



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Charakterisierung von Phenylpropan-
Verbindungen aus *Scrophularia lucida*“

verfasst von

Tobias Ledermüller

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Frau Univ.-Prof. Dr. Verena M. Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie, für die Möglichkeit der Durchführung meiner praktischen Arbeit an ihrem Department bedanken.

Ich bedanke mich auch in besonderer Weise bei Frau ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die stets lehrreiche, freundliche und geduldige Betreuung im Rahmen der gesamten Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei Apothekerin Andrea Lubich, bei Dr. Martin Zehl und dem ganzen Department für Pharmakognosie bedanken, die nicht nur für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten, sondern auch immer eine helfende Hand für mich übrig hatten.

Nicht zuletzt bin ich Gott, meiner Familie, meinen Freunden und meinen Studienkollegen äußerst dankbar. Ohne ihre Hilfe und ermutigende Unterstützung wäre der Abschluss meines Studiums bestimmt nicht möglich gewesen.

Vielen Dank.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. Untersuchungsmaterial	3
2.2. Angewendete Methoden.....	4
2.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)	4
2.2.2. Säulenchromatographie (SC)	5
2.2.3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	6
2.2.4. Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS).....	8
3. Ergebnisse	8
3.1. Präparative Trennung mittels Dünnschichtchromatographie	8
3.2. Säulenchromatographie 1 (SC 1)	11
3.3. Säulenchromatographie 2 (SC 2)	12
3.4. Vergleiche mit Referenzsubstanzen.....	16
3.4.1. Charakterisierung der Säure-Derivate.....	17
3.4.2. Untersuchung von Fraktion SC 2 / SF 14.....	18
3.4.3. Untersuchung von Fraktion SC 2 / SF 21.....	21
3.4.4. Untersuchung der Fraktionen SC 2 / SF 24, 25, 26 und 27	23
3.5. Strukturaufklärung mittels HRMS	25
3.6. Quantifizierung	26
3.6.1. Gewinnung der Reinsubstanzen	27
3.6.1.1. Aufreinigung von Homoplantaginin.....	27
3.6.1.2. Aufreinigung von Scrovalentinosid	27
3.6.1.3. Koelziosid und Hispidulin	30
3.6.2. Stammlösungen und Verdünnungsreihen.....	30
3.6.3. Quantifizierung von Homoplantagin	31
3.6.4. Quantifizierung von Koelziosid	34
3.6.5. Quantifizierung von Scrovalentinosid.....	37

3.6.6.	Quantifizierung von Hispidulin.....	40
4.	Diskussion	44
5.	Zusammenfassung	46
6.	Summary	47
7.	Literaturverzeichnis.....	48
8.	Abbildungsverzeichnis.....	50
9.	Tabellenverzeichnis.....	52

Abkürzungsverzeichnis

AAS.....	Anisaldehyd-Schwefelsäure
CCID.....	Circular Chemorepellent Induced Defects
DC.....	Dünnschichtchromatographie
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
ELSD.....	Evaporative Light Scattering Detector
ESI.....	Elektronen Spray Ionisation
EtOAc.....	Ethylacetat
HPLC.....	High Performance Liquid Chromatography
HRMS.....	High Resolution Mass Spectrometry
MeOH.....	Methanol
NL.....	Nachlauf
NS.....	Niederschlag
NST A/ PEG.....	Naturstoffreagenz A/ Polyethylenglykol 400
SC.....	Säulenchromatographie
SF.....	Sammelfraktion
SPE.....	Solid Phase Extraction
T.....	Teil
TOF.....	Time of Flight
ÜS.....	Überstand

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Der Familie der Scrophulariaceae gehören mehr als 220 Gattungen an, zu welchen unter anderem die Gattung *Scrophularia* zählt. Deren verschiedene Arten finden eine breite Anwendung in der Volksmedizin bei Ekzemen, Psoriasis, Krätze, entzündlichen Erkrankungen und Tumoren [1, 2]. Eine dieser Arten ist *Scrophularia lucida* (L.). Sie ist vorwiegend im mediterranen Raum, in der Türkei, Griechenland und Italien zu finden [3].

Abbildung 1: *Scrophularia lucida* (L.)¹



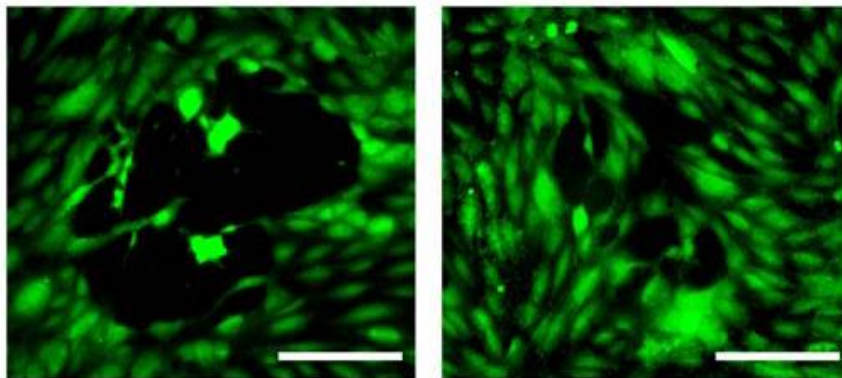
Für die Gattung *Scrophularia* wurden bereits antiinflammatorische, antibakterielle, zytotoxische und einige weitere Effekte beschrieben [2, 4]. Aus diesem Grund wurden im Zuge einer Studie fünf verschiedene Vertreter der Gattung auf ihre Anti-Tumor-Wirkung untersucht. Hierzu wurde u.a. ein Zell-Modell für Brustkrebs-Metastasierung herangezogen, um auf Aktivität der ausgewählten Arten zu prüfen [1].

¹ Quelle: http://azalas.de/blog/?page_id=4175 (zuletzt aufgerufen am: 20.1.2015)

Ein notwendiger Schritt für die Metastasierung des Tumors ist eine „Lochbildung“ (*gap-formation*) im betroffenen Endothel, wodurch Tumorzellen in Lymph- und/oder Blutbahn eindringen und Metastasen in Lymphknoten oder entfernten Körperregionen bilden [1].

Im Rahmen der Studie wurde der CCID-Assay (*Circular chemorepellent induced defects*) angewendet. Hierbei wurde eine einlagige Schicht von Lymphendothelzellen mit MCF-7 Brustkrebszell-Sphäroiden inkubiert. Nach wenigen Stunden Inkubation wurde auf Größe und Zahl der Löcher geprüft, welche nach Behandlung mit den Extrakten der verschiedenen *Scrophularia*-Arten entstanden sind [1].

Abbildung 2: Aktivität im CCID-Assay: Reduktion der Löcher unter Behandlung mit dem Methanol-Extrakt von *Scrophularia lucida* [1]



Es zeigte sich, dass es unter Einwirkung eines methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* zu einer signifikanten Hemmung der gap-formation gekommen war [1].

Die Ergebnisse der Studie und die Untersuchungen vorhergehender Diplomarbeiten zur Aufklärung der Sekundärmetabolite bilden die Grundlage der vorliegenden Diplomarbeit. Da es über *Scrophularia lucida* keine Informationen über die chemische Zusammensetzung der Sekundärmetabolite einschließlich der wirksamen Komponenten gab, war es das Ziel dieser Arbeit, die Charakterisierung des Inhaltsstoffmusters fortzusetzen, um *Scrophularia lucida* innerhalb der Gattung chemotaxonomisch besser zuordnen zu können. Die bisher unbekannten Phenylpropan-Verbindungen vor allem aus der Ethylacetat-Fraktion (siehe 2.1., Seite 3) sollten identifiziert und vier Hauptkomponenten des methanolischen Extraktes quantitativ bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

In vorangegangenen Diplomarbeiten [5, 6] standen 158 g methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* zur Verfügung. Das Pflanzenmaterial stammte aus der Türkei. Der Extrakt wurde anschließend nach der Methode von Wall et al. vorgereinigt. Danach standen eine Petrolether-, Chloroform-, Ethylacetat- und eine Butanol-Fraktion zur Verfügung [5].

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden die in Tabelle 1 angeführten Fraktionen zur weiteren Untersuchung verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Fraktionen

Fraktion	Menge (mg)	Quelle	Weitere Aufarbeitung
SPE 2 / 1 + 2	38,2	[7]	SC 1
SPE 2 / 3 - 8	10,3	[7]	SC 1
SPE 2 / 9 - 11	10,6	[7]	Präparative Trennung mittels DC
SC 1 / SF 8	385,0	[5]	SC 2
SC 3 / SF 12	24,5	[5]	Isolierung von Homoplantaginin; Quantifizierung
SL 1	133,4	[6]	Quantifizierung
SL 2	208,4	[6]	SC 3; Quantifizierung

2.2. Angewendete Methoden

2.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie wurde zur Überprüfung der Einzel- bzw. Sammelfractionen angewendet.

Andererseits wurden mehrere Inhaltsstoffe mit Referenzsubstanzen auf ihre Identität geprüft.

Es wurde verschiedene DC-Systeme verwendet:

Stationäre Phase:

- a) Kieselgel-Fertigplatte 60 F₂₅₄ (Merck®)
- b) Polyamid-Fertigplatte 6 F₂₅₄ (Sigma-Aldrich®)
- c) Kieselgel-Fertigplatte mit Konzentrationszone (Merck®)

Mobile Phase:

- 1. Ethylacetat + Ameisensäure_{conc.} + Essigsäure_{conc.} + Wasser (100 + 11 + 11 + 10)
- 2. Toluol + Petrolether + Butanon + MeOH (15 + 4,5 + 9 + 12)
- 3. Chloroform + MeOH + Essigsäure_{conc.} (2 + 1 + 2)
- 4. Ethylacetat + MeOH + Ameisensäure_{conc.} + Wasser (70 + 8 + 4 + 4)

Detektion:

Naturstoffreagenz A/ Polyethylenglykol 400 (NST A/PEG):

Zur Detektion wurde bei den Analysen mit den mobilen Phasen 1 - 3 die entwickelte DC-Platte zunächst mit 1% methanolischer Naturstoffreagenz A-Lösung (NST A) und nach kurzem Zwischentrocknen mit 5% ethanolischer Polyethylenglykol-400-Lösung (PEG) besprüht. Nach etwa 10 – 15 Minuten konnte unter UV-Licht bei 366 nm ausgewertet werden [8].

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AAS):

Bei Verwendung der mobilen Phase 5 zur Detektion der Inhaltsstoffe aus der Chloroform-Fraktion, wurde mit einer frisch bereiteten Mischung aus 0,5 ml Anisaldehyd, 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml Schwefelsäure_{conc} besprüht. Anschließend wurde die DC-Platte für wenige Minuten im Trockenschrank bei 100°C erhitzt. Danach konnte bei Tageslicht ausgewertet werden [8].

2.2.2. Säulenchromatographie (SC)

Es wurden zwei verschiedene Systeme verwendet, um das komplexe Inhaltsstoffmuster der verwendeten Fraktionen (s. Tabelle 1, S. 3) besser auftrennen zu können.

Stationäre Phase:

- A) Polyamid (Roth®)

Die Trennung erfolgt hier vor allem auf Grund unterschiedlicher Affinität, aber auch auf Grund der Größe von Molekülen eines Stoffgemisches und eignet sich gut, um Phenole und Carbonsäuren zu trennen [9].

- B) Sephadex® LH-20 (Sigma-Aldrich®)

Sephadex besteht aus hydroxypropylierten Dextranen. Als stationäre Phase eignet es sich ebenfalls zur Trennung von phenolischen Verbindungen [10].

Mobile Phase:

Zur Trennung der Stoffgemische wurden bei Verwendung von Polyamid als stationäre Phase Gemische von Ethanol und Wasser und bei Verwendung von Sephadex Methanol/Wasser-Gemische in unterschiedlichen Konzentrationen als mobile Phase eingesetzt.



Die weiteren Parameter sind bei der jeweiligen SC angegeben.

Es wurde jede zehnte Fraktion in einem geeigneten DC-System überprüft. Bei Übereinstimmung der Inhaltsstoffe der analysierten Fraktionen wurden diese zu Sammel-fraktionen vereinigt.

Abbildung 3: Säulenchromatographie

2.2.3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC wurde zur Identitätsprüfung von Komponenten des Untersuchungsmaterials eingesetzt. Die in Dünnschichtchromatogrammen aufgezeigten Übereinstimmungen von Inhaltsstoffen mit Referenzsubstanzen sollten durch Vergleich in der HPLC bestätigt werden.

Die HPLC wurde auch zur Quantifizierung von vier ausgewählten Hauptinhaltsstoffen des methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* herangezogen.

Vor jeder Analyse wurde die Analysen-Lösung zentrifugiert.

Tabelle 2: HPLC-Parameter

Gerät (Shimadzu®)		Einstellungen	
Pumpe	LC - 20AD	Injektionsvolumen	10µl
Detektor	SPD - M20A (Dioden-Array-Detektor)	Temperatur	25°C
Säulenofen	CTO – 20AC	Konzentration der Analysenlösungen ²	0,5 mg/ml
Autosampler	SIL – 20AC HT	Flussrate	1 ml/min
Säule	Luna 5µ C18 100A 250x 4,6 mm, Phenomenex, USA	Detektion	200 nm - 400 nm

Zur Kontrolle der Reinheit der Standards, welche für die Quantifizierung verwendet wurden, kam ein *Evaporative Light Scattering Detector* (ELSD-LT, Shimadzu®) zum Einsatz. Der Vorteil dieser Detektionsmethode besteht darin, dass damit auch nicht chromophore Verbindungen detektiert werden können.

Mobile Phase [5]:

A: Destilliertes Wasser, mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt

B: Acetonitril / Destilliertes Wasser pH 3 (80 + 20)

Gradient [5]:

Konzentration	Zeit
5% → 20% B	15 min
20% B isokratisch	10 min
20% → 50% B	40 min
50% → 95% B	15 min

² Konzentration für Identitätsprüfung

2.2.4. Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)³

Die HRMS wurde verwendet, um jene Substanzen, deren Struktur durch HPLC-Vergleich nicht aufgeklärt werden konnte, über das Molekulargewicht und das Fragmentierungsverhalten zu identifizieren.

Die Versuche wurden am maXis HD ESI-Qq-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics®) durchgeführt. Die Probenlösungen wurden mit einer Flussrate von 3 µL/min direkt in die ESI-Quelle infundiert.

Die ESI-Quelle wurde mit folgenden Parametern betrieben: Kapillarspannung: 2,0 – 4,0 kV, Verneblungsgas: 0,4 bar (N₂), Trockengasfluss: 4,0 L/min, Trockengas-temperatur: 200°C. Die Massenspektren wurden in einem Bereich von 50 m/z bis 1550 m/z aufgenommen. Die Summenformeln konnten mit Hilfe des Programms Bruker Compass Data Analysis 4.2 ermittelt werden, basierend auf einer Massengenauigkeit von $\Delta m/z \leq 2$ ppm und einem Isotopenmustervergleich.

3. Ergebnisse

3.1. Präparative Trennung mittels

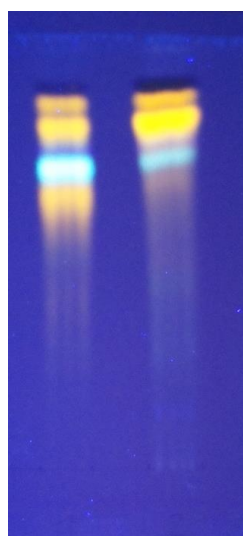
Dünnschichtchromatographie

Im ersten Schritt sollten die zwei gelb fluoreszierenden Banden bei $R_f = 0,73$ und $R_f = 0,79$ (s. Abb. 4, S. 9) in der Fraktion SPE 2/ 9-11 [7] einzeln dargestellt werden.

Dazu erfolgte ein Vorversuch zur Ermittlung einer geeigneten mobilen Phase für die Auftrennung mittels DC (s. Abb. 4, S. 9).

³ Für die Durchführung der MS-Messungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Martin Zehl, Institut für Pharmakognosie, Universität Wien.

Abbildung 4 : DC der Fraktionen SPE 2/ 3-8 [7] und SPE 2/ 9-11 [7]



Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

Detektion: NST A/ PEG

Bahn	Fraktion
1	SPE 2/ 3-8 [7]
2	SPE 2/ 9-11 [7]

Die zwei gelb fluoreszierenden Banden konnten in der DC ausreichend getrennt dargestellt werden (s. Abb. 4), deshalb wurde die dafür benutzte mobile Phase für die anschließende Trennung verwendet.

Für die präparative Trennung (s. Abb. 5) wurde eine Kieselgel-Platte mit Konzentrationszone verwendet und die Fraktion SPE 2/ 9-11 (10,6 mg) [7] aufgetragen. Nach der Entwicklung der DC wurden beide Banden getrennt voneinander von der Platte abgekratzt.

Abbildung 5: Präparative DC-Trennung



Bande 2

Bande 1

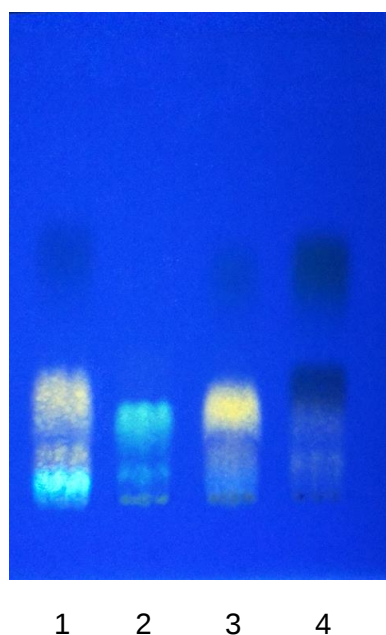
Stationäre Phase:
Kieselgel-Platte mit
Konzentrationszone;
20 cm x 20 cm

Mobile Phase:
EtOAc + konz. Essigsäure +
konz. Ameisensäure +
Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

Detektion: Tageslicht

Die Substanzen, die den gelben Banden 1 bzw. 2 entsprachen (s. Abb. 5, S. 9), wurden mit einer Mischung aus Methanol/Chloroform (7:1) vom Kieselgel gelöst, mittels Dünnschichtchromatographie überprüft und mit Kämpferol-3-O-rutinosid verglichen.

Abbildung 6: DC-Prüfung der isolierten Banden 1 und 2



Stationäre Phase: Polyamid-Fertigplatte 6 F₂₅₄ (Sigma-Aldrich®)

Mobile Phase: Toluol + Petrolether + Butanon + MeOH (15 + 4,5 + 9 + 12)

Detektion: NST A/ PEG

Bahn	Fraktion
1	SPE 2/ 1 + 2 [7]
2	Kämpferol-3-O-rutinosid
3	Bande 1
4	Bande 2

Abbildung 6 zeigt, dass die weniger polare, gelb fluoreszierende Substanz in der Bande 1 angereichert war. Der Vergleich mit der Referenz zeigte auch deutlich, dass es sich bei der angereicherten Substanz nicht um Kämpferol-3-O-rutinosid handelt. Es wurden 3,7 mg der Substanz erhalten.

In Bande 2 wurden zwei dunkel gefärbte Komponenten detektiert, bei denen es sich um Derivate von Homoplantaginin handeln könnte. Es wurden 5,2 mg des Gemisches erhalten.

3.2. Säulenchromatographie 1 (SC 1)

Um eine ausreichende Menge für die Strukturaufklärung von der Substanz in Bande 1 (s. Abb. 6, S. 10) zu gewinnen, wurden die Fraktionen SPE 2/ 1+2 [7] und SPE 2/ 3-8 [7] (s. Tabelle 1, S. 3) vereinigt und mittels SC 1 unter folgenden Bedingungen aufgetrennt.

