

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Isolierung phenolischer Inhaltstoffe von
Eriosema laurentii

Verfasser

Claus Gatterer

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

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

Danksagung

Ich danke Frau Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie. Durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes hat sie diese Diplomarbeit erst möglich gemacht.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Sylvain Ateba für das Untersuchungsmaterial.

Ich bedanke mich bei Dr. Martin Zehl und Ass.-Prof. Dr. Hanspeter Kählig für die Ermittlung und Interpretation der MS- bzw. NMR-Daten.

Ganz besonderer Dank gilt Frau ao. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn für die intensive Unterstützung bei meiner Arbeit.

Ich bedanke mich auch bei allen weiteren Mitarbeitern des Departments für Pharmakognosie, für ihre Unterstützung im Rahmen meiner Diplomarbeit.

Mein Dank gilt weiters meiner Familie, die mir dieses Studium ermöglicht hat und meinen Freunden, die mich motiviert haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	3
2.1 Material	3
2.1.1 Ausgangsmaterial	3
2.1.2 Vergleichssubstanzen	3
2.2 Methoden	3
2.2.1 Säulenchromatographie	3
2.2.2 High Performance Countercurrent Chromatography	3
2.2.3 Solid Phase Extraktion	4
2.2.4 Dünnschichtchromatographie	4
2.2.4.1 Mobile und stationäre Phasen	4
2.2.4.2 Detektionsverfahren	5
2.2.5 High Performance Liquid Chromatography	5
2.2.6 Massenspektrometrie	6
2.2.6 Kernresonanzspektroskopie	7
3 Ergebnisse	8
3.1 DC-Untersuchung der zur Verfügung stehenden Fraktionen	8
3.2 Isolierung von CSG4 aus Fraktion 3	11
3.2.1 Durchführung von SC1	11
3.2.2 Durchführung von SC2	15
3.2.3 Identifizierung von CSG4 (=2,6-Dihydroxybenzoesäure)	17
3.3 Isolierung von CSG1, CSG2 und CSG6 aus Fraktion 4+5	20
3.3.1 Durchführung von SC3	20
3.3.2 Identifizierung von CSG1 (=3,4',6,8-Tetrahydroxyflavanon-7-C-glucosid)	24
3.3.3 Durchführung von CC1	27
3.3.3.1 Auswahl des Fließmittelsystems	27
3.3.3.2 Optimierung des Fließmittelsystems	28
3.3.4 Durchführung von CC2	30
3.3.5 Identifizierung von CSG6 (=Syringaresinol)	34
3.3.6 Identifizierung von CSG2 (=2"-O-alpha-Rhamnosyl- 6-C-fucosyl-3'-methoxy-luteolin)	34
3.4 Isolierung von CSG7 und CSG8 aus Fraktion 11	35
3.4.1 Durchführung von CC3	35
3.4.2 Identifizierung von CSG7 (=p-Hydroxybenzoesäure) und CSG8 (=3,4-Dihydroxybenzoesäure)	41

Inhaltsverzeichnis

3.5 Isolierung von CSG5a und CSG5b aus Fraktion 12	44
3.5.1 Durchführung von SPE1	44
3.5.2 Identifizierung von CSG5a (=2'-Hydroxygenistein-7-O-glucosid) und CSG5b (=Genistein-8-C-glucosid)	47
3.6 Isolierung von CSG3 aus Fraktion 23	50
3.6.1 Vorversuche	50
3.6.2 Durchführung von SPE2	51
3.6.3 Identifizierung von CSG3 (=3,4',6,8-Tetrahydroxyflavon-7-C- glucoside).....	54
3.7 Identifizierung von Substanzen mittels DC und HPLC	56
3.7.1 Identifizierung von Isovitexin und Homoorientin	56
3.7.2 Identifizierung von Homoorientin in Fraktion 16	58
3.7.3 Identifizierung von Luteolin-7-O-glucosid	59
3.7.4 Identifizierung von Genistein und Quercetin-3-O-methylether	62
3.7.4 Identifizierung von Luteolin	64
4. Diskussion der Ergebnisse.....	67
5. Zusammenfassung.....	69
6. Summary.....	70
Literaturverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Curriculum Vitae.....	VI
Anhang.....	VII

1 Einleitung

Die Gattung *Eriosema* gehört zur Familie der Schmetterlingsblütler (Fabaceae). Ihre Vertreter sind vor allem in tropischen Regionen beheimatet, wobei man etwa 140 Arten unterscheidet [1].

Viele Vertreter dieser Gattung (*E. glomerata* (Guill. & Perr.) Hook.f., *E. tuberosum* A. Rich., *E. kraussianum* N. E. Br., *E. robustum* Baker...) finden Einsatz in der traditionellen Medizin in Afrika, China und Südamerika. Die Einsatzgebiete umfassen Impotenz, Unfruchtbarkeit, Erkältungen, Durchfall und Hauterkrankungen [1-7].

Aus verschiedenen Vertretern der Gattung konnten bisher Polyphenole, Chromone und Flavonoide isoliert werden [1-3].

Die Pyranoisoflavone Kraussianon 1 und 2 aus *E. kraussianum* zeigten einen positiven Effekt bei erektiler Dysfunktion [6].

Eriosema laurentii ist ein vor allem in tropischen Gebieten Afrikas verbreiteter Strauch. Auszüge der Pflanze werden in Kamerun unter anderem bei Unfruchtbarkeit, verschiedenen gynäkologischen und menopausalen Beschwerden eingesetzt [8].

In den unterirdischen Anteilen von *E. laurentii* konnten bisher verschiedene Zucker sowie die Isoflavone Genistin und Genistein nachgewiesen werden [9].

Abbildung 1: *Eriosema laurentii* (Foto, Sylvain B. Ateba)



Ein methanolischer Extrakt wurde in vitro an rekombinanten Hefezellen, die humanen Estrogenrezeptor alpha, Androgenrezeptor, Progesteronrezeptor und Arylhydrocarbonrezeptor exprimierten und in vivo an ovariectomierten Ratten untersucht. Dabei konnte in beiden Studien Östrogen-Aktivität festgestellt werden [8].

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass über die Inhaltsstoffe von *E. laurentii* wenig bekannt war, war es das Ziel dieser Diplomarbeit, weitere Substanzen aus den oberirdischen Teilen zu isolieren, die für die Wirkung verantwortlich sein könnten, und deren Struktur zu klären.

Abbildung 2: Herbarbeleg *E. laurentii*



2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Ausgangsmaterial

Ausgangsmaterial waren verschiedene Fraktionen eines methanolischen Extraktes der gepulverten oberirdischen Teile von *Eriosema laurentii*. Das Pflanzenmaterial stammte aus Kamerun (Zentralafrika), wo es bei Bazou gesammelt worden war.

2.1.2 Vergleichssubstanzen

Es wurden Vergleichssubstanzen aus dem Bestand des Departments für Pharmakognosie bei den Analysen verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Säulenchromatographie

Eine der verwendeten Methoden, Substanzen zu isolieren, war die Säulenchromatographie.

Als stationäre Phasen dienten Sephadex® LH 20 (Sigma) und Kieselgel 60 (Merck). Bei Kieselgel 60 als stationärer Phase dienten Mischungen von Chloroform, Methanol und Wasser als mobile Phase, bei Sephadex® LH 20 wurden Methanol-Wasser-Mischungen verwendet.

Die genauen Bedingungen werden bei den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

2.2.2 High Performance Countercurrent Chromatography

Eine weitere verwendete Technik zur Auftrennung der Fraktionen war die High Performance Countercurrent Chromatography (HPCCC), die auf der Verteilung eines Substanzgemisches zwischen zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen beruht.

Gerät: Dynamic Extractions Spectrum HPCCC – analytische Säule
(Volumen: 32 ml)

Fließmittelsysteme: HPCCC 1: Ethylacetat + n-Butanol + Wasser
(2 + 1 + 2)
HPCCC 2: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser
(1 + 9 + 1 + 9)
HPCCC 3: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser
(1 + 4 + 1 + 4)

Bei allen Auftrennungen mittels HPCCC wurde als mobile Phase die organische Oberphase und als stationäre Phase die wässrige Unterphase bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Drehzahl von 1620 rpm verwendet.

2.2.3 Solid Phase Extraktion

Als weitere Methode zur Aufreinigung wurde die Solid Phase Extraktion an Varian Mega Bond Elut C18 20 ml Kartuschen eingesetzt, wobei Mischungen von Methanol und Wasser als mobile Phase dienten. Die Kartuschen wurden vor dem Auftragen der Probe zuerst mit destilliertem Wasser und Methanol gewaschen und anschließend mit jener Methanol-Konzentration konditioniert, mit der die Elution begonnen werden sollte. Als Tropfgeschwindigkeit wurden 2.5 ml / min gewählt.

2.2.4 Dünnschichtchromatographie

Zur Kontrolle der Fraktionen, die durch die unterschiedlichen Auftrennungsverfahren gewonnen wurden, diente die Dünnschichtchromatographie. Sie wurde auch zur Identifizierung von Substanzen durch Vergleich mit authentischen Vergleichssubstanzen verwendet.

2.2.4.1 Mobile und stationäre Phasen

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten Merck

Mobile Phasen: (1) Ethylacetat + Ameisensäure conc. + Essigsäure conc.
+ Wasser (100 + 11 + 11 + 20)
(2) Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser
(80 + 20 + 10 + 5)

- (3) Ethylacetat + Ameisensäure conc. + Essigsäure conc.
+ Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

Stationäre Phase: Cellulose F Fertigplatten Merck

Mobile Phase: (1) Essigsäure conc. + Wasser (1 + 1)

2.2.4.2 Detektionsverfahren

Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (NP/PEG)

Die entwickelte DC-Platte wird mit einer 1%igen Lösung von Naturstoffreagens A (Diphenylboryloxyethylamin) in Methanol und anschließend mit einer 5%igen Lösung von PEG 400 in Ethanol besprüht. Die Platte wird unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm ausgewertet [10].

2.2.5 High Performance Liquid Chromatography

System: SHIMADZU

Pumpe: LC-20AD

Detektor: SPD M20A diode array detector

Column oven: CTO-20AC

Auto injector: SIL-20AC HT

Säule: Hypersil® BDS-C18, 5µm, 4.0 x 250mm (Fa. Agilent)

Mobile Phase: A: 0,03M wässrige Essigsäure (pH 3)

B: CH₃CN/0,03M wässrige Essigsäure (pH 3) (80+20)

Detektion: 254 und 340 nm

Flussrate: 1,0 ml / min

Probenkonzentration: 1,0 mg / ml

Injektionsvolumen: 10 µl

Druck: 120 bar

Temperatur: 25 °C

Die verwendeten Methoden orientierten sich an einer Dissertation [11].

Methode 1

<u>Gradient:</u>	5% B	5 min
	5-20% B	10 min
	20% B	25 min
	20-26% B	20 min

<u>Purge:</u>	100% B	10 min
---------------	--------	--------

Methode 2

<u>Gradient:</u>	5% B	10 min
	5-20% B	20 min
	20-60% B	10 min

<u>Purge:</u>	100% B	10 min
---------------	--------	--------

Methode 3

<u>Gradient:</u>	20% B	5 min
	20-34% B	5 min
	34-50% B	50 min
	50% B	5 min

<u>Purge:</u>	100% B	10 min
---------------	--------	--------

Methode 4

<u>Gradient:</u>	20% B	5 min
	20-45% B	25 min
	45% B	10 min

<u>Purge:</u>	100% B	10 min
---------------	--------	--------

Nach dem Purge wurde 10 Minuten mit der Startkonzentration equilibriert.

2.2.6 Massenspektrometrie

Um die molekularen Massen der einzelnen Verbindungen zu bestimmen, wurden LC-MS Analysen auf einem Ultimate 3000 RSLC-Series System (Dionex,

Germering, Deutschland), das an ein 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT; Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) gekoppelt ist, durchgeführt. Der Elutionsfluss wurde ca. 1:4 vor der ESI-Quelle gesplittet, welche mit folgenden Einstellungen betrieben wurde: Kapillarspannung -3,7 kV, Vernebelungsgas 26 psi (N₂), Trockengasfluss 9 l/min (N₂), und Trockengas-temperatur 340°C. Mehrstufenmassenspektren bis zu MS⁴ wurden im Positivionen-Modus in einem automatischen data-dependent acquisition (DDA) Modus mit Helium als Kollisionsgas, einem Isolationsfenster von 4 Th und einer Fragmentierungsamplitude von 1,0 V gemessen.

2.2.6 Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden mit einem Avance III 600 MHz NMR Spektrometer (Bruker BioSpin) in deuteriertem Methanol (MeOH-d₄) aufgenommen. Die Resonanzfrequenzen betrugen für die ¹H-NMR 400 MHz und für die ¹³C-NMR 150 MHz.

3 Ergebnisse

3.1 DC-Untersuchung der zur Verfügung stehenden Fraktionen

Um beurteilen zu können, welche Fraktionen für eine weitere Auftrennung geeignet wären, wurden die zur Verfügung stehenden Fraktionen mittels DC untersucht.

Tabelle 1: Zur Verfügung stehende Fraktionen

Fraktion	Gewicht (mg)
1	2389,0
2	1257,0
3	248,0
4 + 5	580,0
6 + 7 + 8	245,0
9 +10	256,0
11	210,0
12	86,0
13	181,0
14	610,0
15	299,0

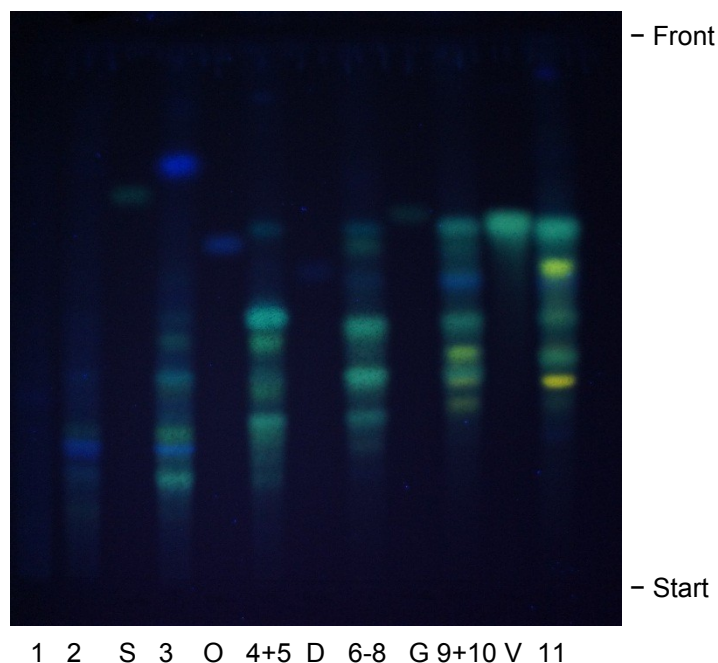
Fraktion	Gewicht (mg)
16	437,0
17	149,0
18	90,0
19 + 20	13,3
22	13,0
23	100,0
24	69,0
25	58,0
30	77,0
31	34,0
32	56,0

Abbildung 3: DC der Fraktionen 1-20

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 20 x 20 cm

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

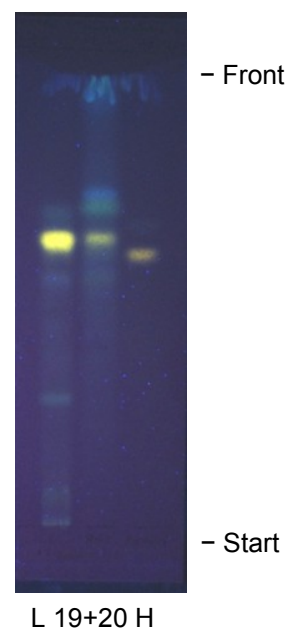
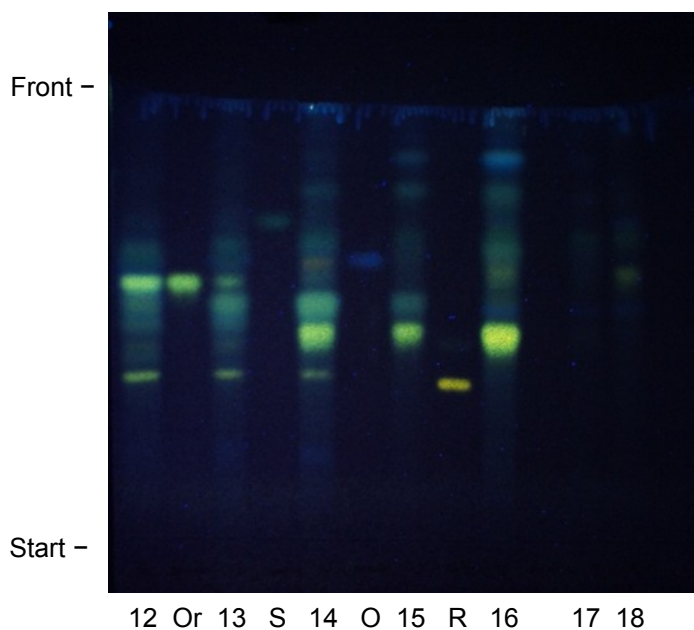
Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 1
2	Fraktion 2
S	Sissotrin
3	Fraktion 3

Bahn	Substanz
O	Ononin
4+5	Fraktionen 4+5
D	Daidzin
6-8	Fraktionen 6+7+8

Bahn	Substanz
G	Genistin
9+10	Fraktion 9 + 10
V	Vitexin
11	Fraktion 11



3. Ergebnisse

Bahn	Substanz
12	Fraktion 12
Or	Orientin
13	Fraktion 13
S	Sissotrin
14	Fraktion 14

Bahn	Substanz
O	Ononin
15	Fraktion 15
R	Rutin
16	Fraktion 16
17	Fraktion 17

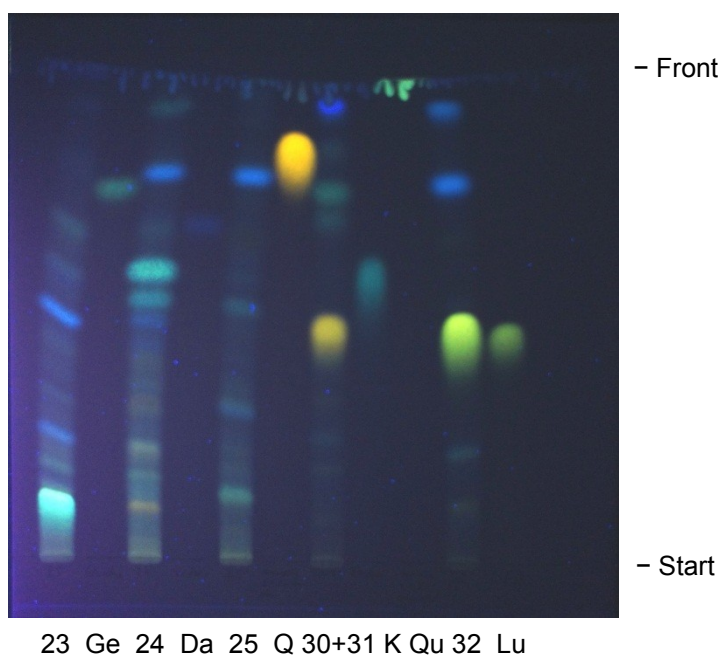
Bahn	Substanz
18	Fraktion 18
L	Luteolin-7-O-glukosid
19+20	Fraktionen 19+20
H	Hyperosid

Abbildung 4: DC der Fraktionen 23-32

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 20 x 20 cm

Mobile Phase: Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser
(80 + 20 + 10 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Bahn	Substanz
23	Fraktion 23
Ge	Genistein
24	Fraktion 24
Da	Daidzein
25	Fraktion 25
Q	Quercetin-3,7-dimethylether

Bahn	Substanz
30+31	Fraktionen 30+31
K	Kämpferol
Qu	Quercetin-3,7,3',4'-tetramethylether
32	Fraktion 32
Lu	Luteolin

Aufgrund dieser dünnschichtchromatographischen Versuche wurden die Fraktionen 3, 4+5, 6-8, 11, 12 und 23 zur weiteren Auftrennung ausgewählt.

3.2 Isolierung von CSG4 aus Fraktion 3

3.2.1 Durchführung von SC1

In Fraktion 3 zeigte sich bei R_f ca. 0,8 eine unter Detektion mit Naturstoffreagenz und Polyethylenglycol 400 intensiv blau fluoreszierende Bande. Diese sollte mittels Säulenchromatographie isoliert werden.

Säule: Durchmesser: 2 cm
 Füllhöhe: 50 cm
 Stationäre Phase: Sephadex® LH-20
 Mobile Phase: Isokratische Elution mit Methanol/Wasser (20:80)
 Auftragelösung: 248 mg Fraktion 3 wurden in 1 ml 20 % Methanol im Ultraschallbad gelöst und auf die Säule aufgetragen.
 Flussrate: 5 ml / 30 min

Es wurden insgesamt 200 Fraktionen gesammelt.

Jede 5. Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch überprüft.

Anschließend wurden die Fraktionen zu Sammelfraktionen vereinigt und die Säule mit steigenden Konzentrationen an Methanol eluiert (pro Konzentration mit 1,5 Säulenvolumen).

Tabelle 2: Sammelfraktionen SC 1

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Gewicht (mg)
1	1 - 30	10,6
2	31 - 34	1,9
3	35 - 40	4,0
4	41 - 44	6,5
5	45 - 55	34,5
6	56 - 59	14,8
7	60 - 65	21,2
8	66 - 69	19,3
9	70 - 75	22,7
10	76 - 112	37,3
11	113 - 140	27,6
12	141 - 200	6,0
13	NL 30% Methanol	5,7
14	NL 40% Methanol	5,2
15	NL 50% Methanol	5,4
16	NL 60% Methanol	7,4

3. Ergebnisse

Sammelfraktion	Einzelfaktionen	Gewicht (mg)
17	NL 70% Methanol	6,3
18	NL 80% Methanol	4,2
19	NL 90% Methanol	2,0
20	NL 100% Methanol	2,4

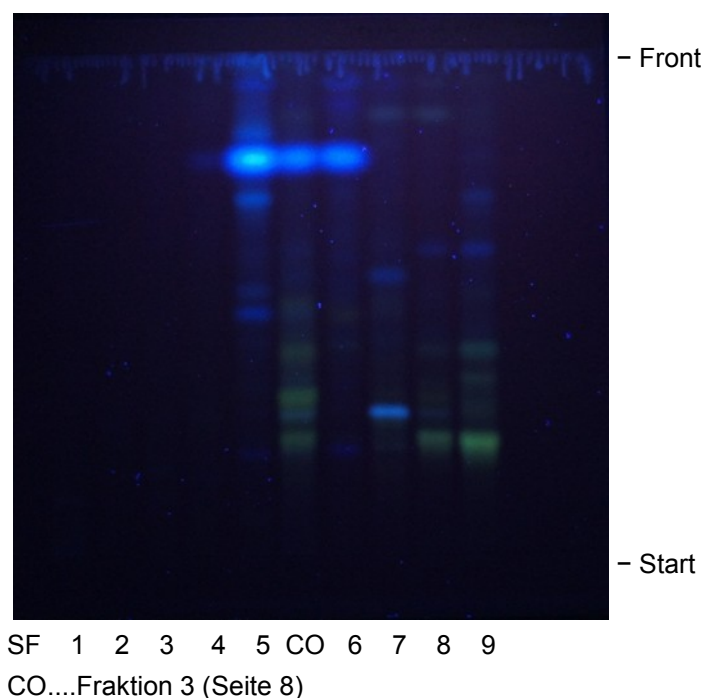
Die erhaltenen Sammelfraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert.

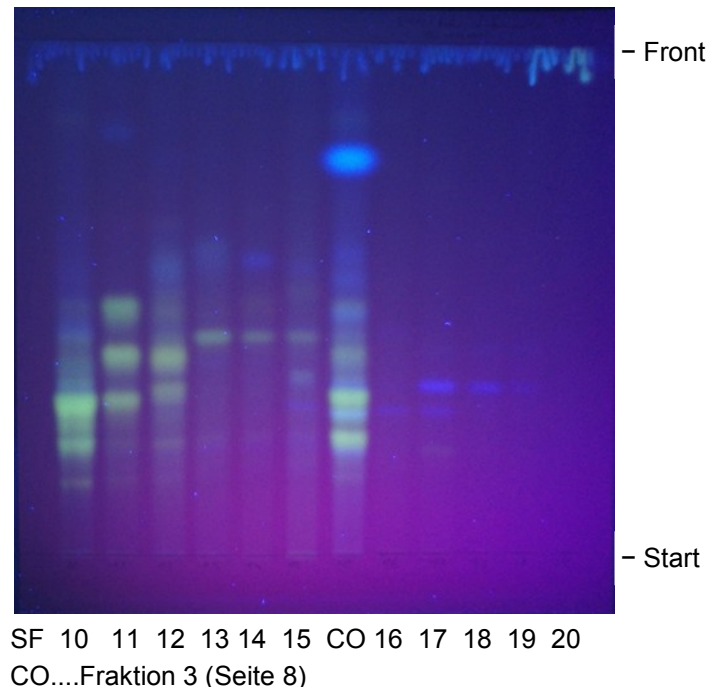
Abbildung 5: DC der Sammelfraktionen von SC1

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 20 x 20 cm

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

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)





Das Dünnschichtchromatogramm zeigte eine Anreicherung der bei UV 366 nm mit Naturstoffreagenz und Polyethylenglycol 400 blau fluoreszierenden Bande in den Sammelfractionen 5 und 6. In Sammelfraction 7 war eine weitere Substanz mit hellblauer Fluoreszenz bei R_f 0,3 angereichert. Da bei höheren R_f -Werten jedoch weitere Banden sichtbar waren und relativ wenig von dieser Fraction vorhanden war, wurde sie nicht weiter bearbeitet. Die Sammelfractionen 8 und 9 zeigten eine grüne Bande bei R_f 0,28, enthielten aber eine Reihe von Begleitsubstanzen. Die Fractionen 10 bis 12 wiesen eine zu komplexe Zusammensetzung für eine weitere Trennung auf.

Zur Überprüfung der Reinheit Fractionen 5 und 6 wurden sie mittels HPLC untersucht.

Als Probenlösung diente eine Lösung von 1 mg der Fraction in 1 ml Methanol. Von dieser Lösung wurden 10 μ l injiziert.

3. Ergebnisse

Abbildung 6: HPLC-Chromatogramm von SC1SF5

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 2

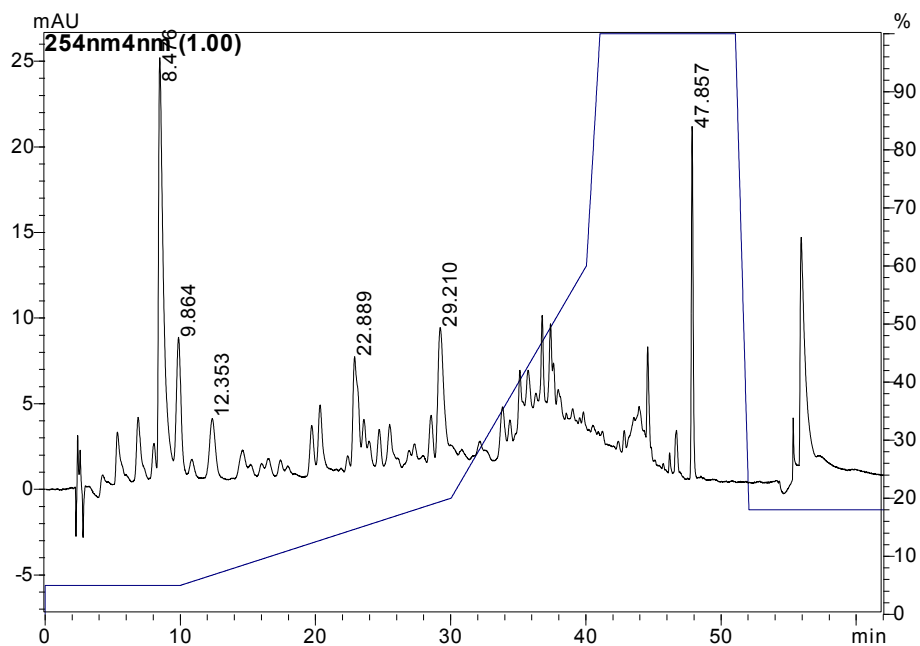
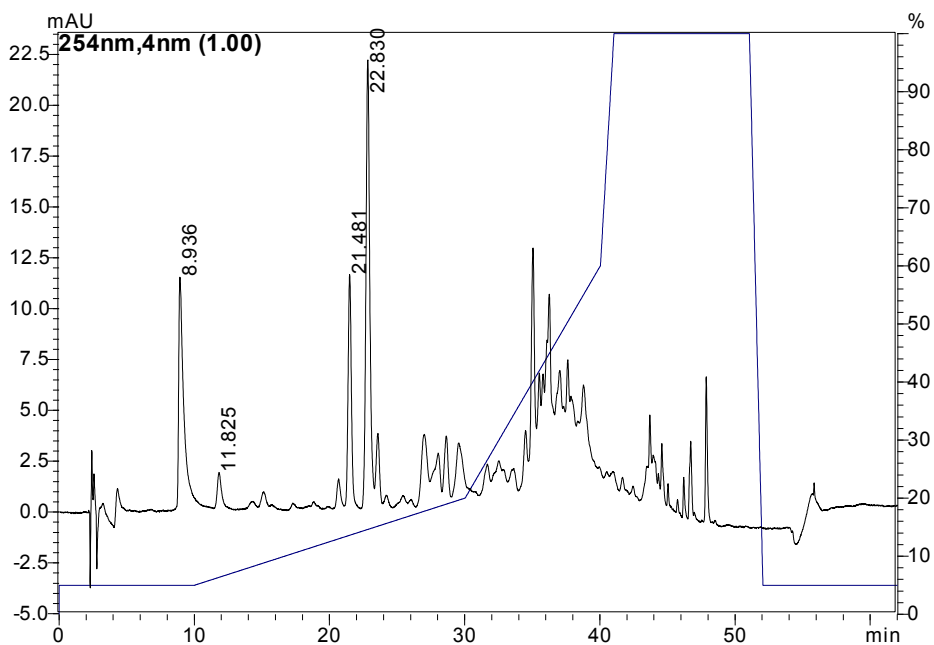


Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm von SC1SF6

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 2



Beide Chromatogramme zeigten eine komplexe Zusammensetzung. Daher war eine weitere Aufreinigung der Sammelfractionen nötig.

3.2.2 Durchführung von SC2

Die Sammelfractionen 5 und 6 aus SC1, welche eine mit Naturstoffreagenz und Polyethylenglycol 400 bei 366 nm blau fluoreszierende Hauptkomponente enthielten, wurden kombiniert und gemeinsam mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 aufgetrennt.

Säule: Durchmesser: 1 cm
 Füllhöhe: 40 cm
 Stationäre Phase: Kieselgel 60
 Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser (70 + 22 + 3,5)
 Auflöserlösung: Fraktionen SC1SF5 und SC1SF6 (49 mg) wurden in 300 µl der mobilen Phase gelöst und auf 150 mg der stationären Phase aufgezogen, getrocknet und auf die vorbereitete Säule aufgetragen.
 Flussrate: 3 ml / 30 min

Es wurden insgesamt 196 Fraktionen gesammelt.

Jede 5. Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch überprüft.

Anschließend wurden die Fraktionen zu Sammelfractionen vereinigt und die Säule zwei Mal mit jeweils 1,5 Säulenvolumina Methanol + Wasser (50 + 50) eluiert.

Tabelle 3: Sammelfractionen SC2

Sammelfraction	Einzelfractionen	Gewicht (mg)
1	1 - 8	9,5
2	9 - 12	5,5
3	13 - 21	7,0
4	22 - 28	3,0
5	29 - 44	5,2
6	45 - 49	1,0
7	50 - 60	3,0
8	61 - 67	1,5
9	68 - 95	2,4
10	96 - 196	3,3
11	Nachlauf 1	1,6
12	Nachlauf 2	3,7

3. Ergebnisse

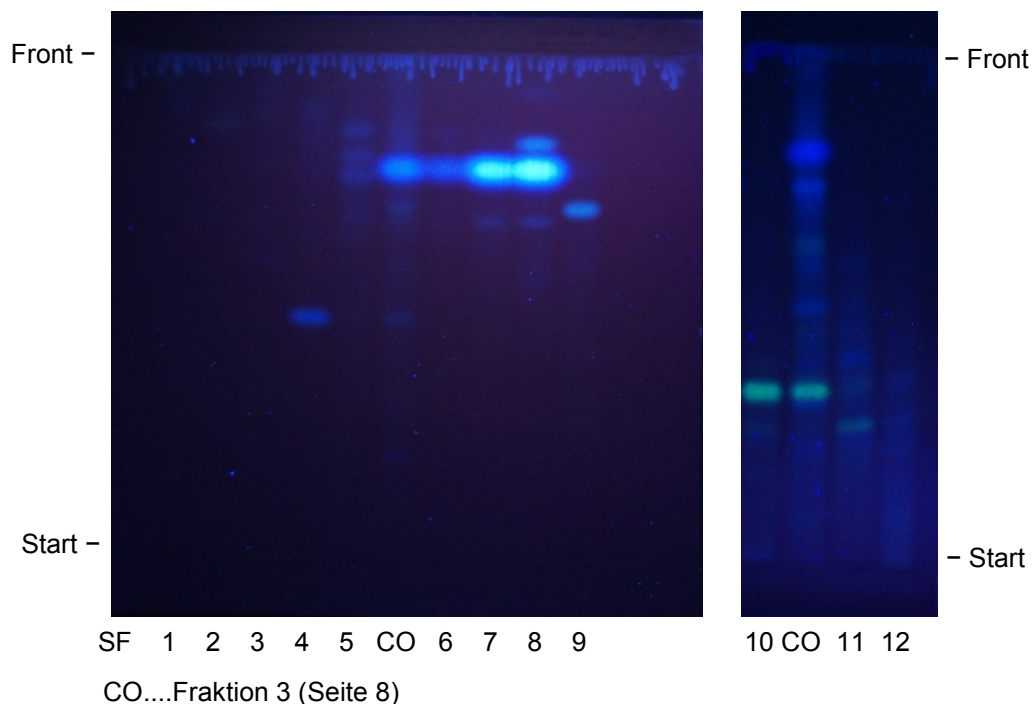
Von den erhaltenen Sammelfractionen wurde eine Dünnschichtchromatographie angefertigt.

Abbildung 8: DC der Sammelfractionen von SC2

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 20 x 20 cm

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

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)

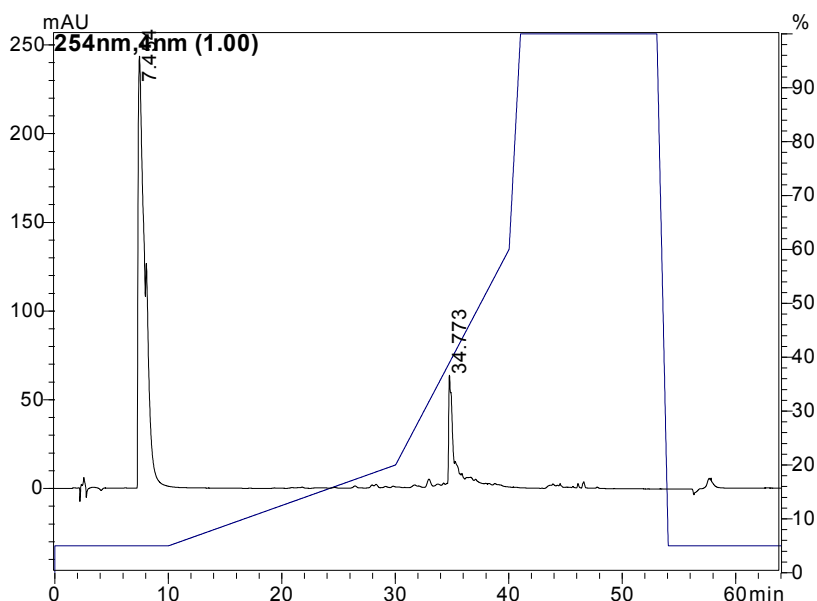
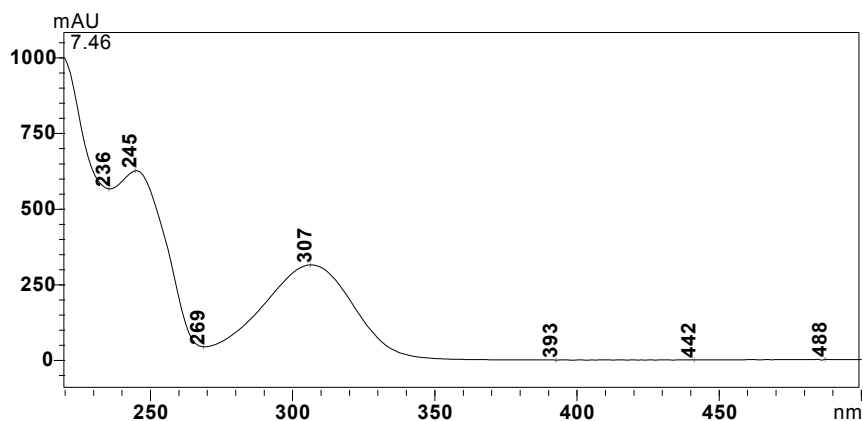


In den Sammelfractionen 7 und 8 war die intensiv blau fluoreszierende Substanz stark angereichert. Um die Reinheit zu überprüfen, wurde mit Sammelfraktion 8 eine HPLC-Analyse durchgeführt.

Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm von SC2SF8

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 2

**Abbildung 10: UV-Spektrum des Peaks bei 7,46 Minuten**

Das Chromatogramm zeigte die Hauptkomponente bei einer Retentionszeit von 7,46 Minuten, einen weiteren Peak bei 34,77 Minuten. Die Substanz wurde als CSG4 bezeichnet.

3.2.3 Identifizierung von CSG4 (=2,6-Dihydroxybenzoesäure)

Für erste Informationen zur Struktur von CSG4 wurde eine LC-MS-Analyse durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchung war, dass das Molekulargewicht

3. Ergebnisse

der Hauptkomponente 154,0 Da (m/z 155.0 $[M+H]^+$) betrug und es sich aufgrund der Fragmentierung wahrscheinlich um eine Dihydroxybenzoesäure handelt.

