



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Bioaktivitätsgeleitete Isolierung von immunsuppressiven
Substanzen aus *Viola odorata* L.

verfasst von

Katrin Pummer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek

Danksagung

Mein Dank gilt,...

...Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung eines Diplomarbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie.

...Ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Glasl/Reznicek/Krenn, für deine guten Ratschläge und dein offenes Ohr und vor allem für deine positive und humorvolle Art, die sehr ansteckend ist.

...Dr. Martin Zehl für die Vergabe des spannenden Diplomarbeits-themas, deine hervorragende Betreuung und die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen. Es hat sehr viel Spaß gemacht, mit dir zusammen zu arbeiten!

...Mag. Christina Sykora für die tolle Unterstützung und die ausführlichen Erklärungen zu den Geräten und Arbeitsschritten. Danke, dass du mir mit Rat und Tat beiseite gestanden bist.

...der Arbeitsgruppe Glasl/Reznicek/Krenn für die freundliche Aufnahme, die tolle Arbeitsatmosphäre und für euer offenes Ohr bei allen Problemen und den tollen Hilfestellungen. Ihr seid einfach ein unglaublich tolles Team!

...Ao. Univ. Prof. Dr. Mag. pharm. Ernst Urban für die Durchführung der NMR-Analysen und die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen.

...meinen Eltern, die mich mein ganzes Studium unterstützt haben, mich motiviert, mir gut zuredet und an mich geglaubt haben. Danke, dass ihr mich nie unter Druck gesetzt habt und danke für eure Ausdauer, mit der ihr mich durch das Studium begleitet habt. Ihr seid die tollsten Eltern, die man sich vorstellen kann!

...meinem Freund! Danke für deine Unterstützung, deine unermüdliche Aufmunterung und Motivierung und den Glauben an mich. Ohne dich wäre das Leben nur halb so schön!

...meinen Freunden, die immer geduldig mit mir waren, auch wenn ich wieder einmal keine Zeit für sie hatte, weil ich lernen musste. Danke für euer offenes Ohr, euer gutes Zureden und euer unglaubliches Verständnis. Ich möchte keinen von euch missen!

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
CAD	Charged Aerosol Detector
C-Atom	Kohlenstoff-Atom
CD ₃ OD	Deuteromethanol
CH ₃ OH	Methanol
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DAD	Diodenarray Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO-d ₆	perdeutertes Dimethylsulfoxid
Esculetin	Synonym für 6,7-Dihydroxycumarin
ESI	Elektrospray-Ionisation
FM	Fließmittel
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
korr.	korrigiert
[M+H] ⁺	protoniertes Molekül im Positiv-Ionenmodus der MS
[M-H] ⁻	deprotoniertes Molekül im Negativ-Ionenmodus der MS
MS	Massenspektrometrie
NaOH	Natronlauge
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NSR	Naturstoffreagenz A
OH	Hydroxygruppe
PEG	Polyethylenglykol
ppm	parts per million
R _t	Retentionszeit
SC	Säulenchromatographie
Si	Silizium/Kieselgel
SPE	Solid Phase Extraction
SAX	starker Anionenaustauscher
Tab.	Tabelle

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	10
1.1. Viola odorata Linné	10
1.1.1. Viola odoratae herba	11
1.1.2. Neueste Studienergebnisse zu <i>Viola odorata</i>	14
1.2. Hintergrund und Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Drogenmaterial	19
2.1.2. Lösungsmittel	19
2.2. Methoden	19
2.2.1. Extraktion	19
2.2.2. Festphasenextraktion	20
2.2.3. Säulenchromatographie	30
2.2.4. Dünnschichtchromatographie	34
2.2.5. LC-MS	36
2.2.6. NMR	42
3. Resultate	45
3.1. Vorarbeit: Ermittlung der interessanten Fraktionen	45
3.2. Aufreinigung des Lyophilisats mittels SPE C18	49
3.2.1. Vergleich der SPE C18 A-D	49
3.3. Methodenentwicklung zur Auftrennung der interessanten Fraktionen	54
3.3.1. Säulenchromatographie	54
3.3.2. Festphasenextraktion	56
3.3.3. Entwickelte Methode	60
3.4. Beispiel: Extraktion, Aufreinigung, Auftrennung	67
3.5. Charakterisierung der isolierten Substanzen	69
3.5.1. Reinheitsprüfung	70
3.5.2. MS	75
3.5.3. NMR	80
4. Diskussion	107
5. Zusammenfassung	109
6. Abstract	111
7. Literaturverzeichnis	113

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: DC der erhaltenen Fraktionen mittels SPE C18 im Vergleich zur Originalfraktion. _____	17
Abb. 2: Proliferationsassays der beiden aktivsten Fraktionen. _____	18
Abb. 3: Links: Phasentrennung im Scheidetrichter; Rechts: Versuchsaufbau SPE C18 _____	20
Abb. 4: DC der mittels im Vorfeld durchgeführten SPE C18 erhaltenen Fraktionen im Vergleich zur Originalfraktion. Ansicht 254 nm. _____	45
Abb. 5: DC der mittels im Vorfeld durchgeführten SPE C18 erhaltenen Fraktionen im Vergleich zur Originalfraktion. Ansicht bei 366 nm, besprüht. _____	47
Abb. 6: HPLC-Chromatogramme der mittels im Vorfeld durchgeführten SPE C18 erhaltenen Fraktionen 12%_1 bis 12%_4 bei 254 nm im Vergleich zur immunsuppressiv wirksamen Originalfraktion. _____	48
Abb. 7: DC der SPE C18 A, Ansicht: 254 nm. _____	51
Abb. 8: DC der SPE C18 A, Ansicht 366 nm, besprüht. _____	51
Abb. 9: DC der SPE C18 B, Ansicht: 254 nm. _____	51
Abb. 10: DC der SPE C18 B, Ansicht: 366 nm, besprüht. _____	52
Abb. 11: DC der SPE C18 C, Ansicht: 254 nm. _____	52
Abb. 12: DC der SPE C18 C, Ansicht: 366 nm, besprüht. _____	52
Abb. 13: DC der SPE C18 D, Ansicht: 254 nm. _____	53
Abb. 14: DC der SPE C18 D, Ansicht: 366 nm, besprüht. _____	53
Abb. 15: DC der SPE NH ₂ . Aufgetragen wurde die halbe Fraktion 8%_5 A. Ansicht 254 nm. _____	57
Abb. 16: DC der SPE NH ₂ . Aufgetragen wurde die halbe Fraktion 8%_5 A. Ansicht bei 366 nm, besprüht. _____	58
Abb. 17: links: Die DC zeigt das Nachwaschen (NW) der Säule der SPE NH ₂ , die mit der Fraktion 8%_5 A durchgeführt wurde. _____	58
Abb. 18: DC der SPE Si. Aufgetragen wurde die halbe Fraktion 8%_5 A. Ansicht 254 nm. _____	59
Abb. 19: DC der SPE Si. Aufgetragen wurde die halbe Fraktion 8%_5 A. Ansicht bei 366 nm, besprüht. _____	59
Abb. 20: DC der SPE NH ₂ . Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen 7-12 der zuvor durchgeführten SPE Si (8%_5 A) mit verfeinerten FM-Gradient. Ansicht bei 254 nm. _____	61
Abb. 21: DC der SPE NH ₂ . Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen 7-12 der zuvor durchgeführten SPE Si (8%_5 A) mit verfeinerten FM-Gradient. Ansicht bei 366 nm, besprüht. _____	61
Abb. 22: DC der SPE Si-Methode 2. Aufgetragen wurde die Fraktion 8%_6 A. Ansicht: 254 nm. _____	63
Abb. 23: DC der SPE Si-Methode 2. Aufgetragen wurde die Fraktion 8%_6 A. Ansicht: 366 nm, besprüht. _____	63
Abb. 24: DC der SPE NH ₂ -Methode 3. Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen 11-18 der zuvor durchgeführten SPE Si der Fraktion 8%_6 A. Ansicht bei 254 nm. _____	65
Abb. 25: DC der SPE NH ₂ -Methode 3. Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen 11-18 der zuvor durchgeführten SPE Si der Fraktion 8%_6 A. Ansicht bei 366 nm, besprüht. _____	65
Abb. 26: Die Graphik zeigt die Gewichtsverhältnisse von der Extraktion bis zur Isolation der aktiven Substanz. _____	67
Abb. 27: Reinsubstanzen. _____	69
Abb. 28: Die Abbildung zeigt das Chromatogramm des Blanks (Methanol). _____	71
Abb. 29: Chromatogramm der isolierten Substanz KP01. _____	72
Abb. 30: Chromatogramm der isolierten Substanz KP02. _____	73
Abb. 31: Chromatogramm der isolierten Substanz KP03. _____	74
Abb. 32: ESI-MS ⁿ Spektren des [M-H] ⁻ Ions von KP01 bei <i>m/z</i> 399,0. _____	76
Abb. 33: ESI-MS ⁿ Spektren des [M-H] ⁻ Ions von KP02 bei <i>m/z</i> 399,0. _____	77
Abb. 34: Vergleich der durch den Neutralverlust der Hexosylgruppe entstehenden Fragmentationen der [M-H] ⁻ Ionen von KP01 und KP02. _____	78
Abb. 35: ESI-MS Spektrum von KP03 und ESI-MS ² Spektrum des [M+H] ⁺ Ions bei <i>m/z</i> 179,0. _____	79
Abb. 36: Gezoomtes ¹ H-NMR-Spektrum von KP03 in CD ₃ OD. _____	82
Abb. 37: Gezoomtes ¹³ C-NMR-APT-Spektrum von KP03 in CD ₃ OD. _____	85
Abb. 38: 6,7-Dihydroxycumarin. _____	86
Abb. 39: Gezoomtes ¹ H-NMR-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD. _____	88
Abb. 40: Gezoomtes HSQC-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD. _____	88
Abb. 41: Gezoomtes ¹³ C-NMR-APT-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD. _____	93
Abb. 42: Gezoomtes ¹³ C-NMR-APT-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD. _____	93
Abb. 43: Gezoomtes ¹³ C-NMR-APT-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD. _____	94

Abb. 44: Gezoomtes HSQC-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD.	94
Abb. 45: Gezoomtes HMBC-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD.	95
Abb. 46: Gezoomtes NOESY-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD.	96
Abb. 47: Gezoomtes NOESY-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD.	97
Abb. 48: Gezoomtes NOESY-Spektrum von KP02 in CD ₃ OD.	97
Abb. 49: Strukturformel von KP02.	98
Abb. 50: Gezoomtes HMBC-Spektrum von KP01 in DMSO-d ₆ .	104
Abb. 51: Gezoomtes NOESY-Spektrum von KP01 in Deuteromethanol.	105
Abb. 52: Strukturformel von KP01.	106

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Parameter für die SPE C18.	22
Tab. 2: Ersichtlich sind die Auswaagen, die verwendete Menge Wasser (H ₂ O) bzw. Methanol (CH ₃ OH) zur Bereitung der Untersuchungslösung und die auf die DC aufgetragene Menge der Untersuchungslösung.	23
Tab. 3: Parameter für die SPE SAX.	26
Tab. 4: Parameter der SPE NH ₂ -Methode 1.	27
Tab. 5: Parameter der SPE NH ₂ -Methode 2.	28
Tab. 6: Parameter der SPE NH ₂ -Methode 3.	28
Tab. 7: Parameter der SPE Si-Methode 1.	29
Tab. 8: Parameter der SPE Si-Methode 2.	29
Tab. 9: Parameter der SPE Si-Methode 3.	29
Tab. 10: Parameter für die SC mit Kieselgel als stationäre Phase.	30
Tab. 11: Parameter der SC mit Polyamid als stationäre Phase.	31
Tab. 12: Parameter für die SC mit Sephadex LH-20 als stationäre Phase.	32
Tab. 13: Parameter für die SC mit Polystyrol als stationäre Phase.	33
Tab. 14: Parameter für die DC.	35
Tab. 15: Parameter für die HPLC-Methode 1, Detektor: DAD.	38
Tab. 16: Parameter für die HPLC-Methode 2, Detektor: DAD.	39
Tab. 17: Parameter für die HPLC-Reinheitsprüfung, Detektor: CAD.	40
Tab. 18: Einstellung der ESI-Quelle zur Bestimmung der molekularen Massen.	41
Tab. 19: Einstellung der ESI-Quelle zur Strukturaufklärung.	41
Tab. 20: Parameter der NMR-Analyse.	44
Tab. 21: Die Tabelle zeigt die mit der entwickelten Methode aufgetrennten Fraktionen sortiert nach der zur Aufreinigung durchgeführten SPE C18.	66
Tab. 22: Die Tabelle fasst alle gewonnenen Fakten über die Mischfraktionen „blaue Bande“ und „orange Bande“ zusammen.	67
Tab. 23: Fakten zu den isolierten Substanzen.	69
Tab. 24: Die Tabelle zeigt die Daten des in Abb. 28 ersichtlichen Injektionspeaks.	71
Tab. 25: Die Tabelle zeigt die Daten der Peaks des Chromatogramms in der Abb. 29.	72
Tab. 26: Die Tabelle zeigt die Daten der Peaks des Chromatogramms in der Abb. 30.	73
Tab. 27: Die Tabelle zeigt die Daten der Peaks des Chromatogramms in der Abb. 31.	74
Tab. 28: Zusammenfassung der bisher gesammelten Daten der isolierten Substanzen.	80
Tab. 29: Auflistung der ¹ H-NMR-Signale von KP03 im Vergleich zur Literatur.	82
Tab. 30: Vergleich der ¹³ C-NMR-Signale von Esculetin und einem unsubstituiertem Cumarin.	84
Tab. 31: Auflistung der ¹³ C-NMR-Signale von KP03 im Vergleich zur Literatur.	85
Tab. 32: Auflistung der ¹ H-NMR-Signale von KP02 im Vergleich zur Literatur ähnlicher Verbindungen.	89
Tab. 33: Auflistung der ¹³ C-NMR-Signale von KP02 im Vergleich zu in der Literatur angeführten ähnlichen Verbindungen.	92
Tab. 34: ¹³ C-NMR-Ergebnisse der Hexose von KP02 im Vergleich zur Literatur.	98
Tab. 35: Auflistung der ¹ H-NMR-Signale von KP01 im Vergleich zur Literatur ähnlicher Verbindungen.	100
Tab. 36: Auflistung der ¹³ C-NMR-Signale von KP01 in Deuteromethanol und DMSO-d ₆ im Vergleich zu in der Literatur angeführten ähnlichen Verbindungen.	103
Tab. 37: ¹³ C-NMR-Ergebnisse der Hexose von KP01 im Vergleich zur Literatur.	105

1. EINLEITUNG

1.1. *Viola odorata* Linné

Viola odorata L. gehört zur Familie der Violaceae und wird im Deutschen unter anderem als wohlriechendes Veilchen, Duftveilchen oder Märzveilchen bezeichnet. Es kommt ursprünglich aus dem Mittelmeergebiet, wurde aber fast vollständig in den meisten Gebieten des restlichen Europas eingebürgert. Der Anbau von *Viola odorata* dient in den Balkanländern oft der Gewinnung der Wurzel, in Italien und Südfrankreich typischerweise zur Isolierung der Duftstoffe und in Mitteleuropa erfolgt die Kultivierung zumeist zur Verwendung als Zierpflanze (Hänsel et al., 1994).

Bei *Viola odorata* handelt es sich um eine Rosettenstaude, die Ausläufer bildet, welche zumeist erst im zweiten Jahr Blüten ausbilden. Die Kronblätter sind wohlriechend, dunkel purpurviolett und am Grund weiß gefärbt. Um *Viola odorata* von anderen Arten unterscheiden zu können, kann man die Nebenblätter, die Stellung der Vorblätter an den Blütenstielen oder die langen Ausläufer heranziehen (Hänsel et al., 1994).

Drogen (Hänsel et al., 1994):

Im Folgenden werden die von *Viola odorata* verwendeten Drogen näher beschrieben.

- *Viola-odorata*-Blütenöl

Es handelt sich hierbei um das ätherische Öl der Blüten von *Viola odorata*. Der Anbau erfolgt hauptsächlich in Frankreich in Hyères und Grasse. Anwendung findet es in der Kosmetik. Außerdem soll das ätherische Öl als Repellent gegen den Holzbock, *Ixodes ricinus*, angewendet werden können und soll dabei das Standardrepellent Diethyltoluamid (DEET) in seiner Wirkung übertreffen (Hänsel et al., 1994).

- *Violae odoratae* flos

Die Droge besteht aus den getrockneten Blüten von *Viola odorata*. Die beschriebenen Wirkungen, wie expektorierend, antimikrobiell und leicht abführend, konnten bis jetzt nicht wissenschaftlich bestätigt werden.

Die Blüten finden in der Kosmetik Anwendung (Hänsel et al., 1994).

- *Violae odoratae folium*

Es handelt sich dabei um die zur Blütezeit gesammelten Blätter von *Viola odorata*. Die Trocknung der Blätter erfolgt an der Luft. Die Wirkungen sind mit denen von *Violae odoratae herba* vergleichbar (siehe Punkt 1.1.1.). Anwendung findet die Droge in der Kosmetik (Hänsel et al., 1994).

- *Violae odoratae herba*

Die Droge besteht aus dem blühenden Kraut von *Viola odorata* (siehe Punkt 1.1.1.).

- *Violae odoratae rhizoma*

Die Droge besteht aus dem getrockneten Wurzelstock. Die in der Literatur beschriebene expektorierende und emetische Wirkung ist nicht ausreichend belegt (Hänsel et al., 1994). *Violae odoratae rhizoma*, die echte Veilchenwurzel, darf nicht mit der volksmedizinisch bezeichneten „Veilchenwurzel“ verwechselt werden. Bei letzterer handelt es sich um die Wurzel von *Iris germanica*, welche als Kaumittel für zahnende Kinder verwendet wird (Frohne, 2006).

1.1.1. *Violae odoratae herba*

Da die Krautdroge im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendet wurde, wird hier auch näher auf die Inhaltsstoffe, Wirkungen und Anwendungen eingegangen.

Generell ist anzumerken, dass im Europäischen Arzneibuch keine Monographie zu *Viola odorata* vorhanden ist und dass es wenig Literatur über die Droge gibt. Im britischen Arzneibuch gibt es eine Monographie zur Blüte und zum Blatt von *Viola odorata* (Bradley, 2006).

Inhaltsstoffe der Blüten

(Hänsel et al., 1994):

- Zyklotide¹
- Ätherisches Öl
- Wachse
- Anthocyane: Violanin, Gauin
- Flavonoide (v.a. O-glykosylierte Quercetin- und Kämpferol-Derivate (Karioti et al., 2010))
- Salizylsäuremethylester
- Violin (Alkaloid)
- Vitamin C
- Reduzierende Zucker
- Niedermolekulare Proteine

Inhaltsstoffe der Blätter

(Hänsel et al., 1994):

- Zyklotide¹
- Terpene: Friedelin, β -Sitosterol
- Ätherisches Öl
- Phthalsäuredimethylester
- Phenolische Säuren: Ferulasäure, Sinapinsäure
- Vitamin C
- Violin (Alkaloid)

Wirkungen (Hänsel et al., 1994):

- hämolytische Wirkung (in vitro): ein Auszug wird verwendet, experimentelle Daten fehlen²
- antiexsudative Wirkung: ein Dekokt wird verwendet, nähere Angaben sind nicht zugänglich²
- antipyretische Wirkung: ein Extrakt mit 90 %igem Ethanol wird hergestellt und getrocknet; anschließend werden Hexan-, Chloroform- und Wasser-Fractionen hergestellt, der Hexanextrakt erzielte die deutlichste Wirkung
- expektorierende Wirkung: ein wässriger Auszug wird verwendet, unzureichende Daten²
- schweißtreibende Wirkung: ein wässriger Auszug wird verwendet, keine experimentellen Belege²

¹ Nach neueren Erkenntnissen enthält die Droge keine Saponine, wie früher vermutet, sondern cyclische Peptide (=Zyklotide), die eine hämolytische, antimikrobielle und insektizide Wirkung aufweisen. Aus *Viola odorata* wurde unter anderem Cycloviolacin O2 isoliert (Wichtl, 2009; Studien zu Cycloviolacin O2: Gerlach et al., 2010; Burman et al., 2010; Studie zu Cycloviolacin O1: Craik et al., 1999).

² Eine abschließende Beurteilung der Wirkung konnte daher nicht vorgenommen werden (Hänsel et al., 1994).

Fortsetzung Wirkungen (Hänsel et al., 1994):

- antitussive, muskelrelaxierende und spasmolytische Wirkung: experimentelle Belege fehlen²
- Keine Antitumorwirkung des Lyophilisats eines mit 50%igem Ethanol hergestellten Extraktes (getestet im L-1210-Mäuseleukämie-Modell, am Lewis-Tumor, am Sarkom 180 und an KB-Zellen).

Volkstümliche Anwendungen:

Violae odoratae herba wird als Teegetränk bei Husten, Heiserkeit, Lungenentzündung, als schweißtreibendes Mittel, bei Halsentzündung, bei Bronchitis mit festsitzendem Schleim, bei nervöser Überreizung, bei Schlafstörungen und bei Hysterie angewendet.

Bei Hautkrankheiten wird eine äußerliche Anwendung empfohlen.

Anzumerken ist, dass die Wirksamkeit der Droge bei diesen Anwendungsgebieten noch nicht wissenschaftlich nachgewiesen werden konnte (Hänsel et al., 1994).

Zur therapeutischen Verwendung ist außerdem zu sagen, dass eine Negativ-Monographie der Kommission E aus dem Jahr 1994 vorliegt³. Grund dafür war eine nicht ausreichend belegte Wirksamkeit. Es bestehen jedoch keine Risiken, wodurch eine Verwendung nach eigenen therapeutischen Erfahrungen nicht ausgeschlossen ist. Außerdem kann das Duftveilchen als Hilfs- und Schmuckdroge oder als Geschmackskorrigens verwendet werden (Schilcher et al., 2007).

² Eine abschließende Beurteilung der Wirkung konnte daher nicht vorgenommen werden (Hänsel et al., 1994).

³ Die Kommission E wurde vom heutigen Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (früher Bundesgesundheitsamt) in Deutschland beauftragt, das Nutzen-Risiko-Verhältnis von 312 pflanzlichen Drogen nach den damals aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen neu zu bewerten. Damit sollte die Nachzulassung von pflanzlichen Arzneimitteln beschleunigt werden (Kooperation Phytopharmaka, 2014).

1.1.2. Neueste Studienergebnisse zu *Viola odorata*

Im Folgenden werden die neuesten Studienergebnisse zu *Viola odorata* kurz zusammengefasst.

Zarrabi et al. (2013) isolierten Zyklotide aus der iranischen *Viola odorata* und untersuchten die antimikrobiellen Effekte in Bezug auf humane (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) und pflanzliche Bakterien (*Xanthomonas oryzae*, *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia cicil*, *Bacillus sp.*). Es konnte gezeigt werden, dass zwar das Wachstum aller getesteten Bakterien inhibiert wurde, pflanzliche Bakterien aber empfindlicher auf Zyklotide reagieren, was die Annahme unterstützt, dass sie Teil eines Abwehrsystems der Pflanze sind. Unter den getesteten humanen Bakterien war *Staphylococcus aureus* der sensibelste (Zarrabi et al., 2013).

Gerlach et al. (2010) untersuchten die zytotoxischen, porenbildenden und chemosensibilisierenden Eigenschaften von Cycloviolacin O₂ (CyO₂) aus *Viola odorata*. Dabei führte CyO₂ zu einem dosisabhängigen zytotoxischen Effekt. Die kombinierte Verabreichung von CyO₂ und Doxorubicin in der gleichen Konzentration führte zu einer Chemosensibilisierung in Doxorubicin resistenten Brustkrebszellen, was sich durch die auf ein Drittel reduzierte IC₅₀ zeigte. Der Grund dafür ist, dass CyO₂ die Zellmembran der resistenten Zellen porös macht und dadurch die Aufnahme von Doxorubicin gesteigert wird. Die Kombination von Cycloviolacin O₂ mit einem Chemotherapeutikum könnte also eine vielversprechende Therapiemöglichkeit bei therapieresistentem Brustkrebs sein (Gerlach et al., 2010).

Koochek et al. (2003) erforschten die Effektivität eines wässrigen Extraktes der Blüten von *Viola odorata* in der Vorbeugung bzw. Behandlung einer durch Formalin ausgelösten Lungenschädigung an Ratten. Dabei wurde eine subletale Dosis von Formalin mittels Zerstäuber verabreicht. Als Positivkontrolle wurde Hydrocortison, als Negativkontrolle eine Salzlösung verwendet. Bei der Behandlung einer derart ausgelösten Lungenschädigung waren Hydrocortison (10 mg/kg Körpergewicht) und der wässrige Extrakt (50 mg/kg Körpergewicht)

gleich wirksam und konnten eine signifikante Reduktion der untersuchten Indikatoren für die Lungenschädigung erreichen. Der entzündungshemmende Effekt des wässrigen Extraktes ist also in der Behandlung einer durch Formalin ausgelösten Lungenschädigung mit dem von Hydrocortison vergleichbar (Koochek et al., 2003).

Gautam et al. (2012) untersuchten die antibakterielle Aktivität mehrerer Extrakte von *Viola odorata* gegen Erreger von Infektionen des Respirationstraktes (*Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*). Als Positivkontrolle wurde Erythromycin verwendet. Am Besten schnitt dabei der Methanolextrakt ab, wobei ein phytochemisches Screening ergab, dass dieser Flavonoide, herzwirksame Glykoside, Alkaloide, Steroide, Saponine und Tannine enthält. Aufgrund dieses Ergebnisses könnten neue Phytopharmaka für die Behandlung von respiratorischen Infekten entwickelt werden (Gautam et al., 2012).

Karioti et al. (2010) führten eine qualitative und quantitative Charakterisierung eines Dekokt und eines Infus aus den Blüten von *Viola odorata* durch. Die qualitativen Untersuchungen zeigten, dass in beiden Zubereitungen Flavonolglykoside enthalten waren. In Spuren wurden zusätzlich Flavone gefunden. Die violette Farbe der Zubereitungen konnte auf Violanin und ein zweites Anthocyan zurückgeführt werden, welche ebenfalls in Spuren in den Zubereitungen gefunden wurde. Bei der Quantifizierung kam man zu dem Schluss, dass sowohl der Dekokt als auch der Infus eine ähnliche Zusammensetzung aufwiesen (Karioti et al., 2010).

Hasan et al. (2012) untersuchten den Extrakt der Blätter von *Viola odorata* auf antihypertensive und antidyslipidämische Aktivität. Die Ergebnisse zeigten dabei einen Blutdruck-senkenden Effekt des Extraktes auf anästhesierte Ratten. Bei isolierten tierischen Gewebepreparaten zeigte sich eine Vasodilatation, ausgelöst durch eine Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms durch Membrankanäle, durch eine Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und über NO-vermittelte Kaskaden. Dies stellt auch eine mögliche Erklärung der Blutdrucksenkung dar. Außerdem konnten eine Reduktion des Körpergewichtes

und antidyslipidämische Effekte, vermutlich durch eine Hemmung der Synthese und Absorption von Fetten und durch antioxidative Effekte des Extraktes, beobachtet werden (Hasan et al., 2012).

Hammami et al. (2011) führten in vitro Untersuchungen bezüglich der antimykotischen Eigenschaften des ätherischen Öls und des Methanolextraktes der Blüten von *Viola odorata* gegen *Botrytis cinerea* auf Petrischalen, in Flüssigkultur und unter Lagerbedingungen durch. Dabei ergab sich eine starke antimykotische Aktivität des ätherischen Öls. Daher könnte das ätherische Öl von *Viola odorata* eine potentielle Quelle für ein nachhaltiges umweltfreundliches botanisches Fungizid sein (Hammami et al., 2011).

Vishal et al. (2009) untersuchten diuretische, laxierende und toxische Effekte von Extrakten aus den oberirdischen Anteilen von *Viola odorata* in Ratten. Dabei zeigte sich, dass der wässrige Extrakt eine signifikante diuretische Aktivität aufwies. Der Butanolextrakt und der wässrige Extrakt wiesen einen guten laxierenden Effekt auf. Die akute Toxizität wurde nach oraler Gabe in Ratten ermittelt und war dabei höher als 2000 mg/kg (Vishal et al., 2009).

1.2. Hintergrund und Zielsetzung

Dr. Carsten Gründemann von der Uniklinik Freiburg und Dr. Christian Gruber von der Medizinischen Universität Wien konnten zeigen, dass zyklotidhaltige Extrakte von *Oldenlandia affinis* (Gründemann et al., 2012) und Reinzyklotide (Gründemann et al., 2013) eine proliferationshemmende Wirkung auf primäre Lymphozyten haben.

Da in Violaceen ebenfalls Zyklotide enthalten sind, galt es im nächsten Schritt Extrakte von *Viola tricolor* (Hellinger et al., 2013) und *Viola odorata* auf eine immunsuppressive Wirkung zu testen. Im Rahmen dieser Testung stießen sie auf eine Fraktion von *Viola odorata*, die eine immunsuppressive Wirkung aufwies, allerdings keine Zyklotide enthielt. Diese mit präparativer HPLC gewonnene Fraktion wurde an Dr. Martin Zehl geschickt. Im nächsten Schritt wurde im Department für Pharmakognosie der Universität Wien die Droge nach dem gleichen Schema extrahiert und mittels SPE C18 aufgereinigt. Mit diesem Versuch gelang es, Fraktionen zu erhalten, deren Inhaltsstoffmuster weitgehend mit der Originalfraktion übereinstimmten (siehe Abb. 1).

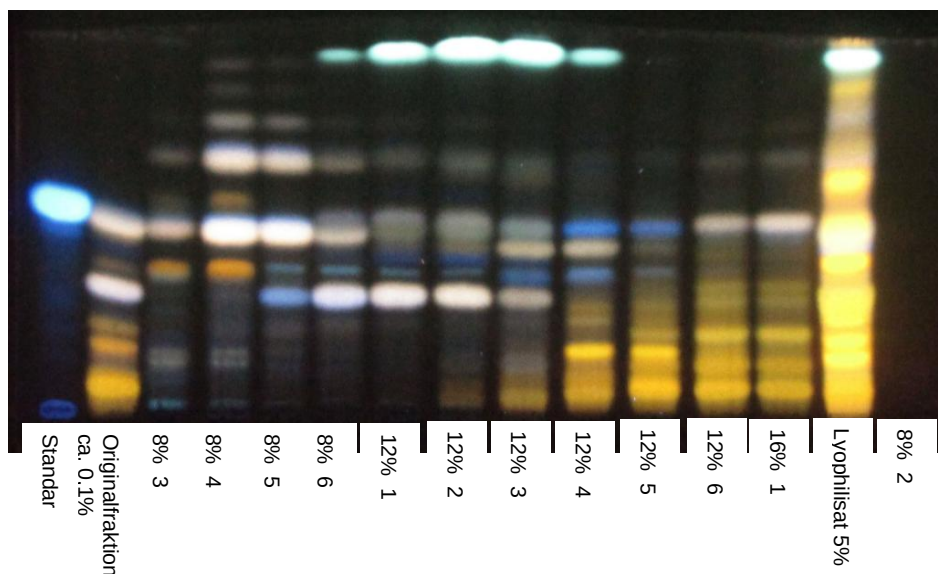


Abb. 1: DC der mittels SPE C18 erhaltenen Fraktionen im Vergleich zur Originalfraktion. Fließmittel: Ethylacetat-konz. Ameisensäure-konz. Essigsäure-Wasser (100-11-11-27), Standard: Esculin Hydrat, besprüht mit Naturstoffreagenz, Ansicht bei 366 nm.

Die so erhaltenen Fraktionen wurden anschließend erneut an Dr. Gründemann in die Uniklinik Freiburg geschickt, um eine Bioaktivitätstestung durchzuführen. Diese erfolgte mittels eines Proliferationsassays an primären Lymphozyten. Dabei wurden die Lymphozyten zunächst mit zwei verschiedenen Stimuli zur

Proliferation angeregt. Bei dem stärkeren T-Zell-Stimulus PHA-L ist zu bemerken, dass neben einer starken Proliferation auch ein schnelleres Absterben der T-Lymphozyten beobachtet werden kann, daher ist hier auch immer eine größere Effektstärke zu sehen als bei dem milderen, physiologischen T-Zell-Stimulus CD3-28. Anschließend wurden die mit der SPE C18 erhaltenen Fraktionen in den Konzentrationen 30, 100 und 300 µg/mL zugegeben. Bei einer Konzentration von 30 µg/mL zeigte sich nur eine geringe bis gar keine Wirkung bei CD3-28-stimulierten T-Zellen. Bei einer Konzentration von 100 µg/mL zeigte sich bei den Fraktionen 12%_2 und 12%_3 eine deutliche Hemmung der Proliferation und damit eine mögliche immunsuppressive Wirkung. Die Konzentration von 300 µg/mL führte bei allen Fraktionen zu einer Reaktion. Anhand dieser Ergebnisse (siehe Abb. 2, Anhang: Abb.1 und Abb. 2) ist zu erkennen, dass es sich bei den Fraktionen 12%_2 und 12%_3 um die Aktivsten handelt.

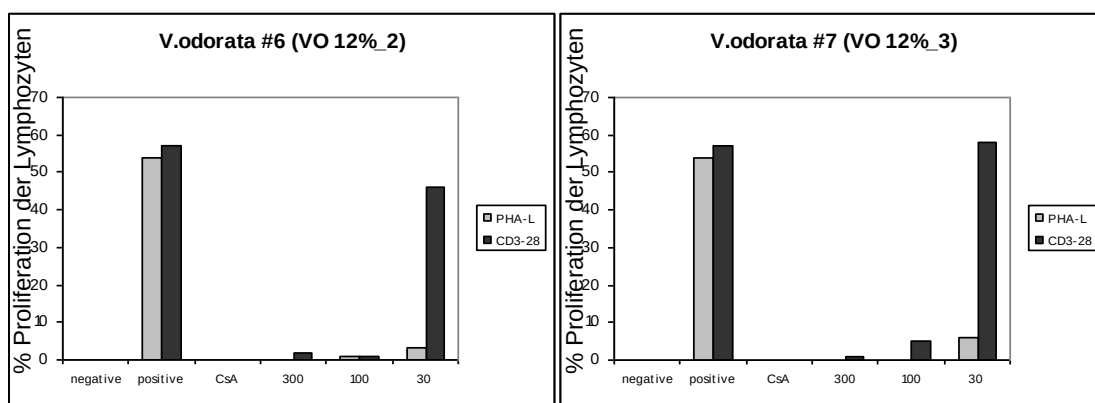


Abb. 2: Resultate des Proliferationsassays der beiden aktivsten Fraktionen. Die grauen Balken zeigen den stärkeren T-Zell-Stimulus (PHA-L), die schwarzen Balken den schwächeren physiologischen T-Zell-Stimulus (CD3-28). Je kleiner der Balken, desto wirksamer die Fraktion. Cyclosporin A (CsA) diente als Positivkontrolle.

Nach dem Erhalt dieser Ergebnisse wurden im Department für Pharmakognosie der Universität Wien mit den Fraktionen HPLC-Analysen durchgeführt. Die HPLC-Chromatogramme (Abb. 6, Seite 48; Anhang: Abb. 3 und 4) der beiden aktivsten Fraktionen 12%_2 und 12%_3 wurden mit denen der schwächer bis gar nicht wirksamen Fraktionen verglichen, und anhand der Unterschiede wurden mögliche wirksame Substanzen identifiziert. Anknüpfend an diese Ergebnisse war die Zielsetzung dieser Diplomarbeit zunächst die Auftrennung der aktiven Fraktionen in ihre Einzelkomponenten. Danach sollten die aktiven Substanz(en) isoliert und ihre Struktur aufgeklärt werden. Abschließend sollte ihre Bioaktivität mittels oben genannten Proliferationsassay getestet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Drogenmaterial

Das Drogenmaterial wurde von der Firma Kottas Pharma GmbH (Wien, Österreich) bezogen. Es handelte sich dabei um die geschnittene Krautdroge (*Violae odoratae herba cs*), welche die Ch.Nr.: W13203808 aufwies.

2.1.2. Lösungsmittel

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die folgenden Lösungsmittel in der angegebenen Reinheit verwendet:

- Acetonitril, Chromanorm for HPLC, VWR Prolabo Chemicals
- Aqua destillata
- konzentrierte Ameisensäure, ÖAB 98-100 %, Gatt-Koller
- Dichlormethan, AnalaR Normapur, VWR Prolabo Chemicals
- konzentrierte Essigsäure, PHE 5.0, 6.0, Gatt-Koller
- Ethylacetat, AnalaR Normapur, VWR Prolabo Chemicals
- Methanol, HPLC Gradient Grade, J.T. Baker

2.2. Methoden

2.2.1. Extraktion

Bei der Extraktion wurden 100 g Droge mit 1000 mL Methanol/Dichlormethan (1:1, v/v) versetzt und über Nacht unter ständigem Rühren extrahiert. Am nächsten Tag wurde das Drogenmaterial durch einen Faltenfilter abfiltriert. Das Filtrat (ca. 700 mL) wurde mit der gleichen Menge Wasser versetzt und im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Da die Phasentrennung nur sehr langsam einsetzte, wurde die oberste der drei gebildeten Phasen erst am darauffolgenden Tag abgetrennt (siehe Abb. 3). Diese wässrig-methanolische Lösung wurde am Rotavapor so weit eingeeengt, bis der gesamte Methanol abgedampft war. Die wässrige Lösung wurde danach über Nacht eingefroren und anschließend lyophilisiert.

Diese Methode wurde von Hellinger et al. (2013) abgeleitet.

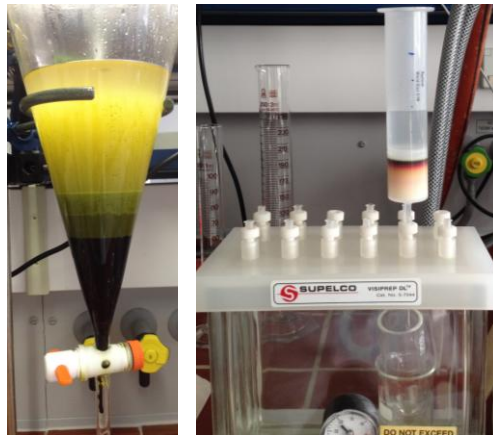


Abb. 3: Links: Phasentrennung im Scheidetrichter;
Rechts: Versuchsaufbau SPE C18

2.2.2. Festphasenextraktion

Bei der Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) handelt es sich um eine Sonderform der Säulenchromatographie (SC; Prinzip der SC siehe Punkt 2.2.3.). Dabei kommt es aufgrund von Adsorptionsvorgängen zur Trennung. Die stationäre Phase ist fest und befindet sich bereits fertig gepackt in einer kurzen Säule. Oberhalb und unterhalb der stationären Phase befindet sich eine Fritte. Die mobile Phase ist flüssig und wird von oben in die Säule eingefüllt. Es besteht die Möglichkeit, die mobile Phase durch das Anschließen von Vakuum durch die Säule zu ziehen. Ein ungefährender Aufbau der SPE kann der Abb. 3 entnommen werden. Mit derartigen Apparaturen kann eine große Anzahl von Proben gleichzeitig aufgearbeitet werden. Einsatzgebiete der SPE sind die Abtrennung störender Matrixbestandteile, Gehaltsbestimmungen in der Arzneipflanzenanalytik, die Erfassung körpereigener Bestandteile (wie z.B. Serumlipide), die Bestimmung von Arzneistoff-Blutspiegeln, die Probenvorbereitung in der Umweltanalytik und die Abtrennung störender Begleitstoffe (Adam und Becker, 2000).