Füllhöhe: 65 cm

Säulendurchmesser: 1,2 cm

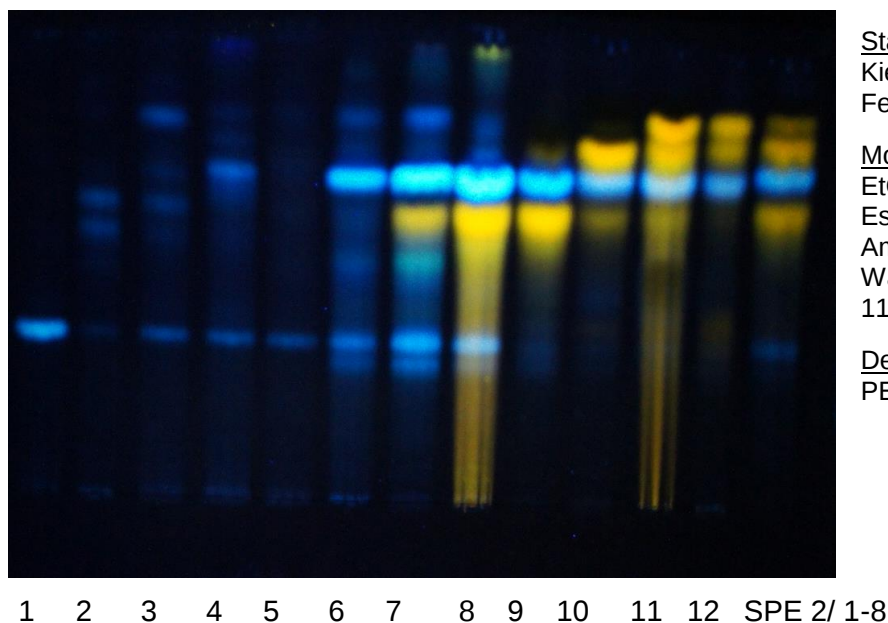
Stationäre Phase: Polyamid (Roth®)

Mobile Phase: Ethanol/Wasser-Gemische

Aufgetragene Menge: 48,4 mg

Flussrate: 3 ml/ 30 min

Abbildung 7: DC der Sammelfraktionen der SC 1



Stationäre Phase:
Kieselgel 60 F₂₅₄
Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase:
EtOAc + konz.
Essigsäure + konz.
Ameisensäure +
Wasser (100 + 11 +
11 + 10)

Detektion: NST A/
PEG

Tabelle 3: Sammelfractionen der SC 1

Sammelfraktion	Einzelfraktion	Menge (mg)	Mobile Phase
SC1 / SF 1	2 – 28	1,0	30% Ethanol
SC1 / SF 2	29 – 50	0,5	
SC1 / SF 3	51 – 60	0,1	
SC1 / SF 4	61 – 80	0,1	
SC1 / SF 5	81 – 129	0,9	40% Ethanol
SC1 / SF 6	130 – 137	1,4	
SC1 / SF 7	138 – 140	1,6	
SC1 / SF 8	141 – 150	8,5	
SC1 / SF 9	151 – 160	5,3	50% Ethanol
SC1 / SF 10	161 – 170	3,9	
SC1 / SF 11	171 – 190	10,3	
SC1 / SF 12	191 – 290	7,6	

In der DC der Sammelfractionen von SC 1 (s. Abb. 7, S. 11) ist zu sehen, dass es zu einer Auftrennung gekommen ist, die gewünschte Reindarstellung von einzelnen Komponenten wurde allerdings nicht erreicht. Da die isolierten Mengen zu gering für eine Reindarstellung von Komponenten waren, wurden einzelne Sammelfractionen der SC 1 für den Vergleich mit Referenzsubstanzen (s. 3.4., S. 16) herangezogen.

3.3. Säulenchromatographie 2 (SC 2)

Für die Säulenchromatographie 2 wurde die Fraktion SC 1/ SF 8 [5] (s. Abb. 8) ausgewählt, da eine ausreichende Menge verfügbar war und die Möglichkeit zur Reindarstellung und anschließenden Identifizierung mehrerer Substanzen des komplexen Inhaltsstoffmusters gegeben war.

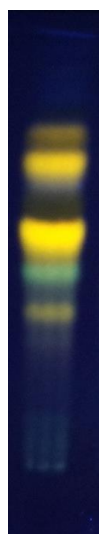


Abbildung 8: DC der Fraktion SC 1/ SF 8 [5]

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser
(100 + 11 + 11 + 10)

Detektion: NST A/ PEG

SC 1/ SF 8

SC 2 wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Füllhöhe: 75 cm

Säulendurchmesser: 2,5 cm

Stationäre Phase: Sephadex® LH-20 (Sigma -Aldrich®)

Mobile Phase: Methanol/Wasser-Gemische

Aufgetragene Menge: 385 mg

Flussrate: 5 ml/ Stunde

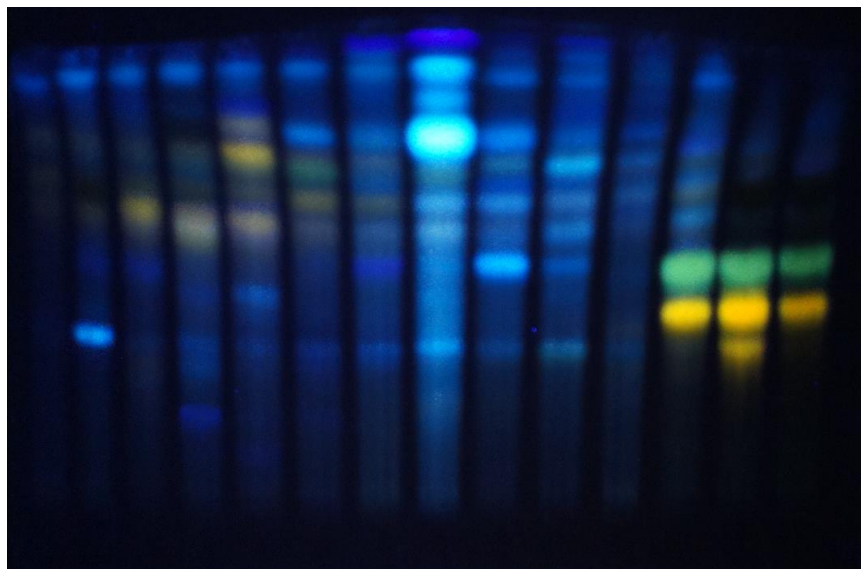
Es wurde jede zehnte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Bei Übereinstimmung des Inhaltsstoffmusters wurden die Fraktionen vereinigt. Auf diese Weise wurden 908 Einzelfraktionen gesammelt, die zu 32 Sammelfraktionen vereinigt wurden. In Sammelfraktion 21 kam es zur Bildung eines farblosen Niederschlags. Daraufhin wurde der Überstand abdekantiert und der Niederschlag als Fraktion 21 NS bezeichnet.

Abbildung 9: DC der Sammelfractionen von SC 2

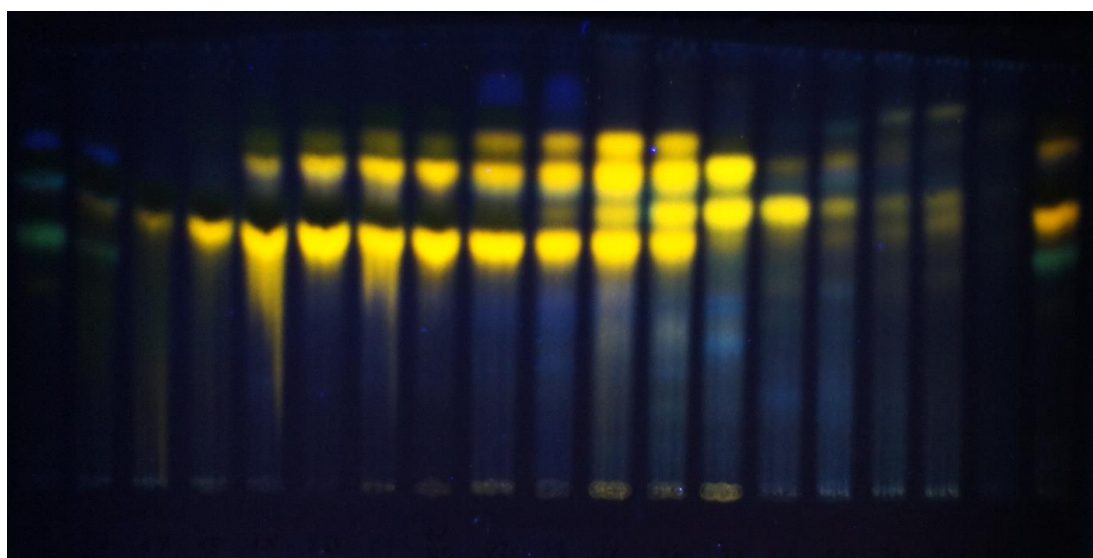
Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

Detektion: NST A/ PEG



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



15 16 17 18 19 20 21 21_{NS} 22 23 24 25 26 27 28 29 30 NL Vgl.

Tabelle 4: Sammelfraktionen der SC 2

Sammelfraktion	Einzelfraktion	Ausbeute (mg)	Mobile Phase
1	1 – 110	7,8	Methanol 30%
2	111 – 130	0,7	
3	131 – 140	0,2	
4	141 – 150	0,1	
5	151 – 160	0,1	
6	161 – 200	2,0	
7	201 – 280	6,6	
8	281 – 310	1,9	
9	311 – 330	2,6	
10	331 – 350	0,5	
11	351 – 400	4,9	
12	401 – 410	3,9	
13	411 – 420	12,7	
14	421 – 440	67,0	
15	441 – 450 ÜS	4,7	
16	441 -450 NS+ 451 – 460 ÜS	13,6	
17	451 – 460 NS	4,7	
18	461 – 470	11,0	
19	471 – 500	32,0	
20	501 – 580	87,6	
21	581 – 640	63,2	
21 NS		7,6	Methanol 40%
22	641 – 690	16,1	
23	691 – 720	5,9	
24	721 – 750	8,0	
25	751 – 770	4,6	
26	771 – 800	4,5	
27	801 – 820	2,6	
28	821 – 840	1,9	Methanol 50%
29	841 – 880	2,5	
30	881 – 908	1,7	Methanol 60%
NL	Nachlauf	0,1	

Auch bei der zweiten Säulenchromatographie kam es nicht zur gewünschten Reindarstellung von Einzelsubstanzen. Die Sammelfraktionen 2 bis 6 waren in sehr geringer Menge vorhanden (s. Tabelle 4) und wurden deshalb nicht weiter untersucht. In den Fraktionen 1 bis 11 zeigten sich nach dem Besprühen mit NST A/PEG unter UV₃₆₆ zahlreiche blau fluoreszierende Banden (s. Abb. 9, S. 14), bei welchen es sich vermutlich um Phenolcarbonsäure-Derivate handelte. In SF 8 ist eine blau fluoreszierende Hauptkomponente bei R_f 0,80 erkennbar, welche mittels DC-Vergleich (s. 3.4.1., S. 17) und HRMS (s. 3.5., S. 25) analysiert wurde.

In den Fraktionen 12 bis 14 wurden zwei Flavonoid-Komponenten bei $R_f=0,37$ und bei $R_f=0,47$ detektiert, bei welchen es sich aufgrund der Fluoreszenzfarben vermutlich um Kämpferol- und Quercetinmono- oder Diglykoside handelte.

Von Sammelfraktion 15 bis 22 war eine dunkel gefärbte Bande bei $R_f=0,61$ sichtbar, welche für das Vorliegen des Flavonoids Homoplantagin in den Fraktionen sprach [5].

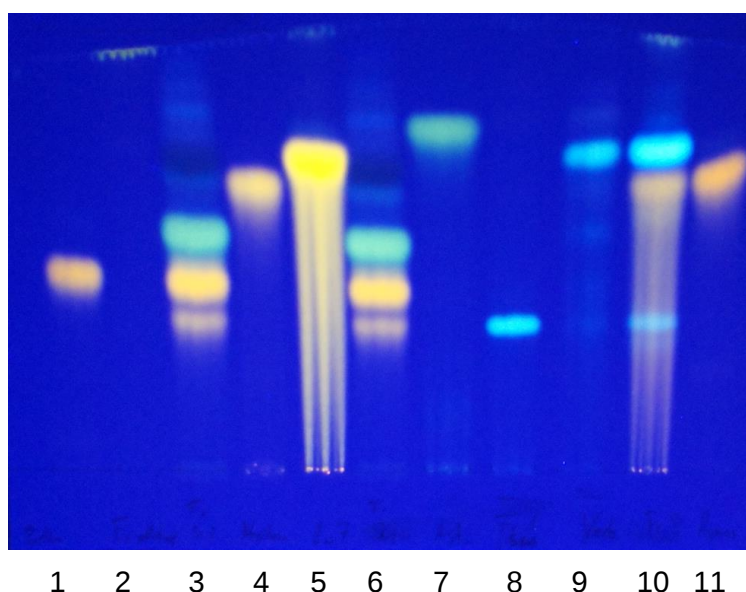
Von Fraktion 18 bis 27 waren in der oberen Hälfte der DC (s. Abb. 9, S. 14) mehrere gelb fluoreszierende Banden detektierbar, deren Fluoreszenz für Flavonoide charakteristisch ist.

Die Identifizierung der Komponenten erfolgte durch Vergleiche der DC- und HPLC-Charakteristika mit bekannten Referenzsubstanzen [11].

3.4. Vergleiche mit Referenzsubstanzen

Zunächst wurden Versuche zur Identifizierung der Inhaltsstoffe mittels DC durchgeführt. Bei Übereinstimmungen in R_f -Wert und Fluoreszenzfarbe der Banden von Referenz und Komponente einer Fraktion, wurde mit einem zweiten, unterschiedlichen chromatographischen Verfahren, in diesem Fall mittels HPLC (s. 2.2.3., S. 6), die Übereinstimmung bestätigt und die Identität der entsprechenden Substanz bewiesen.

Abbildung 10: DC-Vergleiche mit Referenz-Substanzen



Stationäre Phase: Kieselgel
60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase:
EtOAc + konz. Essigsäure +
konz. Ameisensäure +
Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

Detektion: NST A/ PEG

Legende s. Tabelle 5, S. 17

Tabelle 5: DC-Vergleiche mit Referenz-Substanzen

Bahn	Referenz / Fraktion	Bahn	Referenz / Fraktion
1	Rutin	7	Astragalin
2	Eriodictyol	8	SC 1 / SF 1
3	SC 2 / SF 13	9	Verbascosid
4	Nepitrin	10	SC 1 / SF 8
5	Luteolin-7-O-glucosid	11	Hyperosid
6	SC 2 / SF 13		

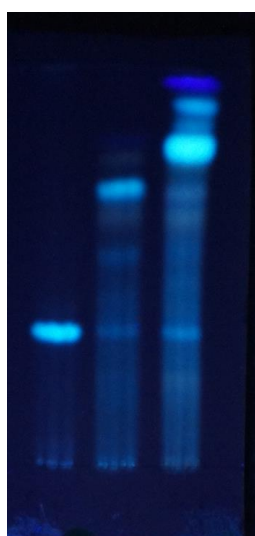
Die DC (Abb. 10, S. 16) zeigte beim Vergleich der Fraktionen mit den Referenzsubstanzen Übereinstimmungen. Die gelb fluoreszierende Bande von SC 2/ SF 13 bei $R_f=0,37$ stimmt mit jener von Rutin auf Bahn 1 überein und die hellblau fluoreszierende der Fraktion SC 1/ SF 8 bei $R_f= 0,70$ mit jener des Phenylcarbonsäure-Derivates Verbascosid. Die gelb fluoreszierende Bande von SC 1/ SF 8 bei $R_f= 0,57$ war mit zwei Referenzsubstanzen, Hyperosid und Nepitrin, vergleichbar.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden weitere Sammelfractionen mit verschiedenen Referenzsubstanzen verglichen.

3.4.1. Charakterisierung der Säure-Derivate

Aufgrund der DC (s. Abb. 10 S. 16) wurde vermutet, dass in der Fraktion SC 1/ SF 8 Verbascosid enthalten ist. Da auch in den Fraktionen SC 1/ SF 1 und SC 2/ SF 8 blau fluoreszierende Hauptkomponenten detektiert wurden, sollten diese Säure-Derivate ebenfalls identifiziert werden.

Abbildung 11: DC-Vergleich mit Verbascosid



1 2 3

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

Detektion: NST A/ PEG

Bahn	Fraktion/ Substanz
1	SC 1 / SF 1
2	Verbascosid
3	SC 2 / SF 8

Der Vergleich mit Verbascosid (s. Abb. 11, S. 17) zeigte, dass es sich bei den intensiv blau fluoreszierenden Banden von Fraktion SC 1/ SF 1 bei $R_f = 0,33$ und Fraktion SC 2/ SF 8 bei $R_f = 0,80$ nicht um dieses Phenolcarbonsäure-Derivat handelte. Ein HPLC-Vergleich von SC 2/ SF8 mit Verbascosid zeigte ebenfalls keine Überstimmung der Retentionszeiten und bestätigte dieses Resultat.

Die Hauptkomponente der Fraktion SC 2/ SF 8 wurde daher mittels HRMS untersucht (siehe 3.5., S. 25).

3.4.2. Untersuchung von Fraktion SC 2 / SF 14

Bei allen dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen der Sammelfractionen 13 und 14 der SC 2 zeigte sich einen Tag nach Durchführung der DC eine Rot-Verfärbung der Bande bei $R_f = 0,69$. Dieses Verhalten ist charakteristisch für das Flavanon Eriodictyol [11]. Da es sich hierbei, wie bereits gezeigt (s. Abb. 10, S. 16), nicht um das Aglykon handeln konnte, wurde die Sammelfraction 14 mit Eriodictyol-7-O-glucosid verglichen.

Abbildung 12: DC-Vergleich mit Eriodictyol-7-O-glucosid



Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

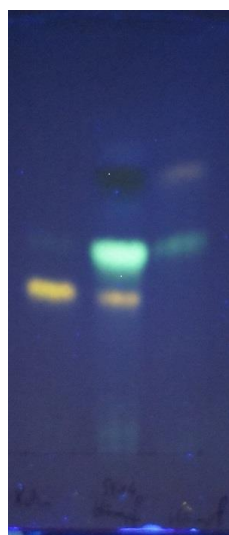
Detektion: NST A/ PEG

Bahn	Fraktion/Substanz
1	SC 2/ SF 14
2	Eriodictyol-7-O-glucosid

In der Sammelfraction 14 war die rote Bande bei $R_f = 0,69$ nur sehr schwach zu sehen. Somit konnte das Vorkommen von Eriodictyol-7-O-glucosid nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Sammelfraktion 14 der SC 2 wurde außerdem mit den Referenzsubstanzen Rutin und Kämpferol-3-O-rutinosid verglichen.