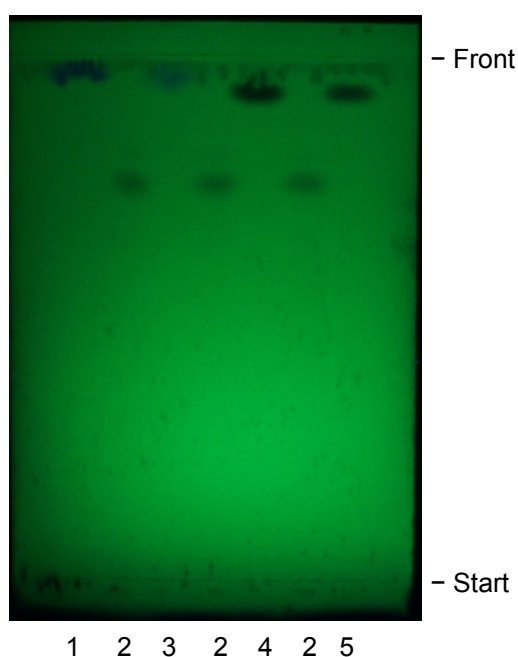
Daher wurde CSG4 mit verschiedenen Dihydroxybenzoesäuren dünnsschichtchromatographisch verglichen.

Abbildung 11: DC-Vergleich von CSG4 mit Dihydroxybenzoesäuren

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 20 x 14 cm

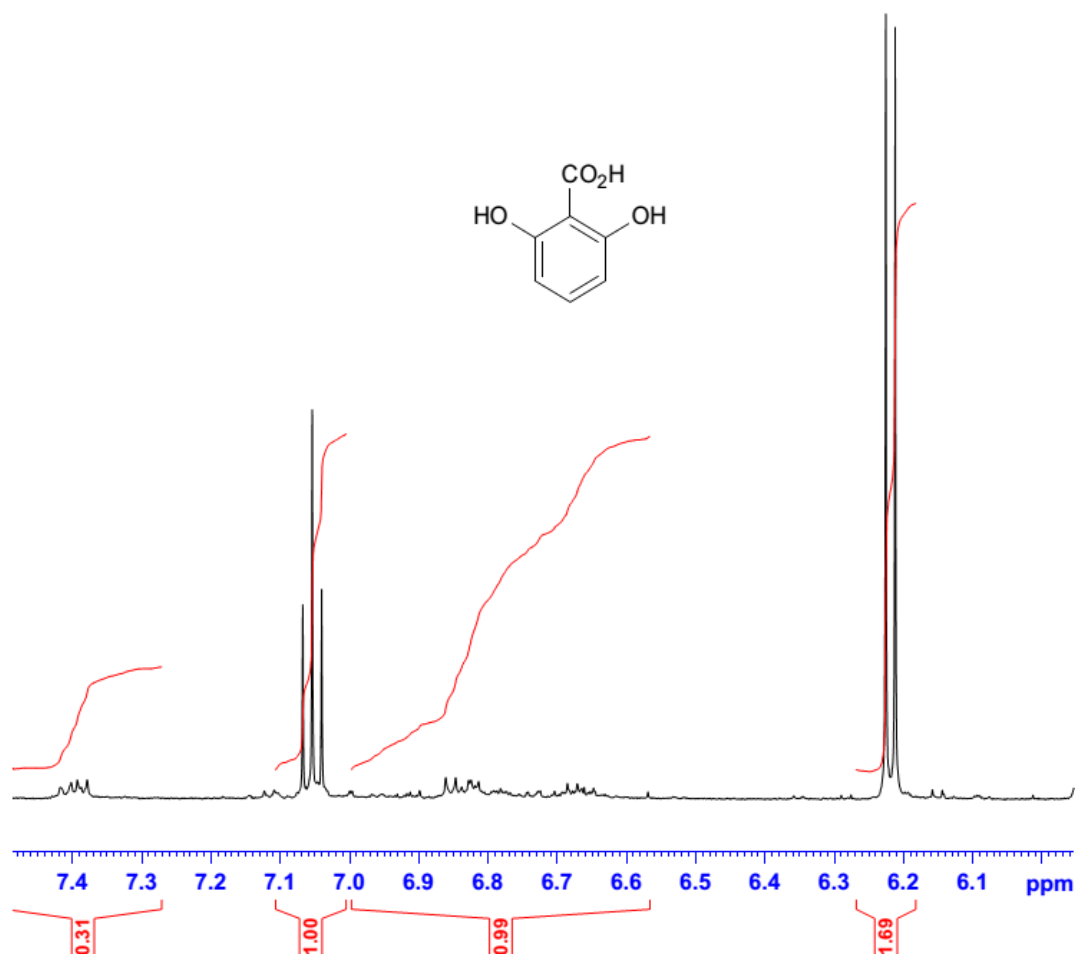
Mobile Phase: Ethylacetat + Ameisensäure conc. + Essigsäure conc. + Wasser
(100 + 11 + 11 + 20)

Detektion: 254 nm



Bahn	Substanz
1	2,4-Dihydroxybenzoesäure
2	CSG4
3	2,5-Dihydroxybenzoesäure
4	3,4-Dihydroxybenzoesäure
5	3,5-Dihydroxybenzoesäure

Das Dünnschichtchromatogramm zeigte, dass CSG4 mit keiner der vier Dihydroxybenzoesäuren übereinstimmte. Deshalb wurde CSG4 mittels NMR analysiert.

Abbildung 12: ^1H -NMR von CSG4

In Abbildung 12 erkennt man die Signale der Protonen im aromatischen Ring der Dihydroxybenzoesäure. Da es sich um ein Triplet und ein Dublett handelt, konnte es sich nur um die 2,6-Dihydroxybenzoesäure handeln. Das Triplet ist dem Proton an Position 4 zuzuordnen, das Dublett den Protonen an den Positionen 3 und 5. Die ^1H -NMR belegte somit, dass es sich bei CSG4 um 2,6-Dihydroxybenzoesäure handelte.

3.3 Isolierung von CSG1, CSG2 und CSG6 aus Fraktion 4+5

3.3.1 Durchführung von SC3

Fraktion 4+5 (siehe Seite 8) zeigte auf dem Dünnschichtchromatogramm mehrere Hauptkomponenten. Da die Fraktion in ausreichender Menge vorlag, schien es von Interesse, diese Substanzen zu isolieren. Zu diesem Zweck wurde eine Säulenchromatographie an Sephadex® LH-2 durchgeführt.

Säule: Durchmesser: 3 cm
Füllhöhe: 60 cm
Stationäre Phase: Sephadex® LH-20
Mobile Phase: Elution mit Methanol/Wasser (20:80)
Auftragelösung: Fraktion 4+5 (580 mg), wurde in 1,5 ml 20 % Methanol im Ultraschallbad gelöst und auf die Säule aufgetragen.
Flussrate: 6 ml / 30 min

Es wurden 485 Fraktionen gesammelt.

Jede 5. Fraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

Anschließend wurden die Fraktionen zu Sammelfraktionen vereinigt und die Säule mit 50 %, 80 % und dreimal 100 % Methanol gewaschen (jeweils 1,5 Säulenvolumen).

Tabelle 4: Sammelfraktionen SC 3

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Gewicht (mg)
1	1 – 40	14,5
2	41 – 90	11,1
3	91 – 133	12,5
4	134 – 140	6,3
5	141 – 167	19,8
6	168 – 176	7,4
7	177 – 182	5,3
8	183 – 190	48,2
9	191 – 202	54,9
10	203 – 212	16,2
11	213 – 217	7,0

Sammelfraktion	Einzelfaktionen	Gewicht (mg)
12	218 – 227	12,9
13	228 – 238	18,2
14	239 – 257	53,8
15	258 – 310	121,4
16	311 – 337	28,8
17	338 – 411	53,3
18	412 – 467	18,0
19	468 – 485	5,1
20	Methanol 50 %	9,1
21	Methanol 80 %	7,2
22	Methanol 100 %	20,8
23	Methanol 100 %	6,2
24	Methanol 100 %	1,2

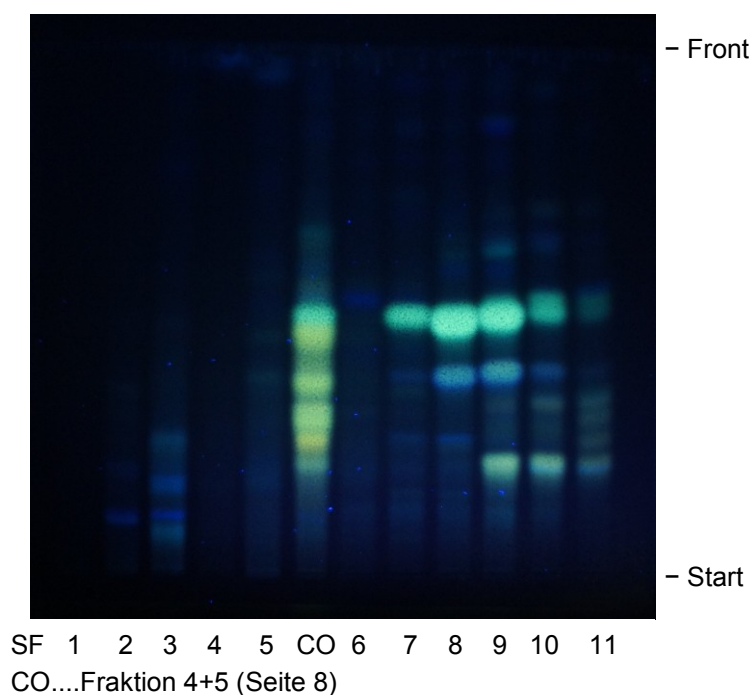
Von den erhaltenen Sammelfraktionen wurde eine DC angefertigt.

Abbildung 13: DC der Sammelfraktionen von SC3

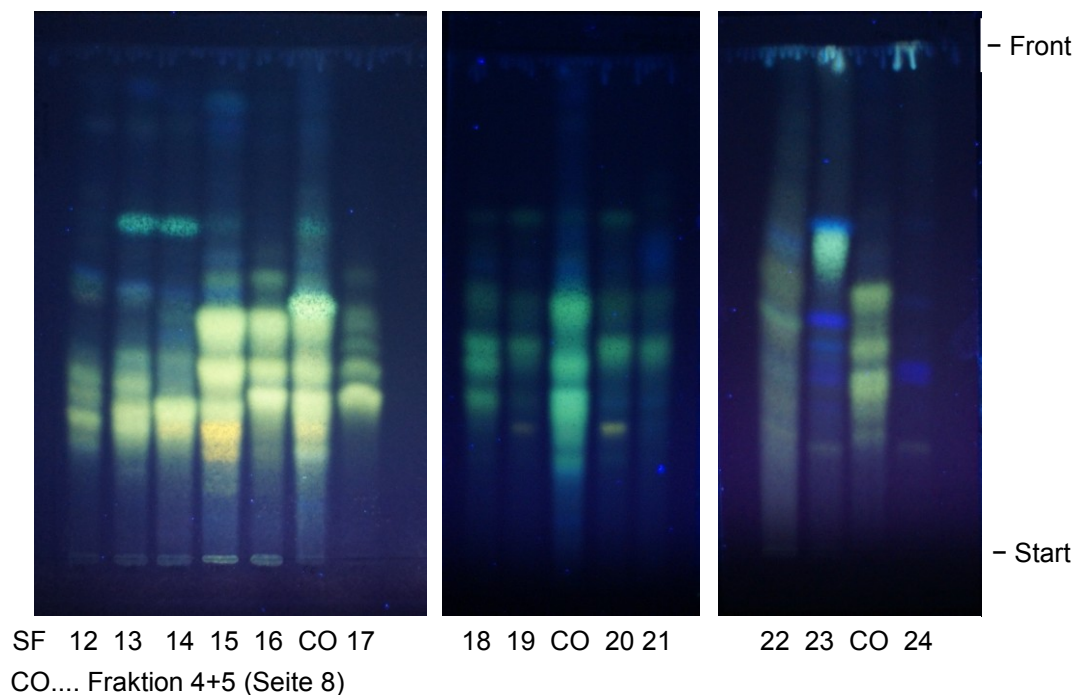
Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 20 x 20 cm

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

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



3. Ergebnisse



Die Sammelfractionen 7 und 8 wiesen bei R_f ca. 0,5 eine hellgrün fluoreszierende Bande auf, die in beiden Fractionen stark angereichert war. Sammelfraction 9 zeigte ebenfalls diese Bande, jedoch eine weitere hellgrün fluoreszierende Zone bei R_f 0,2. Die Sammelfractionen 12 bis 24 enthielten eine Vielzahl grünlich fluoreszierender Banden. Die Reinheit der Fractionen 7 und 8 wurde durch HPLC-Analysen überprüft.

Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von SC3SF7

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1

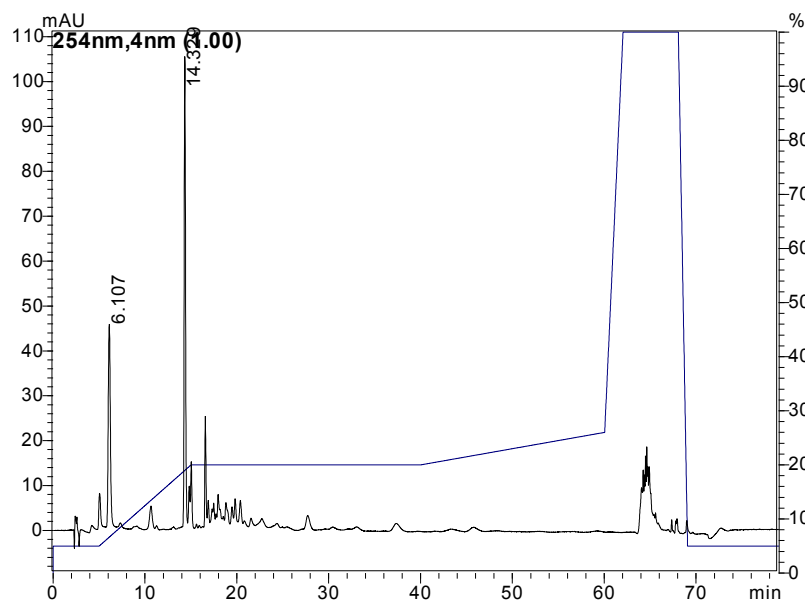
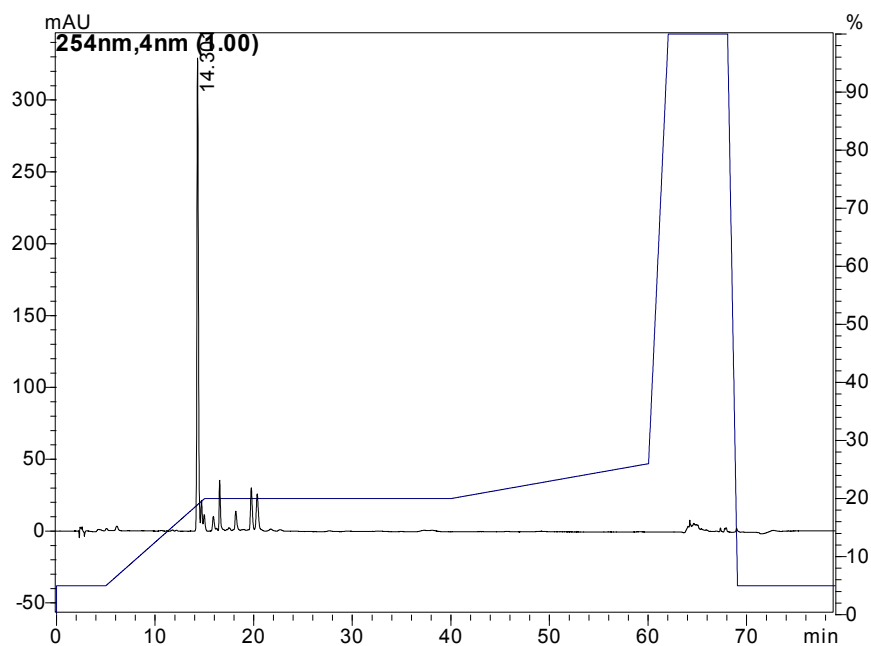
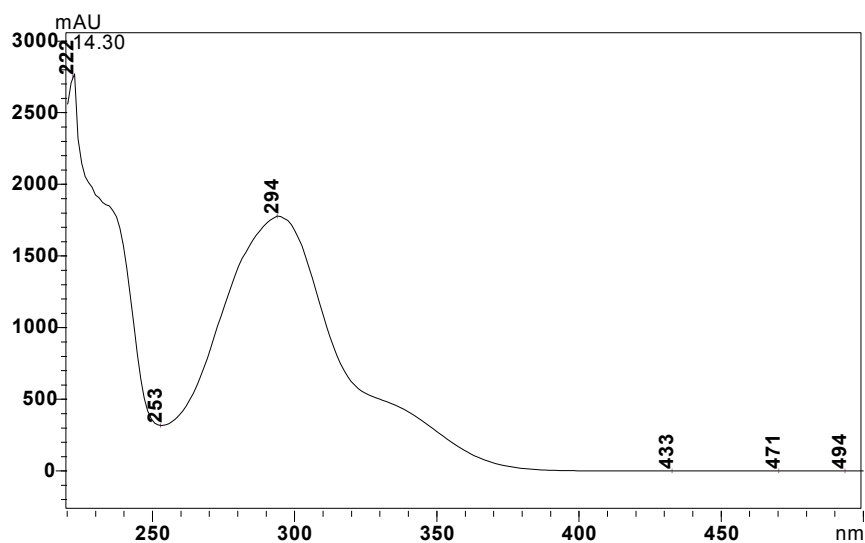


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm von SC3SF8

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1

**Abbildung 16: UV-Spektrum des Peaks bei 14,30 Minuten**

Das Chromatogramm von Sammelfraktion 8 zeigte deutlich weniger Begleitsubstanzen als jenes von SF7. Daher wurde diese Fraktion für die Strukturaufklärung herangezogen und erhielt den Namen CSG1.

3.3.2 Identifizierung von CSG1 (=3,4',6,8-Tetrahydroxyflavanon-7-C-glucosid)

Das UV-Spektrum der Substanz zeigte Ähnlichkeit mit Flavanonen wie Engeletin oder Taxifolin [12].

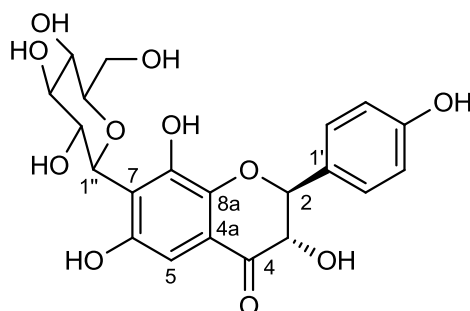
Eine LC-MS-Analyse zeigte, dass die Substanz ein Molekulargewicht von 450,0 Da (m/z 449.0 $[M-H]^-$ im Negativionen Modus) aufwies. Weiters konnten Fragmentationen bei m/z 359.2 ($[M-H]^- - 90$) und m/z 329.2 ($[M-H]^- - 120$) beobachtet werden, was auf eine C-verknüpfte Hexose hinwies und daher ein C-glycosiliertes Tetrahydroxyflavanon angenommen werden konnte.

Zur Strukturaufklärung wurde CSG1 mittels zweidimensionaler NMR-Techniken analysiert.

Tabelle 5: NMR Signale von CSG1 in MeOH-d₄

		¹ H (ppm)	J _{H,H} (Hz)	¹³ C (ppm)
2	CH	4.986	d 11.5	84.96
3	CH	4.548	d 11.5	73.58
4	C	–	–	198.87
4a	C	–	–	101.73
5	CH	5.950	s	96.42
6	C	–	–	167.64
7	C	–	–	106.34
8	C	–	–	164.11
8a	C	–	–	163.90
1'	C	–	–	129.14
2'/6'	CH	7.345	d 8.6	130.34
3'/5'	CH	6.831	d 8.6	116.16
4'	C	–	–	159.25
β-Glucose				
1	CH	4.800	d 9.9	75.14
2	CH	4.120	d 9.9 / d 9.3	72.60
3	CH	3.443	d 9.3 / d 9.3	80.17
4	CH	3.439	d 9.3 / d 9.7	71.84
5	CH	3.383	d 9.7 / d 2.3 / d 5.5	82.55
6	CH ₂	3.860	d 2.3 / d 12.1	62.93
		3.712	d 5.5 / d 12.1	

HH-Kopplungskonstanten aus Spinsimulation mit DAISY.

Abbildung 17: Struktur von CSG1Chemical Formula: $C_{21}H_{22}O_{11}$

Molecular Weight: 450,39

Im ^1H -NMR Spektrum der Substanz zeigten sich drei Signale für aromatische Protonen, wobei es sich um ein Singlett und zwei Dubletts handelte. Im HSQC-Spektrum war ersichtlich, dass das Dublett mit einem Shift von δ 7.345 ppm mit einem Kohlenstoff mit einem Shift von δ 130.34 ppm im ^{13}C -NMR Spektrum korrelierte. Das zweite Dublett mit einem Shift von 6.831 ppm korrelierte mit einem Kohlenstoff mit einem Shift von δ 116.16 ppm. Demzufolge konnte es sich nur um die benachbarten Protonen in einem para-substituierten aromatischen Ring handeln, welcher als B-Ring eines Flavonoids identifiziert wurde, der in Position 4' hydroxyliert ist. Ähnliche Signale für H-2'/H-6' und H-3'/H-5' konnten für Kämpferol gemessen werden, das ebenfalls einen para-hydroxylierten B-Ring besitzt [13].

Da die Protonen H-2'/H-6' in der HMBC mit einem nicht aromatischen Kohlenstoff mit einem Shift von δ 84.96 ppm koppelten, wurde bestätigt, dass es sich um ein Flavanonol handelt. Das Signal für einen Kohlenstoff mit einem Shift von δ 198.87 ppm konnte der Carbonylfunktion in Position 4 zugeordnet werden, was charakteristisch für Flavanonole ist [13].

Das Proton mit einem Shift von δ 5.950 ppm war ein Singlett, weshalb auf das Vorliegen eines einzigen freien Protons im A-Ring geschlossen werden konnte. In der HBMC koppelte dieses Proton mit Kohlenstoffen bei δ 198.87 ppm (C-4, Carbonyl-Funktion), δ 167.64 ppm (C-6, aromatischer Kohlenstoff verbunden mit einem Sauerstoff), δ 163.90 ppm (C-8a, aromatischer Kohlenstoff verbunden mit einem Sauerstoff), δ 106.34 ppm (C-7, aromatischer Kohlenstoff) und δ 101.73 ppm (C-4a, aromatischer Kohlenstoff). Es zeigte sich allerdings keine Kopplung mit C-8 bei δ 164.11 ppm. Daraus konnte geschlossen werden, dass das freie Proton an Position 5 gebunden sein muss.

Im ^1H -NMR Spektrum waren drei Dubletts in Bereich von δ 4.5 ppm bis δ 5.0 ppm sichtbar. In der HMBC koppelte das Proton mit einem Shift von δ 4.800 ppm mit drei aromatischen Kohlenstoffen bei δ 167.64 ppm, δ 164.11 ppm und δ 106.34 ppm und mit drei nicht aromatischen Kohlenstoffen mit Shifts von δ 75.0 ppm bis δ 83.0 ppm. Dadurch konnte dieses Proton als das anomere Proton der Zucker-Komponente identifiziert werden. Der Zucker musste an Position 7 gebunden sein, da sich keine Kopplung mit C-5 zeigte, aber zu den hydroxylierten Kohlenstoffen C-6 und C-8a bei 167.64 ppm und δ 163.90 ppm.

Im HMBC-Spektrum koppelten die Dubletts bei δ 4.986 ppm und δ 4.548 ppm mit C-4 bei δ 198.87 ppm. Daher konnten sie als die vicinalen Protonen des C-Ringes identifiziert werden. Da das Proton bei δ 4.986 ppm mit C-2'/C-6' koppelte, konnte es Position 2 zugeordnet werden, wohingegen das Proton bei δ 4.548 ppm an Position 3 gebunden war.

Da die Summenformel das Vorliegen von 4 Hydroxylgruppen zeigte, musste in der Position 3 eine Hydroxylgruppe gebunden sein.

Die Kopplungskonstante von 11.5 Hz für H-2 und H-3 wiesen auf eine trans-Anordnung der Substituenten hin.

Die Kopplungen der Signale für H-2, H-3, H-4 und H-5 zwischen 9 und 10 Hz indizierten axiale Anordnung und daher das Vorliegen von Glucose als Zuckerkomponente. Die Kopplungskonstante des anomeren Protons der Zuckerkomponente von 9.9 Hz deutet auf die β -Verknüpfung der Glucose hin.

CSG1 wurde somit als 3,4',6,8-Tetrahydroxyflavanon-7-C-glucosid identifiziert und stellt einen neuen Naturstoff dar.

3.3.3 Durchführung von CC1

Die Sammelfractionen 15, 16 und 17 aus SC3 (siehe Seite 22) zeigten ähnliche Zusammensetzung und waren in ausreichender Quantität vorhanden, sodass eine weitere Auftrennung mittels HPCCC zur Isolierung weiterer Substanzen erfolgversprechend schien.

3.3.3.1 Auswahl des Fließmittelsystems

Um ein geeignetes Fließmittelsystem zu finden, wurden die Verteilungskoeffizienten der zu trennenden Fraktionen in verschiedenen Fließmittelsystemen bestimmt.

Dazu wurde eine genau gewogene Menge der Fraktion in Ober- und Unterphase gelöst und die Phasen anschließend im Scheidetrichter getrennt. Die Rückstände der getrockneten Phasen wurden gewogen und so der Verteilungskoeffizient errechnet.

Für das System Ethylacetat + Wasser (1 + 1) betrug der Koeffizient 0,39. Allgemein kann mit einer guten Trennleistung gerechnet werden, wenn dieser Wert zwischen 0,5 und 2,0 liegt. Da sich die Fraktion vermehrt in der wässrigen Phase befand, wurde die organische Phase polarer und das System Ethylacetat + n-Butanol + Wasser (2 + 1 + 2) gewählt.

Gerät: siehe Abschnitt 2.2.2, Seite 3

Fließmittelsystem: Ethylacetat + n-Butanol + Wasser (2 + 1 + 2)

Mobile Phase: Oberphase

Stationäre Phase: Unterphase

Auftragslösung: 200 mg Fraktion SC3SF15+16+17, gelöst in 2 ml mobiler und stationärer Phase (1:1) des Fließmittelsystems

Es wurden 93 Fraktionen zu jeweils 1 ml gesammelt.

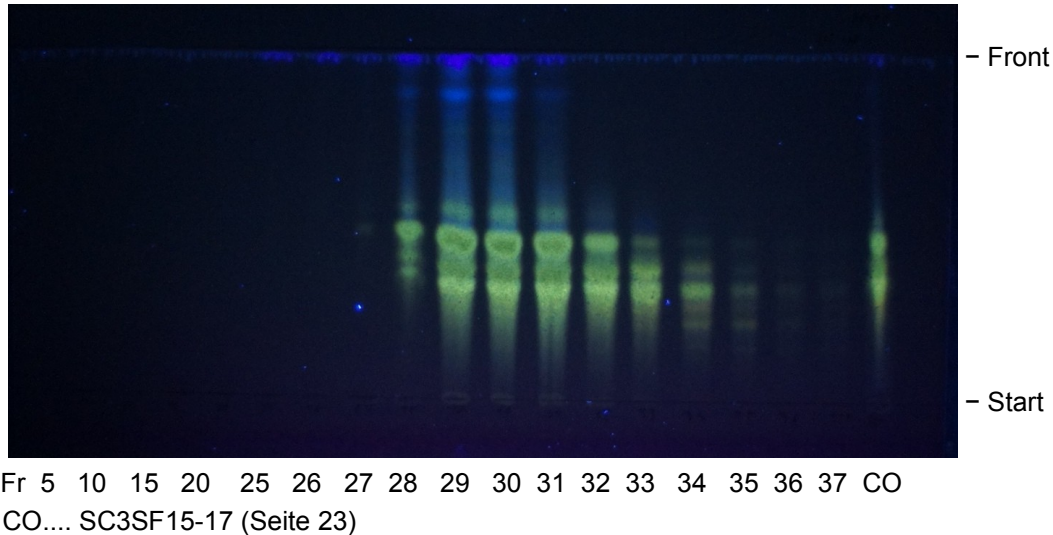
Die Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert.

Abbildung 18: DC Fraktionen von CC1

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 10 x 20 cm

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

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Das Dünnschichtchromatogramm der Fraktionen zeigte, dass nur eine ungenügende Trennung erfolgt war. Deshalb wurden die Fraktionen wieder vereinigt und es wurde auf eine alternative Methode, ein geeignetes Fließmittelsystem zu ermitteln, zurückgegriffen.

3.3.3.2 Optimierung des Fließmittelsystems

Um das Fließmittelsystem zu verbessern, wurde eine in einer vorhergegangenen Diplomarbeit verwendete Methode angewendet. Dabei wurde die zu trennende Fraktion auf Kieselgel 60 Platten aufgetragen und mit unterschiedlichen mobilen Phasen entwickelt, wobei es sich um die Oberphasen von HPCCC-Fließmittelsystemen handelte. Die Substanzen sollten möglichst niedrige R_f-Werte aufweisen, damit diese in der HPCCC langsamer eluieren und somit besser getrennt werden können [9].

Tabelle 6: Fließmittelsysteme für die HPCCC

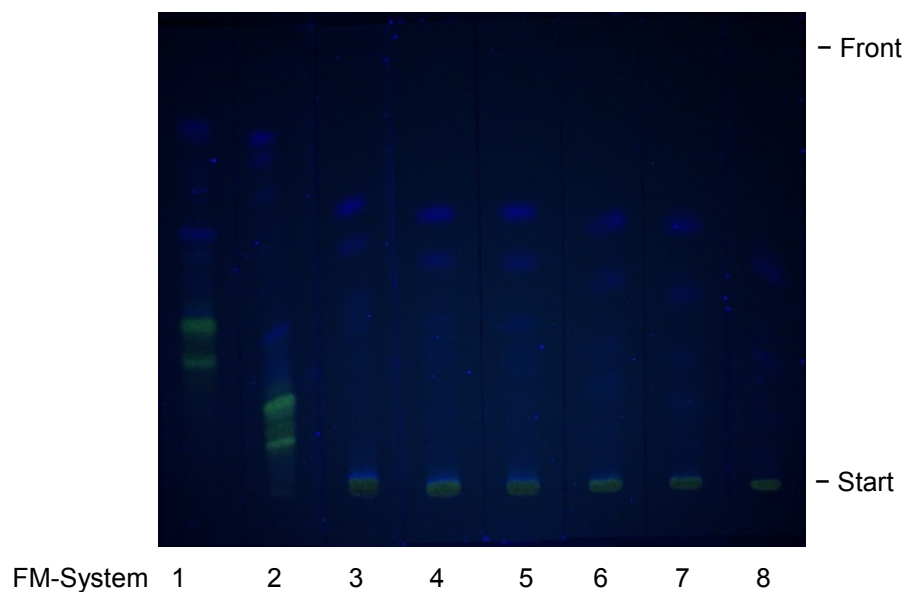
Fließmittel-system	Hexan + Ethylacetat + n-Butanol + Methanol + Wasser
1	0 + 2 + 1 + 0 + 2
2	0 + 4 + 1 + 0 + 5
3	0 + 1 + 0 + 0 + 1
4	1 + 9 + 0 + 1 + 9
5	1 + 5 + 0 + 1 + 5
6	1 + 3 + 0 + 1 + 3
7	1 + 2 + 0 + 1 + 2
8	5 + 6 + 0 + 5 + 6

Abbildung 19: DC-Optimierung des Fließmittelsystems für die HPCCC

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 3 x 20 cm

Mobile Phase: jeweilige Oberphasen der Fließmittelsysteme aus Tabelle 5

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Basierend auf den Erfahrungen [9], wurde Fließmittelsystem 4 gewählt, in dem die Substanzen kaum vom Start eluiert wurden.

3.3.4 Durchführung von CC2

Gerät: siehe Abschnitt 2.2.2, Seite 3

Fließmittelsystem: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (1 + 9 + 1 + 9)

Mobile Phase: Oberphase

Stationäre Phase: Unterphase

Auftragslösung: 200 mg Fraktion SC3SF15+16+17, gelöst in 2 ml mobiler und stationärer Phase (1:1) des Fließmittelsystems

Anmerkungen: bei Fraktion 182 Phasenwechsel (Unterphase als mobile Phase)

Es wurden 189 Fraktionen zu jeweils 1 ml gesammelt.

Jede 3. Fraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert.

Die Fraktionen wurden zu Sammelfraktionen vereinigt und die Säule mit Unter- und Oberphase sowie mit 50 % Methanol gewaschen.

Tabelle 7: Sammelfraktionen CC 2

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Gewicht (mg)
1	1 – 13	1,9
2	14 – 16	1,0
3	17 – 18	8,7
4	19 – 22	6,2
5	23 – 56	12,1
6	57 – 80	18,5
7	81 – 115	28,3
8	116 – 124	6,7
9	125 – 182	30,6
10	183 – 186	5,4
11	187 – 189	62,8
12	Nachlauf	8,0

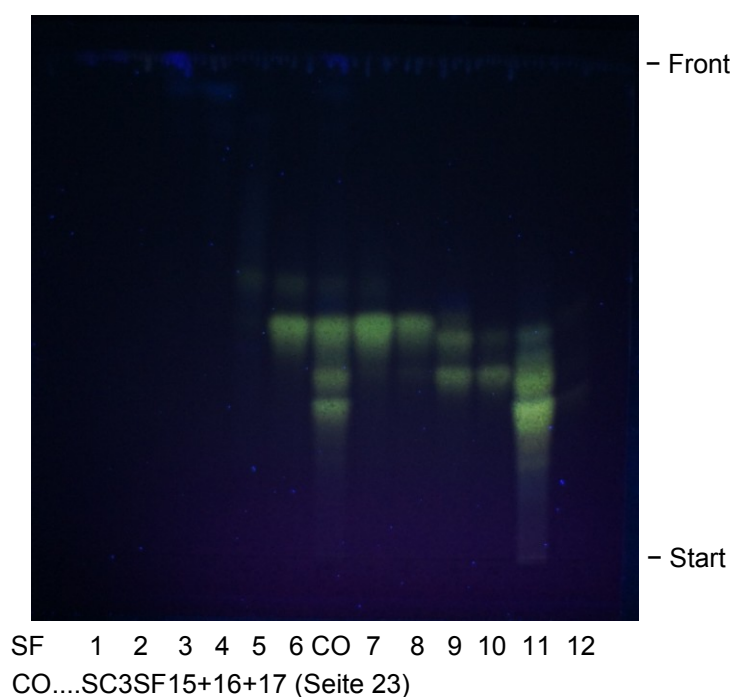
Von den erhaltenen Sammelfractionen wurde eine Dünnschichtchromatographie angefertigt.

Abbildung 20: DC der Fraktionen von CC2

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 10 x 20 cm

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

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Die Auswertung des Dünnschichtchromatogramms zeigte, dass die Sammelfractionen 3 und 7 jeweils nur eine einzelne Bande bei R_f 0,99 (dunkelblau) bzw. bei R_f 0,5 (grün) aufwiesen. Um eventuelle Begleitsubstanzen feststellen zu können, wurden beide Sammelfractionen mittels HPLC untersucht.

