

**Chemotaxonomisches Screening von zwölf Spezies der
Gattung *Salix* und Untersuchung des phenolischen
Sekundärstoffspektrums von *Salix cinerea* L.**



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

vorgelegt von

Thomas Olaf Gruber

aus Landshut

2025

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von April 2018 bis Oktober 2024 unter der Leitung von Herrn PD Dr. Guido Jürgenliemk am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 09.01.2025

Datum der mündlichen Prüfung: 21.03.2025

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr.	Pierre Koch	(Vorsitzender)
	PD Dr.	Guido Jürgenliemk	(Erstgutachter)
	PD Dr.	Gregor Aas	(Zweitgutachter)
	Prof. Dr.	Jörg Heilmann	(Dritter Prüfer)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Guido Jürgenliemk für die Betreuung der vorliegenden Arbeit bedanken. Insbesondere für das Vertrauen bei der Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das Übertragen des Herzensthemas *Salix*. Lieber Guido, die Arbeit mit dir war mir immer ein Vergnügen, ob im Weiden-Labor während des PB3-Praktikums oder den Exkursionen in die „exotischen“ Bergregionen Südtirols. Deine herzliche Art und dein freundschaftlicher Rat haben mich in der gemeinsamen Zeit ungemein wachsen lassen.

Ein besonderes Dankeschön gilt PD Dr. Gregor Aas, für die jahrelange Begleitung dieses Projekts, ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre. Vielen Dank dass wir den Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth und insbesondere das Salicetum regelmäßig besuchen und die Weiden „zurechtstutzen“ durften. Die Motivation, Ideen und dein schier unerschöpfliches Wissen zu Weiden waren immer Quelle der Inspiration.

Auch Prof. Dr. Jörg Heilmann gilt mein tiefster Dank für die Möglichkeit diese Dissertation am Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für dein Vertrauen und die Unterstützung zu jeder Zeit und in allen Lagen. Deine fachliche Expertise und war immer sehr wertvoll und durch nichts zu ersetzen.

Prof. Dr. Pierre Koch möchte ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission recht herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Dejan Orčić für die Durchführung der LC-MS/MS Experimente an der Universität Novi Sad. Der Austausch nach Serbien und die Weiterbildung im Bereich Massenspektrometrie waren für diese Arbeit und darüber hinaus sehr wertvoll.

Fritz Kastner und Tuan-Anh Nguyen gilt ein besonderer Dank für die Durchführung der NMR-spektroskopischen Experimente. Auch für die entgegegebrachte Geduld bei Langzeitmessungen möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Josef Kiermaier, Wolfgang Söllner und Thomas Herl für die immer gewissenhafte Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und der Tüftelei zum Erreichen optimaler Messparameter.

Stellvertretend für alle Beschäftigten des Ökologisch-Botanischen Gartens Bayreuth möchte ich mich herzlichst bei Gudrun Hauschulz bedanken. Ohne die Hilfe bei Ernte, Trocknung und Versand der Weidenproben wäre dieses Projekt niemals möglich gewesen. An Ihrer herzlichen Art und der Gastfreundschaft kann man sich immer ein Beispiel nehmen.

Ein herzliches Dankeschön an Anne Grashuber, für die Unterstützung und Vorbereitung der Praktika ohne die wir schon mal ins Straucheln kamen. Auch für die Einführung in die Verstecke und geheimen Lagerorte des Lehrstuhls und die großartige Zusammenarbeit bei der photographischen Erfassung der Vorlesungspflanzen bin ich dir sehr dankbar.

Ein Dank auch an Gabriele Brunner, für die die Unterstützung einer ökonomisch äußerst effizienten Instandhaltung der Laborgerätschaften und insbesondere der UPLC-Anlage.

Einen lieben Dank möchte ich Hedwig Ohli aussprechen, für die Hilfe im Verwaltungsdschungel und ihre offene und direkte Art beim Ansprechen von Missständen und Problemen aller Art.

An alle meine Wahlpflichtpraktikanten Max Wiesmüller, Christian Lederer, Silvia Siegmar, Johanna Brunner, Veronika Jahn, Johanna Klimeck möchte in einen herzlichen Dank richten. Eure tatkräftige Unterstützung hat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und euer Interesse immer neuen Input gegeben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Melissa Kellner für die Unterstützung im Rahmen des Forschungspraktikums bedanken. Ohne diese wäre die Extraktion und Grundlage des präparativen Teils dieser Arbeit nicht zu stemmen gewesen. Außerdem hätte ich die Bedeutung und Komplexität der Ornithologie nie im Ansatz erkannt.

Liza Dreisbusch möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung in ihrem praktischen Jahr danken. Vielen Dank für die tolle Zeit und die außergewöhnliche Einsatzbereitschaft sich für Stabilitätsmessungen die Zeit auch bis in die späten Abendstunden um die Ohren zu schlagen. Liebe Liza, ich wünsche die viel Erfolg auf deiner eigenen Reise in die Welt der Weiden.

Die alte Riege des Lehrstuhls darf hier auch nicht vergessen werden: Dr. Christian Zeh, Dr. Katharina Schiller, Dr. Julianna Max, Dr. Eva Wolfgarten, Dr. Marcel Flemming und Dr. Sebastian Schmidt danke ich sehr für die Aufnahme und Unterstützung mit eurem reichen Erfahrungsschatz.

Insbesondere Dr. Stefan Wiesneth sei für die Einführung in die Welt der Weiden für das Vertrauen seine Arbeit fortsetzen zu dürfen recht herzlich gedankt. Danke auch für die erstklassige Übergangszeit und die zahlreichen Empower-/UPLC®-Crashkurse.

Dr. Sebastian Schwindl möchte ich für seine immer präzisen und aufschlussreichen Einführungen und Einweisungen danken, die den Start und die Zeit am Lehrstuhl enorm vereinfacht haben. An dir ist ein großartiger Lehrer verloren gegangen.

Nicole Herl möchte ich für den reichen Erfahrungsschatz der Massenspektrometrie und das immer offene Ohr bei Problemen jedweder Art danken.

Carola Aumer danke ich für den immerwährenden Optimismus, die vielen heiteren Geschichten sowie die vertrauensvolle Übernahme der Praktikumsgeschäfte.

Leonie Kayser für ihren nüchternen, analytischen Blick und die Unterstützung an der UPLC®. Liebe Leo, ich freue mich sehr die Weiterführung dieses spannenden Themas in deine Hände übergeben zu können.

Dr. Anna Unterholzner sei für ihre immer direkte Art und lustige Stunden im Sozialraum gedankt. Das morgendliche „Griasdi“ am Gang hat so manchen trüben Tag aufgehellt.

Dr. Julia Brunner möchte ich für die vertrauensvolle Zusammenarbeit im Labor und die Kniffe beim Haltbarmachen von pflanzlichen Probenmaterial sowie Prozessoptimierung beim Trocknen von Säulenmaterial danken.

Dr. Miriam Roth danke ich für die beispiellose Zusammenarbeit in zahllosen Stunden des PB3 Praktikums. Das immer faire Teilen der Nervennahrung, die klare Aufgabenverteilung zwischen good und bad cop und die unvergessliche Zeit auf der Exkursion haben uns zu einem großartigen Team gemacht.

Bernhard Kram möchte ich für die Möglichkeit danken, Teil seines „Hausmeisterteams“ gewesen zu sein. Mit dir zu Schrauben war mir immer eine große Ehre, auch wenn uns der Erfolg nicht immer vergönnt war. Die gemeinsamen Kaffeepausen, Fachvorträge zu Bau- und Labormaschinen und Herzblatt-Fernsehabende haben mein Leben nachhaltig verändert.

Dr. Peter Bürkel dem zweitgrößten Flavan-3-ol Experten deutschland-, wenn nicht weltweit danke ich für sein leuchtendes Beispiel von Disziplin, Effizienz und Ausdauer. Lieber Peter, du warst mir eine Stütze, wenn nichts mehr ging. Egal ob auf Forschungsfahrt nach Serbien und Kongressfahrt nach Griechenland konnte man sich in allen Lebenslagen auf dich verlassen.

Dr. Martina Tremmel soll für die fantastische gemeinsame Zeit gedankt werden. Liebe Tine, die Teilnahme an der „Landwirtschaftsmesse“ in Bonn wird mir für immer in Gedächtnis bleiben und die daraus erwachsene Freundschaft bleibt uns hoffentlich noch lange erhalten. Auf deine Hilfe und deinen ehrlichen Rat konnte ich mich jederzeit verlassen.

Ein besonderer Dank geht auch an Sabrina Zölch für zahlreiche Fashion-Tipps und ein immer nüchternes, ehrliches Urteil zu Outfit- und Freizeitgestaltung. Liebe Zabrina, die

„Auswärtsfahrten“ und Heimspiele werden mir für immer im Gedächtnis bleiben. Auch in schweren und späten Stunden haben wir immer super harmoniert und zusammengearbeitet.

Meinem Freund und Projekt-X-Kommilitonen Quirin Werthner möchte ich für das Ausrichten der Hacker-School Saarbrücken danken. Diese hat mir die Augen dafür geöffnet, welche Ausdruckmöglichkeiten gute Sprachkenntnisse bieten, auch wenn nur mit Maschinen gesprochen wird.

Meine tiefste Dankbarkeit gilt auch meinem Bruder, meinen Eltern und Großeltern, die mich auf meinem Weg immer bestärkt und bedingungslos unterstützt haben. Ohne eure grenzenlose Geduld und eure Hilfe wäre dieses Projekt niemals zum Erfolg geworden.

An letzter und wichtigster Stelle möchte ich Dr. Katrin Kuck hervorheben. Liebe Katrin, ohne dich wäre dieses Projekt zum Scheitern verurteilt gewesen. Ob bei der Durchführung der Zellkulturuntersuchungen oder beim Teilen der Laborbank waren wir stets ein Traum-Duo. Die oft bis in die Abendstunden geführten (fachlichen) Diskussionen waren von unschätzbarem Wert und haben mich durch diese Zeit getragen. Die Liebe zu dir war die Entdeckung dieser Zeit und ich freue mich auf viele weitere Abenteuer an deiner Seite.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Konferenzbeiträge

Vorträge

Young Researcher Workshop of 70th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 28.-31. August 2022, Thessaloniki, Griechenland

Gruber, T.; Kuck, K.; Heilmann, J.; Jürgenliemk, G. HCH-catechin isolated from *Salix cinerea* L. significantly reduces the TNF α -induced ICAM-1 expression *in vitro*

Posterbeiträge

5. Young Researcher Meeting, 22. - 23. März 2019, Münster, Deutschland

Gruber, T.; Wiesneth, S.; Heilmann J.; Aas, G.; Jürgenliemk, G. *Salix* Screening: Vergleichende Untersuchung der Procyanolidinmuster in 16 Individuen

12th World Congress on Polyphenols Applications, 26.-28. September 2018, Bonn, Deutschland

Gruber, T.; Wiesneth, S.; Heilmann, J.; Aas, G.; Jürgenliemk. G. Investigation of the procyanolidin patterns in 16 *Salix* individuals

ICP 2020 30th International Conference on Polyphenols, 13.-16- Juli 2020, Turku Finnland (online)

Gruber, T.; Heilmann, J.; Aas, G.; Jürgenliemk, G. *Salicis* cortex: influences of sex and harvest season on Polyphenolic content in four *Salix* species

71st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) (GA Congress), 2.-5. Juli 2023, Dublin, Irland

Gruber, T.; Kayser, L; Heilmann, J.; Aas, G.; Jürgenliemk, G. Comparison of phenolic composition of ten *Salix* species

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	A
Publikationsliste	E
Konferenzbeiträge	E
Inhaltsverzeichnis.....	G
1. Abkürzungsverzeichnis.....	1
2. Einleitung.....	4
2.1. Weide allgemein	4
2.2. Verwendung.....	6
2.3. Salicis cortex - Arzneidroge Weidenrinde	7
2.4. Phenolische Hauptinhaltsstoffgruppen in Weiden	8
2.4.1. Phenolglykoside	8
2.4.2. Flavonoide	9
2.4.3. Flavan-3-ole und Proanthocyanidine	10
2.5. Pharmakologie	12
2.6. Spezies in dieser Arbeit	15
2.7. Zielsetzung	18
3. Präparativ-analytischer Teil.....	19
3.1. Hintergrund (<i>Salix cinerea</i> L.)	19
3.2. Material und Methoden.....	19
3.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterial	19
3.2.2. Ernte, Pflanzenmaterial und Extraktion.....	23
3.2.3. Dünnschichtchromatographie	23
3.2.4. Säulenchromatographie (Sephadex® LH20)	24
3.2.5. MPLC (MCI-Gel® CHP20P).....	25
3.2.6. Analytische HPLC	26
3.2.7. Präparative HPLC	26
3.2.8. Evaporation	28
3.2.9. Lyophilisierung.....	29
3.3. Spektroskopische Methoden.....	30

3.3.1. NMR-Spektroskopie.....	30
3.3.2. Massenspektrometrie.....	30
3.3.3. UV-Vis-Spektroskopie	31
3.3.4. Polarimetrie	31
3.3.5. Circulardichroismus.....	31
3.4. Isolierung	33
3.4.1. Isolierungsstrategie	33
3.4.2. Extraktion	35
3.4.3. Säulenchromatographie (Sephadex® LH20)	35
3.4.4. MPLC (MCI®-Gel CHP20P).....	38
3.4.5. Präparative HPLC (RP18/Biphenyl).....	43
3.4.5.1. SdII2.....	43
3.4.5.2. SdII67M2	45
3.4.5.3. SdII67M8	46
3.4.5.4. SdII67M8T3.....	47
3.4.5.5. SdII9M5	49
3.5. Strukturaufklärung	50
3.5.1. Verkürzte Phenylpropane	50
3.5.1.1. Salicin (Substanz 1).....	50
3.5.1.2. Salicortin (Substanz 2).....	53
3.5.1.3. Picein (Substanz 3).....	56
3.5.2. Cumarylalkoholglykoside	59
3.5.2.1. Triandrin (Substanz 4)	59
3.5.2.2. Vimalin (Substanz 5)	61
3.5.3. Flavan-3-ole und Flavonoide	64
3.5.3.1. Gallocatechin (Substanz 6)	64
3.5.3.2. Catechin (Substanz 7)	67
3.5.3.3. (2R,3R)-Dihydromyricetin (Substanz 8)	70
3.5.3.4. HCH-Catechin (Substanz 9)	74
3.5.3.5. Procyanidin B1 (Substanz 10)	77
3.5.3.6. Procyanidin B3 (Substanz 11)	80
3.5.3.7. Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin (Substanz 12)	83
3.5.3.8. Gallocatechin-(4 α →8)-Gallocatechin (Substanz 13).....	87

3.6.	NMR-Untersuchung der Fraktionen polymerer Proanthocyanidine im Jahresverlauf	90
3.7.	Diskussion	95
3.8.	Zusammenfassung	98
4.	Pharmakologischer Teil	99
4.1.	Hintergrund	99
4.2.	Material und Methoden.....	100
4.2.1.	Gerätschaften und Software.....	100
4.2.2.	Verbrauchsmaterial und Chemikalien	101
4.2.3.	Zellen des Zellmodells (HMEC-1).....	103
4.2.4.	Vorbereitungen und Standardoperationen.....	103
4.2.4.1.	Fetales Kälberserum (FKS)	103
4.2.4.2.	Kulturmedium	103
4.2.4.3.	Trypsin/EDTA.....	103
4.2.4.4.	MTT Stammlösung.....	104
4.2.4.5.	SDS-Lösung	104
4.2.4.6.	TNF- α Stammlösung.....	104
4.2.4.7.	Parthenolid Stammlösung.....	104
4.2.4.8.	Kryokonservierung und In-Kulturnahme	104
4.2.4.9.	Zellkultivierung & Passagieren	105
4.2.4.10.	Bestimmung der Zellzahl	105
4.2.5.	MTT Assay.....	106
4.2.6.	ICAM-1 Assay	107
4.2.7.	Stabilitätsmessung.....	108
4.2.8.	Statistische Auswertung.....	108
4.3.	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Untersuchungen	109
4.3.1.	MTT Assay.....	109
4.3.2.	Stabilitätsuntersuchung von HCH-Catechin.....	110
4.3.3.	ICAM-1 Assay	112
4.4.	Diskussion	113
4.5.	Zusammenfassung	115
5.	HCH-Screening.....	117
5.1.	Hintergrund	117

5.2.	Material und Methoden.....	118
5.2.1.	Geräte und Verbrauchsmaterial	118
5.2.2.	Extrakte und Probenvorbereitung	119
5.2.3.	Methoden.....	119
5.3.	Ergebnisse & Diskussion	121
5.3.1.	Massenspektroskopisches Screening	121
5.3.2.	Untersuchung des Fragmentierungsmusters (LC-QqQ-MS/MS)	122
5.3.3.	Screening auf HCH-Flavan-3-ole (LC-qTOF-HRESI-MS/MS).....	128
5.3.3.1.	Modellsubstanz 1: HCH-diHO-Fl3ol (428.a)	128
5.3.3.2.	Modellsubstanz 2: HCH-triHO-Fl3ol (444.a).....	130
5.3.3.3.	Modellsubstanz 3: HCH-diHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol (716.a)	132
5.3.3.4.	Modellsubstanz 4: HCH-triHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol (732.a)	134
5.3.3.5.	Modellsubstanz 5: HCH-diHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol (1004.a)....	137
5.4.	Zusammenfassung	140
6.	<i>Salix</i> Screening	141
6.1.	Hintergrund	141
6.2.	Material und Methoden.....	144
6.2.1.	Geräte und Verbrauchsmaterial	144
6.2.2.	Pflanzenmaterial.....	147
6.2.2.1.	Probenvorbereitung	148
6.2.2.2.	Liste der beprobten Individuen.....	148
6.2.2.3.	Liste der Probenzüge	150
6.2.3.	UPLC®-DIOL-FLR: Quantifizierung von Proanthocyanidinen	151
6.2.4.	UPLC®-RP18-PDA: Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe	153
6.2.5.	Modifizierte Gerbstoffbestimmung	157
6.2.6.	Datenverarbeitung.....	158
6.2.7.	Statistische Auswertung.....	159
6.2.7.1.	PCA (Principal Component Analysis).....	160
6.2.7.2.	DBSCAN (Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise)	
	162	
6.2.7.3.	Heatmap (hierarchical clustering).....	163
6.3.	Ergebnisse.....	164
6.3.1.	Saisonale Variabilität von Sekundärmetaboliten.....	164

6.3.1.1.	Modifizierte Gerbstoffbestimmung: Gesamtphenole und Gerbstoffe	164
6.3.1.2.	UPLC®-DIOL-FLR Screening: Proanthocyanidine.....	168
6.3.1.3.	UPLC®-RP18-PDA Screening: phenolische Inhaltsstoffe	174
6.3.1.3.1.	<i>Salix caprea</i>	174
6.3.1.3.2.	<i>Salix cinerea</i>	179
6.3.1.3.3.	<i>Salix daphnoides</i>	183
6.3.1.3.4.	<i>Salix fragilis</i>	187
6.3.1.3.5.	<i>Salix purpurea</i>	192
6.3.2.	Geschlechterspezifische Variabilität im Genus <i>Salix</i>	196
6.3.2.1.	<i>Salix caprea</i>	197
6.3.2.2.	<i>Salix cinerea</i>	204
6.3.2.3.	<i>Salix daphnoides</i>	208
6.3.2.4.	<i>Salix fragilis</i>	212
6.3.2.5.	<i>Salix purpurea</i>	216
6.3.3.	Vergleich der Arten	221
6.3.3.1.	Modifizierte Gerbstoffbestimmung: Gesamtphenole und Gerbstoffe	221
6.3.3.2.	UPLC®-DIOL-FLR Screening: Proanthocyanidine.....	222
6.3.3.3.	UPLC®-RP18-PDA Screening: phenolische Inhaltsstoffe	226
6.3.3.3.1.	Charakterisierung der Extraktzusammensetzung mittels Radarplot	230
6.3.3.3.2.	Chemotaxonomischer Vergleich der Spezies per PCA, DBSCAN und Hierarchical Clustering.....	233
6.4.	Diskussion	243
6.4.1.	Saisonale Variabilität von Sekundärermetaboliten	243
6.4.2.	Geschlechterspezifische Variabilität im Genus <i>Salix</i>	250
6.4.3.	Chemotaxonomischer Vergleich der Spezies im Genus <i>Salix</i>	254
6.4.3.1.	Modifizierte Gerbstoffbestimmung: Gesamtphenole und Gerbstoffe	254
6.4.3.2.	UPLC®-FLR Screening: Proanthocyanidine	255
6.4.3.3.	UPLC®-RP18-PDA Screening: phenolische Inhaltsstoffe	256
6.5.	Zusammenfassung	265
	Abschließende Zusammenfassung	269
	Summary.....	273
	Literaturverzeichnis	277
	Anhang.....	293

Erklärung zur Eigenständigkeit	321
--------------------------------------	-----

1. Abkürzungsverzeichnis

♂ / m (male)	männlich, Männchen
♀ / f (female)	weiblich, Weibchen
°C	Grad Celsius
$[\alpha]_D^{25}$	spezifischer Drehwert
%	Prozent
1D	eindimensional
¹ H	Wasserstoff-Isotop mit einem Neutron
¹³ C	Kohlenstoff-Isotop mit 13 Neutronen
2D	zweidimensional
δ	chemische Verschiebung
ε	molarer Absorptionskoeffizient
λ_{\max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Å	Ångström
AA	Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz
ACN	Acetonitril
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
br	breites Signal
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Kohlenstoff
ca.	circa
calcd.	calculated (berechnet)
CD	Circular dichroism, Zirkulardichroismus
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COSY	Correlated spectroscopy
COX	Cyclooxygenase
d	Dublett
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie/Dünnschichtchromatogramm
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
dd	Dublett vom Dublett
d.h.	das heißt
diHO-Fl3ol	dihydroxyliertes Flavan-3-ol (B-Ring)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Electrospray-Ionisation
etc.	et cetera
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
EU	Emission Unit
FA	Ameisensäure
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting, Durchflusszytometer
FKS	Fetales Kälber Serum

Fl3ol	Flavan-3-ol (ohne Berücksichtigung der Stereochemie)
FLR	Fluoreszenzdetektor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FM	Fließmittel
FSC	Forward-Scattered Light, Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GPL	Gesamtphenollösung
Gst	Gerbstoffe
h	Stunden
H	Wasserstoff
HCH	1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy
HMEC-1	Human Microvascular Endothelial Cells-1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
HR	High Resolution, hochauflösend
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy
Hz	Hertz
ICAM-1	Interzellulaires Adhesionsmolekül-1, CD54
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
Konz.	Konzentration
l	Liter
LC	liquid chromatography, Flüssigchromatographie
LM	Lösemittelkontrolle
log	dekatischer Logarithmus
M	molar
M	Multiplett
m/m	Massenanteile
m/V	Masse/Volumen
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
mAU	Milli-Absorptionseinheit
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
mHO-Fl3ol	monohydroxyliertes Flavan-3-ol (B-Ring)
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernresonanzspektroskopie
NK	Negativkontrolle
NO	Stickstoffmonoxid
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Nr.	Nummer
p.a.	pro analysi (analysenrein)

PAs/oPAs/pPAs	Proanthocyanidine/oligomere PAs/polymere PAs
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Procyanidin
PD	Prodelphinidin
PDA	Photodiodearray-Detektor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Ph. Eur.	Pharmacopoeia Europaea Europäisches Arzneibuch
PK	Positivkontrolle
Pos.	Position
ppm	parts per million
rel.	relativ
R _f	Retentionsfaktor
R _t	Retentionszeit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP-18	reversed Phase 18
RPL	Restphenollösung
s	Singulett
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat, Natriumdodecylsulfat
Sekt.	Sektion
SSC	Side-Scattered Light, Seitenstreulicht
SEM	Standard error of the mean
t	Triplet
T	Temperatur
TD	Trockendroge / getrocknetes Drogenmaterial
TIC	Total Ion Current
TMS	Trimethylsilan
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
triHO-Fl3ol	trihydroxyliertes Flavan-3-ol (B-Ring)
UPLC [®]	Ultra Performance Liquid Chromatography [®]
UK	unbehandelte Kontrolle
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV/Vis	Ultraviolet/sichtbarer Bereich des Lichts
V/V	Volumen/Volumen
Vanilin/HCl	Vanilin/HCl Sprühreagens

2. Einleitung

2.1. Weide allgemein

Die Gattung *Salix* L. ist neben der Gattung *Populus* L. eine der artenreichsten in der Familie der Weidengewächse (Salicaceae). Etwa 400-500 Arten werden dieser Gattung *Salix* zugeordnet (Aas, 2017; Meier & Meier-Liebi, 2007; Skvortsov & Zinovjev, 1999), andere Quellen zählen mehr als 600 Arten zu dieser Gattung (Stevens, 2017). Während Vertreter der Salicaceae weltweit zu finden sind (Stevens, 2017), beschränkt sich das Verbreitungsgebiet der Gattung *Salix* überwiegend auf die nördliche Hemisphäre mit den gemäßigten und kühleren, bis arktischen Breiten. Einige Arten sind auch auf der südlichen Hemisphäre in tropischen Gebieten heimisch (Aas, 2017; Meier & Meier-Liebi, 2007; Stevens, 2017). 37 Arten werden in Mitteleuropa als einheimisch betrachtet (Aas, 2017). Die Morphologie der Weiden ist sehr heterogen und umfasst sommergrüne Zwerg- und Spaliersträucher ebenso wie Bäume mit einer Wuchshöhe von bis zu 30 Metern, während die Mehrheit der Weidenarten als Sträucher vorkommt (Aas, 2017; Holdenrieder et al., 1999). Weiden weisen wechselständige Blätter mit ungeteilter Spreite auf, zudem sind Nebenblätter häufig gut ausgebildet. Die Knospen werden kapuzenartig von meist einer Knospenschuppe umgeben. Blätter sind zumeist kurz gestielt, länglich bis lanzettlich mit ganzrandigem, fein gesägtem oder gekerbtem Blattrand. Eine Behaarung kann auftreten, ebenso eine Graufärbung der Unterseite durch Ausbildung einer Wachsschicht (Aas, 2017; Holdenrieder et al., 1999; Wichtl et al., 2015). Die Blüten sind eingeschlechtig und (bis auf Ausnahmen) zweihäusig verteilt. Sie sind in aufrechten bis abstehenden, ährenartigen Blütenständen, den sogenannten „Kätzchen“, zumeist an Trieben des Vorjahres ausgebildet (Aas, 2017; Holdenrieder et al., 1999). Die Blüte erfolgt meist vor der Blattentfaltung, früh im Jahr zu Beginn der Wachstumsperiode. Die Einzelblüten sind klein und in der Achsel eines schuppenförmig ausgebildeten Tragblatts ohne Blütenhülle positioniert. Die männliche Blüte besteht aus zumeist zwei Staubblättern, wobei Ausprägungen von einem Stamen bis zwölf Stamina zu beobachten sind. Am Grund der männlichen wie auch der weiblichen Blüte finden sich Nektarien (Nektardrüsen). Ein oberständiger Fruchtknoten aus zwei verwachsenen Fruchtblättern bildet die weibliche Einzelblüte, aus welchen als Frucht eine Kapsel mit kleinen, ringförmig behaarten Samen entsteht (Aas, 2017; Holdenrieder et al., 1999). Die Verbreitung der Samen erfolgt durch den Wind mit Hilfe eines haarigen Flugapparats. Der Samen ist nur kurze Zeit, bis wenige Wochen

keimfähig und benötigt Licht, wodurch bevorzugt offene Rohböden besiedelt werden können. Die konkurrenzschwachen Weiden werden im Laufe der Sukzession verdrängt und stellen keinen relevanten Anteil an der Schlusswaldgesellschaft oder Klimaxvegetation in Mitteleuropa (Holdenrieder et al., 1999). Da die Weiden jedoch außergewöhnliche Eigenschaften wie unter Anderem Frostresistenz, Toleranz gegen Überflutung und Regenerationsfähigkeit bei mechanischer Verletzung aufweisen, bieten sich ökologische Nischen, wie Auenwälder, Schotter und Kiesbänke an Flüssen aber auch alpine Bereiche für eine Besiedelung an. Weiden besitzen in dieser Hinsicht Pioniercharakter und sind sogenannte Ökosystem-Ingenieure, die durch ihre Anwesenheit weitere Lebensräume für nachfolgende Arten (Insekten, Pilze, Wasser- und Bodenorganismen) gestalten (Holdenrieder et al., 1999).

2.2. Verwendung

Weiden erfüllen aufgrund ihrer Holzstruktur und Wachstumseigenschaften spezielle Voraussetzungen für verschiedene Einsatzgebiete. Die beschriebenen Pioniereigenschaften erlauben den Einsatz bei Landschaftsbau und Renaturierungsmaßnahmen wie Uferbefestigungen (Holdenrieder et al., 1999). Die Triebe bestimmter Weidenarten finden in der Korbflecherei Anwendung und die schnellwüchsigen Kopfweiden sind für die Biomasseproduktion geeignet (Perttu, 1998; Stott, 1991). Hier werden durch bestimmte Weidenarten Nischen bedient, so wie bei der Herstellung von Cricketschlägern, Versuchen zur Sanierung schwermetallkontaminierter Flächen (Holdenrieder et al., 1999; Perttu, 1998) und gezielten Pflanzungen zur positiven Beeinflussung der Biodiversität (Perttu, 1998).

Pharmazeutisch wird Weide seit der Antike angewandt. Es sind Anwendungen von Weidenblättern aus dem antiken Ägypten (1300 v. Chr.) sowie in chinesischen Zivilisationen vor mehr als 2000 Jahren überliefert. Der griechische Gelehrte und Philosoph (460–370 v. Chr.) nutzte die Rinde von Weiden zur Linderung von Fieber und Schmerzen und empfahl Zubereitungen aus Blättern bei Geburt und Entbindung. Später fanden Weidenzubereitungen auch bei den Römern, beispielsweise durch Galen Anwendung (Mahdi et al., 2006). Im 18. Jahrhundert begann die moderne Erforschung der Weidenrinde und ihrer pharmakologischen und klinischen Wirksamkeit (Stone, 1763), welche mit Studien zu Extraktten und Isolaten (Salicin) weitergeführt wurde (MacLagan, 1876). Dies führte zu einer gesteigerten Nachfrage nach Weidenrinde als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Salicin (MacLagan, 1876; Mahdi et al., 2006; I. Wagner et al., 2003). Durch die Etablierung der chemischen Synthese von Salicylsäure durch Kolbe und Schmitt, sowie der Weiterentwicklung der Salicylsäure durch Acetylierung durch Hoffmann waren die Voraussetzungen für eine großindustrielle Herstellung von Acetylsalicylsäure als effektivem und verträglichen Schmerz- und fiebersenkendem Arzneimittel gegeben. Die Firma Bayer registrierte den Wirkstoff 1899 unter dem Namen Aspirin® und vermarktete diesen ab 1900 weltweit (Mahdi et al., 2006; I. Wagner et al., 2003). Obwohl die Extraktion von Salicylsäure aus Gaultheriaöl erfolgte und der Handelsname Aspirin®, ein Hinweis auf die acetylierte Form der in *Spiraea ulmaria* L. enthaltenen Salicylsäure ist, bleibt die Weide als Namensgeberin der Salicylsäure (Weidensäure) mit dieser Erfolgsgeschichte verbunden (Mahdi et al., 2006; März & Kemper, 2002). Die Weidenrinde verlor in der Folge des Siegeszugs der industriell hergestellten

Acetylsalicylsäure an Bedeutung, fand aber vor der Jahrtausendwende als monographierte Arzneidroge wieder zunehmende Beachtung in der Phytotherapie (I. Wagner et al., 2003).

2.3. *Salicis cortex* - Arzneidroge Weidenrinde

Die Arzneidroge *Salicis cortex* (Weidenrinde) ist im europäischen Arzneibuch monographiert und wird als ganze oder zerkleinerte, getrocknete Rinde junger Zweige oder ganze getrocknete Stücke der diesjährigen Triebe verschiedener Arten der Gattung *Salix* definiert ("Weidenrinde *Salicis Cortex*," 2020). Als Stammpflanzen werden beispielhaft *Salix purpurea* L., *Salix daphnoides* VILL. und *Salix fragilis* L. genannt, die Gewinnung der Arzneidroge jedoch nicht auf diese Arten beschränkt. Als Kriterium wird ein Mindestgehalt von 1,5 Prozent Gesamtsalicyl-Derivate, berechnet als Salicin gefordert ("Weidenrinde *Salicis Cortex*," 2020; Wichtl et al., 2015). Weitere Monographien wurden von der ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy, 2003), dem HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products, 2017) und der WHO (World Health Organization, 2009) verfasst. Das HMPC führt einen *well-established use* für standardisierte Zubereitungen zur kurzzeitigen Behandlung leichter Rückenschmerzen auf und einen *traditional use* für die Droge und diverse Zubereitungen bei leichten Gliederschmerzen, fieberhaften einfachen Erkältungen und Kopfschmerzen (Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2017; Wichtl et al., 2015). Die aufgeführten Indikationen in den anderen genannten Mongraphien weichen geringfügig davon ab (Wichtl et al., 2015).

2.4. Phenolische Hauptinhaltsstoffgruppen in Weiden

Die Arzneidroge *Salicis cortex* enthält ein komplexes Gemisch von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Die prominenteste Inhaltsstoffgruppe stellen die Salicylalkoholderivate als Teil der Gruppe der Phenolglucoside dar. Die Salicinoide werden als taxonomischer Marker für den Genus *Salix* angesehen (Tawfeek et al., 2021). Für diese Gruppe wird vom Arzneibuch ein Mindestgehalt von 1,5% (berechnet als Salicin) gefordert. Daneben sind diverse Phenylpropanderivate, verschiedene Flavonoide, sowie Gerbstoffe in hohen Anteilen bis 20% nachweisbar (Wichtl et al., 2015).

2.4.1. Phenolglykoside

Die Gruppe der Phenolglykoside stellt mit einem Masseanteil an der getrockneten Droge von bis zu 30% eine der Hauptgruppen in Weidenrinde dar. Zu den Phenolglykosiden werden neben den Salicylalkoholderivaten (Salicinoide) auch andere phenolische Glykoside gerechnet. Darunter unter Anderem Glykoside von Phenylpropanoiden (beispielsweise Vimalin und Triandrin), Phenylethanoiden sowie von Salicylsäurderivaten (Tawfeek et al., 2021).

Die Salicylalkoholderviate sind in einer großen Strukturvielfalt enthalten. Die Grundstruktur bildet das Salicin, welches an verschiedenen Stellen, dem Grundkörper (Saligenin) oder den Hydroxygruppen der verbundenen Glukose mit diversen Unterstrukturen verestert vorkommt. Dabei sind Kombinationen von Benzoyl-, Acetyl-, Saliciloyl-, 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonyl- und andere Gruppen entdeckt worden. Besonders hervorzuheben ist das Hauptsalicylalkoholderivat Salicortin, ein Ester der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure des Salicin (HCH-Salicin) welches zusammen mit Tremulacin von Pearl & Darling (1971) isoliert wurde. Tawfeek et al. (2021) geben einen Überblick über die Vielfalt der bekannten nachgewiesene Strukturen aus verschiedenen *Salix* Spezies.

Salicylalkoholderivate sind mit einem Anteil von bis zu 11% in der getrockneten Droge enthalten (Wichtl et al., 2015), wobei das unsubstituierte Salicin nur einen geringen Teil von maximal 1% ausmacht (Meier & Meier-Liebi, 2007). Beim Trocknen der Droge sind einige der beschriebenen Strukturen labil und das Phenolglykosid-Spektrum wird durch diesen Vorgang verändert (Julkunen-Tiitto & Sorsa, 2001). Dennoch wird den Salicylalkoholderivaten die Wirksamkeit der Droge *Salicis cortex* zugeschrieben (Antoniadou et al., 2021) und die Bildung

von Salicylsäure als aktiver Metabolit konnte *in vivo* gezeigt werden (Schmid, Kötter, et al., 2001a). Allerdings deuten mehrere Studien darauf hin, dass auch andere Inhaltsstoffgruppen, wie Flavonoide und weitere Phenole zur Wirksamkeit der Droge beitragen (Nahrstedt et al., 2007; Schmid, Lüdtke, et al., 2001).

2.4.2. Flavonoide

In Weidenrinde sind diverse Flavonoidstrukturen nachzuweisen. Neben Flavanonen und Chalkonen kommen Flavanonole, Flavone, Flavonole und verschiedene Glykoside dieser Klassen vor (Meier & Meier-Liebi, 2007; Tawfeek et al., 2021; Wichtl et al., 2015). Die größte Bandbreite an Flavonen, Flavonolen, Flavanonen, Flavanonolen und Isoflavonen wurden in den Blättern nachgewiesen, wobei in der Rinde die größere Zahl an Chalkonen, Proanthocyanidinen und Anthocyanidinen vorhanden ist (Tawfeek et al., 2021). Bridle et al. (Bridle et al., 1970, 1973) gelang es in verschiedenen Arten diverse Anthocyanidinglykoside nachzuweisen. Ähnlich wie bei den Phenolglykosiden sind auch bei Flavonoiden Derivate bekannt. So konnten die Glykoside Naringenin-7-O- β -D-glucosid, sowie die beiden Diastereomere (2R)- / (2S)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid und das cumaroylierte Diastereomerpaar 6''-O-*trans*-*p*-Cumaroyl-(2R)-naringenin-5-O- β -D-glucosid und 6''-O-*trans*-*p*-Cumaroyl-(2S)-naringenin-5-O- β -D-glucosid isoliert werden (Freischmidt, 2011). Ein entsprechendes Addukt wurden für das Chalkon Isosalipurposid aus mehreren Arten isoliert und nachgewiesen (Freischmidt, 2011; Freischmidt et al., 2010; Krauze-Baranowska et al., 2013; Vinokurov, 1979; Zapesochnaya et al., 2002).

Pheylpropansäuren und deren Derivate konnten in den Blättern verschiedener Arten nachgewiesen werden, so beispielsweise *p*-Cumarsäure und Chlorogensäure bei Julkunen-Tiitto & Meier (1992) und Nyman & Julkunen-Tiitto (2005). Der Nachweis von *p*-Cumarsäure neben Kaffeesäure gelang ebenfalls in Weidenrinde (Pobłocka-Olech et al., 2010) und zeigt, dass diese als Substrate für eine mögliche Kupplung an Flavonoidgrundkörper im gleichen Gewebe zur Verfügung stehen. Ob diese Reaktion in der Rinde stattfindet, oder die Phenylpropane das Ergebnis von Spaltungs- und Abbauprozessen sind, ist bisher nicht eindeutig gezeigt worden.

Eine Übersicht über bekannte Strukturen in Weiden findet sich in der Arbeit von Tawfeek et al. (2021).

2.4.3. Flavan-3-ole und Proanthocyanidine

Die Klasse der Flavan-3-ole erweitert das Spektrum der in Weiden und Weidenrinde nachgewiesenen Flavonoidstrukturen (Meier & Meier-Liebi, 2007; Tawfeek et al., 2021). Eng mit den Flavan-3-olen sind die Proanthocyanidine (PAs) verbunden, welche strukturell polymerisierte, kondensierte Flavan-3-ol-Ketten darstellen. Diese, als kondensierte Gerbstoffe zusammengefassten Proanthocyanidine, bilden die Gerbstofffraktion in Weidenrinde. Hydrolysierbare Gerbstoffe, beziehungsweise Gallotannine, sind in Weidenrinde laut Meier & Meier-Liebi (2007) nicht zu erwarten, obwohl einzelne Berichte über den Nachweis von (Epi)allocatechingallat und (Epi)catechingallat (Kompantsev et al., 1974), sowie (Epi)allocatechindigallat und gallussäurehaltige Glykoside bestehen (Mostafa et al., 2020). Bei diesen Berichten handelt es sich allerdings um Identifikationen mittels chromatographischer Methoden, ohne diese Gallate in größeren Mengen isoliert zu haben. In Anbetracht der Gesamtmenge an Gerbstoffen, welche von Thieme (1968) per Hautpulverfällung mit 8% bis 21% bestimmt wurden, können diese vernachlässigt werden. Eine Nachweisreaktion für Proanthocyanidine stellt die sogenannte Proanthocyanidinreaktion dar, bei der nach oxidativer Spaltung im Sauren Anthocyanidine entstehen. Je nach Substitutionsmuster des entstehenden Anthocyanidins spricht man von Prodelphinidinen (trihydroxylierter B-Ring), Procyanidinen (dihydroxylierter B-Ring) oder Propellargonidinen (monohydroxylierter B-Ring). Bei längeren Ketten können aber auch mehrere verschiedene Anthocyanidine entstehen, wenn das oligomere/polymere Proanthocyanidin aus gemischten Monomeren Grundkörpern aufgebaut ist. Die unterste Einheit, welche an Position 4 keine Bindung zu einem weiteren Flavan-3-ol aufweist, bildet bei der Proanthocyanidinreaktion kein Anthocyanidin. Als monomere Bausteine kommen in Weide überwiegend Catechin und dessen (2R,3R)-Stereoisomer Epicatechin vor, welche bei der oxidativen Spaltung Cyanidin ergeben. Bei der Proanthocyanidinreaktion von Extrakten aus *S. daphnoides* konnte neben Cyanidin auch Delphinidin und Pelargonidin nachgewiesen werden, was für das Vorkommen von (*epi*)-Catechin sowie (*epi*)-Gallocatechin und mHO-Fl3ol (bspw. Afzelechin) in den Gerbstoffen dieser Art spricht (Wiesneth et al., 2015). Aber auch andere Bausteine finden in anderen Gattungen bei der Biosynthese von Proanthocyanidinen Verwendung (Xie & Dixon, 2005). Aus Weiden-Extrakten wurden diverse mono- sowie oligomere PAs isoliert (beispielsweise Hsu et al., 1985; Jürgenliemk et al., 2007; Wiesneth, 2019) und nachgewiesen (beispielsweise Mostafa et al., 2020; Pobłocka-Olech & Krauze-

Baranowska, 2008). Studien zum Gehalt an Proanthocyanidinen wurden in der Vergangenheit zumeist mit Hilfe von Konventionalmethoden angestellt (Julkunen-Tiitto, 1985a, 1986; Nyman & Julkunen-Tiitto, 2005; Thieme, 1968). Jüngere Untersuchungen verwendeten HPLC- (Esatbeyoglu et al., 2010) und UHPLC-Analysemethoden (Wiesneth et al., 2018) und erweiterten den Fokus von einer reinen Gehaltsbestimmung auf die Konzentrationsveränderungen über die Wachstumssaison (Wiesneth et al., 2018) oder verglichen Pflanzenproben derselben Individuen über verschiedene Jahre hinweg (Nyman & Julkunen-Tiitto, 2005).

Eine strukturelle Besonderheit stellen die Addukte von Flavan-3-olen mit einer 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonyl-Struktur (HCH) dar, eine Seitengruppe, die in der Gruppe der Salicylalkoholderivate weit verbreitet ist. Ein solches HCH-Catechin konnte erstmals von Hsu und Mitarbeiter (1985) aus *Salix sieboldiana* BLUME isoliert und die Struktur postuliert werden. Jürgenliemk et al. (2007) gelang die Isolierung aus *Salix purpurea* L.. Diese Komponente konnte von (Wiesneth, 2019) in mehreren *Salix spec.* per massenspektrometrischer Analyse nachgewiesen werden, allerding gelang aus *Salix daphnoides* L. keine Isolierung.

2.5. Pharmakologie

Die Wirksamkeit von Zubereitungen aus Weidenrinde wurde in mehreren klinischen Studien zur Anwendung von Weidenrinde bei Unterrückenschmerzen mit vielversprechenden Ergebnissen nachgewiesen (Chrubasik et al., 2000; Chribasik, Künzel, Black, et al., 2001; Chribasik, Künzel, Model, et al., 2001). Bei anderen Studien zu ostearthritischen und rheumatoïden Beschwerden konnte die Weidenrinden Zubereitung keinen signifikanten Unterschied zur Placebobehandlung zeigen, was nach Vlachojannis et al. (2009) mit der relativ niedrigen Dosierung zusammenhängen könnte. In einer Studie von Schmid, Lüdtke & Mitarbeiter (2001) wurde jedoch durchaus ein schmerzlindernder Effekt von Weidenrinde bei osteoarthritischen Beschwerden des Knie- und Hüftgelenks nachgewiesen. Die Wirkung der Droge wird im Allgemeinen den Salicylalkoholderivaten, oder genauer deren Metaboliten (v. a. Salicylsäure) zugeschrieben. Salicylsäure kann nach Esterspaltung der Seitengruppen und Abspaltung der Glucose aus Saligenin (Salicylalkohol) durch Oxidation entstehen. Dieser Metabolisierungsweg konnte von Schmid, Kötter & Mitarbeitern (2001a) durch Messung der Plasmaspiegel von Salicylsäure nach Einnahme eines Weidenrindenextrakts nachgewiesen werden. Dabei wurden Spitzenwerte von 1,2 mg/l bestimmt, die einer Äquivalenzdosis von nur 87 mg Acetylsalicylsäure (Schmid, Kötter, et al., 2001b) entsprechen. Diese niedrige Dosis kann die Wirksamkeit bei der in der ESCOP-Monographie (European Scientific Cooperative on Phytotherapy, 2017; Wichtl et al., 2015) genannten Indikationen (leichte Rückenschmerzen, symptomatische Behandlung leichter Gelenkarthrose und rheumatischer Beschwerden, nicht alleine erklären (Schmid, Lüdtke, et al., 2001), zumal die Extrakte eine andere Wirkweise aufweisen, als Acetylsalicylsäure (Vlachojannis et al., 2011). Zu diesem Schluss kommen auch Nahrstedt et al. (2007), die den polyphenolhaltigen/proanthocyanidinreichen Fraktionen eine Beteiligung an der Wirksamkeit zuschreiben. Antoniadou et al. (2021) konnten diesen Beitrag bei der Untersuchung antiinflammatorischer Aktivität (PGE_2 -Freisetzung) *in vitro* nicht beobachten und stellen einen Bezug zwischen der HCH-Strukturuntereinheit und der Aktivität im vorgestellten Assay her. Dieser Effekt wird wie zuvor bei Knuth et al. (2011) auf den Abbau dieser Struktureinheiten zu Catechol zurückgeführt (Antoniadou et al., 2021). Dass dieser Abbau zu Catechol unter *in vitro* Bedingungen stattfindet, konnten Knuth et al. im Rahmen eines ICAM-1 Zellassays nachweisen (Knuth et al., 2011). In dieser Studie reduzierte das eingesetzte Salicortin die Expression des Oberflächenproteins ICAM-1, welches durch die

Steigerung der Adhärenz von neutrophilen Immunzellen an die Zelloberfläche proinflammatorische Reaktion begünstigen kann (Knuth et al., 2011). In einer klinischen Studie der Arbeitsgruppe konnten neben Salicylsäure relevante Konzentrationen von Catechol im Serum gesunder Probanden bestimmt werden. 1,2 h nach der Einnahme wurde die maximale Catecholkonzentration mit 13 µM bestimmt (Knuth et al., 2013). Das Serumcatechol stammt vermutlich allerdings nur zum Teil aus den HCH-Untereinheiten, da der Extrakt durch die Aufarbeitung bereits freies Catechol enthielt (Knuth et al., 2013). Trotzdem wird auf die Möglichkeit des Beitrags HCH-haltiger Substanzen auf die anti-inflammatorische Wirksamkeit von Weidenrinde hingewiesen. Des Weiteren wurden Studien zur Aktivität eines Weidenblütenextrakts bei neuropathischen Schmerzen im Tiermodell durchgeführt, die eine verminderte Expression von Entzündungsmarkern wie NF-κB, TNF- α , PGE2, und anderen zeigen konnte (Sobeh et al., 2019).

Catechol sowie 2-Hydroxybenzylalkohol wiesen zusätzlich in einer Studie von Masika et al. (2005) anti-mikrobielle Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* auf. Ebenfalls konnten Effekte bei gram-negativen und gram-positiven Keimen beobachtet werden (Popova et al., 2015). Weitere Untersuchungen befassen sich mit anti-retroviraler Aktivität *in vitro* (Eftekhari et al., 2014), antifungaler und antihelmintischer Aktivität (Salem et al., 2017) und positiven Effekten bei Fettleibigkeit und Lipidämie im Mausmodell (Liu, 2012). Hepatoprotektive Effekte, welche von Wahid et al. in einem Rattenmodell demonstriert werden konnten, wurden auf antiinflammatorische Aktivität des verwendeten Blütenextrakts von *Salix subserrata* WILLD. zurückgeführt (Wahid et al., 2016). Diese Forschungsergebnisse, welche auf andere, als in den Monographien genannten Indikationen abzielen, bedürfen aber allesamt noch entsprechender Untersuchungen *in vivo* und in einem weiteren Schritt in klinischen Studien.

Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Arten, Pflanzengewebe und Zubereitungen, welche in den genannten Studien zur Anwendung kamen. Dadurch können die Extrakte beispielweise in der Zusammensetzung und Komposition der sekundären Pflanzenmetabolite gegebenenfalls stark variieren. Auch ist die Vorgabe des Europäischen Arzneibuchs mit seiner Forderung nach 1,5% Salicylakoholderivaten für *Salicis cortex* und 5,0% für den Weidenrindentrockenextrakt speziell auf eine Stoffgruppe fokussiert ("Weidenrinde *Salicis Cortex*," 2020; "Willow Bark Dry Extract *Salicis Corticis Extractum Siccum*," 2023). Untersuchungen zu den Unterschieden

in der Zusammensetzung sind daher unerlässlich und werden zunehmend durchgeführt (beispielsweise Förster et al., 2021).

2.6. Spezies in dieser Arbeit

Die Gattung *Salix* ist sehr artenreich und umfasst in Mitteleuropa 37 Arten (vgl. Kapitel 2.14). Bestimmung der Weidenart anhand morphologischer Merkmale ist nach Holdenrieder et al. anspruchsvoll, da diese diözisch sind und vor der Laubentwicklung blühen aber beide Gewebe für eine Bestimmung benötigt werden. Zudem sind die vegetativen Merkmale, wie beispielsweise die Blattform innerhalb einer Art variabel (Holdenrieder et al., 1999). Zum Teil müssen zudem morphologische Eigenschaften am Holz der entrindeten Zweige beachtet werden (Aas, 2017), was die Vielzahl der zu berücksichtigenden Merkmale verdeutlicht. Des Weiteren können durch die mögliche Hybridisierung und Rückkreuzung Phänotypen entstehen, die morphologisch zwischen den Elternarten stehen können, aber nicht müssen (Holdenrieder et al., 1999).

Der Genus *Salix* beinhaltet nach Skvortsov & Zinovjev (1999) drei Subgenera: *Salix* (Echte Weiden, sechs Sektionen), *Chamaetia* (Spalier- und Zwergweiden, fünf Sektionen) und *Vetrix* (Korb- und Salweiden, 15 Sektionen). Die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Spezies sind nach der Einteilung von Skvortsov & Zinovjev (1999) in **Abbildung 1** (S. 16) gezeigt.

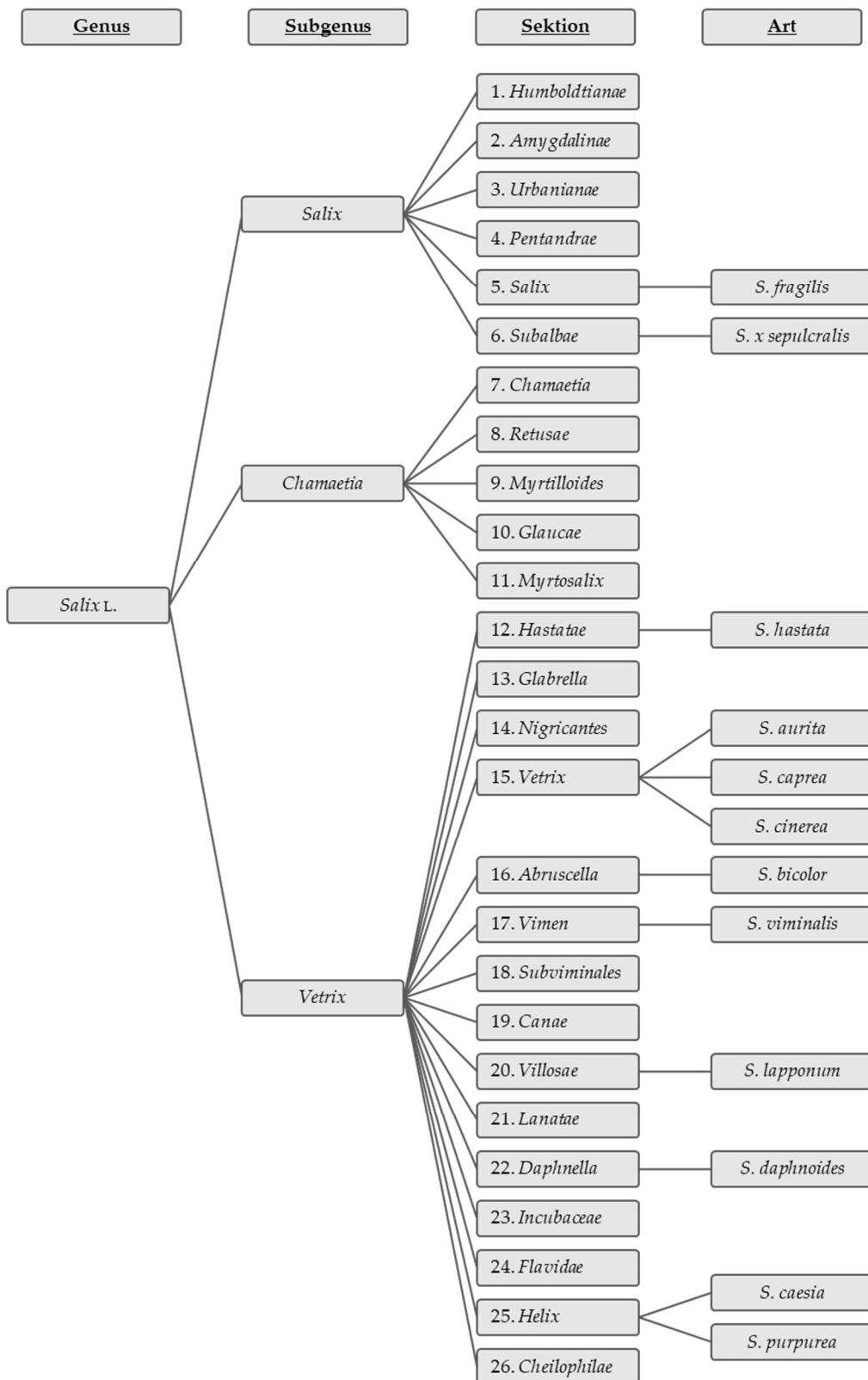


Abbildung 1: Darstellung der postulierten Einteilung des Genus *Salix* L. in Subgenera und Sektionen nach Skvortsov & Zinovjev (1999); die in der vorliegenden Arbeit behandelten Spezies der Gattung *Salix* sind, der Systematik von Skvortsov und Zinovjev folgend, den jeweiligen Sektionen zugeordnet;

In einer Pilotstudie von Wiesneth (2019), welche 13 Individuen aus verschiedenen Sektionen über eine Wachstumsperiode beobachtete, wurden bereits deutliche Unterschiede

in der Zusammensetzung der Extrakte aus Blättern und Rindendroge präsentiert. (Wiesneth, 2019). Analog zur Artbestimmung durch morphologische Merkmale zeigten sich bei einem eingeschlossenen Hybriden Eigenschaften beider Eltern und ein chemisches „Mischprofil“ (Wiesneth, 2019), eine Beobachtung, welche auch Oberprieler et al. (2013) bei der Studie von *Salix alba*, *S. fragilis* und deren Hybrid *S. x rubens* machten. Ähnliche Studien zu chemotaxonomischen Unterschieden verschiedener *Salix* Spezies wurden beispielsweise von Förster et al. (2021), Julkunen-Tiitto (1986, 1989), Nyman & Julkunen-Tiitto (2005) durchgeführt. Erschwert werden diese chemotaxonomischen Betrachtungen durch die saisonalen Schwankungen im Sekundärstoffprofil, welche berücksichtigt werden müssen (Köhler et al., 2023; Nyman & Julkunen-Tiitto, 2005; Wiesneth, 2019).

Die chemotaxonomischen Erkenntnisse mit den morphologischen Merkmalen auf eine ähnliche Ebene zu stellen fordert daher Wink (2003), um zu einer ganzheitlicheren taxonomischen Einteilung zu kommen. Der Versuch einer solchen chemotaxonomischen Betrachtung in Ergänzung zur morphologischen Einteilung der untersuchten Weiden soll als Teil der vorliegenden Arbeit vorgestellt werden.

2.7. Zielsetzung

- 1) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das phenolische Inhaltsstoffspektrum von *Salix cinerea* untersucht werden. Ziel war es, Salicylalkoholderivate, Phenolglykoside, Flavan-3-ole und Proanthocyanidine sowie 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäureester (HCH-Addukte) der Flavan-3-ole zu isolieren und deren chemische Struktur aufzuklären. In diesem Rahmen sollte auch der jahreszeitliche Einfluss auf den Polymerisierungsgrad polymerer Proanthocyanidine in *S. cinerea* durch NMR-spektroskopische Analysen eruiert werden.
- 2) Im ICAM-1 *in vitro* Zellassay sollte isoliertes HCH-Catechin gegen das unsubstituierte Flavan-3-ol verglichen werden, mit besonderem Augenmerk auf die Stabilität und das Stabilitätsverhalten der HCH-Teilstruktur unter *in vitro* Bedingungen. Diese Erkenntnisse sollen einen Beitrag zum Verständnis der Pharmakologie der Arzneidroge *Salicis cortex*, insbesondere der Proanthocyanidinfraktion, liefern.
- 3) Die Gerbstofffraktion von *S. cinerea* sollte in einem nächsten Schritt systematisch einem Screening für HCH-Addukte unterzogen werden. Ziel war es, ein Fragmentierungsmuster für HCH-Addukte zu postulieren und mit massenspektrometrischen Daten zu untermauern. In einem zweiten Schritt sollten Substanzen mit einem entsprechenden Fragmentierungsmuster identifiziert und chemische Strukturen vorgeschlagen werden.
- 4) Ein Screening von bis zu 12 verschiedenen *Salix* Spezies über die Wachstumsperiode von bis zu drei aufeinanderfolgenden Jahren sollte durchgeführt werden. Dabei waren die jahreszeitlichen Konzentrationssverläufe des Sekundärstoffspektrums in *Salicis cortex* zu betrachten. Im Fokus standen dabei die Gerbstofffraktion, die Proanthocyanidine im Speziellen, sowie verschiedene phenolische Substanzklassen. Darunter sind im Rahmen dieser Studie Salicylalkohol- und Kaffeesäurederivate, Phenolglykoside und fünf Flavonoidklassen zu verstehen. Neben jahreszeitlichen Verläufen sollte der Fokus auf Geschlechtsspezifische Unterschiede und die Charakterisierung des phenolischen Spektrums vertretener Arten gelegt werden. Zudem sollten chemotaxonomische Betrachtungen angestellt und die erhaltenen Daten mit den etablierten, postulierten verwandtschaftlichen Beziehungen der verschiedenen *Salix* spec. abgeglichen werden, um die bisherige auf morphologischer Beobachtung fußende Einteilung mit Erkenntnissen aus chemotaxonomischen Charakterisierung zu erweitern.

3. Präparativ-analytischer Teil

3.1. Hintergrund (*Salix cinerea* L.)

In der Literatur finden sich zahlreiche Arbeiten, welche die Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen aus Drogenmaterial verschiedener *Salix* Spezies beschreiben (vgl. Tawfeek et al., 2021).

Dabei fällt auf, dass die bei uns heimische *Salix cinerea* L. und im Speziellen die Rinde dieser Art bisher nicht eingehender untersucht wurde. In gängigen Datenbanken (Google Scholar¹, SciFinder^{®1}) findet sich keine Arbeit zur systematischen Untersuchung des phenolischen Inhaltsstoffspektrums dieser Spezies. Ziel des präparativen Teils der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Strukturaufklärung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Besonderes Augenmerk lag dabei auf einfachen phenolischen Verbindungen wie Salicylalkoholderivaten, Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen sowie deren HCH-Addukte.

3.2. Material und Methoden

Die Extraktion pflanzlicher Sekundärmetabolite erfordert die Anwendung unterschiedlicher Fraktionierungs- und Trennmethoden. Zu diesem Zweck kamen im Rahmen der hier angefertigten Arbeit eine Reihe von Instrumenten und Verbrauchsmaterialien zur Anwendung (**Tabelle 1** und **Tabelle 2**).

3.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Liste der zur Anwendung gebrachten Geräte

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fraktionskollektor	2111 Multirac	LKB Bromma, Stockholm, Schweden
DC-Auftragung	Linomat 5 WinCats 1.4.2 (Software)	Camag, Muttenz, Schweiz
DC-Kammer	Flachbodenkammer (20x20 cm)	Desaga Sarstedt-Gruppe, Nümbrecht, Deutschland
DC-Platten	TLC Silica gel 60 F254, Aluminiumfolie, 20x20 cm	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Einmalspritzen	Norm-Ject, Tuberculin, 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland

¹ <https://scholar.google.de/>, <https://scifinder-n.cas.org/> Suchen durchgeführt am 20.10.2024, Suchbegriffe: „*Salix cinerea*, willow bark, phenolic profile, phenolics, screening“

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
Flash-Chromatographie Anlage	Spot Flash System Armen Glider Flash V2.3 (Software)	Armen Instrument, Paris, Frankreich
Gefrieretrocknung	P10-85	Dieter Piatkowski-Forschungsgeräte, München, Deutschland
Glasgeräte, diverse	Mess- und Vollpipetten (vers. Volumina) Messkolben (5, 10 und 25 ml) Messzylinder (10 bis 1000 ml) Rundkolben (25 bis 1000 ml) Spitzkolben (10 bis 50 ml)	Brand, Wertheim, Deutschland oder Schott, Mainz, Deutschland
Glassäule zur Flüssigchromatographie	Länge: 600 mm, Durchmesser: 25 mm	Besta-Technik für Chromatographie GmbH, Wilhelmsfeld, Deutschland
MCI-Gel®	CHP20P	Mitsubishi Chemical Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Sephadex®	LH20	GE Healthccare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Glassäulen	verschiedene Größen	Glasbläser der Uni Regensburg
Heizplatte	Thermoplate S	Desaga Sarstedt-Gruppe, Nümbrecht, Deutschland
HPLC - analytisch	LaChrom Elite L-2200 (Autosampler) LaChrom Elite L-2130 (Pumpe) LaChrom Elite L-2455 (DAD) LaChrom Elite L-2350 (Säulenofen) EZChrom Elite 3.1.7 (Software)	Hitachi, Tokio, Japan Vertrieb: VWR, Darmstadt, Deutschland
HPLC - präparativ	1260 Infinity (binäre Pumpe) 1260 Infinity (manueller Injektor) 1260 Infinity (DAD) 1260 Infinity (Fraktionskollektor) OpenLab CDS (Software)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
HPLC-Säulen	Kinetex® Biphenyl, 100 Å, 5 µm, 4,6x250 mm (analytisch) Kinetex® Biphenyl, 100 Å, 5 µm, 21,2x250 mm (präparativ)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
HPLC-Vial	11 mm CrimpSnap-Vial, braun, 2 ml	Wicom, Heppenheim, Deutschland
HPLC-Vial Insert	Micro Insert, 300 µl, l: 30 mm, Ø: 6 mm	Wicom, Heppenheim, Deutschland
LC-MS	1290 Infinity UHPLC G4220A (Binäre Pumpe) G4226A (Ausosampler) G1316C (Säulenofen) G4212A (DAD) Q-TOF 6540 UHD Ionenquelle Dual-ESI	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
Mikropipetten	Blaubrand® intraMARK, 10 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
NMR-Röhrchen	507-HP-8	Norell, Lansville, USA
NMR-Software	Topspin 3.5.b.91 pl 7	Bruker Corporation, Billerica, USA
Oberschalenwaage	MC 1, Laboratory LC 6200 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Pasteurpipetten	230 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	100 Research (10-100 µl) 1000 Research (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl 100 - 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland
Polarimeter I	UniPol L 1000 Polarimeter	Schmidt + Haensch, Berlin, Deutschland
Polarimeter II	PL1	Exacta OpTech GmbH, München
Probendosierspritze (manuelle Injektion, präparative HPLC)	5 ml	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Probendosierspritze (DC-Auftragung)	100 µl	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Quarzküvette	QS: 10,00 mm	Hellma, Müllheim, Deutschland
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Berlin, Deutschland
Rotationsverdampfer	Laborota 4003 control	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Schnappdeckelgläser	5 und 20 ml	VWR, Darmstadt, Deutschland
Spektropolarimeter	J-715	JASCO Deutschland, Gross-Umstadt, Deutschland
Spektrophotometer	Cary 50 Scan Cary WinUV 3.00(182) (Software)	Varian Deutschland, Darmstadt, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ultrazentrifugalmühle	UZM 1	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Zeichenprogramm	ChemBioDraw Ultra 18.0.0.231	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

Tabelle 2: Auflistung der zur Anwendung gebrachten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Aceton	technisch, HSL	CSC Jäcklechemie Nürnberg, Deutschland (wurde vor Gebrauch am Rotationsverdampfer aufgereinigt)
Acetonitril (ACN)	HPLC-grade, LiChrosolv®	Merck Chemicals Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	p.a.	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Anisaldehyd	4-Methoxybenzaldehyd zur Synthese	Merck Chemicals Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	100%, anhydrous	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Ethanol	technisch, HSL	CSC Jäcklechemie Nürnberg, Deutschland (wurde vor Gebrauch am Rotationsverdampfer aufgereinigt (120 mbar))
Methanol (DC, Flash, AA Reagenz)	p.a., EMSURE®	Fisher Scientific Hampton, USA
Methanol (für optische und spektroskopische Methoden, HPLC)	HPLC-grade, LiChrosolv®	Merck Chemicals Darmstadt, Deutschland
Methanol-d ₄	Methylalcohol-d ₄	Deutero Kastellaun, Deutschland
Naturstoff-Reagenz Diphenylboryloxyethylamin	≥ 97%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Macrogol 400	Polyethylenglykol zur Synthese	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCL), rauchend	~37%, analytical reagent grade	Fisher Scientific, Hampton, USA
Schwefelsäure	95-97%, p.a.	Merck Chemicals Darmstadt, Deutschland
Seesand	p.a.	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Silica Gel Orange (=Orangegegel)	-	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Vanillin	≥ 99%	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Wasser	< 0,05 µS	An Reinstwasseranlage frisch vor Verwendung erzeugt

3.2.2. Ernte, Pflanzenmaterial und Extraktion

Das für die präparative Arbeiten benutzte Pflanzenmaterial einer *Salix cinerea* (Bez.: 38_Scin_f_BT) wurde im Ökologisch Botanischen Garten der Universität Bayreuth unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Gregor Aas an drei unterschiedlichen Zeitpunkten im Jahr 2020 gesammelt. Um die Wachstumssaison gleichmäßig abzudecken, wurde im Juni, nach dem vollständigen Ausbilden des Laubs, sowie im August und zu Ende der Wachstumssaison im Oktober geerntet. Die geschnittenen Zweige wurden in Exsikkatoren über Orangegel im Vakuum für sieben Tage getrocknet (täglicher Austausch des Orangegeles). Rückstellmuster wurden am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg hinterlegt.

Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde mithilfe einer Ultrazentrifugalmühle unter Anwendung der Siebgröße 0,5 mm zerkleinert mit einem äquivalenten Volumen Seesand vermengt, in Glassäulen überführt und mit vordestilliertem Methanol HSL mazeriert. Nach 12 h Mazeration wurde über 14 Tage erschöpfend, bis zur Farblosigkeit des Eluats perkoliert. Des erhaltene Eluat wurde evaporiert, das Destillat der Perkolation erneut zugeführt und der erhaltene Extrakt als Ausgangsmenge für die präparativen Arbeiten benutzt.

3.2.3. Dünnschichtchromatographie

Um den Erfolg der Extraktion oder die Auftrennung bei chromatographischen Schritten (offene Säule und MPLC) zu überprüfen, wurde stets eine dünnschichtchromatographische Kontrolle zur Fraktionseinteilung durchgeführt. Dazu wurden an die Konzentration der Substanzen angepasst, 10–20 µl per Mikropipette (10 µl) manuell auf DC-Platten (TLC Silica gel 60 Platten, Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Um diesen Schritt zu beschleunigen und Ressourcen zu sparen, wurde jedes zweite/dritte Fraktionsgläschen für Fraktionseinteilung benutzt. Um die geschnittenen Fraktionen auf einer Übersichts-DC darzustellen, wurde auf eine halbautomatisierte Auftragung mit einem Linomat 5 (Camag, Muttenz, Schweiz) zurückgegriffen. Dabei wurden jeweils zwischen 5 und 20 µl aufgetragen. Die Fließhöhe wurde auf 9 cm festgelegt. Die Entwicklung der DC-Platten erfolgte in 20x20 cm großen DC-Kammern, nach Sättigung mit dem jeweils verwendeten Fließmittelgemisch. Die verwendeten Gemische können **Tabelle 3** entnommen werden.

Tabelle 3: Für DC-Analysen verwendete Fließmittelgemische

Nr.	Lösemittel	Verhältnis
1	EtOAc:FA:H ₂ O	90:5:5
2	EtOAc:HOAc:FA:H ₂ O	100:11:11:26
3	EtOAc:FA:MeOH:H ₂ O	90:5:3:2

Nach Trocknung im Kaltluftstrom erfolgte die Dokumentation am CAMAG TLC Visualizer (Camag, Muttenz, Schweiz) bei Tageslicht sowie 254 und 366 nm. Die anschließende Derivatisierung erfolgte unter Anwendung von Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz (AA), Vanillin-Salzsäure Sprühreagenz (Vanilin-HCl) oder Naturstoffreagenz nach Neu.

Für das AA-Sprühreagenz wurden 0,50 mL AA in 10,0 mL HOAc gelöst, anschließend wurden unter Eiskühlung 85 mL MeOH und 5,0 mL Schwefelsäure zugegeben.

Das zweiteilige Vanillin-HCl-Sprühreagenz bestand aus einer 4%igen Lösung von Vanillin in Ethanol und konzentrierter (rauchender) Salzsäure, welche nacheinander aufgesprüht wurden.

Für das Naturstoffreagenz wurde eine 1%ige Lösung von Diphenylboryloxyethylamin in Methanol benutzt und die Platte mit 5%iger methanolischer Macrogol 400-Lösung fixiert.

Dem Besprühen mit AA-Reagenz oder Vanillin-HCl folgte Erhitzen auf einer Heizplatte bei 100 °C bis zur optimalen Farbentwicklung (ca. 5 Min) und nach dem Abkühlen die erneute Dokumentation im Tageslicht, bei 254 und 366 nm.

3.2.4. Säulenchromatographie (Sephadex® LH20)

Als erster Fraktionierungsschritt diente eine Chromatographie an Sephadex® LH-20 (ca. 250 g, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) als stationärer Phase unter Verwendung einer offenen Glassäule (Länge: 95 cm, Durchmesser: 3 cm). Die Fraktionierung wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Zur Anwendung kamen die Systeme 1 und 2 (**Tabelle 3**) mit AA/H₂SO₄ und Vanillin-HCl als Derivatisierungsreagenzien.

Das Säulenmaterial wurde mit EtOH 70% equilibriert, die Extrakte in Rundkolben mit Hilfe von EtOH 70% aufgeschlämmt und auf direkt auf das Säulenbett aufgetragen. Nachdem der gesamte Extrakt ins Säulenbett eingesickert war, wurde die Chromatographie mit Ethanol 70% begonnen. Als Fließmittel diente ebenfalls EtOH 70% bei einer Fließgeschwindigkeit von ca. 2-3 ml/min.

Bei Farblosigkeit des Eluats wurde das Fließmittel auf Aceton 70% umgestellt, um die auf der Säule verbleibende Fraktion polymerer Proanthocyanidine (pPA) von der stationären Phase zu lösen. Dabei wurde etwa das fünffache Säulenvolumen benutzt, um die Vollständigkeit der Elution zu gewährleisten.

Anschließend wurde die stationäre Phase entnommen, mit Wasser gereinigt und das Säulenbett neu gegossen.

3.2.5. MPLC (MCI-Gel® CHP20P)

Bei proanthocyanidinhaltigen Sephadexfraktionen wurde eine MPLC angeschlossen. Um eine Trennung stereoisomerer Flavan-3-ole zu ermöglichen, wurden ca. 170 g MCI-Gel® CHP20P (Mitsubishi Chemical Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) als stationäre Phase in eine druckstabile Chromatographieglassäule (Länge: 600 mm; Durchmesser: 25 mm) der Firma BESTATEchnik- für Chromatographie GmbH (Wilhelmsfeld, Deutschland) gefüllt. Die Säule wurde per Flash-Chromatographie-Anlage (Spot Liquid Chromatography Flash, Armen Instruments, Saint-Avé, Frankreich) betrieben und der in **Tabelle 4** beschriebene Gradient genutzt (Eluent A: MeOH 20%, Eluent B: MeOH 50%). Bei Fraktionen höherpolymerer PAs wurde der letzte Spülschritt bis zur Farblosigkeit des Eluats entsprechend verlängert. Die Fraktion wurde in Startbedingungen gelöst und manuell mithilfe eines Dreiwegeventils aufgegeben. Die Fraktionskontrolle erfolgte unter Verwendung des in Kapitel 3.2.3 beschriebenen DC-Systems Nr.2 mit Vanillin/HCl als Derivatisierungs-Reagenz.

Tabelle 4: Gradient der Flash-Chromatographie an MCI-Gel® CHP20P

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
0	100	0	12,5
5	100	0	15
150	0	100	15
180	Wechsel auf MeOH 75%		15
225	Wechsel auf MeOH 100%		15
270	Verlängerung bis zur Farblosigkeit des Eluats		15

3.2.6. Analytische HPLC

Die Methodenentwicklung für die präparative HPLC ebenso wie die Fraktionskontrolle der Flash-Fraktionen und Reinheitsüberprüfung der Isolate erfolgte an einer analytischen LaChrom Elite HPLC-Anlage (Hitachi, VWR, Darmstadt, Deutschland). Die verwendeten Säulen sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

Tabelle 5: Übersicht über die bei der analytischen HPLC verwendeten Säulen

Nr.	Bezeichnung	Hersteller
HPLC-Säule analytisch I	Nucleodur C18 Isis, 5 µm, 4,6x250 mm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
HPLC-Säule analytisch II	Kinetex® Biphenyl, 100 Å, 5 µm, 4,6x250 mm	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Die Proben wurden jeweils in Konzentrationen von 1 mg/ml in Methanol gelöst und durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) in HPLC-Vials überführt (beide WICOM). Die Injektionsmenge betrug 5 µl. Als Ausgangspunkt für die Methodenentwicklung für die präparative HPLC diente der in **Tabelle 6** beschriebene Gradient. Ein Säulenofen wurde nicht betrieben, sodass die Trennung bei Raumtemperatur erfolgte. Als Fließmittel kamen Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) zur Anwendung.

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung des chromatographischen Systems, welches als Ausgangspunkt für die analytische HPLC-Methodenentwicklung diente; Eluent A (Wasser), Eluent B (Acetonitril)

Stationäre Phase	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
HPLC-Säule I	0	95	5	1
	15,0	45	55	1
	16,0	0	100	1
	20,0	0	100	1

Durch dieses Vorgehen konnte im analytischen Maßstab eine effektive und ressourcenschonende Methode entwickelt und auf die präparative HPLC übertragen werden. Der Übertrag erfolgte durch proportionale Erhöhung des Flusses zum Verhältnis der Querschnitte der benutzten Säulen.

3.2.7. Präparative HPLC

Für die Aufreinigung und Isolierung der Einzelsubstanzen kam eine präparative HPLC-Anlage zur Anwendung, wenn diese nach MCI-Flash-Chromatographie noch keine ausreichende Reinheit zur Strukturaufklärung zeigten. Dabei wurde eine Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet, bestehend aus einer

binären Pumpe 1260 Infinity, einem manuellen 1260 Agilent Injektor, einem 1260 Agilent DAD und einem 1260 Agilent Fraktionskollektor (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland). **Tabelle 7** zeigt die verwendeten stationären Phasen und Parameter der verwendeten Säulen. Ein Säulenofen kam nicht zur Anwendung, die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur.

Tabelle 7: Übersicht über die bei der präparativen HPLC verwendeten Säulen

Nr.	Bezeichnung	Hersteller
HPLC-Säule I	Nucleodur C18 Isis, 5 µm, 10x250 mm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
HPLC-Säule II	Nucleodur C18 Isis, 5 µm, 21x250 mm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
HPLC-Säule III	Kinetex® Biphenyl, 100 Å, 5 µm, 21,2x250 mm	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Die Proben wurden in MeOH oder in Startbedingungen gelöst, filtriert (0,2 µm) und manuell in Aliquoten auf die äquilibrierte Säule injiziert. Als Fließmittel dienten Wasser und Acetonitril, welche in verschiedenen Gradienten zur Anwendung kamen. Die verwendeten Chromatographischen Systeme sind nachfolgend in den **Tabelle 8 - Tabelle 12** aufgeführt:

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung des chromatographischen Systems zur Trennung der Fraktion SdII2 per präparativer HPLC; Eluent A (Wasser), Eluent B (Acetonitril)

Stationäre Phase	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
HPLC-Säule I	0	88	12	5
	13,5	60	40	5
	14	50	50	5
	15	0	100	5
	18	0	100	5

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung des chromatographischen Systems zur Trennung der Fraktion SdII67M2 per präparativer HPLC; Eluent A (Wasser), Eluent B (Acetonitril)

Stationäre Phase	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
HPLC-Säule II	0	90	10	21
	10	55	45	21
	11	0	100	21
	13	0	100	21

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des chromatographischen Systems zur Trennung der Fraktion SdII67M8 per präparativer HPLC; Eluent A (Wasser), Eluent B (Acetonitril)

Stationäre Phase	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
HPLC-Säule III	0	80	20	21
	10	63,3	36,7	21
	11	0	100	21
	13	0	100	21

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung des chromatographischen Systems zur Aufreinigung der Fraktion SdII67M8T3 per präparativer HPLC; Eluent A (Wasser), Eluent B (Acetonitril)

Stationäre Phase	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
HPLC-Säule III	0	80	20	21
	10	65	35	21
	11	0	100	21
	13	0	100	21

Tabelle 12: Tabellarische Darstellung des chromatographischen Systems zur Trennung der Fraktion SdII9M5 per präparativer HPLC; Eluent A (Wasser), Eluent B (Acetonitril)

Stationäre Phase	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
HPLC-Säule III	0	95	5	21
	10	64,3	35,7	21
	11	0	100	21
	13	0	100	21

Die Detektion der Peaks erfolgte bei 230 oder 280 nm. Steuerung und Fraktionssammlung erfolgte in der Software OpenLabsCDS (Agilent). Die einzelnen Läufe wurden mehrfach wiederholt und entsprechende Fraktionen im Nachgang vereinigt. Das Fließmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer evaporiert.

3.2.8. Evaporation

Die Evaporation des Extraktionsmittels sowie von Fließmitteln der Chromatographie und organischer Lösemittelgemische zum Überführen der Fraktionen und Isolate erfolgte an Rotationsverdampfern (Laborota 4003 control, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland). Bei den zu entfernenden Flüssigkeiten handelte es sich überwiegend um Mischungen organischer Lösemittel (Methanol, Ethanol und Acetonitril) mit Wasser. Diese wurden bei 40 °C im Wasserbad und stetig sinkendem Druck evaporiert. Restliche Feuchte wurde per Gefriertrocknung entfernt.

Bei Isolaten und Fraktionen, welche ein Volumen von 10 ml und 500 mg nicht überschritten, wurde ein Stickstoffstrom zur Evaporation direkt im Schnappdeckelglas

verwendet. Um die exakte Auswaage der Isolate bestimmen zu können, wurde auch hier eine Gefriertrocknung angeschlossen.

3.2.9. Lyophilisierung

Das Lyophilisieren der Fraktionen und Isolate nach der chromatographischen Aufreinigung erfolgte an einer Gefriertrocknung des Typs P10-85 (Dieter-Piatkowski-Forschungsgeräte, München, Deutschland). Die Fraktionen wurden in Rundkolben vereinigt, nach Evaporation des organischen Lösemittels mit Wasser aufgeschlämmt und in einem gekühlten Isopropanolbad eingefroren. Konstante Rotation des Kolbens sorgte für eine homogene Eisbildung und verhinderte die Sedimentation während des Erstarrens. In einem zweiten Schritt wurden die Kolben auf -80 °C gekühlt. Isolate wurden aufgrund der geringen Menge in Schnappdeckelgläsern direkt bei -80 °C eingefroren und mit perforiertem Parafilm verschlossen.

Die Gefriertrocknungsanlage wurde bei -85 bis -90 °C betrieben. Der Prozess wurde abgeschlossen, wenn die Kolben Raumtemperatur erreicht hatten, was je nach Fraktions- und Kolbengröße bis zu 72 Stunden dauerte.

3.3. Spektroskopische Methoden

3.3.1. NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopischen Experimente wurden an der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg durchgeführt. Dabei wurden 1D- (^1H , ^{13}C) als auch 2D-Experimente ($[^1\text{H}-^1\text{H}]\text{-COSY}$, $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]\text{-HSQC}$, $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]\text{-HMBC}$, $[^1\text{H}-^1\text{H}]\text{-NOESY}$, $[^1\text{H}-^1\text{H}]\text{-ROESY}$) zur Strukturaufklärung angewendet. Die Messungen wurden an einem AVANCE III HD NMR (^1H NMR 400,13 MHz, ^{13}C NMR 100,63 MHz, 298/233 K) oder einem AVANCE III 600 NMR (^1H NMR 600,25 MHz, ^{13}C NMR 150,95 MHz, 298 K) (jeweils Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) durchgeführt.

Als Lösemittel wurde MeOD- d_4 verwendet, um so Tieftemperaturmessungen bei -40 °C (233 K) zu ermöglichen. Zur Kalibrierung diente das verwendete Lösemittel. Alle chemischen Verschiebungen (δ_H und δ_C) wurden dabei in ppm und die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Die Auswertung der Spektren erfolgte in TopSpin 3.6.2 (Bruker, USA).

3.3.2. Massenspektrometrie

Für die erhaltenen Isolate wurden an der Zentralen Analytik der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg ESI-HRMS-Spektren gemessen, um über das Auftreten von Molekülionen und -fragmenten sowie der Isotopenverteilung die Summenformel der jeweiligen Substanzen zu errechnen. Zur Anwendung kam dabei eine 1290 Infinity UHPLC in Kombination mit einem Quadrupol-Time of Flight Q-TOF 6540 UHD Massenspektrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Der Gradient der Chromatographie sind in **Tabelle 13** gezeigt und wurde bei einer Temperatur von 50 °C angewendet. Das Injektionsvolumen betrug 1,0 µl.

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung des chromatographischen Systems vor HRESI-MS-Messungen der isolierten Substanzen; Eluent A (Wasser + 0,1% Ameisensäure), Eluent B (Acetonitril + 0,1% Ameisensäure)

Stationäre Phase	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
RP-18	0	80	20	0,5
ZORBAX Eclipse	10,0	2	98	
XDB-C18 (Agilent)	12,0	2	98	
	12,1	80	80	
	13,5	80	80	

Die Auswertung der Spektren und Errechnung der Summenformeln erfolgte in MassHunter Qualitative Analysis 10 (Agilent).

3.3.3. UV-Vis-Spektroskopie

Für die Vermessungen der UV-Spektren wurden die Isolate in Methanol gelöst und an einem Cary 50 Scan UV-Spektrometer (Varian Deutschland, Darmstadt, Deutschland) gegen Methanol vermessen (Schichtdicke 1 cm, Quarzküvette Hellma, Müllheim, Deutschland). Dabei wurde ein Wellenlängenbereich von 190–400 nm abgedeckt und die Substanzen zu Konzentrationen verdünnt, in welchen sich die charakteristischen Maxima im linearen Bereich des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Absorption 0,1–0,9) befinden.

3.3.4. Polarimetrie

Die Erfassung der optischen Aktivität isolierter Substanzen wurde, sofern nicht anders angegeben, an einem UniPol L 1000 Polarimeter (Schmidt + Haensch GmbH & Co., Berlin, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die Substanzen in Methanol gelöst und der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{25}$ bei einer Wellenlänge von 589 nm in einem Mikromessrohr (Länge: 50 mm, Volumen: 550 μ l) bei Raumtemperatur gegen Methanol, ermittelt. Alternativ kam ein Polarimeter PL1 (Exacta OpTech GmbH, München) zur Anwendung, bei welchem die Substanzen in 10 ml MeOH gelöst und bei Raumtemperatur vermessen wurden. Die angegebenen Werte werden als Mittelwert aus zehn Messungen, bzw. fünf Ablesungen (im Falle des PL1) nach **Formel 1** angegeben.

Formel 1. Berechnung des spezifischen Drehwerts.

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha}{c \cdot d}$$

$[\alpha]_D^{25}$	spezifischer Drehwert $[(^\circ \cdot ml) \cdot (g \cdot dm)^{-1}]$
α	Drehwinkel $[^\circ]$
c	Konzentration $[g/ml]$
d	Schichtdicke $[dm]$

3.3.5. Circulardichroismus

Die Aufnahme der CD-Spektren erfolgte an einem J-715 Spektropolarimeter der Firma JASCO Deutschland GmbH (Gross-Umstadt, Deutschland) bei einer Temperatur von 22 °C. Die Proben wurden in Methanol gelöst und gegen das reine Lösemittel, unter den in **Tabelle 14** angegebenen Parametern, vermessen. Das Spektrum stellt den Mittelwert aus zehn Messzyklen dar, welche durch Anwendung des Savitzky-Golay Algorithmus mit einer Konvolutionsbreite von 15 geglättet wurde. Im jeweiligen Spektrum aufgetragen ist die molare Elliptizität, welche sich nach **Formel 2** berechnet, gegen die Wellenlänge.

Formel 2: Formel zum Berechnen der molaren Ellipizität

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot M}{c \cdot 1 \cdot 10}$$

$[\theta]$	<i>molare Ellipizität [$(^{\circ} \cdot \text{cm}^2) \cdot \text{dmol}^{-1}$]</i>
θ	<i>Ellipizität [$^{\circ}$]</i>
M	<i>molare Masse [g/mol]</i>
c	<i>Konzentration [g/ml]</i>
L	<i>Schichtdicke [cm]</i>

Tabelle 14: Parameter und gewählte Einstellungen bei der Vermessung der CD-Spektren am J-715 Spektropolarimeter

Parameter	Einstellung
Sensitivität	Standard
Wellenlängenbereich	190–400 nm
Messschritte	0,5 nm
Scanmodus	kontinuierlich
Scangeschwindigkeit	100 nm/min
Ansprechzeit	0,5 s
Bandweite	1 nm
Temperatur	22 °C

3.4. Isolierung

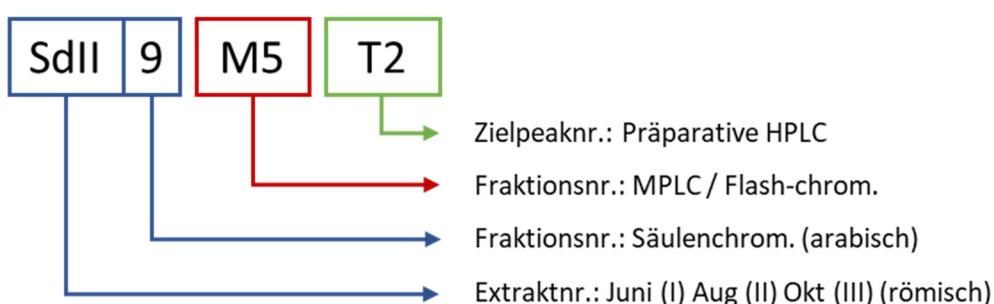
Eines der Ziele dieser Arbeit war es, phenolische Inhaltsstoffe aus einem methanolischen Extrakt von *Salicix cortex* (*Salix cinerea*) zu isolieren, die Strukturen aufzuklären und einer Testung im Zellkulturmodell zugänglich zu machen.

3.4.1. Isolierungsstrategie

Die Extraktion des Pflanzenmaterials erfolgte wie unter 3.2.2 (S. 23) beschrieben, unter Verwendung von Methanol. Als Ausgangsmaterial dienten geschnittene und gemahlene Triebe eines Individuums *Salix cinerea* der Monate Juni, August und Oktober. An die Extraktion schloss sich jeweils die Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 an (3.2.4, S. 24). Die vereinigten Fraktionen wurden evaporiert und lyophilisiert. Die Flavan-3-ol-haltigen Fraktionen (positive Reaktion bei DC-Kontrolle mit Vanillin-HCl Sprühreagens) wurden anschließend einer MPLC/Flash-Chromatographie an MCI-Gel® (CHP20P) unterzogen (3.2.5, S. 25). Im weiteren Verlauf wurde eine préparative HPLC zur finalen Aufreinigung der Isolate eingesetzt (3.2.7, S. 26).

Ausnahmen sind: die Sephadexfraktion SII2, welche direkt einer préparativen HPLC unterzogen wurde sowie einige Fraktionen, die nach MPLC bereits ausreichend aufgereinigt waren, um eine Strukturaufklärung durchführen zu können.

Die Fraktionen wurden nach folgendem System benannt und ermöglichen so eine einfache Rückverfolgung:



Eine Übersicht der gewonnenen Isolate und des jeweiligen Isolierungswegs ist im Isolierungsbaum (**Abbildung 2**) schematisch dargestellt.

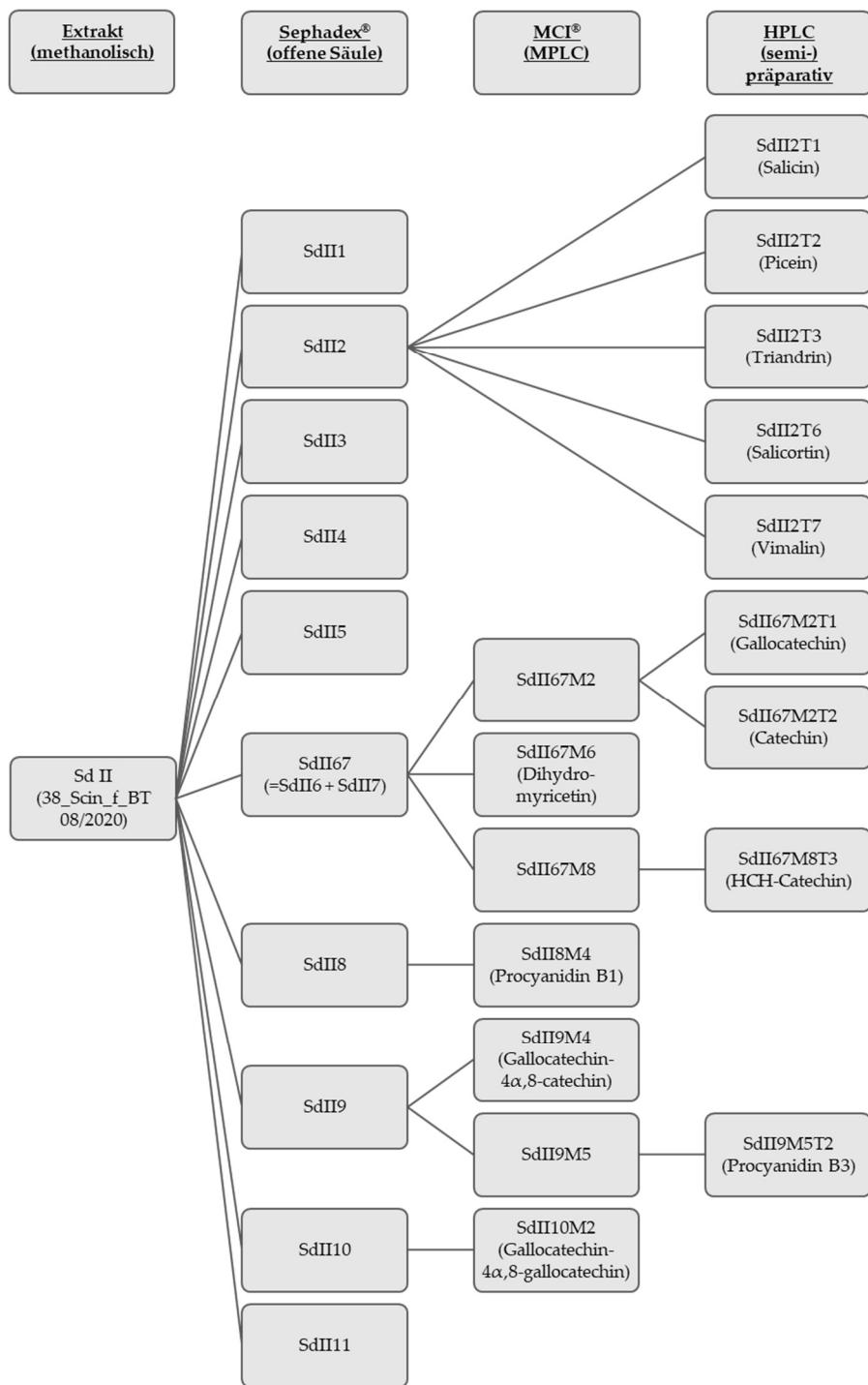


Abbildung 2: Isolierungsschema mit den Substanzen, welche aus dem methanolischen Extrakt des im August 2020 geernteten Pflanzenmaterial isoliert werden konnten; der Extrakt wurde in einer offenen Glassäule an Sephadex® LH20 Material getrennt, daran schloss sich eine MPLC an MCI-Gel® CHP-20 und eine Aufarbeitung an (semi-)präparativer HPLC an; eine Sephadex®-Fraktion wurde direkt per HPLC aufgetrennt (SdII)

3.4.2. Extraktion

Zur Extraktion standen nach Trocknung und Aufarbeitung zu den jeweiligen Erntezeitpunkten zwischen ca. 90 und 185 g zur Verfügung. Davon wurden Rückstellmuster gezogen und das restliche getrocknete Drogenmaterial wie unter 3.2.2 (S. 23) beschrieben extrahiert. Die genauen Einwagen, die erhaltenen Extraktmengen und das errechnete Drogen-Extrakt-Verhältnis (DEV) sind in **Tabelle 15** gezeigt.

Tabelle 15: Übersicht zu Drogeneinwaage und Extraktion

Erntemonat	Jun 2020	August 2020	Oktober 2020
Einwaage Drogen [g]	88,41	171,76	182,28
Auswaage Extrakt [g]	12,50	31,88	38,56
Elutionsvolumen [l]	11,97	13,97	15,20
DEV	7,07:1	5,38:1	4,72:1

3.4.3. Säulenchromatographie (Sephadex® LH20)

Für die Chromatographie an Sephadex® LH20 wurden die Extrakte wie unter 3.2.4 (S. 24) beschrieben auf die offene Glassäule aufgebracht und chromatographiert. Die erhaltenen Fraktionen sind zusammen mit den Elutionsbereichen und den entsprechenden Auswaagen in **Tabelle 16** aufgeführt.

Eine Übersichts-DC der geschnittenen Fraktionen nach Chromatographie der drei Extrakte ist in **Abbildung 3** gezeigt.

Tabelle 16: Elutionsbereiche und Auswaagen der Fraktionen nach Chromatographie an Sephadex® LH-20; aufgetrennt wurden methanolische Extrakte von *Salicis cortex* (*S. cinerea*) die aus drei Ernten 2020 (Juni-Oktober) hergestellt wurden

Juni 2020 (SdI)			August 2020 (SdII)		Oktober 2020 (SdIII)	
Bez.	Elutions-bereich [ml]	Auswaage [g]	Elutions-bereich [ml]	Auswaage [g]	Elutions-bereich [ml]	Auswaage [g]
1	0-252	0,81	0-392	2,76	0-270	0,44
2	252-336	2,44	392-578	7,46	270-390	2,82
3	336-588	5,36	578-1003	9,15	390-915	21,47
4	588-1113	0,83	1003-1269	0,42	915-1125	0,48
5	1113-1365	0,18	1269-1495	0,29	1125-1335	0,40
6	1365-1785	0,23	1495-1801	0,58	1335-1680	0,86
7	1785-2268	0,23	1801-1988	0,41	1680-1935	0,48
8	2268-2793	0,07	1988-2533	0,87	1935-2145	0,27
9	2793-3402	0,06	2533-3464	0,52	2145-2625	0,40
10	3402-4431	0,08	3464-4249	0,27	2625-2880	0,17
11	4431-5460	0,05	4249-5033	0,28	2880-3165	0,16
12	5460-7980	0,08	5033-5565	0,20	3165-3915	0,30
13			5565-8850	0,71	3915-4500	0,19
14					4500-5070	0,15
15					5070-6285	0,24
16					6285-10069	0,55
pPA	7980-11680	0,47	8850-12350	3,83	10069-13569	3,75
Summe		10,875		27,731		33,135
WF		87,0%		87,0%		85,9%

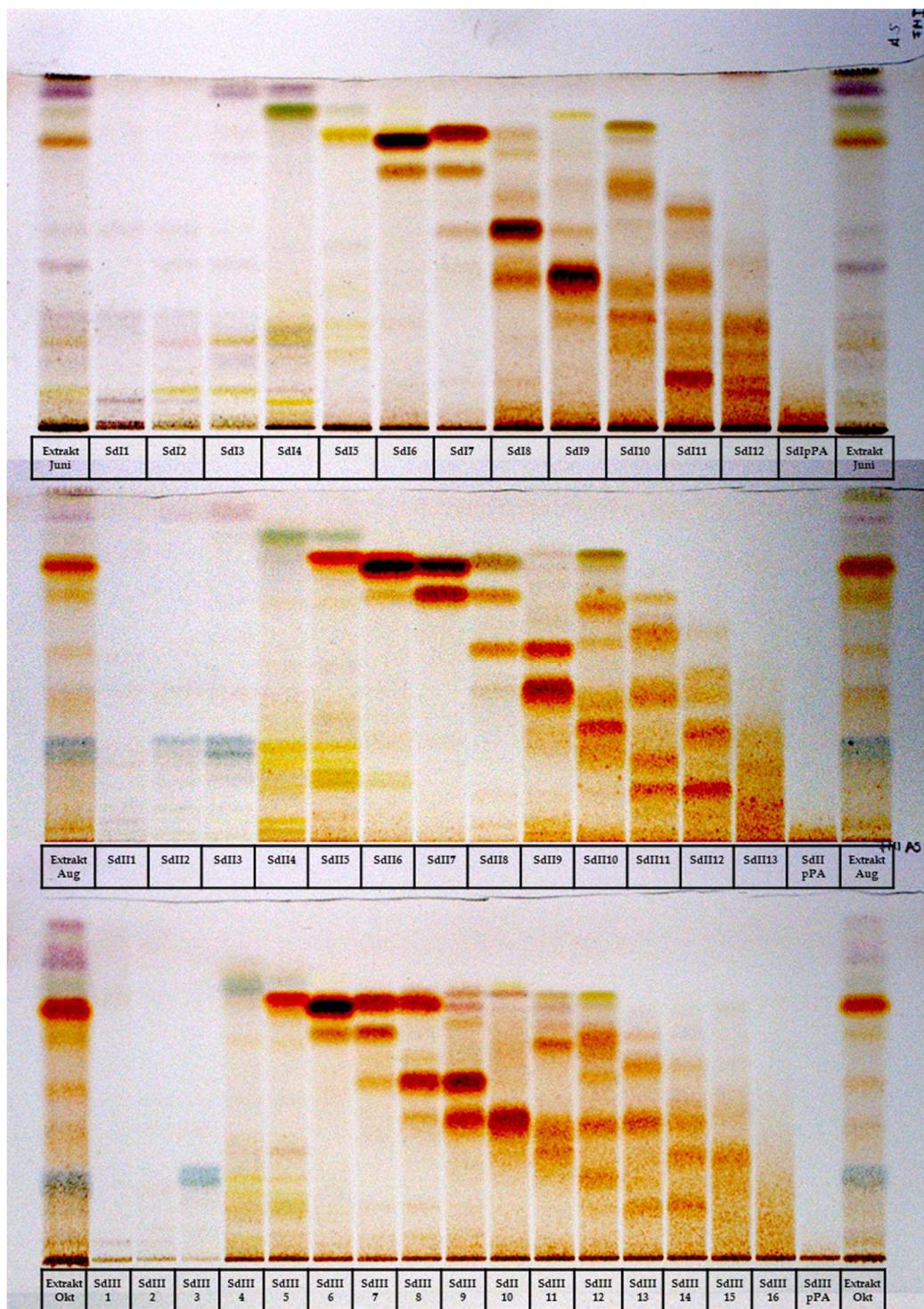


Abbildung 3: Übersichts-DC der bei Chromatographie an Sephadex® LH-20 erhaltenen Fraktionen; gezeigt sind die drei Erntezeitpunkte Juni, August und Oktober 2020 (von oben nach unten); auf den Außenbahnen sind jeweils die Gesamtextrakte aufgetragen (links 30 µl, rechts 20 µl, 0,1%), dazwischen die Fraktionen in Elutionsreihenfolge von links nach rechts (je 10 µl, 0,1%); FM: EtOAc:FA:H₂O (90:5:5), Derivatisierung AA-H₂SO₄, Detektion bei Tageslicht

3.4.4. MPLC (MCI®-Gel CHP20P)

Um die Ausgangsmenge für eine weitere Isolierung zu erhöhen und die Menge der entstehenden Fraktionen zu verringern, wurde aufgrund des sehr ähnlichen Fingerprints entschieden, die Fraktionen SdII6 und SdII7 zu vereinigen. Diese wurde im weiteren Verlauf als SdII67 benannt. Die vier Sephadexfraktionen SdII67–SdII10 wurden anschließend einer MPLC an MCI®-Gel unterzogen (vgl. 3.2.5, S. 25). Die Ausgangsmenge wurde dazu in Startbedingungen gelöst und flüssig aufgegeben. Die MPLC erlaubte die Bildung von jeweils neun bis zehn Fraktionen. Die neuen Fraktionen wurden mit der entsprechenden Endung M1–M9 bzw. M1–M10 versehen (vgl. 3.4.1, S: 33). Die Auswaagen der gebildeten Fraktionen können **Tabelle 17** bis **Tabelle 20**, (S. 39–42) entnommen werden. Die entsprechenden Übersichts-DCs finden sich in den **Abbildung 4** bis **Abbildung 7** (S. 39–42).

Tabelle 17: Elutionsbereiche und Auswaagen der Fraktionen nach MPLC an MCI®-Gel CHP20P; aufgetrennt wurde die Fraktion SdII67, die Einteilung der Fraktionen erfolgte anhand dünnsschichtchromatographischer Kontrolle an Kieselgel (System 1/AA-H₂SO₄ und System 2/Vanillin-HCl, vgl. 3.2.3, S. 23)

Bezeichnung	Vial Beginn	Vial Ende	Volumen/ Vial [ml]	Volumen Beginn [ml]	Volumen Ende [ml]	Auswaage [mg]
SdII67_M1	0	7	20	0	140	2,6
SdII67_M2	8	12	20	141	220	168,3
SdII67_M3	11	27	20	221	540	27,9
SdII67_M4	28	85	20	541	1680	297,6
SdII67_M5	86	110	20	1681	2160	36,1
SdII67_M6	111	135	20	2161	2640	160,5
SdII67_M7	136	155	20	2641	3020	22,4
SdII67_M8	156	171	20	3021	3320	102,8
SdII67_M9	172	200	20	3321	3880	86,7
SdII67_M10	201	220	20	3881	4260	20,1

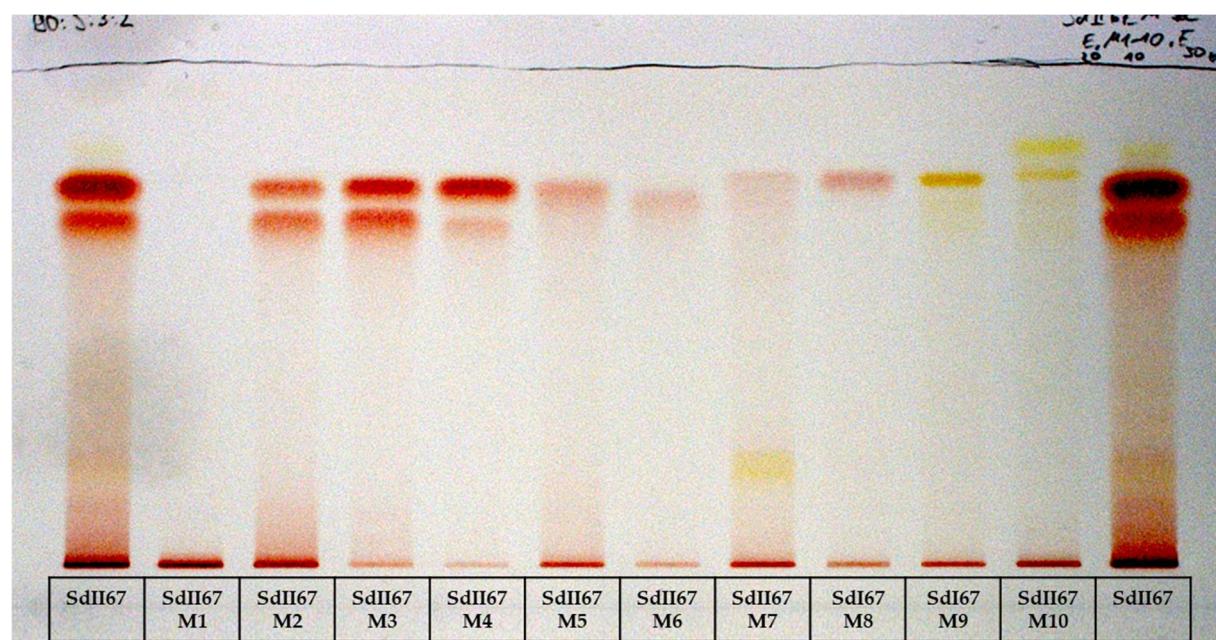


Abbildung 4: Übersichts-DC der neu gebildeten Fraktionen nach MPLC der Fraktion SdII67 an MCI®-Gel CHP20P; DC-System Nr. 3 (Siehe 3.2.3, S. 23), Derivatisierung mit Vanillin/HCl, Detektion bei Tageslicht; Die Fraktionen SdII67M1-10 wurden mit 10 µl einer 0,1%igen Lösung aufgetragen, die Sephadexfraktion SdII67 mit 20 (links) bzw. 30 µl (rechts)

Tabelle 18: Elutionsbereiche und Auswaagen der Fraktionen nach MPLC an MCI®-Gel CHP20P; aufgetrennt wurde die Fraktion SdII8, die Einteilung der Fraktionen erfolgte anhand dünnssichtchromatographischer Kontrolle an Kieselgel (System 1/AA-H₂SO₄ und System 2/Vanillin-HCL, vgl. 3.2.3, S. 23)

Bezeichnung	Vial Beginn	Vial Ende	Volumen/ Vial [ml]	Volumen Beginn [ml]	Volumen Ende [ml]	Auswaage [mg]
SdII8_M1	0	11	20	0	220	17,4
SdII8_M2	12	31	20	221	600	23,4
SdII8_M3	32	57	20	601	1100	57,4
SdII8_M4	58	71	20	1101	1360	27,8
SdII8_M5	72	91	20	1361	1740	40,3
SdII8_M6	92	113	20	1741	2160	174,6
SdII8_M7	114	155	20	2161	2980	401,8
SdII8_M8	156	167	20	2981	3200	61,6
SdII8_M9	168	181	20	3201	3460	28,7
SdII8_M10	182	220	20	3461	4220	28,7

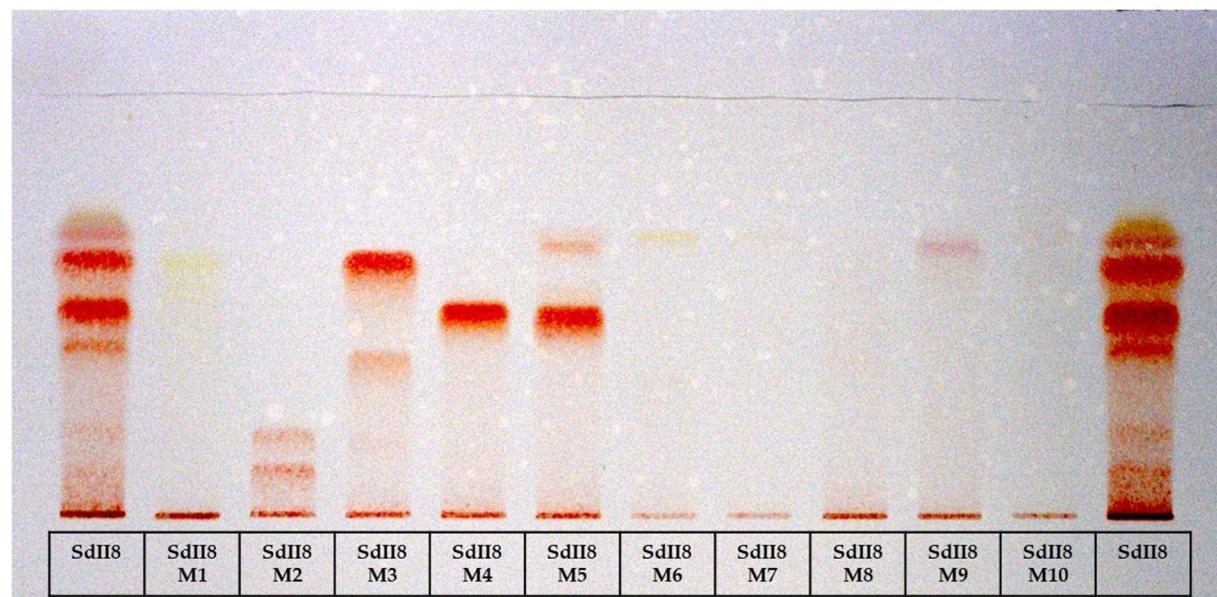


Abbildung 5: Übersichts-DC der neu gebildeten Fraktionen nach MPLC der Fraktion SdII8 an MCI®-Gel CHP20P; DC-System Nr. 3 (Siehe 3.2.3, S. 23), Derivatisierung mit Vanillin/HCl, Detektion bei Tageslicht; Die Fraktionen SdII8M1-10 wurden mit 10 µl einer 0,1%igen Lösung aufgetragen, die Sephadexfraktion SdII8 mit 20 (*links*) bzw. 30 µl (*rechts*)

Tabelle 19: Elutionsbereiche und Auswaagen der Fraktionen nach MPLC an MCI-Gel CHP20P; aufgetrennt wurde die Fraktion SdII9, die Einteilung der Fraktionen erfolgte anhand dünnsschichtchromatographischer Kontrolle an Kieselgel (System 1/AA-H₂SO₄ und System 2/Vanillin-HCl, vgl. 3.2.3, S. 23)

Bezeichnung	Vial Beginn	Vial Ende	Volumen/ Vial [ml]	Volumen Beginn [ml]	Volumen Ende [ml]	Auswaage [mg]
SdII9_M1	0	11	20	0	220	12,4
SdII9_M2	12	31	20	221	600	42,6
SdII9_M3	32	57	20	601	1100	41,5
SdII9_M4	58	71	20	1101	1360	125,2
SdII9_M5	72	91	20	1361	1740	72,1
SdII9_M6	92	113	20	1741	2160	50,0
SdII9_M7	114	155	20	2161	2980	37,3
SdII9_M8	156	167	20	2981	3200	73,3
SdII9_M9	168	181	20	3201	3460	12,0
SdII9_M10	182	220	20	3461	4220	17,9

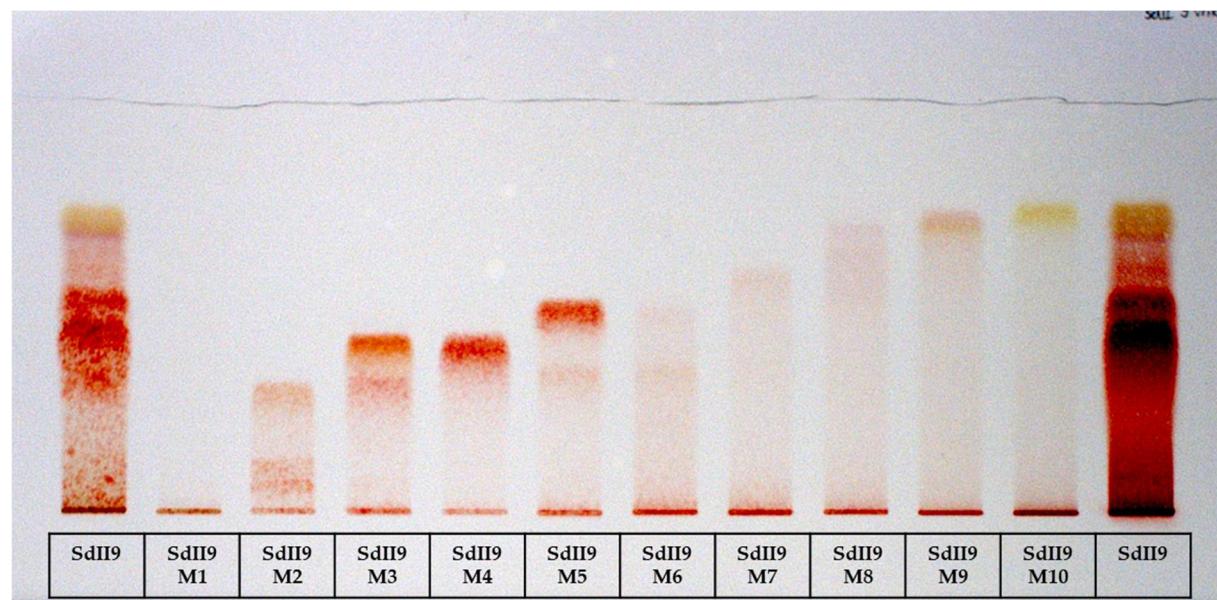


Abbildung 6: Übersichts-DC der neu gebildeten Fraktionen nach MPLC der Fraktion SdII9 an MCI®-Gel CHP20P; DC-System Nr. 3 (Siehe 3.2.3, S. 23), Derivatisierung mit Vanillin/HCl, Detektion bei Tageslicht; Die Fraktionen SdII9M1-10 wurden mit 10 µl einer 0,1%igen Lösung aufgetragen, die Sephadexfraktion SdII9 mit 20 (links) bzw. 30 µl (rechts)

Tabelle 20: Elutionsbereiche und Auswaagen der Fraktionen nach MPLC an MCI-Gel CHP20P; aufgetrennt wurde die Fraktion SdII10, die Einteilung der Fraktionen erfolgte anhand dünnsschichtchromatographischer Kontrolle an Kieselgel (System 1/AA-H₂SO₄ und System 2/Vanillin-HCl, vgl. 3.2.3, S. 23)

Bezeichnung	Vial Beginn	Vial Ende	Volumen/ Vial [ml]	Volumen Beginn [ml]	Volumen Ende [ml]	Auswaage [mg]
SdII10_M1	0	11	20	0	220	18,8
SdII10_M2	12	31	20	221	600	27,8
SdII10_M3	32	57	20	601	1100	11,7
SdII10_M4	58	71	20	1101	1360	28,3
SdII10_M5	72	91	20	1361	1740	54,2
SdII10_M6	92	113	20	1741	2160	26,5
SdII10_M7	114	155	20	2161	2980	39,5
SdII10_M8	156	167	20	2981	3200	9,2
SdII10_M9	168	220	20	3201	4240	10,8

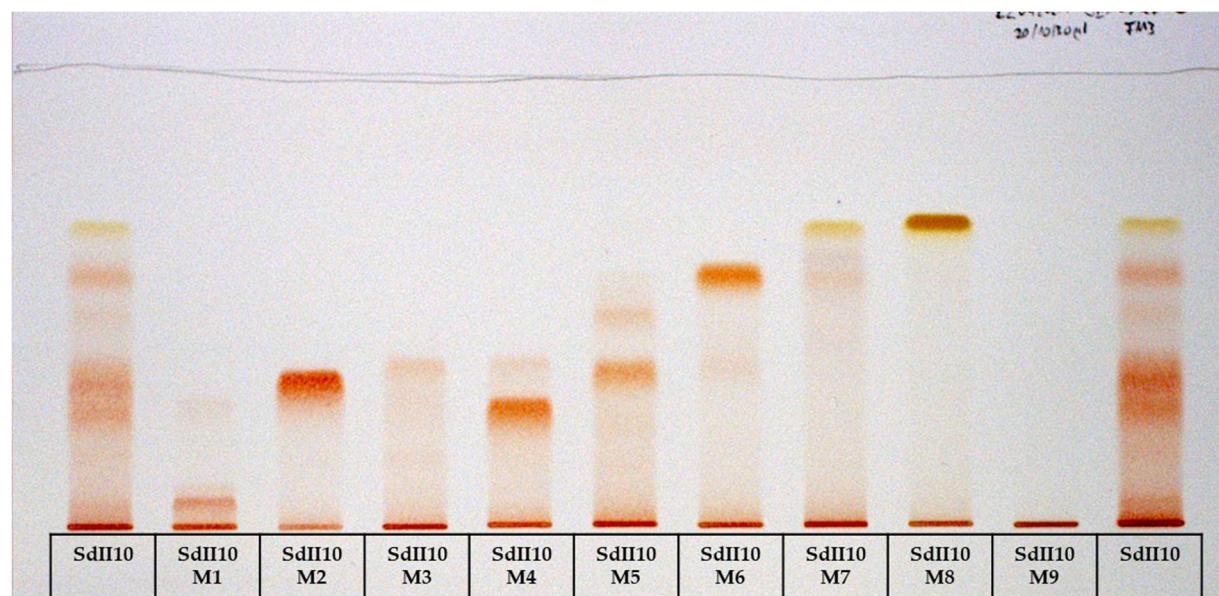


Abbildung 7: Übersichts-DC der neu gebildeten Fraktionen nach MPLC der Fraktion SdII10 an MCI®-Gel CHP20P; DC-System Nr. 3 (Siehe 3.2.3, S. 23), Derivatisierung mit Vanillin/HCl, Detektion bei Tageslicht; Die Fraktionen SdII10M1-9 wurden mit 10 µl einer 0,1%igen Lösung aufgetragen, die Sephadexfraktion SdII10 mit 20 (links) bzw. 30 µl (rechts)

3.4.5. Präparative HPLC (RP18/Biphenyl)

Fraktionen, die nach Säulenchromatographie oder MPLC noch keine für die Strukturaufklärung ausreichende Reinheit aufwiesen, wurden an einer präparativen HPLC-Anlage aufgearbeitet. Zuvor wurden chromatographische Methoden an einer analytischen HPLC entwickelt, um die Trennung zu optimieren und den Ressourcenverbrauch zu reduzieren (vgl. 3.2.6, S. 26). Im Folgenden sind die Ergebnisse der chromatographischen Trennung an der präparativen HPLC beschrieben.

3.4.5.1. SdII2

Die Fraktion SdII2 wurde an HPLC-Säule I in 22 Läufen aufgetrennt. Die Probe wurde zu 20 mg/ml in MeOH gelöst und 1–3 mg je Lauf injiziert. Bei der analytischen Methodenentwicklung wurden 9 Zielpeaks identifiziert. Angewendet wurde der in **Tabelle 8** aufgeführte (verkürzte) Gradient und ergab in **Abbildung 8** dargestelltes Chromatogramm.