Abbildung 13: DC-Vergleich mit Rutin und Kämpferol-3-O-rutinosid



Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

Detektion: NST A/ PEG

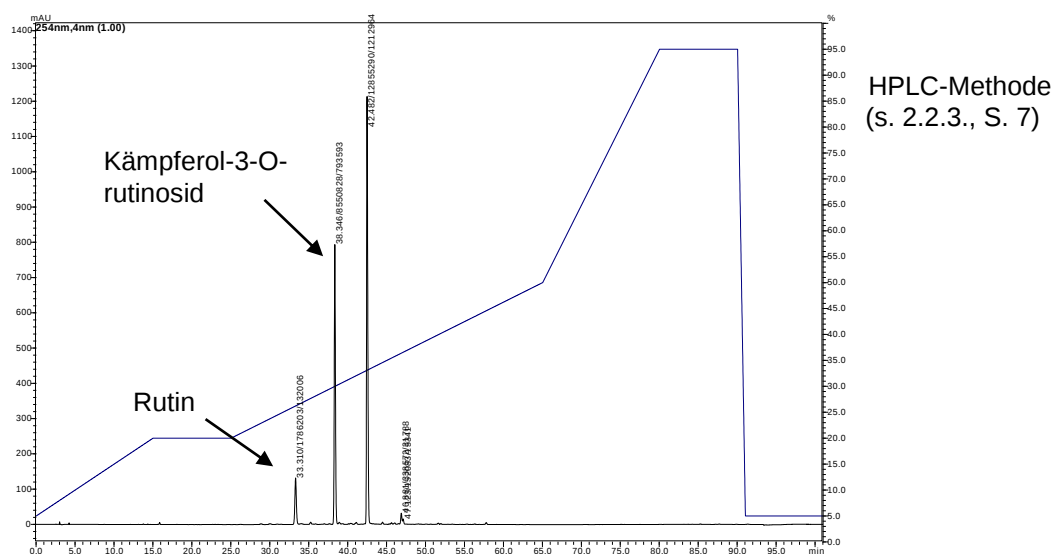
Bahn	Fraktion/ Substanz
1	Rutin
2	SC 2/ SF 14
3	Kämpferol-3-O-rutinosid

1 2 3

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, stimmten die Banden von Referenz und Komponenten der Sammelfraktion überein. Die gelb fluoreszierende Bande bei $R_f=0,37$ von Rutin (Bahn 1) und die türkis fluoreszierende Bande bei $R_f=0,47$ von Kämpferol-3-O-rutinosid (Bahn 3) zeigen denselben R_f -Wert und dieselbe Fluoreszenzfarbe wie die zwei Hauptkomponenten in Sammelfraktion 14.

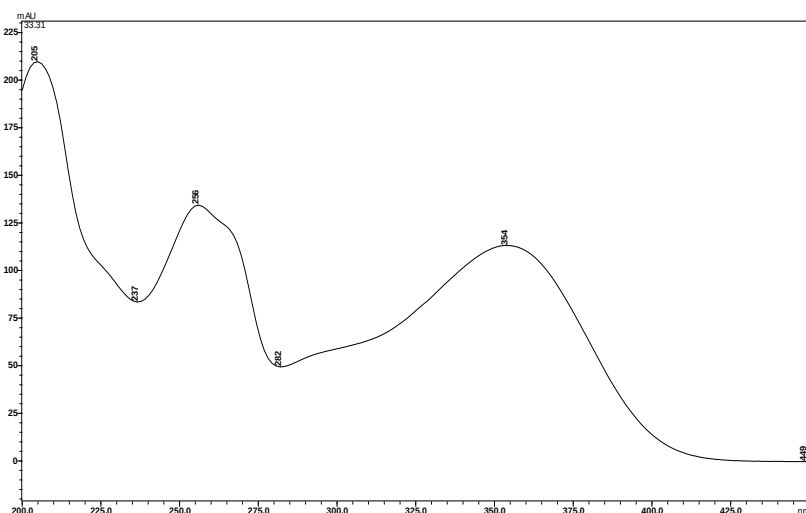
Diese dünnschichtchromatographischen Übereinstimmungen wurden mittels HPLC überprüft, um das Vorliegen von Rutin und Kämpferol-3-O-rutinosid in der Sammelfraktion 14 zu bestätigen.

Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von SC 2/ SF 14



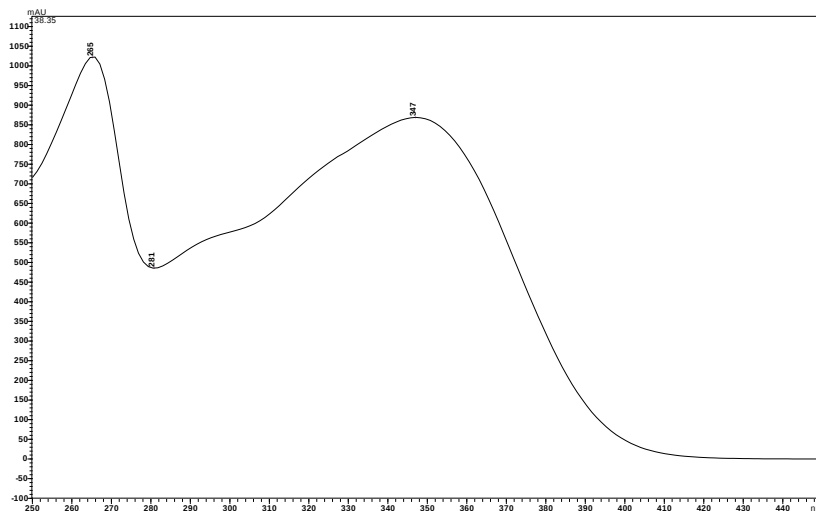
Das Chromatogramm der Referenz Rutin (s. Anhang 1 und 2, S. 53) zeigte eine Übereinstimmung des Substanzpeaks bei Retentionszeit und UV-Spektrum mit dem Peak der Sammelfraktion 14 bei 33,31 min.

Abbildung 15: UV-Spektrum von Rutin in SF 14, bei 33,31 min



Die Komponente aus SC 2/ SF 14, die nach 38,35 min eluiert wurde, konnte mit Hilfe der Referenz als Kämpferol-3-O-rutinosid (s. Anhang 3 und 4, S. 54) identifiziert werden, da die Retentionszeit und UV-Spektrum übereinstimmten.

Abbildung 16: UV-Spektrum von Kämpferol-3-O-rutinosid in SF 14, bei 38,35 min



Durch die Vergleiche in zwei unterschiedlichen chromatographischen Systemen konnte das Vorkommen der Flavonoldiglykoside Rutin und Kämpferol-3-O-rutinosid in der Sammelfraktion 14 bestätigt werden. Beide Komponenten waren in *Scrophularia ilwensis* nachgewiesen worden [12].

3.4.3. Untersuchung von Fraktion SC 2 / SF 21

Die Sammelfraktion 21 der SC 2 wurde bezüglich der intensiv gelb fluoreszierenden Bande bei $R_f=0,56$ näher untersucht. Aus einer vorhergehenden Diplomarbeit [5] lagen Hinweise vor, dass Nepitrin im methanolischen Extrakt von *Scrophularia lucida* enthalten sein könnte. Daher sollten diese Hinweise bestätigt werden.

Abbildung 17: DC-Vergleich von SC 2/ SF21 mit Nepitrin



Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

Detektion: NST A/ PEG

Bahn	Fraktion/Substanz
1	SC 2 / SF 21
2	Nepitrin

1 2

Auf Grund der Überstimmung im DC-Vergleich (s. Abb. 17, S. 21), wurde die HPLC als zweites chromatographisches System zum Identitätsnachweis herangezogen.

Abbildung 18: HPLC-Chromatogramm von SC 2/ SF 21

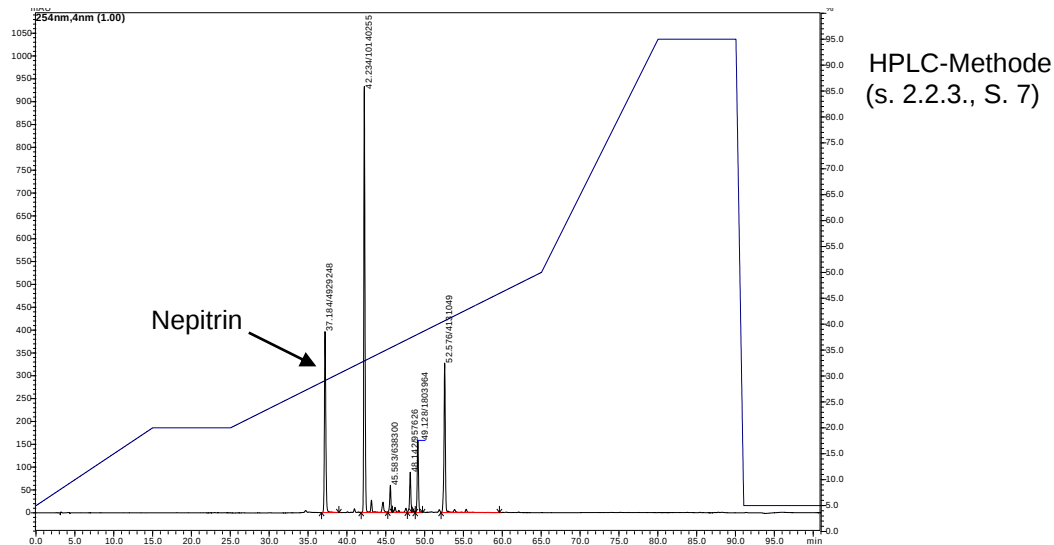
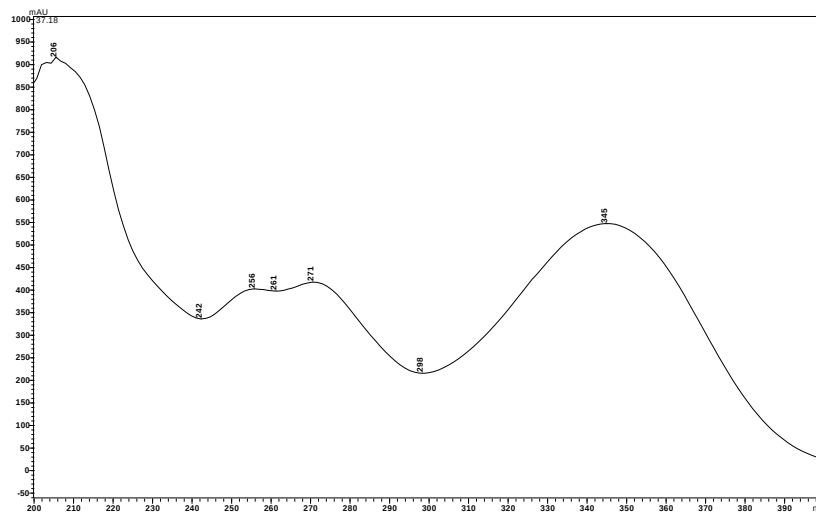


Abbildung 19: UV-Spektrum von Nepitrin in SF 21, bei 37,18 min

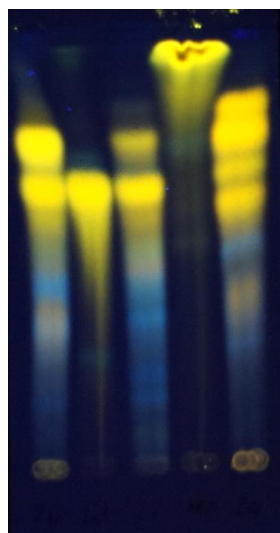


Die Vergleiche mittels DC und HPLC bestätigten die Identität von Nepitrin in der Sammelfraktion 21 von SC 2, da bei der HPLC-Analyse der Referenz (s. Anhang 5 und 6, S. 54-55) Nepitrin nach 37,11 min eluiert wurde und sich ein völlig überstimmendes UV-Spektrum mit dem Inhaltsstoff in SF 21 zeigte. Nepitrin ist ein selten vorkommendes Flavonol, welches schon in *Scrophularia ningpoensis* identifiziert werden konnte [13].

3.4.4. Untersuchung der Fraktionen SC 2 / SF 24, 25, 26 und 27

Die drei gelb fluoreszierenden Flavonoide der Sammelfraktionen 24 bis 27 der Säulenchromatographie 2 mit R_f -Werten von 0,67 bis 0,79, wurden mittels Dünnschichtchromatographie mit ausgewählten Referenzsubstanzen verglichen.

Abbildung 20: DC-Vergleich von SC 2/ SF 24, 26 und 27



Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + konz. Essigsäure + konz. Ameisensäure + Wasser (100 + 11 + 11 + 10)

Detektion: NST A/ PEG

Bahn	Fraktion/ Referenz
1	SC 2/ SF 26
2	Luteolin-7-O-glucosid
3	SC 2/ SF 27
4	Nepetin
5	SC 2/ SF 24

Der Vergleich der Sammelfraktionen mit Nepetin (s. Abb. 20), dem Aglykon des Flavonoids Nepitrin (s. 3.4.3., S. 21), zeigte keine Übereinstimmung, da die Referenz eindeutig apolarer war als die zu identifizierenden Substanzen.

Der Vergleich mit Luteolin-7-O-glucosid (s. Abb. 20) deutete darauf hin, dass die intensiv gelb fluoreszierende Bande bei $R_f=0,67$ in den untersuchten Sammelfraktionen mit dieser Substanz übereinstimmte.

Daher wurden die Fraktionen 24 bis 27 auch mittels HPLC mit Luteolin-7-O-glucosid verglichen.

Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm von SC 2/ SF 27

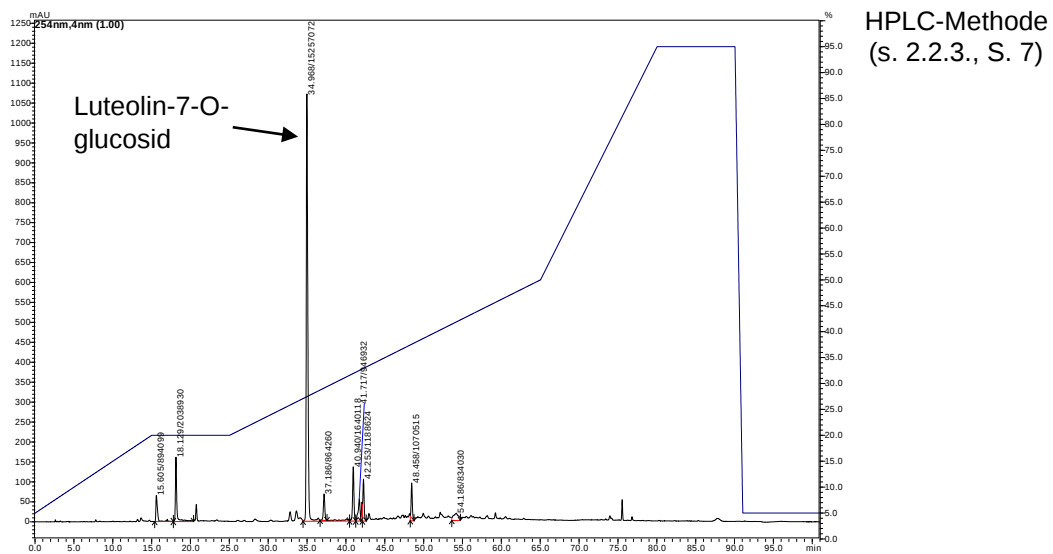
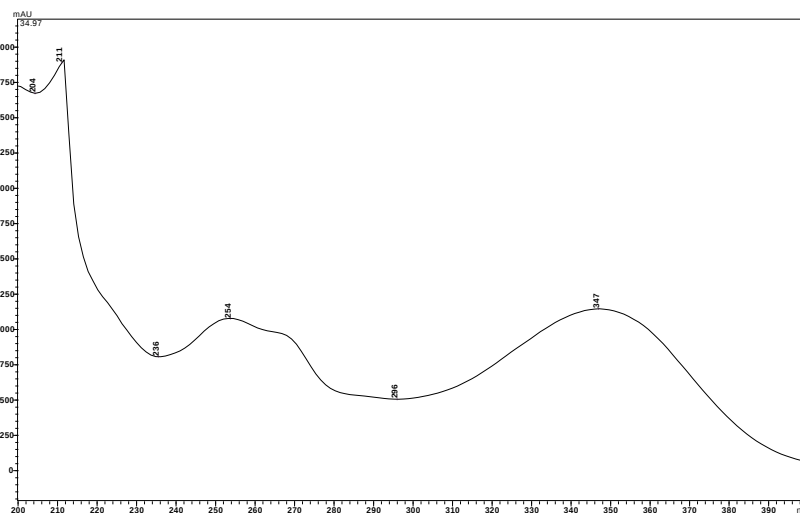


Abbildung 22: UV-Spektrum von Luteolin-7-O-glucosid in SF 27, bei 34,97 min



Anhand der Retentionszeit und des UV-Spektrums der Referenz (s. Anhang 7 und 8, S. 55) konnte eine Übereinstimmung mit dem Substanzpeak der Fraktion zweifelsfrei gezeigt werden. Luteolin-7-O-glucosid konnte auch in Fraktion 25 und 26 (s. Anhang 9, 10, 11 und 12, S. 56 und 57) nachgewiesen werden.

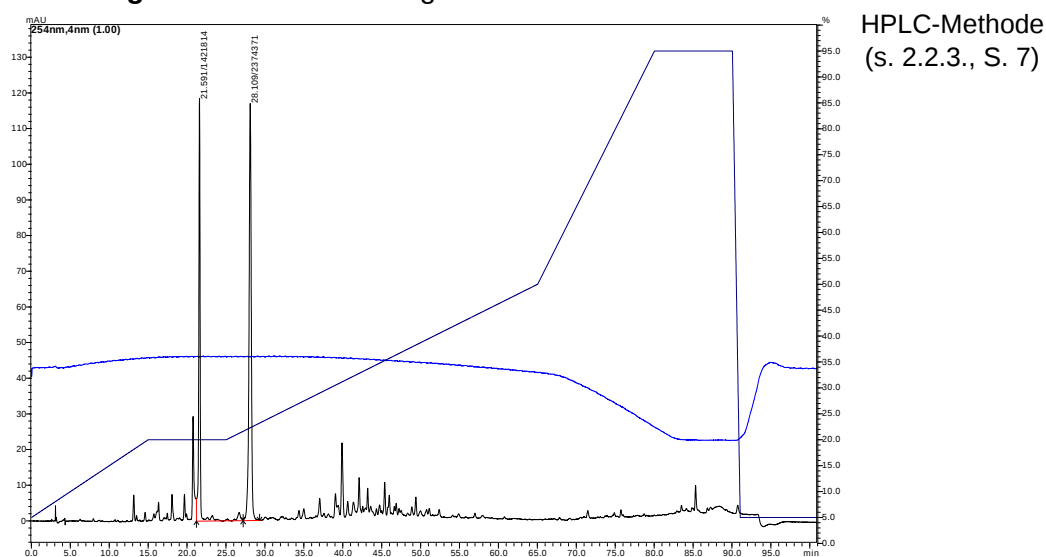
Das Flavonol Luteolin-7-O-glucosid war bisher unbekannt in der Gattung *Scrophularia* und konnte somit in *Scrophularia lucida* zum ersten Mal nachgewiesen werden.

3.5. Strukturaufklärung mittels HRMS

Um über das Molekulargewicht und das Fragmentierungsverhalten auf die Strukturen schließen zu können, wurden die Komponenten, die mittels Referenz-Vergleich nicht identifiziert werden konnten, mittels hochauflösender Massenspektrometrie untersucht.

Aus Fraktion SC 2 / SF 8 wurde der Substanzpeak bei einer Retentionszeit von 28,11 min mittels HPLC präparativ gewonnen (s. Abb. 23).

Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm von SC 2 / SF 8

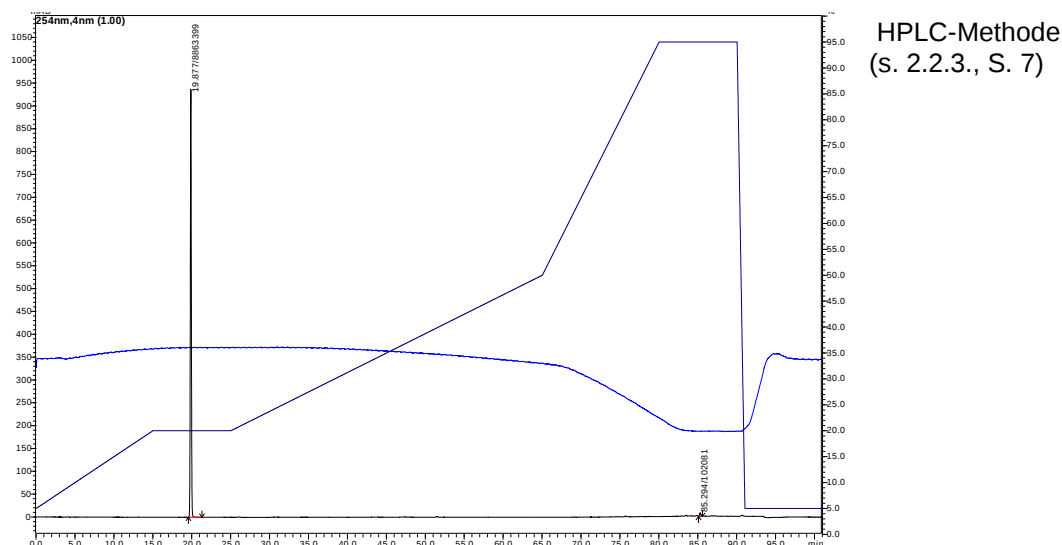


Die dadurch gewonnene Substanz-Lösung wurde anschließend mittels HRMS im Negativ-Ionenmodus analysiert.

Das Massenspektrum (s. Anhang 13, S. 58) zeigte, dass es sich um eine Verbindung mit einem Molekulargewicht von 168 Da und der Summenformel $C_8H_8O_4$ handelte. Diese Resultate legten nahe, dass es sich um Vanillin- oder Isovanillinsäure handeln könnte. Beide Benzoessäure-Derivate waren bereits in der Gattung *Scrophularia* nachgewiesen worden [14, 15].

Daher wurde ein HPLC-Vergleich der Fraktion SC 2/ SF 8 mit Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoessäure) durchgeführt.

Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm von Vanillinsäure



Da die Vergleichssubstanz bereits nach 19,55 min eluiert wurde, konnte das Vorliegen von Vanillinsäure ausgeschlossen werden. Die Überstimmung der UV-Spektren von Vanillinsäure und der Komponente mit $R_t = 28,11$ min in der Sammelfraktion 8 (s. Anhang 14 und 15, S. 59) spricht für das Vorliegen eines strukturverwandten Isomers des untersuchten Benzoessäure-Derivates wie Isovanillinsäure (3-Hydroxy-4-methoxybenzoessäure).

Ein Strukturbeweis war allerdings nicht möglich, da entsprechende Referenzsubstanzen im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht verfügbar waren.

3.6. Quantifizierung

Zum Abschluss der Charakterisierung des Inhaltsstoffmusters des methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* wurden vier Komponenten des Extraktes quantitativ bestimmt. Einerseits wurden die drei Hauptinhaltsstoffe Homoplantagin, Koelziosid, und Scrovalentinosid quantifiziert. Andererseits wurde Hispidulin quantitativ bestimmt, welches in aktivitätsgeleiteten Untersuchungen von Fraktionen des methanolischen Extrakts eine hohe Aktivität gezeigt hatte [16].

3.6.1. Gewinnung der Reinsubstanzen

Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Standardisierung in HPLC-Analysen. Für die Bestimmungen war es notwendig, die Substanzen zur Herstellung einer Stammlösung in möglichst reiner Form zu gewinnen.

3.6.1.1. Aufreinigung von Homoplantagin

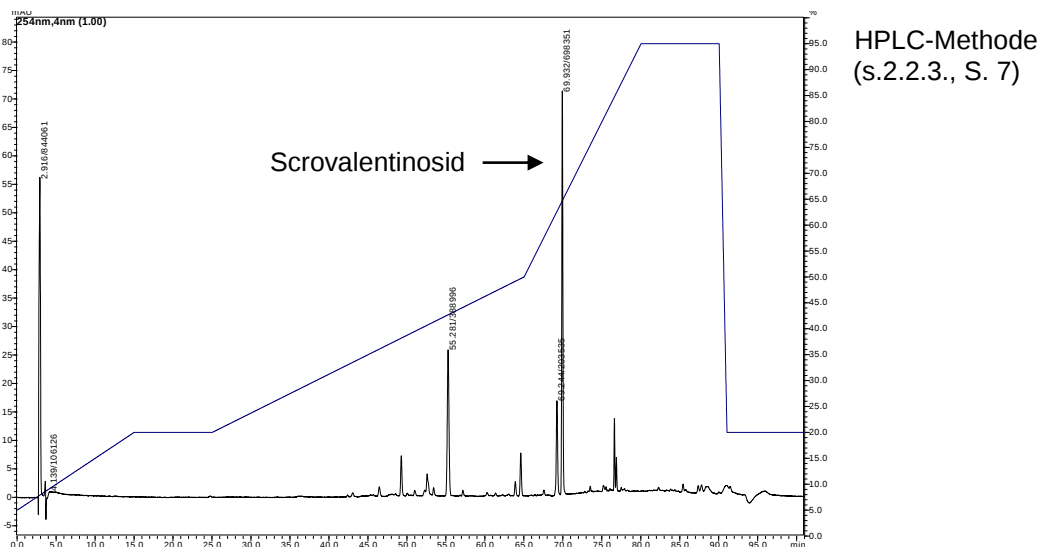
Das Flavonoid Homoplantagin war in einer vorangegangenen Diplomarbeit [5] aus der Ethylacetat-Fraktion des methanolischen Extraktes gewonnen worden. Allerdings stand es nicht in ausreichender Reinheit und Menge zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde die Fraktion SC 3 / SF 12 (s. 2.1., S. 3), in der Homoplantagin die Hauptkomponente darstellte, aufgereinigt. Dazu wurde die Fraktion (24,5 mg) in wenigen ml Chloroform gelöst und anschließend mit 1-2 ml Methanol versetzt. Daraus kristallisierte unter Kühlung ein hellgelber Niederschlag von Homoplantagin, der abzentrifugiert wurde.

Die Reinheit des gewonnenen Homoplantagins wurde mittels ELSD (s. 2.2.3., S. 7) und unter UV-Detektion überprüft.

3.6.1.2. Aufreinigung von Scrovalentinosid

Das Iridoidglykosid Scrovalentinosid (=SL 2) war in der Chloroform-Fraktion des methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* nachgewiesen worden [6]. Bei einer HPLC-Untersuchung der zur Verfügung stehenden Substanz zeigte sich, dass die Reinheit für eine Quantifizierung nicht ausreichend war (s. Abb. 25, S. 28). Deswegen sollten mittels Säulenchromatographie Begleitsubstanzen abgetrennt werden.

Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm von Scrovalentinosid (69,93 min) vor der SC 3



Säulenchromatographie 3:

Die Säulenchromatographie wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Füllhöhe: 60 cm

Säulendurchmesser: 1,2 cm

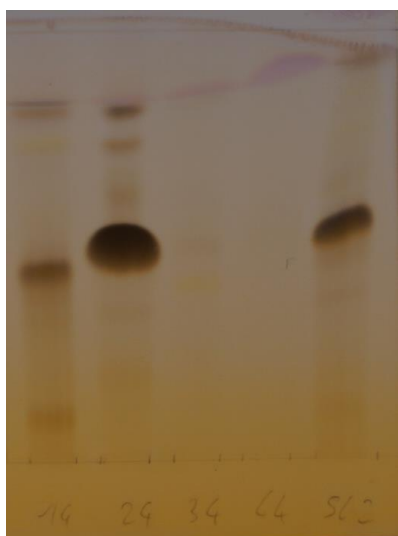
Stationäre Phase: Sephadex® LH-20 (Sigma -Aldrich®)

Mobile Phase: Methanol 40%

Aufgetragene Menge: 104,2 mg SL 2 [6]

Flussrate: 5 ml/ Stunde

Abbildung 26: DC-Überprüfung der Fraktionen von SC 3



1 2 3 4 Vgl.

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + MeOH + konz. Ameisensäure + Wasser (70 + 8 + 4 + 4)

Detektion: AAS-Reagens

Bahn	Fraktion
1	SC 3 / 14
2	SC 3 / 24
3	SC 3 / 34
4	SC 3 / 44
Vergleich	SL 2 [6]

Es wurde jede zehnte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. In Abbildung 26 (s. S. 28) ist zu sehen, dass Scrovalentinosid bei $R_f=0,54$ in Fraktion 24 fast rein vorlag. Um die erwünschte Komponente möglichst quantitativ zu gewinnen, wurden auch die Fraktionen 18, 20, 22 und 28 mittels DC überprüft (s. Abb. 27 und 28).

Abbildung 28: DC-Überprüfung der Fraktionen 18 und 28 von SC 3



18 28

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck®)

Mobile Phase: EtOAc + MeOH + konz. Ameisensäure + Wasser (70 + 8 + 4 + 4)

Detektion: AAS-Reagens

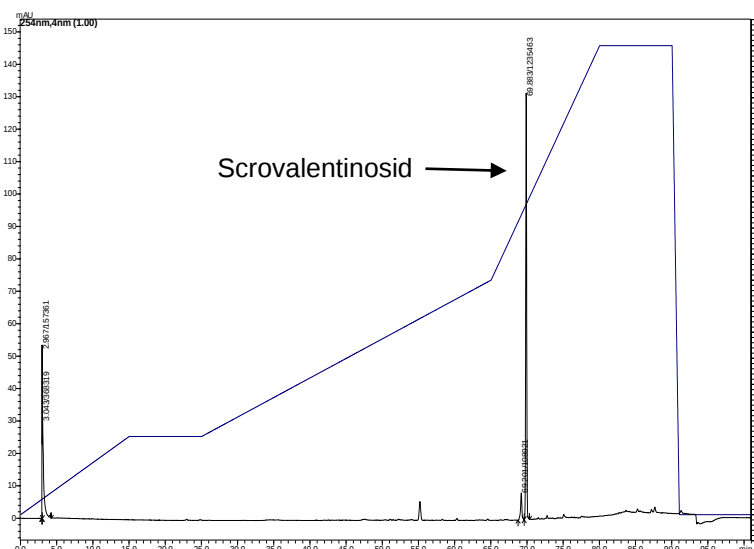
Abbildung 27: DC-Überprüfung der Fraktionen 20 und 22 von SC 3



20 22

Da auch die Fraktionen 20 und 22 Scrovalentinosid in reiner Form enthielten, wurden die Fraktionen 20 bis 26 vereinigt. Die Ausbeute betrug 44,4 mg.

Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm von Scrovalentinosid *nach* der SC 3



HPLC-Methode
(s. 2.2.3., S. 7)

Das HPLC-Chromatogramm (s. Abb. 29, S. 29) bestätigte die erfolgreiche Aufreinigung von Scrovalentinosid durch die SC 3, das nun für die Erstellung der Eichgeraden verwendet werden konnte.

3.6.1.3. Koelziosid und Hispidulin

Das zweite Iridoidglykosid Koelziosid (=SL 1), welches neben Scrovalentinosid aus der Chloroform-Fraktion isoliert worden war [6], stand in ausreichender Reinheit zur Verfügung.

Das Flavonoid-Aglykon Hispidulin, welches ebenfalls in der Chloroform-Fraktion des methanolischen Extraktes nachgewiesen worden war [16], stand in reiner Form als Standard zur Verfügung (Sigma-Aldrich®).

3.6.2. Stammlösungen und Verdünnungsreihen

Um die passenden Konzentrationen der Verdünnungslösungen zur Erstellung der Eichgeraden zu ermitteln, wurde zunächst von jeder Substanz eine Lösung von je 1 mg/ml in DMSO angefertigt. In Abhängigkeit der Fläche des Substanzpeaks in den Chromatogrammen von Methanol-Extrakt, Ethylacetat- und Chloroform-Fraktion, wurde jede Stammlösung entsprechend verdünnt. Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte beim jeweiligen UV-Maximum.

Die Reinheit der verwendeten Standards wurde über die Verdünnungslösung mit der höchsten und der zweitniedrigsten Konzentration jeder Verdünnungsreihe berechnet.

Tabelle 6: Reinheit der Standards

Standard	Reinheit
Homoplantagin	93,6%
Koelziosid	84,4%
Scrovalentinosid	88,0%
Hispidulin	98,0% ⁴

⁴ Reinheit deklariert vom Hersteller (Sigma-Aldrich®)

3.6.3. Quantifizierung von Homoplantaginin

Die quantitative Bestimmung des Flavonoids Homoplantaginin erfolgte im MeOH-Extrakt, der Ethylacetat- und der Chloroform-Fraktion.

Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm vom MeOH-Extrakt bei 334 nm

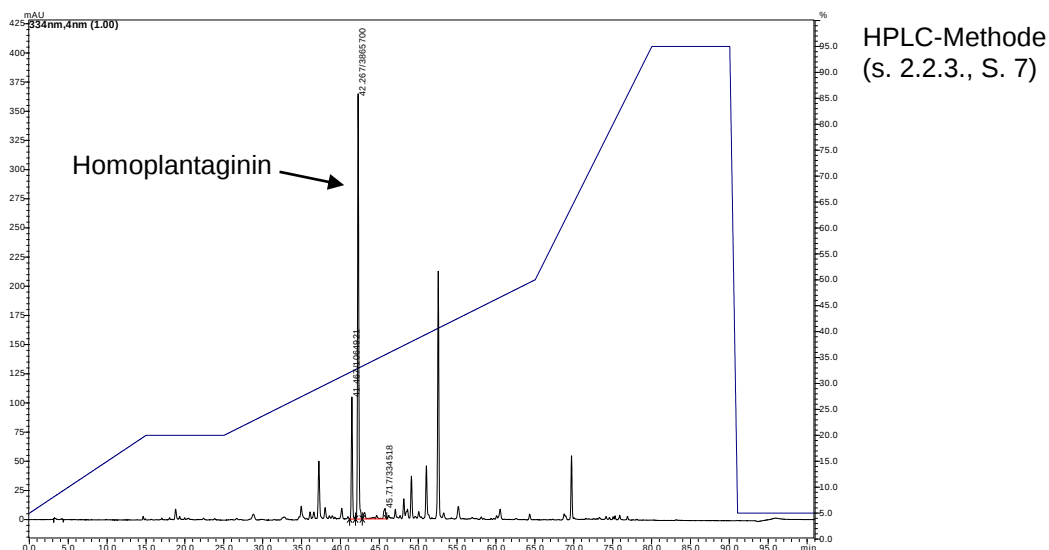


Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm der Ethylacetat-Fraktion bei 334 nm

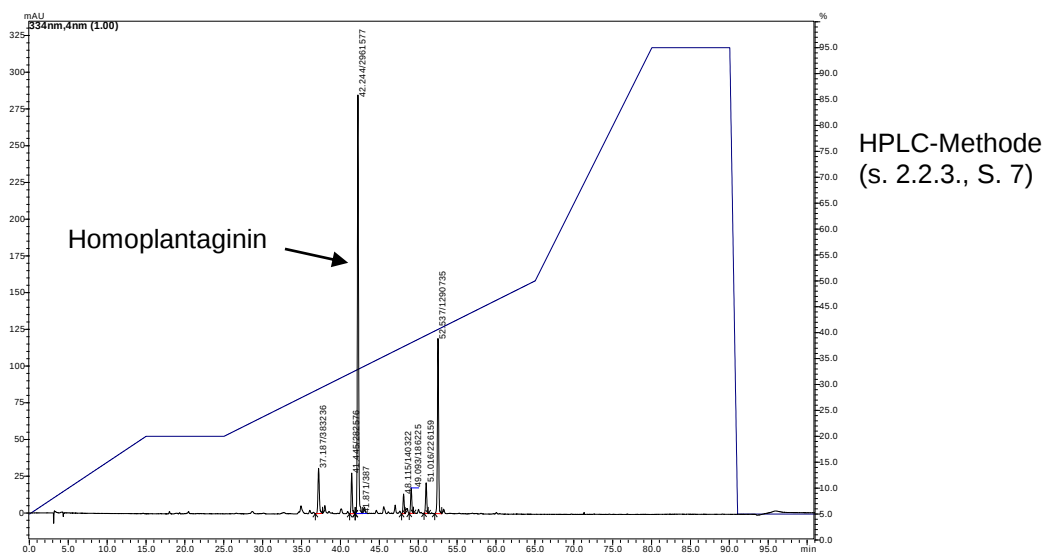
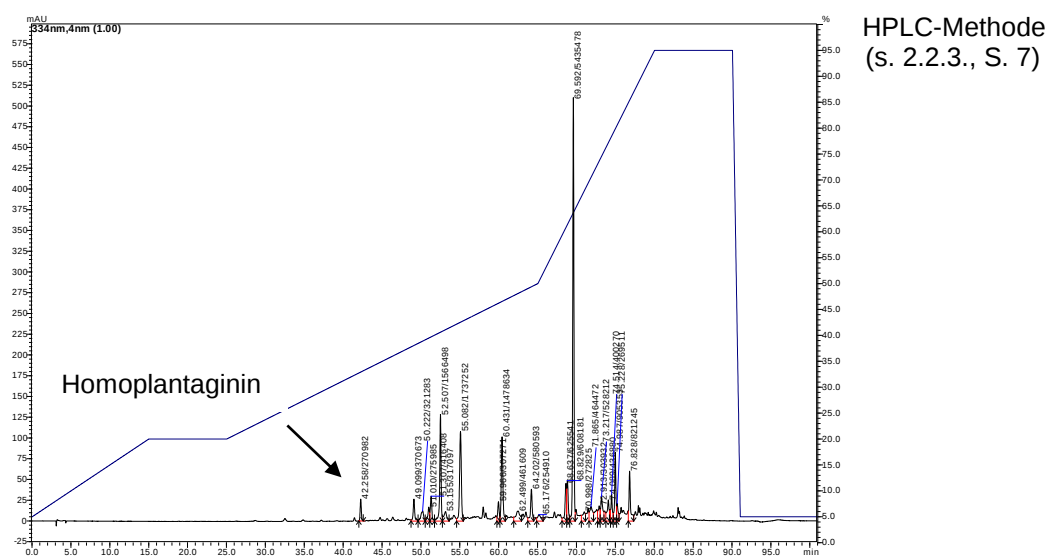
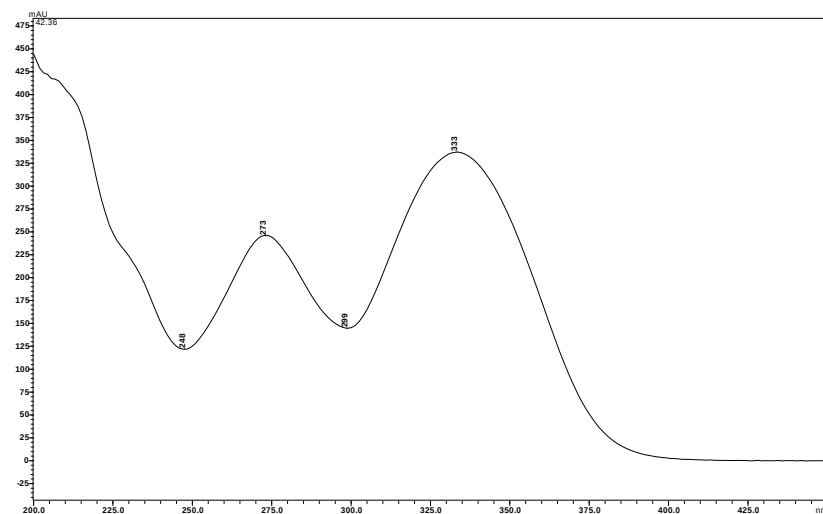


Abbildung 32: HPLC-Chromatogramm der Chloroform-Fraktion bei 334 nm



Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 334 nm.

