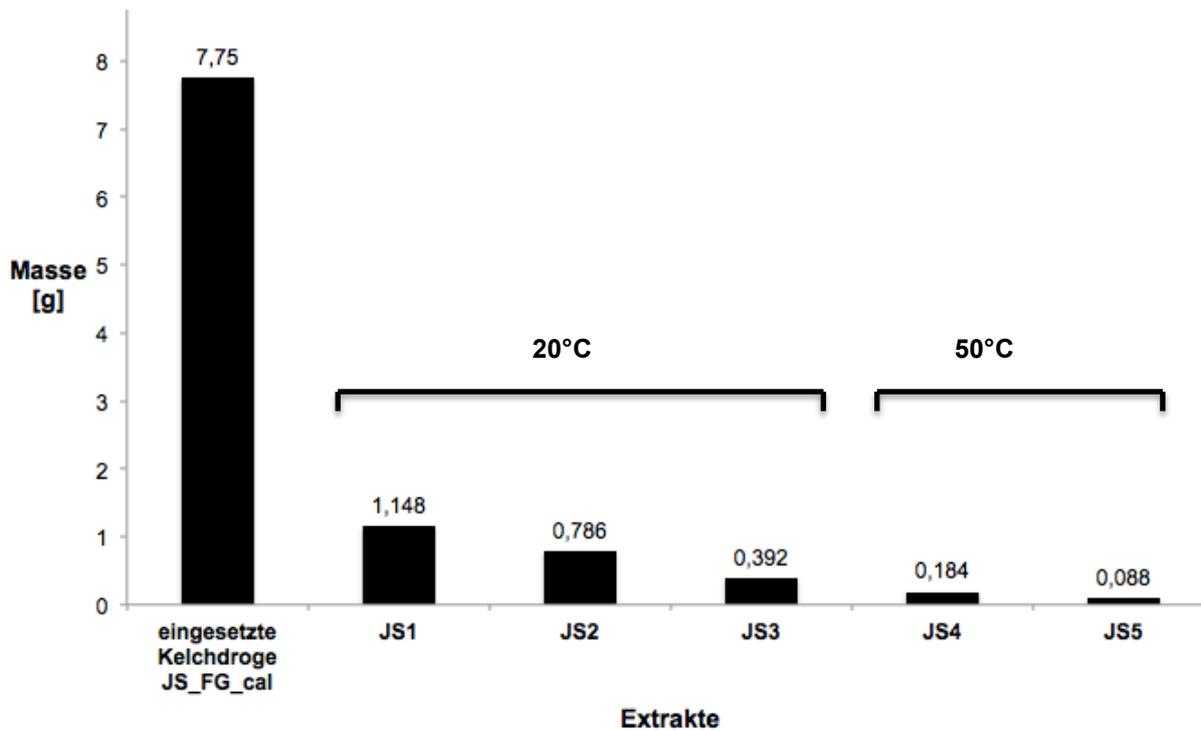
### 2.2.1 Wässrige Extraktion des Kelchmaterials

Die Isolation des Kelchmaterials **JS\_FG\_cal** (vgl. Tabelle 1, Seite 4) aus Französisch Guyana wurde von Dr. Disan Gunbilig durchgeführt. 7,75 g getrocknete Kelche wurden hierzu ohne weitere Zerkleinerung fünfmal nacheinander mit je 100 mL Leitungswasser versetzt und jeweils 30 Minuten lang mittels eines Magnetrührers extrahiert. Die ersten drei Extraktionen fanden bei einer Temperatur von 20°C, die letzten beiden bei 50°C statt. Anschließend wurden die fünf Fraktionen getrennt lyophilisiert und dafür die Nomenklatur **JS1-JS5** eingeführt



**Abb. 3:** Extraktionschema für das Kelchmaterial **JS\_FG\_cal** (Tabelle 1, Seite 4)

(Abbildung 3). Fraktion **JS1** stellt die schwerste Fraktion dar (Abbildung 4, Seite 7), weshalb diese auch für die weiteren Aufreinigungsschritte (siehe Kapitel 2.3.1.1, Abbildung 8, Seite 11), herangezogen wurde.



**Abb. 4: Gewichtsbilanz zur wässrigen Extraktion des Kelchmaterials JS\_FG\_cal (vgl. Abb. 3, Seite 6)**

Aus den eingesetzten 7,75 g getrocknetem Kelchmaterial aus Französisch Guyana (**JS\_FG\_cal**) wurde nach der ersten Extraktion mit 100 mL Leitungswasser bei 20°C die Fraktion **JS1** mit einem Trockengewicht von 1,148 g gewonnen. Durch erneute Extraktion mit derselben Menge Wasser bei 20°C entstand Fraktion **JS2** mit einem Trockengewicht von 0,786 g. Fraktion **JS3** entstand durch Wiederholen dieses Schrittes und wies ein Trockengewicht von 0,392 g auf. Um sicher zu stellen, dass möglichst viele wasserlösliche Inhaltsstoffe aus dem Kelchmaterial gelöst wurden, wurde bei den letzten beiden Extraktionsschritten (Fraktionen **JS4** und **JS5**) die Temperatur auf 50°C erhöht, die Gewichtsangaben sind der **Abbildung 4** zu entnehmen.

### 2.2.2 Methanolische Extraktion und Aufreinigung der Blattmaterialien

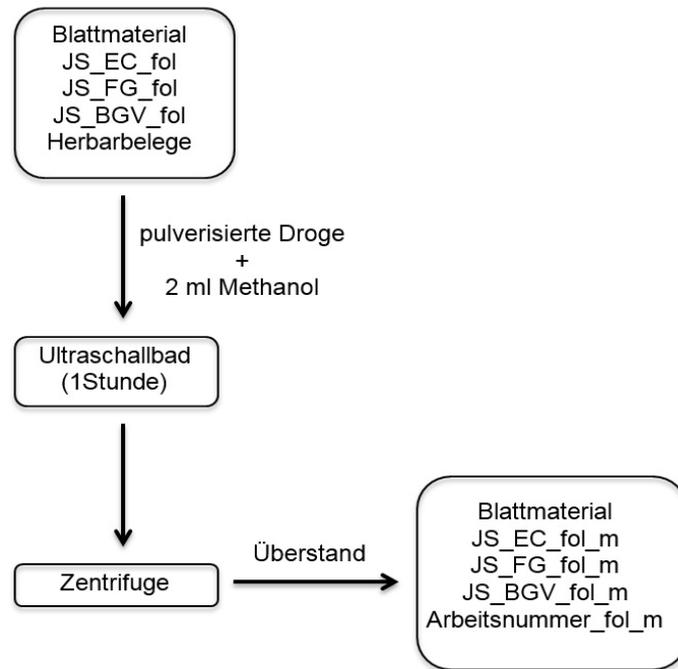
Für die Aufarbeitung der Blattmaterialien für die Fingerprintvergleiche wurden getrocknete Blätter aus Ecuador (**JS\_EC\_fol**), Französisch Guyana (**JS\_FG\_fol**), dem Glashaus der Universität Wien von der Pflanze die ursprünglich aus Venezuela (**JS\_BGV\_fol**) stammt (**Tabelle 1, Seite 4**), sowie von den 19 Herbarbelegen (**Tabelle 2, Seite 59**), mittels einer Schlagmühle zerkleinert. Jeweils 0,2 g

pulverisierte Droge wurden in Falcon-Tubes (Volumen 15 mL) eingewogen, mit je 2 mL Methanol versetzt und eine Stunde lang im Ultraschallbad bei Raumtemperatur extrahiert. Daraufhin wurde das Gemisch in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Labofuge 400 von Heraeus Instruments) 5 Minuten bei 1400 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur zentrifugiert. Der methanolische Flüssigkeitsüberstand wurde abgenommen und zur Trockene gebracht (**Abbildung 5**). Um für weitere phytochemische Untersuchungen mehr

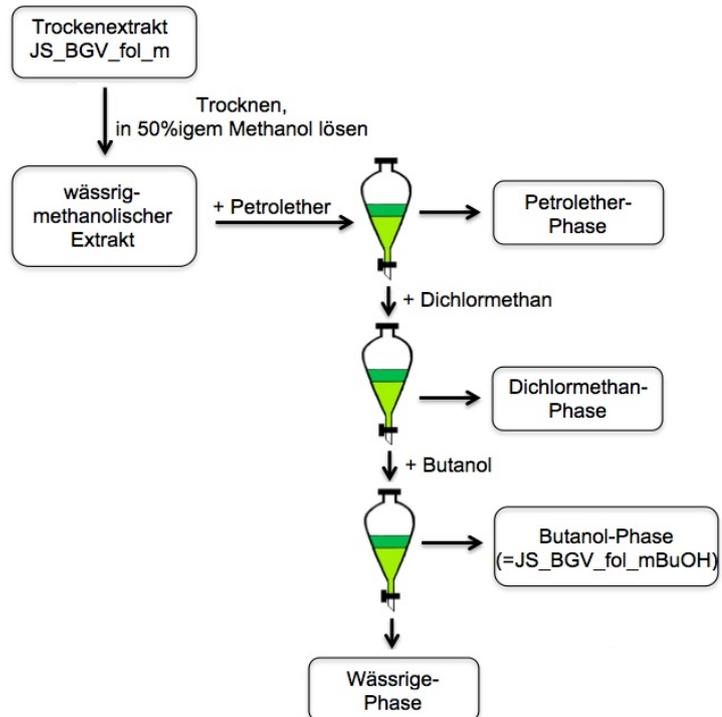
Blattextrakt von **JS\_BGV\_fol** zu gewinnen, wurden analog zu der zuvor beschriebenen Methode zusätzlich 2,9 g pulverisiertes Blattmaterial mit 100 mL Methanol extrahiert und wie oben beschrieben behandelt (**Abbildung 5**). Die entstandenen 466 mg Trockenextrakt

(**JS\_BGV\_fol\_m**) wurden in 40 mL 50%igem Methanol gelöst und störende Inhaltsstoffe mit einer Flüssig-Flüssig-Verteilung (**Abbildung 6**) abgetrennt. Hierbei wurde

zunächst mit Petrolether ausgeschüttelt, um das Chlorophyll des Gesamtextraktes

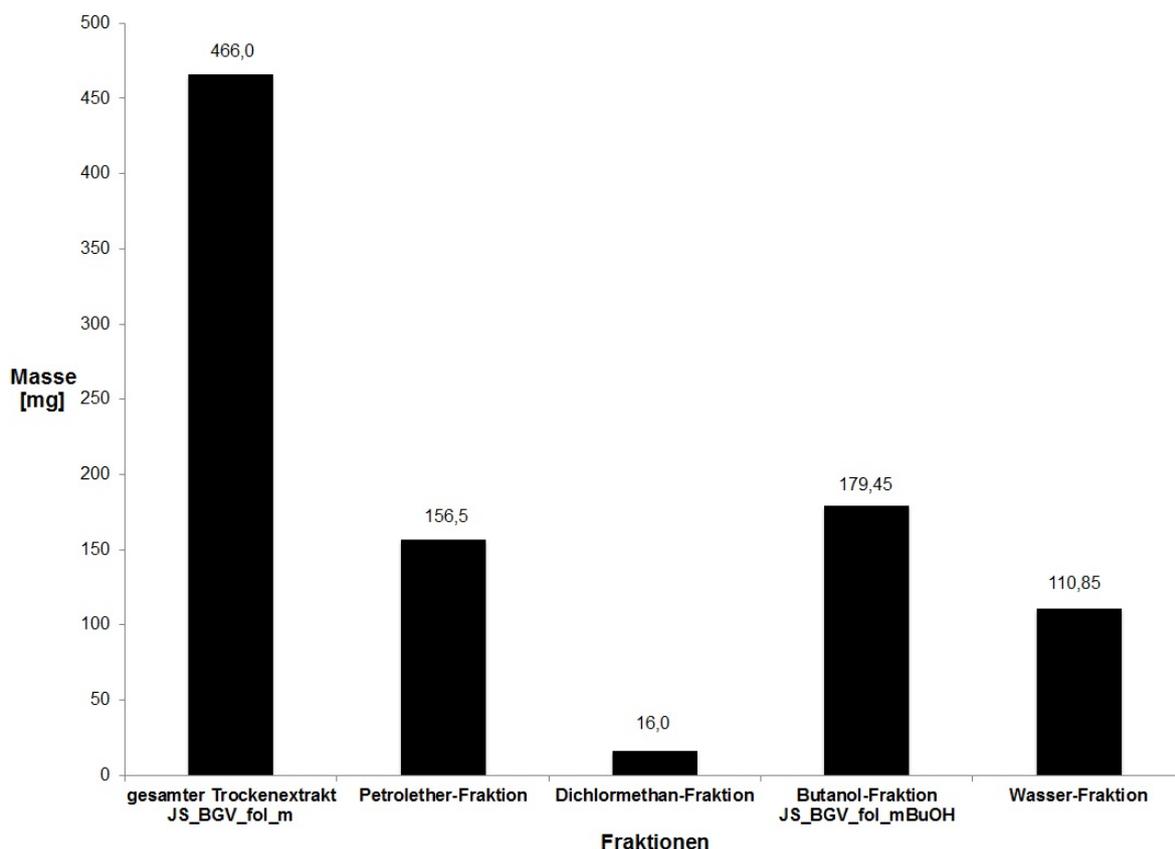


**Abb. 5: Extraktionsschema für die diversen Blattmaterialien**



**Abb. 6: Aufreinigung des aus JS\_BGV\_fol (Tabelle 1, Seite 4) stammenden Trockenextrakts JS\_BGV\_fol\_m (Abbildung 5, Seite 8) mittels Flüssig-Flüssig-Verteilung**

abzutrennen. Die verbleibende wässrige Unterphase wurde mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die daraus resultierende wässrige Oberphase wurde gegen Butanol verteilt und die beiden Phasen voneinander getrennt. In **Abbildung 7** sind die jeweiligen Gewichte der getrockneten Fraktionen abgebildet. Aufgezeigt wird die massenmäßige Verteilung der Inhaltsstoffe in den jeweiligen Lösungsmittelfractionen, wobei die Butanolfraktion **JS\_BGV\_fol\_mBuOH** mit 179,45 mg die schwerste Fraktion bildet. Mit dieser Fraktion wurde auch im **Kapitel 2.3.1.1, Abbildung 9, Seite 11** gearbeitet, da in dieser Fraktion relevante Flavonoide angereichert waren.



**Abb. 7: Gewichtsbilanz nach der Aufreinigung von JS\_BGV\_fol\_m (Abbildung 5, Seite 8) mittels Flüssig-Flüssig-Verteilung (Abbildung 6, Seite 8)**

### 2.3 Chromatographische Methoden

Hier sollen sämtliche chromatographische Methoden erläutert werden, die im Rahmen dieser Diplomarbeit eingesetzt wurden. Anzuführen sind Säulenchromatographie (SC), Dünnschichtchromatographie (DC), Hochleistungs-

dünnschichtchromatographie (HPTLC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). All diese Verfahren beruhen auf physikalischen Trennprinzipien, bei denen sich Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften zwischen einer ruhenden, stationären Phase und einer sich daran vorbeibewegenden, mobilen Phase verteilen.

### **2.3.1 Säulenchromatographie**

Im Speziellen wird auf die Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20, sowie auf die Adsorptionschromatographie an Kieselgel näher eingegangen, da diese zur weiteren Aufreinigung der Gesamtextrakte des Kelch- und Blattmaterials dienen.

Bei der Säulenchromatographie trennen sich die Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkung zwischen der stationären Phase, die sich eng gepackt in einer meist aus Glas bestehenden Säule befindet, und einer mobilen Phase, dem Eluenten, auf. Je nach Art der Wechselwirkung unterscheidet man Größenausschlusschromatographie, Adsorptionschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie und hydrophobe Interaktionschromatographie.

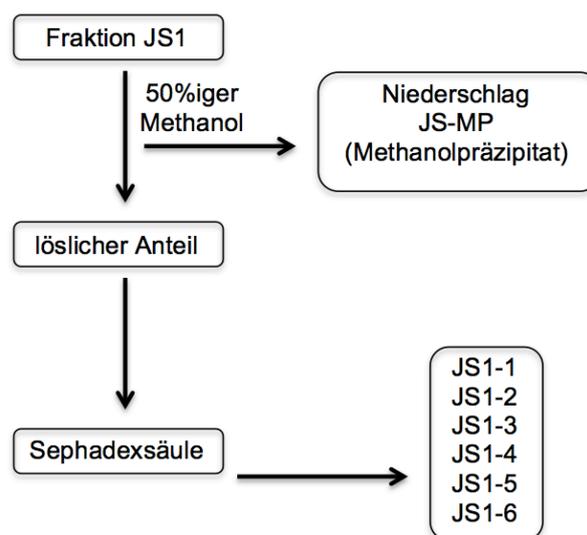
#### **2.3.1.1 Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20**

Die Größenausschlusschromatographie trennt Moleküle nach ihrer Größe. Als stationäre Phase wurde Sephadex LH 20-Material, das aus quervernetzten Dextranen besteht, verwendet. In die somit entstehenden Hohlräume können ausschließlich kleine Moleküle eindringen, die dadurch stärker zurückgehalten werden und somit verspätet am Säulenende ankommen. Größere Moleküle hingegen können nicht in die kleinen Poren der vernetzten Dextrane eindringen und werden schnell mit dem Eluenten weitertransportiert. Die Eigenschaften der für die Aufreinigung verwendeten Sephadex-Säule sind in **Tabelle 3, Seite 11** festgehalten.

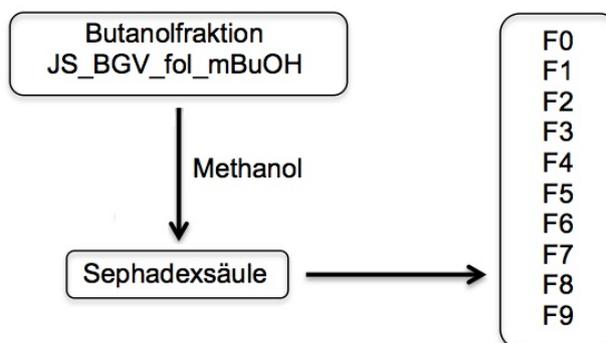
**Tab. 3: Parameter der Sephadex LH 20-Säule**

Sephadex LH 20-Säule	
<b>Säule</b>	Glassäule mit Reservoir
<b>Füllhöhe</b>	60 cm
<b>Durchmesser</b>	3 cm
<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex LH 20
<b>Eluent</b>	50%iger Methanol bzw. reiner Methanol
<b>Gradient</b>	isokratisch

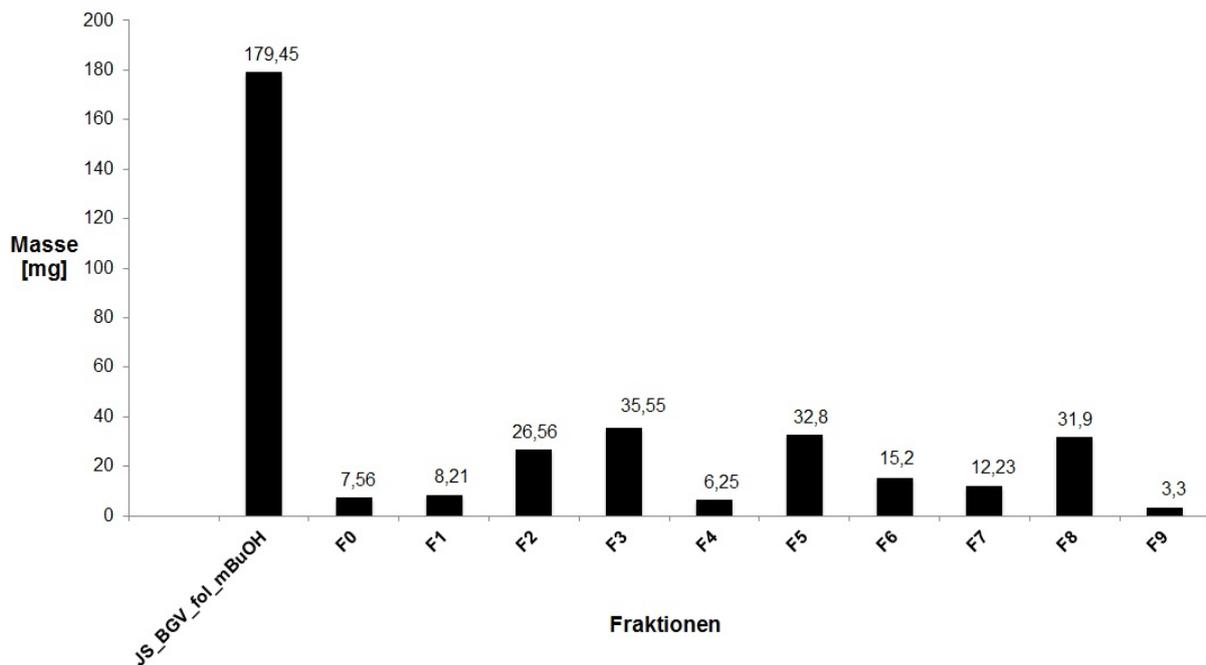
Um Fraktion **JS1** (**Abbildung 3, Seite 6**) weiter aufzureinigen, wurde diese in Methanol gelöst. Hierbei fiel ein Teil des Extraktes aus, der als Methanolpräzipitat (**JS-MP**) bezeichnet wurde. Der methanolische Überstand (=löslicher Anteil) wurde weiterverwendet und an Sephadex LH 20 mit 50%igem Methanol als Eluenten aufgereinigt. Hierbei resultierten die Fraktionen **JS1-1** bis **JS1-6** (**Abbildung 8**).

**Abb. 8: Aufreinigung von JS1 (Abbildung 3, Seite 6) an Sephadex LH 20 (Tabelle 3)**

Die im **Kapitel 2.2.2, Seite 7** aus dem Trockenextrakt **JS\_BGV\_fol\_m** (466,0 mg, **Abbildung 5, Seite 8**) durch Flüssig-Flüssig-Verteilung erhaltene Butanolfraction **JS\_BGV\_fol\_mBuOH** (**Abbildung 6, Seite 8**) wurde ebenfalls durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 in zehn Fraktionen getrennt.

**Abb. 9: Aufreinigung von JS\_BGV\_fol\_mBuOH (Abbildung 5, Seite 8) an Sephadex LH 20 (Tabelle 3, Seite 11)**

Dazu wurde die gesamte Phase in möglichst wenig Methanol (3 mL) gelöst und die Lösung auf die Sephadexsäule LH 20 aufgetragen. Die Parameter aus **Tabelle 3, Seite 11** wurden hier übernommen, als Eluent diente reiner Methanol. Hierbei wurde aufgrund verschiedener Gelbtöne, der unterschiedlichen Fluoreszenzlösungen bei 254 nm und der unterschiedlichen Fluoreszenzen bei 366 nm fraktioniert und die erhaltenen zehn Fraktionen der Reihe nach mit **F0-F9** bezeichnet. In **Abbildung 10** sind die Gewichte der getrockneten Fraktionen festgehalten.



**Abb. 10: Gewichtsbilanz nach der Aufreinigung von JS\_BGV\_fol\_mBuOH (Abbildung 9, Seite 11) mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 (Tabelle 3, Seite 11)**

### 2.3.1.2 Aufreinigung mittels Adsorptionschromatographie an Silicagel

Die Adsorptionschromatographie an Kieselgel beruht auf der unterschiedlichen Polarität von Molekülen. Hierbei haben polarere Substanzen eine längere Retentionszeit, da sie stärker mit den polaren Silanolgruppen des Kieselgels wechselwirken. Apolare Substanzen werden hingegen weniger stark zurückgehalten und eluieren dadurch früher. Die Parameter der für die Aufreinigung verwendeten Silicagelsäule sind in der nachfolgenden **Tabelle 4, Seite 13** festgehalten.