3. Ergebnisse

Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm von CC2SF3

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 4

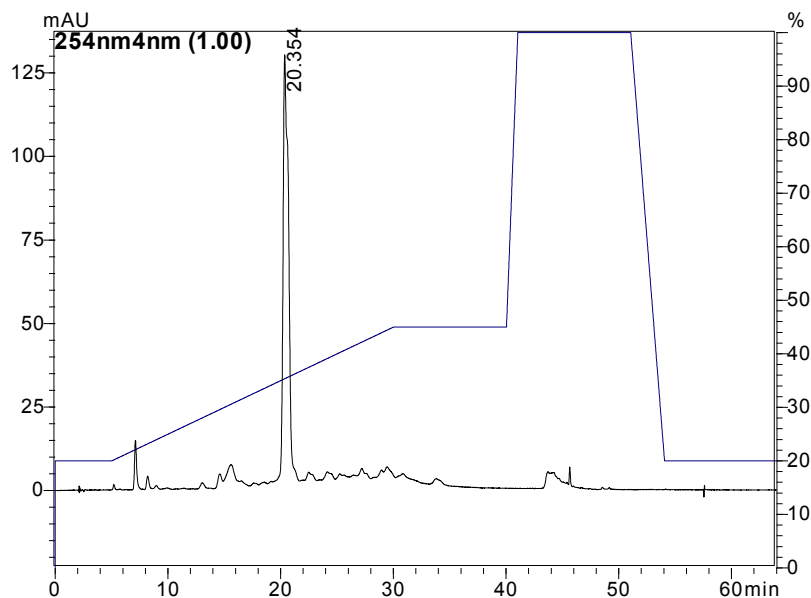


Abbildung 22: UV-Spektrum des Peaks bei 20,35 Minuten

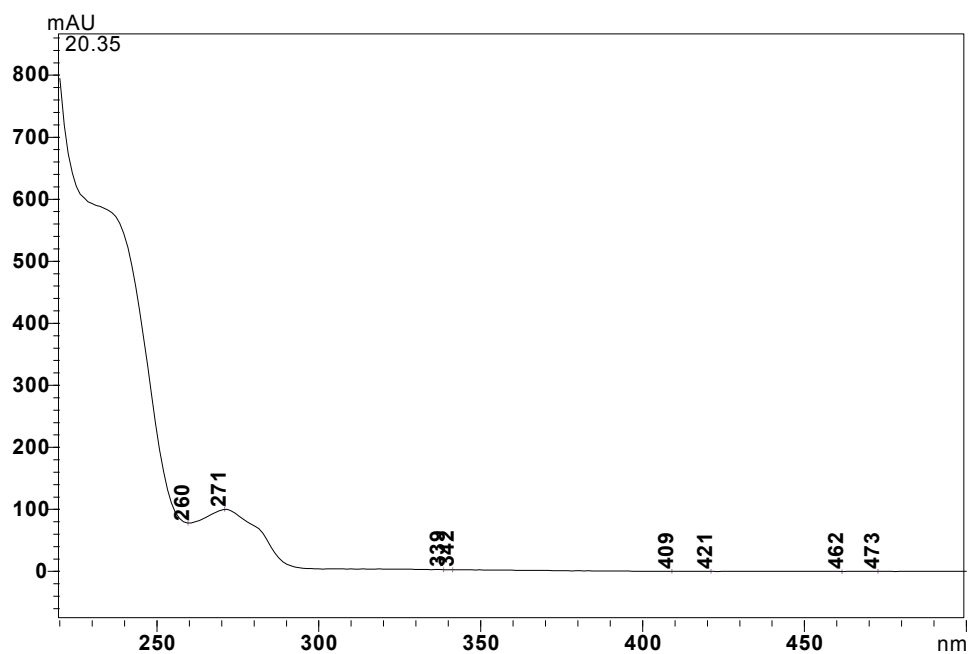
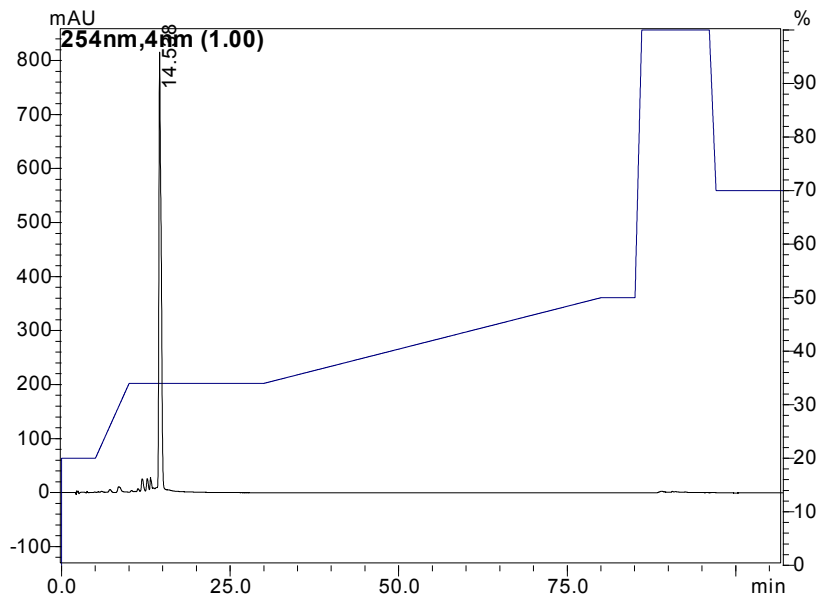
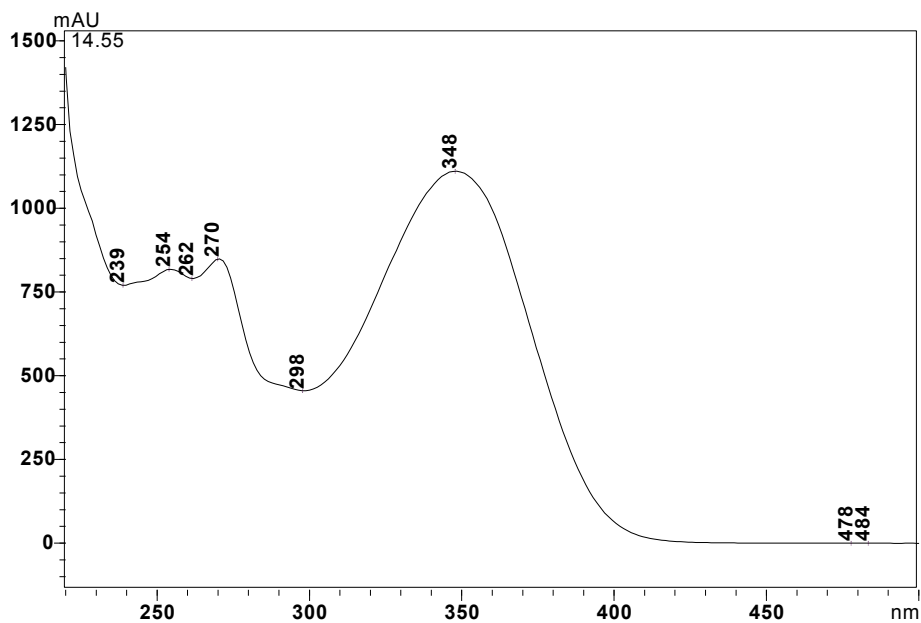


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm von CC2SF7

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 3

**Abbildung 24: UV-Spektrum des Peaks bei 14,55 Minuten**

Sowohl Sammelfraktion 3 als auch Sammelfraktion 7 zeigten eine überwiegende Hauptkomponente und nur Spuren weiterer Substanzen und konnten somit für die

Strukturaufklärung eingesetzt werden. Sammelfraktion 3 erhielt die Bezeichnung CSG6 und Sammelfraktion 7 CSG2.

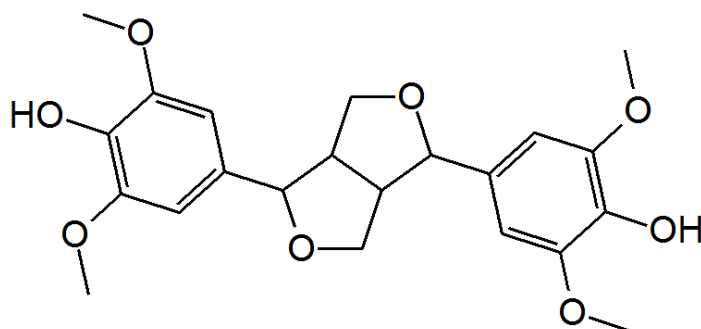
Das UV-Spektrum von CSG2 zeigte deutliche Ähnlichkeit mit jenem von Orientin bzw. Homoorientin (Maximum bei 348 nm, Minimum bei 299 nm) [11].

3.3.5 Identifizierung von CSG6 (=Syringaresinol)

CSG6 wurde mittels LC-MS analysiert und zeigte ein Molekulargewicht von 418,1 Da (m/z 417.1 $[M-H]^-$) sowie eine Fragmentierung, die mit der von Syringaresinol, einem Lignan, übereinstimmte.

Abbildung 25: Syringaresinol

(Quelle: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Syringaresinol.png>)

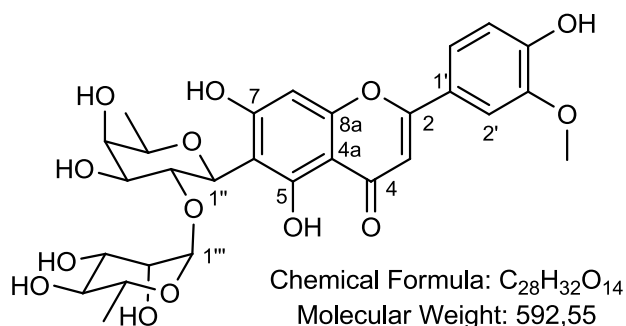


3.3.6 Identifizierung von CSG2 (=2"-O-alpha-Rhamnosyl-6-C-fucosyl-3'-methoxy-luteolin)

In der Massenspektrometrie konnte ein Molekulargewicht von 592,2 Da (m/z 593,2 $[M+H]^+$ im Positiven Modus) ermittelt werden. Fragmentationen bei m/z 447,3 ($[M+H]^+ - 146$, -Deoxyhexose) und bei m/z 343,4 ($[M+H]^+ - 146 - 104$, Fragment einer C-verknüpften Deoxyhexose) deuteten auf eine C-verknüpfte und eine weitere O-verknüpfte Deoxyhexose hin. Es konnte von einem C-Deoxyhexose-O-deoxyhexose-methoxy-trihydroxyflavon ausgegangen werden. Die zweidimensionalen NMR-Analysen ergaben, dass es sich um 2"-O-alpha-Rhamnosyl-6-C-fucosyl-3'-methoxy-luteolin handelte. Die gleiche Substanz wurde in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit aus anderen Fraktionen des Extrakts der

oberirdischen Teile von *E. laurentii* isoliert, weshalb an dieser Stelle auf diese verwiesen wird [14].

Abbildung 26: Struktur von CSG2



3.4 Isolierung von CSG7 und CSG8 aus Fraktion 11

Das Dünnschichtchromatogramm von Fraktion 11 (siehe Seite 8) zeigte eine gelborange fluoreszierende Bande bei R_f 0,39 sowie vier grün fluoreszierende Banden bei R_f 0,41, 0,48, 0,58 und 0,64. Es sollte versucht werden, die Hauptkomponenten mittels HPCCC zu isolieren.

3.4.1 Durchführung von CC3

Ermittlung des Fließmittelsystems

Um ein geeignetes Fließmittelsystem zu finden, wurde abermals wie unter 3.3.3.2 (siehe Seite 28) beschrieben, vorgegangen und DCs auf Kieselgel 60 mit der aufzutrennenden Fraktion unter Verwendung der Oberphasen verschiedener Fließmittelsysteme als mobile Phasen durchgeführt.

Tabelle 8: Fließmittelsysteme für die HPCCC3

Fließmittel-system	Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser
1	0 + 1 + 0 + 1
2	1 + 9 + 1 + 9
3	1 + 5 + 1 + 5

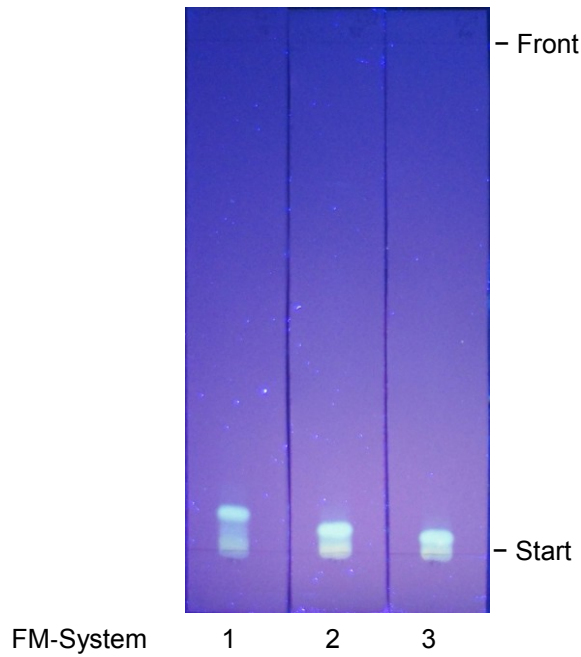
3. Ergebnisse

Abbildung 27: DC der Fließmittelsysteme für die HPCCC3

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 3 x 20 cm

Mobile Phase: jeweilige Oberphasen der Fließmittelsysteme aus Tabelle 8

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Da auch im Fließmittelsystem 3 eine zu schnelle Elution zu erwarten war, wurde das etwas apolarere System Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (1 + 4 + 1 + 4) verwendet.

Gerät: siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Fließmittelsystem: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (1 + 4 + 1 + 4)

Mobile Phase: Oberphase

Stationäre Phase: Unterphase

Aufragelösung: 210 mg Fraktion 11 gelöst in 2 ml mobiler und stationärer Phase (1:1) des Fließmittelsystems

Es wurden 21 Fraktionen zu jeweils 3 ml gesammelt.

Jede Fraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert.
Anschließend wurden die Fraktionen zu Sammelfraktionen vereinigt und die Säule mit Unter- und Oberphase sowie 50 % Methanol gewaschen.

Tabelle 9: Sammelfraktionen CC 3

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Gewicht (mg)
1	1 – 5	0,1
2	6	4,8
3	7	9,2
4	8	3,6
5	9	2,8
6	10	2,6
7	11 – 12	4,7
8	13	3,3
9	14	8,1
10	15 – 21	84,8
11	Nachlauf	4,9

Von den erhaltenen Sammelfraktionen wurde eine Dünnschichtchromatographie angefertigt.

3. Ergebnisse

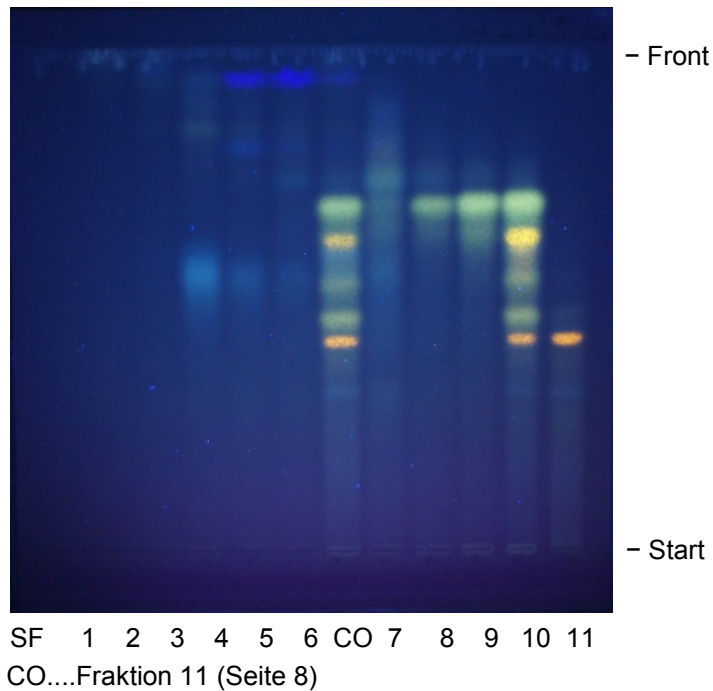
Abbildung 28: DC der Fraktionen von CC3

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 20 x 20 cm

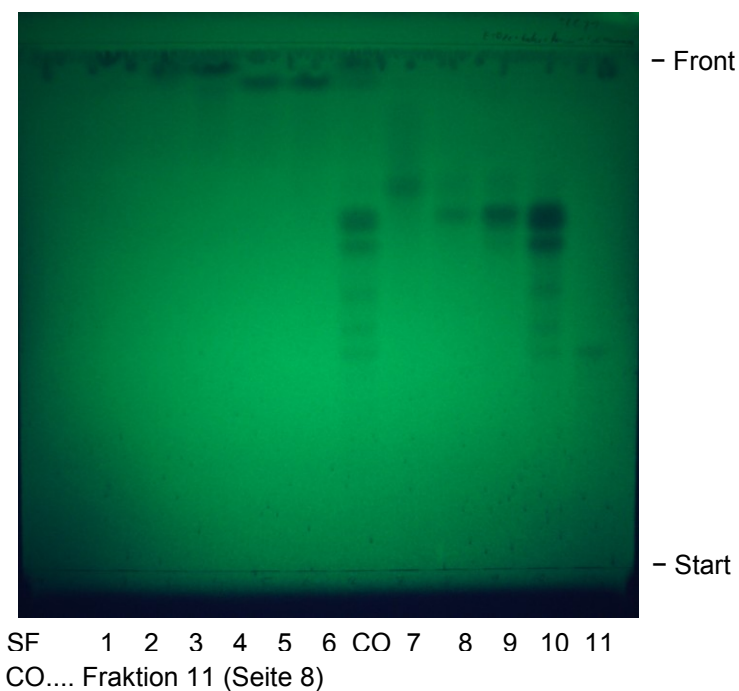
Mobile Phase: Ethylacetat + Ameisensäure conc. + Essigsäure conc. + Wasser
(100 + 11 + 11 + 20)

Detektion: a) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2,
Seite 5)
b) unbesprüht bei 254 nm

a)



b)



Das Dünnschichtchromatogramm zeigte nach Besprühen mit Naturstoffreagenz und Polyethylenglycol 400 auf den Bahnen 5 und 6 bei R_f 0,95 jeweils eine dunkelblau fluoreszierende Bande. In Fraktion 8 und 9 wurde eine grün fluoreszierende Bande bei R_f 0,71 detektiert, in Fraktion 11 eine orange fluoreszierende bei R_f 0,43.

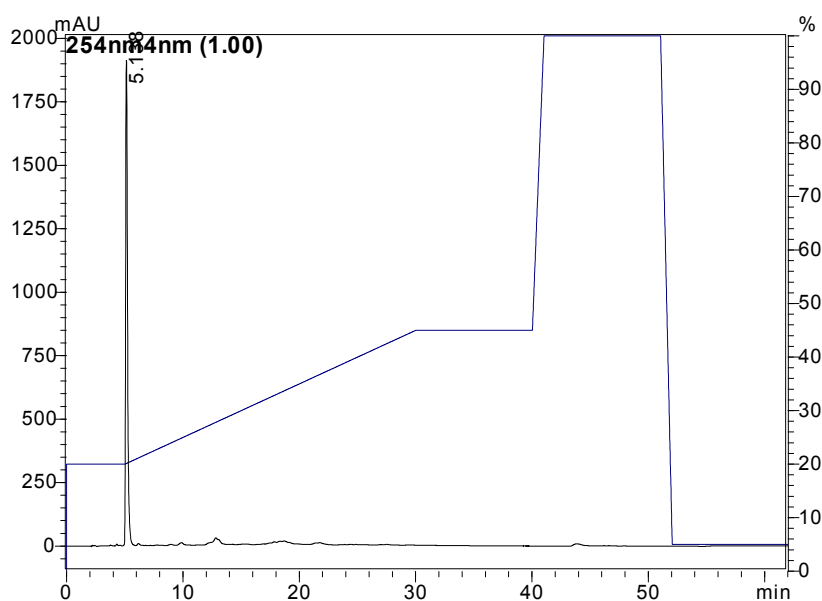
Bei Betrachtung des Dünnschichtchromatogramms vor dem Besprühen unter 254 nm war erkennbar, dass in Fraktion 4 eine intensiv löschende Bande nahe der Front sichtbar war, die jedoch mit Naturstoffreagenz und Polyethylenglycol 400 keine Reaktion zeigte.

Mit den Fraktionen 4, 6, 8 und 11 wurden HPLC-Analysen durchgeführt. Die Fraktionen 8 und 11 wiesen keine ausreichende Reinheit für eine Strukturaufklärung mittels NMR auf.

Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm von CC3SF4

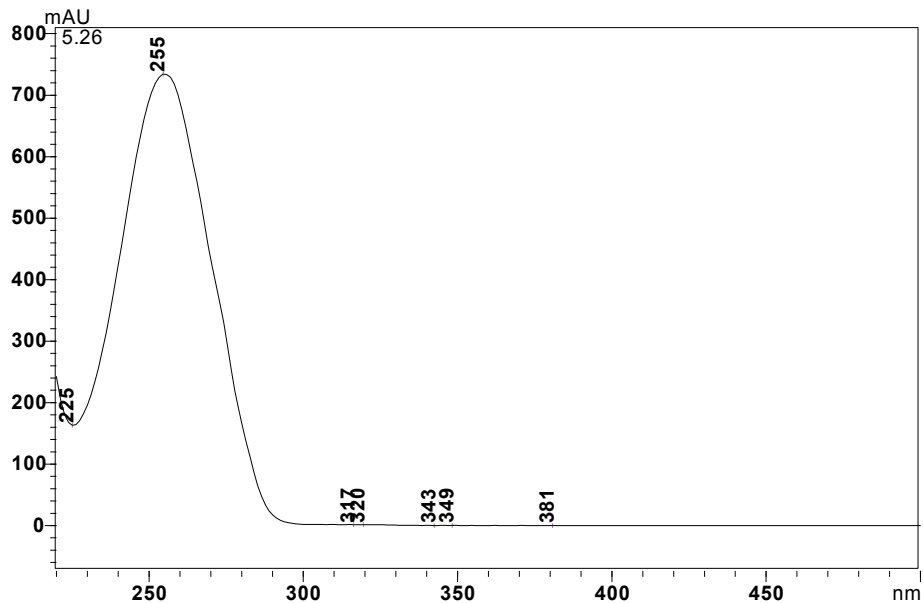
Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 4



3. Ergebnisse

Abbildung 30: UV-Spektrum des Peaks bei 5,26 Minuten



Das Auftreten eines einzigen Peaks im HPLC-Chromatogramm von Fraktion CC3SF4 deutete auf eine gute Anreicherung einer Einzelkomponente hin, die als CG7 bezeichnet wurde. Das UV-Spektrum zeigte ein Maximum bei 255 nm.

Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm von CC3SF6

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 4

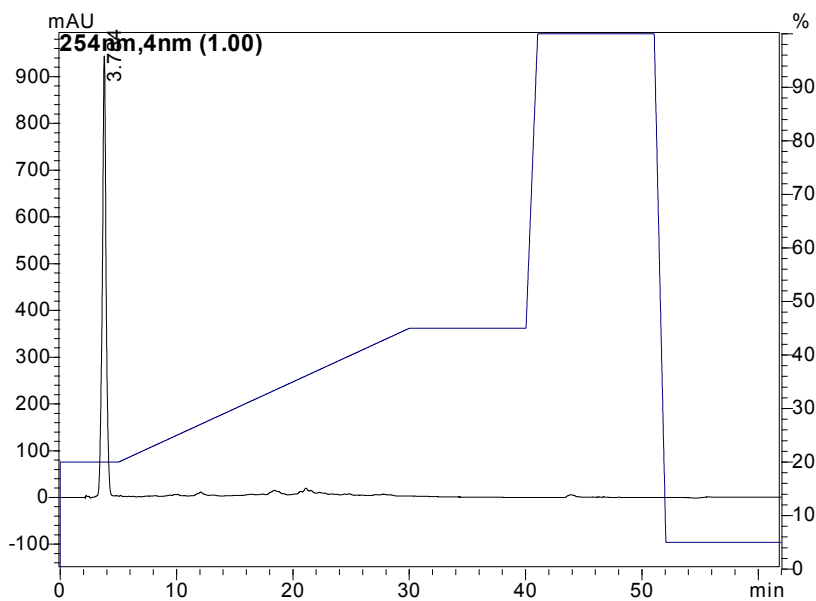
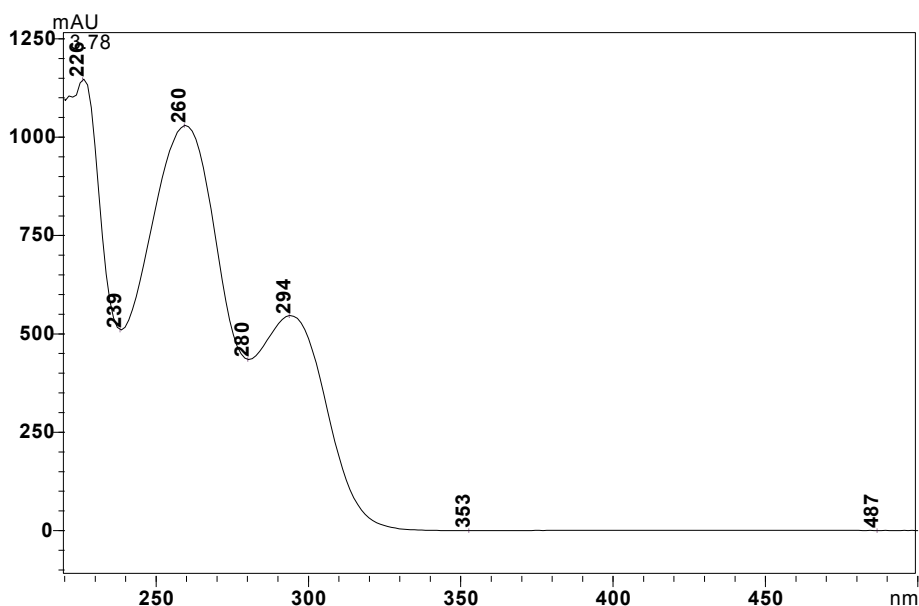


Abbildung 32: UV-Spektrum des Peaks bei 3,78 Minuten

Das HPLC-Chromatogramm zeigte, dass auch Sammelfraktion 6 neben einer Hauptkomponente kaum Begleitsubstanzen enthielt. Daher wurde sie als Substanz CSG8 bezeichnet.

3.4.2 Identifizierung von CSG7 (=p-Hydroxybenzoesäure) und CSG8 (=3,4-Dihydroxybenzoesäure)

Die Substanzen CSG7 und CSG8 wurden mittels Massenspektrometrie untersucht. Für CSG7 konnte ein Molekulargewicht von 138,0 Da (m/z 139,0 $[M-H]^+$ im Positiven Modus) ermittelt werden. Die auftretenden Fragmente bei m/z 121.1 ($[M-H]^+-18.0$, $-H_2O$) und m/z 95.1 ($[M-H]^+-44.0$, $-CO_2$) deuteten darauf hin, dass es sich um p-Hydroxybenzoesäure handeln könnte. Diese Substanz war bereits in einem anderen Vertreter der Gattung *Eriosema* nachgewiesen worden [2].

Für CSG8 wurde ein Molekulargewicht von 154,0 Da (m/z 155,0 $[M-H]^+$ im Positiven Modus) ermittelt, wobei die Fragmentationen bei m/z 137.0 ($[M-H]^+-18.0$, $-H_2O$), m/z 111.1 ($[M-H]^+-44.0$, $-CO_2$) und m/z 93.0 ($[M-H]^+-44.0-18.0$, $-CO_2-H_2O$) auf eine Dihydroxybenzoesäure schließen ließen.

Um die Ergebnisse der Massenspektrometrie zu überprüfen, wurden die Substanzen mittels DC mit authentischen Vergleichssubstanzen verglichen.

3. Ergebnisse

Abbildung 33: DC-Vergleich von CSG7 und CSG8 mit authentischen Substanzen (System 1)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 20 x 20 cm

Mobile Phase: Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser
(80 + 20 + 10 + 5)

Detektion: a) unbesprüht unter 254 nm
b) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)

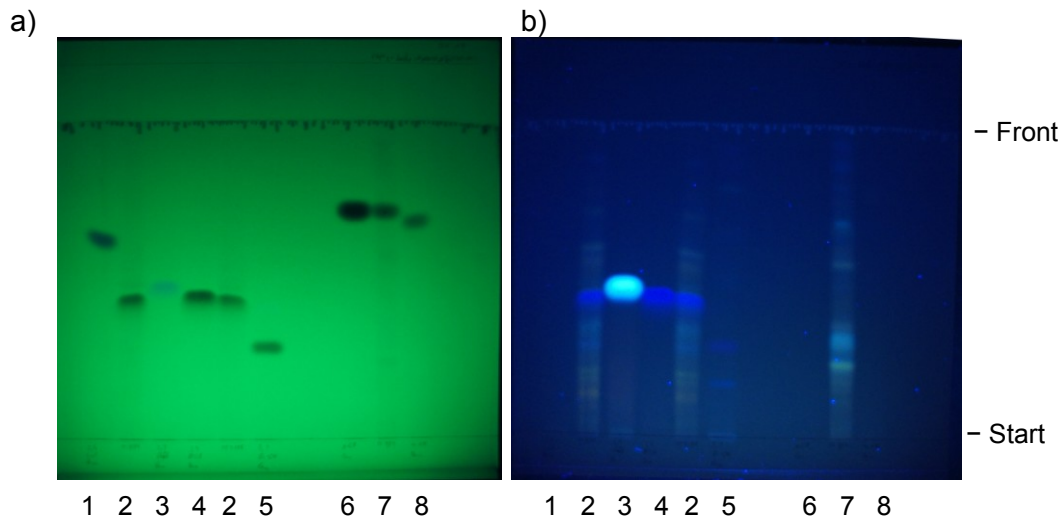
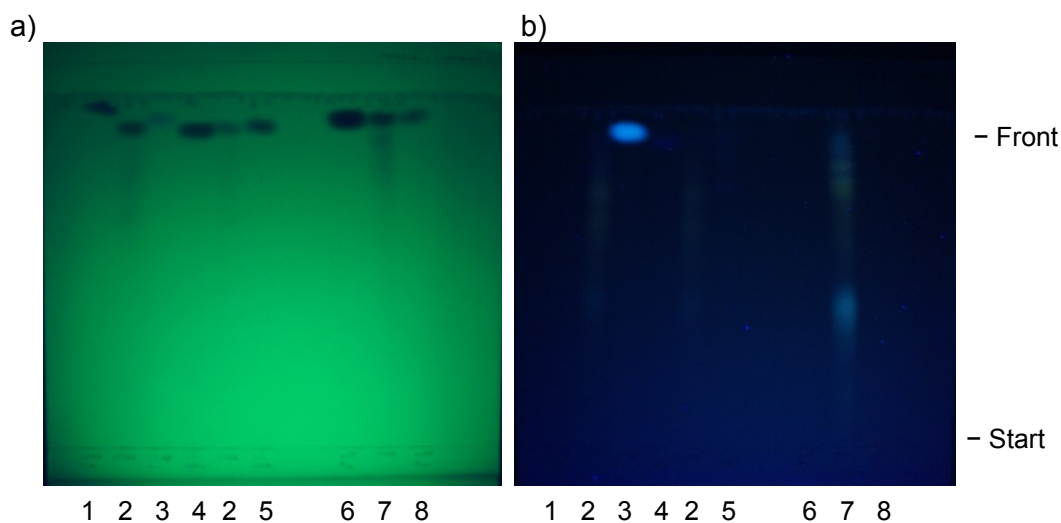


Abbildung 34: DC-Vergleich von CSG7 und CSG8 mit authentischen Substanzen (System 2)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 20 x 20 cm

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

Detektion: a) unbesprüht unter 254 nm
b) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)

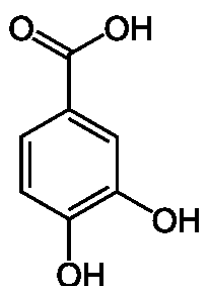


Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	2,4-Dihydroxybenzoesäure	5	3,5-Dihydroxybenzoesäure
2	CSG8	6	p-Hydroxybenzoesäure
3	2,5-Dihydroxybenzoesäure	7	CSG7
4	3,4-Dihydroxybenzoesäure	8	m-Hydroxybenzoesäure

In den Dünnschichtchromatogrammen zeigte sich unter Betrachtung bei UV 254 nm, dass 3,4-Dihydroxybenzoesäure den gleichen R_f-Wert wie Substanz CSG8 bei R_f 0,44 im System 1 bzw. R_f 0,9 im System 2 zeigte. Nach Besprühen mit Naturstoffreagenz und Polyethylenglycol 400 zeigten sowohl CSG8 als auch die 3,4-Dihydroxybenzoesäure eine blaue Fluoreszenz. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei CSG8 um 3,4-Dihydroxybenzoesäure handelte.

Abbildung 35: 3,4-Dihydroxybenzoesäure

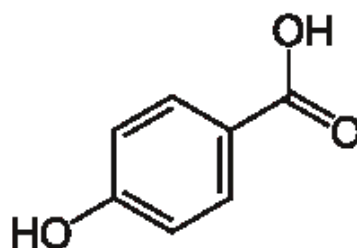
(Quelle: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Protocatechusäure.svg>)



Unter UV 254 nm konnte man erkennen, dass CSG7 die gleichen R_f-Werte aufwies wie p-Hydroxybenzoesäure (R_f 0,6 im System 1 bzw. R_f 0,95 im System 2). So wie diese zeigte auch CSG7 keine Reaktion mit Naturstoffreagenz und Polyethylenglycol. p-Hydroxybenzoesäure war bereits für eine andere *Eriosema*-Art beschrieben worden [2].

Abbildung 36: p-Hydroxybenzoesäure

(Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/File:4-Hydroxybenzoic_acid.svg)



3.5 Isolierung von CSG5a und CSG5b aus Fraktion 12

3.5.1 Durchführung von SPE1

Fraktion 12 (Seite 8f.) zeigte auf dem Dünnschichtchromatogramm zwei angereicherte Substanzen, eine bei R_f 0,33 und eine weitere bei R_f 0,57. Da knapp unter 100 mg der Fraktion vorhanden waren, wurde sie mittels Solid Phase Extraktion aufgereinigt.

Durchführung: siehe 2.2.3, Seite 4

Kartusche: Varian Mega Bond Elut C18, 20 ml

Auftragelösung: Fraktion 12 (86 mg) wurde in 300 μ l Methanol im Ultraschallbad gelöst und langsam auf die Kartusche aufgetragen.

Elution: Methanol-Wasser Mischungen von 0–100 %

Flussrate: 2,5 ml / min

Jede Fraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert und ähnliche zu Sammelfraktionen vereinigt.

Tabelle 10: Sammelfraktionen SPE 3

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Gewicht (mg)
1	Wasser 1-3 10 % MeOH 1-3 15 % MeOH 1-2	3,1
2	15 % MeOH 3 20 % MeOH 1-5	10,4
3	30 % MeOH 1	1,7
4	30 % MeOH 2	5,7
5	30 % MeOH 3 40 % MeOH 1-2	13,1
6	40 % MeOH 3 50 % MeOH 1	5,5
7	50 % MeOH 2-3 70 % MeOH 1-3 100 % MeOH 1-3	4,8

Von den erhaltenen Sammelfraktionen wurde eine DC angefertigt.

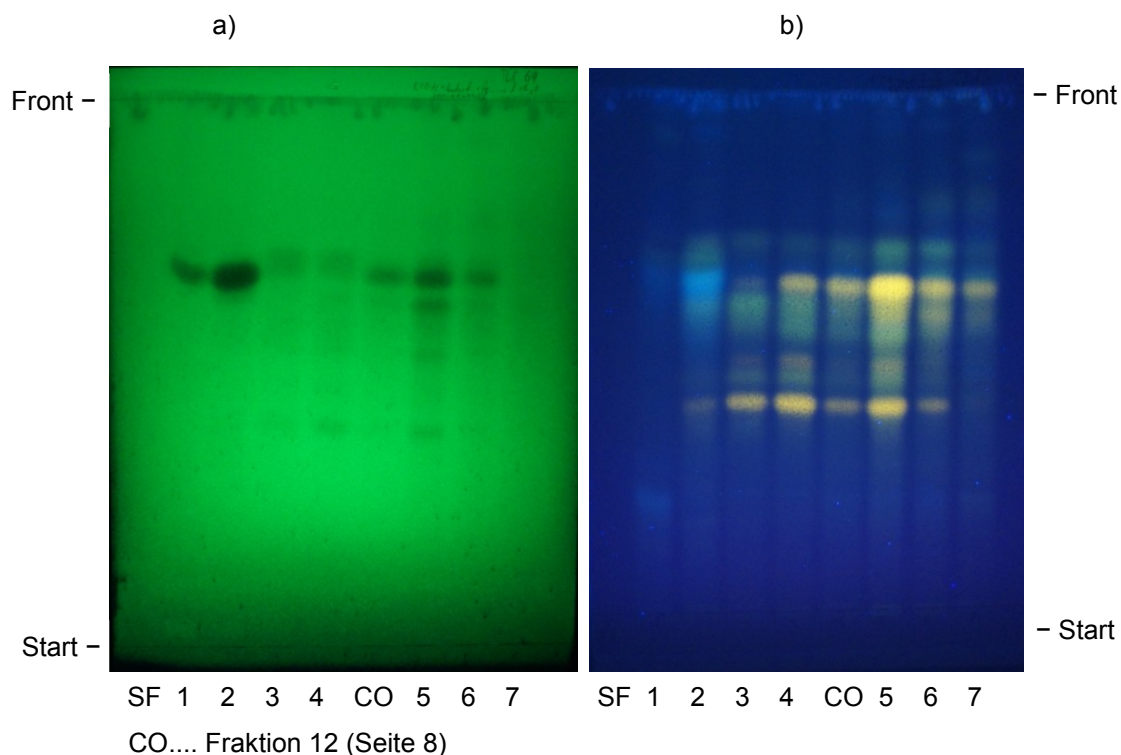
Abbildung 37: DC der Sammelfraktionen von SPE 3

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 10 x 20 cm

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

Detektion: a) ohne Besprühen bei 254 nm

b) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Unbesprüht erkennt man auf Bahn 2 unter UV 254 nm bei ca. R_f 0,71 eine Bande mit starker Löschung, die nach Besprühen mit Naturstoffreagenz eine schwache grünliche Fluoreszenz zeigte. Obwohl auf der besprühten Platte noch weitere Banden in dieser Fraktion sichtbar waren, wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt.

3. Ergebnisse

Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm von SPE1SF2

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1

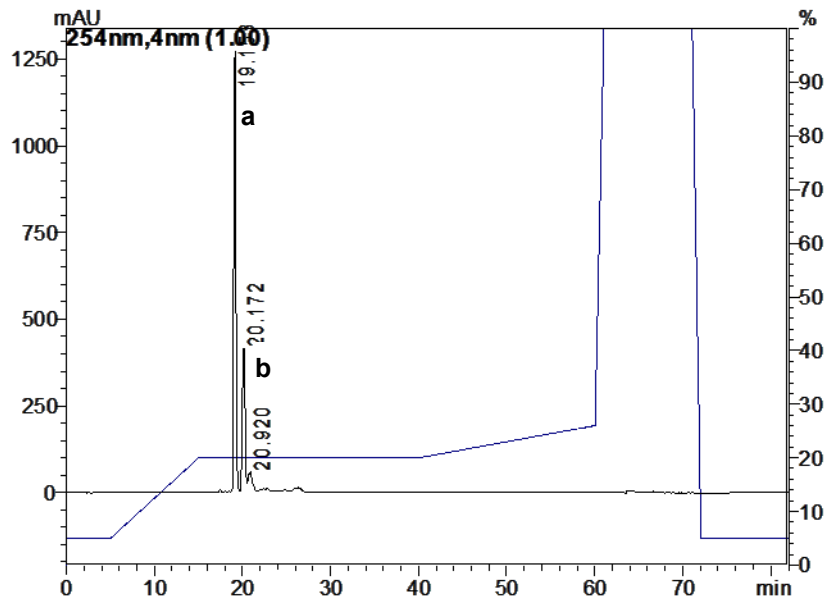
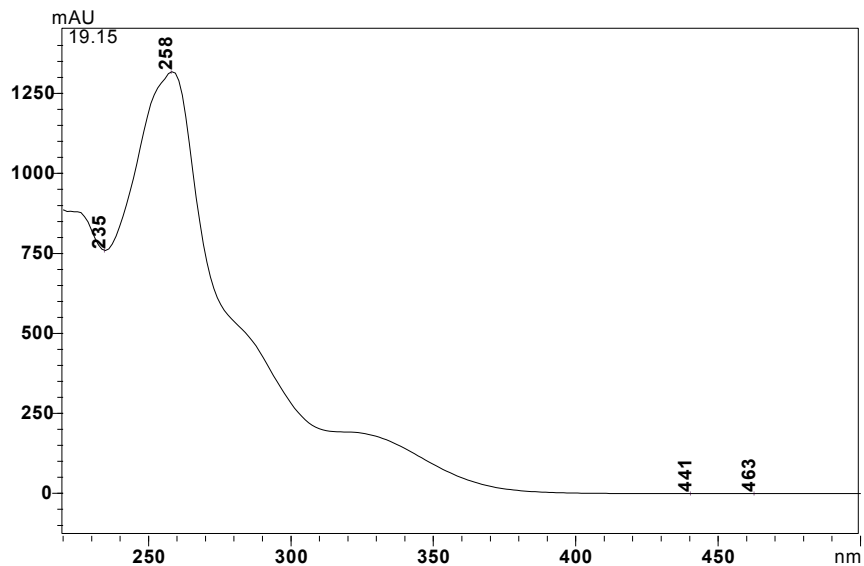


Abbildung 39: UV-Spektrum des Peaks bei 19,15 Minuten



Im HPLC-Chromatogramm war ersichtlich, dass es sich bei Sammelfraktion 2 um ein Gemisch aus einer Hauptkomponente mit einer Retentionszeit von 19,15

Minuten und einem zweiten, kleineren Peak mit einer Retentionszeit von 20,17 Minuten handelte. Diese Fraktion wurde CSG5 bezeichnet.