Abbildung 33: UV-Spektrum von Homoplantagin bei 42,36 min

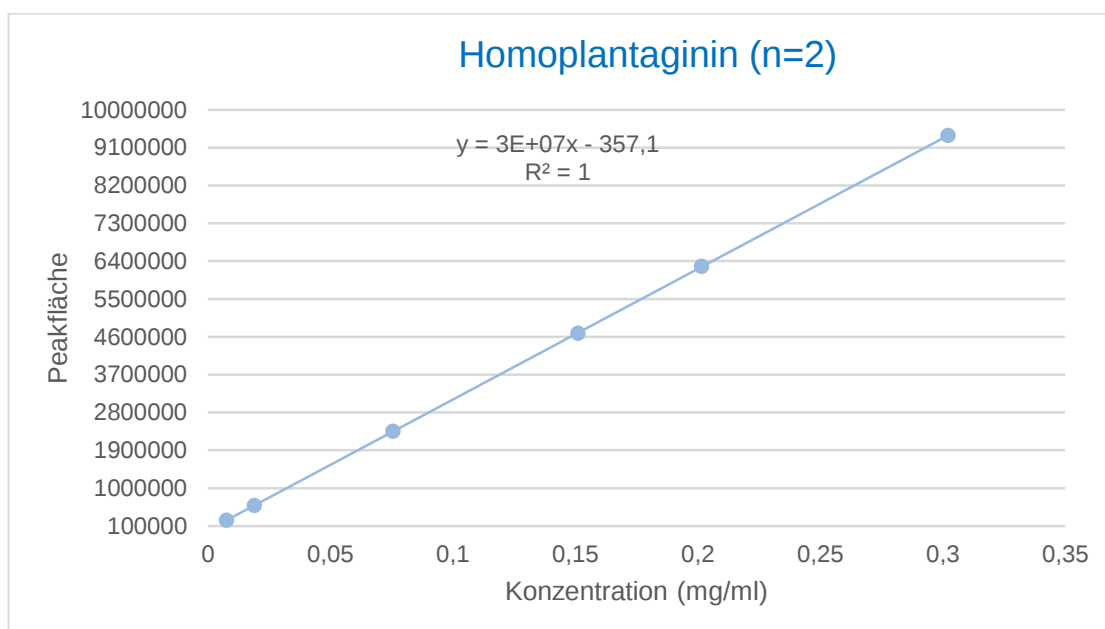


Für Stammlösung wurden 0,97 mg Homoplantagin (s. 3.6.1.1., S. 27) in 1 ml DMSO gelöst. Unter Berücksichtigung der Reinheit von 93,5% (s. Tabelle 6, S. 30), enthielt die Stammlösung 0,9066 mg/ml Homoplantagin. Für die Erstellung der Eichgerade wurden sechs Verdünnungen analysiert.

Tabelle 7: Herstellung der Eichlösungen von Homoplantagin in DMSO

Verdünnungs- lösung	Verdünnungsschritte	Konzentration (mg/ml)	Peakfläche (n=2)
H1	1 T Stammlsg. + 2 T DMSO	0,3022	9 379 157
H2	2 T H1 + 1 T DMSO	0,2015	6 278 013
H3	1 T H1 + 1 T DMSO	0,1511	4 687 986
H4	1 T H3 + 1 T DMSO	0,0755	2 357 932
H5	1 T H3 + 3 T DMSO	0,0189	586 581
H6	1 T H4 + 9 T DMSO	0,0076	234 475

Abbildung 34: Eichgerade Homoplantagin



Geradengleichung: $y = 3 \cdot 10^7 x - 357,1$

Tabelle 8: Peakflächen von Homoplantagin in den Untersuchungslösungen

Untersuchungslösung	Konzentration (mg/ml)	Peakfläche Homoplantagin (n=2)
MeOH-Extrakt	4,26	3 826 192
Ethylacetat-Fraktion	0,41	2 990 176
Chloroform-Fraktion	4,30	275 263

Aus den jeweiligen Peakflächen aus Tabelle 8 (s. S. 33) konnte mit Hilfe der Geradengleichung die Konzentration und damit auch der Anteil des Homoplantagins in den entsprechenden Untersuchungslösungen errechnet werden (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der Quantifizierung von Homoplantagin

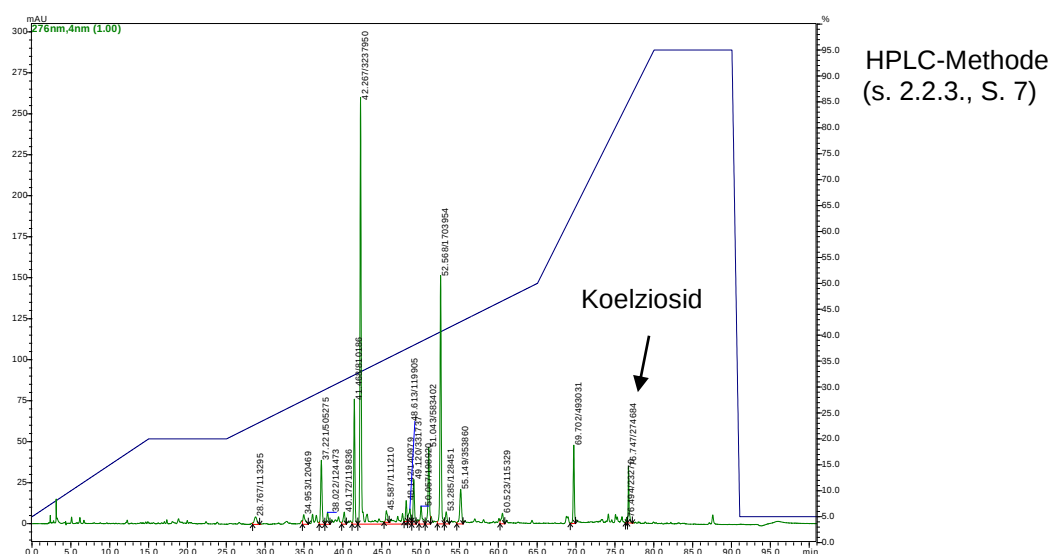
	Konzentration (mg/ml)	Anteil (%)
Methanol-Extrakt	0,1276	2,99
Ethylacetat-Fraktion	0,0997	24,08
Chloroform-Fraktion	0,0092	0,21

Mit einem Anteil von 2,99% war Homoplantagin ein Hauptinhaltsstoff des methanolischen Extraktes von *Scropularia lucida*, der durch Verteilung stark in der Ethylacetat- und in nur geringen Mengen in der Chloroform-Fraktion angereichert wurde.

3.6.4. Quantifizierung von Koelziosid

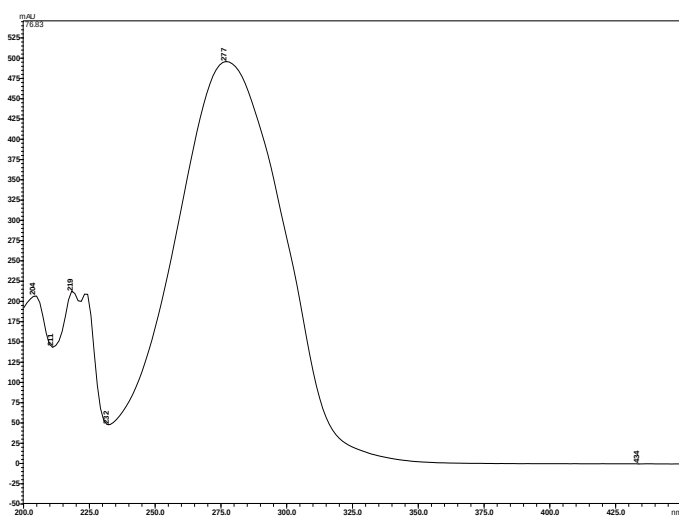
Das Iridoidglykosid Koelziosid wurde sowohl im MeOH-Extrakt als auch in der Chloroform-Fraktion quantifiziert.

Abbildung 35: HPLC-Chromatogramm vom MeOH-Extrakt bei 276 nm



HPLC-Methode (s. 2.2.3., S.7)

Abbildung 37: UV-Spektrum von Koelziosid bei 76,83 min

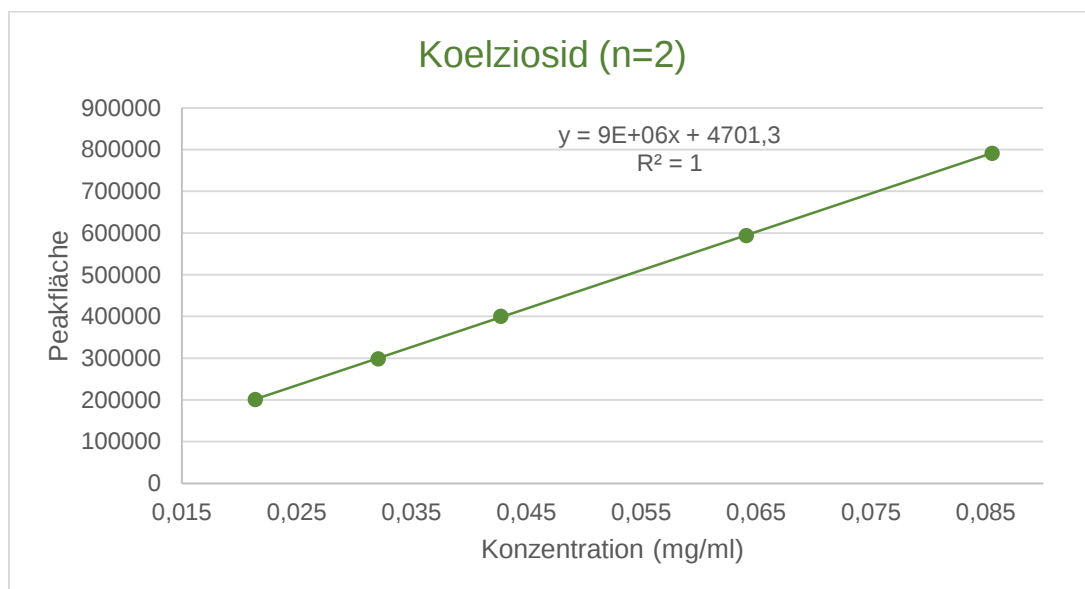


35

Tabelle 10: Herstellung der Eichlösungen von Koelziosid in DMSO

Verdünnungs- lösung	Verdünnungsschritte	Konzentration (mg/ml)	Peakfläche (n=2)
K1	1 T Stammlsg. + 9 T DMSO	0,0855	796 309
K2	3 T K1 + 1 T DMSO	0,0642	607 508
K3	1 T K1 + 1 T DMSO	0,0428	401 302
K4	1 T K2 + 1 T DMSO	0,0321	300 569
K5	1 T K3 + 1 T DMSO	0,0214	201 394

Abbildung 38: Eichgerade Koelziosid



Geradengleichung: $y = 9 \cdot 10^6 x + 4701,3$

Tabelle 11: Peakflächen von Koelziosid in den Untersuchungslösungen

Untersuchungslösung	Konzentration (mg/ml)	Peakfläche Koelziosid (n=2)
MeOH-Extrakt	4,26	276 905
Chloroform-Fraktion	0,48	406 258

Die Konzentration und der Anteil des Koelziosids in MeOH-Extrakt und Chloroform-Fraktion wurden durch Einsetzen der Peakflächen der Komponente (s. Tabelle 11, S. 36) in die Geradengleichung ermittelt.

Tabelle 12: Ergebnisse der Quantifizierung von Koelziosid

	Konzentration (mg/ml)	Anteil (%)
MeOH-Extrakt	0,0302	0,71
Chloroform-Fraktion	0,0446	9,34

Im Vergleich zum Homoplantaginin war Koelziosid in deutlich geringerer Konzentration im Methanol-Extrakt enthalten und wurde durch Verteilung fast quantitativ in die Chloroform-Fraktion übergeführt.

3.6.5. Quantifizierung von Scrovalentinosid

Das zweite Iridoidglykosid Scrovalentinosid aus *Scrophularia lucida* wurde ebenfalls im MeOH-Extrakt und der Chloroform-Fraktion quantitativ bestimmt.

Abbildung 39: HPLC-Chromatogramm vom MeOH-Extrakt bei 313 nm

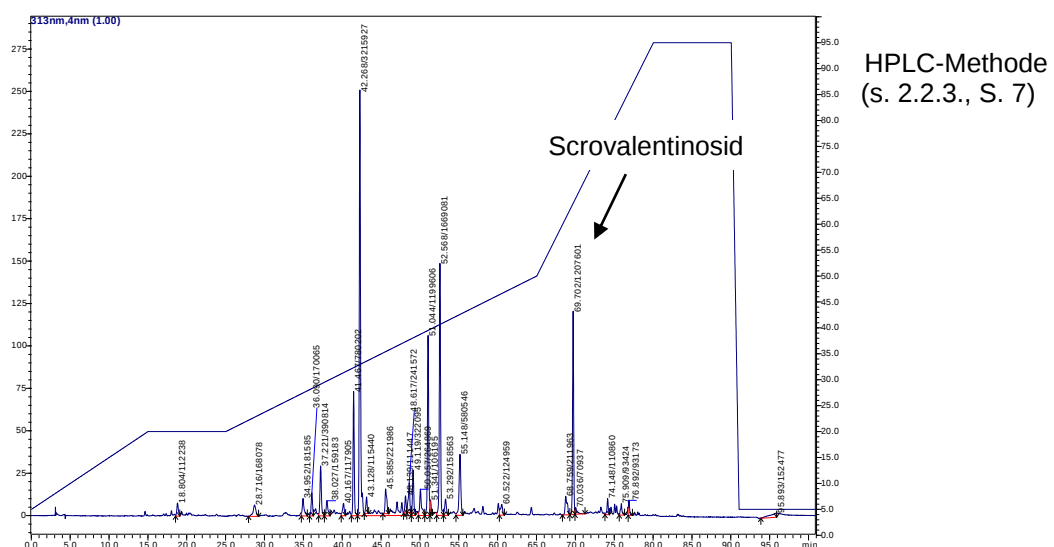
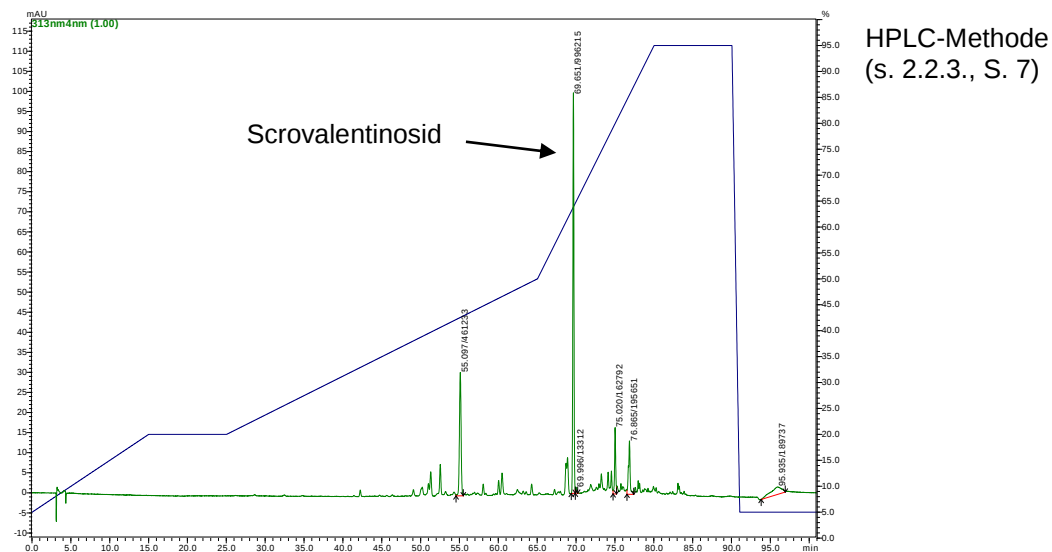
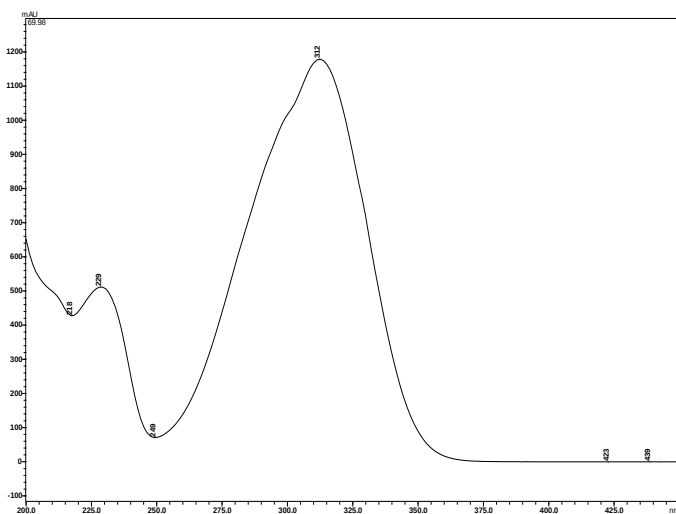


Abbildung 40: HPLC-Chromatogramm der Chloroform-Fraktion bei 313 nm



Für die Quantifizierung von Scrovalentinosid wurde eine Wellenlänge von 313 nm, entsprechend dem UV-Maximum der Komponente, gewählt.

Abbildung 41: UV-Spektrum von Scrovalentinosid bei 69,98 min

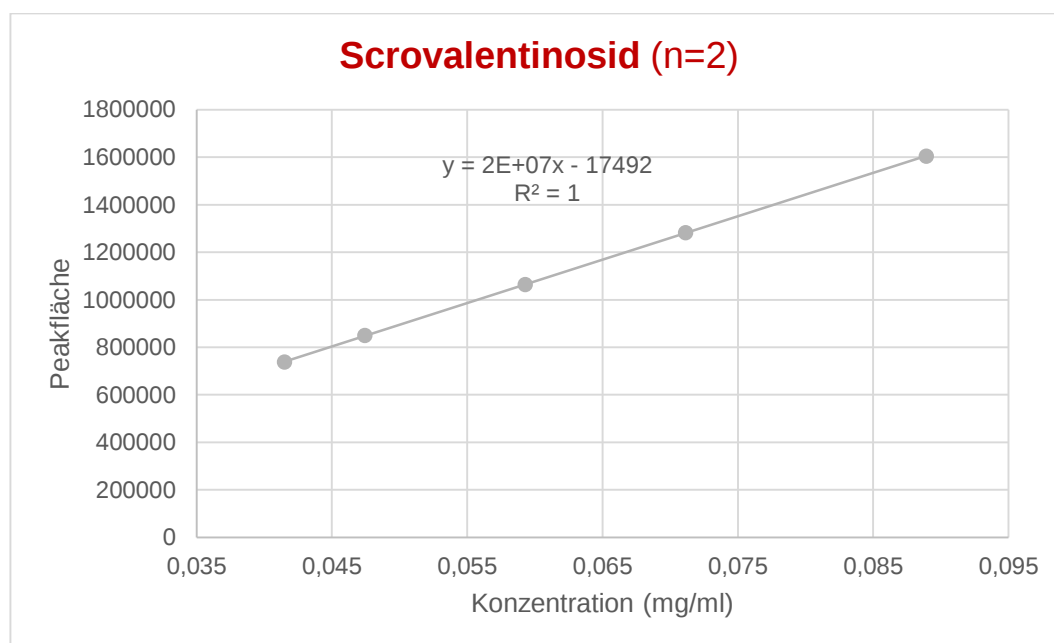


Die Lösungen, die zur Erstellung der Eichgerade gedient hatten, wurden durch Verdünnen der Stammlösung (1,01 mg Substanz in 1 ml DMSO) hergestellt. Unter Berücksichtigung der Reinheit von 88,0% (s. Tabelle 6, S. 30) waren 0,8891 mg Scrovalentinosid in der Lösung enthalten. Es wurden fünf unterschiedliche Verdünnungen des externen Standards vermessen.

