

Sebastian Tolle

**Analytische und  
toxikologische Untersuchungen  
von Früchten von *Morinda citrifolia***



**Cuvillier Verlag Göttingen**  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Analytische und toxikologische Untersuchungen  
von Früchten von *Morinda citrifolia*





# **Analytische und toxikologische Untersuchungen**

## **von Früchten von *Morinda citrifolia***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sebastian Tolle

aus Wernigerode



## **Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. – Göttingen: Cuvillier, 2012

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2012

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2012

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2012

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 978-3-95404-060-5

1. Referent:	Prof. Dr. P. Winterhalter
2. Referent:	apl. Prof. Dr. U. Engelhardt
eingereicht am:	18. Dezember 2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09. März 2012

Druckjahr 2012

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,  
Fakultät für Lebenswissenschaften



---

## VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

Tolle S., Lander V., Winterhalter P. Authentication of Fruit Juices Derived from *Morinda citrifolia* (Noni). Ebeler S.E., Takeoka G.R., Winterhalter P. (eds) In: Progress in Authentication of Food and Wine. ACS Symp. Series 1081, American Chemical Society: Washington DC, 2011, pp. 249-258.

Tolle S., Hönig S., Lander V., Winterhalter P. Results of Brine shrimp lethality assay of fermented and fresh fruit juices from *Morinda citrifolia* (Noni). In: Proceedings of the Euro Food Chem XV. Food for the future—the contribution of chemistry to improvement of food quality. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark (2009), Vol. II, pp 37-41.

### Tagungsbeiträge

Tolle S., Lander V., Winterhalter P. Authentication of Fruit Juices Derived from *Morinda citrifolia* (Noni). Progress in Authentication of Food and Wine Symposium held in conjunction with the American Chemical Society (ACS) 239<sup>th</sup> National Meeting. Division of Agricultural and Food Chemistry. San Francisco, CA (21.-22. März 2010).

Tolle S., Lander V., Stodt U., Winterhalter P. Präparative Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Morinda citrifolia* L. (Noni) mittels Countercurrent Chromatography. 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Hohenheim (2010), Abstract erschienen in Lebensmittelchemie, 2011.

Tolle S., Lander V., Schmid W., Winterhalter P. Unterscheidung von fermentierten und frischen Fruchtsäften aus *Morinda citrifolia* (Noni) anhand flüchtiger Inhaltsstoffe. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin (2009), Abstract erschienen in Lebensmittelchemie, 2010, 64, 86.





---

## DANKSAGUNG

Ein großer Dank gilt allen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben. Denen, die diesen wundervollen Doktorwagen konzipiert und umgesetzt haben und nicht zu vergessen den Doktorhut angefertigt haben. Ihr seid großartig!

Lieber Prof. Peter Winterhalter, meinen herzlichsten Dank, dass ich bei Ihnen meine Dissertation anfertigen durfte. Die Reisen, die ich unternehmen durfte und die Konferenzen, die ich besucht habe, waren großartige Erfahrungen, die mich in meinem Leben weitergebracht haben. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung.

Herzlicher Dank gebührt auch Frau Dr. Vera Lander vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit für die Finanzierung des Projekts und die fortwährende Unterstützung bei der Bearbeitung der Aufgaben.

Herrn Prof. Ulrich Engelhardt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens der Dissertation. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Ingo Rustenbeck für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ein großes Dankeschön gebührt auch Herrn Prof. Dieter Schrenk von der TU Kaiserslautern für die Durchführung der Hepatotoxizitäts-Tests und die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Vielen Dank dem gesamten Institut für Lebensmittelchemie. Es war eine wunderbare Zeit mit euch. Ich habe mich immer wohlfühlt, habe viel gelernt und bin immer gern hier gewesen. Besonders hervorheben möchte ich:

- PI-Betreuer-Crew: Heike Scharnhop und Fabian Weber
- PII-Betreuer-Crew 1. Besetzung: Tuba Esatbeyoglu
- PII-Betreuer-Crew 2. Besetzung: Stefanie Dräger, Recep Gök, Sebastian Macke
- NMR-Spektren: Silke Hillebrand, Gerold Jerz, Monika Messerer
- Literatur und Korrekturen: Carola Balcke
- Annika Burmeister, Miriam Adriana Rodriguez Arzaba, Andrea Wilkens
- WAs: Susann Hönig, Ulf Stodt, Christine Gabriel, Sarah Richter, Sabrina Zinn

Vielen Dank für die Unterstützung und den Rückhalt liebe Eltern, Großeltern, Schwiegereltern und kleiner Bruder Christian. Danke, dass Ihr alle immer an mich geglaubt habt.

Julia. Vielen Dank für alles. Ich liebe dich.





# INHALT

<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>IX</b>
<b>ABBILDUNGEN</b>	<b>XIII</b>
<b>TABELLEN</b>	<b>XXI</b>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Die Pflanze <i>Morinda citrifolia</i></b>	<b>3</b>
2.1.1 Taxonomie und Morphologie	3
2.1.2 Wachstumsbedingungen und Verbreitung	5
2.1.3 Ethnobotanik und Vermarktung von Noni	6
2.1.4 Kultivierung von <i>Morinda citrifolia</i> auf Hawai'i	11
2.1.5 Produktion von Noni-Saft	12
2.1.5.1 Herstellung und Mikrobiologie von fermentiertem Saft	12
2.1.5.2 Herstellung von frischem Saft	15
2.1.6 Phytochemie von <i>Morinda citrifolia</i>	15
2.1.6.1 Nichtflüchtige Inhaltsstoffe	15
2.1.6.2 Flüchtige Inhaltsstoffe	19
2.1.7 Biosynthese ausgewählter Inhaltsstoffe	20
2.1.7.1 Lignane und Neolignane	20
2.1.7.2 Iridoide	25
2.1.8 Problematik Noni	27
2.1.8.1 Toxikologie	28
2.1.8.2 Authentizität	29
<b>2.2 Präparative Trenntechniken</b>	<b>30</b>
2.2.1 Gegenstromverteilungschromatographie	30
2.2.1.1 Grundlagen	30
2.2.1.2 Auswahl des Fließmittelsystems	32
2.2.1.3 High-speed countercurrent chromatography	33
2.2.2 Gelchromatographie	36
<b>2.3 Grundlagen zu einigen verwendeten Methoden</b>	<b>37</b>
2.3.1 Untersuchung der Zytotoxizität mittels Brine-shrimp-Assay	37
2.3.2 Untersuchung der Zytotoxizität mittels Resazurin (Alamar Blue) Assay	38

2.3.3	Bestimmung des antioxidativen Potentials .....	38
2.3.4	Bestimmung des Gesamtphenolgehalts.....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Nichtflüchtige Bestandteile</b> .....	<b>41</b>
3.1.1	Saft von <i>Morinda citrifolia</i> .....	41
3.1.1.1	Herstellung der Extrakte .....	41
3.1.1.1.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	41
3.1.1.1.2	Adsorption an Amberlite XAD-7 und XAD-2 .....	43
3.1.1.2	Untersuchung der Extrakte .....	44
3.1.1.2.1	Dichlormethan-Extrakte .....	44
3.1.1.2.2	Ethylacetat-Extrakte .....	47
3.1.1.2.3	XAD-2-Extrakte .....	52
3.1.1.3	Zytotoxizität in Brine shrimps .....	56
3.1.1.4	Zytotoxizität in Rattenhepatozyten in Primärkultur .....	62
3.1.1.5	Antioxidative Kapazität und Gesamtphenolgehalt der Extrakte .....	70
3.1.1.6	Isolierung und Strukturaufklärung .....	75
3.1.1.6.1	Isolierungen aus dem XAD-7-Extrakt von TAreif .....	75
3.1.1.6.2	Isolierungen aus dem XAD-2-Extrakt von TAreif .....	86
3.1.2	Steine und Pulpe von <i>Morinda citrifolia</i> .....	90
3.1.2.1	Herstellung der Extrakte .....	90
3.1.2.2	Untersuchung der Extrakte .....	91
3.1.2.2.1	Dichlormethan-Extrakte .....	91
3.1.2.2.2	Ethylacetat-Extrakte .....	94
3.1.2.2.3	XAD-2-Extrakt .....	97
3.1.2.3	Antioxidatives Potential und Zytotoxizität der Extrakte .....	99
3.1.2.4	Isolierung und Strukturaufklärung .....	106
3.1.2.4.1	Steine .....	106
3.1.2.4.2	Pulpe .....	117
<b>3.2</b>	<b>Flüchtige Bestandteile</b> .....	<b>122</b>
3.2.1	Übersicht über die flüchtigen Verbindungen in frischen Säften .....	122
3.2.2	Übersicht über die flüchtigen Verbindungen in fermentierten Säften ....	125
3.2.3	Vergleich der flüchtigen Verbindungen .....	129
3.2.3.1	Alkohole .....	129
3.2.3.2	Carbonsäuren und Carbonsäureester .....	132
3.2.4	Gebundene flüchtige Verbindungen .....	135
<b>3.3</b>	<b>Quantifizierung von Inhaltsstoffen in Früchten von <i>Morinda citrifolia</i></b> .....	<b>138</b>
3.3.1	Quantifizierungen und deren Nutzen für die Authentifizierung .....	138

3.3.1.1	Asperulosidsäure.....	138
3.3.1.2	Scopoletin .....	141
3.3.1.3	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatriensäure und dessen Glucose-Ester .....	143
3.3.1.4	Furan-2-carbonsäure.....	146
3.3.1.5	Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A.....	149
3.3.2	Quantifizierungen in Pulpe und Steine.....	155
3.3.2.1	Asperulosidsäure.....	155
3.3.2.2	Scopoletin .....	157
3.3.2.3	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatriensäure und dessen Glucose-Ester .....	158
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>161</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungsmaterialien .....</b>	<b>161</b>
4.1.1	Authentische Untersuchungsmaterialien.....	161
4.1.2	Kommerzielle Untersuchungsmaterialien .....	161
4.1.3	Verarbeitung der Untersuchungsmaterialien .....	163
4.1.3.1	Herstellung von Saft.....	163
4.1.3.2	Pulpe und Steine .....	164
<b>4.2</b>	<b>Lösungsmittel und Chemikalien .....</b>	<b>164</b>
<b>4.3</b>	<b>Geräteparameter und Fließmittelsysteme .....</b>	<b>165</b>
4.3.1	Flüssigchromatographie .....	165
4.3.1.1	HPLC-DAD.....	165
4.3.1.2	HPLC-ESI-MS <sup>n</sup> .....	166
4.3.1.2.1	HPLC.....	166
4.3.1.2.2	ESI-MS/MS .....	166
4.3.1.2.3	DAD-ESI-MS <sup>n</sup> .....	166
4.3.1.3	HR-ESI-MS .....	168
4.3.1.4	Fließmittelsysteme.....	168
4.3.1.5	Präparative HPLC-UV/VIS.....	170
4.3.2	Gaschromatographie .....	172
4.3.2.1	GC-FID .....	172
4.3.2.2	GC-MS .....	172
4.3.3	High-Speed Countercurrent Chromatography .....	173
4.3.4	Dünnschichtchromatographie .....	173
4.3.5	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy .....	174
4.3.6	UV-Spektrometer.....	174
4.3.7	Polarimeter .....	174
4.3.8	Datenauswertung .....	174

<b>4.4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>175</b>
4.4.1	Flüchtige Verbindungen .....	175
4.4.1.1	Probenvorbereitung.....	175
4.4.1.2	Qualifizierung und Quantifizierung der flüchtigen Verbindungen .....	175
4.4.1.2.1	Qualifizierung .....	175
4.4.1.2.2	Quantifizierung.....	176
4.4.1.3	Enzymatische Freisetzung gebundener Aromastoffe .....	176
4.4.1.4	Synthese der heterocyclischen Acetale .....	177
4.4.2	Nichtflüchtige Verbindungen .....	177
4.4.2.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion von Saft.....	177
4.4.2.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion von Pulpe und Steinen.....	178
4.4.2.3	Herstellung von Extrakten mit Amberlite XAD-7 und XAD-2 .....	178
4.4.2.4	Gelchromatographie .....	179
4.4.2.5	Brine-shrimp-Assay .....	179
4.4.2.6	Resazurin (Alamar Blue) Assay.....	180
4.4.2.7	Bestimmung der antioxidativen Aktivität .....	181
4.4.2.8	Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes .....	181
4.4.2.9	Quantifizierungen in Säften, Pulpe und Steinen von <i>Morinda citrifolia</i> .....	182
4.4.2.9.1	Asperulosidsäure in Säften.....	182
4.4.2.9.2	Scopoletin in Säften.....	183
4.4.2.9.3	2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose (DTA-diglucose) in Säften .....	183
4.4.2.9.4	(2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid in Säften.....	183
4.4.2.9.5	Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A in Säften .....	183
4.4.2.9.6	Furan-2-carbonsäure in Säften .....	184
4.4.2.9.7	Asperulosidsäure, Scopoletin und 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)- decatrienoyl-β-D-glucopyranose (DTA-diglucose) in Pulpe und Steinen.....	184
4.4.2.9.8	(2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid in Pulpe und Steinen .....	185
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>186</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>189</b>
<b>7</b>	<b>APPENDIX .....</b>	<b>205</b>
7.1	Daten weiterer isolierter Verbindungen .....	205
7.2	Daten der flüchtigen Verbindungen .....	212
7.3	Daten der nichtflüchtigen Verbindungen .....	215



## ABKÜRZUNGEN

A.	<i>Artemia</i>
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
BPC	Base peak chromatogram
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CCC	Countercurrent chromatography
CCD	Countercurrent distribution
CI	chemische Ionisation
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
const.	konstant
COSY	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ correlated spectroscopy
CPC	Centrifugal partition chromatography
CR	Costa Rica
CU	Kuba
d	Durchmesser
<i>d</i>	dublett
d.h.	das heisst
DAD	Diode array detector
DC	Dünnschichtchromatographie
<i>dd</i>	dublett von dublett
<i>ddd</i>	dublett von dublett von dublett
DMADP	(3,3-Dimethylallyl)diphosphat
<i>dt</i>	dublett von triplet
DTA	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatrienoic acid
EE	Elution extrusion
EFSA	European Food Safety Authority
EI	Elektronenstoßionisation
EIC	Extracted ion chromatogram
ELSD	Evaporative light scattering detector
ESI	Electrospray Ionization
<i>et al.</i>	und andere
etc.	et cetera
<i>F.</i>	<i>Forsythia</i>
FID	Flame Ionization Detector
fullferm	acht Wochen fermentiert
GAE	Gallussäure-Äquivalente
GC	Gas chromatography
Glc	Glucosid
h	Stunde
ha	Hektar

HA	Hawai'i
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HPLC	High performance liquid chromatography
HS-SPME	Headspace solid-phase microextraction
HSCCC	High-speed countercurrent chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz
i.D.	innerer Durchmesser
IDP	Isopentenylidiphosphat
IRMS	Isotope ratio mass spectrometry
i.S.	interner Standard
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Verteilungskoeffizient
k.A.	keine Angabe
kg	Kilogramm
l	Länge
L	Liter
L.	LINNÉ
LC	Liquid chromatography
LC <sub>50</sub>	letale Konzentration, bei der 50 % der Versuchsorganismen gestorben sind
LDL	Low density lipoprotein
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
m	Meter
<i>m</i>	multipllett
<i>M.</i>	<i>Morinda</i>
medferm	zwei Wochen fermentiert
min	Minute
mL	Milliliter
MS	Mass spectrometry
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
n.q.	nicht quantifizierbar
n.n.	nicht nachweisbar
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
Nr.	Nummer
p.a.	pro analysi
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pK <sub>s</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurestärke
ppm	Parts per million
psi	Pounds per square inch
<i>q</i>	quartett
Ref.	Referenz
RFU	Relative fluorescence units



## ABKÜRZUNGEN

---

s	Sekunde
s.	siehe
SAFE	Solvent assisted flavor evaporation
SCF	Scientific Committee on Food
SD	Standard deviation
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
sog.	sogenannt
SPE	Solid phase extraction
SR	Noni-Säfte ohne Zusatz anderer Zutaten laut Herstellerangabe
SZ	Noni-Säfte mit Zusatz anderer Zutaten laut Herstellerangabe
t	Zeit
<i>t</i>	triplett
TA	Tahiti
Tab.	Tabelle
tBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TEAC	Trolox <sup>®</sup> equivalent antioxidant capacity
TFA	Trifluoressigsäure
Trolox <sup>®</sup>	6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-carbonsäure
u	Unified atom mass unit
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
ü. NN	über Normalnull
USA	United States of America
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
V	Volt
var.	Varietät
Vis	Visible
Vpp	Volts peak-to-peak
$\omega$	Winkelgeschwindigkeit
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil





## ABBILDUNGEN

Abb. 2-1: Wuchsformen von <i>M. citrifolia</i> . <i>M. citrifolia</i> als Baum (links), als Strauch auf Lavagestein (Mitte) und in Buschform am Pazifischen Ozean (rechts). .....	3
Abb. 2-2: Früchte von <i>M. citrifolia</i> . Grüne Früchte mit Blüten (links) und aufgetaute aufgeschnittene Frucht (rechts). .....	4
Abb. 2-3: Unterschiedliche Reifestadien der Früchte von <i>M. citrifolia</i> . Die Früchte in den Stadien 1–5 weisen eine sehr harte Konsistenz auf, Stadium 6 weist eine feste Konsistenz auf, im Reifestadium 7 ist die Frucht sehr weich. ....	5
Abb. 2-4: Geographische Verbreitung von <i>M. citrifolia</i> . Die graue Fläche kennzeichnet die derzeitige Ausbreitung der großfrüchtigen <i>M. citrifolia</i> var. <i>citrifolia</i> . Die schwarz gestrichelte Linie begrenzt das Verbreitungsgebiet von <i>M. citrifolia</i> var. <i>bracteata</i> . Die graue Linie umschließt die Verbreitungszone von <i>M. citrifolia</i> cultivar <i>Potteri</i> und die schwarze Linie stellt die Ausbreitung der mikronesischen kleinfrüchtigen <i>M. citrifolia</i> var. <i>citrifolia</i> dar. Abbildung aus RAZAFIMANDIMBISON <i>et al.</i> , 2010 (12). ....	6
Abb. 2-5: Noni-Farm auf Big Island (Hawai'i). Setzling von <i>M. citrifolia</i> , der zum Schutz vor Austrocknung in einem Autoreifen steht (links). Lavaspalte, aus der eine junge Noni-Pflanze wächst. Die Samen werden in diese Spalten eingebracht, um neue Felder anzulegen (Mitte). Im Vordergrund sind frisch gepflückte Früchte gezeigt, die zum Abtransport für die Weiterverarbeitung bereit sind (rechts). ....	11
Abb. 2-6: Blick über die Noni-Farm auf Big Island (Hawai'i). Älterer Teil der Noni-Farm (links) und neuerer Teil der Noni-Farm, die auf einem erkalteten Lavafeld angelegt wurde (rechts). ....	12
Abb. 2-7: Verschiedene Säfte von <i>M. citrifolia</i> . Saft von unreifen Früchten (HAunreif) und von reifen Früchten (HAreif) sowie zwei Wochen fermentierter Saft (HAMEDferm) und vier Wochen fermentierter Saft (HAFULLferm). ....	13
Abb. 2-8: Mikrobiologische Veränderungen während der Fermentation von Saft von <i>M. citrifolia</i> . Veränderung des Gehaltes an koloniebildenden Einheiten von mesophilen und milchsäurebildenden Bakterien sowie Schimmelpilzen und Hefen während der Fruchtreifung und des achtwöchigen Fermentationsprozesses von Noni-Saft nach CHAN-BLANCO <i>et al.</i> (57). ....	14
Abb. 2-9: Aus Früchten von <i>M. citrifolia</i> isolierte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Die Zuordnung der einzelnen Strukturen erfolgt nach Tab. 2-3. ....	18
Abb. 2-10: Untergruppen der Lignane. Dargestellt sind die acht Untergruppen Furofuran, Furan, Dibenzylbutan, Dibenzylbutyrolacton, Aryltetralin, Arylnaphthalin, Dibenzocyclooctadien und Dibenzylbutyrolactol. Abbildung nach UMEZAWA (89). ....	21
Abb. 2-11. Biosynthese der Lignine und Lignane. Tyrosin und Phenylalanin bilden die Ausgangsstoffe zur Synthese von <i>p</i> -Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol, die in die Biosynthese von Ligninen und Lignanen eingehen können. Beteiligte Enzyme an der Umsetzung sind Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (1), Tyrosin-Ammoniak-Lyase (2), Cinnamat-4-hydroxylase (3), Hydroxylase (4), CoA-Ligase mit AMP und CoA (5), <i>O</i> -Methyltransferase (6), Cinnamoyl-CoA:NADP-Oxireduktase (7) und Cinnamoylalkoholdehydrogenase (8). Abbildung modifiziert nach LEWIS <i>et al.</i> (93). ....	22
Abb. 2-12. Biosynthese von Lignan in <i>Forsythia intermedia</i> . Ausgehend von zwei Molekülen <i>E</i> -Coniferylalkohol wird über mehrere Zwischenschritte (–)-Matairesinol gebildet. Die Reaktionen laufen stereoselektiv und enantiospezifisch ab. Abbildung nach LEWIS <i>et al.</i> (93). ....	23
Abb. 2-13. Biosynthese von Lignan und Neolignan. Aus zwei Molekülen Coniferylalkohol entstehen durch Dimerisierung Pinoresinol (8-8' verknüpftes Lignan), Guajacylglycerol- $\beta$ -coniferylether (8- <i>O</i> -4' verknüpftes Neolignan) und Dehydroconiferylalkohol (8-5' verknüpftes Neolignan). Abbildung nach BEEJMOHUN <i>et al.</i> (106). ....	24

Abb. 2-14: Biosynthese von Isopentylidiphosphat und (3,3-Dimethylallyl)diphosphat. Über den Mevalonat-Weg werden aus drei Molekülen Acetyl-CoA die aktiven Isopren-Einheiten Isopentylidiphosphat und (3,3-Dimethylallyl)diphosphat gebildet. ....	25
Abb. 2-15: Biosynthese von Deoxyloganinsäure. Ausgehend von Geraniol wird über Oxidationsschritte, Cyclisierung und Glykosidierung das Iridoid Deoxyloganinsäure gebildet. Abbildung modifiziert nach Jensen (118). ....	26
Abb. 2-16: J-Type-HSCCC-Anlage. Schematischer Aufbau einer Monocoil-J-Typ-HSCCC-Anlage bestehend aus einem Lösungsmittelreservoir, einer HPLC-Pumpe, einer Dosierschleife, einer Coilhalterung, einem Detektor und einem Fraktionssammler nach SUTHERLAND (147). ....	33
Abb. 2-17: Bewegungsablauf eines multilayer Type-J-Coils, hydrodynamische Äquilibration in einem Coil und Elutionsmodi der HSCCC. Gezeigt ist die Rotation der Coil-Halterung um ihre eigene Achse als auch um die Zentralachse mit gleicher Winkelgeschwindigkeit ( $\omega$ ) und gleicher Richtung (links). Hydrodynamische Äquilibration zweier Phasen im geschlossenen Coil und Elution der leichten Phase und der schweren Phase in einem rotierenden offenen Coil (rechts). Abbildungen nach ITO (139). ....	34
Abb. 2-18: Bewegung und Verteilung der Flüssigkeiten in einem Type-J-Coil. Gezeigt ist die Mischung und Trennung der Phasen während der Revolution (links). Bewegung der Mixing Zones durch den helical gewickelten Schlauch in den Positionen I–IV (rechts). Abbildungen nach ITO (139). ....	35
Abb. 2-19: Strukturen von Resazurin und Resorufin. Dargestellt sind Resazurin (Alamar Blue, 1) und Resorufin (reduziertes Alamar Blue, 2). ....	38
Abb. 2-20: Schematische Darstellung der Reaktionen des TEAC-Assays. ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) wird in Gegenwart von $K_2S_2O_8$ (Kaliumperoxodisulfat) zum Radikalkation oxidiert. In Anwesenheit von antioxidativ wirksamen Substanzen tritt eine Minderung der Farbtintensität ein, die bei 734 nm verfolgt werden kann. ....	39
Abb. 3-1: Schema zur Aufarbeitung von Noni-Saft. Der Saft wurde zunächst mit <i>n</i> -Hexan und nachfolgend mit Dichlormethan und Ethylacetat extrahiert. Die Komponenten in der wässrigen Phase wurden an XAD-2 adsorbiert. ....	42
Abb. 3-2: Base-peak-Chromatogramme (BPC) der Dichlormethan-Extrakte. Dargestellt sind die Chromatogramme von HAunreif (A), HAreif (B) und Hamedferm (C) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-4 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden. ....	45
Abb. 3-3: Base peak Chromatogramme (BPC) der Ethylacetat-Extrakte. Dargestellt sind die Chromatogramme von HAunreif (A), HAreif (B) und Hamedferm (C) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-5 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden. ....	48
Abb. 3-4: Base peak Chromatogramme (BPC) der XAD-2-Extrakte. Dargestellt sind die Chromatogramme von HAunreif (A), HAreif (B) und Hamedferm (C) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-6 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden. ....	53
Abb. 3-5: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung und $LC_{50}$ -Werte des Brine-shrimp-Assays des Ethylacetat-Extrakts von fermentiertem Saft (Tamedferm). Dargestellt ist das UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung bei 260 nm. Erhalten wurden fünf Fraktionen (F1–F5) und zusätzlich die Coil-Fraktion (F6). Für die Trennung wurde CCCSystem 3 verwendet (links). Tabellarisch aufgeführt sind die erhaltenen Fraktionen der HSCCC-Trennung mit Auswaagen und den $LC_{50}$ -Werten des Brine-shrimp-Assays (rechts). Podophyllotoxin als Positivkontrolle wies einen $LC_{50}$ -Wert von $68,03 \pm 13,18 \mu\text{g}/\text{mL}$ auf. ....	58
Abb. 3-6: Contour-Plot des Ethylacetat-Extrakts von fermentiertem Saft. Dargestellt ist der DAD-Contour-Plot des Ethylacetat-Extrakts von Tamedferm von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-5. ....	58



Abb. 3-7: Contour-Plots der Fraktionen F2 und F3 sowie UV-Vis- und MS-Daten der unbekanntenen Verbindung. Dargestellt sind die Contour-Plots der Fraktionen F2 und F3 des Ethylacetat-Extrakts von Tamedferm. Die Nummerierung richtet sich nach Tab. 3-5. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Zusätzliche Verbindungen sind mit der Retentionszeit angegeben (oben). Zusätzlich sind die UV-Vis- und MS-Daten der unbekanntenen Verbindung mit  $R_t$  24,2 min gezeigt (unten). ..... 60

Abb. 3-8: Contour-Plot von Fraktion F6. Dargestellt ist der DAD-Contour-Plot von Fraktion F6 des Ethylacetat-Extrakts von Tamedferm von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-5. .... 61

Abb. 3-9: Zytotoxische Verbindungen aus dem Saft von *M. citrifolia*. Identifizierte Verbindungen aus Fraktion F6 des Ethylacetat-Extrakts von Tamedferm, die möglicherweise für die zytotoxischen Wirkungen auf die Brine shrimps verantwortlich sind. .... 61

Abb. 3-10: Reduktion von Resazurin [%] in Rattenhepatozyten in Primärkultur nach Inkubation mit Extrakten von fermentiertem Saft von *M. citrifolia*. Dargestellt ist die Reduktionsrate von Resazurin [%] nach 24 h (links) und 48 h (rechts) von 0,5 %igen und 1,0 %igen Extraktlösungen der Hexan-, Dichlormethan-, Ethylacetat- und XAD-2-Extrakte von fermentiertem Saft (Tamedferm). Die Reduktion von Resazurin in der Kontrolle wurde als 100 % definiert. Die Balken geben Mittelwerte  $\pm$  SD von vier Messungen an. Signifikante Unterschiede zur DMSO-Kontrolle  $**p \leq 0,01$ ,  $*p \leq 0,05$  und nicht signifikante Unterschiede  $p > 0,05$ . ..... 62

Abb. 3-11: Contour-Plot des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft. Dargestellt ist der DAD-Contour-Plot des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-4. .... 63

Abb. 3-12: Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft von *M. citrifolia*. Dargestellt ist das UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm bei 280 nm. Erhalten wurden elf Fraktionen (F1–F11). Acht Fraktionen (F1–F8) wurden im Elutions-Modus erhalten. Die drei Fraktionen F9–F11 wurden im Extrusions-Modus erhalten. Für die Trennung wurde CCCSystem 6 verwendet. .... 64

Abb. 3-13: Reduktion von Resazurin [%] in Rattenhepatozyten in Primärkultur nach Inkubation mit CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm. Dargestellt ist die Reduktionsrate von Resazurin [%] nach 24 h und 48 h von 1,0 %igen Lösungen der elf CCC-Fraktionen (F1–F11) des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft (Tamedferm). Die Reduktion von Resazurin in der Kontrolle wurde als 100 % definiert. Die Balken geben Mittelwerte  $\pm$  SD von vier Messungen an. .... 65

Abb. 3-14: Contour-Plots der CCC-Fraktionen F9, F10 und F11 des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft von *M. citrifolia*. Dargestellt sind die DAD-Contour-Plots der CCC-Fraktionen F9, F10 und F11 des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm von 220–600 nm. Die jeweiligen Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-4. Retentionszeitverschiebungen zu Tab. 3-4 ergeben sich durch Verwendung von HPLCSystem 8. .... 66

Abb. 3-15: Gewichtete Vitalität (Relative fluorescence units, [RFU]) der Rattenhepatozyten in Primärkultur der Unterfraktionen von Fraktion F10 der CCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm. Dargestellt ist die gewichtete Vitalität der Rattenhepatozyten [RFU] nach Inkubation mit 1 %igen Lösungen der 13 Unterfraktionen der CCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft (Tamedferm) nach 24 h und 48 h. Die Balken geben Mittelwerte  $\pm$  SD von vier Messungen an. .... 67

Abb. 3-16: Contour-Plot der Subfraktionen F10.6 von CCC-Fraktion F10. Dargestellt ist der DAD-Contour-Plot der Subfraktion F10.6 der CCC-Fraktion F10 des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft von *M. citrifolia* (Tamedferm) von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-4. Retentionszeitverschiebungen zu Tab. 3-4 ergeben sich durch Verwendung von HPLCSystem 8. .... 68

Abb. 3-17: Antioxidative Kapazität und Gesamtphenolgehalt von Säften von *M. citrifolia*. Dargestellt ist die Antioxidative Kapazität bestimmt als Trolox-Äquivalente [mmol Trolox/L] und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu als Gallussäure-Äquivalente [mg GAE/L] der authentischen Noni-Säfte von unreifen Früchten (TAunreif, HAunreif), reifen Früchten (TAreif, HAreif, CRreif, CUreif) und fermentierten Säften (Tamedferm, TAffullferm, Hamedferm, HAffullferm). .... 70

Abb. 3-18: Antioxidative Kapazität der Extrakte von Säften aus <i>M. citrifolia</i> . Dargestellt ist die antioxidative Kapazität als Trolox-Äquivalente [ $\mu\text{mol Trolox/g}$ ] von gefriergetrocknetem Saft, des Dichlormethan-, Ethylacetat- und XAD-2-Extrakts von frischen Säften aus unreifen Früchten (TAunreif, HAunreif), reifen Früchten (TAreif, HAreif, CRreif, CUreif) und fermentierten Säften (TAmeferm, HAmeferm). Die Vergleichssubstanzen Ascorbinsäure und Catechin wiesen Werte von 5,10 bzw. 3,71 $\mu\text{mol Trolox/g}$ auf....	72
Abb. 3-19: Antioxidative Kapazität der XAD-7- und XAD-2-Extrakte von Säften von <i>M. citrifolia</i> . Dargestellt ist die antioxidative Kapazität bestimmt als Trolox-Äquivalente [ $\mu\text{mol Trolox/g}$ ] der XAD-7- und XAD-2-Extrakte von frischen (TAreif und HAreif) und fermentierten Säften (TAmeferm und HAmeferm). Die Vergleichssubstanzen Ascorbinsäure und Catechin wiesen Werte von 5,10 bzw. 3,71 $\mu\text{mol Trolox/g}$ auf....	74
Abb. 3-20: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7-Extrakts von TAreif bei 260 nm. Nach der Trennung konnten fünf Fraktionen (F1–F5) sowie die Coil-Fraktion (F6) eingeteilt werden. Für die Trennung wurde CCCSystem 1 verwendet.....	75
Abb. 3-21: Strukturaufklärung von 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose. Gezeigt sind wichtige $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und HMBC-Kopplungen. ....	77
Abb. 3-22: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung von Fraktion F1 des XAD-7-Extrakts von TAreif. Nach der Trennung konnten acht Fraktionen (F1–F8) erhalten werden. Für die Trennung wurde das CCCSystem 4 verwendet. ....	79
Abb. 3-23: Strukturaufklärung von Scopoletin-7-O-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'])- $\beta$ -D-glucopyranosid). Gezeigt sind wichtige HMBC- und NOESY-Kopplungen. ....	79
Abb. 3-24: Strukturaufklärung von 10-Dehydrogardenosid (1) und 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid (2). Gezeigt sind wichtige HMBC- und NOESY-Kopplungen.....	81
Abb. 3-25: Intramolekulare Acetalisierung von 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid (2). Durch die Anlagerung eines Protons an der Aldehydgruppe von 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid kommt es zu einer intramolekularen Acetalbildung an C-10. Dabei entsteht ein neues Stereozentrum und damit zwei epimere Citrifolinoside. Abb. nach SANG <i>et al.</i> verändert (234).....	83
Abb. 3-26: Struktur des Dimers von 10-Dehydrogardenosid. Die Verbindung wurde zur besseren Übersichtlichkeit bei der Auswertung in die zwei Teilstrukturen A und B eingeteilt. ....	83
Abb. 3-27: Strukturaufklärung des Dimers von 10-Dehydrogardenosid. Gezeigt sind wichtige HMBC- und NOESY-Kopplungen. ....	85
Abb. 3-28: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-2-Extrakts von TAreif bei 260 nm. Nach der Trennung konnten sieben Fraktionen (F1–F7) erhalten werden. Für die Trennung wurde das CCCSystem 2 verwendet. ....	86
Abb. 3-29: Struktur von Asperulosidsäure. ....	88
Abb. 3-30: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Asperulosidsäure. Die Fragmentierung wurde ausgehend von $m/z$ 431 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$ im negativen Modus (ESI-MS $^n$ ) durchgeführt.....	89
Abb. 3-31: Schematische Aufarbeitung von Pulpe und Steinen von <i>M. citrifolia</i> . Die lyophilisierten Pulpebestandteile bzw. Steine (links) wurden zunächst mit <i>n</i> -Hexan extrahiert (1. Schritt). Die extrahierte Pulpe bzw. extrahierten Steine wurden anschließend einer Methanol/Wasser-Extraktion unterworfen (2. Schritt). Dieser Methanol/Wasser-Extrakt wurde <i>in vacuo</i> eingengt, zusätzlich mit Wasser verdünnt und gegen Dichlormethan (3. Schritt) und Ethylacetat (4. Schritt) separiert. Die Verbindungen in der übrigen Wasser-Phase wurden an XAD-2 adsorbiert (5. Schritt) (rechts). ....	90
Abb. 3-32: Base-peak-Chromatogramme (BPC) der Dichlormethan-Extrakte. Dargestellt sind die Chromatogramme der Dichlormethan-Extrakte der Pulpe (A) und der Steine (B) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-20 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden. ....	92
Abb. 3-33: Base-peak-Chromatogramme (BPC) der Ethylacetat-Extrakte. Dargestellt sind die Chromatogramme der Ethylacetat-Extrakte der Pulpe (A) und der Steine (B) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist	

in Tab. 3-21 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden. .... 94

Abb. 3-34: Base-peak-Chromatogramm (BPC) des XAD-2-Extrakts. Dargestellt ist das Chromatogramm des XAD-2-Extrakts der Pulpe im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-22 angegeben. .... 98

Abb. 3-35: Antioxidative Kapazitäten der Extrakte von Pulpe und Steinen von *M. citrifolia*. Dargestellt sind die antioxidativen Kapazitäten bestimmt als Trolox-Äquivalente [ $\mu\text{mol Trolox/g}$ ] der Hexan-, Methanol/Wasser-, Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakte der Pulpe und Steine sowie des XAD-2-Extrakts der Pulpe. Die Vergleichssubstanzen Ascorbinsäure und Catechin wiesen Werte von 5,10 bzw. 3,71  $\mu\text{mol Trolox/g}$  auf. . 100

Abb. 3-36: Contour-Plots der Fraktionen F7 und F8. Dargestellt sind die DAD-Contour-Plots der Fraktionen F7 (oben) und F8 (unten) des Ethylacetat-Extrakts der Steine von TAreif von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung der Verbindungen erfolgt nach Tab. 3-21. Zusätzliche Verbindungen sind mit ihren Retentionszeiten angegeben. .... 103

Abb. 3-37: Strukturformeln ausgewählter identifizierter Verbindungen in den Fraktionen F7 und F8. Fett gedruckte Bezeichnungen stellen Verbindungen dar, die für die zytotoxischen Effekte verantwortlich sind. .... 105

Abb. 3-38: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Ethylacetat-Extrakts der Steine bei 280 nm. Es konnten acht Fraktionen (F1–F8) eingeteilt werden. Die Fraktionen F1–F5 wurden im Elutions-Modus und die Fraktionen F6–F8 im Extrusions-Modus erhalten. Die Trennung wurde mit *CCCSytem 3* durchgeführt. .... 106

Abb. 3-39: Strukturaufklärung von Morindolin. Struktur von Morindolin mit Nummerierung (links). Wichtige HMBC-Kopplungen in der Struktur von Morindolin (rechts). .... 107

Abb. 3-40: Struktur von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol. .... 108

Abb. 3-41: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol. Die Fragmentierung wurde ausgehend von  $m/z$  329  $[\text{M}-\text{H}]^-$  im negativen Modus (ESI- $\text{MS}^n$ ) durchgeführt. .... 110

Abb. 3-42: Strukturformeln der vier isolierten Neolignane. Dargestellt sind die Strukturen von Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4). .... 112

Abb. 3-43: Strukturaufklärung von Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4). Gezeigt sind relevante HMBC-Kopplungen für die Strukturaufklärung. .... 114

Abb. 3-44: Vorgeschlagene Fragmentierungen von Isoamericanol A. Als Precursor-Ion wurde  $m/z$  329  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ausgewählt. Die Fragmentierungen wurden im negativen Modus (ESI- $\text{MS}^n$ ) durchgeführt. .... 115

Abb. 3-45: Vorgeschlagene Fragmentierungen von Isoamericaninsäure A. Als Precursor-Ion wurde  $m/z$  343  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ausgewählt. Die Fragmentierungen wurden im negativen Modus (ESI- $\text{MS}^n$ ) durchgeführt. .... 116

Abb. 3-46: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Ethylacetat-Extrakts der Pulpe bei 280 nm. Es konnten neun Fraktionen (F1–F9) eingeteilt werden. Die Fraktionen F1–F6 wurden im Elutions-Modus, die Fraktionen F7–F9 wurden im Extrusions-Modus erhalten. Die Trennung wurde mit *CCCSytem 3* durchgeführt. .... 118

Abb. 3-47: Strukturaufklärung von Noniosid B (1) und Noniosid J (2). Gezeigt sind wichtige HMBC-Kopplungen. .... 119

Abb. 3-48: Nachgewiesene Oxolane und Dioxane in fermentierten Noni-Säften. Dargestellt sind die Strukturformeln von *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan (1), *trans*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan (2), *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan (3), *trans*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan (4). .... 127

Abb. 3-49: Identifizierung der Oxolane und Dioxane in fermentiertem Saft. Dargestellt ist das TIC von TAFullferm (A). In B ist der relevante Ausschnitt von A als EIC ( $m/z$  103) dargestellt. Die zugehörigen Massenspektren der Verbindungen sind unter D dargestellt. Chromatogramm C zeigt die synthetisierten und mittels HSCCC aufgereinigten Oxolane und Dioxane im TIC. .... 127

- Abb. 3-50: Chromatogramme von fermentiertem und frischem Saft. Dargestellt sind die Chromatogramme (GC-FID) der flüchtigen Verbindungen von fermentiertem (oben) und frischem Noni-Saft (unten). Als interne Standards (i.S.) wurden Octanal und Cyclodecanon verwendet. .... 129
- Abb. 3-51: Gehalte an Alkoholen in Säften von *M. citrifolia*. Dargestellt sind die Gehalte [ppm] von 2-Methylpropanol (A), 3-Methyl-1-butanol/2-Methyl-1-butanol (B), 1-Butanol (C), 1-Hexanol (D), 2-Heptanol (E), 3-Methylthiopropyl (F), Benzylalkohol (G) und 3-Methyl-3-buten-1-ol (H)..... 131
- Abb. 3-52: Gehalte an flüchtigen Carbonsäuren und Carbonsäureestern in Säften aus *M. citrifolia*. Dargestellt sind die Gehalte [ppm] der Säuren Essigsäure (A), Butansäure (B), Hexansäure (C) und Octansäure (D) sowie der Ester Methylhexanoat (E) und Methyloctanoat (F) in frischen und fermentierten Säften aus *M. citrifolia*. Zusätzlich ist die Summe der Ester Methylhexanoat, Methyloctanoat, Ethylhexanoat und Ethyloctanoat in den Säften aus *M. citrifolia* (G) gezeigt. .... 133
- Abb. 3-53: Freigesetzte flüchtige Verbindungen aus Saft aus *M. citrifolia*. Dargestellt sind die enzymatisch freigesetzten Verbindungen 3-Methyl-3-buten-1-ol, 3-Methyl-2-buten-1-ol, Hexansäure und Octansäure in Saft von unreifen Früchten (HAunreif), reifen Früchten (HAreif) und fermentiertem Saft (Hamedferm).... 137
- Abb. 3-54: Gehalte an Asperulosidsäure in zehn authentischen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an Asperulosidsäure [mg/L] in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUREif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (Tamedferm und TAffullferm) und Hawai'i (Hamedferm und HAffullferm). .... 139
- Abb. 3-55: Gehalte an Asperulosidsäure in 21 kommerziell erhältlichen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an Asperulosidsäure [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert. .... 140
- Abb. 3-56: Gehalte an Scopoletin in zehn authentischen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an Scopoletin [mg/L] in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUREif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (Tamedferm und TAffullferm) und Hawai'i (Hamedferm und HAffullferm). .... 142
- Abb. 3-57: Gehalte an Scopoletin in 21 kommerziell erhältlichen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an Scopoletin [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert..... 142
- Abb. 3-58: Gehalte an (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatrienoic acid (DTA) und 2-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1-*O*-(2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (DTA-digluco) in zehn authentischen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an DTA und DTA-digluco in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUREif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (Tamedferm und TAffullferm) und Hawai'i (Hamedferm und HAffullferm). .... 144
- Abb. 3-59: Gehalte an (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure (DTA) in 21 kommerziell erhältlichen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an DTA [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert. .... 146
- Abb. 3-60: Gehalte an Furan-2-carbonsäure in zehn authentischen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an Furan-2-carbonsäure [mg/L] in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUREif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (Tamedferm und TAffullferm) und Hawai'i (Hamedferm und HAffullferm). .... 148
- Abb. 3-61: Gehalte an Furan-2-carbonsäure in 21 kommerziell erhältlichen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an Furan-2-carbonsäure [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft

als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert. ....	148
Abb. 3-62: Entwicklung des Gehaltes an Furan-2-carbonsäure während der Lagerung. Frischer Saft von <i>M. citrifolia</i> wurde acht Wochen bei T = 37 °C gelagert. Der Gehalt an Furan-2-carbonsäure wurde jeweils in Abständen von sieben Tagen bestimmt ( $R^2 = 0,956$ ). ....	149
Abb. 3-63: Extracted ion Chromatogramme (EIC) bei $m/z$ 329 von Isoamericanol A sowie frischem und fermentiertem Noni-Saft. Dargestellt ist das EIC der isolierten Standardsubstanz Isoamericanol A (A), das EIC des Ethylacetat-Extrakts eines frischen Noni-Safts (B) und das EIC des Ethylacetat-Extrakts eines fermentierten Noni-Safts (C) jeweils bei $m/z$ 329. ....	150
Abb. 3-64: Extracted ion Chromatogramme (EIC) bei $m/z$ 343 von Isoamericaninsäure A sowie von frischem und fermentiertem Noni-Saft. Dargestellt ist die isolierte Standardsubstanz Isoamericaninsäure A (A), das EIC des Ethylacetat-Extrakts eines frischen Noni-Safts (B) und das EIC des Ethylacetat-Extrakts eines fermentierten Noni-Safts (C) jeweils bei $m/z$ 343. ....	151
Abb. 3-65: Gehalte an Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A in zehn authentischen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A [mg/L] in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUREif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (TAmeferm und TAFullferm) und Hawai'i (HAMeferm und HAFullferm). ....	152
Abb. 3-66: Gehalte an Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A in 21 kommerziell erhältlichen Säften. Dargestellt sind die Gehalte an Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert. ....	153
Abb. 3-67: Entwicklung der Gehalte von Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A während der Lagerung. Frischer Saft von <i>M. citrifolia</i> wurde acht Wochen bei T = 37 °C gelagert. Die Gehalte von Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A wurden jeweils in Abständen von sieben Tagen bestimmt. ....	154
Abb. 3-68: Gehalte an Asperulosidsäure in den Fruchtbestandteilen Pulpe und Steine. Dargestellt sind die Gehalte an Asperulosidsäure [mg/kg Feuchtgewicht] in der Pulpe und den Steinen von Früchten aus Tahiti (TAunreif und TAreif), Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUREif). ....	156
Abb. 3-69: Gehalte an Scopoletin in den Fruchtbestandteilen Pulpe und Steine. Dargestellt sind die Gehalte an Scopoletin [mg/kg Feuchtgewicht] in der Pulpe und den Steinen von Früchten aus Tahiti (TAunreif und TAreif), Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUREif). ....	157
Abb. 3-70: Gehalte an (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (DTA) in den Steinen. Dargestellt sind die Gehalte an DTA [mg/kg Feuchtgewicht] in den Steinen von Früchten aus Tahiti (TAunreif und TAreif), Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUREif). ....	158
Abb. 3-71: Gehalte an (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (DTA) und 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (DTA-digluco) in der Pulpe. Dargestellt sind die Gehalte an DTA und DTA-digluco [mg/kg Feuchtgewicht] in der Pulpe von Früchten aus Tahiti (TAunreif und TAreif), Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUREif). ....	159
Abb. 7-1: Quercetin-3-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid). ....	205
Abb. 7-2: Scopoletin. ....	206
Abb. 7-3: Scopoletin-7-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid). ....	206
Abb. 7-4: 1-O-(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -D-glucopyranose. ....	207
Abb. 7-5: Noniosid A. ....	208
Abb. 7-6: Quercetin. ....	208



## ABBILDUNGEN

---

Abb. 7-7: 3,4-Dihydroxyzimtaldehyd. ....	209
Abb. 7-8: 4- <i>epi</i> -Borreriagenin (1) und 10-Deacetylasperulosidsäure (2). ....	210
Abb. 7-9: (2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatriensäure. ....	211



## TABELLEN

Tab. 2-1: Übersicht über den ethnomedizinischen Nutzen von <i>M. citrifolia</i> .....	8
Tab. 2-2: Untersuchungen zu <i>M. citrifolia</i> . Ausgewählte Untersuchungen zu Bestandteilen von <i>M. citrifolia</i> hinsichtlich ihres medizinischen Nutzens. ....	10
Tab. 2-3: Auswahl an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die aus Früchten von <i>M. citrifolia</i> isoliert wurden. Die zugehörigen Strukturen sind in Abb. 2-9 gezeigt. ....	16
Tab. 2-4: Hepatotoxizität von Noni-Produkten. Zusammenstellung von neun publizierten Fällen von Hepatotoxizität in Zusammenhang mit der Einnahme von Saft und anderen Zubereitungen von <i>M. citrifolia</i> *. ....	28
Tab. 3-1: Verwendete Früchte und Säfte für die Flüssig-Flüssig-Extraktion. Aufgeführt sind die zur Herstellung von frisch gepresstem Saft verwendeten Früchte, das erhaltene Saftvolumen nach Pressung und die Saftausbeute. Von den fermentierten Säften ist das eingesetzte Saftvolumen angegeben. ....	41
Tab. 3-2: Auswaagen der Extrakte. Aufgeführt sind die nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion der frischen und fermentierten Säfte erhaltenen Auswaagen der Extrakte. ....	42
Tab. 3-3: Auswaagen der XAD-7- und XAD-2-Extrakte. Angegeben sind die Auswaagen der XAD-7- und XAD-2-Extrakte von TAreif und Tamedferm. ....	44
Tab. 3-4: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Dichlormethan-Extrakten. Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS <sup>2</sup> in HAunreif (A), HAreif (B) und Hamedferm (B) (n.d. nicht detektiert). ....	46
Tab. 3-5: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Ethylacetat-Extrakten. Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS <sup>2</sup> in HAunreif (A), HAreif (B) und Hamedferm (C) (n.d. nicht detektiert). ....	49
Tab. 3-6: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den XAD-2-Extrakten. Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS <sup>2</sup> in HAunreif (A), HAreif (B) und Hamedferm (C) (n.d. nicht detektiert). ....	54
Tab. 3-7: LC <sub>50</sub> -Werte des Brine-shrimp-Assays der Säfte und Extrakte. Angegeben sind die LC <sub>50</sub> -Werte mit Standardabweichung (SD) [µg/mL] für die Extrakte der frischen (TAunreif, TAreif, HAunreif, HAreif, CRreif und CUREif) und fermentierten Säfte (Tamedferm und Hamedferm). Podophyllotoxin als Positivkontrolle wies einen LC <sub>50</sub> -Wert von 68,03±13,18 µg/mL auf. ....	56
Tab. 3-8: LC <sub>50</sub> -Werte des Brine-shrimp-Assays der Säfte und Extrakte. Angegeben sind die LC <sub>50</sub> -Werte mit Standardabweichung (SD) [µg/mL] der XAD-7- und XAD-2-Extrakte von TAreif und Tamedferm. Podophyllotoxin als Positivkontrolle wies einen LC <sub>50</sub> -Wert von 68,03±13,18 µg/mL auf. ....	57
Tab. 3-9: Identifizierte Verbindungen in der Subfraktion F10.6 von CCC-Fraktion F10 des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft. Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit den Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS <sup>2</sup> in der Subfraktion F10.6 von CCC-Fraktion F10 des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm. ....	68
Tab. 3-10: <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten von 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum von 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( <sup>1</sup> H-NMR) bzw. 150 MHz ( <sup>13</sup> C-NMR) in CD <sub>3</sub> OD aufgenommen. ....	76
Tab. 3-11: Fragmentierung von 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose. Angegeben sind die MS <sup>2</sup> -Fragmentierungen im negativen und positiven Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS). ....	77
Tab. 3-12: <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten von Scopoletin-7-O-(β-D-apiofuranosyl-[1''→6']-β-D-glucopyranosid). Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum von	

Scopoletin-7-O-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1$ H-NMR) bzw. 150 MHz ( $^{13}$ C-NMR) in DMSO-d <sub>6</sub> aufgenommen.....	80
Tab. 3-13: $^1$ H-NMR- und $^{13}$ C-NMR-Daten von 10-Dehydrogardenosid und 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1$ H-NMR- und $^{13}$ C-NMR-Spektrum von 10-Dehydrogardenosid und 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1$ H-NMR) bzw. 150 MHz ( $^{13}$ C-NMR) in DMSO-d <sub>6</sub> aufgenommen. ....	82
Tab. 3-14: Fragmentierung des Dimers von 10-Dehydrogardenosid. Angegeben sind die MS <sup>2</sup> -Fragmentierungen im positiven Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS). ....	84
Tab. 3-15: $^1$ H-NMR- und $^{13}$ C-NMR-Daten des Dimers von 10-Dehydrogardenosid. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1$ H-NMR- und $^{13}$ C-NMR-Spektrum des Dimers von 10-Dehydrogardenosid. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1$ H-NMR) bzw. 150 MHz ( $^{13}$ C-NMR) in DMSO-d <sub>6</sub> aufgenommen. ....	84
Tab. 3-16: Fragmentierung von Asperulosidsäure. Angegeben sind die MS <sup>2</sup> -Fragmentierungen im negativen und positiven Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS). ....	87
Tab. 3-17: $^1$ H-NMR- und $^{13}$ C-NMR-Daten von Asperulosidsäure. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1$ H-NMR- und $^{13}$ C-NMR-Spektrum von Asperulosidsäure. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1$ H-NMR) bzw. 150 MHz ( $^{13}$ C-NMR) in CD <sub>3</sub> OD aufgenommen.....	88
Tab. 3-18: Zusammensetzung der Früchte von <i>M. citrifolia</i> . Dargestellt ist die Zusammensetzung von 100 g reifen Früchten (TAreif) ( $n = 5$ ) aus Saft, Pulpe und Steinen sowohl als Anteil an frischer sowie gefriergetrockneter Frucht. ....	90
Tab. 3-19: Flüssig-Flüssig-Extraktion der Steine und Pulpe. Auswaagen der aus 6,5 kg Früchten von <i>M. citrifolia</i> aus Tahiti erhaltenen Steine und Pulpe. Zusätzlich sind die Auswaagen der Hexan-, Methanol/Wasser-, Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie die Auswaagen nach Aufarbeitung des Rückstandes an XAD-2 angegeben. ....	91
Tab. 3-20: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Dichlormethan-Extrakten. Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS <sup>2</sup> in der Pulpe (A) und den Steinen (B) (n.d. nicht detektiert). ....	93
Tab. 3-21: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Ethylacetat-Extrakten. Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS <sup>2</sup> in der Pulpe (A) und den Steinen (B) (n.d. nicht detektiert). ....	95
Tab. 3-22: Identifizierung der detektierten Verbindungen im XAD-2-Extrakt der Pulpe. Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS <sup>2</sup> in der Pulpe (n.d. nicht detektiert). ....	99
Tab. 3-23: LC <sub>50</sub> -Werte des Brine-shrimp-Assays der Extrakte von Pulpe und Steinen. Angegeben sind die LC <sub>50</sub> -Werte mit Standardabweichung (SD) [ $\mu$ g/mL] für die Methanol/Wasser-, Dichlormethan-, Ethylacetat- und XAD-2-Extrakte der Pulpe und der Steine von TAreif. Podophyllotoxin als Positivkontrolle wies einen LC <sub>50</sub> -Wert von 68,03 $\pm$ 13,18 $\mu$ g/mL auf. ....	102
Tab. 3-24: LC <sub>50</sub> -Werte des Brine-shrimp-Assays und antioxidative Kapazitäten der HSCCC-Fractionen des Ethylacetat-Extrakts der Steine. Angegeben sind die Auswaagen von 1400 mg getrenntem Extrakt, die LC <sub>50</sub> -Werte mit Standardabweichung (SD) aus dem Brine-shrimp-Assay und die antioxidativen Kapazitäten des TEAC-Assays [ $\mu$ mol Trolox/g]. Podophyllotoxin als Positivkontrolle für den Brine-shrimp-Assay wies einen LC <sub>50</sub> -Wert von 68,03 $\pm$ 13,18 $\mu$ g/mL auf. Die Vergleichssubstanzen für den TEAC-Assay Ascorbinsäure und Catechin wiesen Werte von 5,10 bzw. 3,71 $\mu$ mol Trolox/g auf.....	103
Tab. 3-25: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Fraktionen F7 und F8. Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit den Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS <sup>2</sup> in den Fraktionen F7 und F8 des Ethylacetat-Extrakts der Steine (n.d. nicht detektiert).....	104
Tab. 3-26: Fragmentierung von Morindolin. Angegeben sind die MS <sup>2</sup> -Fragmentierungen im negativen Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS).....	107