3.5.2 Identifizierung von CSG5a (=2'-Hydroxygenistein-7-O-glucosid) und CSG5b (=Genistein-8-C-glucosid)

Um die enthaltenen Substanzen zu identifizieren, wurde CSG5 mittels Massenspektrometrie analysiert.

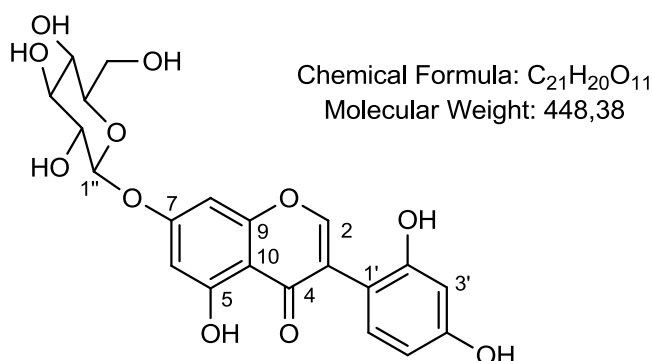
Für die Substanz mit der Retentionszeit von 19,15 (=CSG5a) konnte eine Masse von 448,0 Da (m/z 447,0 $[M-H]^-$ im Negativionen Modus) ermittelt werden. Das auftretende Fragmentation bei m/z 285,1 ($[M-H]^- - 162,0$ -Hexose) wies auf eine O-verknüpfte Hexose hin.

Daher konnte man von einem O-Hexosid von Hydroxygenistein ausgehen.

Die zweite enthaltene Substanz (=CSG5b) hatte ein Molekulargewicht von 432,0 Da (m/z 431,0 $[M-H]^-$ im Negativionen Modus) und war ein C-Glycosid eines Aglykons (Fragmentation bei m/z 311,2 ($[M-H]^- - 120,0$)), das eine Hydroxylgruppe weniger aufwies.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden das Substanzgemisch mittels zweidimensionaler NMR-Techniken untersucht.

Abbildung 40: Struktur von CSG5a



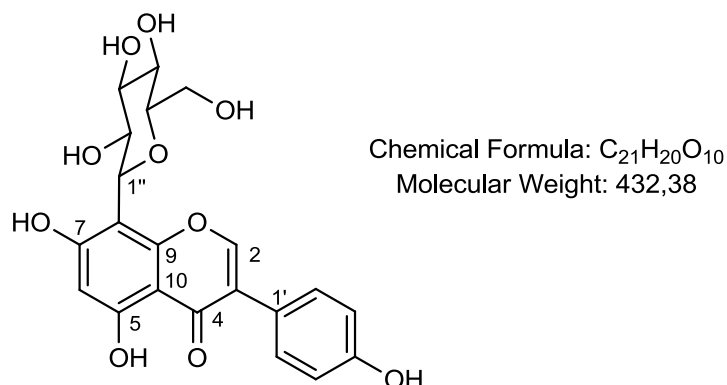
3. Ergebnisse

Tabelle 11: Vergleich der ^{13}C -NMR Signale von CSG5a mit 2'-Hydroxygenistein-7-O-glucosid

Position	^{13}C (ppm) CSG5a (MeOH-d4)	^{13}C (ppm) Referenz (DMSO-d6) [15]
2	157.3	155.9
3	122.9	120.8
4	182.9	180.7
5	163.4	161.5
6	101.1	99.5
7	164.8	162.9
8	95.9	94.5
9	159.3	157.3
10	108,0	106.1
1'	110.5	108.4
2'	157.8	156.4
3'	104.2	102.6
4'	160.3	158.7
5'	108.1	106.3
6'	133.3	132.2
1''	101.6	99.9
2''	74.7	73.1
3''	77.8	77.2
4''	71.2	69.6
5''	78.4	76.4
6''	62.4	60.7

Die ^{13}C -NMR Daten von CSG5a (in MeOH-d4) zeigten gute Übereinstimmung mit den Daten von 2'-Hydroxygenistein-7-O-glucosid (in DMSO-d6) [15] und erlaubten die eindeutige Identifizierung der Substanz mit der Retentionszeit von 19,15 Minuten.

Aus dem Fragmentierungsmuster der zweiten Komponente in der MS lag der Schluss nahe, dass es sich um Genistein als Genin handelte.

Abbildung 41: Struktur von CSG5b**Tabelle 12: Vergleich ¹³C-NMR Signale von CSG5b mit Genistein-8-C-glucosid**

Position	¹³ C (ppm) CSG5b (MeOH-d4)	¹³ C (ppm) Referenz (MeOH-d4) [16]
2	154.7	154.7
3	124.5	124.4
4	182.6	182.5
5	163.5	163.4
6	100.3	100.4
7	164.7	164.7
8	104.4	104.4
9	158.0	158.8
10	106.4	106.5
1'	123.2	123.5
2'/6'	131.4	131.3
3'/5'	116.3	116.1
4'	158.9	158.8
1''	75.3	75.4
2''	72.9	72.7
3''	80.1	79.9
4''	71.8	71.8
5''	82.7	82.6
6''	62.9	62.9

Aus der hervorragenden Übereinstimmung mit der Literatur [16] konnte die zweite Komponente in CSG5 eindeutig als Genistein-8-C-glucosid identifiziert werden.

3.6 Isolierung von CSG3 aus Fraktion 23

3.6.1 Vorversuche

Fraktion 23 (siehe Seite 8f.) war bereits in früheren Arbeiten mittels HPLC-MS untersucht worden. Dabei wurde eine Fragmentierung ähnlich der von Homoorientin beobachtet. Um dies zu überprüfen, wurde ein Vergleich von Fraktion 23 mit Homoorientin mittels HPLC durchgeführt und die UV-Spektren verglichen.

Abbildung 42: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 23

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1

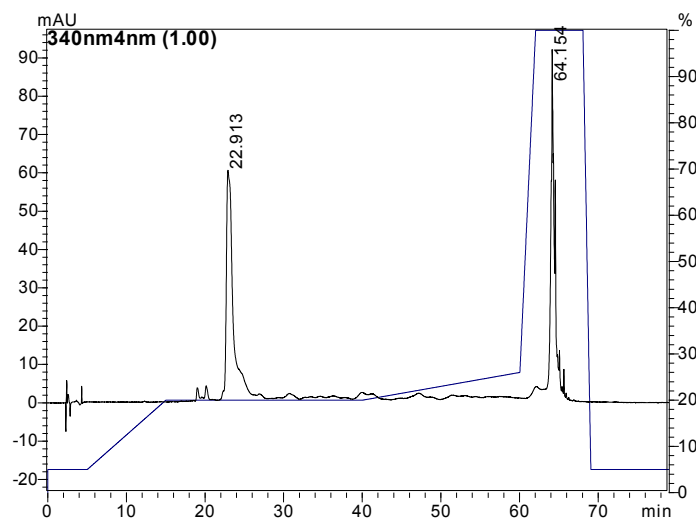


Abbildung 43: HPLC-Chromatogramm von Homoorientin

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1

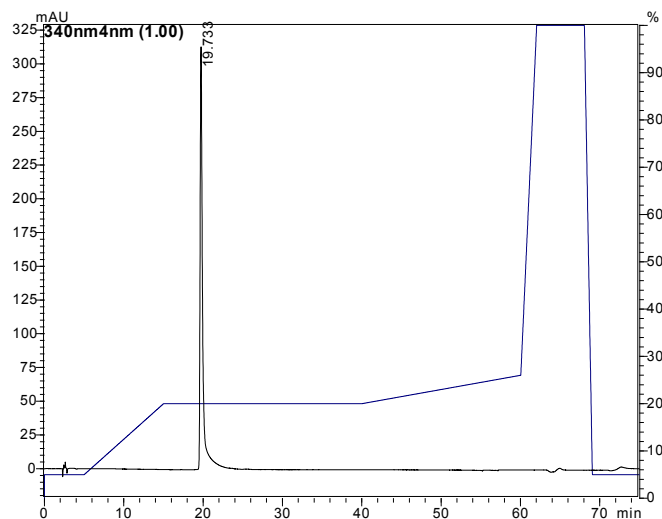
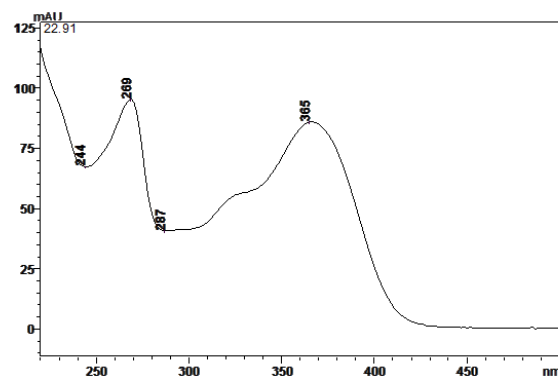
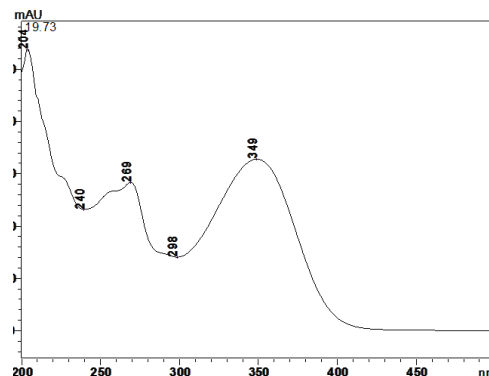


Abbildung 44: Vergleich der UV-Spektren des Peaks bei 22,91 Minuten und von Homoorientin

Peak bei 22,91 Minuten



Homoorientin



Obwohl die Hauptkomponente von Fraktion 23 im verwendeten HPLC-System eine ähnliche Retentionszeit wie Homoorientin zeigte, wurde beim Vergleich der UV-Spektren deutlich, dass es sich nicht um Homoorientin handeln konnte. Weiters konnten auch andere Glykoside und Glykosyle von Luteolin ausgeschlossen werden, da diese ähnliche UV-Spektren wie Homoorientin hätten. Das UV-Spektrum der Substanz aus Fraktion 23 ähnelte jedoch dem Spektrum von Kämpferol [11].

3.6.2 Durchführung von SPE2

Um die Hauptkomponente aus Fraktion 23 zu isolieren, wurde eine Solid Phase Extraktion durchgeführt.

Durchführung: siehe 2.2.3, Seite 4

Kartusche: Varian Mega Bond Elut C18, 20 ml

Auftragslösung: Fraktion 23 (100 mg) wurde in 300 µl Methanol im Ultraschallbad gelöst und langsam auf die Kartusche aufgetragen.

Elutionslösungen: Methanol-Wasser Mischungen von 10–100%, je 3 mal 15 ml

Flussrate: 2,5 ml / min

Jede Fraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert und ähnliche zu Sammelfractionen vereinigt.

Tabelle 13: Sammelfractionen SPE2

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Gewicht (mg)
1	10 % MeOH 1-3 20 % MeOH 1-3 30 % MeOH 1	3,5
2	30 % MeOH 2	3,1
3	30 % MeOH 3	2,2
4	40 % MeOH 1	6,4
5	40 % MeOH 2	9,9
6	40 % MeOH 3	3,9
7	50 % MeOH 1	8,5
8	50 % MeOH 2	5,9
9	50 % MeOH 3	4,4
10	60 % MeOH 1-3	11,6
11	70 % MeOH 1-2	4,9
12	70 % MeOH 3	2,0
13	80 % MeOH 1-3 90 % MeOH 1-3 100 % MeOH 1-3	3,8

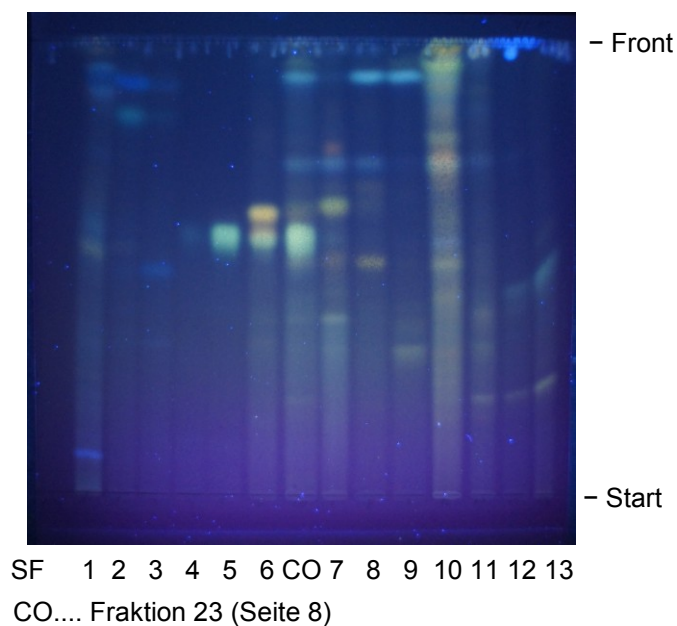
Von den erhaltenen Sammelfractionen wurde eine DC angefertigt.

Abbildung 45: Sammelfractionen von SPE2

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 20 x 20 cm

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

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Die Sammelfraktion 5 zeigte bei ca. Rf 0,6 eine grünlich-gelb fluoreszierende Bande, die offenbar von den anderen in der Fraktion enthaltenen Substanzen abgetrennt werden konnte. Um zu überprüfen, ob es sich dabei um die zu isolierende Substanz handelte, wurde eine HPLC-Analyse unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.6.1 (Seite 50) durchgeführt.

Abbildung 46: HPLC-Chromatogramm von SPE2SF5

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1

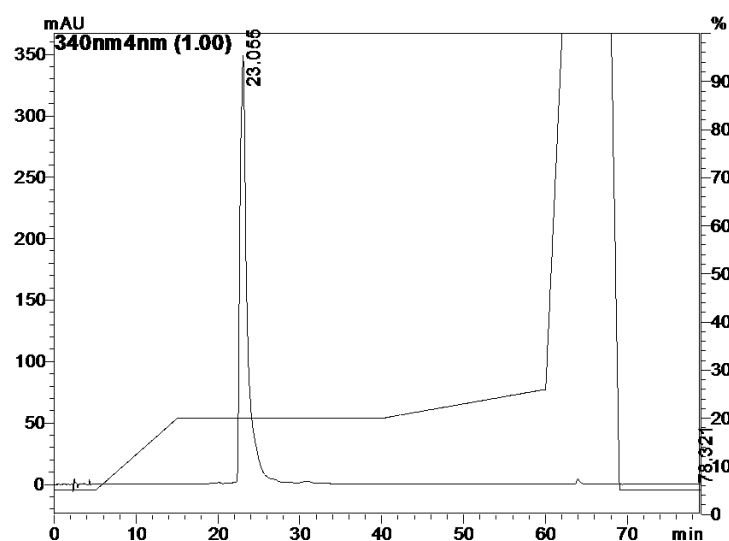
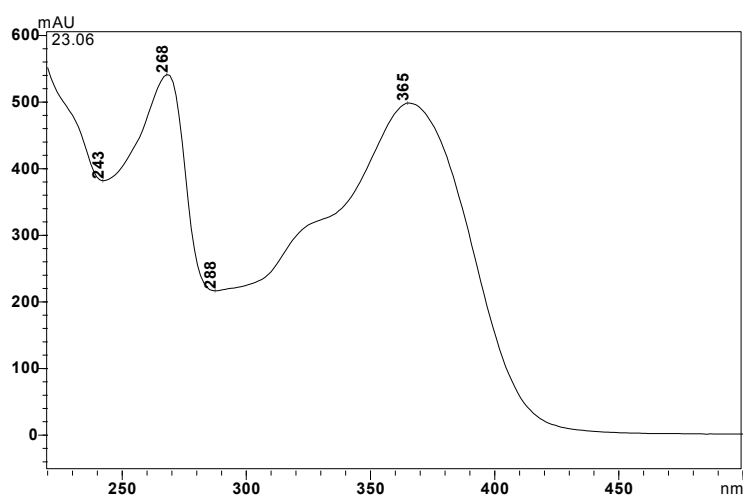


Abbildung 47: UV-Spektrum des Peaks bei 23,06 Minuten

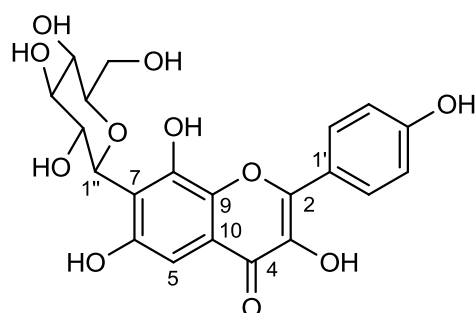


Da sowohl die Retentionszeit, als auch das UV-Spektrum mit der zu isolierenden Substanz übereinstimmte, war davon auszugehen, dass CSG3 erfolgreich isoliert worden war.

3.6.3 Identifizierung von CSG3 (=3,4',6,8-Tetrahydroxyflavon-7-C-glucoside)

Zur Strukturaufklärung wurde CSG3 mittels zweidimensionaler NMR-Techniken untersucht.

Abbildung 48: Struktur von CSG3 in MeOH-d4



Chemical Formula: $C_{21}H_{20}O_{11}$
Molecular Weight: 448,38

Tabelle 14: NMR Signale CSG3

		^1H (ppm)	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	^{13}C (ppm)
2	C	–	–	148.07
3	C	–	–	137.19
4	C	–	–	177.57
5	CH	6.454	s	94.74
6	C	–	–	164.54
7	C	–	–	108.30
8	C	–	–	161.33
9	C	–	–	157.57
10	C	–	–	104.45
1'	C	–	–	123.62
2'/6'	CH	8.080	d 9.0	130.69
3'/5'	CH	6.902	d 9.0	116.33
4'	C	–	–	160.63
β -Glucose				
1	CH	4.910	d 9.8	75.32
2	CH	4.177	d 9.8 / d 9.3	72.61
3	CH	3.481	d 9.3 / d 9.3	80.15
4	CH	3.482	d 9.3 / d 9.7	71.80
5	CH	3.422	d 9.7 / d 2.3 / d 5.5	82.62
6	CH ₂	3.878	d 2.3 / d 12.1	62.88
		3.741	d 5.5 / d 12.1	

Aus der Analyse mittels ESI-MS ergab sich ein Molekulargewicht von 448.0 Da (m/z 447.0 $[M-H]^-$ im Negativionen Modus). Die auftretenden Fragmente bei m/z 357.0 ($[M-H]^- - 90$) und m/z 327.0 ($[M-H]^- - 120$) waren charakteristisch für eine C-glykosidisch gebundene Hexose.

Im 1H -NMR Spektrum der in MeOH- d_4 gelösten Substanz waren zwei Bereiche erkennbar. Die Protonen des Aglykons im Bereich von δ 8.0 bis 6.0 ppm und die Protonen der Zuckerkomponente im Bereich von δ 5.0 bis 3.0 ppm. In der aromatischen Region traten nur drei Signale auf, wobei es sich um ein Singlet und zwei Dubletts handelte. Die HSQC zeigte, dass das Dublett mit einem Shift von δ 8.080 ppm an einem Kohlenstoff mit einem Shift von δ 130.69 gebunden war und daher zu einer aromatischen Struktur gehörte. Das zweite Dublett mit einem Shift von δ 6.902 ppm war an einen Kohlenstoff mit einem Shift von δ 116.33 ppm gebunden. Somit konnte, wie auch schon für CSG1, ein 4'-hydroxylierter B-Ring einer Flavonoid-Struktur nachgewiesen werden.

Der Kohlenstoff mit einem Shift von δ 177.57 ppm konnte der Carbonylfunktion in Position 4 zugeordnet werden. Da diese Verschiebung charakteristisch für Flavonole [13] ist, konnte eine Hydroxylgruppe in Position 3 bestätigt werden.

Das verbleibende aromatische Proton mit einem Shift von δ 6.454 ppm war ein Singlet. Daraus konnte das Vorliegen eines einzigen freien Protons in Ring A abgeleitet werden. In der HMBC koppelte dieses Proton mit Kohlenstoffen bei δ 104.45 ppm (C-10, aromatischer Kohlenstoff), δ 108.30 ppm (C-7, aromatischer Kohlenstoff), δ 157.57 ppm (C-9, aromatischer Kohlenstoff gebunden an einen Sauerstoff), δ 164.54 ppm (C-6, aromatischer Kohlenstoff gebunden an einen Sauerstoff) und δ 177.57 ppm (C-4, Carbonylfunktion). Da keine Kopplung mit dem zweiten Kohlenstoff mit einer freien Hydroxylgruppe auftrat, ergab sich Position 5 als einzige mögliche Position für dieses Proton. Dies deckte sich mit dem Substitutionsmuster von CSG1.

Für das anomere Proton der Zuckerkomponente konnte ein Shift von δ 4.910 ppm im 1H -NMR Spektrum ermittelt werden. Durch HMBC konnten Kopplungen dieses Protons mit einem aromatischen Kohlenstoff (C-7, δ 108.30 ppm) und zwei aromatischen Kohlenstoffen mit freien Hydroxylgruppen (C-6, δ 164.54 ppm und C-8, δ 161.33 ppm) festgestellt werden. Daraus war ersichtlich, dass der Zucker an Position 7 gebunden sein musste.

Die Kopplungskonstante von 9.8 Hz für H-1 des Zucker deutete auf eine β -Konfiguration der glycosidischen Bindung hin. Die Kopplungskonstanten der

einzelnen Signale des Zuckers für H-2, H-3, H-4 und H-5 zwischen 9 und 10 Hz wiesen auf axiale Anordnung und damit auf das Vorliegen einer Glukose hin. Somit wurde CSG3 als 3,4',6,8-Tetrahydroxyflavon-7-C-glucosid identifiziert, wobei es sich um das 2,3 ungesättigte Derivat von CSG1 handelt. Diese Substanz stellt einen neuen Naturstoff dar.

3.7 Identifizierung von Substanzen mittels DC und HPLC

Weitere Substanzen konnten durch Vergleich mit authentischen Substanzen in zwei chromatographischen Systemen identifiziert werden.

3.7.1 Identifizierung von Isovitexin und Homoorientin

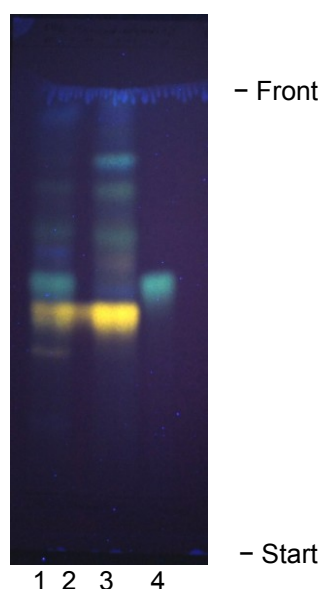
Fraktion 14 wurde aufgrund des Ergebnisses der Voruntersuchungen (Kap. 3.1., Seite 8) auf das Vorliegen von Isovitexin und Homoorientin untersucht.

Abbildung 49: DC von Fraktion 14 mit Isovitexin und Homoorientin

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 20 x 20 cm

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

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 14
2	Homoorientin
3	Fraktion 16
4	Isovitexin

Das Dünnschichtchromatogramm zeigte, dass die orange fluoreszierende Bande bei R_f 0,45, die sowohl in Fraktion 14 und 16 auftrat, mit Homoorientin übereinstimmte.

Die knapp darüber liegende, türkis fluoreszierende Bande in Fraktion 14 hatte den gleichen R_f-Wert und die gleiche Farbe wie Isovitexin.

Zur Bestätigung wurde ein HPLC–Lauf durchgeführt und die Fraktion mit den beiden Substanzen anhand der Retentionszeit als auch des UV-Spektrums verglichen.

Abbildung 50: HPLC–Chromatogramm von Fraktion 14

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1

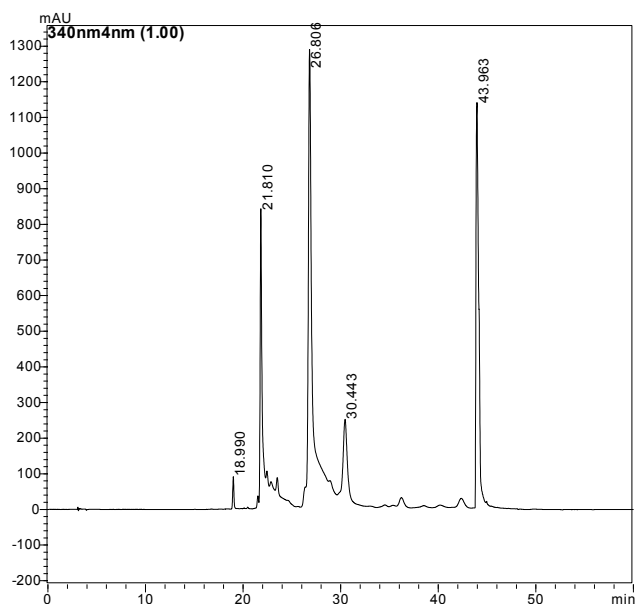
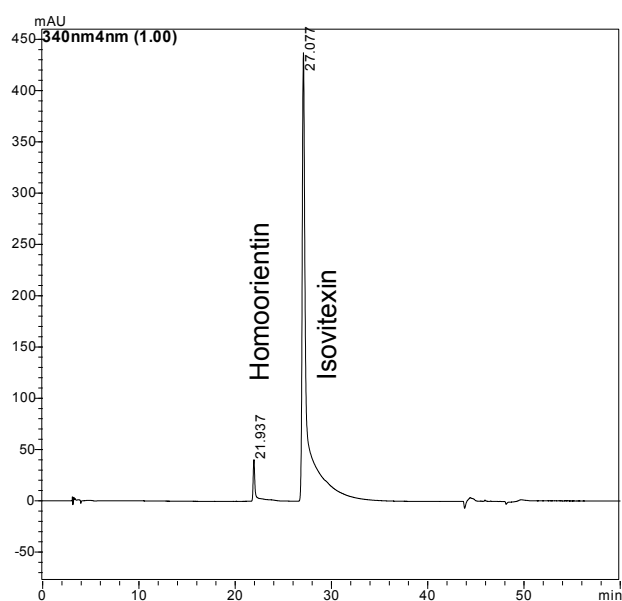


Abbildung 51: HPLC–Chromatogramm von Isovitexin und Homoorientin

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1



3. Ergebnisse

Abbildung 52: Vergleich der UV-Spektren des Peaks bei 21,81 Minuten und von Homoorientin

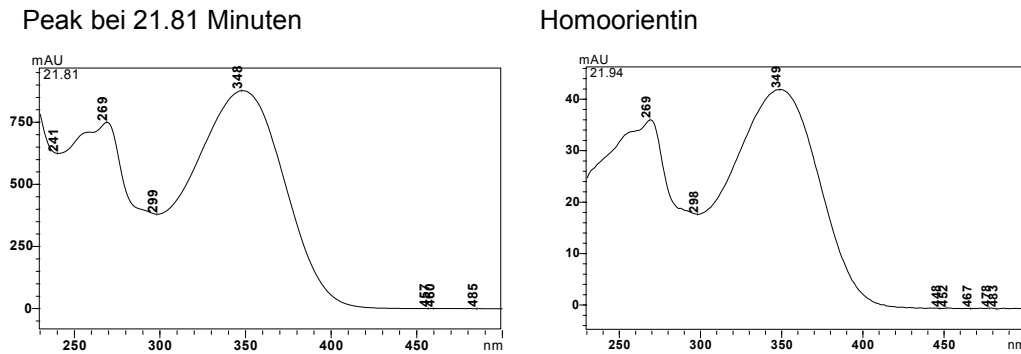
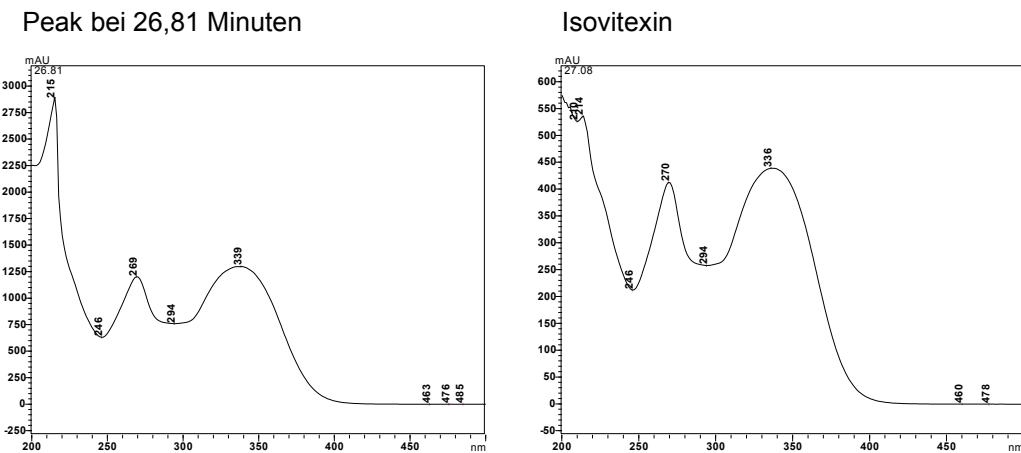


Abbildung 53: Vergleich der UV-Spektren des Peaks bei 26,81 Minuten und von Isovitexin



Da die Peaks im HPLC-Chromatogramm der Fraktion 14 mit Rt 21,81 Minuten und Rt 26,81 Minuten jeweils das gleiche UV-Spektrum aufwiesen wie die Referenzsubstanzen (Homoorientin mit Rt 21,94 Minuten und Isovitexin mit Rt 27,08 Minuten), wurde das Vorhandensein beider Substanzen bestätigt.

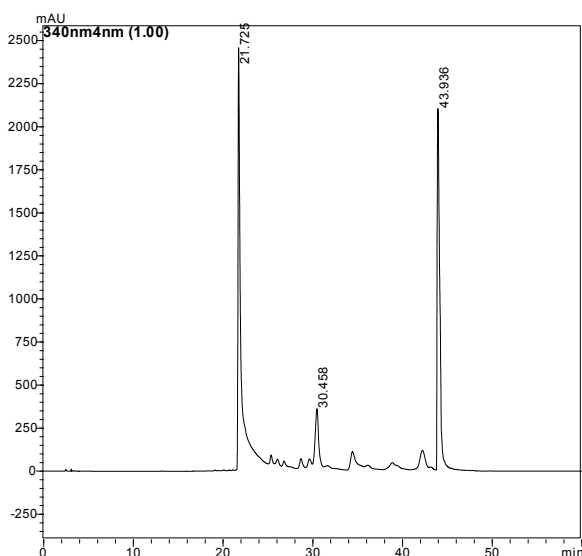
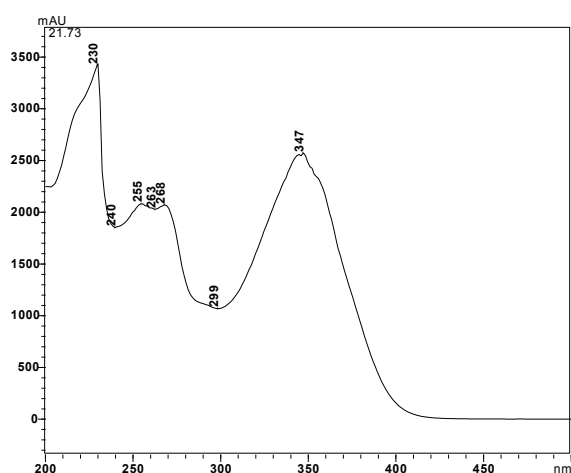
3.7.2 Identifizierung von Homoorientin in Fraktion 16

In Abbildung 49 (Seite 56) ist ersichtlich, dass auch Fraktion 16 Homoorientin enthalten könnte. Um dies zu bestätigen, wurde ebenfalls eine HPLC-Analyse durchgeführt.

Abbildung 54: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 16

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1

**Abbildung 55: UV-Spektrum des Peaks bei 21,73 Minuten**

Das HPLC-Chromatogramm von Fraktion 16 zeigte einen Peak bei Rt 21,73 Minuten, der sehr gut mit Homoorientin übereinstimmte (Abbildung 51, Seite 57). Die UV-Spektren stimmten ebenfalls überein (Abbildung 52, Seite 58).

3.7.3 Identifizierung von Luteolin-7-O-glucosid

Fraktion 19+20 wurde aufgrund des Ergebnisses der Voruntersuchungen (Kap. 3.1., Seite 9) näher auf das Vorliegen von Luteolin-7-O-glucosid untersucht.

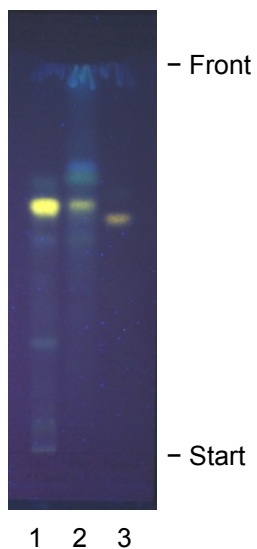
3. Ergebnisse

Abbildung 56: DC von Fraktion 19+20 mit Luteolin-7-O-glucosid

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 6 x 20 cm

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

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Bahn	Substanz
1	Luteolin-7-O-glucosid
2	Fraktion 19+20
3	Hyperosid

Bei R_f 0,65 sieht man sowohl auf Bahn 1 als auch auf Bahn 2 eine gelb fluoreszierende Bande, die auf das Vorhandensein von Luteolin-7-O-glucosid schließen ließ. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine HPLC-Analyse mit der authentischen Referenzsubstanz durchgeführt.

Abbildung 57: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 19+20

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

Methode: Methode 1

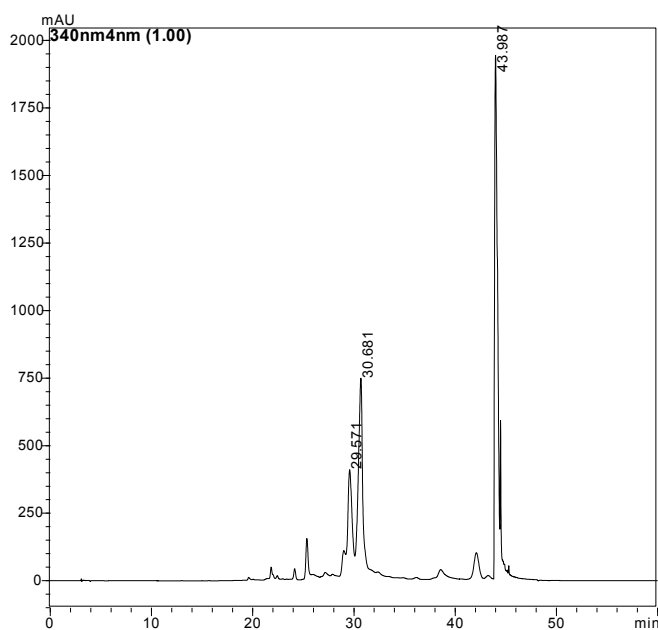
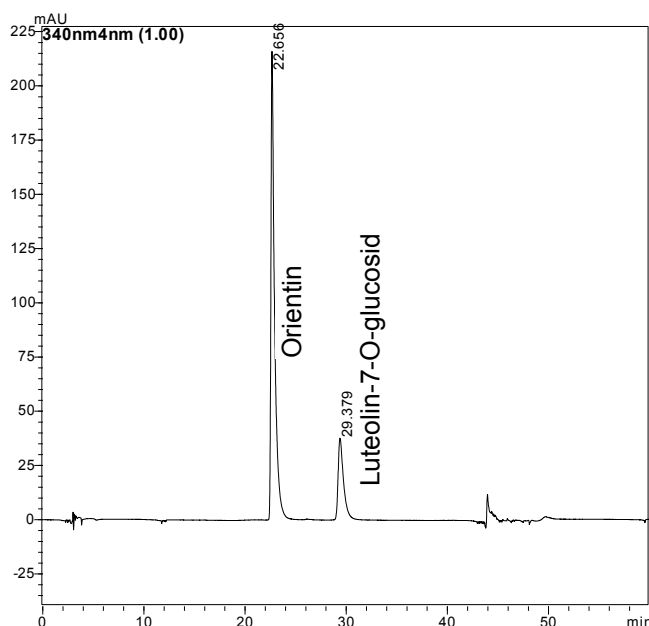


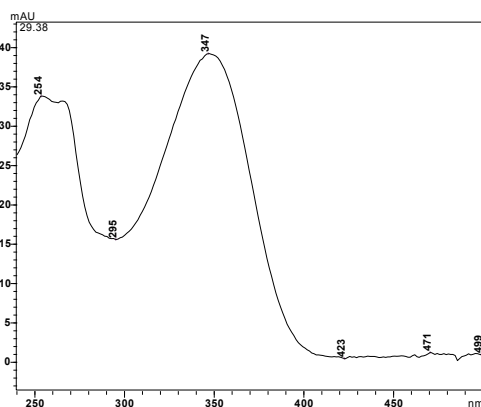
Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm von Luteolin-7-O-glucosid und Orientin

Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 5

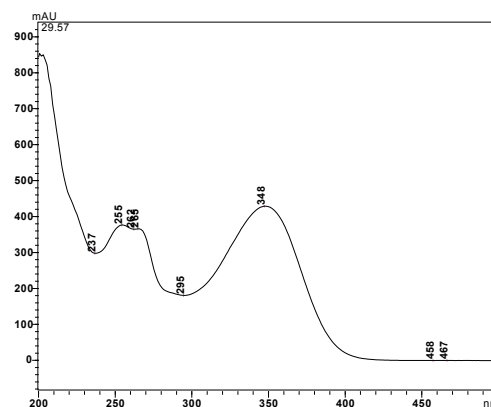
Methode: Methode 1

**Abbildung 59: Vergleich der UV-Spektren des Peaks bei 29,57 Minuten und von Luteolin-7-O-glucosid**

Peak bei 29,57 Minuten



Luteolin-7-O-glucosid



Der Peak im HPLC-Chromatogramm der Fraktion 19+20 bei Rt 29,57 Minuten zeigte das gleiche UV-Spektrum wie der Peak bei Rt 29,38 Minuten im Referenzchromatogramm, der Luteolin-7-O-glucosid entspricht. Somit war durch zwei Methoden belegt, dass Fraktion 19+20 Luteolin-7-O-glucosid enthielt. Orientin konnte in dieser Fraktion nicht nachgewiesen werden.