Tabelle 13: Herstellung der Eichlösungen von Scrovalentinosid in DMSO

Verdünnungs- lösung	Verdünnungsschritte	Konzentration (mg/ml)	Peakfläche (n=2)
S1	1 T Stammlsg. + 9 T DMSO	0,0889	1 607 510
S2	4 T S1 + 1 T DMSO	0,0711	1 286 785
S3	2 T S1 + 1 T DMSO	0,0593	1 067 917
S4	2 T S2 + 1 T DMSO	0,0474	853 748
S5	7 T S3 + 3 T DMSO	0,0415	742 853

Abbildung 42: Eichgerade von Scrovalentinosid



Geradengleichung: $y = 2 \cdot 10^7 x - 17492$

Tabelle 14: Peakflächen von Scrovalentinosid in den Untersuchungslösungen

Untersuchungslösung	Konzentration (mg/ml)	Peakfläche Scrovalentinosid (n=2)
MeOH-Extrakt	4,26	1 181 748
Chloroform-Fraktion	0,48	1 025 435

Unter Verwendung der Geradengleichung und der Peakfläche des Substanzpeaks von Scrovalentinosid im MeOH-Extrakt und in der Chloroform-Fraktion (s. Tabelle 14, S. 39) konnte die Konzentration der Komponente in den Untersuchungslösungen ermittelt werden.

Tabelle 15: Ergebnisse der Quantifizierung von Scrovalentinosid

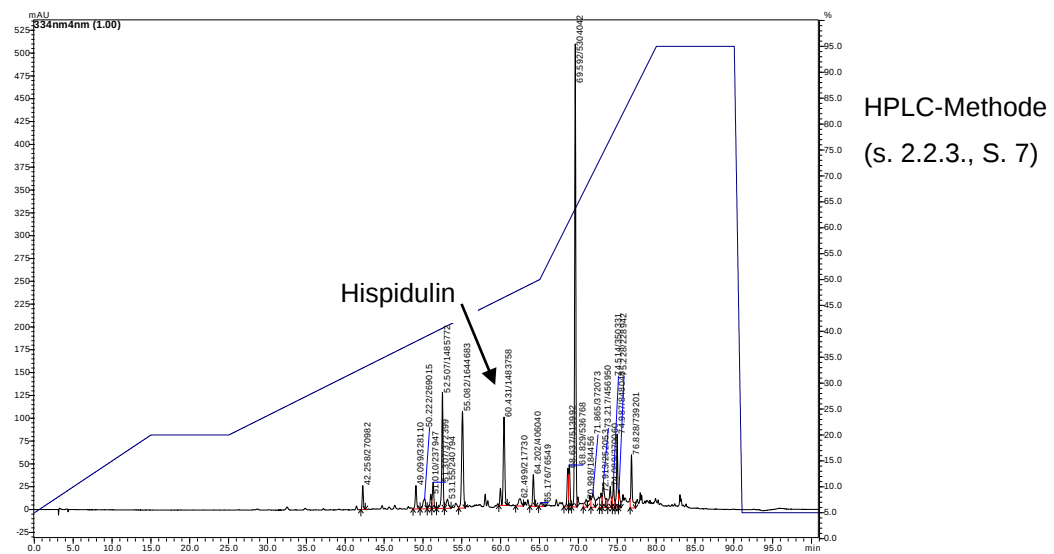
	Konzentration (mg/ml)	Anteil (%)
MeOH-Extrakt	0,0560	1,41
Chloroform-Fraktion	0,0521	10,91

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung des Iridoidglykosids zeigten ebenfalls eine starke Anreicherung von Scrovalentinosid in der Chloroform-Fraktion. Verglich man die Ergebnisse mit jenen von Koelziosid (s. Tabelle 12, S. 37), so war festzustellen, dass Scrovalentinosid die Hauptkomponente in der Chloroform-Fraktion darstellte.

3.6.6. Quantifizierung von Hispidulin

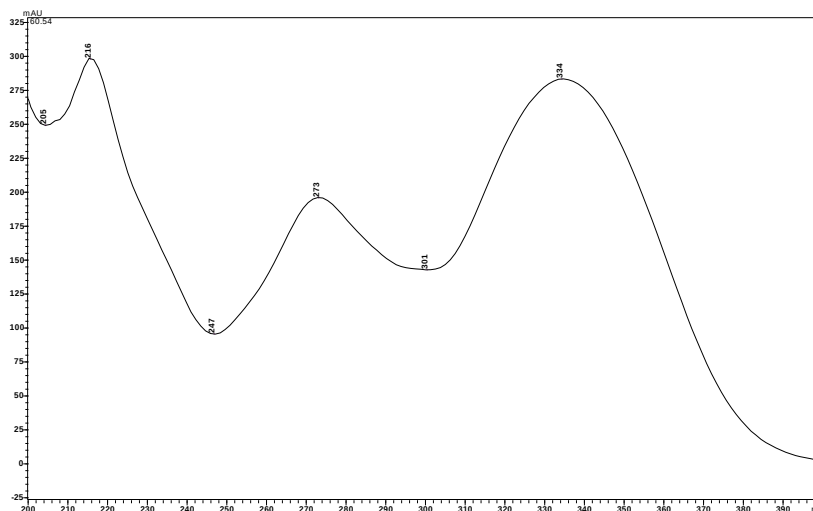
Die Quantifizierung von Hispidulin erfolgte ausschließlich in der Chloroform-Fraktion, da es sich hierbei nicht um eine Hauptkomponente des methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* handelte. Es wurde quantitativ bestimmt, da eine aktivitätsgeleitete Untersuchung die hohe Aktivität von Hispidulin gezeigt hatte [16]. Bei Hispidulin handelt es sich um das Aglykon von Homoplantaginin.

Abbildung 43: HPLC-Chromatogramm der Chloroform-Fraktion bei 334 nm



Hispidulin wurde bei einer Wellenlänge 334 nm, dem UV-Maximum der Komponente entsprechend, quantifiziert.

Abbildung 44: UV-Spektrum von Hispidulin bei 60,54 min

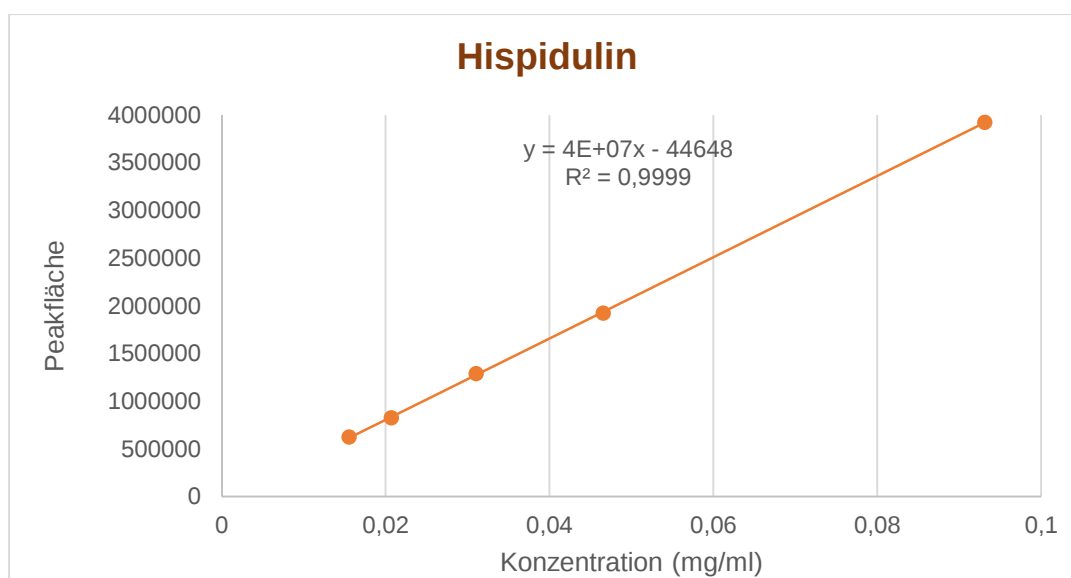


Zur Erstellung der fünf Verdünnungslösungen wurde eine Stammlösung mit 0,95 mg Hispidulin in 1 ml DMSO angefertigt. Die Stammlösung beinhaltete, entsprechend der Reinheit von 98,0% (s. Tabelle 6, S. 30), 0,931 mg Substanz.

Tabelle 16: Herstellung der Eichlösungen von Hispidulin in DMSO

Verdünnungs- lösung	Verdünnungsschritte	Konzentration (mg/ml)	Peakfläche (n=2)
Hisp1	1 T Stammlsg. + 9 T DMSO	0,0931	3 921 578
Hisp2	1 T Hisp1 + 1 T DMSO	0,0466	1 919 522
Hisp3	2 T Hisp2 + 1 T DMSO	0,0310	1 283 460
Hisp4	2 T Hisp3 + 1 T DMSO	0,0207	832 503
Hisp5	3 T Hisp4 + 1 T DMSO	0,0155	623 062

Abbildung 45: Eichgerade von Hispidulin



Geradengleichung: $y = 4 \cdot 10^7 x - 44648$

Tabelle 17: Peakfläche von Hispidulin in der Untersuchungslösung

Untersuchungslösung	Konzentration (mg/ml)	Peakfläche Hispidulin (n=2)
Chloroform-Fraktion	4,3	1 405 565

Um die Konzentration und den Anteil des Hispidulins in der Chloroform-Fraktion zu bestimmen, wurde die Fläche des Substanzpeaks in der Untersuchungslösung (s. Tabelle 17, S. 42) in die Geradengleichung eingesetzt.

Tabelle 18: Ergebnisse der Quantifizierung von Hispidulin

	Konzentration (mg/ml)	Anteil (%)
Chloroform-Fraktion	0,0363	0,84

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen weiteren Beitrag zur Charakterisierung des Inhaltsstoffmusters eines methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* zu leisten, um die genannte Art innerhalb der Gattung *Scrophularia* chemotaxonomisch besser zuordnen zu können.

Hierzu erfolgte eine Identifizierung von Komponenten der Ethylacetat-Fraktion, die in vorangegangenen Diplomarbeiten bereits aufgetrennt und analysiert worden war [5,7]. Fraktionen aus diesen Arbeiten wurden im Zuge dieser Arbeit mittels Säulenchromatographie (SC 1 und SC 2) fraktioniert.

Insbesondere phenolische Substanzen des komplexen Inhaltsstoffmusters sollten für eine anschließende Strukturaufklärung in möglichst reiner Form dargestellt werden.

Eine Reindarstellung von Inhaltsstoffen mittels SC konnte nicht erreicht werden. Es war allerdings durch Vergleiche mit bekannten Flavonoiden [11] mittels Dünnschichtchromatographie und High Performance Liquid Chromatography möglich, die Identität einiger Komponenten zu bestimmen. Durch Übereinstimmung von R_f -Werten und Fluoreszenz-Farben der Substanzbanden nach der Detektion mit NST A/ PEG in der DC und der Retentionszeiten und UV-Spektren in der HPLC wurden in der Sammelfraktion 14 der SC 2 Rutin und Kämpferol-3-O-rutinosid nachgewiesen. In SC 2 / SF 21 konnte die Identität von Nepitrin bestätigt werden und in den Sammelfraktionen 25, 26 und 27 konnte die Komponente mit $R_f=0,67$ Luteolin-7-O-glucosid zugeordnet werden.

Die Flavonoide Rutin und Kämpferol-3-O-rutinosid waren bereits aus *Scrophularia ilwensis* [12] und Nepitrin aus *Scrophularia ningpoensis* [13] bekannt. Luteolin-7-O-glucosid wurde zum ersten Mal in der Gattung *Scrophularia* nachgewiesen.

Die Analysen der Hauptkomponente aus Sammelfraktion 8 der SC 2 mittels HRMS und HPLC wiesen auf ein Derivat der Vanillinsäure hin. Die Identität konnte allerdings auf Grund fehlender Referenz-Substanzen bzw. zu geringer Ausbeute der Sammelfraktion nicht eindeutig bestimmt werden.

Außerdem wurden zur Charakterisierung des Inhaltsstoffmusters des methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* vier Komponenten im Methanol-Extrakt, der Ethylacetat- und der Chloroform-Fraktion quantitativ bestimmt.

Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC und externer Eichung. Dazu mussten Homoplantagin durch Kristallisation und Scrovalentinosid durch SC aufgereinigt werden. Für die Erstellung einer Eichgerade wurden fünf bzw. sechs Konzentrationen

des Standards vermessen. Durch die daraus ermittelte Geradengleichung konnte die Menge und die Konzentration der jeweiligen Substanz in den Analysenlösungen bestimmt werden.

Homoplantaginin konnte als Hauptinhaltsstoff von *Scrophularia lucida*, der sich vorwiegend in der Ethylacetat-Fraktion und in geringem Ausmaß auch in der Chloroform-Fraktion anreichert, bestimmt werden. Die Iridoidglykoside Koelziosid und Scrovalentinosid sind im MeOH-Extrakt in geringerer Konzentration enthalten, werden allerdings als Hauptkomponenten in der Chloroform-Fraktion angereichert. Hispidulin zählt nicht zu den Hauptinhaltsstoffen von *Scrophularia lucida*, wurde aber auf Grund seiner hohen Aktivität im CCID-Assay quantifiziert. Es war in der Chloroform-Fraktion angereichert.

5. Zusammenfassung

Scrophularia lucida wird, wie auch andere Arten der Gattung *Scrophularia*, seit langer Zeit in der traditionellen Medizin zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen wie Ekzemen und Psoriasis angewendet. Aktivitätsgeleitete Untersuchungen zeigten einen inhibierenden Effekt des methanolischen Extraktes auf einen wichtigen Schritt im Zuge der Metastasierung von Brustkrebs.

Da bisher keine Daten zum Inhaltsstoffmuster von *Scrophularia lucida* vorlagen, wurde in vorangegangenen Diplomarbeiten mit dessen Charakterisierung begonnen, welche in der vorliegenden Arbeit fortgesetzt werden sollte.

Es wurden Fraktionen der Ethylacetat-Fraktion mittels Säulenchromatographie aufgetrennt. Eine Reindarstellung von Einzelkomponenten konnte nicht erreicht werden. Durch Vergleiche mit bekannten Flavonoiden in zwei unterschiedlichen chromatographischen Systemen (DC, HPLC) konnte das Vorliegen der Flavonoide Rutin, Kämpferol-3-O-rutinosid und Nepitrin nachgewiesen werden, welche bereits in der Gattung *Scrophularia* bekannt waren. Luteolin-7-O-glucosid wurde zum ersten Mal in der Gattung identifiziert.

Des Weiteren wurden vier Inhaltsstoffe des methanolischen Extraktes mittels HPLC unter Verwendung von externen Standards quantitativ bestimmt. Das Flavonoid Homoplantaginin wurde als Hauptinhaltsstoff des methanolischen Extraktes (2,99%) und der Ethylacetat-Fraktion (24,08%) nachgewiesen. Die Iridoidglykoside Koelziosid (9,34%) und Scrovalentinosid (10,41%) konnten als Hauptkomponenten der Chloroform-Fraktion bestimmt werden. Das Flavonoid Hispidulin lag zu 0,84% in der Chloroform-Fraktion vor.

Somit konnten die Daten zum Flavonoidmuster erweitert und zum ersten Mal die quantitativen Anteile einiger Sekundärmetaboliten in *Scrophularia lucida* ermittelt werden.

6. Summary

Scrophularia lucida, as well as other species of the genus *Scrophularia* has been used since a long time in traditional medicine to treat inflammatory diseases like eczema and psoriasis. Investigations showed an inhibiting effect of the methanolic extract on an important step in the course of the metastasis of breast cancer.

Due to the fact that so far no data on the secondary metabolites of *Scrophularia lucida* were available, the characterization was started in previous diploma theses, which were to be continued in the present work.

Fractions of the ethylacetate fraction were initially separated by column chromatography. As an isolation of single components was not possible, several components were identified by comparison with authentic flavonoids in two different chromatographic systems (TLC, HPLC). This way the flavonoids rutin, kaempferol-3-O-rutinoside and nepitrin were confirmed in this species. Rutin and kaempferol-3-O-rutinoside were already known in the genus *Scrophularia*. Luteolin-7-O-glucoside was identified for the first time in the genus.

Furthermore, four secondary metabolites in the methanolic extract were quantified by HPLC under external standardisation. The flavonoid homoplantaginin was characterized as the main ingredient of the methanolic extract (2.99%) and the ethylacetate fraction (24.08%). The iridoid-glycosides koelziosid (9.34%) and scrovalentinoside (10.41%) were determined as the main components of the chloroform fraction. The flavonoid hispidulin was quantified in the chloroform fraction (0.84%).