Tab. 3-27: <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten von Morindolin. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum von Morindolin. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( <sup>1</sup> H-NMR) bzw. 150 MHz ( <sup>13</sup> C-NMR) in CD <sub>3</sub> OD aufgenommen. ....	108
Tab. 3-28: Fragmentierung von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol. Angegeben sind die MS <sup>2</sup> -Fragmentierungen im negativen Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS).....	109
Tab. 3-29: <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( <sup>1</sup> H-NMR) bzw. 150 MHz ( <sup>13</sup> C-NMR) in CD <sub>3</sub> OD aufgenommen. ....	109
Tab. 3-30: Fragmentierung der Neolignane Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4). Angegeben sind die MS <sup>2</sup> -Fragmentierungen im negativen Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS). ....	111
Tab. 3-31: <sup>1</sup> H-NMR-Daten der Neolignane Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4). Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale [ppm]. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( <sup>1</sup> H-NMR) in CD <sub>3</sub> OD aufgenommen. ....	113
Tab. 3-32: <sup>13</sup> C-NMR-Daten der Neolignane Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4). Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale [ppm]. Die Spektren wurden bei 150 MHz ( <sup>13</sup> C-NMR) in CD <sub>3</sub> OD aufgenommen. ....	113
Tab. 3-33: Fragmentierung der Nonioside B und J. Angegeben sind die MS <sup>2</sup> -Fragmentierungen im negativen und positiven Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS). ....	119
Tab. 3-34: <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten von Noniosid B und Noniosid J. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup> H-NMR- und <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum von Noniosid B und Noniosid J. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( <sup>1</sup> H-NMR) bzw. 150 MHz ( <sup>13</sup> C-NMR) in CD <sub>3</sub> OD aufgenommen. ....	120
Tab. 3-35: Flüchtige Verbindungen in frischen Säften. Gehalte der flüchtigen Verbindungen [ppm], die in frischen Säften unreifer Früchten aus Tahiti und Hawai'i sowie in frischen Säften reifer Früchten aus Tahiti, Hawai'i, Costa Rica und Kuba nachgewiesen werden konnten (n.n. nicht nachweisbar, n.q. nicht quantifizierbar). ....	122
Tab. 3-36: Flüchtige Verbindungen in fermentierten Säften. Gehalte der flüchtigen Verbindungen [ppm], die zusätzlich in allen fermentierten Säften nachgewiesen und in mehr als der Hälfte der Säfte quantifiziert werden konnten (n.q. nicht quantifizierbar). ....	125
Tab. 3-37: Flüchtige Verbindungen, die mittels GC-MS in fermentierten Säften nachgewiesen werden konnten. Diese Verbindungen waren mittels GC-FID nicht quantifizierbar (x nachweisbar, o nicht nachweisbar). ....	126
Tab. 3-38: Untersuchung von 21 kommerziellen Säften hinsichtlich <i>cis</i> -5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan und <i>cis</i> -4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan. Dargestellt sind die Daten der 21 kommerziellen Säfte, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft enthalten (SR1-13) und der Säfte, die mit anderen Säften (SZ1-8) versetzt sind (x nachweisbar, o nicht nachweisbar). ....	128
Tab. 3-39: Gehalte der freigesetzten Verbindungen aus Saft aus <i>M. citrifolia</i> . Massengehalte [ppm] der enzymatisch freigesetzten Verbindungen aus XAD-2-Extrakten von HAunreif, HAreif und Hamedferm (n.q. nicht quantifizierbar). ....	136
Tab. 3-40: Parameter für die Bestimmung von Asperulosidsäure. Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup> für die Quantifizierung von Asperulosidsäure. ....	138
Tab. 3-41: Parameter für die Bestimmung von Scopoletin. Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup> für die Quantifizierung von Scopoletin. ....	141
Tab. 3-42: Parameter für die Bestimmung von (2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatriensäure (DTA) und 2- <i>O</i> -(β- <i>D</i> -Glucopyranosyl)-1- <i>O</i> -(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-decatrienoyl-β- <i>D</i> -glucopyranose (DTA-diglucose). Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup> für die Quantifizierung von DTA und DTA-diglucose. ....	144

Tab. 3-43: Parameter für die Bestimmung von Furan-2-carbonsäure. Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß $R^2$ für die Quantifizierung von Furan-2-carbonsäure. ....	147
Tab. 3-44: Parameter für die Bestimmung von Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A. Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß $R^2$ für die Quantifizierung der Neolignane Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A. ....	151
Tab. 3-45: Trockensubstanzgehalte der Fruchtbestandteile von <i>M. citrifolia</i> . Dargestellt sind die Trockensubstanzgehalte der Pulpe, Steine und des Saftes von Früchten von <i>M. citrifolia</i> [g/100 g]. Für die Bestimmung wurden Pulpe, Steine und Saft eingewogen, lyophilisiert und anschließend ausgewogen. ....	155
Tab. 4-1: Authentische Untersuchungsmaterialien von <i>M. citrifolia</i> . Angegeben sind die Herkunft, das Datum der Probenahme und die Menge der Probe. ....	161
Tab. 4-2: Kommerziell erhältliche Säfte von <i>M. citrifolia</i> . Angegeben ist der Hersteller bzw. Vertrieb und Herkunft der Säfte (k.A. keine Angabe). ....	162
Tab. 4-3: Verwendete Chemikalien mit Hersteller und Reinheit. ....	164
Tab. 4-4: Citronensäure-Phosphat-Puffer nach MCLVAINE. ....	165
Tab. 4-5: Einstellungen für den massenspektrometrischen Detektor. ....	166
Tab. 4-6: Einstellungen für den MSD zur Verwendung mit <i>HPLCSystem 2-4</i> und <i>6</i> . ....	166
Tab. 4-7: Einstellungen für den MSD zur Verwendung mit <i>HPLCSystem 7</i> . ....	167
Tab. 4-8: Einstellungen des MSD für die Direktinjektionen. ....	167
Tab. 4-9: Parameter für die HSCCC-Trennungen. Angewendete Fließmittelsysteme, Flussraten und Rotationsgeschwindigkeiten für die HSCCC-Trennungen. Alle Trennungen wurden im head-to-tail-Modus durchgeführt. ....	173
Tab. 4-10: Fließmittelsysteme für die durchgeführten DC-Trennungen. Zusammensetzungen der verwendeten Fließmittelsysteme für die DC-Trennungen. ....	174
Tab. 7-1: $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von Quercetin-3- <i>O</i> -( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1\text{H-NMR}$ - ( $\delta_{\text{H}}$ ) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum ( $\delta_{\text{C}}$ ) von Quercetin-3- <i>O</i> -( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 150 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in $\text{CD}_3\text{OD}$ aufgenommen. ....	205
Tab. 7-2: $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von Scopoletin. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1\text{H-NMR}$ - ( $\delta_{\text{H}}$ ) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum ( $\delta_{\text{C}}$ ) von Scopoletin. Die Spektren wurden bei 300 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 75 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in $\text{CD}_3\text{OD}$ aufgenommen. ....	206
Tab. 7-3: $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von Scopoletin-7- <i>O</i> -( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1\text{H-NMR}$ - ( $\delta_{\text{H}}$ ) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum ( $\delta_{\text{C}}$ ) von Scopoletin-7- <i>O</i> -( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Die Spektren wurden aufgenommen bei 600 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 150 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in $\text{DMSO-d}_6$ . ....	207
Tab. 7-4: $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von 1- <i>O</i> -(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -D-glucopyranose. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 1- <i>O</i> -(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -D-glucopyranose. Die Spektren wurden aufgenommen bei 300 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 75 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	207
Tab. 7-5: $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von Noniosid A. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Noniosid A. Die Spektren wurden aufgenommen bei 300 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 75 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	208
Tab. 7-6: $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von Quercetin. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Quercetin. Die Spektren wurden aufgenommen bei 300 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 75 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	209

Tab. 7-7: $^1\text{H}$ -NMR- und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von 3,4-Dihydroxyzimtaldehyd. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1\text{H}$ -NMR und $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 3,4-Dihydroxyzimtaldehyd. Die Spektren wurden aufgenommen bei 400 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) bzw. 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR) in $\text{CD}_3\text{OD}$ . .....	209
Tab. 7-8: $^1\text{H}$ -NMR- und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von 4- <i>epi</i> -Borreriagenin und 10-Deacetylasperulosidsäure. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1\text{H}$ -NMR und $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 4- <i>epi</i> -Borreriagenin und 10-Deacetylasperulosidsäure. Die Spektren wurden aufgenommen bei 600 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) bzw. 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR) in $\text{CD}_3\text{OD}$ . .....	210
Tab. 7-9: $^1\text{H}$ -NMR und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von (2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatriensäure. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im $^1\text{H}$ -NMR und $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von (2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatriensäure. Die Spektren wurden aufgenommen bei 600 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) bzw. 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR) in $\text{CDCl}_3$ . .....	211
Tab. 7-10: Identifizierte flüchtige Verbindungen in Säften aus <i>M. citrifolia</i> . Dargestellt sind die identifizierten flüchtigen Verbindungen in den Säften aus reifen Früchten (TAreif, HAreif, CRreif und CUREif), aus unreifen Früchten (TAunreif und HAunreif) sowie fermentierten Säften (Tamedferm, TFullferm, Hamedferm und HFullferm) und deren bestimmte Massengehalte [ppm] (n.q. nicht quantifizierbar, n.n. nicht nachweisbar). .....	212
Tab. 7-11: Gehalte der nichtflüchtigen Verbindungen in Früchten und Fruchtsäften von <i>M. citrifolia</i> . Dargestellt sind die bestimmten Gehalte an Asperulosidsäure (ASP), Scopoletin (SCO), (2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatrienoic acid (DTA), 2- <i>O</i> -( $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosyl)-1- <i>O</i> -(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-decatrienoyl- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranose (DTA-digl), Furan-2-carbonsäure (F2C), Isoamericanol A (IAM) und Isoamericaninsäure A (IAA) in den authentischen Früchten (TAunreif, TAreif, HAunreif, HAreif, CRreif und CUREif) [mg/kg] und Fruchtsäften (TAunreif, TAreif, HAunreif, HAreif, CRreif und CUREif sowie zusätzlich Tamedferm, TFullferm, Hamedferm, HFullferm) [mg/L] (LOD—limit of detection, LOQ—limit of quantitation, leere Felder—Daten nicht bestimmt). .....	215





## **E lawe i ke a`o a malama, a e `oi mau ka na`auao**

*He who takes his teachings and applies them increases his knowledge*

(Mary Kawena Pukui „`Olelo No`eau“)





# 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

*Morinda citrifolia*, auf Hawai'i und im europäischen Raum auch unter dem Namen Noni bekannt, ist eine seit mehr als 2000 Jahren im polynesischen und indonesischen Kulturkreis genutzte Heilpflanze, welche dort eine Volksmedizin darstellt (1). Dabei wurden traditionell alle Teile der Pflanze, wie Blätter, Wurzeln, Blüten und Früchte gegen vielfältige Beschwerden eingesetzt (2). Seit 1996 dürfen Produkte aus der Pflanze *M. citrifolia* auf dem US-amerikanischen Markt sowie in Kanada, Japan, Australien, Mexiko, Norwegen und Hongkong angeboten werden. Im Jahr 2003 wurde der Saft der Früchte in der EU als neuartiges Lebensmittel zur Verwendung in pasteurisierten Fruchtsaftgetränken zugelassen (3). Seit August 2008 sind die getrockneten und gerösteten Blätter zur Zubereitung von teeähnlichen Getränken und seit April 2010 zusätzlich Fruchtsaftkonzentrat und Fruchtpüree in der EU zugelassen (4, 5).

Der Saft stellt jedoch das am häufigsten konsumierte Produkt aus *M. citrifolia* in der EU dar. Obwohl die Preise für einen normalen Fruchtsaft ungewöhnlich hoch sind, sind nicht wenige Verbraucher bereit diese zu bezahlen. Dies könnte daran liegen, dass Noni-Produkte oft mit positiven gesundheitlichen Effekten, wie heilungsfördernden Wirkungen bei Krebs-, Herz- und Kreislauferkrankungen sowie bei Infektionen, Allergien und anderen Defiziten des Immunsystems, beworben werden (6, 7). Obwohl einige Untersuchungen bezüglich positiver Eigenschaften von Noni existieren, entbehrt das Gros dieser postulierten Wirkungen jedoch bisher jeder wissenschaftlichen Grundlage.

Über Inhaltsstoffe der Pflanze *M. citrifolia*, insbesondere der Früchte, existieren bis dato zahlreiche Publikationen. Jedoch ist wenig über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der aus ihnen gewonnenen Säfte bekannt. Ein Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, eine Übersicht über die flüchtigen und nichtflüchtigen Verbindungen in fermentierten und frischen Säften zu geben. Für anschließende quantitative Analysen ist die Isolierung und Strukturaufklärung relevanter Inhaltsstoffe nötig, da Standardsubstanzen in den meisten Fällen nicht kommerziell verfügbar sind. Die Isolierung von Verbindungen soll zunächst von verschiedenen Fruchtsaft-Extrakten ausgehen. Eine Anreicherung erfolgt mittels Gegenstromverteilungschromatographie und die weitere Aufreinigung zur Gewinnung von Reinsubstanzen mittels präparativer HPLC bzw. Größenausschlusschromatographie. Die Strukturaufklärung der isolierten Substanzen wird mit 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie und hochauflösender Massenspektrometrie durchgeführt. Darüber hinaus sollen diese Unter-

suchungen auf die anderen Bestandteile der Frucht, wie Pulpe und Steine, ausgedehnt werden, da hierüber bis zu diesem Zeitpunkt keine Daten verfügbar sind.

Zu den beschriebenen positiven Wirkungen von Fruchtsäften von *M. citrifolia* zählen ihre antioxidativen Eigenschaften. Das antioxidative Potential sowie der mit diesem in Zusammenhang stehende Gesamtphenolgehalt der Säfte sowie die daraus hergestellten Extrakte sollen aufgrund dessen näher untersucht werden.

Es existieren jedoch auch negative Schlagzeilen im Zusammenhang mit Noni. So sind mehrere Fälle, bei denen nach dem Verzehr von Noni-Produkten Leberschädigungen aufgetreten sind, publiziert (8, 9). Nach Einschätzung des Scientific Committee on Food (SCF) besteht jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen Hepatotoxizität und der Einnahme von Noni-Produkten (10). Um diese Fragestellung näher zu beleuchten, werden die zytotoxischen Eigenschaften von Noni-Säften und deren Extrakten mittels Brine-shrimp-Assay und Resazurin (Alamar Blue) Assay an Rattenhepatozyten in Primärkultur durchgeführt.

Die oben erwähnten hohen Preise lassen eine Verfälschung von Noni-Säften sehr lukrativ erscheinen. Deshalb sollen die gewonnenen Kenntnisse über die charakteristischen Zusammensetzungen der flüchtigen und nichtflüchtigen Bestandteile der Säfte in Ansätze zur Authentifizierung solcher Produkte münden. Dabei soll vor allem auf die zwei unterschiedlichen Herstellungsverfahren von Noni-Säften eingegangen werden. Diese werden als fermentierte oder frische Säfte auf dem Markt angeboten. Das traditionelle polynesisches Verfahren führt zu fermentierten Säften und ist deutlich aufwändiger im Gegensatz zur Herstellung von frischgepresstem Saft. Da eine zuverlässige Methode zur Unterscheidung beider Noni-Saft-Produkte bis dato nicht möglich ist, sollen hier Ansätze zur eindeutigen Zuordnung beider Produkte gezeigt werden.

## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 Die Pflanze *Morinda citrifolia*

#### 2.1.1 Taxonomie und Morphologie

*Morinda citrifolia* L. (Noni) gehört zur Pflanzenfamilie der Rubiaceen (Rötegewächse). Der Genus *Morinda* umfasst weltweit etwa 80 Arten, welche ausschließlich in den tropischen Klimazonen anzutreffen sind (11). Bei der Art *M. citrifolia* sind aufgrund der hohen genetischen Variabilität zahlreiche Varietäten bekannt, wobei heutzutage jedoch nur zwei Varietäten und ein Kultivar eine größere Rolle spielen. Dabei handelt es sich um die Varietäten *M. citrifolia* var. *bracteata* und var. *citrifolia* und den Kultivar *M. citrifolia* cultivar *Potteri* (12, 13).

*M. citrifolia* var. *citrifolia* weist unter den hier genannten Varietäten den mit Abstand größten ökonomischen Wert sowie die weiteste Verbreitung auf. Diese Varietät ist morphologisch uneinheitlich. Sie kann sowohl kleine als auch große Früchte aufweisen. Darüber hinaus können die Blätter in ihrer Form und Größe sehr unterschiedlich sein. *M. citrifolia* var. *bracteata* stellt eine kleinfrüchtige Varietät dar, die auffällige Brakteen aufweist und an der Grenze von Indischem und Pazifischem Ozean beheimatet ist. Der Kultivar *Potteri* lässt sich aufgrund der grün-weißen Kolorierung der Blätter von den anderen Varietäten eindeutig unterscheiden (14, 15). Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die großfrüchtige *M. citrifolia* var. *citrifolia*, welche im Folgenden nur noch mit *M. citrifolia* bezeichnet wird.



**Abb. 2-1: Wuchsformen von *M. citrifolia*.** *M. citrifolia* als Baum (links), als Strauch auf Lavagestein (Mitte) und in Buschform am Pazifischen Ozean (rechts).

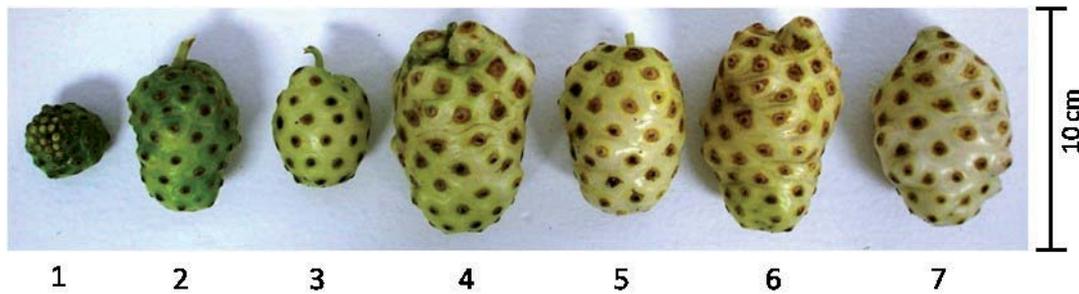
Da die Ursprünge von *M. citrifolia* als Heilpflanze mehr als 2000 Jahre zurückliegen, existieren vielfältige Bezeichnungen für dieses Gewächs. So ist *M. citrifolia* unter den Bezeichnungen *Indian Mulberry* (Englisch), *Mora de la India* (Spanisch), *Canary Wood* (Australien), *Noni* (Hawai'i, Marquesas), *Nono* (Tahiti, Cook Islands), *Nonu* (Samoa, Tonga) und *Kura* (Fidschi) bekannt (11). Der immergrüne kleine Baum oder Strauch erreicht im ausgewachsenen Zustand eine Höhe von etwa drei bis zehn Metern (Abb. 2-1). Während die Borke des Stammes graubraun und leicht angeraut ist, sind das laterale Wurzelsystem und die innere Baumrinde gelb bis orangerot gefärbt (7). Die ovalen, glänzenden, unbehaarten Blätter sind gegenüberliegend angeordnet und erreichen eine Länge von 20 bis 45 cm und eine Breite von 7 bis 25 cm. Die Blüten von *M. citrifolia* sind perfekt, weiß, röhrenförmig und es sind etwa 75 bis 90 kugelförmige Köpfchen an einem Blütenstängel, wie in Abb. 2-2 (links) gezeigt, gruppiert (16).



**Abb. 2-2:** Früchte von *M. citrifolia*. Grüne Früchte mit Blüten (links) und aufgetaute aufgeschnittene Frucht (rechts).

Die einzelnen Blüten verbinden sich bei der Ausbildung der Frucht, so entsteht eine Fruchtoberfläche, die polygonale Segmente aufweist und in deren Zentrum sich die Nektarie einer Blüte befindet (17). Die Größe der synkarpen Früchte von *M. citrifolia* variiert recht stark. Im Regelfall weisen diese eine Länge von 5 bis 10 cm und einen Durchmesser von 3 bis 4 cm auf. Es gibt jedoch auch Exemplare, die eine Länge von über 20 cm und einen entsprechend größeren Durchmesser erreichen können (7).

Die unreifen Früchte von *M. citrifolia* sind dunkelgrün (Stadium 1 und 2, Abb. 2-3). Während des Reifungsprozesses verändert sich die Farbe der Früchte von grün über gelb (Stadien 3–6) zu weißlich durchscheinend (Stadium 7). Zusätzlich ändert sich die Konsistenz der Früchte, die Frucht ist anfangs sehr hart und bleibt bis zu Stadium 6 recht fest. Beim Übergang zum letzten Stadium ändert sich die Konsistenz jedoch schlagartig. Die Frucht ist nun so weich, dass sie problemlos mit der Hand zerdrückt werden kann. Die reifen Früchte besitzen einen sehr unangenehmen, käseartigen Geruch und seifenartigen Geschmack.



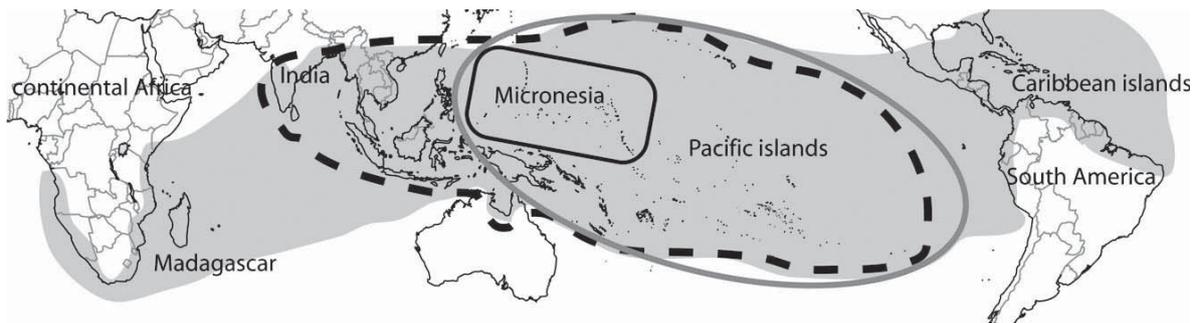
**Abb. 2-3: Unterschiedliche Reifestadien der Früchte von *M. citrifolia*.** Die Früchte in den Stadien 1–5 weisen eine sehr harte Konsistenz auf, Stadium 6 weist eine feste Konsistenz auf, im Reifestadium 7 ist die Frucht sehr weich.

Im Inneren der Früchte befinden sich ca. 1 cm große, bräunliche Steine. Die Früchte enthalten ungefähr 40 000 Steine pro kg Frucht (14). Eine aufgetaute aufgeschnittene Frucht ist in Abb. 2-2 (rechts) gezeigt. Die Steine sind aufgrund ihrer sich im Inneren befindlichen Luftkammern befähigt, auf dem Meerwasser zu schwimmen und währenddessen für mehrere Monate keimfähig zu bleiben (18).

### 2.1.2 Wachstumsbedingungen und Verbreitung

*M. citrifolia* ist das, was gemeinhin als anspruchslose Pflanze bezeichnet wird. Die Pflanze ist sehr gut an tropische und subtropische klimatische Verhältnisse angepasst, d.h. sie benötigt Jahresdurchschnittstemperaturen von 20 bis 35 °C und durchschnittliche Jahresniederschlagsmengen von 250 bis 4000 mm und wächst bis zu einer Höhe von 800 m ü. NN. Darüber hinaus toleriert *M. citrifolia* eine Vielzahl an Böden, wie saure und alkalische sowie nährstoffarme Untergründe, extreme Trockenheit und Lichtverhältnisse von 100 % Sonneneinstrahlung bis zu 80 % Schatten (14). Des Weiteren kommt Noni auf erkalteten Lavaströmen und an Meeresküsten, wie in Abb. 2-1 (Mitte und rechts) gezeigt, vor.

Durch diese ausgezeichnete Adaption und die ausgeprägte Fähigkeit zur Selbstregeneration erstreckt sich die Verbreitung von *M. citrifolia* heutzutage etwa 19° geographischer Breite zu beiden Seiten des Äquators. Die indopazifische Verbreitung schließt Ostpolynesien (z.B. Hawai'i, die Pitcairn-Inseln, die Marquesas und die Cook-Inseln), Melanesien (z.B. Fidschi, Vanuata und Neu-Guinea), Westpolynesien (wie z.B. Tonga, Samoa und Rotuma), Mikronesien (z.B. Guam, Palau, die Marshall-Inseln), Australien und Südostasien ein. Des Weiteren ist Noni mittlerweile auch in Mittel- und Südamerika (z.B. Mexiko, Surinam, Panama, Costa Rica und Venezuela), auf vielen Inseln der Karibik (z.B. den Westindischen Inseln, den Bahamas, Kuba und den Bermudas) sowie Teilen von Afrika zu finden (11, 12, 19). Das gegenwärtige Verbreitungsgebiet ist in Abb. 2-4 gezeigt. Zusätzlich sind in dieser Abbildung die Verbreitungsgebiete von *M. citrifolia* var. *bracteata*, *M. citrifolia* cultivar *Potteri* und der kleinfrüchtigen *M. citrifolia* var. *citrifolia* dargestellt.



**Abb. 2-4: Geographische Verbreitung von *M. citrifolia*.** Die graue Fläche kennzeichnet die derzeitige Ausbreitung der großfrüchtigen *M. citrifolia* var. *citrifolia*. Die schwarz gestrichelte Linie begrenzt das Verbreitungsgebiet von *M. citrifolia* var. *bracteata*. Die graue Linie umschließt die Verbreitungszone von *M. citrifolia* cultivar *Potteri* und die schwarze Linie stellt die Ausbreitung der mikronesischen kleinfrüchtigen *M. citrifolia* var. *citrifolia* dar. Abbildung aus RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010 (12).

Die Ursprünge von *M. citrifolia* werden gemeinhin in Südostasien vermutet (11). Phylogenetische Untersuchungen aus dem Jahr 1994 in Neu Kaledonien zeigten, dass *M. citrifolia* zu einer Klade an endemischen Spezies des Südwestpazifiks gehört und damit der Ursprung u.U. eher dort zu suchen ist als in Südostasien (19). *M. citrifolia* wurde anschließend durch Menschen oder Tiere über die Inseln des westlichen Pazifiks verteilt (20). Eine große Rolle spielten dabei wohl Vögel, die die Früchte als Nahrung nutzten und so zu einer weiten Verbreitung der Pflanze beitrugen (18). Sowohl WHISTLER als auch ABBOTT und SHIMAZU nehmen an, dass Noni von früheren Seefahrern, die die pazifischen Inseln kolonisiert haben, als medizinische Heilpflanze verbreitet worden ist (1, 21).

Neuere Untersuchungen aus dem Jahr 2010 zeigten jedoch durch molekular-phylogenetische Analysenmethoden, dass *M. citrifolia* bereits vor der Besiedlung von mikronesischen und polynesischen Vorfahren aus Südostasien im pazifischen Raum beheimatet war und lediglich sekundär durch den Menschen bzw. Tiere verbreitet wurde. Die heutige weitläufige geographische Verbreitung von Noni ist damit auf die schwimmfähigen und extrem widerstandsfähigen Samen, die Fähigkeit zur Selbstbestäubung und das ganzjährige Wachsen von Blüten und Früchten zurückzuführen (12).

### 2.1.3 Ethnobotanik und Vermarktung von Noni

Die Verwendung von Bestandteilen der Pflanze *M. citrifolia* hat eine mehr als 2000 jährige Tradition (22). Seit ungefähr 1000 Jahren wird Noni aufgrund seiner vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten in Polynesien domestiziert und kultiviert. Genutzt wurde dabei traditionell die gesamte Pflanze. Die Wurzeln und das Holz wurden vorwiegend wegen ihrer färbenden Eigenschaften als Färbemittel für Bekleidung verwendet (16). Das frische Holz zeigt eine gelbe Färbung. Während des Alterungsprozesses verändert sich die Farbe zu gelb-braun bis olivgrün. Die Färbung der Wurzeln und des Holzes wird durch das Vorhandensein von

Anthrachinonen hervorgerufen (23, 24). Auf die Inhaltsstoffe in *M. citrifolia* wird unter 2.1.6 gesondert eingegangen. Der Stamm der Pflanze wurde vorwiegend als Brennholz, aber auch zur Herstellung von Geschirrutensilien, wie Tellern und Schüsseln verwendet. Die Blätter von *M. citrifolia* dienen als Nahrungsmittel. Sie wurden im jungen Stadium roh oder gegart als Gemüse auf Java und in Thailand zu Reis verzehrt. Außerdem wurde häufig Fisch in die Blätter eingewickelt und gegart (11).

Die Noni-Frucht wurde ebenfalls, obwohl sie einen recht unangenehmen Geschmack und Geruch aufweist, als Nahrungsmittel verwendet. Dies galt lange Zeit als nicht gesichert, obwohl SIDNEY PARKINSON, ein Mitglied der Crew von Captain JAMES COOK auf der *Endeavour* bei COOKS erster Pazifikreise 1768–1771, schon 1773 festhielt, dass die Tahitianer Noni-Früchte als Nahrungsmittel nutzten (25). Auf den meisten polynesischen Inseln waren Noni-Früchte fester Bestandteil der Ernährung. So waren die Früchte auf Raratonga, Samoa und Fidschi auf dem Speiseplan der einheimischen Bevölkerung zu finden (26). Auf Hawai'i waren die Früchte jedoch kein normales Nahrungsmittel, sondern wurden nur in Zeiten von Hungersnöten konsumiert (27).

Sehr wichtig ist jedoch die traditionelle Nutzung von *M. citrifolia* als Heilpflanze. Wenn die Anzahl an Indikationen für Noni in Betracht gezogen wird, kann davon ausgegangen werden, dass Noni eine der wichtigsten polynesischen Heilpflanzen ist (20). In einer Umfrage im Jahr 1995 war Noni nach Aloe (*Aloe barbadensis*) auf Platz zwei der populärsten Naturheilmittel des Bundesstaates Hawai'is zu finden, vor Knoblauch (*Allium sativum*) und Ginseng (*Panax ginseng*) (16). Die Nutzung von Noni als Heilpflanze betrifft alle Pflanzenteile. Dabei sind die Anwendungen sowie die Applikationsarten sehr vielfältig. So können die Wurzeln, das Holz, die Rinde, die Blätter und die Früchte äußerlich als Kompressen angewendet werden sowie intern als Aufgüsse bzw. wie es bei den Säften aus den Früchten der Fall ist, direkt oral verabreicht werden. Säfte werden oft auch durch Fermentation der Früchte hergestellt und dann verabreicht (6).

Die Indikationen für die äußerlichen Anwendungen betreffen vorwiegend Wunden und Entzündungen sowie Verletzungen durch giftige Fische und Kopfschmerzen. Die Indikationen für die innerlichen Anwendungen von Noni sind relativ breit aufgefächert. Diese reichen von der Therapie von Krebs bis zur Behandlung von Wurmbefall (16). Die Tab. 2-1 soll einen Überblick über einige traditionelle medizinische Anwendungen von *M. citrifolia* geben und die vielfältige Nutzung der Pflanze als Naturmedizin zeigen.

Tab. 2-1: Übersicht über den ethnomedizinischen Nutzen von *M. citrifolia*.

Pflanzenteil	medizinische Verwendung	Ort	Ref.	
Früchte	Behandlung von Karies	Brunei	(28)	
	Behandlung von Harnwegserkrankungen, Unterleibschmerzen und Gonorrhoe	Cook-Inseln	(22)	
	Behandlung von Geschwüren im Rachenbereich und Hämorrhoiden; orale Aufnahme gegen Depressionen, Fieber, Tuberkulose, virale Infektionen und Krämpfe	Fidschi	(29)	
	zerkaute Frucht wird auf die Lippe aufgetragen zur Behandlung von Geschwüren	Futuna	(30)	
	Behandlung von Tuberkulose; als Bestandteil von Kompressen zur Behandlung von Wunden, Schnitten und Frakturen; Fruchtsaft aus unreifen Früchten gegen Diabetes, Bluthochdruck, Verdauungsstörungen, Menstruationsbeschwerden; die überreifen Früchte wurden gegen Müdigkeit und Bluthochdruck eingesetzt	Hawai'i	(27) (31) (32)	
	Behandlung von Geschwüren an den Füßen; Behandlung von Diabetes; Saft von unreifen Früchten gegen Diabetes	Mikronesien	(33)	
	orale Einnahme gegen Tuberkulose und Fieber	Samoa	(34)	
	Behandlung von Steinfischwunden; gegen Schwellungen des Halses, der Ohren, der Gliedmaßen	Tahiti	(11) (22)	
	Blüten	Behandlung von Entzündungen im Augenbereich	Fidschi	(32)
		Behandlung von Augenentzündungen, Konjunktivitis und Hordeoleen; gegen Hustenbeschwerden	Samoa	(20)
Blätter	Abführmittel	Afrika	(11)	
	Behandlung von Gonorrhoe	Cook-Inseln	(22)	
	Behandlung von Wunden durch giftige Fische; Kompressen bei Entzündungen, Rheuma und Verbrennungen	Fidschi	(32) (35)	
	zerkleinert und gekocht als Tonikum; oral verabreicht als Abortivum	Hawai'i	(16)	
	Behandlung von Rheuma und Wunden; gekaut gegen entzündetes und geschwollenes Zahnfleisch	Samoa	(34)	
Rinde und Holz	Antiseptikum	Australien	(11)	
	orale Einnahme zur Behandlung von Diabetes	Cook-Inseln	(22)	
	Behandlung von Blasenbeschwerden	Fidschi	(32)	
	orale Einnahme als Abortivum und gegen Magenbeschwerden	Futuna	(30)	
	gegen bakterielle Infektionen	Rotuma	(36)	
	orale Einnahme gegen Diarrhoe, Magenschmerzen und Husten	Samoa	(34)	
	gegen Unfruchtbarkeit	Tonga	(30)	
Wurzel	die Flüssigkeit aus zerriebenen Wurzeln wird gegen die Wunden von Steinfischvergiftungen eingesetzt; äußerliche Anwendung gegen Krebsgeschwüre	Cook-Inseln	(22)	
	zerriebene Wurzel wird zur Behandlung von Yaws eingesetzt; wässriger Extrakt gegen Insektenstiche und Entzündungen	Fidschi	(29)	
	Behandlung von Schwellungen; Behandlung von Steinfisch- und Stachelrochenwunden; gegen Pocken	Mikronesien	(33)	
	Behandlung von Zahnschmerzen und Gelbsucht	Samoa	(34)	

Mittlerweile geht der Bekanntheitsgrad von Noni weit über den polynesischen Raum hinaus. Mit der Zulassung vom 1. Juli 1996 durfte Noni-Saft in den USA, Kanada, Japan, Australien, Mexiko, Norwegen und Hong Kong zum Verkauf angeboten werden (37). In der Europäischen Union ist Noni-Saft als neuartige Lebensmittelzutat in pasteurisierten Fruchtsäften nach Verordnung (EG) Nr. 258/97 seit 5. Juni 2003 zugelassen (3). Dem zugrunde lag ein Gutachten des Scientific Committee on Food (SCF), welches pasteurisierten Noni-Saft als sicher einstufte und auf Grundlage des Zulassungsantrages von Tahitian Noni eine Verzehrsempfehlung von 30 mL/Tag aussprach. Diese Verzehrsempfehlung liegt laut Tahitian Noni im hohen Preis und dem einzigartigen Geschmack von Noni-Saft begründet. Das SCF konnte aber keine Hinweise auf gesundheitsfördernde Wirkungen, die über die anderer Fruchtsäfte hinausgehen, nachweisen. Folglich wurde klargestellt, dass Werbung mit gesundheitsbezogenen Aussagen zur Heilung von Krankheiten ausdrücklich zu unterlassen sei (37).

Diese Zulassung bezog sich ausschließlich auf pasteurisierte Fruchtsäfte von *M. citrifolia*, wohingegen z.B. gefriergetrocknete Pulver der Früchte oder anderer Pflanzenbestandteile, wie den Blättern, keine Zulassung erhielten. Bis Juni 2009 wurden 48 Noni-Säfte nach Antrag auf Gleichstellung in der EU notifiziert. Die zugelassenen Säfte sind in einer Liste auf den Webseiten der EU nachzulesen (38). In Bezug auf einen Antrag auf Zulassung getrockneter und gerösteter Blätter von *M. citrifolia* zur Herstellung von Aufgussgetränken gab die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) am 11. August 2008 bekannt, dass diese in den zu erwartenden Aufnahmemengen sicher seien (39). Die Zulassung erfolgte am 15. Dezember 2008 durch die Europäische Kommission (4). Im April 2009 gab die EFSA des Weiteren bekannt, dass auch Noni-Fruchtpüree sowie Noni-Fruchtkonzentrat als sicher angesehen werden (40). Die Zulassung dieser Zubereitungen aus Noni-Früchten wurde am 21. April 2010 erteilt (5).

Die breitangelegte Werbung und clevere Vermarktungsstrategie der Noni-Produkte als Allheilmittel gegen eine Vielzahl von Erkrankungen, obwohl nach europäischem Lebensmittelrecht nicht zulässig, ließ eine große Anzahl an Konsumenten Noni-Produkte für sich entdecken (6). Gerade im Internet existiert eine Vielzahl von Anbietern, welche Behauptungen aufstellen, denen zufolge der Genuss von Noni-Saft u.a. als Heilmittel von Entzündungen, Bluthochdruck, Verdauungsstörungen, aber auch schweren Erkrankungen wie AIDS, Krebs, Depression und Diabetes geeignet sei (16). Die wissenschaftlichen Nachweise dafür fehlen jedoch größtenteils.

Es existieren aber mittlerweile einige wissenschaftliche Untersuchungen zu *M. citrifolia*, bei denen positive Wirkungen von Noni nachgewiesen werden konnten. Dabei zeigten sich z.B. positive Effekte auf die Wundheilung, aber auch hypoglykämische und hepatoprotektive

Effekte. Weitere Untersuchungen zum medizinischen Nutzen von diversen Pflanzenteilen von *M. citrifolia* sind in Tab. 2-2 angegeben.

**Tab. 2-2: Untersuchungen zu *M. citrifolia*.** Ausgewählte Untersuchungen zu Bestandteilen von *M. citrifolia* hinsichtlich ihres medizinischen Nutzens.

Untersuchungs-materialien	Untersuchungen/Ergebnisse	Jahr	Ref.
Fruchtsaft	Mäuse mit Lewis-Lung-Cancer zeigten eine signifikant erhöhte Überlebensdauer	1999	(41)
Hexan-Extrakt der Blätter	starke Aktivität gegen <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , den Erreger der Tuberkulose <i>in vitro</i>	2002	(42)
Fruchtextrakt	Inhibierung der LDL-Oxidation <i>in vitro</i>	2004	(43)
Fruchtextrakt (lyophilisiert)	bei Krebspatienten zeigte sich keine Tumorrückbildung, aber eine messbare Schmerzlinderung	2005	(44)
Fruchtsaft, Blätter	Förderung der Wundheilung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	2007	(45)
		2009	(46)
		2010	(47)
diverse Fruchtextrakte	erhöhte Proliferationsrate von B- und T-Lymphozyten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	2010	(48)
Ethanolextrakt des Fruchtpürees	analgetische und antiinflammatorische Effekte an Mäusen und in Humanzellen	2010	(49)
Fruchtsaft	Vorbeugung von Nervenzellschädigungen nach Ischämie bei Mäusen	2010	(50)
fermentierter Fruchtsaft	hypoglykämische und hepatoprotektive Effekte bei Diabetes-induzierten Mäusen	2011	(51)

Eine beträchtliche Anzahl der positiven Effekte von Noni in Werbeaussagen werden dabei dem Alkaloid „Xeronine“ zugeschrieben. Dieses existiert angeblich als Precursor „Proxeronine“ in Noni, welches im Körper gespalten wird und vielfältige positive Effekte auf den Organismus besitzt (52). Weder die Struktur von „Xeronine“ noch von „Proxeronine“ wurden in dieser Publikation angegeben. Außerdem existiert bis dato keine peer-reviewed-Veröffentlichung, die diese Ergebnisse bestätigen konnte.

Trotz der oftmals fehlenden Beweise für die angepriesenen gesundheitsfördernden Wirkungen von Noni-Produkten hat sich inzwischen ein Milliarden-Dollar-Geschäft rund um die Vermarktung von Noni-Erzeugnissen entwickelt. Internationaler Marktführer beim Vertrieb von Noni-Produkten ist die Firma Tahitian Noni International aus den USA, welche nach eigenen Angaben allein 2004 einen Umsatz von 500 Millionen US\$ machte und bis 2008 einen kumulativen Umsatz von 4 Milliarden US\$ erreichte. Die 1996 gegründete Firma ist laut eigenen Angaben das am viertschnellsten wachsende Unternehmen aller Zeiten (53). Tahitian Noni International beantragte im Jahr 2000 auch die Zulassung von Noni-Saft als Novel Food in der Europäischen Union, die im Jahr 2003 genehmigt wurde.

### 2.1.4 Kultivierung von *Morinda citrifolia* auf Hawai'i

*M. citrifolia* ist in den subtropischen und tropischen Klimazonen beheimatet und benötigt für das Wachstum Jahresdurchschnittstemperaturen von 20–35 °C. Deshalb verwundert es nicht, dass kommerzielle Noni-Plantagen auf Hawai'i, den polynesischen Inseln Tahiti, Fidschi und Samoa, in Costa Rica sowie Indonesien zu finden sind (7). Im August 2008 wurde vom Autor eine Noni-Plantage auf Big Island, Hawai'i im Puna District, besucht. Die dargestellten Photographien wurden dort aufgenommen.

Für den Aufbau einer Plantage werden Noni-Pflanzen aus den Samen oder aus Stecklingen der Wurzeln oder Sprossachsen vermehrt. Die Vermehrung der Pflanze aus den Samen dauert bis zum Keimen etwa 6–12 Monate, wohingegen die vegetative Vermehrung nur zwei Monate in Anspruch nimmt. Oft werden die Setzlinge anschließend, wie in Abb. 2-5 (links) gezeigt, zum Schutz vor Austrocknung in Autoreifen gepflanzt. Eine weitere Möglichkeit ist es, die Samen einfach in Lavaspalten zu platzieren und dort sich selbst zu überlassen (Abb. 2-5 Mitte). So können auch Lavafelder relativ einfach zum Aufbau einer Plantage verwendet werden (Abb. 2-6 rechts).



**Abb. 2-5: Noni-Farm auf Big Island (Hawai'i).** Setzling von *M. citrifolia*, der zum Schutz vor Austrocknung in einem Autoreifen steht (links). Lavaspalte, aus der eine junge Noni-Pflanze wächst. Die Samen werden in diese Spalten eingebracht, um neue Felder anzulegen (Mitte). Im Vordergrund sind frisch gepflückte Früchte gezeigt, die zum Abtransport für die Weiterverarbeitung bereit sind (rechts).

Da Noni recht langsam wächst (30–60 cm/Jahr), werden die Früchte das erste Mal nach etwa drei Jahren nach dem Auspflanzen geerntet. Auf den Farmen werden die Pflanzen auf eine Höhe von etwa zwei Metern geschnitten, um das Pflücken der Früchte zu erleichtern. Das tropische bzw. subtropische Klima erlaubt ein ganzjähriges kontinuierliches Wachstum der Früchte.

Die besuchte Farm besitzt eine Größe von 27 ha (Abb. 2-6). Die Farm ist nicht als Monokultur angelegt, sondern durchzogen von Papaya- und Mangobäumen, Bananenstauden, Kokos-

nusspalmen und Ananaspflanzen. Durch den Verzicht des Einsatzes von Pestiziden und besonders Fungiziden, kann es bei hohen Niederschlagsmengen zu Pilzbefall auf den Blättern kommen. Diese Erkrankung der Pflanzen wird als Black Flag Disease bezeichnet und durch *Phytophthora spec.* hervorgerufen (54, 55).



**Abb. 2-6: Blick über die Noni-Farm auf Big Island (Hawai'i).** Älterer Teil der Noni-Farm (links) und neuerer Teil der Noni-Farm, die auf einem erkalteten Lavafeld angelegt wurde (rechts).

Die Ernte der Früchte erfolgt manuell im Zweiwochen-Rhythmus. Dabei werden ausschließlich reife Früchte mit harter Konsistenz geerntet (vgl. Abb. 2-3). Eine ausgewachsene Pflanze erzeugt etwa 10 kg Früchte/Monat. Die geerntete Menge für die gesamte Farm beläuft sich somit, abhängig von der Niederschlagsmenge, auf ungefähr 1000 kg/Monat. In Noni-Monokulturen können durch den Anbau von besonders großfrüchtigen Genotypen jährlich bis zu 80 Tonnen Früchte/ha geerntet werden. Dies ist jedoch nur durch einen hohen Düngereinsatz, optimale Standortbedingungen und eine hohe Pflanzdichte von etwa 700 Pflanzen/ha zu erreichen (56).

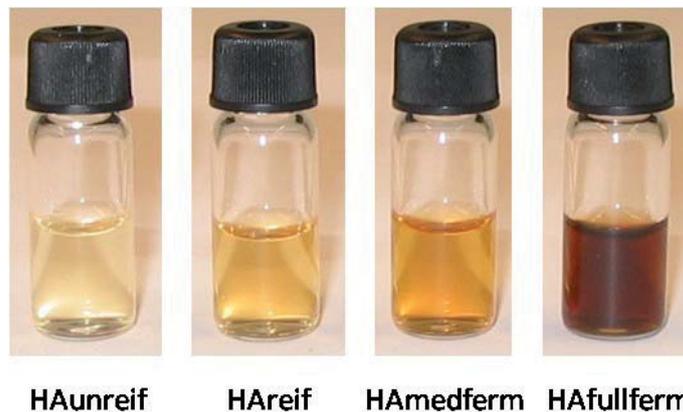
## 2.1.5 Produktion von Noni-Saft

### 2.1.5.1 Herstellung und Mikrobiologie von fermentiertem Saft

Saft aus *M. citrifolia* kann nach zwei verschiedenen Verfahren gewonnen werden. Diese beiden Verfahren sollen hier vorgestellt werden.

Das Produktionsverfahren für die Herstellung von fermentiertem Noni-Saft stammt aus Polynesien und stellt die traditionelle Vorgehensweise zur Herstellung von fermentiertem Noni-Saft dar. Durch die internationale Vermarktung von Noni-Saft ist es heute auch in den anderen Anbaugebieten verbreitet. Hierzu werden die Früchte im reifen, aber festen Zustand geerntet und in Säcke verpackt. Die Früchte reifen sehr schnell nach und werden innerhalb kurzer Zeit sehr weich, deshalb ist die umgehende Weiterverarbeitung unabdingbar.

Die Früchte werden anschließend gewaschen und an der Luft getrocknet. Für das Waschen der Früchte existieren mehrere Möglichkeiten. So können die Früchte mit einem Wasserstrahl gewaschen oder in speziellen automatisierten Waschanlagen gesäubert werden. Einige Hersteller verwenden aber auch umgerüstete Waschanlagen, welche z.B. für die Reinigung von Tomaten, Ingwer oder Kartoffeln verwendet werden. Anschließend werden die Früchte in Fermentationsbehältnisse überführt. Diese sind meist aus Edelstahl, Glas oder lebensmittelechtem Kunststoff und gewähren den Ausschluss von Sauerstoff. In diesen Behältnissen lagern die Früchte zwei Monate oder länger. Während dieser Zeit trennt sich der Saft selbständig von der Pulpe. Die höchste Saftausbeute von etwa 40–50 % wird erreicht, wenn Früchte im Stadium der Vollreife zur Fermentation verwendet werden. Diese kann durch nachträgliches Auspressen der Pulpe jedoch erhöht werden. Der Saft wird schließlich aus den Fermentationsbehältnissen abgezogen, filtriert und abgefüllt (56). Durch den niedrigen pH-Wert von 3,5 ist eine Pasteurisation der Säfte zur Haltbarmachung nicht zwingend notwendig, jedoch zur Einfuhr in die Europäische Union vorgeschrieben (3).

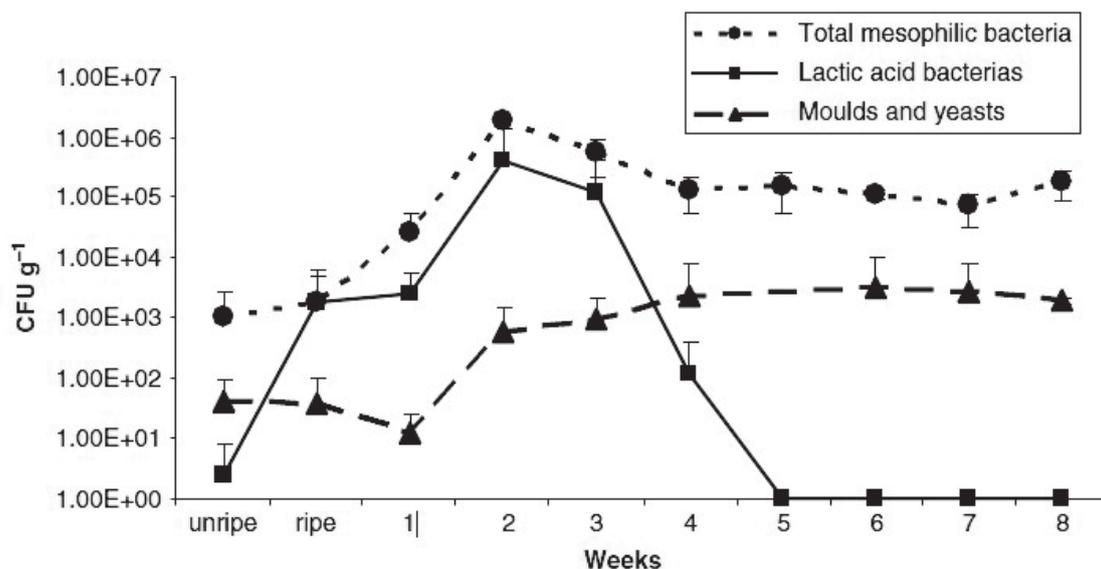


**Abb. 2-7: Verschiedene Säfte von *M. citrifolia*.** Saft von unreifen Früchten (HAunreif) und von reifen Früchten (HAreif) sowie zwei Wochen fermentierter Saft (HAmeferm) und vier Wochen fermentierter Saft (HAFullferm).

Während der Fermentation ändert sich die Farbe des Saftes von gelb für Saft von reifen Früchten über bernsteinfarben für Saft mit zwei Wochen Fermentationszeit zu dunkelbraun für Saft mit vier Wochen Fermentationszeit (Abb. 2-7). Darüber hinaus verändert sich der Geschmack der Säfte. Der Saft von unreifen Früchten ist deutlich heller im Gegensatz zu Saft aus reifen Früchten und besitzt eine deutliche Bitternote, die während der Fruchtreifung verschwindet. Der Saft von reifen Früchten schmeckt sehr süß. Bei der Fermentation nimmt die Süße der Säfte stark ab. Das fertige Produkt weist einen sauren Geschmack auf und eine Textur, die an Sojasauce erinnert.

Die während der Fermentation von Noni-Früchten ablaufenden mikrobiologischen Prozesse wurden von CHAN-BLANCO *et al.* 2007 in Costa Rica untersucht (57). Hierbei zeigte sich, dass

innerhalb der ersten zwei Wochen ein exponentielles Wachstum der Schimmelpilz- und Hefepopulationen sowie der mesophilen Bakterien und Milchsäurebakterien stattfand. Die Populationen der mesophilen Bakterien sowie der Hefen und Schimmelpilze blieben innerhalb des Untersuchungszeitraums stabil. Die Anzahl der Milchsäurebakterien erreichte ihren Höhepunkt nach zwei Wochen. Diese nahmen dann stark ab und waren nach fünf Wochen nicht mehr nachweisbar (Abb. 2-8). Untersuchungen zur Fermentation von Früchten einer verwandten *Morinda*-Spezies (*M. coreia* HAM.) von KANTACHOTE *et al.* aus dem Jahr 2009 bestätigen diese Ergebnisse (58). Es wird angenommen, dass die Abnahme der Population der Milchsäurebakterien durch die Veränderung des Substrates, durch die Bildung von Gasen und die Bildung antimikrobieller Substanzen während des Fermentationsprozesses hervorgerufen wird. Die antimikrobielle Wirkung von diversen Extrakten aus *M. citrifolia* ist hinlänglich bekannt (31, 59, 60).



**Abb. 2-8: Mikrobiologische Veränderungen während der Fermentation von Saft von *M. citrifolia*.** Veränderung des Gehaltes an koloniebildenden Einheiten von mesophilen und milchsäurebildenden Bakterien sowie Schimmelpilzen und Hefen während der Fruchtreifung und des achtwöchigen Fermentationsprozesses von Noni-Saft nach CHAN-BLANCO *et al.* (57).

Der pH-Wert des Safts sinkt während der ersten Woche der Fermentation leicht ab und bleibt danach relativ konstant bei pH 3,6. In Bezug auf die Inhaltsstoffe wurden die Konzentrationen von Ethanol, Milchsäure, Vitamin C und der phenolischen Komponenten Rutin und Scopoletin während der Fermentation untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Ethanolgehalt in der ersten Woche auf etwa 10 g/L ansteigt und dann konstant bleibt. Die Gehalte an Milchsäure erreichen ihren höchsten Wert mit ca. 3 g/L nach drei Wochen und fallen danach etwas ab. Der Ascorbinsäure-Gehalt bleibt über den Untersuchungszeitraum

relativ unverändert. Der Gehalt an Rutin sinkt während der Fermentation etwas ab. Die Werte für Scopoletin dagegen erfahren im Zuge der Fermentation einen leichten Anstieg (57).

### 2.1.5.2 Herstellung von frischem Saft

Zur Herstellung von frisch gepresstem Saft werden die reifen Früchte von *M. citrifolia* in einer Saftpresse abgepresst und anschließend in Flaschen oder Plastikbehältern abgefüllt. Bei dieser Methode beträgt die Saftausbeute bis zu 65 %. Frisch gepresster Saft besitzt einen süßeren und fruchtigeren Geschmack als fermentierter Saft. Seine Farbe ist goldgelb und er weist weniger Sedimente als fermentierter Saft auf. Für Produkte, welche auf frisch gepresstem Saft basieren, ist eine Pasteurisation unabdingbar, da andernfalls der Verderb umgehend einsetzen würde (56).

### 2.1.6 Phytochemie von *Morinda citrifolia*

#### 2.1.6.1 Nichtflüchtige Inhaltsstoffe

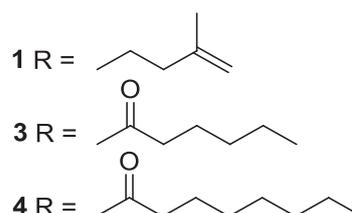
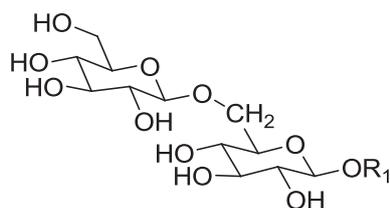
Aufgrund der mittlerweile recht populären Nutzung von *M. citrifolia* existieren eine große Anzahl biologischer und chemischer Untersuchungen, die teilweise mehr als 100 Jahre zurückgehen (6). Aus der Pflanze *M. citrifolia*, d.h. aus Wurzeln, Holz, Blättern, Blüten und Früchten sind bisher ungefähr 200 Verbindungen isoliert worden. Zu den isolierten Sekundärmetaboliten aus Noni gehören vorrangig Anthrachinone und Anthrachinonglykoside, Fettsäuren und Di- bzw. Trisaccharid-Fettsäureester, Iridoide und Iridoidglykoside, Lignane und Neolignane, Flavonole und Flavonolglykoside, Cumarinderivate und Triterpenoide. Eine Auswahl an relevanten sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die aus den Früchten bisher isoliert worden sind, ist in Tab. 2-3 und Abb. 2-9 aufgeführt.

Die Säfte von Noni-Früchten wurden bezüglich ihrer Zusammensetzung untersucht. Noni-Säfte weisen einen Trockensubstanzgehalt von etwa 10 % auf. In der Trockensubstanz liegen hauptsächlich Ballaststoffe (34,5 %), die Monosaccharide Glucose (12 %) und Fructose (8 %), Proteine (25 %), Lipide (1,5 %) und Mineralstoffe (9 %) vor (61). Untersuchungen der Polysaccharid-Fraktion von Noni zeigten, dass diese hauptsächlich aus pektischen Polysacchariden, wie Homogalacturonanen, Typ I Arabinogalactanen, Arabinan und Rhamnogalacturonanen sowie Typ II Arabinogalactan besteht. Bei der Analyse der aus der Spaltung der Polysaccharide erhaltenen Monosaccharide konnten Galacturonsäure, Galactose, Arabinose, Rhamnose, Glucose, Gluconsäure, Xylose, Mannose und Fucose nachgewiesen werden (62, 63). An Mineralstoffen konnten in Noni-Saft Natrium, Phosphor, Kalium, Calcium, Magnesium, Schwefel und Selen nachgewiesen werden. Relativ hohe Werte werden dabei für Kalium mit ca. 4 g/100 g Trockenmasse erreicht (61). Noni-Früchte stellen

darüber hinaus mit 30–160 mg/kg Trockenmasse eine gute Quelle für Vitamin C dar (64). Untersuchungen der Lipidphase aus Noni-Saft zeigten, dass etwa 50 % des Öls ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren darstellen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Öl- und Linolensäure. Interessant ist, dass in relativ großen Mengen kurzkettige Fettsäuren, wie Hexan- (6 %) und Octansäure (22 %), im Öl enthalten sind (61).

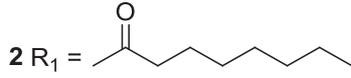
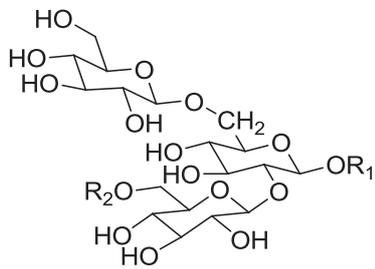
**Tab. 2-3: Auswahl an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die aus Früchten von *M. citrifolia* isoliert wurden.** Die zugehörigen Strukturen sind in Abb. 2-9 gezeigt.

