



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Pluchea odorata (L.) Cass. – Charakterisierung von
Inhaltsstoffen einer Heilpflanze der Maya

verfasst von

Claudia Strauß

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Univ. Prof. i.R. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp für die Möglichkeit die Diplomarbeit in dieser Arbeitsgruppe zu machen und somit Einblicke in das phytochemische Arbeiten zu bekommen, bedanken.

Mein aufrichtiger Dank geht an Dipl.-Ernährungswiss. Michael Blaschke für die nette und kompetente Betreuung der praktischen Arbeit.

Für die gute Einführung in die Laborpraxis und Durchführung der Experimente möchte ich mich bei meiner Kollegin Beatrix Hartl bedanken.

Weiter möchte ich mich bei Mag. Günter Seiringer, Ap. Andrea Lubich, Mag. Katharina Waldbauer und allen Mitarbeitern des Departments für die freundliche Unterstützung und die nette Umgebung bedanken.

Für die Aufnahme und Interpretation der Massen- und Kernresonanzspektren bedanke ich mich bei Herrn ao.Univ.-Prof. Dr. Ernst Urban und Dr. Martin Zehl. Durch Ihre Bemühungen haben sie den isolierten Substanzen ein Gesicht verliehen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mich während der schulischen und universitären Ausbildung begleitet und unterstützt hat.

Abkürzungen

ASR	Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagens
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI-MS	Elektrosprayionisation - Massenspektrometrie
EtOAc	Ethylacetat
HEMWat	Hexan-Ethylacetat-Methanol-Wasser Lösungsmittelmischung
HPCCC	High performance Counter Current Chromatographie (=Gegenstromverteilungschromatographie)
HPTLC	High performance Thin layer Chromatographie
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
OP	Oberphase
R _f -Wert	Retentionsfaktor-Wert
SPE	Solid-Phase-Extraction (=Festphasenextraktion)
UP	Unterphase
VLC	Vacuum-Liquid-Chromatographie
ZP	Zwischenphase

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Ethnomedizin.....	1
1.2.	<i>Pluchea odorata</i> (L.) Cass.....	2
1.3.	Bekannte Inhaltsstoffe von <i>Pluchea odorata</i> (L.) Cass. und deren Wirkungen	3
1.4.	Problemstellung	7
2.	Material und Methoden	8
2.1.	Material.....	8
2.1.1.	Untersuchungsmaterial	8
2.1.2.	Chemikalien.....	10
2.2.	Methoden	11
2.2.1.	Chromatographische Methoden.....	11
2.2.1.1.	Dünnschichtchromatographie.....	11
2.2.1.2.	Säulenchromatographie	12
2.2.1.3.	High performance counter current chromatography (HPCCC).....	13
2.2.1.4.	Solid phase extraction (SPE)	16
2.2.2.	Spektroskopische Methoden.....	17
2.2.2.1.	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	17
2.2.2.2.	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS)	18
3.	Ergebnisse.....	19
3.1.	Fraktionierung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus verschiedenen B-Fraktionen	19
3.1.1.	Fraktion B7	20
3.1.2.	Fraktion B8	22
3.1.3.	Fraktion B10	24
3.1.4.	Fraktion B10.1	27
3.1.5.	Fraktion B24/25	29
3.1.6.	Fraktion B24/25.7	30
3.1.7.	Fraktion B24/25.10	31
3.1.8.	Fraktion B28 und B28.4	32
3.1.9.	Fraktion B29	35
3.1.10.	Fraktion B29.7-10.....	37
3.1.11.	Fraktion B29.14-15.....	38

3.1.12.	Fraktion B17	39
3.1.13.	Fraktion B17.16	41
3.1.14.	Fraktion B18	41
3.1.15.	Fraktion B18.4	43
3.1.16.	Fraktion B18.4.4	45
3.1.17.	Fraktion B18.4.3	46
3.1.18.	Fraktion B18.9	48
3.2.	Identifizierung der isolierten Substanzen.....	49
3.2.1.	Vergleich mit bekannten Phytosterolen	51
3.2.2.	Substanz PO_38	52
3.2.3.	Substanz PO_39	52
3.2.4.	Substanz PO_40	53
3.2.5.	Substanz PO_41 (= α - und β - Amyrin)	57
3.2.6.	Substanz PO_44 (=Kongol)	62
3.2.7.	Substanz PO_45	66
3.2.8.	Substanz PO_46 (= (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-6-oxo-2-naphthalenyl]-2,3-dihydroxy-2-methyl-butansäureester)	67
3.2.9.	Substanz PO_48 (= Pheophorbid A)	72
3.2.10.	Substanz PO_49 (=Hydroxy-Pheophorbid A)	75
3.2.11.	Substanz PO_50 (=3-O- β -D-Glucopyranolsyl-stigmasterol)	77
3.2.12.	Substanz PO_51	82
3.2.13.	Substanz PO_52	83
3.2.14.	Substanz PO_53 (= (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-6-oxo-2-naphthalenyl]-2,3-dimethyl-oxirancarbonsäureester)	83
3.2.15.	Substanz PO_54	85
3.2.16.	Substanz PO_55	86
3.2.17.	Substanz PO_56	89
4.	Diskussion	94
5.	Zusammenfassung	101
6.	Literaturverzeichnis	103
	Lebenslauf	111
	Anhang	I - XCII

1. Einleitung

Weltweit gehören Krebserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Fast dreiviertel der aufgrund von malignen Tumoren registrierten Todesfälle werden in Afrika, Asien und Zentral- und Südamerika verzeichnet. Diese Tatsache zeigt, dass Früherkennung und Therapie zu einer deutlichen Reduktion der Mortalität beitragen (WHO, 2014). Trotz Behandlung kann es zum Versagen einer Therapie kommen. Dies ist oft auf die rasche Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen die eingesetzten Chemotherapeutika zurückzuführen. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, neue Wirkstoffe zu finden, deren Wirkung von Resistenzmechanismen noch nicht beeinflusst wird oder die einen dauerhaften Wachstumsstillstand der Tumorzellen bewirken können (Baguley, 2010). Eine bedeutende Quelle neuer Wirkstoffe sind Substanzen biogener Herkunft. Es ist nicht überraschend, dass mehr als die Hälfte der verwendeten niedermolekularen antineoplastisch wirksamen Medikamente von Substanzen biogenen Ursprungs abgeleitet worden sind (Newman und Cragg, 2012). Neben dem automatisierten Screening einer großen Anzahl an Pflanzenextrakten hat sich vor allem die ethnomedizinische Herangehensweise bei der Entwicklung neuer antineoplastisch wirksamen Arzneistoffen als zielführend erwiesen.

1.1. Ethnomedizin

Von vielen Pflanzen wird berichtet, dass sie zur Behandlung von Krebs und Erkrankungen mit einem ähnlichen Erscheinungsbild eingesetzt werden. In den volksmedizinischen Überlieferungen wird das Krankheitsbild „Krebs“ nicht erwähnt. Es deuten jedoch Beschreibungen wie harte Schwellungen, Abszesse, Warzen, Polypen und Hyperkeratosen auf maligne Tumore hin (Cragg und Newman, 2005). Anzeichen wie Schwellungen und Abszesse kommen nicht nur bei bösartigen Geschwulste, sondern auch bei Entzündungsreaktionen vor. Bereits 1863 entdeckte Virchow Immunzellen in entartetem Gewebe und schaffte somit einen Zusammenhang zwischen malignen Neoplasmen und Infektionen. Während die Entzündungsreaktion in nicht entartetem Gewebe selbst limitierend ist, kommt es zu einem Ungleichgewicht dieser aufeinander abgestimmten Zytokine und Chemokine im Tumorgewebe, wodurch die Ausbreitung entarteter Zellen gefördert wird (Balkwill und Mantovani, 2001; Coussens und Werb, 2002). Somit ist die Tatsache, dass NSAIDs die Entstehung und Ausbreitung von

malignen Zellen durch proapoptotische und antiangiogenetische Wirkung vermindern können, auf die Unterbrechung dieser oft sehr ähnlichen Signalwege zurückzuführen (Thun et al., 2002). Dies zeigt, dass antiinflammatorisch wirksame Substanzen auch einen Effekt gegen Neoplasmen aufweisen können. Pflanzen wie *Pluchea odorata* (L.) Cass., die in der Volksmedizin der Maya gegen schwere Entzündungen wie Rheuma und Arthritis eingesetzt werden, stellen eine wichtige Quelle von antineoplastisch wirksamen Substanzen dar. Daher haben Gridling et al. *Pluchea odorata* (L.) Cass. hinsichtlich einer in vitro Wirkung auf Krebszellen untersucht (Gridling et al., 2008).

1.2. *Pluchea odorata* (L.) Cass.

Pluchea odorata (L.) Cass., von den Maya auch „chalche“ genannt, ist eine Pflanzenart aus der Familie der Asteraceae. Diese einjährige bis ausdauernde Pflanze erreicht meist eine Wuchshöhe von 20-80 cm, kann aber eine Höhe von 2 m erreichen. Charakteristisch sind die rosa-violetten Blütenköpfe, die stark nach Campher riechen (siehe Abbildung 1). Sie kommt vor allem in Nord- und Südamerika vor und bevorzugt feuchte und salzreiche Böden (Barkley, http://efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=242431232 [abgerufen am 22.6.2014]; Quattrocchi, 2012).



**Abbildung 1: Photo and © by Roger Hammer, Wildflowers of the Everglades;
<http://www.florida.plantatlas.usf.edu/Photo.aspx?id=7345>, abgerufen am 20. 04.2014**

Pluchea odorata (L.) Cass. wird von den Maya bei verschiedenen Erkrankungen eingesetzt: chronische Entzündungen wie rheumatische Schmerzen, Neuritis und arthritische Gelenke therapieren diese mit Umschlägen aus in Öl erwärmten Blätter oder

mit Einreibungen eines alkoholischen Infuses. Oberflächige Verletzungen und Entzündungen wie Schürfwunden, Zerrungen und Schwellungen werden mit einem wässrigen Dekokt aus den Blättern behandelt. Bekannt ist auch die orale Verabreichung eines wässrigen Infuses der Blätter bei Schmerzen, Asthma und Erkältungskrankheiten wie Husten, Pneumonie, Fieber oder Grippe. Anwendung findet diese Pflanze auch in der Frauenheilkunde: Arvigo und Balick beschreiben, dass Frauen nach der Geburt zur Vermeidung von Infektionen und starke Blutungen und damit der Uterus wieder an die richtige Position zurückkehrt, Sitzdampfbäder des wässrigen Dekoktes der Blätter einsetzten (1998). Des Weiteren wird diese Pflanze verwendet, um Monatsblutungen herbeizuführen oder Abtreibungen vorzunehmen. Bekannt ist auch, dass *Pluchea odorata* (L.) Cass. bei gastrointestinalen Beschwerden sowie Bluthochdruck und Schlangenbisse angewendet wird (Hussain et al., 2013; Quattrocchi, 2012; Standley, 1920).

1.3. Bekannte Inhaltsstoffe von *Pluchea odorata* (L.) Cass. und deren Wirkungen

Die Gattung *Pluchea* umfasst ca. 80 Arten, die in Nord- und Südamerika, Afrika, Asien und Australien vorkommen, von welchen etwa ein Viertel bis heute ethnomedizinisch verwendet wird (Hussain et al., 2013). In Amerika wird bei Entzündungen, Erkältungen und gastrointestinalen Beschwerden neben *Pluchea odorata* vor allem auch *P. sagittalis* und *P. carolinensis* angewendet. In Asien bis Nord-Afrika ist der Gebrauch von *P. indica* in der Volksmedizin beschrieben, während *P. lanceolata* in der Ajuvedrischen Medizin verankert ist (Srivastava und Shanker, 2012). Da viele Menschen auf Pflanzen als Arzneimittel angewiesen sind, ist es wichtig, die Wirksamkeit und vor allem die Unbedenklichkeit dieser Pflanzen zu prüfen.

Bei der Untersuchung von *Pluchea odorata* (L.) Cass. konnten Arriaga-Giner et al. die Eudesman-Derivate Plucheinol [1], 2-(2,3-dihydroxy-2-methyl-Butansäure)-plucheinol [2], 1-(acetyloxy)-2-(2,3-dimethyl-Oxirancarbonsäure)-plucheinol [3], 2-(2,3-dimethyl-Oxirancarbonsäure)-plucheinol [4], 1-(acetyloxy)-2-(3-chloro-2-hydroxy-2-methyl-Butansäure)-plucheinol [5], 2-(3-chloro-2-hydroxy-2-methyl-Butansäure)-plucheinol [6] und 1-(acetyloxy)-2-(2-methyl-2-Butensäure)-plucheinol [7] aus den Blättern, die in El Salvador gesammelt worden waren, isolieren (Arriaga-Giner et al. 1983 und 1985). Weiters wurde 2-(2-methyl-2-Butensäure)-cuauthemon [8] in dieser Pflanze nachgewiesen (Hussain et al., 2013; siehe Abbildung 2, Seite 4).

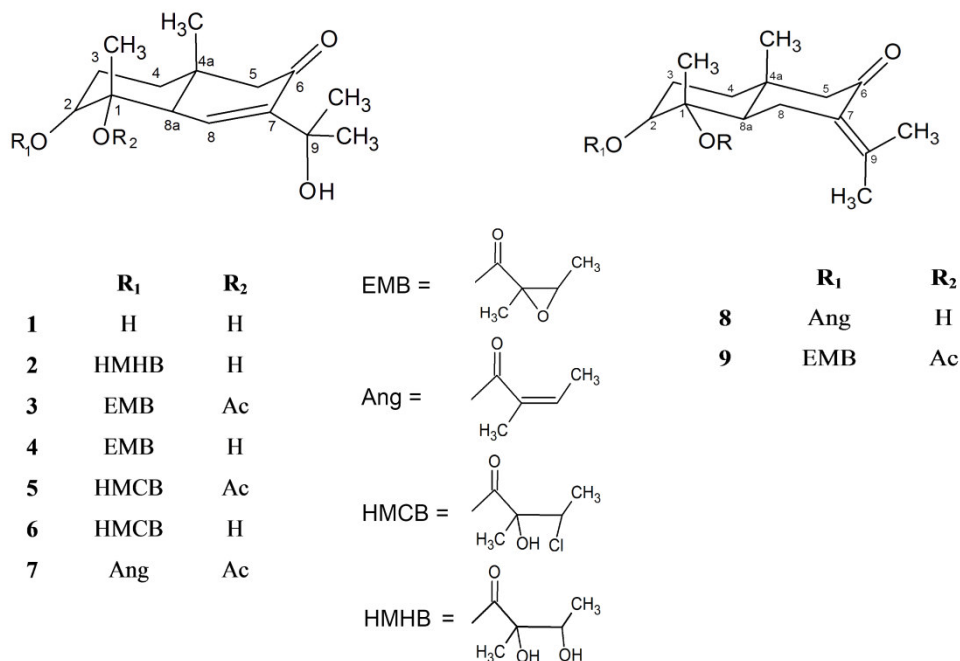


Abbildung 2: Isolierte Eudesman-Derivate aus *Pluchea odorata* (L.) Cass.

Aus der wachsartigen Cuticula der in Mexiko gesammelten Blätter haben Wollenweber et al. das Eudesman-Derivat 2-(2,3-dimethyl-Oxirancarbonsäure)-cuauthemon [9] (siehe Abbildung 2) und kleine Mengen von den Flavonoiden 3-Methyl-kaempferol [10], 3,7,4'-Trimethyl-kaempferol [11], 3,6,4'-Trimethyl-6-hydroxykaempferol [13], 3,6,7,4'-Tetramethyl-6-hydroxykaempferol [14], 3,3'-Dimethyl-quercetin [15], 3,7,3',4'-Tetramethyl-quercetin [16], 3,6,3'-Trimethyl-quercetagenin [17], 3,6,4'-Trimethyl-quercetagenin [18], 3,6,7,4'-Tetramethyl-quercetagenin [19], 3,6,7,3',4'-Pentamethyl-quercetagenin [20] (siehe Abbildung 3, Seite 5) nachgewiesen (Wollenweber et al., 1985). Neben 6,7-Dimethyl-6-hydroxykaempferol [12] ist auch das Flavonoid 3,6,7,3',4'-Pentamethyl-quercetagenin [20] (siehe Abbildung 3, Seite 5) aus den in El Salvador gesammelten Blättern isoliert worden.

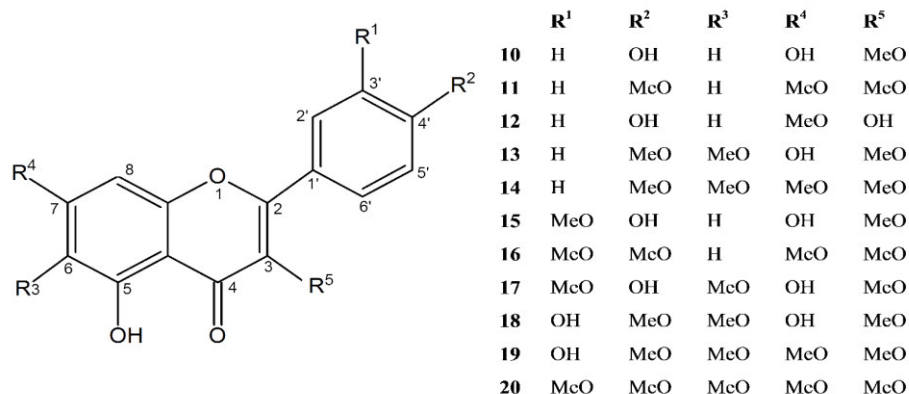


Abbildung 3: Isolierte Flavonoide aus *Pluchea odorata* (L.) Cass.

In den durchgeführten phytochemischen Analysen sind auch Triterpene wie α - [21] und β -Amyrin [22], deren Acetate und Taraxasterylacetat [23] sowie die Phytosterole β -Sitosterol [24] und Stigmasterol [25] (siehe Abbildung 4) und verschiedene n-Alkane (C₁₉-C₃₁) nachgewiesen worden. Der Vergleich von in Mexiko mit in El Salvador gesammeltem Pflanzenmaterial hat gezeigt, dass letzteres eine geringere Anzahl an unterschiedlichen Triterpenen und Flavonoiden, jedoch mehr strukturell verschiedene Sesquiterpene enthält. Diese Tatsache weist auf das Vorhandensein verschiedener Chemotypen hin (Wollenweber et al., 1985). Neben β -Amyrin haben Domínguez und Zamudio auch das Phytosterol Campesterol [26] (siehe Abbildung 4) in den oberirdischen Pflanzenteilen gefunden (1972).

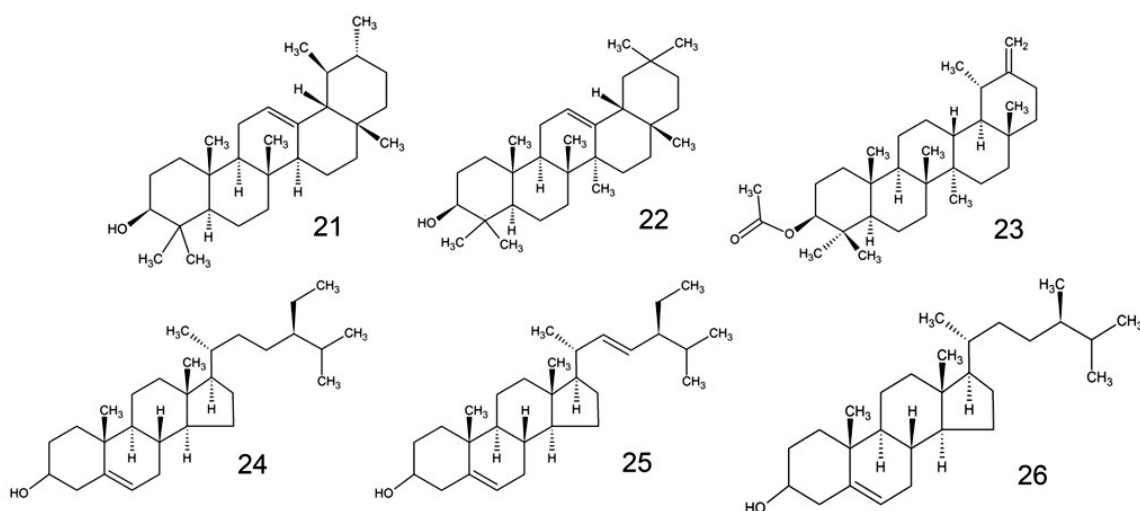


Abbildung 4: Isolierte Triterpene und Sterole aus *Pluchea odorata* (L.) Cass.

Auch wurden verschiedene Thiophen-Derivate [27-29], die phenolischen Verbindungen 2,5-Dimethoxy-p-cymen [30], Carvacrol [31], 3,5-Dimethoxyphthalsäure-dimethylester [32] und das Monoterpen 2-Butensäure, 2-methyl-, 3-methyl-6-(1-methylethyl)-2-oxo-3-cyclohexen-1-yl ester, [33] in dieser Art beschrieben (Hussain et al., 2013).

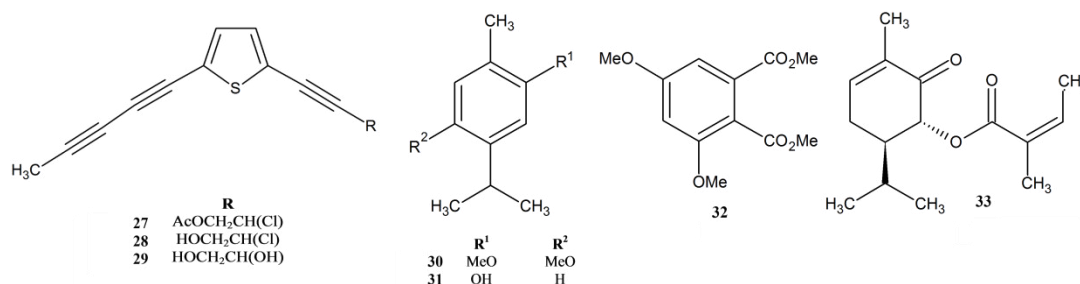


Abbildung 5: weitere aus *Pluchea odorata* (L.) Cass. isolierte Substanzen

Von keiner aus den Extrakten von *Pluchea odorata* gewonnenen Verbindung ist eine biologische Wirkung bestimmt worden. Von Inhaltsstoffen, die auch aus anderen Pflanzen isoliert worden sind, konnten bereits biologische Aktivitäten nachgewiesen werden: Die Plucheinol-Derivate 3 und 6 (siehe Abbildung 2, Seite 4) sind auch in *Epaltes mexicana* Less. enthalten und zeigen antibiotische Wirkung gegen *Micrococcus luteus* und *Staphylococcus epidermidis* (Frei et al., 1998). Eudesman-Derivat 3 und 4 (siehe Abbildung 2, Seite 4) können *Spodoptera frugiperda* vom Fressen abhalten (Vera et al., 2008) und Casticin (19, siehe Abbildung 3, Seite 5) ist ein bedeutendes Flavonoid aus *Vitex trifolia* L. und weist in in vitro Studien eine antineoplastische Wirkung gegen verschiedene Krebszelllinien auf (Liu et al., 2014). Auch Thiophene zeigen in vitro ein deutliches zytotoxisches Potential gegen HL60 und K562 Zelllinien (Zhang et al., 2009).

Gridling et al. testeten in in vitro Modellen die mit unterschiedlichen Lösungsmitteln gewonnenen Extrakte von *Pluchea odorata* (L.) Cass. auf eine antineoplastische Aktivität. Bei diesen Untersuchungen wies der Dichlormethanextrakt das stärkste Potential gegen maligne Tumorzellen in der menschlichen Leukämie-Zelllinie HL-60 ($\text{IC}_{50} \sim 0,7 \text{ mg/ml}$) und in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 auf. Dieser Extrakt besitzt auch ein pro-apoptotisches Potential ($\text{IC}_{50} = 25 \text{ } \mu\text{g/ml}$), das womöglich zur antiproliferativen Wirkung beiträgt (Gridling et al., 2008). Auch in der Volksmedizin der Maya wird ein apolarer Extrakt aus *Pluchea odorata* (L.) Cass. gegen schwere Entzündungen eingesetzt

(Arvigo und Balick, 1998). Damit wird gezeigt, dass apolare Substanzen für die antiinflammatorische und antineoplastische Wirkung verantwortlich sind.

Zusätzlich zu den oben genannten Substanzen sind noch folgende in der Gattung *Pluchea* nachgewiesen worden: aus den Arten *Pluchea arabica* Quiser und Lack. und *Pluchea dioscoridis* (L.) DC. sind auch Sesquiterpene vom Guaian-Typ und aus *Pluchea sericea* (NUTT) Caville vom Modhephen-Typ isoliert worden. Diterpene konnten bis jetzt nur in *Pluchea wallichiana* DC. gefunden werden. Weiters sind verschiedene aromatische Verbindungen wie Citrucin C und Phenol-Glucoside aus *Pluchea indica* (L.) Less. und Kaffeeoylchinasäuren mit antibiotischer und antihelminthischer Wirkung aus *Pluchea symphytifolia* (Mill.) Gillis identifiziert worden (Hussain et al., 2013).

Neben der bereits erwähnten antitumoralen Wirkung des Dichlormethanextraktes von *Pluchea odorata* (L.) Cass. haben Extrakte von anderen Arten der Gattung *Pluchea* antiparasitäre, immunsuppressive, antioxidative, anti-acetylcholinesterase, antimikrobielle, hepatoprotektive, immunregulierende, Gastro-intestinaltrakt regulierende, antiulcerative, entzündungshemmende und antinozizeptive sowie Schlangengift-neutralisierende Wirkungen gezeigt (Hussain et al., 2013).

1.4. Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, aus verschiedenen Fraktionen des aktiven Dichlormethan-Extraktes von *Pluchea odorata* (L.) Cass. Substanzen zu isolieren und deren Struktur aufzuklären, sodass in weiterer Folge deren biologische Aktivität bestimmt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Untersuchungsmaterial

Für die Isolierung der Substanzen standen verschiedene B-Fractionen des Dichlormethanextraktes von *Pluchea odorata* (L.) Cass. zur Verfügung, die im Rahmen einer Dissertation (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung) gewonnen wurden. Eine Übersicht der zur Verfügung gestellten Fractionen ist in Tabelle 1 (Seite 9) dargestellt.

Die Extraktion der getrockneten oberirdischen Teile der Pflanze erfolgte mit Dichlormethan (DCM). 62g dieses Extraktes wurden mit Vakuum-Liquid Chromatographie (VLC) aufgetrennt und die Fractionen mittels Zellassay auf antineoplastische Eigenschaften untersucht. Die Fractionen A3 und A4 (30g) zeigten die höchste Aktivität und wurden, um die Ausgangsmenge für die nächste Fractionierung zu erhöhen, vereint. Die Separation der Fractionen A3 und A4 erfolgte mittels Säulenchromatographie und die zytotoxische Aktivität der erhaltenen B-Fractionen wurden bestimmt (siehe Blaschke, Dissertation in Vorbereitung). In Abbildung 6 (Seite 9) ist das Schema der bisherigen Auftrennung dargestellt.

Neben den in Zellassays nicht aktiven Fractionen B7 und B8 wurden die B-Fractionen B10, B17, B18, B24/25, B28 und B29, die eine moderate Wirkung aufwiesen und noch keinen weiteren Fractionierungen unterzogen wurden, für weitere Trennungsexperimente ausgewählt. Damit sollten Substanzen isoliert und identifiziert werden, die möglicherweise zu der antineoplastischen Wirkung dieses Extraktes beitragen.

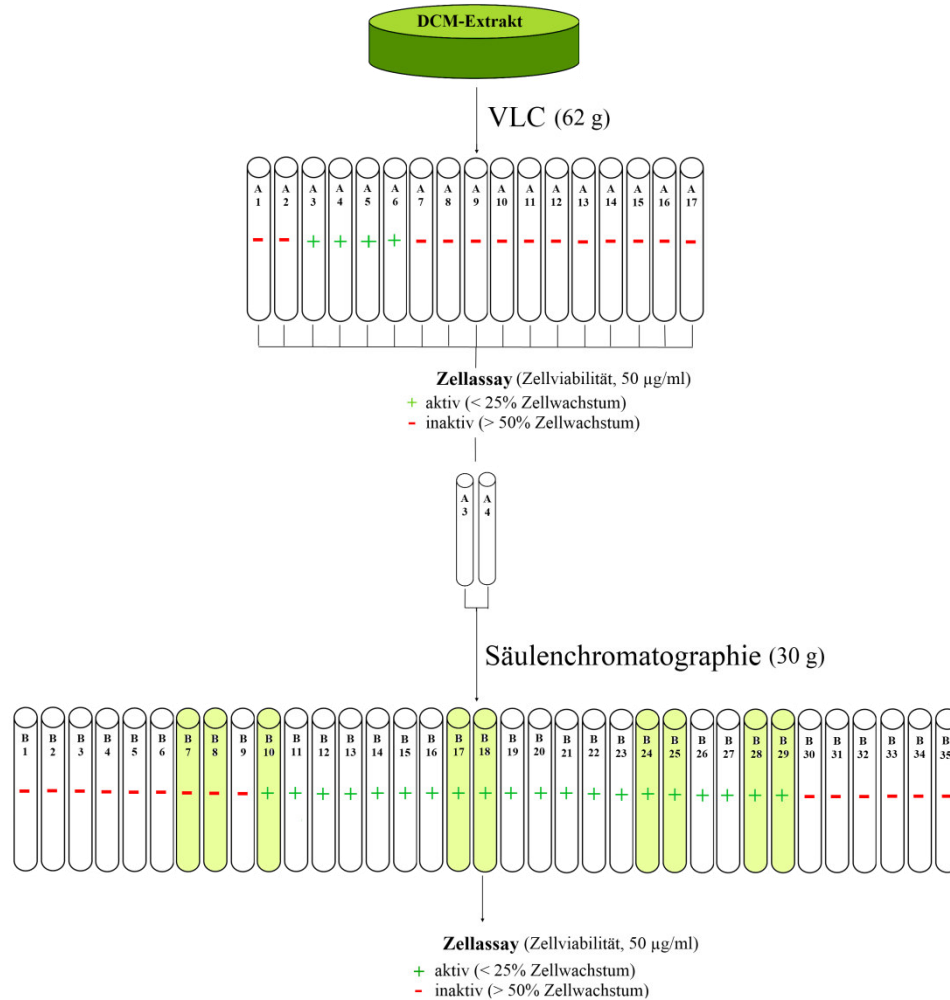


Abbildung 6: Schema der Auftrennung des DCM-Extraktes von *Pluchea odorata* (L.) Cass.
grün: in dieser Arbeit untersuchte Fraktionen

Tabelle 1: Übersicht der B-Fractionen, die zu weiteren Untersuchungen dienen

Fraktion	Masse (mg)
B7	200
B8	280
B10	300
B17	202
B18	434
B24/25	280
B28	4000
B29	250

2.1.2. Chemikalien

Es wurden Lösungsmittel und Reagenzien in höchst verfügbarer Qualität verwendet; diese sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die als Vergleichssubstanzen eingesetzten Reinsubstanzen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: verwendete Lösungsmittel und Reagenzien

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Ameisensäure 98 %	ROTIPURAN®, ≥98 %, p.a.,	ROTH, Karlsruhe (Deutschland)
4-Methoxybenzaldehyd (Anisaldehyd)	zur Synthese	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn (Deutschland)
Chloroform	GPR RECTAPUR®, dest.	VWR BDH Prolabo, Fontenay-sous-Bois (Frankreich)
Dichlormethan	GPR RECTAPUR®, dest.	VWR BDH Prolabo, Fontenay-sous-Bois (Frankreich)
Essigsäure 100 %	ROTIPURAN® 100 %, p.a.	ROTH, Karlsruhe (Deutschland)
Ethylacetat	GPR RECTAPUR®, dest	VWR BDH Prolabo, Fontenay-sous-Bois (Frankreich)
n-Hexan	AnalaR NORMAPUR® Reag. Ph. Eur. zur Analyse	VWR BDH Prolabo, Fontenay-sous-Bois (Frankreich)
Methanol	AnalaR NORMAPUR® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur. zur Analyse	VWR BDH Prolabo, Fontenay-sous-Bois (Frankreich)
Methanol	HPLC Gradient Grade	J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Deventer (Niederlande)
Schwefelsäure	ACS reagent, 95.0-98.0%	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Wasser	dest.	Eigenproduktion

Tabelle 3: Reinsubstanzen als Vergleichssubstanzen

Bezeichnung	Hersteller	Chargennummer
Fucoesterol	Milanfarma S.p.A., Caronno Pertusella (Italien)	
Stigmasterol	E.Merck, Darmstadt (Deutschland)	K1478143
Sitosterol	SIGMA Chemical Co., St. Louis (USA)	

2.2. Methoden

2.2.1. Chromatographische Methoden

2.2.1.1. *Dünnschichtchromatographie*

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde zur Beurteilung der Fraktionszusammensetzung und des Trennungserfolges verwendet. Sie diente außerdem zur Auswahl einer geeigneten mobilen und stationären Phase für chromatographische Experimente (siehe Säulenchromatographie, Seite 12, und High performance counter current chromatography (HPCCC), Seite 13).

Als stationäre Phase für die DC wurden entweder DC-Platten (Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folien, 20x20 cm, Merck, Darmstadt - Deutschland) oder HPTLC-Platten (Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Glasplatten, 10x10 cm, Merck, Darmstadt - Deutschland) eingesetzt. Als mobile Phase dienten die in Tabelle 4 angeführten Fließmittelsysteme.

Tabelle 4: Fließmittel-Systeme für die DC

System	CHCl ₃	MeOH	H ₂ O	HCOOH
95	95	1,5	0,1	0
90	90	3,5	0,2	0
85	85	8	0,5	0
80	80	10	1,0	0
80+S	80	10	1,0	1
75	75	15	2,0	0
70	70	22	3,5	0

Parameter der Dünnschichtchromatographie:

Laufstrecke:	8 cm
Auftragemenge:	1,5 µl (Konzentration 7,5 mg/ml; für Reinsubstanzen und Fraktionen)
Bandbreite:	0,5 cm

Die DC- und HPTLC-Platten wurden in einem mit mobiler Phase gesättigten DC-Trog entwickelt.

Detektion:

Vor dem Besprühen der entwickelten und getrockneten Platten mit Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagens (ASR) erfolgte eine Beurteilung der DC-Trennung unter UV-Licht 254 nm.

Für das Sprühreagens wurden 0,5 ml Anisaldehyd mit 10 ml Essigsäure 100%, 85 ml Methanol (MeOH) und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure gemischt (Wagner et al., 1983). Die behandelten Platten wurden 2,5 Minuten bei 100°C im Trockenschrank erhitzt und bei Tageslicht und unter UV-Licht 365 nm betrachtet.

2.2.1.2. Säulenchromatographie

Vorbereitung und Durchführung:

Die Probe wurde in wenig DCM oder DCM/MeOH 1:1 gelöst und tropfenweise mit der zwei bis dreifachen Menge Kieselgel verrieben. Die Trocknung des mit Probe beladenen Kieselgels erfolgte im Exsikkator.

DC-Analysen mit verschiedenen Fließmittelsystemen (siehe Tabelle 4, Seite 11) dienten zur Auswahl einer optimalen mobilen Phase. Es wurde jenes Chloroform-System ausgewählt, welches die Substanzbanden bestmöglich trennte und Retentionsfaktoren (R_f -Wert) der Hauptsubstanzen von etwa 0,5 bewirkte. Chloroform konnte zur Zersetzung der Substanzen führen (Hartl, 2015), weshalb für die Säulenchromatographie die Chloroform- in Dichlormethan-Systeme übertragen wurden. Zusätzlich wählte man eine apolarere Fließmittelzusammensetzung (im Vergleich zu Chloroform-Systemen für die DC).

Zuerst wurde die Säule mit etwas Watte abgedichtet um ein Auslaufen des Sorptionsmittels zu verhindern. Die luftblasenfreie Packung der Säule erfolgte anschließend mit im jeweiligen Fließmittel konditioniertem Kieselgel. Die auf Kieselgel aufgezogene Probe wurde auf die gepackte Säule gegeben und die Tropfgeschwindigkeit eingestellt. Die Analyse der erhaltenen Fraktionen geschah mittels DC, jene mit ähnlichem Bandenmuster wurden zu Sammelfraktionen vereinigt.

Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (Korngröße 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh) für die Säulenchromatographie (Merck, Darmstadt - Deutschland) und als mobile Phase wurden die in Tabelle 5 angeführten Fließmittel verwendet.

Tabelle 5: Fließmittelsysteme für die Säulenchromatographie

Mobile Phase	CH ₂ Cl ₂	MeOH	H ₂ O
95	95	1,5	0,1
90	90	3,5	0,2
85	85	8	0,5

2.2.1.3. *High performance counter current chromatography (HPCCC)*

Instrument:

Dynamic Extraction Spectrum HPCCC Instrument war ausgestattet mit zwei Spulen, auf denen sich je eine analytische und eine semi-präparative Säule befanden. Die Zufuhr der flüssigen Phasen erfolgte über eine Pumpe und der Kühler ermöglichte eine Trennung bei etwa Raumtemperatur. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler gesammelt und mit einem Verdampfer getrocknet. Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Instrumente für die Durchführung einer HPCCC

Instrument	Bezeichnung	Hersteller
HPCCC	Spectrum HPCCC	Dynamic Extraction, Slough (Großbritannien)
Pumpe:	Alpha 10+ Pumpe	ECOM, Praha (Tschechien)
Kühler:	H150-1500 Smart Water Chiller	LabTech, Sorisole (Italien)
Verdampfer	EZ-2 Series Evaporator	Genvac, Ipswich (Großbritannien)

Spezifikationen HPCCC:

<u>Analytische Säulen:</u>	Volumen: 23,5 ml Innendurchmesser: 0,8 mm β -value: 0,64-0,81 Material: PTFE (Teflon ®)
<u>Semi-präparative Säulen:</u>	Volumen: 139 ml Innendurchmesser: 3,2 mm β -value: 0,052-0,86 Material: verstärktes PVC

Die Rotationsgeschwindigkeit war bei den durchgeführten Trennungen auf 1600 rpm eingestellt. Während der Trennung betrug die Temperatur des Instrumentes 30-32°C.

Vorbereitung

Lösungsmittel-Systeme:

Zur Durchführung eines HPCCC-Experiments wird ein zweiphasiges Lösungsmittel-System verwendet. Die miteinander nicht mischbare Ober- und Unterphase werden dabei als mobile und stationäre Phase eingesetzt. In dieser Arbeit ist die von Garrard modifizierte HEMWat-Methode angewendet worden (Mischungen aus Heptan, Ethylacetat (EtOAc), Methanol (MeOH), Butanol und Wasser), die gut für die Trennung apolarer Verbindungen geeignet ist. Für die Experimente wurde Heptan durch Hexan ausgetauscht. Bei den HEMWat-Systemen (siehe Tabelle 7, Seite 15) ist das Volumen von Hexan und Ethylacetat (unpolar, Oberphase) gleich dem Volumen von Methanol und Wasser (polar, Unterphase). Durch Änderung der Verhältnisse der einzelnen Lösungsmittel-Komponenten konnte eine Reihe von Systemen mit auf- bzw. absteigender Polarität dargestellt werden (Friesen und Pauli, 2005; Garrard, 2005). Gewöhnlich wurde die Oberphase als stationäre Phase und die Unterphase als mobile Phase verwendet.

Tabelle 7: HEMWat Systeme (Garrard, 2005)

Nr.	Hexan	EtOAc	MeOH	Wasser
12	1	3	1	3
13	2	5	2	5
14	1	2	1	2
15	2	3	2	3
16	5	6	5	6
18	6	5	6	5
20	2	1	2	1
22	3	1	3	1
24	5	1	5	1

Die Auswahl des Lösungsmittelsystems erfolgte durch DC-Analyse. Dazu wurden 1-5 mg Probe in einer 1:1 Mischung aus Ober (OP)- und Unterphase (UP) gelöst und gut durchmischt. Nachdem sich die Phasen wieder getrennt hatten, wurde je 1 ml von Ober- und Unterphase entnommen, in kleine Eproutetten (Gen-Vac Gläschen) überführt und getrocknet. Die Rückstände löste man für die DC Analyse in gleichen Volumina von DCM/MeOH (1:1).

Zur Auftrennung von Fraktionen sollten sich die zu isolierenden Substanzen in verschiedenen Phasen befinden. Für die Reindarstellung von Substanzen war jenes zweiphasige Lösungsmittelsystem am besten geeignet, bei dem die Konzentration der zu isolierenden Verbindung in Ober- und Unterphase gleich war.

Durchführung der Trennung

Die Lösungsmittel wurden im Verhältnis des gewählten HEMWat-Systems in einem Scheidetrichter gemischt und gut geschüttelt. Nachdem sich die Phasen wieder getrennt hatten, erfolgte die Überführung der Phasen in Messuren.

Zuerst wurden die analytischen bzw. semi-präparativen Säulen mit der stationären Phase gefüllt. Nach dem Erreichen der gewünschten Rotationsgeschwindigkeit konnte die mobile Phase mit einer Flussrate von 1 ml/min in das System gepumpt werden.

Die Lösung der Probe erfolgte in einer Mischung aus Ober- und Unterphase; durch Zentrifugation (5 Minuten bei 3600 rpm) sollten unlösliche Bestandteile entfernt werden. Die Probenschleife wurde mit dieser Emulsion beladen und in das System injiziert. Nachdem etwa das 1,5fache des Säulenvolumens an mobiler Phase durch das System gepumpt wurde, verwendete man die jeweils andere Phase als mobile Phase, um die noch nicht eluierten Bestandteile der Probe aus der Säule zu entfernen. Bei diesem Auswaschvorgang befand sich nur die unpolare oder polare Phase in der HPCCC-Säule. Die gewonnenen Fraktionen wurden mit dem Evaporator eingedampft und mittels DC analysiert.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Fraktionierungen erfolgten mittels analytischer Säule (siehe Seite 14). Je nach Löslichkeit und Ausgangsmenge der zu trennenden Fraktion wurden verschiedene Probenschleifen (2 ml, 3 ml oder 6 ml) gewählt.

2.2.1.4. *Solid phase extraction (SPE)*

Die Festphasenextraktion war eine chromatographische Methode, die in dieser Arbeit zur Entfernung von unerwünschten Begleitsubstanzen, die nicht durch HPCCC oder Säulenchromatographie abgetrennt werden konnten, genutzt wurde.

Die SPE-Experimente erfolgten mit folgenden Materialien:

SPE-Säule 1: Varian Mega BOND ELUT C18, Size 12 ml

SPE-Säule 2: Bakerbond spe C18, Size 3 ml

Durchführung:

Das Extraktionsröhrchen aus Polypropylen wurde auf einem Vakuum-Block montiert und mit einer Pumpe erfolgte die Einstellung eines Unterdrucks von 10-15“ Hg. Um mögliche polare Verunreinigungen der Säule zu entfernen, wurde zunächst die Säule mit Wasser gespült.

Zur Konditionierung des modifizierten Kieselgels wurde das Probenreservoir 2-3-mal mit MeOH gefüllt und durch die stationäre Phase gesaugt. Die anschließende Equilibrierung des Sorbens-Materials erfolgte mit Wasser.

Die Probe wurde in wenig DCM gelöst und auf die Säule aufgetragen. Da DCM für C18-Material ungeeignet war, trocknete man die aufgetragene Probe unter Luftstrom. Das Sorbens-Material wurde mit Elutionsmittel (Wasser-Methanol Mischungen) mit steigendem Methanol-Gehalt gespült, die Analyse der erhaltenen Eluenten erfolgte mittels DC. Die Arbeitsschritte sind in Abbildung 7 kurz dargestellt.

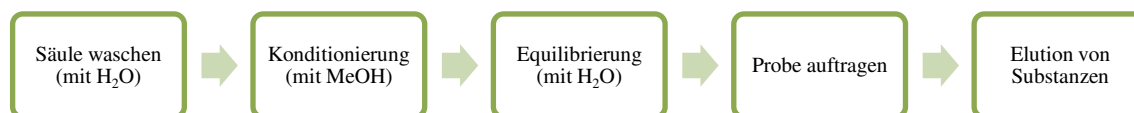


Abbildung 7: Arbeitsschritte bei der Festphasenextraktion

2.2.2. Spektroskopische Methoden

2.2.2.1. Kernresonanzspektroskopie (NMR)¹

Klassische 1D und Gradienten optimierte 2D NMR Experimente wurden mit einem NMR Spektrometer der Firma Bruker (Bruker Avance 500 – UltraShield, BrukerBioSpin, Rheinstetten - Deutschland) durchgeführt.

Aufnahmebedingungen:

Resonanzfrequenz	500,13 MHz (¹ H NMR) 125,75 MHz (¹³ C NMR)
Lösungsmittel	Deuteriertes Chloroform Deuteriertes Dimethylsulfoxid
Temperatur	298 K

¹ Für die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren danken wir Herrn a.o. Univ.-Prof. Dr. E. Urban, Department für pharmazeutische Chemie

Folgende Experimente wurden nach Herstellerangaben durchgeführt:

- ^1H NMR
- ^{13}C NMR
- ^1H COSY
- ^1H NOESY
- ^{13}C , ^1H HSQC
- ^{13}C , ^1H HMBC

Die in δ -Werten dargestellten chemischen Verschiebungen der jeweils betrachteten Kerne wurden auf den externen Standard Tetramethylsilan bezogen, dessen Signal man eine chemische Verschiebung von 0 ppm zuwies. Als interner Standard wurden die nicht-deuterierten Lösungsmittel-Signale von Chloroform (δ_{H} 7,26 ppm, δ_{C} 77,00 ppm) oder Dimethylsulfoxid (δ_{H} 2,50 und 3,3 ppm, δ_{C} 39,5) verwendet.

2.2.2.2. *Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie*² (ESI-MS)

Die ESI-MSⁿ Spektren wurden mit einem 3D-Ionenfalle Massenspektrometer (HCT, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) aufgenommen. Dazu bereitete man 0,5 ml einer in Dichlormethan-Methanol gelösten Probe (0,01 mg/ml).

Aufnahmebedingungen:

Kapillarspannung:	3,7 kV
Verneblergas:	7 psi (N ₂)
Trockengasfluss:	4 L/min (N ₂)
Trockengastemperatur:	250 °C
Kollisionsgas:	Helium

² Für die Aufnahme und Auswertung der ESI-MS Spektren danken wir Herrn Dr. M. Zehl, Department für Pharmakognosie

3. Ergebnisse

3.1. Fraktionierung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus verschiedenen B-Fractionen

Zur Auftrennung und Isolierung standen verschiedene B-Fractionen zur Verfügung. Die Zusammensetzung dieser Fractionen wird in Abbildung 8 dargestellt. Entsprechend dem vorliegenden Problem und dem festgelegtem Ziel wurde entweder die Säulenchromatographie, die HPLC oder die SPE als Trennmethode gewählt. Die weiter bearbeiteten Sammelfractionen erhielten die Bezeichnung: B-Fraction.Sammelfraction

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie

Mobile Phase: a: CHCl₃ : MeOH : H₂O (95 : 1,5 : 0,1)

b: CHCl₃ : MeOH : H₂O (80 : 10 : 1,0)

Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

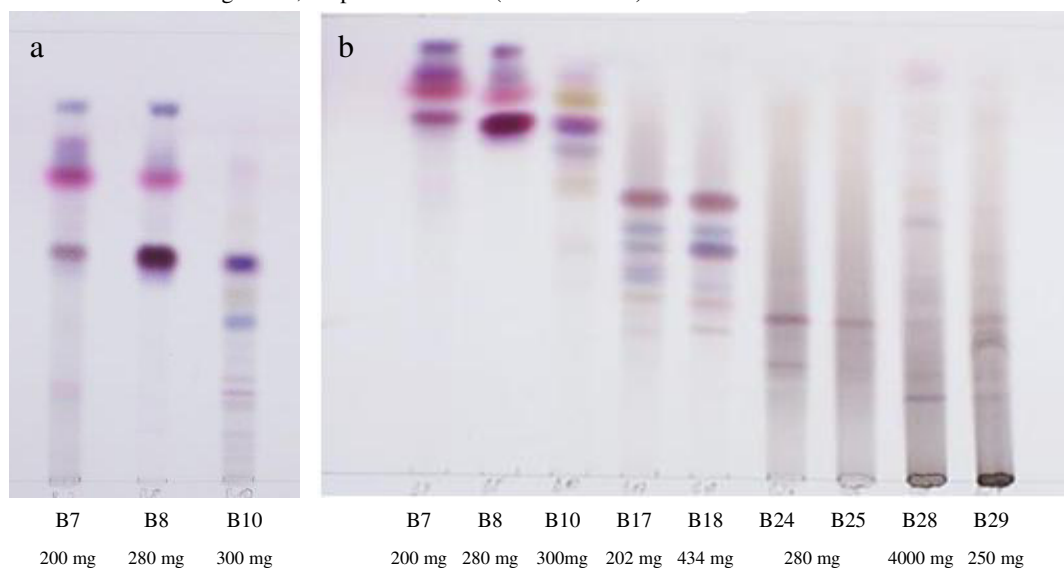


Abbildung 8: DC der untersuchten B-Fractionen

3.1.1. Fraktion B7

Fraktion B7 (200 mg) enthielt drei mengenmäßig vorherrschende Substanzen, die mittels Säulenchromatographie isoliert werden sollten. Um eine gute Trennung der Hauptsubstanzen zu gewährleisten, erfolgte die Bestimmung einer geeigneten mobilen Phase mittels DC (Durchführung siehe Seite 12). Die Säulenchromatographie wurde mit CH_2Cl_2 : MeOH : H_2O (95 : 1,5 : 0,1) als mobile Phase und Kieselgel (Säulendurchmesser 2 cm, Höhe 80 cm) als stationäre Phase eingesetzt. Dieses Experiment erfolgte mit 150 mg Probe.

Der Fraktionswechsel geschah nach jeweils 20 Minuten; es wurden insgesamt 182 Fraktionen zu je 3 ml gesammelt. Die Analyse jeder zweiten (Fraktion 42-100) bzw. jeder vierten Fraktion (Fraktion 104-182) erfolgte mittels DC; Fraktionen mit ähnlichem Bandenmuster wurden zu 15 Sammelfraktionen vereinigt. Die Zusammensetzung und die erhaltenen Massen der gewonnenen Sammelfraktionen sind in Abbildung 9 (Seite 21) und Tabelle 8 (Seite 21) dargestellt. Durch diese Trennung konnten zwei der drei Hauptsubstanzen gewonnen werden: Sammelfraktion 3 (6,7 mg) enthielt eine nach dem Besprühen mit ASR als blau-violette Zone sichtbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,8 (PO_38). Eine als rosa Bande erkennbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,63 (PO_39) war in Sammelfraktion 11 (8,1 mg) vorhanden.

Sammelfraktion 13 (9,5 mg) enthielt neben verschiedenen Begleitsubstanzen zwei Substanzen mit fast gleichem R_f -Wert (PO_40 und PO_41), die nach dem Besprühen mit ASR als violette Zone sichtbar waren. Für eine weitere Auftrennung und Reindarstellung war die Masse zu gering. Daher wurde versucht, Substanz PO_40 und PO_41 aus Fraktion B8 zu isolieren (siehe Seite 22).

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (95 : 1,5 : 0,1)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

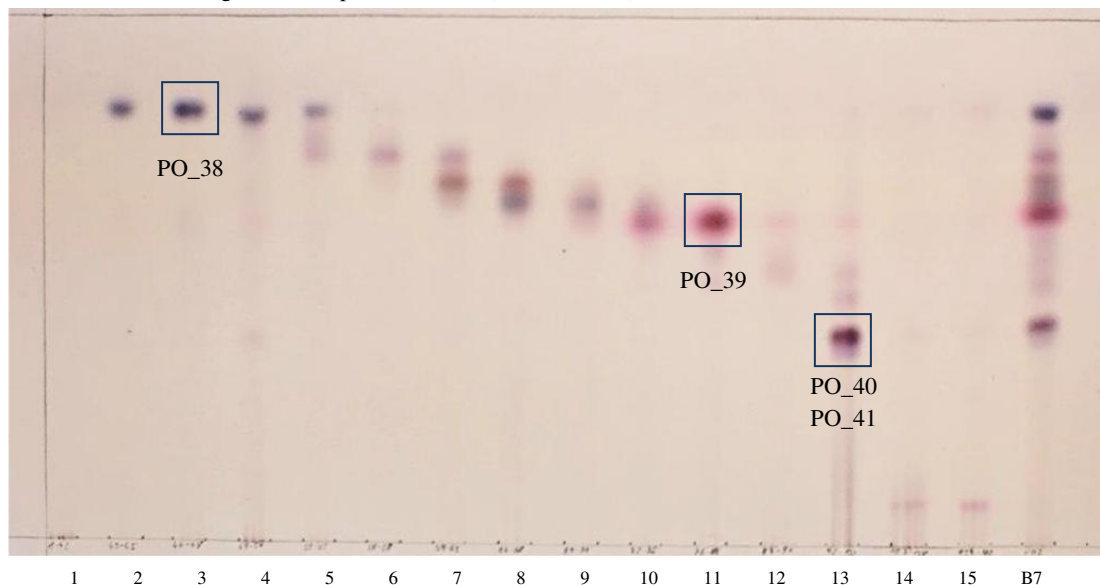


Abbildung 9: DC der Sammelfractionen der Säulenchromatographie von Fraktion B7

Tabelle 8: Sammelfractionen der Säulenchromatographie von Fraktion B7

Sammelfraktion	Fractionen	Masse (mg)	Ergebnis
1	1-42	5,6	
2	43-45	6,8	
3	46-48	6,7	Substanz PO_38 (Seite 52)
4	49-51	7,4	
5	52-55	7,0	
6	56-58	6,9	
7	59-63	6,5	
8	64-68	7,1	
9	69-71	7,1	
10	72-75	7,6	
11	76-86	8,1	Substanz PO_39 (Seite 52)
12	87-91	6,1	
13	92-122	9,5	
14	123-158	7,3	
15	159-182	6,9	

3.1.2. Fraktion B8

Fraktion B8 (280 mg) wies eine ähnliche Zusammensetzung wie Fraktion B7 auf; die Substanzen PO_40 und PO_41 lagen in einer höheren Konzentration vor (vgl. DC Seite 19). Da die beiden anderen mengenmäßig dominierenden Substanzen PO_38 und PO_39 bereits aus Fraktion B7 gewonnen worden waren, versuchte man mittels HPCCC die Verbindungen PO_40 und PO_41 zu isolieren.

Die erste HPCCC-Trennung wurde mit 230 mg Probe, einer 6 ml Probenschleife und Fließmittelsystem HEMWat 16 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) durchgeführt; als mobile Phase diente die Unterphase; der Fraktionswechsel erfolgte nach einer Minute. 80 Fraktionen wurden gesammelt, mittels DC analysiert und jene mit ähnlicher Zusammensetzung zu 16 Sammelfraktionen vereinigt. Dieses Experiment bewirkte die Entfernung von polarerer Verunreinigungen, welche neben Substanz PO_38, PO_39, PO_40 und PO_41 ebenfalls in Fraktion B8 enthalten waren. Das System wies für das vorliegende Trennungsproblem eine zu hohe Polarität auf, um die Substanzen PO_40 und PO_41 zu separieren. Sammelfraktion 14 (= B8.14, 187 mg) enthielt die Substanzen PO_38, PO_39, PO_40 und PO_41.

Das HPCCC-Experiment von Fraktion B8.14 wurde mit Fließmittelsystem HEMWat 20 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) durchgeführt (40 mg Probe, 6 ml Probenschleife, Fraktionswechsel nach 1,5 Minuten, Unterphase als mobile Phase). Dabei konnten 80 Fraktionen gesammelt werden. Nach der DC-Analyse wurden jene Fraktionen mit ähnlichem Bandenmuster zu 10 Sammelfraktionen vereinigt. Sammelfraktion 7 (0,9 mg) enthielt Substanz PO_38 mit vielen Verunreinigungen. Sammelfraktionen 8 (30,3 mg) und 9 (3,7 mg), die die Substanzen PO_38, PO_40 und PO_41 enthielten, wurden vereinigt und als Fraktion B8.14.8-9 (34 mg) bezeichnet.

Um Substanz PO_39 und andere Verbindungen, die apolarer waren, von Substanz PO_40 und PO_41 zu entfernen, wurde eine HPCCC mit Fraktion B8.14.8-9 (28,7 mg Probe, 2 ml Probenschleife, Fraktionswechsel nach 1,5 Minuten, Unterphase als mobile Phase) unter Verwendung des Fließmittelsystems HEMWat 24 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) durchgeführt. 80 Fraktionen konnten gesammelt und zu 6 Sammelfraktionen vereinigt werden. Diese Trennung zeigte, dass es sich bei der nach Besprühen mit ASR sichtbaren violetten Bande um zwei Verbindungen mit fast identem R_f -Wert handelte. In Sammelfraktion 1 (1,6 mg) war eine nach dem Besprühen als rosa-violette Zone sichtbare

Substanz mit dem R_f -Wert von 0,56 relativ rein enthalten (PO_40). Die nach Besprühen als violette Bande erscheinende Substanz mit dem R_f -Wert von 0,59 (PO_41) konnte in Sammelfraktion 3 gewonnen werden.

In Abbildung 10 und Tabelle 9 sind die Zusammensetzung und die erhaltenen Massen der gewonnenen Sammelfraktionen dargestellt.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (90 : 3,5 : 0,2)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

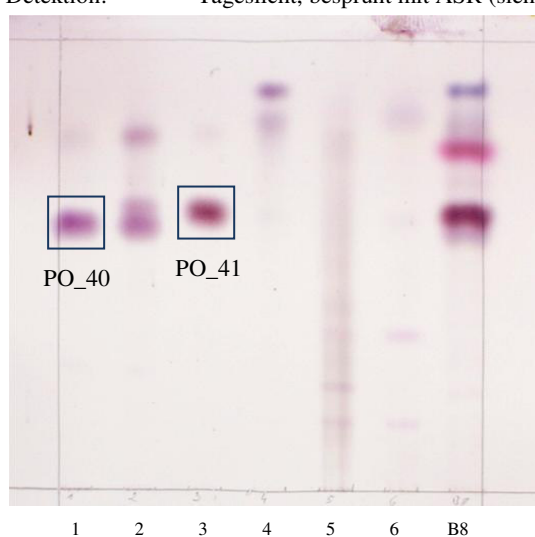


Abbildung 10: DC der Sammelfraktionen der HPCCC von Fraktion B8.14.8-9

Tabelle 9: Sammelfraktionen der HPCCC von Fraktion B8.14.8-9

Sammelfraktion	Fraktionen	Masse (mg)	Ergebnis
1	52-54	1,6	Substanz PO_40 (siehe Seite 53)
2	55	0,4	
3	56-57	10,7	Substanz PO_41 (siehe Seite 57)
4	58-60	14,2	
5	1-51	0,5	
6	61-80	1,4	

3.1.3. Fraktion B10

Fraktion B10 (300 mg) wies wie die bereits beschriebenen Fraktionen B7 und B8 ein relativ unpolares Substanzspektrum auf. Die nach dem Besprühen mit ASR sichtbare blaue Zone hatte einen ähnlichen R_f -Wert wie die bereits isolierten Substanzen PO_40 und PO_41. Die Banden-Färbung zeigte aber, dass neben den bereits gewonnenen Substanzen noch eine weitere vorhanden war (vgl. DC Seite 19). Bei der nach Besprühen erkennbaren braunen Zone handelte es sich um mehrere Substanzen mit sehr ähnlicher Polarität. Das Ziel war, mit verschiedenen HPCCC-Trennungen die Hauptsubstanzen dieser Fraktion zu isolieren.

Die Ermittlung eines geeigneten HEMWat-System für die Separation der vorliegenden Fraktion erfolgte durch Ausschütteln von etwas Probe in verschiedenen zweiphasigen Systemen (Durchführung siehe Seite 15). Die Ober- (OP) und Unterphase (UP) wurden getrennt und mittels DC untersucht (siehe Abbildung 11, Seite 25). Die chromatographische Analyse dieses Verteilungsexperimentes zeigte, dass die in der DC als braune Bande sichtbaren Verbindungen bereits in dem polarerem HEMWat-System 16 etwas und im HEMWat-System 20 fast vollständig in der unteren, polaren Phase löslich waren. Im Vergleich dazu befand sich die in der DC als blaue Bande sichtbare Substanz (siehe Pfeil Abbildung 11, Seite 25) ausschließlich in der oberen, apolaren Phase. Die in der DC erkennbare blau-violette Bande (R_f -Wert von 0,6) stellte wahrscheinlich eine Mischung verschiedener Substanzen dar (vgl. Auftrennung von Fraktion B8, Seite 22) von denen eine Verbindung ab HEMWat-System 20 auch in der Unterphase vorhanden war.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (90 : 3,5 : 0,2)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

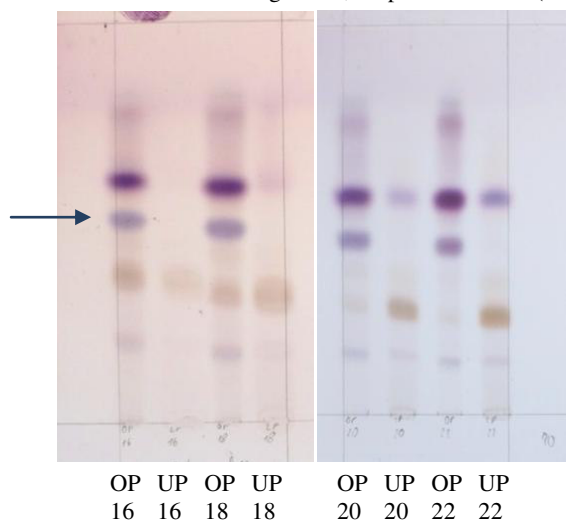


Abbildung 11: DC von Fraktion B10 nach Verteilung in unterschiedlichen HEMWat-Systemen
 OP = Oberphase; UP = Unterphase
 die Zahlen in der Beschriftung geben das verwendete HEMWat-System an (vgl. Tabelle 7, Seite 15)

Es konnte gezeigt werden, dass mit HEMWat-System 22 die vorhandenen Verbindungen bestmöglich voneinander getrennt wurden. Daher erfolgte die Separation von Fraktion B10 mit diesem Fließmittelsystem.

Zur Fraktionierung von 100 mg Probe wurde die Unterphase als mobile Phase, eine 3 ml Probenschleife und ein Fraktionswechsel nach 1,5 Minuten gewählt. Nach der Trocknung der erhaltenen 80 Fraktionen waren in den Fraktionen 26 bis 31 weiße Kristalle neben leichten Verunreinigungen zu erkennen. Die Kristalle wurden aus den Fraktionen 26-31 in Eprouvetten übergeführt und als Fraktionen K26 bis K31 bezeichnet. Die DC-Analyse aller Fraktionen zeigte, dass die gewonnenen Kristalle in Fraktion K26 bis K31 einer nach dem Besprühen mit ASR als blaue Zone sichtbaren Substanz mit dem R_f -Wert von 0,59 entsprachen (PO₄₄). In hoher Reinheit war diese Substanz in den Fraktionen K27 bis K30 vorhanden, weshalb diese zur Sammelfraktion 13 (4,7 mg) vereint wurden. Fraktion K26 und K30, die noch geringfügige Verunreinigungen aufwiesen, resultierten in Sammelfraktion 12 (0,7 mg; siehe Abbildung 12, Seite 26). Jene Fraktionen, die in der durchgeführten DC eine ähnliche Zusammensetzung aufwiesen, fasste man in den Sammelfraktionen 1-11 zusammen (siehe Abbildung 12, Tabelle 10, Seite 26).

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie

Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (90 : 3,5 : 0,2)

Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

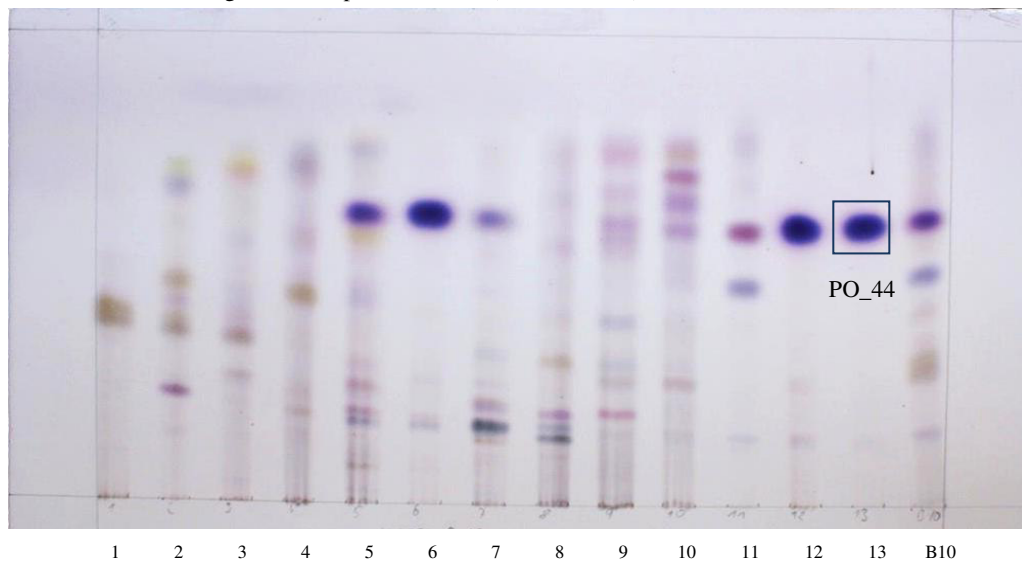


Abbildung 12: DC der Sammelfractionen der Trennung von Fraktion B10 mit HPCCC

Tabelle 10: Sammelfractionen der Trennung von Fraktion B10 mit HPCCC

Sammelfraktion	Unterfraktion	Masse (mg)	Ergebnis
1 (= B10.1)	1-4	21,2	Siehe Kapitel 3.1.4 (Seite 27)
2	5-6	10,5	
3	7-10	4,5	
4	11-13	0,8	Vergleich mit Sterolen (Seite 51)
5	14-26	5,5	
6	27-32	11,0	
7	33-40	3,4	
8	41-54	1,2	
9	55-58	1,4	
10	59-61	2,7	
11	62-80	32,4	Substanz PO ₄₄ (Seite 62)
Kristalle			
12	K26+K31	0,7	
13	K27-K30	4,7	

Da Phytosterole eine ähnliche Polarität und nach dem Besprühen mit ASR ebenfalls eine blau-violette Färbung zeigen, sind Substanz PO_44 und Sammelfraktion 11 mit bekannten Phytosterolen verglichen worden (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 51).

3.1.4. Fraktion B10.1

Fraktion B10.1 (21,2 mg) stammte aus der Auftrennung von Fraktion B10 (siehe Kapitel 3.1.3, Seite 24). Die DC (Abbildung 12, Seite 26) zeigte, dass zwei als braune Banden sichtbare Substanzen mit sehr ähnlicher Polarität in dieser Fraktion vorhanden waren. Um diese beiden Verbindungen zu isolieren, wurde eine HPCCC-Trennung (20 mg Probe, 2 ml Probenschleife, Fraktionswechsel nach 1,5 Minuten) mit dem zweiphasigen System HEMWat 18 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) durchgeführt. Die Auswahl dieses Systems beruhte auf der HEMWat-Testung von Fraktion B10 (siehe Abbildung 11, Seite 25). Im HEMWat-System 18 waren die auf der DC als braune Zonen sichtbare Substanzen in annähernd gleicher Konzentration in Ober- und Unterphase enthalten.

Die erhaltenen 80 Fraktionen wurden mittels DC untersucht und Fraktionen mit ähnlichem Bandenmuster fasste man zu 7 Sammelfractionen zusammen (siehe Abbildung 13, Tabelle 11, Seite 28). In den Fraktionen 12 und 13 befanden sich nach der Trocknung Kristalle, die in Eprouvetten übergeführt und als Fraktionen 12a und 13a bezeichnet wurden. Die DC-Analyse der erhaltenen Fraktionen zeigte, dass es sich bei diesen Kristallen um die in der DC als braune, intensiv grün fluoreszierende Bande sichtbare Substanz PO_45 mit dem Rf-Wert von 0,37 handelte. Gut aufgereinigt war diese in Sammelfraktion 4 (1,82 mg) enthalten. Die zweite nach dem Besprühen mit ASR als braune Zone erkennbare Substanz (Rf-Wert 0,3), die keine Fluoreszenz bei UV₃₆₆ aufwies, konnte gut von Substanz PO_45 getrennt werden, enthielt aber noch viele Verunreinigungen (vgl. Sammelfraktion 6).

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie

Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (90 : 3,5 : 0,2)

Detektion: besprüht mit ASR (siehe Seite 12), a: Tageslicht, b: UV₃₆₆

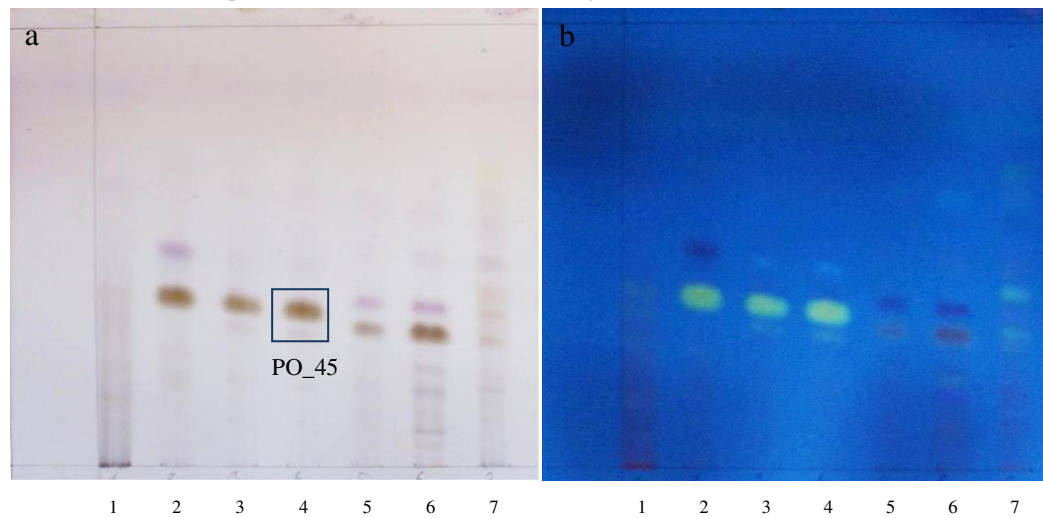


Abbildung 13: Ausschnitt der DC der Sammelfractionen der Trennung von Fraktion B10.1 mit HPCCC

Tabelle 11: Sammelfractionen der Trennung von Fraktion B10.1 mit HPCCC

Sammelfraktion	Fraktionen	Masse (mg)	Ergebnis
1	1-11+14	3,7	
2	12+12a	3,4	
3	13	2,1	
4	13a	1,8	Substanz PO ₄₅ (Seite 66)
5	15	1,6	
6	16-17	4,9	
7	18-21	1,3	
8	22-24	1,2	
9	25-49	1,2	
10	50-58	1,4	
11	59-80	1,4	

3.1.5. Fraktion B24/25

Die Fraktionen B24 und B25 (280 mg) wurden aufgrund ihrer ähnlichen Zusammensetzung und um die Ausgangsmenge zu erhöhen, vereinigt. Mittels Säulenchromatographie versuchte man, die beiden Hauptsubstanzen von den zahlreichen, als Verunreinigung betrachteten Verbindungen, zu trennen. Da das mit Probe beladene Kieselgel beim Auftragen auf die Säule klumpte, wurde es mit mehr Adsorptionsmaterial versetzt und konnte somit luftblasenfrei auf die Kieselgelsäule appliziert werden. Die Höhe der Startzone wurde jedoch stark vergrößert, was die Trennleistung beeinträchtigte.

Eine für die Entfernung von Begleitsubstanzen geeignete mobile Phase wurde mittels DC ermittelt. Dazu erfolgte die Entwicklung der Probe in verschiedenen Chloroform-Fließmittelsystemen für die DC. Mit dem Fließmittel $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (75 : 15 : 2,0) konnten die Verbindungen gut voneinander getrennt werden und wiesen einen R_f -Wert von etwa 0,5 auf, weshalb $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (85 : 8 : 0,5) als mobile Phase für die folgende Fraktionierung gewählt wurde. Als stationäre Phase fungierte Kieselgel (Säulendurchmesser 2 cm, Höhe: 80 cm). Die Fraktionierung erfolgte mit 196 mg Probe; es konnten 233 Fraktionen zu je 2,5 ml gesammelt werden; jene mit ähnlichem Bandenprofil wurden zu Sammelfraktionen vereinigt. Die Zusammensetzung der gewonnenen Sammelfraktionen wurde mittels DC (siehe Abbildung 14) untersucht; die erhaltenen Massen sind in Tabelle 12 (Seite 30) dargestellt.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie

Mobile Phase: $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (75 : 15 : 2,0)

Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

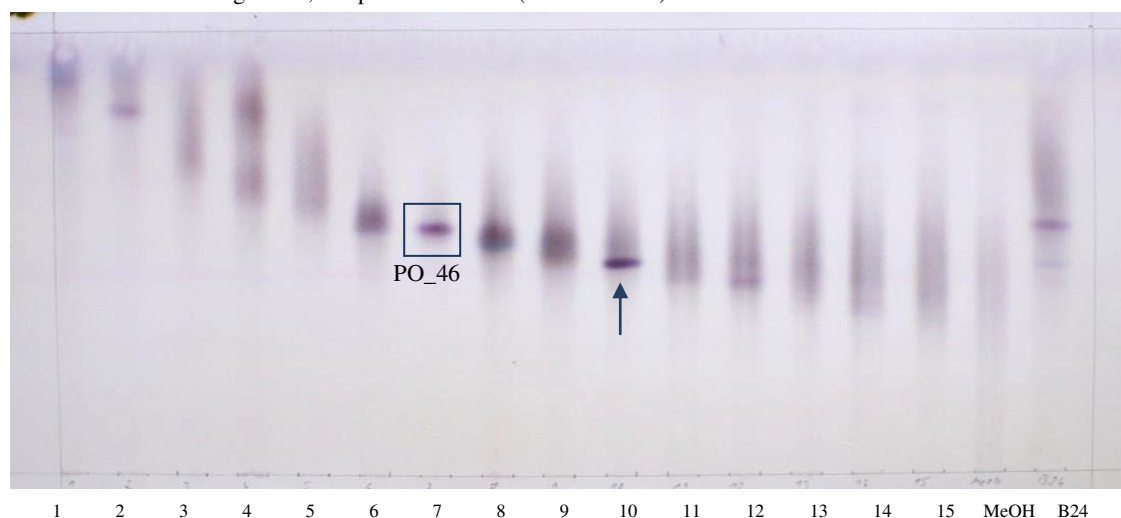


Abbildung 14: DC der Sammelfraktionen der Säulenchromatographie von Fraktion B24/25

Tabelle 12: Sammelfractionen der Säulenchromatographie von Fraktion B24/25

Sammelfraktion	Unterfraktion	Masse (mg)	Ergebnis
1	1-19	0,7	
2	20-22	0,7	
3	23-31	4,7	
4	32-53	2,9	
5	54-65	36,5	
6	66-69	5,6	
7 (=B24/25.7)	70-77	15,8	Siehe Kapitel 3.1.6 (Seite 30)
8	78-85	4,5	
9	86-93	2,8	
10 (=B24/25.10)	94-108	4,1	Siehe Kapitel 3.1.7 (Seite 31)
11	109-127	2,0	
12	128-146	1,7	
13	147-163	1,1	
14	164-203	1,3	
15	204-233	1,4	

In Sammelfraktion 7 (15,8 mg) war eine nach dem Besprühen mit ASR als braune Bande sichtbare Substanz (PO_46) mit einem R_f -Wert von 0,55 etwas verunreinigt vorzufinden. Die zweite Hauptsubstanz (siehe Pfeil Abbildung 14, Seite 29) war in Sammelfraktion 10 (4,1 mg) neben zahlreichen Begleitsubstanzen enthalten.

3.1.6. Fraktion B24/25.7

Fraktion B24/25.7 (15,8 mg) wurde mittels Säulenchromatographie aus Fraktion B24/25 gewonnen (siehe Kapitel 3.1.5, Seite 29). Um die darin enthaltene Substanz PO_46 rein darzustellen, wurde eine HPCCC-Trennung (10,7 mg Probe, 2 ml Probenschleife, Fraktionswechsel nach 1,5 Minuten, Unterphase als mobile Phase) mit HEMWat-System 15 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) durchgeführt. Es konnten 80 Fraktionen gesammelt werden und jene mit ähnlicher Zusammensetzung wurden zu 9 Sammelfractionen vereinigt. Die DC-Überprüfung der gewonnenen Sammelfractionen ist in Abbildung 15 (Seite 31) dargestellt. In Sammelfraktion 2 (2,9 mg) war die Substanz PO_46 rein enthalten.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (75 : 15 : 2,0)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

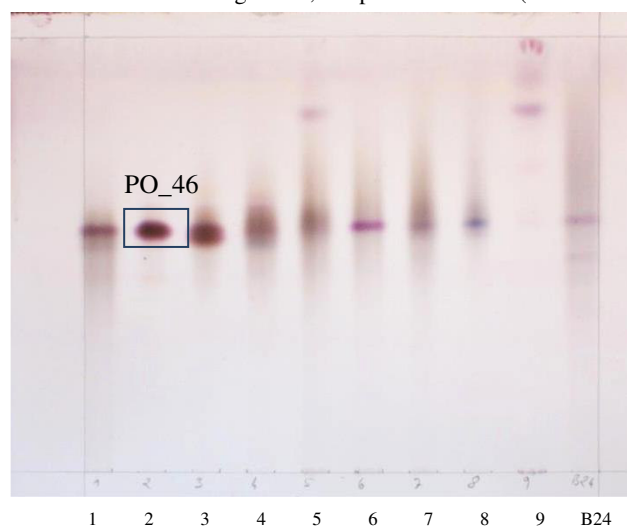


Abbildung 15: DC der Sammelfractionen der HPCCC von Fraktion B24/25.7

3.1.7. Fraktion B24/25.10

Fraktion B24/25.10 (4,1 mg) konnte mittels Säulenchromatographie aus Fraktion B24/25 (siehe Kapitel 3.1.5, Seite 29) gewonnen werden. Um die nach dem Besprühen mit ASR als violette Bande sichtbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,44 aus dieser Fraktion zu isolieren, wurde eine weitere Säulenchromatographie mit 3,5 mg Probe, mit Kieselgel als stationäre Phase (Höhe: 18,5 cm, Durchmesser 0,5 cm) und dem Fließmittelsystem CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O (85 : 8 : 0,5) durchgeführt. Die Analyse der im Abstand von zwei Minuten erhaltenen 72 Fraktionen zu je 0,3 ml erfolgte mittels DC. Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung wurden zu 4 Sammelfractionen vereinigt und erneut dünnschichtchromatographisch untersucht (siehe Abbildung 16, Seite 32). In Sammelfraktion 3 konnten nur 0,3 mg der Substanz relativ rein dargestellt werden.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (75 : 15 : 2,0)
Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

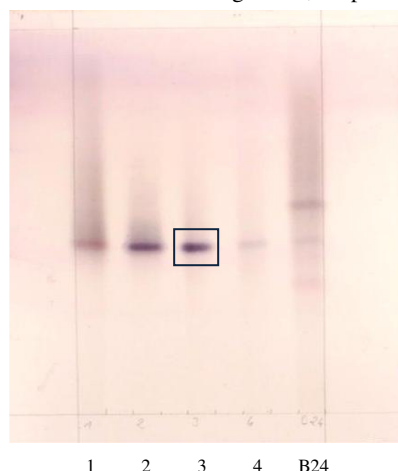


Abbildung 16: DC der Sammelfractionen der Säulenchromatographie von Fraktion B24/25.10

3.1.8. Fraktion B28 und B28.4

Fraktion B28 (4000 mg) wurde mittels Säulenchromatographie aufgetrennt. Als mobile Phase dienten DCM, Methanol und Methanol/Wasser (1:1) und es konnten 8 Fraktionen zu je 250 ml gesammelt werden. Die aus dieser Separation stammende Sammelfraktion 4 (= B28.4, 897 mg) enthielt eine nach dem Besprühen mit ASR als violette Bande sichtbare Verbindung mit dem R_f-Wert von 0,34 (PO₅₀), die mittels HPCCC isoliert werden sollte. Die Bestimmung des zweiphasigen flüssigen Systems für die HPCCC-Trennung erfolgte durch Ausschütteln von jeweils 6 mg Probe in verschiedenen zweiphasigen flüssigen Systemen (Durchführung siehe Seite 15). Nachdem sich die Phasen wieder getrennt hatten, wurde ein Aliquot aus Ober- und Unterphase entnommen, getrocknet und mittels DC analysiert (siehe Abbildung 17, Seite 33). HEMWat-System 15 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) wurde für die Isolation ausgewählt, da dieses in der Lage war, einen Großteil der in dieser Fraktion vorhandenen Verunreinigungen in der Unterphase zurückzuhalten, während Substanz PO₅₀ unter diesen Bedingungen in beiden Phasen vorkam.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (75 : 15 : 2,0)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

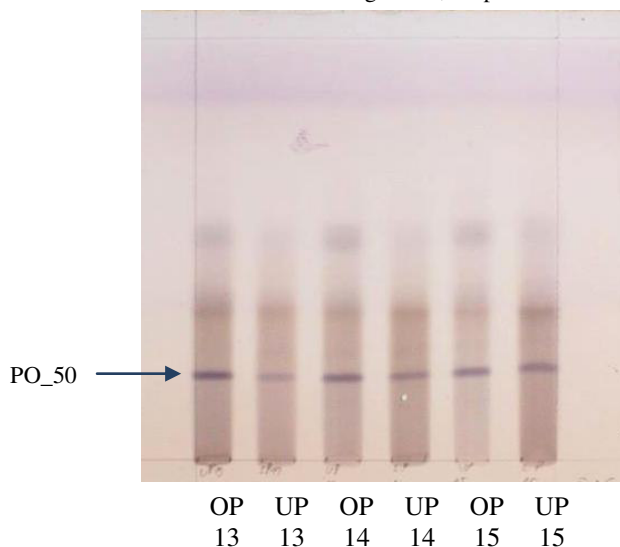


Abbildung 17: DC von Fraktion B28.4 nach Verteilung in unterschiedliche HEMWat-Systemen
 OP = Oberphase, UP = Unterphase
 die Zahlen in der Beschriftung geben das HEMWat-System an (vgl. Tabelle 7, Seite 15)

Zur Vorbereitung für die HPCCC wurden 890 mg Probe mit 20 ml einer 2:3 Mischung aus Ober- und Unterphase (HEMWat 15; vgl. Tabelle 7, Seite 15) versetzt und im Ultraschallbad suspendiert. Damit etwaige nicht lösliche Bestandteile abgetrennt werden konnten, erfolgte eine Zentrifugation des Probenkonzentrates (10 Minuten bei 3500 rpm). An der Phasengrenze zwischen Ober- und Unterphase bildete sich eine wachsartige Zwischenphase (ZP) und in der Unterphase setzte sich eine zähflüssige Masse ab. Die entstandenen 4 Phasen wurden getrennt und dünnschichtchromatographisch untersucht. Substanz PO₅₀ war in der Zwischenphase aufkonzentriert vorhanden.

Um Substanz PO₅₀ weiter aufzureinigen, erfolgte eine Suspension der Zwischenphase in der vorbereiteten Lösungsmittelmischung (HEMWat System 15), wobei die geringe Löslichkeit von Substanz PO₅₀ in dieser Flüssigkeit genutzt wurde. Mit Filtration unter vermindertem Druck konnten die unlöslichen Bestandteile von der flüssigen Phase getrennt werden. Der erhaltene Rückstand wurde anschließend mehrmals mit Ober- und Unterphase dieses zweiphasigen Lösungsmittelsystems gewaschen. Um Substanz PO₅₀ in hoher Reinheit zu erhalten, erfolgte ein Abkratzen von nicht durch Begleitsubstanzen verfärbten Stücken des Rückstandes vom Filterpapier (Fraktion 1). Der auf dem Filterpapier verbleibende Rest wurde durch Extraktion des Filters in einer Mischung von DCM und MeOH (1:1) im Ultraschallbad gewonnen (Fraktion 2). Eine DC-Analyse von

Fraktion 1 und 2, dem getrockneten Filtrat (Fraktion 3), von Ober- und Unterphase und dem zähflüssigen Rückstand aus der Unterphase ist in Abbildung 18 dargestellt. Dadurch war erkennbar, dass die durch Abkratzen gewonnene Substanz in eine polarere Verbindung zerfiel, während jene leicht verunreinigte Masse des Filterkuchens eine höhere Stabilität aufwies (siehe Fraktion 2). Es konnte auch gezeigt werden, dass durch Ausschüttelung und Filtration Substanz PO_50 gut von den Begleitverbindungen getrennt wurde; 11,1 mg konnten somit von dieser wachsartigen Verbindung in Fraktion 2 gewonnen werden. In Tabelle 13 sind die jeweiligen Auswaagen der erhaltenen Fraktionen dargestellt.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (75 : 15 : 2,0)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

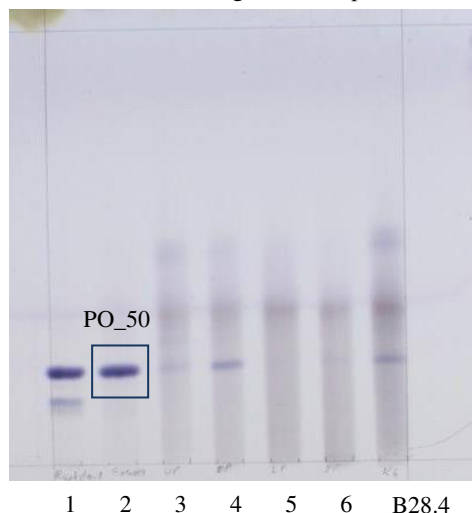


Abbildung 18: DC der erhaltenen Fraktionen durch HPCCC-Probenvorbereitung von Fraktion B28.4

Tabelle 13: Sammelfraktionen der HPCCC-Probenvorbereitung der Fraktion B28.4

ZP = Zwischenphase, OP = Oberphase, UP = Unterphase

Fraktion	Phase	Masse (mg)	Ergebnis
1	ZP gewaschen, unrein	2,0	
2	ZP gewaschen	11,1	Substanz PO_50 (Seite 77)
3	OP	404,4	
4	ZP Rest	18,2	
5	UP	166,9	
6	Zentrifugat UP	279,5	

3.1.9. Fraktion B29

Fraktion B29 (250 mg) enthielt neben zahlreichen, als Verunreinigung betrachteten Verbindungen, vier auf der DC schwach sichtbare Substanzbanden, die mittels Säulenchromatographie isoliert werden sollten. Eine geeignete mobile Phase wurde mittels DC in verschiedenen Fließmittelsystemen ermittelt. Da mit CHCl_3 : MeOH : H_2O (75 : 15 : 2,0) als Fließmittel eine zufriedenstellende Trennung der einzelnen Banden erfolgte, wurde für die Säulenchromatographie CH_2Cl_2 : MeOH : H_2O (85 : 8 : 0,5) als mobile Phase gewählt. Die Separation von 200 mg Probe erfolgte mit Kieselgel als stationäre Phase (Höhe: 80 cm, Säulendurchmesser 2 cm); es konnten 334 Fraktionen zu je 2 ml gesammelt werden. Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung wurden zu 15 Sammelfraktionen vereinigt. Die Überprüfung der erhaltenen Sammelfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit CHCl_3 : MeOH : H_2O : HCOOH (80 : 10 : 1,0 : 1,0) als Fließmittel (siehe Abbildung 19). Die bestimmten Massen sind in Tabelle 14 (Seite 36) aufgelistet.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie

Mobile Phase: CHCl_3 : MeOH : H_2O : HCOOH (80 : 10 : 1,0 : 1,0)

Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

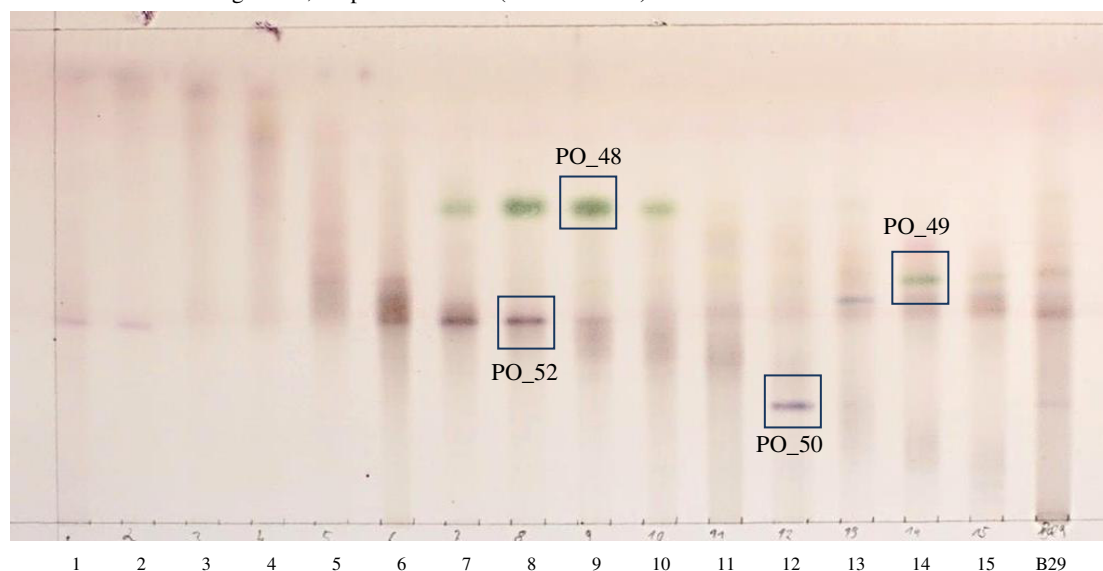


Abbildung 19: DC der Sammelfraktion der Säulenchromatographie von Fraktion B29

Tabelle 14: Sammelfractionen der Säulenchromatographie von Fraktion B29

Sammelfraktion	Fraktionen	Masse (mg)	Ergebnis
1	1-13	1,3	
2	14-16	1,9	
3	17-18	2,4	
4	19-22	3,4	
5	23-38	13,0	
6	39-48	6,4	
7	49-57	4,8	{ Fraktion B29.7-10 siehe Kapitel 3.1.10 (Seite 37)
8	58-76	10,5	
9	77-84	3,9	
10	85-90	2,2	
11	91-120	7,1	
12	121-181	9,5	ident mit PO_50 (Seite 77)
13	182-270	19,0	
14	271-300	8,7	{ Fraktion B29.14-15 siehe Kapitel 3.1.11 (Seite 38)
15	301-334	5,0	

Die mengenmäßig dominierenden Substanzen konnten in den jeweiligen Sammelfractionen aufkonzentriert werden. Sammelfraktion 12 enthielt eine als violette Bande sichtbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,24. Auf der mit ASR besprühten DC wies diese Verbindung eine ähnliche Polarität und Farbe wie Substanz PO_50 auf, die aus Fraktion B28.4 (siehe Seite 32) isoliert werden konnte. Der dünnschichtchromatographische Vergleich zeigte, dass es sich bei der in Sammelfraktion 12 sichtbaren violetten Zone um Substanz PO_50 handelte.

3.1.10. Fraktion B29.7-10

Die Sammelfraktionen 7-10 (21,4 mg), die aus der Säulenchromatographie von Fraktion B29 (siehe Kapitel 3.1.9, Seite 35) stammten und eine auf der DC als grüne Zone sichtbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,53 (PO_48) enthielten, wurden vereint und sollten mittels Säulenchromatographie aufgetrennt werden. In den Sammelfraktionen 7 und 8 war neben Substanz PO_48 noch eine auf der DC als violette Bande sichtbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,29 (PO_52) enthalten. Um die vorliegenden Substanzen zu trennen, wurde eine Säulenchromatographie mit 20 mg Probe, mit Kieselgel als stationäre Phase (Säulendurchmesser 1 cm, Höhe 67 cm) und CH_2Cl_2 : MeOH : H_2O (90 : 3,5 : 0,2) als mobile Phase durchgeführt. Die Sammlung der 450 Fraktionen erfolgte im Abstand von 10 Minuten zu je 1,5 ml.

Nach Vereinigung von Fraktionen mit ähnlichem Bandenspektrum zu 12 Sammelfraktionen wurden diese erneut dünnsschichtchromatographisch analysiert (siehe Abbildung 20). Die DC-Überprüfung ergab, dass durch diese Trennung drei Substanzen mäßig rein isoliert werden konnten: 3,4 mg von Substanz PO_48 mit dem R_f -Wert von 0,53 (Sammelfraktion 11), 1,3 mg von Substanz PO_52 mit dem R_f -Wert von 0,29 (Sammelfraktion 7) und 1,6 mg von einer nach dem Besprühen mit ASR als schwach lila gefärbte Bande sichtbare Substanz (PO_51) mit dem R_f -Wert von 0,55 (Sammelfraktion 3).

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
Mobile Phase: CHCl_3 : MeOH : H_2O : HCOOH (80 : 10 : 1,0 : 1,0)
Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

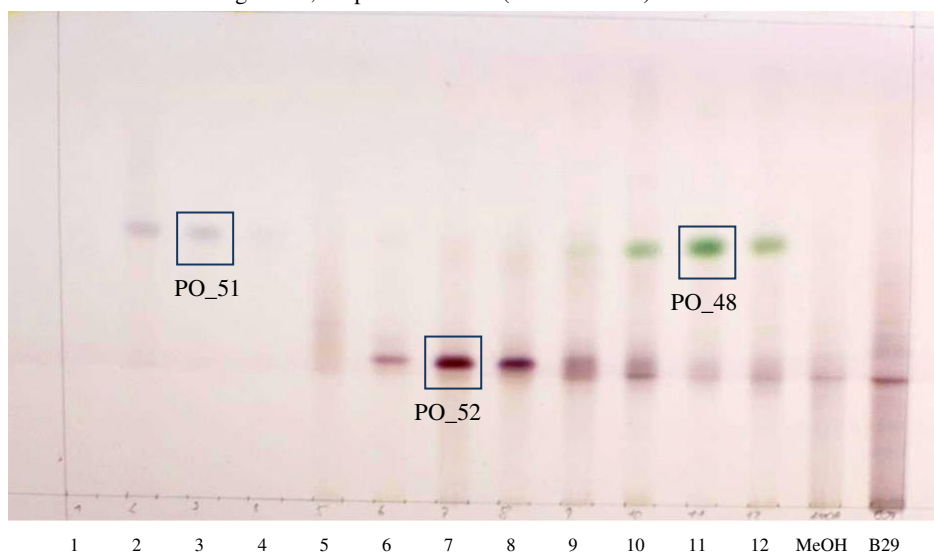


Abbildung 20: DC der Sammelfraktionen der Säulenchromatographie von Fraktion B29.7-10

3.1.11. Fraktion B29.14-15

Mittels Säulenchromatographie der Fraktion B29 konnten die Sammelfraktionen 14 (8,7 mg) und 15 (5 mg) gewonnen werden (siehe Kapitel 3.1.9, Seite 35). Beide Fraktionen enthielten eine auf der DC als grüne Bande sichtbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,49 (PO_49), weshalb sie, um die Ausgangsmasse für die folgende Trennung zu erhöhen, vereint wurden. Die Auftrennung mittels HPCCC (9,9 mg Probe, 2 ml Probenschleife, Fraktionswechsel nach 1,5 Minuten, Unterphase als mobile Phase) erfolgte mit HEMWat-System 15 (vgl. Tabelle 7, Seite 15). Die erhaltenen 80 Fraktionen wurden mittels DC untersucht und jene mit ähnlicher Zusammensetzung zu 9 Sammelfraktionen vereinigt (siehe Abbildung 21).

