



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Untersuchung phenolischer Inhaltsstoffe aus
Scrophularia lucida“

verfasst von / submitted by

Edgar Sumetsberger

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Weiters bedanke ich mich bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die sehr gute Betreuung und Geduld während meiner gesamten Arbeit. Vielen Dank!

Ich danke dem gesamten Department der Pharmakognosie für die freundliche Unterstützung, die tollen Gespräche und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die ein Pharmaziestudium erst ermöglicht und mich stets angespornt haben.

Zuletzt bedanke ich mich bei allen Freunden und Studienkollegen, die mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung und Problemstellung	1
2 Material und Methoden	3
2.1 Material.....	3
2.2 Methoden	6
2.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC).....	6
2.2.2 Säulenchromatographie (SC).....	7
2.2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	8
2.2.4 Solid Phase Extraction (SPE)	9
2.2.5 Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)	10
2.2.6 Lyophilisation	11
2.2.7 Evaporation	11
2.2.8 Sonstige Geräte	11
3 Ergebnisse	12
3.1 Vereinigung von Fraktionen.....	12
3.2 Identifizierung von Flavonoiden in vorhandenen Fraktionen.....	14
3.2.1 Prüfung auf Kämpferol-3-rutinosid	14
3.2.1.1 DC-Vergleich mit Referenzsubstanz	15
3.2.1.2 HPLC-Vergleich.....	16
3.2.2 Prüfung auf Rutin	18
3.2.2.1 DC-Vergleich mit Referenzsubstanz	19
3.2.2.2 HPLC-Vergleich.....	20
3.3 Säulenchromatographie 1 (SC1).....	22
3.3.1 Durchführung von SC1.....	22
3.3.2 Identifizierung von Luteolin-7-O-glucosid.....	24
3.4 Säulenchromatographie 2 (SC2).....	28
3.4.1 Durchführung von SC2.....	28
3.4.2 Identifizierung von Verbascosid	30
3.5 Versuch zur Isolierung zweier Flavonoidkomponenten.....	33
3.6 Säulenchromatographie 3 (SC3).....	37
3.7 Solid Phase Extraction 1 (SPE1).....	42
3.8 Solid Phase Extraction 2 (SPE2).....	46

4 Diskussion.....	49
5 Zusammenfassung	51
6 Summary	52
7 Abbildungsverzeichnis	53
8 Tabellenverzeichnis.....	55
9 Literaturverzeichnis.....	56
Anhang.....	57

Abkürzungsverzeichnis

CCID	Circular Chemorepellent Induced Defects
CH ₃ COOH	Essigsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
F	Fraktion
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography-Massenspektrometrie
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NFκB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NL	Nachlauf
NS	Niederschlag
PEG	Polyethylenglykol
R _f	Retentionsfaktor
SC	Säulenchromatographie
SPE	Solid Phase Extraction
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett

1 Einleitung und Problemstellung

Scrophularia lucida L. gehört zur Pflanzenfamilie der Scrophulariaceae. Es sind rund 300 Arten dieser Gattung bekannt, die vor allem im Mittelmeerraum, besonders in Frankreich, Italien, der Türkei und Griechenland vorkommen [1, 2].

Das Extrakt, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, stammte aus der Türkei.¹

Abbildung 1: *Scrophularia lucida* L.²



Bereits seit der Antike fanden verschiedene *Scrophularia*-Arten in der Volksmedizin als Mittel zur Behandlung von Scabies, Ekzemen und Psoriasis Anwendung [3].

Die ersten Charakterisierungen der Gattung *Scrophularia* wurden von Volken in den Jahren 1887 durchgeführt. Anatomische Studien konzentrierten sich vor allem auf

¹ Ich danke Herrn Dr. A. Özmen herzlich für die Bereitstellung des Extraktes

² Quelle: <http://luirig.altervista.org/flora/taxa/> (letzter Zugriff 28.7.15)

die Blattmerkmale. *Scrophularia lucida* L. ist zwischen 30 und 150 cm hoch und hat gestielte oblonge Blätter. Die Kronzipfel sind bräunlich rosa bis weißlich rot, Staubblätter sind vorhanden und die Frucht ist eine Kapsel. Die Blütezeit erstreckt sich von Februar bis Mai [1].

Einige Publikationen beschrieben die antiinflammatorische, immunmodulatorische, antibakterielle und zytotoxische Wirkung dieser Pflanze [3].

Giessrigl et al. untersuchten methanolische Extrakte von fünf verschiedenen *Scrophularia*-Arten auf ihre antiproliferative und pro-apoptotische Wirkung an Brustkrebszellen. Anhand eines dreidimensionalen Zellkultur-Assay wurden die CCIDs (Circular Chemorepellent Induced Defects) untersucht. Hier handelt es sich um eine sogenannte Löcherbildung (gap-formation) in Schichten aus Lymphendothel oder Blutendothelzellen. Dieser Prozess ist der Ausgangspunkt zur Metastasierung von Tumoren [3].

Es wurde gezeigt, dass das Extrakt aus *Scrophularia lucida* L. die stärkste Inhibition von CCIDs durch MCF-7 Brustkrebszellen und eine Hemmung der NFkB Aktivität bewirkt [3].

Aus diesem Grund war eine Untersuchung der Inhaltsstoffe von *Scrophularia lucida* L. zur Identifizierung der Wirkstoffe von Interesse.

Im Rahmen vorangegangener Diplomarbeiten waren die Iridoide [4] und die phenolischen Inhaltsstoffe [5] untersucht worden.

2 Material und Methoden

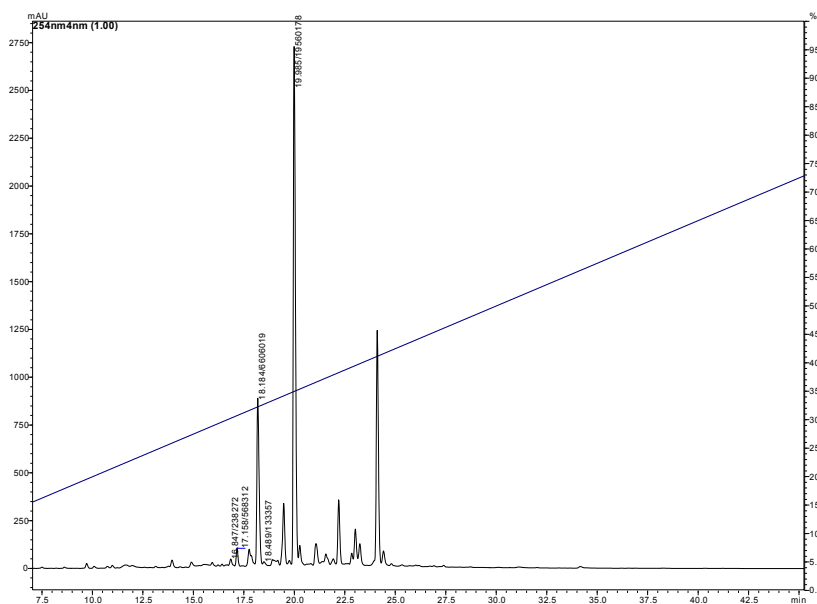
2.1 Material

Ausgangsmaterial waren verschiedene Fraktionen, die nach Verteilung des methanolischen Extraktes von *Scrophularia lucida* L. zwischen Wasser und Ethylacetat gewonnen worden waren. Das methanolische Extrakt ist aus 2700 g getrocknetem Kraut hergestellt worden [5]. Das Pflanzenmaterial stammte aus der Türkei.

Das HPLC-Chromatogramm des Ethylacetatextraktes zeigte eine Hauptkomponente und zahlreiche Nebenkomponenten (s. Abbildung 2, S. 3).

Abbildung 2: HPLC-Chromatogramm des Ethylacetatextraktes

HPLC-Methode 1, Gerät 1 (s. S. 8)



In der vorangegangenen Diplomarbeit [5] sind Vorarbeiten geleistet worden. Das Ethylacetatextrakt war mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 aufgetrennt worden (s. Abbildung 3, s. Abbildung 4 und s. Abbildung 5, S. 5)

Abbildung 3: DC der Sammelfractionen der SC1 [5] ³

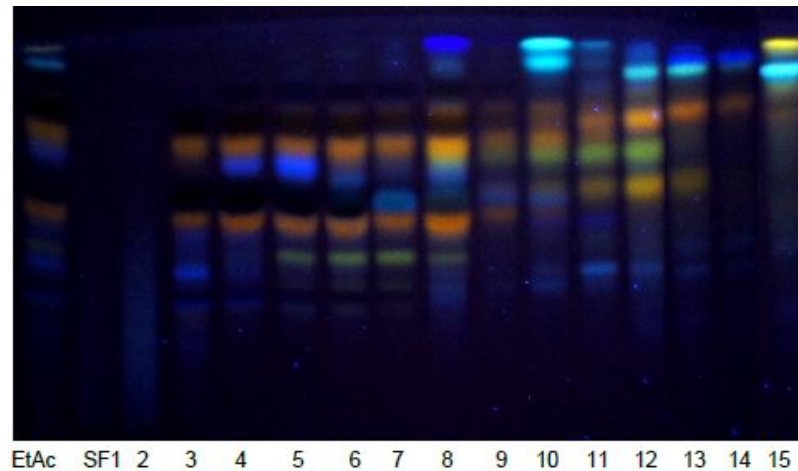
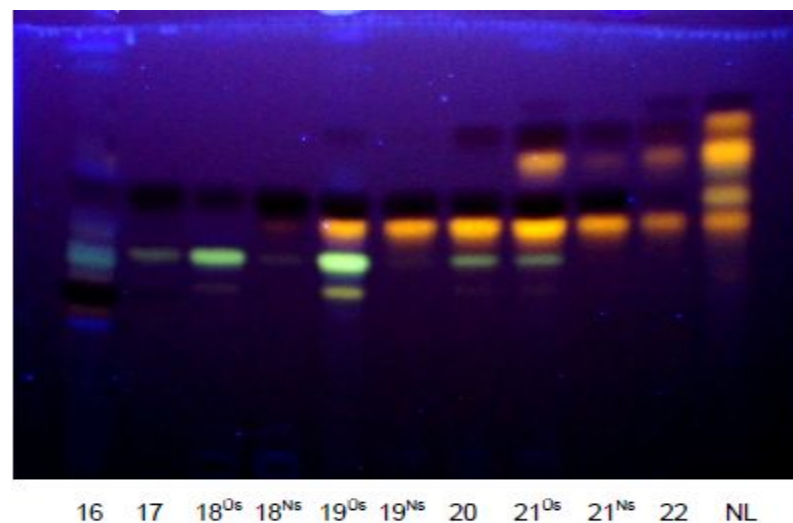


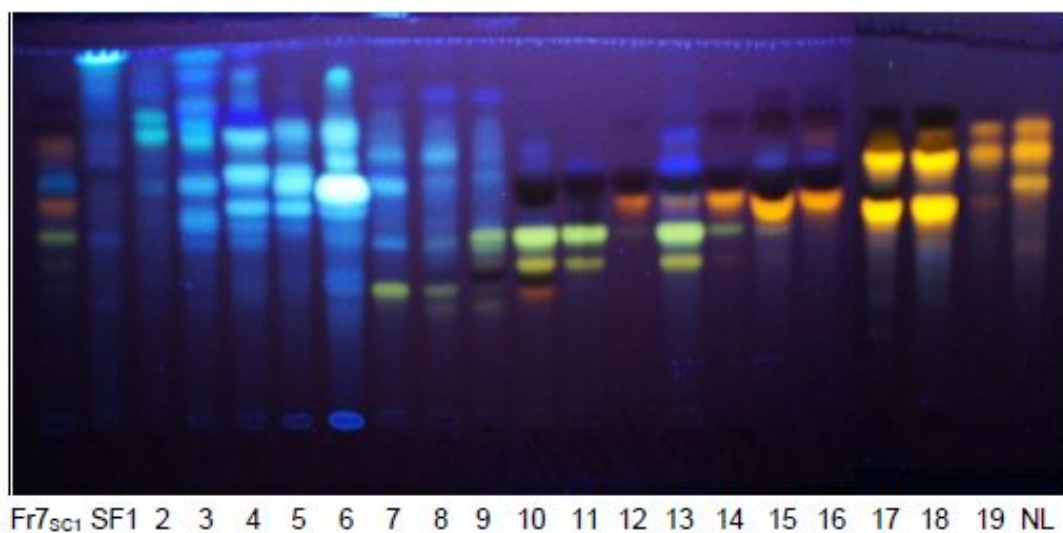
Abbildung 4: DC der Sammelfractionen der SC2 [5] ⁴



³ Quelle: Lewenhofer V. (2014) Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*, Diplomarbeit, Universität Wien

⁴ Quelle: Lewenhofer V. (2014) Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*, Diplomarbeit, Universität Wien

Abbildung 5: DC der Sammelfractionen der SC3 [5] ⁵



Einige Sammelfractionen der SC1, SC2 und SC3 [5] sollten in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung der Hauptkomponenten weiter bearbeitet werden.