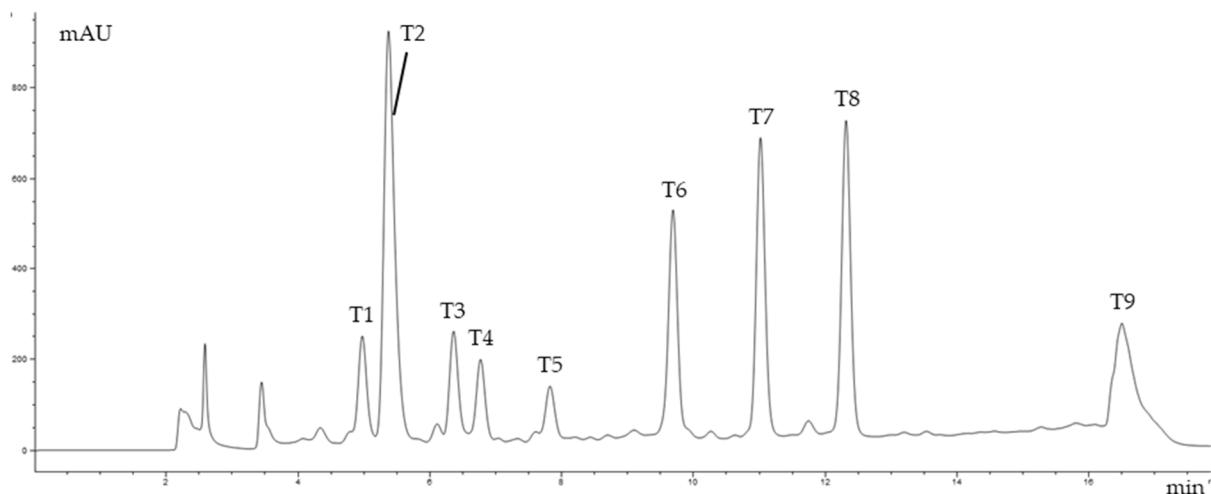
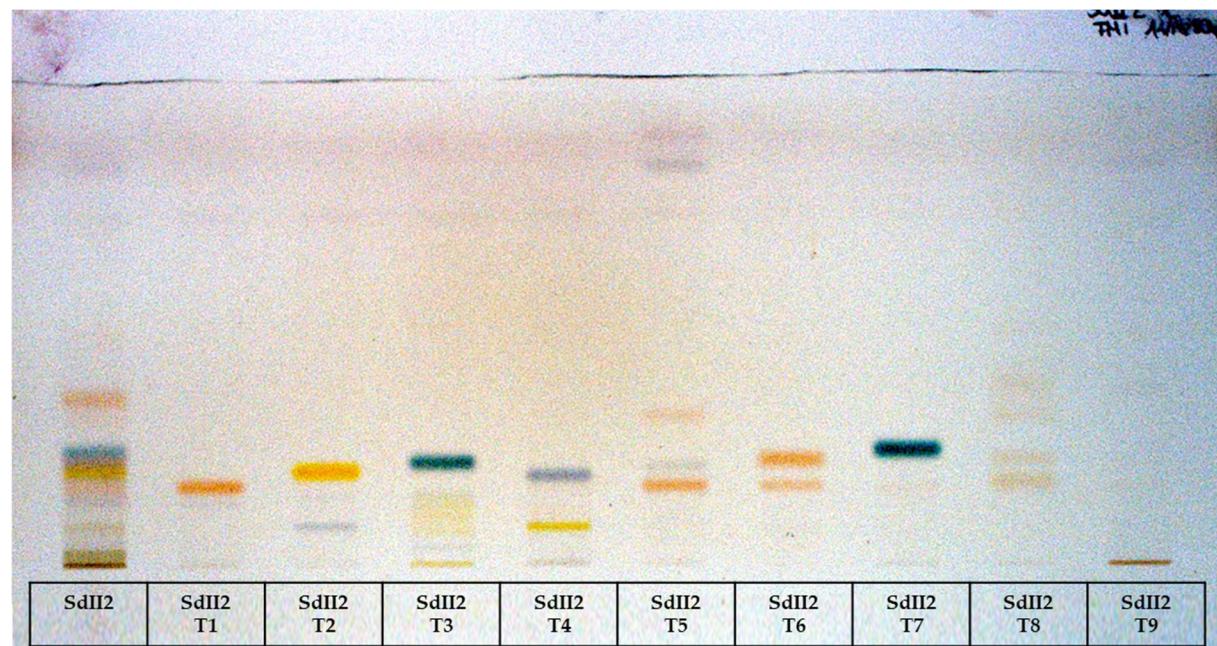


Abbildung 8: Chromatogramm der Fraktion SdII2 während präparativer HPLC (Säule I), mit den Zielpeaks T1–9 bei 230 nm

Die bei der präparativen HPLC entstandenen Fraktionen sind zusammen mit der Elutionszeit und der jeweiligen Auswaage in **Tabelle 21** aufgeführt. Die Übersichts-DC der Fraktionen bzw. Isolate ist in **Abbildung 9** gezeigt.

Tabelle 21: Übersicht der Fraktionen, Auswaagen und Elutionszeiten nach präparativer HPLC von SdII2

Fraktion		Elutionszeit [min]	Auswaage [mg]
SdII2T1	Substanz 1	4,9	1,99
SdII2T2	Substanz 3	5,3	2,98
SdII2T3	Substanz 4	6,3	1,33
SdII2T4		6,7	1,07
SdII2T5		7,8	0,95
SdII2T6	Substanz 2	9,5	2,78
SdII2T7	Substanz 5	10,9	1,85
SdII2T8		12,2	2,88
SdII2T9		16,5	1,30

**Abbildung 9:** Übersichts-DC der neu Fraktionen/Isolate nach präparativer HPLC der Fraktion SdII2; DC-System Nr. 1 (Siehe 3.2.3, S. 23), Derivatisierung mit AA/H₂SO₄, Detektion bei Tageslicht; die Fraktionen SdII2T1–9 wurden mit 10 µl einer 0,1%igen Lösung aufgetragen, die Sephadexfraktion SdII2 mit 20 µl

3.4.5.2. SdII67M2

Fraktion SdII67M2 wurde per präparativer HPLC in 9 Läufen an Säule I chromatographiert. Die Probe wurde zu ca. 80 mg/ml in MeOH gelöst und 50–100 µl je Lauf injiziert. Bei der analytischen Methodenentwicklung wurden 3 Zielpeaks identifiziert. Angewendet wurde der in **Tabelle 9** aufgeführte Gradient. Dieser wurde ab dem dritten Lauf auf zehn Minuten verkürzt und ergab das in **Abbildung 10** dargestellte Chromatogramm.

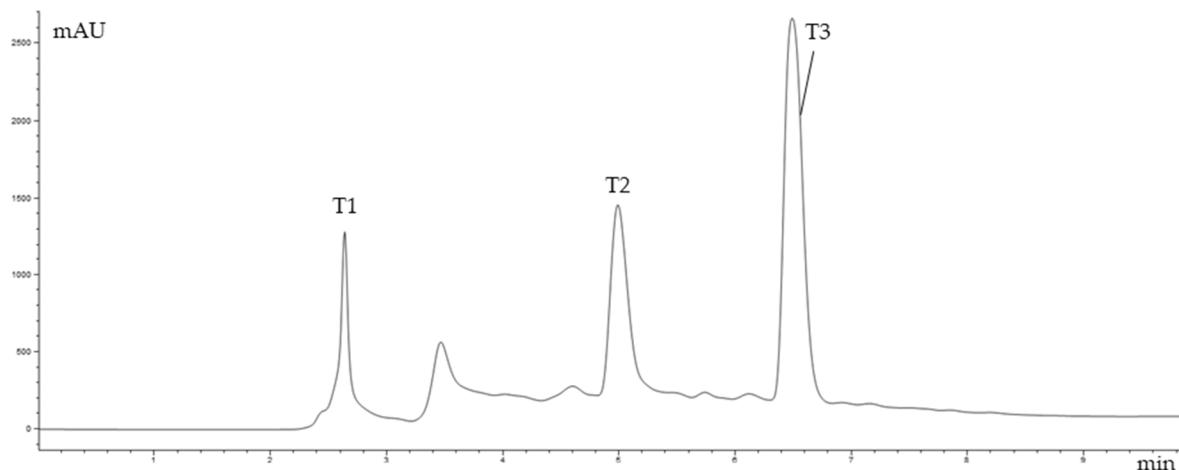


Abbildung 10: Chromatogramm der Fraktion SdII67M2 während präparativer HPLC (Säule I), mit den Zielpeaks T1–3 bei 230 nm

Die neu entstandenen Fraktionen sind unter Angabe von Elutionszeit und Auswaage in **Tabelle 22** aufgeführt.

Tabelle 22: Übersicht der Fraktionen, Auswaagen und Elutionszeiten nach präparativer HPLC von SdII67M2

Fraktion		Elutionszeit [min]	Auswaage [mg]
SdII67M2T1	Substanz 6	2,4	10,52
SdII67M2T2	Substanz 7	4,8	11,39
SdII67M2T3		6,3	1,40

3.4.5.3. SdII67M8

Die Fraktion SdII67M8 wurde an HPLC-Säule III in 14 Läufen aufgetrennt. Die Probe wurde zu 40 mg/ml in MeOH gelöst und 1–10 mg je Lauf injiziert. Bei der analytischen Methodenentwicklung wurden 3 Zielpeaks identifiziert. Angewendet wurde der in **Tabelle 10** aufgeführte Gradient und ergab in **Abbildung 11** dargestelltes Chromatogramm.

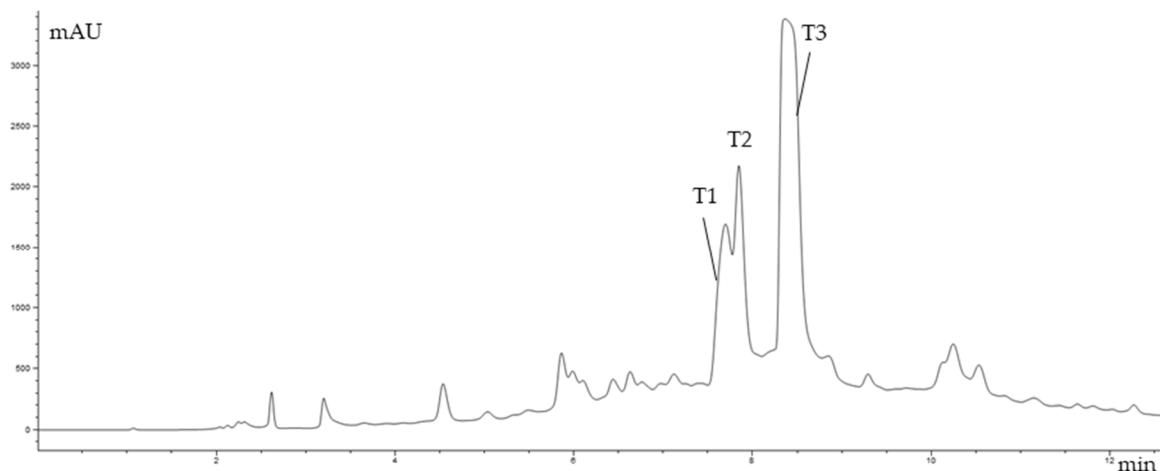


Abbildung 11: Chromatogramm der Fraktion SdII67M8 während präparativer HPLC (Säule III), mit den Zielpeaks T1–3 bei 230 nm

Die neu entstandenen Fraktionen sind zusammen mit der Elutionszeit und der Auswaage in **Tabelle 23** aufgeführt.

Tabelle 23: Übersicht der Fraktionen, Elutionszeiten und Auswaagen nach präparativer HPLC von SdII67M8

Fraktion	Elutionszeit [min]	Auswaage [mg]
SdII67M8T1	7,6–7,8	9,49
SdII67M8T2		
SdII67M8T3	Substanz 9	30,28

3.4.5.4. SdII67M8T3

Die Fraktion SdII67M8T3 (Substanz 9) wurde einer Aufreinigung an HPLC-Säule III unterzogen, um diese für eine Zellkulturuntersuchung vorzubereiten. Dabei wurde die Fraktion in 7 Läufen aufgetrennt. Die Probe wurde zu 30 mg/ml in MeOH gelöst und 1,5–4,5 mg je Lauf injiziert. Etwa 0,6 ml der beschriebenen Lösung wurden aufgereinigt. Angewendet wurde eine leichte Abwandlung der bereits unter 3.4.5.3 (S. 46) vorgestellten HPLC-Methode. Der modifizierte Gradient ist in **Tabelle 11** aufgeführt und ergab in **Abbildung 12** dargestelltes Chromatogramm. Dabei wurde die Zuordnung der Zielpeaks aus 3.4.5.3 übernommen.

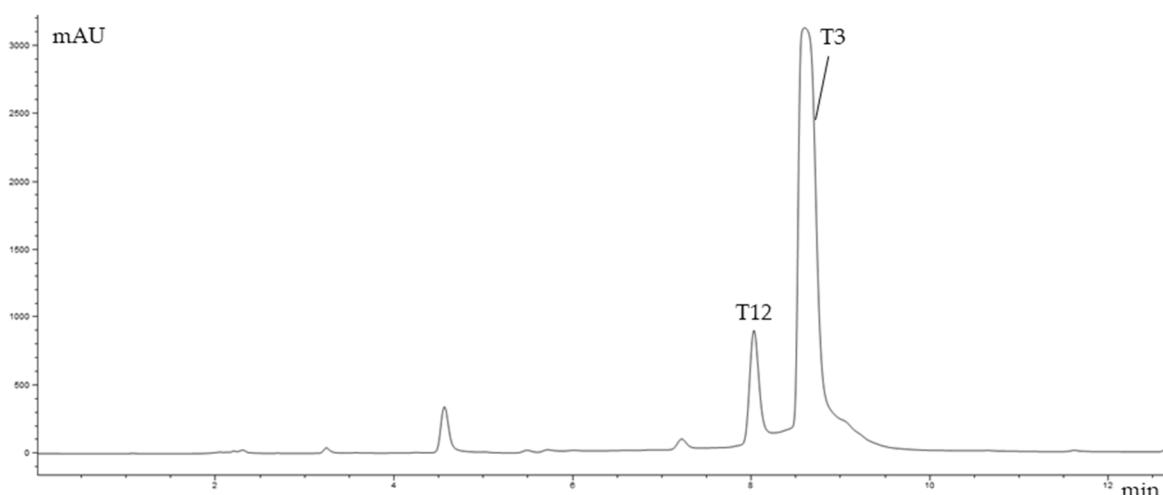


Abbildung 12: Chromatogramm der Fraktion SdII67M8T3 während präparativer HPLC (Säule III), mit den Zielpeaks T12 und T3 bei 230 nm

Die neu entstandenen Fraktionen sind zusammen mit der Elutionszeit und der Auswaage in **Tabelle 24** aufgeführt. Die Bezeichnung weicht vom in Kapitel 3.4.1 (S. 33) vorgestellten System ab, da es sich um kein eigenständiges Isolat, sondern eine Aufreinigung des Isolats SdII67M8T3 handelt.

Tabelle 24: Übersicht der Fraktionen, Elutionszeiten und Auswaagen nach Aufreinigung per präparativer HPLC von SdII67M8T3

Fraktion		Elutionszeit [min]	Auswaage [mg]
SdII67M8T3.1		7,9–8,4	verworfen
SdII67M8T3.2	Substanz 9*	8,5–8,9	10,97

* Substanz 9 wurde bereits als SdII67M8T3 isoliert und als solches strukturell aufgeklärt

Der Aufreinigung wurde eine Reinheitsbestimmung per UPLC® unter Verwendung einer RP-18-Phase angeschlossen. Das zur Anwendung gebrachte chromatographische System wird im Abschnitt 6.2.4 (S. 153) vorgestellt. Das erhaltene Chromatogramm ist in **Abbildung 13** und der purity plot, welcher die spektrale Reinheit des Substanzpeaks visualisiert, in **Abbildung 14** gezeigt. Es ergab sich eine chromatographische Reinheit von 96,0%.

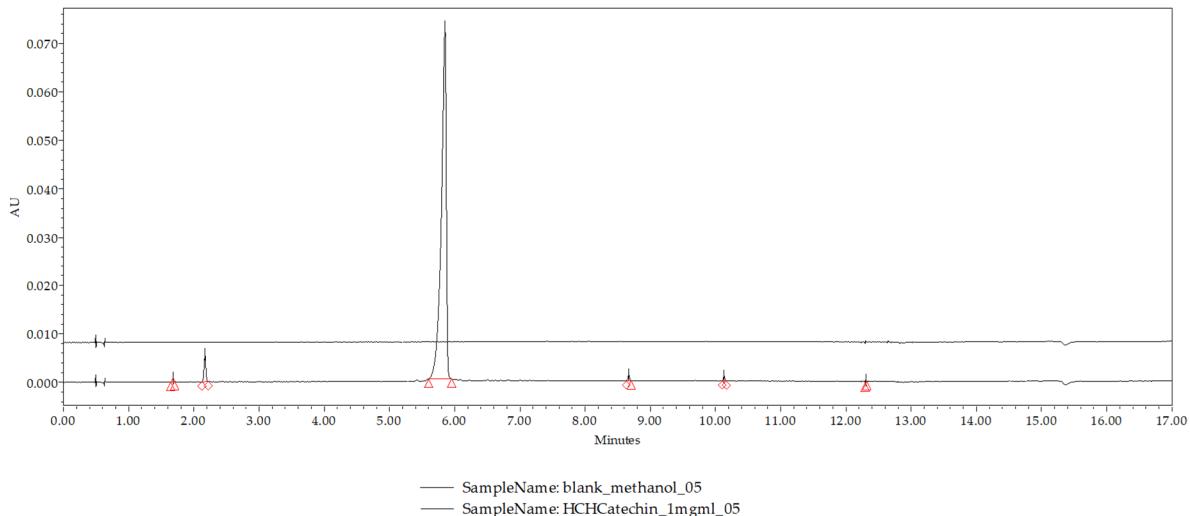


Abbildung 13: Chromatogramm der Fraktion SdII67M8T3.2 bei Reinheitsbestimmung an UPLC® im Overlay mit dem Chromatogramm des Lösemittels als blank; Injektion von 0,5 µl (1 mg/ml), Detektion bei 279 nm

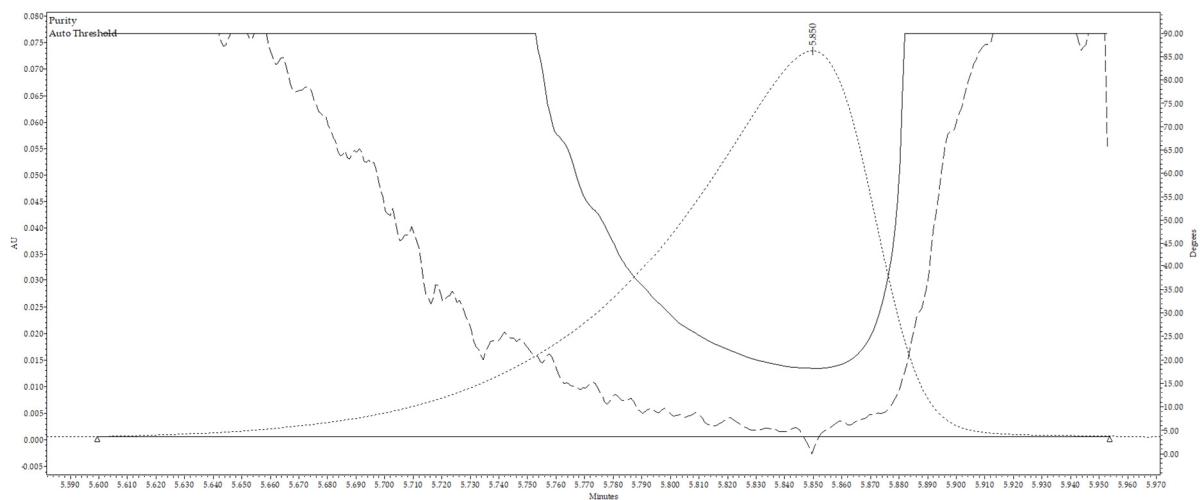


Abbildung 14: Purity plot des Substanzpeaks von SdII67M8T3.2; die purity (gestrichelte Linie) liegt während des ganzen Elutionsvorgangs (gepunktete Linie entspricht Chromatogramm) unterhalb des Auto Thresholds (durchgezogene Linie) und zeigt die spektrale Reinheit des Substanzpeaks

3.4.5.5. SdII9M5

Die Fraktion SdII9M5 wurde an HPLC-Säule III in 31 Läufen aufgetrennt. Die Probe wurde zu 40 mg/ml in MeOH gelöst und 2 mg je Lauf injiziert. Bei der analytischen Methodenentwicklung wurden 3 Zielpeaks identifiziert. Angewendet wurde der in **Tabelle 12** aufgeführte Gradient und ergab in **Abbildung 15** dargestelltes Chromatogramm.

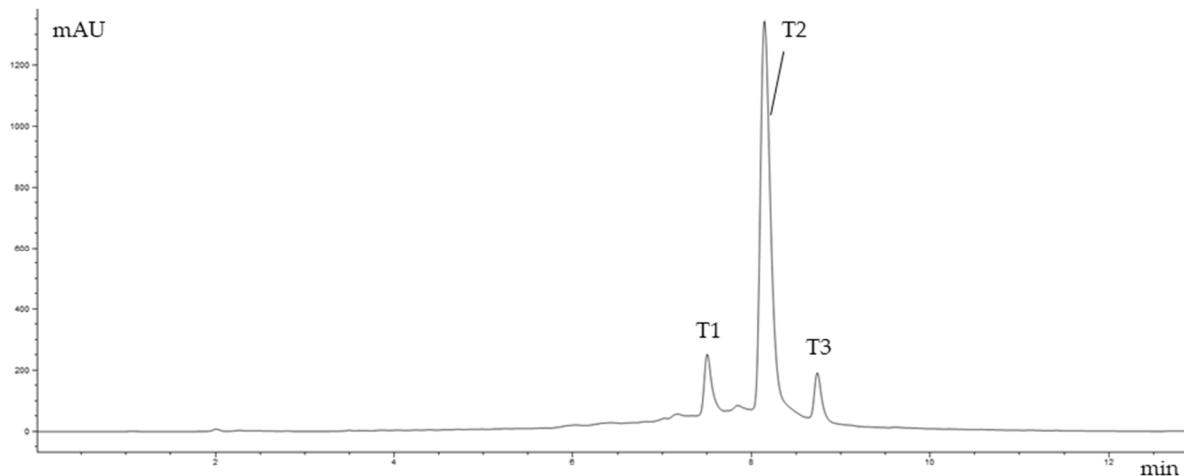


Abbildung 15: Chromatogramm der Fraktion SdII9M5 während präparativer HPLC (Säule III), mit den Zielpeaks T1-3 bei 280 nm

Die neu entstandenen Fraktionen sind zusammen mit Elutionszeit und Auswaage in **Tabelle 25** aufgeführt.

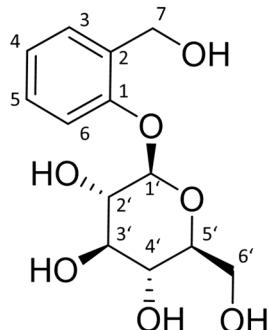
Tabelle 25: Übersicht der Fraktionen, Elutionszeiten und Auswaagen nach präparativer HPLC von SdII9M5

Fraktion		Elutionszeit [min]	Auswaage [mg]
SdII9M5T1		7,3–7,5	4,84
SdII9M5T2	Substanz 11	8,0–8,4	23,38
SdII9M5T3		8,6–8,7	2,48

3.5. Strukturaufklärung

3.5.1. Verkürzte Phenylpropane

3.5.1.1. Salicin (Substanz 1)



Name:	Salicin
Fraktion:	SdII2T1
Auswaage:	2,0 mg
Aussehen:	weißes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	-35° (c 1,0 g/l)
λ_{\max}	212,0 nm (c 0,1 MeOH)
CD:	c 1750 μ mol/l, Abbildung 17
HRESIMS:	m/z 285,0979 [M-H] ⁻ (berechnet: C ₁₃ H ₁₈ O ₇ ; 285,0980)

Tabelle 26. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 1** (600,25 bzw. 150,95 MHz, CD₃OD; δ in ppm, s Singulett, d Dublett, t Triplett, br breites Signal, m Multiplett, J in Hz).

Nr.	δ_c	δ_H
1	157,2	
2	132,2	
3	129,9	7,32 (1H, dd, 1,7, 7,7)
4	123,7	7,02 (1H, dd, 1,3, 7,3)
5	130,0	7,24 (1H, dd, 1,3, 8,0)
6	117,1	7,20 (1H, dd, 0,8, 8,0)
7	61,0	4,56 (1H, d, 13,2) 4,77 (1H, d, 13,2)
1'	103,4	4,86 (1H, d, 7,7)
2'	75,1	3,5 (1H, dd, 8,3, 8,8)
3'	78,0	3,45 (1H, t, 8,8)
4'	71,4	3,38 (1H, dd, 2,2, 5,5)
5'	78,3	3,41 (1H, dd, 2,2, 5,5)
6'	62,6	3,7 (1H, dd, 5,5, 12,1) 3,89 (1H, dd, 2,2, 12,1)

Substanz 1 eluierte bei der Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 (3.2.4, S. 24) in Fraktion SdII2. Die Isolierung erfolgte direkt mittels präparativer HPLC (3.4.5.13.4.5.2) als SdII2T1. Die Auswaage betrug 2,0 mg.

HRESIMS-Messung ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 285,0979 [M-H]⁻ und eine Summenformel von C₁₃H₁₈O₇.

Die NMR-spektroskopischen Daten (Tabelle 26), die zur Strukturaufklärung herangezogen wurden, decken sich mit denen von Domisse et al. (1986) und Zapesochnaya et al. (2002).

Die ¹H- und ¹³C-Spektren und die Zuordnung der Signale sind in Abbildung 16 gezeigt. Die Übereinstimmung der erhobenen spektroskopischen Daten mit Literaturwerten zeigt, dass es sich bei **Substanz 1** um Salicin handelt.

Das 1828 entdeckte und 1830 erstmals aus Weidenrinde isolierte Salicin stellt eine der Leitsubstanzen des Genus *Salix* dar (Thieme, 1963a). In *Salix cinerea* L. wurde Salicin durch

Thieme nach Chromatographie an einer Polyamidsäule mittels Papierchromatographie nachgewiesen (Thieme, 1965c).

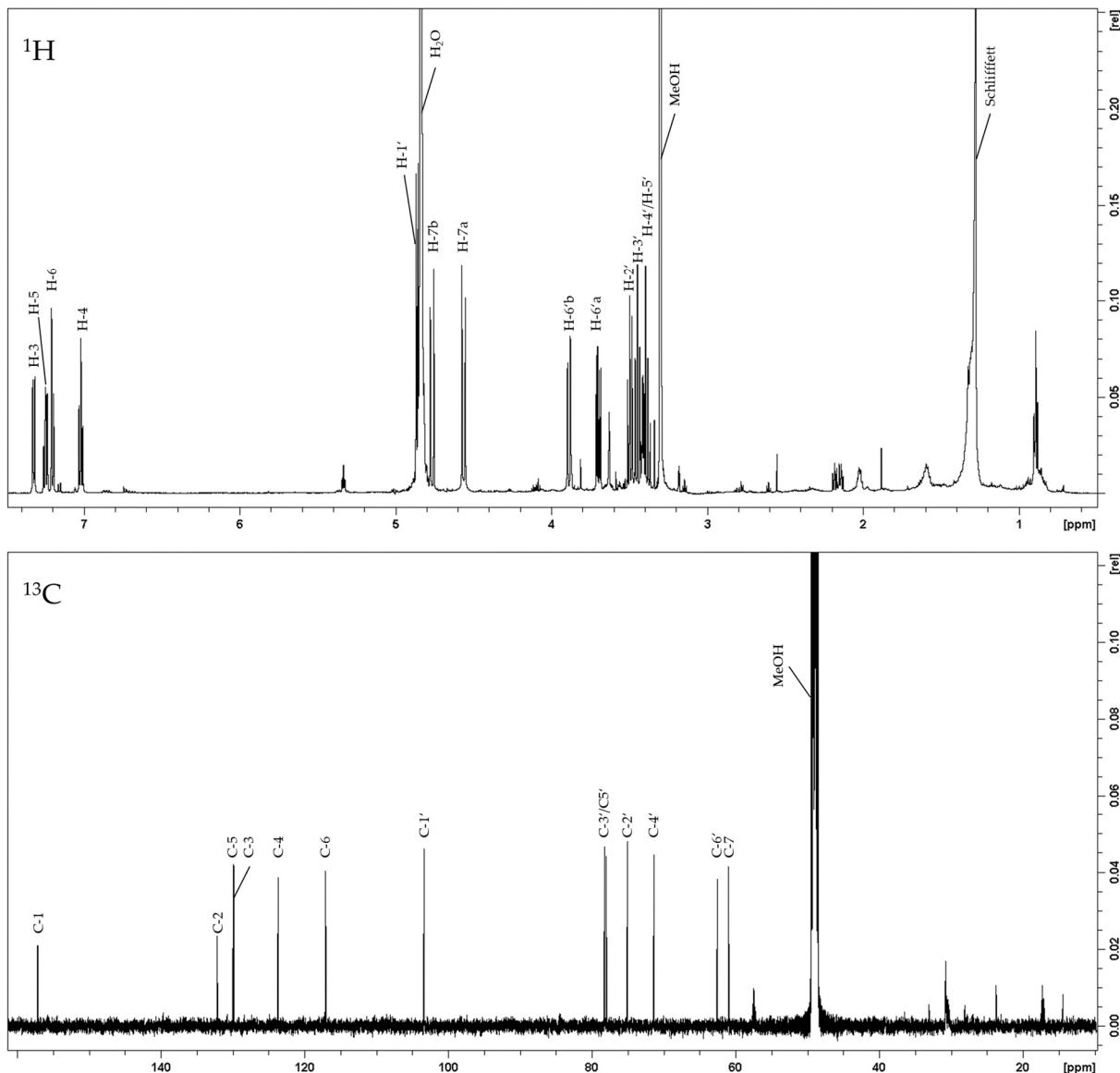


Abbildung 16: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 1** (Salicin); ^1H - (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten), 600 bzw. 150 MHz (MeOD- d_4)

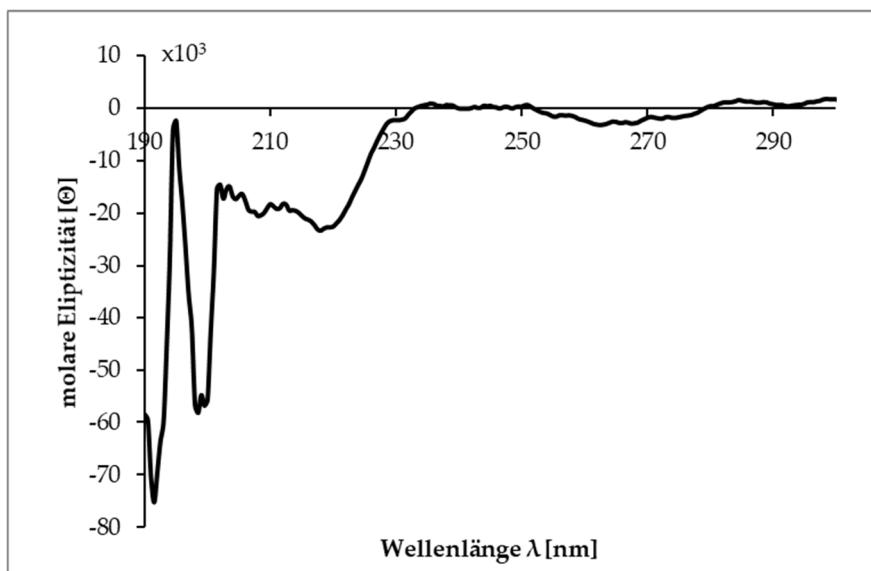
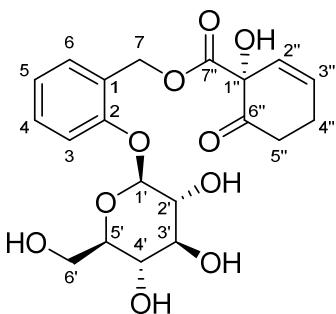


Abbildung 17: CD-Spektrum von **Substanz 1** (MeOH)

3.5.1.2. Salicortin (Substanz 2)



Name: Salicortin

Fraktion: SdII2T6

Auswaage: 2,8 mg

Aussehen: weißes Pulver

[α]_D²⁵: -92,5° (c 1,0 g/l) λ_{max} : 269,1 nm (c 0,1 MeOH)CD: c 350 $\mu\text{mol/l}$ HRESIMS: m/z 423,1301 [M-H]⁻
(berechnet: C₂₀H₂₄O₁₀; 423,1297)

Tabelle 27. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 2** (600,25 bzw. 150,95 MHz, CD₃OD; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, t Triplet, br breites Signal, m Multiplett, n.d. nicht detektiert).

Nr.	δ_c	δ_h
1	132,2	
2	157,0	
3	116,7	7,2 (1H, d, 8,3)
4	130,0	7,24 (1H, dd, 0,5, 8,3)
5	123,7	7,02 (1H, m)
6	129,9	7,32 (1H, dd, 0,8, 8,0)
7	61,0	4,56 + 5,26 (1H, d, 13,2/d, 12,1) 4,77 + 5,37 (1H, d, 12,6/d, 12,1)
1'	103,4 + 102,6	4,86 + 4,92 (1H, d, 7,7/ d, 7,7)
2'	75,1	3,49 (1H, dd, 7,7, 9,4)
3'	78,0	3,45 (1H, t, 8,8)
4'	71,4	3,38 (1H, t, 8,2)
5'	78,3	3,41 (1H, dd, 2,0, 5,2)
6'	62,6	3,69 (1H, ddd, 5,5 6,6, 12,1) 3,88 (1H, ddd, 2,2, 5,0, 12,1)
1''	n.d.	
2''	129,4	5,75 + 5,71 (1H, d, 9,9/d, 9,9)
3''	133,3	6,14 (1H, m)
4''	27,3	2,5 (1H, m) ¹ 2,64 (1H, m)
5''	36,9	2,52 (1H, m) ¹ 2,89 (1H, m)
6''	207,4	
7''	171,5	

¹ Überlagerte Signale

Substanz 2 eluierte in Fraktion SdII2 bei der Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 (3.2.4, S. 24). Anschließende erfolgte die Isolierung mittels präparativer HPLC (3.4.5.1, S. 43) als SdII2T6. Die Auswaage betrug 2,8 mg.

Die Analyse per UPLC-HRESIMS ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 423,1301 [M-H]⁻ und eine Summenformel von C₂₀H₂₄O₁₀.

Die NMR-spektroskopischen Daten waren kongruent mit denen von Dommise et al. (1986) sowie Zapesochnaya et al. (2002). Die NMR-Signale sind in **Tabelle 27** aufgelistet und die Zuordnung in **Abbildung 18** gezeigt.

Der ermittelte Drehwert betrug $-92,5^\circ$ bei einer Konzentration von 0,1% in MeOH, das CD-Spektrum der Substanz ist in **Abbildung 19** gezeigt.

Die Daten der massen- und NMR-spektroskopischen Untersuchungen ließen darauf schließen, dass es sich bei **Substanz 2** um Salicortin handelt.

Salicortin wurde erstmals 1964 von Thieme in Rinde von *Salix purpurea* L. nachgewiesen und isoliert (Thieme, 1964c). Nach Chromatographie an einer Polyamidsäule wurde Salicortin mittels Papierchromatographie auch in *S. cinerea* nachgewiesen (Thieme, 1965c).

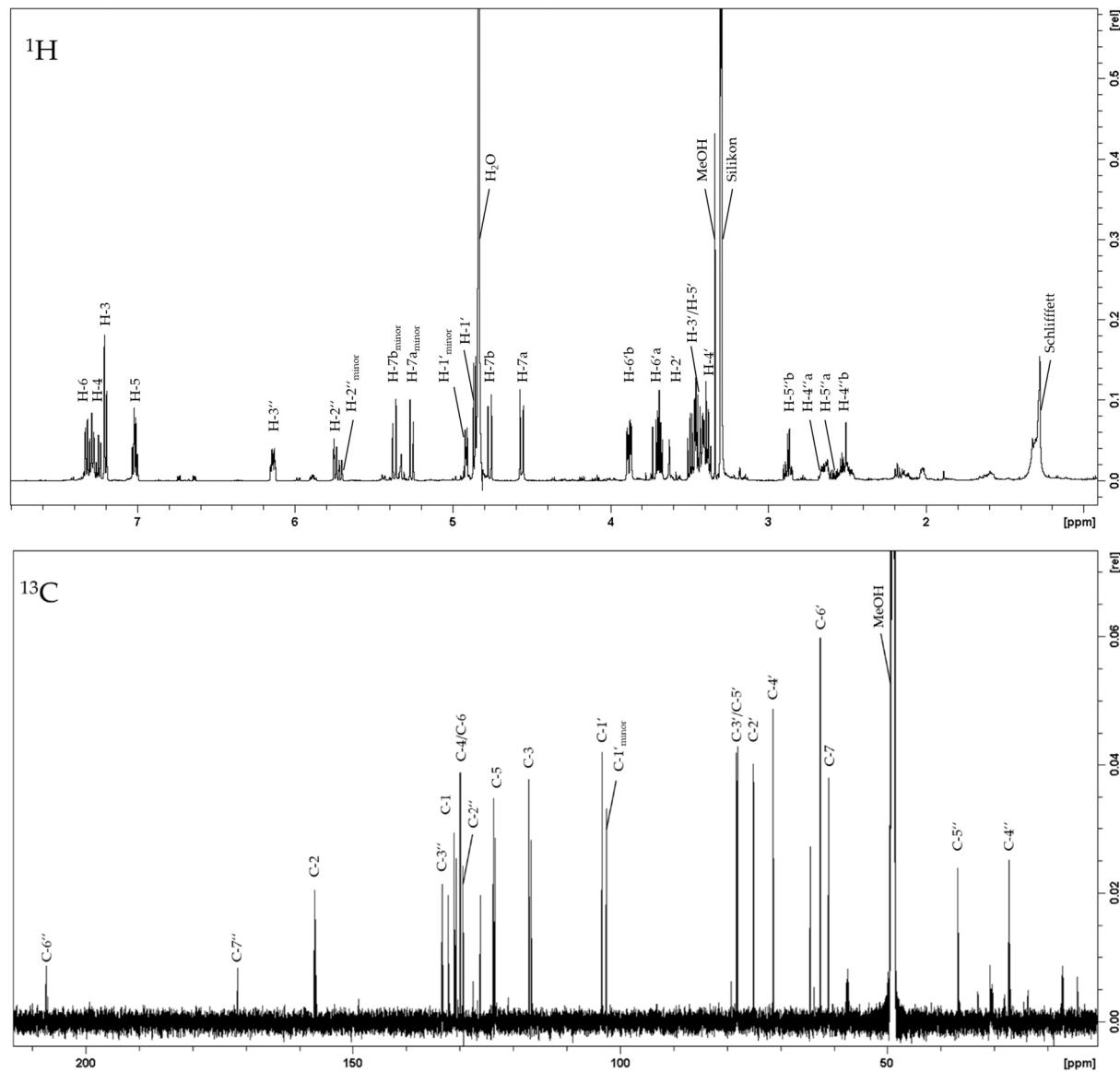


Abbildung 18: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 2** (Salicortin); ^1H - (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten), 600,25 bzw. 150,95 MHz (CD_3OD)

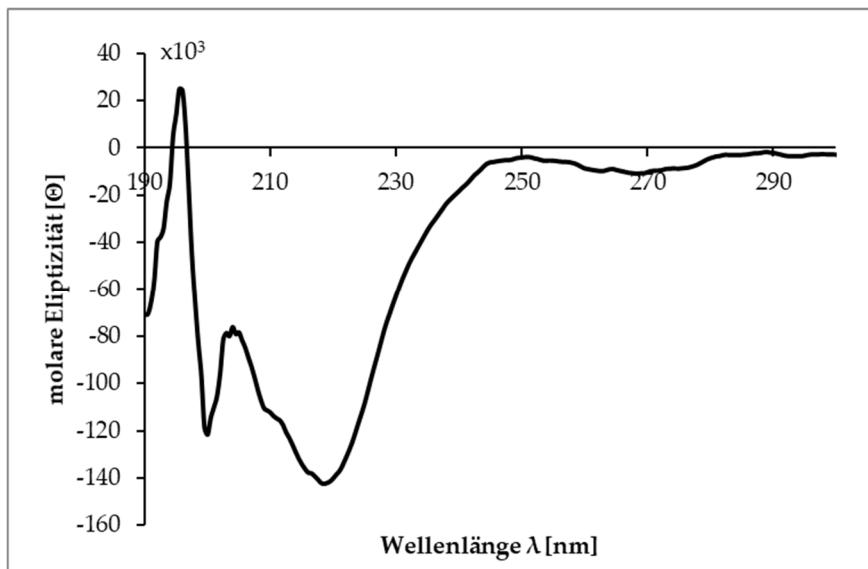
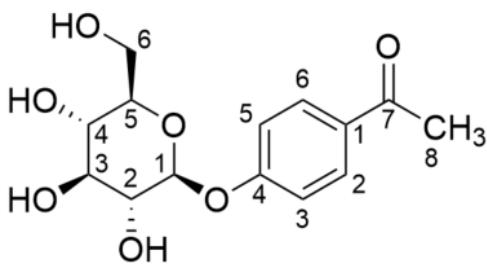


Abbildung 19: CD-Spektrum von **Substanz 2** (MeOH)

3.5.1.3. Picein (Substanz 3)



Name:	Picein
Fraktion:	SdII2T2
Auswaage:	3,0 mg
Aussehen:	weißes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	-72,4° (c 1,0 g/l)
λ_{max} :	264,0 nm (c 0,1 MeOH)
CD:	c 1750 $\mu\text{mol/l}$
HRESIMS:	m/z 297,0979 [M-H] ⁻ (berechnet: C ₁₄ H ₁₈ O ₇ ; 297,0980)

Tabelle 28. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 3** (600,25 bzw. 150,95 MHz, CD₃OD; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, br breites Signal, m Multiplett).

Nr.	δ_c	δ_h
1	132,6	
2	131,6	7,97 (2H, d, 8,8)
3	117,3	7,16 (2H, d, 8,8)
4	161,7	
5	117,3	7,16 (2H, d, 8,8)
6	131,6	7,97 (2H, d, 8,8)
7	199,4	
8	26,5	2,55 (3H, s)
1'	101,6	5,01 (1H, d, 7,7)
2'	71,3	3,4 (1H, m)
3'	74,8	3,48 (1H, m) ¹
4'	77,9	3,49 (1H, m) ¹
5'	78,3	3,49 (1H, ddd, 2,5, 5,8) ¹
6'	62,7	3,69 (1H, dd, 5,5, 12,1) 3,89 (1H, dd, 2,8, 12,1)

¹ Überlagerte Signale

Substanz 3 wurde bei der Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (3.2.4) in Fraktion SdII eluiert. Anschließend erfolgte die Isolierung mittels präparativer HPLC (3.4.5.1) als SdII2T2. Die Auswaage betrug 3,0 mg.

Die Analyse per UPLC-HRESIMS ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 297,0979 [M-H]⁻ und eine Summenformel von C₁₄H₁₈O₇.

Die NMR-spektroskopischen Daten waren kongruent mit denen von Al Bittar et al. (2016) und Domisse et al. (1986). Die NMR-Signale sind in **Tabelle 28** aufgelistet und die Zuordnung in **Abbildung 20** gezeigt.

Der ermittelte Drehwert betrug -72,4° bei einer Konzentration von 0,1% in MeOH, das CD-Spektrum der Substanz ist in **Abbildung 21** (S. 58) gezeigt.

Die massen- und NMR-spektroskopischen Daten ließen darauf schließen, dass es sich bei **Substanz 3** um Picein handelt.

Picein wurde erstmals von Johanson aus *Salix cinerea* L. isoliert, auch wenn 1875 noch keine Strukturaufklärung möglich war (Johanson, 1875; Thieme, 1963a). Diese gelang erst 1964 von Thieme et al. als Bestandteil eines Rindenextrakts von *Salix fragilis* L. (Thieme, 1964a).

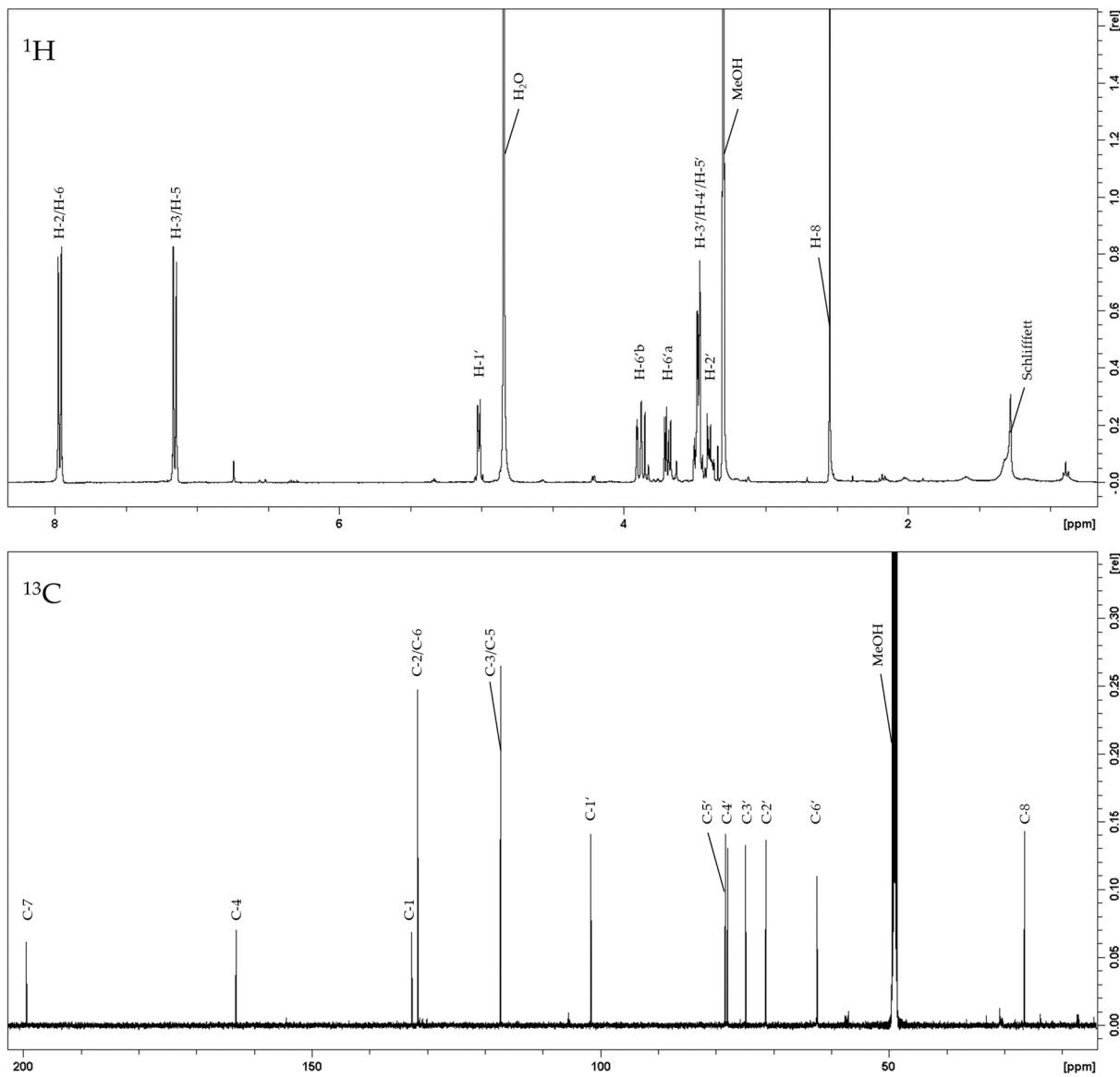


Abbildung 20: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 3**; ^1H - (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten), 600,25 bzw. 150,95 MHz (CD_3OD)

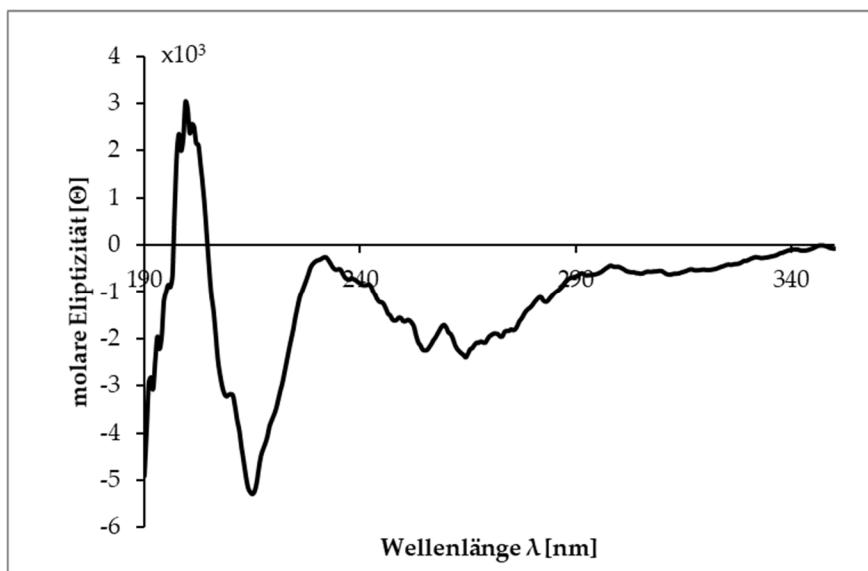
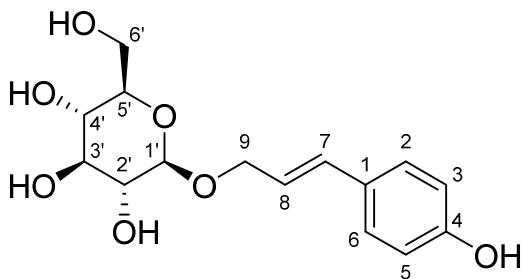


Abbildung 21: CD-Spektrum von Substanz 3 (MeOH)

3.5.2. Cumarylalkoholglykoside

3.5.2.1. Triandrin (Substanz 4)



Name:	Triandrin
Fraktion:	SdII2T3
Auswaage:	1,3 mg
Aussehen:	weißes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	-36,2 (c 1,0 g/l)
λ_{\max} :	263,1 nm (c 0,1 MeOH)
CD:	c 1750 μ mol/l
HRESIMS:	m/z 330,1546 [M+NH ₄] ⁺ (berechnet: C ₁₅ H ₂₀ O ₇ ; 330,1547)

Tabelle 29. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 4** (600,25 bzw. 150,95 MHz, CD₃OD; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, br breites Signal, m Multiplett).

Nr.	δ_c	δ_H
1	129,8	
2	128,8	7,25 (2H, d, 8,8)
3	116,3	6,72 (2H, d, 8,8)
4	158,9	
5	116,3	6,72 (2H, d, 8,8)
6	128,8	7,25 (2H, d, 8,8)
7	134,1	6,57 (1H, d, 16,0)
8	123,4	6,16 (1H, dt, 6,3, 6,3, 16,0)
9	71,1	4,28 (1H, dd, 6,0, 12,2) 4,47 (1H, dd, 7,3, 12,0)
1'	103,1	4,35 (1H, d, 7,7)
2'	75,1	3,21 (1H, dd, 8,0, 9,1)
3'	78,1	3,35 (1H, dd, 8,5, 9,0)
4'	71,7	3,27 (1H, d, 8,3) ¹
5'	78,0	3,26 (1H, m) ¹
6'	62,8	3,67 (1H, dd, 5,5, 12,1) 3,87 (1H, dd, 2,2, 11,6)

Substanz 4 wurde bei der Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 (3.2.4) in Fraktion SdII eluiert. Die Auf trennung mittels präparativer HPLC (3.4.5.1) führte zur Isolierung als SdII2T3. Die Ausbeute betrug 1,3 mg.

Die Analyse per UPLC-HRESIMS ergab bei positiver Ionisierung eine Masse von m/z 330,1546 [M-NH₄]⁺ und eine Summenformel von C₁₅H₂₀O₇.

Die NMR-spektroskopischen Daten (**Tabelle 29**) waren kongruent mit denen von Naidoo et al. (1992). Die NMR-Signale zusammen mit ihrer Zuordnung sind in **Abbildung 22** gezeigt. Der ermittelte Drehwert betrug $[\alpha]_D^{22}$: -29,5 (c = 0,05; MeOH) und lag im Bereich der berichteter Literaturwerte (Naidoo et al., 1992; Thieme, 1963b). Das CD-Spektrum der Substanz ist in **Abbildung 23** (S. 60) gezeigt.

Die spektroskopischen Daten ließen darauf schließen, dass es sich bei **Substanz 4** um Triandrin handelt, welches von Thieme erstmals isoliert (*Salix triandra* L.) und auch in *S. cinerea* nach Chromatographie an einer Polyamidsäule mittels Papierchromatographie nachgewiesen wurde (Thieme, 1963b).

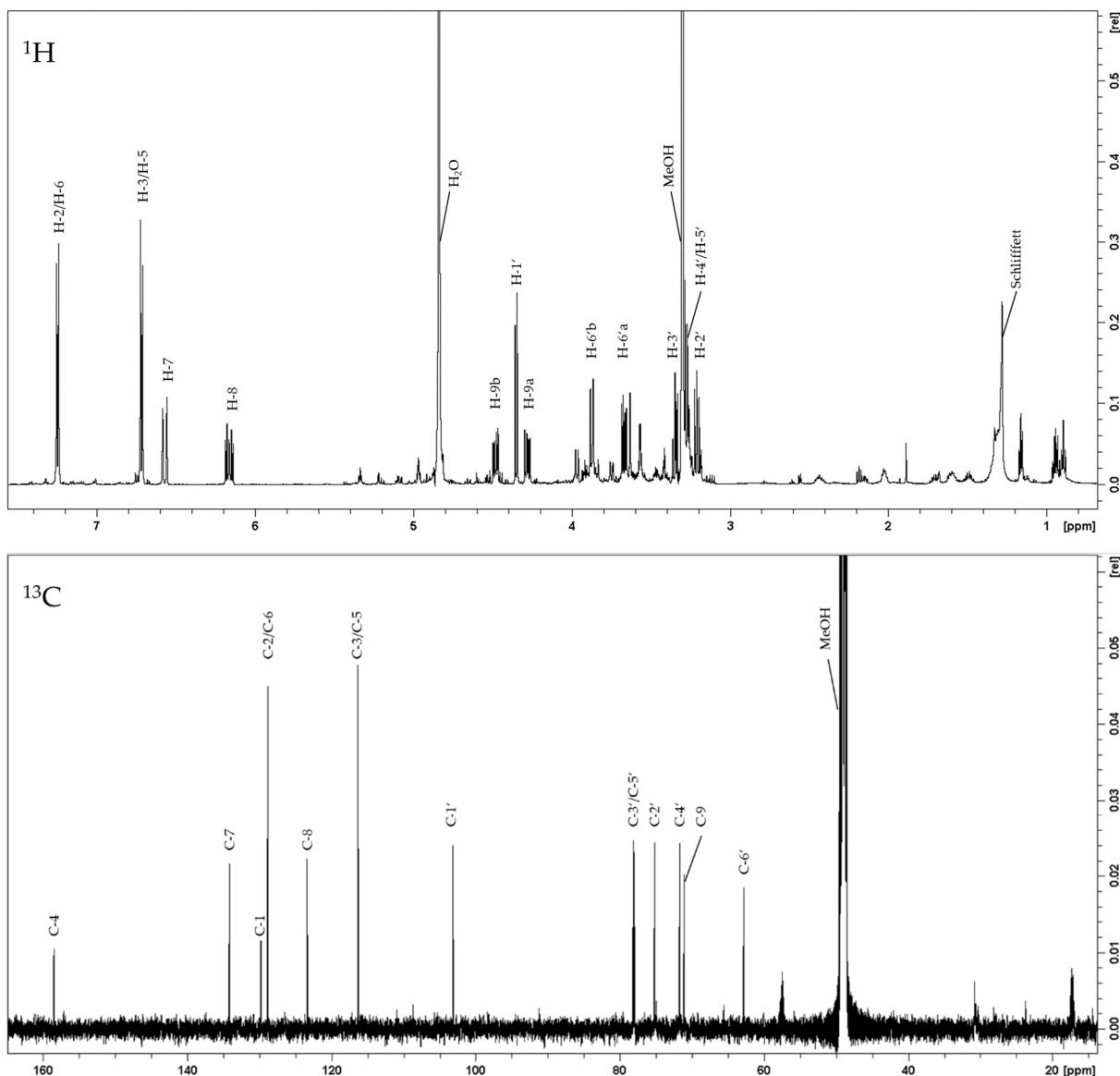


Abbildung 22: NMR-Spektren und Signalzuordnung von Substanz 4 (Triandrin); ¹H- (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten), 600,25 bzw. 150,95 MHz (CD_3OD)

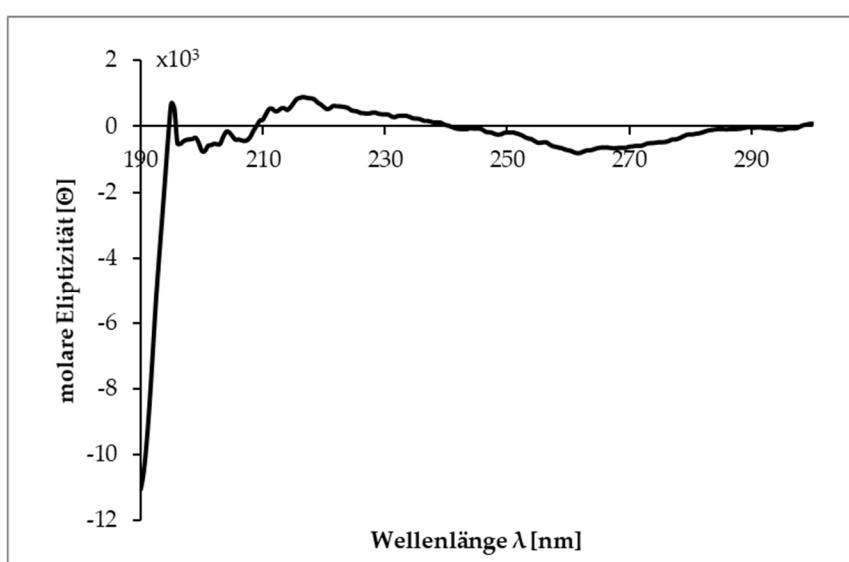
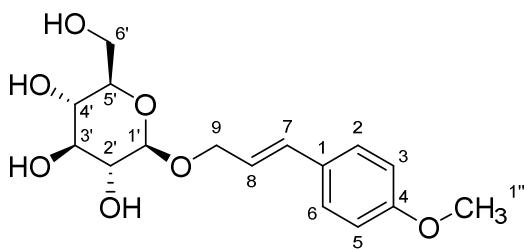


Abbildung 23: CD-Spektrum der Substanz 4 (MeOH)

3.5.2.2. Vimalin (Substanz 5)



Name:	Vimalin
Fraktion:	SdII2T7
Auswaage:	1,9 mg
Aussehen:	weißes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	-50,4° (c 1,0 g/l)
λ_{\max} :	262,0 nm (c 0,1 MeOH)
CD:	c 1750 $\mu\text{mol/l}$
HRESIMS:	m/z 325,1290 [M-H] ⁻ (berechnet: C ₁₆ H ₂₂ O ₇ ; 325.1293)
Reinheit:	95,9%

Tabelle 30. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 5** (600,25 bzw. 150,95 MHz, CD₃OD; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, t Triplet, br breites Signal, m Multiplett).

Nr.	δ_c	δ_H
1	131,0	
2	128,8	7,34 (2H, d, 8,8)
3	115,0	6,86 (2H, d, 8,8)
4	160,9	
5	115,0	6,86 (2H, d, 8,8)
6	128,8	7,34 (2H, d, 8,8)
7	133,7	6,6 (1H, d, 16,0)
8	124,3	6,2 (1H, ddd, 5,9, 6,8, 15,8)
9	70,9	4,29 (1H, ddd, 1,4, 5,9, 12,5) 4,49 (1H, ddd, 1,4, 6,8, 12,4)
1'	103,2	4,35 (1H, d, 7,7)
2'	75,2	3,21 (1H, dd, 8,0, 9,1)
3'	78,1	3,34 (1H, t, 8,8)
4'	71,7	3,28 (1H, d, 7,7) ¹
5'	78,0	3,27 (1H, dd, 2,2, 5,8) ¹
6'	62,8	3,67 (1H, dd, 5,5, 12,1) 3,87 (1H, dd, 1,9, 11,8)
1''	55,7	3,77 (3H, s)

¹ Überlagerte Signale

Substanz 5 wurde bei der Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (3.2.4, S. 24) in Fraktion SdII eluiert. Die Isolierung erfolgte anhand präparativer HPLC (3.4.5.1, S. 43) als SdII2T7. Die Auswaage betrug 1,9 mg.

HRESIMS-Messung ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 325,1290 [M-H]⁻ und eine Summenformel von C₁₆H₂₂O₇.

Die NMR-Signale von **Substanz 5** (Tabelle 30 und Abbildung 24) entsprechen denen von Bassanini et al. (2017). Allerdings muss der Zuordnung von H-2/6 bzw. H-3/5 widersprochen werden. Das Vorliegen eines klaren NOESY-Kreuzsignals zwischen H-7 (6,60 ppm) und zweier Protonen bei 7,34 ppm lassen darauf schließen, dass diese Protonen in räumlicher Nähe zueinanderstehen müssen (Abbildung 25). Die gleichzeitige Abwesenheit eines Kreuzsignals zwischen H-7 und den Protonen bei 6,86 ppm stützt diese Annahme. Daher wurden die Signale H-3/5 und H-2/6 umgekehrt zu Bassanini et al. (2017) zugeordnet.

Der ermittelte Drehwert ($[\alpha]_D^{25}$: -50,4; $c = 0,1$; MeOH) liegt nahe dem in der Literatur berichteten (Thieme, 1964d). Die bisher vorhandenen spektroskopischen Daten konnten um ein CD-Spektrum erweitert und weiter vervollständigt werden (Abbildung 26).

Die massen- und NMR-spektroskopischen Daten ließen darauf schließen, dass es sich bei **Substanz 5** um Vimalin handelt. Dieses wurde, wie Triandrin, erstmals von Thieme isoliert und beschrieben. Die erstmalige Isolierung erfolgte aus *Salix viminlis* L.. Zudem wird eine Detektion in Rindenmaterial von *S. cinerea* (Thieme, 1964d) sowie der Blattdroge dieser Spezies berichtet (Binns et al., 1968).

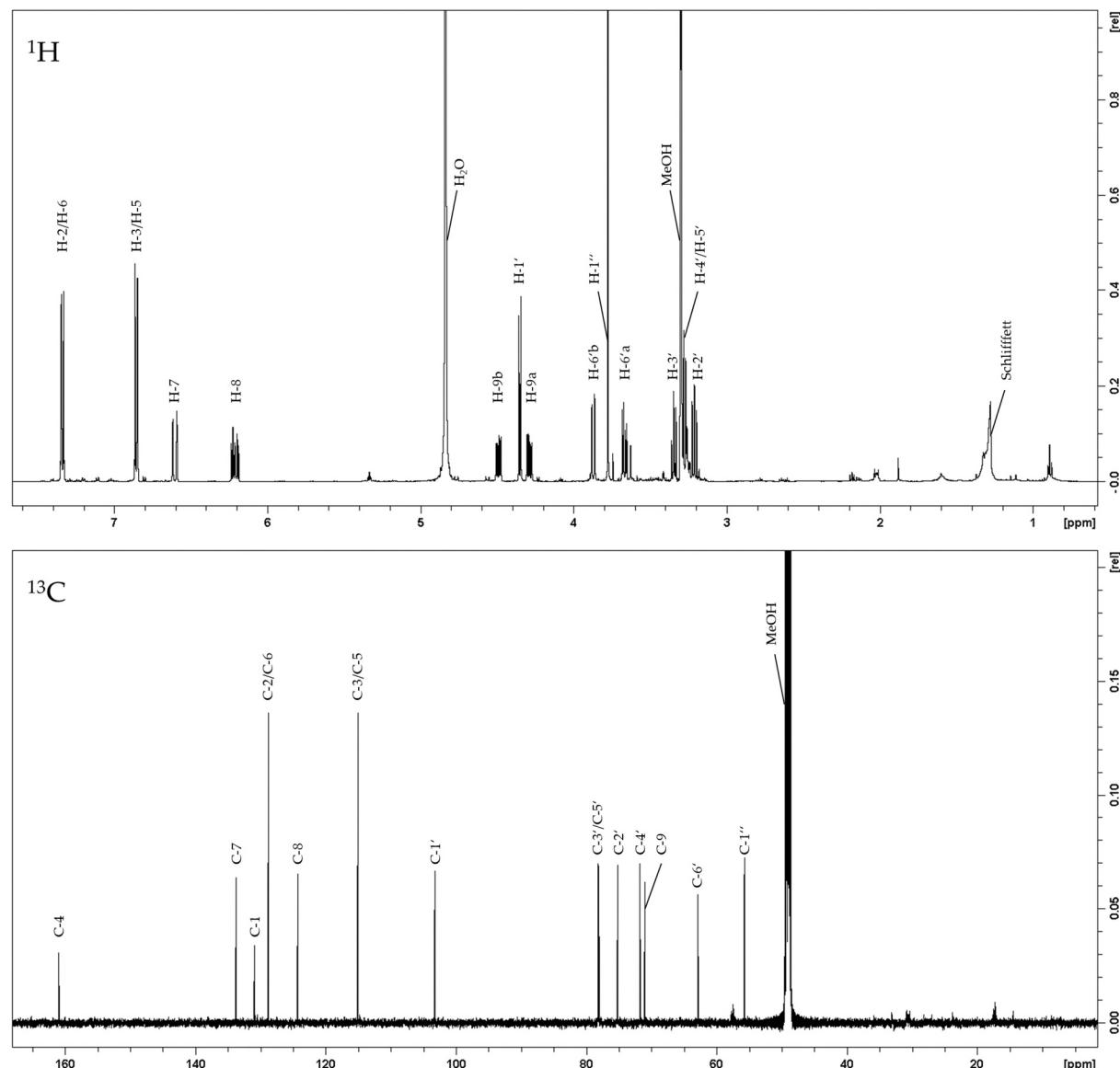


Abbildung 24: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 5** (Vimalin); ^1H - (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten), 600 bzw. 150 MHz (MeOD-*d*4)

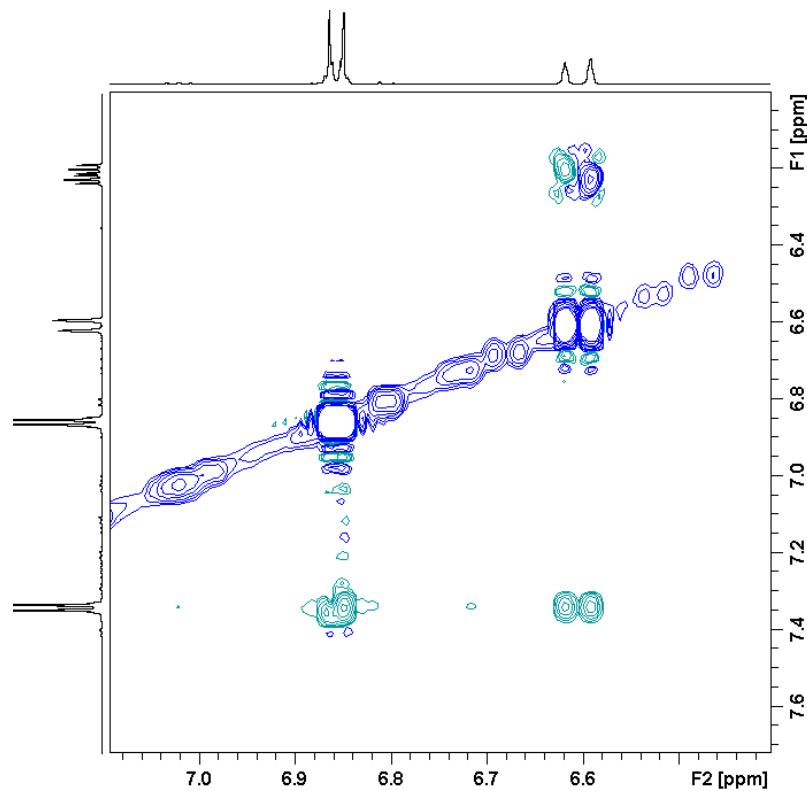


Abbildung 25: Ausschnitt eines 2D-NOESY-NMR-Spektrums von Substanz 5 (Vimalin); Vorliegen eines klaren NOESY-Kreuzsignals zwischen H-7 (6,60 ppm) und zweier Protonen bei 7,34 ppm; 600 MHz (MeOD-*d*4)

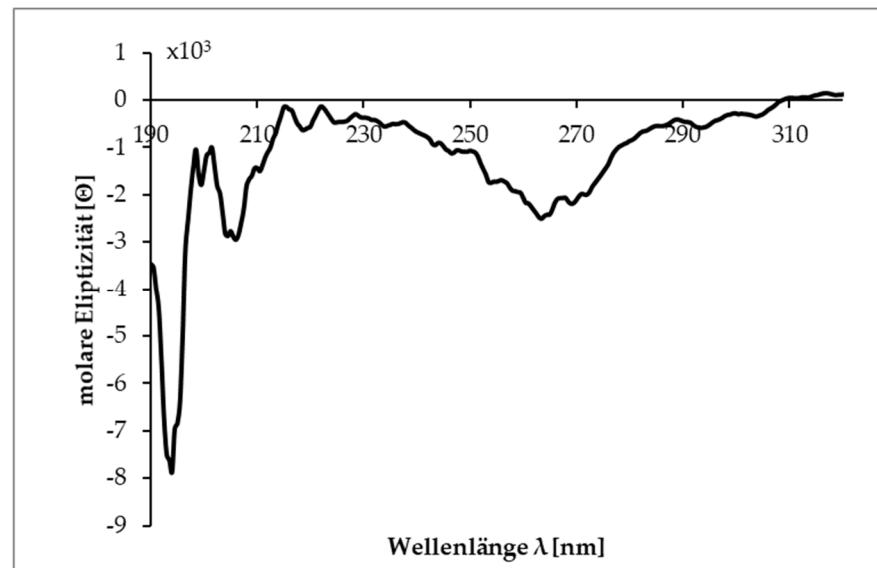
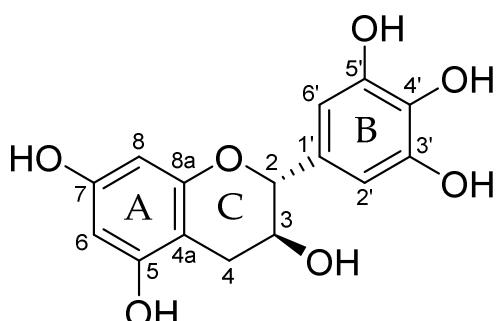


Abbildung 26: CD-Spektrum der Substanz 5 (MeOH)

3.5.3. Flavan-3-ole und Flavonoide

3.5.3.1. Gallocatechin (Substanz 6)



Name:	(+)-Gallocatechin
Fraktion:	SdII67M2T1
Auswaage:	10,5 mg
Aussehen:	beige-braunes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	162,4 (c 1,06 g/l) 210,0 nm (c 0,1 MeOH), 271,9 nm* * lokales Maximum
CD:	c 350 μ mol/l,
HRESIMS:	m/z 305,0676 [M-H] (berechnet: C ₁₅ H ₁₄ O ₇ ; 305,0667)

Tabelle 31. ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Substanz 6 (400,30 bzw. 100,66 MHz, CD_3OD ; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, m Multiplett).

Nr.	δ_C	δ_H
1		
2	81,5	4,48 (1H, d, 7,2)
3	67,4	3,92 (1H, m)
4	27,3	2,45 (1H, dd, 7,7, 16,1)
		2,76 (1H, dd, 5,3, 16,1)
4a	99,3	
5	156,2	
6	94,8	5,87 (1H, d, 2,2)
7	156,4	
8	94,1	5,81 (1H, d, 2,2)
8a	155,5	
1'	130,2	
2'	106,5	6,35 (2H, s)
3'	145,5	
4'	132,6	
5'	145,5	
6'	106,5	6,35 (2H, s)

Substanz 6 eluierte bei Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 (3.2.4, S. 24) in Fraktion SdII67. Die weitere Auftrennung dieser Fraktion erfolgte mittels Flash-Chromatographie an MCI-Gel® CHP20P (3.2.5, S. 25). Dabei wurde die Substanz in Fraktion SdII67M2 eluiert. Die Isolierung erfolgte mittels präparativer HPLC (3.4.5.2, S. 45) als SdII67M2T1. Die Auswaage betrug 10,5 mg.

HRESIMS-Messung ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 305,0676 [M-H]⁻ eine Summenformel von C₁₅H₁₄O₇.

Die NMR-spektroskopischen Daten (**Tabelle 31**) decken sich mit denen von An et al. (2005) und Schwindl (2020, S. 144). Insbesondere die Kopplungskonstante J an H-2 von 7,2 Hz, sowie das Multiplett welches durch H-3 erzeugt wird, lassen auf die 2,3-*trans*-Konfiguration schließen. Die ^1H - und ^{13}C -Spektren sind in **Abbildung 27** gezeigt. Der ermittelte Drehwert ($[\alpha]_D^{25}$: 162,4, c = 1,06, MeOH) differiert stark vom Bericht bei An et al. (2005), deckt sich jedoch mit den Ergebnissen von Schwindl (2020). Das CD-Spektrum (**Abbildung 28**) zeigt bei ca.

270-280 nm einen leichten negativen Cotton-Effekt. Vergleicht man diese mit den Daten von Hashida et al. (2009), so ist ein *ent*-Gallocatechin ausgeschlossen.

Die Übereinstimmung der erhobenen spektroskopischen Daten, insbesondere der NMR-spektroskopischen Erhebung, mit Literaturwerten zeigt, dass es sich bei **Substanz 6** um (+)-Gallocatechin handelt.

Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal aus *S. cinerea* isoliert.

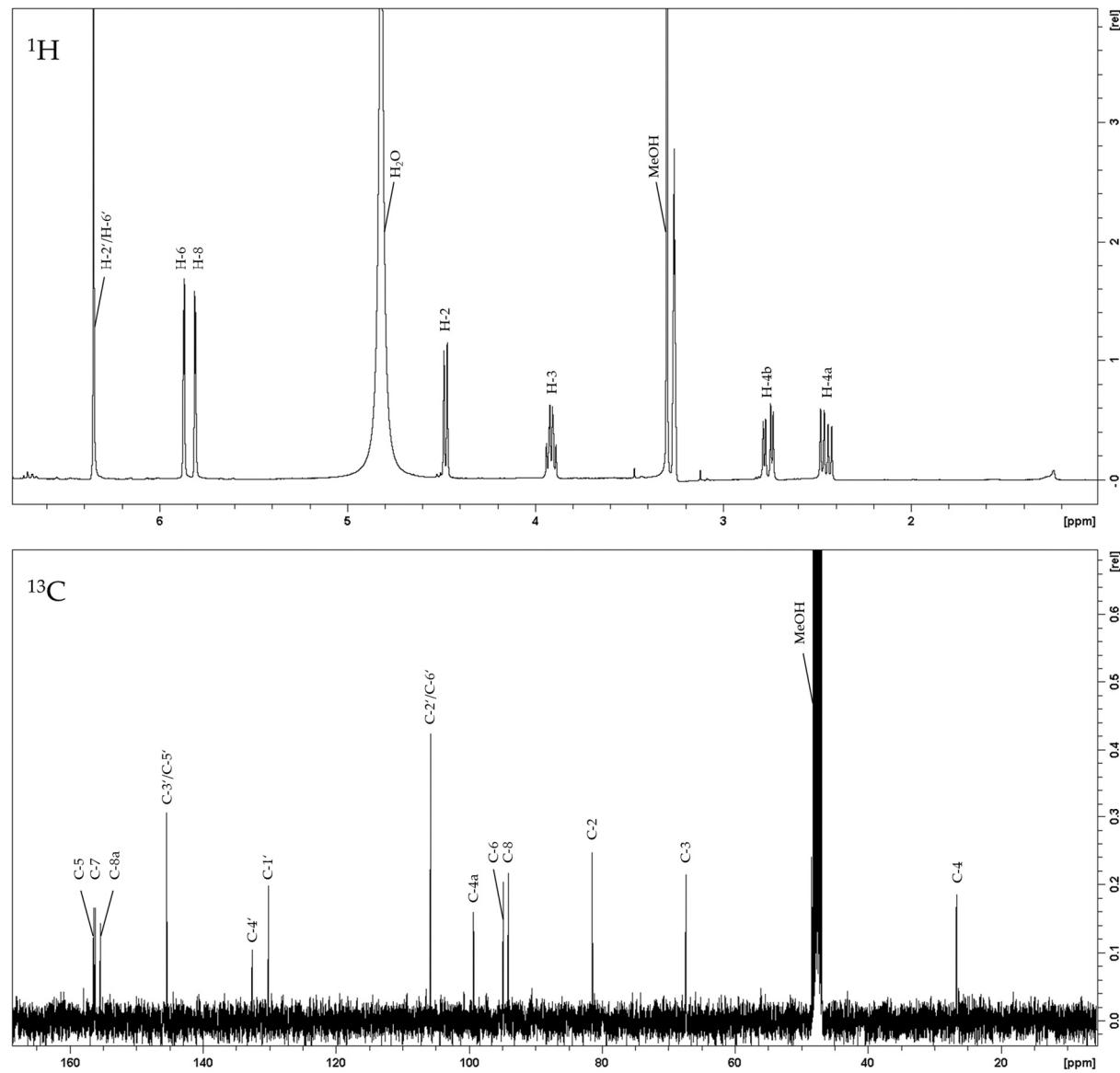


Abbildung 27: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 6** (Gallocatechin); ^1H - (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten), 400,30 bzw. 100,66 MHz (CD_3OD)

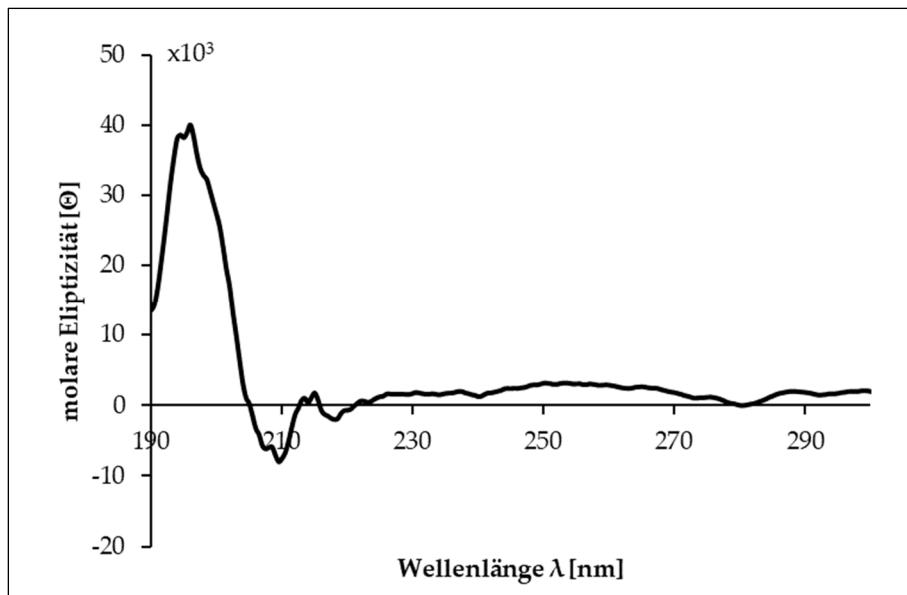
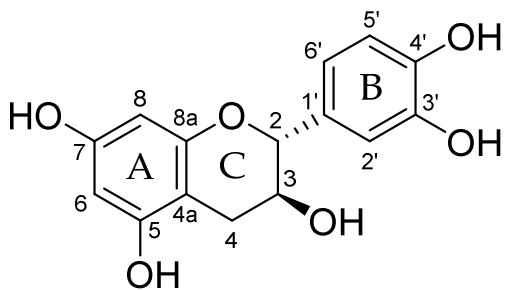


Abbildung 28: CD-Spektrum der Substanz 6 (MeOH)

3.5.3.2. Catechin (Substanz 7)



Name:	(+)-Catechin
Fraktion:	SdII67M2T2
Auswaage:	11,4 mg
Aussehen:	beige-braunes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	+48,1 (c 0,74 g/l)
λ_{\max} :	207,9 nm (c 0,1 MeOH), 271,9 nm* * lokales Maximum
CD:	c 350 μ mol/l
HRESIMS:	m/z 289,0727 [M-H] ⁻ (berechnet: C ₁₅ H ₁₄ O ₆ ; 289,0718)

Tabelle 32. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 7** (400,30 bzw. 100,66 MHz, CD₃OD; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett).

Nr.	δ_c	δ_H
1		
2	81,5	4,52 (1H, d, 7,5)
3	67,4	3,92 (1H, m)
4	27,1	2,44 (1H, dd, 8,1, 16,1) 2,81 (1H, dd, 5,5, 16,1)
4a	99,4	
5	156,5	
6	94,9	5,88 (1H, d, 2,2)
7	156,2	
8	94,1	5,81 (1H, d, 2,2)
8a	155,5	
1'	130,8	
2'	113,9	6,79 (1H, d, 1,8)
3'	144,8	
4'	144,9	
5'	114,7	6,71 (1H, d, 8,1)
6'	118,6	6,67 (1H, dd, 1,8, 8,1)

Substanz 7 eluierte bei Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 (3.2.4, S. 24) in Fraktion SdII67. Die weitere Auftrennung dieser Fraktion erfolgte mittels Flash-Chromatographie an MCI-Gel® CHP20P (3.2.5, S. 25). Dabei wurde die Substanz in Fraktion SdII67M2 eluiert. Die Isolierung erfolgte mittels präparativer HPLC (3.4.5.2, S. 45). Die Auswaage betrug 11,4 mg.

HRESIMS-Messung ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 289,0727 [M-H]⁻ eine Summenformel von C₁₅H₁₄O₆.

Die NMR-spektroskopischen Daten (**Tabelle 32**) decken sich mit denen von Baldé et al. (1991).

Die ¹H- und ¹³C-Spektren sind in **Abbildung 29**, das CD-Spektrum in **Abbildung 30** gezeigt. Das CD-Spektrum zeigt einen leichten negativen Cotton-Effekt bei 280 nm, was mit Spektren in der Literatur übereinstimmt (Hashida et al., 2009; Korver & Wilkins, 1971). Als Drehwert wurde $[\alpha]_D^{25}$: 48,1 (c = 0,74, MeOH) ermittelt.

Die Übereinstimmung der erhobenen NMR-spektroskopischen Daten und des CD-Spektrums mit Literaturwerten sowie ein Vergleich des ermittelten spezifischen Drehwerts mit Literaturwerten zeigt, dass es sich bei **Substanz 7** um (+)-Catechin handelt.

Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal aus *S. cinerea* isoliert.

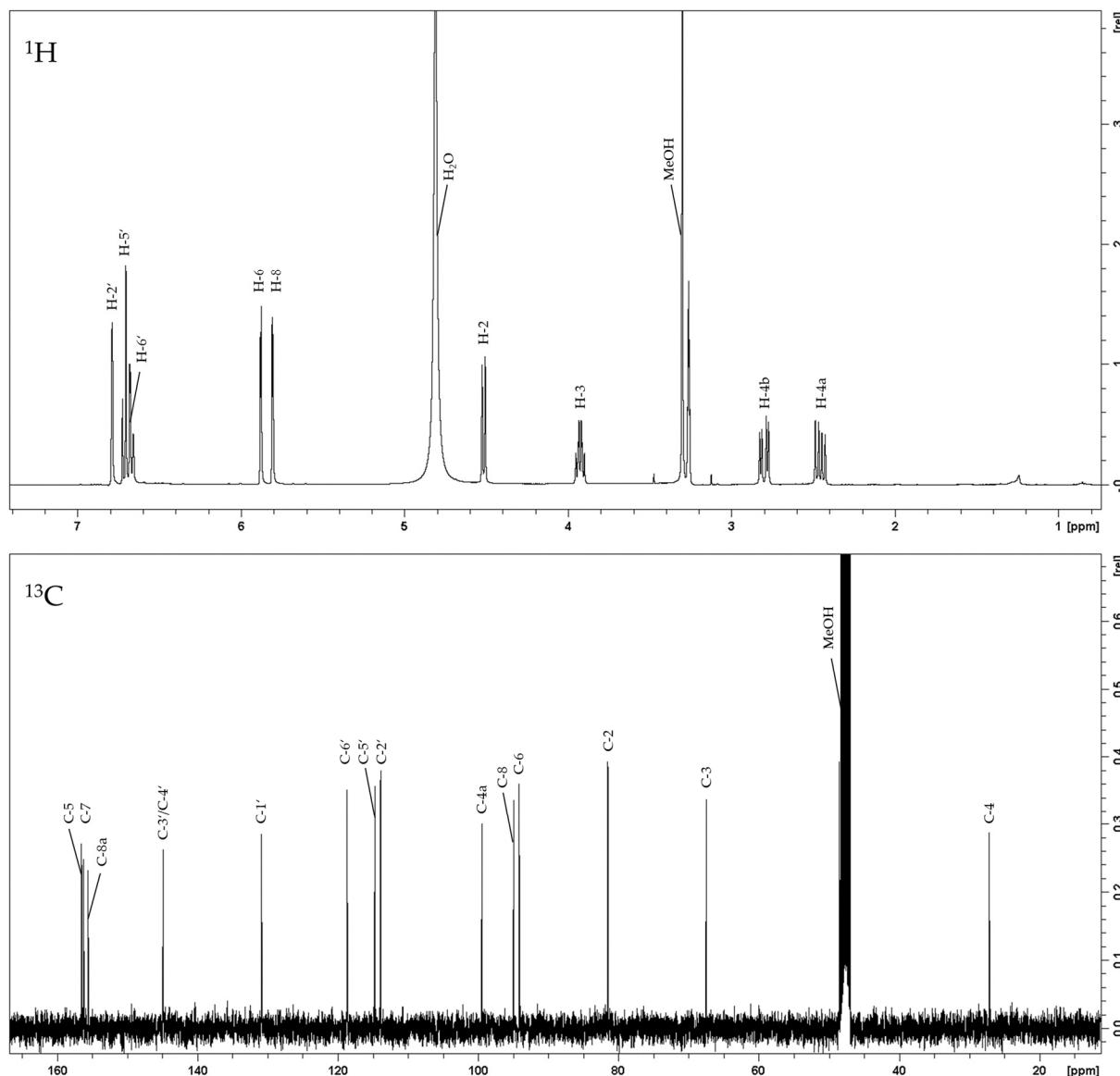


Abbildung 29: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 7**; ^1H - (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten), 400,30 bzw. 100,66 MHz (CD_3OD)

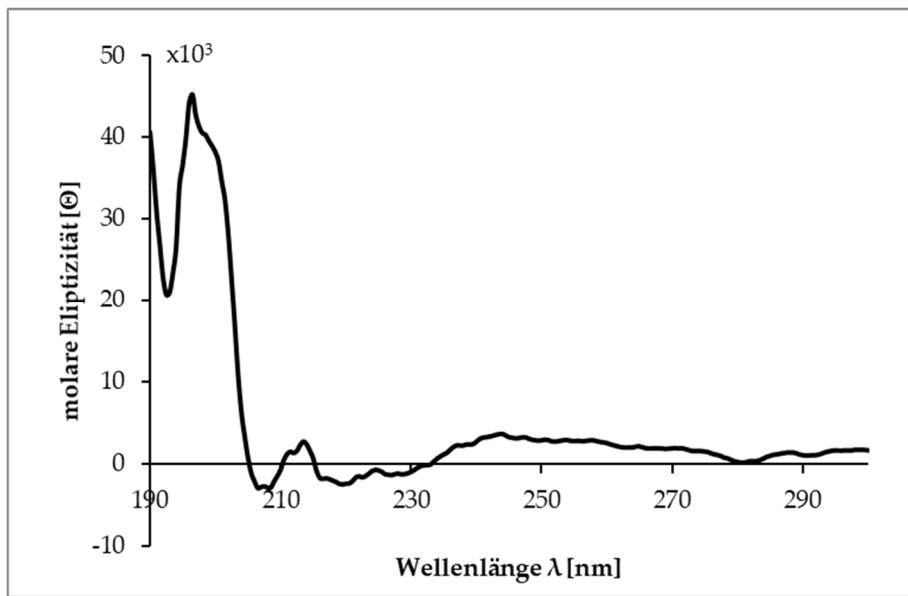
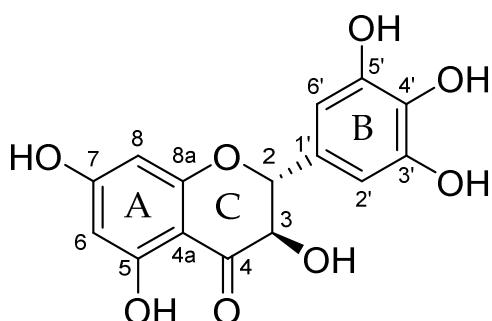


Abbildung 30: CD-Spektrum der **Substanz 7** (MeOH)

3.5.3.3. (2R,3R)-Dihydromyricetin (Substanz 8)



Name:	Dihydromyricetin / Ampelopsin
Fraktion:	SdII67M6
Auswaage:	160,5 mg
Aussehen:	beige-braunes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	+122,3 (c 2,78 g/l)
λ_{\max} :	207,9 nm (c 0,1 MeOH), 291,0 nm* * lokales Maximum
CD:	c 350 μ mol/l
HRESIMS:	m/z 319,0473 [M-H] ⁻ (berechnet: C ₁₅ H ₁₂ O ₈ ; 319,0459)

Tabelle 33. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 8** (400,30 bzw. 100,66 MHz, CD₃OD; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett).

Nr.	δ_c	δ_h
1		
2	83,9	4,78 (1H, d, 11,4)
3	72,3	4,39 (1H, d, 11,4)
4	196,7	
4a	100,2	
5	163,9	
6	96,1	5,85 (1H, d, 2,0)
7	168,2	
8	95,1	5,82 (1H, d, 2,0)
8a	163,0	
1'	127,7	
2'	106,0	6,48 (2H, s)
3'	145,5	
4'	133,5	
5'	145,5	
6'	106,0	6,48 (2H, s)

¹ Überlagerte Signale

Substanz 8 wurde bei Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 in Fraktion SdII67 eluiert (3.2.4, S. 24). Die weitere Auftrennung dieser Fraktion erfolgte mittels Flash-Chromatographie an MCI-Gel[®] CHP20P (3.2.5, S. 25). Dabei wurde die Substanz in Fraktion SdII67M6 eluiert. Die Auswaage betrug 160,5 mg.

Die HRESIMS-Messung ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 319,0473 [M-H]⁻ und eine Summenformel von C₁₅H₁₂O₈.

Die NMR-Daten sind in **Tabelle 33** aufgelistet und die Zuordnung in **Abbildung 31** gezeigt. Eine Strukturaufklärung wurde unter Anwendung ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie und Vergleich mit Literaturdaten von Chaturvedula & Huang (2013) durchgeführt. Die lässt darauf schließen, dass es sich bei Substanz 8 um Dihydromyricetin handelt. Im Vergleich der Daten mit Gegenüberstellung von NMR-Daten des Dihydromyricetins in verschiedenen Lösemitteln von Chaturvedula & Huang (2013) zeigt sich, dass diese leicht verschoben sind. Die Verschiebungen liegen näher an den in DMSO-*d*₆ erhobenen, als jenen in MeOD-*d*₄, welches auch in dieser Arbeit benutzt wurde.

Zudem unterscheidet sich die Zuordnung der Protonen H-6 und H-8. In **Abbildung 32** sind die Kreuzsignale des HSQC-Experiments gezeigt, welche eine eindeutige Zuordnung der Protonen zu den jeweiligen Atomen C-6 und C-8 erlauben. Die Ermittlung der relativen Stereochemie (2,3-*trans*) erfolgte über die Kopplungskonstanten $J_{2,3}$ von je 11,4 Hz in Übereinstimmung mit Petereit et al. (1991).

Die absolute Stereochemie konnte mit Hilfe der CD-Spektroskopie ermittelt werden. Das erhobene Spektrum **Abbildung 33** (S. 73) weist bei 300-340 nm einen positiven Cotton-Effekt auf, was für 2R,3R-*trans*-konfigurierte Dihydroflavanole typisch ist (Slade et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte Dihydromyricetin (Syn.: Ampelopsin) aus *Salix cinerea* isoliert werden. Bei Ampelopsin handelt es sich um einen typischen Inhaltsstoff der Weidenrinde (Shao et al., 1989; Wichtl et al., 2015), allerdings ist bisher keine Isolierung aus *S. cinerea* berichtet worden.

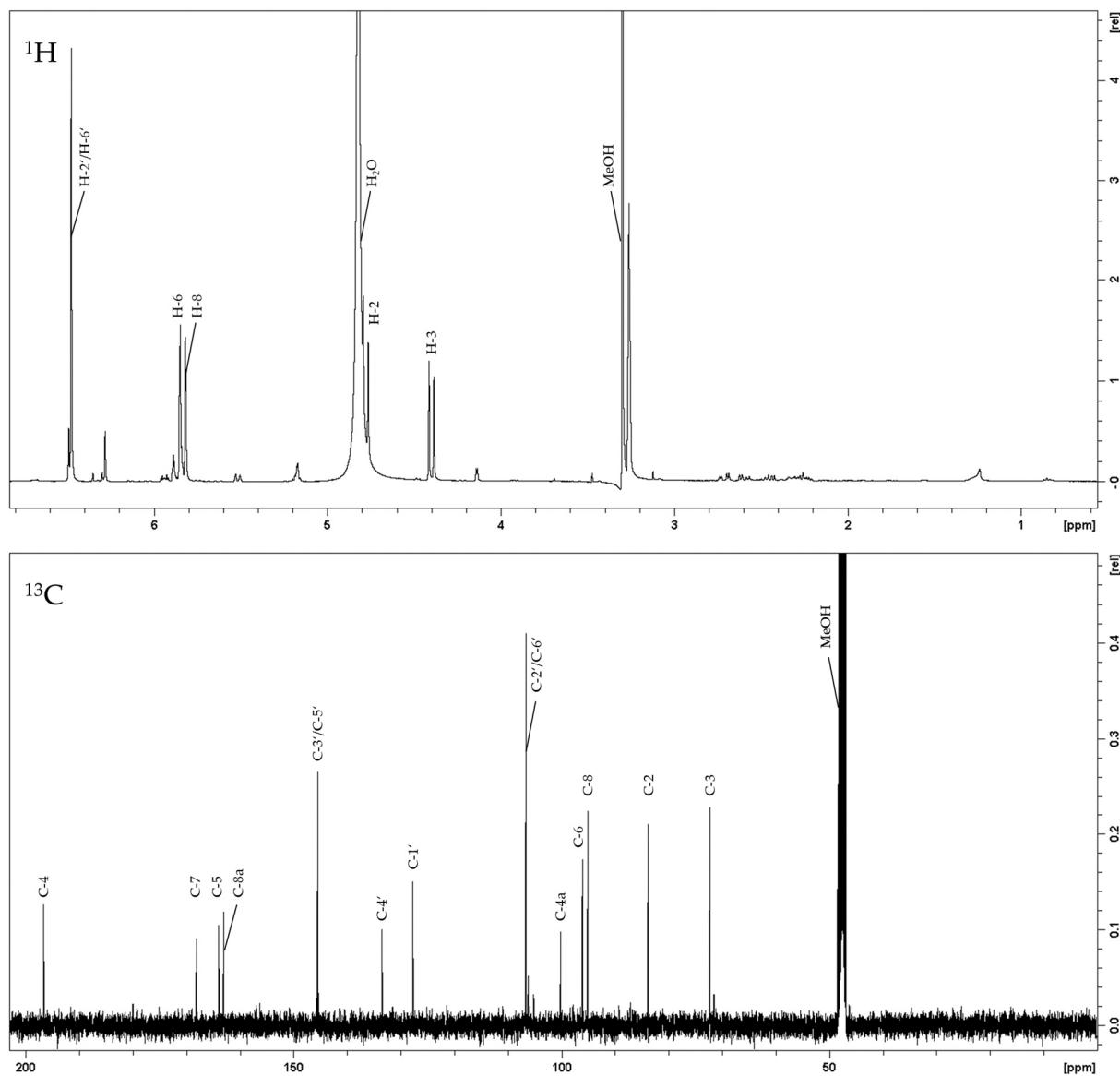


Abbildung 31: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 8** (Dihydromyricetin); ^1H - (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten), 400,30 bzw. 100,66 MHz (CD_3OD)

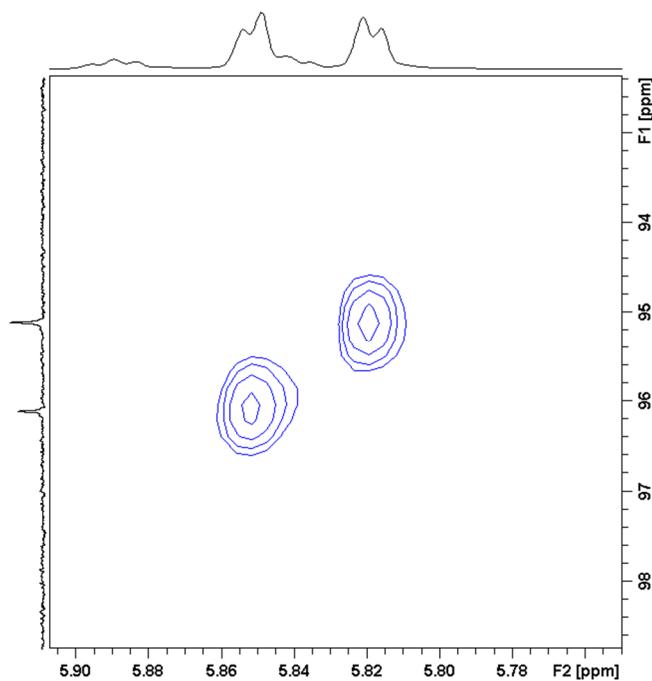


Abbildung 32: Ausschnitt eines 2D-HSQC-NMR-Spektrums von **Substanz 8** (Dihydromyricetin); Vorliegen eines klaren NOESY-Kreuzsignals zwischen H-7 (6,60 ppm) und zweier Protonen bei 7,34 ppm; 400,30 bzw. 100,66 MHz (CD_3OD)

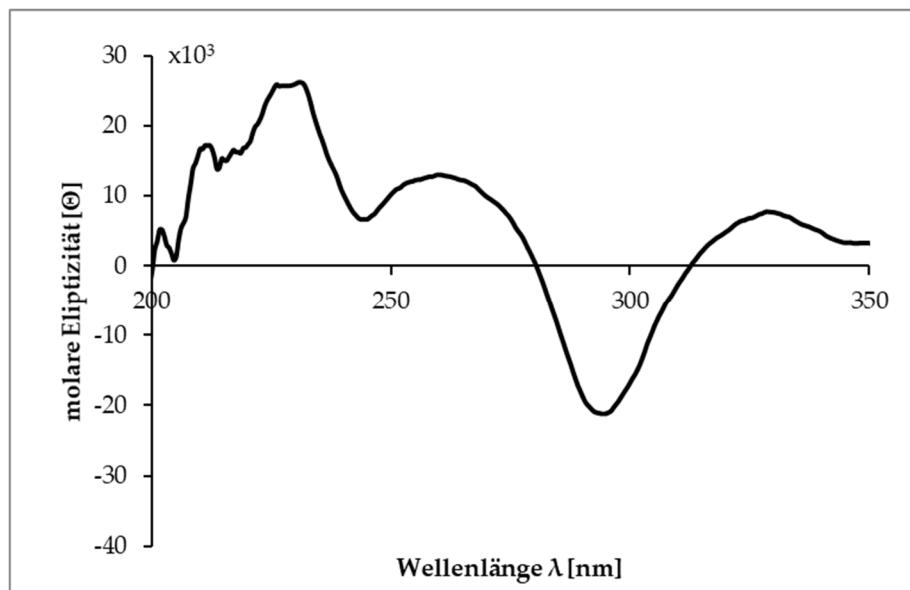
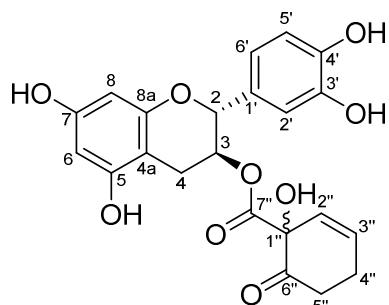


Abbildung 33: CD-Spektrum der **Substanz 8** (MeOH)

3.5.3.4. HCH-Catechin (Substanz 9)



Name:	Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonyl-ester) (HCH-Catechin)
Fraktion:	SdII67M8T3
Auswaage:	30,3 mg
Aussehen:	beige-braunes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	-91,6° (c 1,0 g/l)
λ_{\max}:	205,0 nm (c 0,1 MeOH), 289,1 nm* * lokales Maximum
CD:	c 175 μ mol/l
HRESIMS:	m/z 427,104 [M-H] ⁻ (berechnet: C ₂₂ H ₂₀ O ₉ ; 427,1035)
Reinheit:	96,0%

Tabelle 34. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 9** (400,30 bzw. 100,66 MHz, CD₃OD; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, t Triplett, m Multiplett).

Nr.	δ_c	δ_H
1		
2	77,7	4,86 (1H, d, 6,4)
3	71,5	5,2 (1H, m)
4	23,0	2,6 (1H, dd, 6,6, 16,5) 2,73 (1H, dd, 4,9, 16,4)
4a	97,9	
5	156,3	
6	94,1	5,84 (1H, d, 2,2)
7	157,0	
8	95,1	5,9 (1H, d, 2,2)
8a	155,0	
1'	129,3	
2'	113,3	6,71 (1H, d, 2,0)
3'	145,1	
4'	145,2	
5'	115,0	6,7 (1H, d, 8,1)
6'	118,0	6,61 (1H, dd, 1,9, 8,1)
1''	77,8	
2''	127,4	5,5 (1H, dt, 1,6, 9,8)
3''	131,8	5,94 (1H, dt, 3,9, 9,8)
4''	25,4	2,26 (1H, m) ¹ 2,35 (1H, m)
5''	34,8	2,24 (1H, m) ¹ 2,44 (1H, m)
6''	205,6	
7''	169,3	

¹ Überlagerte Signale

Substanz 9 eluierte in Fraktion SdII67 bei Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (3.2.4, S. 24). Die Auftrennung dieser Fraktion erfolgte mittels Flash-Chromatographie an MCI-Gel[®] CHP20P (3.2.5, S. 25). Dabei wurde die Substanz in Fraktion SdII67M8 eluiert. Eine Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC (3.4.5.3, S. 46). Die Auswaage betrug 30,3 mg.

Eine HRESIMS-Messung ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 427,1040 [M-H]⁻ und eine Summenformel von C₂₂H₂₀O₉.

Die NMR- und masse-spektroskopischen Daten waren kongruent mit denen von Jürgenliemk et al. (2007). Die NMR-Signale sind in **Tabelle 34** aufgelistet und die Zuordnung in **Abbildung 34** gezeigt.

Der Drehwert ($[\alpha]_D^{25}$: -91,6) wurde bei einer Konzentration von 0,1% in MeOH bestimmt, das CD-Spektrum der Substanz ist in **Abbildung 35** gezeigt.

Die massen- und NMR-spektroskopischen Daten ließen darauf schließen, dass es sich bei **Substanz 9** um Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester bzw. (HCH-Catechin) handelte.

Diese Substanz wurde erstmals 1985 von Hsu et al. (1985) aus *Salix sieboldiana* BLUME isoliert. Die einzige weitere Isolierung von HCH-Catechin wurde durch Jürgenliemk et al. (2007) aus *S. purpurea* berichtet, obwohl die Substanz in verschiedenen Arten des Genus *Salix* durch massenspektroskopische Verfahren nachgewiesen wurde (Wiesneth, 2019, S. 217 ff).

Damit stellt diese Arbeit den ersten Bericht einer Isolierung von Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester aus *Salix cinerea* L. dar. Die bisher vorhandenen spektroskopischen Daten konnten um ein CD-Spektrum erweitert und weiter vervollständigt werden.

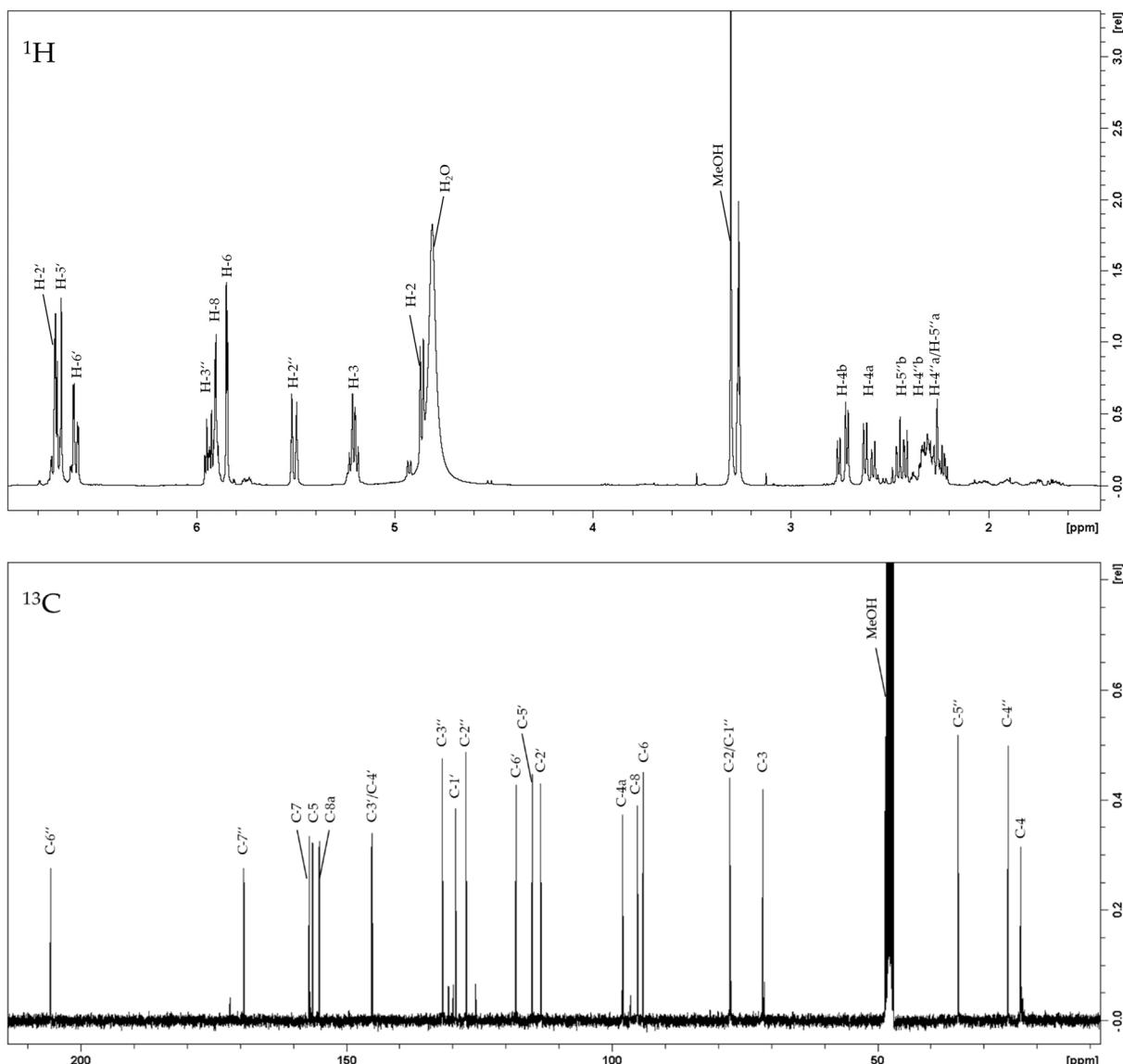


Abbildung 34: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 9** (HCH-Catechin); ¹H- (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten), 400,30 bzw. 100,66 MHz (CD₃OD)

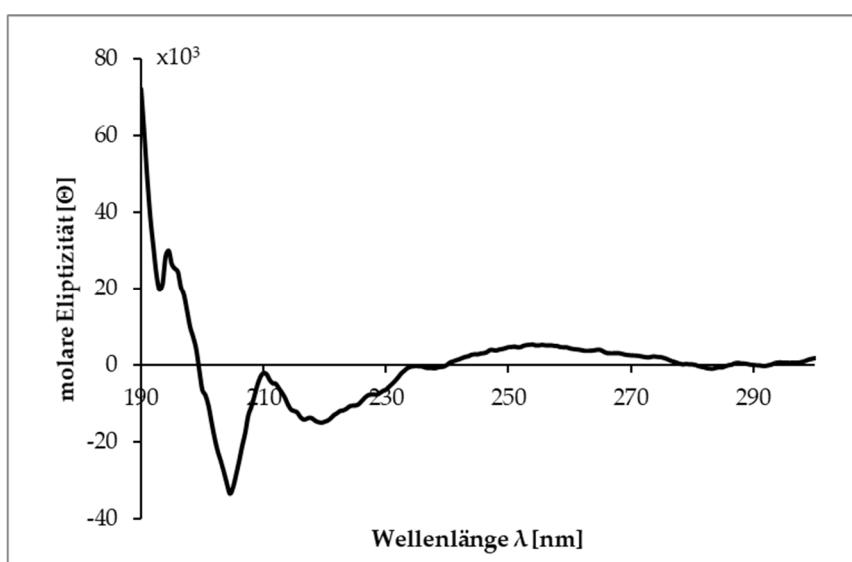
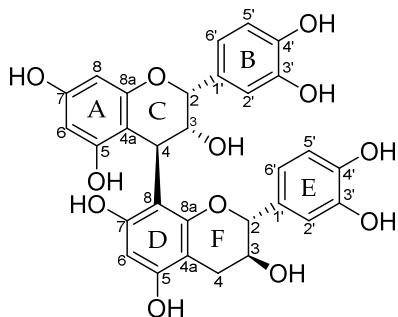


Abbildung 35: CD-Spektrum der **Substanz 9** (MeOH)

3.5.3.5. Procyanidin B1 (Substanz 10)



Name:	Procyanidin B1 Epicatechin-(4β→8)-Catechin
Fraktion:	SdII8M4
Auswaage:	27,8 mg
Aussehen:	beige-braunes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	-4,02 (c 1,0 g/l)
λ_{\max} :	203,1 nm (c 0,1 MeOH), 289,1 nm*; * lokales Maximum
CD:	c 350 μ mol/l
HRESIMS:	m/z 577,1358 [M-H] ⁻ (berechnet: C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ ; 577,1357)

Tabelle 35. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 10** (400,30 bzw. 100,66 MHz, MeOD-*d*₄, 233 K; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, b breites Signal, m Multiplett).

Nr.	δ _C	δ _H
1c		
2c	77,0 + 76,5	5,10 + 5,18 (1H, bs)
3c	72,9 + 73,4	3,93 ^a + 3,84 (1H, bs)
4c	36,7 + 37,2	4,66 + 4,46 (1H, bs)
4a _A	102,1 + 103,7	
5 _A	157,8	
6 _A	95,1	5,92 + 5,67 (1H, d, 1,7/1,3)
7 _A	157,7	
8 _A	95,6	5,91 (1H, d, 1,3)
8a _A	158,6	
1' _B	132,7 + 133,1	
2' _B	114,9	6,86 (1H, d, 0,9)
3' _B	145,7	
4' _B	145,4	
5' _B	115,5	6,68 ^b (1H)
6' _B	119,0	6,67 ^b (1H)
1 _F		
2 _F	81,5 + 82,9	4,97 + 3,92 ^a (1H, d, 5,1)
3 _F	687,1 + 69,0	4,17 + 3,75 (1H, m)
4 _F	26,3 + 29,7	2,53 + 2,40 (1H, dd, 5,4, 17,2/8,7, 16,0)
		2,60 + 2,93 (1H, dd, 5,0, 17,3/5,7, 16,1)
4a _D	99,8 + 101,0	
5 _D	155,7	
6 _D	96,5	5,83 (1H, s)
7 _D	156,4	
8 _D	107,6 + 108,7	
8a _D	153,7	
1' _E	132,2 + 131,5	
2' _E	113,7 + 115,2	6,83 + 6,55 (1H, d, 1,6)
3' _E	146,0	
4' _E	145,7	
5' _E	115,9 + 119,3	6,70 ^b + 6,64 ^b (1H, d, 8,4)
6' _E	119,2 + 120,5	6,89 + 6,42 (1H, dd, 1,7, 8,2)

^{a-b} Überlagerte Signale

Procyanidin B1 eluierte in Fraktion SdII8 bei der Auftrennung an Sephadex® LH-20 (3.2.4). Die anschließende Fraktionierung per Flash-Chromatographie an MCI-Gel® CHP20P (3.2.5) ergab in Fraktion M4 eine ausreichende Abtrennung von Begleitsubstanzen. Die Auswaage belief sich auf 27,8 mg.

Die Strukturaufklärung erfolgte über spektroskopische Verfahren und Vergleich der Spektren mit Literaturwerten. Die NMR-Spektren der freiphenolischen Substanz deckten sich mit denen von Shoji et al. (2003). **Tabelle 35** listet die ^{13}C - und ^1H -NMR-Signale auf, **Abbildung 36** zeigt die Zuordnung der Signale zu den erhobenen Spektren. Die NMR-Experimente wurden als Tieftemperaturmessung durchgeführt, um eine Verbreiterung der Signale durch Rotationsisomerie zu verringern (Shoji et al., 2003).

Das erhobene CD-Spektrum (**Abbildung 37**) entspricht dem von Wiesneth et al. (2015) präsentierten. Dadurch wird auch hier unter Anwendung der von Barrett et al. (1979) aufgestellten Regel auf eine $4\alpha\rightarrow 8$ -Verknüpfung geschlossen.

Obgleich Procyanidin B1 im Genus *Salix* weit verbreitet ist (Jürgenliemk et al., 2007; Wiesneth et al., 2015), handelt es sich hier um den ersten Bericht über eine Isolierung aus *Salix cinerea* L.

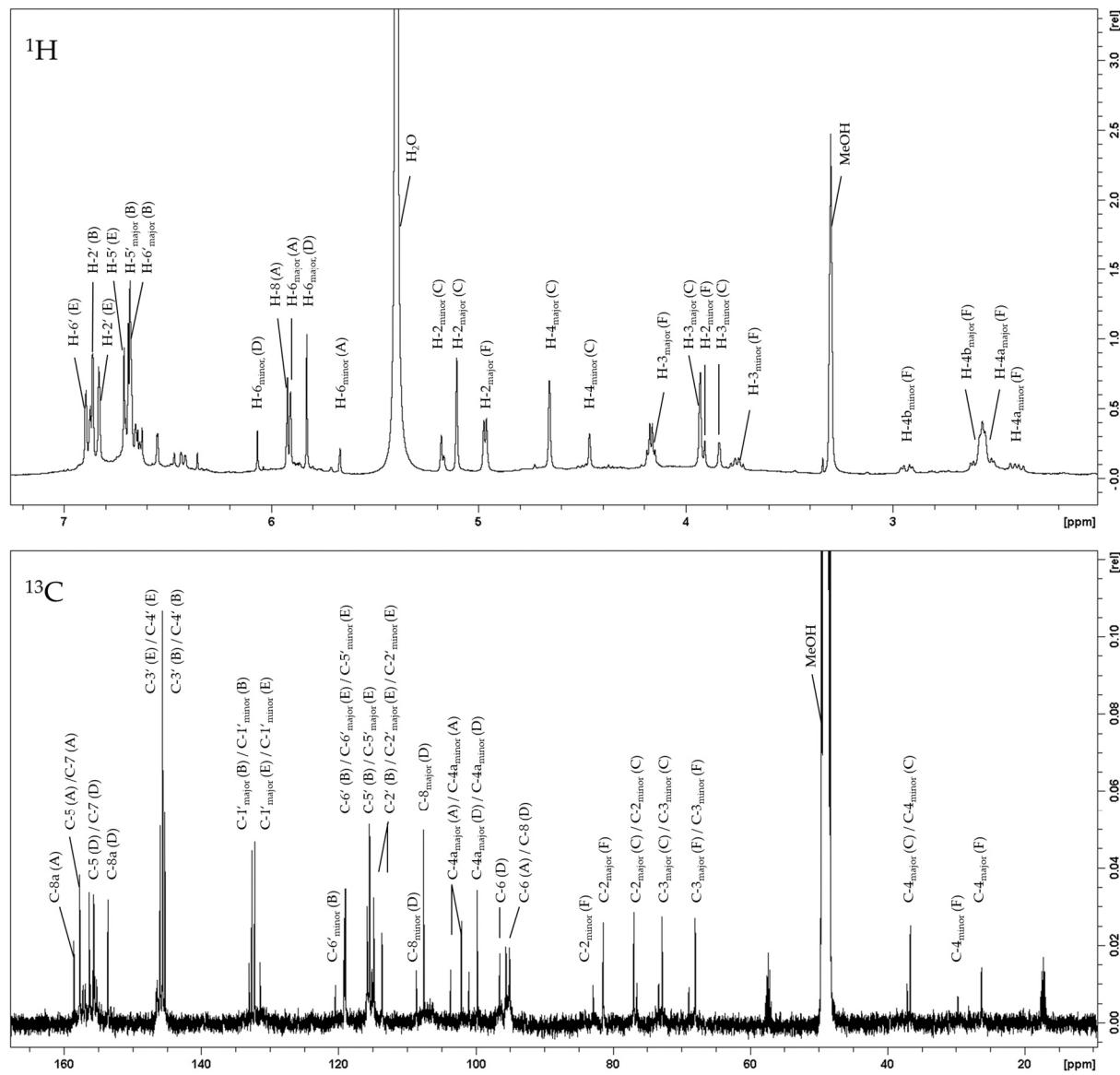


Abbildung 36: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 10** (Procyanidin B1); ¹H- (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten), 400,30 bzw. 100,66 MHz, 233 K (CD₃OD)

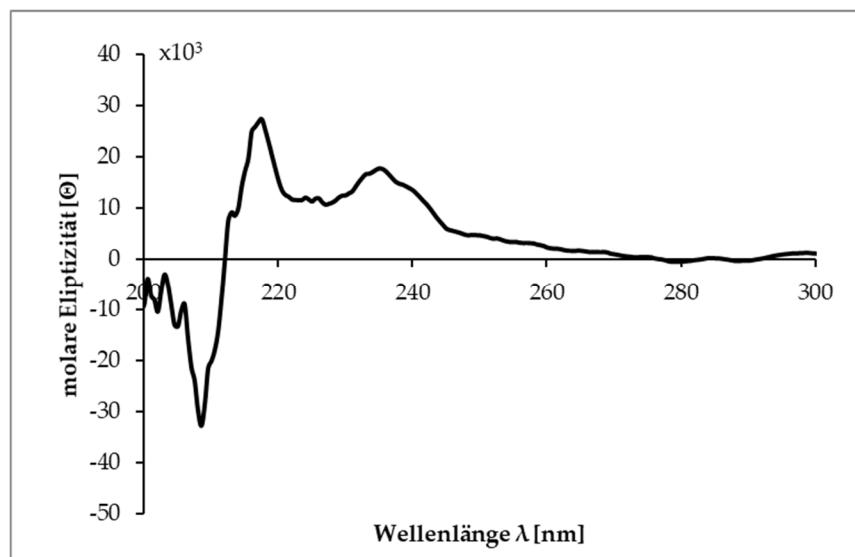
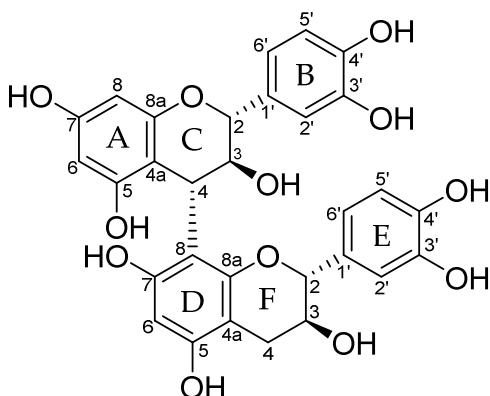


Abbildung 37: CD-Spektrum der **Substanz 10** (MeOH)

3.5.3.6. Procyanidin B3 (Substanz 11)



- IUPAC:** Procyanidin B3
Catechin-(4 α - \rightarrow 8)-Catechin
- Fraktion:** SdII9M5T2
- Auswaage:** 23,4 mg
- Aussehen:** beige-braunes Pulver
- $[\alpha]_D^{25}$: -224,2 (c 1,0 g/l)
- λ_{max} : 282,0 nm (c 0,1 MeOH);
- CD:** c 175 $\mu\text{mol/l}$
- HRESIMS:** m/z 577,1358 [M-H] $^-$
(berechnet: C₃₀H₂₆O₁₂; 577,1357)

Tabelle 36. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 11** (400,30 bzw. 100,66 MHz, CD₃OD, 233 K; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, b breites Signal, m Multiplett).