Verbindungsklasse/Name	Nr.	Ref.	Verbindungsklasse/Name	Nr.	Ref.
<b>Nonioside</b>			Morindolin	24	(43)
Noniosid A	1	(65)	Balanophonin	25	(66)
Noniosid B	2	(67)	3,3'-Bisdemethylpinoresinol	26	(43)
Noniosid C	3	(65)	(-)-Pinoresinol	27	(68)
Noniosid D	4	(65)	3,3'-Bisdemethyltanegool	28	(68)
Noniosid E	5	(69)	Isoprincepin	29	(43)
Noniosid F	6	(69)	<b>Flavonole/Flavonolglykoside</b>		
Noniosid G	7	(69)	Kämpferol	30	(68)
Noniosid H	8	(69)	Quercetin	31	(68)
Noniosid L	9	(70)	Kämpferol-3- <i>O</i> -rutinosid (Nicotiflorin)	32	(71)
Noniosid M	10	(70)	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinosid (Narcissosid)	33	(71)
<b>Iridoide</b>			Rutin	34	(67)
Asperulosid	11	(72)	<b>Anthrachinone</b>		
Asperulosidsäure	12	(67)	Anthragallol-1,2-di- <i>O</i> - methylether	35	(73)
Asperulosidsäuremethylester	13	(74)	Anthragallol-2- <i>O</i> -methylether	36	(73)
Deacetylasperulosid	14	(71)	Austrocortinin	37	(75)
Deacetylasperulosidsäure	15	(73)	5,15- <i>O</i> -Dimethylmorindol	38	(73)
Deacetylasperulosid- säuremethylester	16	(74)	6-Hydroxyanthragallol-1,3-di- <i>O</i> - methylether	39	(73)
Borreriagenin	17	(73) (76)	2-Methoxy-1,3,6- trihydroxyanthrachinon	40	(66)
4- <i>epi</i> -Borreriagenin	18	(77)	Morindon-5- <i>O</i> -methylether	41	(73)
<b>Lignane/Neolignane</b>			<b>diverse Verbindungen</b>		
Americaninsäure A	19	(43)	Scopoletin	42	(42)
Americanin A	20	(43)	Aesculetin	43	(78)
Americanol A	21	(43)	β-Hydroxypropiovanillon	44	(66)
Isoamericaninsäure A	22	(79)	Coniferylaldehyd	45	(66)
Isoamericanin A	23	(79)	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatrienoic acid	46	(80)

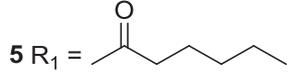




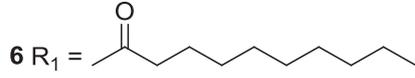
Fortsetzung



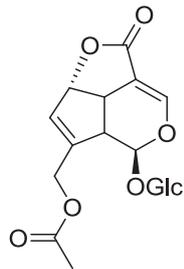
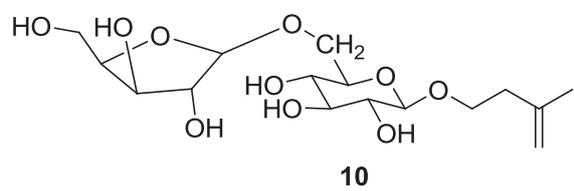
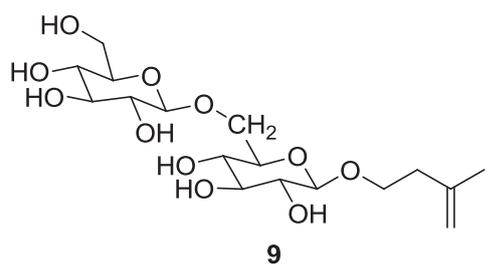
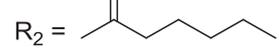
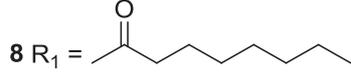
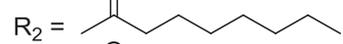
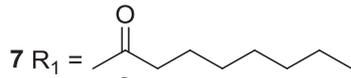
R<sub>2</sub> = H



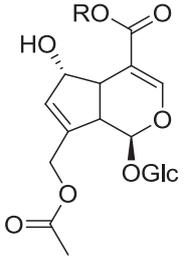
R<sub>2</sub> = H



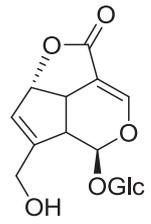
R<sub>2</sub> = H



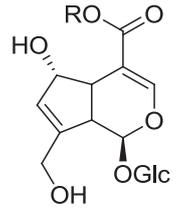
11



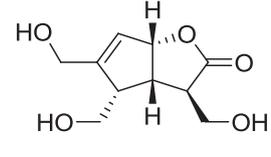
12 R = H  
13 R = CH<sub>3</sub>



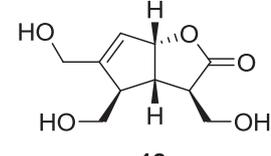
14



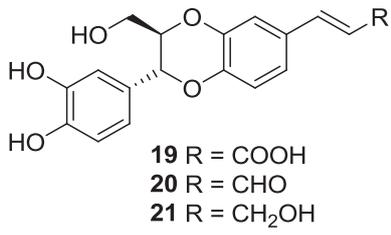
15 R = H  
16 R = CH<sub>3</sub>



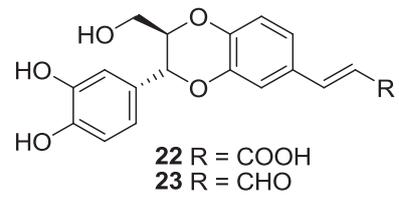
17



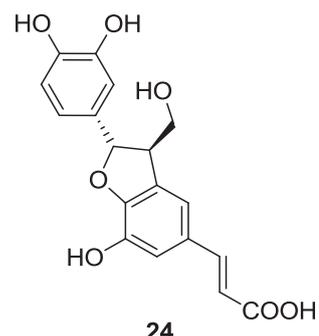
18



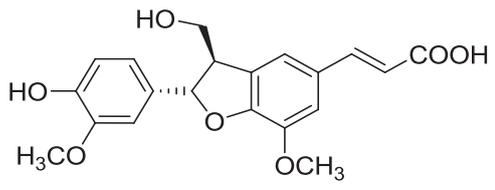
19 R = COOH  
20 R = CHO  
21 R = CH<sub>2</sub>OH



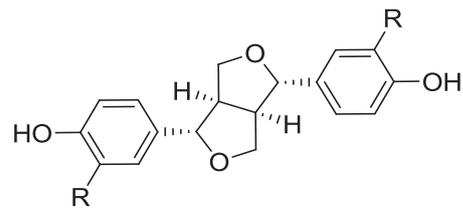
22 R = COOH  
23 R = CHO



24



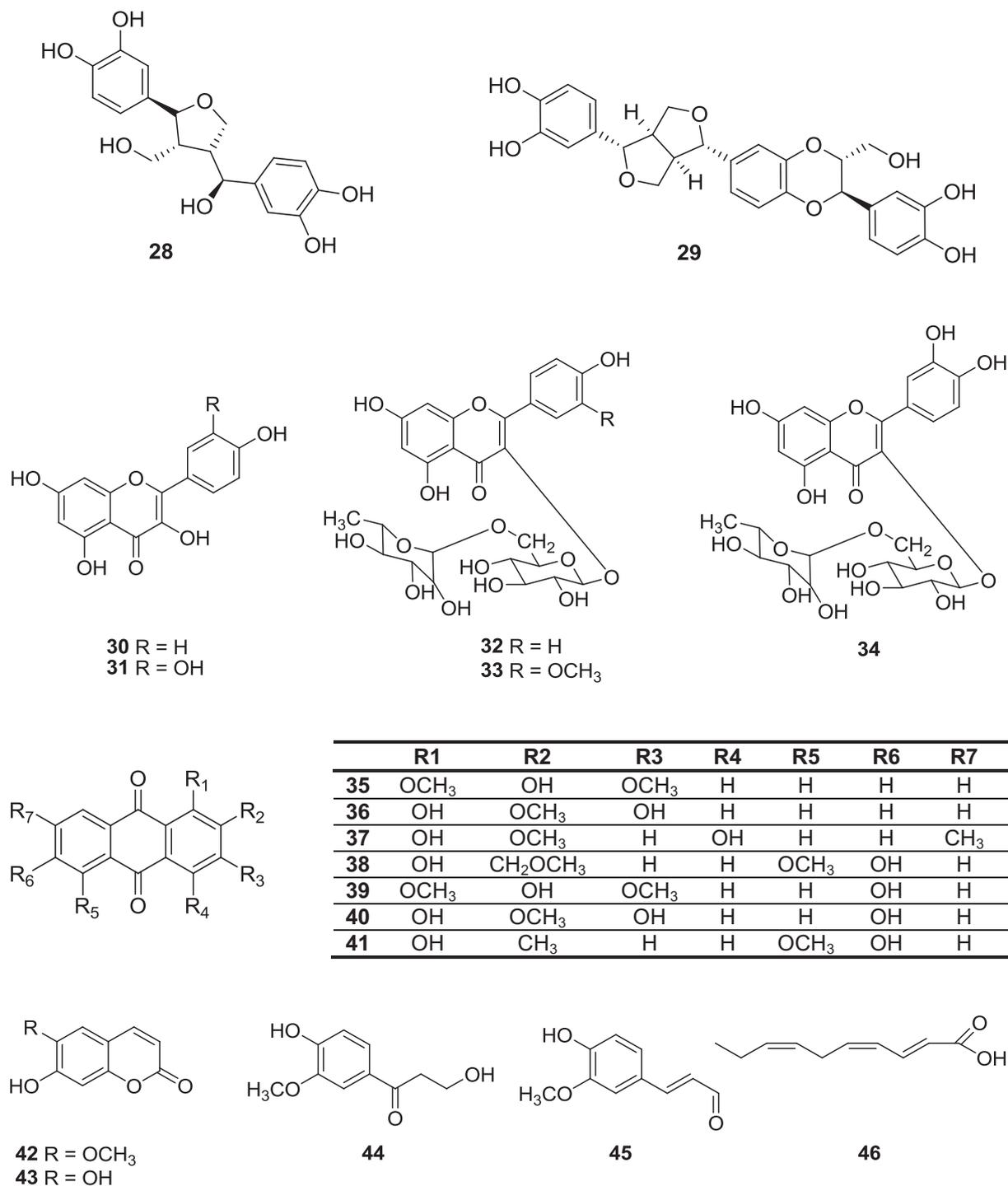
25



26 R = OH  
27 R = OCH<sub>3</sub>



Fortsetzung



**Abb. 2-9:** Aus Früchten von *M. citrifolia* isolierte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Die Zuordnung der einzelnen Strukturen erfolgt nach Tab. 2-3.

Unter den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in Noni-Früchten stellen die Nonioside relativ einzigartige Verbindungen dar. Als Nonioside werden die Glucoseester von Fettsäuren (2–7) und Glykoside von 3-Methyl-3-buten-1-ol bezeichnet (1, 8, 9). Bei den Fettsäure-Glucose-

estern handelt es sich um kurzkettige Fettsäuren, wie 2-Methylbutan-, Hexan-, Octan- und Decansäure, die mit zwei oder drei  $\beta$ -D-Glucopyranose-Einheiten verknüpft sind. Glykoside von 3-Methyl-3-buten-1-ol sind mit  $\beta$ -D-Glucopyranose (1),  $\beta$ -D-Xylopyranose (8) und  $\beta$ -D-Xylofuranose (9) nachgewiesen worden. Die Bezeichnung der Verbindungen als Nonioside geht auf DALSGAARD *et al.* zurück, der diese Nomenklatur 2006 etablierte (69).

Aus Noni-Früchten konnten diverse Anthrachinone isoliert werden (35–41). 5,15-Dimethylmorindol (38) ist bisher nur aus Noni bekannt und das einzige Anthrachinon, welches in Noni-Früchten in signifikanten Mengen mit 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fruchtpüree nachweisbar ist (81). Die genotoxischen Anthrachinone Rubiadin und Lucidin (Nachweisgrenze: jeweils 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) konnten in Noni-Früchten nicht nachgewiesen werden (37). Früchte von *M. citrifolia* weisen eine Vielfalt von Iridoiden (11–18) auf. Davon stellen Asperulosidsäure (12) und Deacetylasperulosidsäure (15) die Hauptiridoide in Noni-Früchten dar (82). Einige Iridoid-Strukturen wurden im Jahr 2006 revidiert. So wurde z.B. Morindacin zu Borreriagenin (17) korrigiert (76). Bei den Lignan- und Neolignan- (19–29), die aus Noni-Früchten bisher isoliert wurden, handelt es sich um Verbindungen, die hauptsächlich aus Pflanzensamen bekannt sind (83, 84). Dies könnte auch bei Noni der Fall sein, da zur Isolierung von der vollständigen Frucht ausgegangen worden ist (43). Darüber hinaus sind Flavonole und deren Glykoside (30–34), die Phenylpropanoide Scopoletin (42), Aesculetin (43),  $\beta$ -Hydroxypropiovanillon (44) und Coniferylaldehyd (45) sowie die ungewöhnliche Fettsäure (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure (46), die wie die Nonioside relativ einzigartig für Noni zu sein scheint, bekannt.

#### 2.1.6.2 Flüchtige Inhaltsstoffe

Die erste Veröffentlichung zu flüchtigen Inhaltsstoffen von Noni-Früchten von FARINE *et al.* stammt aus dem Jahr 1996. Hier konnten in Früchten von *M. citrifolia* 50 flüchtige Verbindungen nach Extraktion mit Dichlormethan mittels GC-MS (CI und EI) identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass sich die flüchtigen Verbindungen aus Carbonsäuren, Estern, Alkoholen, Ketonen und Lactonen zusammensetzen. Die Carbonsäuren stellen mit 20 Verbindungen die größte Substanzklasse dar. Hier konnten als Hauptkomponenten Hexan-, Octan-, Decan- und 2-Methylbutansäure nachgewiesen werden (85). Bei einer neueren Untersuchung von PINO *et al.* aus dem Jahre 2009 konnten 34 flüchtige Säuren in Noni-Früchten identifiziert werden. Hierunter fallen einige verzweigte kurzkettige Säuren, die bei der Synthese aliphatischer Aminosäuren eine Rolle spielen, und 2- bzw. 3-Hydroxycarbonsäuren, die durch die Oxidation von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Fettsäuren gebildet werden (86).

Mit elf Verbindungen stellen die Ester die zweitgrößte Substanzklasse dar. Hier konnten vorwiegend die Carbonsäureester der Hauptfettsäuren mit Methanol bzw. Ethanol

nachgewiesen werden. Bei den Alkoholen stellt 3-Methyl-3-buten-1-ol die mengenmäßig wichtigste Komponente dar. Darüber hinaus konnten noch Hexanamid, Limonen und die schwerer flüchtigen Komponenten Scopoletin und Vomifoliol identifiziert werden. Die fünf Substanzen mit den höchsten Gehalten (Hexan-, Octan-, Decansäure, 3-Methyl-3-buten-1-ol und Scopoletin) stellen ca. 85 % der volatilen Komponenten in Noni-Früchten dar (85).

In einer aktuelleren Veröffentlichung von PINO *et al.* aus dem Jahr 2010 konnten 96 flüchtige Verbindungen nach Anreicherung mittels HS-SPME in reifen und überreifen Früchten identifiziert werden. Hier konnten zusätzlich einige noch nicht bekannte Ester, verzweigte Alkohole und Ketone nachgewiesen werden. Hexan- und Octansäure konnten auch hier als die Hauptkomponenten im Aroma von Noni-Früchten nachgewiesen werden (87).

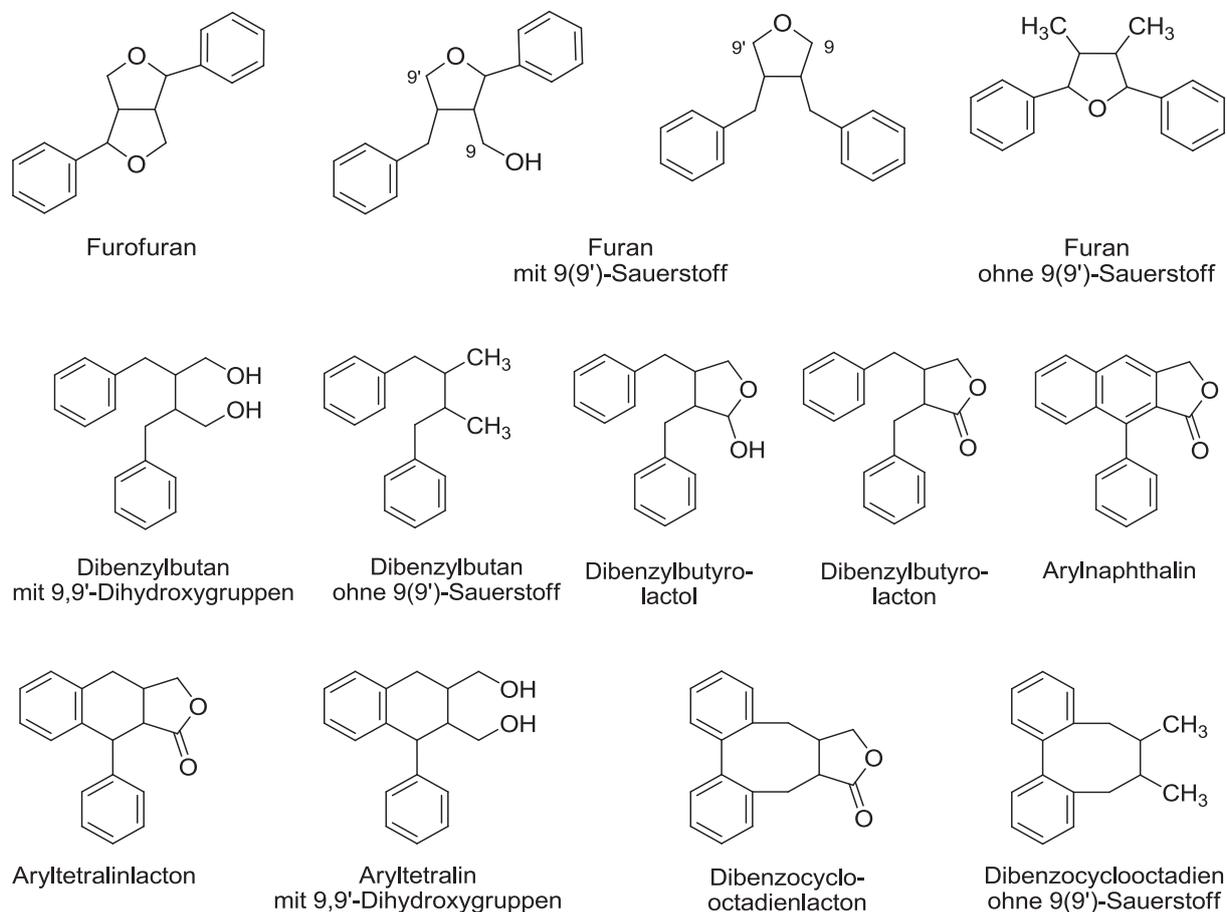
Des Weiteren wurden die Veränderungen der Gehalte der Carbonsäuren, Alkohole und Ester während des Fermentationszeitraumes von 108 Tagen untersucht. Dabei ist eine Abnahme der Carbonsäuren im Untersuchungszeitraum zu verzeichnen. Außerdem steigen die Gehalte von Estern mit fruchtigen Noten aus Ethanol, 1-Butanol und 1-Hexanol an. Diese flüchtigen Verbindungen erfahren nach 60 Tagen Fermentationsprozess keine Änderung in ihrer Zusammensetzung mehr (88).

## 2.1.7 Biosynthese ausgewählter Inhaltsstoffe

### 2.1.7.1 Lignane und Neolignane

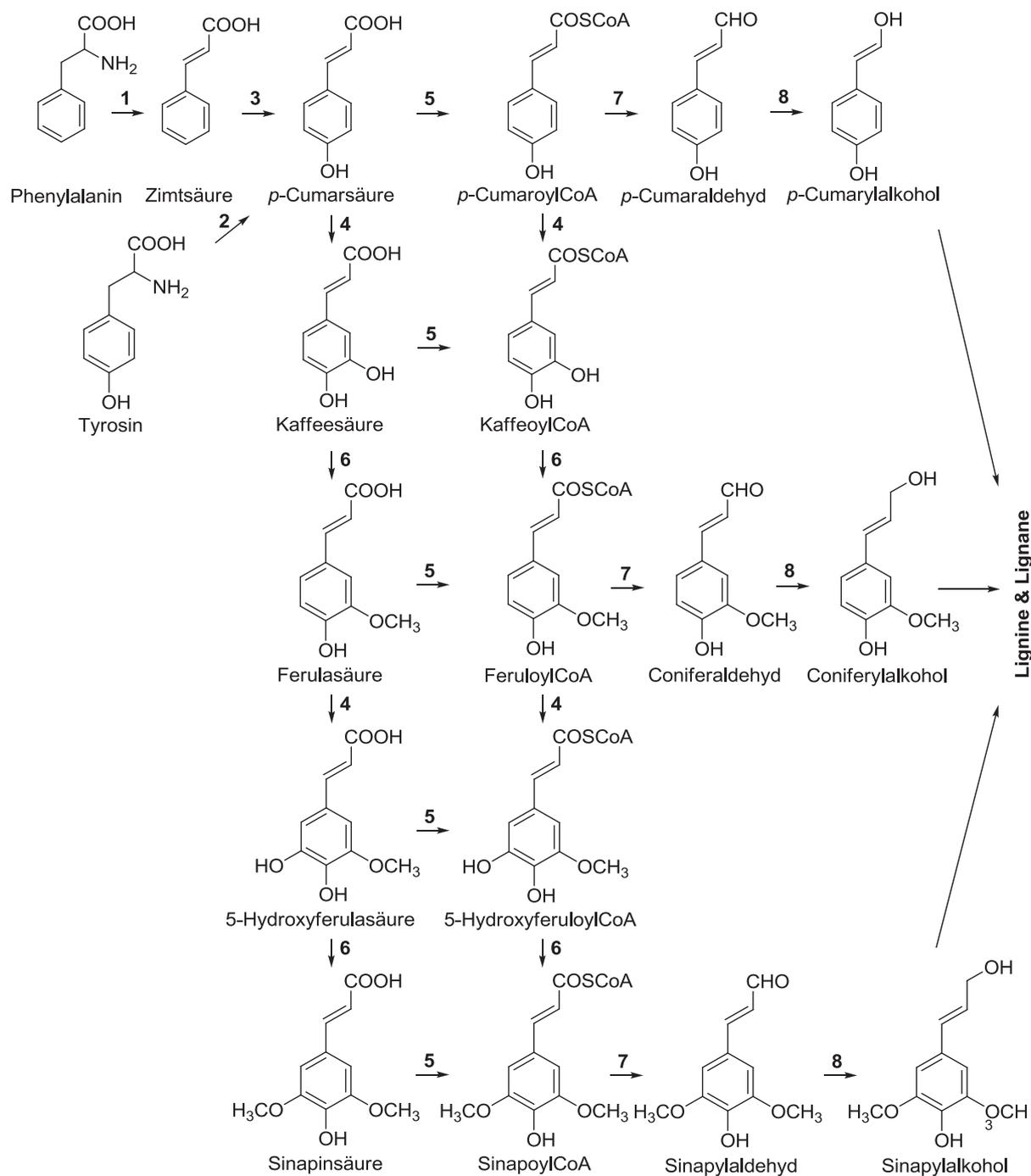
Lignane gehören zur Gruppe der phenolischen Naturstoffe, welche in höheren Pflanzen weit verbreitet sind. Darüber hinaus wurden sie in Farnen und Lebermoosen nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Ligninen kommen Lignane jedoch nicht ubiquitär vor (89). Bei den Lignanen handelt es sich nach der Definition von HAWORTH aus dem Jahr 1936 um Dimere von Phenylpropanoiden, deren Phenylpropanoid-Einheiten über ein zentrales Kohlenstoffatom (C8) der Propyl-Seitenketten verbunden sind (90). Lignane variieren dabei in der chemischen Struktur des Kohlenstoffgrundgerüsts, im Oxidationsgrad und Substitutionsmuster. Aufgrund dessen können Lignane in acht Untergruppen unterteilt werden. Diese Untergruppen resultieren aus der unterschiedlichen Inkorporation von Sauerstoff und Art der Cyclisierung der Strukturen. In Abb. 2-10 sind die acht Untergruppen Furofuran, Furan, Dibenzylbutan, Dibenzylbutyrolacton, Aryltetralin, Arylnaphthalin, Dibenzocyclooctadien und Dibenzylbutyrolactol nach UMEZAWA dargestellt (89), welcher die Darstellung von WHITING zugrunde liegt (91). Darüber hinaus weisen einige Furane, Dibenzylbutane und Dibenzocyclooctadiene keinen Sauerstoff an C9 (C9') auf, wohingegen andere eine zusätzliche Hydroxylgruppe an C7 (C7') oder C8 (C8') besitzen (89). Über die strukturelle Diversität hinaus existiert bei den Lignanen auch eine große Diversität an Enantiomeren. In der Natur

existierende Lignane kommen dabei als ein Enantiomer oder als Enantiomergemische mit unterschiedlichen Zusammensetzungen vor. Darüber hinaus existieren auch racemische Gemische von Lignanen (92).



**Abb. 2-10: Untergruppen der Lignane.** Dargestellt sind die acht Untergruppen Furofuran, Furan, Dibenzybutan, Dibenzybutyrolacton, Aryltetralin, Arylnaphthalin, Dibenzocyclooctadien und Dibenzybutyrolactol. Abbildung nach UMEZAWA (89).

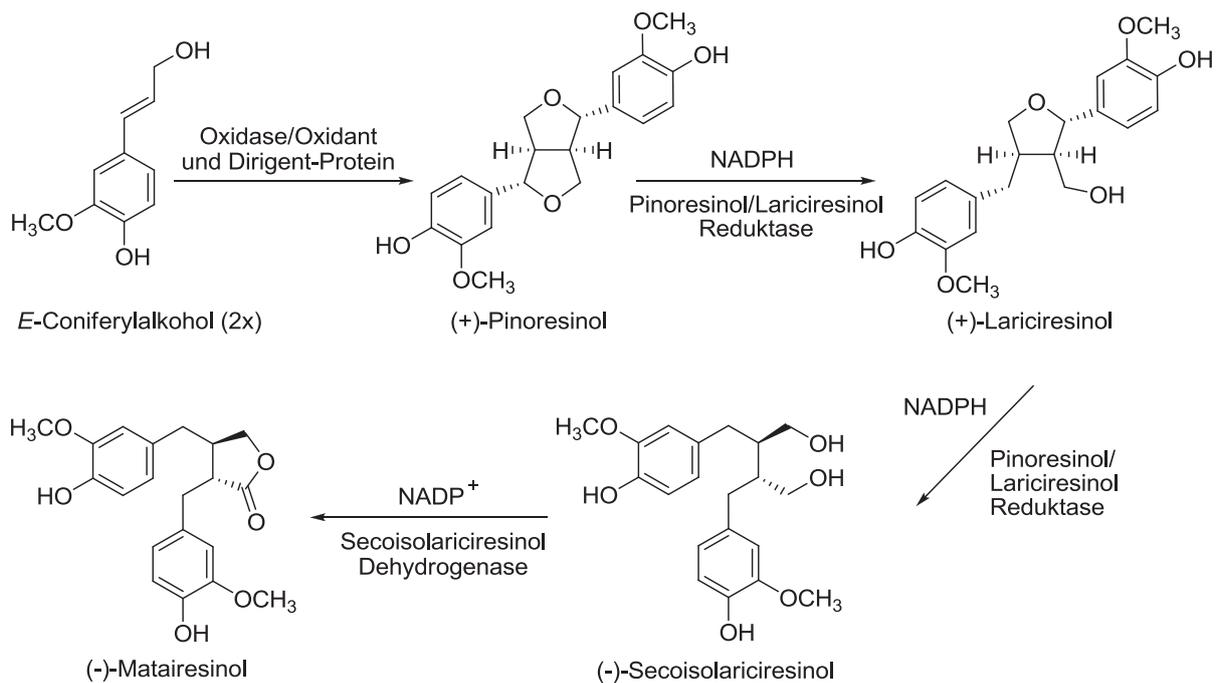
Lignane kommen sowohl als freie Aglykone als auch mono- bzw. diglykosyliert in allen Pflanzengeweben, einschließlich Wurzeln, Samen, Blüten, Blättern, Früchten, Rhizomen und Sprossachse, vor (93). Besonders hohe Konzentrationen an Lignan-Aglykonen konnten von HOLMBOM *et al.* im Kernholz und in den Astknoten von *Picea abies* (Norwegische Fichte) nachgewiesen werden (94). In Pflanzen erfüllen Lignane vielfältige Abwehrfunktionen, vor allem schützen sie diese gegenüber Fungi, die zur Verwesung des Holzes führen würden (95). In Lebensmitteln sind Lignane vor allem in Leinsamen mit 340 mg/100 g und in Ölsaaten mit 370 mg/100 g sowie in vielen Vollkorngetreideprodukten enthalten (96). Der Verzehr von lignanreichen Lebensmitteln spielt für die menschliche Gesundheit eine große Rolle.



**Abb. 2-11. Biosynthese der Lignine und Lignane.** Tyrosin und Phenylalanin bilden die Ausgangsstoffe zur Synthese von *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol, die in die Biosynthese von Ligninen und Lignanen eingehen können. Beteiligte Enzyme an der Umsetzung sind Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (1), Tyrosin-Ammoniak-Lyase (2), Cinnamat-4-hydroxylase (3), Hydroxylase (4), CoA-Ligase mit AMP und CoA (5), *O*-Methyltransferase (6), Cinnamoyl-CoA:NADP-Oxireduktase (7) und Cinnamoylalkoholdehydrogenase (8). Abbildung modifiziert nach LEWIS *et al.* (93).

Die meisten Lignane werden durch die intestinale Mikroflora im oberen Bereich des Darms in Enterolactone und Enterodiole umgewandelt. Diese Verbindungen weisen vielfältige

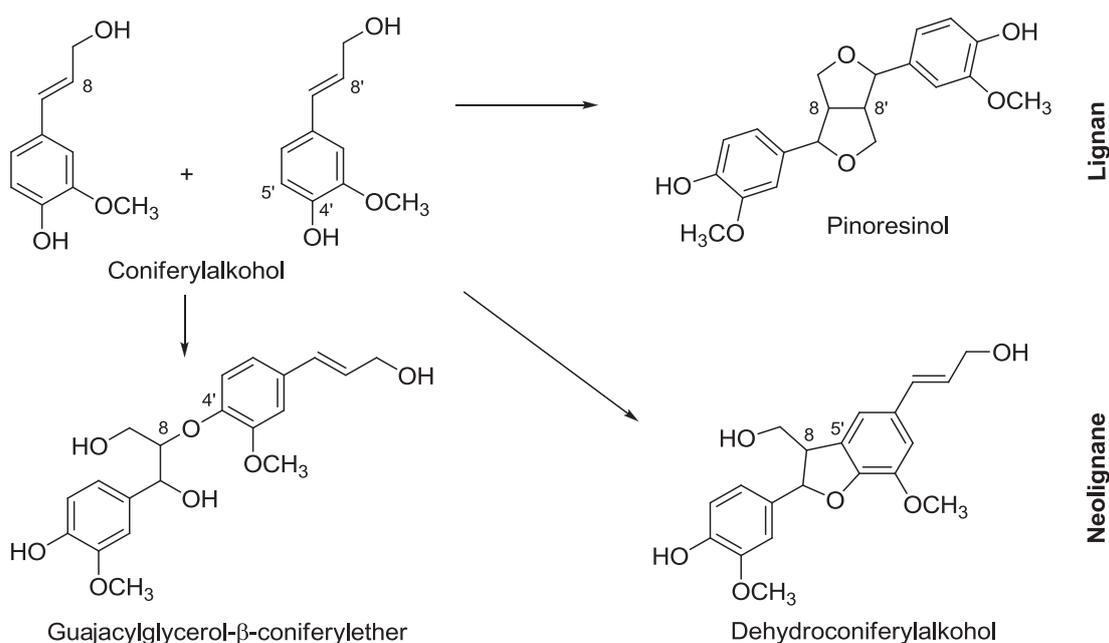
positive gesundheitliche Wirkungen auf. So haben Experimente gezeigt, dass diese Lignane anticancerogene Effekte aufweisen (97). Darüber hinaus konnte in epidemiologischen Studien eine Schutzfunktion der Lignane gegen hormonabhängige Tumore, wie z.B. Brustkrebs, nachgewiesen werden (98). Für diese Effekte könnten die anti-estrogenen und estrogenen (99, 100) sowie antioxidativen Eigenschaften (101, 102) dieser Verbindungen verantwortlich sein. Des Weiteren könnte das anti-Aromatase Potential von Lignanene eine Rolle spielen (103, 104). Lignane und Lignine sind neben Stilbenen, Flavonoiden und Cumarinen Metabolite des Phenylpropanoid-Metabolismus in höheren Pflanzen. Als Edukte für die Biosynthese von Lignanene sind Tyrosin und Phenylalanin, welche auf dem Shikimat-Weg gebildet werden, zu nennen. Zum Shikimat-Weg sei auf einschlägige Lehrbücher verwiesen. Aus Tyrosin bzw. Phenylalanin wird *p*-Cumarsäure gebildet. Die *p*-Cumarsäure kann zum Einen über die Zwischenschritte des aktivierten *p*-CumaroylCoA-Esters und des *p*-Cumaraldehyds zum *p*-Cumarylalkohol reduziert werden. Zum Anderen kann *p*-Cumarsäure zu Kaffeesäure, Ferulasäure, 5-Hydroxyferulasäure und Sinapinsäure umgewandelt werden.



**Abb. 2-12. Biosynthese von Lignanene in *Forsythia intermedia*.** Ausgehend von zwei Molekülen *E*-Coniferylalcohol wird über mehrere Zwischenschritte (-)-Matairesinol gebildet. Die Reaktionen laufen stereoselektiv und enantiospezifisch ab. Abbildung nach LEWIS *et al.* (93).

Ferulasäure und Sinapinsäure werden über mehrere Zwischenstufen zu Coniferyl- bzw. Sinapylalkohol reduziert. Coniferyl-, *p*-Cumaryl- und Sinapylalkohol können dann in die Biosynthese von Ligninen und Lignanene eingehen (Abb. 2-11) (93).

Recht gut untersucht ist die Biosynthese von Lignan en ausgehend von Coniferylalkohol in *Forsythia intermedia* (Goldflieder, Goldglöckchen), welche in Abb. 2-12 dargestellt ist. Das in *F. intermedia* enthaltene Dirigent-Protein kann in Gegenwart von entsprechenden Oxidasen, wie z.B. Laccasen, die Kopplungsreaktion von zwei Molekülen *E*-Coniferylalkohol unter Beibehaltung der absoluten Konfiguration katalysieren. Während die Oxidase die Oxidation von einzelnen Elektronen katalysiert, spezifiziert das Dirigent-Protein den Zusammenschluss. Im Falle der *F. intermedia* wird dabei (+)-Pinoresinol gebildet. Anschließend katalysiert die (+)-Pinoresinol/(+)-Lariciresinol Reduktase zwei enantiospezifische NADPH abhängige Reduktionen, aus denen über (+)-Lariciresinol (-)-Secoisolariciresinol hervorgeht. Bei *F. intermedia* kann dann das entstandene (-)-Secoisolariciresinol unter enantiospezifischer Dehydrierung in das (-)-Matairesinol überführt werden. Wie das Beispiel *F. intermedia* verdeutlicht, unterliegen biochemische Prozesse bei der Bildung von Lignan en stereoselektiven und enantiospezifischen Transformationen (93, 105).



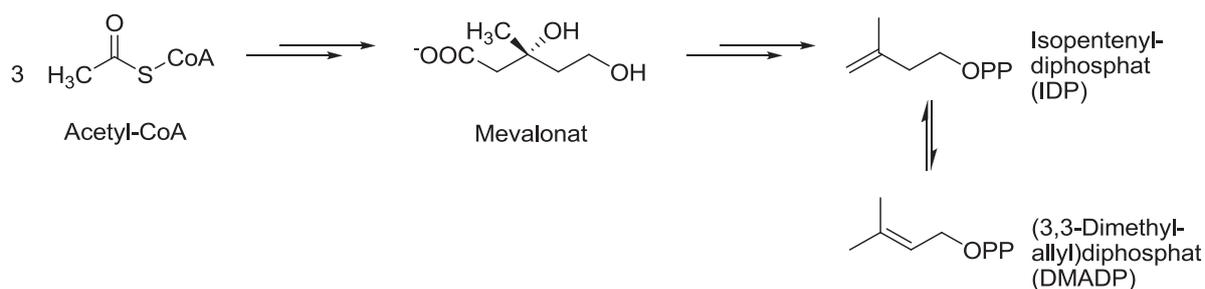
**Abb. 2-13. Biosynthese von Lignan en und Neolignan en.** Aus zwei Molekülen Coniferylalkohol entstehen durch Dimerisierung Pinoresinol (8-8' verknüpftes Lignan), Guajacylglycerol- $\beta$ -coniferyl-ether (8-O-4' verknüpftes Neolignan) und Dehydroconiferylalkohol (8-5' verknüpftes Neolignan). Abbildung nach BEEJMOHUN *et al.* (106).

Neolignane gehören, wie die Lignane, zu den phenolischen Naturstoffen. Sie sind im Kernholz der Pflanzenfamilien Magnoliaceae (107) und Piperaceae (108) sowie in den Früchten und Samen von *Ocotea veraguensis* (Lauraceae) zu finden (109). Für die Klassifikation der Neolignane existieren mehrere Definitionen. So sind Neolignane nach GOTTlieb  $C_6C_3$ -Körper, die anders verknüpft sind als Lignane, welche 8-8'-verknüpfte  $C_6C_3$ -Körper darstellen (110). Später wurden Neolignane als Dimere von Allyl- bzw. Propenyl-

phenyl-Monomeren, die durch oxidative Kupplung entstanden sind, bezeichnet, wohingegen Lignane als Dimere von Cinnamoylalkohol bzw. Zimtsäure angesehen werden (111). In Abb. 2-13 ist die Dimerisierung von zwei Molekülen Coniferylalkohol gezeigt. Dabei können sowohl 8-8'-Dimere (Lignane), wie das Pinoresinol, als auch 8-5'- und 8-O-4'-Dimere (Neolignane) entstehen (106). Obwohl eine ganze Reihe an Enzymen bekannt sind, die für die Biosynthese der Neolignane eine Rolle spielen, ist über den Mechanismus der Bildung vieler Neolignane wenig bekannt (91, 105, 112).

### 2.1.7.2 Iridoide

Iridoide stellen eine große Untergruppe der Monoterpene dar. Bis zu diesem Zeitpunkt sind etwa 500 Verbindungen (ca. 300 Iridoide, 100 Secoiridoide und 100 nichtglykosidische Iridoide) bekannt (113). Die Bezeichnung Iridoid geht auf das im Abwehrsekret der Ameisenart *Iridomyrmex* gefundene Iridodial zurück (114). Entgegen der ersten Beschreibung von Iridoiden in Insekten sind diese Verbindungen im Pflanzenreich weitaus häufiger anzutreffen (115). Hier spielen sie u.a. eine Rolle als bitterschmeckende Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde. Darüber hinaus wirken einige Iridoide hemmend auf das Pflanzenwachstum (113). Bei Iridoiden handelt es sich normalerweise um Verbindungen mit einem Grundgerüst bestehend aus einem Cyclopentanring, welcher mit einem Pyranring verknüpft ist. Chemotaxonomisch sind Iridoide u.a. nützlich als Marker für diverse Gattungen von Pflanzenfamilien. So stellt beispielsweise Aucubin für die Gattung *Plantago* (Plantaginaceae) und Aperulosid für die Gattung *Galium* (Rubiaceae) einen Marker dar (116, 117).

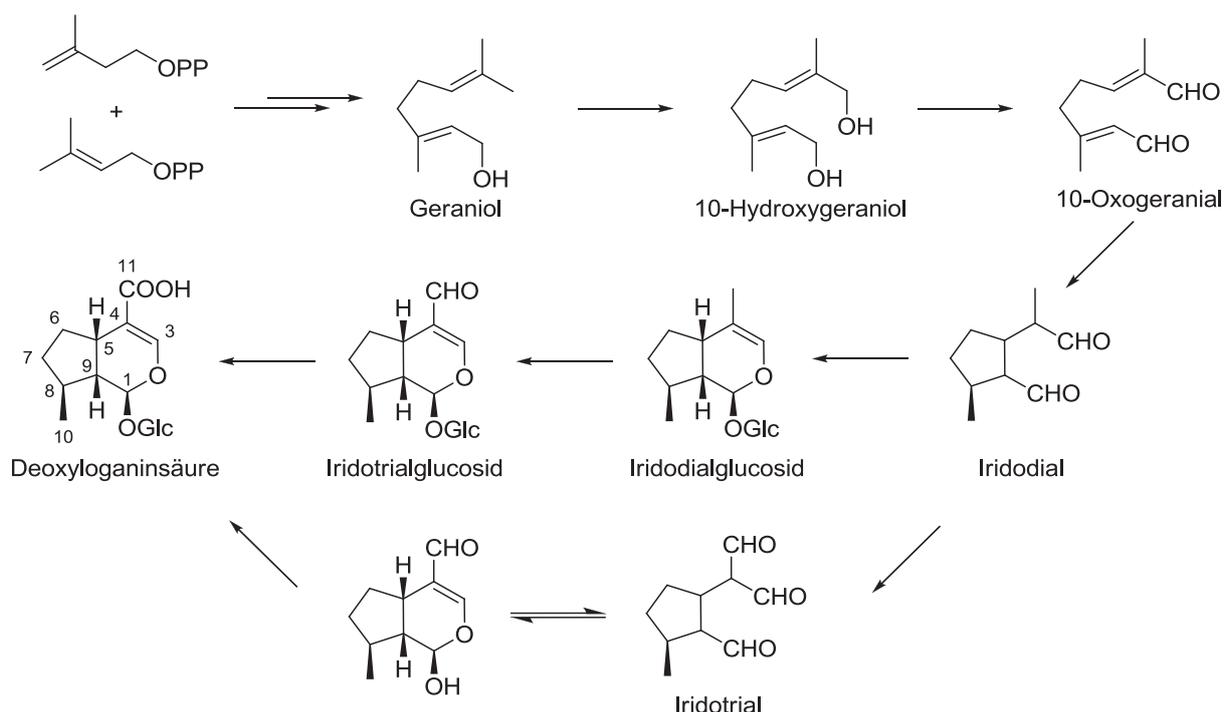


**Abb. 2-14: Biosynthese von Isopentylidiphosphat und (3,3-Dimethylallyl)diphosphat.** Über den Mevalonat-Weg werden aus drei Molekülen Acetyl-CoA die aktiven Isopren-Einheiten Isopentenyldiphosphat und (3,3-Dimethylallyl)diphosphat gebildet.

Die Biosynthese der Iridoide geht wie bei allen Terpenen von der Bildung von Isopentenyldiphosphat (IDP) und (3,3-Dimethylallyl)diphosphat (DMADP) aus. IDP bzw. DMADP werden über den Mevalonat-Weg aus drei Molekülen Acetyl-CoA über die Zwischenschritte Acetoacetyl-CoA, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, Mevalonat und Mevalonatdiphosphat

gebildet (Abb. 2-14). Zusätzlich können Pflanzen, Algen und einige Bakterien IDP bzw. DMADP über den Methylerythritol-Phosphat-Weg synthetisieren.

Für die weitere Biosynthese von Iridoiden existieren mindestens drei Wege, wovon Weg 1, welcher zur Bildung von Deoxyloganinsäure führt, in Abb. 2-15 dargestellt ist. Sowohl Weg 1 als auch Weg 2 gehen von 10-Hydroxygeraniol als Hauptprecursor aus, welches durch Oxidation von Geraniol entsteht. Geraniol wird vorher über mehrere Zwischenschritte durch Kopf-Schwanz-Addition aus IDP und DMADP gebildet. Bei Weg 1 wird 10-Hydroxygeraniol zum Dialdehyd 10-Oxogeraniol oxidiert, welches dann zum Iridodial cyclisiert (118). Der Mechanismus des Ringschlusses ist nicht vollständig aufgeklärt, wurde jedoch von ESCHER *et al.* 1970 plausibel beschrieben (119). Für die weitere Synthese vom Iridodial zur Deoxyloganinsäure existieren zwei mögliche Wege. Zum Einen kann es zur direkten Bildung des glykosidierten Dihydropyrans kommen, welches anschließend an Position 10 zum Aldehyd und zur Säure oxidiert wird. Die Glykosidierung in Position 1 führt dabei zu einer stärkeren Stabilisierung des Lactolrings und verleiht dem Molekül einen hydrophileren Charakter (120).



**Abb. 2-15: Biosynthese von Deoxyloganinsäure.** Ausgehend von Geraniol wird über Oxidationschritte, Cyclisierung und Glykosidierung das Iridoid Deoxyloganinsäure gebildet. Abbildung modifiziert nach Jensen (118).

Obwohl bei Iridoiden auch Glykosidierungen an anderen Positionen bekannt sind, ist die Position 1 für die Verknüpfung mit einer  $\beta$ -D-Glucopyranose bevorzugt (121). Darüber hinaus kann zum Anderen aus dem Iridodial durch Oxidation an Position 10 das Iridotrial entstehen,

welches im Gleichgewicht mit seiner Lactolform steht. Das Iridotrial wird anschließend in Position 1 glykosyliert. Welche Alternative hier bevorzugt wird, hängt von der Pflanzenart ab (113, 118). Weg 2 führt ausgehend vom 10-Hydroxygeraniol über 8-*epi*-Iridodial und 8-*epi*-Iridotrial zu *epi*-Deoxyloganinsäure. Diese ist als Vorstufe weiterer Iridoide, die als Marker für verschiedene Gattungen gelten, wie Aucubin (*Plantago*), Lamiid (*Phlomis*) und Ipolamiid (*Stachytarpheta*), bekannt (118, 122, 123).

Weg 3 geht von 10-Hydroxycitronellol aus, welches über die aus Weg 1 und 2 bekannte Zwischenstufe Iridodial nichtglykosidische Iridoide, wie Dolichodial und Dolicholacton, bildet. Interessant ist, dass nur (*S*)-(-)-Citronellol und (*S*)-(-)-10-Hydroxycitronellol als Zwischenstufen zur Bildung befähigt sind, nicht aber 10-Hydroxygeraniol wie bei Weg 1 und Weg 2 (121).

### 2.1.8 Problematik Noni

Im Jahr 1996 wurde Noni auf dem US-amerikanischen Markt eingeführt. Im Zuge dieser Einführung durften Noni-Produkte ebenso in Kanada, Japan, Australien, Mexiko, Norwegen und Hongkong vermarktet werden (37). Seit dem 5. Juni 2003 ist der Saft der Früchte von *M. citrifolia* in der EU als neuartiges Lebensmittel zur Verwendung in pasteurisierten Fruchtsaftgetränken zugelassen (3). Im August 2008 wurden getrocknete und geröstete Blätter der Pflanze *M. citrifolia* zur Zubereitung von Teegetränken für den europäischen Markt zugelassen und seit April 2010 ist das Inverkehrbringen von Püree und Konzentrat aus Früchten von *M. citrifolia* für die Herstellung von Joghurt, Eiscreme, Bonbons, Marmeladen und Gelees in der EU erlaubt (4, 5). Zu beachten ist jedoch, dass andere aus Noni hergestellte Produkte, wie z.B. Kapseln oder Tabletten aus Bestandteilen der Pflanze, in der EU (noch) nicht zugelassen sind.

Für Säfte aus *M. citrifolia* ergeben sich nun folgende Probleme. So wurden bis zum April 2011 elf Fälle von akutem Leberversagen in Zusammenhang mit der Einnahme von Noni-Produkten bekannt. Der Kenntnisstand zu dieser Problematik soll unter 2.1.8.1 näher erläutert werden. Des Weiteren stellen Noni-Säfte relativ hochpreisige Produkte dar. So belaufen sich die Preise für Noni-Säfte auf etwa 30 bis 60 € pro Liter Saft. Diese hohe Gewinnspanne macht eine Verfälschung dieser Säfte zu einem lukrativen Geschäft. Darüber hinaus ist die eindeutige Differenzierung von Noni-Säften mit unterschiedlicher Verarbeitung, d.h. frischer Saft vs. fermentierter Saft, bis jetzt nicht möglich. Diese Problematik wird unter 2.1.8.2 näher behandelt.

### 2.1.8.1 Toxikologie

In den Jahren 2005 und 2006 erschienen drei Publikationen, in denen vier Fälle in Österreich und Deutschland von akuter Hepatitis nach Verzehr von Noni-Saft beschrieben wurden (8, 124, 125). Bei drei der vier Fälle erfolgte eine spontane Gesundung. Aufgrund der wenigen Fälle und der Begleitmedikation in zwei von vier Fällen von Acetaminophen und chinesischen Kräutern (124) bzw. Interferon beta-1a (8) kam die EFSA zu der Auffassung, dass kein kausaler Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Noni-Saft und einer hepatotoxischen Wirkung bestehe (126).

In der Stellungnahme der EFSA zu Fruchtpüree und Fruchtkonzentrat aus *M. citrifolia* im April 2009 wurden fünf weitere Fälle von Hepatotoxizität im Zusammenhang mit der Einnahme von Noni-Saft und ein Fall in Zusammenhang mit der Einnahme einer nicht weiter spezifizierten Noni-Zubereitung erwähnt (127-130). Auch hier kam das Panel zu der Einschätzung, dass kein kausaler Zusammenhang zwischen Hepatotoxizität und der Einnahme von Noni-Produkten nachgewiesen werden kann. Jedoch wird mittlerweile in Betracht gezogen, dass möglicherweise sensible Bevölkerungsgruppen existieren, die auf Noni-Produkte mit Schädigung der Leber reagieren könnten (10).

**Tab. 2-4: Hepatotoxizität von Noni-Produkten.** Zusammenstellung von neun publizierten Fällen von Hepatotoxizität in Zusammenhang mit der Einnahme von Saft und anderen Zubereitungen von *M. citrifolia*\*.

Geschlecht /Alter	Begleitmedikation	Aufnahme an Noni	Symptome	Ref.
M/45	keine	1 Glas Saft/Tag über mehrere Wochen	allgemeines Unwohlsein	(125)
M/29	Acetaminophen, Kräuter	1,5 L Saft	akutes Leberversagen	(124)
W/62	keine	2 L Saft	nach vier Wochen Diarrhea	(124)
W/24	Interferon beta-1a	1–1,5 L Saft	nach drei Wochen subakutes Leberversagen	(8)
M/43	Levetiracetam	0,56 L Saft	Routine-Check	(9)
W/49	Acetaminophen	30 mL Saft/Tag über mehrere Jahre, danach acht Wochen 240 mL Saft/Tag	nach acht Wochen erhöhten Saft-Konsums Erschöpfung und Gelbsucht	(127)
W/80	keine	tägliche Saftaufnahme über vier Wochen	Juckreiz und Gelbsucht	(128)
W/33	keine	Zubereitung über einige Tage	Übelkeit, Anorexie und Gelbsucht	(129)
M/14	keine	0,6 L Saft	nach acht Wochen Gelbsucht	(131)

\*Zwei weitere Fälle aus dem Jahr 2008 sind nicht gesondert publiziert (130).

Im Jahr 2010 wurde ein weiterer Fall von Hepatotoxizität nach Aufnahme von Noni-Saft bei einem 14-jährigen Jungen veröffentlicht (131). Eine Zusammenstellung der publizierten Fälle von Hepatotoxizität im Zusammenhang mit Noni-Produkten ist in Tab. 2-4 aufgeführt.

In den zwei bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten *in-vitro*-Studien zur Hepatotoxizität von Noni-Saft von WESTENDORF *et al.* und WEST *et al.* konnten keine hepatotoxischen Wirkungen nachgewiesen werden (132, 133). Des Weiteren sei eine im Jahr 2008 durchgeführte pränatale Toxizitätsstudie mit Saft aus *M. citrifolia* an schwangeren Sprague Dawley-Ratten von WEST *et al.* erwähnt. Diese Untersuchung kam zu dem Schluss, nachdem keine Effekte auftraten, dass das Potential einer Toxizität von Noni-Saft für werdende Mütter sehr gering einzuschätzen sei (134). Im Gegensatz dazu sind *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Reproduktionstoxizität eines wässrigen Noni-Extraktes von MÜLLER *et al.* aus dem Jahr 2009 zu betrachten. Hier konnten an Wistar-Ratten Effekte auf die pränatale Entwicklung nachgewiesen werden. Die Autoren weisen daraufhin, dass während des ersten Trimesters der Schwangerschaft und der Laktation sehr vorsichtig mit der Einnahme von Produkten aus *M. citrifolia* verfahren werden soll (135). Im Jahr 2010 erschien eine weitere Untersuchung zur Toxizität von wässrigem Noni-Extrakt und Noni-Saft an schwangeren Wistar-Ratten. Hier konnte keine Toxizität auf die Muttertiere nachgewiesen werden. Jedoch konnten verzögerte Verknöcherungen des Schädels, der Rippen, der Wirbelsäule, der vorderen und hinteren Extremitäten und des Brustbeins in den Föten beobachtet werden (136). Eine abschließende Beurteilung einer möglichen Toxizität von Noni-Saft kann aufgrund dieser z.T. widersprüchlichen publizierten Ergebnisse nicht erfolgen.

### 2.1.8.2 Authentizität

Wie oben schon angemerkt, liegen die Preise für Noni-Saft mit 30–60 €/Liter Saft, verglichen mit anderen Fruchtsäften, recht hoch. Aufgrund der großen Gewinnspanne besteht deshalb die Gefahr, dass Noni-Säfte verfälscht werden. Verfälschung im Fall von Saft aus *M. citrifolia* kann bedeuten, dass der Saft mit Wasser verdünnt wird, dass günstigere Fruchtsäfte zugesetzt werden, dass nachträglich Zucker zugesetzt wird oder dass Fruchtsaftkonzentrat statt Direktsaft verwendet wird.

Die Wässerung von Noni-Saft bzw. die Verwendung von rückverdünntem Konzentrat sowie der Einsatz von günstigere Fruchtsäften können mittels Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) anhand der  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte erfolgen. So konnten für derartig verfälschte Säfte stark negative  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte bestimmt werden, die für die Säfte aus *M. citrifolia* nicht zu erwarten waren. Darüber hinaus ist es mit der IRMS-Methode anhand der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte möglich, Zusätze von Rohrzucker zu identifizieren, da *M. citrifolia* zu den C3-Pflanzen gehört (137).

Eine Methode zur Detektion der Verdünnung von Noni-Saft mit Wasser bzw. anderen Fruchtsäften und des Einsatzes von Saftkonzentrat anstatt von Direktsaft wurde von BASAR und WESTENDORF vorgeschlagen. Dafür wurden die drei Marker (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure, Scopoletin und Kalium verwendet. Durch den Gehalt an Kalium und der Trockensubstanz konnte eine Verdünnung von Noni-Säften nachgewiesen werden und durch das Verhältnis von Scopoletin und (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure konnte eine Verwendung von Saftkonzentrat nachgewiesen werden (80).

Ein weiteres Problem hinsichtlich der Zulassung von neuen Säften aus *M. citrifolia* stellt die Bestimmung des Verarbeitungsgrades der Früchte (frisch vs. fermentiert) dar. Mit der von BASAR und WESTENDORF vorgeschlagenen Methode kann eine Fermentation anhand des Gehalts an (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid und des zugehörigen Saccharidesters nachgewiesen werden (80). Es bleibt jedoch zu bedenken, dass die Spaltung dieser Esterverbindung auch durch Lagerung und bei der Herstellung von Saftkonzentrat hervorgerufen werden kann.

Auch die Bestimmung der geographischen Herkunft von Säften aus *M. citrifolia* stellt ein Problem dar, da die Früchte aus verschiedenen Regionen stammen und mit der Herkunft der Säfte geworben wird, möglicherweise auch um die Produkte zu höheren Preisen zu verkaufen. Ein Ansatz zur Bestimmung der geographischen Herkunft mittels Gaschromatographie und anschließender Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde veröffentlicht (138). Die geringe verfügbare Probenzahl authentischer Säfte schränkt die Anwendbarkeit statistischer Methoden für die Herkunftsbestimmung jedoch stark ein.

## 2.2 Präparative Trenntechniken

### 2.2.1 Gegenstromverteilungschromatographie

#### 2.2.1.1 Grundlagen

Die Gegenstromverteilungschromatographie, engl. Countercurrent chromatography (CCC), stellt eine überaus leistungsfähige präparative Vorfraktionierungs- und Isolierungsmethode zur Gewinnung von Naturstoffen aus komplexen Matrices und zur Isolierung von Substanzen aus Reaktionsgemischen dar (139, 140). Bei der CCC handelt es sich um eine Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie. Die Trennung beruht dabei auf der Verteilung der Substanzen zwischen zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen. Eine der beiden flüssigen Phasen (obere oder untere bzw. leichte oder schwere) wird als mobile Phase eingesetzt, während die zweite flüssige Phase die stationäre Phase darstellt.