Thus, the data on the flavonoid pattern were extended and the characterization of the quantitative composition of some secondary metabolites of *Scrophularia lucida* are described for the first time.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Giessrigl B., Yazici G., Teichmann M., Kopf S., Ghassemi S., Atanasov A., Dirsch V., Grusch M., Jäger W., Özmen A., Krupitza G. (2012) Effects of *Scrophularia* Extracts on tumor Cell Proliferation, Death and Intravasation through Lymphoendothelial Cell Barriers. *International Journal of Oncology* 40 (6): 2063-2074
- [2] Galindez J.D., Lanza A.M.D., Matellano L.F. (2002) Biologically Active Substances from the Genus *Scrophularia*. *Pharmaceutical Biology* 40 (1): 45-99
- [3] <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?33420>, zuletzt aufgerufen am 03.03.2015
- [4] Shen X., Eichhorn T., Greten H. J., Efferth T. (2012) Effects of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. on Inhibition of Proliferation, Apoptosis Induction and NF- κ B Signaling of Immortalized and Cancer Cell Lines. *Pharmaceuticals* 5 (2): 189-208
- [5] Lewenhofer V. (2014) Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*, Diplomarbeit, Universität Wien
- [6] Schweighofer L. (2015) Aktivitätsgeleitete Untersuchungen von *Scrophularia lucida* L., Diplomarbeit, Universität Wien
- [7] Sumetsberger E., Diplomarbeit, Universität Wien, in Vorbereitung
- [8] Wagner H., Blatt S., Zgainski E.M. (1983) Drogenanalyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneistoffen. Springer-Verlag, Berlin: 299, 304
- [9] Endres H., Hörmann H. (2006) Präparative und analytische Trennung organischer Verbindungen durch Chromatographie an Polyamid. *Angewandte Chemie*, 75 (6): 288-294
- [10] http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18110722AB_20110830184615.pdf, zuletzt aufgerufen am 21.01.2015
- [11] Pemp E. (2005) Analytik pharmazeutisch relevanter Flavonoide mittels HPLC/ UV, HPLC/ MS und HPLC/ UV/ MS. Dissertation, Universität Wien
- [12] Calis I., Zor M., Basaran A. A., Wright A. D., Sticher O. (1993) Karsoside and scropolioside D, two new iridoid glycosides from *Scrophularia ilwensis*. *Journal of Natural Products* 56 (4): 606-9

- [13] Xu F., Xu X., Chen S., Zhongguo X. Z. (2013) Progress in chemical constituents and bioactivities of *Scrophularia ningpoensis*. Modern Chinese Medicine 15 (9): 752-759
- [14] Fernandez, M. A.; Garcia, M. D.; Saenz, M. T. (1996) Antibacterial activity of phenolic acid fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. Journal of Ethnopharmacology 53(1): 11-14
- [15] Fernandez M. A.; Saenz M. T.; Garcia M. D. (1998) Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. The Journal of pharmacy and pharmacology 50(10): 1183-6
- [16] Spitznagel A., Diplomarbeit, Universität Wien, in Vorbereitung

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Scrophularia lucida</i> (L.)	1
Abbildung 2: Aktivität im CCID-Assay: Reduktion der Löcher unter Behandlung mit dem Methanol-Extrakt von <i>Scrophularia lucida</i> [1].....	2
Abbildung 3: Säulenchromatographie.....	6
Abbildung 4 : DC der Fraktionen SPE 2/ 3-8 [7] und SPE 2/ 9-11 [7].....	9
Abbildung 5: Präparative DC-Trennung	9
Abbildung 6: DC-Prüfung der isolierten Banden 1 und 2.....	10
Abbildung 7: DC der Sammelfractionen der SC 1	11
Abbildung 8: DC der Fraktion SC 1/ SF 8 [5]	12
Abbildung 9: DC der Sammelfractionen von SC 2	14
Abbildung 10: DC-Vergleiche mit Referenz-Substanzen.....	16
Abbildung 11: DC-Vergleich mit Verbascosid	17
Abbildung 12: DC-Vergleich mit Eriodictyol-7-O-glucosid	18
Abbildung 13: DC-Vergleich mit Rutin und Kämpferol-3-O-rutinosid	19
Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von SC 2/ SF 14	20
Abbildung 15: UV-Spektrum von Rutin in SF 14, bei 33,31 min	20
Abbildung 16: UV-Spektrum von Kämpferol-3-O-rutinosid in SF 14, bei 38,35 min	21
Abbildung 17: DC-Vergleich von SC 2/ SF21 mit Nepitrin.....	21
Abbildung 18: HPLC-Chromatogramm von SC 2/ SF 21	22
Abbildung 19: UV-Spektrum von Nepitrin in SF 21, bei 37,18 min	22
Abbildung 20: DC-Vergleich von SC 2/ SF 24, 26 und 27	23
Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm von SC 2/ SF 27	24
Abbildung 22: UV-Spektrum von Luteolin-7-O-glucosid in SF 27, bei 34,97 min...	24
Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm von SC 2 / SF 8	25
Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm von Vanillinsäure	26
Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm von Scrovalentinosid (69,93 min) vor der SC 3.....	28
Abbildung 26: DC-Überprüfung der Fraktionen von SC 3	28
Abbildung 27: DC-Überprüfung der Fraktionen 20 und 22 von SC 3.....	29
Abbildung 28: DC-Überprüfung der Fraktionen 18 und 28 von SC 3.....	29
Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm von Scrovalentinosid nach der SC 3	29
Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm vom MeOH-Extrakt bei 334 nm	31
Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm der Ethylacetat-Fraktion bei 334 nm	31
Abbildung 32: HPLC-Chromatogramm der Chloroform-Fraktion bei 334 nm.....	32

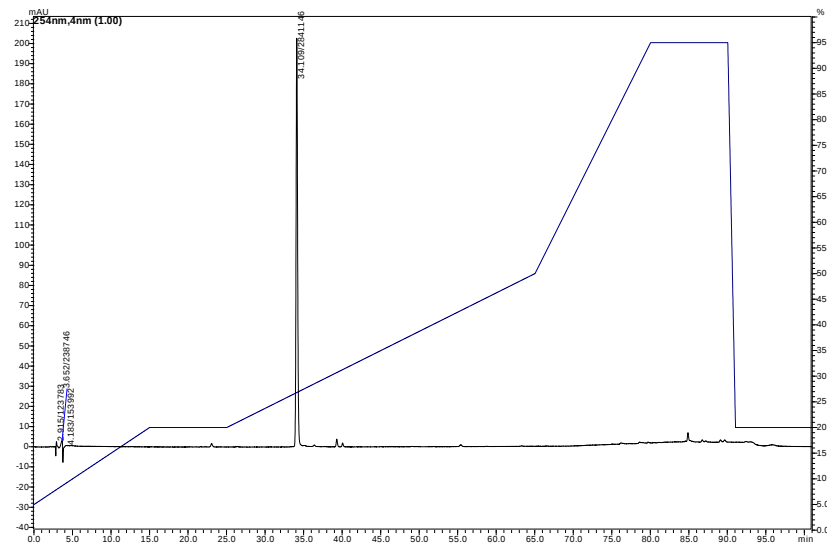
Abbildung 33: UV-Spektrum von Homoplantagin in bei 42,36 min	32
Abbildung 34: Eichgerade Homoplantagin in	33
Abbildung 35: HPLC-Chromatogramm vom MeOH-Extrakt bei 276 nm	34
Abbildung 36: HPLC-Chromatogramm der Chloroform-Fraktion bei 276 nm	35
Abbildung 37: UV-Spektrum von Koelziosid bei 76,83 min	35
Abbildung 38: Eichgerade Koelziosid	36
Abbildung 39: HPLC-Chromatogramm vom MeOH-Extrakt bei 313 nm	37
Abbildung 40: HPLC-Chromatogramm der Chloroform-Fraktion bei 313 nm	38
Abbildung 41: UV-Spektrum von Scrovalentinosid bei 69,98 min	38
Abbildung 42: Eichgerade von Scrovalentinosid	39
Abbildung 43: HPLC-Chromatogramm der Chloroform-Fraktion bei 334 nm	41
Abbildung 44: UV-Spektrum von Hispidulin bei 60,54 min	41
Abbildung 45: Eichgerade von Hispidulin	42

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Fraktionen	3
Tabelle 2: HPLC-Parameter.....	7
Tabelle 3: Sammelfractionen der SC 1	12
Tabelle 4: Sammelfractionen der SC 2	15
Tabelle 5: DC-Vergleiche mit Referenz-Substanzen	17
Tabelle 6: Reinheit der Standards	30
Tabelle 7: Herstellung der Eichlösungen von Homoplantagin in DMSO	33
Tabelle 8: Peakflächen von Homoplantagin in den Untersuchungslösungen	33
Tabelle 9: Ergebnisse der Quantifizierung von Homoplantagin	34
Tabelle 10: Herstellung der Eichlösungen von Koelziosid in DMSO.....	36
Tabelle 11: Peakflächen von Koelziosid in den Untersuchungslösungen.....	36
Tabelle 12: Ergebnisse der Quantifizierung von Koelziosid	37
Tabelle 13: Herstellung der Eichlösungen von Scrovalentinosid in DMSO	39
Tabelle 14: Peakflächen von Scrovalentinosid in den Untersuchungslösungen	39
Tabelle 15: Ergebnisse der Quantifizierung von Scrovalentinosid	40
Tabelle 16: Herstellung der Eichlösungen von Hispidulin in DMSO	42
Tabelle 17: Peakfläche von Hispidulin in der Untersuchungslösung	42
Tabelle 18: Ergebnisse der Quantifizierung von Hispidulin	43

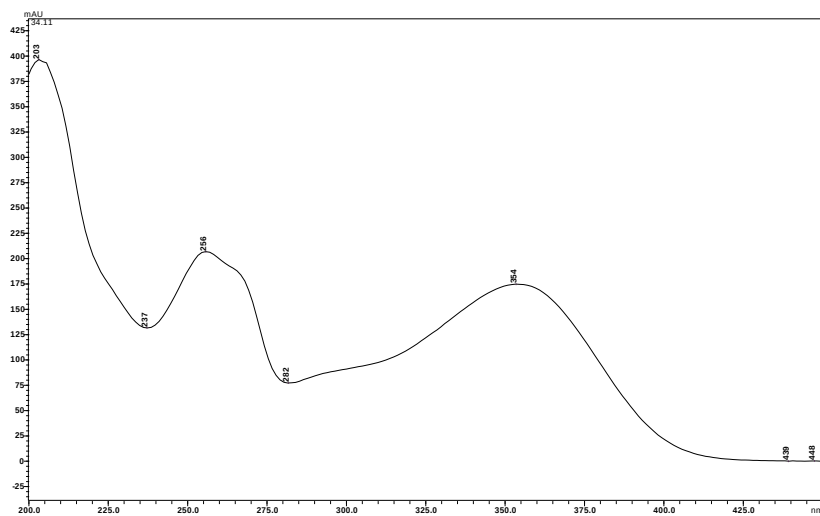
Anhang

Anhang 1: HPLC-Chromatogramm der Referenz Rutin

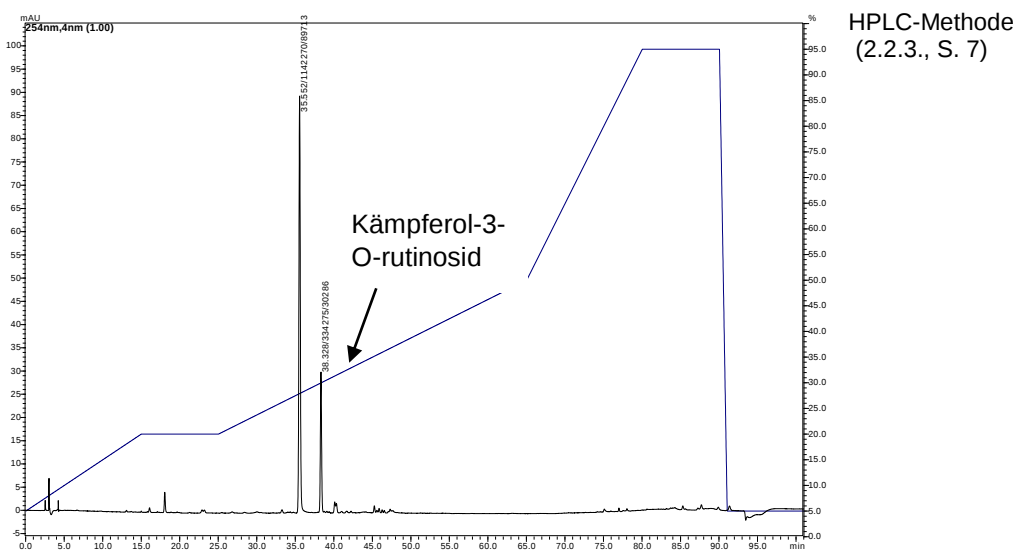


HPLC-Methode
(2.2.3., S. 7)

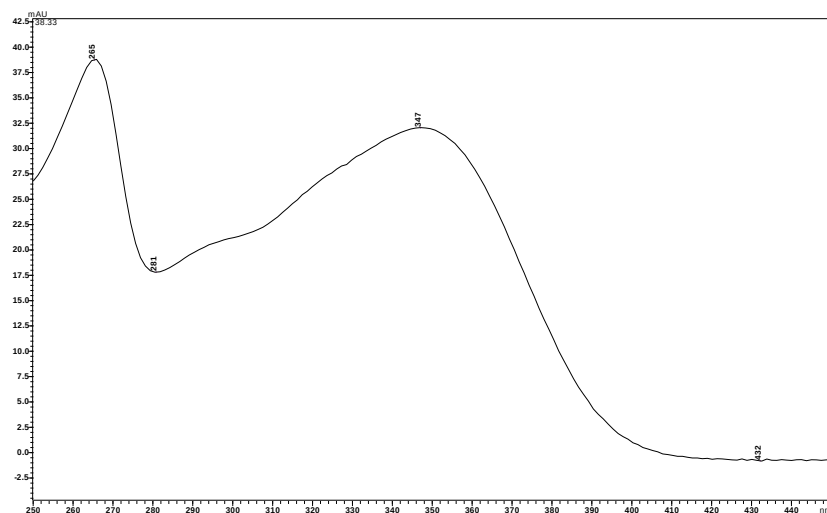
Anhang 2: UV-Spektrum von Rutin bei 34,11 min



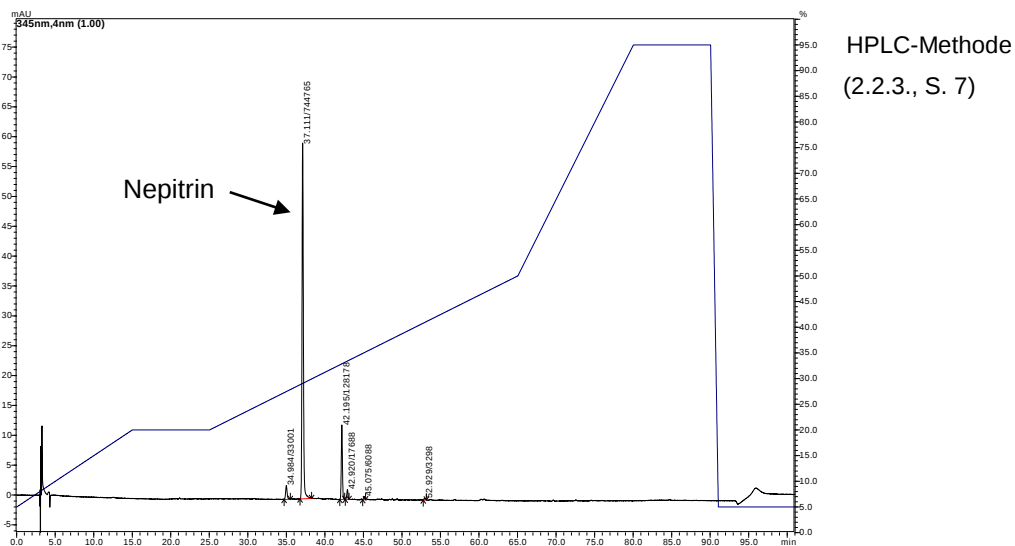
Anhang 3: HPLC-Chromatogramm der Referenz Kämpferol-3-O-rutinosid



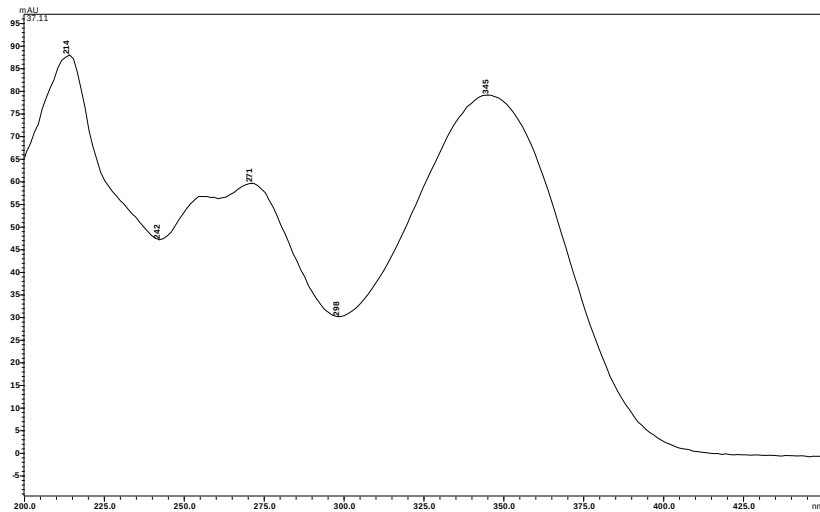
Anhang 4: UV-Spektrum von Kämpferol-3-O-rutinosid bei 38,33 min



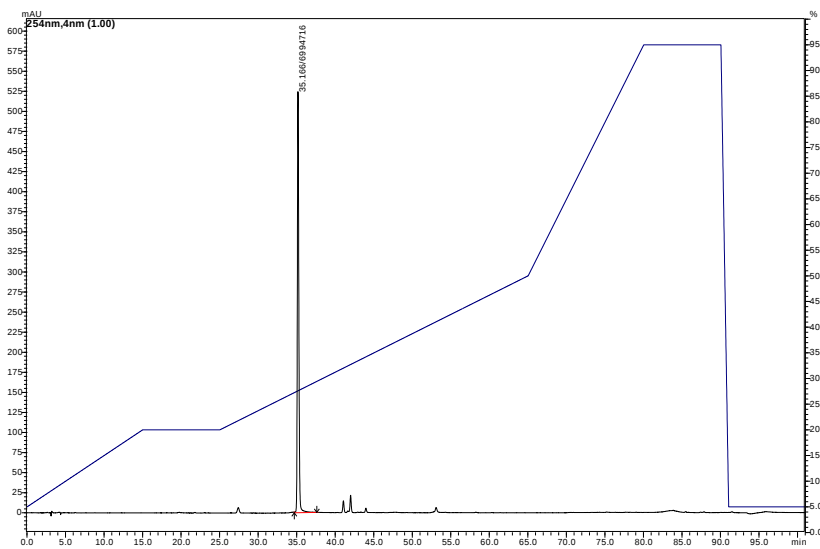
Anhang 5: HPLC-Chromatogramm der Referenz Nepitrin



Anhang 6: UV-Spektrum von Nepitrin bei 37,11 min

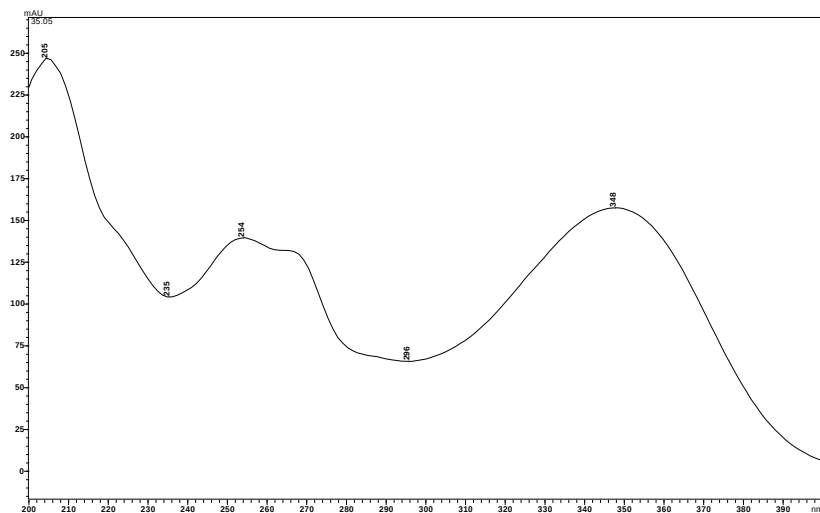


Anhang 7: HPLC-Chromatogramm der Referenz Luteolin-7-O-Glucosid

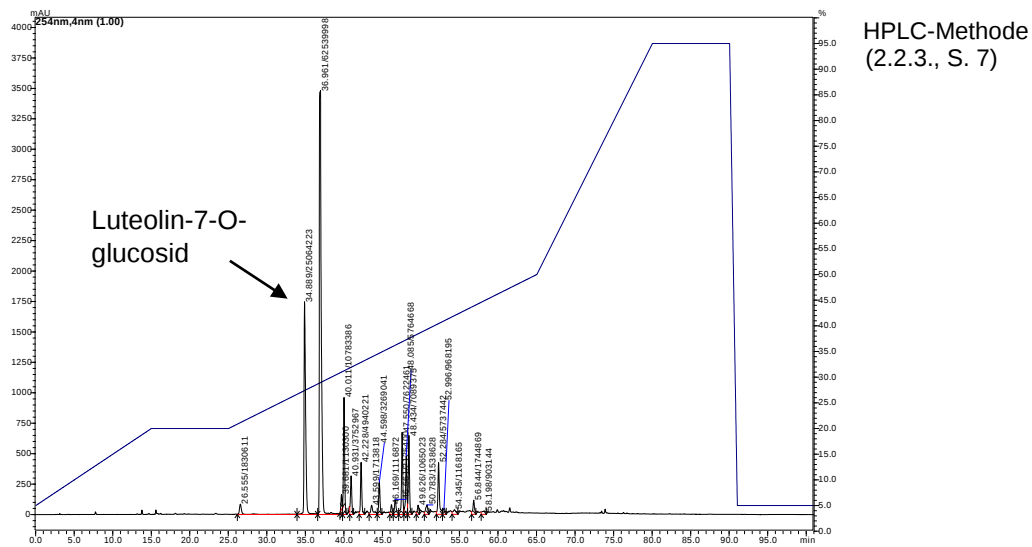


HPLC-Methode
(2.2.3., S. 7)