Bei der Vorbereitung des Probenkonzentrates für die HPCCC bildete sich ein unlöslicher Rückstand. DC-Analyse dieses tief grün gefärbten Produktes zeigte, dass Substanz PO_49 darin angereichert war. Dieser Rückstand wurde gemeinsam mit Sammelfraktionen 6 (0,6 mg) und 7 (1,2 mg) mehrmals mit einer Mischung aus MeOH und H₂O im Verhältnis 1:1 versetzt und zentrifugiert (10 Minuten, 3500 rpm).

Dabei sammelte sich Substanz PO_49 am Boden, und die wässrige Methanolphase wurde abgenommen. Durch diese Ausschüttelungsvorgänge konnten die vorhandenen Begleitsubstanzen etwas reduziert und 1,2 mg von Substanz PO_49 mäßig rein in Sammelfraktion 10 gewonnen werden.

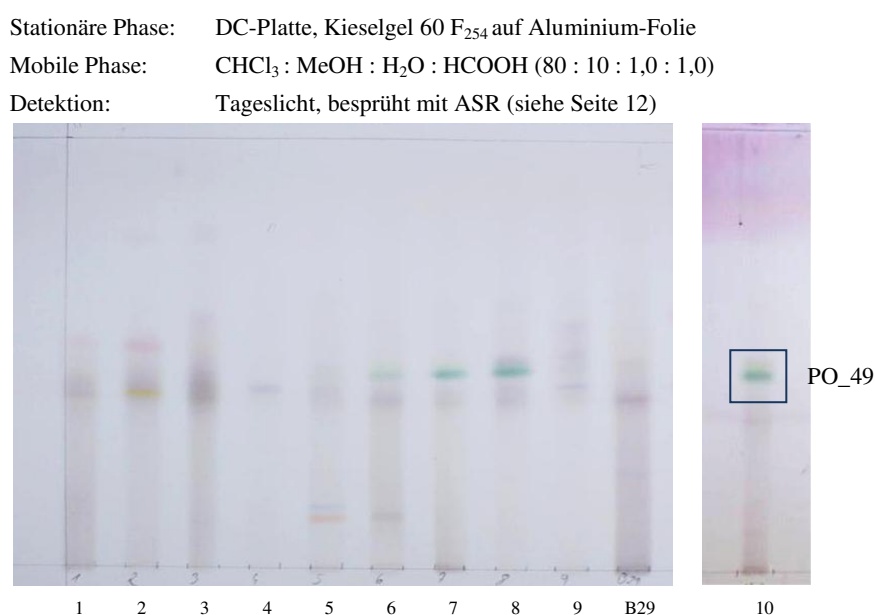


Abbildung 21: DC der Sammelfraktionen der Auftrennung von Fraktion B29.14-15

3.1.12. Fraktion B17

Fraktion B17 (202 mg) enthielt verschiedene, nach dem Besprühen mit ASR auf der DC sichtbare Substanzbanden, die mittels Säulenchromatographie isoliert werden sollten. Da das Sorbens, auf welches die Probe aufzubringen war, bereits mit wenig Probe klumpte, wurden Fraktion B17 mittels HPCCC aufgetrennt. Die Fraktionierung von 110 mg Probe erfolgte mit dem Fließmittelsystem HEMWat 18 (vgl. Tabelle 7, Seite 15), einer 3 ml Probenschleife, einem Fraktionswechsel nach 1 Minute und der Oberphase als mobile Phase. Die erhaltenen 80 Fraktionen wurden mittels DC analysiert und jene mit ähnlicher Zusammensetzung zu 18 Sammelfraktionen vereinigt. Die Zusammensetzung und die erhaltenen Massen der vereinten Fraktionen sind in Abbildung 22 und in Tabelle 15 (Seite 40) dargestellt.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie

Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (80 : 10 : 1,0)

Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

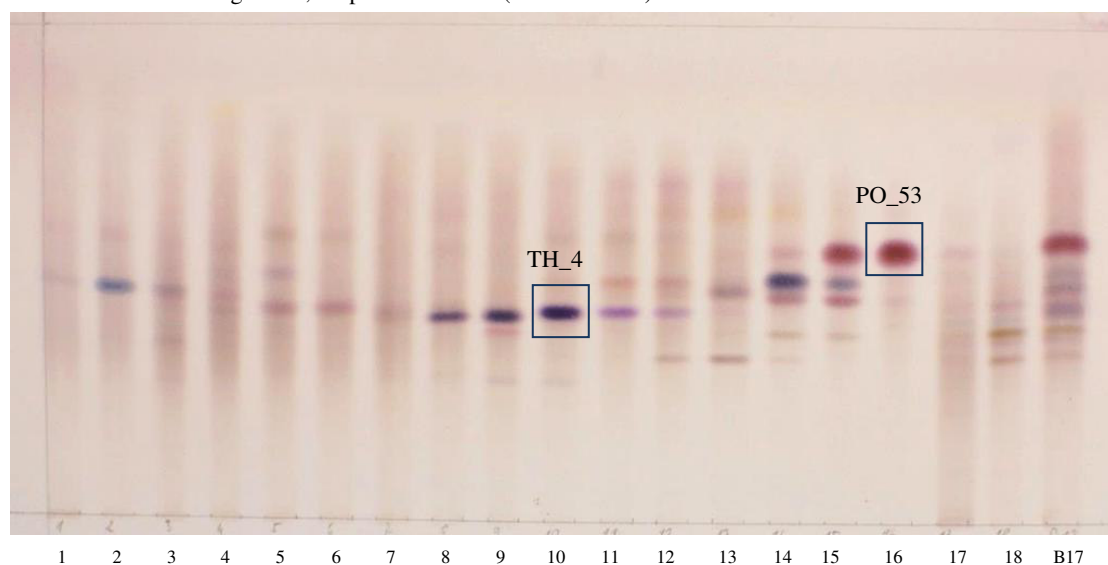


Abbildung 22: DC der Sammelfraktion der HPCCC von Fraktion B17

Tabelle 15: Sammelfractionen der HPCCC von Fraktion B17

Sammelfraktion	Fraktionen	Masse (mg)	Ergebnis
1	1-14	2,2	
2	15-17	16,1	
3	18-19	5,1	
4	20-22	2,3	
5	23-25	2,3	
6	26-28	1,7	
7	29-30	1,0	
8	31-34	2,3	} ident mit Substanz TH_4 (siehe Hartl, 2015)
9	35-45	4,9	
10	46-56	5,3	
11	57-58	0,9	
12	59-63	1,7	
13	64-66	1,2	
14	67-71	9,2	
15	72	4,0	
16 (= B17.16)	73-76	24,3	siehe Kapitel 3.1.13 (Seite 41)
17	77-79	15,0	
18	80-100	10,3	

Durch die HPCCC-Fraktionierung konnten die vorliegenden Hauptsubstanzen gut getrennt werden. Da diese noch mit zahlreichen anderen Verbindungen in den jeweiligen Sammelfractionen vorlagen, waren noch weitere Aufreinigungsschritte notwendig. In den Sammelfractionen 8 (2,3 mg), 9 (4,9 mg) und 10 (5,3 mg) war eine als blaue Bande sichtbare Substanz enthalten. Mittels DC-Vergleich konnte diese Verbindung als Substanz TH_4 identifiziert werden. Die Isolation von TH_4 erfolgte bereits aus dem DCM-Extrakt von *Pluchea odorata* (L.) Cass. (Hartl, 2015). Daher wurde von einer weiteren Auftrennung der Sammelfractionen 8-10 abgesehen.

3.1.13. Fraktion B17.16

Fraktion B17.16 (24,3 mg) wurde durch die HPCCC-Trennung von Fraktion B17 (siehe Kapitel 3.1.12, Seite 39) gewonnen. Um die darin enthaltene, nach Besprühen mit ASR als braun-violette Bande sichtbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,58 (PO_53) aufzureinigen, wurde ein HPCCC-Experiment (18 mg Probe, 2 ml Probenschleife, Fraktionswechsel nach 1 Minute, Unterphase als mobile Phase) mit HEMWat-System 16 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) durchgeführt. Fraktionen mit ähnlichem Bandenmuster wurden zu 7 Sammelfraktionen vereinigt. Durch diese HPCCC konnten die meisten Begleitsubstanzen abgetrennt werden. Sammelfraktion 5 (10,7 mg) enthielt Substanz PO_53 in hoher Reinheit (siehe PO_53, Seite 83).

3.1.14. Fraktion B18

Fraktion B18 (434 mg) enthielt neben der bereits aus Fraktion B17 isolierten Substanz PO_53 vor allem Verbindungen mit einem niedrigeren R_f -Wert, die mittels HPCCC isoliert werden sollten. Die mit HEMWat-System 18 durchgeführte Separation von Fraktion B17 (vgl. Kapitel 3.1.12, Seite 39) zeigte, dass mit dieser Fließmittelzusammensetzung Substanzen höherer Polarität gut aufgetrennt werden konnten. Daher wurde, um jene Verbindungen mit niedrigerem R_f -Wert aus Fraktion 18 zu isolieren, für die Vortrennung dieser Fraktion das etwas polarere HEMWat-System 16 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) gewählt. Die Fraktionierung von 400 mg Probe erfolgte mit einer 6 ml Probenschleife und einem Fraktionswechsel nach 1 Minute. Die erhaltenen 80 Fraktionen wurden mittels DC analysiert und jene mit ähnlichem Substanzspektrum zu 9 Sammelfraktionen vereinigt. Die Zusammensetzung und die Massen der erhaltenen Sammelfraktionen sind in Abbildung 23 (Seite 42) und in Tabelle 16 (Seite 42) dargestellt.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (80 : 10 : 1,0)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

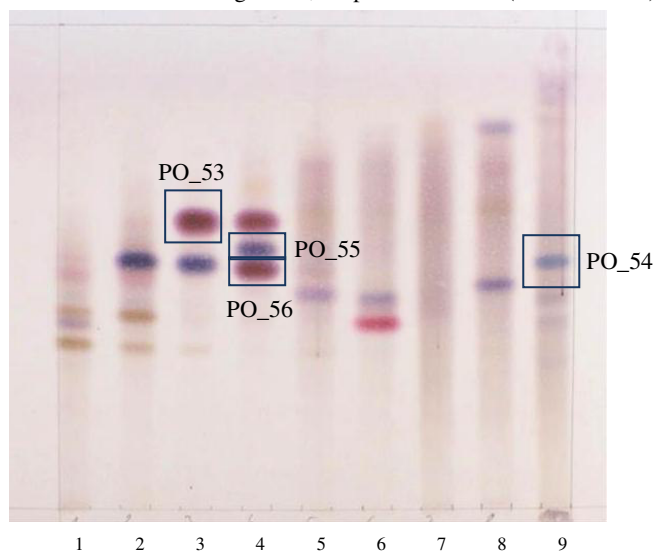


Abbildung 23: DC der Sammelfractionen der HPCCC von Fraktion B18

Tabelle 16: Sammelfractionen der HPCCC von Fraktion B18

Sammelfraktion	Fractionen	Masse (mg)	Ergebnis
1	1-8	23,7	
2	9	9,7	
3	10-12	53,7	
4 (= B18.4)	13-20	63,5	Siehe Kapitel 3.1.15 (Seite 43)
5	21	1,4	
6	22-34	12,3	
7	35-50	16,3	
8	51-62	5,4	
9 (= B18.9)	63-80	36,1	Siehe Kapitel 3.1.18 (Seite 45)

3.1.15. Fraktion B18.4

Sammelfraktion 4 (63,5 mg), die durch HPCCC-Trennung aus Fraktion B18 gewonnen werden konnte (siehe Kapitel 3.1.14, Seite 41), enthielt neben Substanz PO_53, die bereits aus Fraktion B17 isoliert wurde (siehe Kapitel 3.1.13, Seite 41), zwei weitere, mengenmäßig dominierende Substanzen: eine nach dem Besprühen als braun-violette Bande sichtbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,51 (PO_56) und eine auf der DC als blaue Zone erkennbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,55 (PO_55).

HPCCC Experimente zeigten, dass Substanz PO_55 und PO_56 durch Gegenstromverteilungschromatographie nicht isoliert werden konnten, da sie unter diesen Bedingungen ein zu ähnliches Verhalten aufwiesen. Aufgrund der klebrigen Konsistenz der Probe war die Säulenchromatographie nicht die Methode der Wahl, weshalb versucht wurde, die vorliegenden Substanzen mittels SPE zu separieren. Als stationäre Phase diente mit Oktadekyl-Ketten modifiziertes Kieselgel (siehe SPE-Säule 1, Seite 16) und als Elutionsmittel wurden Methanol-Wasser Mischungen mit steigendem Methanol-Anteil verwendet. Der Vorversuch mit 60 mg Probe zeigte, dass die beiden Substanzen bei einem Methanol-Anteil zwischen 20 und 60% eluiert wurden. Für den zweiten Versuch wurden die Fraktionen II bis IV (46 mg) des Vorversuches (siehe Tabelle 17) vereint und mit verschiedenen Methanol-Wasser Mischungen (20-60% MeOH) als Elutionsmittel aufgetrennt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Verwendete Methanol-Wasser Mischungen bei der SPE von Fraktion B18.4

Vorversuch		2. Versuch	
Fraktion	MeOH (%)	Fraktion	MeOH (%)
I	0	1	20
II	20	2	25
III	40	3	30
IV	60	4	35
V	70	5	40
VI	80	6	45
VII	90	7	50
VIII	100	8	55
		9	60

Das SPE-Experiment zeigte, dass Substanz PO_55 und PO_56 mit dieser Methode angereichert werden konnten, jedoch waren weitere Aufreinigungsschritte notwendig um die vorliegenden Substanzen zu isolieren. Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung wurden zu 5 Sammelfraktionen vereint (Abbildung 24, Tabelle 18).

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (80 : 10 : 1,0)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

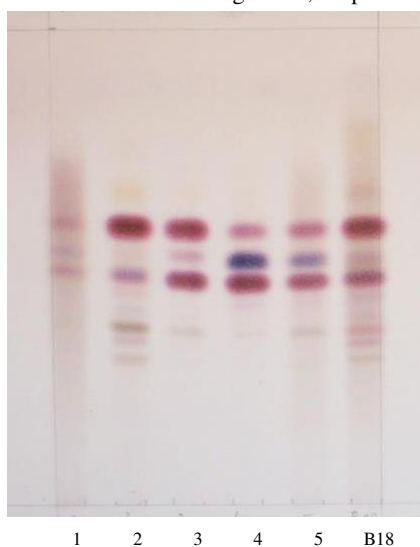


Abbildung 24: DC der Sammelfraktionen der SPE von Fraktion B18.4

Tabelle 18: Sammelfraktionen der SPE von Fraktion B18.4

Sammelfraktion	Fraktionen	Masse (mg)	Ergebnis
1	1, 2, V	2,9	
2	3-4	5,0	
3 (= B18.4.3)	5-6	19,2	Siehe Kapitel 3.1.17 (Seite 46)
4 (= B18.4.4)	7-8	12,7	Siehe Kapitel 3.1.16 (Seite 45)
5	9, VI-VII	5,3	

3.1.16. Fraktion B18.4.4

Die Fraktion B18.4.4 (12,7 mg) wurde durch die SPE-Trennung von Fraktion B18.4 erhalten (siehe Kapitel 3.1.15, Seite 43). Durch diese Fraktionierung konnte Substanz PO_55 noch nicht von der auf der DC darunter sichtbaren Substanz PO_56 getrennt werden. Festzustellen war aber eine deutliche Elution von Substanz PO_56 bei einem MeOH-Gehalt von 40%, während Substanz PO_55 bei Methanol 50% stark von der stationären Phase gelöst wurde. Um Substanz PO_55 zu isolieren, erfolgte eine weitere SPE-Trennung mit 10 mg Probe (SPE-Säule 2, Seite 16), die mit kleineren Abstufungen im MeOH-Gehalt (siehe Tabelle 19) durchgeführt wurde.

Tabelle 19: Verwendete MeOH-Wasser Mischungen für die SPE von Fraktion B18.4.4

Fraktion	MeOH (%)
1+2	40
3+4	44
5+6	46
7+8	48
9+10	50
11+12	52
13+14	54

Die erhaltenen 14 Fraktionen wurden mittels DC analysiert und jene mit ähnlicher Zusammensetzung zu 6 Sammelfractionen vereint (siehe Abbildung 25; Tabelle 20, Seite 46). Eine DC-Untersuchung der Sammelfractionen zeigte, dass Sammelfraction 5 (0,7 mg) Substanz PO_55 mit schwach sichtbaren Begleitsubstanzen enthielt.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (80 : 10 : 1,0)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

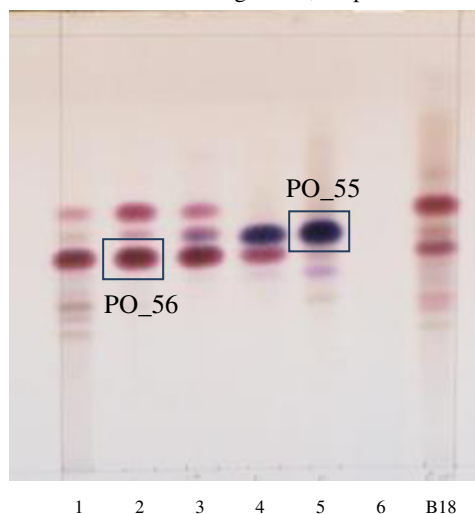


Abbildung 25: DC der Sammelfractionen der SPE von Fraktion B18.4.4

Tabelle 20: Sammelfractionen der SPE von Fraktion B18.4.3

Sammelfraktion	Fraktionen	Masse (mg)	Ergebnis
1	1-2	0,3	
2	3-5	3,0	
3	6	1,5	
4	7-9	3,7	
5	10-12	0,7	Substanz PO_55 (Seite 86)
6	13-14	0,2	

3.1.17. Fraktion B18.4.3

Die aus der SPE-Trennung von Fraktion B18.4 stammende Fraktion B18.4.3 (19,2 mg) enthielt die zwei mengenmäßig dominierende Substanzen PO_53 und PO_56 (siehe Kapitel 3.1.15, Seite 43). Die HPLCCC von Fraktion B18 (siehe Kapitel 3.1.14, Seite 41) ergab eine Separation dieser beiden Verbindungen. Daher wurde durch HPLCCC mit HEMWat-System 16 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) versucht, diese beiden Substanzen weiter aufzutrennen. Dieses Experiment erfolgte mit 15,6 mg Probe unter Verwendung einer 2 ml Probenschleife, einem Fraktionswechsel nach 1 Minute und der Unterphase als mobile Phase. Die erhaltenen 80 Fraktionen wurden mittels DC analysiert und jene mit ähnlicher Zusammensetzung vereinigt. Eine Untersuchung der erhaltenen

Sammelfractionen erfolgte mittels DC (vgl. Abbildung 26), die Massen sind in Tabelle 21 aufgelistet. In Sammelfraktion 5 (1,3 mg) war Substanz PO_56 gut aufgereinigt enthalten.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (80 : 10 : 1,0)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

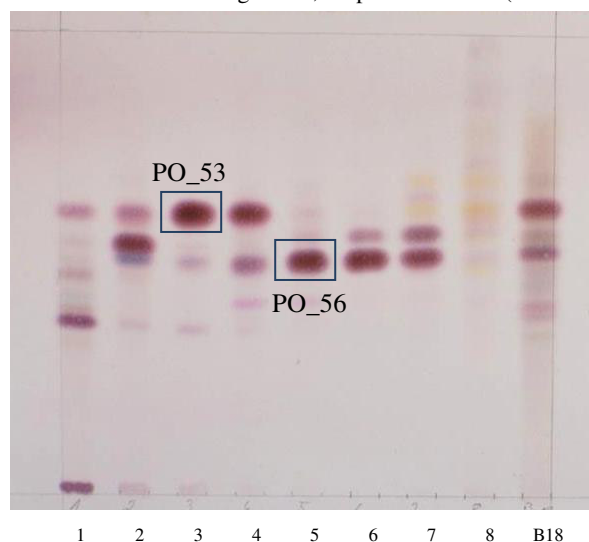


Abbildung 26: DC der Sammelfractionen der HPCCC von Fraktion B18.4.3

Tabelle 21: Sammelfractionen der HPCCC von Fraktion B18.4.3

Sammelfraktion	Fraktionen	Masse (mg)	Ergebnis
1	1-7	1,5	
2	8-9	1,0	
3	10-11	3,4	
4	12	0,6	
5	13	1,3	Substanz PO_56 (siehe Seite 89)
6	14-15	4,8	
7	16-17	0,8	
8	18-80	1,3	

3.1.18. Fraktion B18.9

Die Fraktion B18.9 (36,1 mg) wurde durch die Auftrennung von Fraktion B18 erhalten (siehe Kapitel 3.1.14, Seite 41). Um die darin vorhandene, nach dem Besprühen mit ASR als blaue Bande sichtbare Substanz (siehe Pfeil in Abbildung 27) mit dem R_f -Wert von 0,5 (PO_54) zu isolieren, wurde eine HPCCC durchgeführt. Die Bestimmung eines geeigneten zweiphasigen Systems erfolgte durch Ausschütteln von etwas Probe in verschiedenen HEMWat-Systemen (Durchführung siehe Seite 15). Die Ober- und Unterphase wurden getrennt und mittels DC analysiert (siehe Abbildung 27).

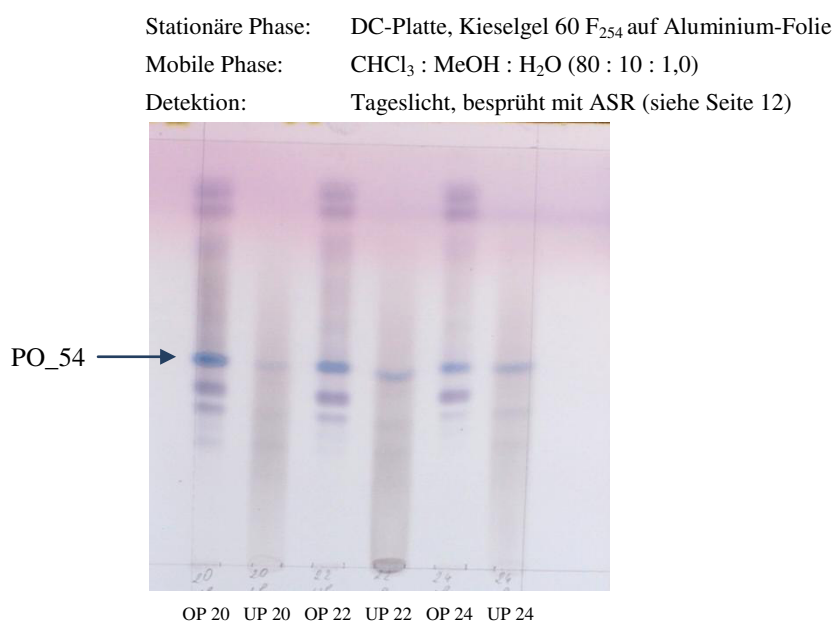


Abbildung 27: DC von Fraktion B18.9 nach Verteilung in unterschiedlichen HEMWat-Systemen

OP = Oberphase; UP = Unterphase

Die in der Beschriftung angegebenen Zahlen bezeichnen das jeweilige HEMWat-System (vgl. Tabelle 7, Seite 15)

Das Verteilungsexperiment zeigte, dass Substanz PO_54 in Ober- und Unterphase in annähernd gleicher Konzentration vorhanden war, wenn die Probe in HEMWat-System 24 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) ausgeschüttelt wurde. Daher erfolgte die HPCCC-Trennung mit dieser zweiphasigen Lösungsmittelmischung (28 mg Probe, 2 ml Probenschleife, Fraktionswechsel nach 1 Minute, Unterphase als mobile Phase). Die erhaltenen Fraktionen wurden nach dünnschichtchromatographischer Analyse zu 8 Sammelfractionen vereinigt (siehe Abbildung 28, Seite 49). Substanz PO_54 war aufgereinigt in Sammelfraktion 3 (1,4 mg) enthalten.

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie
 Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (80 : 10 : 1,0)
 Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

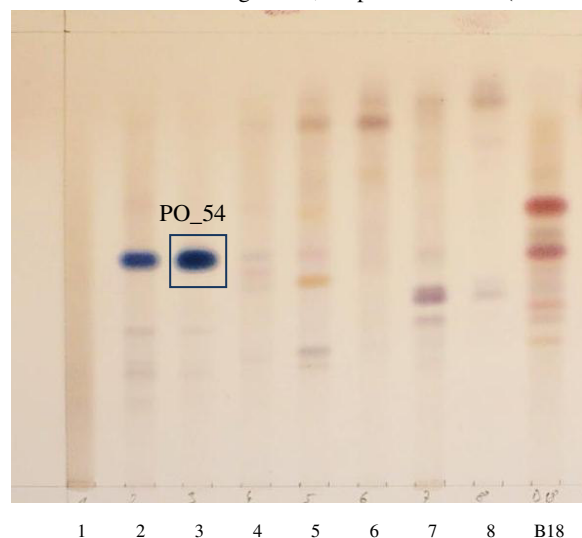


Abbildung 28: DC der Sammelfraktion der HPCCC von Fraktion B18.9

3.2. Identifizierung der isolierten Substanzen

Im Zuge dieser Arbeit konnten 16 Substanzen (siehe Abbildung 29, Seite 50) aus den Fraktionen B7, B8, B10, B17, B18, B24/25, B28 und B29 isoliert werden. Diese wurden mit bereits aus anderen Fraktionen des DCM-Extraktes aus *Pluchea odorata* (L.) Cass. isolierten Verbindungen (Hartl, 2015; Blaschke, Dissertation in Vorbereitung), dünnschichtchromatographisch verglichen. Die Strukturklärung erfolgte mittels MS und NMR.³ Die entsprechenden Spektren sind im Anhang enthalten. Die Parameter, mit denen die MS- und NMR-Spektren aufgenommen worden sind, sind auf Seite 17 aufgelistet.

³ Für die Aufnahme der MS- und NMR-Spektren sowie für die Strukturklärung danken wir ao.Univ.-Prof. Dr. Ernst Urban (Department für Pharmazeutische Chemie) und Dr. Martin Zehl (Department für Pharmakognosie)

Stationäre Phase

HPTLC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Glas

Mobile Phase:

a: CHCl₃ : MeOH : H₂O (90 : 3,5 : 0,2)

b: CHCl₃ : MeOH : H₂O (80 : 10 : 1,0)

Detektion:

1: Tageslicht, besprüht mit ASR

2: UV₃₆₆, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)

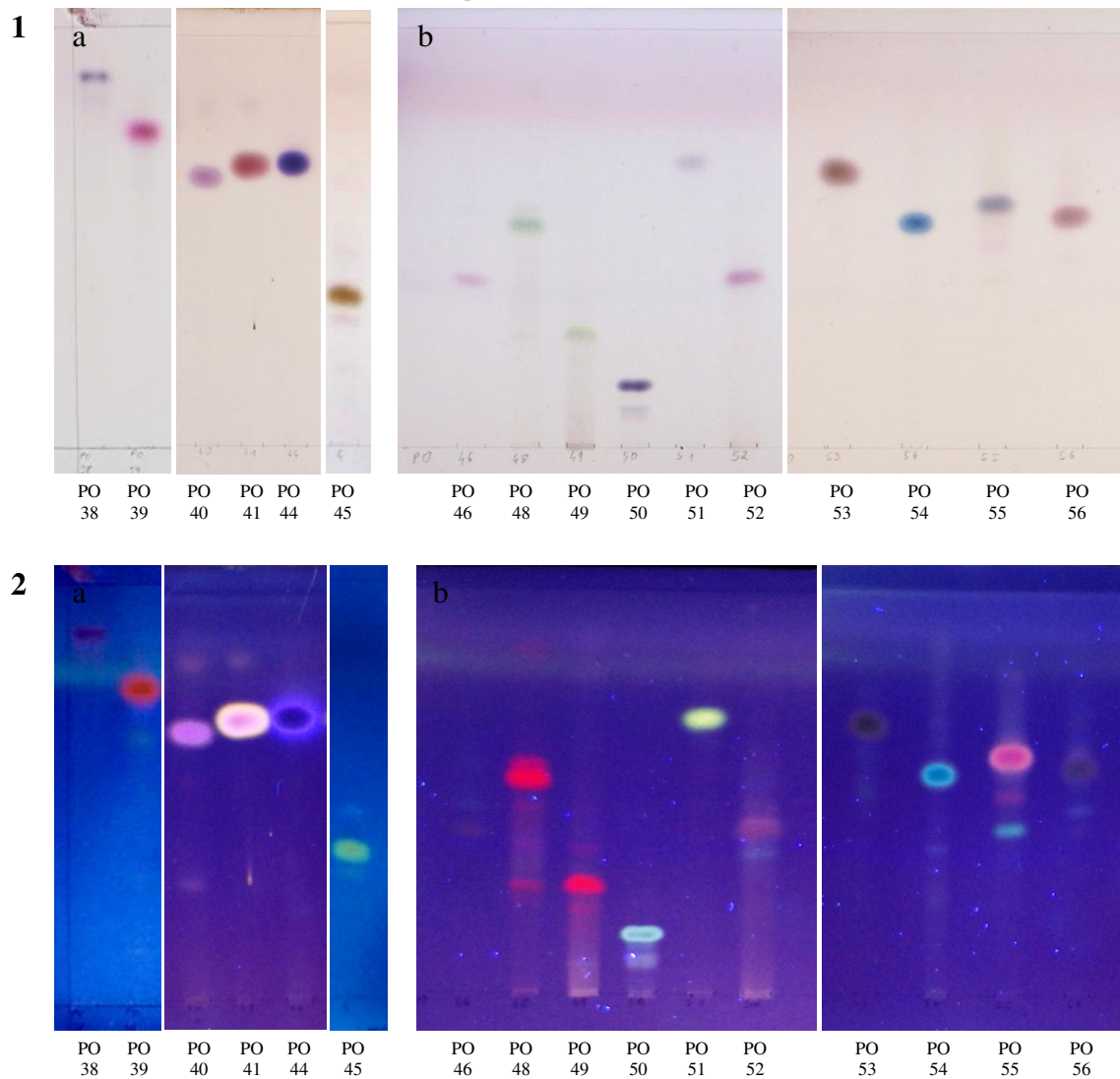


Abbildung 29: DC sämtlicher isolierter Substanzen

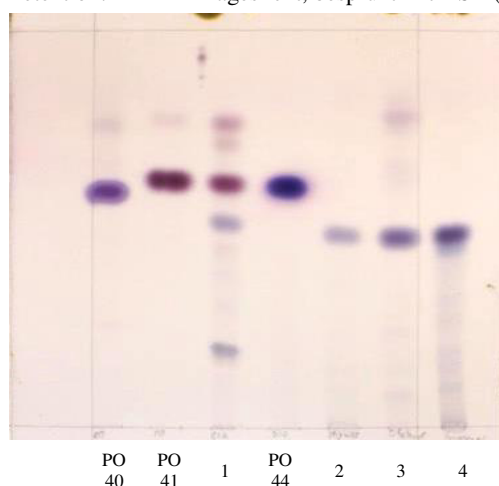
3.2.1. Vergleich mit bekannten Phytosterolen

In der Gattung *Pluchea* konnten bereits Phytosterole wie β -Sitosterol und Stigmasterol nachgewiesen werden (Hussain et al., 2013). In den Fraktionen B8 und B10 waren verschiedene Substanzen enthalten, die nach Besprühung mit ASR als blau bis violette Banden sichtbar wurden. Die ESI-MS Analyse dieser isolierten Substanzen bewirkte keine charakteristischen Fragmentationen, wie es auch bei Phytosterolen der Fall ist. Vergleichbare Phytosterole haben eine ähnliche Polarität und sind nach dem Besprühen als blaue Zonen erkennbar. Daher wurden Substanz PO_40, PO_41 und PO_44 sowie Fraktion B10.11 (siehe Kapitel 3.1.3, Seite 24) mit Stigmasterol, β -Sitosterol und Fucosterol dünnschichtchromatographisch verglichen (siehe Abbildung 30).

Stationäre Phase: DC-Platte, Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium-Folie

Mobile Phase: CHCl₃ : MeOH : H₂O (90 : 3,5 : 0,2)

Detektion: Tageslicht, besprüht mit ASR (siehe Seite 12)



- 1 B10.11
- 2 Stigmasterol
- 3 β -Sitosterol
- 4 Fucosterol

Abbildung 30: DC Vergleich der isolierten Substanzen PO_40, PO_41, PO_44 und Fraktion B10.11 mit bekannten Phytosterolen

Die isolierten Substanzen waren nicht den bekannten Sterolen zuzuordnen, da sie einen etwas höheren R_f -Wert und andere Bandenfärbung aufwiesen. Die nach dem Besprühen mit ASR sichtbare blau-violette Farbe und die ähnliche Polarität ließen eventuell auf ein Derivat der getesteten Pflanzensterole schließen. In Fraktion B10.11. war eine nach dem Besprühen mit ASR als blaue Bande sichtbare Substanz mit dem R_f -Wert von 0,51 enthalten, die sowohl in Farbe als auch in Polarität mit Stigmasterol übereinstimmte. Da dieses Phytosterol (PO_14) bereits aus anderen Fraktionen des DCM-Extraktes isoliert werden konnte (siehe Blaschke, Dissertation in Vorbereitung), wurde diese Fraktion nicht weiter analysiert.

3.2.2.Substanz PO_38

Die Verbindung PO_38 (6,8 mg) konnte mittels Säulenchromatographie aus Fraktion B7 gewonnen werden (siehe Seite 20f). Durch Besprühen der DC-Platte mit ASR wurde sie als dunkel-violette Bande mit einem R_f -Wert von 0,88 (System 90) bzw. 0,80 (System 95) sichtbar (Parameter DC siehe Seite 11f). Nach kurzer Zeit verblasste diese Substanzzone und war dann als grün-blaue Bande zu erkennen. Unter UV_{366} wies sie keine Fluoreszenz auf. Charakteristisch war auch der fruchtige Geruch dieser Verbindung.

Die ESI-MS Analyse bewirkte sowohl im positiven als auch im negativen Modus mehrere Signale, weshalb es sich hierbei um eine Mischung von verschiedenen Substanzen mit sehr ähnlichen chromatographischen Eigenschaften handelte. Im positiven Modus war das signalstärkste Natriumadduktion $[Na+M]^+$ bei m/z 541,1 zu finden, das einer Substanz mit einem Molekulargewicht (MG) von 518 Da entsprach. Da es sich hierbei um eine Substanz-Mischung handelte, wurden keine NMR-Spektren aufgenommen. Für eine weitere Auftrennung und Reindarstellung war die Masse des Gemisches (6,8 mg) zu gering.

3.2.3.Substanz PO_39

Mittels Säulenchromatographie von Fraktion B7 konnte neben Substanz PO_38 noch 8,1 mg der Verbindung PO_39 gewonnen werden (siehe Seite 20f). Durch Besprühen der DC-Platte mit ASR und anschließendem Trocknen wurde die vorliegende Substanz als dunkel-rosa Bande sichtbar, die unter UV_{366} hell-violett fluoreszierte. Der R_f -Wert von 0,63 (System 95) bzw. von 0,75 (System 90) zeigte den unpolaren Charakter dieser Substanz (Parameter DC siehe Seite 11f).

Basierend auf den ESI-MS Daten, die im positiven Ionenmodus zwei deutliche Natriumadduktionen $[Na+M]^+$ bei m/z 273,1 und 243,1 zeigten, konnte auf eine Mischung zweier Substanzen mit den MG von 250 Da und 220 Da geschlossen werden. Das MS^2 -Spektrum des Ions m/z 243,1 zeigte Hauptfragmente bei m/z 211,0; 184,9; 141,0 und 110,0. Diese Ionen resultierten möglicherweise aus den Verlusten von MeOH (-32), CO_2 (-44) und der Abspaltung aliphatischer Radikationen (-58, -70).

Die gewonnenen Informationen aus der DC- und ESI-MS-Analyse ließen vermuten, dass es sich hierbei um den Methylester einer Fettsäure handeln könnte. Die Struktur dieser Verbindungen konnte nicht eindeutig geklärt werden. Weiters war für eine Auftrennung und Reindarstellung die Masse dieses Gemisches (8,1 mg) zu gering.

3.2.4.Substanz PO_40

Durch mehrere Trennungsschritte mittels HPLC konnte die Verbindung PO_40 (1,6 mg) aus Fraktion B8 gewonnen werden. Nach dem Besprühen der DC-Platte mit ASR war Substanz PO_40 als violette Bande mit einem R_f -Wert von 0,56 (System 90, Parameter DC siehe Seite 11f) sichtbar. Bei der Betrachtung unter UV₃₆₆ wies diese Verbindung eine deutliche violette Fluoreszenz auf.

Die ESI-MS Analyse ergab zwei dominierende Natriumadduktionen $[M+Na^+]$ bei m/z 319,3 und 347,3; daher konnte auf ein Gemisch zweier Substanzen mit den MGs von 296 Da und 324 Da geschlossen werden.

Da Phytosterole eine ähnliche Polarität hatten und bei einer ESI-MS Analyse in keine charakteristischen Spaltprodukte zerfielen, wurde diese Verbindung mit bekannten Phytosterolen verglichen. Diese DC-Analyse zeigte, dass nach dem Besprühen mit ASR Substanz PO_40 Stigmasterol, α -Sitosterol und Fucosterol in Bandenfärbung sowie Polarität ähnelte, jedoch stimmten weder die Färbung noch der R_f -Wert mit den Referenzsubstanzen überein (siehe Seite 51).

Die 1D und 2D NMR Experimente gaben Aufschluss über vorhandene Strukturelemente der beiden Substanzen: So konnten zwei von dreizehn im ^{13}C -NMR Experiment registrierten Kohlenstoff (C)-Atome Methingruppen zugeordnet werden (δ_{C} = 27,97 und 32,78). Aufgrund von im HSQC-Experiment erkennbaren Kopplungen zu Protonen entsprachen acht C-Signale Methylengruppen. Die chemische Verschiebung dieser wies auf eine terminale olefinische Gruppe (δ_{C} = 114,41), zwei Carbinol-C (δ_{C} = 65,64 und 59,43) und fünf Alkan-C hin (δ_{C} = 39,87; 39,35; 37,27, 24,79 und 24,46). Weiters waren noch drei Methyl-Gruppen im ^{13}C -NMR definierbar (δ_{C} = 22,72; 22,62 und 19,74).

Von drei weiteren im ^1H -NMR Spektrum vorhandenen Signale konnte mit Hilfe des HSQC-Kopplungsexperiments das daran gebundene C-Atom bestimmt werden: So wurde

ein weiteres Carbinol-C ($\delta_C = 66,20$; $\delta_H = 4,48$), ein olefinisches Methin-C ($\delta_C = 123,00$; $\delta_H = 5,41$) und eine Methyl-Gruppe ($\delta_C = 16,06$; $\delta_H = 1,67$) identifiziert. Ein quartäres Olefin-C ($\delta_C = 140,42$) wurde aufgrund der HMBC-Korrelation von H1 ($\delta_H = 4,16$) und CH₃ an 3 ($\delta_H = 1,67$) zu C3 ($\delta_C = 140,42$) bestimmt.

2D NMR Kopplungsexperimente wie HMBC und COSY gaben weitere Informationen bezüglich der Verknüpfung der beobachteten Signale. Die HMBC-Korrelation von H1 ($\delta_H = 4,16$) zu den beiden olefinischen C-Atomen C2 ($\delta_C = 123,00$) und C3 ($\delta_C = 140,42$) zeigte, dass eine Methylen-Gruppe mit einer Hydroxylfunktion an ein Olefin geknüpft war. Aufgrund der COSY-Korrelation von H1 ($\delta_H = 4,16$) zu H2 ($\delta_H = 5,41$) konnte angenommen werden, dass C1 an C2 gebunden war.

Die beiden noch unbestimmten Valenzen am quartären Olefin C3 konnten durch das HMBC-Kopplungsexperiment bestimmt werden: die Korrelation von CH₃ an 3 ($\delta_H = 1,67$) zu C2 ($\delta_C = 123,00$), C3 ($\delta_C = 140,42$) und C4 ($\delta_H = 39,87$) zeigte, dass eine Methylgruppe und das Methylen C4 an das quartäre Olefin C3 gebunden waren.

HMBC-Korrelationen von CH₃ an 5 ($\delta_H = 19,74$) zu C5 ($\delta_H = 32,78$) und C6 ($\delta_H = 37,27$) deuteten darauf hin, dass an das Methin C5 eine Methylgruppe und das Methylen C6 gebunden waren. Eine terminale Isopropylgruppe konnte durch die HMBC-Korrelationen von zwei Methylgruppen ($\delta_H = 0,87$) zu dem Methin C16 ($\delta_C = 27,97$) und dem Methylen C15 ($\delta_C = 39,35$) nachgewiesen werden.

Durch den Vergleich der erhaltenen NMR-Daten mit denen des Fettalkohols (E)-3,5,7,16-tetramethylheptadec-2-en-1-ol, der von Ross et al. aus *Terminalia arjuna* Roxb. isoliert wurde, konnte eine Verbindung des vorliegenden Gemisches als 3,5,16-Trimethyl-heptadec-2-en-ol identifiziert werden (siehe Abbildung 31 und Tabelle 22, Seite 55). Diese Substanz unterschied sich von dem bereits beschriebenen Fettalkohol durch das Fehlen der Methylgruppe am C7 (Ross et al., 2013).

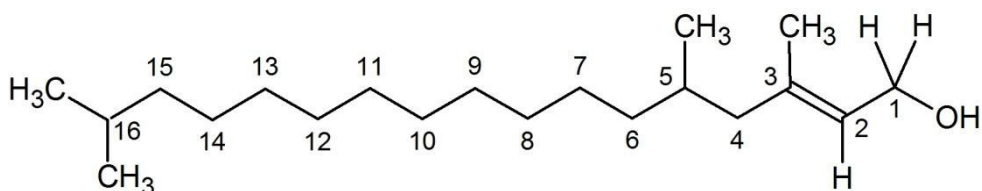


Abbildung 31: Struktur von Substanz PO_40a

Die an Hand der vorliegenden Literatur- und NMR-Daten bestimmte Summenformel $C_{20}H_{40}O$ und das daraus berechnete MG von 296 Da stimmte mit dem im ESI-MS Spektrum beobachteten Natriumadduktion $[M+Na^+]$ bei m/z 319,3 ($= 296 + 23$) überein.

IUPAC: 3,5,16-Trimethyl-heptadec-2-en-ol

Summenformel: $C_{20}H_{40}O$

MW: 296 Da

CA-Reg.Nr.: unbestimmt

Tabelle 22: NMR Daten von Substanz 40a mit Literaturvergleich

Position		Substanz PO_40a		Literatur (Ross et al., 2013)
		1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)
1	CH ₂	4,16	59,43	59
2	CH	5,41	123,00	123
3	C	--	140,42	139,5
4	CH ₂	1,99	39,87	39,9
5	CH	1,38	32,78	32,7
6	CH ₂	1,25/1,06	37,27	39,3
7 bis 14	CH ₂	1,30/1,20	24,79/24,46	32,6/25,1/29,7/36,6/37,2
		1,25/1,06	37,42/37,34	
15	CH ₂	1,13	39,35	37,3
16	CH	1,52	27,97	27,9
CH ₃ an 3	CH ₃	1,67	16,06	16,1
CH ₃ an 5	CH ₃	0,84	19,74	19,6
CH ₃ an 16	CH ₃	0,87	22,72/22,62	22,7/22,6

Da Substanz PO_40 ein Gemisch von zwei Substanzen darstellte, die weder mittels DC noch anderen Verfahren getrennt werden konnten, ging man davon aus, dass es sich hierbei um sehr ähnliche Verbindungen handelte. Die Analyse des HMBC- und COSY-Kopplungsmusters zeigte die Verknüpfungen von bis jetzt noch nicht zuordnungsbaaren Signalen. Die HMBC-Korrelation der terminalen Olefingruppe ($\delta_H = 5,08/5,21$) zu dem Methin Carbinol C2 ($\delta_C = 66,20$) zeigte, dass C3 (Signal nicht detektiert) an das terminale Olefin und das Carbinol C2 gebunden waren. Die noch unbestimmte Position an dem Methin C2 wurde von dem Methylen C1 eingenommen wie aus der COSY-Korrelation von C1 ($\delta_H = 3,82$) zu C2 ($\delta_H = 4,48$) abgeleitet werden konnte.

Die HMBC-Korrelation von H5 ($\delta_H = 1,38$) zu einem stark tieffeldverschobenen Carbinol ($\delta_C = 87,00$) ließ vermuten, dass C4 in dieser Verbindung als Carbinol vorlag. Der Vergleich mit dem aus einer nachfolgenden Fraktion isolierten Fettalkohol PO_28 (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung) zeigte, dass bei der vorliegenden Substanz das Carbinol C2 eine Hochfeldverschiebung aufwies. Dies deutete auf mögliche abschirmende Substituenten an dieser Hydroxyl-Gruppe hin (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Vergleich NMR Daten von Substanz 40b mit PO_28

		PO_28		Substanz PO_40b (Vorschlag)	
		(Blaschke, Dissertation in Vorbereitung)			
Position		¹H NMR (ppm)	¹³C NMR (ppm)	¹H NMR (ppm)	¹³C NMR (ppm)
1	CH ₂	3,72/3,54	65,59	3,82	65,64
2	CH	4,21	74,97	4,48	66,20
3	C	--	148,67		
=CH ₂	CH ₂	5,14/4,98	110,51	5,08/5,21	114,41

Durch das anhand des Natriumadduktions bei m/z 347,3 bestimmte MG von 324 Da und der vorhandenen NMR- und DC-Daten konnte zwar ein Vorschlag für die Summenformel gemacht werden - C₂₁H₄₀O₂ – ein endgültiger Strukturvorschlag war hingegen nicht möglich.

3.2.5. Substanz PO_41 (= α - und β - Amyrin)

Die Verbindung PO_41 (10,7 mg) konnte wie Substanz PO_40 mittels HPCCC-Trennungen gewonnen werden (siehe Seite 22f). Beide hatten einen ähnlichen R_f -Wert, aber während Substanz PO_40 nach dem Trocknen eine harzige Konsistenz aufwies, bildete die Verbindung PO_41 weiße Kristalle. Durch Besprühung der DC-Platte mit ASR wurde PO_41 als violett-rote Substanz mit dem R_f -Wert von 0,59 (System 90, DC-Parameter siehe Seite 11f) sichtbar. Unter UV₃₆₆ erschien sie als intensiv gelb-orange fluoreszierende Bande.

Die Struktur der vorliegenden Verbindung konnte mittels 1D und 2D-NMR Experimenten bestimmt werden. Die im ^1H -NMR registrierten Protonen-Signale wurden mit Hilfe vom HSQC-Kopplungsexperiment den daran gebundenen C-Atomen zugeordnet. Acht detektierte C-Atome wiesen keine Korrelation zu Protonen auf. Die chemische Verschiebung zeigte, dass es sich bei sechs von diesen quartären C-Atomen um Alkane ($\delta_{\text{C}} = 31,08; 32,61; 33,74; 38,54; 36,86$ und $42,03$;) und bei zwei um Olefine ($\delta_{\text{C}} = 139,55$ und $145,18$) handelte. Aufgrund der Signalausrichtung, der chemischen Verschiebung und der Anzahl daran gebundener Protonen enthielt diese Verbindung elf Methin-Gruppen: neben acht Alkanen ($\delta_{\text{C}} = 39,58; 39,63; 39,97; 47,60; 47,18; 47,67; 55,14$ und $59,02$) und zwei Olefinen ($\delta_{\text{C}} = 121,69$ und $124,38$) konnte eine Carbinol-Gruppe ($\delta_{\text{C}} = 79,03$) bestimmt werden. Weitere fünfzehn C-Signale wiesen eine negative Signalausrichtung im ^{13}C -NMR Spektrum auf, weshalb es sich hier um Methylen-Gruppen handelte ($\delta_{\text{C}} = 18,26; 18,32; 23,25; 23,34; 26,11; 26,58; 27,24; 28,06; 31,22; 32,89; 34,70; 37,11; 38,75; 41,49$ und $46,79$). Die chemische Verschiebung von fünfzehn C-Atomen und der daran gebundenen Protonen wies auf Methyl-Gruppen hin ($\delta_{\text{C}} = 15,35; 15,49; 15,61; 15,67; 16,84; 17,46; 21,39; 23,25; 23,67; 25,98; 27,96; 28,10; 28,39; 28,74$ und $33,33$).

Das Ergebnis der ESI-MS Analyse sowie das später beschriebene Korrelationsmuster zeigten, dass es sich hier um ein Gemisch zweier sehr ähnlicher Strukturisomere mit der Summenformel $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ und sechs Doppelbindungsäquivalente handelte. Diese Fakten wiesen auf pentacyclische Triterpen-Alkohole mit einer Doppelbindung wie Amyrine, Taraxerol, Multiflorenol, Glutinol oder Lupeol hin. Da die chemischen Verschiebungen der Protonen der Methylgruppen zwischen 0,78 und 1,13 lag, konnte man davon ausgehen, dass keine dieser CH_3 -Gruppen an ein olefinisches C-Atom gebunden war.

Somit handelte es sich bei den vorliegenden Verbindungen wahrscheinlich nicht um Lupeol (Thimmappa et al., 2014).

Basierend auf dieser Vermutung konnte die Struktur der vorliegenden Verbindungen mit Hilfe verschiedener 2D-NMR Kopplungsexperimenten bestimmt werden. Die beiden Methyle H23 und H24 ($\delta_H = 0,99$ und $0,80$) wiesen HMBC-Korrelationen zu dem Methin C5 ($\delta_C = 55,14$), dem Carbinol C3 ($\delta_C = 79,03$) und dem quartären C-Atom C4 ($\delta_C = 38,54$) auf. Dies zeigte, dass beide Methylgruppen an das quartäre C-Atom gebunden waren, welches weiter mit C3 und C5 verbunden war. Die COSY-Korrelationen zwischen H2 ($\delta_H = 1,63/1,58$) und H3 ($\delta_H = 3,22$) bestimmte die noch unbesetzte Valenz am C3.

HMBC-Korrelationen waren von dem Methyl H25 ($\delta_H = 0,95$) zu C10 ($\delta_C = 36,86$), C9 ($\delta_C = 47,67$) und auch zu C5 ($\delta_C = 55,14$) beobachtbar. Daraus konnte man schließen, dass diese CH₃-Gruppe an das quartäre C-Atom C10 gebunden war, das mit dem Methin C9 die Anellierungsstelle der Ringe A und B bildete. Zu dem Methin C9 ($\delta_C = 47,67$) waren auch Korrelationen von dem Methyl H26 ($\delta_H = 1,00$) bemerkbar wodurch gezeigt wurde, dass C9 sowohl drei Bindungen von H25 und H26 entfernt war als auch, dass es eine Anellierungsstelle der Ringe B und C bildete. H26 ($\delta_H = 1,00$) wies weiter eine HMBC-Korrelation zu dem Methylen C7 ($\delta_C = 32,89$) und gemeinsam mit H27 ($\delta_H = 1,07$) zu den quartären Kohlenstoffen C8 ($\delta_C = 39,97$) und C14 ($\delta_C = 42,03$) auf. Somit waren C8 und C14 miteinander verbunden und banden je an eine Methylgruppe. H26 befand sich an der Anellierungsstelle der Ringe B und C, da H27 keine Korrelation zu C9 und C7 aufwies.

Von H27 ($\delta_H = 1,07$ bzw. $1,13$) war auch eine HMBC-Korrelation zu dem quartären Olefin C13 ($\delta_C = 139,55$ bzw. $145,18$) vorhanden. Es wurde angenommen, dass die Doppelbindung zu dem einzig weiteren Olefin C12 ($\delta_C = 124,38$ bzw. $121,69$) führte. HMBC- und COSY-Korrelationen zwischen dem Olefin H12 ($\delta_H = 5,12$ bzw. $5,18$) und dem Methylen H11 ($\delta_H = 1,91$) / C11 ($\delta_C = 23,34$) wiesen darauf hin, dass C11 an C12 gebunden war.

Korrelationen von H27 ($\delta_H = 1,07$) zu dem Methylen C15 ($\delta_C = 26,58$) und von H28 ($\delta_H = 0,79$) zu den Methylenen C16 ($\delta_C = 28,06$) und C22 ($\delta_C = 41,49$), dem quartären C-Atom C17 ($\delta_C = 33,74$) und dem Methin C18 ($\delta_C = 59,02$) zeigten, dass die noch unbestimmte Position des an C27 gebundenen quartären C-Atoms von C15 eingenommen

wurde. Weiter war C28 an das quartäre C-Atom C17 gebunden, welches mit den beiden Methylenen C16 und C22 verbunden war und mit C18 die Anellierungstelle der Ringe D und E bildete.

Da sich die chemischen Verschiebungen der Protonen und C-Atome der Ringe A bis D kaum unterschied, war anzunehmen, dass das Substitutionsmuster dieser Ringe bei den beiden Strukturisomeren ident war. Da die chemische Verschiebung des C16 von beiden Verbindungen gleich war, konnte man C16 Ring D zuordnen.

Eine Verbindung hatte je eine Methylgruppe an die Methine C19 und C20 gebunden: gezeigt wurde dies dadurch, dass H29 ($\delta_H = 0,79$) HMBC-Korrelation zu dem Methin C18 ($\delta_C = 59,02$) und gemeinsam mit H30 ($\delta_H = 0,91$) zu den Methinen C19 ($\delta_C = 39,63$) und C20 ($\delta_C = 39,58$) aufwies.

H29* ($\delta_H = 0,87$) und H30* ($\delta_H = 0,87$) wiesen nur HMBC-Korrelationen zu dem Methylen C19* ($\delta_C = 46,79$) und dem quartären C-Atom C20* ($\delta_C = 31,08$) auf. Durch die fehlende Kopplung zu C18* und der Anzahl der an C19* und C20* gebundenen Protonen konnte man sagen, dass C20* mit beide CH₃-Gruppen C29* und C30* verbunden war.

Bezüglich der Stellung der Methylgruppen konnte man folgendes annehmen: da die Ringe der pentacyclische Triterpene in der Natur stets all trans verknüpft sind, befanden sich die Methylgruppen C25, C26, C27 und C28 in axialer Stellung. C23 und C24 sowie C29* und C30* waren an dasselbe quartäre C-Atome gebunden. Da C23 ($\delta_C = 28,10$ bzw. $27,96$) und C29* ($\delta_C = 33,33$) im Vergleich zu C24 ($\delta_C = 15,67$ bzw. $15,49$) und C30* ($\delta_C = 23,67$) eine Tieffeldverschiebung aufwiesen, waren C23 und C29* in äquatorialer und C24 und C30* in axialer Position an das jeweilige quartäre C-Atom gebunden.

Durch die 1D- und 2D-NMR Experimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei den beiden Verbindungen um α - und β -Amyrin handelte. Die erhaltenen chemischen Verschiebungen sowie die Strukturformel dieser Substanzen sind in Tabelle 24 und Abbildung 32 (Seite 60) dargestellt.

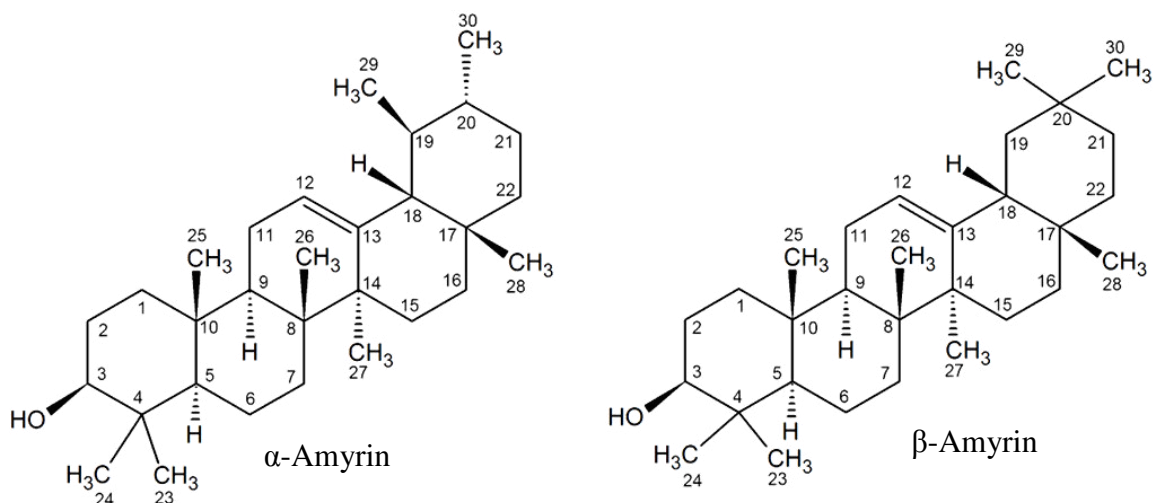


Abbildung 32: Strukturformel von Substanz PO_41 (= Gemisch von α - und β -Amyrin im Verhältnis 79:21)

Um das Mengenverhältnis der beiden Strukturisomere zu bestimmen, wurde der Summe der Flächen der Resonanzsignale H12 und H12* der Wert 100 zugewiesen, wodurch das Signal H12 eine Intensität von 78,654 und H12* eine Intensität von 21,346 aufwies. Somit lagen α - und β -Amyrin im Verhältnis von 79 zu 21 vor.

Trivialname: alpha-Amyrin, beta-Amyrin

IUPAC: (3 β)-Urs-12-en-3-ol (alpha-Amyrin)
(3 β)-Olean-12-en-3-ol (beta-Amyrin)

Summenformel: C₃₀H₅₀O

MG (kalk.): 426,72 Da

CA-Reg.Nr.: α,β -Amyrin: 216668-31-4

α -Amyrin: 638-95-9

β -Amyrin: 559-70-6

Tabelle 24: NMR-Daten von Substanz PO_41 (= Gemisch von α - und β -Amyrin)

Position		α -Amyrin		β -Amyrin	
		^1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)	^1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)
1	CH ₂	1,66/1,00	38,75	1,66/1,00	38,75
2	CH ₂	1,63/1,58	27,24	1,63/1,58	27,24
3	CH	3,22	79,03	3,22	79,03
4	C	--	38,54	--	38,54
5	CH	0,74	55,14	0,74	55,14
6	CH ₂	1,54/1,40	18,32	1,54/1,40	18,26
7	CH ₂	1,53/1,35	32,89	1,53/1,35	32,89
8	CH	--	39,97	--	39,97
9	CH	1,52	47,67	1,92	47,60
10	C	--	36,86	--	36,86
11	CH ₂	1,91/0,87	23,25	1,87/0,87	23,34
12	CH	5,12	124,38	5,18	121,69
13	C	--	139,55	--	145,18
14	C	--	42,03	--	42,03
15	CH ₂	1,82/0,97	26,58	1,75/0,97	26,11
16	CH ₂	2,00/0,86	28,06	2,00/0,86	28,06
17	C	--	33,74	--	32,61
18	CH	1,31	59,02	1,93	47,18
19	CH/CH ₂	1,31	39,63	1,67/1,00	46,79
20	CH/C	0,92	39,58	--	31,08
21	CH ₂	1,38/1,27	31,22	1,10/1,07	34,70
22	CH ₂	1,41/1,27	41,49	1,43/1,23	37,11
23	CH ₃	0,99	28,10	0,97	27,96
24	CH ₃	0,80	15,67	0,78	15,49
25	CH ₃	0,95	15,61	0,96	15,35
26	CH ₃	1,00	16,84	1,00	16,84
27	CH ₃	1,07	23,25	1,13	25,98
28	CH ₃	0,79	28,74	0,83	28,39
29	CH ₃	0,79	17,46	0,87	33,33
30	CH ₃	0,91	21,39	0,87	23,67

Diese pentacyclischen Triterpenalkohole wurden durch den Vergleich mit in der Literatur publizierten spektroskopischen Daten als Mischung der Strukturisomere α - und β -Amyrin eindeutig identifiziert (Hernández Vázquez et al., 2012). Auch Wollenweber und Mann konnten diese Triterpene in einem ähnlichen Mischungsverhältnis und ihre jeweiligen Acetate in der Cuticula von *Pluchea odorata* nachweisen (Wollenweber und Mann, 1985). Substanz PO_41 stellte somit ein Gemisch von α - und β -Amyrin dar und war keine Reinsubstanz.

3.2.6. Substanz PO_44 (=Kongol)

4,7 mg einer pulvrig-kristallinen Verbindung konnten mittels HPCCC aus Fraktion B10 (siehe Seite 24f) gewonnen werden. Nach dem Besprühen der DC-Platte mit ASR war sie als dunkel-blaue Bande mit dem R_f -Wert von 0,59 (System 90, Parameter DC siehe Seite 11f) sichtbar, wies aber unter UV_{366} keine Fluoreszenz auf.

Das MG wurde mittels ESI-MS Analyse bestimmt: Durch das bei m/z 245,2 registrierte Natriumadduktion $[M+Na]^+$ konnte auf ein MG von 222 Da geschlossen werden. Das Fehlen von charakteristischen Fragmentationen sowie der DC-Vergleich mit bekannten Phytosterolen (siehe Seite 51) zeigten, dass es sich hier um Sterole handeln könnte.

1D und 2D NMR-Experimenten ermöglichten die Strukturklärung dieser Verbindung. Die Anzahl der Kohlenstoffatome sowie die Anzahl der daran gebundenen Protonen wurden mittels ^{13}C NMR und dem HSQC Kopplungsexperiment bestimmt: von fünfzehn detektieren C-Signalen entsprachen drei quartären C-Atomen. Die Funktionalitäten konnten mit Hilfe der jeweiligen chemischen Verschiebung bestimmt werden: ein Olefin ($\delta_C = 150,71$), ein Carbinol ($\delta_C = 72,24$) und ein Alkan ($\delta_C = 34,61$). Zwei Signale wurden Methin-Gruppen ($\delta_C = 54,88$ und $46,31$) zugeordnet. Weiter zeigten sieben Signale das Vorhandensein von sechs alkanischen ($\delta_C = 44,64$; $43,34$; $41,05$; $26,84$; $26,01$ und $20,12$) und einer olefinischen Methylen-Gruppe ($\delta_C = 108,13$) an. Aufgrund der chemischen Verschiebung und der Signalausrichtung im ^{13}C -NMR konnten drei Methyl-Gruppen nachgewiesen werden ($\delta_C = 22,71$; $21,08$; $18,69$).

Unter Berücksichtigung der somit gewonnenen Informationen über funktionelle Gruppen und der Anzahl an C- und H-Atomen konnte auf die Summenformel von $C_{15}H_{26}O$ mit drei Doppelbindungsäquivalenten geschlossen werden.

Aufgrund der chemischen Verschiebung und der HMBC-Korrelation von $=CH_2$ ($\delta_H = 4,70$) zu C9 ($\delta_C = 150,71$) konnte von einer terminalen Doppelbindung, die sich am quartären C9 befand, ausgegangen werden. Benachbarte chemische Gruppen wurden mittels HMBC Experiment ermittelt: Korrelationen von $=CH_2$ ($\delta_H = 4,70$) zu CH_3 an 9 ($\delta_C = 21,08$) zeigten, dass an das quartäre C9 neben der terminalen Doppelbindung eine Methylgruppe gebunden war. Aufgrund der Korrelationen von CH_3 an 9 ($\delta_H = 1,75$) und $=CH_2$ ($\delta_H = 4,70$) zu C7 ($\delta_C = 46,31$) war C9 an C7 gebunden.

HMBC-Korrelationen von H8 ($\delta_H = 1,86/1,18$) zu C7 ($\delta_C = 46,31$) und C9 ($\delta_C = 150,71$) zeigten, dass das Methylen C8 an das Methin C7 gebunden war. Da COSY-Korrelationen von H7 ($\delta_H = 1,95$) zu H8 ($\delta_H = 1,86/1,18$) als auch zu H6 ($\delta_H = 1,55/1,44$) festgestellt werden konnten, wurde angenommen, dass neben dem Methylen C8 auch das Methylen C6 an C7 gebunden war. Die noch unbestimmte Position am C8 wurde von C8a eingenommen, wie aufgrund der HMBC-Korrelationen von H8a ($\delta_H = 1,26$) zu C8 ($\delta_C = 26,01$) zu erkennen war. Bekräftigt wurde dies durch die NOESY-Korrelation zwischen H8a ($\delta_H = 1,26$) und H8/1 ($\delta_H = 1,86$).

Neben C8 hatte Methin C8a noch zwei weitere Bindungen zu Kohlenstoffatomen. HMBC-Korrelationen von H8a ($\delta_H = 1,26$) zu C4a ($\delta_C = 34,61$) und C1 ($\delta_C = 72,24$) zeigten eine skalare Kopplung über zwei oder drei Bindungen des Kerns C8a mit zwei quartären C-Atomen an. Aus der HMBC-Korrelation von CH_3 an 1 ($\delta_H = 1,12$) zu C1 ($\delta_C = 72,24$) und C8a ($\delta_C = 54,88$) konnte abgelesen werden, dass das quartäre Carbinol C1, an dem sich eine Methyl-Gruppe befand, an das Methin C8a gebunden war. Ebenfalls war das quartäre C4a mit einer weiteren Methyl-Gruppe und C8a verbunden. Dies konnte durch die HMBC-Korrelation von CH_3 an 4a ($\delta_C = 0,89$) zu C8a ($\delta_C = 54,88$) und C4a ($\delta_C = 34,61$) gezeigt werden.

CH_3 an 1 ($\delta_H = 1,12$) wies auch eine HMBC-Korrelation über drei Bindungen zu C2 ($\delta_C = 43,34$) auf. Da dies die einzige noch unbestimmte Position war, die maximal drei Bindungen von diesen Methyl-Protonen entfernt war, konnte davon ausgegangen werden, dass das quartäre Carbinol C1 an das Methylen C2 gebunden war. Dieses Methylen war

in weiterer Folge mit dem Methylen C3 verbunden, wie aus der HMBC-Korrelation von H3 ($\delta_H = 1,56/1,38$) zu C1 ($\delta_C = 72,24$) und der NOESY-Korrelation von CH₃ an 1 ($\delta_H = 1,12$) zu H3/1 ($\delta_H = 1,56$) abgeleitet werden konnte.

Aufgrund der HMBC-Korrelation von CH₃ an 4a ($\delta_H = 0,89$) zu C4 ($\delta_C = 44,64$) und C5 ($\delta_C = 41,05$) konnte davon ausgegangen werden, dass die beiden noch unbestimmten Positionen am quartären C4a von den zwei Methylengruppen C4 und C5 eingenommen wurden. Da somit alle im ¹³C-NMR aufscheinende C-Atome zugeordnet werden konnten, jedoch je eine Valenz der Methylen-Gruppen C3, C4, C5 und C6 noch unbestimmt war, wurde angenommen, dass je zwei dieser Methylengruppen miteinander verbunden waren. Somit handelte es sich hierbei um eine bicyclische Verbindung. Bestätigt wurde diese Vermutung durch zwei noch nicht zugeordneten DBÄ und den NOESY-Korrelationen von CH₃ an 1 ($\delta_H = 1,12$) und CH₃ an 4a ($\delta_H = 0,89$) zu H3/1 ($\delta_H = 1,56$) und sowie von CH₃ an 4a ($\delta_H = 0,89$) zu H6/1 ($\delta_H = 1,55$). Die NOESY-Korrelationen sind in Abbildung 33 dargestellt.

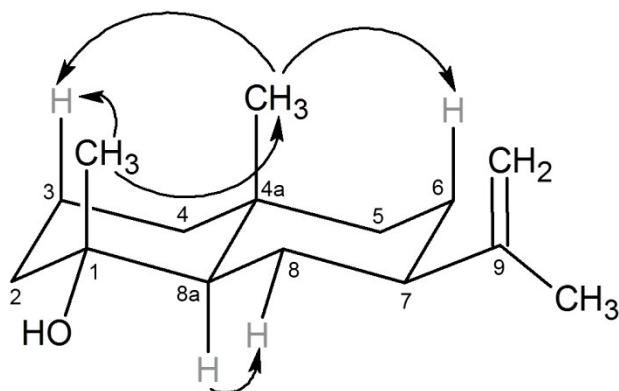


Abbildung 33: NOESY Korrelationen von Substanz PO_44

Die beobachtete NOESY Korrelation zwischen CH₃ an 1 ($\delta_H = 1,12$) und CH₃ an C4a ($\delta_H = 0,89$) zeigte die räumliche Nachbarschaft dieser beiden Methyl-Gruppen an, weshalb aufgrund der β -axialen Stellung der Methylgruppe am C4 auf eine β -axiale Stellung der Methyl-Gruppe am C1 geschlossen werden konnte.

Unter Berücksichtigung der erhaltenen Daten konnte bestimmt werden, dass es sich bei dieser bicyclischen Verbindung um ein Eudesman-Sesquiterpen mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe am C1 und einer terminalen Doppelbindung an Stelle einer

Methylgruppe am C9 handelte. Die ^1H und ^{13}C chemischen Verschiebungen dieser Substanz sind in Tabelle 25 aufgelistet. Abbildung 34 zeigt die bestimmte Struktur.

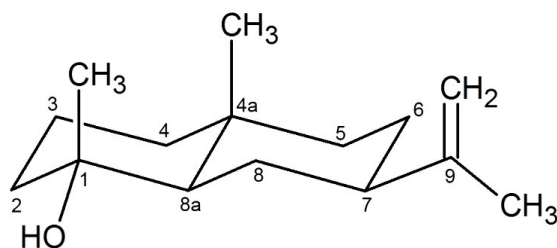


Abbildung 34: Struktur von Substanz PO_44

Trivialname: Kongol

IUPAC: (1R,4aR,7R;8aR)-7-(1-methylethenyl)-1,4a-dimethyl-decahydronaphtalen-1-ol (= α -Selin-11-en-4-ol)

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$

MG (kalk.): 222.37 Da

CA-Reg.Nr.: 16641-47-7

Tabelle 25: NMR Daten von Substanz PO_44

Position		^1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)
1	C	--	72,24
2	CH_2	1,80/1,37	43,34
3	CH_2	1,56/1,38	20,12
4 (5)	CH_2	1,43/1,20	44,64
4a	C	--	34,61
5 (4)	CH_2	1,39/1,10	41,05
6	CH_2	1,55/1,44	26,84
7	CH	1,95	46,31
8	CH_2	1,86/1,18	26,01
8a	CH	1,26	54,88
9	C	--	150,71
= CH_2	CH_2	4,70	108,13
CH_3 an 1	CH_3	1,12	22,71
CH_3 an 4a	CH_3	0,89	18,69
CH_3 an 9	CH_3	1,75	21,08

Durch den Vergleich der erhaltenen NMR-Daten mit in der Literatur publizierten spektroskopischen Informationen wurde diese Substanz als alpha-Selin-11-en-4-ol identifiziert (Chanotiya et al., 2005). In der Gattung *Pluchea* konnte dieser Eudesman-Alkohol als ein Hauptbestandteil des ätherischen Öls der Blüten von *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don identifiziert werden (Pino et al., 2009). Pino et al. zeigten auch, dass dieses Eudesman-Derivat eine Hauptkomponente des ätherischen Öls der Blüten und Blättern von *Pluchea rosea* Godfrey und der Stängeln von *Pluchea purpurascens* (Sw.) DC war (Pino et al., 2008).

3.2.7. Substanz PO_45

Mittels HPLC konnten 1,8 mg von Substanz PO_45 aus Fraktion B10.1 gewonnen werden (siehe Seite 27f). Durch das Besprühen der DC-Platte mit ASR wurde die Verbindung PO_45 als braune Bande sichtbar, die unter UV₃₆₆ intensiv blau-grün fluoreszierte (System 90, Parameter DC siehe Seite 11f).

Da bei der ESI-MS Analyse das Natriumaddukt $[M+Na]^+$ ein m/z Verhältnis von 447,2 aufwies, konnte ein MG von 424,2 bestimmt werden. Das MS² Spektrum dieses Ions zeigte Fragmentionen bei m/z 415,1; 387,1 und 355,1, die aus der Abspaltung von O₂ oder CH₃OH (-32) und CH₃COOH (-60) resultierten. Diese Ionen waren, wie das Fragmention m/z 239,0, auch bei weiteren Fragmentierungen dieses Natriumaddukts im MS³ zu sehen. Höchstwahrscheinlich entstand das Fragmention bei m/z 239,0 durch die Abspaltung einer 2,3-dimethyl-oxirancarbonsäure. Diese Gruppe war ebenfalls als Natriumaddukt bei m/z 139,0 zu sehen. Da sowohl das Fragmentierungsmuster als auch das MG mit der bereits aus diesem DCM-Extrakt isolierten Substanz PO_16 übereinstimmten (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung), wurden diese beiden Substanzen mittels DC verglichen. Diese dünnschichtchromatographische Analyse bestätigte, dass es sich um die gleiche Substanz handelte.

Für die Aufnahme von interpretierbaren NMR-Spektren war die vorliegende Substanzmenge zu gering. Weiter zeigten die ¹H-NMR-Daten, dass diese Verbindung als Mischung vorlag, obwohl das CID Spektrum nur auf wenige Verunreinigung hinwies. Diese Tatsache deutete darauf hin, dass diese Substanz einem raschen Zerfall im gelösten Zustand unterlag. Andere Plucheinol-Derivate aus diesem DCM-Extrakt, die eine

Peroxid-Gruppe in Position 9 substituiert hatten, wiesen ähnliche Instabilitäten auf, weshalb man auch in diesem Fall eine Peroxid-Funktion in der Struktur vermuten konnte (Hartl, 2015; Blaschke, Dissertation in Vorbereitung). Weiters war Substanz PO_45 chromatographisch ident mit einer von Blaschke aus diesem DCM-Extrakt isolierten Substanz. Abbildung 35 zeigt die ermittelte Struktur dieser Verbindung.

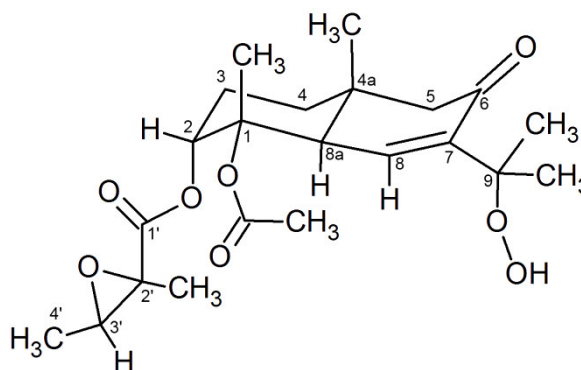


Abbildung 35: Struktur von Substanz PO_45

3.2.8. Substanz PO_46 (= (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-6-oxo-2-naphthalenyl]-2,3-dihydroxy-2-methyl-butansäureester)

Mittels Säulenchromatographie und anschließender HPCCC konnten 1,8 mg der Substanz PO_46 in hoher Reinheit aus der Ausgangsfraction B24/25 gewonnen werden (siehe Seite 29). Nach dem Besprühen der DC-Platte mit ASR war diese Substanz als violett-braune Bande mit einem R_f -Wert von 0,55 (DC-System 75) oder 0,40 (DC-System 80) sichtbar (Parameter DC siehe Seite 11f). Die Betrachtung unter UV_{366} zeigte, dass diese Substanz keine Fluoreszenz aufwies.

Das MG konnte mittels MS bestimmt werden. Diese Analyse im positiven Ionenmodus bewirkte ein Natriumadduktion $[M+Na]^+$ bei m/z 407,1, weshalb auf ein MG von 384 Da geschlossen wurde. Das MS^2 -Spektrum des beobachteten Natriumadduktes zeigte ein starkes Signal bei m/z 273,1. Dieses entstand durch die Abspaltung einer 2,3-Dihydroxy-2-Methyl-Butansäure mit einem Molekulargewicht von 134 Da. Diese Gruppe war auch als Natriumaddukt mit m/z 157,0 zu sehen. Ähnliche Fragmentationenmuster konnten

bereits bei zuvor analysierten Verbindungen dieses DCM-Extraktes gefunden werden (siehe Blaschke, Dissertation in Vorbereitung; Hartl, 2015)

Die Struktur der vorliegenden Verbindung wurde mittels 1D und 2D NMR-Experimente bestimmt. Das ^{13}C -NMR Spektrum zeigte neunzehn Signale von Kohlenstoffatomen. Mit einem HSQC-Kopplungsexperiment konnte die Anzahl der daran gebundenen Protonen bestimmt werden. Aufgrund fehlender Korrelationen zu Protonen und der geringen Signalstärke entsprachen sechs C-Signale quartären C-Atomen. Die chemische Verschiebung zeigte, dass es sich hierbei um ein Carbonyl- ($\delta_{\text{C}} = 200,82$), drei Carbinol- ($\delta_{\text{C}} = 77,59$; $71,88$ und $71,51$), ein Olefin- ($\delta_{\text{C}} = 145,07$) und ein Alkan-C ($\delta_{\text{C}} = 39,13$) handelte. Weiter konnten vier Signale von C-Atomen mit positiver Ausrichtung bestimmt werden, die mit jeweils einem Proton verbunden waren: neben einem Olefin ($\delta_{\text{C}} = 141,91$) und einem Alkan ($\delta_{\text{C}} = 50,13$) konnten zwei Carbinole ($\delta_{\text{C}} = 77,07$ und $72,36$) bestimmt werden. Aufgrund der Signalintensität, der beobachteten Korrelationen im HSQC-Experiment und der chemischen Verschiebung waren noch drei Methylen-Gruppen ($\delta_{\text{C}} = 57,67$; $32,78$ und $23,91$) und sechs Methylgruppen ($\delta_{\text{C}} = 29,26$; $28,66$; $22,51$; $21,50$; $17,84$ und $16,31$) festzustellen. Im HMBC-Kopplungsexperiment konnte ein quartäres Carboxyl-C ($\delta_{\text{C}} = 175,26$) bestimmt werden, das mit dem Proton von Carbinol C2 ($\delta_{\text{H}} = 5,05$) korrelierte.

Die erhobenen Daten aus den vorliegenden ESI-MS- und NMR-Experimenten zeigten, dass diese Verbindung eine Summenformel von $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_7$ aufwies. Daraus wurde die Anzahl der Doppelbindungsäquivalente von fünf abgeleitet. Das somit bestimmte MG von 384 Da stimmt mit den Ergebnissen der ESI-MS Analyse überein.

Die Struktur dieser Substanz konnte mit 2D-NMR Experimenten wie COSY und HMBC bestimmt werden. Zwei Methylgruppen wiesen eine sehr ähnliche chemische Verschiebung ($\delta_{\text{C}} = 29,26$ und $28,66$; $\delta_{\text{H}} = 1,45$ und $1,43$) und ein identes Kopplungsmuster im HMBC-Experiment auf, weshalb angenommen werden konnte, dass sich diese am selben C-Atom befanden. Korrelationen waren zwischen den Protonen dieser Methyl-Gruppen und C7 ($\delta_{\text{C}} = 145,07$) und C9 ($\delta_{\text{C}} = 71,88$) beobachtbar. Der Vergleich mit in der Literatur vorhandenen ^{13}C -NMR Daten über Cyclohexanone und deren Beeinflussung durch verschiedene Substituenten zeigte, dass es sich bei dieser Verbindung um ein Enon handeln könnte, da unbeeinflusste Keto-Gruppen bei cyclischen Verbindungen eine chemische Verschiebung von etwa 211 ppm aufwiesen (Reich 2004-

2014, <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/handouts/nmr-c13/cdata.htm> [abgerufen am 15.9.2014]). Daher konnte aufgrund des deutlich hochfeldverschobenen Carbonyl C6 ($\delta_C = 200,82$) angenommen werden, dass das Olefin C7 mit dem Carbonyl C6 ein Enon bildete und daher nur mehr eine freie Valenz am C7 vorhanden war. Somit wurde gezeigt, dass sich zwei Methylgruppen am quartären Carbinol-C9 befanden, das wiederum mit C7 verbunden war.

Die chemischen Verschiebungen wiesen darauf hin, dass sich eine Doppelbindung zwischen C7 ($\delta_C = 145,07$) und dem olefinischem Methin C8 ($\delta_C = 141,91$) befand. Weiter waren HMBC-Korrelationen von H8a ($\delta_H = 2,78$) zu C7 ($\delta_C = 145,07$) und C8 ($\delta_C = 141,91$) auffindbar, die vermuten ließen, dass C8a an C8 gebunden war. Diese Annahme konnte durch die Kopplung zwischen H8 ($\delta_C = 7,01$) und H8a ($\delta_C = 2,78$), ersichtlich im COSY-Experiment, bestätigt werden.

Die beiden noch unbestimmten Positionen am Methin C8a wurden von den quartären C-Atomen C1 und C4a eingenommen. Gezeigt konnte dies durch die HMBC-Korrelation von H8 ($\delta_H = 7,01$) zu C1 ($\delta_C = 71,51$) und C4a ($\delta_C = 39,13$) und der Tatsache, dass es keine weiteren freien Positionen gab, die maximal drei Bindungen von H8 entfernt waren, werden.

Weiter wiesen zwei Methylgruppen ($\delta_C = 1,28$ und $0,98$) eine Korrelation mit C8a ($\delta_C = 50,13$) auf, die darauf hindeutete, dass an den beiden quartären C-Atomen C1 und C4a jeweils eine Methylgruppe substituiert war. Da die Methylgruppe CH₃ an 1 im Vergleich zu CH₃ an 4a eine Tieffeldverschiebung aufwies und eine HMBC-Korrelation von CH₃ an 1 ($\delta_H = 1,28$) zu C1 ($\delta_C = 71,51$) bestand, konnte davon ausgegangen werden, dass sich diese Methylgruppe an dem quartären Carbinol-C1 befand. Somit wurde die einzige noch unbesetzte Position, die maximal drei Bindungen von C8a entfernt war, von CH₃ an 4a eingenommen.

Aufgrund der HMBC-Korrelation von CH₃ an 4a ($\delta_H = 0,98$) zu Methylen C5 ($\delta_C = 57,67$) und von H5 ($\delta_C = 2,37/2,33$) zu Carbonyl C6 ($\delta_C = 200,82$) konnte angenommen werden, dass sich C5 zwischen C4a und C6 befand. Damit wurde gezeigt, dass es sich hierbei um eine cyclische Verbindung handelte.

Die noch unbestimmte Position am quartären Carbinol C1 wurde von C2 eingenommen. Dies konnte durch die HMBC-Korrelation von H2 ($\delta_H = 5,05$) zu C8a ($\delta_C = 50,13$) und

von CH₃ an 1 ($\delta_{\text{H}} = 1,28$) zu C2 ($\delta_{\text{C}} = 77,07$) gezeigt werden. Die Triplet Aufspaltung des H2-Signals wies auf die Nachbarschaft mit einer der beiden noch unbestimmten Methylengruppen hin. Aufgrund der COSY-Korrelationen von H2 ($\delta_{\text{H}} = 5,05$) zu H3 ($\delta_{\text{H}} = 1,96$) und der höheren chemischen Verschiebung von H3 im Vergleich zu H4 ($\delta_{\text{H}} = 1,70/1,38$) wurden angenommen, dass C3 an das Carbinol C2 gebunden war. Zwischen C3 und C4a befand sich das Methylen C4, was durch die HMBC-Korrelation von H2 ($\delta_{\text{H}} = 5,05$) zu C4 ($\delta_{\text{C}} = 32,78$) und der Tatsache, dass eine Position am C4a noch unbestimmt war, gezeigt wurde.

Die im MS²-Spektrum beobachtete Abspaltung einer 2,3-Dihydroxy-2-Methyl-Butansäure konnte aufgrund beobachteter HMBC- und COSY-Korrelationen und charakteristischen chemischer Verschiebungen bestätigt werden: da das Carbinol C2 im Vergleich zu anderen Carbinolen eine Tieffeldverschiebung aufwies, wurde angenommen, dass diese Hydroxyl-Gruppe an das Carboxyl-C1' gebunden war. Bekräftigt wurde diese Annahme durch die HMBC-Korrelation von H2 ($\delta_{\text{H}} = 5,05$) zu C1' ($\delta_{\text{C}} = 175,26$). Die größere chemische Verschiebung des quartären Carbinol C2' ($\delta_{\text{C}} = 77,59$) wies darauf hin, dass sich am Nachbarkohlenstoff ein Substituent mit Elektronen-ziehenden Eigenschaften wie eine Carboxylgruppe befand. Die HMBC-Korrelation von CH₃ an 2' ($\delta_{\text{H}} = 1,37$) zu C1' ($\delta_{\text{C}} = 175,26$) zeigte, dass das quartäre Carbinol C2' methyliert war. Weitere HMBC-Korrelationen waren von H4' ($\delta_{\text{H}} = 1,27$) zu C2' ($\delta_{\text{C}} = 77,59$) und C3' ($\delta_{\text{C}} = 72,36$) erkennbar, welche darauf hinwiesen, dass das Carbinol C3' mit Carbinol C2' eine Diol-Gruppe bildete. COSY-Korrelationen zwischen H3' ($\delta_{\text{C}} = 3,98$) und H4' ($\delta_{\text{C}} = 1,27$) bestätigten die Position der Methylgruppe C4' am Carbinol C3'.

Aufgrund der aus 1D- und 2D-NMR Spektren gewonnenen Strukturinformationen konnte auf ein Sesquiterpen mit einem Eudesman-Grundgerüst geschlossen werden welches mit einer Oxo-Gruppe (C6), einer Doppelbindung (C7-8) und einer 2,3-Dihydroxy-2-Methyl-Butansäure-Gruppe (C2) substituiert war. C1 und C9 waren quartäre Kohlenstoffatome, da sie mit einer Hydroxyl-Gruppe verbunden waren, die eine Tieffeldverschiebung der benachbarten Methylgruppen ($\delta_{\text{C}} = 22,51, 28,66, 29,26$) bewirkten (Abbildung 36, Seite 71). Die erhaltenen Daten der durchgeführten Analysen sind in Tabelle 26 (Seite 71) aufgelistet. Ein Vergleich dieser Werte mit denen von bereits isolierten Substanzen zeigte, dass diese Verbindung ident war mit Substanz TH_6 (Hartl, 2015).

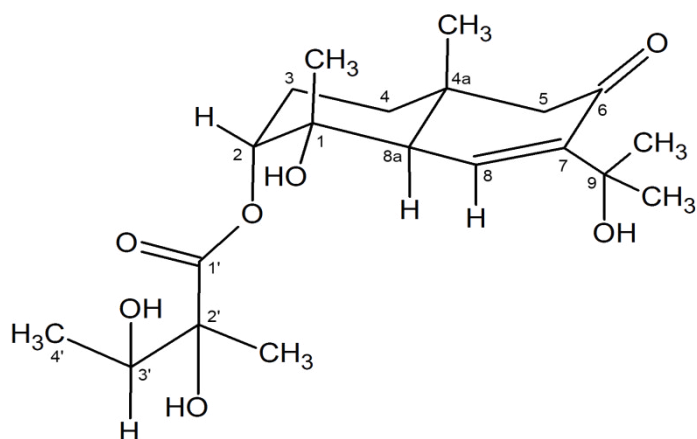


Abbildung 36: Struktur von Substanz PO_46

Tabelle 26: NMR-Daten Substanz PO_46

Position	^1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)
1 C	--	71,51
2 CH	5,05	77,07
3 CH ₂	1,96	23,91
4 CH ₂	1,70/1,38	32,78
4a C	--	39,13
5 CH ₂	2,37/2,33	57,67
6 C	--	200,82
7 C	--	145,07
8 CH	7,01	141,91
8a CH	2,78	50,13
9 C	--	71,88
CH ₃ an 1 CH ₃	1,28	22,51
CH ₃ an 4a CH ₃	0,98	17,84
CH ₃ an 9 CH ₃	1,45	29,26
CH ₃ an 9 CH ₃	1,43	28,66
1' C	--	175,26
2' C	--	77,59
3' CH	3,98	72,36
4' CH ₃	1,27	16,31
CH ₃ an 2' CH ₃	1,37	21,50

IUPAC: (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-
1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-6-oxo-2-naphthalenyl]-
2,3-dihydroxy-2-methyl-butansäureester

Summenformel: C₂₀H₃₂O₇

MG (kalk.): 384,46 Da

CA-Reg.Nr.: 1037001-15-2

Dieses Eudesman-Keton konnte bereits von Arriaga-Giner aus *Pluchea odorata* (L.) Cass. (Arriaga-Giner und Borges-Del-Castillo, 1985) und von Vera et al. aus *Pluchea sagittalis* (Lamarck) Cabrera isoliert werden (Vera et al., 2008). In diesem Artikel ist angemerkt, dass diese Verbindung bereits von Guilhon und Müller aus *Pluchea quitoc* DC gewonnen werden konnte, jedoch gab es keine Übereinstimmung bezüglich des MG (Guilhon und Müller, 1998).

3.2.9. Substanz PO_48 (= Pheophorbid A)

Die Verbindung PO_48 (1,3 mg) konnte mittels Säulenchromatographie aus den Fraktionen B29.7-10 gewonnen werden (siehe Seite 37f). Die Eigenfarbe dieser Substanz war intensiv dunkelgrün und war bereits vor dem Besprühen mit ASR als grüne Bande mit dem R_f-Wert von 0,48 (System 80, Parameter DC siehe Seite 11f) auf einer entwickelten DC-Platte sichtbar. Unter UV₃₆₆ erschien diese Verbindung als stark rot fluoreszierende Bande.

Basierend auf den ESI-MS-Daten, die ein Natriumadduktion [M+Na]⁺ mit dem m/z-Verhältnis von 615,3 zeigten, konnte auf ein MG von 592 Da geschlossen werden. Im MS² Spektrum dieses Natriumadduktes war das Fragmentation mit m/z 539,2, das wahrscheinlich aus der Abspaltung von MeOH (-32) und CO₂ (-44) resultierte, erkennbar. Eine weitere Fragmentierung dieses Ions im MS³ erzeugte weitere Fragmentationen bei m/z 524,2 und 510,2. Diese entstanden wahrscheinlich durch die Abspaltung eines Methyl- (-15 Da) bzw. Ethyl-Radikals (-29 Da) (siehe Abbildung 37, Seite 73). Verluste von MeOH und CO₂ waren auch im negativen Ionen-Modus erkennbar.

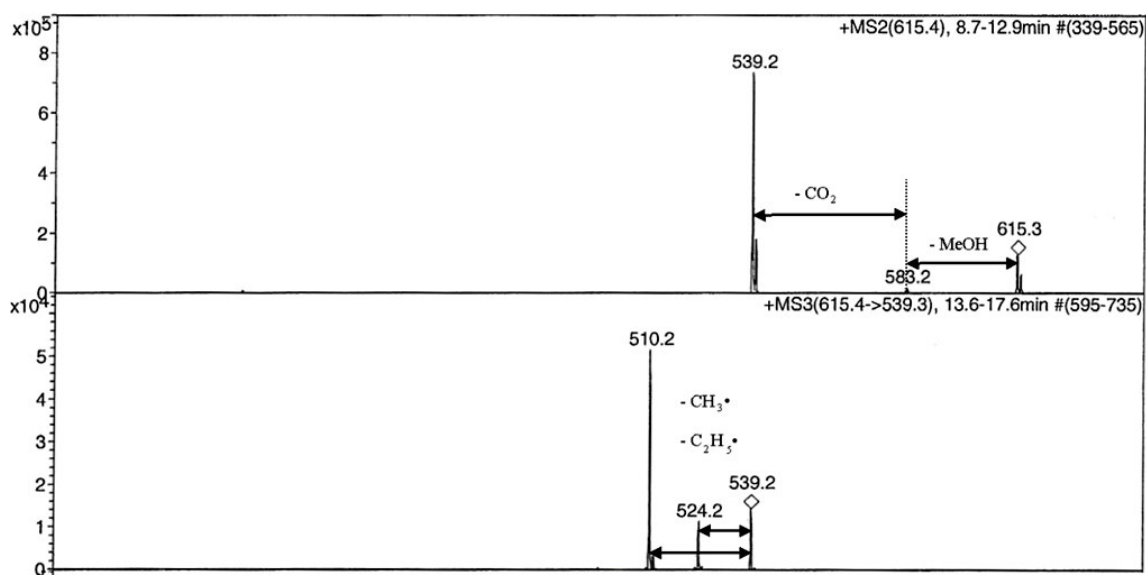


Abbildung 37: Ausschnitt eines ESI-MS Spektrums von Substanz PO_48
Bedingungen vgl. Seite 18

Die erhaltenen MS-Daten sowie die Eigenfarbe dieser Substanz wiesen darauf hin, dass es sich bei der Verbindung PO_48 um ein Chlorophyllderivat mit intaktem Porphyrinring, von dem bereits die Phytol-Gruppe abgespalten wurde, handelte. Diese ist bei Chlorophyll A mit der Propionsäure-Gruppierung an Position 17 verestert. Die beobachteten Abspaltungen von CO₂ und MeOH deuteten darauf hin, dass die Methylester-Gruppierung in Position 13² (siehe Abbildung 38, Seite 74) noch vorhanden war. Ein wichtiger Bestandteil vieler Chlorophyll-Derivate ist die Propionsäure-Gruppe in Position 17, die die Detektion von Molekül- und Fragmentionen im negativen Ionen-Modus ermöglicht (Lafeuille et al., 2014, Müller et al., 2014). Durch den Vergleich mit bereits in der Literatur beschriebenen Chlorophyll-Abbauprodukten konnte diese Verbindung als Pheophorbid A (siehe Abbildung 38, Seite 74) mit der Summenformel C₃₅H₃₆N₄O₅ identifiziert werden (van Breemen 1991). Da an Position 13² leicht eine Epimerisierung über die Enol-Form möglich ist, handelt es sich hier um ein labiles Chiralitätszentrum. Daher würde man eine Mischung beider Epimere erwarten. Durch die räumliche Nähe zu der Propionsäure-Gruppe ist aber die R-Konfiguration für Position 13² am wahrscheinlichsten.