Die SPE wurde für die Aufreinigung des Lyophilisats, das im Rahmen des Extraktionsprozesses gewonnen wurde, verwendet. Außerdem kam sie bei der Methodenentwicklung zur Auftrennung der interessanten Fraktionen zum Einsatz. Die hierbei verwendeten Materialien werden später vorgestellt.

Nach der Auftrennung wurden die einzelnen Fraktionen zur Trockene gebracht. Die Überprüfung der Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Parameter siehe Seite 35).

2.2.2.1. SPE-Methoden zur Aufreinigung und ersten Fraktionierung des Lyophilisats:

- **SPE C18**

Bei der SPE C18 ist die stationäre Phase ein modifiziertes Kieselgel auf dessen Oberfläche Alkylgruppen mit 18 Kohlenstoffatomen gebunden sind. Dieses Material kommt daher in der Umkehrphasenchromatographie zum Einsatz, wo es zur Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Substanzen und der lipophilen stationären Phase kommt (Adam und Becker, 2000). Daher wird C18 Kieselgel gerne für die Abtrennung von apolaren Analyten aus polaren Matrices verwendet. Es kann dabei im Gegensatz zu anderen modifizierten Kieselgelen recht universell eingesetzt werden (Agilent Technologies, 2014).

Vorgangsweise für die Aufreinigung des Lyophilisats (Methode abgeleitet von Hellinger et al. (2013); Optimierung: Mag. Sykora, Dr. Zehl, Uni Wien, 2013):

Zuerst wurde die Säule (siehe Tab. 1) mit dreimal 60 mL Methanol gewaschen und danach mit dreimal 60 mL 4 % Acetonitril in 1 %iger wässriger Ameisensäure konditioniert.

Das Lyophilisat (ca. 1 g) wurde mit 15 mL 4 % Acetonitril in 1 %iger Ameisensäure versetzt, dann ca. 5 min ultraschalliert und danach 5 min bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand langsam auf den Säulenkopf aufgetropft und zwar so, dass zwischen dem Auftropfen immer wieder das Absinken der Analysenlösung abgewartet wurde. In Folge konnte mit der volumetrischen Fraktionierung begonnen werden (siehe Abb. 3, Seite 20). Wie in Tab. 1 ersichtlich, wurde mittels Gradientenelution eluiert, wobei pro Elutionsmittel 6 Fraktionen zu je 10 mL gesammelt wurden.

Bei einer Gradientenelution wird mit einem Elutionsmittelgemisch mit geringer Elutionsstärke begonnen und diese im Laufe der Auftrennung stetig gesteigert (Rücker et al., 2008). Ziel dieser Vorgehensweise ist es, eine vollständige Trennung des Analysengemisches innerhalb einer vernünftigen Analysenzeit zu erreichen (Böcker, 1997). Im gegebenen Fall wurde kein kontinuierlicher, sondern ein Stufengradient verwendet.

Tab. 1: Parameter für die SPE C18.

Stationäre Phase:	Mega BE-C18, 10 g Volumen: 60 mL Phase: C 18 Firma: Agilent Technologies Ch.-Nr.: 12256031
Mobile Phase:	Gradient: 4 %, 8 % und 12 % Acetonitril in 1 %iger Ameisensäure
Fraktionsvolumen:	10 mL; je 6 Fraktionen pro Elutionsmittel

Die gesammelten Fraktionen mit 4 % Acetonitril in 1 %iger Ameisensäure wurden verworfen. Die Fraktionen mit 8 % und 12 % Acetonitril in 1 %iger Ameisensäure wurden mittels einer Evaporatorzentrifuge (Genevac EZ-2 plus) zur Trockene gebracht und danach mittels Dünnschichtchromatographie (Parameter siehe Seite 35) und LC-MS (siehe Punkt 2.2.5, Seite 36) überprüft. Die Bezeichnung der Fraktionen ergaben sich aus der Prozentigkeit, die für den Gehalt an Acetonitril in 1%iger Ameisensäure steht, und der Fraktionsnummer (z.B. 8%_1).

Insgesamt wurden vier Extraktionen durchgeführt und dabei vier Lyophilisate erhalten, die getrennt weiter aufgearbeitet wurden. Die Lyophilisate wurden mit den Buchstaben A - D versehen. Dadurch ergibt sich auch die Bezeichnung der durchgeführten SPE C18. Wie in Tab. 2 erkennbar ist, wurden die bei der SPE C18 A erhaltenen Fraktionen in verschiedenen Mengen Wasser aufgelöst. Grund dafür war einerseits die gute Wasserlöslichkeit der Substanzen und andererseits erschien zu Beginn das Lösungsmittel Wasser für die weitere Bearbeitung der Fraktionen am sinnvollsten. Bei der Fraktion 12%_1 wurde aufgrund von schlechter Löslichkeit zusätzlich etwas Methanol zugesetzt. Bevor die nächste Extraktion durchgeführt wurde, zeigte sich im Rahmen der Methodenentwicklung zur weiteren Auftrennung der interessanten Fraktionen, dass eine Lösung der Fraktionen in reinem Methanol für die weitere Bearbeitung besser ist. Deshalb wurden die Untersuchungslösungen der SPE C18 B - D mit unterschiedlichen Mengen reinem Methanol hergestellt (siehe Tab. 2). Aus Tab. 2 ist außerdem ersichtlich, welche Volumina der bereiteten Untersuchungslösung auf die DC-Platte aufgetragen wurden. Um eine Überladung der DC zu vermeiden, wurden ab der SPE C18 B teilweise und bei der SPE C18 C und D gänzlich 1:10 Verdünnungen der Untersuchungslösung hergestellt. Außerdem wurden

unterschiedliche Mengen dieser Untersuchungslösungen auf die DC aufgetragen. Die tatsächlich aufgetragene Menge ergab sich anhand der Intensität der Löschung unter der UV-Lampe bei 254 nm.

Tab. 2: Ersichtlich sind die Auswaagen, die verwendeten Volumina Wasser (H₂O) bzw. Methanol (CH₃OH) zur Bereitung der Untersuchungslösung und die auf die DC aufgetragenen Volumina der Untersuchungslösung. Bei der SPE C18 A und B wurden die Auswaagen nur für die relevanten Fraktionen bestimmt. Zur besseren Abschätzung der Mengenverhältnisse wurden bei der SPE C18 C und D alle Fraktionen abgewogen.

SPE C18 A			
	Auswaage (g)	Volumen an H₂O	Auf die DC aufgetragenes Volumen
8 %_1		1050 µL	1 µL
8 %_2		450 µL	1 µL
8 %_3		250 µL	1 µL
8 %_4	0,0247	250 µL	1 µL
8 %_5	0,0113	1050 µL	1 µL
8 %_6	0,0091	1050 µL	1 µL
12 %_1	0,0057	450 µL H ₂ O + 200 µL CH ₃ OH	1 µL
12 %_2		1050 µL	1 µL
12 %_3		450 µL	1 µL
12 %_4		450 µL	1 µL
12 %_5		1050 µL	1 µL
12 %_6		1050 µL	1 µL
SPE C18 B			
	Auswaage (g)	Volumen an Methanol	Auf die DC aufgetragenes Volumen
8 %_1		300 µL	4 µL einer 1:10 Verdünnung
8 %_2		1000 µL	2 µL
8 %_3	0,0224	300 µL	2 µL einer 1:10 Verdünnung
8 %_4	0,0247	300 µL	4 µL einer 1:10 Verdünnung
8 %_5	0,0099	500 µL	2 µL
8 %_6	0,0089	500 µL	2 µL
12 %_1	0,0053	300 µL	6 µL einer 1:10 Verdünnung
12 %_2		300 µL	5,5 µL einer 1:10 Verdünnung
12 %_3		1300 µL	2 µL
12 %_4		300 µL	2 µL einer 1:10 Verdünnung
12 %_5		300 µL	5,5 µL einer 1:10 Verdünnung
12 %_6		300 µL	4 µL einer 1:10 Verdünnung

Fortsetzung Tab. 2:

SPE C18 C			
	Auswaage (g)	Volumen an Methanol	Auf die DC aufgetragenes Volumen, jeweils 1:10 Verdünnung
8 %_1	0,0111	300 µL	2 µL
8 %_2	0,0260	1200 µL	4 µL
8 %_3	0,0331	1000 µL	2 µL
8 %_4	0,0178	400 µL	2 µL
8 %_5	0,0108	400 µL	2 µL
8 %_6	0,0085	500 µL	4 µL
12 %_1	0,0061	400 µL	4 µL
12 %_2	0,0101	300 µL	2 µL
12 %_3	0,0144	300 µL	2 µL
12 %_4	0,0102	300 µL	2 µL
12 %_5	0,0064	300 µL	4 µL
12 %_6	0,0059	300 µL	4 µL
SPE C18 D			
	Auswaage (g)	Volumen an Methanol	Auf die DC aufgetragenes Volumen, jeweils 1:10 Verdünnung
8 %_1	0,0132	1300 µL	8 µL
8 %_2	0,0260	500 µL	2 µL
8 %_3	0,0332	300 µL	2 µL
8 %_4	0,0223	1000 µL	4 µL
8 %_5	0,0114	400 µL	4 µL
8 %_6	0,0075	650 µL	5 µL
12 %_1	0,0052	300 µL	8 µL
12 %_2	0,0119	400 µL	2 µL
12 %_3	0,0168	400 µL	2 µL
12 %_4	0,0105	300 µL	2 µL
12 %_5	0,0067	300 µL	2 µL
12 %_6	0,0065	400 µL	2 µL

2.2.2.2. Im Rahmen der Methodenentwicklung verwendete SPE-Methoden:

- **Starker Anionenaustauscher**

Bei einem Anionenaustauscher handelt es sich zumeist um eine polymere Gerüstsubstanz, an welche ionische Gruppen über einen hydrophoben Abstandshalter befestigt sind. Die ionischen Gruppen sind meist substituierte Aminogruppen, deren Ladung durch ein bewegliches Gegenion neutralisiert wird (Adam und Becker, 2000). Bei einem starken Anionenaustauscher (SAX) kommen im Speziellen quartäre Ammoniumionen als ionische Gruppen zum Einsatz (Macherey-Nagel, 2014a). Im Rahmen der Ionenaustauschchromatographie kommt es zur Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Analytanionen und den entgegengesetzt geladenen Aminogruppen, wodurch die negativ geladenen Analyten zurückgehalten werden. Das heißt, das bewegliche Gegenion wird durch ein passend geladenes Probenmolekül ausgetauscht. Die Stärke der Retention wird durch die Höhe der Ladung des Analytens bestimmt. Außerdem hat der pH-Wert und die Ionenstärke des Elutionsmittels einen Einfluss auf die Retention. Durch den pH-Wert wird der Dissoziationsgrad des Materials und der Probenmoleküle festgelegt, sofern diese protonierbar bzw. deprotonierbar sind. Nur im geladenen Zustand kann ein Austausch, und damit eine Retention des Probenmoleküls, zu Stande kommen. Durch eine Erhöhung der Ionenstärke des Elutionsmittels werden die ausgebildeten Wechselwirkungen geschwächt. Bei der Gradientenelution werden diese beiden Parameter zur Erhöhung der Elutionskraft verändert (Adam und Becker, 2000).

Die Ionenaustauschchromatographie kommt als Anreicherungsschritt bei der Isolierung ionischer oder ionogener Naturstoffe und bei der präparativen Reinigung von Biopolymeren zum Einsatz (Adam und Becker, 2000).

Die Anwendung von starken Anionenaustauschern wird für die Auftrennung von Carbonsäuren, Sulfonsäuren und Phosphaten empfohlen (Merck Millipore, 2014).

Das verwendete Material wird in der Tab. 3 vorgestellt. Für die Entwicklung der Methode diente das Standardprotokoll von Macherey-Nagel als Vorlage (Macherey-Nagel, 2014b). Die Säule wurde mit 15 mL Methanol gewaschen,

danach wurde sie mit 15 mL Wasser konditioniert. Es wurde die Fraktion 12%_1 der im Vorfeld von Mag. Sykora durchgeführten Extraktion aufgetragen.

Dazu wurde sie in 200 µL Wasser gelöst und mit einer Pasteurpipette auf die Säule aufgetropft. Anschließend wurde mit der volumetrischen Fraktionierung begonnen.

Danach wurden die Fraktionen zur Trockene gebracht und mittels DC analysiert (Parameter siehe Tab. 14).

Tab. 3: Parameter für die SPE SAX.

Stationäre Phase:	LiChrolut® SAX 500 mg Firma: Merck Ch.Nr.: K90648125
Mobile Phase:	Gradient: 0,1 M NaOH, Ammoniumacetatpuffer pH: 6,77, Ammoniumacetatpuffer pH: 4,0, 0,1 % Ameisensäure, 50 % Methanol in 1 %iger Ameisensäure
Fraktionsvolumen:	1 mL; pro Fließmittel wurden 5 Fraktionen gesammelt

- **Aminopropyl-Kieselgel (SPE NH₂)**

Bei Aminopropyl-Kieselgel handelt es sich um ein polares oberflächenmodifiziertes Kieselgel (Adam und Becker, 2000), das kovalent gebundene γ -Aminopropylgruppen an seiner Oberfläche trägt. Je nach Auswahl des Elutionsmittels können bei diesem Material verschiedenste Wechselwirkungen auftreten. Am Häufigsten wird das Material als schwacher Anionenaustauscher eingesetzt. Durch die Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen mit den geladenen Probenmolekülen kommt es zu ihrer Retention. Bei der Verwendung von wässrigen Eluenten liegt die Aminogruppe in ihrer protonierten Form vor und das Material fungiert ebenfalls als schwacher Anionenaustauscher. Als Beispiel wäre hier die Trennung von sauren Mono- und Oligosacchariden mit Acetonitril-Wasser-Mischungen zu nennen. Polare, ungeladene Verbindungen können mit den Fließmitteln Hexan, Dichlormethan und Isopropanol aufgetrennt werden (Böcker, 1997).

Bei dieser Arbeit kamen rein organische Eluenten zum Einsatz. Hierbei kommt es durch Wechselwirkungen mit den ungeladenen, polaren, schwach basischen Aminogruppen zur Ausbildung von Adsorptionseffekten und damit zur Retention der Probenmoleküle (Böcker, 1997).

Bei der Trennung von starken Anionen, wie z.B. Sulfonsäuren, kann Aminopropyl-Kieselgel als schwacher Anionenaustauscher eine bessere Wahl gegenüber eines starken Anionenaustauschers sein. Starke Anionen können nämlich irreversibel an den starken Anionenaustauscher binden. Außerdem kann Aminopropyl-Kieselgel für die Trennung von Strukturisomeren verwendet werden (Agilent Technologies, 2014).

Vorgangsweise bei der Auftrennung:

Zuerst wurde die Säule mit 30 mL Methanol gewaschen, danach mit 30 mL Ethylacetat konditioniert. Da es sich bei der SPE NH₂ um ein eher älteres Material handelte, wurde beim Waschen und bei der Konditionierung die doppelte Menge an Lösungsmittel verwendet.

Aufgrund von schlechter Löslichkeit in Ethylacetat und Aceton wurde die Fraktion 8%_5 A in Methanol gelöst. Jeweils 20 µL dieser Probenlösung wurden auf den Säulenkopf aufgetropft und das Methanol wurde sofort mittels Luftstrom abgedampft. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Probenlösung vollständig aufgetragen war. Danach wurde mit der volumetrischen Fraktionierung begonnen. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend zur Trockene gebracht und mittels DC analysiert (Parameter siehe Tab. 14).

Die für die SPE NH₂ verwendeten Parameter sind in Tab. 4 bis Tab. 6 zu sehen. Es kamen insgesamt drei Methoden zum Einsatz, die sich im Fließmittelgradienten unterscheiden.

Tab. 4: Parameter der SPE NH₂-Methode 1.

Methode 1	
Stationäre Phase:	Bond Elut NH ₂ LRC 500 mg Firma: Varian Sample Preparation Products Ch.-Nr.: 112875
Mobile Phase:	Gradient: Ethylacetat, 95 %, 90 %, 85 %, 80 % und 50 % Ethylacetat in Methanol, Methanol
Fraktionsvolumen:	1 mL; pro Fließmittel wurden 5 Fraktionen gesammelt

Tab. 5: Parameter der SPE NH₂-Methode 2.

Methode 2	
Stationäre Phase:	Siehe Methode 1
Mobile Phase:	Gradient: 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 % Ethylacetat in Methanol, Methanol
Fraktionsvolumen:	Siehe Methode 1

Tab. 6: Parameter der SPE NH₂-Methode 3.

Methode 3	
Stationäre Phase:	Siehe Methode 1
Mobile Phase:	Gradient: 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, 65 %, 60 %, 50 % und 40 % Ethylacetat in Methanol, Methanol
Fraktionsvolumen:	Siehe Methode 1

- **Kieselgel (SPE Si)**

Beim Kieselgel handelt es sich um künstlich hergestelltes hochaktives Silicagel. Die Bezeichnung Silicagel steht für amorphes, wasserhaltiges Siliziumdioxid. Die große innere Oberfläche ergibt sich aus der Oberfläche der zahlreichen Kanäle und Hohlräume, die das Siliziumdioxid durchziehen. Auf der Oberfläche befinden sich Silanol(Si-OH)-Gruppen, wodurch Wasserstoffbrücken mit polaren Gruppen des Analyten, aber auch untereinander, ausgebildet werden können (Böcker, 1997). Es können aber auch andere polare Wechselwirkungen, wie z.B. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, zum Tragen kommen. Durch die genannten Wechselwirkungen zwischen Kieselgel und den polaren Substanzen im Analysengemisch werden diese zurückgehalten und verlassen erst zu einem späteren Zeitpunkt als weniger polare Substanzen die Säule.

Eine gewisse Anzahl der Si-OH-Gruppen ist bei Raumtemperatur und entsprechender Luftfeuchte durch Wasser besetzt. Wird das Kieselgel bei 150 °C aktiviert und damit das adsorbierte Wasser entfernt, sind die meisten Si-OH-Gruppen verfügbar und es besitzt somit die größte Aktivität.

Korngröße, Korngrößenverteilung und die innere und äußere Oberfläche haben einen entscheidenden Einfluss auf die Trenneffizienz (Adam und Becker, 2000).

Im Rahmen der Festphasenextraktion weist Kieselgel als stationäre Phase die höchste verfügbare Polarität auf (Agilent Technologies, 2014).

Vorgehensweise bei der Auftrennung:

Die Vorgehensweise bei der Vorbereitung der Säule, der Probenaufbringung und der Auftrennung gleicht dem Schema der SPE NH₂ (siehe voriger Punkt) und wird daher nicht mehr näher erläutert.

Es wurde die Fraktion 8%_5 A auf den Säulenkopf aufgetragen.

Es kamen drei Methoden zum Einsatz, die sich bezüglich des Fließmittelgradienten unterscheiden (siehe Tab. 7 bis Tab. 9).

Tab. 7: Parameter der SPE Si-Methode 1.

Methode 1	
Stationäre Phase:	LiChrolut Si 500 mg Firma: Merck Ch.-Nr.: L933029
Mobile Phase:	Gradient: Ethylacetat, 95 %, 90 %, 85 %, 80 % und 50 % Ethylacetat in Methanol, Methanol
Fraktionsvolumen:	1 mL; pro Fließmittel wurden 5 Fraktionen gesammelt

Tab. 8: Parameter der SPE Si-Methode 2.

Methode 2	
Stationäre Phase:	Siehe Methode 1
Mobile Phase:	Gradient: Ethylacetat, 95 %, 90 %, 85 %, 80 % und 50 % Ethylacetat in Methanol, Methanol
Fraktionsvolumen:	1 mL; 10 Fraktionen mit Ethylacetat, danach jeweils 5 Fraktionen

Tab. 9: Parameter der SPE Si-Methode 3.

Methode 3	
Stationäre Phase:	Siehe Methode 1
Mobile Phase:	Gradient: Ethylacetat, 95 %, 90 %, 85 % und 80 % Ethylacetat in Methanol
Fraktionsvolumen:	1 mL; 10 Fraktionen mit Ethylacetat, danach jeweils 5 Fraktionen

2.2.3. Säulenchromatographie

Die stationäre Phase wird bei der Säulenchromatographie (SC) in eine senkrecht befestigte Säule gepackt. Dann wird die Lösung des zu trennenden Substanzgemisches auf den Säulenkopf aufgetragen und mit Hilfe der mobilen Phase, welche oben aufgebracht wird und durch den hydrostatischen Druck von oben nach unten fließt, durch die Säule transportiert. Die Trennleistung wird durch die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung der stationären Phase bestimmt (Rücker et al., 2008). Durch die Wechselwirkungen der einzelnen Substanzen mit der stationären Phase ergeben sich idealerweise für jede Substanz unterschiedliche Retentionszeiten und dadurch auch verschiedene Zeiten, zu denen sie die Säule verlassen. Die Wechselwirkungen entstehen aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen und der stationären Phase (Adam und Becker, 2000).

Im Laufe der Methodenentwicklung zur Auftrennung der interessanten Fraktionen wurden die unten folgenden Materialien getestet. Nach der Auftrennung wurden die einzelnen Fraktionen zur Trockene gebracht. Die Überprüfung der Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Parameter siehe Seite 35).

2.2.3.1. Getestete Säulenmaterialien:

- **Kieselgel**

Die Eigenschaften des Materials wurden bereits unter dem Punkt 2.2.2.2 erläutert. Es wurde die Fraktion 12%_2 von der im Vorfeld durch Mag. Sykora durchgeführten Extraktion aufgetragen. Die Parameter für die SC können der Tab. 10 entnommen werden.

Tab. 10: Parameter für die SC mit Kieselgel als stationärer Phase.

Säule:	Glassäule, Dimensionen: h = 20 cm, d = 0,5 cm
Stationäre Phase:	Kieselgel 60 Firma: E. Merck Korngröße: 0,063 - 0,200 mm Ch.-Nr.: 7734.5000
Mobile Phase:	Chloroform/Methanol (75+15)
Fraktionsvolumen:	6 mL

Für die Testung der nachfolgenden Materialien wurde die Fraktion 12%_1 von der im Vorfeld durch Mag. Sykora durchgeführten Extraktion aufgetragen. Konnte mit einer getesteten Methode keine Auftrennung dieser Fraktion erreicht werden, wurden die erhaltenen Fraktionen, die die aufgetragene Probe enthielten, vereint, eingetrocknet und für die Testung der nächsten Methode verwendet.

- **Polyamid**

Polyamide sind lineare Kunststoffe, die als charakteristische Wiederholungseinheit eine Säureamidgruppe enthalten (Ammon, 2004). Es gibt zwei handelsübliche Typen von Polyamiden, Polycaprolactam (= Perlon oder Polyamid 6) und Poly(hexamethylen)adipamid (= Nylon oder Polyamid 66).

Polyamide sind besonders geeignet, phenolische Analyten zu trennen. Dabei bildet die Hydroxygruppe des Phenols mit einem Säureamid eine Wasserstoffbrücke, wodurch das Phenol am Polyamid zurückgehalten wird. Ausschlaggebend für diese Reaktion ist die Zahl und Stellung der Hydroxygruppen der aromatischen Verbindung und das Fließmittel. Besitzt das verwendete Fließmittel die Eigenschaft, selbst Wasserstoffbrücken zum Polyamid auszubilden oder die phenolische Substanz besonders gut zu solvatisieren, kommt es zur Desorption.

Desweiteren können Aminosäuren, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und aromatische Nitroverbindungen aufgetrennt werden (Böcker, 1997).

Die in dieser Arbeit verwendeten Parameter sind in Tab. 11 ersichtlich.

Tab. 11: Parameter der SC mit Polyamid als stationärer Phase.

Versuch 1	
Säule:	Glassäule, Dimensionen: h = 20 cm, d = 0,5 cm
Stationäre Phase:	Polyamid 6 Firma: Carl Roth GmbH Partikelgröße: 0,05 - 0,16 mm Ch.-Nr.: 313202191 Vorquellung in 50 %igem Methanol
Mobile Phase:	50 % Methanol
Fraktionsvolumen:	4 mL

Fortsetzung Tab. 11:

Versuch 2	
Säule:	Glassäule, Dimensionen: h=20 cm, d=0,5 cm, Füllhöhe=12,4 cm,
Stationäre Phase:	siehe Versuch 1; Vorquellung in Wasser.
Mobile Phase:	Gradient: Wasser, 4 %, 8 %, 12 %, 16 % und 20 % Acetonitril in Wasser
Fraktionsvolumen:	2 mL; je 10 Fraktionen pro Fließmittel
Versuch 3	
Säule:	Glassäule, Dimensionen: h=20 cm, d=0,5 cm, Füllhöhe=12,4 cm,
Stationäre Phase:	siehe Versuch 1; Vorquellung 1 % Ameisensäure.
Mobile Phase:	1 % Ameisensäure
Fraktionsvolumen:	2 mL

- **Sephadex**

Bei Sephadex handelt es sich um ein quervernetztes Dextrangel. Es kann eine Einteilung bezüglich Vernetzungsgrad vorgenommen werden. Innerhalb dieser kann in verschiedene Porengrößen unterschieden werden.

Das bei dieser Arbeit verwendete Sephadex LH-20 zeichnet sich durch zusätzliche Hydroxypropylgruppen aus, wodurch es lipophiler gemacht wird. Es ergibt sich eine organophile Matrix, die die Verwendung organischer Lösungsmittel erlaubt (Adam und Becker, 2000). Die zum Einsatz gekommenen Parameter werden in Tab. 12 vorgestellt.

Mit Sephadex LH-20 können sowohl Terpengemische nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden, als auch höhermolekularer Substanzen (wie z.B. Chlorophyll) abgetrennt werden. Hierbei kommen vor allem Größenausschlusseffekte zum Tragen. Außerdem können phenolische Substanzen von nicht phenolischen getrennt werden. Dabei spielen vor allem Adsorptionseffekte eine Rolle (Adam und Becker, 2000).

Tab. 12: Parameter für die SC mit Sephadex LH-20 als stationärer Phase.

Versuch 1	
Säule:	Glassäule, Dimensionen: h=20 cm, d=0,5 cm, Füllhöhe=11,9 cm
Stationäre Phase:	Sephadex LH-20 Firma: Sigma Aldrich Partikelgröße: 25 - 100 µm Ch.-Nr.: 106K1844 Vorquellung in Methanol.
Mobile Phase:	Methanol
Fraktionsvolumen:	2 mL

Fortsetzung Tab. 12:

Versuch 2	
Säule:	Glassäule Dimensionen: h=20 cm, d=0,5 cm, Füllhöhe=11,9 cm
Stationäre Phase:	siehe Versuch 1, Vorquellung in Wasser.
Mobile Phase:	Wasser, 10 % Methanol
Fraktionsvolumen:	4 mL

- **Polystyrol**

Polystyrol zählt zu den bedeutendsten Massenkunststoffen. Es weist eine glasartige Transparenz auf, ist hart, amorph und kann zu Styropor® aufgeschäumt werden. Außerdem zeigt es eine hohe Durchlässigkeit für Wasserdampf und Gase (Ammon, 2004).

Polystyrol hat eine organophile Matrix, die die Verwendung organischer Lösungsmittel möglich macht (Adam und Becker, 2000). Es wird vor allem als Material in der Ionenaustausch-Chromatographie eingesetzt (Kiel, 2002). Das in dieser Arbeit verwendete Material ist im Wesentlichen ein Umkehrphasenmaterial, das zusätzlich die Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen ermöglicht (Altmann Analytik GmbH & Co. KG, 2014). Die zur Anwendung gekommenen Säulenparameter können der Tab. 13 entnommen werden.

Tab. 13: Parameter für die SC mit Polystyrol als stationäre Phase.

Säule:	Glassäule Dimensionen: h=20 cm, d=0,5 cm, Füllhöhe=12,4 cm
Stationäre Phase:	Diaion® HP-20 Firma: Supelco Analytical Ch.-Nr.: 33956 Vorquellung in Wasser.
Mobile Phase:	Gradient: Wasser, 4 %, 8 %, 12 %, 16 % und 20 % Acetonitril in 1 %iger Ameisensäure
Fraktionsvolumen:	2 mL; je 10 Fraktionen pro Fließmittel

2.2.4.Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist ein planarchromatographisches Verfahren, das zur Trennung von Substanzgemischen und zur qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzen eingesetzt wird.

Die Lösung des Substanzgemisches wird üblicherweise mit Hilfe einer Glaskapillare ca. 1 cm vom unteren Rand entfernt auf die DC-Platte aufgetragen. Zur Entwicklung kommt die DC-Platte in eine Entwicklungskammer, in der sich die mobile Phase befindet (Rücker et al., 2008). Die mobile Phase steigt durch Kapillarkräfte die DC-Platte nach oben auf. Dabei kommt es zur Trennung des Substanzgemisches durch die Verteilung und/oder Adsorption der Substanzen zwischen der stationären, festen Phase und der mobilen, flüssigen Phase (Böcker, 1997). Abhängig von der verwendeten stationären Phase kann es zu verschiedenen Wechselwirkungen, wie Ionenaustausch- oder Siebeffekten, kommen. Nach der Entwicklung wird die DC-Platte aus der Kammer genommen und z.B. unter dem Abzug oder mit Hilfe eines Föns getrocknet. Bei der DC erhält man ein inneres Chromatogramm, da die Substanzen die Trennstrecke nicht verlassen.

Die Detektion erfolgt typischerweise unter der UV-Lampe bei den Wellenlängen 254 und 366 nm, wobei bei 254 nm Substanzen zumeist nur gesehen werden können, wenn die DC-Platte einen Fluoreszenzindikator enthält. Aufgrund der Absorption der UV-Strahlen bei 254 nm wird die Substanz als dunkle Zone auf einem hell leuchtenden Hintergrund sichtbar. Es kommt also zu einer Minderung der Fluoreszenz des Indikators. Bei 366 nm können einige Substanzklassen zur Eigenfluoreszenz angeregt werden, wodurch sie auf dem dunklen Hintergrund der DC-Platte sichtbar werden.

Danach wird die DC-Platte häufig mit einem passenden Detektionsreagenz besprüht. Dabei reagieren verschiedene Substanzen mit dem Reagenz und werden dadurch als gefärbte Banden sichtbar.

Die Dokumentation des Ergebnisses erfolgt durch Abzeichnen, Kopieren oder Fotografieren der Platte (Rücker et al., 2008).

Die im Rahmen dieser Diplomarbeit angewandten Parameter sind in Tab. 14 ersichtlich. Die Entwicklung erfolgte in einer Glaskammer mit Kammersättigung und dauerte ca. 40 Min. Danach wurde die DC-Platte entnommen und zur Trocknung in den Abzug gelegt, bis der Geruch von konzentrierter Essigsäure kaum noch wahrnehmbar war. Die Detektion erfolgte unter der UV-Lampe bei den Wellenlängen 254 und 366 nm.

Als Detektionsreagenz diente das Naturstoff-Polyethylenglykol (PEG)-Reagenz. Dabei handelt es sich um eine 1 %ige Lösung von Naturstoffreagenz A (= Diphenylborsäure- β -aminoethylester) in Methanol und eine 5 %ige Lösung von Polyethylenglykol 400 in Ethanol, die aufeinander folgend auf die DC-Platte aufgesprüht werden. Dieses Detektionsreagenz eignet sich besonders zum Flavonoid-Nachweis. Die Auswertung erfolgt unter der UV-Lampe bei 366 nm, wo sofort oder nach etwa 15 min intensive Fluoreszenzfarben entstehen. PEG wird zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit von 10 μg auf 2,5 μg angewendet (Wagner et al., 1983).

Die Dokumentation erfolgte mittels Digitalkamera.

Tab. 14: Parameter für die DC.

Stationäre Phase:	Kieselgel 60 F ₂₅₄ Träger: Aluminiumplatte Firma: E. Merck
Mobile Phase:	Ethylacetat - konzentrierte Ameisensäure - konzentrierte Essigsäure - Wasser (100-11-11-27)
Laufstrecke:	8,5 cm
Standard:	Esculin Hydrat (Konzentration: 10 μg)
Aufgetragenes Volumen des Standards:	1,5 μL ; strichförmig
Untersuchungslösung:	Lösung in 100 μL Methanol
Aufgetragenes Volumen der Untersuchungslösung:	2 μL ; strichförmig

2.2.5.LC-MS

Der Begriff LC-MS steht für die Kopplung der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) mit der Massenspektrometrie (MS).

2.2.5.1. HPLC

Bei der HPLC handelt es sich um eine Art der Säulenchromatographie (Prinzip siehe Seite 30), die zur Trennung von Analysengemischen, aber auch zu deren qualitativen und quantitativen Analyse eingesetzt wird. Um die Trenneffizienz im Vergleich zur konventionellen Säulenchromatographie zu erhöhen, verwendet man stationäre Phasen, die aus kleinen, regelmäßig geformten Partikeln (2 -50 μm) bestehen. Dadurch ergibt sich eine hohe Packungsdichte, die der mobilen Phase Widerstand entgegensetzt. Damit die mobile Phase trotzdem eine für die Trennung ausreichende Fließgeschwindigkeit von ca. 0,1 bis 10 mL/min im Fall der analytischen bzw. semi-präparativen HPLC erreicht, wird sie mit Hilfe von Pumpen durch die Trennsäule gepresst. Der dafür benötigte Druck ist sowohl von der Packungsdichte und Länge der Säule, als auch von der Viskosität des Lösungsmittels abhängig. Der Druck kann dabei auf bis zu 400 bar (Rücker et al., 2008), im Fall der Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie (UHPLC) sogar bis über 1000 bar (Dionex, 2014b), ansteigen. Die stationäre Phase befindet sich in einer ca. 5 bis 30 cm langen Säule aus rostfreiem Stahl, die bei analytischen und semi-präparativen Anwendungen einen inneren Durchmesser von 2 bis 8 mm aufweist. Das Material wird nach dem gewünschten Trennmechanismus ausgewählt. Bei der Normalphasenchromatographie werden Materialien wie z.B. Kieselgel oder Al_2O_3 verwendet, bei der Umkehrphasenchromatographie (reversed phase, RP) werden chemisch modifizierte Kieselgele angewendet.

Anhand der zum Einsatz kommenden stationären Phase wird die mobile Phase ausgewählt. Wichtig ist, dass sie sehr rein ist und im Detektor kein Störsignal auslöst. Bei der Analyse kann die Zusammensetzung der mobilen Phase unverändert bleiben, dann spricht man von isokratischer Elution. Wird die Zusammensetzung während der Analyse allerdings variiert, um die Elutionskraft zu erhöhen, handelt es sich um eine Gradientenelution (Rücker et al., 2008). Ziel bei der Variation ist eine vollständige Trennung des Analysengemisches innerhalb einer vernünftigen Analysenzeit zu erreichen (Böcker, 1997). Bei der

Normalphasenchromatographie wird dabei während der Analyse die Polarität der mobilen Phase erhöht, bei der RP-Chromatographie wird sie erniedrigt. Die Säulentemperatur spielt in der HPLC keine so große Rolle wie in der Gaschromatographie. Dennoch sollten Temperaturschwankungen vermieden werden, da die Temperatur die Retentionszeit beeinflussen kann. Die Trennsäule kann zu diesem Zweck in einem Säulenofen eingebaut werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, die mobile Phase auf die Temperatur der Säule zu bringen (Rücker et al., 2008).

Nach der Wahl der geeigneten stationären und mobilen Phase und der anderen Parameter (wie z.B. Fließgeschwindigkeit, Temperatur) (Rücker et al., 2008), wird das in Lösung gebrachte Analysengemisch üblicherweise mit Hilfe eines automatischen Probengebers (Autosamplers) in das System injiziert (Adam und Becker, 2000). Nach der Trennung verlassen die Substanzen die Säule und gelangen in den Detektor, wo sie registriert werden. Als Ergebnis der HPLC erhält man ein äußeres Chromatogramm, dass auf der x-Achse die Zeit und auf der y-Achse die Intensität des Detektorsignals zeigt.

Die HPLC ist eine universell einsetzbare Methode, die große Bedeutung in der pharmazeutischen Analytik bekommen hat. Sie kann für fast alle löslichen organischen und anorganischen Substanzen zur Anwendung kommen (Rücker et al., 2008).

Der bei der HPLC-Methode 1 und 2 verwendete Detektor war der Dioden-Array-Detektor (DAD). Dabei handelt es sich um einen UV/Vis-Detektor, bei dem die Probe von polychromatischem Licht durchstrahlt wird. Nach dem Durchtritt durch die Probenlösung wird das Licht durch ein Gitter oder Prisma in seine spektralen Bestandteile zerlegt. Danach können diese durch linear angeordnete Photodioden (Diodenarray) einzeln detektiert werden, wodurch die Aufnahme des gesamten Absorptionsspektrums der Analysesubstanz ermöglicht wird (Adam und Becker, 2000).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit kam vor allem die in Tab. 15 (siehe Seite 38) vorgestellte HPLC-Methode 1 zum Einsatz. Die Optimierung dieser Methode wurde im Vorfeld von Mag. Sykora durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass bei einer Wellenlänge von 254 nm die für diese Arbeit relevanten Substanzen zu

sehen sind. Die Beurteilung der HPLC-Chromatogramme erfolgte nachfolgend daher bei dieser Wellenlänge.

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Substanzen wurde zusätzlich ein Chromatogramm über den aufsummierten Wellenlängenbereich von 190-400 nm begutachtet.

Tab. 15: Parameter für die HPLC-Methode 1, Detektor: DAD.

Gerät:	Dionex Ultimate 3000 RSLC																
Stationäre Phase:	Aquasil C18 Firma: Thermo Scientific Partikelgröße: 3 µm Säulendimension: 2,1 x 150 mm																
Mobile Phase:	Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure Fließmittel B: Acetonitril																
FM-Gradient:	<table> <tr> <th>Minuten</th><th>% Acetonitril</th></tr> <tr> <td>0,0</td><td>10</td></tr> <tr> <td>2,0</td><td>10</td></tr> <tr> <td>19,0</td><td>14</td></tr> <tr> <td>19,9</td><td>95</td></tr> <tr> <td>24,9</td><td>95</td></tr> <tr> <td>25,0</td><td>10</td></tr> <tr> <td>35,0</td><td>10</td></tr> </table>	Minuten	% Acetonitril	0,0	10	2,0	10	19,0	14	19,9	95	24,9	95	25,0	10	35,0	10
Minuten	% Acetonitril																
0,0	10																
2,0	10																
19,0	14																
19,9	95																
24,9	95																
25,0	10																
35,0	10																
Temperatur des Säulenofens:	15 °C																
Flussrate:	0,4 mL/min																
Detektor:	Ultimate 3000 DAD																
UV-Bereich des DAD:	190 - 400 nm																

Die HPLC-Methode 2 (siehe Tab. 16, Seite 39) wurde nur zur Überprüfung der Fraktionen 12%_1 bis 12%_6, die bei der Aufreinigung des Lyophilisats mit Hilfe der SPE C18 gewonnen wurden, verwendet. Die Entwicklung der Methode erfolgte durch Dr. Zehl.