Nr.	δ_C	δ_H
1 _C		
2 _C	83,9 (84,1)	4,25 + 4,34 (1H, d, 9,4/9,7)
3 _C	73,7 + 73,7	4,36 + 4,51 (1H, d, 9,9/1H, d, 9,4)
4 _C	38,6 + 38,6	4,41 + 4,49 (1H, d, 7,7/1H, d, 8,3)
4 _{aA}	107,2 + 107,1	
5 _A	157,1 + 157,4	
6 _A	97,3 + 96,2	5,88 + 5,84 (1H, d, 2,2/1H, d, 2,2)
7 _A	157,1 + 157,3	
8 _A	96,8 + 97,5	5,78 + 5,81 (1H, d, 2,8/1H, d, 2,2)
8 _{aA}	158,7 + 158,6	
1 _B	132,7 + 132,4	
2 _B	116,4 + 116,1	6,73 + 6,95 ^a (1H, d, 2,2/1H, d, 2,2)
3 _B	145,6 + 146,1	
4 _B	146,0 + 146,3	
5 _B	116,1 + 116,1	6,67 + 6,76 (1H, d, 8,2/1H, d, 8,1)
6 _B	120,7 + 121,0	6,47 + 6,82 ^b (1H, dd, 2,2, 8,1/1H, dd)
1 _F		
2 _F	82,4 + 82,9	4,54 + 4,74 (1H, d, 7,1/1H, d, 7,1)
3 _F	68,9 + 68,6	3,79 + 4,07 (1H, m/1H, m)
4 _F	28,8 + 28,5	2,48 + 2,58 (1H, dd, 8,0, 16,2/1H, dd, 7,7, 16,0)
		2,75 + 2,81 (1H, dd, 5,0, 16,0/1H, dd, 5,2, 16,2)
4 _{aD}	102,2 + 100,5	
5 _D	155,6 + 155,7	
6 _D	96,0 + 97,5	6,07 + 5,94 (1H, s/1H, s)
7 _D	155,8 + 155,7	
8 _D	108,1 + 108,4	
8 _{aD}	154,8 + 155,0	

Fortsetzung **Tabelle 36**

Nr.	δ_c	δ_h
1' _E	131,8 + 132,1	
2' _E	115,5 + 115,2	6,58 + 6,95 ^a (1H, d, 2,2/1H, d, 2,2)
3' _E	145,7 + 146,3	
4' _E	145,7 + 146,1	
5' _E	116,1 + 116,1	6,67 + 6,75 (1H, dd, 1,7, 8,2/1H, dd, 3,9, 8,3)
6' _E	119,9 + 120,1	6,25 + 6,82 ^b (1H, dd, 1,6, 8,3/1H, dd)

^{a-b}: Überlagerte Signale

Procyanidin B3 eluierte in Fraktion SdII9 bei der Auftrennung an Sephadex[®] LH-20 (3.2.4, S. 24). Bei der Fraktionierung an MCI-Gel[®] CHP20P per Flash-Chromatographie (3.2.5, S. 25) wurde Fraktion M5 weiterverwendet. Eine Aufreinigung per semipräparativer HPLC ergab die Zielfraktion SdII9M5T2 (3.4.5.5, S. 49). Die Auswaage belief sich auf 23,4mg.

Die Strukturaufklärung erfolgte über spektroskopische Verfahren und Vergleich der Spektren mit Literaturwerten. Die NMR-Experimente der freiphenolischen Substanz ergaben bereits bei Raumtemperatur auswertbare Spektren, welche sich mit den Daten von Saito et al. (2002) und Wiesneth et al. (2015) decken. Die ¹³C- und ¹H-NMR-Signale werden in **Tabelle 36** für beide Rotationsisomere angegeben, soweit diese zugeordnet werden konnten. In **Abbildung 38** wird die Zuordnung der Signale im Spektrum gezeigt, welche der Zuordnung von Wiesneth entspricht (Wiesneth, 2019). Eine HRESIMS-Messung ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von *m/z* 577,1358 [M-H]⁻ und bestätigt so das Vorliegen eines im B- und E-Ring dihydroxylierten dimeren Proanthocyanidins.

Das erhobene CD-Spektrum (**Abbildung 39**) entspricht dem von Barrett et al., wobei der ausgeprägte negative Cotton-Effekt auf eine 4 α →8-Verknüpfung der beiden Untereinheiten hindeutet (Barrett et al., 1979).

Procyanidin B3 ist in der Vergangenheit aus verschiedenen Weiden-Arten isoliert worden (Hsu et al., 1985; Jürgenliemk et al., 2007; Ramos et al., 2019; Wiesneth et al., 2015). Dies ist jedoch der erste Bericht einer Isolierung aus der Rinde von *Salix cinerea* L..

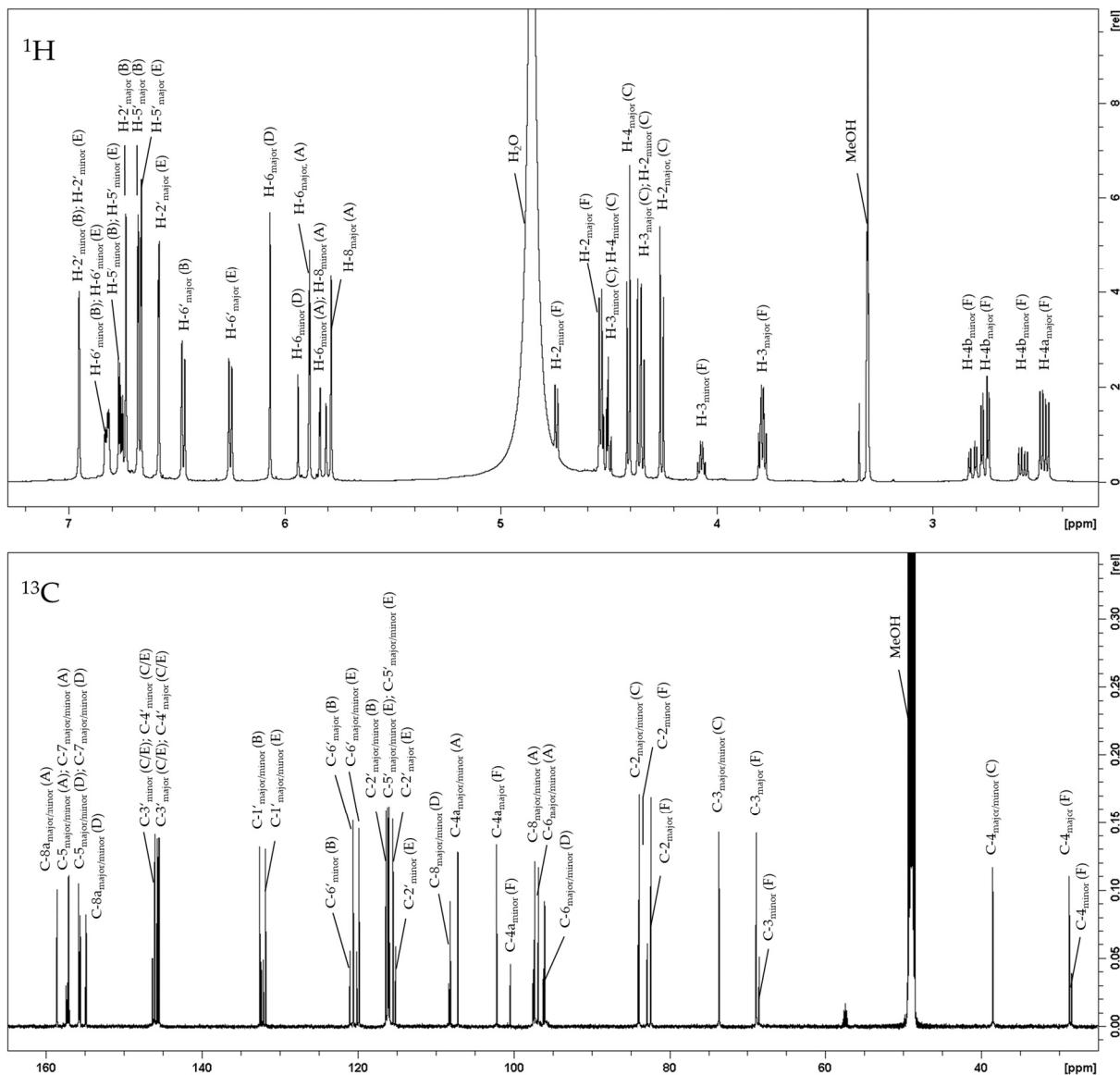


Abbildung 38: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 11**; ¹H- (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten), 400,30 bzw. 100,66 MHz, 233 K (CD₃OD)

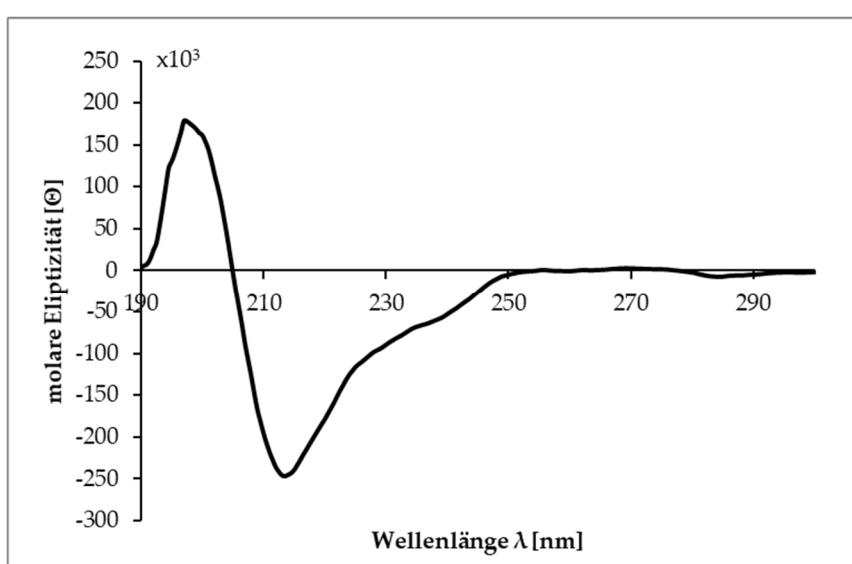
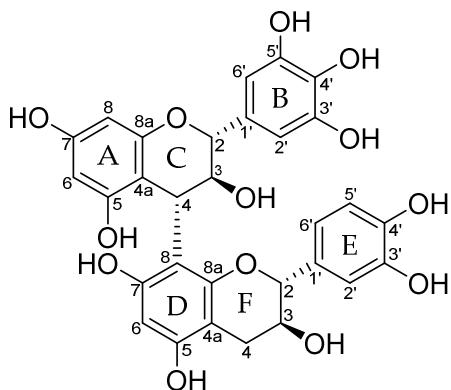


Abbildung 39: CD-Spektrum der **Substanz 11** (MeOH)

3.5.3.7. Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin (Substanz 12)

Name:	Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin Prodelphinidin C* Prodelphinidin B3*
Fraktion:	SdII9M4
Auswaage:	125,2 mg
Aussehen:	beige-braunes Pulver
[α] _D ²⁵ :	-152,7 (c 1,0 g/l)
λ_{max} :	205,0 nm (c 0,1 MeOH), 282,0 nm**;
CD:	c 175 μ mol/l
HRESIMS:	<i>m/z</i> 593,1306 [M-H] ⁻ (berechnet: C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃ ; 593,1301)

Tabelle 37. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der **Substanz 12** (400,30 bzw. 100,66 MHz, CD₃OD, 233 K; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, m Multiplett).

Nr.	δ_H	δ_C
1 _C		
2 _C	84,1 + 84,2	4,23 + 4,30 (1H, d, 9,4/1H, d, 8,8)
3 _C	73,4 + 73,5	4,36 + 4,51 (1H, dd 8,0, 9,6/ 1H, m)1
4 _C	38,6 + 38,4	4,43 + 4,45 (1H, d, 8,3/1H, d, 8,3)
4 _{A_A}	107,1 + 107,1	-
5 _A	155,6 + 155,6	-
6 _A	97,3 + 97,5	5,91 + 5,85 (1H, d, 1,1/1H, d, 1,7)
7 _A	157,0 + 156,9	-
8 _A	96,9 + 97,5	5,75 + 5,82 (1H, d, 1,7/1H, d, 1,7)
8 _{A_A}	158,5 + 158,5	-
1 _B	131,6 + 131,5	-
2 _B	108,3 + 108,3	6,36 + 6,53 (2H, s/2H, s)
3 _B	146,4 + 146,6	-
4 _B	134,1 + 134,1	-
5 _B	146,4 + 146,6	-
6 _B	108,3 + 108,3	6,36 + 6,53 (2H, s/2H, s)
1 _F		
2 _F	81,9 + 82,8	4,66 + 4,76 (1H, d, 6,6/1H, d, 7,2)
3 _F	68,5 + 68,5	3,84 + 4,09 (1H, m/ 1H, m)
4 _F	27,7 + 28,3	2,50 + 2,59 (1H, dd, 7,4, 16,2/1H, dd, 7,7, 16,5)
		2,67 + 2,82 (1H, dd, 5,0, 16,0/1H, dd, 5,3, 16,2)
4 _{AD}	101,6 + 100,4	-
5 _D	155,6 + 155,7	-
6 _D	96,0 + 97,4	6,07 + 5,95 (1H, s/1H, s)
7 _D	156,9 + 157,1	-
8 _D	107,8 + 107,8	-
8 _{A_D}	154,4 + 154,9	-
1 _E	131,8 + 132,1	-
2 _E	115,1 + 115,1	6,52 + 6,98 (1H, d, 1,7/1H, d, 2,2)
3 _E	145,2 + 146,0	-

Fortsetzung Tabelle 37

Nr.	δ_H	δ_C
4' _E	145,5 + 146,0	-
5' _E	116,3 + 116,1	6,61 + 6,76 (1H, d, 8,3/1H, d, 8,3)
6' _E	119,5 + 120,1	6,11 + 6,83 (1H, dd, 2,2, 8,3/1H, dd, 2,2, 8,3)

* Beide Namen sind für diese Struktur in der Literatur zu finden, sind jedoch nicht eindeutig

** lokales Maximum

Substanz 12 eluierte in Fraktion SdII9 bei der Auftrennung an Sephadex[®] LH-20 (3.2.4, S. 24). Die Fraktionierung an MCI-Gel[®] CHP20P per Flash-Chromatographie (3.2.5, S. 25) isolierte Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin als Fraktion M4. Die Auswaage der Fraktion SdII9M4 betrug 125,2 mg.

Eine HRESIMS-Messung ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 593,1306 [M-H]⁻. Dies ergibt C₃₀H₂₆O₁₃ als Summenformel, welche ein Sauerstoffatom mehr enthält als Procyanidin B3 (3.5.3.6, S. 80). Die bei Raumtemperatur erhobenen NMRspektroskopischen Daten (Tabelle 37) stimmen mit denen von Fujii et al. (2013) überein, die Zuordnung der Signale ist kongruent mit Schwindl (2020) und in Abbildung 40 gezeigt. Die CD-spektroskopischen Daten (Abbildung 41) sind kongruent mit denen von Esatbeyoglu et al. (2014), die polarimetrischen mit Fujii et al. (2013). Analog zur Argumentation zu Procyanidin B3 (3.5.3.6, S. 80) führt dies zur Annahme, dass es sich bei SdII9M4 um Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin handelt.

Bate-Smith berichtete schon 1975 von Prodelphinidinen in *Salix cinerea* L.. Dabei wurde festgestellt, dass in *S. cinerea* Prodelphinidine einen größeren Anteil besaßen als Procyanidine, die ebenfalls festgestellt wurden. Eine Isolierung von Prodelphinidinen wurde jedoch nicht berichtet (Bate-Smith, 1975).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Bezeichnungen für die isolierte Substanz Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin. Zum einen wird sie als Prodelphinidin B3 bezeichnet, eine Bezeichnung die auch durch Gallocatechin-(4 α →8)-Gallocatechin belegt ist (Fujii et al., 2013; Schwindl et al., 2017). Aus *S. caprea* wurde die Substanz von Foo und Porter (1978) als Prodelphinidin B6 isoliert und aufgeklärt. Zum anderen ist der Name Prodelphinidin C zu finden, wobei bei den analogen Procyanidinen die C-Reihe homogene Trimere bezeichnet

(bspw. PC C1, C2 und C4 in SciFinder[®]) (Mulkay et al., 1981). Daher wird im Rahmen dieser Arbeit die Bezeichnung Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin oder GC-(4 α →8)-C benutzt.

Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal aus *Salix cinerea* L. isoliert.

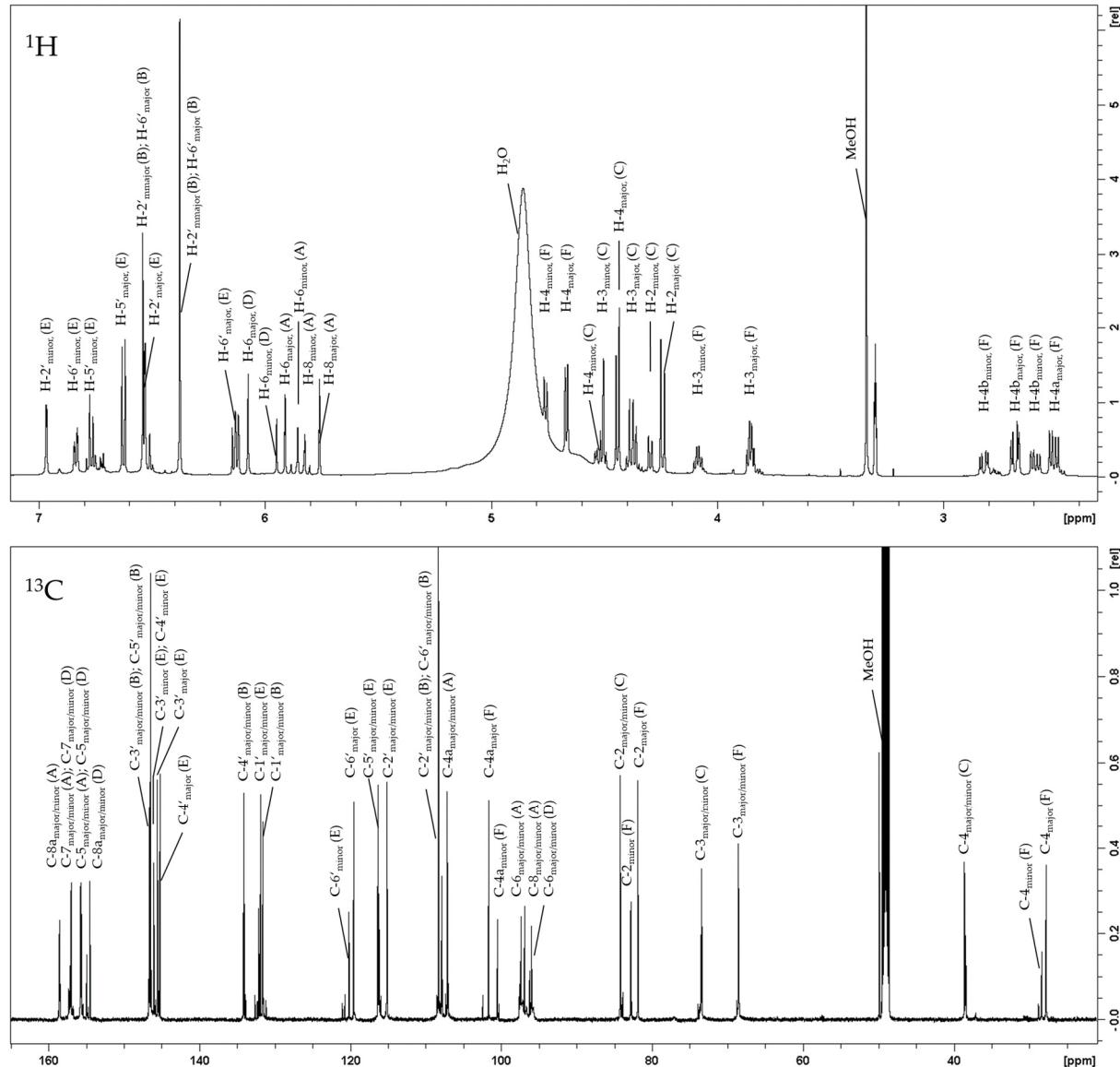


Abbildung 40: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 12** (Prodelphinidin B3); ^1H - (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten), 400,30 bzw. 100,66 MHz, 233 K (CD_3OD)

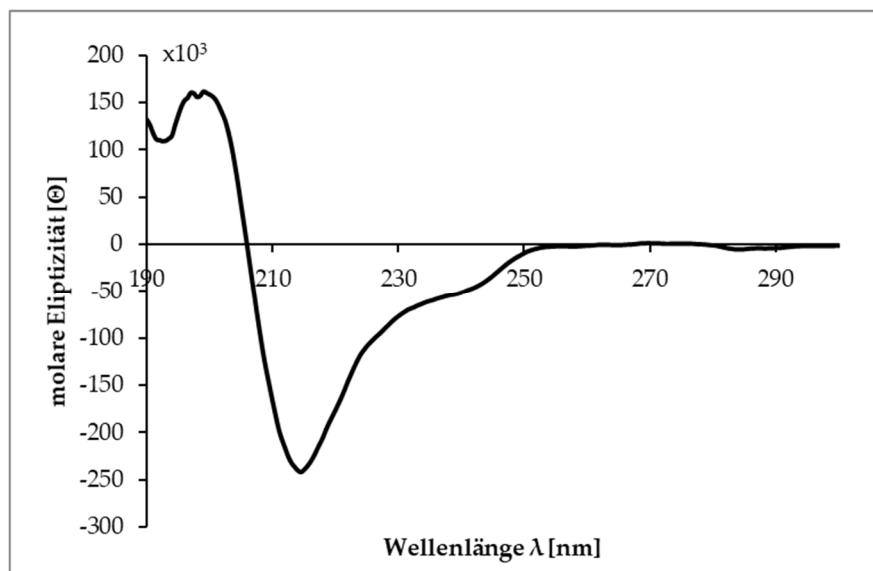
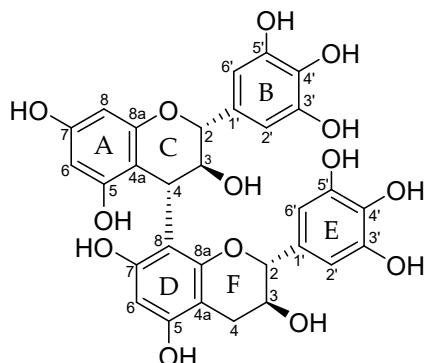


Abbildung 41: CD-Spektrum der Substanz 12 (MeOH)

3.5.3.8. Gallocatechin-(4 α -8)-Gallocatechin (Substanz 13)

Name:	Gallocatechin-(4 α -8)-Gallocatechin, Prodelphinidin B3*
Fraktion:	SdII10M2
Auswaage:	27,9 mg
Aussehen:	beige-braunes Pulver
$[\alpha]_D^{25}$:	-267,4 (c 1,0 g/l)
λ_{max} :	209,0 nm (c 0,1 MeOH)
CD:	c 175 $\mu\text{mol/l}$
HRESIMS:	m/z 609,1261 [M-H] $^-$ (berechnet: $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{14}$; 609,1250)

Tabelle 38. ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der **Substanz 13** (400,30 bzw. 100,66 MHz, CD_3OD , 233 K; δ in ppm, J in Hz, s Singulett, d Dublett, t Triplet, m Multiplett).

Nr.	δ_H	δ_C
1 _C		
2 _C	82,8 + 82,8	4,15 + 4,25 (1H, d, 9,5/1H, ol)
3 _C	72,3 + 72,3	4,27 + 4,45 (1H, t, 9,6/1H, dd, 8,5, 14,0)
4 _C	37,2 + 37,1	4,35 + 4,46 (1H, d, 7,9/1H, s)
4 _{aA}	106,0 + 106,0	
5 _A	155,6 + 156,0	
6 _A	96,0 + 94,9	5,83 + 5,80a (1H, d, 2,2/1H, d, 2,4)
7 _A	155,6 + 156,0	
8 _A	95,5 + 96,2	5,70 + 5,77a (1H, d, 2,2/1H, d, 2,4)
8 _{aA}	157,1 + 157,4	
1' _B	130,2 + 130,2	
2' _B	106,9 + 107,1	6,32 + 6,49 (2H, s/2H, s)
3' _B	145,1 + 145,3	
4' _B	132,6 + 132,8	
5' _B	145,1 + 145,3	
6' _B	106,9 + 107,1	6,32 + 6,49 (2H, s/2H, s)
1 _F		
2 _F	81,1 + 81,4	4,50 + 4,70 (1H, d, 7,0/1H, d, 6,6)
3 _F	67,0 + 67,1	3,81 + 4,00 (1H, m/1H, m)
4 _F	26,6 + 26,5	2,44 + 2,53 (1H, dd, 7,3, 16,1/1H, dd, 7,3, 16,1)
		2,67 + 2,72 (1H, dd, 5,7, 16,7/1H, dd, 5,3, 16,3)
4 _{aD}	100,6 + 98,9	
5 _D	154,3 + 154,3	
6 _D	94,6 + 96,0	6,02 + 5,89 (1H, s/1H, s)
7 _D	155,4 + 154,5	
8 _D	106,9 + 106,9	
8 _{aD}	153,4 + 153,4	
1' _E	130,0 + 130,2	
2' _E	106,3 + 105,7	6,01 + 6,46 (2H, s/2H, s)
3' _E	144,8 + 145,4	
4' _E	132,6 + 132,5	
5' _E	144,8 + 145,4	
6' _E	106,3 + 105,7	6,01 + 6,46 (2H, s/2H, s)

* Die Bezeichnung Prodelphinidin B3 ist uneindeutig wird daher im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet (vgl. 3.5.3.7, S. 83)

Substanz 13 eluierte bei Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 (3.2.4, S. 24) in Fraktion SdII10. Anschließende Fraktionierung an MCI-Gel® CHP20P per Flash-Chromatographie (3.2.5, S. 25) ergab als zweite Fraktion SdII10M2. Die Auswaage der Fraktion SdII10M2 betrug 27,9 mg.

HRESIMS-Messung ergab bei negativer Ionisierung eine Masse von m/z 609.1261 [M-H]⁻ und eine Summenformel von C₃₀H₂₆O₁₄, welche ein dimeres Proanthocyanidin mit trihydroxyliertem B- und E-Ring nahelegt.

Die Strukturaufklärung stützt sich auf die NMR-Spektren, welche bei Raumtemperatur aufgenommen wurden. Die NMR-Signale der freiphenolischen Substanz sind in **Tabelle 38** aufgeführt. In **Abbildung 42** sind die NMR-Spektren und die Zuordnung der Signale gezeigt. Diese deckt sich mit der von Sun et al. (1987).

Das in **Abbildung 43** gezeigte CD-Spektrum, sowie der ermittelte Drehwert ($[\alpha]_D^{25}$: 267,4) deckt sich mit den Daten von Petereit et al. (1991), weshalb auf eine 4 α →8-Verknüpfung der beiden Gallocatechin-Einheiten geschlossen wird.

Daraus ergibt sich, dass es sich bei **Substanz 13** um Gallocatechin-(4 α →8)-Gallocatechin handelt. Obgleich Bate-Smith von Prodelphinidinen in *Salix cinerea* berichtete (Bate-Smith, 1975), konnte bei der Literaturrecherche (SciFinder²) kein Bericht über die Isolierung von Gallocatechin-(4 α →8)-Gallocatechin aus *Salix* gefunden werden. Damit stellt dies die erste Isolierung dieser Substanz im Genus *Salix* dar.

² <https://scifinder-n.cas.org/>, Suche durchgeführt am 20.10.2024, Suchbegriffe: „78362-05-7“ (+„*Salix*“/„willow“) und „214914-94-0“ (+„*Salix*“/„willow“), ebenso eine gezeichnete Struktur ohne Berücksichtigung der Stereochemie (Gallocatechin-(4→8)-Gallocatechin) (+„*Salix*“) sowie „Prodelphinidin B3“ (+„*Salix*“/„willow“)

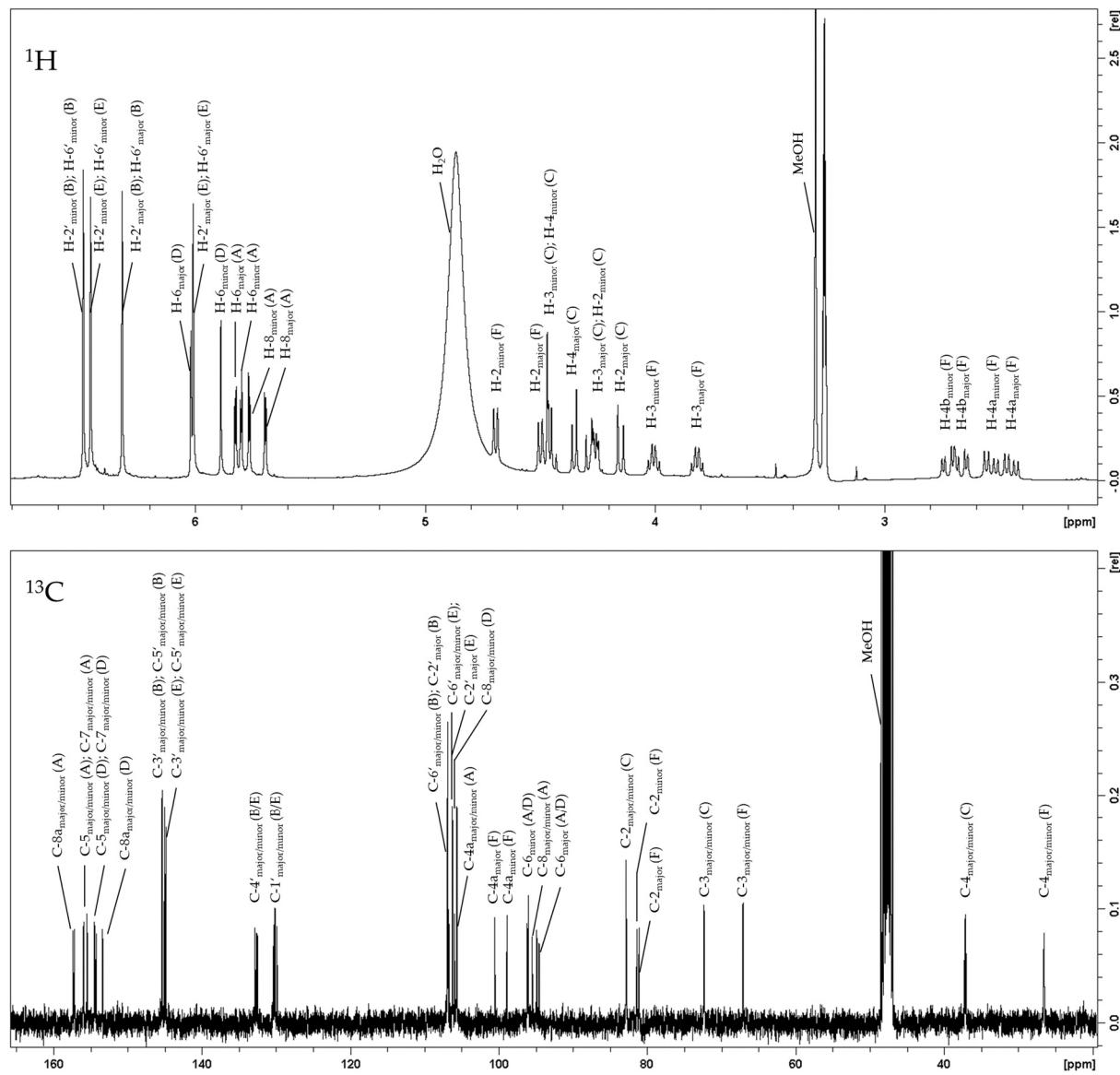


Abbildung 42: NMR-Spektren und Signalzuordnung von **Substanz 13**; ^1H - (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten), 400,30 bzw. 100,66 MHz, 233 K (CD_3OD)

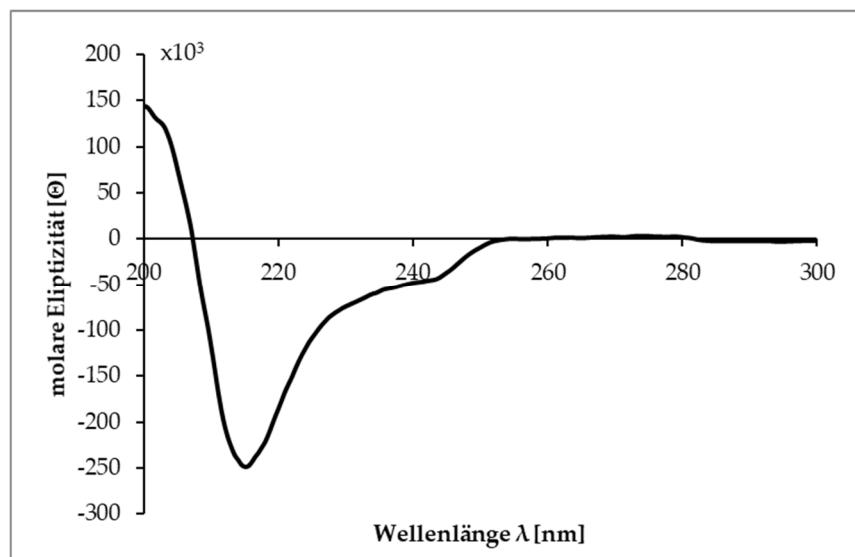


Abbildung 43: CD-Spektrum der Substanz 13 (MeOH)

3.6.NMR-Untersuchung der Fraktionen polymerer Proanthocyanidine im Jahresverlauf

Ziel des Isolierungsprojekts war neben der Strukturaufklärung phenolischer Inhaltsstoffe von *S. cinerea* auch eine Charakterisierung der Proanthocyanidin-Faktion der methanolischen Weidenrindenextrakte im Jahresverlauf. Da die Isolierung oligomerer Proanthocyanidine aufgrund der zu geringen Ausgangsmenge an Drogenmaterial bereits bei Trimeren an die Grenzen der methodischen Machbarkeit stieß, wurde eine zuvor gut erprobte Methode zur Charakterisierung der Polymerfraktionen angewandt. Dazu wurden die drei unter 3.2.4 beschriebenen Fraktionen polymerer Proanthocyanidine (SdIpPA, SdIIpPA und SdIIIpPA) per NMR-Spektroskopie untersucht. Diese Methodik wurde in früheren Arbeiten entwickelt und in der Untersuchung von PAs etabliert (Czochanska et al., 1980; Eberhardt & Young, 1994; Newman et al., 1987; Porter et al., 1982; Sun et al., 1987) und analog zu Jürgenliemk et al. (2007) und Wiesneth et al. (2015) durchgeführt. Dazu wurden jeweils ca. 200 mg der Fraktionen in 0,6 ml MeOD-d₄ gelöst und bei Raumtemperatur einem ¹³C-Experiment unterzogen (100,61 MHz, 24k-30k Scans). Dabei wurden Informationen zum mittleren Polymerisationsgrad, der Verteilung von 2,3-*cis* zu 2,3-*trans* konfigurierten Flavan-3-olen sowie dem Anteil von trihydroxylierten Einheiten an der Gesamtfraktion erwartet. Berechnet wurden die Anteile anhand eines Vergleichs der Integrale der in **Abbildung 44** dargestellten Spektren (Übersicht der Zuteilung in **Abbildung 45** und Integrale in **Tabelle 39**). Gezeigt sind die die Spektren der pPA-Faktion vom Juni 2020 in schwarz, vom August 2020 in rot und vom Oktober 2020 in blau (von unten nach oben).

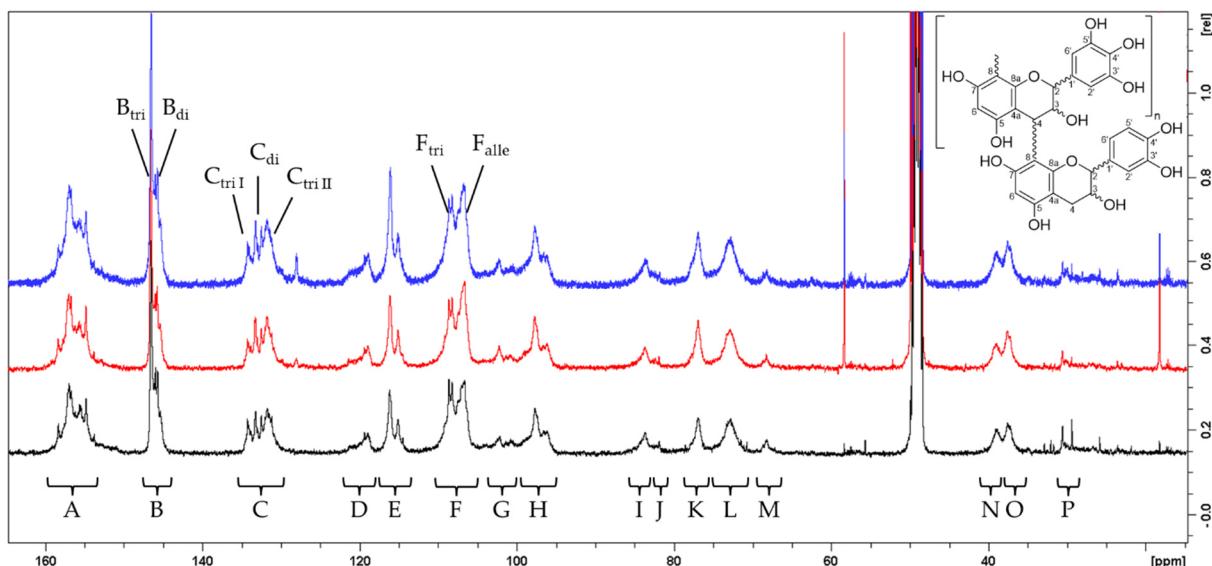


Abbildung 44: ^{13}C NMR Spektren dreier pPA-angereicherter Fraktionen einer *Salix cinerea* zu drei unterschiedlichen Erntezeitpunkten (Juni schwarz, August rot, Oktober blau dargestellt), 100 MHz, MeOD-d₄, 24k-30k Scans; A: C-5/C-7/C-8a; B: C-3'/C-4' (Procyanidin-Einheiten, PC) u. C-3'/C-5' (Prodelphinidin-Einheiten, PD); C: C-1' u. C-4' (PD); D: C-6' (PC); E: C-2'/C-5' (PC); F: C-8_{substituiert} u. C-2'/C-6' (PD); G: C-4a; H: C-6 unsubstituiert /C-8unsubstituiert; I: C-2 der 2,3-*trans* Kettenglieder; J: C-2 der 2,3-*trans* konfigurierten terminalen Einheiten; K: C-2 der 2,3-*cis* Einheiten; L: C-3 der Kettenglieder; M: C-3 der Endeinheiten; N: C-4 der Kettenglieder bei 2,3-*trans*-Konfiguration; O: C-4 der Kettenglieder bei 2,3-*cis*-Konfiguration; P: C-4 der terminalen Einheiten; Btri, Bdi, Ctri, Cdi, Ftri und Falle für die Abschätzung des Anteils trihydroxylierter Flavan-3-ole geteilte Integrale.

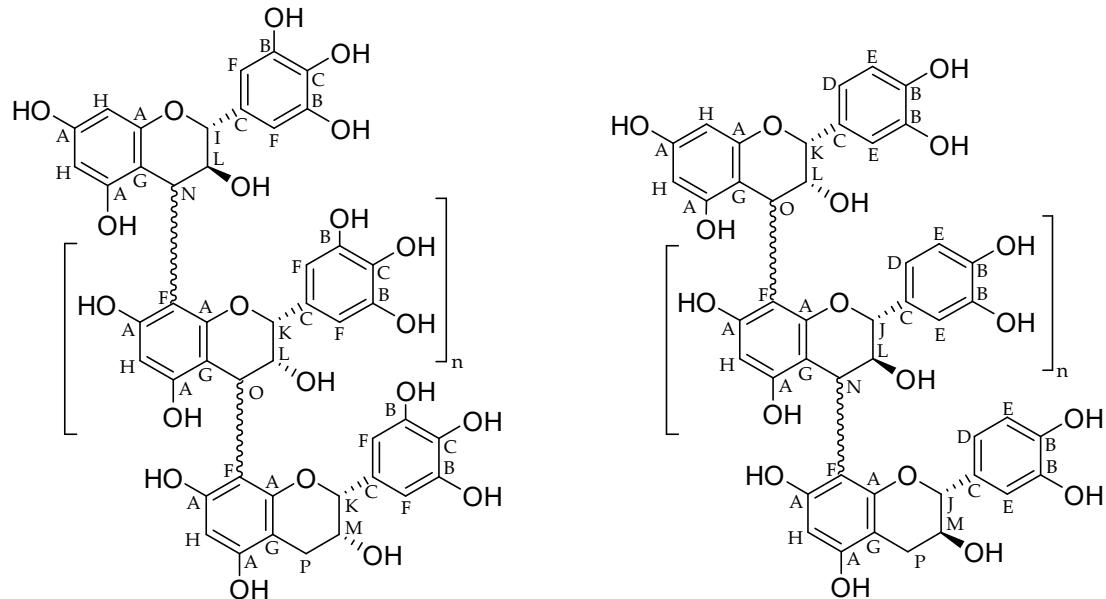


Abbildung 45: Zuteilung der in **Abbildung 44** gezeigten Integrale anhand beispielhafter Proanthocyanidin-Strukturen

Tabelle 39: Integrale und Verschiebungsgrenzen der in **Abbildung 44** (S. 91) gezeigten Bereiche der ^{13}C -Spektren polymerer Proanthocyanidin-Fraktionen (Erntezeitpunkte Juni, August und Oktober).

Integralbereich	Juni	August	Oktober	Integral
A (150,5-160,5 ppm)	2,9543	2,4990	2,9649	
B _{tri} (146,1-147,1 ppm)	1,1276	1,0441	1,0816	
B _{di} (144,7-146,1 ppm)	0,9709	0,785	0,9544	
C _{tri I} (133,6-134,7 ppm)	0,3152	0,2477	0,2792	
C _{di} (132,2-133,6 ppm)	0,5187	0,5215	0,5666	
C _{tri II} (130,0-132,2 ppm)	0,8314	0,7604	0,8492	
D (118,0-122,0 ppm)	0,4864	0,4542	0,5373	
E (114,0-117,0 ppm)	1,0051	0,9541	1,1966	
F _{tri} (107,8-109,5 ppm)	1,1459	0,9808	1,0427	
F _{alle} (105,7-107,8 ppm)	1,5510	1,5007	1,4758	
G (100,0-103,0 ppm)	0,4538	0,4436	0,4413	
H (95,0-99,5 ppm)	1,2617	1,2077	1,1379	
I (82,5-85,5 ppm)	0,3880	0,3582	0,3368	
J (81,5-82,5 ppm)	0,0911	0,0713	0,0649	
K (76,0-78,5 ppm)	0,5406	0,6144	0,6141	
L (75,0-70,5 ppm)	1,0000	1,0000	1,0000	
M (69,0-67,0 ppm)	0,1643	0,1208	0,1050	
N (38,2-41,0 ppm)	0,4263	0,3871	0,4076	
O (35,5-38,2 ppm)	0,5436	0,5493	0,5497	
P (26,0-31,0 ppm)	0,3667	0,1959	0,2980	

Zur Abschätzung des mittleren Polymerisationsgrades (mDP) wurden analog zu Czochanska et al. (1980), Eberhardt & Young (1994), Jürgenliemk et al. (2007) und Newman et al. (1987) die Integrale „L“ und „M“ herangezogen, welche jeweils die C-3 Atome der verlängernden Ketteneinheiten bzw. der terminalen Flavan-3-ol-Einheit repräsentieren. Wiesneth et al. (2015) verwendeten die Integrale der Terminalen C-4 Atome, welche N, O und P entsprechen, was jedoch aufgrund der niedrigen Intensität der Signale und der damit einhergehenden unzuverlässigen Integrierbarkeit nicht möglich war.

Aus dem Vergleich der Integrale der C-3 Atome ergaben sich folgende Werte des mDP:

Tabelle 40: Anteil der terminalen Flava-3-ol-Einheiten an den gesamten verbauten Monomeren nach Erntemonat, berechnet aus dem Verhältnis der ^{13}C -NMR-Signale der jeweiligen C-3 Kerne und der sich daraus errechnende mittlere Polymerisationsgrad (mDP)

	Juni	August	Oktober
Anteil terminaler Einheiten	14%	11%	10%
mDP	7	9	11

Um die Verhältnisse von 2,3-*cis* zu 2,3-*trans* verknüpften Einheiten miteinander zu vergleichen, bieten sich zwei Bereiche des Spektrums an. So wurden die Integrale „I“ und „J“ addiert und zum Integral „K“ ins Verhältnis gesetzt, ein Vergleich der Häufigkeit der jeweiligen C-2 Kerne. Zudem wurden die Signale „N“ und „O“ verglichen, welche den Anteil jeweiliger C-3 widerspiegeln (vgl. **Abbildung 46, Tabelle 41**).

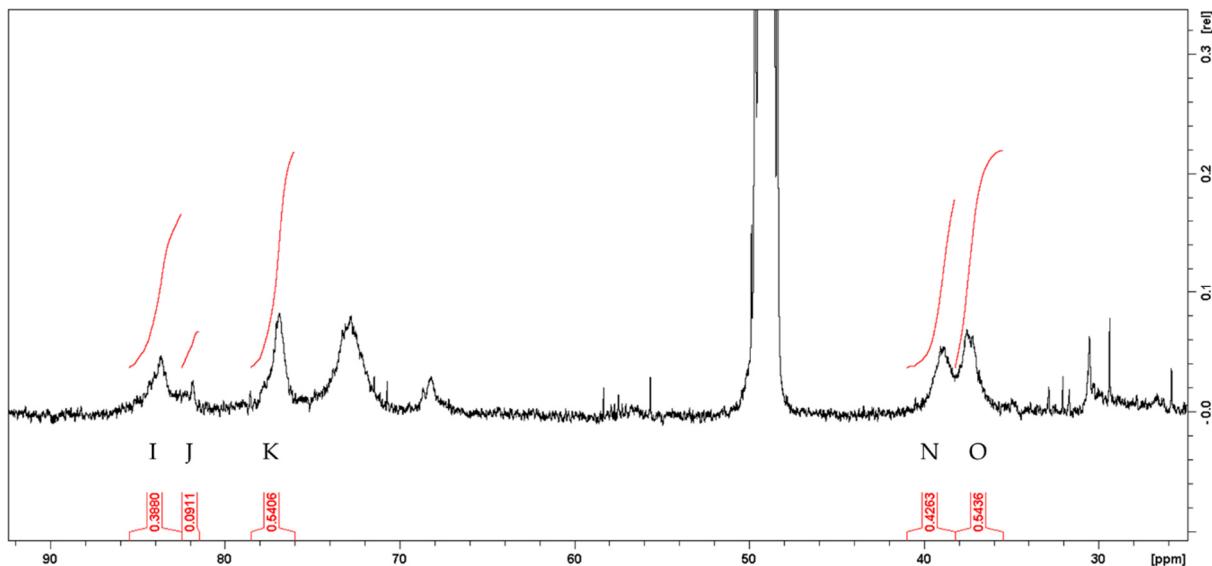


Abbildung 46: Detailausschnitt des ^{13}C -NMR-Spektrums der polymeren PA-Fraktion SdIpPA (Erntemonat Juni 2020, 100 MHz, MeOD-d₄, vgl. 3.2.4); Integrale zur Abschätzung des Verhältnisses von 2,3-*cis*- zu 2,3-*trans*-konfigurierten Flavan-3-ol-einheiten.

Tabelle 41: Anteil der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans*-konfigurierten Flavan-3-ol-einheiten an den Monomeren der Fraktionen polymerer PAs nach Erntemonat errechnet als Mittelwert der Verhältnisse I und J zu K sowie N zu O.

	Juni	August	Oktober
Anteil "2,3- <i>cis</i> " (MW)	55%	59%	59%
Anteil "2,3- <i>trans</i> " (MW)	45%	41%	41%

Der Anteil von im B-Ring trihydroxylierten Flavan-3-olen an den verbauten Monomeren wurde an unterschiedlichen Stellen der Spektren abgeschätzt. Im Folgenden werden Flavan-3-ole mit trihydroxyliertem B-Ring als triHO-Fl3ole und jene mit dihydroxyliertem B-Ring als diHO-Fl3ole bezeichnet, unabhängig von ihrer Position im PA. Die Bezeichnung als „PD-Einheit“ (Prodelphinidin-Einheit) bzw. „PC-Einheit“ (Procyanidin-Einheit), gilt strenggenommen nicht für terminale Einheiten gilt, da diese in der Proanthocyanidin-Reaktion nicht zu den entsprechenden Cyanidinium-Kationen abgebaut werden (Porter et al., 1986). Zur Bestätigung und Festlegung geeigneter Bereiche des Spektrums (vgl. Wiesneth et al., 2015) werden das Spektrum der Fraktion SdIpPAs, Substanz SdII9M4 (Prodelphinidin B3, 3.5.3.7, S. 83) SdII10M2 (Gallocatechin-(4 α - \rightarrow 8)-Gallocatechin, 3.5.3.8, S. 87) sowie von SdII8M4

(Procyanidin B1, 3.5.3.5, S. 77) verglichen (Abbildung 47). Dabei zeigen sich drei geeignete Bereiche des Spektrums in denen sich ein Vergleich von diHO-Fl3ole zu triHO-Fl3ole anbietet. Im Integral „B“ ist ein separates Integrieren von C-3'/5' der triHO-Fl3ole und jenen von C-3'/4' der diHO-Fl3ole möglich. Ebenso bieten sich die Signale im Bereich „C“ an, in welchem C-4' der triHO-Fl3ole und C-1' aller Monomere Signale erzeugen. Als dritte Möglichkeit ergibt sich noch eine Teilung des Bereichs „F“. Hier können die Signale von C-2'/6' (triHO-Fl3ole), von substituierter C-Atome des A-Rings getrennt werden. Als Integral der diHO-Fl3ole wurden die Bereiche „D“ und „E“ verwendet, welche ausschließlich von diHO-Fl3ole erzeugt werden (vgl. PD B3 und PC B1 in Abbildung 47). Die Berechnung erfolgte nach Normalisierung der jeweiligen Integrale und anschließender Bildung des Verhältnisses der arithmetischen Mittel (Tabelle 42).

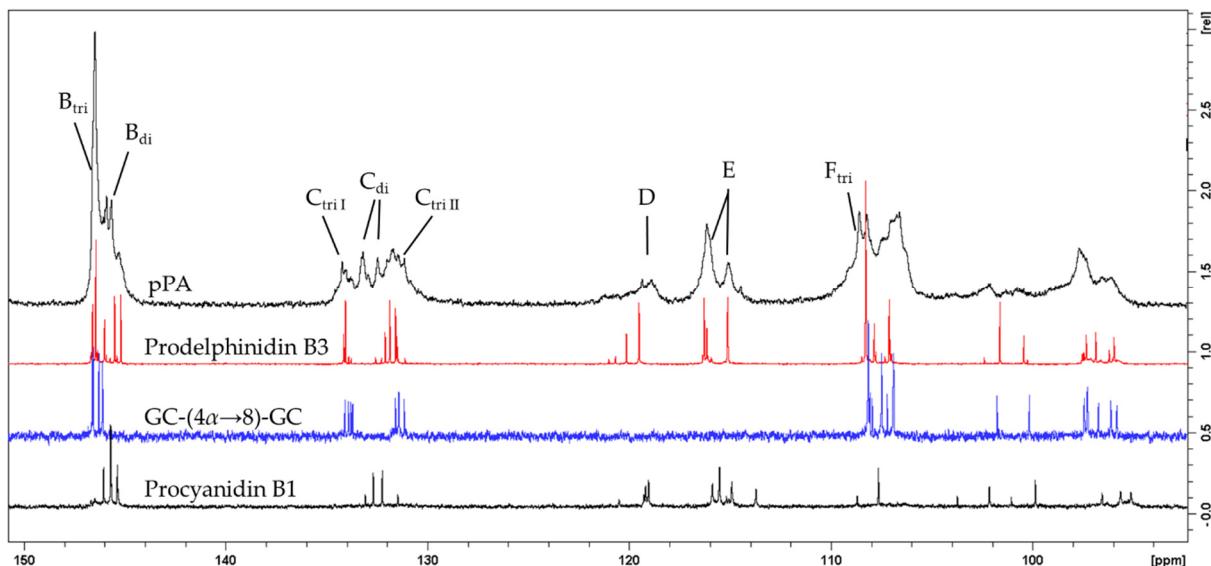


Abbildung 47: Detailausschnitt des ^{13}C -NMR-Spektrums der polymeren PA-Fraktion SdIpPA (Erntemonat Juni 2020, vgl. Abbildung 44 und 3.2.4, schwarz oben), von Prodelphinidin B3 (Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin, 2x 2,3-*trans*, rot), Gallocatechin-(4 α →8)-Gallocatechin (2x 2,3-*trans*-GC, blau) und Procyanidin B1 (Epicatechin-(4 α →8)-Catechin); für die Abschätzung der Häufigkeit der triHO-Fl3ole verwendete Integrale: $\text{B}_{\text{tri}}/\text{B}_{\text{di}}$, $\text{C}_{\text{tri I/II}}/\text{C}_{\text{di}}$, $\text{F}_{\text{tri}}/\text{D+E}$

Tabelle 42: Verhältnis der triHO-Fl3ole zu diHO-Fl3ole der Fraktionen polymerer PAs im jeweiligen Erntemonat errechnet aus dem Verhältnis der normalisierten Integrale B_{tri} zu B_{di} , $\text{C}_{\text{tri I/II}}$ zu C_{di} sowie F_{tri} zu D+E

	Juni	August	Oktober
Verhältnis triHO-Fl3ole / diHO-Fl3ole	1,14	1,11	1,01
Anteil triHO-Fl3ole	53%	53%	50%

3.7.Diskussion

Im Rahmen dieses Projekts wurden insgesamt 13 Verbindungen isoliert und deren chemische Struktur aufgeklärt. Darunter fanden sich drei verkürzte Phenylpropane: Salicin, Salicortin und Picein. Diese sind allesamt bereits in früheren Arbeiten aus verschiedenen *Salix* Spezies isoliert und auch in *Salix cinerea* L. durch chromatographische Trennung, Reaktion mit Millons Reagenz und anschließender photometrischer Bestimmung quantifiziert worden (Thieme, 1964b, 1965c). Die Salicylalkoholderivate Salicin und Salicortin sind die vermutlich bekanntesten Inhaltsstoffe der Salicaceae und waren in der Vergangenheit Gegenstand zahlreicher Studien. Dabei stellen die Derivate des Salicylalkohols einen charakteristischen Inhaltsstoff des Genus *Salix* dar (Thieme, 1963a). Salicin wurde erstmals 1828 von Buchner, Picein im späten 19. Jahrhundert von Johannson isoliert, während Salicortin erstmals 1964 von Thieme in Reinform gewonnen werden konnte (Thieme, 1963a, 1964c).

Mit den Substanzen Triandrin und Vimalin konnten weiterhin zwei Phenylpropanalkoholglykoside oder Phenolglykoside isoliert werden. Auch diese wurden erstmals von Thieme beschrieben und aus Rindenmaterial von *Salix triandra* L. bzw. *Salix viminalis* L. gewonnen (Thieme, 1963b, 1964d). Darin wird auch der Nachweis dieser Substanzen in der Rinde von *S. cinerea* erwähnt. Ob dies jedoch auf papierchromatographischen Untersuchungen beruht oder diese isoliert wurden, wird nicht deutlich. Insgesamt kann das Vorkommen der genannten Substanzen in *S. cinerea* bestätigt werden.

Die Strukturen der Flavonoide und im speziellen die der Flavan-3-ole und Proanthocyanidine waren bisher nur selten Fokus bei der Untersuchung von *S. cinerea*. Allenfalls Gesamtbestimmungen der kondensierten Gerbstoffe und Gesamtphenole wurden durchgeführt (Julkunen-Tiitto, 1986).

Als Teil dieses Projekts gelang die Isolierung des Flavanonols Ampelopsin bzw. Dihydromyricetin, welches einen typischen Inhaltsstoff von *Salicis cortex* darstellt (Wichtl et al., 2015), über dessen Isolierung aus *Salix cinerea* jedoch bisher kein Bericht gefunden wurde.

Zudem wurden die monomeren Flavan-3-ole Catechin und Gallocatechin isoliert, wobei große Mengen (+)-Catechin (8-20%) für die Droge bestimmt wurden (Wichtl et al., 2015).

Diese Arbeit stellt den ersten Bericht über die Isolierung von Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester (HCH-Catechin) aus *Salix cinerea* dar. Es ist der erst dritte Bericht über die Isolierung dieser Substanz, nach Hsu et al. (1985) aus *S. sieboldiana* und

Jürgenliemk et al. (2007) aus *S. purpurea*. HCH-Catechin ist in verschiedenen Spezies des Genus *Salix* verbreitet (Wiesneth, 2019, pp. 217–218). Die 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure-Seitengruppe, welche auch Teil der weit verbreiteten Salicylalkoholderivate Salicortin und Tremulacin ist, legt die Frage nach einem möglichen Beitrag zur pharmakologischen Wirksamkeit der Weidenrinde nahe. Es konnten ca. 30 mg HCH-Catechin isoliert werden, was einer Konzentration von 0,1% im hier verwendeten Extrakt (233.2.2, S. 23) entspricht. Da die durchgeführte Isolierung nicht erschöpfend sein konnte, kann diese Betrachtung nur als eine vorsichtige Schätzung einer Konzentration im vorliegenden Extrakt angesehen werden. Um eine mögliche pharmakologische Wirkung näher zu untersuchen, wurde die Substanz weiter aufgereinigt (3.4.5.4, S. 47) und einer *in vitro* Testung unterworfen (Abschnitt 4, ab S. 99).

Des Weiteren wurden zwei dimere Proanthocyanidine isoliert. Procyanidin B1 (Epicatechin-(4 β →8)-Catechin) stellt ein häufig vorkommendes dimeres Procyanidin in *Salicis* cortex dar (Pobłocka-Olech & Krauze-Baranowska, 2008). Procyanidin B3 (Catechin-(4 α →8)-Catechin) ist ebenso ein in Weidenrinde weit verbreitetes dimeres Procyanidin. Für beide Substanzen ist dies der erste Bericht über eine Isolierung aus *S. cinerea*.

Eine Isolierung gelang auch für zwei dimere Prodelphinidine: PD B3 (Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin) sowie Gallocatechin-(4 α →8)-Gallocatechin (GC-4 α →8-GC) wurden zum ersten Mal aus *S. cinerea* isoliert. Für GC-(4 α →8)-GC ist dies nach sorgfältiger Literaturrecherche (SciFinder^{®3}, GoogleScholar⁴) der erste Bericht einer Isolierung für den gesamten Genus *Salix*. Die Fähigkeit von *S. cinerea* zur Bildung von Prodelphinidinen und stärkere Neigung zu ebendiesem Verhalten wurde in einer vergleichenden Studie durch Bate-Smith für die Blattdroge beschrieben (Bate-Smith, 1975). Diese Aussage wurde anhand chromatographischer Untersuchungen getroffen. Bate-Smith beschreibt unter Verweis auf ältere Untersuchungen (Jay, 1967, 1969) eine Möglichkeit, die Anteile von Procyanidinen zu Prodelphinidinen über das UV-Maximum abzuschätzen. Leider werden dafür keine Werte angegeben, sodass die genannte Studie keine Aussage zu *S. cinerea* ermöglicht.

³ <https://scifinder-n.cas.org/>, Suche durchgeführt am 20.10.2024,
Suchbegriffe: „78362-05-7“ (+„*Salix*“/„willow“) und „214914-94-0“ (+“*Salix*“/„willow“), ebenso eine gezeichnete Struktur ohne Berücksichtigung der Stereochemie (Gallocatechin-(4→8)-Gallocatechin) (+„*Salix*“) sowie “Prodelphinidin B3” (+„*Salix*“/„willow“)

⁴ <https://scholar.google.de/>, Suche durchgeführt am 20.10.2024,
Suchbegriffe: „78362-05-7, *Salix*, willow“, „214914-94-0, *Salix/willow*“ und „*Salix* “Gallocatechin*gallocatechin”“

Um das Ausmaß der Prodelphinidin-Bildung in *S. cinerea* zu untersuchen, wurde ein ^{13}C -NMR-Experiment durchgeführt. Die Charakterisierung der Fraktion polymerer Proanthocyanidine per ^{13}C -NMR-Spektroskopie ergab mit 50-53% einen hohen Anteil an triHO-Fl3olen, vergleicht man diese Ergebnisse mit der Literatur (Jürgenliemk et al., 2007; Wiesneth et al., 2015), welche nur geringe Mengen bzw. keinen Hinweis auf Prodelphinidine feststellen konnten. Das Vorkommen von Prodelphinidinen überrascht in diesem Falle nicht, als auch mehrere Vertreter dieser Substanzklasse isoliert werden konnten. Auch Foo & Porter (1978) konnten das Vorkommen von Prodelphinidinen in *Salix caprea* nachweisen. Die nahezu ausgewogene Verteilung von di- und trihydroxylierten Vertretern ist dennoch ein bemerkenswerter Befund und bestätigt die Ergebnisse von Bate-Smith (1975) aus dem Jahre 1975, der einen bedeutenden Anteil von Prodelphinidinen in Extrakten aus Blättern von *Salix cinerea* feststellte.

Des Weiteren ergab die Untersuchung einen leichten Überschuss 2,3-*cis*-konfigurierter Monomere (55-59%) im PA-Gemisch. Während der Isolierungsarbeiten dieser Arbeit konnten ausschließlich die 2,3-*trans*-konfigurierten Monomere Catechin und Gallocatechin isoliert werden. Für die 2,3-*cis*-konfigurierten Epicatechin und Epigallocatechin war dies jedoch nicht möglich, auch konnte an der analytischen HPLC im Verlauf des Isolierungsprozesses kein dem Epicatechin entsprechender Peak identifiziert werden, obwohl diese annähernd die Hälfte der Kettenglieder der PA-Fraktion zu bilden scheinen. Als einziger Vertreter konnte Procyanidin B1 mit einer Epicatechin-Einheit isoliert werden.

Während die Verteilung der Hydroxylierungsstruktur im B-Ring, sowie die Konfiguration zwischen C-2 und C-3 des C-Rings über die drei Erntezeitpunkt (Beginn, Höhepunkt und Ende der Wachstumssaison) mit einer Schwankung von ca. 10% konstant blieben, zeichnete sich bei der Betrachtung des mittleren Polymerisationsgrads (mDP) ein Trend ab. Der Polymerisationsgrad betrug zu Beginn der Wachstumssaison etwa 7 und stieg auf zuletzt durchschnittlich 11 Einheiten an. Damit liegen die Werte zwischen denen für *Salix purpurea* (mDP 4-5) (Jürgenliemk et al., 2007) und *Salix daphnoides* (mDP 12) (Wiesneth et al., 2015) berichteten, welche auf gleiche Weise erhoben wurden. Allerdings ist über den Erntezeitpunkt des benutzten Drogenmaterials keine Information verfügbar, was eine Einordnung und den Vergleich mit den hier berichteten Werten erschwert. Der beobachtete Trend über die Wachstumssaison hin zu steigenden Kettenlängen der gebildeten

Proanthocyanidine kann aufgrund der aufwendigen Probenbereitung und der damit einhergehenden Einmalbestimmung je Erntezeitpunkt nur postuliert werden.

3.8.Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projekts war es möglich insgesamt dreizehn Substanzen zu isolieren. Zwei Salicylalkoholderivate (Salicin, Salicortin), ein weiteres verkürztes Phenylpropan (Picein), zwei Phenylpropanglycoside (Vimalin und Triandrin), ein Flavanonol (2R,3R-Dihydromyricetin), zwei Monomere Flavan-3-ole (Catechin und Gallocatechin), ein HCH-substituiertes Flavan-3-ol (Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexene-1-carboxylsäure)-ester) sowie vier dimere Proanthocyanidine (Procyanidin B1, PC B3, Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin, Gallocatechin-(4 α →8)-Gallocatechin) isoliert und die jeweilige Struktur mit Hilfe spektroskopische Methoden aufgeklärt und belegt werden.

Weiterhin konnten die Fraktionen polymerer Proanthocyanidine eines Individuums von *Salix cinerea* L. per ^{13}C -NMR-Spektroskopie charakterisiert werden und ein Vergleich dreier Erntezeitpunkte (Beginn, Mitte und Ende der Wachstumssaison) angestellt werden. Dabei konnte ein Verhältnis von 2,3-*cis*- zu 2,3-*trans*-konfigurierten von 55-59% und ein Anteil trihydroxylierter Flavan-3-ol-Einheiten von 50-53% bestimmt werden. Der mittlere Polymerisationsgrad stieg im Laufe der Wachstumsperiode von 7 auf 11 Einheiten an und deutet auf eine Abhängigkeit vom Erntezeitpunkt hin.

Nach Literaturrecherche stellt die vorliegende Arbeit eine erste systematische Untersuchung des phenolischen Inhaltsstoffspektrums in *Salix cinerea* L. unter besonderer Betrachtung der Proanthocyanidine und zur Charakterisierung der Polymerfraktion dar.

4. Pharmakologischer Teil

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wird die pharmakologische *in vitro*-Untersuchung einer aus *Salix cinerea* isolierten Substanz, dem Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester oder HCH-Catechin, beschrieben. Dabei kam ein ICAM-1 Assay als pharmakologisches Modell zur Anwendung. Dieser bildet die TNF- α vermittelte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 nach, welches *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Leukozytenmigration in entzündetes Gewebe spielt (Lawson & Wolf, 2009; Ley et al., 2007).

4.1. Hintergrund

Im Zuge des präparativ-analytischen Teils dieser Arbeit konnte HCH-Catechin (3.5.3.3) isoliert werden, welches Strukturmerkmale eines Flavan-3-ols mit denen prominenter -Salicylalkoholderivate, wie Salicortin, vereint. Gemeinsames Strukturmerkmal ist die HCH-Untereinheit (1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexenon-1-carbonsäure), welche aufgrund von Catechol-Bildung beim Zerfall von Salicylalkoholderivaten in vorangegangenen Arbeiten als deren wirksame Teilstruktur im ICAM-1 Assay identifiziert werden konnte (Knuth et al., 2011). Auch *in vivo* konnte Catechol als Metabolit nach Einnahme von Weidenrindenextrakt nachgewiesen werden (Knuth et al., 2013). Um die pharmakologischen Eigenschaften von HCH-Catechin zu untersuchen, wurde dieses einem ICAM-1 Assay unterzogen und mit unsubstituiertem Catechin verglichen. Durch diese Gegenüberstellung sollte gezeigt werden, dass die Degradation des HCH-Flavan-3-ols unter Bildung ähnlicher Metabolite, wie sie für Salicortin beschrieben wurden verläuft und dass die Aktivität der Verbindung auf die HCH-Untereinheit zurückzuführen ist.

4.2. Material und Methoden

Bei der Durchführung der Zellkulturversuche zur Untersuchung von HCH-Catechin kamen verschiedene Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien zur Anwendung, welche in **Tabelle 43** und **Tabelle 44** (S. 101) aufgeführt werden.

4.2.1. Gerätschaften und Software

Tabelle 43 Auflistung der Gerätschaften und Software, welche im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller	Ort
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Autoklav, Stand-	VE-120	Systec	Kinden, Deutschland
Autoklav, Tisch-	Melag Autoklav 23	Melag Medizintechnik	Berlin, Deutschland
FACS (Fraktionen)	FacscaliburTM	BD	Lakes, USA
	FASCDiva (Software)		
FACS (Isolate)	FACSCanto II	BD	Lakes, USA
	WinMDI 2.9 (Software)	entwickelt von Joe Trotter	
Gefrierbehälter	XC 47/11-6	Chart Industries	Burnsville, USA
Gefrierschrank (-80 °C)	Ultratiefkühlschrank, Modell 995	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland
Inkubator	AutoFlow IR Direct Heat, NU-5500 E T = 37 °C, CO2 = 5%, rel. Luftfeuchtigkeit = 90%	Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Magnetrührer	Combimag Reo Drehzahl Electronic	IKA	Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroskop	Olympus CKX41	Olympus	Tokio, Japan
Objektive	UPIanFLN 4x/0.13/PhP ∞/-/FN22 CAchN 10x/0.25/PhP ∞/- /FN22 LCAchN 20x/0.40/PhP ∞/-/FN22 LCAchN 40x/0.55/PhP ∞/-/FN22	Olympus	Tokio, Japan
Pipetten	2,5 Reference (0,1-2,5 µl) 10 Reference (2,5-10 µl) 100 Research (10-100 µl) 1000 Research (100- 1000 µl) 100 Research, 12-Kanal (10-100 µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer	Accu-jet® pro	Brand	Wertheim, Deutschland
Plattenlesegerät	Spectra FluorPlus Xfluor4 V 4.40 (Software)	Tecan	Crailsheim, Deutschland

Fortsetzung **Tabelle 43**

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller	Ort
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure	Berlin, Deutschland
Software zur Erhebung biostatistischer Daten	Microsoft Excel 2010 SPSS 28	Microsoft Corporation IBM	Redmond, USA Armonk, USA
Trockenschrank	771 364	Memmert	Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR	Darmstadt, Deutschland
Vakuumpumpe	N 811 KT.18	KNF Neuberger	Freiburg im Breisgau, Deutschland
Vortexer	VF2 Laborschüttler D 365 DL	Janke & Kunkel IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Wasserbad	WB 22	Memmert	Schwabach, Deutschland
Werkbank, steril	HeraSafe KS	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R Sepatech	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland

4.2.2. Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Tabelle 44: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Kulturmedien.

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller	Ort
Antikörper	FITC-markierter monoklonaler Mausantikörper gegen CD54 (ICAM-1), MCA1615F	Bio-Rad	Feldkirchen, Deutschland
BSA	Bovines Serum Albumin Fraktion V	PAA Laboratories	Linz, Österreich
DMSO	Dimethylsulfoxid, ≥ 99,5% für Molekularbiologie	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritzen, steril	Norm-Ject, Tuberculin, 1 ml	Henke Sass Wolf	Tuttlingen, Deutschland
FACS-Röhrchen	Polystyren Round Bottom Tube, 5 ml	Becton Dickinson	Franklin, USA
FACS-Trägerflüssigkeiten	BD FACSFlowTM BD FACSRinseTM BD FACSTM Shutdown	BD	Lakes, USA
Falcon-Tubes	15 und 50 ml, steril für die Zellkultur	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
FKS	Fetales Kälberserum Superior	Biochrom	Berlin, Deutschland
Formaldehydlösung	10%ige Formaldehydlösung, phosphatgepuffert	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Kryovials	Cryo.STM Vials, 2 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 44

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller	Ort
Kulturflaschen	75 cm ²	Greiner Bio- One	Frickenhausen, Deutschland
	150 cm ²		
Kulturmedium	EASY Endothelial Cell Growth Medium	PeloBiotech	Planegg, Deutschland
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, ~98%	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Parthenolid	≥ 97%	Calbiochem	Bad Soden, Deutschland
Pasteurpipetten	230 mm	VWR	Darmstadt, Deutschland
PBS	Dulbecco's phosphate buffer saline	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
Pipetten, serologisch	5, 10 und 25 ml, steril	Greiner Bio- One	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	0,1 - 10 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	200 µl	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
	100 - 1250 µl	VWR	Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße	0,5 ml	Greiner Bio- One	Frickenhausen, Deutschland
	1,5 ml		
VWR			Darmstadt, Deutschland
SDS	Natriumdodecylsulfat, 92,5 - 100,5%	Sigma- Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)	Wicom	Heppenheim, Deutschland
Supplement-Mix	Easy Supplement-Mix	PeloBiotech	Planegg, Deutschland
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA Lösung, x10, 0,5%/0,2%	Biochrom	Berlin, Deutschland
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α, ≥ 97%, rekombinant, human, <i>E. coli</i>	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
Zellkulturtestplatte	24-Well Platte	Greiner Bio- One	Frickenhausen, Deutschland
	96-Well Platte		
Zählkammer	Hemocytometer disposable Neubauer improved	TPP Techno Plastic Products	Trasadingen, Schweiz
		NanoEnTek	Pleasanton, USA

4.2.3. Zellen des Zellmodells (HMEC-1)

Als Zellmodell für die pharmakologische Testung von HCH-Catechin kamen HMEC-1 Zellen (Human Microvaskular Endothelial Cells) zu Anwendung. Die Verwendung der Zellen wurde dankenswerterweise von Dr. E. Ades und F.-J. Candel (CDC, Atlanta, USA) sowie Dr. T. Lawley (Emory University, Atlanta, USA) ermöglicht. Vor Verwendung wurden die Zellen auf Mycoplasmen-Kontamination getestet (negatives Ergebnis, durchgeführt durch GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland). Bei der Substanzttestung kam die zehnte Passage zur Anwendung.

4.2.4. Vorbereitungen und Standardoperationen

Soweit nicht ausdrücklich anders angegeben, wurden alle zellbiologischen Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank ausgeführt. Zur Anwendung kamen sterile sowie durch Hitze (180 °C, 3 h, Trockenschrank) oder Dampf (121 °C, 1 bar, 120 min) sterilisiertes Verbrauchsmaterial. Um den Workflow zu beschleunigen und mögliche Einflüsse durch unnötige Frier-Tau-Zyklen auf die verwendeten Lösungen zu minimieren, wurden diese, soweit möglich, vorbereitet und aliquotiert. Zur Verwendung wurden, soweit nicht anders angegeben, alle Lösungen im Wasserbad auf 37 °C temperiert.

4.2.4.1. Fetales Kälberserum (FKS)

Herstellung von 50 ml Aliquoten des FKS (Fetales Kälberserum Superior, Biochrom, Berlin, Deutschland) nach Hitzeinaktivierung (30 min im Wasserbad bei 56 °C) und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur. Die Lagerung der Aliquote erfolgte bei -20 °C, bis zur Verwendung.

4.2.4.2. Kulturmedium

Als Kulturmedium für die HMEC-1 Zellen diente EASY ECGM (Endothelial Cell Growth Medium, PeloBiotech, Planegg, Deutschland), welches mit 50 ml EASY-Supplement-Mix (ebenfalls PeloBiotech), 50 ml hitzeinaktiviertem FKS sowie einem Antimykotikum und einem Antibiotikum (Amphotericin B, Gentamicin, jeweils 50 ng/ml) versetzt wurde. Die Lagerung des Mediums erfolgte bis zur Verwendung bei 6 °C.

4.2.4.3. Trypsin/EDTA

Zur Anwendung kam eine 10%ige Verdünnung von Trypsin/EDTA Lösung (10x, 0,5%/0,2% (m/V), Biochrom, Berlin, Deutschland) in PBS. Bis zur weiteren Verwendung

wurden 50 ml große Aliquote dieser Verdünnung bei 6 °C gelagert, Verwendung fand diese Lösung bei Raumtemperatur.

4.2.4.4. MTT Stammlösung

Als Stammlösung von MTT (~98%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 4 mg/ml in PBS hergestellt und in Portionen zu 15 ml bei -20 °C gelagert. Vor Verwendung war eine Verdünnung auf eine Konzentration von 0,4 mg/ml (1:10 Verdünnung) erforderlich, welche mit Hilfe von Medium (4.2.4.2) erfolgte.

4.2.4.5. SDS-Lösung

Verwendet wurde eine 10%ige Lösung (m/V) von SDS (92,5–100,5%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in Reinstwasser (Astacus LS, MembraPure, Berlin, Deutschland). Die Lagerung der Lösung erfolgte bei Raumtemperatur in einem 1 l fassenden Standgefäß.

4.2.4.6. TNF- α Stammlösung

Zur Lagerung der TNF- α Stammlösung bei -80 °C wurden mit einer BSA-Lösung gecoatete Reaktionsgefäße verwendet (0,1% (m/V) BSA in PBS, bei 6 °C über Nacht, anschließend entleert). Die Stammlösung setzte sich aus 588 μ l der beschriebenen BSA-Lösung und 10 μ g TNF- α (\geq 97%, rekombinant, human, *E. coli*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zusammen, was einer Konzentration von 1 μ M entspricht. Unmittelbar vor der Verwendung wurde die Stammlösung 1:10 mit Medium verdünnt.

4.2.4.7. Parthenolid Stammlösung

Die Parthenolid Stammlösung wurde als 100 mM Lösung von Parthenolid (\geq 97%, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) in DMSO zubereitet und in Aliquoten von je 10 μ l bei 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine Verdünnung mit Medium in zwei Schritten (1:100 und 1:2) erfolgte unmittelbar vor Verwendung.

4.2.4.8. Kryokonservierung und In-Kulturnahme

Die dauerhafte Lagerung der hier verwendeten Zelllinie erfolgte in Kryovials unter flüssigem Stickstoff bei 196 °C in einer Mischung aus FKS, Medium und DMSO, welches als Kryoprotektivum dient. (50:42:8 (V/V)) (Schmitz, 2020).

Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, mit der zehnfachen Menge entsprechenden Kulturmediums versetzt, suspendiert und anschließend abzentrifugiert (1000 UpM, 3 min). Der Überstand wurde verworfen, anschließend das Zellpellet in 20 ml Medium suspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

Nach 24 h wurde das Anwachsen der Zellen mikroskopisch kontrolliert, diese mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt.

Ein Konservieren der Zellen erfolgte durch Kultivierung in einer großen Kulturflasche bis zur Konfluenz, der Bildung eines Monolayers. Dieser wurde nach Entfernung des Mediums mit PBS gewaschen, und wenige Minuten mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, um den Zellrasen abzulösen. Anschließende Zugabe von Medium brachte diese Reaktion zum Erliegen. Darauf folgte Zentrifugation (1000 UpM, 3 min), das Verwerfen des Überstands, Resuspension in einer Mischung aus FKS, Medium und DMSO (50:42:8 (V/V)) und das Einfrieren bei 80 °C in einer Styroporbox über 24 h. Eine Überführung in flüssigen Stickstoff erfolgte am darauffolgenden Tag.

4.2.4.9. Zellkultivierung & Passagieren

Kulturflaschen oder Testplatten mit in Kultur genommenen HMEC-1 Zellen wurden in einem AutoFlow IR Direct Heat Inkubator (Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland) bei 90% rel. Luftfeuchte, 5% CO₂-Gehalt und 37 °C inkubiert. Eine mikroskopische Kontrolle des Wachstums fand in regelmäßigen Abständen statt.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium einer konfluent bewachsenen Kulturflasche verworfen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung und anschließende Inkubation für wenige Minuten führte zum Ablösen des Zellrasens. Analog zum Vorgehen beim Einfrieren der Zellen wurde diese Reaktion durch Zugabe von Medium abgebrochen und Zentrifugiert (1000 UpM, 3 min). Das Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstands in 5 ml Medium suspendiert und ein Aliquot (1,0-5,0 ml) in 20 ml Medium gegeben. Das Passagieren der Zellen wurde alle 2-5 Tage durchgeführt.

4.2.4.10. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Zellrasen einer Kulturflasche wie zum Passagieren abgelöst und in Medium suspendiert. Einige µl der erhaltenen Zellsuspension wurden mit der dreifachen Menge Kulturmedium verdünnt (1:4, ergibt einen Verdünnungsfaktor von 4) und 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer (Hemocytometer disposable Neubauer improved NanoEnTek, Pleasonton, USA) gegeben. Die Zählung erfolgte mikroskopisch in allen vier Großquadranten und erlaubte die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter mithilfe nachfolgender Formel:

$$\text{Zellzahl } \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Anzahl der Zellen in Großquadranten}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

4.2.5. MTT Assay

Der in einer Modifikation zu Mosmann (Mosmann, 1983) durchgeführte MTT Assay soll einen möglichen zytotoxischen Effekt der untersuchten Substanz auf die verwendeten HMEC-1 Zellen zeigen. Der Versuch basiert auf der Umwandlung des gelben MTTs (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch Dehydrogenasen der Atmungskette in den Mitochondrien vitaler HMEC-1 Zellen zum korrespondierenden, blau/violett gefärbtem Formazan. Nach Lyse der behandelten Zellen erlaubt eine photometrische Vermessung des Umsetzungsprodukts eine Abschätzung der Viabilität der untersuchten Zellen und einen Vergleich mit der Viabilität von Zellen nach Inkubation mit Untersuchungslösung (Schmitz, 2020).

Die Ergebnisse dieses Assays dienten als Entscheidungsgrundlage zur Festlegung des Konzentrationsbereichs der Testsubstanzen im ICAM-1 Assay. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch zytotoxische Effekte wird somit ausgeschlossen.

Zur Durchführung des MTT-Assays wird eine konfluent bewachsene Kulturflasche wie unter 4.2.4.9 beschrieben aufbereitet, die Zellzahl ermittelt und die Suspension auf eine Zellzahl von 90 000 Zellen/ml eingestellt (4.2.4.10, S. 105). In 96-Well-Platten wurden 100 µl dieser Suspension vorgelegt (außenliegende Wells wurden zur Vermeidung von Randeffekten mit PBS beschickt) und über 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch Untersuchungslösungen ersetzt (je 100 µl, in Hexaplikaten), bzw. erneut durch Medium (Negativkontrolle, NK) oder DMSO in Medium ausgetauscht (Lösemittelkontrolle, LK, höchste verwendete Konzentration von DMSO). Nach erneuter Inkubation für 24 h wurden die Überstände entfernt und die Wells mit einer 1:10 verdünnten MTT-Lösung (4.2.4.4, Endkonzentration 0,4 mg/ml) beschickt. Eine erneute Inkubation für 3 h ermöglichte die Umsetzung zum Formazan. Die überstehende MTT-Lösung wurde abgesaugt und durch Zugabe von 100 µl SDS-Lösung (4.2.4.5, S. 104) die Zellen lysiert, wodurch ein Lösen der entstandenen Formazankristalle über Nacht (Lichtausschluss, Raumtemperatur) ermöglicht wurde.

Die photometrische Vermessung erfolgte am Folgetag bei 560 nm an einem Tecan Spectra FluorPlus (Tecan, Crailsheim, Deutschland). Die erhaltenen Absorptionswerte der Hexaplikate wurden auf die Werte der unbehandelten Kontrolle (NK) bezogen, welche einem Wert vom 100% gleichgesetzt wurden.

4.2.6. ICAM-1 Assay

Der ICAM-1 Assay dient zur Untersuchung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) und soll somit einen Aspekt der physiologischen Entzündungsreaktion abbilden. Die ICAM-1 Expression auf der Zelloberfläche von HMEC-1 Zellen wird durch Zugabe des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α über die Aktivierung von NF- κ B stimuliert. Ein fluoreszenz-markierter ICAM-1-Antikörper ermöglicht die Bestimmung der Menge an exprimierten Adhäsionsmolekül mittels Durchflusszytometrie nach 24 h (vgl. Freischmidt et al., 2012). Die Zellen einer konfluent bewachsenen Kulturflasche wurden analog zu 4.2.4.9 (S. 105) gewaschen, abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 9 ml Medium suspendiert, 3 ml der Suspension mit 10 ml Medium verdünnt und eine 24-Well-Platte mit jeweils 500 μ l pro Well beschickt. Inkubation für 48 h erlaubte die erneute Ausbildung eines Monolayers.

Die Substanzaufgabe erfolgte durch Austausch des Überstands mit je 500 μ l Substanzverdünnung (Duplikate der vier getesteten Substanzkonzentrationen beider Testsubstanzen). Die Konzentrationen der Testsubstanzen lagen im Bereich von 1075 μ M und einer maximalen Konzentration von 0,1% DMSO. Des weiteren wurden die unbehandelte Kontrolle mit 0,1% DMSO in Kulturmedium, die Negativkontrolle mit reinem Kulturmedium und die Positivkontrolle mit einer Parthenolid-Lösung (5 μ M, siehe 4.2.4.7, S. 104) versetzt. Die Stimulation mit TNF α (Endkonzentration 10 ng/ml, siehe 4.2.4.6, S. 104) erfolgte nach 30 Minuten Inkubation. Die Wells der unbehandelten Kontrolle, welche die natürliche ICAM-1-Expression der HMEC1 Zellen repräsentieren, blieben unstimuliert.

An die Stimulation schloss sich eine 24-stündige Inkubation an, anschließend wurden die Überstände entfernt, die Zelllayer mit PBS gewaschen und jedes Well mit 200 μ l Trypsin/EDTA-Lösung zur Ablösung der Zellen versetzt (4.2.4.3, S. 103). Nach 3-5 Minuten wurden die Zellen mit Hilfe einer Pipette suspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Vorgelegte Formalinlösung (100 μ l) und anschließendes Vortexen fixierte die Zellen während 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Daran schloss sich Waschen mit 1000 μ l PBS und Zentrifugieren (1200 UpM, 5 min) an. Das Sediment wurde nach Verwerfen des Überstands mit 5 μ l eines FITC-markierten ICAM-1 Antikörpers (MCA1615F, Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) versetzt, aufgeschlämmt und weitere 20 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert (Raumtemperatur). Es schloss sich ein weiterer Waschschritt mit

1000 µl PBS (Zentrifugation 1200 UpM, 5 min) und Ersetzen des Überstands durch 400 µl PBS an.

Die durchflusszytometrische Auswertung erfolgte an einem FACSCanto II (BD, Lakes, USA) bei einem Durchfluss von 60 µl/min bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 519 nm. Eine Vorwärtsstreuulichteinstellung (FSC) von 1 V und Seitenstreuulicht (SSC) von 320 V sowie die Spannung von FL 1/FITC von 320 V selektiert einen bestimmten Größen- und Granularitätsbereich der Zellen und schließt somit nur intakte Zellen in die Messung ein. Aus diesem eingeschlossenen Zellbereich wurde eine Zellpopulation definierter Größe und Granularität gewählt und je Well 5000 Zellen vermessen.

4.2.7. Stabilitätsmessung

Für die Stabilitätsuntersuchungen der Untersuchungssubstanz wurden die Wells einer Zellkulturplatte mit je 500 µl einer 50 µM Lösung von HCH-Catechin in Kulturmedium beschickt. Die Platten wurden analog zum Vorgehen beim ICAM-1 Assay für 24 h inkubiert (37 °C, 90% rel. Luftfeuchte, 5% CO₂). Die Substanzaufgabe erfolgte in Triplikaten mit reinem Zellkulturmedium als Negativkontrolle. Unmittelbar nach der Präparation der Platten (0 h) sowie nach 2, 4, 8, 12, 18 und 24 h wurden jeweils 250 µl aus den Wells entnommen und in einer äquivalenten Menge kaltem Methanol die Proteinbestandteile der Lösung gefällt. Anschließend wurde mit Hilfe von Nanosept® Zentrifugalfiltern unter Kühlung zentrifugiert (14000 UpM, 10 °C, 30 min) und das Filtrat zur Analyse per UPLC®-RP18-PDA verwendet. Die verwendete Anlage und Methode werden in den Abschnitten 6.2.1 (S. 144) beziehungsweise 6.2.4 (S. 153) vorgestellt. Als Referenzsubstanzen dienten Catechol und die Untersuchungssubstanz HCH-Catechin, welche im Rahmen dieses Projekts isoliert und vor den Zellkulturversuchen aufgereinigt wurde (vgl. 3.4.5.4).

4.2.8. Statistische Auswertung

Die Bestimmung der ICAM-1-Expression wurde in Duplikaten durchgeführt. Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mithilfe von Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Eine einfaktorielle ANOVA sowie ein angeschlossener Post-hoc-Test (Tukey-HSD) zur Ermittlung der Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung von SPSS (Version 28.0.1.1, IBM, Armonk, USA) durchgeführt.

4.3. Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen

Für die Untersuchung der Aktivität im ICAM-1 Assay wurden Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carboxyl)-ester (HCH-Catechin, 3.5.3.3, S. 74) sowie Catechin, welchem die HCH-Einheit an Position 3 fehlt, herangezogen. Die untersuchten Konzentrationen wurden mit 10, 25, 50 und 75 μ M analog zu Knuth et al. (2011) gewählt und in MTT und ICAM-1 Assay getestet.

4.3.1. MTT Assay

In der Zytotoxizitätsuntersuchung konnte für beide Substanzen keine signifikante Veränderung der Viabilität der HMEC-1 Zellen durch die verwendeten Substanzkonzentrationen beobachtet werden. Die Viabilitätswerte betrugen für Catechin zwischen 94,9 und 97,7% verglichen mit der Negativkontrolle und für HCH-Catechin 95,7 bis 106%.

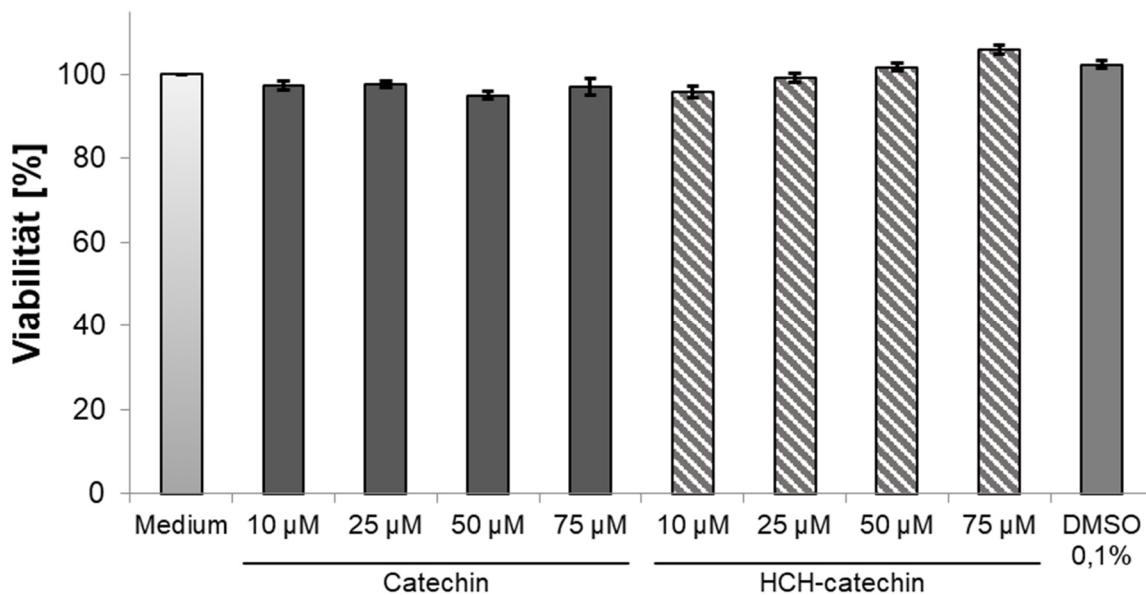


Abbildung 48: Einfluss von Catechin und HCH-Catechin auf die Zellviabilität von HMEC-1 Zellen (Medium: Negativkontrolle (NK) mit Medium; je vier Substanzkonzentrationen (10, 25, 50 und 75 μ M); DMSO 0,1%: Lösemittelkontrolle (LK) mit Medium mit 0,1% DMSO; Tests wurden in Hexaplikaten (n=3) durchgeführt; Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM

4.3.2. Stabilitätsuntersuchung von HCH-Catechin

Die Instabilität von Salicylalkoholderivaten mit 6-HCH-Substruktur wie Salicortin, Tremulacin und anderen ist durch die Arbeiten von Ruuhola et al. (2003) bekannt. Ebenso konnte die Bildung von Catechol unter den hier angewendeten Bedingungen in der Vergangenheit gezeigt werden (Knuth et al., 2011). Um einen möglichen Abbau der eingesetzten Substanz zu untersuchen, wurde eine Stabilitätsuntersuchung des eingesetzten HCH-Catechins unter den Bedingungen des ICAM-1 Assays, an der unter 6.2.1 (S. 144) und 6.2.4 (S. 153) beschriebenen UPLC®-Anlage, durchgeführt. Die folgende **Abbildung 49** zeigt deutlich die Instabilität von HCH-Catechin unter Zellkulturbedingungen innerhalb 24 h: Bei den übereinander dargestellten Chromatogrammen ist über die Zeit der Stabilitätsstudie ein deutliches Abnehmen der Peakgröße für die Testsubstanz HCH-Catechin und eine sich vergrößernder Peak des Catechols zu erkennen. Beide Peaks wurden mit Hilfe von externer Kalibrierung quantifiziert. Die eingesetzte Konzentration (50 μ M) nahm auf $14,3 \pm 0,7 \mu$ M ab, was einem Abbau von $71,3\% \pm 1,3\%$ entspricht. Das Abbauprodukt Catechol erreichte nach 24 h Inkubation eine Konzentration von $11,7 \pm 0,5 \mu$ M. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in **Abbildung 50** dargestellt.

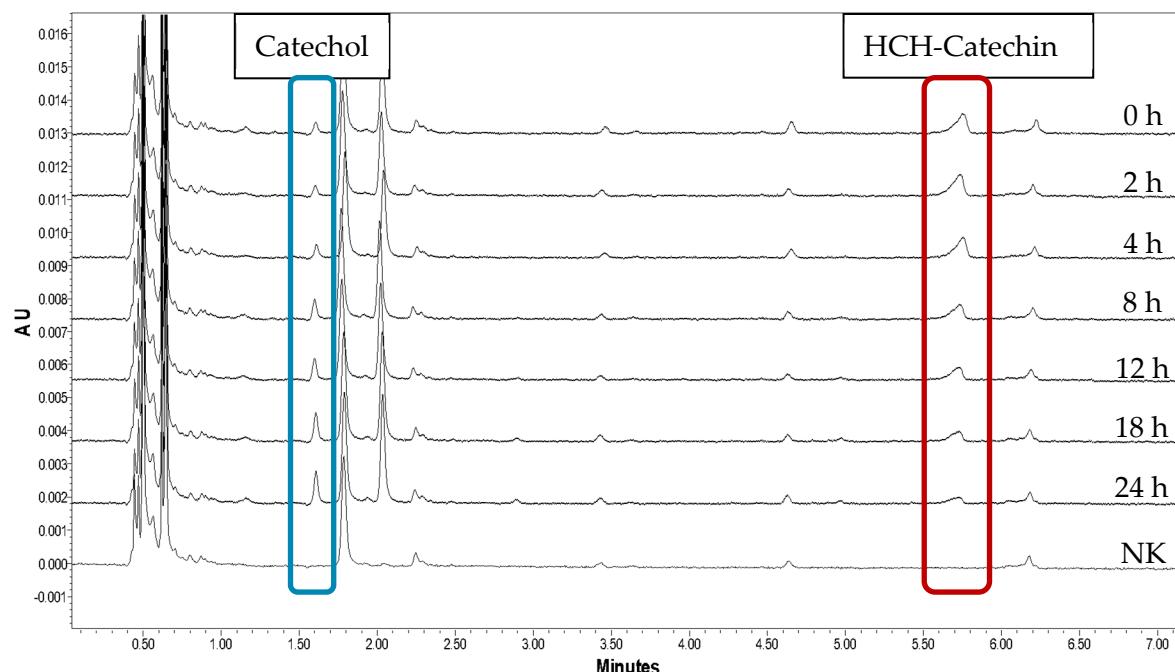


Abbildung 49: Gezeigt sind Ausschnitte der Chromatogramme einer 50 μ M Lösung von HCH-Catechin in ECGM Medium nach 0, 2, 4, 8, 12, 18 und 24 h Inkubation unter Zellkulturbedingungen (90% rel. Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5% CO₂) sowie reinem ECGM als Negativkontrolle (NK), ebenfalls nach 24 h Inkubation; rechts umrandet der Peak der Untersuchungssubstanz HCH-Catechin; links umrandet der Peak des Abbauprodukts Catechol; 275 nm

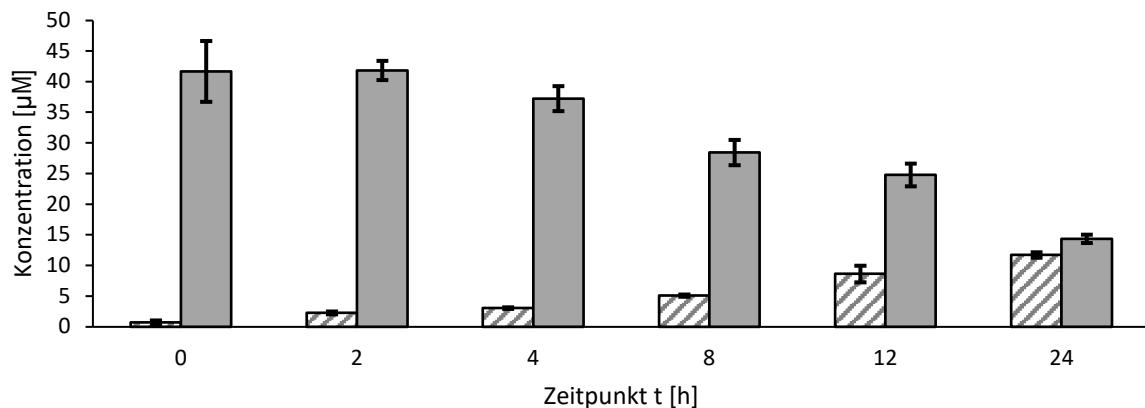


Abbildung 50: Abbau der Testsubstanz HCH-Catechin zu Catechol unter Zellkulturbedingungen innerhalb von 24 h (37 °C, 90% rel. Luftfeuchte, 5% CO₂); Startkonzentration 50 μ M; Mittelwert \pm SD (n = 3)

4.3.3. ICAM-1 Assay

Im ICAM-1 Assay zeigte sich eine signifikante und konzentrationsabhängige Aktivität des HCH-Catechins, während das unsubstituierte Catechin keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte (Abbildung 51). HCH-Catechin war in der Lage, ab einer Konzentration von 25 μ M die ICAM-1 Expression signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle zu verringern ($83,7\% \pm 1,8\%$, MW \pm SEM). Eine 50 μ M bzw. 75 μ M Lösung erreichte eine hochsignifikante Reduktion auf $72,5\% \pm 4,2\%$ bzw. $54,7\% \pm 2,2\%$ (MW \pm SEM).

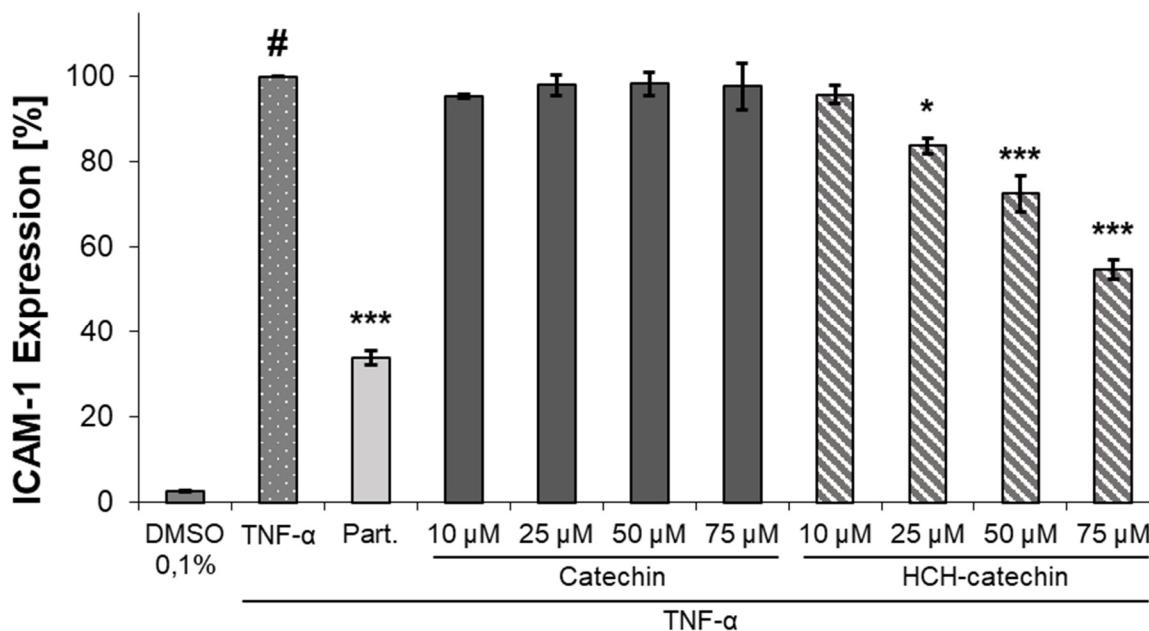


Abbildung 51: Einfluss von Catechin und HCH-Catechin auf die ICAM-1 Expression in HMEC-1 Zellen. (DMSO 0,1%: unbehandelte Kontrolle; TNF- α : 10 ng/ml als Negativkontrolle (NK); Part.: Parthenolid (5 μ M) + TNF- α als Positivkontrolle (PK); Substanzkonzentrationen 10-75 μ M + TNF- α ; Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM (n=3); #: p < 0,001 vs. Unbehandelte Kontrolle; *: p < 0,05, ***: p < 0,001 vs. TNF- α)

4.4. Diskussion

Das in 3.5.3.3 beschriebene, isolierte HCH-Catechin zeigte im ICM-1 Assay in Konzentrationen ab 25 μ M eine signifikante Reduktion der TNF- α induzierten ICAM-1 Expression in HMEC-1 Zellen. Da Catechin als Vergleichssubstanz keine Aktivität in diesem Assay zeigte, kann die Aktivität der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure-Partialstruktur zugeschrieben werden. Frühere Untersuchungen zeigten einen Abbau der Partialstruktur zu Catechol (Ruuholo et al., 2003), welches als wirksames Prinzip im ICAM-1 Assay *in vitro* gezeigt (Knuth et al., 2011) und sogar als Metabolit *in vivo* (Knuth et al., 2013) nachgewiesen werden konnte.

Ein Vergleich der hier präsentierten Ergebnisse, mit denen von Knuth et al. (2011) zeigt, dass die Aktivität von HCH-Catechin unter der von Salicortin liegt, welches schon ab 10 μ M Konzentration signifikante und vergleichbare Effekte zeigte. Interessant ist die Betrachtung der jeweiligen Stabilitätsuntersuchungen: Während bei Knuth et al. nach 24 h nahezu keine Ausgangssubstanz mehr vorhanden war (Abbau ca. 90%), schreitet der hier gezeigte Abbau von HCH-Catechin deutlich langsamer voran (Abbau von $71,3\% \pm 1,3\%$ innerhalb von 24 h). Bei Knuth et al. stellt sich für Salicortin ein Plateau der Catechol-Konzentration ein, welche einer Aufgabekonzentration von ca. 20 μ M entspricht. Die in dieser Studie beobachtete, nach 24 h Inkubation entstandene Menge Catechol, entspricht einer Aufgabekonzentration von $11,7 \pm 0,5 \mu$ M. Die Hemmung der ICAM-1 Expression von 50 μ M HCH-Catechin ($72,5\% \pm 4,2\%$) entspricht derer, welche Knuth et al. für die 10 μ M Lösung von Catechol bestimmten (ca. 74,8%) und bestätigt diese Ergebnisse somit (Knuth et al., 2011). Festzuhalten bleibt somit, dass das die Seitengruppe des hier betrachteten HCH-Catechins deutlich langsamer abgebaut und somit eine geringere Catechol-Verfügbarkeit als Salicortin aufweist. Interessanterweise ist diese Konzentration äquivalent zu der von Knuth für die gleiche eingesetzte Menge Tremulacin bestimmten Konzentration Catechol, obwohl dieses noch deutlich schneller abgebaut wird als Salicortin (Knuth, 2013).

Die hier für HCH-Catechin gezeigten Effekte auf die Expression von ICAM-1 liegen im Bereich von Tremulacin, welches ebenfalls von Knuth et al. untersucht wurde und entsprechen der Konzentration von 10 μ M Catechol im modifizierten ICAM-1 Assay (Knuth et al., 2011).

Die Aktivität von HCH-Catechin, Salicortin und Tremulacin im ICAM-1 Assay lässt sich also auf deren gemeinsames, wirksames Abbauprodukt Catechol zurückführen und bestätigen die Ergebnisse von Knuth et al. (2011). Die Unterschiede in der Höhe der Aktivität

lassen sich durch unterschiedliche Freisetzungskinetiken der Substanzen *in vitro* begründen. So setzt HCH-Catechin unter gleichen Inkubationsbedingungen langsamer Catechol frei als Salicortin oder Tremulacin bei Knuth et al. (2011). Der Vergleich mit unsubstituiertem Catechin beweist zudem den Zusammenhang von HCH-Seitengruppe und der Hemmung der ICAM-1 Expression *in vitro* wie dies auch von Knuth et al. (2011) im Vergleich zu Saligenin, Salicylsäure und Salicin gezeigt werden konnte.

Neuere *in vitro* Studien legen eine anti-inflammatorische Aktivität von Catechol auch in anderen Zellmodellen bei der Freisetzung von PGE₂ nahe (Antoniadou et al., 2021). Dass Catechol-Konjugate nach Einnahme von Weidenrindenpräparaten als Phase-II-Metaboliten *in vivo* im menschlichen Organismus präsent sind, konnte in mehreren Studien eindrücklich nachgewiesen werden (Knuth et al., 2013; Untergehrer et al., 2019). Allerdings fehlt ein umfassendes Bild zu allen Catechol-freisetzenden Substanzen, welche in Zubereitungen von Weidenrinde enthalten sind. Catechol als Abbauprodukt scheint schon durch die Verbreitung von HCH-Seitengruppen nicht nur auf die Gruppe der Salicylalkoholderivate beschränkt zu sein. Der Begriff der Qualität, muss unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten ggf. weiter gefasst werden und weitere Untersuchungen zu Metabolisierung und Wirkung der Droge Salicis cortex unternommen werden.

4.5.Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte das im präparativen Teil isolierte HCH-Catechin einer pharmakologisch *in vitro* Testung unterzogen werden. Im vorgestellten ICAM-1 Assay zeigte HCH-Catechin ab einer 25 µM Konzentration eine signifikante Reduktion der ICAM-1 Expression. Unsubstituiertes Catechin zeigte keinen Effekt, weshalb die Aktivität der HCH-Untereinheit zugeschrieben werden kann. Diese wird unter Zellkulturbedingungen zu Catechol abgebaut.

Ein Vergleich mit früheren Arbeiten zeigte, dass HCH-Catechin stabiler gegenüber den angewendeten Zellkulturbedingungen ist als Salicylalkoholderivate, wie Salicortin und Tremulacin, welche unter gleichen Bedingungen ebenfalls zu Catechol als Abbauprodukt führen.

Die Menge an freigesetztem Catechol und der davon ausgehende Effekt ist mit der für Salicortin gezeigten vergleichbar (Knuth et al., 2011). Die Stabilitätsuntersuchung in Zellkulturmedium zeigt, dass nach 24 h noch etwa ein Drittel des HCH-Catechins vorliegt, während eine äquimolare Salicortin-Lösung deutlich weiter abgebaut ist (Knuth et al., 2011). Abschließend ließ sich zeigen, dass HCH-Catechin in Analogie zu Salicylalkoholderivaten mit HCH-Seitengruppe eine Quelle für Catechol ist. Dieser Umstand wird bei der Qualitätsuntersuchung für *Salicis cortex* nicht berücksichtigt, da sich die Arzneibuchmethode auf das Salicin als Qualitätsmarker beschränkt ("Weidenrinde *Salicis Cortex*," 2020). Inwieweit verschiedene andere Catechol-freisetzende Substanzen in Weidenrinde präsent sind, muss durch weitere Untersuchungen gezeigt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Catechol auch *in vivo* nach Administration von Weidenrinde entsteht (Knuth et al., 2013; Untergerher et al., 2019). In welchem Ausmaß die gezeigte *in vitro* Aktivität auch in einem entzündungshemmenden Effekt und eine klinische Effektivität von *Salicis cortex* umzusetzen ist, müssen weitere klinische Studien zeigen. Zudem ist weitere Forschung zum Vorkommen von Substanzen nötig, welche zu Catechol abgebaut oder metabolisiert werden können. Als Beispiel hierfür sind HCH-Addukte zu nennen, welche nicht nur in der Strukturklasse der Salicylalkoholderivate zu finden aber bei der Qualitätsbestimmung unberücksichtigt sind.

5. HCH-Screening

Im pharmakologischen Teil der vorliegenden Arbeit (Kapitel 4 ,S. 99) wurde die Untersuchung von HCH-Catechin (Substanz 9) in einem ICAM-1 *in vitro* Assay beschrieben. Kapitel 5 beschäftigt sich mit dem Screening des vorliegenden Pflanzenextrakts auf Substanzen, welche dem HCH-Catechin strukturell ähneln.

5.1. Hintergrund

Im Zentrum der Aufmerksamkeit bei der Erforschung der Weidenrinde standen in der Vergangenheit in erster Linie die Salicylalkoholderivate. Diese können aber laut Nahrstedt et al. nicht allein für die antiinflammatorische Wirksamkeit von *Salicis cortex* verantwortlich gemacht werden. Es wird außerdem der Beitrag von Flavonoidstrukturen bzw. flavonoidhaltigen Fraktionen eines Extrakts diskutiert (Freischmidt et al., 2012; Nahrstedt et al., 2007).

Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführte *in vitro* Testung von HCH-Catechin im ICAM-1 Assay wirft die Frage auf, welchen Beitrag HCH-haltige Substanzen zur Wirksamkeit von *Salicis cortex* leisten. Neben HCH-Catechin könnten in der Droge auch noch weitere HCH-Addukte enthalten sein, die analog über dieses Strukturelement ähnliche Effekte zeigen. Eine Isolierung weiterer HCH-Flavan-3-ol-Addukte wie sie z. B. von Hsu et al. (1985) beschrieben werden, gelang im präparativen Teil dieser Arbeit nicht. Daher war das Ziel, das Vorkommen verschiedener Addukte von Flavan-3-olen mit der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure (HCH) per LC-MS und LC-MS/MS in *S. cinerea* nachzuweisen. Da mit Hilfe der Massenspektrometrie keine Aussagen zur Stereochemie der Flavan-3-ole getroffen werden kann, wird in diesem Abschnitt die Abkürzung Fl3ol für ein Flavan-3-ol ohne Berücksichtigung der Stereochemie verwendet. Analog werden mHO-Fl3ol für im B-Ring monohydroxylierte Flavan-3-ole (bspw. Afzelechin oder Epiafzelechin), diHO-Fl3ol für im B-Ring dihydroxylierte Flavan-3-ole (bspw. Catechin) und triHO-Fl3ol für im B-Ring trihydroxylierte Flavan-3-ole (bspw. Epigallocatechin) jeweils ohne Berücksichtigung der Stereochemie genutzt. Dies schließt neben der 2R3S- und der 2R3R-Konfiguration auch die Möglichkeit der jeweiligen Enantiomere ein.

5.2. Material und Methoden

Ein erster Schritt der massenspektrometrischen Untersuchung des Extraktes von *S. cinerea* wurde an der in Abschnitt 3.3.2 (S. 30) beschriebenen Anlage der Zentralen Analytik der Universität Regensburg durchgeführt. Im weiteren Verlauf des Projekts wurden die LC-MS/MS (LC-QqQ) Experimente am Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection der Faculty of Sciences der University of Novi Sad, Serbien unter Anleitung von Prof. Dr. Dejan Orčić durchgeführt. Die erlangten Erkenntnisse wiederum erlaubten eine genauere Untersuchung der entsprechenden Fraktionen per UHPLC-HRESI-MS/MS (LC-Q-TOF) an der Universität Regensburg.

5.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Die für die Massenspektrometrische Untersuchung zur Anwendung gekommenen Anlagen sind in **Tabelle 45** und **Tabelle 46** aufgelistet.

Tabelle 45: Aufbau des verwendeten UHPLC-Q-TOF-MS Systems der Zentralen Analytik der Universität Regensburg

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
UHPLC	1290 Infinity G4220A (Binäre Pumpe)	Agilent Technologies, Waldborn, Deutschland
	1290 Infinity G1316C (Säulenofen)	Agilent Technologies, Waldborn, Deutschland
	1290 Infinity G4226A (Autosampler)	Agilent Technologies, Waldborn, Deutschland
	1290 Infinity G4212A (DAD)	Agilent Technologies, Waldborn, Deutschland
Massenspektrometer	Q-TOF 6540 UHD Ionenquelle Dual-ESI	Agilent Technologies, Waldborn, Deutschland
Säule	Luna Omega 1,6 µm C18 100 Å 50x2,1 mm	Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland

Tabelle 46: Aufbau des verwendeten LC-QqQ-MS Systems an der Universität Novi Sad, Serbien (Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences University of Novi Sad)

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
LC-System	1200 Series (Degaser)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
	1200 Series (Binäre Pumpe)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
	1200 Series (Autosampler)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
	1200 Series (Säulenofen)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
	1200 Series (DAD)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Massenspektrometer	6410 Triple Quad LC/MS Ionenquelle ESI	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Säule	Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 mm × 4.6 mm, 1.8 µm	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

5.2.2. Extrakte und Probenvorbereitung

Für die Durchführung des Screenings wurden die Sephadex®-Fraktionen des methanolischen Extrakts der im Oktober geernteten Rindendroge von *Salix cinerea* verwendet (3.4.2., S.35). Dabei kamen die gefriergetrockneten Fraktionen SdIII5-SdIII16 zur Anwendung. Diese wurden in Konzentrationen von 1-2 mg/ml in Methanol gelöst und durch einen Spritzenvorsatzfilter in Braunglasvials filtriert und stellten damit die Untersuchungslösungen dar.

5.2.3. Methoden

Die bei den massenspektrometrischen Untersuchungen zur Anwendung gebrachten Gradienten sind in **Tabelle 47** und **Tabelle 48** gezeigt.

Die Chromatographie an der Zentralen Analytik der Universität Regensburg erfolgte an einer Umkehrphase bei einer Temperatur von 50 °C, nach Injektion von 1,00 µl Probelösung. Für die massenspektrometrische Detektion wurde ein Aufnahmebereich von *m/z* 80-1700 im negativen Modus und eine Aufnahmgeschwindigkeit von 4 MS Scans/s bzw. 6 MS/MS Scans/s gewählt. Die Ionisierung erfolgte mithilfe einer Jet Stream ESI Ionenquelle. Die Gas- und Hüllgastemperatur lag bei 300 °C, der Gasfluss bei 8 L/min und der Druck des Nebulizers bei 40 psi. Die Fragmentorspannung wurde bei 120 V festgelegt.

Tabelle 47: Am UHPLC-Q-TOF-MS System der Zentralen Analytik der Universität Regensburg angewandter Gradient zur chromatographischen Trennung (reversed phase, RP18); Eluent A: $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ FA}$, Eluent B: $\text{ACN} + 0,1\% \text{ FA}$

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
0,0	80	20	0,5
6,0	40	60	0,5
9,0	0	100	0,5
12,0	0	100	0,5
15,0	80	20	0,5

Die chromatographische Auftrennung der LC-QqQ-MS Experimente erfolgte ebenfalls bei 50 °C an einer Umkehrphase. Injiziert wurden jeweils 5 μl . Die photometrische Detektion erfolgte im Wellenlängenbereich von 190-700 nm. Für die massenspektrometrische Detektion kam eine ESI Ionenquelle zum Einsatz, bei einem Hüllgasstrom von 350 °C und 10 L/min und einen Druck im Nebulizer von 50 psi.

Für den Übersichtsscan der Fraktionen (MS2Scan) kamen positive sowie negative Ionisierung zur Anwendung. Der Detektionsbereich wurde dabei auf m/z 100-1680 festgelegt. Die Fragmentorspannung lag bei 120 V.

Für das Screening im *precursor ion scan mode* (Scan-CID-SIM) wurde mit negativer Ionisierung gearbeitet. Der Bereich für das *precursor ion* wurde auf m/z 153-1680, der für das *product ion* auf m/z 155 festgelegt. Die Fragmentorspannung lag wiederum bei 120 V, die Kollisionsenergie wurde von 10, über 20 auf 30 V schrittweise gesteigert.

Der *product ion scan* (SIM-CID-Scan) wurde bei positiver wie negativer Ionisierung durchgeführt. Als *precursor ion* wurden jeweils die Spezies $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ und $[\text{M}-\text{H}]^-$ ausgewählt. Der Detektionsbereich wurde jeweils auf m/z 35-„*precursor+2*“ festgelegt. Die Fragmentorspannung wurde auf 100 V festgesetzt, die Kollisionsenergie mit 5, 15, 25, 35 V variiert.

Tabelle 48: Am HPLC-QqQ-MS Systems der Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, University of Novi Sad, Serbien angewandter Gradient zur chromatographischen Trennung (reversed phase, RP18); Eluent A: $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ FA}$, Eluent B: ACN

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
0,0	80	20	1
6,0	40	60	1
9,0	0	100	1
12,0	0	100	1
15,0	80	20	1

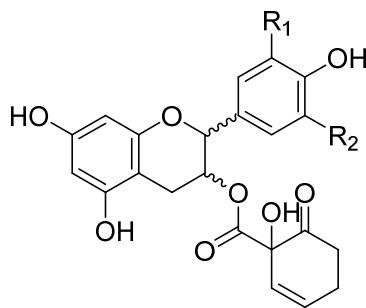
5.3. Ergebnisse & Diskussion

5.3.1. Massenspektroskopisches Screening

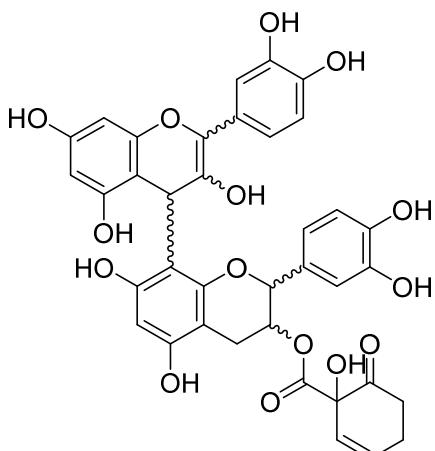
In einem ersten Schritt wurden die Analysen per LC-HRESI-MS auf das Auftreten definierter Molekülmassen gescreent. Dazu wurde eine Datenbank erstellt, welche verschiedene mono- bis tetrameren Proanthocyanidine in Kombination mit je ein bis drei HCH-Gruppen beinhaltete. Gefundene Massen mit einem Score von >95 wurden dabei als Treffer angesehen und sind in **Tabelle 49** aufgeführt. Beispielhafte Strukturen sind in **Abbildung 52** dargestellt.

Tabelle 49: Modellsubstanzen, deren m/z in einem ersten UHPLC-HRESIMS Screening in verschiedenen Fraktionen eines methanolischen Extraks von Salicis cortex (3.4.2, S. 35) nachgewiesen wurden (rote Markierung); aufgeführt sind ausschließlich Modellsubstanzen deren m/z mit einem Score ≥ 95 gefunden wurde; mHO-Fl3ol: im B-Ring monohydroxyliertes Flavan-3-ol, diHO-Fl3ol: im B-Ring dihydroxyliertes Flavan-3-ol, triHO-Fl3ol: im B-Ring trihydroxyliertes Flavan-3-ol, HCH: 1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure

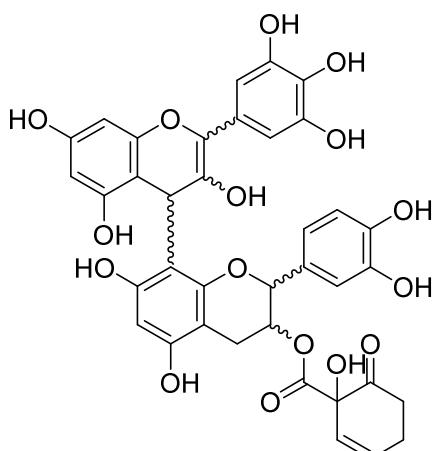
Modellsubstanz	SdIII 5	SdIII 6	SdIII 7	SdIII 8	SdIII 9u10	SdIII 11u12	SdIII 13Mix	SdIII 14	SdIII 15	SdIII 16
mHO-Fl3ol + HCH										
mHO-Fl3ol + HCH + HCH										
diHO-Fl3ol + diHO-Fl3ol + HCH										
diHO-Fl3ol + triHO-Fl3ol + HCH										
diHO-Fl3ol + HCH + triHO-Fl3ol + HCH										
diHO-Fl3ol + HCH										
triHO-Fl3ol + triHO-Fl3ol + HCH										
triHO-Fl3ol + HCH + triHO-Fl3ol + HCH										
triHO-Fl3ol + HCH										
triHO-Fl3ol + HCH + HCH										
triHO-Fl3ol + triHO-Fl3ol + triHO-Fl3ol + HCH										
diHO-Fl3ol + diHO-Fl3ol + diHO-Fl3ol + HCH										
triHO-Fl3ol + triHO-Fl3ol + diHO-Fl3ol + HCH										
triHO-Fl3ol + diHO-Fl3ol + HCH + diHO-Fl3ol + HCH										
triHO-Fl3ol + diHO-Fl3ol + diHO-Fl3ol + HCH										



HCH-mHO-Fl3ol: $R_1/R_2 = H$
 HCH-diHO-Fl3ol: $R_1 = OH, R_2 = H$
 HCH-triHO-Fl3ol: $R_1 = OH, R_2 = OH$



HCH-diHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol



HCH-triHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol

Abbildung 52: Beispielhafte Strukturen von HCH-Flavan-3-ol Addukten, welche Ziel der massenspektrometrischen Untersuchung waren

Diese Untersuchung deutet auf das Vorkommen verschiedener HCH-Fl3ole und HCH-Proanthocyanidine hin. Allerdings kann das Auftreten einer Molekülmasse nicht als Beweis dieser Substanzen ausreichen, da bei gleicher Summenformel und Molekülmasse verschiedene Konstitutionen denkbar sind. Aufschluss über den molekularen Aufbau der Substanzen kann in einem weiteren Schritt ein MS/MS-Experiment und das dabei beobachtete Fragmentierungsmuster liefern.

