



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Isolierung und Charakterisierung von
Sekundärstoffen verschiedener Arzneipflanzen“

verfasst von / submitted by

Michaela Koch

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

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2021 / Vienna 2021

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

UA 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departements für Pharmakognosie, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zur Durchführung meiner Diplomarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn bedanken, für ihre freundliche und allseits motivierende Betreuung während der gesamten Arbeit. Ich durfte sehr viel lernen, hatte die Möglichkeit selbständig zu arbeiten und Ideen einzubringen, die durch ihre fachliche Kompetenz gestützt wurden.

Mein Dank gilt Dr. Ammar Tahir, MSc und Mag. Christina Sykora für die Unterstützung bei den LC-MS und HRMS-Analysen.

Außerdem danke ich Mag. pharm. Eva Mittermair, Dr. Agnieszka Kowalska, Ruzica Colic und allen anderen Mitarbeitern des Departements für Pharmakognosie, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und für ein sehr angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir sowohl finanziell als auch in allen anderen Phasen meines Studiums bedingungslos und unterstützend zur Seite standen, sowie meinen beiden Geschwistern und meinem Freund, die mir immer wieder den Rücken gestärkt, mich ermutigt und mit ihrer unbegrenzten Unterstützung durch mein Studium begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung	3
3.1. <i>Dorema ammoniacum</i> D. Don	3
3.2. <i>Scrophularia lucida</i> L.....	3
3.3. <i>Combretum zenkeri</i> Engl. & Diels	5
4. Zielsetzung.....	6
5. Ergebnisse	7
5.1. <i>Dorema ammoniacum</i> D.Don	7
5.1.1. DC-Überprüfung vorhandener Fraktionen	7
5.1.2. Fraktionierung mittels Flash Chromatography	10
5.1.2.1. Auftrennung von Fraktion R1 (Flash Chromatography FC 1).....	10
5.1.2.2. Auftrennung der Fraktionen N8 – N10 (Flash Chromatography FC 2)..	11
5.1.2.3. Strukturaufklärung von Substanz MK12	13
5.1.2.4. Auftrennung der Fraktion N3 (Flash Chromatography FC 3)	14
5.2. <i>Scrophularia lucida</i> L.....	16
5.2.1. DC-Überprüfung vorhandener Fraktionen	16
5.2.1.1. Untersuchung von Fraktionen aus der Ethylacetatfraktion.....	16
5.2.1.2. Untersuchung von Fraktionen aus der Chloroformfraktion.....	19
5.2.2. Vergleiche mit Referenzsubstanzen	20
5.2.3. Fraktionierung mittels Flash Chromatography	25
5.2.3.1. Auftrennung der Fraktion SC2/F18+19 (Flash Chromatography FC 4)..	25
5.2.3.2. Auftrennung der Fraktion SC1/F13 (Flash Chromatography FC 5) ..	27
5.2.4. Untersuchung verschiedener Fraktionen mittels HPLC.....	28
5.2.4.1. Analyse von Fraktion SPE/SF3.....	28
5.2.4.2. Analyse von Fraktion SC3/F11	30

5.2.4.3. Analyse der Sammelfractionen SF7 – SF9 der FC 5	31
5.3. <i>Combretum zenkeri</i> Engl. & Diels.....	34
5.3.1. DC-Überprüfung vorhandener Fraktionen.....	34
5.3.2. Fraktionierung mittels Säulenchromatographie	38
5.3.2.1. Auftrennung der Fraktion Fc7 _{NS} (Säulenchromatographie SC 1)	38
5.3.3. Strukturaufklärung von Substanz MIK1	41
6. Diskussion und Schlussfolgerung.....	45
7. Material und Methoden	47
7.1. Untersuchungsmaterial	47
7.2. Methoden	47
7.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)	47
7.2.2. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	48
7.2.3. Flash Chromatography (FC)	49
7.2.4. Säulenchromatographie (SC).....	52
7.2.5. Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS).....	53
7.2.6. Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)	53
7.2.7. NMR-Spektroskopie	54
8. Literaturverzeichnis	55
Anhang.....	i

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acetic Acid/Essigsäure
AAS	Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagens
AChE	Acetylcholinesterase
BChE	Butyrylcholinesterase
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EtOAc	Ethylacetat
FA	Formic Acid/Ameisensäure
FC	Flash Chromatography
Fr	Fraktion
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
MeOH	Methanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NST A	Naturstoffreagens A
PEG	Polyethylenglykol 400
TIC	Total Ion Current
TLC	Thin Layer Chromatography

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Dorema ammoniacum</i> D.Don.....	3
Abbildung 2: <i>Scrophularia lucida</i> L.....	4
Abbildung 3: <i>Combretum zenkeri</i> Engl. & Diels.....	5
Abbildung 4: DC verschiedener Fraktionen aus <i>D. ammoniacum</i>	7
Abbildung 5: DC der Fraktionen JRL3, R5 und S3	8
Abbildung 6: DC-Vergleich von Fraktion R1 mit Sterolen	9
Abbildung 7: DC von Fraktionen aus FC 1.....	10
Abbildung 8: DC der Sammelfraktionen von FC 2.....	11
Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm von Sammelfraktion 2/FC 2 bei 315 nm;	12
Abbildung 10: UV-Spektrum bei 35,88 min.....	12
Abbildung 11: UV-Spektrum bei 38,34 min.....	12
Abbildung 12: UV-Spektrum bei 39,37 min.....	13
Abbildung 13: HRMS-HPLC-Chromatogramm von Substanz MK12;.....	14
Abbildung 14: DC der Sammelfraktion 1 aus FC 3.....	15
Abbildung 15: DC-Kontrolle verschiedener Ethylacetatfraktionen	16
Abbildung 16: DC-Kontrolle weiterer Ethylacetatfraktionen.....	18
Abbildung 17: DC-Kontrolle verschiedener Chloroformfraktionen	19
Abbildung 18: DC-Kontrolle weiterer Chloroformfraktionen.....	20
Abbildung 19: DC-Vergleich von Fraktion SPE/SF3-5 mit Nepitrin.....	21
Abbildung 20: DC-Vergleich von Fraktion SPE/SF7+9+11 mit Nepetin	22
Abbildung 21: DC-Vergleich von Fraktionen mit Kämpferol-3-O-rutinosid	22
Abbildung 22: DC-Vergleich der Fraktionen SC3/F12 und SC3/F14 mit Nepitrin	23
Abbildung 23: DC-Vergleich von Fraktion SC2/SF8 mit Verbascosid	24
Abbildung 24: DC-Vergleich verschiedener Fraktionen mit Kaffeesäure und Quercetin	24
Abbildung 25: DC-Vergleich von Fraktion SC2/F26 mit Naringenin-7-O-glucosid	25
Abbildung 26: DC der Sammelfraktionen der FC 4	26
Abbildung 27: DC der Sammelfraktionen der FC 5	27
Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm von SPE/SF3-5 bei 254 nm;	29
Abbildung 29: UV-Spektrum bei 37,23 min.....	29
Abbildung 30: UV-Spektrum bei 42,31 min.....	29
Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm von SC3/F11 bei 254 nm;.....	30
Abbildung 32: UV-Spektrum bei 37,75 min.....	30
Abbildung 33: UV-Spektrum bei 42,02 min.....	30
Abbildung 34: HPLC-Chromatogramm von FC5/SF7 bei 315 nm;	31
Abbildung 35: UV-Spektrum bei 30,81 min.....	32

Abbildung 36: HPLC-Chromatogramm von FC5/SF8 bei 315 nm;.....	32
Abbildung 37: UV-Spektrum bei 30,81 min	33
Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm von FC5/SF9 bei 315 nm;.....	33
Abbildung 39: UV-Spektrum bei 30,81 min	34
Abbildung 40: DC der Fraktionen Fc7 _{ÜS} und Fc7 _{NS}	35
Abbildung 41: DC-Vergleich von Substanz CG1, CG2 und β -Sitosterol mit Fc7 _{ÜS} und Fc7 _{NS}	35
Abbildung 42: DC-Vergleich verschiedener Fraktionen von <i>C.zenkeri</i> mit Sterolen	36
Abbildung 43: DC-Vergleich von Fc7 _{NS} und &Fc7 _{ÜS} mit Madecassinsäure.....	37
Abbildung 44: DC-Vergleich von Fc7 _{NS} und Fc7 _{ÜS} mit Substanz CZ-B und CZ-C.....	37
Abbildung 45: DC 1 der Fraktionen von SC 1.....	38
Abbildung 46: DC 2 der Fraktionen von SC 1.....	39
Abbildung 47: DC der SF3 aus SC 1	40
Abbildung 48: DC der SF4 aus SC 1	41
Abbildung 49: Daucosterol (β -Sitosterol-3-O-glucosid).....	42
Abbildung 50: 24(R)-Ethylcholest-6-en-5 α -ol-3-O- β -D-glucopyranosid.....	44
Abbildung 51: Säulenchromatographie - Parameter	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sammelfractionen der FC 2.....	11
Tabelle 2: Sammelfractionen der FC 4.....	26
Tabelle 3: Sammelfractionen der FC 5.....	28
Tabelle 4: Sammelfractionen der SC 1.....	39
Tabelle 5: ¹ H-NMR- und ¹³ C-NMR- Daten von Daucosterol in MeOH-d ₄	43
Tabelle 6: ¹ H-NMR- und ¹³ C-NMR- Daten von 24(R)-Ethylcholest-6-en-5α-ol-3-O-β-D-glucopyranosid in MeOH-d ₄	44
Tabelle 7: HPLC-Parameter	48
Tabelle 8: Säulen und Fließmittel HPLC.....	48
Tabelle 9: Gradienten HPLC.....	49
Tabelle 10: Flash Chromatography 1 - Parameter	49
Tabelle 11: Flash Chromatography 2 - Parameter	50
Tabelle 12: Flash Chromatography 3 - Parameter	50
Tabelle 13: Flash Chromatography 4 - Parameter	51
Tabelle 14: Flash Chromatography 5 - Parameter	51
Tabelle 15: Säulenchromatographie - Fließmittelgradient.....	52
Tabelle 16: LC-MS Parameter	53
Tabelle 17: HRMS-Parameter.....	53

1. Zusammenfassung

Dorema ammoniacum D. Don, *Scrophularia lucida* L. und *Combretum zenkeri* Engl. & Diels sind Arzneipflanzen, die aufgrund ihrer entzündungshemmenden, antibakteriellen oder antimykotischen Eigenschaften Anwendung in der traditionellen Medizin finden. Es konnten schon einige aktive Verbindungen der Pflanzen wie Dshamirone (*D. ammoniacum*), Hispidulin (*S. lucida*), sowie Urolsäure und Oleanolsäure (*C. zenkeri*) isoliert werden.

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, weitere Sekundärstoffe der drei Arzneipflanzen zu charakterisieren und Reinsubstanzen zu isolieren.

Verschiedene Fraktionen aus vorangegangenen Diplomarbeiten wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf ihre Zusammensetzung sowie das Vorliegen bekannter Substanzen überprüft und deren Reinheit und die prozentuelle Zusammensetzung verschiedener Fraktionen mittels HPLC ermittelt.

In Ethylacetatfraktionen aus einem methanolischen Extrakt von *S. lucida* konnten die Flavonoide Nepitrin, Homoplagagin und Kämpferol-3-O-rutinosid und die Phenolcarbonsäure Kaffeesäure nachgewiesen werden. Das Vorliegen von Quercetin, Naringenin-7-O-glucosid und Verbascosid konnte ausgeschlossen werden.

Eine LC-MS-Analyse ergab Hinweise auf das Vorliegen einer Verbascosid-ähnlichen Verbindung.

Weiters konnte Scrovalentinosid, ein seltenes Iridoidglykosid, mit Hilfe der Flash Chromatography aus der Chloroformfraktion aus einem methanolischen Extrakt von *S. lucida* weitgehend aufgereinigt werden.

Mittels Säulenchromatographie konnte Substanz MIK1 aus einer Chloroformfraktion aus dem methanolischen Extrakt von *C. zenkeri* isoliert werden, die zur Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie untersucht wurde. Die Substanz erwies sich als eine Mischung aus zwei Komponenten, Daucosterol und 24(R)-Ethylcholest-6-en-5 α -ol-3-O- β -D-glucopyranosid, im Verhältnis 1 : 0,35. Letztere Substanz wurde im Zuge dieser Diplomarbeit erstmals in der Familie der Combretaceae nachgewiesen.

2. Abstract

Dorema ammoniacum D. Don, *Scrophularia lucida* L. and *Combretum zenkeri* Engl. & Diels are medicinal plants, which are used in traditional medicine due to their antiinflammatory, antibacterial or antimycotic properties. Some of their active compounds, such as dshamirone (*D. ammoniacum*), hispidulin (*S. lucida*), ursolic acid und oleanolic acid (*C. zenkeri*), have already been isolated.

The aim of this diploma thesis was to characterise further secondary metabolites from these three medicinal plants and to isolate pure compounds.

The composition of fractions from previous work was investigated by TLC and components were identified by comparison with authentic substances. By HPLC, their purity and amounts in mixtures were determined.

The flavonoids nepitrin, homoplantagin and kaempferol-3-O-rutinoside as well as caffeic acid were detected in ethylacetate fractions of a methanolic extract of *S. lucida*. The presence of quercetin, naringenin-7-O-glucoside and verbascoside could be excluded. By LC-MS analysis, the presence of a verbascoside-like compound was indicated. Furthermore, the rare iridoide glycoside scrovalentinoside, was purified from a chloroform fraction by flash chromatography.

Column chromatography of a chloroform fraction from a methanolic extract of *C. zenkeri* lead to the isolation of compound MIK1, which was further investigated by NMR-spectroscopy. The analysis showed that MIK1 was a mixture of two compounds, namely daucosterol and 24(R)-ethylcholest-6-ene-5 α -ol-3-O- β -D-glucopyranoside, at a ratio of 1 to 0,35. The latter compound was proven for the first time in the Combretaceae family.

3. Einleitung

3.1. *Dorema ammoniacum* D. Don

Dorema ammoniacum D. Don gehört zur Familie der Apiaceae und kommt vor allem in Nord-Indien, in Afghanistan und im Iran vor (Adhami et al., 2013). Die traditionelle Verwendung des Harzes dieser Pflanze in der iranischen Medizin geht in der Geschichte weit zurück und es wird auch noch heute zur Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt. Dazu zählen unter anderem Cystitis, Koliken sowie der Einsatz als Expektorans und als Antikonvulsivum (Buso et al., 2020).

Abbildung 1: *Dorema ammoniacum* D. Don¹



Das verwendete Gummiharz hat in Studien eine hemmende Wirkung auf das Enzym AChE gezeigt (Adhami et al., 2013). Eine der Hauptstrategien in der symptomatischen Behandlung von Alzheimer ist die Hemmung der AChE (Dey. et al., 2017). Eine Verbindung in *D. ammoniacum*, die für diese Hemmung mitverantwortlich sein könnte, wurde als Dshamirone identifiziert (Adhami et al. 2013).

3.2. *Scrophularia lucida* L.

Scrophularia lucida L. gehört zur Familie der Scrophulariaceae und ist weit verbreitet, unter anderem in Südwest-Asien und im Mittelmeerraum (Zengin et al., 2018; Lewenhofer et al., 2018).

Verschiedene Arten der Gattung *Scrophularia* werden schon lange in der Volksmedizin im Mittelmeerraum unter anderem zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen, Hauterkrankungen wie Psoriasis, Ekzeme, Pruritus oder zur Wundheilung eingesetzt (Lewenhofer et al., 2018; Giessrigl et al., 2012). In verschiedenen prä-klinischen Studien

¹ Bild übernommen aus Zandpour et al., 2016

konnten antibakterielle, antimykotische, antitumorale, kardioprotektive und analgetische Wirkungen gezeigt werden (Zengin et al., 2018).

Abbildung 2: *Scrophularia lucida* L.²



In einer Studie, in der fünf verschiedene *Scrophularia*-Arten auf ihre antiproliferative Aktivität getestet wurden, konnte gezeigt werden, dass Extrakte aus *S. lucida* die Metastasierung von MCF-7 Krebszellen unterbinden können, indem die sogenannte „gap formation“ in Schichten von endothelialen Lymphzellen inhibiert wurde. Diese Hemmung konnte mittels CCID-Assay (Circular Chemorepellent-Induced Defects) nachgewiesen werden (Giessrigl et al., 2012).

In einer weiteren Untersuchung wurde Hispidulin als Hauptkomponente in einer wirksamen Fraktion des aktiven methanolischen Extrakt identifiziert (Lewenhofer et al., 2018).

² Quelle: http://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/cdm_dataportal/media/4ac2f582-c393-45b7-848f-9a3cb26fd0f5 (letzter Zugriff 16.06.2021)

Desweiteren konnte in einer Studie die hemmende Wirkung eines Extraktes aus *S.lucida* auf AChE und BChE, die eine bedeutende Rolle in der Behandlung von Alzheimer spielen, beobachtet werden. In derselben Arbeit wurde eine Reduktion der α -Amylase und α -Glucosidase, die bei der Behandlung von Diabetes maßgeblich sind, ebenso wie eine hemmende Wirkung auf Tyrosinase, welche bei Störungen des Pigmentsystems wichtig ist, nachgewiesen (Zengin et al., 2018).

3.3. *Combretum zenkeri* Engl. & Diels

Combretum zenkeri Engl. & Diels ist eine Kletterpflanze, die zur Familie der Combretaceae gehört und weit verbreitet in Afrika von Guinea über Nigeria bis nach Kamerun ist (Ujowundu et al., 2010).

Vertreter der Familie der Combretaceae zeigen ein weites Spektrum an bioaktiven Verbindungen und werden in der Volksmedizin zur Behandlung verschiedener Krankheiten wie Hepatitis, respiratorischen Infektionen, entzündlichen Erkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) oder Malaria angewandt (Wande, Babatunde, 2017; Ujowundu, et al., 2015; Wande et al., 2020).

Abbildung 3: *Combretum zenkeri* Engl. & Diels³



In einer Studie, in der zehn Arten aus der Familie der Combretaceae auf ihre Antimalaria-Aktivität getestet wurden, zeigte unter anderem das methanolische Extrakt aus Blättern von *C. zenkeri* eine signifikante Aktivität verglichen mit dem Standard-Antimalariamittel Chloroquin (Wande, Babatunde, 2017).

³ http://www.africanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=78&id=2654#image=8502
(letzter Zugriff 12.03.2020)

In einer weiterführenden, aktivitätsgeleiteten Untersuchung von *C. zenkeri* konnte eine Mischung der Triterpene Ursolsäure und Oleanolsäure nachgewiesen werden (Wande et al., 2019).

4. Zielsetzung

Arzneipflanzen wurden bereits sehr früh in der Menschheitsgeschichte in der traditionellen Medizin zur Behandlung verschiedenster Krankheiten oder Symptome eingesetzt. Ein wichtiges Ziel der Ethnopharmakologie ist es, verbesserte Arzneimittel aus den traditionell angewandten Pflanzen zu entwickeln bzw. die Plausibilität der traditionellen Anwendungen wissenschaftlich zu belegen (Heinrich, Gibbons, 2001).

Zu diesem Zweck ist es unverzichtbar, das Inhaltsstoffspektrum einer Arzneipflanze und deren wirksame Komponenten zu charakterisieren. Dazu sind phytochemische Untersuchungen der Pflanzenextrakte notwendig.

In vorangegangenen Arbeiten konnten bereits einige bioaktive Inhaltsstoffe von *D. ammoniacum*, *S. lucida* und *C. zenkeri* identifiziert werden (Adhami et al., 2013; Lewenhofer et al., 2018; Wande et al., 2019).

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, in zur Verfügung stehenden Fraktionen aus Extrakten der drei Arzneipflanzen Sekundärstoffe zu charakterisieren und weitere Inhaltsstoffe zu identifizieren sowie Reinsubstanzen zu isolieren, die unter anderem für Screenings verwendet werden können.

5. Ergebnisse

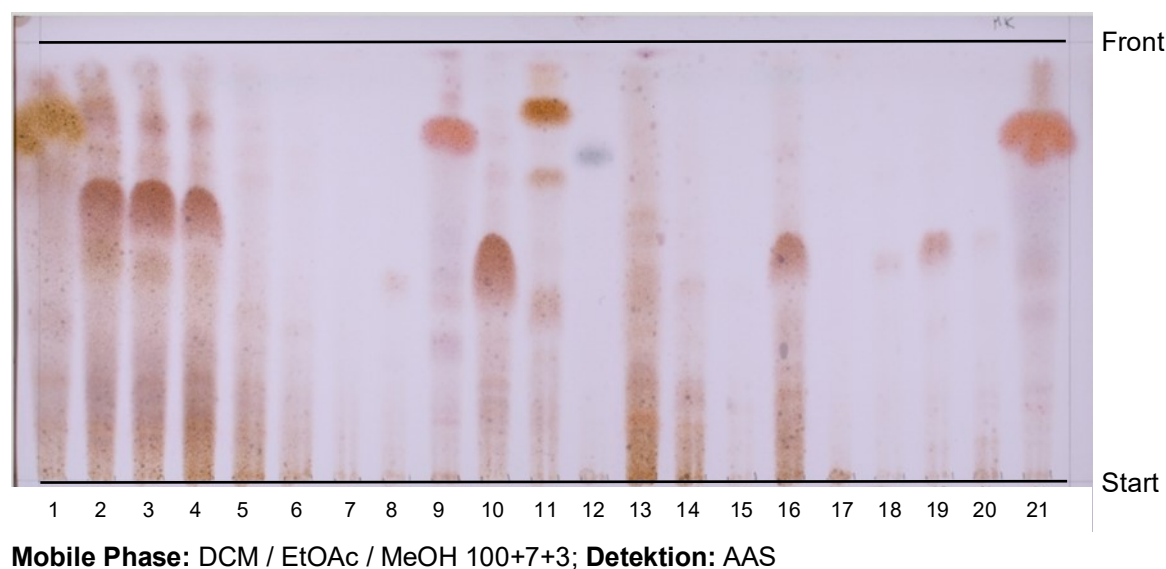
5.1. *Dorema ammoniacum* D.Don

Es standen Fraktionen aus einer vorangegangenen Diplomarbeit zur Verfügung, die im Rahmen einer aktivitätsgeleiteten Untersuchung zur Hemmung von Acetylcholinesterase durch Extrakte aus *D. ammoniacum* hergestellt worden waren (Lutz, 2013).

5.1.1. DC-Überprüfung vorhandener Fraktionen

Diese Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht, um festzustellen, ob daraus weitere Sekundärstoffe isoliert werden könnten (s. Abbildung 4).

Abbildung 4: DC verschiedener Fraktionen aus *D. ammoniacum*

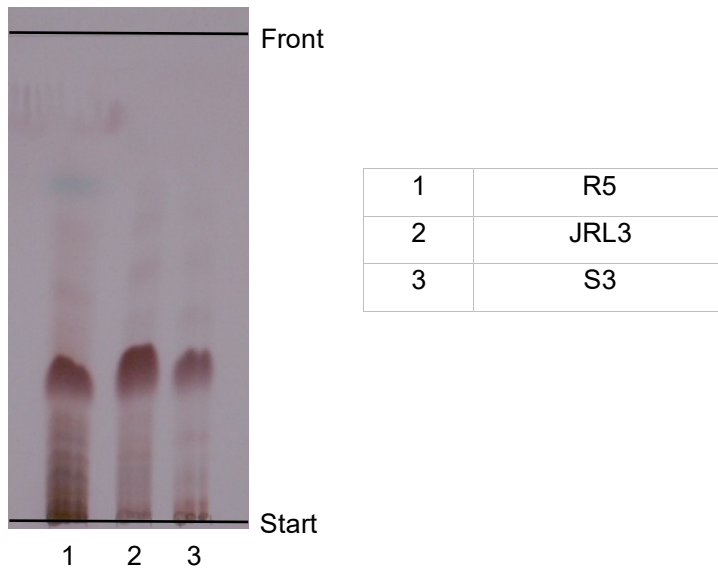


	Fraktion	Menge		Fraktion	Menge		Fraktion	Menge	Quelle
1	N3	35,2 mg	8	Q5	15,2 mg	15	R4	1,2 mg	Lutz, 2013
2	N8	9,8 mg	9	JRL1	5,0 mg	16	R5	10,4 mg	
3	N9	8,9 mg	10	JRL3	4,3 mg	17	R6	< 50,0 mg	
4	N10	7,9 mg	11	JRL4	3,5 mg	18	S1	< 5,0 mg	
5	P8	16,2 mg	12	R1	100,0 mg	19	S3	< 50,0 mg	
6	JRL2	0,2 mg	13	R2	< 50,0 mg	20	S4	< 5,0 mg	
7	Q2	36,3 mg	14	R3	< 50,0 mg	21	80%	6,8 mg	

Die Bande der Fraktion 80% wies das gleiche Muster an Inhaltsstoffen auf wie Substanz JRL1 und konnte daher als Dshamirone identifiziert werden, da die Struktur von JRL1 bereits als Dshamirone aufgeklärt worden war (Lutz, 2013).

Die Fraktionen JRL3, R5 und S3 wurden in einem weiteren DC-System untersucht (s. Abbildung 5).

Abbildung 5: DC der Fraktionen JRL3, R5 und S3



Mobile Phase: DCM / EtOAc / MeOH 100+6+2, **Detektion:** AAS

Die drei Fraktionen wiesen die gleiche Hauptkomponente auf.

Die Struktur von JRL3 konnte in der Diplomarbeit Lutz, 2013, nicht aufgeklärt werden, da sich Nebenprodukte nicht hatten abtrennen lassen. Auch im Zuge der vorliegenden Arbeit waren aufgrund der geringen Menge der Fraktionen, keine weitere Trennungsschritte zur Reindarstellung möglich.

Fraktion R1 wies im verwendeten DC-System eine bläuliche Bande im oberen Rf-Bereich auf, wie sie typisch für Sterole ist. Daher wurde diese Fraktion mit einigen Sterolen verglichen (s. Abbildung 6).

Abbildung 6: DC-Vergleich von Fraktion R1 mit Sterolen



Mobile Phase: DCM / EtOAc / MeOH 100+6+2, **Detektion:** AAS

Anhand der DC konnten Fucosterol, Stigmasterol und β -Sitosterol ausgeschlossen werden. Da in Fraktion R1 relativ große Anteile polarer Substanzen in der Startzone detektiert wurden, wurde für die weitere Aufreinigung die Flash Chromatography gewählt, um die bläuliche Hauptkomponente für die zweifelsfreie Charakterisierung zu isolieren (s. 5.1.2.1, S. 10).

Die Fraktionen N8-N10 (s. Abbildung 4, S. 7) wiesen ein übereinstimmendes Muster an Inhaltsstoffen auf und konnten daher zu einer Sammelfraktion vereinigt werden. Dadurch ergab sich eine ausreichende Menge von 36 mg, um eine weitere Auftrennung durchzuführen (s. 5.1.2.2., S. 11).

Fraktion N3 (35 mg) (s. Abbildung 4, S. 7) wies eine deutliche Hauptkomponente mit Rf 0,8 auf, die mittels Flash Chromatography rein dargestellt werden sollte (s. 5.1.2.4., S. 14).

Die anderen Fraktionen wurden aufgrund des Fehlens von eindeutigen Hauptkomponenten bzw. der geringen Mengen nicht weiter bearbeitet.