Tab. 16: Parameter für die HPLC-Methode 2, Detektor: DAD.

Gerät:	Dionex Ultimate 3000 RSLC																		
Stationäre Phase:	Acclaim 120 C18 Firma: Dionex Partikelgröße: 3 µm Säulendimension: 2,1 x 150 mm																		
Mobile Phase:	Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure Fließmittel B: Acetonitril																		
FM-Gradient:	<table> <tr> <th>Minuten</th><th>% Acetonitril</th></tr> <tr><td>0,0</td><td>6</td></tr> <tr><td>2,0</td><td>6</td></tr> <tr><td>10,0</td><td>10</td></tr> <tr><td>17,0</td><td>17</td></tr> <tr><td>18,0</td><td>95</td></tr> <tr><td>27,0</td><td>95</td></tr> <tr><td>28,0</td><td>6</td></tr> <tr><td>38,0</td><td>6</td></tr> </table>	Minuten	% Acetonitril	0,0	6	2,0	6	10,0	10	17,0	17	18,0	95	27,0	95	28,0	6	38,0	6
Minuten	% Acetonitril																		
0,0	6																		
2,0	6																		
10,0	10																		
17,0	17																		
18,0	95																		
27,0	95																		
28,0	6																		
38,0	6																		
Temperatur des Säulenofens:	25 °C																		
Flussrate:	0,5 mL/min																		
Detektor:	Ultimate 3000 DAD																		
UV-Bereich des DAD:	190 - 400 nm																		

Im Zuge der Reinheitsprüfung der isolierten Substanzen kam der Charged Aerosol Detector (CAD) zum Einsatz. In diesem wird das Eluat zuerst zu feinsten Tröpfchen vernebelt, welche in weiterer Folge getrocknet werden. Die Größe der dabei entstehenden Partikel nimmt in Abhängigkeit zum Gehalt an nichtflüchtigen Komponenten zu. Anschließend wird positiv geladenes Gas eingeleitet, welches mit den Partikeln kollidiert. Die Ladung wird dadurch auf die Partikel übertragen. Dabei gilt, je größer der Partikel desto höher seine Ladung. Abschließend wird die Ladung der Partikel in einem Elektrometer gemessen. Das dabei generierte Signal ist direkt proportional zur Menge des jeweiligen Analyten im Eluat (Dionex, 2014a). Der CAD weist im Vergleich zu anderen universellen Detektoren eine hohe Empfindlichkeit und einen breiten dynamischen Bereich auf. Außerdem ist die Detektion unabhängig von der chemischen Struktur. Es können alle nichtflüchtigen Analyten und teilweise auch halbflüchtige Analyten quantifiziert werden (Dionex, 2014a).

Die Parameter für die durchgeführte Analyse können der Tab. 17 entnommen werden. Die Substanzen wurden mit Methanol auf eine Konzentration von 0,1 mg/mL verdünnt. 5 µL dieser Probenlösung wurden anschließend in das Gerät injiziert.

Tab. 17: Parameter für die HPLC-Reinheitsprüfung, Detektor: CAD.

Gerät:	Dionex Ultimate 3000 RSLC																		
Stationäre Phase:	Aquasil C18 Firma: Thermo Scientific Partikelgröße: 3 µm Säulendimension: 2,1 x 150 mm																		
Mobile Phase:	Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure Fließmittel B: Acetonitril																		
Probenkonzentration:	0,1 mg/mL																		
Blank:	Methanol																		
FM-Gradient:	<table> <tr> <th>Minuten</th><th>% Acetonitril</th></tr> <tr> <td>0,0</td><td>10</td></tr> <tr> <td>2,0</td><td>10</td></tr> <tr> <td>19,0</td><td>14</td></tr> <tr> <td colspan="2">→ dann pro Minute 2 % Erhöhung von Acetonitril</td></tr> <tr> <td>59,5</td><td>95</td></tr> <tr> <td>70,0</td><td>95</td></tr> <tr> <td>71,0</td><td>10</td></tr> <tr> <td>80,0</td><td>10</td></tr> </table>	Minuten	% Acetonitril	0,0	10	2,0	10	19,0	14	→ dann pro Minute 2 % Erhöhung von Acetonitril		59,5	95	70,0	95	71,0	10	80,0	10
Minuten	% Acetonitril																		
0,0	10																		
2,0	10																		
19,0	14																		
→ dann pro Minute 2 % Erhöhung von Acetonitril																			
59,5	95																		
70,0	95																		
71,0	10																		
80,0	10																		
Temperatur des Säulenofens:	15 °C																		
Flussrate:	0,4 mL/min																		
Detektor:	Dionex Corona Ultra RS																		

2.2.5.2. MS

Die molekularen Massen der einzelnen Verbindungen in den Fraktionen wurden mit Hilfe einer LC-MS Analyse bestimmt. Dazu wurde die bereits im vorangegangenen Kapitel beschriebene Anlage Ultimate 3000 RSLC verwendet, welche an ein HCT 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer mit einer orthogonalen Elektrospray-Ionisation (ESI)-Quelle (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) gekoppelt ist. Die Tab. 15 auf der Seite 38 zeigt die Parameter für die HPLC Analyse. Der Elutionsfluss wurde ca. 1:4 vor der ESI-Quelle gesplittet. Die Einstellungen der ESI-Quelle können der Tab. 18 entnommen werden.

Tab. 18: Einstellung der ESI-Quelle zur Bestimmung der molekularen Massen mittels LC-MS.

Gerät:	HCT, Bruker Daltonik
Ionisation:	ESI, alternierender Ionenmodus
Kapillarspannung:	±3,7 kV
Verneblungsgas:	N ₂ Druck: 26 psi
Trockengas:	N ₂ Fluss: 9 L/min Temperatur: 340 °C

Zum Abschluss der Diplomarbeit wurden im Positiv- und Negativ-Ionenmodus Mehrstufenmassenspektren bis zu MS³ aufgenommen, um die Struktur der isolierten Verbindungen aufzuklären. Dazu wurde eine Probelösung in einer Konzentration von 10 µg/mL hergestellt und mittels Spritzenpumpe (5 µL/min) direkt in das MS infundiert. Die Tab. 19 zeigt die Einstellungen der ESI-Quelle. Die Aufnahme der CID-Spektren erfolgte mit Helium als Kollisionsgas, einem Isolationsfenster von $\Delta m/z = 2$ und einer manuell optimierten Fragmentierungsamplitude.

Tab. 19: Einstellung der ESI-Quelle zur Strukturaufklärung mittels Direktinfusion.

Gerät:	HCT, Bruker Daltonik
Ionisation:	ESI
Kapillarspannung:	±3,7 kV
Verneblungsgas:	N ₂ Druck: 7 psi
Trockengas:	N ₂ Fluss: 4 L/min Temperatur: 250 °C

2.2.6.NMR

Bei der Strukturaufklärung spielt die NMR-Spektroskopie eine wichtige Rolle. Dabei kommt es zu einer Detektion von Atomkernen, die ein magnetisches Moment aufweisen. Im Rahmen von naturstoffchemischen Analysen zählen ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Kerne zu den wichtigsten.

Die zu vermessende Substanz wird in deuterierten Lösungsmitteln gelöst und anschließend einem homogenen Magnetfeld ausgesetzt. Eine Strahlung im Radiowellenbereich liefert die nötige Energie um den Übergang der Kerne zwischen verschiedenen Energieniveaus zu ermöglichen. Die dabei benötigte Übergangsenergie ist abhängig von der Feldstärke, der Kernsorte und den benachbarten Kernen und wird von der Empfängerspule des NMR-Gerätes registriert (Adam und Becker, 2000). Die Energie wird allerdings nur dann aufgenommen, wenn sie gerade ausreicht, um in den energiereicheren Zustand zu wechseln (= Kernresonanz). Im NMR-Spektrum wird die Signalintensität gegen die Frequenz bzw. chemische Verschiebung aufgetragen (Rücker et al., 2008).

Bei der Interpretation der Spektren helfen zum Beispiel die Lage des Signals im Spektrum, welche als chemische Verschiebung (δ) bezeichnet wird, oder die Aufspaltung eines Signals in mehrere Teilsignale (= Spin-Kopplung). Beide Phänomene treten aufgrund der spezifischen Nachbarschaft der detektierten Kerne auf (Rücker et al., 2008).

Um die Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie zu erhöhen, wurde die Puls-Fourier-Transformations (auch FID)-NMR-Spektroskopie entwickelt. Dabei wird durch die gleichzeitige Anregung aller Kerne einer Sorte mittels eines breiten Hochfrequenz-Impulses eine Vielzahl von Einzelspektren aufgenommen, die anschließend addiert werden (Rücker et al., 2008).

Diese Empfindlichkeitserhöhung war vor allem für die ^{13}C -NMR-Spektroskopie wichtig, da das magnetische Moment des ^{13}C -Kern nur ca. ein Viertel des Wertes des ^1H -Kerns beträgt und das ^{13}C -Isotop nur 1,1 % der Kohlenstoffatome ausmacht. Zusätzlich führen besondere Entkopplungsverfahren zu einer Erhöhung der Nachweisgrenze (Rücker et al., 2008).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde der Attached Proton Test (APT) als spezielles Entkopplungsverfahren gewählt, da hier zusätzlich eine Unterscheidung zwischen primären bzw. tertiären Kohlenstoffatomen und sekundären bzw. quartären Kohlenstoffatomen möglich ist (Hesse et al., 2012). Beim APT wird folgende Pulssequenz eingesetzt: 90° Anregungsimpuls, Zeitintervall τ , 180° Impuls (Invertierung der transversalen Magnetisierung), Zeitintervall τ , 180° Impuls, FID. Während des zweiten Zeitintervalls wird der ^1H -Entkoppler abgeschaltet und damit die Magnetisierung durch die $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -Kopplungen beeinflusst. Somit erhält man ein entkoppeltes Spektrum bei welchem die Signalintensitäten der CH_n -Gruppen von τ abhängen (Hesse et al., 2012). Normalerweise arbeitet man mit $\tau = 1/J$ (Hesse et al., 2012), wobei als Kopplungskonstante ($^1J(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$) 145 Herz gewählt werden, da es sich hierbei um den Mittelwert zwischen den Kopplungskonstanten von aliphatischen und aromatischen Kohlenstoffatomen handelt. Bei Cumarinen (die in dieser Arbeit behandelt wurden, siehe Punkt 3.5.3, Seite 80) liegt die Kopplungskonstante z.T. allerdings über 200 Herz, wodurch ein Mittelwert von 180 Herz gewählt werden muss. Da die Wahl eines Mittelwertes nur einen Kompromiss darstellt, kann es durch Phasenverschiebungen dazu kommen, dass Signale im Spektrum nicht sichtbar sind. Die Ausrichtung der C- und CH_2 -Gruppen bzw. der CH- und CH_3 -Gruppen im APT-Spektrum wird durch das intensivste Signal bestimmt. Dabei handelt es sich meist um das Signal des Lösungsmittels. Bei dieser Arbeit weisen C- und CH_2 -Gruppen negative Signale und CH- und CH_3 -Gruppen positive Signale auf (Urban, 2011).

Neben den erwähnten 1D-Experimenten gibt es auch 2D-Experimente. Der Unterschied besteht darin, dass bei den 2D-Experimenten die Evolutionszeit nicht konstant ist (Rücker et al., 2008).

In dieser Diplomarbeit wurden H,H-COSY-, NOESY-, HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen:

- COSY (correlated spectroscopy)-Spektrum:
auf beiden Achsen ist das ^1H -NMR-Spektrum aufgetragen; Kreuzsignale zeigen skalare Kopplungen zwischen Protonen an (Adam und Becker, 2000)

- NOESY (nuclear Overhauser enhancement spectroscopy)-Spektren:
auf beiden Achsen ist das ^1H -NMR-Spektrum aufgetragen;
Kreuzsignale zeigen räumliche Nähe zwischen den entsprechenden Protonen an (Adam und Becker, 2000)
- HSQC (heteronuclear single quantum correlation)-Spektren:
auf der X-Achse ist das ^1H -NMR-Spektrum, auf der Y-Achse das ^{13}C -NMR-Spektrum aufgetragen; Kreuzsignale zeigen Kopplungen über eine Bindung an (Hesse et al., 2012)
- HMBC (heteronuclear multiple bond correlation)-Spektren:
auf der X-Achse ist das ^1H -NMR-Spektrum, auf der Y-Achse das ^{13}C -NMR-Spektrum aufgetragen; Kreuzsignale zeigen Kopplungen über zwei bis vier Bindungen an (Adam und Becker, 2000)

Der Tab. 20 können die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendeten Parameter der NMR-Analyse entnommen werden.

Tab. 20: Parameter der NMR-Analyse.

Gerät:	Bruker Avance 500 NMR Spektrometer (UltraShield) mit einem 5 mm schaltbaren Probenkopf (PA BBO 500 SB BBF-H-D-05-Z, ^1H , BB = 19F und 31P - 15N) mit z-Gradientenspule und automatischer Matching- und Tuning-Einheit (Bruker BioSpin)
Resonanzfrequenz für ^1H -NMR:	500,13 MHz
Resonanzfrequenz für ^{13}C -NMR:	125,75 MHz
Lösungsmittel:	deutერიertes Methanol (CD_3OD) bzw. deutერიertes Dimethylsulfoxid (DMSO-d_6)
Messtemperatur:	298 K
Interne Standardsubstanz zur Berechnung der chemischen Verschiebung ⁴ :	nicht deutერიertes Methanol: ^1H (δ 3,31 ppm), ^{13}C (δ 49,00 ppm)

⁴ chemische Verschiebung = relative Entfernung des Signals der Substanz vom Signal des Standards (Rücker et al., 2008).

3. RESULTATE

3.1. Vorarbeit: Ermittlung der interessanten Fraktionen

Nach dem Erhalt der immunsuppressiv wirksamen Originalfraktion aus Freiburg wurde am Department für Pharmakognosie der Universität Wien die Droge nach dem gleichen Schema extrahiert (siehe Seite 19) und das dabei erhaltene Lyophilisat mittels SPE C18 aufgearbeitet (Parameter: Tab. 1, Seite 22). Anschließend wurden die dabei gewonnenen Fraktionen zur Bioaktivitätstestung in die Uniklinik Freiburg geschickt, wobei die Fraktionen 12%_2 und 12%_3 (siehe Abb. 2, Seite 18) am Besten abschnitten. Währenddessen wurden am Department für Pharmakognosie der Universität Wien DC- (Parameter: Tab. 14, Seite: 35) und HPLC-Analysen (Parameter: Tab. 15, Seite: 38) der einzelnen Fraktionen durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden aktivsten Fraktionen wurden dabei mit den weniger bis gar nicht wirksamen Fraktionen verglichen, um mögliche Unterschiede herausheben zu können.

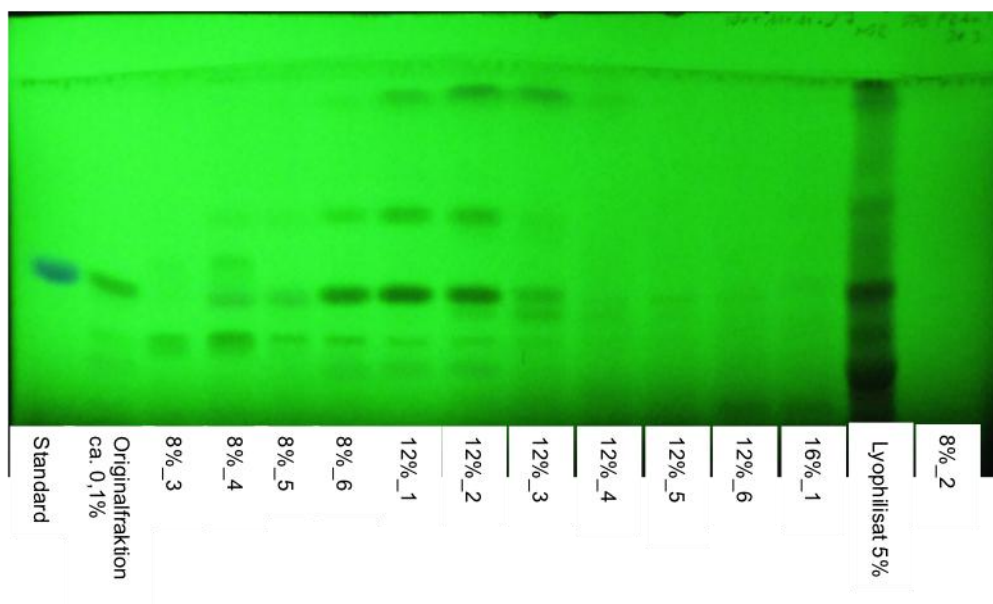


Abb. 4: DC der mittels SPE C18 im Vorfeld erhaltenen Fraktionen im Vergleich zur Originalfraktion. Ansicht bei 254 nm, besprüht. Bei den Beschriftungen 8%_2 - 16%_1 steht die Prozentigkeit für den Gehalt an Acetonitril in 1%iger Ameisensäure und die Ziffer für die Fraktionsnummer. Die Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

Bei der DC-Analyse konnte man bei 254 nm in der interessanten Fraktion 12%_2 vor allem eine stark löschende Bande erkennen (siehe Abb. 4, Seite 45). Sie befindet sich ca. auf der Höhe des Standards Esculin Hydrat und weist einen R_x -Wert⁵ von 0,92-0,99 auf. Zusätzlich sind auch noch Banden mit R_x -Werten über 1,0 und schwache Banden mit R_x -Werten unter 0,90 zu erkennen. Die zweite interessante Fraktion, 12%_3, weist große Ähnlichkeit mit der Originalfraktion auf. Man erkennt zwei löschende Banden. Die eine ca. auf der Höhe des Standards Esculin Hydrat mit einem R_x -Wert von 0,92-0,99, und die andere Bande etwas unterhalb mit einem R_x -Wert von 0,83-0,90.

Bei der möglichen Wirksubstanz oder den Wirksubstanzen handelt es sich wahrscheinlich um die Banden mit den R_x -Werten 0,83-0,90 und 0,92-0,99, da diese vor allem in den wirksamen Fraktionen vorkommen. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Fraktion 12%_3 mit der Originalfraktion, lässt sich der Verdacht einer möglichen Wirkung der oben genannten Banden verstärken.

Anzumerken ist, dass man in der Abb. 5 (Seite 47) in den Fraktionen 8%_6 bis 12%_4 bei einem R_x -Wert von 1,75-1,76 eine hell leuchtende Bande erkennen kann, die in der mittels präparativer HPLC gewonnenen Originalfraktion nicht vorkommt. Es wurde angenommen, dass diese Substanz im Rahmen des Extraktions- und Aufreinigungsprozesses angereichert wurde. Der Grund für diese Anreicherung bzw. das Fehlen dieser Substanz in der Originalfraktion konnte nicht geklärt werden. Kleinere Änderungen im Extraktionsprozess, wie eine Verkürzung der Extraktionszeit oder sofortiges Abfiltrieren nach der nächtlichen Extraktion, brachten keine Verminderung des Gehaltes dieser Komponente.

Aufgrund des Massenspektrums (siehe Punkt 3.5.2.3, Seite 79), der Masse von 178 Da und des charakteristischen UV-Spektrums mit einem Maximum bei 344 nm (Anhang: Abb. 5), konnte diese Komponente als Dihydroxycumarin identifiziert werden.

⁵ Berechnung des $R_x(=R_{St})$ -Wertes: Entfernung der Analysesubstanz vom Start dividiert durch die Entfernung der Standardsubstanz (Esculin Hydrat) vom Start (Adam und Becker, 2000)

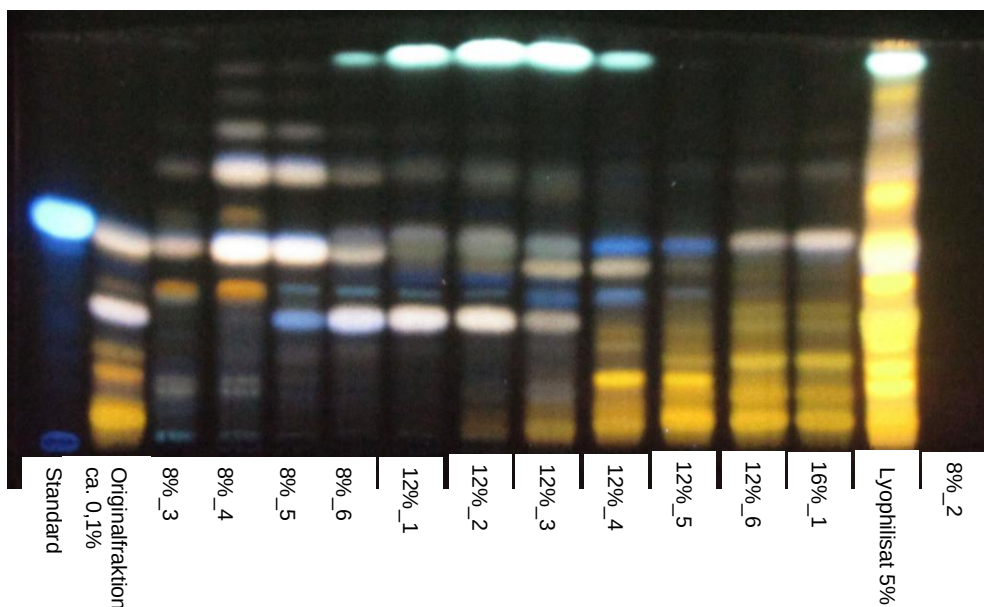


Abb. 5: DC der mittels SPE C18 im Vorfeld erhaltenen Fraktionen im Vergleich zur Originalfraktion. Ansicht bei 366 nm, besprüht. Bei den Beschriftungen 8%_2 - 16%_1 steht die Prozentigkeit für den Gehalt an Acetonitril in 1%iger Ameisensäure und die Ziffer für die Fraktionsnummer. Die Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

In den HPLC-Chromatogrammen (siehe Abb. 6, Seite: 48) kann man bei einer Retentionszeit (R_t) von 12,5 min einen mit einem roten Pfeil gekennzeichneten Peak erkennen, der hauptsächlich in den wirksamen Fraktionen 12%_2 und 12%_3 vorkommt. Dieser hat ein Absorptionsmaximum von 313 nm und entspricht vermutlich einer der beiden auf der DC sichtbaren löschenden Banden im Bereich $R_x = 0,8 - 1,0$.

Die Abb. 6 zeigt nur die HPLC-Chromatogramme der relevanten Fraktionen, die HPLC-Chromatogramme der restlichen Fraktionen können dem Anhang (Abb. 3 und Abb. 4) entnommen werden.

Anhand dieser Informationen wurde mit der Aufarbeitung der Droge und Isolierung der interessanten Substanzen begonnen.

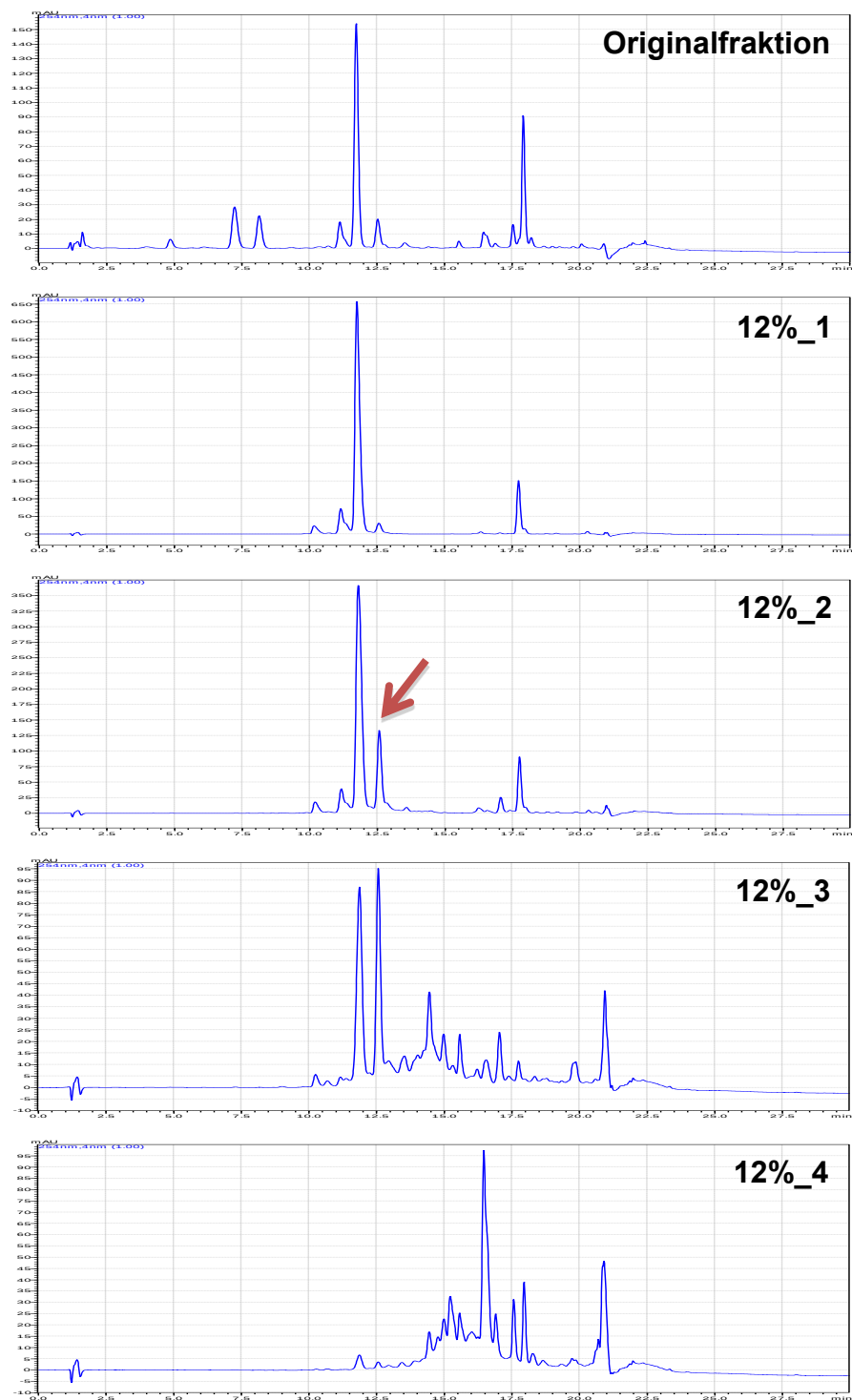


Abb. 6: HPLC-Chromatogramme der mittels SPE C18 im Vorfeld erhaltenen Fraktionen 12%_1 bis 12%_4 bei 254 nm im Vergleich zur immunsuppressiv wirksamen Originalfraktion. Die Parameter der verwendeten HPLC-Methode 1 können der Tab. 15 auf der Seite 38 entnommen werden.

3.2. Aufreinigung des Lyophilisats mittels SPE C18

Nach der Extraktion von *Viola odorata* wurde eine SPE C18 zur Aufreinigung des Lyophilisats durchgeführt. Dabei kam ein Fließmittel(FM)-Gradient von verschiedenen Konzentrationen Acetonitril in 1%iger Ameisensäure zum Einsatz. Pro Prozentigkeit wurden 6 Fraktionen gesammelt, wodurch sich auch die Beschriftung der Fraktionen (z.B. 8%_1) ergibt. Die Parameter für die SPE C18 können der Tab. 1 auf der Seite 22 entnommen werden. Insgesamt wurden vier SPE C18 durchgeführt und mit den Buchstaben A bis D bezeichnet. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden zur Trockene gebracht und anschließend mittels DC (Parameter siehe Tab. 14, Seite 35) und LCMS (Parameter der MS: Tab. 18, Seite 41) überprüft. Im Rahmen der LCMS kam vor allem die HPLC-Methode 1 zum Einsatz (Parameter siehe Tab. 15, Seite 38). Es stellte sich allerdings im Rahmen der Untersuchungen heraus, dass diese Methode für die Fraktionen 12%_3 - 12%_6 nicht geeignet war, da bei der - für die gesuchten Substanzen - relevanten Wellenlänge von 254 nm keine Peaks mehr zu sehen waren. Dies stellte allerdings kein Problem dar, da sich die relevanten Substanzen ohnehin in den Fraktionen davor befanden. Trotzdem wurde zur Überprüfung der Fraktionen 12%_3 - 12%_6 die HPLC-Methode 2 entwickelt, bei welcher eine andere Säule zum Einsatz kam (Parameter siehe Tab. 16, Seite 39). Im Rahmen der SPE C18 C wurden die Fraktionen 12%_3 - 12%_6 mit dieser Methode überprüft. Die Ergebnisse dieser HPLC-Analysen (siehe Anhang: Abb. 14 und 15) werden hier allerdings nicht näher diskutiert.

Die Ermittlung der für die weitere Aufreinigung interessanten Fraktionen erfolgte anhand der DC- und HPLC-Ergebnisse der im Vorfeld durchgeführten SPE C18. Diese wurden dann in weiterer Folge in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt.

3.2.1. Vergleich der SPE C18 A-D

Die Abb. 7 und die Abb. 8 (Seite 51) zeigen die DC-Ergebnisse der SPE C18 A. Die relevanten Fraktionen sind 8%_4, 8%_5, 8%_6 und 12%_1, da sie vergleichbar mit den im Vorfeld ermittelten wirksamen Fraktionen sind.

Die Fraktionen 8%_4 und 8%_5 enthalten eine der beiden gesuchten löschtenden Banden mit einem R_x -Wert von 0,92-0,99 in hoher Intensität. Die Fraktionen 8%_6 und 12%_1 enthalten sowohl die gesuchte löschtende Bande mit dem R_x -Wert 0,92-0,99 als auch die gesuchte löschtende Bande mit dem R_x -Wert 0,83-0,90. Die

Ergebnisse der HPLC (Anhang: Abb. 6 bis 9) sind ebenfalls weitgehend vergleichbar mit denen der wirksamen Fraktionen (siehe Abb. 6, Seite 48) und bestätigen damit die Auswahl der für die weitere Bearbeitung relevanten Fraktionen.

Ein ähnliches Bild zeigt die SPE C18 B (siehe Abb. 9 und Abb. 10). Bei den relevanten Fraktionen handelt es sich hierbei um 8%_3, 8%_4, 8%_5 und 8%_6. Diese enthalten entweder eine oder beide der relevanten löschenden Banden. Anzumerken ist, dass bei dieser Auftrennung wesentlich mehr Dihydroxycumarin angereichert wurde als bei der SPE C18 A. Davon betroffen sind die relevanten Fraktionen 8%_5 und 8%_6. Der Grund für diese stärkere Anreicherung ist nicht bekannt. Die HPLC-Chromatogramme können dem Anhang (Abb. 10 und 11) entnommen werden.

Die SPE C18 C (siehe Abb. 11 und Abb. 12) ist ebenfalls vergleichbar mit den zuvor durchgeführten SPE C18. Die für die weitere Bearbeitung interessanten Fraktionen sind 8%_3, 8%_4, 8%_5, 8%_6 und 12%_1. Wie schon bei der SPE C18 B angemerkt, ist auch bei dieser Aufreinigung eine wesentlich stärkere Dihydroxycumarin-Anreicherung zu erkennen (siehe HPLC-Chromatogramme im Anhang: Abb. 12 bis 15, bei R_t : 11 min), wobei eine quantitative Steigerung im Vergleich zur SPE C18 B beobachtet werden kann (Anhang: Abb. 10 und 11). Auch hier ist der Grund nicht bekannt.

Die DC-Ergebnisse der SPE C18 D (siehe Abb. 13 und Abb. 14) decken sich auch mit denen der SPE C18 A-C. Bei den relevanten Fraktionen handelt es sich um die Fraktionen 8%_3, 8%_4, 8%_5 und 8%_6. Auch hier ist eine Cumarin-Anreicherung zu beobachten, die quantitativ in etwa jener der SPE C18 C entspricht (HPLC-Chromatogramme im Anhang: Abb. 16 und 17).

Generell kann man eine Verschiebung der Elution der interessanten Komponenten nach vorne, also von 12%_2 zu 8%_5, beobachten. Ab der SPE C18 B kommt es allerdings zu einer Stabilisierung bei 8%_5 bzw. 8%_6. Gründe für diese Verschiebung können Unterschiede in der Temperatur, Luftfeuchtigkeit und im Lösungsverhalten der Probe sein.

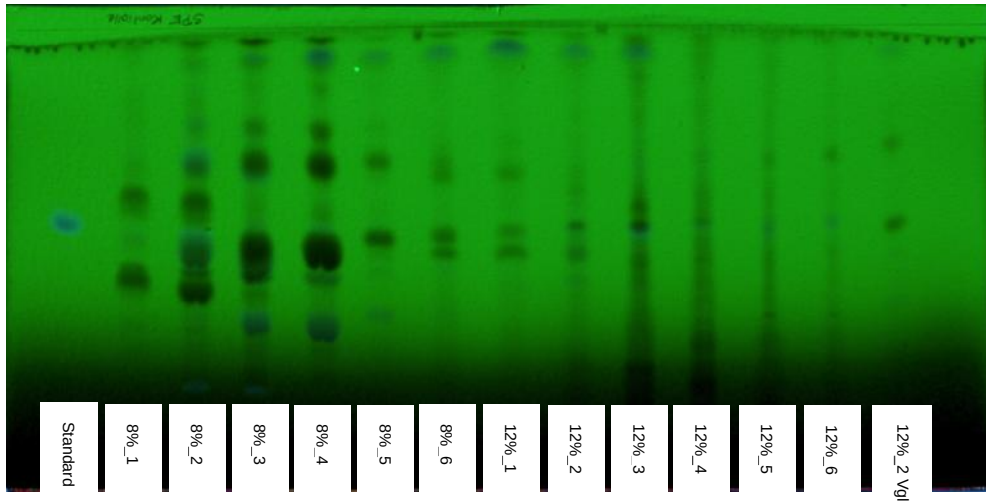


Abb. 7: DC der SPE C18 A, Ansicht: 254 nm; Parameter: Tab. 14, Seite: 35.

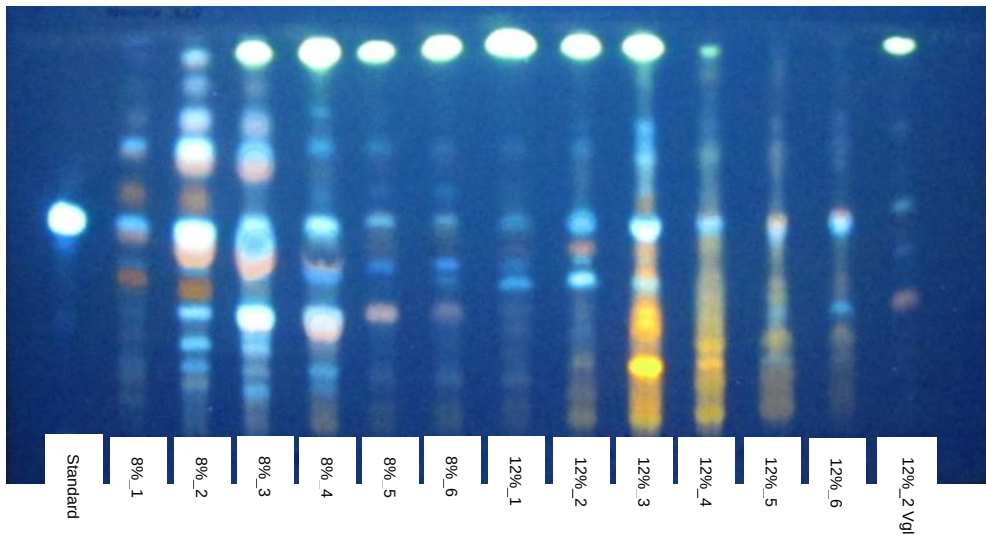


Abb. 8: DC der SPE C18 A, Ansicht 366 nm, besprüht; Parameter: Tab. 14, Seite: 35.

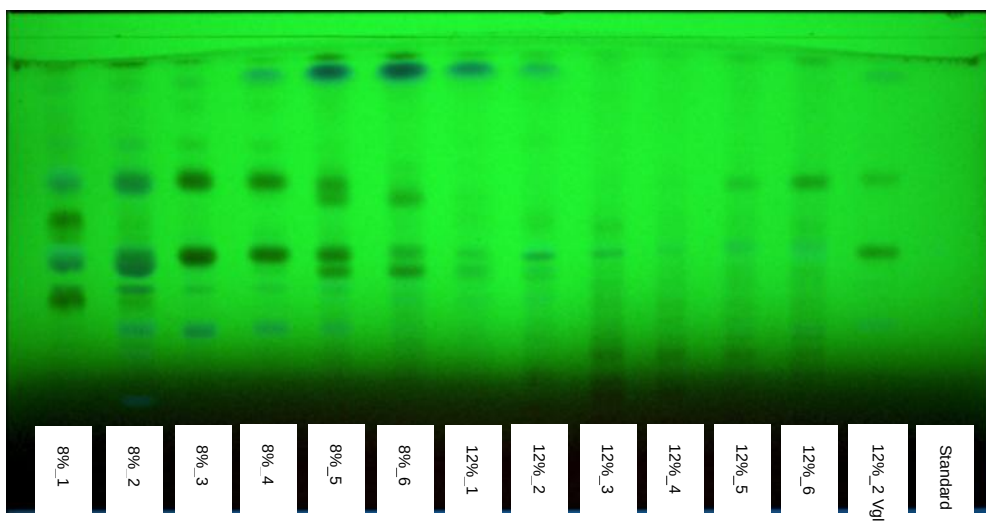


Abb. 9: DC der SPE C18 B, Ansicht: 254 nm; Parameter: Tab. 14, Seite: 35.

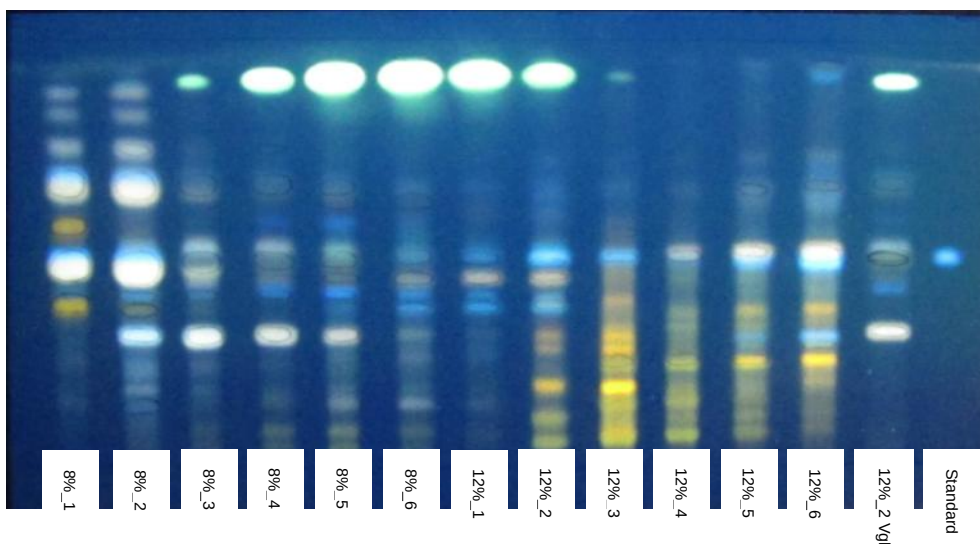


Abb. 10: DC der SPE C18 B, Ansicht: 366 nm, besprüht; Parameter: Tab. 14, Seite: 35.