⁵ Quelle: Lewenhofer V. (2014) Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*, Diplomarbeit, Universität Wien

2.2 Methoden

2.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie diente zur Identifizierung von Komponenten einzelner Fraktionen durch Vergleich mit verschiedenen Referenzsubstanzen und zur Überprüfung der Sammelfractionen verschiedener Trennschritte sowie der Reinheit isolierter Substanzen.

Stationäre Phase 1:

Kieselgel 60 F₂₅₄

Trägermaterial: Alufolie

Trägergröße: 20 x 10 cm

Hersteller: Merck, Darmstadt, Deutschland

Mobile Phase:

Ethylacetat-konz. HCOOH-konz. CH ₃ COOH-Wasser	100+11+11+20
---	--------------

Detektion:

Für die Detektion wurden die Chromatogramme zunächst mit einer 1% methanolischen Lösung von Naturstoffreagens A und nach 5 Minuten mit einer 5% ethanolischen Lösung von Polyethylenglykol 4000 besprüht. Nach dem Besprühen wurden die Chromatogramme 5 Minuten in einem Trockenschrank bei 105° C erhitzt, anschließend unter UV bei 366nm ausgewertet und fotografiert.

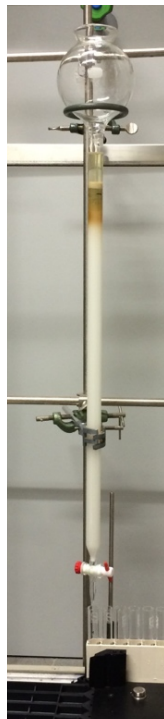
2.2.2 Säulenchromatographie (SC)

Die Säulenchromatographie wurde zur Auftrennung von Fraktionen eingesetzt.

Es wurde Sephadex® LH-20 als stationäre Phase verwendet, da dieses für die Fraktionierung von phenolischen Verbindungen besonders geeignet ist.

Sephadex® LH-20 wurde vor der Anwendung in Wasser bzw. in Wasser/Methanol Gemischen über Nacht gequollen und danach in die Säule gepackt. Das Substanzgemisch wurde in konzentrierter Lösung aufgetragen.

Abbildung 6: Säulenchromatographie



Die genauen Abmessungen der jeweils verwendeten Säulen, Fließmittel und Tropfgeschwindigkeiten werden in den einzelnen Kapiteln näher beschrieben.

2.2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Eine weitere Methode, die zur Analyse von Fraktionen eingesetzt wurde, ist die HPLC. Die HPLC wurde zur Bestimmung der Reinheit isolierter Komponenten und zur eindeutigen Identifizierung verschiedener Substanzen verwendet.

Die Proben sind mit zwei HPLC Geräten der Firma Shimadzu untersucht worden.

- Gerät 1

Tabelle 1: HPLC-Gerätekomponenten von Gerät 1

Pumpe:	LC-20AD
Detektor:	Diode Array Detektor SPD-M20A
Säulenofen:	CTO-20AC
Autosampler:	SIL-20AC HT
Säule:	Luna 5 μ C18 100A 250x 4,6 mm, Phenomenex, USA

- Gerät 2

Tabelle 2: HPLC-Gerätekomponenten von Gerät 2

Pumpe:	LC-10AD
Detektor:	SPD-M10A-VP
Säulenofen:	CTO-20AC
Autosampler:	SIL-10AD
Säule:	Luna 5 μ C18 100A 250x 4,6 mm, Phenomenex, USA

Tabelle 3: HPLC-Parameter

Injektionsvolumen:	10µl
Temperatur:	25°C
Konzentrationen der untersuchten Fraktionen:	1 mg/ml
Konzentrationen der untersuchten Reinsubstanzen:	0,1 mg/ml
Fließmittel:	A: Aqua _{dest} mit Ameisensäure auf pH 3 angesäuert B: Acetonitril
Elutionsgradient:	5% B auf 95% B in 60 min
Flussrate:	1 ml/min
Detektion	254nm 350nm

Zur Reinigung der Säule wurde grundsätzlich ein Lauf mit Methanol durchgeführt. Es ist vor den Messungen 10 min mit 95% Eluent B gespült und anschließend 20 min mit der Anfangskonzentration equilibriert worden.

2.2.4 Solid Phase Extraction (SPE)

Die SPE ist zur weiteren Auftrennung von Fraktionen, welche durch die Säulenchromatographie erhalten wurden, eingesetzt worden.

Als stationäre Phase wurde eine "Mega Bond Elut C18" Kartusche der Firma Varian mit einem Fassungsvermögen von 12 ml verwendet.

Die Gradientenelution wurde mit verschiedenen Methanol/Wasser-Gemischen durchgeführt.

Vor der Trennung wurde die Kartusche zuerst mit Wasser, dann mit Methanol und anschließend mit dem ersten Elutionsmittel konditioniert.

Nach dem letzten Konditionierungsschritt wurde die Probe auf die stationäre Phase aufgetragen.

Im Anschluss daran wurde mit der Elution begonnen, wobei die Tropfgeschwindigkeit auf 1 Tropfen alle 2 Sekunden eingestellt wurde.

Es sind alle Fraktionen mittels DC untersucht worden und je nach Zusammensetzung wurde die Konzentration des Elutionsmittels gesteigert.

2.2.5 Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)

Es wurde die LC-MS Analyse zur Bestimmung der molekularen Masse einer isolierten Verbindung durchgeführt.

Die LC-MS Analyse wurde auf einem Ultimate 3000 RSLC-Series System (Dionex, Germering, Deutschland), welches an ein 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT; Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) gekoppelt ist, durchgeführt. Das Eluat ist im Verhältnis 1:4 vor der ESI-Quelle gesplittet worden, die mit folgenden Einstellungen betrieben wurde:

Kapillarspannung: -3,7/+3,5 kV, Vernebelungsgas: 26 psi (N₂), Trockengasfluss: 9 l/min (N₂), und Trockengastemperatur: 340°C.

Es sind Mehrstufenmassenspektren bis zu MS⁴ im Positiv- und Negativ-Ionenmodus in einem data-dependent acquisition (DDA) Modus mit einem Isolationsfenster von 4Th und einer Fragmentierungsamplitude von 1,0 V erstellt worden. Helium kam als Kollisionsgas zum Einsatz.

2.2.6 Lyophilisation

Um die Wasseranteile einiger Fraktionen zu entfernen, wurden sie in Rundkolben eingefroren und durch Gefriertrocknung auf einem Va CO 5-II Lyophilisator, der Firma Zirbus technology zur Trockene gebracht.

Parameter: Druck ca. 0,050 mbar bei -78°C

2.2.7 Evaporation

Um Lösungsmittel aus sehr kleinen Probenmengen entfernen und die Probe rasch zur Trockenen zu bringen, wurde ein Zentrifugaltrockner EZ-2-Series Personal Evaporator der Firma Gene Vac® verwendet.

Parameter: Low BP Mixture/HPLC-Programm bei 40°C.

2.2.8 Sonstige Geräte

Tabelle 4: sonstige Geräte

Ultraschallbad:	Elma Transsonic 460H
pH-Elektrode:	WTW pH Elektrode Sen Tix 81
Waagen:	Sartorius BP 210 59008 Sartorius LC 4801P
Zentrifuge:	Eppendorf mini Spin Zentrifuge
Destillationsapparatur:	IKA-dest M3000
Kamera:	Sony NEX-3

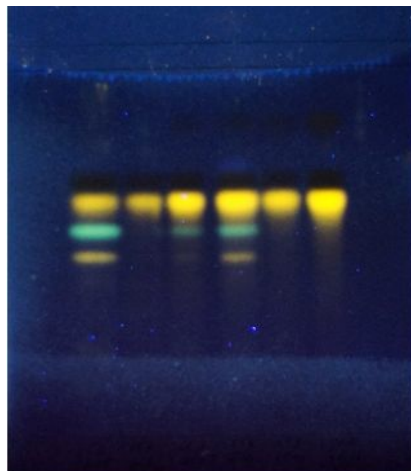
3 Ergebnisse

3.1 Vereinigung von Fraktionen

Um erfolgsversprechende Mengen für die Reindarstellung der Hauptkomponenten zu fraktionieren, wurden zur Verfügung stehende Fraktionen mittels DC untersucht und vereinigt.

Abbildung 7: DC-Vergleich von Fraktionen

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



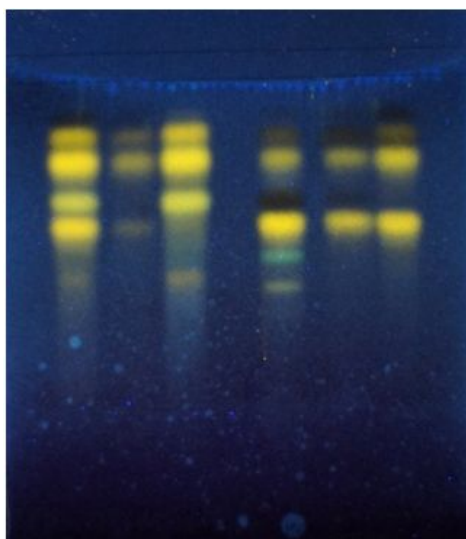
1 2 3 4 5 6

Bahn	Fraktion [5]
1	SC2F19
2	SC2F19 NS
3	SC2F20
4	SC3F14
5	SC3F15
6	SC3F16

Es sollte die gelb fluoreszierende Substanz bei R_f 0,60 isoliert werden. Diese war in den Fraktionen SC2F19 NS [5], SC3F15 [5] und SC3F16 [5] enthalten (s. Abbildung 7, S. 12), die zur Fraktion A vereinigt wurden. Weitere Verarbeitung siehe Kapitel 3.5, S. 33.

Abbildung 8: DC-Vergleich von Fraktionen

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



Bahn	Fraktion [5]
1	SC2 NL
2	SC3F19
3	SC3 NL
4	SC2F21
5	SC3F17
6	SC3F18

Aufgrund dieser dünnschichtchromatographischen Untersuchung (s. Abbildung 8, S. 13) sind die Fraktionen SC2 NL [5], SC3F19 [5], SC3 NL [5] zur Fraktion B vereinigt worden. Aus Fraktion B sollte die gelb fluoreszierende Bande bei R_f 0,67 isoliert werden. Weitere Verarbeitung siehe Kapitel 3.3, S. 22.

Die Fraktionen SC2F21 [5], SC3F17 [5], SC3F18 [5] (s. Abbildung 8, S. 13) sind zur Fraktion C vereinigt und anschließend mittels Säulenchromatographie aufgetrennt worden, siehe Kapitel 3.6, S. 37.

Tabelle 5: Mengen der vereinigten Fraktionen A, B und C

Nummer	Gewicht
Fraktion A	72,9 mg
Fraktion B	57,5 mg
Fraktion C	152,1 mg

3.2 Identifizierung von Flavonoiden in vorhandenen Fraktionen

Es waren mehrere Fraktionen vorhanden [5], die mit authentischen Vergleichssubstanzen auf verschiedene Flavonoide geprüft wurden.

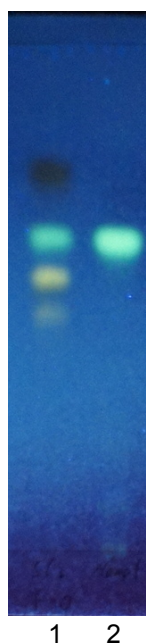
3.2.1 Prüfung auf Kämpferol-3-rutinosid

Bei der grün fluoreszierenden Bande der Fraktion SC3F10 [5] bei R_f ca. 0,48 bestand aufgrund der Laufstrecke und der Fluoreszenzfarbe der Verdacht auf das Vorliegen von Kämpferol-3-rutinosid (s. Abbildung 5, S. 5). Daher ist auf Kämpferol-3-rutinosid durch einen DC-Vergleich geprüft worden. Die Laufstrecke betrug 8 cm.

3.2.1.1 DC-Vergleich mit Referenzsubstanz

Abbildung 9: DC-Vergleich von Fraktion SC3F10 [5] mit Kämpferol-3-rutinosid

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



Bahn	Substanz
1	SC3F10 [5]
2	Kämpferol-3-rutinosid

Aus der Dünnschichtchromatographie ging hervor, dass sowohl die Fluoreszenz als auch die Laufstrecken der Komponente in Fraktion SC3F10 [5] und von Kämpferol-3-rutinosid übereinstimmten. Zur eindeutigen Identifizierung sind die Fraktion SC3F10 [5] und Kämpferol-3-rutinosid durch eine HPLC Analyse untersucht worden.