5.3.2. Untersuchung des Fragmentierungsmusters (LC-QqQ-MS/MS)

Die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen zu den Fragmentierungsmustern der HCH-Ester in Extrakten von *S. cinerea* wurden im Rahmen eines Austauschs an der Universität Novi Sad durchgeführt. Die Anwendung eines LC-QqQ erlaubte die Suche nach unbekannten Substanzen, welche eine HCH-Gruppe bzw. daraus entstehende Fragmente im MS/MS-Experiment zeigten. Verwendet wurden die Sephadex®-Fraktionen der im Oktober geernteten Droge Salicis cortex (*Salix cinerea* 3.4.2, S. 35). Die Fraktionen wurden in einem mehrstufigen Verfahren nach enthaltenen HCH-Addukten durchsucht.

In einem ersten Schritt wurden die Fraktionen SdIII1-SdIIIPPA per MS2Scan mit einem Fenster von m/z 100-1680 betrachtet. Dies diente dazu, einen allgemeinen Überblick über die in den Fraktionen enthaltenen Molekülmassen zu gewinnen und eine erste Orientierung zu ermöglichen.

In einem zweiten Schritt wurde ein *Precursor-Ion-Scan* (Scan-CID-SIM) durchgeführt, in welchem die Moleküle im ersten Quadrupol gescannt, diese im zweiten Quadrupol fragmentiert und die Fragmente im dritten Quadrupol analysiert wurden (*Precursor*: m/z 153 - 1680, *Product*: m/z 155). Als Ergebnis konnten dabei Molekülmassen erfasst werden, welche bei der Fragmentierung ein Fragment mit m/z 155 ergaben.

In einem dritten Schritt wurden diese Massen in einem *Product-Ion-Scan* näher untersucht. Die entsprechenden Moleküle wurden im ersten Quadrupol gefiltert fragmentiert und im dritten Quadrupol in einem Fenster von m/z = 35 bis „*Precursor*+2“ untersucht.

Als Beispilmoleküle wurden Salicortin und HCH-Catechin herangezogen, deren Vorkommen in den vermessenen Extrakten zu erwarten waren. Beide Substanzen konnten bereits aus dem Extrakt einer früheren Ernte desselben Individuums isoliert werden (vgl. Kapitel 3, S. 19.). Mit diesem Vorgehen konnten einige aus der Literatur bekannte Fragmente und das generelle Fragmentierungsmuster für Salicortin bestätigt werden (vgl. Kammerer et al., 2005). Die erhaltenen Ergebnisse der Fragmentierung von Salicortin werden in **Abbildung 53** (S. 124) gezeigt.

Im Falle des HCH-Catechins kam es zu einem abweichenden Fragmentierungsmuster: Das HCH-Addukt verlor den HCH-Ester als Neutralteilchen und zurück blieb das Tochterfragment $[M-HCH-H]^-$, was der $[M-H]^-$ -Spezies des Catechins entspricht. Dieses wiederum bildete unter Wasserverlust eine $[M-HCH-H_2O-H]^-$ -Spezies. Zusätzlich bildeten sich bei höheren Kollisionsenergien mehrere typische Fragmente des Flavonoidgrundkörpers bspw. das $^{1,3}A^-$, $^{1,4}A^-$ oder das Aglykon als Y_0^- Fragment (Ma et al., 1997). Das Nichtauftreten eines Tochterfragments mit m/z 155, dem $[HCH-H]^-$ entsprechend (vgl. Kammerer et al., 2005), stellt somit einen deutlichen Unterschied zwischen HCH-Addukten von Flavan-3-olen und denen der Salicylalkohole dar. Um auch diese Moleküle zu erfassen und zu analysieren, wurde der *Precursor-Ion-Scan* modifiziert und ein dynamisches m/z von „*Precursor* - 155“ für das *Product-Ion* festgelegt. Durch das beschriebene Vorgehen war es möglich, verschiedene Moleküle als mögliche HCH-Addukte zu identifizieren.

Im Folgenden werden die einzelnen identifizierten Substanzen und die postulierten Fragmentierungsmuster dargestellt:

In Fraktion SdIII3 konnte Salicortin als $[M-H]$ -Spezies bei m/z 423 im negativen Ionisierungsmodus, sowie die Natrium-, Kalium- und Ammonium-Addukte im positiven Ionisierungsmodus nachgewiesen werden (m/z 447, 463 und 442). Die Fragmentierung bei negativer Ionisierung deckte sich mit der von Kammerer et al. (2005) beschriebenen unter Bildung von Tochterfragmenten mit m/z 83, 137, 123 und 155. Bei positiver Ionisierung entstanden Spezies mit m/z 107, 287 und 263 (Abbildung 53).

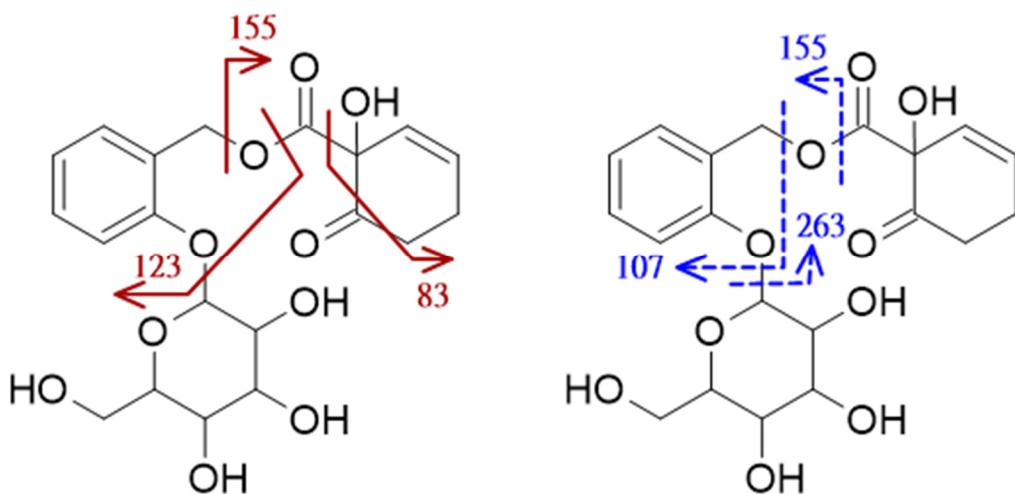


Abbildung 53: Postulierte Fragmentierung des detektierten Salicortins; rot: Fragmentierung bei negativer Ionisierung, blau gestrichelt: Fragmente bei positiver Ionisierung

Ebenfalls in Fraktion SdII3 wurde eine Substanz mit einem m/z von 527 detektiert. Die erfassten Tochterfragmente sprechen für Tremulacin und decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Fragmentierungsmuster (Kammerer et al., 2005).

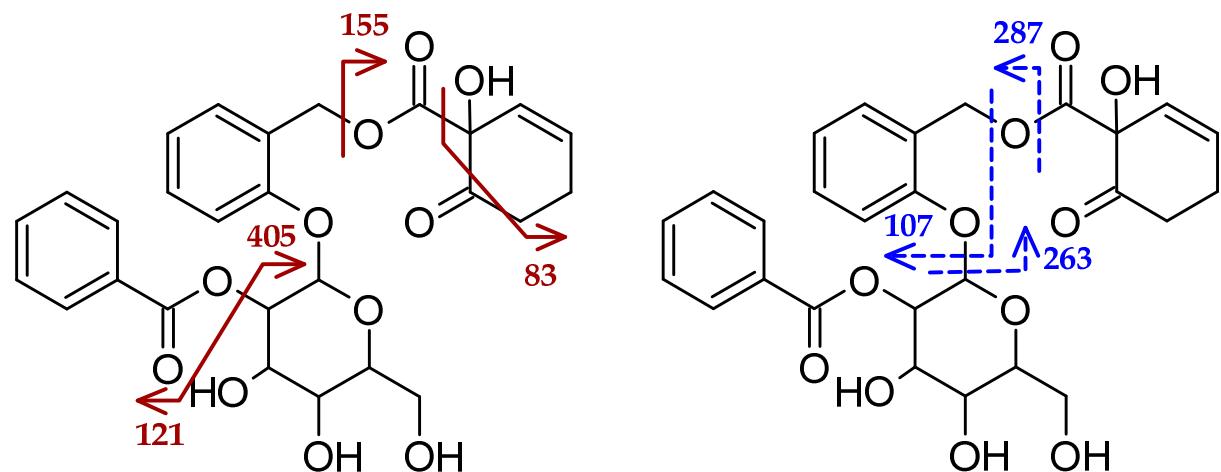


Abbildung 54: Postulierte Fragmentierung des detektierten Tremulacin, bzw. Tremulacin-Isomers; rot: Fragmentierung bei negativer Ionisierung, blau gestrichelt: Fragmente bei positiver Ionisierung

Des Weiteren wurde in Fraktion SdIII3 eine Substanz mit einem m/z 465 identifiziert, die im positiven Ionisierungsmodus ein Neutralteilchen mit einer Masse von $155\text{ }\mu$ verlor. Dies könnte ein acetyliertes Salicortin darstellen. Zusätzliche Tochterfragmente traten bei m/z 205 (mögliche acetylierte Hexose) sowie m/z 311 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCH}]^+$ und m/z 107 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCH}-\text{(AcHexH}_2\text{O)}]^+$ auf. Die postulierte Fragmentierung ist in **Abbildung 55** gezeigt. Das Fragment mit einem Signal bei m/z 107 unterstützt die Vermutung, dass es sich bei der Substanz mit m/z 466 ebenfalls um ein Salicylalkoholderivat handelt.

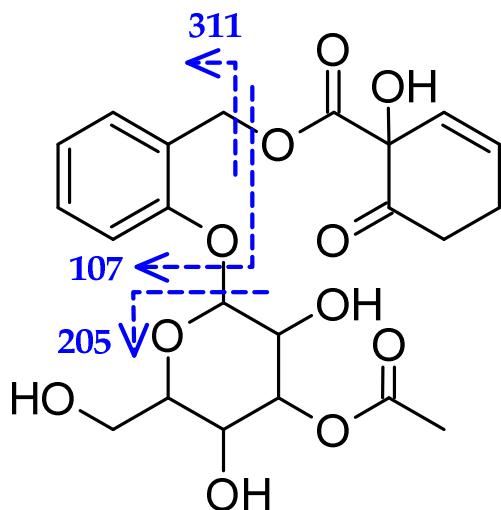


Abbildung 55: Postulierte Fragmentierung des detektierten Acetylsalicortins bzw. Acetylsalicortin-Isomers; blau gestrichelt: Fragmente bei positiver Ionisierung

In den Fraktionen SdIII4-6 wurden zwei Substanzen erfasst, welche ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von 427 aufwiesen, sich jedoch in ihren Retentionszeiten unterschieden. Beide wurden jeweils als verschiedene Spezies bei positiver und negativer Ionisierung in Übereinstimmung mit Daten von Jürgenliemk et al. (2007) detektiert: $[\text{M}-\text{H}]^-$ bei m/z 427, $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ m/z 463, $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 429, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 451 und $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 467. Die erfassten und postulierten Tochterfragmente bei negativer Ionisierung waren das negativ geladene Aglykon-Anion Y_0^- (m/z 289) sowie die typischen Flavonoidfragmente $^{1,3}\text{A}^-$ (m/z 137) und $^{1,4}\text{A}^-$ (m/z 125). Zudem entstand durch Wasserabspaltung neben dem Y_0^- auch eine Spezies mit m/z 271, welche dem $[\text{Y}_0-\text{H}_2\text{O}]^-$ entspricht (**Abbildung 56**). Die HCH-Seitengruppe wurde unter diesen Bedingungen als Neutralteilchen abgespalten mit einer Masse von 156 bzw. $138\text{ }\mu$. Demnach konnte durch diese Untersuchung das Vorkommen von HCH-mHO-Fl3olen bestätigt werden. Eines dieser Addukte (HCH-Catechin) konnte im Rahmen dieser Arbeit aus einer früheren Ernte desselben Individuums isoliert und aufgeklärt werden (vgl. 3.4.5.4, S.47). Ob es sich bei der zweiten Verbindung um das HCH-Addukt des Epicatechins (bzw. das

entsprechende Enantiomer) handelt, kann mithilfe dieser Methodik nicht abschließend geklärt werden. Allerdings liegt dies aufgrund der leicht verschobenen Retentionszeiten nahe. Zur Bestätigung wäre die Isolierung und spektroskopische Untersuchung der Substanz oder der Abgleich mit einer Referenzsubstanz nötig. Aufgrund der erfolgten Isolierung von HCH-Catechin und der Retentionszeitverschiebung bei großer Übereinstimmung im Fragmentierungsmuster wird hier das Vorkommen von HCH-Catechin sowie HCH-Epicatechin postuliert.

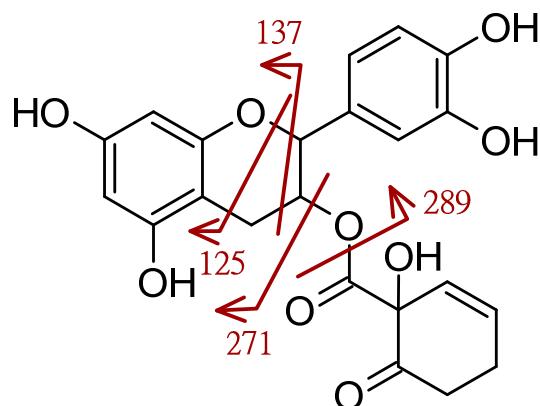


Abbildung 56: Postulierte Fragmentierung der detektierten HCH-diHO-Fl3ole; die Fragmentierung bei negativer Ionisierung ist durch rote Pfeile dargestellt

In der Fraktion SdIII6 wurden zwei Substanzen detektiert, für welche jeweils eine Masse von $444\text{ }\mu$ ermittelt wurde. Die Molekülmasse entspricht einem HCH-triHO-Fl3ol. Die Retentionszeiten der beiden Peaks unterschieden sich, während die Fragmentierungsmuster kongruent sind. Bei positiver Ionisierung wurden die Spezies $[\text{M}+\text{Na}]^+$ und $[\text{M}+\text{K}]^+$ mit einem m/z 467 bzw. 483 detektiert, zudem traten Fragmente mit m/z 289 und 139 auf. Diese könnten die Fragmente $[\text{M}+\text{H}-\text{HCH}]^+$ (289) und ein $^{1,3}\text{A}^+$ -Fragment darstellen. Bei negativer Ionisierung ($[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 443 und $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ m/z 481) ist die Fragmentierung umfassender: Es entstanden zuordenbare Fragmente mit m/z von 287, 269, 137 und 125. Das Fragment mit m/z 287 entspricht der $[\text{M}-\text{H}-\text{HCH}]^-$ -Spezies bzw. der $[\text{Y}_0-\text{H}_2\text{O}]^-$ -Spezies (Abbildung 58). Dies würde dem Verlust der HCH-Seitengruppe als Neutralteilchen mit einer Differenz zum Ursprungsmolekül von $156\text{ }\mu$ entsprechen. Ein weiterer Verlust eines Wassermoleküls führt zu einem Fragment mit m/z 269. Zudem traten die typischen Fragmente des Flavonoid-Grundkörpers auf, welche das $^{1,4}\text{A}^-$ -Fragment (m/z 125) und das $^{1,3}\text{A}^-$ -Fragment (m/z 137) darstellen. Letzteres Fragment kann beim Vorliegen eines triHO-Fl3ols als Grundkörper auch durch das $^{1,3}\text{B}-\text{CO}$ erzeugt werden und könnte das deutlich prominente Auftreten dieses

Fragments im Vergleich zum Fragmentierungsmuster des HCH-diHO-Fl3ols erklären. Diese Untersuchung deutet auf das Vorkommen von HCH-triHO-Fl3ol in *Salix cinerea* hin. Allerdings kann die Identität mithilfe der Massenspektrometrie nicht abschließend geklärt werden. Eine Isolierung der vermuteten Substanz und anschließende Strukturaufklärung war im Rahmen des vorgestellten Projekts leider nicht möglich.

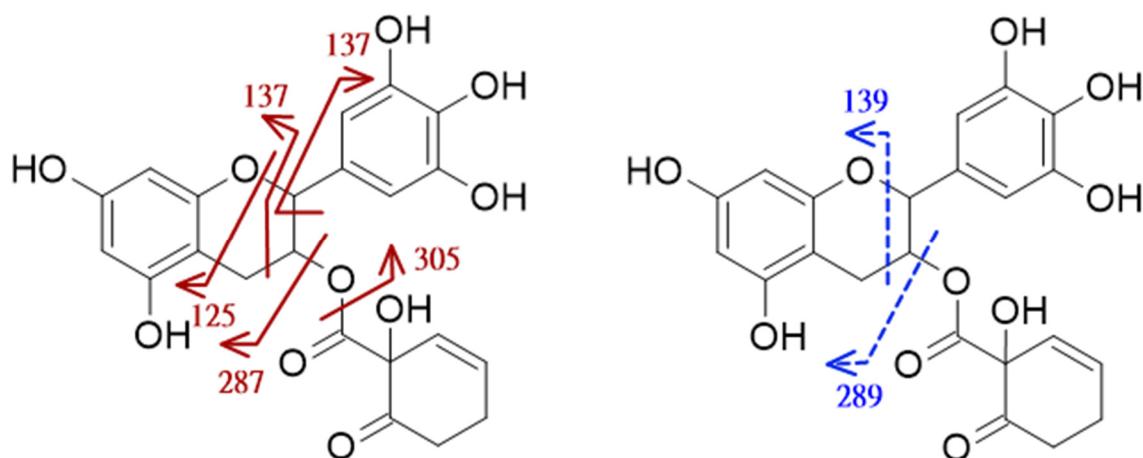


Abbildung 57: Postulierte Fragmentierung des detektierten HCH-triHO-Fl3ol; rot: Fragmentierung bei negativer Ionisierung, blau gestrichelt: Fragmente bei positiver Ionisierung

5.3.3. Screening auf HCH-Flavan-3-ole (LC-qTOF-HRESI-MS/MS)

In einem letzten Schritt wurden die Fraktionen SdIII5 bis SdII15 und die bereits ermittelten Massen, welche auf HCH-Addukte von Flavan-3-olen hindeuten mit Hilfe von LC-MS/MS Experimenten untersucht (vergl. **Tabelle 49**, S. 121). Dazu kam erneut die Anlage der Zentralen Analytik der Universität Regensburg (**Tabelle 1**, S. 19) zur Anwendung. Die Nutzung einer UHPLC-qTOF-Anlage erlaubte die Untersuchung geringerer Mengen bei höherer Auflösung.

5.3.3.1. Modellsubstanz 1: HCH-diHO-Fl3ol (428.a)

In Fraktion SdIII5 wurde eine Substanz mit einem m/z von 427 bei negativer Ionisierung einem MS/MS-Experiment unterzogen, für welche exemplarisch der postulierte Fragmentierungsweg dargelegt werden soll. Dieses Experiment soll die Vergleichbarkeit der mit UHPLC-HRESIMS/MS erhaltenen Daten mit denen an LC-QqQ erzeugten zeigen (5.3.2, S. 122). Beobachtet wurden starke Übereinstimmungen bei den auftretenden Fragmenten, beispielsweise durch die Fragmente Y_0^- , $[Y_0\text{-H}_2\text{O}]^-$, $^{1,3}\text{A}^-$ und $^{1,4}\text{A}^-$ (m/z 289, 271, 137, 125). Zudem zeigte sich der Verlust eines Neutralteilchens einer dem HCH entsprechenden Masse von 156 u . Die postulierte Fragmentierung und Zuordnung der Signale zu Fragmenten der Substanz ist in **Abbildung 58** (S. 129) gezeigt. In **Tabelle 50** sind die Fragmente, welche eine relative Signalintensität von mindestens 20% bezogen auf das höchste Signal im Massenspektrum aufweisen, zugeordnet. Die auftretenden Fragmente belegen das Vorkommen von HCH-diHO-Fl3ol. Die Stereochemie der Modellsubstanz 428.a ist mithilfe dieser Methodik nicht zweifelsfrei zu beweisen. Das Vorliegen von Aglykon und dehydratisiertem Aglykon gibt einen Hinweis auf die Substitution in 3-Position des Grundkörpers. Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester (HCH-Catechin) konnte aus demselben Individuum isoliert werden (vgl. 3.4.5.4, S. 47) und zeigte übereinstimmende Fragmentierung (Y_0^- , $[Y_0\text{-H}_2\text{O}]^-$, $^{1,3}\text{A}^-$). Daher wird dieses Fragmentierungsmuster einem 3-O-HCH-diHO-Fl3ol zugeordnet.

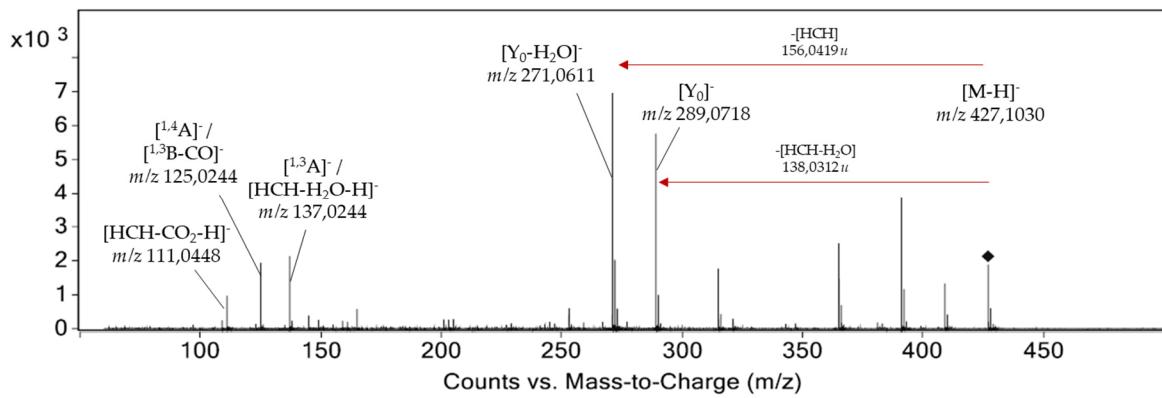


Abbildung 58: Massenspektrum der Modellsubstanz 428.a bei negativer Ionisierung

Tabelle 50: Liste der aufgetretenen Fragmente bei negativer Ionisierung; aufgeführt sind alle Fragmente mit Signalen \geq rel. 20%

<i>m/z</i>	postulierte Spezies
427,1030	[M-H] ⁻
409,0927	
392,0853	
391,0823	
365,1030	
315,0509	
290,0748	
289,0718	[Y ₀] ⁻
272,0662	
271,0611	[Y ₀ -H ₂ O] ⁻
165,0190	
137,0244	[HCH-H ₂ O-H] ⁻
125,0244	[¹⁴ A] ⁻ / [¹³ B-CO] ⁻
111,0448	[HCH-CO ₂ -H] ⁻

5.3.3.2. Modellsubstanz 2: HCH-triHO-Fl3ol (444.a)

Moleküle mit einem m/z von 443 bei negativer Ionisierung konnten ebenfalls in Fraktion SdIII5 einer UHPLC-HRESI-MS/MS-Analyse unterzogen werden. Dabei zeigte sich das in Kapitel 5.3.2 (S. 122) postulierte Fragmentierungsmuster für HCH-triHO-Fl3ole. Das Massenspektrum sowie der postulierte Fragmentierungsweg sind in **Abbildung 59** abgebildet. Charakteristische Fragmente zeigten sich zum einen durch Verlust eines Neutralteilchens mit einer Masse von 156 u (Y_0 -Fragment, m/z 305) sowie den anschließend postulierten Wasserverlust $[Y_0\text{-H}_2\text{O}]^-$. Zudem konnten die für den Flavan-3-ol-Grundkörper typischen Spezies $^{13}\text{A}^-$, $^{14}\text{A}^-$ bzw. $[^{13}\text{B-CO}]^-$ beobachtet werden. Wie schon bei der Untersuchung per LC-QqQ ist auffällig, dass die Wasserabspaltung des Aglykon-Anions deutlich prominenter abzulaufen scheint als bei HCH-diHO-Fl3olen. Dies zeigte sich in einem deutlich zugunsten der $[Y_0\text{-H}_2\text{O}]^-$ -Spezies verschobenen Signalverhältnis (vergl. 5.3.3.1, S. 128). In **Tabelle 51** sind die Fragmente, welche eine relative Signalintensität von mindestens 20% bezogen auf das höchste Signal im Massenspektrum aufweisen den entsprechenden m/z -Werten zugeordnet. Die auftretenden Fragmente belegen das Vorkommen von HCH-triHO-Fl3olen.

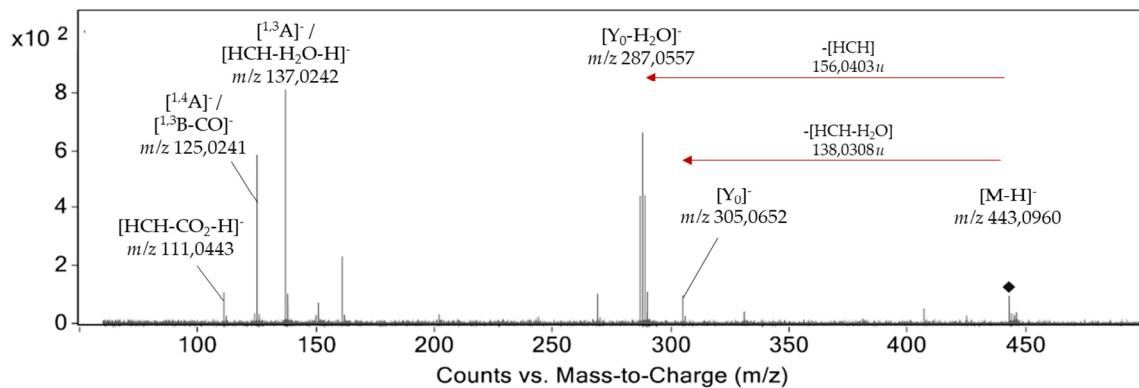


Abbildung 59: Massenspektrum der Modellsubstanz 444.a bei negativer Ionisierung

Tabelle 51: Liste der aufgetretenen Fragmente bei negativer Ionisierung; aufgeführt sind alle Fragmente mit Signalen \geq rel. 20%

<i>m/z</i>	postulierte Spezies
443,096	[M-H] ⁻
305,0652	[Y ₀] ⁻
290,0733	
289,0707	
288,063	
287,0557	[Y ₀ -H ₂ O] ⁻
269,0441	
161,0238	
138,0275	
137,0242	[HCH-H ₂ O-H] ⁻
125,0241	[¹⁴ A] ⁻
111,0443	[HCH-CO ₂ -H] ⁻

5.3.3.3. Modellsubstanz 3: HCH-diHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol (716.a)

Die Modellsubstanz 3 wurde in Fraktion SdIII7 mit einem m/z von 715,1665 definiert. Die errechnete Summenformel entspricht einem Procyanidin-HCH-Addukt (HCH-diHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol). Das erhaltene MS/MS-Spektrum, sowie der postulierte Fragmentierungsweg ist in **Abbildung 60** (S. 133) gezeigt. Charakteristische Fragmente zeigten sich unter anderem durch Verlust eines Neutralteilchens, das mit einer Masse von 156,0424 μ dem HCH entspräche. Dies führt zum Fragment $[M-HCH-H]^-$, welches die Masse eines dehydratisierten dimeren Procyanidins aufweist. Weiterhin konnte analog zu den Modellsubstanzen 1 und 2 eine Abspaltung von HCH ohne Dehydratisierung beobachtet werden. Dies resultierte im Tochterfragment $[M-(HCH-H_2O)-H]^-$, welches mit einem m/z 577,1342 dem dimeren Procyanidin entspräche.

Als weiteres Fragment konnte das Signal bei m/z 563,1192 erfasst und dem möglichen Produkt einer Retro-Diel-Alder-Spaltung (Verlust des $^{1,3}\text{B}$ -Neutralteilchens, RDA) zugeordnet werden. Den zusätzlichen Verlust der HCH-Seitengruppe als Neutralteilchen zeigte das Tochterfragment $[M-^{1,3}\text{B}-HCH-H]^-$ bei m/z 407,0768 (vergl. Symma & Hensel, 2022).

Weitere charakteristische Fragmente eines dimeren Procyanidins konnten ebenso zugeordnet werden. Dazu gehörten das monomere Flavan-3-ol $[Y_0]$, sowie das um ein Wasserstoffmolekül leichtere Fragment $[Y_0-\text{H}_2]$, welche beide aus der Spaltung dimerer Procyanidine hervorgehen (analog Symma & Hensel, 2022). Zudem konnten die Fragmente $[Y_0-\text{H}_2\text{O}]^-$ und $[^{1,4}\text{A}]^+ / [^{1,3}\text{B}-\text{CO}]^-$ beobachtet werden. Alle Fragmente sind in **Tabelle 52** (S: 133) zusammengefasst.

Die auftretenden Fragmente belegen das Vorkommen von HCH-Addukten dimerer Procyanidine in *S. cinerea*. Eine genauere Aussage zur Stereochemie der untersuchten Substanz war mit der angewandten Methodik jedoch nicht möglich.

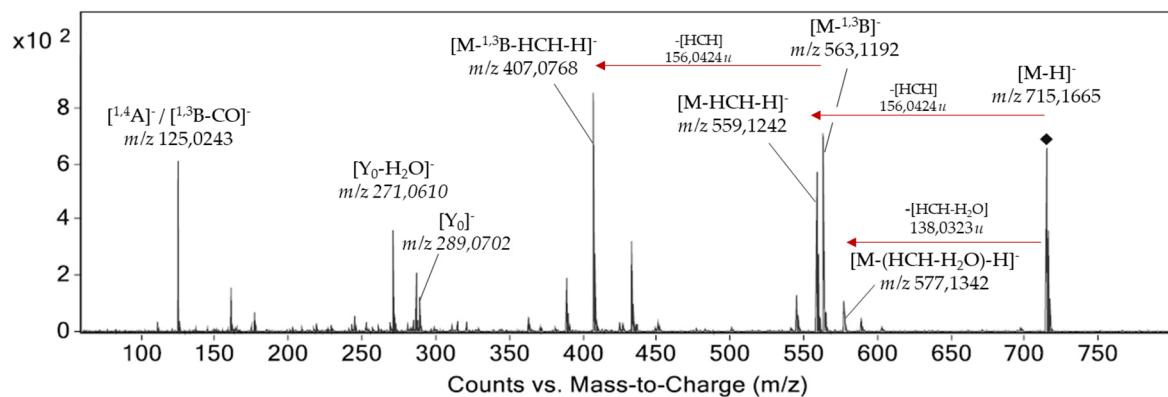


Abbildung 60: Massenspektrum der Modellsubstanz 716.a bei negativer Ionisierung

Tabelle 52: Liste der aufgetretenen Fragmente bei negativer Ionisierung; aufgeführt sind alle Fragmente mit Signalen \geq rel. 20%

<i>m/z</i>	postulierte Spezies
717,1706	
716,1694	
715,1665	$[\text{M}-\text{H}]^-$
577,1342	$[\text{M}-(\text{HCH}-\text{H}_2\text{O})-\text{H}]^-$
564,1122	
563,1192	$[\text{M}-^{13}\text{B}]^-$
560,1272	
559,1242	$[\text{M}-\text{HCH}-\text{H}]^-$
545,1075	
434,0956	
433,0924	
408,0797	
407,0768	$[\text{M}-^{13}\text{B}-\text{HCH}-\text{H}]^-$
389,0655	
289,0702	$[\text{Y}_0]^-$
287,0555	$[\text{Y}_0-\text{H}_2]^-$
271,0610	$[\text{Y}_0-\text{H}_2\text{O}]^-$
161,0237	
125,0243	$^{14}\text{A}]^- / [^{13}\text{B}-\text{CO}]^-$

5.3.3.4. Modellsubstanz 4: HCH-triHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol (732.a)

Modellsubstanz 4 wurde in Fraktion SdIII7 bei einer Retentionszeit von 6,8 - 6,9 Minuten eluiert und weist eine Masse von $732,1689\text{ }\mu$ auf. Die ermittelte Summenformel $\text{C}_{37}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ entspräche dem HCH-Addukt eines dimeren Proanthocyanidins, welches je eine diHO-Fl3ol und triHO-Fl3ol-Untereinheit aufweist. Das durchgeführte MS/MS-Experiment ergab ein Mutterfragment bei m/z 731,1604.

Das erhaltene MS/MS-Spektrum, sowie der postulierte Fragmentierungsweg ist in **Abbildung 61** gezeigt. Charakteristische Fragmente treten analog zu Modellsubstanz 3 (S. 132) auf. Es zeigt sich ein Tochterfragment $[\text{M}-\text{HCH}-\text{H}]^-$ nach Neutralverlust von 156,0420 μ , welches dem Verlust der HCH-Seitengruppe entspräche. Zudem wird das Tochterfragment detektiert, welches bei Modellsubstanz 3 dem Retro-Diels-Alder Produkt $[\text{M}-^{13}\text{B}]^-$ zugeordnet wurde (m/z 563,1181). Auch ein zusätzlicher Neutralverlust, welcher im postulierten Tochterfragment $[\text{M}-^{13}\text{B}-\text{HCH}]^-$ bei m/z 407,0765 resultiert, konnte beobachtet werden (vergl. Symma & Hensel, 2022).

In diesem Zusammenhang hervorzuheben ist, dass diese Fragmente in ihren m/z -Werten exakt den Tochterfragmenten der Modellsubstanz 3 entsprechen, obwohl von einem anderen Mutterfragment ausgegangen wird. Nach den postulierten Fragmentierungen lässt dies den Schluss zu, dass bei der RDA-Spaltung der trihydroxylierte B-Ring der triHO-Fl3ol-Einheit abgespalten wird (^{13}B -Fragment als Neutralteilchen). Dies scheint bevorzugt gegenüber der Abspaltung eines dihydroxylierten B-Rings, da keine Fragmente detektiert werden konnten, die einen um 16 μ höheren m/z -Wert aufweisen.

Zudem konnten charakteristische Tochterfragmente einer Spaltung eines dimeren Proanthocyanidins beobachtet werden. Diese werden einem dehydrierten triHO-Fl3ol ($[\text{X}_0-\text{H}_2]^-$ m/z 303,0504), dem diHO-Fl3ol ($[\text{Y}_0]^-$ m/z 289,0696), dem triHO-Fl3ol nach Verlust eines Wassermoleküls ($[\text{X}_0-\text{H}_2\text{O}]^-$ m/z 287,0553) und dem diHO-Fl3ol nach Verlust eines Wassermoleküls ($[\text{Y}_0-\text{H}_2\text{O}]^-$ m/z 271,0598) zugeordnet. Das Fehlen eines Signals bei m/z 305 bei gleichzeitigem Auftreten eines dem dehydrierten triHO-Fl3ol zuzuordnenden Signals legt den Schluss nahe, dass triHO-Fl3ol die obere der beiden Flavan3ol-Einheiten darstellt. Bei der Spaltung des dimeren Proanthocyanidins wird die Entstehung eines dehydrierten Flavan-3-ols aufgrund der typischen Verknüpfung unter Beteiligung von C4 angenommen (vergl. Symma & Hensel, 2022).

Für eine einfachere Unterscheidung wurde analog zur Bezeichnung $[Y_0]^-$ für die $[MH]^-$ -Spezies des diHO-Fl3ols die Bezeichnung $[X_0]^-$ für die korrespondierenden Spezies des triHO-Fl3ols eingeführt. Die Signale und zugeordneten postulierten Fragmente sind in **Tabelle 53** zusammengefasst.

Das Auftreten der dargestellten Fragmente belegt das Vorkommen eines HCH-Addukts eines dimeren Proanthocyanidins unter Beteiligung im jeweiligen B-Ring di- und trihydroxylierter Flavan-3-ol-Monomere. Das Vorkommen dieser gemischt hydroxylierten dimeren Proanthocyanidine in *S. cinerea* wurde im Rahmen dieses Projekts durch die Isolierung von Prodelphinidin B3 (3.5.3.7, S. 83) bereits belegt. Daher wird hier das Vorkommen eines Prodelphinidin-HCH-Addukts unter Beteiligung je einer triHO-Fl3ol und einer diHO-Fl3ol-Einheit postuliert.

Trotz intensiver Literaturrecherche konnte kein Bericht über eine solches HCH-Addukt in der Literatur gefunden werden.

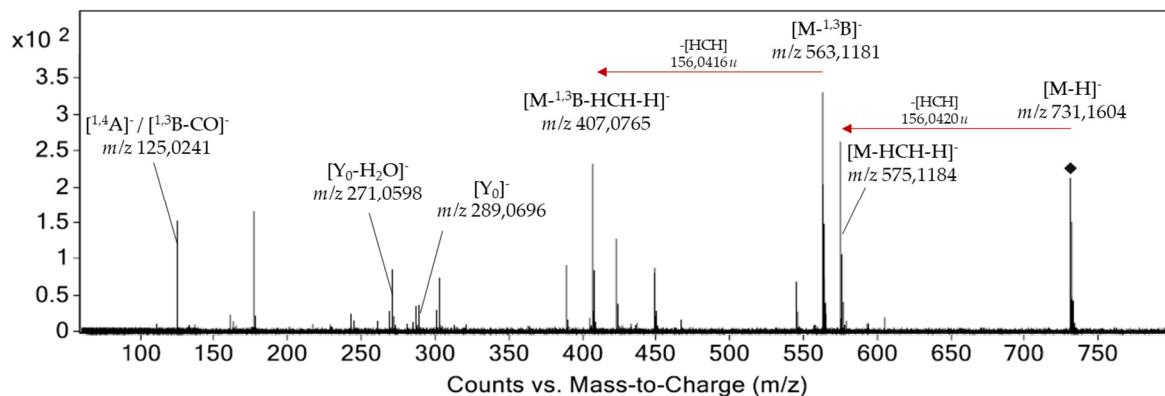


Abbildung 61: Massenspektrum der Modellsubstanz 732.a bei negativer Ionisierung

Tabelle 53: Liste der aufgetretenen Fragmente bei negativer Ionisierung; aufgeführt sind alle Fragmente mit Signalen \geq rel. 20%

<i>m/z</i>	postulierte Spezies
732,1634	
731,1604	$[\text{M}-\text{H}]^-$
575,1184	$[\text{M}-\text{HCH}-\text{H}]^-$
564,1209	
563,1181	$[\text{M}-^{1,3}\text{B}]^-$
545,1071	
450,0898	
449,0858	
423,0707	$[\text{M}-^{1,3}\text{B}-(\text{HCH}-\text{H}_2\text{O})]^-$
408,0796	
407,0765	$[\text{M}-^{1,3}\text{B}-\text{HCH}]^-$
389,0659	
303,0504	$[\text{X}_0-\text{H}_2]^-$
289,0696	$[\text{Y}_0]^-$
287,0553	$[\text{X}_0-\text{H}_2\text{O}]^-$
271,0598	$[\text{Y}_0-\text{H}_2\text{O}]^-$
177,0187	
125,0241	$[^{1,4}\text{A}]^- / [^{1,3}\text{B}-\text{CO}]^-$

5.3.3.5. Modellsubstanz 5: HCH-diHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol-diHO-Fl3ol (1004.a)

In Fraktion SdIII8 wurde mit einer Retentionszeit von 7,8 - 7,9 Minuten und einer Masse von 1004,2366 μ die Modellsubstanz 5 definiert. Die aus der hochauflösenden Massebestimmung resultierende Summenformel $C_{52}H_{44}O_{21}$ entspräche dem HCH-Addukt eines trimeren Procyanidins. Das MS/MS-Experiment führte zu einem Mutterfragment bei m/z 1003,2282. Das erzeugte MS/MS-Spektrum, der postulierte Fragmentierungsweg sowie eine Auflistung der Signale und zugeordneten Fragmente sind in **Abbildung 62** bzw. **Tabelle 54** (S. 139) gezeigt.

Das auftretende Tochterfragment bei m/z 847,1838 wurde der Spezies $[M-HCH-H]^-$ zugeordnet, welches in Analogie zu den Modellsubstanzen 1 bis 4, durch den Verlust eines Neutralteilchens mit einer Masse von 156,0419 μ die Abspaltung der HCH-Gruppe zeigte. Zudem konnte ein Neutralverlust von 288,0656 μ beobachtet werden. Dieser entspräche dem Verlust einer diHO-Fl3ol-Einheit, in der Abbildung als „Cat“ bezeichnet. Das daraus resultierende Tochterfragment $[M-Cat-H]^-$ bei m/z 715,1626 entspricht damit dem Mutterfragment der Modellsubstanz 3, einem HCH-Addukt eines homogenen dimeren Procyanidins.

Weitere bereits für Modellsubstanz 3 besprochene Tochterfragmente konnten detektiert werden. Dazu zählen die analog benannten Tochterfragmente $[Y_0]^-$, $[Y_0-H_2]^-$, $[^{14}A]^-/[^{13}B-CO]^-$ sowie die nach Abspaltung einer diHO-Fl3ol-Einheit erhaltenen Tochterfragmente $[M-Cat-^{13}B-H]^-$, $[M-Cat-HCH-H]^-$, $[M-Cat-^{13}B-HCH]^-$ (vgl. 5.3.3.3, S. 132).

Zudem konnte das Tochterfragment $[M-Cat-^{13}B-(HCH-H_2O)-H]^-$ bei m/z 423,0697 analog Modellsubstanz 4 dem RDA-Spaltprodukt des dimeren Procyanidins zugeordnet werden.

Das Signal bei m/z 305,0623 kann in diesem Falle nicht einer triHO-Fl3ol-Einheit zugeordnet werden, da im gesamten MS/MS-Spektrum keine Massenverluste von 304 oder 306 μ zu beobachten sind, welche auf eine triHO-Fl3ol-Einheit als Kettenglied bzw. als untere Flavan-3-ol-Einheit des Proanthocyanidins hindeuteten. Da ebenfalls keine auf ein mHO-Fl3ol hindeutenden Signale zu erkennen waren, kann ausgeschlossen werden, dass der zugrundeliegende Proanthocyanidin-Grundkörper aus je einem mono-, di und trihydroxylierten Flavan-3-olen aufgebaut ist.

Die Gesamtheit der auftretenden Fragmente führt zu dem Schluss, dass es sich bei Modellsubstanz 4 (1004.a) um das HCH-Addukt eines homogen aus diHO-Fl3ol-Einheiten aufgebauten trimeren Procyanidins handelt.

Ein solches Addukt wurde bereits in der Literatur beschrieben (Hsu et al., 1985), allerdings wurden bisher keine Daten zur Fragmentierung präsentiert. Diese Arbeit stellt somit den ersten Bericht von MS/MS-Daten des HCH-Addukts eines trimeren Procyanidins dar.

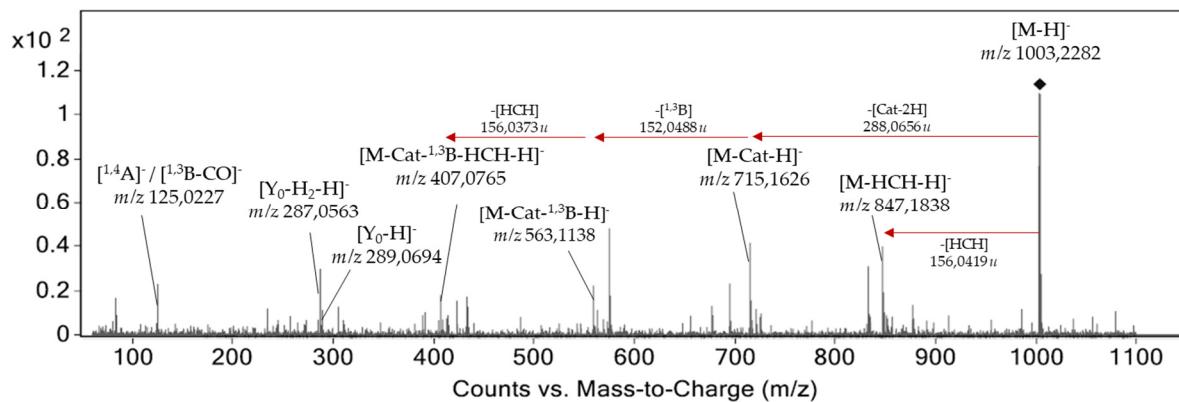


Abbildung 62: Massenspektrum der Modellsubstanz 1004.a bei negativer Ionisierung

Tabelle 54: Liste der aufgetretenen Fragmente bei negativer Ionisierung; aufgeführt sind alle Fragmente mit Signalen \geq rel. 10%

<i>m/z</i>	postulierte Spezies
1004,2300	
1003,2282	[M-H] ⁻
985,8480	
877,1992	
848,1882	
847,1838	[M-HCH-H] ⁻
833,1672	
721,1524	
716,1678	
715,1626	[M-Cat-H] ⁻
695,1320	[M- ^{1,3} B-HCH] ⁻
677,1291	[M- ^{1,3} B-HCH-H ₂ O-H] ⁻
576,1245	
575,1184	
563,1138	[M-Cat- ^{1,3} B-H] ⁻
559,1243	[M-Cat-HCH-H] ⁻
434,0953	
433,0924	
423,0697	[M-Cat- ^{1,3} B-(HCH-H ₂ O)-H] ⁻
407,0742	[M-Cat- ^{1,3} B-HCH] ⁻
305,0623	
289,0694	[Y ₀ -H] ⁻
287,0563	[Y ₀ -H ₂ -H] ⁻
234,5300	
125,0227	[^{1,4} A] ⁻ / [^{1,3} B-CO] ⁻
83,0247	

5.4.Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit konnten für *Salix cinerea* zahlreiche HCH-Addukte (1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure-ester) nachgewiesen werden. In allen proanthocyanidinhaltigen Fraktionen eines an Sephadex® LH-20 chromatographierten, methanolischen Extrakts konnten durch LC-MS und LC-MS/MS Verbindungen detektiert werden, die in der molekularen Zusammensetzung HCH-Addukten von Flavan-3-olen und Procyanidinen entsprechen.

Des Weiteren konnte durch die Anwendung von LC-MS/MS (TripleQuad) das Fragmentierungsmuster von HCH-Addukten mit Salicylalkohol-Grundkörper und jener mit Flavan-3-olen als Grundkörper verglichen werden. Dabei konnte die Neigung der HCH-Fl3ole, die HCH-Seitengruppe als Neutralteilchen abzuspalten beobachtet werden. Dies führt im Vergleich mit den Salicylalkoholderivaten zu unterschiedlichen charakteristischen Tochterfragmenten im MS/MS-Experiment.

Mit Hilfe der identifizierten, charakteristischen Fragmente konnten ferner fünf HCH-Addukte von Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen in ihrer Struktur näher beschrieben und das jeweilige Fragmentierungsmuster postuliert werden. Dies stellt den ersten detaillierten Bericht zum postulierten Fragmentierungsweg di- und trimerer Proanthocyanidin-HCH-Addukte dar. Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein HCH-Addukt eines gemischt, di- und trihydroxylierten dimeren Proanthocyanidins nachgewiesen werden.

Diese massenspektrometrische Untersuchung gibt einen Einblick in die weite Verbreitung der HCH-Addukte in Extrakten von *Salix cinerea*, auch abseits der in der Vergangenheit stets im Fokus stehenden Salicylalkoholderivate. Inwieweit diese Addukte auch mit anderen Inhaltsstoffgruppen gebildet werden, müssen nachfolgende Untersuchungen zeigen. Ebenso von Interesse wäre eine Gesamt-HCH-Bestimmung, um einen Beitrag dieser Addukte zur Wirksamkeit von Zubereitungen aus *Salicis cortex* abschätzen zu können. Insofern stellt diese Untersuchung einen weiteren Schritt zum Verständnis der Wirkung der Droge *Salicis cortex* dar.

6. *Salix* Screening

6.1. Hintergrund

Die Qualität der Arzneidroge *Salicis cortex* wird durch eine Gehaltsbestimmung der Gesamtsalicylderivate, berechnet als Salicin überprüft. Für die Gewinnung von *Salicis cortex* als Arzneidroge werden im europäischen Arzneibuch drei Arten der Gattung *Salix*, *Salix fragilis*, *dpahnoides* und *purpurea* vorgeschlagen, jedoch sind auch andere Arten der Gattung *Salix* zugelassen ("Weidenrinde *Salicis Cortex*," 2020; Wichtl et al., 2015), sofern die geforderten Qualitätsmerkmale erfüllt sind. Zu einem geeigneten Erntezeitpunkt der Ernte findet sich in der Arzneibuchmonografie keine Aussage. Verschiedene Studien befassten sich mit dem jahreszeitlichen Verlauf der Salicylalkoholderivate in Weidenrinde, um die Grundlagen für eine qualitativ hochwertige Droge zu schaffen. Betrachtungen dazu finden sich beispielweise bei Förster et al. (2008), Meier et al. (1985) oder Thieme (1965a) und einer Übersichtsarbeit von Zidorn (2018). Dabei wurden sowohl die Rinde als auch weitere Pflanzenorgane in die Betrachtung einbezogen und insbesondere für die Folium-Droge bemerkenswerte Gehalte an Salicylalkoholen beobachtet (Julkunen-Tiitto, 1985a; Julkunen-Tiitto et al., 1988; Wiesneth, 2019). Diese sowie weitere Arbeiten hatten auch interspezifische Unterschiede im Blick (vgl. Förster et al., 2021; Julkunen-Tiitto, 1989), ein Aspekt der wegen des Formenreichtums der Gattung *Salix* (die Gattung umfasst ca. 350 bis 500 Arten (Aas, 2017; Holdenrieder et al., 1999; Laron-Moreau et al., 2015; Wu et al., 2015)), nur im Teilen abgedeckt werden kann. Zudem sind durch Zweihäusigkeit und mögliche Hybridisierung (Aas, 2017; Holdenrieder et al., 1999) weitere Variablen mit möglichem Einfluss auf die Qualität und Eigenschaften der Droge gegeben.

Um diese Aspekte im Rahmen der vorliegenden Arbeit abdecken zu können, ist die Zusammenarbeit mit dem Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth von unschätzbarem Wert. Das dortige Salicetum beheimatet eine große Anzahl (ca. 90 Taxa) verschiedener Weiden. Dies ermöglicht durch den gemeinsamen Standort und einheitliche klimatische Bedingungen vergleichende Studien durchzuführen. In einer Pilotstudie von Wiesneth (2019) wurden bereits 13 Individuen (elf Taxa) über eine Wachstumsperiode beobachtet und studiert. Dabei wurden neben den Salicylalkoholen auch Gerbstoffe, Proanthocyanidine und weitere phenolische Inhaltsstoffgruppen betrachtet (Wiesneth, 2019; Wiesneth et al., 2018). Neben dem jahreszeitlichen Verlauf der Inhaltsstoffkonzentrationen

wurden auch Erkenntnisse zu geschlechterspezifischen Unterschieden und dem Einfluss von Hybridisierung auf das Inhaltsstoffspektrum gesammelt.

In der vorliegenden Arbeit sollten diese Erkenntnisse genutzt werden und eine umfassendere Untersuchung an 12 Spezies durchgeführt werden. Zum Einen wurden die eingeschlossenen Individuen über mehrere Jahre beprobt, um auch einen saisonübergreifenden Vergleich anstellen zu können. Ähnliche Betrachtungen wurden auch von Köhler et al. (2023) und Nissinen et al. (2018) angestellt, welche deutliche Variabilität zwischen einzelnen Jahrgängen feststellen konnten. Diese jahreszeitlichen Betrachtungen wurden für Gerbstoffe und Restphenole, Proanthocyanidine sowie insgesamt acht phenolische Strukturklassen durchgeführt. Eine Ausweitung der Betrachtung auf andere Strukturklassen als die Salicylalkoholderivate, liegt im Beitrag phenolischer Inhaltsstoffgruppen zur Wirksamkeit der Droge begründet (Nahrstedt et al., 2007). Bei der Gerbstoffuntersuchung kam eine Modifikation der Arzneibuchmethode Ph.Eur 2.4.18 nach Wiesneth & Jürgenliemk (2017) zur Anwendung (6.2.5 S. 157). Proanthocyanidine wurden mit Hilfe einer UPLC®-Diol-Methode nach Hellenbrand et al. (2015a) durchgeführt (6.2.3, S. 151). Acht phenolische Inhaltsstoffgruppen wurden mit Hilfe der in Kapitel 6.2.4 (S. 153) vorgestellten UPLC®-RP Methode bestimmt (Wiesneth, 2019; Wiesneth et al., 2018). Die Einteilung der Strukturklassen sowie die Zuteilung unterscheidet sich zu der Pilotstudie von Wiesneth (2019). Drei phenolische Strukturklassen wurden untersucht: Salicylalkoholderivate, Kaffeesäurederivate sowie Cumarylalkoholglykoside & Acetophenone. Letztere werden gemeinsam mit diesen Phenylpropanalkoholderivaten in der Klasse Cumarylalkoholglykoside (CAG) zusammengefasst. Neben diesen wurden fünf Flavonoidklassen untersucht: Flavan-3-ole, Flavone, Flavonole, Flavanone und Flavanonole.

Mit den erhobenen Daten sollten saisonale Variabilitäten auch intersexuelle Unterschiede gezeigt werden. Der Einfluss des Geschlechts auf die Sekundärmetabolite sowie Wachstum und Nährstoffakkumulation, Blütenduftstoffe und Nektarzusammensetzung wurden bereits in verschiedenen Studien adressiert (Dötterl et al., 2014; Füssel et al., 2007; Köhler et al., 2023; Nybakken & Julkunen-Tiitto, 2013; Yang et al., 2020). Diese kommen jedoch zu teils unterschiedlichen Ergebnissen und ein Vergleich der Studien ist aufgrund der unterschiedlichen Standorte und Studiendesigns schwierig (Sargent & McKeough, 2022). Daher wurden in den Jahren 2018 und 2019 vier Spezies (*S. caprea*, *cinerea*, *fragilis* und *purpurea*) mit mehreren Individuen eingeschlossen, um eine solche Betrachtung zu ermöglichen.

S. daphnoides wurde über drei Jahre mit mehreren Individuen (zwei männliche, ein weibliches) in die Studie inkludiert und in die geschlechterspezifische Betrachtung eingeschlossen.

Neben diesen Betrachtungen sollten die erhobenen Daten zu einer Charakterisierung herangezogen und Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten der jeweiligen Arten beleuchtet werden. Diese Ergebnisse sollten mit den etablierten Einteilungen der Gattung *Salix* in Sektionen nach Skvortsov & Zinovjev (1999) abgeglichen werden. Da diese Einteilung auf morphologischen Eigenschaften beruht, sollten auch neuere Erkenntnisse phylogenetischer Studien wie bei N. D. Wagner (2018) und N. D. Wagner et al. (2020) herangezogen werden. Studien zum Chemoprofiling wie bei Förster et al. (2021) oder Kammerer et al. (2005) erfordern einen speziellen und kostenintensiven apparativen Aufbau. Um die Datenlage zu erweitern, soll die vorliegende Studie eine einfache und kostengünstige Möglichkeit eines Screenings auf phenolische Inhaltsstoffgruppen zur Charakterisierung von Sekundärstoffprofilen in *Salix* aufzeigen und Anhaltspunkte für weiterführende Studien und für gezielte Extraktkomposition liefern.

6.2. Material und Methoden

6.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 55: Liste der zur Anwendung gebrachten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller	Ort
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Einmalspritzen	Norm-Ject, Tuberculin, 1 ml	Henke Sass Wolf GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Glasgeräte, diverse	Mess- und Vollpipetten (vers. Volumina)	Brand GmbH & Co KG	Wertheim, Deutschland
Glasgeräte, diverse	Messkolben (5, 10, 25, 50 und 1000 ml)	Brand GmbH & Co KG	Wertheim, Deutschland
Glasgeräte, diverse	Messzylinder (10 bis 1000 ml)	Schott AG	Mainz, Deutschland
HPLC-Vial	11 mm CrimpSnap-Vial, braun, 2 ml	Wicom Germany GmbH	Heppenheim, Deutschland
Oberschalenwaage	MC 1, Laboratory LC 6200 S	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Pasteurpipetten	230 mm	VWR International GmbH part of avantor	Ismaning, Deutschland
Pipetten	100 Research (10-100 µl)	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Pipetten	1000 Research (100-1000 µl)	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Pipetten	Mehrkanal (30-300 µl)	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl	Sarstedt AG & Co KG	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	100 - 1250 µl	VWR International GmbH part of avantor	Ismaning, Deutschland
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure GmbH	Berlin, Deutschland
Schnappdeckelgläser	5 und 20 ml	VWR International GmbH part of avantor	Ismaning, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)	Wicom Germany GmbH	Heppenheim, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR International GmbH part of avantor	Ismaning, Deutschland
Exsikkatoren	DURAN® Vakuum-Exsikkator	Duran-Group GmbH	Mainz, Deutschland
Ultracentrifugalmühle	UZM 1	Retsch GmbH	Haan, Deutschland
Schwingmühle	Retsch MM 400	Retsch GmbH	Haan, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 55

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller	Ort
Reaktionsgefäß	1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß	2,0 ml	VWR International GmbH part of avantor	Ismaning, Deutschland
Plattenlesegerät	Spectra FluorPlus	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim, Deutschland
Plattenlesegerät	Xfluor4 V 4.40 (Software)	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim, Deutschland
Zellkulturstestplatte	96-well	TPP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
UPLC®-System	Acquity H-Class quaternary solvent manager	Waters GmbH	Eschborn, Deutschland
	Acquity FTN autosampler	Waters GmbH	Eschborn, Deutschland
	Acquity eλ PDA detector	Waters GmbH	Eschborn, Deutschland
	Acquity FLR detector	Waters GmbH	Eschborn, Deutschland
UHPLC-Säulen	Acquity UPLC® Protein SEC, 200 Å, 1,7 µm, 4,6x150 mm	Waters GmbH	Eschborn, Deutschland
UHPLC-Säulen	Luna Omega 1,6 µm C18 100 Å 100x2,1 mm	Phenomenex Ltd. Deutschland	Aschaffenburg, Deutschland
Reaktionsgefäß-Zentrifugen	Sigma 1-14	Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz, Deutschland
Schüttler	Vortex Genie 2™	VWR International GmbH part of avantor	Ismaning, Deutschland
Proben-Becher	100 mL Mehrzweck PP-Becher	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Skalpelle	Cutfix	B. Braun SE	Melsungen, Deutschland
Wasserstrahlpumpe	Water Jet Pump	Bürkle GmbH	Bad Bellingen, Deutschland

Tabelle 56: Liste der zur Anwendung gebrachten Chemikalien und Referenzsubstanzen

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller	Ort
Acetonitril (ACN)	HPLC-grade, LiChrosolv®	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	100%, anhydrous	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Methanol	HPLC-grade, LiChrosolv®	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
(+)-Catechin Hydrat	≥ 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
5,7-Dimethoxycoumarin (= Citropten),	≥ 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Folin-Ciocalteu Reagenz	-	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kaffeesäure	Reag. DAB	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Na ₂ CO ₃	anh.	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
D-(-)-Salicin	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Silica Gel Orange (=Orangegegel)	-	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Quercetin Dihydrat	97%	Alfa Aesar (Thermo Fisher GmbH)	Karlsruhe, Deutschland
3',5,7-Trihydroxy-4'- methoxyflavanone 97% (Hesperetin)	97%	Alfa Aesar (Thermo Fisher GmbH)	Karlsruhe, Deutschland
Hautpulver	-	Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen GmbH	Freiberg, Deutschland
3,4-Dicaffeoylchinasäure	≥90%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Cryptochlorogensäure	phyproof® Reference Substance	Phytolab GmbH & Co. KG	Vestenbergsgreuth, Deutschland
m-Cumarsäure	puriss.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Rosmarinsäure	>98%	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Epicatechin	≥ 95%	Phytolab GmbH & Co. KG	Vestenbergsgreuth, Deutschland
Epigallocatechin	≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Eriodictyol	≥ 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Eriodictyol-7-O-glykosid	≥ 95%	Extrasynthese	Genay Cedex, Frankreich

Fortsetzung Tabelle 56

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller	Ort
Luteolin	≥ 95%	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Luteolin-7-O-glykosid	≥ 95%	Phytolab GmbH & Co. KG	Vestenbergsgreuth, Deutschland
Naringenin	≥ 95%	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Taxifolin	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Apigenin	≥ 95%	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Baicalein	98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Vicenin II	≥ 95% (HPLC)	Phytolab GmbH & Co. KG	Vestenbergsgreuth, Deutschland
Isorhamnetin	≥ 95% (HPLC)	Phytolab GmbH & Co. KG	Vestenbergsgreuth, Deutschland
Kaempferol	≥ 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland

6.2.2. Pflanzenmaterial

Die im Rahmen dieses Projekts beprobten *Salix*-Individuen haben ihren Standort im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth. Die Individuen wurden markiert und die GPS-Daten dokumentiert, um Verwechslungen im Laufe des Projekts auszuschließen. Jeweils zwei Gewebe wurden beprobt – Blätter und diesjährige Triebe. Blätter wurden manuell von den Trieben entfernt und per Skalpell zerkleinert. Die Triebe wurden, von Knospen und Blättern befreit, mit Skalpellen und Scheren in ca. 2 mm große Stücke geschnitten. Anschließend erfolgte die Trocknung in 100 mL Mehrzweck PP-Bechern (Greiner Bio-One GmbH, Frickehausen, Deutschland) in Exsikkatoren über Orangegele. Um das Verdampfen der Flüssigkeit zu beschleunigen, wurden die Exsikkatoren jeweils per Wasserstrahlpumpe evakuiert. Dieses Vorgehen orientiert sich an verschiedenen Studien, welche zu unterschiedlichen Trocknungsmethoden und deren Auswirkungen auf die Inhaltsstoffzusammensetzung durchgeführt wurden. Dabei zeigte sich die Trocknung im Vakuum als die schonendste Methode zum Erhalt der labilen salicylalkoholhaltigen Verbindungen und Flavonoide (Julkunen-Tiitto & Gebhardt, 1992; Julkunen-Tiitto & Sorsa, 2001; Julkunen-Tiitto & Tahvanainen, 1989).

Das Orangegelel wurde fünf Tage lang täglich gegen regeneriertes Orangegelel (150 °C, über Nacht) ausgetauscht, eine letzte Trocknungsperiode fand über das jeweils folgende Wochenende statt.

Wiesneth et al. (2015, 2018) etablierten dieses Vorgehen am Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth bereits mit einer Trocknungszeit von fünf Tagen. Diese wurde aus organisatorischen Gründen auf sieben Tage ausgedehnt wurde.

6.2.2.1. Probenvorbereitung

Die Proben der Wachstumssaison 2017 wurden mit einer UZM 1 Ultrazentrifugalmühle (Retsch GmbH, Haan Deutschland) unter Verwendung des Siebeinsatzes von 0,5 mm vermahlen. Dabei wurden etwa 5 g des jeweiligen Gewebes verarbeitet.

Ab der Saison 2018 wurden die Proben mit einer Schwingmühle MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) verarbeitet. Für die Triebe kam ein 50 ml Mahlbecher aus rostfreiem Stahl mit einer 25 mm Kugel, für die Folium-Droge ein 25 ml Mahlbecher mit 10 mm Kugel (Mahlbecher und Kugeln rostfreier Stahl) zur Anwendung. Es wurden jeweils ca. 1,5 g Triebe und 1,0 g Blätter eingewogen und für 1 min bei einer Schwingfrequenz von 30 Hz vermahlen.

Das gepulverte Material wurde bis zur Verwendung in Schnappdeckelgläsern bei -20 °C gelagert. Zur Analyse wurden ca. 50 mg genau gewogen und in 1,5 ml Reaktionsgefäß extrahiert. Als Extraktionsmittel diente Methanol mit 0,2 mg/ml Citropten (5,7-Dimethoxycoumarin) als internem Standard für die spätere UHPLC-Analyse. Die Extraktion wurde für 30 min im Ultraschallbad (VWR International GmbH, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen pro Minute (3 min) und eine Filtration durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm Perfect Flow® RC Filter, WICOM Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland) an.

6.2.2.2. Liste der beprobten Individuen

Im Folgenden sind die für die Studie ausgewählten Individuen aufgelistet (**Tabelle 57**). Diese Liste führt die Individuen nach aufsteigender Nummerierung auf. Zudem sind die Individuen aufgeführt, welche bereits bei der Pilotstudie von Wiesneth (2019) und Wiesneth et al. (2018) untersucht wurden (Probennahme in der Saison 2016). In der Saison 2017 wurde das Probenset im Vergleich zur Pilotstudie deutlich verändert und in den darauffolgenden Jahren die Anzahl der beprobten Individuen deutlich erhöht. Insgesamt wurden elf beziehungsweise zwölf verschiedene Spezies in die Studie einbezogen. Bei mehrfach

vertretenen Spezies wurde ein möglichst ausgewogenen Geschlechterverhältnis angestrebt, um eine Betrachtung intersexueller Variabilität zu ermöglichen. Eine Übersicht der untersuchten Spezies findet sich in **Tabelle 58** (S. 150).

Tabelle 57: Auflistung der beprobten Individuen für das *Salix* Screening in den Jahren 2016-2019; mit enthalten sind Individuen, welche im Rahmen eines Pilotprojekts von Wiesneth et al. in der Wachstumssaison 2016 beprobzt wurden; diese Ergebnisse wurden bereits publiziert (Wiesneth, 2019; Wiesneth et al., 2018)

ID_Individuum	Kurzbez.	Gattung	Art	Geschlecht	2016	2017	2018	2019
01_Spur_m_BT	Spur_01	Salix	<i>purpurea</i>	♂	x	x	x	x
02_Sdap_f_BT	Sdap_02	Salix	<i>daphnoides</i>	♀	x	x	x	x
03_Sdap_m_BT	Sdap_03	Salix	<i>daphnoides</i>	♂	x	x	x	x
04_Sfra_m_BT	Sfra_04	Salix	<i>fragilis</i>	♂	x	x	x	x
05_Salb_BT	-	Salix	<i>alba</i>		x			
06_Scap_f_BT	-	Salix	<i>caprea</i>	♀	x			
07_Scap_m_BT	-	Salix	<i>caprea</i>	♂	x			
08_Scin_m_BT	Scin_08	Salix	<i>cinerea</i>	♂	x		x	x
09_Sexc_BT	-	Salix	<i>caprea x cinerea</i>		x			
10_Sele_BT	-	Salix	<i>eleagnos</i>		x			
11_Spen_BT	-	Salix	<i>pentandra</i>		x			
12_Sdas_BT	-	Salix	<i>dasyclados</i>		x			
13_Srep_BT	-	Salix	<i>repens</i>		x			
14_Spur_f_BT	Spur_14	Salix	<i>purpurea</i>	♀		x	x	x
15_Spur_f_BT	Spur_15	Salix	<i>purpurea</i>	♀		x	x	x
16_Sdap_m_BT	Sdap_16	Salix	<i>daphnoides</i>	♂		x	x	x
17_Sfra_m_BT	Sfra_17	Salix	<i>fragilis</i>	♂		x	x	x
18_Sfra_f_BT	Sfra_18	Salix	<i>fragilis</i>	♀		x	x	x
19_Sbic_f_BT	Sbic_19	Salix	<i>bicolor</i>	♀		x	x	x
20_Shaf_f_BT	Shaf_20	Salix	<i>hastata</i>	♀		x	x	
21_Scae_f_BT	Scae_21	Salix	<i>caesia</i>	♀		x	x	x
22_Saur_f_BT	Saur_22	Salix	<i>aurita</i>	♀		x	x	x
23_Svim_m_BT	Svim_23	Salix	<i>viminalis</i>	♂		x	x	x
24_Slap_f_BT	Slap_24	Salix	<i>lapponum</i>	♀		x	x	x
25_Sxse_mf_BT	Sxse_25	Salix	<i>x sepulcralis</i>	♂♀		x	x	x
26_Scap_f_BT	Scap_26	Salix	<i>caprea</i>	♀			x	x
27_Scap_f_BT	Scap_27	Salix	<i>caprea</i>	♀			x	x
28_Scap_f_BT	Scap_28	Salix	<i>caprea</i>	♀			x	x
29_Scap_f_BT	Scap_29	Salix	<i>caprea</i>	♀			x	x
30_Scap_m_BT	Scap_30	Salix	<i>caprea</i>	♂			x	x
31_Scap_m_BT	Scap_31	Salix	<i>caprea</i>	♂			x	x
32_Scap_m_BT	Scap_32	Salix	<i>caprea</i>	♂			x	x
33_Scap_m_BT	Scap_33	Salix	<i>caprea</i>	♂			x	x
34_Scin_m_BT	Scin_34	Salix	<i>cinerea</i>	♂			x	x
35_Scin_m_BT	Scin_35	Salix	<i>cinerea</i>	♂			x	x
36_Scin_m_BT	Scin_36	Salix	<i>cinerea</i>	♂			x	x
37_Scin_f_BT	Scin_37	Salix	<i>cinerea</i>	♀			x	x
38_Scin_f_BT	Scin_38	Salix	<i>cinerea</i>	♀			x	x
39_Scin_f_BT	Scin_39	Salix	<i>cinerea</i>	♀			x	x

Fortsetzung Tabelle 57

ID_Individuum	Kurzbez.	Gattung	Art	Geschlecht	2016	2017	2018	2019
40_Scin_f_BT	Scin_30	<i>Salix</i>	<i>cinerea</i>	♀		x	x	
41_Sfra_f_BT	Sfra_41	<i>Salix</i>	<i>fragilis</i>	♀		x	x	
42_Sfra_f_BT	Sfra_42	<i>Salix</i>	<i>fragilis</i>	♀		x	x	
43_Sfra_f_BT	Sfra_43	<i>Salix</i>	<i>fragilis</i>	♀		x	x	
44_Sfra_m_BT	Sfra_44	<i>Salix</i>	<i>fragilis</i>	♂		x	x	
45_Sfra_m_BT	Sfra_45	<i>Salix</i>	<i>fragilis</i>	♂		x	x	
46_Spur_f_BT	Spur_46	<i>Salix</i>	<i>purpurea</i>	♀		x	x	
47_Spur_f_BT	Spur_47	<i>Salix</i>	<i>purpurea</i>	♀		x	x	
48_Spur_m_BT	Spur_48	<i>Salix</i>	<i>purpurea</i>	♂		x	x	
49_Spur_m_BT	Spur_49	<i>Salix</i>	<i>purpurea</i>	♂		x	x	
50_Spur_f_BT	Spur_50	<i>Salix</i>	<i>purpurea</i>	♀		x	x	

Tabelle 58: Anzahl der im Rahmen dieser Arbeit beprobten Individuen pro Spezies

Gattung	Art	Geschlecht	2017	2018	2019
<i>Salix</i>	<i>purpurea</i>	1x ♂, 2x ♀ (2017) 3x ♂, 5x ♀ (2018/19)	3x	8x	8x
<i>Salix</i>	<i>daphnoides</i>	2x ♂, 1x ♀	3x	3x	3x
<i>Salix</i>	<i>fragilis</i>	2x ♂, 1x ♀ (2017) 4x ♂, 4x ♀ (2018/19)	3x	8x	8x
<i>Salix</i>	<i>caprea</i>	4x ♂, 4x ♀ (2018/19)		8x	8x
<i>Salix</i>	<i>cinerea</i>	1x ♂ (2017) 4x ♂, 4x ♀ (2018/19)	1x	8x	8x
<i>Salix</i>	<i>bicolor</i>	♀	1x	1x	1x
<i>Salix</i>	<i>hastata</i>	♀	1x	1x	
<i>Salix</i>	<i>caesia</i>	♀	1x	1x	1x
<i>Salix</i>	<i>aurita</i>	♀	1x	1x	1x
<i>Salix</i>	<i>viminalis</i>	♂	1x	1x	1x
<i>Salix</i>	<i>lapponum</i>	♀	1x	1x	1x
<i>Salix</i>	<i>sepulcralis</i> ^x	♂♀	1x	1x	1x
Anzahl Individuen			17	42	41
Anzahl verschiedener Arten			11	12	11

6.2.2.3. Liste der Probenzüge

In Tabelle 59 sind die Tage der Probenzüge im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth aufgeführt. Der erste Probenzug wurde durchgeführt, wenn das Laub voll entwickelt war, was den Beginn der Wachstumssaison kennzeichnet. Die Probenzüge wurden in einem zeitlichen Abstand von ca. vier bis fünf Wochen und jeweils möglichst zu Beginn des Monats durchgeführt, soweit dies möglich war. Wie in Kapitel 6.2.2 (S. 147)

beschrieben wurden die Probenzüge an Montagen durchgeführt, um eine Trocknung über Orangegel im Verlauf einer gesamten Woche zu ermöglichen.

Tabelle 59: Auflistung der Daten durchgeföhrter Probenzüge am Ökologisch-botanischen Garten der Universität Bayreuth;

Monat	2017	2018	2019
Mai	-	07.05.2018	13.05.2019
Juni	06.06.2017	11.06.2018	03.06.2019
Juli	04.07.2017	02.07.2018	01.07.2019
August	07.08.2017	30.07.2018	05.08.2019
September	12.09.2017	03.09.2018	10.09.2019

6.2.3. UPLC®-DIOL-FLR: Quantifizierung von Proanthocyanidinen

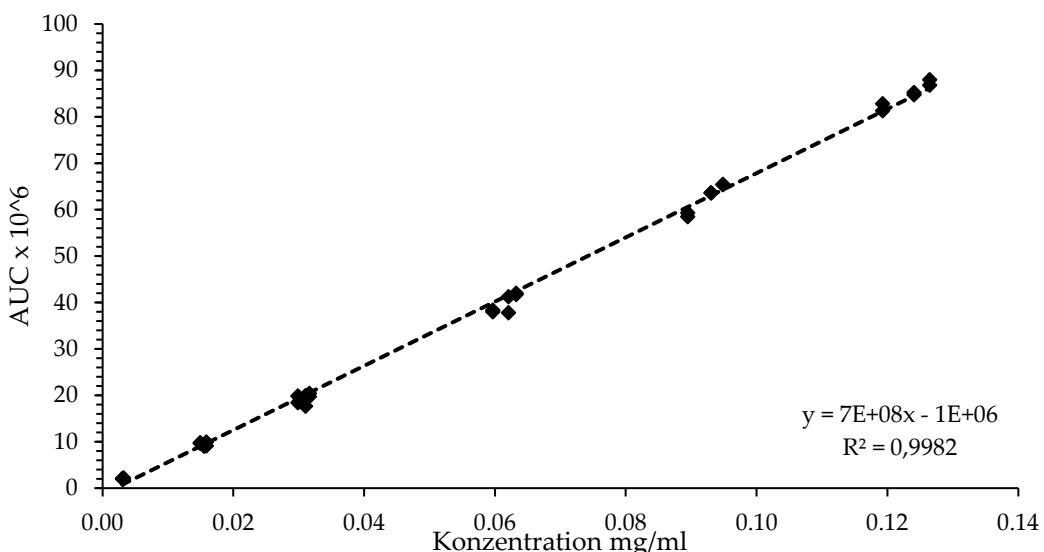
Die im Rahmen dieses Projekts verwendete Methode zur Quantifizierung der Proanthocyanidin-Cluster wurde von Hellenbrand et al. (2015b) entwickelt und validiert

Die Messungen wurden an einer Acquity H-Class UPLC® (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) bestehend aus Acquity H-Class quaternary solvent manager, Acquity FTN autosampler, Acquity eλ PDA detector und Acquity FLR detector durchgeführt. Der Säulenofen wurde auf 50 °C eingestellt und mit aktiviertem Active Preheater betrieben. Der Fluoreszenz-Detektor wurde während der Kalibrierungen mit einem Gain = 1 betrieben ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$). Zum Quantifizieren der Proanthocyanidine wurde der Gain bis zur Elution der monomeren Flavan-3-ole auf 0,01 reduziert, um die Signale der Monomeren zu stauchen und nach etwa 4,5 min auf 1 gesetzt. Das Injektionsvolumen betrug standardmäßig 1,0 μl , wurde jedoch auf 0,5 μl reduziert, wenn Probensignale die Erfassungsgrenze des Detektors überschritten. Als Analyten dienten die unter 6.2.2.1 beschriebenen Extrakte. Die Chromatographie fand an einer Acquity UPLC® Protein SEC, 200 Å, 1,7 μm , 4,6x150 mm (Waters GmbH) statt, als Eluenten dienten MeCN + 2% HOAc (Eluent A) und H₂O + 2% HOAc (Eluent B) bei einem Fluss von 1,0 ml/min. Der Gradient ist in **Tabelle 60** dargestellt.

Tabelle 60: Gradient der UPLC®-Methode zur Quantifizierung der Proanthocyanidin-Cluster

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
0,00	100	0	1,0
6,18	65	35	1,0
7,75	60	40	1,0
9,00	60	40	1,0
10,50	0	100	1,0
13,00	0	100	1,0
14,26	100	0	1,0
16,00	100	0	1,0

Quantifiziert wurde mit Hilfe von Catechin als externem Standard. Aus drei unabhängigen Stammlösungen wurden jeweils im Duplikat Verdünnungsreihen erstellt, welche eine Kalibriergerade ergaben. Gezeigt ist in **Abbildung 63** die Kalibriergerade vom 28.08.2018. Die Kalibrierung wurde regelmäßig wiederholt, um die Konstanz und Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Die ermittelten Gehalte wurden angegeben „berechnet als Catechin“ in mg pro g getrockneter Droge [mg/g TD] als Mittelwert aus einem unabhängigen Triplikat von Messungen.

**Abbildung 63:** Kalibriergerade zur Quantifizierung der Procyandin-Cluster; die Detektion erfolgte an einem Acquity FLR detector ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$) und wurde in Triplikaten von Doppelbestimmungen durchgeführt

Diese Methode ermöglichte durch die Auflösungsleistung einer UHPLC eine Trennung der PAs nach ihrem Polymerisierungsgrad (DP = degree of polymersation). Die Peakgruppen/Cluster, welche einem DP von zwei bis zehn entsprechen, wurden einzeln quantifiziert. Mit zunehmendem Polymerisierungsgrad nimmt das Auflösungsvermögen der chromatographischen Trennmethode ab, sodass alle höherpolymerisierten Proanthocyanidine

als „polymere PAs“ zusammengefasst wurden. Eine beispielhafte Abbildung eines Chromatogramms ist in **Abbildung 64** zu sehen. Die Berechnung erfolgte als Catechin und die Angabe der Ergebnisse in mg pro g getrocknete Droge (mg/g TD).

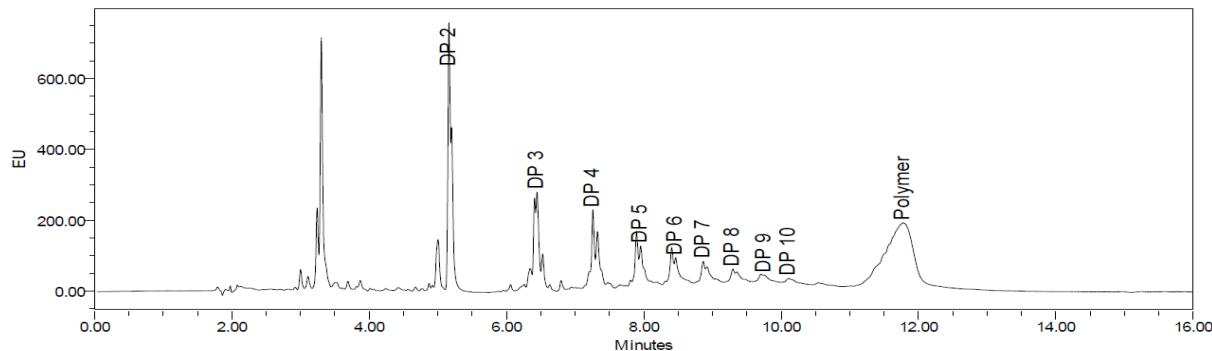


Abbildung 64: Beispielchromatogramm zur Bestimmung der PA-Cluster; Chromatogramm von 02_Sdap_f_BT; Gekennzeichnet sind die PA Cluster; DP (Degree of polymerisation), $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$

6.2.4. UPLC®-RP18-PDA: Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe

Die Quantifizierung von phenolischen Inhaltsstoffen erfolgte über eine von Wiesneth et al. entwickelte Methode zur Umkehrphasenchromatographie (Wiesneth, 2019; Wiesneth et al., 2018). Dabei kann die unter 6.2.3 beschriebene UPLC®-Anlage zum Einsatz. Die Detektion erfolgte über den PDA-Detektor bei einer Wellenlänge von 279 nm. Das Injektionsvolumen betrug 1,0 μl bei einem Fluss von 0,5 ml/min. Als stationäre Phase diente eine Luna Omega 1,6 μm C18 100 Å 100x2,1 mm (Phenomenex Ltd. Deutschland, q) bei 50 °C im Säulenofen und aktiviertem Preheater, der die Eluenten A ($\text{H}_2\text{O} + 1\% \text{ FA}$) und B (ACN + 1% FA) vor dem Säuleneintritt aufheizte. Der Gradient dieser Methode ist in **Tabelle 61** aufgeführt.

Tabelle 61: Gradient zur Trennung phenolischer Inhaltsstoffe an RP-18-UPLC®, nach (Wiesneth, 2019; Wiesneth et al., 2018)

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
0,0	95	5	0,5
0,5	95	5	0,5
9,0	70	30	0,5
10,5	50	50	0,5
11,5	0	100	0,5
14,0	0	100	0,5
15,0	95	5	0,5
17,0	95	5	0,5

Als Proben dienten die unter 6.2.2.1 beschrieben methanolischen Extrakte, welche auch zur Quantifizierung der Proanthocyanidine verwendet wurden. Als interner Standard diente Citropten, dessen Kalibriergerade in **Abbildung 65** dargestellt ist. Die Kalibrierung erfolgte mit in Duplikaten hergestellten Verdünnungsreihen aus drei Stammlösungen in MeOH. Die Referenzsubstanzen (Quercetin, Catechin; Salicin, Hesperetin und Kaffeesäure) wurden in Mischung gelöst (MeOH + 0,2 mg/ml Citropten [m/V]) und jeweils in Duplikaten aus den drei Stammlösungen verdünnt. Vimalin als weitere Referenzsubstanz wurde getrennt in gleicher Weise mit Citropten zur Kalibrierung verwendet. Zur Anwendung kam das in Abschnitt 3.5.2.1 (S. 59) vorgestellte Isolat, für welches eine Reinheit von 95,9% bestimmt wurde. Kalibriergeraden und die daraus abgeleiteten Korrekturfaktoren sind in **Abbildung 66** dargestellt und wurden in regelmäßiger Wiederholung bestimmt. Der Korrekturfaktor für Quercetin kam zur Quantifizierung von Flavone und Flavonole, der Korrekturfaktor für Hesperetin bei der Quantifizierung von Flavanonen und Flavanonolen zur Anwendung.

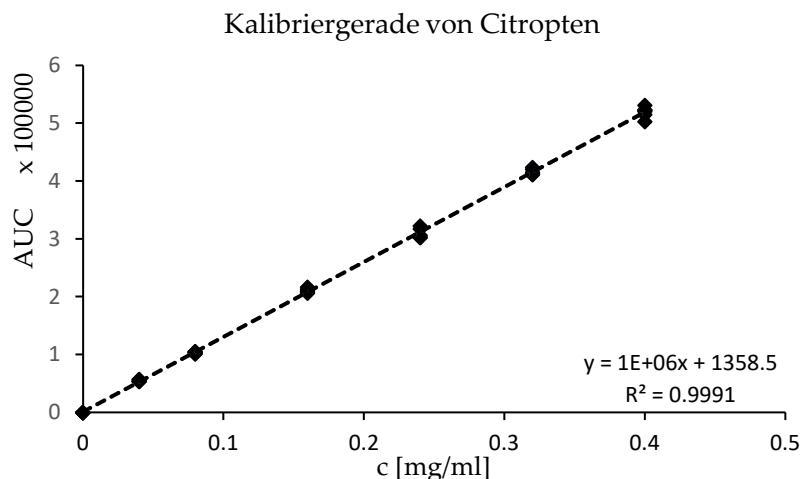


Abbildung 65: Kalibriergerade von Citropten (interner Standard). Std. Die Messungen wurden in unabhängigen Triplikaten von doppelten Aufarbeitungen durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 279,0 nm.

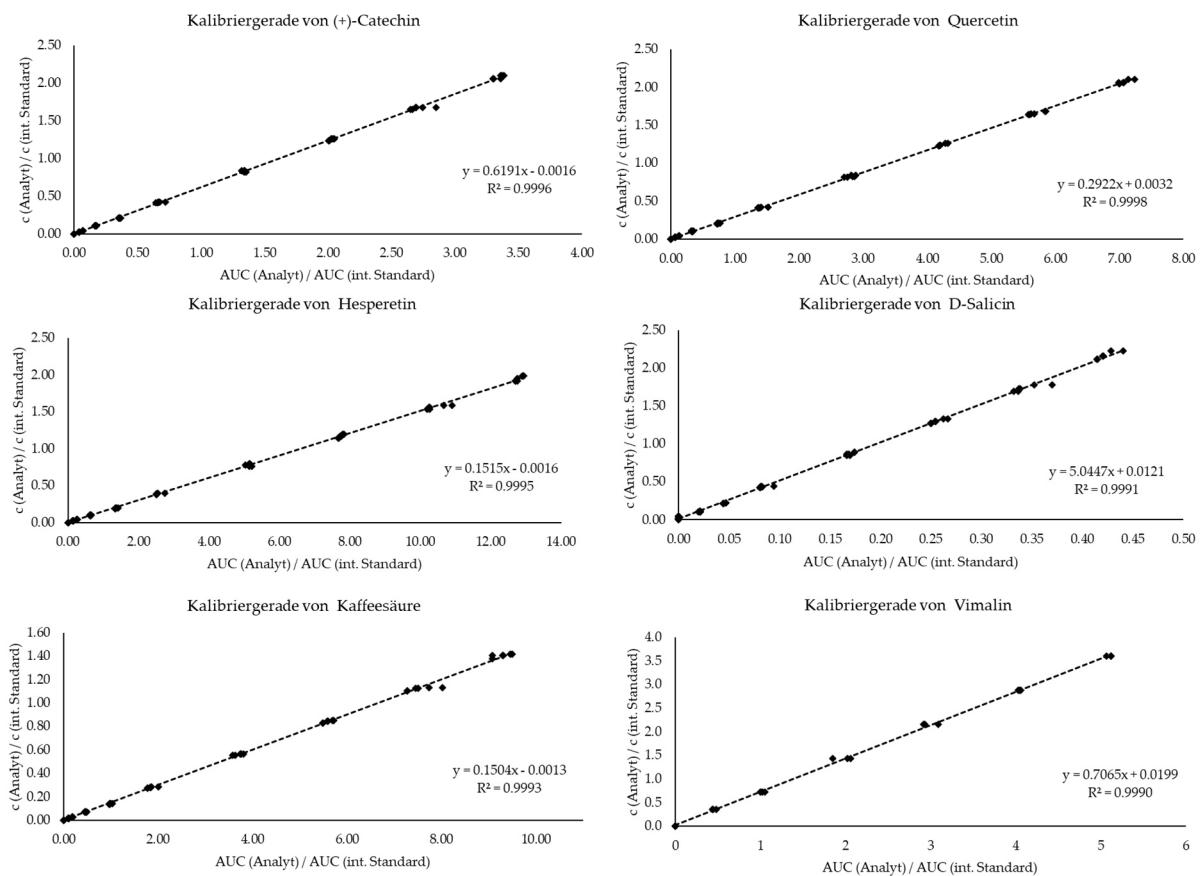


Abbildung 66: Kalibriergeraden (und Geradengleichung der Regressionsgerade) von sechs Modellsubstanzen (Catechin, Hesperetin, Kaffeesäure, Quercetin, Salicin und Vimalin) zur Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe durch den internen Standard Citropten. Die Messungen wurden in unabhängigen Triplikaten von doppelten Aufarbeitungen durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 279,0 nm; exemplarisch gezeigt sind die Daten der Kalibrierung vom 12.04.2020

Die Integration der Chromatogramme erfolgte automatisiert mithilfe von traditional integration (Empower3) bei einer Wellenlänge von 279 nm. Die Integrationsparameter sind in **Tabelle 62** aufgelistet. Die Peaks wurden mithilfe einer spektralen Datenbank insgesamt acht Stoffklassen zugeteilt. Die Zuteilung der Peaks erfolgte nach der Spectral Contrast Theory (SCT) durch Abtasten der jeweiligen UV-Spektren der Peaks und den Vergleichsspektren der UV-Spektrendatenbank. Für den Abgleich wurde der Wellenlängenbereich von 230-400 nm gewählt, um die stark rauschenden Bereiche der Spektren abzuschneiden und insbesondere die höherwelligen Bereiche (>400 nm) auszuschließen, da diese bei den meisten Substanzpeaks wenig Absorption zeigten und so nach der SCT einen kleineren *match angle* ergeben. Dies würde zu einer weniger starken Diskriminierung führen und eine automatisierte Unterscheidung und Zuteilung der Peaks anhand des *match angle* erschweren.

Tabelle 62: Integrationsparameter der UPLC®-Methode zur Quantifizierung sonstiger phenolischer Inhaltsstoffe

Integration/processing parameter	Einstellung
Wellenlänge Integration	279 nm
Integrationsfenster	ca. 1,6-13,0 min*
Integrations-Algorithmus	Traditional
Mindestfläche	5000
Peakbreite	10.00
Mindesthöhe	0
Threshold	1500.000
Wellenlängenbereich für Datenbankabgleich	230-400 nm
Grenze Datenbankabgleich (<i>library matching</i>)	45°

* leichte Verschiebungen der Retentionszeiten
wurden im Laufe des Projekts durch Anpassung des
Zeitfensters korrigiert

Die Spektrendatenbank wurde mit Vergleichslösungen von insgesamt 26 Referenzsubstanzen sowie Citropten als internen Standard erstellt. Die verwendeten Substanzen sind in **Tabelle 63** aufgelistet. Vier Referenzsubstanzen (Vimalin, Triandrin, Picein und Salicortin) lagen nicht als kommerziell erworbene Substanz vor. Diese wurden im Rahmen des präparativen Teils der vorliegenden Arbeit aus *S. cinerea* isoliert (vgl. Abschnitt 3, S. 19ff.).

Tabelle 63: Auflistung der Referenzsubstanzen, die für die spektrale Datenbank vermessen und deren Spektren in die Datenbank eingespeist wurden; abgekürzte Stoffklassen: CAD = Kaffeesäurederivate, CAG = Cumaryl-alkoholglykoside, ACP = Acetophenone, SAD = Salicylalkoholderivate;

Nr.	Substanzname (engl.)	Stoffklasse	Retentionszeit [min]	UV- Maximum [nm]	Auflösung [nm]
1	3,4-Dicaffeoylquinic acid	CAD	5,762	327,7	1,2
2	Caffeic Acid	CAD	2,997	323,2	1,2
3	Cryptochlorogenic Acid	CAD	2,604	326,5	1,2
4	m-Cumaric Acid	CAD	3,995	278,9	1,2
5	Rosmarinic Acid	CAD	6,191	328,9	1,2
6	Picein	ACP*	4,627	264,9	1,2
7	Triandrin	CAG	5,629	260,1	1,2
8	Vimalin	CAG	9,101	261,3	1,2
9	(+)-Catechin	Flavan-3-ole	2,497	235,2	1,2
10	Epicatechin	Flavan-3-ole	2,898	236,2	1,2
11	Epigallocatechin	Flavan-3-ole	2,255	236,2	1,2
12	Eriodictyol	Flavanone	7,105	288,4	1,2
13	Eriodictyol-7-O-glucoside	Flavanone	4,102	284,8	1,2
14	Hesperetin	Flavanone	9,796	287,4	1,2
15	Luteolin	Flavone	8,07	348,7	1,2
16	Luteolin-7-O-glucoside	Flavone	5,093	348,7	1,2
17	Naringenin	Flavanone	8,568	289,6	1,2
18	Taxifolin	Flavanonole	4,027	289,6	1,2
19	Apigenin	Flavone	9,354	338,4	1,2
20	Baicalein	Flavone	9,936	276,5	1,2
21	Vicenin II	Flavone	3,195	336,1	1,2
22	Isorhamnetin	Flavonole	9,709	371,5	1,2
23	Kaempferol	Flavonole	9,314	366,7	1,2
24	Quercetin	Flavonole	8,314	255,4	1,2
25	Salicin	SAD	1,738	268,4	1,2
26	Salicortin	SAD	1,042	270,6	1,2
27	Citropten	STD	10,002	328,0	1,2

* aufgrund der starken Ähnlichkeit der UV-Spektren werden die Acetophenone im Verlauf der Arbeit mit der Gruppe der Cumarylalkoholglykoside zusammengefasst

6.2.5. Modifizierte Gerbstoffbestimmung

Die von Wiesneth & Jürgenliemk (2017) entwickelte und validierte Methode zur Modifikation der Arzneibuchmethode Ph. Eur. 2.8.12 kam zu Anwendung, um den Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen und an Hautpulver adsorbierbaren Polyphenolen/Gerbstoffen zu ermitteln. Die Quantifizierung erfolgte bezogen auf Catechin, welches als externer Standard diente (Wiesneth & Jürgenliemk, 2017). Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgte mit drei unabhängigen Stammlösungen, aus welchen jeweils in Duplikaten Verdünnungsreihen erstellt wurden.

Als Probe dienten Aliquots von 50 µl der unter 6.2.2.1 beschriebenen Untersuchungslösungen. Diese wurden aus den HPLC-Vials entnommen, in ein 1,5 ml SuperSpinTM microtube (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt und mit 950 µl zu 1 ml ergänzt. Diese Mischung wurde am Vortexer gemischt und stellte die Gesamtphenollösung (GPL) dieser Untersuchung dar. 500 µl der GPL-Lösung wurden in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in welchem ca. 7,5-10 mg Freiberger Hautpulver vorgelegt waren. Dabei wurde auf gleichmäßige Benetzung des Hautpulvers geachtet. Diese Ansätze wurden für 60 Minuten auf einem KS/B Laborschüttler (Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen) geschüttelt. Anschließend wurde das Hautpulver mit einer Sigma 1-14 Laborzentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz,) abzentrifugiert (14000 UpM, 3 min) um den klaren Überstand als Restphenollösung (RPL) zu gewinnen.

Die Aliquote der Proben der Wachstumssaison 2017 wurden aufgrund des Zeitmanagements über Nacht in Exsikkatoren über Orangegele in Vakuum getrocknet und am nächsten Tag mit 1,000 ml Wasser resuspendiert, um die GPL zu erhalten.

20 µl der jeweiligen Untersuchungslösungen wurden in 96-Well Polystyren F-bottom microplates (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) zur Reaktion gebracht. Dazu wurden zu jeder Probe 100 µl mit Wasser verdünntes Folin-Ciocalteu's Reagenz (1 + 9 H₂O [V/V]) gegeben. Nach vier Minuten Schütteln unter Lichtausschluss wurden 80 µl 10,6%ige Natriumcarbonat-Lösung zugefügt. Die 96-Well Platten wurden mit Alufolie umschlossen und für 180 Minuten bei leichtem Schütteln auf dem Laborschüttler inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 690 nm mit Hilfe eines SpectraFLUOR PLUS® (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Die äußerste Reihe der 96-Well Platte wurde mit 200 µl Wasser befüllt, um Randeffekte bei der Absorptionsmessung zu unterdrücken.

Beim Auftreten von Absorptionswerten >1 wurden jeweils 100 µl aus den Wells entnommen und in einer weiteren Platte mit 100 µl einer Mischung aus Wasser, verdünntem Folin-Ciocalteu's Reagenz (1 + 9 H₂O [V/V]) und 10,6%iger Na₂CO₃-Lösung (1:5:2 [V/V/V]) vermischt. Nach erneutem Schütteln für 5 Minuten wurde die Absorptionsmessung wiederholt.

6.2.6. Datenverarbeitung

Als Analysenwerte der UPLC®-Messungen dienten die Peakflächen und entsprechenden spektralen Zuordnungen, welche direkt aus Empower® exportiert werden konnten. Diese Listen wurden in Microsoft Excel (Microsoft 365, Version 2402, Build 17328.20550 Klick-und-

Los) importiert und dort mit den jeweiligen Einwaagen und zugehörigen Kalibrierungen verknüpft. Die daraus berechneten Werte wurden in Excel gemittelt und zusammengeführt. Für die Analysenwerte der Gerbstoffbestimmung wurden die Absorptionswerte der einzelnen Bestimmungen analog behandelt und verarbeitet. Diese Datenpunkte stellten die Grundlage für die statistische Auswertung und Erstellung der Grafiken dar.

6.2.7. Statistische Auswertung

Die Analysen und Erstellung der Grafiken wurden mit Hilfe der Statistiksoftware R 4.3.1 (Team, 2023) durchgeführt. Als GUI diente RStudio 2022.12.0 Build 353 (Posit Software, PBC). Dabei kamen Funktionen der folgenden Packages zur Anwendung: *tidyverse* (Wickham et al., 2019), *dplyr* (Wickham H, François R, Henry L, Müller K, 2023), *readr* (Wickham et al., 2023), *readxl* (Wickham & Bryan, 2023), *writexl* (Ooms, 2024), *fmsb* (Nakazawa, 2023), *glue* (Hester & Bryan, 2022), *stringr* (Wickham, 2022), *lubridate* (Grolemund & Wickham, 2011), *cowplot* (Wilke, 2020), *dendextend* (Galili, 2015), *stats* (Team, 2023), *GGally* (Schloerke et al., 2021), *fpc* (Hennig, 2023).

Im Folgenden sind die Skripte einiger verwendeter Auswerteverfahren und zur Erstellung von Grafiken vereinfacht dargestellt.

6.2.7.1. PCA (Principal Component Analysis)

Die Principal Component Analysis (deutsch Hauptkomponentenanalyse) errechnet durch Singulärwertzerlegung aus vorliegenden Daten und deren Variablen neue, sogenannte latente Variablen, welche auch als Hauptkomponenten bezeichnet werden (Kessler, 2007). Für diese Hauptkomponenten werden die jeweiligen Eigenwerte berechnet, die den Anteil an der Gesamtvarianz angeben, welcher durch die entsprechende Hauptkomponente erklärt wird.

Für die Hauptkomponenten werden sog. *Loadings* (Faktorenladung) berechnet, welche den Einfluss der ursprünglichen Variablen auf die Richtung der Hauptkomponenten ausdrücken und die Richtung im ursprünglichen Datenraum angeben. Sie ergeben als Wurzel der addierten Quadrate der Loadings die Länge des Richtungsvektors: 1. Die Hauptkomponenten werden als neue Achsen des Koordinatensystems etabliert und die Positionen der Datenpunkte als sogenannte Scores angegeben. Eine detaillierte und ausführliche Erklärung findet sich bei Kessler (2007). Der zur Anwendung gebrachte R Code wird im Folgenden vereinfacht dargestellt:

```

## PCAs ---
# ****
### PCA X - Titel ---
# ****
dataframe <- data
row.names(dataframe) <- c(rownames(data_names)) #Reihennamen anpassen
colnames(dataframe) <- c(colnames(data_name)) #Spaltennamen anpassen

pca1 <- prcomp(dataframe) #Berechnen der PCA

pca1 #Anzeigen der Werte in Konsole

## Plotting der PCA (pca1 und pc2)
plot(pca1$x[,1], pca1$x[,2])

## Scree plot (Eigenwerteverlauf) erstellen
pca1.var <- pca1$sdev^2
pca1.var.per <- round(pca1.var/sum(pca1.var)*100, 1)

barplot(pca1.var.per,
        main="Scree Plot",
        xlab="Principal Component",
        ylab="Percent Variation")

## Erstellen der Grafik zur PCA

pca.salix <- data.frame(Sample = rownames(dataframe),
                         X = pca1$x[, 1],
                         Y = pca1$x[, 2])

pca.salix #Anzeigen der Werte in Konsole

PCA1 <- ggplot(data = pca.salix, aes(x = X, y = Y, label = Sample)) + #Grafik erstellen
  geom_text() + #Geom wählen
  xlab(paste("PC1 - ", pca1.var.per[1], "%", sep = "")) + #x-Achse beschriften
  ylab(paste("PC2 - ", pca1.var.per[2], "%", sep = "")) + #y-Achse beschriften
  theme_bw() + #Theme black/white auswählen
  theme(panel.grid.major = element_blank(), # Gitterlinien für Hauptachsen entfernen
        panel.grid.minor = element_blank()) # Gitterlinien für Nebenachsen entfernen
  ) +
  ggtitle("Titel") #Grafiktitel einfügen

# Der Graph wird exportiert
PCA1 %>%
  export_it(name = "Titel",
            width = 10,
            export = export_stuff,
            format = "svg")

## Ausgabe der Namen der 5 wichtigsten Messungen,
## die am meisten zu pca1 beitragen.
loading_scores <- pca1$rotation[,1] #Auswahl der Hauptkomponente
salix_scores <- abs(loading_scores) #Größenordnungen erhalten
salix_score_ranked <- sort(salix_scores, decreasing = TRUE) #Sortieren der Ergebnisse
top_5_salix <- names(salix_score_ranked[1:5]) #In Objekt transferieren

top_5_salix #Anzeigen der top 5 Variablen

pca1$rotation[top_5_salix,1] # Anzeige der Scores (+/-)

# Wechsel zu PC2
loading_scores2 <- pca1$rotation[,2] #Auswahl der Hauptkomponente
salix_scores2 <- abs(loading_scores2) #Größenordnungen erhalten
salix_score_ranked2 <- sort(salix_scores2, decreasing = TRUE) #Sortieren der Ergebnisse
top_5_salix_PC2 <- names(salix_score_ranked2[1:5]) #In Objekt transferieren

top_5_salix_PC2 #Anzeigen der top 5 Variablen

pca1$rotation[top_5_salix_PC2,2] # Anzeige der Scores (+/-)

```

6.2.7.2. DBSCAN (Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise)

Das Verfahren DBSCAN gruppiert Datenpunkte anhand ihrer Dichteverbundenheit und somit aufgrund ihrer räumlichen Nähe zueinander. Jeder Punkt des Clusters muss über eine Kette dichtverbundener Datenpunkte mit einem Kernpunkt (engl. *Seed*) verbunden sein. Maßgeblich beeinflusst wird das Ergebnis durch die Anzahl der „Seeds“ (Ausgangspunkte für Cluster), die erlaubte Distanz zwischen zwei dichtverbundenen Nachbarn (eps) und die Mindestanzahl der dichtverbundenen Nachbarschaftspunkte, um einen Cluster zu erhalten (MinPts). Folgender R Code kamen dabei in Abwandlung zu Anwendung:

```
## DS-Scan Clustering ----
# ****
#Auswahl der Daten und Speichern in Arbeitsobjekt
#Überprüfung der Struktur des dataframe
dbscan <- as.data.frame(data) %>%
  select(X:Y)
str(dbscan)

#Durchführen DBSCAN Clustering, Festlegen Anzahl der 'Seeds',
#Parameter Entfernung und Mindestzahl Clusterpunkte
set.seed(10)
Dbscan_cl <- dbscan(dbscan,
  eps = 3,
  MinPts = 4)

#Auswahl und Anzeige der Spalte Cluster
Dbscan_cl$cluster

#Umwandlung in Tabelle
table(Dbscan_cl$cluster)

#Plotting des DBSCAN Clusterings
plot(Dbscan_cl,
  data$X,
  data$Y,
  main = "",
  xlab = "PC1",
  ylab = "PC2")

# Speichern des Plot in einem Objekt
DBScan_plot <- recordPlot()

# Exportieren des Graphen
DBScan_plot %>%
  export_it(name = "Dateiname",
  width = 10,
  export = export_stuff,
  format = "svg")

## Tabelle zur Zuordnung Datenpunkte zu Clustern
# Überprüfen, ob Cluster zugewiesen wurden
# Kombinieren der Clusterzuweisungen mit den Kategorien
# Zählen der Häufigkeit jeder Ausprägung von "Kategorie" in jedem Cluster
# Anzeigen der Ergebnisse
if (length(unique(Dbscan_cl$cluster)) > 1) {
  result <- cbind(data,
    Cluster = factor(Dbscan_cl$cluster))

  cluster_count <- table(result$X.Sample...data.'Kategorie'.,
    result$Cluster)

  print(cluster_count)
} else {
  print("Es wurden keine Cluster zugewiesen.")
}

# Exportieren der Tabelle in eine Textdatei
write.table(cluster_count,
  file = "cluster_count.txt",
  sep = "\t",
  quote = FALSE,
  row.names = TRUE)
```

6.2.7.3. Heatmap (hierarchical clustering)

Zur Anwendung kam in dieser Studie eine Clusterheatmap, welche unter Anwendung von hierarchischem Clustering errechnet wurde. Hierarchisches Clustering bezeichnet ein distanzbasiertes Verfahren, bei welchem entstehende Cluster in der weiteren Analyse bestehen bleiben und weitere Datenpunkte nach Ähnlichkeit beziehungsweise aufsteigender Distanz zum bestehenden Cluster hinzugefügt werden (agglomeratives Clusterverfahren oder „Bottom-Up“-Verfahren). Die Ergebnisse des hierarchischen Clusterings werden zusätzlich zur Heatmap auch in einem Dendrogramm angegeben. Die Erstellung der Heatmap erfolgte mit Hilfe der Funktion *heatmap()* aus dem R package *stats* (Team, 2023).

```
## Cluster heatmap hierarchical ----
# ****
#Auswahl der Daten und Speichern in Arbeitsobjekt, Benennen der Zeilen
data_heat <- as.matrix(data)
rownames(data_heat) <- datas$Art

#Auswahl eines Subsets
data_heat2 <- data_heat[,2:9]

#Umwandlung in Datenmatrix und Festlegen der Datenstruktur
data_heat3 <- matrix(as.numeric(data_heat2), ncol = ncol(data_heat2))

#Erstellen einer Heatmap mit zwei Dendrogrammen an beiden Achsen
#Anpassen der Grafik und Exportieren der Grafik
heatmap(data_heat3,
         Colv = FALSE,
         Rowv = FALSE,
         labRow = as.expression(lapply(data_arten_radars$Art, function(a)
bquote(italic(.(a))))),
         labCol = colnames(data_arten_radars[2:9]),
         cexRow = 0.8,
         cexCol = 0.8) %>%
export_it(name = "Dateiname", export = export_stuff, format = "svg")
```

6.3. Ergebnisse

6.3.1. Saisonale Variabilität von Sekundärmetaboliten

Im folgenden Kapitel soll der jahreszeitliche Verlauf des Inhaltsstoffspektrums von *Salicis cortex* in den Fokus genommen werden. Dazu werden zuerst die Ergebnisse der durchgeführten Gesamtphenolbestimmung (vgl. 6.2.5, S. 157) beschrieben. In nächsten Schritt werden die Proanthocyanidine betrachtet, um möglichst allgemein gültige Thesen zum saisonalen Verlauf der Konzentrationen aufstellen zu können. In einem dritten Teil werden die Ergebnisse des Screenings in Hinblick auf die Bestimmung phenolischer Inhaltsstoffgruppen per UPLC®-RP18-PDA (6.2.4, S. 153) dargelegt. Dies erfolgt anhand einzelner Individuen, da die hohe Variabilität der Daten eine generelle Aussage nicht sinnvoll erscheinen lassen. Die Zusammenfassung verschiedener Einzelsubstanzen in Stoffgruppen und Kalibrierung auf je eine prominente Substanz vereinfacht dabei die erhaltenen Daten. Dadurch werden jedoch keine „wahren“ Gehalte ermittelt, sondern ähnlich einer Konventionalmethode innerhalb der Studie vergleichbare Werte erzeugt.

6.3.1.1. Modifizierte Gerbstoffbestimmung: Gesamtphenole und Gerbstoffe

Der Gehalt an Gesamtphenolen und -gerbstoffen wurde mit Hilfe der in 6.2.5 vorgestellten Methode bestimmt. Diese stellt die von Wiesneth & Jürgenliemk (2017) entwickelte Modifizierung der Gerbstoffbestimmung des Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur. 2.8.14) dar. Dabei werden die Gesamtphenole (GPh), sowie die nicht mit Hautpulver zu fällenden Restphenole (RPh) bestimmt. Aus der Differenz von Gesamtphenolen und Restphenolen ergibt sich die Konzentration fällbarer Gerbstoffe (Gst).

Ausgewertet wurden die Daten der Jahrgänge 2018 und 2019. Um das Datenset zu vereinfachen wurden die erhobenen Daten der beprobten Individuen nicht nach Art oder Geschlecht unterschieden.

Es zeigt sich ein Anstieg der Konzentrationen der Gesamtphenole im Laufe der Wachstumssaison von Mai bis in den August und anschließend ein leichter Rückgang (**Abbildung 67**, S. 165). Am Höhepunkt überwiegt die Konzentration der Gerbstoffe, welche denselben Konzentrationsverlauf mit einem Höhepunkt im August zeigen ($48,0 \pm 2,2$ mg/g Trockendroge (TD)). Zudem zeigen diese über die gesamte Saison deutlich höhere Konzentrationen als die Restphenole. Die Restphenole zeigen einen konstanten

Konzentrationsanstieg über die gesamte in dieser Studie abgedeckten Wachstumsperiode ($11,2 \pm 1,1$ mg/g TD (Mai) bis $21,3 \pm 0,6$ mg/g TD (September)).

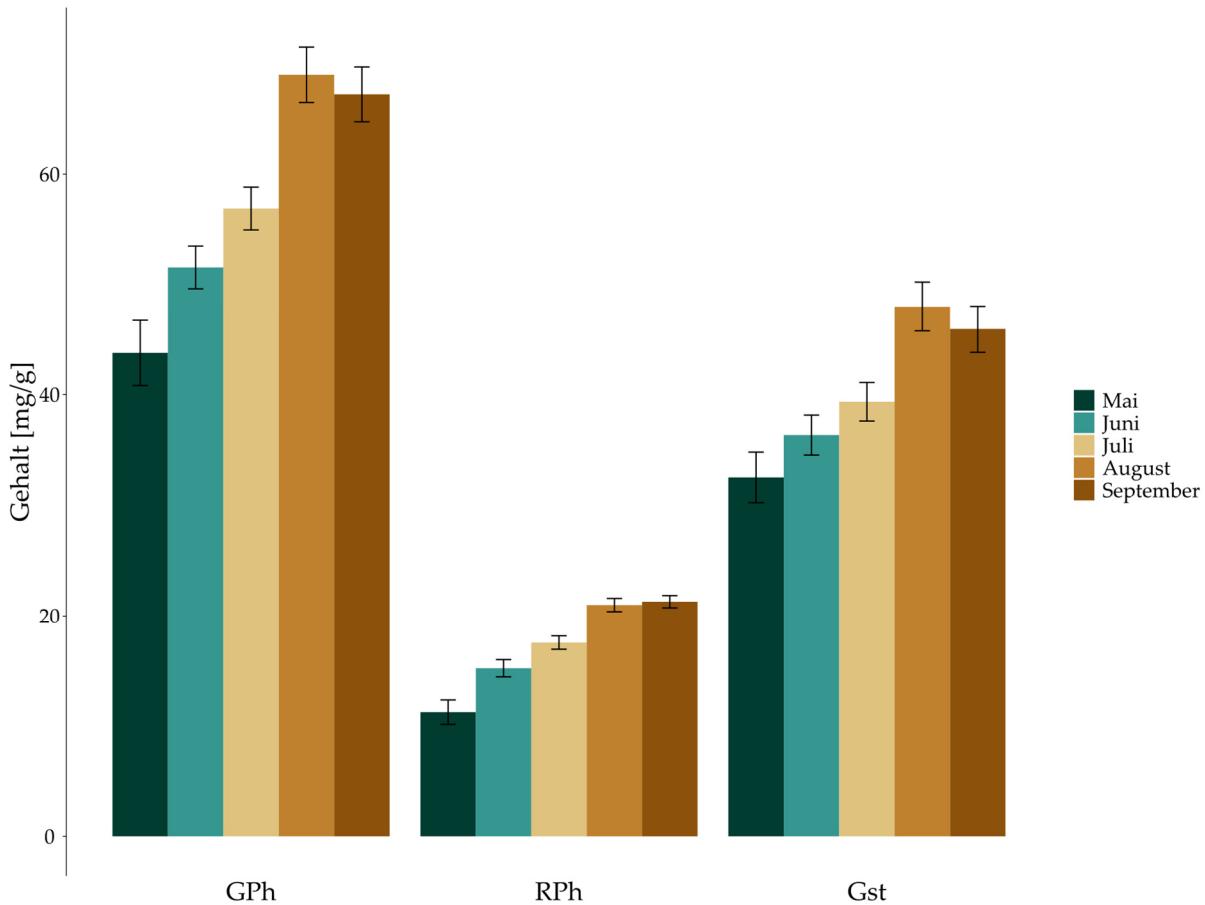


Abbildung 67: Konzentration der Gesamtphenole (GPh), Restphenole (RPh) und Gerbstoffe (Gst) in Rindenproben der beprobteten *Salix* Individuen (vgl. 6.2.2.2) in mg/g Trockendroge (MW \pm SEM); Gst berechnet als Differenz von GPh und RPh; gezeigt sind die gemittelten Daten der Wachstumssaison 2018 und 2019

In **Abbildung 68** (S. 166) ist die über alle in der Studie eingeschlossenen Individuen (Saison 2018 und 2019) gemittelte, prozentuale Verteilung der Gesamtphenole auf Gerbstoffe und Restphenole dargestellt. Der Anteil der dominierenden Gerbstoffe sinkt im Verlauf der Wachstumssaison konstant von 74,3 auf 68,3%. Im Verhältnis ist der Zuwachs von Restphenolen im Jahresverlauf also größer als der der Gerbstoffen, wobei sich die prozentuale Verteilung zwischen den Monaten nicht signifikant unterscheidet.

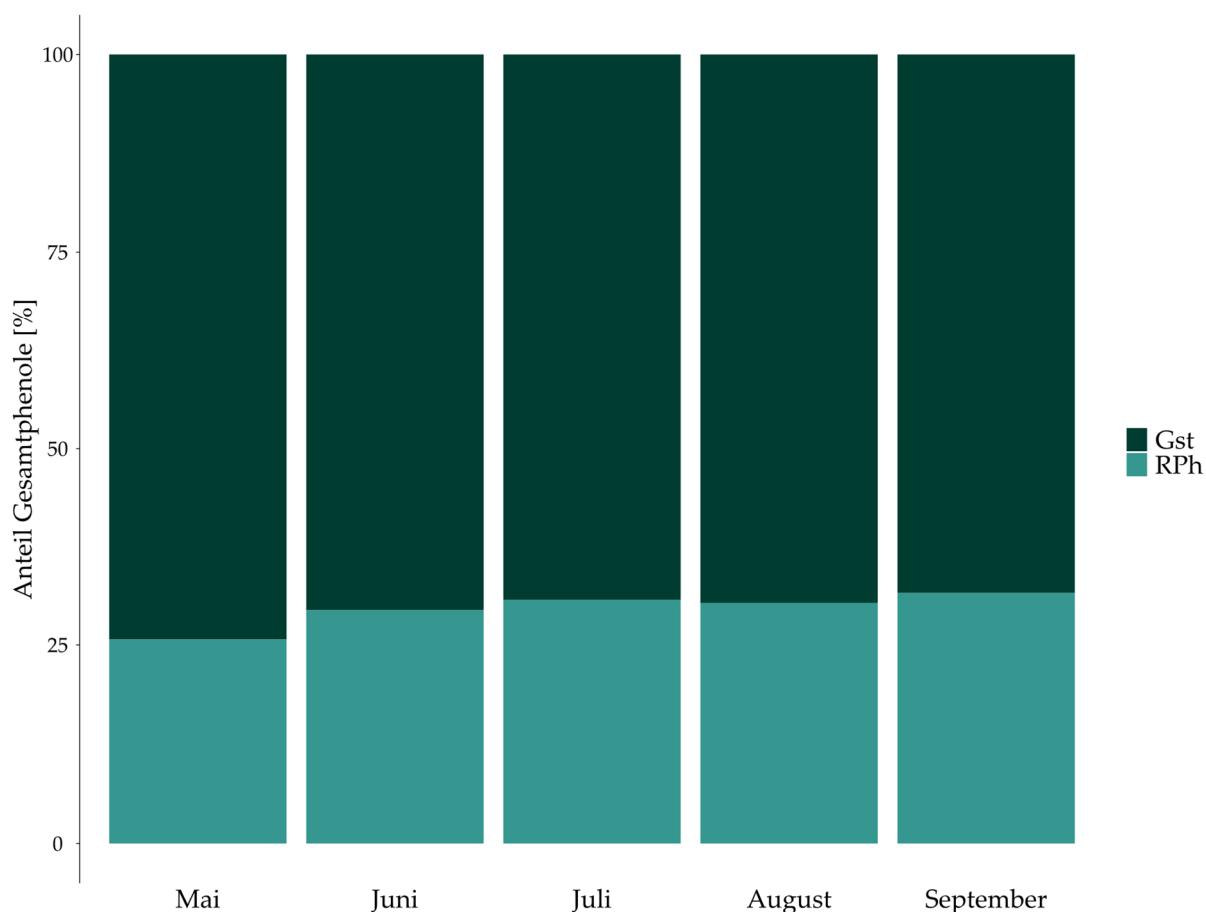


Abbildung 68: Prozentualer Anteil der der Gerbstoffe (Gst, dunkelgrün) und Restphenole (RPh, hellgrün) an der Konzentration der Gesamtphenole; gezeigt sind die gemittelten Daten der Wachstumssaison 2018 und 2019

Die Verteilung und Konzentrationen der Gesamtphenole unterscheidet sich in den Einzelindividuen stark. Eine Darstellung der ermittelten Konzentrationen (Restphenole und Gerbstoffe) ist in **Abbildung 69** (S. 167) gezeigt. Die Verteilung der Werte der jeweiligen Monate sind mit einer Ellipse umzeichnet. Sehr niedrige Werte, nahe an der Bestimmungsgrenze, sind nur im Monat Mai zu beobachten. Die Zentren der Ellipsen bewegen sich im Laufe der Wachstumssaison zu höheren Konzentrationen. Die Zuwächse der Restphenole überwiegen die der Gerbstoffe, sodass sich die Zentren der Ellipsen stärker zu Konzentrationen der Restphenole verlagern. Trotz der insgesamten Dominanz der Gerbstoffe sind viele Proben mit nahezu ausgeglichenem Verhältnis oder leichtem Überhang von Restphenolen zu beobachten.