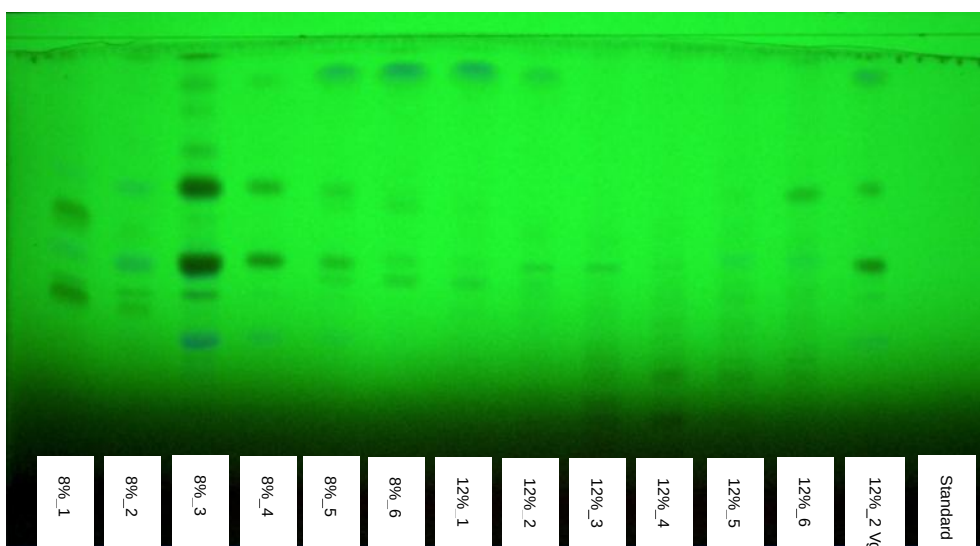


Abb. 11: DC der SPE C18 C, Ansicht: 254 nm; Parameter: Tab. 14, Seite: 35.

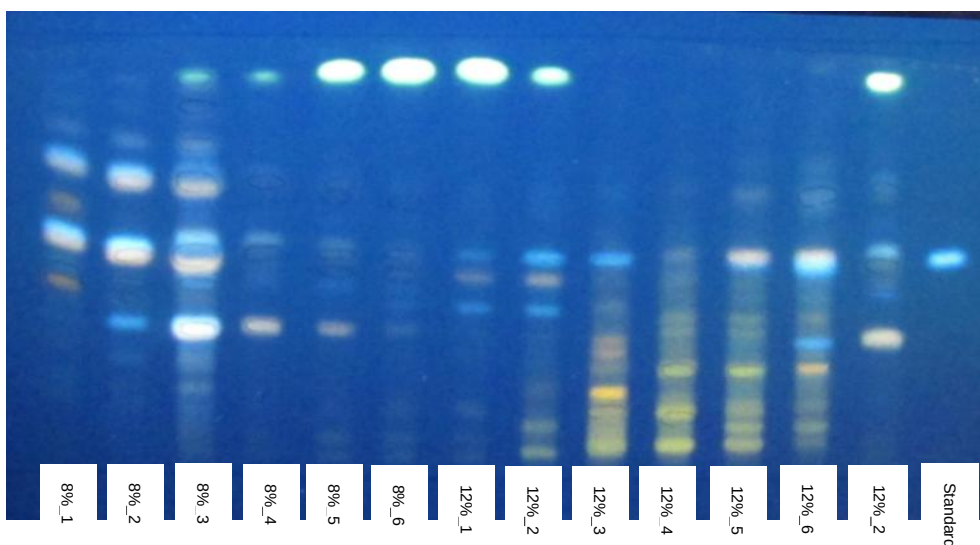


Abb. 12: DC der SPE C18 C, Ansicht: 366 nm, besprüht. Parameter: Tab. 14, Seite: 35.

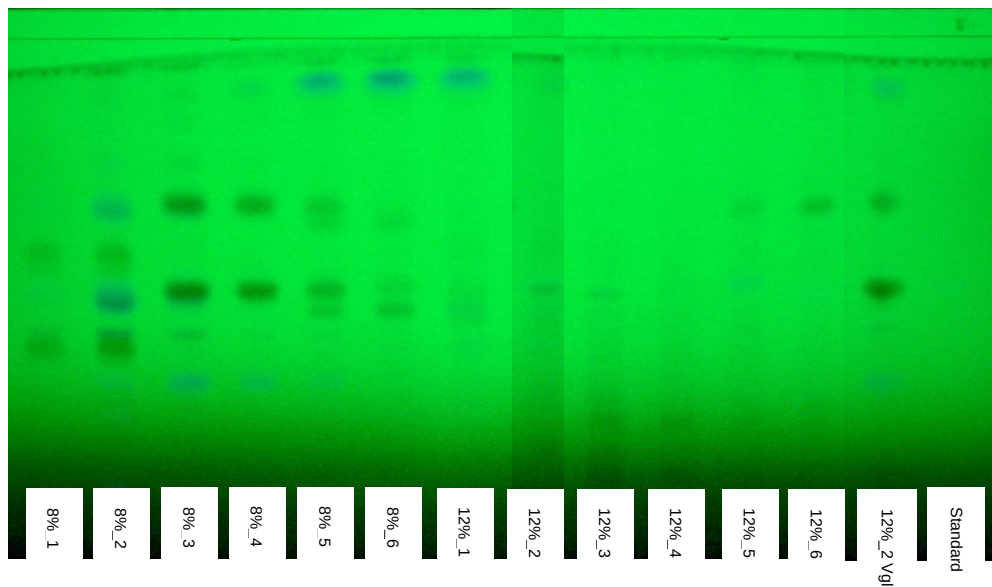


Abb. 13: DC der SPE C18 D, Ansicht: 254 nm; Parameter: Tab. 14, Seite: 35.

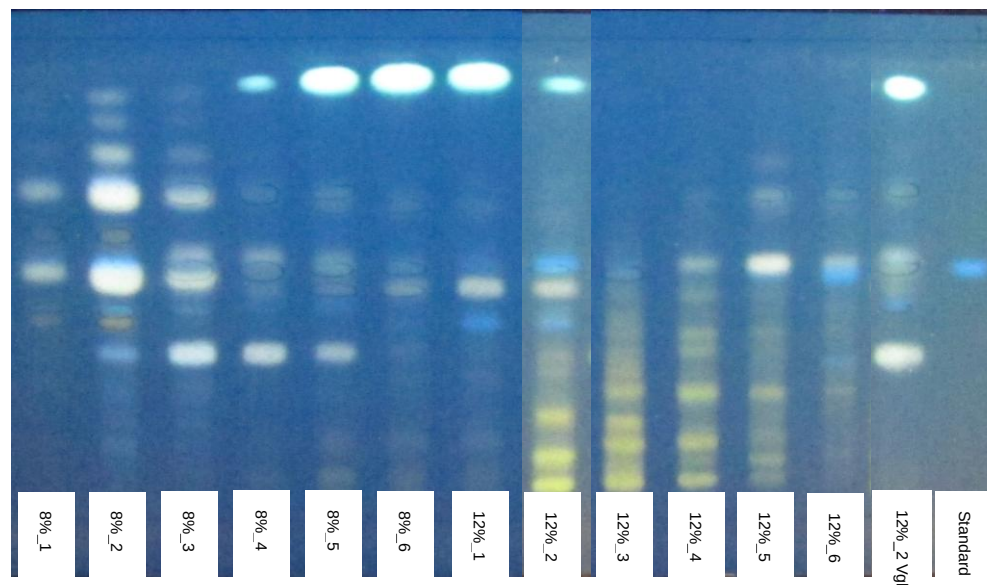


Abb. 14: DC der SPE C18 D, Ansicht: 366 nm, besprüht; Parameter: Tab. 14, Seite: 35.

3.3. Methodenentwicklung zur Auftrennung der interessanten Fraktionen

Nachdem die relevanten Fraktionen der SPE C18 A-D ermittelt wurden, musste eine Methode entwickelt werden, mit welcher diese in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt werden konnten.

Bei der Auswahl der Materialien für die Auftrennung halfen die im Vorfeld gesammelten MS-Daten der möglichen Wirksubstanz. Sie ließen eine monoglykosylierte, phenolische Teilstruktur und einen leicht sauren Charakter vermuten.

3.3.1. Säulenchromatographie

Die Methodenentwicklung begann mit der Testung einiger stationärer Phasen für die SC. Die SC stellte insofern die Methode der Wahl dar, da eine Hochskalierung in größere Maßstäbe möglich ist.

Getestete Säulenmaterialien:

- **Kieselgel:**

Kieselgel erlaubt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken (Böcker, 1997) und interagiert auch über andere polare Wechselwirkungen (Adam und Becker, 2000). Eine Wechselwirkung mit der möglichen Wirksubstanz wäre also aufgrund der phenolischen Teilstruktur daher möglich gewesen. Die Auswahl der mobilen Phase erfolgte anhand des Auftrennungsvermögens verschiedener Lösungsmittelgemische auf mit Kieselgel beschichteten Dünnschichtchromatographieplatten (Anhang: Abb. 18 und 19). Das Gemisch Chloroform/Methanol (75+15) wies dabei die besten Eigenschaften auf. Trotzdem wurden die Inhaltsstoffe bei der SC zu wenig retardiert und eine weitere Auftrennung der im Vorfeld gewonnenen SPE-Fraktion 12%_2 (siehe Abb. 5, Seite 47) ist daher nicht gelungen. Das Dihydroxycumarin konnte allerdings aus der Fraktion 1 abgetrennt werden (Anhang: Abb. 20). Die Parameter für die SC können der Tab. 10 (Seite 30) entnommen werden.

- **Polyamid:**

Da Polyamide besonders geeignet sind, phenolische Analyten zu trennen (Böcker, 1997), kam dieses Material als nächstes zum Einsatz. Insgesamt wurden drei Versuche mit unterschiedlichen mobilen Phasen und Fraktionsvolumina durchgeführt. Die dabei verwendeten Parameter können der Tab. 11 (Seite 31) entnommen werden. Beim Versuch 1 ergab sich die mobile Phase durch die Vortestung verschiedener Fließmittelsysteme auf mit Polyamid beschichteten Dünnschichtchromatographieplatten (Anhang: Abb. 21). 50 %iges Methanol stellte sich als am Besten geeignet heraus. Eine Auftrennung der im Vorfeld gewonnenen Fraktion 12%_1 (siehe Abb. 5, Seite 47) war trotzdem nicht möglich, da ein Großteil der Inhaltsstoffe bereits in Fraktion 1 eluierte. Wie auf der DC des Versuchs 1 (Anhang: Abb. 22) ersichtlich, konnte allerdings eine Abreicherung des störenden Dihydroxycumarin erreicht werden. Beim Versuch 2 wurde mit einem stärker polaren Lösungsmittel (H₂O) begonnen und dann die Polarität Schritt für Schritt vermindert. Auch hierbei konnte keine Auftrennung erzielt werden. Beim dritten Versuch wurde 1%ige Ameisensäure als Fließmittel verwendet. Hier kann man eine etwas stärkere Retention der Probe erkennen, was auf eine deprotonierbare Substanz im Gemisch hindeuten könnte. Eine Auftrennung der aufgetragenen Fraktion konnte trotzdem nicht erreicht werden. Die DC-Ergebnisse der Versuche 2 und 3 sind ebenfalls im Anhang (Abb. 23 und 24) zu finden. Anzumerken ist, dass beim Versuch 2 und 3 eine an Dihydroxycumarin abgereicherte Fraktion aufgetragen wurde.

- **Sephadex:**

Mit Sephadex LH-20 kommen Größenausschlusseffekte zum Tragen und es können phenolische Substanzen von nicht phenolischen getrennt werden (Adam und Becker, 2000). Eine Abtrennung der phenolischen Wirksubstanz wäre daher möglich gewesen. Bei den verwendeten mobilen Phasen wurde die Polarität variiert. Der erste Versuch wurde mit reinem Methanol, der zweite Versuch mit einem Stufengradient aus Wasser und 10%igem Methanol durchgeführt.

Da bei der SC mit Polyamid das störende Dihydroxycumarin abgereichert werden konnte, wurde bei dem ersten Versuch mit Sephadex als Säulenmaterial die Fraktion 1 des ersten Versuches der Polyamid-SC (Anhang: Abb. 22), welche nur noch eine geringere Menge Dihydroxycumarin enthielt, aufgetragen. Man kann

zwar eine weitere Abreicherung des Dihydroxycumarins beobachten, eine darüber hinausgehende Auftrennung konnte allerdings nicht erzielt werden (Anhang: Abb. 25 und 26). Beim zweiten Versuch wurde die im Vorfeld gewonnene SPE-Fraktion 12%_1 aufgetragen. Eine Auftrennung ist, abgesehen von der noch effektiveren Abtrennung des Dihydroxycumarins, auch hier nicht gelungen (Anhang: Abb. 26). Die verwendeten Parameter können der Tab. 12 (Seite 32) entnommen werden.

- **Polystyrol:**

Bei der Verwendung von Polystyrol als Säulenmaterial kommt es zu einer Trennung aufgrund hydrophoben und π - π -Wechselwirkungen (Altmann Analytik GmbH & Co. KG, 2014). Aufgetragen wurde die vereinigten Fraktionen 1 und 2 des 2. Versuches der Sephadex-SC, welche kaum Dihydroxycumarin enthielten. Als mobile Phase wurde ein Stufengradient aus Wasser und verschiedenen Konzentrationen Acetonitril in 1%iger Ameisensäure verwendet.

Es konnte eine deutliche Retention und teilweise eine Trennung beobachtet werden, allerdings liegen die beiden interessanten löslichen Banden in den Fraktionen 24-31 nicht getrennt voneinander vor (Anhang: Abb. 27 und 28). Daher kommt diese Methode für eine weitere Auftrennung ebenfalls nicht in Frage. Die Parameter für die SC können der Tab. 13 (Seite 33) entnommen werden.

3.3.2. Festphasenextraktion

Da alle getesteten Materialien für die Säulenchromatographie gescheitert sind, wurde von der Säulenchromatographie auf die Festphasenextraktion übergegangen.

Verwendete Materialien:

- **Starker Anionenaustauscher (SPE SAX)**

Beim dritten Versuch der Polyamid-SC, bei welchem 1%ige Ameisensäure als Fließmittel verwendet wurde, kam es zu einer stärkeren Retention der Probe. Daher ist man zu der Annahme gekommen, dass im Probengemisch deprotonierbare Substanzen enthalten sind, was zur Verwendung eines starken Anionenaustauschers als Material für die SPE geführt hat. Die verwendeten Parameter können der Tab. 3 (Seite 26) entnommen werden. Die vereinigten

Fraktionen 1 bis 6 des dritten Versuches der Polyamid-SC (Anhang: Abb. 24) wurden auf die Säule aufgetragen. Eine Auftrennung konnte leider nicht erzielt werden (Anhang: Abb. 29).

- **Aminopropyl-Kieselgel (SPE NH₂)**

Das nächste getestete Material war Aminopropyl-Kieselgel. Wie den Parametern der Tab. 4, Tab. 5 und Tab. 6 (Seite: 27 bis 28) entnommen werden kann, wurden rein organische Eluenten verwendet. Daher kommt es durch die ungeladene, polare, schwach basische Aminogruppe zur Ausbildung von Adsorptionseffekten und damit zu einer Retention der Probenmoleküle (Böcker, 1997). Für die Testung der Methode wurde die Fraktion 8%_5 A in 50 µL Methanol gelöst und 25 µL davon wurden auf die Säule aufgetragen. Es kam ein FM-Gradient von Ethylacetat, verschiedenen Konzentrationen Ethylacetat in Methanol und Methanol zum Einsatz. Die Parameter der SPE NH₂-Methode 1 können der Tab. 4 (Seite 27) entnommen werden. Die Auftrennung der Fraktion 8%_5 A ist mit diesem Material gelungen (siehe Abb. 15 und Abb. 16; +Anhang: Abb. 30). Allerdings enthalten die Fraktionen 26-28 nicht nur die interessante löschende Bande mit einem R_x-Wert von 0,92-0,99, sondern auch das störende Dihydroxycumarin. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Elution wurde die Säule mit 10 mL 50 % MeOH/H₂O und 10 mL H₂O nachgewaschen. Beide Fraktionen wurden vereinigt, zur Trockene gebracht und mittels DC überprüft. Wie in der Abb. 17 ersichtlich, erfasst der Elutions-Gradient nicht alle Substanzen des Gemisches. Da aber die interessante löschende Bande mithilfe dieses Gradienten eluiert werden kann, wurde keine Änderung vorgenommen.

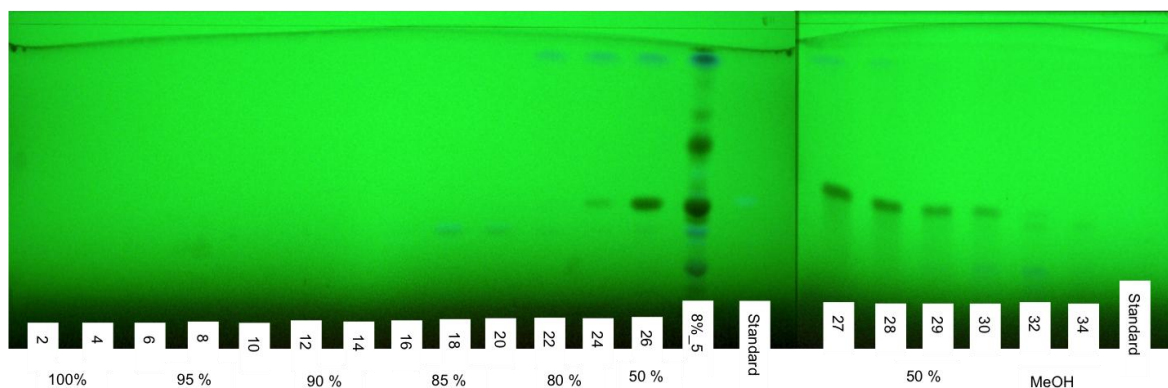


Abb. 15: DC der SPE NH₂. Aufgetragen wurde die halbe Fraktion 8%_5 A. Ansicht bei 254 nm. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die Beschriftung 8%_5 zeigt die gesamte Fraktion. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

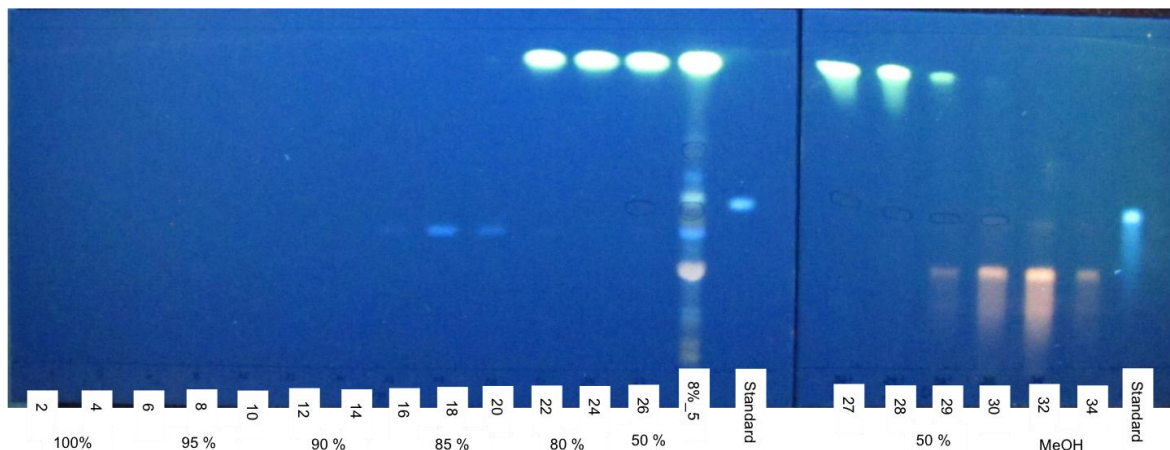


Abb. 16: DC der SPE NH₂. Aufgetragen wurde die halbe Fraktion 8%_5 A. Ansicht bei 366 nm, besprüht. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die Beschriftung 8%_5 zeigt die gesamte Fraktion. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

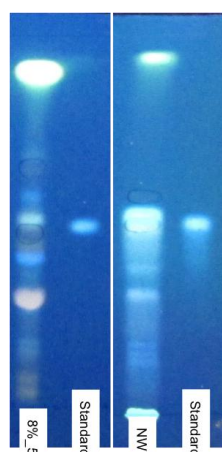


Abb. 17: Links: Die DC zeigt das Nachwaschen (NW) der Säule der SPE NH₂, die mit der Fraktion 8%_5 A durchgeführt wurde. Die Beschriftung 8%_5 zeigt die gesamte Fraktion. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

Rechts: Versuchsaufbau SPE NH₂.

Da die interessante Substanz zusammen mit dem Dihydroxycumarin eluiert, musste eine Lösung gefunden werden, mit welcher das Dihydroxycumarin abgetrennt werden kann, bevor es zu einer endgültigen Auftrennung mit der SPE NH₂ kommt. In einem vorherigen Versuch mittels SC konnte gezeigt werden, dass das Dihydroxycumarin mit der Verwendung von Kieselgel als Material abgetrennt werden kann. Daher wurde im nächsten Schritt eine Festphasenextraktion mit Kieselgel (SPE Si) durchgeführt.

- **Kieselgel (SPE Si)**

Zur Überprüfung der Eignung dieser Methode zur Abtrennung des Dihydroxycumarins wurden die restlichen 25 µL der Fraktion 8%_5 A auf die Säule aufgetragen. Es kam wieder ein FM-Gradient von Ethylacetat, verschiedenen Konzentrationen Ethylacetat in Methanol und Methanol zum Einsatz. Die Parameter für die SPE Si können der Tab. 7 (Seite 29) entnommen werden. Wie man in der Abb. 18 und Abb. 19 (+Anhang: Abb. 31) sehen kann, ist die Abtrennung des Dihydroxycumarins gelungen. Eine Auftrennung der anderen Komponenten konnte allerdings mit dieser Methode nur unzureichend erzielt werden.

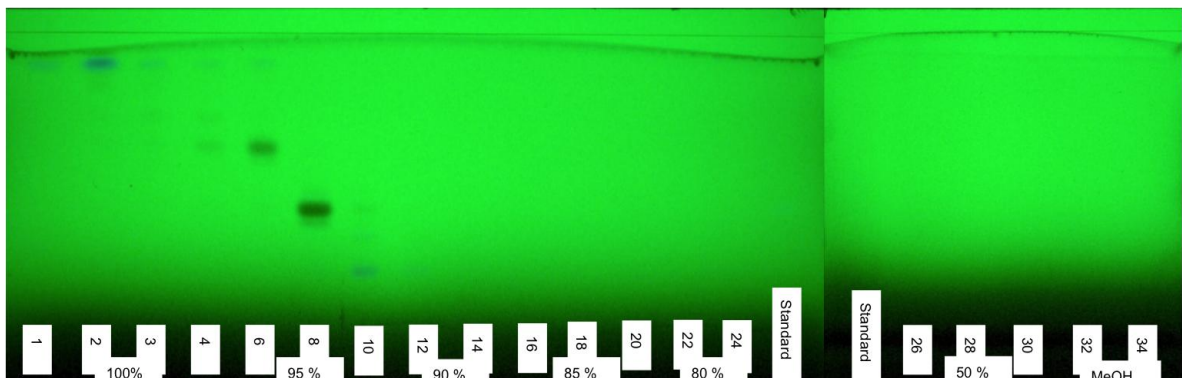


Abb. 18: DC der SPE Si. Aufgetragen wurde die halbe Fraktion 8%_5 A. Ansicht bei 254 nm. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

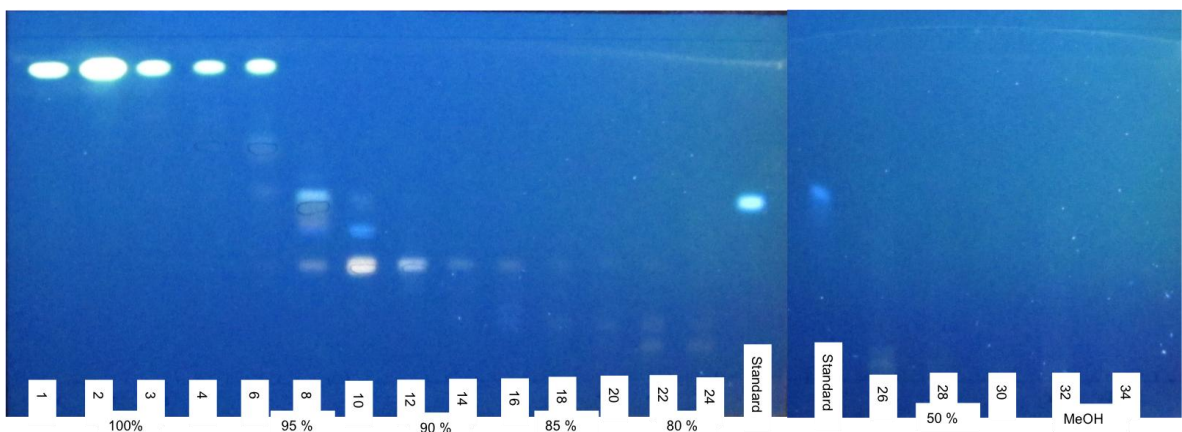


Abb. 19: DC der SPE Si. Aufgetragen wurde die halbe Fraktion 8%_5 A. Ansicht bei 366 nm, besprüht. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

3.3.3. Entwickelte Methode

Da eine Abtrennung des Dihydroxycumarins und eine gleichzeitige vollständige Auftrennung des Substanzgemisches mit den getesteten Methoden nicht möglich war, wurden zur Erreichung des gewünschten Zieles die SPE Si und die SPE NH₂ kombiniert.

Zur Überprüfung der mit dieser Kombination erzielbaren Ergebnisse wurden mit den vereinigten Fraktionen 7-12 der durchgeführten SPE Si (siehe Abb. 18 und Abb. 19) anschließend eine SPE NH₂ durchgeführt.

Anhand der Ergebnisse der ersten SPE NH₂ wurde eine leichte Modifikation des FM-Gradienten durchgeführt. Das reine Ethylacetat zu Beginn wurde weggelassen, da dieses keine Substanzen des Gemisches eluierte. Außerdem wurde der Gradient verfeinert, indem die zusätzlichen Konzentrationen 70 %, 60 % und 40 % Ethylacetat in Methanol hinzugefügt wurden. Die Parameter der SPE NH₂-Methode 2 können der Tab. 5 (Seite 28) entnommen werden.

Wie in der Abb. 20 und Abb. 21 (+Anhang: Abb. 32) ersichtlich, hat die Auftrennung des Gemisches gut funktioniert. Die interessante, lösche Bande mit einem R_x-Wert von 0,92-0,99 ist in den Fraktionen 22-29 enthalten. Die im Anhang (Abb. 33 und 34) befindlichen HPLC-Chromatogramme zeigen, dass die Abtrennung des Dihydroxycumarins mit der vorher durchgeführten SPE Si gut gelungen ist, da nur ein relevanter Peak mit einem UV-Maximum von 308 nm erkennbar ist.

Die Fraktionen 12-17 zeigen eine blaue Bande. In den HPLC-Chromatogrammen (Anhang: Abb. 33 und 34) ist allerdings ersichtlich, dass die Substanz mit einem UV-Maximum von 338 nm, welche höchstwahrscheinlich der blauen Bande zugeordnet werden kann, in einem Gemisch mit einer zweiten Substanz (UV-Maximum: 264 nm) vorliegt. In den Fraktionen 34-42 lässt sich eine orange Bande erkennen. Nach Analyse der HPLC-Chromatogramme kann man auch hier erkennen, dass die Substanz mit einem UV-Maximum von 338 nm, welche höchstwahrscheinlich der orangen Bande zugeordnet werden kann, in einem Gemisch mit den beiden gesuchten löschenden Substanzen bei einem R_x-Wert von 0,83-0,99 vorliegt (UV-Maxima: 308 und 313 nm). Die einzelnen UV-Spektren können dem Anhang (Abb. 35 bis 37) entnommen werden.

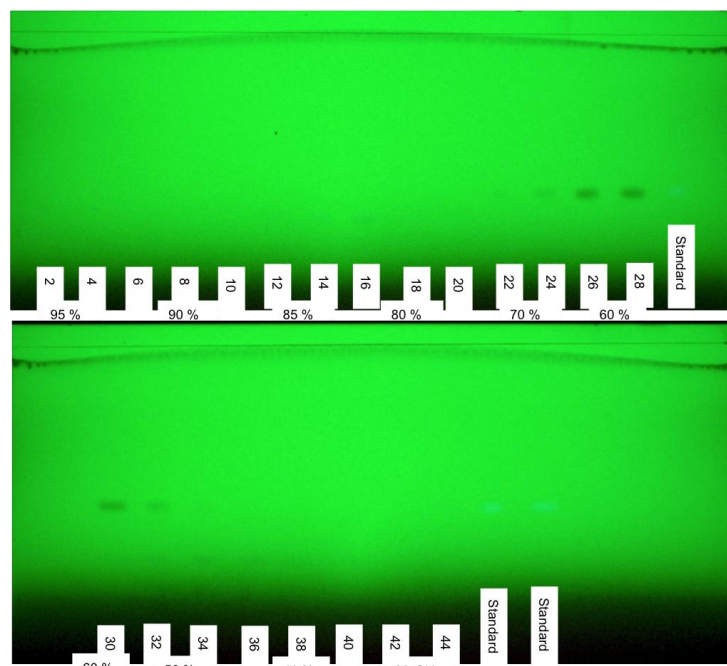


Abb. 20: DC der SPE NH₂ mit verfeinertem FM-Gradient (Methode 2, siehe Tab. 5). Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen 7-12 der zuvor durchgeführten SPE Si (ausgehend von der Fraktion 8%_5 A der SPE C18). Ansicht bei 254 nm. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

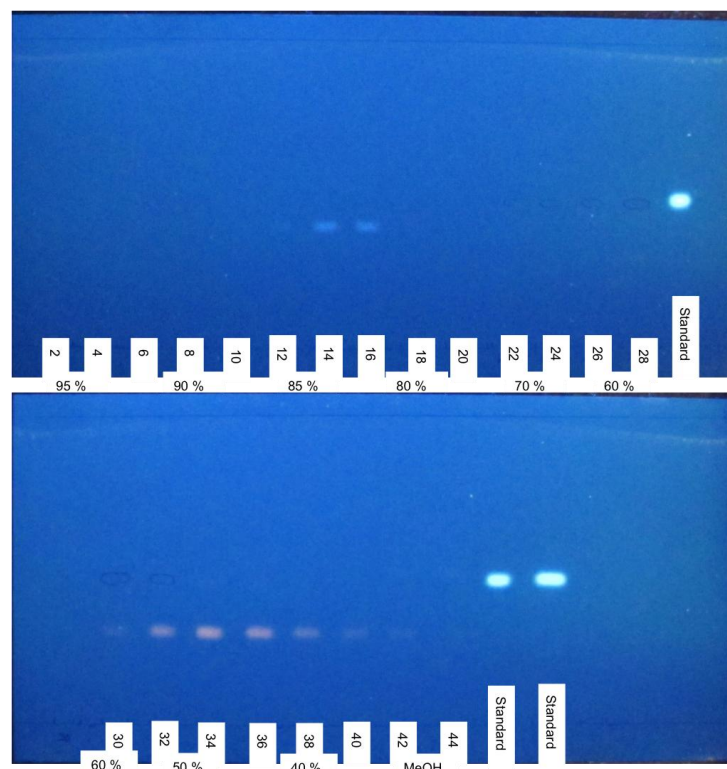


Abb. 21: DC der SPE NH₂ mit verfeinertem FM-Gradient (Methode 2, siehe Tab. 5). Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen 7-12 der zuvor durchgeführten SPE Si (ausgehend von der Fraktion 8%_5 A der SPE C18). Ansicht bei 366 nm, besprüht. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

Trotz guter Auftrennung kann man in der Abb. 20 und der Abb. 21 Mischfraktionen (Fraktion 30, 31 und 32) erkennen, die sowohl noch die interessante, löschende Bande mit einem R_x -Wert von 0,92-0,99 enthalten, als auch bereits die orange Bande. Zur eventuellen Vermeidung dieser Mischfraktionen wurde eine weitere Verfeinerung des FM-Gradienten für die SPE NH_2 durchgeführt, indem die Konzentration 65 % Ethylacetat in Methanol hinzugefügt wurde (siehe SPE NH_2 -Methode 3, Tab. 6, Seite 28).

Außerdem wurden noch Verfeinerungen an der SPE Si vorgenommen. Zur Erreichung einer besseren Abtrennung des zu Beginn eluierenden Dihydroxycumarins, wurde die Anzahl der gesammelten Fraktionen mit Ethylacetat (bei gleichbleibenden Fraktionsvolumen) von fünf auf zehn erhöht. Die Parameter der SPE Si-Methode 2 können der Tab. 8 (Seite 29) entnommen werden. Später wurde anhand der Ergebnisse der durchgeführten SPE Si eine weitere Modifikation des FM-Gradienten durchgeführt. Die Konzentration 50 % Ethylacetat in Methanol und reines Methanol wurden aus Zeitgründen ausgespart, da sich gezeigt hat, dass in diesem Bereich keine interessanten Substanzen mehr eluieren. Die bei der SPE Si-Methode 3 verwendeten Parameter zeigt die Tab. 9 (Seite 29).

Die zweite interessante löschende Bande mit einem R_x -Wert von 0,83-0,90 war in der aufgetragenen Fraktion 8%_5 A kaum enthalten. Es galt also in weiteren Versuchen herauszufinden, ob mit dieser entwickelten Methode beide löschenden Banden voneinander getrennt werden können. Dazu wurde in einem weiteren Schritt mit der Fraktion 8%_6 A zunächst eine SPE Si-Methode 2 durchgeführt. Wie auf der Abb. 22 und der Abb. 23 (+Anhang: Abb. 38) ersichtlich, ist eine Abreicherung des Dihydroxycumarins gelungen. Allerdings sind in den Fraktionen 11-16, in denen die anderen Komponenten eluieren, noch geringe Mengen Dihydroxycumarin enthalten.

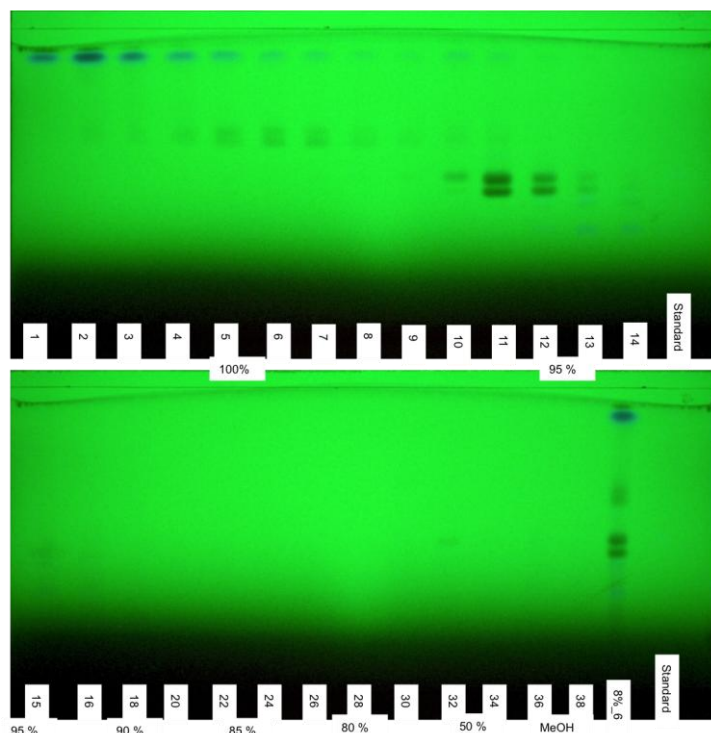


Abb. 22: DC der SPE Si-Methode 2 (Parameter siehe Tab. 8, Seite 29). Aufgetragen wurde die Fraktion 8%_6 A. Ansicht bei 254 nm. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die Beschriftung 8%_6 zeigt die gesamte Fraktion. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

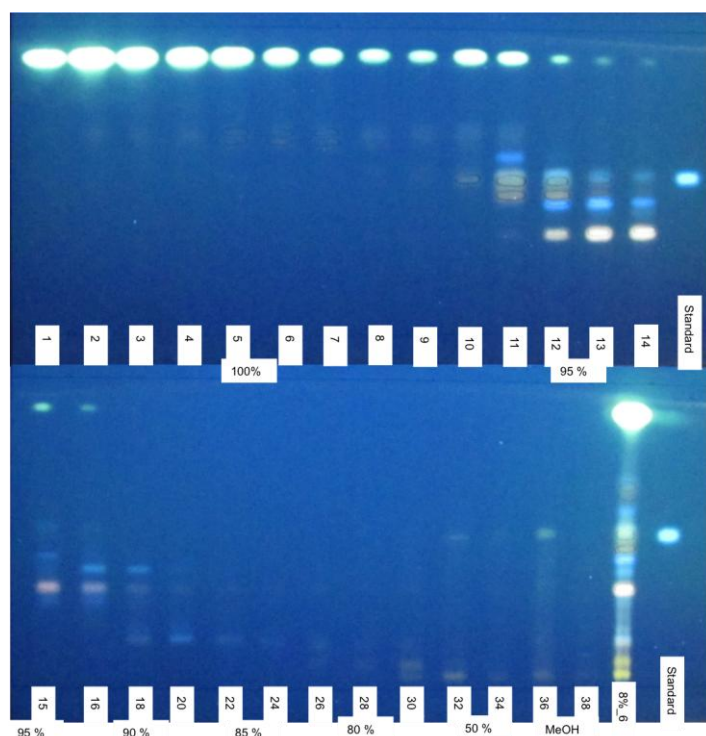


Abb. 23: DC der SPE Si-Methode 2 (Parameter siehe Tab. 8, Seite 29). Aufgetragen wurde die Fraktion 8%_6 A. Ansicht bei 366 nm, besprüht. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die Beschriftung 8%_6 zeigt die gesamte Fraktion. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

Trotz der geringen Mengen Dihydroxycumarin wurden die Fraktionen 11-18 anschließend vereinigt und eine SPE NH_2 -Methode 3 durchgeführt. Wie in der Abb. 24 und der Abb. 25 (+Anhang: Abb. 39) zu erkennen, konnten die beiden interessanten, löschenden Banden mit dieser Methode getrennt werden.

Die Fraktionen 25-29 enthalten die erste löschende Bande mit einem R_x -Wert von 0,92-0,99. Im HPLC-Chromatogramm (Anhang: Abb. 40 und 41; UV-Spektren: Anhang: Abb. 43) kann man neben dem Hauptpeak der löschenden Bande mit einem UV-Maximum von 308 nm noch einen zweiten kleinen Peak erkennen. Dieser entspricht dem zuvor nicht vollständig abgetrennten Dihydroxycumarin mit einem UV-Maximum bei 345 nm. Da die Menge des Dihydroxycumarins im Verhältnis zur löschenden Substanz sehr gering ist, spielt diese Verunreinigung keine Rolle.