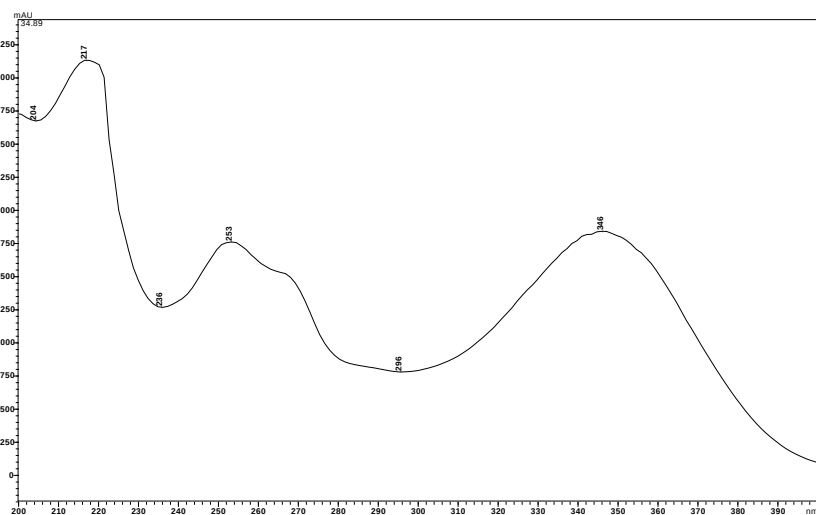
Anhang 8: UV-Spektrum von Luteolin-7-Glucosid bei 35,05 min



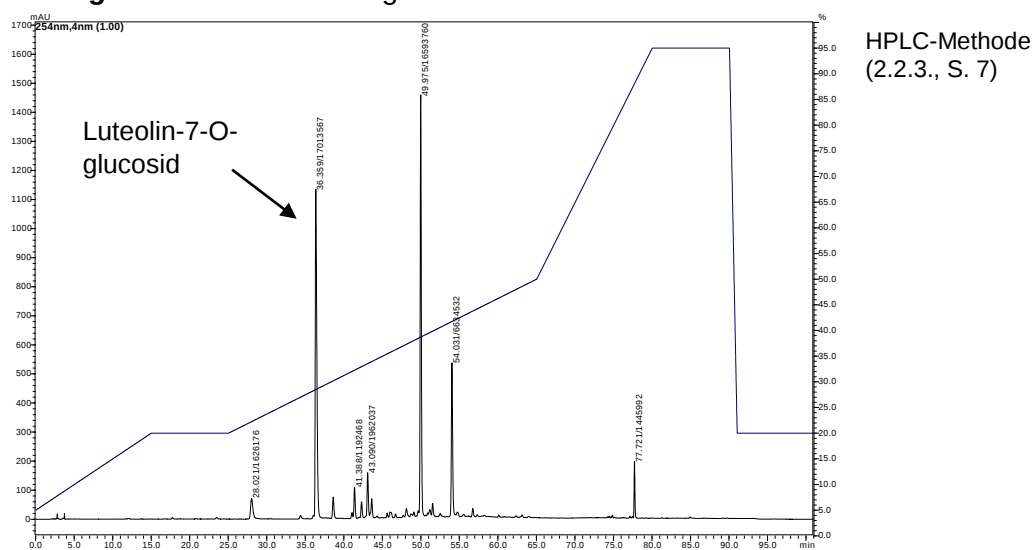
Anhang 9: HPLC-Chromatogramm von SC 2 / SF 25



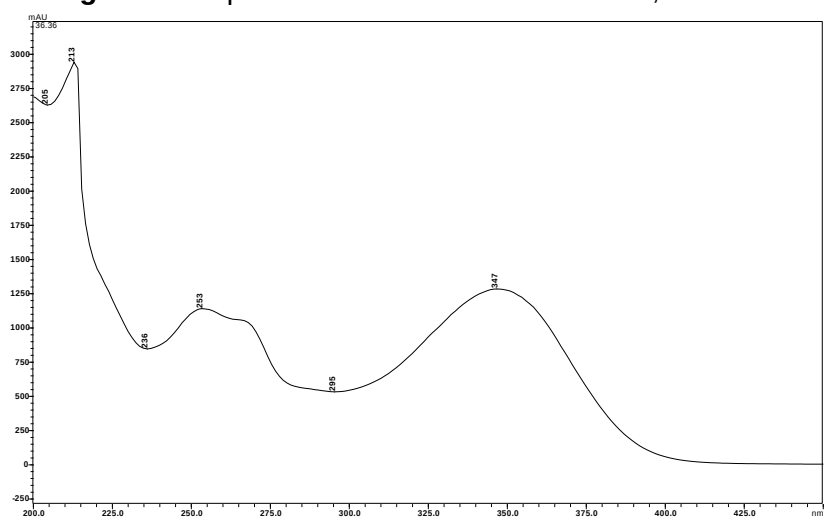
Anhang 10: UV-Spektrum von SC 2 / SF 25 bei 34,89 min



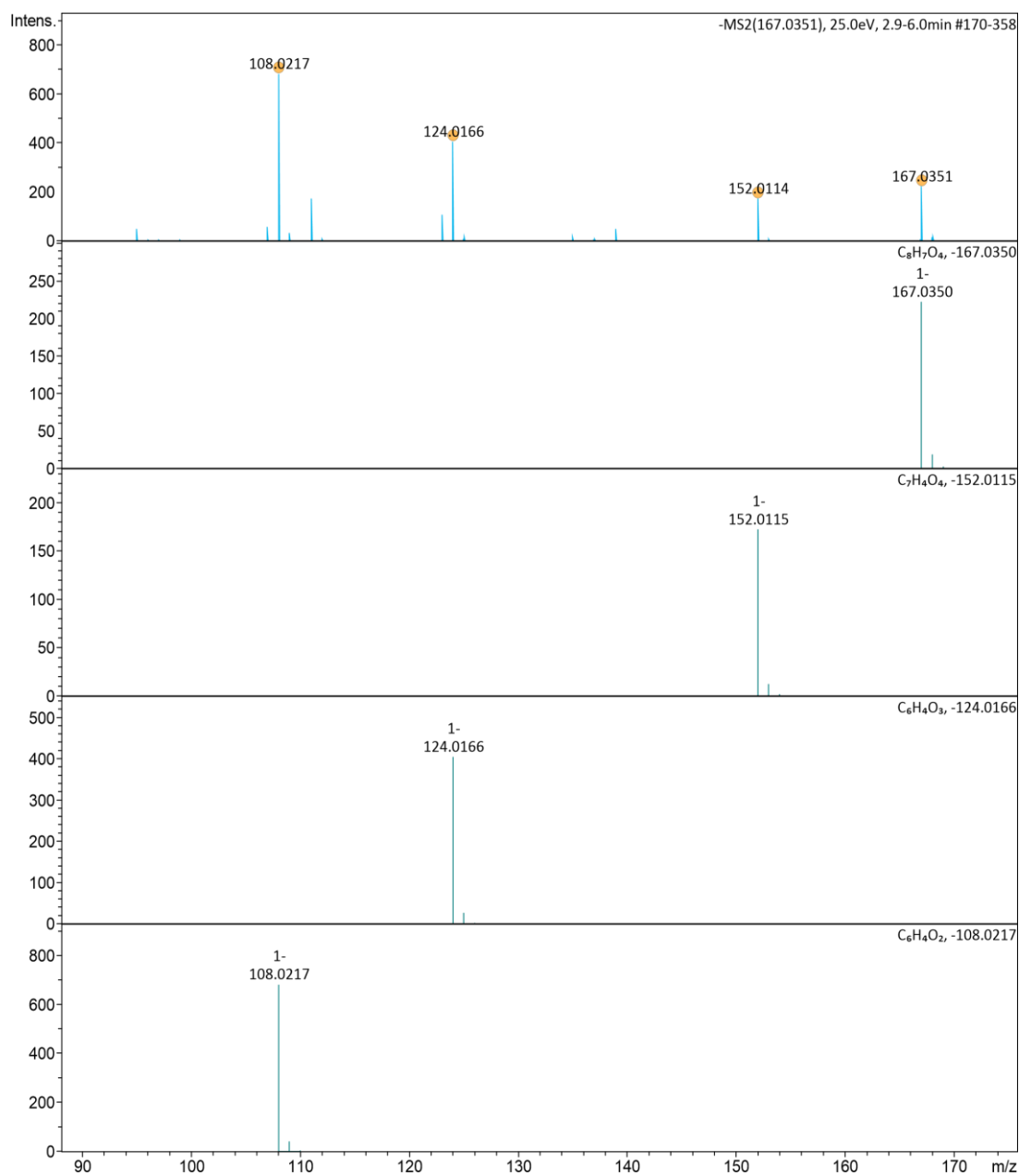
Anhang 11: HPLC-Chromatogramm von SC 2 / SF 26



Anhang 12: UV-Spektrum von SC 2 / SF 26 bei 36,36 min

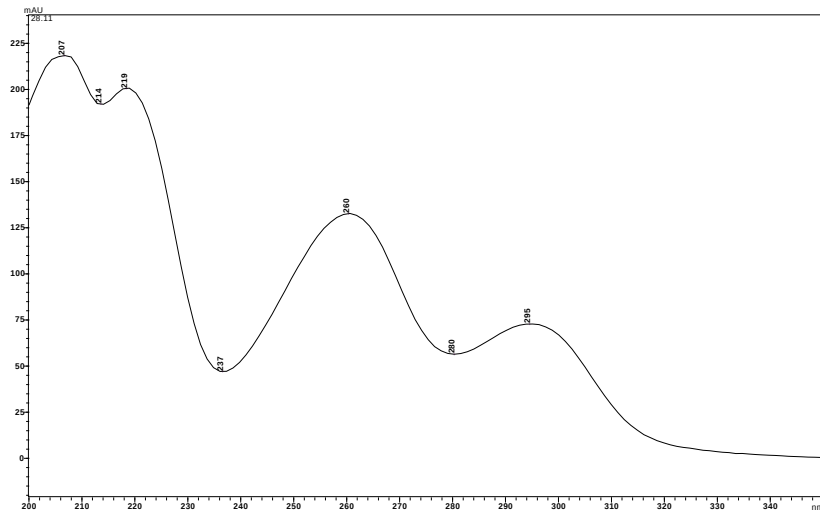


Anhang 13: HRMS-Spektren im Negativ-Ionenmodus der Komponente bei 28,11 min aus SC 2/ SF 8

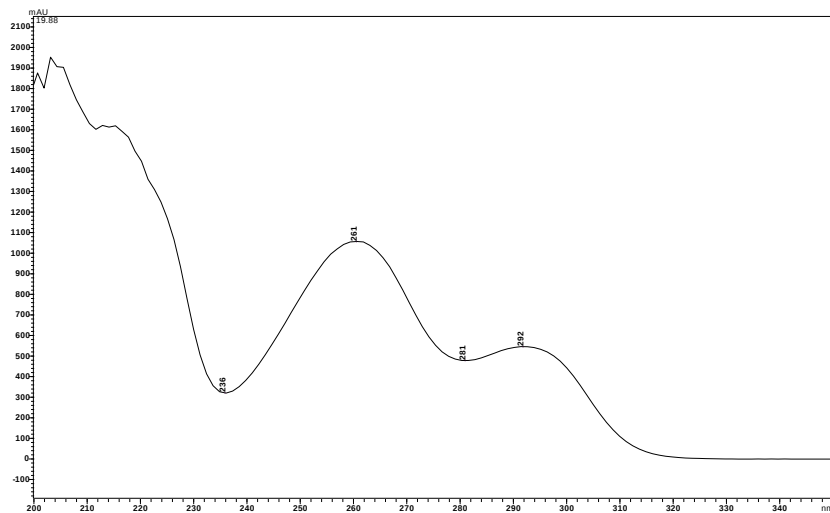


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Score
108.0217	1	C ₆ H ₄ O ₂	108.0217	-0.4	100.00
124.0166	1	C ₆ H ₄ O ₃	124.0166	0.3	100.00
152.0114	1	C ₇ H ₄ O ₄	152.0115	0.9	100.00
167.0351	1	C ₈ H ₇ O ₄	167.0350	-0.9	100.00

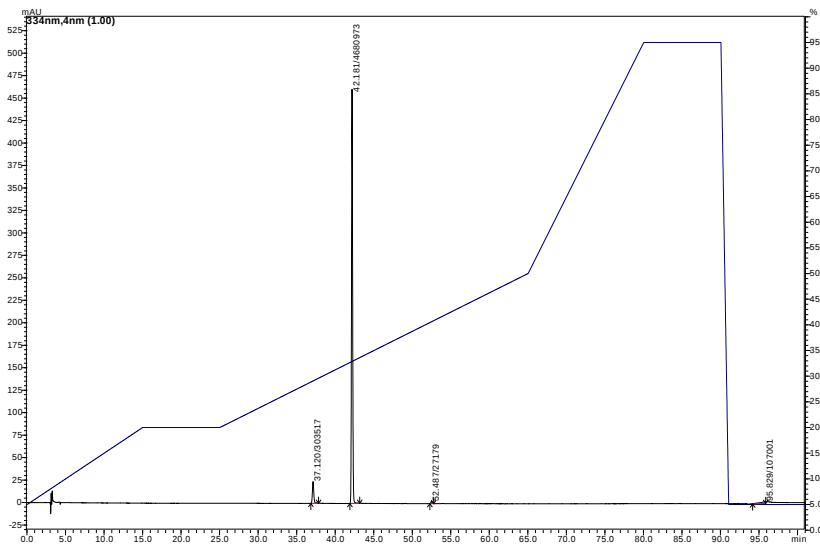
Anhang 14: UV-Spektrum von SC 2/ SF 8 bei 28,11 min



Anhang 15: UV-Spektrum von Vanillinsäure bei 19,88 min

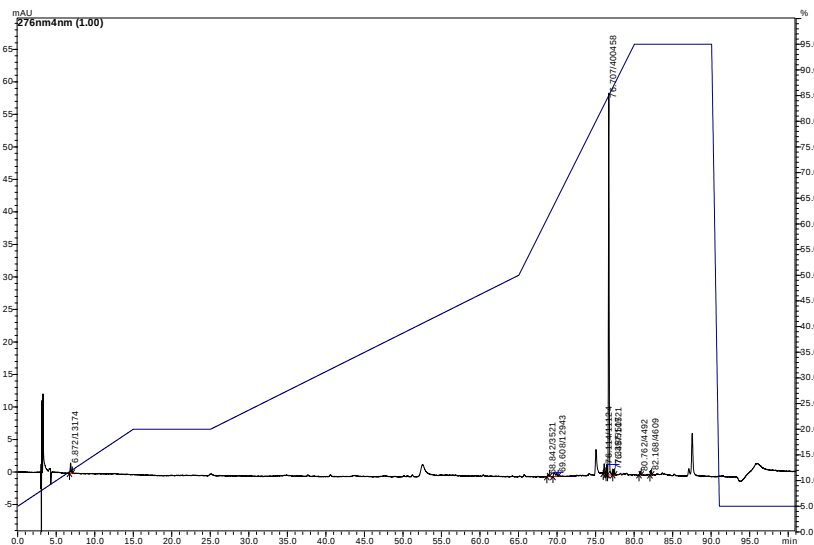


Anhang 16: HPLC-Chromatogramm der Homoplantagin-Verdünnungslösung H3



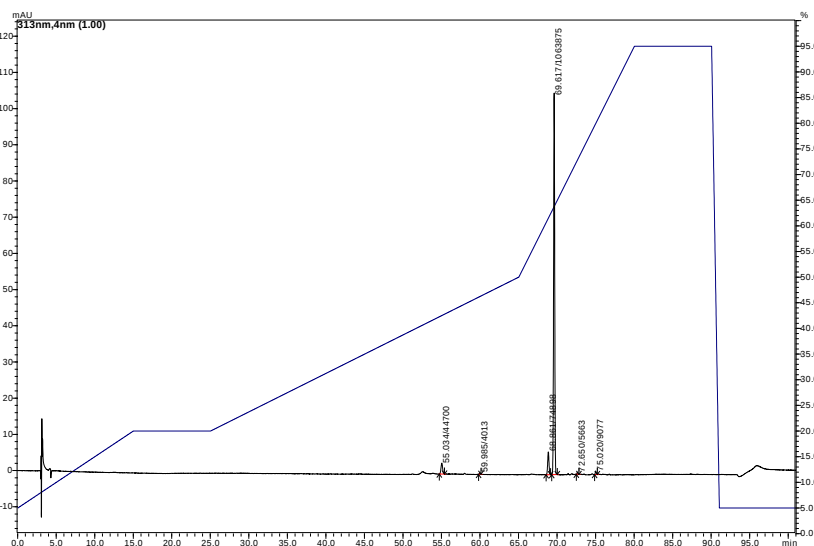
HPLC-Methode
(2.2.3., S. 7)

Anhang 17: HPLC-Chromatogramm der Koelziosid-Verdünnungslösung K3



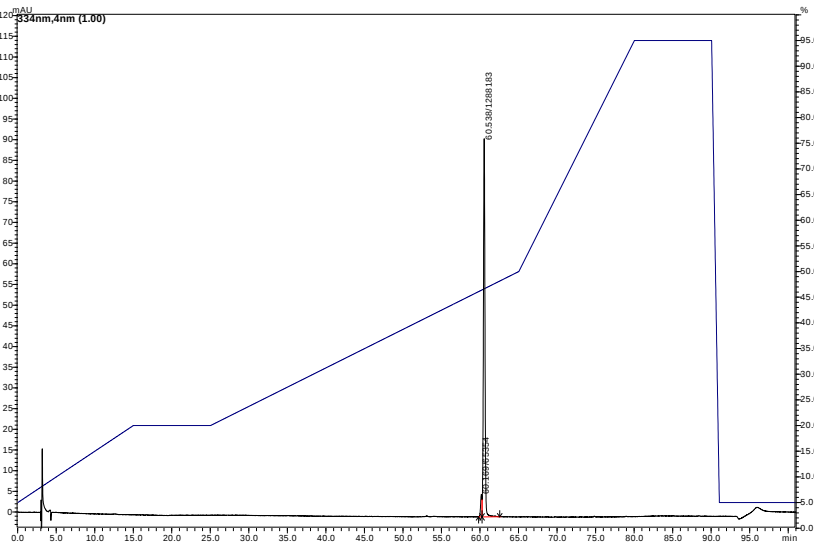
HPLC-Methode
(2.2.3., S. 7)

Anhang 18: HPLC-Chromatogramm der Scrovalentinosid-Verdünnungslösung S3



HPLC-Methode
(2.2.3., S. 7)

Anhang 19: HPLC-Chromatogramm der Hispidulin-Verdünnungslösung Hisp3



HPLC-Methode
(2.2.3., S. 7)

Curriculum vitae

Name:	Tobias Ledermüller
Geburtsdatum:	17.08.1990
Geburtsort:	Wien
Staatsangehörigkeit:	Österreich
Eltern:	Dr. Herbert Ledermüller Brigitte Ledermüller (geb. Mader)

Ausbildung

1996 - 2000	Volksschule, 1210 Wien
2000 - 2008	BRG Bertha v. Suttner, 1210 Wien
04.06.2008	Reifeprüfung
März 2009	Beginn des Pharmazie-Studiums an der Universität Wien

Praktika

Juli 2006	Ströck – Brot GmbH, 1010 Wien
August 2007	Julius Meinl am Graben, 1010 Wien
September 2009 – Oktober 2010	TST GmbH Personaldienstleister
September 2011 – April 2015	Allerheiligen Apotheke, 1200 Wien