Tab. 4: Parameter der Silicagelsäule

Silicagelsäule	
Säule	Glassäule mit Reservoir
Füllhöhe	30 cm
Durchmesser	1 cm
Stationäre Phase	13 g Kieselgel
Eluent	Methanol
Gradient	isokratisch

Mit der Fraktion des Kelchmaterials **JS1-3** (Abbildung 8, Seite 11) wurde aufgrund der vielversprechenden intensiven, violetten Färbung weitergearbeitet. **JS1-3** wurde mittels Silicagelsäule erneut fraktioniert, wodurch weitere Fraktionen (**GD1-GD9**) entstanden. Um möglichst reine Fraktionen zu erhalten, wurde **GD8** ein weiteres Mal mittels Silicagelsäule fraktioniert, wobei sich die Farbstofffraktionen **GD8a-d** bildeten (Abbildung 11).

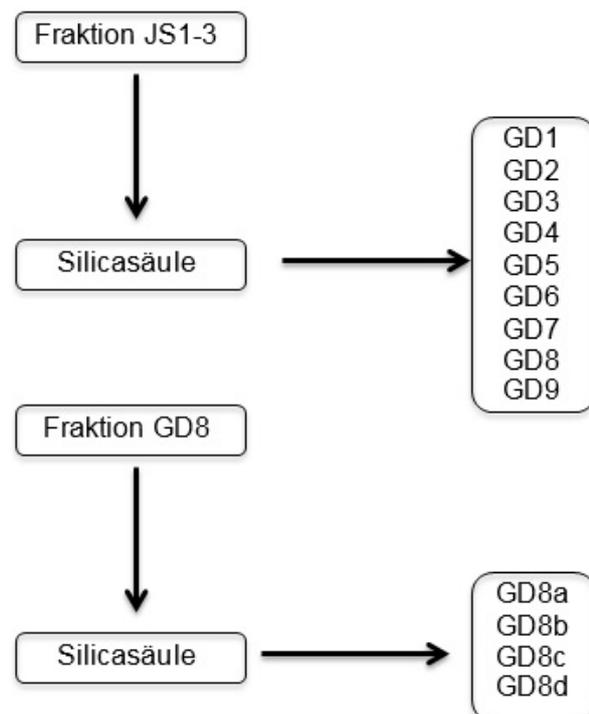


Abb. 11: Aufreinigung von JS1-3 (Abbildung 8, Seite 11) mittels Kieselgelsäule (Tabelle 4, Seite 13)

### 2.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) handelt es sich um eine chromatographische Methode, die zur Analyse von Lösungen, sowie zur Isolierung von Reinsubstanzen herangezogen werden kann.

Das Prinzip ähnelt dem anderer chromatographischer Verfahren, da es sich ebenfalls um eine Auftrennung der Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen der stationären und der mobilen Phase handelt. Im Gegensatz zur normalen Säulenchromatographie werden hier trotz kleiner dimensionierter Säulen hinsichtlich Länge und Durchmesser wesentlich bessere Trennleistungen erreicht. Das resultiert aus der kleineren Partikelgröße, der höheren Packungsdichte der stationären Phase und der dadurch erhöhten Trennbodenzahl. Aufgrund der deshalb nötigen hohen Drücke von bis zu 400 bar, mit der die mobile Phase transportiert wird, müssen die Säulenmäntel aus stabileren Materialien, wie beispielsweise Stahl, gefertigt sein [8]. Bei den verwendeten Säulen muss man zwischen Normalphasen- und Umkehrphasensäulen differenzieren. Erstere besitzen polare Gruppen und halten daher stärker polare Substanzen mehr zurück als apolare. Vice versa eluieren polare Substanzen auf Umkehrphasen schneller. Vereinfacht gesagt bedingen weniger Wechselwirkungen eine geringere Retention und schnellere Elution zwischen 0-5 Minuten. In dieser Diplomarbeit wurde ausschließlich mit Umkehrphasen, auch Reversed-Phase-Säulen genannt, gearbeitet (**Tabelle 5, Seite 16, 17**). Verwendet wurde eine HPLC-Anlage der Firma SHIMADZU (**Tabelle 5, Seite 16, 17**), die durch die Software SHIMADZU LAB-Solution-LC-Solution bedient wurde (**Abbildung 12, Seite 15**). Injiziert wurden stets zwischen 5 und 15  $\mu\text{L}$  durch den Autosampler. Mittels Pumpe wurden die jeweiligen mobilen Phasen, Acetonitril und saures Wasser (0,1% Ameisensäure), angesaugt und durch den Degaser von Luftblasen befreit. Durch den Säulenofen wurde ein Arbeiten bei konstanter Temperatur gewährleistet. Vor jeder neuen Probenaufgabe wurde die Säule „gepurged“. Darunter versteht man die Erhöhung der Acetonitrilkonzentration auf 95%, damit sämtliche Verschmutzungen, die sich durch vorhergehende Untersuchungen möglicherweise noch im Bereich des Säulenkopfes befinden, entfernt werden. Anschließend wurde die Säule auf die Ausgangskonzentration der jeweiligen Methode equilibriert (**Tabelle 5, Seite 16, 17**). Bezüglich der mobilen Phase wurde anfangs isokratisch, sprich mit gleichbleibender Eluentenzusammensetzung, gearbeitet. Hierbei handelte es sich um bidestilliertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure und 1% Acetonitril. Andererseits wurde mittels Gradientenelution, also zunehmender Konzentration eines zweiten Eluenten (Acetonitril), gearbeitet. Die Gradienten der jeweiligen Methoden ergaben sich durch

zahlreiche Testläufe, bei denen möglichst bis zur Grundlinie getrennte Peaks der Substanzen angestrebt wurden (**Tabelle 5, Seite 16, 17**).

Zur Detektion wurde ein Diodenarray Detektor (DAD; **Tabelle 5, Seite 16, 17**) verwendet. Durch dieses Gerät lassen sich alle Substanzen, die entweder UV- oder sichtbares Licht absorbieren, detektieren. Zusätzlich kann von jeder Substanz, die einen Peak im Chromatogramm liefert, das komplette UV/Vis-Spektrum aufgenommen werden. Außerdem wurde ein Lichtstreuendetektor (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD; **Tabelle 5, Seite 16, 17**) herangezogen, da mit diesem Gerät auch Substanzen ohne chromophores System detektiert werden können. Bei dieser Form der Detektion wird der Eluent mit der darin gelösten Substanz mittels inertem Gas ( $N_2$ ) in winzige Tröpfchen zerstäubt. Durch die Wärme einer Heizwendel verdampft die mobile Phase, wodurch nicht flüchtige Analyten als kleine Partikel übrigbleiben, welche einen darauf fallenden Laserstrahl ablenken. Die dadurch entstehende Abnahme der Lichtintensität wird durch eine Photodiode registriert.



**Abb. 12: Verwendete HPLC der Firma SHIMADZU samt ELSD (rechts davon)**

Tab. 5: HPLC-System

<b>Gerät</b>	HPLC-Anlage der Firma SHIMADZU			
<b>Analyseneinheiten</b>	SHIMADZU® Degasser DGU-20A <sub>5</sub> SHIMADZU® Pump LC-20AD SHIMADZU® Autosampler SIL-20AC HAT (1-15µL) SHIMADZU® Interface CBM-20A SHIMADZU® Column Oven CTO-20AC (25°C, max. 40°C)			
<b>Detektor 1: DAD</b>	SHIMADZU® SPD-M20A			
<b>Detektor 2: ELSD</b>	SHIMADZU® ELSD-LT			
<b>Software</b>	SHIMADZU® LAB-Solution-LC-Solution			
<b>Mobile Phasen</b>	LM A: Wasser-konz. Ameisensäure (0,1%) LM B: Acetonitril (ACN)			
<b>Stationäre Phasen</b>	<b>Beschreibung des Säulematerials</b>	<b>Methode</b>		<b>Analysiertes Material</b>
	<b>Pathfinder AS®:</b> Silica 100 RP, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm	<b>Pathfinder 7:</b>		
		Gradient	1% iso ACN 10 min, 1-5% ACN in 8 min	
		Fluss	0,4 mL/min	
Injektionsvolumen	Analytisch: 10 µL Semipräparativ: 15 µL			
				<b>Kelchmaterial: Untersuchung JS-MP</b>

<b>Stationäre Phasen</b>	<p><b>LiChrospher® 100:</b> RP 18endcapped, 5 µm, 250-4</p> <p>Vorsäule: LiChrospher® 100 RP-18 endcapped, 5 µm, 4 x 4</p>	<b>LiChrospher 1:</b>		<p><b>Kelchmaterial:</b> Stabilitätstests an der Farbstofffraktion <b>GD8c</b></p>
		Gradient	5-30% ACN in 50 min	
		Fluss	0,8 mL/min	
		Injektionsvolumen	5 µL	
		<b>LiChrospher 2:</b>		
		Gradient	1-25% ACN in 100 min	
		Fluss	0,8 mL/min	
		Injektionsvolumen	5 µL	
	<p><b>Acclaim® 120:</b> RP18, 3 µm, 2,1 x 150 mm</p>	<b>Acclaim 1</b>		<p><b>Blattmaterial:</b> Flavonoid- analyse <b>JS_EC_fol_m</b> <b>JS_FG_fol_m</b> <b>JS_BGV_fol_m</b></p>
		Gradient	15-22,5% ACN in 5 min, 22,5-25% ACN in 10 min	
		Fluss	0,8 mL/min	
		Injektionsvolumen	Analytisch: 10 µL	
			Semipräparativ: 20 µL	

### **Analytische HPLC**

Die analytische HPLC diente zum quantitativen Vergleich der Zusammensetzung der Fraktionen des Kelchmaterials und des Blattmaterials. Dazu wurden die in Methanol gelösten 1-5%igen Lösungen mittels einer Zentrifuge mit Festwinkelrotor (Heraeus Pico 21 von Thermo Scientific) 5 Minuten lang bei 1400 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur zentrifugiert. Der methanolische Flüssigkeitsüberstand wurde anschließend abgenommen und je nach Methode (**Tabelle 5, Seite 16, 17**) 5-10 µL durch den Autosampler injiziert.

### **Semipräparative HPLC**

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde auch präparativ eingesetzt. Hierbei wurden die mittels HPLC aufgetrennten unbekannt Substanzen manuell gesammelt, die somit als Reinsubstanzen für weiterfolgende Untersuchungen zur Verfügung standen. Vorgegangen wurde hierzu analog zur analytischen HPLC, jedoch wurden, um möglichst viel Substanzmenge in einem HPLC-Lauf zu sammeln, 15-20 µL mittels Autosampler injiziert. Die grundliniengetretenen Substanzen wurden nacheinander anhand bereits bekannter Retentionszeiten und dem UV/Vis-Spektrum gesammelt, indem der Verbindungsschlauch zum gewünschten Zeitpunkt vor dem ELSD abgeschraubt wurde, und die in der mobilen Phase gelösten Substanzen in Spitzkolben aufgefangen wurden. Zuletzt wurden die Fraktionen mittels Rotationsverdampfer getrocknet. Da mittels dieser Technik jedoch nur kleine Mengen gewonnen werden konnten, musste dieser Vorgang zwischen zehn und zwanzig mal wiederholt werden, um eine ausreichende Menge der Substanzen für weiterfolgende Untersuchungen zu erzielen.

Angewandt wurde diese Technik im **Kapitel 3.1.1.1, Seite 26** an der Pathfinder-Säule mittels der Methode Pathfinder 7 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**), zur Isolation der Substanzen die in den **Peak 1** und **Peak 2** entsprechenden Fraktionen (**Kapitel 3.1.1.1, Seite 26**) von **JS-MP** (**Abbildung 8, Seite 11**) enthalten waren, sowie im **Kapitel 3.2.2, Seite 38** an der Acclaim-Säule mittels der Methode Acclaim 1 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**) zur Isolation des Flavonoids **JK1** (**Abbildung 26, Seite 37**) aus **JS\_BGV\_fol\_m** (**Abbildung 5, Seite 8**).

### 2.3.3 Dünnschichtchromatographie und Hochleistungsdünnschichtchromatographie

Im Gegensatz zur Säulenchromatographie befindet sich bei der Dünnschichtchromatographie die stationäre Phase (**Tabelle 7, Seite 21**), meist Kieselgel, als dünne Schicht auf einer geeigneten Unterlage wie beispielsweise Glas oder Alufolie. Durch geeignete Laufmittel (**Tabelle 7, Seite 21**) konnten komplexe Stoffgemische, die am Start aufgetragen wurden, durch die unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der stationären Phase, getrennt werden. Durchschnittlich wurden 5-20  $\mu\text{L}$  1-5%iger methanolischer Lösungen bandenförmig mittels geeigneter Kapillaren aufgetragen. Essenziell hierbei war, dass die Entwicklung des Chromatogramms erst nach vollständigem Abdunsten des zum Auftragen verwendeten Lösungsmittels stattfand. Die Befüllung mit mobiler Phase erfolgte in den dafür vorgesehenen DC-Trögen, in denen die jeweiligen Laufmittel 1 cm hoch eingefüllt wurden. Daraufhin wurde fünf bis zehn Minuten gewartet, um Kammersättigung zu schaffen, und die beladenen, getrockenen DC-Platten so in den Entwicklungstrog gestellt, dass die Banden nicht in die mobile Phase reichten. Nachdem das Laufmittel, das sich aufgrund der Kapillarwirkung die Platte hinaufgesogen hatte, die markierte Frontlinie erreicht hatte, wurden die Platten entnommen und unter dem Abzug trocken gelassen. Anschließend wurde die Entwicklung jeweils mit einem Foto bei Tageslicht, UV 254 nm und UV 366 nm dokumentiert. Darauf folgte die je nach nachzuweisender Substanzklasse zugehörige Derivatisierung (**Tabelle 7, Seite 21**), gefolgt von einem Foto bei der gewünschten Wellenlänge für die nachfolgende Auswertung.

Die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC) wurde ebenfalls eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein optimiertes Verfahren der DC, bei dem mit qualitativ hochwertigeren stationären Phasen, HPTLC-Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten der Firma MERCK, gearbeitet wurde. Diese zeichnen sich durch einen gleichmäßigeren Partikeldurchmesser und eine homogenere Packung aus und sind dadurch herkömmlichen DC-Platten überlegen. Die Entwicklung fand in einer HPTLC-Anlage der Firma CAMAG (**Tabelle 6, Seite 20**) statt, die ein geschlossenes System mit standardisierten Bedingungen bezüglich Kammersättigung, Luftfeuchte und Temperatur (**Tabelle 6, Seite 20**)

darstellt. So konnten bessere Trennleistungen und reproduzierbarere Ergebnisse erzielt werden. Die Anlage wurde über die dazugehörige Software visionCATS mittels PC bedient. Die stationären Phasen (HPTLC-Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten der Firma MERCK) wurden vorab mittels CAMAG TLC Visualizer fotografiert um einen Nullabgleich der Platte zu erhalten, den die Software später automatisch von der entwickelten Platte abzog. Durch den Autosampler wurde das definierte Probenvolumen präzise bandenförmig aufgetragen. Im Anschluss darauf erfolgte die Entwicklung in der Entwicklungskammer, in der die Platten unter immer gleichen Bedingungen entwickelt wurden. Darauf folgte die erste Dokumentation der Entwicklung mittels Foto unter Tageslicht, UV 254 nm und UV 366 nm aus der jeweils gleichen Position. Zuletzt wurden die Platten per Tauchvorrichtung gleichmäßig in das jeweilige Derivatisierungsreagenz getaucht und im Anschluss wieder bei der gewünschten Wellenlänge fotografiert.

Tab. 6: HPTLC-System

Gerät	CAMAG HPTLC Anlage
<b>Autosampler</b>	CAMAG Automatic TLC Sampler 4 Auftragevolumen: 5-10 µL
<b>Entwicklung</b>	CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2) Vortrocknung der Platte Sättigung: 20 min mit Filter Luftfeuchte: K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (43% RH), 10 min
<b>Derivatisierung</b>	CAMAG Chromatogram Immersion Device (III) Derivatisierungsreagenzien siehe <b>Tabelle 8, Seite 21, 22</b>
<b>Dokumentation</b>	CAMAG TLC Visualizer (Tageslicht, UV 254 nm, UV 366 nm)
<b>Software</b>	VisionCATS

Tab. 7: Stationäre Phase, mobile Phasen und Derivatisierung für DC und HPTLC

Stationäre Phase	DC-Kieselgel 60 F <sub>254</sub> MERCK bzw. HPTLC-Kieselgel 60 F <sub>254</sub> MERCK	
Mobile Phasen	Laufmittel	Derivatisierung
	<b>System 1:</b> Chloroform-Methanol-Wasser (60-40-10)	Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz (Zusammensetzung siehe <b>Tabelle 8</b> )
	<b>System 2:</b> Dichlormethan-Methanol-Essigsäure conc.-Wasser (20-6-10-4)	DAP: Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure Reagenz (Zusammensetzung siehe <b>Tabelle 8</b> )
	<b>System 3:</b> HEES: Ethylacetat-Ameisensäure conc.-Essigsäure conc.-Wasser (100-11-11-26)	Naturstoffreagenz A (Zusammensetzung siehe <b>Tabelle 8</b> )
	<b>System 4:</b> Chloroform-Methanol-Ammoniak conc. (5-4-1)	Spezial Dragendorffreagenz (Zusammensetzung siehe <b>Tabelle 8</b> )

Tab. 8: Zusammensetzung der Derivatisierungsreagenzien [9]

Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz		
Zusammensetzung	Detektion	Detektierbare Stoffklasse
Ethanol-Schwefelsäure conc.-Anisaldehyd (17-2-1)	Tageslicht, nach erhitzen der DC-Platte auf 100°C	Organische Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen

<b>DAP: Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure Reagenz</b>		
<b>Zusammensetzung</b>	<b>Detektion</b>	<b>Detektierbare Stoffklasse</b>
0,5 Diphenylamin in 0,5 mL Anilin lösen und mit 20 mL Aceton und 4 mL 85%iger Phosphorsäure versetzen	Tageslicht, nach erhitzen der DC-Platte auf 100°C	Zucker
<b>Naturstoffreagenz A</b>		
<b>Zusammensetzung</b>	<b>Detektion</b>	<b>Detektierbare Stoffklasse</b>
Diphenylborsäure- $\beta$ -aminoethylesterlösung 1%ig in Methanol	UV 366 nm	Flavonoide
<b>Spezial-Dragendorffreagenz</b>		
<b>Zusammensetzung</b>	<b>Detektion</b>	<b>Detektierbare Stoffklasse</b>
Wasser dest. 500 mL, Schwefelsäure conc. 35 mL, Essigsäure conc. 20 mL, Wismut(III) nitrat 1,79 g, Kaliumjodidlösung 40%ig ad 1000 mL	Tageslicht	Alkaloide, tertiäre Amine

Sowohl DC als auch HPTLC wurden zur Charakterisierung, Qualitätsüberprüfung, Fraktionskontrolle und für die vergleichende Gegenüberstellung der phytochemischen Fingerprints verwendet.

## 2.4 Strukturaufklärung

Die unter diesem Punkt angeführten Methoden geben Auskunft über die chemische Zusammensetzung und erlauben eine Vorhersage bezüglich deren struktureller Anordnung. Zum Einsatz kamen hierbei die Massenspektrometrie (MS) und die Kernresonanzspektroskopie (NMR).

### 2.4.1 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie wird aus dem Verhältnis Masse zu Ladung ( $m/z$ ) die Molmasse unbekannter Substanzen ermittelt. Aufgrund der entstandenen Fragmentierungsmuster können zusätzlich Schlüsse auf die Struktur gezogen werden. Dazu wird eine Probenlösung in den gasförmigen Zustand übergeführt und durch eine geeignete Ionenquelle ionisiert. Die entstandenen Ionen und Fragmente werden im elektrischen Feld beschleunigt und durch den Analysator nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt. Die entstandenen Fragmente können mittels geeigneter Detektoren analysiert werden [10].

Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Martin Zehl am Department für Pharmazeutische Chemie durchgeführt. Die Parameter zur Messung der HRESIMS Spektren sind der **Tabelle 9** zu entnehmen. Anwendung fand diese Methode im **Kapitel 3.1.1.3, Seite 29** zur Bestimmung der genauen molaren Masse und damit zur Aufklärung der Summenformel der Substanzen die in den **Peak 1** und **Peak 2** entsprechenden Fraktionen (**Kapitel 3.1.1.1, Seite 26**) enthalten waren, sowie im **Kapitel 3.2.2, Seite 38** zur genaueren Charakterisierung des Flavonoids **JK1 (Abbildung 25, Seite 36)**. Außerdem lieferten die Fragmentierungsmuster wichtige Hinweise auf mögliche Strukturen (**Kapitel 3.2.2, Seite 38**).

Tab. 9: MS-Parameter

<b>Gerät</b>	maXis HD ESI-Qq-TOF Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland
<b>Lösungsmittel</b>	HPLC-Fraktion in 20% Methanol

<b>Probenaufgabe</b>	manuell mittels Spritzenpumpe (3 $\mu$ L/min)
<b>ESI-Quelle</b>	Kapillarspannung: 1-4 kV (individuell optimiert) Vernebelungsgas: 0.5 bar (N <sub>2</sub> ) Trockengasfluss: 5 L/min (N <sub>2</sub> ) Trockengastemperatur: 250°C
<b>Aufnahmemodus</b>	positiver Ionenmodus, $m/z$ 50 – 1550
<b>Fragmentierung</b>	Mehrstufenmassenspektren M <sup>2</sup> , CID mit manuell optimierter Fragmentierungsamplitude Kollisionsgas: N <sub>2</sub> Isolationsfenster: $\Delta m/z = 2$
<b>Ermittlung der Summenformeln der detektierten Ionen</b>	Software Bruker Compass DataAnalysis 4.2 basierend auf der Massengenauigkeit ( $\Delta m/z \leq 2$ ppm) und einem Abgleich des Isotopenmusters (SmartFormula algorithm)

#### 2.4.2 Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy; NMR) wurde neben der Massenspektrometrie ebenfalls zur Strukturaufklärung eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Technik, die nur für Atomkerne mit einem Kernspin ungleich Null (z.B. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) anwendbar ist. Durch Einwirken eines starken Magnetfeldes entstehen Wechselwirkungen, die Auskunft über die Umgebung des Kerns geben können [10].

Die NMR-Spektren wurden freundlicherweise von ao. Univ.- Prof. Mag. Dr. Ernst Urban am Department der Pharmazeutischen Chemie aufgenommen. Die Geräte und Parameter der Messung wurden in der **Tabelle 10, Seite 25** festgehalten. Anwendung fand diese Methode zur näheren Charakterisierung der Struktur von **JK1 (Abbildung 25, Seite 36)** im **Kapitel 3.2.5, Seite 44**.

Tab. 10: NMR-Parameter

<b>Gerät und Methode</b>	Bruker Avance 500 NMR spectrometer (UltraShield), z-Achsen Gradient, automatisches Tuning mit passendem Zubehör (Bruker BioSpin)
<b>Probenaufgabe</b>	Probengeber (PA BBO 500SB BBF-H-D-05-Z, 1H, BB = 19F und 31P-15N)
<b>Experiment</b>	HSQC COSY
<b>Resonanzfrequenz</b>	<sup>1</sup> H NMR: 500.13 MHz <sup>13</sup> C NMR: 125.75 MHz
<b>Bezugssignal</b>	<sup>1</sup> H NMR: Methanol Lösungsmittelsignal <sup>1</sup> H (δ 3.31 ppm) <sup>13</sup> C NMR: Methanol Kohlenstoffsignal <sup>13</sup> C (δ 49.00 ppm)
<b>Lösungsmittel</b>	Deuteromethanol (dMeOH)
<b>Messtemperatur</b>	298 K

### 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Farbstoffanalyse des Kelchmaterials und der Flavonoidanalyse des Blattmaterials werden getrennt voneinander betrachtet.

#### 3.1 Ergebnisse der Farbstoffanalyse des Kelchmaterials

Der erste Teil, die Ergebnisse der Farbstoffanalyse des Kelchmaterials **JS\_FG\_cal** (**Tabelle 1, Seite 4**) fokussiert sich im Speziellen auf mögliche Abbauprodukte.