3.2.1.2 HPLC-Vergleich

**Abbildung 10: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F10 [5] und
Kämpferol-3-rutinosid**

HPLC-Methode 1, Gerät 1 (s. S. 8)

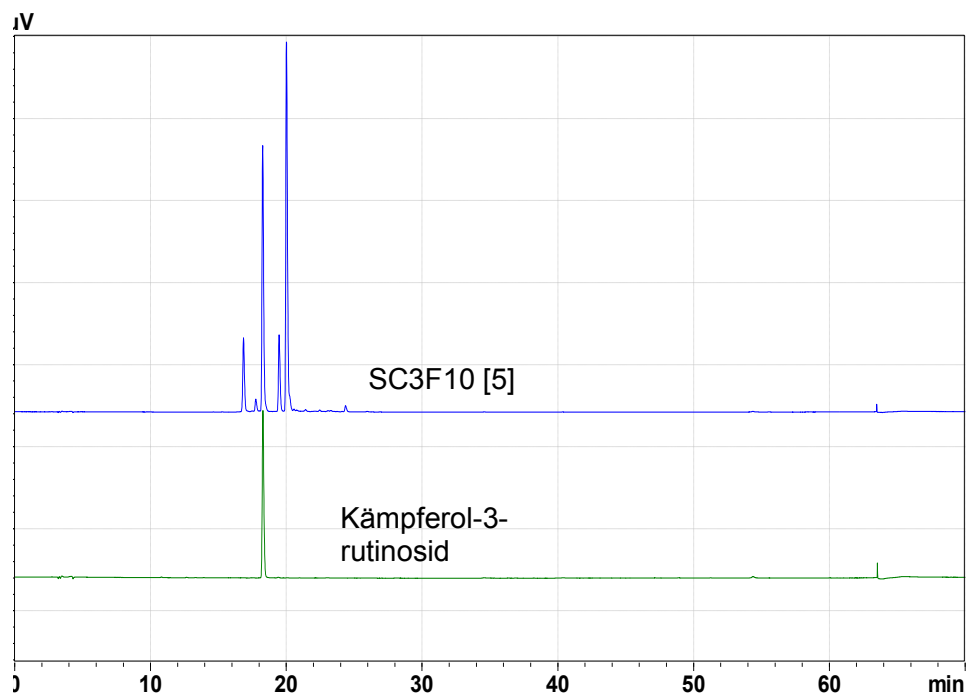


Abbildung 11: UV-Spektrum von Kämpferol-3-rutinosid bei 18,28 min

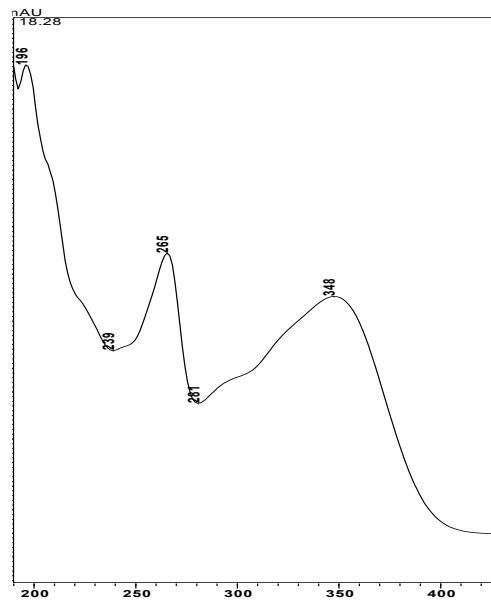
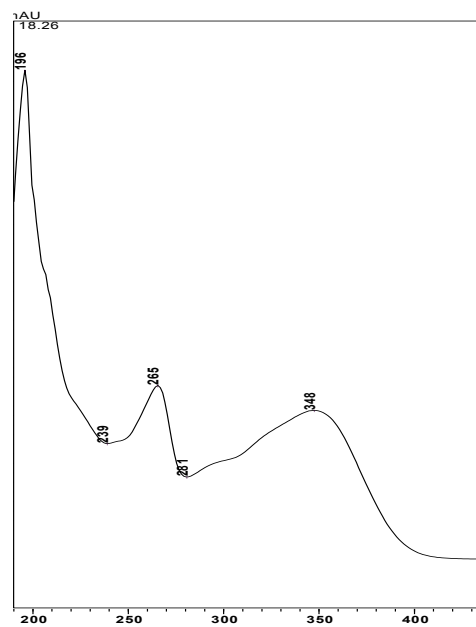


Abbildung 12: UV-Spektrum der Komponente von SC3F10 [5] bei 18,26 min



Das HPLC Ergebnis (s. Abbildung 10, S. 16) zeigte, dass Fraktion SC3F10 [5] aus 4 Komponenten bestand. Beim größten Peak bei einer Retentionszeit von 20,02 min handelte es sich um die braunschwarze Bande bei R_f 0,75 (s. Abbildung 9, S. 15). Der Peak, bei einer Retentionszeit von 18,26 min, konnte durch den chromatographischen Vergleich der Referenzsubstanz Kämpferol-3-rutinosid zugeordnet werden. Auch die UV-Spektren von Kämpferol-3-rutinosid und der Komponente von SC3F10 [5] zeigten idente Minima und Maxima. Somit wurde durch DC und HPLC belegt, dass es sich bei der grünen Bande bei R_f 0,61 (s. Abbildung 9, S. 15) eindeutig um Kämpferol-3-rutinosid handelte.

3.2.2 Prüfung auf Rutin

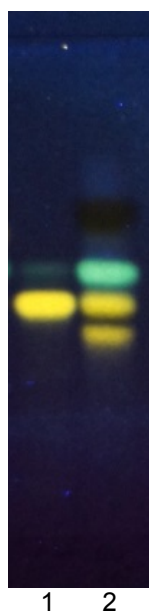
Die gelbe Bande unterhalb des Kämpferol-3-rutinosids bei R_f ca. 0,40 in Fraktion SC3F10 [5] (s. Abbildung 5, S. 5) konnte durch Vergleich mit einer authentischen Substanz in zwei chromatographischen Systemen identifiziert werden.

Aufgrund von Erfahrungswerten bestand die Annahme, dass es sich um Rutin handeln könnte. Zur Prüfung dieser Annahme wurde zunächst ein DC-Vergleich mit Rutin durchgeführt.

3.2.2.1 DC-Vergleich mit Referenzsubstanz

Abbildung 13: DC-Vergleich von Fraktion SC3F10 [5] mit Rutin

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



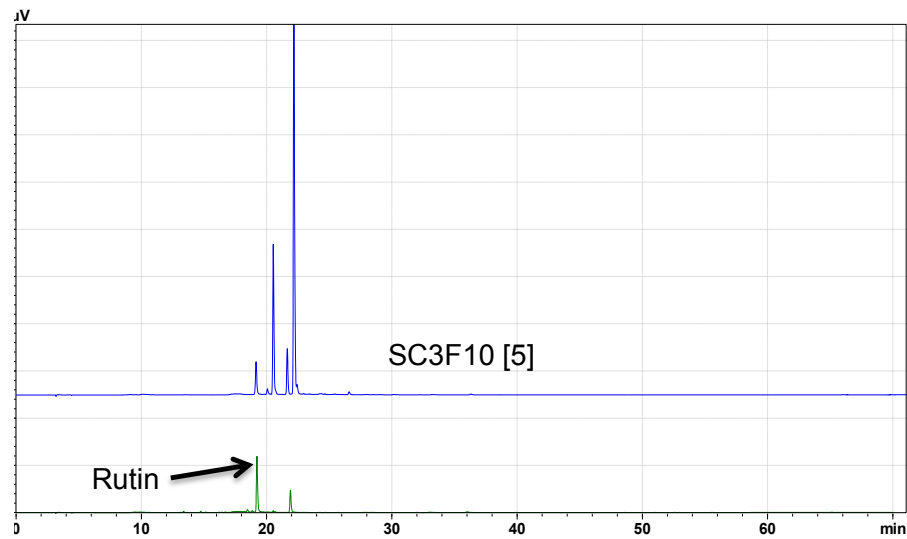
Bahn	Substanz
1	Rutin
2	SC3F10 [5]

Die DC zeigte nach dem Besprühen mit Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 4000 unter UV 366nm eine gelb fluoreszierende Bande in der Fraktion SC3F10 [5], deren Rf-Wert und Fluoreszenzfarbe mit Rutin übereinstimmte. Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde eine HPLC Analyse durchgeführt.

3.2.2.2 HPLC-Vergleich

Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F10 [5] und Rutin

HPLC-Methode 1, Gerät 2 (s. S. 8)



Aus dem HPLC-Chromatogramm war erkennbar, dass die Fraktion SC3F10 [5] eine Mischung aus den Komponenten Homoplantaginin, Kämpferol-3-rutinosid und einem weiteren, etwas kleineren Peak mit einer Retentionszeit von 19,21 min war. Dieser Peak konnte nach chromatographischer Untersuchung als Rutin identifiziert werden.

Abbildung 15: UV-Spektrum von Rutin bei 19,22 min

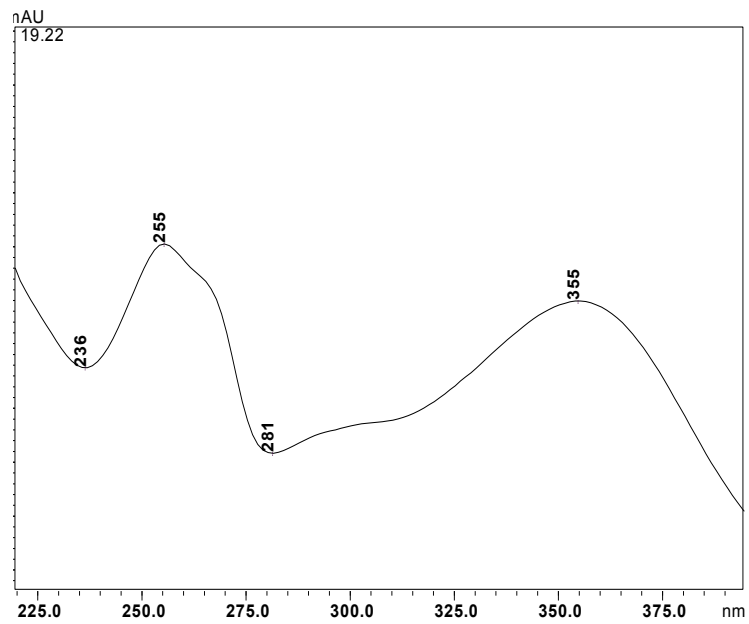
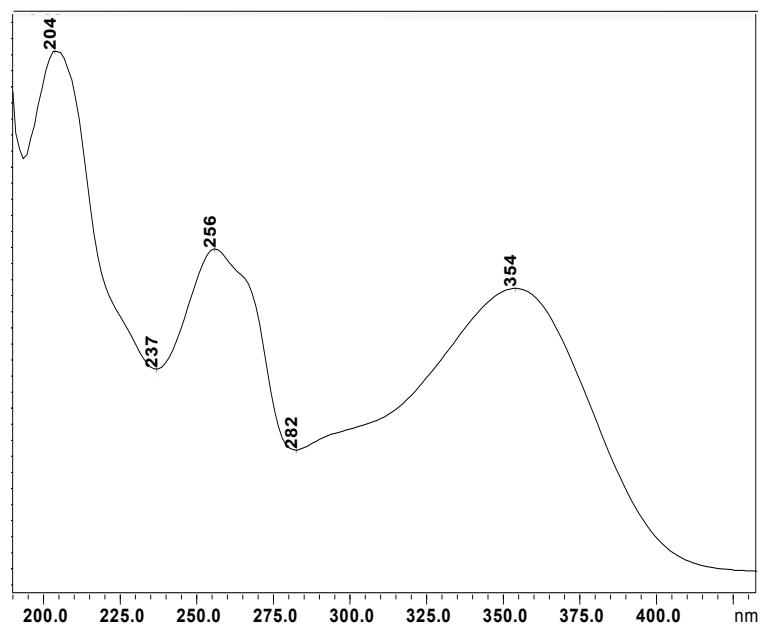


Abbildung 16: UV-Spektrum der Komponente von SC3F10 [5] bei 19,21 min



Mit der HPLC konnte gezeigt werden, dass sowohl die Retentionszeiten als auch die UV-Spektren der Komponente der Fraktion SC3F10 [5] und der Referenzsubstanz Rutin gleich waren (s. Abbildung 15 und Abbildung 16, S. 21). Somit war belegt, dass es sich bei dieser gelben Bande mit dem Rf Wert 0,47 eindeutig um Rutin handelte (s. Abbildung 13, S. 19).