Mathematisch kann das Grundprinzip der CCC folglich nach dem NERNST'schen Verteilungsgesetz (Gleichung 2-1) ausgedrückt werden (141). Der Verteilungskoeffizient  $K$  ist dabei

zusätzlich von Druck, Temperatur und Art des Lösungsmittels abhängig. Eine Trennung der Substanzen erfolgt nun aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten in den beiden flüssigen Phasen. Für Verbindungen, die eine gute Löslichkeit in der stationären Phase aufweisen, ist  $K > 1$  und für Verbindungen, die sich gut in der mobilen Phase lösen, ist  $K < 1$ .

$$K = \frac{c(\text{Substanz})_{\text{stationäre Phase}}}{c(\text{Substanz})_{\text{mobile Phase}}} \quad \text{Gleichung 2-1}$$

K Verteilungskoeffizient  
c Konzentration

Für die Trennung von Substanzen bei der CCC ist neben dem Verteilungskoeffizienten auch die Retention an stationärer Phase, welche direkten Einfluss auf die Auflösung hat, wichtig. Die Auflösung  $R_s$  von zwei Substanzen eines Substanzgemisches definiert sich für die CCC nach Gleichung 2-2.

$$R_s = \frac{1}{4} \times (\alpha - 1) \times \sqrt{N} \times \left( \frac{k'}{1 + k'} \right) \quad \text{Gleichung 2-2}$$

mit

$$k' = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

$R_s$  Auflösung  
 $\alpha$  Selektivitätsfaktor  
 $N$  Anzahl der theoretischen Trennstufen  
 $k'$  Kapazitätsfaktor  
 $K$  Verteilungskoeffizient  
 $V_s$  Volumen an stationärer Phase  
 $V_m$  Volumen an mobiler Phase

Wird in Gleichung 2-2 der Kapazitätsfaktor  $k'$  ersetzt, ergibt sich Gleichung 2-3, in welcher die Zusammenhänge zwischen der Auflösung  $R_s$ , dem Selektivitätsfaktor  $\alpha$ , der Trennstufenzahl  $N$  und dem Verteilungskoeffizienten  $K$  besser ersichtlich sind.

$$R_s = \frac{1}{4} \times (\alpha - 1) \times \sqrt{N} \times \frac{K}{(V_m/V_s) + K} \quad \text{Gleichung 2-3}$$

Je größer diese Werte werden, desto besser ist die Auflösung. Gut zu erkennen ist ebenfalls der Einfluss des Volumenverhältnisses an mobiler und stationärer Phase auf die Trennung. Bei der CCC kommt ein relativ großes Volumen an stationärer Phase zum Einsatz, deshalb ist der Quotient von  $V_m/V_s$  mit Werten von 0,1–1 relativ klein. Der Quotient beträgt bei der präparativen HPLC im Vergleich dazu etwa 15–20. Durch ein großes Volumen an stationärer Phase  $V_s$  und damit ein kleines Volumen an mobiler Phase  $V_m$ , da  $V_s + V_m = \text{const.}$ , lässt sich

der Kapazitätsfaktor  $k'$  also beeinflussen. Dadurch lässt sich auch die relativ gute Trennleistung der CCC erklären, obwohl die Anzahl der theoretischen Trennstufen  $N$  lediglich bei ca. 1000 liegt (142).

### 2.2.1.2 Auswahl des Fließmittelsystems

Aus dem vorangegangenen Absatz wird ersichtlich, dass ein optimales Fließmittelsystem unabdingbar für eine gelungene Trennung der Analyten ist. Die Suche nach einem geeigneten System kann nach dem „trial-and-error“-Prinzip sehr aufwändig sein, deshalb empfiehlt es sich, immer vorher die Literatur hinsichtlich bereits entwickelter Fließmittelsysteme für CCC und Countercurrent distribution (CCD) zu durchsuchen. Mittlerweile sind sehr viele Übersichtsartikel zur Anwendung der HSCCC erschienen, die eine Vielzahl an Fließmitteln zur Durchführung unterschiedlicher Trennungen enthalten (139, 141, 143, 144). Im Regelfall sind dies binäre, tertiäre oder quartäre Lösungsmittelsysteme, welche eine stabile Phasengrenze ausbilden. Es existieren jedoch darüber hinaus einige Anforderungen an die Fließmittelsysteme, deren man sich bewusst sein sollte.

- Die Analyten müssen im Phasensystem löslich und stabil sein.
- Das System sollte eine Verteilung von oberer und unterer Phase von etwa 1:1 aufweisen, um unnötigen Lösungsmittelabfall zu vermeiden.
- Die Analyten sollten eine adäquate Verteilung zwischen den beiden Phasen einnehmen.
- Die Retention an stationärer Phase sollte maximal sein.

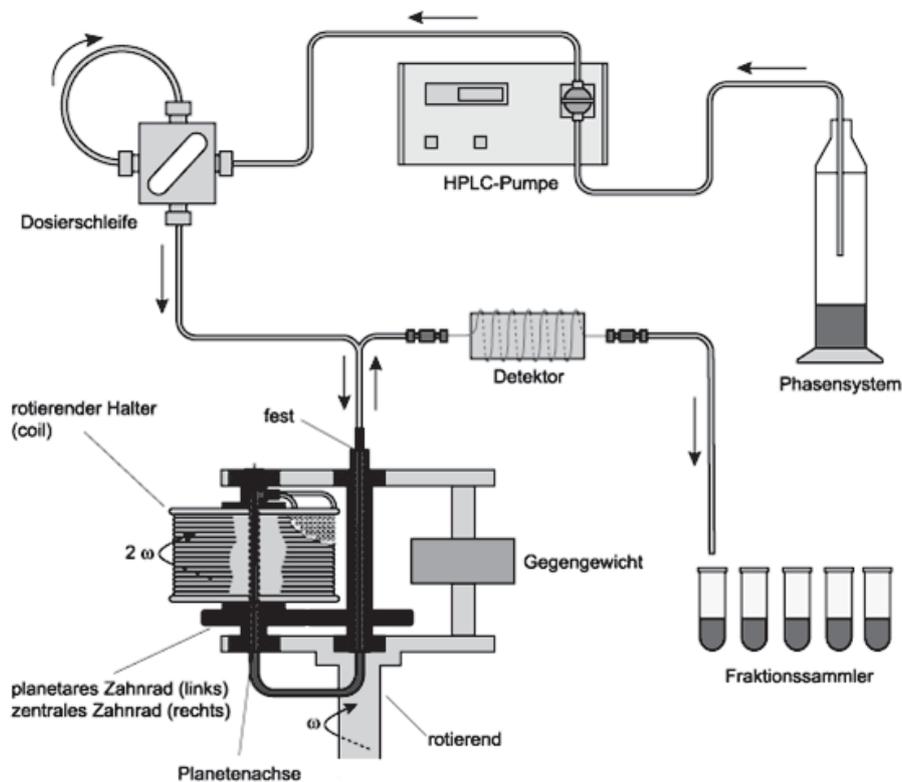
Die letzten beiden Punkte sollen näher erläutert werden. Zunächst muss die Entscheidung getroffen werden, ob die schwere (untere) oder die leichte (obere) Phase als stationäre Phase dienen soll. Es wird dann von einer Tail-to-head-Trennung bzw. von einer Head-to-tail-Trennung gesprochen (Erklärung unter 2.2.1.3). Meistens wird der Head-to-tail-Modus bevorzugt, der hier näher betrachtet werden soll. Der Verteilungskoeffizient  $K$  sollte für eine erfolgreiche Trennung des Analyten  $0,5 \leq K \leq 1,0$  betragen. Analyten mit  $K < 1$  sind hauptsächlich in der schweren, also der mobilen Phase, gelöst und Analyten mit  $K > 1$  hauptsächlich in der leichten, also der stationären Phase, gelöst. Kleine Werte für  $K$  bedeuten eine schnelle Elution und damit eine mögliche unzureichende Abtrennung der Analyten von der Matrix. Große Werte für  $K$  führen zu einer langen Trennzeit oder u.U. dazu, dass die Verbindungen in der stationären Phase verbleiben.

Unter 2.2.1.1 wurde gezeigt, dass die Retention der stationären Phase entscheidenden Einfluss auf die Güte der Trennung hat. Eine hohe Retention geht dabei einher mit einer

hohen Auflösung der Analyten. Eine hohe oder gute Retention bedeutet in der HSCCC, dass die stationäre Phase > 50 % des Gesamtvolumens des Coils beansprucht. Jedoch können ausreichende Trennungen auch mit Retentionen < 30 % erreicht werden, dann jedoch nur bei hohen Verteilungskoeffizienten (139).

### 2.2.1.3 High-speed countercurrent chromatography

Mitte der 1960er Jahre wurde der erste Prototyp zur Anwendung der CCC von ITO *et al.* entwickelt. Diese sog. Coil Planet Centrifuge war zunächst u.a. zur Analyse der osmotischen Fragilität von roten Blutzellen gedacht (145). Seit den frühen 1970er Jahren setzte die Entwicklung hydrostatischer Systeme ein. Zu diesen Techniken zählen z.B. die Droplet CCC und die Centrifugal partition chromatography (CPC) (146). Heutzutage finden vorwiegend hydrodynamische Systeme wie die High-speed countercurrent chromatography (HSCCC) Anwendung, deren Entwicklung in den 1980ern einsetzte. Solche Systeme eignen sich sehr gut zur Durchführung effizienter Trennungen zur Fraktionierung und Isolierung von Substanzen aus komplexen Matrices (140).

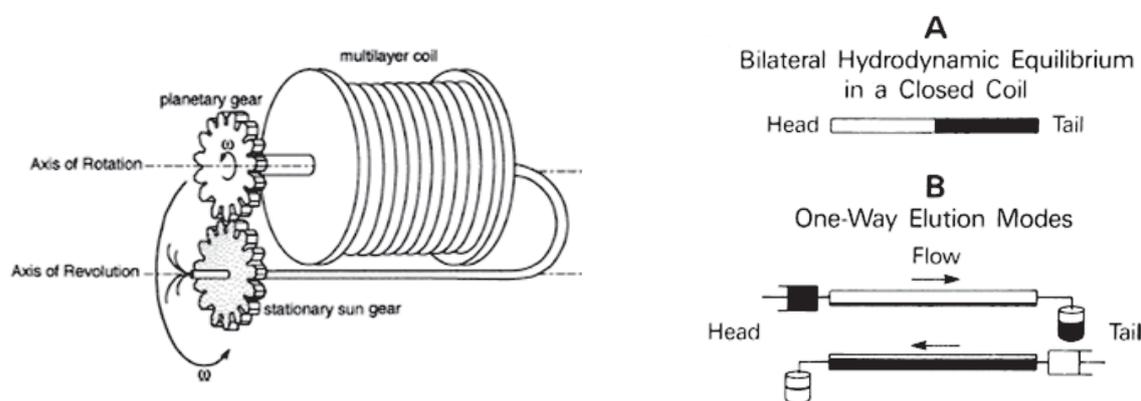


**Abb. 2-16. J-Type-HSCCC-Anlage.** Schematischer Aufbau einer Monocoil-J-Typ-HSCCC-Anlage bestehend aus einem Lösungsmittelreservoir, einer HPLC-Pumpe, einer Dosierschleife, einer Coilhalterung, einem Detektor und einem Fraktionssammler nach SUTHERLAND (147).

Der Aufbau einer J-Type-HSCCC-Anlage mit einer Trennsäule ist in Abb. 2-16 gezeigt. Der Versuchsaufbau ist dem einer HPLC-Anlage recht ähnlich. Die Anlage besteht aus einer

Pumpe, einer Dosierschleife, einer Coilhalterung mit dem Coil (der eigentlichen Trennsäule), einem Detektor und einem Fraktionssammler. Zu Beginn wird mittels einer Pumpe stationäre Phase in den PTFE-Schlauch, der in mehreren Lagen helical um die Achse gewickelt ist (Coil), gepumpt. Dieser Schlauch hat eine ungefähre Länge von bis zu 160 m und einen i.D. von 2,5 mm. Anschließend kann die im Fließmittelsystem gelöste Probe mit Hilfe einer Probenschleife aufgegeben werden. Gleichzeitig wird mit dem Einpumpen der mobilen Phase und der Rotation begonnen. Nach Verlassen des Coils registriert ein Detektor die Substanzen. Die getrennt eluierenden Substanzen werden anschließend mit Hilfe eines Fraktionssammlers fraktioniert gesammelt.

Der eigentliche Chromatographievorgang findet in einem inerten Teflonschlauch statt. Dieser ist in mehreren Lagen um eine Spule gewickelt. Dieser sog. Coil wird in Bewegung versetzt. Dabei führt der Coil eine synchrone Planetenbewegung durch, d.h. er dreht sich sowohl um die eigene Achse (Rotation) als auch in gleicher Richtung und mit gleicher Geschwindigkeit um die Zentralachse (Revolution), wie in Abb. 2-17 links gezeigt.

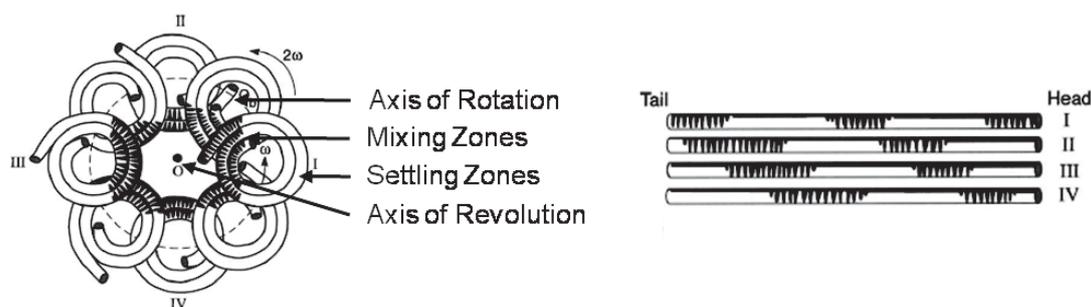


**Abb. 2-17. Bewegungsablauf eines multilayer Type-J-Coils, hydrodynamische Äquilibrierung in einem Coil und Elutionsmodi der HSCCC.** Gezeigt ist die Rotation der Coil-Halterung um ihre eigene Achse als auch um die Zentralachse mit gleicher Winkelgeschwindigkeit ( $\omega$ ) und gleicher Richtung (links). Hydrodynamische Äquilibrierung zweier Phasen im geschlossenen Coil und Elution der leichten Phase und der schweren Phase in einem rotierenden offenen Coil (rechts). Abbildungen nach ITO (139).

Diese Bewegung führt zum Einen dazu, dass die mobile Phase kontinuierlich eluiert wird und zum Anderen wird eine hydrodynamische Bewegung zweier nichtmischbarer Flüssigkeiten innerhalb des Coils erzeugt. Das Prinzip, welches diesem Effekt zugrunde liegt, kann als Archimedische Schraube bezeichnet werden. Werden zwei nichtmischbare Phasen in einen geschlossenen Coil eingebracht, trennen sich diese Phasen bei der Rotation vollständig. Die leichtere Phase (weiß dargestellt) bewegt sich zum Head-Ende und die schwerere Phase (schwarz dargestellt) zum Tail-Ende (Abb. 2-17 A). Die Bezeichnungen „Head“ und „Tail“ wurden definiert. So bezeichnet „Tail“ das Schlauchende, welches in die Rotationsrichtung

zeigt. Als „Head“ ist das Schlauchende definiert, welches entgegengesetzt der Rotationsrichtung zeigt (148).

In Abb. 2-17 B ist der Effekt der Archimedischen Schraube für die HSCCC dargestellt. Der Coil wird zunächst mit der leichteren Phase (weiß) gefüllt und anschließend wird vom Head-Ende schwere Phase (schwarz) eingepumpt (Abb. 2-17 B oben). In Abb. 2-17 B unten wird zunächst die schwere Phase in den Coil eingefüllt und danach vom Tail-Ende die leichte Phase eingepumpt. In beiden Fällen wandert die mobile Phase zügig durch den Coil und ein Teil der anderen Phase bleibt als stationäre Phase aufgrund der durch die Bewegung hervorgerufenen Kräfte auf dem Coil zurück (139). Wird die schwere flüssige Phase als stationäre Phase eingesetzt, wird von einer Tail-to-head-Trennung gesprochen, wird dagegen die leichtere flüssige Phase als stationäre Phase eingesetzt, wird dies als Head-to-tail-Trennung bezeichnet.



**Abb. 2-18. Bewegung und Verteilung der Flüssigkeiten in einem Type-J-Coil.** Gezeigt ist die Mischung und Trennung der Phasen während der Revolution (links). Bewegung der Mixing Zones durch den helical gewickelten Schlauch in den Positionen I-IV (rechts). Abbildungen nach ITO (139).

Diese Bewegung führt dazu, dass zwischen beiden Phasen ein ständiger Mischungs- und Trennvorgang abläuft. Während einer Revolution des Coils wandert die Mixing Zone um genau eine Runde. Die gängigen Rotationsgeschwindigkeiten in der HSCCC liegen bei etwa 600–1000 U/min. Bei einer mittleren Rotationsgeschwindigkeit von 800 U/min werden ca. 13 Misch- und Trennvorgänge der Phasen pro Sekunde erreicht, was mehr als 45000 solcher Vorgänge pro Stunde entspricht (vgl. Abb. 2-18). Dies verdeutlicht die hohe Verteilungseffizienz in der HSCCC.

Für die Detektion der Analyten nach Verlassen des Coils wird meist ein UV-Detektor mit variablen Wellenlängen oder besser noch ein DAD verwendet. In letzter Zeit sind auch einige Veröffentlichungen zur Kopplung der CCC mit Lichtstreuendetektoren (evaporative light scattering detector, ELSD) und Massenspektrometern (MS) erschienen (149, 150). Verbindungen mit einem hohen Verteilungskoeffizienten verbleiben u.U. auf dem Coil und eluieren nicht mit der mobilen Phase. Hier bietet es sich an, eine Elution-Extrusion durchzuführen, d.h. nach Ende der normalen Elution wird statt der mobilen Phase stationäre Phase einge-

pumpt und die Verbindungen werden dadurch vom Coil gedrückt und können fraktioniert gesammelt werden (151).

Für die Durchführung von flüssig-flüssig-chromatographischen Trennungen mit der HSCCC ergeben sich einige Vorteile gegenüber anderen etablierten Methoden zur Isolierung und Aufreinigung von Verbindungen. Durch die Verwendung einer flüssigen stationären Phase werden sowohl irreversible Adsorptionen als auch oberflächenkatalysierte Reaktionen, wie sie bei festen stationären Phasen auftreten können, verhindert. Des Weiteren wird durch den Austausch der stationären Phase nach jeder Trennung die im Gerät verbliebene Probe vollständig zurückgewonnen. Einen weiteren Vorteil stellt die Vielfalt der möglichen Phasensysteme dar, durch welche sich Substanzgemische in einem weiten Polaritätsbereich trennen lassen. Der Teflonschlauch, in welchem die Trennung abläuft, ist im Vergleich zu Säulen, die mit festen Materialien gepackt sind, sehr viel langlebiger und kostengünstiger (146).

### 2.2.2 Gelchromatographie

Die Säulenflüssigkeits-Chromatographie stellt einen wesentlichen Bestandteil zur Trennung und Isolierung von Naturstoffen dar. Bei einer Art der Säulenflüssigkeits-Chromatographie, der Gelchromatographie, wird eine Auftrennung der Substanzgemische nach der Molekülgröße und Polarität erreicht. Für präparative Trennungen von Naturstoffen, wie polyphenolischen Verbindungen und cyanogenen Glykosiden, sowie für analytische Trennungen von anthropogenen Substanzen, wie polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, hat sich das Dextrangel Sephadex LH-20 bewährt (152-154).

Sephadex LH-20 ist ein lipophiles und gleichzeitig hydrophiles Dextrangel, welches durch Epichlorhydrin quervernetzt ist. Es besteht aus dem hochpolymeren Kohlenhydrat Dextran, welches ausschließlich aus Glucose aufgebaut ist. Pro Glucoseeinheit sind drei freie Hydroxylgruppen vorhanden, die hydroxypropyliert werden, um eine Lipophilisierung des Gels zu erreichen, die es ermöglicht, mit organischen Lösungsmitteln lipophile Substanzgemische nach Größenausschluß- und Adsorptionseffekten zu trennen.

Für die Quellungseigenschaften des Materials sind die Dextrankonzentration, die relative Molekülmasse des Ausgangsmaterials und das Mengenverhältnis von Dextran zu Epichlorhydrin verantwortlich. Somit können Sephadex-Gele, mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad und damit auch unterschiedlichen Porengrößen, für Fraktionierungen von Substanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen bereitgestellt werden (155).

Einige Vorteile von Sephadex LH-20 gegenüber anderen Säulenfüllmaterialien sind die simplen Trennsysteme, die meistens angewendet werden. Oft werden nur reine Lösungsmittel als mobile Phase verwendet. Außerdem ist eine Gradientenelution zur Trennung nicht

nötig. Weiterhin ist die universelle Einsetzbarkeit der stationären Phase zu erwähnen, da die Trennung nicht ausschließlich nach Molekülgröße, sondern auch durch Adsorptionseffekte erfolgt. Zudem ist die Probenaufgabe mit bis zu 300 mg pro Gramm trockenem Gel recht hoch (156).

## 2.3 Grundlagen zu einigen verwendeten Methoden

### 2.3.1 Untersuchung der Zytotoxizität mittels Brine-shrimp-Assay

Um umfassende Aussagen über einzelne Substanzen oder Substanzklassen treffen zu können, müssen chromatographische Trenntechniken zur Isolierung, spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung und Biosysteme zur Abschätzung von Wirkungen auf Organismen miteinander verknüpft werden (157). Solch ein Biosystem stellt der Brine-shrimp-Assay dar. Hierbei handelt es sich um eine *in-vivo*-Screening-Methode, die Hinweise auf das Vorliegen von zytotoxisch aktiven Verbindungen liefert. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wird der Testorganismus *Artemia salina* LEACH (Brine shrimp) verwendet (158). *A. salina* ist ein Vertreter der Crustaceen, der in natürlichen und künstlichen Salzseen vorkommt. Im Handel können die sogenannten Zysten der Brine shrimps erworben werden. Diese werden in Extremsituationen gelegt, um das Überleben der Art zu sichern. Sie sind im trockenen Zustand noch nach mehreren Jahren keimfähig (159). Unter geeigneten Bedingungen, d.h. salzhaltiges Wasser, Wärme und Licht, schlüpfen innerhalb von 24–48 Stunden eine sehr große Anzahl von Larven, die sogenannten Nauplien, welche für die Durchführung des Assays verwendet werden (158).

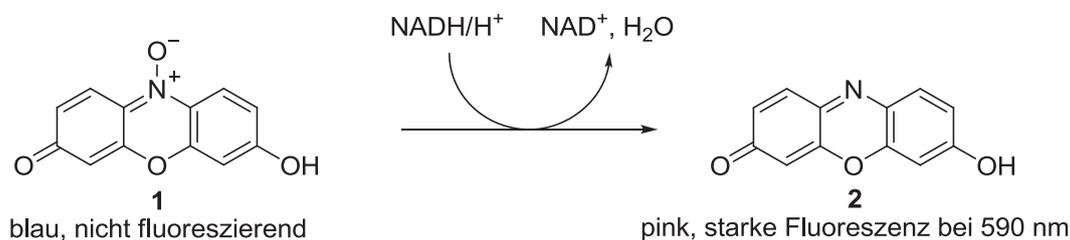
Aufgrund der schnellen und unbegrenzten Verfügbarkeit, der einfachen Handhabung und der geringen Kosten bieten sich Brine-shrimp-Nauplien für die Verwendung in vielen Bioassay-Systemen an. So werden sie für die Analyse von Pestizid-Rückständen (160), toxischen marinen Pflanzen (161), Narkotika (162), Phorbolesteren (163), Dinoflagellatentoxinen (164) und Mykotoxinen (165-167) eingesetzt.

Für die Durchführung des Assays werden frisch geschlüpfte Nauplien mit wenigen Milligramm der zu untersuchenden Probe in künstlichem Meerwasser inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit werden die überlebenden und toten Brine shrimps ausgezählt. Aus diesen Werten lässt sich die Absterberate berechnen, mit welcher sich auf den LC<sub>50</sub> schließen lässt (158, 168). Als Positivkontrolle werden Brine shrimps mit Podophyllotoxin inkubiert. Hierbei handelt es sich um ein Lignan des Aryltetralin-Typs, welches in der Wurzel der Gattung *Podophyllum* vorkommt. Dieses wirkt durch die Hemmung der Topoisomerase II als starkes Mitosegift und dient damit der Überprüfung des Assays (169).

### 2.3.2 Untersuchung der Zytotoxizität mittels Resazurin (Alamar Blue) Assay

In den letzten Jahren sind sporadisch Fälle von Lebererkrankungen nach Einnahme von Noni-Produkten aufgetreten (vgl. 2.1.8.1). Auch für andere Pflanzenextrakte, wie z.B. Extrakte aus Kava Kava (*Piper methysticum*) (170), Grünem Tee (*Camellia sinensis*) (171) und Schöllkraut (*Chelidonium majus*) (172) sind vereinzelte hepatotoxische Wirkungen beim Menschen bekannt. Dies zeigt die Wichtigkeit eines einfachen, schnellen, verlässlichen und empfindlichen Tests zur Einschätzung der Lebertoxizität von Extrakten und Reinsubstanzen. Durch die Verwendung von Alamar Blue (Resazurin) als Farbstoff zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde ein solches Testsystem geschaffen, da diese Verbindung zum Einen selbst nicht toxisch auf die Zellen wirkt und zum Anderen keine Wechselwirkungen mit Testsubstanzen bekannt sind (173).

Resazurin wurde erstmals 1929 von PESCH und SIMMERT zur quantitativen Bestimmung von Bakterien benutzt (174). Seit den 1950ern wird der „Resazurin-Reduktions-Test“ routinemäßig zur Einschätzung der Kontamination von Milch und anderen biologischen Flüssigkeiten mit Bakterien oder Hefen eingesetzt (175). Resazurin (Alamar Blue), welches eine blaue Farbe und keine Fluoreszenz aufweist, wird bei diesem Test in Anwesenheit vitaler Zellen zu Resorufin (reduziertes Alamar Blue) reduziert (Abb. 2-19).



**Abb. 2-19: Strukturen von Resazurin und Resorufin.** Dargestellt ist die Umwandlung von Resazurin (Alamar Blue, 1) in Resorufin (reduziertes Alamar Blue, 2) in lebenden Zellen.

Es wurde eine direkte Korrelation zwischen der Reduktion von Resazurin im Medium und der Proliferation von verschiedenen Zellen (173), wie z.B. Lymphozyten (176), Fibroblasten (177) und diversen Krebszelllinien (178), nachgewiesen. Resorufin zeigt im reduzierten Zustand eine intensive pinke Fluoreszenz im Medium, wenn Zellaktivität besteht, welche anschließend fluorimetrisch oder colorimetrisch bestimmt werden kann.

### 2.3.3 Bestimmung des antioxidativen Potentials

Das antioxidative Potential eines Stoffes ist definiert als dessen Fähigkeit, die Oxidation anderer Verbindungen zu verhindern oder zu verzögern. So existiert eine große Vielfalt von antioxidativ wirksamen Substanzen, die aufgrund ihrer Löslichkeit in lipophile, wie Toco-

pherole und Carotinoide, bzw. hydrophile Verbindungen, wie Ascorbinsäure, Glutathion, phenolische und polyphenolische Verbindungen, eingeteilt werden können. In den 1990ern wurden einige Methoden zur Bestimmung des antioxidativen Potentials in verschiedenen Matrices, wie z.B. Körperflüssigkeiten (179, 180) und Lebensmitteln (181, 182) entwickelt. Diese Methoden unterscheiden sich durch die Erzeugung der Radikale und durch die Detektion des Endpunktes der Reaktion.

Hier soll näher auf die von MILLER *et al.* (180) im Jahr 1993 entwickelte Methode zur Bestimmung des antioxidativen Potentials von hydrophilen Verbindungen eingegangen werden, welche 1999 von RE *et al.* (183) für lipophile Verbindungen erweitert wurde. Diese Methode beruht auf einer photometrischen Endpunktbestimmung und wird gemeinhin als TEAC-Assay (Trolox®-Equivalent-Antioxidative-Capacity-Assay) bezeichnet.

Die Methode des TEAC-Assays basiert auf der Oxidation von ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) in Gegenwart von Kaliumperoxodisulfat zum relativ stabilen ABTS<sup>•+</sup>-Radikalkation. Nach Zugabe von antioxidativ wirksamen Substanzen führt dies zu einer Minderung der Farbintensität, welche photometrisch bei 734 nm verfolgt werden kann. Je stärker die Entfärbung der Lösung, desto stärker ist das antioxidative Potential der Probe.



**Abb. 2-20: Schematische Darstellung der Reaktionen des TEAC-Assays.** ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) wird in Gegenwart von K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Kaliumperoxodisulfat) zum Radikalkation oxidiert. In Anwesenheit von antioxidativ wirksamen Substanzen tritt eine Minderung der Farbintensität ein, die bei 734 nm verfolgt werden kann.

Die Durchführung des Assays erfolgt in ethanolischer Lösung, sodass auch lipophile Stoffe erfasst werden können. Als Bezugssubstanz wird Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure), ein wasserlösliches Vitamin-E-Analogon, verwendet. Die Ergebnisse des antioxidativen Potentials werden folglich in Trolox®-Äquivalenten, d.h. in Bezug auf die Aktivität einer 1 mM Trolox®-Lösung, angegeben (183).

### 2.3.4 Bestimmung des Gesamtphenolgehalts

Phenolische Verbindungen besitzen für viele Lebensmittel eine große Relevanz. Aufgrund des weiten Spektrums an unterschiedlichen Substanzen ist es sinnvoll, auf eine Methode zurückgreifen zu können, die eine Aussage über den Gesamtphenolgehalt einer Probe zulässt. Solch eine Methode stellt der photometrische Assay mit Folin-Ciocalteu-Reagenz nach SINGLETON und ROSSI von 1965 dar (184), welcher anschließend mehrmals miniaturisiert wurde (185, 186).

Das Reagenz für den Assay wurde 1927 von OTTO FOLIN und VINTILA CIOCALTEU entwickelt. Es stellt eine Lösung aus Natriumwolframat und Natriummolybdat dar, welche mit Salzsäure und Phosphorsäure angesäuert, erhitzt und nach dem Abkühlen mit Lithiumsulfat versetzt wird (187). Diese Lösung weist eine klare gelbe Färbung auf. In Anwesenheit von phenolischen Verbindungen werden die im Reagenz gebildeten Phosphorsäure-Komplexe, Isopolyphosphowolframat und dessen Molybdän-Analogon, zu Molybdänoxid und Wolframoxid in alkalischem Milieu reduziert, wobei sich die Oxidationsstufe von Molybdän von +6 teilweise zu +5 ändert; es entsteht das sog. Molybdänblau. Diese sich bildende Blaufärbung kann bei 765 nm photometrisch detektiert werden (188).

Bei der Oxidation von Phenolat-Ionen entstehen Radikale, die durch Resonanzstabilisierung an sich relativ stabil sind, jedoch zur Dimerisierung neigen. Um quantitative Aussagen zu treffen, muss die Reaktion schnell ablaufen, da dimerisierte Moleküle oft leichter oxidierbar sind als die Ausgangsverbindungen und damit wieder in die Reaktion eingehen können. Die Oxidation läuft bei Phenolen schnell und vollständig am oder über dem  $pK_S$ -Wert ab. Dies ist in der Regel bei einem pH-Wert von über 10 gegeben.

Die Intensität der Blaufärbung ist annähernd proportional zur Anzahl freier phenolischer Hydroxylgruppen. Zu beachten ist jedoch, dass Hydroxylgruppen, die in *ortho*- oder *para*-Stellung zueinander stehen, eine höhere Reaktivität aufweisen. Als Vergleichssubstanz wird Gallussäure eingesetzt und der Gesamtphenolgehalt somit als Gallussäure-Äquivalente angegeben (185).

Vorteile dieses Assays mit Folin-Ciocalteu-Reagenz zur Bestimmung der Gesamtphenole sind die schnelle und einfache Durchführbarkeit und die reproduzierbaren Ergebnisse, die die Methode liefert. Nachteilig ist jedoch, dass andere leicht oxidierbare Verbindungen wie Ascorbinsäure, Proteine und Schwefeldioxid die bestimmten Werte für den Gesamtphenolgehalt einer Probe beeinflussen können (186).



## 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 3.1 Nichtflüchtige Bestandteile

#### 3.1.1 Saft von *Morinda citrifolia*

##### 3.1.1.1 Herstellung der Extrakte

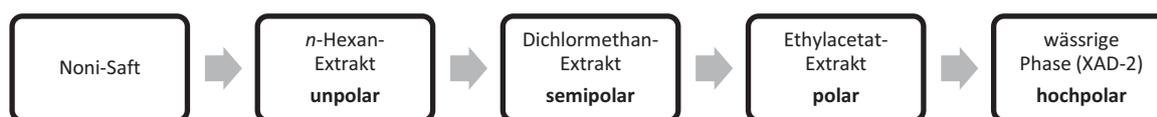
###### 3.1.1.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden acht Säfte von *M. citrifolia* verwendet. Bei sechs Säften handelte es sich um Säfte aus frisch gepressten Früchten. Die Früchte stammten aus Tahiti (TAunreif, TAreif) Hawai'i (HAunreif, HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif). Zwei Säfte wurden durch Fermentation von Noni-Früchten gewonnen (TAmeferm, HAmeferm). Die eingesetzten Mengen an Früchten und die daraus erhaltenen Volumina an Säften sind in Tab. 3-1 angegeben. Des Weiteren sind die Saftausbeuten zu den Früchten aufgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Ausbeuten bei den unreifen Früchten jeweils geringer waren als bei den reifen Früchten.

**Tab. 3-1: Verwendete Früchte und Säfte für die Flüssig-Flüssig-Extraktion.** Aufgeführt sind die zur Herstellung von frisch gepresstem Saft verwendeten Früchte, das erhaltene Saftvolumen nach Pressung und die Saftausbeute. Von den fermentierten Säften ist das eingesetzte Saftvolumen angegeben.

Bezeichnung	Einwaage [kg]	Saftvolumen [L]	Saftausbeute [%]
TAunreif	2,98	2,1	70
TAreif	3,10	2,3	74
HAunreif	3,09	1,7	55
HAreif	3,12	2,1	67
CRreif	2,22	1,4	64
CUreif	2,01	1,5	75
TAmeferm	—	2,3	—
HAmeferm	—	2,2	—

Um eine Vorfractionierung der komplexen Zusammensetzung der nichtflüchtigen Bestandteile der Säfte zu erreichen, wurden diese einer fraktionierten Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Lösungsmitteln ansteigender Polarität unterworfen. Die schematische Aufarbeitung der Säfte ist in Abb. 3-1 dargestellt.



**Abb. 3-1: Schema zur Aufarbeitung von Noni-Saft.** Der Saft wurde zunächst mit *n*-Hexan und nachfolgend mit Dichlormethan und Ethylacetat extrahiert. Die Komponenten in der wässrigen Phase wurden an XAD-2 adsorbiert.

Zur besseren Phasentrennung wurden die Säfte mit Methanol versetzt. Die Extraktion erfolgte jeweils dreimal mit 1,5 L *n*-Hexan, Dichlormethan und Ethylacetat. Die Auswaagen der erhaltenen Extrakte sind in Tab. 3-2 angegeben. Es zeigte sich, dass die Hexan- und Dichlormethan-Extrakte sehr unterschiedliche Auswaagen aufweisen. Die Hexan-Extrakte zeigten bei Säften aus den reifen Früchten höhere Auswaagen, wohingegen im Dichlormethan-Extrakt die Säfte aus den jeweiligen unreifen Früchten höhere Auswaagen lieferten. Im Ethylacetat-Extrakt und der wässrigen Phase zeigten die Säfte aus reifen Früchten höhere Auswaagen. Die Freisetzung von Fettsäuren während der Reifung kann für die höheren Auswaagen im Hexan-Extrakt verantwortlich sein. Die höheren Auswaagen des Ethylacetat-Extrakts sind wahrscheinlich durch die Zunahme glykosylierter Verbindungen im Verlauf der Reifung bedingt. Durch den Abbau der Kohlenhydrate während der Fermentation waren in den fermentierten Säften die geringsten Auswaagen in der Saftphase zu vermerken.

**Tab. 3-2: Auswaagen der Extrakte.** Aufgeführt sind die nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion der frischen und fermentierten Säfte erhaltenen Auswaagen der Extrakte.

Saft/Extrakt	Hexan [mg]	Dichlormethan [mg]	Ethylacetat [mg]	übrige Saftphase [g]	XAD-2 [g]*	nach XAD-2 [g]
TAunreif	498	1303	363	73	0,9	7,5
TAreif	684	760	894	121	0,7	8,2
HAunreif	40	299	122	78	1,1	7,7
HAreif	230	210	847	138	0,9	9,4
CRreif	66	254	682	91	0,6	9,0
CUreif	156	1708	1320	87	0,9	8,9
TAmeferm	491	790	965	55	0,8	8,6
HAmeferm	613	560	490	63	1,0	9,0

\*Jeweils 10 g der übriggebliebenen Saftphase wurden mittels XAD-2 aufgearbeitet.

Solch eine Fraktionierung nach der Polarität der Inhaltsstoffe hatte zur Folge, dass im Hexan-Extrakt die stark lipophilen Verbindungen wie Fette/Öle und freie Fettsäuren sowie Phytosterole und Tocopherole zu finden waren. Im semi-polaren Dichlormethan-Extrakt sollten Anthrachinone, Flavonoide und Cumarinderivate zu finden sein. Die nachfolgende Extraktion mit Ethylacetat führte zur Separierung der polaren Verbindungen, wie den Glykosiden (Iridoide, Flavonolglykoside etc.) und den Glucose-Estern, den Noniosiden. Die

übrige Saftphase stellte einen hochpolaren Extrakt, der hauptsächlich aus ebenfalls hochpolaren Glykosiden bestand. Darüber hinaus waren in dieser Phase Proteine, freie Aminosäuren und organische Säuren zu finden. Zur Abtrennung dieser unerwünschten Begleitstoffe aus der übrigen Saftphase wurden jeweils 10 g davon an Amberlite XAD-2 adsorbiert.

#### 3.1.1.1.2 Adsorption an Amberlite XAD-7 und XAD-2

Die Aufarbeitung der Säfte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion stellt eine sehr zeitaufwändige Methode dar, welche zudem nur geringe Mengen an Extrakt für eine weitere Auftrennung liefert. Für die Generierung größerer Extraktmengen für weitere Untersuchungen und Isolierungen wurden zwei der acht Säfte (TAreif und TAmeferm) an XAD-7 und nachfolgend an XAD-2 adsorbiert.

TAreif wurde ausgewählt, da in reifen Früchten ein höherer Anteil an glykosidisch gebundenen Substanzen vermutet wird als in unreifen Früchten. TAmeferm als fermentierter Noni-Saft wurde einerseits aufgrund der unter 3.1.1.3 gezeigten zytotoxischen Aktivität sowie andererseits aufgrund der typischerweise enthaltenen putativen Markersubstanzen zur Isolierung herangezogen. Die erhaltenen lyophilisierten Extrakte der beiden ausgewählten Säfte wurden ferner auf ihre Zytotoxizität getestet.

Bei XAD-7 handelt es sich um ein schwach polares Acrylsäureester-Polymer, welches für seine adsorptiven Eigenschaften von phenolischen und polyphenolischen Verbindungen hinlänglich bekannt ist (189). Durch Waschen der XAD-7-Säule mit Wasser wurden Proteine, Aminosäuren, Kohlenhydrate, organische Säuren und Salze eliminiert, wohingegen (poly)phenolische Verbindungen selektiv am Adsorbens adsorbiert wurden. Im Wassereluat des Waschschrittes sollten sich demnach keine Verbindungen (poly)phenolischer Natur befinden. Die (poly)phenolischen Verbindungen wurden anschließend mit Methanol eluiert. Das gefriergetrocknete Eluat konnte dann zur Trennung mittels HSCCC eingesetzt werden.

Da der Saft der Früchte von *M. citrifolia* eine Vielzahl glykosylierter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe beinhaltet, die jedoch keine (poly)phenolische Struktur aufweisen, war es naheliegend, das Wassereluat aus der vorangegangenen Adsorption für eine Aufarbeitung an XAD-2-Material zu nutzen. Amberlite XAD-2 stellt ein Adsorbens dar, welches aus hydrophoben, quervernetzten Polyesterol-Divinylbenzol-Copolymeren aufgebaut und bekannt für die Adsorption glykosidisch gebundener Substanzen ist (190). Die Vorgehensweise war analog zur Aufarbeitung mittels XAD-7. Die glykosidischen Verbindungen wurden mit Methanol eluiert. Der eingeeengte und lyophilisierte Extrakt wurde anschließend zur weiteren Trennung mittels HSCCC eingesetzt.

**Tab. 3-3. Auswaagen der XAD-7- und XAD-2-Extrakte.** Angegeben sind die Auswaagen der XAD-7- und XAD-2-Extrakte von TAreif und Tamedferm.

Saft	eingesetztes Volumen [L]	XAD-7-Extrakt [g]	XAD-2-Extrakt [g]
TAreif	3,10	7,5	3,2
Tamedferm	3,15	5,1	5,3

Nach der Adsorption der verschiedenen Säfte zur Anreicherung der (poly)phenolischen Verbindungen (XAD-7) sowie der glykosidischen Verbindungen (XAD-2) wurden die in Tab. 3-3 angegebenen Auswaagen erhalten. Diese Herangehensweise erwies sich für die weitere Aufarbeitung der Extrakte als wertvoll, da ausreichende Auswaagen erreicht wurden.

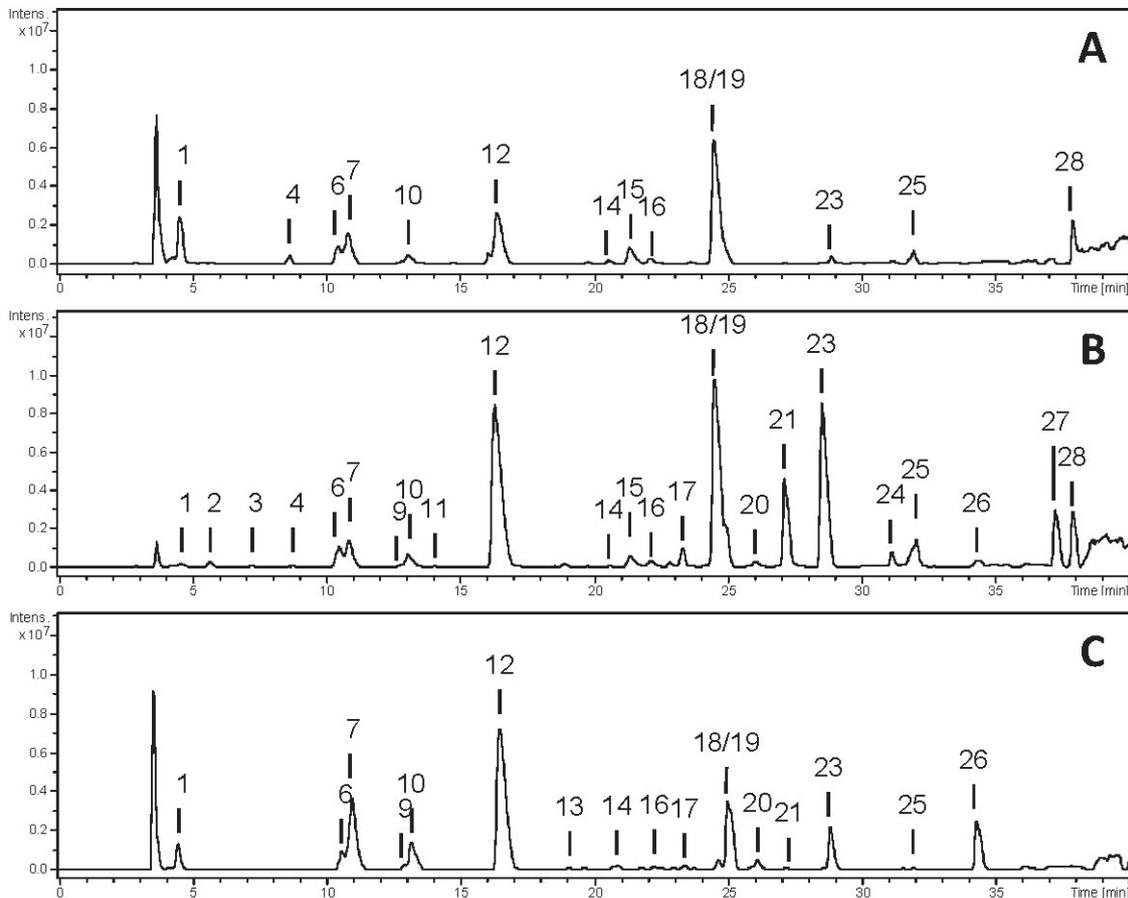
### 3.1.1.2 Untersuchung der Extrakte

#### 3.1.1.2.1 Dichlormethan-Extrakte

Für die Analyse der Extrakte der Noni-Säfte wurde HPLC-DAD-MS<sup>2</sup> verwendet. Die base-peak-Chromatogramme der Dichlormethan-Extrakte von HAunreif (A), HAreif (B) und Hamedferm (C) zeigten, dass diese Extrakte hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe eine ähnliche Zusammensetzung aufweisen (Abb. 3-2). Die UV-Vis- und LC-MS-Daten der einzelnen Verbindungen sind in Tab. 3-4 aufgeführt. Da nicht in allen Extrakten alle Verbindungen nachgewiesen werden konnten, sind zusätzlich die Extrakte, in welchen die Verbindungen identifiziert wurden, angegeben. Nach Auswertung der Chromatogramme konnten 28 Verbindungen detektiert werden, von denen 14 Verbindungen, darunter Flavonole, Iridoide, Cumarinderivate, Lignane, ein Anthrachinon sowie weitere phenolische Komponenten, in den Dichlormethan-Extrakten identifiziert werden konnten. Die folgenden Verbindungen wurden durch Überprüfung mittels Standardsubstanzen verifiziert: 10-Deacetylasperulosidsäure, Noniosid A, Asperulosidsäure, Aesculetin, Scopoletin, Isoamericaninsäure A, Noniosid B, Quercetin, Kämpferol und (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure.

Peak 1 zeigte im LC-MS die Massen  $m/z$  389  $[M-H]^-$  bzw.  $m/z$  413  $[M+Na]^+$ . Die Fragmentierung im negativen Modus ergab  $m/z$  227, 209, 183, 165 und 137. Dies deutete durch einen Vergleich mit Literaturdaten auf ein Iridoidglykosid hin (77). Des Weiteren zeigte Peak 7  $m/z$  431  $[M-H]^-$  bzw.  $m/z$  455  $[M+Na]^+$  und Fragmente im negativen Modus von 269, 251 und 165. Auch hier ließ sich ein Iridoidglykosid vermuten (67). Durch Vergleich mit den Standardsubstanzen konnten 10-Deacetylasperulosidsäure (Peak 1) und Asperulosidsäure (Peak 7) identifiziert werden. Die hohe Polarität der Iridoidglykoside lässt ein Vorhandensein im Dichlormethan-Extrakt widersprüchlich erscheinen. Bedingt jedoch durch die sehr guten

Ionisierungseigenschaften lassen sich wahrscheinlich schon geringste Spuren dieser Verbindungen detektieren, wodurch diese hier nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 3-2: Base-peak-Chromatogramme (BPC) der Dichlormethan-Extrakte.** Dargestellt sind die Chromatogramme von HAunreif (A), HAreif (B) und Hamederm (C) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-4 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden.

Bei Peak 6 wurde  $m/z$  409  $[M-H]^-$  detektiert und bei Peak 15  $m/z$  629  $[M-H]^-$ . Charakteristische Fragmente von  $m/z$  341, 247 und 179 für Peak 6 und  $m/z$  611, 527, 431, 305 und 179 für Peak 15 sowie die fehlende UV-Vis-Absorption im gemessenen Wellenlängenbereich deuteten auf Nonioside hin (65, 67). Durch Koinjektion von authentischen Standards konnten Noniosid A (Peak 6) und Noniosid B (Peak 15) identifiziert werden. Bei den Noniosiden handelt es sich um sehr polare Verbindungen, die nicht im Dichlormethan-Extrakt aufzufinden sein sollten. Aufgrund amphiphiler Eigenschaften durch ihren polaren Teil, z.B. Glucose, und den unpolaren Teil, z.B. Octansäure, lässt sich die Anwesenheit im Dichlormethan-Extrakt jedoch erklären.

**Tab. 3-4: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Dichlormethan-Extrakten.** Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS<sup>2</sup> in HAunreif (A), HAreif (B) und HAmeferm (B) (n.d. nicht detektiert).

Peak	R <sub>t</sub> [min]	UV [nm]	MS [ <i>m/z</i> ]	MS <sup>2</sup> (-) [ <i>m/z</i> ]	identifizierte Verbindung	Extrakt
1	4,6	n.d.	389 [M-H] <sup>-</sup> 413 [M+Na] <sup>+</sup>	227, 209, 183, 165, 137	10-Deacetylasperulosid-säure	A, B, C
2	5,7	n.d.	397 (-)	279, 257	unbekannt	B
3	7,2	290	471 (-)	411, 323, 179	unbekannt	B
4	8,6	n.d.	529 (-)	345, 255, 299	unbekannt	A, B
5	10,0	257, 292	153 [M-H] <sup>-</sup>	109	Protocatechusäure	A, B, C
6	10,4	n.d.	409 [M-H] <sup>-</sup>	341, 247, 179	Noniosid A	A, B, C
7	10,8	n.d.	431 [M-H] <sup>-</sup> 455 [M+Na] <sup>+</sup>	269, 251, 165	Asperulosidsäure	A, B, C
8	11,7	260, 291	167 [M-H] <sup>-</sup>	n.d.	Vanillinsäure	A, B, C
9	12,9	288	367 (-)	119	unbekannt	B, C
10	13,2	296, 344	177 [M-H] <sup>-</sup> 201 [M+Na] <sup>+</sup>	133, 115, 103	Aesculetin	A, B, C
11	14,1	257, 290	505 (-)	337, 277, 175	unbekannt	B
12	16,4	298, 344	191 [M-H] <sup>-</sup>	177	Scopoletin	A, B, C
13	18,7	282, 310	343 [M-H] <sup>-</sup>	299, 269, 179, 177, 163	Isoamericaninsäure A	C
14	20,6	n.d.	523 (-)	463	unbekannt	A, B, C
15	21,3	n.d.	629 [M-H] <sup>-</sup> 653 [M+Na] <sup>+</sup>	611, 527, 431, 305, 179	Noniosid B	A, B
16	22,1	265	583 (-)	535, 387	unbekannt	A, B, C
17	23,3	280	151 [M-H] <sup>-</sup>	129, 121	Vanillin	B, C
18	24,4	370	301 [M-H] <sup>-</sup> 303 [M+H] <sup>+</sup>	273, 179, 151	Quercetin	A, B, C
19	24,9	272	343 (-)	241, 223, 159	unbekannt	A, B, C
20	26,1	n.d.	187 (-)	169, 151, 141	unbekannt	B, C
21	27,1	260, 366	285 [M-H] <sup>-</sup>	257, 151	Kämpferol	A, B, C
22	27,9	260	n.d.	n.d.	unbekannt	A, B; C
23	28,5	n.d.	399 (-)	339, 291, 143	unbekannt	A, B, C
24	31,0	n.d.	259 (-)	143, 115	unbekannt	B
25	32,0	262	165 [M-H] <sup>-</sup>	n.d.	(2E,4Z,7Z)-Decatrien-säure	A, B, C
26	34,1	412	313 [M-H] <sup>-</sup>	299, 285, 270, 253	5,15-Dimethylmorindol	B, C
27	37,1	n.d.	491 (-)	431, 347, 287, 185, 143	unbekannt	B
28	37,8	n.d.	369 (-)	337, 193, 163	unbekannt	A, B

Die Peaks 18 und 21 zeigten ein *m/z* von 301 bzw. 285 [M-H]<sup>-</sup>. Die Fragmentierung von Peak 18 zeigte *m/z* 273, 179 und 151 und die Fragmentierung von Peak 21 zeigte *m/z* 257 und 151. Peak 18 konnte daraufhin nach FABRE *et al.* als Quercetin und Peak 21 als Kämpferol identifiziert werden (191). Diese Annahme wurde unterstützt durch die Absorptions-

wellenlängen bei 370 nm (Peak 18) bzw. 260 nm und 366 nm (Peak 21). Zusätzlich wurde ein Vergleich mit den Standardsubstanzen Quercetin und Kämpferol durchgeführt.

Die Absorptionsmaxima von Peak 10 und Peak 12 von 296 nm und 344 nm bzw. 298 nm und 344 nm deuteten auf Cumarinderivate hin (78). Die Peaks wiesen ein  $m/z$  von 177  $[M-H]^-$  und 201  $[M+Na]^+$  (Peak 10) und  $m/z$  191  $[M-H]^-$  (Peak 12) auf. Durch Koinjektion von authentischen Standards konnten die Verbindungen Aesculetin (Peak 10) und Scopoletin (Peak 12) nachgewiesen werden.

Der Peak 13 wies ein  $m/z$  343  $[M-H]^-$  auf und eine charakteristische UV-Absorption bei 282 nm und 310 nm. Hier lag die Vermutung nahe, dass es sich um eine Verbindung des Lignantyps handelt, was durch die Fragmente mit  $m/z$  299, 269, 179, 177 und 163 untermauert werden konnte (43). Die Verbindung konnte als Isoamericaninsäure A identifiziert werden. Darüber hinaus fällt auf, dass diese Verbindung lediglich im Extrakt von Tamedferm (C) nachgewiesen werden konnte.

Peak 25 wies eine sehr starke UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 262 nm und ein  $m/z$  von 165  $[M-H]^-$  auf. Die Verbindung konnte nach Vergleich mit der Standardsubstanz als (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure identifiziert werden. Die Verbindung ist aus Früchten bis jetzt nur aus *M. citrifolia* bekannt und konnte bereits von BASAR *et al.* nachgewiesen werden (80).

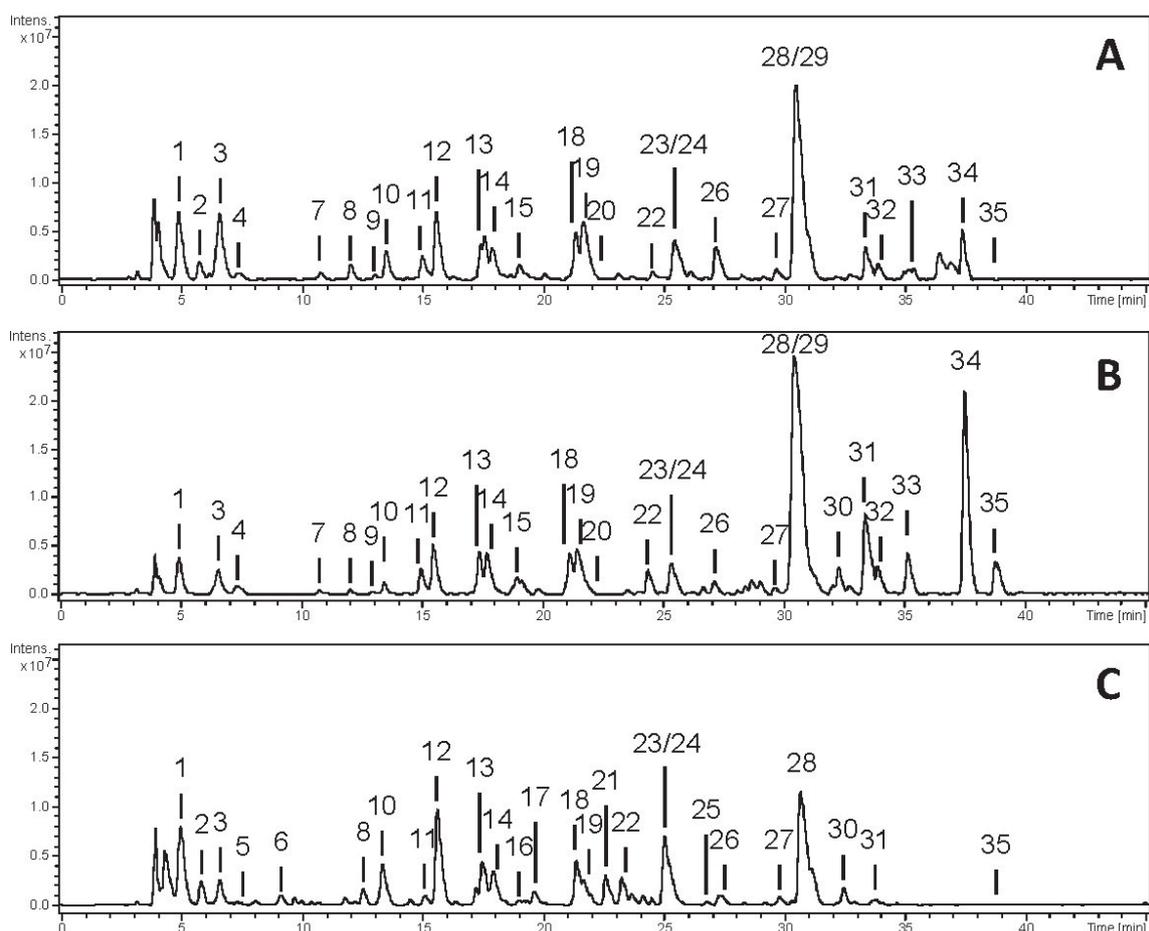
Weitere Verbindungen, die anhand ihrer UV-Absorption und ihrer Massendaten identifiziert werden konnten, waren Protocatechusäure (Peak 5) mit  $m/z$  153  $[M-H]^-$  und UV-Maxima bei 260 nm und 291 nm, Vanillinsäure (Peak 8) mit UV-Maxima bei 260 nm und 294 nm und Vanillin (Peak 17) mit  $m/z$  151  $[M-H]^-$  und einem UV-Maximum bei 280 nm. Diese Verbindungen wurden auch von Dussoy *et al.* beschrieben (192). Des Weiteren konnte aus der Gruppe der Anthrachinone 5,15-Dimethylmorindol (Peak 26) mit  $m/z$  313  $[M-H]^-$  und einem UV-Maximum bei 412 nm nachgewiesen werden. Die Verbindung konnte durch den Vergleich mit Literaturdaten identifiziert werden (73). 5,15-Dimethylmorindol wurde von DENG *et al.* als Hauptanthrachinon in Noni-Saft identifiziert (81).