##### 3.1.1 Ergebnisse der Untersuchung des Methanolpräzipitates JS-MP

Bei der wässrigen Extraktion von **JS\_FG\_cal** (**Tabelle 1, Seite 4**) entstanden die lyophilisierten Fraktionen **JS1-JS5** (**Abbildung 3, Seite 6**) und der als Methanolpräzipitat deklarierte Niederschlag **JS-MP** (**Abbildung 8, Seite 11**). Diese wurden gleich zu Beginn der praktischen Arbeit mittels HPLC und der Pathfinder-Säule (**Tabelle 5, Seite 16, 17**) untersucht, da diese Säule bereits in den vorangegangenen Arbeiten von Dr. Disan Gunbilig verwendet worden war. Um eine bessere Auftrennung von **JS-MP** zu erhalten, wurde schrittweise eine von ihm vorhandene Methode durch Variation des Gradienten durch „Trial and Error“ optimiert. Daraus resultierte die Methode Pathfinder 7 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**). Wie sich bei den analytischen Untersuchungen herausstellte, ähnelten die Chromatogramme der Fraktionen **JS1-JS5** dem von **JS-MP**. Da von diesem mengenmäßig am meisten vorhanden war, wurden die anschließenden Untersuchungen mit **JS-MP** durchgeführt.

##### 3.1.1.1 Resultat der Methodenoptimierung

Die Optimierung der Methode Pathfinder 7 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**) anhand von **JS-MP** (**Abbildung 8, Seite 11**) lieferte die Auftrennung der Inhaltsstoffe in fünf Fraktionen, welche als **Peak 1-Peak 5** (**Abbildung 13, Seite 27**) bezeichnet wurden. Sowohl die polaren Substanzen am Beginn des Chromatogramms als auch die apolaren Substanzen mit längeren Retentionszeiten, waren annähernd

grundliniengetrennt. Die Substanzen der **Peak 1** (3-4 Minuten) und **Peak 2** (4,5-5,0 Minuten) entsprechenden Fraktionen lieferten im ELSD ein sehr starkes Signal, während die Substanzen der **Peak 3** (5,8-6,3 Minuten), **Peak 4** (9,0-9,5 Minuten) und **Peak 5** (14,5-15,0 Minuten) entsprechenden Fraktionen deutlich geringere Signale lieferten. Trotz der starken, violetten Färbung von **JS-MP** fiel auf, dass mit den zur Verfügung stehenden Geräten quantitativ kein Farbstoff mehr nachweisbar war, da in den dazugehörigen UV-Spektren im sichtbaren Bereich um 450 nm keine Absorption und damit keine Peaks im Chromatogramm sichtbar waren. Ältere Untersuchungen dieser Farbstofffraktionen, die von Dr. Disian Gunbilig durchgeführt worden waren, zeigen jedoch deutlich Farbstoffe um 450 nm. Um zu klären, ob die polaren Substanzen der **Peak 1** und **Peak 2** entsprechenden Fraktionen am Beginn des Chromatogramms mögliche Abbauprodukte waren, wurden diese, sowie die Substanzen der **Peak 3**, **Peak 4** und **Peak 5** entsprechenden Fraktionen anhand des UV/Vis-Spektrums bei 190 nm semipräparativ isoliert, um diese möglichst rein zu gewinnen (**Kapitel 2.3.2. Seite 18**).

Detektion: ELSD, UV190 nm

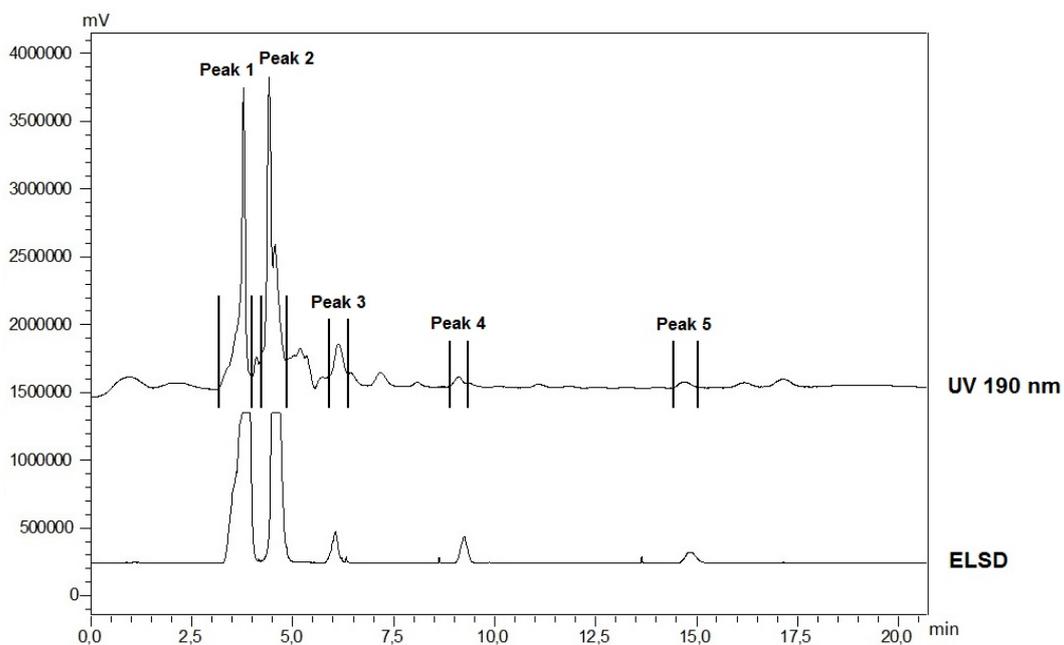


Abb. 13: Analyse von JS-MP (Abbildung 8, Seite 11) mittels HPLC und der Methode Pathfinder 7 (Tabelle 5, Seite 16, 17)

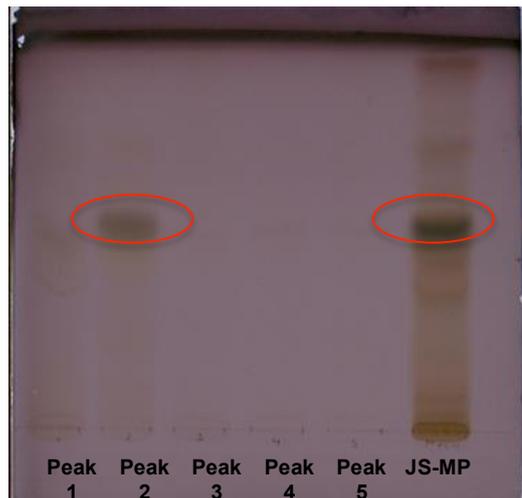
Anhand der dünnschichtchromatographischen Untersuchung, bei der **JS-MP** (Abbildung 8, Seite 11) und die semipräparativ gesammelten Substanzen der Fraktionen **Peak 1-Peak 5** (Abbildung 13, Seite 27) in System 1 entwickelt und mit

Anisaldehyd derivatisiert wurden (**Tabelle 7, Seite 21**), konnte eine Korrelation zwischen den Peaks der HPLC Chromatogramme und den Banden der DC hergestellt werden. Wie in **Abbildung 14** ersichtlich, befindet sich die Hauptkomponente in der Bahn von **Peak 2**. Aufgrund der tiefbraunen bis schwarzen Färbung mit Anisaldehyd, die zwar nicht spezifisch ist, aber an Zucker erinnerte, wurden weitere DC-Untersuchungen eingeleitet.

### 3.1.1.2 DC-Nachweis von Zuckern

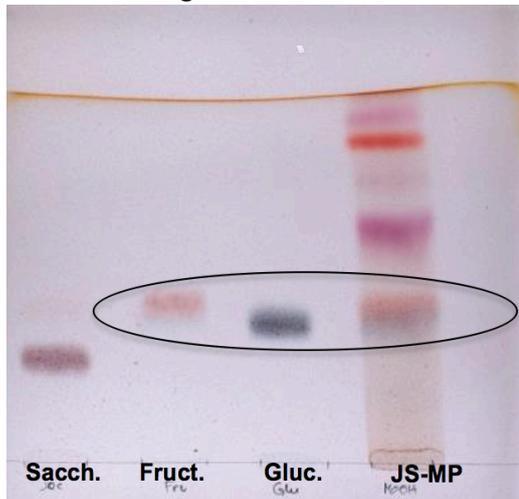
Um den Verdacht zu bestätigen, dass in der **Peak 2** entsprechenden Fraktion Zucker enthalten sein könnten, wurden Saccharose, Fructose und Glucose als Reinsubstanzen dünnschichtchromatographisch mit **JS-MP** (**Abbildung 8, Seite 11**) verglichen. Dazu wurden 5 µL der obengenannten Zucker als 1%ige Lösungen neben **JS-MP** aufgetragen. Sowohl in System 1 und anschließender Derivatisierung mit Anisaldehyd (**Tabelle 7, Seite 21**), als auch in System 2 und Derivatisierung mit Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure Reagenz (**Tabelle 7, Seite 21**) liefen Fructose und Glucose auf die gleiche Position wie die Hauptfraktion von **JS-MP**. Somit konnte bestätigt werden, dass die beiden Zucker in **JS-MP** enthalten waren (**Abbildung 15**). Aufgrund der Intensität von **Peak 2** im ELSD (**Abbildung 13, Seite 27**) konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Substanzen nicht ausschließlich um Zucker handelte. Daher wurden die Substanzen aus den **Peak 1** bis **Peak 3**

Detektion: Tageslicht



**Abb. 14: Analyse von JS-MP** (**Abbildung 8, Seite 11**) und der semipräparativ isolierten Substanzen der Fraktionen Peak 1-5 (**Abbildung 13, Seite 27**) mittels DC, entwickelt in System 1 und derivatisiert mit Anisaldehyd (**Tabelle 7, Seite 21**)

Detektion: Tageslicht

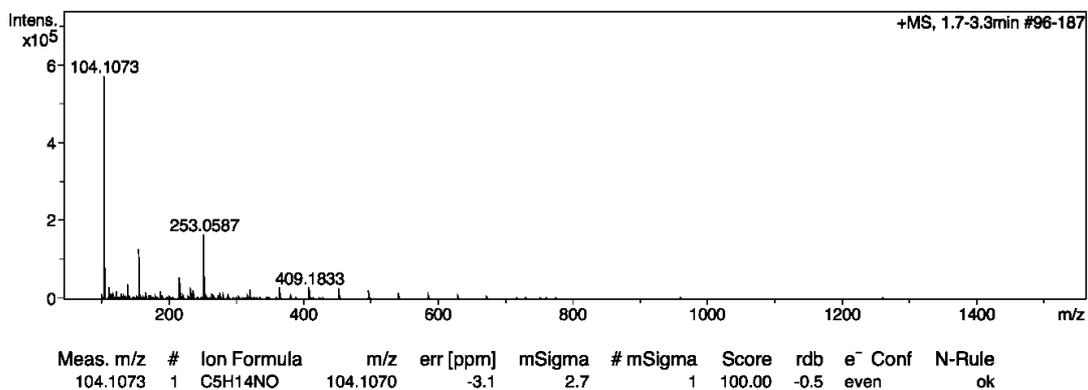


**Abb. 15: Analyse von JS-MP** (**Abbildung 8, Seite 11**) mittels DC, entwickelt in System 2 und derivatisiert mit DAP (**Tabelle 7, Seite 21**)

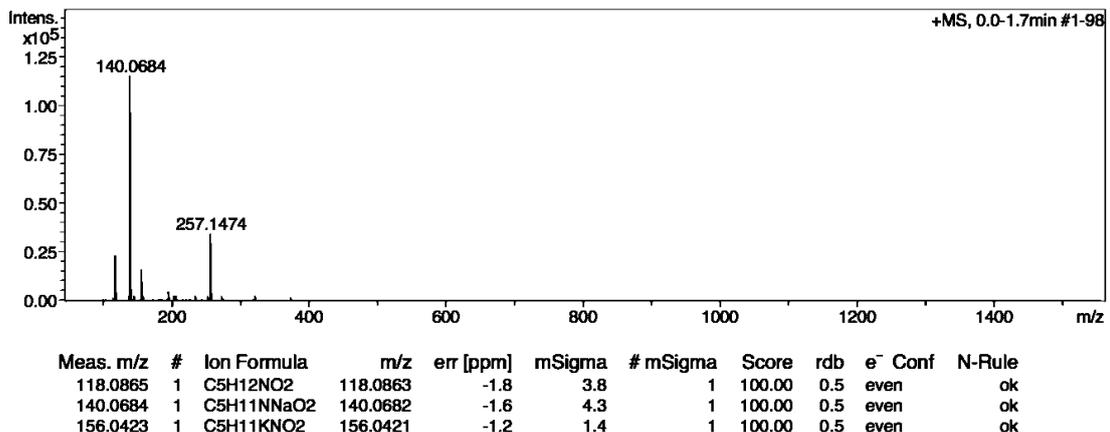
entsprechenden Fraktionen erneut an der Pathfinder-Säule mit der Methode Pathfinder 7 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**) mittels semipräparativer HPLC isoliert (**Kapitel 2.3.2, Seite 18**) und deren molare Massen mittels Massenspektrometrie bestimmt.

### 3.1.1.3 MS-Identifizierung der mittels semipräparativer HPLC gewonnenen Substanzen und Verifizierung der Daten mittels DC

Um Gewissheit über die chemische Zusammensetzung der mittels präparativer HPLC isolierten Verbindungen der **Peak 1-Peak 3** entsprechenden Fraktionen (**Abbildung 13, Seite 27**) aus **JS-MP (Abbildung 8, Seite 11)** zu erlangen, wurden diese durch Massenspektrometrie analysiert. Hierzu wurden hochaufgelöste ESI-MS und ESI-MS/MS Spektren im positiven Ionenmodus aufgenommen (**Kapitel 2.4.1, Seite 23**). Die Spektren sind in **Abbildung 16** und **Abbildung 17** festgehalten.



**Abb. 16:** Analyse der Peak 1 entsprechenden Fraktion (**Abbildung 13, Seite 27**) mittels MS (**Kapitel 2.4.1, Seite 23**)



**Abb. 17:** Analyse der Peak 2 entsprechenden Fraktion (**Abbildung 13, Seite 27**) mittels MS (**Kapitel 2.4.1, Seite 23**)

Bei der Substanz, die aus der **Peak 1** im Chromatogramm der HPLC entsprechenden Fraktion, mit einer Retentionszeit von 3-4 Minuten, gewonnen worden war, handelt es sich aufgrund der Summenformel  $C_5H_{14}NO$  und einem Masse-Ladungsverhältnis von  $m/z = 104,17$  (**Abbildung 18**) höchstwahrscheinlich um Cholin. Bei der Substanz, die aus der **Peak 2** entsprechenden Fraktion, mit einer Retentionszeit von 4,5-5 Minuten im HPLC-Chromatogramm, handelt es sich, wie bereits vermutet, nicht nur um die Monosaccharide Glucose und Fructose, sondern auch um Betain, das eine Summenformel von  $C_5H_{11}NO_2$  besitzt und ein Masse-Ladungsverhältnis von  $m/z = 117,15$  (**Abbildung 18**) aufweist. Die molare Masse von der Substanz, die aus der **Peak 3** entsprechenden Fraktion präparativ isoliert wurde, konnte aufgrund ungenügender Reinheit mittels MS nicht bestimmt werden.

Detektion: DAD; 190 nm

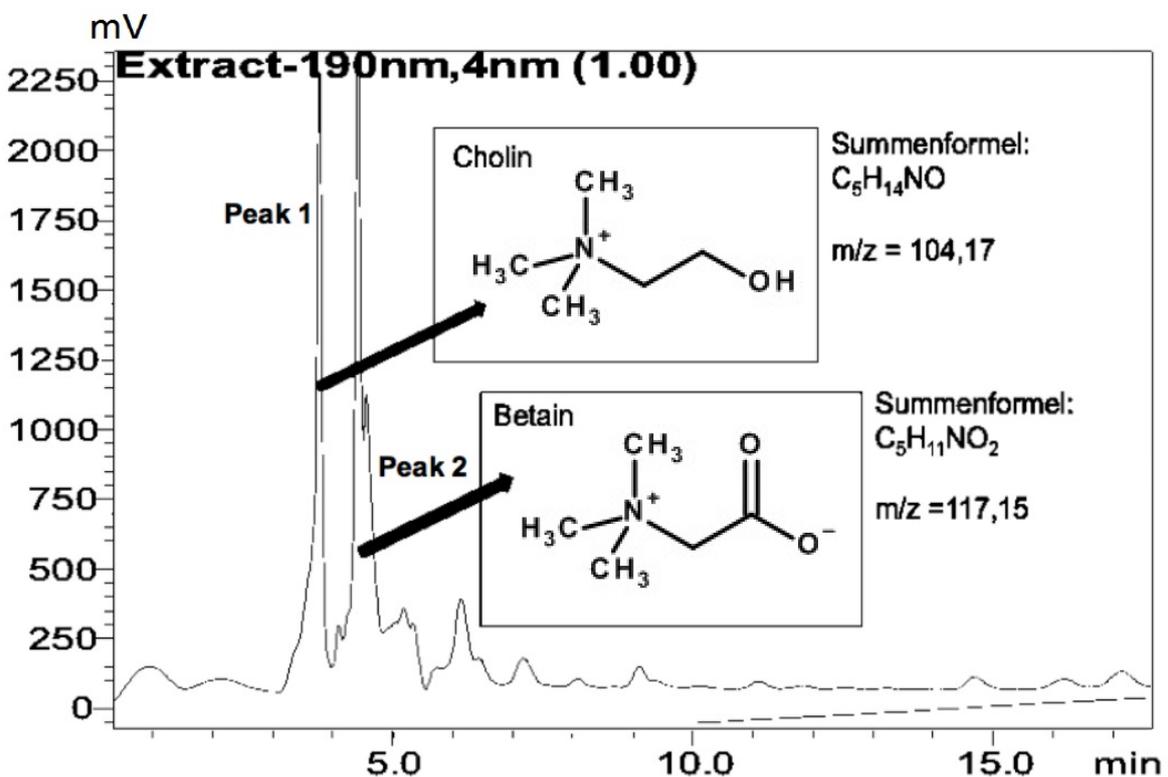


Abb. 18: Analyse von JS-MP (Abbildung 8, Seite 11) mittels HPLC und der Methode Pathfinder 7 (Tabelle 5, Seite 16, 17) mit den Struktur- und Summenformeln der durch MS identifizierten Verbindungen Cholin und Betain

Das Ergebnis der MS wurde anschließend noch mit einer dünnschichtchromatographischen Analyse, bei der die Reinsubstanzen Betain und Cholin aufgetragen wurden, verifiziert. Dazu wurden jeweils 5  $\mu\text{L}$  dieser Substanzen als 1%ige methanolische Lösungen auf eine DC-Platte aufgetragen und neben **JS-MP** (**Abbildung 8, Seite 11**) im System 4 entwickelt (**Tabelle 7, Seite 21**). Anschließend wurde mittels spezial Dragendorffreagenz auf die Anwesenheit von Betain und Cholin geprüft (**Tabelle 7, Seite 21**). Wie in **Abbildung 19** zu erkennen, stellt Betain (braungefärbte

Bande) aus der Fraktion, die **Peak 2** entspricht (**Abbildung 13, Seite 27**), einen großen Anteil im Extrakt von **JS-MP** dar. Cholin, das in der Fraktion enthalten ist, die im HPLC-Chromatogramm dem **Peak 1** entspricht, ist im Gegensatz dazu in viel geringerer Konzentration enthalten. Dies ist an der sehr viel schwächeren dunkelbraunen Bande in **JS-MP** im Gegensatz zur Referenz zu erkennen.

Somit war es vorerst nicht gelungen, fragliche Abbauprodukte aus dem Methanolpräzipitat zu isolieren. Stattdessen konnten die stickstoffhaltigen Verbindungen Betain und Cholin identifiziert werden. Dennoch bestand weiterhin die Annahme, dass die ursprünglich vorhandenen Farbstoffe abgebaut worden waren. Um deren Abbau nachzuverfolgen wurden deshalb in weiterer Folge Untersuchungen zur Stabilität der Farbstoffe unternommen.

### 3.1.2 Stabilitätstests der Farbstofffraktion GD8c

Für die Farbstoffanalyse wurden die stark violett gefärbten Fraktionen **GD8a-d** (**Abbildung 11, Seite 13**) herangezogen. Hierbei zeigte ein Vergleich auf der Lichrospher-Säule mit der Methode LiChrospher 2 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**), dass die Fraktionen **GD8a**, wie auch **GD8c**, den größten Anteil an Farbstoff enthielten. Beide zeigten im sichtbaren Bereich bei 450 nm einen deutlichen Peak zwischen 50 und 75

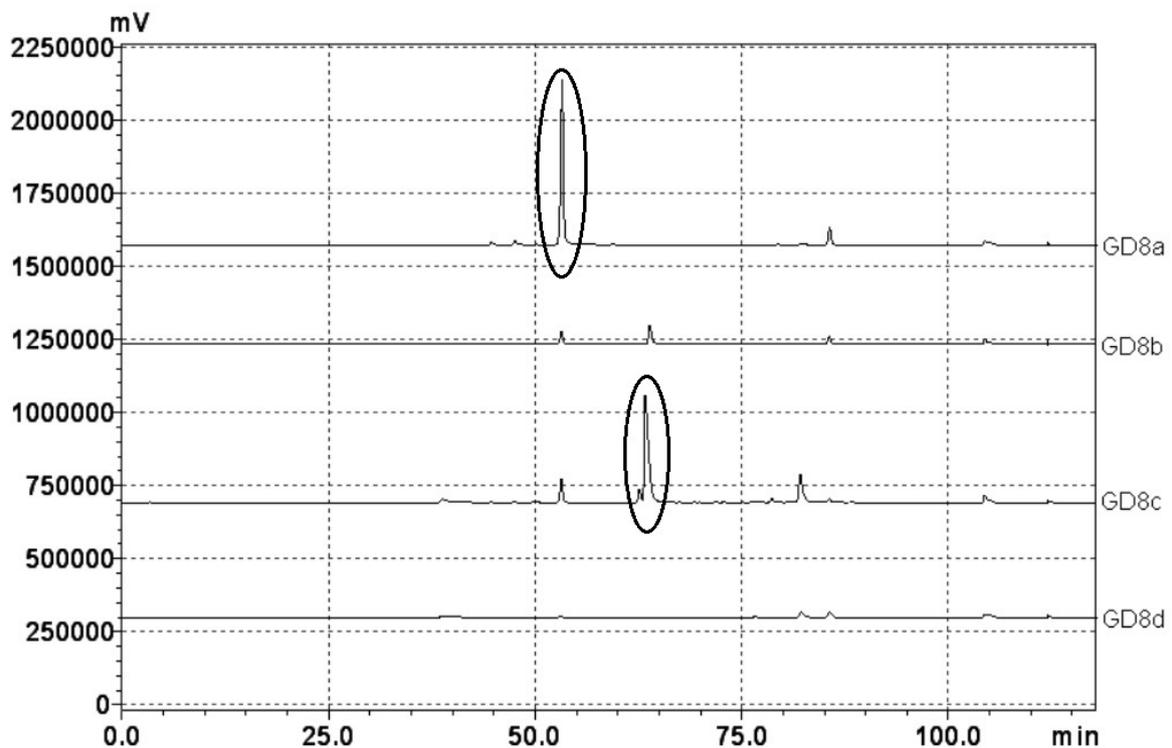
Detektion: Tageslicht



**Abb. 19:** Analyse von **JS-MP** (**Abbildung 8, Seite 11**) mittels DC, entwickelt in System 4 und derivatisiert mit spezial Dragendorffreagenz (**Tabelle 7, Seite 21**), zur Verifizierung von Betain und Cholin mittels Reinsubstanzen

Minuten. Dagegen wiesen die übrigen Fraktionen (**GD8b** und **GD8d**) keine bis minimale Signale auf (**Abbildung 20**). Da von der Fraktion **GD8c** gewichtsmäßig noch mehr Substanz vorhanden war, wurden die weiterfolgenden Untersuchungen mit dieser Fraktion fortgesetzt.