3.3 Säulenchromatographie 1 (SC1)

Die Fraktion B zeigte nach Besprühen mit Naturstoffreagens A und PEG bei Rf ca. 0,67 eine intensiv gelb fluoreszierende Bande, die durch eine Säulenchromatographie isoliert werden sollte (s. Abbildung 8, S. 13)

3.3.1 Durchführung von SC1

Es wurde für die Auftrennung von 57,5 mg eine Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 Säule durchgeführt. Als mobile Phase kam 50% MeOH zum Einsatz.

Säulendurchmesser: 1 cm

Füllhöhe: 30 cm

Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 2 ml/30 min wurden 214 Fraktionen gesammelt. Jede fünfte Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Jene Fraktionen, die ein ähnliches Bandenmuster aufwiesen, wurden zu 17 Sammelfraktionen vereinigt.

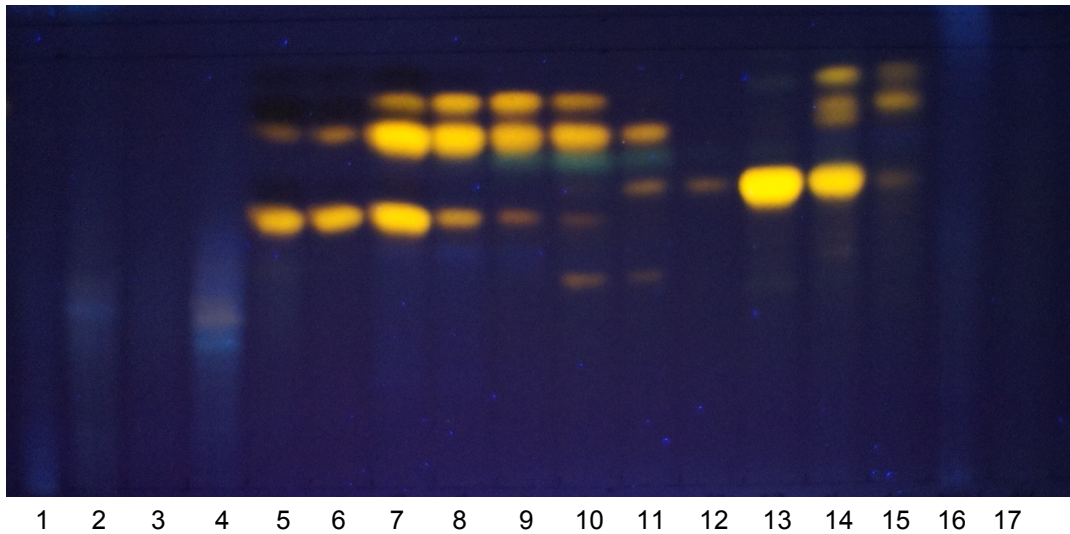
Tabelle 6: Sammelfraktionen der SC1

Sammelfraktionen	Fraktionen	Ausbeute	Vereinigungen
1	15-30	1,1 mg	
2	31-62	1,1 mg	
3	63-72	0,9 mg	
4	73-82	0,7 mg	
5	83-92	7,2 mg	SC1 5/6 9,3 mg
6	93-97	4,1 mg	
7	98-107	6,2 mg	
8	108-117	3,9 mg	
9	118-127	3,0 mg	
10	128-137	1,4 mg	
11	138-142	0,2 mg	
12	143-153	0,5 mg	
13	154-174	1,7 mg	
14	175-185	0,2 mg	
15	186-214	1,6 mg	
16	Nachlauf	0,9 mg	
17	WaschMeOH	2,0 mg	

Von den erhaltenen Sammelfraktionen wurde eine DC angefertigt.

Abbildung 17: DC der Sammelfraktion von SC1

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



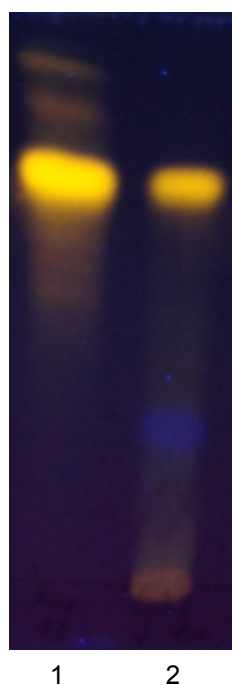
3.3.2 Identifizierung von Luteolin-7-O-glucosid

Mittels Säulenchromatographie 1 war die gelb fluoreszierende Bande bei R_f 0,67 der Fraktion 13 in einheitlicher Form angereichert worden (s. Abbildung 17, S. 24). Es bestand die Vermutung, dass es sich um das Flavonoid Luteolin-7-O-glucosid handeln könnte.

Um diese These zu prüfen, wurde zunächst eine DC der Fraktion SC1F13 und der Referenzsubstanz Luteolin-7-O-glucosid angefertigt.

Abbildung 18: DC-Vergleich von Fraktion SC1F13 mit Luteolin-7-O-glucosid

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm

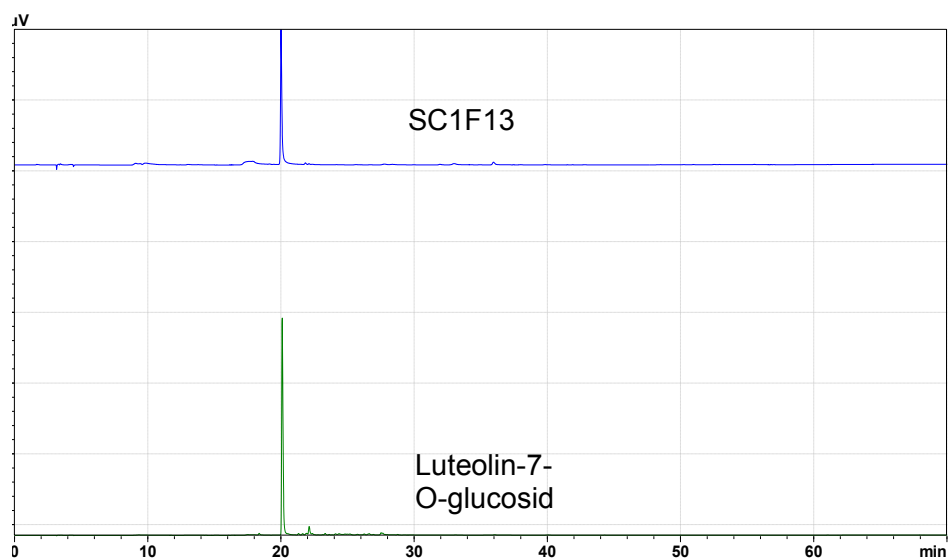


Bahn	Substanz
1	SC1F13
2	Luteolin-7-O-glucosid

Die DC zeigte, dass sowohl die Fluoreszenz als auch die Laufstrecke der Hauptkomponente in Fraktion SC1F13 auf Luteolin-7-O-glucosid hinwiesen. Anschließend wurde eine HPLC-Untersuchung durchgeführt, um diese Annahme zu bestätigen (s. Abbildung 19, S. 26).

Abbildung 19: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC1F13 und Luteolin-7-O-glucosid

HPLC-Methode 1, Gerät 2 (s. S. 8)



Das HPLC-Chromatogramm veranschaulichte, dass die Fraktion SC1F13 aus einer Hauptkomponente mit der Retentionszeit von 20,09 Minuten bestand. Durch den Vergleich mit einer authentischen Substanz konnte dieser Peak dem Luteolin-7-O-glucosid zugewiesen werden. Auch die Minima und Maxima der UV-Spektren beider Substanzen stimmten überein (s. Abbildung 20 und Abbildung 21, S. 27).

Abbildung 20: UV-Spektrum der Komponente von SC1F13 bei 20,09 min

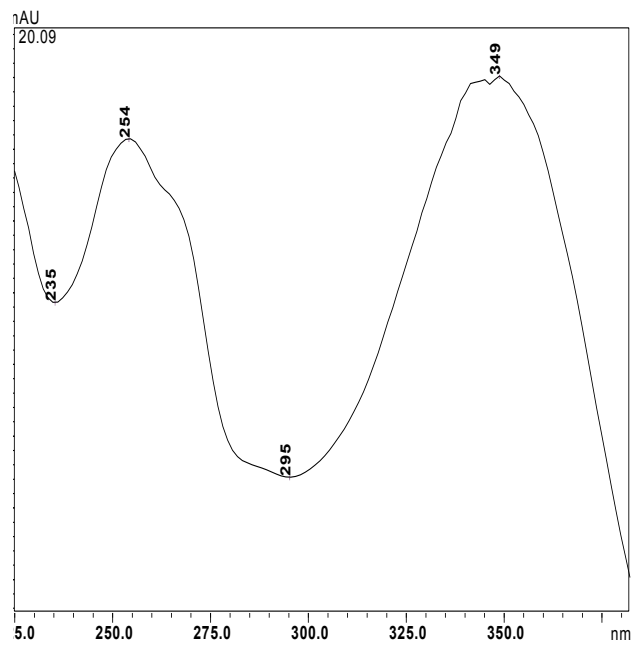
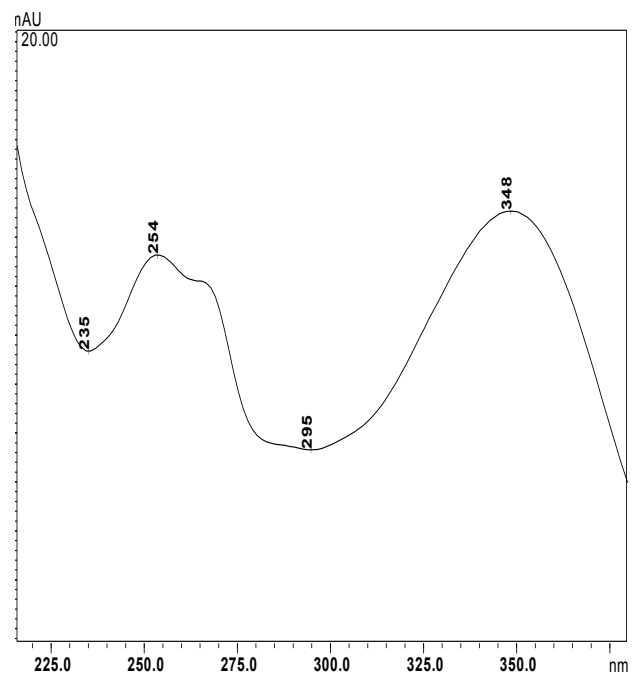


Abbildung 21: UV-Spektrum von Luteolin-7-O-glucosid bei 20,00 min



3.4 Säulenchromatographie 2 (SC2)

Im nächsten Schritt sollte die stark blau fluoreszierende Bande der Fraktion SC3F6 [5] (s. Abbildung 5, S. 5) bei R_f ca. 0,59 identifiziert werden.

3.4.1 Durchführung von SC2

Zur Auftrennung der Fraktion SC3F6 [5] (s. Abbildung 5, S. 5) wurde ebenfalls die Säulenchromatographie verwendet. Es wurde wieder mit Sephadex® LH-20 als stationäre Phase gearbeitet, auf die eine Probenmenge von 63,2 mg aufgebracht wurde. Als Elutionsmittel ist Wasser benutzt worden.

Säulendurchmesser: 1 cm

Füllhöhe: 30 cm

Die Tropfgeschwindigkeit betrug 2 ml/30 min. Es sind 180 Fraktionen gesammelt worden, die nach einer Überprüfung mittels Dünnschichtchromatographie jeder fünften Fraktion, zu 15 Sammelfraktionen vereinigt wurden.