Die Fraktionen 35-46 enthalten die zweite löschende Bande mit einem R_x -Wert von 0,83-0,90. Wie auf der DC ersichtlich, eluiert die zweite löschende Bande gemeinsam mit einer orangen Bande. Dies wird auch durch die HPLC-Chromatogramme (Anhang: Abb. 40 und 41) bzw. durch die UV-Spektren (Anhang: Abb. 44) bestätigt. Mengenmäßig herrscht allerdings die löschende Bande mit einem UV-Maximum von 313 nm vor, wodurch auch hier die Verunreinigungen in Kauf genommen wurden.

Zusätzlich kann man in den Fraktionen 12-17 erneut eine blaue Bande erkennen, welche wie bereits zuvor besprochen höchstwahrscheinlich der Substanz mit einem UV-Maximum von 338 nm zugeordnet werden kann. Anhand der HPLC-Chromatogramme (Anhang: Abb. 40 und 41) ist allerdings wieder erkennbar, dass in diesen Fraktionen noch zwei weitere Substanzen mit den UV-Maxima von 242 und 261 nm vorliegen (UV-Spektren siehe Anhang: Abb. 42). Da das UV-Maximum bei 261 nm nicht eindeutig bestimmt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass diese Substanz höchstwahrscheinlich mit der in der zuvor besprochenen Mischung der blauen Bande vorkommenden Substanz (UV-Maximum: 264 nm) übereinstimmt (Anhang: HPLC-Chromatogramme: Abb. 34, UV-Spektren: Abb. 35).

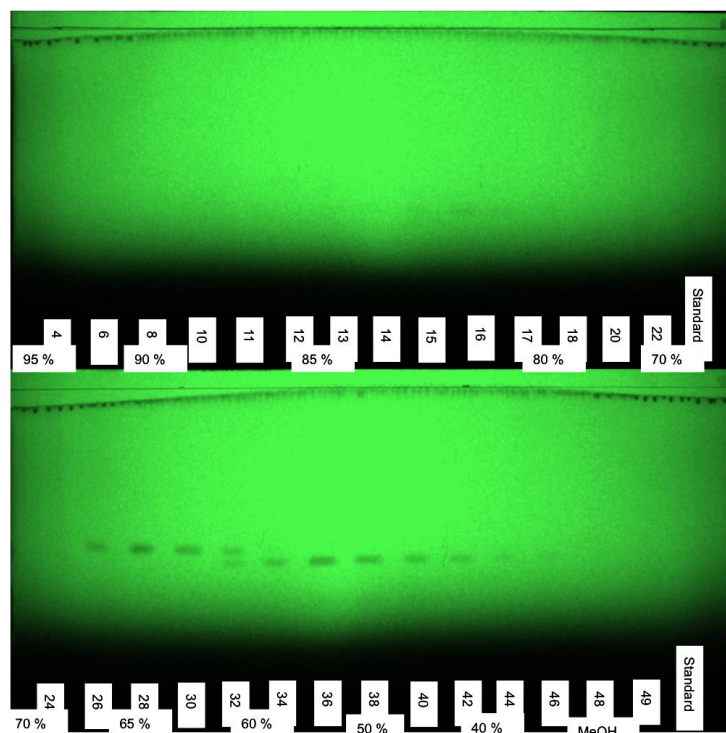


Abb. 24: DC der SPE NH_2 -Methode 3 (Parameter siehe Tab. 6, Seite 28). Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen 11-18 der zuvor durchgeführten SPE Si der Fraktion 8%_6 A. Ansicht bei 254 nm. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

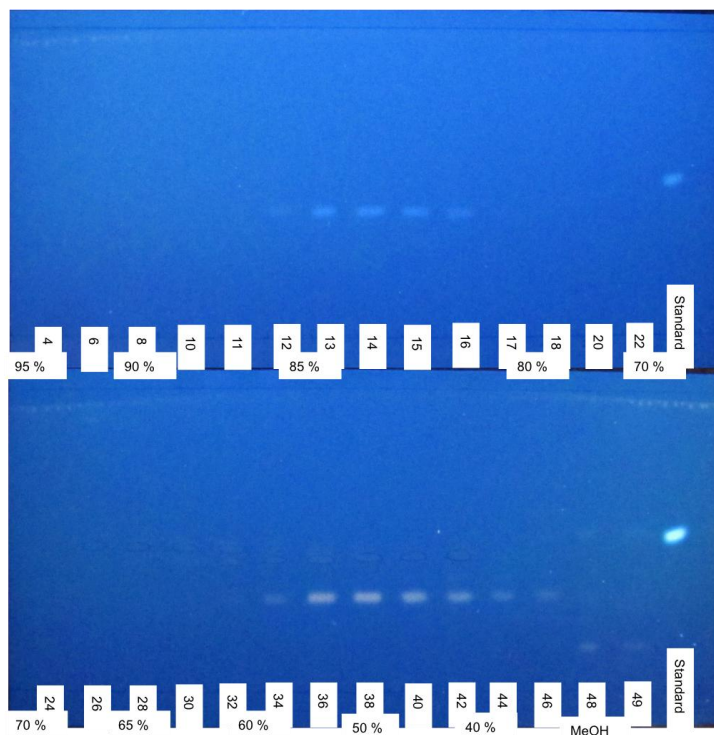


Abb. 25: DC der SPE NH_2 -Methode 3 (Parameter siehe Tab. 6, Seite 28). Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen 11-18 der zuvor durchgeführten SPE Si der Fraktion 8%_6 A. Ansicht bei 366 nm, besprüht. Die Zahlen beschreiben die gesammelten Fraktionen, die Prozentigkeit bezieht sich auf den Gehalt an Ethylacetat in Methanol in der mobilen Phase. Die verwendeten Parameter für die DC können der Tab. 14 auf der Seite 35 entnommen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kombination aus SPE Si und SPE NH₂ dafür geeignet ist, zunächst das Dihydroxycumarin abzutrennen und in einem weiteren Schritt die interessanten, löslichen Substanzen ($R_x = 0,83-0,99$) zu isolieren.

Zur Isolierung ausreichender Mengen der möglichen Wirksubstanzen wurde die entwickelte Methode zwölfmal durchgeführt. Die dabei aufgetrennten Fraktionen sind in der Tab. 21 zusammengefasst. Die DC- und HPLC-Ergebnisse stimmen mit den bereits gezeigten Ergebnissen überein und können dem Anhang (Abb. 45 bis 109) entnommen werden.

Insgesamt konnten drei Reinsubstanzen isoliert werden (siehe Punkt 3.5, Seite 69).

Tab. 21: Die Tabelle zeigt die mit der entwickelten Methode aufgetrennten Fraktionen sortiert nach der davor durchgeführten SPE C18.

	aufgetrennte Fraktionen
SPE C18 A:	8%_4 (Anhang: Abb. 55 bis 73), 8%_5 (Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21; Anhang: Abb. 31) 8%_6 (Abb. 22, Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25; Anhang: Abb. 39) 12%_1 (Anhang: Abb. 45 bis 54)
SPE C18 B:	8%_3 und 8%_4 (Anhang: Abb. 55 bis 73), 8%_5 (Anhang: Abb. 74 bis 79), 8%_6 (Anhang: Abb. 80 bis 85)
SPE C18 C:	8%_5 (Anhang: Abb. 86 bis 91), 8%_6 und 12%_1 (Anhang: Abb. 92 bis 100)
SPE C18 D:	8%_5 und 8%_6 (Anhang: Abb. 101 bis 109)

Zusätzlich wurden zwei immer wieder auftretende Mischfraktionen gesammelt. Die eine wurde mit „orange Bande“ die andere mit „blaue Bande“ bezeichnet. In den DC-Ergebnissen zeigte sich bei diesen Mischfraktionen zunächst nur eine Bande, wodurch angenommen wurde, dass es sich ebenfalls um Reinsubstanzen handelt. Auf der Abb. 21 (Seite 61) ist zum Beispiel die „blaue Bande“ in den Fraktionen 12-17 und die „orange Bande“ in den Fraktionen 34-42 ersichtlich. Wie bereits zuvor erklärt, zeigten die HPLC-Ergebnisse allerdings, dass die auf der DC sichtbaren Substanzen in einer Mischung mit anderen Substanzen vorliegen, die

auf der DC aufgrund der Unterschreitung der Detektionsgrenze nicht sichtbar sind (Anhang: HPLC-Chromatogramme: Abb. 34, 41, 52, 71; UV-Spektren: Abb. 35, 37, 42, 44, 53, 73).

Die Tab. 22 zeigt alle über die Mischfraktionen „blaue Bande“ und „orange Bande“ gewonnenen Fakten. Bei beiden Mischfraktionen handelt es sich bei den Substanzen, welche jeweils ein UV-Maximum von 338 nm aufweisen, höchstwahrscheinlich um die auf der DC sichtbaren.

Die Verwahrung dieser Mischfraktionen wurde für den Fall vorgenommen, dass es sich bei den isolierten Substanzen nicht um die Wirksubstanzen handelt. Eine Methode zur Auftrennung dieser Fraktionen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht entwickelt.

Tab. 22: Die Tabelle fasst alle gewonnenen Fakten über die Mischfraktionen „blaue Bande“ und „orange Bande“ zusammen. Der Bereich des R_x -Wertes ergab sich aus den Ergebnissen aller durchgeführten DCs.

	R _x -Wert (cm)	UV-Maxima (nm)	Isolierte Menge (mg)
„blaue Bande“	0,80 - 0,86	231, 240, 241, 242, 261, 264, 338	0,63
„orange Bande“	0,63 - 0,66	308, 313, 323, 327, 338	1,86

3.4. Beispiel: Extraktion, Aufreinigung, Auftrennung

Die Abb. 26 soll die Gewichtsverhältnisse von der Extraktion bis zur Isolation der aktiven Substanz veranschaulichen.

Zu Beginn wurden 100 g Droge für die Extraktion eingewogen. Daraus wurde 0,91 g Lyophilisat erhalten, welches anschließend mittels SPE C18 aufgereinigt wurde. Die dabei erhaltene relevante Fraktion 8%_5 wog 0,0108 g. Mit dieser wurde zunächst eine SPE Si zur Abtrennung des Dihydroxycumarins durchgeführt. Danach wurde die Fraktion 11 (0,0018 g), welche eine der beiden relevanten löslichen Banden enthielt, zur Auftrennung auf die SPE NH₂ aufgetragen. Dabei wurden 0,00032 g der zweiten löslichen Substanz mit einem R_x -Wert bei 0,83-0,90 und einem UV-Maximum bei 313 nm isoliert.

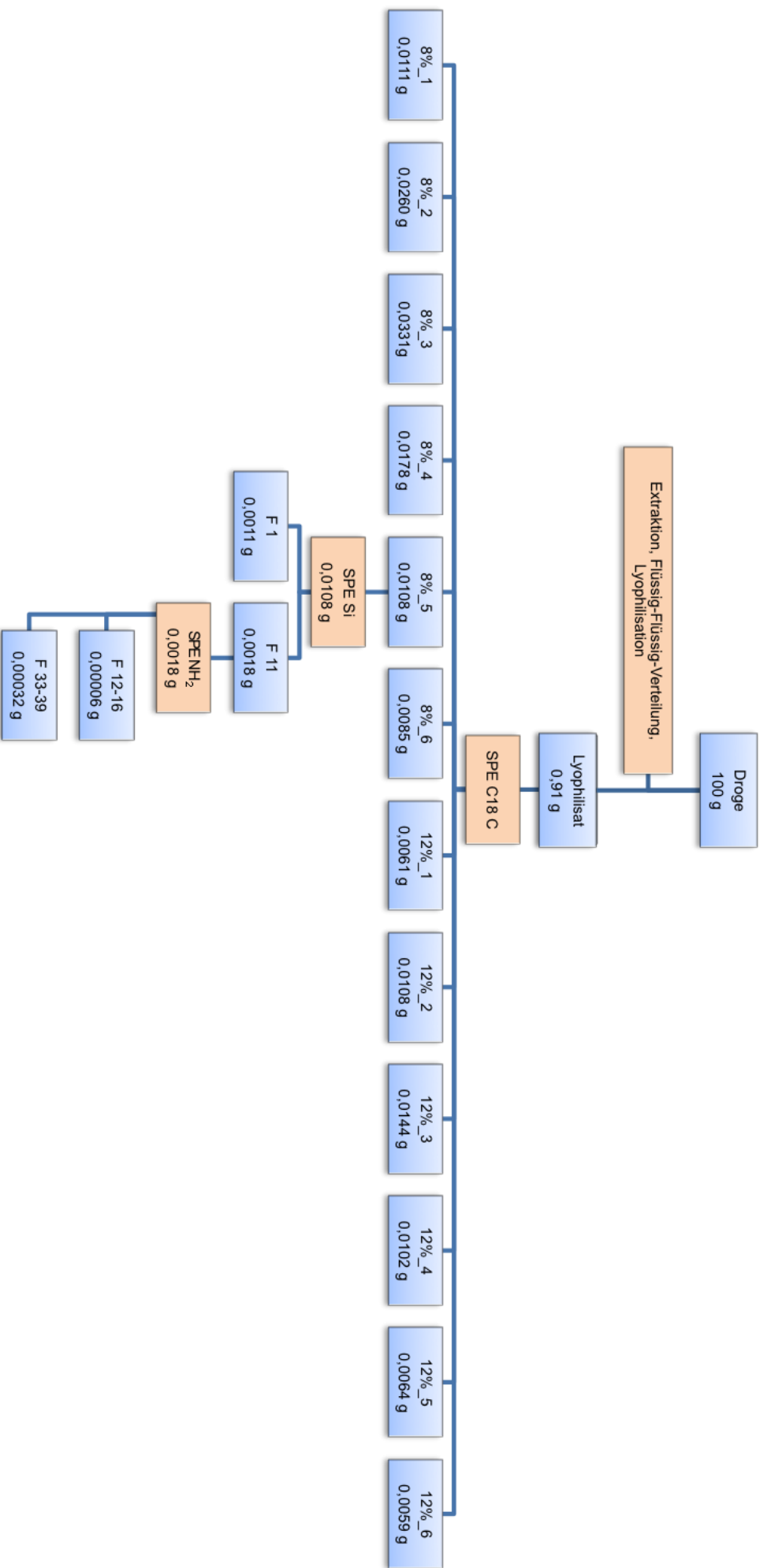


Abb. 26: Die Graphik zeigt die Gewichtsverhältnisse von der Extraktion bis zur Isolation der aktiven Substanz. Die Beschriftungen 8%_1 – 12%_6 stehen für die Fraktionen der im Rahmen der Aufreinigung durchgeführten SPE C18 C. Bei der SPE Si steht die Fraktion (F) 1 für die Menge an störendem Dihydroxycumarin, die aus dieser Isolation gewonnen wurde. Mit der F11 wurde anschließend die SPE NH₂ durchgeführt. Hierbei stehen die F 33-39 für die Menge der zweiten löschenden Substanz (R_x-Wert: 0,83 - 0,90, UV-Maximum: 313 nm), die im Rahmen dieser SPE isoliert werden konnte. Die F12-16 stehen für eine Mischung an Substanzen, die mit der Bezeichnung „blaue Bande“ vereinigt und zur Sicherheit aufbewahrt wurden.

3.5. Charakterisierung der isolierten Substanzen

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden insgesamt drei Substanzen isoliert (siehe Abb. 27).

Die erste Substanz wurde mit KP01 bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine der beiden löschenden Banden mit einem R_x -Wert von 0,83 - 0,90 und einem UV-Maximum bei 313 nm.

Die zweite löschende Bande mit einem R_x -Wert von 0,92 - 0,99 und einem UV-Maximum bei 308 nm wurde mit KP02 bezeichnet.

Bei der dritten Substanz handelt es sich um das Dihydroxycumarin, welches mit KP03 benannt wurde.

In der Tab. 23 sind alle im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Fakten zusammengefasst.

Tab. 23: Fakten zu den isolierten Substanzen.

	R_x -Wert (cm)	UV-Max. (nm)	Isolierte Menge (mg)	Ø isolierte Menge/SPE (mg)
KP01	0,83 - 0,90	313	2,01	0,20 - 0,40
KP02	0,92 - 0,99	308	7,55	0,49 - 2,48
KP03	1,75 - 1,76	344	4,40	0,50 - 0,70

Bevor die isolierten Substanzen zur Strukturaufklärung mittels NMR vermessen wurden, wurde die Reinheit mittels HPLC-CAD geprüft (siehe Punkt 3.5.1, Seite 70). Zur Bestimmung des Molekulargewichts und zur ersten Abschätzung möglicher Strukturelemente wurde zusätzlich eine MS mit Direktinfusion durchgeführt (siehe Punkt 3.5.2, Seite 75).

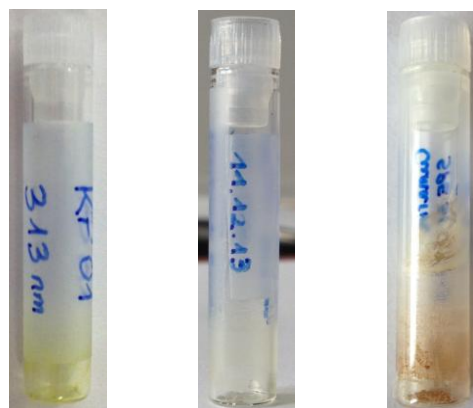


Abb. 27: Reinsubstanzen. Links: KP01, zitronengelb, ölig; Mitte: KP02, beige, ölig; Rechts: KP03, orange-bräunlich, amorph.

3.5.1. Reinheitsprüfung

Die Reinheitsprüfung der isolierten Substanzen erfolgte durch eine HPLC-Analyse mit einem Charged Aerosol Detector. Die Parameter der Analyse können der Tab. 17 (Seite 40) entnommen werden.

Dazu wurden die Substanzen in Methanol gelöst und soweit verdünnt, dass eine Zielkonzentration von 0,1 mg/mL erreicht wurde und anschließend wurden 5 µL dieser Lösung in das Gerät injiziert. Nach 80 min Laufzeit erhielt man ein Chromatogramm, welches manuell nachbearbeitet wurde, um die Flächen der relevanten Peaks zu integrieren. Von der Fläche des Injektionspeaks musste anschließend die Peakfläche des Blanks (reines Methanol) abgezogen. Danach folgte eine Neuberechnung der relativen Fläche aller erfassten Substanzen, wodurch sich dann die Reinheit der isolierten Substanz ergab.

Die Chromatogramme und die Reinheitsberechnung der isolierten Substanzen werden in den folgenden Punkten gezeigt.

3.5.1.1. Blank

Die Probelösungen wurden mit reinem Methanol hergestellt. Zur Korrektur der relativen Fläche des Injektionspeaks, der alle nicht-retardierten Inhaltsstoffe enthält, bei den Analysen der isolierten Substanzen wurde daher ein Blank mit reinem Methanol vermessen (siehe Abb. 28 und Tab. 24).

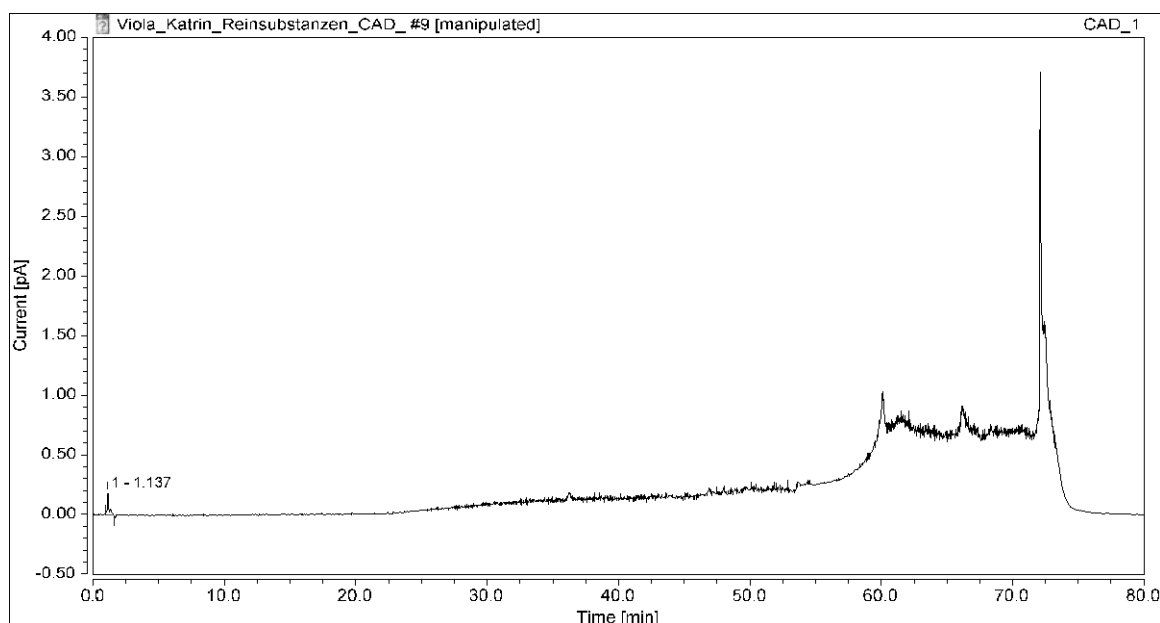


Abb. 28: Die Abbildung zeigt das Chromatogramm des Blanks (Methanol). Der mit 1 beschriftete Peak mit einer Retentionszeit von 1,137 min entspricht dem Injektionspeak. Die Parameter für die HPLC-CAD-Analyse können der Tab. 17 (Seite 40) entnommen werden.

Tab. 24: Die Tabelle zeigt die Daten des in Abb. 28 ersichtlichen Injektionspeaks.

	Retentionszeit (min)	Fläche (pA*min)	Höhe (pA)	Relative Fläche (%)
1	1,137	0,029	0,190	100,0

3.5.1.2. KP01

Die Abb. 29 zeigt das Chromatogramm der isolierten Substanz KP01. Zu sehen sind 5 Peaks. Beim Peak mit der Nummer 1 handelt es sich um den Injektionspeak, der Peak Nummer 5 entspricht der Substanz KP01. Die Peaks 2, 3, und 4 sind Verunreinigungen. Die zu den Peaks zugehörigen Daten sind in der Tab. 25 aufgelistet. Der Wert Fläche korr. ergibt sich durch Abzug der Fläche des Blanks (siehe Tab. 24) von der Peakfläche des Injektionspeaks. Die restlichen Flächen bleiben gleich, es ergibt sich allerdings eine neue Gesamtsumme. Mit dieser wird dann die korrigierte relative Fläche berechnet.

z.B. Korrektur des Injektionspeaks:

Fläche korr.: $0,068 - 0,029$ (Blank) = $0,039 \rightarrow$ neue Gesamtsumme: $0,434$.

Korrektur der relativen Fläche für Peak Nummer 5:

relative Fläche korr.: $0,340 \cdot 100 / 0,434 = 78,34 \%$

Dadurch ergibt sich für KP01 eine Reinheit von $78,34 \%$.

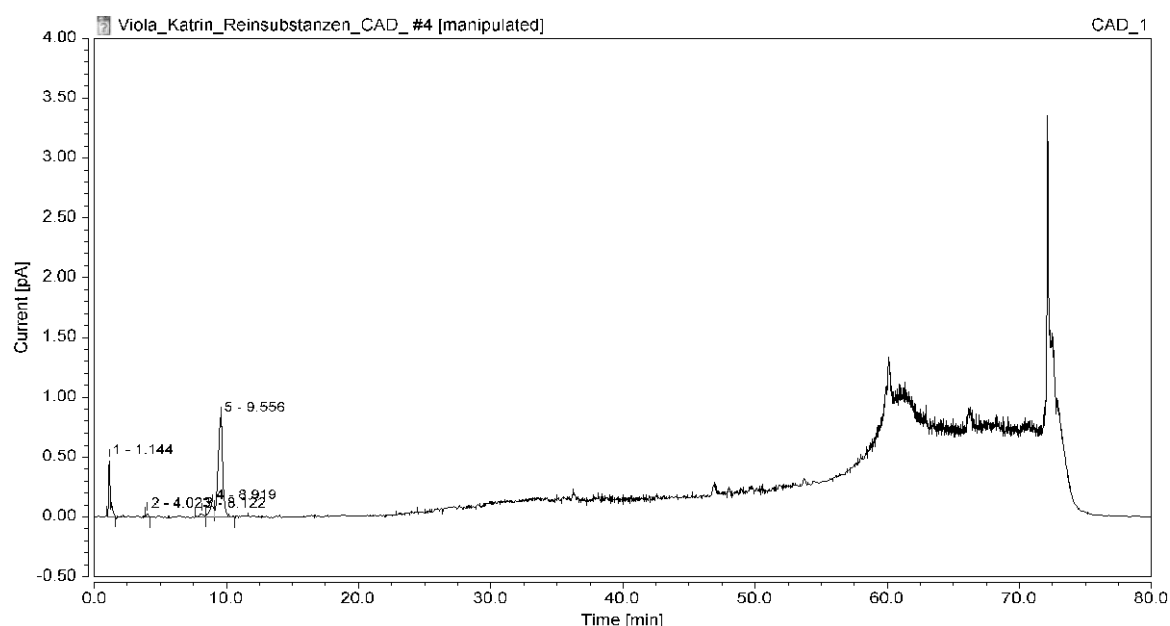


Abb. 29: Chromatogramm der isolierten Substanz KP01. Peak 1: Injektionspeak, Peak 2,3,4: Verunreinigungen, Peak 5: Substanzpeak. Die Parameter für die HPLC-CAD-Analyse können der Tab. 17 (Seite 40) entnommen werden.

Tab. 25: Die Tabelle zeigt die Daten der Peaks des in der Abb. 29 ersichtlichen Chromatogramms.

	Retentionszeit (min)	Fläche (pA*min)	Höhe (pA)	Relative Fläche (%)	Fläche korr. (pA*min)	Relative Fläche korr. (%)
1	1,144	0,068	0,477	14,67	0,039	8,99
2	4,023	0,005	0,033	1,09	0,005	1,15
3	8,122	0,011	0,032	2,40	0,011	2,53
4	8,919	0,039	0,102	8,39	0,039	8,99
5	9,556	0,340	0,835	73,45	0,340	78,34
					Σ 0,434	Σ 100,00

3.5.1.3. KP02

In der Abb. 30 ist das Chromatogramm der isolierten Substanz KP02 zu erkennen. Zu sehen ist nur der Injektionspeak (1) und der Peak der Substanz (2). Die Durchführung der Berechnung kann dem Punkt 3.5.1.2 (Seite: 71) entnommen werden. Die Reinheit der Substanz KP02 beläuft sich auf 98,67 % (siehe Tab. 26).

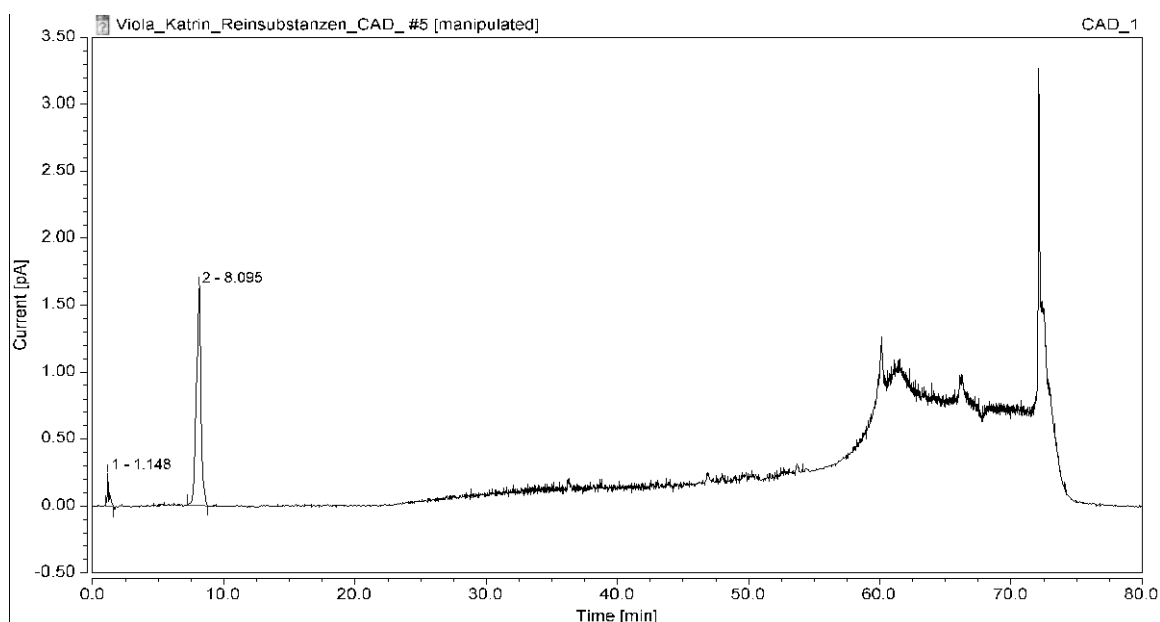


Abb. 30: Chromatogramm der isolierten Substanz KP02. Peak 1: Injektionspeak, Peak 2: Substanzpeak. Die Parameter für die HPLC-CAD-Analyse können der Tab. 17 (Seite 40) entnommen werden.

Tab. 26: Die Tabelle zeigt die Daten der Peaks des in der Abb. 30 ersichtlichen Chromatogramms.

	Retentionszeit (min)	Fläche (pA*min)	Höhe (pA)	Relative Fläche (%)	Fläche korrr. (pA*min)	Relative Fläche korrr. (%)
1	1,148	0,038	0,236	5,42	0,009	1,33
2	8,095	0,668	1,628	94,58	0,668	98,67
					Σ 0,677	Σ 100,00

3.5.1.4. KP03:

Die Abb. 31 zeigt das Chromatogramm der isolierten Substanz KP03. Es sind 13 Peaks zu erkennen. Wobei es sich beim Peak Nummer 1 um den Injektionspeak handelt und bei Peak Nummer 4 um den Peak der Substanz. Bei den restlichen, größtenteils sehr kleinen Peaks handelt es sich um Verunreinigungen. Die Durchführung der Berechnung kann dem Punkt 3.5.1.2 (Seite: 71) entnommen werden. Die Substanz KP03 weist eine Reinheit von 90,31 % auf (siehe Tab. 27).

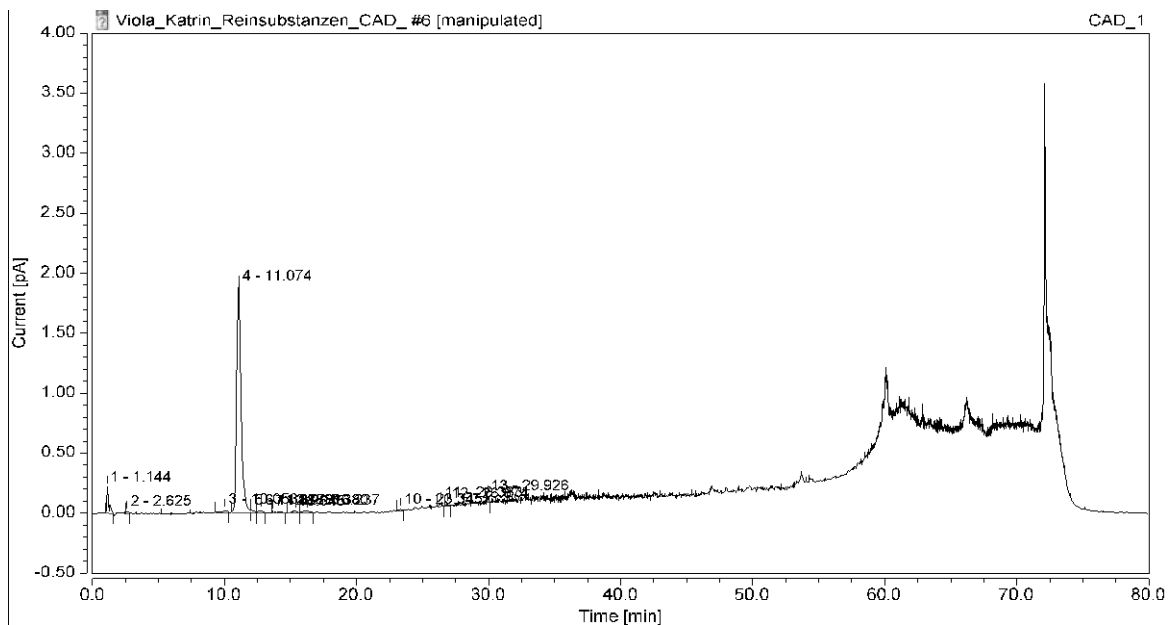


Abb. 31: Chromatogramm der isolierten Substanz KP03. Peak 1: Injektionspeak, Peaks 2,3 und 5-13: Verunreinigungen, Peak 4: Substanzpeak. Die Parameter für die HPLC-CAD-Analyse können der Tab. 17 (Seite 40) entnommen werden.

Tab. 27: Die Tabelle zeigt die Daten der Peaks des in der Abb. 31 ersichtlichen Chromatogramms.

	Retentionszeit (min)	Fläche (pA*min)	Höhe (pA)	Relative Fläche (%)	Fläche korrt. (pA*min)	Relative Fläche korrt. (%)
1	1,144	0,035	0,223	4,11	0,006	0,73
2	2,625	0,003	0,018	0,35	0,003	0,36
3	10,053	0,008	0,025	0,93	0,008	0,97
4	11,074	0,746	1,886	87,10	0,746	90,31
5	11,988	0,006	0,026	0,68	0,006	0,73
6	12,778	0,007	0,026	0,85	0,007	0,85
7	13,645	0,008	0,018	0,94	0,008	0,97
8	15,380	0,011	0,027	1,28	0,011	1,33
9	16,237	0,013	0,026	1,53	0,013	1,57
10	23,345	0,003	0,018	0,39	0,003	0,36
11	26,383	0,006	0,034	0,73	0,006	0,73
12	26,874	0,003	0,022	0,39	0,003	0,36
13	29,926	0,006	0,053	0,73	0,006	0,73
					Σ 0,826	Σ 100,00

3.5.2.MS

Nach der Reinheitsprüfung der isolierten Substanzen wurde eine MS mit Direktinfusion mittels einer Ionenfalle mit Elektrosprayquelle durchgeführt. Dabei sollten die Molekulargewichte bestimmt und erste Strukturelemente der isolierten Substanzen aufgeklärt werden.

3.5.2.1. KP01

Das ESI-MS-Spektrum (siehe Abb. 32) zeigt im Negativ-Ionenmodus das $[M-H]^-$ Ion bei m/z 399,0, wodurch sich ein Molekulargewicht von 400,0 Da ergibt.

Im ESI-MS²-Spektrum des $[M-H]^-$ Ions bei m/z 399,0 kann man ein dominierendes Fragmentation bei m/z 235,9 erkennen. Daraus ergibt sich ein Verlust von -163 Da, was einem Hexosyl-Radikal entspricht.

Nach einer weiteren Fragmentierung dieses Fragmentions bei m/z 235,9 kann man im ESI-MS³-Spektrum den Verlust von -15 Da erkennen, der auf die Abspaltung eines Methylradikals ($CH_3^\cdot$) hinweist. Das ESI-MS³-Spektrum des resultierenden Fragmentions bei m/z 220,9 zeigt erneut den Neutralverlust einer $CH_3^\cdot$ -Gruppe.

Daraus ergibt sich, dass in der Struktur von KP01 eine Hexose und zwei aromatische Methoxygruppen vorkommen.

Im Positiv-Ionenmodus kann man das $[M+Na]^+$ Ion bei m/z 423,1 und das $[M+K]^+$ Ion bei m/z 439,1 erkennen. Es konnten keine weitere Strukturinformation gewonnen werden (Spektrum siehe Anhang: Abb. 110).

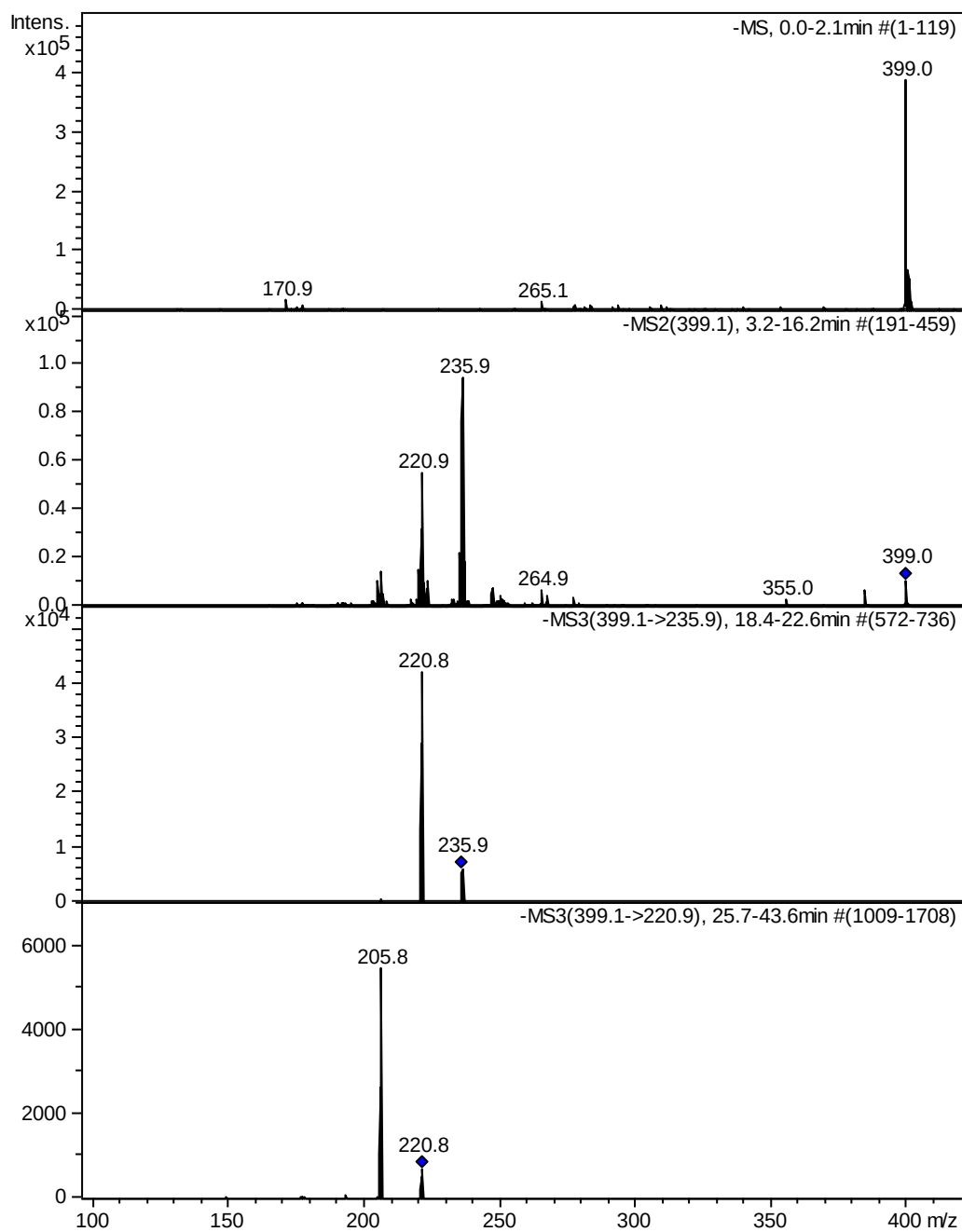


Abb. 32: ESI-MSⁿ Spektren des [M-H]⁻ Ions von KP01 bei m/z 399,0.