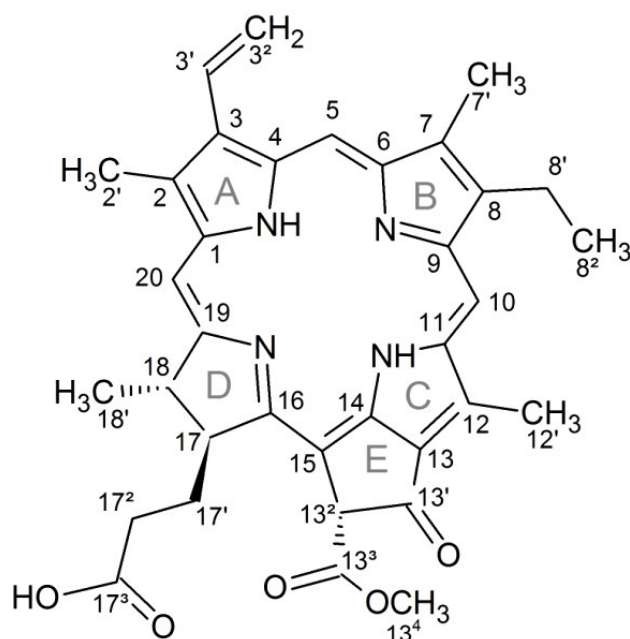


Abbildung 38: Struktur von Substanz PO_48 (= Pheophorbide A)

Pheophorbide A ist ein Intermediärprodukt des Chlorophyll-Abbaus, welches nach der Ernte und durch verschiedene Aufarbeitungsschritte aus Chlorophyll A entsteht. Die Phytol-Kette wird durch das Enzym Chlorophyllase abgespalten, während der Verlust des chelatierten Mg-Ions durch die Interaktion mit sauren Komponenten beschleunigt werden kann (Lafeuille et al., 2014).

Trivialname: Pheophorbide A

IUPAC: 9-ethenyl-14-ethyl-21-(methoxycarbonyl)-4,8,13,18-tetramethyl-20-oxo-3-Phorbinepropansäure

Summenformel: C₃₅H₃₆N₄O₅

MG (kalk.): 592,68 Da

CAS: 15664-29-6

3.2.10. Substanz PO_49 (=Hydroxy-Pheophorbid A)

Ein weiteres Chlorophyllderivat (1,2 mg) konnte aus Fraktion B29.14+15 mittels HPLCC und anschließendem Ausschütteln isoliert werden (siehe Seite 38f). Diese Verbindung war als grüne Bande mit dem R_f -Wert von 0,29 auf einer mit System 80 entwickelten DC-Platte sichtbar (Parameter DC siehe Seite 11f). Eine intensiv rote Fluoreszenz war ebenfalls unter UV_{366} bemerkbar.

Die ESI-MS-Analyse zeigte ein Natriumadduktion $[M+Na]^+$ mit dem m/z Verhältnis von 631,3, wodurch auf ein MG von 608 Da geschlossen wurde. Das MS^2 -Spektrum dieses Ions zeigte Hauptfragmente bei m/z 613,3; 587,3; 581,2; 569,3; 555,3; 537,3 und 511,3. Diese Fragmentationen resultierten aus den Verlusten von H_2O (-18), MeOH (-32) und CO_2 (-44). Die weitere Fragmentierung des Fragmentions bei m/z 537,3 im MS^3 lieferte zwei deutliche Ionen bei m/z 522,2 und 508,2. Neutralverluste von 15 und 29 deuteten wahrscheinlich auf die Abspaltung von Methyl- bzw. Ethyl-Gruppen hin. In Abbildung 39 ist das CID-Spektrum dieser Verbindung dargestellt.

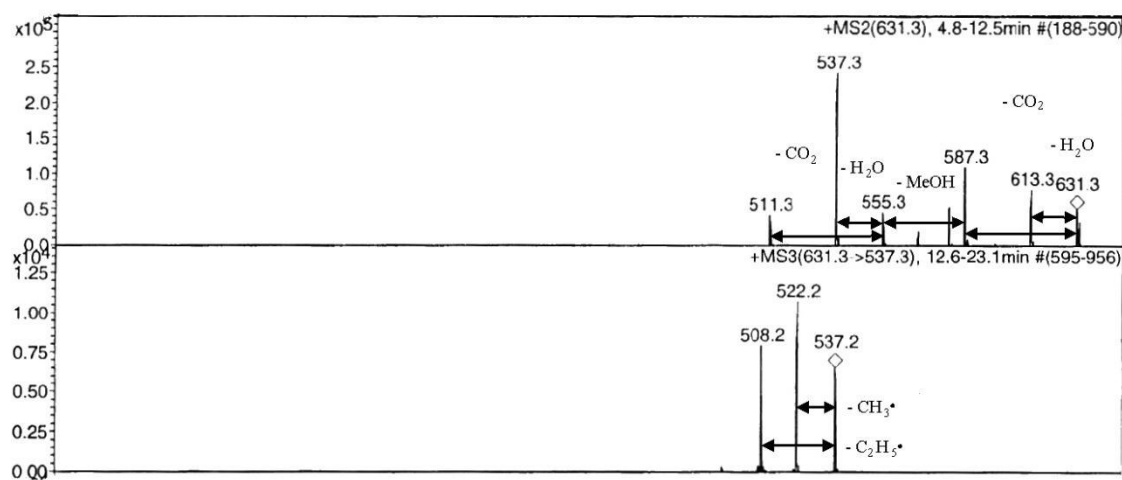


Abbildung 39: Ausschnitt eines ESI-MS Spektrums von Substanz PO_49
Bedingungen vgl. Seite 18

Aufgrund der beobachteten Eigenschaften dieser Verbindung konnte auf ein Produkt des Chlorophyll-Metabolismus, bei dem die Phytol-Gruppe abgespalten wurde, geschlossen werden. Wie Pheophorbid A wies auch diese Verbindung Neutralverluste von 44 und 32 auf, die zeigten, dass die β -Ketoester Gruppierung am Ring E noch vorhanden war (siehe Seite 72). Die Differenz zwischen den bestimmten MGs von Pheophorbid A und

Verbindung PO_49 betrug 16 Da. Diese Tatsache wies auf ein hydroxyliertes Pheophorbid-A Derivat hin (Huang et al., 2008). Bekräftigt konnte diese Annahme dadurch werden, dass bei dem Natriumaddukt $[M+Na]^+$ von Substanz PO_49 ein H_2O -Verlust beobachtbar war. Dieser war bei Pheophorbid A bei der Fragmentierung von $[M+Na]^+$ nicht vorhanden. Der Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Pheophorbid A-Derivaten zeigte, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung möglicherweise um (13²S)-hydroxy-pheophorbid A (siehe Abbildung 40) handelte (Zhao et al., 2014). Die tatsächliche Position der zusätzlichen Hydroxyl-Gruppe konnte durch alleinige MS-Analyse nicht festgestellt werden. Eine Literaturrecherche zeigte, dass Hydroxyl-Gruppen an einer anderen Position des Porphyrin-Ringes noch nicht beschrieben wurden.

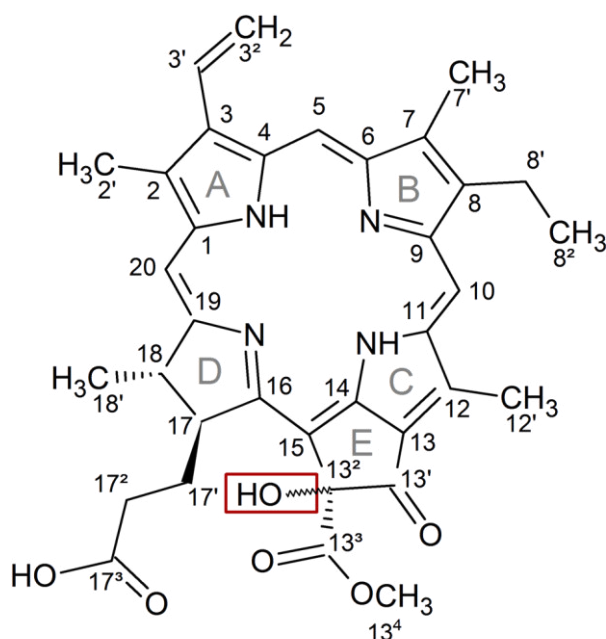


Abbildung 40: Struktur von Substanz PO_49 (= 13 Hydroxy-pheophorbid A)

Durch die Einwirkung von oxidierenden Enzymen wie die Chlorophylloxidase entstehen hydroxylierte Chlorophyll-Derivate. Es ist gezeigt worden, dass der Anteil an diesen modifizierten Porphyrinen während des Reifungsprozesses zunimmt. Im Zuge des Chlorophyllmetabolismus könnten diese hydroxylierten Derivate u.a. zu 13-OH-Pheophorbid A abgebaut werden. Diese Intermediärprodukte wurden in

verschiedenen Obst- und Gemüse-Pflanzen sowie in *Salicornia herbacea* nachgewiesen (Huang et al., 2008; Zhao et al., 2014).

Trivialname: Hydroxy Pheophorbid A

Summenformel: $C_{35}H_{35}N_4O_6$

MG (kalk.): 608,68 Da

3.2.11. Substanz PO_50 (=3-O- β -D-Glucopyranolsyl-stigmasterol)

Diese Verbindung war in der Ausgangsfractionen B28 und B29 enthalten, 11,1 mg konnten aus Fraktion B28.4 isoliert werden (siehe Seite 32). Aufgrund der geringen Löslichkeit im HEMWat-System 15 (vgl. Tabelle 7, Seite 15) konnten viele als Verunreinigung betrachteten Begleitsubstanzen durch abwechselndes Waschen mit Ober- und Unterphase des vorbereiteten Lösungsmittelsystems und Filtration unter vermindertem Druck entfernt werden.

Auf einer mit System 80 entwickelten DC-Platte war diese Verbindung nach dem Besprühen mit ASR als violette Bande mit dem R_f -Wert von 0,18 sichtbar (Parameter DC siehe Seite 11f). Unter UV_{366} wies sie eine lila Fluoreszenz auf. Durchgeführte DCs zeigten, dass diese Substanz in weitere Produkte zerfiel, die als schwach grüne Banden mit niedrigerem R_f -Wert erschienen. Diese Tatsache war nur in Sammelfraktion 1 beobachtbar. Eventuell schützten die in Sammelfraktion 2 vorkommenden Begleitsubstanzen Substanz PO_50 vor dem Zerfall.

Die Tatsache, dass diese Verbindung nach der Zentrifugation als Zwischenphase in der zweiphasigen Lösungsmittelmischung angefallen war, zeigte, dass diese Substanz einen amphiphilen Charakter hatte.

Da diese Verbindung nicht vollständig in Chloroform gelöst werden konnte, war die Aufnahme der NMR-Daten mit deuteriertem $CHCl_3$ nicht möglich. Lösungsversuche in Lösungsmittel wie Methanol, Aceton und Butanol bewirkten einen ähnlichen Anteil an unlöslichen Partikeln. Substanz PO_50 konnte aber in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst werden.

Durch die im deuterierten DMSO aufgenommenen 2D und 3D NMR Spektren konnte diese Substanz identifiziert werden. 35 im ^{13}C -NMR Spektrum registrierte Signale wurden der zu analysierenden Verbindung zugeordnet und die Anzahl der daran gebundenen Protonen konnte mittels HSQC-Experiment bestimmt werden: bei drei Signalen handelte es sich um ein olefinisches ($\delta_{\text{C}} = 140,47$) und zwei alkanische quartäre C-Atome ($\delta_{\text{C}} = 36,24; 41,88/41,77$). Sechzehn Kohlenstoffe wurden anhand ihrer positiven Signalausrichtung und ihrer chemischen Verschiebung als Methine erkannt. Dabei handelte es sich um drei Olefine ($\delta_{\text{C}} = 138,10; 128,83$ und $121,28$), ein Acetal ($\delta_{\text{C}} = 100,78$), vier Carbinole ($\delta_{\text{C}} = 76,91; 76,78; 73,49$ und $70,09$) und sieben Alkane ($\delta_{\text{C}} = 56,29/56,19; 55,43/55,35; 50,63; 49,61; 40,10; 31,44$ und $31,37$). Da die Intensität des Signals bei $\delta_{\text{C}} = 76,78$ größer war als bei den anderen registrierten Methin-Carbinolen, konnte man davon ausgehen, dass es sich hierbei um zwei Carbinole mit fast identer chemischen Verschiebung handelte. Es waren weitere neun C-Signale mit negativer Ausrichtung vorhanden, die als Methylene identifiziert wurden. Außer einem Carbinol ($\delta_{\text{C}} = 61,10$) waren an diese CH_2 -Gruppen keine Funktionalitäten gebunden ($\delta_{\text{C}} = 38,31; 36,85; 31,40; 31,33; 29,29; 24,92; 23,91$ und $20,61$). Die chemische Verschiebung der C-Atome sowie die positive Signalausrichtung im ^{13}C -NMR zeigten, dass sechs Kohlenstoffe als CH_3 -Gruppen vorlagen ($\delta_{\text{C}} = 21,15; 20,99; 19,14; 18,96/18,89; 12,18$ und $11,87/11,72$). Durch die HMBC-Korrelation von H18 ($\delta_{\text{H}} = 0,67/0,65$) zu C12 ($\delta_{\text{C}} = 39,09$) konnte ein weiteres Methylen identifiziert werden.

Die aus den NMR Experimenten erhaltenen Informationen ließen auf eine Verbindung mit der Summenformel $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6$ schließen. Die daraus abgeleiteten sieben Doppelbindungsäquivalente und die vier olefinischen C-Atome zeigten, dass diese Verbindung zwei Doppelbindungen und fünf Ringe hatte. Berücksichtigte man den zuvor beobachteten amphiphilen Charakter dieser Verbindung, handelte es sich hierbei wahrscheinlich um das Glucosid eines Phytosterols.

Die Verwendung von deuteriertem DMSO als Lösungsmittel bewirkte, dass OH-Protonen im ^1H -NMR Spektrum sichtbar waren. So konnten Signale zwischen 4,92 und 4,44 ppm OH-Protonen zugeordnet werden. Das COSY-Korrelationsexperiment gab an, an welche C-Atome diese Hydroxylgruppen gebunden waren: OH an 2' ($\delta_{\text{H}} = 4,89$) korrelierte mit H2' ($\delta_{\text{H}} = 2,89$), OH an 4' ($\delta_{\text{H}} = 4,88$) mit H4' ($\delta_{\text{H}} = 3,00$), OH an 3' ($\delta_{\text{H}} = 4,92$) mit H3' ($\delta_{\text{H}} = 3,11$) und OH an 6' ($\delta_{\text{H}} = 4,45$) mit dem Methylen H6' ($\delta_{\text{H}} = 3,64/3,40$). Die

COSY-Korrelation zwischen dem Acetal H1' ($\delta_H = 4,22$) und dem Carbinol H2' ($\delta_H = 2,89$) zeigte, dass C1' an C2' gebunden war. Weiter war C2' an C3' gebunden, was die HMBC-Korrelationen von OH an 2' ($\delta_H = 4,89$) und H1' ($\delta_H = 4,22$) zu C3' ($\delta_H = 76,78$) zeigten. HMBC-Korrelationen waren auch von OH an 4' ($\delta_H = 4,88$) zu C3'/C5' ($\delta_H = 76,78$) und von H1' ($\delta_H = 4,22$) zu C5' ($\delta_H = 76,78$) beobachtbar. Somit war C4' an C3' und C5' und C1' wiederum an C5' gebunden. Das Methylen C6' war mit dem Methin C5' verknüpft, da die anderen Methin-Carbinole COSY-Korrelationen zu OH-Protonen aufwiesen. Die chemische Verschiebung der Protonen der Carbinole C2', C3', C4' und C5' war ähnlich, weshalb man davon ausgehen konnte, dass diese sich in axialer Stellung befanden. Das als Duplett vorliegende Signal H1' koppelte mit H2' und wies eine Kopplungskonstante $^3J_{1,2'}$ von 7,60 Hz auf. Somit wurde gezeigt, dass beide Kerne eine axiale Stellung einnahmen und es sich bei der Zuckerkomponente um eine β -D-Glucopyranose handelte.

Die Positionen der C-Signale des Aglycons konnten durch COSY und HMBC-Korrelationen und durch den Vergleich mit Stigmasterol (PO_14), das bereits aus dem DCM-Extrakt von *Pluchea odorata* isoliert werden konnte (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung), bestimmt werden (siehe Tabelle 27, Seite 81).

Die HMBC-Korrelationen von dem Methyl H19 ($\delta_H = 0,95$) zu dem Methylen C1 ($\delta_C = 36,85$), dem quartären Olefin C5 ($\delta_C = 140,47$), dem Methin C9 ($\delta_C = 49,61$) und dem quartären C-Atom C10 ($\delta_C = 36,24$) zeigten, dass die Methyl-Gruppe wie auch C1, C5 und C9 an C10 gebunden waren. Somit bildete C10 mit C5 die Anellierungsstelle der Ringe A und B. Die Doppelbindung befand sich im Ring B, da das Methylen H7 ($\delta_H = 1,92$) mit dem Proton des Olefins C6 ($\delta_H = 5,32$) und des Methins H8 ($\delta_H = 1,50$) eine COSY-Korrelation aufwies. Daher wurde die Anellierungsstelle der Ringe B und C durch die beiden Methine C8 und C9 gebildet.

Vom Methyl H18 ($\delta_H = 0,67/0,65$) waren HMBC-Korrelationen zu den Methinen C17 ($\delta_C = 55,43/55,35$) und C14 ($\delta_C = 56,29/56,19$), dem Methylen C12 und dem quartären C-Atom C13 ($\delta_C = 41,88/41,77$) beobachtbar. Somit waren neben dem Methyl auch C12, C14 und C17 an C13 gebunden. Da auch das Methyl H21 ($\delta_H = 0,99$) eine HMBC-Korrelation mit C17 ($\delta_C = 55,43/55,35$) aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass C14 mit C13 die Anellierungsstelle der Ringe C und D bildeten und an C17 die aliphatische Kohlenstoff-Kette substituiert war.

Weitere HMBC-Korrelationen waren von dem Methyl H21 ($\delta_H = 0,99$) zu dem Olefin C22 ($\delta_C = 138,10$) und dem Methin C20 ($\delta_C = 40,10$) sichtbar. Daher war C20 mit C17, C22 und einer Methyl-Gruppe verknüpft. Gezeigt wurde dies durch die COSY-Korrelation von H20 ($\delta_H = 2,03$) zu H21 ($\delta_H = 0,99$) und H22 ($\delta_H = 5,15$). Durch die HMBC-Korrelation von H22 ($\delta_H = 5,15$) zu C24 ($\delta_C = 50,63$) und durch die COSY-Korrelation zwischen dem Olefin H23 ($\delta_H = 5,02$) und H24 ($\delta_H = 1,52$) wurde bestätigt, dass sich die Doppelbindung zwischen C22 und C23 befand und das Methin C24 an C23 gebunden war.

Die beiden Methyl-Gruppen H26 ($\delta_H = 0,82$) und H27 ($\delta_H = 0,77$) wiesen eine HMBC-Korrelation zu dem Methin C25 ($\delta_C = 31,44$) auf und H26 ($\delta_H = 0,82$) korrelierte weiter mit C24 ($\delta_C = 50,63$) und C27 ($\delta_C = 18,96/18,89$). Auch war eine COSY-Korrelation zwischen H25 ($\delta_H = 1,50$) und H27 ($\delta_H = 0,77$) vorhanden. Dieses Muster zeigte, dass eine Isopropylgruppe an C24 gebunden war. Somit wurde die noch unbestimmte Position am C24 durch eine Ethyl-Gruppe eingenommen, da das Methyl H29 ($\delta_H = 0,77$) eine HMBC-Korrelation mit dem Methylen C28 ($\delta_C = 24,92$) aufwies.

Somit handelt es sich hierbei um β -D-Glucopyranosid von Stigmasterol. Dieses Aglykon (PO_14) konnte bereits aus diesem DCM-Extrakt isoliert werden (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung). Die bestimmten NMR-Daten sind in Tabelle 27 (Seite 81) und Tabelle 28 (Seite 82) dargestellt. Die Struktur zeigt Abbildung 41.

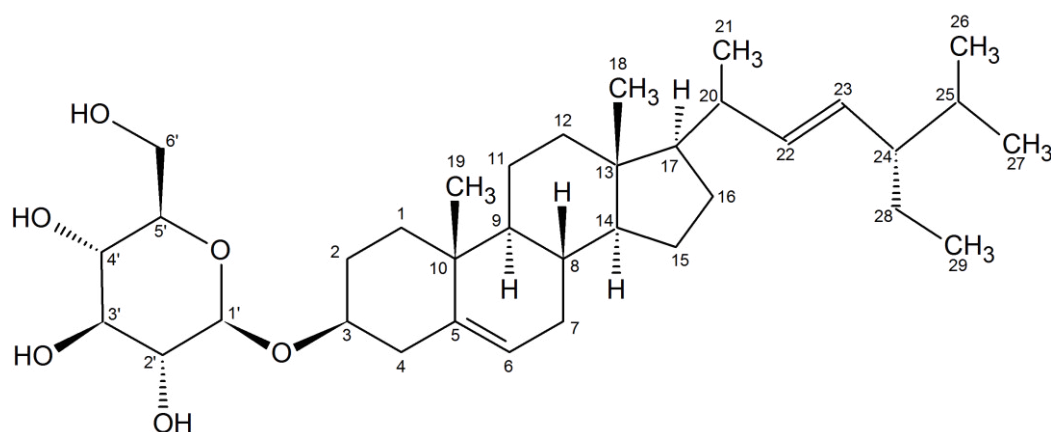


Abbildung 41: Struktur von Substanz PO_50

Tabelle 27: NMR-Daten von Substanz PO_50, Vergleich mit PO_14 (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung)

		PO_50		Stigmasterol (PO_14)	
		(in d ₆ DMSO)		(in C ₆ D ₆)	
Position		¹H-NMR (ppm)	¹³C-NMR (ppm)	¹H-NMR (ppm)	¹³C-NMR (ppm)
1	CH ₂	1,80/0,99	36,85	1,70/0,99	38,35
2	CH ₂	1,39	31,33	1,42	32,97
3	CH	3,24	76,91	3,40	72,33
4	CH ₂	2,37/2,13	38,31	2,25	43,59
5	C	--	140,57	--	141,95
6	CH	5,32	121,28	5,36	122,28
7	CH ₂	1,92	31,40	1,94	32,81
8	CH	1,50	31,37	1,71	32,89
9	CH	0,88	49,61	0,92	51,22
10	C	--	36,24	--	37,47
11	CH ₂	1,47/1,38	20,61	1,44	22,08
12	CH ₂	1,94/1,14	39,09	1,98/1,15	40,73
13	C	--	41,88/41,77	--	43,13
14	CH	0,99/0,96	56,29/56,19	0,93	57,80
15	CH ₂	1,52/1,02	23,91	1,54	25,32
16	CH ₂	1,81/1,23	29,29	1,80/1,35	30,10
17	CH	1,08/1,12	55,43/55,35	1,13	56,92
18	CH ₃	0,67/0,65	11,87/11,72	0,69	12,90
19	CH ₃	0,95	19,14	0,97	22,06
20	CH	2,03	40,10	2,08	41,63
21	CH ₃	0,99	21,15	1,13	22,22
22	CH	5,15	138,10	5,23	139,57
23	CH	5,02	128,83	5,07	130,31
24	CH	1,52	50,63	1,62	52,36
25	CH	1,50	31,44	1,56	33,02
26	CH ₃	0,82	20,99	0,96	22,22
27	CH ₃	0,77	18,96/18,89	0,91	19,94
28	CH ₂	1,38/1,13	24,92	1,47/1,25	26,53
29	CH ₃	0,77	12,18	0,95	13,26

Tabelle 28: Fortsetzung NMR-Daten von Substanz PO_50

		PO_50	
		(in d ₆ DMSO)	
		¹ H-NMR (ppm)	¹³ C-NMR (ppm)
1'	CH	4,22	100,78
2'	CH	2,89	73,49
3'	CH	3,11	76,78
4'	CH	3,00	70,09
5'	CH	3,06	76,78
6'	CH ₂	3,64/3,40	61,10

Trivialname: 3-O-β-D-Glucopyranosyl-β-stigmasterol

IUPAC: (3β, 22E)-Stigmasta-5,22-dien-3-yl-β-D-Glucopyranoside

Summenformel: C₃₅ H₅₈ O₆

MG (kalk.): 574,83 Da

CAS: 19716-26-8

In der Gattung *Pluchea* wurde Stigmasterolglucosid bereits von Uchiyamaa et al in *Pluchea indica* nachgewiesen (Uchiyamaa et al., 1989).

3.2.12. Substanz PO_51

Mittels Säulenchromatographie konnten 1,6 mg von Substanz PO_51 aus den Fraktionen B29.7-10 gewonnen werden (siehe Seite 37f). Nach dem Besprühen der DC-Platte mit ASR wurde sie als hell violette Bande mit dem R_f-Wert von 0,57 sichtbar, die unter UV₃₆₆ eine stark gelbe Fluoreszenz aufwies (System 80, Parameter DC siehe Seite 11f).

Die ESI-MS Analyse zeigte ein deutliches Signal eines Natriumadduktions [M+Na]⁺ bei m/z 393,4, wodurch auf ein MG von 370 Da geschlossen wurde.

Für die Aufnahme von NMR-Spektren war die Substanzmenge zu gering, sodass eine Strukturklärung von Substanz PO_51 nicht möglich war.

3.2.13. Substanz PO_52

1,3 mg dieser Verbindung konnten durch Säulenchromatographie aus den Fraktionen B29.7-10 gewonnen werden (siehe Seite 37f). Durch das Besprühen mit ASR und anschließendem Trocknen war sie als braun-violette Bande mit dem R_f -Wert von 0,33 sichtbar (System 80, Parameter DC siehe Seite 11f). Betrachtete man diese DC-Platte unter UV_{366} , so war keine Fluoreszenz bemerkbar.

Für die Aufklärung der Struktur mittels NMR-Analyse war die Substanzmenge zu gering.

3.2.14. Substanz PO_53 (= (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-6-oxo-2-naphthalenyl]-2,3-dimethyl-oxirancarbonsäureester)

Aus der Fraktion B17.16 konnten mittels HPLC 10,7 mg von Substanz PO_53 isoliert werden (siehe Seite 41f). Diese klare, dickflüssig bis lackartige Verbindung war nach dem Besprühen mit ASR als violett-braune Bande mit dem R_f -Wert von 0,58 sichtbar (Parameter DC siehe Seite 11f). Unter UV_{366} wies sie keine Fluoreszenz auf.

Im ESI-MS Spektrum war ein Natriumadduktion $[M+Na]^+$ bei m/z 389,2 sichtbar, weshalb auf ein MG von 366 Da geschlossen wurde. Eine weitere Aufspaltung dieses Ions zeigte ein deutliches Signal bei m/z 273,1, das aus der Abspaltung einer 2,3-dimethyl-oxirancarbonsäure (-116) resultierte. Diese Gruppe war auch als Natriumaddukt bei m/z 138,9 sichtbar.

Die 1H und ^{13}C NMR Daten (siehe Tabelle 29, Seite 84) wiesen viele Übereinstimmungen mit denen von Substanz PO_46 (siehe Seite 67) auf. Unterschiede waren in den chemischen Verschiebungen der Protonen und C-Atomen der Seitenkette zu finden: die chemische Verschiebung des Carboxyl- $C1'$ ($\delta_C = 169,55$), des quartären $C2'$ ($\delta_C = 60,25$) sowie des Methin $C3'$ ($\delta_C = 59,83$; $\delta_H = 3,09$) wiesen eine Hochfeldverschiebung gegenüber den jeweiligen C-Atomen und Proton von Substanz PO_46 auf (siehe Seite 67f). Die kleineren chemischen Verschiebungen und die Massendifferenz von 18 Da dieser beiden Substanzen deuteten darauf hin, dass in Substanz PO_53 am $C2'$ und $C3'$

statt zwei Hydroxyl-Gruppen eine Epoxy-Gruppe vorlag. Abbildung 42 zeigt die anhand vorliegender NMR-Daten bestimmte Struktur.

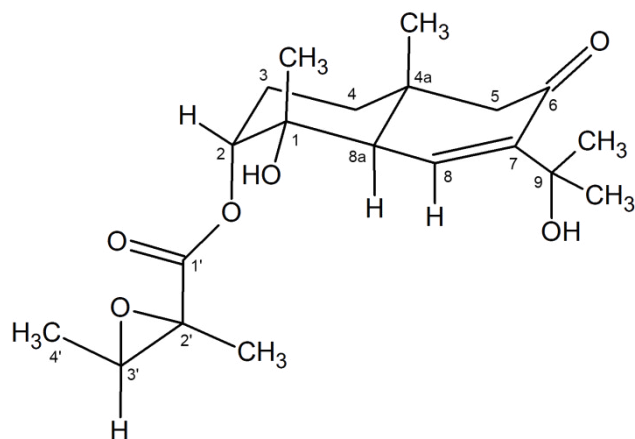


Abbildung 42: Substanz PO_53

Tabelle 29: NMR Daten von Substanz PO_53

Position		¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)
1	C	--	71,12
2	CH	4,93	77,20
3	CH ₂	1,95	23,85
4	CH ₂	1,63/1,36	32,60
4a	C	--	39,07
5	CH ₂	2,37/2,33	57,62
6	C	--	200,81
7	C	--	144,98
8	CH	7,02	142,02
8a	CH	2,81	50,10
9	C	--	71,82
CH ₃ an 1	CH ₃	1,26	22,52
CH ₃ an 4a	CH ₃	0,98	17,78
CH ₃ an 9	CH ₃	1,45	29,26
CH ₃ an 9	CH ₃	1,43	28,72
1'	C	--	169,55
2'	C	--	60,25
3'	CH	3,09	59,83
4'	CH ₃	1,35	14,11
CH ₃ an 2'	CH ₃	1,61	19,40

IUPAC: (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-
1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-6-oxo-2-naphthalenyl]-
2,3-dimethyl-oxirancarbonsäureester

Summenformel: C₂₀H₃₀O₆

MG: 366,45 Da

CAS: 1036730-75-2

Der Vergleich der gewonnenen spektroskopischen Daten mit denen bereits isolierter Verbindungen zeigte, dass diese Verbindung ident mit Substanz TH_2 und PO_29 war (siehe Hartl, 2015; Blaschke, Dissertation in Vorbereitung). Weiter konnte dieses substituierte Eudesman-Keton von Arriaga-Giner et al. aus *Pluchea odorata* (L.) Cass. und von Vera et al. aus *Pluchea sagittalis* (Lamarck) Cabrera isoliert werden (Arriaga-Giner et al., 1983; Vera et al., 2008).

3.2.15. Substanz PO_54

Diese weiße, pulvrige Substanz (1,4 mg) konnte durch eine HPLCC-Trennung aus Fraktion B18.9 isoliert werden (siehe Seite 48f). Durch das Besprühen mit ASR und anschließendem Trocknen wurde die Substanz PO_54 als blau-grüne Bande mit dem R_f-Wert von 0,5 sichtbar (System 80. Parameter DC siehe Seite 11f). Betrachtete man diese Substanz-Bande unter UV₃₆₆, so war keine Fluoreszenz bemerkbar.

Durch das bei der ESI-MS Analyse sichtbare dominierende Natriumadduktion [M+Na]⁺ bei m/z 301,1 konnte ein MG von 278 Da bestimmt werden. Im MS² Spektrum dieses Ions war ein deutliches Signal bei m/z 245,0 und weitere kleinere Signale von Fragmentationen bei m/z 188,9; 170,9 und 97,0 sichtbar. Das Fragmentation bei m/z 245,0 resultierte aus der Abspaltung von 2 CO oder von einem C₄H₈-Radikal. Die weiteren Fragmentationen entstanden wahrscheinlich aus den Verlusten von H₂O (-18) und C₄H₁₀O oder C₃H₆O₂ (-74). Diese Gruppen wiesen auf die Anwesenheit von Ether oder Ester-Funktionen im Molekül hin.

1D NMR-Experimente zeigten, dass es sich hierbei nicht um eine Einzelkomponente sondern um eine Mischung handelte. Eine weitere Auftrennung in Einzelkomponenten war aus Substanzmangel nicht möglich.

3.2.16. Substanz PO_55

Durch zwei SPE-Trennungen konnten 0,7 mg dieser klaren, zähflüssig bis lackartigen Verbindung aus Fraktion B18.4 gewonnen werden (siehe Seite 43f). Nach dem Besprühen der DC-Platte mit ASR war sie als dunkelblaue Bande mit dem R_f -Wert von 0,51 sichtbar (System 80, Parameter DC siehe Seite 11f). Wenn man die entwickelte DC-Platte mit UV₃₆₆ bestrahlte, wies Substanz PO_55 eine intensive rosa Fluoreszenz auf.

Das ESI-MS Spektrum zeigte ein deutliches Signal eines Natriumadduktes $[M+Na^+]$ bei m/z 467,2 und drei weitere Signale bei m/z 449,2; 447,2 und 433,2, die auf Verbindungen mit den MG von 444 Da (PO_55a), 426 Da (PO_55b), 424 Da (PO_55c) und 410 Da (PO_55d) schließen ließen (siehe Abbildung 43).

Am Signal des Natriumadduktes m/z 467,2 war das eines Isotops bei m/z 469,2 sichtbar. Das Verhältnis dieser Signale betrug 3:1, weshalb auf das Vorhandensein eines Chlor-Atoms in Verbindung PO_55a geschlossen werden konnte. In der Natur kommen die zwei stabilen Isotope ^{35}Cl und ^{37}Cl stets in einem Verhältnis von 3:1 vor. Die Fragmentierung dieses Natriumadduktes erzeugte im MS^2 Spektrum Fragmentionen bei m/z 431,1, 407,1 und 371,1. Diese resultierten aus der Abspaltung von HCl oder 2 H_2O (-36) und

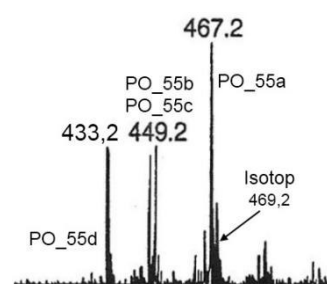


Abbildung 43: Ausschnitt eines ESI-MS Spektrums von Substanz PO_55
Bedingungen vgl. Seite 18

CH_3COOH (-60). Da bei anderen Eudesman-Derivaten, die zwei H_2O Moleküle abspalteten, kein Signal eines Fragmentions mit hoher Intensität registriert werden konnte, resultierte das Fragmention m/z 431,1 mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Abspaltung von HCl. Weitere Fragmentionen m/z 273,0 und 237,0 entstanden durch die Abspaltung einer 2,3-Dihydroxy-2-Methyl-butansäure (-134) von den Ionen m/z 407,1 und 371,1. Diese Gruppe war auch als Natriumaddukt bei m/z 156,9 sichtbar (Abbildung 44, Seite 87). Auch bei Substanz PO_46 war ein Natriumaddukt bei m/z 157 erkennbar

(vgl. Seite 67ff). Diese Tatsache zeigte, dass sich das Chlor-Atom nicht in der Seitenkette befand.

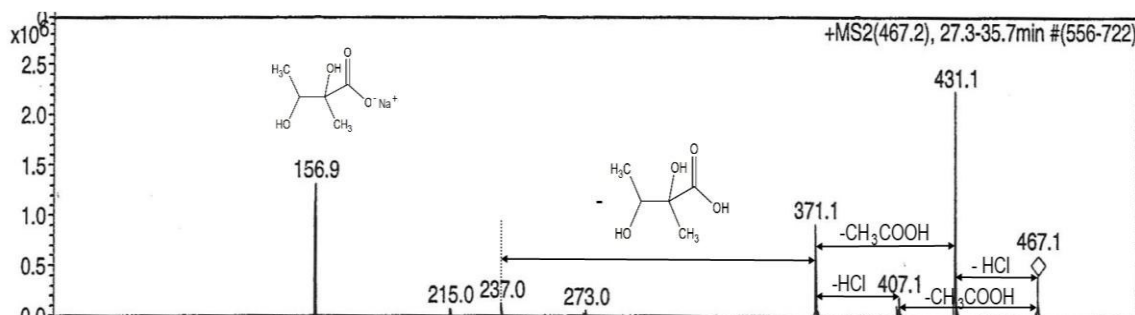


Abbildung 44: Ausschnitt eines ESI-MS Spektrums von Substanz PO_55a
Bedingungen vgl. Seite 18

Der Vergleich mit bisher isolierten Eudesmanen aus dem DCM-Extrakt ließ folgende Vermutungen zu: die 2,3-Dihydroxy-3-Methyl-butansäure Gruppe war wahrscheinlich mit der Hydroxyl-Gruppe in Position 2 verestert und nicht chloriert. Der Neutralverlust von CH_3COOH deutete darauf hin, dass eine weitere Hydroxyl-Gruppe, möglicherweise an Position 1, acetyliert war. Bei vielen bereits identifizierten Plucheinol-Derivaten lag außerdem C9 oder C7 als Carbinol und C8, C7 und/oder C9 als Olefin vor. Da die Einführung eines Chloratoms oft über Substitution einer Hydroxyl-Gruppe durch ein Chlor-Atom geschah, konnte man vermuten, dass bei Substanz PO_55a anstelle der dritten Hydroxyl-Gruppe ein Chlor gebunden war. Ein Strukturvorschlag wurde in Abbildung 45 (Seite 88) dargestellt.

In den MS^2 Spektren der Natriumaddukte m/z 449,2; 447,2 und 433,2 waren ebenfalls Abspaltungen von CH_3COOH (-60) und 2,3-Dihydroxy-2-Methyl-butansäure (-134) erkennbar. Damit wurde gezeigt, dass es sich bei den vorliegenden Substanzen um sehr ähnliche Verbindungen handelte.

Da Substanz PO_55b eine um 18 Da geringere Masse besaß als Substanz PO_55a und am Molekülionensignal von PO_55b kein Signal von einem Isotop vorhanden war, das die Anwesenheit eines Chlor-Atoms im Molekül angezeigt hätte, konnte angenommen werden, dass bei Substanz PO_55b anstelle eines Chlor-Atoms eine Hydroxyl-Gruppe substituiert war (vgl. Abbildung 45, Seite 88).

Bei Substanz PO_55c konnte man, basierend auf dem MG von 424 Da, die Hypothese aufstellen, dass es sich hierbei um Verbindung PO_55b mit einer zusätzlichen Doppelbindung handeln könnte.

Die Verbindung PO_55d wies ein um 16 Da geringeres MG im Vergleich mit PO_55b auf, was darauf hindeutete, dass das dritte Carbinol-C als Alkan-C vorlag.

Für eine eindeutige Strukturbestimmung mittels NMR-Experimenten war die Substanzmenge zu gering. Jedoch konnten aufgrund von beobachteten Signalen im ^1H -NMR Spektrum Vermutungen zur Lage der Doppelbindung und somit der Hydroxyl-Gruppe aufgestellt werden.

Wenn eine Doppelbindung zwischen C7 und dem Methin C8 vorlag, wies H8 eine chemische Verschiebung von etwa 7 ppm auf. Im vorliegenden Spektrum war kein Signal in diesem Bereich sichtbar. Jedoch konnten Signale zwischen 5,22 und 5,36 ppm registriert werden, die auf eine terminale Doppelbindung am C9 und somit einer möglichen Hydroxyl-Gruppe oder Chlor am C7 hinwiesen.

Dass eine acetylierte Hydroxyl-Gruppe am C1 vorlag, konnte durch das Protonen-Signal bei 5,93 bestätigt werden. Durch diese gewonnenen NMR- und ESI-MS Daten konnte in Abbildung 45 ein Strukturvorschlag der Verbindungen PO_55a und b gemacht werden.

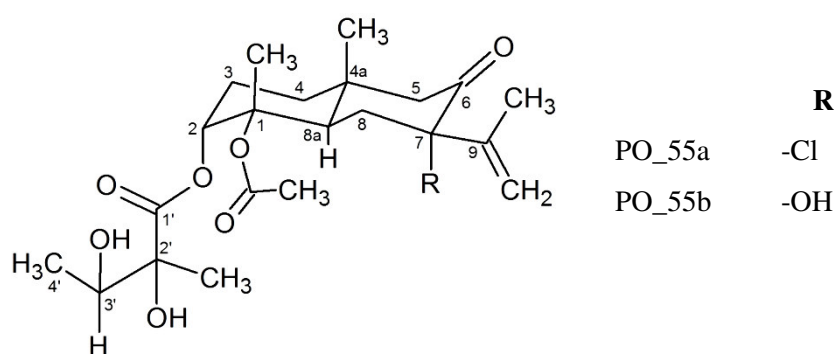


Abbildung 45: mögliche Struktur von Substanz PO_55a und b

Die hier getätigten Vergleiche bezogen sich auf bisher identifizierten Eudesmanderivate, die bereits aus anderen Fraktionen dieses DCM-Extraktes gewonnen werden konnten (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung; Hartl, 2015).

3.2.17. Substanz PO_56

Mittels HPLC waren 1,3 mg dieser Verbindung aus Fraktion B18.4.3 isoliert worden (siehe Seite 46f). Sie wurde als braune Bande mit dem R_f -Wert von 0,51 (System 80) nach dem Besprühen mit ASR sichtbar (Parameter DC siehe Seite 11f). Betrachtete man diese Substanz unter UV_{366} , so war keine Fluoreszenz bemerkbar.

Die ESI-MS Analyse bewirkte vier Natriumadduktionen $[M+Na^+]$ bei m/z 459,1; 439,1; 407,1 und 367,1 durch die auf vier Verbindungen mit folgende MGs geschlossen werden konnte: 436 Da (PO_56a), 416 Da (PO_56b), 384 Da (PO_56c) und 344 Da (PO_56d).

Neben dem Natriumadduktion von Substanz PO_56a war das Signal eines um zwei Masseneinheiten schwereren Isotops bemerkbar. Die Chlorisotope ^{35}Cl und ^{37}Cl sind stabil und kommen in der Natur im Verhältnis 3:1 vor. Daher sind bei Chlor-haltige Verbindungen im MS-Spektrum charakteristische Signale von Isotopen, die um 2 Masseneinheiten schwerer sind, bemerkbar. In diesem ESI-MS Spektrum wies das Molekülion m/z 459,1 ein Isotop bei m/z 461,1 auf. Diese Signale hatten ein relatives Verhältnis von 9:6, weshalb auf zwei Chlor-Atome in diesem Molekül geschlossen werden konnte. Im MS^2 Spektrum dieses Natriumadduktes war ein Fragmention bei m/z 423,1 sichtbar, welches aus der Abspaltung von HCl (-36) resultierte (vgl. Substanz PO_55, Seite 86). Eine weitere Fragmentierung dieses Ions im MS^3 erzeugte Fragmentionen bei m/z 405,1; 387,1; 369,1; 289,1 und 271,1. Diese entstanden wahrscheinlich durch die Abspaltung von einem weiteren HCl (-36), von einem H_2O (-18) und von einer 3-Chlor-2-Hydroxy-2-Methyl-Butansäure (-152).

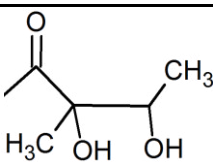
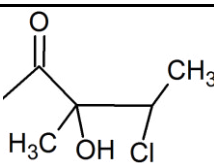
Das Natriumadduktion von Substanz PO_56c lag mit einem Isotop bei m/z 409,1 im Verhältnis von 3:1 vor. Dies zeigte, dass diese Verbindung ein Chlor-Atom enthielt. Das MS^2 Spektrum wies ein Fragmention bei m/z 255,0 auf, das wahrscheinlich aus der Abspaltung von 3-Chlor-2-Hydroxy-2-Methyl-Butansäure (-152) resultierte.

Auch am Natriumadduktion von Substanz PO_56d war ein um 2 Masseneinheiten größeres Isotop vorhanden. Aufgrund dem 3:1 Verhältnis dieser Signale konnte auf das Vorhandensein eines Chlor-Atoms in dieser Verbindung geschlossen werden.

Wie die ESI-MS Analyse wiesen auch die NMR-Daten auf eine Mischung von verschiedenen Verbindungen hin, jedoch konnten mit Hilfe der 2D NMR-Experimente einige Signale bestimmten Strukturelementen zugeordnet werden. Da für ein aussagekräftiges ^{13}C -NMR Spektrum die Menge der einzelnen Verbindungen in dieser Substanzmischung zu gering war, wurden die chemischen Verschiebungen der C-Atome und die daran gebundenen Protonen über HSQC- und HMBC-Kopplungsexperimente bestimmt.

Die im CID-Spektrum beobachteten Abspaltung einer 3-Chlor-2-Hydroxy-2-Methyl-Butansäure konnte durch verschiedene COSY- und HMBC-Korrelationen bestätigt werden: HMBC-Korrelationen der Methylgruppe $\text{H4}'$ ($\delta_{\text{H}} = 1,59/1,56$) mit $\text{C3}'$ ($\delta_{\text{C}} = 62,44$) und $\text{C2}'$ ($\delta_{\text{C}} = 76,93$) und COSY-Korrelationen zwischen $\text{H4}'$ ($\delta_{\text{H}} = 1,59/1,56$) und $\text{H3}'$ ($\delta_{\text{H}} = 4,34$) zeigten, dass eine Methylgruppe und ein quartäres Carbinol an das Methin $\text{C3}'$ gebunden waren. Der Vergleich dieser mit der am C2 befindlichen Seitenkette von Substanz PO_46 zeigte, dass $\text{C3}'$ von PO_56c eine deutliche Hochfeldverschiebung gegenüber $\text{C3}'$ von PO_46 aufwies. Auch bei Substanz PO_05 konnte im Vergleich mit anderen Diolen eine niedrigere chemische Verschiebung von $\text{C3}'$ festgestellt werden (vgl. Blaschke, Dissertation in Vorbereitung). Daher war eine Chlorierung des $\text{C3}'$ anzunehmen (Vergleich siehe Tabelle 30, Seite 91). Weitere HMBC-Korrelationen waren zwischen einer Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1,43/1,49$) und $\text{C2}'$ ($\delta_{\text{C}} = 76,93$) und $\text{C1}'$ ($\delta_{\text{C}} = 173,85/174,16$) vorhanden, die zeigten, dass das quartäre Carbinol $\text{C2}'$ an eine Methylgruppe und an das Carboxyl $\text{C1}'$ gebunden war.

Tabelle 30: Vergleich der chemischen Verschiebung der Seitenketten am C2

						
PO_46 (Seite 67)	PO_05 (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung)	PO_56c				
Position	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1'	--	175,26	--	167,07	--	173,85/174,16
2'	--	77,59	--	77,06	--	76,93
3'	3,98	72,36	4,32	65,48	4,34	62,44
4'	1,27	16,31	1,59	17,97	1,59/1,56	17,82
CH₃ an 2'	1,37	21,50	1,48	23,71	1,43/1,49	22,65/22,96

Vom CH₃ an 4a ($\delta_H = 1,09$) waren HMBC-Korrelationen zu dem Olefin C8a ($\delta_C = 138,48$) und dem Methylen C5 ($\delta_C = 53,41$) und COSY-Korrelationen zum Methylen H4 ($\delta_H = 1,68/1,91$) beobachtbar. Aufgrund der chemischen Verschiebung von CH₃ an 1 ($\delta_H = 1,87$ und $\delta_C = 16,73$) und dessen HMBC-Korrelationen mit C2 ($\delta_C = 73,23$) und C8a konnte angenommen werden, dass eine Doppelbindung zwischen C8a und C1 vorlag. Eine COSY-Korrelation war zwischen H2 ($\delta_H = 5,37$) und dem Methylen H3 ($\delta_H = 1,99$) beobachtbar wodurch C3 an C2 gebunden war. Das Methylen H5 ($\delta_H = 2,47/2,43$) wies HMBC-Korrelationen zu C4a ($\delta_C = 36,67$) und dem Carbonyl C6 ($\delta_C = 200,80$) auf.

HMBC-Korrelationen waren zwischen den Methylgruppen am C9 ($\delta_H = 1,45$ und $1,48$), dem quartären Carbinol C9 ($\delta_C = 71,80$) und dem quartären Olefin C7 ($\delta_C = 142,49$) beobachtbar. Da das olefinische Methin H8 ($\delta_H = 7,29$) eine Korrelation mit C9 ($\delta_C = 71,80$) aufwies, befand sich eine Doppelbindung zwischen C7 und C8. Damit wurde gezeigt, dass eine Isopropylgruppe mit einer Hydroxyl-Funktion am C9 an das Olefin C7 gebunden war.

Da das Olefin C8 im Vergleich zu den bereits isolierten Plucheinol-Derivaten PO_46 und PO_53 eine Hochfeldverschiebung aufwies, war eine abschirmende Funktionalität am C8a zu erwarten. Eventuell konnte eine wie oben beschriebene Doppelbindung zwischen C8a und C1 die chemische Verschiebung des Olefins C8 in dieser Weise beeinflussen. Da

auch die chemische Verschiebung des C6 darauf hindeutete, dass hier ein α,β -ungesättigtes Keton vorlag, konnte trotz fehlender HMBC- oder COSY-Korrelationen angenommen werden, dass die beschriebenen Teilstrukturen miteinander verbunden waren. Ging man davon aus, dass eine 3-Chlor-2-Hydroxy-2-Methyl-Butansäure-Gruppe mit dem Hydroxyl am C2 verestert war, erhielt man ein Molekül mit einem MG von 384 Da. Dieses stimmte mit einer im CID-Spektrum registrierten Verbindung überein. Ein Strukturvorschlag ist in Abbildung 46 dargestellt und Tabelle 31 (Seite 93) listet die chemischen Verschiebungen auf.

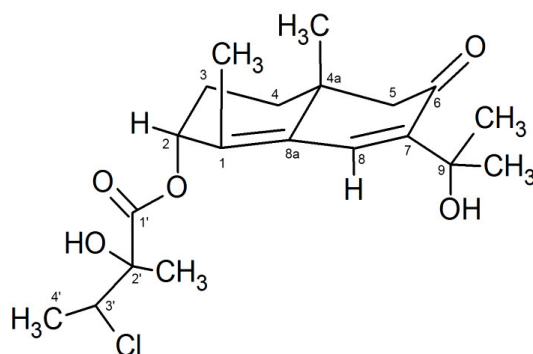


Abbildung 46: mögliche Struktur von PO_56c

Tabelle 31: Hypothese zur Zuordnung der Signale von Substanz PO_56c

Position		¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)
1	C	--	134,11
2	CH	5,38	73,23
3	CH ₂	1,99	23,90
4	CH ₂	1,68/1,91	32,23
4a	C	--	36,67
5	CH ₂	2,47/2,43	53,41
6	C	--	200,80
7	C	--	142,49
8	CH	7,29	135,01
8a	CH		138,48
9	C	--	71,80
CH ₃ an 1	CH ₃	1,87	16,73
CH ₃ an 4a	CH ₃	1,09	23,38
CH ₃ an 9	CH ₃	1,48	28,95
CH ₃ an 9	CH ₃	1,45	28,61
1'	C	--	173,85/174,16
2'	C	--	76,93
3'	CH	4,34	62,44
4'	CH ₃	1,59/1,56	17,82
CH ₃ an 2'	CH ₃	1,43/1,49	22,65/22,96

4. Diskussion

Immunzellen und Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und der Entwicklung maligner Erkrankungen: Durch ein Ungleichgewicht der Entzündungs-Mediatoren und Zellen wird Wachstum und Ausbreitung von malignen Zellen gefördert. Da antiinflammatorisch wirksame Substanzen diese Signalkaskaden unterbrechen, können sie auch einen antineoplastischen Effekt besitzen (Balkwill, 2001). Gridling et al. haben *Pluchea odorata* (L.) Cass., eine Pflanze, die in der Volksmedizin der Maya gegen schwere Entzündungen eingesetzt wird, für Untersuchungen hinsichtlich antineoplastischer Wirkung ausgewählt. In in vitro Modellen hat der DCM-Extrakt dieser Pflanze ein deutliches antineoplastisches Potential aufgewiesen (Gridling et al., 2008), weshalb durch bioassay geleitete Fraktionierung die dafür verantwortlichen Substanzen bestimmt werden sollen (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden noch nicht aufgetrennte Fraktionen des DCM-Extraktes analysiert. Andere Trennexperimente hatten gezeigt, dass sich für die Isolierung von darin enthaltenen Verbindungen die Säulenchromatographie und die Gegenstromverteilungschromatographie gut eigneten (Hartl, 2015; Blaschke, Dissertation in Vorbereitung). Da die Säulenchromatographie aufgrund der klebrigen Konsistenz mancher Fraktionen oftmals nicht zielführend war und Nachteile wie irreversible Adsorption von Verbindungen an die stationäre Phase aufwies, wurde vor allem die HPCCC zur Isolierung von Substanzen verwendet. Diese Technik ermöglichte innerhalb weniger Stunden unter deutlich geringerem Lösungsmittelverbrauch die Auftrennung von Fraktionen. Die größte Herausforderung dieser Methode war die Auswahl des geeigneten zweiphasigen Systems: Eine gute Hilfestellung boten Systemfamilien wie die HEMWat-Systeme, die auch schon bei der Isolierung von Sesquiterpenen und anderen terpenoiden Verbindungen erfolgreich verwendet wurden. (Garrard, 2005; Skalicka-Woźniak und Garrard, 2014).

Zur Beurteilung des Trennungserfolges und der Reinheit isolierter Substanzen wurde die Dünnschichtchromatographie verwendet. Obwohl mittels DC kaum Begleitsubstanzen erkennbar waren, erwiesen sich einige der isolierten Verbindungen bei der ESI-MS und NMR-Analyse als Gemische. Möglicherweise waren die isolierten Substanzen während der spektroskopischen Untersuchung zerfallen oder es handelte sich um

Substanzmischungen, die mittels Dünnschichtchromatographie nicht getrennt werden konnten.

Mit Hilfe der HPCCC-Technik konnte ein langkettiger primärer Alkohol (PO_40) aus Fraktion B8 gewonnen werden. 3,5,16-Trimethyl-heptadeca-2-en-ol wies, wie der bereits aus dem DCM-Extrakt von *Pluchea odorata* (L.) Cass. isolierter Fettalkohol PO_28 (Blaschke, Dissertation in Vorbereitung), eine terminale Isopropyl-Gruppe auf. Derartige iso-Fettsäuren entstehen durch die Verwendung von Leucin CoA anstelle von Acetyl CoA als Startermolekül (Dewick, 2009a). Fettalkohole nehmen für das Überleben von Pflanzen eine lebenswichtige Rolle ein. In freier Form oder als Ester mit Fettsäuren bilden sie den Hauptbestandteil der Cuticula, die so die Oberfläche von Pflanzen vor Austrocknung, Benetzung mit Wasser und schädlichen Mikroorganismen schützt (Samuels et al., 2008). In manchen Samen, wie jenen von Jojoba, fungieren Wachse anstelle von Triglyceriden als Energiereserve (Metz et al., 2000). Ross et al. isolierten einen langkettigen aliphatischen Alkohol aus *Terminalia arjuna*, der sich nur durch eine zusätzliche Methylgruppe am C7 von Substanz PO_40a unterschied. Von dieser Verbindung sowie von dem davon abgeleiteten Acetat konnte eine deutliche Aktivität gegen Leishmanien festgestellt werden. Weiter hatte das Acetat eine vierfach höhere Wirkung als der ursprüngliche Alkohol (Ross et al., 2013). Dies zeigt, dass langkettige Alkohole möglicherweise neben einer Schutz- und Energiereservfunktion noch weitere spezifische Bedeutungen für die Pflanze aufweisen.

Dieser Fettalkohol hat große strukturelle Ähnlichkeit mit dem ubiquitär vorkommenden Diterpenalkohol Phytol. Durch Senkung der Migration von neutrophilen Granulozyten, der Zytokinproduktion und der Bildung von freien Radikalen wirkt Phytol antiinflammatorisch (Silva et al., 2014). Pejin et al. haben gezeigt, dass dieser langkettige Alkohol, der bereits als aktive Komponente in Blutfette senkenden Zubereitungen enthalten ist, eine deutliche antibakterielle und antifungale Aktivität hat und durch Erhöhung des NO-Spiegels eine vaskuläre Relaxation bewirkt (2014). Weiters konnte in in vivo Modellen ein antinozizeptiver Effekt (de Menezes Patrício Santos et al, 2013) und in menschlichen Krebszelllinien ein zytotoxischer Effekt von Phytol festgestellt werden (Pejin et al., 2014). Ähnliche Wirkungen weisen auch Mischungen von verschiedenen nicht-terpenoiden langkettigen Fettalkoholen auf: so konnte in vitro ein antiinflammatorischer Effekt durch Senkung der Entzündungsmediatoren

(Montserrat-de la Paz et al., 2013) und in Affen eine antiatherosklerotische Wirkung bestimmt werden (Noa und Mas, 2005).

Bei der zweiten aus Fraktion B8 isolierten Substanz handelte es sich um die Strukturisomere α - und β -Amyrin (PO_41). Diese Triterpenalkohole sind ein weiterer Bestandteil der pflanzlichen Cuticula und fungieren vermutlich als Insektenfraß vermindern Substanzen und als Signalstoffe für Herbivoren (Buschhaus und Jetter, 2011). Weiter zeigten diese Triterpenalkohole in in vivo Studien eine antiinflammatorische Wirkung: topisch appliziertes α -Amyrin konnte Ödeme, die durch 12-O-tetradecanoylphorbol-acetat hervorgerufen wurden, deutlich mindern (Otuki et al., 2005). Auch führte die Vorbehandlung mit α - und β -Amrin p.o. zu einer deutlichen Reduktion der akuten, durch Cerulein induzierten Pankreatitis (Melo et al., 2011). Eine hepatoprotektive Wirkung wurde bei mit α -, β -Amyrin vorbehandelten Mäusen festgestellt. Dieser Effekt war wahrscheinlich auf die Minderung des oxidativen Stresses und der Bildung von toxischen Metaboliten durch Cytochrom P₄₅₀ Enzyme zurückzuführen (Oliveira et al., 2005). Darüber hinaus konnten noch von α -, β -Amyrin antinozizeptive (Pinto et al., 2008) und von α -Amyrin-acetat und dessen Derivate antihyperglycämische Effekte festgestellt werden (Narender et al., 2009).

Amyrine sind biosynthetische Vorstufen von Ursol- und Oleanolsäure, die in verschiedenen Zellessays eine zytotoxische Wirkung gegenüber malignen Neoplasmen aufgewiesen haben. In weiterer Folge konnten aus diesen Triterpensaponinen durch Derivatisierungen vielversprechende Substanzen entwickelt werden, die eine deutliche antitumorale Wirkung und hohe Selektivität zeigten (Chudzik et al., 2015).

In einem DC-Vergleich wurde festgestellt, dass Fraktion B10 auch Verbindungen mit einem ähnlichen R_f-Wert wie jene in Fraktion B7 und Fraktion B8 enthielt. Durch HPCCC gelang die Isolierung von Kongol (PO_44). Diese Substanz ist auch eine Komponente des ätherischen Öls verschiedener Pflanzen, die Sesquiterpene vom Eudesman-Typ mit unterschiedlichem Substitutionsmuster bilden (Shimizu et al., 2011; Morikawa et al., 2002). Daher konnte angenommen werden, dass Kongol ein Metabolit einer Reihe von Eudesmanen mit u.a. sehr ähnlichen sekundären Modifikationen ist. Dafür spricht auch der Biosyntheseweg dieser Sesquiterpene: Die meist im Zytosol über den Mevalonat-Weg produzierten Farnesyldiphosphate werden von Zyklasten zu Germacryl-Kationen und durch weitere Protonierungs- und Cyclisierungs-Reaktionen zu

einem Eudesman-Kation geformt. Dieses Kation hat eine positive Ladung am C1, das nun empfänglich für einen nukleophilen Angriff ist (Dewick, 2009b). Da 11-Selinen-4-ol als einzige sekundäre Modifikation eine Hydroxylgruppe am C1 aufweist, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Verbindung eine der ersten stabilen Produkte dieses Synthesewegs darstellt.

Die folgenden Eudesmanderivate wiesen einen niedrigeren Retentionsfaktor und somit einen höheren Grad an sekundären Modifikationen auf: Neben Kongol war eine weitere dominierende Komponente in Fraktion B10 enthalten, welche durch eine weitere HPCCC-Trennung isoliert wurde. Die Identität von Substanz PO_45 konnte nicht durch NMR-Experimente festgestellt werden, da diese Verbindung instabil war.

Die NMR-Analyse zeigte, dass aus Fraktion B17 und Fraktion B24/25 zwei Eudesman-Derivate isoliert werden konnten, die sich lediglich durch die Seitenkette am C2 unterschieden: während Substanz PO_53 eine Epoxyangeoyl-Gruppe hatte, war die Epoxy-Funktion bei Substanz PO_46 zur Diol-Gruppe aufoxidiert. Erwähnenswert war, dass sich PO_53 nur durch die fehlende Carboxyl-Gruppe am C1 und durch die Peroxid-Funktion am C9 von 1-(acetyloxy)-2-(2,3-dimethyl-Oxirancarbonsäure)-9-hydroperoxyplucheinol unterscheidet. Dieses Insektenfraß mindernde Plucheinol-Derivat wurde aus *Pluchea sagittalis* isoliert (Vera et al., 2008).

Weitere Trennungsexperimente der Fraktionen B17-19 führten zu Substanzen, die sich durch ESI-MS und NMR-Analysen als Mischungen verschiedener, u.a. chlorierter Plucheinol-Derivate herausstellten (PO_55 und PO_56). Dabei handelte es sich möglicherweise durch den Aufarbeitungsprozess entstandene Artefakte von in dieser Pflanze produzierten Verbindungen. So konnte die 2-Hydroxy-3-Chlor-2-Methyl-Butansäure-Gruppe leicht durch eine säurekatalysierte Ringöffnung der Epoxyangeoyl-Gruppe entstehen. Dies wurde bereits bei Trennungen mit Chloroform, das reaktiv ist und in Salzsäure zerfallen kann, beobachtet (Gribble und Gordon, 2010). Chlorierte Eudesman-Derivate wurden schon im C₆H₆-Extrakt von *Pluchea odorata* (Arriaga Giner, 1983) und im DCM/MeOH-Extrakt von *Pluchea carbonensis* nachgewiesen (Ahmed et al, 1998). In beiden Fällen erfolgte die spektroskopische Analyse mit deuteriertem Chloroform.

Obwohl die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von chlorierten Artefakten durch die Verwendung von DCM als Lösungs- und Extraktionsmittel möglicherweise verringert wurde, sollte für den eindeutigen Nachweis von halogenierten Verbindungen auf chlorfreie Lösungsmittel mit ähnlichen apolaren Eigenschaften wie Diethylether, Ethylacetat oder Hexan zurückgegriffen werden. Dass mit diesen Alternativen gute Trennungen möglich sind, zeigt die Verwendung des HEMWat-Systems bei der HPLCC.

Eudesmane mit unterschiedlichem Substitutionsmuster sind weit verbreitet in der Familie der Korbblütler und wurden bereits in verschiedenen Arten der Gattung *Pluchea* nachgewiesen (Hussain et al., 2013). Eine Literaturrecherche zeigte, dass Sesquiterpenen mit einem Eudesman-Grundgerüst verschiedene biologische Aktivitäten - u.a. antitumorale Wirkungen aufweisen: Die Eudesmanolide, 1 β -hydroxyalantolactone [1], 11,13-dehydroisohyposantonin [2] und 3-oxoeudesma-1,4,11(13)-trien-12,6b-olid [3] (siehe Abbildung 47; Cheng et al., 2013) zeigten signifikante zytotoxische Aktivität in manchen humanen Krebszelllinien. Ähnliche Sesquiterpen-Derivate mit einer α -Methylen- γ -Lacton Gruppe konnten bereits in *Pluchea dioscoridis* nachgewiesen werden (Bohlmann et al., 1984; Dawidar und Metwally, 1985). Auch Eudesmane ohne α -Methylen- γ -Lacton Gruppe wie Atractyolenolid I [4] (Jeon et al., 2013), Solajiangxin F [5] und G [6] (Li et al., 2013), Lyratol G [7] und 1 β -hydroxy-1,2-dihydro- α -santonin [8] (Nie et al., 2014) wiesen in in vitro Modellen einen zytotoxischen Effekt auf (siehe Abbildung 47).

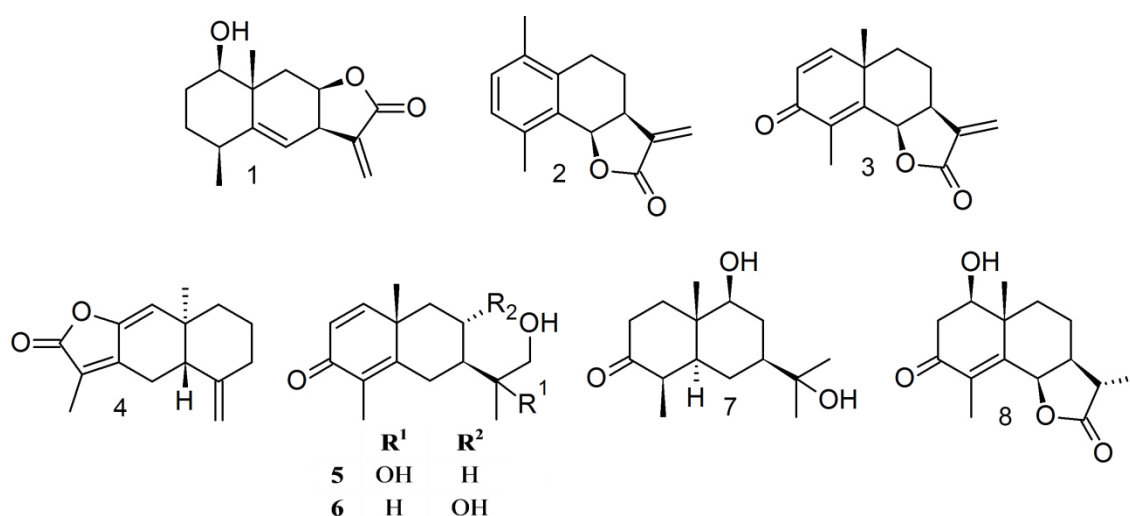


Abbildung 47: Eudesman-Derivate mit antitumoraler Aktivität

Wie die meisten der oben erwähnten Eudesmane enthalten auch Plucheinol (Abbildung 48) und viele seiner Derivate, die bisher aus dem DCM-Extrakt von *Pluchea odorata* isoliert werden konnten (Hartl, 2015; Blaschke, Dissertation in Vorbereitung), eine α,β -ungesättigte Ketogruppe, die möglicherweise für eine biologische Wirkung von Bedeutung ist. Von Verbindungen mit einem ähnlichen Substitutionsmuster, die aus *Epaltes mexicana* und *Pluchea sagittalis* isoliert wurden, konnte eine antibiotisch und eine vor Insektenfraß schützende Wirkung nachgewiesen werden. Jene Substanzen, die die stärkste Insektenfraß verhindernde Wirkung besitzen, haben am C1 anstelle der Hydroxyl-Gruppe eine Carboxyl-Funktion und eine Epoxy-Angeoyl-Gruppe ist mit der Alkoholfunktion am C2 verestert (Frei et al., 1998; Vera et al., 2008).

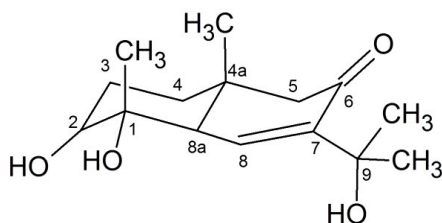


Abbildung 48: Plucheinol

Mittels Ausschüttelung, Anreicherung und Filtration gelang die Isolierung von Stigmast-5,22-dien-3-O- β -D-glucopyranosid (PO_50) aus Fraktion B28. Da sich dieses glucosylierte Phytosterol zwischen der polaren und unpolaren flüssigen Phase anreicherte, wurde auf einen tensidartigen Charakter dieser Verbindung geschlossen.

Corrêa et al. testeten verschiedene aus *Justicia acuminatissima* isolierte Steroide und Triterpene auf antiinflammatorische Wirkung. Eine Entzündung der Rattenpfoten konnte durch topische Applikation von β -Sitosterol und Stigmasterol und in stärkerem Ausmaß durch die jeweiligen Glucoside deutlich gemindert werden. Dadurch wurde gezeigt, dass Glucosylierung zu einer Verbesserung der Wirkung bei topischer Anwendung beitrug (Corrêa et al., 2014). Wenig ist bekannt über die Funktion dieser Steryl- Glucoside in Pflanzen. Es wird angenommen, dass sie eine Rolle in der Regulation der Permeabilität und der Fluidität der Biomembran und somit in der Anpassung an die Umgebungstemperatur spielen. Bei Menschen wurde eine neurotoxische und immunmodulierende Wirkung festgestellt. Weiters können Phytosterole sowie ihre

jeweiligen Glucoside die intestinale Cholesterinabsorption vermindern (Grille et al., 2010).

Aus Fraktion B29 konnten zwei grüne Pigmente (PO_48 und PO_49) isoliert werden, die mittels ESI-MS Analyse als Pheophorbid A und Hydroxy-Pheophorbid A identifiziert wurden. Dabei handelt es sich um Abbauprodukte des für den pflanzlichen Metabolismus essentiellen Chlorophylls. Die Fähigkeit dieser Porphyrine, Strahlungsenergie in chemische Energie umzuwandeln, versucht man bei der Behandlung von malignen Tumoren zu verwenden, indem man Porphyrinderivate als Photosensitizer nützt: bei der photodynamischen Therapie wird durch Bestrahlung von Tumorzellen, die Pheophorbid A aufgenommen haben, zytotoxischer Singulett-Sauerstoff produziert, der die Tumorzelle zerstört. Yoon et al. zeigten, dass der auch in in vivo Modellen beobachtete antitumorale Effekt der photodynamische Therapie mit Pheophorbid A zur Apoptose und Autophagozytose der malignen Zellen führte (2014). Durch den Vergleich von verschiedenen Pheophorbid A Derivaten konnten Wang et al. feststellen, dass jene Porphyrin-Derivate mit einer Hydroxyl-Gruppe am C13² mehr reaktive Sauerstoffspezies bilden konnten und jene ohne Alkyl-Kette, die mit der Carboxyl-Gruppe C17³ verestert war, besser in die Zellen gelangten (2014).

Da zytostatischen Effekte auch ohne direkte Lichteinwirkung registriert werden konnten, wurde angenommen, dass auch andere Mechanismen als jener über reaktive Sauerstoffspezies zum Zelltod führten (Cheng et al., 2001; Chan et al., 2006). Wie Wang et al. zeigte Cheng et al., dass Chlorophyllderivate ohne Phytol-Kette eine höhere Wirksamkeit aufwiesen, was auf die verbesserte Penetration durch die Zellmembran zurückzuführen war. Weiters stellten sie fest, dass hydroxylierte Pheophorbid-Derivate nur bei gleichzeitiger Methylierung der Carboxyl-Gruppe am C17³ eine höhere Wirkung aufwiesen. Dieser Effekt wurde auf die Unterbindung der Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxyl- und der Hydroxyl-Gruppe zurückgeführt (Cheng et al., 2001).

Durch die phytochemische Analyse von zehn B-Fractionen mit unterschiedlicher Polarität konnten Substanzen isoliert werden, die möglicherweise zum antineoplastischen Potential des DCM-Extraktes aus *Pluchea odorata* (L.) Cass. beitragen könnten.

5. Zusammenfassung

Entzündungen stellen oft Vorstufen von malignen Prozessen dar und begünstigen Wachstum und Ausbreitung von Tumorzellen. Daher ist *Pluchea odorata* (L.) Cass., eine Pflanze, die die Maya gegen schwere Entzündungen einsetzen, von Gridling et al. auf eine mögliche anti-tumorale Wirkung untersucht worden. Dabei zeigte der Dichlormethan (DCM)- Extrakt ein starkes antineoplastisches Potential in HL-60 und MCF-7 Zellen. Durch Bioassay geleitete Fraktionierung werden aktive Substanzen isoliert und strukturell identifiziert.

Das Ziel dieser Arbeit war, Verbindungen aus bisher noch nicht untersuchten Fraktionen des DCM-Extraktes zu isolieren, die für weitere pharmakologische Untersuchungen verwendet werden können. Mit Hilfe von Säulenchromatographie, Gegenstromverteilungschromatographie und Festphasenextraktion wurden 9 Unterfraktionen des DCM-Extraktes weiter aufgetrennt. Der Fortschritt dieser Analysen wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt; acht Substanzen waren rein darstellbar und konnten durch spektroskopische Analysen identifiziert werden: Der Fettalkohol 3,5,16-Trimethyl-heptadec-2-en-ol, die ubiquitären Triterpenalkohole α - und β - Amyrin und das Eudesman Kongol wurden aus sehr lipophilen Fraktionen gewonnen. Aus etwas hydrophileren Fraktionen konnten zwei strukturell sehr ähnliche Sesquiterpene vom Eudesmantyp isoliert werden: (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-6-oxo-2-naphthalenyl]-2,3-dihydroxy-2-methyl-butansäureester und (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-6-oxo-2-naphthalenyl]-2,3-dimethyl-oxirancarbonsäureester. Strukturell ähnliche Plucheinol-Derivate sind weit verbreitet in der Gattung *Pluchea*. In polareren Fraktionen dieses Extraktes waren auch Stigmast-5,22-dien-3-O- β -D-glucopyranosid und die Chlorophyllabbauprodukte Pheophorbid A und Hydroxy-Pheophorbid A enthalten. Ein Vergleich mit der Literatur hat gezeigt, dass manche Eudesmanolide eine entzündungshemmende und antineoplastische Wirkung aufweisen und somit möglicherweise zur zytotoxischen Aktivität dieser Pflanze auf verschiedene Krebszellen beitragen.

Summary

Inflammation often leads to malignant processes and favors growth and proliferation of tumor cells. Therefore, *Pluchea odorata* (L.) Cass., a plant used against inflammations in Maya medicine, has been examined by Gridling et al. It could be demonstrated that the dichloromethane- (DCM) extract shows strong anti neoplastic effects in HL-60 and MCF-7 cells. Through bioassay guided fractionation active substances are isolated and structurally identified.

The aim of this work was to isolate substances of fractions from the DCM-extract for further pharmacological investigations. Using column chromatography, counter current chromatography and solid phase extraction, 9 subfractions of the DCM-extract were separated. The progress was monitored by thin layer chromatography. Fractionation resulted in eight compounds, structure elucidation was performed by spectroscopic methods: The fatty alcohol 3,5,1,-trimethyl-heptadec-2-en-ol, the ubiquitous triterpene alcohols α - and β -amyrine and the eudesmane kongol were isolated from very lipophilic fractions. Two structurally very similar sesquiterpenes with an eudesmane scaffold were isolated: (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-6-oxo-2-naphthalenyl]-2,3-dihydroxy-2-methyl-butanoic acid ester and (1S,2R,4aR,8aR)-[1-(Hydroxy)-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1,4a-dimethyl-6-oxo-2-naphthalenyl]-2,3-dimethyl-oxiranecarboxylic acid ester from more hydrophilic fractions. Structurally similar plucheinol-derivates are common in *Pluchea*. More polar fractions of this extract contained Stigmast-5,22-dien-3-O- β -D-glucopyranoside and the chlorophyll degradation products pheophorbide A and hydroxy-pheophorbide A. Previous publications identified some eudesmanolides as anti-inflammatory and anti neoplastic substances. Therefore, they may contribute to the cytotoxic effects of *Pluchea odorata* against various cancer cell lines.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmed A.A., El-Seedi H.R., Mahmoud A.A., El-Douski A.E.A., Zeid I.F., Bohlin L. (1998), Eudesmane Derivatives from *Laggera crispata* and *Pluchea carolonesis*, *Phytochemistry* 49(8): 2421-2424
- Arriaga-Giner F.J., Borges-Del-Castillo J., Manresa-Ferrero M.T., Vázquez-Bueno P., Rodríguez-Luis F., Valdés-Iraheta S. (1983), Eudesmane derivatives from *Pluchea odorata*, *Phytochemistry* 22: 1767-1769
- Arriaga-Giner F.J., Borges-Del-Castillo J. (1985), A new eudesmane derivative from *Pluchea odorata*, *Planta Med.* 51: 290.
- Arvigo R., Balick M., (1998), *Rainforest Remedies: One hundred healing herbs of Belize*, 2. Auflage, Lotus Press, Twin Lakes, S. 182-183
- Baguley B.C (2010), Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer, *Molecular Biotechnology* 46(3): 308-316
- Balkwill F., Mantovani A. (2001), Inflammation and cancer: back to Virchow?, *Lancet* 357: 539–545
- Barkley T.M. (2006), *Pluchea odorata*, *Flora of North America*, Vol. 19-21, S.479-482, http://efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=242431232, abgerufen am 22.6.2014
- Blaschke M. Dissertation, Univ. Wien, in Vorbereitung
- Bohlmann F., Metwally M.A., Jakupovic J. (1984), Eudesmanolides from *Pluchea dioscoridis*, *Phytochemistry* 23(9): 1975-1977
- Buschhaus C., Jetter R. (2011), Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces?, *J. Exp. Bot.* 62 (3): 841–853
- Chan J.Y.W, Tang P.M.K, Hon P.M., Au S.W.N, Tsui S.K.W., Waye M.M.Y., Kong S.K., Mak T.C.W., Fung K.P. (2006), Pheophorbide a, a major antitumor component purified from *Scutellaria barbata*, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells, *Planta Med.* 72(1): 28-33
- Chanotiya C.S., Sammal S. S., Mathela C. S. (2005), Composition of a new chemotype of *Tanacetum nubigenum*, *Indian J. Chem. B* 44B(9): 1922-1926
- Cheng H.H., Wang H.K., Ito J., Bastow K.F., Tachibana Y., Nakanishi Y., Xu Z.H., Luo T.Y., Lee K.H. (2001), Cytotoxic Pheophorbide-Related Compounds from *Clerodendrum calamitosum* and *C. cyrtophyllum*, *J. Nat. Prod.* 64(7): 915-919

- Cheng X.R., Zhang S.D., Wang C.H., Ren J., Qin J.J., Tang X., Shen Y.H., Yan S.K., Jin H.Z., Zhang W.D. (2013) Bioactive eudesmane and germacrane derivatives from *Inula wissmanniana* Hand.-Mazz., *Phytochemistry* **96**: 214-222
- Chudzik M., Korzonek-Szlacheta I., Król W. (2015), Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds, *Molecules* **20**: 1610-1625
- Corrêa G.M., Da Costa Abreu V.G., De Abreu Martins D.A., Takahashi J.A., De Souza Fontoura H., Cara D.C., Piló-Veloso D., De Carvalho Alcântara A.F. (2014), Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae), *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6(6)**: 75-81
- Coussens L., Werb Z. (2002), Inflammation and cancer, *Nature* **420**: 860-867
- Cragg G., Newman D. (2005), Plants as a source of anti-cancer agents, *J. Ethnopharmacol.* **100**: 72-79
- Dawidar A.A., Metwally M. (1985), New α -Cyclocostunolide and Isocostic Acid Derivatives from *Pluchea dioscoridis*, *Chem. Pharm. Bull.* **33(11)**: 5068-5070
- de Menezes Patrício Santos C.C., Stiebbe Salvadori M., Gomes Mota V., Muratori Costa L., Cardoso de Almeida A.A., Lopes de Oliveira G.A., Pereira Costa J., Pergentino de Sousa D., Mendes de Freitas R., Nóbrega de Almeida R. (2013), Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models, *Neuroscience Journal* 2013
- Dewick P. (2009), *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 3. Auflage, Wiley Verlag, Oxford, Seite 53-57
- Dewick P. (2009), *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 3. Auflage, Wiley Verlag, Oxford, Seite 210-223
- Domínguez X.A., Zamudio A. (1972), β -Amyrin Acetate and Campesterol from *Pluchea odorata*, *Phytochemistry* **11**: 1179
- Frei B., Heinrich M., Bork P.M., Herrmann D., Jaki B., Kato T., Kuhnt M., Schmitt J., Schühly W., Volken C., Sticher O. (1998), Multiple screening of medicinal plants from Oaxaca, Mexico: ethnobotany and bioassays as a basis for phytochemical investigation, *Phytomedicine* **5 (3)**: 177-186.
- Friesen J.B., Pauli G.F. (2005), G.U.E.S.S.—A Generally Useful Estimate of Solvent Systems for CCC, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **28**: 2777-2806,
- Garrard I. (2005), Simple Approach to the Development of a CCC Solvent Selection Protocol Suitable for Automation, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **28**: 1923-1935
- Gribble G.W., Gordon W. (2010), *Naturally occurring organohalogen compounds : a comprehensive update*, Springer Verlag, Wien, New York, Seite 38f

- Gridling M., Stark N., Madlener S., Lackber A., Popescu R., Benedek B., Diaz R., Tut F.M., Nha Vo, T.P., Huber D., Gollinger M., Saiko P., Özmen A., Mosgoeller W., de Martin R., Eytner R., Wagner K.-H., Grusch M., Fritzer-Szekeres M., Szekeres T., Kopp B., Frisch R., Krupitza G. (2009) In vitro anti-cancer activity of two ethno-pharmacological healing plants from Guatemala *Pluchea odorata* and *Phlebodium decumanum*, Int. J. Oncol. **34**: 1117-1128
- Grille S., Zaslawski A., Thiele S., Plat J., Warnecke D. (2010), The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals, Prog. Lipid Res. **49**: 262–288
- Guilhon G.M.S.P., Müller, A.H. (1998), Eudesmanolides and epoxycuauthemonones from *Pluchea quitoc*, Phytochemistry **49**: 1347-1351
- Hartl B. (2015), Diplomarbeit, Univ. Wien
- Hernández Vázquez L., Palazon J., Navarro-Ocaña A. (2012), The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-andhealth/the-pentacyclic-triterpenes-amyrins-a-review-of-sources-and-biological-activities>
- Holanda Pintoa S.A., Pintoa L.M.S., Guedesa M.A., Cunhaa G.M.A., Chavesb M.H., Santosa F.A., Rao V.S. (2008), Antinoceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin, Phytomedicine **15**: 630-634
- Huang S.C., Hung C.F., Wu W.B., Chen B.H. (2008) Determination of chlorophylls and their derivates in *Gynostemma pentaphyllum* Makino by liquid chromatography-mass spectrometry, J. Pharmaceut. Biomed. **48**: 105-112
- Hussain H., Al-harrasi A., Abbas G., Rehman N., Mabood F., Ahmed I., Saleem M., Van Ree T., Green I., Anwar S., Badshah A., Shah A., Ali I. (2013), The Genus *Pluchea*: Phytochemistry, Traditional Uses, and Biological Activities, Chem. Biodivers. **10**: 1944-1971
- Jeon T.I., Jung C.H., Cho J.Y., Park D.K., Moon J.H. (2013), Identification of an anticancer compound against HT-29 cells from *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice, Asian Pac. J. Trop. Biomed. **3(10)**: 785-789
- Lafeuille J., Lefèvre S., Lebuhotel J. (2014) Quantitation of Chlorophylls and 22 of Their Colored Degradation Products in Culinary Aromatic Herbs by HPLC-DAD-MS and Correlation with Color Changes During the Dehydration Process, J. Agr. Food Chem. **62(8)**: 1926-1935

- Li G.S., Yao F., Zhang L., Yue X.D., Dai S.J. (2013), Two new cytotoxic sesquiterpenoids from *Solanum lyratum*, Chinese Chem. Lett. **24**: 1030–1032
- Liu L.P., Cao X.C., Liu F., Quan M.F., Sheng X.F., Ren K.Q. (2014), Casticin induces breast cancer cell apoptosis by inhibiting the expression of forkhead box protein M1, Oncol. Lett. **7**: 1711-1717
- Melo C.M., Morais T.C., Tomé A.R., Brito G.A.C., Chaves M.H., Rao V.S., Santos F.A. (2011), Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice, Inflamm. Res. **60**: 673–681
- Metz J.G., Pollard M.R., Anderson L., Hayes T.R., Lassner M.W. (2000), Purification of a Jojoba Embryo Fatty Acyl-Coenzyme A Reductase and Expression of Its cDNA in High Erucic Acid Rapeseed, Plant Physiol. **122**: 635–644
- Montserrat-de la Paz S., García-Giménez M.D., Ángel-Martín M., Pérez-Camino M.C., Fernández Arche A. (2014), Long-chain fatty alcohols from evening primrose oil inhibit the inflammatory response in murine peritoneal macrophages, J. Ethnopharmacol. **151**: 131-136
- Morikawa T., Matsuda H., Toguchida I., Ueda K., Yoshikawa M. (2002), Absolute Stereostructures of Three New Sesquiterpenes from the Fruit of *Alpinia oxyphylla* with Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production and Degranulation in RBL-2H3 Cells, J. Nat. Prod. **65**(10): 1468-1474
- Müller T., Vergeiner S., Kräutler B. (2014) Structure elucidation of chlorophyll catabolites (phyllobilins) by ESI-mass spectrometry-Pseudo-molecular ions fragmentation analysis of a nonfluorescent chlorophyll catabolite (NCC), Int. J. Mass Spectrom. **365-366**: 48-55
- Murphy C.D. (2003), New frontiers in biological halogenations, J. Appl. Microbiol. **94**: 539–548
- Narender T., Khaliq T., Singh A.B., Joshi M.D., Mishra P., Chaturvedi J.P., Srivastava A.K., Maurya R., Agarwal S.C. (2009), Synthesis of α -amyrin derivatives and their in vivo antihyperglycemic activity, Eur. J. Med. Chem. **44**: 1215-1222
- Newman D., Cragg G. (2012), Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, J. Nat. Prod. **75**: 311-335
- Nie X.P., Yao F., Yue X.D., Li G.S., Dai S.J. (2014) New eudesmane-type sesquiterpenoid from *Solanum lyratum* with cytotoxic activity, Nat. Prod. Res. **28**(9): 641-645
- Noa M., Mas R. (2005), Protective Effect of Policosanol on Atherosclerotic Plaque on Aortas in Monkeys, Arch. Med. Res. **36**: 441–447

- Oliveira F.A., Chaves M.H., Almeida F.R.C., Lima Jr. R.C.P, Silva R.M., Maia J.L. (2005), Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice, J. Ethnopharmacol. **98**: 103–108
- Otuki M.F., Vieira-Lima F., Malheiros K., Yunes R.A., Calixto J.B. (2005), Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene, Eur. J. Pharmacol. **507**: 253– 259
- Pejin B., Savic A., Sokovic M., Glamoclija J., Ciric A., Nikolic M., Radotica K., Mojovic M. (2014), Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol, Nat. Prod. Res. **28(6)**: 372–376
- Pejin B., Kojic V., Bogdanovic G. (2014), An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions, Nat. Prod. Res. **28(22)**: 2053–2056
- Pino J.A., Perera W.H., Sarduy R., Oviedo R., Quijano C.E. (2008) Essential Oil from the Stems, Leaves and Flowers of *Pluchea rosea* Godfrey and *Pluchea purpurascens* (Sw.) DC., J. Essent. Oil Res. **20(6)**: 497-501
- Pino J.A., Perera W.H., Sarduy R., Oviedo R., Quijano C.E. (2009) Essential Oil from Flowers of *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don, J. Essent. Oil Res. **21(1)**: 45-47
- Pinto S.A.H., Pinto L.M.S., Guedes M.A., Cunha G.M.A., Chaves M.H., Santos F.A., Rao V.S. (2008), Antinociceptive effect of triterpenoid α,β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin, Phytomedicine **15**: 630-634
- Quattrocchi U. (2012), CRC world dictionary of medicinal and poisonous plants: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology Volume IV M-Q, CRC Press, Boca Raton, Fla., S. 639
- Reich H.J. (2004-2014), C-13 chemical shifts, <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/handouts/nmr-c13/cdata.htm> [abgerufen am 15.9.2014]
- Ross S.A., El-Fishawy A.M., Said A., Hawas U.W., Tekwani B.L., Radwan M.M., Aboelmagd M. (2013), A new fatty alcohol from *Terminalia arjuna* leaves with antileishmanial activity, Med. Chem. Res. **22**: 5844–5847
- Samuels L., Kunst L., Jetter R. (2008), Sealing Plant Surfaces: Cuticular Wax Formation by Epidermal Cells, Annu. Rev. Plant Biol. **59**: 683–707
- Shimizu Y., Imayoshi Y., Kato M., Maeda K., Iwabuchi H., Shimomura K. (2011), New eudesmane-type sesquiterpenoids and other volatile constituents from the roots of *Gynura bicolor* DC., Flavour Fragr. J. **26**: 55–64

- Silva R.O., Sousa F.B.M., Damasceno S.R.B., Carvalho N.S., Silva V.G., Oliveira F.R.M.A., Sousa D.P., Aragão K.S., Barbosa A.L.R., Freitas R.M., Medeiros J.V.R. (2014), Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress, *Fund. Clin. Pharmacol.* **28**: 455–464
- Skalicka-Woźniak K., Garrard I. (2014), Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: a comprehensive review with respect to the solvent systems employed, *Phytochem. Rev.* **13** (2): 547-572
- Srivastava P., Shanker K. (2012), *Pluchea lanceolata* (Rasana): Chemical and biological potential of Rasayana herb used in traditional system of medicine, *Fitoterapia* **83**: 1371–1385
- Standley, P.C. (1920) Contributions United States National Herbarium, Volume 23 Part 1: Trees and shrubs of Mexico (Gleicheniaceae-Betulaceae), Government Printing Office, Washington, D.C., S. 1510f
- Thimmappa R., Geisler K., Louveau T., O'Maille P., Osbourn A. (2014), Triterpene Biosynthesis in Plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**: 225–57
- Thun M.J., Henley S.J., Patrono C. (2002), Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues, *J. Natl. Cancer I.* **94** (4): 252-266
- Uchiyama T., Miyase T., Ueno A., Usmanghani K. (1989), Terpenic glycosides from *Pluchea indica*, *Phytochemistry* **28**(12); 3369-3372
- van Breemen R.B., Canjura F.L., Schwartz S.J. (1991) Identification of Chlorophyll Derivatives by Mass Spectrometry, *J. Agr. Food Chem.* **39**: 1452-1456
- Vera N., Misico R., González Sierra M., Asakawa Y., Bardón A. (2008), Eudesmanes from *Pluchea sagittalis*. Their antifeedant activity on *Spodoptera frugiperda*, *Phytochemistry* **69**: 1689–1694
- Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M. (1983), *Drogenanalyse*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 299
- Wang K.K., Li J., Kim B.J., Lee J.H., Shin H.W., Ko S.H., Lee W.Y., Lee C.H., Jung S.H., Kim Y.R. (2014), Photophysical Properties of Pheophorbide-a Derivatives and Their Photodynamic Therapeutic Effects on a Tumor Cell Line In Vitro, *Int. J. Photoenergy* **2014**
- WHO (2014), Cancer Fact sheet N°297,
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, abgerufen am 19.8.2014
- Wollenweber E., Mann K. (1985), Flavonoids and Terpenoids from Leaf Resin of *Pluchea odorata*, *Z. Naturforsch.* **40c**: 321-324

- Wong W. (1976), Some Folk Medicinal Plants from Trinidad, *Economic Botany* **30**: 103-142
- Yoon H.e., Oh S.H., Kim S.A., Yoon J.H., Ahn S.G. (2014), Pheophorbide a-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis via the activation of MAPKs in human skin cancer cells, *Oncol. Rep.* **31**(1): 137-144
- Zhang P., Liang D., Jin W., Qu H., Cheng Y., Li X., Ma Z. (2009), Cytotoxic Thiophenes from the Root of *Echinops grijisii* Hance, *Z. Naturforsch.* **64 c**: 193–196
- Zhao Y., Wang X., Wang H., Liu T., Xin Z. (2014) Two new noroleanane-type triterpene saponins from the methanol extract of *Salicornia herbacea*, *Food Chem.* **151**: 101-109

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

Claudia Strauß

CURRICULUM VITAE

Claudia Strauß

Persönliche Angaben:

Geboren: 13. September 1990

Geburtsort: Linz

Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung:

1997 – 2001 Volksschule in Ansfelden

2001 – 2009 WRg des Schulvereins der Kreuzschwestern Linz

Seit 2009 Pharmaziestudium an der Universität Wien

2014 Diplomarbeit am Department der Pharmakognosie

ANHANG

Die Parameter der 1D und 2D-NMR und der ESI-MS Analysen sind auf Seite 17 und 18 zu finden.

Für die Aufnahme und Interpretation der NMR- und MS-Spektren danken wir Herrn a.o. Univ.-Prof. Dr. E. Urban (Department für pharmazeutische Chemie) und Herrn Dr. M. Zehl (Department für Pharmakognosie).