Die übrigen detektierten Verbindungen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Die LC-MS-Daten und Maxima der UV-Absorption der einzelnen Verbindungen sind in Tab. 3-4 angegeben. Bei der Untersuchung der Dichlormethan-Extrakte von TAunreif, TAreif, CRreif, CUnreif und Tamedferm wurden sehr ähnliche Profile erhalten.

#### 3.1.1.2.2 Ethylacetat-Extrakte

In den base-peak-Chromatogrammen der Ethylacetat-Extrakte von HAunreif (A), HAreif (B) und Hamedferm (C) konnten 35 Verbindungen detektiert werden, von denen 22 identifiziert werden konnten. Die Chromatogramme der Ethylacetat-Extrakte der verschiedenen Säfte

waren untereinander recht ähnlich. Die auffälligsten Abweichungen existierten zwischen A/B und C (Abb. 3-3). Die LC-MS- und UV-Vis-Daten der detektierten Verbindungen sind mit ihrem Vorkommen in den Extrakten in Tab. 3-5 angegeben.



**Abb. 3-3: Base peak Chromatogramme (BPC) der Ethylacetat-Extrakte.** Dargestellt sind die Chromatogramme von HAunreif (A), HAreif (B) und HAMEDERM (C) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-5 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden.

In den Ethylacetat-Extrakten der Säfte konnten Iridoide, Lignane/Neolignane, Nonioside, Flavonole, Flavonolglykoside und Cumarinderivate nachgewiesen werden. Mittels authentischer Referenzsubstanzen konnten folgende Verbindungen identifiziert werden: 10-Deacetylasperulosidsäure, Furan-2-carbonsäure, Noniosid A, Asperulosidsäure, Aesculetin, 3,3'-Bisdemethylpinoresinol, Morindolin, Scopoletin, Rutin, Isoamericanol A, Isoamericaninsäure A, 2-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose, Quercetin, Kämpferol und (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure.

Bei Peak 3 und Peak 12 konnten die Iridoide 10-Deacetylasperulosidsäure ( $m/z$  389 [ $M-H$ ] $^-$  und  $m/z$  413 [ $M+Na$ ] $^+$ ) und Asperulosidsäure ( $m/z$  431 [ $M-H$ ] $^-$  und  $m/z$  455 [ $M+Na$ ] $^+$ ) nach-

gewiesen werden, die durch Koinjektion mit Standardsubstanzen überprüft wurden. Zusätzlich konnte ein Peak 13 mit  $m/z$  445  $[M-H]^-$  identifiziert werden, der die Fragmente  $m/z$  431, 269, 251, 227, 183 und 165 aufwies und damit eine sehr ähnliche Fragmentierung zu Asperulosidsäure mit den Fragmenten  $m/z$  269, 251 und 165 zeigte. Der Verlust von 14 Da von  $m/z$  445  $\rightarrow$  431 bei der Fragmentierung ließ auf eine Methylgruppe schließen. Ein Vergleich mit Literaturdaten zeigte, dass es sich um Asperulosidsäuremethylester handelt (74).

**Tab. 3-5: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Ethylacetat-Extrakten.** Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei  $MS^2$  in HAunreif (A), HAreif (B) und HAmidferm (C) (n.d. nicht detektiert).

Peak	$R_t$ [min]	UV [nm]	MS [ $m/z$ ]	$MS^2$ (-) [ $m/z$ ]	identifizierte Verbindung	Extrakt
1	4,9	n.d.	275 (-) 299 (+)	257, 159	unbekannt	A, B, C
2	5,9	n.d.	187 (-)	115	unbekannt	A, B, C
3	6,6	n.d.	389 $[M-H]^-$ 413 $[M+Na]^+$	227, 209, 183, 165, 137	10-Deacetylasperulosidsäure	A, B, C
4	7,1	n.d.	257 (-)	n.d.	unbekannt	A, B
5	7,4	260	117 $[M-H]^-$	n.d.	Furan-2-carbonsäure	C
6	9,6	293	329 (-)	311, 213, 195, 177, 133	unbekannt	C
7	10,8	280, 338	471 (-) 495 (+)	411, 323, 179, 177	Aesculetinderivat	A, B
8	12,0	270	345 (-) 369 (+)	299, 255, 227, 161	unbekannt	A, B, C
9	13,0	n.d.	327 (-) 351 (+)	165	unbekannt	A, B
10	13,5	257, 292	153 $[M-H]^-$ 177 $[M+Na]^+$	109	Protocatechusäure	A, B, C
11	15,0	n.d.	409 $[M-H]^-$ 433 $[M+Na]^+$	341, 247, 179	Noniosid A	A, B, C
12	15,6	n.d.	431 $[M-H]^-$ 455 $[M+Na]^+$	269, 251, 165	Asperulosidsäure	A, B, C
13	17,4	n.d.	445 $[M-H]^-$	431, 269, 251, 227, 183, 165	Asperulosidsäuremethylester	A, B, C
14	17,7	296, 344	177 $[M-H]^-$ 201 $[M+Na]^+$	133, 115, 103	Aesculetin	A, B, C
15	18,8	n.d.	601 $[M-H]^-$ 625 $[M+Na]^+$	583, 499, 403, 305, 277, 179	Noniosid E	A, B
16	19,0	260, 291	167 $[M-H]^-$	n.d.	Vanillinsäure	A, B, C
17	19,5	280	329 $[M-H]^-$	269, 219, 189, 159, 137	3,3'-Bisdemethylpinoresinol	C
18	21,0	282, 325	343 $[M-H]^-$	299, 267, 189, 159	Morindolin	A, B, C
19	21,4	298, 344	191 $[M-H]^-$	177	Scopoletin	A, B, C
20	21,9	n.d.	439 $[M-H]^-$ 463 $[M+Na]^+$	361, 263, 179	Noniosid D	A, B

Peak	R <sub>t</sub> [min]	UV [nm]	MS [m/z]	MS <sup>2</sup> (-) [m/z]	identifizierte Verbindung	Extrakt
21	22,5	298, 310	379 (-)	n.d.	unbekannt	C
22	24,5	288, 320	343 [M-H] <sup>-</sup>	313, 297, 151, 137	unbekannt	A, B, C
23	25,1	256, 354	609 [M-H] <sup>-</sup> 633 [M+Na] <sup>+</sup>	301	Rutin	A, B, C
24	25,5	268	329 [M-H] <sup>-</sup>	311, 299, 165, 163	Isoamericanol A	A, B, C
25	26,8	282, 310	343 [M-H] <sup>-</sup>	299, 269, 179, 177, 163	Isoamericaninsäure A	C
26	27,3	268, 346	593 [M-H] <sup>-</sup> 617 [M+Na] <sup>+</sup>	285, 257	Nicotiflorin	A, B, C
27	29,6	272	489 [M-H] <sup>-</sup> 513 [M+Na] <sup>+</sup>	323, 263, 179	2-O-(β-D-glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose	A, B, C
28	30,4	370	301 [M-H] <sup>-</sup> 303 [M+Na] <sup>+</sup>	273, 179, 151	Quercetin	A, B, C
29	30,4	n.d.	467 [M-H] <sup>-</sup> 491 [M+Na] <sup>+</sup>	389, 263, 179	Noniosid C	A, B
30	32,4	n.d.	187 (-)	169, 141	unbekannt	B, C
31	33,3	260, 366	285 [M-H] <sup>-</sup>	257, 213, 151	Kämpferol	A, B, C
32	33,8	n.d.	367 (-)	307, 163	unbekannt	A, B
33	35,1	n.d.	399 (-) 423 (+)	339, 143	unbekannt	A, B
34	37,3	368	259 (-) 283 (+)	143	unbekannt	A, B
35	38,7	262	165 [M-H] <sup>-</sup>	n.d.	(2E,4Z,7Z)-Decatriensäure	A, B, C

Peak 11 konnte wie im Dichlormethan-Extrakt aufgrund der MS-Daten ( $m/z$  409 [M-H]<sup>-</sup> und  $m/z$  433 [M+Na]<sup>+</sup>) nach Überprüfung mit der Standardsubstanz als Noniosid A identifiziert werden. Weiterhin lag bei Peak 15 ( $m/z$  601 [M-H]<sup>-</sup> und  $m/z$  625 [M+Na]<sup>+</sup>), Peak 20 ( $m/z$  439 [M-H]<sup>-</sup> und  $m/z$  463 [M+Na]<sup>+</sup>) und Peak 29 ( $m/z$  467 [M-H]<sup>-</sup> und  $m/z$  491 [M+Na]<sup>+</sup>) die Vermutung nahe, dass es sich ebenfalls um Nonioside handeln könnte. Die fehlende UV-Absorption im gemessenen Wellenlängenbereich untermauerte diese Annahme. Die charakteristischen Fragmente der einzelnen Verbindungen bei MS<sup>2</sup> zeigten nach einem Vergleich mit der Literatur, dass es sich um Noniosid E (Peak 15) (69), Noniosid D (Peak 20) und Noniosid C (Peak 29) (65) handeln könnte. Eine eindeutige Zuordnung konnte aufgrund fehlender Standards nicht durchgeführt werden. Darüber hinaus fiel auf, dass diese Verbindungen nicht in C nachweisbar waren. Durch die Bedingungen bei der Fermentation schienen diese Verbindungen einem starken Abbau zu unterliegen. Peak 27 wies  $m/z$  489 [M-H]<sup>-</sup> und 513 [M+Na]<sup>+</sup> und ein UV-Maximum bei 272 nm auf. Die Fragmentierung mit  $m/z$

263 und 179 deutete auch hier auf ein Noniosid hin. Ein Vergleich mit der isolierten Standardsubstanz zeigte, dass es sich um 2-*O*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-*O*-(2*E*,4*Z*,7*Z*)-deca-trienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose handelt.

Die Peaks 28 und 31 konnten anhand ihrer UV-Maxima bei 370 nm bzw. 260 nm und 366 nm durch Koinjektion von Standardsubstanzen als Quercetin und Kämpferol identifiziert werden. Hinzukommen im Ethylacetat-Extrakt die Peaks 23 und 26 mit  $m/z$  609  $[M-H]^-$  und 633  $[M+Na]^+$  bzw.  $m/z$  593  $[M-H]^-$  und 617  $[M+Na]^+$ . Die UV-Maxima von Peak 23 mit 256 nm und 354 nm und das Fragment mit  $m/z$  301 deuteten auf ein Quercetinderivat hin. Durch Koinjektion der Referenzsubstanz konnte Rutin, Quercetin-3-*O*-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid), identifiziert werden. Peak 26 wies ähnliche UV-Maxima mit 268 nm und 346 nm auf. Hier konnte ein Fragment-Ion mit  $m/z$  285 detektiert werden, welches für ein Kämpferolderivat spricht. Anhand von bereits zu Noni publizierten Daten konnte Nicotiflorin, Kämpferol-3-*O*-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid), identifiziert werden (71, 193).

Des Weiteren konnten, wie im Dichlormethan-Extrakt, die Cumarinderivate Aesculetin (Peak 14) und Scopoletin (Peak 19) identifiziert werden. Interessanterweise zeigte Peak 7 ähnliche UV-Maxima mit 290 nm und 338 nm wie Aesculetin oder Scopoletin. Das detektierte  $m/z$  von 471 (-) bzw. 495 (+) und das Fragmentierungsmuster mit  $m/z$  411, 323, 179 und 177 deutete auf ein Diglykosid von Aesculetin ( $m/z$  475  $\rightarrow$  177) hin. Der Übergang von  $m/z$  471  $\rightarrow$  323  $[M-149]^-$  deutet auf die Abspaltung eines Pentosyl-Restes hin und das Fragment-Ion mit  $m/z$  179 auf einen Hexosyl-Rest. Da Hymexelsin, Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid), aus Noni isoliert werden konnte, wäre es denkbar, dass es sich bei dieser Verbindung um das entsprechende Aesculetinderivat handelt, wobei die Verknüpfung an Aesculetin aufgrund der Struktur auch in Position 6 stattfinden könnte.

Peak 25 konnte anhand der UV-Maxima von 282 nm und 310 nm, dem  $m/z$  343  $[M-H]^-$  und dem Vergleich mit der Standardsubstanz als Isoamericaninsäure A identifiziert werden. Die Verbindung konnte, wie es auch beim Dichlormethan-Extrakt der Fall war, nur in C detektiert werden. Weitere Verbindungen des Lignantyps konnten bei Peak 17, 18 und 24 identifiziert werden. Peak 17 zeigte eine UV-Absorption bei 280 nm und ein  $m/z$  329  $[M-H]^-$ . Das Fragmentierungsmuster zeigte eine hohe Übereinstimmung mit der isolierten Verbindung 3,3'-Bisdemethylpinoresinol. Dies wurde zusätzlich durch Koinjektion mit der Referenzsubstanz überprüft. Peak 24 wies ein UV-Maximum bei 268 nm und ein  $m/z$  329  $[M-H]^-$  auf. Durch Vergleich mit der Standardsubstanz konnte Isoamericanol A identifiziert werden. Des Weiteren konnte bei Peak 18 ein Molekül-Ion mit  $m/z$  343  $[M-H]^-$  identifiziert werden. Das Fragmentierungsmuster mit  $m/z$  299, 267, 189 und 159 und die UV-Absorptionen bei 282 nm und 325 nm deuteten nach Vergleich mit Literaturdaten von KAMIYA *et al.* auf ein

Neolignan hin (43). Durch Vergleich mit der isolierten Standardsubstanz konnte Morindolin identifiziert werden.

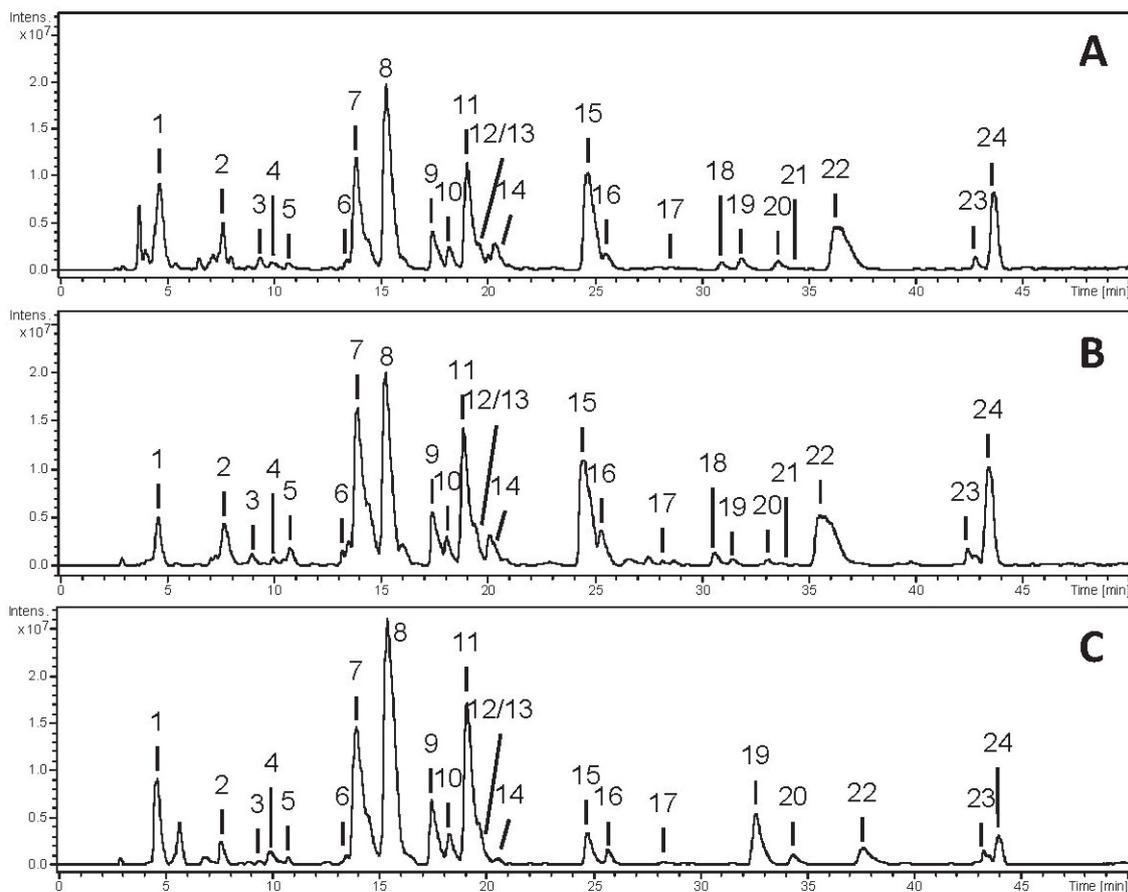
Peak 5 stellte eine Verbindung dar, die lediglich in C identifiziert werden konnte. Eine intensive UV-Absorption bei 260 nm und ein  $m/z$  117  $[M-H]^-$  ließen keine Rückschlüsse auf die Struktur der Verbindung zu. Nach Isolierung und Strukturaufklärung (Daten nicht gezeigt) konnte Furan-2-carbonsäure identifiziert werden. Dies wurde zusätzlich durch einen Vergleich mit einer Referenzsubstanz überprüft. Die aus dem Dichlormethan-Extrakt bekannten Verbindungen Protocatechusäure (Peak 10) mit  $m/z$  153  $[M-H]^-$  und 177  $[M+Na]^+$  und Vanillinsäure (Peak 16) mit  $m/z$  167  $[M-H]^-$  konnten auch im Ethylacetat-Extrakt identifiziert werden.

Die Peak 14 und 19 konnten anhand ihrer charakteristischen UV-Maxima bei 296 und 344 nm bzw. 298 und 344 nm und der Koinjektion von Standardsubstanzen als Aesculetin (Peak 14) und Scopoletin (Peak 19) identifiziert werden. Zusätzlich konnte (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure (Peak 35) durch Vergleich mit der Standardsubstanz in A, B und C nachgewiesen werden.

Die übrigen detektierten Verbindungen konnten nicht zugeordnet werden. Die LC-MS- und UV-Vis-Daten der einzelnen Verbindungen sind in Tab. 3-5 angegeben. Die Profile der Ethylacetat-Extrakte von TAunreif, TAreif, CRreif, CUreif und Tamedferm zeigten die gleichen Verbindungen.

#### 3.1.1.2.3 XAD-2-Extrakte

Die base-peak-Chromatogramme der XAD-2-Extrakte von HAunreif (A), HAreif (B) und Hamedferm (C) zeigten 24 Verbindungen, von denen 15 Verbindungen identifiziert werden konnten. Die Chromatogramme A und B wiesen untereinander starke Ähnlichkeiten auf. Die größten Unterschiede waren zwischen A/B und C zu erkennen (Abb. 3-4). Hier konnten einige Verbindungen, die in A/B detektierbar waren, nicht nachgewiesen werden. Die LC-MS- und UV-Daten der detektierten Verbindungen sind in Tab. 3-6 aufgeführt. In den Chromatogrammen der XAD-2-Extrakte konnten Iridoide, Nonioside, Cumarinderivate und Flavonolglykoside detektiert werden. Anhand von Referenzsubstanzen konnten die Verbindungen 10-Deacetylasperulosidsäure, Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid), Hymexelsin, Noniosid A, Asperulosidsäure, 10-Dehydrogardenosid, 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid, Rutin, Noniosid B und 2-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1-*O*-(2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose identifiziert werden.



**Abb. 3-4: Base peak Chromatogramme (BPC) der XAD-2-Extrakte.** Dargestellt sind die Chromatogramme von HAunreif (A), HAreif (B) und HAmедferm (C) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-6 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden.

Die Peaks 1 und 8 zeigten erneut  $m/z$  389  $[M-H]^-$  und 413  $[M+Na]^+$  bzw.  $m/z$  431  $[M-H]^-$  und 455  $[M+Na]^+$ . Aufgrund der Fragmentierungen bei  $MS^2$  und dem Vergleich mit Standardsubstanzen konnten 10-Deacetylasperulosidsäure (Peak 1) und Asperulosidsäure (Peak 8) identifiziert werden. Bei Peak 12 und 13 handelte es sich ebenfalls um Iridoide. Diese konnten anhand von Koinjektion von isolierten Standardsubstanzen als 10-Dehydrogardenosid (Peak 12) und 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid (Peak 13) identifiziert werden. Bei Peak 7, 22 und 23 konnten anhand der LC-MS-Daten und Vergleich mit Referenzsubstanzen die Nonioside A (Peak 7) und B (Peak 22) und 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (Peak 23) identifiziert werden. Die Peaks 11 und 14 konnten nur anhand des Vergleichs mit Literaturdaten als Noniosid E (Peak 11) (69) und Noniosid D (Peak 14) (65) angenommen werden. Die Abnahme der Intensitäten besonders der Peaks 14 und 22 in C deuteten auch hier auf einen Abbau dieser Verbindungen während der Fermentation hin.

**Tab. 3-6: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den XAD-2-Extrakten.** Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS<sup>2</sup> in HAunreif (A), HAreif (B) und HAmeferm (C) (n.d. nicht detektiert).

Peak	R <sub>t</sub> [min]	UV [nm]	MS [m/z]	MS <sup>2</sup> (-) [m/z]	identifizierte Verbindung	Extrakt
1	4,6	n.d.	389 [M-H] <sup>-</sup> 413 [M+Na] <sup>+</sup>	227, 209, 183, 165, 137	10-Deacetyl- asperulosid-säure	A, B, C
2	7,7	280, 338	471 [M-H] <sup>-</sup> 495 [M+Na] <sup>+</sup>	411, 323, 179, 177	Aesculetinderivat	A, B, C
3	9,0	285, 340	501 [M-H] <sup>-</sup>	323, 179, 177	Aesculetinderivat	A, B, C
4	10,1	n.d.	461 (-)	401, 359, 239, 221, 179	unbekannt	A, B, C
5	10,8	285, 338	515 [M-H] <sup>-</sup>	191, 179	Scopoletin-7-O-(β-D- glucopyranosyl- [1''→6']-β-D- glucopyranosid)	A, B, C
6	13,0	280, 333	485 [M-H] <sup>-</sup>	425, 323, 191, 179	Hymexelsin	A, B, C
7	14,0	n.d.	409 [M-H] <sup>-</sup> 433 [M+Na] <sup>+</sup>	341, 247, 179	Noniosid A	A, B, C
8	15,3	n.d.	431 [M-H] <sup>-</sup> 455 [M+Na] <sup>+</sup>	371, 269, 251, 225, 165	Asperulosidsäure	A, B, C
9	17,6	265	307 (-)	247, 179	unbekannt	A, B, C
10	18,3	281	379 (-) 403 (+)	293, 251, 221, 191, 149	unbekannt	A, B, C
11	19,0	n.d.	601 [M-H] <sup>-</sup> 625 [M+Na] <sup>+</sup>	583, 499, 403, 305, 277, 179	Noniosid E	A, B, C
12	19,4	n.d.	401 [M-H] <sup>-</sup>	263, 239, 221, 179, 161	10-Dehydro- gardenosid	A, B, C
13	19,4	n.d.	415 [M-H] <sup>-</sup>	n.d.	6β,7β-Epoxy-10- dehydrogardenosid	A, B, C
14	20,6	n.d.	439 [M-H] <sup>-</sup> 463 [M+Na] <sup>+</sup>	361, 263, 179	Noniosid D	A, B, C
15	24,6	285, 342	499 (-)	439, 323, 179	unbekannt	A, B, C
16	25,3	n.d.	439 (-) 463 (+)	361, 323, 263, 179, 161	unbekannt	A, B, C
17	28,2	260, 353	741 (-)	609, 591, 301	Quercetinderivat	A, B, C
18	30,6	n.d.	791 (-)	509, 383	unbekannt	A, B
19	32,0	256, 354	609 [M-H] <sup>-</sup> 633 [M+Na] <sup>+</sup>	301	Rutin	A, B, C
20	33,1	n.d.	523 (-)	463, 331	unbekannt	A, B, C
21	33,7	272	711 (-)	633, 485, 305	unbekannt	A, B
22	35,5	n.d.	629 [M-H] <sup>-</sup> 653 [M+Na] <sup>+</sup>	611, 527, 431, 305, 179	Noniosid B	A, B, C
23	42,3	272	489 [M-H] <sup>-</sup> 513 [M+Na] <sup>+</sup>	323, 263, 179	2-O-(β-D-Glucopyra- nosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)- decatrienoyl-β-D- glucopyranose	A, B, C
24	43,3	368	527 (-)	467, 323, 179	unbekannt	A, B, C

Bei den Flavonolglykosiden konnte nur Peak 19 eindeutig Rutin, Quercetin-3-*O*-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid), anhand des Vergleichs mit der Standardsubstanz zugeordnet werden. Des Weiteren konnten bei Peak 17 Rutin-ähnliche UV-Maxima mit 260 nm und 353 nm nachgewiesen werden. Peak 17 wies ein  $m/z$  741 [M-H]<sup>-</sup> und die Fragment-Ionen bei MS<sup>2</sup> von  $m/z$  609, 591 und 301 auf. Das Fragment-Ion mit  $m/z$  301 deutete dabei auf Quercetin hin und das Fragment-Ion  $m/z$  609 auf Rutin. Die Differenz von 132 Da [M-Rutin-H]<sup>-</sup> würde für einen weiteren Pentosylrest sprechen. Eine solche Verbindung wurde auch von KITE *et al.* aus Früchten von *Styphnolobium japonicum* beschrieben (194). Als interessant stellten sich die Peaks 2, 3, 5 und 6 dar. Peak 5 und 6 wiesen UV-Maxima von 285 nm und 338 nm bzw. 280 nm und 333 nm auf. Die detektierten  $m/z$  betragen 515 [M-H]<sup>-</sup> für Peak 5 und 485 [M-H]<sup>-</sup> für Peak 6. Sowohl das Fragment-Ion mit  $m/z$  191 als auch die UV-Vis-Absorption deuteten hier auf zwei Scopoletinderivate hin. Durch Koinjektion der isolierten Referenzsubstanzen konnten diese Verbindungen als Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid) (Peak 5) und Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid) (Hymexelsin) (Peak 6) identifiziert werden. Die LC-MS- und UV-Vis-Daten wurden darüber hinaus mit Literaturwerten verglichen (195, 196). Bei den Peaks 2 und 3 konnten UV-Maxima von 280 nm und 338 nm bzw. 285 nm und 340 nm detektiert werden. Die LC-MS-Daten zeigten  $m/z$  471 [M-H]<sup>-</sup> und 495 [M+Na]<sup>+</sup> für Peak 2 und  $m/z$  501 [M-H]<sup>-</sup> für Peak 3. Bei der Fragmentierung von Peak 2 konnten mit  $m/z$  411, 323, 179 und 177 recht ähnliche Fragmentierungen zu Peak 6 nachgewiesen werden. Das Fragment  $m/z$  323 entstand vermutlich durch den Verlust eines Apiosyl-Rests [M-148-H]<sup>-</sup>. Des Weiteren entstand das Fragment  $m/z$  177 [Aesculetin-H]<sup>-</sup> durch Abspaltung des Apiosylglucosyl-Rests [M-294-H]<sup>-</sup>. Bei Peak 2 handelte es sich deshalb vermutlich um das Aesculetin-Analogon zu Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Die Verknüpfung des Kohlenhydrat-Restes könnte anstatt an Position 7 jedoch auch an Position 6 erfolgen. Peak 3 zeigte die Fragment-Ionen  $m/z$  323, 179 und 177. Das Fragment-Ion  $m/z$  323 entstand hier vermutlich durch Abspaltung eines Glucosyl-Rests [M-178-H]<sup>-</sup>. Durch Abspaltung des Diglucosyl-Rests [M-324-H]<sup>-</sup> entstand  $m/z$  177 [Aesculetin-H]<sup>-</sup>. Bei Peak 3 konnte so das Aesculetin-Analogon zu Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6'']- $\beta$ -D-glucopyranosid) vermutet werden. Die Verknüpfung des Kohlenhydrat-Restes könnte anstatt an Position 7 auch an Position 6 erfolgen. Für solche Aesculetindiglykoside sind nach bestem Wissen keine Literaturdaten bekannt. Lediglich für Aesculin, Aesculetin-6-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, wurden Daten publiziert (197). Die LC-MS- und UV-Vis-Daten der übrigen Verbindungen sind in Tab. 3-6 aufgeführt. Die Profile der XAD-2-Extrakte von TAunreif, TAreif, CRreif, CUreif und TAmeferm zeigten die gleichen Verbindungen.

### 3.1.1.3 Zytotoxizität in Brine shrimps

Neben der Zusammensetzung der Extrakte aus Säften von *M. citrifolia* wurde auch die Zytotoxizität mittels des Brine-shrimp-Assay analysiert. In Tab. 3-7 sind die berechneten LC<sub>50</sub>-Werte der Säfte und Extrakte von TAunreif, TAreif, HAunreif, HAreif, CRreif, CUreif, TAmeferm und HAmeferm aufgeführt (Herstellung nach 3.1.1.1.1).

**Tab. 3-7: LC<sub>50</sub>-Werte des Brine-shrimp-Assays der Säfte und Extrakte.** Angegeben sind die LC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichung (SD) [µg/mL] für die Extrakte der frischen (TAunreif, TAreif, HAunreif, HAreif, CRreif und CUreif) und fermentierten Säfte (TAmeferm und HAmeferm). Podophyllotoxin als Positivkontrolle wies einen LC<sub>50</sub>-Wert von 68,03±13,18 µg/mL auf.

Saft/ Extrakt	LC <sub>50</sub> ±SD [µg/mL]							
	TA unreif	TA reif	HA unreif	HA reif	CR reif	CU reif	TAmeferm	HAmeferm
Saft	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Dichlor- methan	385,55 ±27,57	>500	>500	440,01 ±25,93	>500	>500	495,43 ±29,56	480,21 ±23,17
Ethylacetat	485,88 ±24,94	336,91 ±18,79	434,32 ±24,69	>500	>500	>500	251,12 ±17,34	266,87 ±20,69
übrige Saftphase	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
XAD-2	>500	359,33 ±24,90	>500	347,96 ±14,99	415,53 ±45,26	366,67 ±41,65	>500	>500

Die gefriergetrockneten Säfte zeigten jeweils LC<sub>50</sub>-Werte >500 µg/mL. Hier waren demnach keine zytotoxischen Wirkungen auf Brine shrimps nachweisbar. Die Dichlormethan-Extrakte der Säfte wiesen keine bis sehr geringe Aktivität im Brine-shrimp-Assay auf. Geringe Aktivitäten zeigten TAunreif mit LC<sub>50</sub> 386 µg/mL, HAreif mit LC<sub>50</sub> 440 µg/mL, TAmeferm mit LC<sub>50</sub> 495 µg/mL und HAmeferm mit LC<sub>50</sub> 480 µg/mL. Von besonderem Interesse waren die Ethylacetat-Extrakte, welche die niedrigsten LC<sub>50</sub>-Werte aufwiesen. So konnten in TAmeferm und HAmeferm LC<sub>50</sub>-Werte von 251 µg/mL bzw. 267 µg/mL detektiert werden. Diese Werte lagen jedoch deutlich höher als der bestimmte LC<sub>50</sub>-Wert von 68,03 µg/mL für die Vergleichssubstanz Podophyllotoxin. In den Ethylacetat-Extrakten von TAunreif (LC<sub>50</sub> 486 µg/mL), TAreif (LC<sub>50</sub> 337 µg/mL) und HAunreif (LC<sub>50</sub> 434 µg/mL) war ebenfalls eine geringe Zytotoxizität nachweisbar. In den Ethylacetat-Extrakten von HAreif, CRreif und CUreif konnte keine Aktivität festgestellt werden. Die übrigen wässrigen Phasen nach der Extraktion zeigten durchgängig keine Zytotoxizität. Dies ist wenig überraschend, da hier die stark polaren Bestandteile wie Kohlenhydrate und Proteine einen großen Anteil am Extrakt haben sollten.

Nach Aufarbeitung dieser wässrigen Phasen an XAD-2-Material konnte jedoch eine geringe Zytotoxizität in den Extrakten von TAreif (LC<sub>50</sub> 359 µg/mL), HAreif (LC<sub>50</sub> 347 µg/mL), CRreif

(LC<sub>50</sub> 416 µg/mL) und CUreif (LC<sub>50</sub> 367 µg/mL) festgestellt werden. Möglicherweise lagen in frischen Säften aus reifen Früchten zytotoxische Substanzen glykosyliert vor und waren dadurch im XAD-2-Extrakt zu finden. Durch den Fermentationsprozess könnten diese Verbindungen freigesetzt worden sein und deshalb im Ethylacetat-Extrakt der fermentierten Säfte gefunden werden. Die übrigen XAD-2-Extrakte zeigten keine zytotoxische Aktivität im Brine-shrimp-Assay.

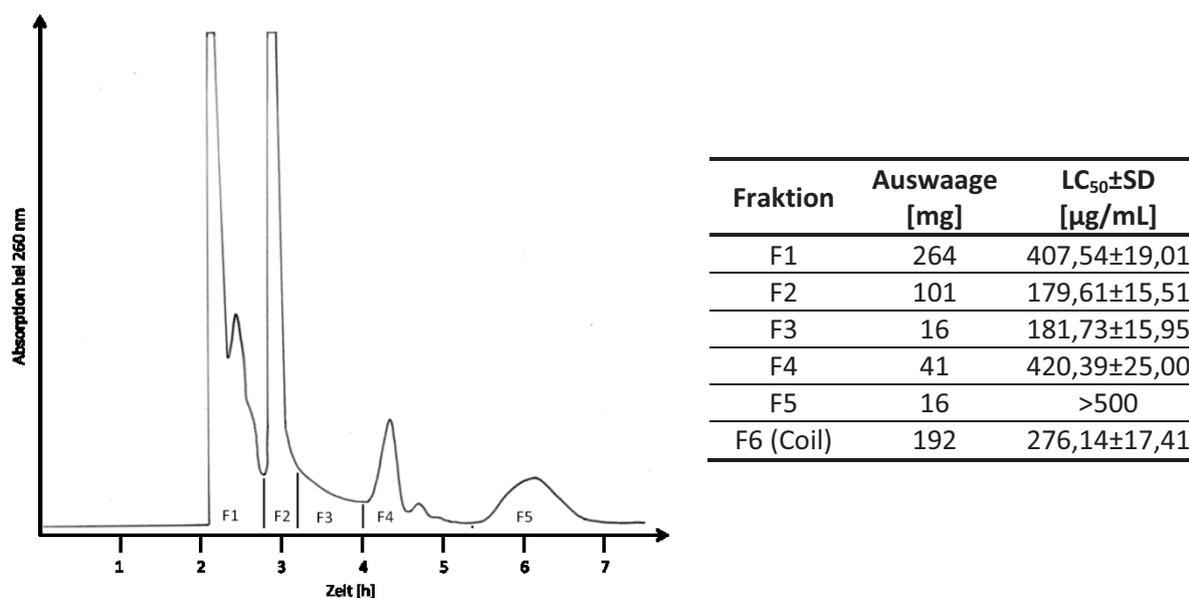
In Tab. 3-8 sind die LC<sub>50</sub>-Werte der XAD-7- und XAD-2-Extrakte sowie der übrigen Saftphase von TAreif und TAmeferm aufgeführt (Herstellung nach 3.1.1.1.2). TAreif zeigte wie nach Aufarbeitung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion keine bzw. eine sehr geringe zytotoxische Wirkung. Lediglich der XAD-2-Extrakt wies mit einem LC<sub>50</sub> von 421 µg/mL eine geringe Zytotoxizität auf. Die Extrakte von TAmeferm zeigten mit LC<sub>50</sub>-Werten von 357 µg/mL für den XAD-7-Extrakt bzw. 361 µg/mL für den XAD-2-Extrakt eine stärkere Zytotoxizität gegenüber den Brine shrimps als die Extrakte von TAreif. Des Weiteren war in der übrigen Saftphase von TAmeferm ebenfalls eine geringe Zytotoxizität festzustellen.

**Tab. 3-8: LC<sub>50</sub>-Werte des Brine-shrimp-Assays der Säfte und Extrakte.** Angegeben sind die LC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichung (SD) [µg/mL] der XAD-7- und XAD-2-Extrakte von TAreif und TAmeferm. Podophyllotoxin als Positivkontrolle wies einen LC<sub>50</sub>-Wert von 68,03±13,18 µg/mL auf.

Saft/Extrakt	TAreif LC <sub>50</sub> ±SD [µg/mL]	TAmeferm LC <sub>50</sub> ±SD [µg/mL]
XAD-7	>500	356,87±29,15
XAD-2	421,24±18,68	361,44±15,67
übrige Saftphase	>500	448,58±20,80

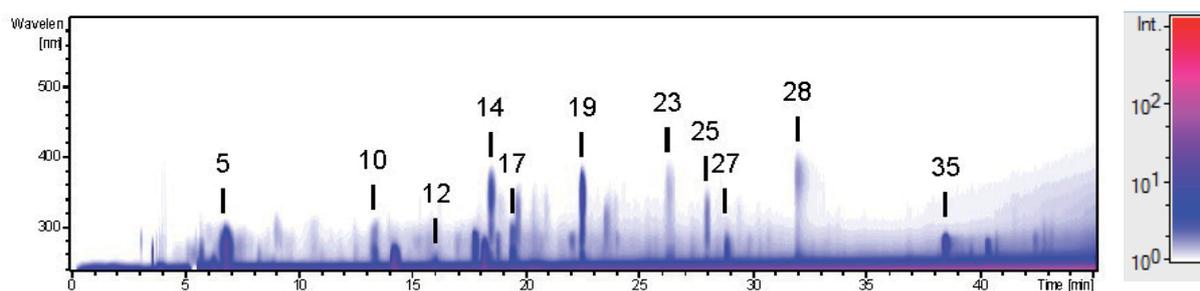
### Untersuchungen des Ethylacetat-Extrakts

Die Untersuchungen der Extrakte auf Zytotoxizität mittels Brine-shrimp-Assay zeigten, dass im Ethylacetat-Extrakt von TAmeferm mit 251,12±17,34 µg/mL der niedrigste LC<sub>50</sub>-Wert vorlag. Dieser Extrakt wurde aus diesem Grund genauer untersucht. Zunächst wurde mittels HSCCC eine Auftrennung von 800 mg des Ethylacetat-Extraktes durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend bezüglich ihrer Zytotoxizität evaluiert. Die Fraktionen mit niedrigen LC<sub>50</sub>-Werten wurden mit HPLC-DAD-ESI-MS/MS untersucht. Aus der Trennung des Ethylacetat-Extrakts mittels HSCCC (CCCSytem 3) wurden sechs Fraktionen inklusive der Coil-Fraktion erhalten. Dafür wurden die Reagenzglas-Fraktionen mittels DC-Analyse mit DCSystem 2 eingeteilt und anschließend vereinigt. Diese Fraktionen wurden gefriergetrocknet. Die Trennung mit den Auswaagen und LC<sub>50</sub>-Werten für die einzelnen Fraktionen ist in Abb. 3-5 dargestellt.



**Abb. 3-5: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung und LC<sub>50</sub>-Werte des Brine-shrimp-Assays des Ethylacetat-Extrakts von fermentiertem Saft (Tamedferm).** Dargestellt ist das UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung bei 260 nm. Erhalten wurden fünf Fraktionen (F1–F5) und zusätzlich die Coil-Fraktion (F6). Für die Trennung wurde *CCCSytem 3* verwendet (links). Tabellarisch aufgeführt sind die erhaltenen Fraktionen der HSCCC-Trennung mit Auswaagen und den LC<sub>50</sub>-Werten des Brine-shrimp-Assays (rechts). Podophyllotoxin als Positivkontrolle wies einen LC<sub>50</sub>-Wert von 68,03±13,18 µg/mL auf.

Im Ethylacetat-Extrakt von fermentiertem Noni-Saft konnte nach Abb. 3-3 und Tab. 3-5 eine Anzahl von 26 Verbindungen nachgewiesen werden (dargestellt ist dort der Ethylacetat-Extrakt von Hamedferm). Um eine Einschätzung vornehmen zu können, welche Verbindungen die Hauptkomponenten des Ethylacetat-Extrakts von Tamedferm darstellen, wurde der UV-Vis-Contour-Plot von 220–600 nm ausgewertet (Abb. 3-6).



**Abb. 3-6: Contour-Plot des Ethylacetat-Extrakts von fermentiertem Saft.** Dargestellt ist der DAD-Contour-Plot des Ethylacetat-Extrakts von Tamedferm von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-5.

Mit diesen Informationen lassen sich ausschließlich Verbindungen nachweisen, die eine Absorption von Licht im UV-Vis-Bereich hervorrufen. Diese Verbindungen sind aufgrund ihrer Strukturmerkmale interessant für die Evaluation möglicherweise zytotoxischer Substanzen im Brine-shrimp-Assay. Durch die Betrachtung des Contour-Plots des Ethylacetat-Extrakt von

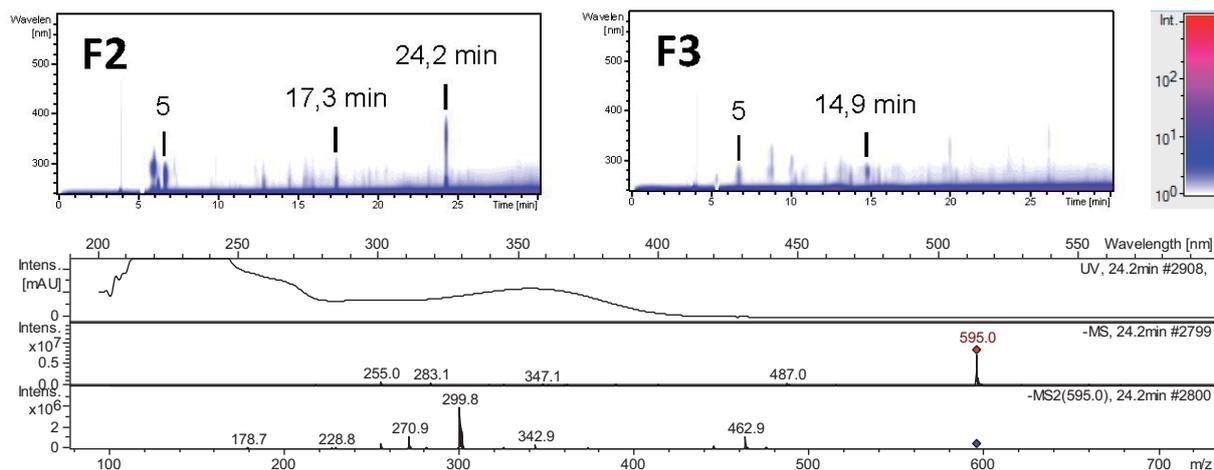
fermentiertem Saft (TAmeferm) zeigte sich, dass die zugeordneten Verbindungen Furan-2-carbonsäure (Peak 5), Protocatechusäure (Peak 10), Aesculetin (Peak 14), 3,3'-Bisdemethylpinoresinol (Peak 17), Morindolin (Peak 18), Scopoletin (Peak 19), Rutin (Peak 23), Isoamericaninsäure A (Peak 25), 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (Peak 27), Quercetin (Peak 28) und (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (Peak 35) die Hauptkomponenten des Extrakts darstellen. Darüber hinaus konnten bei den Retentionszeiten  $R_t$  14,1 min und  $R_t$  18,2 min zwei Verbindungen detektiert werden, die eine relativ starke UV-Absorption bei 250 nm bzw. 254 nm zeigten. Diese Verbindungen konnten nicht zugeordnet werden, da aufgrund ungenügender Ionisierungseigenschaften keine MS-Daten erhalten werden konnten.

Nach Trennung des Ethylacetat-Extrakts zeigten die Fraktionen F2 und F3  $LC_{50}$ -Werte von 180  $\mu$ g/mL bzw. 182  $\mu$ g/mL im Brine-shrimp-Assay. Diese lagen damit niedriger als der Wert, welcher für den Ethylacetat-Extrakt ( $LC_{50}$  251  $\mu$ g/mL) bestimmt werden konnte. In diesen Fraktionen hat demnach eine Anreicherung der zytotoxisch aktiven Komponenten stattgefunden.

Die Untersuchung von Fraktion F2 mit HPLC-DAD-ESI-MS/MS zeigte die Verbindungen Furan-2-carbonsäure (Peak 5) und Protocatechusäure (Peak 10) (Abb. 3-7 oben links). Des Weiteren konnten bei  $R_t$  17,3 min und  $R_t$  24,2 min zwei unbekannte Verbindungen detektiert werden. Die Verbindung mit  $R_t$  17,3 min (UV-Absorption bei 270 nm) wies nur eine ungenügende Ionisation auf und konnte deshalb in der MS-Spur (TIC und BPC) keiner bestimmten Masse zugeordnet werden. Weiterhin schien die unbekannte Verbindung mit  $R_t$  24,2 min interessant. Hier konnten die typischen UV-Vis-Absorptionsmaxima von Flavonolen mit 260 nm und 354 nm nachgewiesen werden. Das Massenspektrum der unbekannteren Verbindung wies ein Molekül-Ion mit  $m/z$  595  $[M-H]^-$  auf (Abb. 3-7 unten). Nach Fragmentierung des Molekül-Ions ergaben sich die folgenden Ionen mit  $m/z$  463 (27 %), 343 (10 %), 301 (44 %), 300 (100 %), 271 (22 %) und 179 (4 %). Die MS/MS-Fragmente mit den höchsten Intensitäten  $m/z$  300 und 301 deuteten auf Quercetin hin. Das Fragment mit  $m/z$  463 ließ vermuten, dass die terminale Einheit eine Pentose ist und die Verbindung zum Aglykon eine Hexose darstellt. Diese Daten passen gut mit den Daten eines Quercetin-Hexose-Pentosids überein, das von GIL-IZQUIERDO und MELLENTHIN in Rowanberry-Saft (*Sorbus aucuparia*) identifiziert wurde (198). Es existieren mehrere Veröffentlichungen bezüglich der Toxizität von Quercetin- und Kämpferolglykosiden gegenüber Brine shrimps (199-202). Es ist daher möglich, dass diese Verbindung einen Beitrag zur Zytotoxizität von Fraktion F2 leistet.

Fraktion F3 zeigte nach Trennung des Ethylacetat-Extrakts mittels HSCCC eine geringe Auswaage von nur 16 mg. Der Contour-Plot von 220–600 nm der Fraktion zeigte eine Vielzahl von Verbindungen, unter denen keine Hauptverbindung identifiziert werden konnte

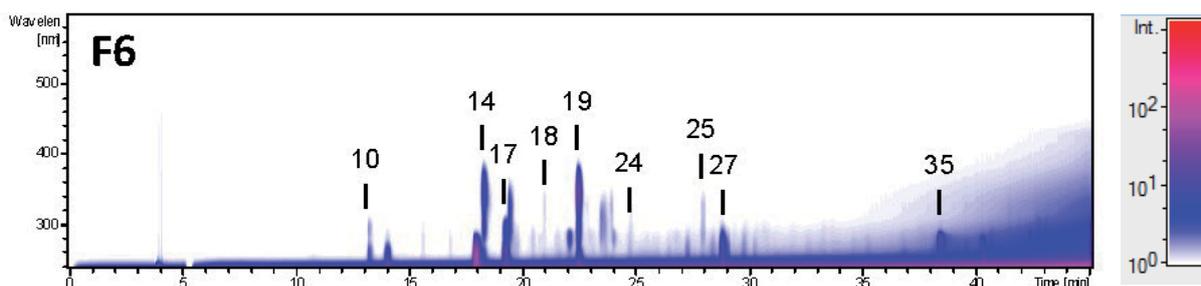
(Abb. 3-7 oben rechts). Peak 5 konnte im Chromatogramm eindeutig als Furan-2-carbonsäure identifiziert werden. Die unbekannte Verbindung mit  $R_t$  14,9 min (UV-Absorption bei 280 nm) konnte aufgrund ungenügender Ionisation nicht weiter evaluiert werden. Durch die geringe Auswaage von Fraktion F3 und dem damit verbundenen geringen Anteil am Gesamtextrakt ist der Beitrag zum zytotoxischen Potential des Ethylacetat-Extrakts eher gering einzuschätzen.



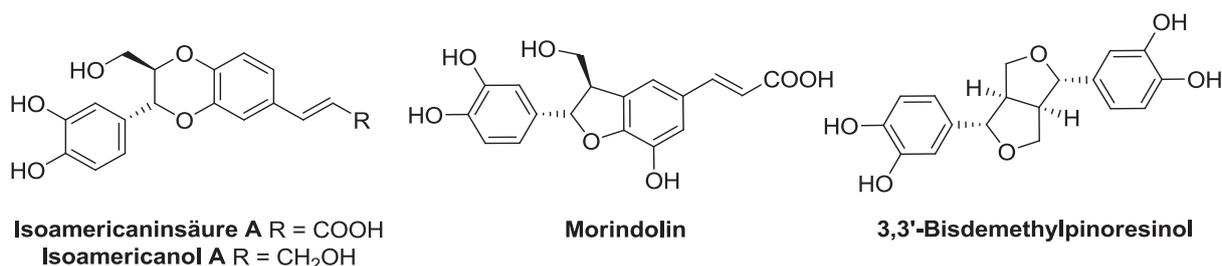
**Abb. 3-7: Contour-Plots der Fraktionen F2 und F3 sowie UV-Vis- und MS-Daten der unbekanntes Verbindung.** Dargestellt sind die Contour-Plots der Fraktionen F2 und F3 des Ethylacetat-Extrakts von Tamedferm. Die Nummerierung richtet sich nach Tab. 3-5. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Zusätzliche Verbindungen sind mit der Retentionszeit angegeben (oben). Zusätzlich sind die UV-Vis- und MS-Daten der unbekanntes Verbindung mit  $R_t$  24,2 min gezeigt (unten).

Darüber hinaus wies die Coil-Fraktion F6 ( $LC_{50}$  276  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) eine zytotoxische Aktivität gegenüber den Brine shrimps auf, die etwas höher als der Wert für den Ethylacetat-Extrakt ausfiel. Es war zu erwarten, dass diese Fraktion aufgrund der Auswaage von 192 mg einen erheblichen Teil zur Zytotoxizität des Ethylacetat-Extrakts beiträgt. In Fraktion F6 konnten die Verbindungen Protocatechusäure (Peak 10), Aesculetin (Peak 14), 3,3'-Bisdemethylpinoresinol (Peak 17), Morindolin (Peak 18), Scopoletin (Peak 19), Isoamericanol A (Peak 24), Isoamericaninsäure A (Peak 25), 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (Peak 27) und (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (Peak 35) identifiziert werden (Abb. 3-8).

Als zytotoxisch aktive Substanzen kamen in dieser Fraktion besonders das Lignan 3,3'-Bisdemethylpinoresinol (Peak 17) und die Neolignane Morindolin (Peak 18), Isoamericanol A (Peak 24) und Isoamericaninsäure A (Peak 25) in Frage, da die zytotoxischen Effekte solcher Verbindungen bereits bekannt sind (die Strukturformeln sind in Abb. 3-9 dargestellt). So konnten aus Blättern von *Magnolia virginiana* (203) und *Endlicheria dysodantha* (204) zahlreiche Neolignane mit teilweise starken zytotoxischen Effekten auf Brine shrimps isoliert werden.



**Abb. 3-8: Contour-Plot von Fraktion F6.** Dargestellt ist der DAD-Contour-Plot von Fraktion F6 des Ethylacetat-Extrakts von Tamedferm von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-5.



**Abb. 3-9: Zytotoxische Verbindungen aus dem Saft von *M. citrifolia*.** Identifizierte Verbindungen aus Fraktion F6 des Ethylacetat-Extrakts von Tamedferm, die möglicherweise für die zytotoxischen Wirkungen auf die Brine shrimps verantwortlich sind.

Des Weiteren existieren mehrere Publikationen über stark zytotoxische Lignane aus *Centaurea americana* (205), *Myrsine africana* (206) und *Hyptis verticillata* (207). Für (±)-Pinoresinol sind darüber hinaus Publikationen über zytotoxische Effekte in Humanzellen verfügbar (208, 209). Da eine weitere Anreicherung der Lignane und Neolignane aus dem Ethylacetat-Extrakt des Saftes aufgrund geringer verfügbarer Extraktmengen nicht möglich war, wurden die Steine hinsichtlich dieser Verbindungen näher untersucht (s. 3.1.2.3).

Für die Cumarinderivate Aesculetin und Scopoletin sind keine zytotoxischen Effekte im Brine-shrimp-Assay bekannt (210, 211). Da jedoch Scopoletin in relativ großen Mengen mit 9–15 mg/L in authentischen Noni-Säften enthalten ist (vgl. 3.3), wurde diese Verbindung erneut evaluiert. Dabei konnten die Ergebnisse der Literatur bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Es ist demnach auszuschließen, dass die Cumarinderivate zur Zytotoxizität des Extrakts beitragen.

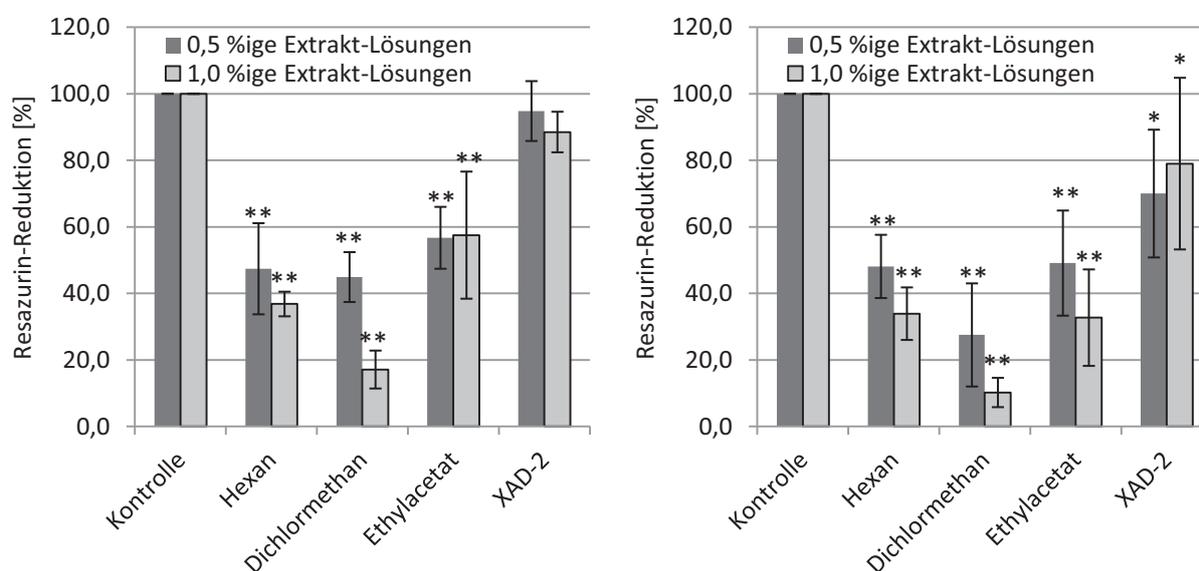
Für langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure (212) sowie kurzkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren (213) sind keine zytotoxischen Effekte auf Brine shrimps bekannt. Trotzdem wurde eine CCC-Fraktion aus dem Dichlormethan-Extrakt der Pulpe, in der (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure (Peak 35) stark angereichert vorlag, mittels Brine-shrimp-Assay untersucht (Isolierung und Anreicherung unter 3.1.2.4.2). Dabei konnte keine Zytotoxizität nachgewiesen werden. Damit waren die Verbindungen (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Deca-

triensäure (Peak 35) und die glykosylierte Form 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose (Peak 27) nicht verantwortlich für die Zytotoxizität des Ethylacetat-Extrakts.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass mehrere Fraktionen aus der Trennung des Ethylacetat-Extrakts von fermentiertem Saft zytotoxische Effekte auf Brine shrimps zeigten. Durch den großen Anteil der CCC-Fraktion F6 am Ethylacetat-Extrakt konnte gefolgert werden, dass die in diesem Extrakt angereicherten Verbindungen 3,3'-Bisdemethylpinoresinol, Morindolin, Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A für die zytotoxischen Effekte verantwortlich sind.

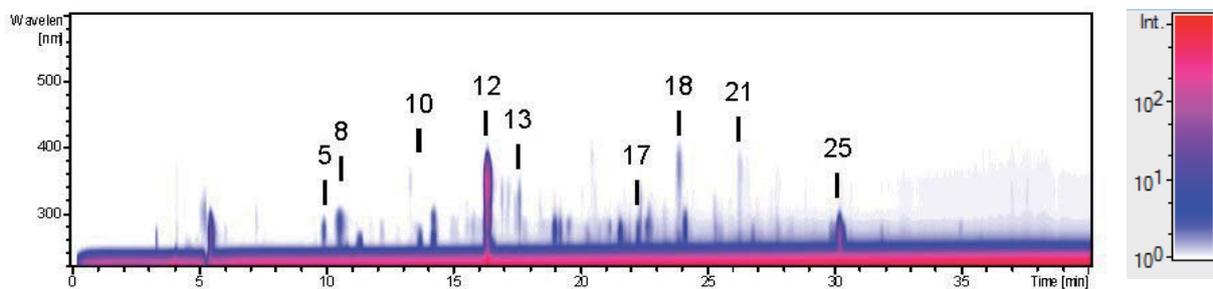
### 3.1.1.4 Zytotoxizität in Rattenhepatozyten in Primärkultur

Für Produkte von *M. citrifolia*, im Besonderen für die Säfte, sind mehrere Fälle von hepatotoxischen Wirkungen nach Aufnahme solcher Produkte publiziert (vgl. 2.1.8.1). Aufgrund der bis dato unklaren Datenlage zur Hepatotoxizität von Noni-Säften wurde im Folgenden eine Untersuchung zur Zytotoxizität in Rattenhepatozyten in Primärkultur vorgenommen. Dabei wurde von Extrakten des fermentierten Saftes Tamedferm, die durch Lösungsmittel ansteigender Polarität (Hexan, Dichlormethan, Ethylacetat) sowie Extraktion mit XAD-2 gewonnen wurden, ausgegangen (s. 3.1.1.1.1).