Detektion: DAD; 450 nm

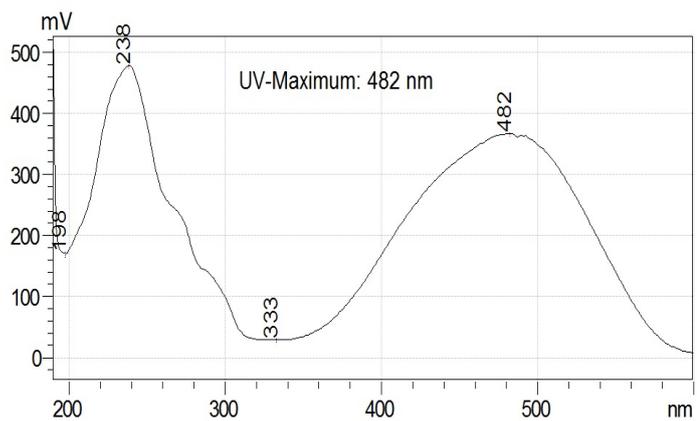


**Abb. 20:** Analyse der Farbstofffraktionen GD8a-d (**Abbildung 11, Seite 13**) mittels HPLC und der Methode LiChrospher 2 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**)

Da aus vorangegangenen Diplomarbeiten bereits bekannt war, dass die in *J. secunda* enthaltenen Farbstoffe äußerst instabil, insbesondere gegenüber Licht sind, und vorangegangene Isolierungsversuche fehlgeschlagen waren [11], konnten diese nicht als Reinsubstanzen gewonnen werden. Daher wurde die Farbstofffraktion **GD8c**, die eine Verbindung mit einem UV-Maximum bei 482 nm aufweist (**Abbildung 21, Seite 33**), Stresstests durch Lichteinwirkung ausgesetzt, um deren Abbau mittels gezielter HPLC-Analysen nachzuverfolgen. Dazu wurden ca. 5 mg von **GD8c** in 100  $\mu$ L Methanol gelöst. Um einen Ausgangswert (=Tag 0) zu erlangen, wurde die Probelösung durch HPLC mittels der Lichrospher-Säule und der Methode Lichrospher 1 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**) vermessen. Anschließend wurde die Probe 17 Tage lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Daraufhin erfolgte eine

sechs stündige Lichtbestrahlung (Tageslicht hinter einer Fensterglasscheibe) und eine sofortige Vermessung mittels den zuvor verwendeten HPLC Parametern. Daraufhin wurde die Probe wieder unter Lichtschutz bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Auf diese Weise wurde mit der Probe noch drei weiter Male verfahren. Die Zeitabstände sowie die Dauer der Lichteinwirkung sind in **Tabelle 11** festgehalten.

Detektion: DAD; 480



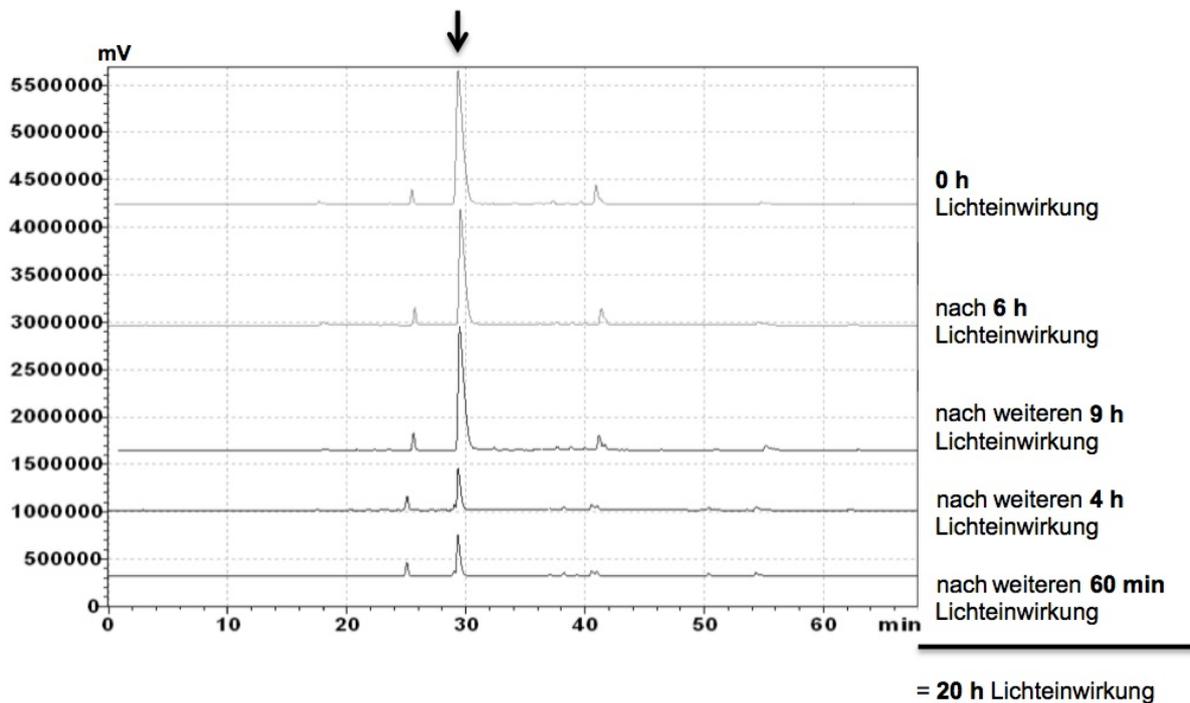
**Abb. 21: UV-Spektrum des Farbstoffes bei Minute 63,4 nach Analyse der Farbstofffraktion GD8c (Abbildung 11, Seite 13) mittels HPLC und der Methode Lichrosper 2 (Tabelle 5, Seite 16, 17)**

**Tab. 11: Bedingungen des Stabilitätstests an der Farbstofffraktion GD8c**

Tag	Dauer der Lichteinwirkung
Tag 0	-
Tag 17	6 h
Tag 21	9 h
Tag 43	4 h
Tag 48	1 h
	= 20 h

Die Probe war somit nach 48 Tagen insgesamt 20 Stunden dem Tageslicht ausgesetzt. Wie der Zeitraffer in **Abbildung 22, Seite 34** zeigt, konnte ein stetiger Abbau des Farbstoffes in der Fraktion **GD8c** bei 30 min festgehalten werden.

Detektion: DAD; 450 nm



**Abb. 22: Analyse der Farbstofffraktion GD8C (Abbildung 11, Seite 13) mittels HPLC und der Methode LiChrospher 1 (Tabelle 5, Seite 16,17) nach unterschiedlich langer Lichteinwirkung**

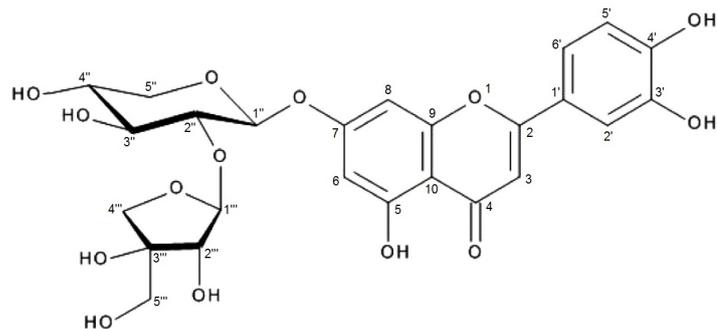
Auch die Stabilitätstests anhand der Farbstofffraktion **GD8c (Abbildung 8, Seite 15)** konnten kein einzelnes Abbauprodukt erfassen. Zwar wurde der kontinuierliche Abbau des Farbstoffes unter Lichteinstrahlung festgehalten, jedoch konnte weder im gesamten UV/Vis-Bereich, noch nach ELSD-Detektion eine merkliche Zunahme einer anderen Peakfläche wahrgenommen werden. Dies deutet stark darauf hin, dass die quantitativ sehr gering vorhandenen Farbstoffe in mehrere Produkte zerfallen, sodass es aufgrund der geringen Zunahme mehrerer unterschiedlicher Substanzpeaks nicht möglich ist, den Abbauprozess nachzuvollziehen, beziehungsweise mögliche Abbauprodukte zu identifizieren.

### 3.2 Ergebnisse der Flavonoidanalyse des Blattmaterials

Im zweiten Teil der Ergebnisse wurde auf die Flavonoide des Blattmaterials (**Tabelle 1, Seite 4** und **Tabelle 2, Seite 59**) eingegangen, da die Vermutung bestand, diese könnten als charakteristisches Identifizierungsmuster für *J. secunda* herangezogen werden.

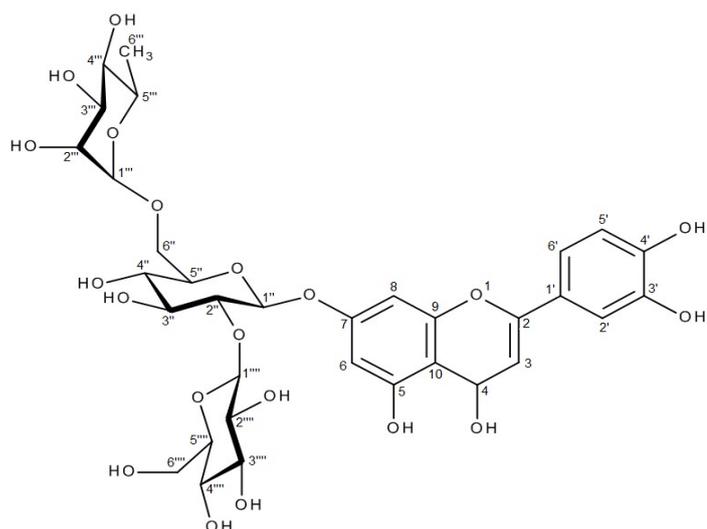
### 3.2.1 HPTLC- und HPLC-Vergleich der Blattextrakte

Um die in **Tabelle 1, Seite 4** angeführten Blattmaterialien **JS\_EC\_fol**, **JS\_FG\_fol** und **JS\_BGV\_fol** miteinander vergleichen zu können, wurden von deren methanolischen Extrakten (**JS\_EC\_fol\_m**, **JS\_FG\_fol\_m** und **JS\_BGV\_fol\_m**, **Abbildung 5, Seite 8**) ein phytochemischer Fingerprint mittels CAMAG HPTLC-Anlage (**Tabelle 6, Seite 20**) in System 3 und anschließender Derivatisierung mit Naturstoffreagenz A (**Tabelle 7, Seite 21**) angefertigt. Anhand dieser Fingerprintvergleiche konnte gezeigt werden, dass es ein Hauptflavonoid gibt. Dieses kann als charakteristisch für diese Art bezeichnet werden, da es in den Blattmaterialien sämtlicher Herkünfte, die im Zuge dieser Arbeit von *J. secunda* untersucht worden waren, zu finden war. Bei der Hauptkomponente, die bereits isoliert und publiziert wurde, handelt es sich um ein Luteolinderivat mit 2 Pentosen (Xylose und Apiose) [12],



**Abb. 23: BT1, Luteolin 7-O-[[ $\beta$ -apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)] $\beta$ -xylopyranosid [12]**

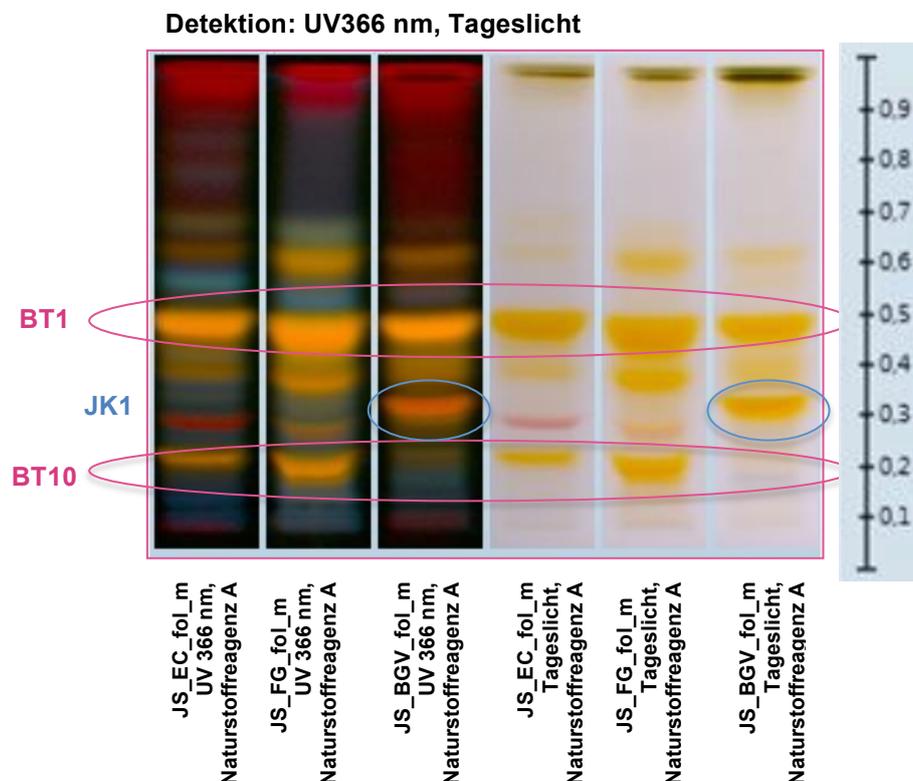
welches in der Folge mit **BT1** abgekürzt wird (**Abbildung 23**). Bereits ebenfalls isoliert und publiziert wurde ein Luteolinderivat, das mit drei Hexosen verknüpft ist [12] und in der Folge als **BT10** bezeichnet wird. Die Zucker und deren Verknüpfungen sind in [12] nicht korrekt dargestellt und werden daher in



**Abb. 24: BT 10, Luteolin 7-O-[[ $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)] $\beta$ -rhamnosyl-(1 $\rightarrow$ 6)] $\beta$ -glucopyranosid adaptiert von [12]**

**Abbildung 24** in richtiger Form abgebildet. In **Abbildung 25, Seite 36** wurden die Fingerprints der methanolischen Extrakte **JS\_EC\_fol\_m**, **JS\_FG\_fol\_m** und **JS\_BGV\_fol\_m** (**Abbildung 5, Seite 8**), die mittels CAMAG-HPTLC-Anlage (**Tabelle 6, Seite 20**) in System 3 und Derivatisierung mit Naturstoffreagenz A (**Tabelle 7,**

**Seite 21)** erstellt wurden, verglichen. In allen 3 Blattextrakten ist bei  $R_f = 0,5$  eine deutliche Bande der Hauptkomponente **BT1** (**Abbildung 23, Seite 35**) sichtbar. **JS\_EC\_fol\_m** und **JS\_FG\_fol\_m** zeigen sowohl unter UV 366 nm als auch bei Tageslicht bei  $R_f = 0,2$  eine deutliche Bande für **BT 10** (**Abbildung 24, Seite 35**). Auffällig ist jedoch, dass in **JS\_BGV\_fol\_m** eine zusätzliche, von den bereits bekannten Flavonoiden **BT1** und **BT10** abweichende Bande bei  $R_f = 0,3$ , enthalten ist. Diese wird in weiterer Folge als **JK1** bezeichnet.



**Abb. 25:** Analyse der methanolisch extrahierten Blattextrakte **JS\_EC\_fol\_m**, **JS\_FG\_fol\_m** und **JS\_BGV\_fol\_m** (**Abbildung 5, Seite 8**) mittels HPTLC, entwickelt in System 3 und derivatisiert mit Naturstoffreagenz A (**Tabelle 7, Seite 21**)

Aufgrund dieser bislang unbekanntes Flavonoidbande **JK1** wurden weiterfolgende HPLC-Analysen der drei methanolischen Extrakte **JS\_EC\_fol\_m**, **JS\_FG\_fol\_m** und **JS\_BGV\_fol\_m** (**Abbildung 5, Seite 8**) eingeleitet. Unter Anwendung der Acclaim-Säule und der angegebenen Methode Acclaim 1 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**) wurden immer 10  $\mu\text{L}$  injiziert. Hierbei erhärtete sich aufgrund der abweichenden Retentionszeit von **JK1** gegenüber **BT1** und **BT10** (deren Retentionszeiten waren aus vorangegangenen Arbeiten bekannt [7]) ebenfalls der Verdacht, dass es sich um ein bisher noch unbekanntes Flavonoid in *J. secunda* handelt. In **Abbildung 26** auf **Seite 37** sieht man, dass die Hauptkomponente **BT1** (**Abbildung 23, Seite 35**) in

allen Herkünften enthalten ist. **BT10** (Abbildung 24, Seite 35) ist nur im Gesamtextrakt von **JS\_EC\_fol\_m** und **JS\_FG\_fol\_m** enthalten. Wie man weiters erkennen kann, eluiert das in **JS\_BGV\_fol\_m** vorkommende Flavonoid **JK1** ungefähr eine Minute nach **BT10**, und vier Minuten vor **BT1** und liegt somit im HPLC-Chromatogramm zwischen diesen beiden Flavonoiden bei Minute 7,5. Dies lässt darauf schließen, dass die Substanz weniger polar ist als **BT10** bei Minute 6,5, daher auf der RP-Säule stärker zurückgehalten wird und somit später am Säulenende ankommt. Jedoch ist **JK1** stärker polar als **BT1** bei Minute 11,5 und verlässt die Säule somit etwas früher als dieses.

Detektion: DAD; 220 nm

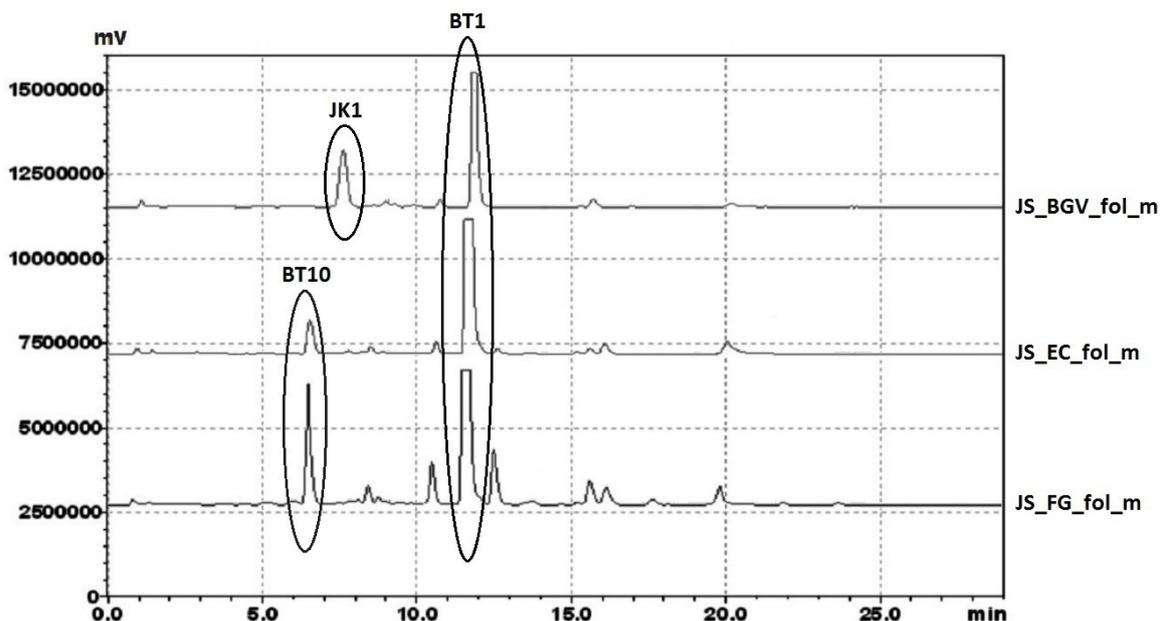


Abb. 26: Analyse der methanolisch extrahierten Blattextrakte **JS\_EC\_fol\_m**, **JS\_FG\_fol\_m** und **JS\_BGV\_fol\_m** (Abbildung 5, Seite 8) mittels HPLC und der Methode Acclaim 1 (Tabelle 5, Seite 16, 17)

Wie der UV-Spektren-Vergleich (Abbildung 27, 28 und 29, Seite 38) zeigt, besitzen **BT1** und **BT10** zwei sehr ähnliche Maxima bei 254 bzw. 253 nm und 348 bzw. 346 nm und ein Minimum bei 295 nm. **JK1** weist ein ähnliches, jedoch leicht abweichendes UV-Spektrum mit den Maxima bei 256 nm und 352 nm und einem Minimum bei 283 nm auf. Da bereits aus vorangegangenen Publikationen [12] bekannt war, dass es sich bei **BT1** und **BT10** um Flavonoide mit einem Luteolingrundgerüst handelt, lag die Vermutung nahe dass es sich bei **JK1** um ein sehr ähnliches Grundgerüst handeln musste. Für eine genauere Charakterisierung der Struktur von **JK1** wurden hochauflösende MS-Spektren sowie NMR-Spektren aufgenommen.