Tabelle 7: Sammelfraktionen der SC2

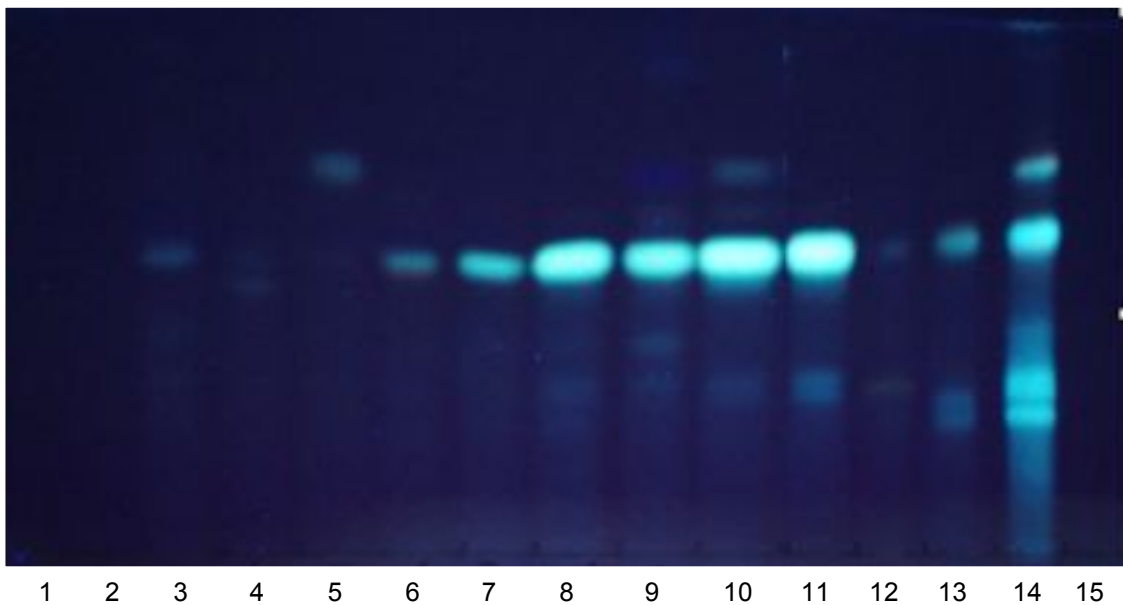
Sammelfraktionen	Fraktionen	Ausbeute
1	1-11	1,0 mg
2	12-17	2,3 mg
3	18-27	1,3 mg
4	28-32	1,4 mg
5	33-38	0,7 mg

6	39-43	1,7 mg
7	44-47	0,8 mg
8	48-57	4,2 mg
9	58-62	2,8 mg
10	63-72	17,1 mg
11	73-87	2,9 mg
12	88-102	20,4 mg
13	103-180	2,9 mg
14	Nachlauf	0,4 mg
15	WaschMeOH	1,7 mg

Von den Sammelfractionen wurde eine DC erstellt.

Abbildung 22: DC der Sammelfraktion von SC2

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



3.4.2 Identifizierung von Verbascosid

Das Dünnschichtchromatogramm der Sammelfractionen (s. Abbildung 22, S. 29) zeigte bei R_f 0,55 unter UV 366nm, dass in den Fractionen SC2F8, SC2F9, SC2F10 und SC2F11 eine blau fluoreszierende Substanz stark angereichert war. Es bestand die Annahme des Vorliegens von Verbascosid.

Auf der DC war erkennbar, dass die Komponente in Fraction SC2F8 sehr rein vorlag (s. Abbildung 23, S. 30).

Abbildung 23: DC der Fraction SC2F8

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



Um die Identität und die Reinheit zu untersuchen, wurde die Fraction SC2F8 mittels HPLC geprüft und mit Verbascosid verglichen.

Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC2F8 und Verbascosid

HPLC-Methode 1, Gerät 1 (s. S. 8)

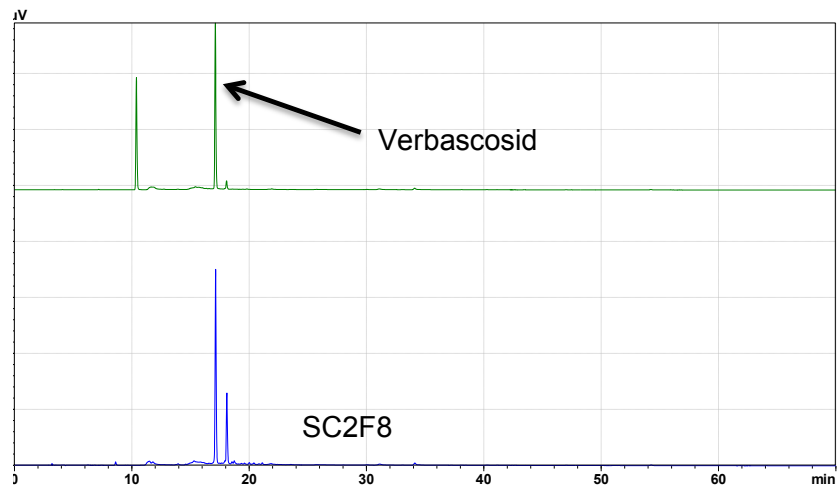


Abbildung 25: UV-Spektrum von Verbascosid bei 17,16 min

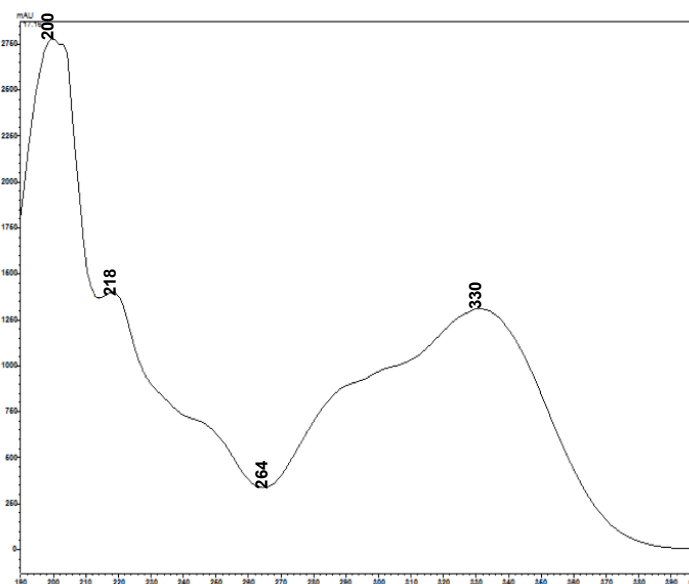
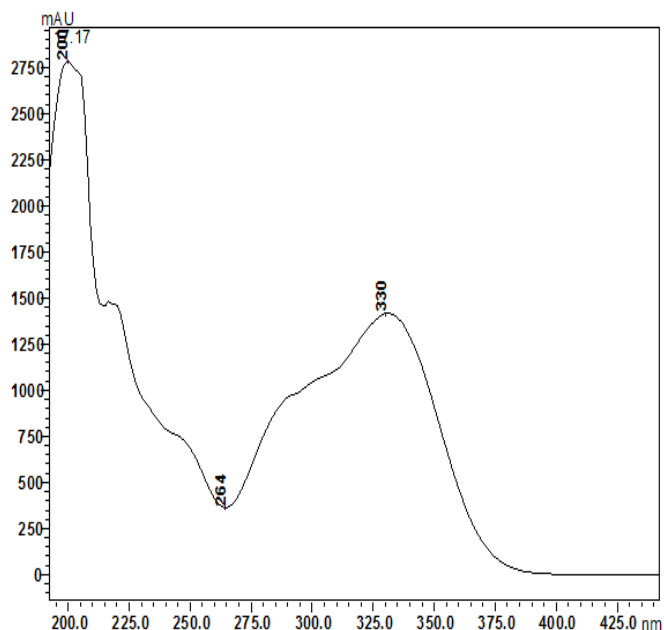


Abbildung 26: UV-Spektrum der Komponente von SC2F8 bei 17,17 min



Es wurde gezeigt, dass die Retentionszeit von Verbascosid mit der Hauptkomponente in Fraktion SC2F8 übereinstimmte. Weiters stimmten auch die UV-Spektren der Fraktion SC2F8 bei 17,17 min und des Verbascosids bei 17,16 min überein.

Zur Strukturaufklärung der Substanz wurde zusätzlich eine LC-MS-Messung durchgeführt.

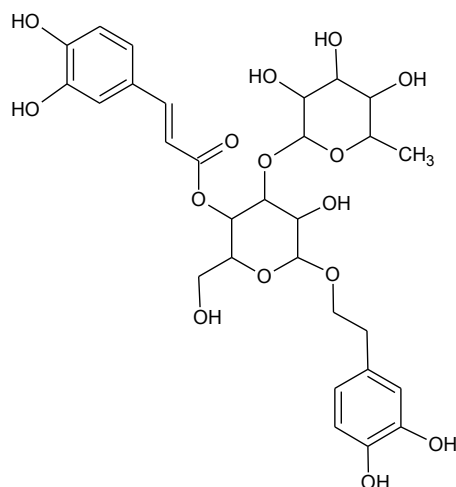
Die MS-Analyse ergab ein Molekulargewicht der Hauptkomponente von 624,2 Da (m/z 623,2 $[M-H]^-$ im Negativionen Modus) (s. Anhang 1, S. 57).

Im Negativionen- MS^2 sah man, dass ein Fragment mit einer Masse von 162 Da abgespalten wurde, was auf Kaffeesäure schließen ließ. Im MS^3 -Scan trat ein Masseverlust von 146 Da auf, was auf Rhamnose hindeutete. Weitere 326 Da wurden abgespalten, wobei auf Hydroxytyrosol geschlossen wurde.

Aufgrund des Fragmentierungsmusters und der Masse konnte davon ausgegangen werden, dass es sich hier um Verbascosid handelte (s. Abbildung 27, S. 33).

Es konnte durch chromatographische und spektroskopische Untersuchung gezeigt werden, dass es sich bei der Hauptkomponente von Fraktion SC2F8 um Verbascosid handelte.

Abbildung 27: Strukturformel von Verbascosid



Chemical Formula: $C_{29}H_{36}O_{15}$

Molecular Weight: 624,59

3.5 Versuch zur Isolierung zweier Flavonoidkomponenten

Es sollte versucht werden die gelborange fluoreszierenden Banden bei R_f 0,53 und bei R_f 0,72 in der Fraktion SC1F4 [5] (s. Abbildung 3, S. 4) zu isolieren.

Daher mussten Schritte unternommen werden, um Homoplantaginin bei Rf 0,55 und 2"-O-Acetyl-homoplantaginin bei Rf 0,76, welche die Hauptkomponenten darstellten, abzutrennen.

Um die braun fluoreszierenden Banden bei Rf 0,55 und Rf 0,76 zu entfernen, wurden 190 mg der Fraktion SC1F4 [5] in Ethylacetat gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und eingedampft. Das wurde zweimal wiederholt.

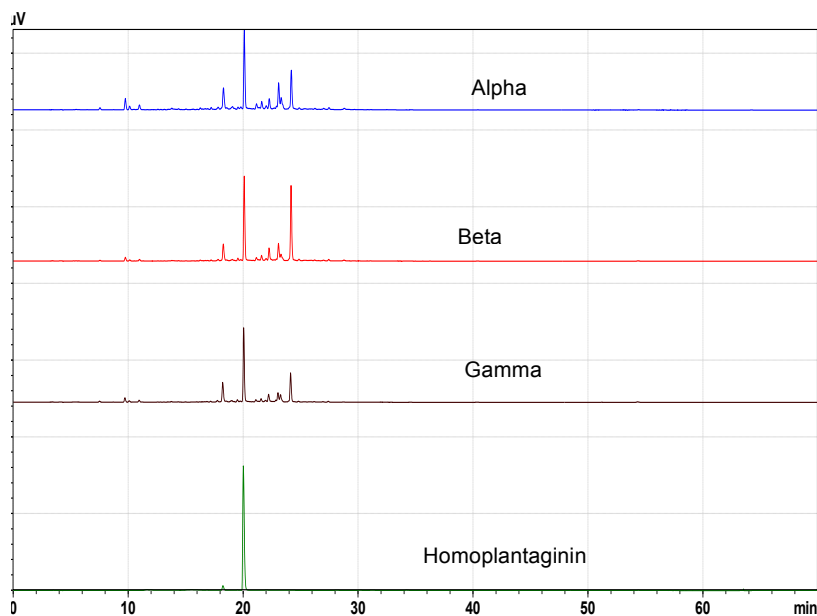
Die so erhaltenen Fraktionen Alpha, Beta und Gamma wurden durch eine HPLC Analyse auf ihre Zusammensetzung geprüft.

Tabelle 8: Gewichte der Fraktionen Alpha, Beta und Gamma

Fraktion	Gewicht
Alpha	54,2 mg
Beta	70,8 mg
Gamma	39,2 mg

Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm der Fraktionen Alpha, Beta und Gamma

HPLC-Methode 1, Gerät 1 (s. S. 8)



Das Resultat war, dass Homoplagatinin und sein acetyliertes Derivat, in allen drei Fraktionen weiterhin in hohem Gehalt enthalten waren (s. Abbildung 28, S. 35).

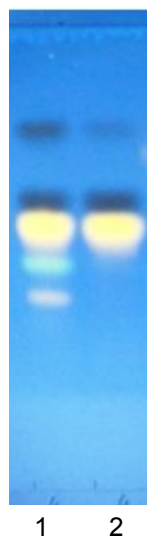
Da diese Ausfällungsschritte zu keiner Abreicherung führten, wurden um die gelbfluoreszierende Bande bei R_f 0,60 zu isolieren (s. Abbildung 7, S. 12), die Fraktion A (s. Abbildung 7, S. 12) und die Fraktion SC2F20 [5] (s. Abbildung 4, S. 4) in 3ml 25% MeOH gelöst, zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Daraus ging der Überstand und der Niederschlag der Fraktion D hervor, welche mittels DC überprüft wurden (s. Abbildung 29, S. 36).