3.7.4 Identifizierung von Genistein und Quercetin-3-O-methylether

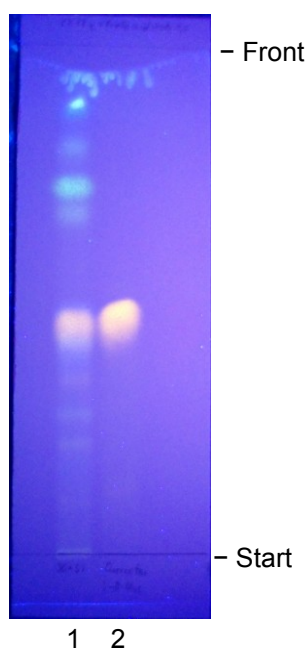
Fraktion 30+31 wurde aufgrund des Ergebnisses der Voruntersuchungen (Kap. 3.1., Seite 8f.) näher auf das Vorliegen von Quercetin-3-O-methylether und Genistein untersucht.

Abbildung 60: DC von Fraktion 30+31 mit Quercetin-3-O-methylether (System 1)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 20 x 20 cm

Mobile Phase: Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser
(80 + 20 + 10 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 30+31
2	Quercetin-3-O-methylether

Bei Rf 0,5 war auf beiden Bahnen eine orange fluoreszierende Band zu erkennen. Dies deutete darauf hin, dass Quercetin-3-O-methylether eine Komponente der Fraktion ist.

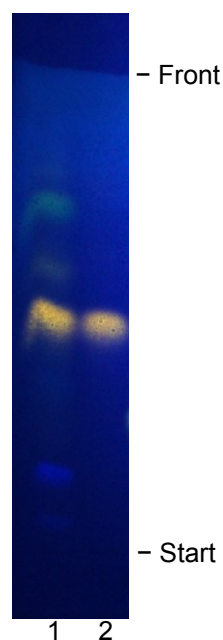
Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine zweite Dünnschichtchromatographie durchgeführt, wobei Cellulose als stationäre Phase verwendet wurde.

Abbildung 61: DC von Fraktion 30+31 mit Quercetin-3-O-methylether (System 2)

Stationäre Phase: Cellulose F Fertigplatte (Merck), 6 x 20 cm

Mobile Phase: Essigsäure conc. + Wasser (1 + 1)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 30+31
2	Quercetin-3-O-methylether

Die orange fluoreszierende Banden zeigten auch im zweiten System denselben Rf-Wert. Somit war mit zwei verschiedenen Systemen belegt, dass die Fraktion 30+31 Quercetin-3-O-methylether enthielt.

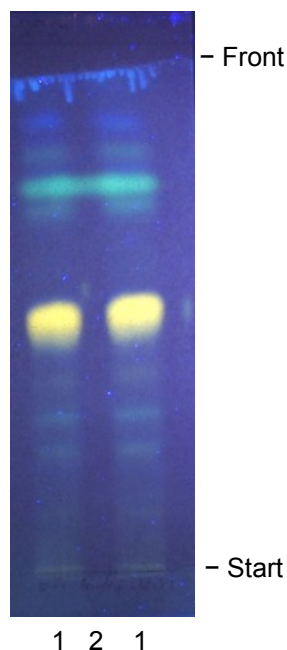
3. Ergebnisse

Abbildung 62: DC von Fraktion 30+31 mit Genistein

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 20 x 20 cm

Mobile Phase: Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser
(80 + 20 + 10 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 30+31
2	Genistein

Bei R_f 0,78 zeigte sich eine türkis fluoreszierende Bande, die auf das Vorhandensein von Genistein in der Fraktion schließen ließ. Genistein war bereits in einer vorhergehenden Diplomarbeit in den unterirdischen Teilen von *Eriosema laurentii* identifiziert worden [9]. Daher erfolgte keine weitere Bestätigung der Struktur.

3.7.4 Identifizierung von Luteolin

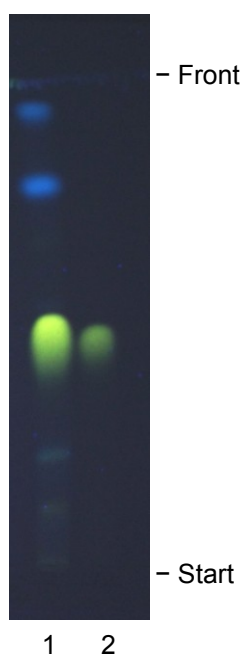
Die orientierende DC (Kap. 3.1, Seite 9) ließ auf das Vorliegen von Luteolin in Fraktion 32 schließen. daher erfolgte eine weitere dünnschichtchromatographische Untersuchung von Fraktion 32 mit Luteolin.

Abbildung 63: DC von Fraktion 32 mit Luteolin (System 1)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 20 x 20 cm

Mobile Phase: Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser
(80 + 20 + 10 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 32
2	Luteolin

Fraktion 32 zeigte nach Besprühen mit Naturstoffreagenz und Polyethylenglycol 400 eine gelb fluoreszierende Bande, die sowohl die gleiche Farbe, als auch den gleichen R_f-Wert aufwies wie Luteolin. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde eine zweite Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Cellulose als stationäre Phase durchgeführt.

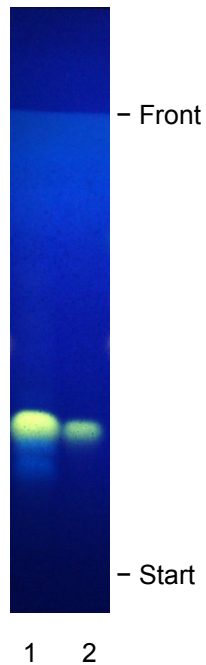
3. Ergebnisse

Abbildung 64: DC von Fraktion 32 mit Luteolin (System 2)

Stationäre Phase: Cellulose F Fertigplatte (Merck), 6 x 20 cm

Mobile Phase: Essigsäure conc. + Wasser (1 + 1)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2, Seite 5)



Bahn	Substanz
1	Fraktion 32
2	Luteolin

Auch in diesem System wies Luteolin den gleichen Rf-Wert auf wie die Hauptkomponente von Fraktion 32. Damit war das Vorliegen von Luteolin in dieser Fraktion bewiesen.

4. Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, Fraktionen eines methanolischen Extraktes der oberirdischen Pflanzenteile von *Eriosema laurentii* mit Hilfe unterschiedlicher Trennmethoden weiter aufzutrennen und die Inhaltsstoffe zu identifizieren. Durch die Aufarbeitung von fünf Fraktionen (Fraktion 3, 4+5, 11, 12 und 23) konnten zwei neue Naturstoffe und sieben weitere Inhaltsstoffe isoliert werden sowie weitere sechs Inhaltsstoffe eindeutig identifiziert werden.

Fraktion 3 wurde mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 aufgetrennt (SC1 und SC2), wobei Substanz CSG4 isoliert werden konnte, die nach Massenspektrometrie und NMR-Experimenten als 2,6-Dihydroxybenzoesäure identifiziert werden konnte.

Fraktion 4 und 5 wurden aufgrund ihrer ähnlichen Zusammensetzung kombiniert und ebenfalls mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 aufgetrennt (SC3), wobei Substanz CSG1 isoliert werden konnte. Mittels Massenspektrometrie und NMR-Analysen konnte die Substanz als 3,4',6,8-Tetrahydroxyflavanon-7-C-glucosid identifiziert werden. Diese Substanz stellt einen neuen Naturstoff dar.

Die Sammelfractionen 15–17 aus SC3 wurden einer weiteren Auftrennung mit Hilfe der HPCCC unterzogen. In diesem Arbeitsschritt wurden die Substanzen CSG6 und CSG2 isoliert. CSG6 konnte durch Massenspektrometrie als Syringaresinol identifiziert werden. CSG2 wurde als 2"-O-alpha-Rhamnosyl-6-C-fucosyl-3'-methoxy-luteolin identifiziert und zeitgleich in einer weiteren Diplomarbeit aus *E. laurentii* isoliert [14].

Fraktion 11 wurde mittels HPCCC aufgetrennt, wobei zwei Reinsubstanzen, CSG7 und CSG8, isoliert werden konnten. Durch Massenspektrometrie und Überprüfung der Ergebnisse mittels Dünnschichtchromatographie konnte CSG7 als p-Hydroxybenzoesäure und CSG8 als 3,4-Dihydroxybenzoesäure identifiziert werden.

Aus Fraktion 12 konnte durch Solid Phase Extraktion das Gemisch CSG5 isoliert werden. Dabei handelte es sich um eine Mischung von zwei Substanzen im

4. Diskussion der Ergebnisse

Verhältnis 1 : 0.38, wobei jene Substanz mit dem größeren Anteil als 2'-Hydroxygenistein-7-O-glucosid und jene mit dem geringeren Anteil als Genistein-8-C-glucosid identifiziert werden konnte.

Aus Fraktion 23 konnte ebenfalls durch Solid Phase Extraktion die Substanz CSG3 isoliert werden. Die Massenspektrometrie ergab als Struktur ein Glykosyl eines Tetrahydroxyflavons. Die NMR-Strukturaufklärung identifizierte die Substanz als 3,4',6,8-Tetrahydroxyflavon-7-C-glucosid. Diese Substanz stellt das 2,3 ungesättigte Derivat von CSG1 dar und es handelt sich dabei ebenfalls um einen neuen Naturstoff.

Weiters war es möglich, das Vorliegen von Homoorientin, Isovitexin, Genistein, Luteolin, Luteolin-7-O-glucosid und Quercetin-3-O-methylether durch DC- und HPLC-Vergleiche mit authentischen Substanzen zu bestätigen und diese Substanzen erstmals in *Eriosema laurentii* nachzuweisen.

5. Zusammenfassung

Pflanzen der Gattung *Eriosema* finden breite Anwendung in der traditionellen afrikanischen, südamerikanischen und chinesischen Medizin. Das Spektrum der Anwendungsgebiete umfasst Impotenz, Unfruchtbarkeit, Erkältungen, Durchfall und Hauterkrankungen.

Auszüge von *Eriosema laurentii* werden in Kamerun unter anderem bei Unfruchtbarkeit, verschiedenen gynäkologischen und menopausalen Beschwerden eingesetzt. Für einen methanolischen Extrakt der oberirdischen Anteile war östrogene Aktivität nachgewiesen worden.

Da *Eriosema laurentii* bisher chemisch nicht untersucht war, stellt die vorliegende Arbeit einen Teil eines Projektes zur phytochemischen Untersuchung dieser Pflanze dar.

Ziel war es, aus Fraktionen eines methanolischen Extraktes der oberirdischen Anteile von *E. laurentii* Substanzen zu isolieren. Zur Auftrennung wurden Säulenchromatographie mit unterschiedlichen stationären Phasen, High Performance Counter Current Chromatography und Solid Phase Extraktion eingesetzt.

Mit diesen Techniken konnten mit CSG1 und CSG3 zwei neue Naturstoffe sowie sieben weitere bekannte, aber bisher nicht für *E. laurentii* beschriebene Substanzen gewonnen werden. Bei den neuen Komponenten handelt es sich um die Flavonoide 3,4',6,8-Tetrahydroxyflavanon-7-C-glucosid und 3,4',6,8-Tetrahydroxyflavon-7-C-glucosid, die ungewöhnlich in Position 6 und 8 hydroxyliert sind. Die bekannten Komponenten waren die Flavonoide 2"-O-alpha-Rhamnosyl-6-C-fucosyl-3'-methoxy-luteolin, 2'-Hydroxygenistein-7-O-glucosid, Genistein-8-C-glucosid, die Hydroxybenzoesäuren p-Hydroxybenzoesäure, 2,6-Dihydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure und das Lignan Syringaresinol.

Als weitere Inhaltsstoffe konnten Homoorientin, Isovitexin, Genistein, Luteolin, Luteolin-7-O-glucosid und Quercetin-3-O-methylether durch DC- und HPLC-Vergleiche mit authentischen Substanzen identifiziert werden.

6. Summary

Members of the genus *Eriosema* are widely used in traditional African, South American and Chinese folk medicine in the treatment of erectile dysfunction, impotence, infertility, cough, diarrhea and skin diseases.

In Cameroon, extracts from *Eriosema laurentii* are used to treat infertility, and various gynecological and menopausal complaints. For a methanol extract of the aerial parts estrogenic activity had been proven.

As the chemical composition of *Eriosema laurentii* has hardly been studied, this thesis is part of a project on the phytochemistry of this plant.

The aim was to isolate substances from different fractions of a methanolic extract under use of different separation techniques like column chromatography with different stationary phases, high performance counter current chromatography and solid phase extraction.

This way CSG1 and CSG3, two new natural compounds, were isolated among seven known compounds that have not been described for *E. laurentii*, yet. The new substances were identified as the flavonoids 3,4',6,8-tetrahydroxyflavanon-7-C-glucoside and 3,4',6,8-tetrahydroxyflavon-7-C-glucoside. They show a very uncommon hydroxylation pattern in position 6 and 8. The other compounds were the flavonoids 2"-O-alpha-rhamnosyl-6-C-fucosyl-3'-methoxy-luteolin, 2'-hydroxy-genistein-7-O-glucosid, genistein-8-C-glucosid, the hydroxybenzoic acids p-hydroxybenzoic acid, 2,6-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid and the lignan syringaresinol.

Homoorientin, isovitexin, genistein, luteolin, luteolin-7-O-glucoside and quercetin-3-O-methylether were identified by TLC and HPLC comparison with authentic samples.

Literaturverzeichnis

- [1] Ma WG, Fuzzati N, Li QS, Yang CR, Stoeckli-Evans H, Hostettmann (1995) Polyphenols from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry* 39, 1049–1061
- [2] Ma WG, Fukushi Y, Ducrey B, Hostettmann K, Tahara S (1999) Phenolic glycosides from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry* 51, 1087–1093
- [3] Awouafack MD, Kouam SF, Hussain H, Ngama D, Tane P, Schulz B, Green IR, Krohn K (2008) Antimicrobial Prenylated Dihydrochalcones from *Eriosema glomerata*. *Planta Medica* 74, 50–54
- [4] Awouafack MD, Tane P, Eloff JN (2013) Two new antioxidant flavones from the twigs of *Eriosema robustum* (Fabaceae). *Phytochemistry Letters* 6, 62–66
- [5] Ma WG, Fukushi Y, Hostettmann K, Tahara S (1998) Isoflavonoid glycosides from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry* 49, 251–254
- [6] Drewes SE, Horn MM, Munro OQ, Dhlamini JTB, Meyer JJM, Rakuambo NC (2002) Pyrano-isoflavones with erectile-dysfunction activity from *Eriosema kraussianum*. *Phytochemistry* 59, 739–747
- [7] Ojewole JAO, Drewes SE, Khan F (2006) Vasodilatory and hypoglycaemic effects of two pyrano-isoflavone extractives from *Eriosema kraussianum* N. E. Br. [Fabaceae] rootstock in experimental rat models. *Phytochemistry* 67, 610–617
- [8] Ateba SB, Njamen D, Medjakovic S, Hobiger S, Mbanya JC, Jungbauer A, Krenn L (2013) *Eriosema laurentii* De Wild (Leguminosae) methanol extract has estrogenic properties and prevents menopausal symptoms in ovariectomized Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 150, 298–307
- [9] Pichler G. Chemische Untersuchung von *Eriosema laurentii*. Diplomarbeit, Universität Wien, 2011
- [10] Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas, Springer-Verlag, Berlin, 1996
- [11] Pemp E. Analytik pharmazeutisch relevanter Flavonoide mittels HPLC/UV, HPLC/MS und HPLC/UV/MS. Dissertation, Universität Wien, 2005

- [12] Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The Systematic Identification of Flavonoids, Springer Verlag, Berlin, 1970
- [13] Wagner H, Chari VM, Sonnenbichler J (1976) ^{13}C -NMR-Spektren natürlich vorkommender Flavonoide. Tetrahedron Letters 21, 1799–1802
- [14] Scherzer T. Phytochemische Untersuchung von *Eriosema laurentii*. Diplomarbeit, Universität Wien, 2014
- [15] Watanabe K, Kinjo J, Nohara T (1993) Three New Isoflavonoid Glycosides from *Lupinus luteus* and *L. polyphyllus* $\times$ *arboreus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 41, 394–396
- [16] Sato S, Hiroe K, Kumazawa T, Jun-ichi O (2006) Total synthesis of two isoflavone C-glycosides: genistein and orobol 8-C- β -D-glucopyranosides. Carbohydrate Research 341, 1091–1095

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Eriosema laurentii</i> (Foto, Sylvain B. Ateba)	2
Abbildung 2: Herbarbeleg <i>E. laurentii</i>	2
Abbildung 3: DC der Fraktionen 1-20	9
Abbildung 4: DC der Fraktionen 23-32	10
Abbildung 5: DC der Sammelfraktionen von SC1	12
Abbildung 6: HPLC-Chromatogramm von SC1SF5	14
Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm von SC1SF6	14
Abbildung 8: DC der Sammelfraktionen von SC2	16
Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm von SC2SF8	17
Abbildung 10: UV-Spektrum des Peaks bei 7,46 Minuten	17
Abbildung 11: DC-Vergleich von CSG4 mit Dihydroxybenzoesäuren	18
Abbildung 12: ¹ H-NMR von CSG4	19
Abbildung 13: DC der Sammelfraktionen von SC3	21
Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von SC3SF7	22
Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm von SC3SF8	23
Abbildung 16: UV-Spektrum des Peaks bei 14,30 Minuten	23
Abbildung 17: Struktur von CSG1	25
Abbildung 18: DC Fraktionen von CC1	28
Abbildung 19: DC-Optimierung des Fließmittelsystems für die HPCCC	29
Abbildung 20: DC der Fraktionen von CC2	31
Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm von CC2SF3	32
Abbildung 22: UV-Spektrum des Peaks bei 20,35 Minuten	32
Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm von CC2SF7	33
Abbildung 24: UV-Spektrum des Peaks bei 14,55 Minuten	33
Abbildung 25: Syringaresinol	34
Abbildung 26: Struktur von CSG2	35
Abbildung 27: DC der Fließmittelsysteme für die HPCCC3	36
Abbildung 28: DC der Fraktionen von CC3	38
Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm von CC3SF4	39
Abbildung 30: UV-Spektrum des Peaks bei 5,26 Minuten	40
Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm von CC3SF6	40
Abbildung 32: UV-Spektrum des Peaks bei 3,78 Minuten	41
Abbildung 33: DC-Vergleich von CSG7 und CSG8 mit authentischen Substanzen (System 1)	42
Abbildung 34: DC-Vergleich von CSG7 und CSG8 mit authentischen Substanzen (System 2)	42
Abbildung 35: 3,4-Dihydroxybenzoesäure	43
Abbildung 36: p-Hydroxybenzoesäure	43
Abbildung 37: DC der Sammelfraktionen von SPE 3	45
Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm von SPE1SF2	46
Abbildung 39: UV-Spektrum des Peaks bei 19,15 Minuten	46
Abbildung 40: Struktur von CSG5a	47
Abbildung 41: Struktur von CSG5b	49
Abbildung 42: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 23	50
Abbildung 43: HPLC-Chromatogramm von Homoorientin	50
Abbildung 44: Vergleich der UV-Spektren des Peaks bei 22,91 Minuten und von Homoorientin	51
Abbildung 45: Sammelfraktionen von SPE2	52
Abbildung 46: HPLC-Chromatogramm von SPE2SF5	53
Abbildung 47: UV-Spektrum des Peaks bei 23,06 Minuten	53
Abbildung 48: Struktur von CSG3 in MeOH-d4	54

Abbildung 49: DC von Fraktion 14 mit Isovitexin und Homoorientin	56
Abbildung 50: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 14	57
Abbildung 51: HPLC-Chromatogramm von Isovitexin und Homoorientin	57
Abbildung 52: Vergleich der UV-Spektren des Peaks bei 21,81 Minuten und von Homoorientin	58
Abbildung 53: Vergleich der UV-Spektren des Peaks bei 26,81 Minuten und von Isovitexin	58
Abbildung 54: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 16	59
Abbildung 55: UV-Spektrum des Peaks bei 21,73 Minuten	59
Abbildung 56: DC von Fraktion 19+20 mit Luteolin-7-O-glucosid	60
Abbildung 57: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 19+20	60
Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm von Luteolin-7-O-glucosid und Orientin	61
Abbildung 59: Vergleich der UV-Spektren des Peaks bei 29,57 Minuten und von Luteolin-7- O-glucosid	61
Abbildung 60: DC von Fraktion 30+31 mit Quercetin-3-O-methylether (System 1)	62
Abbildung 61: DC von Fraktion 30+31 mit Quercetin-3-O-methylether (System 2)	63
Abbildung 62: DC von Fraktion 30+31 mit Genistein	64
Abbildung 63: DC von Fraktion 32 mit Luteolin (System 1)	65
Abbildung 64: DC von Fraktion 32 mit Luteolin (System 2)	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zur Verfügung stehende Fraktionen	8
Tabelle 2: Sammelfractionen SC 1	11
Tabelle 3: Sammelfractionen SC2	15
Tabelle 4: Sammelfractionen SC 3	20
Tabelle 5: NMR Signale von CSG1 in MeOH-d ₄	24
Tabelle 6: Fließmittelsysteme für die HPCCC	29
Tabelle 7: Sammelfractionen CC 2	30
Tabelle 8: Fließmittelsysteme für die HPCCC3	35
Tabelle 9: Sammelfractionen CC 3	37
Tabelle 10: Sammelfractionen SPE 3	44
Tabelle 11: Vergleich der ¹³ C-NMR Signale von CSG5a mit 2'-Hydroxygenistein-7-O-glucosid	48
Tabelle 12: Vergleich ¹³ C-NMR Signale von CSG5b mit Genistein-8-C-glucosid	49
Tabelle 13: Sammelfractionen SPE2	52
Tabelle 14: NMR Signale CSG3	54

Curriculum Vitae

Name: Claus Gatterer
Geburtsdatum und –ort: 10. Mai 1989, Wien
Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung

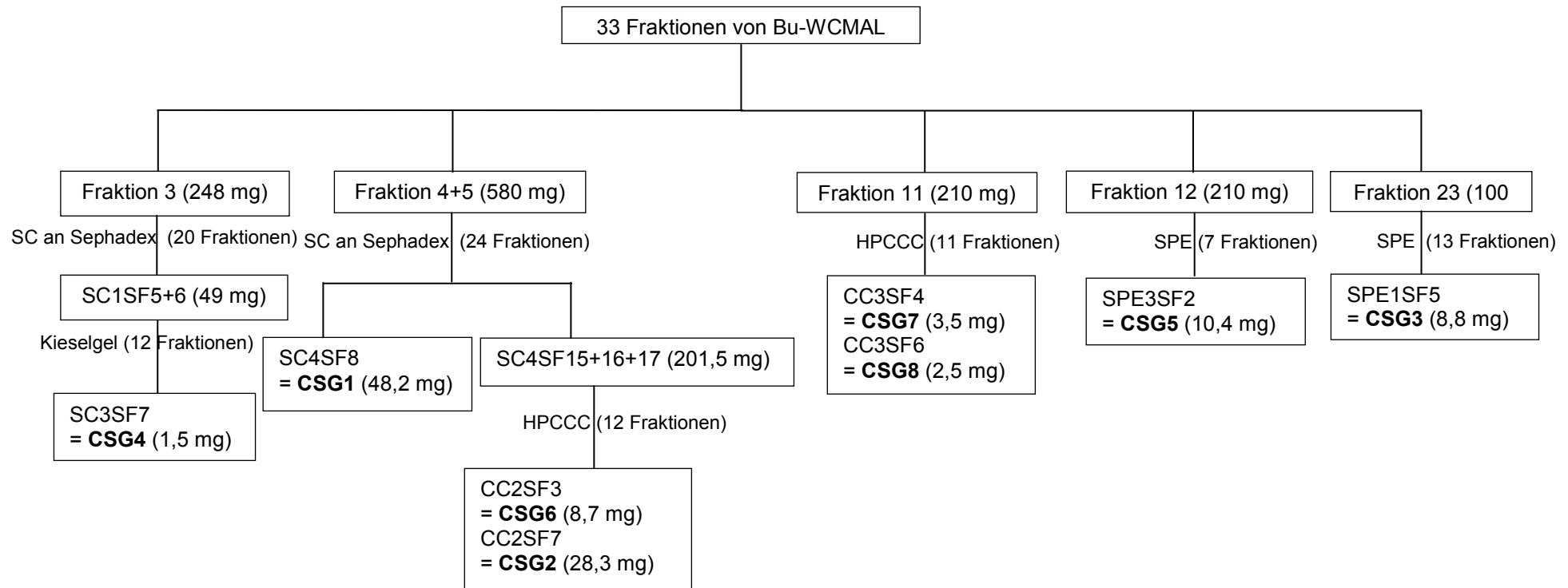
1995 – 1999	Volksschule Wiener Neudorf
1999 – 2007	BG/BRG Keimgasse Mödling
Juni 2007	Matura
Oktober 2008	Beginn des Studiums der Pharmazie, Universität Wien
März 2013 – Juli 2013	Praktischer Teil der Diplomarbeit, Department für Pharmakognosie, Universität Wien

Beruflicher Werdegang

Dezember 2007 – Juni 2008	Grundwehrdienst beim Panzerbataillon 33, Zwölfaxing
ab Oktober 2009	Teilzeittätigkeit in der Apotheke „Zum Grünen Kreuz“, 1140 Wien

Anhang

Abbildung I: Fraktionierung der oberirdischen Anteile von *Eriosema laurentii*



Fraktion 14 (610 mg): Homoorientin, Isovitexin (TLC+HPLC)
 Fraktion 15 (299 mg): Homoorientin, Isovitexin
 Fraktion 16 (437 mg): Homoorientin (TLC+HPLC)
 Fraktion 18 (90 mg): Luteolin-7-O-Glucoside
 Fraktion 19+20 (13,3 mg): Luteolin-7-O-Glucoside (TLC+HPLC)
 Fraktion 30+31 (101 mg): Genistein (TLC), Quercetin-3-O-methylether (TLC)
 Fraktion 32 (56 mg): Luteolin (TLC)

CSG1 (48,2 mg): 3,4',6,8-Tetrahydroxyflavanon-7-C-glucosid, neuer Naturstoff
CSG2 (28,3 mg): 2"-O-alpha-Rhamnosyl-6-C-fucosyl-3'-methoxy-luteolin
CSG3 (8,8 mg): 3,4',6,8-Tetrahydroxyflavon-7-C-glucoside, neuer Naturstoff
CSG4 (1,5 mg): 2,6-Dihydroxybenzoesäure
CSG5a: Genistein-8-C-glucosid
CSG5b: 2'-Hydroxygenistein-7-O-glucosid
CSG6 (8,7 mg): Syringaresinol
CSG7 (3,5 mg): p-Hydroxybenzoesäure
CSG8 (2,5 mg): 3,4-Dihydroxybenzoesäure