Detektion: DAD; 350 nm

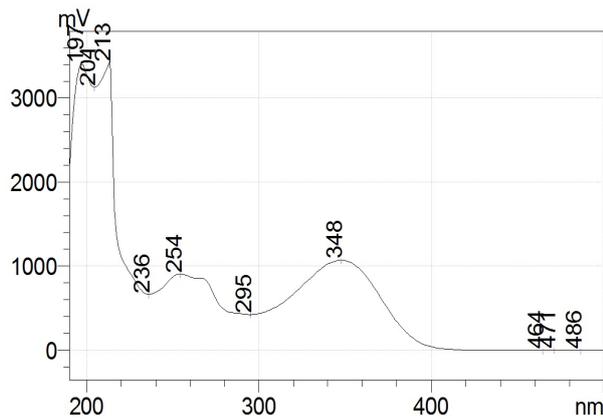


Abb. 27: UV-Spektrum von BT1 bei Minute 11,5 nach Analyse von JS\_BGV\_fol\_m (Abbildung 5, Seite 8) mittels HPLC und der Methode Acclaim 1 (Tabelle 5, Seite 16, 17)

Detektion: DAD; 350 nm

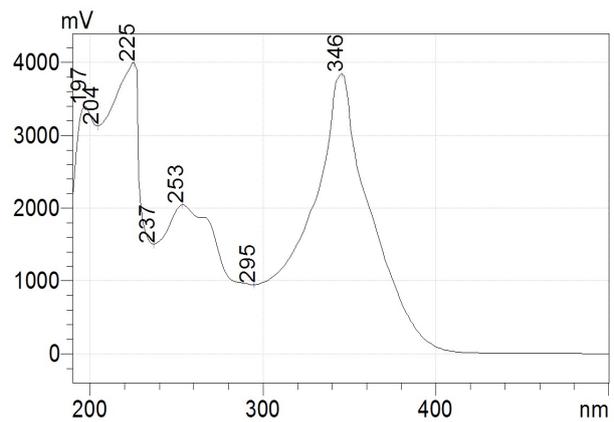


Abb. 28: UV-Spektrum von BT10 bei Minute 6,5 nach Analyse von JS\_EC\_fol\_m (Abbildung 5, Seite 8) mittels HPLC und der Methode Acclaim 1 (Tabelle 5, Seite 16, 17)

Detektion: DAD; 350 nm

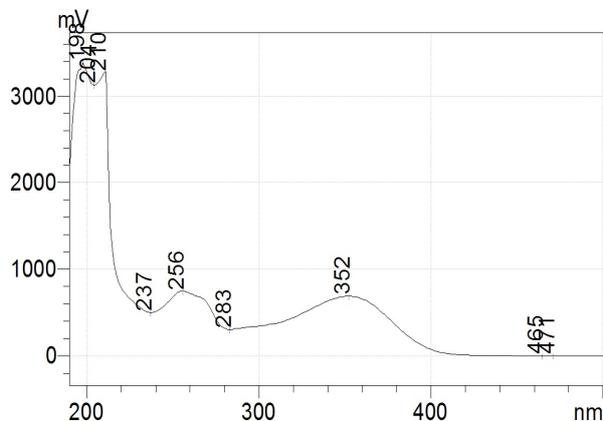
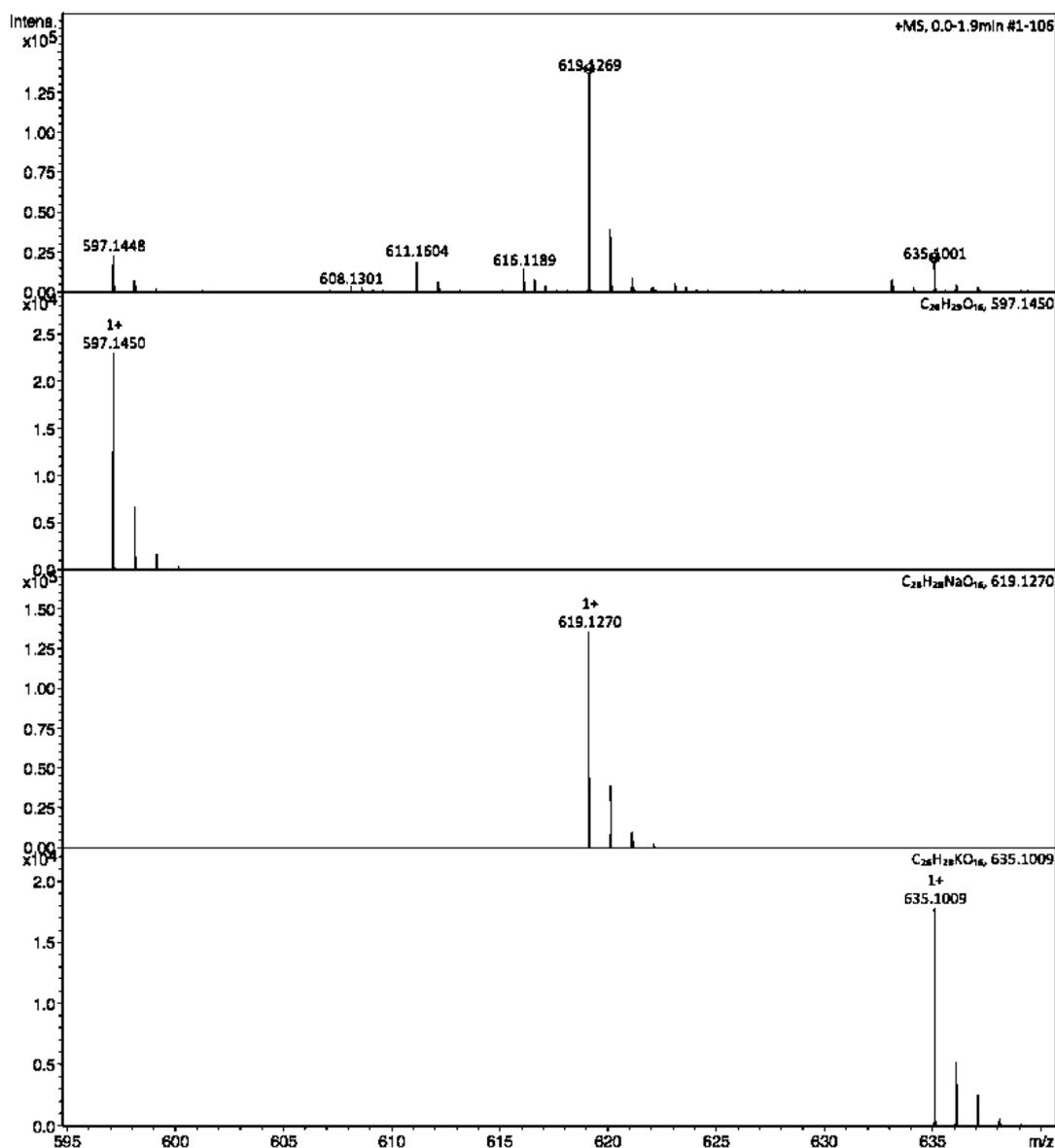


Abb. 29: UV-Spektrum von JK1 bei Minute 7,5 nach Analyse von JS\_BGV\_fol\_m (Abbildung 5, Seite 8) mittels HPLC und der Methode Acclaim 1 (Tabelle 5, Seite 16, 17)

### 3.2.2 Ergebnis der Massenspektrometrie von JK1

Um Gewissheit über die chemische Zusammensetzung des Flavonoids **JK1** (Abbildung 25, Seite 36) zu erlangen, wurde dieses durch Massenspektrometrie analysiert. Hierzu wurde **JK1** auf der Acclaim-Säule und der Methode Acclaim 1 (Tabelle 5, Seite 16, 17) mittels semipräparativer HPLC isoliert (Kapitel 2.3.2, Seite 18) und anschließend direkt in das Massenspektrometer injiziert (Kapitel 2.4.1, Seite 23). Anhand der hochaufgelösten ESI-MS Spektren konnten die Summenformel  $C_{26}H_{28}O_{18}$  und ein Masse/Ladungsverhältnis von  $m/z = 596$  für **JK1** ermittelt werden. Dafür sprechen der Peak bei  $m/z = 597$ , sowie jene der Natrium-

und Kalium- Addukte ( $m/z= 619$  bzw.  $m/z= 635$ , **Abbildung 30, Seite 39**). Aus dem Fragmentierungsmuster konnte man schließen, dass es sich bei dem Flavonoidaglykon wahrscheinlich um ein hydroxyliertes Luteolin handelt, verknüpft mit einer Zuckerkette bestehend aus einer Pentose und einer Hexose. Dafür sprechen der Peak bei  $m/z= 303$  in **Abbildung 31, Seite 40**, der einem hydroxylierten Luteolin entspricht sowie die Massendifferenz von 294, welche auf ein Disaccharid aus einer Hexose und einer Pentose schließen lässt. Demnach ist davon auszugehen, dass ein Disaccharid an einer Position substituiert ist und nicht zwei Zucker an zwei Substitutionspositionen gebunden sind. Dieses erste Ergebnis zur Charakterisierung von **JK1** wurde versucht in **Abbildung 32, Seite 41** darzustellen.



**Abb. 30:** Analyse von JK1 (Abbildung 25, Seite 36) mittels MS (Kapitel 2.4.1, Seite 23)

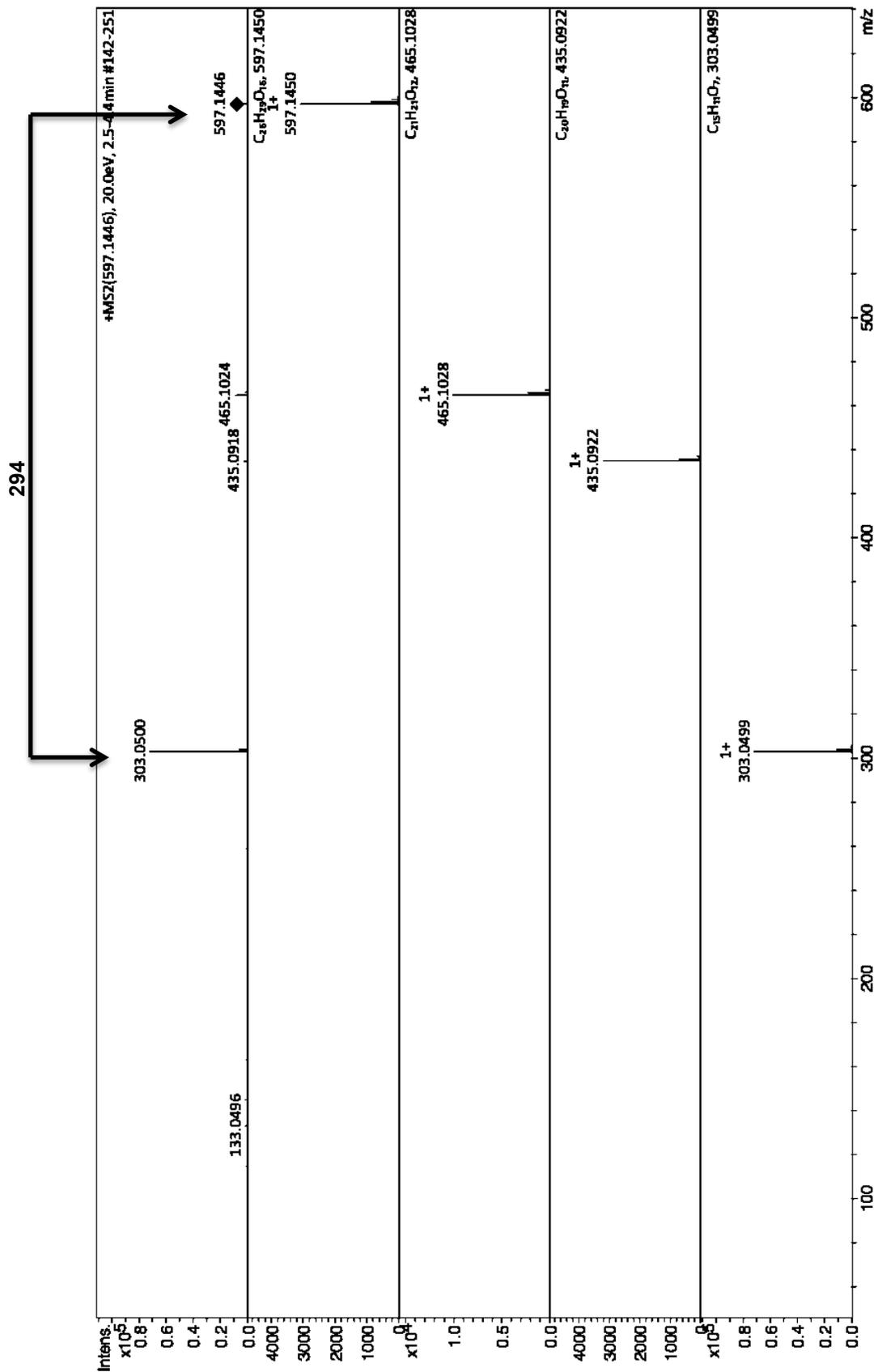
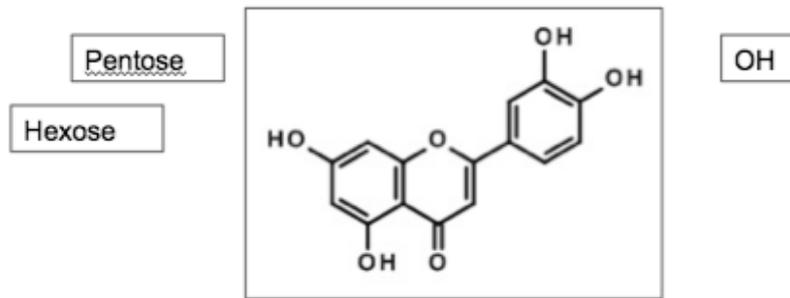


Abb. 31: Analyse von JK1 (Abbildung 25, Seite 36) mittels MS (Kapitel 2.4.1, Seite 23); Fragmentierungsmuster  $M^2$



**Abb. 32: Vereinfachte Darstellung eines ersten Strukturvorschlags für JK1 (Abbildung 26, Seite 37)**

Eine Aussage darüber, an welcher Stelle sich die Hydroxylgruppe befindet, kann jedoch aufgrund des Massenspektrums nicht getroffen werden. Ebenso wenig kann aufgrund dieser Technik geklärt werden, in welcher Reihenfolge und an welcher Position des Genins die Zuckerkette verknüpft ist. Um dies herauszufinden, wurde eine NMR-Analyse durchgeführt. Da hierfür jedoch größere Mengen an Reinsubstanzen von **JK1** notwendig waren, musste erneut Blattmaterial von **JS\_BGV\_fol** methanolisch extrahiert (**Abbildung 5, Seite 8**) und aufgereinigt werden (**Abbildung 6, Seite 8**).

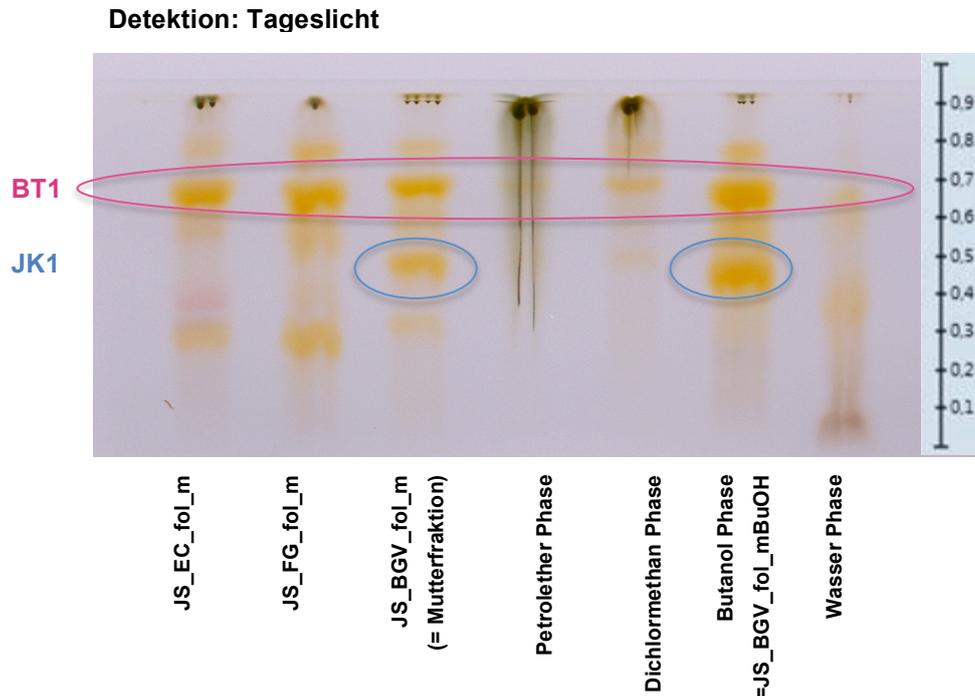
### 3.2.3 Isolierung von JK1

Um für die Strukturaufklärung des Flavonoides **JK1** genügend Substanzmenge zu isolieren, wurde der methanolisch extrahierte Extrakt **JS\_BGV\_fol\_m** mittels einer Flüssig-Flüssig-Verteilung aufgereinigt (**Abbildung 6, Seite 8**). Zur Überprüfung des Aufreinigungsfortschrittes wurden die Phasen der Flüssig-Flüssig-Verteilung mittels HPTLC untersucht.

#### HPTLC-Analyse der Fraktionen der Flüssig-Flüssig-Verteilung von **JS\_BGV\_fol\_m**

Hierbei wurden die getrockneten Fraktionen (Petrolether, Dichlormethan, Butanol und Wasser) in möglichst wenig Methanol gelöst und 5 µL dieser hochkonzentrierten Lösungen händisch auf die DC-Platten aufgetragen. Als Referenzen wurden die methanolischen Blattextrakte **JS\_EC\_fol\_m** und **JS\_FG\_fol\_m** (**Abbildung 5, Seite 8**) aufgetragen. Die Mutterfraktion **JS\_BGV\_fol\_m**, aus der die 4 Phasen der

Flüssig-Flüssig-Verteilung stammen, wurde ebenfalls zur Kontrolle aufgetragen. Entwickelt wurde in dem für Flavonoide spezifischen System 3 und derivatisiert mittels Naturstoffreagenz A (**Tabelle 7, Seite 21**).



**Abb. 33: Analyse der Fraktionen der Flüssig-Flüssig-Verteilung** (Abbildung 6, Seite 8) mittels DC, entwickelt in System 3 und derivatisiert mit Naturstoffreagenz A (**Tabelle 7, Seite 21**)

Wie man in **Abbildung 33** sieht, kann man eine deutliche Abtrennung der störenden apolaren (PE, DCM-Phase) sowie polaren (W-Phase) Inhaltsstoffe erkennen. Die relevanten Flavonoide reichern sich **JS\_BGV\_fol\_mBuOH** an. Wie zu erwarten, ist die Hauptflavonoidbande **BT1** (**Abbildung 23, Seite 35**) bei  $R_f = 0,65$  (Anmerkung: DC:  $R_f = 0,65 \hat{=} \text{HPTLC: } R_f = 0,5$ ; im CAMAG-HPTLC-System wurden stets geringere  $R_f$ -Werte erzielt, die Verhältnisse der Banden zueinander waren jedoch die gleichen) in allen drei Referenzen (**JS\_EC\_fol\_m**, **JS\_FG\_fol\_m**, **JS\_BGV\_fol\_m**), sowie in den Phasen der Flüssig-Flüssig-Verteilung vorhanden. Die als **JK1** deklarierte Flavonoidbande tritt jedoch nur im methanolischen Gesamtextrakt **JS\_BGV\_fol\_m** und in **JS\_BGV\_fol\_mBuOH** der Flüssig-Flüssig-Verteilung auf. Aus der Gewichts Bilanz (**Kapitel 2.2.2, Abbildung 7, Seite 9**) geht **JS\_BGV\_fol\_mBuOH**, in der **JK1** angereichert ist, als die schwerste Phase (179,45 mg) hervor, wodurch die Chancen gut standen, **JK1** zu isolieren. Dazu wurde **JS\_BGV\_fol\_mBuOH** an Sephadex LH 20 mittels methanolischer Elution in zehn Fraktionen **F0-F9** fraktioniert

(**Kapitel 2.3.1.1, Abbildung 9, Seite 11**). Um zu prüfen welche dieser Fraktionen das gesuchte Flavonoid **JK1** enthielt wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt.

### **HPTLC-Analyse der Sephadex-Fraktionen von JS\_BGV\_fol\_mBuOH**

Die an Sephadex LH 20 säulenchromatographisch erhaltenen Fraktionen **F0** bis **F9** (**Kapitel 2.3.1.1, Abbildung 9, Seite 11**) wurden zur Trockene gebracht und 5 mg in 100 µL Methanol gelöst. Für die HPLC-Analyse wurde die Acclaim-Säule mit der Methode Acclaim 1 (**Tabelle 5, Seite 16, 17**) benützt. Injiziert wurden je 10 µL der in Methanol gelösten Fraktionen. In **Abbildung 34, Seite 44** sind die Fraktionen **F4-F8**, deren Mutterfraktion **JS\_BGV\_fol\_mBuOH**, sowie die methanolischen Extrakte der Herkünfte Ecuador, Französisch Guyana und Venezuela (**JS\_EC\_fol\_m, JS\_FG\_fol\_m, JS\_BGV\_fol\_m**) abgebildet. **JK1** konnte aufgrund der Retentionszeit, die bereits aus vorangegangenen Analysen bekannt war, wie auch anhand des UV-Spektrums bei 350 nm (**Abbildung 29, Seite 38**) ermittelt werden und entspricht den Peaks bei Minute 7,5. **JK1** ist somit in Fraktion **F4** und **F5** enthalten, sowie in den Fraktionen **JS\_BGV\_fol\_m** und **JS\_BGV\_fol\_mBuOH** aus denen diese Fraktionen stammen. Die Hauptkomponente **BT1** (**Abbildung 23, Seite 35**) hingegen, die in allen Referenzmaterialien (**JS\_EC\_fol\_m, JS\_FG\_fol\_m, JS\_BGV\_fol\_m**) und in **JS\_BGV\_fol\_mBuOH** vorkommt und immer zwischen Minute 11,0 und 12,0 eluiert ist demnach in den Fraktionen **F6, F7** und **F8** enthalten. Die ersten vier Fraktionen (**F0-F3**) werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt, da dort ausschließlich Zucker enthalten waren. Ebenso wurde auf die Abbildung der Fraktion **F9** verzichtet, da diese nur den Nachlauf der Sephadex LH 20-Säule und keinerlei interessante Substanzen beinhaltete. Aufgrund der HPLC-Analysen war geklärt, dass das gesuchte Flavonoid **JK1** in den Fraktionen **F4** und **F5** vorhanden war. Da die Fraktion **F4** in den HPLC-Analysen einen angemessenen Reinheitsgrad aufwies und die unerwünschten Substanzen in dieser Fraktion nur ein zehntel der Peakgröße von **JK1** aufwiesen wurde eine NMR-Messung der Fraktion **F4** durchgeführt.

Detektion: DAD; 350 nm

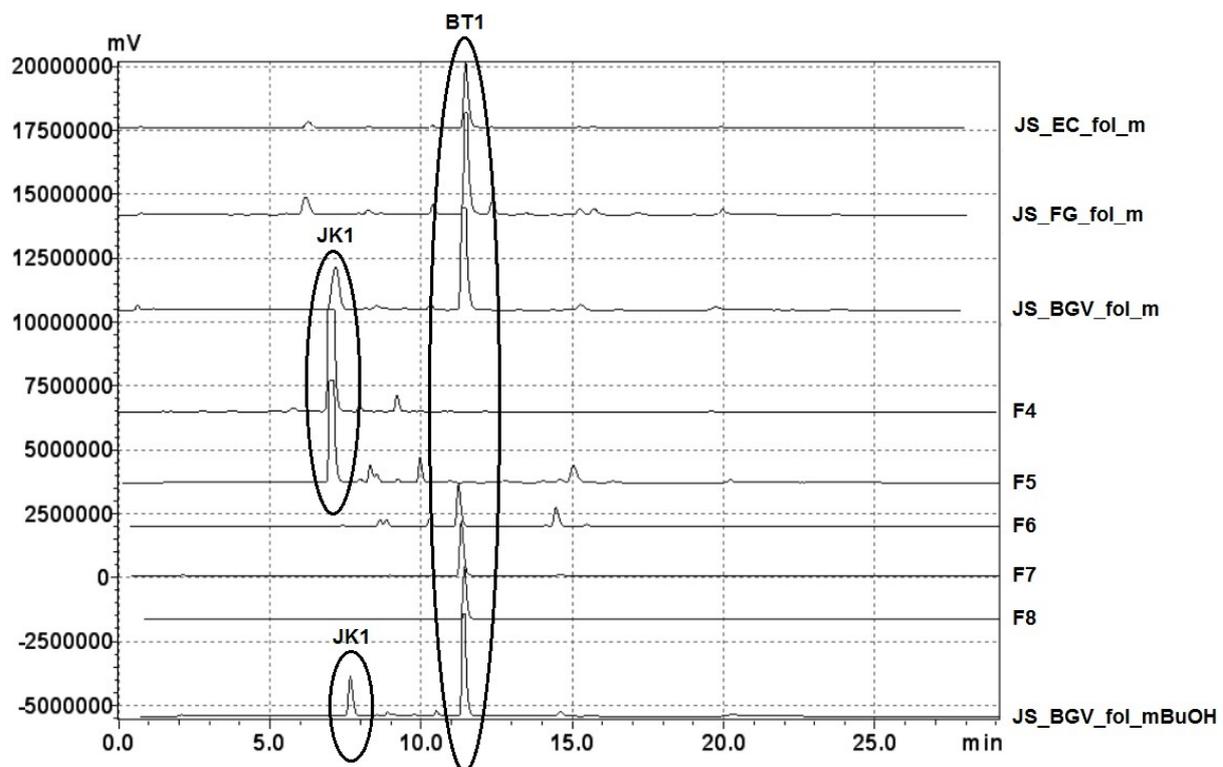


Abb. 34: Analyse der Sephadexfraktionen F4-F8 (Abbildung 9, Seite 11) aus JS\_BGV\_fol\_mBuOH (Abbildung 6, Seite 8) mittels HPLC und der Methode Acclaim 1 (Tabelle 5, Seite 16, 17)

### 3.2.4 Beiträge zur Struktur des Flavonoides JK1 durch NMR

Um genauere strukturelle Aussagen über **JK1** treffen zu können, wurde die Kernresonanzspektroskopie eingesetzt. Hierzu wurde auf einem Bruker Avance 500 NMR spectrometer (UltraShield) ein Serie von NMR-Experimenten von der mittels Größenausschlusschromatographie gewonnenen Fraktion **F4** (Abbildung 9, Seite 11), die das Flavonoid **JK1** beinhaltet, aufgenommen. Die hier angewandte Vorgehensweise und die Parameter der NMR-Anlage sind im Kapitel 2.4.2, Tabelle 10, Seite 25 vermerkt. Tabelle 12 beinhaltet alle  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Verschiebungen, die bei der Vermessung der Fraktion **F4** mittels HSQC-Experiments ermittelt wurden. Die dazugehörigen Spektren des HSQC- (Abbildungen 35-40, Seite 63-65) als auch des durchgeführten COSY-Experiments (Abbildungen 41-44, Seite 66-67) befinden sich im Anhang.