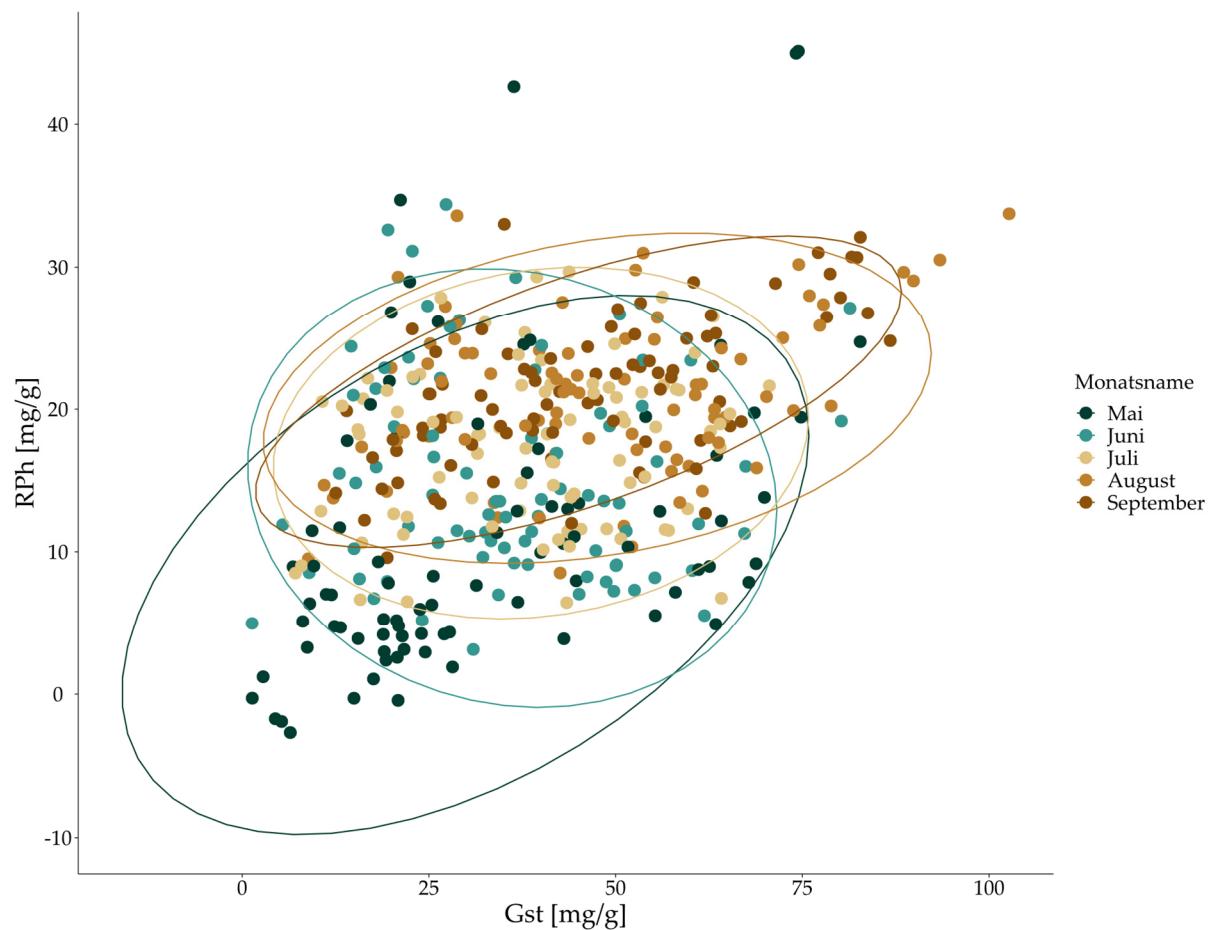


Abbildung 69: Konzentration der Restphenole (RPh) und Gerbstoffe (Gst) in Rindenproben der untersuchten *Salix* Individuen (vgl. 6.2.2.2) in mg/g Trockendroge; Gst berechnet als Differenz von GPh und RPh; gezeigt sind die gemittelten Daten der Mehrfachbestimmungen (MW n = 3) pro Individuum und Monat der Wachstumssaison 2018 und 2019;

6.3.1.2. UPLC®-DIOL-FLR Screening: Proanthocyanidine

Die Proanthocyanidin-Muster wurden chromatographisch mit Hilfe der unter 6.2.3 (S. 151) beschriebenen und von Hellenbrand et al. (2015b) entwickelten Methode quantifiziert und erfasst. Dies erlaubte die Trennung der PAs nach ihrem Polymerisierungsgrad (DP = *degree of polymerisation*) und die Einteilung in Peakgruppen oder Cluster. Die Cluster mit einem DP von zwei bis zehn (DP 02-10) wurden einzeln quantifiziert, werden im Folgenden aber auch als oligomere PAs (oPAs) zusammengefasst betrachtet. Die errechneten Gehalte für DP 02-10 wurden hierfür aufsummiert. Mit zunehmendem Polymerisierungsgrad nimmt das Auflösungsvermögen der chromatographischen Trennmethode ab, sodass alle höherpolymerisierten Proanthocyanidine als „polymere PAs“ (pPAs) zusammengefasst wurden. Ziel war es dabei, generelle Tendenzen und jahreszeitliche Verläufe zu beschreiben, daher sind in diesem Abschnitt die Ergebnisse der einzelnen Individuen und Arten für diese Betrachtung gesammelt betrachtet.

Im Vergleich der Gehalte oligomerer und polymerer PAs im vorliegenden Datenset dominieren die oPAs. Ihr Durchschnittsgehalt wurde mit $3,86 \pm 0,32$ bis $5,23 \pm 0,45$ mg/g TD bestimmt, wobei für pPAs ein Durchschnittsgehalt von $2,17 \pm 0,13$ bis $2,68 \pm 0,19$ mg/g TD ermittelt wurde (Abbildung 70). Für die aufsummierte Gruppe der oPAs zeigte sich eine Steigerung im Frühsommer, dann ein Höhepunkt im Hochsommer (August) und zum Ende der Wachstumssaison ein Absinken des Gehalts.

Die polymeren PAs zeigten im Vergleich deutlich niedrigere Gehalte und eine gegenläufige Entwicklung, bei der diese im Verlauf der Wachstumssaison im Gehalt abnahmen. Die höchsten Gehalte wurden im Frühsommer (Juni) ermittelt.

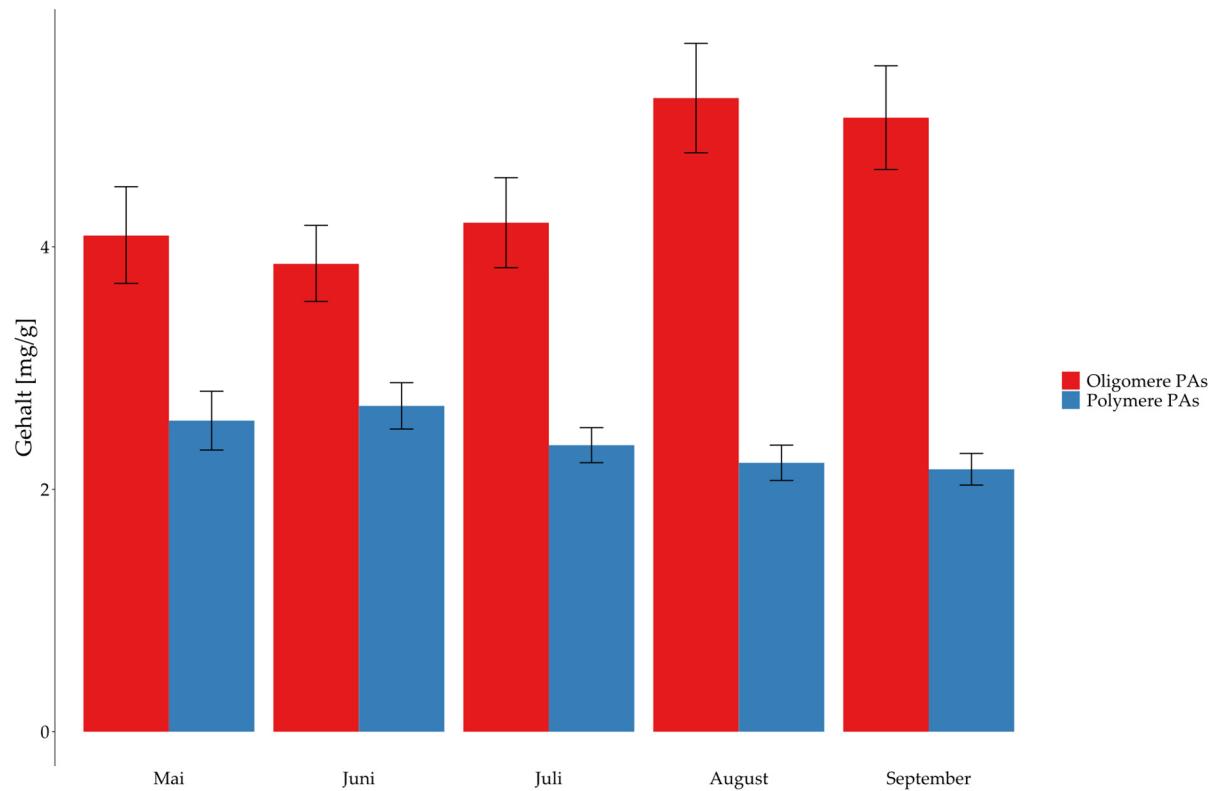


Abbildung 70: PA-Gehalte in *Salicis cortex*, ermittelt unter Anwendung der unter 6.2.3 (S. 151) vorgestellten UPLC®-DIOL-FLR Methode Hellenbrand (2015b); oligomere PAs als Summe der Cluster DP 02-10 (rot) polymere PAs (blau); gezeigt sind die Daten für alle unter 6.2.2.2 (S. 148) aufgelisteten Individuen, der Jahre 2017-2019, nach Monat des Probenzugs (Mai - September); Gehaltsangabe der PAs in mg pro g Trockendroge berechnet als Catechin (Mittelwert \pm SEM)

Um die Entwicklung der Gehalte detaillierter darzustellen, wurden die Veränderungen der Gehalte zum jeweiligen Vormonat berechnet. Die Werte für Mai, den ersten Probenzug der jeweiligen Wachstumssaison, ist die Differenz zum letzten Datensatz (September) des Vorjahres. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 71** dargestellt.

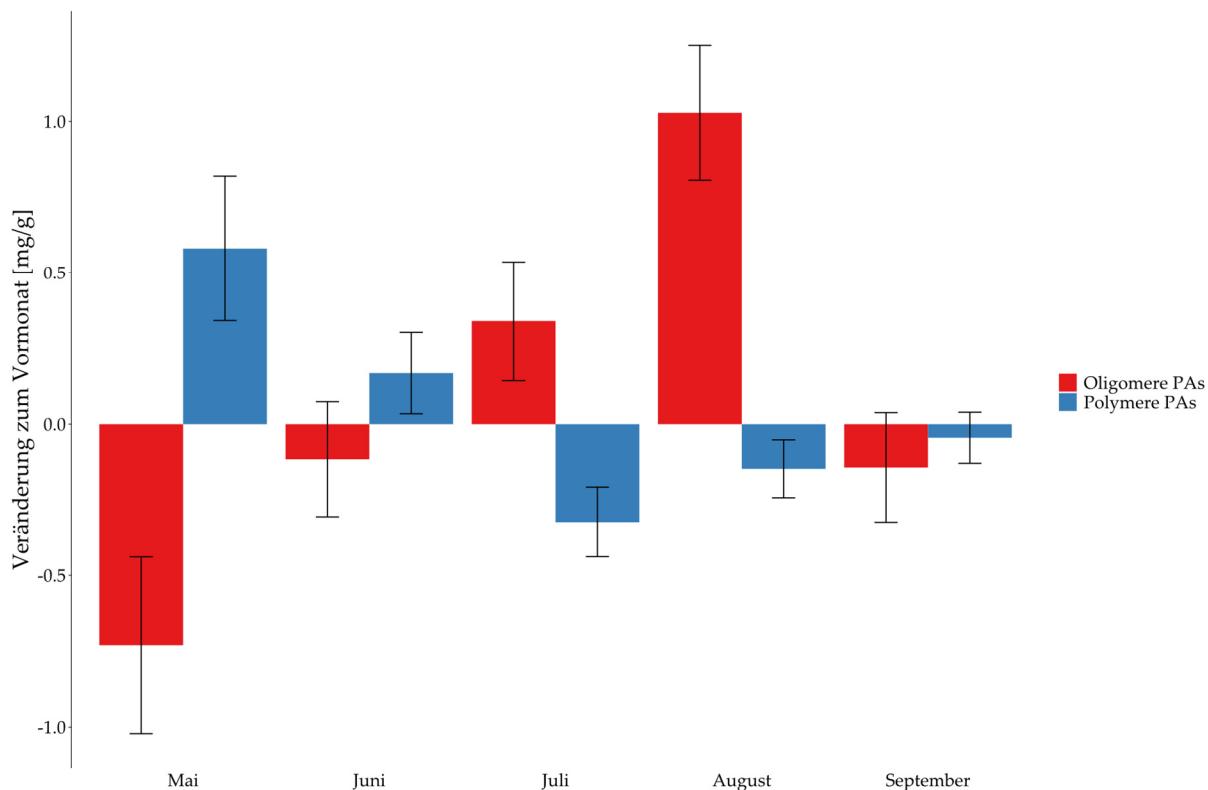


Abbildung 71: Differenz der PA-Gehalte zum Vormonat in *Salicis cortex*, ermittelt unter Anwendung der unter 6.2.3 (S. 151) vorgestellten UPLC®-DIOL-FLR Methode Hellenbrand et al. (2015b); oligomere PAs als Summe der Cluster DP 02-10 (rot) polymere PAs (blau); gezeigt sind die Daten für alle unter 6.2.2.2 (S. 148) aufgelisteten Individuen, der Jahre 2017-2019, nach Monat des Probenzugs (Mai - September); Gehaltsangabe der PAs in mg pro g Trockendroge berechnet als Catechin (Mittelwert ±SEM)

Dabei zeigt sich, dass die Gehalte oligomeren PAs im Frühsommer leicht abnehmen, dann zum Hochsommer (August) deutlich ansteigen ($1,03 \pm 0,22$ mg/g TD) und zum Ende der Wachstumssaison nur leicht abnehmen. Der sprunghafte Anstieg im August entspricht einem Zuwachs von $24,5\% \pm 0,05\%$ im Vergleich zum Juli. Die pPAs zeigen im betrachteten Zeitraum einen gegenläufigen Trend, die Zuwächse zum Beginn der Wachstumssaison schwächen sich deutlich ab. In den Monaten Juni bis September zeigen die Gehalte eine durchgehend negative Entwicklung. Dieser Trend ist im Juli am stärksten und schwächt sich zum Ende der Wachstumssaison ab.

Abbildung 72 zeigt die über gesamten Datensatz gemittelten PA-Gehalte, nach aufsteigendem Polymerisierungsgrad und unterteilt nach Monat des Probenzugs. Dabei kann beobachtet werden, dass die Gehalte und somit die Anteile an der Gesamtmenge der PAs mit zunehmendem DP immer weiter sinken. Der zuletzt eluierende Cluster polymerer PAs zeigt jedoch einen deutlich erhöhten Gehalt im Vergleich zu den direkt zuvor eluierenden Clustern DP 09 und DP 10.

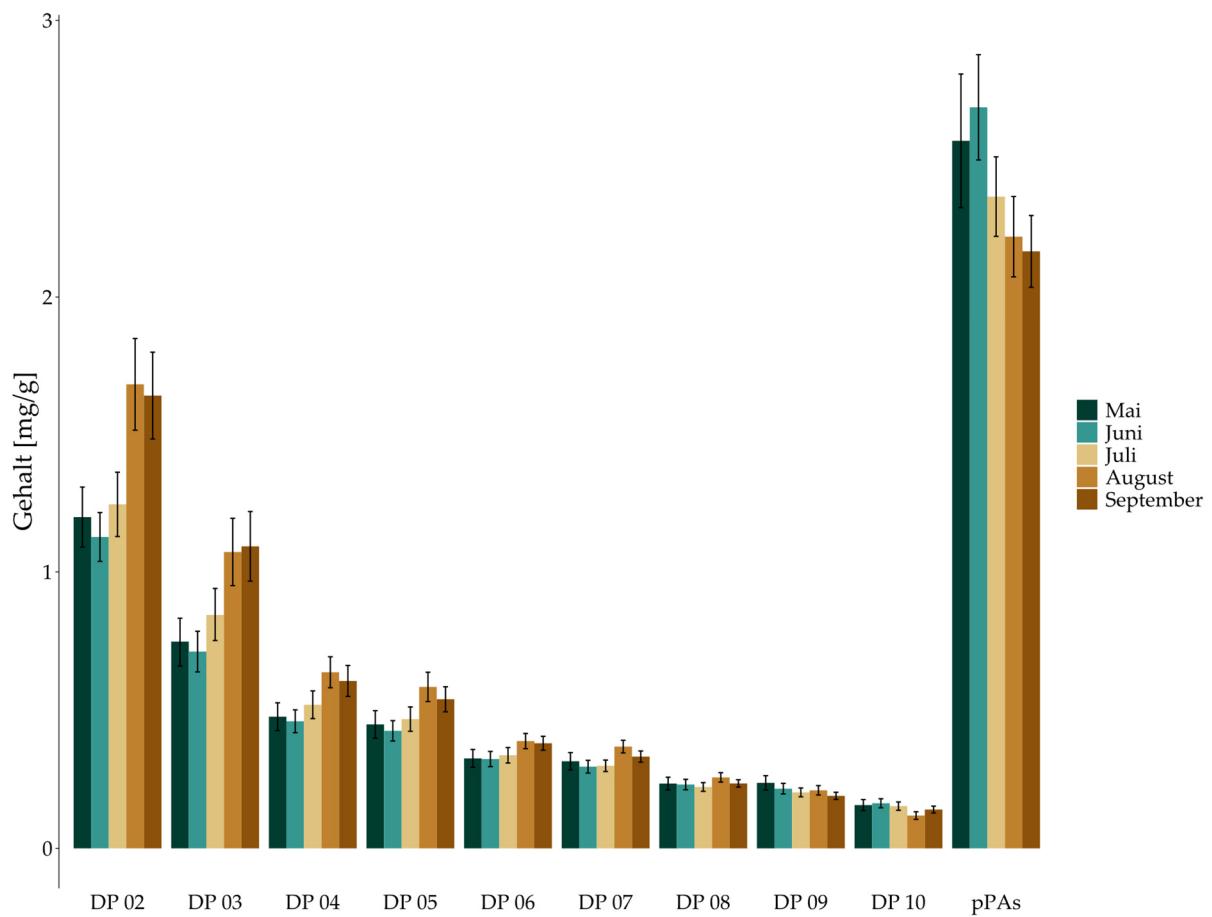


Abbildung 72: Konzentrationen der PAs aller detektierten DPs in *Salicis* cortex ermittelt unter Anwendung der unter 6.2.3 (S. 151) vorgestellten UPLC®-DIOL-FLR Methode Hellenbrandet al. (2015b); dargestellt sind die Daten für alle unter 6.2.2.2 (S. 148) aufgelisteten Individuen der Jahre 2017-2019, nach Monat des Probenzugs (Mai bis September); Gehaltsangabe der PAs in mg pro g Trockendroge, berechnet als Catechin (MW \pm SEM)

Die niedriger polymerisierten oligomeren PAs zeigen im Jahresverlauf ein anderes Muster als die polymeren PAs. Die Cluster DP 02–07 ergeben konstante Gehalte in den Monaten Mai bis Juli und einen deutlichen Anstieg in den Monaten August und September. Dabei zeigt sich für die genannten Cluster mit Ausnahme von DP 03 ein Maximum für den Monat August. Die höherpolymerisierten oligomeren PAs DP 09 und DP 10 zeigen einen saisonalen Verlauf, ähnlich dem Cluster der polymeren PAs. Dabei ist der höchste Gehalt zu Beginn der Wachstumssaison bestimmt worden (Mai/Juni), während die Gehalte im weiteren Jahresverlauf deutlich abnehmen. Der Cluster, welcher dem DP 08 entspricht, zeigt die gesamte Wachstumssaison über nahezu konstante Werte und erreicht den maximalen Gehalt im August ähnlich zu den niedriger polymerisierten PAs. Die Schwankungen der Gehalte über die Wachstumssaison sind unter den oligomeren PAs für den Cluster dimerer Spezies am stärksten ausgeprägt (1,13 \pm 0,09 bis 1,68 \pm 0,17 mg/g TD), was einer Variabilität von 32,7% des höchsten bestimmten Gehalts entspricht, im Cluster DP 03 beträgt die relative Variabilität

sogar 35,2%. Für die pPAs wurden eine ähnliche Schwankung der absoluten Gehalte bestimmt ($2,17 \pm 0,13$ bis $2,69 \pm 0,19$ mg/g TD), was im Vergleich einer relativen Variabilität von 19,3% entspricht. DP 08 zeigt die niedrigsten Schwankungen der erfassten Cluster ($0,22 \pm 0,02$ bis $0,26 \pm 0,02$ mg/g TD, relative Variabilität: 13,5%).

In **Abbildung 73** sind die Differenzen der Gehalte in den DP-Clustern zum jeweiligen Vormonat aufgetragen.

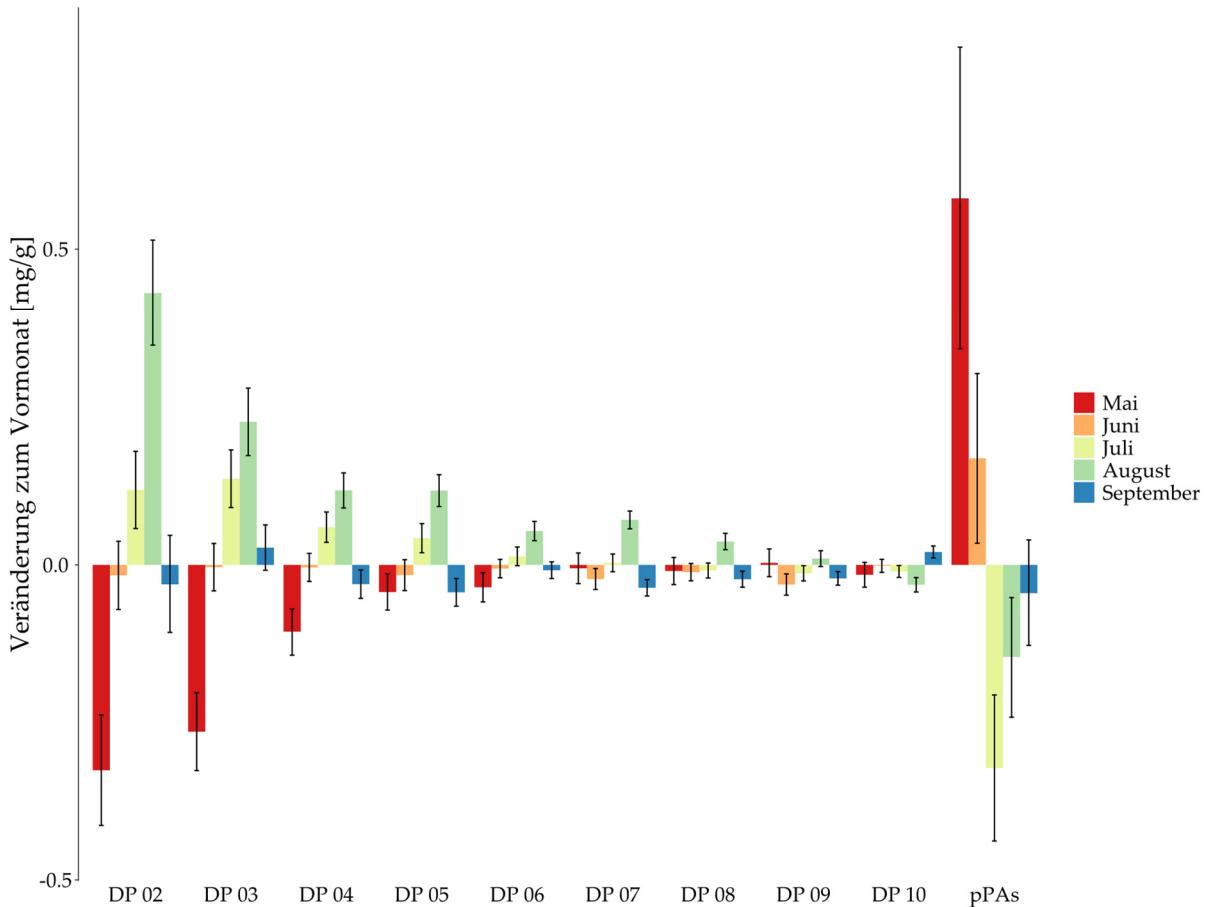


Abbildung 73: Differenz des Gehalts zum jeweiligen Vormonat der PAs aller detektierten DPs in *Salicis cortex* ermittelt unter Anwendung der unter 6.2.3 (S. 151) vorgestellten UPLC®-DIOL-FLR Methode Hellenbrand et al. (2015b); dargestellt sind die Daten für alle unter 6.2.2.2 (S. 148) aufgelisteten Individuen, der Jahre 2017-2019, nach Monat des Probenzugs (Mai-September); Gehaltsangabe der PAs in mg pro g Trockendroge berechnet als Catechin (MW \pm SEM)

Hier zeigt sich deutlich, dass die oligomeren PAs mit DP 02–08 einen nahezu identischen Jahresverlauf aufweisen. Im Mai liegen die Werte deutlich unter denen des Herbstes im Vorjahr. Auch im Juni kommt es zu einem leichten Absinken der Gehalte, während ab Juli ein Zuwachs zu verzeichnen ist. Der Anstieg der Gehalte im Vergleich zum Vormonat erreicht im

August einen Höchstwert, um dann im September wieder in eine leichte Abnahme umzuschwingen.

Dieses Muster ist für die Cluster DP 07 und DP 08 weniger ausgeprägt und nur geringe jahreszeitliche Schwankungen sind zu beobachten. Bei DP 09 und DP 10 ist kein eindeutiges Muster zu erkennen und von den saisonalen Variabilitäten geprägt.

Die pPAs zeigten ein nahezu spiegelbildliches Verhalten zu den niederpolymerisierten Oligomeren. Polymere PAs sind zu Beginn der Wachstumssaison im Mai deutlich mehr vorhanden als am Ende des Vorjahres. Auch im Juni steigen die Gehalte weiter, während im Juli und August ein deutliches Absinken der Gehalte zu verzeichnen ist, welches sich bis zum Ende der Wachstumssaison (September) fortsetzt.

Die deutlichste Abnahme im Gehalt der polymeren PAs findet also zeitgleich zum größten Zuwachs bei den Oligomeren statt, während die deutlichen Zunahmen im Gehalt der polymeren PAs mit den Abnahmen oligomerer PAs zusammenfallen. Dies gilt für oPAs einschließlich DP 08, während sich der Cluster DP 10 in Relation mehr wie die pPAs verhält.

6.3.1.3. UPLC®-RP18-PDA Screening: phenolische Inhaltsstoffe

Um einen Vergleich der jahreszeitlichen Verläufe verschiedener phenolischer Stoffklassen zu evaluieren, wurde neben der modifizierten Hautpulvermethode (6.2.5, S. 157) und der UPLC®-DIOL-FLR Methode (6.2.3, S. 151) auch eine UPLC®-RP18-PDA Methode nach Wiesneth et al. (2018) angewendet, um phenolische Inhaltsstoffe zu untersuchen (6.2.4, S. 153). Eine Adaption und Verknüpfung mit einer spektralen Datenbank erlaubte die Quantifizierung von acht Inhaltsstoffklassen. Im Folgenden werden die Jahreszeitlichen Verläufe von drei Individuen der mehrfach in der Studie vertretenen Arten dargestellt, um auch interindividuelle Unterschiede veranschaulichen zu können. Die Ergebnisse der übrigen in der Studie inkludierten Individuen sind gesammelt im Anhang (S. 293ff.) gezeigt.

6.3.1.3.1. *Salix caprea*

Beispielhaft für die Betrachtung des jahreszeitlichen Verlaufs der Anteile phenolischer Inhaltsstoffe sollen drei Individuen herausgegriffen werden. Die Daten der Jahre 2018 und 2019 sind in **Abbildung 74** bis **Abbildung 76** gezeigt.

Für die Salicylalkoholderivate (SAD, A) wurden stark schwankende Gehalte bestimmt. Zumeist werden niedrige Werte von ca. 0,1 mg/g TD bis hin zu Werten von ca. 30 mg/g TD beobachtet, die Mittelwerte liegen bei 1,20 bis 16,08 mg/g TD (vgl. **Tabelle 77** S. 320). Einzelne Werte liegen auch deutlich darüber. Bei den untersuchten Individuen ist dies vor allem im Juli und August der Saison 2018 der Fall. Zudem kam es zu großen Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmungen, welche auf eine möglicherweise unsaubere Zuordnung der Peakflächen hindeutet.

Die Kaffeesäurederivate (CAD, B) sind ebenso starken jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen. 2018 zeigt sich ein Konzentrationsmaximum im Hochsommer, während 2019 die Gehalte zum Ende des Jahres hin ansteigen. Die Gehalte bewegen sich, von einzelnen deutlich höheren Werten abgesehen, in beiden Jahren in ähnlichen Bereichen, im Mittel bei 0,53 - 1,29 mg/g TD (vgl. **Tabelle 70**, S. 313).

Ein über die Wachstumssaison steigender Gehalt wurde für die Cumarylalkoholglykoside (CAG, C) bestimmt. Der Höchstwert wird dabei je Individuum jede Saison zumeist zur gleichen Zeit erreicht (August/September).

Deutliche Unterschiede zwischen den Jahren zeigen sich bei der Betrachtung der Flavan-3-ole (D). Bei diesen ist 2019 ein deutlicher Anstieg zum Ende der Wachstumssaison

zu beobachten, während die höchsten Gehalte 2018 bereits früher im August beobachtet werden können und im weiteren Verlauf der Saison wieder absinken.

Die Flavanone (E) ebenso wie die Gruppe der Flavanonole (F) zeigen sehr niedrige Werte mit einzelnen auffälligen Maximalwerten im Hochsommer (August 2018) und zum Ende der Wachstumssaison (2019), wobei diese Entwicklung im Jahr 2018 deutlicher ausgeprägt ist als in der Saison 2019. Die Gehalte bewegen sich im Mittel in einem Bereich von wenigen mg/g TD (vgl. **Tabelle 73**, S. 316 bzw. **Tabelle 74**, S. 317).

Ähnliche Beobachtungen werden bei den Flavonen (G) gemacht. Diese zeigen nur bei vereinzelten Probenahmen relevanten Gehalte, zumeist jedoch Werte kleiner 1 mg/g TD mit höchsten Werten zu Beginn und Ende der Wachstumssaison.

Bei den Flavonole (H) wurden z.T. die höchsten Werte zu Beginn der Wachstumssaison 2018 gemessen, aber es konnten auch Entwicklungen mit Höchstwerten im Hochsommer beobachtet werden. Die Gehalte sind 2018 deutlich höher als 2019, aber insgesamt sind die Gehalte mit zumeist < 1 mg/g TD jedoch recht gering.

Scap_26

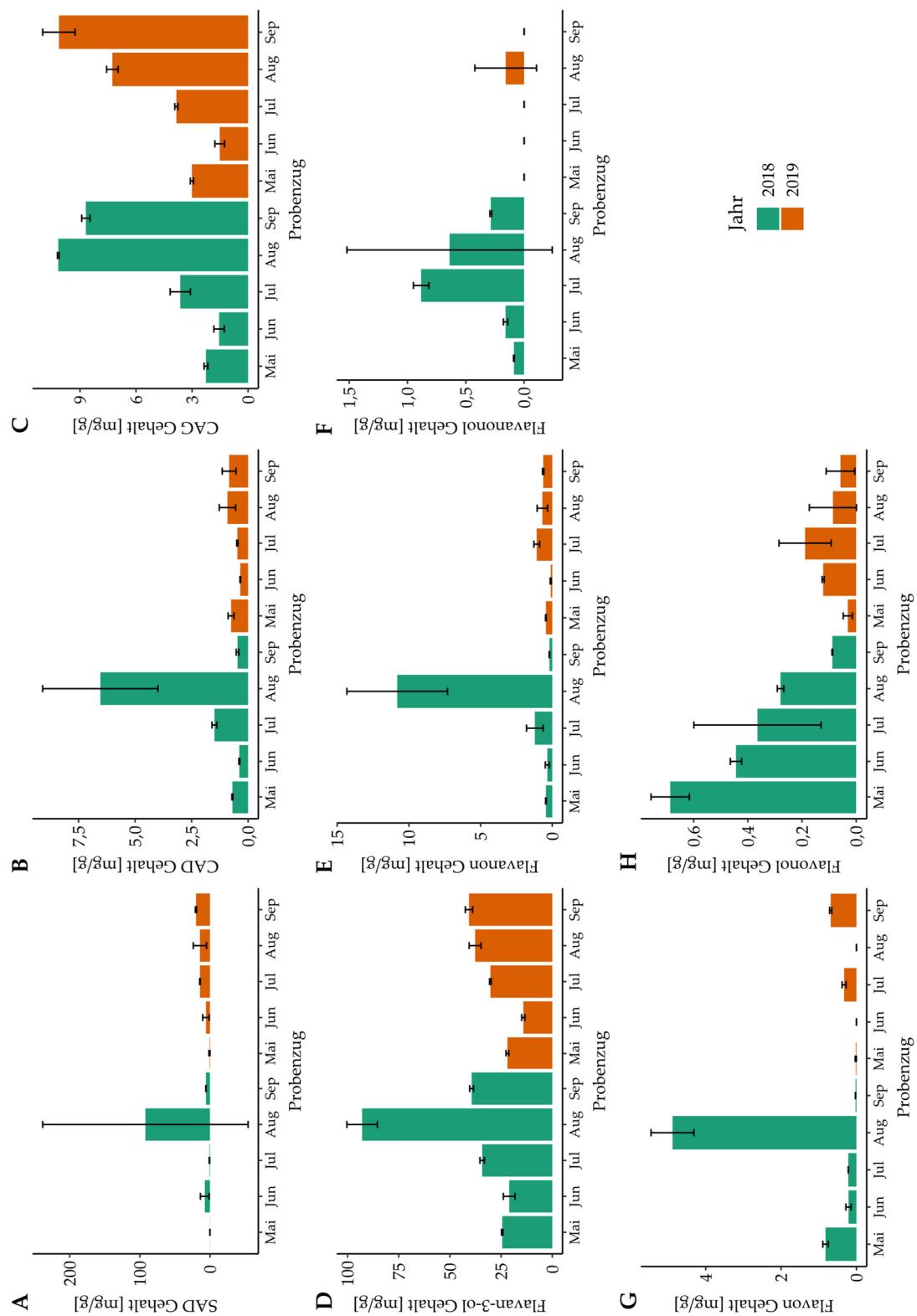


Abbildung 74: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. caprea* (Scap_26, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

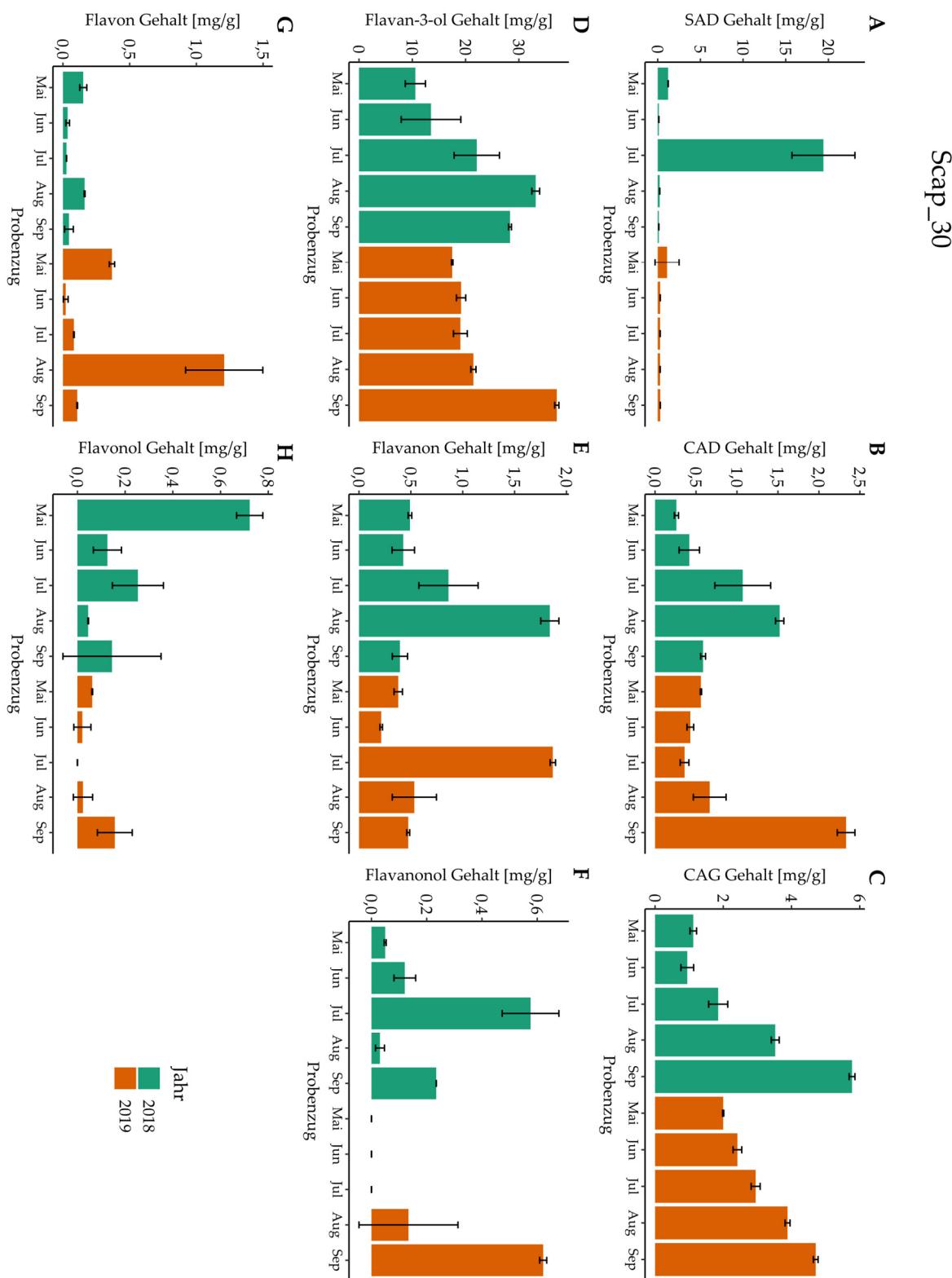


Abbildung 75: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. caprea* (Scap_30, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Scap_33

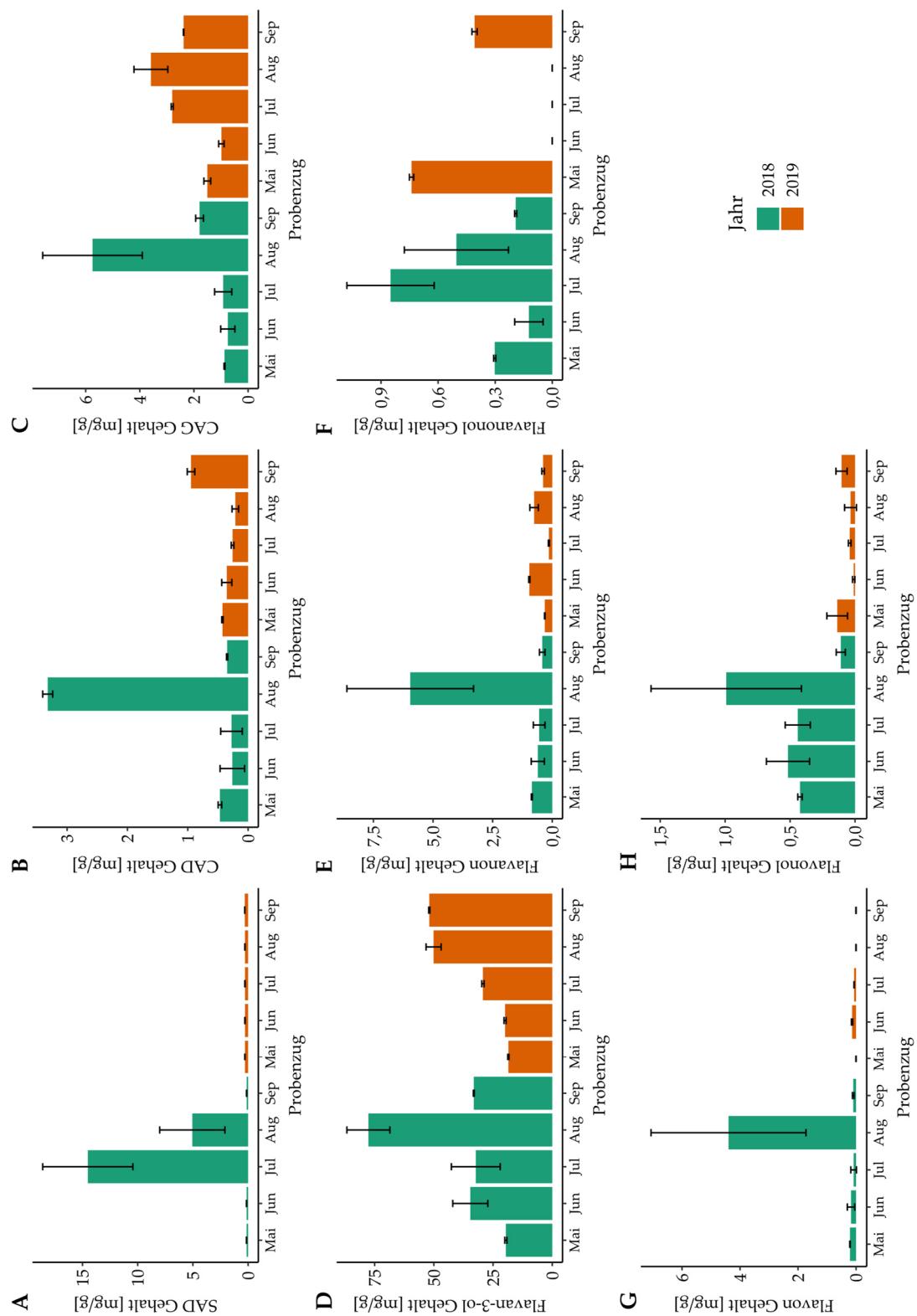


Abbildung 76: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. caprea* (Scap_33, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

6.3.1.3.2. *Salix cinerea*

Beispielhaft für die Betrachtung des jahreszeitlichen Verlaufs der Anteile phenolischer Inhaltsstoffe sind drei Individuen herausgegriffen worden. Die Daten der Jahre 2018 und 2019 sind in Abbildung 77 bis Abbildung 79 gezeigt. Die graphische Präsentation der übrigen in der Studie inkludierten Individuen findet sich im **Anhang** (S. 293ff).

Die beprobten *Salix cinerea* zeigen moderate Gehalte an Salicylalkoholderivaten (SAD, A) mit deutlichen bis sehr starken Gehaltszuwächse zum Ende der Wachstumssaison. Diese Spitzen zeigen sich vor allem im September und sind im Jahr 2019 mit errechneten Werten von bis zu 562 mg/g TD extrem ausgeprägt. Für die Saison 2018 zeigen sich deutlich niedrigere Maxima von bis zu 60 mg/g TD. Zudem werden die Gehaltsspitzen des Jahres 2018 bereits früher (Juli/August) erreicht als im darauffolgenden Jahr.

Für die Substanzgruppe der Kaffeesäurederivate (CAD, B) zeigen sich für die Saison 2018 sehr konstante Werte ohne spezifische Entwicklung. Für das Jahr 2019 sind jedoch deutlich erhöhte Werte zu Beginn und Ende des Studienzeitraums zu beobachten.

Die Gehalte der Cumarylalkoholglykoside (CAG, C) steigen in beiden Jahren deutlich an und zeigen Höchstwerte im Hochsommer (August) oder Frühherbst (September). Dieser Anstieg im Gehalt ist 2019 deutlich stärker ausgeprägt als in der Saison 2018. Auffallend sind die sehr hohen Werte im Vergleich zu anderen Arten von bis zu ca. 111 mg/g TD (einzig *Salix bicolor* weist ähnlich hohe Gehalte auf, vgl. **Tabelle 71** S. 314).

Flavan-3-ole (D) wurden in den Proben des Jahres 2018 und 2019 in ähnlichen Mengen detektiert. Für die Saison 2019 sind die Konzentrationszuwächse zum Ende der Wachstumsperiode deutlich stärker ausgeprägt als im Vorjahr.

Die Flavanone (E) zeigen niedrige und schwankende Werte, mit teils ausgeprägten Höchstgehalten oder Zuwachsen zum Ende der Wachstumssaison.

Ebenso deutlich schwankende Gehalte zeigen die Flavanonole (F) ohne deutlichen Unterschied zwischen den beprobten Jahren.

Gehaltsmaxima der Flavone (G) sind zumeist zu Beginn (2018) oder Ende der Wachstumssaison (2019) zu bestimmen. Die Gehalte liegen für die Saison 2018 deutlich höher als 2019.

Ein ähnliches Bild mit einem zusätzlichen Maximum im Hochsommer zeigen die Flavonole (H), mit vereinzelten Werten über 1 mg/g TD.

Scin_08

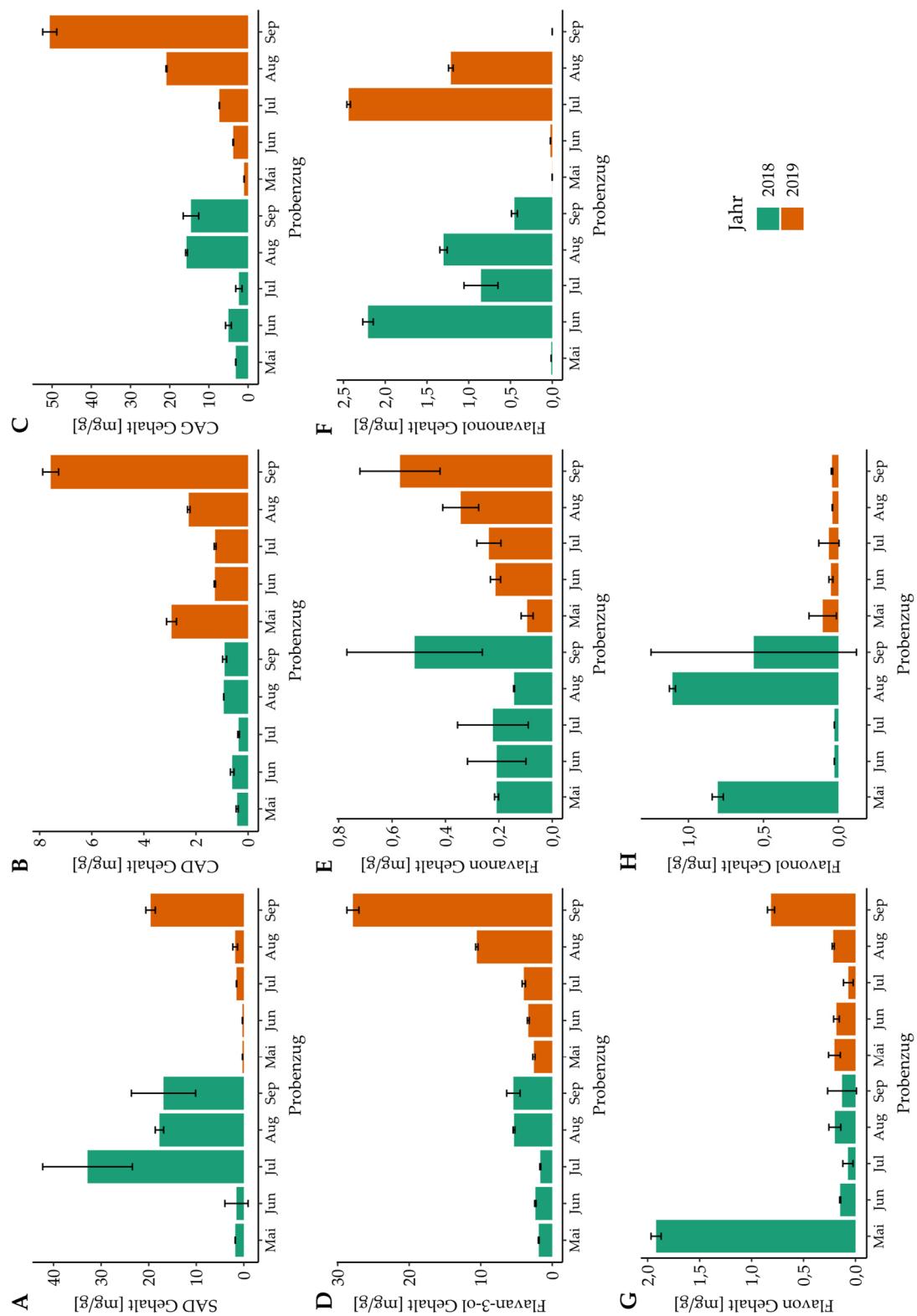


Abbildung 77: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. cinerea* (Scin_08 vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Scin_34

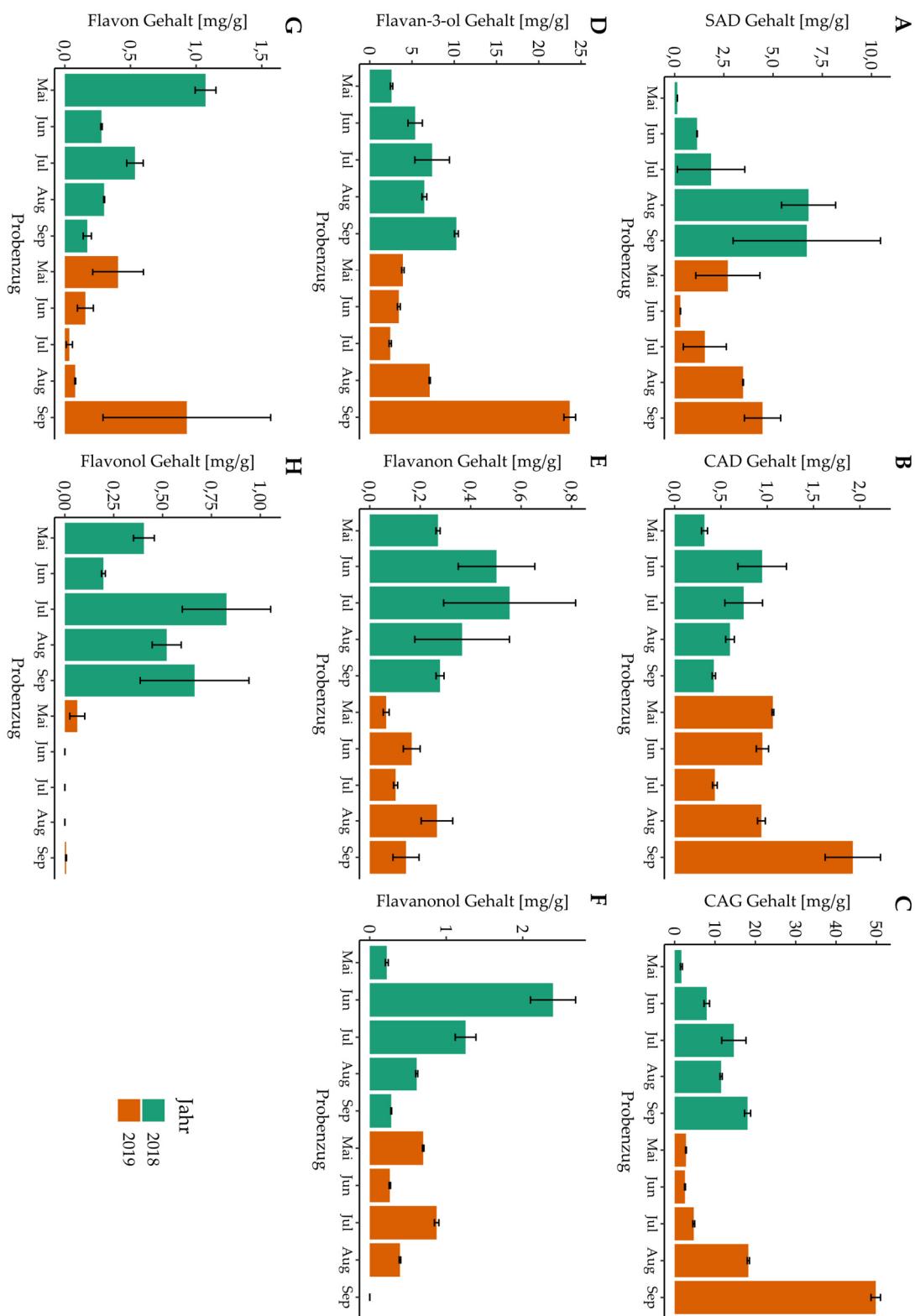


Abbildung 78: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. cinerea* (Scin_34 vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Scin_35

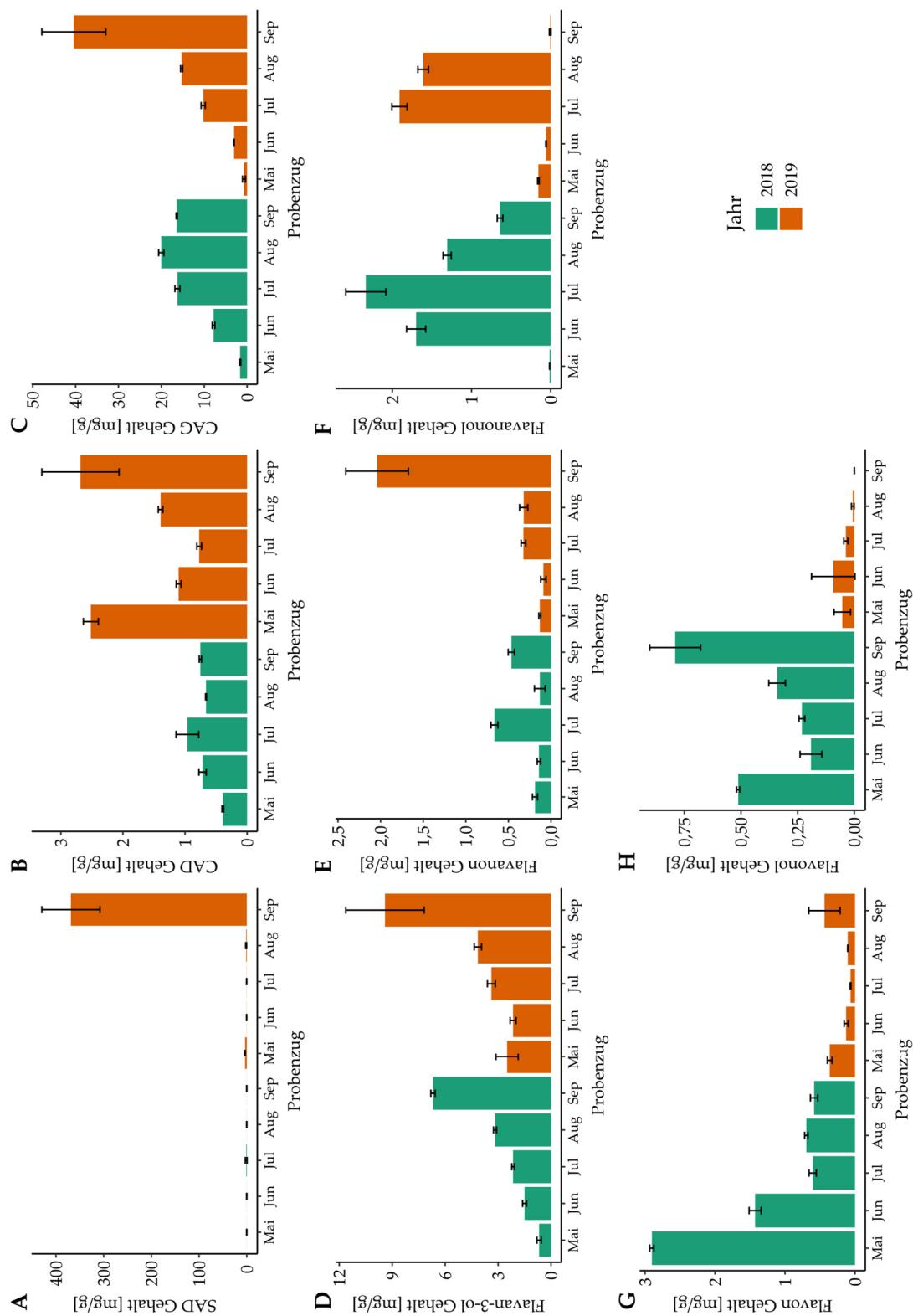


Abbildung 79: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. cinerea* (Scin_35 vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

6.3.1.3.3. *Salix daphnoides*

Abbildung 80 bis **Abbildung 82** zeigen die ermittelten Gehalte der untersuchten phenolischen Inhaltsstoffgruppen in drei Individuen der Spezies *S. daphnoides* für die Jahre 2017-2019.

Für die Salicylalkoholderivate (SAD, A) sind jeweils starke Schwankungen innerhalb der Saison detektiert worden und es zeigen sich deutlich verringerte Werte für weite Teile der Saison 2019.

Bei den Kaffeesäurederivaten (CAD, B) sind in allen drei Jahren sehr unterschiedliche Muster zu beobachten. 2017 sind die Gehalte sehr konstant, während sich in Saison 2018 ein Höhepunkt im Hochsommer (August) und 2019 ein kontinuierlicher Anstieg zum Ende der Saison zeigt.

Eine ähnliche Entwicklung kann in der Gruppe der Cumarylalkoholglykoside (CAG, C) beobachtet werden. Diese zeigen wie die Kaffeesäurederivate schwankende Werte in der Saison 2017, einen Höhepunkt im Frühsommer 2018 und in der darauffolgenden Saison 2019 eine deutliche Steigerung zum Ende der Wachstumssaison.

Unterschiedliche Muster wurden auch für die Flavan-3-ole (D) bestimmt. Die Gehalte liegen 2017 auf konstantem Niveau während für die verschiedenen Individuen unterschiedliche Entwicklungen 2018 und 2019, mit Höchstwerten zu Beginn und Ende der Saison, aufweisen.

Die Flavanone (E) zeigen in allen drei Jahren schwankende Gehalte bei ähnlichen Werten von wenigen mg/g TD.

Flavanonole (F) konnten nur in sehr geringen Mengen (< 1 mg/g) in den Individuen von *S. daphnoides* detektiert werden.

Deutliche Unterschiede zwischen den Jahren zeigen sich bei der Gruppe der Flavone (G). Diese konnten 2017 nur in geringen Mengen detektiert werden, während in den darauffolgenden Jahren höhere Gehalte bestimmt wurden. Dabei deuten sich Maxima im Gehalt zum Ende des Probezeitraums an.

Ebenfalls in geringen Mengen konnten Flavonole (H) nachgewiesen werden. Die Gehalte erwiesen sich 2017 als sehr konstant, in den beiden anderen Jahren als schwankender mit Konzentrationsspitzen im Hochsommer 2018 und Herbst 2019.

Sdap_02

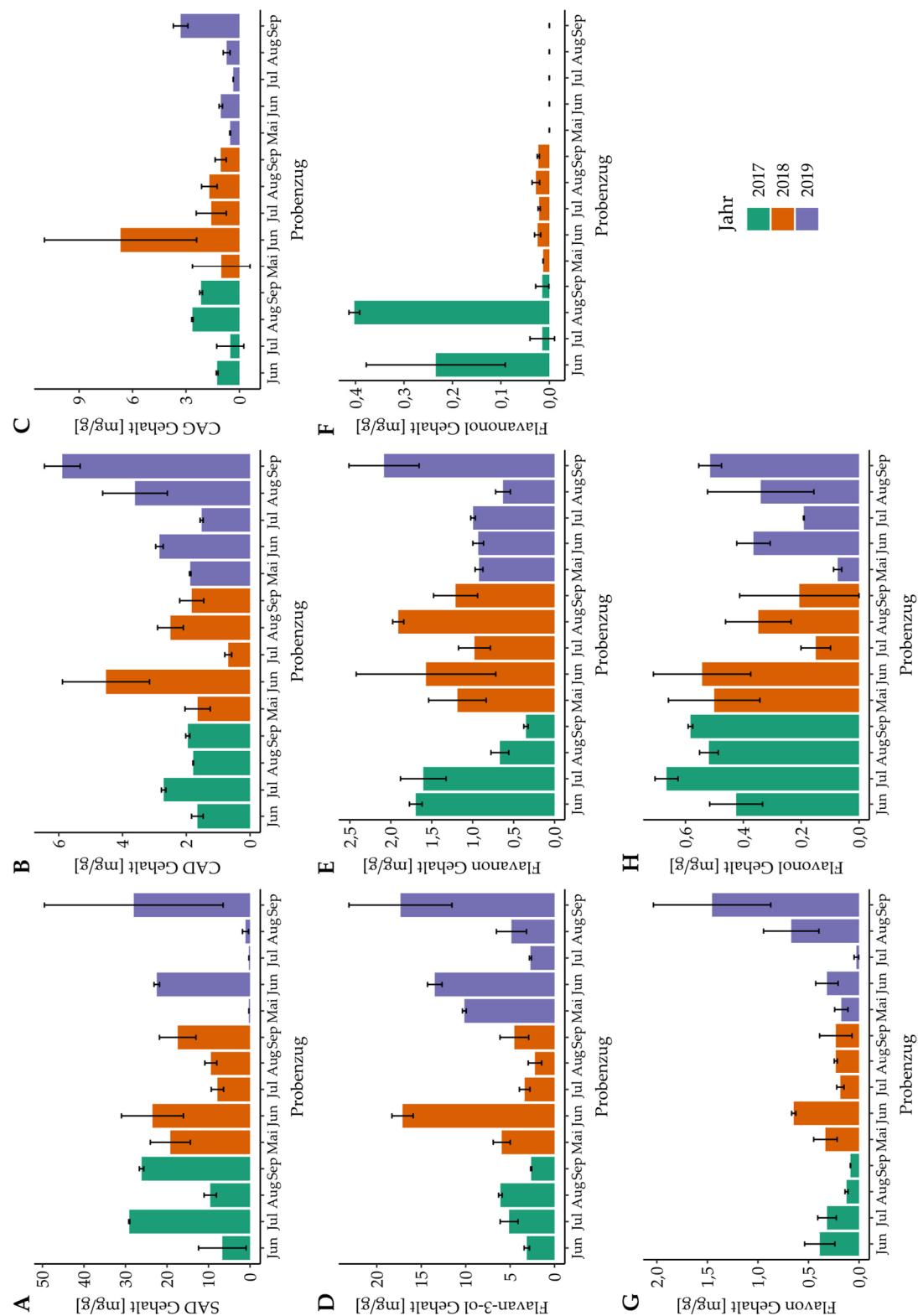


Abbildung 80: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. daphnoides* (Sdap_02, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Sdap_03

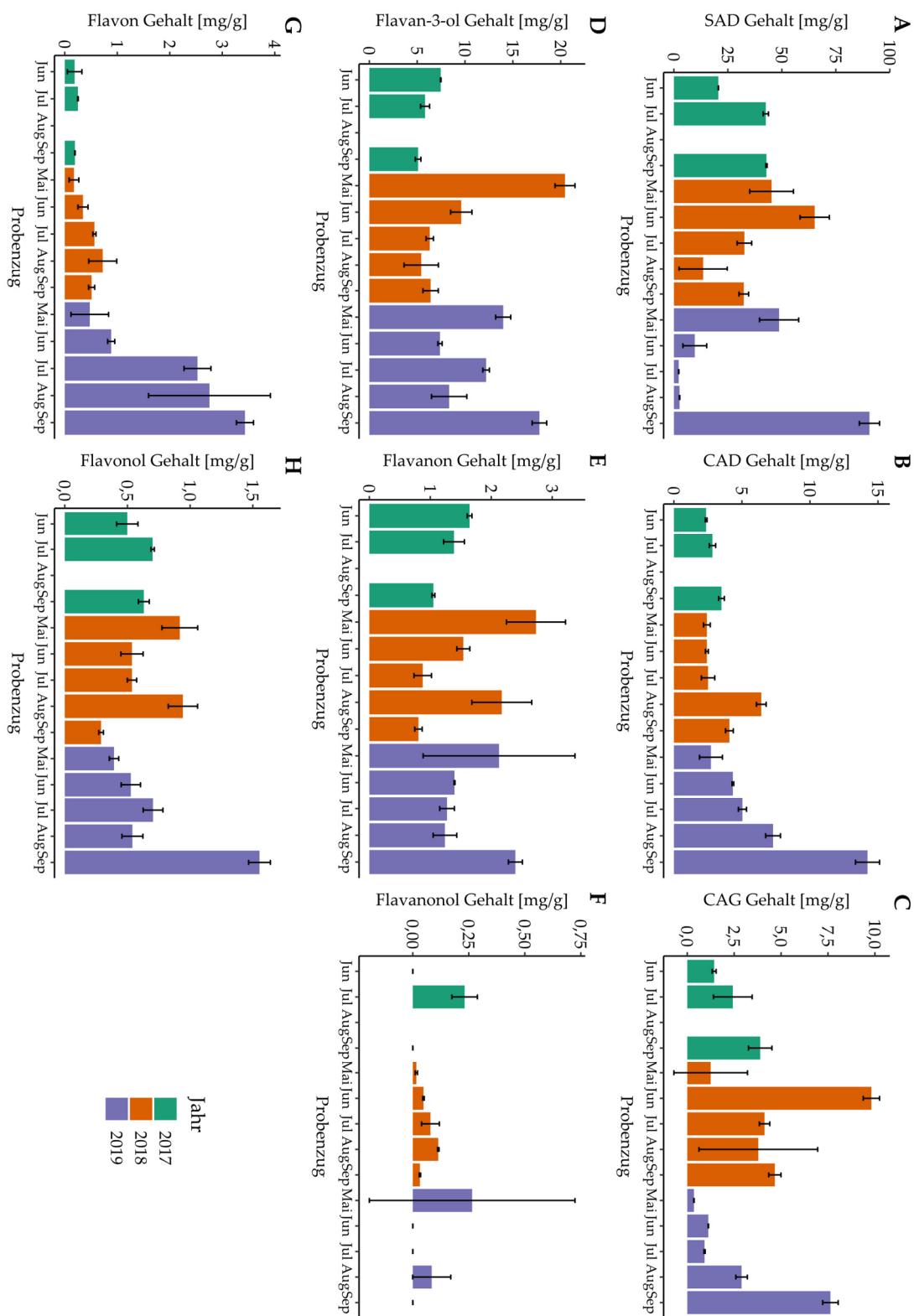


Abbildung 81: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. daphnoides* (Sdap_03, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Sdap_16

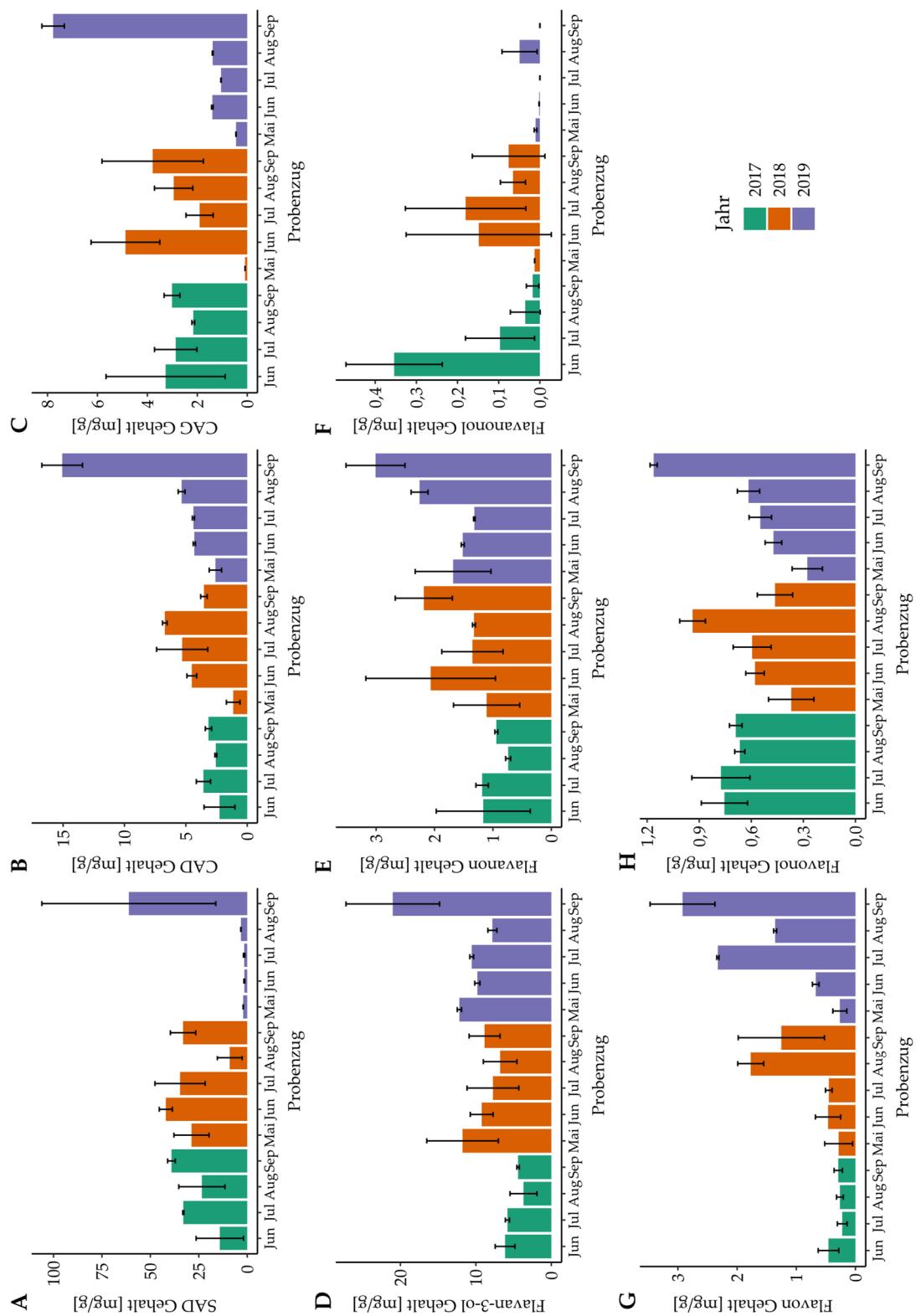


Abbildung 82: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. daphnoides* (Sdap_02, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

6.3.1.3.4. *Salix fragilis*

Die Individuen der Spezies *S. fragilis* zeigen über den beprobten Zeitraum von drei Wachstumsperioden (2017-2019) für einen Teil der getesteten Substanzgruppen jeweils vergleichbare Werte (vgl. **Abbildung 83** bis **Abbildung 85**), während für andere deutliche Unterschiede zwischen den Jahren zu erkennen sind.

Salicylalkoholderivate (SAD, A) zeigen überwiegend konstante Gehalte mit zum Teil deutlichen Anstiegen zum Ende der Saison. Die Werte bewegen sich in den beprobten Jahren in einem ähnlichen Bereich.

Die Kaffeesäurederivate (CAD, B) weisen eine deutliche Abnahme der Gehalte über die Wachstumsperiode auf. Dabei wurden für 2017 niedrigere Werte bestimmt, während sich die Verläufe für die Saisonen 2018 und 2019 sehr stark ähneln.

Leicht unterschiedliche Muster können die Cumarylalkoholglykoside (CAG, C) beobachtet werden. Während 2017 konstante Werte aufweist, sind Höchstwerte 2018 zu Beginn des Analysezeitraums und 2019 zum Ende der Wachstumssaison bestimmt worden.

Ein sehr starker Unterschied zwischen den beprobten Jahren ist bei der Gruppe der Flavan-3-ole (D) zu beobachten. Während sich für 2017 teils sehr konstante Werte, teils auch stark schwankende Gehalte oder kontinuierlich steigende Werte zeigen, ist auffällig, dass die Werte der Saison 2018 auf deutlich höherem Niveau liegen. In der Saison 2019 hingegen weisen die Gehalte bei einem Teil der Individuen einen deutlichen Anstieg zum Ende der Saison auf, während ein anderer Teil zwei Höhepunkt zu Beginn des Sommers im Juli und im September zeigt.

Die Gehalte der Flavanone (E) zeigen Schwankungen innerhalb des Probenzeitraums, mit den höchsten Werten zumeist in den Sommermonaten. Die Gehalte im Jahr 2017 fallen hier deutlich geringer aus als in den darauffolgenden Jahren 2018 und 2019, mit deutlichen individuellen Unterschieden.

Flavanonole (F) wurden nur in sehr geringen Mengen mit kurzzeitigen Konzentrationsspitzen in den Sommermonaten bestimmt. Dabei waren im Jahr 2018 deutlich häufiger relevante Menge zu detektieren.

Flavone (G) und Flavonole (H) sind nur in geringen Mengen vorhanden. Auffälligerweise ist im Jahr 2017 das Verhältnis deutlich zu den Flavonolen verschoben, während sich die Gehalte 2018 auf ähnlichem Niveau bewegen. 2019 verschiebt sich das Bild mehr zu den

Flavonen, Flavonole waren kaum mehr zu bestimmen. Die Gehalte schwanken und zeigen unterschiedliche Muster über die Wachstumssaison.

Die graphische Präsentation der übrigen in der Studie inkludierten Individuen findet sich im Anhang (S. 293ff).

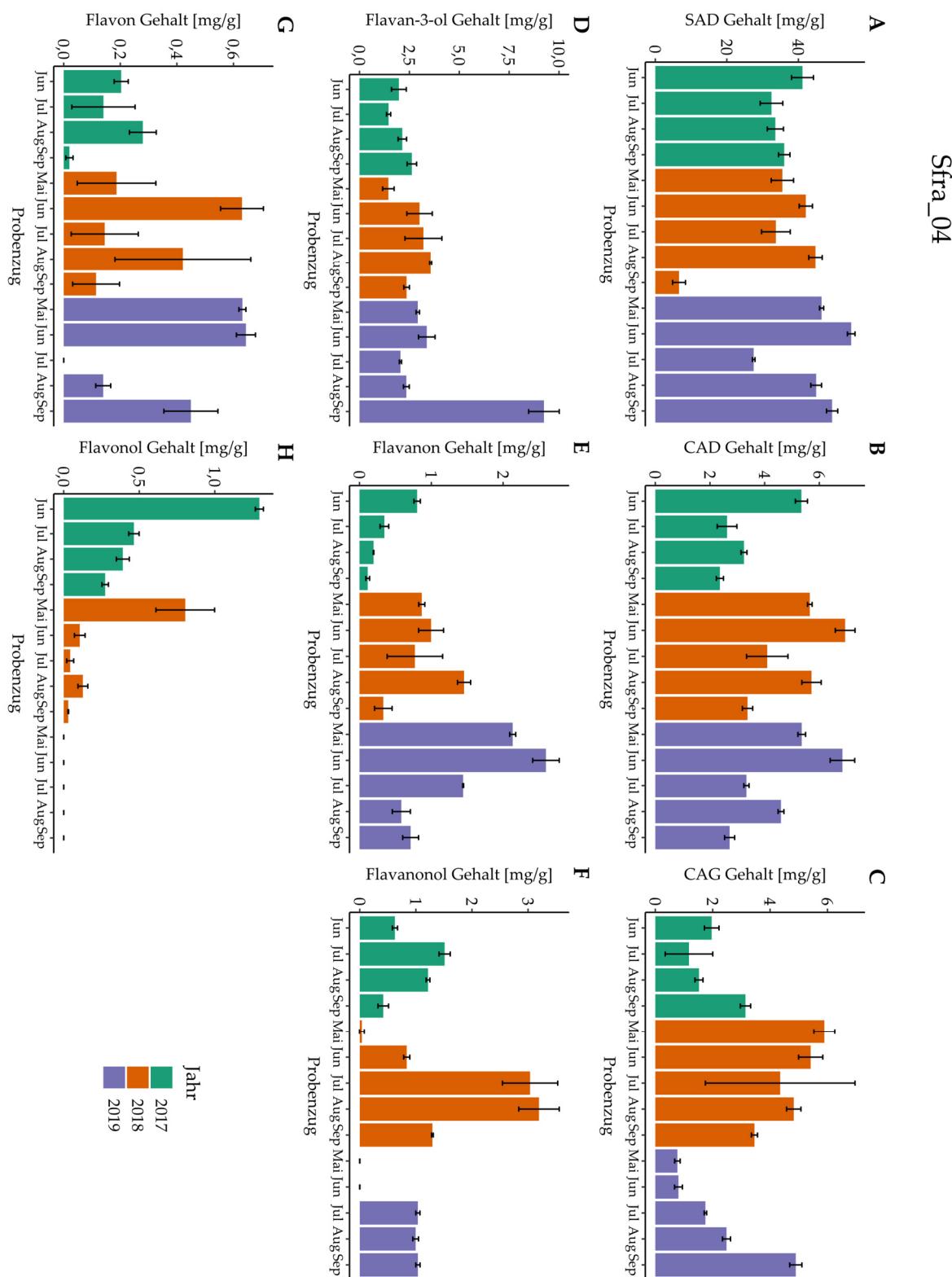


Abbildung 83: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. fragilis* (Sfra_04, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Sfra_17

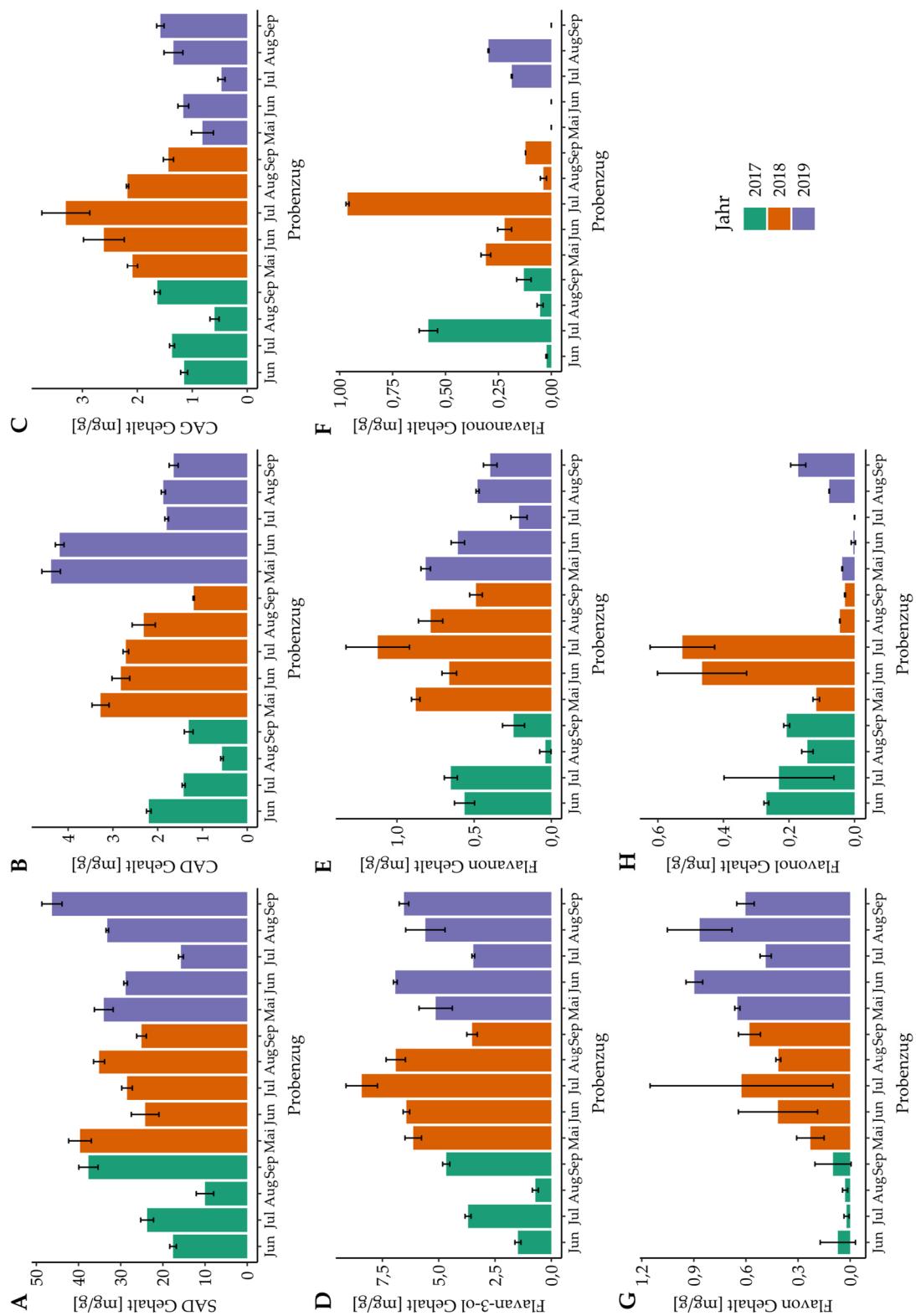


Abbildung 84: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. fragilis* (Sfra_17, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW \pm SD)

Sfra_18

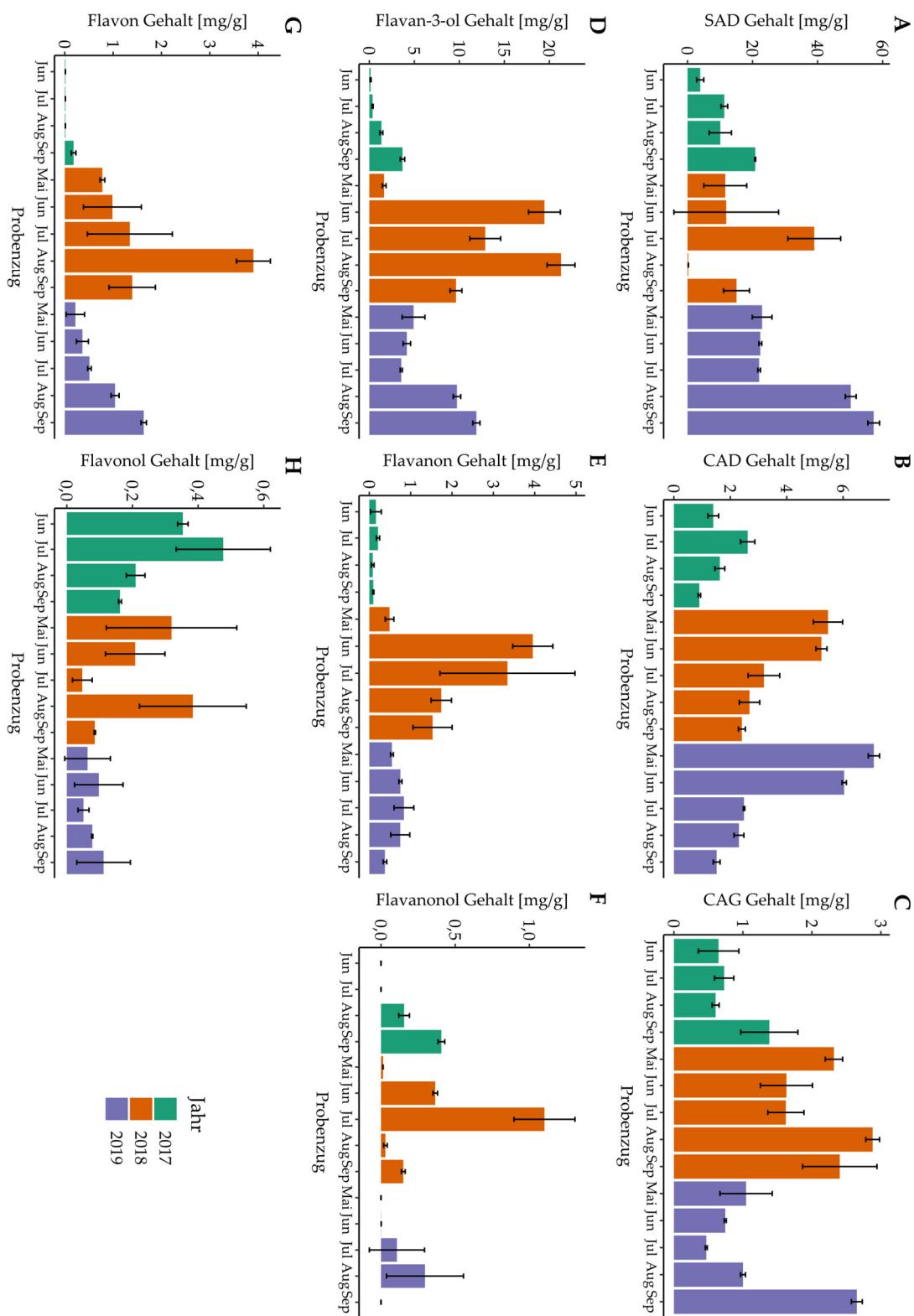


Abbildung 85: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. fragilis* (Sfra_18, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

6.3.1.3.5. *Salix purpurea*

Abbildung 86 bis **Abbildung 88** zeigen die ermittelten Gehalte der untersuchten phenolischen Inhaltsstoffgruppen für die drei Individuen der Spezies *S. purpurea* der Jahre 2017-2019. Die graphische Präsentation der übrigen in der Studie inkludierten Individuen findet sich im **Anhang** (S. 293ff).

Für Salicylalkoholderivate (SAD, A) wurden hohe Gehalte von bis zu 87 mg/g TD bestimmt (**Tabelle 77**, S. 320). Die Werte zeigen jedoch sehr unterschiedliche Muster. Während die Werte 2017 überwiegend sehr konstant sind, schwanken diese 2018 zum Teil erheblich. Die Gehalte der Saison 2019 sind bei sieben von acht Individuen deutlich geringer und bewegen sich bei Werten < 5 mg/g TD. Der Einbruch der Konzentrationen ist zum Ende der Saison 2018 zu beobachten (August/September).

Die Kaffeesäurederivate (CAD, B) zeigen konstante oder steigende Werte über die Saison 2017. Ein ausgeprägtes Maximum des Gehalts ist zumeist für den August 2018, mit Werten bis 10 mg/g TD, zu erkennen.

Cumarylalkoholglykoside (CAG, C) zeigen schwankende, jedoch niedrige Werte mit einer Konzentrationsspitze im Hochsommer 2018 und Tendenz zu kontinuierlicher Zunahme 2019.

Die Flavan-3-ole (D) zeigen konstante, schwankende und kontinuierlich steigende Gehalte in den verschiedenen Individuen. Die Muster unterscheiden sich in den verschiedenen Jahren, auch innerhalb einzelner Individuen.

Die Gehalte der Flavanone (E) erreichen meist zu Beginn des Beobachtungszeitraums die höchsten Werte. Diese liegen deutlich höher als bei den anderen bisher betrachteten Spezies. Im Jahr 2017 zeigten die Gehalte deutlich konstantere Werte als in den Jahren 2018 und 2019.

Für Flavanonole (F) wurden für die einzelnen Individuen über die verschiedenen Jahre sehr unterschiedliche Entwicklungen nachgewiesen. Zum Teil sind Spitzen im Frühsommer, kontinuierlich über die Wachstumssaison steigende, aber auch absinkende Gehalte zu beobachten.

Flavone (G) wurden nur in geringen Mengen mit höchsten Werten im Sommer 2018 nachgewiesen. Ein durchgängiges Muster ist dabei nicht zu erkennen.

Für Flavonole (H) wurde ein über die Wachstumssaison sinkender Gehalt beobachtet, mit sehr ähnlichen Konzentrationsniveaus in allen Jahren der Studie. Einzelne Individuen wiesen außergewöhnlich hohe Gehalte auf (Spur_47, vgl. **Abbildung 130**, S.309).

Spur_01

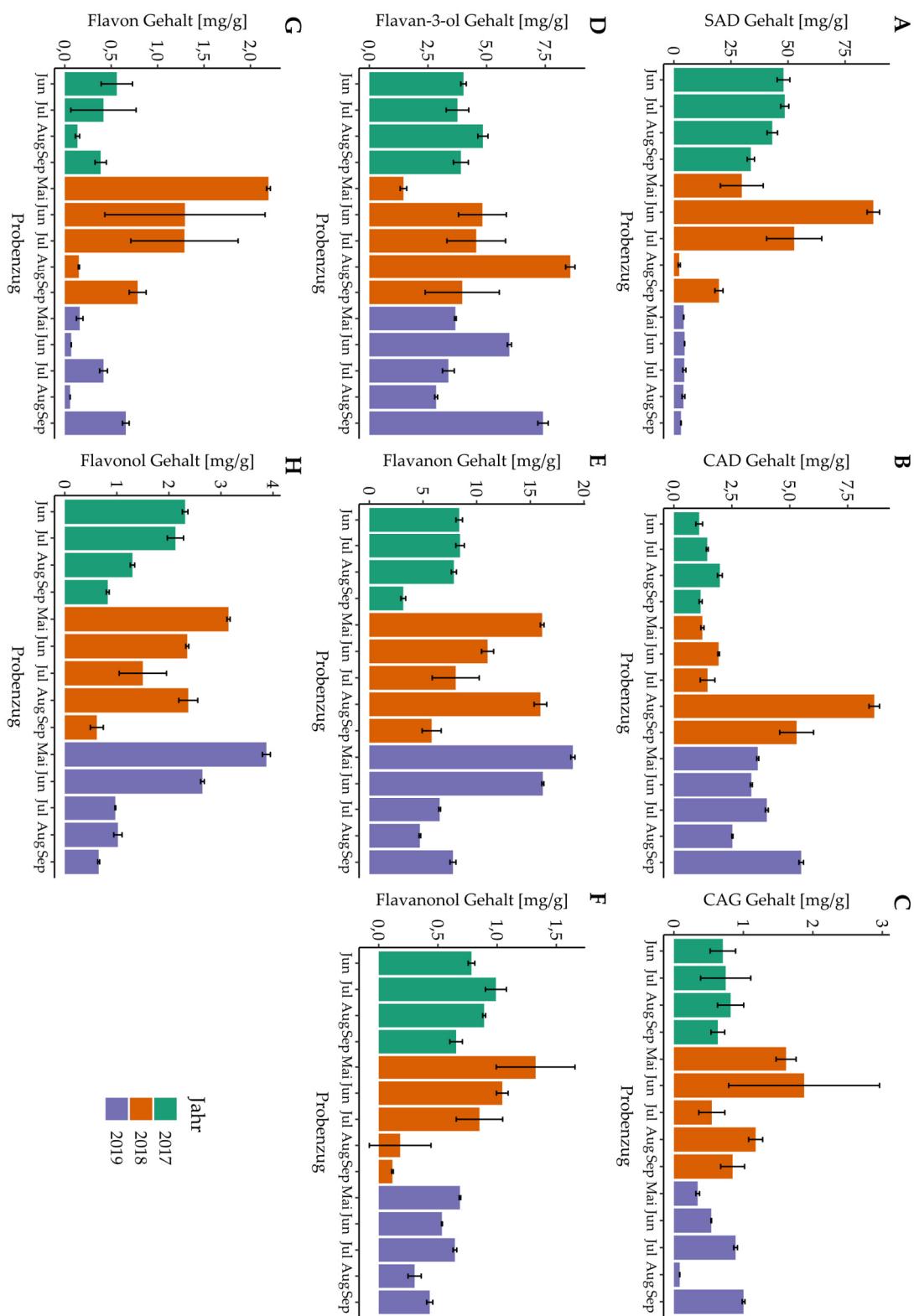


Abbildung 86: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. purpurea* (Spur_01, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Spur_14

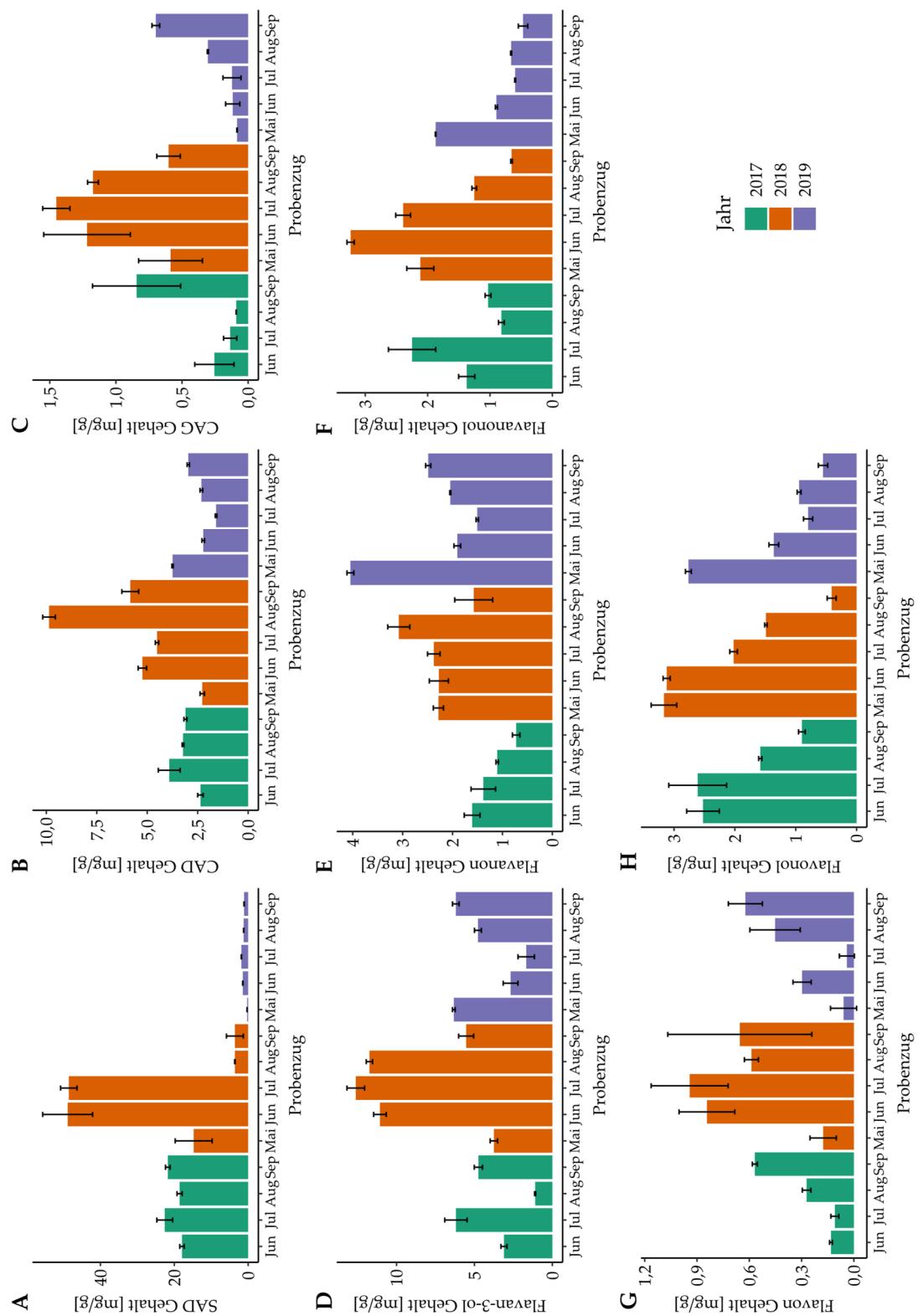


Abbildung 87: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. purpurea* (Spur_14, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Spur_15

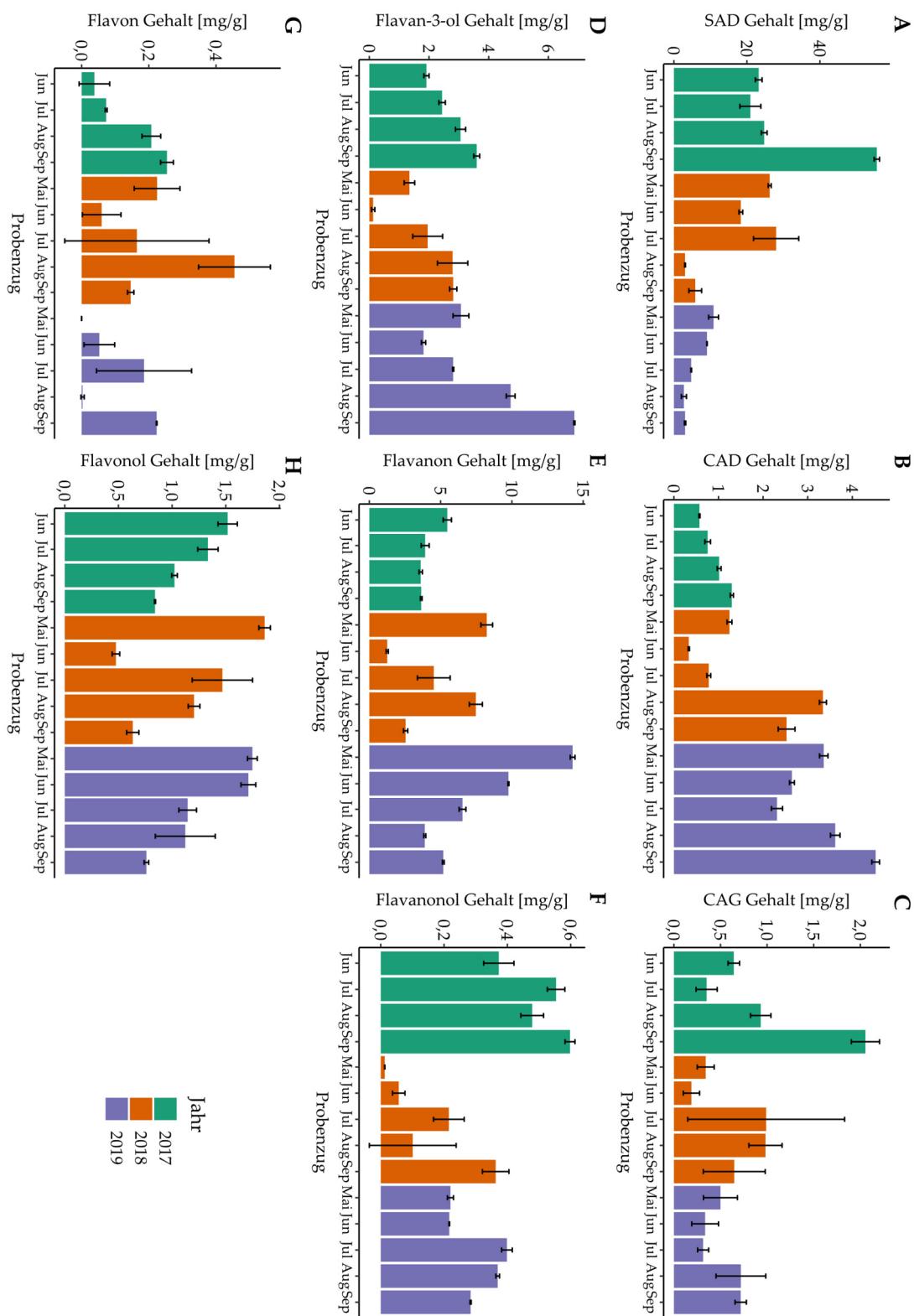


Abbildung 88: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. purpurea* (Spur_15, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge nach Probenzugmonat und Jahr (MW±SD)

6.3.2. Geschlechterspezifische Variabilität im Genus *Salix*

Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Geschlechtern zu erfassen und zu untersuchen, wurden die Daten des UPLC®-RP18-PDA Screenings der phenolischen Sekundärstoffe herangezogen (vgl. 6.2.4, S. S153). Fünf Spezies waren in dieser Studie mehrfach vertreten und erlaubten somit diese geschlechterfokussierte Betrachtung (vgl. 6.2.2.2, S. 148). Für *S. daphnoides* wurden alle Datenpunkte der Jahre 2017 bis 2019 verwendet. Die restlichen Arten (*S. caprea*, *S. cinerea*, *S. fragilis* und *S. purpurea*) wurden in den Jahren 2018 und 2019 betrachtet, damit alle Individuen mit der gleichen Anzahl Probenzüge berücksichtigt werden konnten.

Da es sich mit acht betrachteten Stoffklassen um ein komplexes Datenset handelt wurden zwei verschiedene Verfahren zur Auswertung angewendet:

Zu einen wurde ein Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Die PCA erfolgt über die Singulärwertzerlegung (Kessler, 2007) und veranschaulicht so die komplexen Daten zur besseren Übersichtlichkeit.

Zum anderen wurden die jeweiligen Stoffgruppen getrennt betrachtet und mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf signifikante Unterschiede getestet. Die Ergebnisse werden im Folgenden in Form von Boxplots dargestellt.

Für die PCA wurden die Anteile der den untersuchten Stoffgruppen zugeordneten Peakfläche als Datengrundlage benutzt, während für den Vergleich auf Ebene der einzelnen Stoffgruppen die errechneten Gehalte zugrunde gelegt wurden.

6.3.2.1. *Salix caprea*

In den Jahren 2018 und 2019 waren insgesamt acht Vertreter der Art *Salix caprea* in diese Studie eingeschlossen, darunter 4 weibliche und 4 männliche Individuen (vgl. 6.2.2.2, S. 148).

Abbildung 89 zeigt die PCA auf Grundlage der ermittelten Peakfläche der acht Inhaltsstoffgruppen des UPLC®-RP18-PDA Screenings. Auffällig ist, dass die Datenpunkte der weiblichen Individuen deutlich weiter gestreut sind als die der Männlichen, bei denen ein großer Teil aller Datenpunkte nahe beieinander liegt.

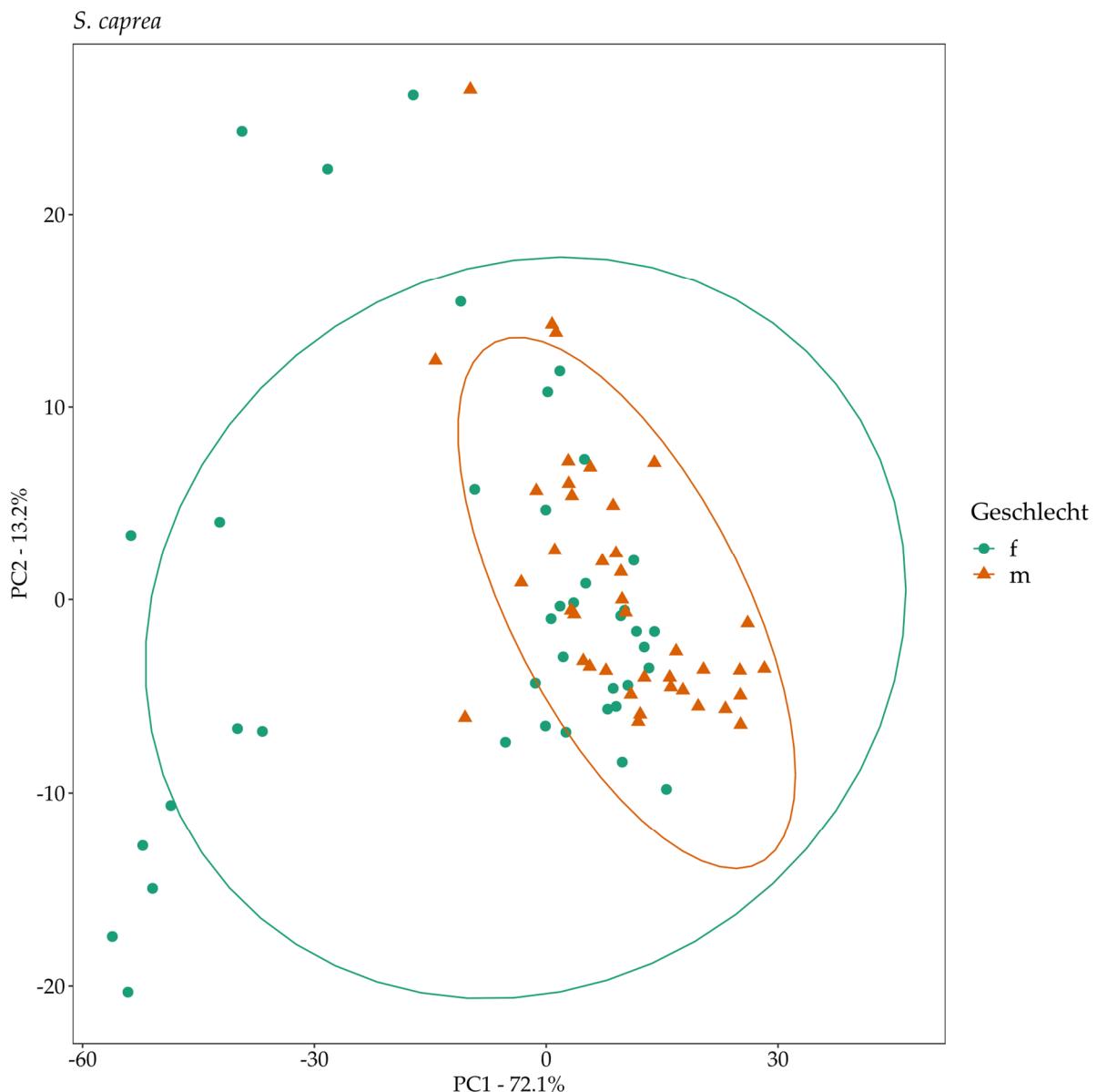


Abbildung 89: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Probenzüge der acht eingeschlossenen Individuen von *S. caprea*; die unterschiedlichen eingeschlossenen Geschlechter sind farblich gekennzeichnet und die statistischen Cluster durch eine Ellipse visualisiert

Um einen Einfluss einzelner Individuen auszuschließen, wurde dieselbe PCA auf Ebene der Einzelindividuen betrachtet. Das Ergebnis ist in **Abbildung 90** gezeigt. Eindeutig zu erkennen ist, dass die Datenpunkte des weiblichen Individuums 28_Scap_f_BT deutlich abseits der anderen Individuen liegen. Es kommt auch zu keiner Überlappung der Ellipsen, welche die Cluster umschließen. Dies deutet auf eine deutlich andere Komposition des Extrakts des Individuums im Vergleich mit den anderen hier betrachteten Individuen der Spezies *S. caprea* hin.

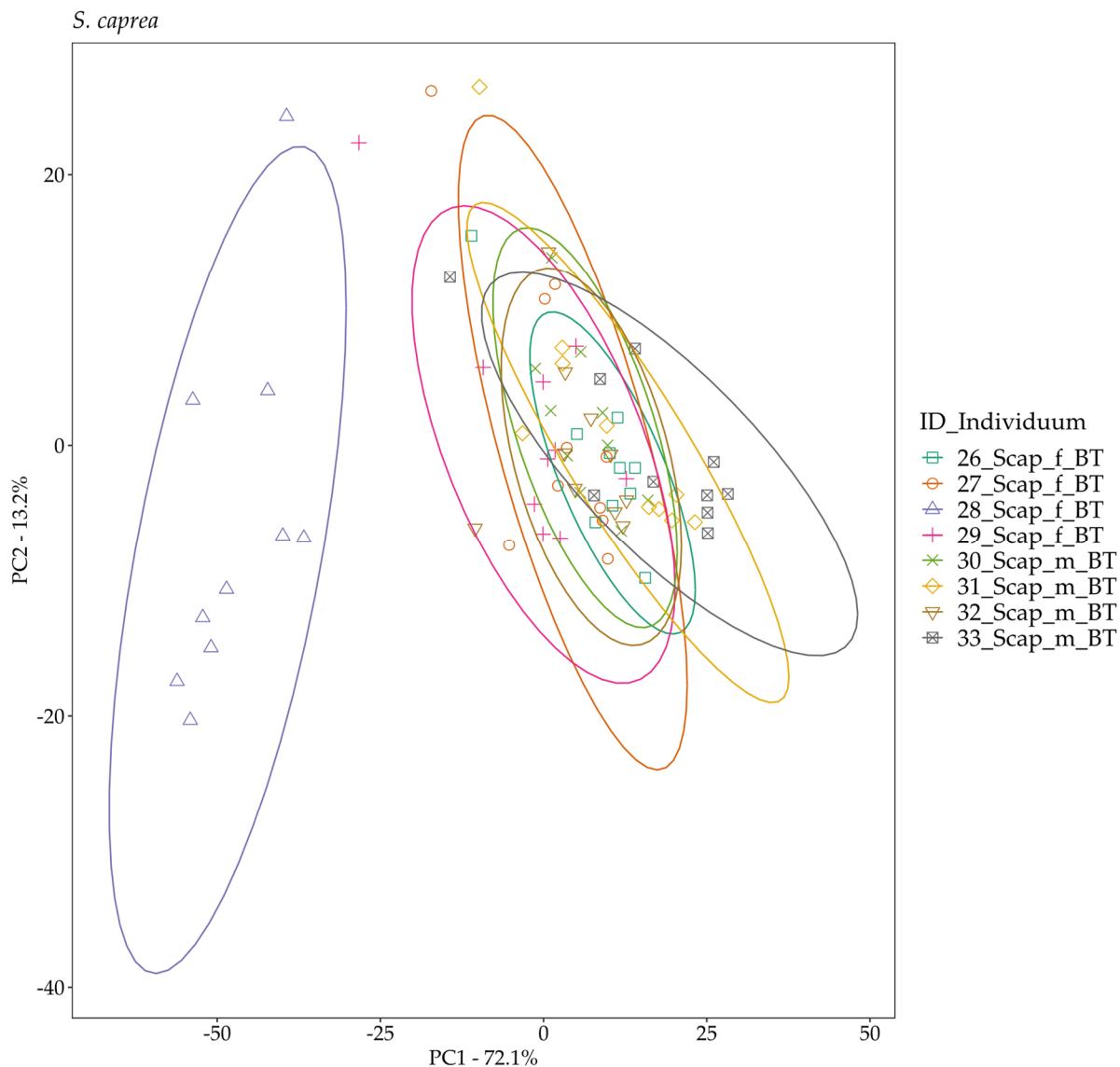


Abbildung 90: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren jeweils einen Probenzug der acht eingeschlossenen Individuen von *S. caprea*; die Proben von weiblichen und männlichen Individuen sind farblich gekennzeichnet und deren statistischen Cluster durch eine Ellipse visualisiert

Für die folgende Betrachtung innerhalb der Spezies *S. caprea* wurde das Individuum 28_Scap_f_BT ausgeschlossen und die Hauptkomponenten erneut berechnet. **Abbildung 91** zeigt die PCA auf Datengrundlage der verbliebenen sieben Individuen der Spezies *S. caprea*. Die Ellipsen, welche die Cluster umschließen, decken sich sehr gut. Dies lässt auf eine sehr ähnliche Zusammensetzung der Extrakte männlicher und weiblicher Individuen schließen.

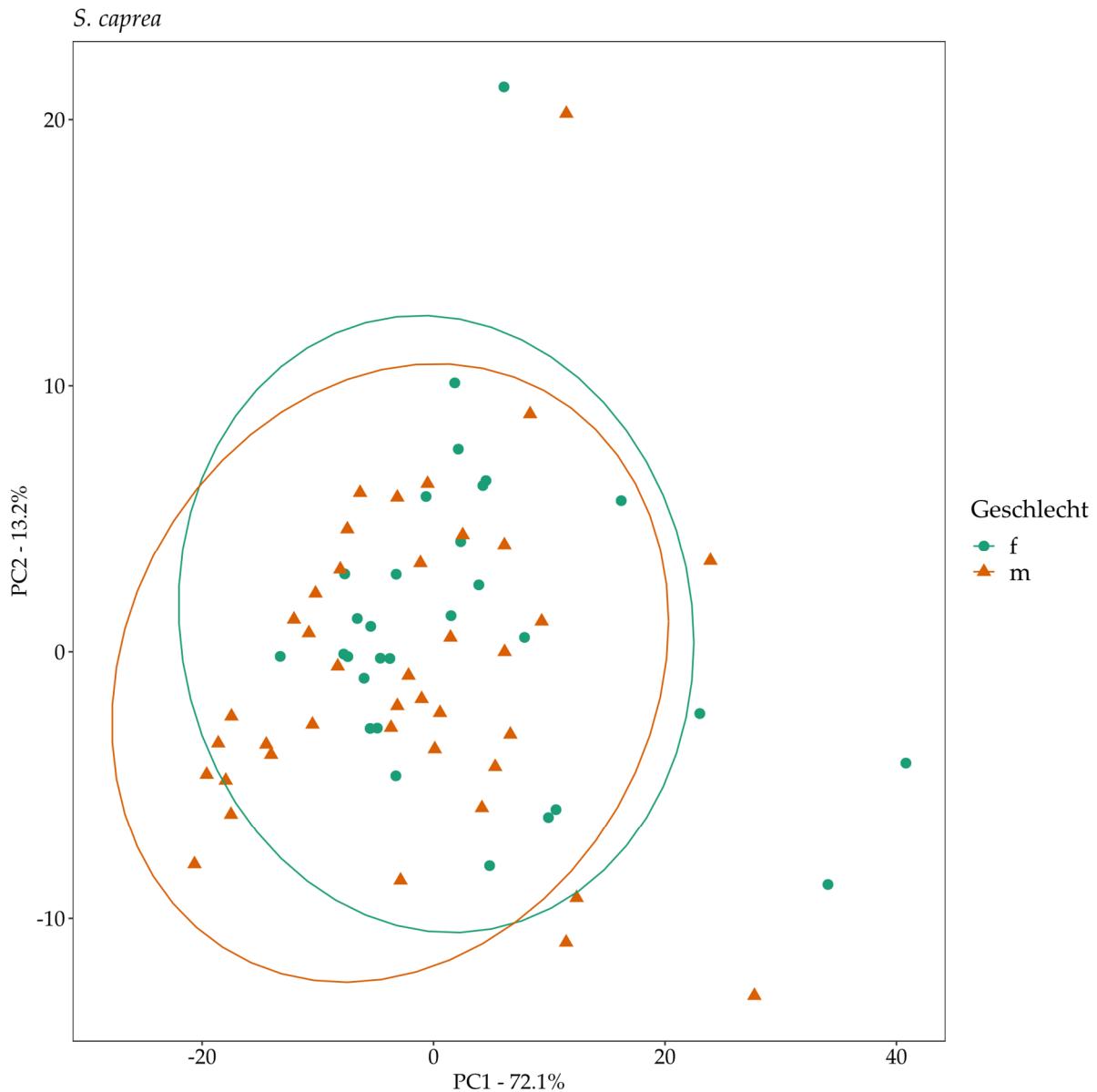


Abbildung 91: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Probenzüge von sieben Individuen von *S. caprea* (ohne 28_Scap_f_BT); die unterschiedlichen eingeschlossenen Geschlechter sind farblich gekennzeichnet und die statistischen Cluster durch eine Ellipse visualisiert

In **Abbildung 92** ist dieselbe PCA mit Kennzeichnung der verbliebenen sieben Einzelindividuen dargestellt. Die Individuen 31_Scap_m_BT und 33_Scap_m_BT, beides Männchen, zeigen eine Tendenz zu negativen Werten auf beiden Achsen der PCA. Dieser wird

bei der Hauptkomponente PC 1 am stärksten vom Anteil der Flavan-3-ole (Score -0,876) und im Falle von PC 2 am stärksten durch den Anteil von Flavanonen (Score -0,674) und Flavanonolen (Score 0,612) bestimmt. Ein hoher Anteil an Flavan-3-olen führt ebenso wie ein hoher Anteil an Flavanonen zu einer Verschiebung der Datenpunkte zu negativen Werten an beiden Hauptkomponentenachsen. Der Gehalt an Flavanonolen korreliert hingegen positiv mit der Hauptkomponente PC 2.

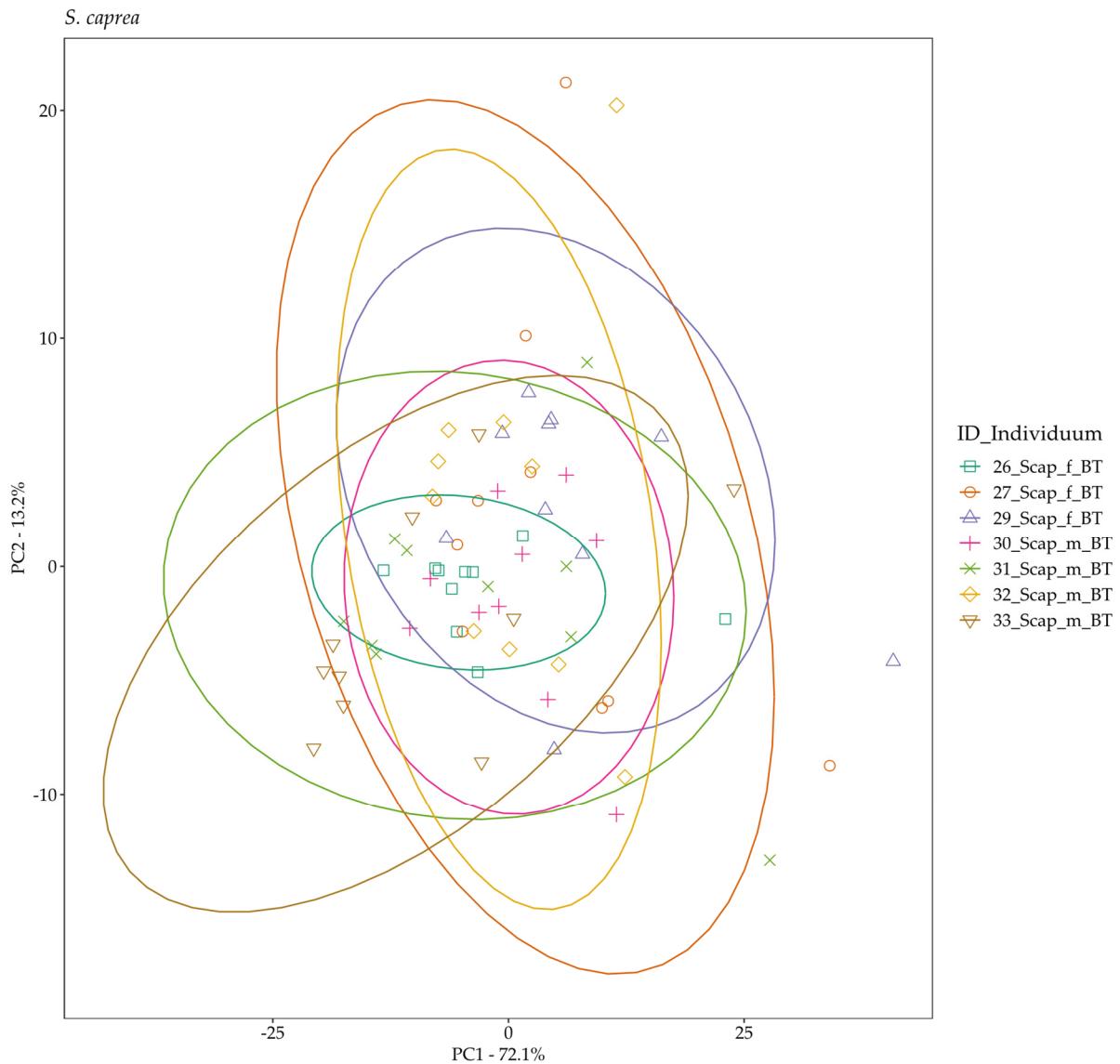


Abbildung 92: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Probenzüge von sieben Individuen von *S. caprea* (ohne 28_Scap_f_BT); im Unterschied zu **Abbildung 91** sind die Individuen farblich gekennzeichnet und die statistischen Cluster durch eine Ellipse visualisiert

In einer weiteren Betrachtung wurden die Gehalte der acht untersuchten phenolischen Inhaltsstoffklassen in beiden Geschlechtern von *S. caprea* gegenübergestellt. Die resultierenden Boxplots sind in **Abbildung 93** gezeigt. Dargestellt sind die ermittelten Gehalte von sieben Individuen der Spezies *S. caprea* der Jahre 2018 und 2019. Das Individuum 28_Scap_f_BT wurde auch bei dieser Betrachtung ausgeschlossen. Die Unterschiede der ermittelten Werte wurden auf Signifikanz getestet. Signifikante Unterschiede werden mit * gekennzeichnet.

Es zeigt sich, dass für weibliche Individuen (grün) bei Salicylalkoholderivaten (SAD, A), Kaffeesäurederivaten (CAD, B), Cumarylalkoholglykosiden (CAG, C) und Flavonen (G) signifikant höhere Werte bestimmt wurden als bei männlichen Individuen derselben Art.

Insgesamt ist bei sieben der bestimmten acht Strukturklassen eine Tendenz zu höheren Gehalten bei weiblichen Individuen zu erkennen. Einzig bei Flavanonolen (F) liegt der Mittelwert auf einem nahezu identischen Niveau.

Die dargestellten Werte sind in **Tabelle 64** gesammelt aufgelistet.