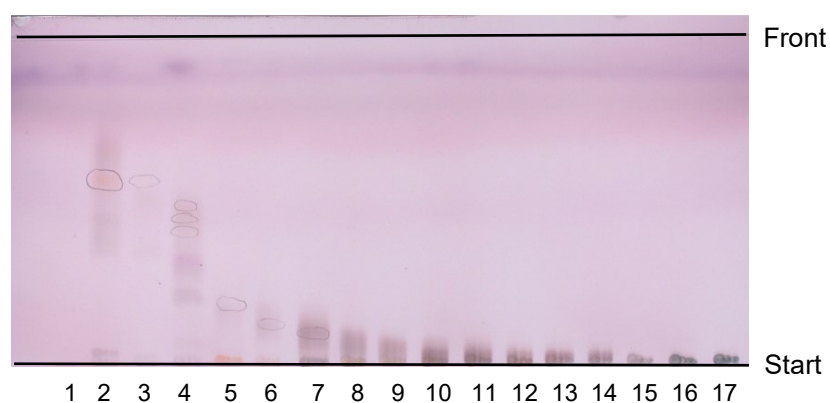
5.1.2. Fraktionierung mittels Flash Chromatography⁴

5.1.2.1. Auftrennung von Fraktion R1 (Flash Chromatography FC 1)

Die Auftrennung von Fraktion R1 (s. Abbildung 6, S. 9) diente dem Ziel, die bläuliche Hauptkomponente bei R_f 0,67 zu isolieren, um die Substanz charakterisieren zu können. Zur Fraktionierung mittels Flash Chromatography wurde ein Dryload mit 100 mg Substanz hergestellt und in FC 1 aufgetrennt. Die Herstellung des Dryloads und die verwendeten Parameter sind Kapitel 7.2.3. (S. 49) zu entnehmen.

Insgesamt wurden 100 Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Die Fraktionen, in denen mittels ELSD und DAD Substanzen detektiert wurden, wurden zusätzlich dünnschichtchromatographisch überprüft (s. Abbildung 7).

Abbildung 7: DC von Fraktionen aus FC 1



Mobile Phase: DCM / EtOAc / MeOH 100+6+2, **Detektion:** AAS

	Fraktion		Fraktion		Fraktion
1	12	7	30	13	36
2	13	8	31	14	37
3	14	9	32	15	47
4	15	10	33	16	48
5	25	11	34	17	49
6	29	12	35		

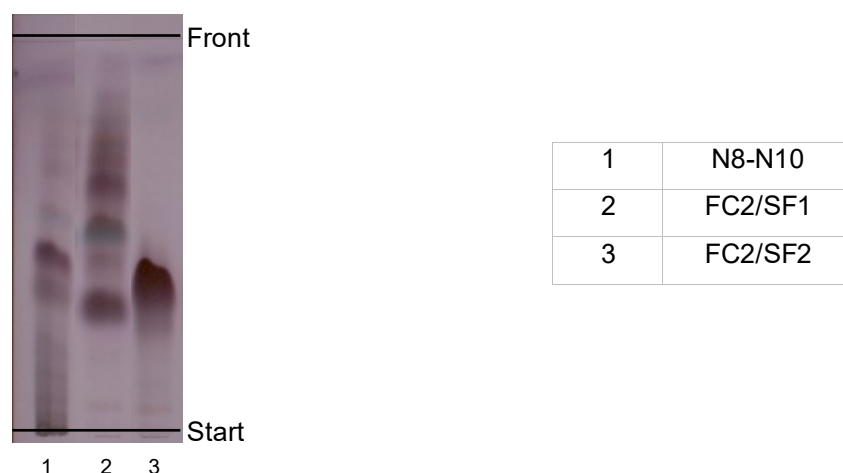
Wie aus der DC zu entnehmen ist, war es nicht möglich die bläuliche Bande zu isolieren, da es während der Auftrennung vermutlich zur Zersetzung der Komponente gekommen war.

⁴ Die Chromatogramme der FC-Analysen befinden sich im Anhang.

5.1.2.2. Auftrennung der Fraktionen N8 – N10 (Flash Chromatography FC 2)

Für die Auftrennung der Inhaltsstoffe aus Sammelfraktion N8-N10 (s. Abbildung 4, S. 7), wurde ein Dryload mit 36 mg Substanz hergestellt, auf Kieselgel aufgebracht und in FC 2 aufgetrennt. Die genauen Parameter der FC 2 sind Kapitel 7.2.3. (S. 49) zu entnehmen. Insgesamt wurden 120 Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Die Fraktionen, in denen mittels ELSD und DAD Substanzen detektiert wurden, wurden zusätzlich dünnschichtchromatographisch überprüft und Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt (s. Abbildung 8).

Abbildung 8: DC der Sammelfraktionen von FC 2



Mobile Phase: DCM / EtOAc / MeOH 100+7+3, **Detektion:** AAS

Tabelle 1: Sammelfraktionen der FC 2

Sammelfraktion	Fraktionen	Ausbeute
1	16-18	2,1 mg
2	19-24	4,9 mg

Die DC zeigte nach Besprühen mit AAS, dass es sich bei Sammelfraktion 1 um eine komplexe Mischung handelte. Da von dieser Fraktion nur eine sehr geringe Menge vorhanden war, konnte diese nicht weiter bearbeitet werden.

In Sammelfraktion 2 war eine Hauptkomponente bei R_f 0,4 angereichert, daher wurde diese Fraktion mittels HPLC untersucht. Die genauen Parameter für die HPLC-Analyse sind in Kapitel 7.2.2. (S. 48) angeführt, wobei in dieser Analyse eine Flussrate von 0,5 ml/min gewählt wurde. Die Analyse wurde mit Säule 2, Fließmittelsystem 2 und Gradient 3 (s. Tabelle 8, S. 48 und Tabelle 9, S. 49) durchgeführt.

Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm von Sammelfraktion 2/FC 2 bei 315 nm;
Bedingungen s. Kapitel 7.2.2, S. 48 ff

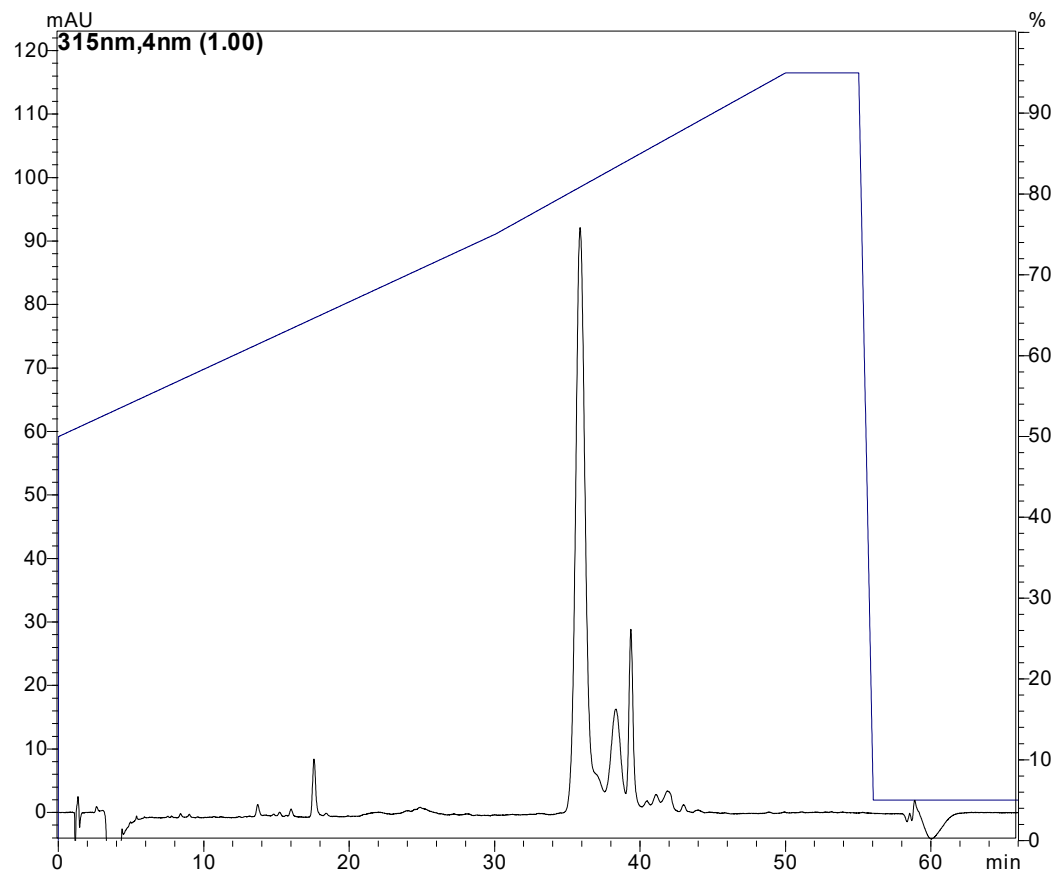


Abbildung 10: UV-Spektrum bei 35,88 min

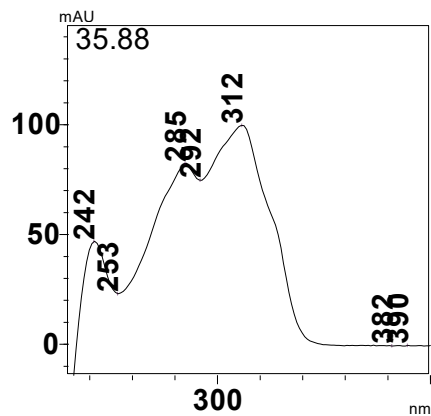


Abbildung 11: UV-Spektrum bei 38,34 min

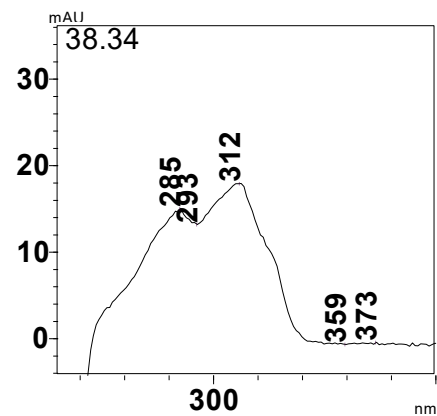
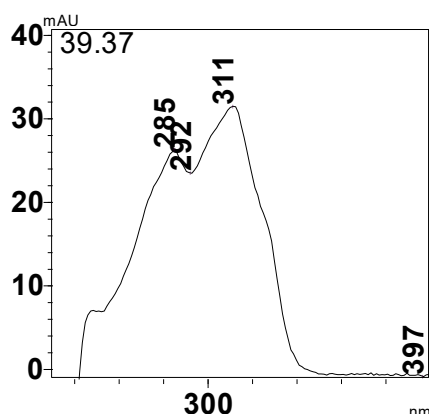


Abbildung 12: UV-Spektrum bei 39,37 min



Die HPLC-Analyse ergab einen Hauptpeak bei 35,88 min und zwei weitere Nebenkomponten mit geringfügig höherer Retentionszeit. Aus den UV-Spektren (s. Abbildungen 10 – 12) folgte die Annahme, dass es sich um nah verwandte Substanzen handeln könnte. Daher wurde die Fraktion mittels LC-MS weiter analysiert (s. 5.1.2.3.). Sammelfraktion 2 von FC 2 wurde als Substanz MK12 bezeichnet.

5.1.2.3. Strukturaufklärung von Substanz MK12 ⁵

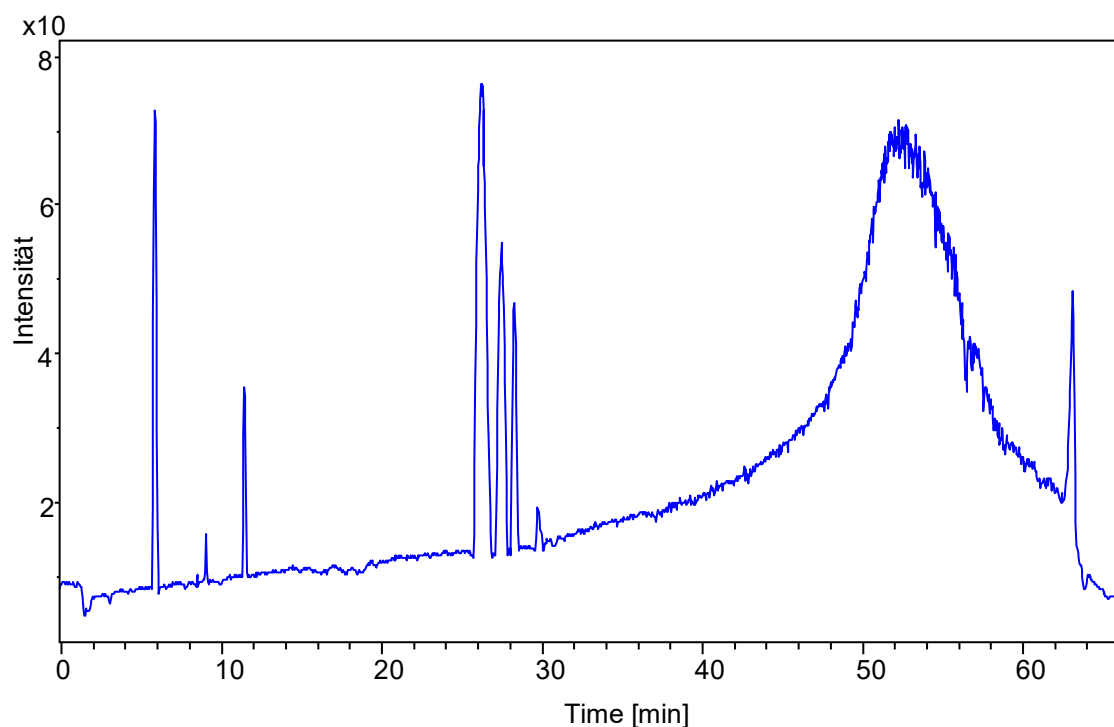
Da die drei Peaks bei der HPLC-Analyse ähnliche UV-Spektren aufwiesen, sollte mittels LC-MS das Molekulargewicht der drei Substanzen ermittelt werden. Dabei wurden für die Flüssigchromatographie die Parameter der HPLC-Analyse verwendet (s. Kapitel 7.2.2., S. 48).

Bei der MS-Analyse von MK12 wurde für alle drei Komponenten ein Molekulargewicht von 808 g/mol ermittelt. Weder das Positivionen-MS noch das Negativionen-MS zeigten eine Fragmentierung.

Zur eindeutigen Ermittlung der Summenformel der Verbindungen wurde die hochauflösende Massenspektrometrie herangezogen. Um eine bessere Trennleistung zu erzielen, wurde die stationäre Phase geändert und die Analysenparameter angepasst (s. 7.2.6., S. 53).

⁵ Die Spektren der LC-MS- und HRMS- Analysen für MK12 befinden sich im Anhang.

Abbildung 13: HRMS-HPLC-Chromatogramm von Substanz MK12;
Bedingungen s. Kapitel 7.2.6, S. 53



Mit den optimierten Bedingungen für die LC-HRMS konnte eine Basislinientrennung der drei Peaks bei Rt 26,3 min, 27,5 min und 28,3 min erzielt werden (s. Abbildung 13). Im Positionen-MS wurde das Molekulargewicht von 808 g/mol bestätigt. Außerdem konnten bei der Analyse auch zwei weitere Hauptkomponenten bei Rt 5,9 min und 11,5 min (s. Abbildung 13) in Substanz MK12 detektiert werden.

Substanz MK12 war somit ein Gemisch aus fünf Hauptkomponenten, wovon drei das gleiche Molekulargewicht aufwiesen. Das wies darauf hin, dass es sich um sehr ähnliche Substanzen mit gleicher Grundstruktur handelt, die sich offensichtlich in der Position ihrer funktionellen Gruppen unterscheiden. Als Summenformel wurde $C_{49}H_{60}O_{10}$ ermittelt, bisher wurden allerdings keine natürlich vorkommenden Substanzen beschrieben.

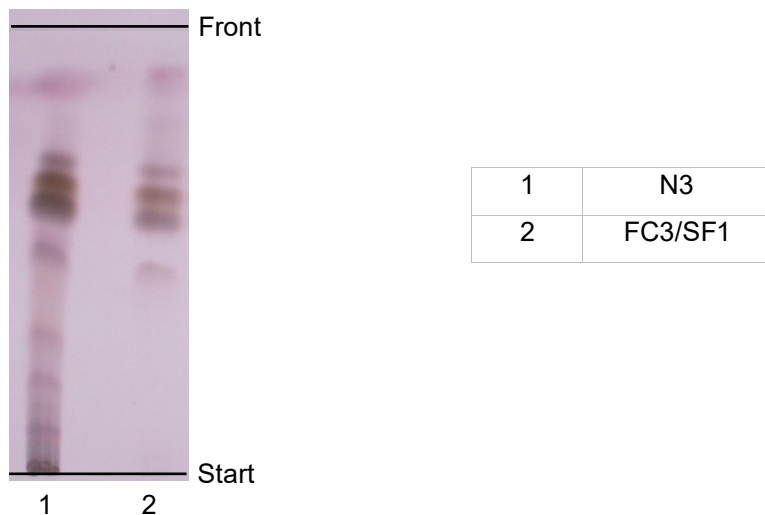
Da es sich bei Substanz MK12 um eine Mischung handelte und nicht genügend Substanz für eine weitere Auftrennung vorhanden war, konnten die Strukturen der Komponenten nicht aufgeklärt werden.

5.1.2.4. Auftrennung der Fraktion N3 (Flash Chromatography FC 3)

Die Hauptkomponente bei Rf 0,8 von Fraktion N3 (s. Abbildung 4, S. 7) sollte mittels Flash Chromatography isoliert werden. Dazu wurde ein Dryload mit 35 mg Substanz hergestellt und in FC3 aufgetrennt. Die verwendeten Parameter sind Kapitel 7.2.3. (S. 49) zu entnehmen.

Es wurden 115 Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, in denen mittels ELSD und DAD Substanzen detektiert wurden, wurden zusätzlich dünnschichtchromatographisch überprüft und zu Sammelfractionen vereinigt (s. Abbildung 14).

Abbildung 14: DC der Sammelfraktion 1 aus FC 3



Mobile Phase: DCM / EtOAc / MeOH 100+5+1, **Detektion:** AAS

Mittels FC 3 konnte in SF 1 der Großteil der Begleitsubstanzen aus Fraktion N3 entfernt werden. Jedoch stellte sich bei der DC-Kontrolle der Fraktionen in dem etwas weniger polaren Fließmittel heraus, dass die Hauptkomponente von N3 ein Gemisch aus drei Verbindungen ist.

Aufgrund der geringen Ausbeute von Sammelfraktion 1 aus FC 3 (6 mg) war es nicht möglich eine weitere Fraktionierung durchzuführen.

5.2. *Scrophularia lucida* L.

5.2.1. DC-Überprüfung vorhandener Fraktionen

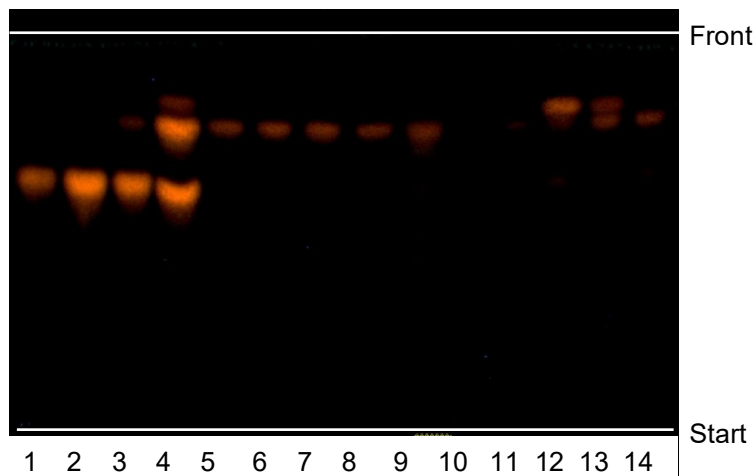
Aus mehreren Diplomarbeiten waren unterschiedliche Fraktionen vorhanden, die aus der Fraktionierung eines Extraktes aus *S. lucida* stammten. Aus einem methanolischen Extrakt waren apolare Begleitsubstanzen und Gerbstoffe entfernt worden. Danach erfolgte Verteilung zwischen Wasser und Chloroform bzw. Wasser und Ethylacetat. Diese beiden Fraktionen waren mittels chromatographischer Methoden weiter aufgetrennt worden (Ledermüller, 2015, Lewenhofer, 2014, Schweighofer, 2015, Spitznagl, 2015, Sumetsberger, 2016).

5.2.1.1. Untersuchung von Fraktionen aus der Ethylacetatfraktion

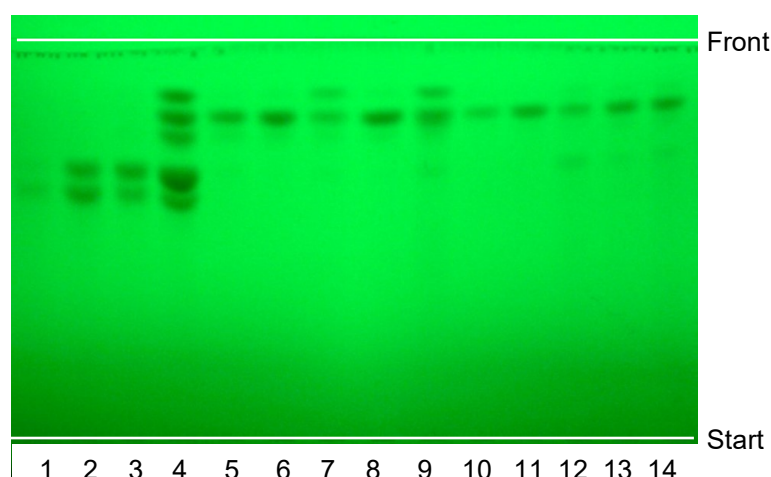
Für die Untersuchungen standen diverse Fraktionen aus drei Diplomarbeiten zur Verfügung (Lewenhofer, 2014; Ledermüller, 2015; Sumetsberger, 2016). Diese wurden dünn-schichtchromatographisch untersucht. Diese Fraktionen enthielten vor allem Flavonoide.

Abbildung 15: DC-Kontrolle verschiedener Ethylacetatfraktionen

a) UV 366 nm



b) UV 245 nm



Mobile Phase: EtOAc / FA conc. / AA conc. / H₂O 100+11+11+20, **Detektion:** NST A / PEG

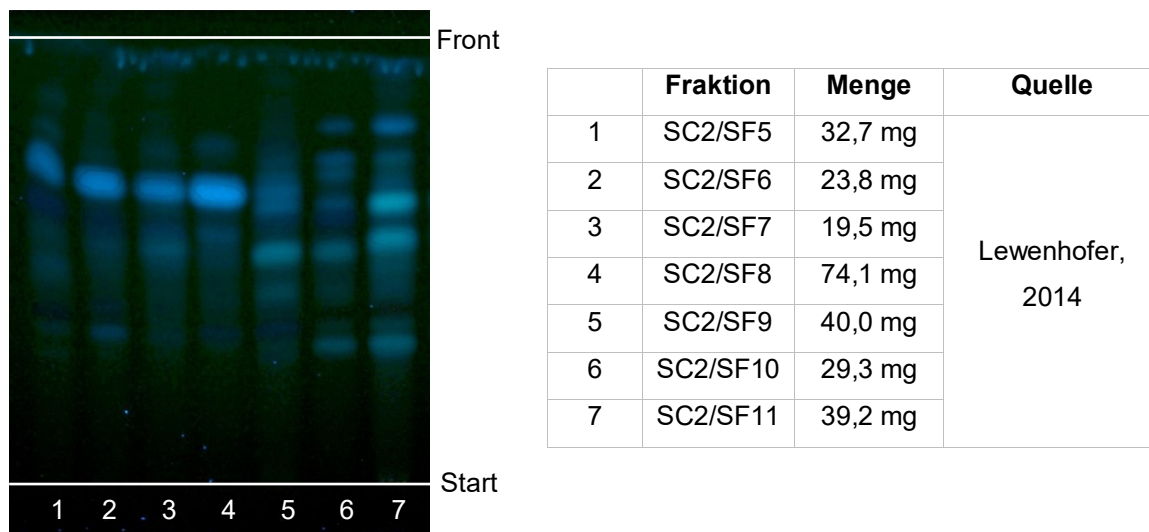
	Fraktion	Menge	Quelle
1	SPE/SF3	2,0 mg	Lewenhofer, 2014
2	SPE/SF4	5,2 mg	
3	SPE/SF5	15,8 mg	
4	SPE/SF6	12,5 mg	
5	SPE/SF7	5,0 mg	
6	SPE/SF9	6,8 mg	
7	SPE/SF10	4,4 mg	
8	SPE/SF11	2,9 mg	
9	SPE/SF12	3,0 mg	
10	SPE/SF13	1,4 mg	
11	SPE/SF14 _{NS}	4,7 mg	
12	SPE/SF16	2,3 mg	
13	SPE/SF17	6,0 mg	
14	SPE/SF18	3,0 mg	

Die Fraktionen SPE/SF3-SF5, sowie SPE/SF7+SF9+SF11 konnten aufgrund des identen Bandenmusters vereinigt werden und wurden zur weiteren Identifizierung mit Referenzsubstanzen verglichen (s. Abbildung 19, S. 21).

Die Fraktionen SPE/SF10, SPE/SF12 sowie SPE/SF16-18 konnten aufgrund der jeweils sehr geringen Menge nicht weiter bearbeitet werden.

Fraktionen SPE/SF13 und SPE/SF14_{NS} enthielten dieselbe Substanz in chromatographischer einheitlicher Form und konnten durch Vergleich mit Daten einer vorherigen Arbeit (Lewenhofer, 2014) als 2"-O-Acetyl-homoplantaginin identifiziert und als Referenzsubstanz in die hauseigene Substanzdatenbank aufgenommen werden.

Abbildung 16: DC-Kontrolle weiterer Ethylacetatfraktionen



Mobile Phase: EtOAc / FA conc. / AA conc. / H₂O 100+11+11+20, **Detektion:** NST A / PEG

Die Sammelfractionen SC2/SF5 – SC2/SF8 wiesen eine blau fluoreszierende Hauptkomponente bei R_f 0,66 auf. Im Vergleich mit den DC-Daten aus Lewenhofer, 2014 konnte festgestellt werden, dass es zu Zersetzungsprozessen der Substanzen gekommen war. Einzelne der untersuchten Fraktionen waren in der Arbeit von Lewenhofer, 2014 bereits mit den Phenolcarbonsäuren Ferulasäure, Chlorogensäure, Neochlorogensäure, p-Cumarsäure, Ellagsäure und Cryptochlorogensäure verglichen und das Vorliegen dieser Substanzen ausgeschlossen worden.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde ein Vergleich der Fraktion SC2/SF8 mit Verbascosid durchgeführt, um auf das Vorliegen dieses Phenolcarbonsäure-Derivats zu überprüfen (s. Abbildung 23, S. 24).

Fraktion SC2/SF5 (Arbeitsbezeichnung MK10) wurde in weiterer Folge mittels LC-MS⁶ analysiert, um die Hauptkomponente dieser Fraktion zu identifizieren.

Dabei konnte für MK10 ein Molekulargewicht von 668 g/mol ermittelt werden. Das Positivionen-MS² zeigte einerseits die Abspaltung eines Fragments mit einer Masse von 162 g/mol, was auf das Vorliegen einer Hexose bzw. von Kaffeesäure hinwies, andererseits wurde ein Fragment mit der Masse 146 g/mol detektiert, wobei es sich vermutlich um eine Desoxyhexose handelte. Im Vergleich zum Molekulargewicht von Verbascosid wies MK10 ein Fragment mit einer Masse von 44 g/mol mehr auf, was auf eine zusätzliche Carboxylgruppe hinwies.

⁶ Die Spektren der LC-MS- Analyse für MK10 befinden sich im Anhang.

Anhand des Fragmentierungsmusters könnte es sich bei MK10 um eine Verbascosid-ähnliche Substanz handeln.