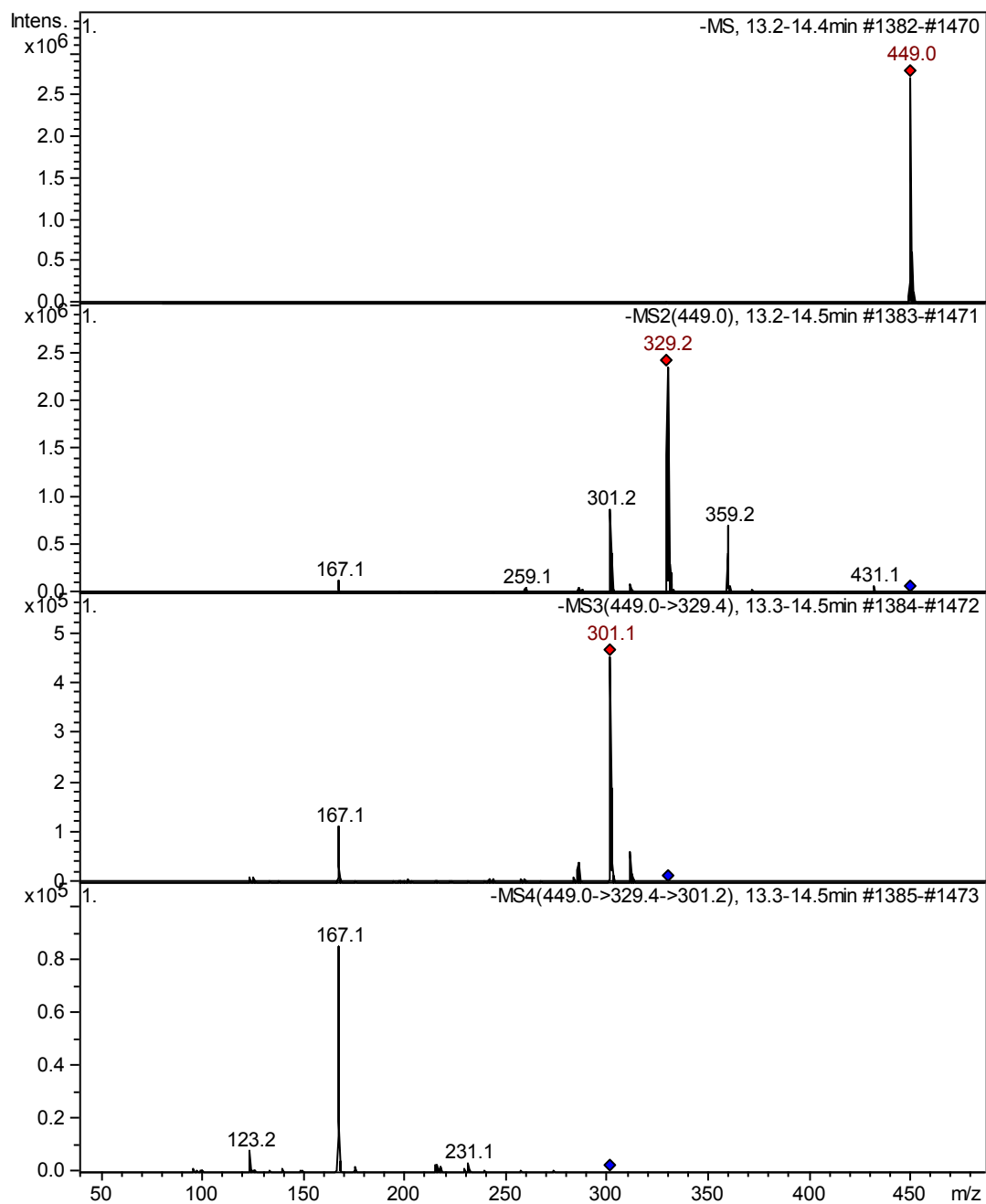
Abbildung II: Negativionen-MS von CSG1

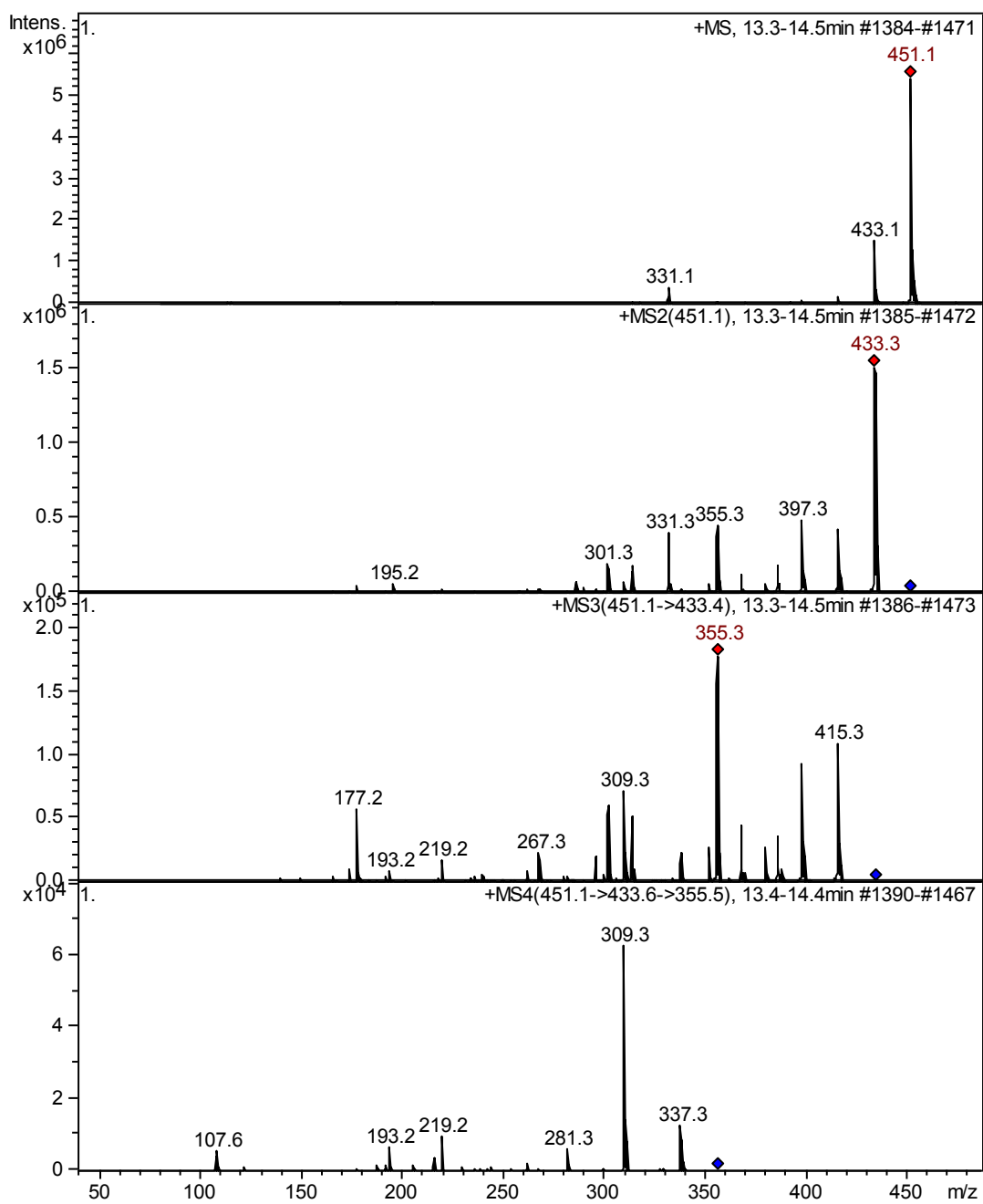
Abbildung III: Positivionen-MS von CSG1

Abbildung IV: Negativionen-MS von CSG2

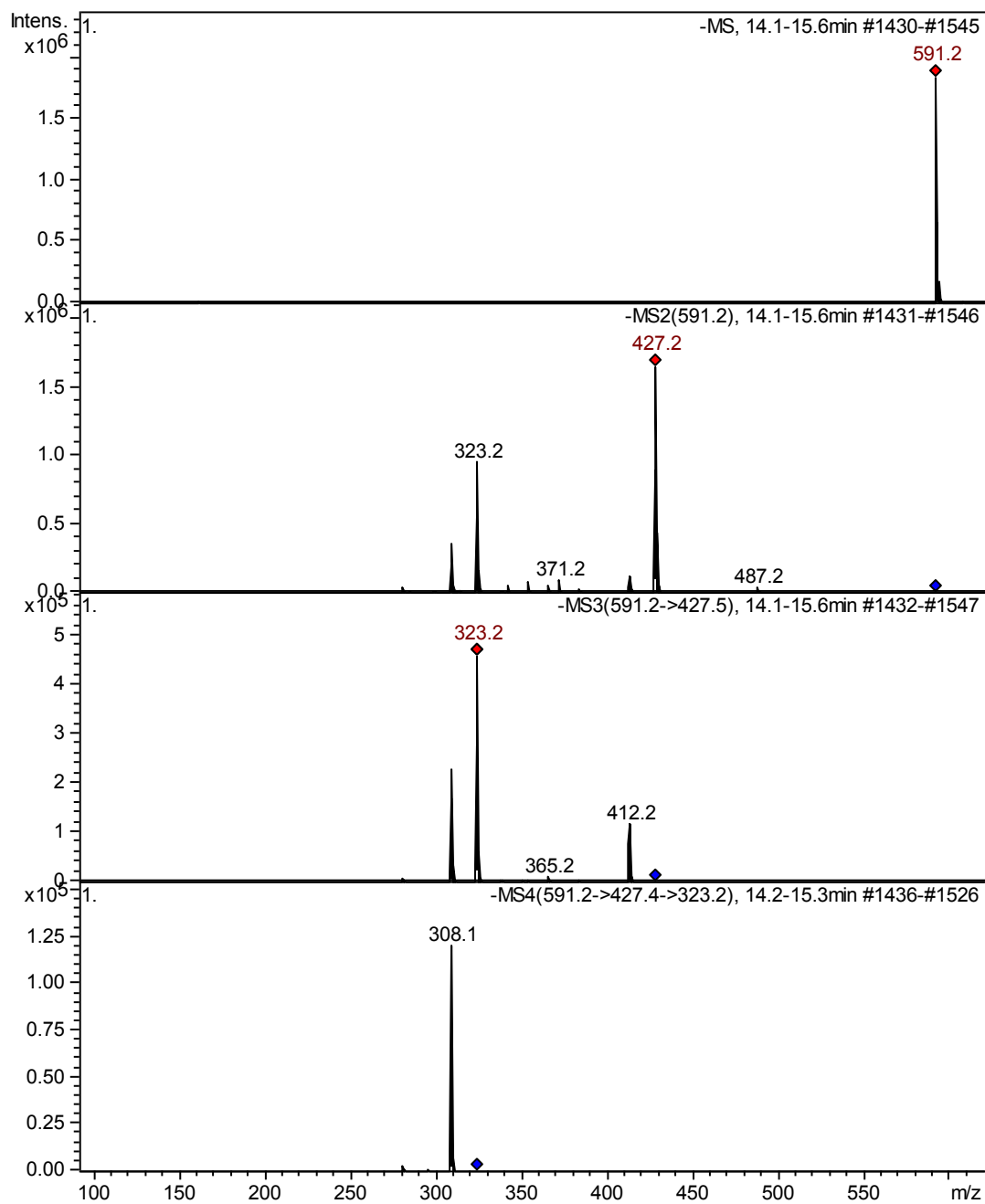


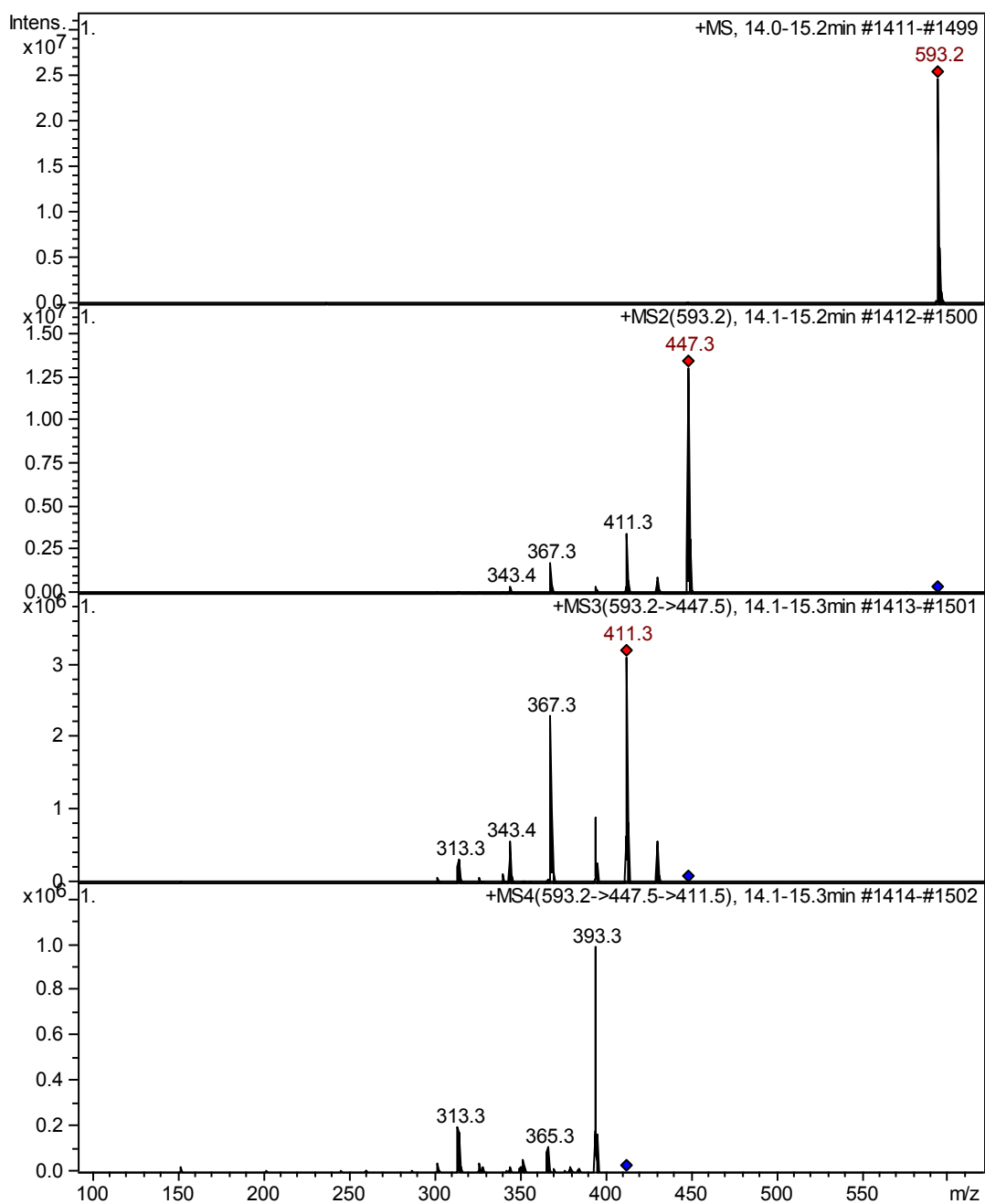
Abbildung V: Positivionen-MS von CSG2

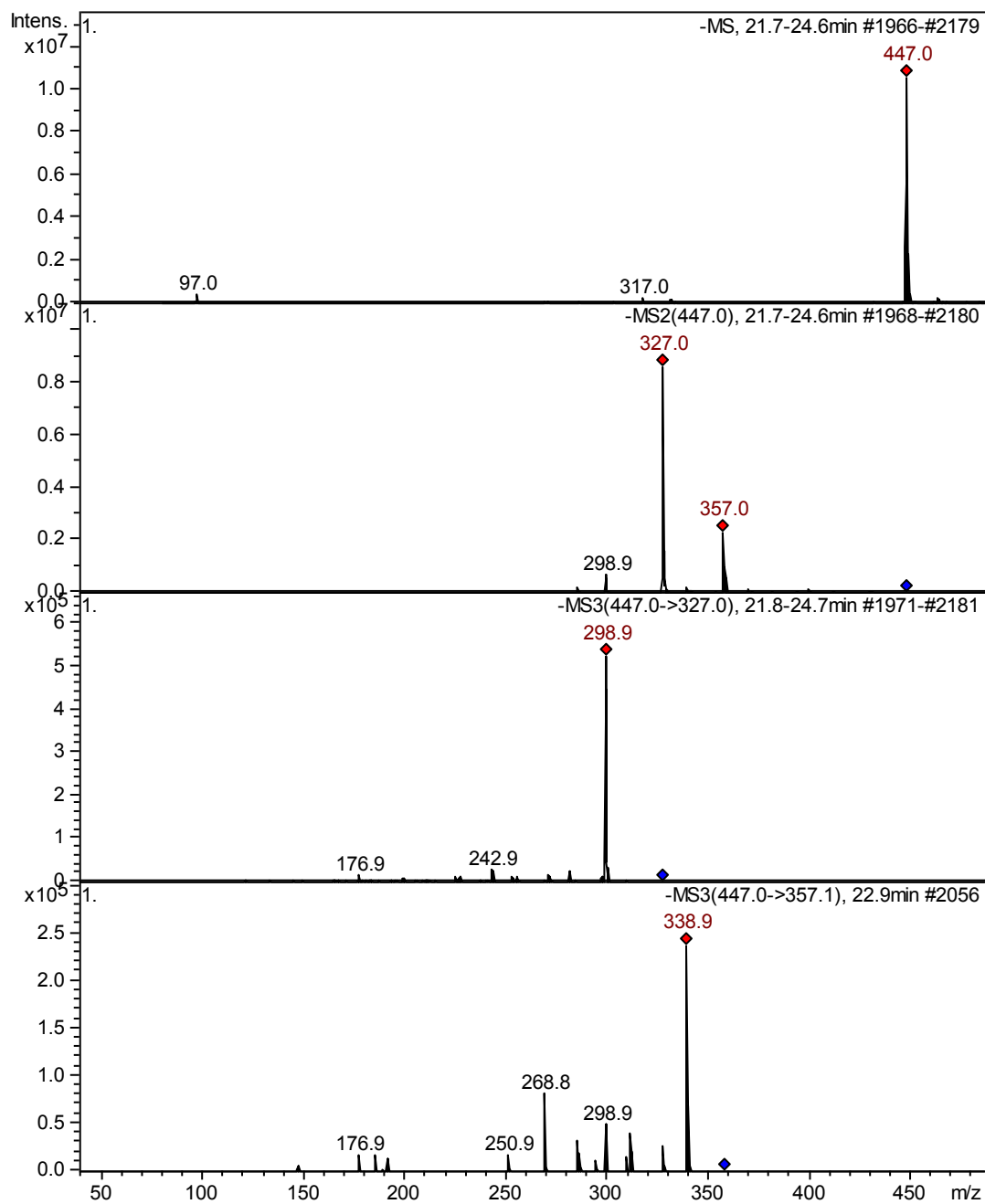
Abbildung VI: Negativionen-MS von CSG3

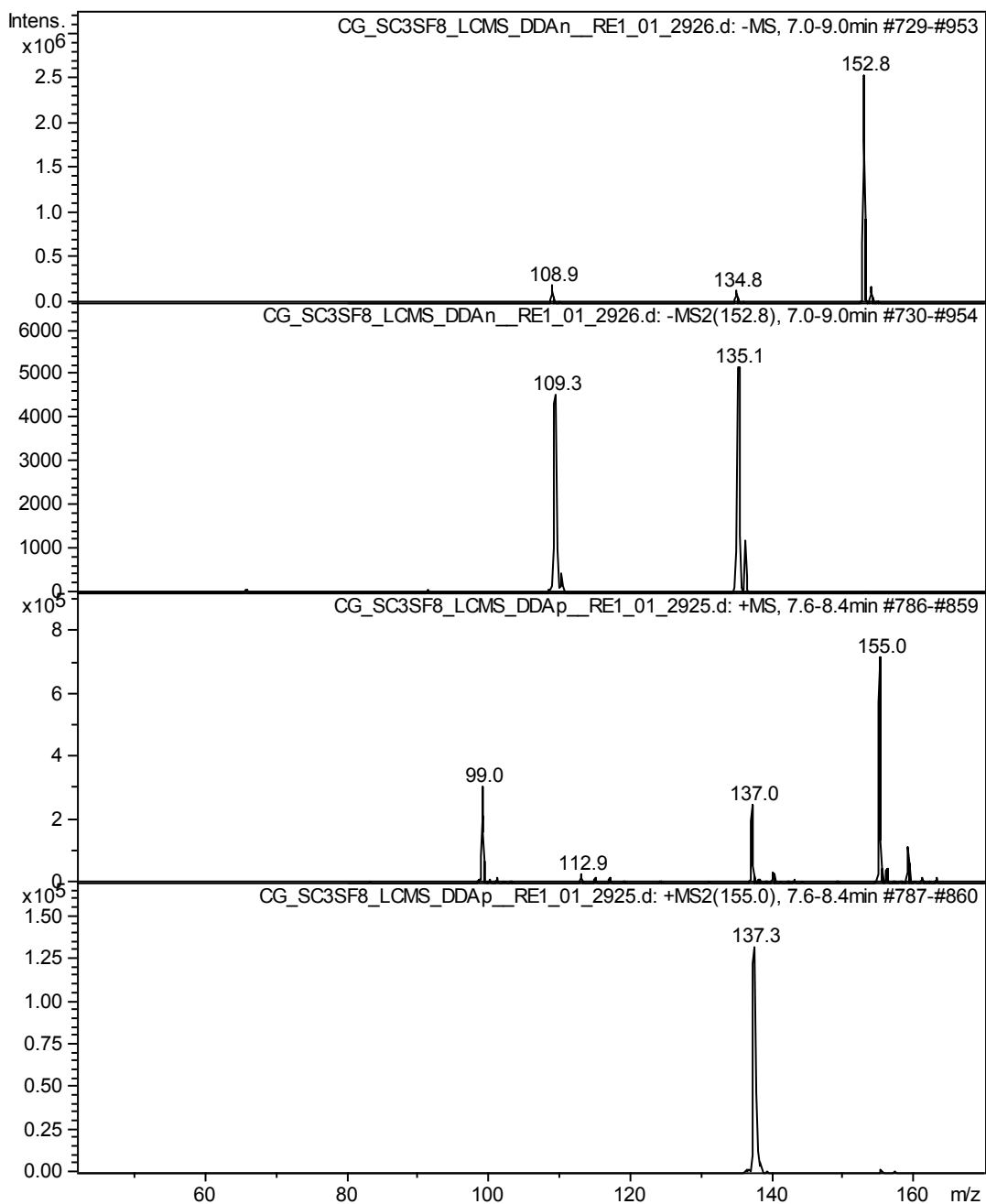
Abbildung VII: Negativionen-MS von CSG4

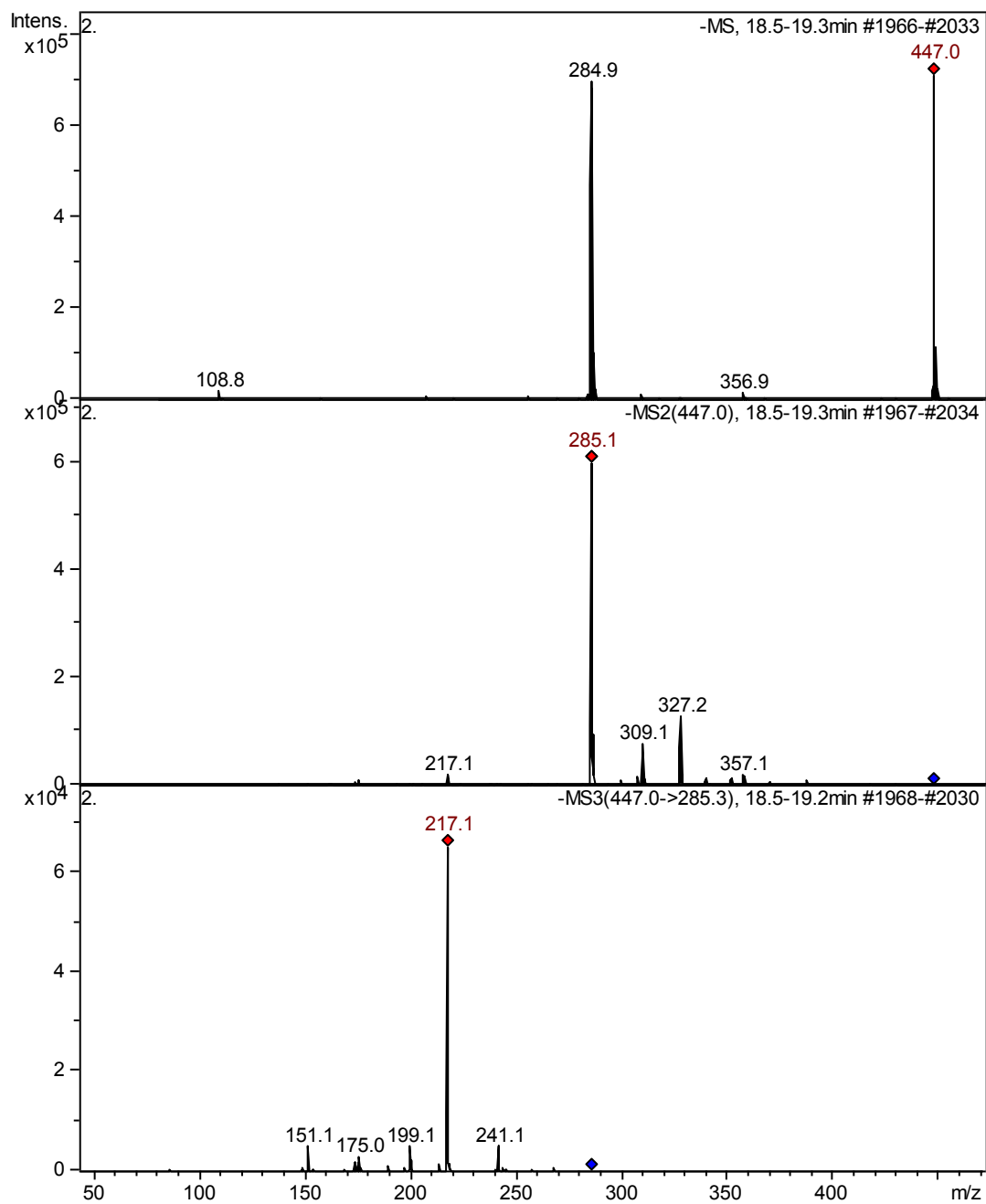
Abbildung VIII: Negativionen-MS von CSG5 (Komponente 1)

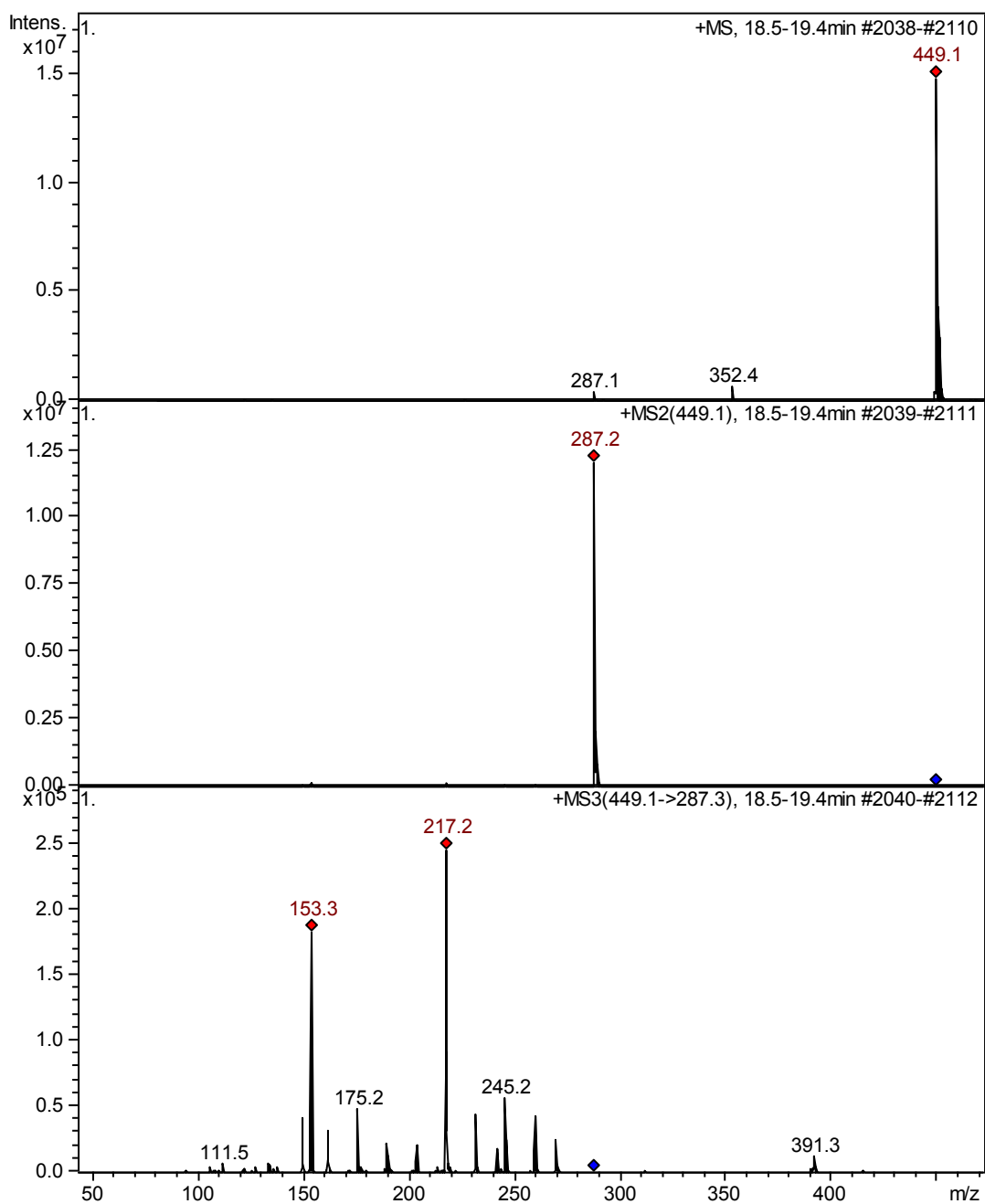
Abbildung IX: Positivionen-MS von CSG5 (Komponente 1)

Abbildung X: Negativionen-MS von CSG5 (Komponente 2)

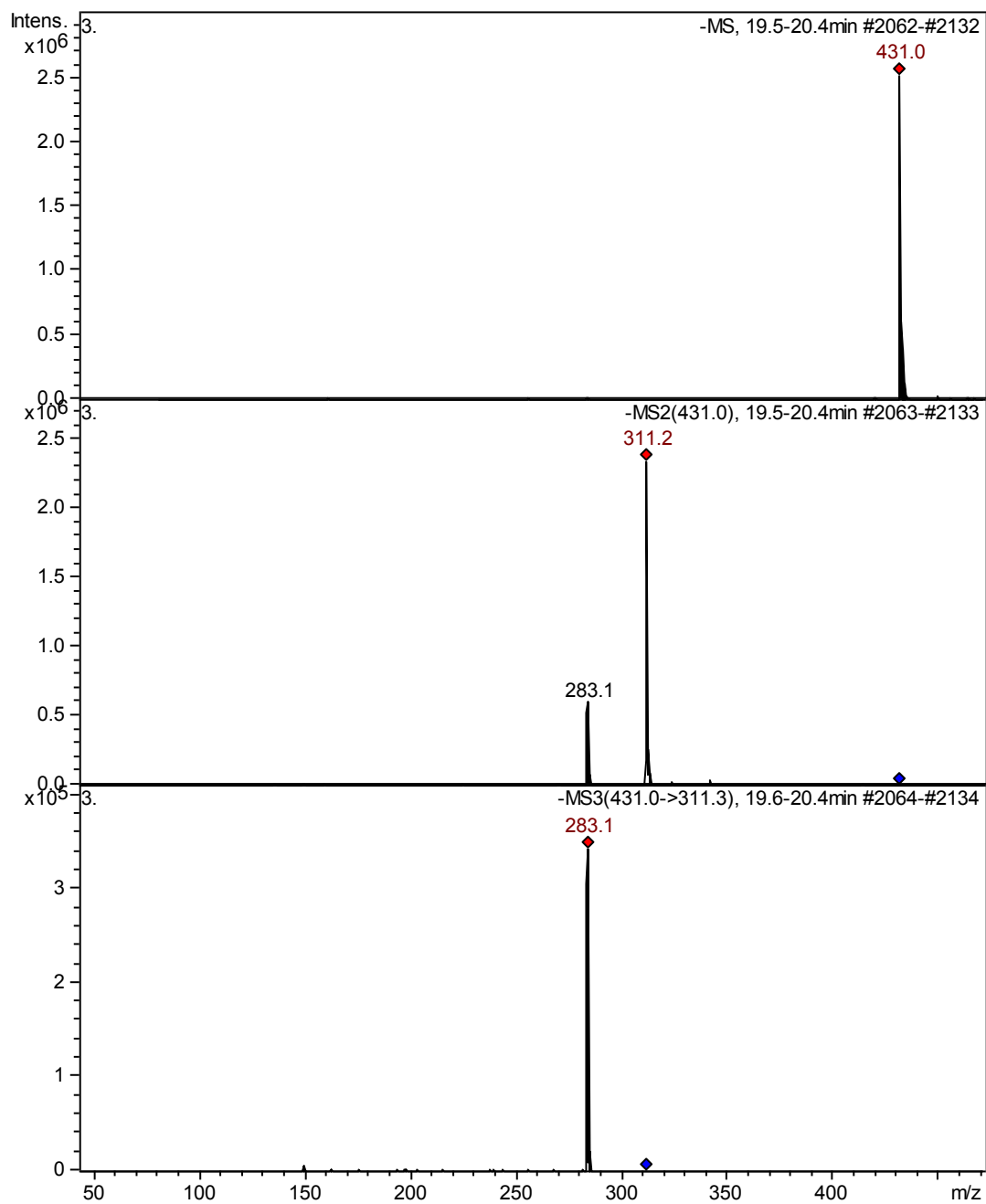


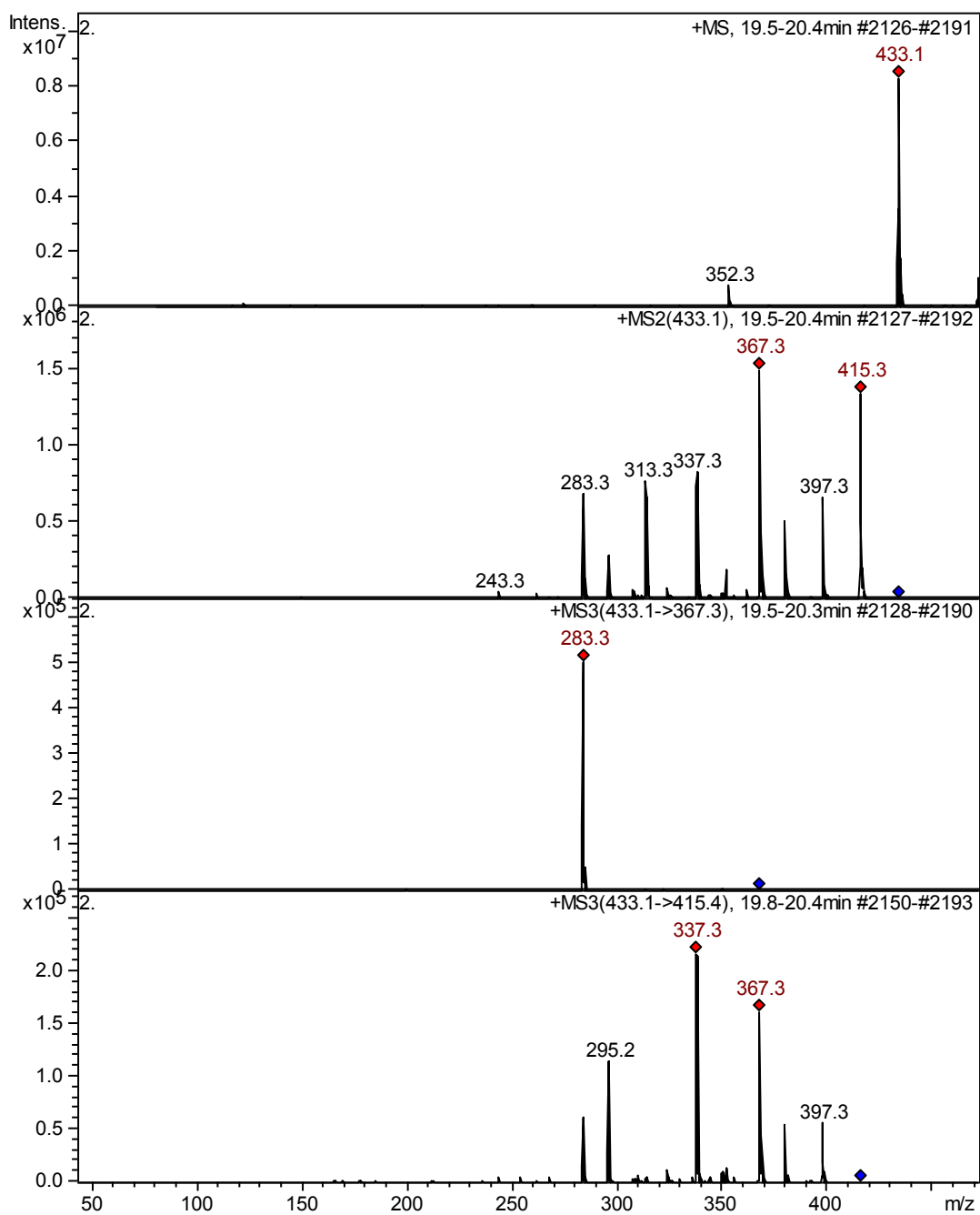
Abbildung XI: Positivionen-MS von CSG5 (Komponente 2)

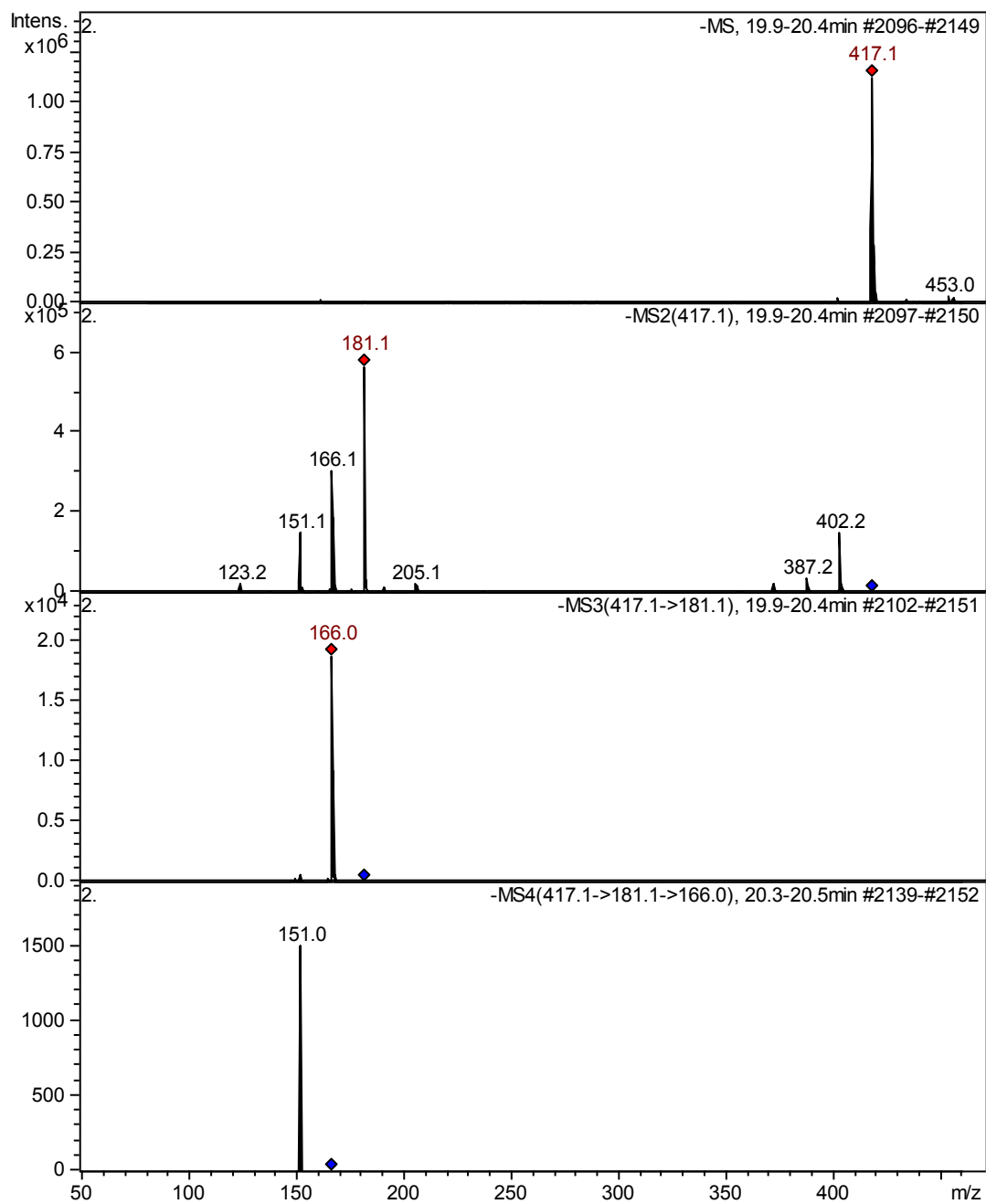
Abbildung XII: Negativionen-MS von CSG6

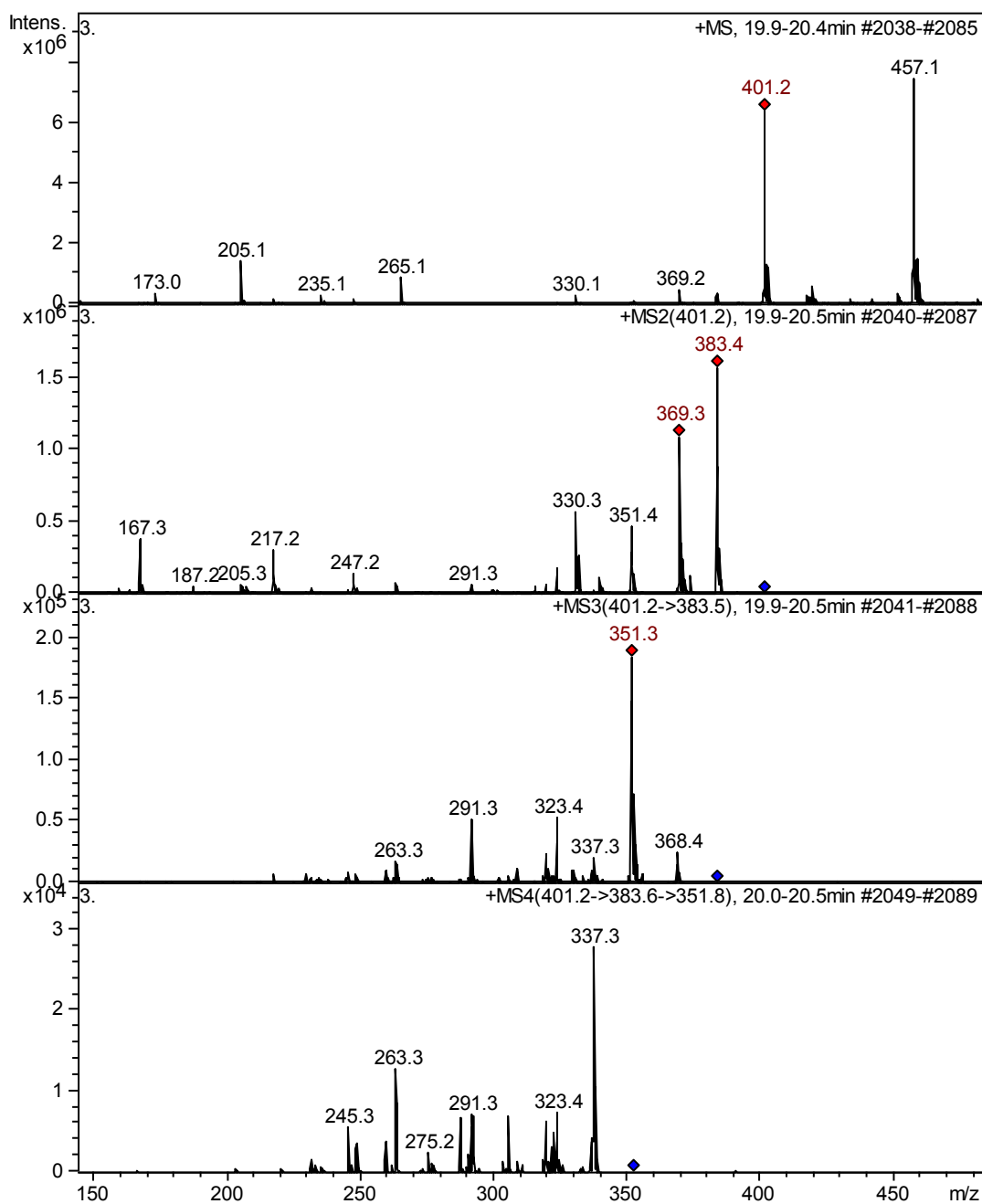
Abbildung XIII: Positivionen-MS von CSG6

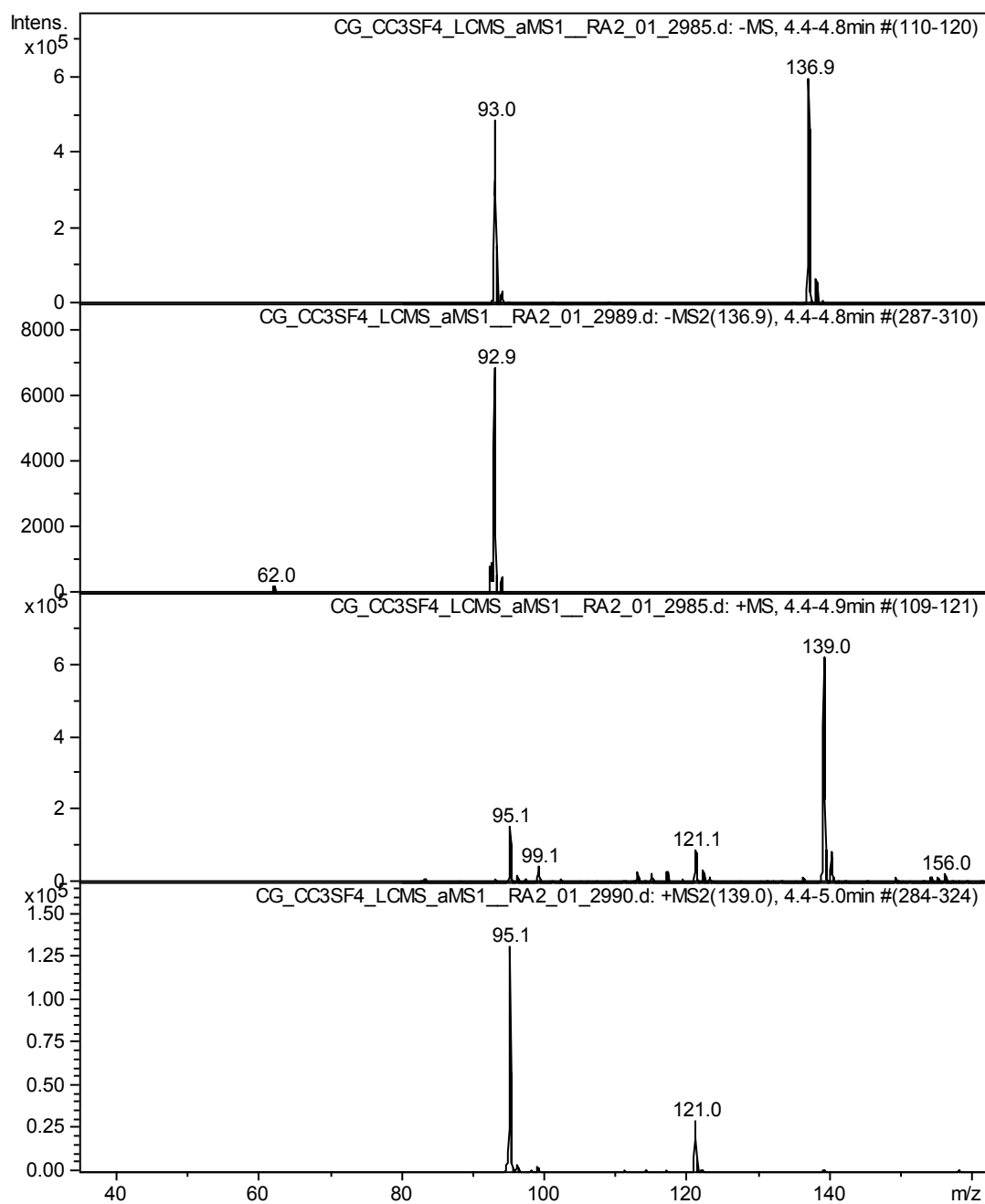
Abbildung XIV: Negativ- und Positivionen-MS von CSG7