Substanz PO_38	Seite
ESI-MS Spektrum	I

Substanz PO_39	
ESI-MS Spektrum	II

Substanz PO_40	
ESI-MS Spektrum	III
¹ H-NMR Spektrum	III - IV
¹³ C-NMR Spektrum	V - VI
HSQC-NMR Spektrum	VII - VIII
COSY-NMR Spektrum	IX - X
HMBC-NMR Spektrum	XI - XII

Substanz PO_41	
¹ H-NMR Spektrum	XIII - XV
¹³ C-NMR Spektrum	XV - XVII
HSQC-NMR Spektrum	XVIII - XX
COSY-NMR Spektrum	XXI - XXI
HMBC-NMR Spektrum	XXII - XXV

Substanz PO_44	
ESI-MS Spektrum	XXVI
¹ H-NMR Spektrum	XXVI - XXVII
¹³ C-NMR Spektrum	XXVIII - XXIX
HSQC-NMR Spektrum	XXIX - XXXI
COSY-NMR Spektrum	XXXI - XXXII
HMBC-NMR Spektrum	XXXIII - XXXVI
NOESY-NMR Spektrum	XXXVII - XXXIX

Substanz PO_45	
ESI-MS Spektrum	XL

Substanz PO_46

ESI-MS Spektrum	XLI
¹ H-NMR Spektrum.....	XLI - XLII
¹³ C-NMR Spektrum	XLIII - XLIV
HSQC-NMR Spektrum	XLV - XLVI
COSY-NMR Spektrum	XLVII
HMBC-NMR Spektrum	XLVIII - LI

Substanz PO_48

ESI-MS Spektrum	LII - LIII
-----------------------	------------

Substanz PO_49

ESI-MS Spektrum	LIV
-----------------------	-----

Substanz PO_50

¹ H-NMR Spektrum.....	LV - LVI
¹³ C-NMR Spektrum	LVI - LIX
HSQC-NMR Spektrum	LX - LXIII
COSY-NMR Spektrum	LXIV - LXVI
HMBC-NMR Spektrum	LXVII - LXX

Substanz PO_51

ESI-MS Spektrum	LXXI
-----------------------	------

Substanz PO_53

ESI-MS Spektrum	LXXII
¹ H-NMR Spektrum.....	LXXIII - LXXIV
¹³ C-NMR Spektrum	LXXV - LXXVI
HSQC-NMR Spektrum	LXXVII - LXXVIII

Substanz PO_54

ESI-MS Spektrum	LXXIX
-----------------------	-------

Substanz PO_55

ESI-MS Spektrum	LXXX - LXXXI
¹ H-NMR Spektrum.....	LXXXI - LXXXII

Substanz PO_56

ESI-MS Spektrum	LXXXIII
¹ H-NMR Spektrum.....	LXXXIV - LXXXV
HSQC-NMR Spektrum	LXXXVI - LXXXVIII
COSY-NMR Spektrum	LXXXVIII - LXXXIX
HMBC-NMR Spektrum	LXXXIX - XCII

Substanz PO_38

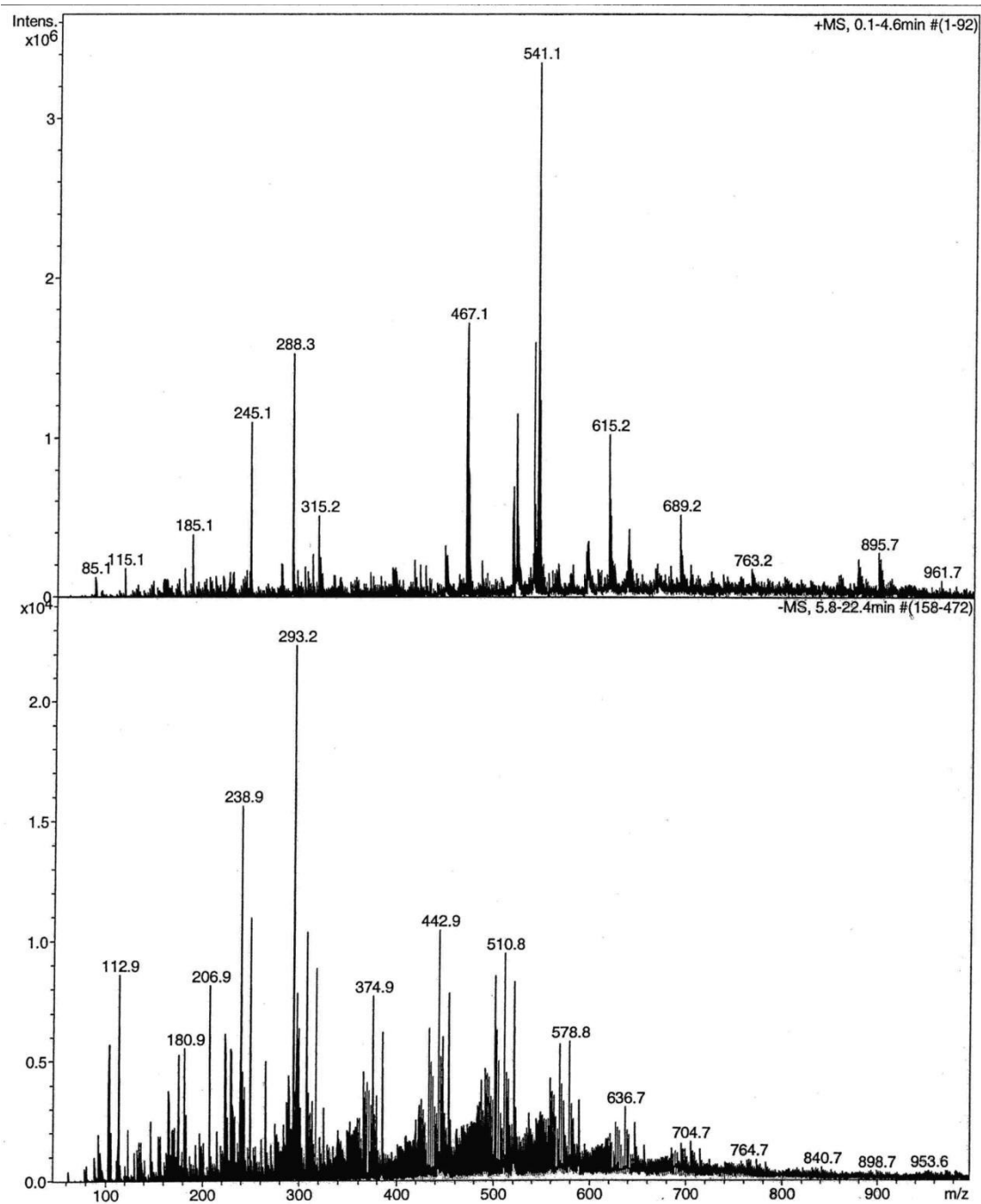


Abbildung 1: ESI-MS Spektrum von Substanz PO_38

Substanz PO_39

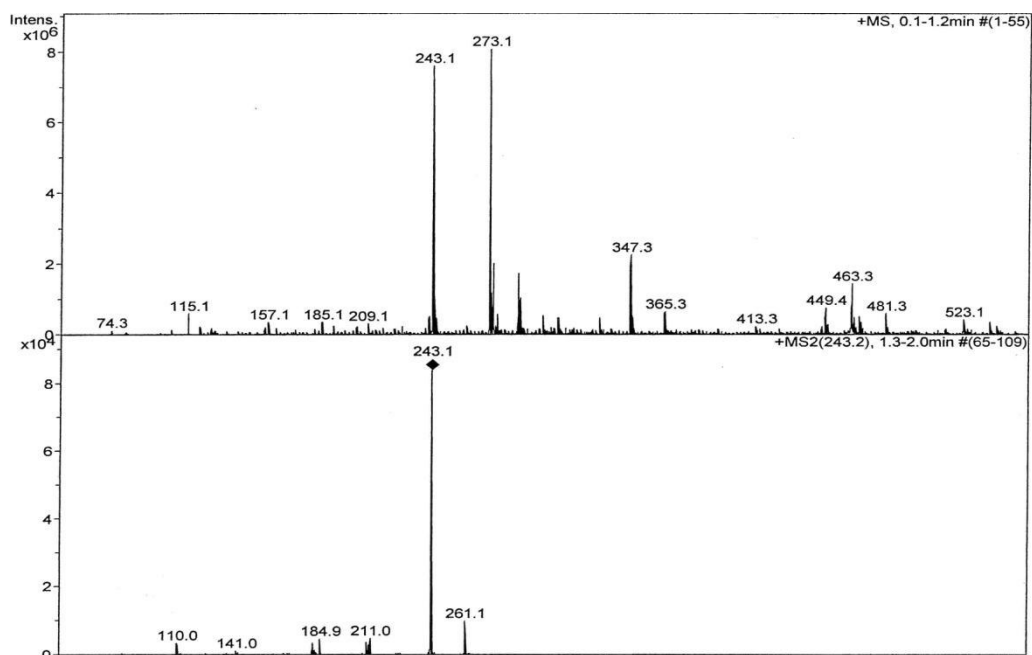


Abbildung 2: ESI-MS und ESI-MS¹ (m/z 243,2) im positiven Ionenmodus von Substanz PO_39

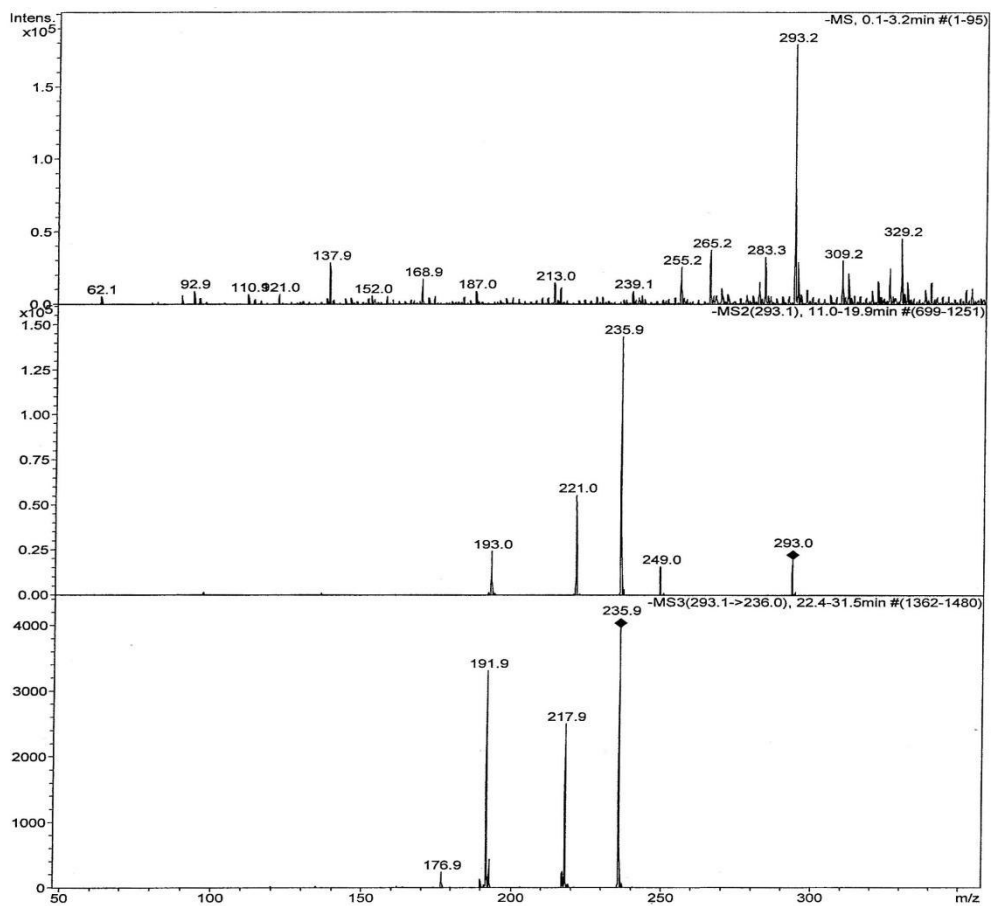


Abbildung 3: ESI-MS und ESI-MSⁿ (m/z 293,2) im negativen Ionenmodus von Substanz PO_39

Substanz PO_40

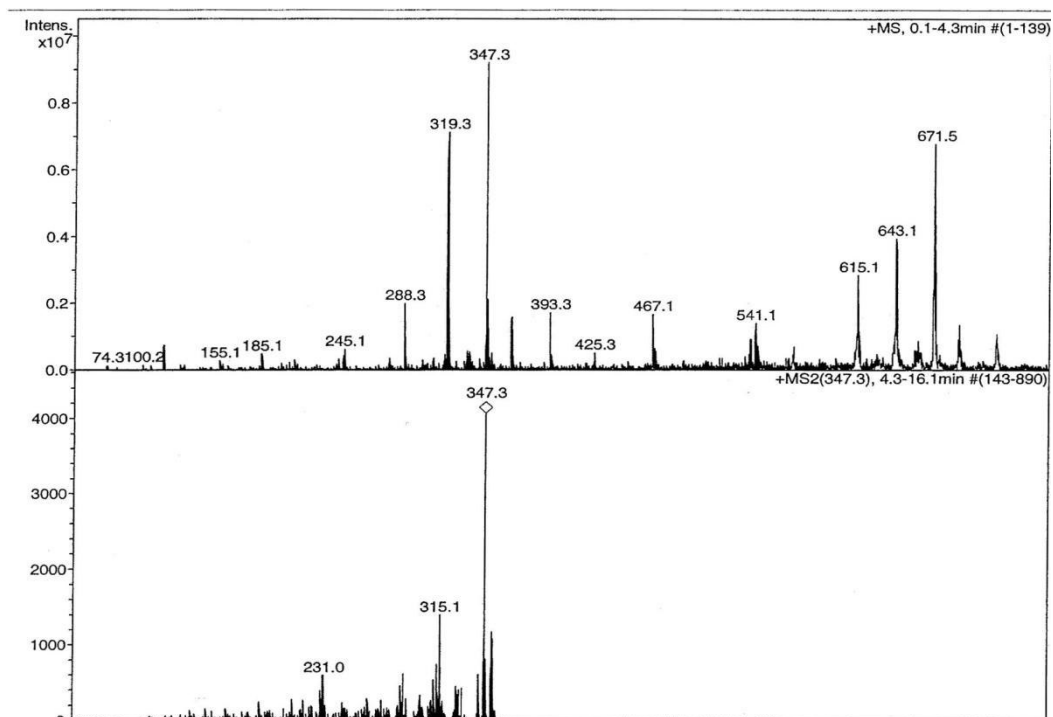


Abbildung 4: ESI-MS und ESI-MS¹ (m/z 347,3) Spektrum von Substanz PO_40

CS_PO_40 in cdcl3 (Proton), 19.8.2014

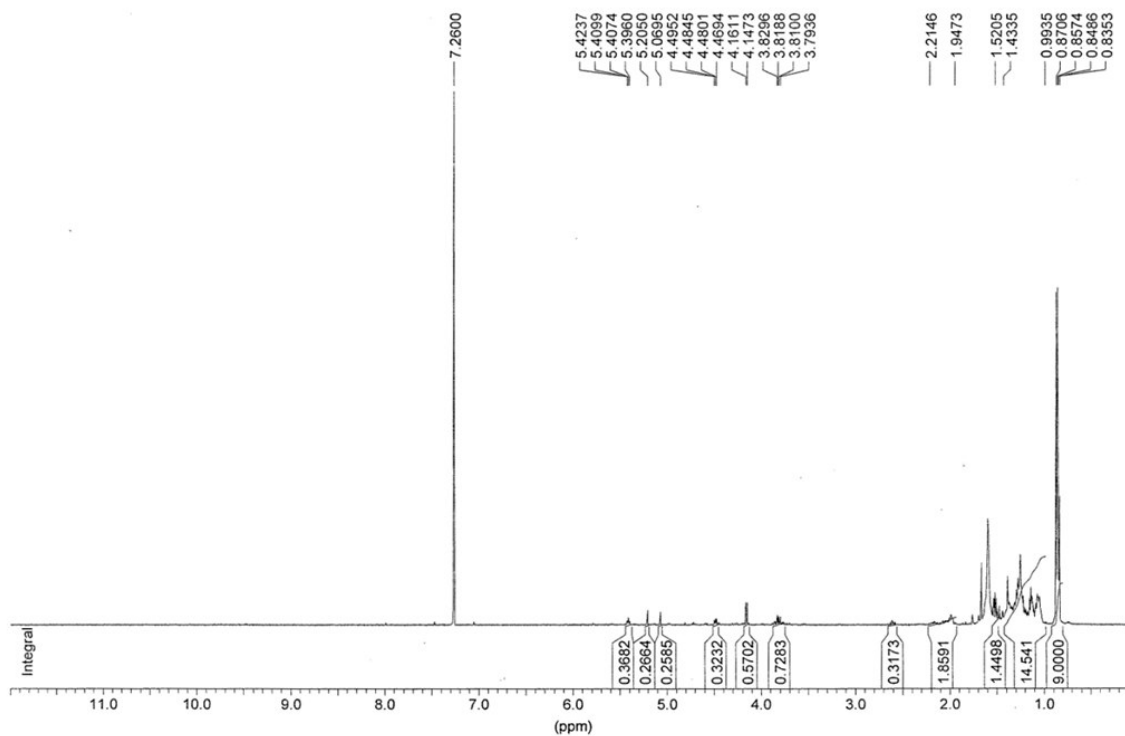


Abbildung 5: ¹H-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃

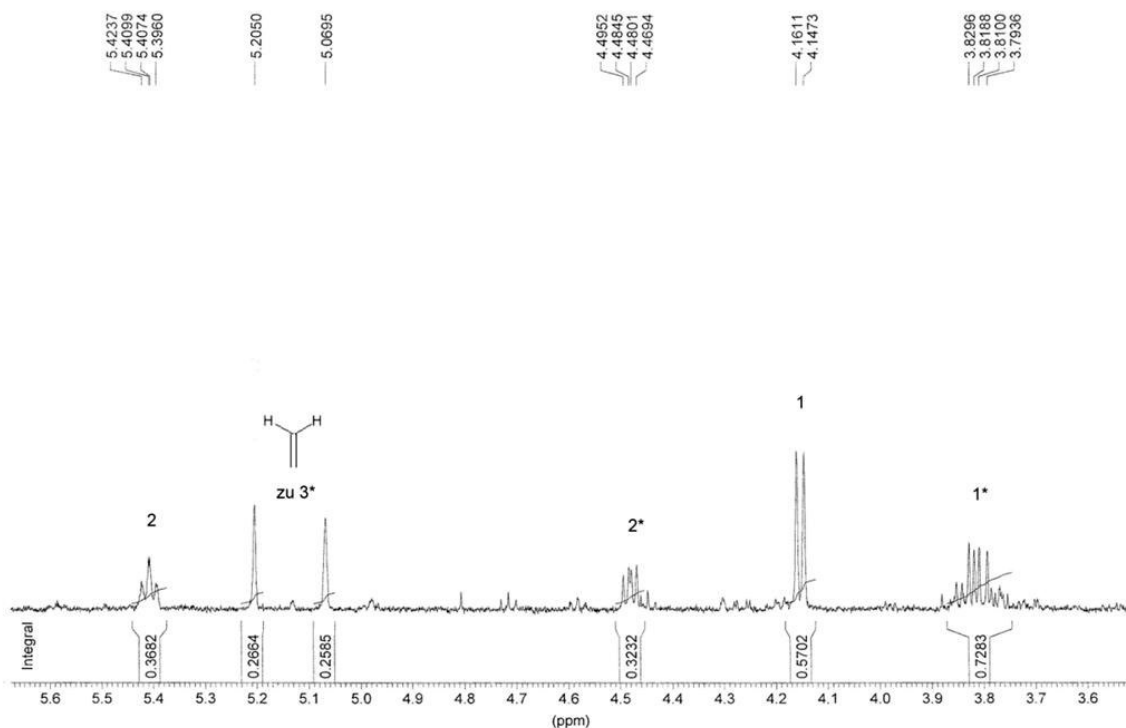


Abbildung 6: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl_3 , Ausschnitt: 5,6-3,6 ppm

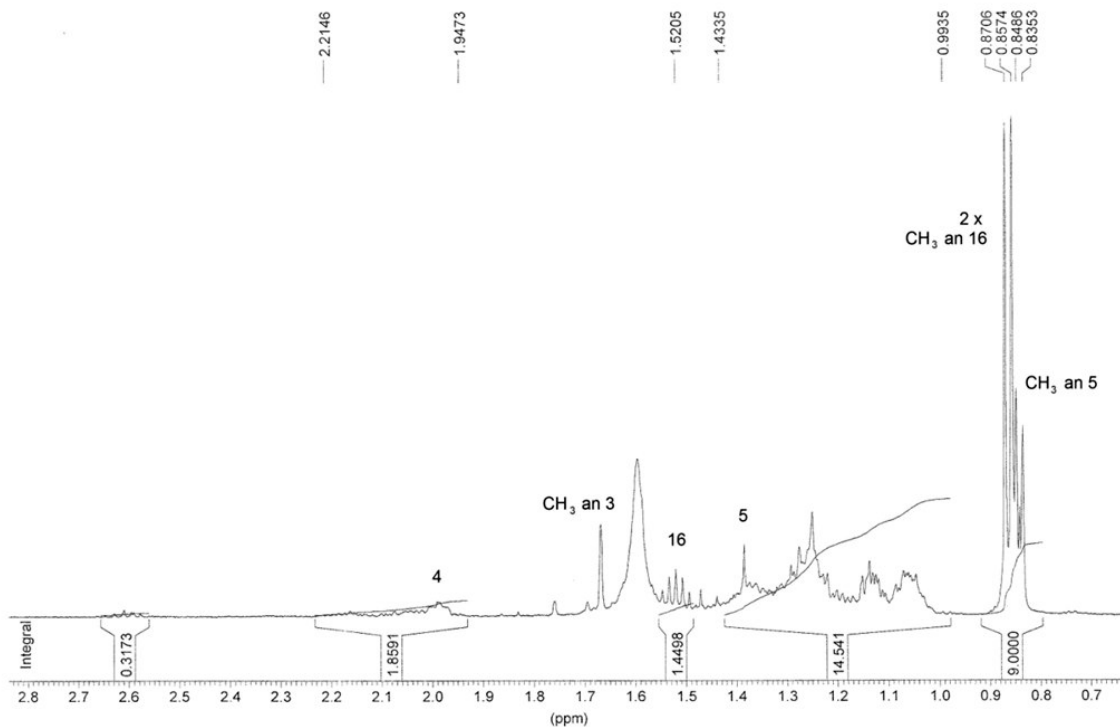


Abbildung 7: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl_3 , Ausschnitt: 2,8-0,7 ppm

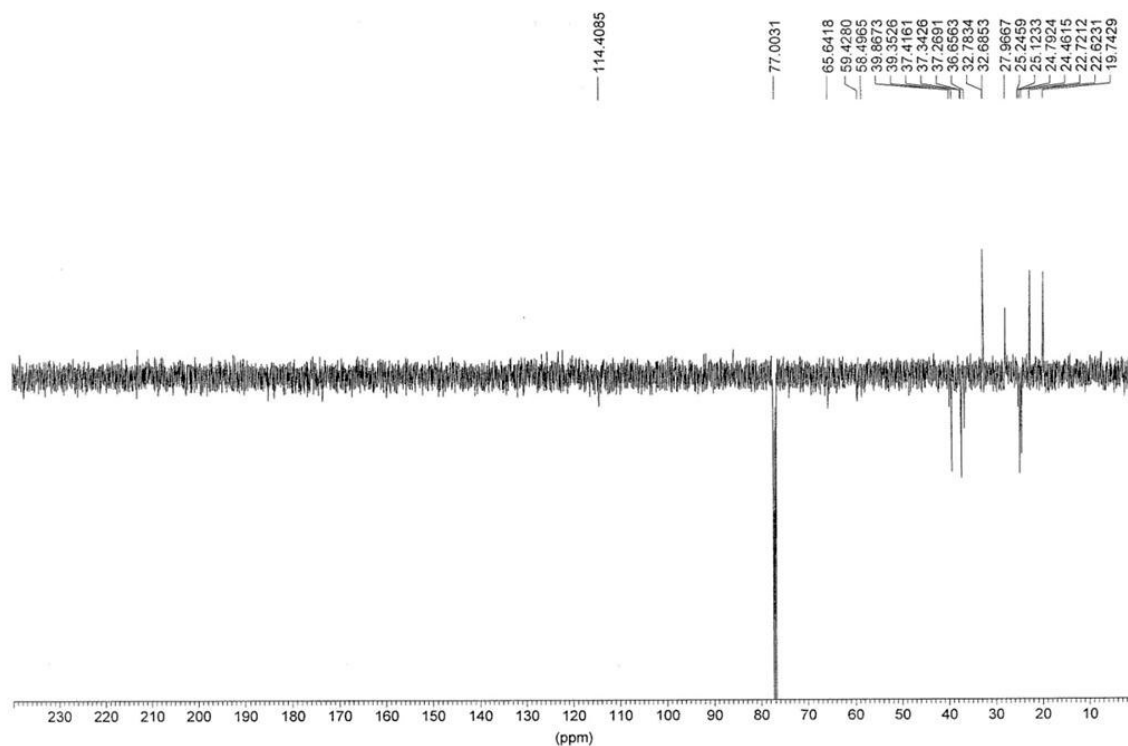


Abbildung 8: ¹³C-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃

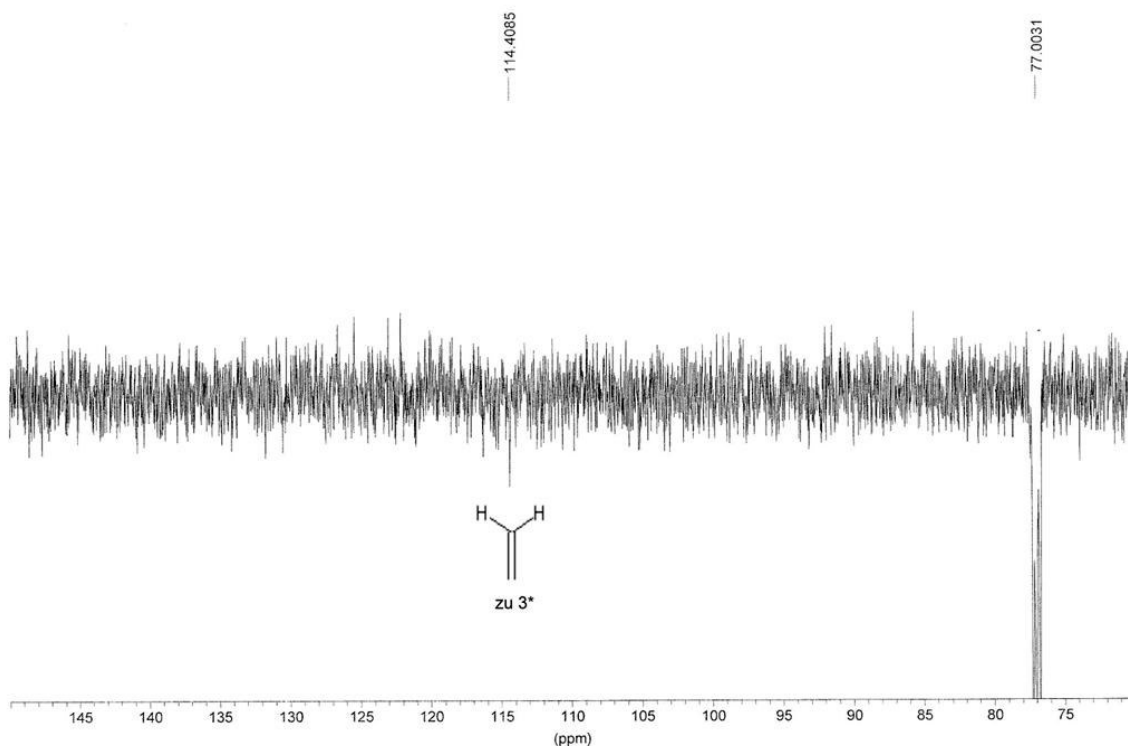


Abbildung 9: ¹³C-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃
Ausschnitt: 145-75 ppm

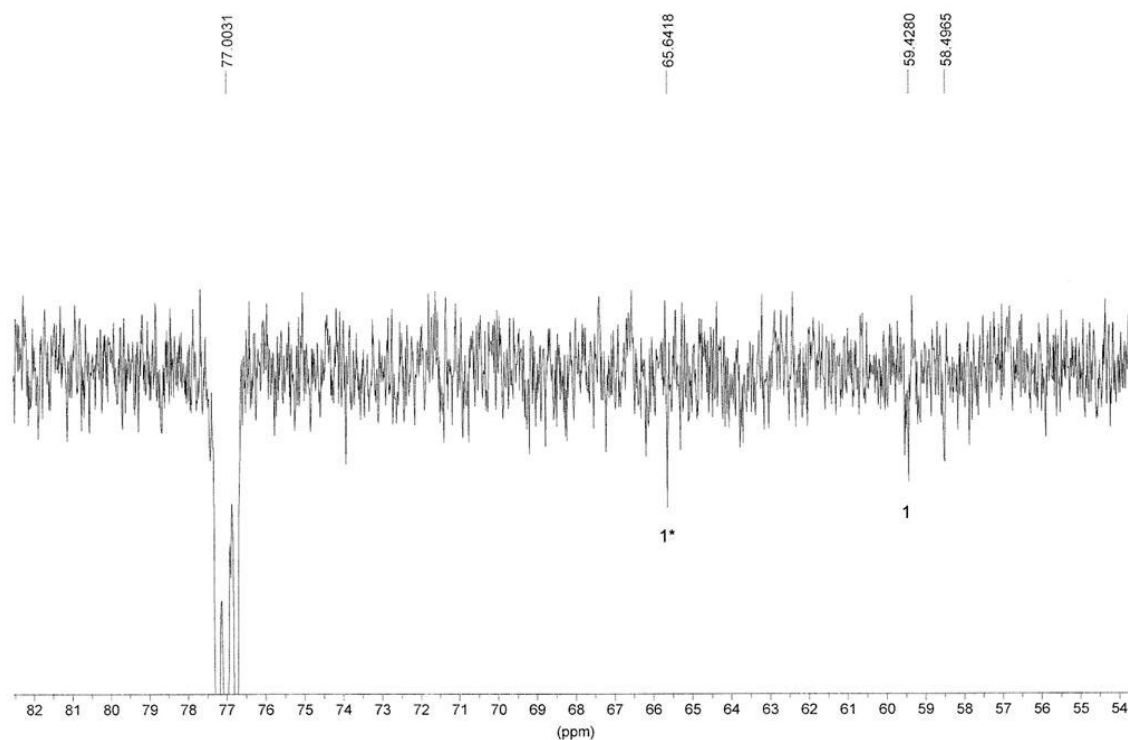


Abbildung 10: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO₄₀ in CDCl₃
Ausschnitt: 82-54 ppm

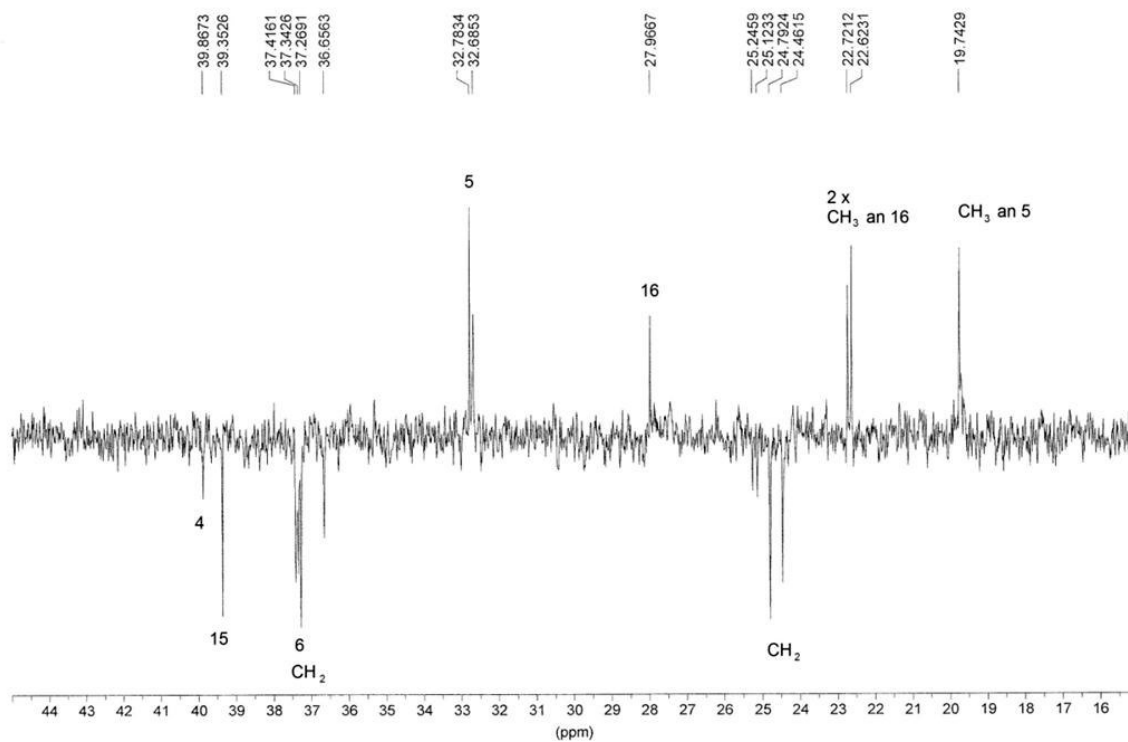


Abbildung 11: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO₄₀ in CDCl₃
Ausschnitt: 44-16 ppm

CS_PO_40 in cdcl3 (HSQC neu), 19.8.2014

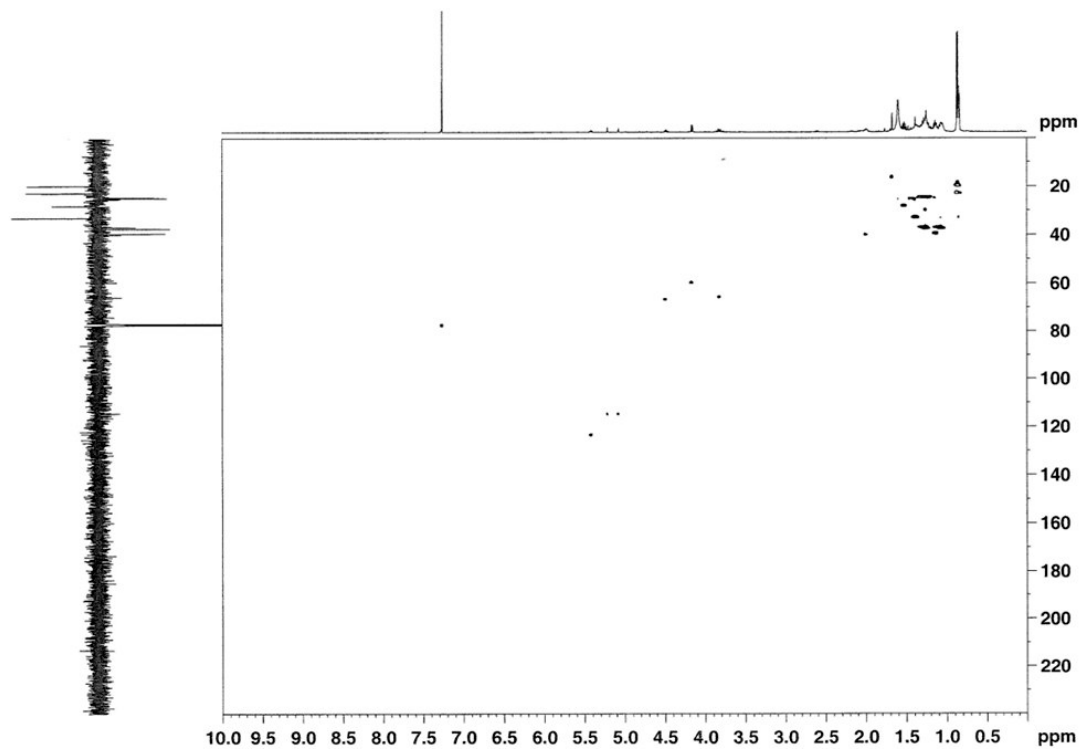


Abbildung 12: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃

CS_PO_40 in cdcl3 (HSQC neu), 19.8.2014

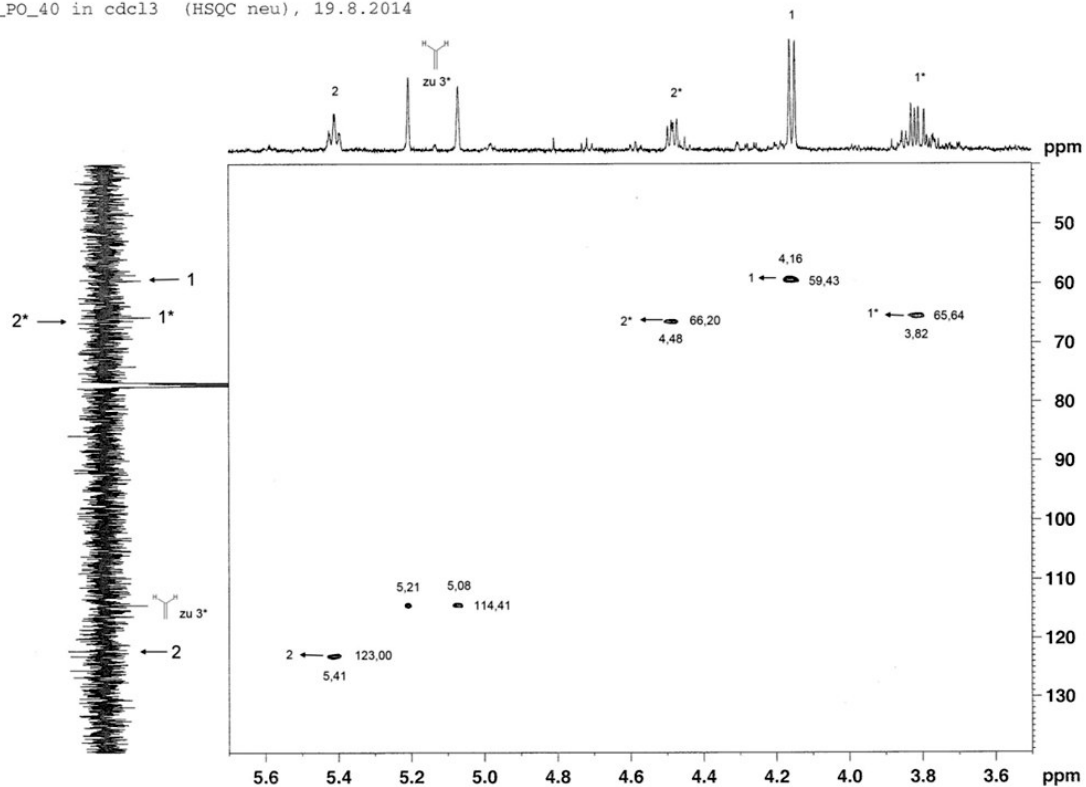


Abbildung 13: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃
Ausschnitt: 5,7-3,5 / 140-40 ppm

CS_PO_40 in cdcl3 (HSQC neu), 19.8.2014

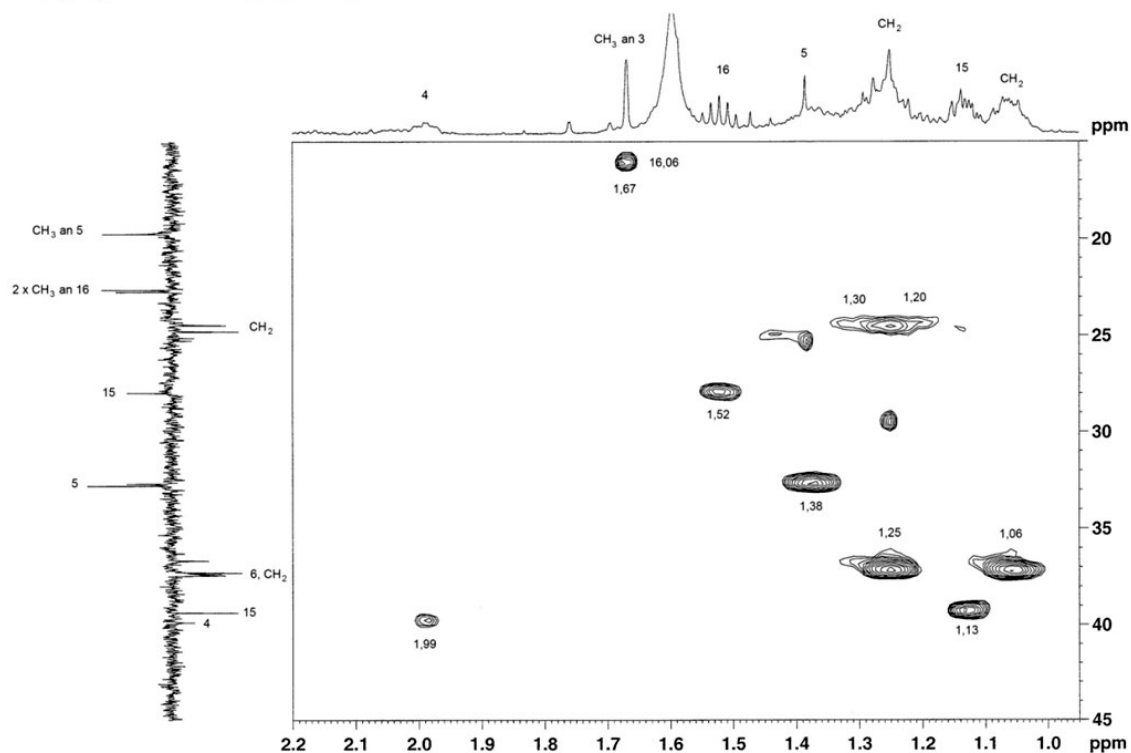


Abbildung 14: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl_3
Ausschnitt: 2,2-0,9 / 45-15 ppm

CS_PO_40 in cdcl3 (HSQC neu), 19.8.2014

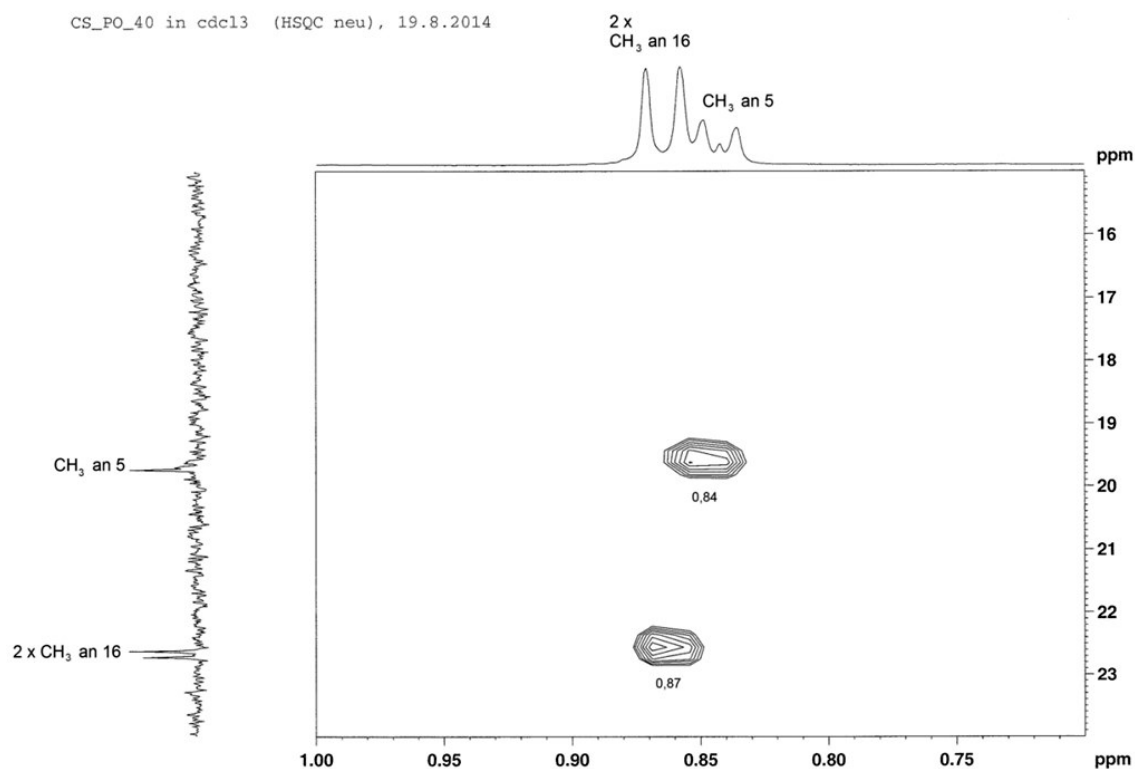


Abbildung 15: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl_3
Ausschnitt: 1,00-0,70 / 24-15 ppm

CS_PO_40 in cdcl3 (COSY 45), 19.8.2014

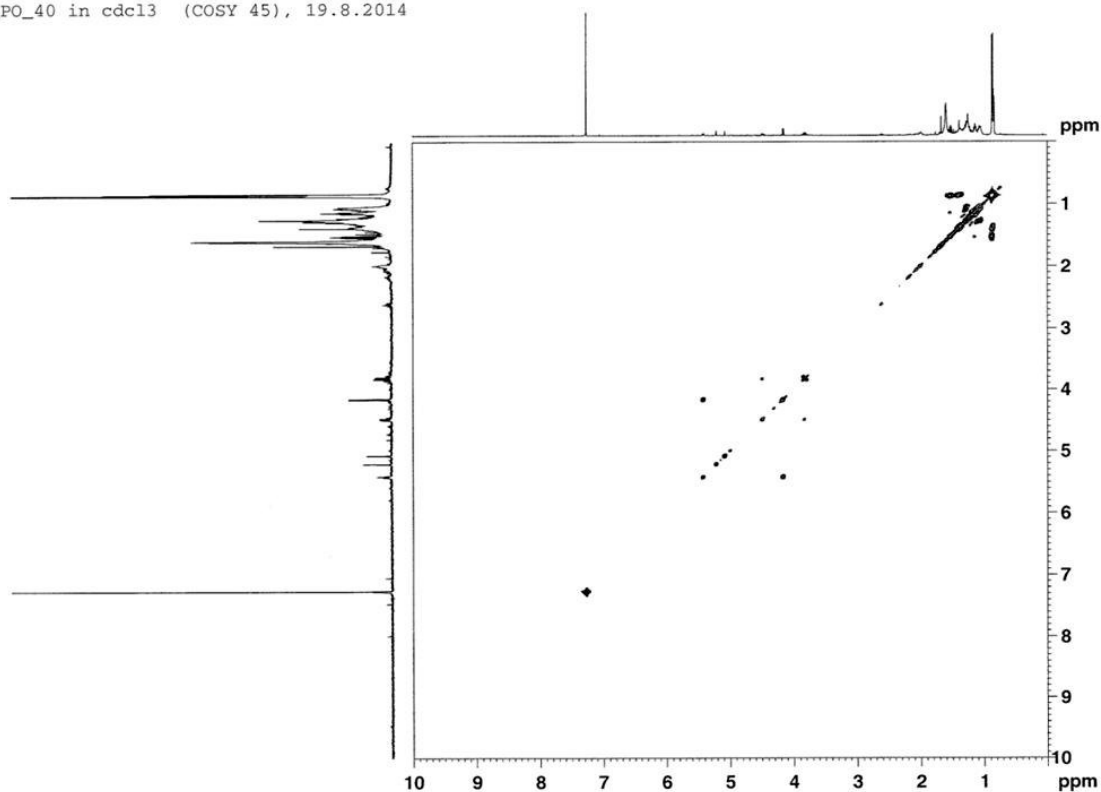


Abbildung 16: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃

CS_PO_40 in cdcl3 (COSY 45), 19.8.2014

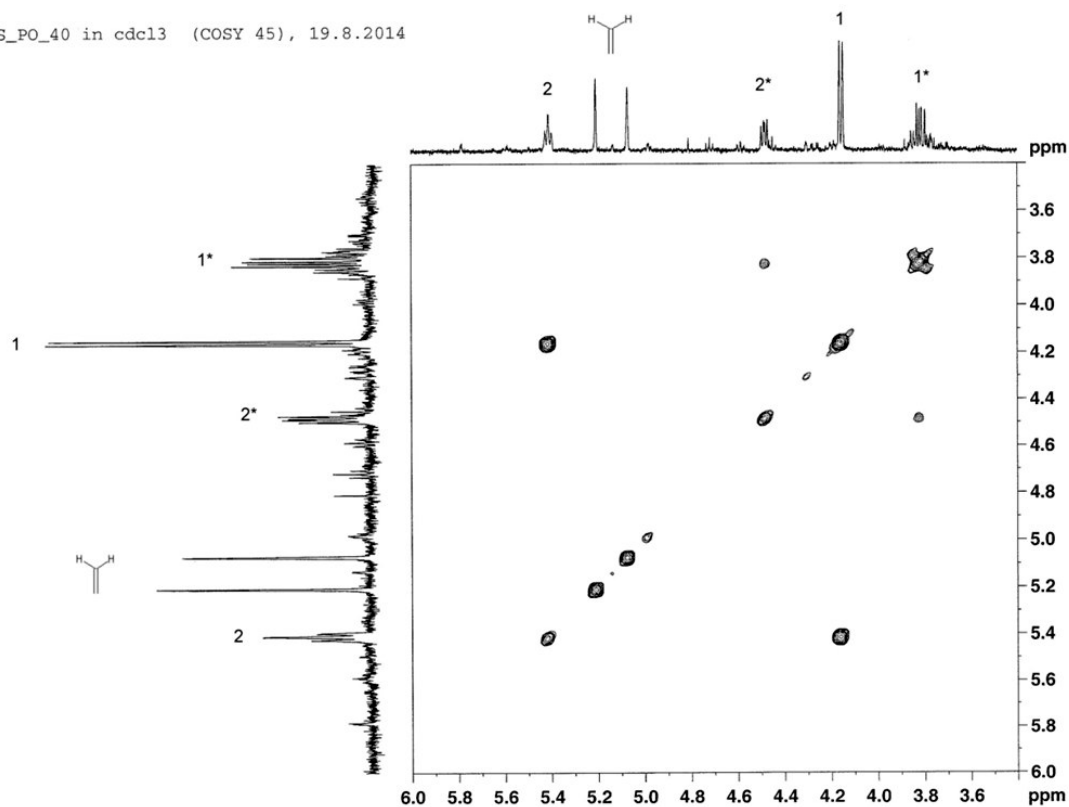


Abbildung 17: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃
Ausschnitt: 6,0-3,4 / 6,0-3,4 ppm

CS_PO_40 in cdcl3 (COSY 45), 19.8.2014

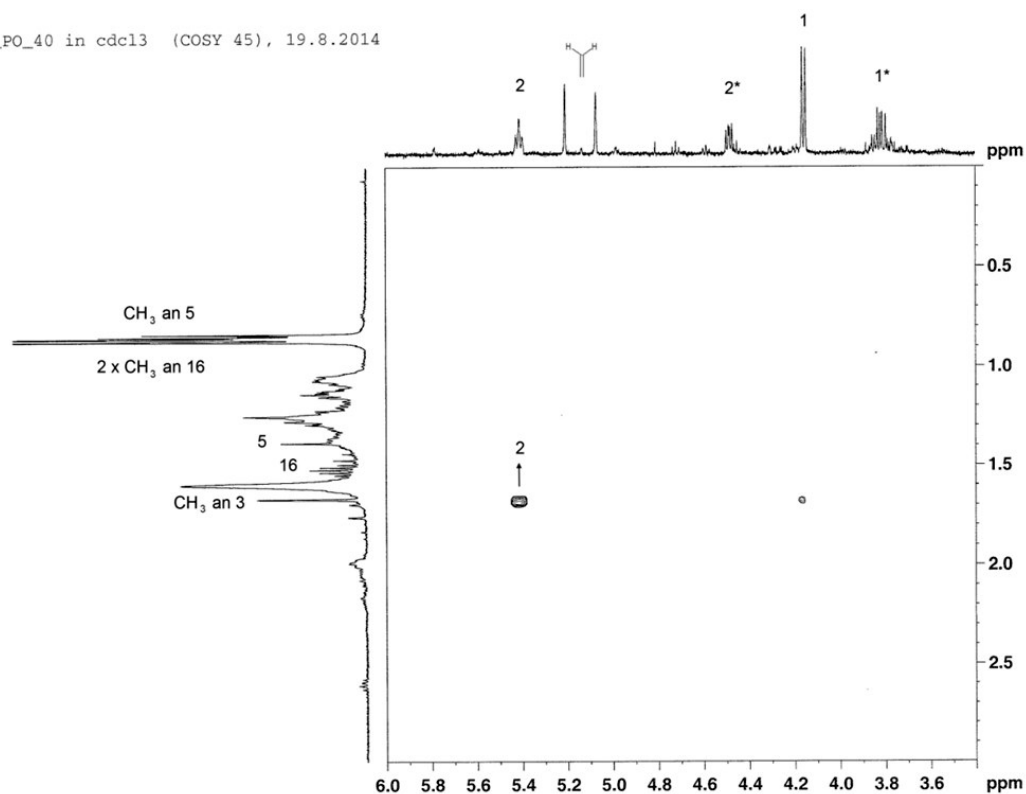


Abbildung 18: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO₄₀ in CDCl₃
Ausschnitt: 6,0-3,4 / 3,0-0,0 ppm

CS_PO_40 in cdcl3 (COSY 45), 19.8.2014

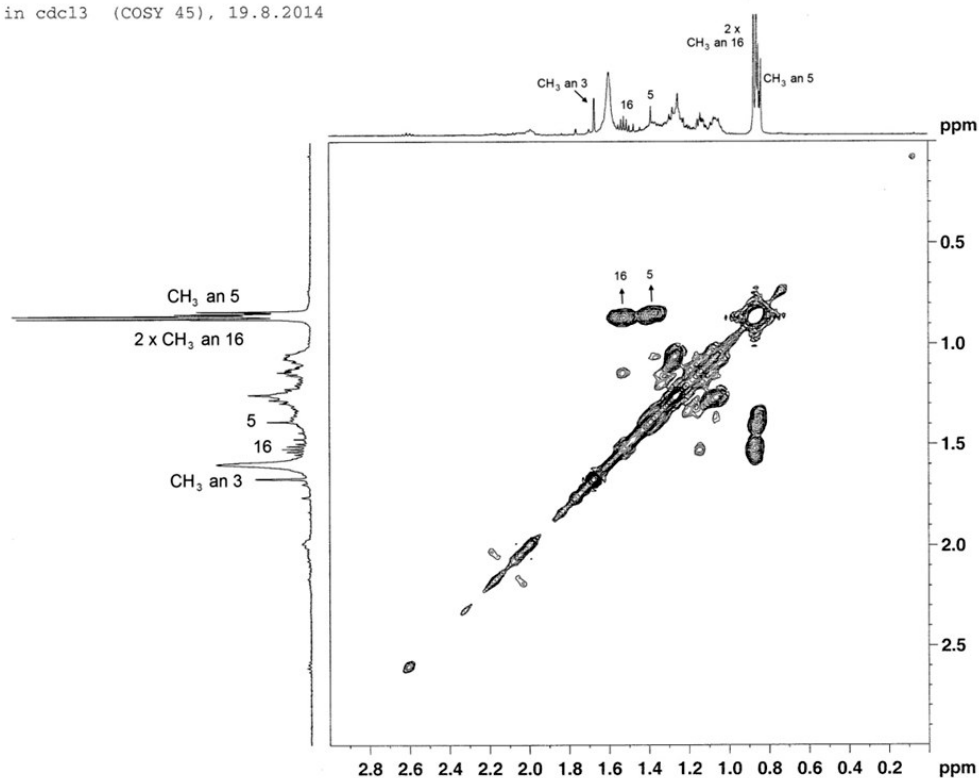


Abbildung 19: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO₄₀ in CDCl₃
Ausschnitt: 3,0-0,0 / 3,0-0,0 ppm

CS_PO_40 in cdcl3 (HMBC), 19.8.2014

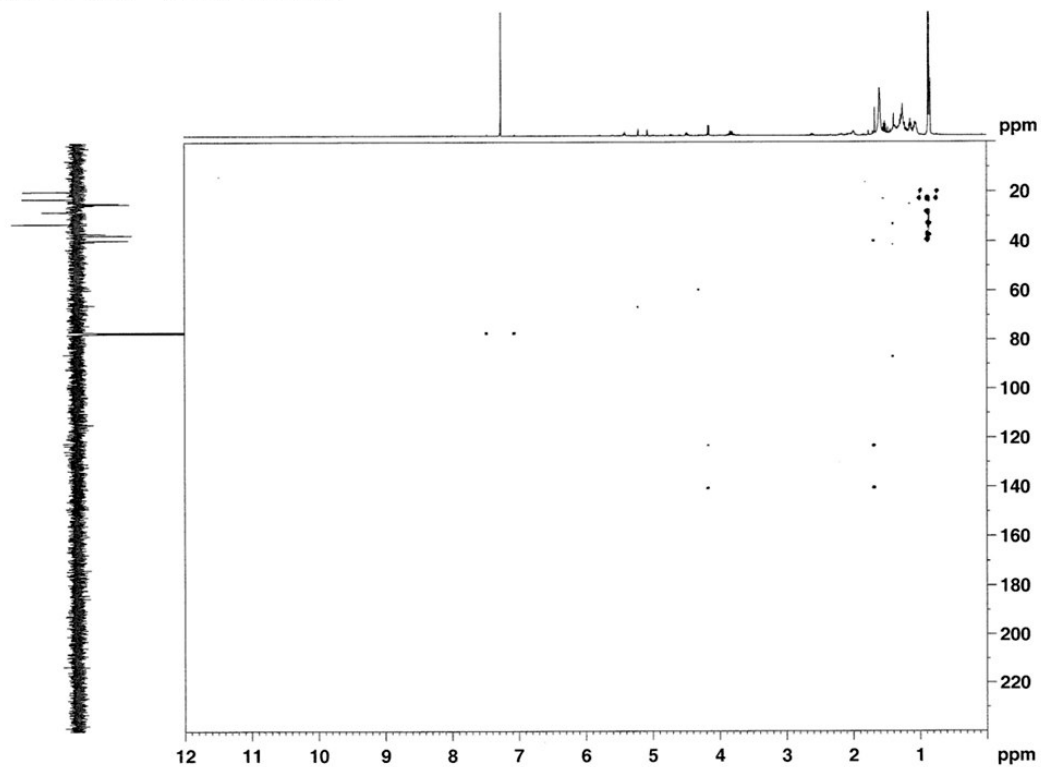


Abbildung 20: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃

CS_PO_40 in cdcl3 (HMBC), 19.8.2014

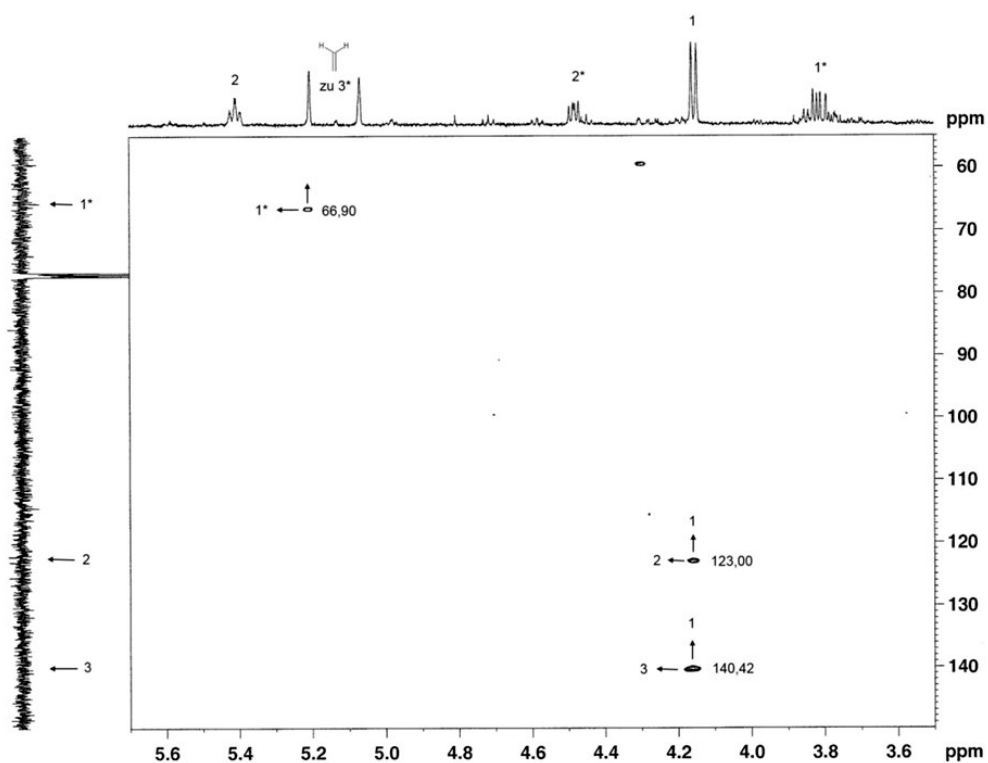


Abbildung 21: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃
Ausschnitt: 5,7-3,5 / 150-50 ppm

CS_PO_40 in cdcl3 (HMBC), 19.8.2014

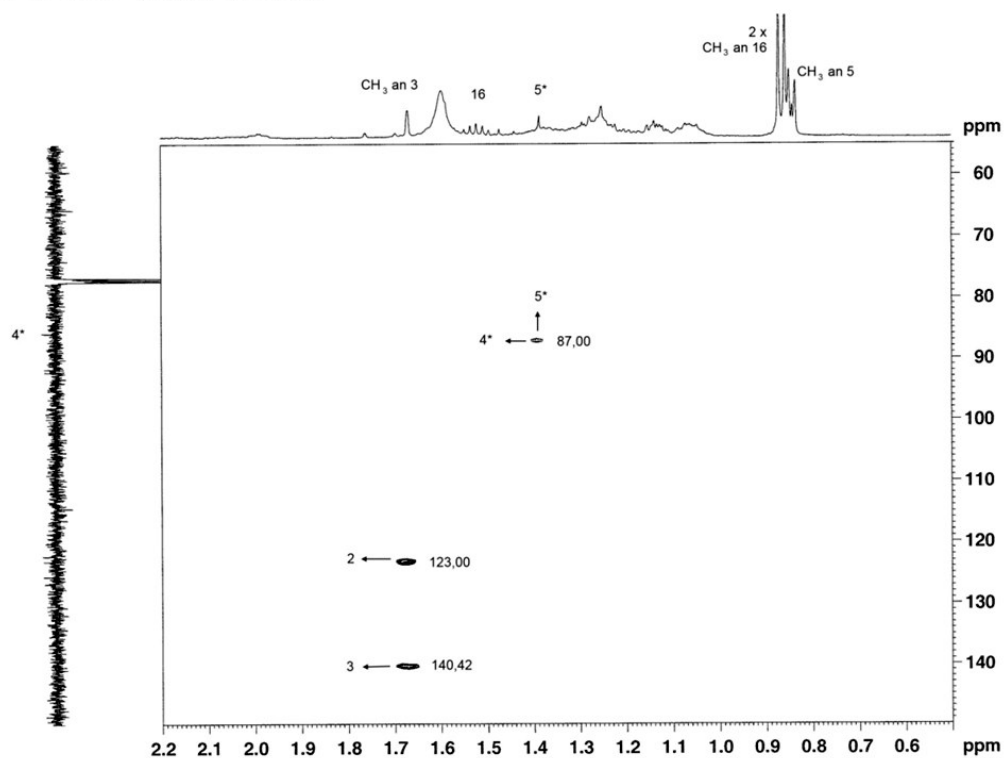


Abbildung 22: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃
Ausschnitt: 2,2-0,5 / 150-50 ppm

CS_PO_40 in cdcl3 (HMBC), 19.8.2014

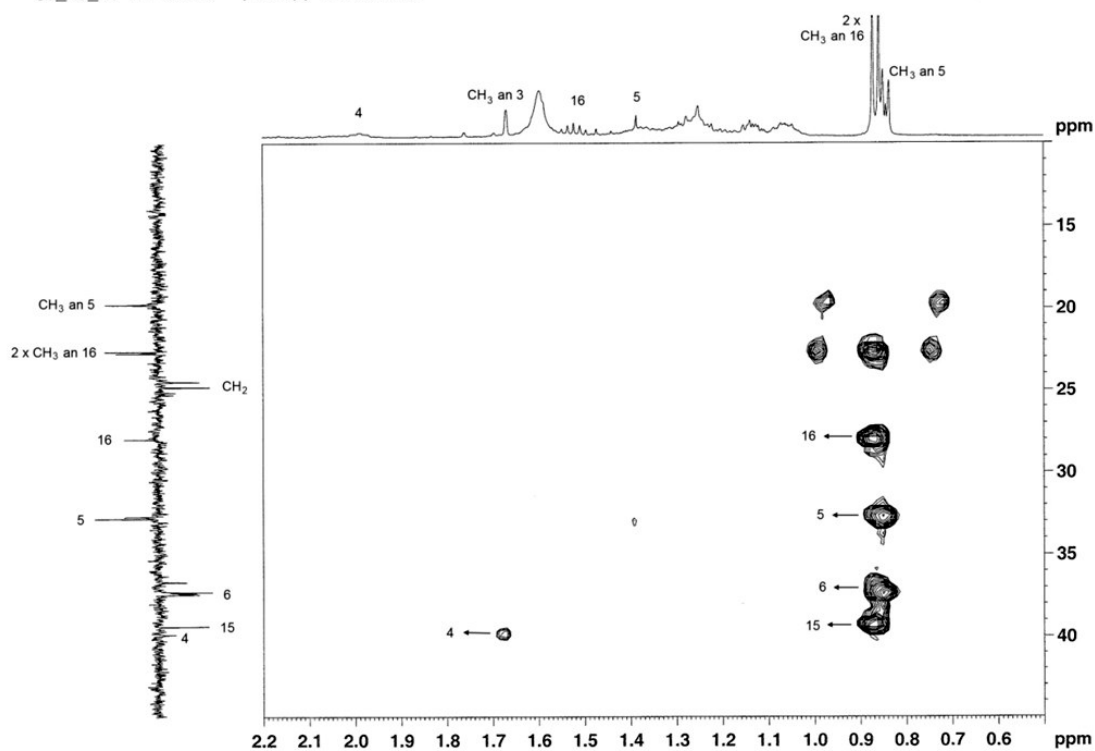


Abbildung 23: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_40 in CDCl₃
Ausschnitt: 2,2-0,5 / 50-10 ppm

Substanz PO_41

CS_PO_41b in cdd3 (Proton), 26.11.2014

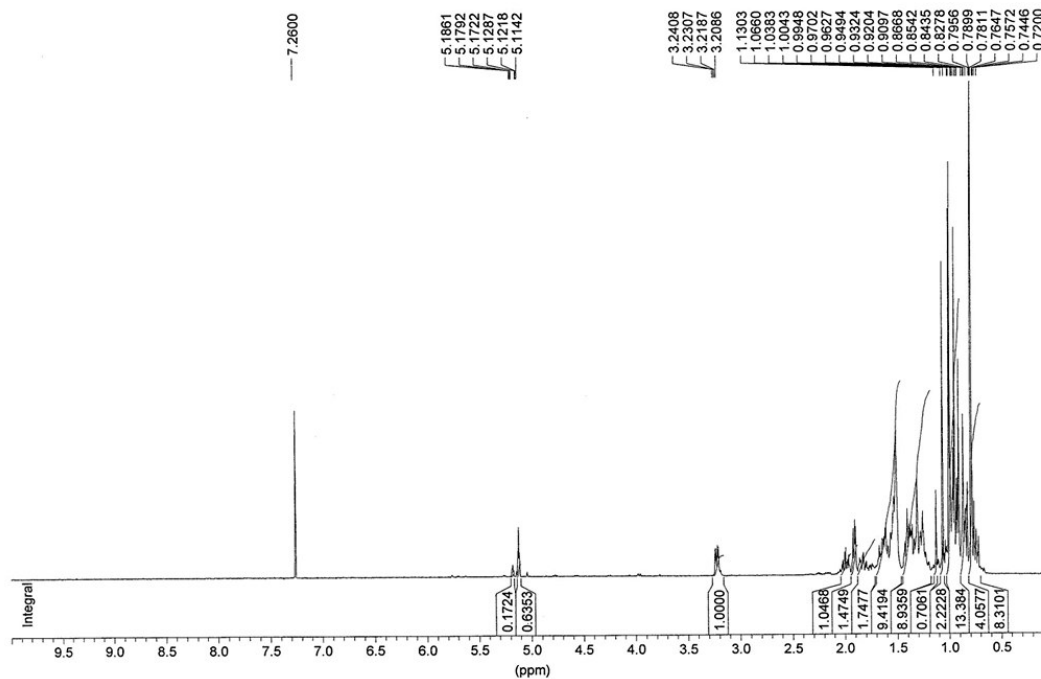


Abbildung 24: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl_3

CS_PO_41b in cdd3 (Proton), 26.11.2014

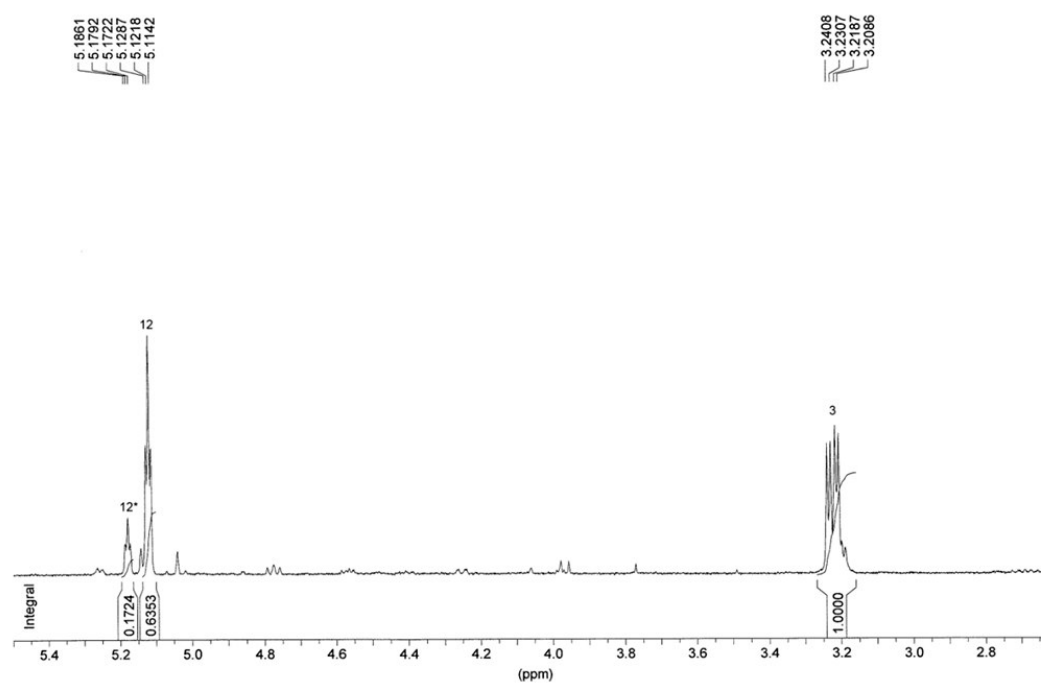


Abbildung 25: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl_3
Ausschnitt: 5,4-2,8 ppm

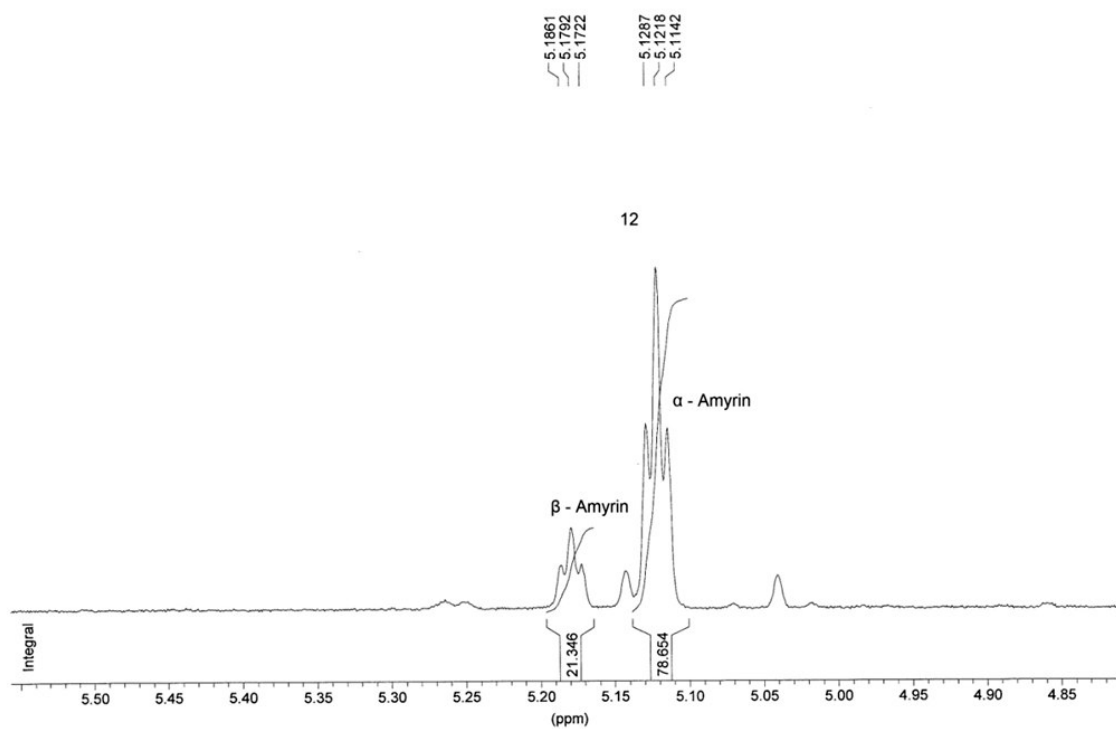


Abbildung 26: ¹H-NMR Spektrum von Substanz PO₄₁ in CDCl₃
Ausschnitt: 5,50-4,85 ppm

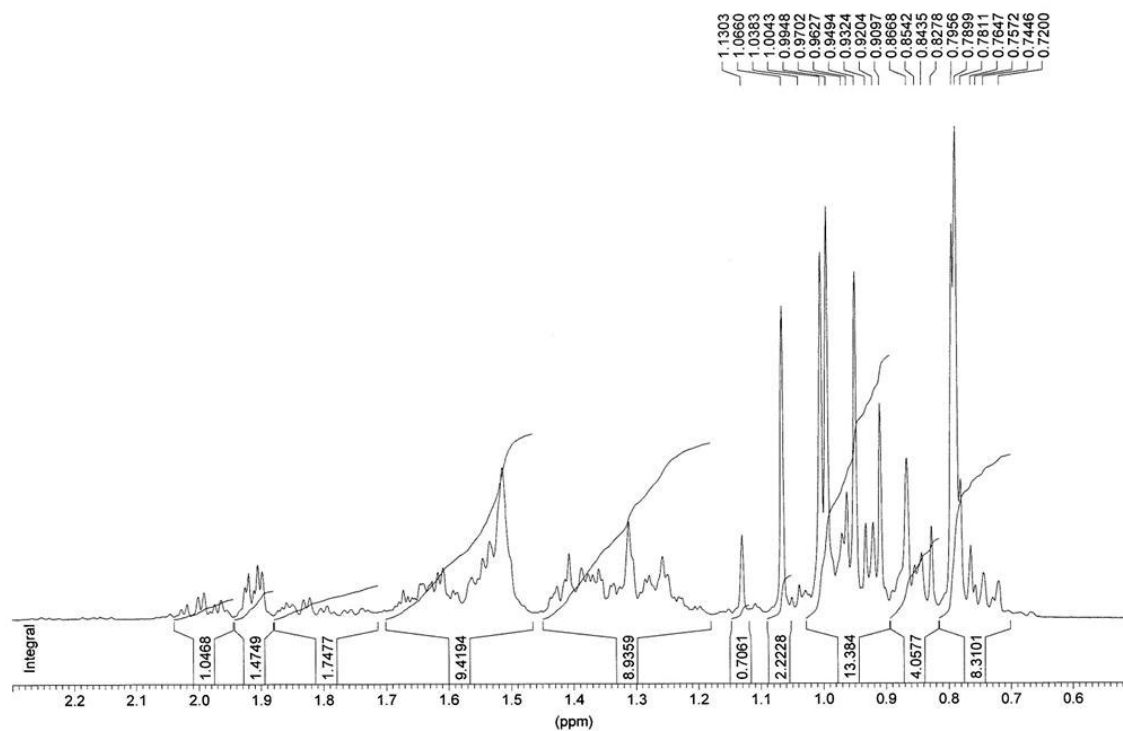


Abbildung 27: ¹H-NMR Spektrum von Substanz PO₄₁ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,2-0,6 ppm

CS_PO_41b in odd3 (Proton), 26.11.2014

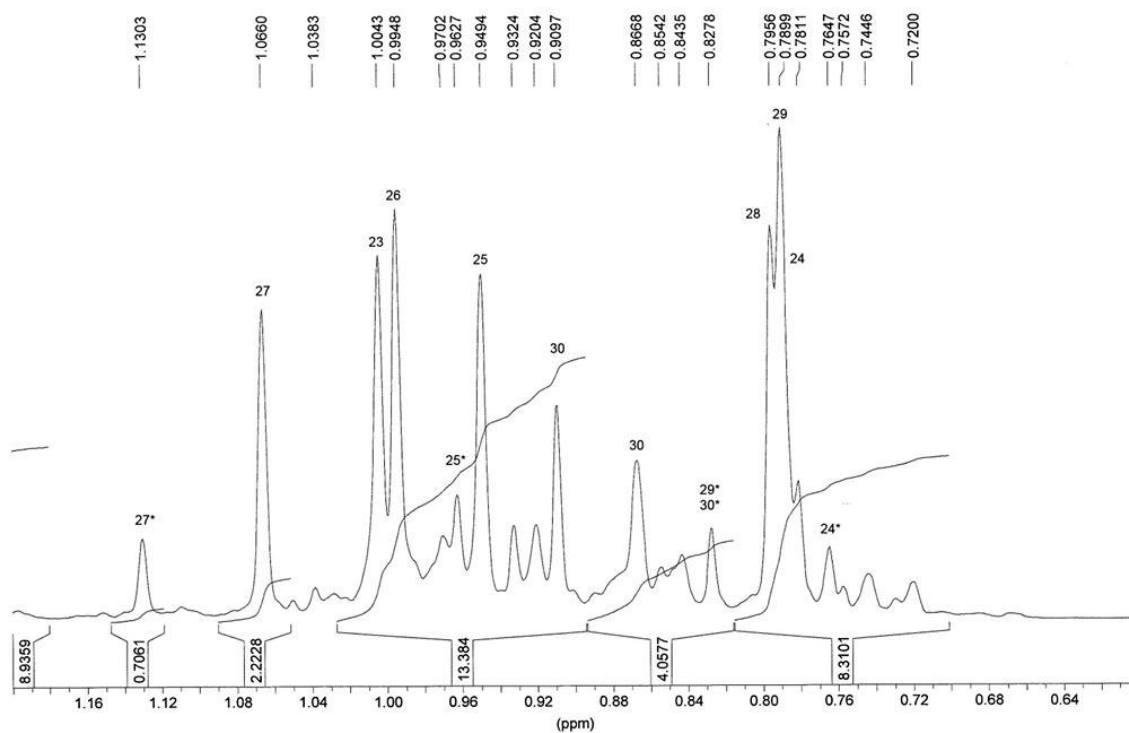


Abbildung 28: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl_3
Ausschnitt: 1,16-0,64 ppm

CS_PO_41b in odd3 (APT), 26.11.2014

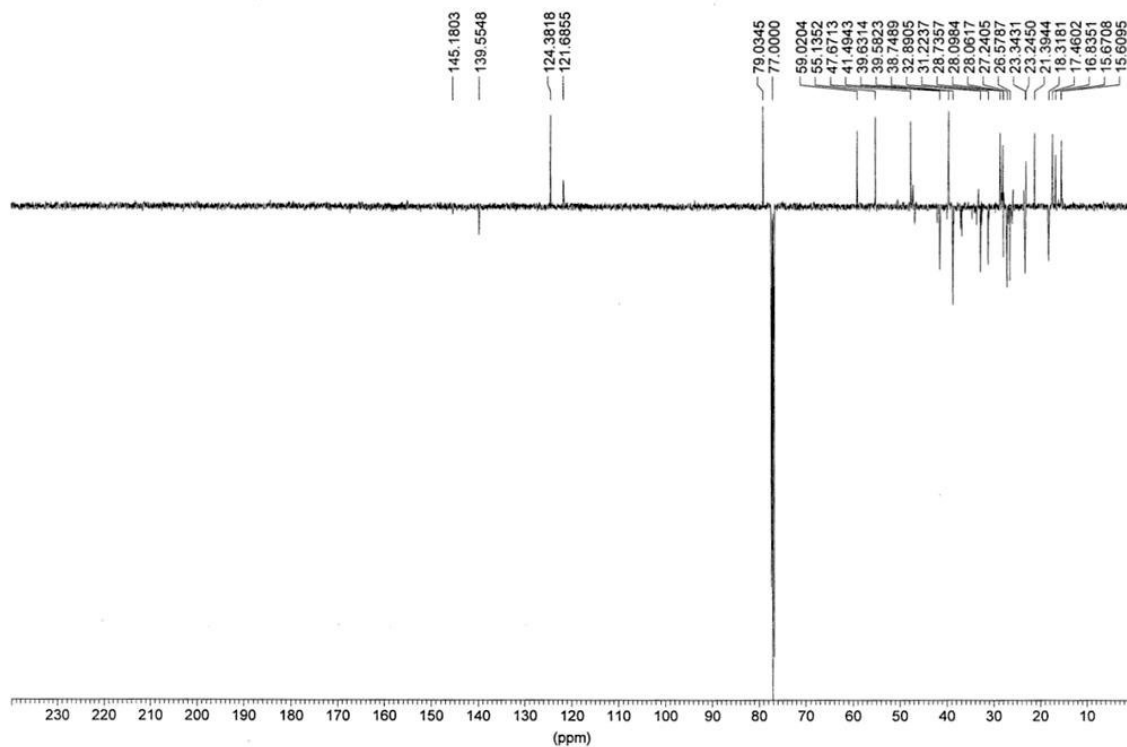


Abbildung 29: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl_3

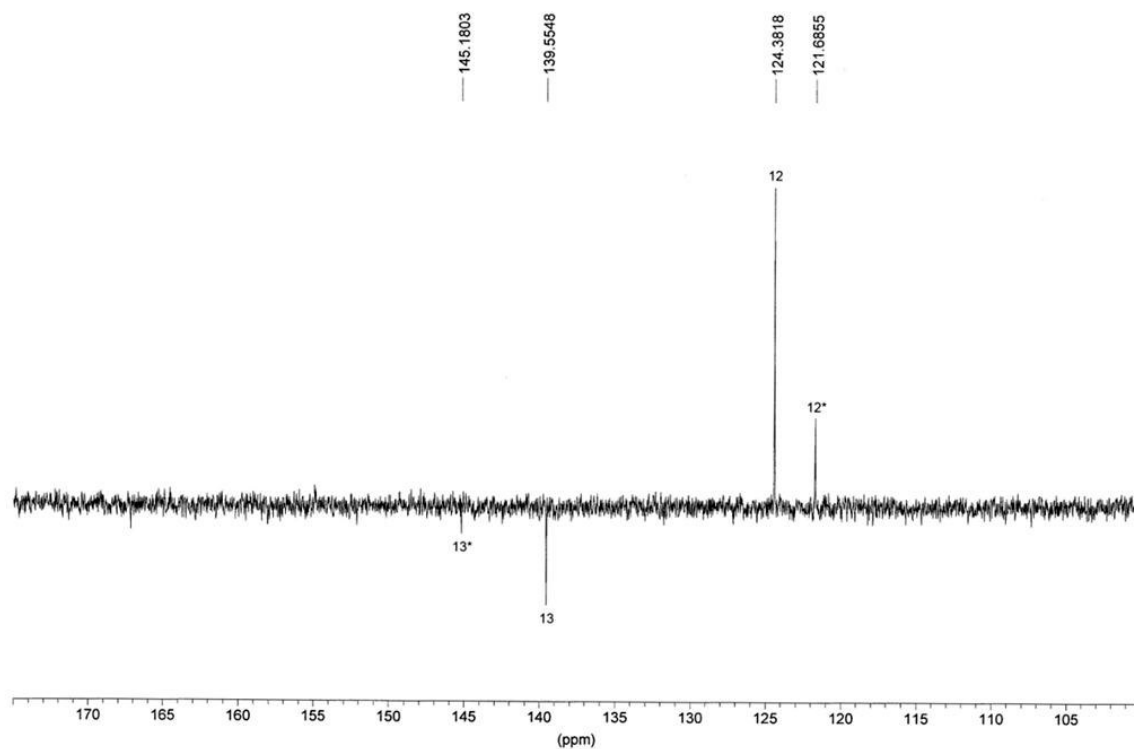


Abbildung 30: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO₄₁ in CDCl_3
Ausschnitt: 170-105 ppm

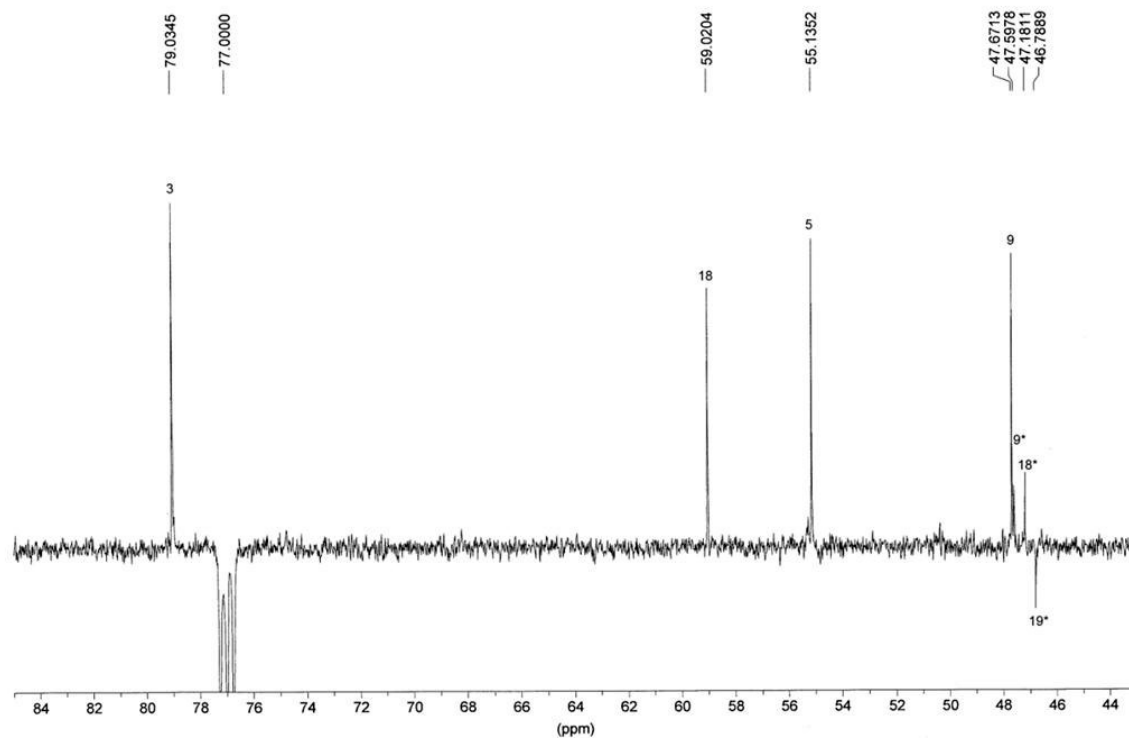


Abbildung 31: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO₄₁ in CDCl_3
Ausschnitt: 84-44 ppm

CS_PO_41b in cdd3 (APT), 26.11.2014

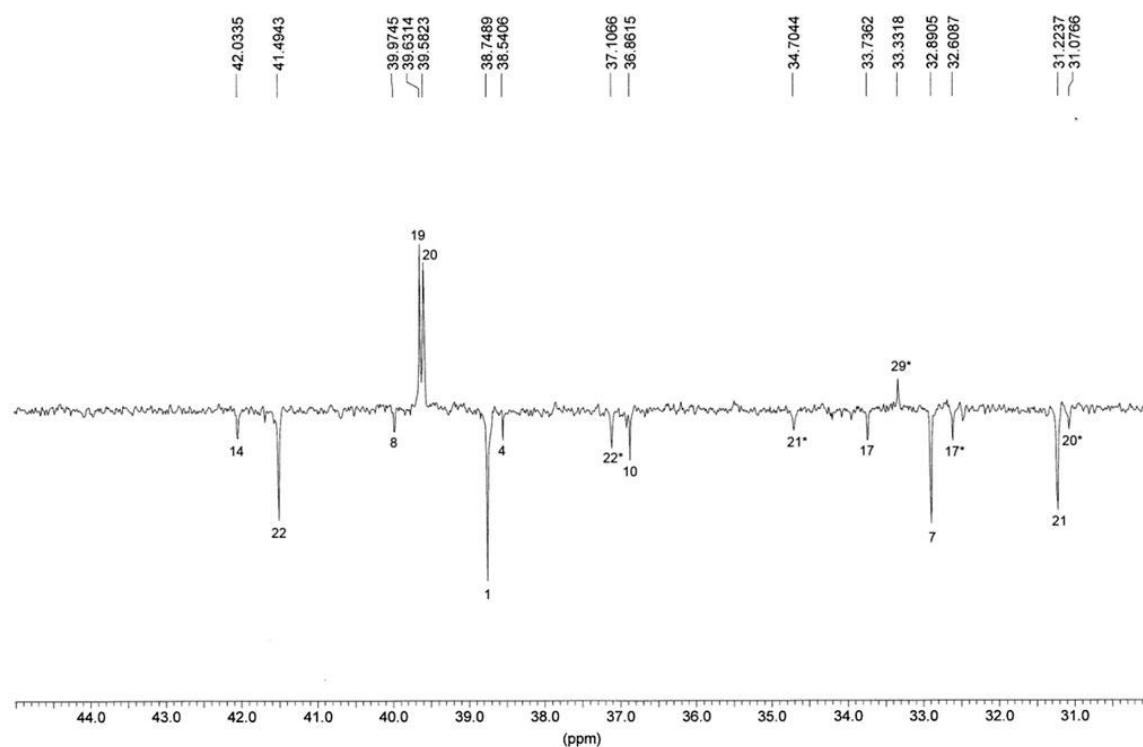


Abbildung 32: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl_3
Ausschnitt: 44,0-31,0 ppm

CS_PO_41b in cdd3 (APT), 26.11.2014

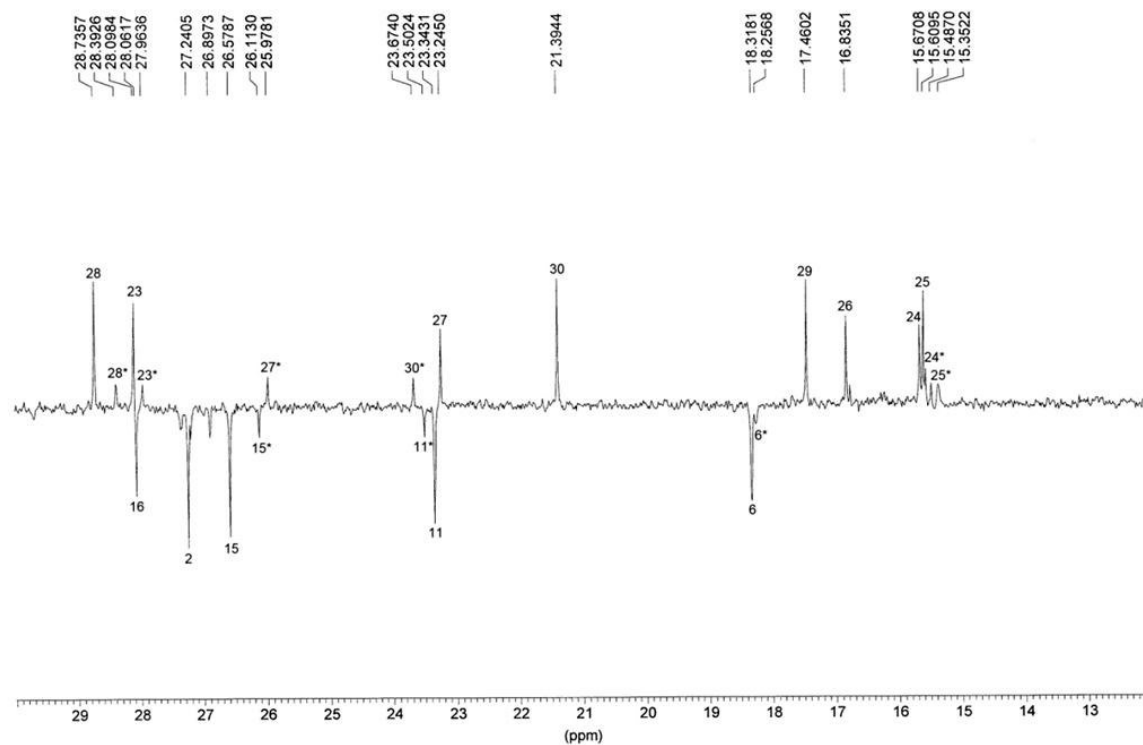


Abbildung 33: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl_3
Ausschnitt: 29-13 ppm