Um die Struktur vollständig mittels NMR aufklären zu können, müsste die Fraktion weiter aufgereinigt werden. Das war im Rahmen dieser Diplomarbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

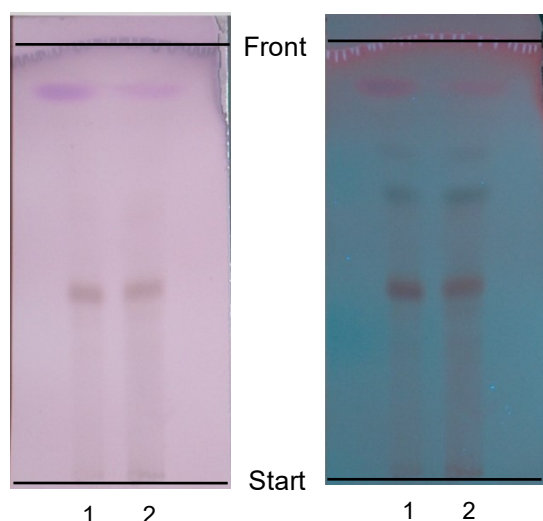
5.2.1.2. Untersuchung von Fraktionen aus der Chloroformfraktion

Aus zwei Diplomarbeiten (Schweighofer, 2015; Spitznagl, 2015) standen Fraktionen aus einer Chloroformfraktion des methanolischen Extraktes aus *S. lucida* zur Verfügung. Die Fraktionen enthielten überwiegend terpenoide Substanzen. In der Diplomarbeit von Schweighofer (2015) waren die Iridoidglykoside Koelziosid und Scrovalentinosid identifiziert worden.

Abbildung 17: DC-Kontrolle verschiedener Chloroformfraktionen

a) Tageslicht

b) UV 366 nm



	Fraktion	Menge	Quelle
1	SC2/F18	74,3 mg	Schweighofer, 2015
2	SC2/F19	88,6 mg	

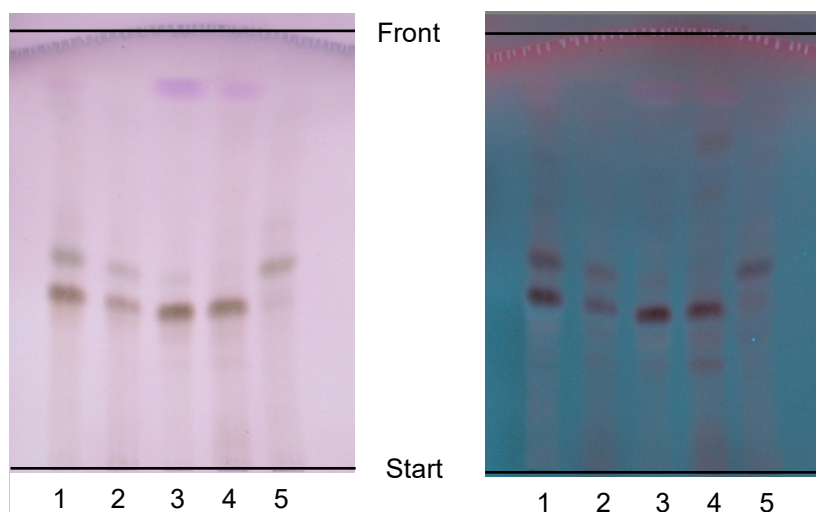
Mobile Phase: EtOAc / MeOH / FA conc. / H₂O 70+8+4+4, **Detektion:** AAS

Die Fraktionen SC2/F18 und SC2/F19 (Schweighofer, 2015) wiesen beide eine braune Hauptkomponente bei R_f 0,44 auf. Diese konnte als Scrovalentinosid bestätigt werden. Die Fraktionen enthielten allerdings noch weitere Komponenten im oberen R_f-Bereich sowie polare Begleitsubstanzen. Da die beiden Fraktionen dasselbe Muster an Inhaltsstoffen aufwiesen, wurden sie vereinigt (SC2/F18+19, 162 mg) und mittels Flash Chromatography zur Reindarstellung von Scrovalentinosid fraktioniert (s. 5.2.3.1., S. 25).

Abbildung 18: DC-Kontrolle weiterer Chloroformfraktionen

a) Tageslicht

b) UV 366 nm



Mobile Phase: EtOAc / MeOH / FA conc. / H₂O 70+8+4+4, **Detektion:** AAS

	Fraktion	Menge	Quelle
1	SC1/F12	246,0 mg	Spitznagl, 2015
2	SC2/F16	120,9 mg	Schweighofer, 2015
3	SC1/F13	506,8 mg	Spitznagl, 2015
4	SC2/F17	104,2 mg	Schweighofer, 2015
5	SC2/F15	133,4 mg	

Die braunen Banden bei R_f 0,38 und R_f 0,48 in mehreren untersuchten Fraktionen (s. Abbildung 18) wurden zweifelsfrei als Scrovalentinosid und Koelziosid bestimmt (Schweighofer, 2015). Von Fraktion SC1/F13 (Spitznagl, 2015) waren 500 mg vorhanden, weshalb diese Fraktion zur Aufreinigung von Scrovalentinosid mittels Flash Chromatography herangezogen wurde (s. 5.2.3.2., S. 27).

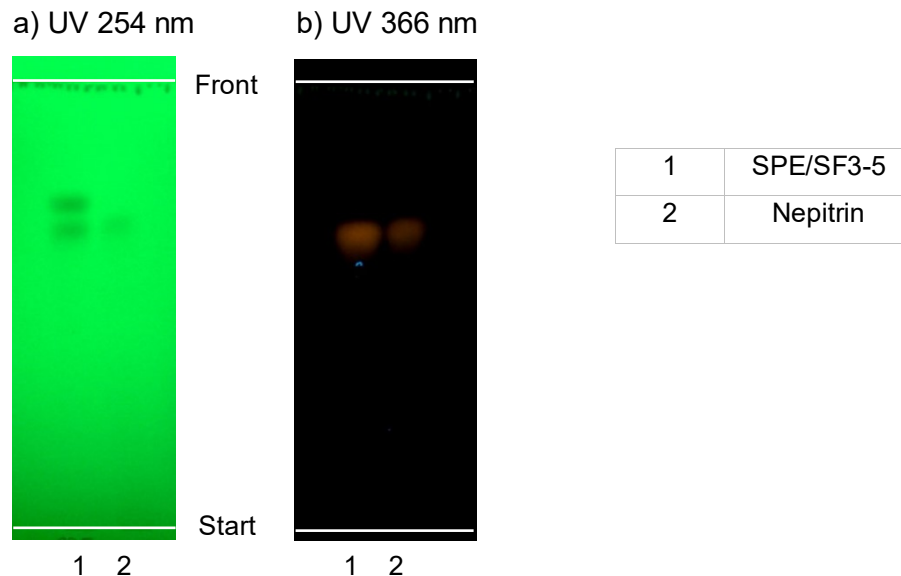
5.2.2. Vergleiche mit Referenzsubstanzen

Mittels Dünnschichtchromatographie wurden Fraktionen, die überwiegend Flavonoide bzw. Phenolcarbonsäuren enthielten, mit diversen Referenzsubstanzen verglichen. Es sollten die orange bzw. blau fluoreszierenden Banden identifiziert und somit das Inhaltsstoffmuster an Sekundärstoffen von *S. lucida* weitgehend charakterisiert werden.

In einer vorhergehenden Diplomarbeit war Nepitrin in einer Fraktion aus dem methanolischen Extrakt von *S. lucida* nachgewiesen worden (Ledermüller, 2015). Die vorliegende Fraktion aus der Arbeit von Lewenhofer, 2014 sollte daher aufgrund der ähnlichen Fluo-

reszenzfärbung und Laufstrecke ebenfalls auf das Vorliegen von Nepitrin überprüft werden.

Abbildung 19: DC-Vergleich von Fraktion SPE/SF3-5 mit Nepitrin



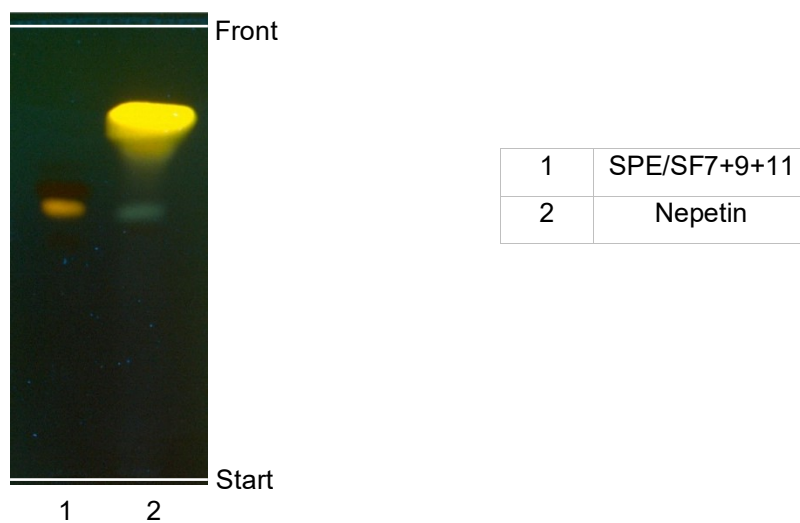
Mobile Phase: EtOAc / FA conc. / AA conc. / H₂O 100+11+11+20, **Detektion:** NST A / PEG

Die DC zeigte, dass das Flavonoid Nepitrin mit der orangen Fluoreszenzfärbung unter UV 366 nm bei R_f 0,66 in Fraktion SPE/SF3-5 enthalten ist.

Unter UV 254 nm konnte man direkt über der Bande von Nepitrin eine weitere Bande bei R_f 0,71 erkennen und es bestand die Annahme, dass es sich bei dieser Bande und Homoplagagin handeln könnte. Daher wurde diese Fraktion auch mittels HPLC analysiert (s. 5.2.4.1., S. 28).

Die orange fluoreszierende Bande bei R_f 0,78 in Sammelfraktion SPE/SF7+9+11 (Lewenhofer, 2014) sollte identifiziert werden. Der Vergleich wurde aufgrund der geringen Polarität der orange fluoreszierenden Hauptkomponente in dieser Fraktion mit Nepitrin durchgeführt.

Abbildung 20: DC-Vergleich von Fraktion SPE/SF7+9+11 mit Nepetin

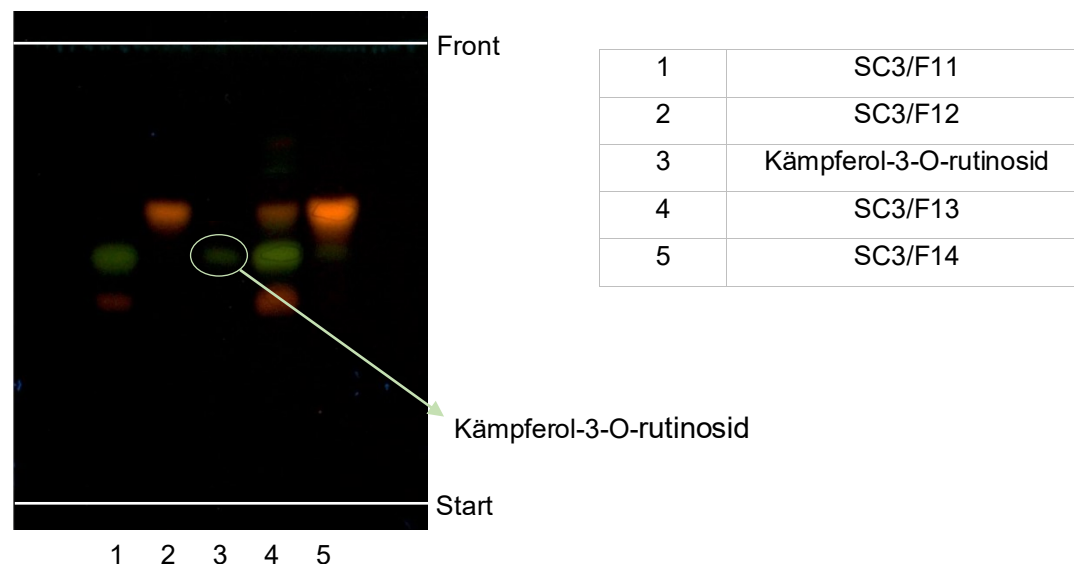


Mobile Phase: EtOAc / FA conc. / AA conc. / H₂O 100+11+11+10, **Detektion:** NST A / PEG

Die DC zeigte jedoch, dass diese Bande weder in der Fluoreszenzfärbung noch in der Retention mit dem Vergleich übereinstimmte.

Fraktionen von SC3 (Lewenhofer, 2014) wurden aufgrund der Fluoreszenzfarbe der Hauptkomponente auf das Vorhandensein von Kämpferol-3-O-rutinosid überprüft.

Abbildung 21: DC-Vergleich von Fraktionen mit Kämpferol-3-O-rutinosid



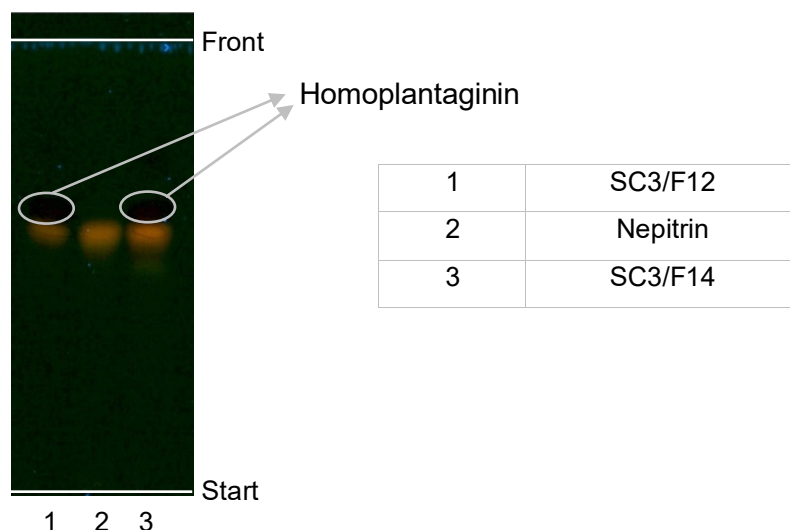
Mobile Phase: EtOAc / FA conc. / AA conc. / H₂O 100+11+11+20, **Detektion:** NST A / PEG

Das grün fluoreszierende Flavonoid konnte in Fraktion SC3/F11 und SC3/F13 als Hauptkomponente identifiziert werden. Um den Anteil von Kämpferol-3-O-rutinosid in

Fraktion SC3/F11 zu bestimmen, wurde diese einer HPLC-Analyse unterzogen (s. 5.2.4.2., S. 30).

Die Fraktionen SC3/F12 und SC3/F14 (Lewenhofer, 2014) zeigten jeweils eine orange fluoreszierende Bande bei Rf 0,61 (s. Abbildung 21, S. 22), die aufgrund der Fluoreszenzfärbung auf das Vorliegen von Nepitrin überprüft wurde.

Abbildung 22: DC-Vergleich der Fraktionen SC3/F12 und SC3/F14 mit Nepitrin



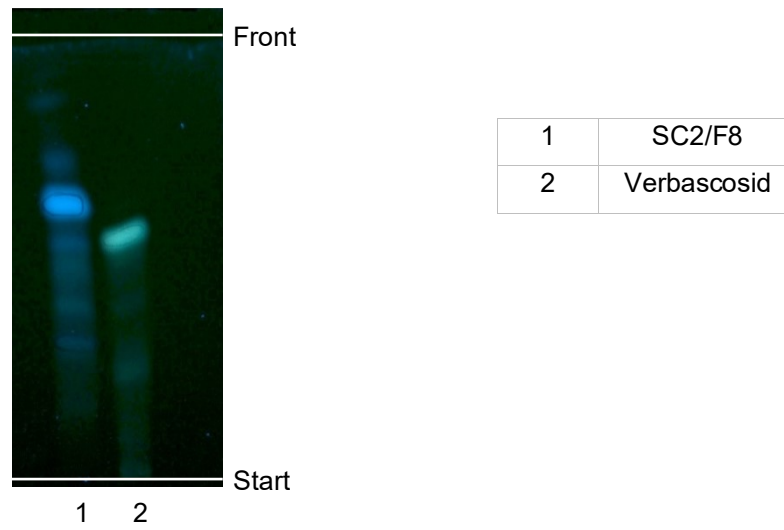
Mobile Phase: EtOAc / FA conc. / AA conc. / H₂O 100+11+11+10, **Detektion:** NST A / PEG

Anhand der DC konnten die orange fluoreszierenden Banden in den Fraktionen SC3/12 und SC3/14 als Nepitrin identifiziert werden. Weiters zeigte die DC das Vorkommen einer zweiten Hauptkomponente auf. Bei der braunschwarzen Bande handelt es sich um das Flavonoid Homoplantagin. Die beiden Substanzen sind in Fraktion SC3/12 und SC3/14 jeweils ca. im Verhältnis 1:1 enthalten.

Nepitrin und Homoplantagin konnten anhand der Fluoreszenzfärbung und der Laufstrecken in weiteren Fraktionen aus *S. lucida* identifiziert werden. Eine Reindarstellung dieser Komponenten wurde nicht durchgeführt, da sie kommerziell erhältlich sind.

Die blau fluoreszierende Hauptkomponente in Sammelfraktion SC2/F8 (Lewenhofer, 2014) bei Rf 0,66 (s. Abbildung 16, S. 18) wurde aufgrund ihrer Fluoreszenzfärbung mit Verbascosid verglichen.

Abbildung 23: DC-Vergleich von Fraktion SC2/SF8 mit Verbascosid

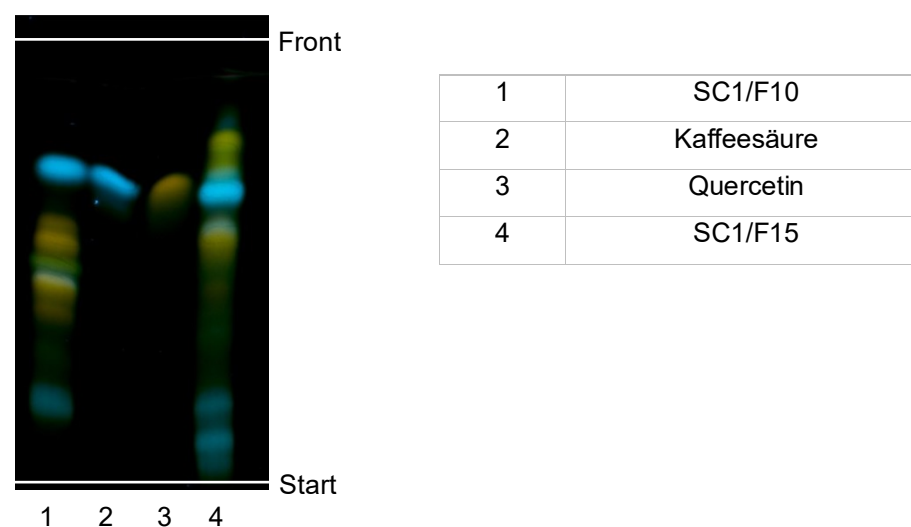


Mobile Phase: EtOAc / FA conc. / AA conc. / H₂O 100+11+11+20, **Detektion:** NST A / PEG

Anhand der unterschiedlichen Laufstrecke und Fluoreszenzfärbung konnte das Vorliegen des Phenolcarbonsäure-Derivats Verbascosid ausgeschlossen werden.

Die Fraktionen SC1/10 und SC1/15 (Lewenhofer, 2014) wiesen mehrere orange und blau fluoreszierende Banden auf, die auf das Vorliegen von Quercetin und Kaffeesäure überprüft werden sollten.

Abbildung 24: DC-Vergleich verschiedener Fraktionen mit Kaffeesäure und Quercetin



Mobile Phase: CHCl₃ / MeOH / AA / H₂O 60+12+32+8, **Detektion:** NST A / PEG

Wie in Abbildung 24 zu sehen, konnte die blau fluoreszierende Bande von Fraktion SC1/F10 bei Rf 0,71 mittels DC-Vergleich aufgrund der Laufstrecke und der Fluoreszenzfärbung als Kaffeesäure bestätigt werden. Das Vorliegen des Flavonoids Quercetin konnte in Fraktion SC1/F10 und SC1/F15 ausgeschlossen werden.

In einer vorangegangenen Diplomarbeit (Ledermüller, 2015) konnte die gelb fluoreszierende Bande in Fraktion SC2/F26 bei Rf 0,58 als Luteolin-7-O-glucosid identifiziert werden. In der vorliegenden Diplomarbeit sollte die Bande bei Rf 0,7 charakterisiert werden. Es wurde ein Vergleich mit Naringenin-7-O-glucosid durchgeführt, da aufgrund der geringeren Polarität dieser Substanz ein höherer Retentionsfaktor erwartet wurde.

Abbildung 25: DC-Vergleich von Fraktion SC2/F26 mit Naringenin-7-O-glucosid



Mobile Phase: EtOAc / FA conc. / AA conc. / H₂O 100+11+11+10, **Detektion:** NST A / PEG

Anhand der DC konnte das Flavanon aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzfärbung und des Retentionsfaktors jedoch ausgeschlossen werden. Für eine Identifizierung dieser Komponente wären weitere Untersuchungen notwendig, die aus zeitlichen Gründen in dieser Diplomarbeit nicht möglich waren.

5.2.3. Fraktionierung mittels Flash Chromatography⁷

5.2.3.1. Auftrennung der Fraktion SC2/F18+19 (Flash Chromatography FC 4)

In Sammelfraktion SC2/F18+19 (161 mg) war Scrovalentinosid als Hauptkomponente nachgewiesen worden (s. Abbildung 17, S.19), das mittels Flash Chromatography rein dargestellt werden sollte. Weiters diente FC 4 als Vorversuch für FC 5, um eine geeig-

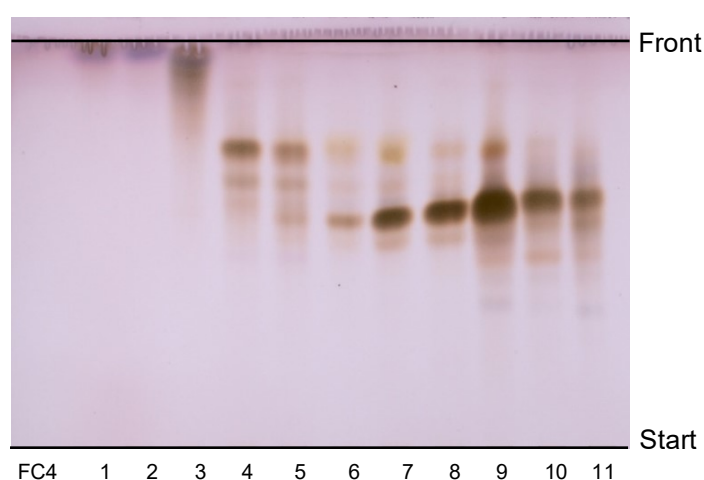
⁷ Die Chromatogramme der FC-Analysen befinden sich im Anhang.

te Fließmittelzusammensetzung und einen geeigneten Fließmittelgradienten zu ermitteln, da eine weitere Fraktion mit Scrovalentinosid als Hauptkomponente, in größerer Menge zur Verfügung stand, welche in FC 5 aufgereinigt werden sollte.

Es wurde ein Dryload mit 161 mg Substanz hergestellt und in FC 4 aufgetrennt. Die verwendeten Parameter sind Kapitel 7.2.3. (S. 49) zu entnehmen.

Insgesamt wurden 208 Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Die Fraktionen, in denen mittels ELSD und DAD Substanzen detektiert wurden, wurden zusätzlich dünnschichtchromatographisch überprüft und Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt (s. Abbildung 26).

Abbildung 26: DC der Sammelfraktionen der FC 4



Mobile Phase: EtOAc / MeOH / FA conc. / H₂O 70+8+4+4, **Detektion:** AAS

Tabelle 2: Sammelfraktionen der FC 4

	Sammelfraktion	Fraktionen	Ausbeute
1	SF1	F7	0,4 mg
2	SF2	F8	21,2 mg
3	SF3	F9	1,8 mg
4	SF4	F19-21	0,8 mg
5	SF5	F22	2,7 mg
6	SF6	F23	6,0 mg
7	SF7	F25+25	12,1 mg
8	SF8	F26	4,9 mg
9	SF9	F27-31	17,4 mg
10	SF10	F32-36	9,8 mg
11	SF11	F37-40	6,6 mg

Die DC der Sammelfractionen zeigte, dass die Anreicherung von Scrovalentinosid mit dieser Methode gut funktionierte. Scrovalentinosid war in den Sammelfractionen 7-9 am stärksten angereichert. Da die Ausbeuten jedoch gering waren und eine weitere Fraktion, die ebenfalls Scrovalentinosid enthielt, in größerer Menge zur Verfügung stand, wurde eine weitere Fraktionierung durchgeführt (s. 5.2.3.2.).

5.2.3.2. Auftrennung der Fraktion SC1/F13 (Flash Chromatography FC 5)

Ziel der Auftrennung war es, Scrovalentinosid bei Rf 0,38 zu isolieren (s. Abbildung 18, S. 20). Es wurde ein Dryload mit 500 mg Substanz hergestellt und in FC 5 aufgetrennt. Da bei FC 4 alle Substanzen in der ersten Stufe des Fließmittelgradienten eluierten, wurden bei FC 5 Anpassungen hinsichtlich Fließmittelzusammensetzung und -gradient durchgeführt, um eine Verlangsamung der Trennung und damit ein besseres Trennergebnis zu erzielen (s. 7.2.3., Tabelle 14).

Es wurden 84 Fraktionen zu je 8 ml gesammelt. Die Fraktionen, in denen mittels ELSD und DAD Substanzen detektiert wurden, wurden zusätzlich dünnschichtchromatographisch überprüft und Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung zu Sammelfractionen vereinigt (s. Abbildung 27).

Abbildung 27: DC der Sammelfractionen der FC 5

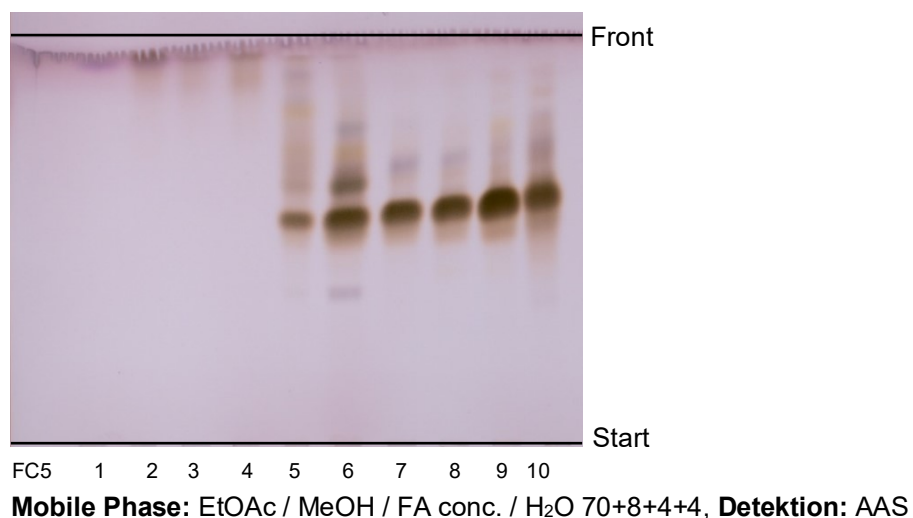


Tabelle 3: Sammelfraktionen der FC 5

	Sammelfraktion	Fraktionen	Ausbeute
1	SF1	F17+18	20,5 mg
2	SF2	F19+20	6,5 mg
3	SF3	F21	4,2 mg
4	SF4	F22	3,8 mg
5	SF5	F47-51	11,6 mg
6	SF6	F52-54	38,9 mg
7	SF7	F55-58	107,8 mg
8	SF8	F59-61	64,1 mg
9	SF9	F62-67	75,1 mg
10	SF10	F68-72	9,4 mg

Scrovalentinosid war in den Sammelfraktionen 7 – 9 am stärksten und in chromatographisch weitgehend einheitlicher Form angereichert. Daher wurden diese Fraktionen weiter mittels HPLC analysiert (s. 5.2.4.3., S. 31).