Das Gewicht der Fraktion D lag bei 58,4 mg.

Abbildung 29: DC der Fraktion D-ÜS und Fraktion D-NS

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm

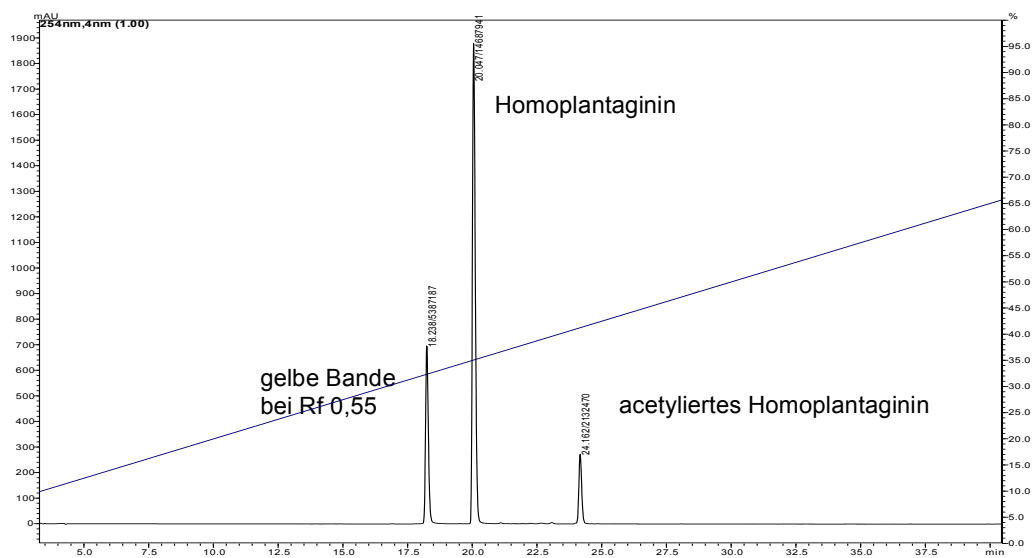


Bahn	Substanz
1	Fraktion D-ÜS
2	Fraktion D-NS

Zur Überprüfung der Reinheit wurde die Fraktion D-NS mittels HPLC analysiert.

Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm von Fraktion D-NS

HPLC-Methode 1, Gerät 1 (s. S. 8)



Das Ergebnis der HPLC-Untersuchung war, dass Homoplantaginin und das acetylierte Derivat immer noch die Hauptkomponenten in dieser Fraktion waren, obwohl die Bande bei Rf 0,55 intensiv gelb fluoreszierte (s. Abbildung 29, S. 36). Aus Zeitgründen waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine weiteren Aufreinigungsversuche möglich.

3.6 Säulenchromatographie 3 (SC3)

Mittels Säulenchromatographie 3 wurde die Fraktion SC1F9 [5] (s. Abbildung 3, S. 4) und die Fraktion C aufgetrennt, da die beiden gelborange fluoreszierenden Banden bei Rf 0,62 und Rf 0,75 identifiziert werden sollten (s. Abbildung 8, S. 13). Hier bestand der Verdacht auf das Vorliegen von Nepitrin.

Es wurden 542,1 mg Probe auf eine Sephadex® LH 20 Säule aufgegeben und mit 35% MeOH eluiert.

Der Säulendurchmesser lag bei 3 cm, die Füllhöhe bei 65 cm. Weiters ist eine Tropfgeschwindigkeit von 5 ml/30 min gewählt worden.

Es sind 686 Fraktionen gesammelt worden, die nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung jeder zehnten Fraktion zu insgesamt 28 Sammelfraktionen vereinigt wurden.

Tabelle 9: Sammelfraktionen der SC3

Sammelfraktionen	Fraktionen	Ausbeute	Vereinigung bzw. weitere Verarbeitung
1	1-103	7,7 mg	
2	104-115	0,6 mg	

3	116-124	1,4 mg	
4	125-135	0,7 mg	
5	136-144	0,5 mg	
6	145-155	1,5 mg	
7	156-174	2,0 mg	
8	175-215	10,3 mg	SC3 8-12 26,3 mg
9	216-225	3,2 mg	
10	226-330	0,1 mg	
11	331-339	3,5 mg	
12	340-353	10,0 mg	
13	354-380	22,2 mg	
14	381-389	12,5 mg	
15	390-399	8,8 mg	SPE1, S. 42
16	400-414	31,2 mg	
17	415-430	42,5 mg	SC3 17/18 114,8 mg
18	431-485	83,9 mg	
19	486-516	72,1 mg	
20	517-526	15,5 mg	
21	527-545	14,5 mg	
22	546-580	16,1 mg	SPE2, S. 46
23	581-625	45,7 mg	
24	626-646	13,1 mg	
25	647-670	1,7 mg	
26	671-686	4,1 mg	SC3 26/27 6,6 mg
27	Nachlauf	5,6 mg	
28	WaschMeOH	34,0 mg	

Von den Sammelfractionen ist eine DC angefertigt worden.

Abbildung 31: DC der Sammelfractionen von SC3

DC der Fraktionen 1-16

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm

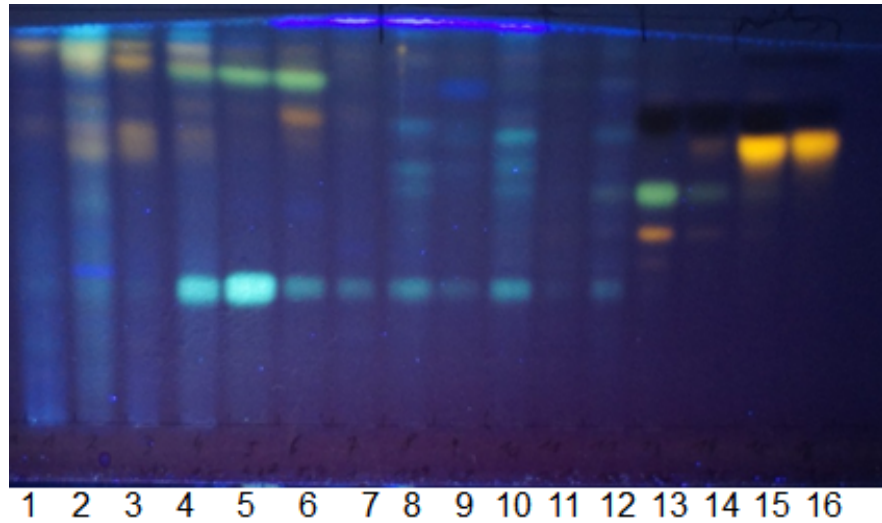
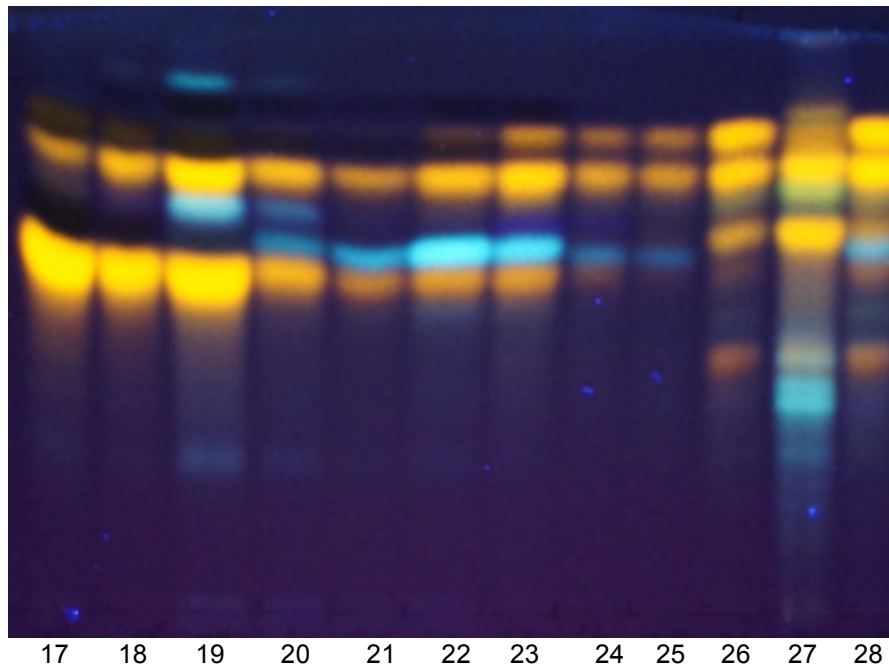


Abbildung 32: DC der Sammelfractionen von SC3

DC der Fraktionen 17-28

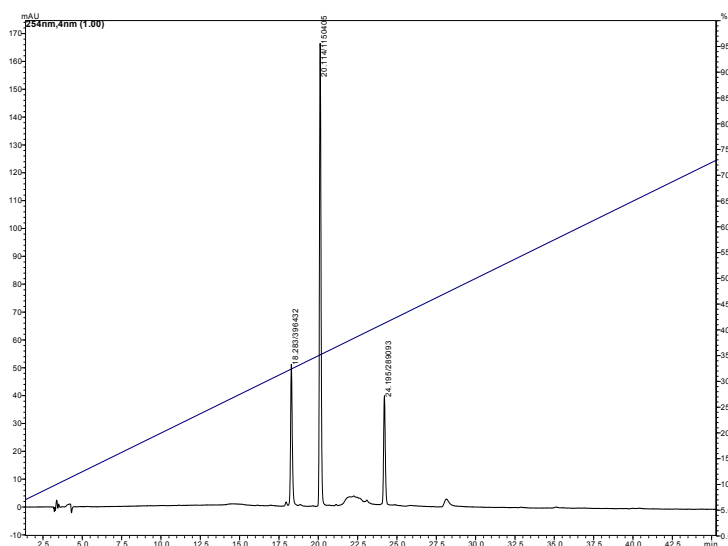
DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



Die Dünnschichtchromatographie der Sammelfractionen zeigte, dass in der Fraktion 15/16 die gelborange fluoreszierenden Bande bei Rf 0,66 (s. Abbildung 31, S. 39) und in den Fraktionen 17/18 und 19 die gelben Banden bei Rf 0,60 bzw. bei Rf 0,76 stark angereichert waren (s. Abbildung 32, S. 39). Um die Zusammensetzung festzustellen, wurden sie mittels HPLC untersucht.

Abbildung 33: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F15/16

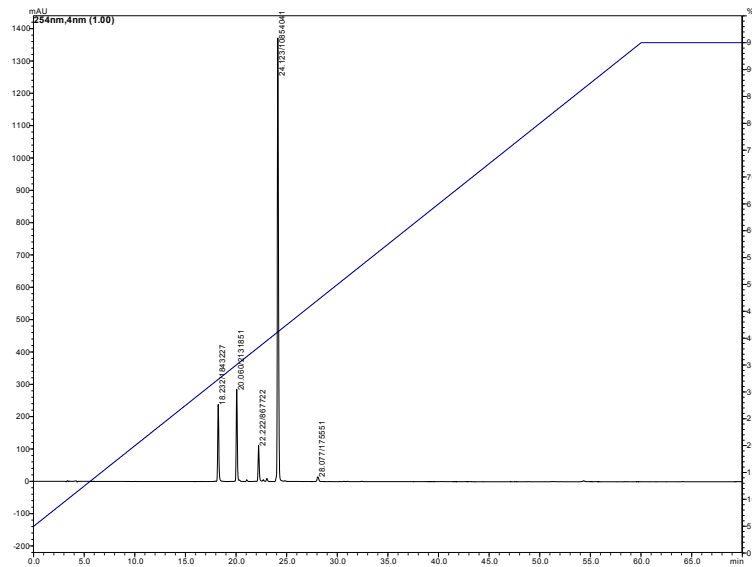
HPLC-Methode 1, Gerät 1 (s. S. 8)



Fraktion 15/16 enthielt 3 Komponenten. Homoplantaginin bei einer Retentionszeit von 20,11 min war die Hauptkomponente. Das Chromatogramm der Fraktion 15/16 zeigte weniger Begleitsubstanzen als jenes der Fraktionen 17/18 und 19. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Fraktion 15/16 zur weiteren Auftrennung mittels SPE eingesetzt worden. Weitere Verarbeitung siehe Kapitel 3.7, S. 42.