CS_PO_41b in cdcl3 (HSQC neu), 26.11.2014

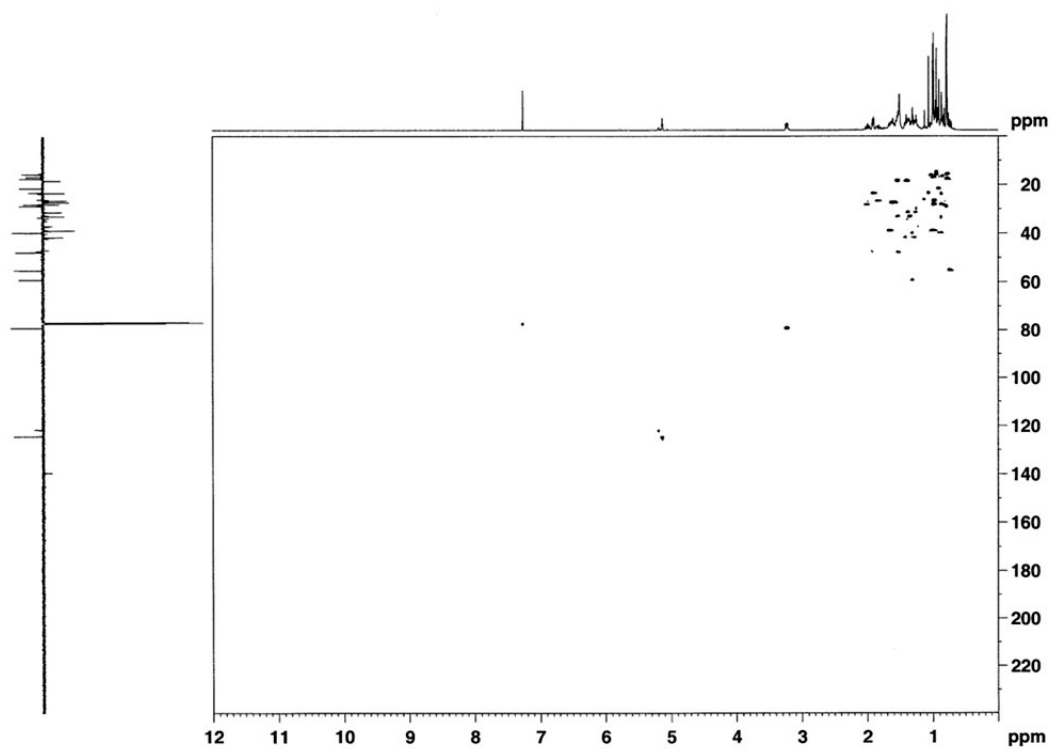


Abbildung 34: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl₃

CS_PO_41b in cdcl3 (HSQC neu), 26.11.2014

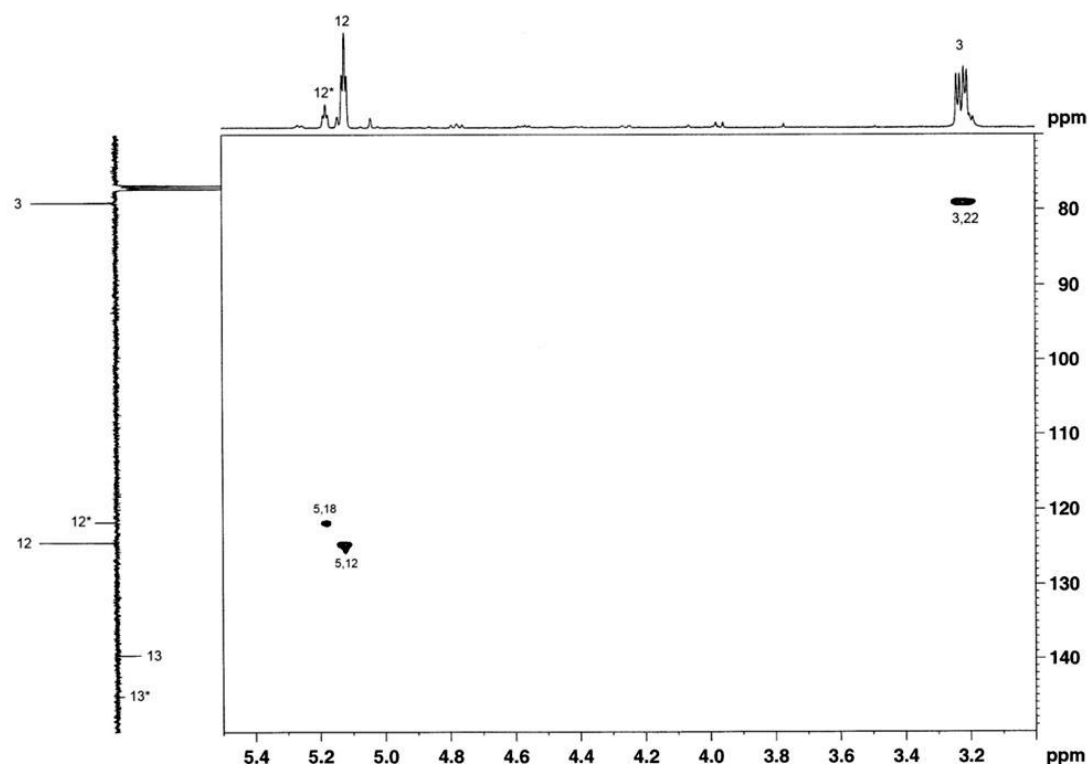


Abbildung 35: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl₃
Ausschnitt: 5,5-3,0 / 150-70 ppm

CS_PO_41b in cdcl3 (HSQC neu), 26.11.2014

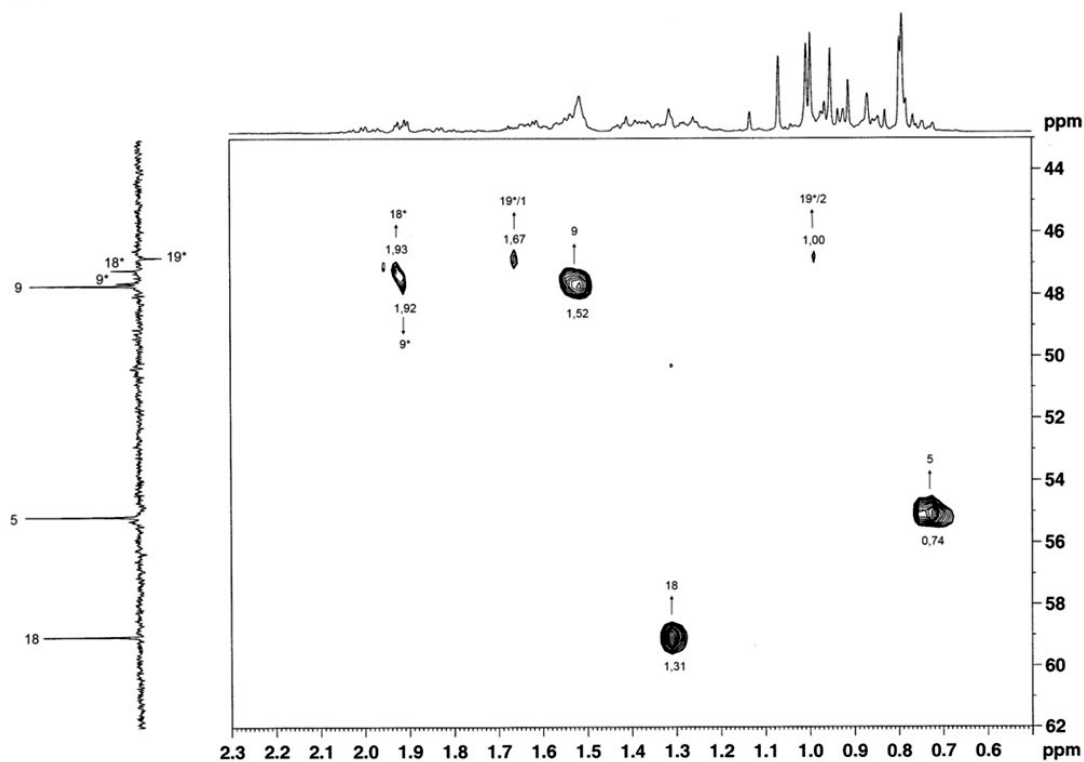


Abbildung 36: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₁ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,3-0,5 / 62-43 ppm

CS_PO_41b in cdcl3 (HSQC neu), 26.11.2014

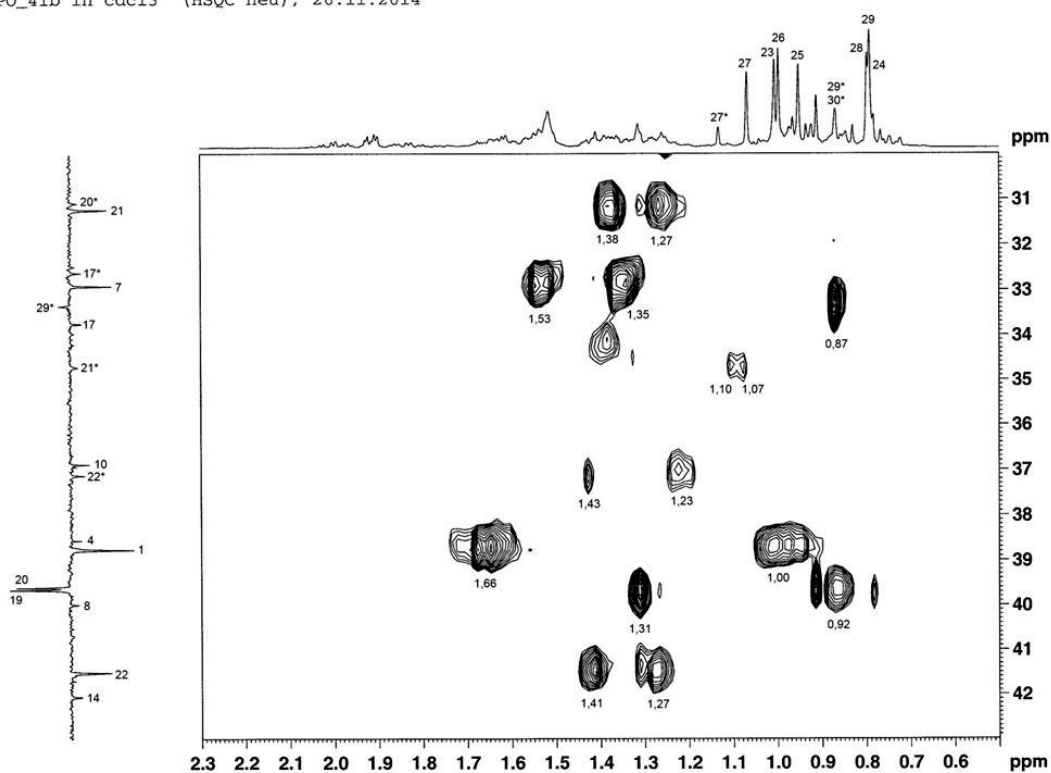
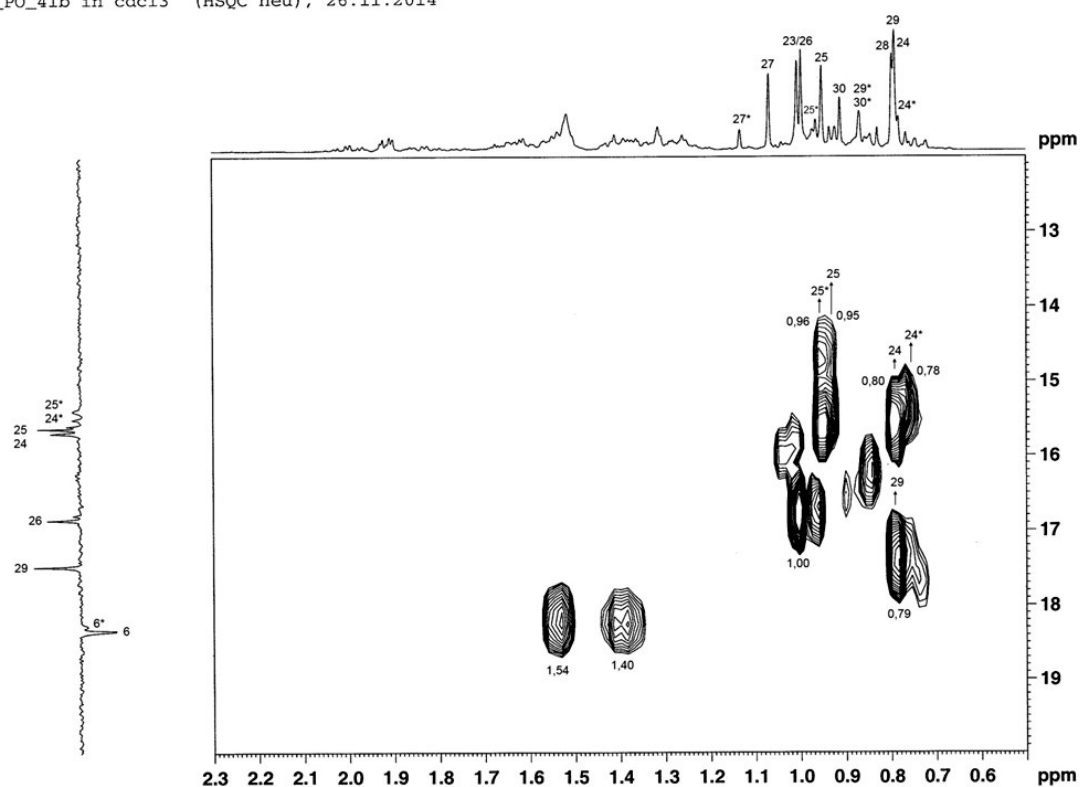


Abbildung 37: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₁ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,3-0,5 / 43-30 ppm

CS_PO_41b in cdc13 (HSQC neu), 26.11.2014



**Abbildung 39: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl₃
Ausschnitt: 2,3-0,5 / 20-12 ppm**

CS_PO_41b in cdcl3 (COSY 45), 26.11.2014

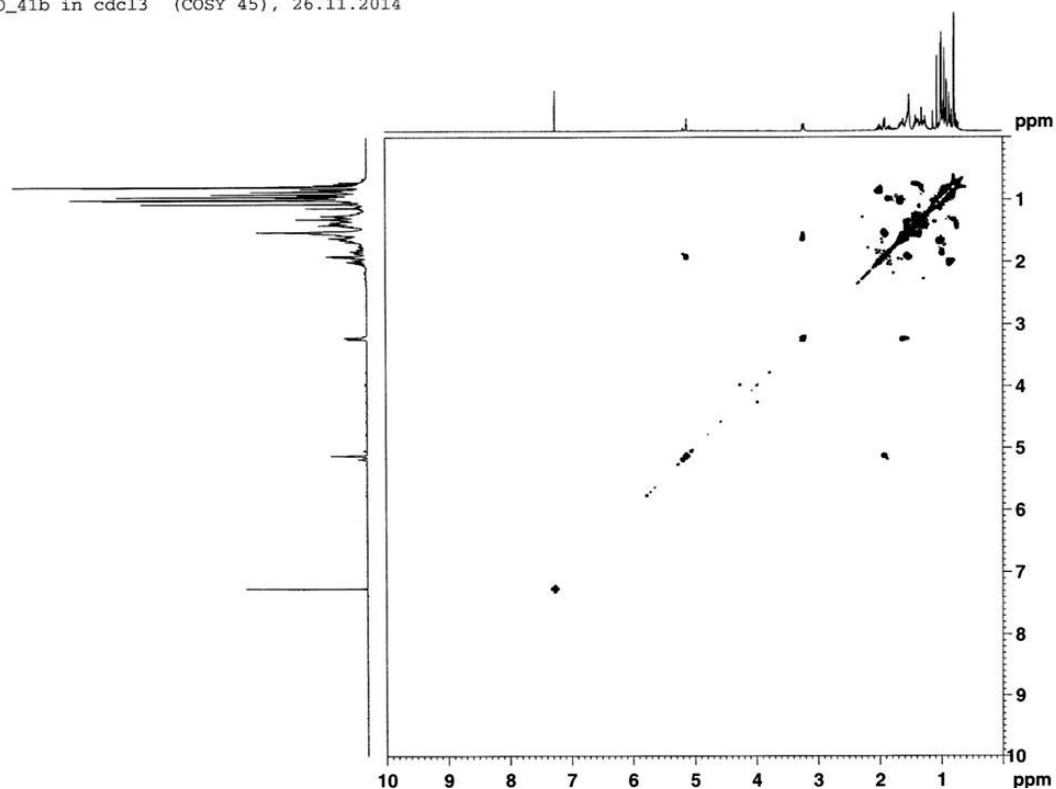


Abbildung 40: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl_3

CS_PO_41b in cdcl3 (COSY 45), 26.11.2014

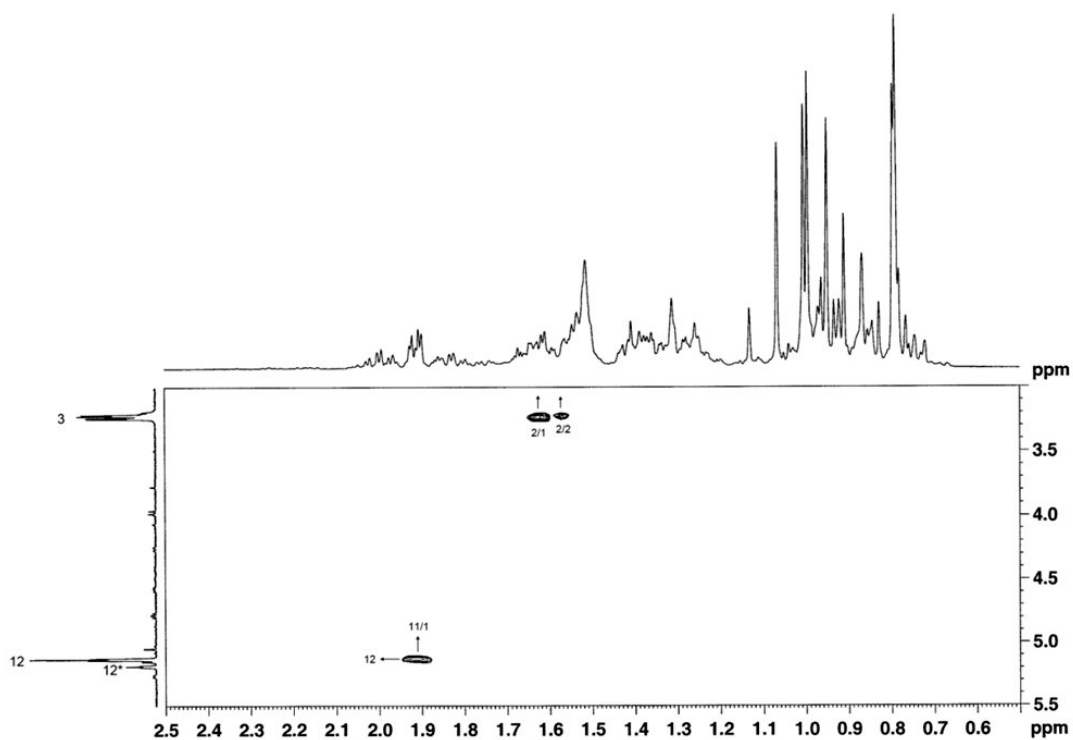


Abbildung 41: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl_3
Ausschnitt: 2,5-0,5 / 5,5-3,0 ppm

CS_PO_41b in cdcl3 (HMBC), 26.11.2014

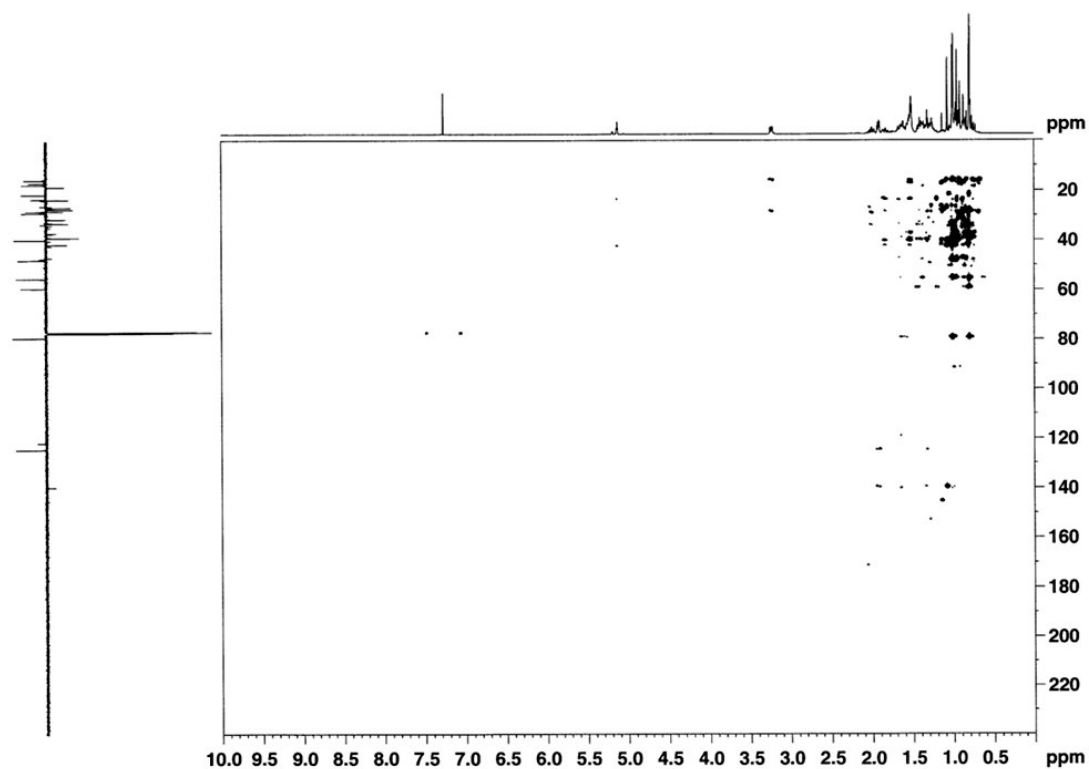


Abbildung 42: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl₃

CS_PO_41b in cdcl3 (HMBC), 26.11.2014

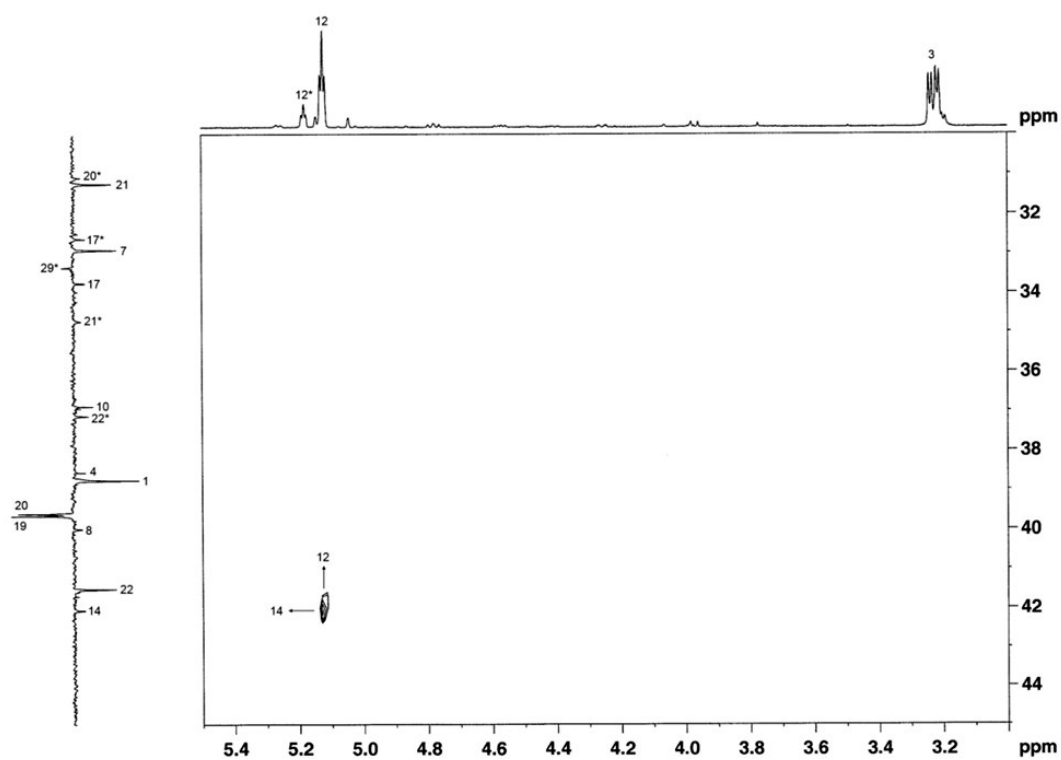


Abbildung 43: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl₃
Ausschnitt: 5,5-3,0 / 45-30 ppm

CS_PO_41b in cdc13 (HMBC), 26.11.2014

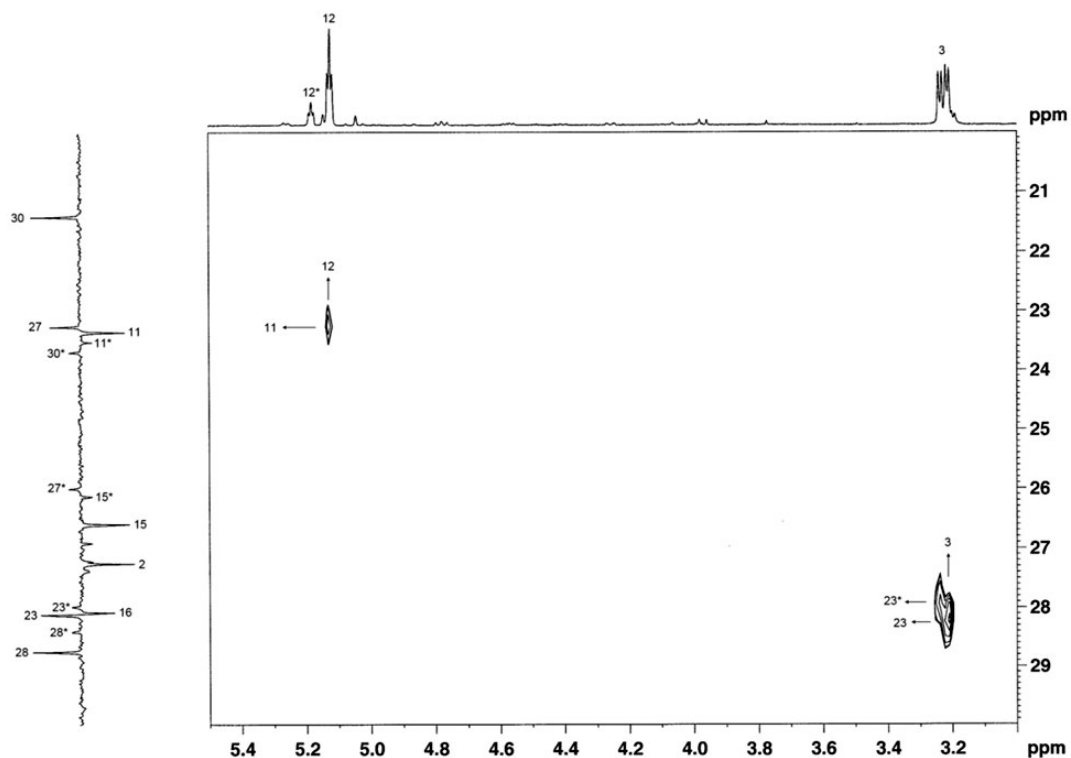


Abbildung 44: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₁ in CDCl₃
Ausschnitt: 5,5-3,0 / 30-20 ppm

CS_PO_41b in cdc13 (HMBC), 26.11.2014

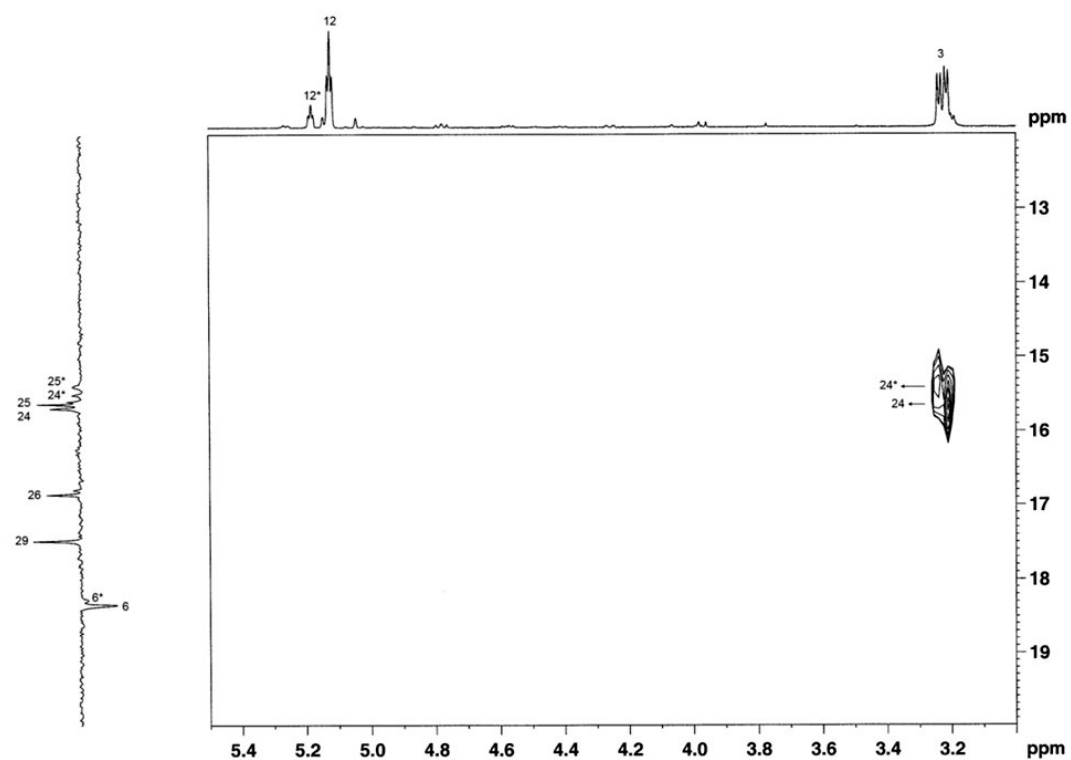


Abbildung 45: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₁ in CDCl₃
Ausschnitt: 5,5-3,0 / 20-12 ppm

CS_PO_41b in cdc13 (HMBC), 26.11.2014

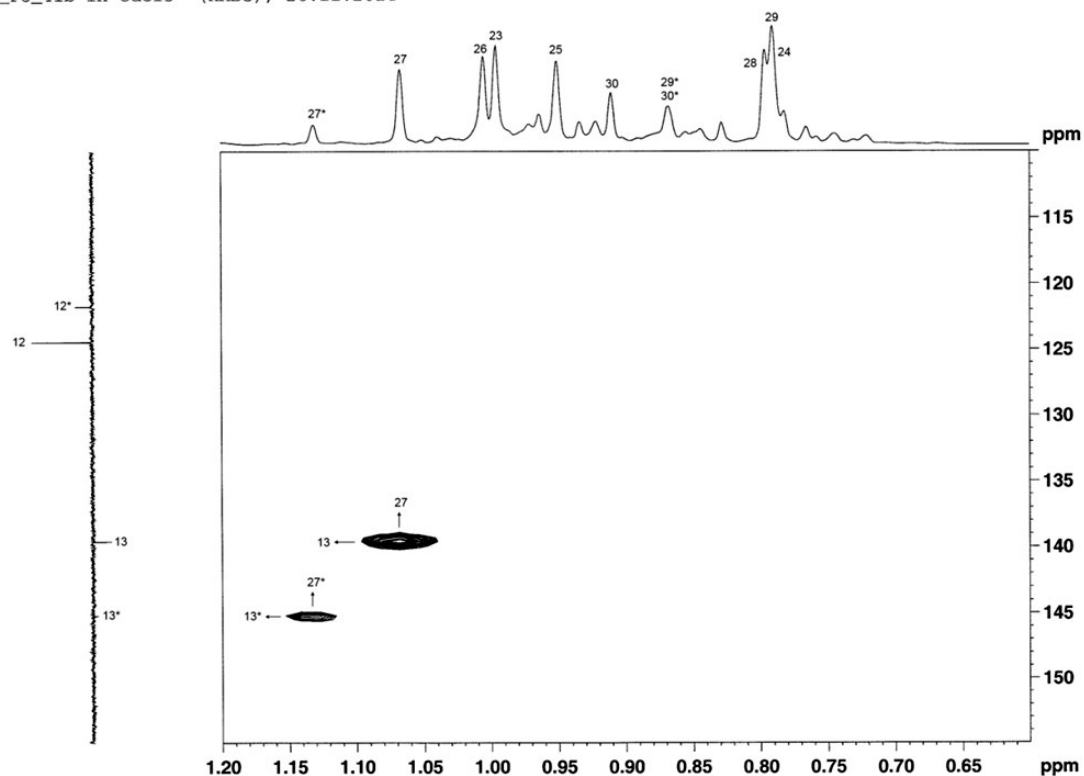


Abbildung 46: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl₃
Ausschnitt: 1,20-0,60 / 160-110 ppm

CS_PO_41b in cdc13 (HMBC), 26.11.2014

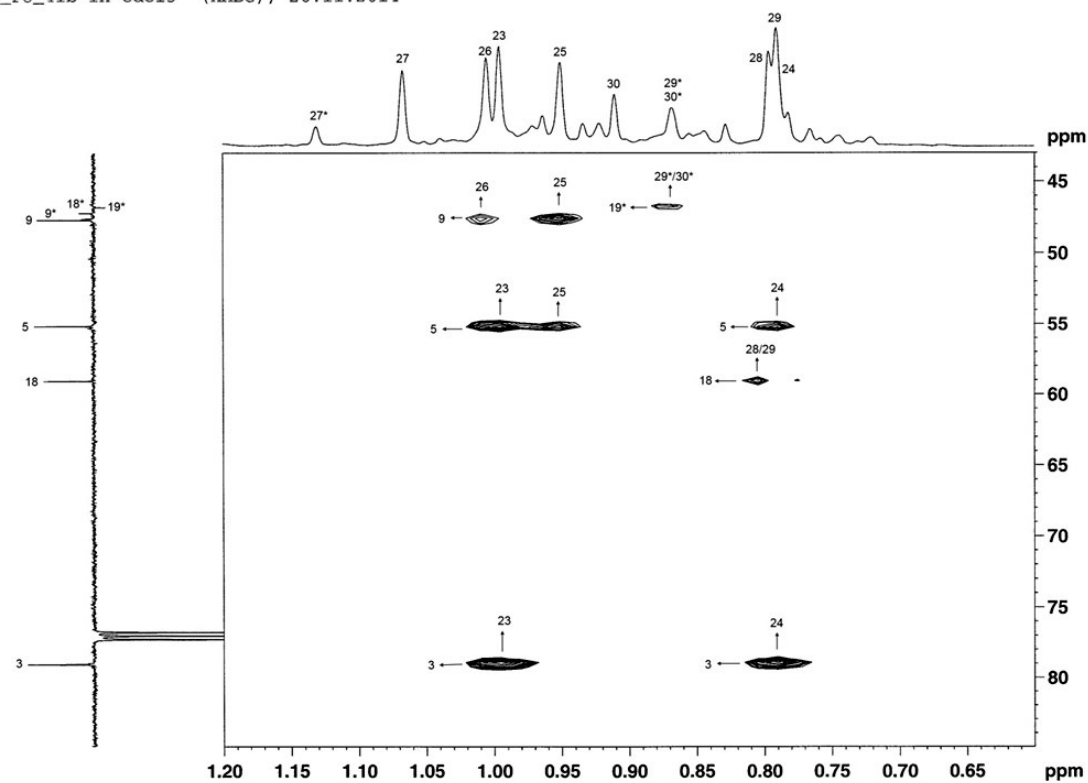
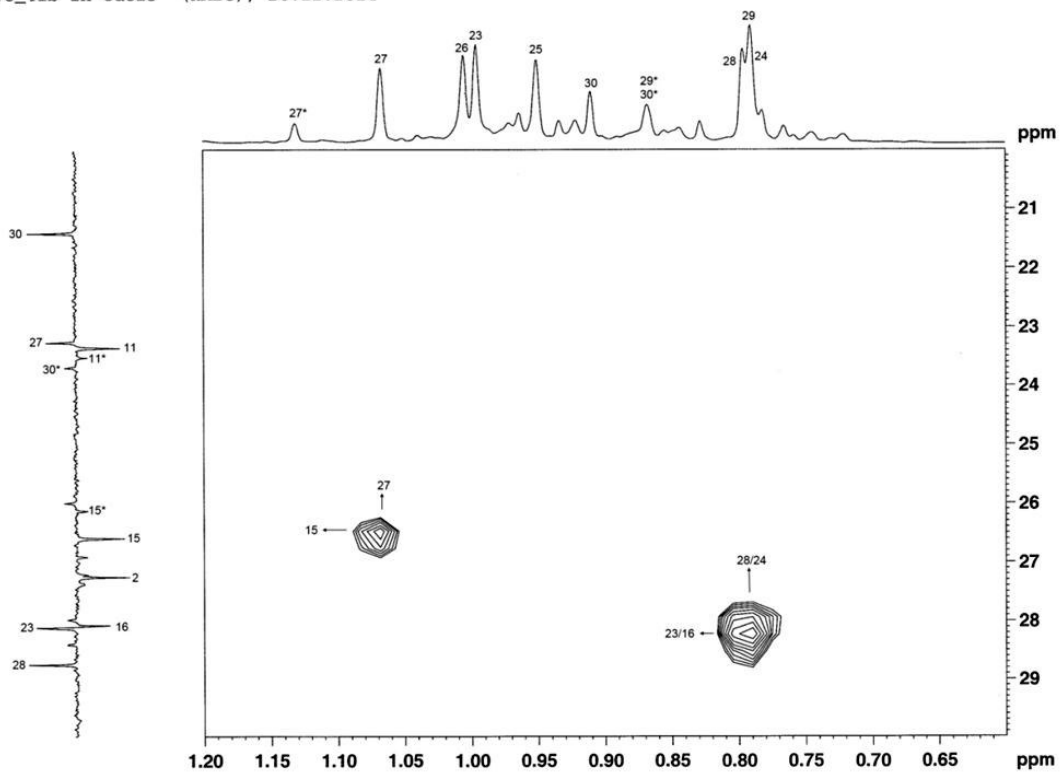


Abbildung 47: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_41 in CDCl₃
Ausschnitt: 1,20-0,60 / 85-45 ppm

The figure displays a 2D contour plot of ^{13}C NMR spectra for poly(2-vinylpyridine). The horizontal axis represents the chemical shift in ppm, ranging from 1.20 to 0.65. The vertical axis represents the chemical shift in ppm, ranging from 32 to 44. The plot shows correlations between two regions: the 100-120 ppm region (top) and the 75-90 ppm region (bottom). Peaks are labeled with numbers 1 through 30, and some are labeled with asterisks (e.g., 27*, 29*, 30*). The plot is divided into four quadrants by a vertical line at approximately 0.95 ppm. The top-left quadrant shows correlations between peaks 27, 26, 23, 25, 30, 29*, and 30*. The top-right quadrant shows correlations between peaks 28, 24, 29, and 28*. The bottom-left quadrant shows correlations between peaks 27, 26, 23, 25, 30, 29*, and 30*. The bottom-right quadrant shows correlations between peaks 28, 24, 29, and 28*.

CS_PO_41b in cdcl3 (HMBC), 26.11.2014



XXV

Substanz PO_44

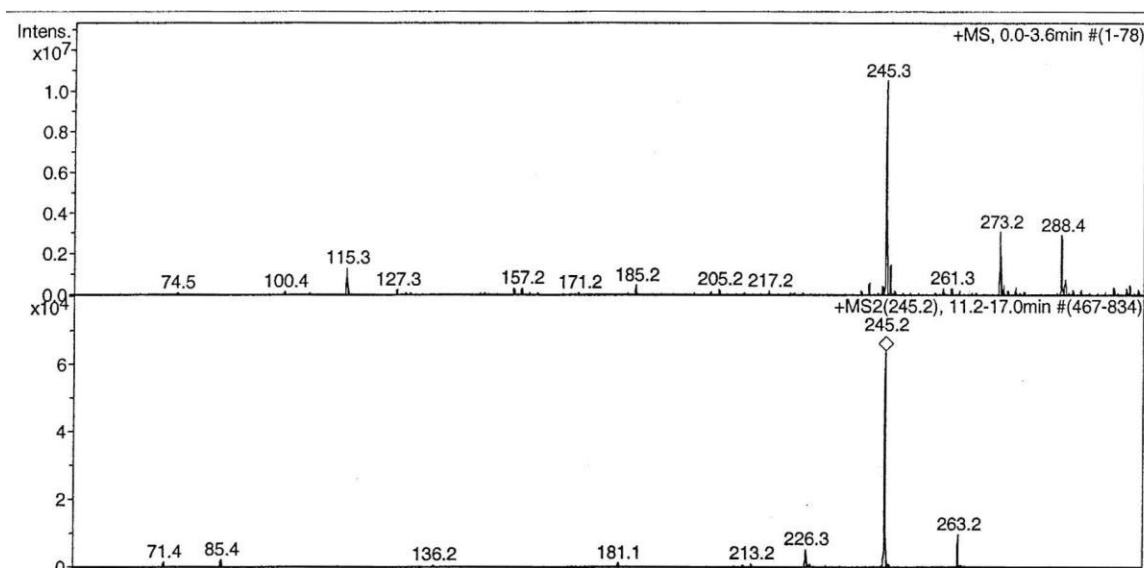


Abbildung 50: ESI-MS und ESI-MS¹ (m/z 245,2) Spektrum von Substanz PO_44

CS_PO_44 in cdd3 (Proton), 14.8.2014

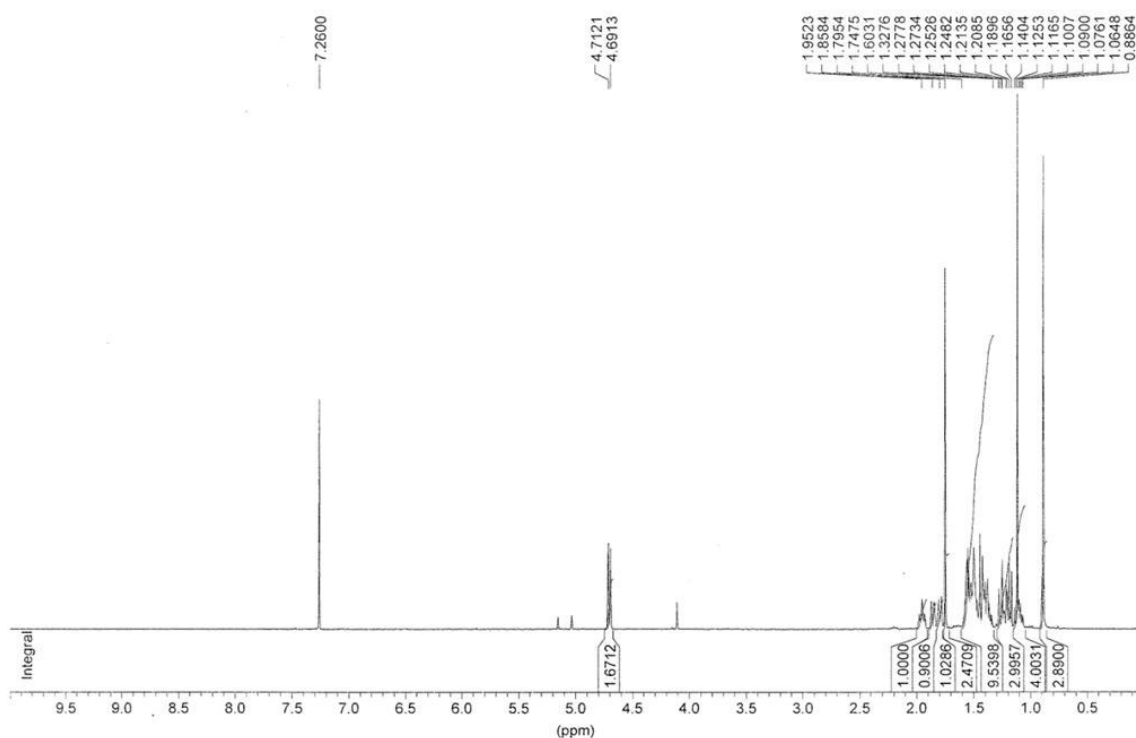


Abbildung 51: ¹H-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃

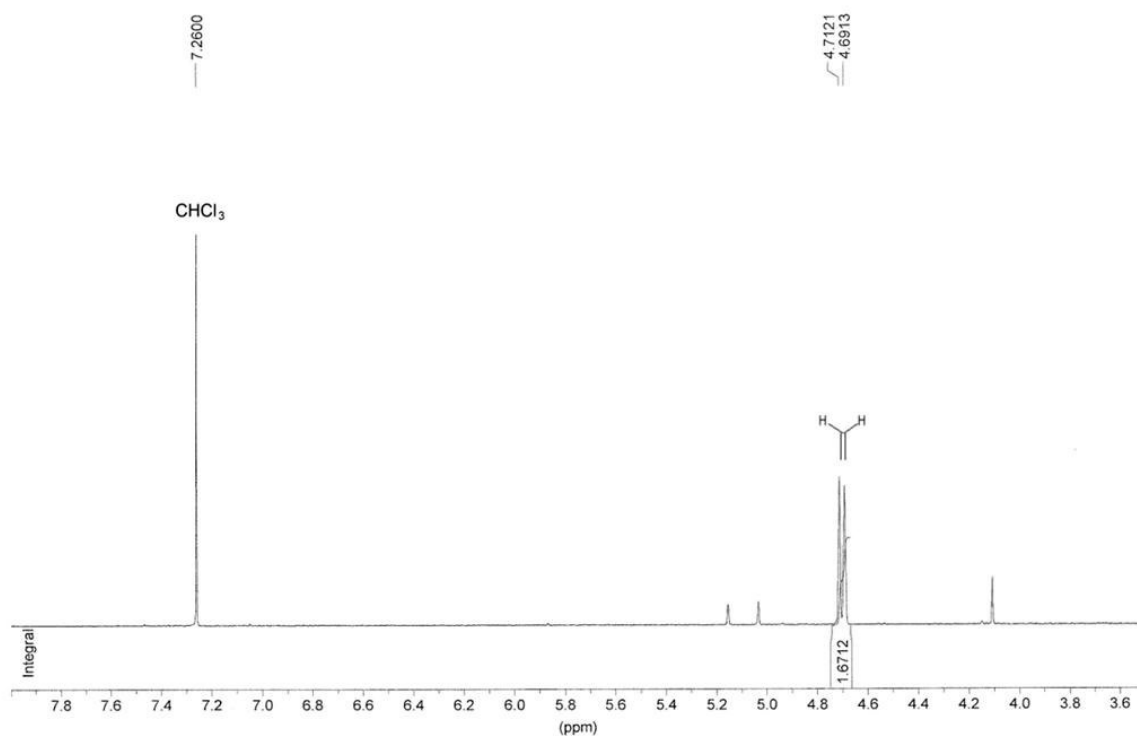


Abbildung 52: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO₄₄ in CDCl_3
Ausschnitt: 7,8-3,6 ppm

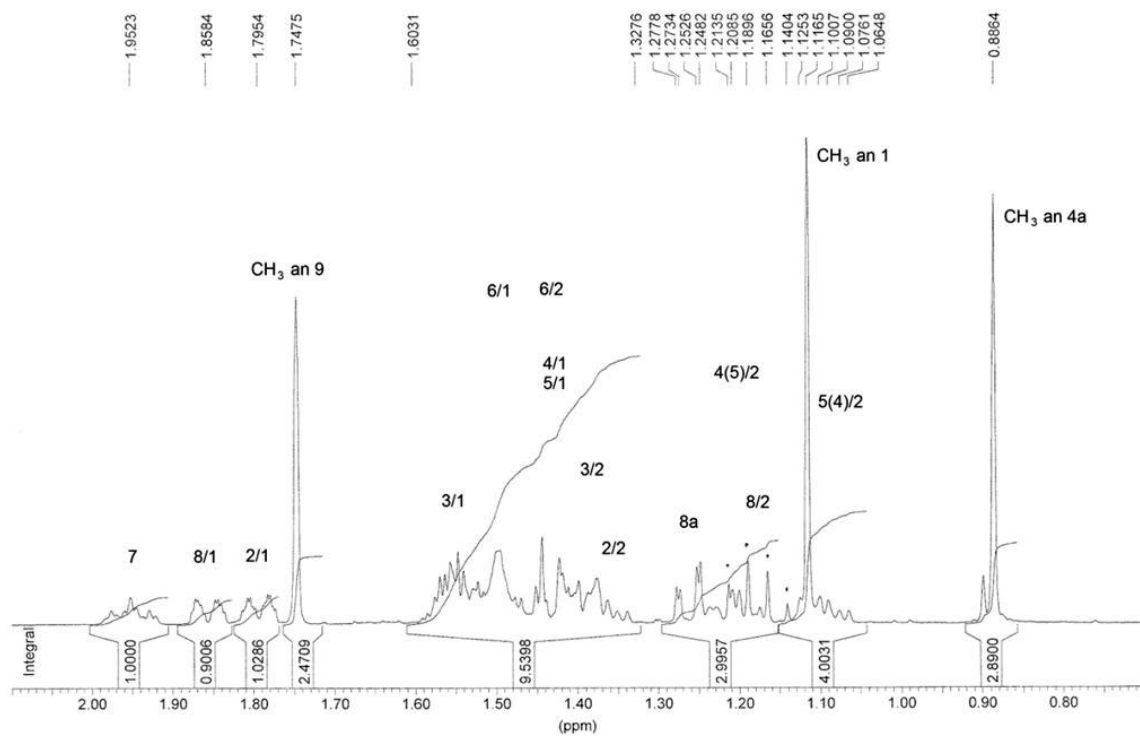


Abbildung 53: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO₄₄ in CDCl_3
Ausschnitt: 2,00-0,80 ppm

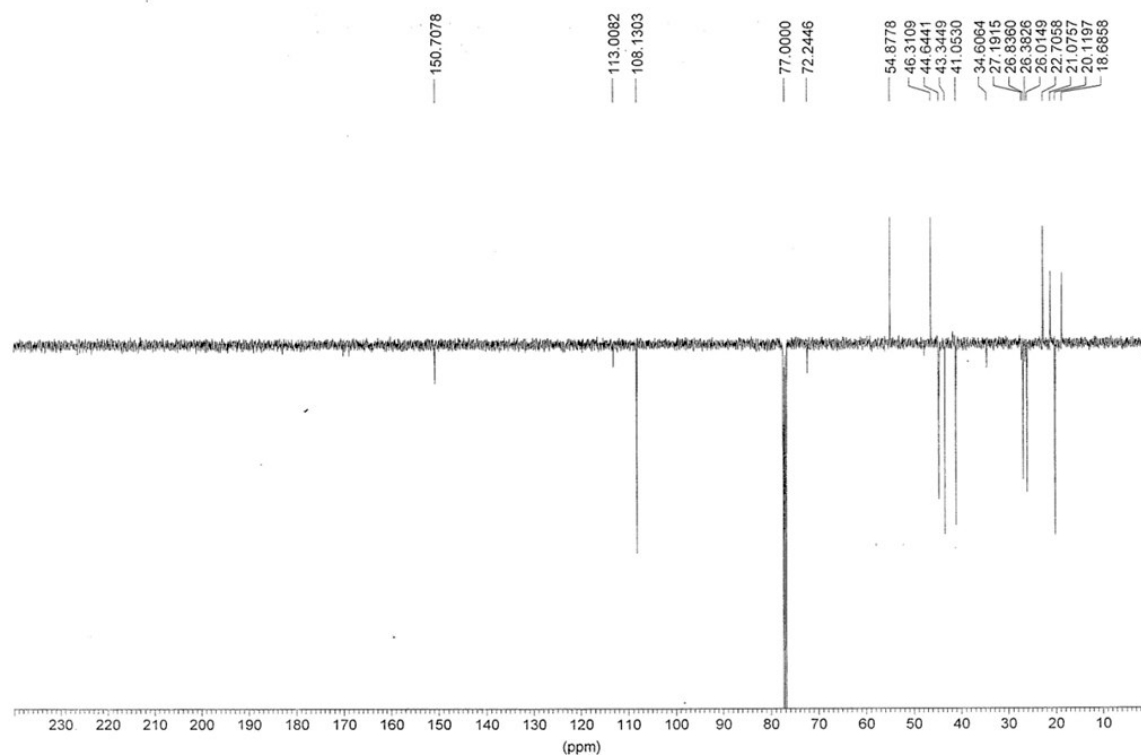


Abbildung 54: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl_3

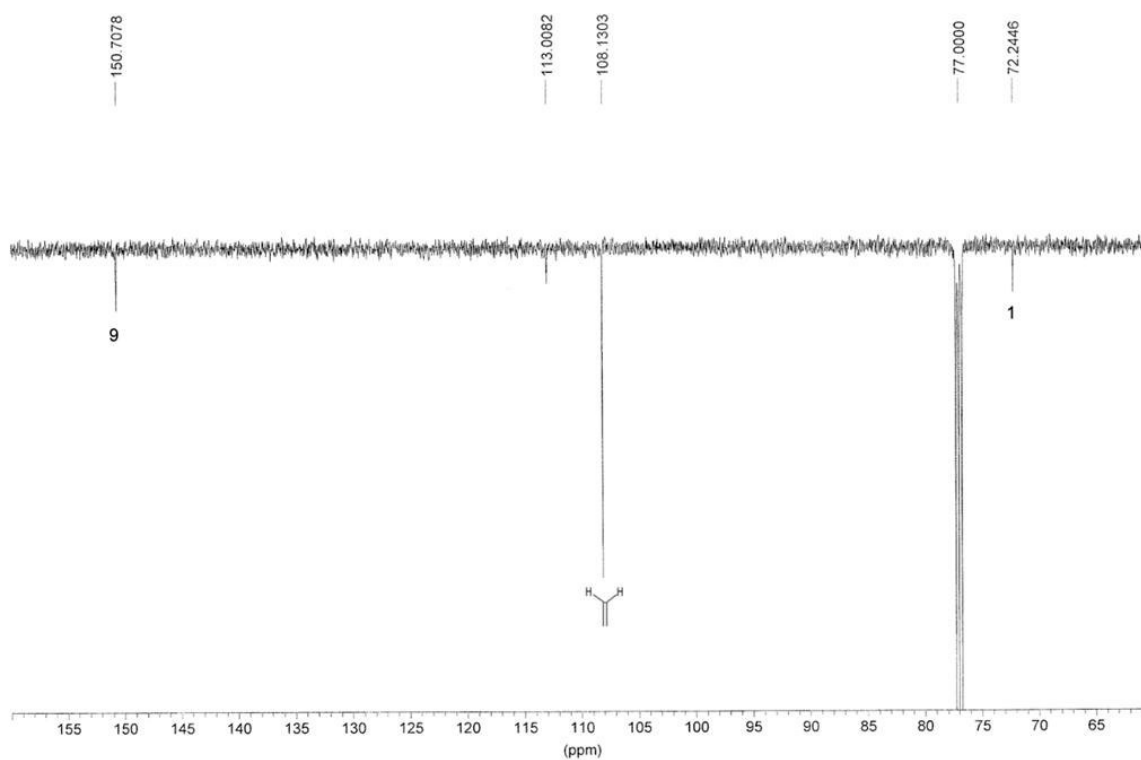


Abbildung 55: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl_3
Ausschnitt: 155-65 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (APT), 14.8.2014

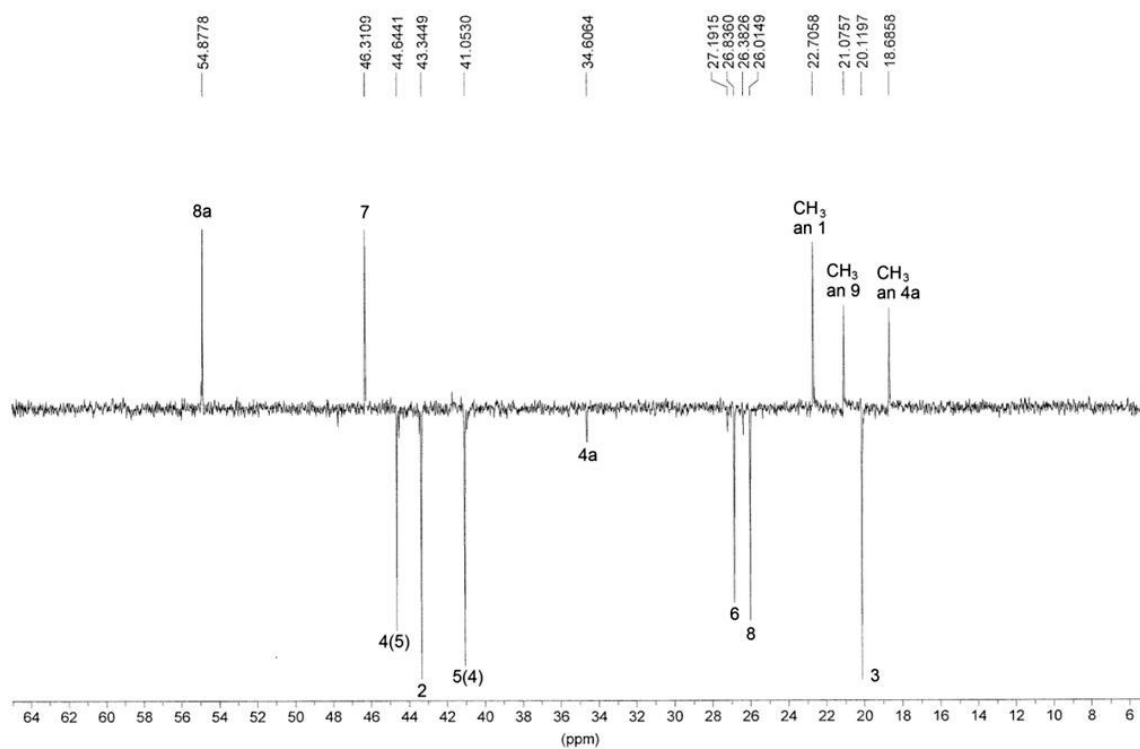


Abbildung 56: ¹³C-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 64-6 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (HSQC neu), 14.8.2014

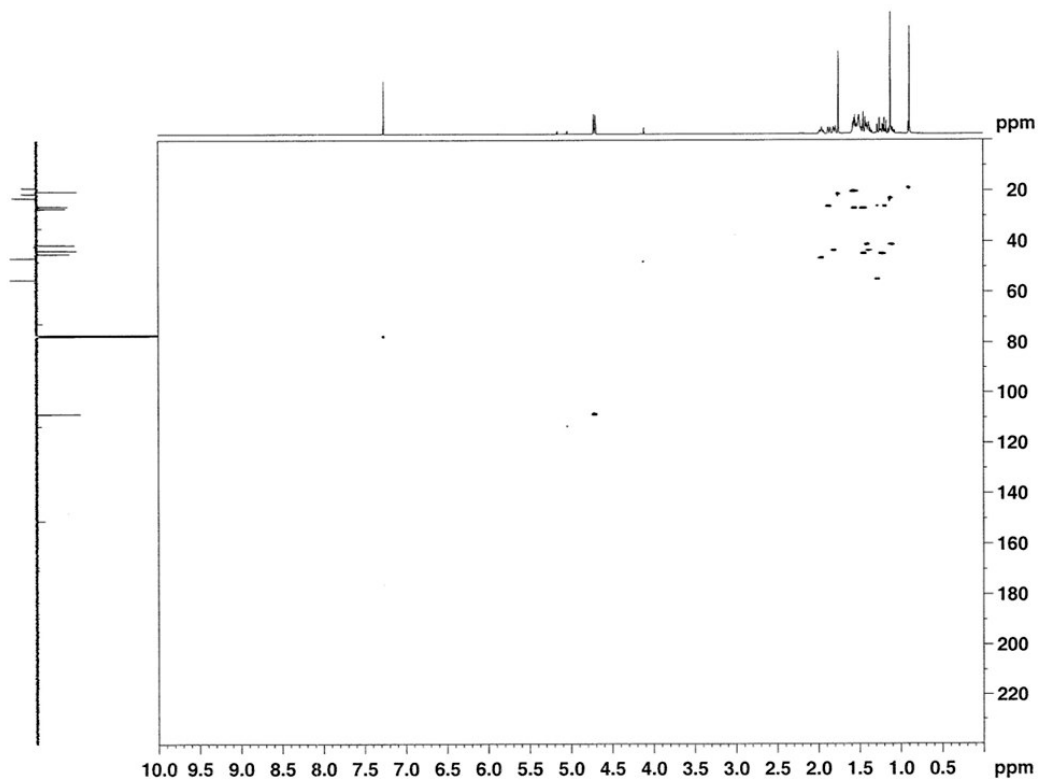


Abbildung 57: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃

CS_PO_44 in cdcl3 (HSQC neu), 14.8.2014



Abbildung 58: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₄ in CDCl₃
Ausschnitt: 5,0-4,0/ 130-100 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (HSQC neu), 14.8.2014

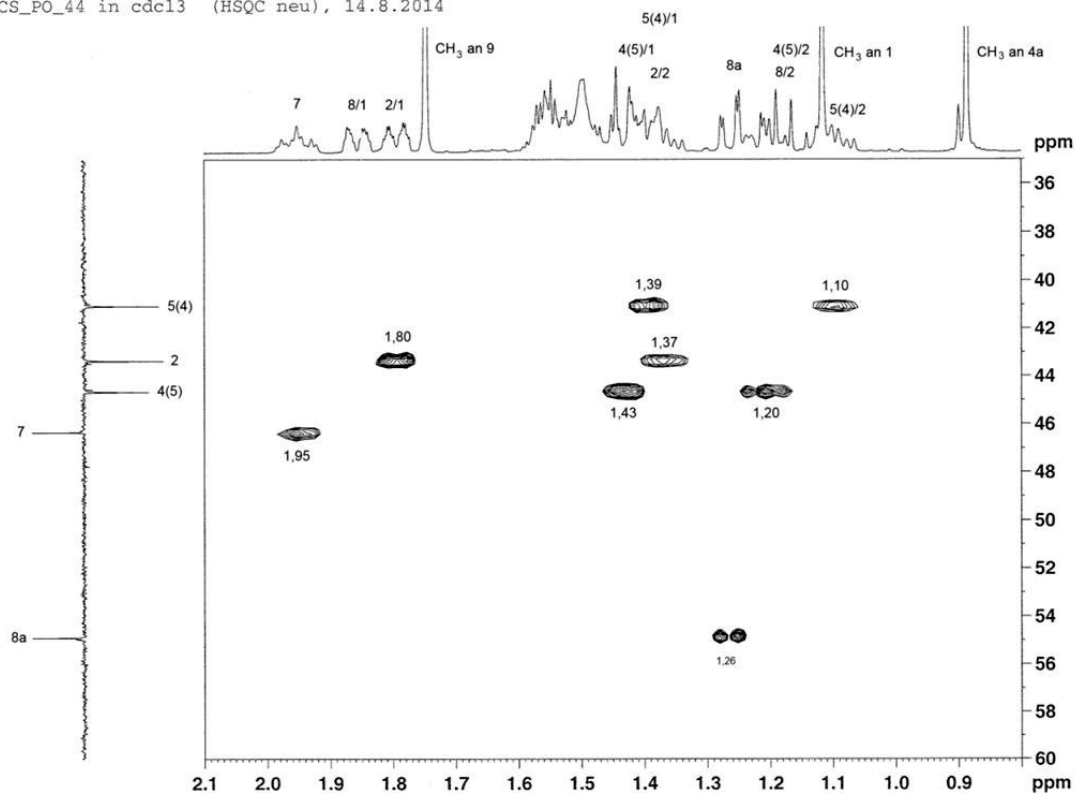


Abbildung 59: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₄ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,1-0,8 / 60-35 ppm

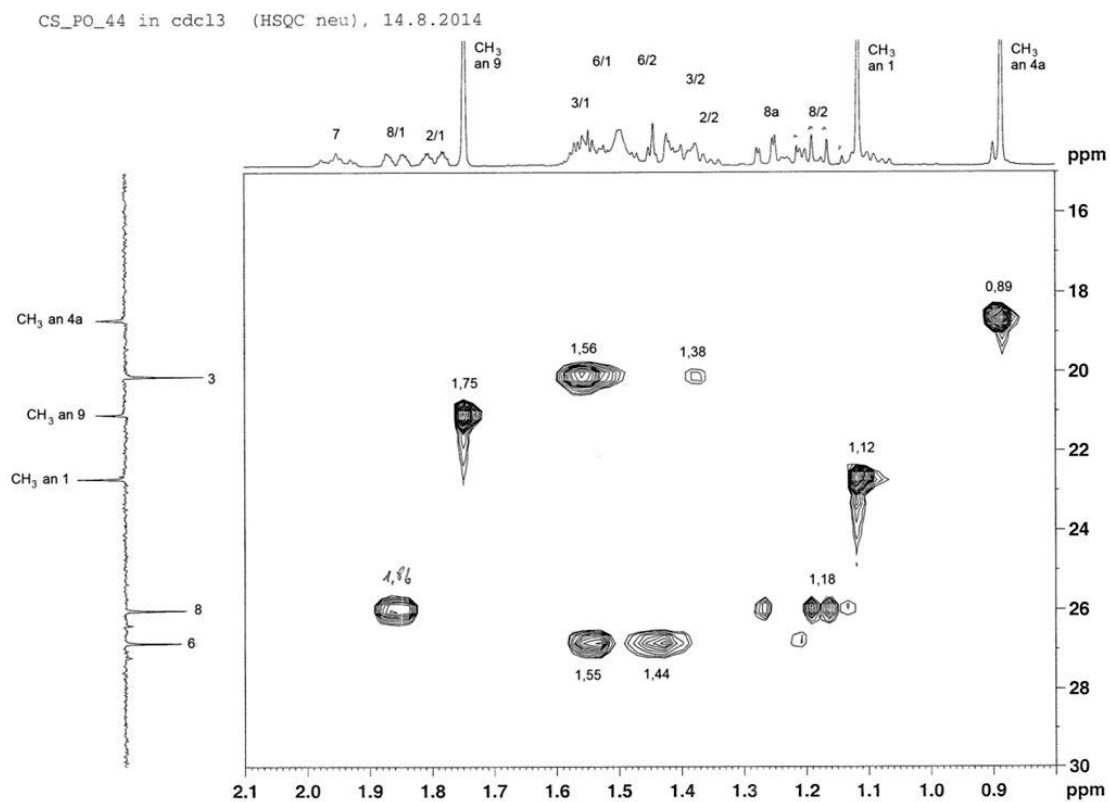


Abbildung 60: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 2,1-0,8 / 30-15 ppm

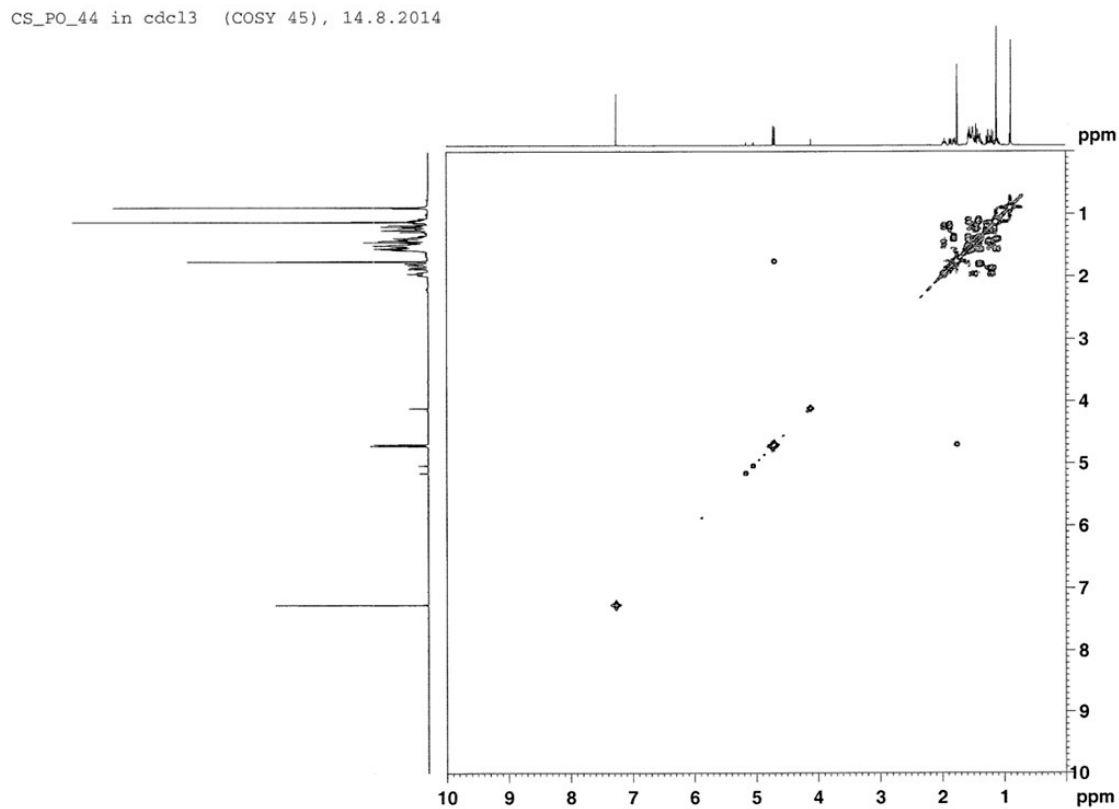


Abbildung 61: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃

CS_PO_44 in cdcl3 (COSY 45), 14.8.2014

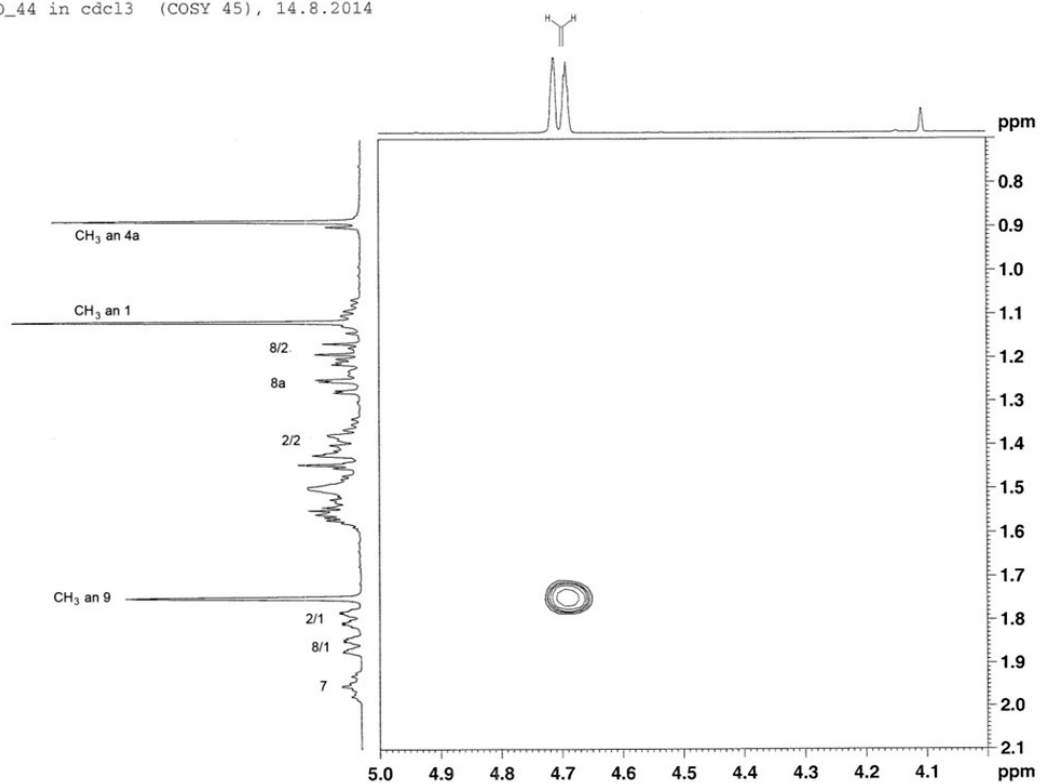


Abbildung 62: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃,
Ausschnitt: 5,0-4,0 / 2,1-0,7 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (COSY 45), 14.8.2014

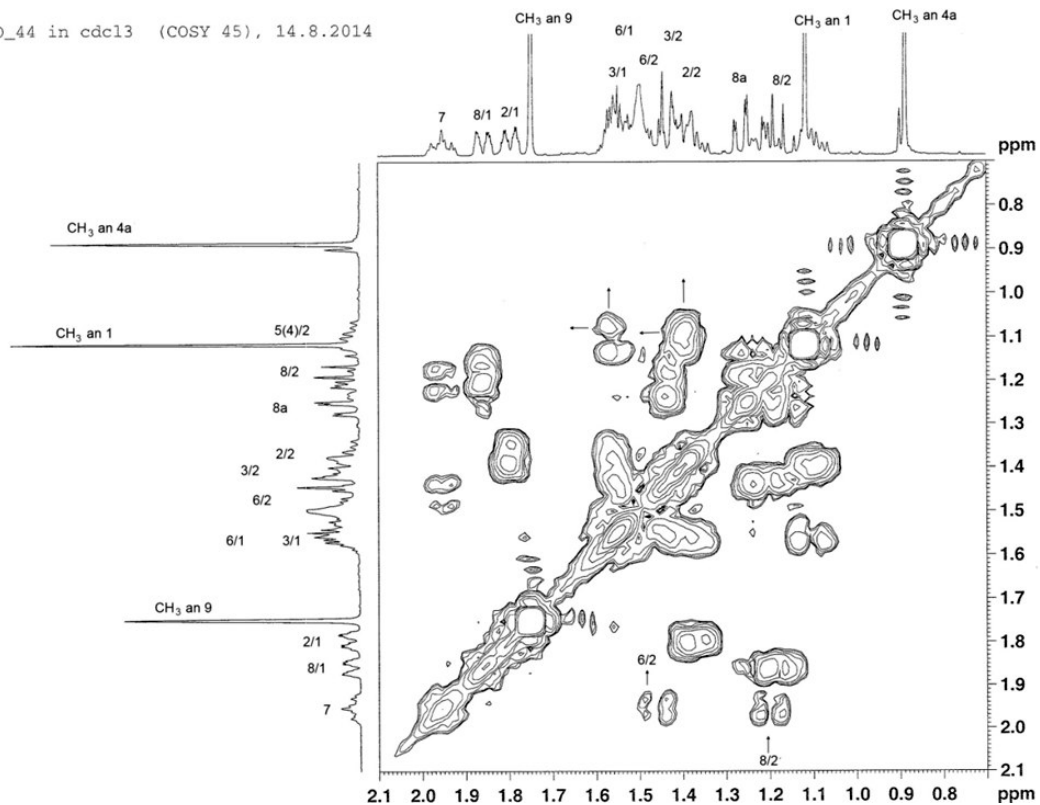


Abbildung 63: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃,
Ausschnitt: 2,1-0,7 / 2,1-0,7 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (HMBC), 14.8.2014

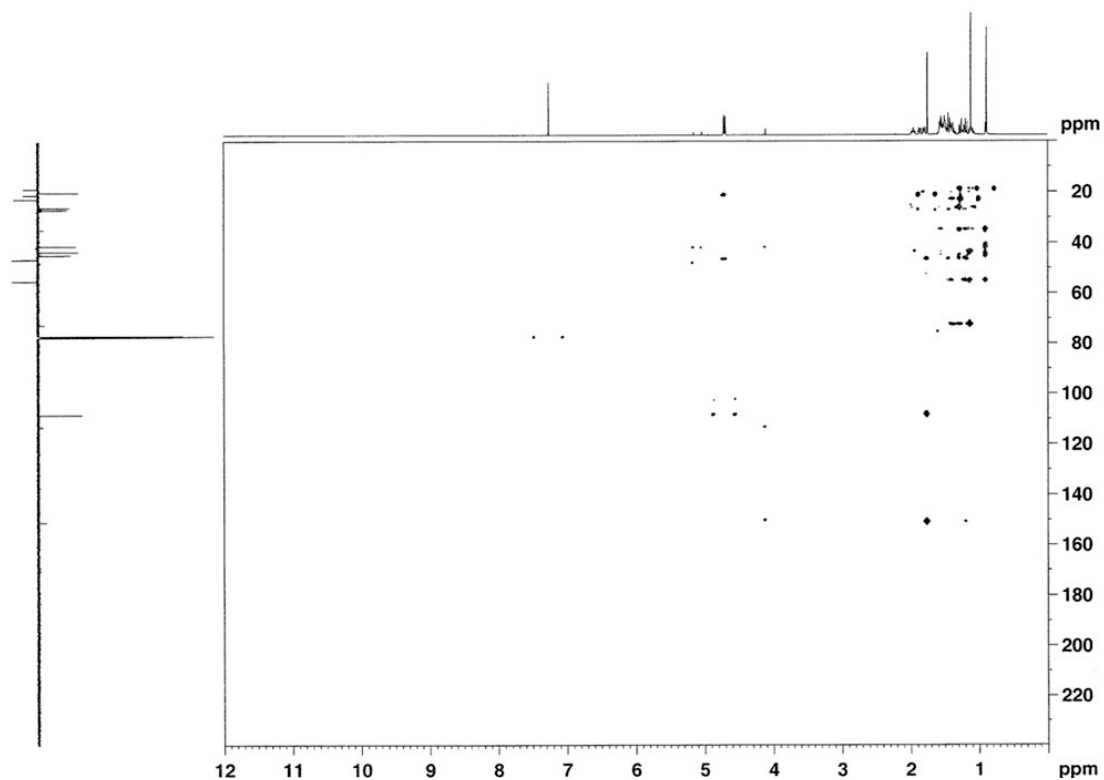


Abbildung 64: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃

CS_PO_44 in cdcl3 (HMBC), 14.8.2014

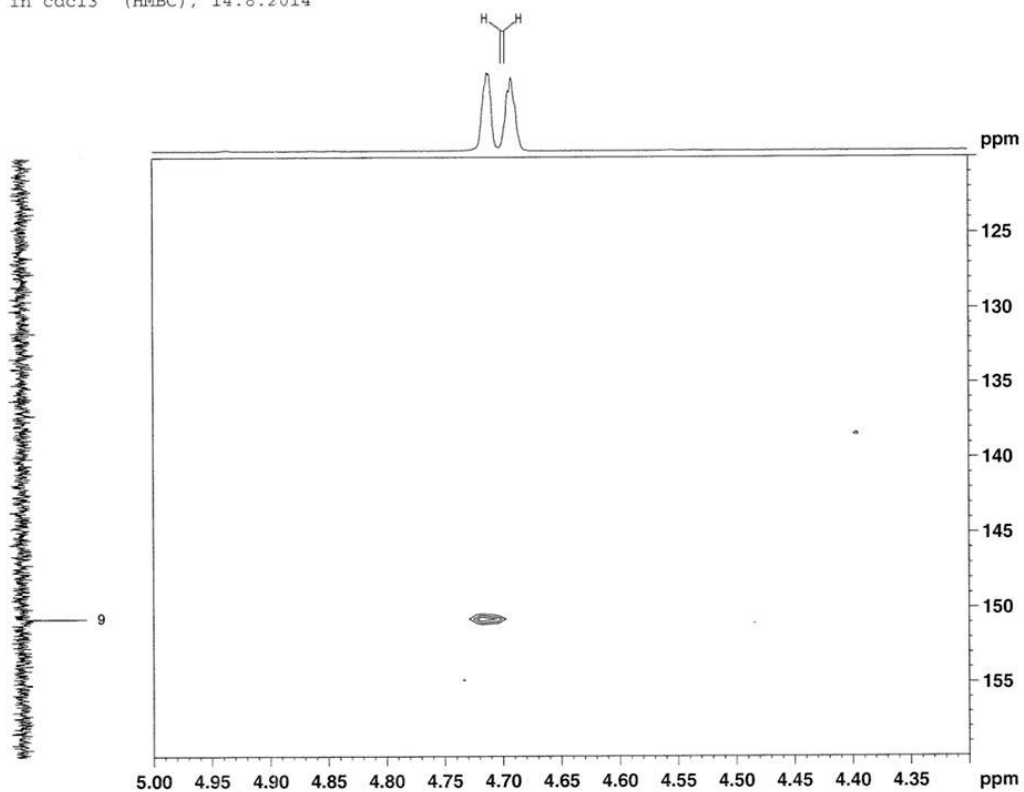


Abbildung 65: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 5,00-4,30 / 160-120 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (HMBC), 14.8.2014

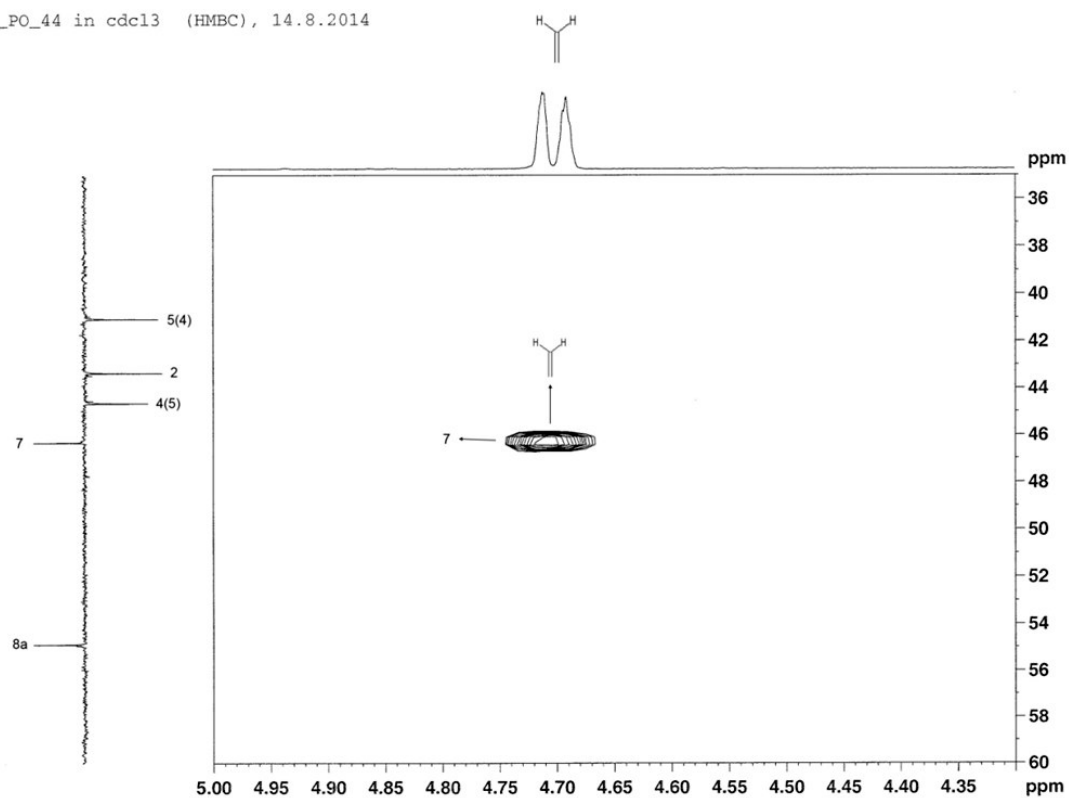


Abbildung 66: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 5,00-4,30 / 60-35 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (HMBC), 14.8.2014

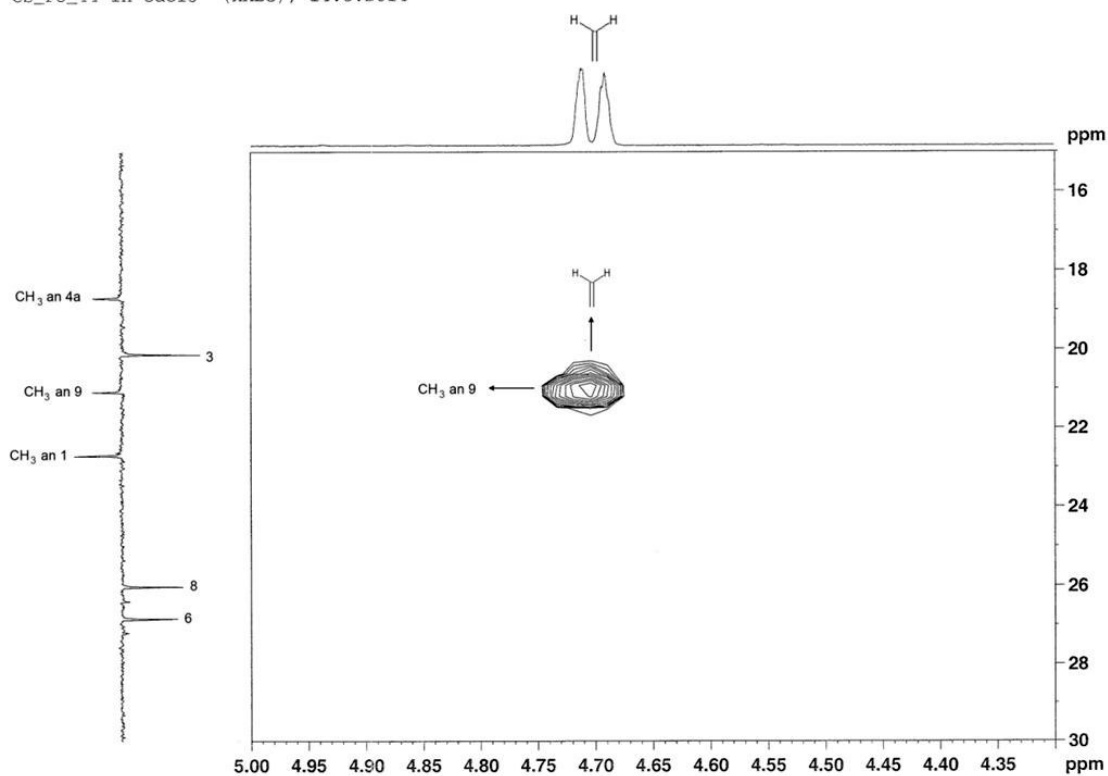


Abbildung 67: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 5,00-4,30 / 30-15 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (HMBC), 14.8.2014

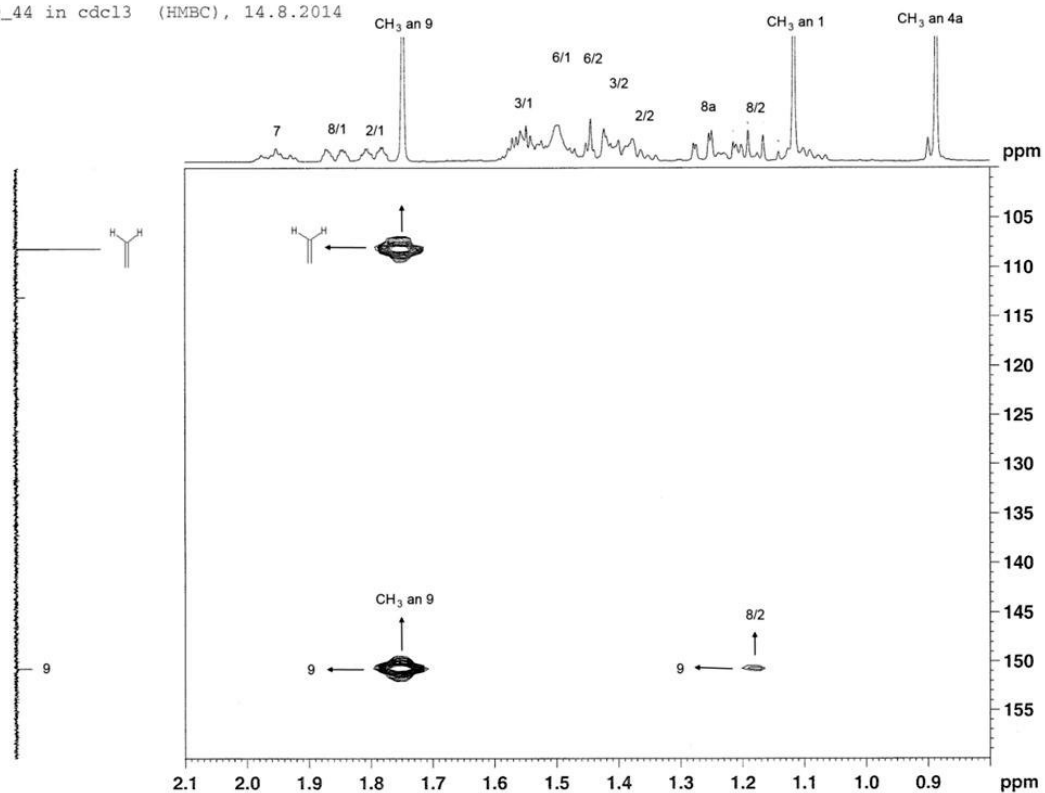


Abbildung 68: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 2,1-0,8 / 160-100 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (HMBC), 14.8.2014

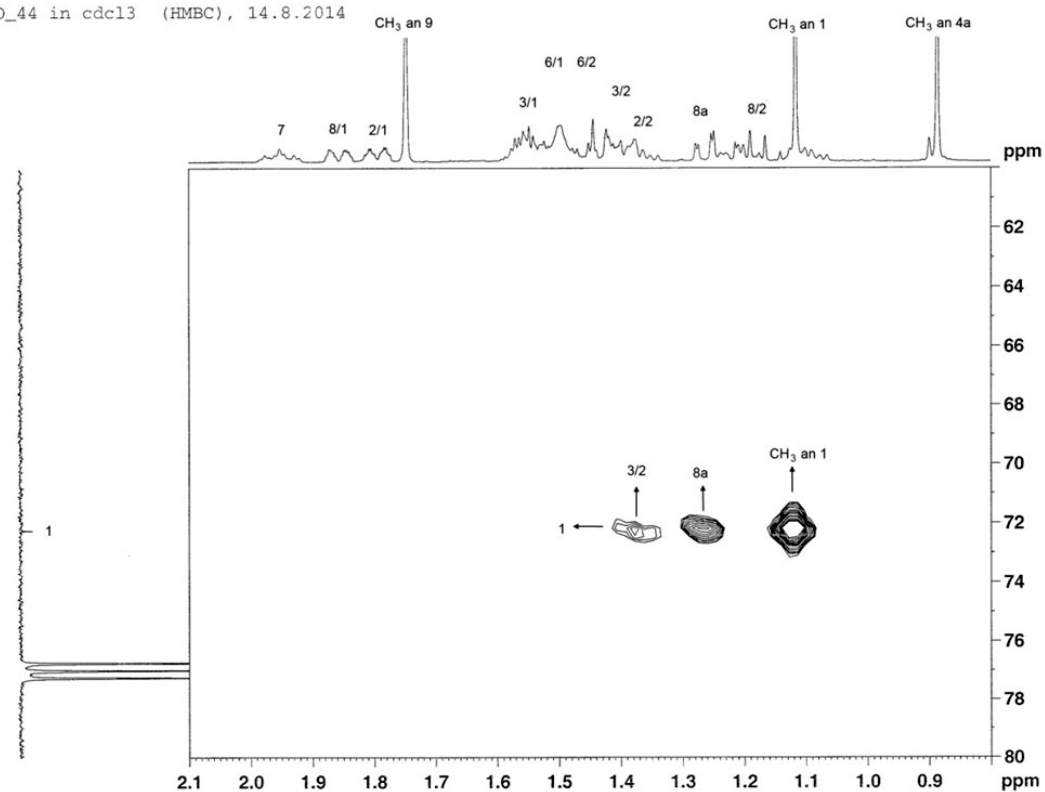


Abbildung 69: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 2,1-0,8 / 80-60 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (HMBC), 14.8.2014

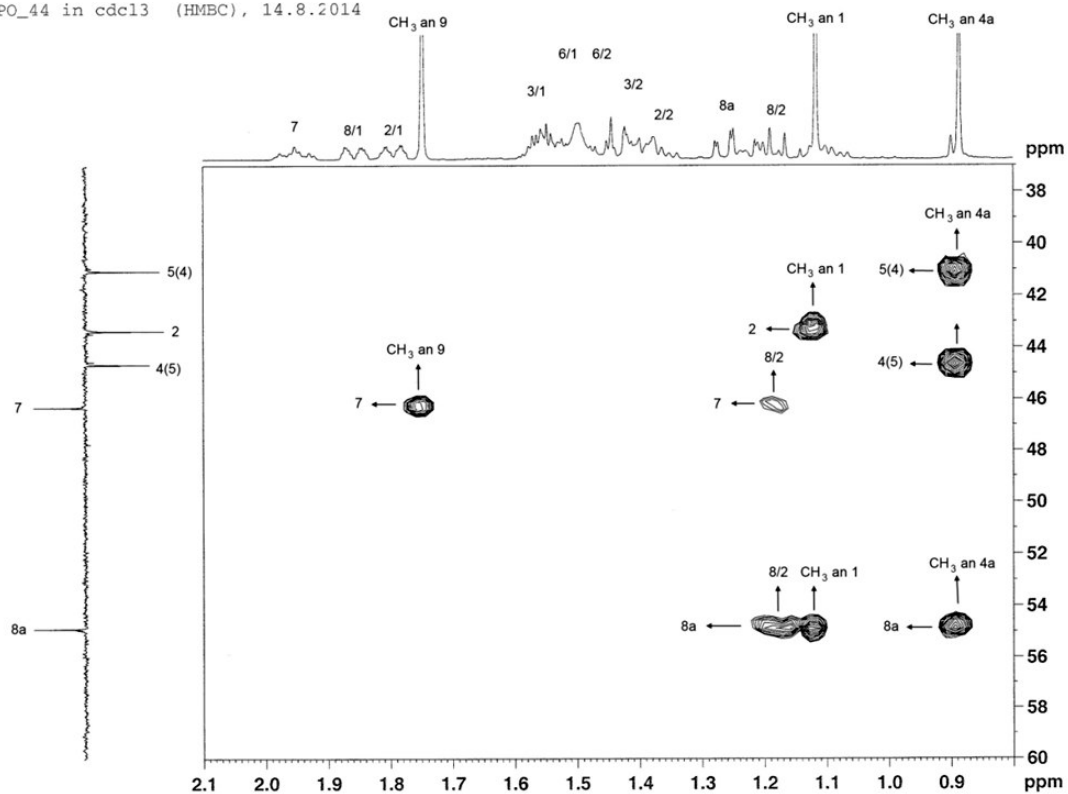


Abbildung 70: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₄ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,1-0,8 / 60-37 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (HMBC), 14.8.2014

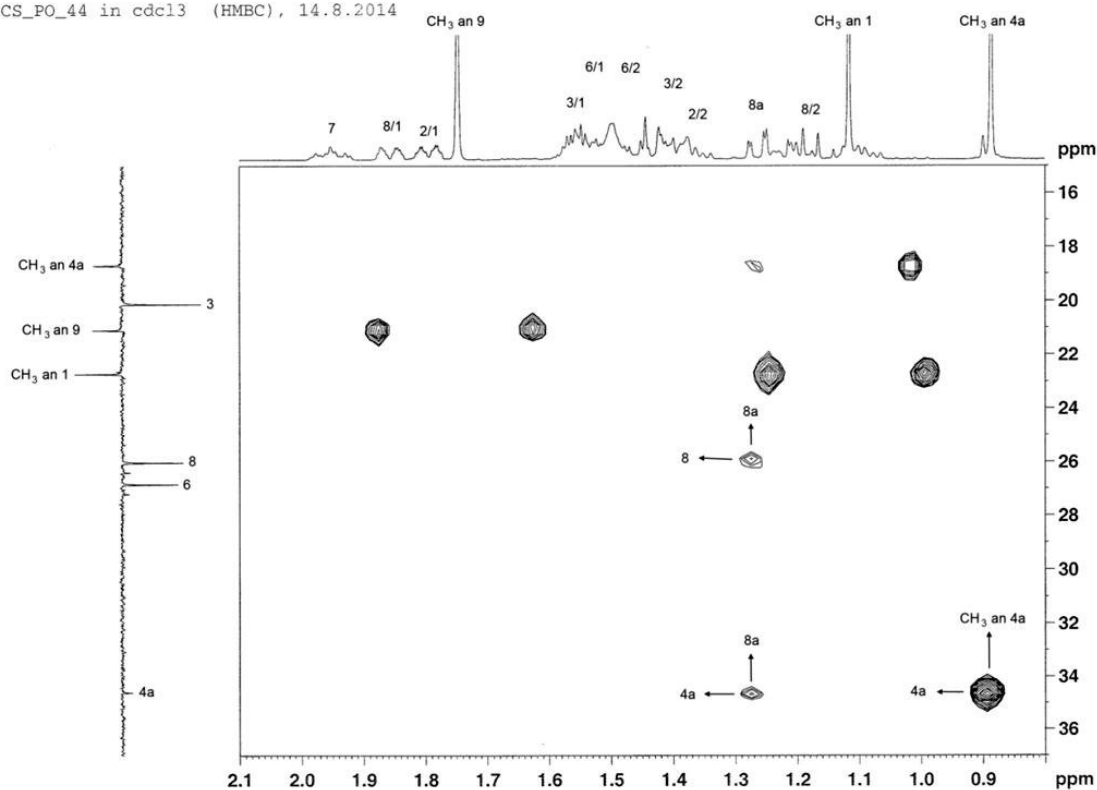


Abbildung 71: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₄ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,1-0,8 / 37-15 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (NOESY, mixing time = 2s), 14.8.2014