5.2.4. Untersuchung verschiedener Fraktionen mittels HPLC

Nachdem die DC-Untersuchungen in mehreren Fraktionen auf das Vorliegen bekannter Komponenten schließen ließen, wurden diese Fraktionen mittels HPLC analysiert und mit den entsprechenden Daten aus vorherigen Diplomarbeiten verglichen.

Die untersuchten Fraktionen in den Kapiteln 5.2.4.1. (S. 28) und 5.2.4.2. (S. 30) stammen aus der Arbeit von Lewenhofer, 2014. Die Bezeichnungen der Fraktionen wurden hinsichtlich der besseren Nachvollziehbarkeit aus dieser Arbeit übernommen.

5.2.4.1. Analyse von Fraktion SPE/SF3

Mittels DC konnte bereits das Vorliegen von Nepitrin bei R_f 0,66 bestätigt werden (s. Abbildung 19, S. 21). Die Vermutung, dass es sich bei der Bande bei R_f 0,71 um Homoplantagin handelt, sollte bestätigt werden.

Zur genauen Identifizierung der Substanz bei R_f 0,71 sowie zur Berechnung des prozentuellen Anteils dieser Komponente in der Fraktion wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt. Die genauen HPLC-Parameter sind Tabelle 7 (s. S. 48) zu entnehmen. Für die Analyse wurde Säule 1, Fließmittelsystem 1 und Gradient 2 verwendet (s. S. 48 ff).

Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm von SPE/SF3-5 bei 254 nm;
Bedingungen s. Kapitel 7.2.2, S. 48 ff

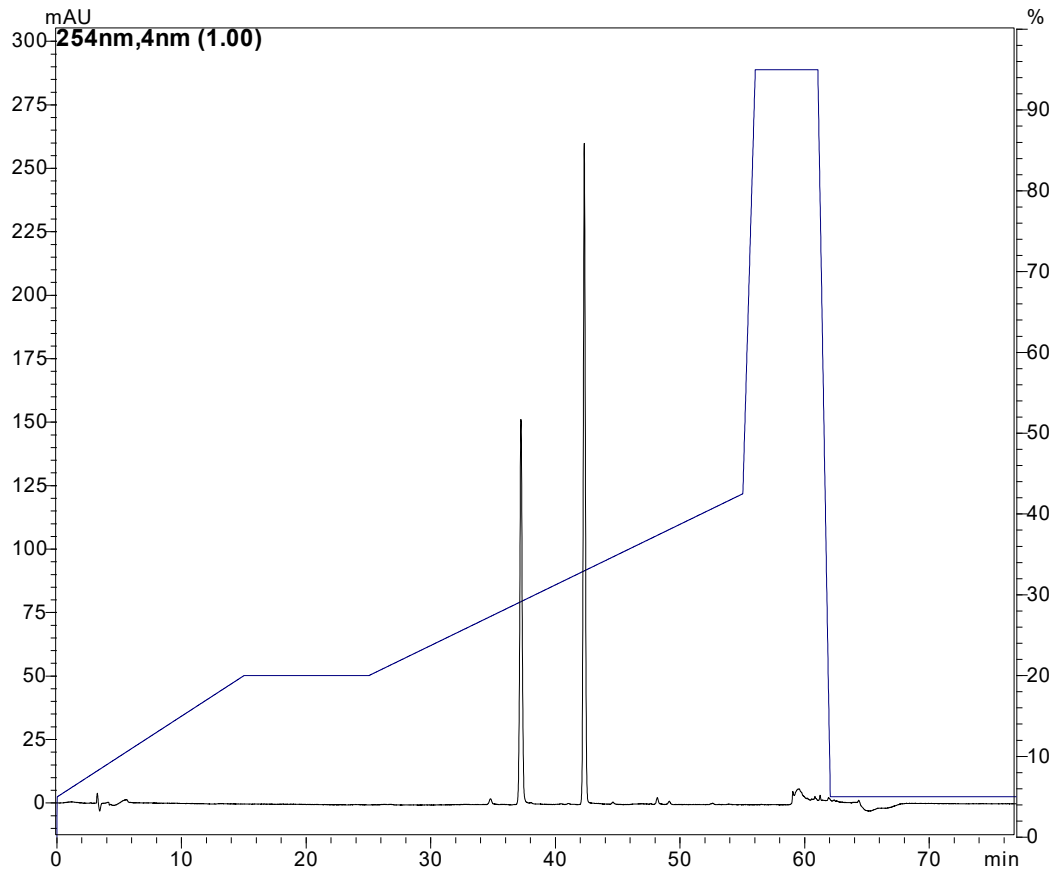


Abbildung 29: UV-Spektrum bei 37,23 min

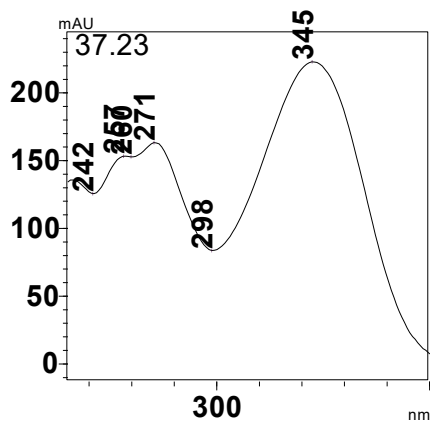
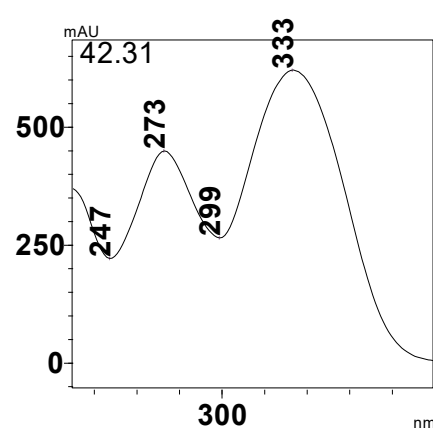


Abbildung 30: UV-Spektrum bei 42,31 min



Die HPLC-Analyse ergab zwei Hauptpeaks, wobei der Peak bei Rt 37,23 min durch Literaturvergleich (Ledermüller, 2015) als Nepitrin identifiziert werden konnte. Der Peak bei 42,31 min konnte als Homoplantaginin (Lewenhofer, 2014) bestimmt werden. Um die prozentuelle Zusammensetzung der Mischung zu bestimmen, wurde die 100%-Methode angewandt. Die Fraktion SPE/SF3-5 enthielt 58% Homoplantaginin und 42% Nepitrin.

5.2.4.2. Analyse von Fraktion SC3/F11

Das Vorliegen des Flavonol-Glykosids Kämpferol-3-O-rutinosid konnte in Fraktion SC3/F11 (Lewenhofer, 2014) mittels DC nachgewiesen werden (s. Abbildung 21, S. 22). Um die Reinheit von Kämpferol-3-O-rutinosid in der vorhandenen Fraktion zu bestimmen, wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt. Die genauen HPLC-Parameter sind Tabelle 7 (s. S. 48) zu entnehmen. Für die Analyse wurde Säule 1, Fließmittelsystem 1 und Gradient 2 verwendet (s. S. 48 ff).

Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm von SC3/F11 bei 254 nm;
Bedingungen s. Kapitel 7.2.2, S. 48 ff

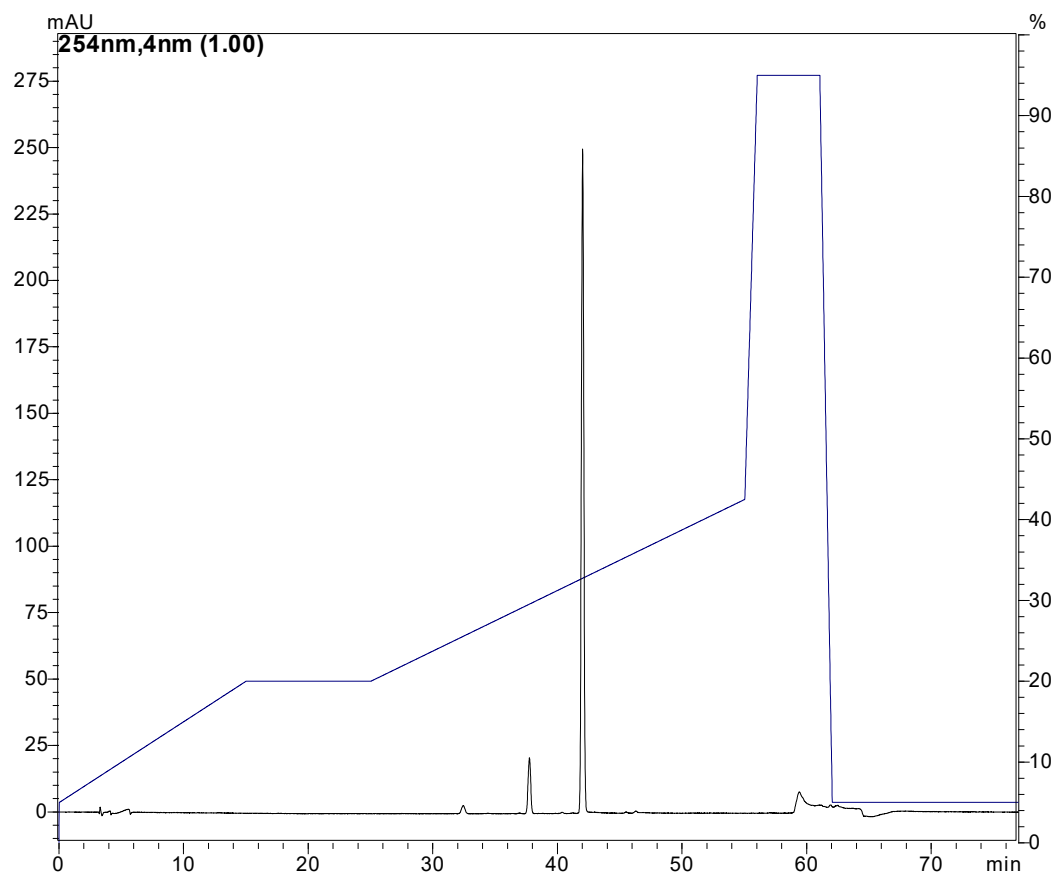


Abbildung 32: UV-Spektrum bei 37,75 min

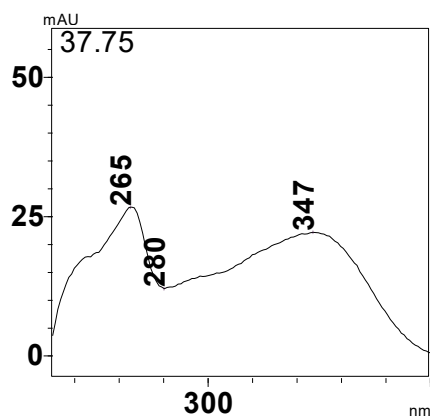
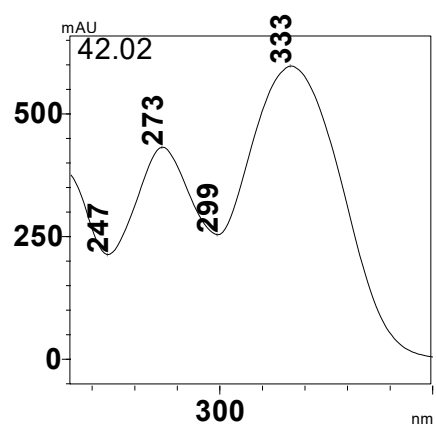


Abbildung 33: UV-Spektrum bei 42,02 min



Die HPLC-Analyse zeigte, dass es sich bei dieser Fraktion um eine Mischung aus zwei Komponenten handelte. Anhand der Retentionszeit und des UV-Spektrums konnte der Peak bei 42,02 min als Homoplantaginin identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die Hauptkomponente der Fraktion. Der Peak bei 37,75 min konnte als Kämpferol-3-O-rutinosid bestimmt werden (Ledermüller, 2015).

5.2.4.3. Analyse der Sammelfractionen SF7 – SF9 der FC 5

Mittels Flash Chromatography konnte Scrovalentinosid in weitgehend einheitlicher Form isoliert werden (s. Abbildung 27, S. 27).

Die HPLC-Analysen wurden durchgeführt, um die Reinheit von Scrovalentinosid in den Sammelfractionen zu bestimmen. Die HPLC-Parameter sind in Tabelle 7 (s. S. 48) aufgeführt. Die Analyse wurde mit Säule 1, Fließmittelsystem 2 und Gradient 1 durchgeführt (s. S. 48 ff).

Abbildung 34: HPLC-Chromatogramm von FC5/SF7 bei 315 nm;
Bedingungen s. Kapitel 7.2.2, S. 48 ff

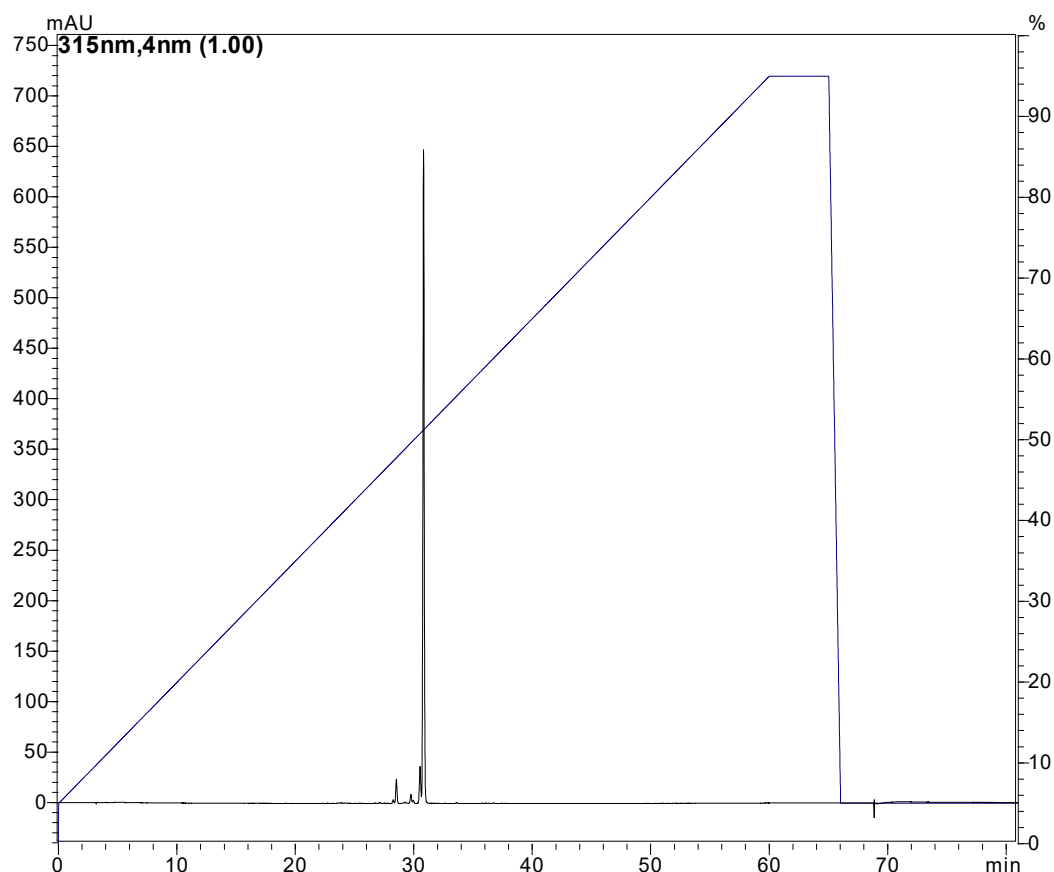


Abbildung 35: UV-Spektrum bei 30,81 min

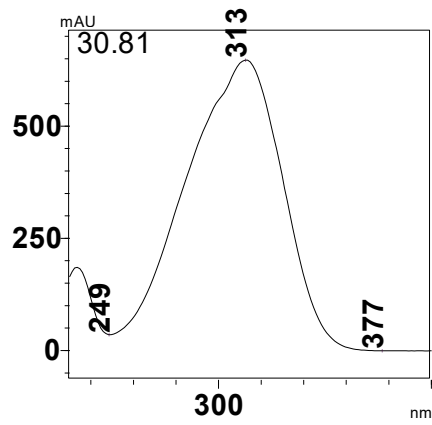


Abbildung 36: HPLC-Chromatogramm von FC5/SF8 bei 315 nm;
Bedingungen s. Kapitel 7.2.2, S. 48 ff

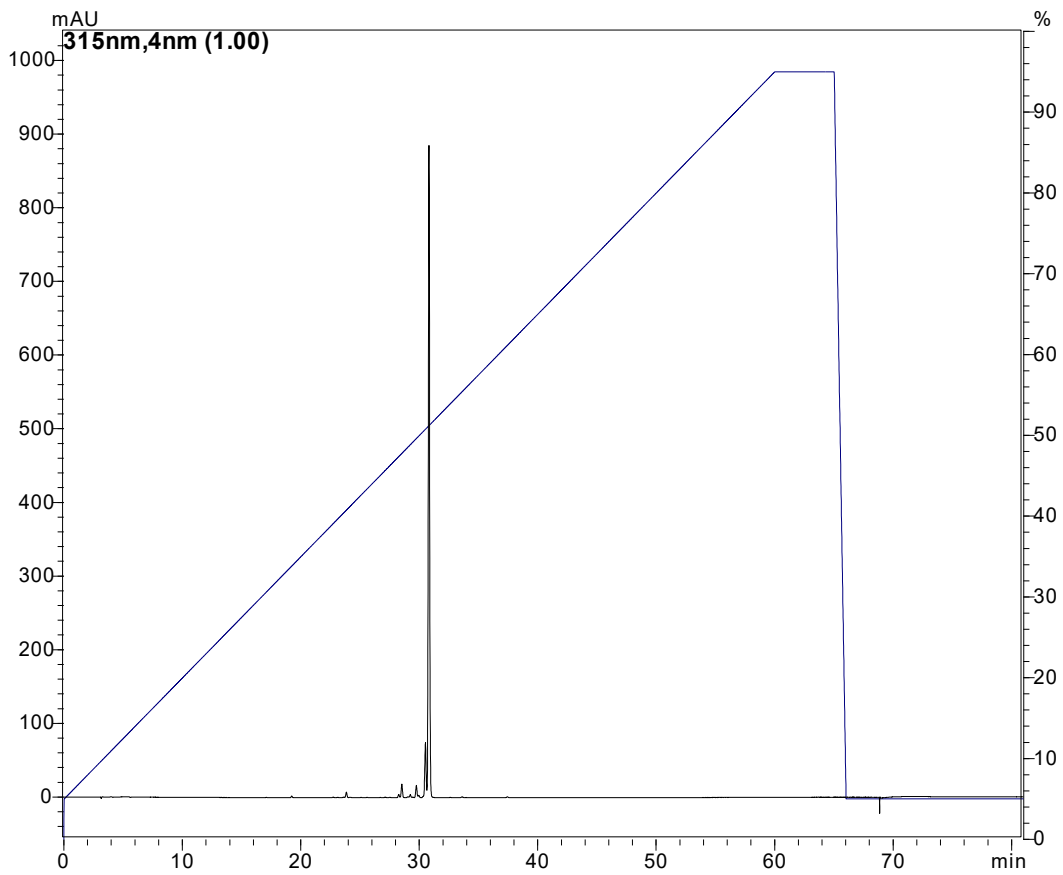


Abbildung 37: UV-Spektrum bei 30,81 min

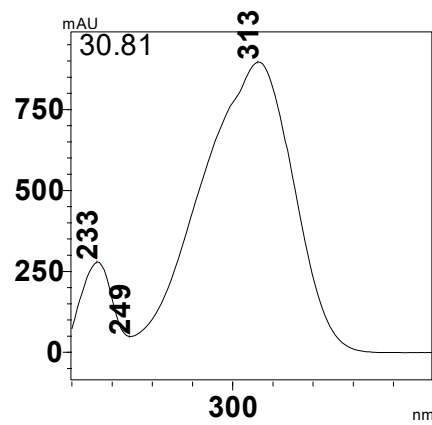


Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm von FC5/SF9 bei 315 nm;
Bedingungen s. Kapitel 7.2.2, S. 48 ff

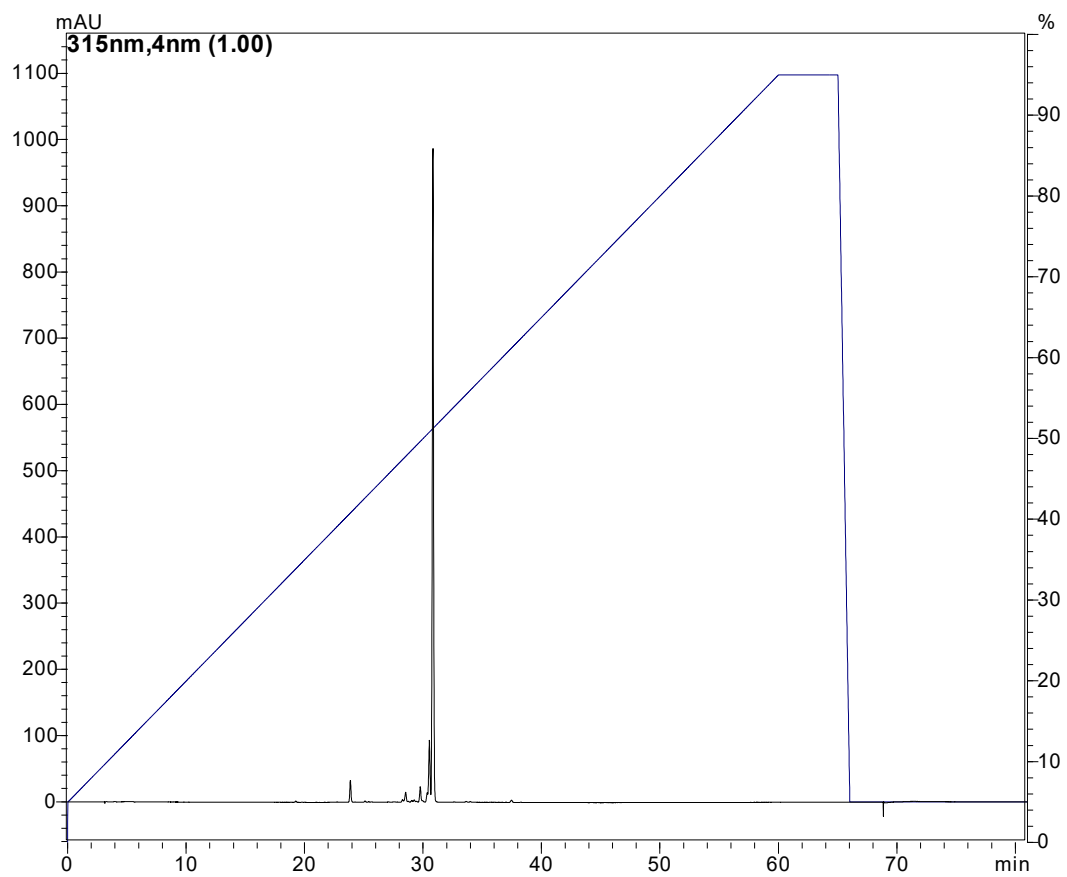
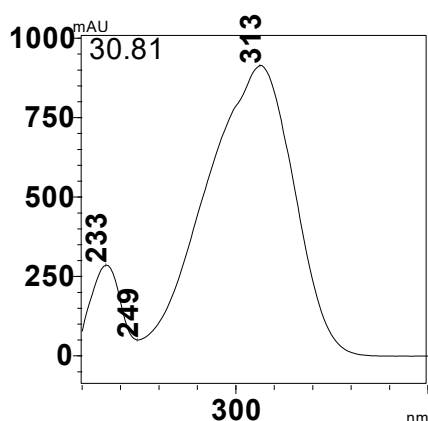


Abbildung 39: UV-Spektrum bei 30,81 min



In den HPLC-Chromatogrammen ist Scrovalentinosid jeweils als deutliche Hauptkomponente bei einer Retentionszeit von 30,8 min erkennbar. Allerdings konnten in allen Sammelfractionen Nebenkomponenten festgestellt werden. Daher wurde jeweils mittels 100%-Methode der prozentuelle Anteil an Scrovalentinosid berechnet. Der größte Anteil mit 75% wurde in SF7 (108 mg) ermittelt. Damit steht eine weitgehend aufgereinigte Menge von Scrovalentinosid für die Substanzdatenbank des Departments zur Verfügung.

5.3. *Combretum zenkeri* Engl. & Diels

Aus einer vorangegangenen Diplomarbeit standen Fractionen aus einem methanolischen Extrakt von *Combretum zenkeri* Engl. & Diels zur Verfügung, die im Rahmen einer phytochemischen Untersuchung von Sekundärmetaboliten aus *C. zenkeri* hergestellt worden waren (Göbl, 2020).

5.3.1. DC-Überprüfung vorhandener Fractionen

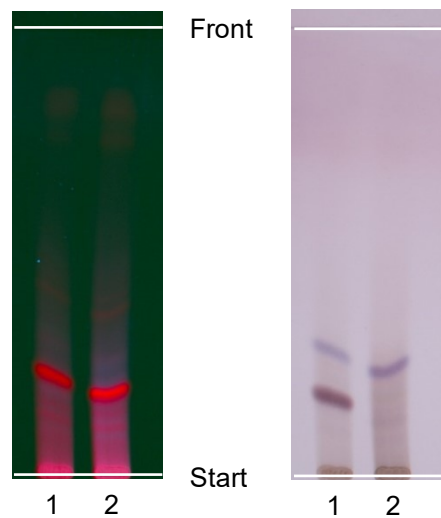
Einige dieser Fractionen wurden im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit dünn-schichtchromatographisch untersucht.

Fraction Fc7 enthielt hohe Anteile an Chlorophyll, das im Zuge dieser Diplomarbeit abgetrennt werden sollte. Die Fraction wurde in einer Mischung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 1:1 gelöst und vorsichtig eingeeengt. Das Chlorophyll sollte sich an der Kolbenwand ablagern und so aus der Fraction entfernt werden. Dabei bildete sich ein Niederschlag, der abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt und die erhaltenen Fractionen Fc7_{ÜS} und Fc7_{NS} wurden dünn-schichtchromatographisch überprüft.

Abbildung 40: DC der Fraktionen Fc7_{ÜS} und Fc7_{NS}

a) UV 366 nm

b) AAS



1	Fc7 _{NS}
2	Fc7 _{ÜS}

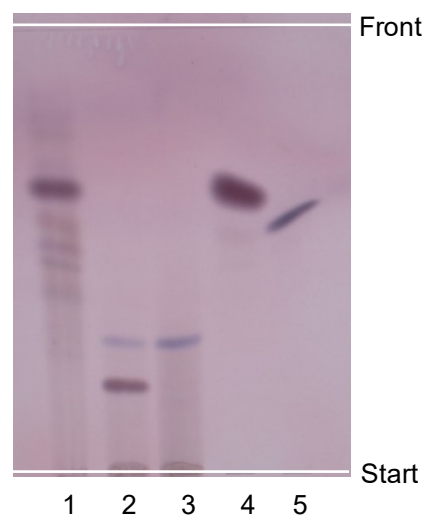
Mobile Phase: CHCl₃ / MeOH / H₂O 80+10+1, **Detektion:** UV 366 nm bzw. AAS

Unter UV 366 nm war anhand der intensiv rot fluoreszierenden Banden zu erkennen, dass Chlorophyll aus beiden Fraktionen nicht vollständig entfernt worden war.

Zur Charakterisierung der mit AAS violett bis bräunlich gefärbten Zonen wurde ein Vergleich mit den Substanzen CG1 und CG2 (Göbl, 2020) sowie mit β -Sitosterol durchgeführt.