Abbildung 34: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F17/18

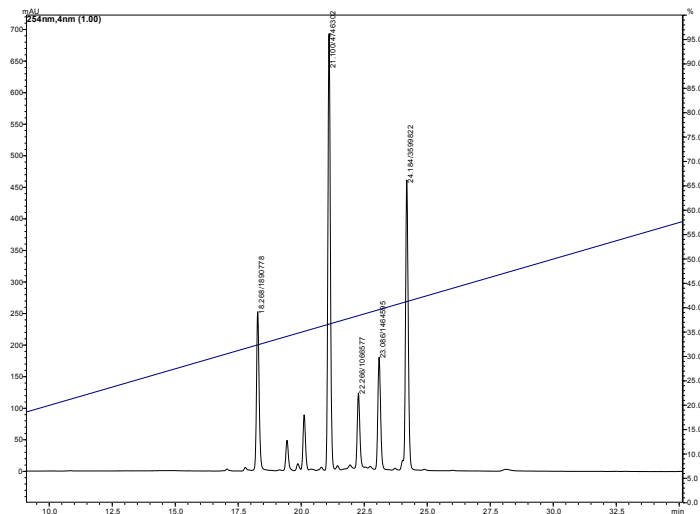
HPLC-Methode 1, Gerät 1 (s. S. 8)



Im Chromatogramm der Fraktion 17/18 war ersichtlich, dass acetyliertes Homoplantaginin, bei einer Retentionszeit von 24,12 min, die Hauptkomponente darstellte. Desweiteren wurden 3 Nebenkompontenten detektiert.

Abbildung 35: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F19

HPLC-Methode 1, Gerät 1 (s. S. 8)



Das Chromatogramm der Fraktion 19 zeigte die komplexeste Zusammensetzung. Homoplantaginin, bei einer Retentionszeit von 21,10 min, und acetyliertes Homoplantaginin, bei einer Retentionszeit von 24,18 min, stellten die Hauptkomponenten dar.

3.7 Solid Phase Extraction 1 (SPE1)

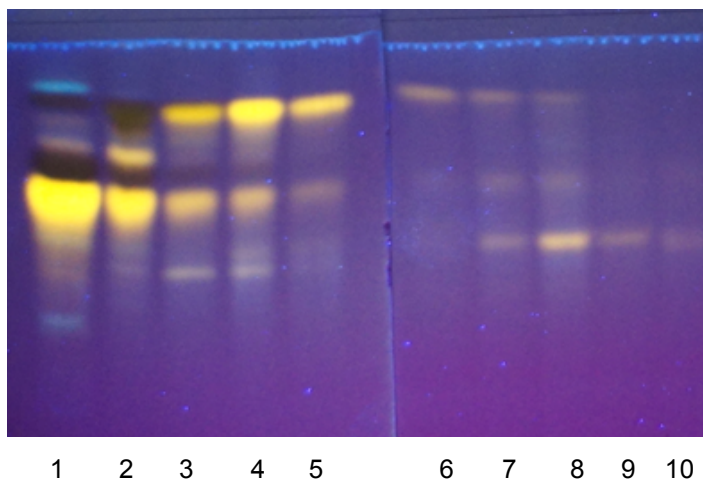
Die Fraktion SC3F15/16 zeigte auf der DC (s. Abbildung 31, S. 39) eine intensiv gelborange fluoreszierende Bande bei R_f 0,66. Da knapp 40 mg der Fraktion zur Verfügung stand, wurde diese mittels SPE aufgereinigt.

Nach der Konditionierung der SPE-Kartusche war die Probe in 50% Methanol gelöst und auf das Sorbens aufgetragen worden.

Die Elution wurde mit 50% Methanol gestartet und jede Fraktion mittels DC untersucht.

Abbildung 36: DC der Fraktionen von SPE1

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



Die Konzentration des Eluenten wurde, sobald auf der DC keine Banden unter UV366nm mehr sichtbar waren, gesteigert.

Tabelle 10: Gradientenelution der SPE1

Fraktionen	mobile Phase
1-7	50% MeOH
8-10	55% MeOH

Fraktionen mit ähnlichem Bandenmuster wurden vereinigt.

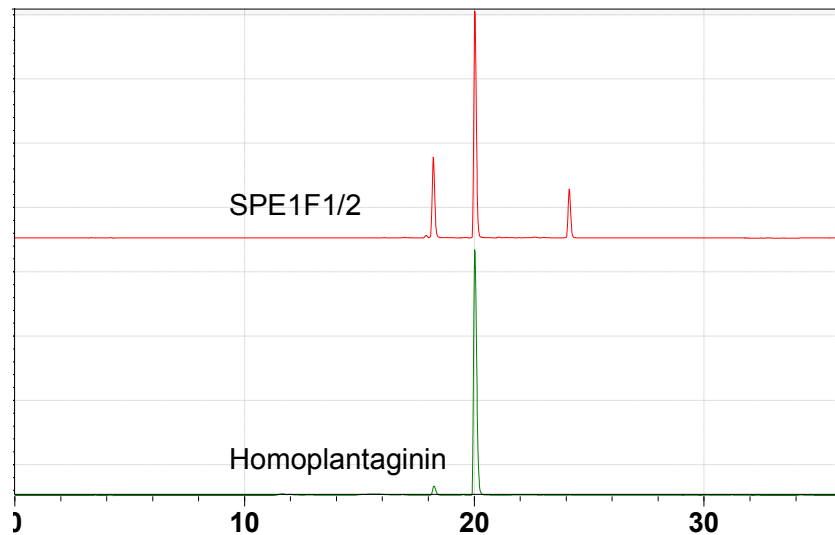
Tabelle 11: Sammelfraktionen der SPE1

Fraktionen	Ausbeute
1	21,2 mg
2	14,9 mg
3	0,3 mg
4	0,1 mg
5	0,1 mg
6-10	0,1 mg

Die DC (s. Abbildung 36, S. 43) zeigte nach dem Besprühen mit Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 4000 unter UV 366nm, dass der Hauptanteil der aufgetragenen Fraktion SC3F15/16 in SPE1F1 und SPE1F2 eluiert worden war.

Abbildung 37: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SPE1F1/2 und Homoplantaginin

HPLC-Methode 1, Gerät 1 (s. S. 8)



Die HPLC-Untersuchung zeigte, dass die Fraktion SPE1F1/2 aus einer Hauptkomponente mit einer Retentionszeit von 20,01 min bestand. Dabei handelte es sich um Homoplantaginin. Weiters wurden 2 Nebenkompontenten detektiert.

Es war nur bedingt gelungen, die gelborange Bande bei Rf 0,60 aufzureinigen und die Banden bei Rf 0,64 bzw. bei Rf 0,78 abzutrennen (s. Abbildung 36, S. 43).

3.8 Solid Phase Extraction 2 (SPE2)

Die Fraktionen SC3F22, SC3F23, SC3F24 und SC3F25 (siehe Abbildung 32, S. 39) wurden vereinigt und mittels SPE2 weiter aufgetrennt. Mit der SPE2 sollten die gelborangen Banden bei R_f 0,60 und R_f 0,76 isoliert und sowohl Homoplantagin als auch 2"-O-Acetyl-homoplantagin abgetrennt werden.

Zur Konditionierung wurde das Sorbens fünf Mal mit dem Säulenvolumen an Methanol danach mit Wasser und abschließend mit 30% Methanol benetzt.

Die gesamte aufgetragene Menge betrug 76,6 mg. Die Elutionsgeschwindigkeit war 1 Tropfen/2 sek.

Die Elution wurde mit 30% Methanol gestartet und jede Fraktion mittels DC untersucht.

Abbildung 38: DC der Fraktionen von SPE2

DC der Fraktionen 1-12

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm

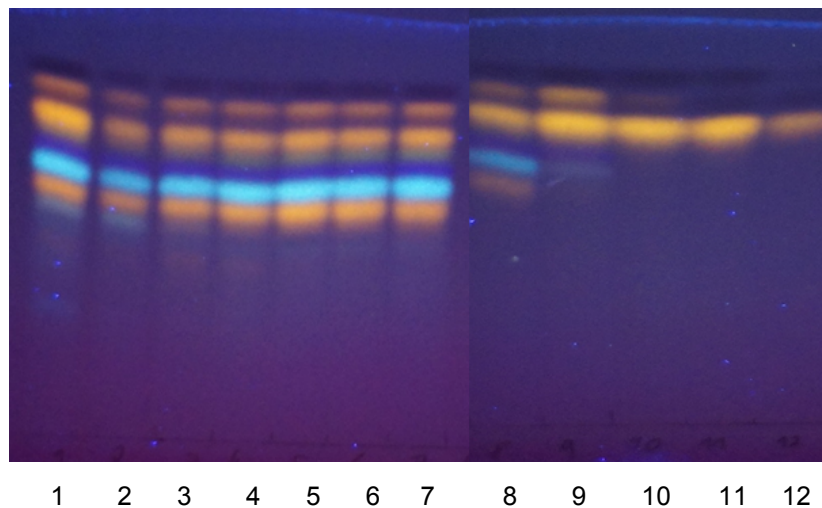
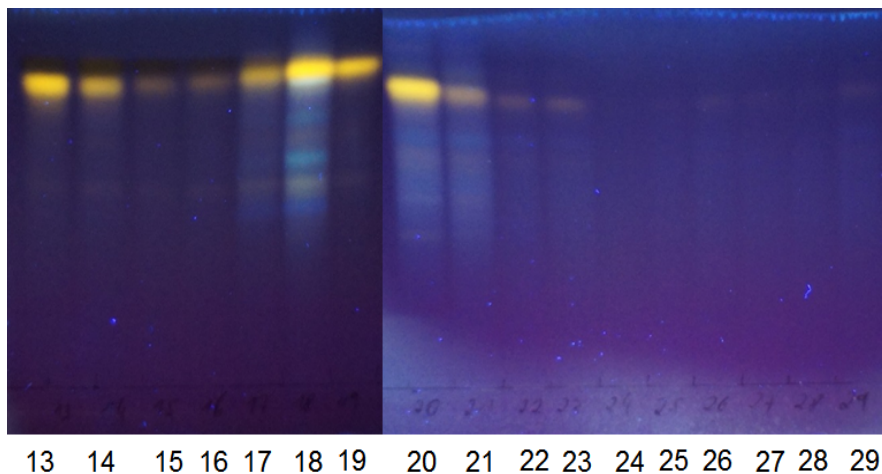


Abbildung 39: DC der Fraktionen von SPE2

DC der Fraktionen 13-29

DC-System (s. S. 6) Detektion: Naturstoffreagens A/PEG; UV 366nm



Die Konzentration des Fließmittels wurde wie folgt erhöht.

Tabelle 12: Gradientenelution der SPE2

Fraktionen	mobile Phase
1-7	30% MeOH
8-13	40% MeOH
15-16	40% MeOH
17-20	50% MeOH
21-25	70% MeOH
26-29	90% MeOH

Fraktionen mit ähnlichem Muster wurden vereinigt.

Tabelle 13: Sammelfraktionen der SPE2

Fraktionen	Ausbeute
1/2	38,2 mg
3-8	10,3 mg
9	5,0 mg
10/11	5,6 mg
12	1,4 mg
13-16	3,0 mg
17-21	2,6 mg
22/23	0,7 mg
24-29	1,7 mg

Die Fraktionen SPE2F1 und SPE2F2 enthielten den größten Teil der aufgetragenen und eluierten Fraktion.

In der Dünnschichtchromatographie war ersichtlich, dass bei R_f 0,60 und bei R_f 0,76 die gelborange fluoreszierenden Banden vorhanden waren. Diese Anreicherungen konnten auch in anderen Fraktionen der SPE2 festgestellt werden, die aber aufgrund der geringen Ausbeuten nicht weiter bearbeitet wurden.

Die DC zeigte, dass Homoplantaginin und sein acetyliertes Derivat immer noch in sehr hoher Konzentration in den Fraktionen der SPE2 enthalten waren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte aus Zeitgründen keine Abtrennung des Homoplantaginins und des 2"-O-Acetyl-homoplantaginins durchgeführt werden, wäre aber für nachfolgende Arbeiten von großem Interesse.

4 Diskussion

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, phenolische Inhaltsstoffe aus *Scrophularia lucida* L. mit Hilfe verschiedener Trennmethoden aufzutrennen und zu identifizieren.

Aus der Verteilung des methanolischen Extraktes, im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit, gingen 12,14g Ethylacetatextrakt hervor, die mittels Säulenchromatographie weiter aufgetrennt worden waren [5]. Sammelfractionen aus dieser Arbeit wurden in der vorliegenden Arbeit weiter fraktioniert. Es konnten 4 Inhaltsstoffe von *Scrophularia lucida* L. aufgeklärt werden.