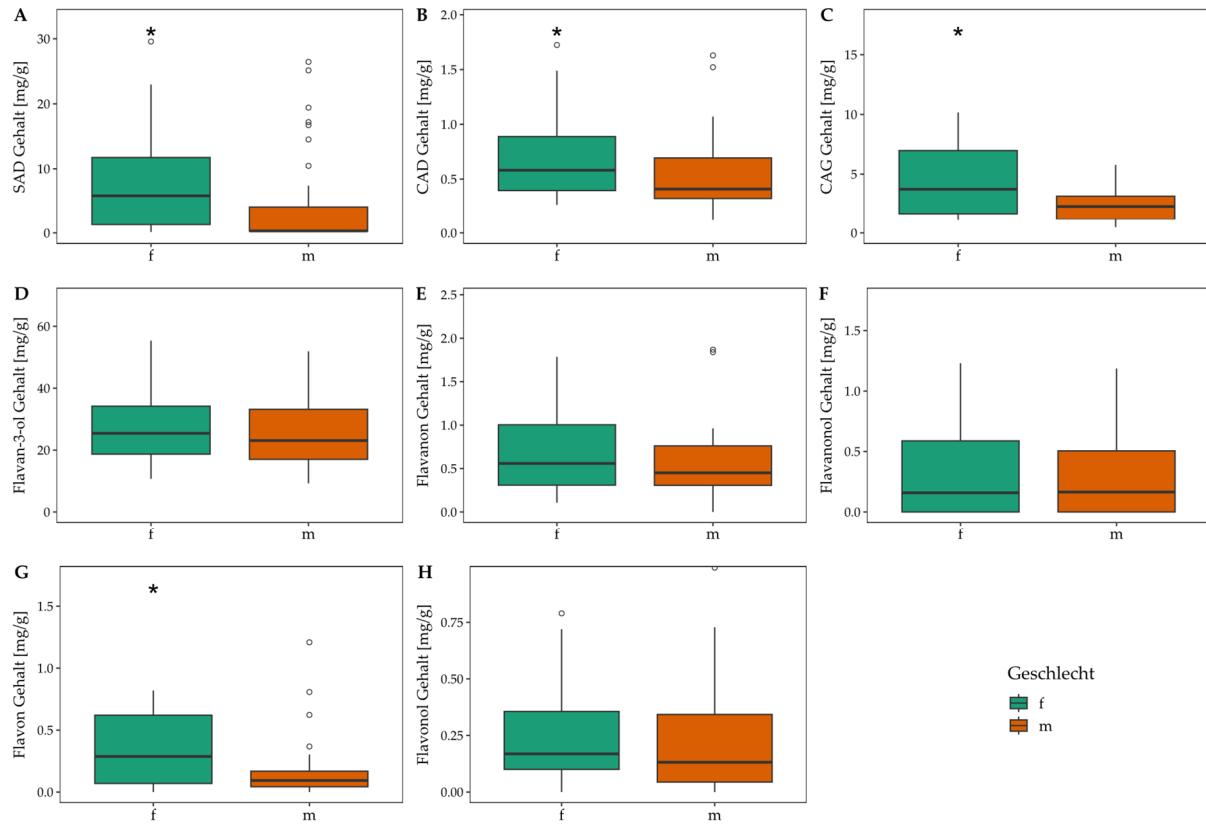
S. caprea

Abbildung 93: Die Boxplots A-H zeigen die bestimmten Gehalte von sieben untersuchten Individuen von *S. caprea* (ohne 28_Scap_f_BT); die Daten fassen alle Vertreter eines Geschlechts über alle durchgeführten Probenzüge zusammen (f: weiblich, m: männlich); signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen werden durch einen * gekennzeichnet

Tabelle 64: Kennzahlen der in **Abbildung 93** dargestellten boxplots zum Vergleich der Geschlechter in *S. caprea*; ausgenommen p-Wert, Gehalte mg/g TD; f: weiblich, m: männlich, Q1: erstes Quartil, MW: Mittelwert, Q3: drittes Quartil

Art	Stoffklasse	p-Wert	Geschlecht	Lower whisker	Q1	MW	Q3	Upper whisker
<i>S. caprea</i>	SAD	0,001	f	-14,38	1,29	11,18	11,74	27,42
			m	-5,48	0,28	4,22	4,12	9,88
	CAD	0,041	f	-0,34	0,40	1,26	0,89	1,63
			m	-0,23	0,32	0,70	0,69	1,25
	CAG	0,005	f	-6,28	1,67	4,96	6,98	14,93
			m	-1,76	1,19	2,38	3,15	6,10
	Flavan-3-ol	0,432	f	-4,54	18,7	29,88	34,19	57,42
			m	-7,24	17,01	26,47	33,18	57,44
Flavanon	Flavanon	0,285	f	-0,73	0,31	1,87	1,00	2,05
			m	-0,37	0,31	1,03	0,76	1,44
Flavanonol	Flavanonol	0,719	f	-0,88	0,00	0,40	0,59	1,47
			m	-0,76	0,00	0,28	0,51	1,26
Flavon	Flavon	0,013	f	-0,76	0,07	0,71	0,62	1,45
			m	-0,15	0,04	0,27	0,17	0,36
Flavonol	Flavonol	0,136	f	-0,28	0,10	0,30	0,36	0,74
			m	-0,40	0,04	0,23	0,34	0,79

6.3.2.2. *Salix cinerea*

In den Jahren 2018 und 2019 waren insgesamt acht Vertreter der Art *Salix cinerea* in diese Studie eingeschlossen (vgl. 6.2.2.2, S. 148).

In **Abbildung 94** ist die PCA auf Grundlage der ermittelten Peakfläche der acht Inhaltsstoffgruppen des UPLC®-RP18-PDA Screenings gezeigt.

Die Cluster der beiden Geschlechter zeigen grundsätzlich nur geringe Abweichungen zueinander. Die Ellipse, welche den Cluster der weiblichen Individuen umschließt (grün) weicht zu positiven Werten der Hauptkomponente PC 1 ab, welche hauptsächlich durch die Anteile der Cumarylalkoholglykoside (Score 0,849) und Kaffeesäurederivate (Score -0,499) bestimmt wird. Die Ellipse des männlichen Clusters weicht zu positiven Werten von PC 2 ab. Diese Hauptkomponente wird vorrangig durch die Anteile von Flavanonolen (Score 0,767) und Kaffeesäurederivaten (-0,512) bestimmt.

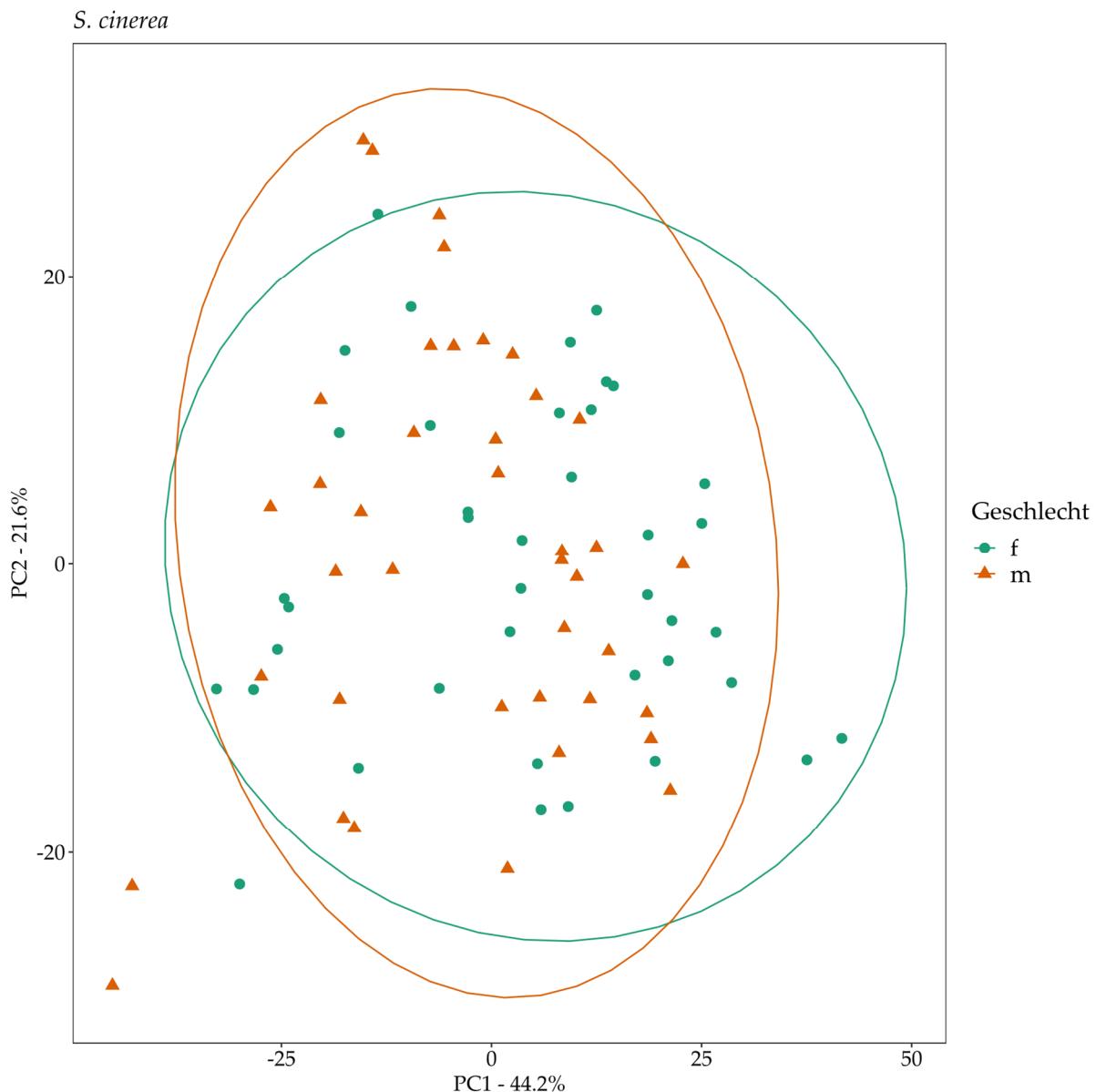


Abbildung 94: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Probenzüge der acht eingeschlossenen Individuen von *S. cinerea*; die unterschiedlichen eingeschlossenen Geschlechter sind farblich gekennzeichnet und die statistischen Cluster durch eine Ellipse visualisiert

Die ermittelten Gehalte der acht untersuchten phenolischen Inhaltsstoffklassen beider Geschlechter von *S. cinerea* wurden in **Abbildung 95** gegenübergestellt. Hierbei wurden nur für die Gehalte der Cumarylalkoholderivate signifikante Unterschiede ermittelt. Die Kennzahlen der dargestellten Boxplots sind zusätzlich in **Tabelle 65** aufgeführt.

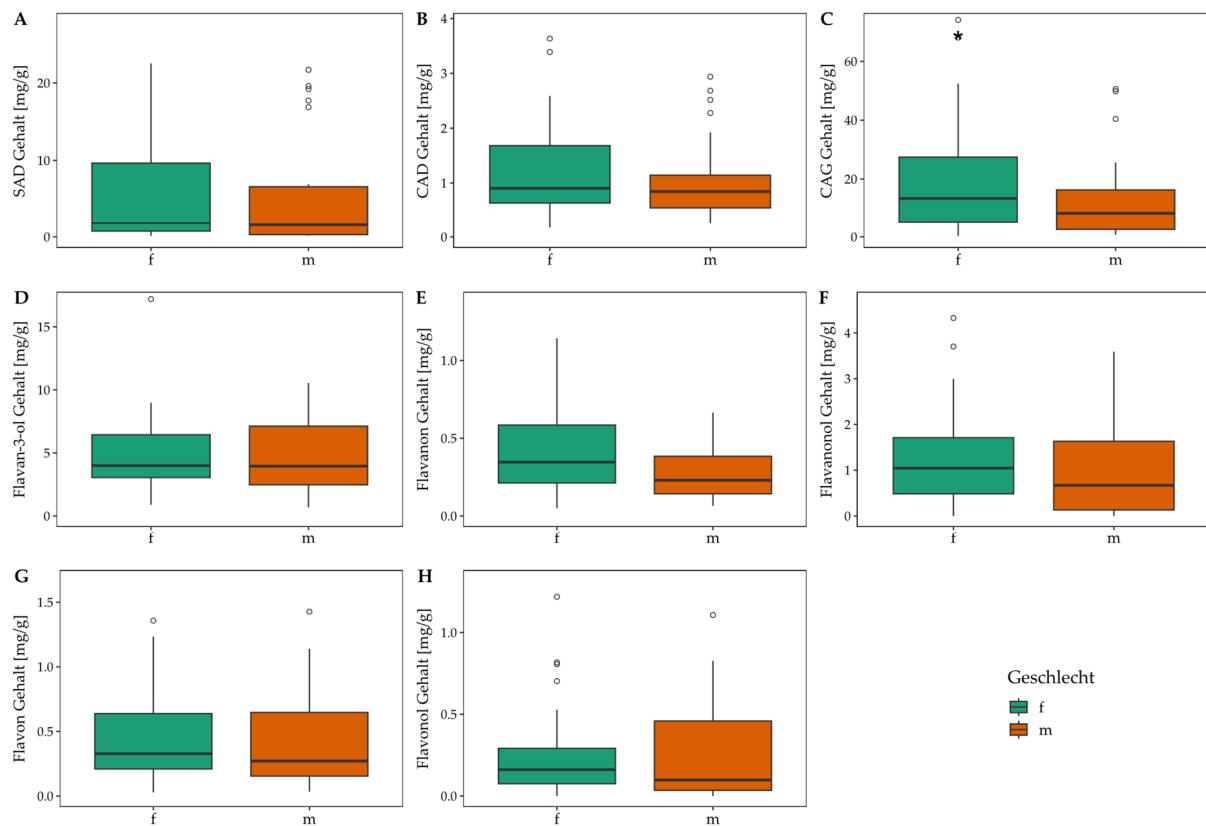
S. cinerea

Abbildung 95: Die Boxplots A-H zeigen die bestimmten Gehalte der untersuchten acht Individuen von *S. cinerea*; die Daten fassen alle Vertreter eines Geschlechts über alle durchgeführten Probenzüge zusammen (f: weiblich, m: männlich); signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen werden durch einen * gekennzeichnet

Tabelle 65: Kennzahlen der in **Abbildung 95** dargestellten boxplots zum Vergleich der Geschlechter in *S. cinerea*; ausgenommen p-Wert, Gehalte mg/g TD; f: weiblich, m: männlich, Q1: erstes Quartil, MW: Mittelwert, Q3: drittes Quartil

Art	Stoffklasse	p-Wert	Geschlecht	Lower whisker	Q1	MW	Q3	Upper whisker
<i>S. cinerea</i>	SAD	0,438	f	-12,61	0,75	39,93	9,66	23,02
			m	-9,19	0,29	13,95	6,61	16,09
	CAD	0,372	f	-0,93	0,64	1,36	1,68	3,25
			m	-0,35	0,55	1,16	1,14	2,04
	CAG	0,04	f	-27,81	5,34	21,50	27,44	60,59
			m	-18,03	2,57	11,72	16,30	36,89
	Flavan-3-ol	0,865	f	-2,04	3,05	5,93	6,45	11,54
			m	-4,50	2,47	5,95	7,12	14,09
	Flavanon	0,057	f	-0,35	0,21	0,56	0,58	1,14
			m	-0,22	0,14	0,44	0,38	0,75
	Flavanonol	0,253	f	-1,35	0,49	1,24	1,71	3,55
			m	-2,12	0,13	0,98	1,63	3,88
	Flavon	0,485	f	-0,43	0,21	0,62	0,64	1,28
			m	-0,58	0,15	0,60	0,65	1,39
	Flavonol	0,285	f	-0,25	0,08	0,30	0,29	0,62
			m	-0,60	0,03	0,25	0,46	1,10

6.3.2.3. *Salix daphnoides*

In den Jahren 2017 bis 2019 waren insgesamt drei Vertreter (1x ♀, 2x ♂) der Art *Salix daphnoides* in diese Studie eingeschlossen (vgl. 6.2.2.2, S. 148).

In **Abbildung 96** ist die PCA auf Grundlage der ermittelten Peakfläche der acht Inhaltsstoffgruppen des UPLC®-RP18-PDA Screenings gezeigt.

Die Ellipse, welche die Datenpunkte männlicher Individuen umzeichnet (braun), zeigt eine Verschiebung zu negativen Werten bei beiden Hauptkomponenten. Einzelne Datenpunkte der weiblichen Individuen zeigen ebenfalls negative Werte bei PC 2, was zu einer Stauchung der Ellipse führt. Die Hauptkomponente PC 1 wird am stärksten vom Anteil der Kaffeesäurederivate und dem Anteil der Flavan-3-ole beeinflusst. Der Score für die PC 1 beträgt -0,743 für die Flavan-3-ole und 0,633 für die Kaffeesäurederivate. Die Hauptkomponente PC 2 wird ebenfalls am stärksten vom Anteil der Flavan-3-ole (Score -0,670) und der Kaffeesäurederivate (Score -0,512) beeinflusst, während die positiven Werte der PC 2 auf die Verteilung der Salicylalkoholderivate zurückgehen (Score 0,405). Zusammengenommen erklären die Hauptkomponenten PC 1 und PC 2 der Variation des Datensets zu 77,9%.

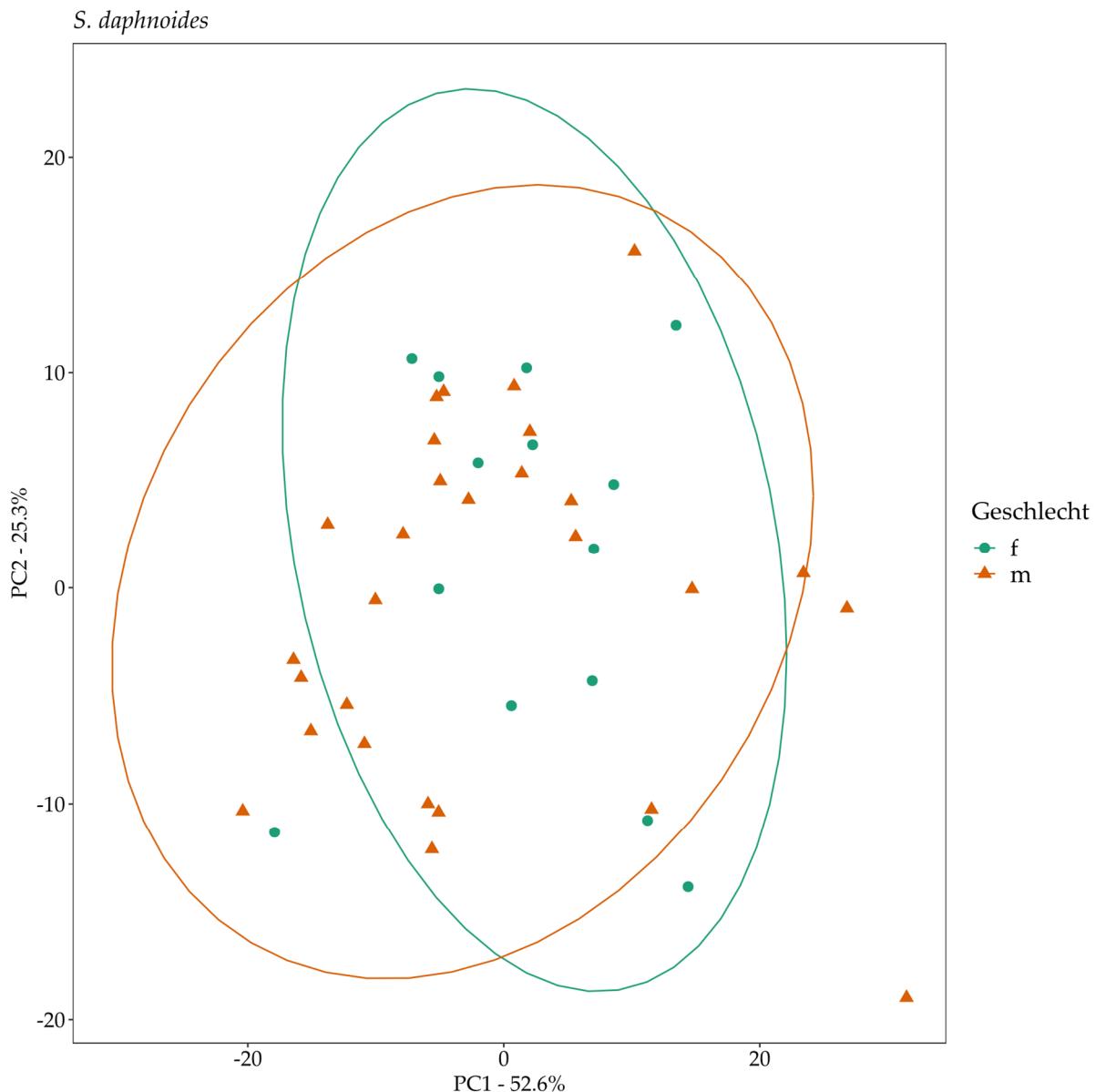


Abbildung 96: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Probenzüge der acht eingeschlossenen Individuen von *S. daphnoides*; die unterschiedlichen eingeschlossenen Geschlechter sind farblich gekennzeichnet und die statistischen Cluster durch eine Ellipse visualisiert

Die ermittelten Gehalte der acht untersuchten phenolischen Inhaltsstoffklassen beider Geschlechter von *S. daphnoides* wurden mit Hilfe von Boxplots gegenübergestellt (Abbildung 97, Daten siehe Tabelle 66). Bei sechs der betrachteten Strukturklassen wurden signifikante Unterschiede der Gehalte bestimmt.

Es zeigt sich, dass für männliche Individuen (braun) bei Salicylalkoholderivaten, Kaffeesäurederivaten, Cumarylalkoholglykosiden, Flavanonen, Flavonen und Flavonolen signifikant höhere Werte vorliegen als bei weiblichen Individuum derselben Art. Auch bei den

übrigen Substanzklassen zeigen die männlichen Individuen eine Tendenz zu höheren Gehalten.

Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass die Stichprobenanzahl für die Art *S. daphnoides* im Vergleich zu den anderen Arten deutlich reduziert ist. Allerdings wurden die Werte von drei aufeinanderfolgenden Jahren in die Betrachtung mit einbezogen.

S. daphnoides

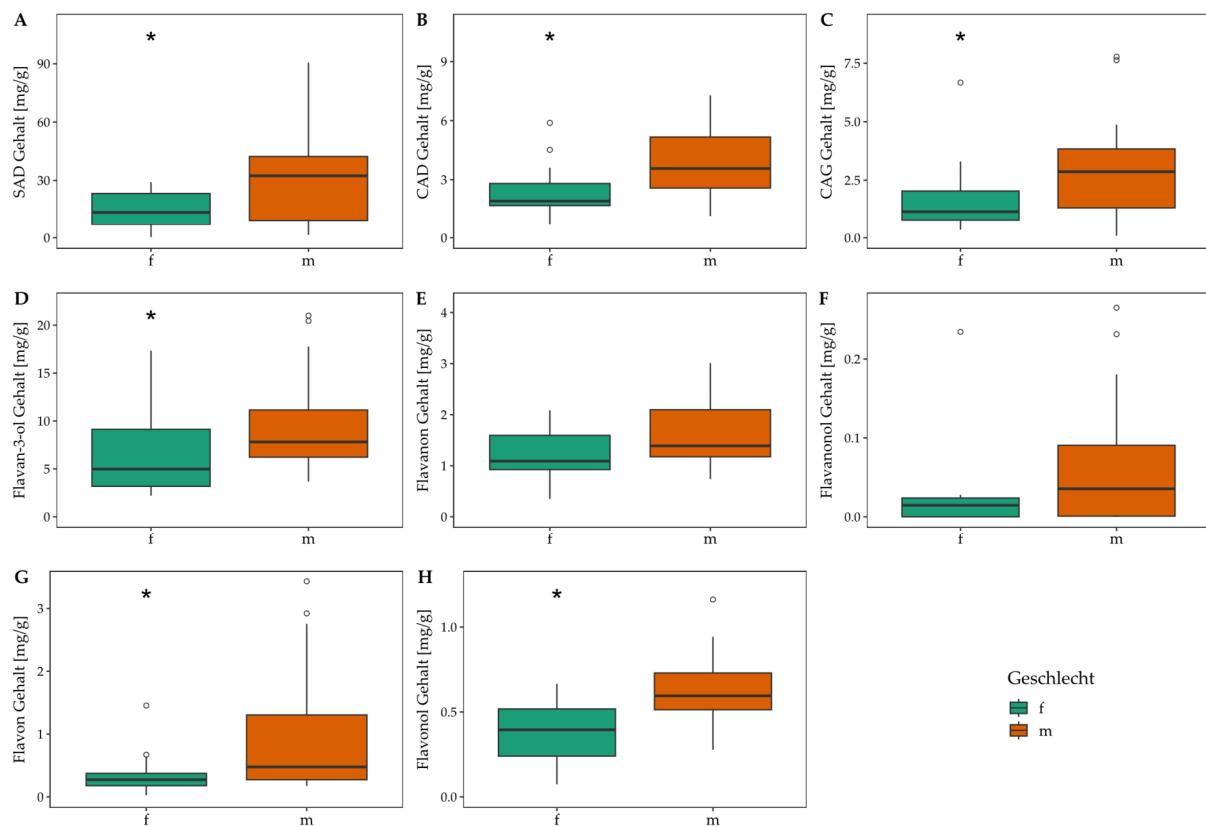


Abbildung 97: Die Boxplots A-H zeigen die bestimmten Gehalte der untersuchten acht Individuen von *S. daphnoides*; die Daten fassen alle Vertreter eines Geschlechts über alle durchgeföhrten Probenzüge zusammen (f: weiblich, m: männlich); signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen werden durch einen * gekennzeichnet

Tabelle 66: Kennzahlen der in Abbildung 97 dargestellten boxplots zum Vergleich der Geschlechter in *S. daphnoides*; ausgenommen p-Wert, Gehalte mg/g TD; f: weiblich, m: männlich, Q1: erstes Quartil, MW: Mittelwert, Q3: drittes Quartil

Art	Stoffklasse	p-Wert	Geschlecht	Lower whisker	Q1	MW	Q3	Upper whisker
<i>S. daphnoides</i>	SAD	0,022	f	-17,44	6,97	14,36	23,25	47,67
			m	-40,06	9,36	28,73	42,30	91,71
	CAD	0,004	f	0,00	1,68	2,50	2,81	4,49
			m	-1,32	2,58	4,62	5,17	9,06
	CAG	0,045	f	-1,07	0,79	1,75	2,04	3,91
			m	-2,46	1,32	3,01	3,84	7,62
	Flavan-3-ol	0,028	f	-5,74	3,18	7,05	9,13	18,06
			m	-1,17	6,22	9,33	11,15	18,55
	Flavanon	0,067	f	0,08	0,93	1,16	1,49	2,33
			m	-0,43	1,09	1,54	2,10	3,61
	Flavanonol	0,189	f	-0,04	0,00	0,05	0,03	0,07
			m	-0,12	0,01	0,07	0,09	0,22
	Flavone	0,014	f	-0,12	0,18	0,37	0,37	0,67
			m	-1,27	0,27	0,96	1,30	2,85
	Flavonol	0,001	f	-0,18	0,24	0,39	0,52	0,94
			m	0,19	0,51	0,65	0,73	1,05

6.3.2.4. *Salix fragilis*

In den Jahren 2018 und 2019 waren insgesamt acht Vertreter der Art *Salix fragilis* in diese Studie eingeschlossen (vgl. 6.2.2.2, S. 148).

In **Abbildung 98** ist die PCA auf Grundlage der ermittelten Peakfläche der acht Inhaltsstoffgruppen des UPLC®-RP18-PDA Screenings gezeigt.

Es sind nur geringe Abweichungen zwischen den Clustern der beiden Geschlechter zu beobachten. Die Ellipse, welche die Datenpunkte männlicher Individuen umzeichnet (braun) ist etwas enger gezeichnet als die der weiblichen Individuen (grün). Beide Ellipsen sind nahezu kreisförmig und nahezu konzentrisch. Dies deutet auf eine ähnliche Verteilung der anteiligen Peakflächen bei beiden Geschlechtern hin. Dafür spricht auch, dass PC 1 und PC 2 nur einen relativ geringen Anteil der Variation erklären (70,5%). Die dominierende Hauptkomponente PC 1 (52,6% der Gesamtvariation) wird überwiegend von der Variation der Kaffeesäurederivate mit einem Score von -0,908 bestimmt. Die Hauptkomponente PC 2 wird hauptsächlich von der Variation der Anteile an Flavan-3-ole bestimmt (Score -0,744).

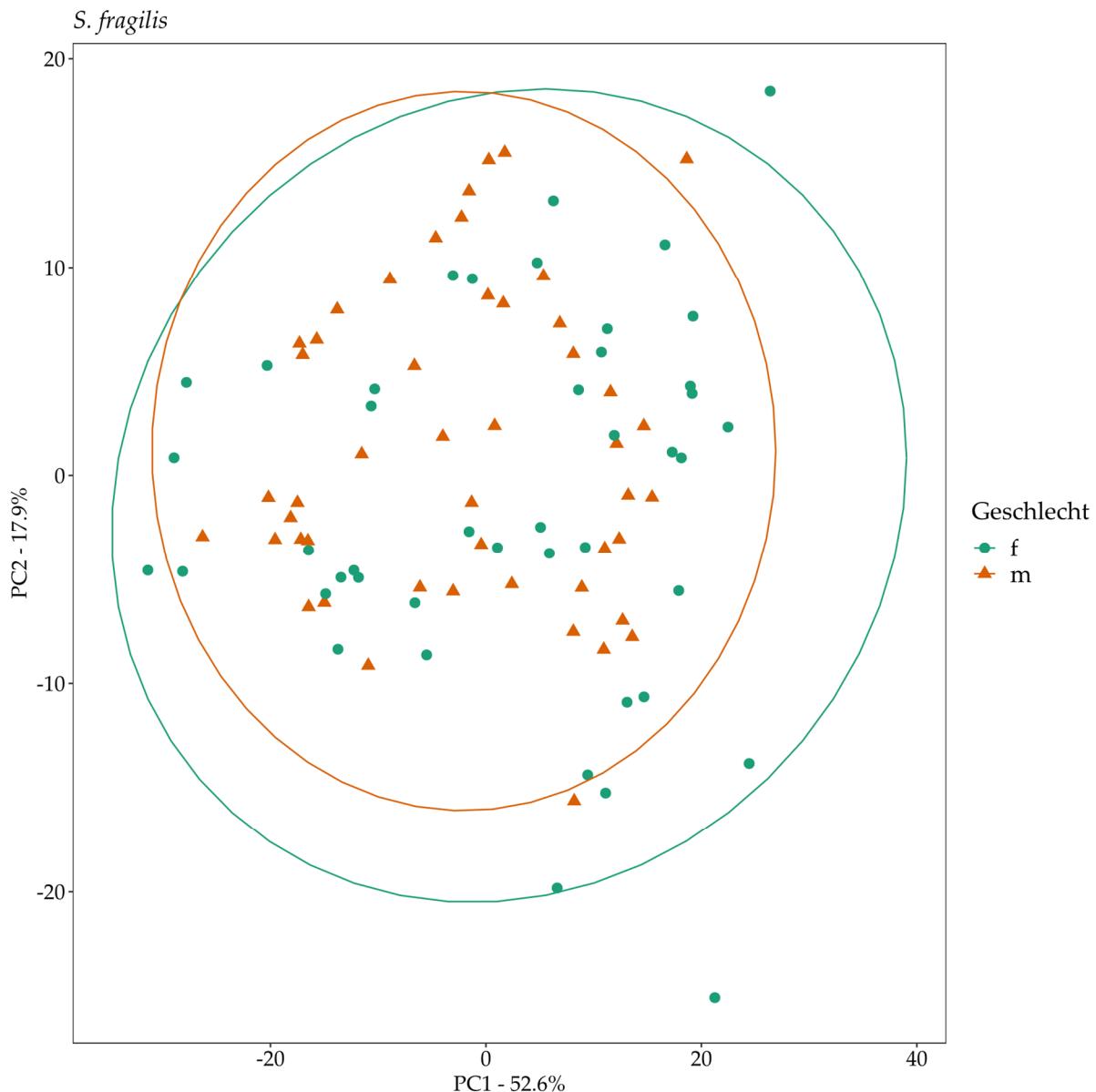


Abbildung 98: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Probenzüge der acht eingeschlossenen Individuen von *S. fragilis*; die unterschiedlichen eingeschlossenen Geschlechter sind farblich gekennzeichnet und die statistischen Cluster durch eine Ellipse visualisiert

In **Abbildung 99** sind die Boxplots der ermittelten Gehalte für beide Geschlechter je Strukturklasse gegenübergestellt. Hervorzuheben sind die bei beiden Geschlechtern sehr hohen Gehalte an Salicylakholoderivaten, welche bei den männlichen Individuen einen geringfügig höheren Mittelwert aufweisen. Allerdings konnte bei keiner der betrachteten phenolischen Strukturklassen ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

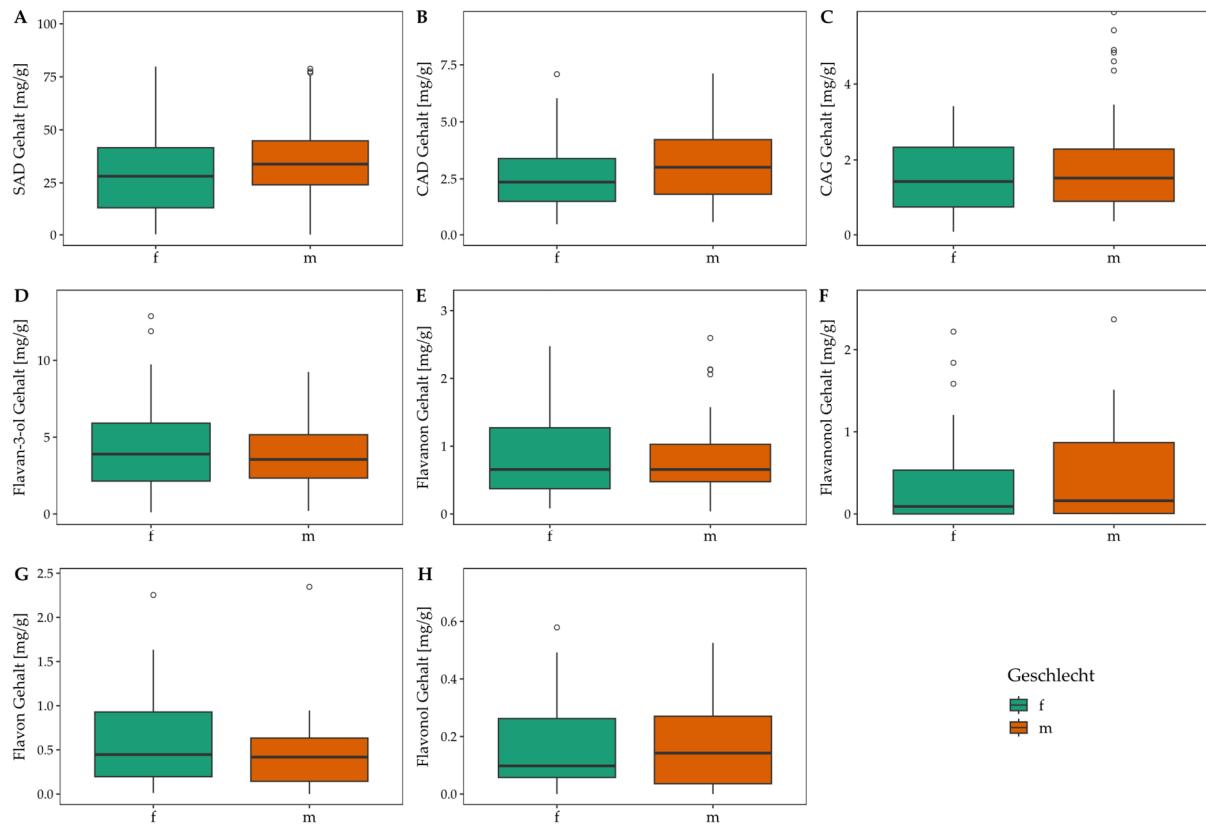
S. fragilis

Abbildung 99: Die Boxplots A-H zeigen die bestimmten Gehalte der untersuchten acht Individuen von *S. fragilis*; die Daten fassen alle Vertreter eines Geschlechts über alle durchgeführten Probenzüge zusammen (f: weiblich, m: männlich); signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen werden durch einen * gekennzeichnet

Tabelle 67: Kennzahlen der in **Abbildung 97** dargestellten boxplots zum Vergleich der Geschlechter in *S. fragilis*; ausgenommen p-Wert, Gehalte mg/g TD; f: weiblich, m: männlich, Q1: erstes Quartil, MW: Mittelwert, Q3: drittes Quartil

Art	Stoffklasse	p-Wert	Geschlecht	Lower whisker	Q1	MW	Q3	Upper whisker
<i>S. fragilis</i>	SAD	0,168	f	-29,24	13,25	30,24	41,59	84,08
			m	-7,02	24,09	35,50	44,83	75,94
	CAD	0,100	f	-1,31	1,51	2,70	3,39	6,21
			m	-1,77	1,83	3,24	4,22	7,82
	CAG	0,481	f	-1,60	0,76	1,78	2,33	4,70
			m	-1,15	0,91	1,94	2,29	4,35
	Flavan-3-ol	0,516	f	-3,52	2,14	5,01	5,91	11,57
			m	-1,91	2,34	3,93	5,16	9,41
	Flavanon	0,966	f	-0,98	0,37	0,96	1,27	2,62
			m	-0,35	0,48	0,82	1,03	1,85
	Flavanonol	0,455	f	-0,80	0,00	0,42	0,53	1,33
			m	-1,29	0,01	0,51	0,87	2,16
	Flavone	0,352	f	-0,90	0,20	0,65	0,93	2,03
			m	-0,59	0,14	0,46	0,63	1,37
	Flavonol	0,975	f	-0,25	0,06	0,18	0,26	0,57
			m	-0,32	0,04	0,20	0,27	0,62

6.3.2.5. *Salix purpurea*

In den Jahren 2018 und 2019 waren insgesamt acht Vertreter der Art *Salix purpurea* in diese Studie eingeschlossen (vgl. 6.2.2.2, S. 148). Diese waren allerdings nicht gleichmäßig auf die Geschlechter verteilt. Es waren fünf weibliche und drei männliche Individuen vertreten.

Abbildung 100 zeigt die PCA auf Grundlage der ermittelten Peakfläche der acht Inhaltsstoffgruppen des UPLC®-RP18-PDA Screenings. Auffällig ist, dass die Datenpunkte der weiblichen Individuen deutlich weiter verstreut sind als die der männlichen und zum Teil zu positiven Werten der PC 1 verschoben sind.

Um einen Einfluss einzelner Individuen auszuschließen, wurde dieselbe PCA mit den Werten der einzelnen Individuen durchgeführt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 101** gezeigt. Eindeutig zu erkennen ist, dass die Datenpunkte des Individuums Spur_47_f_BT (weiblich) deutlich abseits der Datenpunkte anderer Individuen liegen. Es kommt dabei kaum zu Überlappung der Ellipsen, welche die Datenpunkte der Individuen umschließen. Einzig mit den Werten des Individuums Spur_14_f_BT gibt es eine solche.

Ebenfalls abweichende Ellipsen zeigen die Individuen Spur_14_f_BT und Spur_46_f_BT. Allerdings überlappen deren Ellipsen mit sechs bzw. sieben der acht eingeschlossenen Individuen.

Zusammen erklären die Hauptkomponenten PC 1 und PC 2 die Variation des Datensets zu 89,3%. Die dominierende Hauptkomponente PC 1 (78,8%) wird überwiegend von der Variation der Flavanone mit einem Score von -0,824 bestimmt. Die Hauptkomponente PC 2 wird hauptsächlich von der Variation der Anteile an Kaffeesäurederivate bestimmt (Score 0,742).

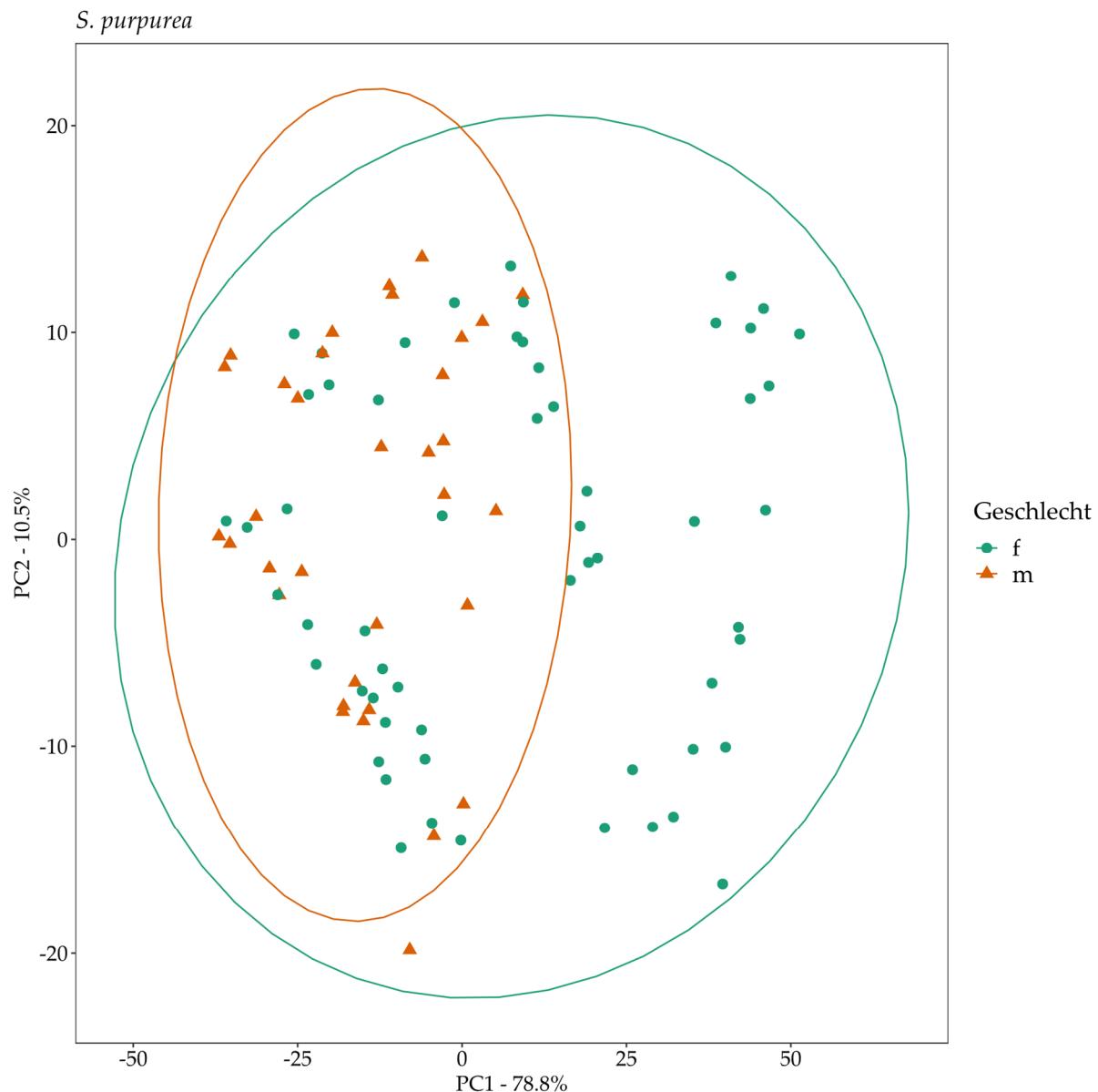


Abbildung 100: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Probenzüge der acht eingeschlossenen Individuen von *S. purpurea*; die unterschiedlichen eingeschlossenen Geschlechter sind farblich gekennzeichnet und die statistischen Cluster durch eine Ellipse visualisiert

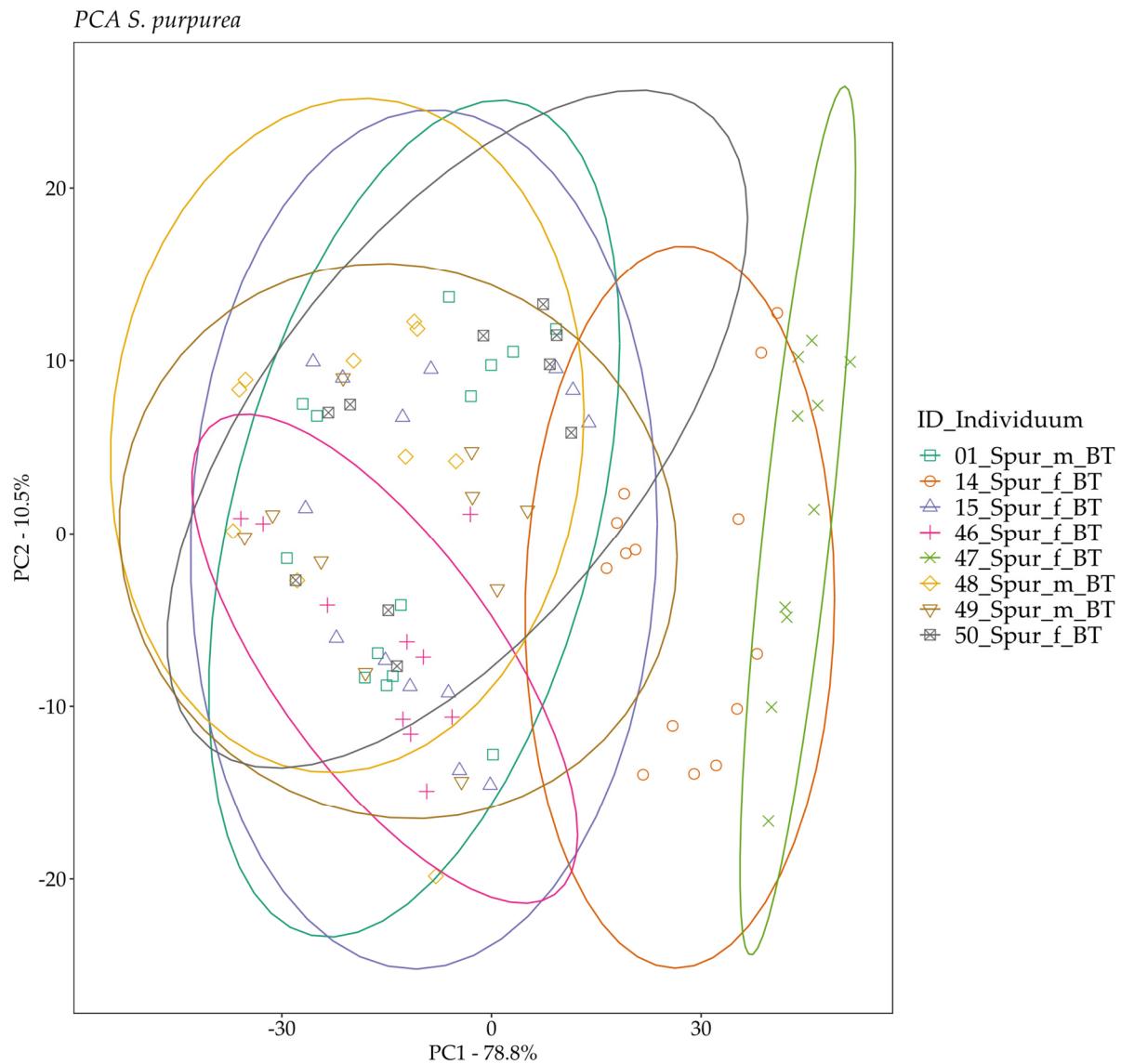


Abbildung 101: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Probenzüge der acht eingeschlossenen Individuen von *S. purpurea*; Im Unterschied zu **Abbildung 100** sind die unterschiedlichen eingeschlossenen Individuen farblich gekennzeichnet und die statistischen Cluster durch eine Ellipse visualisiert

In **Abbildung 102** sind die Boxplots der ermittelten Gehalte für beide Geschlechter je Strukturklasse gegenübergestellt. Für diese Betrachtung wurde das Individuum Nr. 47 ausgeschlossen. Hervorzuheben sind die bei beiden Geschlechtern zum Teil sehr hohen Gehalte an Salicylakholoderivaten (A), welche Werte bis in den mittleren einstelligen Prozentbereich aufweisen. Außerdem sind die bestimmten Gehalte der Flavanone (E) deutlich höher als bei den bisher betrachteten Spezies. Der mittlere Gehalt bei männlichen Individuen zeigt Werte von bis zu 10 mg/g TD.

Die männlichen Individuen zeigen tendenziell geringfügig höhere mittlere Gehalte bei mehreren Stoffgruppen. Allerdings konnte nur für die Gruppen der Flavan-3-ole (D) und

Flavanone (E) ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern bestätigt werden. Die Daten der in **Abbildung 102** dargestellten Boxplots sind zusätzlich in **Tabelle 68** aufgeführt.

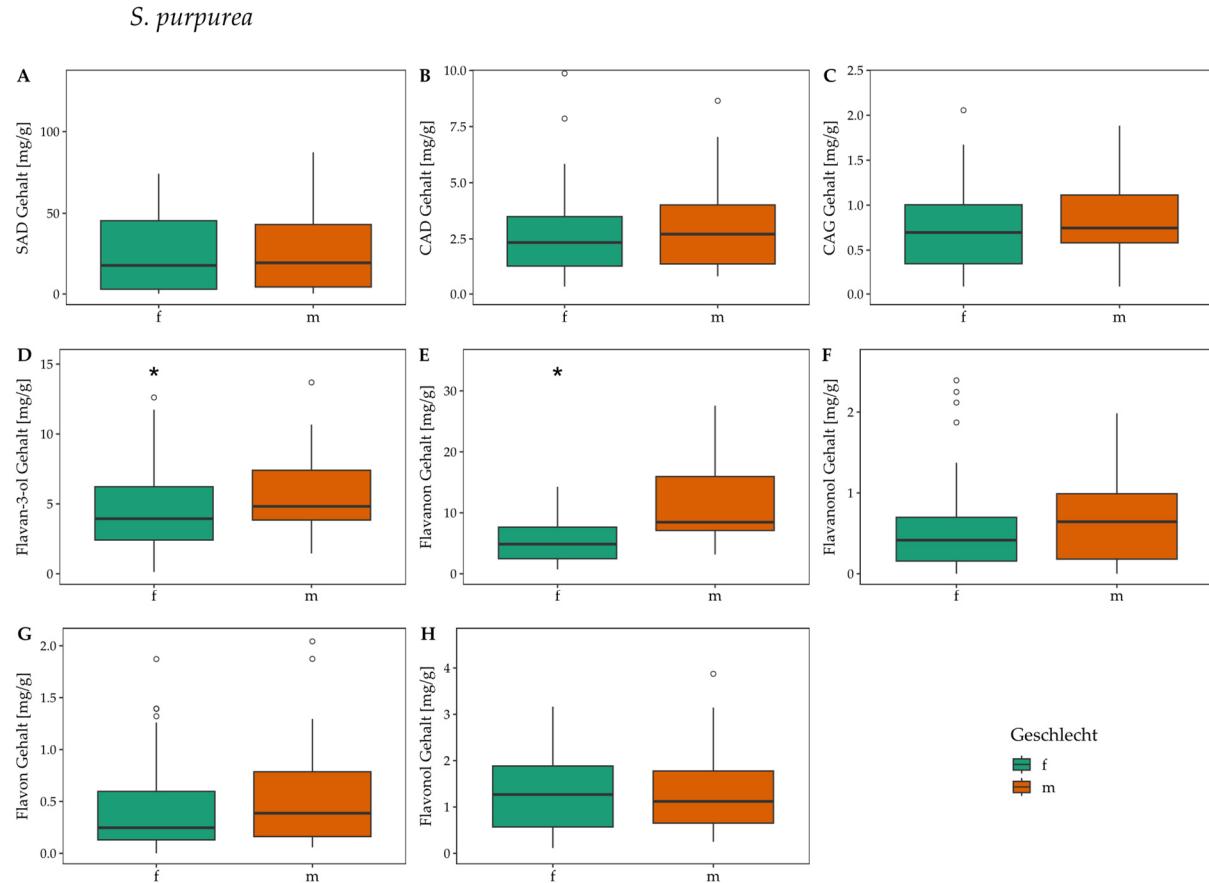


Abbildung 102: Die Boxplots A-H zeigen die bestimmten Gehalte von sieben Individuen von *S. purpurea*, wobei Individuum Spur_47 von der Betrachtung ausgeschlossen wurde; die Boxplots fassen die Daten der Vertreter eines Geschlechts über alle durchgeführten Probenzüge zusammen (f: weiblich, m: männlich); signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen werden durch einen * gekennzeichnet

Tabelle 68: Kennzahlen der in **Abbildung 102** dargestellten Boxplots zum Vergleich der Geschlechter in *S. purpurea*; ausgenommen p-Wert, Gehalte mg/g TD; f: weiblich, m: männlich, Q1: erstes Quartil, MW: Mittelwert, Q3: drittes Quartil

Art	Stoffklasse	p-Wert	Geschlecht	Lower whisker	Q1	MW	Q3	Upper whisker
<i>S. purpurea</i>	SAD	0,494	f	-60,81	2,98	23,37	45,50	109,29
			m	-53,97	4,31	25,13	43,16	101,44
	CAD	0,525	f	-2,01	1,29	2,74	3,49	6,80
			m	-2,56	1,38	3,05	4,01	7,95
	CAG	0,392	f	-0,63	0,35	0,82	1,00	1,99
			m	-0,22	0,58	1,00	1,11	1,91
	Flavan-3-ol	0,043	f	-3,31	2,41	4,89	6,23	11,95
			m	-1,49	3,84	5,94	7,40	12,74
	Flavanon	0,000	f	-5,33	2,46	5,60	7,65	15,44
			m	-6,49	6,97	11,30	15,94	29,40
	Flavanonol	0,465	f	-0,63	0,16	0,61	0,68	1,46
			m	-0,88	0,18	0,63	0,89	1,95
	Flavon	0,290	f	-0,57	0,13	0,55	0,60	1,30
			m	-0,78	0,16	0,59	0,79	1,72
	Flavonol	0,973	f	-1,40	0,57	1,30	1,88	3,86
			m	-1,04	0,65	1,31	1,78	3,47

6.3.3. Vergleich der Arten

6.3.3.1. Modifizierte Gerbstoffbestimmung: Gesamtphenole und Gerbstoffe

In **Abbildung 103** sind die gemittelten Konzentrationen der Gerbstoffbestimmung je Individuum der Probenzüge 2018 und 2019 dargestellt. Die Verteilungen der Werte in den Sektionen *Helix*, *Salix* und *Vetrix* sind von Ellipsen umzeichnet. Die restlichen Sektionen sind mit jeweils einem einzelnen Individuum vertreten, sodass diese Werte das Zentrum der Verteilung darstellen und keine Ellipsen errechnet werden können.

Die Individuen der Spezies *S. purpurea* und somit die Vertreter der Sektion *Helix* zeigen die ausgeglichenste Verteilung von Restphenolen und Gerbstoffen unter den untersuchten Arten. Die Vertreter der Sektion *Salix* (*S. fragilis*) zeigen höhere Gehalte von Gerbstoffen im Verhältnis zu den Restphenolen. Individuen der Sektion *Vetrix* zeigen eine deutliche Dominanz der Gerbstoffe. Insbesondere die Individuen der Spezies *S. caprea* zeigen die höchsten Konzentrationen an Gerbstoffen von etwa 40–70 mg/g DT.

Insgesamt zeigt sich eine deutliche Abgrenzung der Sektionen *Helix* und *Vetrix*. Die Sektion *Salix* zeigt Werte zwischen den beiden anderen mehrfach vertretenen Sektionen.

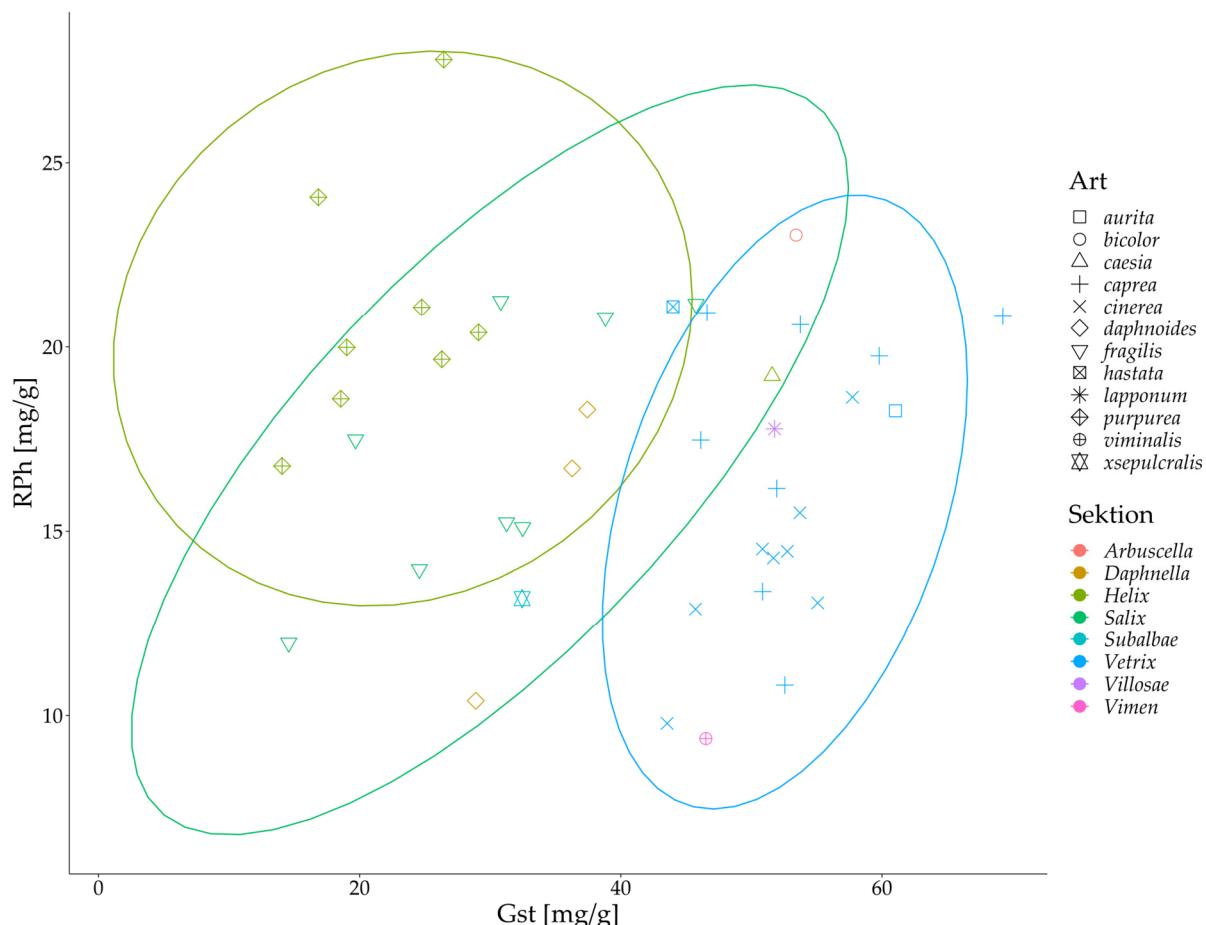


Abbildung 103: Konzentration der Restphenole (RPh) und Gerbstoffe (Gst) in Rindenproben der *Salix* Individuen (vgl. 6.2.2.2) in mg/g Trockendroge; Gst berechnet als Differenz von GPh und RPh; Datenpunkte zeigen die gemittelten Gehalte aller Probenzeitpunkte pro Individuum und Monat der Wachstumssaison 2018 und 2019; Symbole codieren die Art, Farben kennzeichnen die entsprechenden Sektionen nach (Skvortsov & Zinovjev, 1999)

6.3.3.2. UPLC®-DIOL-FLR Screening: Proanthocyanidine

Ein Vergleich der in der Studie vertretenen Arten wurde auch anhand der ermittelten Gehalte an Proanthocyanidinen angestellt. Die angewandte Methodik (6.3.1.2, S. 168) erlaubte eine quantitative Bestimmung der Proanthocyanidine, getrennt nach ihrem Polymerisierungsgrad (DP). Die bestimmten Gehalte sind je Spezies durch Radarplots in **Abbildung 104** visualisiert. Dabei zeigen alle Spezies mit steigendem Polymerisierungsgrad der oligomeren PAs abnehmende Gehalte. Der Gehalt polymerer PAs übersteigt den Gehalt der einzelnen oligomeren Cluster deutlich. Einzig *S. caprea* bildet dabei eine Ausnahme, in der die Gehalte der Cluster DP-02 bis DP-05 allesamt die Menge an pPAs übersteigen. Die charakteristische Form des Radarplots ist der einer Spirale mit im Uhrzeigersinn abnehmendem Durchmesser und einer Spitze am Ende. Dieses Muster zeigt sich bei den beprobten Individuen in unterschiedlicher Ausprägung.

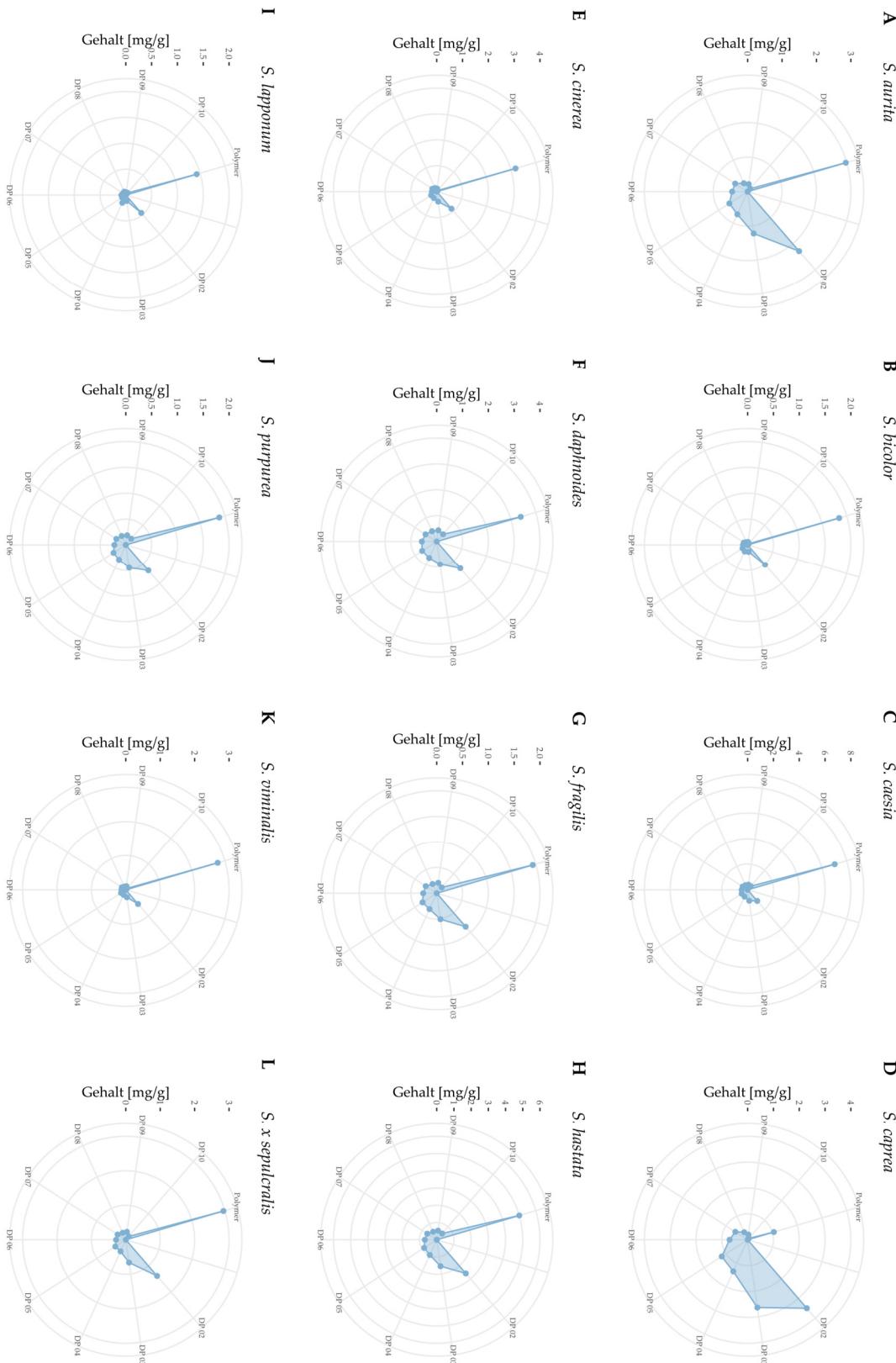


Abbildung 104: Radarplots der ermittelten Polymerisierungsmuster von Proanthocyanidinen in Extrakten verschiedener Arten der Gattung *Salix* (vgl. 6.2.2.2); dargestellt sind die Gehalte an der Gesamtpeakfläche der betrachteten phenolischen Strukturklassen unter Anwendung der unter 6.2.3 (S. 151) vorgestellten UPLC®-DIOL-FLR Methode, gemittelt über alle Individuen und Probenzüge; konzentrische Kreise stellen die Graduierung der Y-Achse in mg/g Trockendroge dar, im Uhrzeigersinn aufgetragen sind Werte nach aufsteigendem Polymerisierungsgrad (DP) von zwei bis zehn, zusätzlich die Gruppe polymerer PAs

Um das komplexe Datenset verschiedener Cluster (DP02-DP10, sowie polymere Proanthocyanidine) zu veranschaulichen und einen Vergleich zu ermöglichen, wurde auch hier eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, welche in **Abbildung 105** dargestellt ist. Abgebildet sind die über alle Probenzeitpunkte gemittelten Werte aller Individuen der jeweiligen Spezies. Zu erkennen ist eine starke Gruppierung der Datenpunkte bei positiven Werten der beiden Hauptkomponenten PC 1 und PC 2, sowie nahe am Ursprung der beiden Achsen. Die Datenpunkte dreier Spezies liegen deutlich entfernt: Der Datenpunkt für *S. caesia* ist bei einem moderat positiven Wert für PC 1 und dem stärksten negativen Wert für PC 2 zu verorten. *S. hastata* zeigt einen moderat negativen Wert für beide Hauptkomponenten und *S. caprea* findet sich bei einem deutlich positiven Wert für PC 1 und dem stärksten negativen Wert für PC 2. Zusammen erklären die Hauptkomponenten PC 1 und PC 2 die Variation des Datensets zu 98,9%. PC 1 wird fast ausschließlich durch die Variation der polymeren PAs erklärt, welche einen Score von -0,976 aufweisen, d.h. sehr hohe Gehalte führen hier zu negativen Werten der PC 1 (*S. caesia*). Ebenso verhält es sich bei PC 2, welche am stärksten durch die Gehalte der Polymerisierungsgrade DP 02 und DP 03 geprägt wird (Score -0,714 und -0,542). Auch hier führen hohe Gehalte der niederpolymeren PAs zu negativen Werten der Hauptkomponente PC 2 (*S. caprea*). Bei *S. hastata* deutet dies auf höhere Werte oligomerer und polymerer PAs im Vergleich zu den anderen betrachteten Spezies hin.

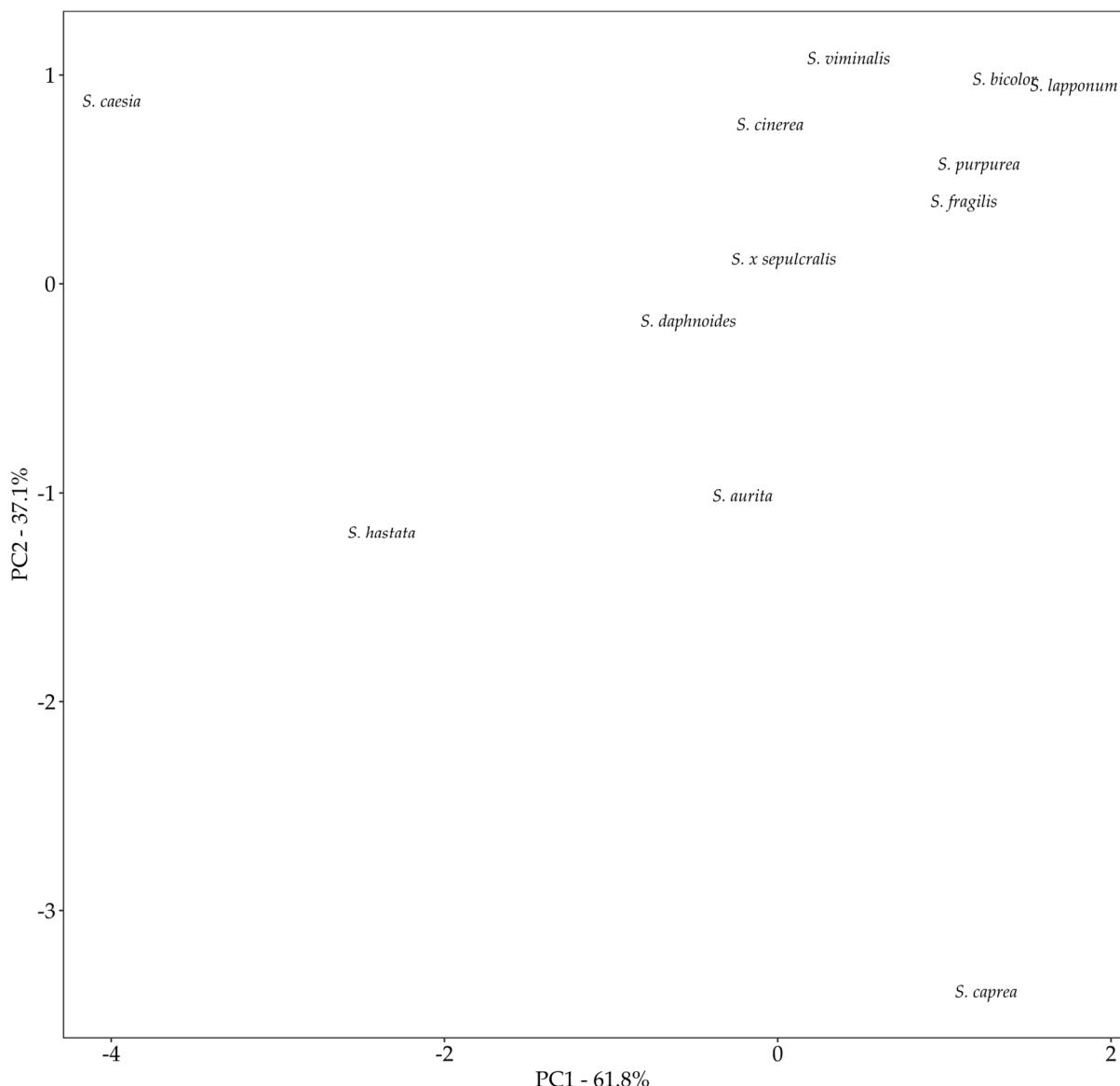


Abbildung 105: PCA auf Grundlage der ermittelten Gehalte von Proanthocyanidincluslern unterschiedlicher Polymerisierung (zwei bis zehn Monomere, bzw. polymere Proanthocyanidine, vgl. 6.2.3, S. 151); die Datenpunkte repräsentieren die gemittelten Gehalte aller Individuen der eingeschlossenen Spezies über alle Probenzüge; die Spezies sind mit ihrer Kurzbezeichnung gekennzeichnet (vgl. 6.2.2.2, S. 148)

6.3.3.3. UPLC®-RP18-PDA Screening: phenolische Inhaltsstoffe

Zum Vergleich der Arten wurden auch die im UPLC®-RP18-PDA Screening (6.2.4, S. 153) erhobenen Daten zu phenolischen Inhaltsstoffgruppen herangezogen. Der Fokus wurde auf die Arten gelegt, welche mehrfach in der Studie vertreten sind.

Die Boxplots in **Abbildung 106** zeigen die anteiligen Peakflächen im UPLC®-RP18-PDA Screening über alle Probenzeitpunkte. Dargestellt sind die Daten je Individuum der mehrfach in der Studie vertretenen Spezies. Die erhobenen Anteile sind je betrachteter Stoffgruppe separat dargestellt.

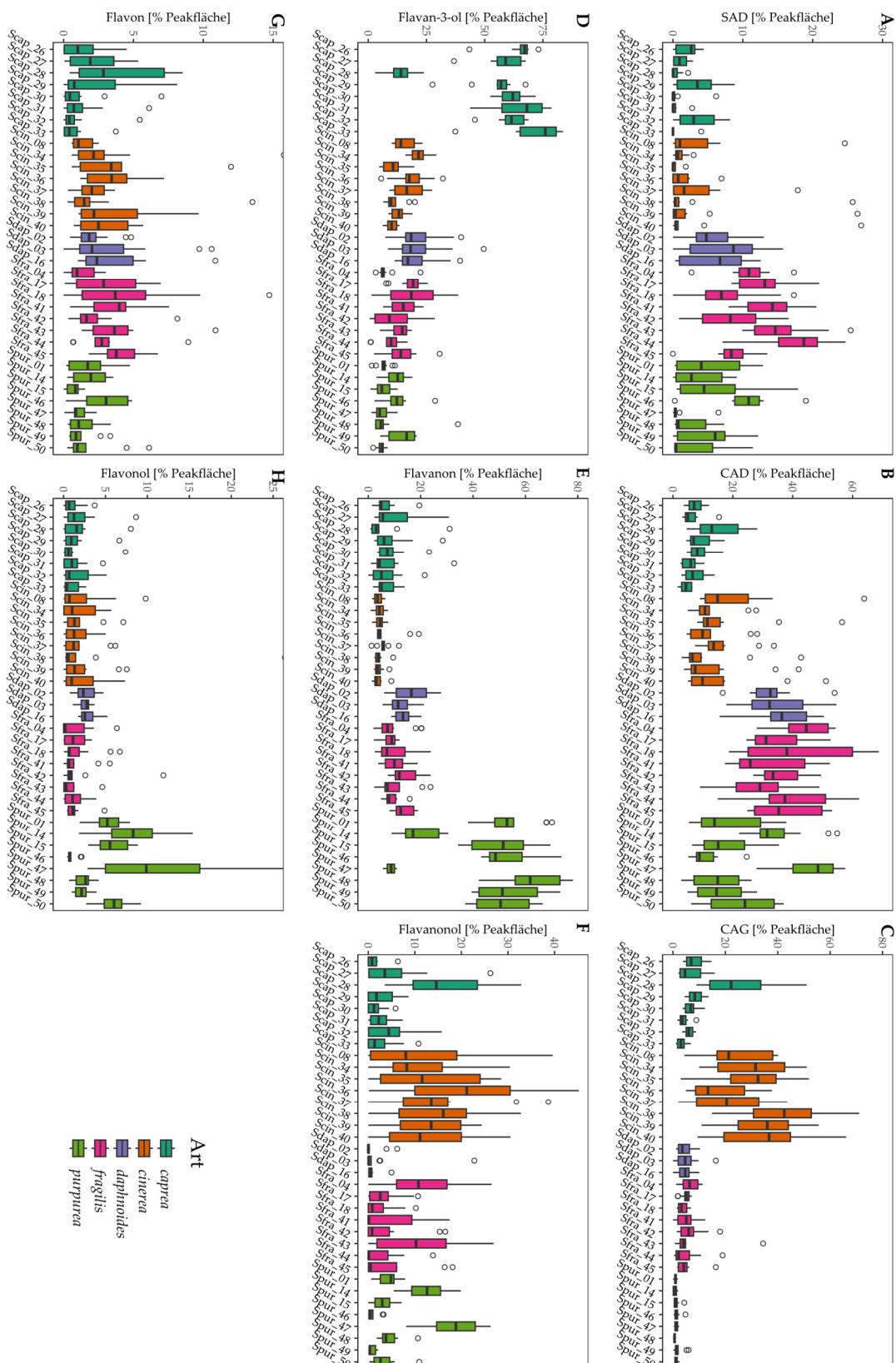


Abbildung 106: Boxplots der in der Studie mehrfach vertretenen Spezies der Gattung *Salix* (*S. caprea*, *cinerea*, *daphnoides*, *fragilis* und *purpurea*, vgl. 6.2.2.2); dargestellt sind die Anteile an der Gesamtpeakfläche der betrachteten phenolischen Strukturklassen unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode, gemittelt über alle Individuen und Probenzüge; aufgetragen sind Salicylalkoholderivate (SAD, A), Kaffeesäurederivate (CAD, B), Cumarylalkoholglykoside (CAG, C), Flavan-3-ole (D), Flavanone (E), Flavanonole (F), Flavone (G), Flavonole (H)

Bei der Gruppe der Salicylalkoholderivate (SAD, A) zeigen sich für die Individuen der Spezies *S. caprea* und *S. cinerea* konstant niedrige Werte, während diese bei *S. daphnoides* und *S. purpurea* deutlich stärker schwanken und der Interquartilsabstand in einem Bereich von bis zu 10% Peakfläche liegen. Deutlich höhere Anteile zeigen sich bei *S. daphnoides*, mit Interquartilsabständen von bis zu 20% Gesamtpeakfläche. Auffällig ist Individuum Spu_47 welches im Vergleich zu den restlichen Vertretern von *S. purpurea* deutlich geringere Anteile an Salicylalkoholderivaten aufweist.

Die Kaffeesäurederivate (CAD, B) zeigen für die Individuen der Spezies *S. caprea* und *S. cinerea* erneut konstant niedrige Werte. Bei *S. cinerea* sind jedoch zahlreiche Ausreißer mit Anteilswerten von bis zu >60% Peakfläche bestimmt worden. Die Spezies *S. daphnoides* und *fragilis* weisen deutlich höhere Anteile mit größeren Schwankungsbreiten auf. Die Anteile von Kaffeesäurederivaten in *S. purpurea* liegen zwischen denen der anderen Arten. Das Individuum Spur_47, welches bei der vergleichenden Betrachtung der Geschlechter einen abweichenden Cluster aufweist, zeigt auch hier auffällig hohe Werte für den Anteil von Kaffeesäurederivaten an der Gesamtpeakfläche.

Alle Vertreter der Spezies *S. cinerea* weisen bei der Betrachtung der Cumarylalkoholglykoside (CAG, C) deutlich größere Flächenanteile als die Individuen der Spezies *S. caprea*, *daphnoides*, *fragilis*, und *purpurea* auf. Die Mediane schwanken in einem Bereich von ca. 15% bis über 40% Gesamtpeakfläche. Auffällig ist das Individuum Scap_28, welches Flächenanteile im Bereich der beprobten *S. cinerea* zeigt, während für die restlichen Individuen sehr kongruente Ergebnisse innerhalb der betrachteten Arten ermittelt wurden. Bei dieser Strukturklasse zeigen sich zudem die wenigsten Ausreißer (gekennzeichnet durch „o“).

Der Anteil an Flavan-3-olen (D) dominiert den Extrakt der Cortex Droge von *S. caprea*. Die Werte liegen außergewöhnlich hoch mit Medianen, die zwischen 50 und 75% Peakfläche liegen. Einzig das Individuum Scap_28 zeigt deutlich geringere Werte. Der Boxplot liegt im Bereich der Individuen der Spezies *S. cinerea*, *daphnoides*, *fragilis* und *purpurea*.

In Individuen von *S. purpurea* dominiert die Strukturklasse der Flavanone (E) mit den höchsten Werten in diesem Vergleich (Anteile z.T. >50% Peakfläche). Die Individuen der anderen Arten zeigen innerhalb der jeweiligen Spezies konstant niedrige Werte mit geringer Streuung. Die beiden Individuen Spur_14 und Spur_47 weisen auch innerhalb dieser Stoffklasse von den anderen *S. purpurea* abweichende, deutlich niedrige Werte auf.

Die Anteile der Flavanonole (F) an der Gesamtpeakfläche schwanken bei *S. cinerea* sehr stark. Innerhalb der beprobten Arten sind die Ergebnisse der Individuen z.T. sehr unterschiedlich. Scap_28 zeigt eine sehr hohe Schwankung der Anteile an Flavanolen, welche in etwa der von *S. cinerea* entspricht. In *S. daphnoides* sind kaum relevante Anteile dieser Inhaltstoffklasse enthalten. Zwei Individuen der Spezies *fragilis* (Sfra_04 und Sfra_43) im Vergleich zu anderen Individuen dieser Art höhere Anteile. Gleches gilt erneut für die Individuen Spur_14 und Spur_47.

Flavone (G) sind in allen Arten in schwankenden, niedrigen Anteilen enthalten. Diese Schwankung zeigt sich auch deutlich innerhalb der Spezies zwischen den Einzelindividuen.

Die Flavonole (H) machen in den betrachteten Arten konstant sehr niedrige Anteile aus. Dies beobachteten Werte liegen bei den Arten *S. caprea*, *cinerea*, *daphnoides* und *fragilis* sehr nahe beieinander und streuen wenig. Einzig bei *S. purpurea* zeigen sich stark abweichende Wertebereiche der einzelnen Individuen. Während Spur_46 sehr konstant kaum relevante Anteile zeigt, weist Spur_47 einen sehr breiten Wertebereich auf. Zudem scheint es Individuen mit besonders geringem Anteil (Spur_46/48/49) und solche mit besonders hohem Anteil zu geben.

6.3.3.3.1. Charakterisierung der Extraktzusammensetzung mittels Radarplot

Neben dem Vergleich der Individuen innerhalb der betrachteten Arten, war ein Ziel des UPLC®-RP18-PDA Screenings (6.2.4, S. 153), die in dieser Studie eingeschlossenen Arten anhand ihrer Extraktzusammensetzung zu charakterisieren. Als Ansatz wurde dafür ein Radarplot genutzt, in welchem die Anteile der acht phenolischen Strukturklassen an der Gesamtpeakfläche aufgetragen wurden. Ähnliche Zusammensetzungen des Extrakts führen zu ähnlichen Formen der umschlossenen Flächen. Die Radarplots der eingeschlossenen Arten sind in **Abbildung 107** (S. 232) gezeigt.

Starke Ähnlichkeiten der Radarplots ergeben sich für die Daten der Spezies *S. cinerea* (E) und *S. viminalis* (K). In beiden Arten dominieren Cumarylalkoholglykoside (CAG) mit einem Anteil von ca. 30% und 25%. Zudem sind relevante Anteile an Flavanonolen, Kaffeesäurederivaten (CAD) und Flavan-3-olen erkennbar. Eine Ähnliche Zusammensetzung lässt sich für *S. aurita* erkennen, wobei in dieser Spezies Flavan-3-ole dominieren.

Die mit Abstand höchsten Anteile an Flavanonolen zeigt die Spezies *S. lapponeum* (I) mit ca. 30% Peakfläche. Zudem sind große Anteile an Cumarylalkoholglykosiden zu erkennen (ca. 30% Peakfläche). Damit ähnelt die Verteilung der phenolischen Stoffgruppen am meisten denen der Spezies *S. cinerea* (E) und *viminalis* (K), wobei die Flavanonole eine deutlich prominenteren Rolle spielen.

Cumarylalkoholglykoside dominieren in Individuen der Spezies *S. bicolor* (B), in der diese im Mittel einen Anteil von >50% der Peakfläche ausmachen.

Eine vergleichbare Dominanz einer Inhaltstoffgruppe ist nur bei der Spezies *S. caprea* (D) vorhanden, welche bevorzugt Flavan-3-ole, mit einem Anteil von mehr als 50% an der Gesamtpeakfläche, enthalten.

In den Spezies *S. x sepulcralis* (L) und *hastata* (H) zeigen sich je zwei dominierende Strukturklassen. Neben Flavan-3-olen haben auch Kaffeesäurederivate einen Anteil von über 20% bzw. 30% am Inhaltstoffspektrum. Eine Ähnlichkeit zu den Radarplots der Spezies *S. daphnoides* (F) und *fragilis* (G) ist vorhanden. In den Extrakten dieser Arten dominieren Kaffeesäurederivate mit einem Anteil von je über 30% im Mittel. Die Flavan-3-ole sind hier deutlich weniger dominant und machen mit ca. 10-20% im Mittel den zweitgrößten Anteil aus. Auch Flavanone konnten in relevanten Mengen bestimmt werden (10-20%), ergeben aber stets geringere Werte als die Flavan-3-ole.

Der Radarplot von *S. purpurea* (J) hat eine entfernte Ähnlichkeit mit denen von *S. daphnoides*, *fragilis*, *hastata* und *x sepulcralis* (F-H, L). Die Gehalte an Kaffeesäurederivaten (CAD) liegen im gleichen Bereich (Anteil >20%). Allerdings dominieren hier eindeutig die Flavanone (mittlerer Anteil > 40%), während Flavan-3-ole deutlich geringere Werte von ca. 10% aufweisen. *S. purpurea* ist die einzige vertretene Spezies, in welcher die Flavanone die dominierende Strukturklasse darstellen.

S. caesia (C) stellt die einzige vertretene Spezies dar, in welcher die Salicylakoholderivate mit über 20% den größten Anteil der untersuchten phenolischen Strukturklassen ausmachen. Daneben sind auch die Anteile an Flavan-3-olen (>20%), Kaffeesäurederivaten und Flavanonen relevant. Damit ergibt sich für *S. caesia* ein deutlich Radarplot, der sich deutlich von den anderen vertretenen Arten unterscheidet.

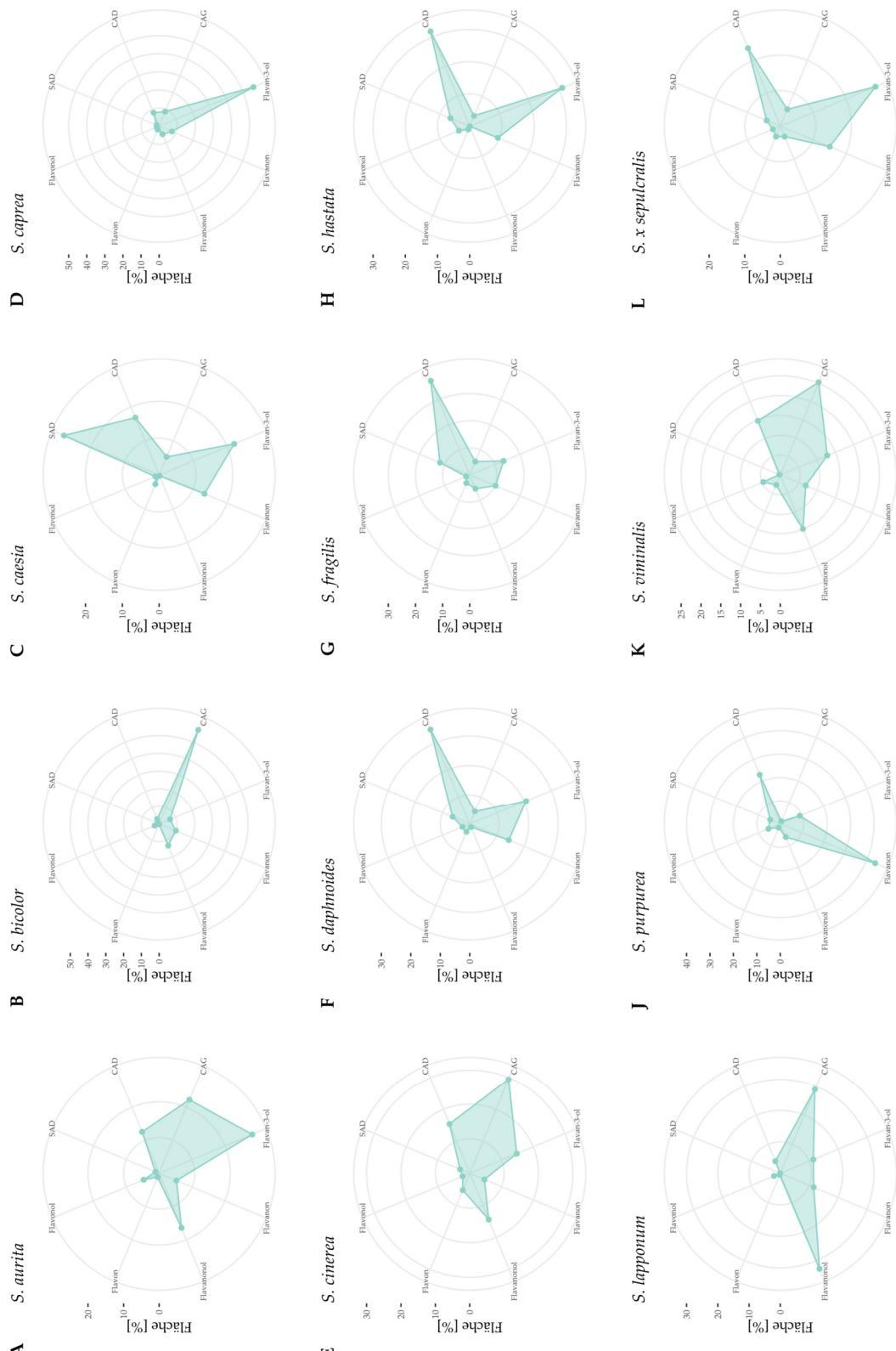


Abbildung 107: Radarplots der Zusammensetzungen von Extrakten verschiedener Arten der Gattung *Salix* (vgl. 6.2.2.2); dargestellt sind die Anteile an der Gesamtpeakfläche der betrachteten phenolischen Strukturklassen unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode, gemittelt über alle Individuen und Probenzüge; konzentrische Kreise stellen die Graduierung der Y-Achse je Strukturklasse dar; im Uhrzeigersinn aufgetragen sind Salicylalkoholderivate (SAD), Kaffeesäurederivate (CAD), Cumarylalkoholglykoside (CAG), Flavan-3-ole, Flavanone, Flavanonole, Flavone, Flavonole

6.3.3.3.2. Chemotaxonomischer Vergleich der Spezies per PCA, DBSCAN und Hierarchical Clustering

In **Abbildung 108** ist die PCA auf Grundlage der ermittelten Peakfläche der acht Inhaltsstoffgruppen des UPLC®-RP18-PDA Screenings gezeigt.

Jeder Probenzug eines Individuums stellt dabei einen eigenen Datenpunkt dar. Die Datenpunkte sind nach Spezies in unterschiedlichen Farben und durch geometrische Symbole gekennzeichnet. Die Cluster der jeweiligen Spezies werden durch eine Ellipse visualisiert. Auffällig ist, dass die Datenpunkte in Form eines Dreiecks angeordnet sind, wobei die Datenpunkte der Spezies *S. purpurea*, *S. caprea* und *S. bicolor* die Ecken bilden.

Zusammen erklären die Hauptkomponenten PC 1 und PC 2 die Variation des Datensets zu 62,6%. Die Hauptkomponente PC 1 (35,0%) wird überwiegend durch die Variation der Flavan-3-ole (Score 0,691) und der Flavanone (-0,531) bestimmt. Die Hauptkomponente PC 2 (27,6%) wird hauptsächlich von der Variation der Anteile an Cumarylalkoholglykosiden (Score -0,678) und ebenfalls Flavan-3-olen (0,593) bestimmt.

Die Datenpunkte von *S. caprea* zeigen die positivsten Werte bei beiden Hauptkomponenten PC 1 und PC 2. Die Datenpunkte der Spezies *S. purpurea* umfassen die niedrigsten Werten der Hauptkomponente PC 1, während die Werte von PC 2 moderat positiv ausgeprägt sind. Ein umgekehrtes Bild zeigt sich für die Spezies *S. bicolor*, welche die am stärksten negativen Werte für PC 2 und moderat positive Werte für PC 1 aufweist. Sämtliche Datenpunkte der anderen, in der Studie eingeschlossenen Arten befinden sich in dem beschriebenen Dreieck zwischen diesen drei Arten.

Für die Spezies *S. lapponum*, *cinerea* und *viminalis* zeigt sich eine leichte Tendenz zu positiven PC 1 und negativen PC 2-Werten, in Analogie zu *S. bicolor*. Die Spezies *S. aurita* wird bei leicht positiven Werten von PC 1 lokalisiert und befindet sich so zwischen *S. caprea* und *bicolor*. Die Spezies *S. caesia*, *daphnoides*, *fragilis*, *hastata* und *x sepulcralis* sind gemeinschaftlich nahe des Koordinatenursprungs zu finden und stellen das Zentrum zwischen *S. purpurea* und *caprea* dar.

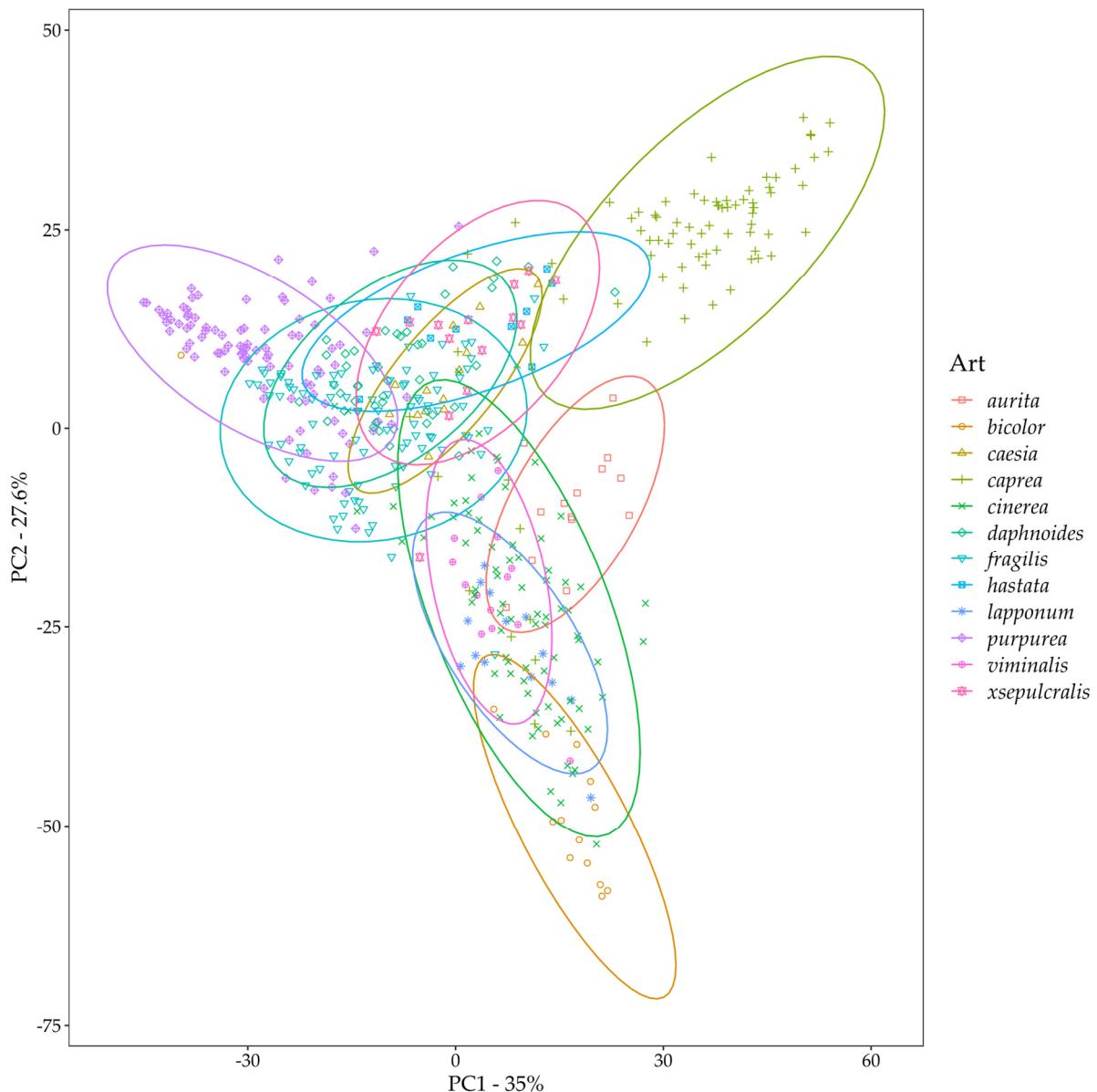


Abbildung 108: Dargestellt ist die PCA auf Grundlage der ermittelten anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren je einen einzelnen Probenzug der eingeschlossenen Individuen; die unterschiedlichen eingeschlossenen Spezies sind farblich sowie durch verschiedene Symbole gekennzeichnet und die Cluster durch eine Ellipse visualisiert

Um die Datenpunkte der PCA (Abbildung 108) in Gruppen zusammenzufassen, wurde ein Clustering nach dem Verfahren DBSCAN (Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise) durchgeführt. Die Ergebnisse des DBSCAN sind in Abbildung 109 und Tabelle 69 gezeigt. Das Verfahren ($\text{eps} = 3$, $\text{MinPts} = 4$) teilt 87,5% der Datenpunkte (420 von 480) insgesamt acht Clustern zu.

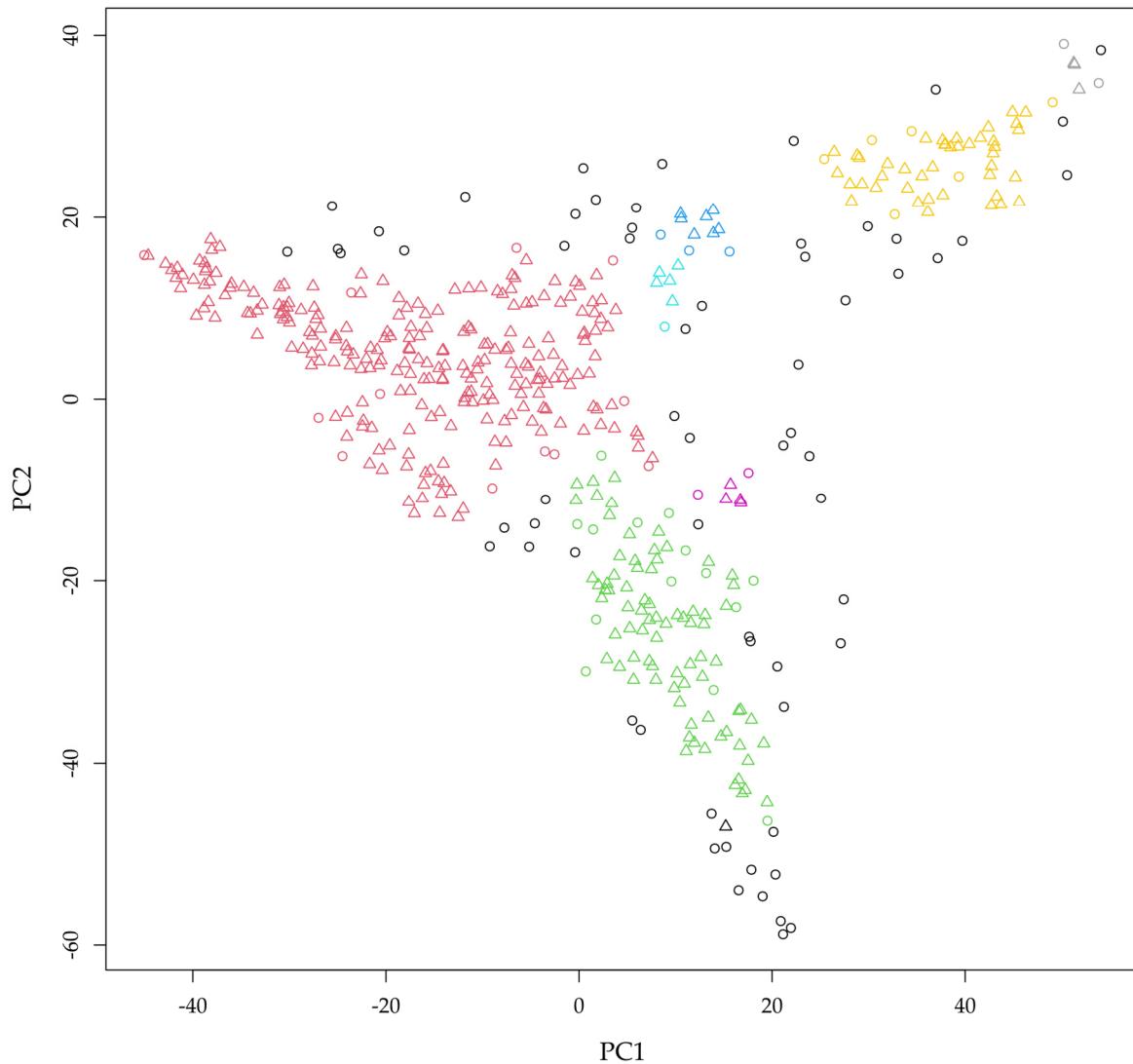


Abbildung 109: Dargestellt ein Clustering nach dem Verfahren DBSCAN; als Grundlage dienen die in einer PCA aufgetragenen Datenpunkte der anteiligen Peakfläche von acht Inhaltsstoffklassen im Chromatogramm (6.2.4, S. 153); die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Probenzüge der Individuen; Cluster sind durch unterschiedliche Farben abgegrenzt; Kernobjekte oder dichte Punkte sind durch Dreiecke gekennzeichnet, dichterreichbare Punkte (Randobjekte) sind als farbige Ringe, Rauschen als schwarze Ringe dargestellt

Dabei ist „Cluster rot“ der größte Cluster und vereinigt 248 von 480 Datenpunkten. In diesem Cluster stellen *S. fragilis* und *purpurea* mit 88 bzw. 84 Datenpunkten die größte Gruppe dar. Dies entspricht 95,6% bzw. 91,3% der Datenpunkte dieser Spezies. Außerdem finden sich die Spezies *S. caesia* (85,7%) und *S. daphnoides* (83,3%) überwiegend in diesem Cluster.

Der zweitgrößte Cluster („Cluster grün“) umfasst 93 Datenpunkte. Diese werden zu mehr als der Hälfte durch *S. cinerea* gestellt (53 Punkte). *S. lapponum* (14 Punkte) findet sich zu 100% in diesem Cluster, während 66,3% der Datenpunkte von *S. cinerea* und 85,7% der Datenpunkte von *S. viminalis* eingeschlossen sind. Zudem finden sich Teile von *S. aurita* und *bicolor* darin.

„Cluster gelb“ umfasst als Drittgrößtes 48 Datenpunkte. Diese stammen ausschließlich von *S. caprea* und repräsentieren 60,0% der Daten dieser Spezies.

Gleiches gilt für den „Cluster grau“, welcher fünf Datenpunkte von *S. caprea* umfasst.

Es wurden vier weitere deutlich kleinere Cluster gebildet: „Cluster hellblau“ und „Cluster dunkelblau“ umfassen 10 und 6 Punkte, welche je zu mindestens der Hälfte von *S. hastata* und *S. x sepulcralis* gebildet werden. „Cluster violett“ wird überwiegend aus Datenpunkten (5) der Spezies *S. aurita* gebildet (83% der Clusterpunkte). Der „Cluster schwarz“ wird mit je zwei Punkten zu gleichen Teilen von *S. bicolor* und *cinerea* gebildet. Eine Zusammenfassung der Anzahl Datenpunkte und deren Zuordnung zu den Clustern findet sich in **Tabelle 69**.

Tabelle 69: Anzahl der Datenpunkte (PCA Abbildung 109) nach Cluster und Spezies;

Spezies	Kein Cluster	Cluster rot	Cluster grün	Cluster gelb	Cluster dunkelblau	Cluster hellblau	Cluster violett	Cluster grau	Cluster schwarz
<i>S. aurita</i>	6	0	3	0	0	0	5	0	0
<i>S. bicolor</i>	8	1	3	0	0	0	0	0	2
<i>S. caesia</i>	0	12	0	0	1	1	0	0	0
<i>S. caprea</i>	14	4	7	48	2	0	0	5	0
<i>S. cinerea</i>	13	10	53	0	0	1	1	0	2
<i>S. daphnoides</i>	6	35	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. fragilis</i>	2	88	1	0	1	0	0	0	0
<i>S. hastata</i>	1	5	0	0	2	2	0	0	0
<i>S. lapponum</i>	0	0	14	0	0	0	0	0	0
<i>S. purpurea</i>	8	84	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. viminalis</i>	1	1	12	0	0	0	0	0	0
<i>S. x sepulcralis</i>	1	8	0	0	3	2	0	0	0
Summe	60	248	93	48	10	6	6	5	4

Neben dem Clustering der einzelnen Datenpunkte des Salix Screenings im Rahmen der PCA (im DBScan-Verfahren, 6.3.3.2, S. 233) wurde auch ein hierarchisches Clustering durchgeführt. Dies dient der weiteren Veranschaulichung der erhobenen Daten. Dazu wurden die im UPLC®-RP18-PDA Screening ermittelten Anteile an der Gesamtpeakfläche je Spezies über alle verfügbaren Probenzüge gemittelt. Die daraus resultierende Heatmap ist in **Abbildung 110** dargestellt. Das hierarchische Clustering wurde zudem durch Dendrogramme visualisiert, welche die Ähnlichkeit der jeweiligen Spezies bzw. Strukturklassen anhand der ermittelten euklidischen Distanz zwischen den Clustern zeigt. Diese Dendrogramme sind in **Abbildung 110** sowie **Abbildung 111** (S. 239) und **Abbildung 112** (S. 241) zu sehen.

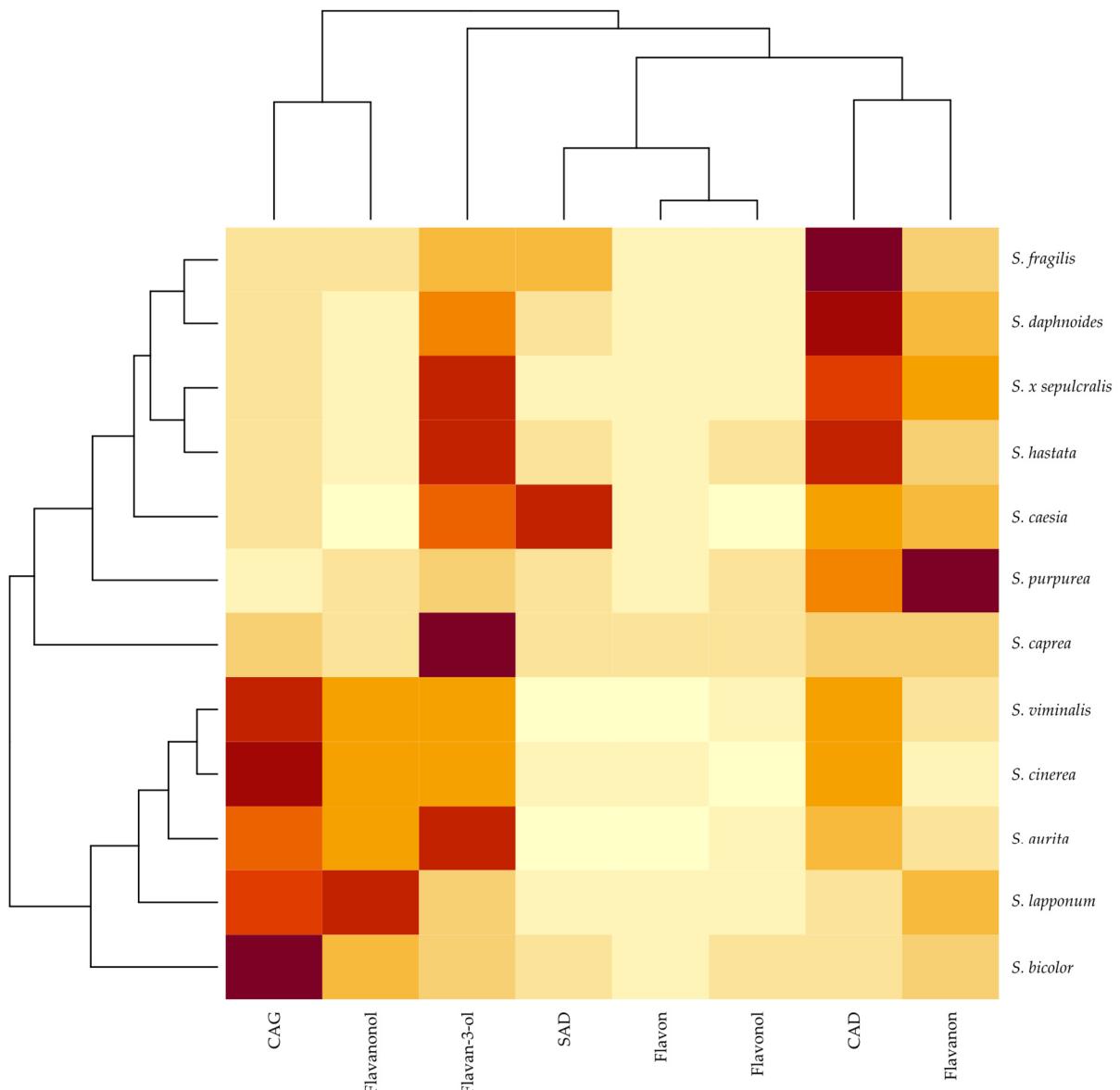


Abbildung 110: Heatmap und Dendrogramm nach hierarchischem Clustering der Anteile acht phenolischer Inhaltsstoffe an der chromatographischen Geamtpeakfläche (6.2.4, S. 153), gemittelt über alle Probenzüge je Spezies; die Anteilige Menge an der Gesamtpeakfläche ist farblich gekennzeichnet (hohe Anteile tiefrot, niedrige Anteile gelblich-weiß dargestellt); die Dendrogramme visualisieren die euklidische Distanz zwischen den Spezies und den daraus gebildeten Clustern (links) sowie den phenolischen Strukturklassen und den daraus gebildeten Clustern (oben)

In der Heatmap sind große Anteile an der Gesamtpeakfläche durch einen Farbverlauf von Hellgelb (niedrige Werte) zu Dunkelrot (hohe Anteile) dargestellt. Die Werte wurden dabei innerhalb jeder Spezies normalisiert. Bei fünf Spezies (*S. viminalis*, *cinerea*, *aurita*, *lapponum* und *bicolor*) zeigen sich im linken unteren Bereich sehr hohe Gehalte an Cumarylalkoholglykosiden (CAG, tiefrote Felder) und hohe Gehalte an Flavanonolen (deutlich gefärbte Felder). Diese

beiden Strukturklassen sind bei allen anderen vertretenen Spezies deutlich heller dargestellt und besitzen damit deutlich niedrigere Anteile.

Die Gruppe der Flavan-3-ole stellt in neun betrachteten Arten relevante Anteile, in *S. purpurea*, *lapponum* und *bicolor* sind diese deutlich geringer ausgeprägt als bei den anderen Spezies. In *S. caprea* dominieren Flavan-3-ole das Inhaltstoffspektrum deutlich.

Salicylalkoholderivate (SAD) zeigen in *S. fragilis* und *caesia* die höchsten Anteile, während sie in den anderen Spezies eine untergeordnete Rolle spielen.

Flavone und Flavonole sind in allen Spezies nur in geringen Anteilen vorhanden und folglich in der Heatmap in hellgelben Tönen gezeichnet.

Kaffeesäurederivate (CAD) zeigen in den vier Spezies *S. fragilis*, *daphnoides*, *x sepulcralis* und *hastata* hohe Anteile, die durch dunkelrot gefärbte Flächen gekennzeichnet sind. In den beiden erstgenannten Arten stellt diese Strukturgruppe die dominierende dar aber auch die Spezies *S. caesia*, *purpurea*, *viminalis*, *cinerea* und *aurita* enthalten relevante Anteile dieser Verbindungen.

Die Strukturklasse der Flavanone ist einzig in der Spezies *S. purpurea* dominant (tiefrot). Insgesamt neun Spezies enthalten relevante Anteile, während *S. viminalis*, *cinerea* und *aurita* die geringsten Werte aufweisen.

Mit Hilfe der Heatmap lassen sich die untersuchten Spezies in fünf Gruppen einteilen. Eine Gruppe zeichnet sich durch hohe Anteile an Cumarylalkoholglykosiden (CAG) und Flavanonolen, sowie moderate Anteile an Flavan-3-olen aus, während die restlichen betrachteten phenolischen Inhaltsstoffgruppen eine untergeordnete Rolle spielen. Zu dieser Gruppe zählen *S. viminalis*, *cinerea*, *aurita* und *lapponum*.

Eine Sonderrolle spielt *S. bicolor*, welche eine starke Dominanz der Cumarylalkoholglykoside (CAG) aufweist und somit als eigene „Gruppe“ geführt werden muss.

Eine weitere große Gruppe enthält hohe Anteile an Kaffeesäurederivaten (CAD), erhöhte Anteile an Flavanonen und bedeutende Anteile an Flavan-3-olen. Dazu gehören *S. fragilis*, *daphnoides*, *x sepulcralis*, *hastata* und *caesia*. In dieser Gruppe sind auch die Spezies, mit dem höchsten Anteil an Salicylalkoholderivaten (SAD) zu finden (*S. fragilis* und *caesia*).

Die vierte „Gruppe“ bildet die Spezies *S. purpurea*, deren Inhaltstoffspektrum von Flavanonen dominiert wird.

S. caprea nimmt ebenfalls eine Sonderstellung durch die Dominanz der Flavan-3-ole im Chromatogramm ein und bildet die fünfte „Gruppe“.

Die beiden beim hierarchischen Clustering ermittelten Dendrogramme sind jeweils in **Abbildung 111** und **Abbildung 112** im Detail gezeigt. Auf der y-Achse ist die euklidische Distanz zwischen den Datenpunkten der einzelnen Spezies aufgetragen und durch das Zusammenführen der Linien (Clusterbildung) gekennzeichnet. Eine geringe euklidische Distanz ist dabei gleichbedeutend mit der Ähnlichkeit der zu vergleichenden Spezies bzw. Clustern.

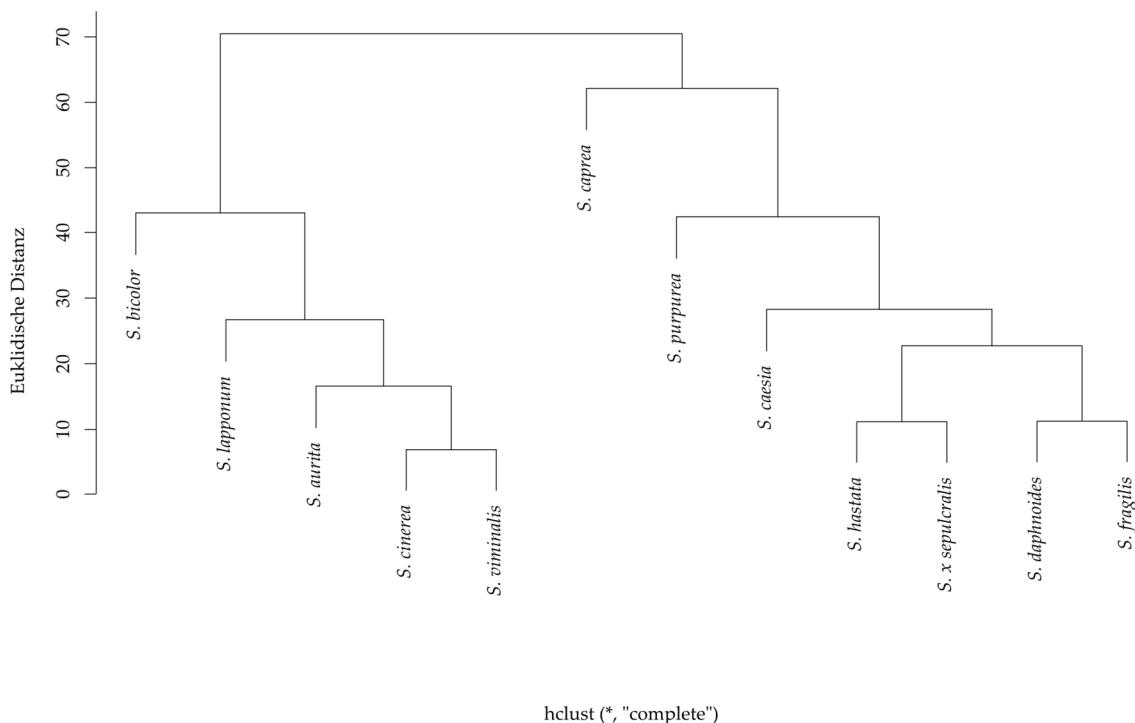


Abbildung 111: Dendrogramm nach hierarchischem Clustering der Anteile acht phenolischer Inhaltsstoffe an der chromatographischen Geampeakfläche (6.2.4, S. 153); gezeigt ist die euklidische Distanz zwischen den Spezies und den daraus gebildeten Clustern beim hierarchischen Clustering; die zugehörige Heatmap ist in **Abbildung 110** dargestellt

Das Dendrogramm teilt die untersuchten Spezies in zwei Äste auf: einer führt die Arten mit relevanten Anteilen an Cumarylalkoholglykosiden (CAG) und Flavanonolen zusammen. Dazu zählen *S. bicolor*, *lapponum*, *aurita*, *cinerea* und *viminalis*. Der zweite Ast vereinigt die Arten mit sehr niedrigen Anteilen an CAGs und Flavanonolen. Dies sind *S. caprea*, *purpurea*, *caesia*, *hastata*, *x sepulcralis*, *daphnoides* und *fragilis* (vgl. Heatmap in **Abbildung 110**)

Bei detaillierter Betrachtung des ersten Astes zeigt sich, dass zwischen den Spezies *S. cinerea* und *viminalis* die geringste Distanz ermittelt wurde und sich diese in der anteiligen Zusammensetzung des Extraks am ähnlichsten unter den untersuchten Arten sind. Der auf diese Weise gebildete Cluster ist der Spezies *S. aurita* am ähnlichsten, welche mit einer Distanz von <20 mit diesem zusammengeführt wird. Diese Spezies zeigt eine deutlich stärkere Ausprägung der Flavan-3-ole in der Zusammensetzung des Extraks.

S. lapponum mit einem umgekehrten Verhältnis der Anteile von Cumarylalkoholglykosiden (CAG) zu Flavanonolen (höhere Anteile) wird mit einer ähnlichen, zusätzlichen Distanz (< 30) mit diesem Cluster zusammengelegt.

Mit deutlich größerem Abstand (euklidische Distanz ca. 45) wird *S. bicolor* mit der beschriebenen Vierergruppe vereint. Diese komplettiert den linken Ast des Dendrogramms und repräsentiert die bereits weiter oben identifizierten Gruppen 1 und 2.

Der zweite Ast, der CAG- und flavanonolarmen Arten fußt auf zwei Zweierpärchen, welche jeweils eine große Ähnlichkeit und eine geringe euklidische Distanz zueinander zeigen. Zum einen *S. hastata* und *x sepulcralis*, welche ausgewogene Anteile an Flavan-3-olen und Kaffeesäurederivaten aufweisen und zudem Flavanone enthalten. Zum anderen *S. daphnoides* und *fragilis*, in welchen neben deutlichen Anteilen von Flavan-3-olen und Flavanone Kaffeesäurederivate dominieren. Diese beiden Zweiercluster werden bei einer euklidische Distanz von ca. 20 zusammengeführt und sind sich demnach in der Zusammensetzung des Extraks untereinander sehr ähnlich.

Als nächste Spezies wird *S. caesia* mit einer euklidischen Distanz von ca. 30 in diesen Cluster integriert. In *S. caesia* dominieren die Salicylalkoholderivate (SAD), während Flavan-3-ole, Kaffeesäurederivate und Flavanone ebenfalls bedeutende Anteile ausmachen.

Mit weiterem Abstand wird *S. purpurea* zum Cluster hinzugefügt. Die Zusammensetzung des Extraks wird deutlich von Flavanonen geprägt. Neben diesen sind nur Kaffeesäurederivate in relevanten Anteilen zu finden.

Mit deutlichem Abstand und einer Distanz von > 60 wird die Spezies *S. caprea* integriert. Dies erfolgt nur kurz vor dem Zusammenschluss beider Äste und somit dem Einschluss aller Spezies bei einer Distanz von ca. 70. Das Alleinstellungsmerkmal von *S. caprea* ist die außergewöhnliche Dominanz der Flavan-3-ole im Extrakt. Diese Spezies bildet daher eine eigene „Gruppe“. Auch die Ergebnisse des DBSCAN Clusterings im vorhergehenden Kapitel 6.3.3.3.2 (S. 233) bestätigen diese Beobachtung.

Eine Betrachtung der Ähnlichkeit der Verteilung der untersuchten Strukturklassen in den Spezies der Studie ist anhand des hierarchischen Clustering ebenfalls möglich und in **Abbildung 112** dargestellt.