Bei den Substanzen CG1 und CG2 handelte es sich um eine Mischung aus β -Sitosterol mit einer Fettsäure im Verhältnis 1:4 sowie um eine Mischung aus Urolsäure und Oleansäure im Verhältnis 1:5.

Abbildung 41: DC-Vergleich von Substanz CG1, CG2 und β -Sitosterol mit Fc7_{ÜS} und Fc7_{NS}



1	CG1
2	Fc7 _{NS}
3	Fc7 _{ÜS}
4	β -Sitosterol
5	CG2

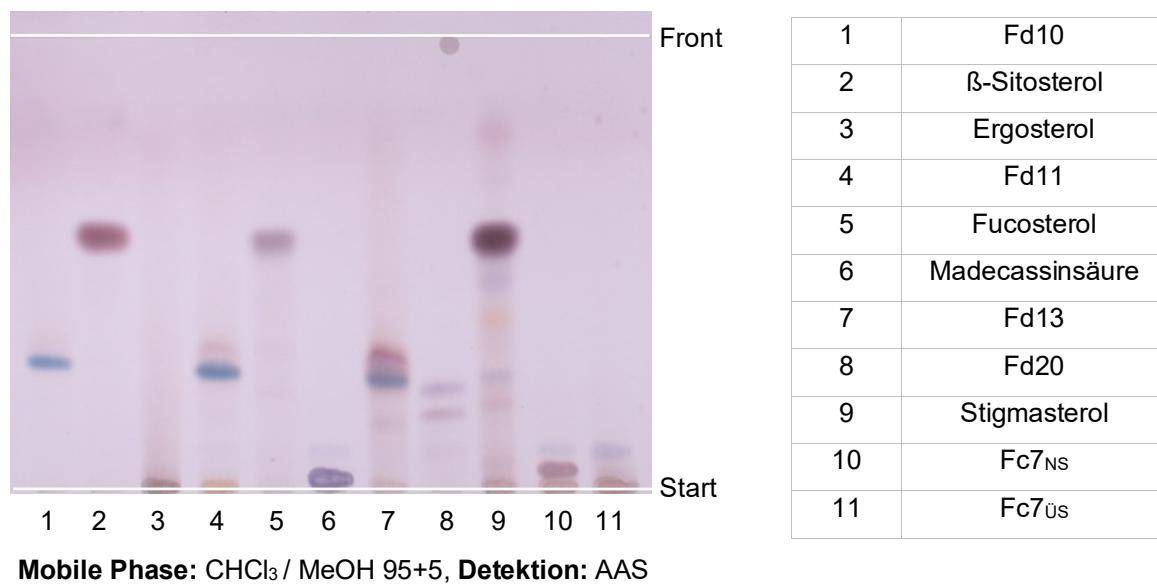
Mobile Phase: CHCl₃ / MeOH / H₂O 80+10+1, **Detektion:** AAS

Die DC zeigte deutlich, dass keine der Vergleichssubstanzen in Fraktionen Fc7_{ÜS} bzw. Fc7_{NS} enthalten ist.

Daher wurde ein Vergleich mit weiteren vorhandenen Fraktionen, einigen Sterolen, da diese nach dem Besprühen bläulich-violette Banden aufweisen, sowie Madecassinsäure durchgeführt (s. Abbildung 42).

Madecassinsäure ist ein Triterpen vom Ursan-Typ und konnte bereits in *Combretum racemosum* P. Beauv nachgewiesen werden (Wande et al., 2020).

Abbildung 42: DC-Vergleich verschiedener Fraktionen von *C.zenkeri* mit Sterolen



Die DC zeigte, dass in den Fraktionen keine der überprüften Sterole enthalten waren. Da die Banden von Madecassinsäure und der Fraktionen Fc7_{NS} und Fc7_{ÜS} kaum von der Startzone eluierten, wurde ein weiterer Vergleich mit einem anderen DC-System durchgeführt.

Abbildung 43: DC-Vergleich von Fc7_{NS} und &Fc7_{ÜS} mit Madecassinsäure

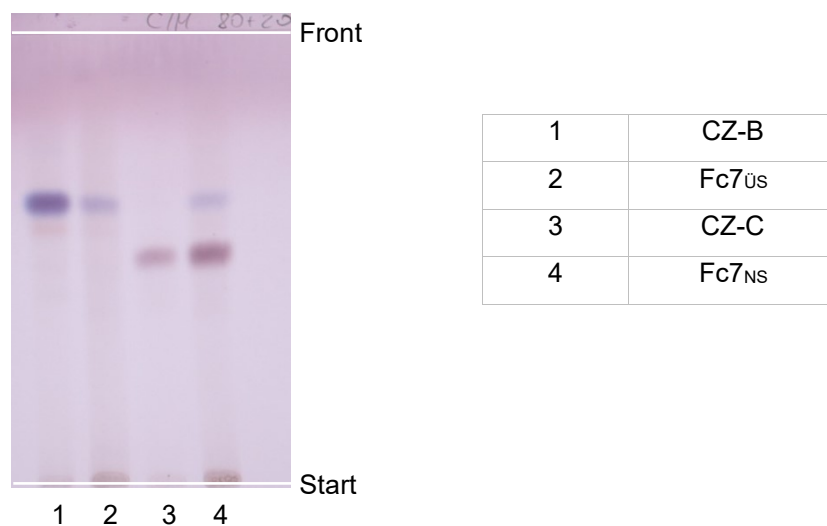


Mobile Phase: CHCl₃/MeOH/H₂O 80+10+1, **Detektion:** AAS

Anhand der DC konnte Madecassinsäure in beiden Fraktionen eindeutig ausgeschlossen werden.

Es wurde ein weiterer Vergleich mit bereits isolierten, aber noch nicht identifizierten Substanzen aus einer vorherigen Arbeit (Wande et al., 2019) durchgeführt.

Abbildung 44: DC-Vergleich von Fc7_{NS} und Fc7_{ÜS} mit Substanz CZ-B und CZ-C



Mobile Phase: CHCl₃ / MeOH 80+20, **Detektion:** AAS

Die DC zeigte, dass sich in Fraktion Fc7_{NS} sowohl die Substanz CZ-B als auch CZ-C befand. Da von dieser Fraktion 100 mg vorhanden war, wurde eine Auftrennung mittels Säulenchromatographie durchgeführt (s. 5.3.2., S. 38).

5.3.2. Fraktionierung mittels Säulenchromatographie

5.3.2.1. Auftrennung der Fraktion Fc7_{NS} (Säulenchromatographie SC 1)

Ziel der Säulenchromatographie war die Auftrennung der beiden Komponenten aus Fraktion Fc7_{NS} bei Rf 0,5 und Rf 0,64 (s. Abbildung 44, S. 37). Es standen 100 mg der Fraktion zur Verfügung. Die Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel als stationärer und einer Mischung von Chloroform, Methanol und Wasser als mobiler Phase durchgeführt. Die genauen Parameter der SC 1 sind Kapitel 7.2.4. (S. 52) zu entnehmen.

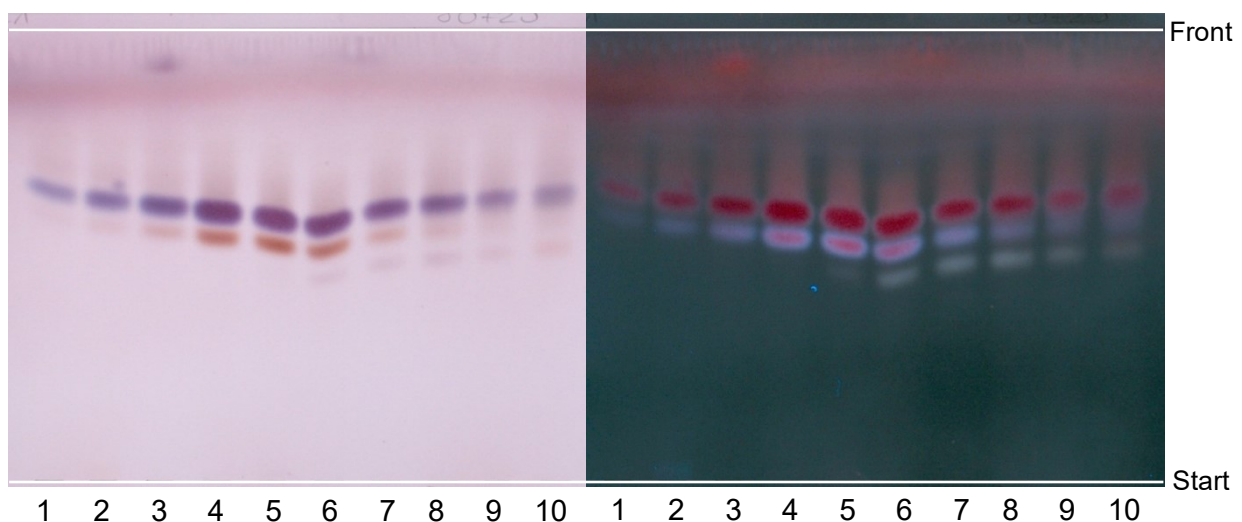
Ab Fraktion 30 wurde jede 10. Fraktion dünnschichtchromatographisch untersucht. Chlorophyll konnte in den ersten 130 Fraktionen vollständig entfernt werden.

Die beiden Hauptkomponenten konnten mit SC 1 in den Fraktionen 353-380 stark angereichert werden (s. Abbildung 45 und Abbildung 46, S. 39).

Abbildung 45: DC 1 der Fraktionen von SC 1

a) Tageslicht

b) UV 366 nm



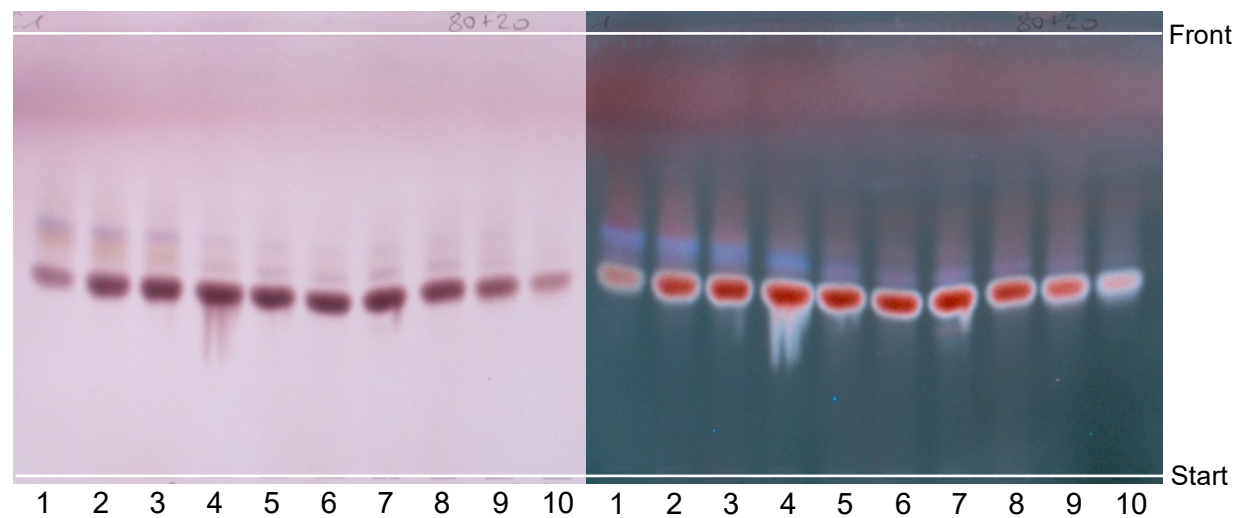
Mobile Phase: CHCl₃ / MeOH 80+20, **Detektion:** AAS

	Fraktion		Fraktion
1	353	6	358
2	354	7	359
3	355	8	360
4	356	9	361
5	357	10	362

Abbildung 46: DC 2 der Fraktionen von SC 1

a) Tageslicht

b) UV 366 nm



Mobile Phase: CHCl₃ / MeOH 80+20, **Detektion:** AAS

	Fraktion		Fraktion
1	367	6	374
2	368	7	375
3	369	8	377
4	371	9	379
5	373	10	382

Die Fraktionen, die ein einheitliches Inhaltsstoffmuster aufwiesen, wurden zu Sammel-fraktionen vereinigt.

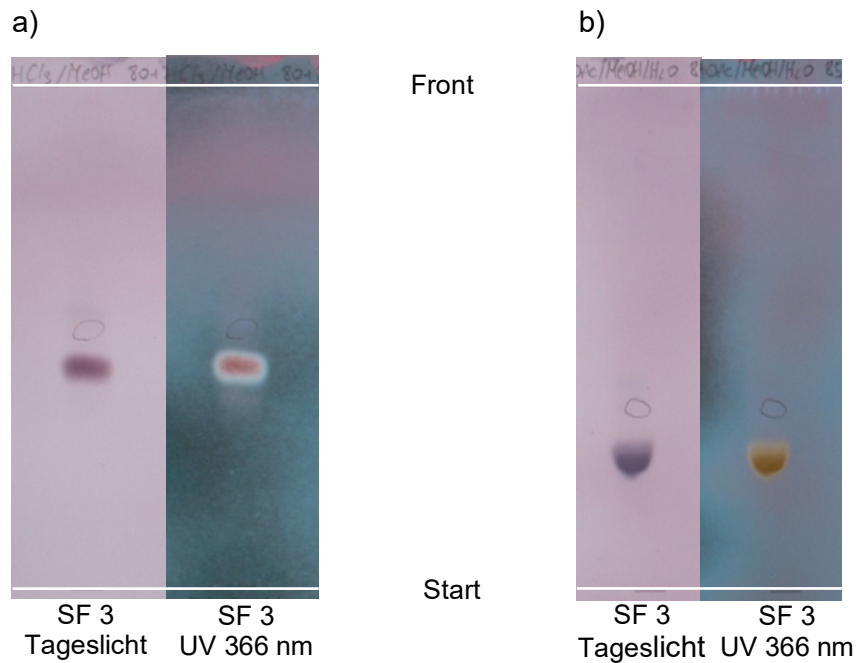
Tabelle 4: Sammel-fraktionen der SC 1

Sammel-fraktion	Fraktionen	Ausbeute
SF1	353-358	3,3 mg
SF2	359-360	0,7 mg
SF3	369-371	8,0 mg
SF4	373-380	13,0 mg

Aufgrund der geringen Ausbeuten konnten SF1 und SF2 nicht weiter bearbeitet werden. In den Sammel-fraktionen 3 und 4 war die Hauptkomponente bei R_f 0,45 stark angerei-chert. Von beiden Fraktionen war eine ausreichende Menge vorhanden um weitere Ana-lysen durchzuführen.

Um festzustellen, welche der beiden Sammelfractionen in dünnsschichtchromatographisch einheitlicherer Form vorhanden war, wurde eine DC-Überprüfung mit einer Konzentration von jeweils 1 mg/ml in zwei verschiedenen DC-Systemen durchgeführt (s. Abbildung 47 und Abbildung 48, S. 41).

Abbildung 47: DC der SF3 aus SC 1

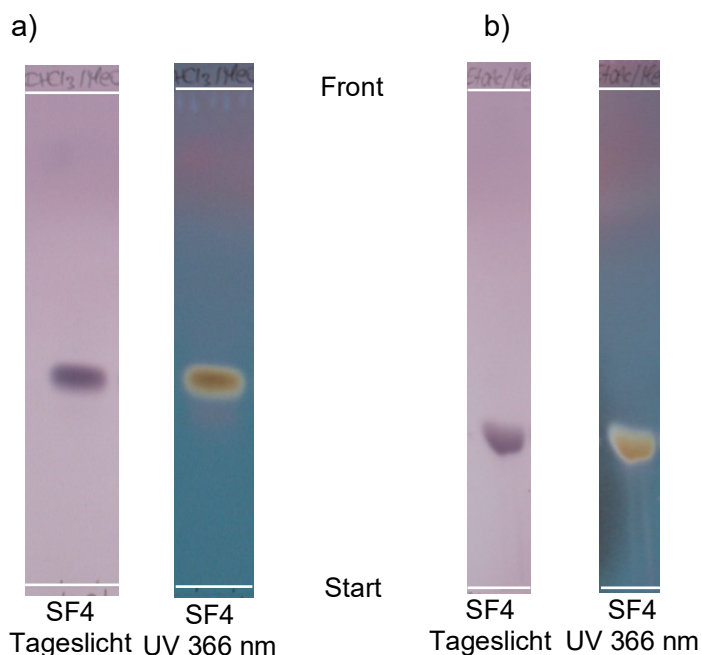


a) **Mobile Phase:** CHCl_3 / MeOH 80+20, **Detektion:** AAS

b) **Mobile Phase:** EtOAc / MeOH / H_2O 85+8+4, **Detektion:** AAS

Über der Bande der Hauptkomponente bei R_f 0,51 wurde nach dem Besprühen mit AAS eine schwach violette Bande detektiert. Das wies darauf hin, dass sich noch mindestens eine weitere Verbindung in SF3 befand, daher wurde diese Fraktion nicht weiter bearbeitet.

Abbildung 48: DC der SF4 aus SC 1



a) **Mobile Phase:** CHCl_3 / MeOH 80+20, **Detektion:** AAS

b) **Mobile Phase:** EtOAc / MeOH / H_2O 85+8+4, **Detektion:** AAS

Die Chromatogramme zeigten nach Besprühen mit AAS, dass die violette Bande bei R_f 0,42 in Abbildung 48a bzw. bei R_f 0,3 in Abbildung 48b in chromatographisch einheitlicher Form vorlag. Daher wurde die Substanz zur Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie untersucht (s. 5.3.3.).

5.3.3. Strukturaufklärung von Substanz MIK1

Bei Substanz MIK1 handelte es sich um SF4 der SC 1 (s. Abbildung 48). Es standen 13 mg zur Strukturaufklärung zur Verfügung. Die Substanz wurde für die NMR-Analysen in MeOH-d_4 gelöst⁸.

Es wurden $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ -, DQFCOSY-, HMBC-, HSQC-, NOESY- und TOCSY-Spektren aufgenommen. Es stellte sich heraus, dass es sich bei Substanz MIK1 um ein Gemisch aus zwei Komponenten im Verhältnis 1 : 0,35 handelte.

Als Hauptkomponente konnte Daucosterol, das 3-O-glucosid von β -Sitosterol, identifiziert werden (s. Abbildung 49, S. 42). Die zweite Komponente wies im Unterschied zu Daucosterol eine zusätzliche Hydroxygruppe in Position 5 auf. Die 5,6-Doppelbindung in Daucosterol war in der zweiten Komponente um eine Position nach C-6,7 verschoben (s. Abbildung 50, S. 44).

⁸ Die NMR-Spektren von Substanz MIK1 befinden sich im Anhang.

Die gemessenen NMR-Daten korrelierten mit den Daten der Literatur (Allaoua et al., 2016, Agnihotri et al., 2008) und die Substanz konnte als 24(R)-Ethylcholest-6-en-5 α -ol-3-O- β -D-glucopyranosid identifiziert werden.

Diese Verbindung wurde bisher nur in Blättern von *Nelumbo nucifera* Gaertn. nachgewiesen (Agnihotri et al., 2008).

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde diese Verbindung erstmals in der Familie der Combretaceae nachgewiesen.

Abbildung 49: Daucosterol (β -Sitosterol-3-O-glucosid)

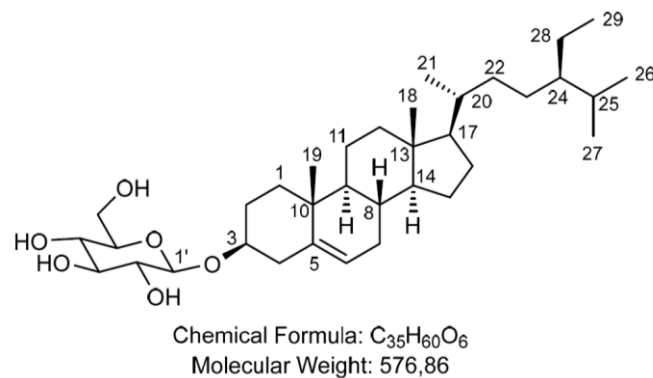
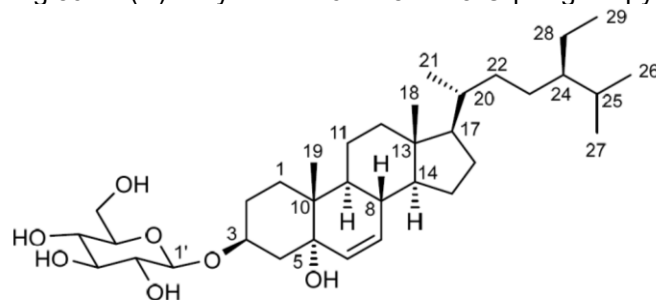


Tabelle 5: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR- Daten von Daucosterol in MeOH-d₄

		¹ H (ppm)	J _{H,H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹³ C (Lit.)
1	CH ₂	1.882	m	38.56	37.6
		1.087	m		
2	CH ₂	1.930	m	30.73	29.9
		1.617	m		
3	CH	3.590	t 11.4 / t 4.6	79.85	79.5
4	CH ₂	2.424	d 13.3 / d 4.6 / d 2.3	39.72	39.0
		2.261	m		
5	C	-	-	141.94	140.7
6	CH	5.374	d 5.2 / d 2.3 / d 1.8	122.77	122.4
7	CH ₂	1.985	m	33.07	32.3
		1.543	m		
8	CH	1.485	m	33.26	32.3
9	CH	0.954	m	51.74	50.6
10	C	-	-	37.89	37.1
11	CH ₂	1.544	m	22.18	21.2
12	CH ₂	2.048	m	41.16	40.8
		1.192	m		
13	C	-	-	43.50	42.7
14	CH	1.026	m	58.19	57.2
15	CH ₂	1.621	m	25.32	24.6
		1.115	m		
16	CH ₂	1.876	m	29.36	28.6
		1.301	m		
17	CH	1.140	m	57.47	56.4
18	CH ₃	0.725	s	12.30	12.1
19	CH ₃	1.035	s	19.84	19.5
20	CH	1.394	m	37.44	36.5
21	CH ₃	0.954	d 6.6	19.32	18.9
22	CH ₂	1.378	m	35.11	34.3
		1.047	m		
23	CH ₂	1.212	m	27.17	26.4
24	CH	0.953	m	47.29	46.2
25	CH	1.688	m	30.39	29.5
26	CH ₃	0.861	d 6.8	20.18	19.9
27	CH ₃	0.841	d 6.8	19.40	19.2
28	CH ₂	1.321	m	24.15	23.4
		1.257	m		
29	CH ₃	0.872	t 7.4	12.33	12.3
1'	CH	4.381	d 7.8	102.46	101.5
2'	CH	3.141	d 7.8 / d 9.2	75.15	74.0
3'	CH	3.346	d 9.2 / d 8.7	78.11	76.9
4'	CH	3.273	d 8.7 / d 9.6	71.69	70.7
5'	CH	3.255	d 9.6 / d 2.2 / d 5.5	77.90	76.3
6'	CH ₂	3.849	d 11.9 / d 2.2	62.79	62.2
		3.650	d 11.9 / d 5.5		

Abbildung 50: 24(R)-Ethylcholest-6-en-5 α -ol-3-O- β -D-glucopyranosid



Chemical Formula: C₃₅H₆₀O₇
Molecular Weight: 592,86

Tabelle 6: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR- Daten von 24(R)-Ethylcholest-6-en-5 α -ol-3-O- β -D-glucopyranosid in MeOH-d₄

		¹ H (ppm)	J _{H,H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹³ C (Lit., pyridine-d ₅)
1	CH ₂	1.543 1.349	m m	29.78	29.0
2	CH ₂	1.969 1.703	m m	a 29.49	30.3
3	CH	4.153	m	75.80	75.6
4	CH ₂	2.486 1.487	m m	33.47	34.0
5	C	-	-	84.20	83.1
6	CH	5.615	d 10.0 / d 2.8	131.56	133.9
7	CH	5.746	d 10.0 / d 2.2	134.07	132.2
8	CH	1.967	m	40.21	39.4
9	CH	1.790	m	45.21	44.6
10	C	-	-	39.51	39.0
11	CH ₂	1.371 1.304	m m	21.93	21.5
12	CH ₂	2.046 1.200	m m	41.41	40.6
13	C	-	-	44.77	44.0
14	CH	1.286	m	55.05	54.1
15	CH ₂	1.723 1.286	m m	24.84	24.4
16	CH ₂	1.921 1.346	m m	a 29.55	29.5
17	CH	1.160	m	57.37	56.5
18	CH ₃	0.735	s	12.45	12.5
19	CH ₃	0.975	s	15.70	15.7
20	CH	1.394	m	37.45	36.8
21	CH ₃	0.949	d 6.6	19.24	19.2
22	CH ₂	1.378 1.047	m m	35.11	34.5
23	CH ₂	1.212	m	27.22	26.8
24	CH	0.953	m	47.28	46.4
25	CH	1.688	m	30.39	29.8
26	CH ₃	0.863	d 6.8	20.20	20.3
27	CH ₃	0.842	d 6.8	19.39	19.6
28	CH ₂	1.321 1.257	m m	24.15	23.7
29	CH ₃	0.873	t 7.4	12.33	12.5
1'	CH	4.413	d 7.8	102.8	104.0
2'	CH	3.144	d 7.8 / d 9.2	75.16	75.8
3'	CH	3.353	m	78.13	78.9
4'	CH	3.302	m	71.72	72.0
5'	CH	3.250	m	77.88	78.5
6'	CH ₂	3.872 3.666	d 11.9 / d 1.6 m	62.84	63.1

6. Diskussion und Schlussfolgerung

Die Verwendung von Arzneipflanzen ist schon lange ein unverzichtbarer Bestandteil der traditionellen Medizin. Die Wirkungen können durch eine Hauptkomponente hervorgerufen werden, ergeben sich aber sehr oft aus einem Synergismus von Sekundärstoffen, die in den Arzneipflanzen enthalten sind. Daher ist die Charakterisierung des Profils an Inhaltsstoffen einer Arzneipflanze ein wichtiges Forschungsgebiet in der Pharmakognosie.

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, Sekundärstoffe von drei in der traditionellen Medizin verwendeten Arzneipflanzen, *Dorema ammoniacum* D. Don, *Scrophularia lucida* L. und *Combretum zenkeri* Engl. & Diels, zu charakterisieren und Reinsubstanzen zu isolieren.

Mithilfe der Flash Chromatography konnte aus einer Fraktion aus einem Dichlormethanextrakt von *D. ammoniacum* eine Substanz isoliert werden, die dünnschichtchromatographisch einheitlich schien. Untersuchungen mittels LC-MS und HRMS zeigten jedoch, dass es sich um ein Substanzgemisch handelte. Die Analyse ergab drei Hauptkomponenten mit demselben Molekulargewicht von 808 g/mol. Als Summenformel wurde $C_{49}H_{60}O_{10}$ ermittelt. Bisher ist kein Naturstoff mit diesem Molekulargewicht und dieser Summenformel bekannt. Zur weiteren Aufreinigung stand nicht genügend Substanz zur Verfügung.

In verschiedenen Ethylacetatfraktionen eines methanolischen Extraktes von *S. lucida* konnten mittels DC- und HPLC- Analysen die Flavonoide Nepitrin, Homoplantaginin und Kämpferol-3-O-rutinosid sowie das Vorliegen von Kaffeesäure bestätigt werden.

Eine LC-MS-Analyse einer weiteren Ethylacetatfraktion von *S. lucida*, die bei der DC eine blau fluoreszierende Hauptkomponente bei R_f 0,66 aufwies, gab aufgrund des Abspaltungsmusters im Positivionen-MS2 Hinweise auf das Vorliegen einer Verbascosid-ähnlichen Struktur. Zur eindeutigen Strukturaufklärung wäre eine Aufreinigung dieser Fraktion notwendig, welche aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht möglich war.