In der Fraktion SC3F10 [5] wurde aufgrund der grün fluoreszierenden Bande und der Laufstrecke auf Kämpferol-3-rutinosid untersucht. Das Vorliegen dieses Flavonoides konnte durch einen DC-Vergleich und eine HPLC Analyse eindeutig bestätigt werden.

Rutin konnte durch einen DC und HPLC Vergleich in Fraktion SC3F10 [5] nachgewiesen werden.

Fraktion B wurde mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 aufgetrennt, wodurch das Flavonoid Luteolin-7-O-glucosid nach einem DC-Vergleich mit authentischer Substanz und einer HPLC-Untersuchung identifiziert werden konnte.

Die Auftrennung von SC3F6 [5] erfolgte durch eine Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20. In dieser Fraktion lag eine stark blau fluoreszierende Hauptkomponente vor. Nach der Untersuchung mittels HPLC und LC-MS stellte sich heraus, dass es sich hierbei um Verbascosid handelte.

SC1F9 [5] und Fraktion C wurden durch eine Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 aufgetrennt, um zwei gelb fluoreszierende Banden bei Rf 0,62 und Rf 0,75 identifizieren zu können. Es bestand der Verdacht auf das Vorliegen von Nepitrin.

Aus dieser SC ging die Fraktion SC3F15/16 hervor, in der die Hauptkomponenten Homoplantagin und 2"-O-Acetyl-homoplantagin abgetrennt werden sollten. Aufgrund der geringen Probenmenge wurde eine Solid Phase Extraction durchgeführt. Das HPLC-Chromatogramm zeigte, dass Homoplantagin und sein acetyliertes Derivat immer noch in hoher Konzentration in dieser Fraktion enthalten waren.

In weiterer Folge sind die Fraktionen SC3F22, SC3F23, SC3F24 und SC3F25 vereinigt und ein neuerlicher Versuch unternommen worden, mittels Solid Phase Extraction die zwei gelb fluoreszierenden Flavonoidkomponenten bei Rf 0,60 und bei Rf 0,76 zu isolieren. Unter den gewählten Bedingungen erfolgte die Elution des Gemisches sehr rasch. Es konnten aber keine weiteren Versuche durchgeführt werden, um diese beiden gelben Banden zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Vertreter der Gattung *Scrophularia*, wie die in dieser Diplomarbeit untersuchte *Scrophularia lucida* L., werden vor allem in der traditionellen türkischen Medizin bei Hautkrankheiten und Entzündungen angewendet.

Aufbauend auf den Ergebnissen einer vorangegangenen Diplomarbeit sollten in dieser Arbeit aus Fraktionen eines Ethylacetatextraktes, Substanzen identifiziert werden.

Zur Identifizierung der Inhaltsstoffe sind DC und HPLC Vergleiche durchgeführt worden.

Mittels dieser Techniken sind die Flavonoide Kämpferol-3-rutinosid, Rutin und Luteolin-7-O-glucosid erstmals in *Scrophularia lucida* L. nachgewiesen worden.

Zur weiteren Auftrennung der Fraktionen wurde die Säulenchromatographie und die Solid Phase Extraction eingesetzt.

Es konnte mittels LC-MS Verbascosid als weiterer Inhaltsstoff nachgewiesen werden.

Weitere Flavonoid-haltige Fraktionen enthielten große Mengen an Homoplantaginin. Trotz des Einsatzes verschiedener Trenntechniken war es nicht möglich, aus diesen Fraktionen Nebenkomponten des Flavonoidkomplexes für eine Strukturaufklärung rein darzustellen.

6 Summary

Representatives of the genus *Scrophularia* and among them *Scrophularia lucida* L. which was examined in this thesis, are used in traditional Turkish medicine for treatment of skindiseases and inflammation.

Based on the findings of a preceding diploma thesis, this work aimed to identify substances of fractions of an ethylacetate extract.

For the identification of these substances TLC as well as HPLC analyses were performed.

By means of these methods the flavonoids kaempferol-3-rutinosid, rutin and luteolin-7-O-glucosid were proven for the first time in *Scrophularia lucida* L.

For further fractionation, column chromatography and solid phase extraction (SPE) were employed.

Using LC-MS, verbascosid could be verified as an ingredient.

In other fractions containing flavonoids, high amounts of homoplantagin were detected. Despite the use of different methods for the separation, it was not possible to purify minor components of the flavonoid complex for structure elucidation.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Scrophularia lucida</i> L.	1
Abbildung 2: HPLC-Chromatogramm des Ethylacetatextraktes.....	3
Abbildung 3: DC der Sammelfractionen der SC1 [5]	4
Abbildung 4: DC der Sammelfractionen der SC2 [5]	4
Abbildung 5: DC der Sammelfractionen der SC3 [5]	5
Abbildung 6: Säulenchromatographie	7
Abbildung 7: DC-Vergleich von Fraktionen	12
Abbildung 8: DC-Vergleich von Fraktionen	13
Abbildung 9: DC-Vergleich von Fraktion SC3F10 [5] mit Kämpferol-3-rutinosid	15
Abbildung 10: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F10 [5] und Kämpferol-3-rutinosid.....	16
Abbildung 11: UV-Spektrum von Kämpferol-3-rutinosid bei 18,28 min	17
Abbildung 12: UV-Spektrum der Komponente von SC3F10 [5] bei 18,26 min	17
Abbildung 13: DC-Vergleich von Fraktion SC3F10 [5] mit Rutin	19
Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F10 [5] und Rutin	20
Abbildung 15: UV-Spektrum von Rutin bei 19,22 min	21
Abbildung 16: UV-Spektrum der Komponente von SC3F10 [5] bei 19,21 min.....	21
Abbildung 17: DC der Sammelfraktion von SC1	24
Abbildung 18: DC-Vergleich von Fraktion SC1F13 mit Luteolin-7-O-glucosid	25
Abbildung 19: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC1F13 und Luteolin-7-O-glucosid	26
Abbildung 20: UV-Spektrum der Komponente von SC1F13 bei 20,09 min	27
Abbildung 21: UV-Spektrum von Luteolin-7-O-glucosid bei 20,00 min	27
Abbildung 22: DC der Sammelfraktion von SC2	29
Abbildung 23: DC der Fraktion SC2F8	30
Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC2F8 und Verbascosid	31
Abbildung 25: UV-Spektrum von Verbascosid bei 17,16 min	31
Abbildung 26: UV-Spektrum der Komponente von SC2F8 bei 17,17 min	32

Abbildung 27: Strukturformel von Verbascosid	33
Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm der Fraktionen Alpha, Beta und Gamma.....	35
Abbildung 29: DC der Fraktion D-ÜS und Fraktion D-NS	36
Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm von Fraktion D-NS.....	36
Abbildung 31: DC der Sammelfraktionen von SC3	39
Abbildung 32: DC der Sammelfraktionen von SC3	39
Abbildung 33: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F15/16	40
Abbildung 34: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F17/18	41
Abbildung 35: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SC3F19	42
Abbildung 36: DC der Fraktionen von SPE1	43
Abbildung 37: HPLC-Chromatogramm von Fraktion SPE1F1/2 und Homoplaginin.....	45
Abbildung 38: DC der Fraktionen von SPE2.....	46
Abbildung 39: DC der Fraktionen von SPE2.....	47

8 Tabellenverzeichnis

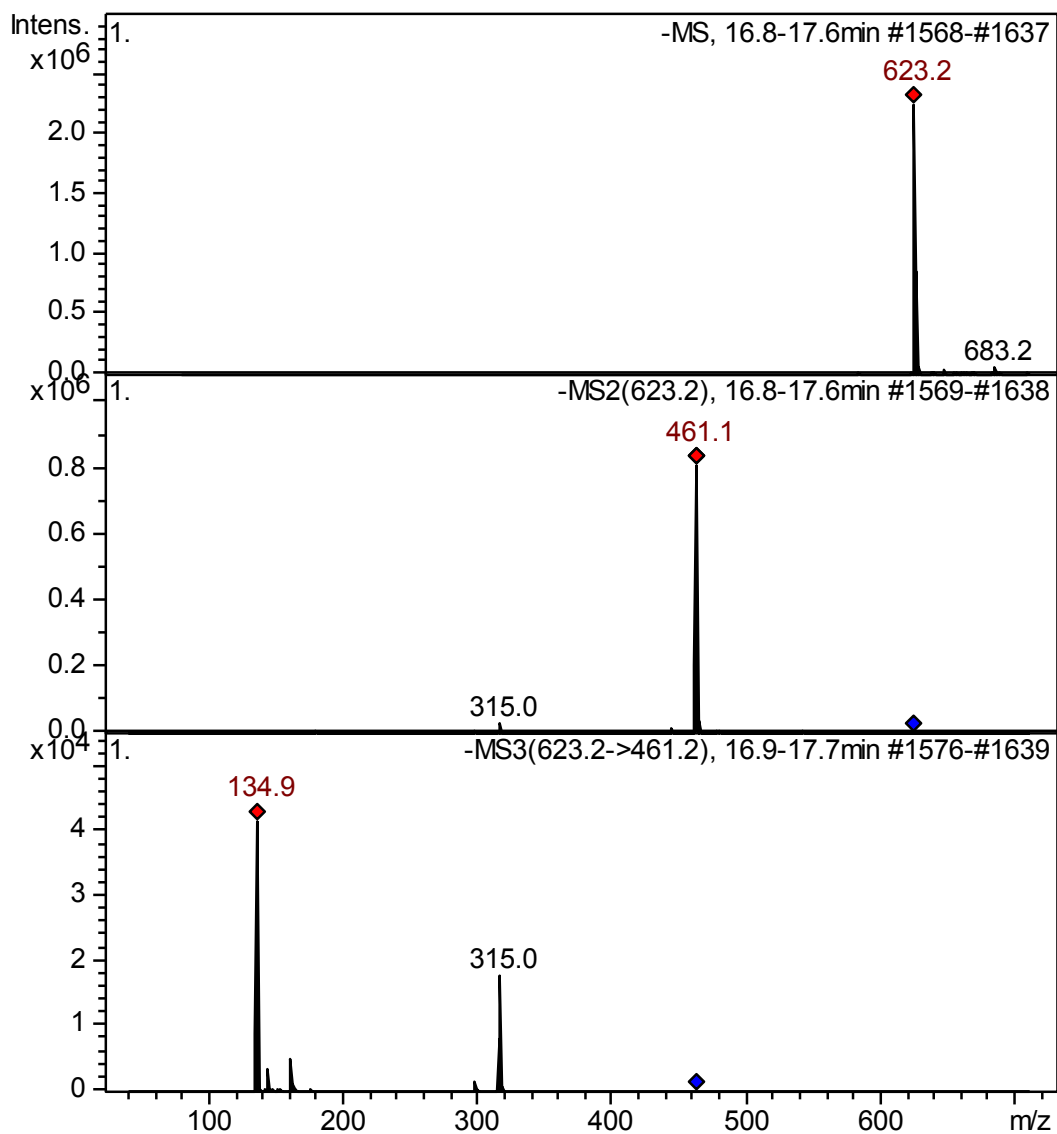
Tabelle 1: HPLC-Gerätekomponenten von Gerät 1	8
Tabelle 2: HPLC-Gerätekomponenten von Gerät 2	8
Tabelle 3: HPLC-Parameter	9
Tabelle 4: sonstige Geräte	11
Tabelle 5: Mengen der vereinigten Fraktionen A, B und C.....	14
Tabelle 6: Sammelfraktionen der SC1.....	23
Tabelle 7: Sammelfraktionen der SC2.....	28
Tabelle 8: Gewichte der Fraktionen Alpha, Beta und Gamma	34
Tabelle 9: Sammelfraktionen der SC3.....	37
Tabelle 10: Gradientenelution der SPE1	43
Tabelle 11: Sammelfraktionen der SPE1	44
Tabelle 12: Gradientenelution der SPE2	47
Tabelle 13: Sammelfraktionen der SPE2	48

9 Literaturverzeichnis

- [1] Makbul S., Coskuncelebi K., Türkmen Z., Beyazoglu O. (2006) Morphology and Anatomy of *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) taxa from NE Anatolia. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48, (1): 33-43
- [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] 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.
- [4] Schweighofer L. (2015) Aktivitätsgeleitete Untersuchungen von *Scrophularia lucida* L., Diplomarbeit, Universität Wien
- [5] Lewenhofer V. (2014) Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*, Diplomarbeit, Universität Wien

Anhang

Anhang 1: MS-Spektren im Negativionenmodus von Fraktion SC2F8



SC2F8, LC-MS-Spektren von oben nach unten: Negativionen-MS¹; MS² des [M-H]⁻ bei m/z 623,2; MS³ (m/z 623,2 $\rightarrow$ 461,1 $\rightarrow$)