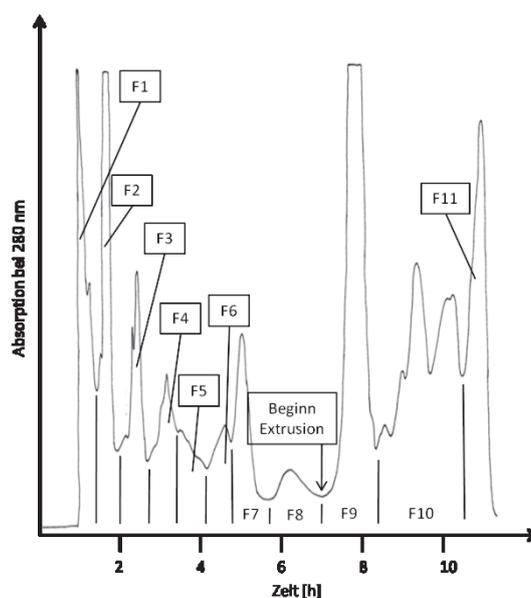
**Abb. 3-10: Reduktion von Resazurin [%] in Rattenhepatozyten in Primärkultur nach Inkubation mit Extrakten von fermentiertem Saft von *M. citrifolia*.** Dargestellt ist die Reduktionsrate von Resazurin [%] nach 24 h (links) und 48 h (rechts) von 0,5 %igen und 1,0 %igen Extraktlösungen der Hexan-, Dichlormethan-, Ethylacetat- und XAD-2-Extrakte von fermentiertem Saft (Tamedferm). Die Reduktion von Resazurin in der Kontrolle wurde als 100 % definiert. Die Balken geben Mittelwerte ± SD von vier Messungen an. Signifikante Unterschiede zur DMSO-Kontrolle \*\*p < 0,01, \*p < 0,05 und nicht signifikante Unterschiede p > 0,05.

Die Analyse von 0,5 %igen und 1,0 %igen Extrakt-Lösungen nach 24 h bzw. 48 h mittels Resazurin-Reduktions-Test ergab signifikant ( $p \leq 0,01$ ) zytotoxische Wirkungen des Hexan-, Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakts im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (100 % Resazurin-Reduktion). Der XAD-2-Extrakt zeigte erst nach 48 h Inkubationszeit signifikante ( $p \leq 0,05$ ) toxische Wirkungen. Der Dichlormethan-Extrakt zeigte mit 44,9 % Resazurin-Reduktion für 0,5 %ige Extrakt-Lösungen bzw. 17,1 % Resazurin-Reduktion für 1,0 %ige Extrakt-Lösungen nach 24 h die niedrigsten Werte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Nach 48 h war die Abnahme der Fähigkeit zur Reduktion von Resazurin der Rattenhepatozyten mit 27,5 % für 0,5 %ige Extrakt-Lösungen bzw. 10,2 % für 1,0 %ige Extrakt-Lösungen noch stärker ausgeprägt (Abb. 3-10). Der Dichlormethan-Extrakt war damit der am stärksten zytotoxische Extrakt und wurde im Folgenden zur Überprüfung der Zusammensetzung näher betrachtet. Im Contour-Plot des Dichlormethan-Extrakts konnten neun Verbindungen eindeutig zugeordnet werden: Protocatechusäure (Peak 5), Vanillinsäure (Peak 8), Aesculetin (Peak 10), Scopoletin (Peak 12), Isoamericaninsäure A (Peak 13), Vanillin (Peak 17), Quercetin (Peak 18), Kämpferol (Peak 21) und (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure (Peak 25). Besonders starke UV-Vis-Absorptionen riefen dabei die Verbindungen Scopoletin und (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure hervor, die die Zusammensetzung des Dichlormethan-Extrakts damit dominieren (Abb. 3-11).



**Abb. 3-11: Contour-Plot des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft.** Dargestellt ist der DAD-Contour-Plot des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-4.

Für Scopoletin sind sowohl hepatotoxische (214) als auch hepatoprotektive Wirkungen (215) in der Literatur bekannt. Für die Fettsäure (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatrienoic acid sind keine Daten hinsichtlich toxischer Wirkungen verfügbar. Der Dichlormethan-Extrakt wurde zur Evaluierung der toxischen Substanzen mittels HSCCC aufgetrennt. Nach Analyse mittels DC (*DCSystem 3*) konnten elf Fraktionen (F1–F11) eingeteilt werden (Abb. 3-12).

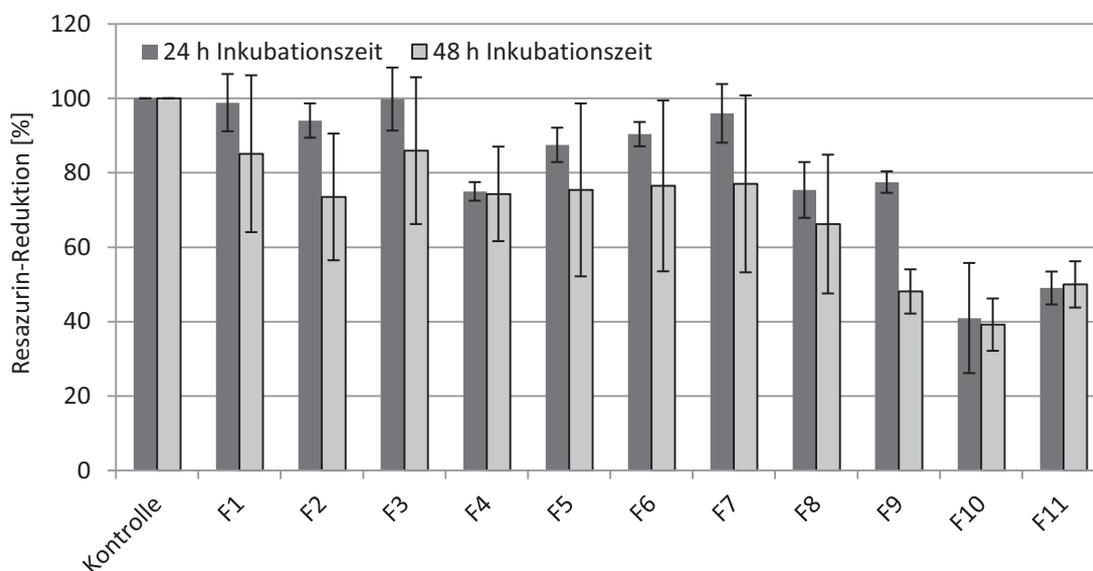


**Abb. 3-12: Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft von *M. citrifolia*.** Dargestellt ist das UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von TAmEdferm bei 280 nm. Erhalten wurden elf Fraktionen (F1–F11). Acht Fraktionen (F1–F8) wurden im Elutions-Modus erhalten. Die drei Fraktionen F9–F11 wurden im Extrusions-Modus erhalten. Für die Trennung wurde *CCCSytem 6* verwendet.

Diese elf Fraktionen wurden anschließend mittels Resazurin-Reduktions-Test analysiert. Besonders starke toxische Effekte konnten in den Fraktionen F10 und F11 detektiert werden. In Fraktion F10 wurden Reduktionsraten von Resazurin von 41,0 % nach 24 h Inkubationszeit und von 39,2 % nach 48 h Inkubationszeit detektiert. Die Fraktion F11 zeigte Resazurin-Reduktionsraten von 49,0 % nach 24 h bzw. 50,0 % nach 48 h Inkubationszeit. Darüber hinaus wurden in Fraktion F9 lediglich nach 48 h Inkubationszeit geringe Resazurin-Reduktionsraten von 48,1 % nachgewiesen (Abb. 3-13). Die Fraktionen F9, F10 und F11 wurden aufgrund ihrer niedrigen Resazurin-Reduktionsraten im Folgenden näher mittels LC-DAD-MS/MS untersucht.

Im Contour-Plot von Fraktion F9 konnte lediglich eine Verbindung nachgewiesen werden. Nach Vergleich der erhaltenen UV- und MS-Daten der Verbindung wurde Scopoletin (12) vermutet. Die Verbindung wurde anschließend durch Koinjektion der isolierten Standardsubstanz überprüft und konnte dadurch als Scopoletin (12) bestätigt werden (Abb. 3-14 oben). Reines Scopoletin wurde weiterhin an primären Rattenhepatozyten getestet. Dabei konnten ähnliche Effekte mit  $79,8 \pm 14,4$  % nach 24 h bzw.  $60,8 \pm 19,7$  % nach 48 h Inkubationszeit detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich der Wirkungen von Scopoletin existieren Veröffentlichungen, welche im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen eher hepatoprotektive Effekte der Verbindung vermuten lassen. So konnten hepatoprotektive Wirkungen von Scopoletin an primären Rattenhepatozyten, welche mit Tetrachlorkohlenstoff behandelt wurden, nachgewiesen werden (215, 216). Es wurden

jedoch auch negative Effekte von Scopoletin auf Rattenleberzellen nachgewiesen. So konnten nach Fütterungsversuchen an männlichen Wistar-Ratten hepatotoxische Wirkungen von Scopoletin nachgewiesen werden (214). Des Weiteren ist zu beachten, dass Scopoletin (6-Methoxy-7-hydroxycumarin) ein Cumarinderivat darstellt. Cumarin (2H-1-Benzopyran-2-on) selbst ist aufgrund des Metabolismus, welcher über eine 3,4-Epoxidierung stattfindet, bekannt für seine Hepatotoxizität in Nagetieren, wie z.B. Ratten (217). Dies könnte u.U. ein Grund für die toxischen Wirkungen von Scopoletin in den Rattenhepatozyten sein. Unklar ist jedoch der Einfluss der Substitutionen an Position 6 und 7 bei Scopoletin auf den Metabolismus und die Toxizität in den Rattenhepatozyten. Es sei überdies darauf hingewiesen, dass aufgrund des unterschiedlichen Metabolismus solcher Verbindungen keine Übertragbarkeit auf Humanzellen gegeben ist (218, 219).

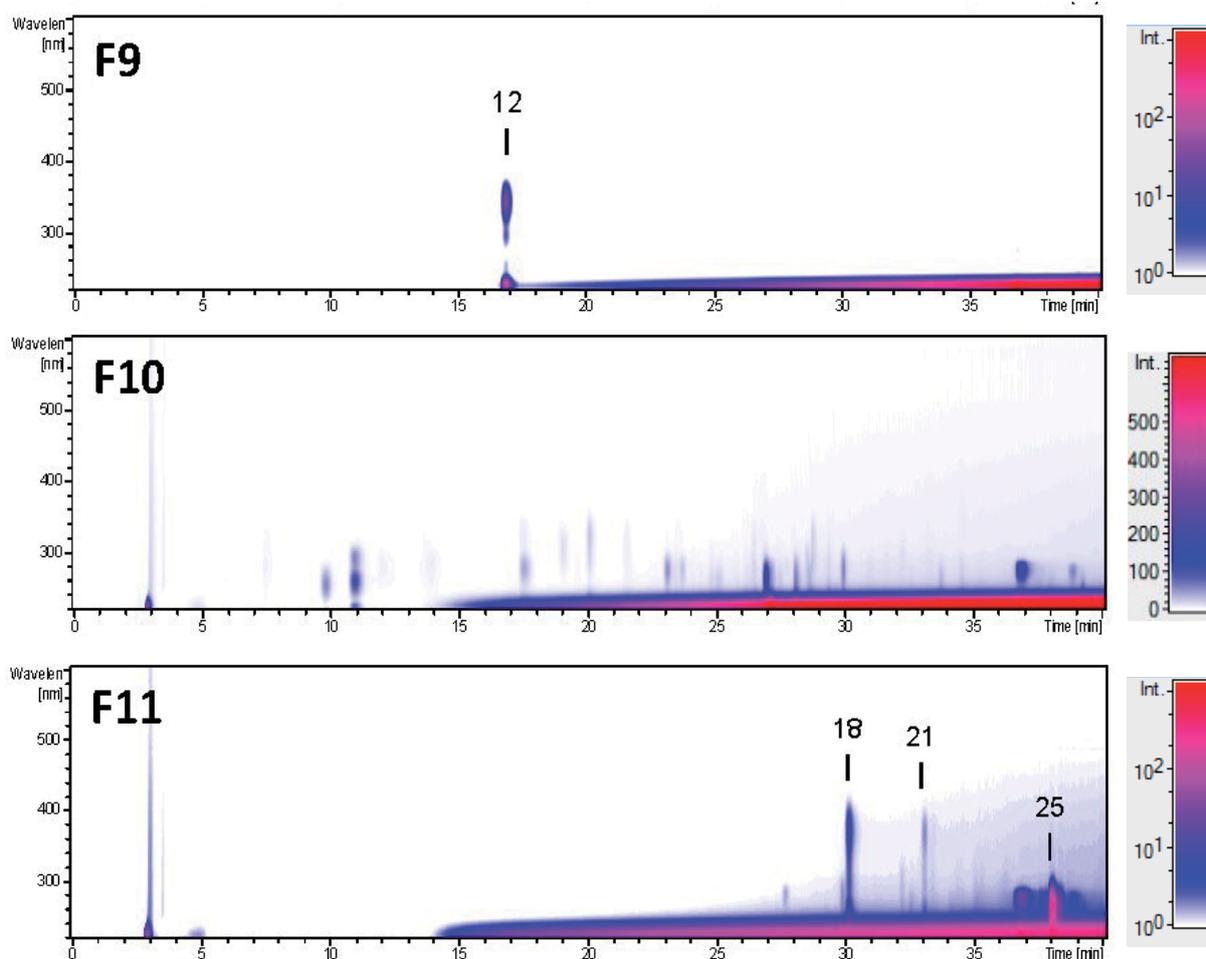


**Abb. 3-13: Reduktion von Resazurin [%] in Rattenhepatozyten in Primärkultur nach Inkubation mit CCC-Fractionen des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm.** Dargestellt ist die Reduktionsrate von Resazurin [%] nach 24 h und 48 h von 1,0 %igen Lösungen der elf CCC-Fractionen (F1–F11) des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft (Tamedferm). Die Reduktion von Resazurin in der Kontrolle wurde als 100 % definiert. Die Balken geben Mittelwerte  $\pm$  SD von vier Messungen an.

Der Contour-Plot der Fraktion F10 zeigte eine hochkomplexe Zusammensetzung der Fraktion (Abb. 3-14 Mitte). Die Fraktion F10 wurde aufgrund der niedrigen Resazurin-Reduktionsraten und der komplexen Zusammensetzung in 13 Unterfraktionen (F10.1–F10.13) unterteilt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf deren Toxizität an Rattenhepatozyten in Primärkultur getestet.

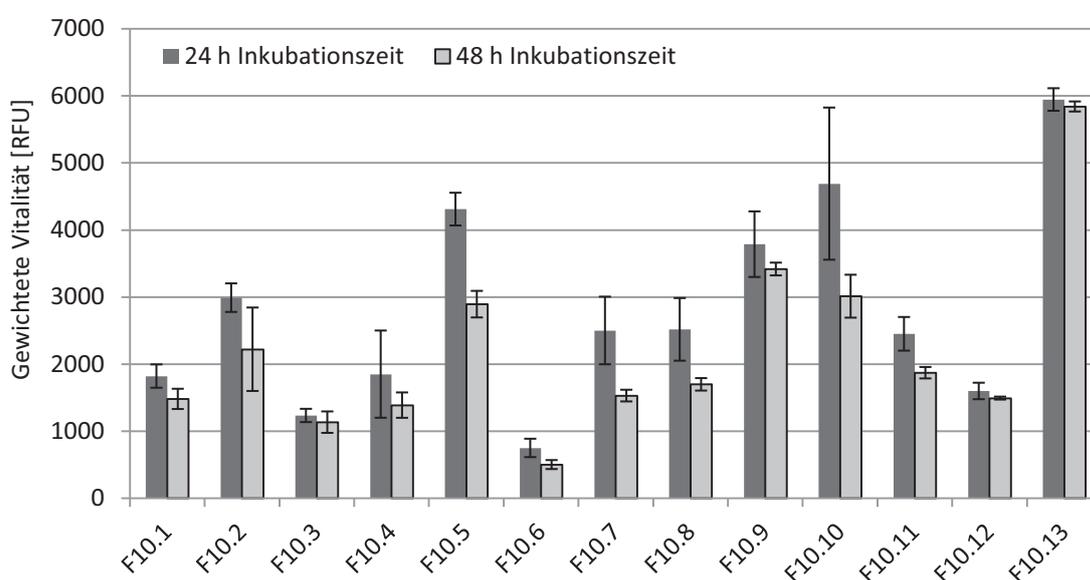
In Fraktion F11 konnten die Verbindungen Quercetin, Kämpferol und (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure nachgewiesen werden (Abb. 3-14 unten). In der Literatur sind nach bestem Wissen keine zytotoxischen Wirkungen für die Verbindungen Quercetin und Kämpferol

vorhanden. Im Gegenteil existieren für Quercetin zahlreiche Veröffentlichungen, welche hepatoprotektive Effekte dieser Verbindung in primären Rattenhepatozyten beschreiben. So wurden positive Effekte in Rattenhepatozyten nachgewiesen, nachdem diese Zellen oxidativem Stress, z.B. in Form des Zellgifts Ethanol, ausgesetzt wurden (220, 221). Weiterhin konnte für Kämpferol eine hepatoprotektive Wirkung in primären Rattenhepatozyten nachgewiesen werden (222). Darüber hinaus sind für die entsprechenden Flavonolglykoside hepatoprotektive Eigenschaften bekannt (223). Es ist damit auszuschließen, dass diese Verbindungen für die zytotoxischen Effekte der Fraktion F11 verantwortlich sind. Für die Verbindung (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure sind bis zu diesem Zeitpunkt keine Daten hinsichtlich toxischer Wirkungen vorhanden. Aufgrund dessen, dass für Quercetin und Kämpferol keine toxischen Wirkungen auf primäre Rattenleberzellen bekannt sind, ist es möglich, dass (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure für die Toxizität der Fraktion F11 verantwortlich ist.



**Abb. 3-14: Contour-Plots der CCC-Fractionen F9, F10 und F11 des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft von *M. citrifolia*.** Dargestellt sind die DAD-Contour-Plots der CCC-Fractionen F9, F10 und F11 des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm von 220–600 nm. Die jeweiligen Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-4. Retentionszeitverschiebungen zu Tab. 3-4 ergeben sich durch Verwendung von *HPLCSystem 8*.

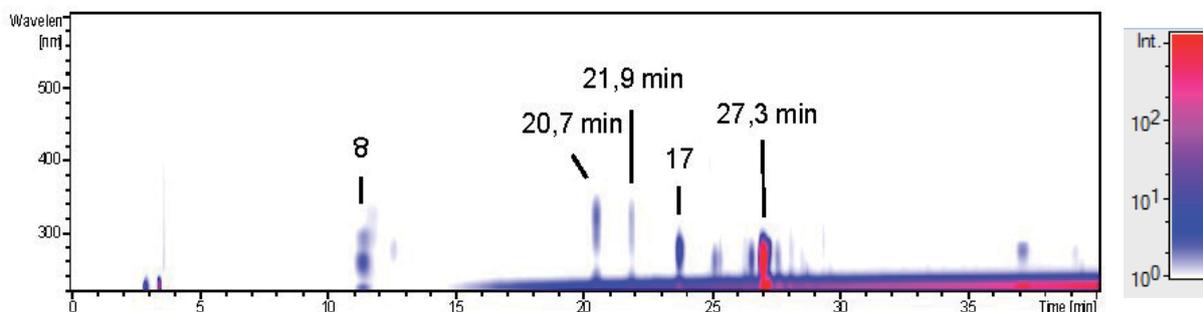
Die Fraktion F10 wurde aufgrund ihrer komplexen Zusammensetzung mittels HPLC-DAD in 13 Unterfraktionen (F10.1–F10.13) unterteilt. Diese Fraktionen wurden erneut mittels Resazurin-Reduktions-Test untersucht. Um die unterschiedlichen Einwaagen der Subfraktionen zu berücksichtigen, wurden die Fraktionen in gleichen Volumina DMSO gelöst. In der Auswertung wurden dann die Fluoreszenzwerte (Relative fluorescence units, [RFU]) mit den jeweiligen Einwaagen multipliziert um die gewichtete Vitalität zu erhalten. Die Fraktion F10.6 zeigte nach Berücksichtigung der Einwaage die geringsten Resazurin-Reduktionsraten mit 750 RFU nach 24 h bzw. 502 RFU nach 48 h Inkubationszeit (Abb. 3-15). Diese Fraktion wird im Folgenden genauer betrachtet.



**Abb. 3-15: Gewichtete Vitalität (Relative fluorescence units, [RFU]) der Rattenhepatozyten in Primärkultur der Unterfraktionen von Fraktion F10 der CCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm.** Dargestellt ist die gewichtete Vitalität der Rattenhepatozyten [RFU] nach Inkubation mit 1%igen Lösungen der 13 Unterfraktionen der CCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft (Tamedferm) nach 24 h und 48 h. Die Balken geben Mittelwerte  $\pm$  SD von vier Messungen an.

Im Contour-Plot der Subfraktion F10.6 der CCC-Fraktion F10 konnten fünf Verbindungen nachgewiesen werden, von denen drei Verbindungen identifiziert werden konnten. Die Verbindungen Vanillinsäure (8) und Vanillin (17) konnten schon im Dichlormethan-Extrakt nachgewiesen werden (vgl. 3.1.1.2.1). Die Verbindung mit der höchsten Konzentration, abgeschätzt mit dem Contour-Plot, konnte als Syringaldehyd ( $R_t$  27,3 min) anhand der erhaltenen UV-Vis- und MS-Daten identifiziert werden. Die Molekülmasse von  $M = 182$  g/mol wurde durch die Molekülionen im negativen Modus  $181 [M-H]^-$  und im positiven Modus  $205 [M+Na]^+$  festgelegt. Die Fragmentierung im negativen Modus von  $m/z$  166 und  $m/z$  151 entsprach der Abspaltung von einer bzw. von zwei Methylgruppen im Molekül. Weiterhin

wurde die Vermutung, dass es sich um Syringaldehyd handelt, durch die intensive UV-Absorption bei 309 nm unterstützt. Nach Vergleich mit Literaturdaten konnte die Verbindung als Syringaldehyd identifiziert werden (224).



**Abb. 3-16: Contour-Plot der Subfraktion F10.6 von CCC-Fraktion F10.** Dargestellt ist der DAD-Contour-Plot der Subfraktion F10.6 der CCC-Fraktion F10 des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft von *M. citrifolia* (Tamedferm) von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung erfolgt nach Tab. 3-4. Retentionszeitverschiebungen zu Tab. 3-4 ergeben sich durch Verwendung von *HPLCSystem 8*.

Darüber hinaus konnten bei  $R_t$  20,7 min und  $R_t$  22,1 min Verbindungen identifiziert werden die zum Einem sehr ähnliche UV-Absorptionen bei 292 nm und 322 nm ( $R_t$  20,7 min) bzw. 291 nm und 321 nm ( $R_t$  22,1 min) und zum Anderen die gleichen Molekülonen mit 193  $[M-H]^-$  und 195  $[M+H]^+$  aufwiesen. Bei den Fragmentierungen ( $MS^2$ ) ergaben sich lediglich Unterschiede bei den Intensitäten. Die Fragmente selbst waren jedoch die gleichen. Nach Vergleich mit Literaturdaten wurde auf Ferulasäure geschlossen (224). Durch Koinjektion der Standardsubstanz konnte schließlich Ferulasäure bei  $R_t$  20,7 min eindeutig identifiziert werden. Die Verbindung mit  $R_t$  22,1 min schien aufgrund der UV-Vis- und MS-Daten eine ähnliche Verbindung zu Ferulasäure zu sein. Diese Verbindung konnte jedoch nicht identifiziert werden (Tab. 3-9).

**Tab. 3-9: Identifizierte Verbindungen in der Subfraktion F10.6 von CCC-Fraktion F10 des Dichlormethan-Extrakts von fermentiertem Saft.** Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit den Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei  $MS^2$  in der Subfraktion F10.6 von CCC-Fraktion F10 des Dichlormethan-Extrakts von Tamedferm.

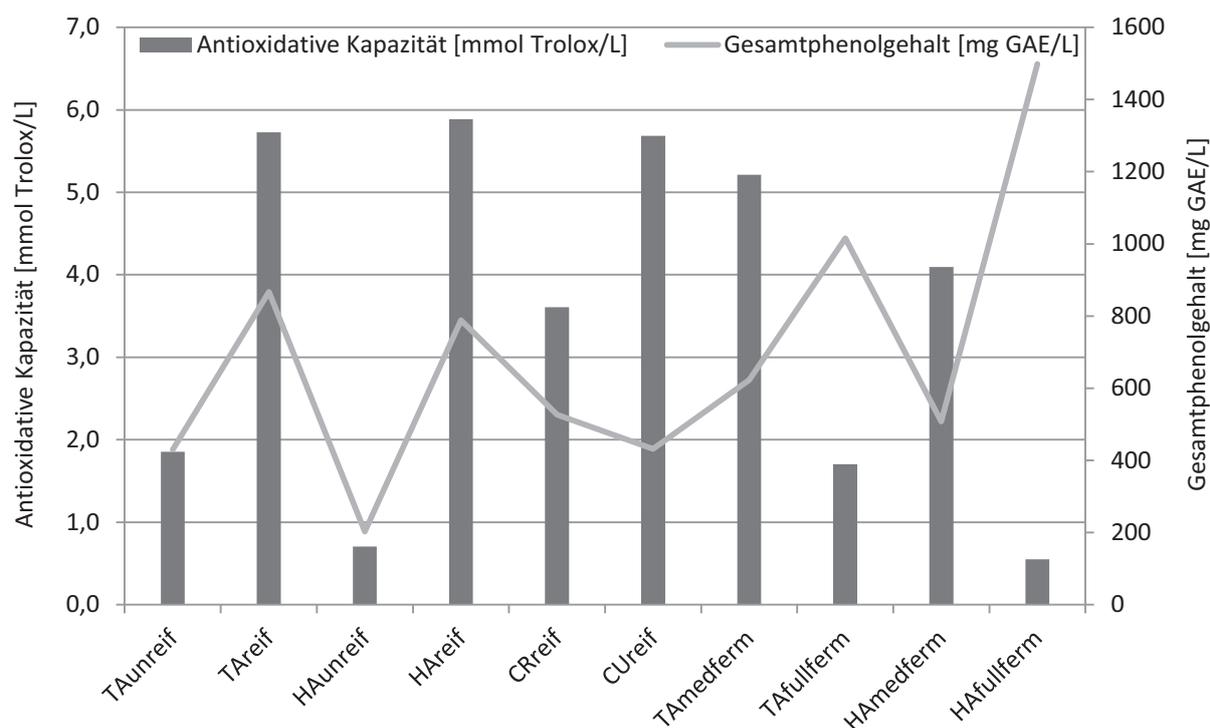
$R_t$ [min]	UV [nm]	MS [ $m/z$ ]	$MS^2$ (-) [ $m/z$ ]	identifizierte Verbindung
11,8	260, 291	167 $[M-H]^-$ 169 $[M+H]^+$	123, 152 (62), 108 (60)	Vanillinsäure (8)
20,7	292, 322	193 $[M-H]^-$ 195 $[M+H]^+$	133, 149 (83), 178 (47)	Ferulasäure
22,1	291, 321	193 $[M-H]^-$ 195 $[M+H]^+$	133, 178 (47), 149 (12)	ähnlich Ferulasäure?
23,9	280	151 $[M-H]^-$	129	Vanillin (17)
27,3	309	181 $[M-H]^-$ 205 $[M+Na]^+$	166, 151 (30)	Syringaldehyd



Nachdem bei Untersuchungen von WEST *et al.* mit purem Noni-Saft (Tahitian Noni Juice) und daraus hergestelltem Ethylacetat-Extrakt keine außergewöhnlichen toxischen Effekte in primären Rattenhepatozyten beobachtet werden konnten (133), wurden bei diesen Untersuchungen toxische Wirkungen im Dichlormethan-Extrakt des fermentierten Safts nachgewiesen. Als zytotoxisch aktive Substanzen konnten in diesem Extrakt die Verbindungen Scopoletin, (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure und Syringaldehyd identifiziert werden. Die Daten können als erste Hinweise auf eine hepatotoxische Wirkung verstanden werden, sind jedoch nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Hier müssten weitere Untersuchungen an Humanleberzellen erfolgen um die Hepatotoxizität im Menschen einschätzen zu können.

### 3.1.1.5 Antioxidative Kapazität und Gesamtphenolgehalt der Extrakte

Mit *M. citrifolia* im Allgemeinen und besonders mit dem Saft der Früchte dieser Pflanze werden neben einer Vielzahl physiologischer Effekte auch antioxidative Eigenschaften in Verbindung gebracht (57, 225). Die Bedeutung antioxidativer Substanzen ergibt sich aus den vielen Krankheiten, wie Arteriosklerose, verschiedenen Krebsarten und neurodegenerativen Krankheiten, welche ihre Ursache im oxidativen Stress haben (226). Im engen Zusammenhang mit dem antioxidativen Potential steht der Gesamtphenolgehalt, da phenolische Verbindungen, wie z.B. Flavonoide, ein hohes antioxidatives Potential besitzen und als Inhaltsstoffe in Früchten und Fruchtsäften weit verbreitet sind (227). Das antioxidative Potential von authentischen und kommerziellen Noni-Säften wurde mittels TEAC-Test nach RE *et al.* (183) und der Gesamtphenolgehalt mit der Folin-Ciocalteu-Methode nach SINGLETON und ROSSI (184) evaluiert.



**Abb. 3-17: Antioxidative Kapazität und Gesamtphenolgehalt von Säften von *M. citrifolia*.** Dargestellt ist die Antioxidative Kapazität bestimmt als Trolox-Äquivalente [mmol Trolox/L] und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu als Gallussäure-Äquivalente [mg GAE/L] der authentischen Noni-Säfte von unreifen Früchten (TAunreif, HAunreif), reifen Früchten (TAreif, HAreif, CRreif, CUreif) und fermentierten Säften (TAmeferm, TAfullferm, HAmeferm, HAfullferm).

Die antioxidative Kapazität lag bei den Säften aus unreifen Früchten zwischen 0,7 und 1,9 mmol Trolox/L. Bei den Säften aus den reifen Früchten wurden signifikant höhere antioxidative Kapazitäten mit 3,6–5,9 mmol Trolox/L detektiert (Abb. 3-17). Die TEAC-Werte der

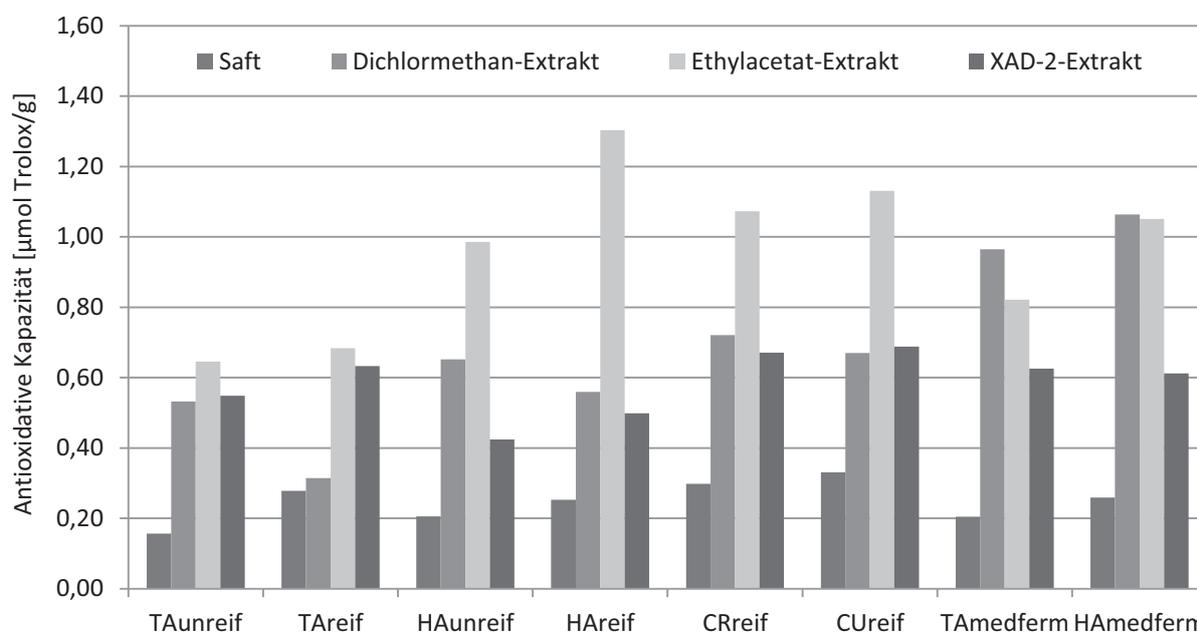
Säfte mit unterschiedlichen Reifestadien differierten also deutlich. Die Reifung der Früchte und die damit verbundene Veränderung der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe spiegelt sich auch in den Säften wieder. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Daten von CHAN-BLANCO *et al.* Hier konnten kaum Änderungen der antioxidativen Kapazität zwischen unreifen und reifen Früchten festgestellt werden (57). Die TEAC-Werte für die Noni-Säfte aus reifen Früchten liegen im Bereich von rotem Trauben-, rotem Johannisbeer-, Blutorangen- und Cranberrysaft und höher als Apfel-, Orangen-, Zitronen- und Ananassaft (228). Die relativ hohen Gehalte für das antioxidative Potential beruhen nach Dussosoy *et al.* auf den (poly)phenolischen Inhaltsstoffen und dem hohen Vitamin-C-Gehalt in den Noni-Säften (192).

Wird der Gesamtphenolgehalt der frischen Säfte betrachtet, zeigt sich, dass die Säfte aus unreifen Früchten Werte an Gesamtphenolen von 430 mg GAE/L für TAunreif bzw. 203 mg GAE/L für HAunreif aufwiesen. Die Werte für die reifen Früchte TAreif und HAreif lagen mit 867 mg GAE/L bzw. 788 mg GAE/L deutlich höher. Der Anstieg des Gehaltes an Gesamtphenolen scheint damit verantwortlich zu sein für den Anstieg der antioxidativen Kapazität. Die Noni-Säfte aus reifen Früchten aus Costa Rica und Kuba lagen mit 527 mg GAE/L bzw. 431 mg GAE/L etwas niedriger. Die Werte für den Gesamtphenolgehalt von Noni-Säften aus reifen Früchten lagen damit im Bereich für Apfel-, Grapefruit- und Zitronensaft (228). Der Anstieg des Phenolgehalts während der Fruchtreifung konnte auch von CHAN-BLANCO *et al.* festgestellt werden (57).

Zwei Wochen fermentierte Säfte von *M. citrifolia* (TAmeferm und HAmeferm) wiesen Werte von 4,1–5,2 mmol Trolox/L im TEAC-Assay auf. Die Werte unterschieden sich also nicht von den Werten der Säfte aus frischen Früchten (3,6–5,9 mmol Trolox/L). Bei den vier Wochen fermentierten Säften konnten im Vergleich zu den zwei Wochen fermentierten Säften deutlich niedrigere Werte mit 0,5–1,7 mmol Trolox/L nachgewiesen werden. Die vier Wochen fermentierten Säfte lagen im Bereich der Säfte unreifer Früchte (0,7–1,9 mmol Trolox/L). Dieser Abfall des antioxidativen Potentials während der Fermentation konnte auch von YANG *et al.* beobachtet werden, die einen Verlust des antioxidativen Potentials nach einer Fermentationszeit von drei Monaten von ca. 90 % im Vergleich zu den frischen Säften feststellen konnten. Dieser Verlust könnte aus dem Abbau von Vitamin C resultieren (229).

Wird der Gesamtphenolgehalt der fermentierten Säfte betrachtet, zeigten sich für die zwei Wochen fermentierten Säfte Werte von 623 mg GAE/L für TAmeferm bzw. 508 mg GAE/L für HAmeferm. Es zeigten sich also kaum Veränderungen zu den frischen Säften aus reifen Früchten (431–867 mg GAE/L). Interessantere Ergebnisse lieferte die Entwicklung des Gesamtphenolgehalts in den fermentierten Säften. So stiegen diese in den vier Wochen fermentierten Säften TAffullferm und HAffullferm auf 1016 mg GAE/L bzw. 1498 mg GAE/L an

(Abb. 3-17). Dieser Anstieg konnte auch von CHAN-BLANCO *et al.* beobachtet werden. Bei der Saftgewinnung durch Abpressen ist anzunehmen, dass nur ein geringer Anteil der in der Pulpe gebundenen Polyphenole in den Saft übergeht. Durch die Fermentation der Früchte stehen diese längere Zeit in Kontakt mit dem Saft und eine erhöhte Extraktion polyphenolischer Verbindungen aus der Pulpe (und den Steinen) ist dadurch möglich. Dieser Effekt kann durch bei der Fermentation entstehendes Ethanol noch verstärkt werden (57). Bei der näheren Betrachtung der antioxidativen Kapazitäten der Extrakte zeigte sich, dass die gefriergetrockneten Säfte die geringsten Werte mit 0,16–0,33  $\mu\text{mol Trolox/g}$  aufwiesen. Die Säfte aus unreifen Früchten, TAunreif und HAunreif, wiesen dabei niedrigere Werte mit 0,16  $\mu\text{mol Trolox/g}$  bzw. 0,21  $\mu\text{mol Trolox/g}$  auf als die Säfte aus reifen Früchten, TAreif und HAreif, mit 0,28  $\mu\text{mol Trolox/g}$  bzw. 0,25  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (Abb. 3-18). Dieses Ergebnis deckt sich mit den entsprechenden Werten der Säfte (Abb. 3-17).



**Abb. 3-18: Antioxidative Kapazität der Extrakte von Säften aus *M. citrifolia*.** Dargestellt ist die antioxidative Kapazität als Trolox-Äquivalente [ $\mu\text{mol Trolox/g}$ ] von gefriergetrocknetem Saft, des Dichlormethan-, Ethylacetat- und XAD-2-Extrakts von frischen Säften aus unreifen Früchten (TAunreif, HAunreif), reifen Früchten (TAreif, HAreif, CRreif, CUreif) und fermentierten Säften (TAmeferm, HAmeferm). Die Vergleichssubstanzen Ascorbinsäure und Catechin wiesen Werte von 5,10 bzw. 3,71  $\mu\text{mol Trolox/g}$  auf.

Nach der Fraktionierung mit Lösungsmitteln ansteigender Polarität (Dichlormethan, Ethylacetat) und Adsorption der übrigen hochpolaren Phase an XAD-2 konnte eine Anreicherung antioxidativ wirksamer Verbindungen in allen Extrakten nachgewiesen werden. In den frischen Säften von HAunreif, HAreif, CRreif und CUreif waren die Werte für die Ethylacetat-Extrakte mit 0,99–1,30  $\mu\text{mol Trolox/g}$  deutlich höher als für die Dichlormethan-Extrakte mit

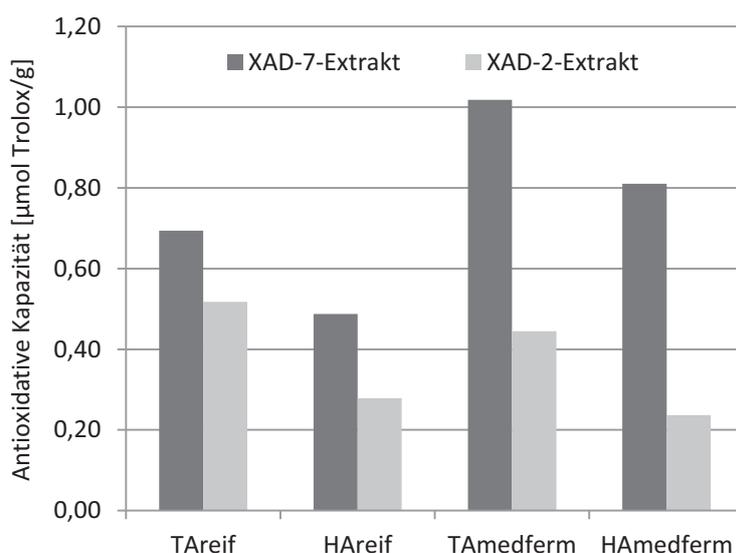
Werten von 0,65–0,72  $\mu\text{mol Trolox/g}$  und XAD-2-Extrakte mit Werten von 0,42–0,69  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . Bei TAunreif und TAreif ergaben sich Werte für die Ethylacetat-Extrakte von 0,65 bzw. 0,68  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . Hier wiesen die XAD-2-Extrakte jedoch nur geringfügig niedrigere Werte mit 0,55  $\mu\text{mol Trolox/g}$  für TAunreif und 0,63  $\mu\text{mol Trolox/g}$  für TAreif auf.

Die gefriergetrockneten fermentierten Säfte TAmeferm und HAmeferm zeigten mit 0,20 bzw. 0,26  $\mu\text{mol Trolox/g}$  keine Unterschiede zu den gefriergetrockneten Extrakten der frischen Säfte, was auch in Abb. 3-17 gezeigt werden konnte. Nach der Flüssig-Flüssig-Fraktionierung der fermentierten Säfte war ebenfalls in allen Extrakten (Dichlormethan-, Ethylacetat-, XAD-2-Extrakt) eine Anreicherung antioxidativ wirksamer Verbindungen zu verzeichnen. Auffällig war, dass die Werte für die Dichlormethan-Extrakte während der Fermentation angestiegen sind. Die Werte beliefen sich hier auf 0,96  $\mu\text{mol Trolox/g}$  für TAmeferm und 1,06  $\mu\text{mol Trolox/g}$  für HAmeferm. Im Vergleich dazu lagen die Werte in den frischen Säften aus *M. citrifolia* mit 0,31–0,72  $\mu\text{mol Trolox/g}$  deutlich niedriger. Die Werte für die Ethylacetat-Extrakte von TAmeferm und HAmeferm waren mit 0,82 bzw. 1,05  $\mu\text{mol Trolox/g}$  geringfügig niedriger bzw. gleich im Gegensatz zu den Werten der Dichlormethan-Extrakte. Ein antioxidatives Potential der Größenordnung der Vergleichssubstanz Ascorbinsäure (5,10  $\mu\text{mol Trolox/g}$ ) konnte jedoch von keinem der getesteten Extrakte erreicht werden.

Verantwortlich für den Anstieg des antioxidativen Potentials der Dichlormethan-Extrakte nach der Fermentation ist wahrscheinlich die Freisetzung von antioxidativ wirksamen Aglykonen aus ihren glykosylierten Vorstufen. Diese Vorstufen lagen in frischen Säften aufgrund ihrer größeren Polarität in den Ethylacetat- oder XAD-2-Extrakten vor. Im Zuge des Fermentationsprozesses kommt es zur Abspaltung der Kohlenhydratreste, wodurch die Aglykone dann im unpolaren Dichlormethan-Extrakt zu finden waren. Flavonoide sowie Cumarinderivate konnten bereits als sehr potente Hydroxylradikalfänger in fermentiertem Saft aus den Früchten von *M. citrifolia* nachgewiesen werden (78). Bei den Flavonoiden handelte es sich dabei um Kämpferol und Quercetin sowie deren Derivate, die aus Noni bekannt sind (vgl. 2.1.6.1) und eine wichtige Rolle als natürliche Antioxidantien spielen (230). Die Cumarinderivate Aesculetin und Scopoletin sind in Noni-Saft von besonderer Bedeutung als Radikalfänger. Für beide Verbindungen konnten antioxidative Wirkungen beschrieben werden (231).

Über die Freisetzung von unpolaren Aglykonen durch Abspaltung von Kohlenhydratresten hinaus wäre eine Extraktion antioxidativ wirksamer Verbindungen aus der Pulpe oder den Steinen während des Fermentationsprozesses denkbar. Durch den Kontakt des Saftes mit diesen Bestandteilen können Verbindungen in den Saft übergehen, die dann zu einer erhöhten antioxidativen Kapazität des Dichlormethan-Extrakts beitragen.

Des Weiteren wurden die antioxidativen Potentiale der Extrakte der Säfte betrachtet, welche durch aufeinanderfolgende Adsorption an XAD-7 und XAD-2 gewonnen wurden. Die frischen Säfte TAreif und HAreif zeigten Werte in den XAD-7-Extrakten von 0,69  $\mu\text{mol Trolox/g}$  bzw. 0,49  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . Diese waren damit niedriger als in den XAD-7-Extrakten der fermentierten Säfte TAmeferm und HAmeferm mit 1,02  $\mu\text{mol Trolox/g}$  bzw. 0,82  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (Abb. 3-19). Die antioxidativen Kapazitäten der XAD-2-Extrakte lagen bei allen Säften niedriger als die der vorab gewonnenen XAD-7-Extrakte. Diese Feststellung verwundert nicht, da an XAD-7 vorwiegend phenolische und polyphenolische Komponenten adsorbiert werden, die bekannt für ihre Eigenschaften als Radikalfänger sind (230). Die antioxidativen Kapazitäten der XAD-2-Extrakte der frischen Säfte TAreif und HAreif beliefen sich auf 0,52  $\mu\text{mol Trolox/g}$  bzw. 0,28  $\mu\text{mol Trolox/g}$ , die Werte für die fermentierten Säfte TAmeferm und HAmeferm lagen bei 0,44  $\mu\text{mol Trolox/g}$  bzw. 0,24  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . In XAD-2-Extrakten finden demnach während der Fermentation nur sehr geringe Veränderungen statt.



**Abb. 3-19: Antioxidative Kapazität der XAD-7- und XAD-2-Extrakte von Säften von *M. citrifolia*.** Dargestellt ist die antioxidative Kapazität bestimmt als Trolox-Äquivalente [ $\mu\text{mol Trolox/g}$ ] der XAD-7- und XAD-2-Extrakte von frischen (TAreif und HAreif) und fermentierten Säften (TAmeferm und HAmeferm). Die Vergleichssubstanzen Ascorbinsäure und Catechin wiesen Werte von 5,10 bzw. 3,71  $\mu\text{mol Trolox/g}$  auf.

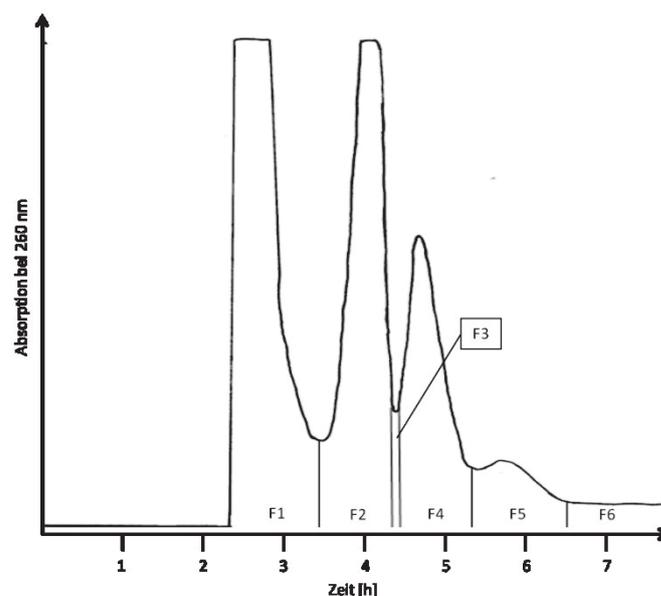
Verantwortlich für die höheren Werte der antioxidativen Kapazität in den XAD-7-Extrakten der fermentierten Säfte könnten auch hier wieder Aglykone sein, die durch die Abspaltung von Kohlenhydratresten während der Fermentation aus glykosylierten Verbindungen entstehen. Weiterhin kann eine Extraktion antioxidativer Komponenten aus der Pulpe und den Steinen während der Fermentation angenommen werden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass frische Säfte aus reifen Früchten und kurzzeitig fermentierte Säfte (zwei Wochen) die höchsten antioxidativen Potentiale aufweisen. Während der fortschreitenden Fermentation nimmt das antioxidative Potential ab, was wahrscheinlich auf der Abnahme von Vitamin C als Radikalfänger beruht. Des Weiteren nimmt im Zuge der Fermentation der Gehalt an phenolischen Verbindungen stark zu, was auf einer längeren Kontaktzeit des Saftes mit der Pulpe und den Steinen beruhen könnte. Werden die Extrakte der Säfte betrachtet, zeigt sich, dass in den frischen Säften die Verbindungen mit dem höchsten antioxidativen Potential im polaren Ethylacetat-Extrakt vorliegen. Bei den fermentierten Säften verschiebt sich das Auftreten des stärksten antioxidativen Potentials durch die Freisetzung unpolarer Aglykone aus glykosylierten Vorstufen von Kämpferol und Quercetin in Richtung des weniger polaren Dichlormethan-Extrakts. Darüber hinaus stellen die in Noni vorhandenen Cumarinderivate potente Radikalfänger dar.

### 3.1.1.6 Isolierung und Strukturaufklärung

#### 3.1.1.6.1 Isolierungen aus dem XAD-7-Extrakt von TAreif

Der XAD-7-Extrakt (800 mg) von TAreif wurde mittels HSCCC getrennt (*CCCSytem 1*). Das UV-Chromatogramm der Trennung bei 260 nm ist in Abb. 3-20 gezeigt. Die Trennung ergab fünf Fraktionen (F1–F5) sowie die Coil-Fraktion (F6), die mittels HPLC-DAD (*HPLCSytem 4*) und DC (*DCSytem 1*) eingeteilt wurden.



**Abb. 3-20: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7-Extrakts von TAreif bei 260 nm.** Nach der Trennung konnten fünf Fraktionen (F1–F5) sowie die Coil-Fraktion (F6) eingeteilt werden. Für die Trennung wurde *CCCSytem 1* verwendet.

Diese Trennung wurde mit dem gleichen Extrakt viermal durchgeführt, um größere Auswaagen der einzelnen Fraktionen für weitere Auftrennungen zu erzielen. Fraktion F1 zeigte ein sehr komplexes Gemisch an unterschiedlichen Substanzen. Diese Fraktion wurde mittels HSCCC rechromatographiert (vgl. Abb. 3-22). Aus Fraktion F2 konnte 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose isoliert werden. Die Strukturauflösung dieser Verbindung ist im Folgenden angegeben. In Fraktion F3 konnte Rutin ohne weitere Aufarbeitung identifiziert werden. Aus der Coil-Fraktion (Fraktion F6) konnte Scopoletin mittels präparativer HPLC isoliert werden. Die Daten zur Strukturauflösung von Scopoletin und Rutin sind im Anhang unter 7.1 zu finden.

### 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose

Aus der CCC-Fraktion F2 des XAD-7-Extraktes von TAreif gelang nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC (*präpHPLCSystem 4*) die Isolierung von 13,3 mg einer blassgelben Substanz. Die Charakterisierung erfolgte mittels 1-D  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie sowie den 2-D-Experimenten  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ , HSQC, HMBC und NOESY. Die 1-D-NMR-Daten sind in Tab. 3-10 aufgeführt.

**Tab. 3-10:**  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 150 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  aufgenommen.

C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]
1		164.62 s	2'	3.42–3.50 (m, 1H)	82.07 d
2	6.07 (d, J=15.0 Hz, 1H)	121.17 d	3'	3.42–3.50 (m, 1H)	75.57 d
3	7.60 (dd, J=11.5, 15.0 Hz, 1H)	140.00 d	4'	3.19 (ddd, J=5.5, 8.5, 9.5 Hz, 1H)	68.98 d
4	6.22 (dd, J=11.5, 11.5 Hz, 1H)	126.29 d	5'	3.27 (ddd, J=2.0, 5.5, 9.5 Hz, 1H)	77.60 d
5	5.88 (dt, J=8.0, 10.5 Hz, 1H)	139.75 d	6'	3.42–3.50 (m, 1H) 3.65 (ddd, J=2.0, 5.5, 12.0 Hz, 1H)	60.30 t*
6	3.04 (dd, J=7.0, 7.0 Hz, 2H)	27.26 t	1''	4.36 (d, J=8.0 Hz, 1 H)	104.71 d
7	5.30 (dtt, J=1.5, 7.5, 10.5 Hz, 1H)	125.61 d	2''	2.94 (ddd, J=8.5, 8.5, 3.0 Hz, 1H)	74.51 d
8	5.43 (dtt, J=1.5, 7.5, 10.5 Hz, 1H)	132.62 d	3''	3.09–3.16 (m, 1H)	76.08 d
9	2.07 (dq, J=1.5, 7.5 Hz, 2H)	20.07 t	4''	3.09–3.16 (m, 1H)	69.24 d
10	0.94 (t, J=7.5 Hz, 3H)	14.05 q	5''	2.99 (ddd, J=9.0, 4.5, 2.0 Hz, 1H)	76.76 d
1'	5.53 (d, J=7.5 Hz, 1H)	92.55 d	6''	3.39 (dd, J=5.0, 6.0 Hz, 1H) 3.42–3.50 (m, 1H)	60.32 t*

\*Signale austauschbar

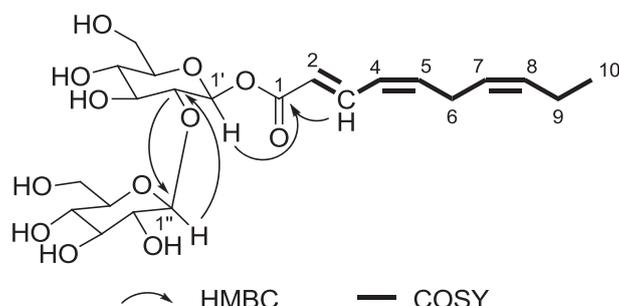
Im HR-ESI-MS-Experiment zeigte sich ein Peak mit  $m/z$  513.1942  $[M+Na]^+$ , was der Molekülformel von  $C_{22}H_{34}O_{12}$  entspricht. Die Fragmentierungen für die Verbindung sind in Tab. 3-11 aufgeführt.

**Tab. 3-11: Fragmentierung von 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose.** Angegeben sind die MS<sup>2</sup>-Fragmentierungen im negativen und positiven Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS).

Modus/Precursor-Ion	Fragmentierung MS <sup>2</sup> [ $m/z$ ]
negativ ( $m/z$ 489 $[M-H]^-$ )	<b>263</b> , 471 (23), 323 (21), 179 (17), 411 (11), 327 (9)
positiv ( $m/z$ 513 $[M+Na]^+$ )	<b>347</b> , 329 (5)

Die NMR-Signale 5.53 ( $d$ ,  $J = 7.5$  Hz) und 4.36 ( $d$ ,  $J = 8.0$  Hz) deuteten auf zwei anomere Protonen hin, welche von zwei Monosacchariden resultieren. Die Kopplungskonstanten von 7.5 Hz bzw. 8.0 Hz wiesen überdies auf eine  $\beta$ -Konfiguration hin. Unterstützt wurde diese Vermutung durch acht Methin-Gruppen im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zwischen 68.98 ppm und 82.07 ppm. Überdies waren zwei Methylen-Gruppen bei 60.30 ppm und 60.32 ppm zu finden, was auf eine Glucose (CH<sub>2</sub>OH-Gruppe in Position 6) zurückzuführen ist. Darüber hinaus war im Massenspektrum ein Fragment mit  $m/z$  179 zu detektieren, was ebenfalls auf eine Glucose hinweist.

Die Zuordnung der zwölf Signale im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zu zwei Glucose-Molekülen steht im Einklang mit den Fragmenten von  $m/z$  323  $(M-C_{10}H_{14}O_2-H)^-$  bzw.  $m/z$  347  $(M-C_{10}H_{14}O_2+Na)^+$ , welche dem Molekulgewicht von zwei verknüpften Glucose-Molekülen entsprechen. Die zehn <sup>13</sup>C-NMR-Signale (14.05  $q$ , 20.07  $t$ , 27.26  $t$ , 121.17  $d$ , 125.61  $d$ , 126.29  $d$ , 132.62  $d$ , 139.75  $d$ , 140.00  $d$ , 164.62  $s$ ) und die zugehörigen <sup>1</sup>H-NMR-Signale bei 0.94 ( $t$ ,  $J = 7.5$  Hz, 3H), 2.07 ( $dq$ ,  $J = 1.5, 7.5$  Hz, 2H), 3.04 ( $dd$ ,  $J = 7.0, 7.0$  Hz, 2H), 6.07 ( $d$ ,  $J = 15.0$  Hz, 1H), 5.30 ( $dt$ ,  $J = 1.5, 7.5, 10.5$  Hz, 1H), 6.22 ( $dd$ ,  $J = 11.5, 11.5$  Hz, 1H), 5.43 ( $dt$ ,  $J = 1.5, 7.5, 10.5$  Hz, 1H), 5.88 ( $dt$ ,  $J = 8.0, 10.5$  Hz, 1H) und 7.60 ( $dd$ ,  $J = 11.5, 15.0$  Hz, 1H) deuteten auf eine dreifach ungesättigte Fettsäure mit zehn Kohlenstoffatomen hin. Die Position der Doppelbindungen konnte mittels <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, wie in Abb. 3-21 dargestellt, ermittelt werden.