Aus einer Chloroformfraktion eines methanolischen Extraktes aus *C. zenkeri* konnte Substanz MIK1 mittels Säulenchromatographie isoliert werden. Zur Strukturaufklärung wurde die Substanz mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Es handelte sich bei MIK1 um ein Gemisch aus zwei Verbindungen. Als Hauptkomponente konnte Daucosterol

identifiziert werden, bei der zweiten Komponente handelte es sich um ein Phytosteringlykosid, 24(R)-ethylcholest-6-ene-5 α -ol-3-O- β -d-glucopyranosid, das bisher nur in den Blättern der Indischen Lotusblume nachgewiesen wurde.

In der vorliegenden Diplomarbeit konnte dieser seltene Naturstoff erstmals in einem Extrakt aus Blättern von *C. zenkeri* nachgewiesen werden.

Damit konnten in der vorliegenden Diplomarbeit einige bekannte und weit verbreitete sowie einzelne sehr seltene Naturstoffe identifiziert und zum Teil isoliert werden. In weiterführenden Untersuchungen der drei Arzneipflanzen wäre die Isolierung weiterer Sekundärstoffe möglich. Das war zum einen aufgrund der geringen Substanzmengen und zum anderen aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

7. Material und Methoden

7.1. Untersuchungsmaterial

Aus vorangegangenen Diplomarbeiten waren Fraktionen aus einem Dichlormethanextrakt von *Dorema ammoniacum* D. Don (Lutz, 2013), aus einer Ethylacetat- und einer Chloroformfraktion aus einem methanolischen Extrakt von *Scrophularia lucida* L. (Ledermüller, 2015, Lewenhofer, 2014, Schweighofer, 2015, Spitznagl, 2015, Sumetsberger, 2016) und aus einer Chloroformfraktion aus dem methanolischen Extrakt von *Combretum zenkeri* Engl. & Diels. (Göbl, 2020) vorhanden. Aus ausgewählten Fraktionen, die in genügender Menge vorhanden waren, sollten im Zuge dieser Diplomarbeit weitere Sekundärstoffe isoliert bzw. identifiziert werden.

7.2. Methoden

7.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie wurde zur Überprüfung einzelner Fraktionen und für den Vergleich mit Referenzsubstanzen herangezogen.

Es wurden verschiedene DC-Systeme verwendet:

Stationäre Phase: Kieselgel Fertigplatten 60 F₂₅₄ der Firma Merck

Mobile Phasen:

CHCl₃ / AA conc. / MeOH / H₂O: 60+32+12+8

CHCl₃ / MeOH: 97+3 bzw. 95+5 bzw. 80+20

CHCl₃ / MeOH / H₂O: 80+10+1

DCM / EtOAc / MeOH: 100+7+3 bzw. 100+6+2 bzw. 100+5+1

EtOAc / FA conc. / AA conc. / H₂O: 100+11+11+20 bzw. 100+11+11+10 bzw. 100+11+11+8

EtOAc / MeOH / FA conc. / H₂O: 70+8+4+4 bzw. 70+8+4+2

EtOAc / MeOH / H₂O: 85+8+4

Detektion:

Zur Detektion wurden unterschiedliche Sprühreagenzien verwendet:

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AAS)

Herstellung: 1,5 ml Anisaldehyd + 30 ml Essigsäure conc. + 255 ml Methanol + 15 ml Schwefelsäure conc.

Nach dem Besprühen mit AAS wurden die DC-Platten 3-5 min im Trockenschrank bei 105°C getrocknet und bei Tageslicht ausgewertet.

Naturstoff A/Polyethylenglykol (NST A / PEG)

Die DC-Platten wurden zuerst mit einer 1%igen methanolischen NST A Lösung und nach kurzem Übertrocknen mit einer 5%igen ethanolischen Lösung von PEG 400 besprüht. Danach konnten die DC-Platten unter UV 366 nm ausgewertet werden.

7.2.2. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde zur Reinheitsprüfung isolierter Substanzen und zur Bestimmung der prozentuellen Anteile der Hauptkomponenten in Gemischen eingesetzt. Außerdem wurden HPLC-Analysen als Vorversuche für optimale Trennungen für nachfolgende LC-MS Analysen durchgeführt.

Vor jeder Messung wurde die Säule 5 min lang mit 95% B gespült und danach 20 min mit der Anfangskonzentration equilibriert.

Folgende HPLC-Parameter wurden verwendet:

Tabelle 7: HPLC-Parameter

Gerät	Shimadzu	Injektionsvolumen	10 µl
Pumpe	LC-20AD	Temperatur	25 °C
Detektor	Diode Array Detektor SPD-M20A	Konzentration der Untersuchungslösung	1 mg/ml
Säulenofen	CTO-20AC	Flussrate	1 ml/min
Autosampler	SIL-20AC HT	Detektion	254 nm 315 nm

Es wurden zwei verschiedene Säulen und Fließmittel verwendet:

Tabelle 8: Säulen und Fließmittel HPLC

Säule 1	Luna 5µ C18 250 x 4.6 mm Phenomenex, USA	Fließmittel 1	A: 0,1% Ameisensäure (pH 3) B: ACN/ 0,1% Ameisensäure (pH 3) (80+20)
Säule 2	Acclaim 3µ 120 C18 155 x 2.1 mm Thermo Scientific	Fließmittel 2	A: 0,1% Ameisensäure (pH 3) B: ACN

Es kamen verschiedene Gradienten zur Anwendung:

Tabelle 9: Gradienten HPLC

Gradient	Konzentration	Zeit
Gradient 1	5% B → 95% B	60 min
Gradient 2	5% B → 20% B	15 min
	20% B isokratisch	10 min
	20% B → 42,5% B	30 min
	42,5% B → 95% B	1 min
Gradient 3	50% B → 75% B	30 min
	75% B → 95% B	20 min

7.2.3. Flash Chromatography (FC)

Die Flash Chromatography wurde zur Auftrennung von verschiedenen Substanzgemischen verwendet.

Herstellung des Dryloads:

Die jeweilige Fraktion wurde in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und gleichmäßig auf der doppelten Menge Kieselgel 60 (Maschenweite 70-230, Fa. Merck) verteilt. Das Gemisch wurde in eine passende Kartusche gefüllt und mit Kieselgel 60 aufgefüllt.

Es kam das Gerät Interchim PuriFlash 4250 zur Anwendung.

Folgende FC-Parameter wurden verwendet:

Tabelle 10: Flash Chromatography 1 - Parameter

Säule	Puriflash Column Silica HP 4 g	
Detektor	UV/VIS und ELSD	
Fließmittel	A: Chloroform B: Methanol	
Flussrate	5 ml/min	
Gradient	Konzentration	Zeit
	100% A + 0% B	20 min
	99% A + 1% B	20 min
	98% A + 2% B	20 min
	97% A + 3% B	5 min
	96% A + 4% B	5 min
	95% A + 5% B	10 min
	94% A + 6% B	10 min

Tabelle 11: Flash Chromatography 2 - Parameter

Säule	Puriflash Column Silica HP 4 g	
Detektor	UV/VIS und ELSD	
Fließmittel	A: Chloroform B: Methanol	
Flussrate	5 ml/min	
Gradient	Konzentration	Zeit
	100% A + 0% B	30 min
	99% A + 1% B	30 min
	98% A + 2% B	12 min
	97% A + 3% B	11 min
	94% A + 6% B	10 min
	91% A + 9% B	10 min
	88% A + 12% B	10 min
	83% A + 17% B	8 min

Tabelle 12: Flash Chromatography 3 - Parameter

Säule	Puriflash Column Silica HP 4 g	
Detektor	UV/VIS und ELSD	
Fließmittel	A: Chloroform B: Methanol	
Flussrate	5 ml/min	
Gradient	Konzentration	Zeit
	100% A + 0% B	30 min
	99% A + 1% B	25 min
	98% A + 2% B	15 min
	95% A + 5% B	15 min
	92% A + 8% B	8 min
	89% A + 11% B	12 min
	83% A + 17% B	10 min

Tabelle 13: Flash Chromatography 4 - Parameter

Säule	Puriflash Column Silica HP 12 g	
Detektor	UV/VIS und ELSD	
Fließmittel	A: Chloroform B: Methanol C: Aqua _{dest.}	
Flussrate	15 ml/min	
Gradient	Konzentration	Zeit
	93% A + 7% B	30 min
	88% A + 11% B + 1% C	20 min
	82% A + 17% B + 1% C	20 min

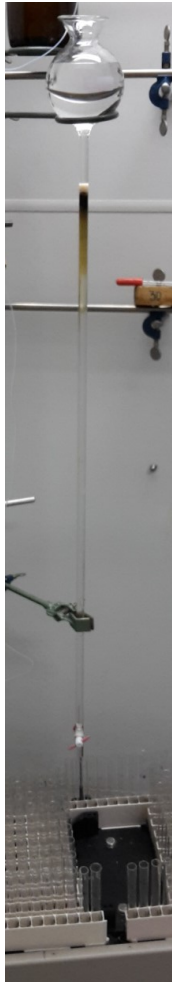
Tabelle 14: Flash Chromatography 5 - Parameter

Säule	Puriflash Column Silica HP 25 g	
Detektor	UV/VIS und ELSD	
Fließmittel	A: Chloroform B: Methanol	
Flussrate	15 ml/min	
Gradient	Konzentration	Zeit
	98% A + 2% B	15 min
	95% A + 5% B	15 min
	93% A + 7% B	15 min

7.2.4. Säulenchromatographie (SC)

Zur Auftrennung einer Fraktion aus *Combretum zenkeri* Engl. & Diels wurde die Säulenchromatographie verwendet.

Abbildung 51: Säulenchromatographie - Parameter



Durchmesser: 1 cm
Länge: 60 cm
Stationäre Phase: Kieselgel 60
(Maschenweite 70-230)
Fließmittel: A: CHCl_3
B: MeOH
C: Aqua_{dest.}

Folgender Fließmittelgradient wurde für die Auftrennung eingesetzt:

Tabelle 15: Säulenchromatographie - Fließmittelgradient

CHCl_3	MeOH	H_2O	Zeit	Fraktionen
95	1,5	0,1	44 Std 30 min	1-170
90	3	0,1	22 Std 30 min	171-273
85	8	0,45	73 Std 30 min	274-499
85	10	0,5	26 Std 30 min	500-553

7.2.5. Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Tabelle 16: LC-MS Parameter

Gerät	Dionex Ultimate 3000 UHPLC + Thermo Fischer LTQ-Ion trap MS	Säule	Luna 5µ C18 250 x 4.6 mm Phenomenex, USA	
Fließmittel	A: 0,1% Ameisensäure B: ACN	Konzentration der Untersuchungslösung	1 mg/ml	
Flussrate	500 µl	Injektionsvolumen	10 µl	
Temperatur	40 °C	Gradient	Konzentration	Zeit
			5% B → 20% B	15 min
			20% B isokratisch	10 min
			20% B → 42,5% B	30 min
			42,5% B → 95% B	10 min

7.2.6. Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

Die hochauflösende MS wurde zur Bestimmung der Summenformeln verschiedener Substanzen eingesetzt.

Tabelle 17: HRMS-Parameter

Gerät	Dionex Ultimate 3000 UHPLC + Bruker maXis II – O-TOF	Säule	Kintex C8 150 x 2.1 mm Phenomenex, USA	
Fließmittel	A: Aqua _{dest.} + 0.1% Ameisensäure B: ACN + 0.1% Ameisensäure	Konzentration der Untersuchungslösung	1 mg/ml	
Flussrate	0.3 ml/min	Injektionsvolumen	5 µl	
Temperatur	40 °C	Gradient	Konzentration	Zeit
			50% B → 98% B	53 min

7.2.7. NMR-Spektroskopie⁹

Die NMR-Analysen zur Strukturaufklärung wurden an einem Avance III HDX 700 MHz NMR-Spektrometer (Bruker BioSpin, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels TopSpin (Bruker BioSpin, Deutschland).

Messfrequenz: ^1H -NMR: 700.40 MHz und ^{13}C -NMR: 176.12 MHz

Messtemperatur: 298 K

Lösungsmittel: MeOH- d_4

Es wurden 1D-Experimente (^1H -NMR, ^{13}C -NMR) und 2D-Experimente (DQFCOSY, HMBC, HSQC, NOESY und TOCSY) durchgeführt.

⁹ Ich bedanke mich bei Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für organische Chemie, Universität Wien, für die NMR-Experimente und Strukturklärung.

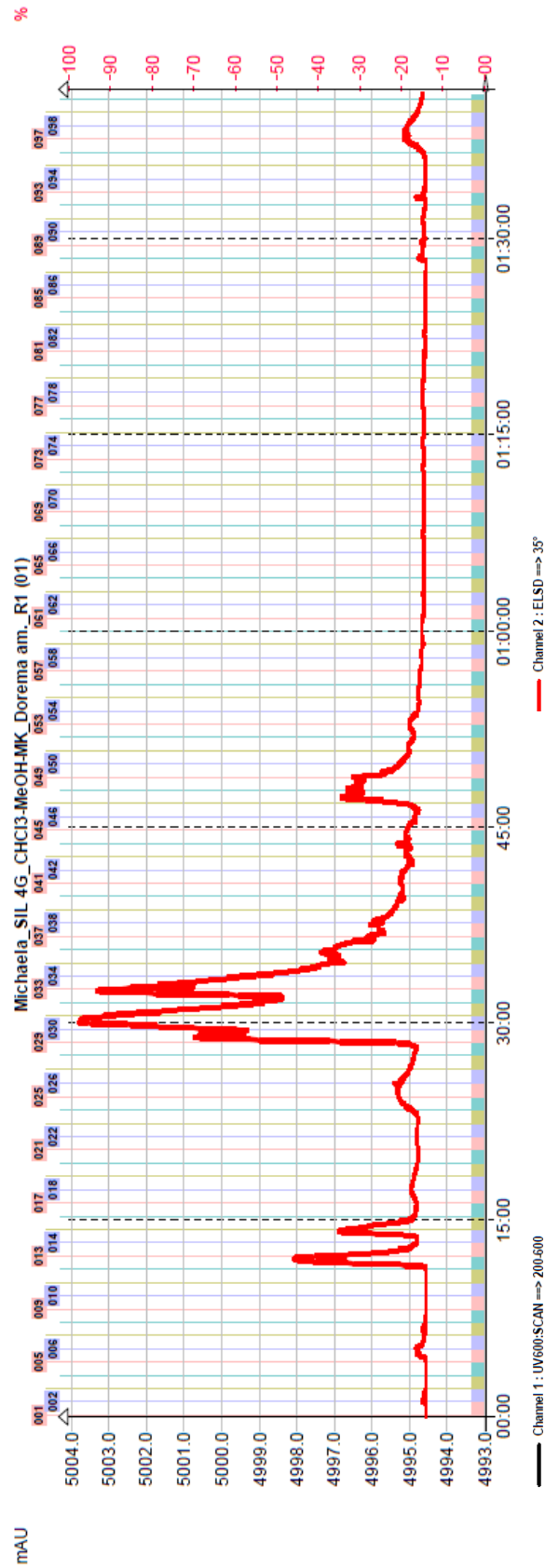
8. Literaturverzeichnis

- Adhami, H.R., Lutz, J., Kählig, H., Zehl, M., Krenn, L. (2013). Compounds from Gum Ammoniacum with Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *Scientia Pharmaceutica*, 81, 793-805.
- Agnihotri, A.K., ElSohly, H.N., Khan, S.I., Jacob, M.R., Joshi, V.C., Smillie, T., Khan, I.A., Walker, L.A. (2008). Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity. *ScienceDirect, Phytochemistry Letters* 1, 89-93
- Allaoua, Z., Benkhaled, M., Dibi, A., Long, C., Aberkane, M.C., Bouzidi, S., Kassah-Laouar, A., Haba, H. (2016). Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Pteranthus dichotomus* from Algerian Sahara. *Natural Product Research*, 30:6, 700-704.
- Buso, P., Manfredini, S., Ahmadi-Ashtiani, H.R., Sciabica, S., Buzzi, R., Vertuani, S., Baldisserotto, A. (2020). Iranian Medicinal Plants: From Ethnomedicine to Actual Studies. *Medicina*, 56(97), 1-53.
- Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A., Pandey, D.K. (2017). Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnology Advances*, 35, 178-216.
- Giessrigl, B., Yazici, G., Teichmann, M., Kopf, S., Ghassemi, S., Atanasov, A.G., Dirshc, V.M., 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, 2063-2074.
- Göbl, C. (2020). Isolation and Characterisation of Secondary Metabolites of *Combretum zenkeri*. Diplomarbeit, Universität Wien.
- Heinrich, M., Gibbons, S. (2001). Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 425-432.
- Ledermüller, T. (2015). Charakterisierung von Phenylpropan-Verbindungen aus *Scrophularia lucida*. Diplomarbeit, Universität Wien.
- Lewenhofer, V. (2014). Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*. Diplomarbeit, Universität Wien.
- Lewenhofer, V., Schweighofer, L., Ledermüller, T., Eichsteininger, J., Kählig, H., Zehl, M., Nguyen, C.H., Krupitza, G., Özmen, A., Krenn, L. (2018). Chemical Composition of *Scrophularia lucida* and the Effects on Tumor Invasiveness in Vitro. *Frontiers in Pharmacology* 9, 304, 1-9.
- Lutz, J. (2013). Isolierung von Inhaltsstoffen aus dem Harz von *Dorema ammoniacum* D.Don. Diplomarbeit, Universität Wien.
- Schweighofer, L. (2015). Aktivitätsgeleitete Untersuchungen von *Scrophularia lucida* L. Diplomarbeit, Universität Wien.
- Spitznagl, A.M. (2015). Zum Phenolmuster von *Scrophularia lucida* L. . Diplomarbeit, Universität Wien.
- Sumetsberger, E. (2016). Untersuchung phenolischer Inhaltsstoffe aus *Scrophularia lucida*. Diplomarbeit, Universität Wien.
- Ujowundu, C.O., Okafor, O.E., Agha, N.C., Nwaogu, L.A., Igwe, K.O., Igwe, C.U. (2010). Phytochemical and chemical composition of *Combretum zenkeri* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(10), 965-968.

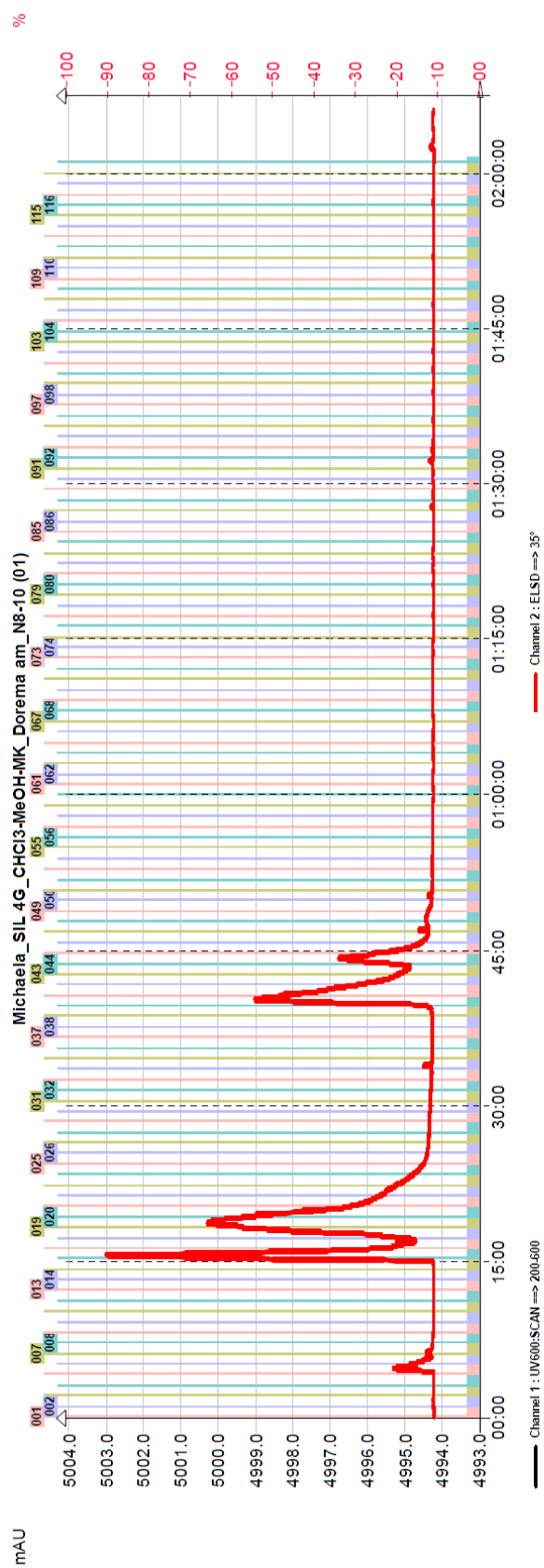
- Ujowundu, C.O., Ogbonna, C.U., Okwu, G.N., Alisi, C.S. (2015). Free Radicals Scavenging and Neuroprotective Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Combretum zenkeri* Leaf. *Annual Research & Review in Biology*, 6(2), 133-141.
- Wande, O., Babatunde, S., Kählig, H., Taramelli, D., Krenn, L. (2019). Isolation of Two Homologous Triterpenes with Antimalarial Activities from the Leaf Extract of *Combretum Zenkeri*. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 57(3), 21-30.
- Wande, O.M., Babatunde, S.B., Kählig, H., Zehl, M., Parapini, S., D'Alessandro, S., Taramelli, D., Krenn, L. (2020). Antiplasmodial activity of triterpenes isolated from the methanolic leaf extract of *Combretum racemosum* P. Beauv. *Journal of Ethnopharmacology*, 247.
- Wande, O.M., Babatunde, S.B. (2017). In vitro screening of ten Combretaceae plants for antimalarial activities applying the inhibition of beta-hematin formation. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(6), 2971-2981.
- Zandpour, F., Vahabi, M.R., Allafchian, A.R., Farhang, H.R. (2016). Phytochemical investigation of the essential oils from the leaf and stem of *Dorema ammoniacum* D. Don (Apiaceae) in Central Zagros, Iran. *Journal of Herbal Drugs*, 7(2), 109-116.
- Zengin, G., Stefanucci, A., Rodrigues, M.J., Mollica, A., Custodio, L., Aumeeruddy, M.Z., Mahomoodally, M.F. (2018). *Scrophularia lucida* L. as a valuable source of bioactive compounds for pharmaceutical applications: In vitro antioxidant, anti-inflammatory, enzyme inhibitory properties, in silico studies, and HPLC profiles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, 225-233

Anhang

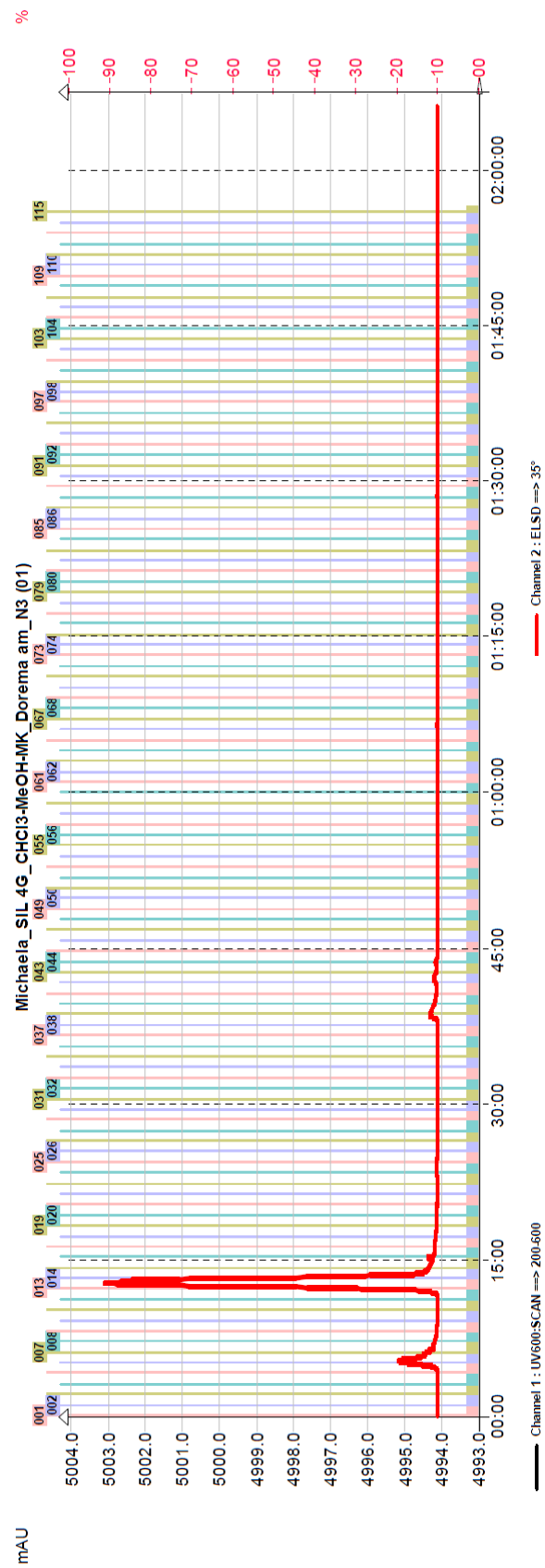
Anhang 1: Flash Chromatogramm von Fraktion R1 (FC 1)



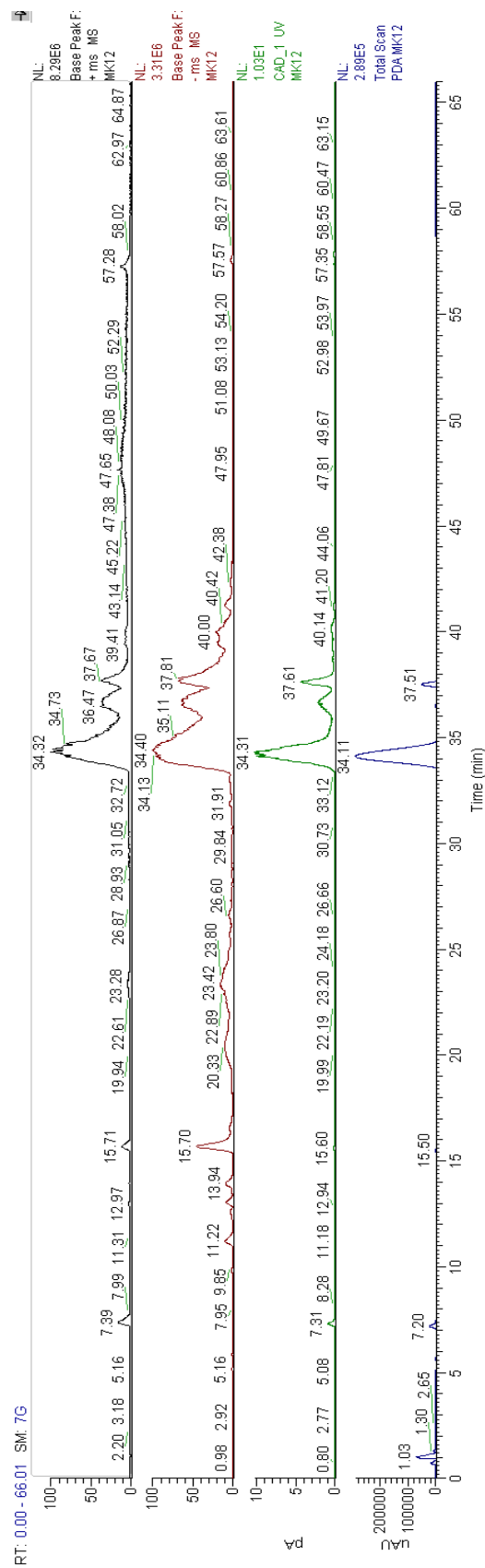
Anhang 2: Flash Chromatogramm von Fraktion N8-N10 (FC 2)