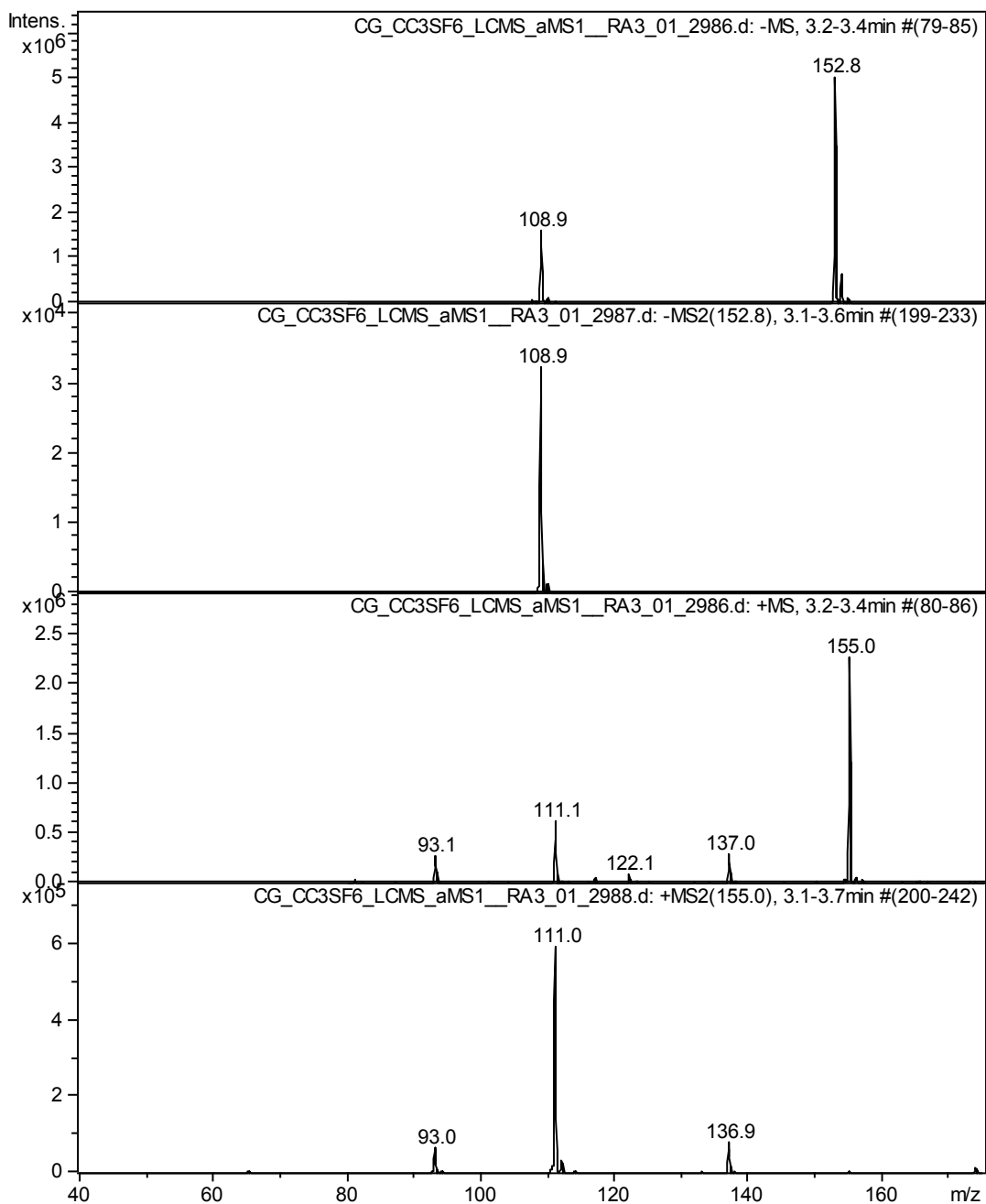
Abbildung XV: Negativ- und Positivionen-MS von CSG8

Abbildung XVI: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von CSG1 in MeOH- d_4

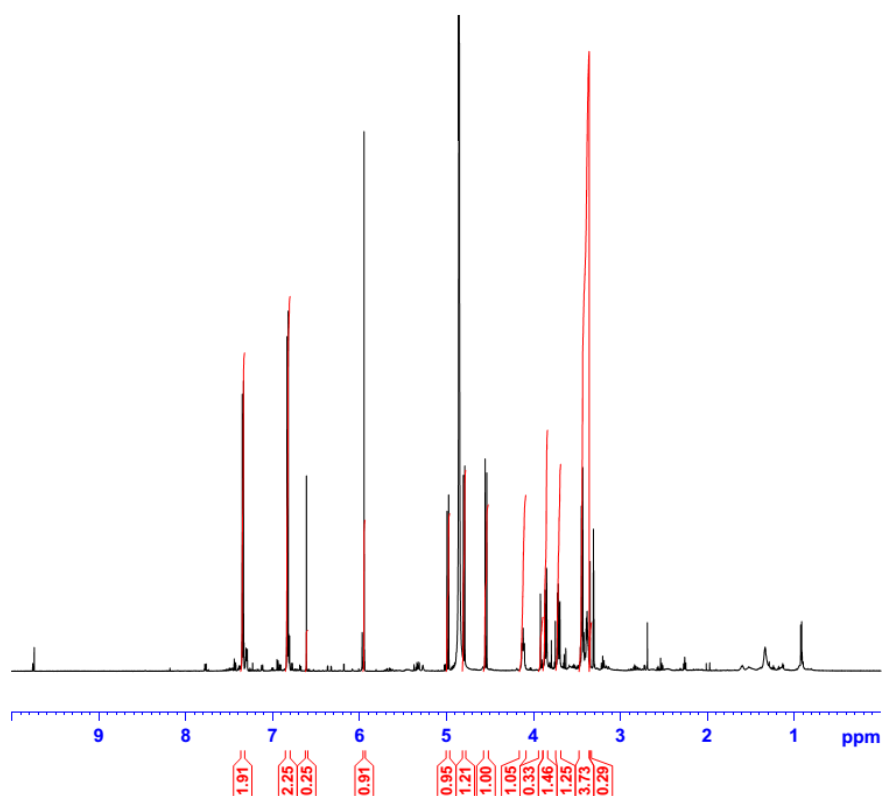


Abbildung XVII: 150 MHz ^{13}C NMR-Spektrum von CSG1 in MeOH- d_4

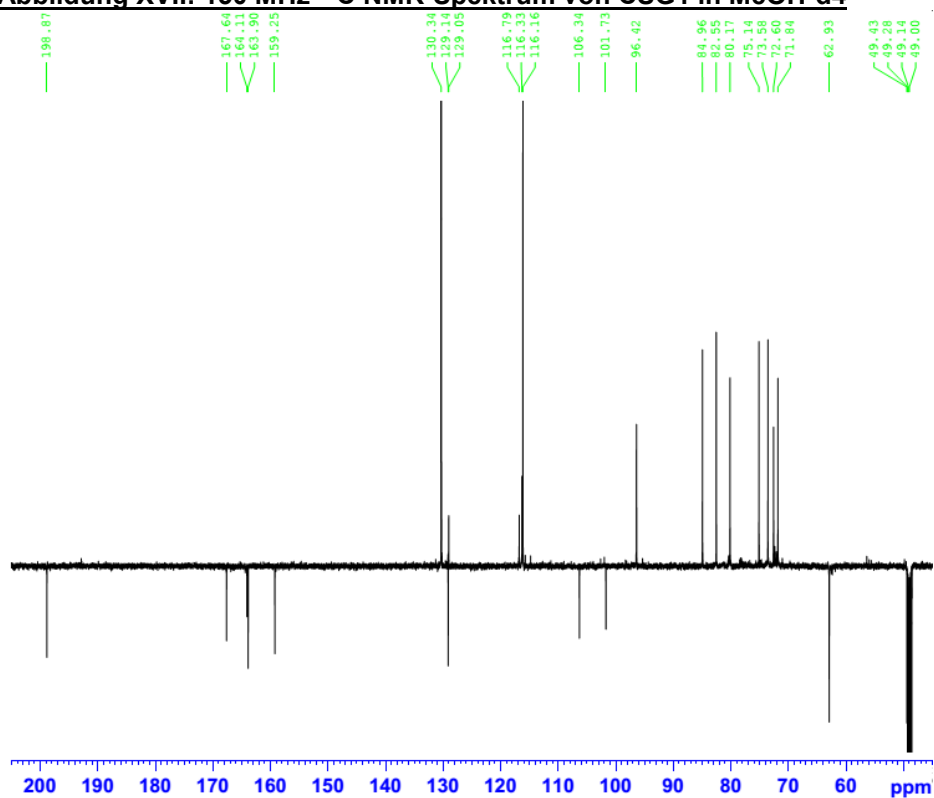


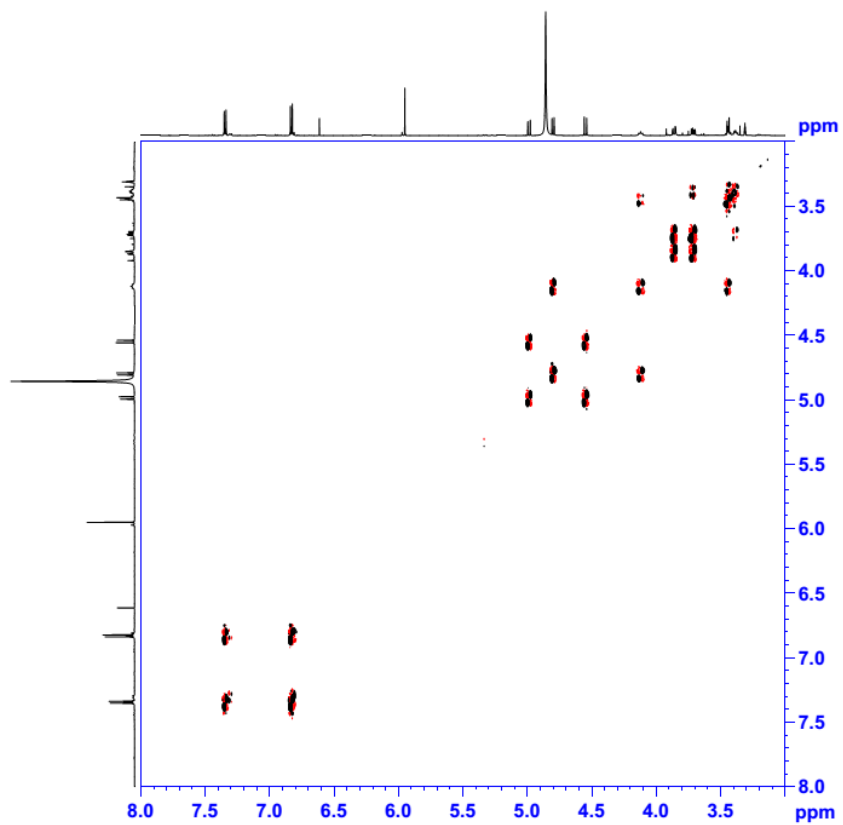
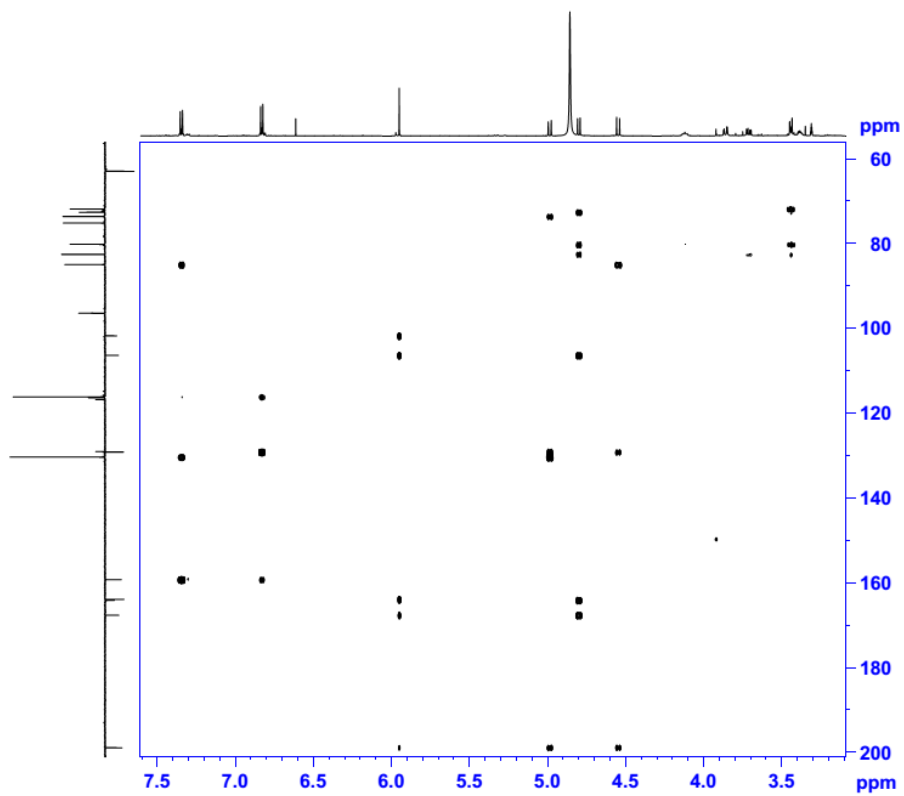
Abbildung XVIII: COSY von CSG1 in MeOH-d₄**Abbildung XIX: HMBC von CSG1 in MeOH-d₄**

Abbildung XX: HSQC von CSG1 in MeOH-d₄

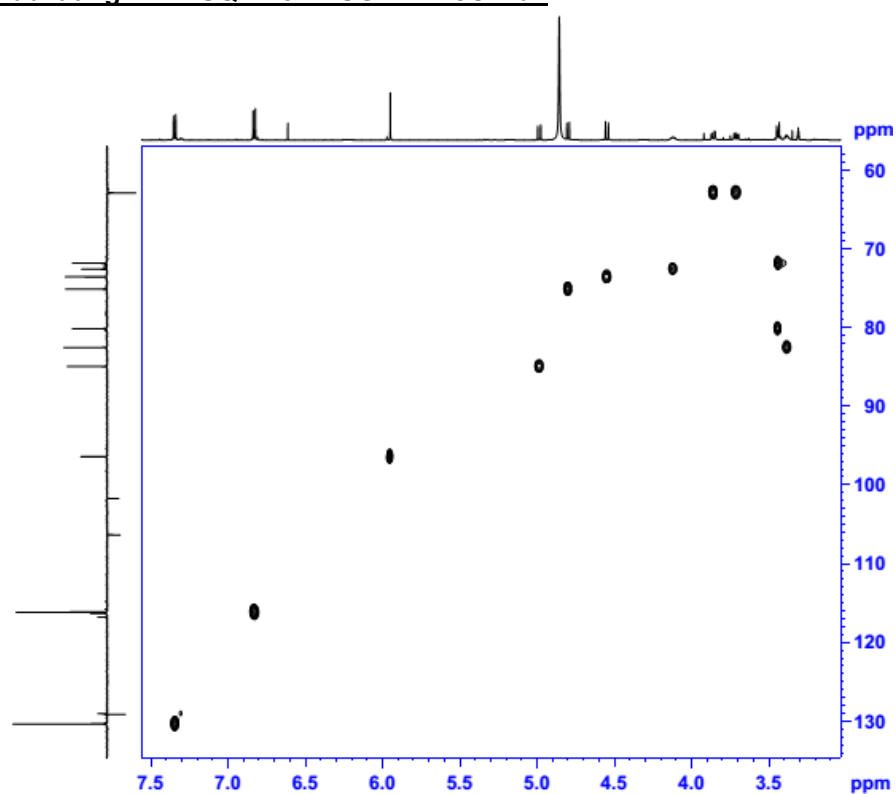


Abbildung XXI: NOESY von CSG1 in MeOH-d₄

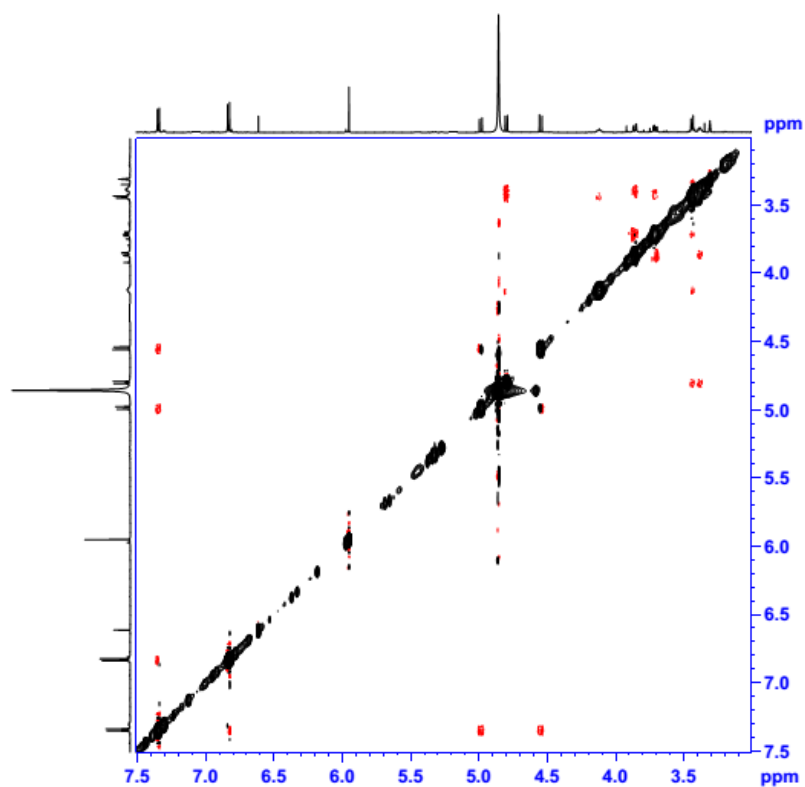


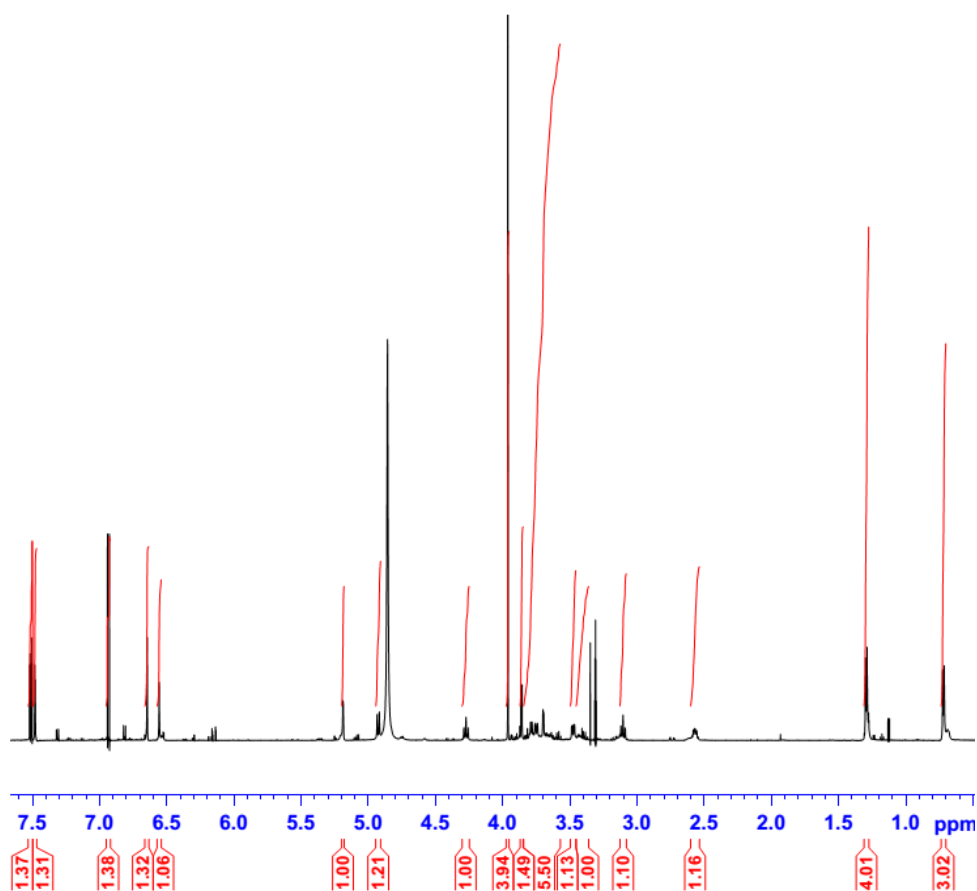
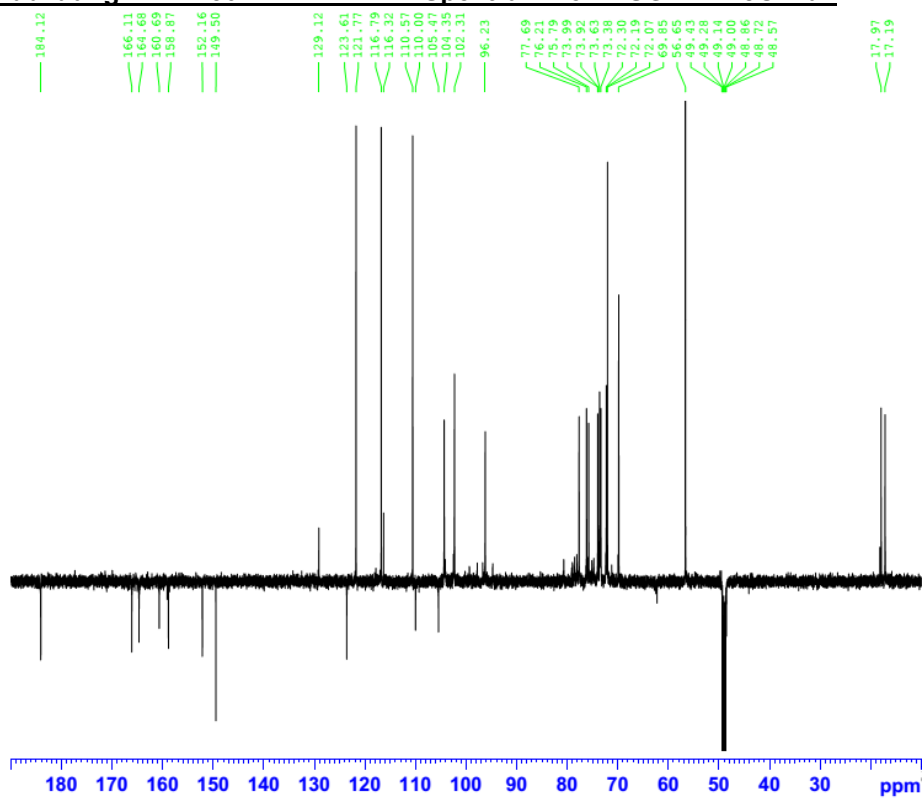
Abbildung XXII: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von CSG2 in MeOH-d₄**Abbildung XXII: 150 MHz ^{13}C NMR Spektrum von CSG2 in MeOH-d₄**

Abbildung XXIV: COSY von CSG2 in MeOH-d₄

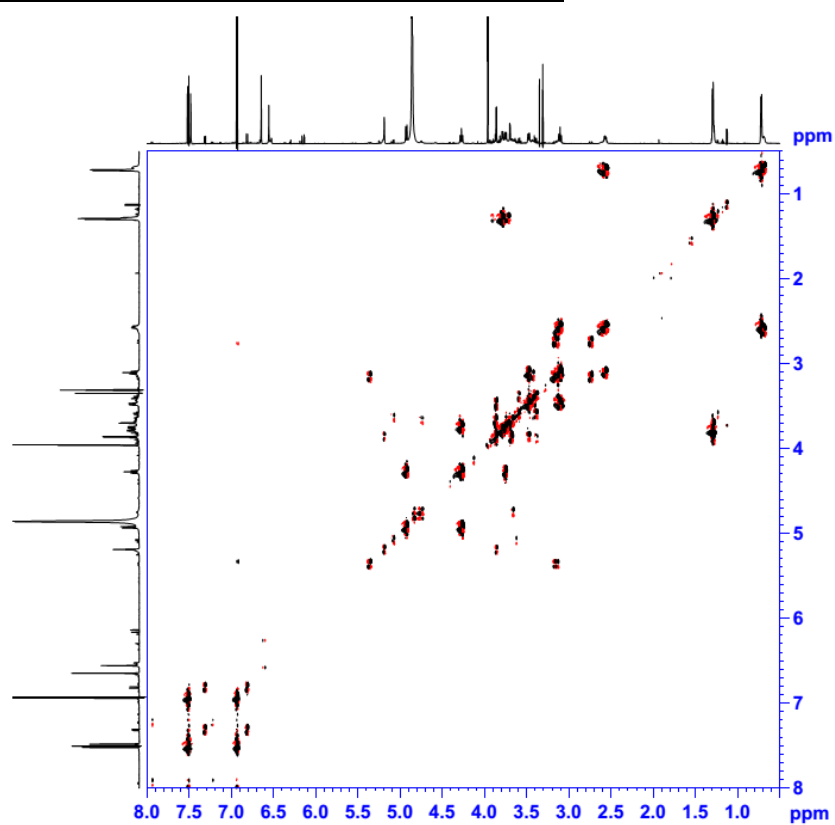


Abbildung XXV: HMBC von CSG2 in MeOH-d₄

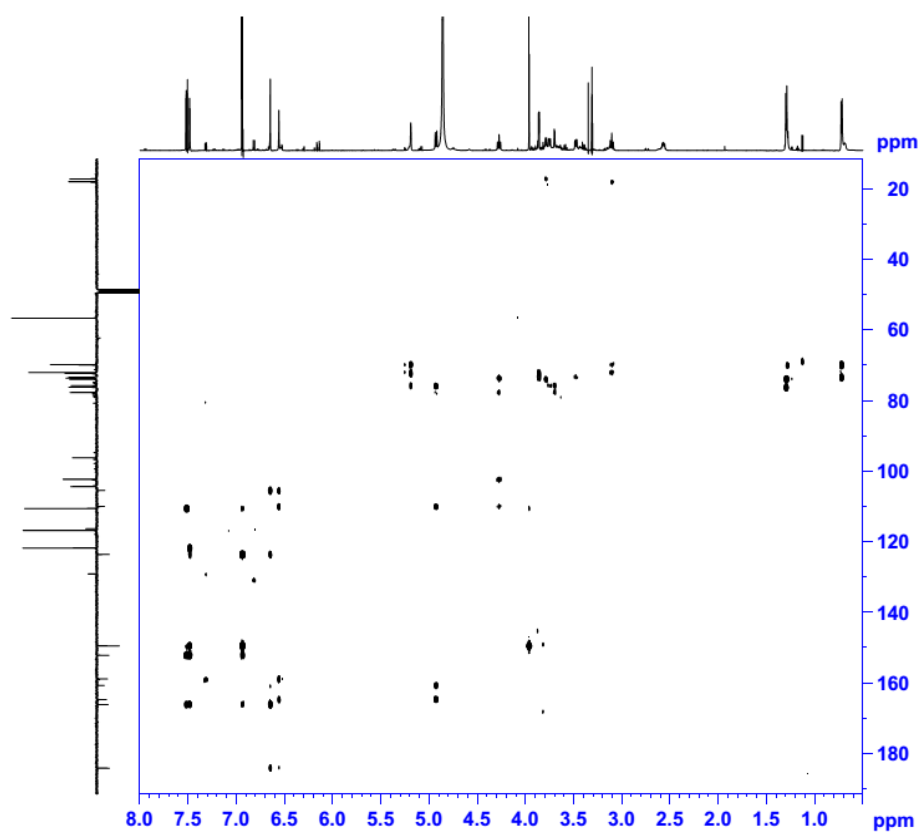


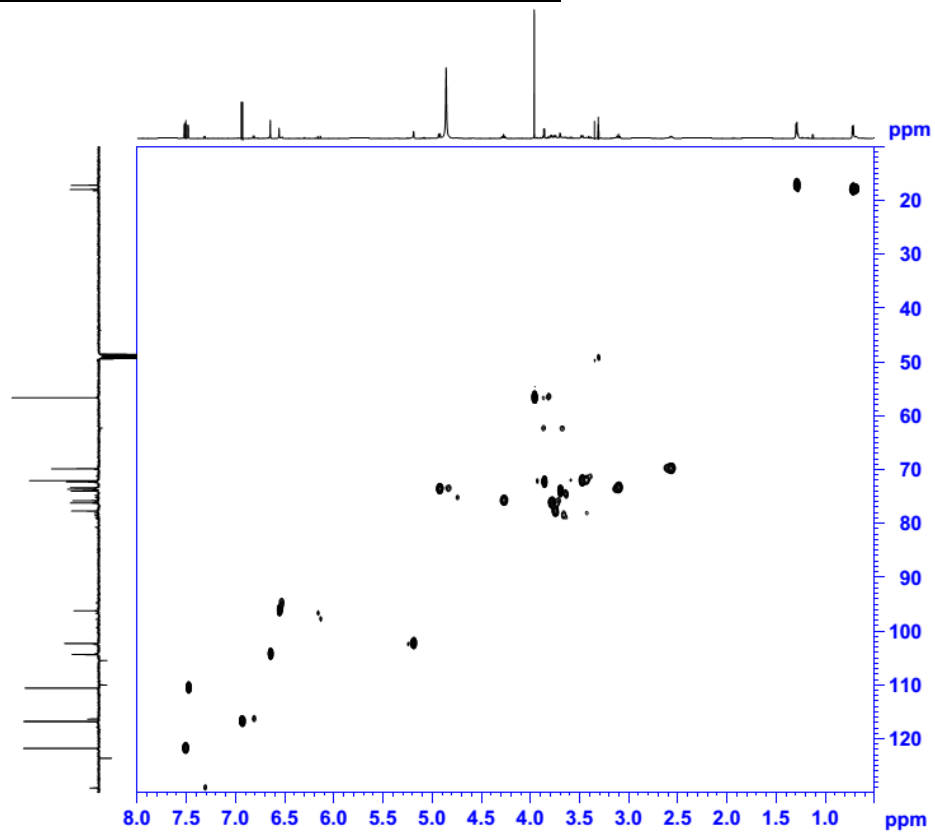
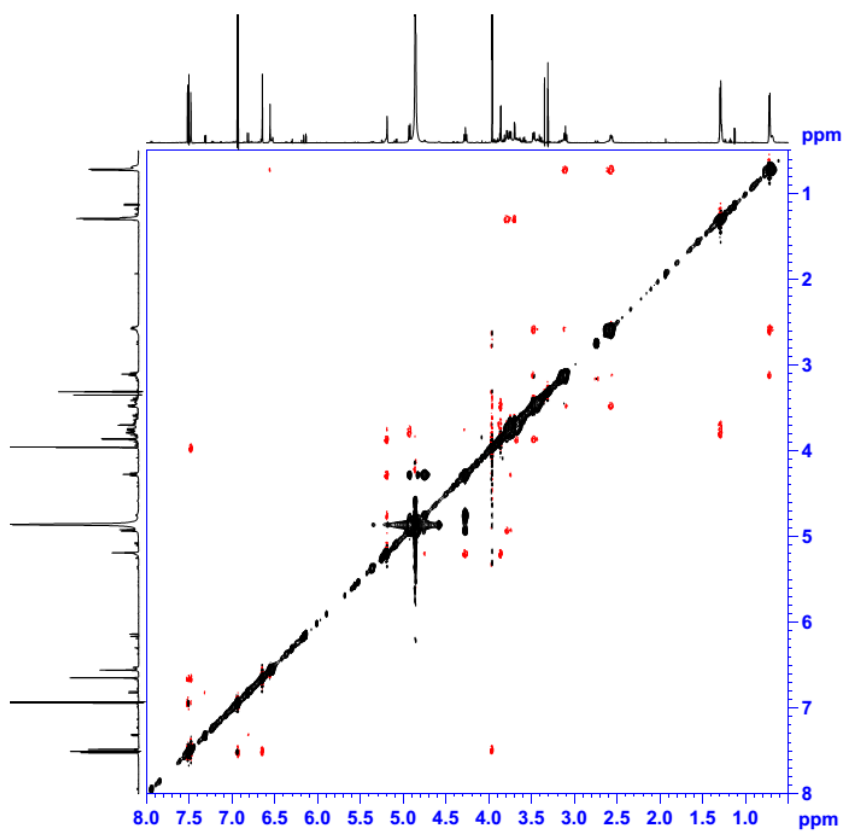
Abbildung XXVI: HSQC von CSG2 in MeOH-d4**Abbildung XXVII: NOESY von CSG2 in MeOH-d4**

Abbildung XXVIII: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von CSG3 in MeOH- d_4