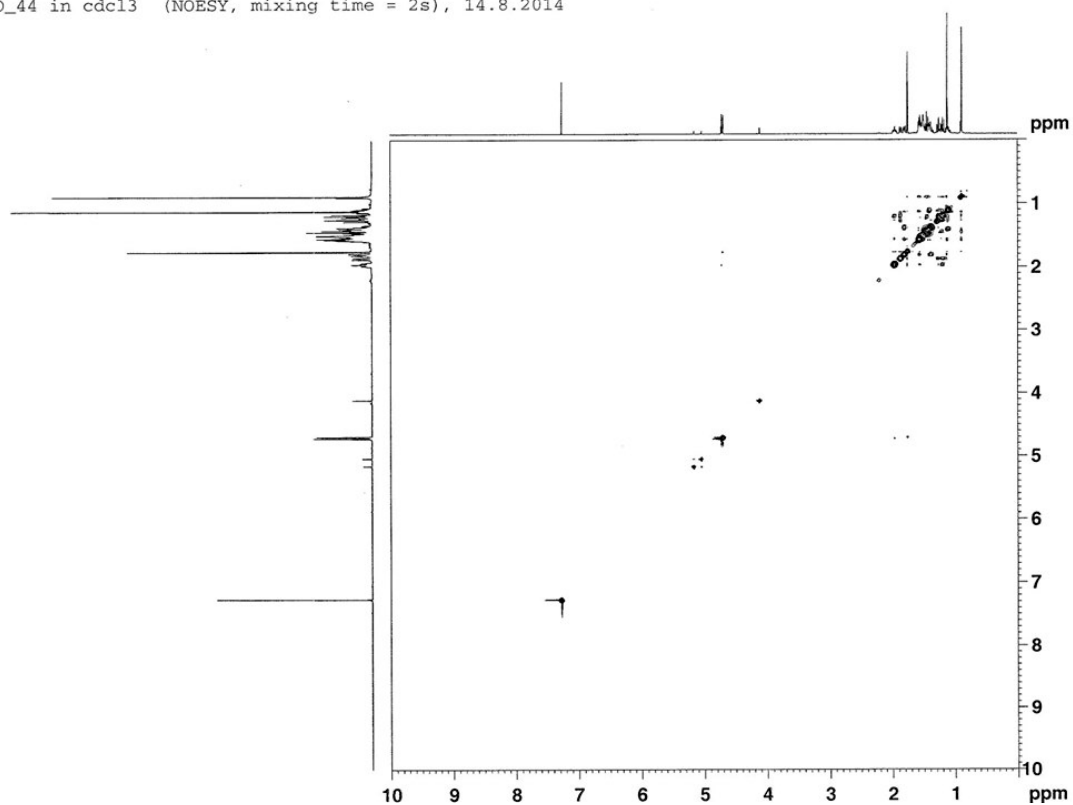


Abbildung 72: NOESY-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃

CS_PO_44 in cdcl3 (NOESY, mixing time = 2s), 14.8.2014

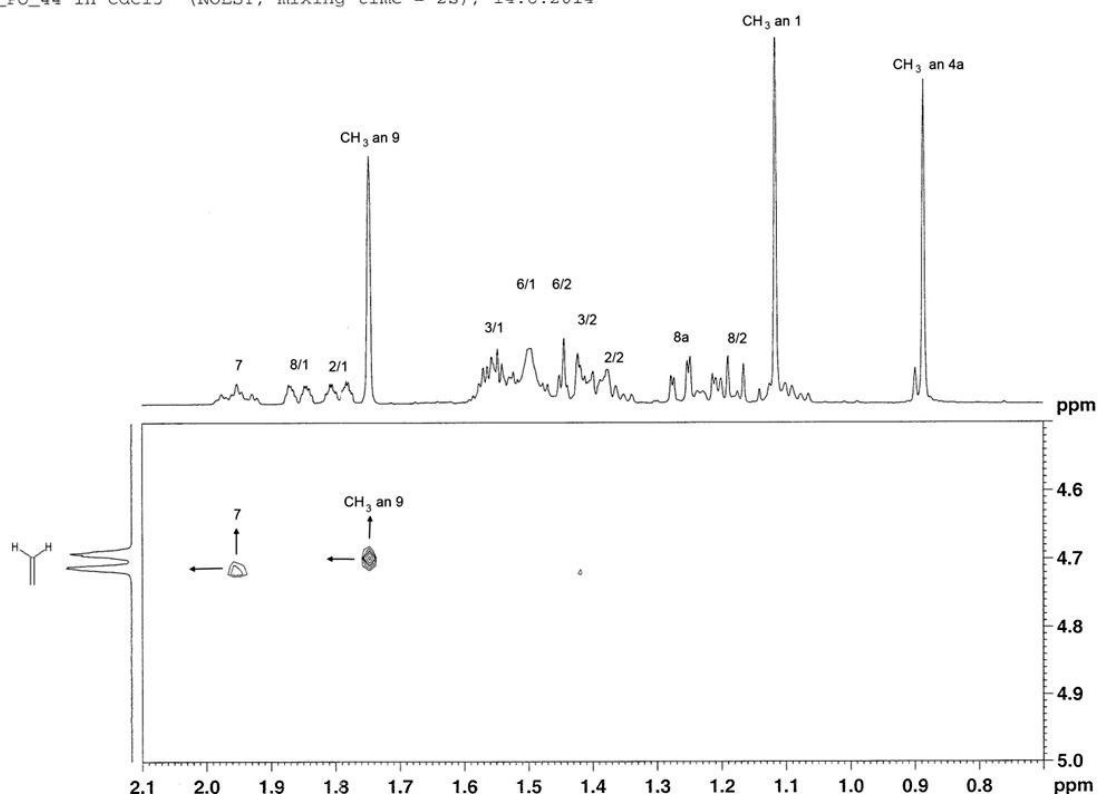


Abbildung 73: NOESY-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 2,1-0,7 / 5,0-4,5 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (NOESY, mixing time = 2s), 14.8.2014

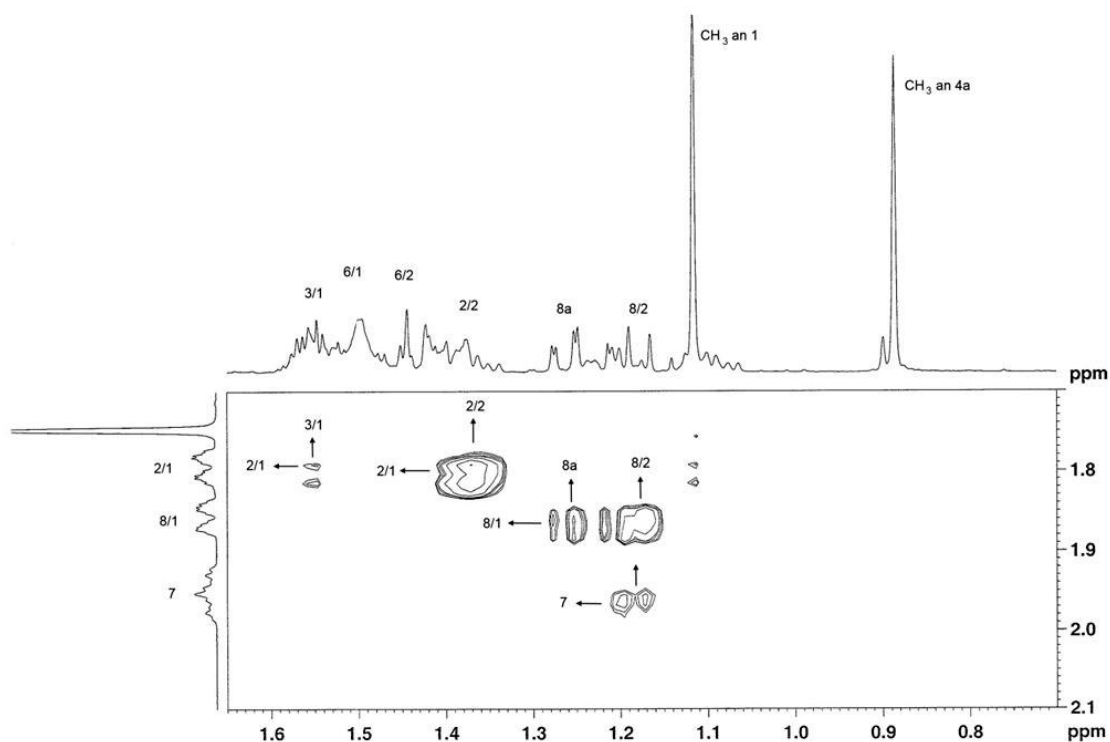


Abbildung 74: NOESY-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 1,65-0,70 / 2,1-1,7 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (NOESY, mixing time = 2s), 14.8.2014

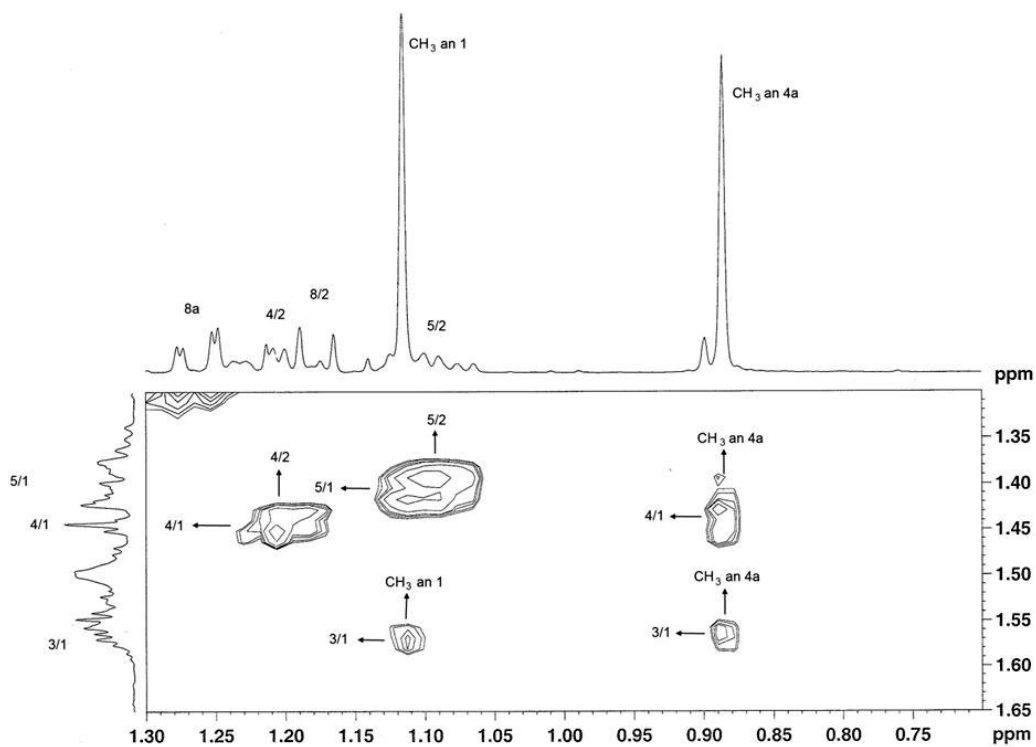
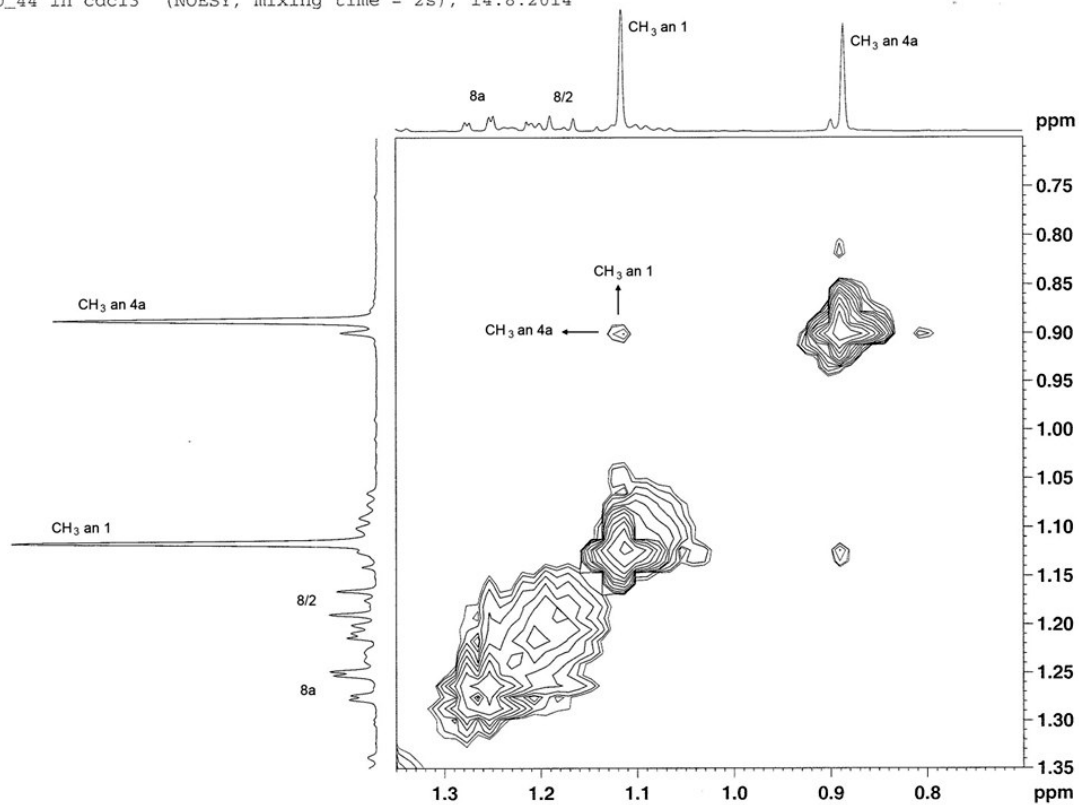


Abbildung 75: NOESY-NMR Spektrum von Substanz PO_44 in CDCl₃
Ausschnitt: 1,30-0,70 / 1,65-1,30 ppm

CS_PO_44 in cdcl3 (NOESY, mixing time = 2s), 14.8.2014



**Abbildung 76: NOESY-NMR Spektrum von Substanz PO₄₄ in CDCl₃
Ausschnitt: 1,35-0,70 / 1,35-0,70 ppm**

Substanz PO_45

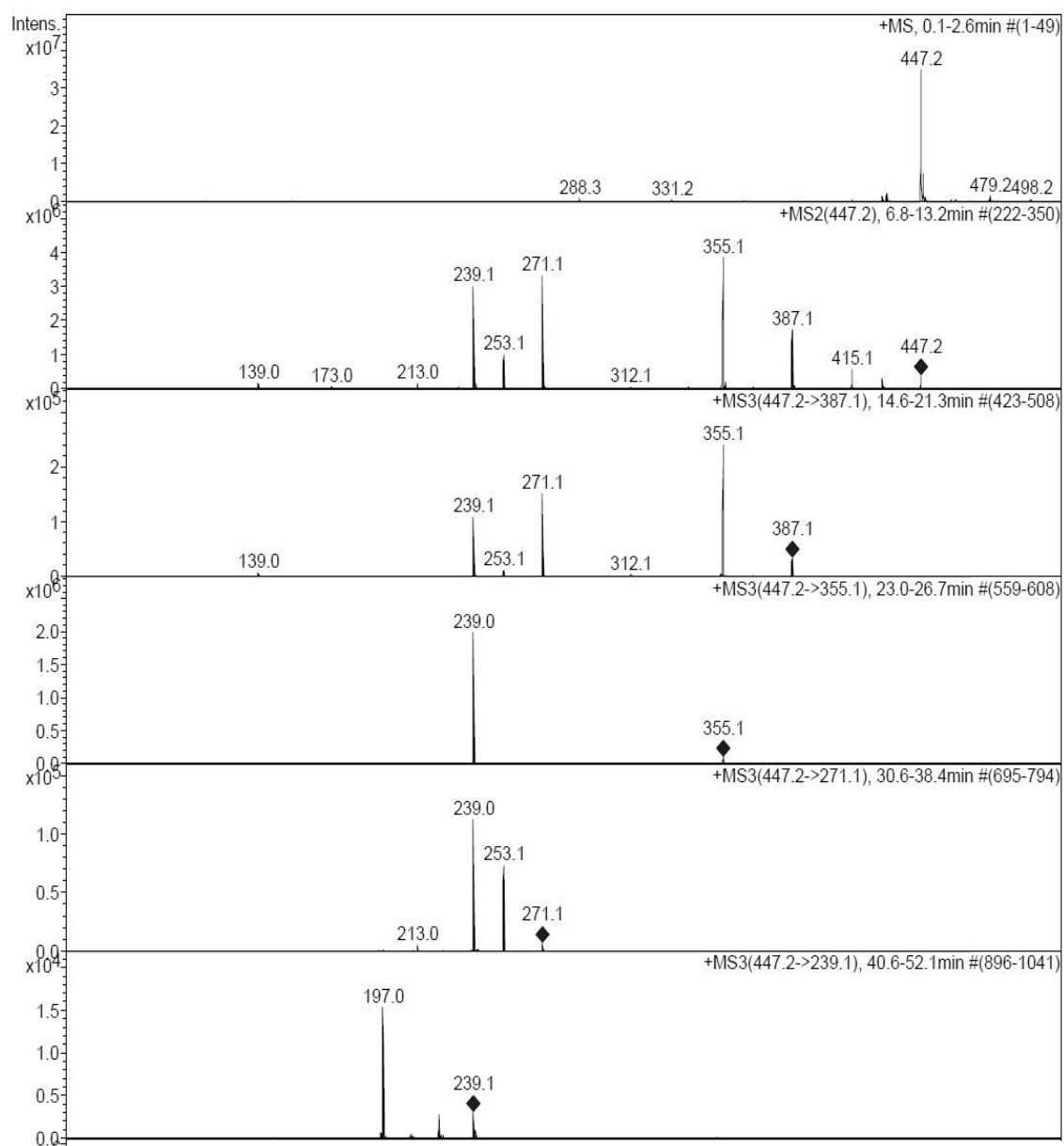


Abbildung 77: ESI-MS und ESI-MSⁿ (m/z 447,2) Spektrum von Substanz PO_45

Substanz PO_46

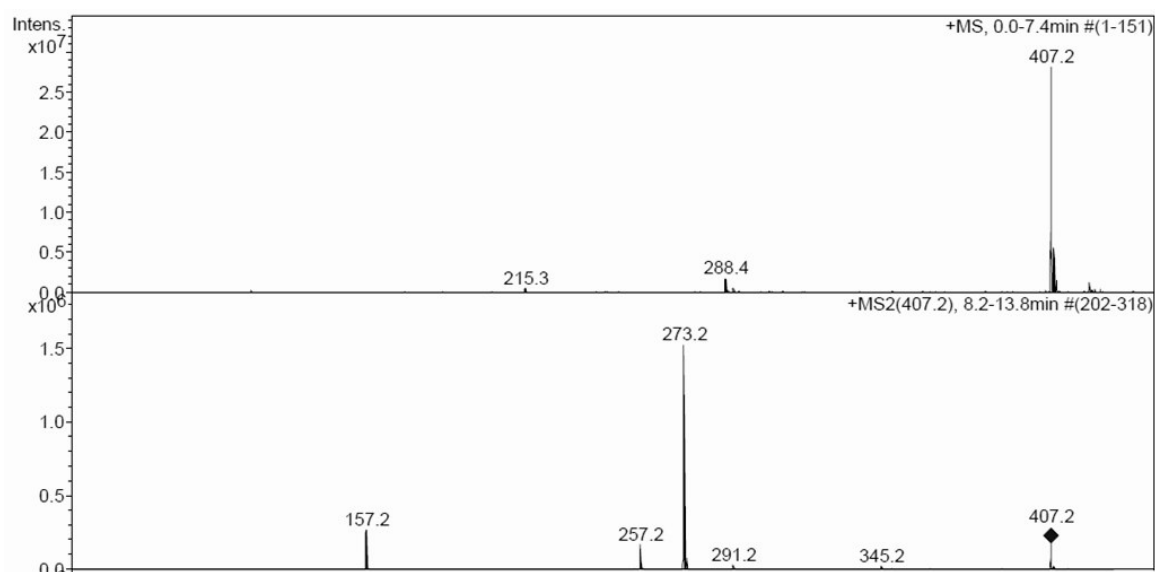


Abbildung 78: ESI-MS und ESI-MS² (m/z 407,2) Spektrum von Substanz PO_46

CS_PO_46 in cdcl3 (Proton), 28.4.2014

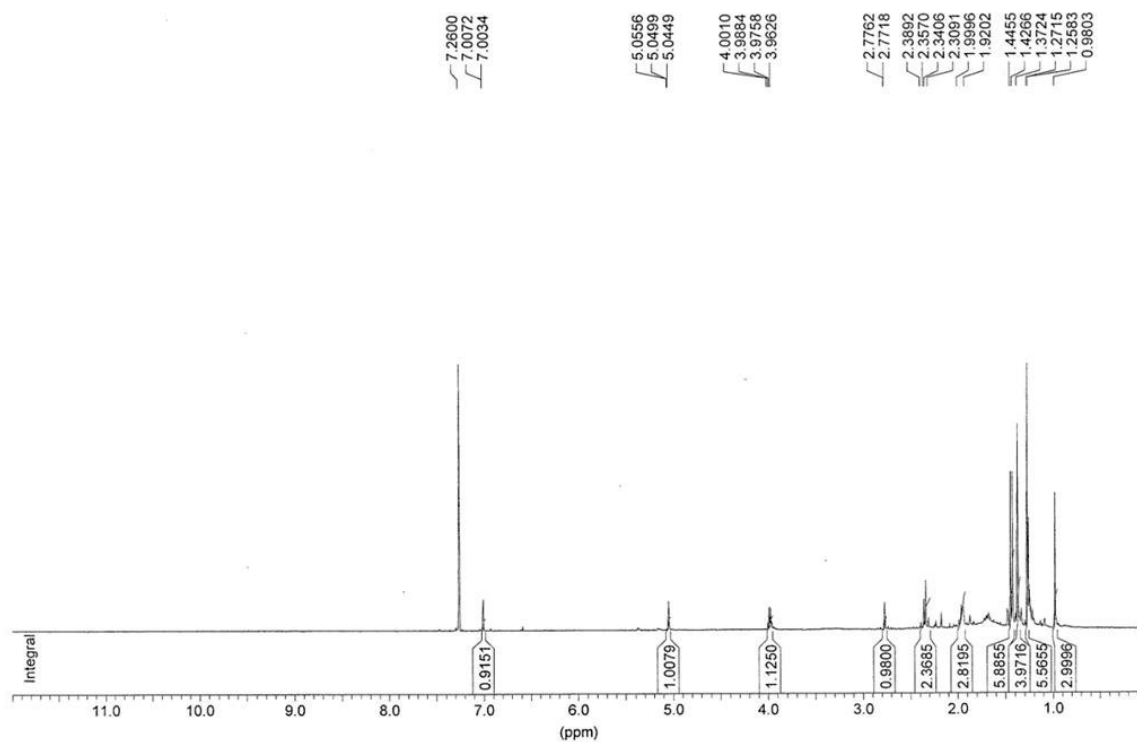


Abbildung 79: ¹H-NMR Spektrum von Substanz PO_46 in CDCl₃

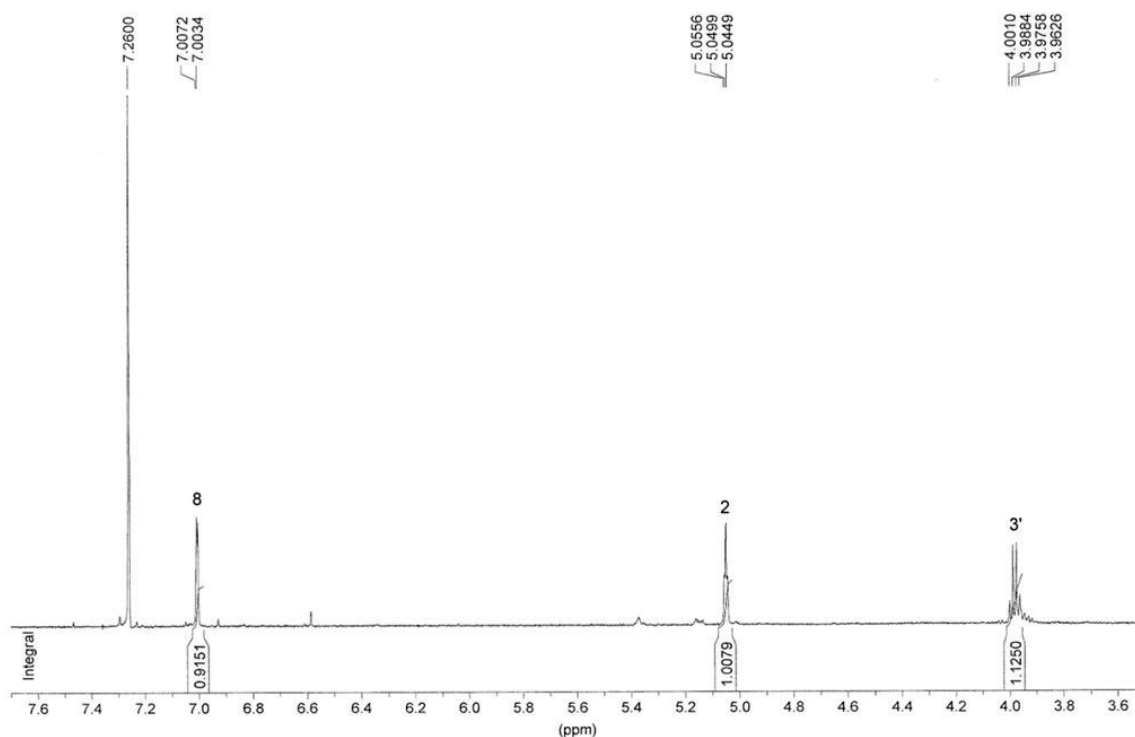


Abbildung 80: ¹H-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 7,6-3,6 ppm

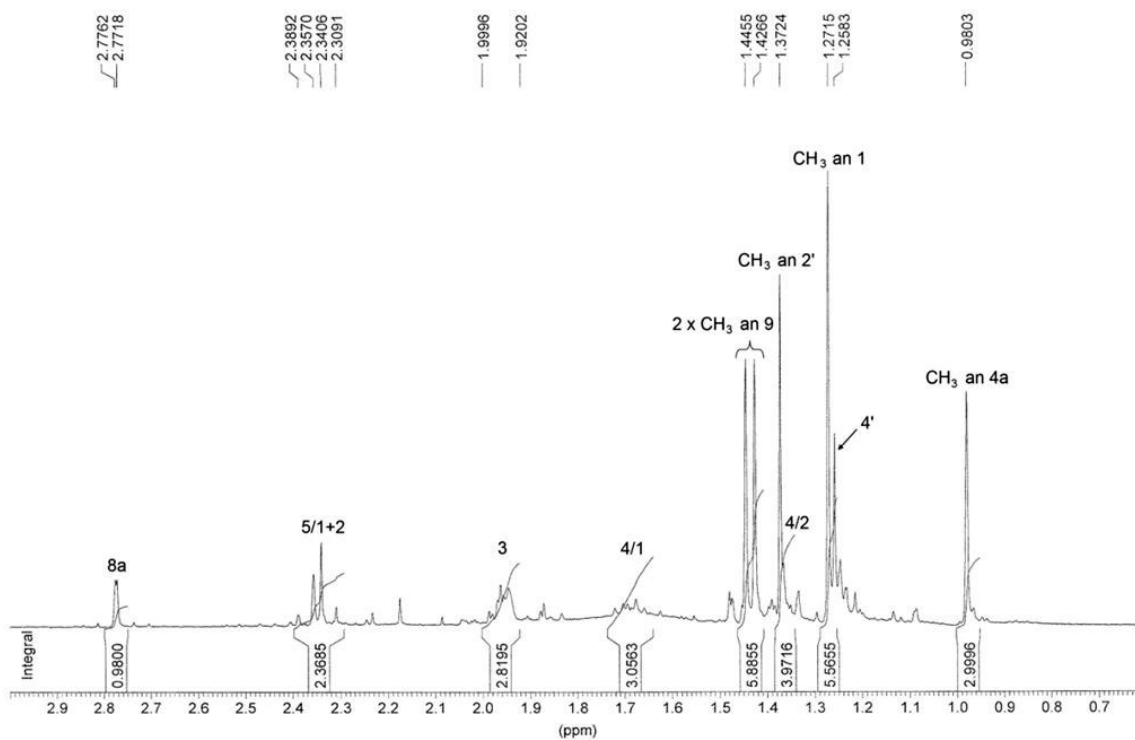


Abbildung 81: ¹H-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,9-0,7 ppm

CS_PO_46 in cdcl3 (APT), 28.4.2014

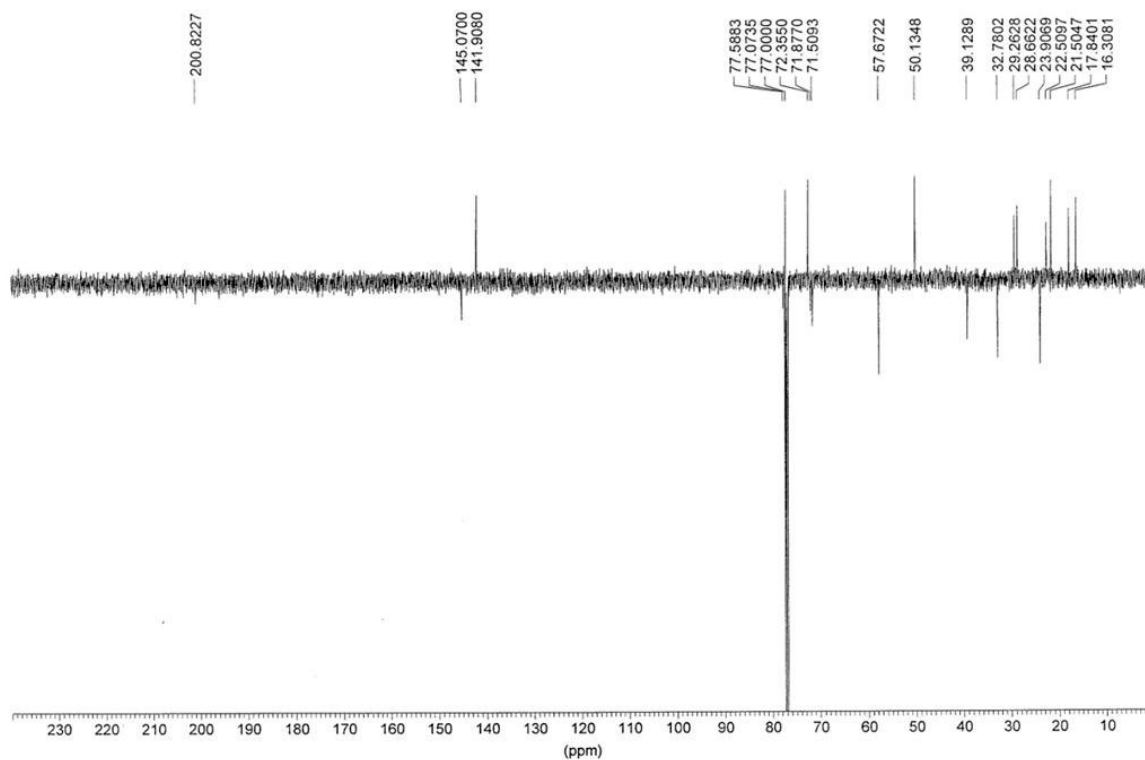


Abbildung 82: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_46 in CDCl_3

CS_PO_46 in cdcl3 (APT), 28.4.2014

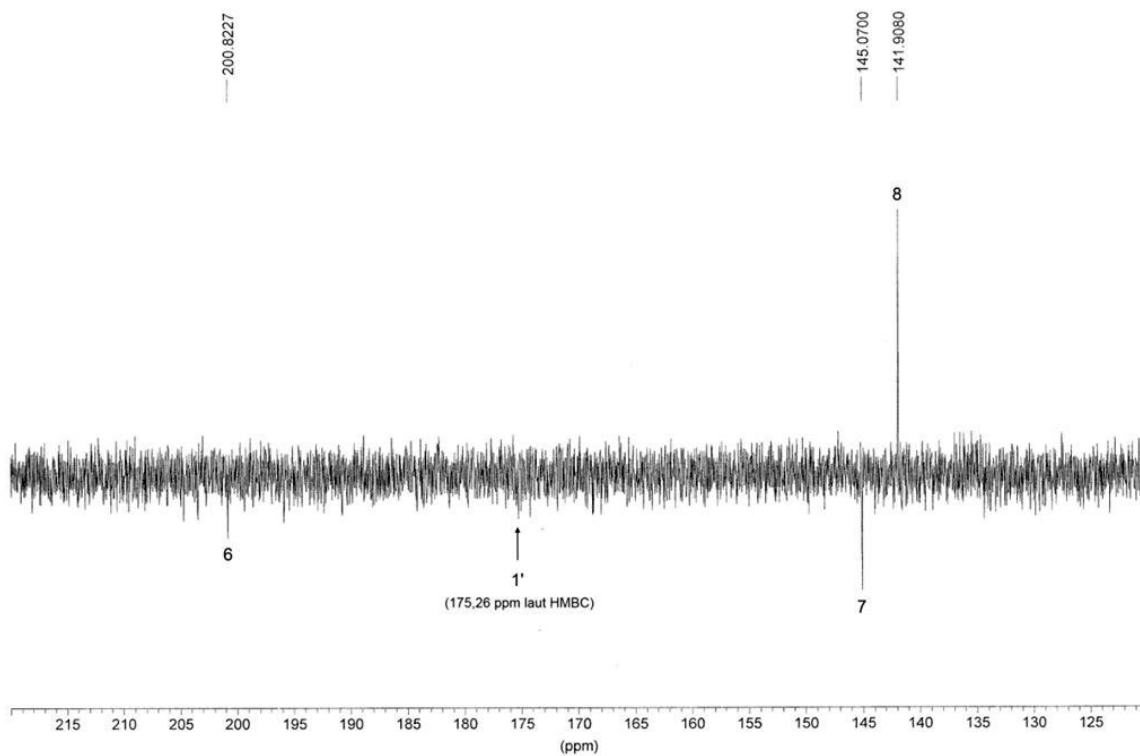


Abbildung 83: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_46 in CDCl_3
Ausschnitt: 215-125 ppm

CS_PO_46 in cdcl3 (APT), 28.4.2014

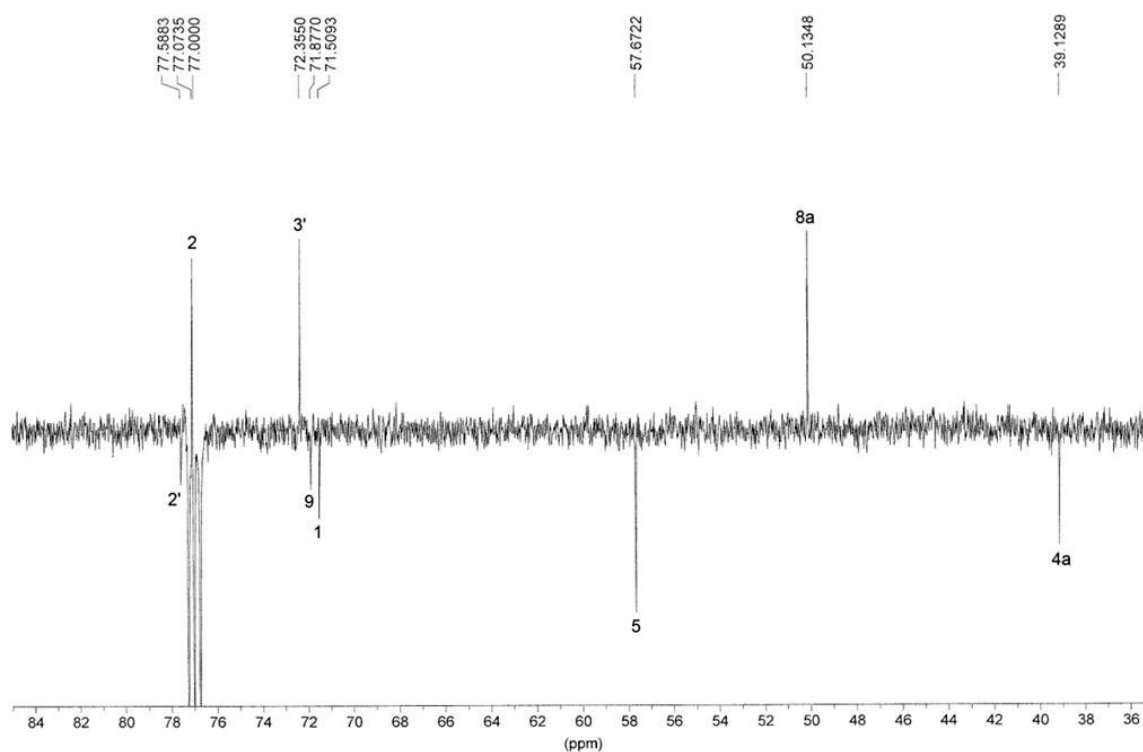


Abbildung 84: ¹³C-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 84-36 ppm

CS_PO_46 in cdcl3 (APT), 28.4.2014

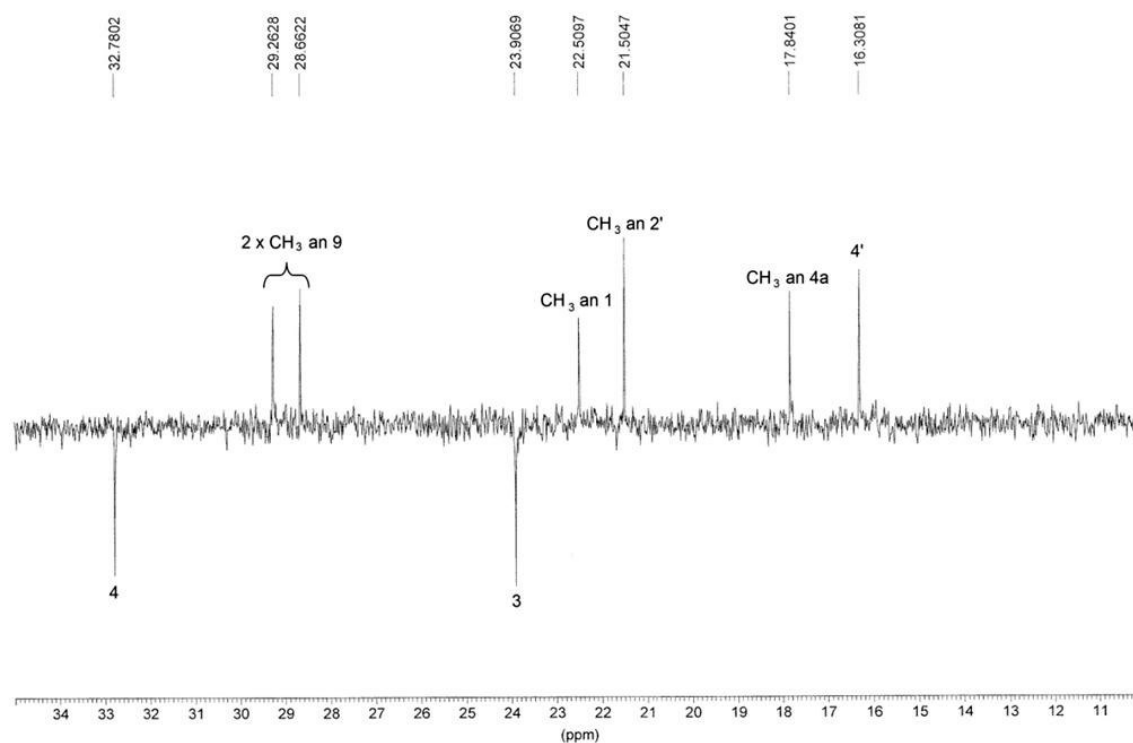


Abbildung 85: ¹³C-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 34-11 ppm

CS_PO_46 in cdcl3 (HSQC neu), 28.4.2014

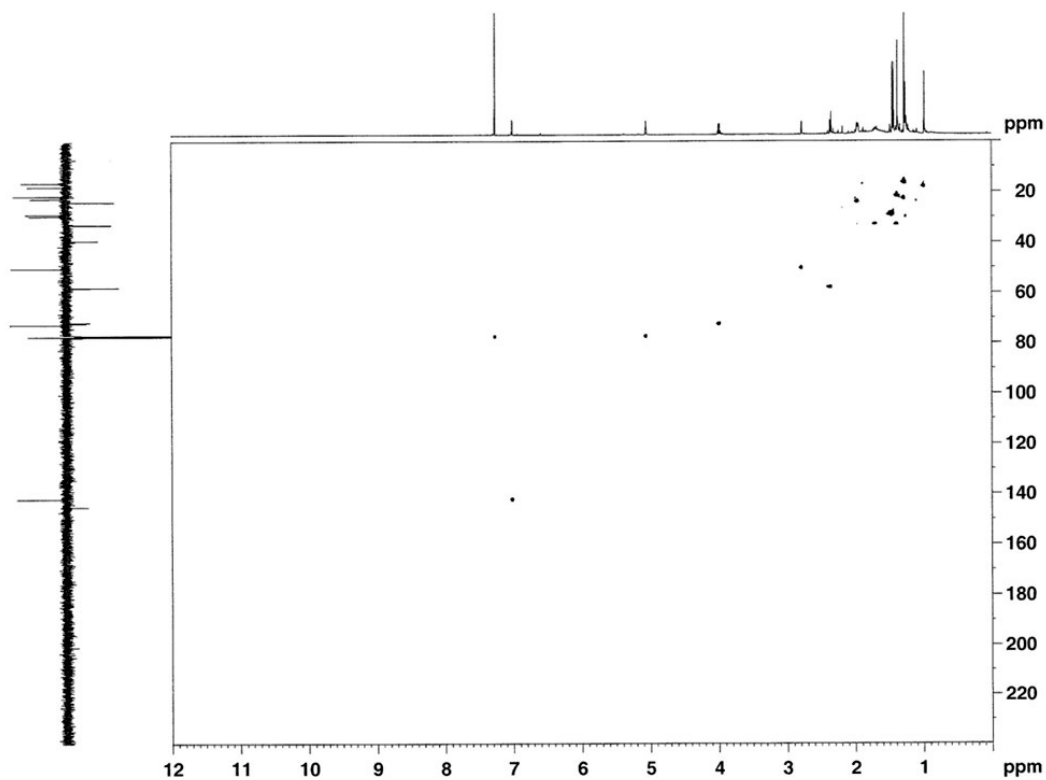


Abbildung 86: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_46 in CDCl₃

CS_PO_46 in cdcl3 (HSQC neu), 28.4.2014

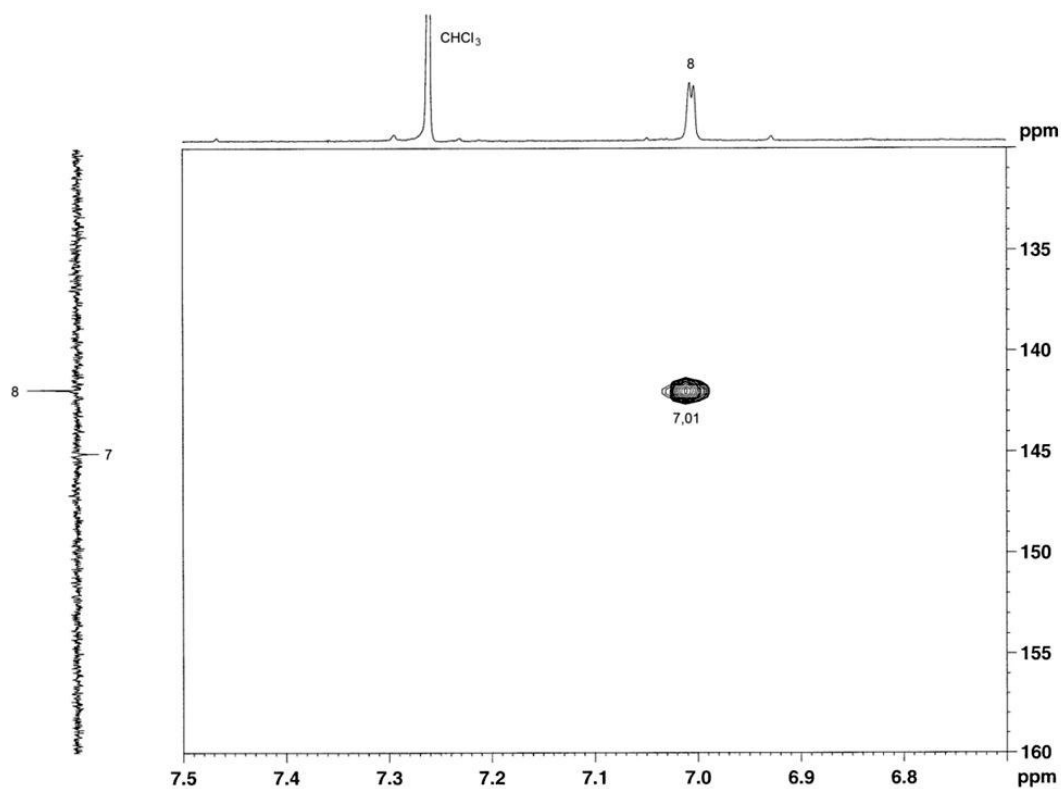


Abbildung 87: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_46 in CDCl₃
Ausschnitt: 7,5-6,7 / 160-130 ppm

CS_PO_46 in cdcl3 (HSQC neu), 28.4.2014

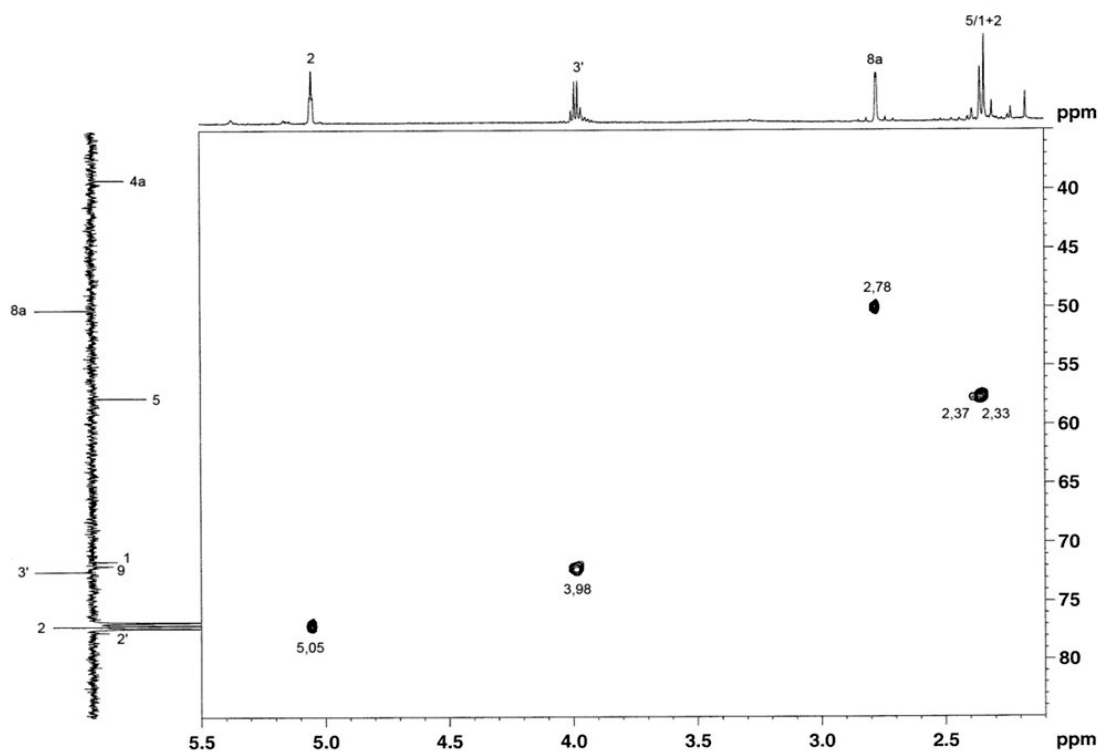


Abbildung 88: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 5,5-2,0 / 85-35 ppm

CS_PO_46 in cdcl3 (HSQC neu), 28.4.2014

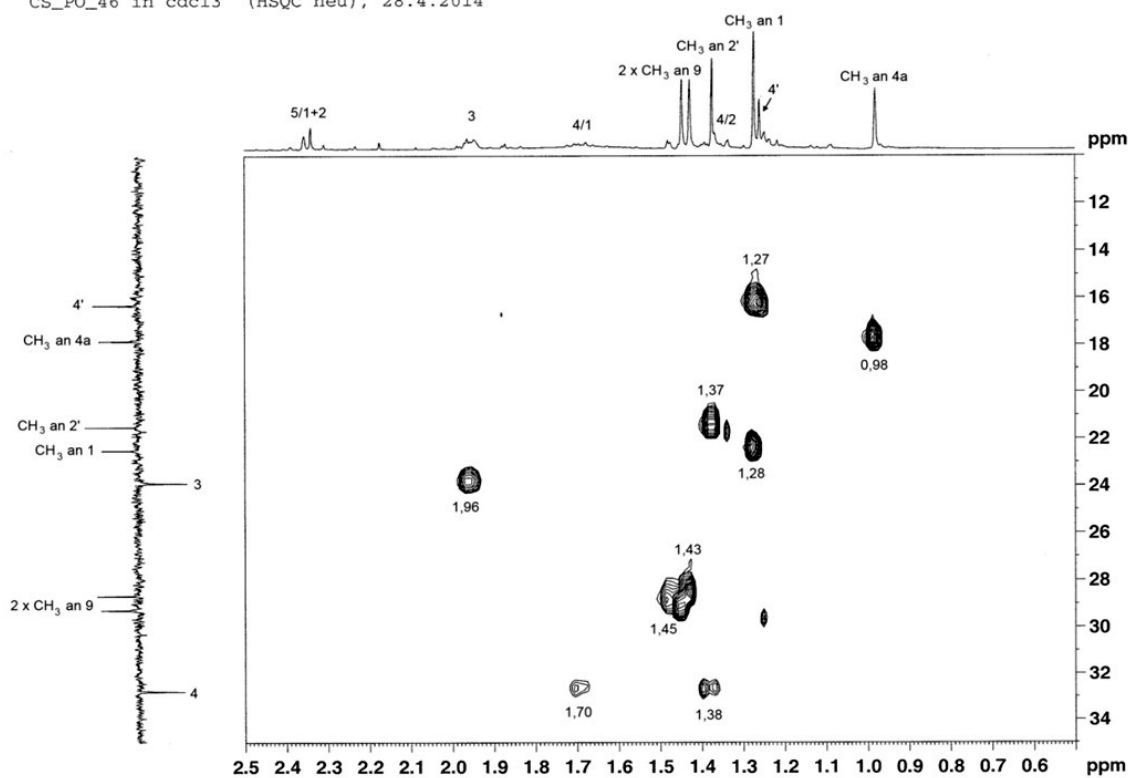


Abbildung 89: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,5-0,5 / 35-10 ppm

CS_PO_46 in cdc13 (COSY 45), 28.4.2014

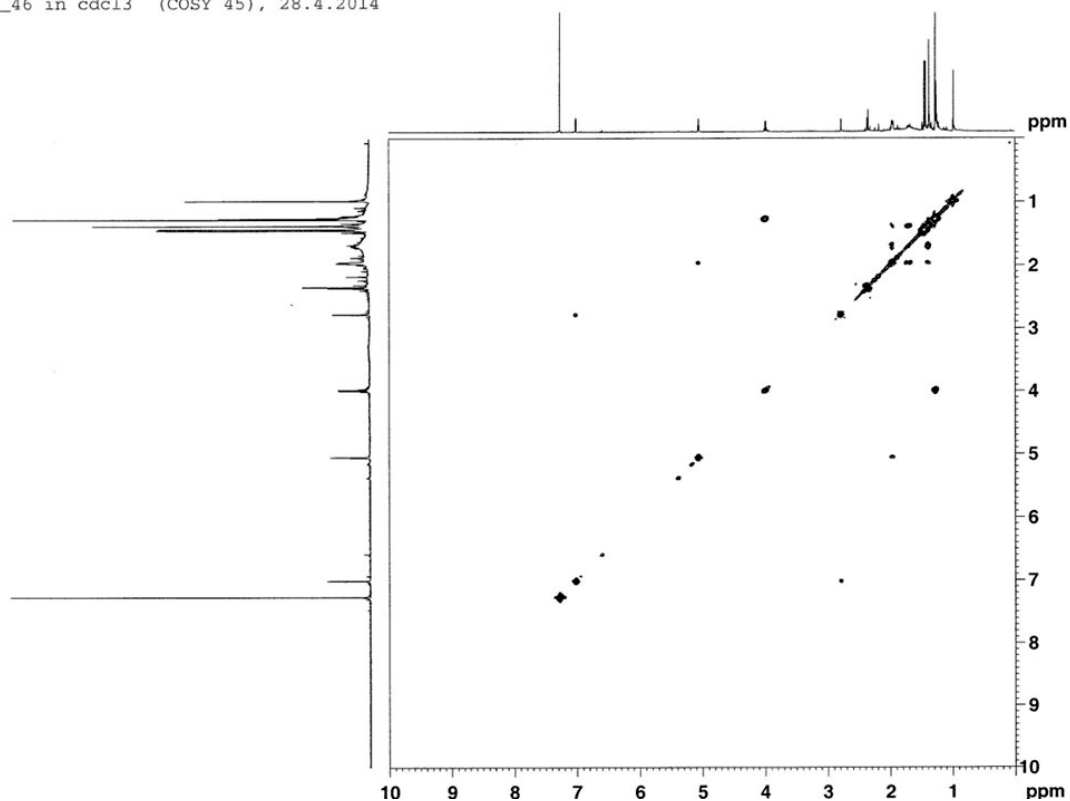


Abbildung 90: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_46 in CDCl_3

CS_PO_46 in cdc13 (COSY 45), 28.4.2014

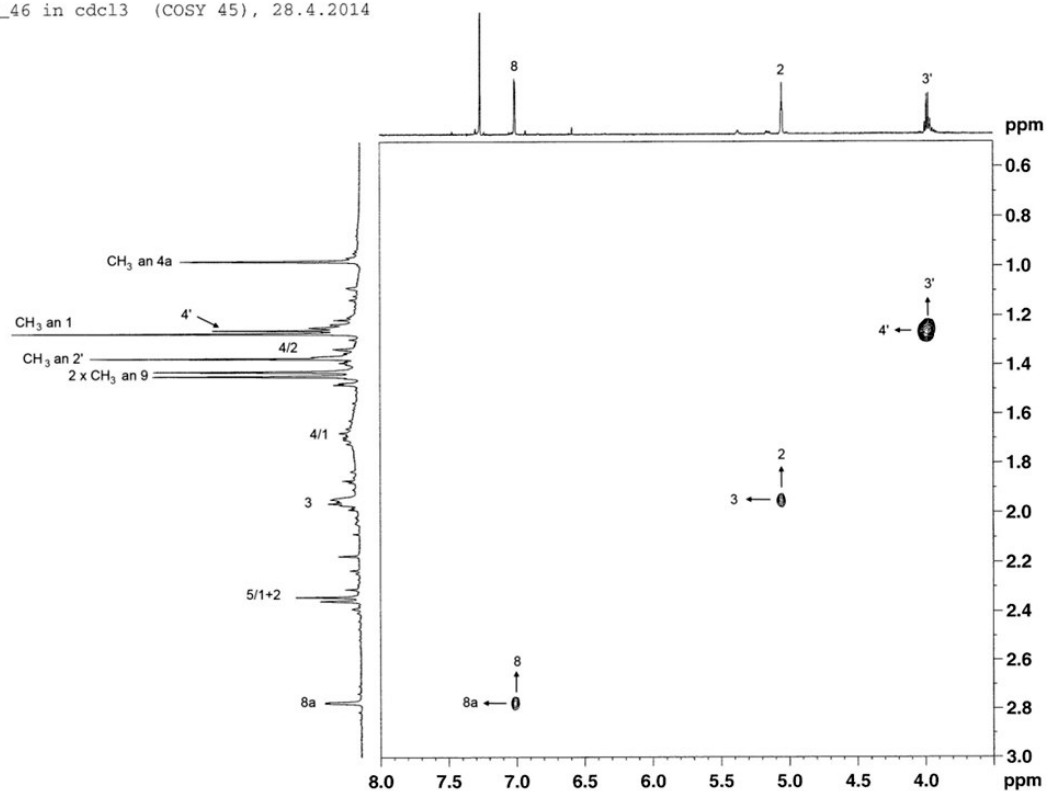


Abbildung 91: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_46 in CDCl_3
Ausschnitt: 8,0-3,5 / 3,0-0,5 ppm

CS_PO_46 in cdcl3 (HMBC), 28.4.2014

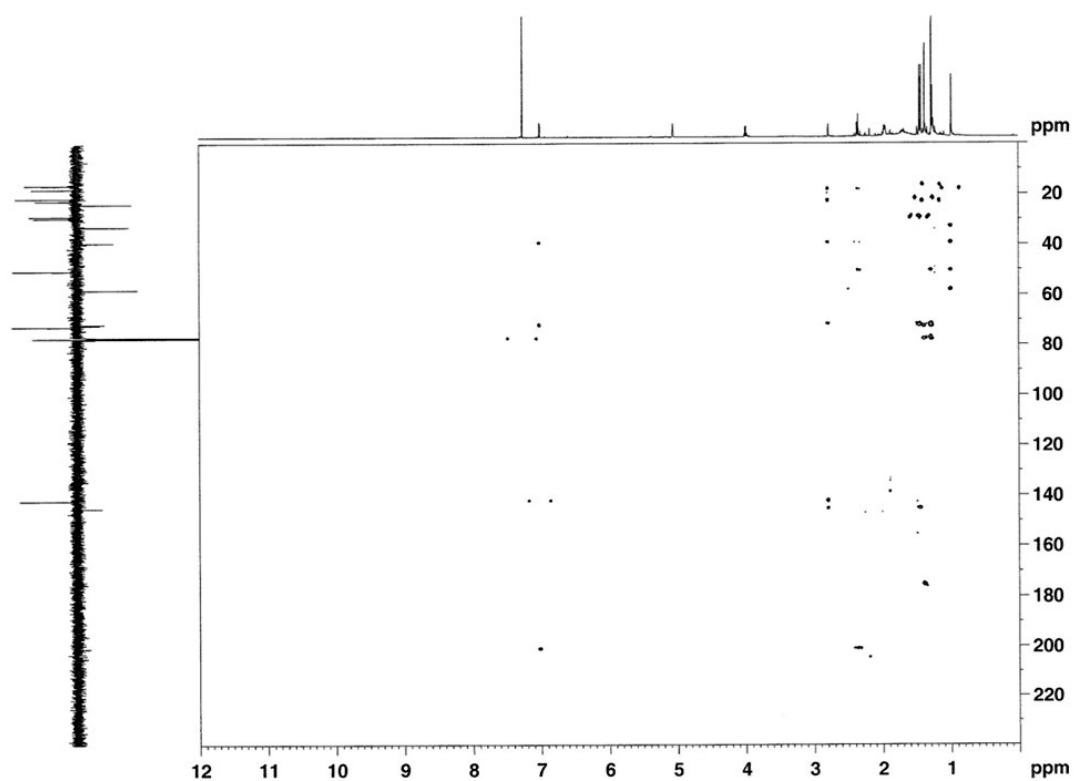


Abbildung 92: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_46 in CDCl₃

CS_PO_46 in cdcl3 (HMBC), 28.4.2014

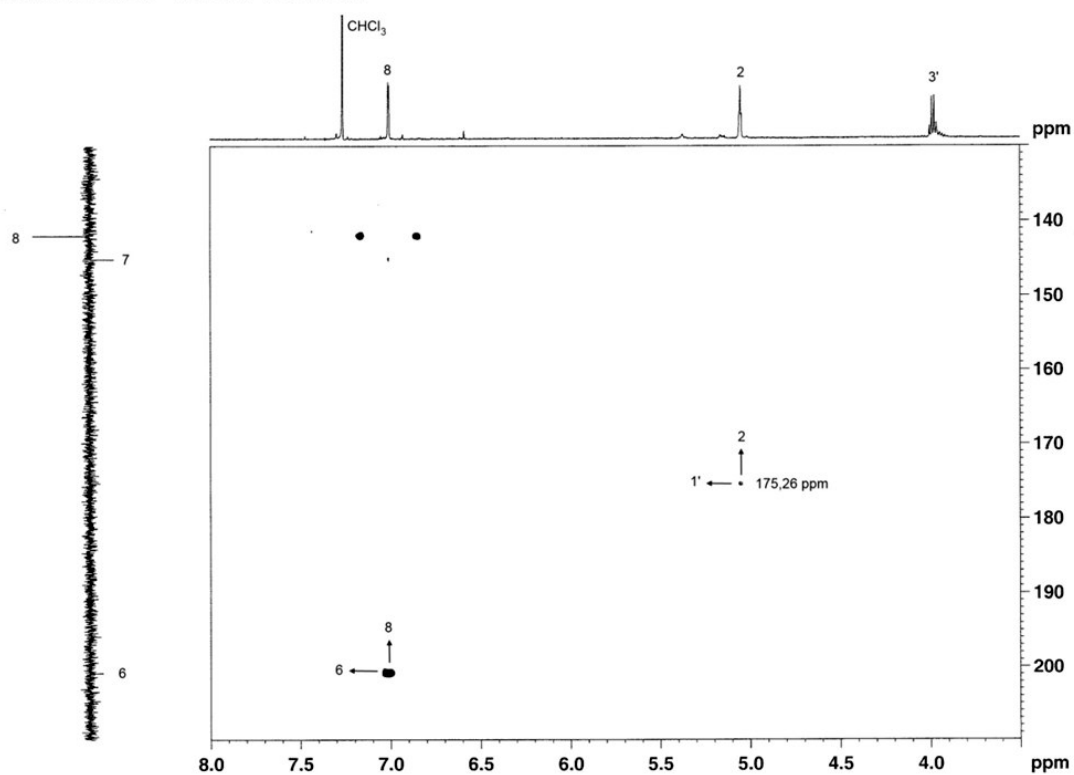


Abbildung 93: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_46 in CDCl₃
Ausschnitt: 8,0-3,5 / 210-130 ppm

CS_PO_46 in cdc13 (HMBC), 28.4.2014

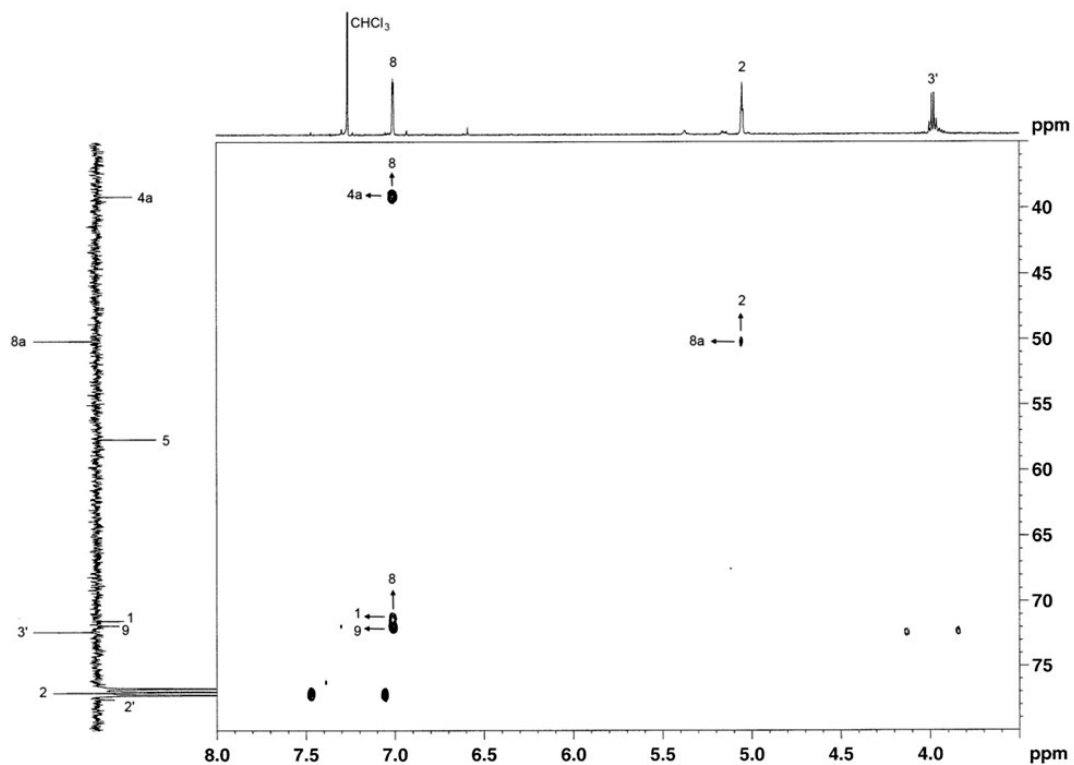


Abbildung 94: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 8,0-3,5 / 80-35 ppm

CS_PO_46 in cdc13 (HMBC), 28.4.2014

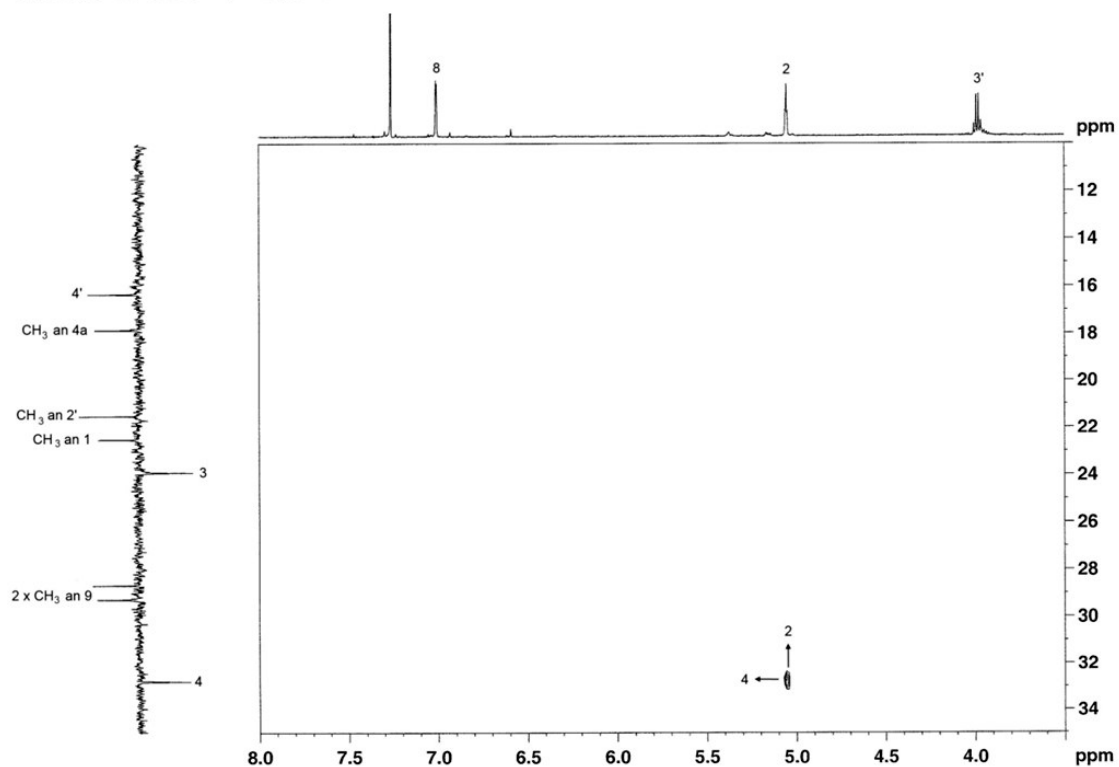


Abbildung 95: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 8,0-3,5 / 35-10 ppm

CS_PO_46 in cdc13 (HMBC), 28.4.2014

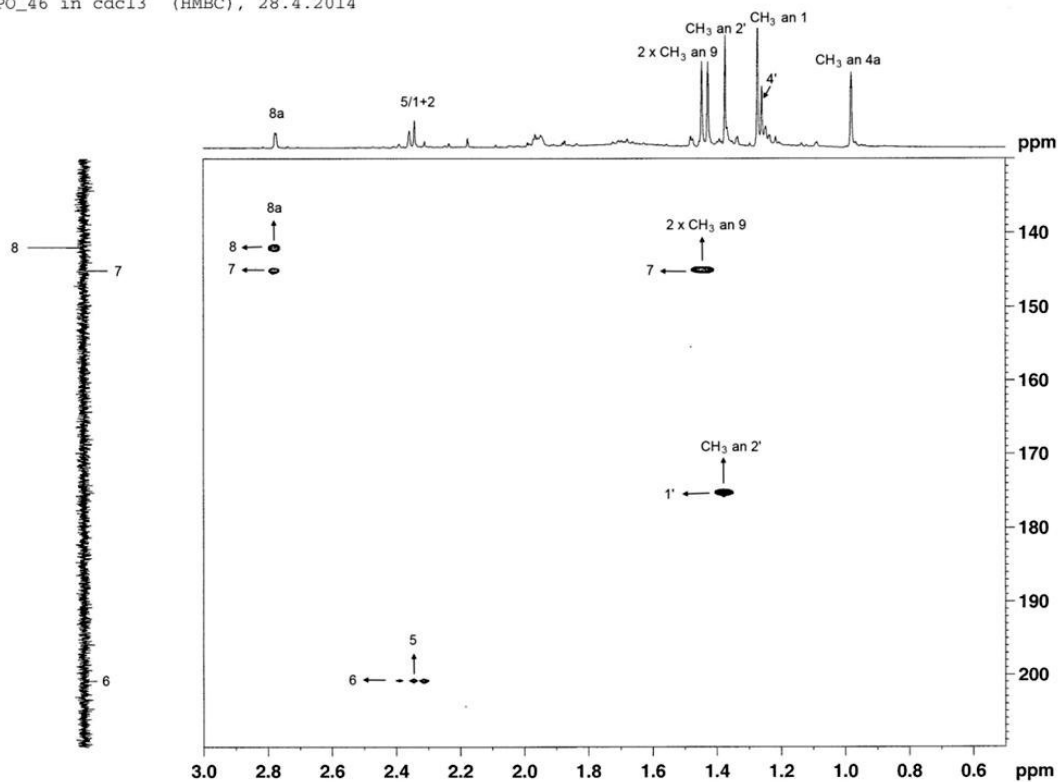


Abbildung 96: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 3,0-0,5 / 210-130 ppm

CS_PO_46 in cdc13 (HMBC), 28.4.2014

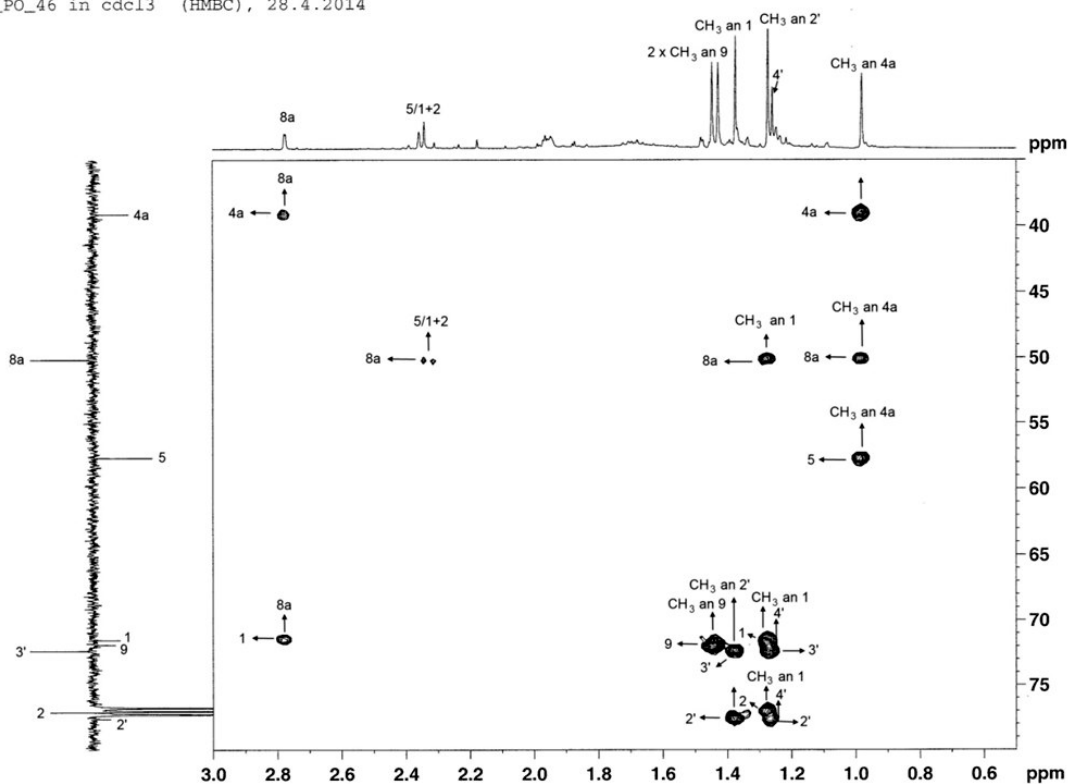


Abbildung 97: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 3,0-0,5 / 80-35 ppm

CS_PO_46 in cdcl3 (HMBC), 28.4.2014

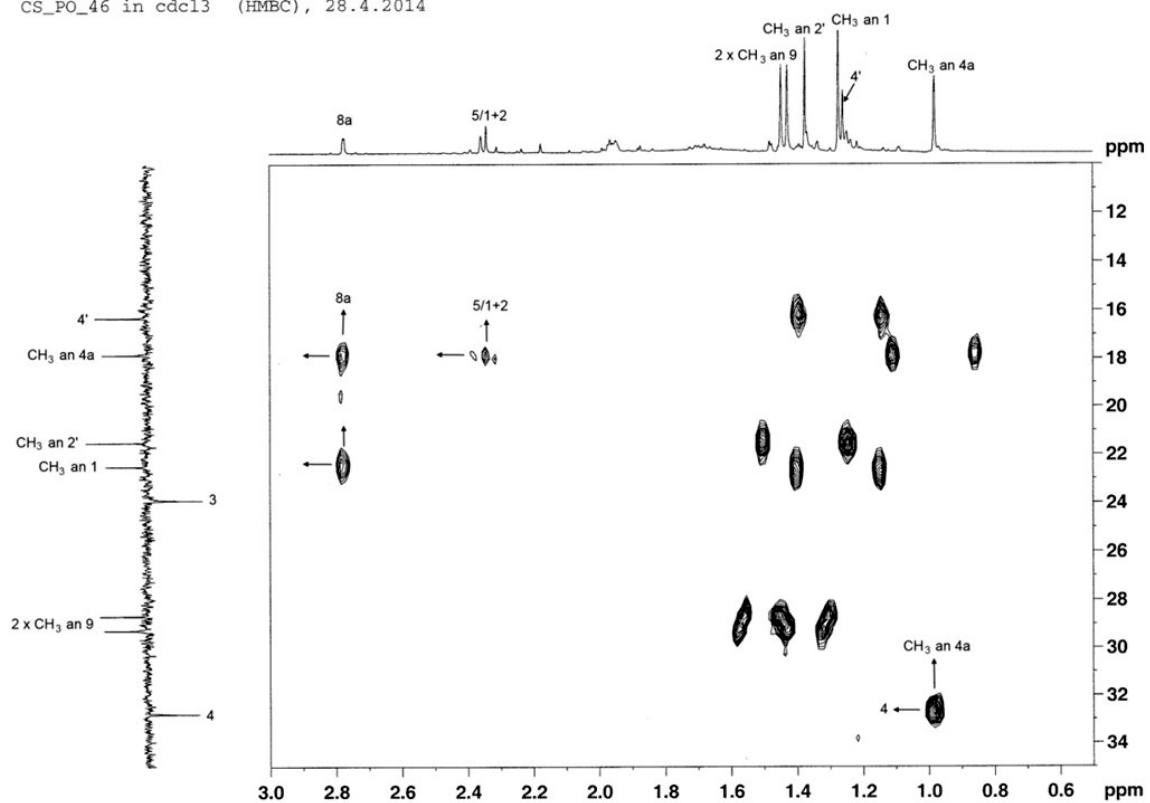


Abbildung 98: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₄₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 3,0-0,5 / 35-10 ppm

Substanz PO_48

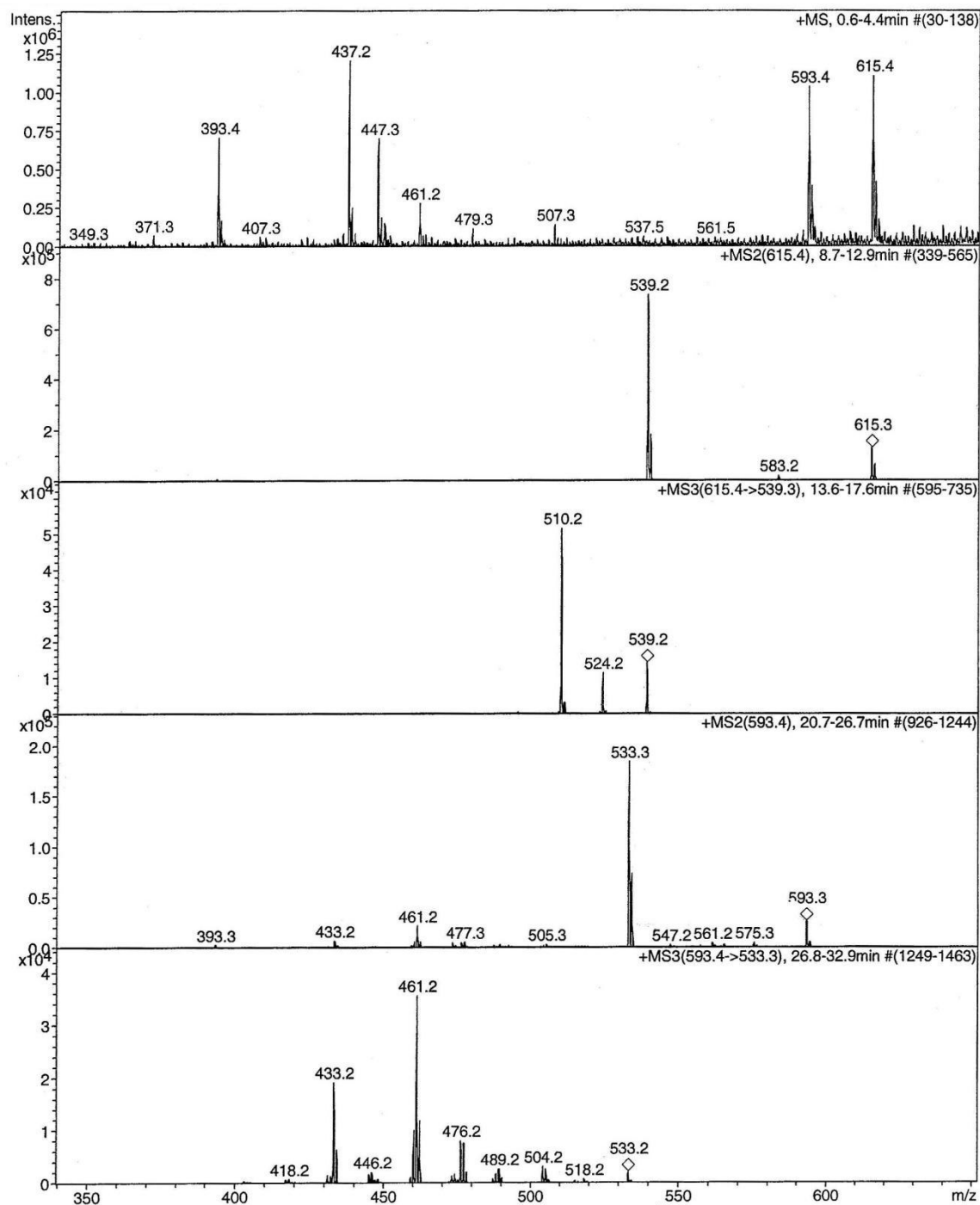


Abbildung 99: ESI-MS und ESI-MSⁿ (m/z 615,4 und 593,4) Spektrum im positiven Ionenmodus von Substanz PO_48

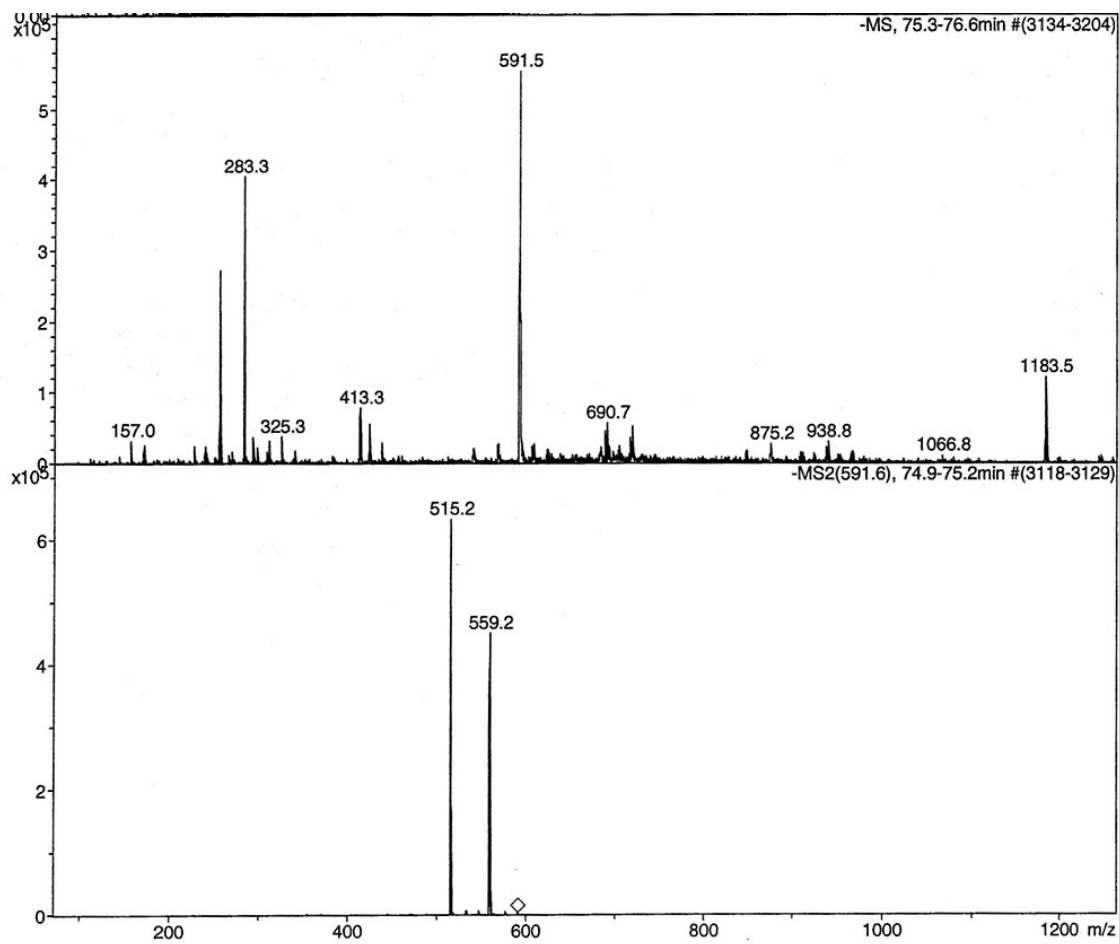


Abbildung 100: ESI-MS und ESI-MS¹ (m/z 591,6) Spektrum im negativen Ionenmodus von Substanz PO_48

Substanz PO_49

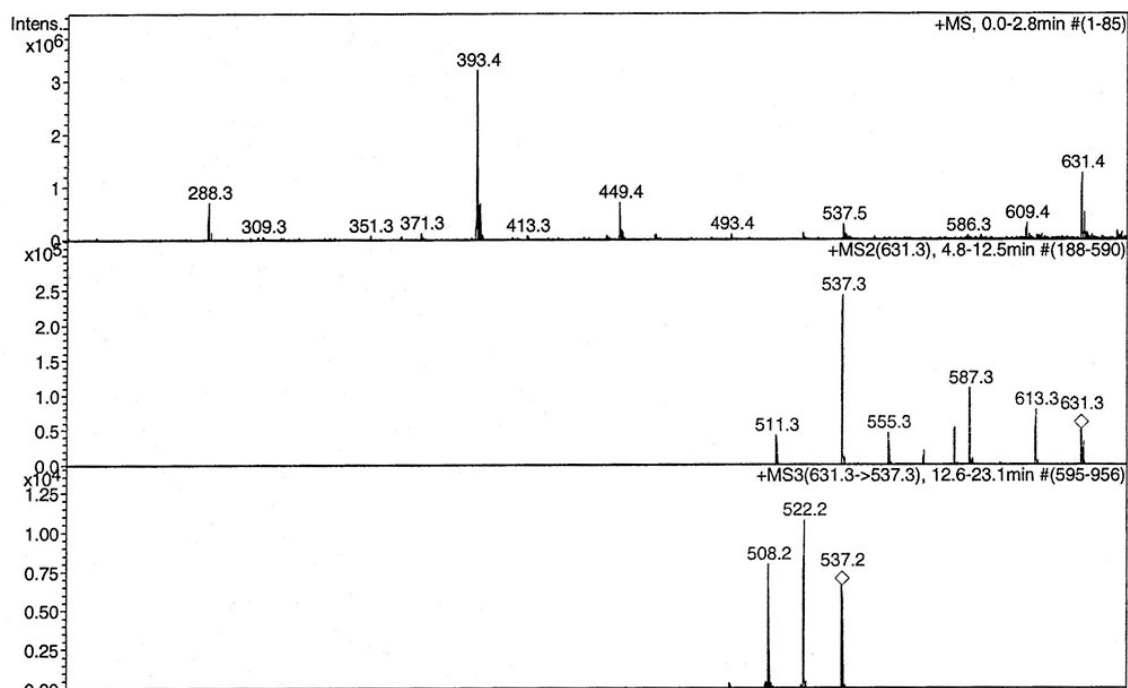


Abbildung 101: ESI-MS und ESI-MSⁿ (m/z 631,3) im positiven Ionenmodus von Substanz PO_49

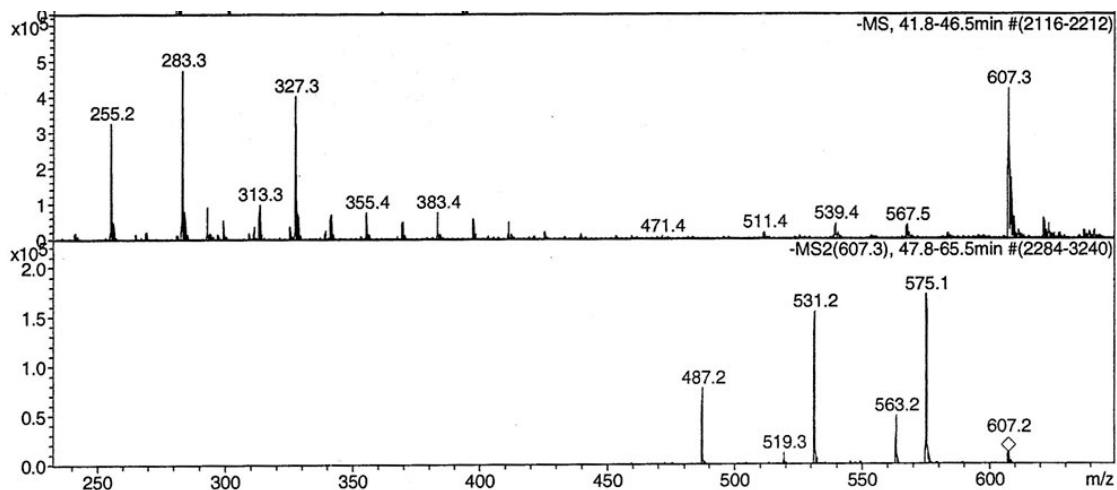


Abbildung 102: ESI-MS und ESI-MS¹ (m/z 607,3) im negativen Ionenmodus von Substanz PO_49

Substanz PO_50

CS_PO_50 in d6DMSO (Proton), 31.10.2014

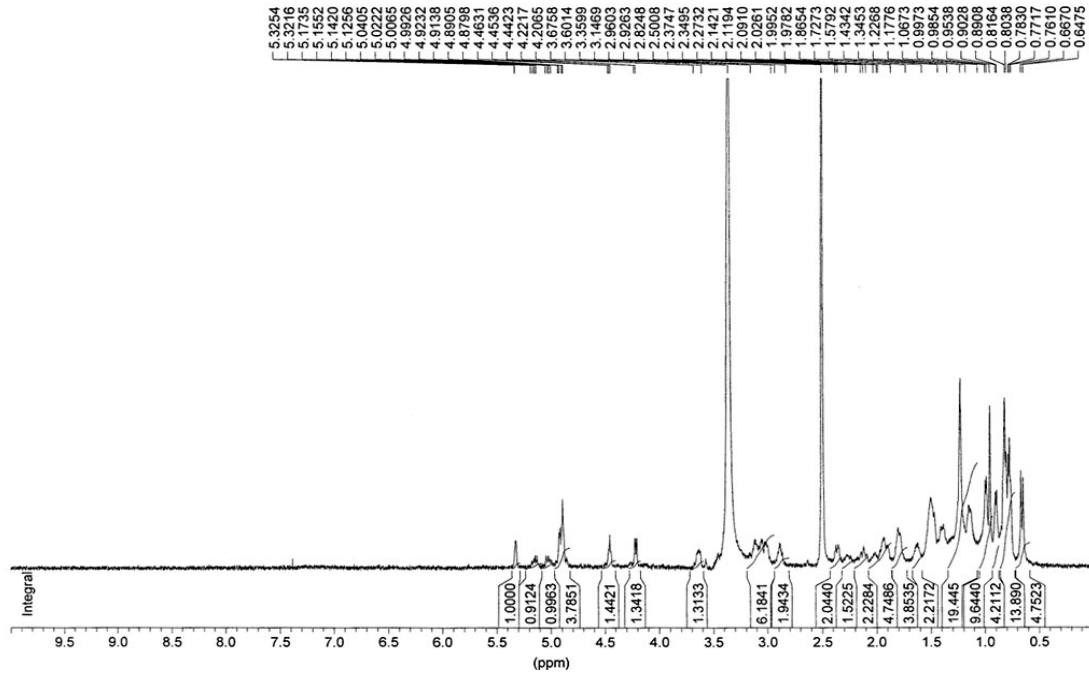


Abbildung 103: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d_6DMSO

CS_PO_50 in d6DMSO (Proton), 31.10.2014

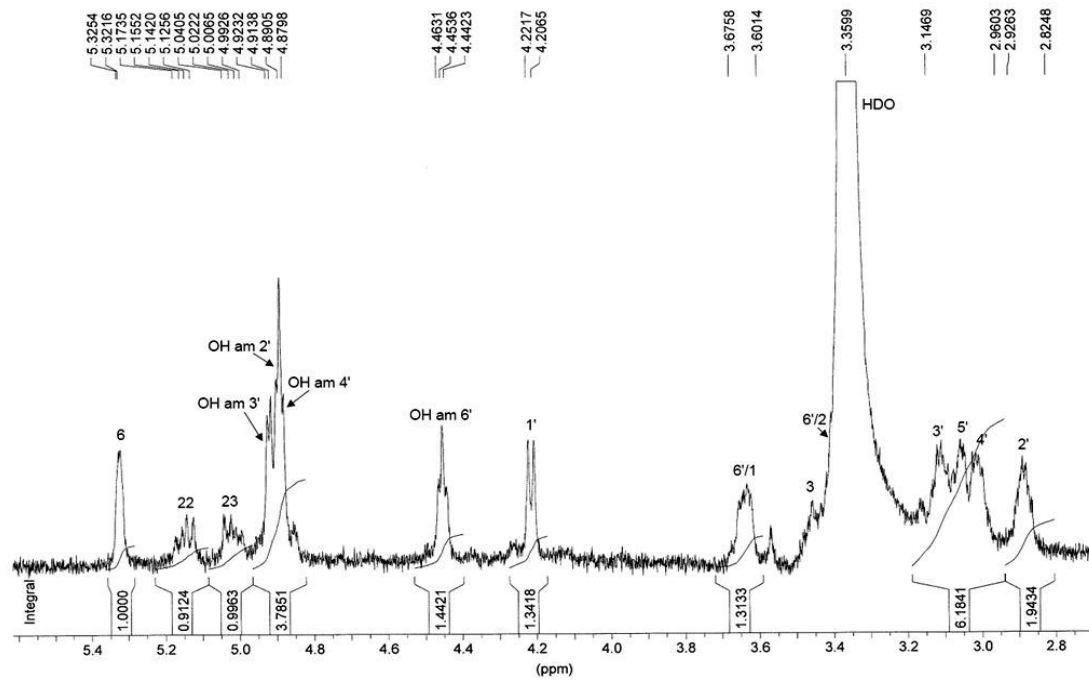


Abbildung 104: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d_6DMSO
Ausschnitt: 5,4-2,8 ppm