3.5.2.2. KP02

Das Massenspektrum von KP02 gleicht im Wesentlichen dem von KP01 (siehe Abb. 33). Es kommen also ebenfalls eine Hexose und zwei aromatische Methoxygruppen in der Struktur von KP02 vor.

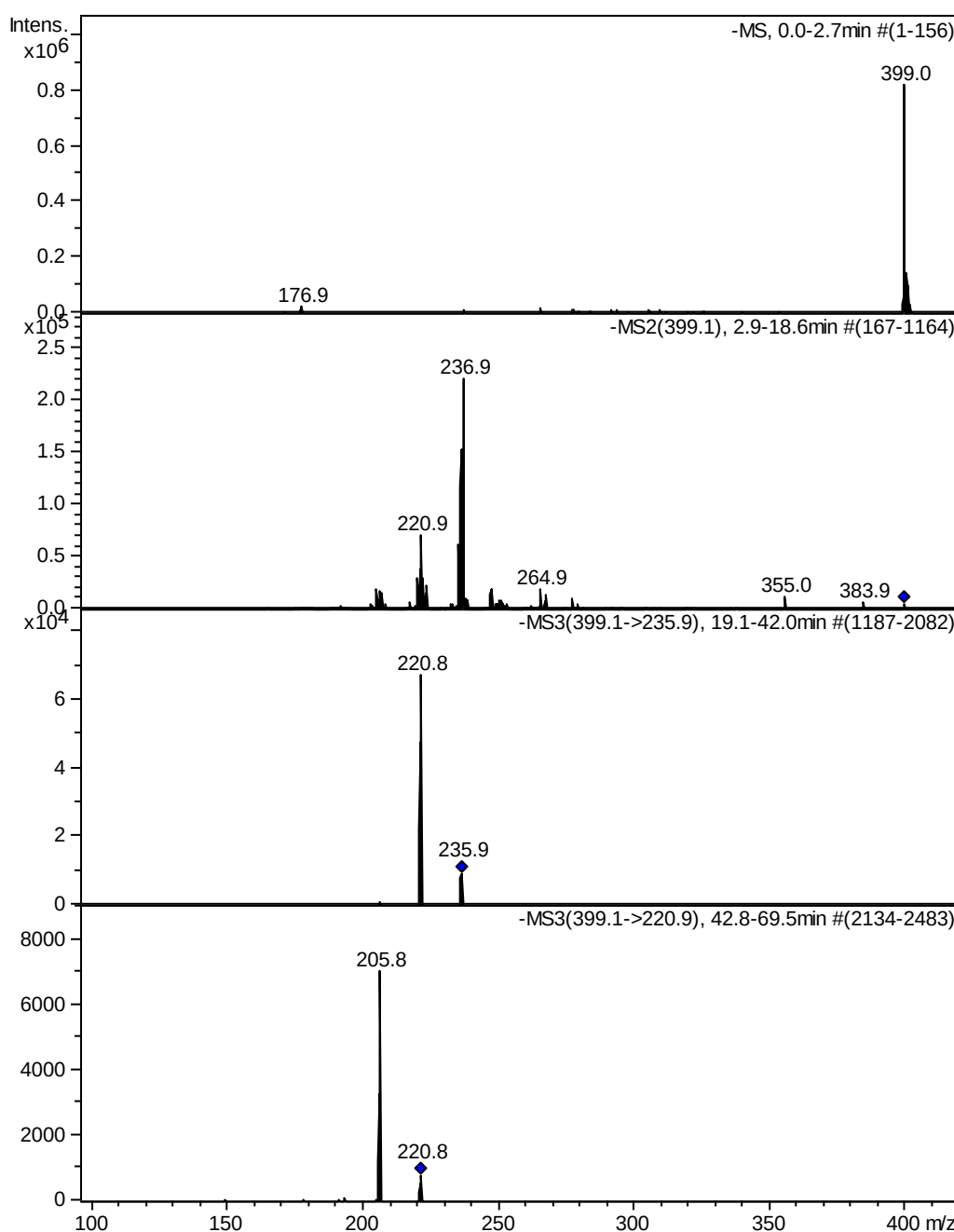


Abb. 33: ESI-MSⁿ Spektren des $[M-H]^-$ Ions von KP02 bei m/z 399.0.

Wie in der Abb. 34 ersichtlich ergaben sich allerdings bei der Abspaltung der Hexose Unterschiede. Bei KP01 entsteht hauptsächlich das Fragmention mit dem m/z von 235,9, das durch den Verlust des Hexosyl-Radikals ($C_6H_{11}O_5^\cdot$) gebildet wird.

Bei KP02 entsteht hauptsächlich das Fragmention bei m/z 236,9, was in diesem Fall einer Hexose nach Wasserverlust ($C_6H_{10}O_5$) entspricht. Es ist allerdings auch das durch die Abspaltung des Hexosyl-Radikals gebildete Fragmention bei m/z 235,9 ersichtlich.

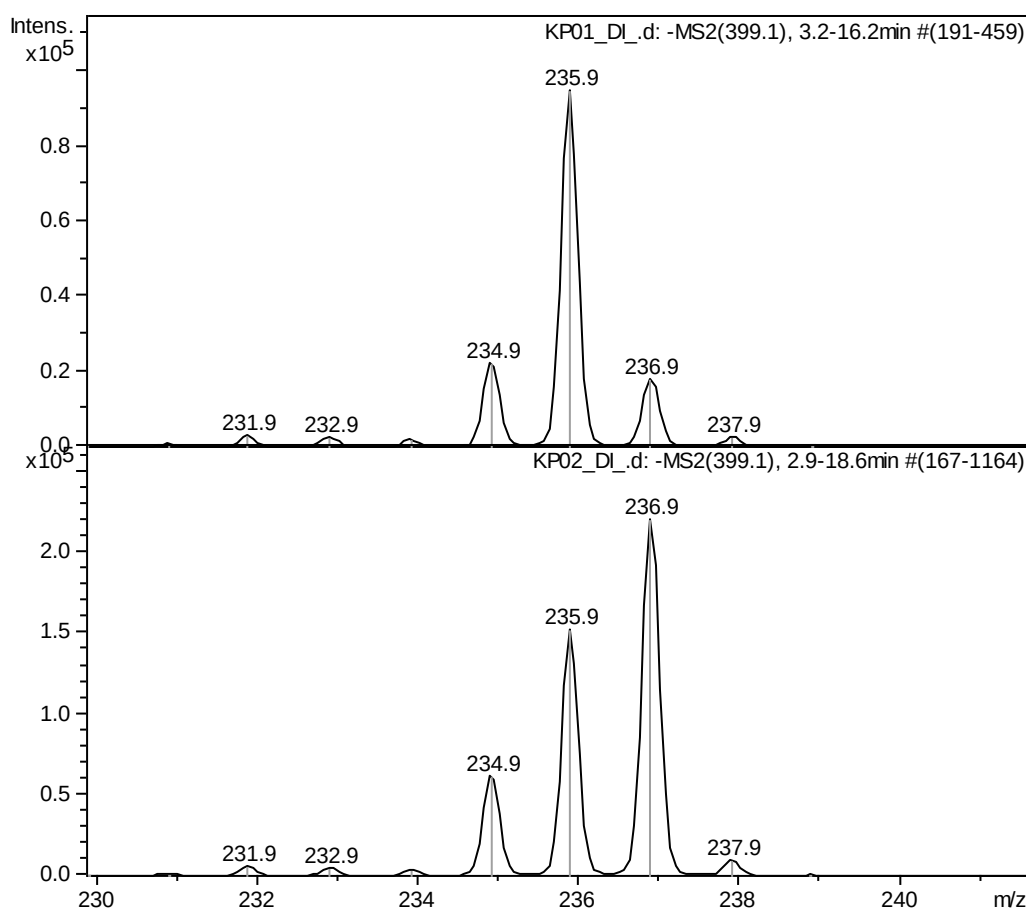


Abb. 34: Vergleich der durch den Neutralverlust der Hexosylgruppe entstehenden Fragmentionen der $[M-H]^-$ Ionen von KP01 und KP02.

Im Positiv-Ionenmodus kann man neben dem $[M+H]^+$ Ion bei m/z 401,1 auch das $[M+Na]^+$ Ion bei m/z 423,1 und das $[M+K]^+$ Ion bei m/z 439,1 erkennen. Es sind allerdings keine zusätzlichen strukturellen Informationen ableitbar (Spektrum siehe Anhang: Abb. 111).

3.5.2.3. KP03

Die von KP03 erhaltenen UV-Daten und DC-Ergebnisse wiesen auf die Grundstruktur eines Cumarins hin.

Im ESI-MS Spektrum von KP03 (siehe Abb. 35) kann man im Positiv-Ionenmodus das $[M+H]^+$ Ion bei m/z 179,0 und das $[M+Na]^+$ Ion bei m/z 201,0 erkennen. Dadurch ergibt sich ein Molekulargewicht von 178 Da. In Übereinstimmung mit Vergleichsdaten aus der Literatur kann angenommen werden, dass es sich aufgrund der vermuteten Grundstruktur eines Cumarins und des Molekulargewichts um ein Dihydroxycumarin handelt (Concannon et al., 2000; Yun et al., 2011; Li et al., 2012; Zhao et al., 2014).

Wie durch Zhao et al. (2014) beschrieben wird, kann man im ESI-MS² Spektrum des $[M+H]^+$ Ions bei m/z 179,0 signifikante Fragment-Ionen bei m/z 151 und 123 erkennen, die für einen aufeinanderfolgenden Verlust von zwei CO stehen (siehe Abb. 35). Außerdem sieht man noch ein $[M-CO-H_2O+H]^+$ Ion bei m/z 133. Anhand dieses Literaturvergleichs kann angenommen werden, dass es sich um ein 6,7-Dihydroxycumarin handelt (Zhao et al., 2014).

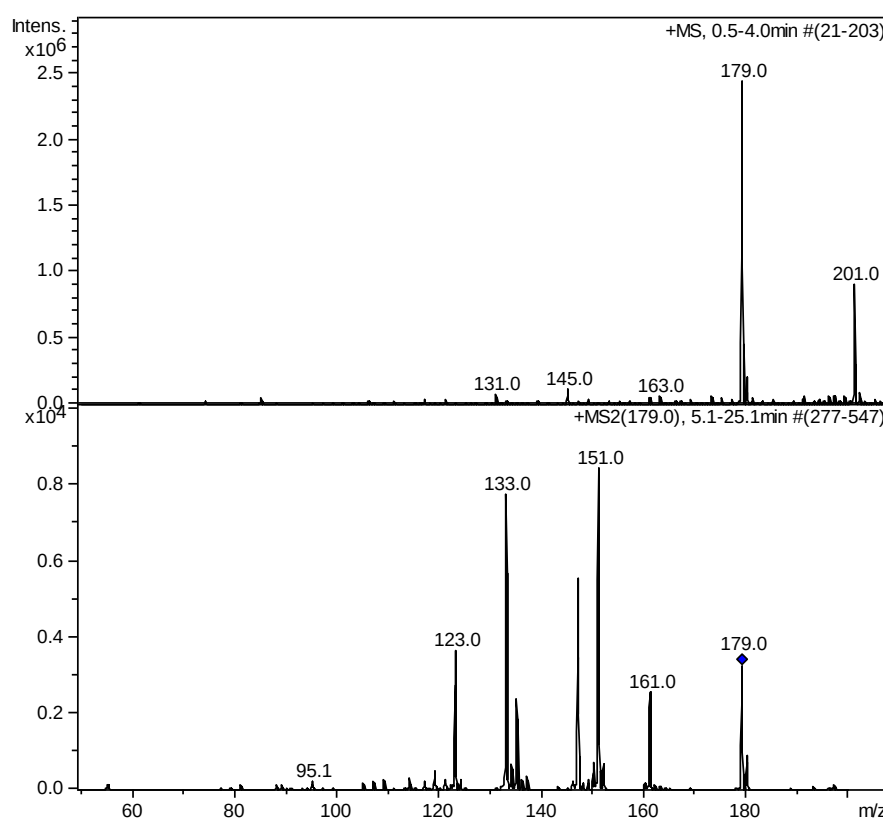


Abb. 35: ESI-MS Spektrum von KP03 und ESI-MS² Spektrum des $[M+H]^+$ Ions bei m/z 179,0.

Im Negativ-Ionenmodus (Spektrum siehe Anhang: Abb. 112) kann man das $[M-H]^-$ Ion bei m/z 176,8 erkennen. Das ESI-MS² Spektrum des $[M-H]^-$ bei m/z 176,8 zeigt ein sehr schwaches Fragmention bei m/z 132,9. Dies kann ebenfalls in der Literatur für 6,7-Dihydroxycumarine gefunden werden. Der Verlust von 44 Da entspricht dabei dem Abgang eines CO₂ (Li et al., 2012).

Eine Bestätigung der Annahme, dass es sich bei KP03 um ein 6,7-Dihydroxycumarin handelt, soll durch die NMR erfolgen.

Zur besseren Übersicht werden in der Tab. 28 die bisher gesammelten Daten der isolierten Substanzen KP01 - KP03 inklusive eines Strukturvorschlages zusammengefasst.

Tab. 28: Zusammenfassung der bisher gesammelten Daten der isolierten Substanzen KP01, KP02 und KP03.

	Ausbeute (mg)	Masse (Da)	Reinheit (CAD) (%)	Strukturvorschlag
KP01 313 nm	2,04	400	78,34 %	Aromatisches System mit 1x O-Hexosyl und 2x OCH ₃
KP02 308 nm	7,56	400	98,67 %	Aromatisches System mit 1x O-Hexosyl und 2x OCH ₃
KP03 Cumarin	4,41	178	90,31 %	Dihydroxycumarin

3.5.3.NMR

Im nächsten Schritt sollte die Struktur der isolierten Substanzen mittels NMR eindeutig aufgeklärt werden⁶. Die Strukturvorschläge der MS mit Direktinfusion wurden als Anhaltspunkte für die Interpretation der Spektren verwendet.

Da es sich bei KP03 um eine bereits bekannte Struktur handelt und sich herausstellte, dass die Verbindungen KP01 und KP02 ebenfalls ein Cumarin-Grundgerüst aufweisen, werden die NMR-Ergebnisse der Verbindung KP03 zuerst behandelt. Anschließend wird aufgrund der größeren isolierten Menge und der eindeutigeren Stellung der Substituenten die Verbindung KP02 charakterisiert. Abschließend folgt KP01.

⁶ Die NMR-Analysen und die Interpretation der NMR-Spektren wurden von Ao. Univ. Prof. Dr. Mag. pharm. Ernst Urban am Department für pharmazeutische Chemie der Universität Wien durchgeführt. Vielen Dank dafür!

3.5.3.1. KP03

Die Ergebnisse der MS führten zu der Annahme, dass es sich bei der Struktur von KP03 um ein 6,7-Dihydroxycumarin (Synonym: Esculetin) handelt. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde zusätzlich eine NMR-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die Substanz in Deuteromethanol (CD_3OD) gelöst und anschließend vermessen (Parameter siehe Tab. 20, Seite 44).

Im ^1H -NMR-Spektrum (siehe Abb. 36 und Anhang: Abb. 113) kann man vier Signale erkennen. Zwei Protonen koppeln miteinander, was durch zwei Duplett-Signale bei 7,78 ppm und 6,18 ppm ersichtlich ist. Dabei handelt es sich um H-4 und H-3, welche im Dihydroxycumarin benachbart sind und daher miteinander koppeln. Die stärkere chemische Verschiebung von H-4 lässt sich durch das Vinylogieprinzip erklären. Aufgrund der Doppelbindung von Position drei nach vier und der Carbonylgruppe in Position zwei verhält sich das Proton in Position vier wie ein Aldehyd-Proton.

Weiters sind noch zwei Singulett-Signale bei 6,94 ppm und 6,75 ppm zu erkennen. Das Signal bei 6,94 ppm entspricht dem H-5 und das Signal bei 6,75 ppm dem H-8. Bei der Zuordnung der Signale zu den Protonen wurden auch die COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren herangezogen (Anhang: Abb. 115 - 122).

Wie in Tab. 29 ersichtlich, ist die getroffene Zuordnung mit der Literatur konform (gelöst in CD_3OD : Chung et al., 2009; gelöst in DMSO-d_6 : Razdan et al., 1987; Yang et al., 2009; Lee et al., 2011).

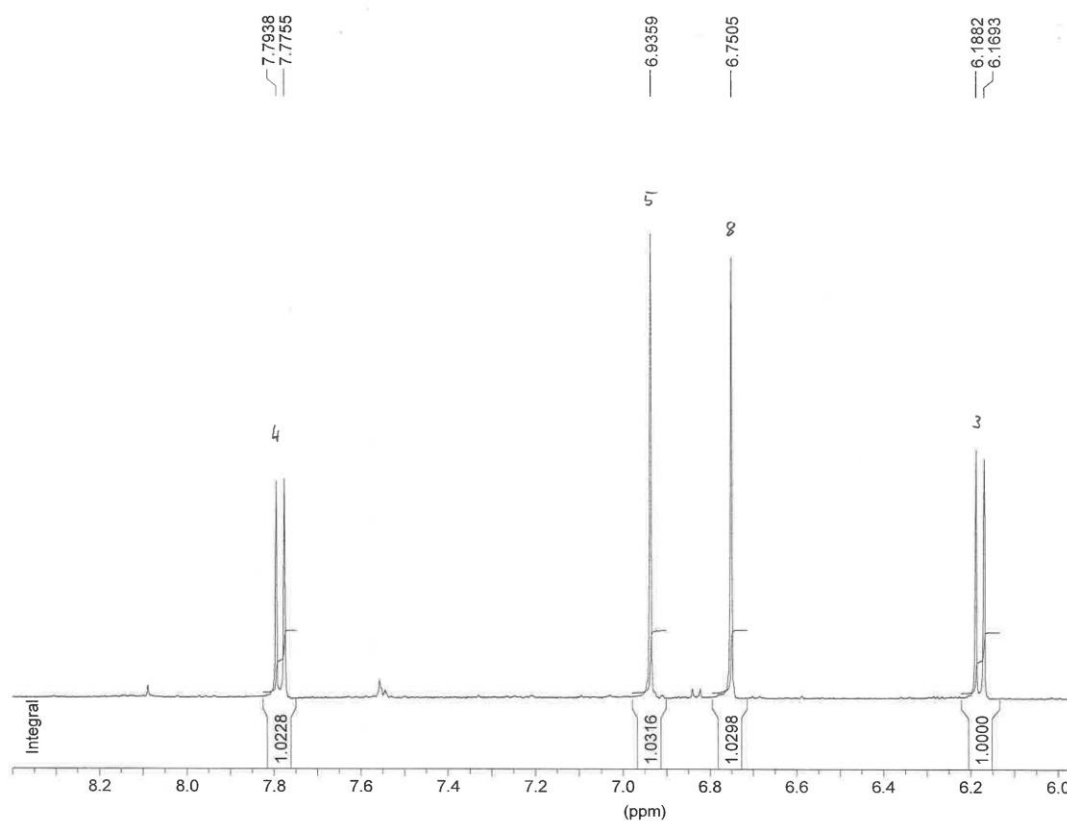


Abb. 36: Gezoomtes ^1H -NMR-Spektrum von KP03 in CD_3OD . Die Ziffern stehen für die Position der Protonen in der Verbindung.

Tab. 29: Auflistung der ^1H -NMR-Signale von KP03 im Vergleich zur Literatur.
ppm = parts per million, d= Dublett, s= Singulett

KP03 in CD_3OD		Esculetin in CD_3OD (Chung et al., 2009)		Esculetin in DMSO-d_6 (Razdan et al., 1987)	
Position	^1H (ppm)	Position	^1H (ppm)	Position	^1H (ppm)
2	--	2	--	2	--
3	6,18 (d)	3	6,18 (d)	3	6,14 (d)
4	7,78 (d)	4	7,78 (d)	4	7,84 (d)
4a	--	4a	--	4a	--
5	6,94 (s)	5	6,94 (s)	5	6,96 (s)
6	--	6	--	6	--
7	--	7	--	7	--
8	6,75 (s)	8	6,75 (s)	8	6,73 (s)
8a	--	8a	--	8a	--

Das ^{13}C -NMR-APT-Spektrum (siehe Abb. 37, Seite 85; Anhang: Abb. 114) wurde ebenfalls in Deuteromethanol aufgenommen. Es sind neun Signale zu erkennen. Das Carbonyl-Kohlenstoffatom (C-2) kann aufgrund der charakteristischen chemischen Verschiebung eindeutig bei 164,28 ppm identifiziert werden (Cussans und Huckerby, 1975b). Cussans und Huckerby (1975a) konnten durch single frequency off-resonance decoupling (SFORD) Experimente zeigen, welches Signal dem C-3 und welches Signal dem C-4 zugeordnet werden kann. Dabei wird zuerst eine Protonen-Off-Resonance-Entkopplung durchgeführt, bei welcher die unmittelbaren $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Kopplungen erhalten bleiben. Anschließend wird die Resonanzfrequenz des H-4 eingestrahlt, wodurch das Dublett des C-4 zu einem Singulett kollabiert (Rücker et al., 2008). Dadurch konnte das entsprechende Signal eindeutig dem C-4 zugeordnet werden. Das gleiche gilt für das C-3. Dieses Experiment ist nur dann durchführbar, wenn die Resonanzfrequenzen der entsprechenden Protonen eindeutig identifiziert wurden, was beim Cumarin der Fall ist (Cussans und Huckerby, 1975a).

Die SFORD-Experimente wurden im Laufe der Zeit durch bessere Methoden ersetzt. Daher erfolgte die Identifizierung von C-3 und C-4 in dieser Diplomarbeit durch einen Attached Proton Test (APT; siehe Abb. 37, Seite 85) und vor allem durch das hier sehr aussagekräftige HSQC-Experiment (Spektren siehe Anhang: Abb. 117 - 119). Das C-3 konnte basierend auf den Ergebnissen dieser Tests dem Signal bei 112,47 ppm und das C-4 dem Signal bei 146,08 ppm zugeordnet werden.

Hängt am carbocyclischen Ring eine OH-Gruppe, kommt es im Vergleich zu den Werten eines unsubstituierten Cumarins (Cussans und Huckerby, 1975a) ebenfalls zu charakteristischen chemischen Verschiebungen der C-Atome im Ring (Cussans und Huckerby, 1975b). Das entstandene quartäre C-Atom, an welchen die OH-Gruppe gebunden ist, erfährt eine Tieffeldverschiebung um ungefähr 30 ppm (Cussans und Huckerby, 1975b). In diesem Fall zeigt sich dieser Effekt wie vermutet beim C-6 (144,57 ppm) und beim C-7 (152,01 ppm). Bei jenen C-Atomen, die sich in ortho- oder para-Position zur OH-Gruppe befinden, kommt es zu einer Hochfeldverschiebung um 11-15 bzw. 7-10 ppm (Cussans und Huckerby, 1975b). Dies kann beim C-5 (112,98 ppm) und beim C-8 (103,6 ppm) beobachtet werden (siehe Tab. 30, Seite 84). Die C-Atome in metha-Position zur OH-Gruppe werden kaum beeinflusst (Cussans und Huckerby, 1975b).

Bei der Zuordnung der Signale zu den entsprechenden C-Atomen wurden auch die Ergebnisse der HSQC- und der HMBC-Experimente herangezogen. In der Tab. 30 sieht man den Vergleich der ^{13}C -NMR-Signale von Esculetin und von einem unsubstituiertem Cumarin.

Tab. 30: Vergleich der ^{13}C -NMR-Signale von Esculetin (Cussans und Huckerby, 1975b) und von einem unsubstituierten Cumarin (Cussans und Huckerby, 1975a).

Esculetin in DMSO- d_6 (Cussans und Huckerby, 1975b)		Cumarin in DMSO- d_6 (Cussans und Huckerby, 1975a)	
Position	^{13}C (ppm)	Position	^{13}C (ppm)
2	161,4	2	159,6
3	112,0	3	115,9
4	144,5	4	143,7
4a (=10)	111,4	4a (=10)	118,5
5	112,9	5	128,1
6	143,2	6	124,1
7	150,6	7	131,5
8	103,2	8	115,9
8a (=9)	149,1	8a (=9)	153,4

Zuletzt musste noch eine Zuordnung der zwei verbleibenden Signale zu C-4a (= C-10) und C-8a (= C-9) erfolgen. Der Carbonsäureester führt beim angrenzenden aromatischen C-Atom zu einer Tieffeldverschiebung von ca. 23 ppm in einem Benzolsystem. Der Einfluss einer Vinylgruppe ist wesentlich geringer (Cussans und Huckerby, 1975a). Daher konnte das C-4a dem Signal bei 112,78 ppm und das C-8a dem Signal bei 150,47 ppm zugeordnet werden.

Wie in Tab. 31 (Seite 85) ersichtlich, ist die getroffene Zuordnung mit der Literatur konform (gelöst in CDCl_3 : Razdan et al., 1987; gelöst in DMSO- d_6 : Cussans und Huckerby, 1975b; Lee et al., 2011; Yang et al., 2009).

Tab. 31: Auflistung der ^{13}C -NMR-Signale von KP03 im Vergleich zur Literatur. ppm= parts per million, CDCl_3 = Deuteriochloroform

KP03 in CD_3OD		Esculetin in CDCl_3 (Razdan et al., 1987)		Esculetin in DMSO-d_6 (Cussans und Huckerby, 1975b)	
Position	^{13}C (ppm)	Position	^{13}C (ppm)	Position	^{13}C (ppm)
2	164,28	2	160,4	2	161,4
3	112,47	3	112,4	3	112,0
4	146,08	4	143,5	4	144,5
4a	112,78	4a (=10)	112,4	4a (=10)	111,4
5	112,98	5	114,2	5	112,9
6	144,57	6	142,7	6	143,2
7	152,01	7	150,2	7	150,6
8	103,60	8	104,4	8	103,2
8a	150,47	8a (=9)	148,1	8a (=9)	149,1

KP03 Cumarin in Deuteromethanol (APT), 11.4.2014

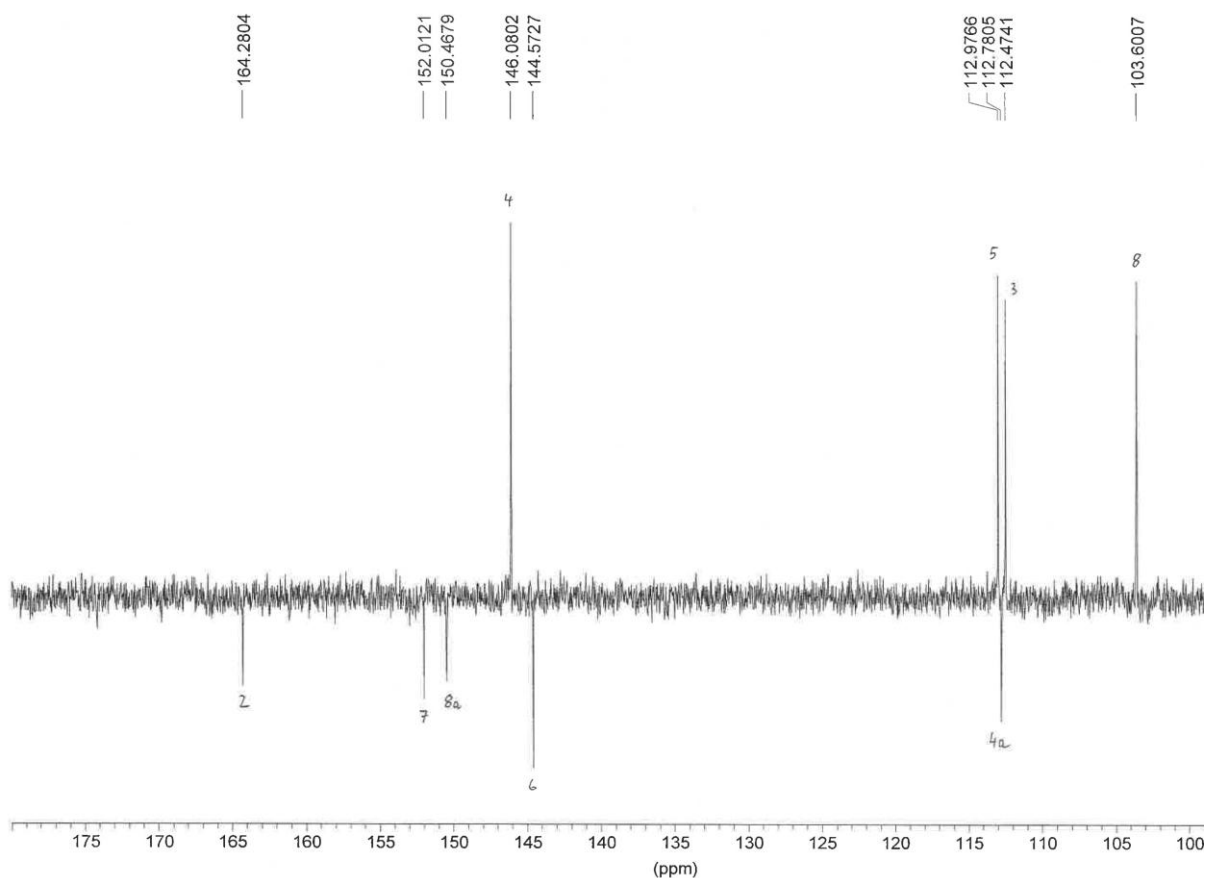


Abb. 37: Gezoomtes ^{13}C -NMR-APT-Spektrum von KP03 in CD_3OD . Die Ziffern stehen für die Position der Kohlenstoffe in der Verbindung.

Die Verbindung konnte daher eindeutig als 6,7-Dihydroxycumarin (= Esculetin) identifiziert werden (siehe Abb. 38).

Beim 6,7-Dihydroxycumarin handelt es sich um eine bekannte Hauptkomponente der Art *Viola yedoensis* Makino (Hong Kong Chinese Materia Medica Standards Volume 5, 2014).

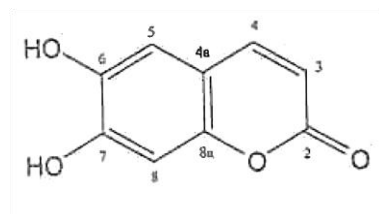


Abb. 38: 6,7-Dihydroxycumarin.

3.5.3.2. KP02

Die Ergebnisse der MS führten zu der Annahme, dass es sich bei der Struktur von KP02 um ein aromatisches System handelt, an welchem eine Hexose und zwei Methoxygruppen gebunden sind. Zur Bestätigung und Aufklärung der Struktur wurde eine NMR-Analyse durchgeführt (Parameter: Tab. 20, Seite 44).

Dabei ergab sich als Grundgerüst ein Cumarin, an welchem eine Hexose, zwei Methoxygruppen und eine Hydroxygruppe gebunden sind.

Das ^1H -NMR-Spektrum wurde in Deuteromethanol aufgenommen (siehe Abb. 39 und Anhang: Abb. 123 und 124). Wie bereits bei der Verbindung KP03 erklärt (siehe Punkt 3.5.3.1, Seite 81), sind auch hier zwei Dublett-Signale bei 6,29 ppm und bei 8,30 ppm zu erkennen. Dabei handelt es sich um sehr charakteristische Signale, die auf ein im Pyranring unsubstituiertes Cumarin hinweisen (Murray et al., 1982). Sie können den koppelnden Protonen in Position drei und vier zugeordnet werden.

Außerdem kann man zwei Singulett-Signale bei 3,93 ppm und bei 3,96 ppm erkennen. Aufgrund der chemischen Verschiebung und der Peakfläche können diese ^1H -NMR-Signale laut Murray et al. (1982) den Protonen zweier aromatischer Methoxygruppen zugeordnet werden. Diese Zuordnung kann durch eine im HSQC-Spektrum sichtbare Kopplung mit zwei C-Signalen bei 62,35 ppm und bei 61,80 ppm (siehe Abb. 40, Seite 88) bestätigt werden, da es sich hierbei um eine chemische Verschiebung eines Methylkohlenstoff in einer Methoxygruppe handelt (Rücker et al., 2008).

Um diese Signale nun der richtigen Position zuweisen zu können, kann das Ergebnis des NOESY-Spektrums herangezogen werden (siehe Abb. 47, Seite 97). Dort ist eine räumliche Nähe des H-1' der Hexose mit der OCH₃-Gruppe in Position sechs zu erkennen. Dadurch konnte das Signal bei 3,93 ppm der Methoxygruppe in Position sechs zugeordnet werden. Das Signal bei 3,96 ppm entspricht damit der zweiten Methoxygruppe, deren Position nicht eindeutig geklärt werden konnte. Eine mögliche Kreuzkorrelation der beiden Methoxygruppen im NOESY (siehe Abb. 48, Seite 97) liefert allerdings einen Hinweis, dass die Methoxygruppen benachbart sind.

Die restlichen ¹H-Signale entsprechen den Protonen der Hexose. Das Signal bei 4,80 ppm kann dabei nach Recherche in bestehender Literatur dem H-1' der Hexose zugeordnet werden (siehe Tab. 32, Seite 89). Die COSY-Spektren können dem Anhang entnommen werden (Anhang: Abb. 126-128).

Der Tab. 32 (Seite 89) sind die ¹H-NMR-Signale von KP02 im Vergleich zu einer ähnlichen Verbindung ersichtlich. Der Unterschied besteht darin, dass statt zwei Hydroxygruppen und zwei Methoxygruppen, in der einen Verbindung drei Hydroxygruppen und eine Methoxygruppe, und in der anderen Verbindung zwei Hydroxygruppen und eine Methoxygruppe vorkommen, wobei jeweils eine Hydroxygruppe in allen drei Strukturen mit einer Hexosylgruppe modifiziert ist.

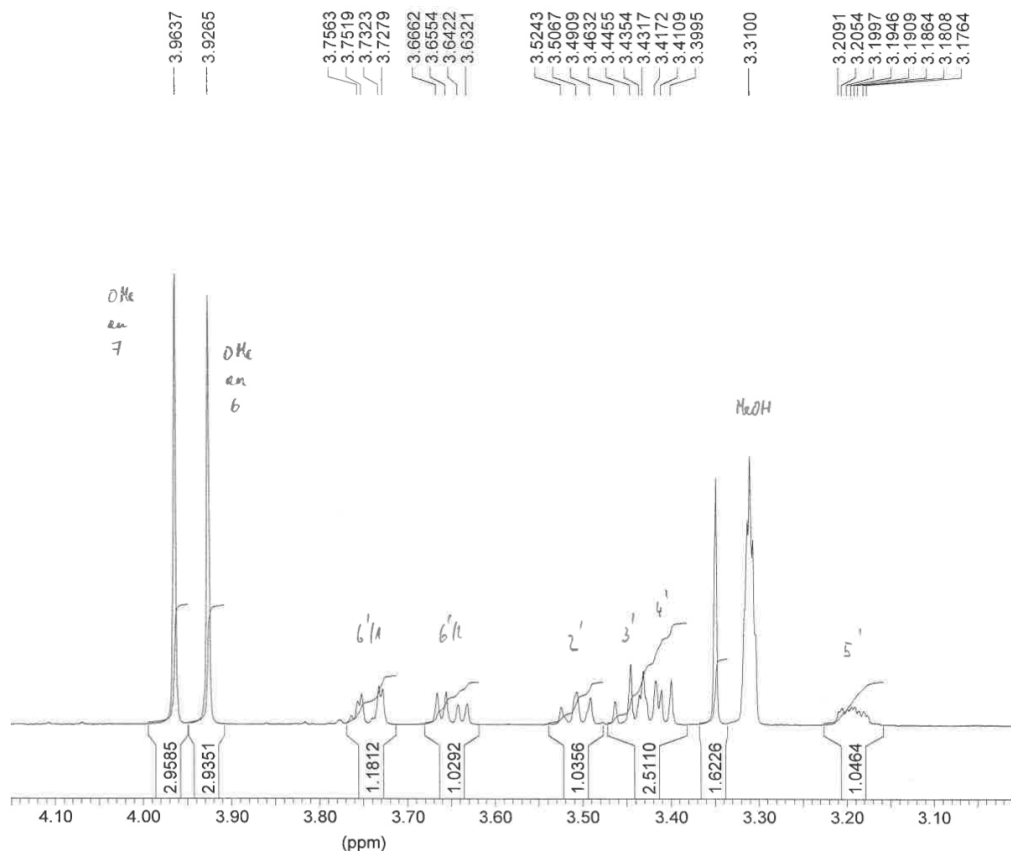


Abb. 39: Gezoomtes ^1H -NMR-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Die Ziffern stehen für die Position der Protonen in der Verbindung.

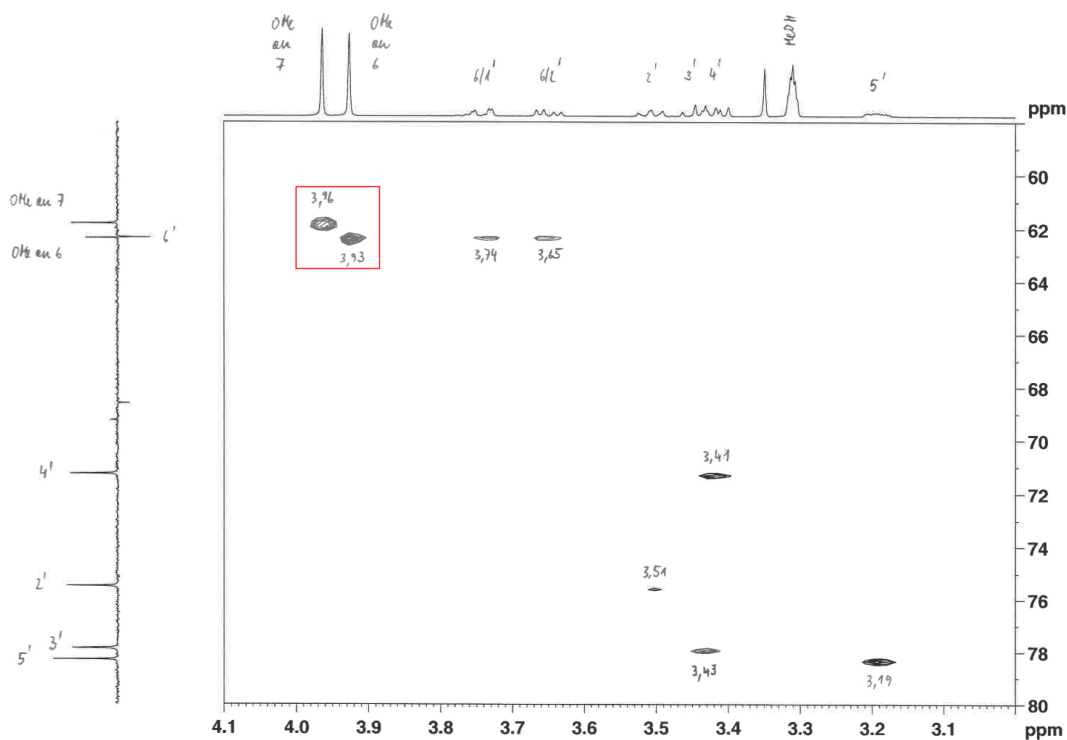


Abb. 40: Gezoomtes HSQC-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Rot eingerahmt sieht man die Kopplung der Methylkohlenstoffe der Methoxygruppen mit den daran gebundenen Protonen.