**Tab. 12:  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Verschiebungen auf Basis des HSQC-Experiments (Vermessung der Fraktion F4, die JK1 beinhaltet in dMeOH, Anhang, Abbildungen 35-40, Seite 63- 65)**

Fraktion F4		
dMeOH	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
CH	7,69	123,21
CH	7,71	117,02
CH	6,87	115,69
CH	6,21	99,65
CH	6,42	94,59
CH	4,68	105,02
CH	5,20	103,72
CH	5,29	99,87
CH	5,42	64,08
CH	4,06	104,43
CH	3,41	77,84
CH	3,24	75,64
CH	3,51	75,39
CH	3,21	73,78
CH	3,36	72,10
CH	3,30	71,25
CH <sub>2</sub>	3,65/3,58	69,31
CH	3,91	68,80
CH <sub>2</sub>	3,93/3,73	61,97

Da aus den vorangegangenen MS-Analysen (**Kapitel 3.2.2, Seite 38**) bereits bekannt war, dass es sich um ein hydroxyliertes Luteolinderivat, verknüpft mit einem Disaccharid handelt, wurde anhand der chemischen Verschiebungen (**Abbildungen 35-44, Seite 63-67**) versucht, die Position der Zuckerkette als auch der Hydroxylgruppe zu ermitteln. Da die Probe jedoch nicht die erwartete Reinheit aufwies, konnte die Verknüpfungsposition der Zuckerkette aufgrund des zu starken Grundlinienrauschens nicht bestimmt werden. Im HSQC-Experiment (**Abbildungen 35-40, Seite 63-65**) sind neben den Signalen der CH- und CH<sub>2</sub>-Gruppen der Zucker, deren Protonen eine geringere chemische Verschiebung aufweisen, auch fünf Signale, deren Protonen eine chemische Verschiebung im Aromatenbereich

aufweisen und somit höchstwahrscheinlich dem Flavon-Grundgerüst zugeordnet werden können. Dieses Ergebnis unterstützt auch den Verdacht der MS-Analyse, dass es sich um ein hydroxyliertes Luteolinderivat handelt, da sonst wie bei den Luteolinderivaten **BT1** und **BT10** sechs Signale im aromatischen Bereich zu erwarten wären. Um zu klären, an welcher der sechs möglichen Positionen (3, 6, 8, 2', 5', 6') sich die Hydroxylgruppe befindet, wurden die chemischen Verschiebungen der CH-Signale mit denen der entsprechenden Derivate, soweit diese in der bestehenden Literatur gefunden wurden, verglichen. Aufgrund der guten Übereinstimmungen der chemischen Verschiebungen mit den Literaturdaten (**Tabelle 13, Seite 4**) für Quercetin (**Abbildung 45**) liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei dem Grundgerüst von **JK1** um ein Quercetinderivat handeln könnte. Die Substitutionspositionen der Zuckerkette bleibt offen.

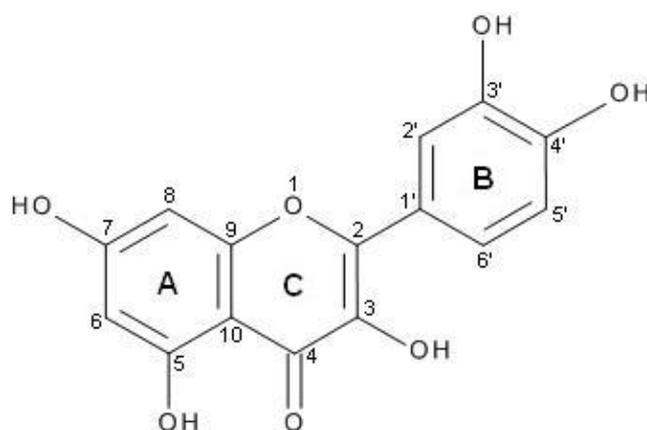


Abb. 45: Quercetin

Tab. 13: Literaturvergleich;  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Verschiebungen von Quercetin (Vermessung in dMeOH) [13-15]

Position	JK1 (d-MeOH)		Quercetin (d-MeOH) [13]		Quercetin (d-MeOH) [14]		Quercetin (d-MeOH) [15]	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
6	6,21	99,7	6,18	99,2	6,18	97,9	6,18	-
8	6,42	94,6	6,39	94,4	6,38	93,0	6,40	-
2'	7,71	117,0	7,73	116,2	7,73	114,6	7,67	-
5'	6,87	115,7	6,88	116,0	6,88	114,9	6,88	-
6'	7,69	123,2	7,63	121,7	7,63	120,3	7,54	-

### 3.2.5 Flavonoidmustervergleich und Prüfung von *J. secunda* Herbarbelegen mittels HPTLC

Um zu prüfen, ob **JK1** (**Abbildung 25, Seite 36**) aus **JS\_BGV\_fol\_m** (**Abbildung 25, Seite 36**) möglicherweise auch in anderen als *J. secunda* deklarierten Blattmaterialien vorkam, wurde weiteres Blattmaterial von 19 Herbarbelegen aus verschiedenen Ländern herangezogen (**Tabelle 2, Seite 59**). Diese wurden, wie auch schon **JS\_EC\_fol\_m**, **JS\_FG\_fol\_m** und **JS\_BGV\_fol\_m**, methanolisch extrahiert (**Abbildung 5, Seite 8**) und deren Fingerprint mittels CAMAG-HPTLC-Anlage (**Tabelle 6, Seite 20**) im System 3 und anschließender Derivatisierung mit Naturstoffreagenz A (**Tabelle 7, Seite 21**) erstellt. Durch die Software VisoinCats (**Tabelle 6, Seite 20**) konnte eine Zusammenstellung der Fingerprints der 22 Blattmaterialien, die auf verschiedenen DC-Platten entwickelt wurden, generiert werden. Hierbei wurde ersichtlich, dass die Fingerprints von *J. secunda* je nach Herkunft eine große Variabilität aufwiesen. Dennoch konnte eine Einteilung in drei Gruppen vorgenommen werden (**Abbildung 46, Seite 48**). Die erste Gruppe zeigt vierzehn Fingerprints, die alle das Hauptflavonoid **BT1** beinhalten (**Abbildung 47, Seite 48**). Anhand des Fingerprints von **JS\_EC\_fol\_m**, der auf Bahn eins und Bahn zwei von links angeführt ist, erkennt man, dass die mit Naturstoffreagenz A nachgewiesenen Flavonoidbanden je nach Einwirkdauer des Derivatisierungsreagenz von gelb bis orange gefärbt sein können, was jedoch für die Auswertung der Fingerprints keine Rolle spielt. In die zweite Gruppe fallen jene Fingerprints, die neben **BT1** auch noch **JK1** beinhalten (**Abbildung 48, Seite 49**). Die Fingerprints der dritten Gruppe enthalten weder **BT1** noch **JK1** (**Abbildung 49, Seite 49**). Die Diskussion dieser Ergebnisse erfolgt im **Kapitel 4, Diskussion**.

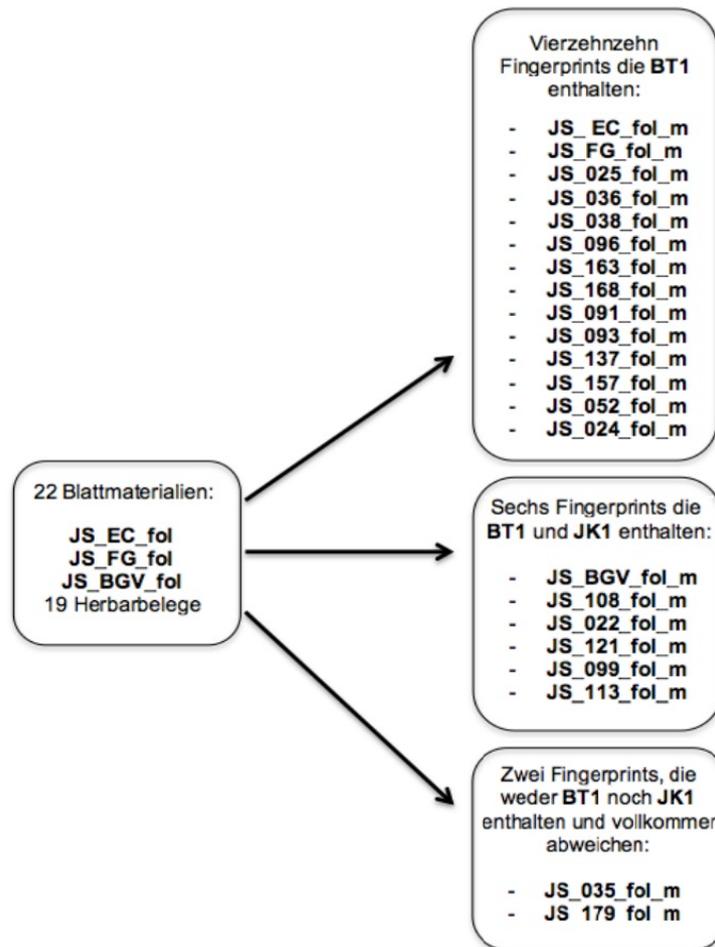


Abb. 46: Einteilung der mittels CAMAG-HPTLC-Anlage (Tabelle 6, Seite 20) in System 3 entwickelten und mit Naturstoffreagenz A derivatisierten (Tabelle 7, Seite 21) Fingerprints von *J. secunda* in drei Gruppen

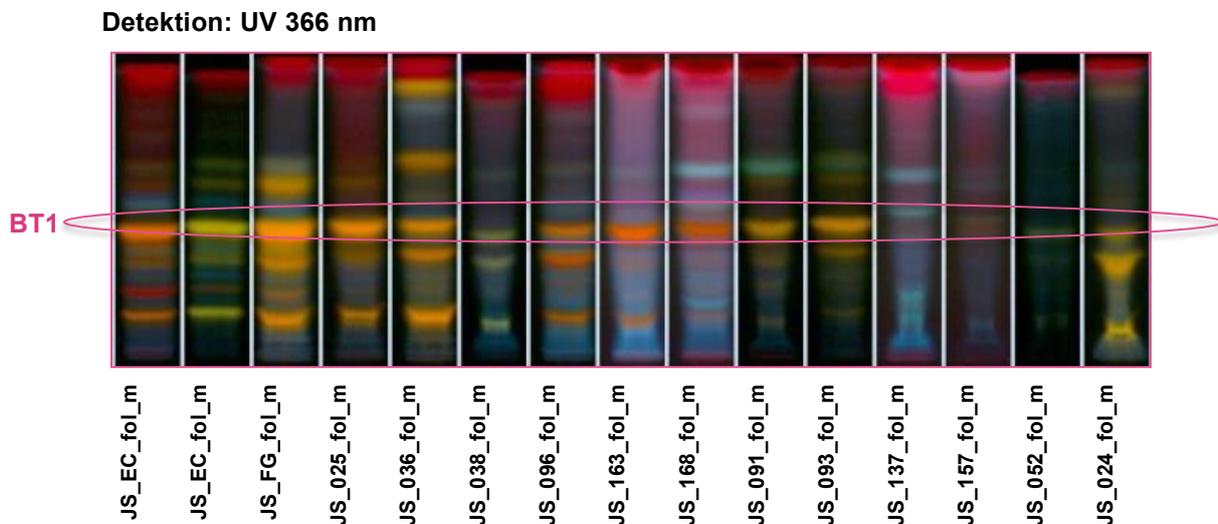
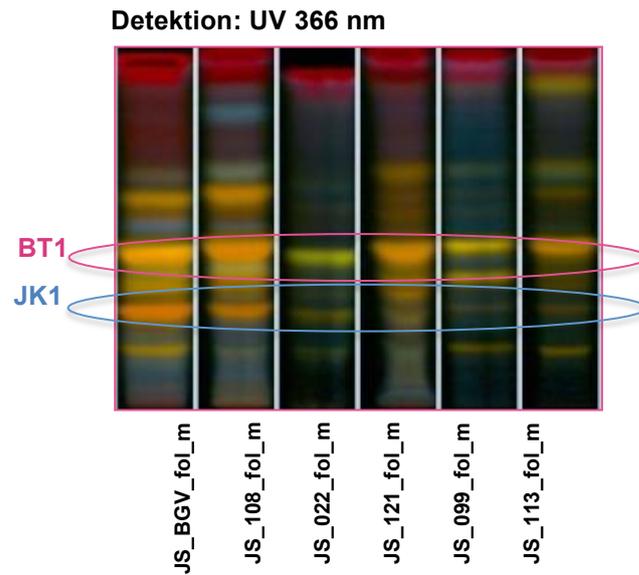


Abb. 47: Analyse der methanolisch extrahierten Blattmaterialien (Abbildung 5, Seite 8) mittels HPTLC (Tabelle 6, Seite 20) entwickelt in System 3 und derivatisiert mit Naturstoffreagenz A (Tabelle 7, Seite 21);  
 Gruppe 1: Fingerprints die BT1 enthalten



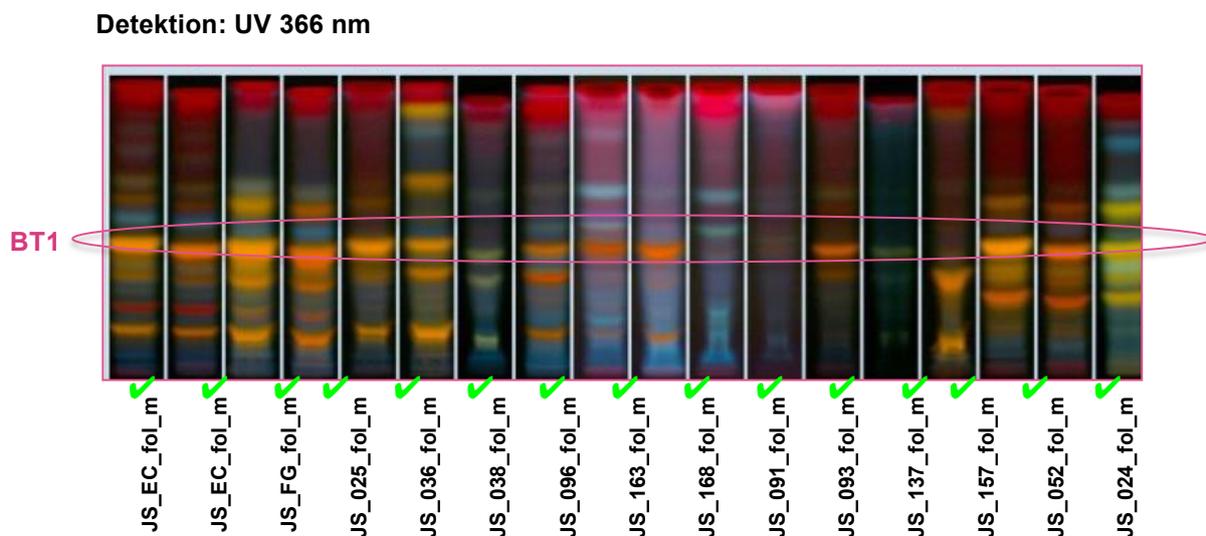
**Abb. 48:** Analyse der methanolisch extrahierten Blattmaterialien (Abbildung 5, Seite 8) mittels HPTLC (Tabelle 6, Seite 20) entwickelt in System 3 und derivatisiert mit Naturstoffreagenz A (Tabelle 7, Seite 21); Gruppe 2: Fingerprints die BT1 und JK1 enthalten



**Abb. 49:** Analyse der methanolisch extrahierten Blattmaterialien (Abbildung 5, Seite 8) mittels HPTLC (Tabelle 6, Seite 20) entwickelt in System 3 und Derivatisiert mit Naturstoffreagenz A (Tabelle 7, Seite 21); Gruppe 3: Fingerprints die weder BT1 noch JK1 enthalten

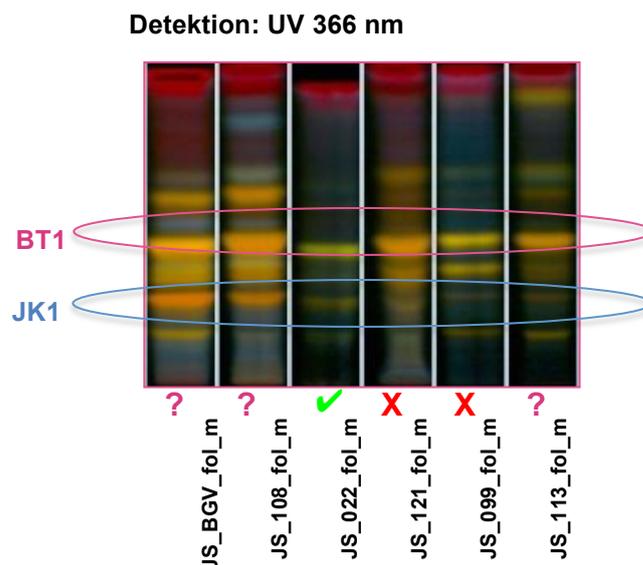
## 4 Diskussion

In diesem Kapitel soll ein Zusammenhang zwischen den Ergebnisse der phytochemischen Fingerprints des Blattmaterials (**Kapitel 3.2.6, Abbildung 47-49, Seite 48-49**) und den mikroskopischen Ergebnissen bereits vorangegangener Diplomarbeiten [16-19] hergestellt werden. In diesen Arbeiten wurde das Pflanzenmaterial aus Ecuador (**JS\_EC**), Französisch Guyana (**JS\_FG**), Venezuela (**JS\_BGV**) (**Tabelle 1, Seite 4**) sowie der 19 Herbarbelege (**Tabelle 2, Seite 59**), mit Augenmerk auf die Blätter und Blüten beurteilt. Proben die aufgrund charakteristischer Identifizierungsmerkmale [16-19] mit Sicherheit als *J. secunda* eingestuft werden konnten, wurden in den folgenden Abbildungen mit einem Häkchen (✓) markiert. Proben, bei den sich die Arbeitsgruppe uneinig war, wurden mit einem Fragezeichen (?) versehen und jene Proben, die definitiv als *J. secunda* ausgeschlossen werden konnten, obwohl sie als diese deklariert waren, wurden mit einem Kreuz (X) markiert. Betrachtet man die Gruppe an Fingerprints, die nur das Hauptflavonoid **BT1** (**Abbildung 49, Seite 48**) enthielten und vergleicht diese mit den mikroskopischen Ergebnissen, so fällt auf, dass all diese Proben zweifellos als *J. secunda* eingestuft und daher mit einem Häkchen „✓“ versehen wurden (**Abbildung 50**).



**Abb. 50:** Analyse der methanolisch extrahierten Blattmaterialien (**Abbildung 5, Seite 8**) mittels HPTLC (**Tabelle 6, Seite 20**) entwickelt in System 3 und derivatisiert mit Naturstoffreagenz A (**Tabelle 7, Seite 21**);  
 Gruppe 1: Fingerprints die BT1 enthalten und Vergleich mit den mikroskopischen Ergebnissen der Diplomarbeiten [16-19]

Die zweite Gruppe, in die sechs Fingerprints fielen, wies neben **BT1** auch **JK1** auf (**Abbildung 29, Seite 49**). Interessant ist, dass die mikroskopische Analyse der jeweiligen Blattmaterialien (**Tabelle 1, Seite 4**) der Fingerprints von **JS\_BGV\_fol\_m**, **JS\_108\_fol\_m** und **JS\_113\_fol\_m** (**Abbildung 5, Seite 8**) eine eindeutige Zuordnung zu *J. secunda* in Zweifel stellte. Ein auffälliges Merkmal ist z.B. die verstärkte Blattbehaarung. Alle drei Fingerprints wurden daher in **Abbildung 51** mit einem Fragezeichen „?“ versehen. Bei den Untersuchungen der Blattmaterialien der Fingerprints von **JS\_121\_fol\_m** und **JS\_099\_fol\_m** (**Abbildung 5, Seite 8**) wurde aufgrund der mikroskopischen Ergebnisse eine Zugehörigkeit zu dieser Art ausgeschlossen und diese daher in der **Abbildung 51** mit einem Kreuz „X“ markiert. **JS\_022\_fol\_m** ist der einzige Fingerprint, der **BT1** und **JK1** aufwies und aufgrund der mikroskopischen Analyse als *J. secunda* eingestuft wurde. Er ist daher in **Abbildung 51** mit einem Häkchen „✓“ markiert. Allerdings fehlen hier die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Pollen, die ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal bei den mikroskopischen Untersuchungen in den Diplomarbeiten von [16-19] darstellten.



**Abb. 51:** Analyse der methanolisch extrahierten Blattmaterialien (**Abbildung 5, Seite 8**) mittels HPTLC (**Tabelle 6, Seite 20**) entwickelt in System 3 derivatisiert mit Naturstoffreagenz A (**Tabelle 7, Seite 21**);  
**Gruppe 2:** Fingerprints die **BT1** und **JK1** enthalten und Vergleich mit den mikroskopischen Ergebnissen der Diplomarbeiten [16-19]

Die Proben **JS\_035\_fol\_m** und **JS\_179\_fol\_m** (**Abbildung 5, Seite 8**) wiesen keine der als charakteristisch erarbeiteten mikroskopischen Merkmale [16-19] von *J.*

*secunda* auf und wurden daher definitiv als *J. secunda* ausgeschlossen. Dies wurde auch durch die in **Abbildung 52** dargestellten Fingerprints bestärkt, die keinerlei Ähnlichkeit mit den anderen Fingerprints aufwiesen.

Detektion: UV 366 nm



**Abb. 52:** Analyse der methanolisch extrahierten Blattmaterialien (Abbildung 5, Seite 8) mittels HPTLC (Tabelle 6, Seite 20) entwickelt in System 3 derivatisiert mit Naturstoffreagenz A (Tabelle 7, Seite 21);  
**Gruppe 2:** Fingerprints die BT1 und JK1 enthalten und Vergleich mit den mikroskopischen Ergebnissen der Diplomarbeiten [16-19]

Aufgrund der Ergebnisse der Flavonoidanalyse des Blattmaterials ist es daher höchst fragwürdig, ob alle als *J. secunda* deklarierten Herbarbelege (**Tabelle 2, Seite 59**), tatsächlich korrekt bestimmt wurden. Auch die Stecklinge, die an die Universität Wien geliefert und vor Ort im Glashaus gezogen wurden (**JS\_BGV; Tabelle 1, Seite 4**), sind möglicherweise falsch als *J. secunda* ausgewiesen. Womöglich ist das Flavonoid **JK1** spezifisch für eine andere, sehr ähnlich aussehende *Justicia* Art. Bei jenen Blattmaterialien, die sowohl **BT1** als auch **JK1** enthalten (**Abbildung 48, Seite 49**), könnte somit eine Mischform zweier *Justicia* Arten vorliegen. Um in Zukunft mikroskopische Untersuchungen an *J. secunda* zu unterstützen, könnte in unklaren Fällen aufgrund des Vorhandenseins von **JK1** im phytochemischen Fingerprint, eine Zugehörigkeit zu *J. secunda* ausgeschlossen werden. Es ist daher von größtem Interesse, die bisher vorgenommene strukturelle Charakterisierung (**Kapitel 3.2.2** und **Kapitel 3.2.5**) von **JK1** zu vervollständigen. Um zu klären, an welcher Stelle des vermuteten Quercetinaglycons das Disaccharid verknüpft ist, müsste eine neuerliche NMR-Messung durchgeführt werden. Dazu müsste **JK1** aus

Fraktion **F4** mittels semipräparativer HPLC (**Kapitel 2.3.2, Seite 18**) isoliert werden, um die Substanz in ausreichend hoher Reinheit zu gewinnen. Andererseits könnte man auch unter Einsatz von Shiftreagenzien arbeiten. Anhand der typischen Komplexbildungen der freien Hydroxylgruppen mit den Shift-Reagenzien und damit einhergehender Verschiebungen könnte mittels Ausschlussverfahren die Position der Zuckerkette ermittelt werden.