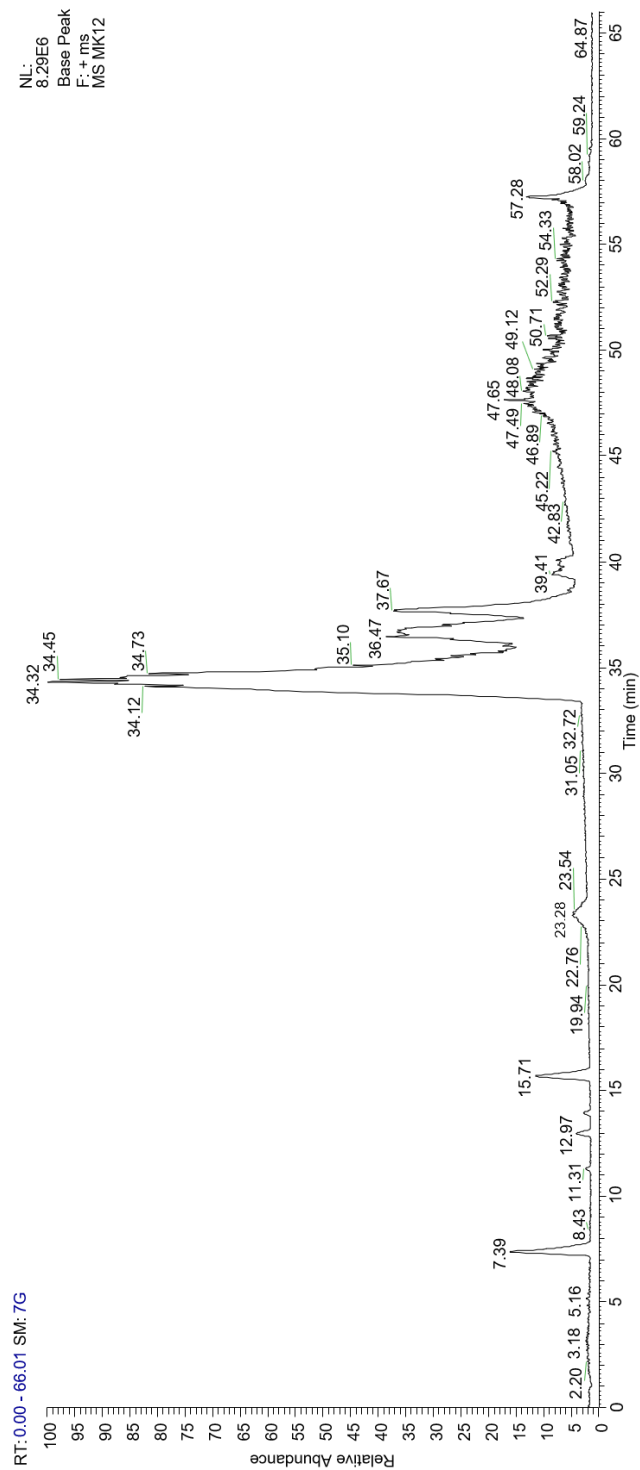
Anhang 3: Flash Chromatogramm von Fraktion N3 (FC 3)



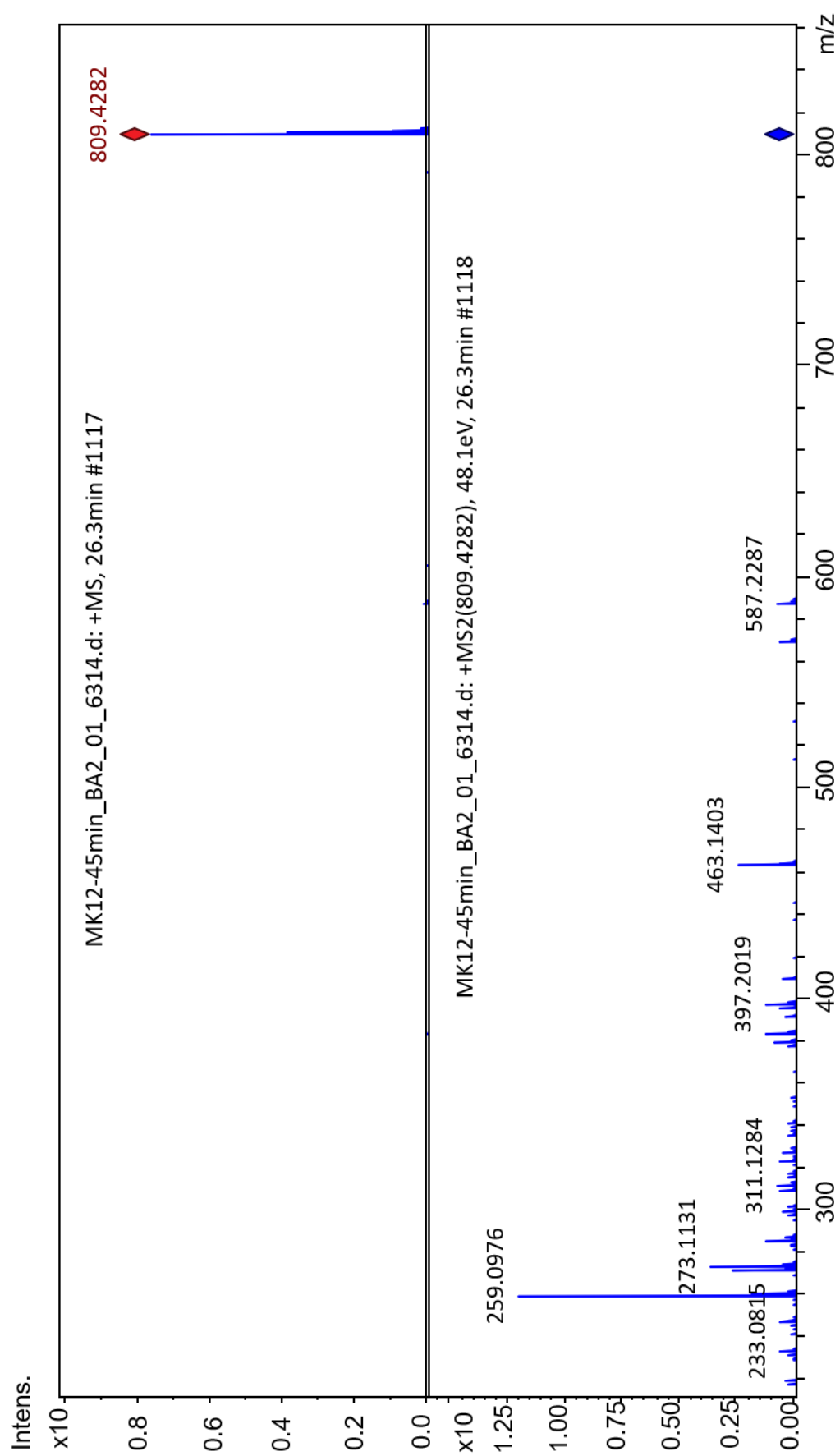
Anhang 4: Übersicht LC-MS-Chromatogramme von MK12



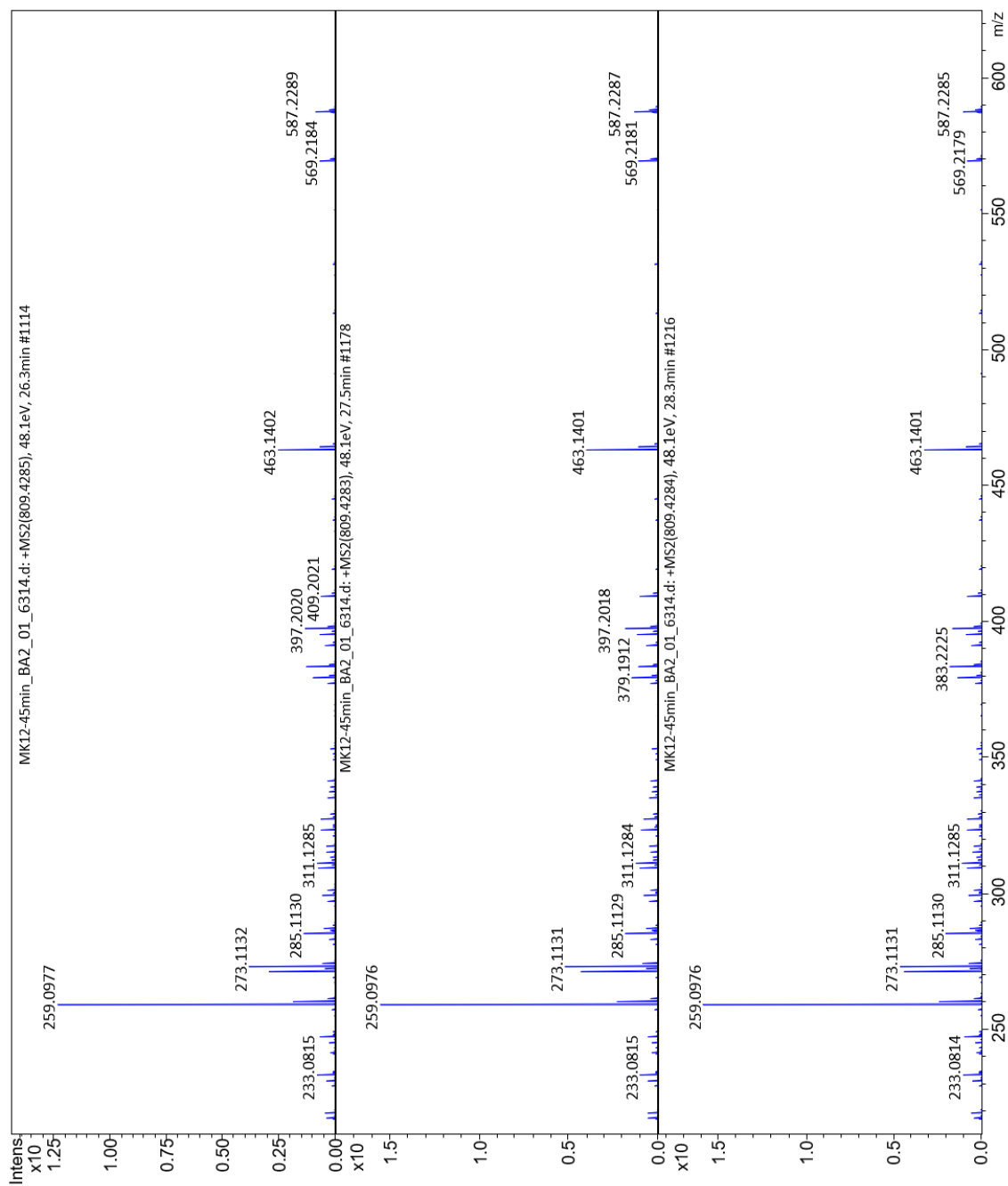
Anhang 5: LC-MS-Chromatogramm (TIC) von MK12



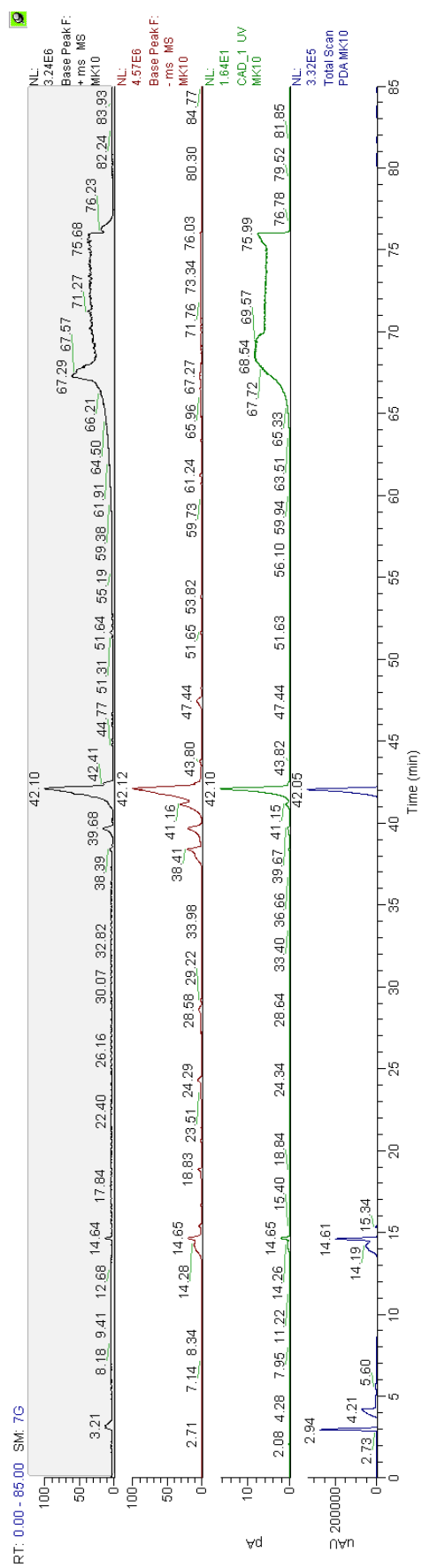
Anhang 6: HRMS-Spektren von MK12 im Positivionenmodus



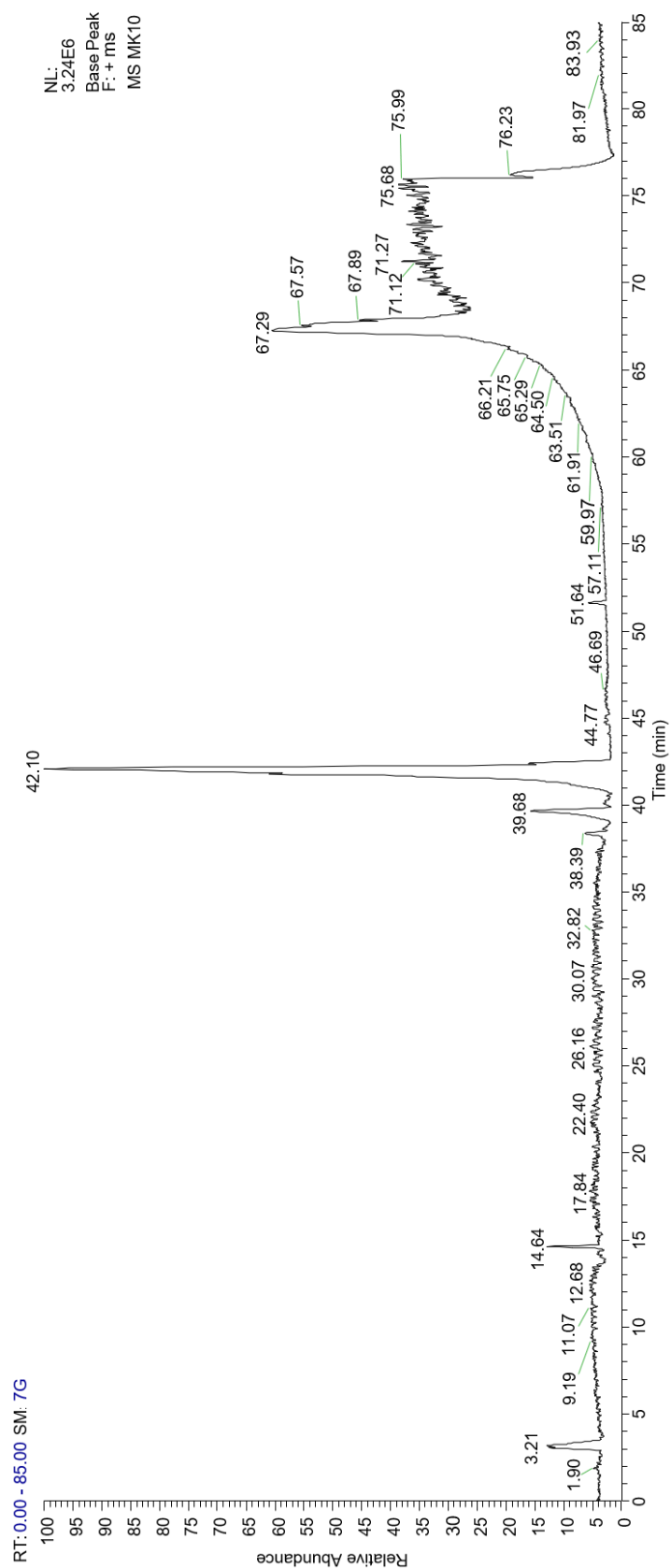
Anhang 7: HRMS-2-Spektren von MK12 im Positivionenmodus



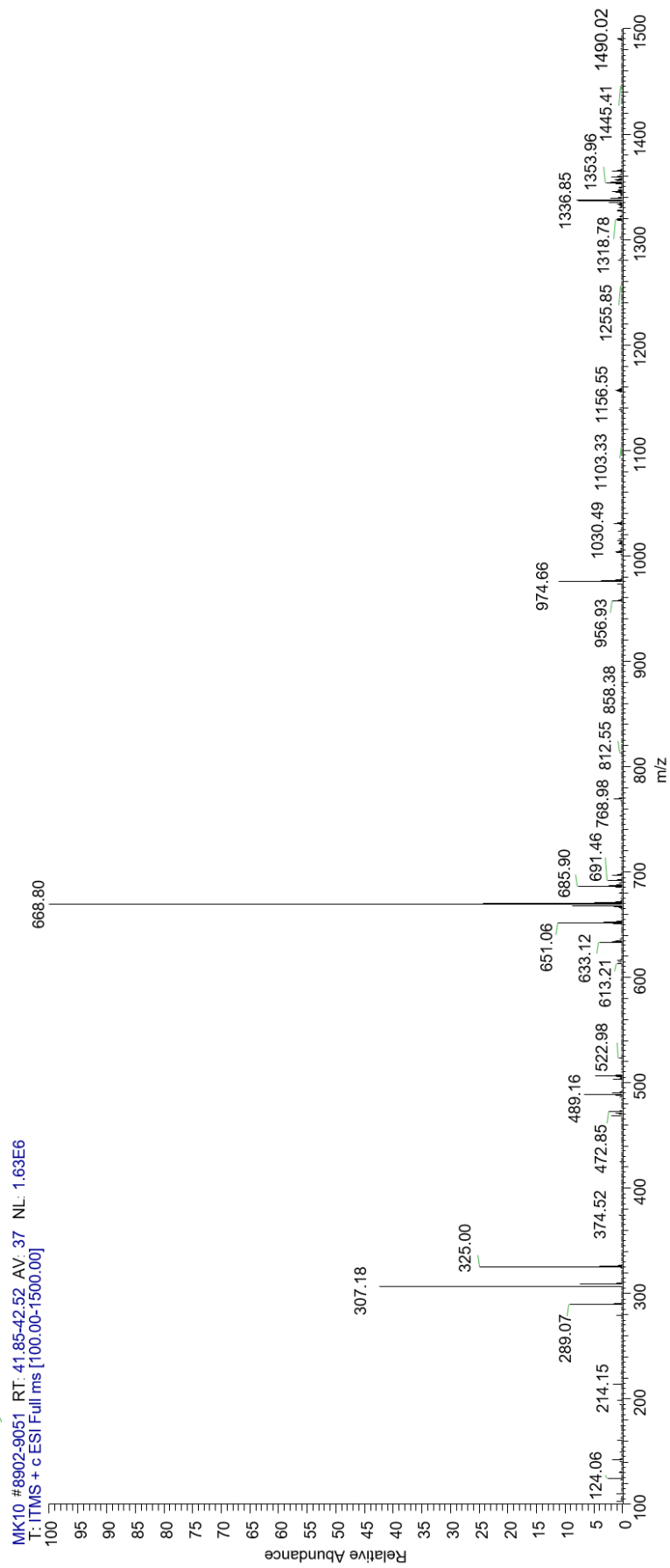
Anhang 8: Übersicht LC-MS-Chromatogramme von MK10



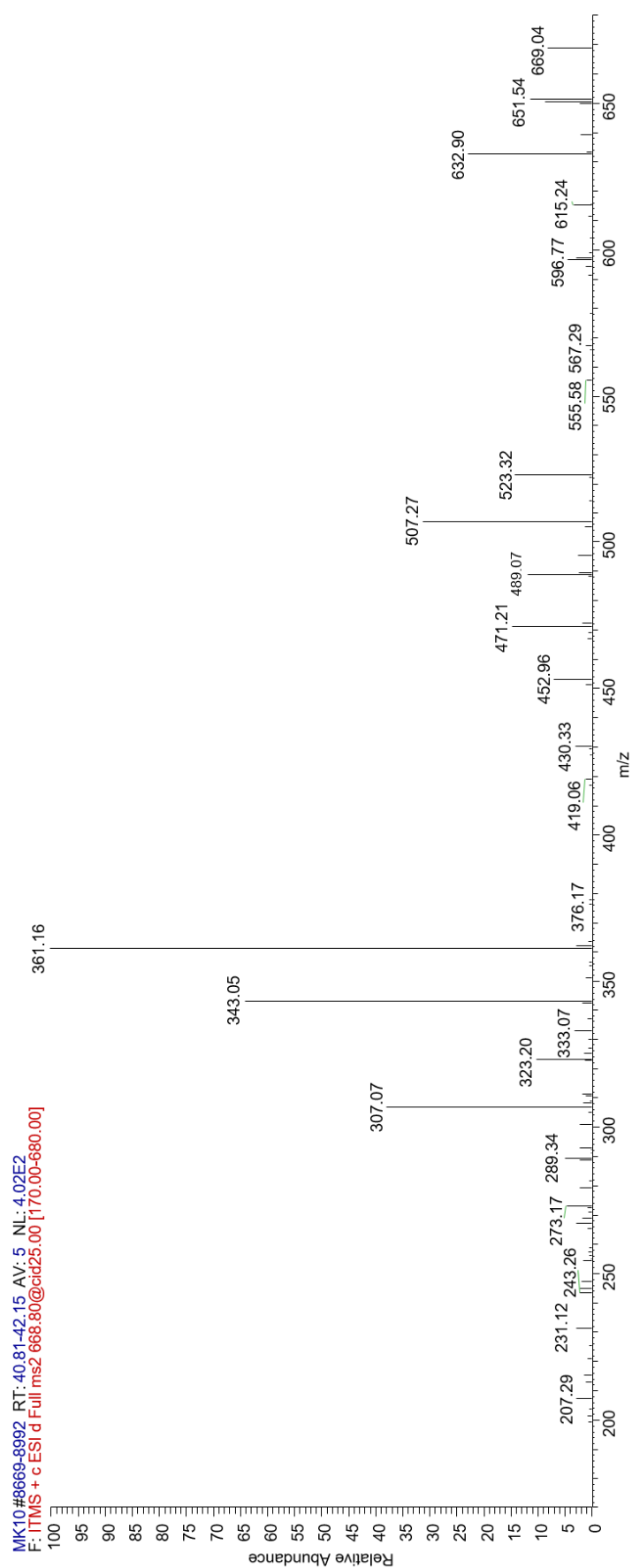
Anhang 9: LC-MS-Chromatogramm (TIC) von MK10



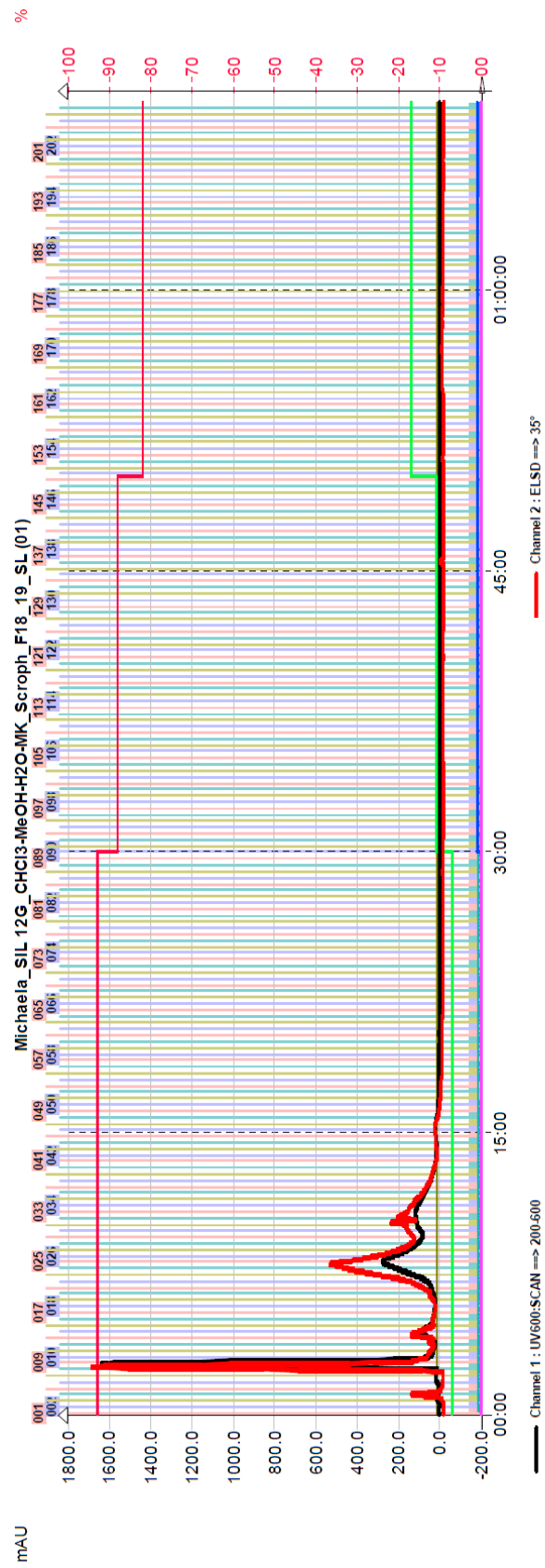
Anhang 10: MS-1-Spektrum von MK10 im Positivionenmodus



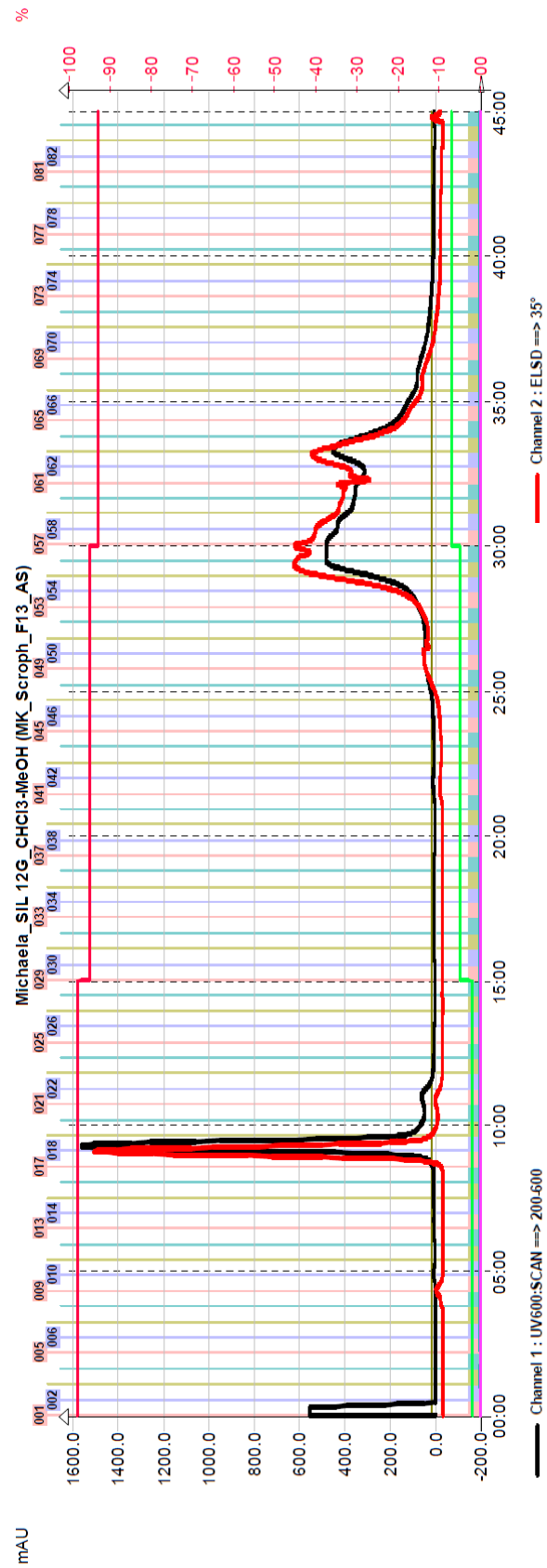
Anhang 11: MS-2-Spektrum von MK10 im Positivionenmodus