**Abb. 3-21: Strukturaufklärung von 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose.** Gezeigt sind wichtige <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY- und HMBC-Kopplungen.

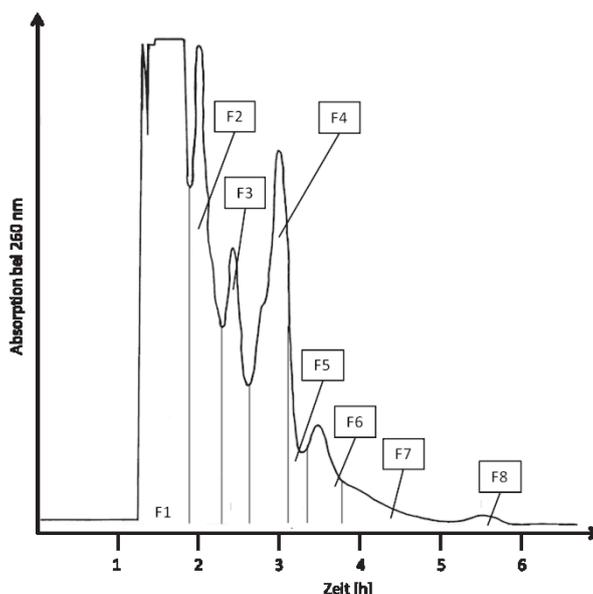
Die Konfiguration der Doppelbindungen konnte anhand der Kopplungskonstanten der Protonen ermittelt werden. So betrug die Kopplungskonstante zwischen den Protonen 2-H und 3-H 15.0 Hz, was für eine *trans*-Konfiguration spricht, während die Kopplungskonstanten zwischen 4-H und 5-H sowie zwischen 7-H und 8-H bei 11.5 Hz bzw. 10.5 Hz lagen, was auf eine *cis*-Konfiguration hindeutet.

Die Verknüpfung der Fettsäure mit der Glucose-Einheit wurde mittels HMBC ermittelt, welche Kopplungen von C-1 zu H-1' und von C-1' zu H-2 zeigte (Abb. 3-21). Die Fettsäure ist demnach an C-1' mit der Glucose verestert. Einen weiteren Schritt der Strukturaufklärung stellte die Aufklärung der Verknüfungsposition der beiden Glucose-Moleküle dar. Zunächst fiel auf, dass C-2' eine hohe Verschiebung von  $\delta_c = 82.07$  aufweist. Kopplungen von C-2' zu H-1'' und von C-1'' zu H-2' im HMBC zeigten, dass die Glucose-Moleküle 2',1'' verknüpft sind. Zwei Glucose-Moleküle, die eine  $\beta$ -1,2-glykosidische Bindung aufweisen, werden als Sophorose bezeichnet. Die Verbindung konnte demnach als 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose identifiziert werden. Diese Verbindung ist nach bestem Wissen bis jetzt in der Literatur nicht bekannt. Die freie Fettsäure (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid konnte jedoch 1999 erstmalig in einer mit einem Stamm des Bakteriums *Streptomyces viridochromogenes* inkubierten Kulturlösung nachgewiesen werden (232). Zur Isolierung der freien Fettsäure aus der Pulpe von *M. citrifolia* sei auf 3.1.2.4.2 verwiesen.

### HSCCC-Trennung von Fraktion F1

Fraktion F1 des XAD-7-Extrakts von TAreif zeigte ein sehr komplexes Spektrum an Verbindungen. Zur Auftrennung dieser Fraktion wurden verschiedene Fließmittelsysteme getestet. Dabei zeigte sich, dass durch Zusatz von 0,1 % TFA eine günstige Phasentrennung und vor allem Verteilung der Verbindungen in beiden Phasen möglich ist (CCCSystem 4). Das UV-Chromatogramm der Trennung ist in Abb. 3-22 gezeigt. Mittels DC (DCSystem 2) und HPLC (HPLCSystem 4) konnten acht Fraktionen (F1–F8) separiert werden. In der Coil-Fraktion konnten keine Verbindungen nachgewiesen werden.

Die Fraktion F1 der erneuten Trennung wurde zur weiteren Isolierung mittels präparativer HPLC (*präpHPLCSystem 1*) eingesetzt. Aus dieser Fraktion konnten Scopoletin-7-O-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1''→6']- $\beta$ -D-glucopyranosid), 10-Dehydrogardenosid und 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid als Gemisch sowie ein Dimer von 10-Dehydrogardenosid isoliert werden, deren Strukturaufklärung nachfolgend erläutert ist. Des Weiteren konnte Scopoletin-7-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1''→6']- $\beta$ -D-glucopyranosid) isoliert werden. Die NMR-Daten zu dieser Verbindung sind im Anhang unter 7.1 zu finden.

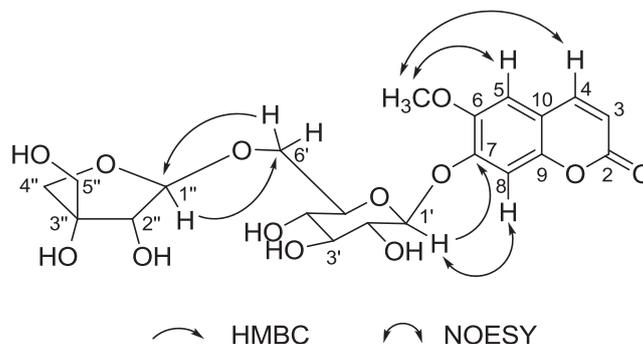


**Abb. 3-22: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung von Fraktion F1 des XAD-7-Extrakts von TAreif.** Nach der Trennung konnten acht Fraktionen (F1–F8) erhalten werden. Für die Trennung wurde das CCCSystem 4 verwendet.

### Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid) (Hymexelsin)

Aus der CCC-Fraktion F1 konnten 4 mg einer gelben Verbindung isoliert werden. Die Charakterisierung der Verbindung erfolgte mittels 1-D- $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie sowie den 2-D-Experimenten  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, HSQC, HMBC und NOESY. Die 1-D-NMR-Daten sind in Tab. 3-12 aufgeführt.

Das HR-ESI-MS-Experiment wies eine Masse von  $m/z$  509.1265  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  auf, was einer Molekülformel von  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$  entspricht. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte vier tiefelfeldverschobene Signale mit  $\delta_{\text{H}}$  6.35 (*d*,  $J=9.5$  Hz, 1H), 7.98 (*d*,  $J=9.5$  Hz, 1H), 7.16 (*s*, 1H) und 7.31 (*s*, 1H). Dies ließ vermuten, dass es sich um eine Cumaringrundstruktur handelt, die an zwei Positionen substituiert ist. Die beiden  $^1\text{H}$ -NMR-Signale  $\delta_{\text{H}}$  7.16 (*s*, 1H) und 7.31 (*s*, 1H) ließen vermuten, dass die Substitutionen an Position 6 und Position 7 stattgefunden haben.



**Abb. 3-23: Strukturaufklärung von Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid).** Gezeigt sind wichtige HMBC- und NOESY-Kopplungen.

Darüber hinaus war im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum eine Verschiebung von  $\delta_{\text{C}}$  55.87 (*q*) zu erkennen, welche auf eine Methoxygruppe hinweist. Dies wurde unterstützt durch ein Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  3.82 im  $^1\text{H}$ -NMR, welches für drei Protonen integrierte. NOESY-Kopplungen mit H-5 und H-4 zeigten, dass die Methoxygruppe an Position 6 mit der Cumarinstruktur verknüpft ist (Abb. 3-23).

Des Weiteren waren im  $^{13}\text{C}$ -NMR die zwei Signale mit  $\delta_{\text{C}}$  99.36 und 109.19 mit den zugehörigen  $^1\text{H}$ -NMR-Daten  $\delta_{\text{H}}$  5.09 (*d*,  $J=7.5$  Hz, 1H) und 4.77 (*d*,  $J=3.0$  Hz, 1H) auffällig. Diese konnten den Protonen an C1' bzw. C1'' der zwei Monosaccharide, einer Glucose und einer Apiose, zugeordnet werden. Die Kopplungskonstanten von  $J=7.5$  Hz für die Glucose und  $J=3.0$  Hz für die Apiose zeigten, dass es sich jeweils um eine  $\beta$ -Konfiguration handelt (233).

**Tab. 3-12:  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid).** Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) bzw. 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR) in DMSO-*d*<sub>6</sub> aufgenommen.

C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]
2		160.51 <i>s</i>	2'	3.25–3.35 ( <i>m</i> , 3H)*	72.85 <i>d</i>
3	6.35 ( <i>d</i> , $J=9.5$ Hz, 1H)	113.29 <i>d</i>	3'	3.25–3.35 ( <i>m</i> , 3H)*	76.51 <i>d</i>
4	7.98 ( <i>d</i> , $J=9.5$ Hz, 1H)	144.11 <i>d</i>	4'	3.13 ( <i>m</i> , 1H)	69.57 <i>d</i>
5	7.31 ( <i>s</i> , 1H)	109.51 <i>d</i>	5'	3.61 ( <i>ddd</i> , $J=2.0, 6.5, 10.5$ Hz, 1H)	75.28 <i>d</i>
6		145.82 <i>s</i>	6'	3.61 ( <i>dd</i> , $J=2.0, 10.5$ Hz, 1H) 3.43 ( <i>dd</i> , $J=6.5, 10.5$ Hz, 1H)	67.35 <i>t</i>
7		148.80 <i>s</i>	1''	4.77 ( <i>d</i> , $J=3.0$ Hz, 1H)	109.19 <i>d</i>
8	7.16 ( <i>s</i> , 1H)	102.88 <i>d</i>	2''	3.71 ( <i>dd</i> , $J=3.0, 6.0$ Hz, 1H)	75.84 <i>d</i>
9		149.65 <i>s</i>	3''		78.66 <i>s</i>
10		112.22 <i>s</i>	4''	3.88 ( <i>d</i> , $J=9.5$ Hz, 1H)	73.29 <i>d</i>
OCH <sub>3</sub>	3.82 ( <i>s</i> , 3H)	55.87 <i>q</i>	5''	3.58 ( <i>d</i> , $J=9.5$ Hz, 1H)	63.22 <i>d</i>
1'	5.09 ( <i>d</i> , $J=7.5$ Hz, 1H)	99.36 <i>d</i>		3.25–3.35 ( <i>m</i> , 3H)*	

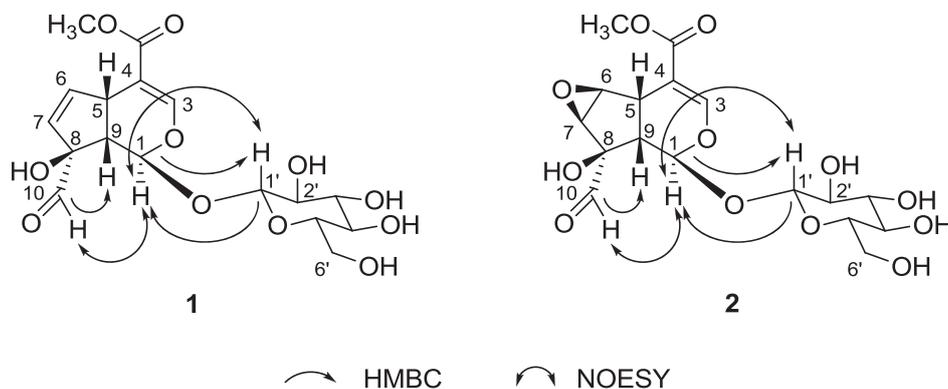
\*Signale überlappen

Aufgrund der Methoxygruppe in Position 6 stand für die Verknüpfung des Saccharidteils mit dem Aglykon nur noch Position 7 zur Verfügung. Die Zuordnung konnte mittels HMBC- und NOESY-Kopplungen erfolgen (Abb. 3-23). Die Verknüpfung der Monosaccharide untereinander konnte ebenfalls durch HMBC festgelegt werden. Cross-Peaks zwischen 1'' und 6' bestätigten die Position der Verknüpfung der beiden Monosaccharide.

Die Verbindung konnte schließlich als Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid) (Hymexelsin) identifiziert werden. Die Daten stimmen mit den in der Literatur angegeben gut überein (195). Die Verbindung war bis zu diesem Zeitpunkt aus *M. citrifolia* nicht bekannt.

### 10-Dehydrogardenosid und 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid

Aus Fraktion F1 konnten weiterhin 7,6 mg eines Zwei-Substanzen-Gemisches isoliert werden. Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte mittels 1-D- $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie sowie den 2-D-Experimenten  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, HSQC, HMBC und NOESY.



**Abb. 3-24: Strukturaufklärung von 10-Dehydrogardenosid (1) und 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid (2).** Gezeigt sind wichtige HMBC- und NOESY-Kopplungen.

Die Molekülmassen wurden mit HR-ESI-MS als  $m/z$  425.1051  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  für 10-Dehydrogardenosid (1) und  $m/z$  441.1002  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  für 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid (2) bestimmt. Daraus ergaben sich die Molekülformeln  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  für 1 bzw.  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$  für 2. Für das Gemisch konnte ferner eine Verteilung von 6:5 (1 : 2) anhand des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums berechnet werden. Verbindung 1 wies die für Iridoide charakteristischen Signale von  $\delta_{\text{H}-1}$  5.56 ( $d$ ,  $J=2.5$  Hz, 1H),  $\delta_{\text{H}-3}$  7.29 ( $d$ ,  $J=1.5$  Hz) und  $\delta_{\text{H}}$  3.66 ( $s$ ) auf. Das Singulett  $\delta_{\text{H}}$  3.66 für die Methylgruppe integrierte für drei Protonen. Darüber hinaus waren die beiden Protonen an C-6 und C-7 mit  $\delta_{\text{H}}$  6.35 ( $dd$ ,  $J=3.0, 6.0$  Hz, 1H) und 5.57 ( $dd$ ,  $J=1.5, 6.0$  Hz, 1H) charakteristisch. Diese deuteten auf eine Doppelbindung in dieser Position hin, was durch die Verschiebungen im  $^{13}\text{C}$ -NMR von  $\delta_{\text{C}-6}$  137.36  $d$  und  $\delta_{\text{C}-7}$  132.02  $d$  gestützt wurde (Tab. 3-13).

Ungewöhnlich stark tieffeldverschoben war das Singulett  $\delta_{\text{H}-10}$  ( $\delta_{\text{H}}$  9.42). Das zugehörige Kohlenstoffatom wies eine Verschiebung von  $\delta_{\text{C}-10}$  200.39  $d$  auf. Dies deutete auf eine Aldehydgruppe hin. Die Position der Aldehydgruppe an C-8 konnte durch HMBC-Kopplung festgelegt werden. Um die Stereochemie an C-8 zu bestimmen, mussten NOESY-Experimente durchgeführt werden. Im NOESY-Spektrum konnten starke cross-peaks zwischen H-10 und H-1 festgestellt werden (Abb. 3-24). In Übereinstimmung mit SANG *et al.* konnte das Stereozentrum an C-8 als  $\alpha$ -orientiert festgelegt werden (234). Zusätzlich konnte ein Monosaccharid-Teil identifiziert werden. Die Kopplungskonstante an C-1' mit  $J=8.0$  Hz sowie die Methylengruppe C-6' mit 60.82 deuteten auf das  $\beta$ -Anomer einer Glucopyranose hin. Die Unterscheidung zur Galactopyranose konnte anhand von Literaturdaten getroffen werden

(235). Die HMBC-Korrelationen C-1/H-1' bzw. C-1'/H-1 und NOESY-Korrelationen (H-1/H-1') zeigten, dass die Verknüpfung der Glucopyranose an Position C-1 des Aglykons stattfindet.

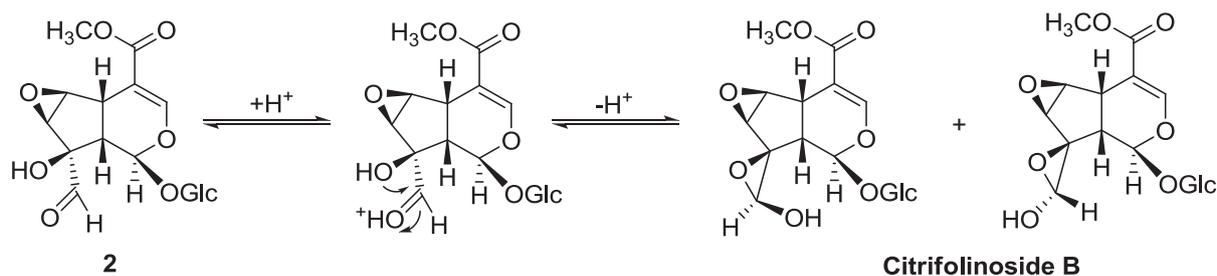
**Tab. 3-13:**  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von **10-Dehydrogardenosid** und **6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid**. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 10-Dehydrogardenosid und 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 150 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in DMSO- $d_6$  aufgenommen.

10-Dehydrogardenosid (1)			6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid (2)		
C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]
1	5.56 ( <i>d</i> , $J=2.5$ Hz, 1H)	91.10 <i>d</i>	1	5.74 ( <i>d</i> , $J=1.0$ Hz, 1H)	90.58 <i>d</i>
3	7.29 ( <i>d</i> , $J=1.5$ Hz, 1H)	150.12 <i>d</i>	3	7.28 ( <i>d</i> , $J=1.5$ Hz, 1H)	151.88 <i>d</i>
4		110.06 <i>s</i>	4		105.81 <i>s</i>
5	3.66 ( <i>m</i> , 1H)	36.97 <i>d</i>	5	3.14 ( <i>m</i> , 1H)	31.49 <i>d</i>
6	6.35 ( <i>dd</i> , $J=3.0, 6.0$ Hz, 1H)	137.36 <i>d</i>	6	3.39 ( <i>d</i> , $J=2.5$ Hz, 1H)	58.17 <i>d</i>
7	5.57 ( <i>dd</i> , $J=1.5, 6.0$ Hz, 1H)	132.02 <i>d</i>	7	3.86 ( <i>d</i> , $J=2.5$ Hz, 1H)	56.79 <i>d</i>
8		88.98 <i>s</i>	8		82.39 <i>s</i>
9	2.65 ( <i>dd</i> , $J=2.5, 8.5$ Hz, 1H)	53.15 <i>d</i>	9	2.25 ( <i>dd</i> , $J=1.0, 8.5$ Hz, 1H)	47.10 <i>d</i>
10	9.42 ( <i>s</i> , 1H)	200.39 <i>d</i>	10	9.54 ( <i>s</i> , 1H)	201.74 <i>d</i>
COO		165.98 <i>s</i>	COO		165.98 <i>s</i>
CH <sub>3</sub>	3.66 ( <i>s</i> , 3H)	51.17 <i>q</i>	CH <sub>3</sub>	3.60 ( <i>s</i> , 3H)	51.17 <i>q</i>
1'	4.43 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	97.96 <i>d</i>	1'	4.38 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	97.99 <i>d</i>
2'	2.85–2.98 ( <i>m</i> , 2H)*	72.77, <i>d</i>	2'	2.85–2.98 ( <i>m</i> , 2H)*	72.85, <i>d</i>
3'	3.09–3.20 ( <i>m</i> , 4H)*	77.29 <i>d</i>	3'	3.09–3.20 ( <i>m</i> , 4H)*	77.33 <i>d</i>
4'	3.01–3.05 ( <i>m</i> , 2H)*	69.74 <i>d</i>	4'	3.01–3.05 ( <i>m</i> , 2H)*	69.77 <i>d</i>
5'	3.09–3.20 ( <i>m</i> , 4H)*	76.37 <i>d</i>	5'	3.09–3.20 ( <i>m</i> , 4H)*	76.49 <i>d</i>
6'	3.59–3.70 ( <i>m</i> , 2H)*	60.82 <i>t</i>	6'	3.59–3.70 ( <i>m</i> , 2H)*	60.86 <i>t</i>
	3.42–3.49 ( <i>m</i> , 2H)*			3.42–3.49 ( <i>m</i> , 2H)*	

\*Proton mit dem jeweils korrespondierenden Signal austauschbar

Verbindung **2** zeigte sehr ähnliche Signale im  $^1\text{H-NMR}$  sowie im  $^{13}\text{C-NMR}$  bis auf die Positionen C-6 und C-7. Die Protonen waren hier mit  $\delta_{\text{H-6}}$  3.39 (*d*,  $J=2.5$  Hz, 1H) bzw.  $\delta_{\text{H-7}}$  3.86 (*d*,  $J=2.5$  Hz, 1H) deutlich hochfeldverschoben. Dies galt ebenso für die Methingruppen mit 58.17 (C-6) und 56.79 (C-7). Hier konnte anhand von Literaturdaten ein Epoxid an dieser Position identifiziert werden (234). Die Konfiguration des Epoxids konnte darüber hinaus nach DAMTOFT *et al.* anhand der Kopplungskonstante  $J_{1,9}=1.0$  Hz und der Verschiebung von  $\delta_{\text{C-1}} < 99$  (hier:  $\delta_{\text{C-1}}$  90.58) als  $\beta$ -orientiert festgelegt werden (236).

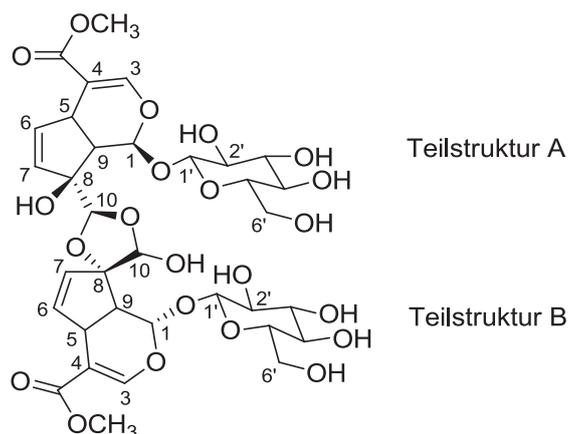
Die Strukturen **1** und **2** waren bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht aus *M. citrifolia* bekannt. Verbindung **2** wurde von SANG *et al.* 2001 als Vorstufe der Citrifolinoside postuliert, welche aus den Blättern von *M. citrifolia* isoliert werden konnten (234). Durch Anlagerung eines Protons am Aldehyd von Verbindung **2** kommt es zur Bildung eines intramolekularen Acetals. Dabei entsteht ein neues Stereozentrum an C-10 (Abb. 3-25).



**Abb. 3-25: Intramolekulare Acetalisierung von 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid (2).** Durch die Anlagerung eines Protons an der Aldehydgruppe von 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid kommt es zu einer intramolekularen Acetalbildung an C-10. Dabei entsteht ein neues Stereozentrum und damit zwei epimere Citrifolinoside. Abb. nach SANG *et al.* verändert (234).

### Dimer von 10-Dehydrogardenosid

Aus Fraktion F1 konnten weiterhin 25 mg einer hellgelben Substanz isoliert werden. Die Charakterisierung dieser Verbindung erfolgte durch 1-D- $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie sowie die 2-D-Experimente  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, HSQC, HMBC und NOESY.



**Abb. 3-26: Struktur des Dimers von 10-Dehydrogardenosid.** Die Verbindung wurde zur besseren Übersichtlichkeit bei der Auswertung in die zwei Teilstrukturen A und B eingeteilt.

Für die Verbindung konnte mit HR-ESI-MS eine Molekülmasse von  $m/z$  827.2218  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ermittelt werden, die der Summenformel  $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_{22}$  zugeordnet werden konnte. Der Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten mit denen von 10-Dehydrogardenosid ließ vermuten, dass es sich um ein Dimer dieser Verbindung handelt (Abb. 3-26). Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Summenformel, welche eine Verdopplung der Anzahl an Kohlenstoff- und Sauerstoffatomen sowie Protonen von 10-Dehydrogardenosid entsprach und dem Fragmentierungsmuster, welches als Hauptfragment im positiven Modus des Molekül-Ions  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  425 ergab. Dies lässt auf die Abspaltung eines 10-Dehydrogardenosid-Monomers schließen (Tab. 3-14).

**Tab. 3-14: Fragmentierung des Dimers von 10-Dehydrogardenosid.** Angegeben sind die MS<sup>2</sup>-Fragmentierungen im positiven Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS).

Precursor-Ion	Fragmentierung MS <sup>2</sup> [m/z]
m/z 827 [M+Na] <sup>+</sup>	425, 665 (65), 633 (56), 408 (15), 647 (13)

Die Signale wurden den zwei Teilstrukturen A und B zugeordnet. Teilstruktur A zeigte folgende Signale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum: δ<sub>H-1</sub> 6.10 (s), δ<sub>H-3</sub> 7.32 (d, J=1.5 Hz), δ<sub>H-5</sub> 3.48 (m), δ<sub>H-6</sub> 6.16 (m), δ<sub>H-7</sub> 5.62 (dd, J=1.5, 6.0 Hz) und δ<sub>H-9</sub> 2.74 (d, J=9.5 Hz). Teilstruktur B zeigte die Signale: δ<sub>H-1</sub> 5.80 (s), δ<sub>H-3</sub> 7.33 (d, J=1.5 Hz), δ<sub>H-5</sub> 3.54 (m), δ<sub>H-6</sub> 6.16 (m), δ<sub>H-7</sub> 5.55 (dd, J=1.5, 6.0 Hz) und δ<sub>H-9</sub> 2.49. Darüber hinaus waren zwei anomere Protonen H-1'A mit δ<sub>H</sub> 4.40 (d, J=8.0 Hz) für Teilstruktur A und H-1'B mit δ<sub>H</sub> 4.50 (d, J=8.0 Hz) für Teilstruktur B vorhanden, die zu zwei β-Glucopyranosiden gehören. Die zugeordneten Protonen und Kohlenstoffatome bestätigten diese Annahme (Tab. 3-15). Die Unterscheidung zur β-D-Galactose wurde nach AGRAWAL *et al.* vorgenommen (235).

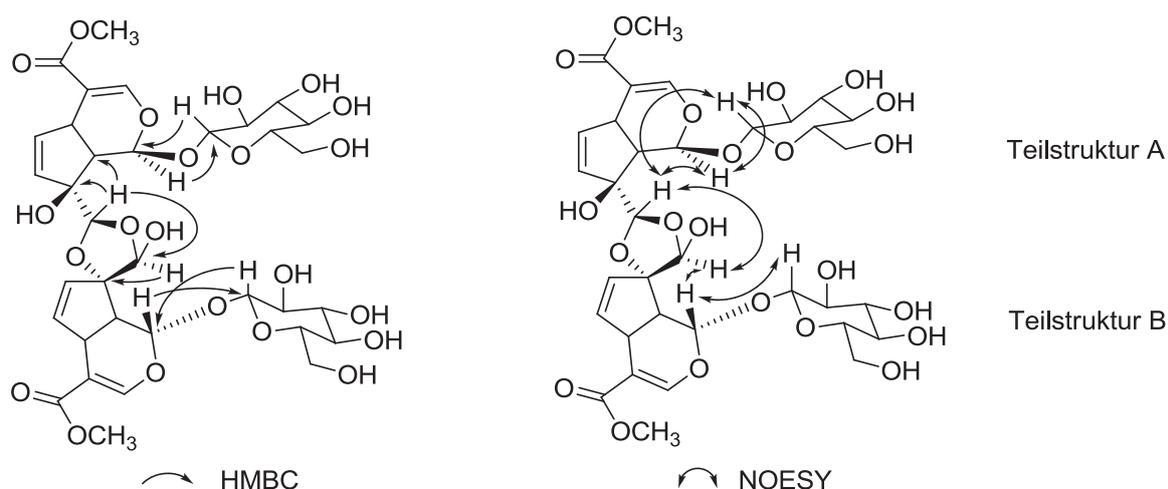
**Tab. 3-15: <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten des Dimers von 10-Dehydrogardenosid.** Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum des Dimers von 10-Dehydrogardenosid. Die Spektren wurden bei 600 MHz (<sup>1</sup>H-NMR) bzw. 150 MHz (<sup>13</sup>C-NMR) in DMSO-d<sub>6</sub> aufgenommen.

Part A			Part B	
C/H	δ <sub>H</sub> [ppm]	δ <sub>C</sub> [ppm]	δ <sub>H</sub> [ppm]	δ <sub>C</sub> [ppm]
1	6.10 (s, 1H)	93.04 d	5.80 (s, 1H)	92.15 d
3	7.32 (d, J=1.5 Hz, 1H)	149.96 d	7.33 (d, J=1.5 Hz, 1H)	150.36 d
4		109.95 s		109.85 s
5	3.48 (m, 1H)	35.75 d	3.54 (m, 1H)	36.56 d
6	6.16 (m, 2H)**	135.10 d	6.16 (m, 2H)**	134.03 d
7	5.62 (dd, J=1.5, 6.0 Hz, 1H)	132.19 d	5.55 (dd, J=1.5, 6.0 Hz, 1H)	134.42 d
8		95.47 s		83.30 s
9	2.74 (d, J=9.5 Hz, 1H)	49.00 d	2.49*	51.26 d
10	5.20 (d, J=5.0 Hz, 1H)	94.46 d	4.90 (s, 1H)	102.60 d
COO		166.38 s		166.40 s
CH <sub>3</sub>	3.63 (s, 3H)	51.06 q	3.64 (s, 3H)	51.16 q
1'	4.40 (d, J=8.0 Hz, 1H)	97.97 d	4.50 (d, J=8.0 Hz, 1H)	99.05 d
2'	3.00–3.30 (m, 4H)**	72.85 d	3.00–3.30 (m, 4H)**	72.85 d
3'	3.00–3.30 (m, 4H)**	76.51 d	3.00–3.30 (m, 4H)**	76.51 d
4'	3.13 (m, 2H)**	69.57 d	3.13 (m, 2H)**	69.57 d
5'	3.61 (ddd, J=2.0, 6.5, 10.5 Hz, 2H)**	75.28 d	3.61 (ddd, J=2.0, 6.5, 10.5 Hz, 2H)**	75.28 d
6'	3.84 (dd, J=2.0, 10.5 Hz, 2H)** 3.43 (dd, J=6.5, 10.5 Hz, 2H)**	67.35 t	3.84 (dd, J=2.0, 10.5 Hz, 2H)** 3.43 (dd, J=6.5, 10.5 Hz, 2H)**	67.35 t

\*interferiert mit Lösungsmittel, \*\*Proton mit dem jeweils korrespondierenden Signal austauschbar

Deutliche Unterschiede waren nur bei den Kohlenstoffatomen C-8 und den Protonen und Kohlenstoffatomen H-10 bzw. C-10 zwischen den beiden Teilstrukturen nachzuweisen. Teilstruktur A wies an C-8A eine Verschiebung von δ<sub>C</sub> 95.47 und Teilstruktur B eine

Verschiebung an C-8B von  $\delta_C$  83.30 auf, was auf quartäre Kohlenstoffatome hindeutet, welche ein Sauerstoffatom tragen. Das Kohlenstoffatom C-10A war Bestandteil einer Acetalgruppe mit  $\delta_{C-10A}$  94.46. Das zugehörige acetalische Proton H-10A zeigte eine Verschiebung von  $\delta_{H-10A}$  5.20 (*d*,  $J=5.0$  Hz). Position C-10B ( $\delta_{C-10B}$  102.60) gehörte zu einer hemiacetalischen Gruppe. Das Proton H-10B wies eine Verschiebung von  $\delta_{H-10B}$  4.90 (*s*) auf. Die Verknüpfung der beiden 10-Dehydrogardenoside blieb zunächst unklar, konnte jedoch durch HMBC- und NOESY-Experimente eindeutig charakterisiert werden.



**Abb. 3-27: Strukturaufklärung des Dimers von 10-Dehydrogardenosid.** Gezeigt sind wichtige HMBC- und NOESY-Kopplungen.

Das Proton H-10A mit  $\delta_H$  5.20 (*d*,  $J=5.0$  Hz) zeigte Kopplungen mit C-8A ( $\delta_C$  95.47) und C-9A ( $\delta_C$  49.00), was die Zugehörigkeit zu Teilstruktur A bewies. Des Weiteren konnte eine Kopplung mit C-10B ( $\delta_C$  102.60) nachgewiesen werden. Das Proton H-10B mit  $\delta_H$  4.90 (*s*) zeigte eine Kopplung mit C-8B ( $\delta_C$  83.30), jedoch keine Kopplung mit C-10A ( $\delta_C$  94.46) (Abb. 3-27 links). Die Bestätigung der Verknüpfung der beiden Teilstrukturen erfolgte durch NOESY-Experimente.

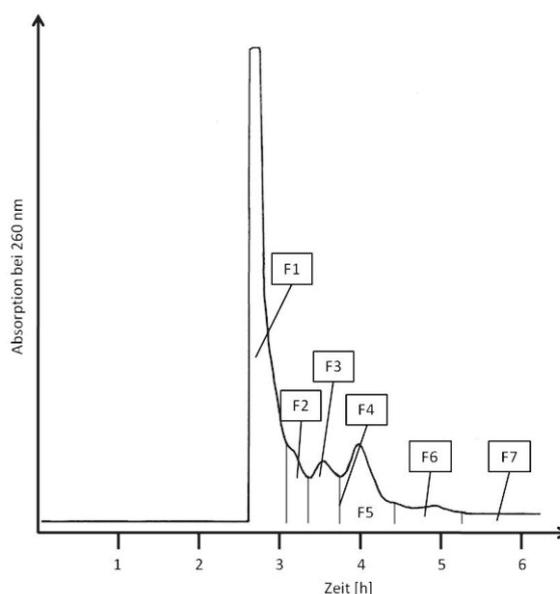
Hier zeigten sich starke Cross-Peaks zwischen H-10A und H-10B, welche die Verknüpfung bestätigten und die Stereochemie an C-10A und C-10B festlegten. Darüber hinaus wurde die Stereochemie an C-8A und C-8B mittels NOESY-Experimenten ermittelt. Es wurden starke Cross-Peaks zwischen H-10A mit  $\delta_{H-10A}$  5.20 (*d*,  $J=5.0$  Hz) und H-1A mit  $\delta_{H-1A}$  6.10 (*s*) nachgewiesen, was für eine  $\alpha$ -Orientierung zwischen C-8A und C-10A spricht. Aufgrund von Cross-Peaks zwischen H-10B mit  $\delta_{H-10B}$  4.90 (*s*) und H-1B mit  $\delta_{H-1B}$  5.80 (*s*) konnte zwischen den korrespondierenden Kohlenstoffatomen C-8B und C-10B in Teilstruktur B ebenfalls eine  $\alpha$ -Orientierung nachgewiesen werden (Abb. 3-27 rechts). Die Verknüpfung der  $\beta$ -Gluco-pyranosid-Einheiten wurde mittels HMBC und NOESY festgelegt. Hier konnte durch Kopplungen zwischen H-1A und C-1'A, H-1'A und C-1A sowie Cross-Peaks zwischen H-1A und

H-1'A die Verknüpfung an H-1A für Teilstruktur A gezeigt werden. Für Teilstruktur B ergaben sich die korrespondierenden Kopplungen und Cross-Peaks.

Die Verbindung konnte aufgrund der vorliegenden Daten als ein Dimer von 10-Dehydrogardenosid identifiziert werden. Dieses Molekül wurde von UESATO *et al.* aus *Randia canthioides* isoliert (237). Das Dimer von Dehydrogardenosid war aus *M. citrifolia* bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

### 3.1.1.6.2 Isolierungen aus dem XAD-2-Extrakt von TAreif

Der XAD-2-Extrakt von TAreif (800 mg) wurde mittels HSCCC getrennt (CCCSystem 2). Die Trennung ergab nach Analyse mittels HPLC-DAD (HPLCSystem 3) und DC (DCSystem 1) sieben Fraktionen (F1–F7). Abb. 3-28 zeigt das Chromatogramm der Trennung, welche mit den gleichen Parametern dreimal zur Erhöhung der Ausbeute an Extrakt für die Isolierungen durchgeführt wurde.



**Abb. 3-28: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-2-Extrakts von TAreif bei 260 nm.** Nach der Trennung konnten sieben Fraktionen (F1–F7) erhalten werden. Für die Trennung wurde das CCCSystem 2 verwendet.

Aufgrund der hohen Auswaage und der günstigen Zusammensetzung erwies sich Fraktion F3 für die weitere Aufarbeitung als sinnvoll. Die Isolierung einzelner Verbindungen aus Fraktion F3 erfolgte mittels Gelchromatographie an Sephadex LH-20. Hieraus konnten die zwei Verbindungen Asperulosidsäure und Noniosid A isoliert werden. Die Strukturaufklärung von Asperulosidsäure ist im Folgenden angegeben. Zusätzlich konnte aus Fraktion F6 mittels präparativer HPLC (*präpHPLCSystem 3*) 1-O-(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -D-glucopyranose isoliert

werden. Die NMR-Daten für Noniosid A und 1-O-(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -D-glucopyranose sind im Anhang unter 7.1 angegeben.

### Asperulosidsäure

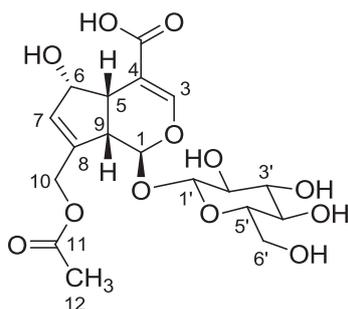
Nach Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 konnte aus Fraktion F3 der CCC-Trennung des XAD-2-Extraktes Asperulosidsäure (46 mg) in Form weißer Kristalle isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels ESI-MS<sup>n</sup> sowie <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie. Die HR-ESI-MS-Experimente zeigten eine Molekülmasse von  $m/z$  455.1158 [M+Na]<sup>+</sup>, welche der Summenformel C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub> zugeordnet werden konnte. Im Massenspektrum (ESI-MS) konnten die Massen  $m/z$  431 [M-H]<sup>-</sup> und  $m/z$  455 [M+Na]<sup>+</sup> für die Verbindung detektiert werden. Auffällig waren bei den Fragmentierungen  $m/z$  251 (negativ) und  $m/z$  275 (positiv), welche der Abspaltung einer Hexose mit 180 Da entsprechen. Dies wird unterstützt durch  $m/z$  269 (negativ) und  $m/z$  293 (positiv), was der Abspaltung eines Glykosylrestes mit 162 Da entspricht. In Tab. 3-16 sind weitere MS<sup>2</sup>-Fragmentierungen der Verbindung mit ihren Intensitäten angegeben. Eine tiefergehende Analyse erfolgt in Abb. 3-30.

**Tab. 3-16: Fragmentierung von Asperulosidsäure.** Angegeben sind die MS<sup>2</sup>-Fragmentierungen im negativen und positiven Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS).

Modus/Precursor-Ion	Fragmentierung MS <sup>2</sup> [ $m/z$ ]
negativ ( $m/z$ 431 [M-H] <sup>-</sup> )	251, 165 (24), 269 (14), 147 (11), 225 (10), 371 (6)
positiv ( $m/z$ 455 [M+Na] <sup>+</sup> )	275, 437 (16), 293 (10), 197 (9), 215 (6)

Die isolierte Verbindung wies die für Iridoide charakteristischen Signale bei  $\delta_{H-1}$  5.07 (*d*,  $J=9.0$  Hz, 1H),  $\delta_{H-3}$  7.66 (*d*,  $J=1.0$  Hz),  $\delta_{H-5}$  3.02 (*dd*,  $J=6.5, 7.5$  Hz, 1H) und  $\delta_{H-9}$  2.64 (*dd*,  $J=7.5, 9.0$  Hz, 1H) sowie die Carboxylgruppe mit  $\delta_{COO}$  170.76 auf. Darüber hinaus deutete die Verschiebung von  $\delta_{C-11}$  172.59 auf einen Carbonsäureester hin. Die <sup>1</sup>H-NMR-Verschiebung von  $\delta_{H-7}$  6.02 (*br d*,  $J=1.5$  Hz, 1H) bzw. <sup>13</sup>C-NMR-Verschiebungen von  $\delta_{C-7}$  131.94 und  $\delta_{C-8}$  146.00 ließen die Vermutung aufkommen, dass zwischen diesen Positionen eine Doppelbindung vorliegt (Tab. 3-17).

Des Weiteren waren sechs für Hexosen charakteristische Signale im <sup>13</sup>C-NMR (101.24 C-1', 75.41 C-2', 77.91 C-3', 71.60 C-4', 78.62 C-5' und 63.84 C-6') zu sehen. Die Kopplungskonstante am C-1' mit  $J=8.0$  Hz deutete auf das  $\beta$ -Anomer einer Glucopyranose hin. Dies konnte durch den Vergleich mit Literaturdaten bestätigt werden (235). Die Stereochemie wurde anhand des Vergleichs des Drehwertes der isolierten Verbindung ( $[\lambda]_D^{29} = -106,95^\circ$  [ $c = 0,20$  g/L, MeOH]) mit Literaturdaten von DELIORMAN *et al.* bestätigt (238). Die isolierte Verbindung konnte als Asperulosidsäure identifiziert werden (Abb. 3-29).


**Abb. 3-29: Struktur von Asperulosidsäure.**

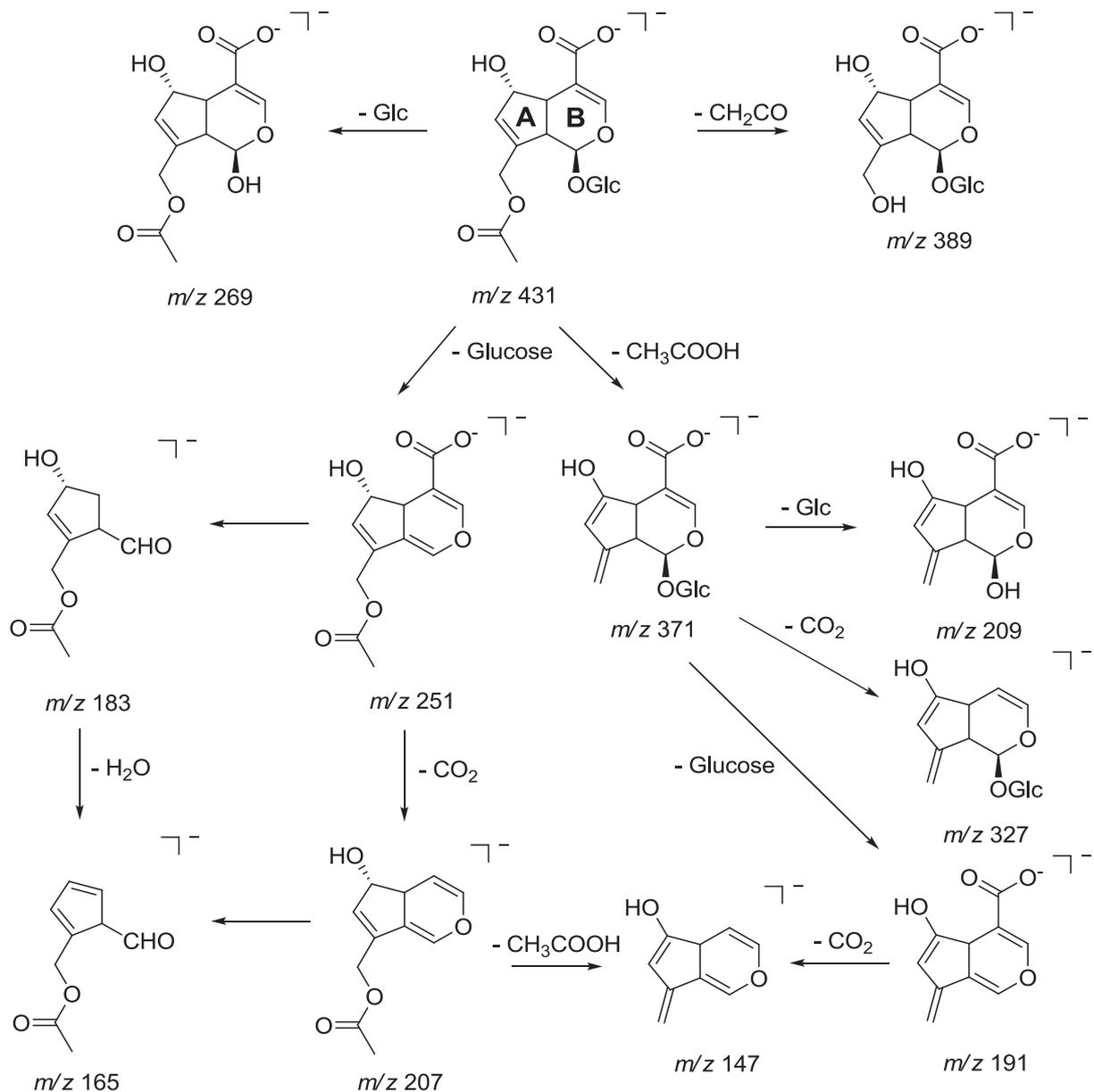
Zusätzlich wurde die Fragmentierung von Asperulosidsäure untersucht (Tab. 3-16 und Abb. 3-30). Dafür wurde das Molekül-Ion mit  $m/z$  431  $[M-H]^-$  als Precursor-Ion ausgewählt. Als Hauptfragment konnte  $m/z$  251 detektiert werden, was dem Verlust einer Glucose-Einheit entspricht. Durch weitere Abspaltung von  $CO_2$  entstand aus  $m/z$  251  $\rightarrow$  207. Das so entstandene Ion mit  $m/z$  207 fragmentierte entweder unter Verlust von Essigsäure (60 Da) zu einem Ion mit  $m/z$  147 ( $207 \rightarrow 147$ ) oder es kam zur Ringöffnung am B-Ring und zu einem Verlust von 42 Da zu einem Ion mit  $m/z$  165 ( $207 \rightarrow 165$ ). Das Ion mit  $m/z$  165 könnte auch über den Weg  $251 \rightarrow 183 \rightarrow 165$  entstehen. Hier käme es zunächst zur Öffnung des B-Rings und Abspaltung von 68 Da. Anschließend würde  $H_2O$  eliminiert, was zu  $m/z$  165 führen würde.

**Tab. 3-17:  $^1H$ -NMR- und  $^{13}C$ -NMR-Daten von Asperulosidsäure.** Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1H$ -NMR- und  $^{13}C$ -NMR-Spektrum von Asperulosidsäure. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1H$ -NMR) bzw. 150 MHz ( $^{13}C$ -NMR) in  $CD_3OD$  aufgenommen.

C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]	C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]
1	5.07 ( <i>d</i> , $J=9.0$ Hz, 1H)	100.57 <i>d</i>	11		172.59 <i>s</i>
3	7.66 ( <i>d</i> , $J=1.0$ Hz, 1H)	155.46 <i>d</i>	12	2.09 ( <i>s</i> , 3H)	20.80 <i>q</i>
4		108.35 <i>s</i>	COO		170.76 <i>s</i>
5	3.02 ( <i>dd</i> , $J=6.5, 7.5$ Hz, 1H)	42.51 <i>d</i>	1'	4.73 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	101.24 <i>d</i>
6	3.62 ( <i>dd</i> , $J=6.5, 12.0$ Hz)	74.96 <i>d</i>	2'	3.21-3.42 ( <i>m</i> , 4H)	75.41 <i>d</i>
7	6.02 ( <i>br d</i> , $J=1.5$ Hz, 1H)	131.94 <i>d</i>	3'	3.38 ( <i>dd</i> , $J=8.5, 9.0$ Hz, 1H)	77.91 <i>d</i>
8		146.00 <i>s</i>	4'	3.21-3.42 ( <i>m</i> , 4H)	71.60 <i>d</i>
9	2.64 ( <i>dd</i> , $J=7.5, 9.0$ Hz, 1H)	46.25 <i>d</i>	5'	3.21-3.42 ( <i>m</i> , 4H)	78.62 <i>d</i>
10	4.97 ( <i>s</i> , 1H)	63.02 <i>t</i>	6'	3.86 ( <i>dd</i> , $J=2.0, 12.0$ Hz, 1H)	63.84 <i>t</i>
	4.93 ( <i>s</i> , 1H)				

Aus dem Precursor-Ion mit  $m/z$  431 kann außerdem Essigsäure mit 60 Da abgespalten werden ( $431 \rightarrow 371$ ). Aus dem Sekundär-Ion mit  $m/z$  371 entstünden drei Ionen mit  $m/z$  327, 209 und 191. Der Verlust von 44 Da entspricht der Abspaltung von  $CO_2$  der Carboxylgruppe ( $371 \rightarrow 327$ ). Das Ion mit  $m/z$  209 entsteht durch einen Verlust einer glucosidischen Einheit, wohingegen das Ion mit  $m/z$  191 aus dem Verlust einer Glucose-Einheit entsteht. Durch weitere Abspaltung von 44 Da ( $CO_2$ ) wird aus  $m/z$  191 das Ion  $m/z$  147 gebildet. Zusätzlich wird aus dem Precursor ( $m/z$  431) durch Verlust einer glucosidischen Einheit das

Ion mit  $m/z$  269 gebildet. Außerdem kann durch Verlust von 42 Da vom Precursor-Ion ( $m/z$  431) das Ion mit  $m/z$  389 entstehen, welches dem Deacetylasperulosidsäure-Anion entspricht.



**Abb. 3-30: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Asperulosidsäure.** Die Fragmentierung wurde ausgehend von  $m/z$  431  $[M-H]^-$  im negativen Modus (ESI- $MS^n$ ) durchgeführt.

### 3.1.2 Steine und Pulpe von *Morinda citrifolia*

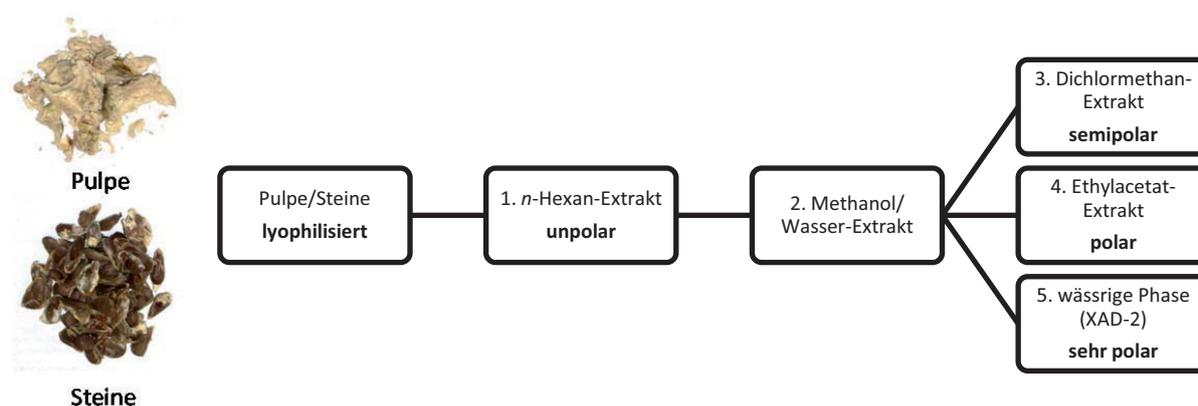
#### 3.1.2.1 Herstellung der Extrakte

Um die Zusammensetzung der Früchte TAreif hinsichtlich der Pulpe und der Steine genauer zu bestimmen, wurden zunächst 100 g Früchte abgepresst. Anschließend wurden Pulpe und Steine manuell voneinander getrennt ( $n = 5$ ). Die ausgewogenen Bestandteile, Saft, Pulpe und Steine, wurden danach gefriergetrocknet und erneut gewogen, um die prozentuale Zusammensetzung der gefriergetrockneten Frucht zu bestimmen (Tab. 3-18).

**Tab. 3-18: Zusammensetzung der Früchte von *M. citrifolia*.** Dargestellt ist die Zusammensetzung von 100 g reifen Früchten (TAreif) ( $n = 5$ ) aus Saft, Pulpe und Steinen sowohl als Anteil an frischer sowie gefriergetrockneter Frucht.

	Saft	Pulpe	Steine	Summe
Frischgewicht [g]	73,8±1,4	21,4±0,7	4,8±0,3	100,0
Anteil an frischer Frucht [%]	73,8	21,4	4,8	100,0
Gewicht gefriergetrocknet [g]	7,1±0,1	4,5±0,2	3,0±0,2	14,6
Anteil an gefriergetrockneter Frucht [%]	48,8	30,9	20,3	100,0

Um größere Mengen an Pulpe und Steinen für die Herstellung von Extrakten zur Verfügung zu haben, wurden weitere 6,5 kg reife Früchte von *M. citrifolia* (TAreif) mittels Saftpresse abgepresst. Die verbliebenen Pulpebestandteile und Steine wurden wieder voneinander getrennt. Sowohl die Steine als auch die Pulpe wurden danach, wie in Abb. 3-31 schematisch gezeigt, getrennt aufgearbeitet.



**Abb. 3-31: Schematische Aufarbeitung von Pulpe und Steinen von *M. citrifolia*.** Die lyophilisierten Pulpebestandteile bzw. Steine (links) wurden zunächst mit *n*-Hexan extrahiert (1. Schritt). Die extrahierte Pulpe bzw. extrahierten Steine wurden anschließend einer Methanol/Wasser-Extraktion unterworfen (2. Schritt). Dieser Methanol/Wasser-Extrakt wurde *in vacuo* eingengt, zusätzlich mit Wasser verdünnt und gegen Dichlormethan (3. Schritt) und Ethylacetat (4. Schritt) separiert. Die Verbindungen in der übrigen Wasser-Phase wurden an XAD-2 adsorbiert (5. Schritt) (rechts).

Gefriergetrocknete, zerkleinerte Pulpebestandteile bzw. Steine wurden zunächst mit *n*-Hexan entfettet, um lipophile Verbindungen wie Fette, freie Fettsäuren, Phytosterole oder

Tocopherole zu entfernen. Aus den Steinen bzw. der Pulpe wurden anschließend Methanol/Wasser-Extrakte hergestellt. Danach wurden die eingeeengten, mit Wasser verdünnten Methanol-Extrakte der Steine bzw. Pulpe mit dem semipolaren Lösungsmittel Dichlormethan extrahiert. Die Reste der Methanol/Wasser-Extrakte der Steine bzw. Pulpe wurden dann mit Ethylacetat separiert. Schließlich wurden 10 g der übrigen Methanol-Phase an XAD-2 adsorbiert.

In Tab. 3-19 sind die Einwaagen der Fruchtbestandteile sowie die Auswaagen der hergestellten Extrakte aufgeführt. Die Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakte der Pulpe und Steine sowie der XAD-2-Extrakt der Pulpe wurden nachfolgend mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> untersucht, um die Verteilung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe einschätzen zu können.

**Tab. 3-19. Flüssig-Flüssig-Extraktion der Steine und Pulpe.** Auswaagen der aus 6,5 kg Früchten von *M. citrifolia* aus Tahiti erhaltenen Steine und Pulpe. Zusätzlich sind die Auswaagen der Hexan-, Methanol/Wasser-, Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie die Auswaagen nach Aufarbeitung des Rückstandes an XAD-2 angegeben.

Früchte/ Extrakt	Einwaage [kg]	Hexan [g]	Methanol/ Wasser [g]	Dichlor- methan [g]	Ethyl- acetat [g]	XAD-2 [g]*	nach XAD-2 [g]
Steine	0,4	19,0	19,8	1,8	5,4	0,0**	9,5
Pulpe	2,5	17,4	63,0	2,4	2,6	0,7	8,7

\*Jeweils 10 g des übriggebliebenen Methanol-Extrakts wurden mittels XAD-2 aufgearbeitet.

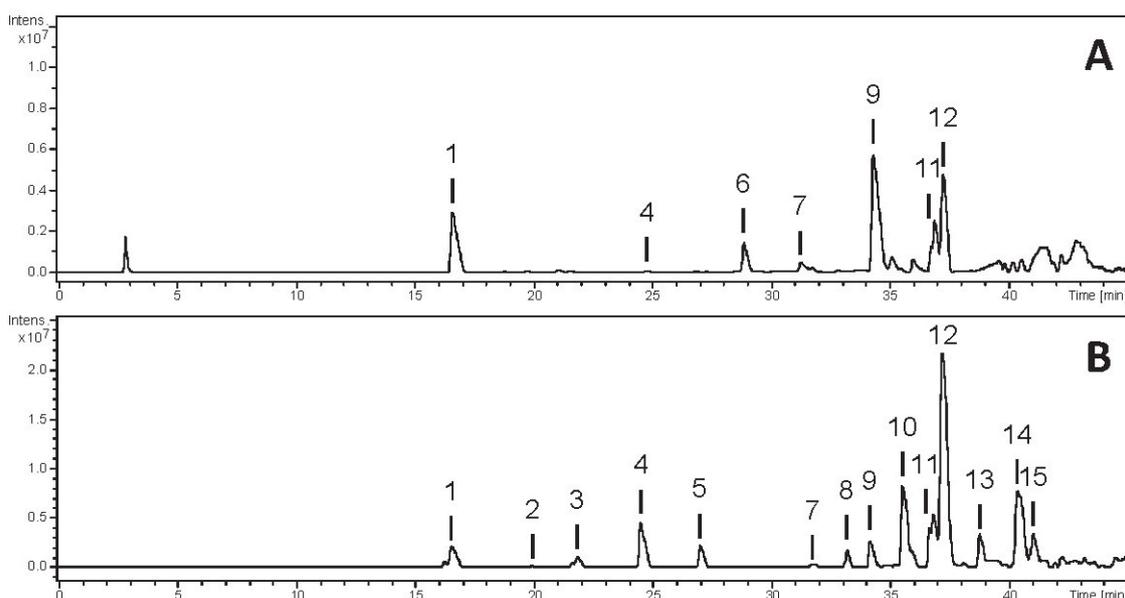
\*\*die erhaltene Menge lag bei <0,05 g

### 3.1.2.2 Untersuchung der Extrakte

#### 3.1.2.2.1 Dichlormethan-Extrakte

Zu den Inhaltsstoffen diverser Pflanzenteile von *M. citrifolia* (Blätter, Holz, Früchte) existieren zahlreiche Veröffentlichungen (6, 7, 239), wohingegen bislang über die Inhaltsstoffe der einzelnen Bestandteile der Früchte (Pulpe und Steine) keine Daten publiziert worden sind. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle auf die Analyse der Extrakte der Pulpe und der Steine von TAreif mittels HPLC-DAD-MS<sup>2</sup> näher eingegangen werden.