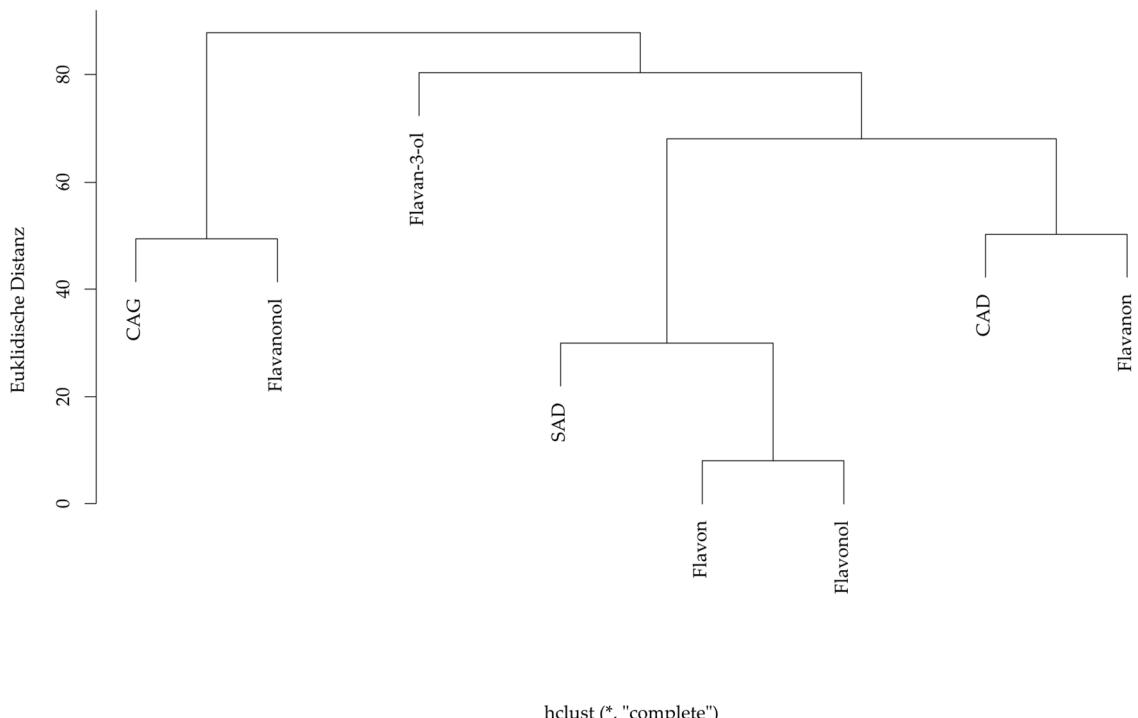


Abbildung 112: Dendrogramm nach hierarchischem Clustering der Anteile acht phenolischer Inhaltsstoffe an der chromatographischen Gesamtpeakfläche (6.2.4, S. 153); gezeigt ist die euklidische Distanz zwischen den Strukturklassen und den daraus gebildeten Clustern beim hierarchischen Clustering; die zugehörige Heatmap ist in **Abbildung 110** gezeigt

Verschiedene Strukturklassen kommen oft vergesellschaftet miteinander vor und zeigen ein ähnliches Verbreitungsmuster im vorliegenden Probenset. Anhand dieser Muster lassen sich die untersuchten Strukturklassen in vier „Gruppen“ einteilen. Die größte Gruppe umfasst drei Stoffklassen: Salicylalkoholderivate, Flavone und Flavonole. Die Verteilung dieser beiden Flavonoidklassen ist im untersuchten Probenset sehr ähnlich, beide Klassen spielen nur eine sehr untergeordnete Rolle und repräsentieren keine relevanten Anteile der Gesamtpeakfläche. Auch die SAD sind in den meisten Spezies nicht mit relevanten Anteilen zu bestimmen. Nur in *S. fragilis* und *caesia* sind diese in größeren Anteilen an der Gesamtpeakfläche vertreten.

Zwei weitere Gruppen sind fast spiegelbildlich links und rechts außen im Dendrogramm angeordnet. Das erste dieser Pärchen wird durch die Klassen der Cumarylalkoholglykoside (CAG) und Flavanonole gebildet, das Zweite durch die Kaffeesäurederivate (CAD) und Flavanone gebildet. In beiden Gruppen überwiegen jeweils die Phenylpropanderivate CAG

und CAD die Anteile der Flavonoide. Einzig bei *S. lapponum*, *purpurea* und *caprea* lässt sich diese Aussage nicht treffen (vgl. **Abbildung 110**, S. 237).

Als vierte „Gruppe“ kann die Klasse der Flavan-3-ole betrachtet werden, welche ebenso wie die erste Gruppe erst bei einer großen euklidischen Distanz mit den anderen Gruppen zusammengeführt wird. Diese herausragende Stellung wird durch die besondere Zusammensetzung des Extrakts der *S. caprea* bedingt.

6.4. Diskussion

6.4.1. Saisonale Variabilität von Sekundärermetaboliten

Die saisonalen Schwankungen der Gehalte sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe waren schon in der Vergangenheit Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Eine Übersichtsarbeit zur saisonalen Variation von Inhaltsstoffen in europäischen Bäumen wurde von Zidorn (2018) angefertigt. Dabei identifizierte Zidorn mehrere Einflussfaktoren auf die saisonale Entwicklung der Sekundärmetabolite. Diese sei artspezifisch, gewebeabhängig, stoffspezifisch und dabei abhängig von Region und Klimaeinflüssen, Reaktion auf Stressfaktoren sowie Pflanzenalter und Fruchtbildung (Zidorn, 2018).

Innerhalb der Gattung *Salix* wurden in der Vergangenheit verschiedene Stoffgruppen betrachtet, jedoch richtete sich der Fokus zumeist auf die Salicylalkohole und Phenolglykoside (Förster et al., 2008; Meier et al., 1985; Thieme, 1965b). Neben den Studien zu Salicylalkohol- und Phenolglykosidgehalten wurden auch umfassendere Studien des Sekundärstoffgehalts durchgeführt (Julkunen-Tiitto, 1989; Julkunen-Tiitto & Meier, 1992; Nyman & Julkunen-Tiitto, 2005). Jedoch analysierten die Autoren in nur wenigen Studien explizit Gerbstoffe und Proanthocyanidine im Jahresverlauf (Thieme, 1968; Wiesneth et al., 2018).

Die Gehaltsbestimmung der Gesamtphenole und Restphenole wurde von Thieme (1968) über eine Gerbstofffällung und von Wiesneth & Jürgenliemk mit Hilfe einer Modifikation der Arzneibuchmethode Ph. Eur. 2.8.14 durchgeführt (Wiesneth, 2019; Wiesneth & Jürgenliemk, 2017). Während Thieme die höchsten Konzentrationen von Gerbstoffen Ende Mai, zu Beginn der Wachstumssaison, bestimmte, zeigten die Individuen bei Wiesneth zumeist leicht steigende Gehalte über die gesamte Wachstumssaison. Die hier präsentierten Ergebnisse der Gerbstoffbestimmung (6.3.1.1, S. 164) zeigen ein anderes Muster. Trotz großer individueller Unterschiede ist eine Steigerung der Gesamtphenole, bestehend aus Restphenolen und mit Hautpulver fällbaren (Gesamt-)gerbstoffen über die Wachstumssaison zu erkennen. Die höchsten Werte zeigen sich im Hochsommer (August) bis zum Ende der Wachstumssaison (September). Dieser sprunghafte, sommerliche Anstieg des Gerbstoffgehalts entspricht den Beobachtungen von (Feeny & Bostock, 1968) bei der Untersuchung von Eichenblättern.

In dieser Studie überwiegen die Gerbstoffe bei der Betrachtung der Gesamtphenole. Allerdings zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Individuen und vereinzelt wurden ausgeglichene Gehalte an Gerbstoffen und Restphenolen bestimmt. Diese Beobachtung deckt sich mit der von Wiesneth (2019), wobei hier einschränkend erwähnt

werden muss, dass es sich in beiden Studien um Individuen am gleichen Standort, dem Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth, handelt. Einzelne Individuen wurden für beide Studien beprobt. Somit stellt diese Arbeit eine Bestätigung der Ergebnisse von 2016 für die darauffolgenden Jahrgänge 2017-2019 dar. Im Mittel zeigt sich eine über die Wachstumssaison konstante Verteilung der Gesamtphenole auf Gerbstoffe und Restphenole, bei der die Gerbstoffe etwa zwei Drittel bis drei Viertel der Gesamtphenole ausmachen. Im Jahresverlauf kommt es zu deutlichen Zuwächsen bei den Gesamtphenolen mit höchsten Werten im Hoch- und Spätsommer.

Die Muster der Proanthocyanidine im Speziellen sind aufgrund der Unterscheidung nach Kettenlänge deutlich komplexer. Beispiele für detaillierte Untersuchungen der Proanthocyanidinmuster in einzelnen Arten finden sich bei Jürgenliemk et al. (2007) und Wiesneth et al. (2015). Eine Betrachtung mehrerer Arten und des Jahresverlaufs von Proanthocyanidingehalten wurde von Wiesneth et al. (2018) publiziert. Dabei wurde ein Ansteigen der Gehalte von Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen über die Sommermonate jedoch auch große interspezifische Unterschiede festgestellt. In der vorgestellten Arbeit wurden die Daten verschiedener Arten aus drei aufeinanderfolgende Wachstumsperioden gemittelt, um einen saisonunabhängigen Trend nachzuweisen. Diese mehrjährige Untersuchung wird auch bei Zidorn (2018) vorgeschlagen, um saisonale Besonderheiten auszugleichen. Dabei bestätigen sich für die Proanthocyanidine die von Wiesneth et al. (2018) am gleichen Standort erhobenen Ergebnisse, nach denen die Gehalte der PAs über den Sommer ansteigen. Im Gegensatz zur These, dass die Entwicklungen der oligomeren und polymeren PAs verknüpft zu sein scheinen (Wiesneth, 2019; Wiesneth et al., 2018), zeigen sich in der vorliegenden Studie gegenläufige saisonale Trends bei oligomeren und polymeren PAs. Die Gehalte von oligomeren PAs mit einem Polymerisierungsgrad bis etwa acht bis neun Einheiten steigen im Jahresverlauf eher an, während die Gehalte höher polymerer PAs tendenziell sinken. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse wäre die Gruppe oligomerer PAs bis zu einem Polymerisierungsgrad von etwa acht zu verstehen und ab einem Polymerisierungsgrad ab zehn bereits von polymeren PAs zu sprechen. Proanthocyanidine, welche aus neun bis zehn Monomeren aufgebaut sind, können nach den vorliegenden Ergebnissen weder den oligo- noch den polymeren PAs eindeutig zugeordnet werden. Diese nahezu spiegelbildliche Konzentrationsentwicklung von oPAs und pPAs im Jahresverlauf

spricht für eine Umwandlung dieser und ein fließendes Gleichgewicht innerhalb der Gruppe kondensierter Gerbstoffe

Im Detail betrachtet sinken die Gehalte oligomerer PAs zu Beginn der Wachstumssaison, zeigen die höchsten Werte im August und anschließend einen leichten Rückgang. Die Konzentrationskurve ähnelt einem leicht im Urzeigersinn gekippten „S“. Diese Form bringt Zidorn (2018) in Verbindung mit einer Reaktion auf Stressfaktoren wie Trockenstress oder mikrobiellen Befall. Besonders die Sommermonate der Jahre 2018 und 2019 waren am Standort der beprobten Individuen (Ökologisch-Botanischer Garten der Universität Bayreuth, Deutschland) von unterdurchschnittlichen Niederschlagsmengen und überdurchschnittlichen Temperaturen geprägt (Thomas, 2018a, 2018b, 2019a, 2019b). Diese Jahre werden aufgrund der Zusammensetzung des Probensets stärker berücksichtigt als das Jahr 2017, in welchem ein überdurchschnittlich feuchter Sommer auftrat (Thomas, 2017a, 2017b).

Bei der Betrachtung der phenolischen Inhaltsstoffgruppen, welche im Rahmen des UPLC®-RP18-PDA-Screenings (6.2.4, S. 153) erfolgte, zeigten sich komplexe Muster, die sich nach Art, Individuum, betrachteter Stoffgruppe und Studienzeitraum deutlich unterschieden. Diese Differenzen zwischen Individuen verschiedener Arten, sowie auch innerhalb einer Art verwundern nicht, haben doch Julkunen-Tiitto & Meier (1992) bereits signifikante Unterschiede zwischen genetisch identischen Klonen von *Salix myrsinifolia* SALISB. feststellen können. Auch Köhler et al. (2023) stellten einen großen, quantitative und qualitative, intraspezifische Variabilität untersuchter Klone fest.

Die Salicylalkohole waren in der Vergangenheit Hauptgegenstand durchgeföhrter Studien. Im Speziellen Salicin stand im Fokus, da dieses schon früh erfolgreich bei Erkrankungen im rheumatoiden Formenkreis zur Anwendung kam (MacLagan, 1876). So wurde in einigen Studien der Blick auf den optimalen Erntezeitpunkt der Droge Salicis cortex gerichtet. Bei den Arbeiten von Förster et al. (2008, 2010) und Thieme (1965a) wurden in *S. purpurea*, *daphnoides* und *pentandra* Spitzenkonzentrationen im Frühjahr (März) vor dem Beginn der Wachstumssaison beobachtet, welche über den Sommer deutlich abfielen und sich erst zum Herbst wieder erholten. Die hohen Konzentrationen wurden als konstant hoch über die Winterhälfte des Jahres beschrieben. Zu einer anderen Beobachtung kamen Meier et al. (1985), welche in *S. purpurea* und *daphnoides* eine Zunahme der Konzentrationen über die Sommermonate mit Höchstwerden von Juli bis September berichteten. Da diese Daten bei der Beprobung von Individuen in voralpinem Klima entstanden, kann eine Verschiebung der

Wachstumsperiode aufgrund der geographischen Gegebenheiten als Erklärungsversuch für die unterschiedlichen Beobachtungen herangezogen werden (Meier et al., 1985). In der vorgestellten Untersuchung zeigten sich bei den betrachteten Spezies sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während bei *S. caprea* einzelne Probenzüge mit hohen Konzentrationen, besonders im Hochsommer auffielen, zeigten die Vertreter der Spezies *S. cinerea* zumeist steigende Konzentrationen zum Ende der Wachstumssaison im September mit zum Teil sehr extremen Entwicklungen. Diese Trends lassen sich nur bedingt mit den von Förster et al. (2008, 2010) und Thieme (1965a) beobachteten Mustern in Einklang bringen. *S. caprea* zeigt zum Teil den beschriebenen Rückgang über die Wachstumssaison, scheint aber kurzzeitig in der Lage zu sein eine hohe Konzentration von Salicylalkoholderivaten in der Rinde verfügbar zu machen. Dies könnte mit einer Reaktion auf Stress (bspw. mikrobiologisch oder klimatisch) zurückzuführen sein, wie dies in einigen Arbeiten dargestellt und postuliert wurde (Nissinen et al., 2018; Zidorn, 2018).

Die von Wiesneth (2019) erhobenen Daten konnten zum Teil bestätigt werden. So wurden beispielweise für *S. cinerea* ähnliche Entwicklungen beobachtet, die sich allerdings in den unterschiedlichen Jahren der Studie stark unterschieden und kein eindeutiges, sich wiederholendes Muster erkennen ließen. Für *S. fragilis* wurden sehr konstante Werte bestimmt, teils schwankend mit Tendenz zu steigenden Konzentrationen zum Ende der Wachstumssaison, eine Beobachtung die sich mit der von Wiesneth (2019) deckt. Diese Aussage muss aber sogleich eingeschränkt werden, da auch hier deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen zu sehen sind, eine Beobachtung welche auch an Klonen innerhalb einer Spezies gemacht wurden (Köhler et al., 2023). Die betrachteten *S. daphnoides* wiesen ebenso ein indifferentes Bild mit starken saisonalen Konzentrationsschwankungen der Salicylalkoholderivate auf. Es zeigten sich mehrere Konzentrationsspitzen im Frühsommer und zum Ende der Wachstumssaison, die in den verschiedenen Jahren deutlich unterschiedlich ausgeprägt sind. Diese Beobachtung entspricht nur bedingt der von Wiesneth (2019), welcher in der Wachstumssaison 2016 sehr konstante Werte beobachtet hatte. Dass es große Unterschiede in der Konzentrationsentwicklung im Jahresverlauf gibt, konnte deutlich bei *S. purpurea* beobachtet werden. Diese Individuen zeigten sehr unterschiedliche Muster über den Studienzeitraum. Es waren sehr konstante, aber auch schnell und stark schwankende Konzentrationen zu beobachten. Diese sind nur bedingt mit vorhandenen Daten von Förster

et al. (2008, 2010), Meier et al. (1985), Thieme (1965b) und Wiesneth (2019) in Einklang zu bringen, da sich die Muster in den jeweiligen Folgejahren nicht zuverlässig wiederholen.

Ebenso divers sind die saisonalen Entwicklungen der übrigen betrachteten phenolischen Inhaltsstoffgruppen unter Betrachtung des gesamten Studienzeitraums. Deutlich wird dies bei den Kaffeesäure- und Cumarylalkoholderivaten. Diese zeigen 2017 zumeist niedrige, aber konstante Werte in *S. daphnoides*, *fragilis* und *purpurea*. In der Saison 2018 ist zumeist ein Konzentrationsmaximum in den Sommermonaten zu erkennen. Einzelne Individuen zeigen jedoch auch einen konstanten Abfall oder ein konstantes Steigen der Konzentration im Jahresverlauf. Auffallend ist, dass das Jahr 2019 von einem deutlichen Anstieg der Konzentrationen in *S. caprea*, *cinerea* und *daphnoides* geprägt ist. Dieses Bild zeigt sich in *S. fragilis* nur bei Cumarylalkoholderivaten, während die Kaffeesäurederivate abfallende Gehalte aufweisen. Die beprobten Vertreter der Spezies *S. purpurea* zeigen in allen drei untersuchten Jahren sehr indifferente Muster, die sich auch zwischen den Individuen stark unterschieden. Insgesamt lässt sich besonders bei diesen beiden Stoffgruppen mit Phenylpropangrundgerüst eine große Vielfalt an Konzentrationsverläufen feststellen. So sind Konzentrationsverläufe mit Maxima zu Beginn und Ende der Wachstumssaison zu beobachten, aber auch konstant steigende Kurven konnten ermittelt werden. Zudem sind auf konstantem Niveau stagnierende Werte und kurze Konzentrationsspitzen mit nachfolgendem Abfall festzustellen. Damit sind in dem Betrachtungszeitraum von nur drei Jahren alle von Zidorn (2018) vorgestellten, typischen Konzentrationsverläufe von Sekundärmetaboliten zu erkennen. Bei Wiesneth (2019) konnten für die untersuchten Individuen im Jahr 2016 allgemein konstante Werte auf deutlich unterschiedlichen Konzentrationsstufen ermittelt werden, eine Beobachtung, welche nur bedingt bestätigt werden konnte. Auch Individuen, welche in beiden Studien inkludiert waren, zeigen für die Saison 2017 die konstantesten Werte und die größte Ähnlichkeit zu den von Wiesneth beschriebenen Ergebnissen. Die Variabilität ist in den Folgejahren deutlich größer, was mit unterschiedlichen Wettersituationen der sehr trockenen und heißen Sommer der Jahre 2018 und 2019 korreliert.

Die Gehalte der fünf betrachteten Gruppen an Flavonoiden zeigten sehr unterschiedliche Muster im Jahresverlauf in den herausgegriffenen Spezies und Individuen. Auffällig ist die im Allgemeinen sehr niedrige Konzentration an Flavonen und Flavonolen, welche nur in wenigen Individuen (v.a. *S. purpurea*) höhere und zwischen den Jahrgängen deutlich schwankende Gehalte aufweisen. Flavan-3-ole zeigen besonders in *S. caprea* eine deutliche Tendenz zu

steigenden Gehalten zum Ende der Wachstumsperiode. Dieser Anstieg ist in den anderen Spezies nicht derart deutlich ausgeprägt. Dort werden eher schwankende Werte mit Maxima zu Beginn und/oder Ende des Sommers beobachtet. In *S. caprea* wird das Sekundärstoffspektrum im Hinblick auf Flavonoide stark von Flavan-3-olen dominiert. Hier wird der starke Unterschied zwischen den jeweiligen Jahrgängen deutlich sichtbar. Während Wiesneth et al. (2018) die höchsten Flavan-3-ol-Gehalte der Wachstumssaison 2016 in den Trieben der untersuchten Spezies allesamt für Juli und August bestimmen konnten, ist das Bild in der vorliegenden Arbeit vielfältiger. Im Jahr 2017 zeigen sich die höchsten Gehalte zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Frühsommer oder Hochsommer, vereinzelt auch zum Ende der Wachstumsperiode. In der Saison 2018 waren die höchsten Gehalte fast ausschließlich im August, bei deutlich niedrigeren Werten, zu bestimmen. Im darauffolgenden Jahr (2019) sind die Höchstgehalte nach Stagnation oder leichtem Rückgang über den Sommer nahezu ausschließlich am letzten Erntezeitpunkt im September zu beobachten. Für Gruppen der Flavanone und Flavanonole sind sehr unterschiedliche Muster zu erkennen. Während in einigen Individuen, über die den Studienzeitraum von drei Jahren wiederholt Gehalte auf ähnlichem Niveau bestimmt werden konnten (bspw. *S. daphnoides*), sind die Unterschiede zwischen aufeinander folgenden Wachstumsperioden bei anderen deutlich ausgeprägt. Die Konzentrationskurven zeigen dabei eine große Vielfalt, das von Zidorn (2018) mit Abwehrmechanismen in Verbindung gebrachte Muster findet sich selten und wenig stark ausgeprägt.

Diese Betrachtung des saisonalen Verlaufs aller acht untersuchten Strukturgruppen zeigt die vorhandene Vielfalt im Genus *Salix*. Zum Teil konnten Gemeinsamkeiten der jeweiligen Individuen innerhalb einer Spezies festgestellt werden. Jedoch muss festgehalten werden, dass im Genus *Salix* eine große interindividuelle und interspezieselle Variabilität besteht, welche auch schon von Förster et al. (2010) eindrücklich präsentiert werden konnten. Zudem sind deutliche Einflüsse der vorherrschenden Wetter und Klimaverhältnisse zu vermuten. Die beobachtete saisonale Variabilität macht selbst einen direkten Vergleich mit Daten von Individuen am selben Standort, wie bei Wiesneth (2019) schwierig, da diese in einer anderen Wachstumsperiode geerntet wurden. Dazu sind die Einflüsse der jeweiligen Klima- und Wetterverhältnisse auf den Sekundärstoffwechsel und die jeweiligen Zusammenhänge noch nicht ausreichend untersucht, obwohl die wechselnden klimatischen Bedingungen

zunehmend in den Fokus der Forschung rücken (Köhler et al., 2020; Nissinen et al., 2016; Nybakken et al., 2012; Paajanen et al., 2011; Randriamanana et al., 2015).

Nissinen et al. (2016) konnten zeigen, dass unter gewissen Voraussetzungen *Salix* Spezies von sich verändernden klimatischen Bedingungen profitieren können. Dabei konnten z. T. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Individuen beobachtet werden (Nissinen et al., 2016). Solche intersexuellen Unterschiede in Reaktion auf besondere klimatische Einflüsse konnten auch in verwandten Gattungen, beispielsweise bei *Populus tremula* L. nachgewiesen werden (Randriamanana et al., 2015)

6.4.2. Geschlechterspezifische Variabilität im Genus *Salix*

Eine Betrachtung der verschiedenen Geschlechter in diözischen Spezies wurde, auch unabhängig von Reaktionen auf klimatische Veränderungen, bereits in der Vergangenheit beleuchtet. Thieme (1965b) betrachtete die intergeschlechtlichen Unterschiede der Phenolglykosidgehalte in mehreren *Salix* Spezies.

Die Ursache für Unterschiede in Wachstum und Gehalten von Sekundärmetaboliten wurde auf die unterschiedlichen Rollen in der Reproduktion zurückgeführt. So stellten Ågren et al. (1999) in ihrer Übersichtsarbeit die Hypothese auf, dass die weiblichen Individuen mehr in die Reproduktion und die Verteidigung gegen Herbivoren investieren. Somit würden weniger Ressourcen für Wachstum zur Verfügung stehen und das Wachstum weiblicher Individuen im Vergleich zu den männlichen verringert sein. Eine Hypothese, die von Herms & Mattson (1992) geteilt und von Obeso (2002) auf die Entwicklung von sexuellem Dimorphismus als evolutionärem Vorteil bei Pflanzen ausgeweitet wurde. Bei Ågren et al. (1999) wurde sich auf Studien gestützt, welche die Herbivorie und Fraßschäden an Weiden untersuchten (Danell et al., 1985) und die Attraktivität männlicher Individuen auf größere Mengen an Nährstoffen und niedrigere Mengen, zur Verteidigung genutzten Sekundärmetabolite zurückführten. Auch Boecklen et al. (1990) machten die Beobachtung größerer Herbivorie in männlichen Individuen von *Salix lasiolepis* BENTH. verbunden mit höheren Gehalten phenolischer Inhaltsstoffe in weiblichen Pflanzen. Weitere Untersuchungen finden sich zu diversen *Salix* Spezies (Elmqvist et al., 1991; Palo, 1984) mit zumeist ähnlichen Ergebnissen, wobei auch einige abweichende Ergebnisse für einige Spezies wie *Salix alba*, *purpurea* und *triandra* berichtet wurden (Palo, 1984; Thieme, 1965c).

Die höheren Gehalte von Phenolglykosiden in weiblichen Individuen erscheint plausibel, werden diese doch als Hauptabwehrmechanismus in *Salix* betrachtet (Boeckler et al., 2011). Diese Hypothese der „male-biased herbivory“ (männlich dominierten Herbivorie) wird in einer Übersichtsarbeit von Cornelissen & Stiling (2005) untermauert und war in den darauffolgenden Jahren noch mehrfach Gegenstand der Forschung. So wurden von Yang et al. (2020) signifikant höhere Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen in Blättern männlicher Individuen von *S. suchowensis* und *triandra* berichtet wohingegen die weiblichen Individuen deutlich stärker von Herbivoren befallen waren, ein Widerspruch zu den Thesen der „male-biased herbivory“. Keine Unterschiede in den Gesamtkonzentrationen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in *S. myrsinifolia* stellten Moritz et al. (2018) fest, jedoch Abweichungen

in der Zusammensetzung des Metaboloms. Zudem stellten sich gemischtgeschlechtliche Pflanzungen für Herbivoren attraktiver dar als geschlechterreine. An der gleichen Spezies wurden auch mit Versuchen im Gewächshaus (Nybakkens & Julkunen-Tiitto, 2013) sowie als Feldstudie gearbeitet (Nybakkens et al., 2012). Während im Gewächshaus die Zweige weiblicher Pflanzen höhere Phenolgehalte und, entgegen der Erwartungen, stärkeres Wachstum zeigten, waren die Gehalte an Phenolsäuren in den Blättern männlicher Individuen deutlich höher. In der Feldstudie von Nybakkens et al. (2012) zeigten die weiblichen Individuen ebenso höhere Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen, jedoch war das Wachstum im Vergleich zu den Männchen deutlich vermindert. Diese Unterschiede der Gehalte waren jedoch im Jahr 2009 nicht signifikant und insgesamt weniger stark ausgeprägt als bei den Gewächshausversuchen. Dies wurde einerseits auf die Verwendung von Stecklingen zurückgeführt, welche aufgrund des Alters keine Reproduktion durchliefen sowie auf die kontrollierten Wachstumsbedingungen mit vermindertem Witterungseinfluss (Nybakkens & Julkunen-Tiitto, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch die Beprobung von Individuen unterschiedlicher Geschlechter zum Teil über mehrere Jahre hinweg, und das Mitteln der Probenzeitpunkte die reellen Gegebenheiten möglichst realistisch darzustellen und dabei sowohl saisonale als auch individuelle Variabilität mit einzuschließen. Bei der Betrachtung von *S. caprea* zeigt sich ein mit den Beobachtungen von Thieme (1965c) kongruentes Bild. Für die weiblichen Individuen konnten signifikant höhere Gehalte von Salicylalkoholderivaten und Cumarylalkoholglykosiden nachgewiesen werden, welche Thieme als Phenolglykoside zusammenfasst. Weibliche Individuen zeigen auch bei Kaffeesäurederivate signifikant höhere Gehalte. Als einzige Flavonoidklasse mit signifikanten Unterschieden stechen Flavone heraus, welche von weiblichen Individuen ebenfalls in signifikant höherer Menge gebildet wurden. Vergleichbare Ergebnisse für *S. caprea* erhielt auch Hjältén (1992), der für weibliche Pflanzen höhere Gesamtphenol-, Phenolglykosid- und Gerbstoffgehalte bestimmte.

Für die untersuchten Individuen der Spezies *S. cinerea* zeigt sich ein ähnliches Bild. Die weiblichen Individuen weisen bei sieben der acht untersuchten phenolischen Strukturklassen höhere Mittelwerte auf. Allerdings sind nur die Unterschiede bei der Strukturklasse der Cumarylalkoholglykoside signifikant. Diese werden, wie bereits erwähnt, von Thieme mit der Gruppe der Salicylalkoholderivate als Phenolglykoside zusammengefasst. Thieme (1965b)

beschrieb in seiner Studie höhere Gehalte in weiblichen Individuen für ebendiese Gruppe von Sekundärmetaboliten.

Ein anderes Bild liefert die Betrachtung der in dieser Arbeit untersuchten Individuen der Spezies *S. daphnoides*. Hier zeigen die untersuchten männlichen Individuen für alle acht betrachteten phenolischen Inhaltsstoffgruppen im Mittel höhere Gehalte als das weibliche Individuum. Für Salicylalkoholderivate, Kaffeesäurederivate sowie Flavanone, Flavone und Flavonole konnten signifikante Unterschiede gezeigt werden. Allerdings muss die sehr geringe Stichprobenzahl einschränkend hervorgehoben werden. Die höheren Gehalte an Salicylalkoholderivaten decken sich mit den Beobachtungen von Wiesneth (2019) an den selben Individuen im Jahr 2016. Das weibliche Individuum zeigte bei Wiesneth (2019) höhere Gehalte innerhalb der Stoffgruppe der Phenylpropansäuren und für eine Sammelgruppe „Flavonoide/Chalkone“ vergleichbare Jahresverläufe auf ähnlichem Niveau. Bei der vorliegenden Studie wurden Unterschiede im Gehalt unabhängig vom Jahresverlauf betrachtet, um allgemeingültige Aussagen zu interindividuellen Unterschieden zu ermöglichen. Dies muss aber durch weitergehende Studien mit deutlich erhöhtem Stichprobenumfang abgesichert werden.

Die Individuen der Spezies *S. fragilis* zeigten in der vorliegenden Studie die geringsten intersexuellen Unterschiede. So konnte für keine der acht betrachteten phenolischen Inhaltsstoffgruppen ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Diese möglichen Unterschiede schienen also im Vergleich zu den saisonalen und intraindividuellen Schwankungen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Zur Unterscheidung der Geschlechter in *S. purpurea* könnte bevorzugt die Inhaltsstoffgruppe der Flavanone herangezogen werden, welche in der vorliegenden Studie signifikante Unterschiede zeigt. Der Gehalt an Falvan-3-olen ist in männlichen Individuen ebenfalls signifikant höher, allerdings liegen die Mittelwerde deutlich näher beieinander. Die übrigen Flavonoidklassen, sowie Kaffeesäurederivate und Cumarylalkoholglykoside weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Insgesamt liegen die mittleren Gehalte der männlichen Individuen bei sechs der acht erfassten Strukturklassen über dem der weiblichen Individuen. Die Salicylalkoholderivate jedoch zeigen sehr ähnliche Werte in beiden Geschlechtern. Dies bestätigt die Ergebnisse von Palo (1984) und Thieme (1965b) die für *S. purpurea* einen nahezu identischen Gehalt an Salicylalkoholderivaten, unabhängig vom Geschlecht, ermittelten.

Insgesamt zeigt sich in der Betrachtung der intersexuellen Variabilität für den Genus *Salix* ein komplexes Bild. Während in *S. caprea* und *S. cinerea* die Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen in weiblichen Individuen höher liegen, sind diese bei *S. daphnoides* und *S. purpurea* bei männlichen Individuen erhöht. Dies gilt aber nicht für alle untersuchten Klassen ohne Einschränkung. Zudem zeigten sich bei *S. fragilis* keine nachweisbaren intersexuellen Unterschiede. Somit kann mit den vorliegenden Daten die von Ågren et al. (1999) und Cornelissen & Stiling (2005) aufgestellte Hypothese, nach der weibliche Individuen mehr in die Verteidigung investieren und somit höhere Gehalte an phenolischen Sekundärmetaboliten aufweisen, nicht unterstützt werden. Die Allgemeingültigkeit dieser Hypothese wird in jüngerer Vergangenheit auch durch andere Arbeiten zunehmend in Frage gestellt; so beispielsweise in der Übersichtsarbeit von Sargent & McKeough (2022). Dort sind diverse Studien zu verschiedenen *Salix* Spezies zusammengefasst, welche ein Bias in beide Richtungen feststellen.

Vorteil der hier präsentierten Arbeit ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch die identischen Erntezeitpunkte, Standortbedingungen, Aufarbeitungsschritte und Reproduzierbarkeit der durchgeführten Analysen und Auswertungen. Abschließend muss festgehalten werden, dass die hier präsentierten Daten auf ein geschlechterabhängiges Bias in den einzelnen Arten hindeuten könnten. Allerdings kann keine allgemeingültige Aussage zu allen Arten des Genus *Salix* getroffen werden.

6.4.3. Chemotaxonomischer Vergleich der Spezies im Genus *Salix*

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es unter anderem, mit den zur Verfügung stehenden Methoden eine chemotaxonomische Einteilung der untersuchten Weiden vorzunehmen und diese gegen bestehende taxonomische Arbeiten beispielsweise von Skvortsov & Zinovjev (1999) abzulegen. Vertreten sind der Subgenus *Salix* mit den Sektionen *Salix* (*S. fragilis*) und *Subalbae* (*S. x sepulcralis*) sowie der Subgenus *Vetrix* mit den Sektionen *Hastatae* (*S. hastata*), *Vetrix* (*S. aurita*, *caprea*, *cinerea* und *purpurea*), *Abruscella* (*S. viminalis*), *Villosae* (*S. lappunum*), *Daphnella* (*S. daphnoides*) und *Helix* (*S. caesia*). Eine Übersicht der Beziehungen vertretener Spezies und deren Einteilung in Subgenera und Sektionen findet sich in **Abbildung 1** (S. 16).

6.4.3.1. Modifizierte Gerbstoffbestimmung: Gesamtphenole und Gerbstoffe

Die durchgeführte Gerbstoffbestimmung, eine Abwandlung der Arzneibuchmethode Ph. Eur. 2.8.14 nach Wiesneth & Jürgenliemk (2017), erlaubte dabei die Erfassung von Gesamtphenolen und Restphenolen. Die Menge an mit Haupulver präzipitierbaren Gerbstoffen wurde als Differenz der beiden Werte, berechnet als Catechin, bestimmt. Auch Thieme (1968) wählte eine Bestimmung mittels Hautpulverfällung, berichtete allerding nur die bestimmten Maximalwerte der Gesamtphenole in den betrachteten Weiden. Trotz der unterschiedlichen Methodik ähneln sich die relativen Ergebnisse der untersuchten Arten. *S. caprea* und *S. aurita* zeigen deutlich höhere Gehalte an Gerbstoffen im Vergleich zu *S. fragilis* und *purpurea*. *S. cinerea* zeigte bei Thieme einen maximalen Gehalt ähnlich zu *S. purpurea*, während in der vorliegenden Arbeit im Mittel deutlich höhere Werte erreicht wurden. In der vorliegenden Studie sind drei Sektionen von *Salix* mit mehreren Individuen vertreten (vgl. 6.2.2.2, S. 148). Durch die Auftragung von Gerbstoffen und Restphenolen sowie der anteiligen Verteilung konnte ein deutlicher Unterschied zwischen der Sektionen *Vetrix* und *Helix* nachgewiesen werden. Hierbei überwiegen in den Individuen der Sektion *Vetrix* die Gerbstoffe gegenüber den Restphenolen deutlich, während die Individuen der Sektion *Helix* ein ausgewogenes Verhältnis beider Inhaltsstoffklassen zeigen. Die Vertreter der Sektion *Salix* weisen eine Verteilung auf, welche zwischen den beiden erstgenannten Sektionen liegt. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Untersuchungen, welche für *S. purpurea* (Sektion *Vetrix*) niedrige Gehalte an Gerbstoffen, aber hohe Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen beschrieben (Wiesneth et al., 2018). Julkunen-Tiitto (1986) untersuchte die Blattdrogen von 15 Spezies mit verschiedenen, nasschemischen Methoden, um die Gesamtphenole und

Gerbstoffe zu erfassen (Hagerman & Butler, 1994; Julkunen-Tiitto, 1985a). Dabei zeigten *S. aurita*, *caprea* (beide Sektion *Vetrix*) und *S. lapponum* (Sektion *Villosae*) untereinander ähnliche Konzentrationen an Gesamtphenolen und Gerbstoffen sowie vergleichbare Verhältnisse zueinander. Die Gehalte in *S. fragilis* (Subgenus *Salix*, Sektion *Salix*) waren, Phenole und Gerbstoffe betreffend, deutlich geringer. Diese Beobachtung deckt sich mit der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchung, nach der *S. aurita*, *lapponum* und *caprea* eine deutliche Ähnlichkeit im Verhältnis von Restphenolen zu Gerbstoffen aufweisen. Die direkte Vergleichbarkeit der einzelnen Werte mit Literaturdaten ist aufgrund der unterschiedlichen Methodiken und Gewebe allerdings eingeschränkt.

6.4.3.2. UPLC®-FLR Screening: Proanthocyanidine

Die Proanthocyanidine wurden in der Vergangenheit zumeist mit Hilfe von Konventionalmethoden bestimmt (Julkunen-Tiitto, 1985a, 1986; Nyman & Julkunen-Tiitto, 2005; Thieme, 1968). Die Untersuchung mittels HPTLC (Pobłocka-Olech & Krauze-Baranowska, 2008) und HPLC (Esatbeyoglu et al., 2010) erlaubten aber im Gegensatz zu Konventionalmethoden die direkte Bestimmung mono- und dimerer Favan-3-ole und den Vergleich verschiedener *Salix* Spezies auf dieser Ebene. Mit der Entwicklung einer UPLC®-Methode zur detaillierten Untersuchung von PAs auf Grundlage des Polymerisierungsgrads durch Clustering und Auf trennung nach Molekülgröße (Hellenbrand et al., 2015b), wurde bisher unerreichter Detailgrad der erhobenen Daten möglich. Eine Untersuchung und Gegenüberstellung verschiedener Spezies der Gattung *Salix* stellten Wiesneth et al. (2018) an. Dabei wurden Unterschiede in der präferierten Kettenlänge festgestellt. So beschrieben Wiesneth et al. für *S. caprea* eine deutliche Dominanz oligomerer PAs, bei zugleich hohen Gesamtgehalten. Ebenso hohe Gehalte zeigte *S. daphnoides*, mit einer leichten Bevorzugung oligomerer gegenüber polymerer PAs. Dies wurde für die Rindendroge aller untersuchten Spezies, mit Ausnahmen einzelner Probenzeitpunkte festgestellt. In der Vorliegenden Studie können diese Ergebnisse bestätigt, erweitert und präzisiert werden. Das PA-Muster von *S. caprea* (Sektion *Vetrix*) wird extrem von di- und trimeren PAs dominiert, während polymere PAs eine sehr untergeordnete Rolle spielen. *S. aurita* (ebenfalls Sektion *Vetrix*) und *S. hastata* (Sektion *Hastatae*), zeigen wie *S. caprea* höhere Gehalte an niederpolymerisierten oligomeren PAs als die restlichen in dieser Studie eingeschlossenen Spezies. Das Inhaltsstoffspektrum von *S. hastata* ist aber gleichermaßen von hohen Gehalten polymerer PAs geprägt. *S. cinerea* als vierte vertretene Spezies der Sektion *Vetrix* weicht dabei von den vorgenannten Vertretern ab,

und zeigt deutlich niedrigere Gehalte an oligomeren PAs. Auch in der Sektion *Helix* treten deutliche Unterschiede auf: Während *S. caesia* im Vergleich zu den anderen Arten höhere Gehalte an polymeren PAs zeigt und das PA-Muster von diesen dominiert wird, zeigt *S. purpurea* keine deutliche Präferenz und generell relativ niedrige Gehalte an Gerbstoffen. Das Muster bei *S. bicolor* und *lapponum* ist ähnlich mit hohen Gehalten an „höherpolymerisierten“ oligomeren PAs (DP 04 bis DP 06) aber vergleichsweise niedrigem Gehalt an polymeren PAs. Der Subgenus *Vetrix* nach Skvortsov & Zinovjev (1999), welcher die vertretenen Sektionen *Hastatae* (*S. hastata*), *Vetrix* (*S. aurita*, *caprea*, *cinerea*, *purpurea*), *Abruscella* (*S. bicolor*), *Vimen* (*S. viminalis*), *Villosae* (*S. lapponum*), *Daphnella* (*S. daphnoides*) und *Helix* (*S. caesia*) umfasst, zeigt hier eine große Vielfalt an PA-Mustern in der Rindendroge *Salicis cortex*. Die Arten *S. fragilis* (Sektion *Salix*) und *S. x sepulcralis* (Sektion *Subalbae*) als Vertreter des Subgenus *Salix*, ergaben bei der Hauptkomponentenanalyse nahe aneinander liegende Datenpunkte. Zudem sind diese in geringer euklidischer Distanz zu den Datenpunkten der Spezies *S. purpurea*, *cinerea* und *daphnoides* und weisen somit ein ähnliches Muster im Polymerisierungsgrad der Proanthocyanidine auf (vgl. **Abbildung 105**, S. 225). Daraus folgt, dass die Variabilität innerhalb der Sektion *Vetrix* deutlich größer ist als die zwischen Sektionen *Salix*, *Subalbae*, *Abruscella*, *Vimen*, *Villosae* und *Daphnella* (vgl. **Abbildung 1**, S. 16). Eine deutliche Abgrenzung gelingt bei einzelnen Arten, wie *S. caesia*, *hastata* und *caprea*. Allerdings kann die Einteilung der Spezies in Subgenera und Sektionen nach Skvortsov & Zinovjev (1999) anhand der erhobenen Daten zum Proanthocyanidingehalt und Polymerisierungsmuster nicht bestätigt werden sondern muss vielmehr in Frage gestellt werden.

6.4.3.3. UPLC®-RP18-PDA Screening: phenolische Inhaltsstoffe

Die HPLC-Analytik der phenolischen Inhaltsstoffe im Genus *Salix* fokussierte sich in Vergangenheit hauptsächlich auf die Salicylalkoholderivate (Julkunen-Tiitto, 1985a, 1989; Kenstavičiūtė et al., 2009; Meier et al., 1986, 1988; Pobłocka-Olech et al., 2007; Rehwald et al., 1994). Weitere Studien befassten sich mit den in *Salix* enthaltenen Flavonoiden und Proanthocyanidinen, welche nach Nahrstedt et al. (2007) einen Beitrag zur Wirksamkeit des Weidenrindenextrakts liefern können. Beispiele für die Anwendung von HPTLC finden sich bei Pobłocka-Olech & Krauze-Baranowska (2008). Flavonoide per HPLC untersuchten beispielsweise Freischmidt et al. (2015) während sich die HPLC/UHPLC-Analytik auch für die Analyse von Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen als nützlich erwies (Esatbeyoglu et al., 2010, 2014; Wiesneth et al., 2018).

Durch den Einsatz von massenspektrometrischen Detektoren konnte das Wissen über Extrakte mit Information über die enthaltenen Einzelstrukturen ergänzt werden. Beispiele finden sich hierzu bei Förster et al. (2008), Kammerer et al. (2005) und Köhler et al. (2023).

In der vorliegenden Studie wurde versucht, mit einer einfachen und kostengünstigen reversed Phase UPLC®-Methode (Wiesneth, 2019) verschiedene Strukturklassen gleichzeitig zu erfassen und chemotaxonomische Zusammenhänge der untersuchten Spezies festzustellen. Einen ähnlichen Ansatz wählten Nyman & Julkunen-Tiitto (2005) in ihrer HPLC-DAD-Analytik. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Gesamtbestimmung aller Verbindungen einer Strukturklasse versucht, die Variabilität von Einzelsubstanzen wie sie bei Förster et al. (2008) beobachtet werden konnten, zu umgehen. Zudem sollten mehrere Erntezeitpunkte einbezogen werden, um auch die saisonale Variabilität abzubilden. In Kapitel 6.3.1.3 (S. 174) konnte mit Hilfe von Boxplots gezeigt werden, dass die einzelnen Individuen in bestimmten Strukturklassen deutliche saisonale Schwankungen aufweisen. Ebenso konnten intraspezifische Variabilitäten dargestellt werden. Trotzdem sind deutliche Unterschiede zwischen den mehrfach vertretenen Spezies zu erkennen. Während *S. caprea* die höchsten Flavan-3-ol Anteile aufweist und das Chromatogramm des methanolischen Extraks von dieser Inhaltsstoffgruppe dominiert wird, ist *S. cinerea* von auffällig hohen Anteilen an Cumarylalkoholglykosiden und Flavanonolen geprägt. Die im Arzneibuch genannten Arten *S. daphnoides*, *fragilis* und *purpurea* ("Weidenrinde Salicis Cortex," 2020; Wichtl et al., 2015) zeigten in der vorliegenden Studie die höchsten Gehalte an Salicylalkoholderivaten und Kaffeesäurederivaten, mit jedoch zum Teil beachtlicher intraspezifischer und saisonaler Variabilität. *S. purpurea* enthält zusätzlich auffällig hohe Anteile an Flavanonen und Flavanonole im Extrakt. Die Gehalte der untersuchten Strukturklassen schwanken generell während der Saison innerhalb eines Individuums sehr stark. Besonders ausgeprägte Schwankungen sind bei den Salicylalkoholderivaten und Kaffeesäurederivaten zu beobachten. Außerdem variieren die Gehalte von Cumarylalkoholglykosiden, Flavanonen und Flavanonolen besonders stark. Diese Strukturklassen sind in einzelnen Individuen zum Teil innerhalb einer Saison mit extrem hohen Gehalten und nur in Spuren bestimmt worden. Trotz starker interspezifischer Unterschiede ist die intraindividuelle und saisonale Variabilität bei den Flavan-3-olen deutlich geringer und lässt so eine deutliche Abgrenzung einzelner Spezies zu.

Diese hohe Variabilität erschwert eine Unterscheidung bzw. Charakterisierung der einzelnen Spezies, wenn nur wenige Zeitpunkte beprobt werden und der saisonale Verlauf nicht berücksichtigt wird. Dies könnte bei der Betrachtung einzelner Erntezeitpunkte zu Fehlinterpretationen führen. Andererseits geht ein Mitteln der erhobenen Einzelwerte, wie in der vorliegenden Studie, mit starken Schwankungen und großen Streuungen einher. Eine Charakterisierung der Extrakte anhand der untersuchten phenolischen Inhaltstoffgruppen war im Rahmen dieser Studie dennoch möglich. In Kapitel 6.3.3.3.1 (S. 230) wurden Radarplots präsentiert, welche eine erste chemotaxonomische Einteilung in Gruppen anhand der vorliegenden Formen andeuten. Ähnlichkeiten in der Extraktzusammensetzung zeigen sich bei einigen Vertretern des Subgenus *Vetrix* (*S. cinerea* und *viminalis*), obwohl sie unterschiedlichen Sektionen, *Vetrix* bzw. *Vimen*, angehören (nach Skvortsov & Zinovjev, 1999). Andere Vertreter der Sektion *Vetrix* zeigen starke Abweichungen zu *S. cinerea* und sind von Flavan-3-olen (*S. caprea*) oder Kombinationen mit Kaffeesäurederivaten (*S. hastata*) und Cumarylalkoholglykosiden (*S. aurita*) geprägt. Diese sehr unterschiedliche Zusammensetzung der Extrakte ist schon bei der Betrachtung ganzer Stoffgruppen offensichtlich und wird noch deutlicher, wenn die Betrachtung auf die Stufe der Einzelsubstanzen gehoben wird, wie bei Förster et al. (2021) oder Köhler et al. (2023). Vor dem Hintergrund dieser ausgeprägten Schwankungen müssen die Aussagen, dass phenolische Inhaltsstoffe zur Wirksamkeit beitragen können (Nahrstedt et al., 2007) und dass diese, im Vergleich zu den Salicylalkoholen, nur einen untergeordneten Beitrag leisten (Antoniadou et al., 2021) neu beleuchtet und bewertet werden. Die Züchtung leistungsfähiger und optimierter Kreuzungen (Förster et al., 2021) könnte sich in Zukunft nicht nur auf die Maximierung des Salicylalkoholgehalts beschränken. Die hier durchgeführte Charakterisierung der Extrakte könnte ein Schritt hin zur Entwicklung von wirksameren Mischextrakten mit abgestimmter Zusammensetzung sein. Diese könnten rational begründete Mischungen von Einzelextrakten sein und ähnlich dem Verschneiden bei der Herstellung von Wein-Cuvées entstehen. Dazu muss allerdings der Fokus bei pharmakologischen Studien auch auf weitere phenolische Strukturklassen ausgeweitet werden und diese Erkenntnisse dann mit Daten aus Chemoprofiling (Förster et al., 2021) und der Analyse auf Einzelsubstanzebene zusammengeführt werden. Eine absolute Aussage über die Eignung einer bestimmten Spezies ist durch die vorgestellte intra- und interspezifische Variabilität nur schwer zu treffen.

Trotz dieser Variabilität konnte in Kapitel 6.3.3.3.2 (S. 233ff) eine chemotaxonomische Betrachtung durchgeführt werden. Die in der Studie inkludierten Spezies wurden anhand vegetativer Merkmale bestimmt (Aas, 2017) und nach der Einteilung von Skvortsov & Zinovjev (1999) behandelt. Die verwandtschaftlichen Beziehungen der Spezies in der Gattung *Salix* sind Gegenstand aktueller Forschung, welche zunehmend auch auf genetische Analysen setzt (N. D. Wagner, 2018; N. D. Wagner et al., 2020; Wu et al., 2015). Die chemotaxonomische Betrachtung wurde mithilfe des DBSCAN Clusterings durchgeführt, welches Daten zu Gehalten phenolischer Stoffgruppen einbezieht (6.2.7, S. 159). Die Methodik ähnelt der von Nyman & Julkunen-Tiitto (2005). Dort wurde das Clustering von sechs *Salix* Spezies anhand der in Blättern bestimmten Konzentrationen von Einzelsubstanzen durchgeführt. Dabei ergeben sich bei Nyman & Julkunen-Tiitto Widersprüche zu der Einteilung von Skvortsov & Zinovjev, allerdings mit dem Hinweis, dass Chemoprofile generell zu anderen Ergebnissen als phylogenetische Untersuchungen führen können (Nyman & Julkunen-Tiitto, 2005). In diesem Zusammenhang sei unter anderem auf die Arbeit von Wink (2003) hingewiesen, welcher für die chemischen Merkmale ebenso eine Interpretation fordert, wie dies für die traditionellen morphologischen Merkmale etabliert ist. Dieser Idee folgend sind beide Einteilungen als komplementär zu betrachten und können zusätzlich durch genetische Untersuchungen ergänzt und abgesichert werden.

Die chemotaxonomische Betrachtung aus den Kapiteln 6.3.3.3.2 (S. 233ff) ergab mittels PCA und DBSCAN Clustering eine Einteilung der untersuchten Spezies in acht Cluster, wobei drei große Cluster die Verteilung prägen. Zum einen stellen die Individuen der Spezies *S. caprea* (Subgenus *Vetrix*, Sektion *Vetrix*) einen eigenen Cluster dar, der vom Flavan-3-ol-Gehalt geprägt ist und sich am stärksten von den restlichen eingeschlossenen Spezies abgrenzt.

Der zweite Cluster umfasst fast ausschließlich Spezies des Subgenus *Vetrix*, darunter weite Teile der Spezies *S. aurita* (Sekt. *Vetrix*), *bicolor* (Sekt. *Abruscella*), *cinerea* (Sekt. *Vetrix*), *lapponum* (Sekt. *Villosae*) und *viminalis* (Sekt. *Vimen*). Diese können als Cumarylalkoholglykosid- und flavanonolreiche Spezies beschrieben werden.

Der dritte Cluster umfasst zum Großteil die Spezies des Subgenus *Salix* (*S. fragilis* aus der Sektion *Salix* und *x sepulcralis* aus der Sektion *Subalbae*) sowie einige Spezies des Subgenus *Vetrix*: *S. caesia* und *purpurea* (beide Sekt. *Helix*), *S. hastata* (Sekt. *Hastatae*) sowie *S. daphnoides* (Sekt. *Daphnella*). Dieser Cluster umfasst die Spezies, deren Extrakt von Kaffeesäurederivaten

und Flavanonen geprägt ist. Dabei stellen die Ergebnisse von *S. caprea* (Flavan-3-ole), *S. bicolor* (Cumarylalkoholglykoside) und *S. purpurea* (Flavanone) jeweils die extremen Ausprägungen der drei Cluster dar.

Zusammenfassend ist also die Ähnlichkeit der Vertreter des Subgenus *Salix* mit den Individuen der Sektionen *Helix*, *Hastatae* und *Daphnella* auffällig. Diese müssten nach den vorliegenden Ergebnissen in der Sektionsübersicht näher zueinander gerückt werden und ggf. auch in einem Subgenus zusammengefasst werden. Auch innerhalb der Sektion *Vetrix*, der ein Großteil der untersuchten Spezies angehört, sind Abweichungen des phylogenetischen Stammbaums nach Skvortsov & Zinovjev (1999) zu den erhaltenen chemotaxonomischen Daten vorhanden. Nach den vorliegenden Ergebnissen besteht eine eben genannte Ähnlichkeit von *S. hastata* zu Teilen der Sektion *Salix* und anderen Sektionen des Subgenus *Vetrix*. Zudem müsste *S. caprea* ausgegliedert werden, da diese die einzige deutlich abgrenzbare Spezies in der vorliegenden Studie darstellt. Ob eine Einteilung in eine eigene Sektion angemessen wäre, sollte das Ziel weiterer Untersuchungen und Studien sein.

Einen übergeordneten Blick auf die Zusammenhänge zwischen den untersuchten Arten erlaubt die Anwendung des hierarchischen Clusters (Abschnitt 6.3.3.3.2, S. 233ff). Um die Daten für die Erstellung der Heatmap und des Dendrogramms um die individuelle Variabilität zu vereinfachen, wurden die Werte auf Ebene der Spezies gemittelt. Das Dendrogramm, welches die Ergebnisse des UPLC®-Screenings darstellt bietet sich für eine Gegenüberstellung mit den postulierten Verwandtschaften nach Skvortsov & Zinovjev (1999) an. Diese Gegenüberstellung wird in **Abbildung 113** präsentiert. Dazu wurden die Sektionen von Skvortsov und Zinovjev um nicht vertretene Sektionen gekürzt und durch Anpassung der Reihenfolge (abweichend von der Nummerierung nach Skvortsov) mit dem in Abschnitt 6.3.3.3.2 vorgestellten Dendrogramm (**Abbildung 111**, S. 239) in größtmögliche Übereinstimmung gebracht.

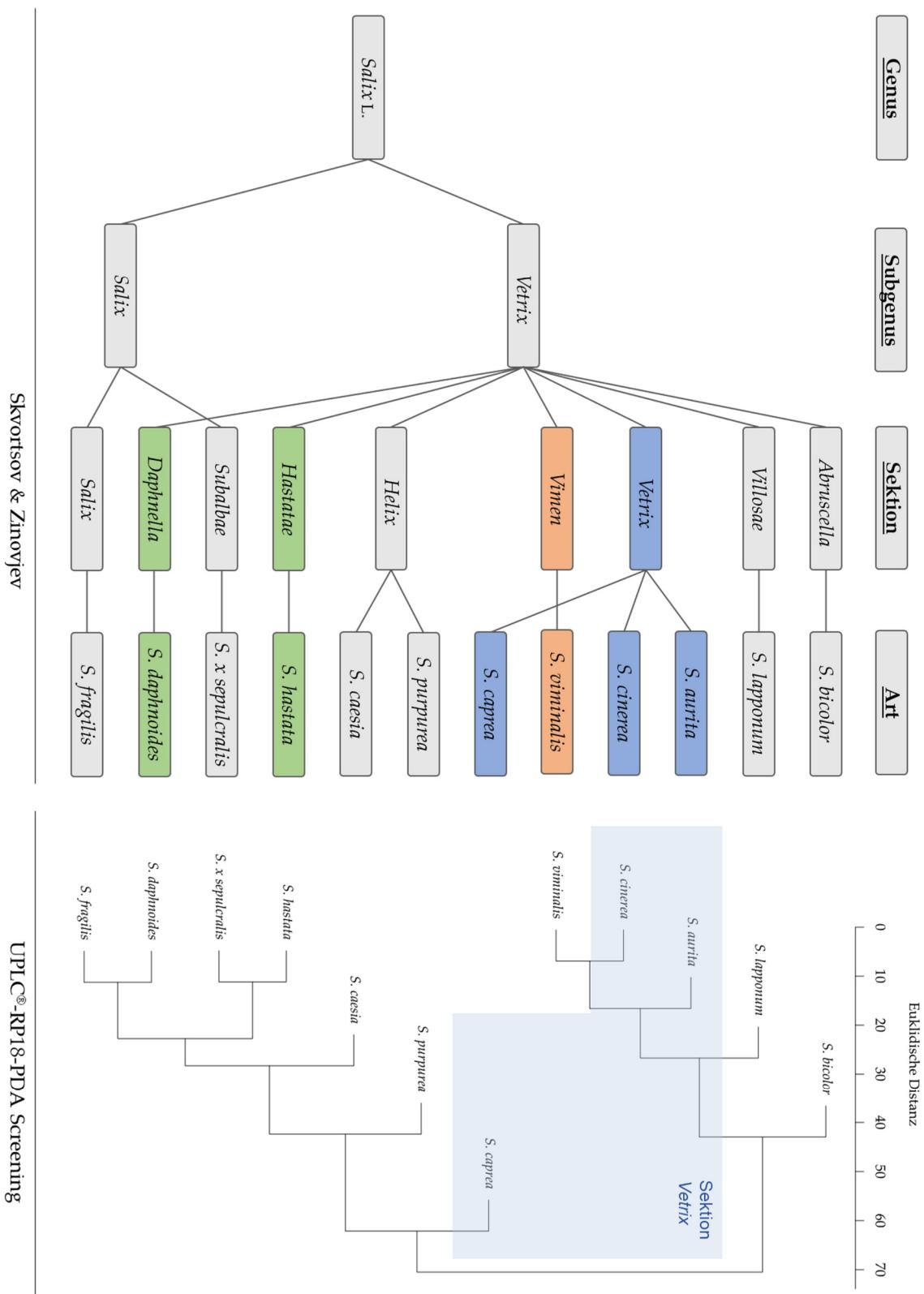


Abbildung 113: Gegenüberstellung der taxonomischen Einteilung der vertretenen *Salix* Spezies anhand morphologischer Merkmale (nach Skvortsov & Zinovjev, 1999) und dem Dendrogramm nach hierarchischen Clustering (euklidische Distanz) der Ergebnisse des UPLC®-RP18-PDA-Screenings (6.3.3.3.2, S. 233ff); die Reihenfolge der Sektionen nach Skvortsov und Zinovjev wurden angepasst, um eine größtmögliche Übereinstimmung zu erzielen; aufgrund der beobachteten Unterschiede sind die Sektionen *Vimen*, *Vetrix*, *Hastatae* und *Daphnella* im Stammbaum nach Skvortsov & Zinovjev farblich markiert, zudem sind die Spezies der Sektion *Vetrix* im Dendrogramm mit einem blauen Kasten umzeichnet

Bei der Betrachtung sticht die besondere Stellung von *S. viminalis* heraus, welche von den Spezies der Sektion *Vetrix* umschlossen wird. Die Sektion *Vetrix* mit ihren drei umfassten Spezies zeigt eine große Varianz, welche sich durch die große euklidische Distanz bis zum Zusammenführen der jeweiligen Datenpunkte und die Aufteilung auf die beiden großen Äste des Dendrogramms äußert. Dies wirft die Frage auf, ob eine Ausgliederung von *S. caprea* aus der Sektion *Vetrix* nicht sinnvoll erscheint. Wie schon beim DBSCAN-Clustering gezeigt, ist das phenolische Profil von *S. caprea* stark unterschiedlich von allen anderen vertretenen Spezies, sodass auch eine Isolierung dieser Spezies legitim erscheint. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Wiesneth (2019), der für diese beiden Arten auch eine Dominanz der Flavan-3-ole (*S. caprea*) beziehungsweise hohe Gehalte an Flavanonen nachweisen konnte. In der vorliegenden Studie nehmen auch die Spezies *S. hastata* und *daphnoides* eine besondere Stellung ein, welche sich jeweils durch eine große Übereinstimmung mit den Spezies *S. x sepulcralis* beziehungsweise *S. fragilis* (beide Subgenus *Salix*) auszeichnet. Die vorliegende Untersuchung könnte als Grundlage dienen, die Sektionen *Hastatae* und *Daphnella* aus dem Subgenus *Vetrix* in den Subgenus *Salix* umzugruppieren. Diese Ergebnisse können allerdings aufgrund der geringen Anzahl von Proben und der Unvollständigkeit der vertretenen Sektionen (und Spezies) nur einen Ausschnitt des Genus *Salix* beleuchten. Zukünftige genetische Untersuchungen müssen zusammen mit chemotaxonomischen Betrachtungen die morphologische Einteilung der *Salix* Spezies ergänzen, um ein umfassendes Bild der verwandtschaftlichen Beziehungen zu erhalten. Für die Nutzung als Arzneidroge sind diese chemotaxonomischen Erkenntnisse sogar von größerer Bedeutung, da sie mögliche Stammpflanzen für Drogenmaterial mit bestimmten Charakteristiken aufzeigen können.

Das hierarchische Clustering lässt sich auch durch Umkehr der Variablen auf die untersuchten phenolischen Strukturklassen anwenden. Dabei konnte eine Einteilung in vier Gruppen vorgenommen werden. Eine herausragende Stellung haben hier die Flavan-3-ole, welche im Probenset weit verbreitet und in allen Spezies nachweisbar sind (vgl. **Tabelle 72**, S. 315). Zum Teil machen diese sehr hohe Anteile des Extrakts aus und begründen so auch die besondere Stellung der *S. caprea* in dieser Studie. Salicylalkoholderivate stellen im Vergleich zu den Flavan-3-olen nur einen geringen Anteil an der chromatographischen Gesamtfläche dar, was jedoch bei der gewählten Methodik im Vergleich höheren absoluten Gehalten entspricht (vgl. **Tabelle 72**, S. 315 und **Tabelle 77**, S. 320). Salicylalkoholderivate sind jedoch unspezifischer auf das vorliegende Probenset verteilt und nur einzelne Spezies (bspw.

S. caesia) weisen außergewöhnliche Anteile auf. Flavone und Flavonole sind in allen untersuchten Spezies nur in geringem Ausmaß im Extrakt vertreten. Es scheint, als würden Flavonoidklassen mit hydrierter 2,3-Position im C-Ring in höherem Ausmaß von den Pflanzen gebildet. Ob diese an einer verminderten Aktivität der Flavonolsynthase oder einer stark ausgeprägten Aktivität der Dihydroflavonol-4-reduktase, als Beginn der Proanthocyanidinbildung in Zusammenhang steht, kann anhand der vorliegenden Studie nicht geklärt werden. Besonders bemerkenswert ist die Korrelation von Flavanonen und Kaffeesäurederivaten auf der einen und Flavanonolen und Cumarylalkoholglykosiden auf der anderen Seite. Dabei sind Flavonoidstrukturen mit einer Hydroxygruppe in Position 3 mit Phenylpropanoiden, welche eine endständige Alkoholgruppe aufweisen, vergesellschaftet. Das Vorkommen dieser 3-Phenylpropanolderivate ist für Weiden bekannt (Thieme, 1963b, 1964d) und sie wurden bereits in verschiedenen Spezies nachgewiesen (Julkunen-Tiitto, 1985b). Im Rahmen dieser Arbeit konnten sie auch aus *Salix cinerea* isoliert werden (vgl. 3.5.2.1/3.5.2.2, S. 59-61). Diese Glykoside können als Speicherform und Grundstock für weitere Biosynthesen im Sekundärstoffwechsel der Weiden dienen. Diese Art der Speicherung in der Vakuole wurde für die strukturell ähnlichen Monolignole, ebenfalls 3-Phenylpropandglykoside, postuliert (Petersen et al., 2010) und wäre für Substanzen wie Vimalin und Triandrin ebenfalls denkbar. Diese Phenylpropanoide könnten durch einfache Umsetzungsprozesse wie Glykosidabspaltung und Oxidation in Ausgangsstoffe für die Synthese von Salicylalkoholderivaten umgewandelt werden. Babst et al. (2010) und Zenk (1967) konnten zeigen, dass Zimtsäurederivaten eine herausragende Rolle als Ausgangsstoffe in der Salicylatsynthese zukommt. Deren Rolle bei der Verteidigung der Pflanze gegen Fraßfeinde (Boeckler et al., 2011; Tahvanainen et al., 1985) macht eine schnelle Bereitstellung erforderlich und eine Speicherung in größeren Mengen plausibel. Aber auch das Einschleusen in den Ligninstoffwechsel bei der Verholzung der diesjährigen Triebe dürfte ein möglicher Stoffwechselweg für diese Substanzen sein. Der Grund für die Vergesellschaftung von Flavanonolen und Cumarylalkoholglykosiden könnte das Vorhandensein leicht zugänglicher und für Derivatisierung geeigneter Hydroxygruppen sein. In 3-Position glykosiderte Flavonoide wurden in großer Vielfalt aus verschiedenen *Salix* Spezies isoliert und nachgewiesen (vgl. Tawfeek et al. 2021) und stellen eine weit verbreitete Strukturklasse dar. Die Position 3 ist dabei die präferierte Positionen für eine Glykosidierung (Simpson & Beton, n.d.; H. Wagner, 1974). Ob dieser Zusammenhang aufgrund einer generell gesteigerten

Aktivität glykosidierender Enzyme besteht, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nur vermuten. Eine Folge dieser Glykosidierung könnte eine gesteigerte Speicherung und damit Entzug dieser Substanzen aus dem Stoffwechsel sein. Die Zucker könnten eine Steigerung der Hydrophilie bewirken und auch als eine Art „Schutzgruppe“ dienen. Diesen beiden Strukturklassen (Cumarylalkoholglykoside und Flavanonole) stehen nach dem Hierarchischen Clustering des vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Screenings Kaffeesäurederivate und Flavanone gegenüber, welche keine Hydroxygruppe in endständiger Position bzw. in 3-Position des Flavonoidgrundgerüsts aufweisen. Ein anderer Mechanismus des Transports und der Speicherung dieser Verbindungen aufgrund anderer Stoffcharakteristiken ist wahrscheinlich. Ob diese Korrelation in einer unterschiedlichen Enzymausstattung oder einer epigenetisch unterschiedlichen Aktivierung in den verschiedenen *Salix* Spezies begründet ist und somit in einem Kausalzusammenhang steht, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Allerdings scheint es, dass diese Strukturklassen eine der Variablen zur Abgrenzung der hier untersuchten Spezies darstellen. Der Subgenus *Salix* (mit den Sektion *Subalbae* und *Salix*) zusammen mit den nahestehenden Sektionen des Subgenus *Vetrix* können als Kaffeesäurederivate und Flavanone präferierend auf der einen Seite den Sektionen des Subgenus *Vetrix* auf der anderen Seite gegenübergestellt werden, welche verstärkt Flavanonole und Cumarylalkoholglykoside bilden. Zu dieser zweiten Gruppe zählen *Abruscella*, *Villosae*, *Vimen* und Teile der Sektion *Vetrix*. Die an der Biosynthese dieser Sekundärmetabolite beteiligten Enzyme könnten ein Ziel von weitergehenden genetischen Untersuchungen zur Unterscheidung der Spezies und der Klärung verwandtschaftlicher Verhältnisse im Genus *Salix* sein. Gegebenenfalls könnten zukünftige Studien dadurch auch einen Blick auf die evolutionäre Entwicklung der Weiden eröffnen.

6.5.Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedenen Betrachtungen zur saisonalen Variabilität und geschlechterspezifischen Variabilität sowie interspezialer Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Sekundärmetaboliten in 12 Spezies der Gattung *Salix* angestellt werden. Der interspezialle Vergleich der untersuchten Weidenarten wurde zudem in einer chemotaxonomischen Betrachtung etablierten Taxonomien der Gattung *Salix* gegenübergestellt.

Die saisonale Entwicklung von Gesamtphenolen und Restphenolen konnte mit Hilfe der modifizierten Hautpulvermethode Ph. Eur. 2.4.18 nach Wiesneth & Jürgenliemk (2017) (vgl. 6.3.1.1, S. 164) verfolgt werden. Es offenbarte sich ein saisonaler Anstieg der Gesamtphenole im Laufe der Wachstumsperiode mit einem Maximum im Hochsommer und anschließendem leichten Abfall zum Ende der Wachstumssaison. Dieser Anstieg liegt in einer Zunahme der Gerbstoffe begründet, welche im vorliegenden Probenset den größten Anteil der phenolischen Inhaltstoffe darstellen. Die Gehalte der Restphenole steigen ebenfalls, anteilig sogar stärker als die Gerbstoffe. Jedoch bleiben die Gerbstoffe mit einem Anteil von etwa zwei Dritteln bis drei Vierteln die dominierende Inhaltstoffgruppe.

Eine Analyse des Extrakts mittels UPLC®-DIOL-FLR ermöglichte eine detaillierte Untersuchung der Proanthocyanidine (kondensierte Gerbstoffe) und des Polymerisierungsmusters dieser Stoffklasse (Kapitel 6.3.1.2, S. 168ff.). Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen mit zunehmendem Polymerisierungsgrad abnehmen. Eine Ausnahme stellt die Sammelgruppe der polymeren Proanthocyanidine (pPAs) dar, welche einen großen Teil der PAs ausmacht. Die saisonale Entwicklung unterscheidet sich zwischen oligomeren PAs (oPAs) und pPAs, wobei eine Abgrenzung bei einem Polymerisierungsgrad von ca. neun bis zehn getroffen werden kann. Die Gehalte der oPAs weisen deutliche Zuwächse im Laufe des Sommers mit Maximalwerten im Hochsommer und anschließendem, leichtem Rückgang zum Ende der Wachstumssaison auf. Die pPAs verhielten sich gegensätzlich, mit höchsten Gehalten im Frühsommer und anschließender stetiger Abnahme zum Ende des Beobachtungszeitraums hin. Die spiegelbildliche Entwicklung von oPAs und pPAs deutet auf ein Fließgleichgewicht innerhalb dieser Stoffgruppe hin.

Deutlich diverser stellten sich die saisonalen Verläufe der im Rahmen des UPLC®-RP18-PDA Screenings untersuchten phenolischen Inhaltstoffe dar. Dabei konnten große saisonale Schwankungen und verschiedene Muster festgestellt werden. Diese Muster wiederholten sich

in aufeinander folgenden Wachstumsperioden nur teilweise und konnten verschiedenen typischen Verlaufsformen wie Stressreaktionen oder Akkumulation zum Saisonende zugeordnet werden. Auch waren deutliche individuelle Unterschiede innerhalb einzelner Spezies zu beobachten.

Diese Unterschiede innerhalb einzelner Spezies können auch auf dem Geschlecht der betrachteten Individuen beruhen. Die geschlechterspezifische Betrachtung der mehrfach vertretenen Spezies des Salix Screenings konnte Unterschiede bei einigen Spezies nachweisen. Dabei weisen weibliche Vertreter von *S. caprea* und *S. cinerea* z.T. signifikant höhere Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe auf, während dies bei *S. daphnoides* und *S. purpurea* umgekehrt ist. Die Individuen der Spezies *S. fragilis* zeigten bei keiner der untersuchten Strukturklassen einen signifikanten Unterschied. Die Idee einer „male-biased herbivory“, nach der weibliche Individuen mehr Ressourcen in die Verteidigung investieren und somit höhere Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen bilden, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht unterstützt werden. Vielmehr scheint dies eine von der Art abhängiges Phänomen zu sein.

In einem weiteren Schritt wurden die vorliegenden Daten zur Durchführung einer chemotaxonomischen Untersuchung genutzt. Die Gerbstoffbestimmung mit Hautpulver offenbarte die unterschiedlichen Anteile von Gerbstoffen und Restphenolen an den Gesamtphenolen in den eingeschlossenen Spezies. Dabei war es möglich, die Sektionen *Helix* und *Vetrix* voneinander abzugrenzen, wobei die Vertreter der Sektion *Salix* Werte zwischen den beiden genannten aufweisen.

Durch detaillierte Betrachtung der Gerbstofffraktion im Rahmen der Untersuchung der Proanthocyanidinmuster mittels UPLC®-DIOL-FLR Analyse, konnten diese Abgrenzungen detaillierter getroffen werden. So ist eine Abgrenzung von *S. caprea* zum Rest des Probensets aufgrund der Dominanz niedrig polymerisierter PAs (DP-02 bis DP-05) möglich. Für *S. caesia* ergibt sich ein umgekehrtes Muster, welches von pPAs geprägt ist. *S. aurita* und *S. hastata* weisen zugleich hohe Gehalte an niederpolymeren oPAs und pPAs auf und lassen sich so von den restlichen Arten abgrenzen. Die acht verbleibenden Spezies zeigten im Rahmen dieser Untersuchung ähnliche Verteilungen der verschiedenen Cluster innerhalb der PA-Fraktion. Auffällig ist, dass die Unterschiede innerhalb einiger Sektionen deutlich größer ausfielen als zwischen den Spezies unterschiedlicher Sektionen und als dies durch die von Skvortsov & Zinovjev (1999) postulierten Beziehungen innerhalb des Genus *Salix* zu erwarten wäre.

Die Erweiterung auf insgesamt acht phenolische Stoffklassen im Rahmen des UPLC®-RP18-PDA Screenings ermöglichte einen noch differenzierteren Blick auf das vorliegende Datenset. Die Hauptkomponentenanalyse und das anschließende Clustering nach dem DBSCAN Verfahren ergaben für die individuellen Datenpunkte eine Einteilung in drei große Cluster. Einer dieser Cluster umfasste den Großteil von *S. caprea* und ließ sich durch den Flavan-3-ol Gehalt von den anderen trennen. Ein zweiter Cluster vereinte Spezies verschiedener Sektionen des Subgenus *Vetrix* (*S. aurita*, *S. bicolor*, *S. cinerea*, *S. lapponum* und *S. viminalis*), mit hohen Anteilen an Cumarylalkoholglykosiden und Flavanonolen als Charakteristikum. Der dritte Cluster umfasst von Kaffeesäurederivaten und Flavanonen geprägte Spezies, welche verschiedenen Sektionen beider Subgenera *Vetrix* und *Salix* zugeordnet werden: *S. fragilis* aus der Sektion *Salix* und *S. x sepulcralis* aus der Sektion *Subalbae* (beide Subgenus *Salix*) sowie *S. caesia* und *S. purpurea* (beide Sekt. *Helix*), *S. hastata* (Sekt. *Hastatae*) sowie *S. daphnoides* (Sekt. *Daphnella*).

Ein Hierarchisches Clustering der für diese Spezies gemittelten Werte resultiert in einem Dendrogramm, welches den etablierten Verwandtschaftsbeziehungen gegenübergestellt werden kann. Dabei konnte das System von Skvortsov & Zinovjev (1999) mit den erhobenen Daten zum Teil in Einklang gebracht werden. Die Sektion *Vetrix* jedoch zeigt eine sehr große Variabilität und die Ausgliederung von *S. caprea* in eine eigene Sektion sollte erwogen werden. Die große Ähnlichkeit von *S. viminalis* zu den restlichen Vertretern der Sektion *Vetrix* lässt eine Verbindung der beiden Sektionen *Vetrix* und *Vimen* anhand der vorliegenden Ergebnisse plausibel erscheinen. Zudem ist eine Ähnlichkeit der Sektionen *Hastatae* und *Daphnella* (beide Subgenus *Vetrix*) mit den Sektionen *Subalbae* und *Salix* des Subgenus *Salix* auffällig. Ein Zusammenführen dieser vier Sektionen im Subgenus *Salix* wäre anhand der vorliegenden Studie begründbar. Einschränkend muss allerdings die unvollständige Abdeckung des gesamten Genus *Salix* anhand des vorliegenden Probensets erwähnt werden.

Durch das angewandte Analyseverfahren konnten auch Korrelationen zwischen verschiedenen Inhaltsstoffgruppen erfasst werden. Dabei ist das vergesellschaftete Vorkommen von Flavanonolen und Cumarylalkoholglykosiden auf der einen Seite und Flavanonen und Kaffeesäurederivaten auf der Anderen hervorzuheben. Diese Korrelation teilt das untersuchte Probenset grob in zwei Teile, welche durch die vorgeschlagene Neuordnung der Subgenera *Vetrix* und *Salix*, durch Umgruppieren der Sektionen *Hastatae* und *Daphnella*, deutlich abgebildet würde.

Abschließende Zusammenfassung

Um das phenolische Inhaltsstoffspektrum in *Salix cinerea* L. zu charakterisieren, wurden nach einem systematischen Ansatz insgesamt 13 Substanzen isoliert und ihre Strukturen durch spektroskopische Methoden aufgeklärt. Darunter finden sich zwei Salicylalkoholderivate (Salicin, Salicortin), ein Acetophenon-Derivat (Picein), zwei Phenylpropanglycoside (Vimalin, Triandrin), ein Flavanonol (Dihydromyricetin), zwei Flavan-3-ole (Catechin, Gallocatechin), ein HCH-substituiertes Flavan-3-ol (Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester), zwei dimere Procyanidine (PC B1 und PC B3) sowie zwei dimere Prodelphinidine (Gallocatechin-(4 α →8)-Catechin und Gallocatechin-(4 α →8)-Gallocatechin). Für das HCH-Catechin sowie die Proanthocyanidine stellt dies den ersten Bericht über eine Isolierung aus *S. cinerea* dar.

Zudem wurde die Fraktion polymerer Proanthocyanidine in *S. cinerea* mittels ^{13}C -NMR im Jahresverlauf, zu Beginn, Höhepunkt und Ende der Wachstumsperiode 2019 charakterisiert. Der Polymerisationsgrad stieg während der Wachstumsperiode von durchschnittlich 7 auf 11 Einheiten an, was auf eine saisonale Abhängigkeit hindeutet. Das Verhältnis von 2,3-*cis*- zu 2,3-*trans*-konfigurierten Flavan-3-ol Einheiten ist sehr ausgeglichen, wobei nur 2,3-*cis*-konfigurierte Monomere isoliert werden konnten. Ebenso ausgeglichen ist das Verhältnis von im B-Ring di- und trihydroxylierten Untereinheiten. Dies weist auf einen hohen Anteil von (Epi-)Gallocatechinen im Vergleich zu anderen bereits untersuchten Arten hin. Im Gegensatz zum durchschnittlichen Polymerisierungsgrad bleiben die Verhältnisse der Monomere untereinander im Jahresverlauf konstant. Diese systematische NMR-spektroskopische Untersuchung der Fraktion polymerer Proanthocyanidine der Rinde von *Salix cinerea*, ist die Erste mit diesem Fokus.

Der pharmakologische Teil dieser Arbeit stellt das mögliche anti-inflammatoryische Potenzial des isolierten HCH-Catechins ins Zentrum. HCH-Catechin bewirkte im ICAM-1-Assay ab einer Konzentration von 25 μM eine signifikante Reduktion der TNF- α -induzierten ICAM-1-Expression *in vitro*. Im Gegensatz dazu zeigte unsubstituiertes Catechin keinen Effekt, ein Ergebnis, welches darauf hindeutet, dass die HCH-Untereinheit für die Aktivität von HCH-Catechin verantwortlich ist. Die Aktivität kann auf die Bildung von Catechol zurückgeführt werden, wie dies in der Literatur bereits für mit HCH-substituierte Salicylalkoholderivate beschrieben ist. Im Rahmen einer kinetischen Untersuchung konnte im

Vergleich zu Literaturdaten festgestellt werden, dass HCH-Catechin stabiler ist als Salicylalkoholderivate wie Salicortin und Tremulacin, die unter identischen Zellkulturbedingungen ebenfalls zu Catechol abgebaut werden. Nach 24 Stunden sind unter Assay-Bedingungen noch etwa ein Drittel des HCH-Catechins intakt. HCH-Catechin stellt somit, ähnlich wie Salicylalkoholderivate, eine Quelle für Catechol dar, was in der Qualitätsbewertung von *Salicis cortex* nicht berücksichtigt wird, da sich diese auf den Gehalt von Salicin stützt. Weitere Studien müssen klären, inwieweit andere Catechol-freisetzende Substanzen in Weidenrinde vorkommen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zahlreiche potenzielle HCH-Addukte (1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester von Flavan-3-olen in *S. cinerea* nachgewiesen werden. Diese wurden verteilt über alle proanthocyanidinhaltigen Fraktionen eines methanolischen Extrakts, der mittels Sephadex® LH-20 aufgereinigt wurde, durch LC-MS und LC-MS/MS detektiert. Zudem wurde das Fragmentierungsmuster von Salicylalkoholderivaten und HCH-Addukten von Flavan-3-olen mittels LC-MS/MS verglichen. Es zeigt sich, dass Flavan-3-ole zur Abspaltung der HCH-Seitengruppe als Neutralteilchen neigen, was zu unterschiedlichen charakteristischen Tochterfragmenten im Vergleich zu Salicylalkoholderivaten führt.

Fünf HCH-Addukte von monomeren Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen konnten strukturell näher beschrieben und ihr Fragmentierungsmuster postuliert werden. Dies ist der erste detaillierte Bericht über den Fragmentierungsweg di- und trimerer Proanthocyanidin-HCH-Addukte. Zudem wurde erstmalig ein gemischt hydroxyliertes dimeres Proanthocyanidin-HCH-Addukt nachgewiesen. Diese massenspektrometrische Analyse deutet auf die weite Verbreitung von HCH-Addukten in *S. cinerea* hin und legt den Grundstein für zukünftige Untersuchungen zur Bildung von HCH-Addukten mit weiteren Inhaltsstoffgruppen. Eine Gesamt-HCH-Bestimmung bzw. Quantifizierung Catecholbildender Strukturen könnte helfen, den Beitrag phenolischer Fraktionen zur Wirksamkeit von Zubereitungen aus *Salicis cortex* besser zu verstehen.

Das *Salix*-Screening als vierter Teil der Arbeit befasst sich mit der saisonalen, geschlechtsspezifischen und interspezialen Variabilität von Sekundärmetaboliten in der Rindendroge von 12 Arten der Gattung *Salix*. Zur Anwendung kamen drei verschiedene

Methoden: Gesamtphenole und Gerbstoffe wurden durch eine Hauptpulverfällung und Phenolreaktion mit Folin-Ciocalteu-Reagenz bestimmt. Proanthocyanidine wurden mit einer UPLC®-DIOL-FLR Methodik nach Polymerisierungsgrad getrennt quantifiziert. Ein UPLC®-RP18-PDA Screening schloss acht phenolische Inhaltsstoffgruppen ein.

Ein zu untersuchender Aspekt war die saisonale Entwicklung der Sekundärmetabolite. Für die Gesamtphenole und insbesondere die Gerbstoffe wurde ein Anstieg im Sommer mit einem anschließenden Abfall nachgewiesen. In der Gruppe der Proanthocyanidine zeigen oligomere und polymere PAs gegensätzliche saisonale Entwicklungen, was auf ein Fließgleichgewicht und eine mögliche Umwandlung der Verbindungen ineinander hindeutet. Das UPLC®-RP18-PDA Screening offenbarte eine große saisonale Variabilität für alle betrachteten Inhaltsstoffgruppen. Aufeinanderfolgende Jahrgänge wiesen in Einzelindividuen ebenso zum Teil deutliche Unterschiede auf. Neben deutlichen interindividuellen, konnten auch interspezifische Variabilitäten nachgewiesen werden.

Ein geschlechtsspezifischer Vergleich in fünf Spezies ergab, dass bei zwei *Salix*-Arten (*S. caprea* und *S. cinerea*) weibliche Individuen signifikant höhere Gehalte an bestimmten phenolischen Inhaltsstoffen aufwiesen. Für eine Spezies (*S. fragilis*) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, während in zwei weiteren Arten (*S. daphnoides* und *S. purpurea*) die männlichen Individuen durchweg höhere Gehalte, mit zum Teil signifikanten Unterschieden aufwiesen. Die Hypothese einer "male-biased herbivory", nach der weibliche Individuen mehr in Abwehr von Schädlingen und Fraßfeinden investieren, muss anhand der vorliegenden Ergebnisse in Frage gestellt und als generelle Regel abgelehnt werden.

Eine chemotaxonomische Untersuchung zeigte bei der Betrachtung der Gesamtphenole und Gerbstoffe deutliche Unterschiede zwischen den Sektionen *Helix* und *Vetrix*. Die Datenpunkte der Sektion *Salix* lagen im Scatterplot der Gerbstoffbestimmung zwischen denen der genannten Sektionen *Helix* und *Vetrix*. Die Betrachtung des Proanthocyanidinmusters erlaubte die Abgrenzung einzelner Arten des Probensets aufgrund des bevorzugten Polymerisierungsgrads. *S. caprea*, *S. caesia* und *S. hastata* konnten deutlich gegen die restlichen Spezies abgegrenzt werden. Zudem konnte eine große Variabilität innerhalb der Sektion *Vetrix* festgestellt werden. Die Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse auf Grundlage von Daten des UPLC®-RP18-PDA Screenings und anschließendes Clustering (DBSCAN) ergab drei große Cluster, basierend auf den Gehalten an Flavan-3-olen, Cumarylalkoholglykosiden und Kaffeesäurederivaten. Mittels hierarchischen Clusterings wurde ein Dendrogramm erstellt,

welches etablierten taxonomischen Einteilungen gegenübergestellt wurde. Die Ergebnisse könnten auf eine nötige Neuordnung der Subgenera *Vetrix* und *Salix* hindeuten. Insbesondere eine Zusammenführung der Sektionen *Hastatae* und *Daphnella* (beide Subgenus *Vetrix*) mit den Sektionen *Subalbae* und *Salix* des Subgenus *Salix* muss in Betracht gezogen werden. Auch die Forderung einer Ausgliederung von *S. caprea* in eine eigene Sektion und eine Neuordnung der Sektion *Vetrix* scheint anhand der vorliegenden Daten legitim. Einschränkend muss jedoch auf die unvollständige Abdeckung des gesamten Genus *Salix* hingewiesen werden. Eine Korrelation von Flavanonen und Kaffeesäurederivaten sowie von Flavanonolen und Cumarylalkoholglykosiden konnte ebenso nachgewiesen werden. Diese teilt das Probenset in zwei große Gruppen auf und legt einen Zusammenhang mit der Einteilung des Genus *Salix* in Subgenera nahe. Ob diese Korrelation epigenetische Ursachen hat, muss in weiteren Untersuchungen beleuchtet werden. Dennoch stellt diese Beobachtung einen Startpunkt für detailliertere chemotaxonomische Studien im vielfältigen Genus *Salix* dar.

Summary

In order to characterize the phenolic spectrum in *Salix cinerea* L., a total of 13 substances were isolated using a systematic approach and their structures were elucidated using a set of spectroscopic methods. The isolates include two salicylic alcohol derivatives (salicin, salicortin), an acetophenone derivative (picein), two phenylpropane glycosides (vimalin, triandrin), a flavanonol (dihydromyricetin), two flavan-3-ols (catechin, gallocatechin), an HCH-substituted catechin (catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexene-1-carboxylic acid)-ester), two dimeric procyanidins (PC B1 and PC B3) and two dimeric prodelphinidins (gallocatechin-4 α ,8-catechin and gallocatechin-4 α ,8-gallocatechin). For HCH-catechin and the proanthocyanidins, this is the first report of isolation from *S. cinerea*.

In addition, the fraction of polymeric proanthocyanidins in *S. cinerea* was characterized by ^{13}C -NMR spectroscopy throughout the year, at the beginning, peak season and end of the 2019 growth period. The degree of polymerization increased from an average of 7 to 11 units during the growth period, indicating a seasonal dependence. The ratio of 2,3-*cis*- to 2,3-*trans*-configured units is very balanced, whereby only 2,3-*cis*-configured monomers could be isolated. The ratio of subunits with di- or trihydroxylated B-rings is balanced. This indicates a high proportion of (epi-)gallocatechin units compared to other species already studied. In contrast to the average degree of polymerization, the ratio within the monomers remains constant over the course of the year. This systematic NMR spectroscopic investigation of the fraction of polymeric proanthocyanidins of the bark of *S. cinerea* is the first with this focus.

The pharmacological part of this work focuses on the possible anti-inflammatory potential of the isolated HCH-catechin. In an ICAM-1 assay, HCH-catechin caused a significant reduction in TNF- α induced ICAM-1 expression at a concentration of 25 μM *in vitro*. In contrast, unsubstituted catechin showed no effect, a result that indicates that the HCH subunit is responsible for the activity of HCH-catechin. The activity can be attributed to formation of catechol, as previously described in the literature for other HCH substituted salicylic alcohol derivatives. In comparison with literature data, a kinetic study showed that HCH-catechol is more stable than salicylic alcohol derivatives such as salicortin and tremulacin, which are also degraded to catechol under identical cell culture conditions. After 24 hours, about one third of the HCH-catechin is still intact under assay conditions. HCH-catechin thus could represents a source of catechol, similar to salicylic alcohol derivatives, which is not taken into account in

the quality assessment of *Salicis* cortex, as it is focused on salicin content. Further studies are necessary to clarify the extent to which other catechol-releasing substances are present in willow bark.

In the present study, numerous potential HCH adducts of flavan-3-ols were detected in *S. cinerea*. These were detected by LC-MS and LC-MS/MS distributed over all proanthocyanidin-containing fractions of a methanolic extract purified by Sephadex® LH-20. In addition, the fragmentation pattern of salicylic alcohol derivatives and HCH adducts of flavan-3-ols was compared by LC-MS/MS. It was found that flavan-3-ols tend to cleave off the HCH side group as neutral mass loss, which leads to different characteristic fragments compared to salicylic alcohol derivatives.

Five HCH adducts of monomeric flavan-3-ols and proanthocyanidins were structurally characterized and their fragmentation pattern postulated. This is the first detailed report on the fragmentation pathway of di- and trimeric proanthocyanidin-HCH adducts. In addition, a mixed hydroxylated dimeric proanthocyanidin-HCH adduct was detected for the first time. This mass spectrometric analysis indicates the wide distribution of HCH adducts in *S. cinerea* and is the foundation for future studies on the formation of HCH adducts with other constituent groups. A total HCH determination or quantification of catechol-forming structures could help to better understand the contribution of phenolic fractions to the efficacy of preparations from *Salicis* cortex.

The *Salix* screening as the fourth part of the present study investigates the seasonal, sex-specific and interspecific variability of secondary metabolites in the bark drug of 12 species of the genus *Salix*. Three different methods were used: total phenols and tannins were determined by a hide powder precipitation and phenol reaction with Folin-Ciocalteu reagent. Proanthocyanidins were separated by degree of polymerization and quantified using a UPLC®-DIOL-FLR method. A UPLC®-RP18-PDA screening included eight phenolic constituent groups.

One aspect to be investigated was the seasonal fluctuation of the secondary metabolites. For the total phenols and especially the tannins, an increase in summer followed by a decrease was detected. The study of proanthocyanidins uncovered that oligomeric and polymeric PAs show opposite seasonal developments, indicating a possible transformation into one another.

The UPLC®-RP18-PDA screening revealed a large seasonal variability for all structural classes examined. Successive years also showed significant differences in some individuals. In addition to clear inter-individual variability, interspecific variability was also detected.

A gender-specific comparison in five species showed that in two *Salix* species (*S. caprea* and *S. cinerea*), female individuals had significantly higher levels of certain phenolic constituents. No significant difference was found for one species (*S. fragilis*), while in two other species (*S. daphnoides* and *S. purpurea*) the male individuals consistently showed higher contents, with significant differences in some cases. The hypothesis of a “male-biased herbivory”, according to which female individuals invest more in defense against parasites and herbivores, must be questioned on the basis of the present results and rejected as a general rule.

A chemotaxonomic analysis showed clear differences between the *Helix* and *Vetrix* sections when looking at the total phenols and tannins. The data points of the *Salix* section lay between those of the sections mentioned. The observation of the proanthocyanidin pattern allowed the differentiation of individual species of the sample set based on the preferred degree of polymerization. *S. caprea*, *S. caesia* and *S. hastata* could be clearly distinguished from the remaining species. In addition, a large variability within the *Vetrix* section was observed. Performing a principal component analysis based on UPLC®-RP18-PDA screening data and subsequent clustering (DBSCAN) revealed three main clusters based on the contents of flavan-3-ols, caffeic alcohol glycosides and caffeic acid derivatives. Using hierarchical clustering, a dendrogram was created which was compared to established taxonomic classifications. The results indicate a necessary reorganization of the subgenera *Vetrix* and *Salix*. Merging the sections *Hastatae* and *Daphnella* (both subgenus *Vetrix*) with the sections *Subalbae* and *Salix* of the subgenus *Salix* must be considered. Based on the available data, it also seems legitimate to demand a separation of *S. caprea* into a separate section and a reorganization of section *Vetrix*. However, the incomplete coverage of the entire genus *Salix* in this study must be pointed out. A correlation of flavanones and caffeic acid derivatives as well as of flavanonols and caffeic alcohol glycosides could also be demonstrated. This divides the sample set into two large groups and suggests a connection with the division of the genus *Salix* into subgenera. Whether this correlation has epigenetic causes must be investigated in further studies. Nevertheless, this observation represents a starting point for more detailed chemotaxonomic studies in the diverse genus *Salix*.

Literaturverzeichnis

- Aas, G. (2017). *Bäume und Sträucher*. Ökologisch-Botanischer Garten, Universität Bayreuth.
- Ågren, J., Danell, K., Elmqvist, T., Ericson, L., & Hjältén, J. (1999). Sexual dimorphism and biotic interactions. In M. A. Geber, T. E. Dawson, & L. F. Delph (Eds.), *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants* (pp. 217–246). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-03908-3_8
- Al Bittar, S., Mora, N., Loonis, M., & Dangles, O. (2016). A simple synthesis of 3-deoxyanthocyanidins and their O-glucosides. *Tetrahedron*, 72(29), 4294–4302.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.05.076>
- An, R.-B., Tian, Y.-H., Oh, H.-C., & Kim, Y.-C. (2005). In vitro free radical scavenging and hepatoprotective compound from *Sanguisorbae radix*. *Natural Product Sciences*, 11(3), 119–122. <https://doi.org/10.1007/bf02977753>
- Antoniadou, K., Herz, C., Le, N. P. K., Mittermeier-Kleßinger, V. K., Förster, N., Zander, M., Ulrichs, C., Mewis, I., Hofmann, T., Dawid, C., & Lamy, E. (2021). Identification of salicylates in willow bark (*Salix cortex*) for targeting peripheral inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11138.
<https://doi.org/10.3390/ijms222011138>
- Babst, B. A., Harding, S. A., & Tsai, C. J. (2010). Biosynthesis of phenolic glycosides from phenylpropanoid and benzenoid precursors in *Populus*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(3), 286–297. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9757-7>
- Baldé, A. M., Pieters, L. A., Gergely, A., Kolodziej, H., Claeys, M., & Vlietinck, A. J. (1991). A-type proanthocyanidins from stem-bark of *Pavetta owariensis*. *Phytochemistry*, 30(1), 337–342. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84150-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84150-Q)
- Barrett, M. W., Klyne, W., Scopes, P. M., Fletcher, A. C., Porter, L. J., & Haslam, E. (1979). Plant proanthocyanidins. Part 6. Chiroptical studies. Part 95. Circular dichroism of procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2375–2377.
<https://doi.org/10.1039/p19790002375>
- Bassanini, I., Krejzová, J., Panzeri, W., Monti, D., Křen, V., & Riva, S. (2017). A sustainable one-pot, two-enzyme synthesis of naturally occurring arylalkyl glucosides. *ChemSusChem*, 10(9), 2040–2045. <https://doi.org/10.1002/cssc.201700136>
- Bate-Smith, E. C. (1975). Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochemistry*, 14(4), 1107–1113. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85197-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85197-1)
- Binns, W. W., Blunden, G., & Woods, D. L. (1968). Distribution of leucoanthocyanidins, phenolic glycosides and imino-acids in leaves of *Salix* species. *Phytochemistry*, 7(9), 1577–1581. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88609-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88609-4)
- Boecklen, W. J., Price, P. W., & Mopper, S. (1990). Sex and drugs and herbivores : Sex-biased herbivory in arroyo willow (*Salix lasiolepis*). *Ecology*, 71(2), 581–588.
<http://www.jstor.org/stable/1940311>
- Boeckler, G. A., Gershenzon, J., & Unsicker, S. B. (2011). Phenolic glycosides of the Salicaceae

- and their role as anti-herbivore defenses. In *Phytochemistry* (Vol. 72, Issue 13, pp. 1497–1509). *Phytochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.038>
- Bridle, P., Stott, K. G., & Timberlake, C. F. (1970). Anthocyanins in *Salix* species. *Phytochemistry*, 9(5), 1097–1098. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85231-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85231-0)
- Bridle, P., Stott, K. G., & Timberlake, C. F. (1973). Anthocyanins in *Salix* species: A new anthocyanin in *Salix purpurea* bark. *Phytochemistry*, 12(5), 1103–1106. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)85023-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)85023-X)
- Chaturvedula, V. S. P., & Huang, R. (2013). Isolation and NMR spectral studies of dihydromyricetin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4), 113–115. <https://www.phytojournal.com/archives/2013.v2.i4.216/isolation-and-nmr-spectral-studies-of-dihydromyricetin>
- Chrubasik, S., Eisenberg, E., Balan, E., Weinberger, T., Luzzati, R., & Conradt, C. (2000). Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: A randomized double-blind study. *American Journal of Medicine*, 109(1), 9–14. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00442-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00442-3)
- Chrubasik, S., Künzel, O., Black, A., Conradt, C., & Kerschbaumer, F. (2001). Potential economic impact of using a proprietary willow bark extract in outpatient treatment of low back pain: An open non-randomized study. *Phytomedicine*, 8(4), 241–251. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00048>
- Chrubasik, S., Künzel, O., Model, A., Conradt, C., & Black, A. (2001). Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: A randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain. *Reumatologija*, 40(12), 1388–1393. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.12.1388>
- Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2017). *European Union herbal monograph on Salix [various species including S. purpurea L., S. daphnoides Vill., S. fragilis L.], cortex: EMA/HMPC/860630/2016 - Corr.* Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC).
- Cornelissen, T., & Stiling, P. (2005). Sex-biased herbivory: a meta-analysis of the effects of gender on plant-herbivore interactions. *Oikos*, 111(3), 488–500. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2005.14075.x>
- Czochanska, Z., Foo, L. Y., Newman, R. H., & Porter, L. J. (1980). Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0(0), 2278–2286. <https://doi.org/10.1039/p19800002278>
- Danell, K., Elmquist, T., Ericson, L., & Salomonson, A. (1985). Sexuality in willows and preference by bark-eating voles: Defence or not? *Oikos*, 44(1), 82. <https://doi.org/10.2307/3544047>
- Domisse, R. A., Van Hoof, L., & Vlietinck, A. J. (1986). Structural analysis of phenolic glucosides from salicaceae by NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 25(5), 1201–1204. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81580-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81580-0)
- Dötterl, S., Glück, U., Jürgens, A., Woodring, J., & Aas, G. (2014). Floral reward,

- advertisement and attractiveness to honey bees in dioecious *Salix caprea*. *PLoS ONE*, 9(3), e93421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093421>
- Eberhardt, T. L., & Young, R. A. (1994). Conifer seed cone proanthocyanidin polymers: Characterization by ¹³C NMR spectroscopy and determination of antifungal activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1704–1708. <https://doi.org/10.1021/jf00044a023>
- Eftekhari, Y., Rustaiyan, A., & Monajjemi, M. (2014). Study of anti-retroviral effects of *Salix aegyptiaca* L. herbal extract on HIV-1 in-vitro. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, 1, 398–405.
- Elmqvist, T., Cates, R. G., Harper, J. K., & Gardfjell, H. (1991). Flowering in males and females of a Utah willow, *Salix rigida* and effects on growth, tannins, phenolic glycosides and sugars. *Oikos*, 61(1), 65. <https://doi.org/10.2307/3545407>
- Esatbeyoglu, T., Juadjur, A., Wray, V., & Winterhalter, P. (2014). Semisynthetic preparation and isolation of dimeric procyanidins B1-B8 from roasted hazelnut skins (*Corylus avellana* L.) on a large scale using countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 7101–7110. <https://doi.org/10.1021/jf501312a>
- Esatbeyoglu, T., Wray, V., & Winterhalter, P. (2010). Dimeric procyanidins: screening for B1 to B8 and semisynthetic preparation of B3, B4, B6, And B8 from a polymeric procyanidin fraction of white willow bark (*Salix alba*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7820–7830. <https://doi.org/10.1021/jf101023e>
- European Scientific Cooperative on Phytotherapy. (2003). *Salicis cortex - Willow bark*. In *E/S/C/O/P monographs: The scientific foundation for herbal medicinal products* (2nd ed.). Thieme.
- European Scientific Cooperative on Phytotherapy. (2017). *Salicis cortex (Willow Bark)*. <https://www.escop.com/downloads/salix/>
- Feeny, P. P., & Bostock, H. (1968). Seasonal changes in the tannin content of oak leaves. *Phytochemistry*, 7(5), 871–880. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84845-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84845-1).
- Foo, L. Y., & Porter, L. J. (1978). Prodelphinidin polymers: definition of structural units. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 711(10), 1186–1190. <https://doi.org/10.1039/p19780001186>
- Förster, N., Antoniadou, K., Zander, M., Baur, S., Mittermeier-Kleßinger, V. K., Dawid, C., Ulrichs, C., & Mewis, I. (2021). Chemoprofiling as breeding tool for pharmaceutical use of *Salix*. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.579820>
- Förster, N., Ulrichs, C., Zander, M., Kätzel, R., & Mewis, I. (2008). Influence of the season on the salicylate and phenolic glycoside contents in the bark of *Salix daphnoides*, *Salix pentandra*, and *Salix purpurea*. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 82(1), 99–102. <https://core.ac.uk/download/pdf/235697527.pdf>
- Förster, N., Ulrichs, C., Zander, M., Kätzel, R., & Mewis, I. (2010). Factors influencing the variability of antioxidative phenolic glycosides in *Salix* species. *Journal of Agricultural*

- and Food Chemistry*, 58(14), 8205–8210. <https://doi.org/10.1021/jf100887v>
- Freischmidt, A. (2011). *in vitro Untersuchungen zu den phenolischen Inhaltsstoffen eines standardisierten Weidenrindenextraktes*, Dissertation. Univeristät Regensburg.
- Freischmidt, A., Jürgenliemk, G., Kraus, B., Okpanyi, S., Müller, J., Kelber, O., Weiser, D., & Heilmann, J. (2010). Phenolic compounds in the ethyl acetate fraction of a standardized willow bark extract. *Planta Medica*, 76(12), P283. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1264581>
- Freischmidt, A., Jürgenliemk, G., Kraus, B., Okpanyi, S. N., Müller, J., Kelber, O., Weiser, D., & Heilmann, J. (2012). Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised Willow bark extract. *Phytomedicine*, 19(3–4), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.08.065>
- Freischmidt, A., Untergerhrer, M., Ziegler, J., Knuth, S., Okpanyi, S., Müller, J., Kelber, O., Weiser, D., & Jürgenliemk, G. (2015). Quantitative analysis of flavanones and chalcones from willow bark. *Pharmazie*, 70(9), 565–568. <https://doi.org/10.1691/ph.2015.5555>
- Fujii, W., Toda, K., Kawaguchi, K., Kawahara, S. I., Katoh, M., Hattori, Y., Fujii, H., & Makabe, H. (2013). Syntheses of prodelphinidin B3 and C2, and their antitumor activities through cell cycle arrest and caspase-3 activation. *Tetrahedron*, 69(17), 3543–3550. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.02.087>
- Füssel, U., Dötterl, S., Jürgens, A., & Aas, G. (2007). Inter-and intraspecific variation in floral scent in the genus *Salix* and its implication for pollination. Article in *Journal of Chemical Ecology*, 33(4), 749–765. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9257-6>
- Galili, T. (2015). dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 31(22), 3718–3720. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv428>
- Grolemund, G., & Wickham, H. (2011). Dates and times made easy with lubridate. *Journal of Statistical Software*, 40(3), 1–25. <https://www.jstatsoft.org/v40/i03/>
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1994). Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. *Methods in Enzymology*, 234(C), 429–437. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34113-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34113-3)
- Hashida, K., Makino, R., & Ohara, S. (2009). Amination of pyrogallol nucleus of condensed tannins and related polyphenols by ammonia water treatment. *Holzforschung*, 63(3), 319–326. <https://doi.org/10.1515/HF.2009.043>
- Hellenbrand, N., sendkerberg, M., Petereit, F., Sendker, J., & Hensel, A. (2015a). Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in the aerial parts of St John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica*, 81(12–13), 1175–1181. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545916>
- Hellenbrand, N., Sendker, J., Lechtenberg, M., Petereit, F., & Hensel, A. (2015b). Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in leaves and flowers of Hawthorn (*Crataegus* spp.). *Fitoterapia*, 104, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.04.010>

- Hennig, C. (2023). *fpc: Flexible Procedures for Clustering* (R package version 2.2-10). <https://cran.r-project.org/package=fpc>
- Herms, D. A., & Mattson, W. J. (1992). The dilemma of plants: To grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, 67(3), 283–335. <https://doi.org/10.1086/417659>
- Hester, J., & Bryan, J. (2022). *glue: Interpreted string literals* (R package version 1.6.2). <https://cran.r-project.org/package=glue>
- Hjältén, J. (1992). Plant sex and hare feeding preferences. *Oecologia*, 89(2), 253–256. <https://doi.org/10.1007/BF00317225>
- Holdenrieder, O., Rudow, A., & Aas, G. (1999). Die Gattung *Salix*. Eine Einführung in die Vielfalt, Biologie und Ökologie der Weiden | The Genus *Salix*: An introduction to the diversity, biology and ecology of willows. *Schweizerische Zeitschrift Fur Forstwesen*, 150(11), 405–411. <https://doi.org/10.3188/szf.1999.0405>
- Hsu, F.-L., Nonaka, G.-I., & Nishioka, I. (1985). Acylated flavanols and procyandins from *Salix sieboldiana*. *Phytochemistry*, 24(9), 2089–2092. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83128-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83128-3)
- Jay, M. (1967). Distribution des flavonoides chez les Bruniacées. *Taxon*, 16(5), 484–488. <https://doi.org/10.1002/j.1996-8175.1967.tb02141.x>
- Jay, M. (1969). Chemotaxonomic researches on vascular plants. XIX. Flavonoid distribution in the Pittosporaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 62(4), 423–429. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1969.tb01976.x>
- Johanson. (1875). *Beiträge zur Chemie der Eichen-, Weiden- und Ulmenrinde* [Kaiserliche Universität zu Dorpat]. <https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=5EUZAAAAAYAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=johannson+eichenrinde&ots=cb5NnzE5G8&sig=8eUbLCG1BFcZ9XdmYmNqbEiEQBY#v=onepage&q&f=false>
- Julkunen-Tiitto, R. (1985a). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 213–217. <https://doi.org/10.1021/jf00062a013>
- Julkunen-Tiitto, R. (1985b). Chemotaxonomical screening of phenolic glycosides in northern willow twigs by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 324(C), 129–139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)81312-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81312-1)
- Julkunen-Tiitto, R. (1986). A chemotaxonomic survey of phenolics in leaves of northern salicaceae species. *Phytochemistry*, 25(3), 663–667. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(86\)88020-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(86)88020-7)
- Julkunen-Tiitto, R. (1989). Phenolic constituents of *Salix*: A chemotaxonomic survey of further finnish species. *Phytochemistry*, 28(8), 2115–2125. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97930-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97930-5)
- Julkunen-Tiitto, R., & Gebhardt, K. (1992). Further studies on drying willow (*Salix*) twigs: The effect of low drying temperature on labile phenolics. *Planta Medica*, 58(4), 385–386.

<https://doi.org/10.1055/s-2006-961494>

Julkunen-Tiitto, R., & Meier, B. (1992). Variation in growth and secondary phenolics among field-cultivated clones of *Salix myrsinifolia*. *Planta Medica*, 58(1), 77–80.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-961394>

Julkunen-Tiitto, R., & Sorsa, S. (2001). Testing the effects of drying methods on willow flavonoids, tannins, and salicylates. *Journal of Chemical Ecology*, 27(4), 779–789.
<https://doi.org/10.1023/A:1010358120482>

Julkunen-Tiitto, R., Tahvanainen, J., & Meier, B. (1988). The tissue variation of self-defensive phenolics in three willow (Salicaceae) species. *Planta Medica*, 54(06), 569–570.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-962574>

Julkunen-Tiitto, R., & Tahvanainen, J. (1989). The effect of the sample preparation method of extractable phenolics of Salicaceae species. *Planta Medica*, 55(01), 55–58.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-961825>

Jürgenliemk, G., Petereit, F., & Nahrstedt, A. (2007). Flavan-3-ols and procyanidins from the bark of *Salix purpurea* L. *Pharmazie*, 62(3), 231–234. <https://doi.org/10.1691/ph.2007.3.6577>

Kammerer, B., Kahlich, R., Biegert, C., Gleiter, C. H., & Heide, L. (2005). HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations. *Phytochemical Analysis*, 16(6), 470–478. <https://doi.org/10.1002/pca.873>

Kenstavičiene, P., Nenortiene, P., Kiliuviene, G., Ževžikovas, A., Lukošius, A., & Kazlauskiene, D. (2009). Application of high-performance liquid chromatography for research of salicin in bark of different varieties of *Salix*. *Medicina*, 45(8), 644–651.
<https://doi.org/10.3390/medicina45080084>

Kessler, W. (2007). Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik. *Multivariate Datenanalyse*, 325. <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527610037>

Knuth, S. (2013). *Pharmakologische und pharmakokinetische Untersuchungen zu Salicylalkoholderivaten aus Salicis cortex*. Universität Regensburg.

Knuth, S., Abdelsalam, R. M., Khayyal, M. T., Schweda, F., Heilmann, J., Kees, M. G., Mair, G., Kees, F., & Jürgenliemk, G. (2013). Catechol conjugates are *in vivo* metabolites of salicis cortex. *Planta Medica*, 79(16), 1489–1494. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350898>

Knuth, S., Schübel, H., Hellemann, M., & Jürgenliemk, G. (2011). Catechol, a bioactive degradation product of salicortin, reduces TNF- α induced ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Planta Medica*, 77(10), 1024–1026. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270722>

Köhler, A., Förster, N., Zander, M., & Ulrichs, C. (2020). Compound-specific responses of phenolic metabolites in the bark of drought-stressed *Salix daphnoides* and *Salix purpurea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 311–320.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.004>

Köhler, A., Förster, N., Zander, M., & Ulrichs, C. (2023). Inter- and intraspecific diversity of *Salix* bark phenolic profiles – A resource for the pharmaceutical industry. *Fitoterapia*, 170, 105660. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105660>

- Kompantsev, V. A., Gaidash, P. M., & Dauksha, A. D. (1974). Phenolic compounds of the bark of *Salix alba* × *babylonica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 10(6), 839–839. <https://doi.org/10.1007/BF00564031>
- Korver, O., & Wilkins, C. K. (1971). Circular dichroism spectra of flavanols. *Tetrahedron*, 27(22), 5459–5465. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)91712-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)91712-0)
- Krauze-Baranowska, M., Pobłocka-Olech, L., Głód, D., Wiwart, M., Zieliński, J., & Migas, P. (2013). HPLC of flavanones and chalcones in different species and clones of *Salix*. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 70(1), 27–34. https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2013/1/027.pdf
- Lauron-Moreau, A., Pitre, F. E., Argus, G. W., Labrecque, M., & Brouillet, L. (2015). Phylogenetic relationships of American willows (*Salix* L., Salicaceae). *PLOS ONE*, 10(4), e0121965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121965>
- Lawson, C., & Wolf, S. (2009). ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports*, 61(1), 22–32. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70004-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70004-0)
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), 678–689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>
- Liu, K. Y. (2012). Stimulatory effects of extracts prepared from *Salix babylonica* L. on fat catabolism in mice fed high-fat diet. *Advanced Materials Research*, 518–523, 498–501. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.518-523.498>
- Ma, Y. L., Li, Q. M., Van Den Heuvel, H., & Claeys, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357–1364. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(199708\)11:12<1357::AID-RCM983>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(199708)11:12<1357::AID-RCM983>3.0.CO;2-9)
- MacLagan, T. (1876). The treatment of acute rheumatism by salicin and salicylic acid. *The Lancet*, 107(2741), 383–384. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)32012-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)32012-9)
- Mahdi, J. G., Mahdi, A. J., Mahdi, A. J., & Bowen, I. D. (2006). The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. In *Cell Proliferation* (Vol. 39, Issue 2, pp. 147–155). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2006.00377.x>
- März, R. W., & Kemper, F. (2002). Willow bark extract - Effects and efficacy. A review on pharmacology, toxicology and clinic. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 152(15–16), 354–359. <https://doi.org/10.1046/j.1563-258x.2002.02053.x>
- Masika, P. J., Sultana, N., & Afolayan, A. J. (2005). Isolation of two antibacterial compounds from the bark of *Salix capensis*. *South African Journal of Botany*, 71(3–4), 441–443. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30117-4](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30117-4)
- Meier, B., Julkunen-Tiitto, R., Tahvanainen, J., & Sticher, O. (1988). Comparative high-performance liquid and gas-liquid chromatographic determination of phenolic glucosides in salicaceae species. In *Journal of Chromatography* (Vol. 442).

- Meier, B., Lehmann, D., Sticher, O., & Bettschart, A. (1985). Identifikation und Bestimmung von je acht Phenolglykosiden in *Salix purpurea* und *Salix daphnoides* mit moderner HPLC. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 60(5), 269–275.
- Meier, B., Lehmann, D., Sticher, O., & Bettschart, A. (1986). HPLC-Screening of naturally occurring salicylates. *Planta Medica*, 52(5), 424–425. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969228>
- Meier, B., & Meier-Liebi, M. (2007). *Salix*. In *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen* (vol. 14, 6, pp. 81–115). Blaschek, W.
- Moritz, K. K., Parachnowitsch, A. L., Julkunen-Tiitto, R., Björkman, C., Ayres, M. P., & Stenberg, J. A. (2018). Roe deer prefer mixed-sex willow stands over monosexual stands but do not discriminate between male and female plants. *Environmental and Experimental Botany*, 146, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.015>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mostafa, I., Abbas, H. A., Ashour, M. L., Yasri, A., El-Shazly, A. M., Wink, M., & Sobeh, M. (2020). Polyphenols from *Salix tetrasperma* impair virulence and inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 25(6), 1341. <https://doi.org/10.3390/molecules25061341>
- Mulkay, P., Touillaux, R., & Jerumanis, J. (1981). Proanthocyanidins of barley: separation and identification. *Journal of Chromatography A*, 208(2), 419–423. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81958-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81958-5)
- Nahrstedt, A., Schmidt, M., Jäggi, R., Metz, J., & Khayyal, M. T. (2007). Willow bark extract: The contribution of polyphenols to the overall effect. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(13–14), 348–351. <https://doi.org/10.1007/s10354-007-0437-3>
- Naidoo, L. A. C., Drewes, S. E., Staden, J. Van, & Hutchings, A. (1992). Exocarpic acid and other compounds from tubers and inflorescences of *Sarcophyte sanguinea*. *Phytochemistry*, 31(11), 3929–3931. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97556-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97556-3)
- Nakazawa, M. (2023). *fmsb: Functions for medical statistics book with some demographic data* (R package version 0.7.5). <https://cran.r-project.org/package=fmsb>
- Newman, R. H., Porter, L. J., Foo, L. Y., Johns, S. R., & Willing, R. I. (1987). High-resolution ¹³C NMR studies of proanthocyanidin polymers (condensed tannins). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 25(2), 118–124. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260250207>
- Nissinen, K., Nybakken, L., Virjamo, V., & Julkunen-Tiitto, R. (2016). Slow-growing *Salix repens* (Salicaceae) benefits from changing climate. *Environmental and Experimental Botany*, 128, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.04.006>
- Nissinen, K., Virjamo, V., Mehtätalo, L., Lavola, A., Valtonen, A., Nybakken, L., & Julkunen-Tiitto, R. (2018). A seven-year study of phenolic concentrations of the dioecious *Salix myrsinifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, 44(4), 416–430. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0942-4>

- Nybakken, L., Hörkkä, R., & Julkunen-Tiitto, R. (2012). Combined enhancements of temperature and UVB influence growth and phenolics in clones of the sexually dimorphic *Salix myrsinifolia*. *Physiologia Plantarum*, 145(4), 551–564. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01565.x>
- Nybakken, L., & Julkunen-Tiitto, R. (2013). Gender differences in *Salix myrsinifolia* at the pre-reproductive stage are little affected by simulated climatic change. *Physiologia Plantarum*, 147(4), 465–476. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01675.x>
- Nyman, T., & Julkunen-Tiitto, R. (2005). Chemical variation within and among six northern willow species. *Phytochemistry*, 66(24), 2836–2843. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.09.040>
- Oberprieler, C., Dietz, L., Harlander, C., & Heilmann, J. (2013). Molecular and phytochemical evidence for the taxonomic integrity of *Salix alba*, *S. fragilis*, and their hybrid *S. rubens* (Salicaceae) in mixed stands in SE Germany. *Plant Systematics and Evolution*, 299(6), 1107–1118. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0782-1>
- Obeso, J. R. (2002). The costs of reproduction in plants. *New Phytologist*, 155(3), 321–348. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00477.x>
- Ooms, J. (2024). *writexl: Export Data Frames to Excel “xlsx” Format* (R package version 1.5.0). <https://cran.r-project.org/package=writexl>
- Paajanen, R., Julkunen-Tiitto, R., Nybakken, L., Petrelius, M., Tegelberg, R., Pusenius, J., Rousi, M., & Kellomäki, S. (2011). Dark-leaved willow (*Salix myrsinifolia*) is resistant to three-factor (elevated CO₂, temperature and UV-B-radiation) climate change. *New Phytologist*, 190(1), 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03583.x>
- Palo, R. T. (1984). Distribution of birch (*Betula* spp.), willow (*Salix* spp.), and poplar (*Populus* spp.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 10(3), 499–520. <https://doi.org/10.1007/BF00988096>
- Pearl, I. A., & Darling, S. F. (1971). The structures of salicortin and tremulacin. *Phytochemistry*, 10(12), 3161–3166. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97369-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97369-2)
- Perttu, K. L. (1998). Environmental justification for short-rotation forestry in Sweden. *Biomass and Bioenergy*, 15(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(98\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(98)00014-2)
- Petereit, F., Kolodziej, H., & Nahrstedt, A. (1991). Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry*, 30(3), 981–985. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85291-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85291-7)
- Petersen, M., Hans, J., & Matern, U. (2010). Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. In M. Wink (Ed.), *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism* (Vol. 40, pp. 182–257). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch4>
- Pobłocka-Olech, L., & Krauze-Baranowska, M. (2008). SPE-HPTLC of procyanidins from the barks of different species and clones of *Salix*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(3), 965–968. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.039>

- Pobłocka-Olech, L., Krauze-Baranowska, M., Głów, D., Kawiak, A., & Łojkowska, E. (2010). Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix*. *Phytochemical Analysis*, 21(5), 463–469. <https://doi.org/10.1002/pca.1220>
- Pobłocka-Olech, L., van Nederkassel, A., Vander Heyden, Y., Krauze-Baranowska, M., Głów, D., & Baczk, T. (2007). Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus *Salix*. *Journal of Separation Science*, 30(17), 2958–2966. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700137>
- Popova, T. P., Kaleva, M., Popova, T. P., & Kaleva, M. D. (2015). Antimicrobial effect *in vitro* of aqueous extracts of leaves and branches of willow (*Salix babylonica* L.). In Article in *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* (Vol. 4, Issue 10). <https://www.researchgate.net/publication/282974969>
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1986). The conversion of porcylanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry Reviewstry*, 25(1), 223–230.
- Porter, L. J., Newman, R. H., Foo, L. Y., Wong, H., & Hemingway, R. W. (1982). Polymeric proanthocyanidins. 13C N.M.R. studies of procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0(0), 1217–1221. <https://doi.org/10.1039/p19820001217>
- Ramos, P. A. B., Moreirinha, C., Silva, S., Costa, E. M., Veiga, M., Coscueta, E., Santos, S. A. O., Almeida, A., Pintado, M. M., Freire, C. S. R., Silva, A. M. S., & Silvestre, A. J. D. (2019). The health-promoting potential of *Salix* spp. bark polar extracts: key insights on phenolic composition and *in vitro* bioactivity and biocompatibility. *Antioxidants*, 8(12), 609. <https://doi.org/10.3390/antiox8120609>
- Randriamanana, T. R., Lavola, A., & Julkunen-Tiitto, R. (2015). Interactive effects of supplemental UV-B and temperature in European aspen seedlings: Implications for growth, leaf traits, phenolic defense and associated organisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 93, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.001>
- Rehwald, A., Meier, B., & Sticher, O. (1994). Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 69(3), 153–158. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0031-6865(94)90017-5)
- Ruuhola, T., Julkunen-Tiitto, R., & Vainiotalo, P. (2003). In vitro degradation of willow salicylates. *Journal of Chemical Ecology*, 29(5), 1083–1097. <https://doi.org/10.1023/A:1023821304656>
- Saito, A., Nakajima, N., Tanaka, A., & Ubukata, M. (2002). Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 2: Stereoselective gram-scale synthesis of procyanidin-B3. *Tetrahedron*, 58(39), 7829–7837. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00936-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00936-5)
- Salem, A. Z. M., Elghandour, M. M. Y., Kholif, A. E., López, S., Pliego, A. B., Cipriano-Salazar, M., Chagoyán, J. C. V., de Oca Jiménez, R. M., & Alonso, M. U. (2017). Tree leaves of *Salix babylonica* extract as a natural anthelmintic for small-ruminant farms in a semiarid region in Mexico. *Agroforestry Systems*, 91(1), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9909-z>
- Sargent, R. D., & McKeough, A. D. (2022). New evidence suggests no sex bias in herbivory or

- plant defense. *American Naturalist*, 200(3), 435–447. <https://doi.org/10.1086/720366>
- Schloerke, B., Marbach, M., Thoen, E., Elberg, A., Crowley, J., Cook, D., Larmarange, J., Briatte, F., Marbach, M., Thoen, E., Elberg, A., & Crowley, J. (2021). *GGally: Extension to "ggplot2"* (R package version 2.1.2). <https://cran.r-project.org/package=GGally>
- Schmid, B., Kötter, I., & Heide, L. (2001a). Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardised willow bark extract. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 57(5), 387–391. <https://doi.org/10.1007/s002280100325>
- Schmid, B., Kötter, I., & Heide, L. (2001b). Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardised willow bark extract. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 57(5), 387–391. <https://doi.org/10.1007/s002280100325>
- Schmid, B., Lüdtke, R., Selbmann, H. K., Kötter, I., Tschirdewahn, B., Schaffner, W., & Heide, L. (2001). Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: Randomized placebo-controlled, double blind clinical trial. *Phytotherapy Research*, 15(4), 344–350. <https://doi.org/10.1002/ptr.981>
- Schmitz, S. (2020). Der Experimentator: Zellkultur. In *Der Experimentator: Zellkultur* (4. Auflage). Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2192-0>
- Schwindl, S. (2020). *Phytochemische und chemotaxonomische Studien zu Juglans regia L. und Untersuchungen zur α -Glucosidasehemmung*. <https://epub.uni-regensburg.de/41118>
- Schwindl, S., Kraus, B., & Heilmann, J. (2017). Phytochemical study of *Juglans regia* L. leaves. *Phytochemistry*, 144, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.08.012>
- Shao, Y., Lahloub, M. F., Meier, B., & Sticher, O. (1989). Isolation of phenolic compounds from the bark of *Salix pentandra*. 55, 617–618.
- Shoji, T., Mutsuga, M., Nakamura, T., Kanda, T., Akiyama, H., & Goda, Y. (2003). Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3806–3813. <https://doi.org/10.1021/jf0300184>
- Simpson, T. H., & Beton, J. L. (n.d.). Anthoxanthins. Part I. Selective methylation and demethylation. In *pubs.rsc.org* TH Simpson, JL Beton *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1954•*pubs.rsc.org*. Retrieved September 14, 2024, from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1954/jr/jr9540004065>
- Skvortsov, A. K., & Zinovjev, A. G. (1999). *Willows of Russia and adjacent countries: Taxonomical and geographical revision*. University of Joensuu.
- Slade, D., Ferreira, D., & Marais, J. P. J. (2005). Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. In *Phytochemistry* (Vol. 66, Issue 18 SPEC. ISS., pp. 2177–2215). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.02.002>
- Sobeh, M., Mahmoud, M. F., Rezq, S., Alsemeh, A. E., Sabry, O. M., Mostafa, I., Abdelfattah, M. A. O., El-Allem, K. A., El-Shazly, A. M., Yasri, A., & Wink, M. (2019). *Salix tetrasperma* roxb. Extract alleviates neuropathic pain in rats via modulation of the Nf- κ b/TNF- α /NOX/iNOS pathway. *Antioxidants*, 8(10), 482.