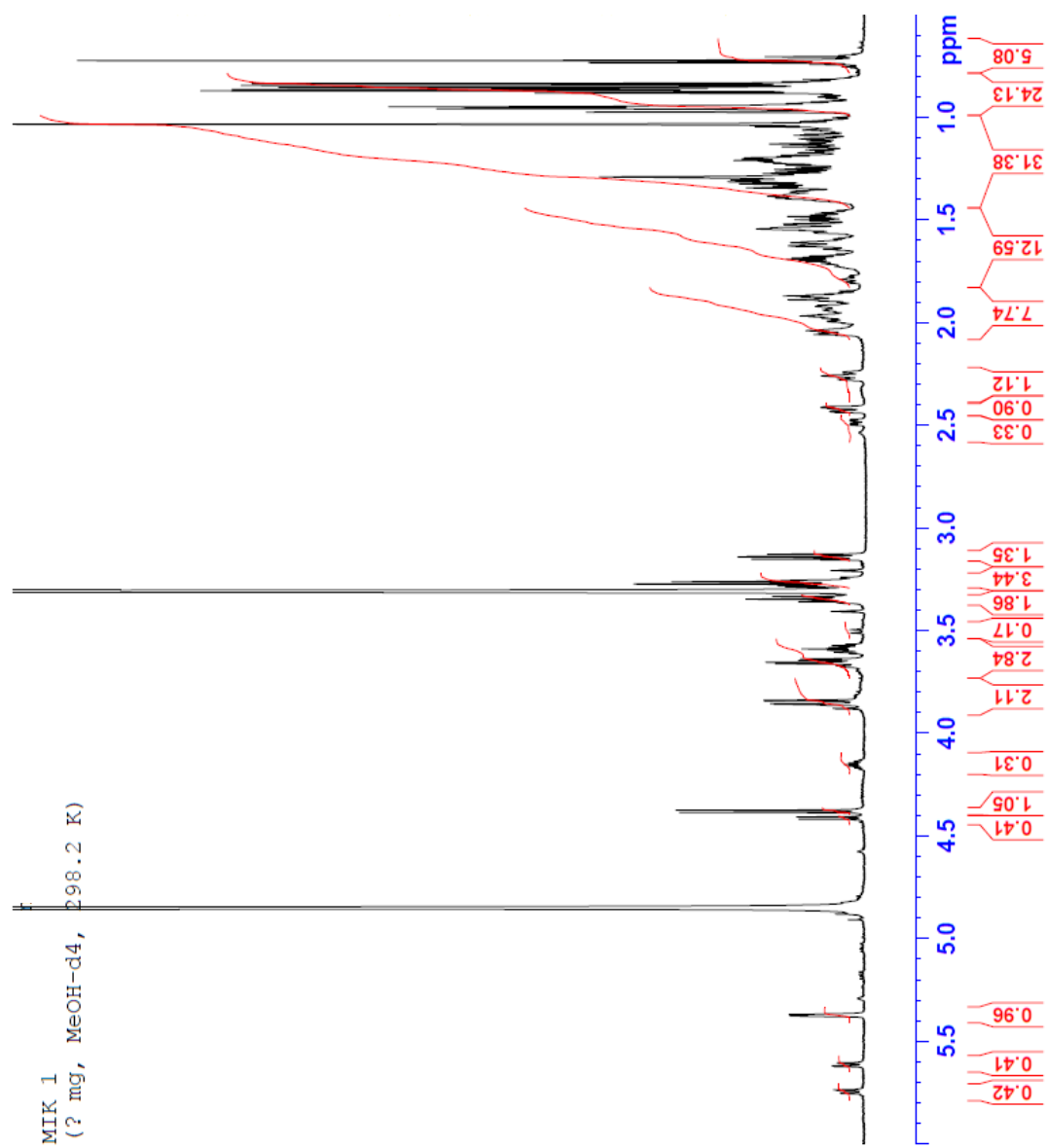
Anhang 12: Flash Chromatogramm von Fraktion SC2/F18+19 (FC 4)



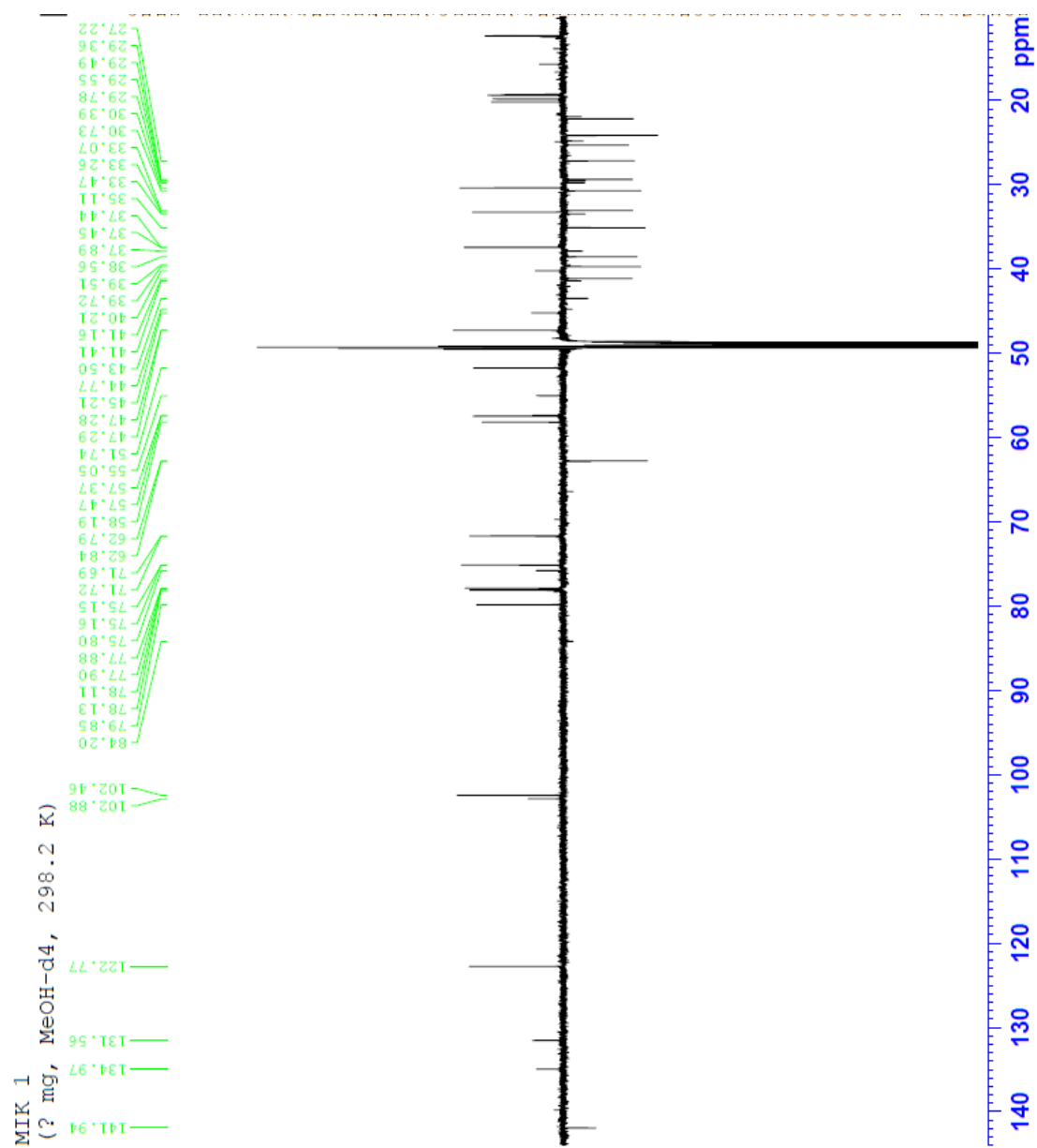
Anhang 13:Flash Chromatogramm von Fraktion SC1/F13 (FC 5)



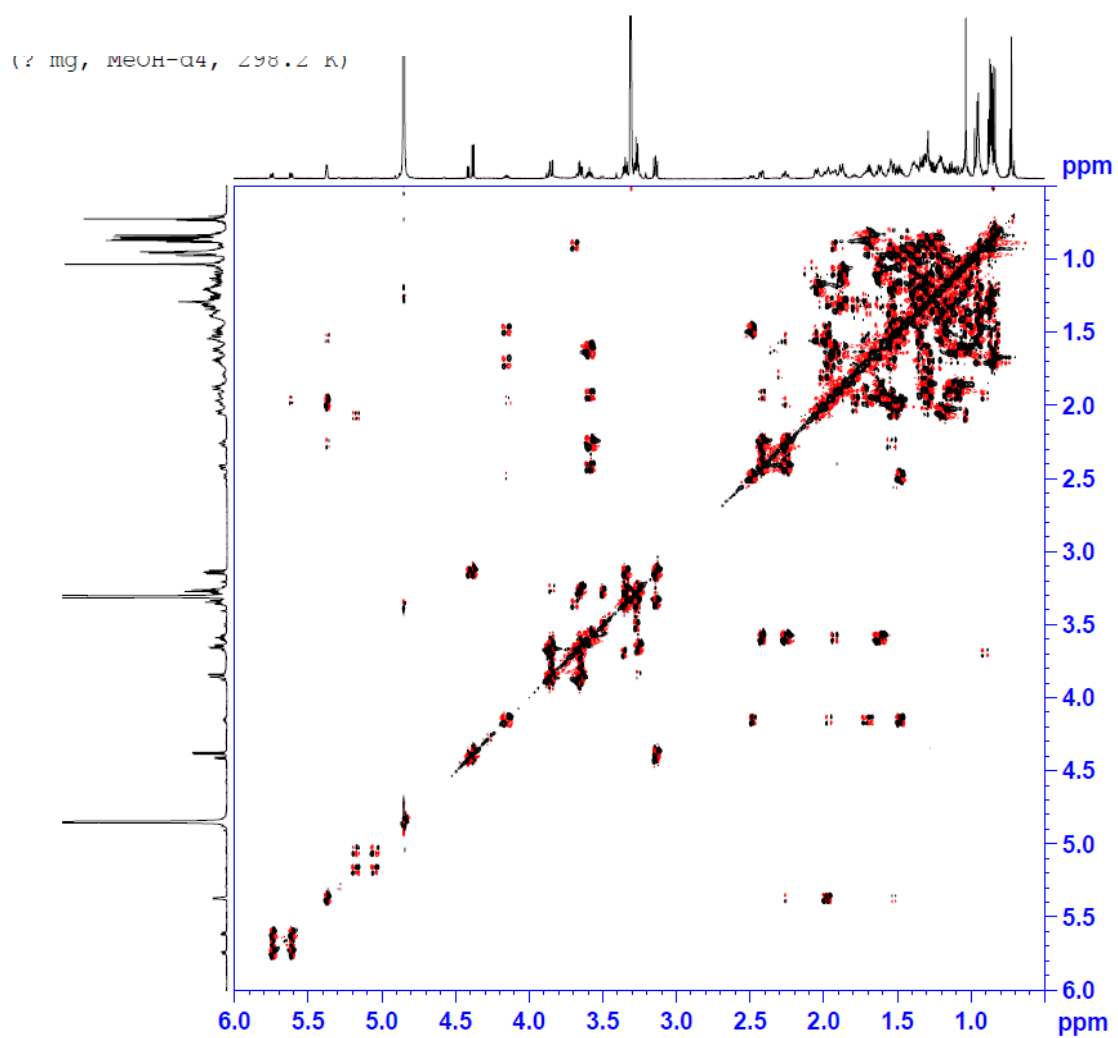
Anhang 14: ^1H -NMR-Spektrum von MIK1



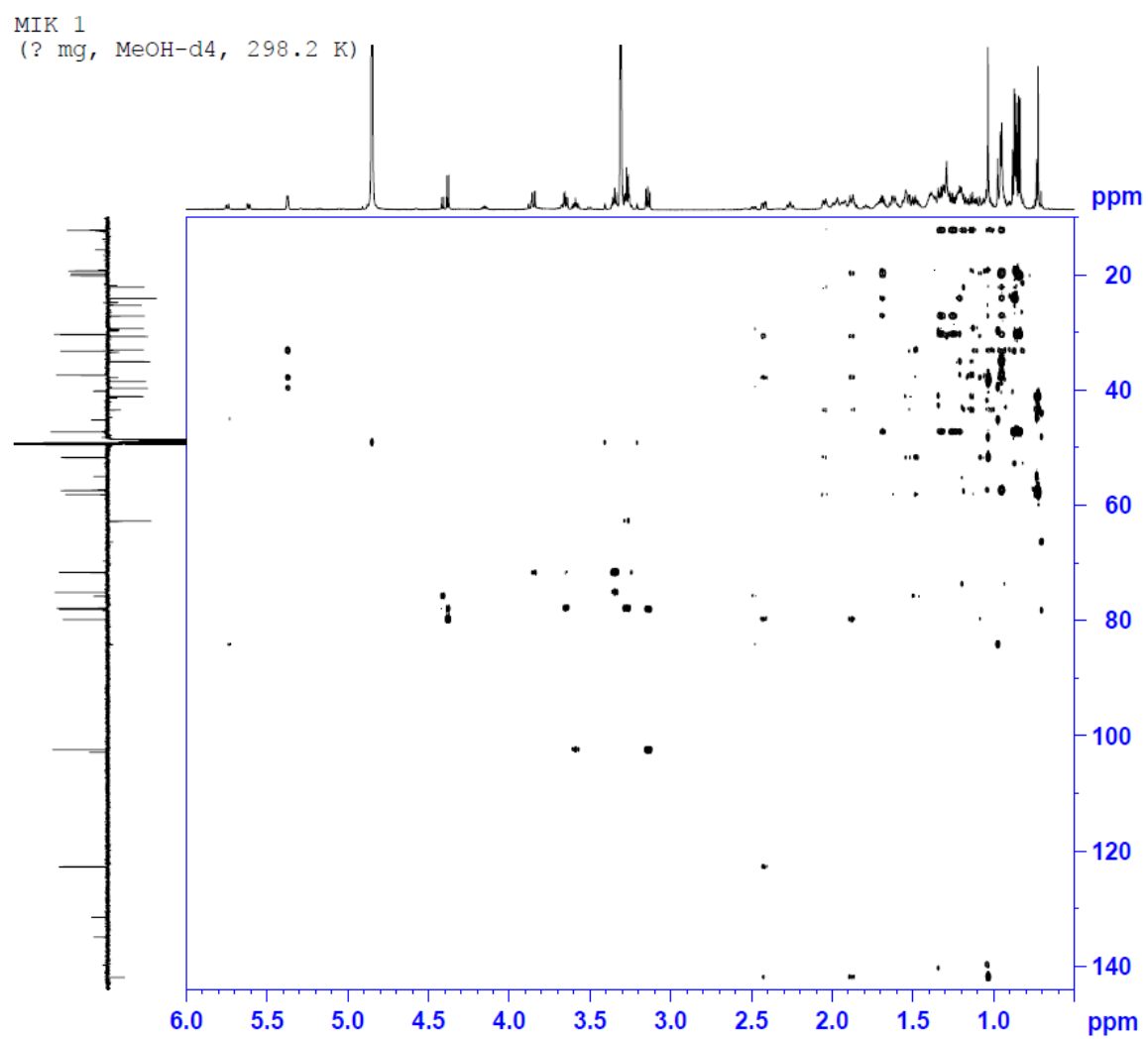
Anhang 15: ^{13}C -NMR-Spektrum von MIK1



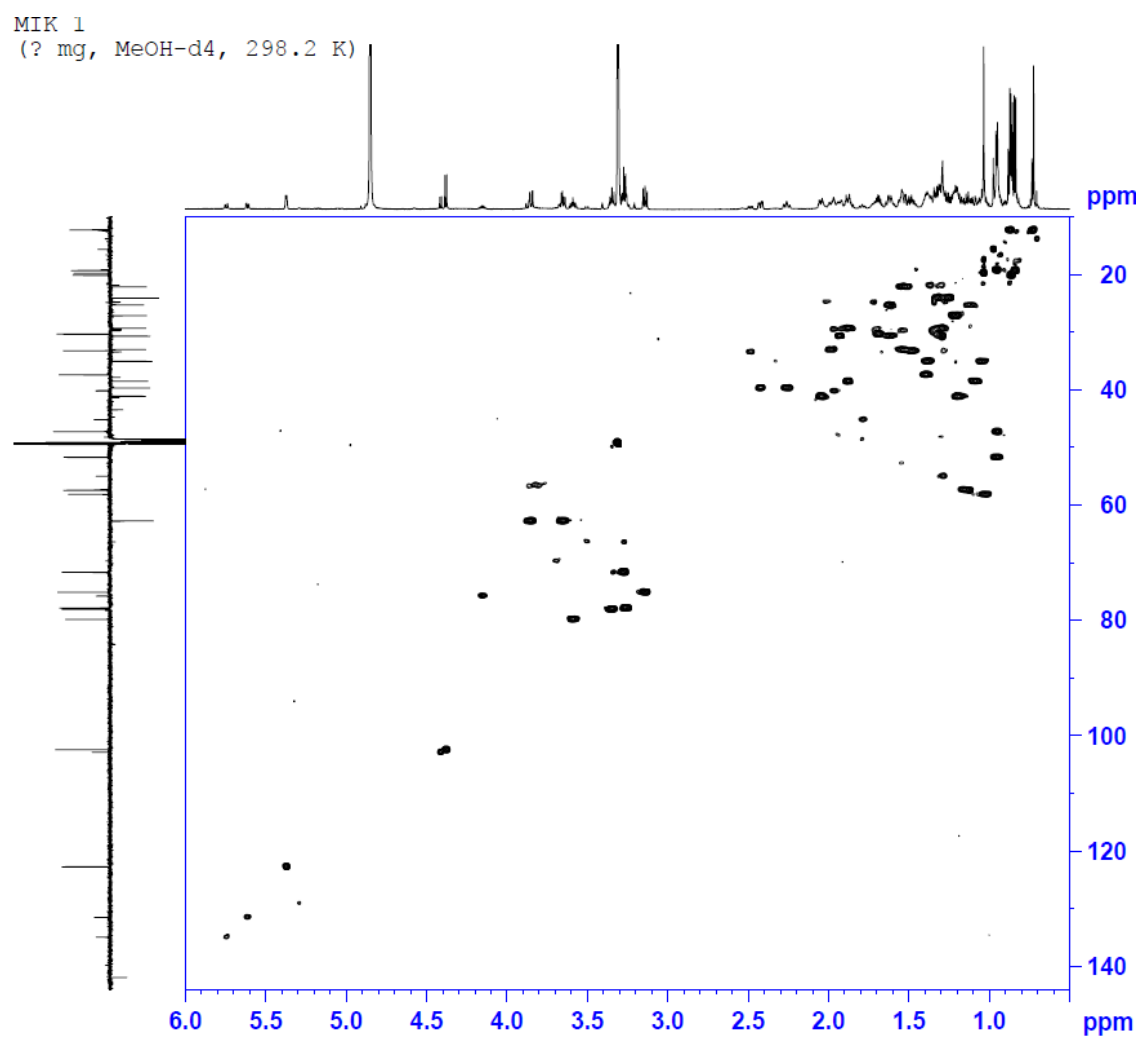
Anhang 16: DQFCOSY-Spektrum von MIK1



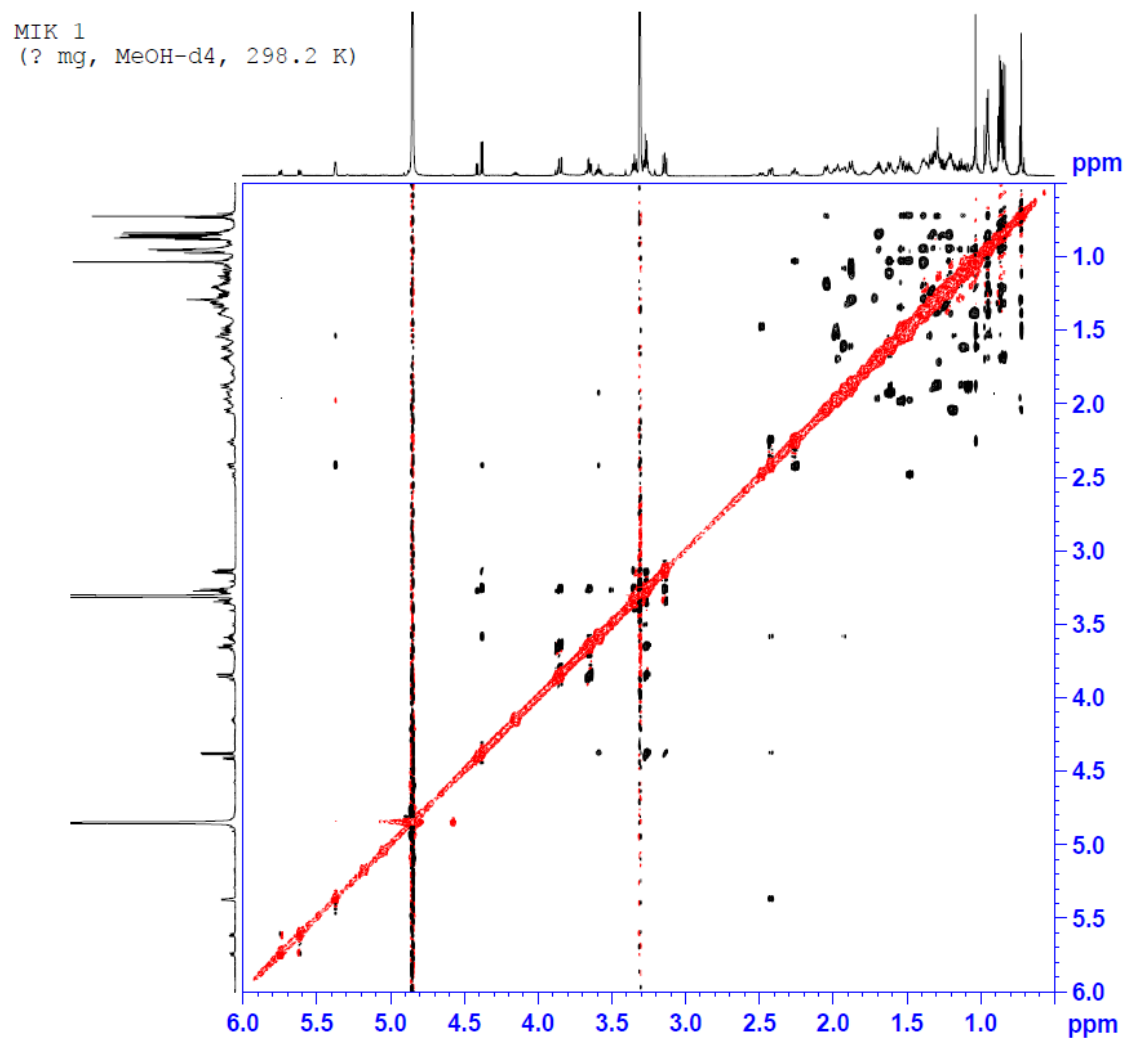
Anhang 17: HMBC-Spektrum von MIK1



Anhang 18: HSQC-Spektrum von MIK1

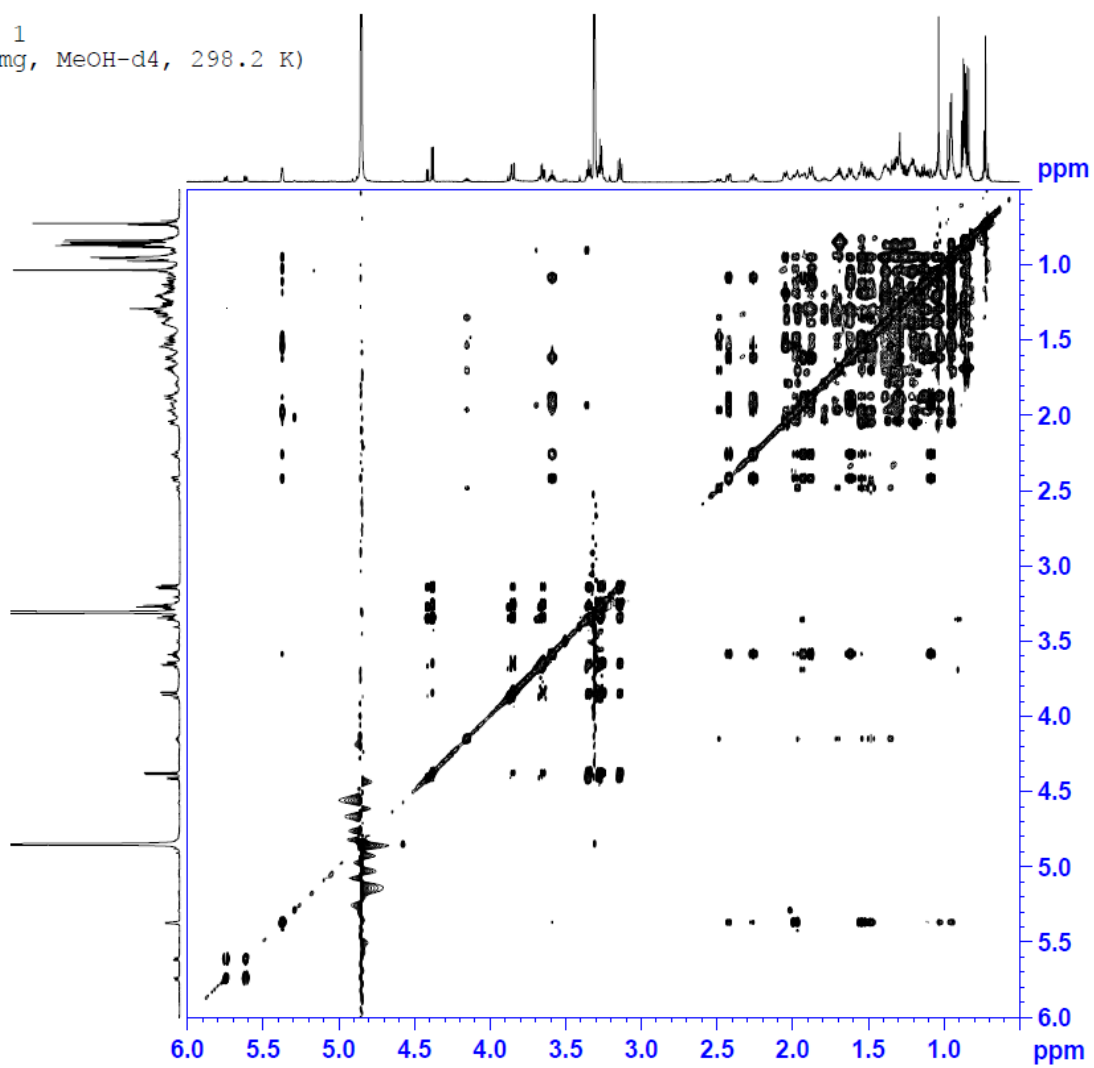


Anhang 19: NOESY-Spektrum von MIK1



Anhang 20: TOCSY-Spektrum von MIK1

MIK 1
(? mg, MeOH-d₄, 298.2 K)



Urheberrecht:

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