## 5 Zusammenfassung

*J. secunda* VAHL stellt aufgrund ihres weitreichenden Anwendungsspektrums in der traditionellen Medizin vieler indigener Völker ein interessantes Forschungsgebiet dar. Wässrige Extrakte der Blätter werden ethnopharmakologisch bei Amenorrhoe, Bluthochdruck, zur Therapie von Anämie und Sichelzellenanämie, sowie zur Senkung des Blutzuckerspiegels angewendet.

Durch vorangegangene Arbeiten auf diesem Gebiet in Ergänzung zur Dissertation von Barbara Theiler war bereits bekannt, dass die Farbstoffe, die den wässrigen Auszügen ihre charakteristische Färbung verleihen, äußerst instabil sind. Daher wurde dem Abbau derer nachgegangen. Aufgrund der durchgeführten Stabilitätstests und begleitenden HPLC-Analysen wird vermutet, dass die Farbstoffe bei Lagerung unter Raumtemperatur (22°C) und partieller Sonnenlichtexposition in eine Vielzahl von verschiedenen Abbauprodukten zerfallen. Eine Identifizierung der einzelnen Produkte im Rahmen dieser Diplomarbeit gelang nicht.

Ebenfalls untersucht wurden die methanolischen Auszüge von *J. secunda*, in welchen sich vor allem Flavonoide anreichern. Durch einen HPTLC-Fingerprint-Vergleich von *J. secunda* Herbarbelegen aus vielen Regionen der Welt stellte sich heraus, dass es ein für *J. secunda* typisches Flavonoid gibt, welches in dieser Arbeit als **BT1** bezeichnet wird und zur Charakterisierung herangezogen werden kann. Darüberhinaus konnte ein bisher in *J. secunda* noch unbekanntes Flavonoid isoliert werden, das möglicherweise einer anderen Art zugeordnet werden kann und somit ein Differenzierungsmerkmal zu *J. secunda* darstellt. Hierbei handelt es sich anhand der Massenspektrometrie- und NMR-Ergebnisse vermutlich um ein Quercetinaglycon, verknüpft mit einem Disaccharid, bestehend aus je einer Hexose und Pentose.

## 6 Abstract

Due to the wide range of applications in the traditional medicine of many indigenous folks, *J. secunda* VAHL is an interesting area of research. The aqueous extracts of the leaves are ethnopharmacologically used against amenorrhea, high blood pressure, treatment of anaemia, sickle cell anaemia and also to lower high blood sugar levels.

Previous work on this topic contributing to the thesis of Barbara Theiler had shown that the natural dyes, which are responsible for the characteristic colour of the aqueous extracts are extremely unstable. Therefore their degradation was examined. It happened that it is not possible to detect a single decomposition product. Based on stress tests with light and the corresponding HPLC analyses, it is most likely that there are a number of different products, which makes it hard to identify any of them.

I also dealt with the methanolic extracts of *J. secunda* which are rich in flavonoids. Because of the HPTLC fingerprint comparison of *J. secunda* voucher specimens from different countries I came to the conclusion that there is a characteristic flavonoid pattern that belongs to this species. Moreover a yet unknown flavonoid (JK1) was isolated, which probably belongs to another *Justicia* species and might serve as essential distinguishing feature of differentiation between *J. secunda* and other species. Mass spectrometry and NMR results showed that it is probably a quercetin aglycon linked to a disaccharide consisting of a hexose and a pentose.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Theiler B., Revoltella S., Zehl M., Dangl C., Espinoza Caisa L. O., König J., Winkler J., Urban E., Glasl S. (2014), Secundarellone A, B, and C from the leaves of *J. secunda* VAHL, *Phytochemical Letters*, 10: cxxix-cxxxxii
- [2] Woodson R. E., Schery R. W., Durkee L. H. (1978), *Flora of Panama*, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 65 (1): 224-225
- [3] Wong W. (1976), Some folk medicinal plants from Tinidad, *Economic Botany*, 30: 103-142
- [4] Mpiana P. T., Ngbolua K. N. N., Bokota M. T., Kasonga T. K., Atibu E. K., Tshibangu D. S. T., Mudogo V. (2010), In vitro effects of anthocyanin extracts from *J. secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes, *Blood Transfusion*, 8 (4): 248-254
- [5] Manda P., Abrogoua D. P., Bahi C., Dano D. S., Gnahoui G., Kablan B. J. (2011), Evaluation of the antihypertensive activity of total aqueous extract of *J. secunda* Vahl (Acanthaceae), *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5 (16): 1838-1845
- [6] Mahabir, D., Gulliford, M. C. (1997), Use of medicinal plants for diabetes in Trinidad and Tobago. *Pan American Journal of Public Health*, 1 (3): 174-178
- [7] Theiler B., Dissertation, Univ. Wien, in Vorbereitung
- [8] Böcker J., (1997), *Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese*, 1. Auflage, Vogel Buchverlag, Würzburg
- [9] Istvanits S., (2014), *Phytochemische Untersuchungen der wasserlöslichen Anteile eines Methanolextraktes aus Justicia secunda VAHL (Acanthaceae)*
- [10] Hesse M., Meier H., Zeeh B., (2005), *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. Auflage, Thieme, Stuttgart
- [11] Lueger L., (2013), *Phytochemische Untersuchungen wässriger Extrakte von Justicia secunda VAHL (Acanthaceae)*, Universität Wien

- [12] Koffi E. N, Le Guernevéc C., Lozanoa P. R., Meudecc E., Adjéd F. A., Bekrob Y. A., Lozanoa Y. F. (2013), Polyphenol extraktion and characterization of *J. secunda* Vahl leaves for traditional medicinal use, *Industrial Corps and Products*, 49: 682-689
- [13] Van der Horst M. A., Hartog A. F., El Morabet R., Marais A., Kircz M., Wever R. (2015), Enzymatic Sulfation of Phenolic Hydroxy Groups of Various Plant Metabolites by an Arylsulfotransferase, *European Journal of Organic Chemistry*, 3: 534-541
- [14] Chen Z., Liu Y.-M., Yang S., Song B.-A., Xu G.-F., Bhadury P. S., Jin L.-H., Hu D.-Y., Liu F., Xue W., Z X. (2008), Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* (L) Meeb, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16: 1337-1344
- [15] Penso J., Cordeiro K. C. F. A., da Cunha C. R. M, da Silva Castro P. F., Martins D. R., Lião L. M., Rocha M. L., de Oliveira V. (2014), Vasorelaxant activity of 7- $\beta$ -O-glycosides biosynthesized from flavonoids, *European Journal of Pharmacology*, 733: 75-80
- [16] Eberlberger J., Diplomarbeit in Vorbereitung, Universität Wien
- [17] Klutz E., Diplomarbeit in Vorbereitung, Universität Wien
- [18] Laufer S., Diplomarbeit in Vorbereitung, Universität Wien
- [19] Putzer I., (2015), Morphologische und anatomische Untersuchungen an Blütenelementen von *Justicia secunda* VAHL (Acanthaceae), Universität Wien

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und Ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

## 8 Anhang

## Abkürzungsverzeichnis

<b>CID</b>	Collision-induced dissociation; Kollisionsinduzierte Dissoziation
<b>COSY</b>	Correlated spectroscopy
<b>DC</b>	Dünnschichtchromatographie
<b>DAD</b>	Diode Array Detector; Diodenarray-Detektor
<b>ELSD</b>	Evaporative Light Scattering Detector; Lichtstreuendetektor
<b>ESI</b>	Electrospray-Ionization; Elektrospray Ionisation
<b>F0</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; enthielt Zucker
<b>F1</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; enthielt Zucker
<b>F2</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; enthielt Zucker
<b>F3</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; enthielt Zucker
<b>F4</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; enthielt JK1
<b>F5</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; enthielt JK1
<b>F6</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; enthielt BT1
<b>F7</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; enthielt BT1
<b>F8</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; enthielt BT1
<b>F9</b>	Durch Aufreinigung von JS_fol_mBuOH an Sephadex LH 20 entstanden; Nachlauf
<b>GD1</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1-3 an Kieselgel entstanden
<b>GD2</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1-3 an Kieselgel entstanden
<b>GD3</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1-3 an Kieselgel entstanden
<b>GD4</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1-3 an Kieselgel entstanden
<b>GD5</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1-3 an Kieselgel entstanden
<b>GD6</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1-3 an Kieselgel entstanden
<b>GD7</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1-3 an Kieselgel entstanden
<b>GD8</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1-3 an Kieselgel entstanden; wurde für weitere Aufreinigungsschritte herangezogen
<b>GD8a</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion GD8 an Kieselgel entstanden
<b>GD8b</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion GD8 an Kieselgel entstanden
<b>GD8c</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion GD8 an Kieselgel entstanden
<b>GD8d</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion GD8 an Kieselgel entstanden
<b>GD9</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1-3 an Kieselgel entstanden
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatographie (=Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
<b>HPTLC</b>	High performance thinlayer chromatographie (=Hochleistungsdünnschichtchromatographie)
<b>HRESIMS</b>	High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry
<b>HSQC</b>	Heteronuclear single quantum coherence
<b>JS</b>	<i>Justicia secunda</i> VAHL
<b>JS1</b>	Erste Fraktion des wässrig extrahierten Kelchmaterials JS_FG_cal bei 20°C
<b>JS1-1</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1 an Sephadex LH 20 entstanden
<b>JS1-2</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1 an Sephadex LH 20 entstanden
<b>JS1-3</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1 an Sephadex LH 20 entstanden; wurde aufgrund der vielversprechenden violettFärbung für weitere Aufreinigungsschritte herangezogen
<b>JS1-4</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1 an Sephadex LH 20 entstanden

<b>JS1-5</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1 an Sephadex LH 20 entstanden
<b>JS1-6</b>	Durch Aufreinigung der Fraktion JS1 an Sephadex LH 20 entstanden
<b>JS2</b>	Zweite Fraktion des wässrig extrahierten Kelchmaterials JS_FG_cal bei 20°C
<b>JS3</b>	Dritte Fraktion des wässrig extrahierten Kelchmaterials JS_FG_cal bei 20°C
<b>JS4</b>	Vierte Fraktion des wässrig extrahierten Kelchmaterials JS_FG_cal bei 50°C
<b>JS5</b>	Fünfte Fraktion des wässrig extrahierten Kelchmaterials JS_FG_cal bei 50°C
<b>JS_BGV</b>	Aus Venezuela stammendes Pflanzenmaterial von <i>J. secunda</i>
<b>JS_BGV_fol</b>	Aus Venezuela stammendes Blattmaterial von <i>J. secunda</i>
<b>JS_BGV_fol_m</b>	Aus Venezuela stammendes Blattmaterial von <i>J. secunda</i> , welches methanolisch extrahiert wurde
<b>JS_BGV_fol_mBuOH</b>	Durch Ausschütteln des methanolischen Extraktes mit Butanol erhaltene Phase
<b>JS_EC</b>	Aus Ecuador stammendes Pflanzenmaterial von <i>J. secunda</i>
<b>JS_EC_fol</b>	Aus Ecuador stammendes Blattmaterial von <i>J. secunda</i>
<b>JS_EC_fol_m</b>	Aus Ecuador stammendes Blattmaterial von <i>J. secunda</i> , welches methanolisch extrahiert wurde
<b>JS_FG</b>	Aus Französisch Guyana stammendes Pflanzenmaterial von <i>J. secunda</i>
<b>JS_FG_cal</b>	Aus Französisch Guyana stammendes Kelchmaterial von <i>J. secunda</i>
<b>JS_FG_fol</b>	Aus Französisch Guyana stammendes Blattmaterial von <i>J. secunda</i>
<b>JS_FG_fol_m</b>	Aus Französisch Guyana stammendes Blattmaterial von <i>J. secunda</i> , welches methanolisch extrahiert wurde
<b>JS-MP</b>	Methanol-Präzipitat, Niederschlag der nach dem Lösen der wässrig extrahierten Fraktion JS1 in Methanol ausgefallen ist.
<b>SC</b>	Column chromatography (=Säulenchromatographie)

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Herbarbelege [9-12]

New York Botanical Garden, New York				
Arbeitsnr.	Belegnr.	Entnahme	Bearbeitung	Beschriftung des Herbarbelegs
<b>JS_022</b>	11202	05.11.2013	Eberlberger & Putzer	VENEZUELA_Vicinity of Duaca, Lara, alt. 725m, in humid forest_Coll. H. Pittier, 23.9.1923_No. 11202_Det. D. Wasshausen, 08-1972
<b>JS_024</b>	20679	05.11.2013	Eberlberger & Putzer	Plants of the West Indies_Trailside herb to 3' tall, flowers deep red. Trail up Mt. Scenery. SABA, NETHERLAND ANTILLES_R. A. & E. S. Howard, 10-16.12.1989_Nr.20679
<b>JS_025</b>	18706	05.11.2013	Eberlberger & Putzer	Arnold Arboretum, Harvard University_Plants of West Indies_Herb to 4' tall, flowers strongly bilabiate, red. Camp Balata, MARTINIQUE_R. A. Howard, 8.3.1978_Nr. 18706

<b>JS_035</b>	429	05.11.2013	Eberberger & Putzer	EX Herb. Mus. Paris._GUYANE FRANCAISE_Leg. [M.] Melinon, 1864_Nr. 429
<b>JS_036</b>	257	17.12.2013	Laufer & Klutz	VENEZUELA_Quebrada de las Comadres, near las Mostazas, Miranda, alt. 1100m, Coll. Allart, 11-1924_Nr. 257_Det. D. Wasshausen, 08-1972
<b>JS_038</b>	95135	17.12.2013	Laufer & Klutz	Ministerio de Agricultura y Cría_VENEZUELA_No. 95135_Herb 1,5m tall, corolla dull red. Estado Sucre: Peninsula de Paria: a lo largo del Rio Grande, entre el pueblo de Rio Grande Arriba y Roma, alt. 50-400m_J. A. Steyermark, 6.3.1966_Det. Wasshausen
<b>JS_052</b>	611	17.12.2013	Laufer & Klutz	Botanic Station Herbarium, BARBADOS, W.I._Herb Nr. 611_Near Dover, xx Coll. Dash [?], 29.10.1906_Det. by M. Meagher, 1972

U.S. National Herbarium, Washington				
Arbeitsnr.	Belegnr.	Entnahme	Bearbeitung	Beschriftung des Herbarbelegs
<b>JS_091</b>	1234696	18.12.2013	Laufer & Klutz	Museum botanicum Hauniense_VENEZUELA_La xxx Caracas_Egger, 1891_Nr. 13498_Det. Lindau
<b>JS_093</b>	1120741	18.12.2013	Laufer & Klutz	VENEZUELA_State of Miranda. Petare and vicinity, near Caracas, alt. 800m. In bushes. xx, flos deep red._H. Pittier, 21
<b>JS_096</b>	2938073	18.12.2013	Laufer & Klutz	Univ. de los Andes, Facultad de Farmacia_L. Ruiz-Terán, L. Ruiz-Pérez, 27.12.1977_No. 14968_VENEZUELA, Edo. Mérida, Dto. Libertador. Caserío San Jacinto, al sur de la ciudad de Mérida. Alt. 1370-1380m_Arbusto sufrutice de 1- 1,3m. Paniculas de cimas terminals de 10-12cm. Caliz verde-azul intenso. Corola

				bilabiada rojo carmine a rojo violáceo.
<b>JS_099</b>	1354346	18.12.2013	Laufer & Klutz	COLOMBIA, Eastern Cordillera Dept. Santander: Vicinity of Charta, alt. 2000m, open hillside. Herb 1,5-2ft, corolla red_E.P. Killip, A.C. Smith, 1-11.2.1927_Nr. 19040_Det. E.C. Leonard: "Justicia filibracteolata Lindau" Det. E.C. Leonard: Justicia sec. Vahl, 25.4.1952_Det. V.W. Smith, 1976
<b>JS_108</b>	3089748	18.12.2013	Laufer & Klutz	COLUMBIA, Cundinamarca, 2km W of Choachi "Justicia filibracteolata Lindau" Corr. J. s. Vahl On a steep, stony, open roadside bank in meadow country, 2100m Long, leggy undershrub 2-3m high. Leaves dark green. Corolla dark brick red. J.R.I. Wood, 10.3.1985_Nr.4738
<b>JS_113</b>	1540019	18.12.2013	Laufer & Klutz	TRINIDAD "Dianthera secunda Griseb. St. John's bush." Blanchisseuse road, xxx, on a bank. Shrubby. Corolla pinkish. W.E. Broadway, 10.11.1929_Nr. 7672_Det. E.C. Leonard, 29.11.1938: Just. sec. Vahl
<b>JS_121</b>	2991623	18.12.2013	Laufer & Klutz	ECUADOR Dr. Gunnar Harling's Fifth Ecuadorian Expedition Nr. 19062_Cotopaxi: Between El Corazón and Pinllopata on road to Angamarca, 1500-1700m. Lax plant, scandent to 2-3m above the ground. Corolla pale red. G. Harling, L. Anderson, 14.5.1980
<b>JS_137</b>	3484964	18.12.2013	Laufer & Klutz	VENEZUELA Estado Carabobo, Distrito Valencia. Cordillera de la Costa: vertiente sur: Antigua Hacienda Aguacatal, propiedad de la Electricidad de Valencia, al oeste de Valencia, Cuenca del Rio Tocuyito, subida pr la carretera de tierra desde El Milagro hasta los diques, sababa y arbustales sec. 980-1050,, 10°11'N 68°07'O Hierba con flores jojizas. W. Meier, P. Borjas, 20.5.2000_No. 7100_ muestras prensadas en alcohol 40-60%_Det. D. Wasshausen, 12-2006

<b>JS_157</b>	3207885	18.12.2013	Laufer & Klutz	Herbario I.R.B.R., Dpto de Biología – Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente_Cumania – VENEZUELA_Cancamure, Dpto. Sucre, Edo. Sucre_Hierba ascendente, flores rojas, crece en suelos arcillosos húmedos, sombríos, Es medicinal NV: Sanguinara_P. Vivenes, 1989_No. 588
<b>JS_163</b>	2639988	18.12.2013	Laufer & Klutz	FRENCH GUIANA_Her. Acad. Rheno-Trai._Vicinity of Saül, forest margin, 200-300m._Herb to 2m tall, corolla pale red._P.J.M.Maas, H. Maas, A.M.W. Mennega, J. Koek-Noormman, 3.11.1974_Nr. 2229_Det. D. Wasshausen, 04- 1977
<b>JS_168</b>	3171689	18.12.2013	Laufer & Klutz	Guianas_FRENCH GUIANA. Saül, Monts La Fumée. 03°40'N 53°10'W. 200-300m. Lowland moist forest with canopy to 45m. Soil red clay. Shrub to 3m, corollas carmin-red._W. Hahn, 24.7.1987_Nr. 3619_Det. W. Hahn, 1987: "Justicia acuminatissima (Miq.) Bremek."_Det. D. Wasshausen, 1999: Justicia sec. Vahl

Herbarium IRD, Cayenne				
Arbeitsnr.	Belegnr.	Entnahme	Bearbeitung	Beschriftung des Herbarbelegs
<b>JS_179</b>	CAY 001131	18.12.2013	Eberlberger & Putzer	Flora of the Guianas; Det. C. Feuillet, 1987; FRENCH GUIANA, Saül region: Trail No.5, 2km SW of Saül, at beginning of trail to Monts Galbao. 3°37'N, 53°12'W; Elev. 206 - 210m; Tropical wet forest; Shrub along trail in full sun, plants to 3 m tall, corollas pink-red; L. Skog and C. Feuillet 7247; With: A. Rossmann; 4 November 1986; US – CAY; Cité dans „Flora of the Guianas“ Series A, Fascicle 23, 145. Acanthaceae. D.C. Wasshausen (2006)