- <https://doi.org/10.3390/antiox8100482>
- Stevens, P. F. (2017). *Angiosperm Phylogeny Website, Version 14*. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Stone, E. (1763). XXXII. An account of the success of the bark of the willow in the cure of agues. In a letter to the Right Honourable George Earl of Macclesfield, President of R. S. from the Rev. Mr. Edward Stone, of Chipping-Norton in Oxfordshire. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 53, 195–200.
<https://doi.org/10.1098/rstl.1763.0033>
- Stott, K. G. (1991). Willows in the service of man. *Proceedings - Royal Society of Edinburgh, Section B*, 98, 169–182. <https://doi.org/10.1017/s0269727000007533>
- Sun, D., Wong, H., & Foo, L. Y. (1987). Proanthocyanidin dimers and polymers from *Quercus dentata*. *Phytochemistry*, 26(6), 1825–1829. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82297-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82297-9)
- Symma, N., & Hensel, A. (2022). Advanced analysis of oligomeric proanthocyanidins: latest approaches in liquid chromatography and mass spectrometry based analysis. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 21, Issue 3, pp. 809–833). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09764-2>
- Tahvanainen, J., Helle, E., Julkunen-Tiitto, R., & Lavola, A. (1985). Phenolic compounds of willow bark as deterrents against feeding by mountain hare. *Oecologia*, 65(3), 319–323. <https://doi.org/10.1007/BF00378905>
- Tawfeek, N., Mahmoud, M. F., Hamdan, D. I., Sobeh, M., Farrag, N., Wink, M., & El-Shazly, A. M. (2021). Phytochemistry, pharmacology and medicinal uses of plants of the genus *Salix*: An updated review. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.593856>
- Team, R. C. (2023). *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Thieme, H. (1963a). Die Phenolglykoside der Salicaceen 1. Mitt.: Allgemeine Übersicht (Entdeckung, Konstitutionsaufklärung, Synthese, Vorkommen). *Die Pharmazie*, 18(11), 770–774. <https://doi.org/10.24355/dbbs.084-201811261224-0>
- Thieme, H. (1963b). Isolierung eines neuen Phenolglykosids aus *Salix triandra* L. *Die Naturwissenschaften*, 50(17), 571. <https://doi.org/10.1007/BF00660484>
- Thieme, H. (1964a). Die Phenolglykoside der Salicaceen 2. Mitteilung: Isolierung und Nachweis. *Die Pharmazie*, 19(7), 471–475. <https://doi.org/10.24355/dbbs.084-201811281403-0>
- Thieme, H. (1964b). Die Phenolglykoside der Salicaceen 3. Mitteilung: Quantitative Bestimmung. *Die Pharmazie*, 19(8), 535–538. <https://doi.org/10.24355/dbbs.084-201811281403-0>
- Thieme, H. (1964c). Isolierung eines neuen Phenolglucosids aus *Salix purpurea* L. *Die Pharmazie*, 19(11), 725. <https://doi.org/10.24355/dbbs.084-201811281403-0>

- Thieme, H. (1964d). Isoierung eines neuen Phenolglykosids aus *Salix viminalis* L. *Die Naturwissenschaften*, 51(9), 217. <https://doi.org/10.1007/BF00637168>
- Thieme, H. (1965a). Die Phenolglykoside der Salicaceen 4. Mitteilung: Übersicht über neu isolierte Glykoside und neuere Arbeiten zur Strukturaufklärung; Nachweis und Bestimmung der neuen Glykoside. *Die Pharmazie*, 20(7), 472–475. <https://doi.org/10.24355/dbbs.084-201901281301-0>
- Thieme, H. (1965b). Die Phenolglykoside der Salicaceen 6. Mitteilung: Untersuchungen über die jahreszeitlich bedingten Veränderungen der Glykosidkonzentrationen, über die Abhängigkeit von der Tageszeit und vom Alter der Pflanzenorgane. *Die Pharmazie*, 20(11), 688–691. <https://doi.org/10.24355/dbbs.084-201901281301-0>
- Thieme, H. (1965c). Die Phenolglykoside der Salicaceen 5. Mitteilung: Untersuchungen über die Glykosidspektren und den Glykosidgehalt der mitteldeutschen Salixarten. *Die Pharmazie*, 20(9), 570–574. <https://doi.org/10.24355/dbbs.084-201901281301-0>
- Thieme, H. (1968). Über den Gerbstoffgehalt der Weidenrinden. *Die Pharmazie*, 23(4), 212.
- Thomas, C. (2017a). *Klimadiagramm - Lufttemperatur botanischer Garten 2017*. Fakultät Für Biologie, Chemie Und Geowissenschaften - Mikrometeorologie - BayCEER. https://www.bayceer.uni-bayreuth.de/meteo/Klimagrafiken/BotG/BotG_2017_barplot_monthlyTA_vio_de.png
- Thomas, C. (2017b). *Klimadiagramm - Niederschlag botanischer Garten 2017*. Fakultät Für Biologie, Chemie Und Geowissenschaften - Mikrometeorologie - BayCEER. https://www.bayceer.uni-bayreuth.de/meteo/Klimagrafiken/BotG/BotG_2017_barplot_monthlyNS_vio_de.png
- Thomas, C. (2018a). *Klimadiagramm - Lufttemperatur botanischer Garten 2018*. Fakultät Für Biologie, Chemie Und Geowissenschaften - Mikrometeorologie - BayCEER. https://www.bayceer.uni-bayreuth.de/meteo/Klimagrafiken/BotG/BotG_2018_barplot_monthlyTA_vio_de.png
- Thomas, C. (2018b). *Klimadiagramm - Niederschlag botanischer Garten 2018*. Fakultät Für Biologie, Chemie Und Geowissenschaften - Mikrometeorologie - BayCEER. https://www.bayceer.uni-bayreuth.de/meteo/Klimagrafiken/BotG/BotG_2018_barplot_monthlyNS_vio_de.png
- Thomas, C. (2019a). *Klimadiagramm - Lufttemperatur botanischer Garten 2019*. Fakultät Für Biologie, Chemie Und Geowissenschaften - Mikrometeorologie - BayCEER. https://www.bayceer.uni-bayreuth.de/meteo/Klimagrafiken/BotG/BotG_2019_barplot_monthlyTA_vio_de.png
- Thomas, C. (2019b). *Klimadiagramm - Niederschlag botanischer Garten 2019*. Fakultät Für Biologie, Chemie Und Geowissenschaften - Mikrometeorologie - BayCEER. https://www.bayceer.uni-bayreuth.de/meteo/Klimagrafiken/BotG/BotG_2019_barplot_monthlyNS_vio_de.png
- Untergehrer, M., Kiermaier, J., Reintjes, S., Heilmann, J., & Jürgenliemk, G. (2019). Identification of phase-II metabolites from human serum samples after oral intake of a

- willow bark extract. *Phytomedicine*, 57, 396–402.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.11.003>
- Vinokurov, I. I. (1979). Flavonoid glycosides of *Salix rubra*. *Chemistry of Natural Compounds*, 15(3), 355–356. <https://doi.org/10.1007/BF00566096>
- Vlachojannis, J., Cameron, M., & Chrubasik, S. (2009). A systematic review on the effectiveness of willow bark for musculoskeletal pain. In *Phytotherapy Research* (Vol. 23, Issue 7, pp. 897–900). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.2747>
- Vlachojannis, J., Magora, F., & Chrubasik, S. (2011). Willow species and aspirin: Different mechanism of actions. *Phytotherapy Research*, 25(7), 1102–1104.
<https://doi.org/10.1002/ptr.3386>
- Wagner, H. (1974). Flavonoid glycosides. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe*, No.31, 153–216. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-7094-6_4
- Wagner, I., Biegert, C., & Heide, L. (2003). Phytoanalgetika: Aktuelle Forschungsergebnisse zur Weidenrinde. *Pharmazeutische Zeitung*, 148(13). <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/titel-13-2003/>
- Wagner, N. D. (2018). Die Verwandtschaft der europäischen Strauchweiden. *Biologie in Unserer Zeit*, 48(5), 324–331. <https://doi.org/10.1002/biuz.201810656>
- Wagner, N. D., He, L., & Hörandl, E. (2020). Phylogenomic relationships and evolution of polyploid *Salix* species revealed by RAD sequencing data. *Frontiers in Plant Science*, 11, 551716. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01077>
- Wahid, A., Hamed, A. N., Eltahir, H. M., & Abouzied, M. M. (2016). Hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Salix subserrata* against CCl4-induced chronic hepatotoxicity in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 263. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1238-2>
- Weidenrinde Salicis cortex. (2020). In *Europäisches Arzneibuch 10. Auflage, Grundwerk 2020, amtliche deutsche Ausgabe* (pp. 2498–2499). Deutscher Apotheker Verlag.
- Wichtl, Willuhn, & Loew. (2015). Weidenrinde - Salicis cortex. In W. Blaschek (Ed.), *Wichtl – Teedrogen und Phytopharmaka : Ein Handbuch für die Praxis* (pp. 575–577). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Wickham H, François R, Henry L, Müller K, V. D. (2023). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation* (R package version 1.1.2). <https://cran.r-project.org/package=dplyr>
- Wickham, H. (2022). *stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations* (R package version 1.5.0). <https://cran.r-project.org/package=stringr>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/https://doi.org/10.21105/joss.01686>

- Wickham, H., & Bryan, J. (2023). *readxl: Read Excel Files* (R package version 1.4.2). <https://cran.r-project.org/package=readxl>
- Wickham, H., Hester, J., & Bryan, J. (2023). *readr: Read Rectangular Text Data* (R package version 2.1.4). <https://cran.r-project.org/package=readr>
- Wiesneth, S. (2019). *Phytochemische Untersuchung des phenolischen Inhaltsstoffspektrums in Salix Spezies unter besonderer Berücksichtigung der Flavan-3-ole*. <https://doi.org/10.5283/epub.36496>
- Wiesneth, S., Aas, G., Heilmann, J., & Jürgenliemk, G. (2018). Investigation of the flavan-3-ol patterns in willow species during one growing-season. *Phytochemistry*, 145, 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.10.001>
- Wiesneth, S., & Jürgenliemk, G. (2017). Total phenolic and tannins determination: a modification of Ph. Eur. 2.8.14 for higher throughput. *Pharmazie*, 72(4), 195–196. <https://doi.org/10.1691/ph.2017.6911>
- Wiesneth, S., Petereit, F., & Jürgenliemk, G. (2015). *Salix daphnoides*: A screening for oligomeric and polymeric proanthocyanidins. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(8), 13764–13779. <https://doi.org/10.3390/molecules200813764>
- Wilke, C. (2020). *cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for “ggplot2”* (R package version 1.1.1). <https://cran.r-project.org/package=cowplot>
- Willow bark dry extract *Salicis corticis extractum siccum*. (2023). In *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 11th Edition*, (pp. 1779–1780). EDQM Council of Europe.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
- World Health Organization. (2009). *Cortex Salicis*. In *WHO monographs on selected medicinal plants* (Vol. 4, pp. 309–322).
- Wu, J., Nyman, T., Wang, D. C., Argus, G. W., Yang, Y. P., & Chen, J. H. (2015). Phylogeny of *Salix* subgenus *Salix* s.l. (Salicaceae): Delimitation, biogeography, and reticulate evolution Neuromuscular disorders and peripheral neurology. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0311-7>
- Xie, D.-Y., & Dixon, R. A. (2005). Proanthocyanidin biosynthesis - Still more questions than answers? In *Phytochemistry* (Vol. 66, Issue 18 SPEC. ISS., pp. 2127–2144). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.008>
- Yang, G., Xu, Q., Li, W., Ling, J., Li, X., & Yin, T. (2020). Sex-related differences in growth, herbivory, and defense of two *salix* species. *Forests*, 11(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/F11040450>
- Zapesochnaya, G. G., Kurkin, V. A., Braslavskii, V. B., & Filatova, N. V. (2002). Phenolic compounds of *Salix acutifolia* bark. *Chemistry of Natural Compounds*, 38(4), 314–318. <https://doi.org/10.1023/A:1021661621628>

- Zenk, M. H. (1967). Pathways of salicyl alcohol and salicin formation in *Salix purpurea* L. *Phytochemistry*, 6(2), 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82770-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82770-3)
- Zidorn, C. (2018). Seasonal variation of natural products in European trees. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 17, pp. 923–935). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9570-4>

Anhang

Scap_27

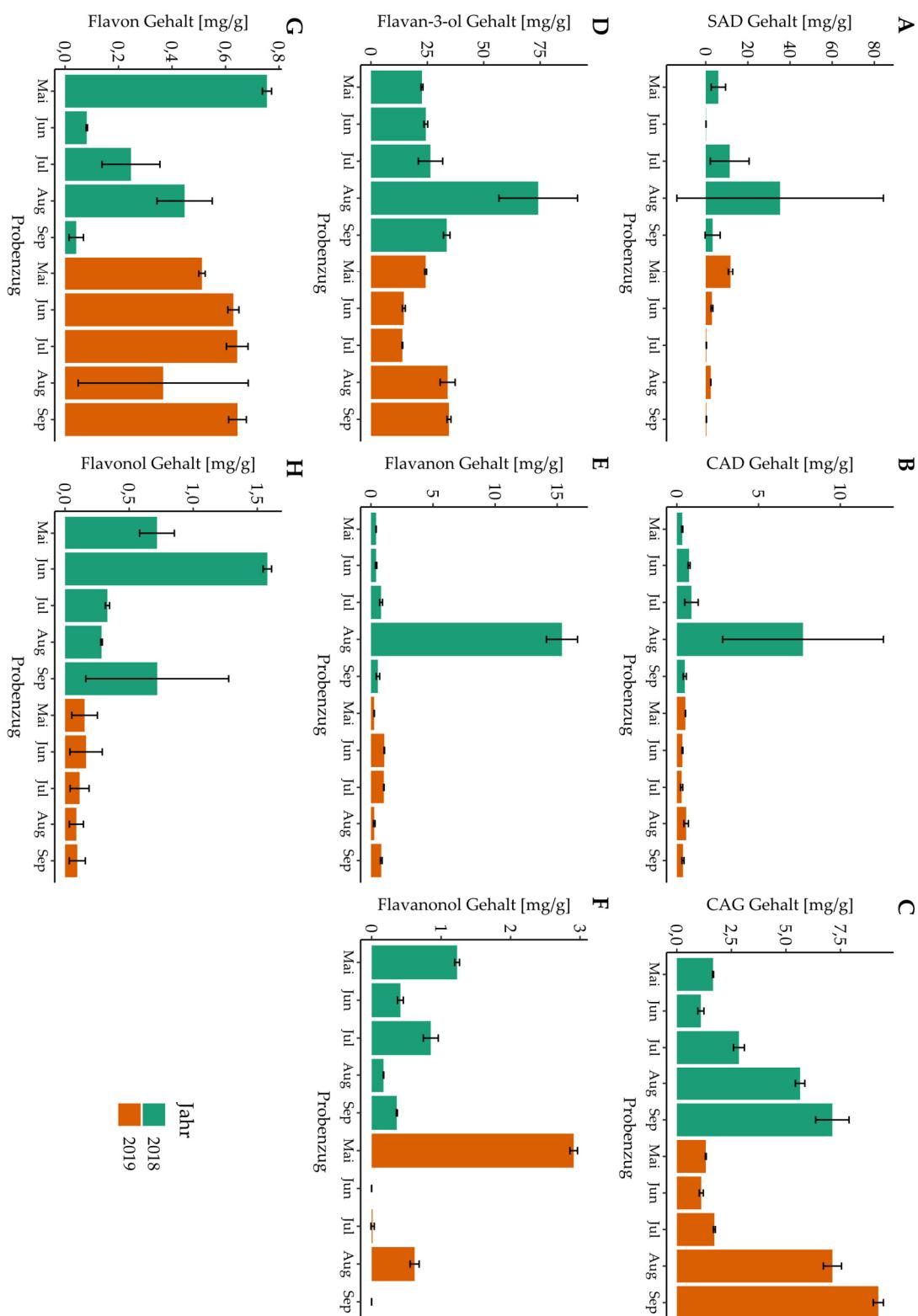


Abbildung 114: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. caprea* (Scap_27, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Scap_28

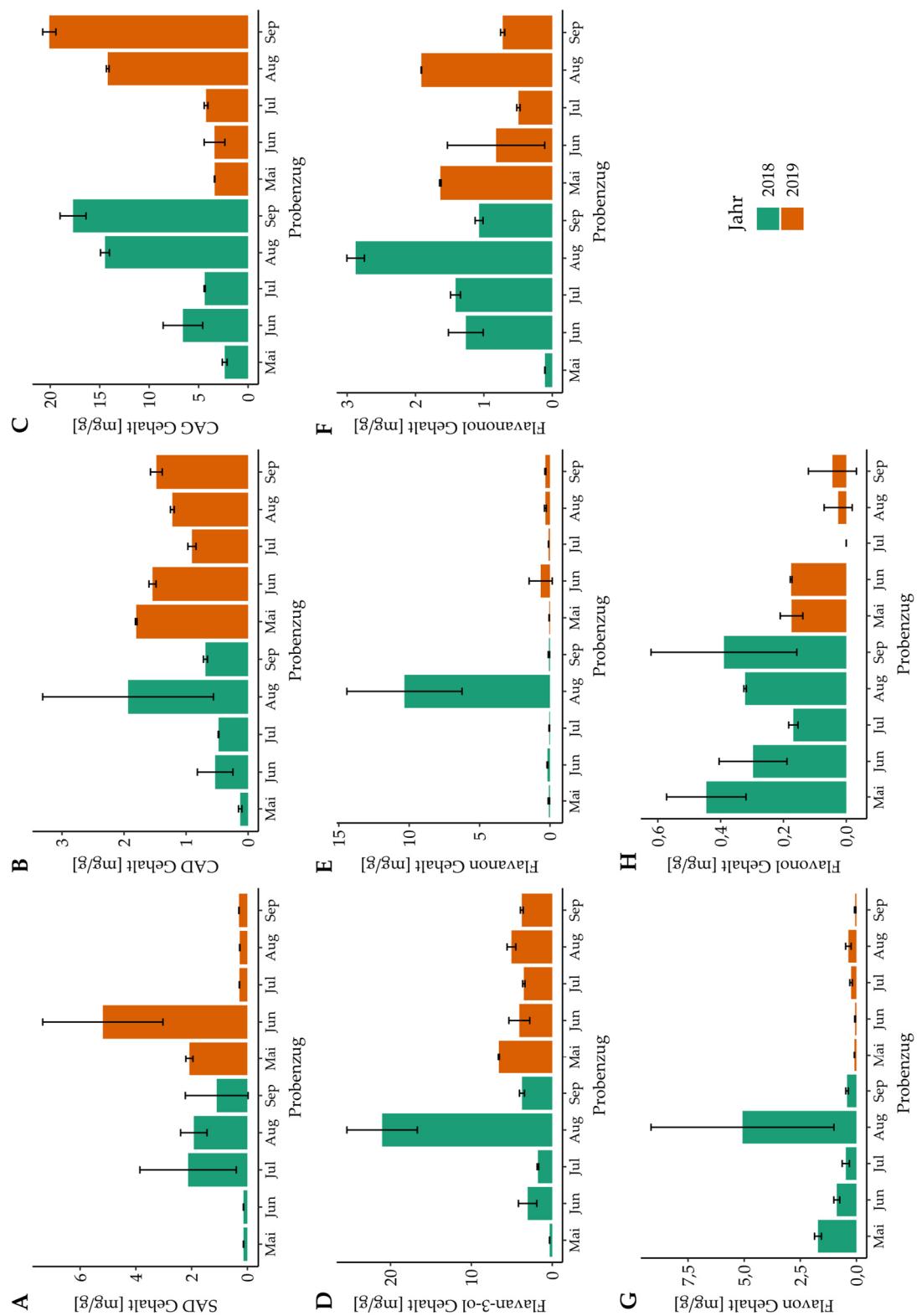


Abbildung 115: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. caprea* (Scap_28, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Scap_29

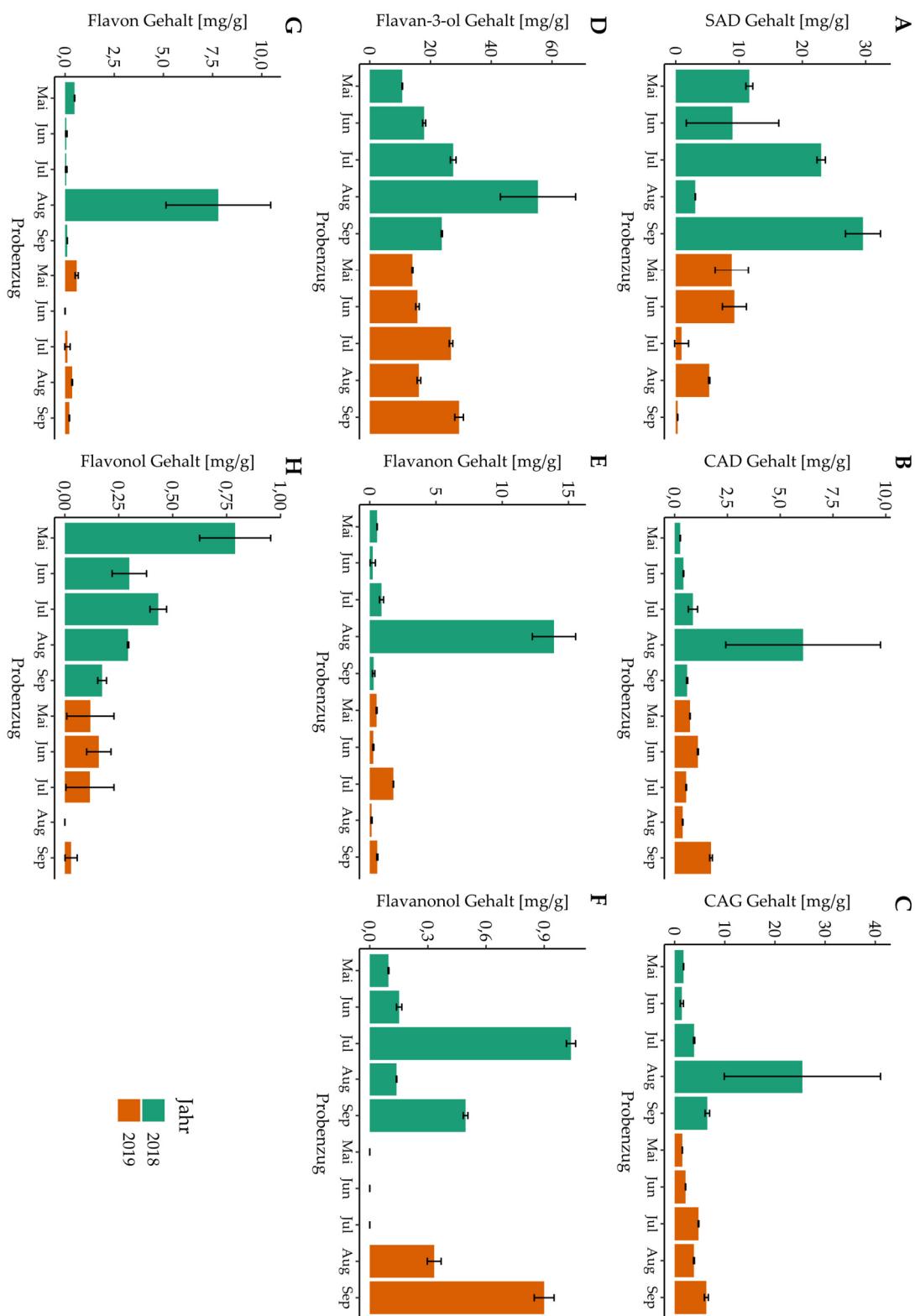


Abbildung 116: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. caprea* (Scap_29, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Scap_31

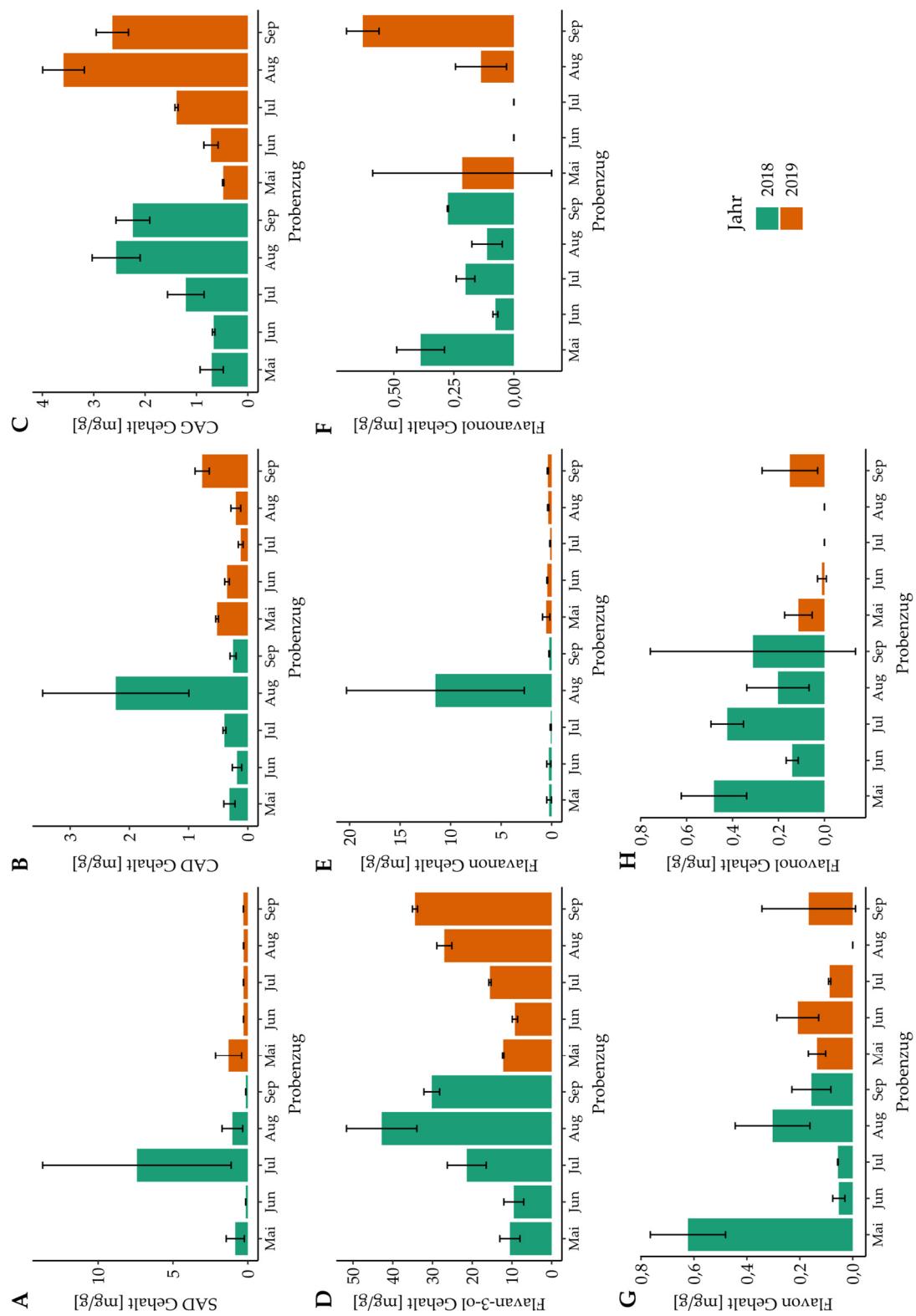


Abbildung 117: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. caprea* (Scap_31, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Scap_32

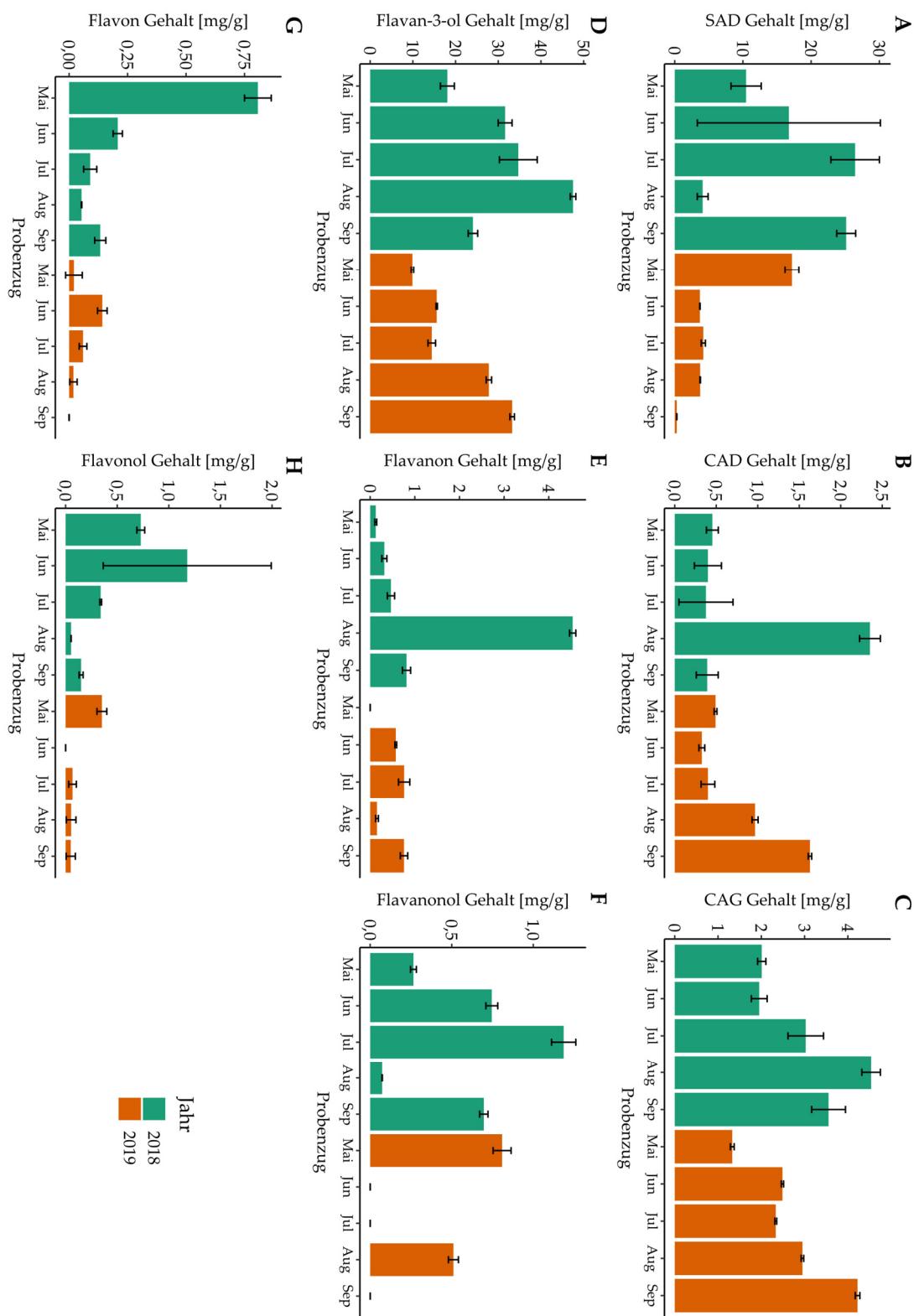


Abbildung 118: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. caprea* (Scap_32, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droege (MW±SD)

Scin_36

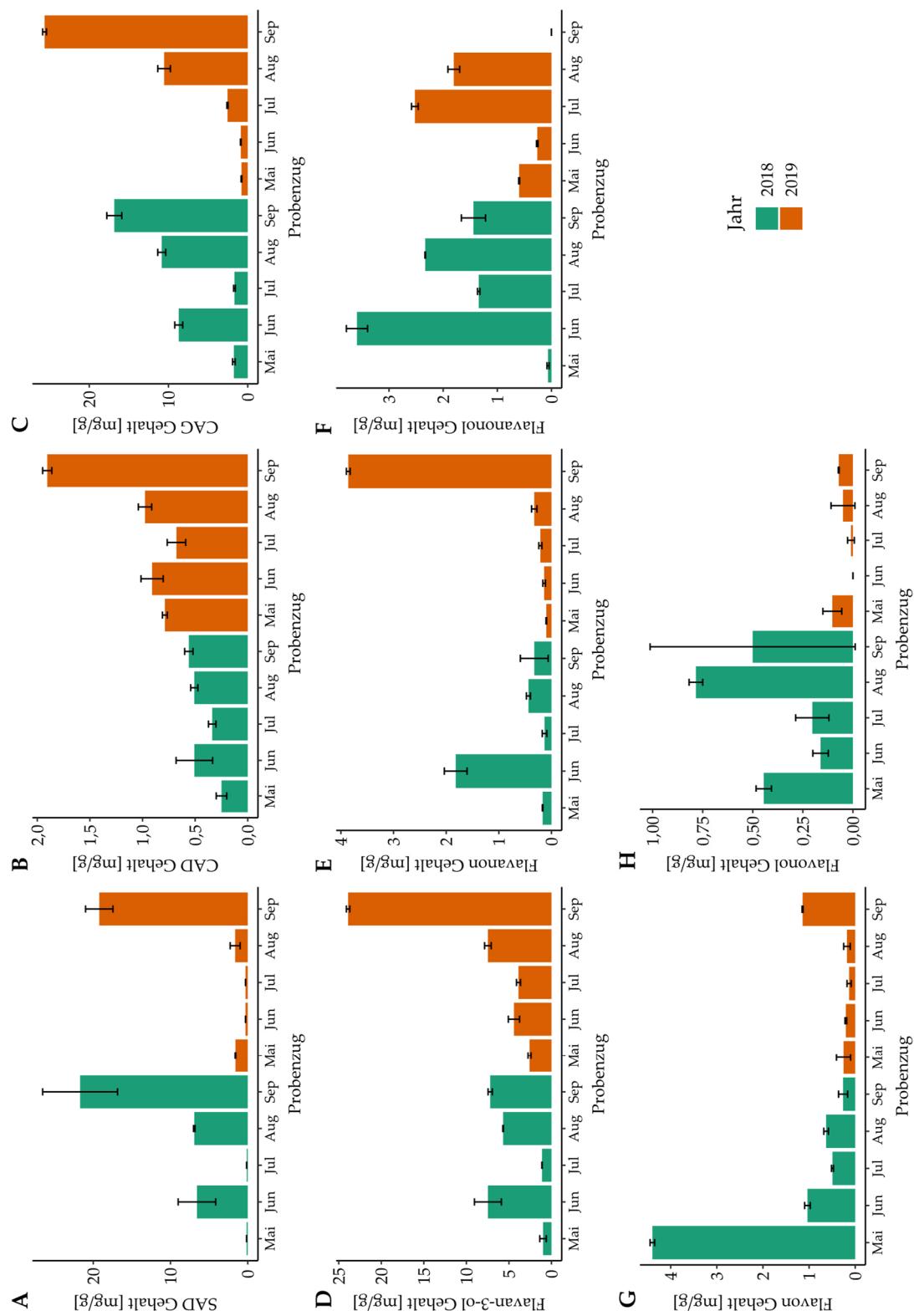


Abbildung 119: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. cinerea* (Scin_36 vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

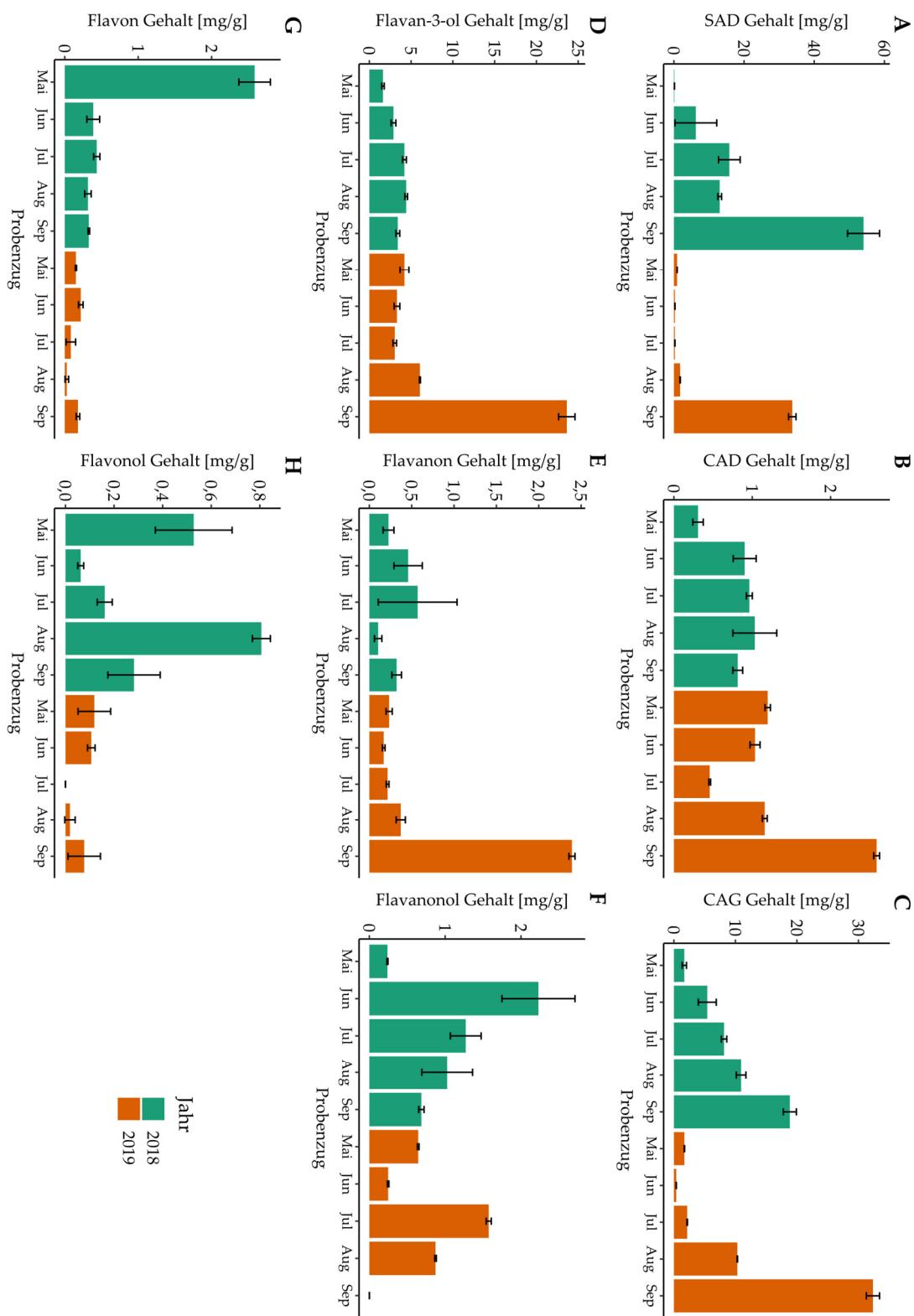


Abbildung 120: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. cinerea* (Scin_37 vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW ± SD)

Scin_38

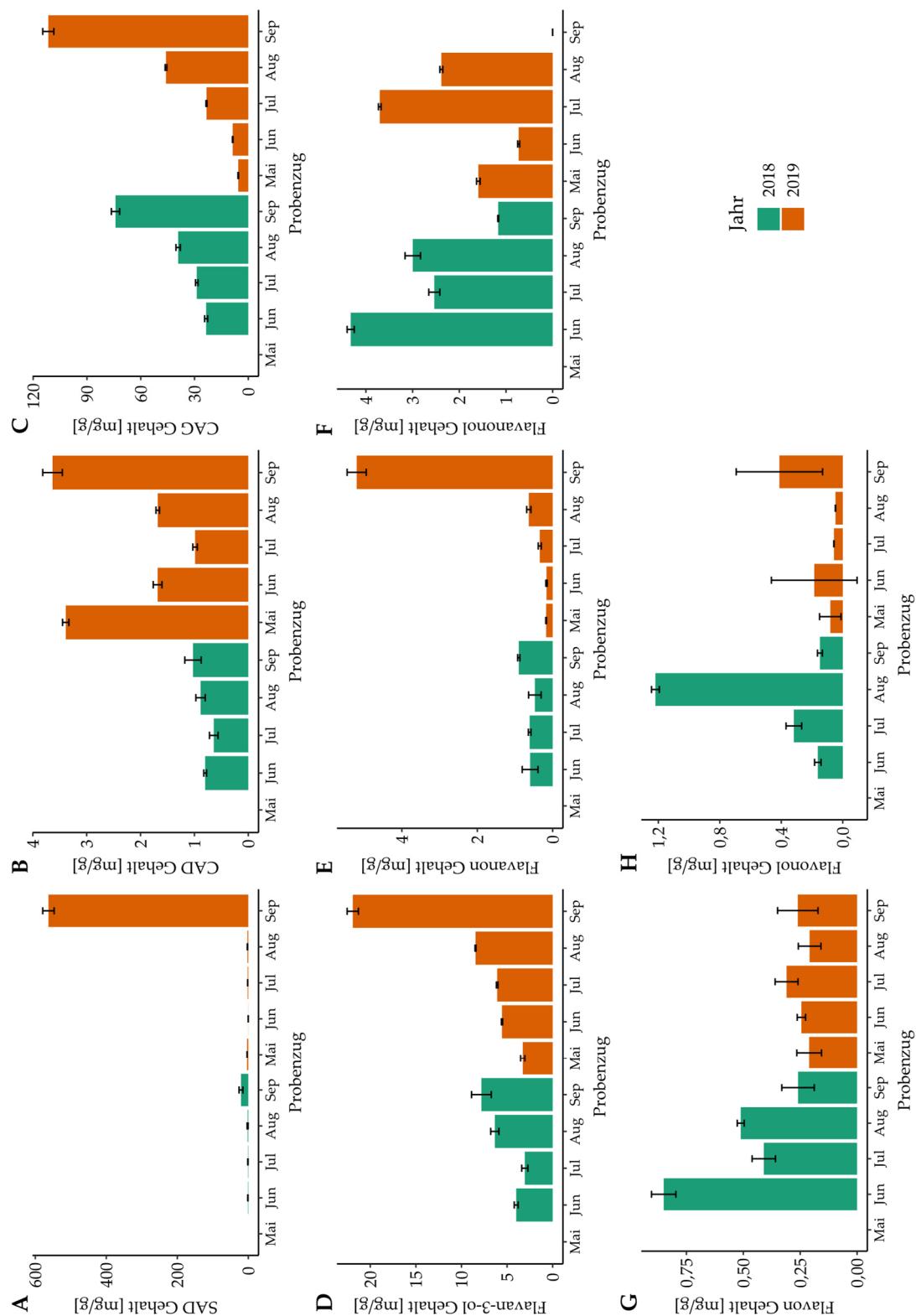


Abbildung 121: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. cinerea* (Scin_38 vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Scin_39

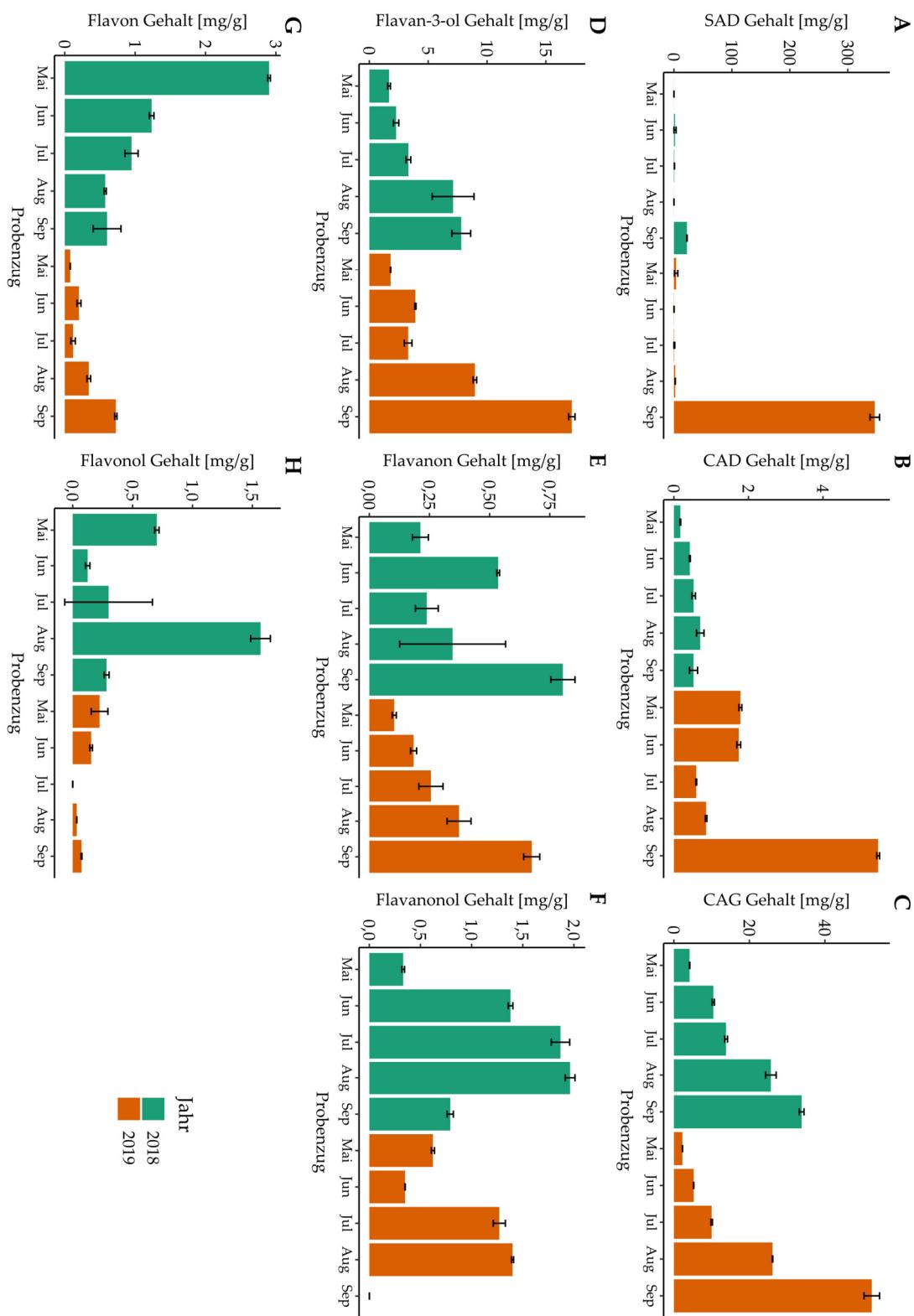


Abbildung 122: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. cinerea* (Scin_39 vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droege (MW±SD)

Scin_40

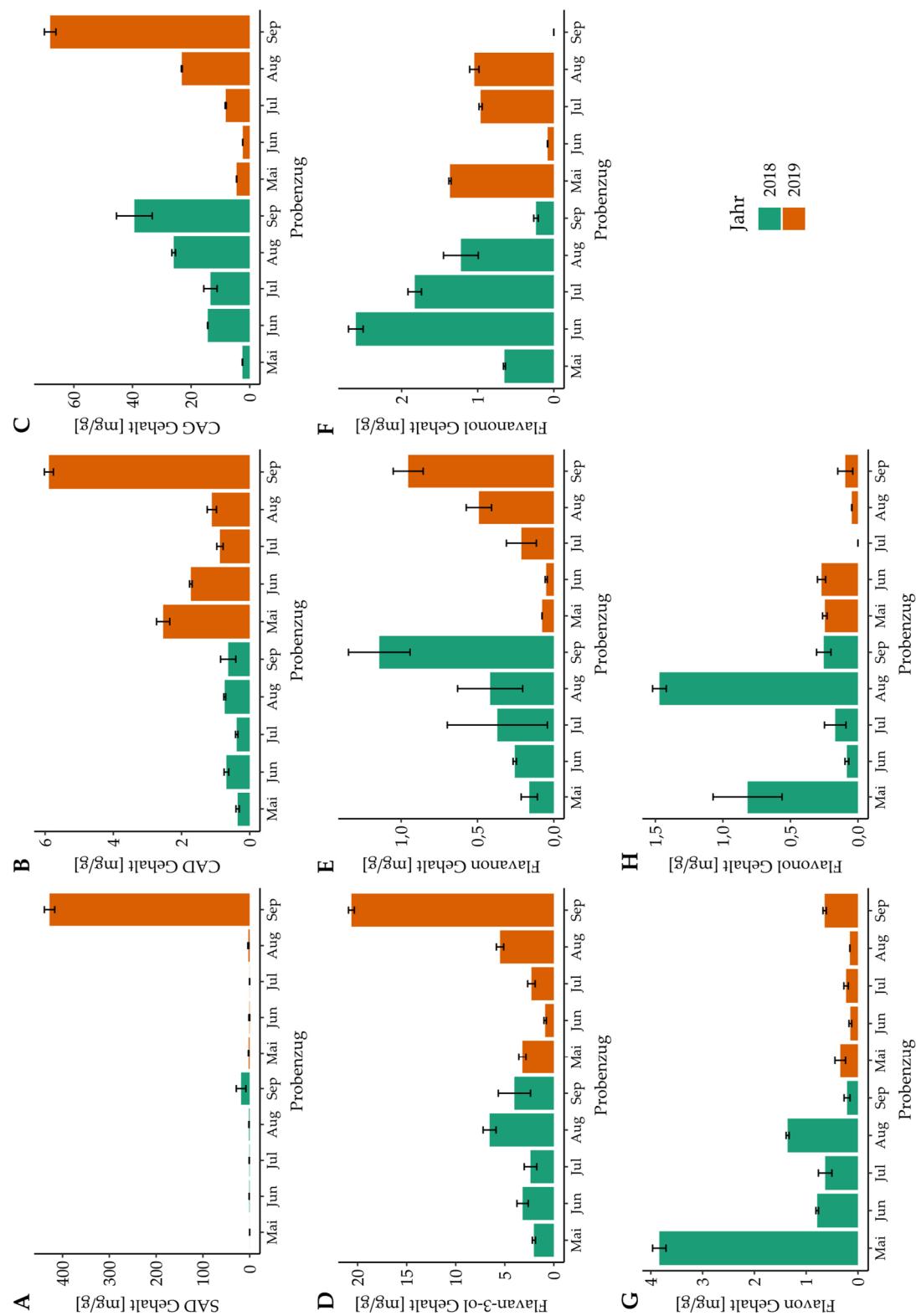


Abbildung 123: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. cinerea* (Scin_40 vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der unter 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ol, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

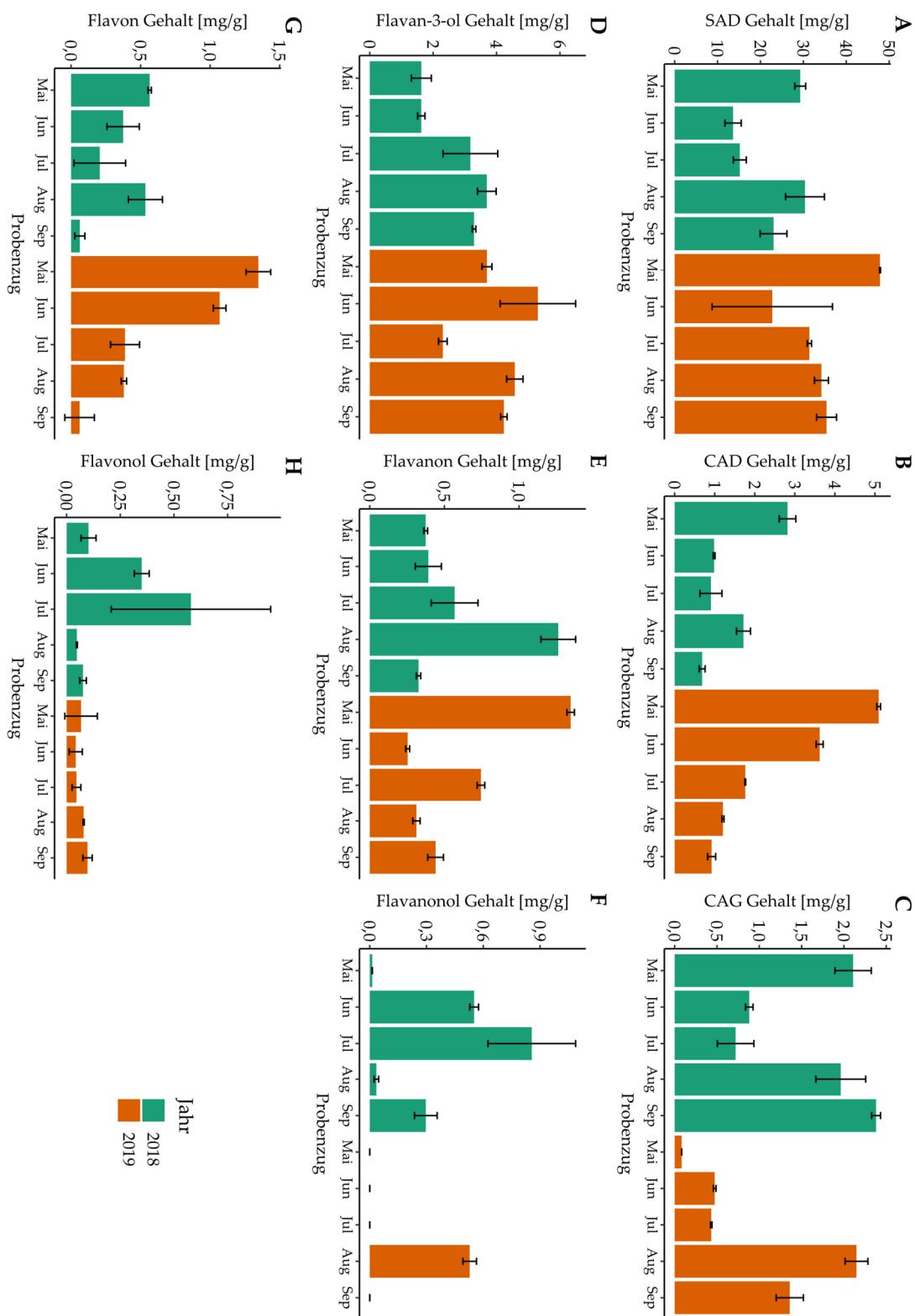


Abbildung 124: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. fragilis* (Sfra_41, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Sfra_42

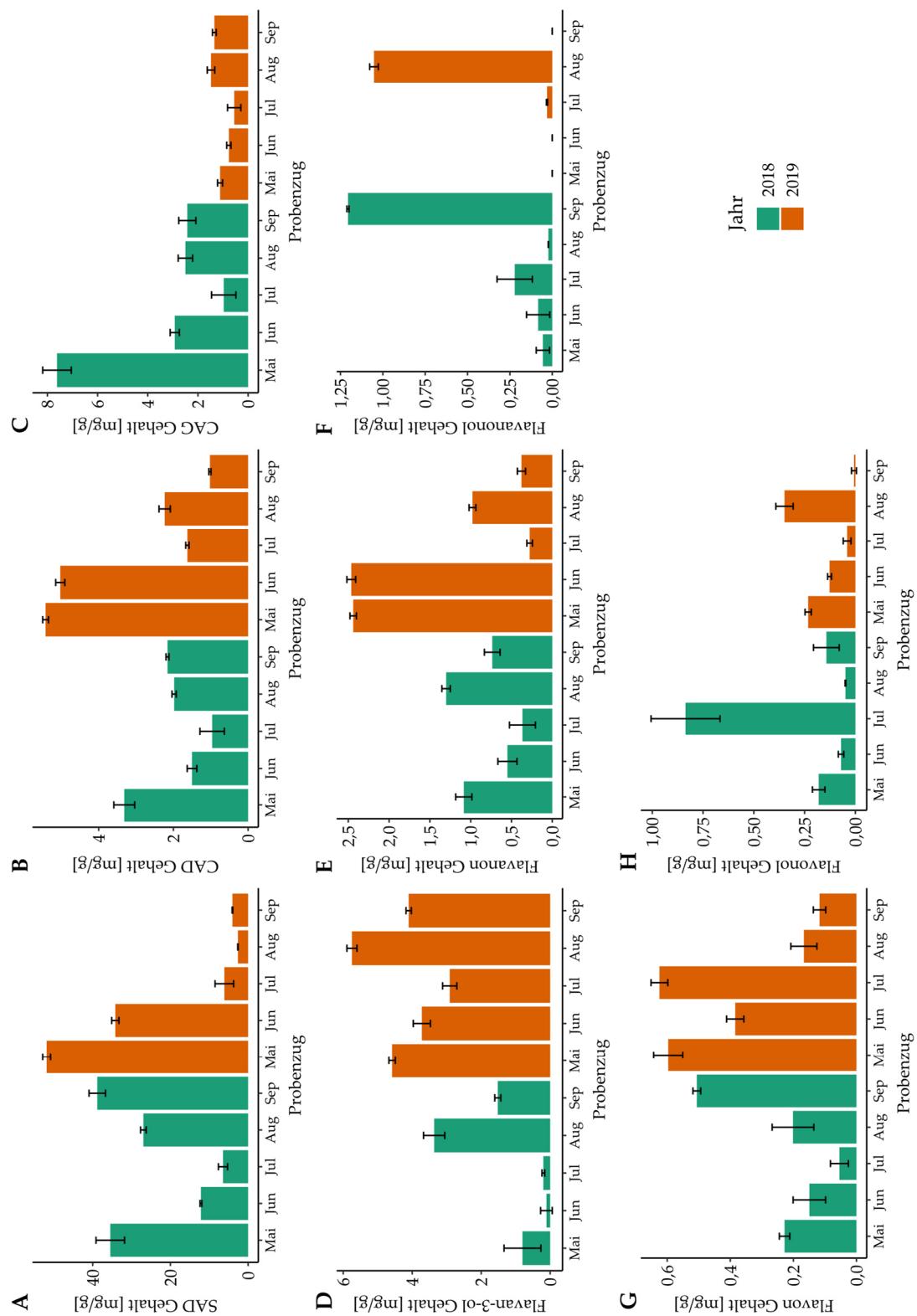


Abbildung 125: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. fragilis* (Sfra_42, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

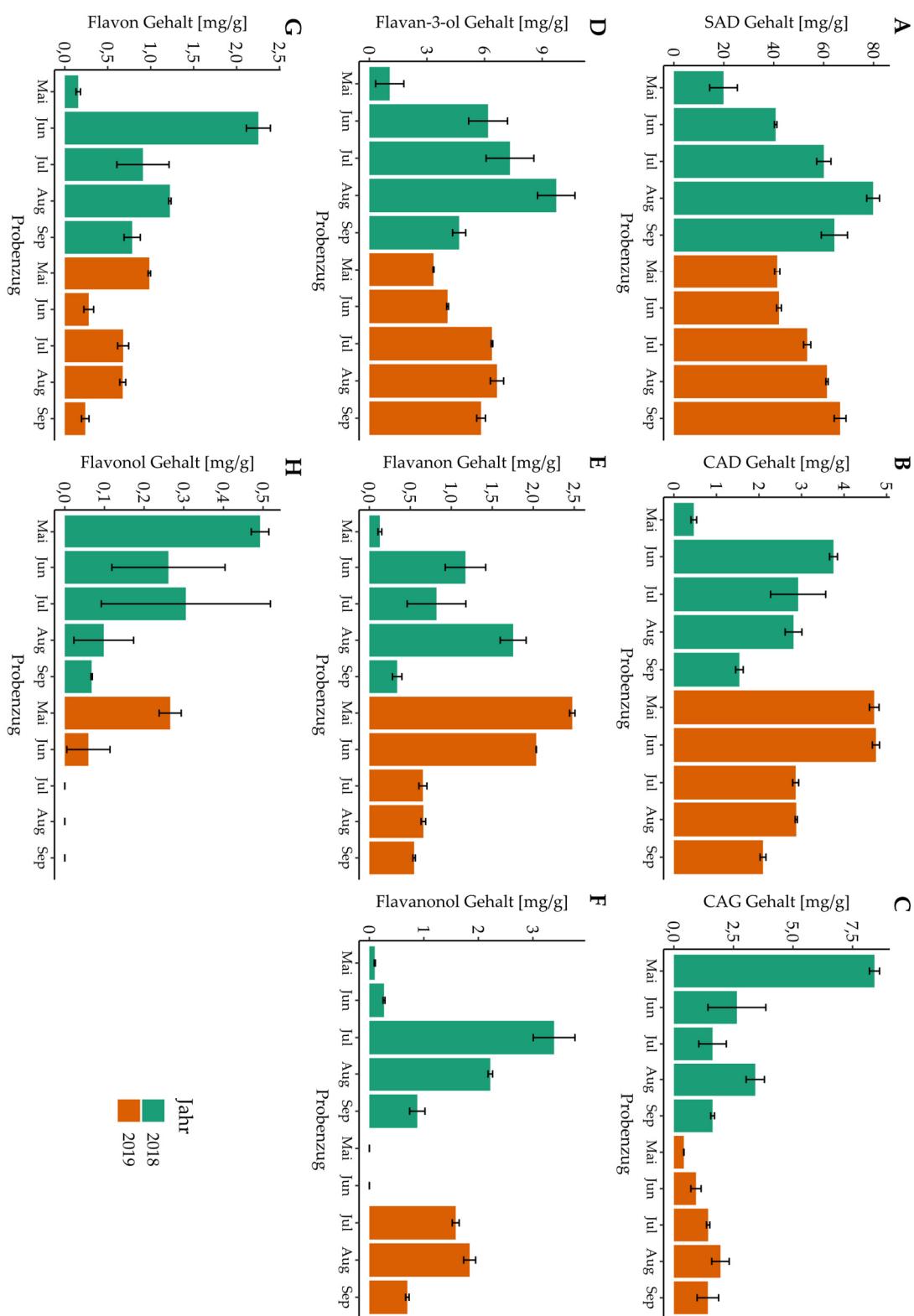


Abbildung 126: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. fragilis* (Sfra_43, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Sfra_44

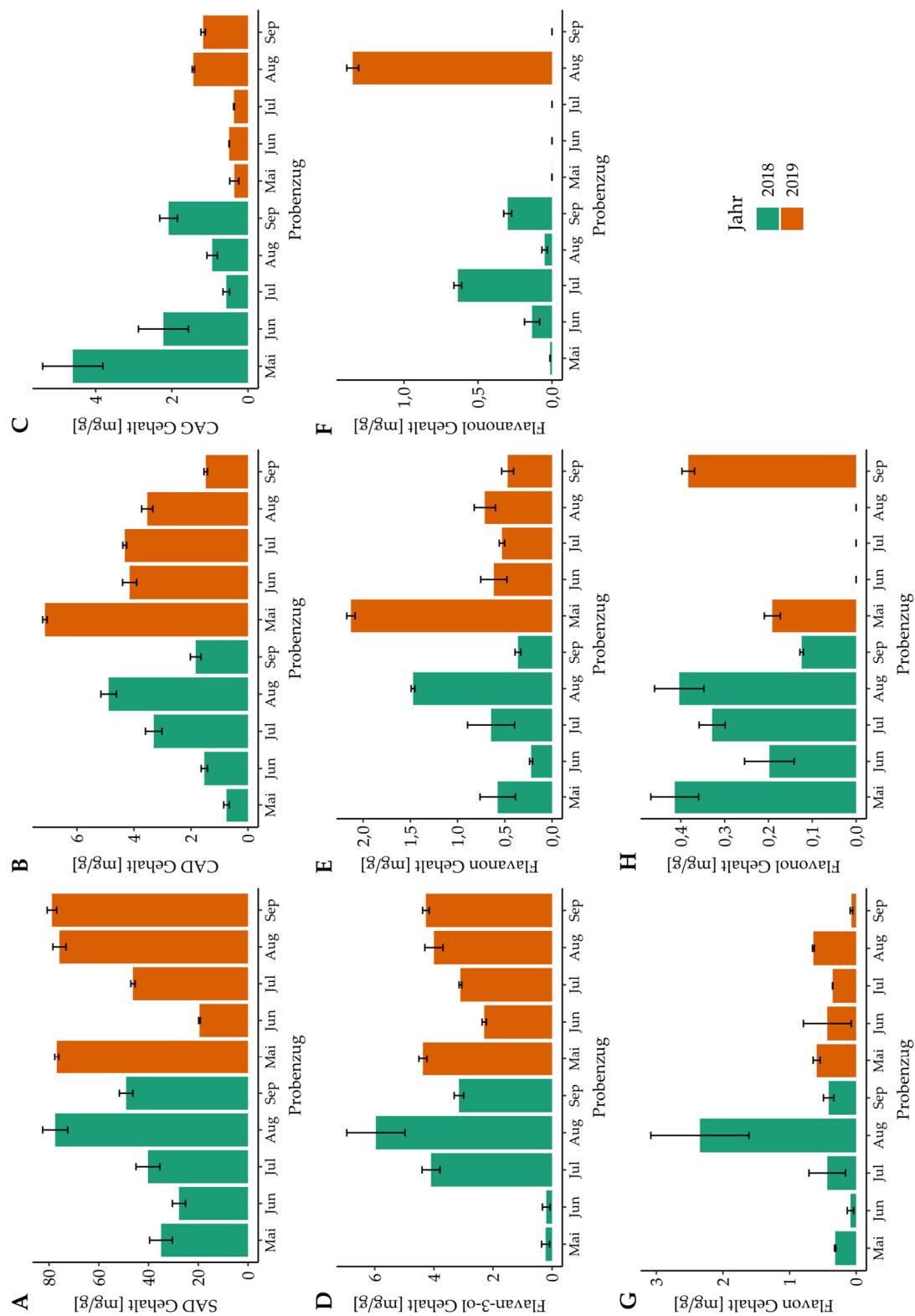


Abbildung 127: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. fragilis* (Sfra_44, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Sfra_45

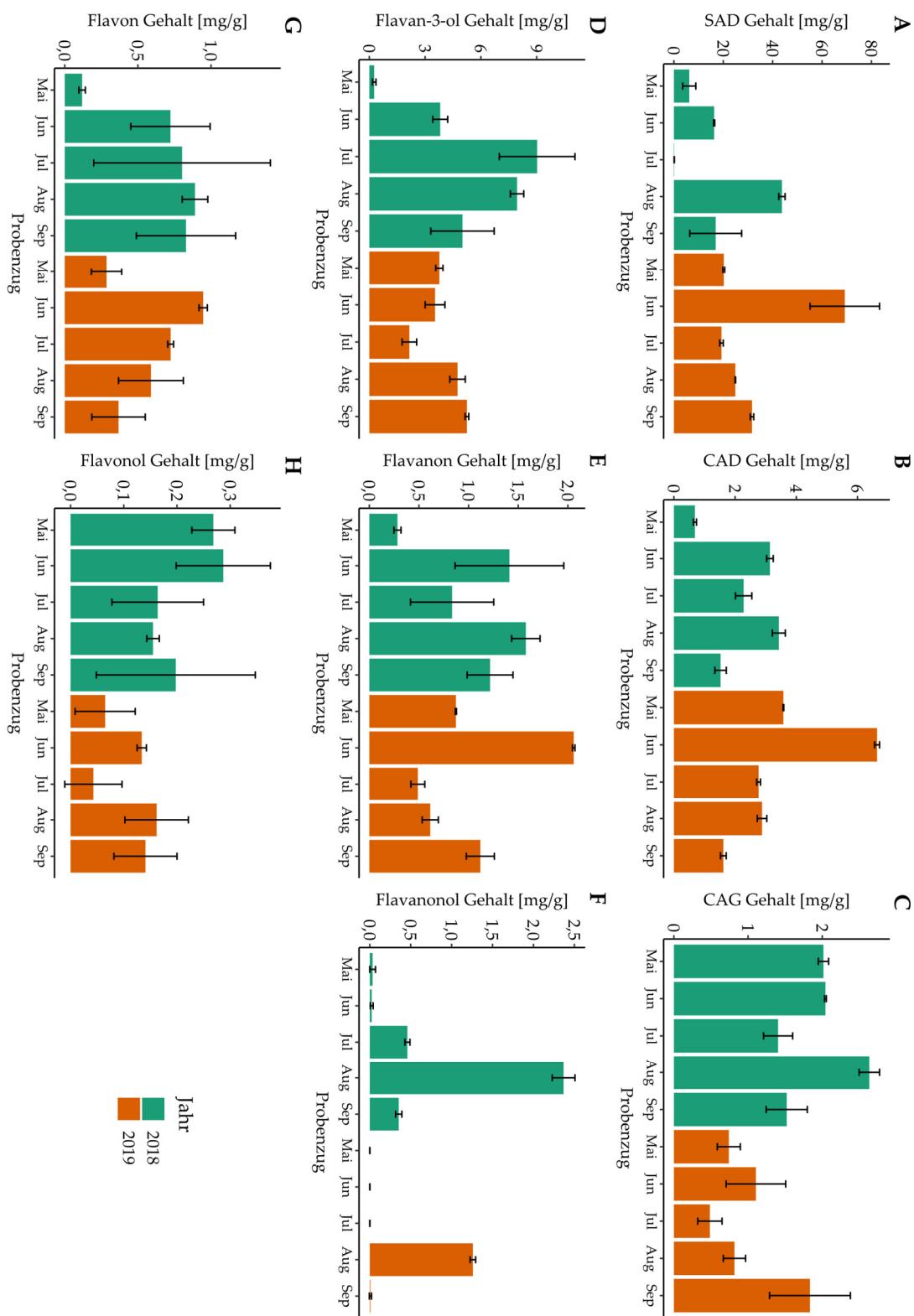


Abbildung 128: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. fragilis* (Sfra_45, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Spur_46

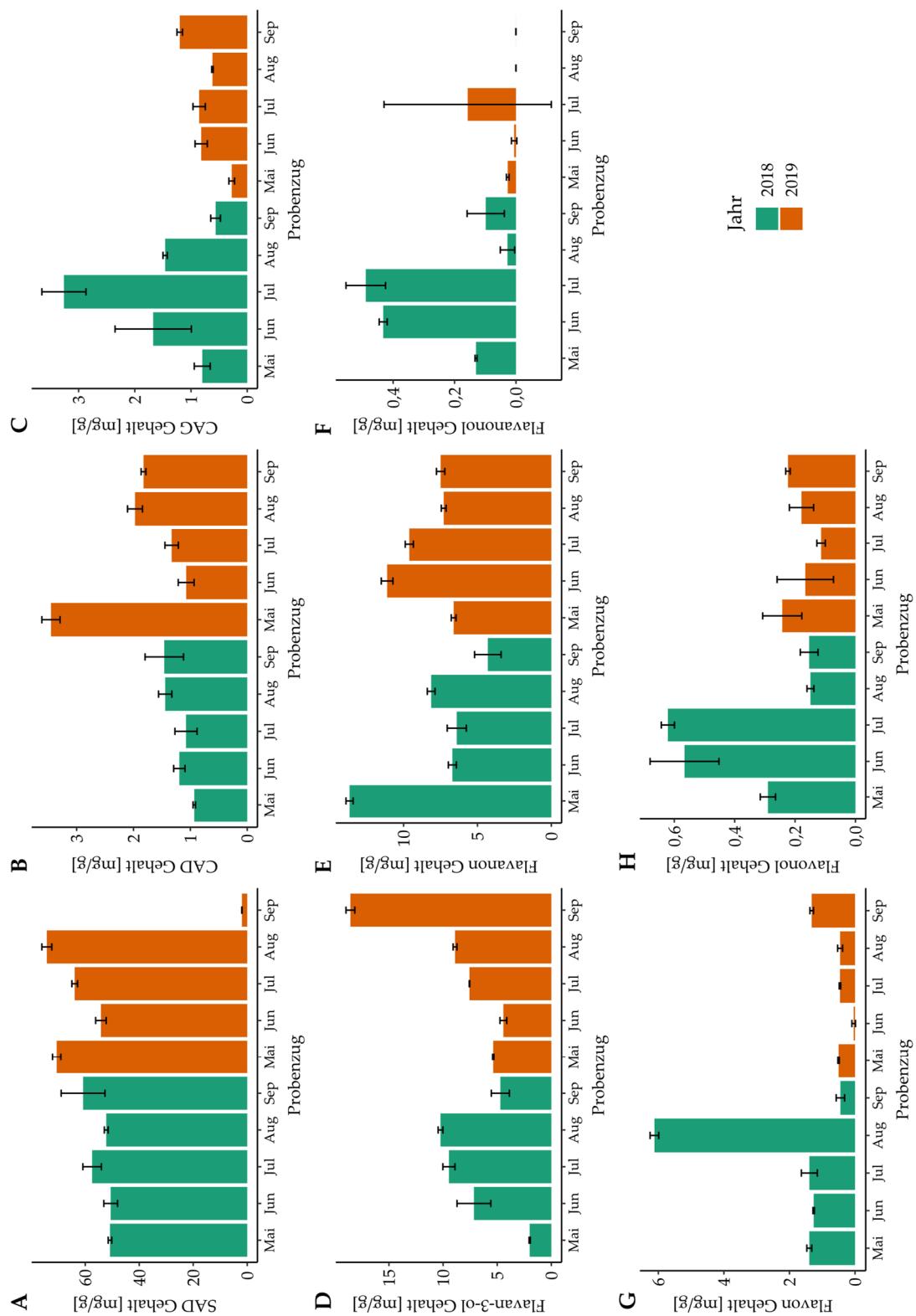


Abbildung 129: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. purpurea* (Spur_46, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Spur_47

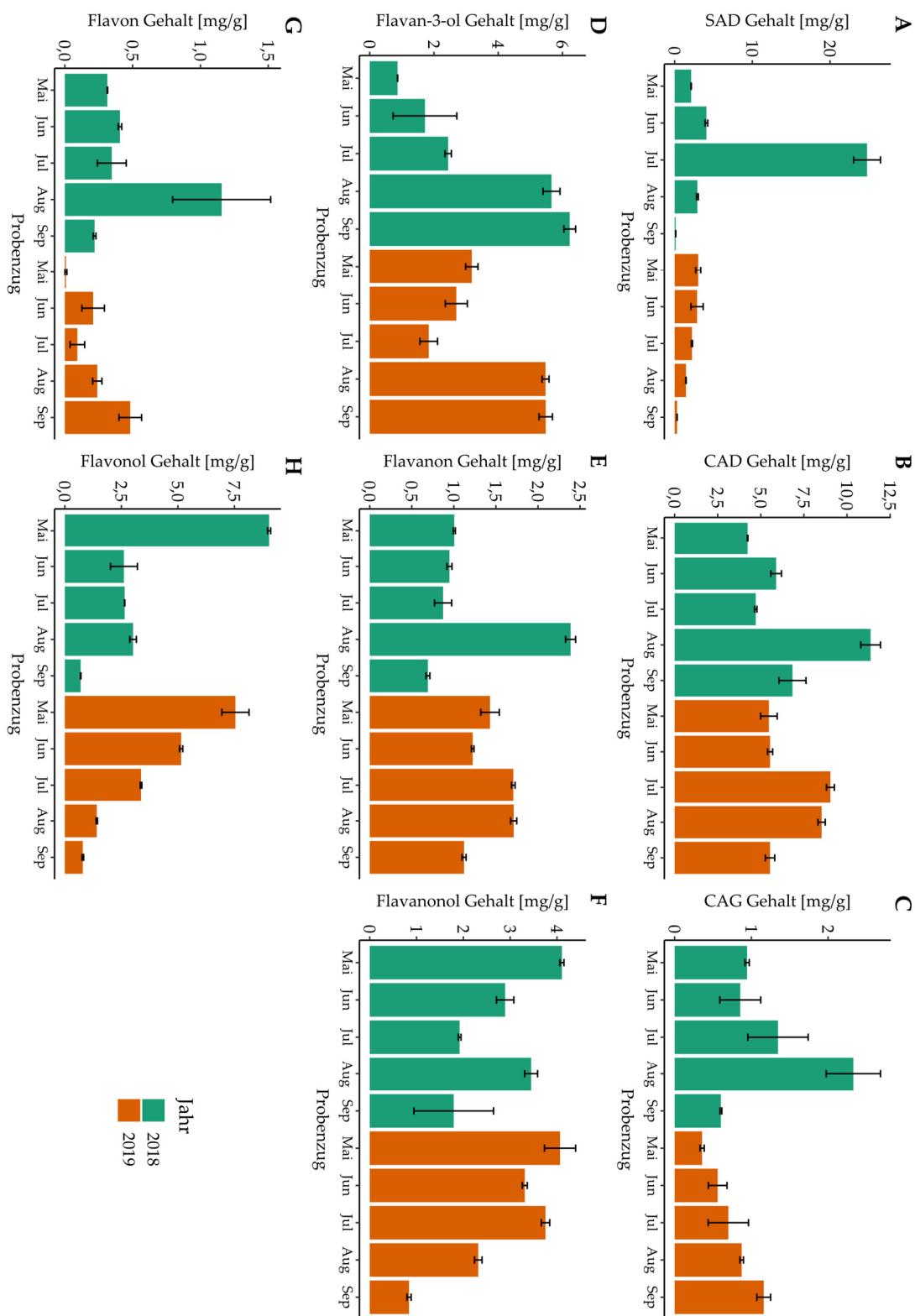


Abbildung 130: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. purpurea* (Spur_47, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Spur_48

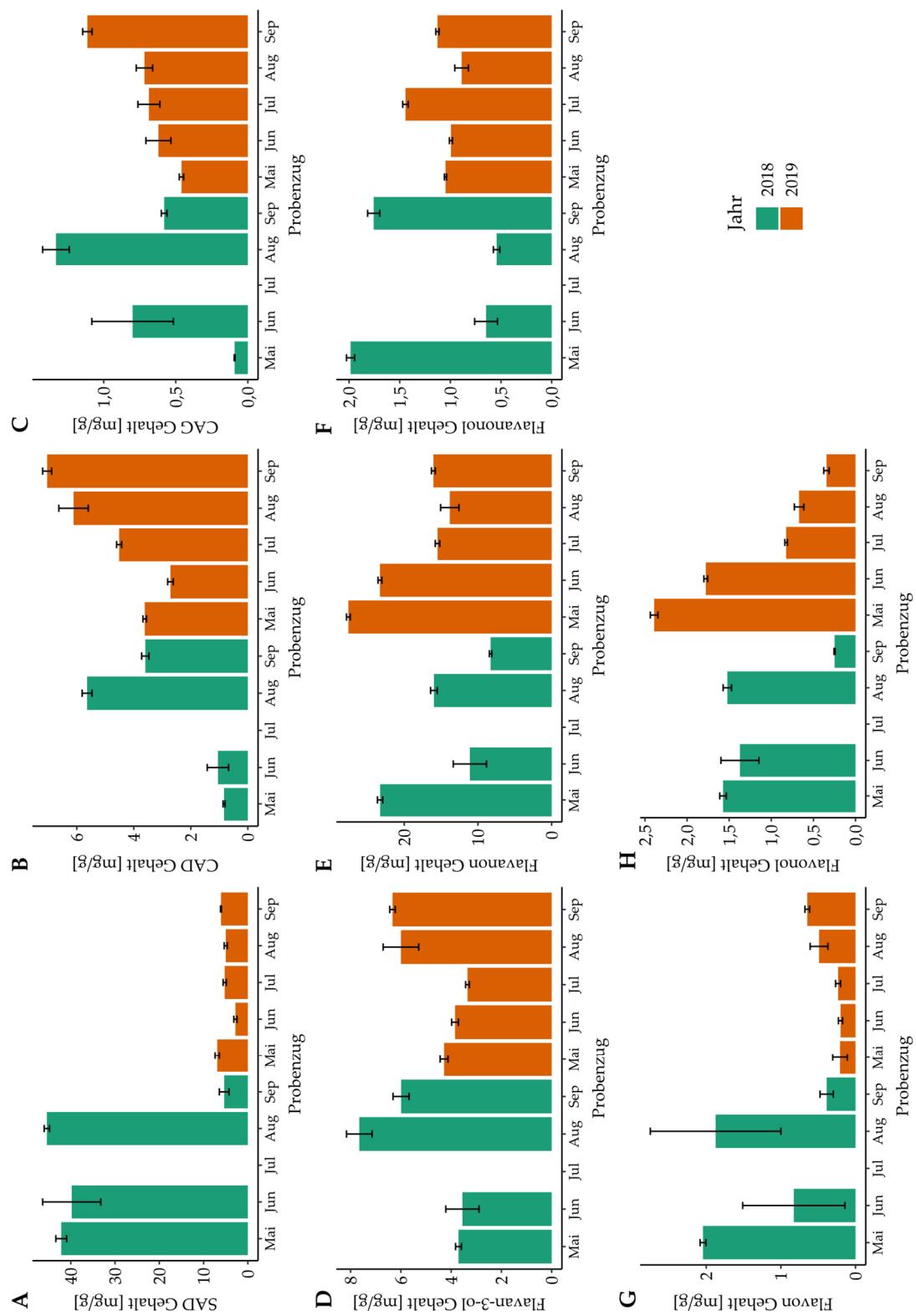


Abbildung 131: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. purpurea* (Spur_48, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

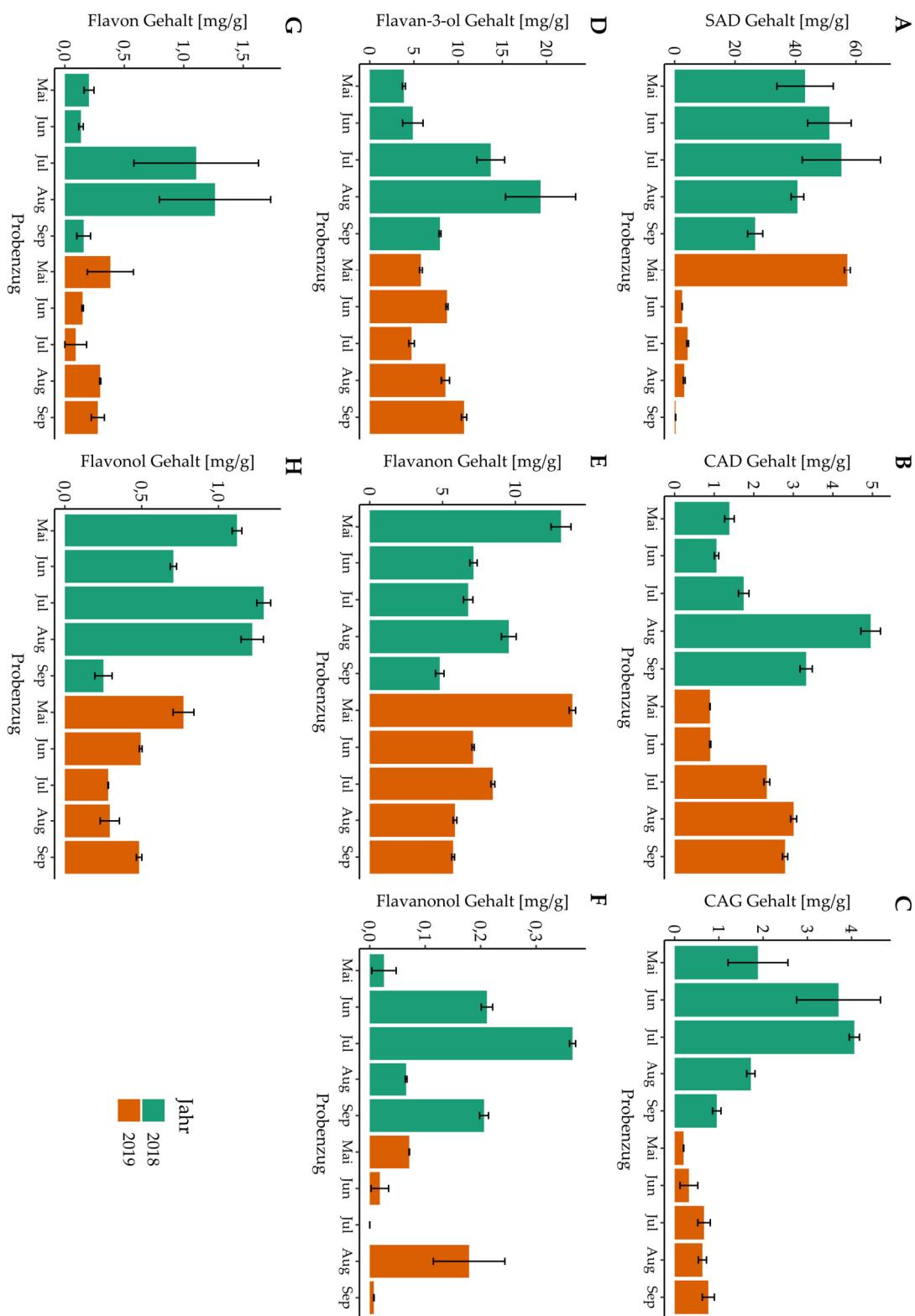


Abbildung 132: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. purpurea* (Spur_49, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Spur_50

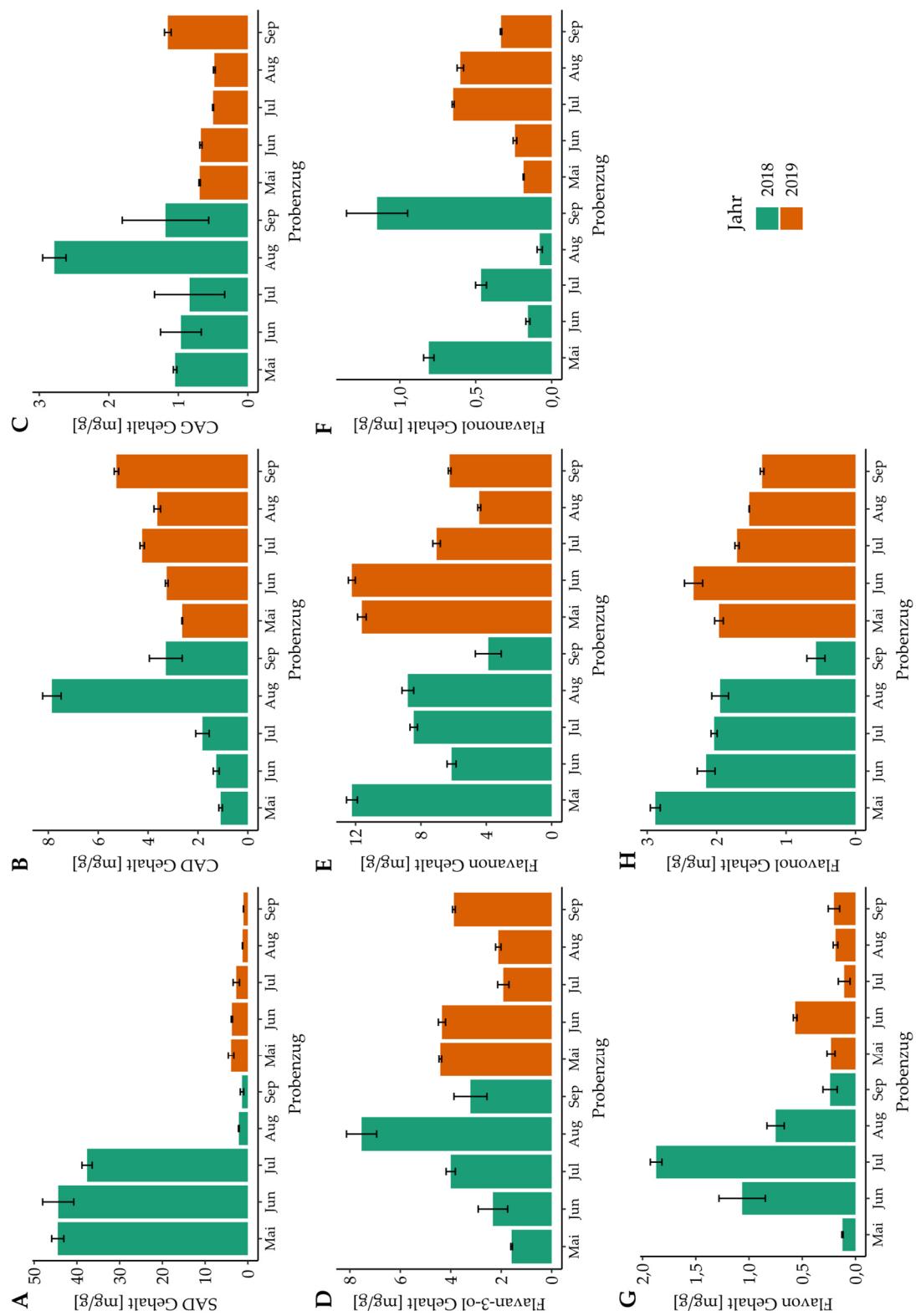


Abbildung 133: Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe in *S. purpurea* (Spur_50, vgl. 6.2.2.2) unter Anwendung der in 6.2.4 vorgestellten UPLC®-RP18-PDA Methode nach Monat des Probenzugs und Jahr; A: Salicylalkoholderivate (SAD), B: Kaffeesäurederivate (CAD), C: Cumarylalkoholglykoside (CAG), D: Flavan-3-ole, E: Flavanone, F: Flavanonole, G: Flavone, H: Flavonole; Werte jeweils in mg/g getrockneter Droge (MW±SD)

Tabelle 70: Kennzahlen der in im UPLC®-RP18-PDA Screening ermittelten Gehalte an CAD; aufgeführt sind die geringsten Gehalte (Min), das erste Quartil (Q1), das arithmetische Mittel (MW), der Median (Median) das 75%-Quartil (Q3) und der Maximalwert, jeweils berechnet für alle erhobenen Probenzüge je Individuum; Angabe in mg/g TD

ID_Individuum	Min	Q1	Mean	Median	Q3	Max
Saur_22	0,35	0,76	1,43	1,12	1,28	6,35
Sbic_19	0,11	0,26	0,52	0,35	0,53	2,28
Scae_21	0,80	0,98	1,38	1,05	1,41	4,21
Scap_26	0,35	0,47	1,29	0,72	0,90	6,54
Scap_27	0,29	0,35	1,23	0,50	0,71	7,72
Scap_28	0,13	0,57	1,07	1,06	1,53	1,93
Scap_29	0,26	0,45	1,27	0,66	1,04	6,09
Scap_30	0,26	0,42	0,82	0,57	0,97	2,33
Scap_31	0,12	0,21	0,53	0,33	0,49	2,23
Scap_32	0,33	0,39	0,78	0,43	0,85	2,35
Scap_33	0,21	0,26	0,69	0,35	0,46	3,32
Scin_08	0,36	0,68	1,86	1,10	2,03	7,58
Scin_34	0,32	0,48	0,83	0,84	0,95	1,92
Scin_35	0,39	0,73	1,20	0,87	1,32	2,68
Scin_36	0,25	0,51	0,74	0,62	0,88	1,91
Scin_37	0,31	0,84	1,05	1,00	1,13	2,59
Scin_38	0,64	0,89	1,64	1,03	1,68	3,63
Scin_39	0,17	0,53	1,28	0,65	1,52	5,48
Scin_40	0,35	0,64	1,49	0,80	1,57	5,89
Sdap_02	0,68	1,68	2,50	1,91	2,81	5,89
Sdap_03	2,37	2,51	4,63	3,50	5,04	14,23
Sdap_16	1,14	2,73	4,60	3,94	5,10	15,07
Sfra_04	2,36	3,27	4,44	4,35	5,58	6,95
Sfra_17	0,56	1,48	2,26	2,04	2,79	4,38
Sfra_18	0,90	1,80	3,21	2,55	4,72	7,09
Sfra_41	0,69	0,94	1,97	1,46	2,55	5,09
Sfra_42	0,96	1,53	2,52	2,07	3,05	5,42
Sfra_43	0,47	2,27	2,88	2,87	3,54	4,75
Sfra_44	0,75	1,61	3,29	3,42	4,28	7,12
Sfra_45	0,69	1,78	2,85	2,83	3,36	6,64
Shas_20	1,39	1,95	2,44	2,47	2,78	3,62
Slap_24	0,13	0,19	0,40	0,25	0,36	1,42
Spur_01	1,09	1,44	3,09	2,25	3,91	8,65
Spur_14	1,59	2,33	3,80	3,17	4,36	9,87
Spur_15	0,33	0,84	2,02	1,81	3,17	4,52
Spur_46	0,93	1,11	1,58	1,39	1,73	3,45
Spur_47	4,23	5,48	6,71	5,71	8,10	11,37
Spur_48	0,84	2,71	3,90	3,62	5,64	7,04
Spur_49	0,89	1,14	2,24	2,04	2,95	4,96
Spur_50	1,09	2,02	3,43	3,27	4,09	7,86
Svim_23	0,07	0,51	0,79	0,64	0,69	3,76
Sxse_25	0,29	0,93	1,39	1,26	1,33	4,56

Tabelle 71: Kennzahlen der in im UPLC®-RP18-PDA Screening ermittelten Gehalte an CAG; aufgeführt sind die geringsten Gehalte (Min), das erste Quartil (Q1), das arithmetische Mittel (MW), der Median (Median) das 75%-Quartil (Q3) und der Maximalwert, jeweils berechnet für alle erhobenen Probenzüge je Individuum; Angabe in mg/g TD

ID_Individuum	Min	Q1	Mean	Median	Q3	Max
Saur_22	3,07	6,93	10,72	9,36	12,27	29,10
Sbic_19	10,07	28,33	45,42	42,72	45,93	147,15
Scae_21	0,24	1,63	2,06	1,98	2,28	5,24
Scap_26	1,52	2,44	5,21	3,74	8,33	10,16
Scap_27	1,10	1,41	3,89	2,28	6,76	9,23
Scap_28	2,36	3,61	9,08	5,49	14,39	20,09
Scap_29	1,44	1,88	5,78	3,87	5,93	25,47
Scap_30	0,95	1,89	2,92	2,68	3,79	5,77
Scap_31	0,48	0,71	1,62	1,30	2,48	3,59
Scap_32	1,33	2,09	2,84	2,72	3,42	4,54
Scap_33	0,75	0,94	2,14	1,65	2,70	5,75
Scin_08	1,02	3,31	12,44	6,17	15,43	50,60
Scin_34	1,68	3,30	13,22	9,75	17,23	49,85
Scin_35	0,72	4,23	13,18	12,75	16,38	40,43
Scin_36	0,79	1,70	8,03	5,63	10,78	25,64
Scin_37	0,39	1,82	9,20	6,79	10,78	32,36
Scin_38	5,60	23,32	40,07	28,75	45,92	111,58
Scin_39	2,26	6,43	18,40	12,13	26,02	52,41
Scin_40	2,37	5,41	20,18	13,86	25,25	68,09
Sdap_02	0,35	0,79	1,75	1,15	2,04	6,67
Sdap_03	0,36	1,25	3,41	2,90	4,12	9,81
Sdap_16	0,09	1,39	2,64	2,51	3,21	7,78
Sfra_04	0,77	1,58	3,03	2,81	4,71	5,89
Sfra_17	0,47	1,15	1,55	1,40	1,97	3,30
Sfra_18	0,47	0,73	1,44	1,21	2,15	2,88
Sfra_41	0,08	0,54	1,26	1,12	2,07	2,38
Sfra_42	0,55	1,01	2,17	1,41	2,48	7,62
Sfra_43	0,42	1,43	2,39	1,62	2,47	8,42
Sfra_44	0,36	0,51	1,42	1,06	1,92	4,60
Sfra_45	0,49	0,89	1,46	1,46	1,97	2,63
Shas_20	0,19	1,00	1,43	1,43	1,89	3,09
Slap_24	2,65	5,51	15,12	8,35	12,93	77,35
Spur_01	0,08	0,57	0,84	0,78	0,97	1,87
Spur_14	0,08	0,13	0,55	0,45	0,81	1,45
Spur_15	0,19	0,34	0,69	0,65	0,88	2,05
Spur_46	0,28	0,66	1,15	0,84	1,40	3,26
Spur_47	0,36	0,63	0,97	0,86	1,11	2,33
Spur_48	0,09	0,58	0,71	0,69	0,80	1,33
Spur_49	0,20	0,64	1,49	0,86	1,84	4,06
Spur_50	0,48	0,68	1,03	0,90	1,12	2,78
Svim_23	0,44	3,04	6,42	5,31	8,27	19,51
Sxse_25	0,49	0,64	1,22	0,95	1,38	3,06

Tabelle 72: Kennzahlen der in im UPLC®-RP18-PDA Screening ermittelten Gehalte an Flavan-3-olen; aufgeführt sind die geringsten Gehalte (Min), das erste Quartil (Q1), das arithmetische Mittel (MW), der Median (Median) das 75%-Quartil (Q3) und der Maximalwert, jeweils berechnet für alle erhobenen Probenzüge je Individuum; Angabe in mg/g TD

ID_Individuum	Min	Q1	Mean	Median	Q3	Max
Saur_22	3,71	7,43	13,01	10,70	14,54	49,22
Sbic_19	2,35	2,74	5,04	3,36	4,92	21,74
Scae_21	2,94	4,37	8,36	5,35	9,71	33,79
Scap_26	14,13	22,54	35,66	32,23	38,96	92,85
Scap_27	13,94	23,03	30,25	25,37	33,90	74,16
Scap_28	0,33	3,17	5,29	3,76	4,80	21,04
Scap_29	10,72	15,83	23,74	20,82	27,31	55,39
Scap_30	10,58	17,87	22,19	20,31	26,78	37,11
Scap_31	9,25	10,93	21,28	18,45	29,39	42,79
Scap_32	9,90	16,21	25,70	25,94	32,84	47,51
Scap_33	18,53	22,27	36,71	32,71	46,25	77,64
Scin_08	1,67	2,41	6,50	3,67	5,41	27,87
Scin_34	2,43	3,57	7,26	5,92	7,31	23,66
Scin_35	0,68	2,15	3,58	2,83	3,95	9,41
Scin_36	0,99	2,90	6,47	5,05	7,40	23,90
Scin_37	1,63	3,11	5,68	3,80	4,36	23,64
Scin_38	3,06	4,00	7,39	6,08	7,82	21,92
Scin_39	1,68	2,53	5,74	3,62	7,64	17,20
Scin_40	0,89	2,31	5,07	3,19	5,12	20,63
Sdap_02	2,21	3,18	7,05	4,98	9,13	17,34
Sdap_03	5,10	6,32	9,71	7,46	12,20	20,45
Sdap_16	3,69	6,29	8,98	8,33	10,36	21,01
Sfra_04	1,45	2,08	2,98	2,49	3,16	9,24
Sfra_17	0,71	3,56	4,97	5,36	6,52	8,42
Sfra_18	0,14	2,12	7,48	4,54	11,36	21,30
Sfra_41	1,63	2,52	3,35	3,49	4,10	5,30
Sfra_42	0,11	0,98	2,71	3,14	4,01	5,75
Sfra_43	1,06	4,23	5,53	6,00	6,59	9,74
Sfra_44	0,20	2,50	3,17	3,58	4,23	5,96
Sfra_45	0,26	3,59	4,55	4,28	5,19	9,03
Shas_20	2,46	8,50	10,68	9,89	13,07	19,11
Slap_24	1,50	2,90	4,88	4,10	4,89	19,91
Spur_01	1,45	3,69	4,51	3,99	4,84	8,57
Spur_14	1,10	3,27	5,82	5,15	6,29	12,61
Spur_15	0,13	1,92	2,81	2,80	3,07	6,87
Spur_46	2,00	4,88	7,84	7,36	9,32	18,56
Spur_47	0,87	1,99	3,56	2,94	5,48	6,23
Spur_48	3,35	3,71	4,97	4,28	6,00	7,65
Spur_49	3,87	5,11	8,82	8,25	10,19	19,32
Spur_50	1,59	2,17	3,53	3,55	4,26	7,53
Svim_23	0,26	1,45	2,84	2,39	3,11	11,18
Sxse_25	0,56	4,86	7,19	6,27	7,71	23,38

Tabelle 73: Kennzahlen der in im UPLC®-RP18-PDA Screening ermittelten Gehalte an Flavanonen; aufgeführt sind die geringsten Gehalte (Min), das erste Quartil (Q1), das arithmetische Mittel (MW), der Median (Median) das 75%-Quartil (Q3) und der Maximalwert, jeweils berechnet für alle erhobenen Probenzüge je Individuum; Angabe in mg/g TD

ID_Individuum	Min	Q1	Mean	Median	Q3	Max
Saur_22	0,14	0,25	0,54	0,40	0,60	1,41
Sbic_19	0,22	0,48	2,11	0,74	1,14	18,08
Scae_21	0,48	0,73	1,01	0,93	1,28	1,98
Scap_26	0,11	0,37	1,60	0,54	0,99	10,81
Scap_27	0,26	0,42	2,11	0,69	0,99	15,38
Scap_28	0,05	0,08	1,22	0,14	0,33	10,34
Scap_29	0,14	0,28	1,92	0,54	0,81	13,90
Scap_30	0,21	0,40	0,75	0,48	0,78	1,87
Scap_31	0,09	0,24	1,42	0,31	0,42	11,51
Scap_32	0,00	0,19	0,85	0,52	0,76	4,54
Scap_33	0,14	0,39	1,10	0,58	0,83	5,96
Scin_08	0,09	0,21	0,28	0,22	0,32	0,57
Scin_34	0,07	0,15	0,27	0,27	0,34	0,55
Scin_35	0,09	0,13	0,45	0,25	0,43	2,04
Scin_36	0,10	0,15	0,75	0,27	0,41	3,86
Scin_37	0,10	0,22	0,51	0,28	0,44	2,39
Scin_38	0,16	0,34	1,01	0,60	0,63	5,20
Scin_39	0,10	0,22	0,37	0,30	0,50	0,80
Scin_40	0,05	0,17	0,41	0,31	0,47	1,14
Sdap_02	0,33	0,93	1,16	1,09	1,49	2,08
Sdap_03	0,81	1,24	1,56	1,40	2,13	2,73
Sdap_16	0,68	1,08	1,53	1,34	1,97	3,01
Sfra_04	0,11	0,39	0,94	0,75	1,33	2,60
Sfra_17	0,04	0,42	0,56	0,54	0,75	1,12
Sfra_18	0,08	0,24	1,06	0,65	1,36	3,95
Sfra_41	0,25	0,34	0,60	0,42	0,70	1,35
Sfra_42	0,28	0,42	1,06	0,86	1,25	2,46
Sfra_43	0,13	0,57	1,06	0,74	1,61	2,48
Sfra_44	0,22	0,49	0,77	0,60	0,70	2,13
Sfra_45	0,28	0,67	1,05	1,00	1,36	2,06
Shas_20	0,13	0,40	0,73	0,67	0,97	1,81
Slap_24	0,57	0,66	1,20	0,88	1,27	5,03
Spur_01	2,80	6,66	9,70	7,64	14,71	18,96
Spur_14	0,65	1,45	1,99	1,98	2,35	4,05
Spur_15	1,25	3,29	5,60	4,68	7,24	14,26
Spur_46	4,30	6,63	8,13	7,39	9,24	13,65
Spur_47	0,69	0,96	1,31	1,17	1,64	2,39
Spur_48	8,29	13,82	17,21	15,97	23,27	27,57
Spur_49	4,81	6,08	8,24	7,11	9,27	13,91
Spur_50	3,88	6,16	8,10	7,74	10,91	12,23
Svim_23	0,02	0,17	0,35	0,27	0,53	0,82
Sxse_25	0,40	0,44	0,86	0,66	1,07	2,88

Tabelle 74: Kennzahlen der in im UPLC®-RP18-PDA Screening ermittelten Gehalte an Flavanonolen; aufgeführt sind die geringsten Gehalte (Min), das erste Quartil (Q1), das arithmetische Mittel (MW), der Median (Median) das 75%-Quartil (Q3) und der Maximalwert, jeweils berechnet für alle erhobenen Probenzüge je Individuum; Angabe in mg/g TD

ID_Individuum	Min	Q1	Mean	Median	Q3	Max
Saur_22	0,00	0,41	1,42	1,14	1,63	4,94
Sbic_19	0,00	0,28	2,61	0,59	2,03	22,35
Scae_21	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	0,11
Scap_26	0,00	0,00	0,22	0,12	0,25	0,88
Scap_27	0,00	0,05	0,66	0,39	0,79	2,91
Scap_28	0,11	0,75	1,23	1,17	1,58	2,88
Scap_29	0,00	0,02	0,32	0,15	0,45	1,04
Scap_30	0,00	0,01	0,18	0,09	0,21	0,62
Scap_31	0,00	0,09	0,20	0,17	0,26	0,63
Scap_32	0,00	0,02	0,43	0,39	0,73	1,19
Scap_33	0,00	0,03	0,31	0,25	0,48	0,85
Scin_08	0,00	0,02	0,85	0,65	1,28	2,44
Scin_34	0,00	0,27	0,70	0,50	0,83	2,40
Scin_35	0,01	0,08	0,97	0,97	1,68	2,34
Scin_36	0,00	0,35	1,40	1,39	2,20	3,59
Scin_37	0,00	0,35	0,88	0,78	1,21	2,23
Scin_38	0,00	1,17	2,16	2,38	3,00	4,33
Scin_39	0,00	0,42	1,00	1,03	1,40	1,96
Scin_40	0,00	0,34	1,00	1,00	1,33	2,60
Sdap_02	0,00	0,00	0,05	0,02	0,03	0,37
Sdap_03	0,00	0,00	0,07	0,03	0,08	0,26
Sdap_16	0,00	0,01	0,08	0,05	0,09	0,32
Sfra_04	0,00	0,43	1,06	1,02	1,24	3,20
Sfra_17	0,00	0,03	0,20	0,12	0,28	0,96
Sfra_18	0,00	0,00	0,18	0,07	0,26	1,10
Sfra_41	0,00	0,00	0,23	0,02	0,47	0,86
Sfra_42	0,00	0,01	0,27	0,04	0,19	1,21
Sfra_43	0,00	0,14	1,10	0,79	1,78	3,39
Sfra_44	0,00	0,00	0,25	0,03	0,26	1,35
Sfra_45	0,00	0,00	0,45	0,03	0,43	2,37
Shas_20	0,00	0,01	0,02	0,01	0,03	0,03
Slap_24	0,00	1,14	3,07	1,98	3,62	10,66
Spur_01	0,12	0,46	0,65	0,66	0,84	1,33
Spur_14	0,47	0,68	1,36	1,07	1,96	3,23
Spur_15	0,01	0,22	0,29	0,31	0,39	0,54
Spur_46	0,00	0,01	0,14	0,06	0,15	0,49
Spur_47	0,84	2,02	2,85	3,10	3,68	4,11
Spur_48	0,54	0,89	1,16	1,05	1,44	1,99
Spur_49	0,00	0,02	0,12	0,07	0,20	0,37
Spur_50	0,08	0,20	0,47	0,40	0,64	1,15
Svim_23	0,00	0,27	0,58	0,48	0,85	1,45
Sxse_25	0,00	0,00	0,17	0,03	0,35	0,71

Tabelle 75: Kennzahlen der in im UPLC®-RP18-PDA Screening ermittelten Gehalte an Flavonen; aufgeführt sind die geringsten Gehalte (Min), das erste Quartil (Q1), das arithmetische Mittel (MW), der Median (Median) das 75%-Quartil (Q3) und der Maximalwert, jeweils berechnet für alle erhobenen Probenzüge je Individuum; Angabe in mg/g TD

ID_Individuum	Min	Q1	Mean	Median	Q3	Max
Saur_22	0,00	0,06	0,20	0,20	0,32	0,57
Sbic_19	0,01	0,03	0,07	0,07	0,11	0,16
Scae_21	0,04	0,21	0,63	0,28	0,53	4,18
Scap_26	0,00	0,02	0,72	0,21	0,59	4,88
Scap_27	0,04	0,28	0,44	0,48	0,64	0,76
Scap_28	0,06	0,13	0,94	0,39	0,78	5,07
Scap_29	0,00	0,08	0,98	0,17	0,45	7,79
Scap_30	0,02	0,04	0,22	0,09	0,16	1,21
Scap_31	0,00	0,06	0,18	0,15	0,20	0,62
Scap_32	0,00	0,03	0,15	0,07	0,14	0,81
Scap_33	0,00	0,02	0,52	0,09	0,16	4,40
Scin_08	0,07	0,13	0,39	0,19	0,21	1,92
Scin_34	0,03	0,16	0,40	0,29	0,50	1,07
Scin_35	0,06	0,19	0,73	0,51	0,67	2,90
Scin_36	0,13	0,22	0,87	0,38	0,93	4,40
Scin_37	0,03	0,16	0,47	0,27	0,37	2,59
Scin_38	0,21	0,24	0,36	0,26	0,41	0,85
Scin_39	0,08	0,24	0,77	0,59	0,89	2,90
Scin_40	0,15	0,22	0,83	0,49	0,75	3,84
Sdap_02	0,03	0,18	0,37	0,27	0,37	1,45
Sdap_03	0,18	0,25	1,00	0,51	0,88	3,43
Sdap_16	0,22	0,29	0,93	0,46	1,33	2,92
Sfra_04	0,00	0,14	0,29	0,19	0,44	0,64
Sfra_17	0,02	0,13	0,43	0,45	0,62	0,90
Sfra_18	0,01	0,19	0,89	0,64	1,27	3,90
Sfra_41	0,06	0,25	0,50	0,38	0,56	1,35
Sfra_42	0,05	0,15	0,30	0,21	0,48	0,62
Sfra_43	0,16	0,38	0,82	0,73	0,97	2,25
Sfra_44	0,07	0,32	0,57	0,42	0,55	2,35
Sfra_45	0,12	0,42	0,63	0,72	0,82	0,95
Shas_20	0,04	0,08	0,19	0,09	0,18	1,02
Slap_24	0,02	0,05	0,11	0,07	0,13	0,48
Spur_01	0,06	0,15	0,61	0,42	0,75	2,19
Spur_14	0,04	0,14	0,41	0,37	0,61	0,94
Spur_15	0,00	0,05	0,15	0,16	0,22	0,45
Spur_46	0,04	0,46	1,34	0,88	1,37	6,12
Spur_47	0,01	0,21	0,35	0,28	0,39	1,16
Spur_48	0,20	0,23	0,77	0,49	0,83	2,04
Spur_49	0,09	0,15	0,41	0,24	0,36	1,26
Spur_50	0,11	0,19	0,53	0,23	0,70	1,87
Svim_23	0,01	0,08	0,27	0,18	0,36	1,02
Sxse_25	0,03	0,14	0,59	0,21	0,35	5,26

Tabelle 76: Kennzahlen der in im UPLC®-RP18-PDA Screening ermittelten Gehalte an Flavonolen; aufgeführt sind die geringsten Gehalte (Min), das erste Quartil (Q1), das arithmetische Mittel (MW), der Median (Median) das 75%-Quartil (Q3) und der Maximalwert, jeweils berechnet für alle erhobenen Probenzüge je Individuum; Angabe in mg/g TD

ID_Individuum	Min	Q1	Mean	Median	Q3	Max
Saur_22	0,02	0,08	0,75	0,75	0,99	2,28
Sbic_19	0,23	0,50	0,86	0,82	1,18	1,55
Scae_21	0,00	0,07	0,15	0,11	0,21	0,44
Scap_26	0,03	0,09	0,23	0,16	0,34	0,69
Scap_27	0,09	0,12	0,42	0,22	0,62	1,58
Scap_28	0,00	0,08	0,20	0,17	0,32	0,45
Scap_29	0,00	0,12	0,24	0,17	0,30	0,79
Scap_30	0,00	0,03	0,16	0,09	0,15	0,72
Scap_31	0,00	0,04	0,18	0,15	0,28	0,48
Scap_32	0,00	0,05	0,30	0,11	0,35	1,18
Scap_33	0,01	0,06	0,28	0,12	0,44	0,99
Scin_08	0,03	0,04	0,28	0,06	0,45	1,11
Scin_34	0,00	0,00	0,27	0,13	0,49	0,83
Scin_35	0,00	0,04	0,23	0,14	0,31	0,79
Scin_36	0,00	0,05	0,23	0,13	0,38	0,78
Scin_37	0,00	0,07	0,22	0,11	0,25	0,81
Scin_38	0,05	0,08	0,29	0,16	0,32	1,22
Scin_39	0,00	0,09	0,35	0,19	0,30	1,57
Scin_40	0,00	0,08	0,34	0,21	0,27	1,47
Sdap_02	0,07	0,24	0,39	0,39	0,52	0,67
Sdap_03	0,29	0,53	0,67	0,54	0,70	1,55
Sdap_16	0,28	0,49	0,64	0,61	0,74	1,16
Sfra_04	0,00	0,00	0,25	0,07	0,36	1,30
Sfra_17	0,00	0,04	0,17	0,13	0,22	0,53
Sfra_18	0,05	0,08	0,19	0,14	0,29	0,48
Sfra_41	0,04	0,05	0,15	0,08	0,10	0,58
Sfra_42	0,01	0,05	0,20	0,14	0,22	0,84
Sfra_43	0,00	0,01	0,16	0,08	0,26	0,49
Sfra_44	0,00	0,03	0,20	0,19	0,37	0,41
Sfra_45	0,04	0,14	0,16	0,16	0,19	0,29
Shas_20	0,28	0,33	0,51	0,41	0,56	1,32
Slap_24	0,01	0,16	0,38	0,41	0,60	0,68
Spur_01	0,62	0,98	1,84	1,81	2,37	3,87
Spur_14	0,41	0,91	1,73	1,54	2,59	3,17
Spur_15	0,48	0,89	1,20	1,17	1,51	1,86
Spur_46	0,11	0,16	0,27	0,20	0,28	0,62
Spur_47	0,70	1,71	3,63	2,83	4,70	9,03
Spur_48	0,25	0,67	1,19	1,37	1,57	2,39
Spur_49	0,25	0,34	0,69	0,60	1,03	1,29
Spur_50	0,57	1,57	1,85	1,96	2,12	2,88
Svim_23	0,00	0,10	0,40	0,40	0,64	0,97
Sxse_25	0,00	0,02	0,20	0,17	0,28	0,70

Tabelle 77: Kennzahlen der in im UPLC®-RP18-PDA Screening ermittelten Gehalte an Salicylalkoholderivaten; aufgeführt sind die geringsten Gehalte (Min), das erste Quartil (Q1), das arithmetische Mittel (MW), der Median (Median) das 75%-Quartil (Q3) und der Maximalwert, jeweils berechnet für alle erhobenen Probenzüge je Individuum; Angabe in mg/g TD

ID_Individuum	Min	Q1	MW	Median	Q3	Max
Saur_22	0,04	0,28	5,46	1,02	5,93	27,86
Sbic_19	0,04	0,22	5,86	1,16	10,00	25,20
Scae_21	41,04	58,28	82,49	73,17	77,94	259,42
Scap_26	0,14	1,98	16,08	6,52	14,32	92,04
Scap_27	0,14	0,83	7,38	3,13	10,04	35,30
Scap_28	0,14	0,28	1,35	0,70	2,04	5,18
Scap_29	0,31	3,64	10,09	8,91	11,04	29,58
Scap_30	0,14	0,24	2,34	0,28	0,90	19,42
Scap_31	0,13	0,28	1,20	0,29	0,98	7,41
Scap_32	0,30	3,82	11,20	7,33	17,08	26,45
Scap_33	0,13	0,18	2,14	0,28	0,30	14,52
Scin_08	0,28	1,54	9,44	1,81	17,52	32,85
Scin_34	0,14	1,24	2,91	2,28	4,22	6,80
Scin_35	0,13	0,14	37,61	0,28	1,34	368,74
Scin_36	0,13	0,29	5,85	1,61	6,83	21,70
Scin_37	0,15	0,45	12,63	4,02	15,12	54,06
Scin_38	0,29	1,13	66,17	1,87	3,48	562,92
Scin_39	0,14	0,40	37,93	1,36	3,44	346,61
Scin_40	0,14	0,84	45,61	1,28	2,74	427,86
Sdap_02	0,28	6,97	14,36	13,51	23,25	29,08
Sdap_03	2,24	13,55	34,53	32,66	45,25	90,57
Sdap_16	1,48	4,70	23,34	26,09	34,28	61,12
Sfra_04	6,63	33,60	37,80	38,60	44,93	54,77
Sfra_17	10,02	23,86	28,54	28,67	34,85	46,30
Sfra_18	0,25	11,40	21,35	17,95	22,81	57,25
Sfra_41	13,62	22,83	28,31	29,83	33,51	47,86
Sfra_42	2,62	6,20	21,88	19,56	35,17	51,87
Sfra_43	19,89	41,59	52,98	56,75	63,57	79,83
Sfra_44	19,49	36,29	52,68	47,64	76,63	78,84
Sfra_45	0,14	16,46	24,86	19,75	29,95	69,22
Shas_20	0,48	2,93	17,34	16,55	32,05	34,63
Slap_24	0,04	0,07	0,52	0,14	0,28	2,76
Spur_01	2,33	4,36	27,58	24,74	46,79	87,36
Spur_14	0,28	1,55	14,72	9,17	20,95	48,87
Spur_15	2,74	5,02	16,89	14,60	24,37	55,60
Spur_46	1,96	51,18	53,67	55,82	63,13	74,22
Spur_47	0,14	1,63	4,40	2,56	3,01	24,77
Spur_48	2,80	5,23	17,63	6,07	39,79	45,41
Spur_49	0,32	3,47	28,43	33,65	49,21	57,14
Spur_50	1,02	1,55	14,25	3,22	29,20	44,48
Svim_23	0,04	0,14	0,47	0,23	0,73	1,85
Sxse_25	0,29	5,36	7,42	6,11	8,70	16,64

Erklärung zur Eigenständigkeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet.

Regensburg, den

Unterschrift