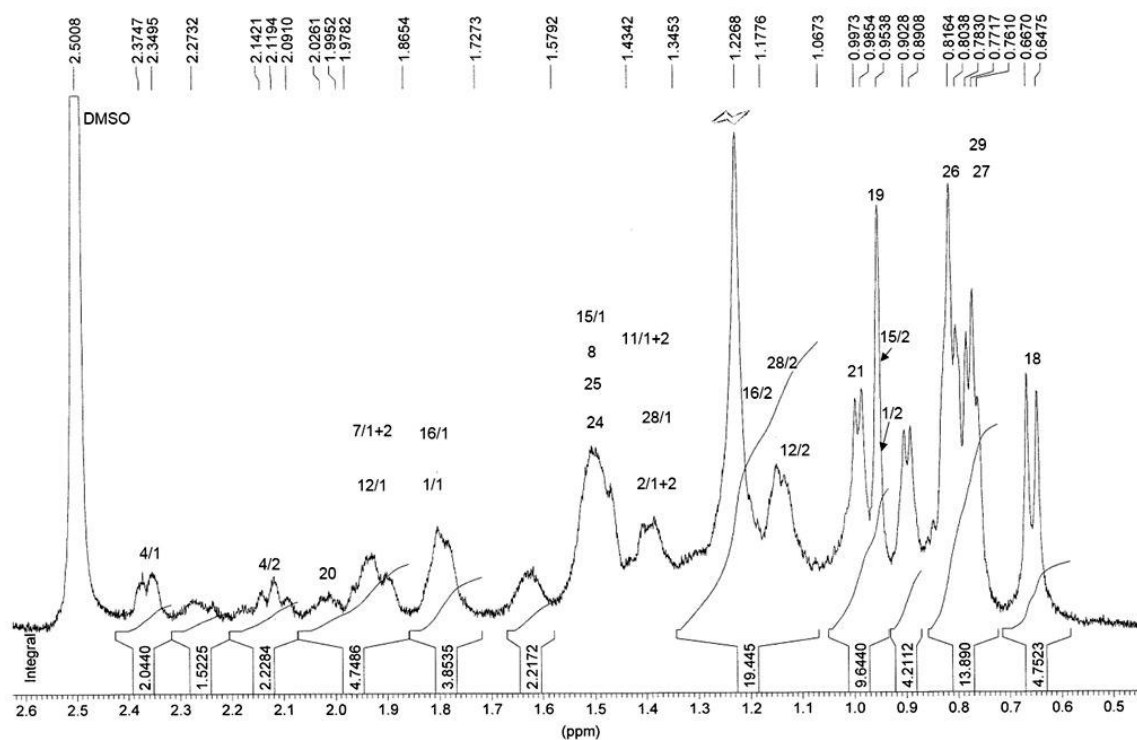


Abbildung 105: ¹H-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 2,6-0,5 ppm

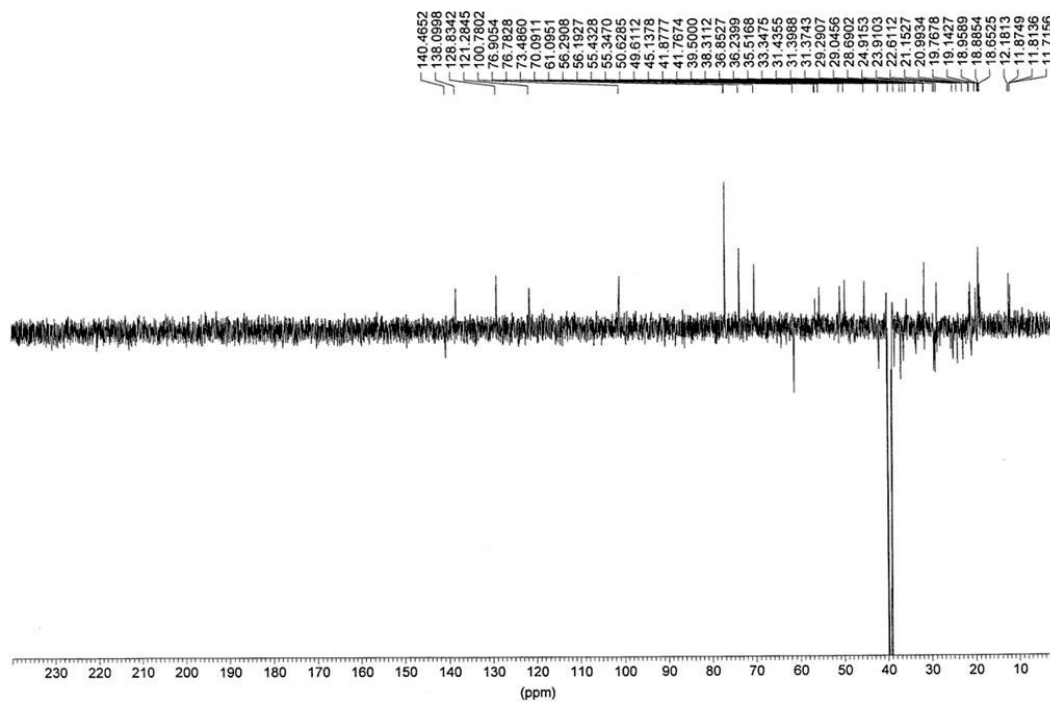


Abbildung 106: ¹³C-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO

CS_PO_50 in d6DMSO (APT), 31.10.2014

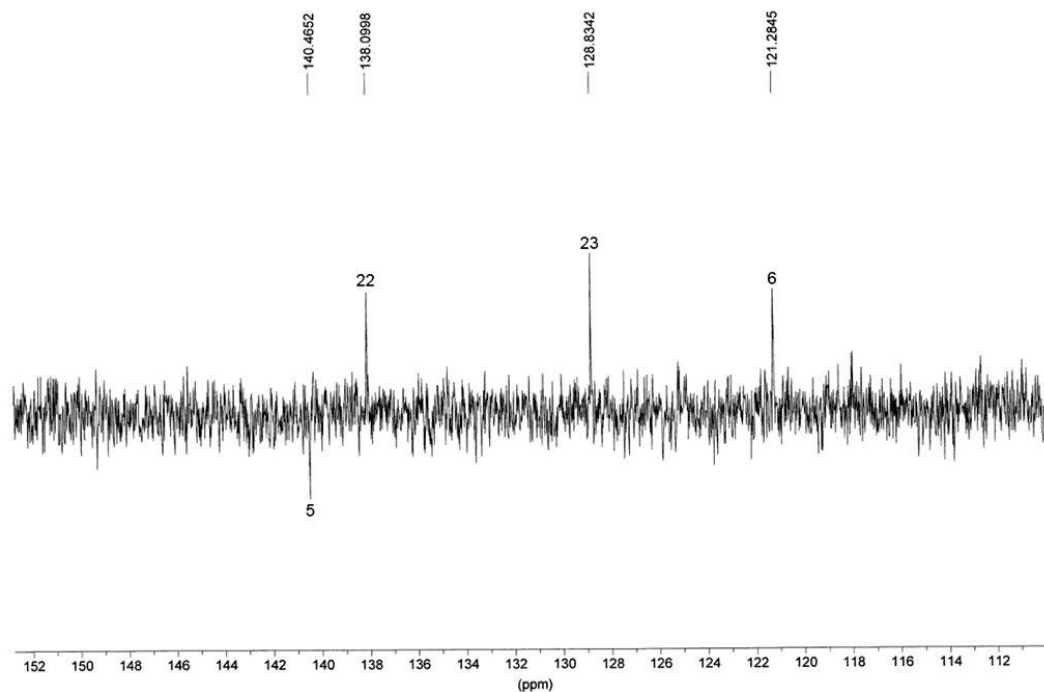


Abbildung 107: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO₅₀ in d₆DMSO
Ausschnitt: 152-112 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (APT), 31.10.2014

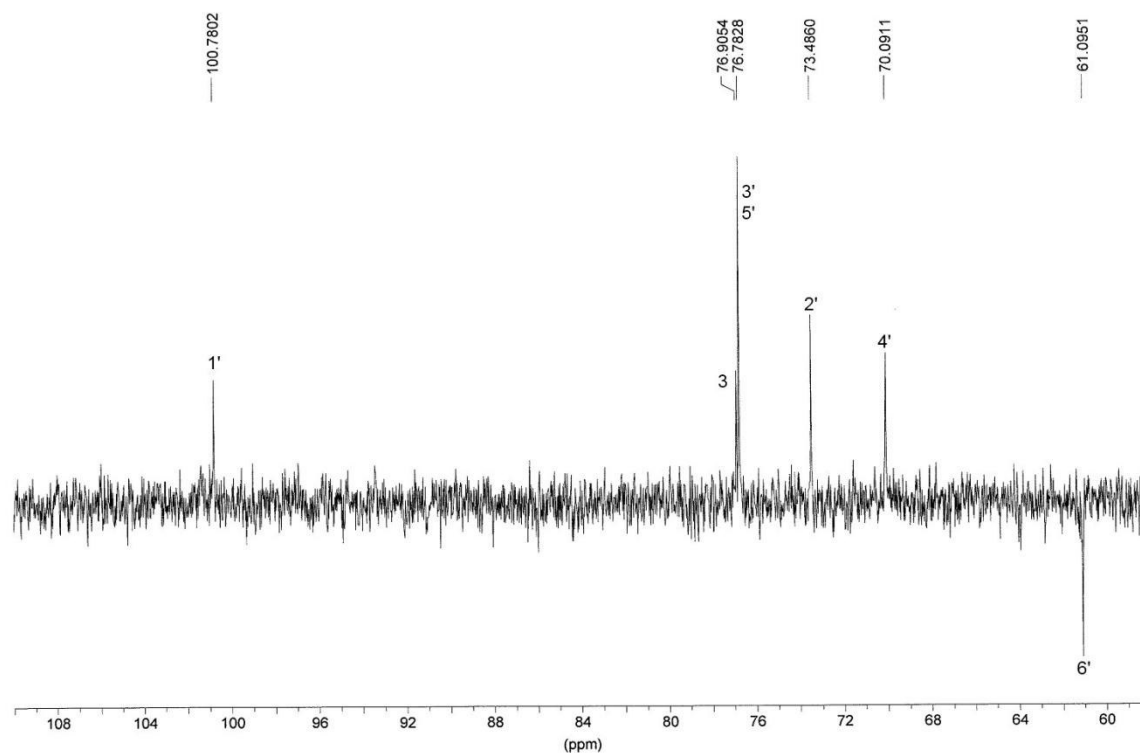


Abbildung 108: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO₅₀ in d₆DMSO
Ausschnitt: 108-60 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (APT), 31.10.2014

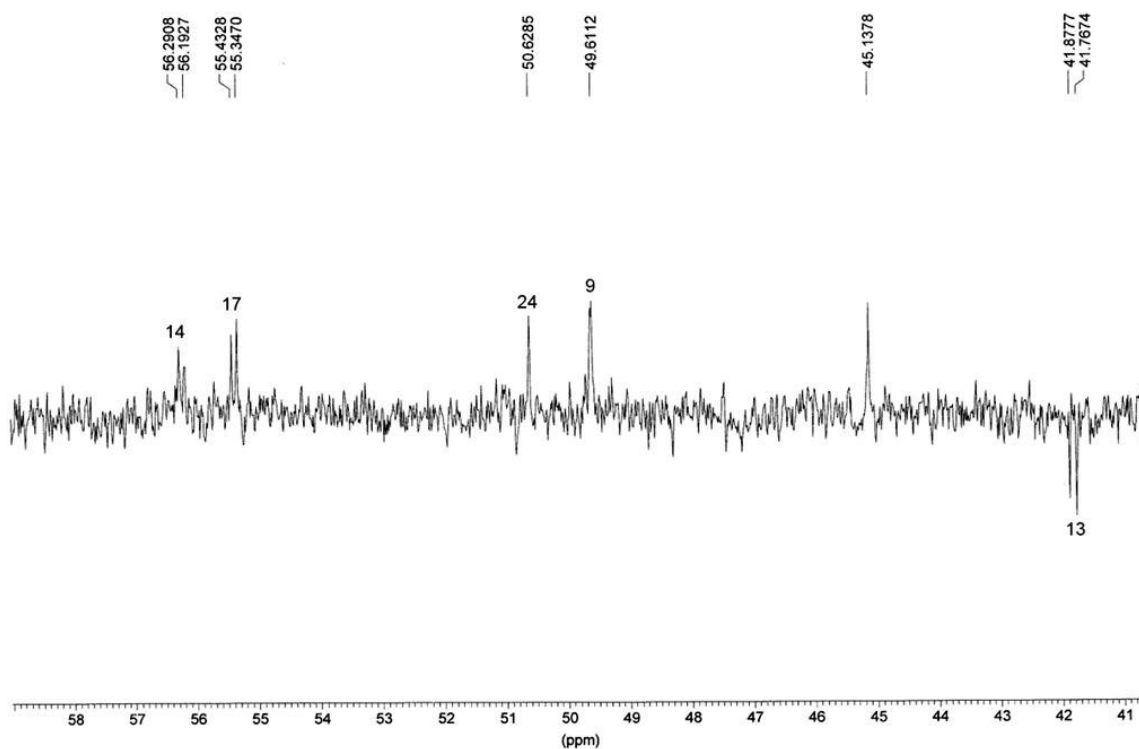


Abbildung 109: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d_6DMSO
Ausschnitt: 58-41 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (APT), 31.10.2014

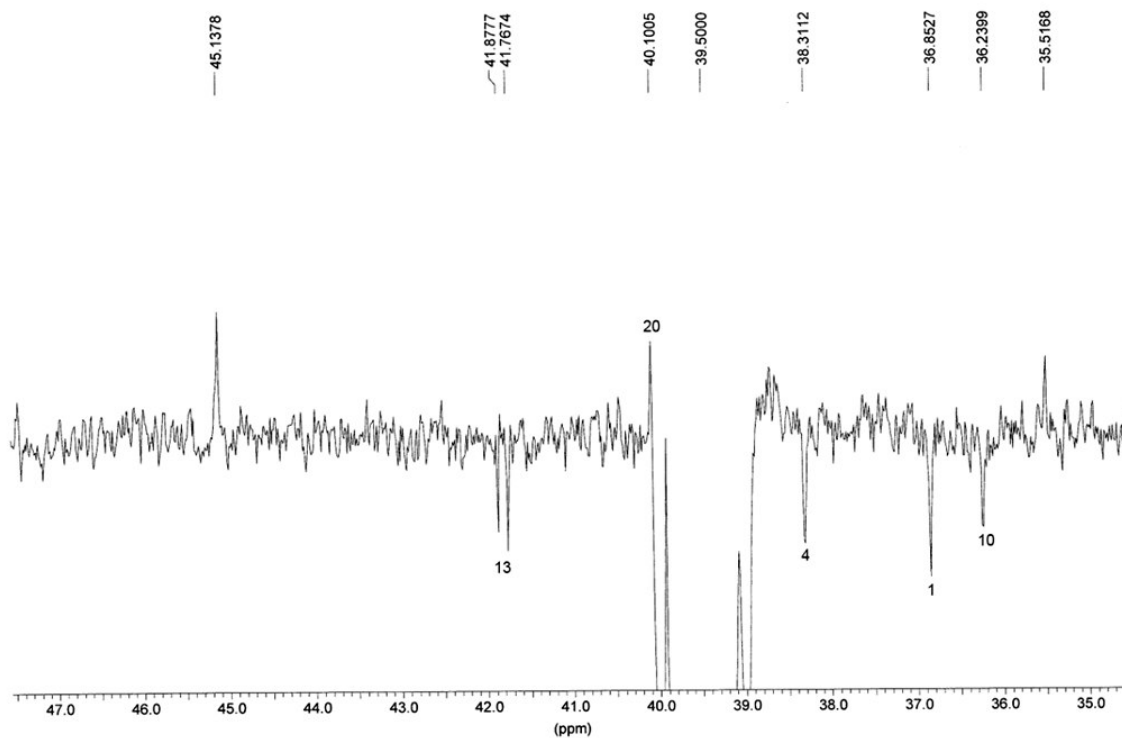


Abbildung 110: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d_6DMSO
Ausschnitt: 47,0-35,0 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (APT), 31.10.2014

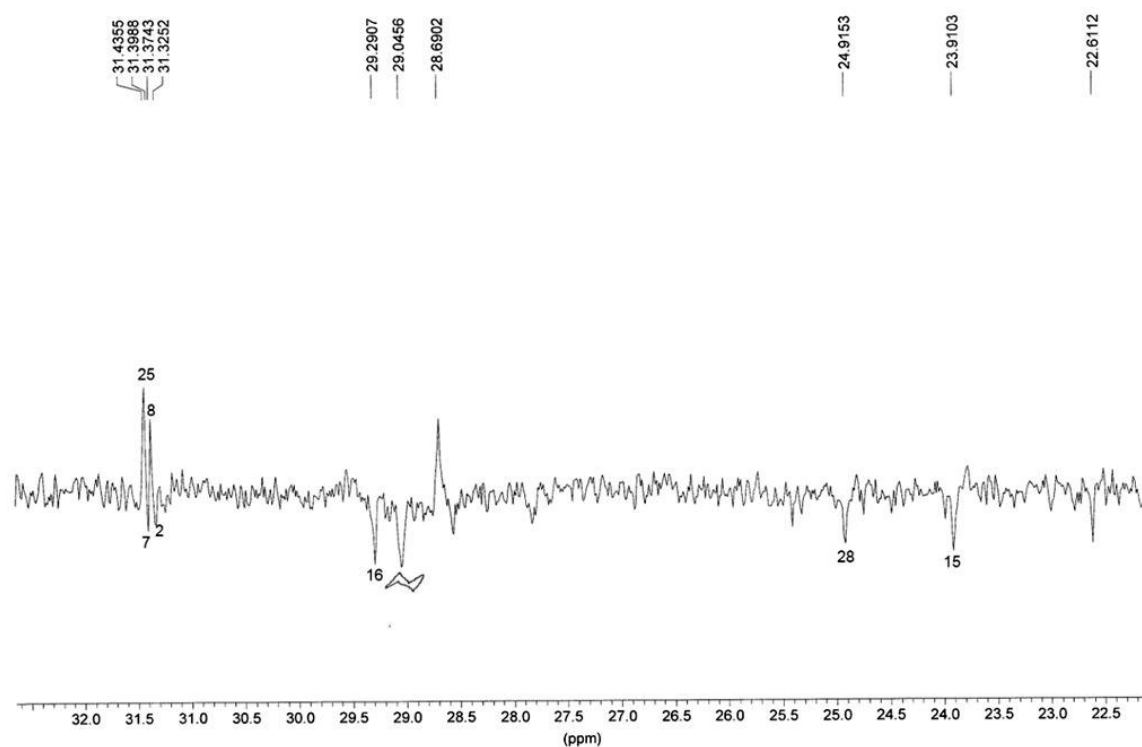


Abbildung 111: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d_6DMSO
Ausschnitt: 32,0-22,5 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (APT), 31.10.2014

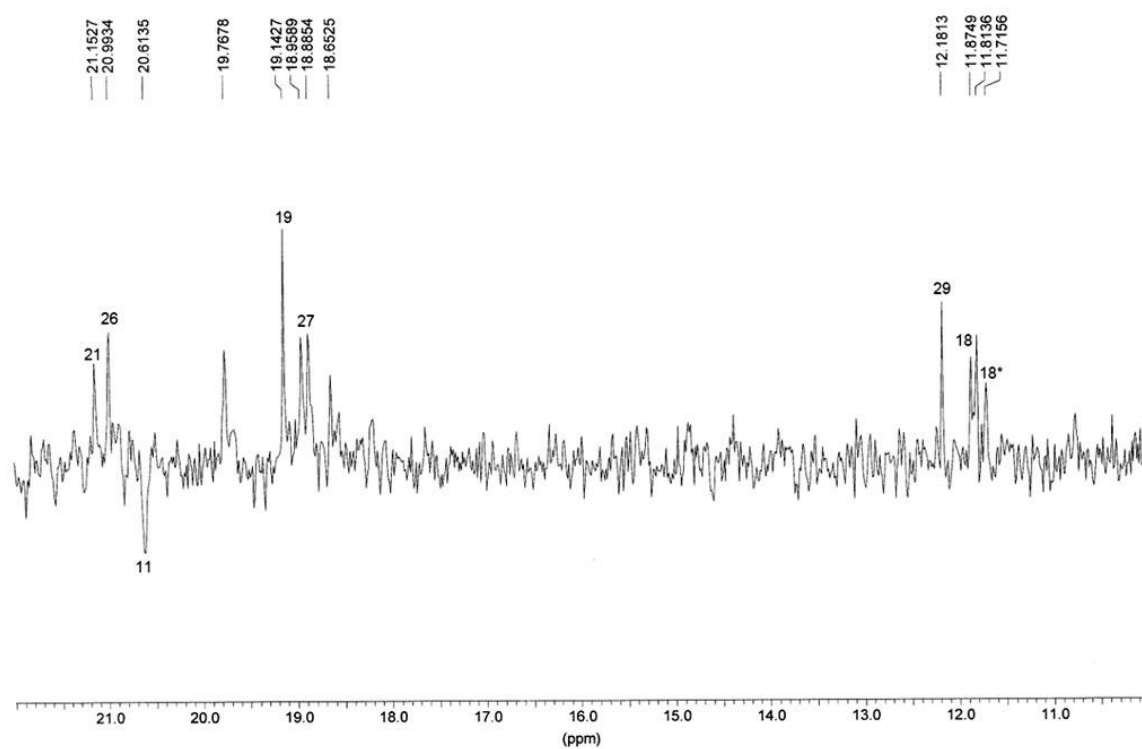


Abbildung 112: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d_6DMSO
Ausschnitt: 21,0-11,0 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HSQC neu), 31.10.2014

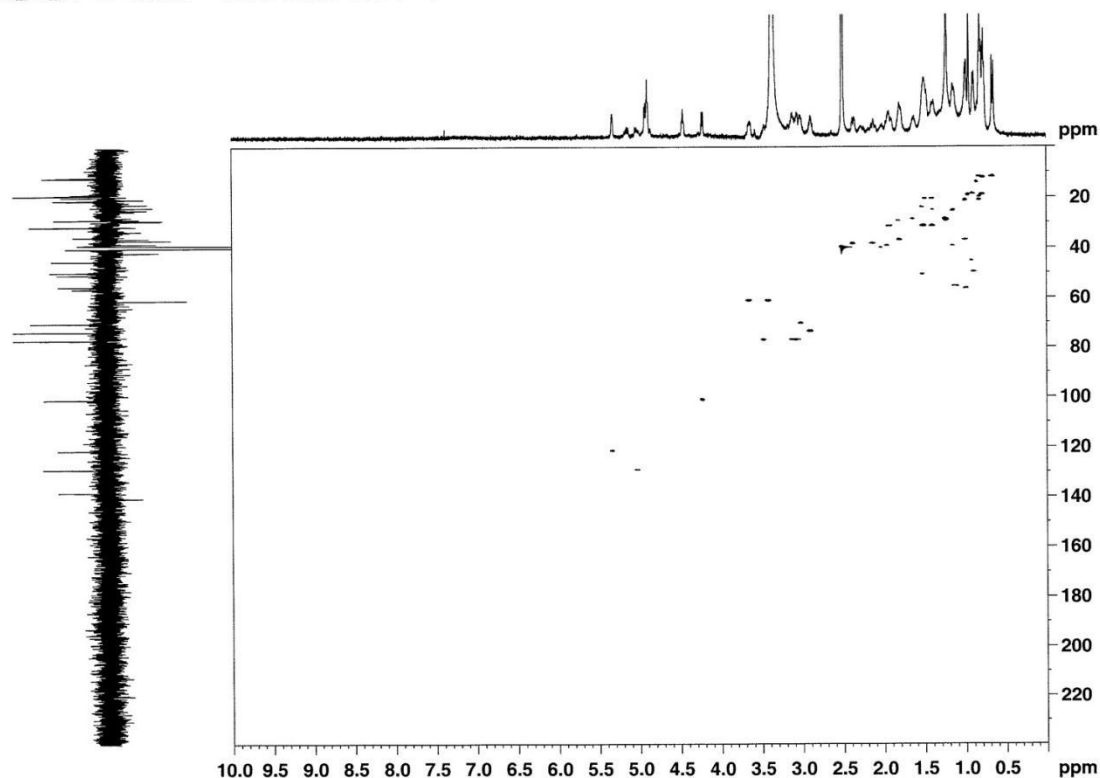


Abbildung 113: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO

CS_PO_50 in d6DMSO (HSQC neu), 31.10.2014

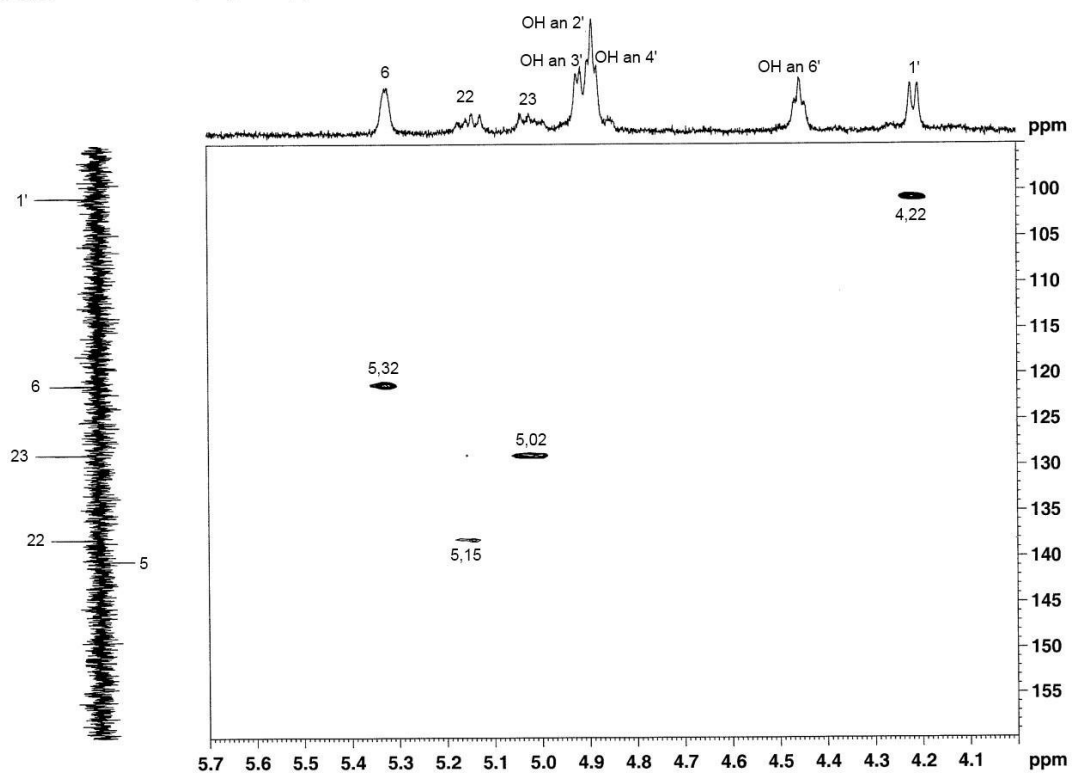


Abbildung 114: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 5,7-4,0 / 160-95 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HSQC neu), 31.10.2014

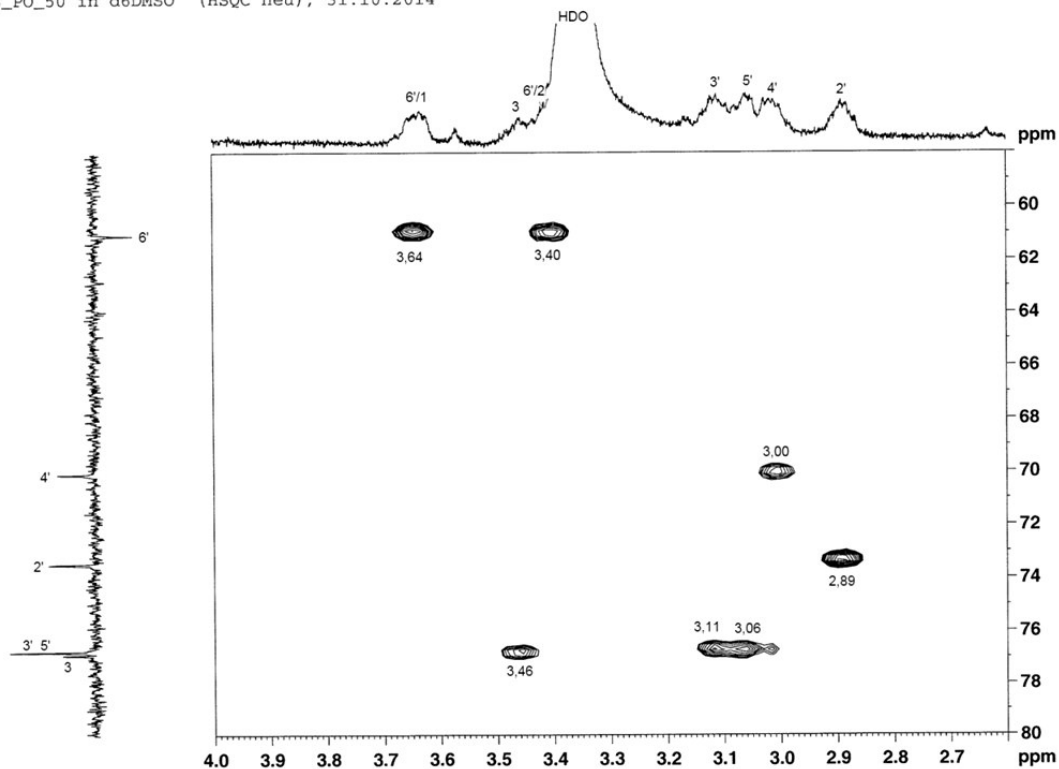


Abbildung 115: HSQC- NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 4,0-2,6 / 80-58 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HSQC neu), 31.10.2014

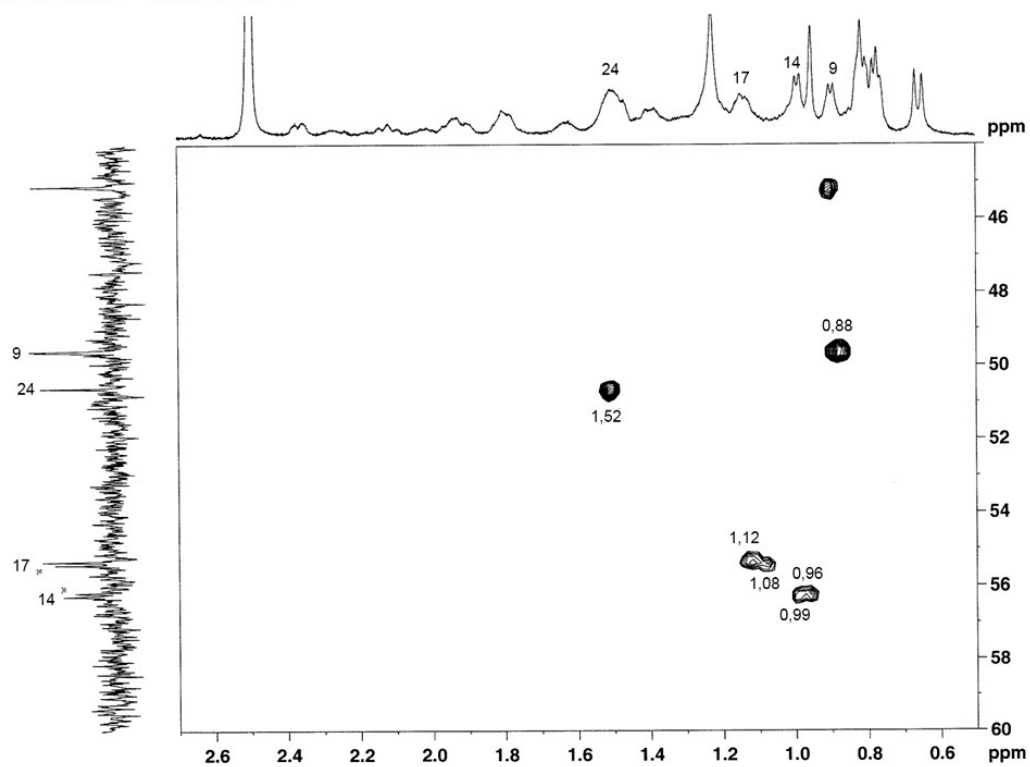


Abbildung 116: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 2,7-0,5 / 60-44 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HSQC neu), 31.10.2014

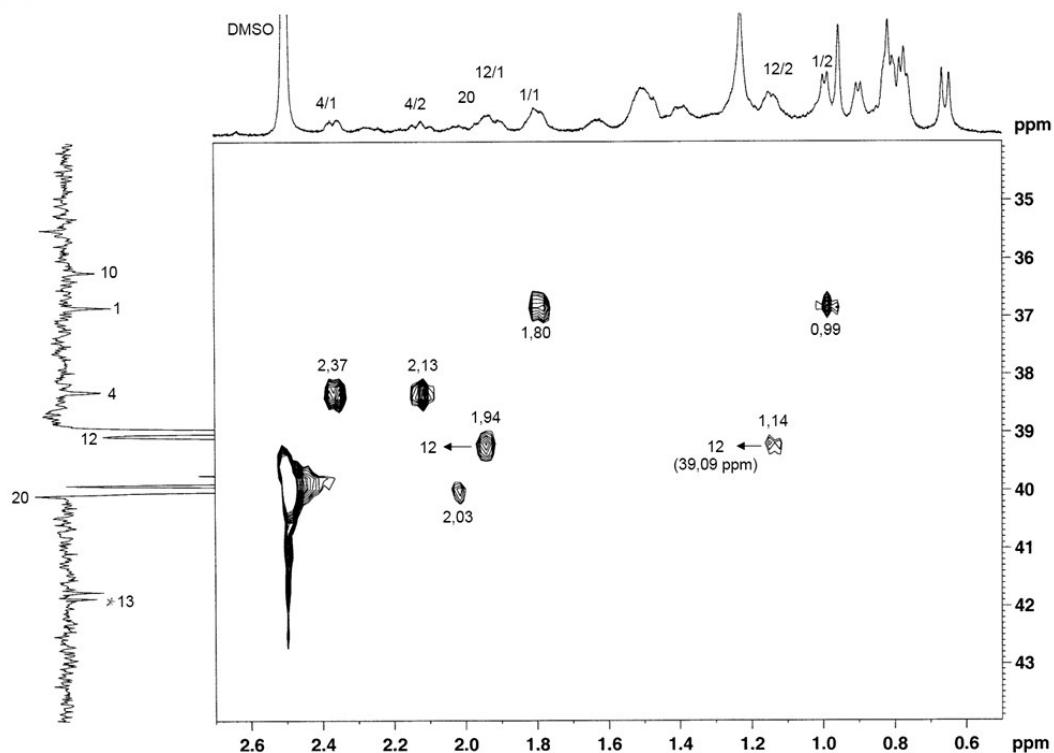


Abbildung 117: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 2,7-0,5 / 44-34 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HSQC neu), 31.10.2014

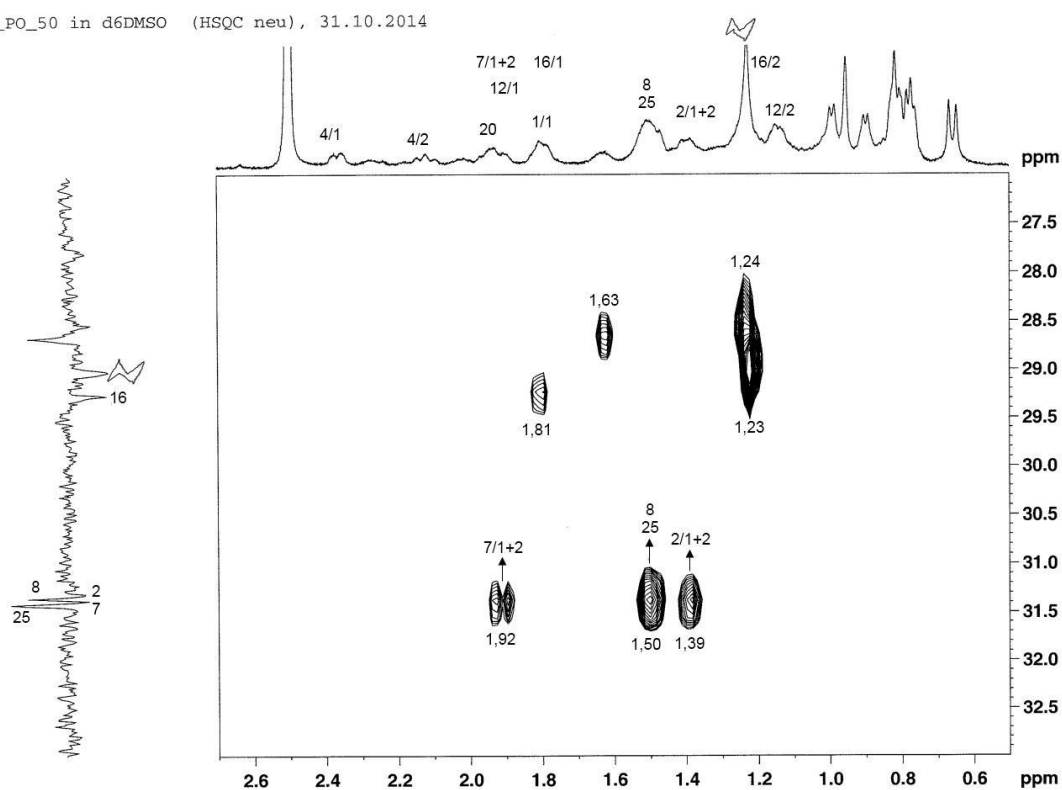


Abbildung 118: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 2,7-0,5 / 33,0-27,0 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HSQC neu), 31.10.2014

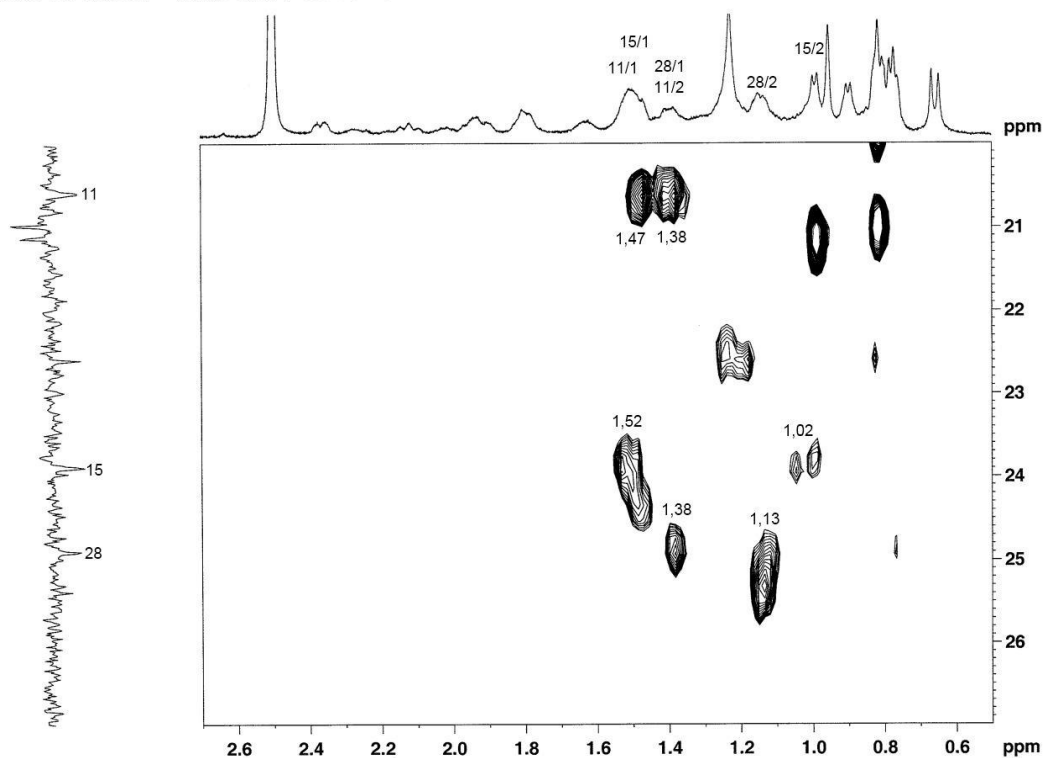


Abbildung 119: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 2,7-0,5 / 27-20 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HSQC neu), 31.10.2014

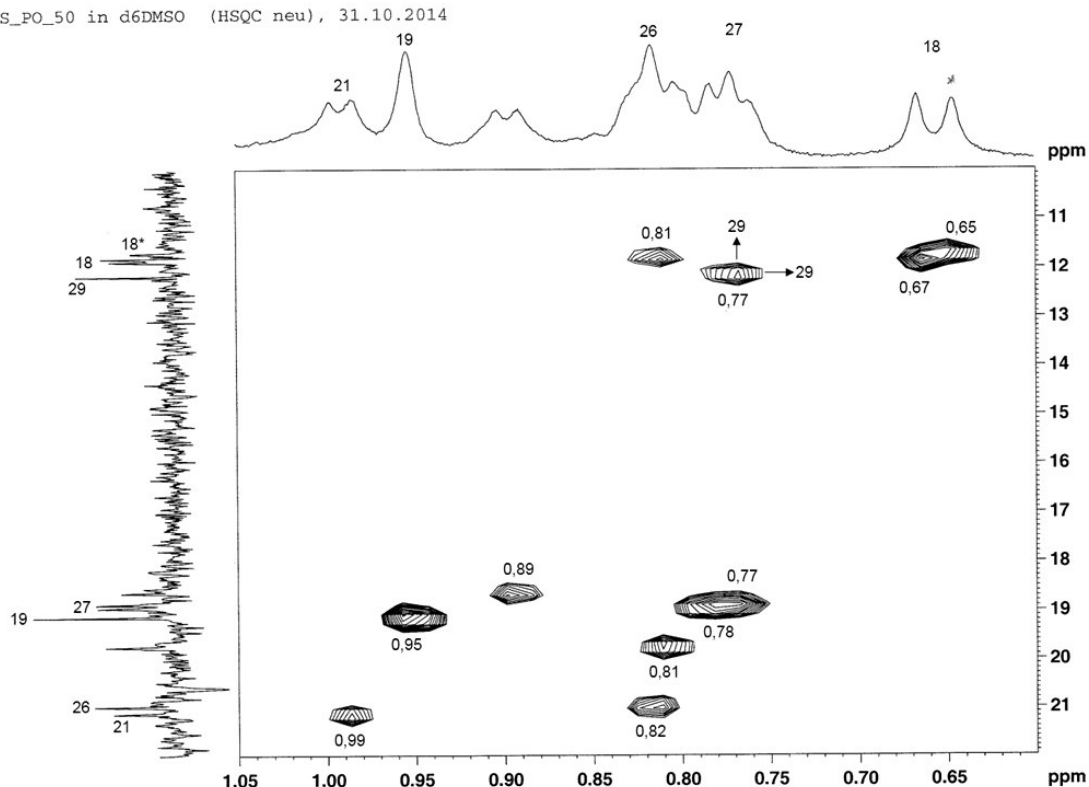


Abbildung 120: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 1,05-0,60 / 22-10 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (COSY 45), 31.10.2014

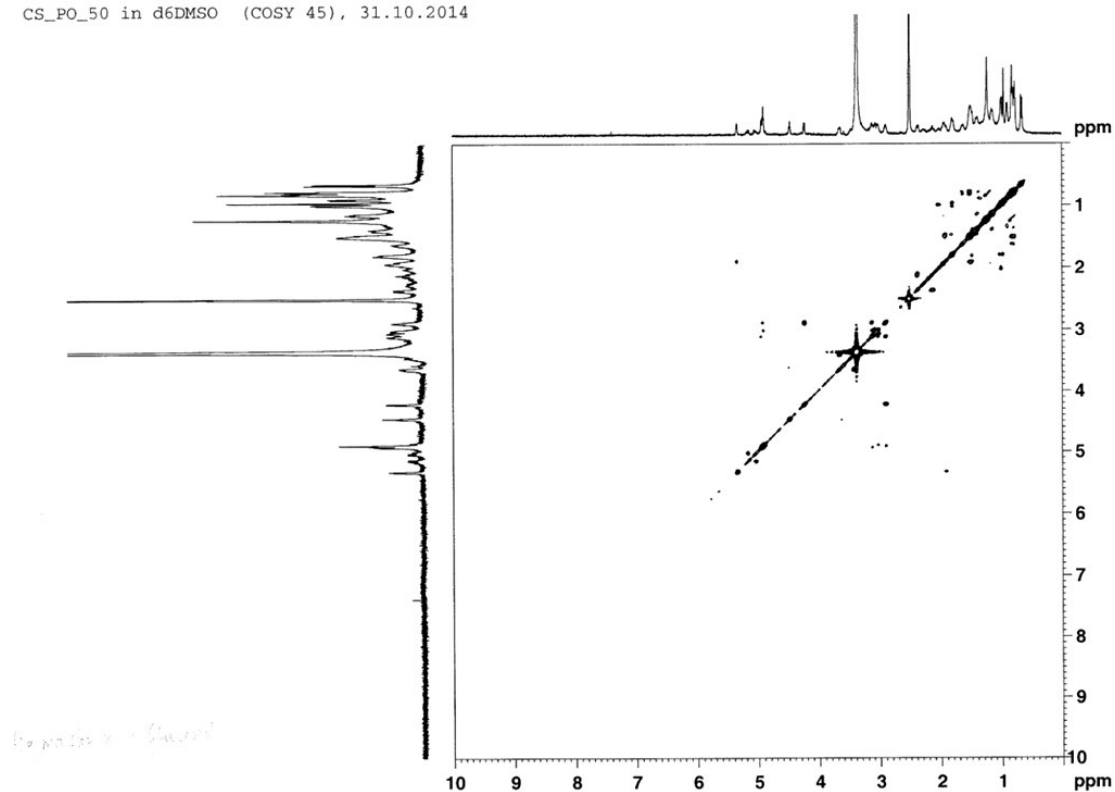


Abbildung 121: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO

CS_PO_50 in d6DMSO (COSY 45), 31.10.2014

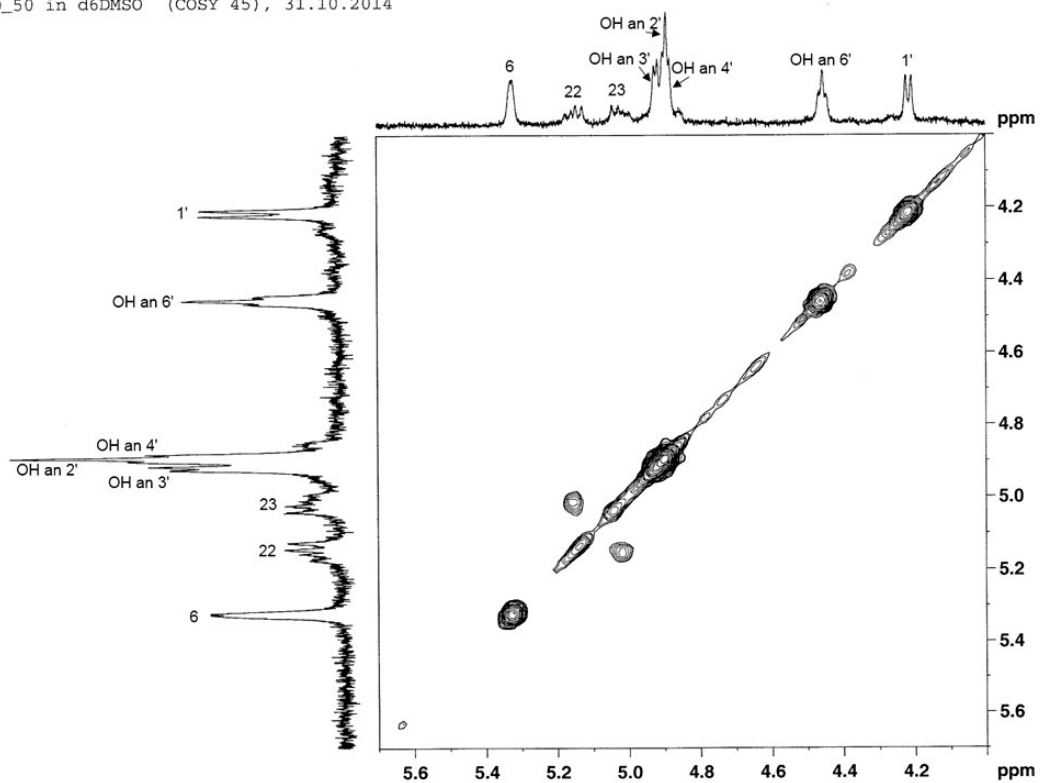


Abbildung 122: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 5,7-4,0 / 5,7-4,0 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (COSY 45), 31.10.2014

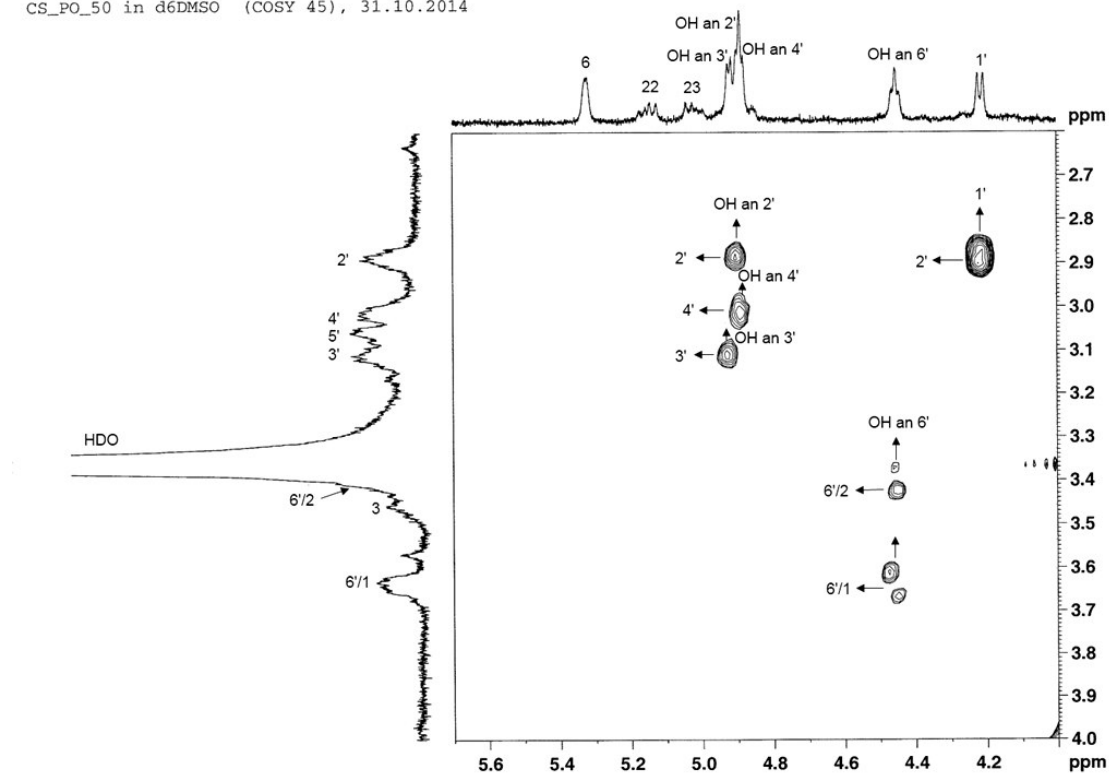


Abbildung 123: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO₅₀ in d₆DMSO
Ausschnitt: 5,7-4,0 / 4,0-2,6 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (COSY 45), 31.10.2014

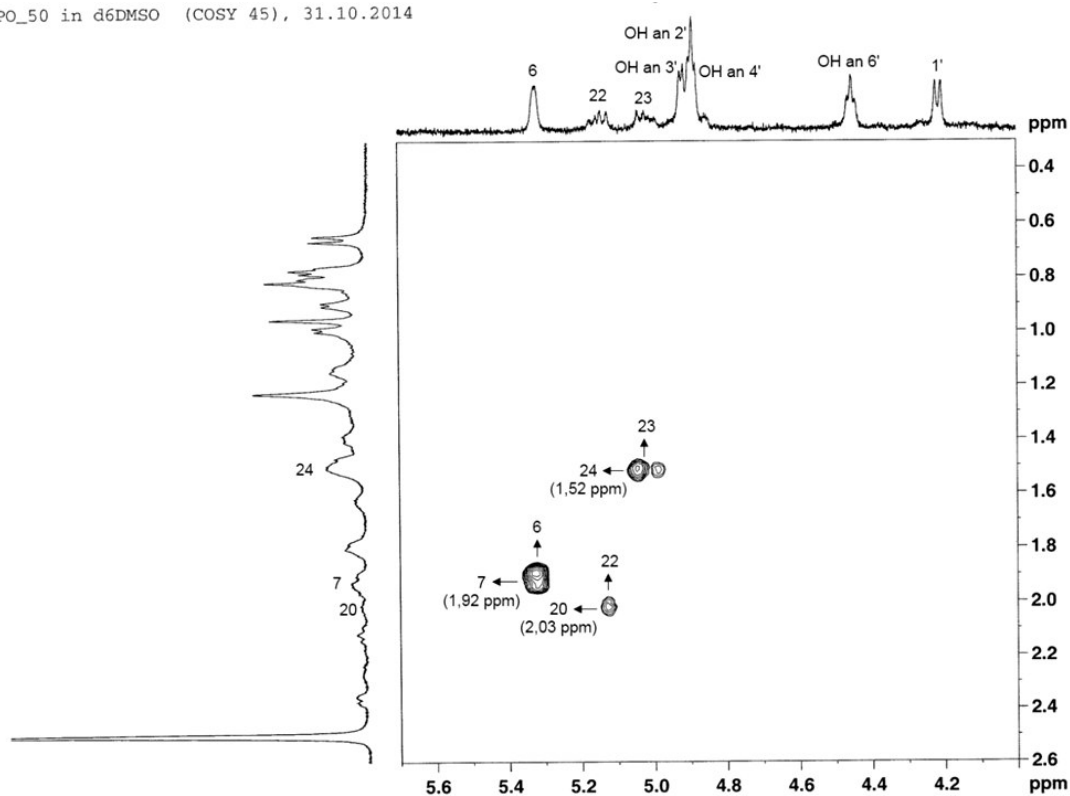


Abbildung 124: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO₅₀ in d₆DMSO
Ausschnitt: 5,7-4,0 / 2,6-0,3 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (COSY 45), 31.10.2014

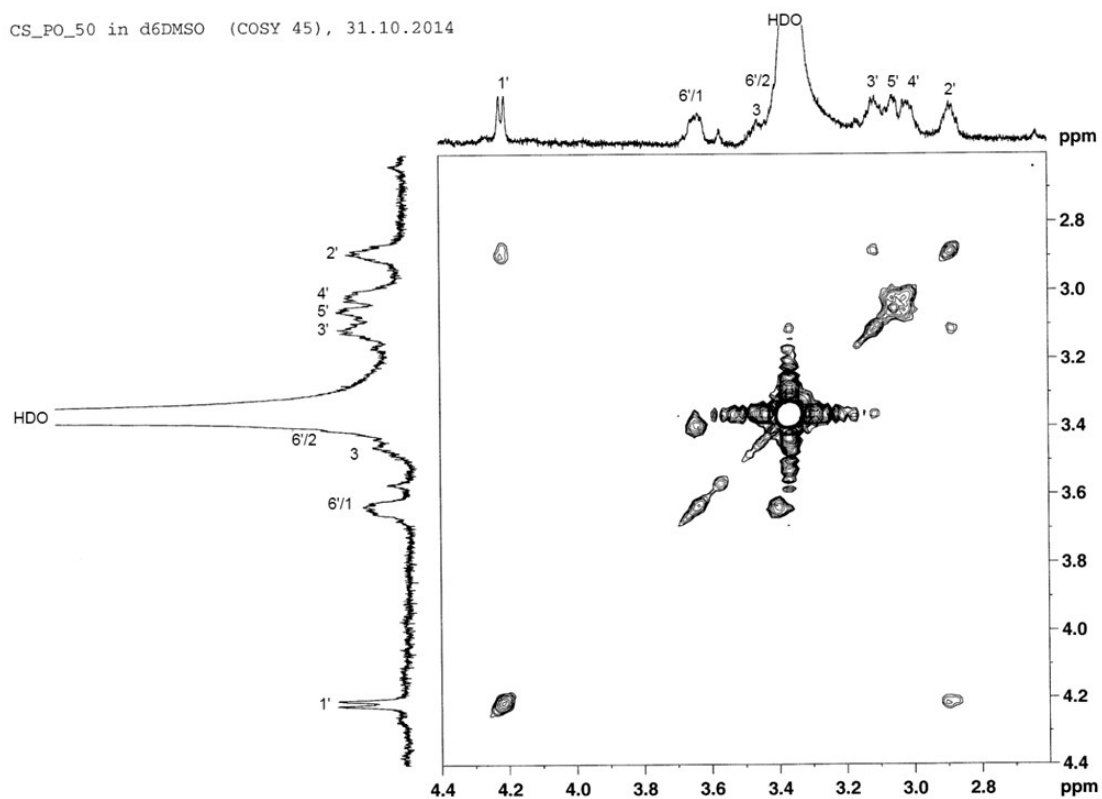


Abbildung 125: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 4,4-2,6 / 4,4-2,6 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (COSY 45), 31.10.2014

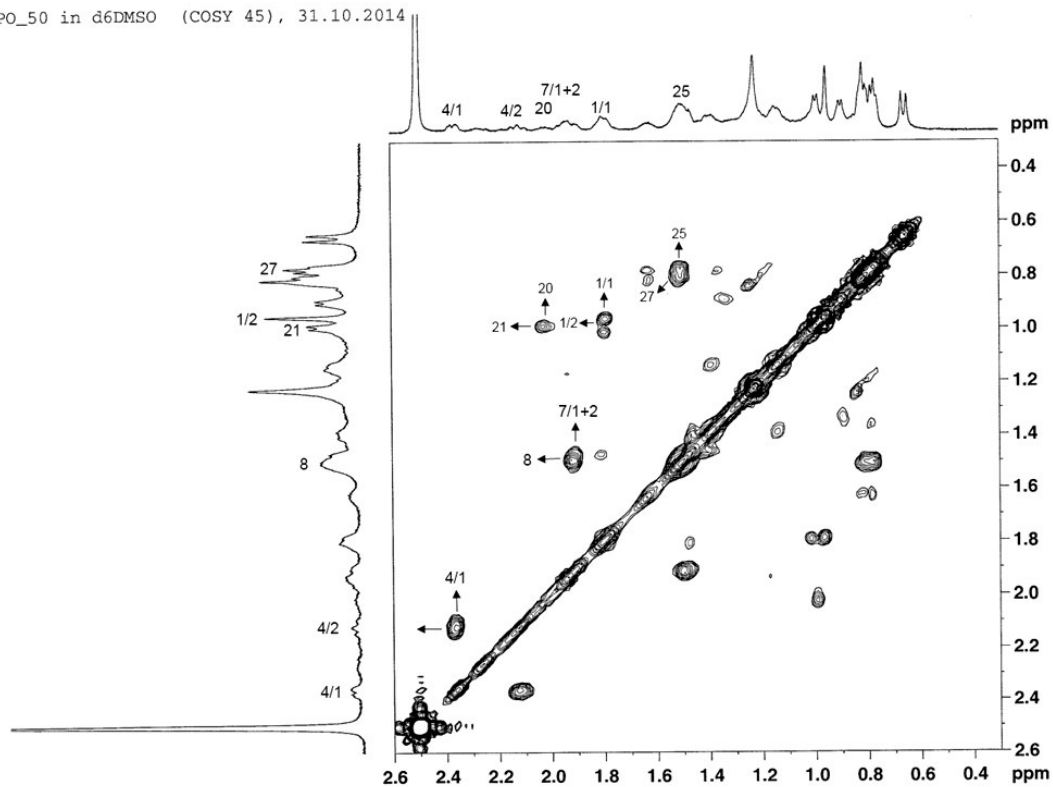


Abbildung 126: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 2,6-0,3 / 2,6-0,3 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HMBC), 31.10.2014

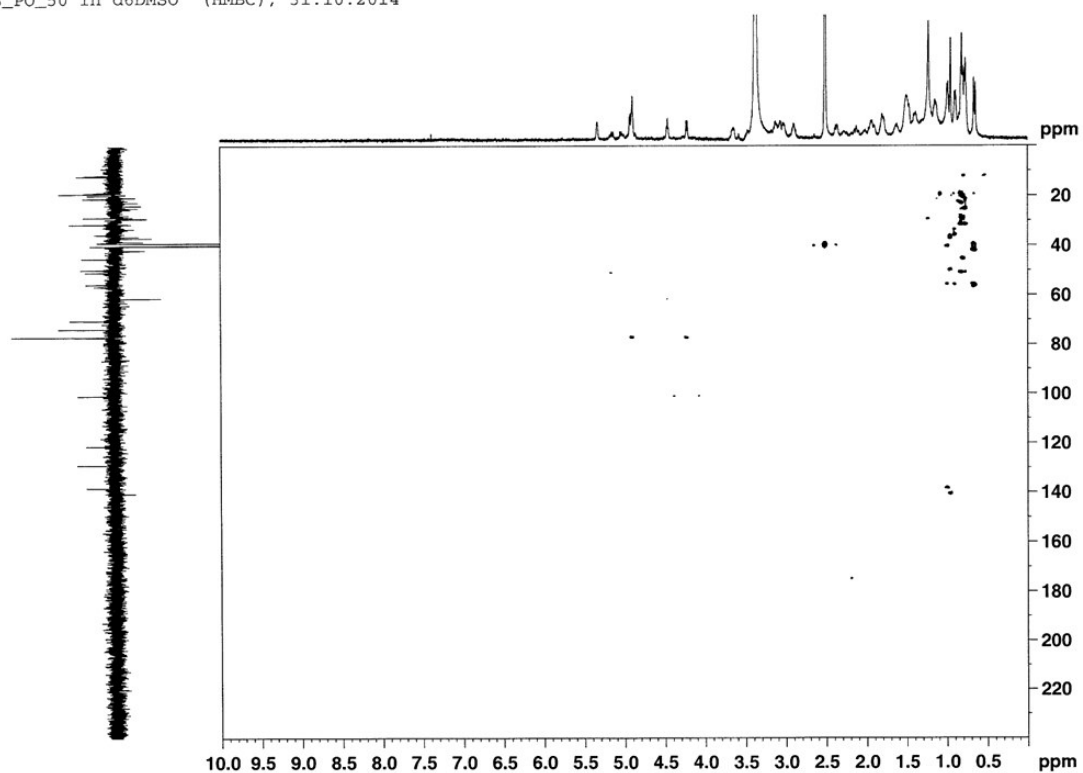


Abbildung 127: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO

CS_PO_50 in d6DMSO (HMBC), 31.10.2014

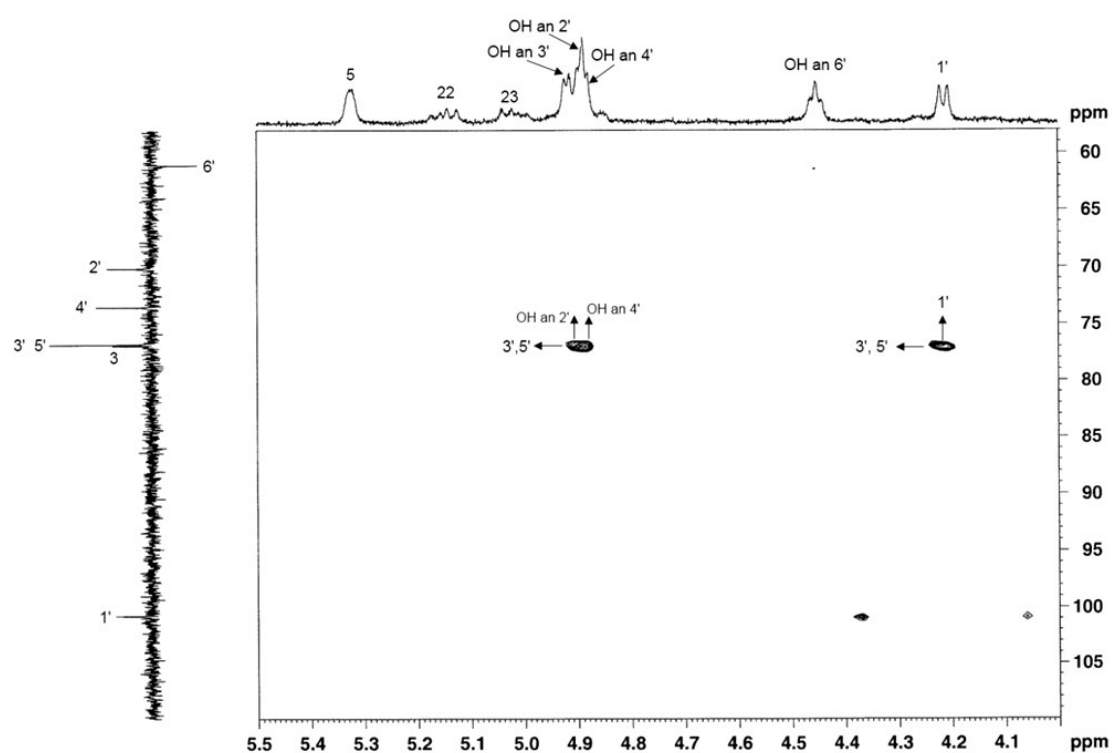


Abbildung 128: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 5,5-4,0 / 110-60 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HMBC), 31.10.2014

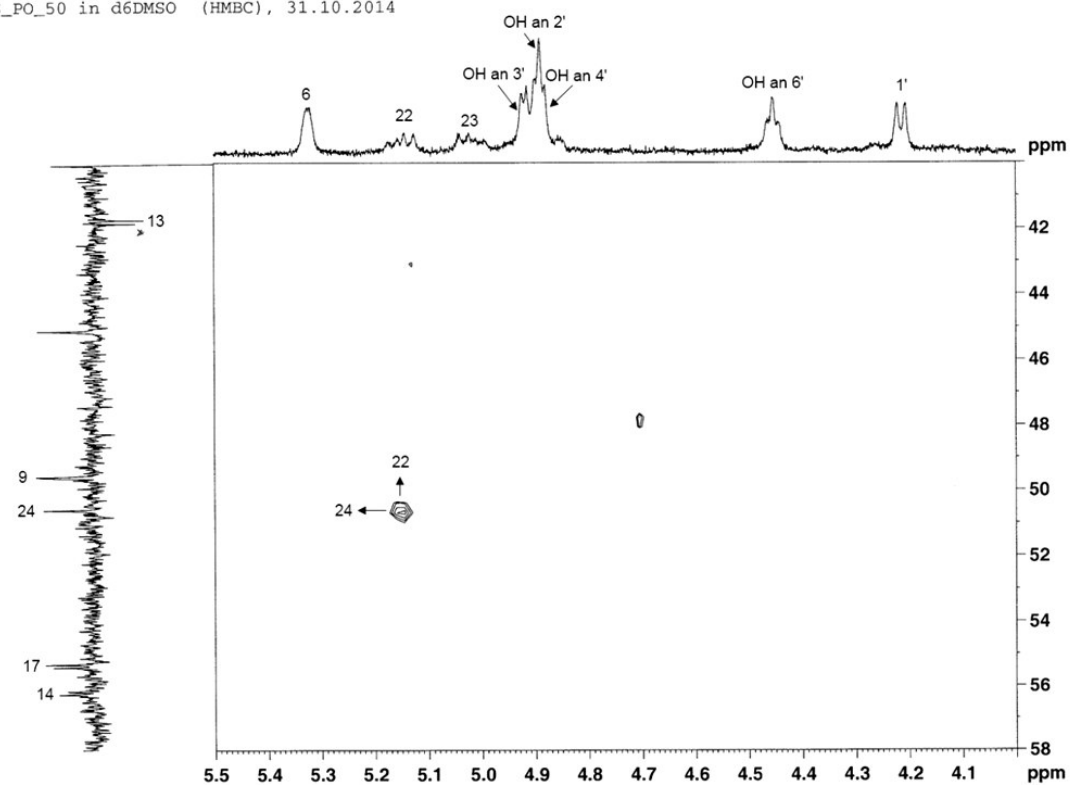


Abbildung 129: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₀ in d₆DMSO
Ausschnitt: 5,5-4,0 / 58-40 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HMBC), 31.10.2014

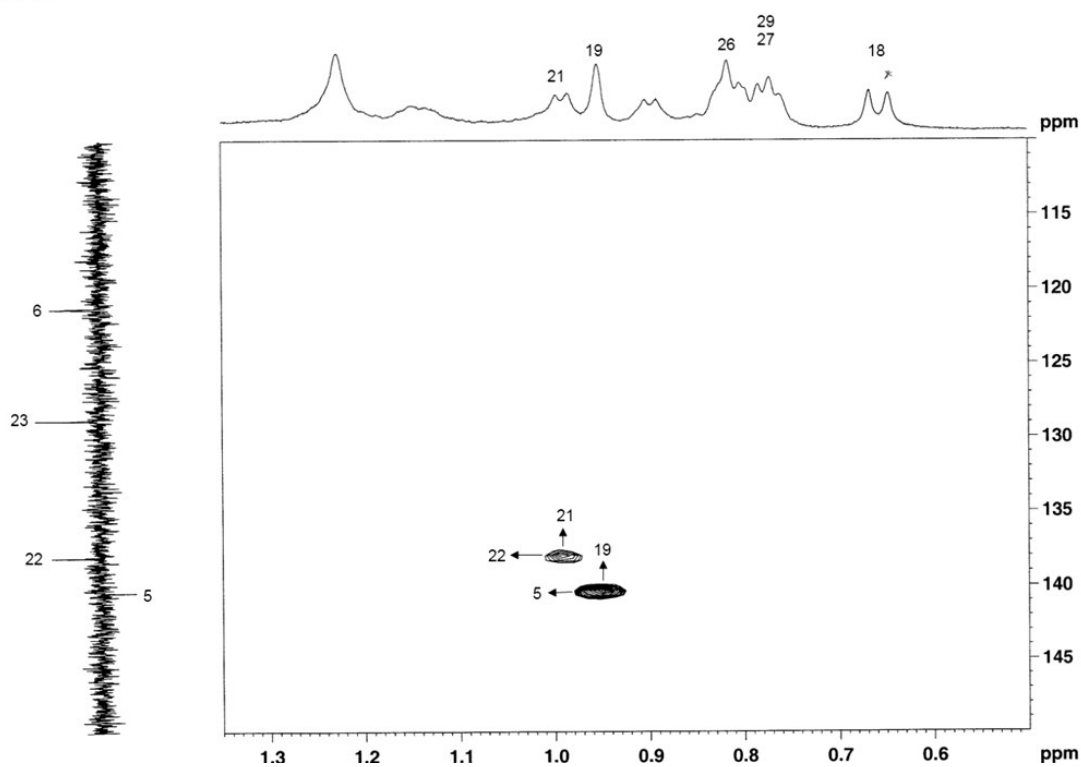


Abbildung 130: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₀ in d₆DMSO
Ausschnitt: 1,35-0,50 / 150-110 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HMBC), 31.10.2014

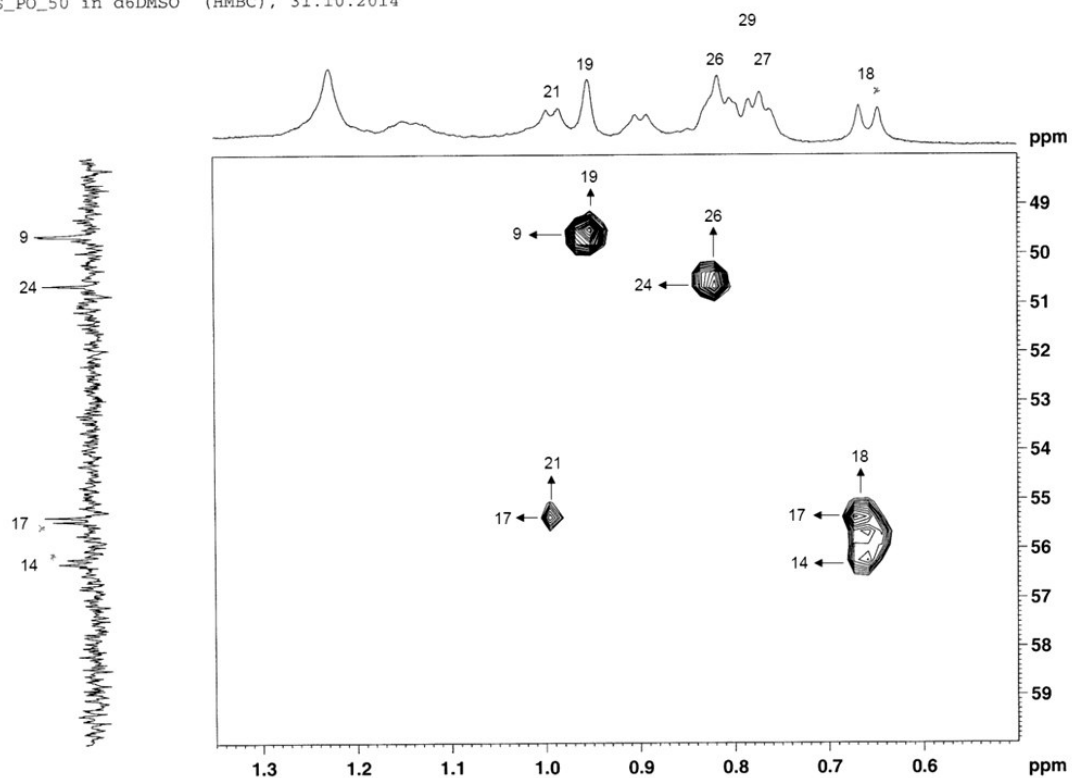


Abbildung 131: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₀ in d₆DMSO
Ausschnitt: 1,35-0,50 / 60-48 ppm

CS_PO_50 in d6DMSO (HMBC), 31.10.2014

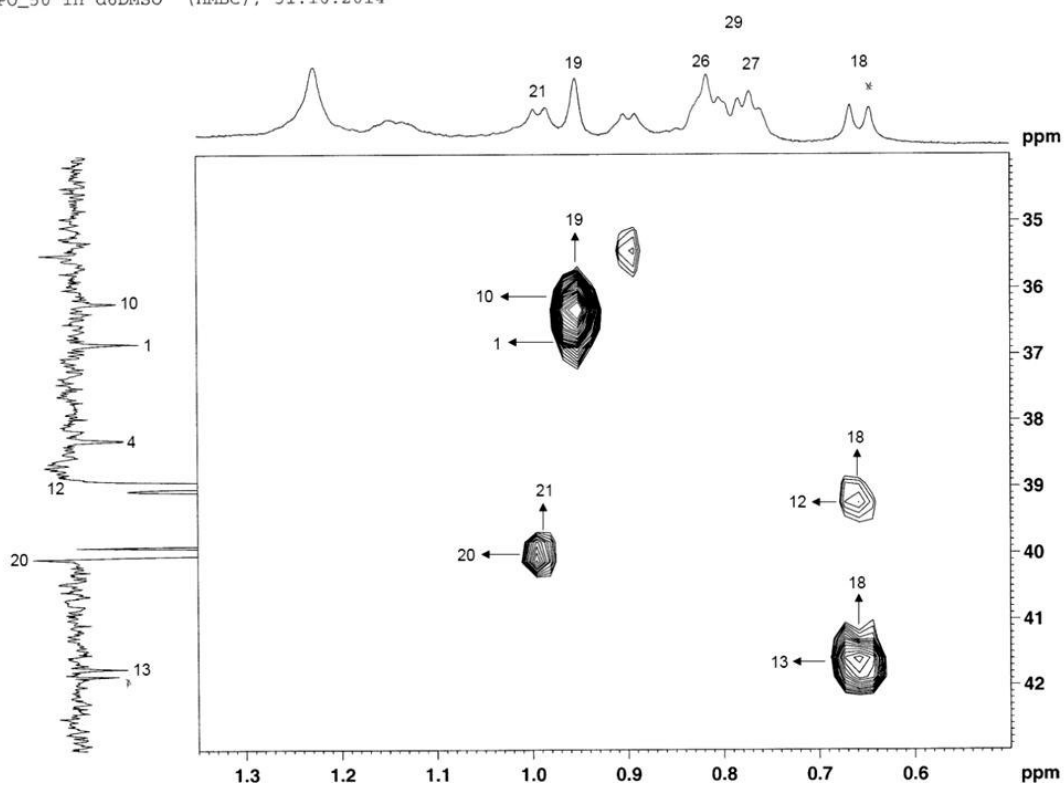


Abbildung 132: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₀ in d₆DMSO
Ausschnitt: 1,35 – 0,50 / 43-34 ppm

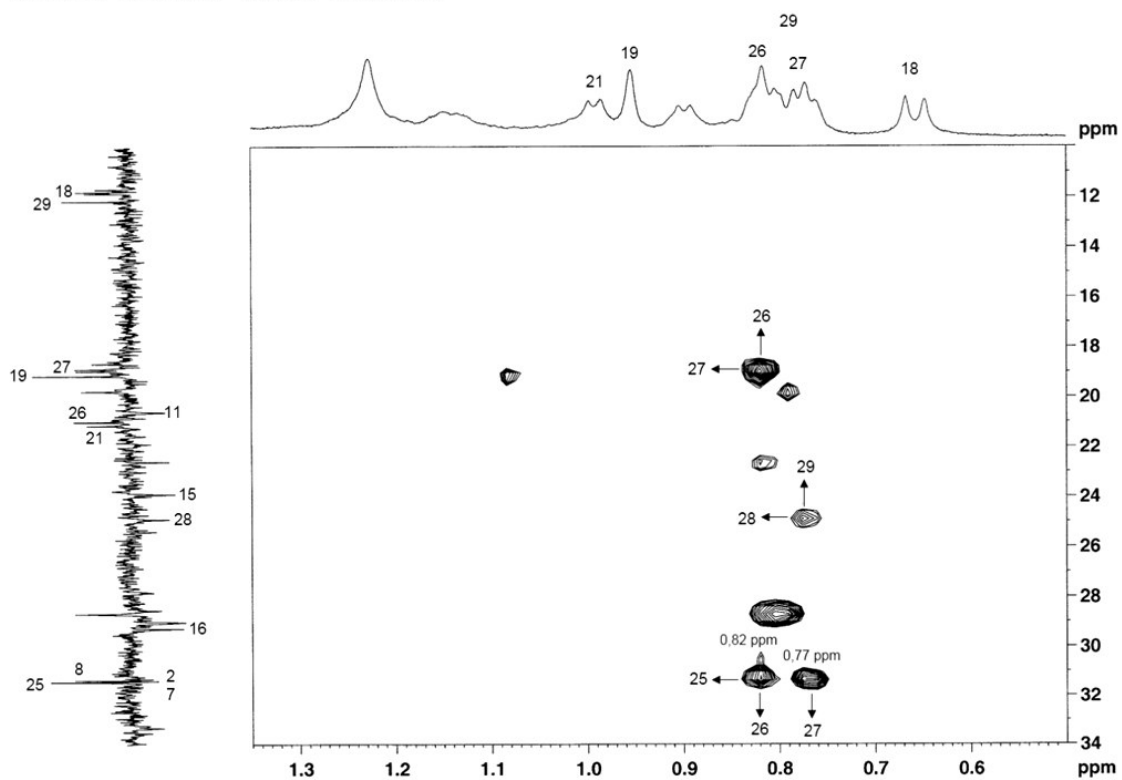


Abbildung 133: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_50 in d₆DMSO
Ausschnitt: 1,35-0,50 / 34-10 ppm

Substanz PO_51

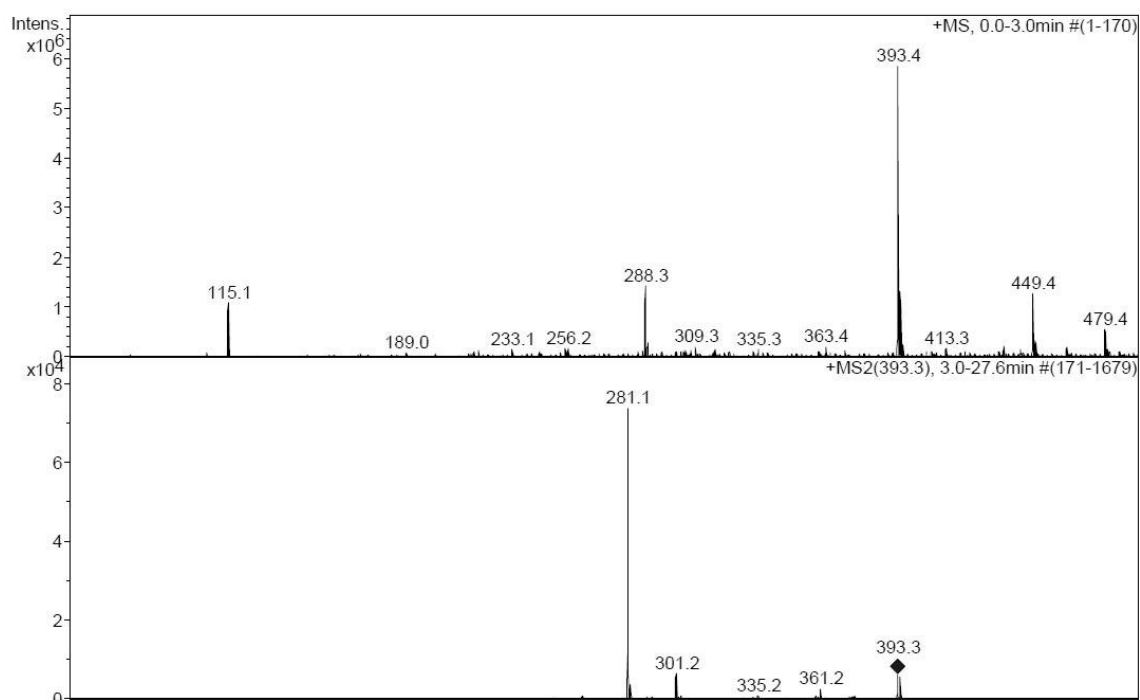


Abbildung 134: ESI-MS und ESI-MS² (m/z 393,3) Spektrum von Substanz PO_51

Substanz PO_53

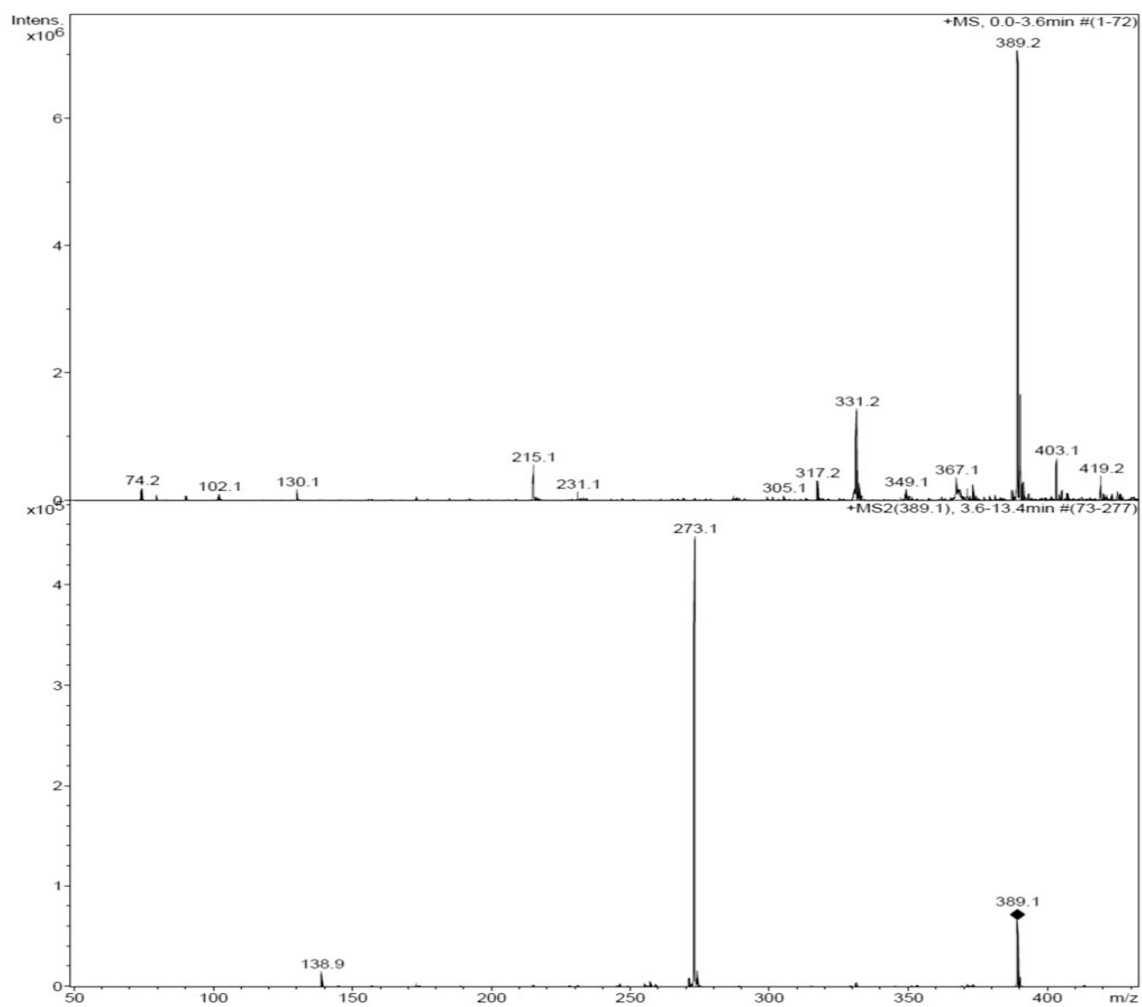


Abbildung 135: ESI-MS und ESI-MS² (m/z 389,2) Spektrum von Substanz PO_53

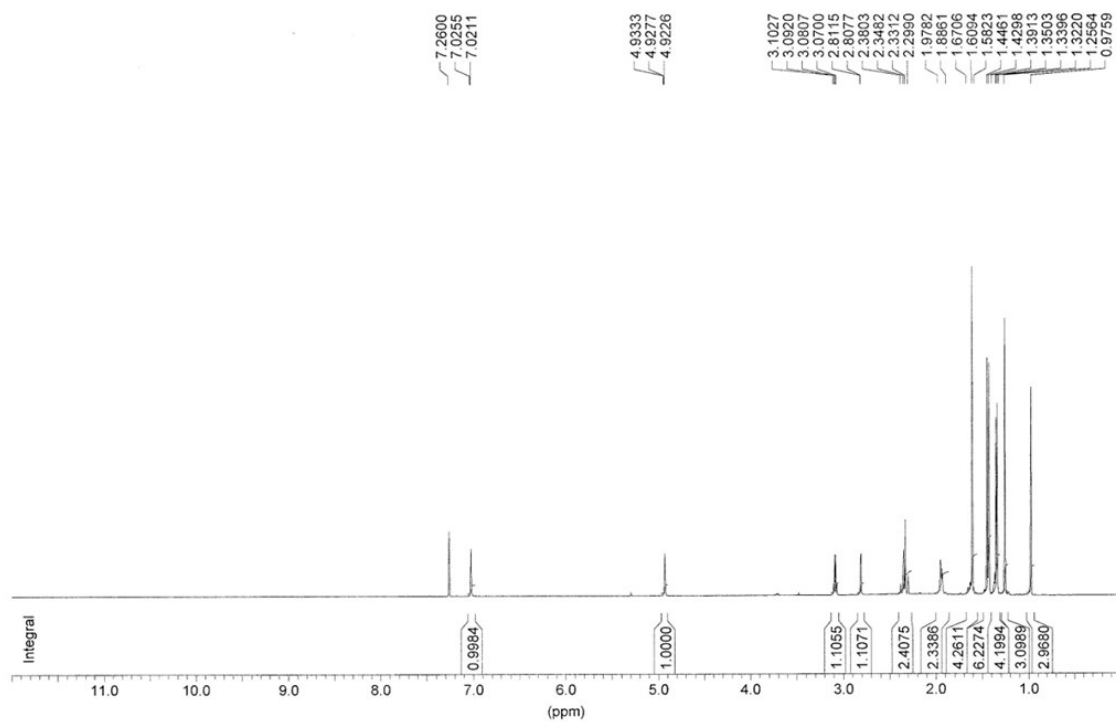


Abbildung 136: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_53 in CDCl_3

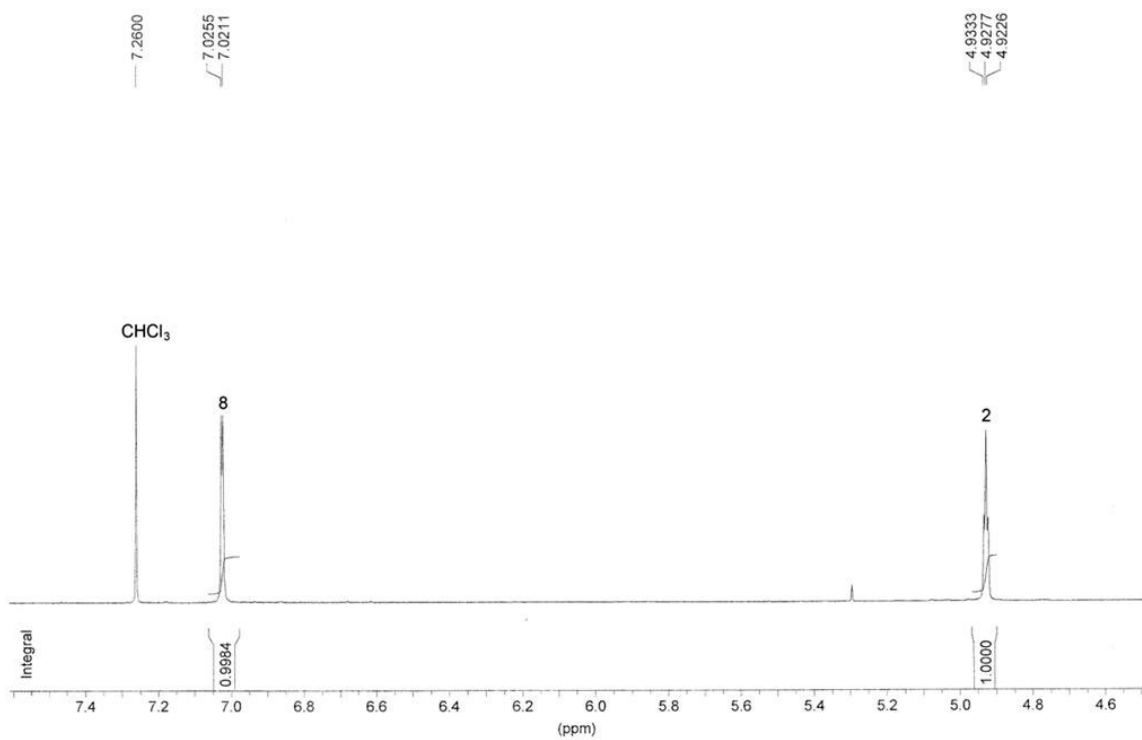


Abbildung 137: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_53 in CDCl_3
Ausschnitt: 7,4-4,6 ppm

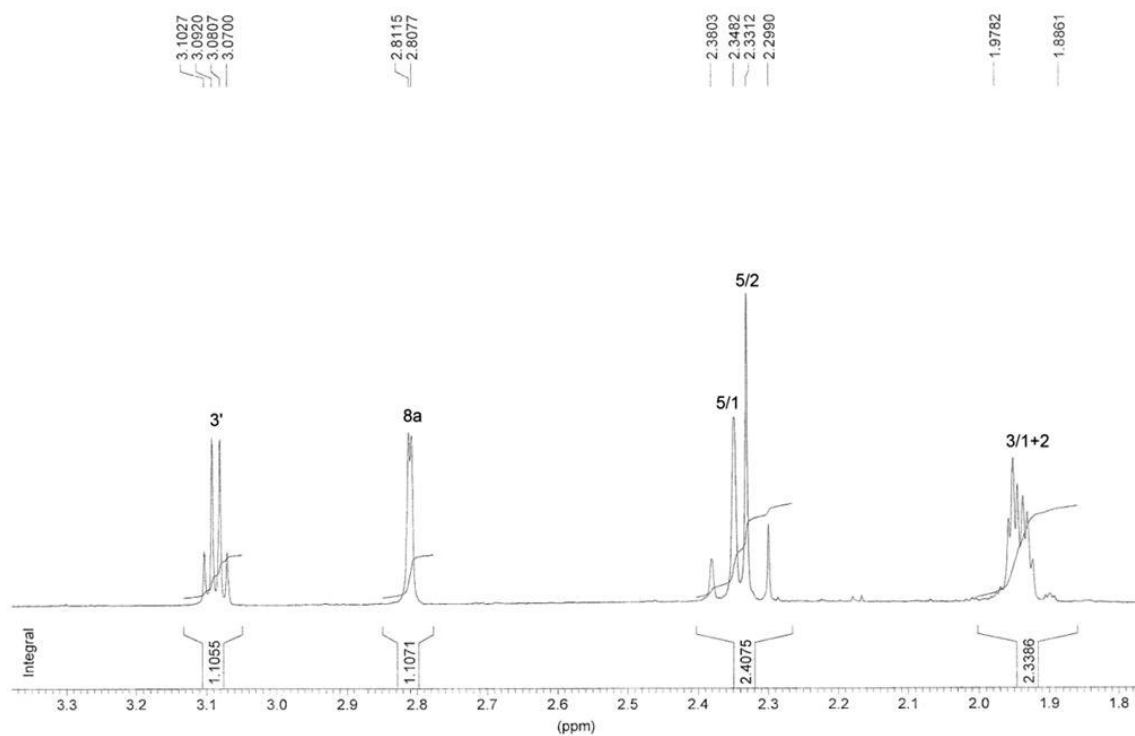


Abbildung 138: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_53 in CDCl_3
Ausschnitt: 3,3-1,8 ppm