Tab. 32: Auflistung der ^1H -NMR-Signale von KP02 im Vergleich zur Literatur ähnlicher Verbindungen. ppm= parts per million, d= Dublett, s= Singulett,; *= Die ^1H -NMR-Signale des Zuckers der Vergleichsverbindung sind in der Studie nicht angegeben, da keine klaren Signale erhalten wurden.

KP02 in CD_3OD			7-methoxy-5,6,8-trihydroxycumarin-5- β -glucopyranosid in DMSO-d_6 (Jung et al., 1995)	5,8-dihydroxy-7-methoxycumarin-5- β -glucopyranosid in DMSO-d_6 (Jung et al., 1994)
Position		^1H (ppm)	^1H (ppm)	^1H (ppm)
2	C	--	--	--
3	CH	6,29 (d)	6,29 (d)	6,20 (d)
4	CH	8,30 (d)	8,29 (d)	8,22 (d)
4a	C	--	--	--
5	C	--	--	--
6	C	--	--	6,90
7	C	--	--	--
8	C	--	--	--
8a	C	--	--	--
1'	CH	4,87	*	4,80
2'	CH	3,51	*	*
3'	CH	3,43	*	*
4'	CH	3,41	*	*
5'	CH	3,19	*	*
6'	CH_2	3,74/3,65	*	*
OMe an 6	CH_3	3,93	--	--
OMe an 7	CH_3	3,96	3,80	3,85

Das ^{13}C -NMR-APT-Spektrum wurde ebenfalls in Deuteromethanol aufgenommen. Es sind 17 Signale zu erkennen, wobei acht quartäre bzw. sekundäre C-Atome und neun primäre bzw. tertiäre C-Atome abgelesen werden können (siehe Abb. 41 bis Abb. 43, Seite 93 bis 94 und Anhang: Abb. 125).

Von den neun primären bzw. tertiären C-Atomen liegen zwei C-Atome im hohen Feld bei 142,59/142,39 (d) ppm bzw. bei 114,43 ppm. Diese Werte sind vergleichbar mit den C-Atomen in Position vier und drei von KP03. Zusätzlich kann im HSQC-Spektrum eine Kopplung des Signals bei 142,59/142,39 (d) ppm mit

dem Signal des H-4 und eine Kopplung des Signals bei 114,43 ppm mit dem Signal des H-3 (siehe Abb. 44, Seite 94) gesehen werden. Das Signal bei 142,59/142,39 ppm kann also dem C-4 und das Signal bei 114,43 ppm dem C-3 zugeordnet werden. Diese Zuordnung ist mit der Literatur konform (Cussans and Huckerby, 1975b; Jung et al., 1995; Murray et al., 1982).

Das nächste Signal auf der Seite der primären bzw. tertiären C-Atome befindet sich bei 106,13 ppm. Nach Vergleich mit der Literatur (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994; Markham et al., 1982; siehe auch Tab. 34, Seite 98) handelt es sich hierbei um das C-1' der Hexose. Anschließend folgen vier Signale von 71-78 ppm, welche ebenfalls durch den oben erwähnten Literaturvergleich den C-2'-C-5' der Hexose zugeordnet werden können. Die beiden verbleibenden Signale weisen aufgrund der chemischen Verschiebung auf den Methylenkohlenstoff in einer Methoxygruppe hin (Rücker et al., 2008). Wie bereits anhand der ^1H -NMR- und HSQC-Spektren erklärt, kann das Signal bei 62,35 ppm eindeutig der Methoxygruppe in der Position sechs zugeordnet werden. Das Signal bei 61,80 ppm entspricht dem Methylenkohlenstoff der Methoxygruppe, welche höchstwahrscheinlich am C-7 gebunden ist.

Auf der Seite der quartären bzw. sekundären C-Atome sind acht Signale zu erkennen. Das erste Signal mit der höchsten Tieffeldverschiebung bei 162,78 ppm kann, wie bei KP03 bereits erklärt, eindeutig dem C-2 zugeordnet werden. Diese Zuordnung entspricht der Literatur (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994; Cussans and Huckerby, 1975b).

Das Signal bei 139,41 ppm konnte aufgrund des HMBC-Spektrums (siehe Abb. 45, Seite 95), in welchem eine Kopplung vom C-5 sowohl zum H-1' als auch zum H-4 zu erkennen ist, dem C-5 zugeordnet werden.

Die Zuordnung der Signale bei 144,16 ppm und bei 146,36 ppm erfolgte aufgrund von logischen Schlussfolgerungen. Zunächst kann im NOESY-Spektrum (siehe Abb. 47, Seite 97) eine räumliche Nähe des H-1' der Hexose zu den Protonen der OCH_3 -Gruppe am C-6 beobachtet werden. Außerdem ist im HMBC-Spektrum (siehe Anhang: Abb. 133) eine Kopplung des Signals bei 144,16 ppm mit derselben OCH_3 -Gruppe zu sehen. Daher kann dieses Signal bei 144,16 ppm dem

C-6 zugeordnet werden. In diesem HMBC-Spektrum ist ebenfalls eine Kopplung des Signals bei 146,36 ppm mit der OCH₃-Gruppe in Position sieben zu erkennen, wodurch dieses Signal dem C-7 zugeordnet werden kann. Zusätzlich können die chemische Verschiebung der Methoxygruppe und die ortho-, metha- und para-Einflüsse der anderen Substituenten (Rücker et al., 2008; Murray et al., 1982) eine Unterstützung bei der Zuordnung darstellen.

Vergleichbar mit KP03 (siehe 3.5.3.1) entspricht das Signal bei 140,6 ppm dem C-8a (= C-9) und das Signal bei 112,4 ppm dem C-4a (= C-10). Bestätigt wird dies auch durch das HMBC-Spektrum, wo eine Kopplung des C-4a mit dem H-3 (siehe Anhang: Abb. 131) und eine Kopplung des C-8a mit dem H-4 (siehe Abb. 45) zu sehen ist. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Literatur (Jung et al., 1995).

Das Signal bei 62,32 ppm entspricht aufgrund der chemischen Verschiebung dem C-6' der Hexose (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994; Markham et al., 1982; Cussans and Huckerby, 1975b).

Das noch verbleibende Signal bei 136,79 ppm kann somit dem C-8 zugeordnet werden. Hierbei kann eine Berücksichtigung der chemischen Verschiebung durch eine direkte OH-Bindung und die jeweiligen ortho-, metha- und para-Einflüsse der Methoxy- und Hydroxygruppen (Rücker et al., 2008; Murray et al., 1982) eine Unterstützung bei der Zuordnung bieten.

Bei der Zuordnung der Signale halfen zusätzlich die HSQC- und HMBC-Spektren (siehe Anhang: Abb. 129-133).

In der Tab. 33 (Seite 92) ist eine Auflistung der ¹³C-NMR-APT-Signale von KP02 im Vergleich zu in der Literatur angeführten ähnlichen Verbindungen zu finden. Der Unterschied besteht darin, dass statt zwei Hydroxygruppen und zwei Methoxygruppen, in der einen Verbindung drei Hydroxygruppen und eine Methoxygruppe, und in der anderen Verbindung zwei Hydroxygruppen und eine Methoxygruppe vorkommen, wobei jeweils eine Hydroxygruppe in allen drei Strukturen mit einer Hexosylgruppe modifiziert ist.

Tab. 33: Auflistung der ^{13}C -NMR-Signale von KP02 im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen ähnlichen Verbindungen. ppm = parts per million, d= Dublett, s= Singulett;

KP02 in CD_3OD			7-methoxy-5,6,8-trihydroxycumarin-5- β -glucopyranosid in DMSO-d_6 (Jung et al., 1995)	5,8-dihydroxy-7-methoxycumarin-5- β -glucopyranosid in DMSO-d_6 (Jung et al., 1994)
Position		^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)
2	C	162,78	159,9	160,1
3	CH	114,43	114,0	110,9
4	CH	142,59/142,39	140,2	139,6
4a	C	112,40	110,0	104,3
5	C	139,41	133,0	146,6
6	C	144,16	135,5	97,3
7	C	146,36	140,1	151,3
8	C	136,79	133,0	128,4
8a	C	140,60	135,9	142,7
1'	CH	106,13	106,5	102,3
2'	CH	75,47	73,8	73,2
3'	CH	77,85	76,0	76,4
4'	CH	71,24	69,6	70,1
5'	CH	78,28	77,3	77,3
6'	CH_2	62,32	60,7	60,9
OMe an 6	CH_3	62,35	--	--
OMe an 7	CH_3	61,80	60,4	56,1

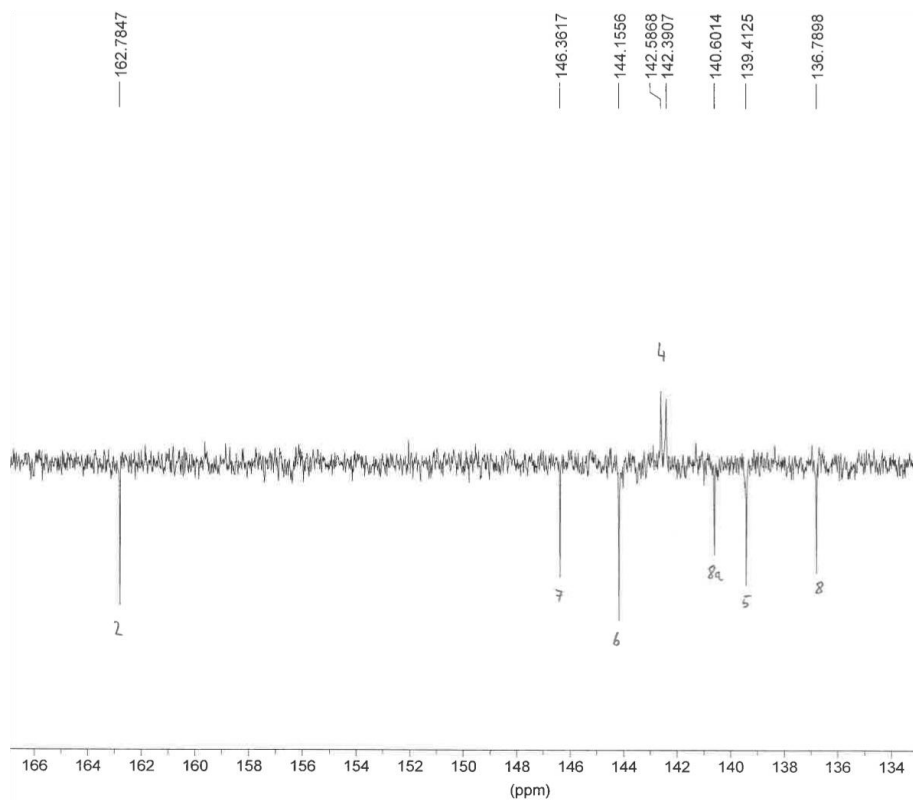


Abb. 41: Gezoomtes ^{13}C -NMR-APT-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Die Ziffern stehen für die Position der Kohlenstoffe in der Verbindung.

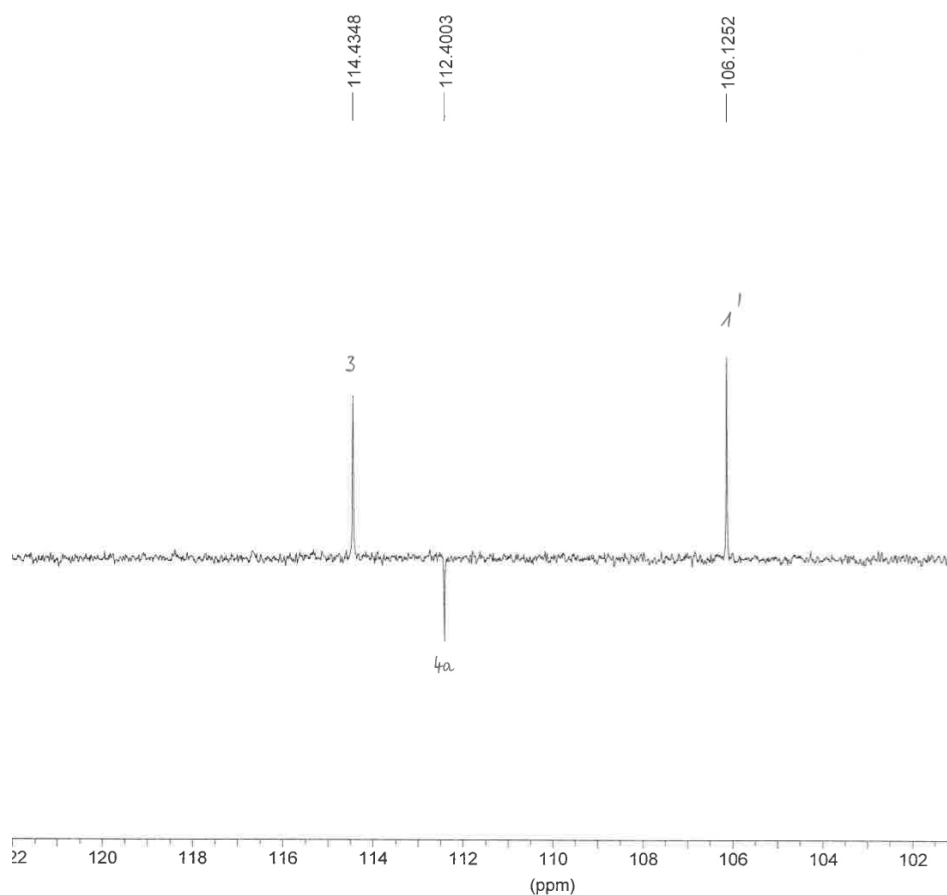


Abb. 42: Gezoomtes ^{13}C -NMR-APT-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Die Ziffern stehen für die Position der Kohlenstoffe in der Verbindung.

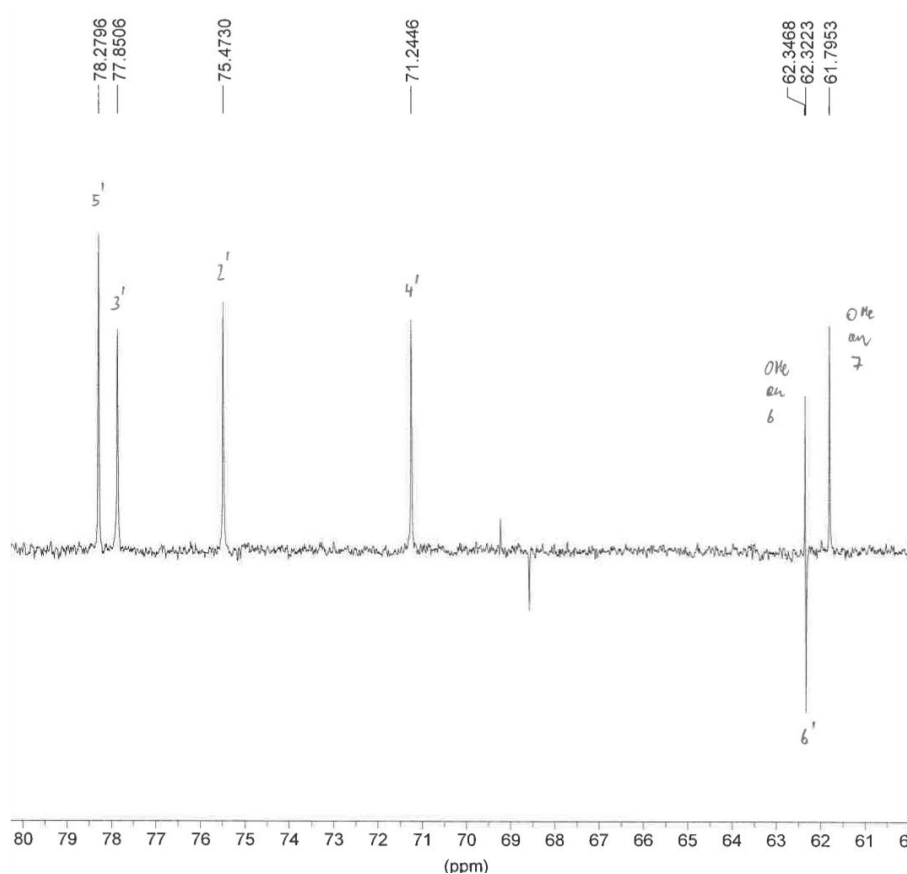


Abb. 43: Gezoomtes ^{13}C -NMR-APT-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Die Ziffern stehen für die Position der Kohlenstoffe in der Verbindung.

KP002_308 in Deuteromethanol (HSQC neu), 10.4.201408

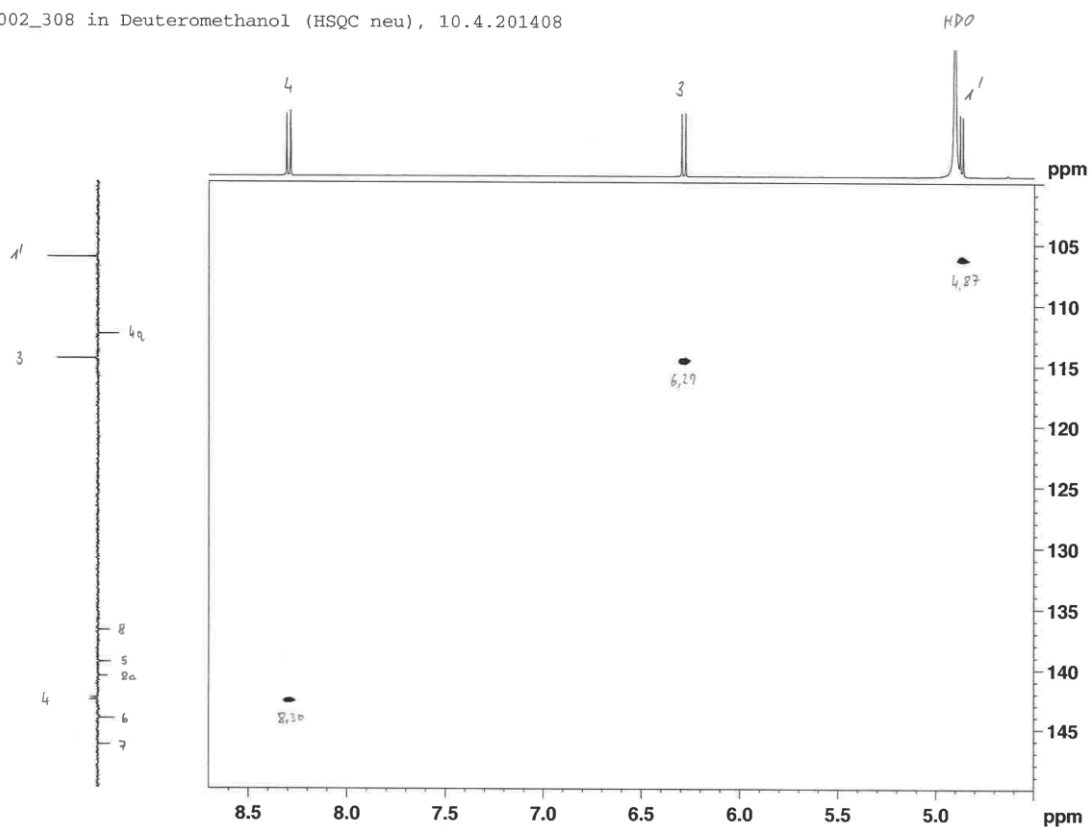


Abb. 44: Gezoomtes HSQC-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Ersichtlich ist unter anderem die Kopplung von C-3 mit H-3 und C-4 mit H-4.

Bei KP02 konnte die Position der Hexose durch das HMBC-Experiment (siehe Abb. 45) eindeutig bestätigt werden. Es ist eine Kopplung vom C-5 sowohl zum H-1' als auch zum H-4 zu erkennen. Zusätzlich kann aus dem NOESY-Spektrum eine räumliche Nähe des H-4 zum H-1' und zum H-2' abgeleitet werden (siehe Abb. 46, Seite 96). Daraus ergibt sich, dass die Hexose an die in Position fünf befindliche OH-Gruppe des Cumarin-Grundgerüsts O-glykosidisch gebunden ist.

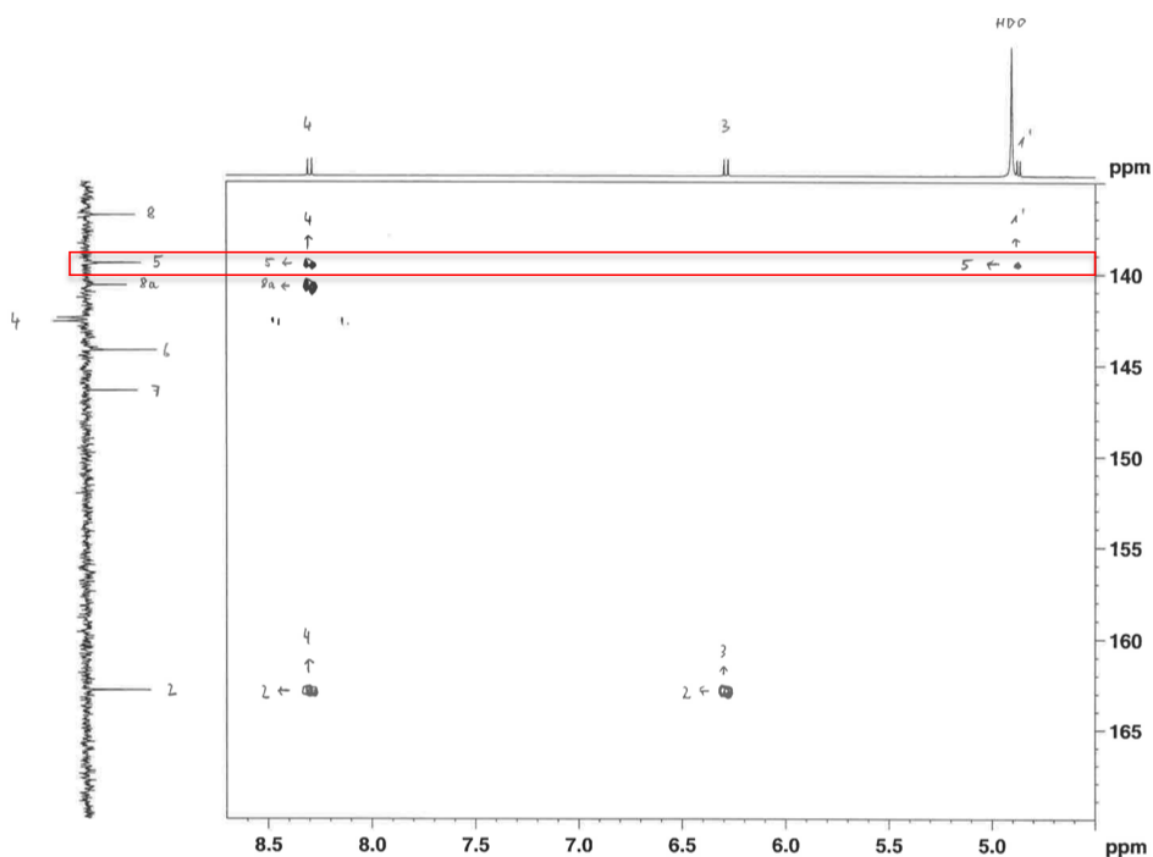


Abb. 45: Gezoomtes HMBC-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Rot eingerahmt sieht man die Kopplung von C-5 zum H-1' und zum H-4.

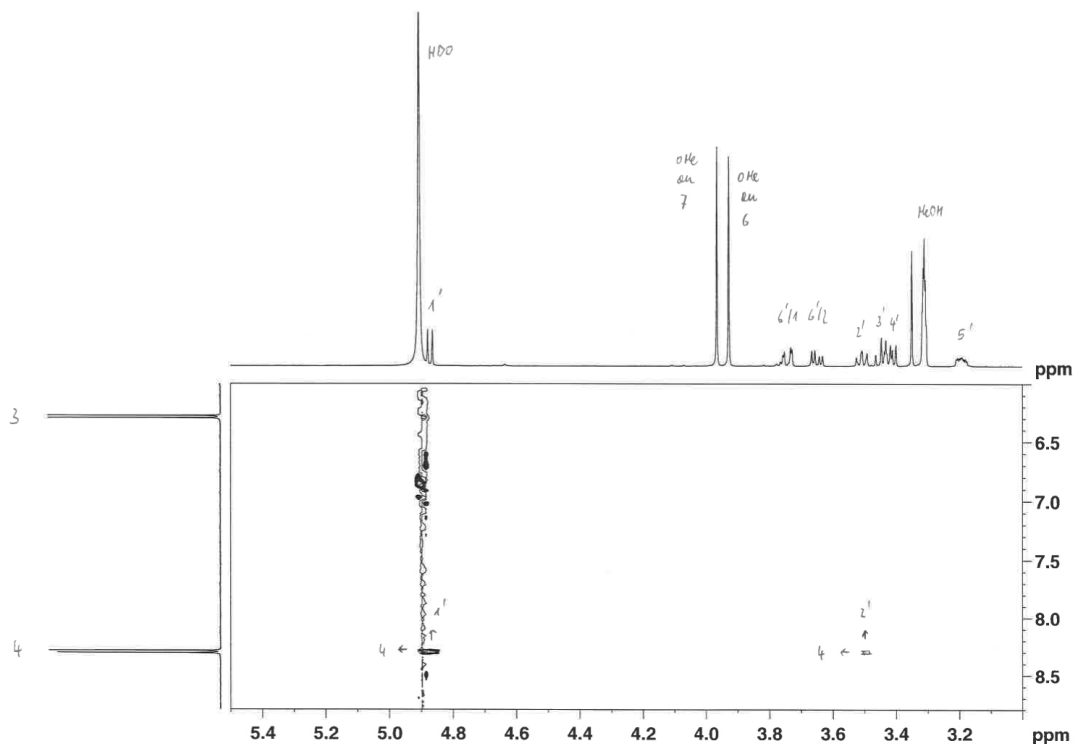


Abb. 46: Gezoomtes NOESY-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Zu erkennen ist die räumliche Nähe von H-4 zu H-1' und H-2'.

Die Stellungen der Methoxygruppen (OCH_3 -Gruppe) und der unmodifizierten Hydroxygruppe konnten nicht eindeutig bewiesen werden. Im NOESY-Spektrum ist allerdings eine räumliche Nähe des H-1' mit der OCH_3 -Gruppe in Position sechs zu erkennen (siehe Abb. 47, Seite 97). Dadurch lässt sich ableiten, dass eine der beiden Methoxygruppen an der Position sechs gebunden ist. Die zweite Methoxy-Gruppe könnte entweder die Position sieben oder acht einnehmen. Ein eindeutiger Beweis für die eine oder andere Variante liegt hier nicht vor. Es gibt allerdings im NOESY den schwachen Hinweis darauf, dass die beiden Methoxygruppen benachbart sind (siehe Abb. 48, Seite 97).

Zum eindeutigen Beweis der Stellungen der beiden Methoxy- und der Hydroxygruppe, sollte die Substanz in einem zusätzlichen Experiment in $\text{DMSO}-d_6$ gelöst und vermessen werden. Durch die Verwendung eines nicht-protischen Lösungsmittels wurde versucht, den Proton/Deuterium (H/D)-Austausch der phenolischen OH-Gruppe zu verhindern und diese somit sichtbar zu machen und ihre Position zu bestätigen. Da bei diesem Experiment zuerst KP01 vermessen wurde und wider den Erwartungen die phenolische OH-Gruppe nicht sichtbar gemacht werden konnte, wurde das Experiment für KP02 nicht durchgeführt.

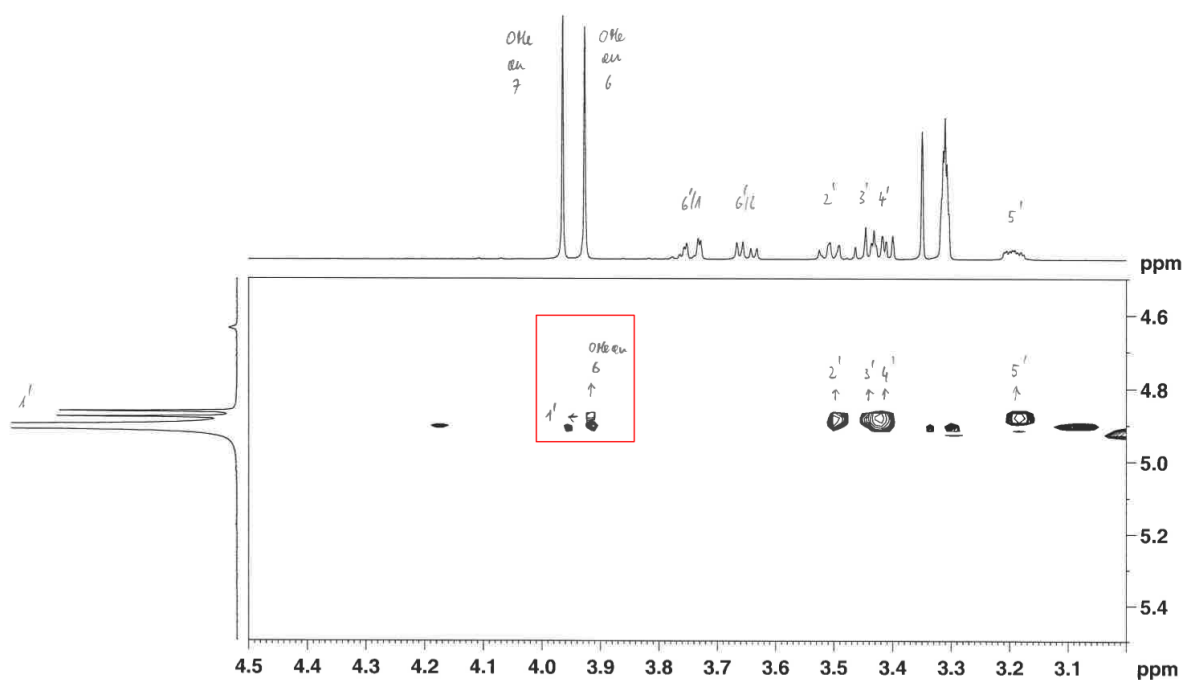


Abb. 47: Gezoomtes NOESY-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Rot eingerahmt sieht man den Hinweis auf die räumliche Nähe von H-1' zum OCH_3 an Position sechs.

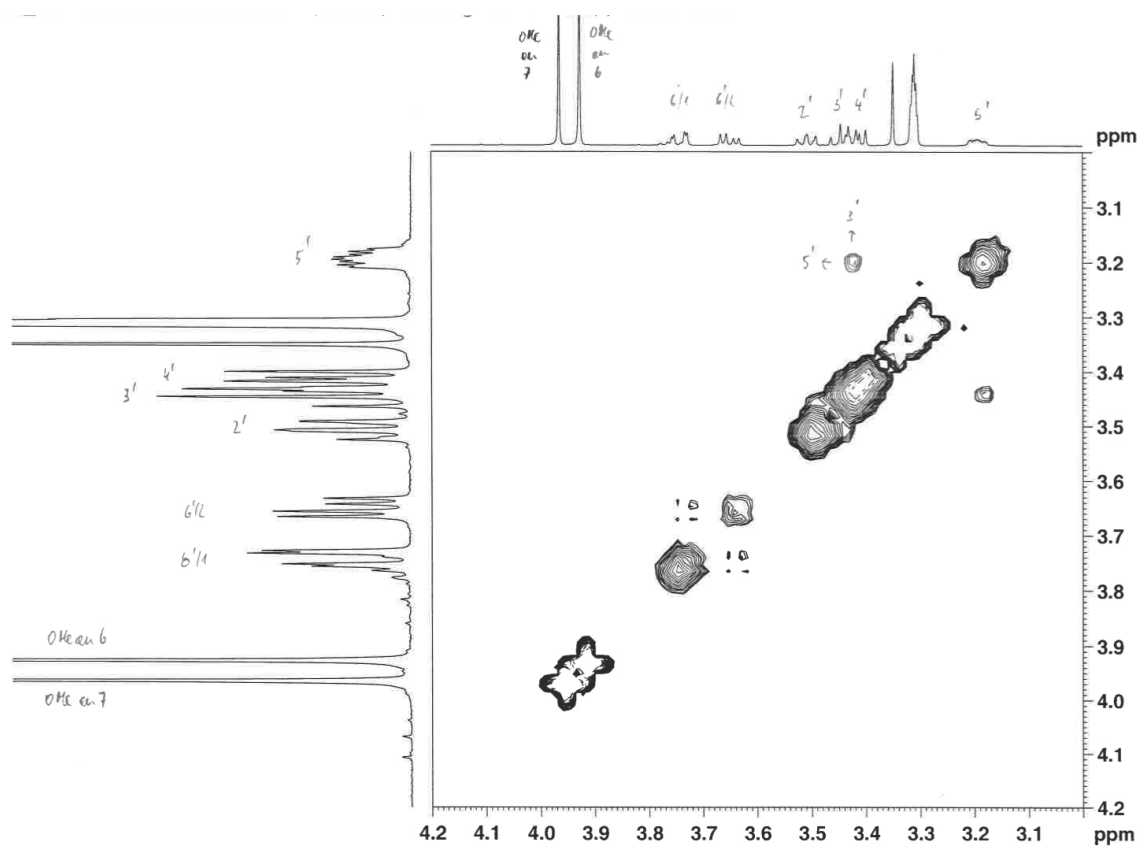


Abb. 48: Gezoomtes NOESY-Spektrum von KP02 in CD_3OD . Die mögliche Kreuzkorrelation zwischen den beiden Methoxygruppen liefert einen Hinweis, dass die beiden Methoxygruppen benachbart sind.

Zur Charakterisierung des Zuckers in Position fünf wurde ein in der Tab. 34 ersichtlicher Literaturvergleich durchgeführt. Dieser ergab, dass es sich bei der Hexose um ein β -D-Glucopyranosid handeln könnte (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994; Markham et al., 1982).

Tab. 34: ^{13}C -NMR-Ergebnisse der Hexose von KP02 im Vergleich zur Literatur. Jung et al. (1995) und Jung et al. (1994) beschrieben die Strukturen von Cumaringlykosiden. Markham et al. (1982) zeigten die verschiedenen chemischen Verschiebungen von Methylglykosiden.

		Hexose von KP02 in CD_3OD	5- β -Glucopyranosid in DMSO-d_6 (Jung et al., 1995)	5- β -Glucopyranosid in DMSO-d_6 (Jung et al., 1994)	β -D-Glucopyranosid in D_2O (Markham et al., 1982)
Pos.		^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)
1'	CH	106,13	106,5	102,3	104,3
2'	CH	75,47	73,8	73,2	74,2
3'	CH	77,85	76,0	76,4	76,9
4'	CH	71,24	69,6	70,1	70,8
5'	CH	78,28	77,3	77,3	76,9
6'	CH_2	62,32	60,7	60,9	61,9

Bei der Struktur von KP02 handelt es sich zusammenfassend höchstwahrscheinlich um ein 5,8-dihydroxy-6,7-dimethoxycumarin-5- β -glucopyranosid (siehe Abb. 49). Gesichert sind dabei das Grundgerüst eines Cumarins, die Position des Zuckers und damit auch die Position der OH-Gruppe in fünf und die Methoxygruppe in Position sechs.

Ein Literaturvergleich hat ergeben, dass es sich bei KP02 - unabhängig von der genauen Anordnung der fraglichen Substituenten - um eine neue Verbindung handelt.

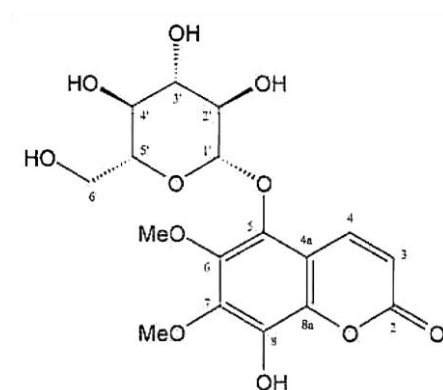


Abb. 49: Strukturformel von KP02.

3.5.3.1. KP01

Die Ergebnisse der MS führten zu der Annahme, dass es sich wie bei der Struktur von KP01 um ein aromatisches System handelt, an welches eine Hexose und zwei Methoxygruppen gebunden sind.

Zur Bestätigung und Aufklärung der Struktur wurde eine NMR-Analyse durchgeführt (Parameter: Tab. 20, Seite 44). Dabei ergab sich wie bei KP02 als Grundgerüst ein Cumarin, an welches eine Hexose, zwei Methoxygruppen und eine Hydroxygruppe gebunden sind. Die Struktur von KP01 ist daher mit der von KP02 vergleichbar. Unterschiede ergeben sich nur in der Stellung der Substituenten.

Das ^1H -NMR-Spektrum wurde in Deuteromethanol aufgenommen (siehe Anhang: Abb. 135 - 137). Zu sehen sind hier wieder die beiden charakteristischen Dubletts bei 6,24 ppm und 8,16 ppm, die wie bereits erwähnt, auf ein im Pyranring unsubstituiertes Cumarin hinweisen (Murray et al., 1982). Das Dublett bei 6,24 ppm kann dem H-3 und das Dublett bei 8,16 ppm dem H-4 zugeordnet werden.

Außerdem kann man wie bei KP02 zwei Singulett-Signale bei 3,83 ppm und bei 4,04 ppm beobachten. Laut Murray et al. (1982) entsprechen diese beiden Signale den Protonen einer aromatischen Methoxygruppe. Vergleichbar mit KP02 kann auch hier im HSQC-Spektrum eine Kopplung mit zwei C-Signalen bei 62,26 ppm und bei 61,72 ppm beobachtet werden (Anhang: Abb. 148), die, wie bereits erklärt, auf einen Methylkohlenstoff in einer Methoxygruppe hinweisen und damit die Zuordnung bestätigen (Rücker et al., 2008). Die Bestimmung der exakten Position erweist sich hier schwieriger. Anhand der HMBC-Korrelationen (Abb. 50, Seite 104) kann das Signal bei 4,04 ppm (DMSO- d_6 : 3,92 ppm) der Methoxygruppe in Position sechs und das Signal bei 3,83 ppm (DMSO- d_6 : 3,72 ppm) der Methoxygruppe in Position sieben zugeordnet werden. Eine eindeutige Bestätigung dieser Zuordnung konnte allerdings nicht erreicht werden. Es gibt im NOESY-Spektrum allerdings einen recht klaren Hinweis, dass die Methoxygruppen benachbart sind (siehe Abb. 51, Seite 105).

Die verbleibenden Signale entsprechen den Protonen der Hexose. Das Signal bei 5,02 ppm (DMSO- d_6 : 4,91 ppm) kann nach Recherche in bestehender Literatur dem H-1' zugeordnet werden (siehe Tab. 35, Seite 100).

Laut Kayser und Kolodziej (1995) deutet das Fehlen der ^1H -NMR-Signale anderer aromatischer Protonen auf eine 5,6,7,8-Tetraoxygenierung des Cumarin-grundgerüsts hin.

Die COSY-Spektren können dem Anhang (Abb. 142-144) entnommen werden.