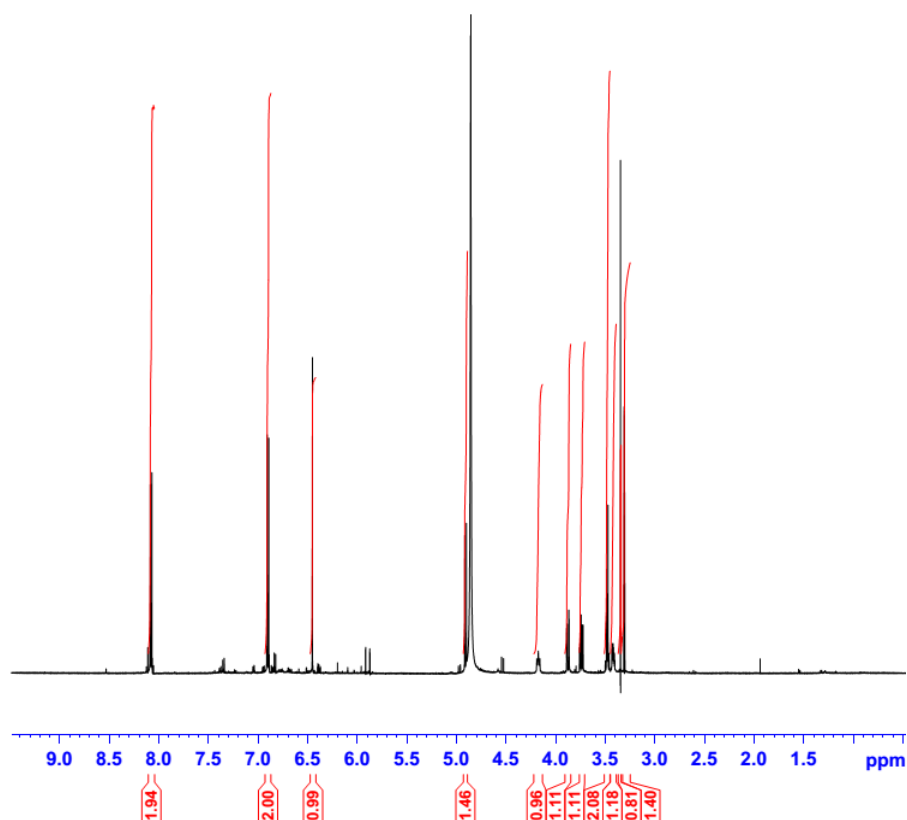


Abbildung XXIX: 150 MHz ^{13}C NMR Spektrum von CSG3 in MeOH- d_4

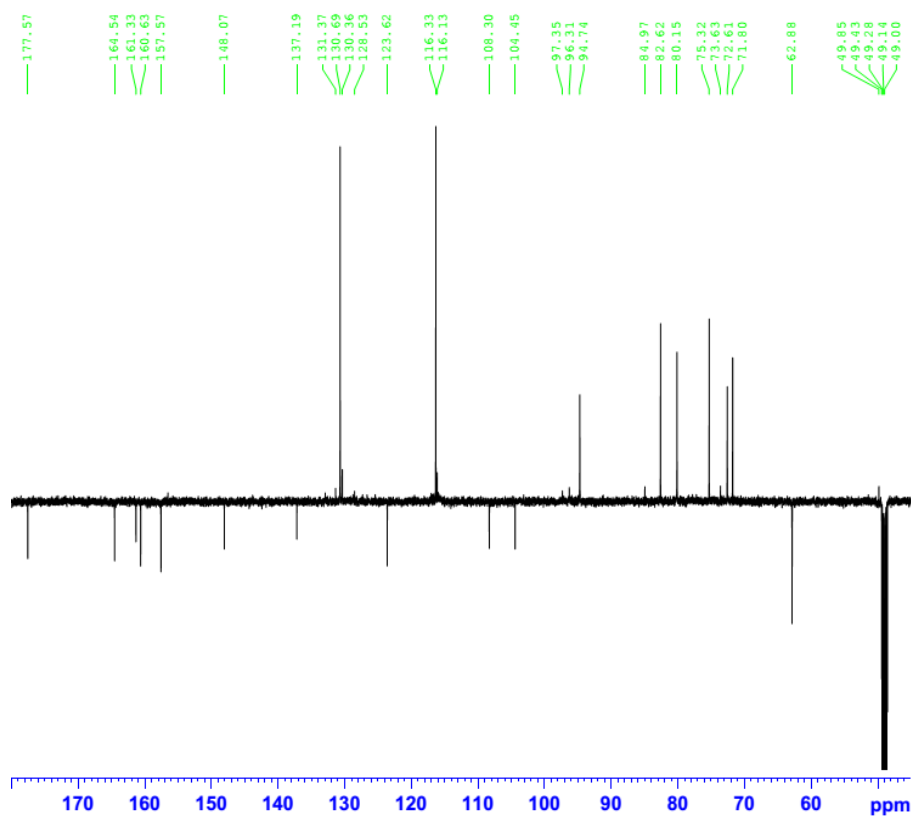


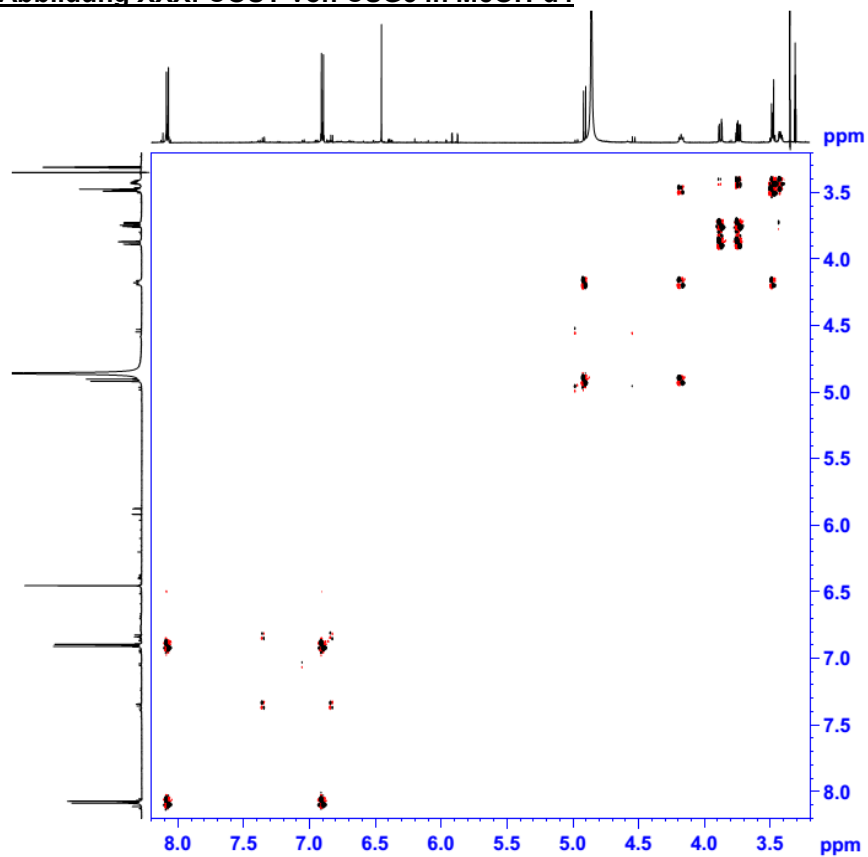
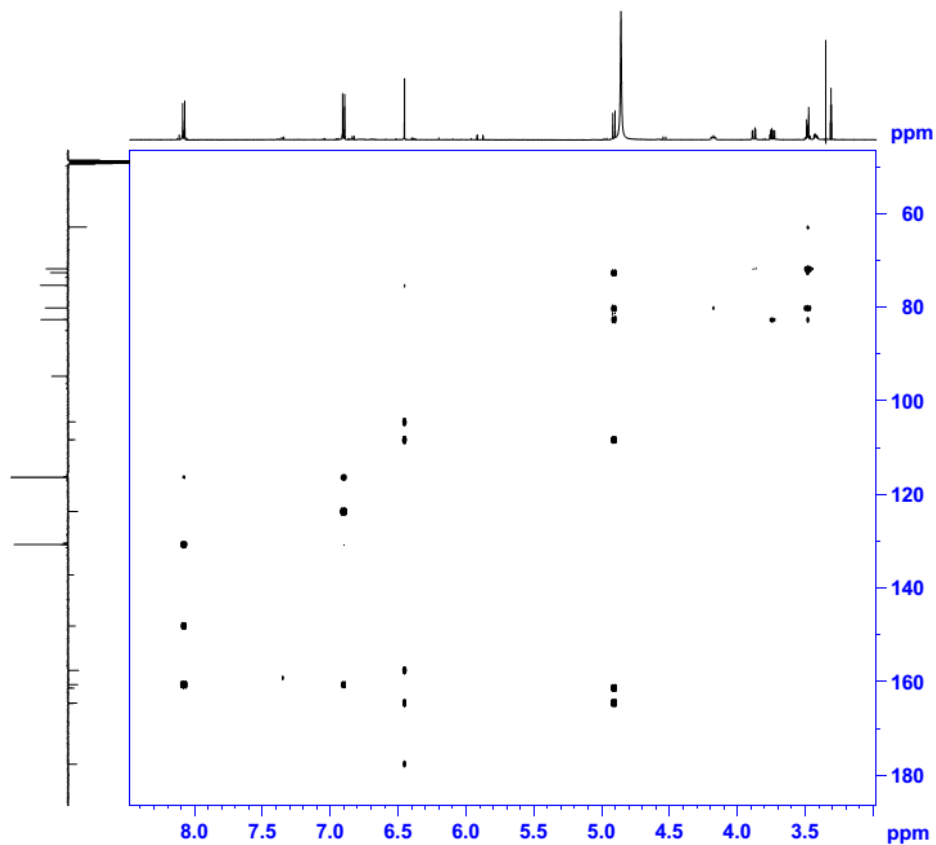
Abbildung XXX: COSY von CSG3 in MeOH-d₄**Abbildung XXXI: HMBC von CSG3 in MeOH-d₄**

Abbildung XXXII: HSQC von CSG3 in MeOH-d4

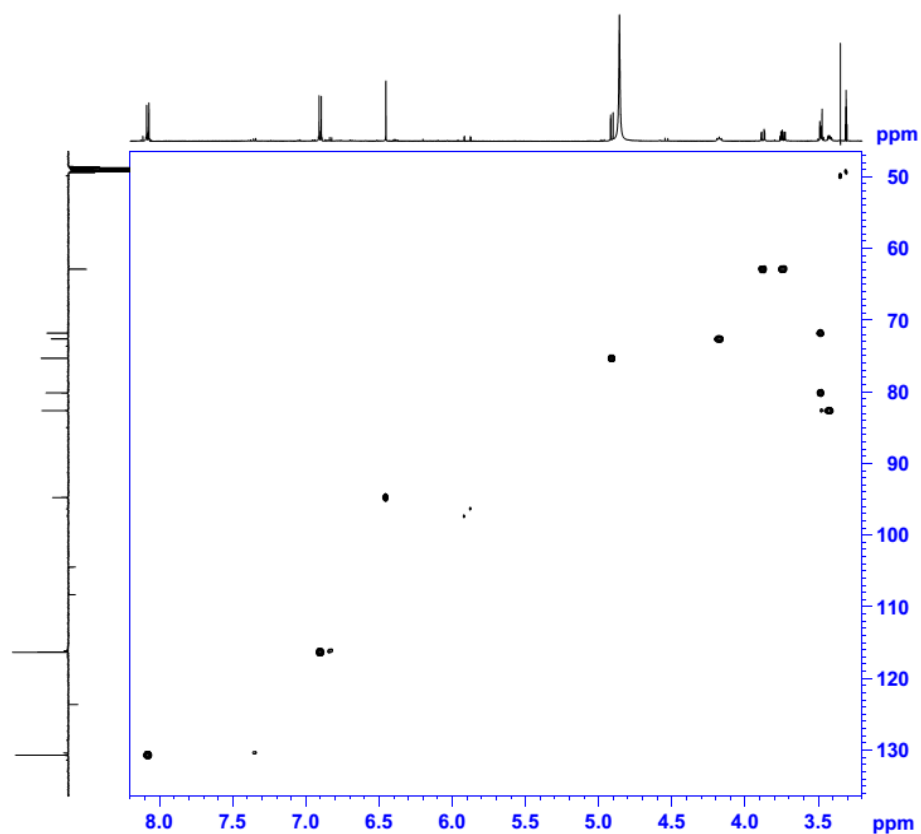


Abbildung XXXIII: NOESY von CSG3 in MeOH-d4

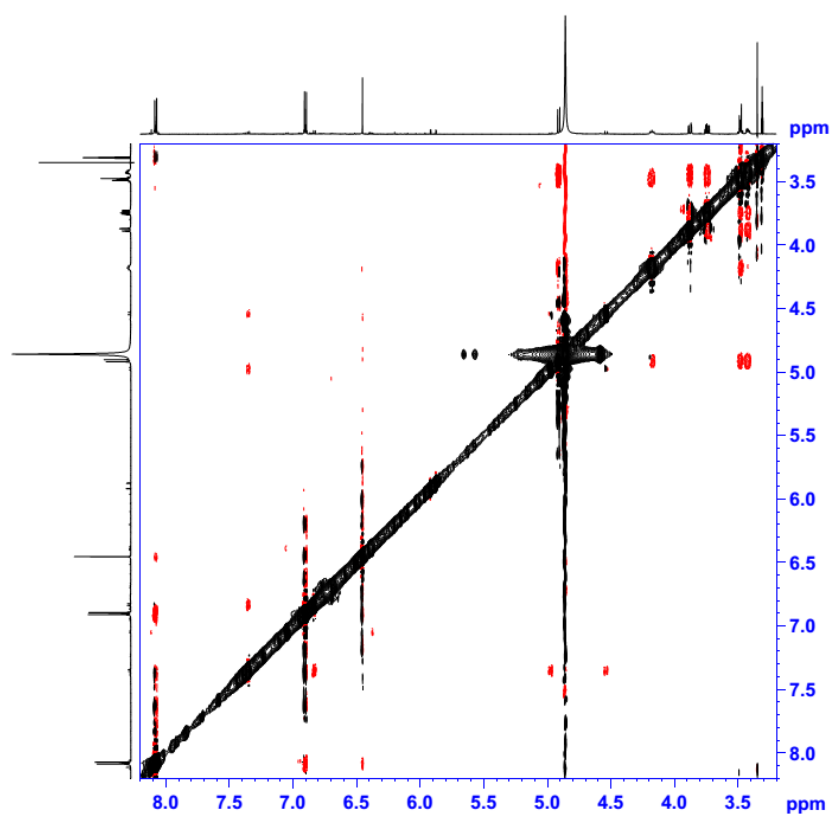


Abbildung XXXIV: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von CSG4 in MeOH- d_4

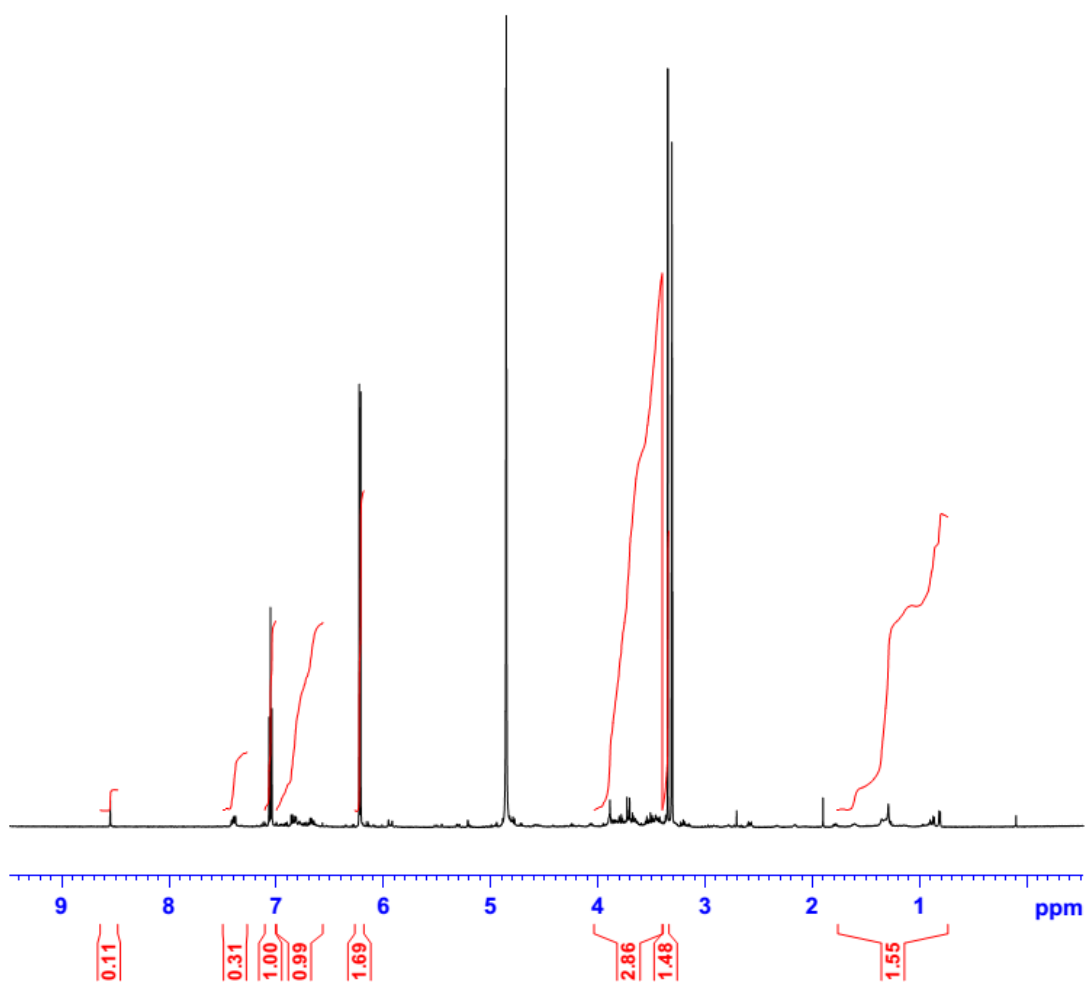


Abbildung XXXV: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von CSG5 in MeOH- d_4

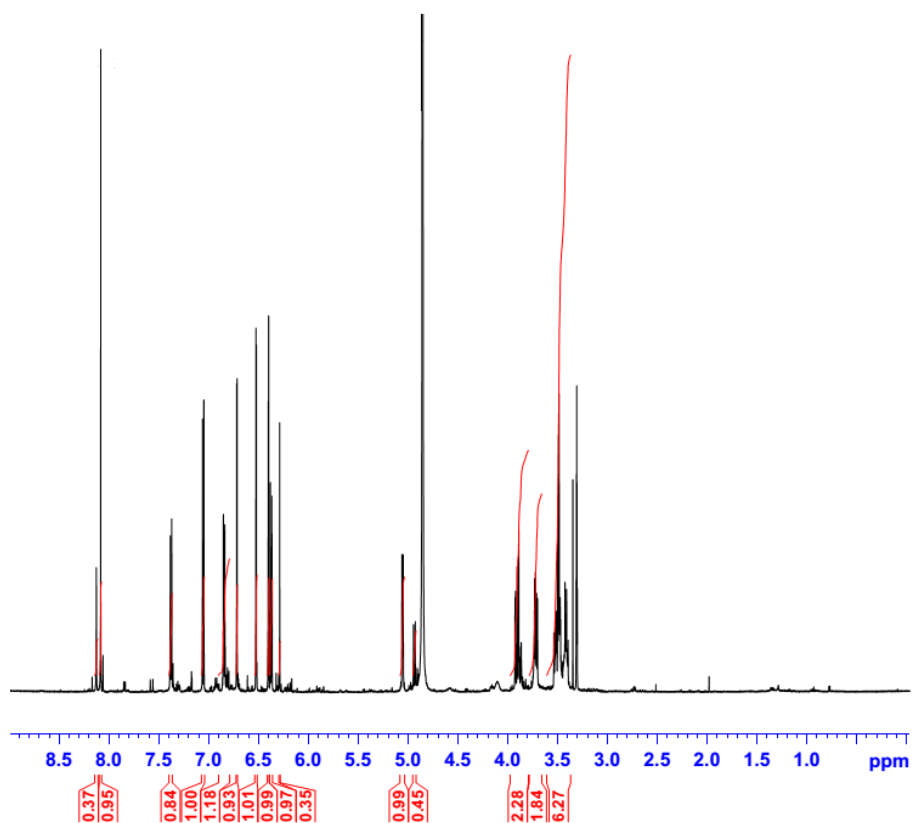


Abbildung XXXVI: 150 MHz ^{13}C NMR Spektrum von CSG5 in MeOH- d_4

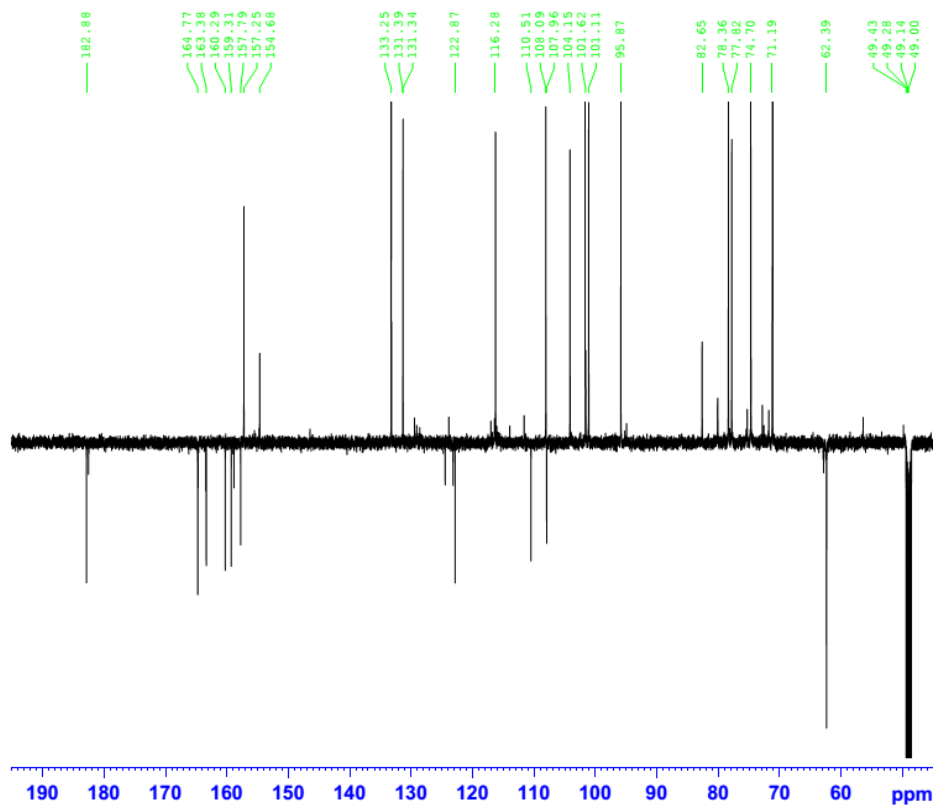


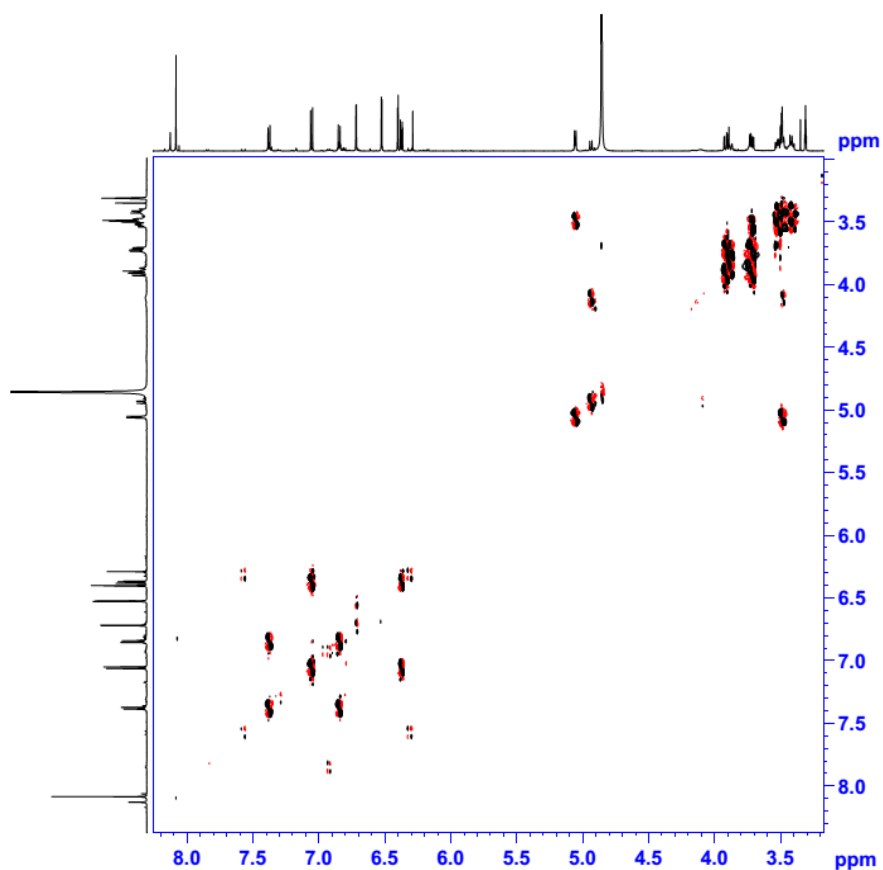
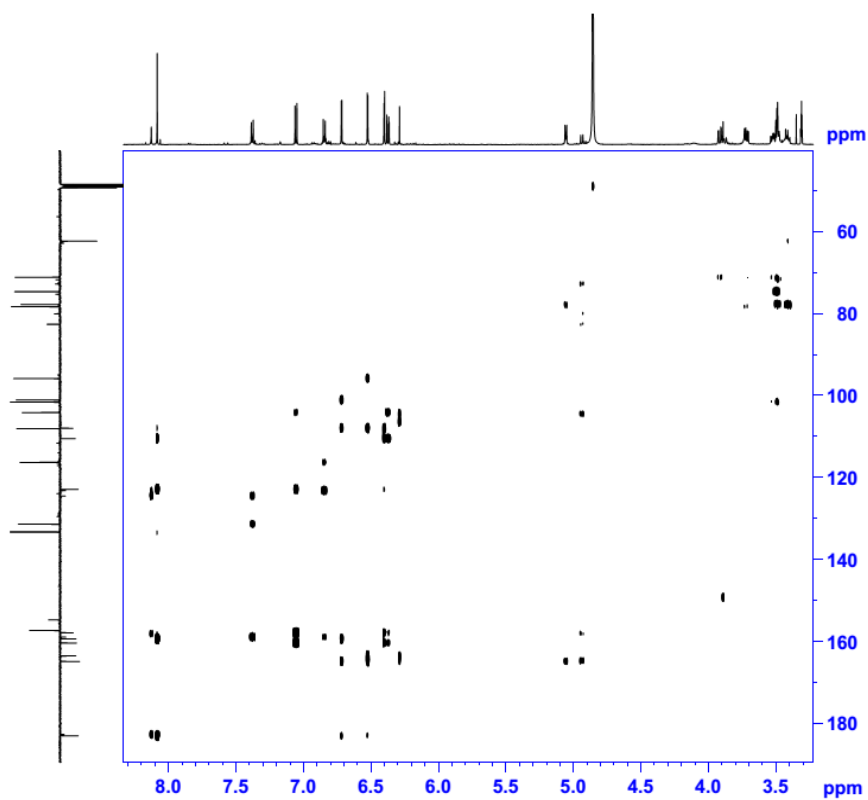
Abbildung XXXVII: COSY von CSG5 in MeOH-d₄**Abbildung XXXVIII: HMBC von CSG5 in MeOH-d₄**

Abbildung XXXIX: HSQC von CSG5 in MeOH-d₄

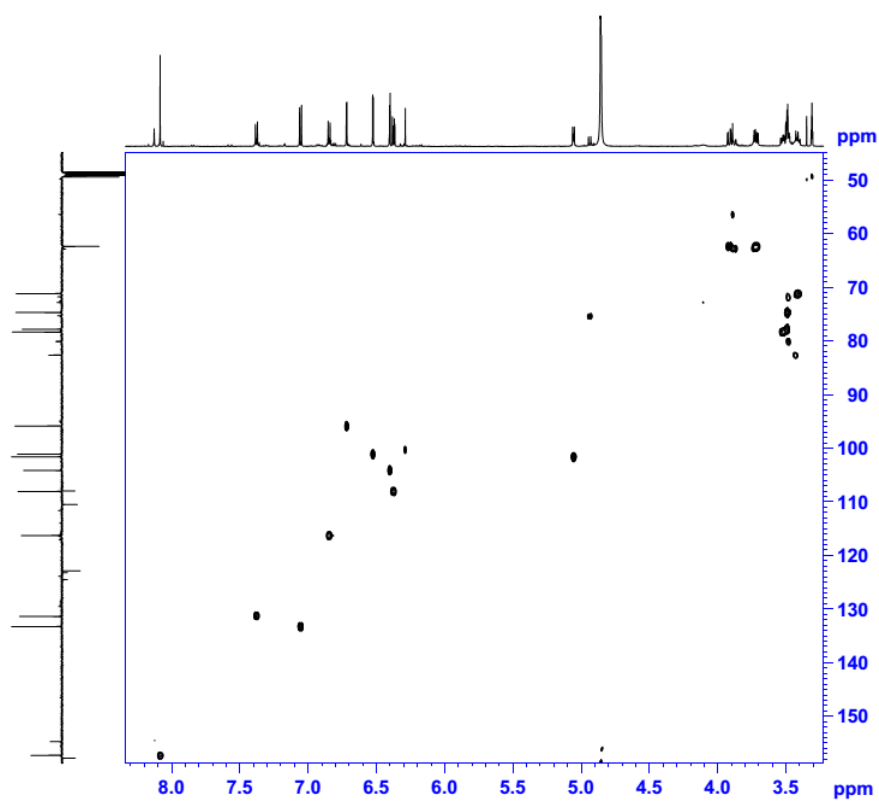


Abbildung XL: NOESY von CSG5 in MeOH-d₄

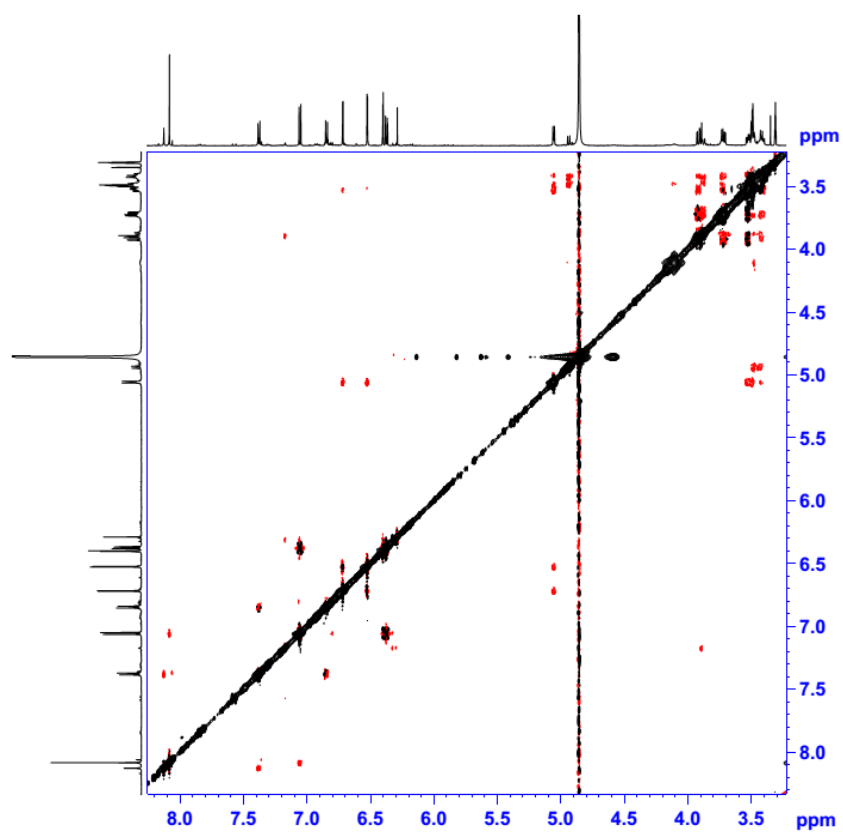
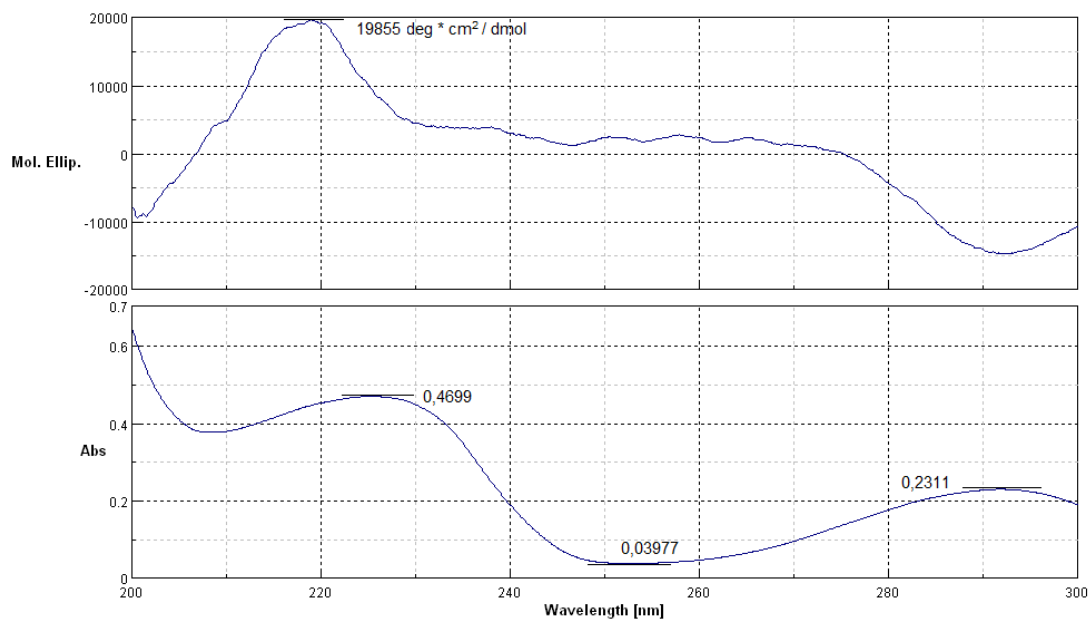


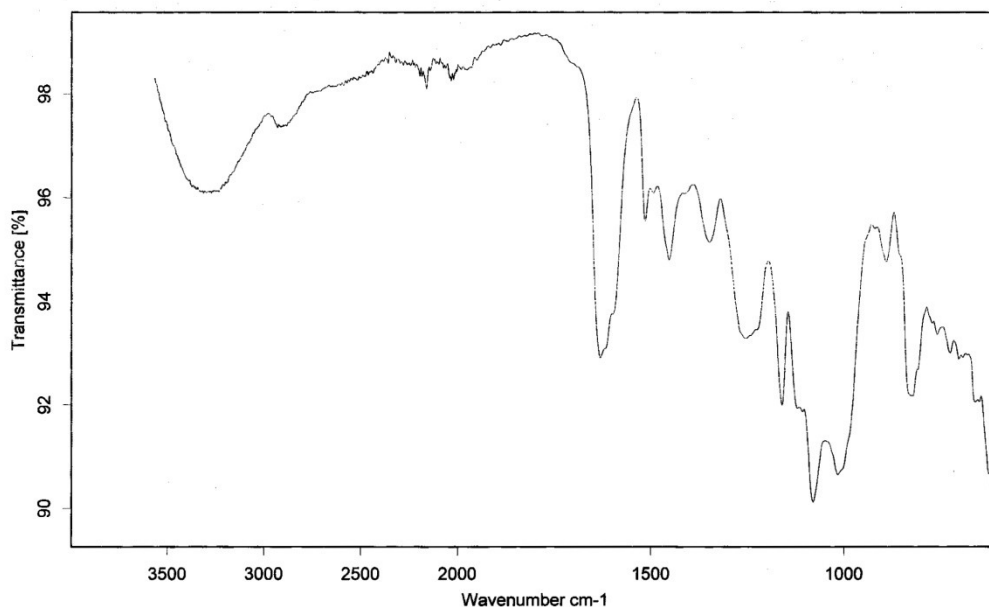
Abbildung XLI: CD- und UV-Spektrum von CSG1 in MeOH (c=0,2087 mmol/l)

$$\theta_{219,0 \text{ nm}} = 19855 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}$$

$$\epsilon_{225,2 \text{ nm}} = 22515 \text{ l} / \text{mol} / \text{cm}$$

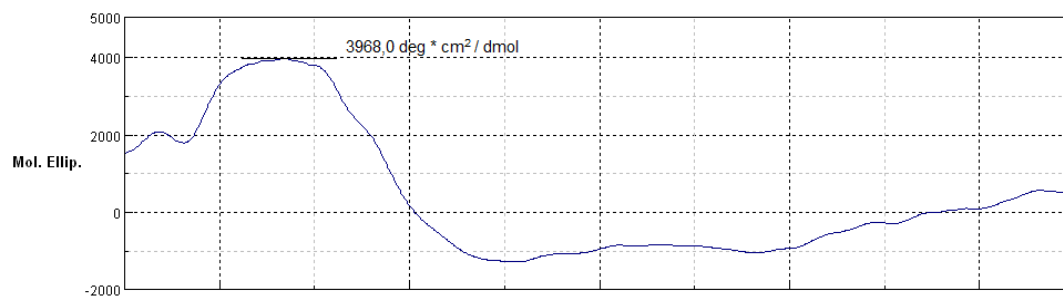
$$\epsilon_{252,7 \text{ nm}} = 1905 \text{ l} / \text{mol} / \text{cm}$$

$$\epsilon_{292,0 \text{ nm}} = 11079 \text{ l} / \text{mol} / \text{cm}$$

Abbildung XLII: IR-Spektrum von CSG1

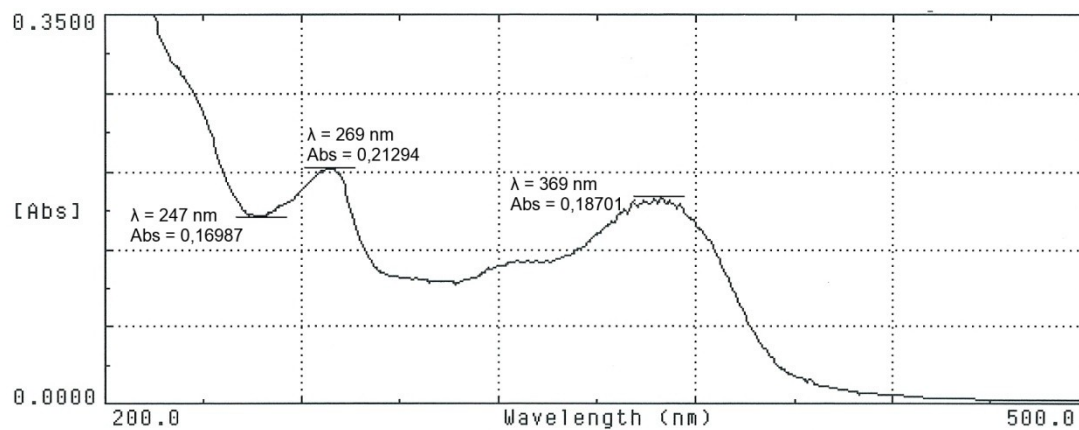
IR (film) ν_{max} 3298 (OH), 2916 (CH), 1631 (C=O), 1080 cm^{-1}

Abbildung XLIII: CD-Spektrum von CSG3 in MeOH (c=2,3605 mmol/l)



$$\theta_{266,9 \text{ nm}} = 6968 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}$$

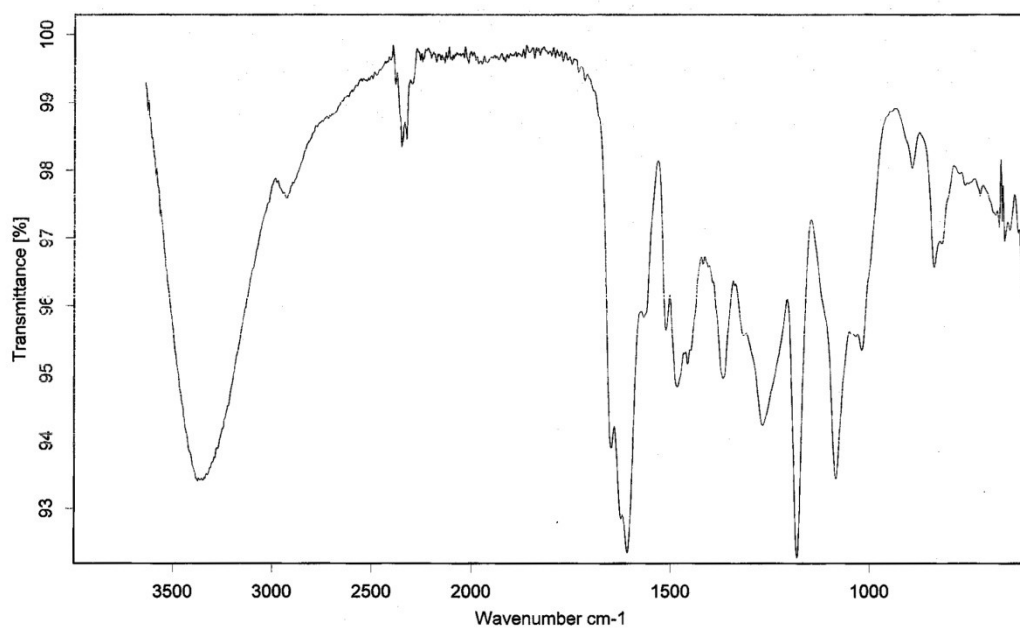
Abbildung XLIV: UV-Spektrum von CSG3 in MeOH (c=8,9216 µmol/l)



$$\epsilon_{247 \text{ nm}} = 19040 \text{ l} / \text{mol} / \text{cm}$$

$$\epsilon_{269 \text{ nm}} = 23867 \text{ l} / \text{mol} / \text{cm}$$

$$\epsilon_{369 \text{ nm}} = 20961 \text{ l} / \text{mol} / \text{cm}$$

Abbildung XLV: IR-Spektrum von CSG3

IR (film) $\nu_{\max}$ 3336 (OH), 2933 (CH), 1608 (C=O), 1180 cm⁻¹