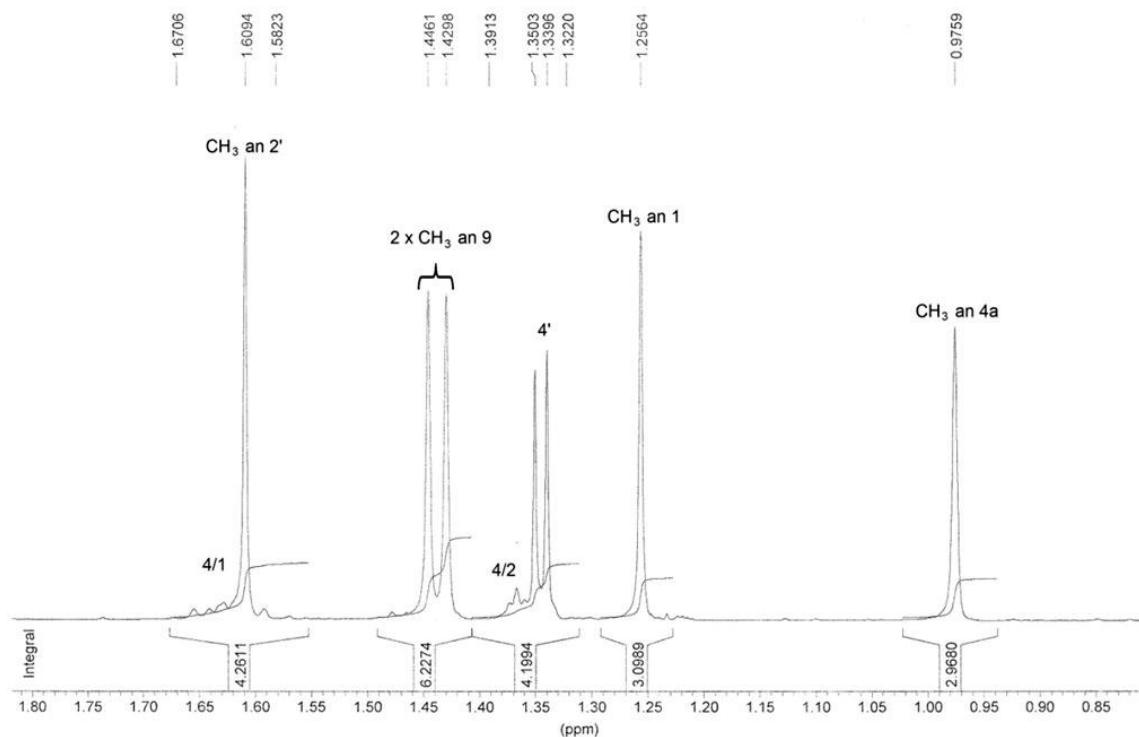


Abbildung 139: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_53 in CDCl_3
Ausschnitt: 1,80-0,85 ppm

CS_PO_53 in cdd3 (APT), 7.8.2014

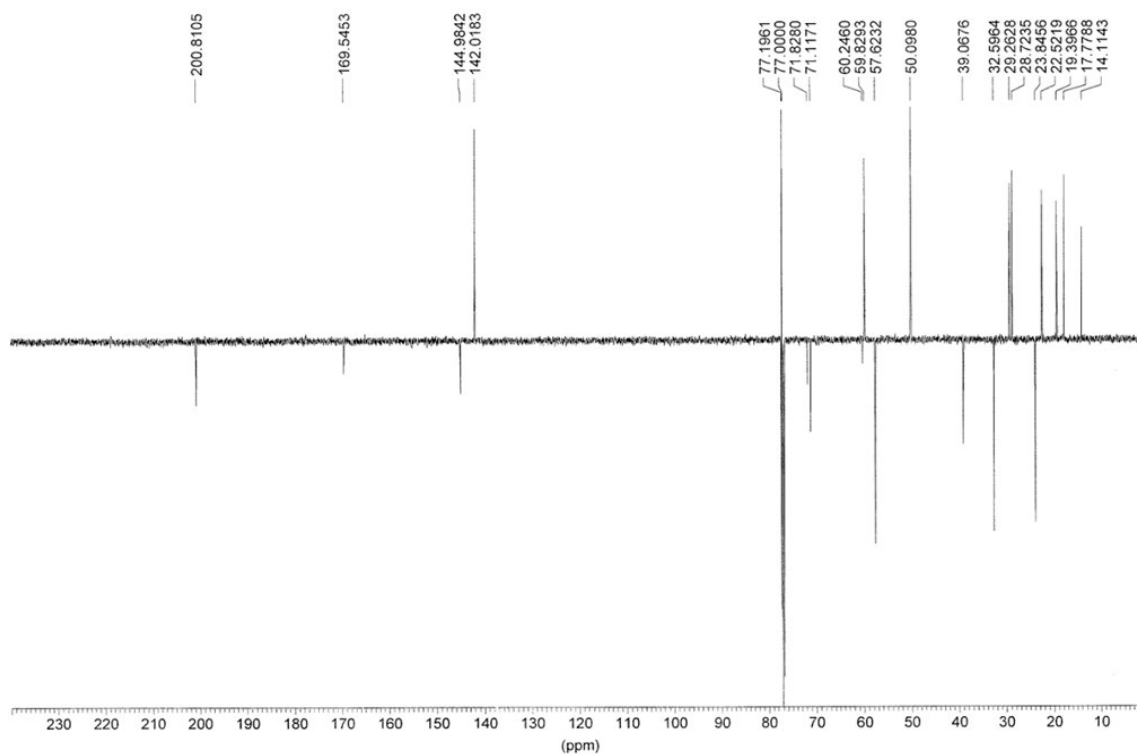


Abbildung 140: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_53 in CDCl_3

CS_PO_53 in cdd3 (APT), 7.8.2014

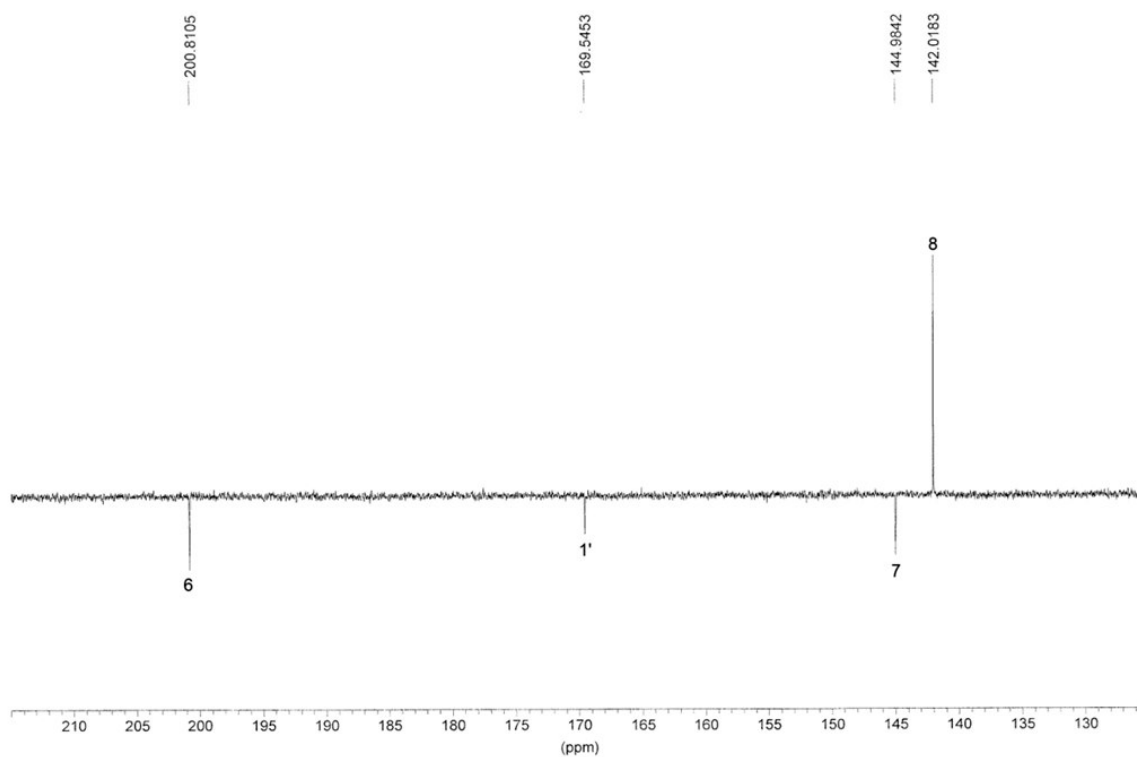


Abbildung 141: ^{13}C -NMR Spektrum von Substanz PO_53 in CDCl_3
Ausschnitt: 210-130 ppm

CS_PO_53 in cdcl3 (APT), 7.8.2014

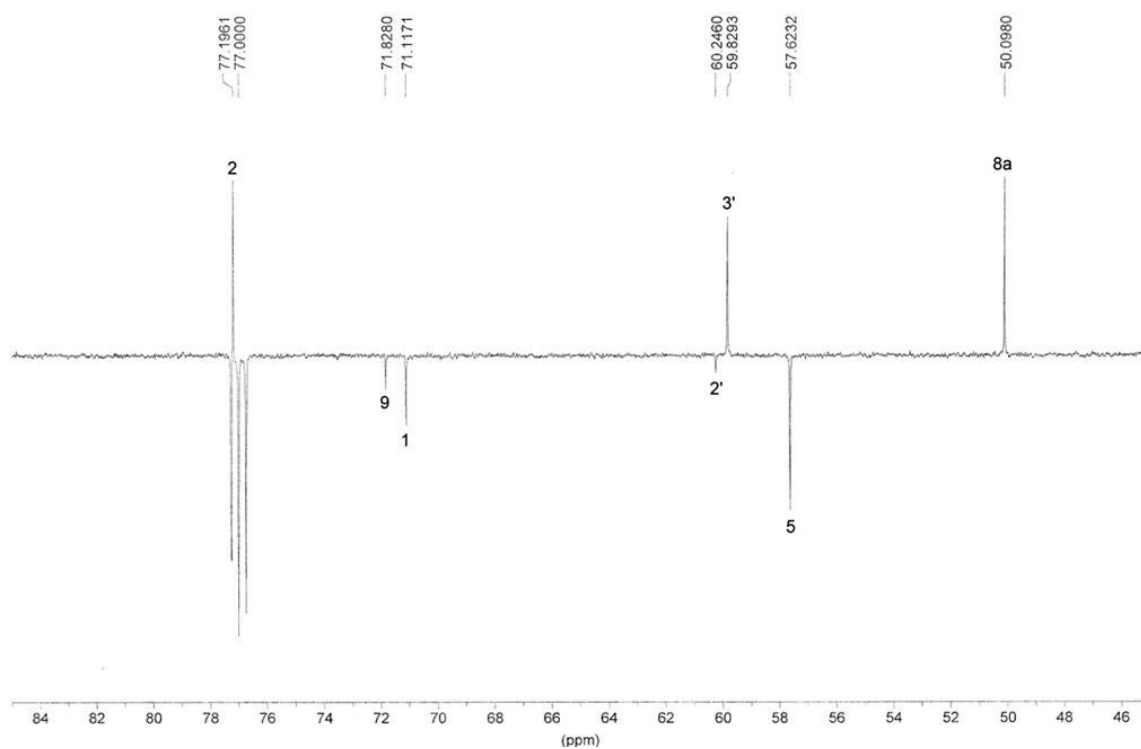


Abbildung 142: ¹³C-NMR Spektrum von Substanz PO₅₃ in CDCl₃
Ausschnitt: 84-46 ppm

CS_PO_53 in cdcl3 (APT), 7.8.2014

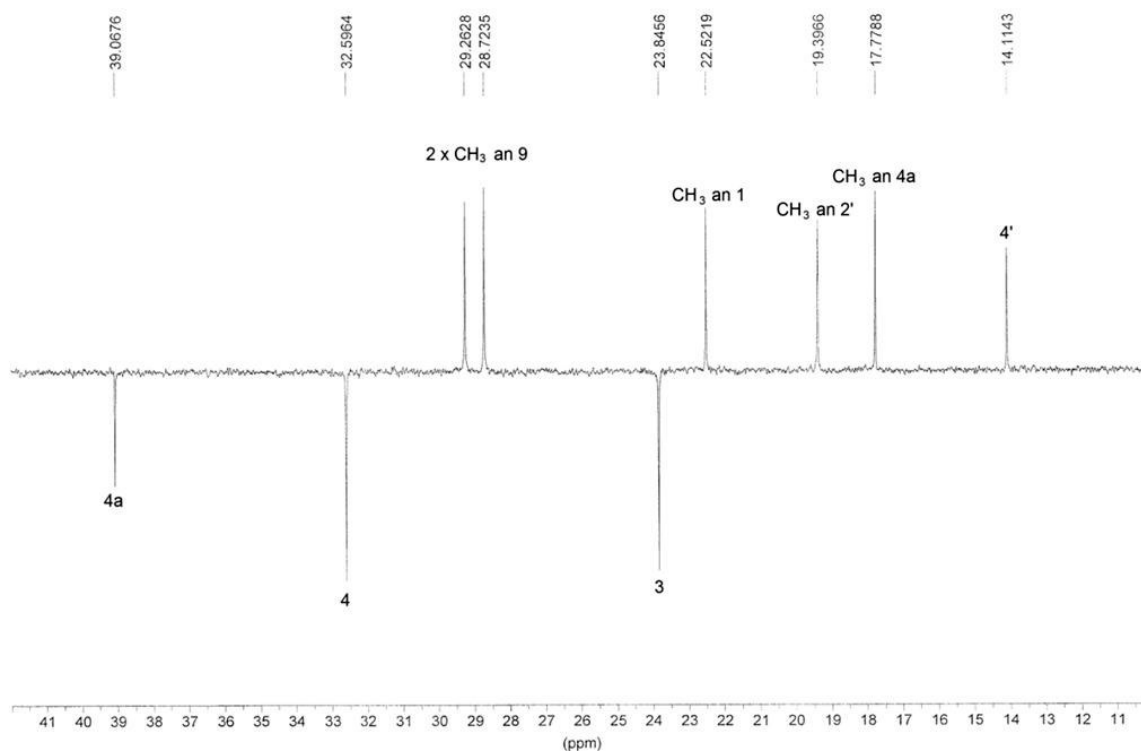


Abbildung 143: ¹³C-NMR Spektrum von Substanz PO₅₃ in CDCl₃
Ausschnitt: 41-11 ppm

CS_PO_53 in cdcl3 (HSQC neu), 7.8.2014

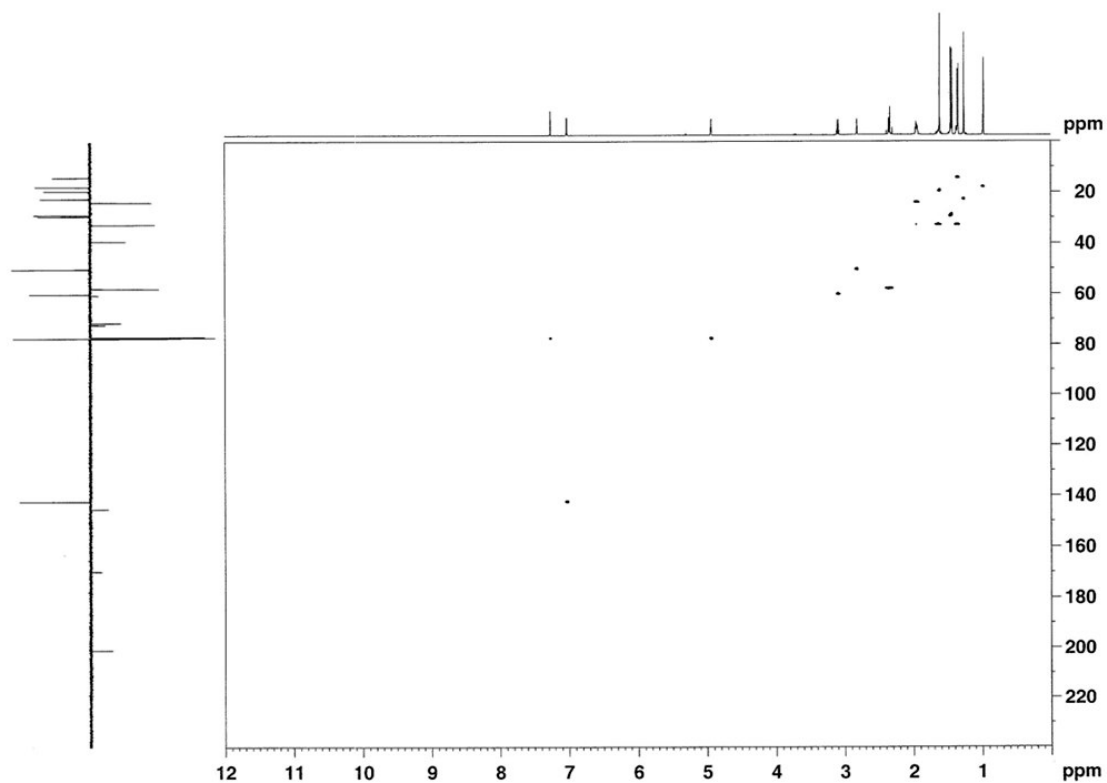


Abbildung 144: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_53 in CDCl₃

CS_PO_53 in cdcl3 (HSQC neu), 7.8.2014

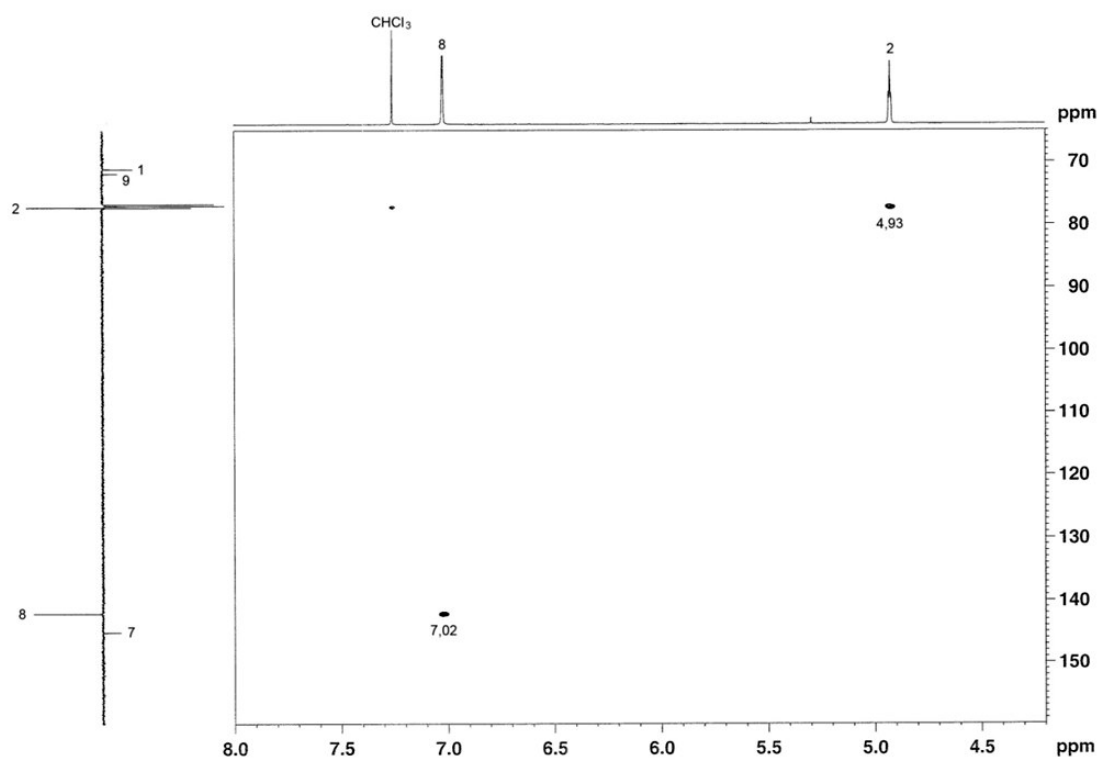


Abbildung 145: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_53 in CDCl₃
Ausschnitt: 8,0-4,0 / 160-75 ppm

CS_PO_53 in cdcl3 (HSQC neu), 7.8.2014

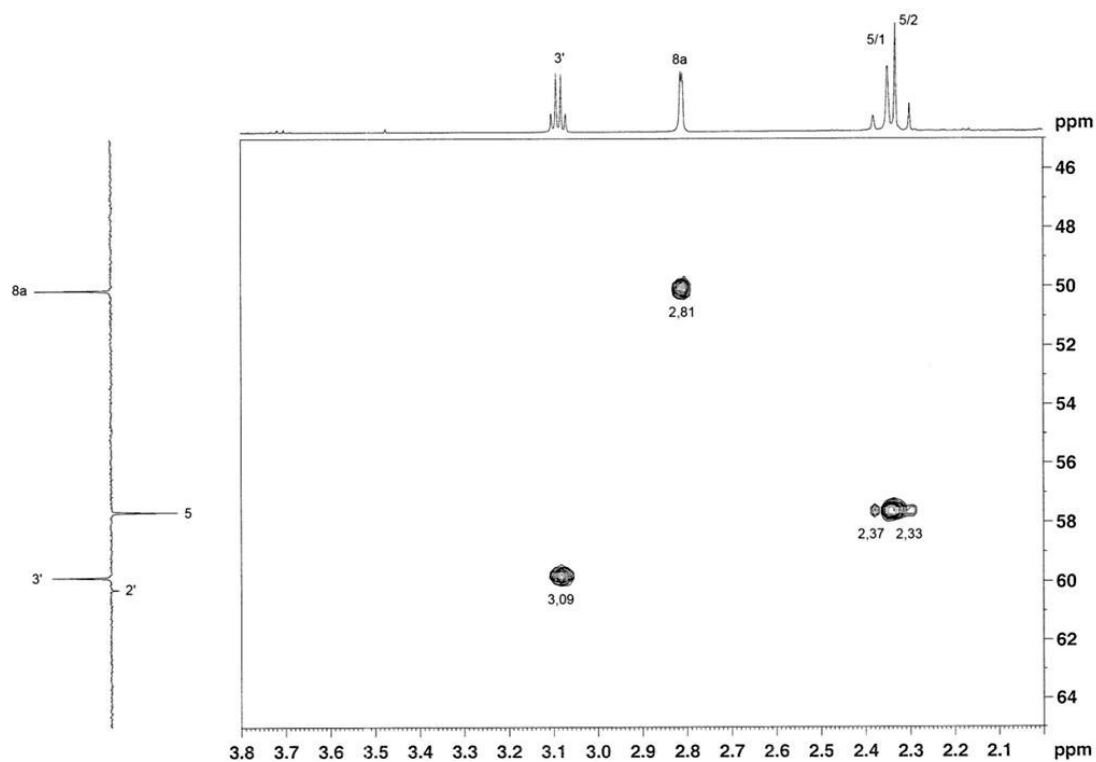


Abbildung 146: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₃ in CDCl₃
Ausschnitt: 3,8-2,0 / 65-45 ppm

CS_PO_53 in cdcl3 (HSQC neu), 7.8.2014

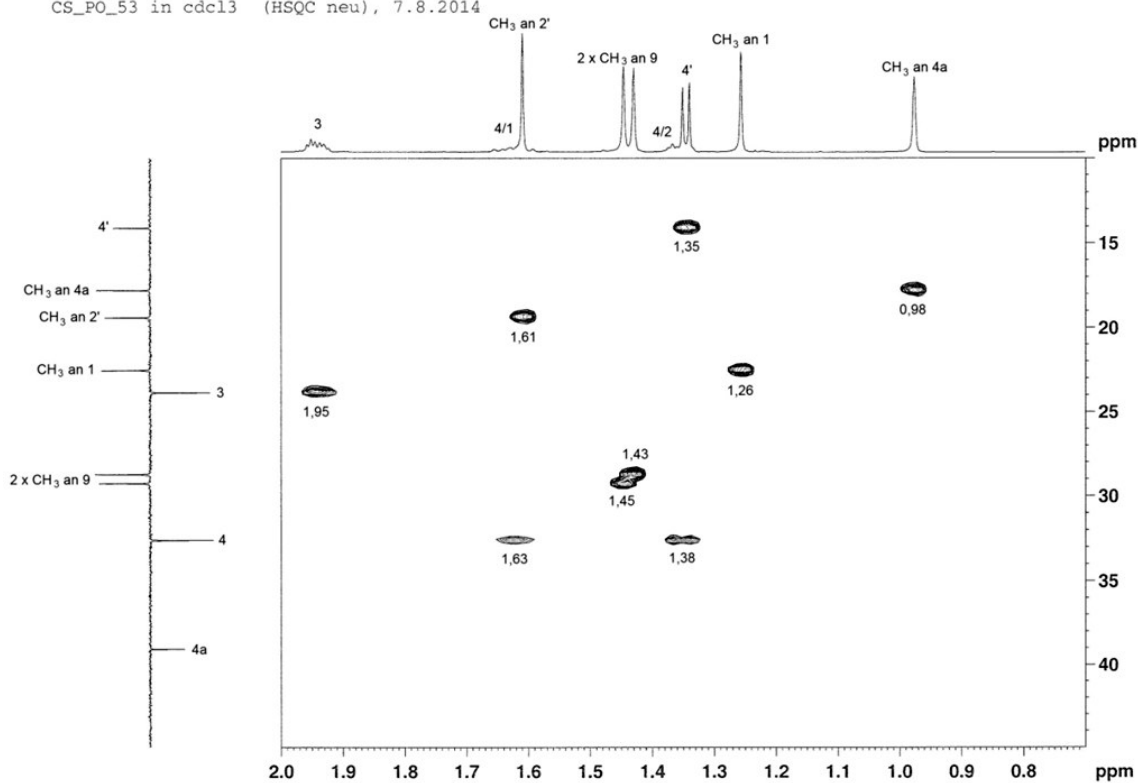


Abbildung 147: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₃ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,0-0,7 / 45-10 ppm

Substanz PO_54

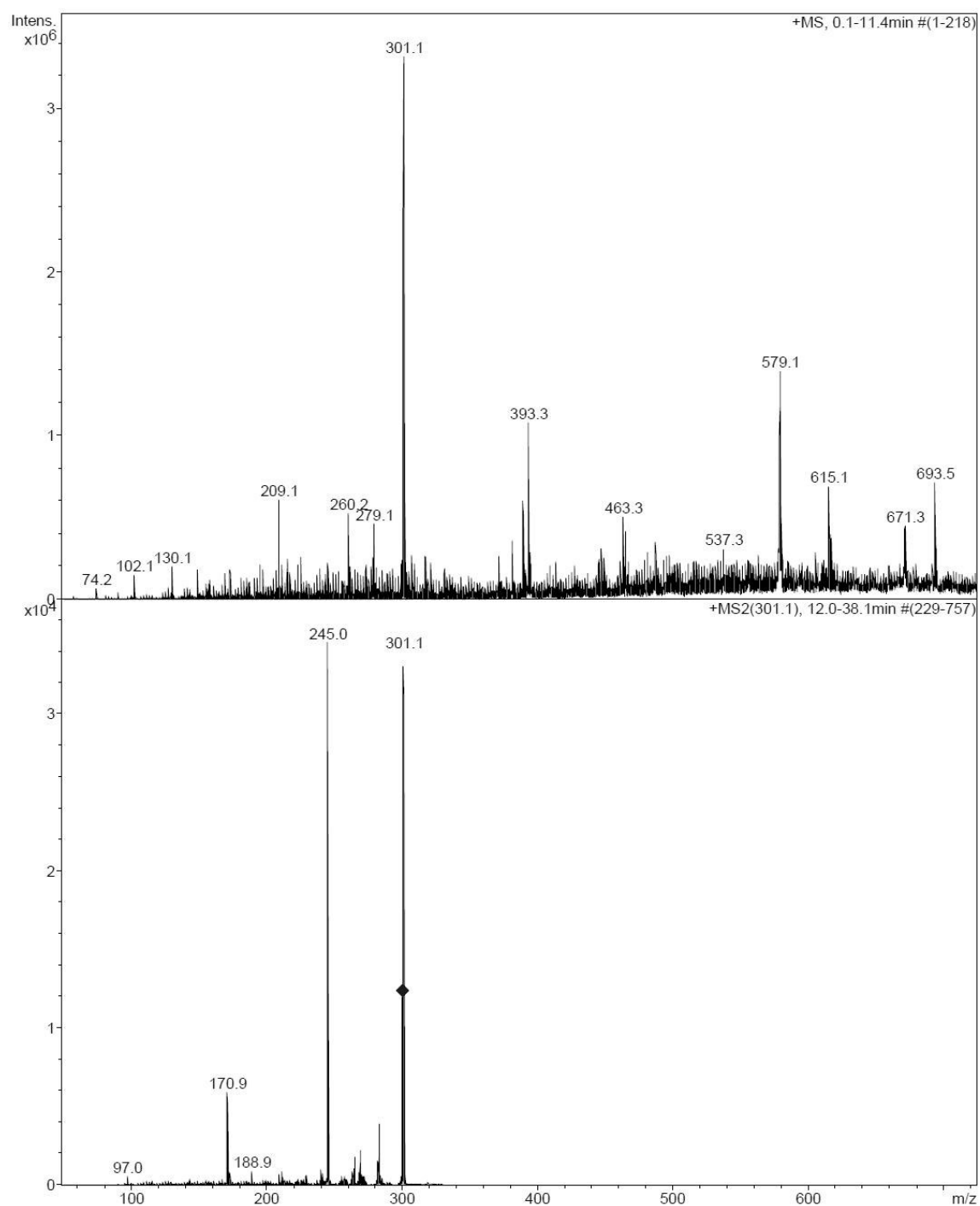


Abbildung 148: ESI-MS und ESI-MS² (m/z 301,1) Spektrum von Substanz PO_54

Substanz PO_55

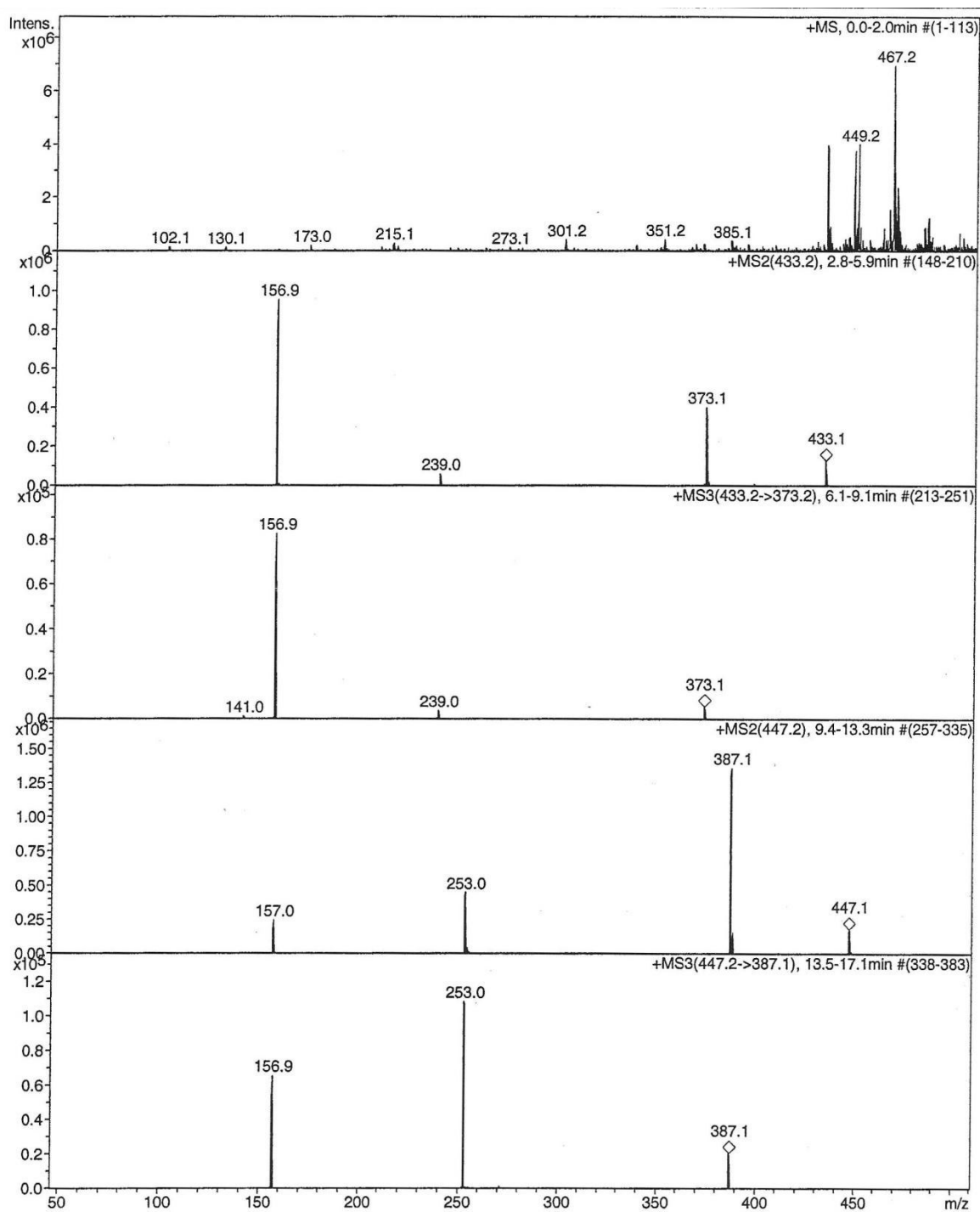


Abbildung 149: ESI-MS und ESI-MSⁿ (m/z 433,2 und 447,2) Spektrum von Substanz PO_55

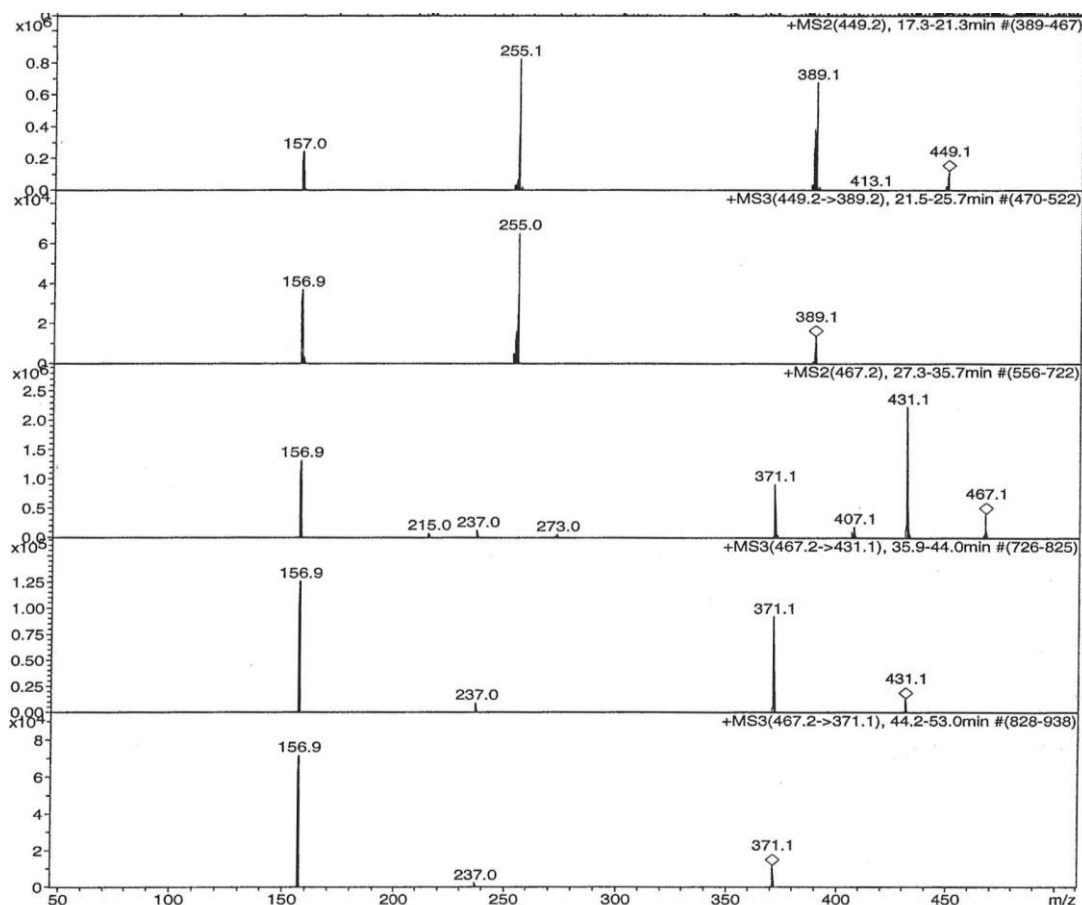


Abbildung 150: ESI-MSⁿ (449,2 und 467,2) Spektrum von Substanz PO₅₅

CS_PO_55 in cdci3 (Proton), 9.8.2014

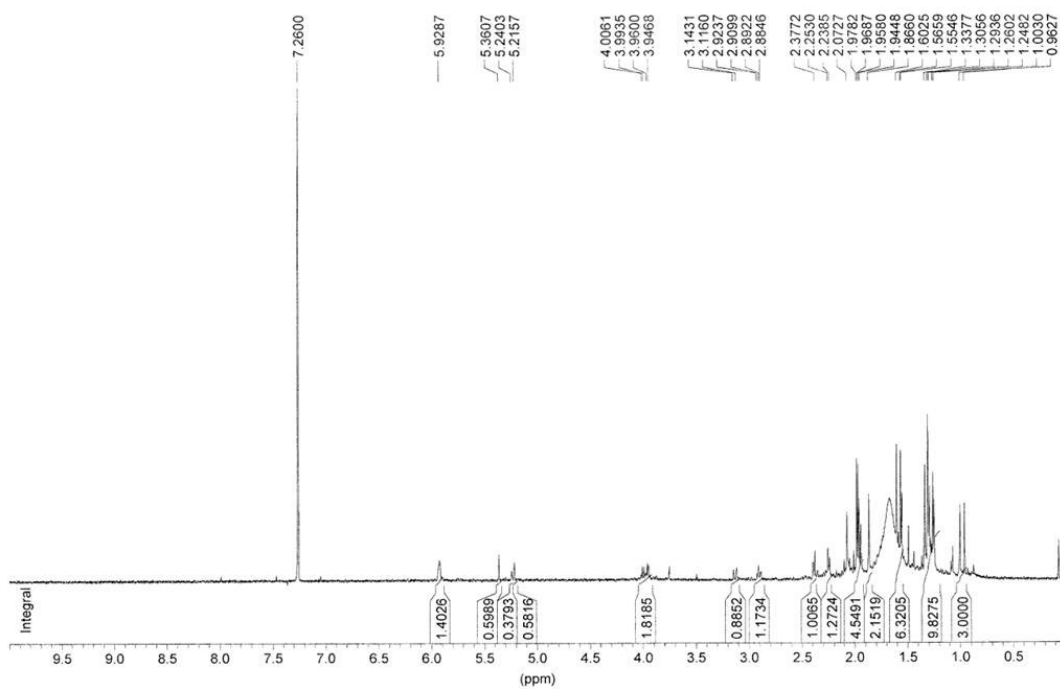


Abbildung 151: ¹H-NMR Spektrum von Substanz PO₅₅ in CDCl₃

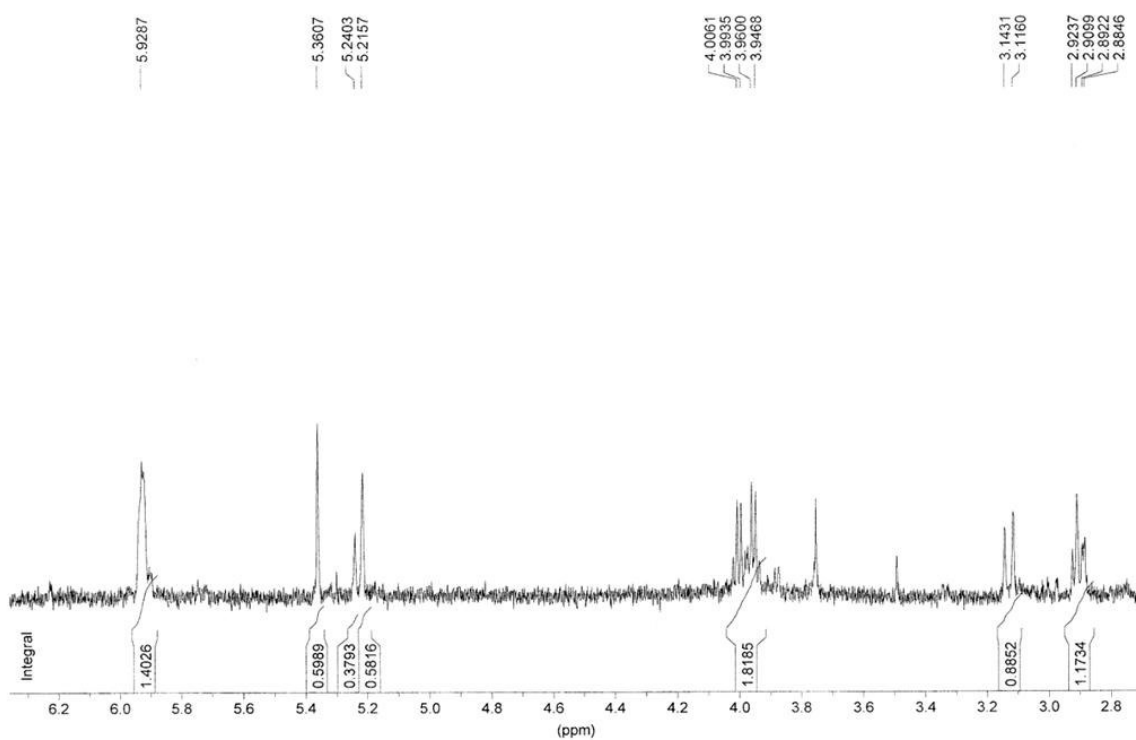


Abbildung 152: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_55 in CDCl_3
Ausschnitt: 6,2-2,8 ppm

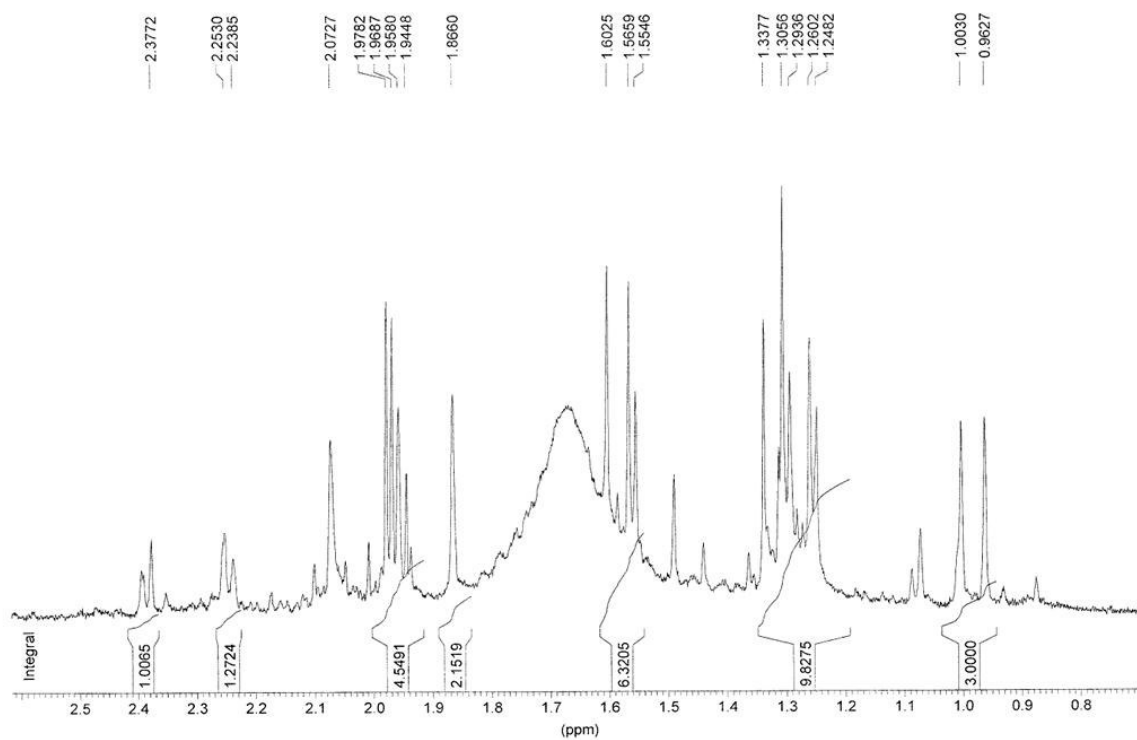


Abbildung 153: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_55 in CDCl_3
Ausschnitt: 2,5-0,8 ppm

Substanz PO_56

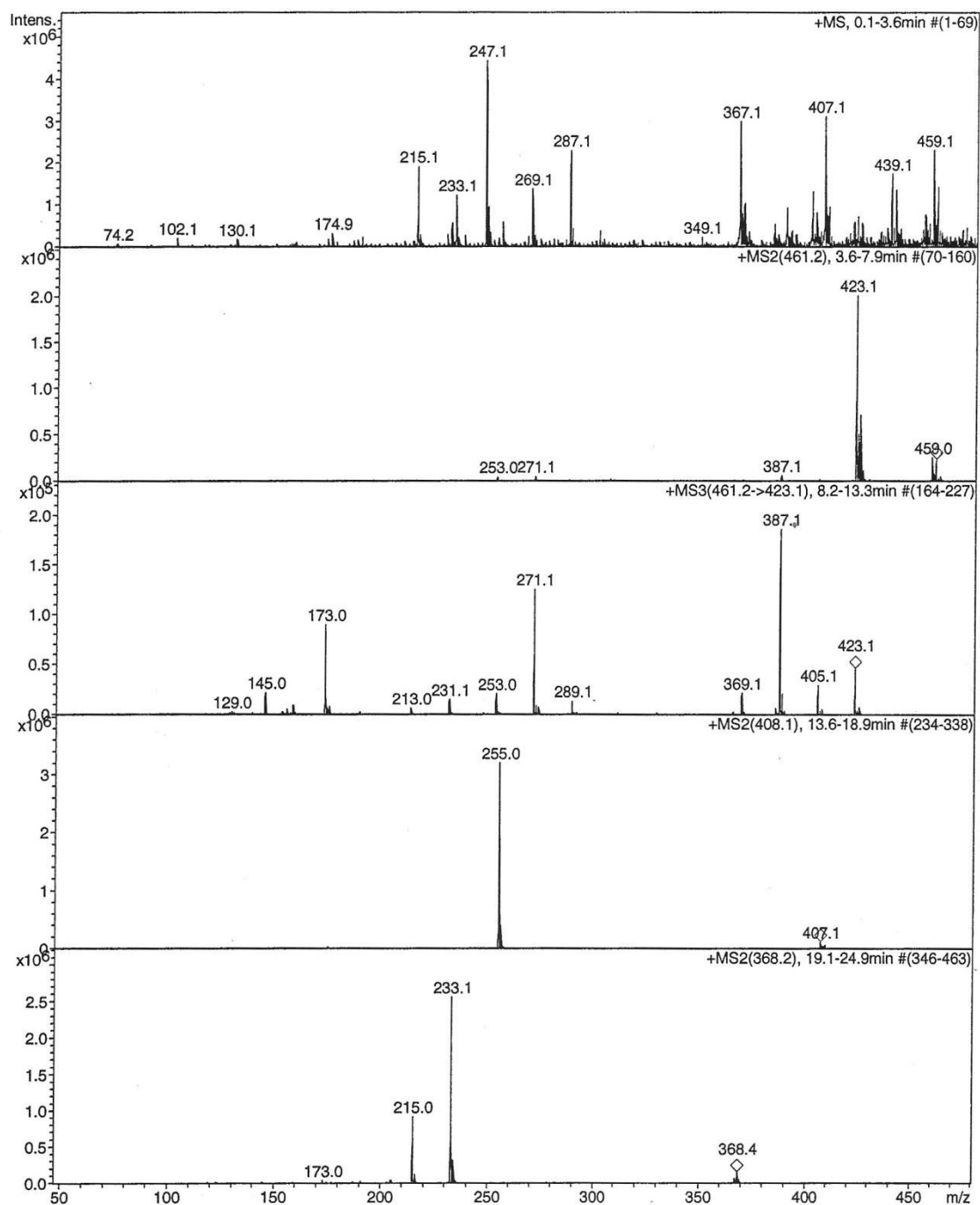


Abbildung 154: ESI-MS und ESI-MSⁿ (m/z 461,2; 408,1 und 368,2) Spektrum von Substanz PO_56

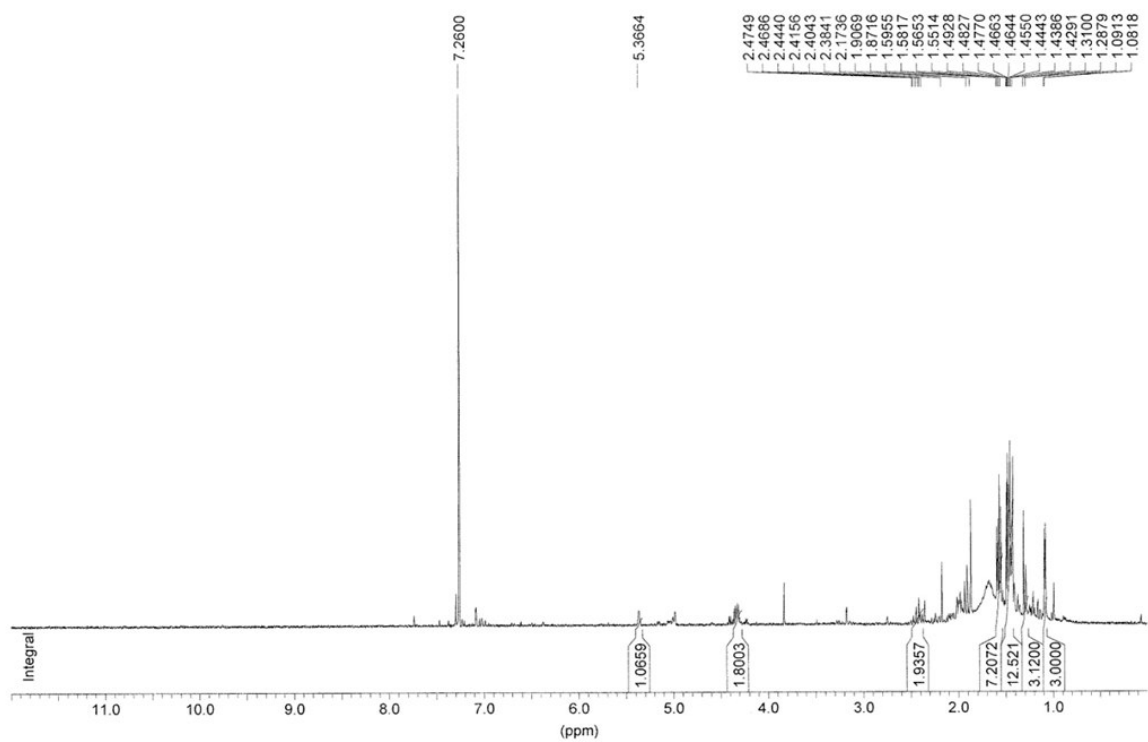


Abbildung 155: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl_3

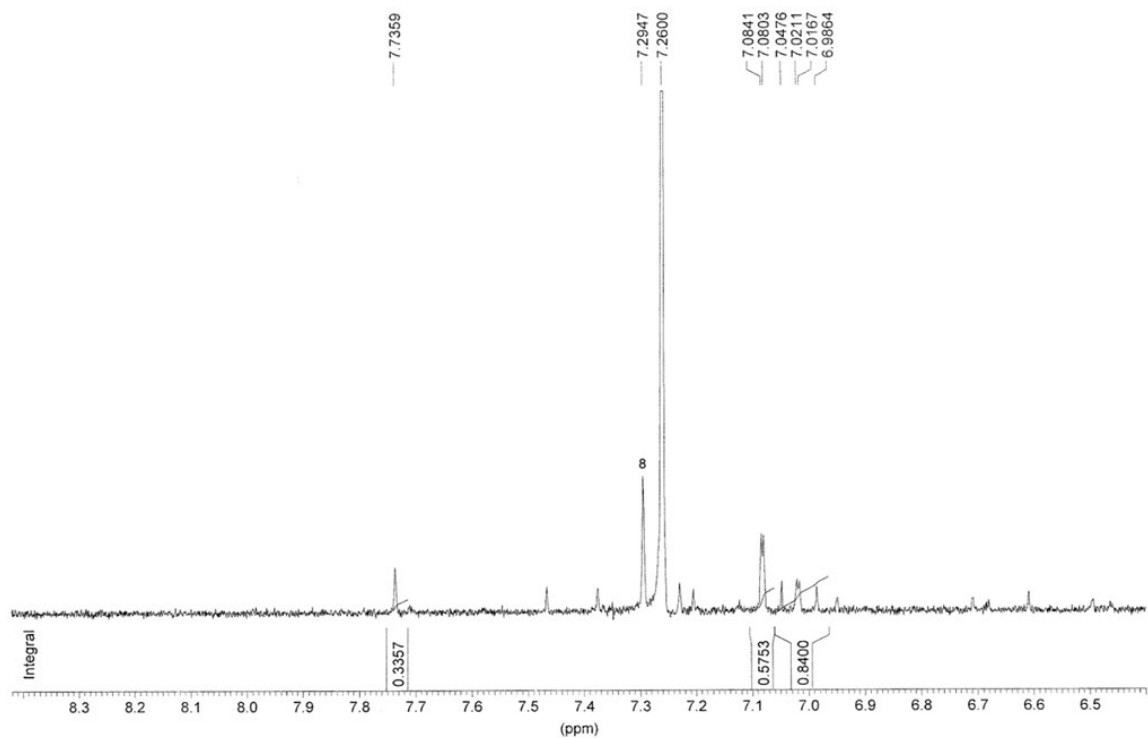


Abbildung 156: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl_3
Ausschnitt: 8,3-6,5 ppm

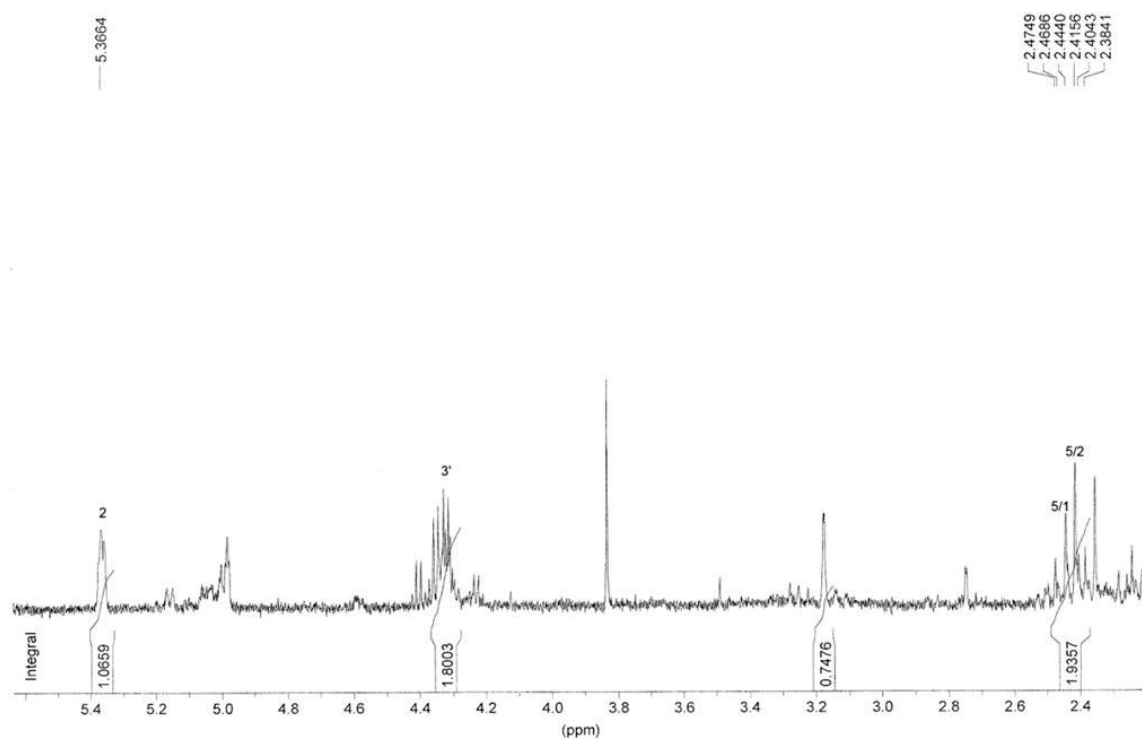


Abbildung 157: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl_3
Ausschnitt: 5,4-2,4 ppm

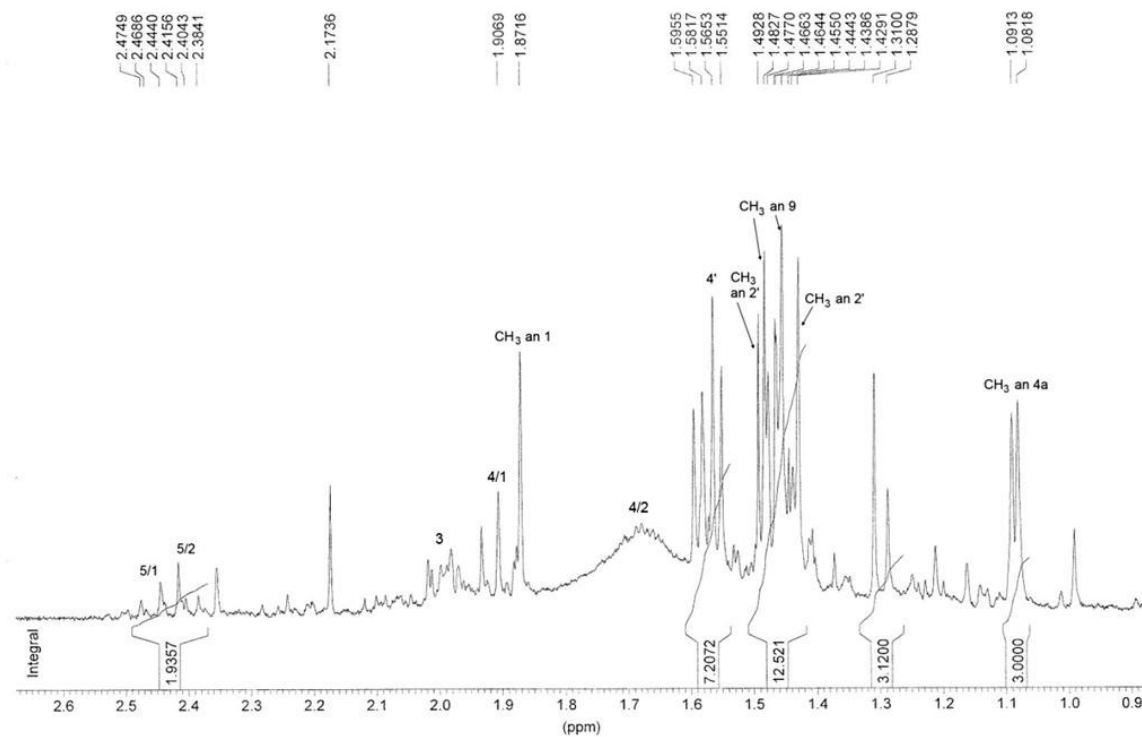


Abbildung 158: ^1H -NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl_3
Ausschnitt: 2,6-0,9 ppm

CS_PO_56 in cdc13 (HSQC neu), 11.9.2014

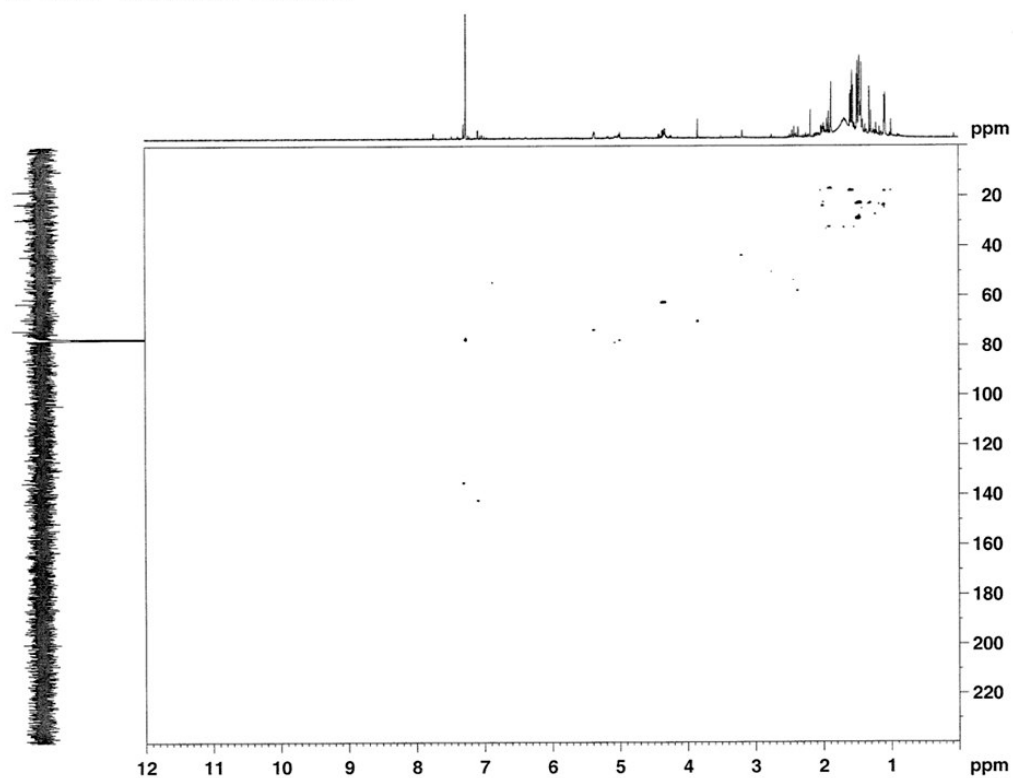


Abbildung 159: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl_3

CS_PO_56 in cdc13 (HSQC neu), 11.9.2014

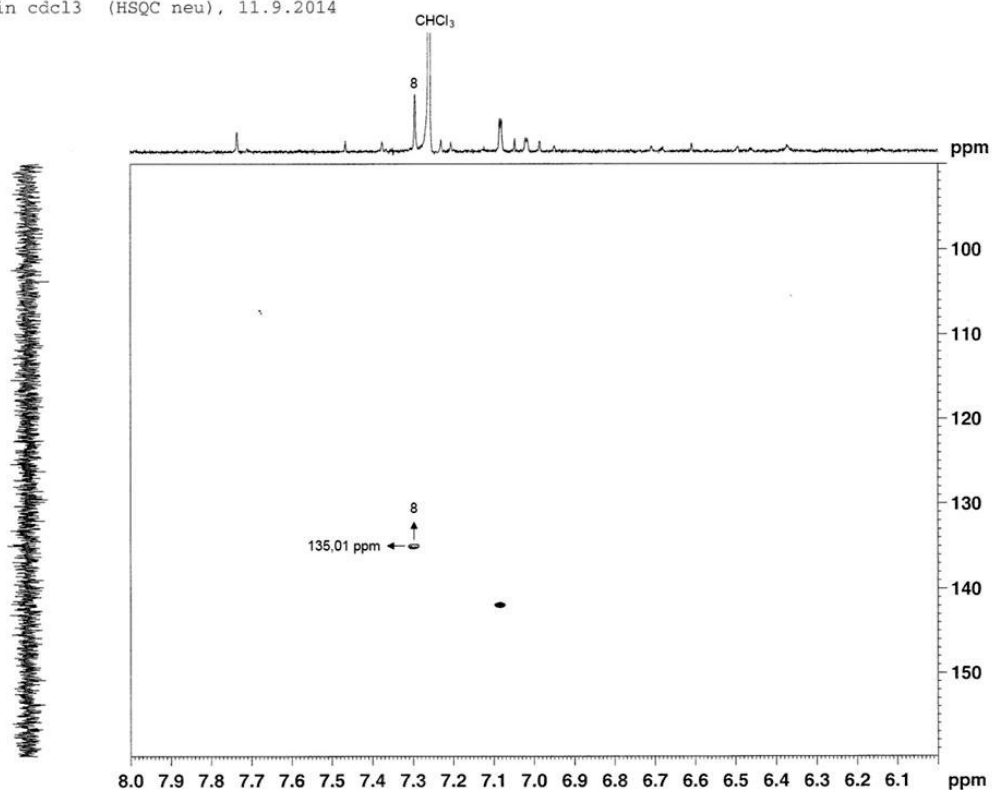


Abbildung 160: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl_3
Ausschnitt: 8,0-6,0 / 160-90 ppm

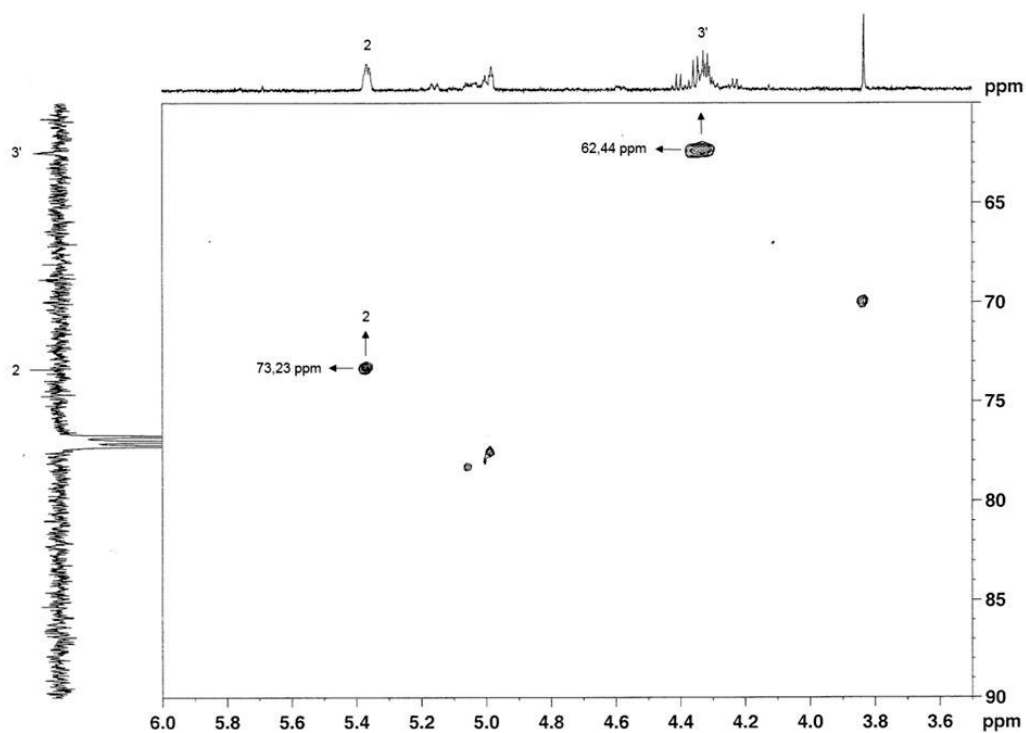


Abbildung 161: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 6,0-3,5 / 90-60 ppm

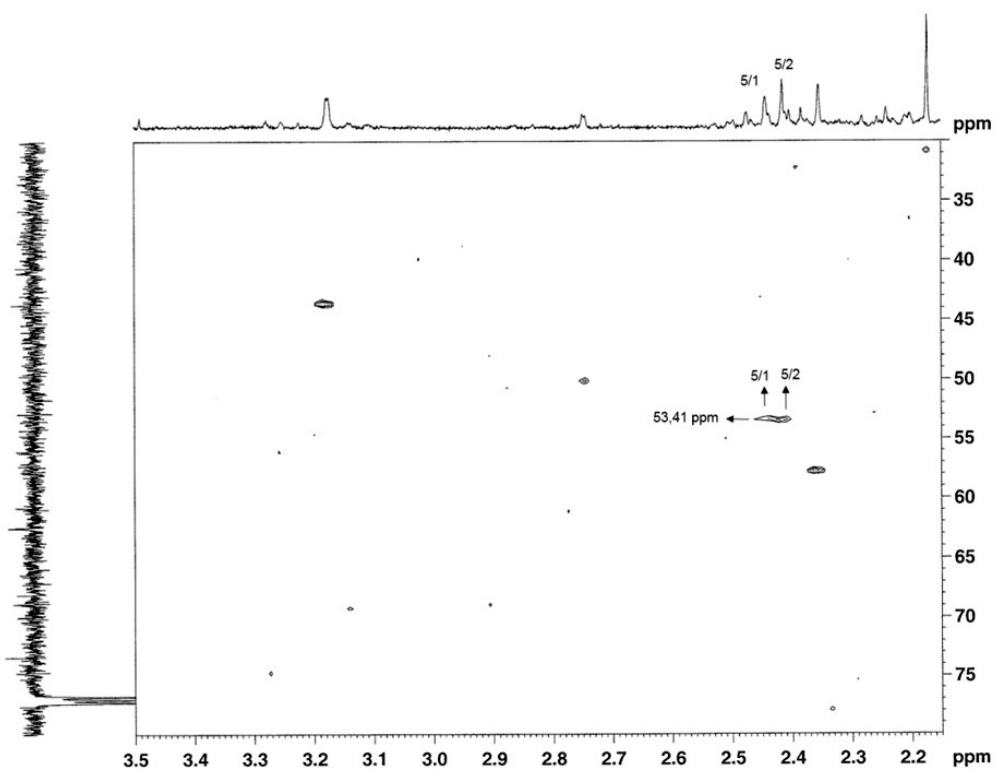


Abbildung 162: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 3,5-2,1 / 80-30 ppm

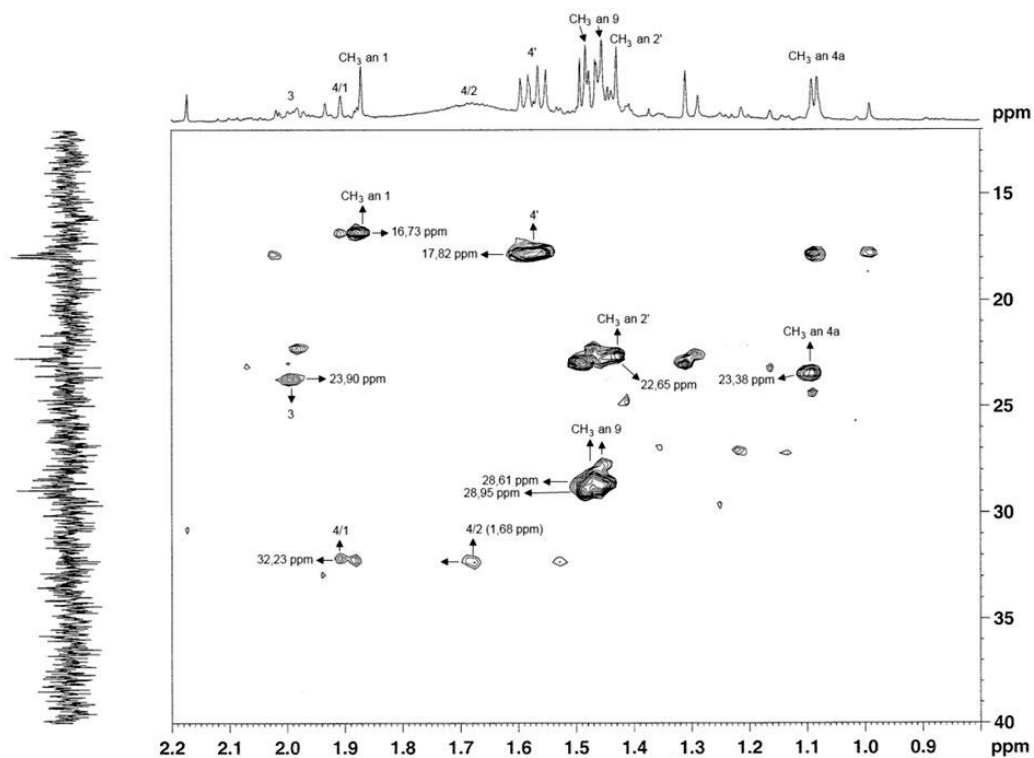


Abbildung 163: HSQC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,2-0,8 / 40-10 ppm

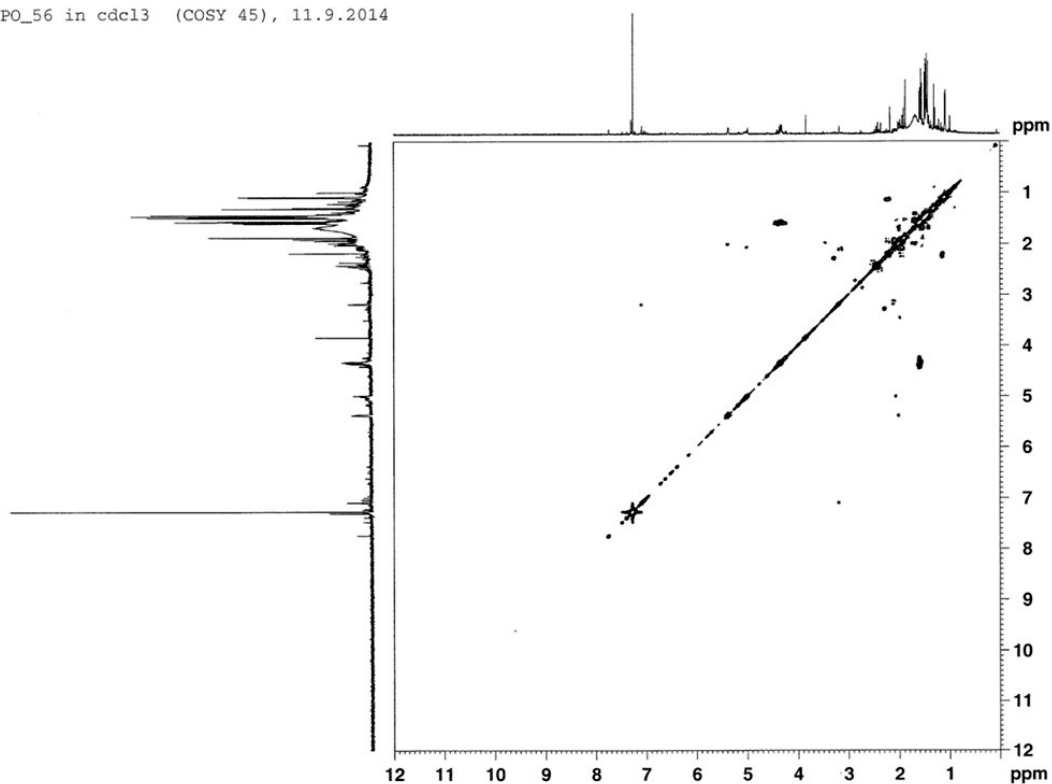


Abbildung 164: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO₅₆ in CDCl₃

CS_PO_56 in cdcl3 (COSY 45), 11.9.2014

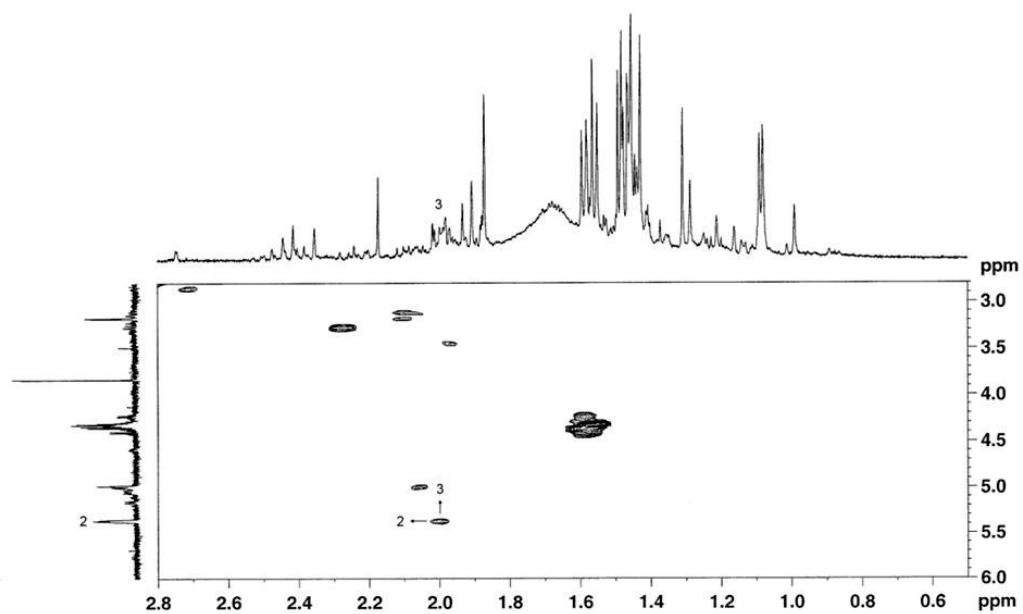


Abbildung 165: COSY-NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl_3
Ausschnitt: 2,8-0,5 / 6,0-3,0 ppm

CS_PO_56 in cdcl3 (HMBC), 11.9.2014

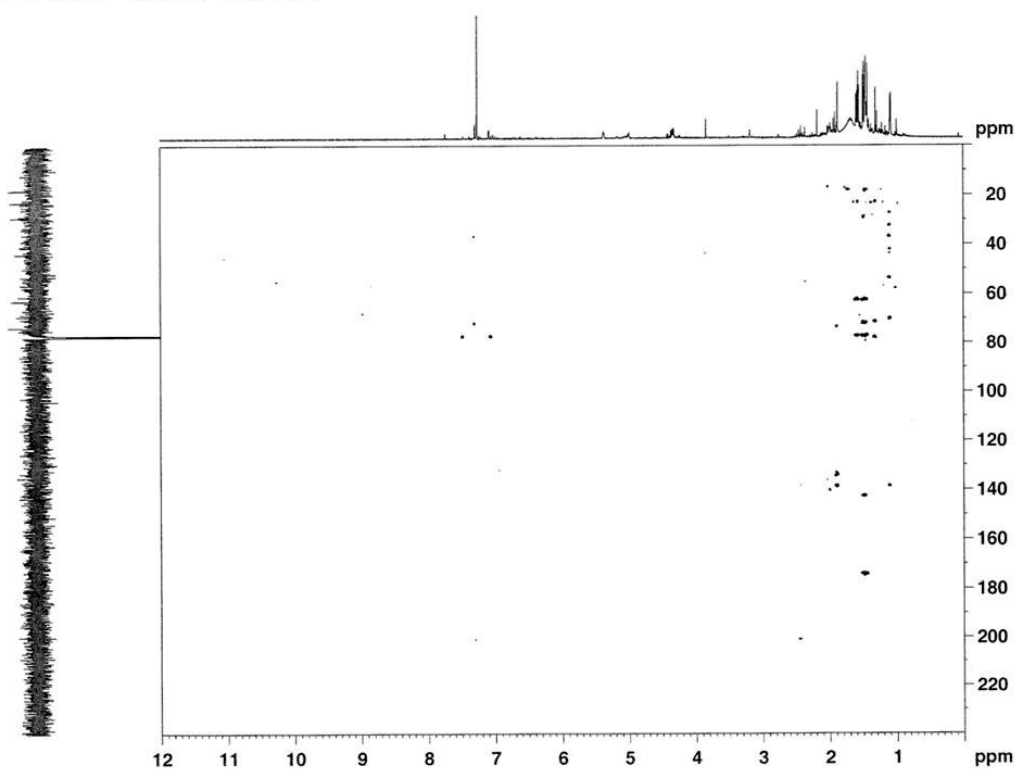


Abbildung 166: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl_3

CS_PO_56 in cdc13 (HMBC), 11.9.2014

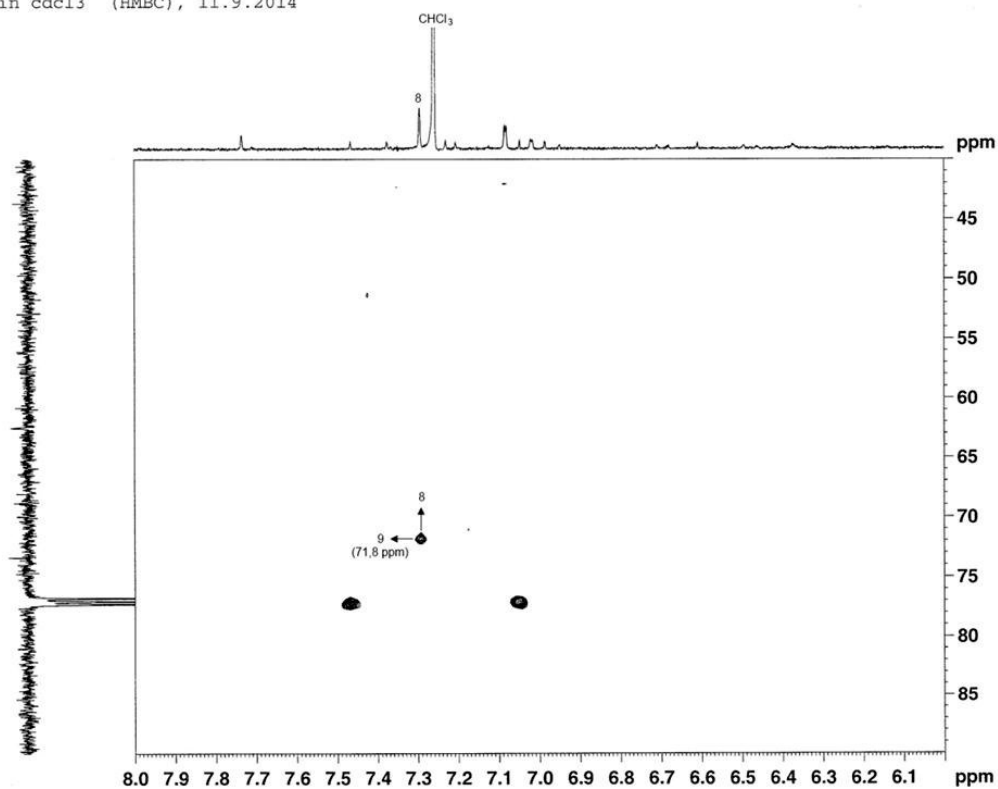


Abbildung 167: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl₃
Ausschnitt: 8,0-6,0 / 90-40 ppm

CS_PO_56 in cdc13 (HMBC), 11.9.2014

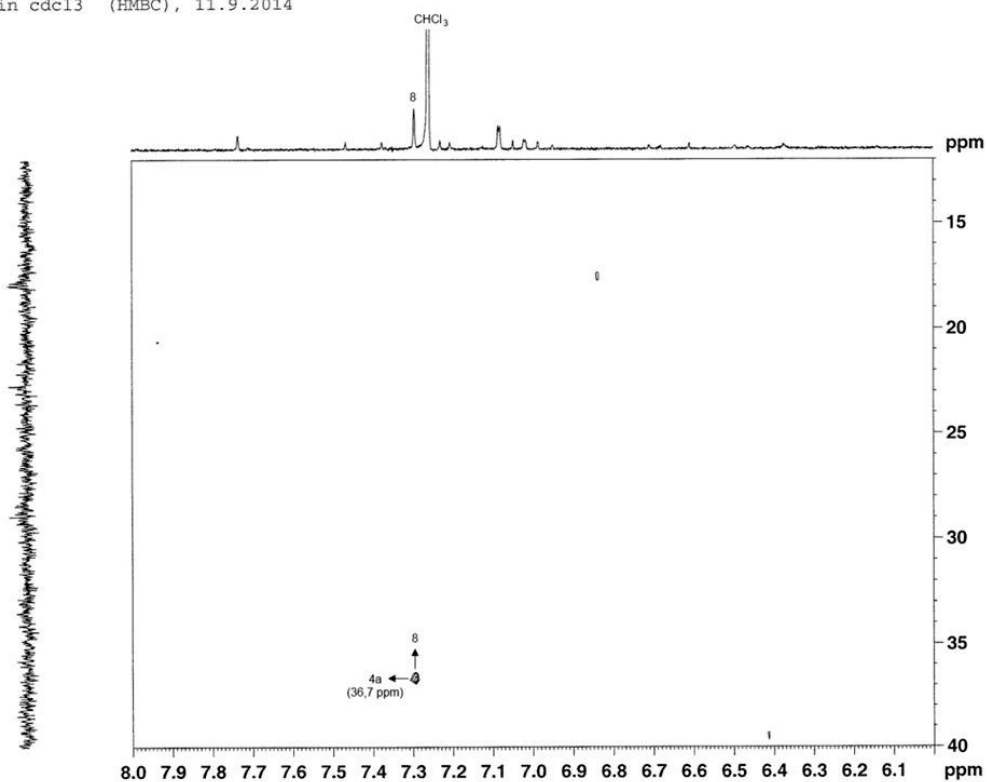


Abbildung 168: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl₃
Ausschnitt: 8,0-6,0 / 40-12 ppm

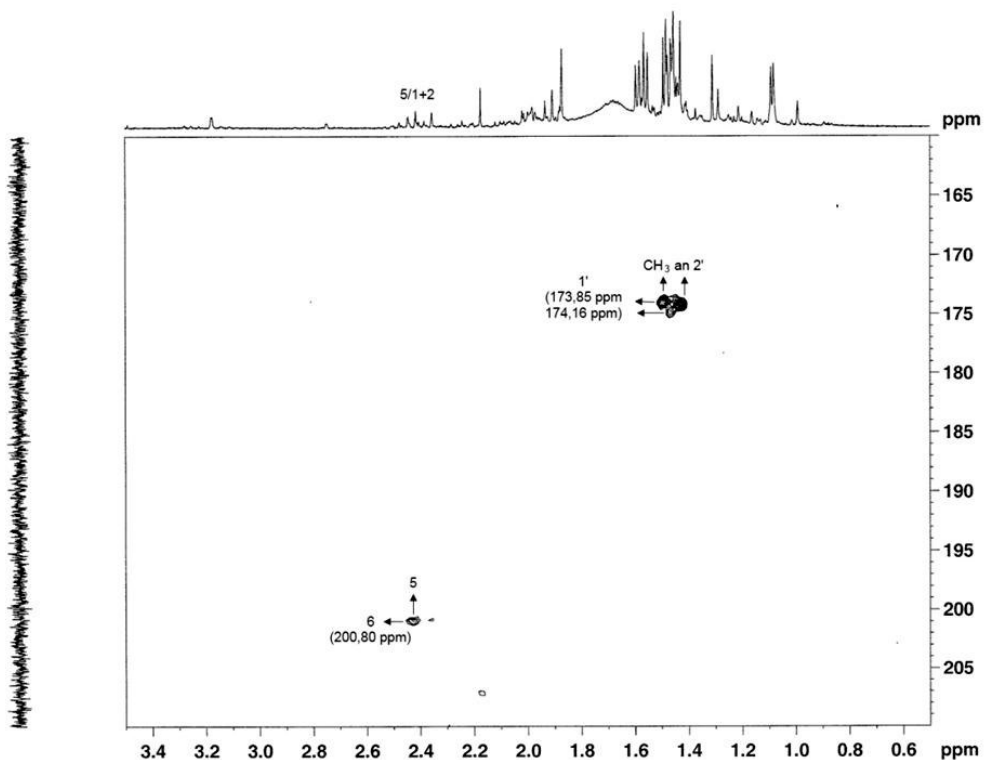


Abbildung 169: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl₃
Ausschnitt: 3,5-0,5 / 210-160 ppm

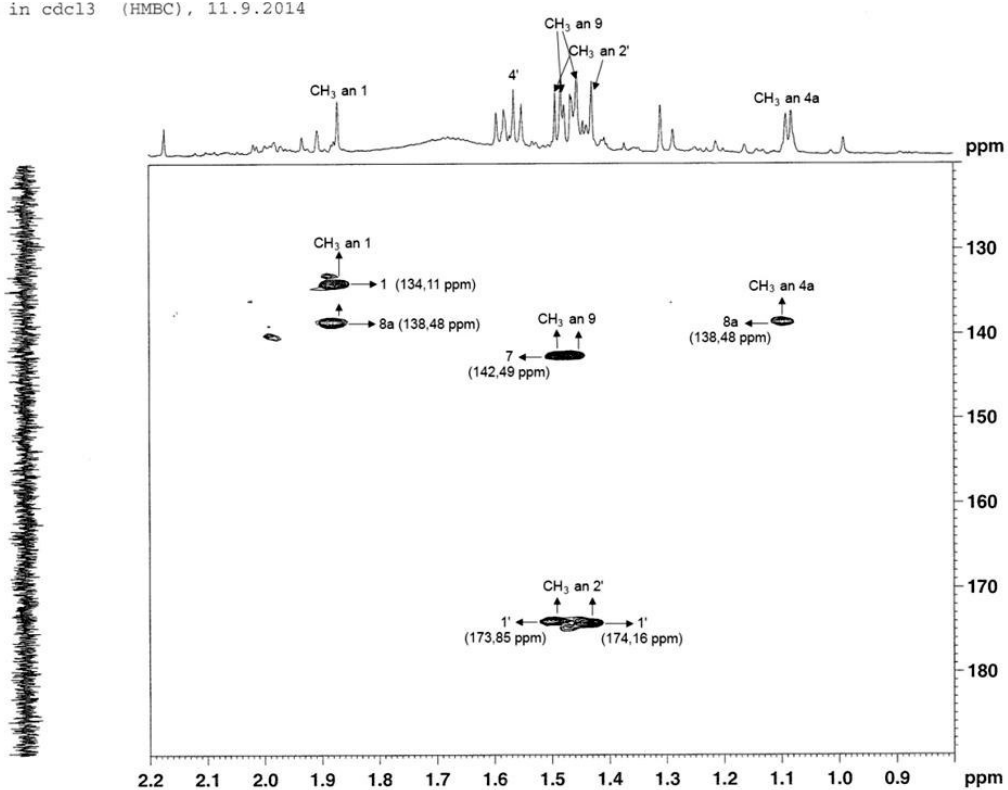


Abbildung 170: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO_56 in CDCl₃
Ausschnitt: 2,2-0,8 / 190-120 ppm

CS_PO_56 in cdcl3 (HMBC), 11.9.2014

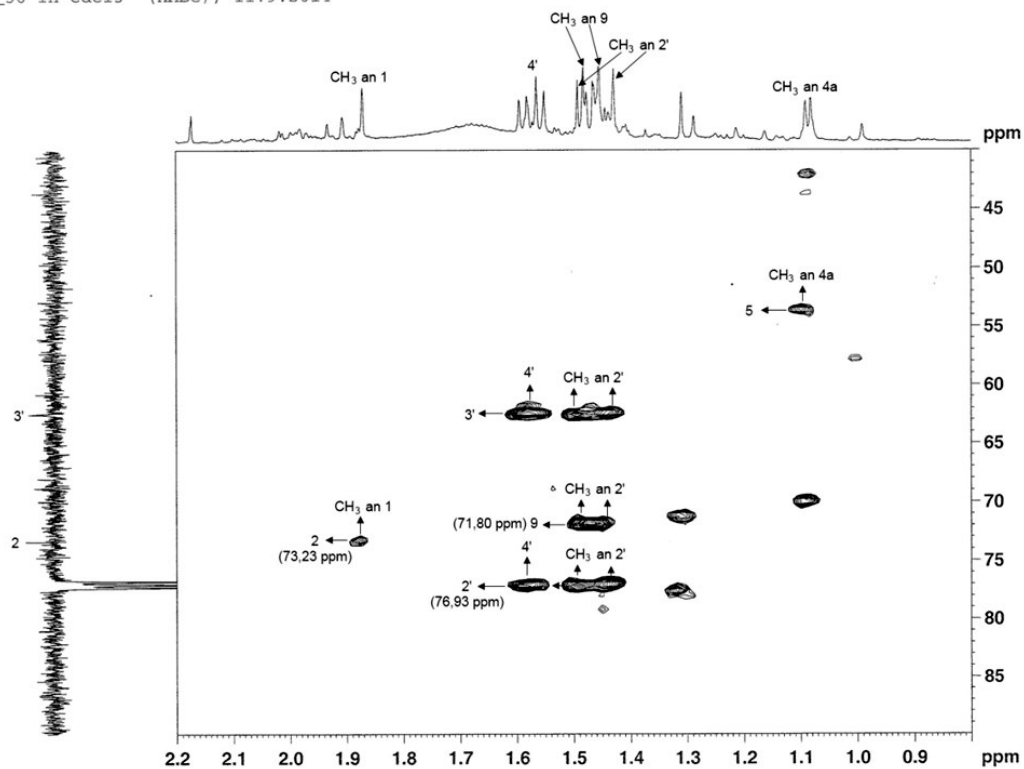


Abbildung 171: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,2-0,8 / 90-40 ppm

CS_PO_56 in cdcl3 (HMBC), 11.9.2014

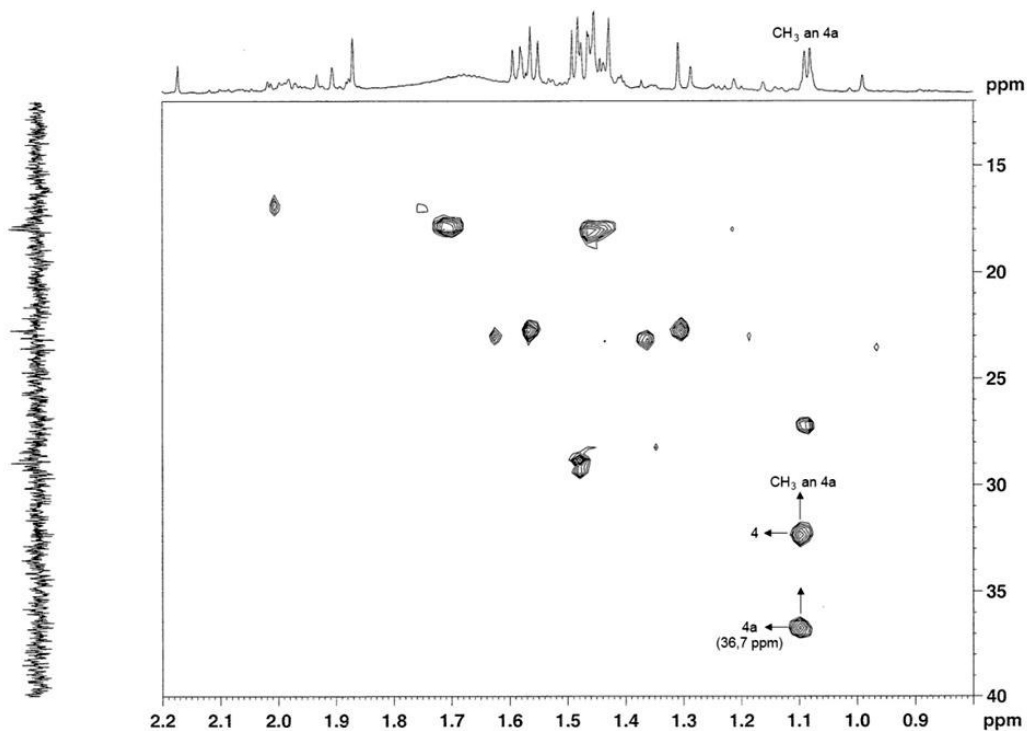


Abbildung 172: HMBC-NMR Spektrum von Substanz PO₅₆ in CDCl₃
Ausschnitt: 2,2-0,8 / 40-12 ppm