Der Tab. 35 sind die ^1H -NMR-Signale von KP01 im Vergleich zu ähnlichen Verbindungen ersichtlich. Der Unterschied besteht darin, dass statt zwei Hydroxygruppen und zwei Methoxygruppen, in der einen Verbindung drei Hydroxygruppen und eine Methoxygruppe, und in der anderen Verbindung zwei Hydroxygruppen und eine Methoxygruppe vorkommen, wobei jeweils eine Hydroxygruppe in allen drei Strukturen mit einer Hexosylgruppe modifiziert ist.

Tab. 35: Auflistung der ^1H -NMR-Signale von KP01 im Vergleich zur Literatur ähnlicher Verbindungen. ppm = parts per million, d= Dublett; *= Die ^1H -NMR-Signale des Zuckers der Vergleichsverbindung sind in der Studie nicht angegeben, da keine klaren Signale erhalten wurden.

KP01				KP02	Literatur 1 ⁷	Literatur 2 ⁸
Position		^1H (ppm) in CD_3OD	^1H (ppm) in $\text{DMSO}-d_6$	^1H (ppm) in CD_3OD	^1H (ppm)	^1H (ppm)
2	C	--	--		--	--
3	CH	6,24 (d)	6,23 (d)	6,29 (d)	6,29 (d)	6,20 (d)
4	CH	8,16 (d)	8,06 (d)	8,30 (d)	8,29 (d)	8,22 (d)
4a	C	--	--		--	--
5	C	--	--		--	--
6	C	--	--		--	6,90
7	C	--	--		--	--
8	C	--	--		--	--
8a	C	--	--		--	--
1'	CH	5,02	4,91	4,87	*	4,80
2'	CH	3,51	3,24	3,51	*	*
3'	CH	3,41	3,21	3,43	*	*
4'	CH	3,46	3,11	3,41	*	*
5'	CH	3,23	3,05	3,19	*	*
6'	CH_2	3,77/3,64	3,58/3,37	3,74/3,65	*	*
OMe an 6	CH_3	4,04	3,92	3,93	--	--
OMe an 7	CH_3	3,83	3,72	3,96	3,80	3,85

⁷ 7-methoxy-5,6,8-trihydroxycumarin-5- β -glucopyranosid in $\text{DMSO}-d_6$ (Jung et al., 1995)

⁸ 5,8-dihydroxy-7-methoxycumarin-5- β -glucopyranosid in $\text{DMSO}-d_6$ (Jung et al., 1994)

Das ^{13}C -NMR-APT-Spektrum wurde ebenfalls in Deuteromethanol aufgenommen. Aufgrund des kleinen Signal-Rausch-Verhältnisses sind die Signale hier wesentlich schwerer zuzuordnen als bei KP02.

Es sind 15 Signale zuordnenbar. Dabei befinden sich neun Signale auf der Seite der primären bzw. tertiären C-Atome und sechs Signale auf der Seite der quartären bzw. sekundären C-Atome (siehe Anhang: Abb. 138-141).

Von den neun primären bzw. tertiären C-Atomen liegen auch hier wieder zwei C-Atome im hohen Feld bei 141,15 ppm und bei 112,84 ppm. Im HSQC-Spektrum kann eine Kopplung des Signals bei 112,84 ppm mit dem H-3 und des Signals bei 141,15 ppm mit dem H-4 beobachtet werden (Anhang: Abb. 146). Analog zu KP02 und zur Literatur (Cussans and Huckerby, 1975b; Jung et al., 1995; Murray et al., 1982) kann das Signal bei 141,15 ppm dem C-4 und das Signal bei 112,84 ppm dem C-3 zugeordnet werden.

Das nächste Signal bei 105,05 ppm entspricht wie bei KP02 und vergleichbar zur Literatur (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994; Markham et al., 1982) dem C-1' der Hexose. Die weiteren Signale bei 71-79 ppm konnten laut Literatur den C-2'-C-5' der Hexose zugeordnet werden (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994; Markham et al., 1982, siehe auch Tab. 37, Seite 105).

Die beiden verbleibenden Signale mit 62,26 ppm und 61,72 ppm auf der Seite der primären bzw. tertiären C-Atome weisen auf den Methylkohlenstoff in einer Methoxygruppe hin (Rücker et al., 2008). Die chemische Verschiebung dieser Signale deutet außerdem auf die Anwesenheit von Substituenten in ortho-Position hin (Kayser und Kolodziej, 1995). Das Signal bei 62,26 ppm kann möglicherweise der Methoxygruppe in der Position sechs zugeordnet werden, das Signal bei 61,72 ppm der Methoxygruppe in sieben. Diese Zuordnung beruht auf dem Ergebnis des HMBC-Spektrums (Abb. 50, Seite 104) und konnte nicht vollständig bestätigt werden.

Auf der Seite der quartären bzw. sekundären C-Atome sind acht Signale zu erkennen. Das Signal bei 163,26 ppm kann, wie bei KP03 und KP02 bereits erklärt, eindeutig dem C-2 zugeordnet werden. Diese Zuordnung entspricht der Literatur (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994; Cussans and Huckerby, 1975b).

Die Signale bei 152,04 ppm und bei 138,22 ppm in Deuteromethanol (bzw. 150,10 ppm und 136,90 ppm in DMSO- d_6) deuten aufgrund der chemischen Verschiebung auf eine direkte OH- oder OCH₃-Bindung und eine Beeinflussung

von benachbarten ortho-, meta- und para-Substituenten hin (Murray et al., 1982). Im HMBC-Spektrum, welches in DMSO-d₆ aufgenommen wurde, zeigt sich eine Kopplung des Signals bei 136,90 ppm mit dem Signal der Methylprotonen in der Methoxygruppe bei 3,72 ppm und eine Kopplung des Signals bei 150,10 ppm mit dem Signal der Methylprotonen der Methoxygruppe bei 3,92 ppm (siehe Abb. 50, Seite 104). Daher kann das Signal bei 150,10 ppm dem C-6 und das Signal bei 136,90 ppm dem C-7 zugeordnet werden. Da die Signale für die C-Atome in Position fünf und acht nicht sichtbar sind, kann diese Zuordnung nicht vollständig bestätigt werden.

Das Signal bei 145,60 ppm kann dem C-8a (=C-9) und das Signal bei 106,53 ppm kann dem C-4a (=C-10) zugeordnet werden. Diese Zuordnung kann durch das HMBC-Spektrum bestätigt werden, wo eine Kopplung des C-4a mit dem H-3 und eine Kopplung des C-8a mit dem H-4 zu sehen ist (siehe Anhang: Abb. 150). Außerdem ist die Zuordnung vergleichbar mit KP02, KP03 und mit der Literatur (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994).

Das letzte Signal auf der Seite der quartären und sekundären C-Atome bei 62,56 ppm entspricht aufgrund der chemischen Verschiebung dem C-6' der Hexose (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994; Markham et al., 1982; Cussans and Huckerby, 1975b).

Bei der Zuordnung der Signale halfen die HSQC- und HMBC- und die NOESY-Spektren (siehe Anhang: Abb. 145-155).

In der Tab. 36 (Seite 103) ist eine Auflistung der ¹³C-NMR-APT-Signale von KP01 im Vergleich zu in der Literatur angeführten ähnlichen Verbindungen zu finden. Der Unterschied besteht darin, dass statt zwei Hydroxygruppen und zwei Methoxygruppen wie in KP01 in der einen Verbindung drei Hydroxygruppen und eine Methoxygruppe und in der anderen Verbindung zwei Hydroxygruppen und eine Methoxygruppe vorkommen, wobei jeweils eine Hydroxygruppe in allen drei Strukturen mit einer Hexosylgruppe modifiziert ist.

Tab. 36: Auflistung der ^{13}C -NMR-Signale von KP01 in Deuteromethanol und DMSO- d_6 im Vergleich zu in der Literatur angeführten ähnlichen Verbindungen. ?= Signal konnte nicht detektiert werden; *=Position nicht eindeutig bewiesen

KP01				KP02	Literatur 1 ⁹	Literatur 2 ¹⁰
Position		^{13}C (ppm) in CD_3OD	^{13}C (ppm) in DMSO-d_6	^{13}C (ppm) in CD_3OD	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)
2	C	163,26	159,92	162,78	159,9	160,1
3	CH	112,84	111,83	114,43	114,0	110,9
4	CH	141,15	139,31	142,59/142,39	140,2	139,6
4a	C	106,53	104,98	112,40	110,0	104,3
5	C	?	?	139,41	133,0	146,6
6	C	152,04*	150,10*	144,16	135,5	97,3
7	C	138,22*	136,90*	146,36	140,1	151,3
8	C	?	?	136,79	133,0	128,4
8a	C	145,60	143,86	140,60	135,9	142,7
1'	CH	105,05	102,75	106,13	106,5	102,3
2'	CH	75,67	74,01	75,47	73,8	73,2
3'	CH	77,94	76,44	77,85	76,0	76,4
4'	CH	71,40	69,92	71,24	69,6	70,1
5'	CH	78,40	77,37	78,28	77,3	77,3
6'	CH_2	62,56	60,87	62,32	60,7	60,9
OMe an 6	CH_3	62,26*	61,20*	62,35	--	--
OMe an 7	CH_3	61,72*	60,97*	61,80	60,4	56,1

⁹ 7-methoxy-5,6,8-trihydroxycumarin-5- β -glucopyranosid in DMSO- d_6 (Jung et al., 1995)

¹⁰ 5,8-dihydroxy-7-methoxycumarin-5- β -glucopyranosid in DMSO- d_6 (Jung et al., 1994)

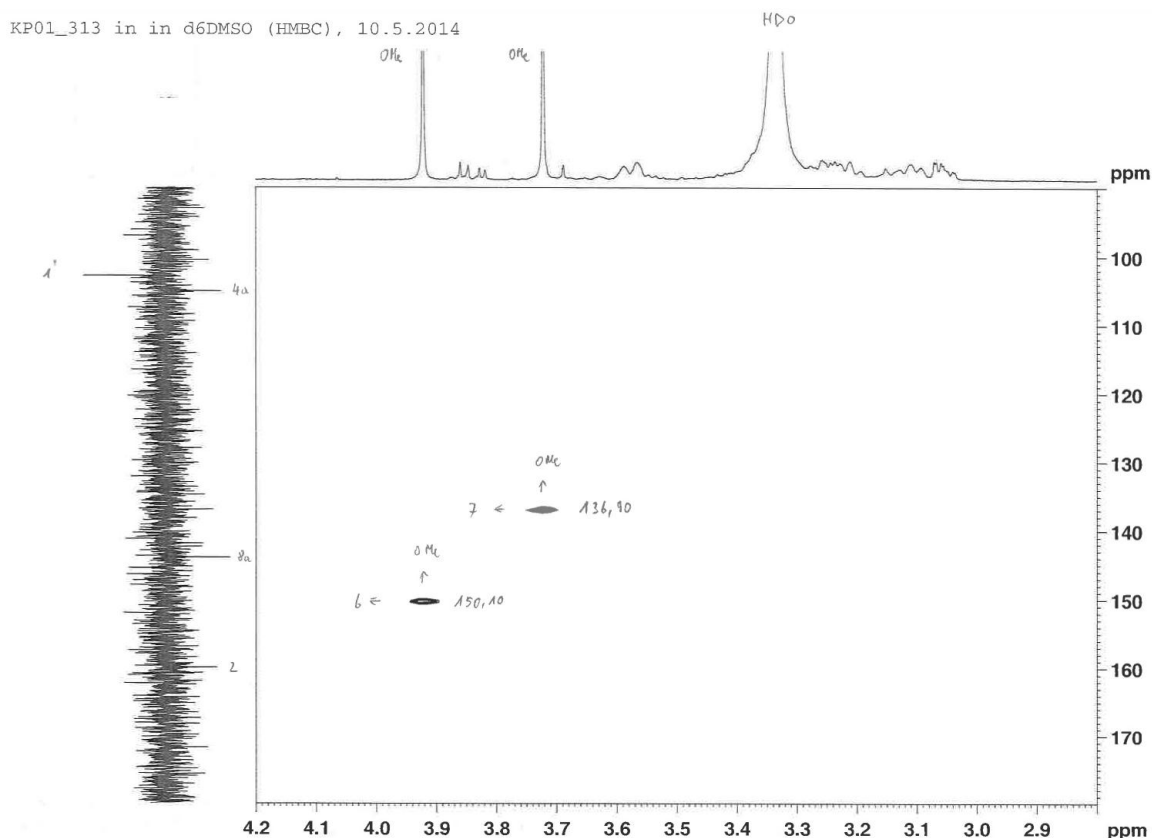


Abb. 50: Gezoomtes HMBC-Spektrum von KP01 in DMSO-d₆. Zu sehen ist eine Kopplung des C-7 und des C-6 mit den entsprechenden Methylprotonen der Methoxygruppe.

Die Position der Hexose konnte nicht eindeutig bewiesen werden. Am Wahrscheinlichsten erscheint eine Anknüpfung an Position acht, da bei KP01 keine Kopplung der Hexose mit dem H-4 im NOESY-Spektrum beobachtet werden konnte.

Der in der Tab. 37 (Seite 105) ersichtliche Literaturvergleich ergab, dass es sich bei der Hexose wie bei KP02 um ein β -D-Glucopyranosid handeln könnte (Jung et al., 1995; Jung et al., 1994; Markham et al., 1982).

Tab. 37: ^{13}C -NMR-Ergebnisse der Hexose von KP01 im Vergleich zur Literatur. Jung et al. (1995) und Jung et al. (1994) beschrieben die Strukturen von Cumaringlykosiden. Markham et al. (1982) zeigten die verschiedenen chemischen Verschiebungen von Methylglykosiden. ppm = parts per million.

		Hexose von KP01 in DMSO- d_6	5- β -Gluco-pyranosid - in DMSO- d_6 (Jung et al., 1995)	5- β -Gluco-pyranosid in DMSO- d_6 (Jung et al., 1994)	β -D-Gluco-pyranosid in D $_2$ O (Markham et al., 1982)
Pos		^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)
1'	CH	102,75	106,5	102,3	104,3
2'	CH	74,01	73,8	73,2	74,2
3'	CH	76,44	76,0	76,4	76,9
4'	CH	69,92	69,6	70,1	70,8
5'	CH	77,87	77,3	77,3	76,9
6'	CH $_2$	60,87	60,7	60,9	61,9

Die Stellungen der Methoxygruppen und der Hydroxygruppe konnten ebenfalls nicht eindeutig bewiesen werden. Es gibt allerdings im NOESY den Hinweis darauf, dass die beiden Methoxygruppen benachbart sind (siehe Abb. 51).

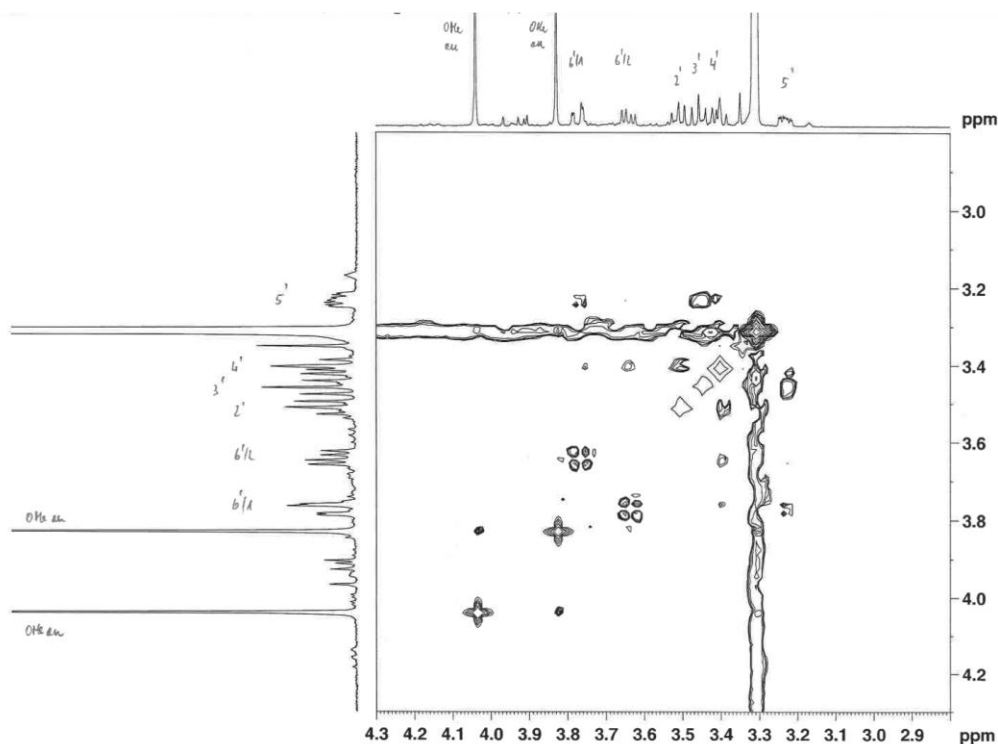


Abb. 51: Gezoomtes NOESY-Spektrum von KP01 in Deuteromethanol. Das eindeutige Korrelationssignal zwischen den beiden Methoxygruppen liefert einen deutlichen Hinweis einer Nachbarschaft der beiden Methoxygruppen.

Zum eindeutigen Beweis der Stellungen der Hexose, der beiden Methoxy- und der Hydroxygruppe wurde die Substanz in einem zusätzlichen Experiment in DMSO-d₆ aufgelöst und vermessen. Dabei konnte allerdings nicht, wie erwartet, die phenolische OH-Gruppe sichtbar gemacht und somit auch ihre Position nicht bestätigt werden. Zu sehen sind allerdings die OH-Gruppen im Zucker (Spektren siehe Anhang: Abb. 156-170).

Bei der Struktur von KP01 handelt es sich daher wahrscheinlich um ein 5,8-dihydroxy-6,7-dimethoxycumarin-8-β-glucopyranosid.

Gesichert ist dabei das Grundgerüst eines Cumarins. Die Abb. 52 zeigt die wahrscheinlichste Variante der Stellung der Substituenten.

Ein Literaturvergleich hat ergeben, dass es sich bei KP01 - unabhängig von der genauen Anordnung der fraglichen Substituenten - um eine neue Verbindung handelt.

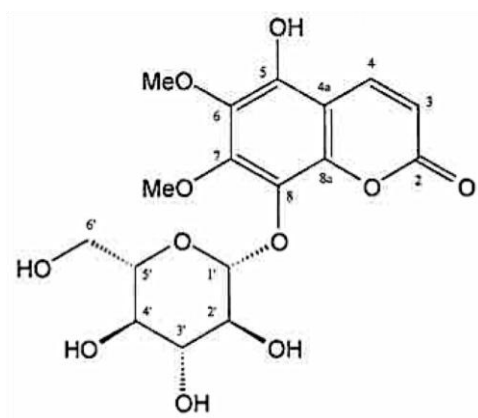


Abb. 52: Strukturformel von KP01.

4. DISKUSSION

Viola odorata wird volkstümlich bei Erkrankungen des Respirationstraktes als Teegetränk und äußerlich bei Hauterkrankungen eingesetzt (Hänsel et al., 1994). Eine wissenschaftliche Bestätigung der Wirksamkeit der Droge konnte bis jetzt allerdings nicht erbracht werden, wodurch eine Negativ-Monographie der Kommission E vorliegt. Die Anwendung der Droge nach eigenen therapeutischen Erfahrungen stellt allerdings kein Risiko dar (Schilcher et al., 2007). Eine weitere Untersuchung der Droge erweist sich daher durchaus als interessant, vor allem nachdem in vitro Hinweise auf eine mögliche immunsuppressive Wirkung von *Viola odorata* gefunden wurden. Da diese Wirkung nicht auf Zyklotide zurückgeführt werden kann, wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit mögliche Wirksubstanzen isoliert, welche nun in der Uniklinik Freiburg auf eine proliferationshemmende Wirkung auf primäre Lymphozyten getestet werden. Es bleibt abzuwarten, ob es sich bei den isolierten Substanzen „KP01“ und „KP02“ tatsächlich um die gesuchten Wirksubstanzen handelt. Sollte dies der Fall sein, müssten weitere Versuche durchgeführt werden, um die Struktur von KP02 zu bestätigen bzw. um die genaue Stellung der Substituenten zu eruieren. Dies gilt auch für KP01, wobei man allerdings vor der Durchführung anderer Versuche einen zusätzlichen Reinigungsschritt einführen sollte, um die Reinheit von KP01 zu erhöhen. Zusätzlich könnte man bei einer Fortsetzung der Arbeit eine Aufreinigungsmethode entwickeln, die es erlaubt, in kürzerer Zeit eine größere Menge von KP01 zu isolieren. Mit einer größeren Menge von KP01 in einer höheren Reinheit gelingt eventuell eine genaue Aufklärung der Struktur.

Anzumerken ist, dass die Probleme bei der NMR auf eine mangelnde HC-Korrelation, bedingt durch die große Anzahl an quartären Kohlenstoffatomen, zurückzuführen sind. Eventuell könnten spezielle NMR-Experimente zur Erfassung von Kopplungen über fünf oder sechs Bindungen die fehlenden Hinweise zur Bestätigung der Struktur von KP02 und KP01 liefern.

Handelt es sich bei KP01 und KP02 nicht um die Wirksubstanzen, müsste die verwendete Methode dahingehend optimiert werden bzw. eine neue Methode entwickelt werden, sodass die Mischfraktionen „orange Bande“ und „blaue Bande“, die ebenfalls bei der Auftrennung anfielen, in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt

werden können. Außerdem ist zu erwähnen, dass einige Substanzen, die in der aktiven Fraktion vorkamen, mit der gewählten Methode nicht von der Aminopropyl-Kieselgel-Säule eluiert werden konnten. Da es sich dabei allerdings nicht um die gesuchten Substanzen handelte, wurde die Methode nicht modifiziert. Eventuell könnte man mit einer Erweiterung des Gradienten deren Elution erreichen und kann so alle Komponenten der aktiven Fraktion isolieren und auf Wirksamkeit testen. Anzumerken ist dabei allerdings, dass viele dieser Komponenten nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Eine Isolierung wird sich daher eher schwierig gestalten und eine mögliche Wirksamkeit ist in derart geringen Konzentrationen vermutlich fraglich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der Untersuchung bezüglich einer immunsuppressiven Wirkung von Zyklotiden aus Violaceen stießen Dr. Gründemann und Dr. Gruber auf eine wirksame Fraktion von *Viola odorata*, die allerdings keine Zyklotide enthielt. Ziel dieser Diplomarbeit war es nun, die Wirkkomponente dieser Fraktion zu identifizieren. Dazu wurde die Droge mit der leicht abgeänderten Extraktionsmethode nach Hellinger et al. (2013) extrahiert. Das Lyophilisat wurde anschließend mittels Festphasenextraktion mit C₁₈-modifiziertem Kieselgel (SPE C18) aufgereinigt, und die dabei erhaltenen Fraktionen zur Testung nach Freiburg geschickt. Anzumerken ist, dass während der Aufreinigung ein Dihydroxycumarin angereichert wurde, das in der Originalfraktion, welche mittels präparativer Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) gewonnen wurde, nicht enthalten war. Der Grund für diese Anreicherung bzw. das Fehlen dieser Substanz in der Originalfraktion konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Nach der Ermittlung der wirksamen Fraktionen wurden der Extraktionsprozess und die SPE C18 insgesamt viermal wiederholt. Um die dabei erhaltenen wirksamen Fraktionen in ihre Einzelkomponenten auftrennen zu können, wurde anschließend eine Methode entwickelt. Bei dieser wurde zunächst das angereicherte Dihydroxycumarin mittels Kieselgel-Festphasenextraktion abgetrennt, um danach die Fraktion mittels einer Aminopropyl-Kieselgel-Festphasenextraktion in ihre Einzelkomponenten auftrennen zu können. Mit Hilfe dieser entwickelten Methode wurden die Substanzen „KP01“ (2,01 mg), „KP02“ (7,55 mg) und „KP03“ (4,40 mg) isoliert, wobei es sich bei „KP03“ um keine der ursprünglichen Zielsubstanzen handelt, sondern um das angereicherte Dihydroxycumarin. Anschließend wurde bei den isolierten Substanzen mittels HPLC-CAD die Reinheit bestimmt und mittels Mehrstufen-MS mit Direktinfusion das Molekulargewicht und erste Strukturelemente erfasst. Danach wurde die Struktur der Substanzen mittels 1D-(¹H, ¹³C) und 2D-NMR (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) bestimmt. Bei „KP03“ handelt es sich um das bekannte 6,7-Dihydroxycumarin. Bei „KP01“ und „KP02“ erwies sich die Strukturaufklärung schwieriger. Gesichert ist, dass beide Verbindungen ein Cumaringrundgerüst aufweisen, welches an den Positionen 5, 6, 7 und 8 substituiert ist. Bei den Substituenten handelt es sich um zwei

Methoxygruppen und zwei Hydroxygruppen, wobei eine der Hydroxygruppen eine O-glykosidisch gebundene Hexose trägt. Bei der Hexose handelt es sich nach Recherche in bestehender Literatur höchstwahrscheinlich um eine β -D-Glucose.

Die exakte Stellung der Substituenten konnte aufgrund der großen Anzahl an quartären C-Atomen bei „KP01“ allerdings nicht ermittelt werden. Es handelt sich wahrscheinlich um ein 5,8-dihydroxy-6,7-dimethoxycumarin-8- β -glucopyranosid.

Bei „KP02“ sind zusätzlich die Position der Hexose und der Methoxygruppe, welche an Position sechs gebunden ist, gesichert. Es handelt sich daher bei „KP02“ mit ziemlicher Sicherheit um ein 5,8-dihydroxy-6,7-dimethoxycumarin-5- β -glucopyranosid.

Nachdem die Struktur der Verbindungen weitestgehend aufgeklärt werden konnte, werden die isolierten Verbindungen in einem nächsten Schritt in der Uniklinik Freiburg einer Bioaktivitätstestung unterzogen.

6. ABSTRACT

Dr. Gründemann and Dr. Gruber found out, that cyclotides (Gründemann et al., 2013) and cyclotide-containing extracts from *Oldenlandia affinis* (Gründemann et al., 2012) show an immunosuppressive effect on primary lymphocytes. Considering that plants of the genus *Viola* contain cyclotides too, the next step was to investigate extracts from *Viola tricolor* (Hellinger et al., 2013) and *Viola odorata*. During this investigation they separated a fraction, which had an in vitro immunosuppressive effect, though didn't contain cyclotides. This is where this diploma thesis draws on, whose target was to find the active component of this fraction. First of all, the drug was extracted with an extraction method derived from Hellinger et al. (2013). Afterwards, the obtained lyophilised extract was pre-purified with C₁₈ solid-phase extraction (SPE C18) and the resulting fractions were sent to Freiburg for activity testing. It should be noted, that in contrary to the original fraction, which was obtained by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) in the group of Dr. Gruber, these fractions contained a dihydroxycoumarin, which was accumulated during the extraction. Neither the reason of this accumulation nor the reason of absence in the original fraction could be worked out in this thesis.

After identification of the active fractions, the extraction process and the SPE C18 were repeated four times and a method for the separation of these fractions was developed. First of all, a silica gel solid-phase extraction was carried out to separate the dihydroxycoumarin. Afterwards, the active fractions were separated in individual components with aminopropyl solid-phase extraction. As a result, three components, „KP01“ (2.01 mg), „KP02“ (7.55 mg) and „KP03“ (4.40 mg), were isolated and the purity of these components was determined by HPLC-CAD. Subsequently, the molecular weight and some elements of the chemical structure were determined by direct infusion mass spectrometry, which supported the structure elucidation by NMR spectroscopy. „KP03“ isn't one of the targeted components, but the accumulated coumarin, which proved to be a 6,7-dihydroxycoumarin. The structure elucidation of „KP01“ and „KP02“ was much more difficult. They were determined to be 5,6,7,8-tetraoxygenated coumarins. Two of the substituents are methoxy groups and the other ones are hydroxy groups, one of them carrying a hexose. A literature research regarding the hexose showed that it is most likely a β -D-glucose.

The exact position of the substituents in “KP01” couldn’t be determined due to the high number of quaternary carbons, but it is most probably a 5,8-dihydroxy-6,7-dimethoxycoumarin-8- β -glucopyranoside.

For “KP02” the position of the hexose and the methoxy group in position six were proven. Thus, “KP02” is very likely a 5,8-dihydroxy-6,7-dimethoxycoumarin-5- β -glucopyranoside.

After the structure of the isolated compounds was mostly elucidated, they were sent to Freiburg for bioactivity testing.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Adam, K.P., Becker, H., 2000. Analytik biogener Arzneistoffe, 1. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Agilent Technologies, 2014.

https://www.chem.agilent.com/Library/catalogs/Public/Sample_Prep_Catalog.pdf, abgerufen am 20.02.14.

Altmann Analytik GmbH & Co. KG, 2014.

<http://hplc-saeule.de/rp-hplc-mit-gebundenen-phasen/>, abgerufen am 12.01.15.

Ammon, H.P.T., 2004. Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch, 9. Auflage. Walter de Gruyter GmbH & Co.KG, Berlin.

Böcker, J., 1997. Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, 1. Auflage. Vogel Buchverlag, Würzburg.

Bradley, P., 2006. British Herbal Compendium, Volume 2. British Herbal Medicine Association, Bournemouth.

Burman, R., Svedlund, E., Felth, J., Hassan, S., Herrmann, A., Clark, R.J., Craik, D.J., Bohlin, L., Claeson, P., Göransson, U., Gullbo, J., 2010. Evaluation of toxicity and antitumor activity of Cycloviolacin O2 in mice. *Biopolymers*. 94, 626-634.

Chung, J.H., Shin, H.C., Cho J.Y., Kang, S.K., Lee, H.J., Shin, S.C., Park, K.H., Moon, J.H., 2009. Isolation and structural determination of free radical scavenging compounds from Korean fermented red pepper paste (Kochujang). *Food Science and Biotechnology*. 18, 463-470.

Concannon, S., Ramachandran, V.N., Smyth, F., 2000. A study of the electrospray ionisation of selected coumarin derivatives and their subsequent fragmentation using an ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 14, 1157-1166.

Craik, D.J., Daly, N.L., Bond, T., Waite, C., 1999. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *Journal of Molecular Biology*. 294, 1327-1336.

Cussans, N.J., Huckerby, T.N., 1975a. Carbon-13 NMR spectroscopy of heterocyclic compounds-II. *Tetrahedron*. 31, 2587-2590.

Cussans, N.J., Huckerby, T.N., 1975b. Carbon-13 NMR spectroscopy of heterocyclic compounds-IV. *Tetrahedron*. 31, 2719-2726.

Dionex, 2014a.

<http://dionexsofttron.de/wp-content/uploads/2013/01/Bro-Corona-ultraRS-08Jun2011-LPN2542-02.pdf>, abgerufen am 30.10.2014.

Dionex, 2014b.

<http://www.dionex.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-modules/pumps/quaternary-rslc/lp-82021.html>, abgerufen am 12.01.15.

Frohne, D., 2006. Heilpflanzenlexikon: ein Leitfaden auf wissenschaftlicher Grundlage, 8. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.

Gautam, S.S., Navneet, Kumar, S., 2012. The antibacterial and phytochemical aspects of *Viola odorata* Linn. extracts against respiratory tract pathogens. Proceedings of the National Academy of Science, India Section B: Biological Sciences. 82, 567-572.

Gerlach, S.L., Rathinakumar, R., Chakravarty, G., Göransson, U., Wimley, W.C., Darwin, S.P., Mondal, D., 2010. Anticancer and chemosensitizing abilities of Cycloviolacin O2 from *Viola odorata* and Psyle cyclotides fom *Psychotria leptothyrsa*. Biopolymers. 94, 617-625.

Gründemann, C., Koehbach, J., Huber, R., Gruber, C.W., 2012. Do Plant Cyclotides have Potential as Immunosuppressant Peptides? Journal of Natural Products. 75, 167-174.

Gründemann, C., Thell, K., Lengen, K., Garcia-Käufer, M., Huang, Y., Huber, R., Craik, D.J., Schabbauer, G., Gruber, C.W., 2013. Cyclotides suppress human T-Lymphocyte Proliferation by an Interleukin 2-Dependent Mechanism. PLoS ONE. 8, e68016.

Hammami, I., Kamoun, N., Rebai, A., 2011. Biocontrol of *Botrytis cinerea* with essential oil and methanol extract of *Viola odorata* L. flowers. Archives of Applied Science Research. 3, 44-51.

Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider G., 1994. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 5. Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Hasan, S.S., Malik, H.M., Najeeb, U.R., Anwar, H.G., 2012. Studies on the antihypertensive and antidyslipidemic activities of *Viola odorata* leaves extract. Lipids in Health and Disease. 11:6.

Hellinger, R., Koehbach, J., Fedchuk, H., Sauer, B., Huber, R., Gruber, C.W., Gründemann, C., 2013. Immunosuppressive activity of an aqueous *Viola tricolor* herbal extract. Journal of Ethnopharmacology. 151, 299-306.

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., 2012. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 8. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Hong Kong Chinese Materia Medica Standards Volume 5, 2014.

http://www.cmd.gov.hk/html/b5/service/hkcmms/vol5/Vol5_pdf_English/D_Monographs/38-Violae%20Herba.pdf, abgerufen am 13.01.15.

Jung, M., Zinsmeister, H.D., Geiger, H., 1994. New three- and tetraoxygenated coumarin glucosides from the mosses *Atrichum undulatum* and *Polytrichum formosum*. Zeitschrift für Naturforschung C. 49, 697-702.

Jung, M., Geiger, H., Zinsmeister, H.D., 1995. Tri- and tetrahydrocoumarin derivatives from *Tetraphis pellucida*. *Phytochemistry*. 39, 379-381.

Karioti, A., Furlan, C., Vincieri, F.F., Bilia, A.R., 2010. Analysis of the constituents and quality control of *Viola odorata* aqueous preparations by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 399, 1715-1723.

Kayser, O., Kolodziej, H., 1995. Highly oxygenated coumarins from *Pelargonium sidoides*. *Phytochemistry*. 39, 1181-1185.

Kiel, G., 2002. *Anorganisches Grundpraktikum kompakt: Qualitative und quantitative Analyse*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

Koochek, M.H., Pipelzadeh, M.H., Mardani, H., 2003. The Effectiveness of *Viola odorata* in the Prevention and Treatment of Formalin-Induced Lung Damage in the Rat. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 10, 95-103.

Kooperation Phytopharmaka, 2014.

<http://www.koop-phyto.org/arzneipflanzenlexikon/kommission-e.php>, abgerufen am 06.02.2014.

Lee, S., Han, S., Kim, H.M., Lee, J.M., Mok, S.Y., Lee, S., 2011. Isolation and identification of phytochemical constituents from *Taraxacum coreanum*. *Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 54, 73-78.

Li, Y.Y., Song, Y.Y., Liu, C.H., Huang, X.T., Zheng, X., Li, N., Xu, M.L., Mi, S.Q., Wang, N.S., 2012. Simultaneous determination of esculin and its metabolite esculetin in rat plasma by LC-ESI-MS/MS and its application in pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 907, 27-33.

Macherey-Nagel, 2014a.

<http://www.mn-net.com/SPEStart/SPEphases/SPEIonexchange/SPEIonexchange/CHROMABONDHRXA/tabid/11031/language/de-DE/Default.aspx>, abgerufen am 23.02.14.

Macherey-Nagel, 2014b.

<http://www.mn-net.com/tabid/11013/default.aspx>, abgerufen am 22.02.14

Markham, K.R., Chari, V.M., Mabry, T.J., 1982. Carbon 13 NMR spectroscopy of flavonoids. In: *The Flavonoids - Advances in Research* (J.B. Harborne and T.J. Mabry, eds.). Chapman and Hall, London.

Merck Millipore, 2014.

http://www.merckmillipore.de/chemicals/lichrolut-solid-phase-extraction/c_XLOsHfET2nsAAAFDmKcQKwFu;sid=OPm9lcRcmPCTIZdV_grQwmycv3qvZa77ANejw3fxGo0D9krSFBneP8JiL6lwKO8lulqticeFxcGUkk2Vmn0lfmsWGQ2k0QiMC2MFtHxFP5COn0PfKgk0XGbY#2, abgerufen am 23.02.14.

Murray, R.D.H., Méndez, J., Brown, S.A., 1982. *The Natural Coumarins*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.

Razdan, T.K., Qadri, B., Harkar, S., Waight, E.S., 1987. Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*. 26, 2063-2069.

Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G.G., 2008. Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 4. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Schilcher, H., Kammerer, S., Wegener, T., 2007. Leitfaden der Phytotherapie, 3. Auflage. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.

Urban, E., 2011.

<http://merian.pch.univie.ac.at/pch/medchem/download/research/urban/Strukturaufklaerung/NO2PhthalsreA.pdf>; abgerufen am 11.12.14.

Vishal, A., Parveen, K., Pooja, S., Kannappan, N., Kumar, S., 2009. Diuretic, laxative and toxicity studies of *Viola odorata* aerial parts. *Pharmacologyonline*. 1, 739-748.

Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M., 1983. Drogenanalyse: dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, 1. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Wichtl, M., 2009. Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage, 5. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Yang, W.Z., Wang, H., Shang, J., Feng, F., Xie, N., 2009. Chemical constituents from *Chichorium glandulosum*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 7, 193-195.

Yun, E.S., Park, S.K., Kim, B.S., Chae, Y.Z., Cho, S.M., Yi, H., Cho, H.J., Shin, H.C., 2011. Determination of the esculetin content of medicinal plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 26, 1247-1251.

Zarrabi, M., Dalirfardouei, R., Sepehrizade, Z., Kermanshahi, R.K., 2013. Comparison of the antimicrobial effects of semipurified cyclotides from Iranian *Viola odorata* against some of plant and human pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 115, 367-375.

Zhao, T., He, J., Wang, X., Ma, B., Wang, X., Zhang, L., Li, P., Liu, N., Lu, J., Zhang, X., 2014. Rapid detection and characterization of major phenolic compounds in *Radix Actinidia chinensis* Planch by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 98, 311-320.

CURRICULUM VITAE

Name

Katrin Pummer

Ausbildung

September 1994 - Juni 1998:	Volksschule Maria Frieden, 1220 Wien
September 1998 - Juni 2002:	Hauptschule mit zweisprachigem Unterricht (Englisch u. Deutsch), 2301 Groß-Enzersdorf
September 2002 - Juni 2007:	Handelsakademie, Polgarstraße 24, 1220 Wien
Juni 2007:	Matura an der Handelsakademie Polgarstraße
seit Oktober 2007:	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
November 2013 - März 2014:	Diplomarbeit, Department für Pharmakognosie

Berufliche Erfahrung

Juli 2004 und 2005 :	Praktikum bei der Firma Siemens, Abteilungen Einkauf und Logistik sowie im Wareneingang
August 2006:	Praktikum: Apotheke zum Löwen von Aspern, 1220 Wien
August 2007:	Praktikum: Apotheke zum Löwen von Aspern, 1220 Wien
März 2008 bis Juli 2010:	geringfügige Beschäftigung: Stadtapotheke zur Heiligen Dreifaltigkeit, 2301 Groß-Enzersdorf
August 2008 und 2009, Juli 2010:	Praktikum: Stadtapotheke zur Heiligen Dreifaltigkeit, 2301 Groß-Enzersdorf
seit August 2010:	geringfügige Beschäftigung: Salvia-Apotheke, 2301 Groß-Enzersdorf
August 2010, Juli 2011, Juli 2012, August 2013:	Praktikum: Salvia-Apotheke, 2301 Groß-Enzersdorf