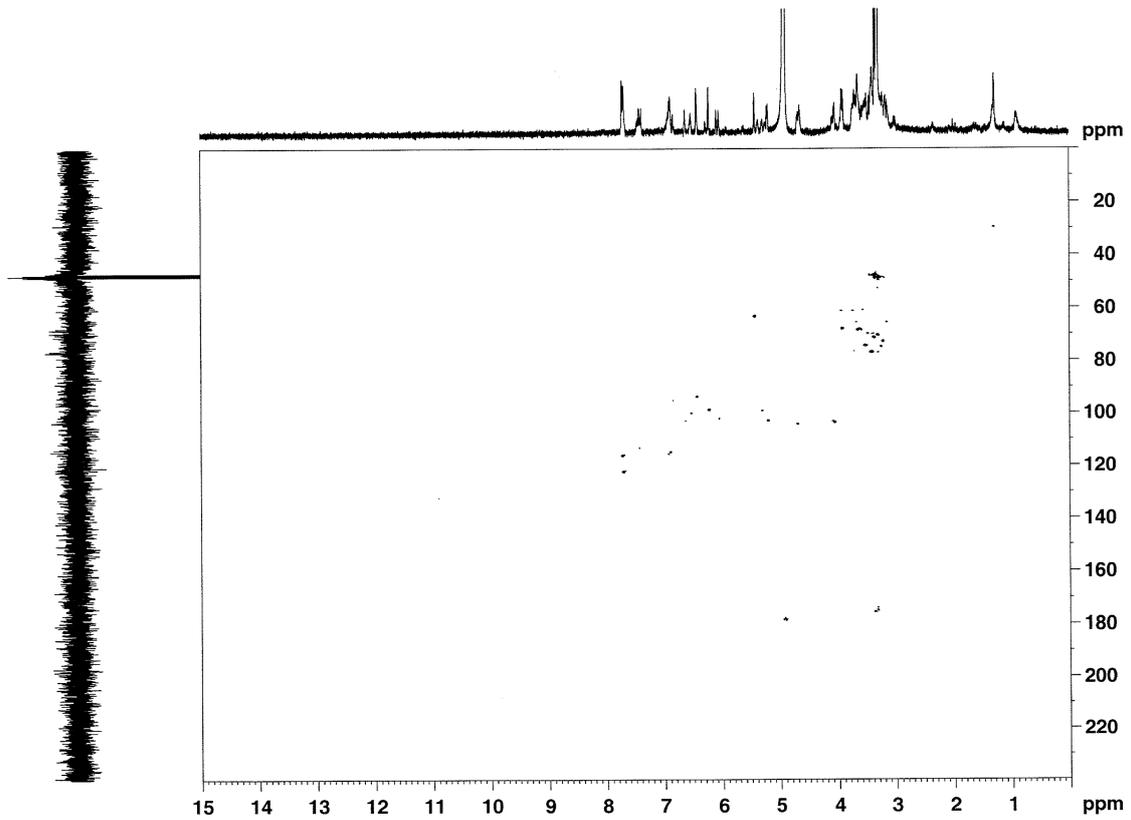


Abb. 35: HSQC-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

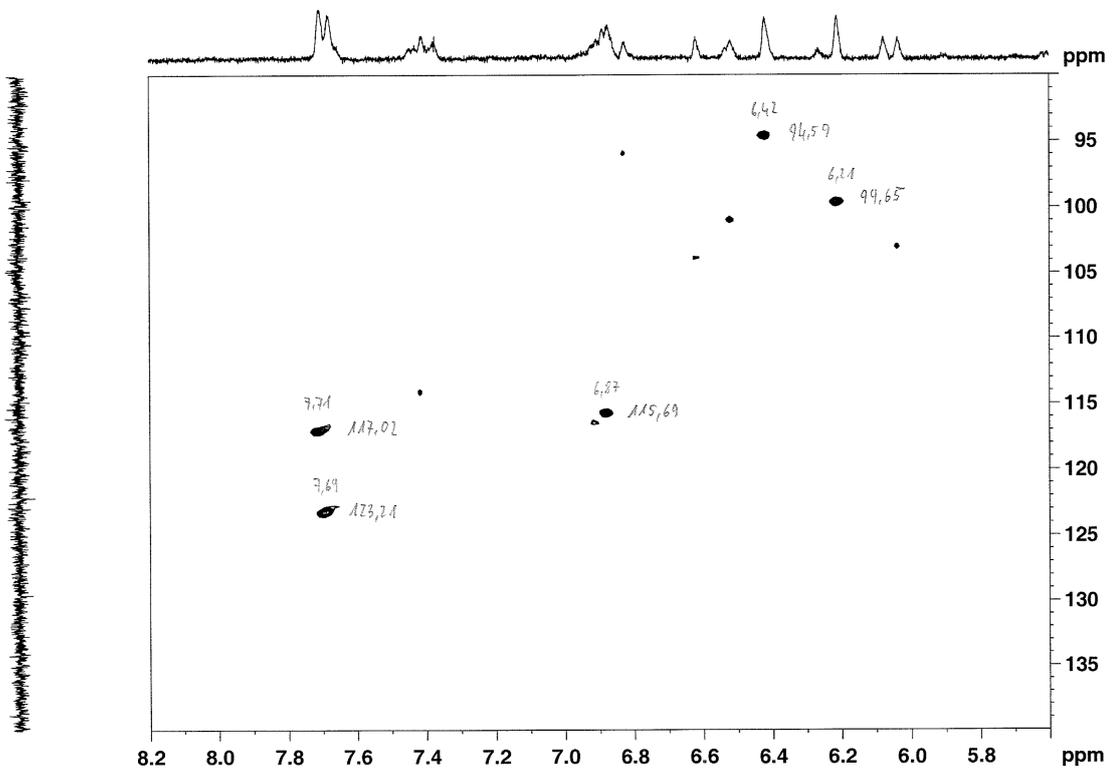


Abb. 36: HSQC-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

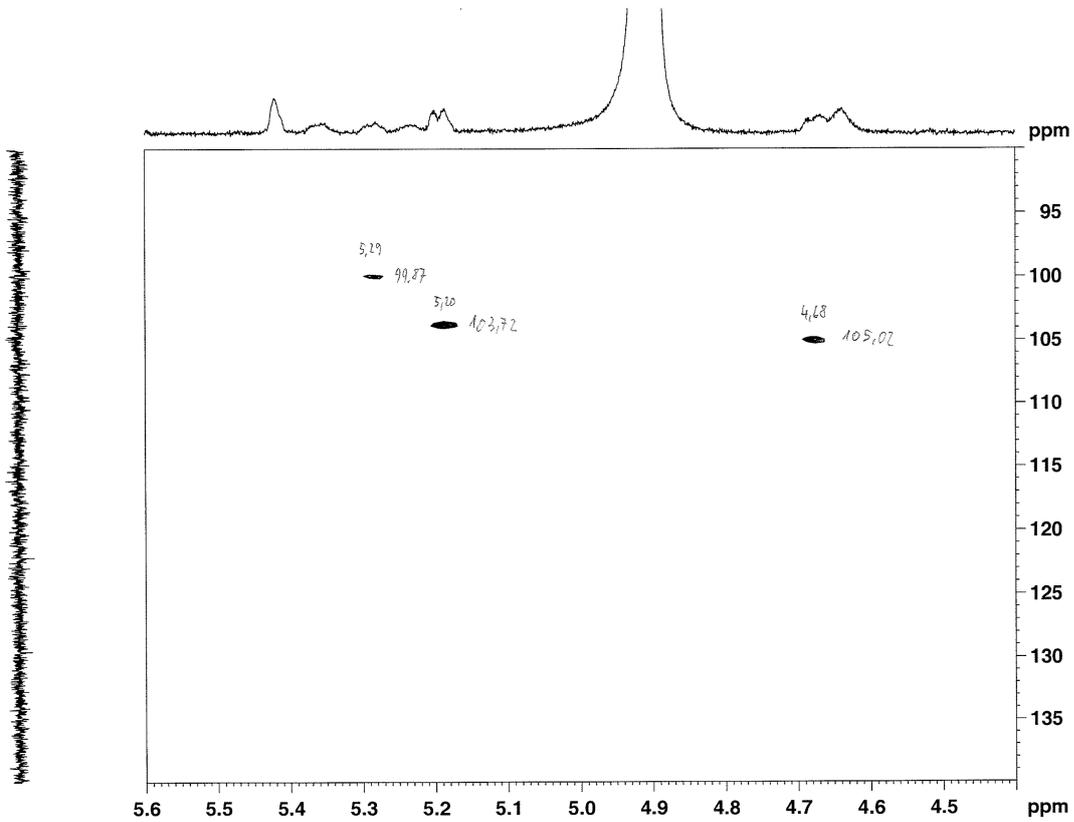


Abb. 37: HSQC-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

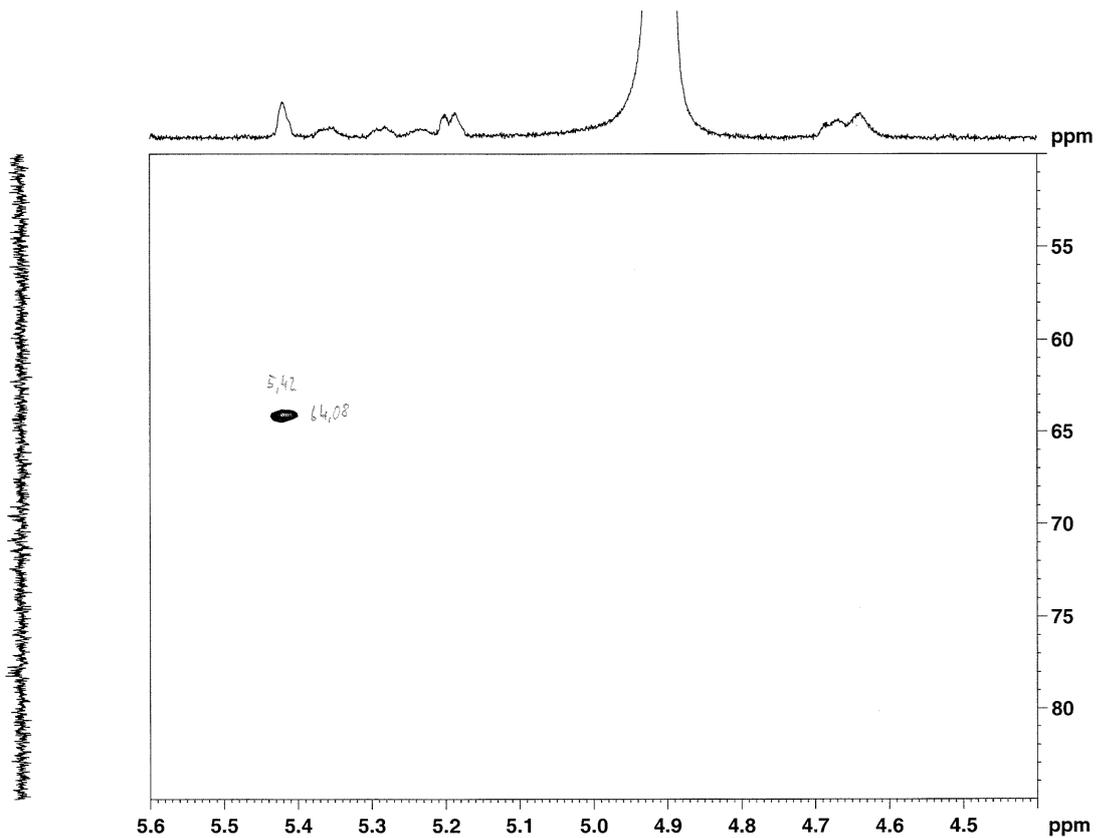


Abb. 38: HSQC-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

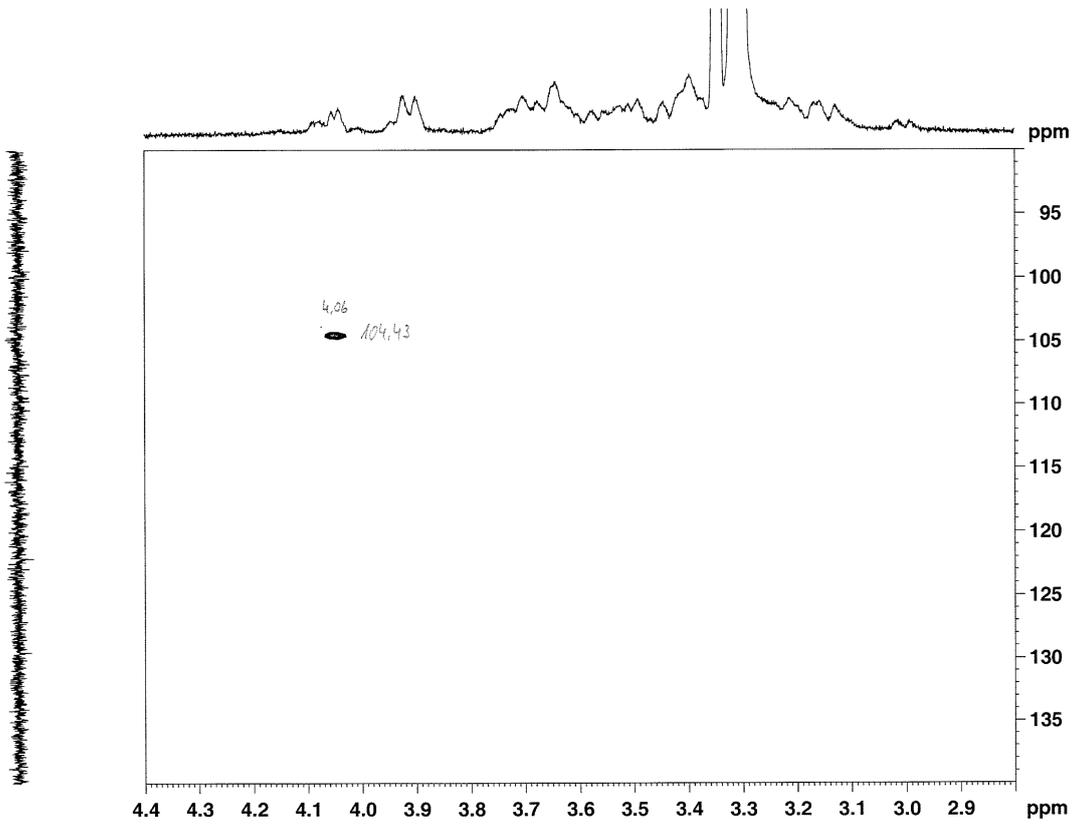


Abb. 39: HSQC-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

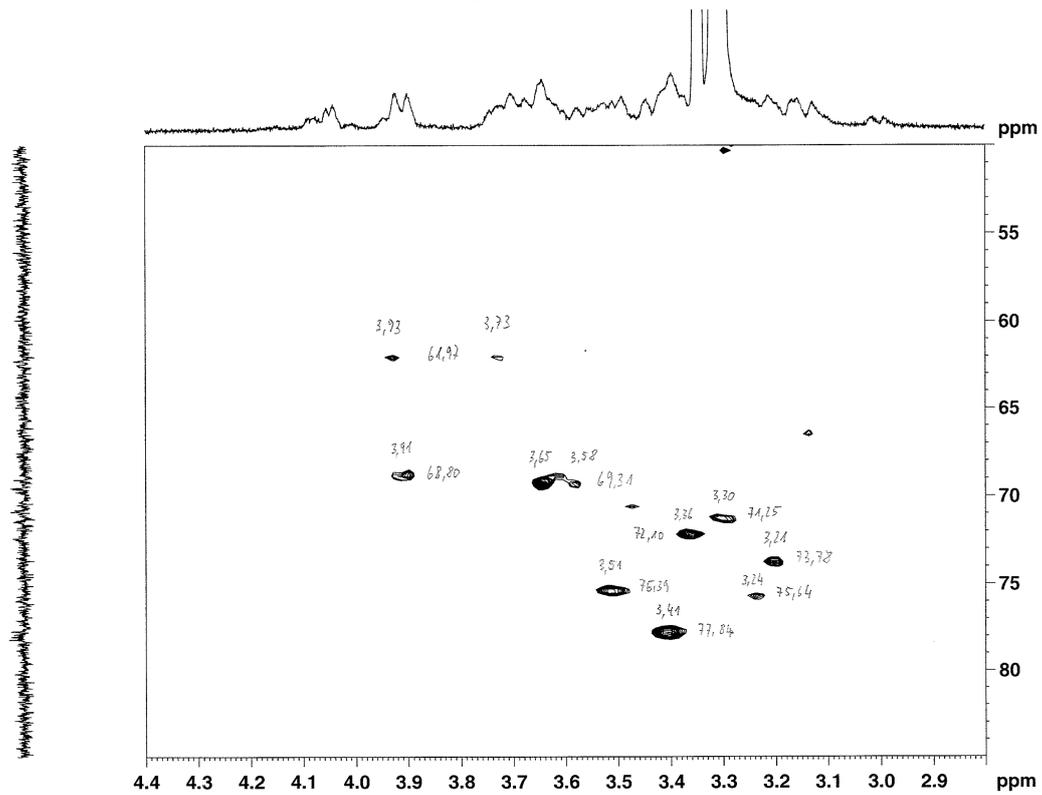


Abb. 40: HSQC-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

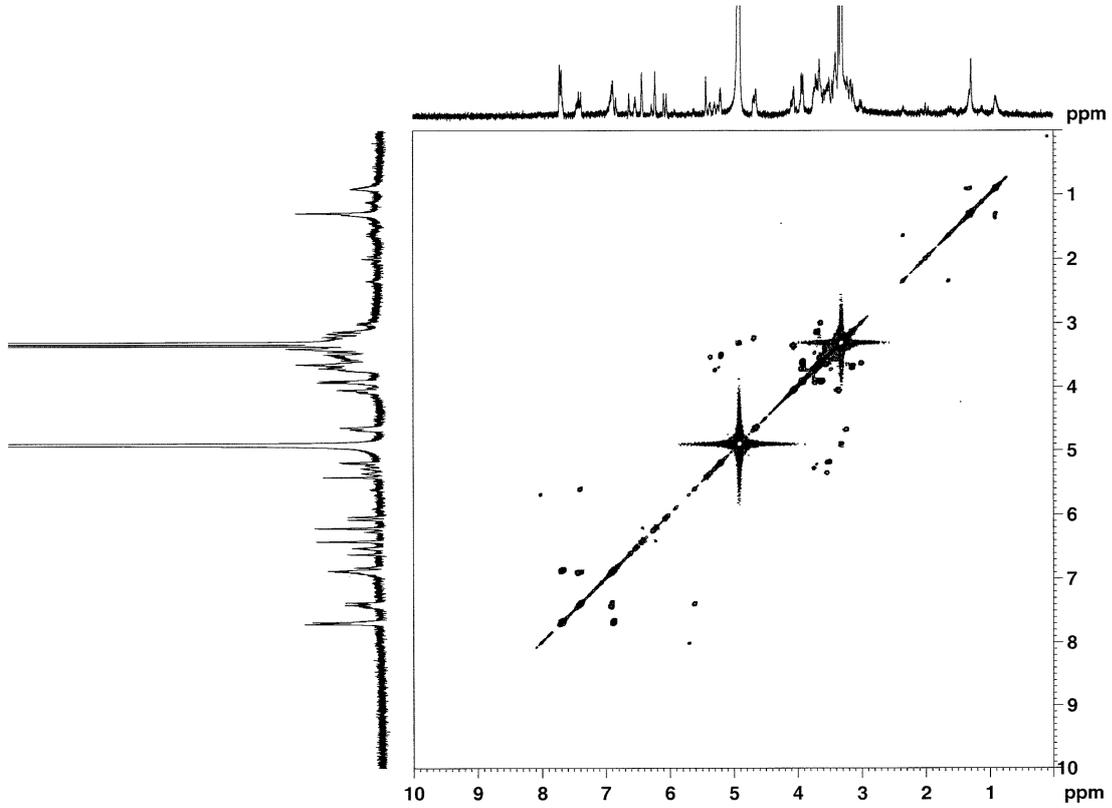


Abb. 41: COSY-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

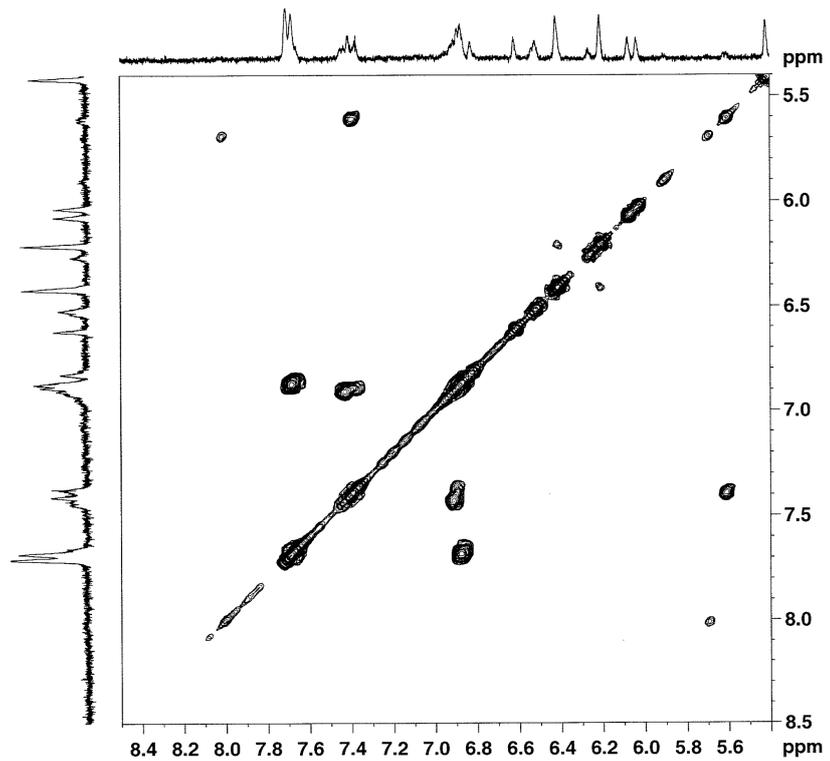


Abb. 42: COSY-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

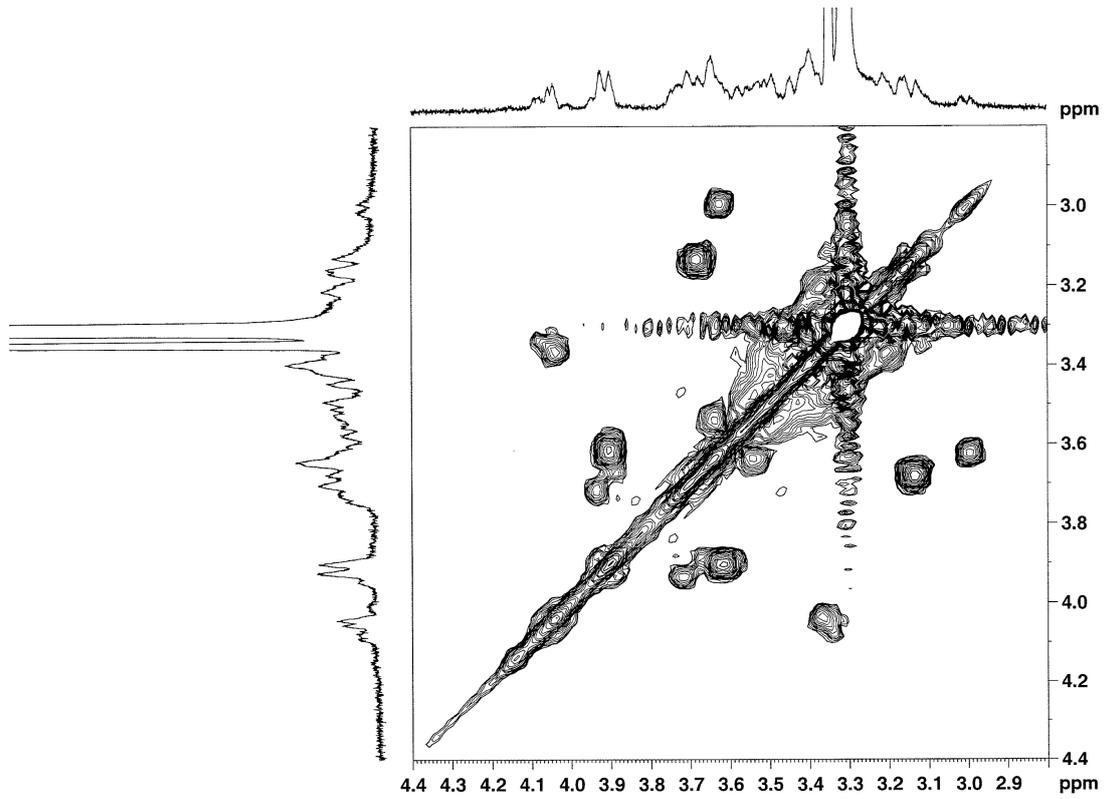


Abb. 43: : COSY-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

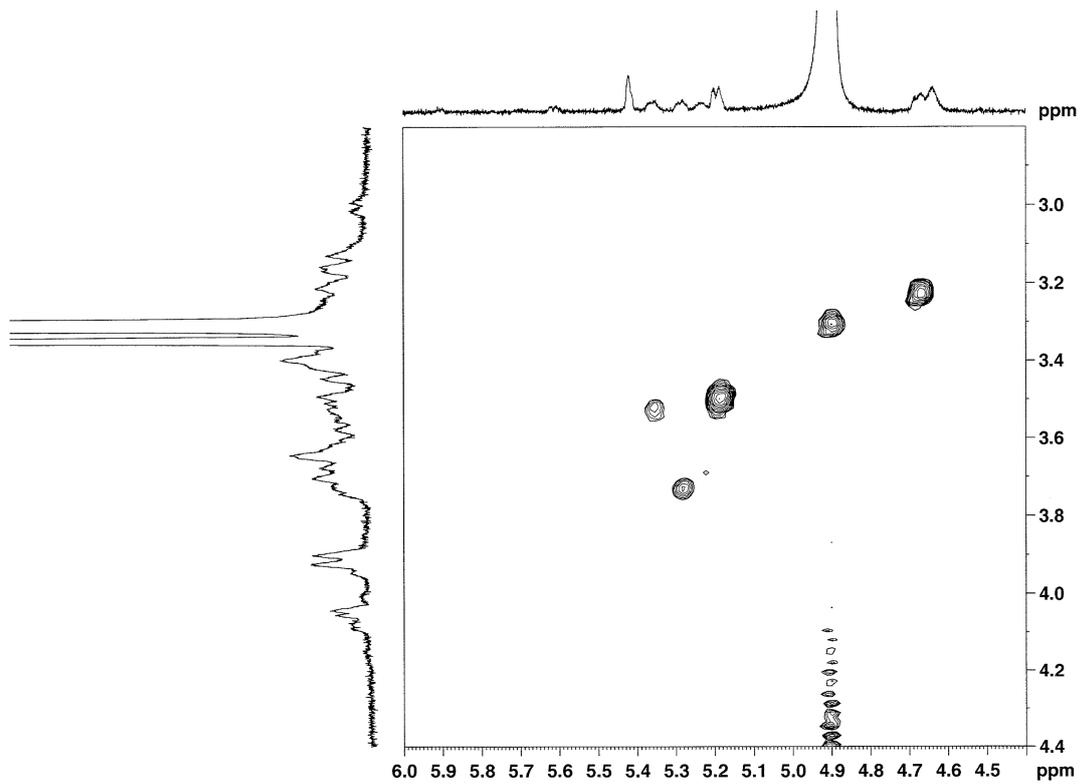


Abb. 44: : COSY-Experiment (Tabelle 10, Seite 25) der Fraktion F4 (Abbildung 9, Seite 11) in dMeOH

## Curriculum vitae

### **Persönliche Daten:**

Vor- und Zuname: Jasmin Kalkus

Geburtsort: Wien

Geburtstag: 16. Juni 1990

Staatsbürgerschaft: Österreich



### **Ausbildung:**

#### Schule:

1997-2001 Volksschule, Markomannenstraße 9, 1220 Wien

2001-2009 Allgemeinbildende höhere Schule,  
Theodor-Kramer Straße 3, 1220 Wien

2009 Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

#### Universität:

WS 2009/10- WS 2015/16 Studium der Pharmazie an der Universität Wien