Die base-peak-Chromatogramme der Dichlormethan-Extrakte der Pulpe (A) und der Steine (B) weisen starke Unterschiede auf. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich jedoch, dass bei beiden Extrakten ähnliche Verbindungen zugegen sind, weshalb die Betrachtung der Extrakte zusammen erfolgen soll (Abb. 3-32). Die UV-Vis- und LC-MS-Daten der detektierten Verbindungen sind in Tab. 3-20 aufgeführt. Insgesamt wurden in den Extrakten 15 Verbindungen detektiert, wovon acht Verbindungen als Cumarinderivate, Neolignane, Flavonole, Anthrachinone und Triterpene identifiziert werden konnten. Die folgenden Verbindungen wurden durch Überprüfung mittels Referenzsubstanzen verifiziert: Scopoletin, Isoamericanol A, Americanin A, Quercetin, Kämpferol und (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure.



**Abb. 3-32: Base-peak-Chromatogramme (BPC) der Dichlormethan-Extrakte.** Dargestellt sind die Chromatogramme der Dichlormethan-Extrakte der Pulpe (A) und der Steine (B) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-20 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden.

Bei Peak 1 konnten die charakteristischen UV-Maxima von 298 nm und 344 nm für die in *M. citrifolia* typischen Cumarinderivate detektiert werden. Die erhaltenen LC-MS-Daten mit  $m/z$  191  $[M-H]^-$  und 215  $[M+Na]^+$  deuteten auf Scopoletin hin. Die Abspaltung von 14 Da, welche zu  $m/z$  177  $[M-CH_3]^-$  führte, wies darüber hinaus auf den Verlust einer Methylgruppe hin, wie sie in Scopoletin vorhanden ist. Durch Vergleich mit der Standardsubstanz konnte Scopoletin (Peak 1) eindeutig identifiziert werden. Die Peaks 4 und 5 wiesen ebenfalls sehr charakteristische UV-Absorptionen mit 366 nm bzw. 370 nm und 260 nm auf. Durch Kenntnis der Saft-Extrakte wurden hier Flavonole vermutet. Durch die MS-Daten mit  $m/z$  301  $[M-H]^-$  und 303  $[M+H]^+$  (Peak 4) und  $m/z$  285  $[M-H]^-$  (Peak 5) konnten Quercetin (Peak 4) und Kämpferol (Peak 5) identifiziert werden. Dies wurde durch Überprüfung mittels Standardsubstanzen abgesichert.

Bei Peak 2 und 3 wurden Verbindungen detektiert, die nur im Extrakt der Steine auftraten. Diese zeigten ein  $m/z$  329  $[M-H]^-$  (Peak 2) bzw.  $m/z$  327  $[M-H]^-$  (Peak 3). Die Fragmentierungen mit  $m/z$  311, 299, 165 und 163 für Peak 2 bzw.  $m/z$  309, 297 und 163 für Peak 3 deuteten nach Vergleich mit den MS-Daten und UV-Maxima ( $\lambda_{max}$  268 nm für Peak 2 bzw.  $\lambda_{max}$  290 nm und 330 nm für Peak 3) von bereits isolierten Verbindungen auf Neolignane hin (s. 3.1.2.4.1). Durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen konnten Isoamericanol A (Peak 2) und Americanin A (Peak 3) identifiziert werden. Weiterhin konnte bei Peak 7 eine starke UV-Absorption bei 262 nm und ein  $m/z$  165  $[M-H]^-$  beobachtet

werden. Durch Koinjektion der Referenzsubstanz konnte (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure identifiziert werden. Peak 9 zeigte eine UV-Absorption bei 412 nm, wie sie für Anthrachinone charakteristisch ist. Die MS-Daten zeigten  $m/z$  313 [M-H]<sup>-</sup> und die Fragment-Ionen mit  $m/z$  299 [M-14-H]<sup>-</sup> und 285 [M-28-H]<sup>-</sup>. Das Fragment  $m/z$  299 entspricht dem Verlust einer Methylgruppe und das Fragment  $m/z$  285 entspricht dem Verlust von zwei Methylgruppen. Literaturdaten deuten darauf hin, dass es sich bei Peak 9 um 5,15-Dimethylmorindol handelt (73, 81).

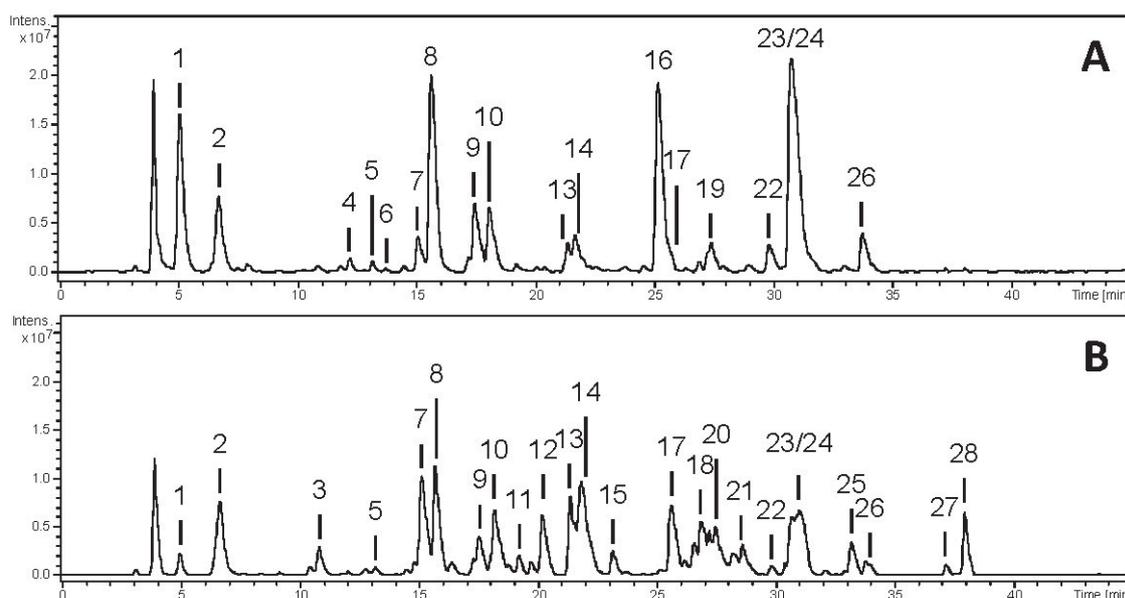
**Tab. 3-20: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Dichlormethan-Extrakten.** Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS<sup>2</sup> in der Pulpe (A) und den Steinen (B) (n.d. nicht detektiert).

Peak	R <sub>t</sub> [min]	UV [nm]	MS [ $m/z$ ]	MS <sup>2</sup> (-) [ $m/z$ ]	identifizierte Verbindung	Extrakt
1	16,5	298, 344	191 [M-H] <sup>-</sup> 215 [M+Na] <sup>+</sup>	177	Scopoletin	A, B
2	19,9	268	329 [M-H] <sup>-</sup>	311, 299, 165, 163	Isoamericanol A	B
3	21,8	290, 330	327 [M-H] <sup>-</sup>	309, 297, 163	Americanin A	B
4	24,5	370	301 [M-H] <sup>-</sup> 303 [M+H] <sup>+</sup>	273, 179, 151	Quercetin	A, B
5	27,0	260, 366	285 [M-H] <sup>-</sup>	257, 213, 151	Kämpferol	A, B
6	28,8	270	327 (-)	313, 229, 171	unbekannt	A
7	31,4	262	165 [M-H] <sup>-</sup>	n.d.	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatrien- säure	A, B
8	33,1	268	427 (-)	311, 281, 165	unbekannt	B
9	34,2	412	313 [M-H] <sup>-</sup>	299, 285, 270, 253	5,15-Dimethyl- morindol	A, B
10	35,4	265	455 (-)	311, 281, 165	unbekannt	B
11	36,8	270	513 (-)	453, 347, 189	unbekannt	A, B
12	37,2	n.d.	491 (-) 515 (+)	431, 347, 287, 239, 143	unbekannt	A, B
13	38,7	n.d.	519 (-)	459, 185, 179	unbekannt	B
14	40,2	n.d.	455 [M-H] <sup>-</sup>	407, 393	Ursolsäure	B
15	40,9	n.d.	483 (-)	423, 279	unbekannt	B

Bei Peak 14 konnte keine UV-Vis-Absorption im beobachteten Wellenlängenbereich detektiert werden. Die LC-MS-Daten zeigten  $m/z$  455 [M-H]<sup>-</sup> und die Fragment-Ionen  $m/z$  407 und 393. Dies deutet auf Ursolsäure hin. Das Ion  $m/z$  407 entsteht dabei durch Abspaltung von Formaldehyd (30 Da) und Wasser (18 Da) (240). Ursolsäure konnte bereits von MASUDA *et al.* in höheren Konzentrationen in den Steinen von *M. citrifolia* nachgewiesen werden (241). Die LC-MS- und UV-Vis-Daten der anderen Verbindungen sind in Tab. 3-20 aufgeführt.

## 3.1.2.2.2 Ethylacetat-Extrakte

Die Analyse der Ethylacetat-Extrakte der Pulpe und der Steine erfolgte mittels HPLC-DAD-MS<sup>2</sup>. Die base-peak-Chromatogramme der Extrakte zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung. Von den insgesamt 28 detektierten Verbindungen konnten 18 identifiziert werden. Davon waren 15 Verbindungen sowohl in der Pulpe als auch den Steinen detektierbar, weshalb eine gemeinsame Auswertung auch hier sinnvoll erschien (Abb. 3-33).



**Abb. 3-33: Base-peak-Chromatogramme (BPC) der Ethylacetat-Extrakte.** Dargestellt sind die Chromatogramme der Ethylacetat-Extrakte der Pulpe (A) und der Steine (B) im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-21 angegeben. Nicht aufgeführte Ziffern konnten in den dargestellten Base-peak-Chromatogrammen nicht als Peaks detektiert werden. Sind diese in der Tabelle für den Extrakt aufgeführt, konnten die Peaks lediglich im Extracted-ion- bzw. im DAD-Chromatogramm nachgewiesen werden.

Die zu den detektierten Verbindungen zugehörigen UV-Vis- und LC-MS-Daten sind in Tab. 3-21 aufgeführt. Die identifizierten Verbindungen gehören zu den Substanzklassen der Iridoide, Nonioside, Cumarinderivate, Lignane/Neolignane, Flavonole und Flavonolglykoside. Durch Überprüfung mittels Referenzsubstanzen wurden die folgenden Verbindungen verifiziert: 10-Deacetylasperulosidsäure, Noniosid A, Asperulosidsäure, Aesculetin, Morindolin, 3,3'-Bisdemethylpinoresinol, Scopoletin, Rutin, 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose, Isoamericanol A, Isoamericaninsäure A, Quercetin und Kämpferol. Auf die Zuordnung eines Großteils der Verbindungen anhand von MS- und UV-Vis-Daten wurde schon unter 3.1.1.2.2 detailliert eingegangen, worauf im Folgenden verwiesen wird.

**Tab. 3-21: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Ethylacetat-Extrakten.** Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS<sup>2</sup> in der Pulpe (A) und den Steinen (B) (n.d. nicht detektiert).

Peak	R <sub>t</sub> [min]	UV [nm]	MS [m/z]	MS <sup>2</sup> (-) [m/z]	identifizierte Verbindung	Extrakt
1	5,0	n.d.	275 (-) 299 (+)	257, 159	unbekannt	A, B
2	6,6	n.d.	389 [M-H] <sup>-</sup> 413 [M+Na] <sup>+</sup>	227, 209, 183, 165, 137	10-Deacetylasperulosid- säure	A, B
3	10,8	290, 338	471 (-) 495 (+)	411, 323, 179, 177	Aesculetinderivat	A, B
4	12,0	n.d.	345 (-)	299, 255, 227, 209, 165	unbekannt	A
5	13,0	n.d.	327 (-) 351 (+)	165	unbekannt	A, B
6	13,5	257, 292	153 [M-H] <sup>-</sup> 177 [M+Na] <sup>+</sup>	109	Protocatechusäure	A
7	15,1	n.d.	409 [M-H] <sup>-</sup> 433 [M+Na] <sup>+</sup>	341, 247	Noniosid A	A, B
8	15,7	n.d.	431 [M-H] <sup>-</sup> 455 [M+Na] <sup>+</sup>	269, 251, 165	Asperulosidsäure	A, B
9	17,4	n.d.	455 [M-H] <sup>-</sup>	431, 269, 251, 227, 183, 165	Asperulosidsäure- methylester	A, B
10	18,0	296, 344	177 [M-H] <sup>-</sup> 201 [M+Na] <sup>+</sup>	133, 115, 103	Aesculetin	A, B
11	19,2	280	329 [M-H] <sup>-</sup>	269, 219, 189, 159, 137	3,3'-Bisdemethylpino- resinol	B
12	20,2	282, 325	343 [M-H] <sup>-</sup>	299, 267, 189, 159	Morindolin	B
13	21,3	298, 344	191 [M-H] <sup>-</sup>	176	Scopoletin	A, B
14	21,8	n.d.	499 (-)	439, 323	unbekannt	A, B
15	23,3	312	319 (-)	163, 155, 119	unbekannt	B
16	25,1	256, 354	609 [M-H] <sup>-</sup> 633 [M+Na] <sup>+</sup>	301	Rutin	A
17	25,7	268	329 [M-H] <sup>-</sup>	311, 299, 165, 163	Isoamericanol A	A, B
18	26,8	282, 310	343 [M-H] <sup>-</sup>	299, 269, 179, 177, 163	Isoamericaninsäure A	B
19	27,3	268, 346	593 [M-H] <sup>-</sup> 617 [M+Na] <sup>+</sup>	285, 257	Nicotiflorin	A
20	27,4	282	493 [M-H] <sup>-</sup> 517 [M+Na] <sup>+</sup>	327	Princepin/Isoprincepin	B
21	28,6	289, 320	343 (-)	299, 269, 177, 165	unbekannt	B
22	29,8	272	489 [M-H] <sup>-</sup> 513 [M+Na] <sup>+</sup>	263, 179	2-O-(β-D-Glucopyra- nosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)- decatrienoyl-β-D-gluco- pyranose	A, B

Peak	R <sub>t</sub> [min]	UV [nm]	MS [ <i>m/z</i> ]	MS <sup>2</sup> (-) [ <i>m/z</i> ]	identifizierte Verbindung	Extrakt
23	30,9	n.d.	467 [M-H] <sup>-</sup> 491 [M+Na] <sup>+</sup>	389, 263, 179	Noniosid C	A, B
24	30,9	370	301 [M-H] <sup>-</sup> 303 [M+H] <sup>+</sup>	179, 151	Quercetin	A, B
25	33,1	n.d.	365 (-) 389 (+)	305, 161, 143	unbekannt	B
26	33,7	260, 366	285 [M-H] <sup>-</sup>	257, 241, 151	Kämpferol	A, B
27	37,1	n.d.	555 (-)	495, 323	unbekannt	B
28	37,8	n.d.	259 (-)	143	unbekannt	B

Die Peaks 2 und 8 zeigten *m/z* 389 [M-H]<sup>-</sup> und 413 [M+Na]<sup>+</sup> bzw. *m/z* 431 [M-H]<sup>-</sup> und 455 [M+Na]<sup>+</sup>. Die charakteristischen Fragmentierungen führten nach Vergleich mit Standardsubstanzen zur Identifikation von 10-Deacetylasperulosidsäure (Peak 2) und Asperulosidsäure (Peak 8). Peak 9 mit *m/z* 445 [M-H]<sup>-</sup> wies ein ähnliches MS<sup>2</sup>-Spektrum wie Peak 8 auf. Die Verbindung konnte nach Vergleich mit Literaturdaten als Asperulosidsäuremethylester identifiziert werden (74). Sie wurde bereits in den Ethylacetat-Extrakten der Säfte identifiziert (s. 3.1.1.2.2).

Peak 7, 22 und 23 konnten zunächst anhand ihrer MS-Daten *m/z* 409 [M-H]<sup>-</sup> und 433 [M+Na]<sup>+</sup> (Peak 7), *m/z* 489 [M-H]<sup>-</sup> und 513 [M+Na]<sup>+</sup> (Peak 22) sowie *m/z* 467 [M-H]<sup>-</sup> und 491 [M+Na]<sup>+</sup> (Peak 23) als Nonioside identifiziert werden. Peak 7 und 22 wurden mittels Koinjektion von Standardsubstanzen als Noniosid A bzw. 2-*O*-(β-D-Glucopyranosyl)-1-*O*-(2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose identifiziert. Das Fragmentierungsmuster bei MS<sup>2</sup> von Peak 23 mit *m/z* 389, 263 und 179 deutete auf Noniosid C hin (65). Diese Verbindungen konnten bereits in den Ethylacetat-Extrakten der Säfte nachgewiesen werden (s. 3.1.1.2.2).

Die UV-Maxima von 370 nm bei Peak 24 bzw. 260 nm und 366 nm bei Peak 26 deuteten auf Flavonole hin. Durch die Koinjektion von Standardsubstanzen konnten Quercetin (Peak 24) und Kämpferol (Peak 26) identifiziert werden. Ähnliche UV-Absorptionen mit 256 nm und 354 nm bzw. 268 nm und 346 nm konnten für Peak 16 und 19 bestimmt werden. Die MS-Daten mit *m/z* 609 [M-H]<sup>-</sup> und 633 [M+Na]<sup>+</sup> für Peak 16 sowie *m/z* 593 [M-H]<sup>-</sup> und 617 [M+Na]<sup>+</sup> für Peak 19 und deren Fragmentierungen bei MS<sup>2</sup> deuteten auf die Flavonoglykoside Rutin (Peak 16) und Nicotiflorin (Peak 19) hin. Peak 16 wurde mittels einer Standardsubstanz identifiziert. Detaillierte Informationen zur Identifikation von Nicotiflorin sind unter 3.1.1.2.2 angegeben.

Bei Peak 10 konnte das aus den Extrakten der Säfte bekannte Cumarinderivat Aesculetin durch Koinjektion nachgewiesen werden. Peak 3 zeigte ähnliche UV-Maxima zu Peak 10 und die *m/z* 471 (-) und 495 (+) sowie das Fragmentierungsmuster mit *m/z* 411, 323, 179 und 177. Hier wurde wie im Ethylacetat-Extrakt der Säfte (3.1.1.2.2) ein Aesculetindiglykosid,

bestehend aus einer Hexosyl- und Pentosyl-Einheit, angenommen. Bei Peak 13 konnte Scopoletin anhand seiner charakteristischen UV-Maxima und dem Vergleich mit der Referenzsubstanz identifiziert werden, welches auch in den Dichlormethan-Extrakten der Säfte nachgewiesen wurde.

Die  $m/z$  von 329  $[M-H]^-$  für Peak 17 und 343  $[M-H]^-$  für Peak 18 sowie deren zugehörige UV-Maxima von 268 nm bzw. 282 nm und 310 nm ließen die zwei Neolignane Isoamericanol A (Peak 17) und Isoamericaninsäure A (Peak 18) vermuten. Diese konnten durch Koinjektion isolierter Standards verifiziert werden. Für Peak 11 wurde eine UV-Absorption bei 280 nm und ein  $m/z$  329  $[M-H]^-$  bestimmt. Die Fragmentierung wies eine hohe Übereinstimmung mit der isolierten Verbindung 3,3'-Bisdemethylpinoresinol auf (s. 3.1.2.4.1). Diese Verbindung konnte durch Koinjektion der Referenzsubstanz bestätigt werden.

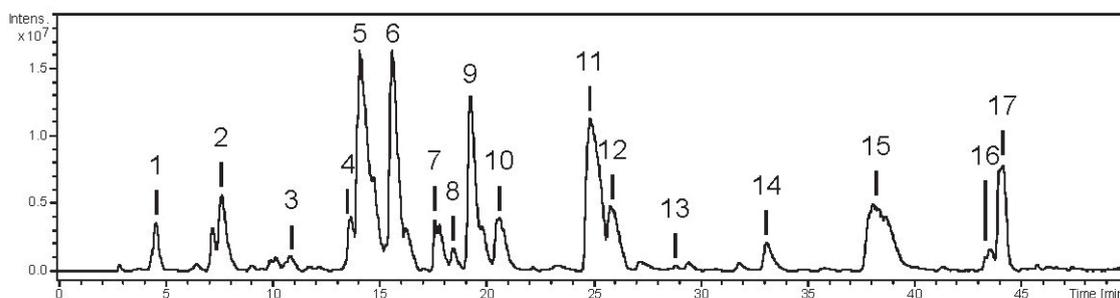
Die UV-Maxima von Peak 12 waren mit 282 nm und 325 nm recht ähnlich zu denen von Peak 18. Weiterhin waren die LC-MS-Daten von Peak 12 mit einem  $m/z$  von 343  $[M-H]^-$  identisch zu denen von Peak 18. Das Fragmentierungsmuster bei  $MS^2$  mit  $m/z$  299, 267, 189 und 159 deutete auf ein Neolignan hin. Durch den Vergleich des Fragmentierungsmusters mit der isolierten Verbindung Morindolin sowie Koinjektion konnte diese Verbindung bestätigt werden.

Peak 20 zeigte eine UV-Absorption bei 282 nm und ein  $m/z$  493  $[M-H]^-$  bzw. 517  $[M+Na]^+$ . Ein Vergleich mit Daten von WAIBEL *et al.* zeigte, dass es sich um Princepin oder Isoprincepin handeln könnte (83). In der Literatur sind keine Daten zur Fragmentierung dieser Verbindungen im ESI-MS verfügbar, wodurch eine endgültige Verifizierung nicht durchgeführt werden konnte. Isoprincepin wurde von KAMIYA *et al.* bereits aus den Früchten von *M. citrifolia* bereits isoliert, was die Vermutung bestätigt, dass es sich bei der detektierten Verbindung um Princepin oder Isoprincepin handelt (43). Schließlich konnte Peak 6 anhand seiner charakteristischen UV- und MS-Daten als Protocatechusäure identifiziert werden. Die übrigen detektierten Verbindungen konnten nicht weiter zugeordnet werden. Deren LC-MS- und UV-Vis-Daten sind in Tab. 3-21 angegeben.

### 3.1.2.2.3 XAD-2-Extrakt

Der XAD-2-Extrakt der Pulpe von TAreif wurde mittels HPLC-DAD-ESI- $MS^2$  analysiert. Von den Steinen konnte kein Extrakt nach Adsorption an XAD-2 erhalten werden (s. Tab. 3-19). Der Extrakt der Pulpe zeigte Substanzen aus den Verbindungsklassen der Iridoide, Cumarinderivate, Nonioside sowie ein Flavonolglykosid. Insgesamt konnten im XAD-2-Extrakt 17 Verbindungen detektiert werden, von denen zwölf Verbindungen identifiziert werden konnten (Abb. 3-34). Durch Überprüfung mittels Standardsubstanzen konnten 10-

Deacetylasperulosidsäure, Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid), Hymexelsin, Noniosid A, Asperulosidsäure, Rutin, Noniosid B und 2-*O*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-*O*-(2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose verifiziert werden. Die LC-MS- und UV-Vis-Daten zu den detektierten Verbindungen sind in Tab. 3-22 aufgeführt.



**Abb. 3-34: Base-peak-Chromatogramm (BPC) des XAD-2-Extrakts.** Dargestellt ist das Chromatogramm des XAD-2-Extrakts der Pulpe im negativen Modus. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3-22 angegeben.

Der Vergleich der Chromatogramme der XAD-2-Extrakte der Säfte mit dem Extrakt der Pulpe wies starke Ähnlichkeiten auf, während jedoch die Anzahl der detektierten Verbindungen im Extrakt der Pulpe geringer war. Die Zuordnung der Verbindungen wurde detailliert unter 3.1.1.2.3 diskutiert.

Die Peaks 1 und 6 konnten wieder als die Hauptiridoide in Noni-Früchten, 10-Deacetylasperulosidsäure mit  $m/z$  389  $[M-H]^-$  und 413  $[M+Na]^+$  bzw. Asperulosidsäure mit  $m/z$  431  $[M-H]^-$  und 455  $[M+Na]^+$ , identifiziert werden. Die größte Klasse an detektierten Verbindungen im XAD-2-Extrakt stellen die Nonioside dar, von denen im vorliegenden Extrakt Noniosid A (Peak 5), Noniosid B (Peak 15) und 2-*O*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-*O*-(2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (Peak 16) durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen identifiziert werden konnten. Die MS-Daten zu Peak 9 mit  $m/z$  601  $[M-H]^-$  und 625  $[M+Na]^+$  sowie Peak 10 mit  $m/z$  439  $[M-H]^-$  und 463  $[M+Na]^+$  deuteten auf Noniosid E bzw. Noniosid D hin. Weitere Informationen zur Zuordnung sind unter 3.1.1.2.3 aufgeführt.

Bei Peak 14 konnte das Flavonolglykosid Rutin anhand der UV-Maxima bei 256 nm und 354 nm identifiziert werden. Peak 13 konnte als das aus dem XAD-2-Extrakt der Säfte bereits bekannte Quercetinderivat mit den charakteristischen UV-Maxima von 260 nm und 353 nm und  $m/z$  741  $[M-H]^-$  identifiziert werden. Es wird vermutet, dass es sich hier um ein Rutinderivat handelt, welches einen weiteren Pentosylrest trägt.

Im XAD-2-Extrakt der Pulpe konnten darüber hinaus drei Verbindungen detektiert werden, die für Cumarinderivate charakteristische UV-Absorptionen mit  $\lambda_{max}$  290 nm und 338 nm (Peak 2),  $\lambda_{max}$  285 nm und 338 nm (Peak 3) sowie  $\lambda_{max}$  280 nm und 333 nm (Peak 4) aufwiesen. Bei Peak 2 konnte anhand der MS-Daten ein Aesculetinderivat identifiziert

werden (s. 3.1.1.2.3). Die Peaks 3 und 4 konnten anhand des Vergleichs mit isolierten Standardsubstanzen als die Scopoletindiglykoside Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid) bzw. Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-apiofuranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid) (Hymexelsin) identifiziert werden.

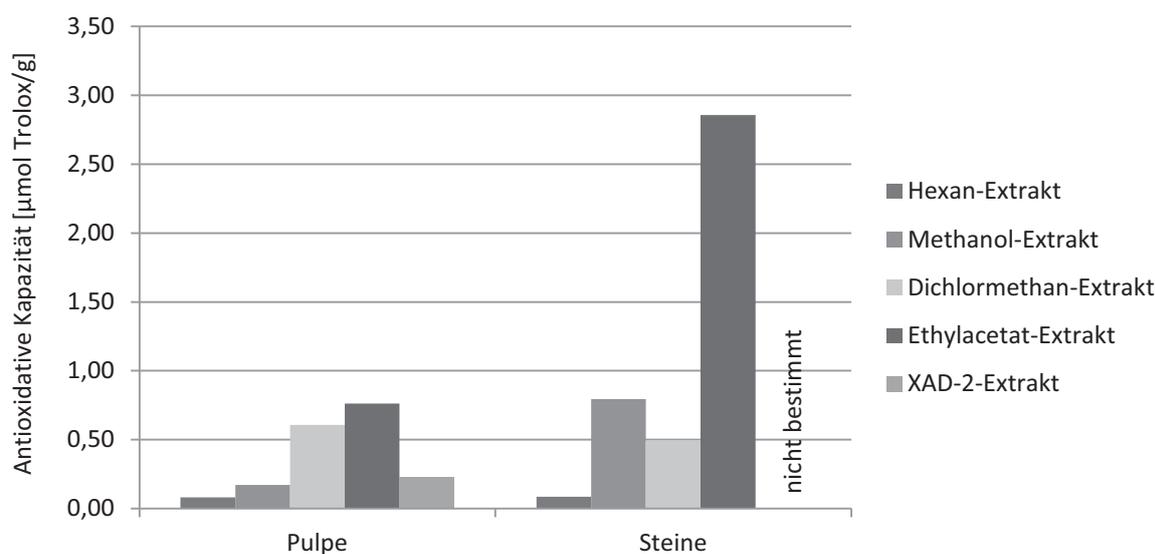
**Tab. 3-22: Identifizierung der detektierten Verbindungen im XAD-2-Extrakt der Pulpe.** Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei MS<sup>2</sup> in der Pulpe (n.d. nicht detektiert).

Peak	R <sub>t</sub> [min]	UV [nm]	MS [ <i>m/z</i> ]	MS <sup>2</sup> (-) [ <i>m/z</i> ]	identifizierte Verbindung
1	4,6	n.d.	389 [M-H] <sup>-</sup> 413 [M+Na] <sup>+</sup>	227, 209, 183, 165, 137	10-Deacetylasperulosidsäure
2	7,7	290, 338	471 [M-H] <sup>-</sup> 495 [M+Na] <sup>+</sup>	411, 323, 179, 177	Aesculetinderivat
3	10,8	285, 338	515 [M-H] <sup>-</sup> 539 [M+Na] <sup>+</sup>	191, 179	Scopoletin-7- <i>O</i> -( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid)
4	13,5	280, 333	485 [M-H] <sup>-</sup>	425, 323, 191, 179	Hymexelsin
5	14,0	n.d.	409 [M-H] <sup>-</sup> 433 [M+Na] <sup>+</sup>	341, 247	Noniosid A
6	15,3	n.d.	431 [M-H] <sup>-</sup> 455 [M+Na] <sup>+</sup>	251, 225, 165	Asperulosidsäure
7	17,8	n.d.	455 (-)	395, 293	unbekannt
8	18,5	n.d.	379 (-)	251, 221, 191, 149	unbekannt
9	19,3	n.d.	601 [M-H] <sup>-</sup> 625 [M+Na] <sup>+</sup>	583, 499, 403, 305, 277, 179	Noniosid E
10	20,6	n.d.	439 [M-H] <sup>-</sup> 463 [M+Na] <sup>+</sup>	379, 247, 179	Noniosid D
11	24,8	n.d.	499 (-)	439, 323, 179	unbekannt
12	25,8	n.d.	439 (-)	361, 323, 263, 179	unbekannt
13	28,5	260, 353	741 (-)	609, 591, 301	Quercetinderivat
14	32,5	256, 354	609 [M-H] <sup>-</sup> 633 [M+Na] <sup>+</sup>	301	Rutin
15	36,8	n.d.	629 [M-H] <sup>-</sup> 653 [M+Na] <sup>+</sup>	611, 527, 431, 305, 179	Noniosid B
16	43,4	272	489 [M-H] <sup>-</sup> 513 [M+Na] <sup>+</sup>	323, 263, 179	2- <i>O</i> -( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1- <i>O</i> -(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose
17	44,1	n.d.	527 (-)	467, 323, 179	unbekannt

### 3.1.2.3 Antioxidatives Potential und Zytotoxizität der Extrakte

Für die Pflanze *M. citrifolia* existieren mehrere Untersuchungen zur antioxidativen Aktivität der Wurzeln und der Blätter (242-245). Weiterhin wurden die Früchte von *M. citrifolia* im Ganzen bereits hinsichtlich ihrer antioxidativen Eigenschaften untersucht (57, 229, 244, 246). Die Früchte wurden dafür in den meisten Fällen getrocknet, pulverisiert und anschließend

zur Analyse eingesetzt. Mit dieser Herangehensweise lassen sich Verbindungen identifizieren, die zum antioxidativen Potential der Früchte beitragen. Allerdings lassen diese Untersuchungen keine Aussagen über das Vorkommen der Verbindungen in den einzelnen Fruchtbestandteilen und deren Beitrag zum antioxidativen Potential der Frucht zu. Aus diesem Grund werden in diesem Abschnitt zusätzlich zu den Säften und deren Extrakten, deren Ergebnisse unter 3.1.1.5 aufgeführt sind, die separierten Extrakte der Pulpe und der Steine von TAreif mittels TEAC-Assay nach RE *et al.* auf ihr antioxidatives Potential hin untersucht (183).



**Abb. 3-35: Antioxidative Kapazitäten der Extrakte von Pulpe und Steinen von *M. citrifolia*.** Dargestellt sind die antioxidativen Kapazitäten bestimmt als Trolox-Äquivalente [µmol Trolox/g] der Hexan-, Methanol/Wasser-, Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakte der Pulpe und Steine sowie des XAD-2-Extrakts der Pulpe. Die Vergleichssubstanzen Ascorbinsäure und Catechin wiesen Werte von 5,10 bzw. 3,71 µmol Trolox/g auf.

Nach Extraktion der Pulpe und der Steine mit Hexan konnten in diesen Extrakten nur geringe antioxidative Kapazitäten mit 0,08 µmol Trolox/g bzw. 0,09 µmol Trolox/g bestimmt werden (Abb. 3-35), was aufgrund der in der Literatur angegebenen Zusammensetzung dieser Extrakte zu erwarten war. So konnten als unpolare Verbindungen aus den Früchten Triterpene wie Ursolsäure und  $\beta$ -Sitosterol (74), freie Fettsäuren wie Hexan- und Octansäure (85) sowie (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (80) identifiziert werden. In der unpolaren Fraktion der Steine konnte ein Fettsäurespektrum, bestehend aus Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure, sowie darüber hinaus die Triterpene  $\beta$ -Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol nachgewiesen werden (247). Einige dieser Verbindungen weisen eher prooxidative Wirkungen auf, wie z.B. ungesättigte Fettsäuren, und erklären damit die niedrigen Werte im TEAC-Assay.

Nach weiterer Separierung der Methanol/Wasser-Extrakte der Pulpe und der Steine konnten für den Dichlormethan-Extrakt TEAC-Werte von 0,61  $\mu\text{mol Trolox/g}$  bzw. 0,49  $\mu\text{mol Trolox/g}$  bestimmt werden. Im Dichlormethan-Extrakt der Pulpe wurden demnach antioxidativ wirksame Verbindungen aus dem Methanol/Wasser-Extrakt angereichert. Diese Verbindungen, die für die antioxidativen Wirkungen in Frage kommen, sind überwiegend Scopoletin, Quercetin und Kämpferol, welche die Hauptverbindungen des Dichlormethan-Extrakts darstellten. Die hohen antioxidativen Potentiale der Flavonole (248) und von Scopoletin (249) sind hinlänglich bekannt. Darüber hinaus lag der TEAC-Wert des Dichlormethan-Extraktes der Pulpe mit 0,61  $\mu\text{mol Trolox/g}$  etwa doppelt so hoch wie der TEAC-Wert des Dichlormethan-Extraktes des Saftes mit 0,31  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . Dies deutete auf in der Pulpe eingelagerte antioxidativ wirksame Verbindungen hin, die nicht in vollem Umfang in den Saft übergehen. Im Gegensatz zur Anreicherung antioxidativ wirksamer Verbindungen im Dichlormethan-Extrakt der Pulpe nahm die antioxidative Kapazität des Dichlormethan-Extraktes der Steine im Vergleich zum Methanol/Wasser-Extrakt ab.

Die Ethylacetat-Extrakte der beiden Fruchtbestandteile Pulpe und Steine wiesen die höchsten antioxidativen Kapazitäten auf. So konnte für die Pulpe ein Wert von 0,76  $\mu\text{mol Trolox/g}$  und für die Steine ein Wert von 2,86  $\mu\text{mol Trolox/g}$  ermittelt werden. Der Anstieg des TEAC-Wertes im Ethylacetat-Extrakt der Pulpe deutete auf eine Anreicherung antioxidativ wirksamer Verbindungen hin. Die Verbindungen, welche dafür in Frage kommen, sind sowohl die im Dichlormethan-Extrakt identifizierten Flavonole Quercetin und Kämpferol sowie die Cumarinderivate Aesculetin und Scopoletin als auch die Flavonoglykoside Rutin (Aglykon: Quercetin) und Nicotiflorin (Aglykon: Kämpferol).

Auch das starke antioxidative Potential des Ethylacetat-Extrakts der Steine deutete auf eine Anreicherung antioxidativ wirksamer Substanzen hin. Der Wert von 2,86  $\mu\text{mol Trolox/g}$  reicht zwar nicht an die antioxidative Kapazität der Vergleichssubstanz Ascorbinsäure mit 5,10  $\mu\text{mol Trolox/g}$  heran, erreicht aber fast das Potential der Vergleichssubstanz Catechin mit 3,71  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . In diesem Extrakt konnten die aus der Pulpe bekannten Cumarinderivate und Flavonole identifiziert werden. Darüber hinaus konnten das Lignan 3,3'-Bisdemethylpinoresinol und die Neolignane Morindolin, Isoamericanol A, Isoamericaninsäure A und Princepin/Isoprincepin identifiziert werden. Solche Lignane und Neolignane sollten nach RICE-EVANS *et al.* aufgrund der Anzahl ihrer phenolischen Hydroxylgruppen über sehr gute antioxidative Eigenschaften verfügen (182). Diese hohen antioxidativen Potentiale konnten von PICCINELLI *et al.* an Pinoresinol-Derivaten bestätigt werden (250). Des Weiteren sind die starken antioxidativen Eigenschaften von Neolignanen aus Riesling-Wein bekannt (251).

Der XAD-2-Extrakt der Pulpe zeigte mit 0,22  $\mu\text{mol Trolox/g}$  einen nur geringfügig höheren Wert als der Methanol/Wasser-Extrakt mit 0,17  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . Dies war zu erwarten, da der Extrakt hauptsächlich aus Iridoiden und Noniosiden zusammengesetzt ist, die erfahrungsgemäß aufgrund ihrer Struktur (z.B. fehlende phenolische Hydroxylgruppen) eher niedrige antioxidative Potentiale aufweisen. Als antioxidativ wirksame Verbindungen konnten ein Aesculetinderivat, zwei Scopoletinderivate (Hymexelsin und Scopoletin-7-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid) sowie Rutin und ein weiteres Quercetinderivat identifiziert werden (Tab. 3-22).

Aufgrund der zytotoxischen Wirkungen einiger Extrakte der Säfte im Brine-shrimp-Assay wurde zusätzlich die Zytotoxizität der Extrakte von Pulpe und Steinen mittels dieses Assays untersucht (Tab. 3-23).

**Tab. 3-23: LC<sub>50</sub>-Werte des Brine-shrimp-Assays der Extrakte von Pulpe und Steinen.** Angegeben sind die LC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichung (SD) [ $\mu\text{g/mL}$ ] für die Methanol/Wasser-, Dichlormethan-, Ethylacetat- und XAD-2-Extrakte der Pulpe und der Steine von TAreif. Podophyllotoxin als Positivkontrolle wies einen LC<sub>50</sub>-Wert von 68,03 $\pm$ 13,18  $\mu\text{g/mL}$  auf.

Extrakte/ Fruchtbestandteil	LC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu\text{g/mL}$ ]			
	Methanol/Wasser	Dichlormethan	Ethylacetat	XAD-2
Pulpe	>500	>500	>500	>500
Steine	>500	>500	391,26 $\pm$ 22,51	>500

In den untersuchten Methanol/Wasser-, Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakten der Pulpe und der Steine sowie im XAD-2-Extrakt der Pulpe konnte nur im Ethylacetat-Extrakt der Steine eine geringe Zytotoxizität mit LC<sub>50</sub> 391,26 $\pm$ 22,51  $\mu\text{g/mL}$  nachgewiesen werden.

### Analyse des Ethylacetat-Extrakts der Steine

Aufgrund des hohen antioxidativen Potentials von 2,86  $\mu\text{mol Trolox/g}$  und der Zytotoxizität (LC<sub>50</sub> 391,26 $\pm$ 22,51  $\mu\text{g/mL}$ ) im Ethylacetat-Extrakt der Steine wurde eine Auftrennung des Extraktes mittels HSCCC durchgeführt. Hier konnten nach Evaluierung der Trennung acht Fraktionen separiert werden (zur Trennung s. 3.1.2.4.1). Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels TEAC-Assay auf ihre antioxidativen Kapazitäten und mittels Brine-shrimp-Assay auf ihre Zytotoxizität hin untersucht.

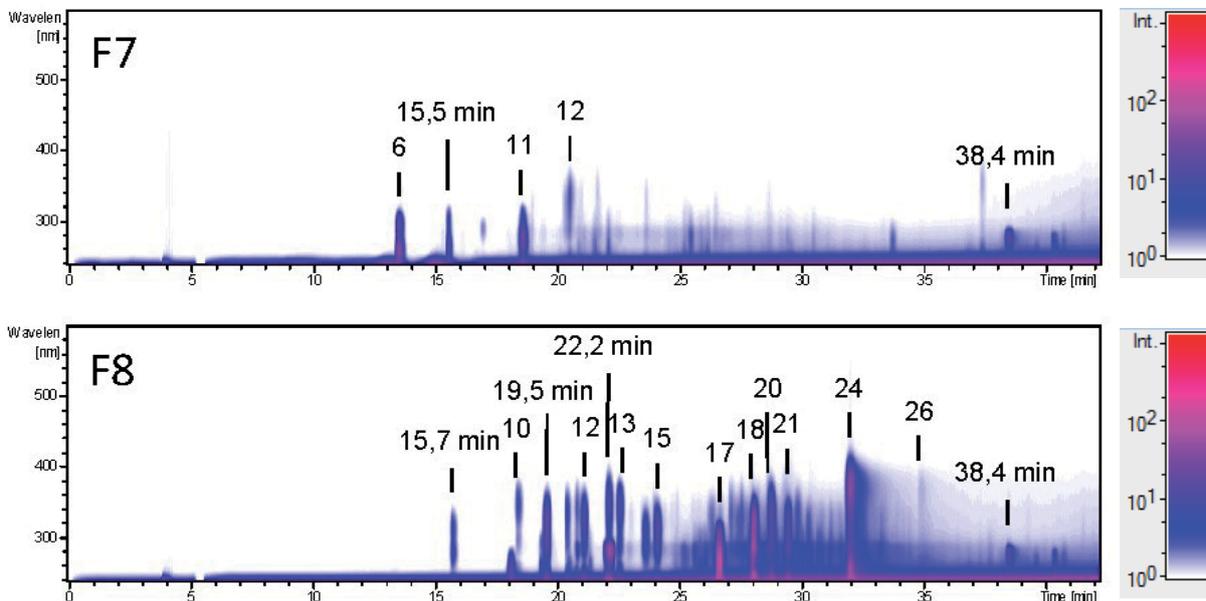
In den Fraktionen F1–F3 und F6 konnte keine Zytotoxizität im Brine-shrimp-Assay nachgewiesen werden. Die Fraktionen F7 und F8 zeigten jedoch mit LC<sub>50</sub>-Werten von 249,13 $\pm$ 31,58 bzw. 234,07 $\pm$ 15,96  $\mu\text{g/mL}$  zytotoxische Aktivitäten im Brine-shrimp-Assay. Darüber hinaus wiesen die Fraktionen F7 und F8 mit 8,90  $\mu\text{mol Trolox/g}$  bzw. 8,25  $\mu\text{mol Trolox/g}$  hohe antioxidative Kapazitäten auf, die deutlich über den bestimmten Werten Vergleichswerten von Catechin mit 3,71  $\mu\text{mol Trolox/g}$  und Ascorbinsäure mit 5,10  $\mu\text{mol Trolox/g}$  lagen (Tab. 3-24).

**Tab. 3-24: LC<sub>50</sub>-Werte des Brine-shrimp-Assays und antioxidative Kapazitäten der HSCCC-Fractionen des Ethylacetat-Extrakts der Steine.** Angegeben sind die Auswaagen von 1400 mg getrenntem Extrakt, die LC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichung (SD) aus dem Brine-shrimp-Assay und die antioxidativen Kapazitäten des TEAC-Assays [ $\mu\text{mol Trolox/g}$ ]. Podophyllotoxin als Positivkontrolle für den Brine-shrimp-Assay wies einen LC<sub>50</sub>-Wert von  $68,03 \pm 13,18 \mu\text{g/mL}$  auf. Die Vergleichssubstanzen für den TEAC-Assay Ascorbinsäure und Catechin wiesen Werte von 5,10 bzw.  $3,71 \mu\text{mol Trolox/g}$  auf.

Fraktion	Auswaage [mg]	LC <sub>50</sub> ±SD [ $\mu\text{g/mL}$ ]	TEAC [ $\mu\text{mol Trolox/g}$ ]	Fraktion	Auswaage [mg]	LC <sub>50</sub> ±SD [ $\mu\text{g/mL}$ ]	TEAC [ $\mu\text{mol Trolox/g}$ ]
F1	722,4	>500	0,69	F5	7,2	n.b.*	3,54
F2	410,9	>500	1,99	F6	15,2	>500	3,07
F3	22,6	>500	1,37	F7	16,7	$249,13 \pm 31,58$	8,90
F4	10,6	n.b.*	2,66	F8	129,9	$234,07 \pm 15,96$	8,25

\*aufgrund geringer Auswaage wurde die Zytotoxizität nicht bestimmt

Die Fraktionen F7 und F8 tragen somit zu den zytotoxischen und antioxidativen Effekten des Ethylacetat-Extraktes der Steine bei. Aufgrund der deutlich höheren Auswaage von Fraktion F8 mit 129,9 mg im Gegensatz zu 16,7 mg für Fraktion F7 sollte jedoch der Hauptbeitrag sowohl zur Zytotoxizität als auch zum antioxidativen Potential durch Fraktion F8 geleistet werden. Zur Abschätzung der Hauptkomponenten in den Fraktionen F7 und F8 wurden die Contour-Plots der Fraktionen analysiert (Abb. 3-36).



**Abb. 3-36: Contour-Plots der Fraktionen F7 und F8.** Dargestellt sind die DAD-Contour-Plots der Fraktionen F7 (oben) und F8 (unten) des Ethylacetat-Extrakts der Steine von TAreif von 220–600 nm. Die Intensitätsbereiche sind rechts angegeben. Die Nummerierung der Verbindungen erfolgt nach Tab. 3-21. Zusätzliche Verbindungen sind mit ihren Retentionszeiten angegeben.

In Fraktion F7 konnten die Verbindungen Protocatechusäure (6), 3,3'-Bisdemethylpinoresinol (11) und Morindolin (12) nachgewiesen werden, die auch im Ethylacetat-Extrakt identifiziert

wurden (Tab. 3-21). Zusätzlich konnten die Verbindungen 3,4-Dihydroxymaldehyd ( $R_t$  15,5 min) und (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure ( $R_t$  38,4 min) identifiziert werden (Abb. 3-36 oben). (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure und 3,4-Dihydroxymaldehyd, letzteres konnte aus dieser Fraktion isoliert werden (s. 3.1.2.4.1), konnten anhand des Vergleichs mit Standardsubstanzen eindeutig zugeordnet werden.

Für die antioxidativen Eigenschaften der Fraktion kommen bis auf (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure alle Verbindungen in Frage. Da jedoch das antioxidative Potential von Protocatechusäure und 3,4-Dihydroxymaldehyd nach CIOFFI *et al.* eher gering einzuschätzen ist, sind wahrscheinlich die Verbindungen 3,3'-Bisdemethylpinoresinol und Morindolin für die antioxidativen Eigenschaften verantwortlich (252). Darüber hinaus sind diese beiden Verbindungen vermutlich für die Zytotoxizität der Fraktion F7 im Brine-shrimp-Assay verantwortlich. Für die Verbindungen Protocatechusäure und 3,4-Dihydroxymaldehyd sind in der Literatur keine zytotoxischen Effekte bekannt.

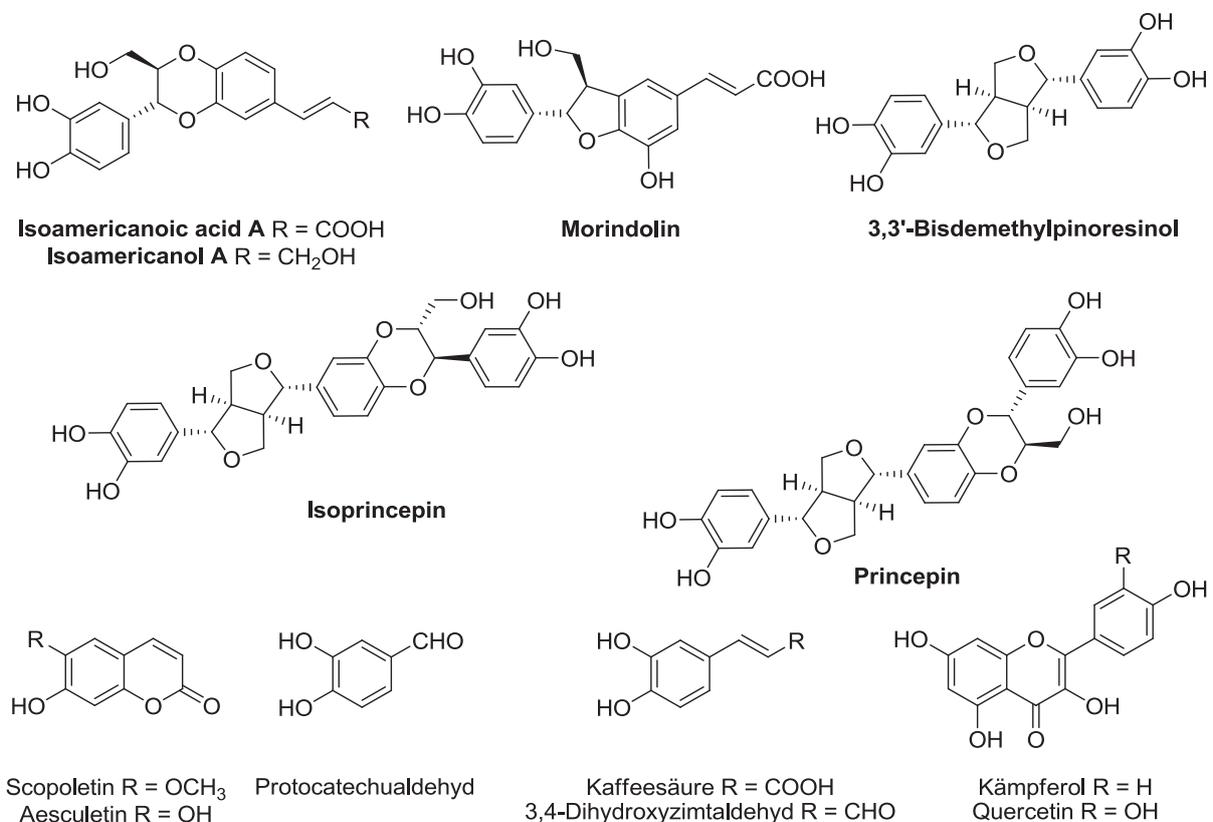
**Tab. 3-25: Identifizierung der detektierten Verbindungen in den Fraktionen F7 und F8.** Angegeben sind die detektierten Verbindungen mit den Wellenlängen für ihre Absorptionsmaxima [nm], ihrer detektierten Masse und ihren Fragmenten bei  $MS^2$  in den Fraktionen F7 und F8 des Ethylacetat-Extrakts der Steine (n.d. nicht detektiert).

$R_t$ [min]	UV [nm]	MS [ $m/z$ ]	$MS^2$ (-) [ $m/z$ ]	identifizierte Verbindung
<b>Fraktion F7</b>				
15,5	261, 298	165 [M-H] <sup>-</sup> 189 [M+Na] <sup>+</sup>	147	3,4-Dihydroxymaldehyd
38,4	262	165 [M-H] <sup>-</sup>	n.d.	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatriensäure
<b>Fraktion F8</b>				
15,7	280, 310	137 [M-H] <sup>-</sup>	109	Protocatechualdehyd
19,5	297, 325	179 [M-H] <sup>-</sup>	135	Kaffeensäure
22,2	280	329 (-)	269, 219, 189, 159, 137	ähnlich 3,3'-Bisdemethylpinoresinol
38,4	262	165 [M-H] <sup>-</sup>	n.d.	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatriensäure

In Fraktion F8 wurden die Verbindungen Aesculetin (10), Morindolin (12), Scopoletin (13), Isoamericanol A (17), Isoamericaninsäure A (18), Princepin/Isoprincepin (20), Quercetin (24) und Kämpferol (26) nach Tab. 3-21 identifiziert. In Fraktion F8 wurden zusätzlich die drei Verbindungen Protocatechualdehyd ( $R_t$  15,7 min), Kaffeensäure ( $R_t$  19,5 min) und (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure ( $R_t$  38,4 min), die starke UV-Vis-Absorptionen bei 280 nm und 310 nm für Protocatechualdehyd, 297 nm und 310 nm für Kaffeensäure bzw. 262 nm für (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure hervorriefen, identifiziert. Protocatechualdehyd und Kaffeensäure konnten anhand von MS- und UV-Vis-Vergleichsdaten zugeordnet werden (253). Die Verbindung mit  $R_t$  22,2 min zeigte dieselbe UV-Absorption von 280 nm und nahezu identische MS-Daten zum isolierten 3,3'-Bisdemethylpinoresinol (s. 3.1.2.4.1). Hier könnte es sich um ein Stereoisomer dieser Verbindung handeln. Die starken antioxidativen Eigenschaften der Fraktion sind

demnach auf die Lignane und Neolignane zurückzuführen, deren hohe antioxidativen Potentiale bekannt sind (250, 251). Ferner scheinen aufgrund der identifizierten Verbindungen im Ethylacetat-Extrakt des fermentierten Safts (s. 3.1.1.3) die zytotoxischen Effekte dieser Fraktion ebenfalls auf diesen Verbindungen zu beruhen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass in den Ethylacetat-Extrakten des fermentierten Saftes und der Steine zytotoxische Effekte nachweisbar waren. Nach Auftrennung der Extrakte mittels HSCCC und eingehender Untersuchung der erhaltenen Fraktionen konnten Verbindungen identifiziert werden, die zur Zytotoxizität der Ethylacetat-Extrakte beitragen. Sowohl in den Säften als auch den Steinen konnten das Lignan 3,3'-Bisdemethylpinoresinol und die Neolignane Morindolin, Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte das Neolignan Princepin bzw. Isoprincepin in den Steinen identifiziert werden. Weitere Verbindungen in den Fraktionen konnten aufgrund eigener Tests oder dem Vergleich mit Literaturdaten als zytotoxisch inaktive Komponenten beurteilt werden. Die Strukturformeln ausgewählter Verbindungen sind in Abb. 3-37 dargestellt. Aufgrund der Überschneidungen der in dieser Arbeit identifizierten Verbindungen beider Fraktionen ist davon auszugehen, dass diese Lignane und Neolignane für die Zytotoxizität verantwortlich sind.

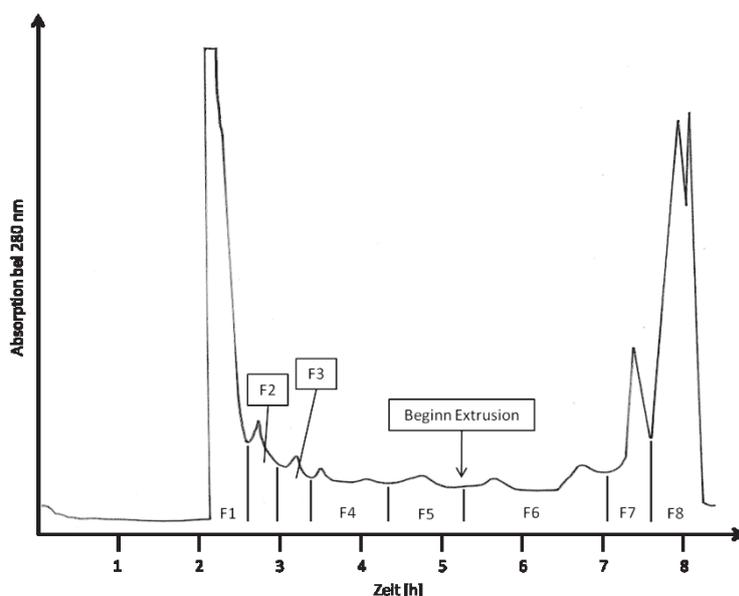


**Abb. 3-37: Strukturformeln ausgewählter identifizierter Verbindungen in den Fraktionen F7 und F8.** Fett gedruckte Bezeichnungen stellen Verbindungen dar, die für die zytotoxischen Effekte verantwortlich sind.

### 3.1.2.4 Isolierung und Strukturaufklärung

#### 3.1.2.4.1 Steine

Der gefriergetrocknete Ethylacetat-Extrakt der Steine (700 mg) wurde zweimal mittels HSCCC (*CCCSytem 3*) aufgetrennt. Es konnten acht Fraktionen erhalten werden, deren Einteilung anhand des Chromatogramms bei 280 nm und mittels DC (*DCSystem 1*) erfolgte. Fünf Fraktionen (F1–F5) wurden im Elutions-Modus und weitere drei Fraktionen (F6–F8) im Extrusions-Modus erhalten. Das Chromatogramm ist in Abb. 3-38 dargestellt. Aufgrund der Zusammensetzung und der Auswaagen boten sich die Fraktionen F7 und F8 zur Isolierung von Reinsubstanzen an. Aus Fraktion F7 konnten mittels präparativer HPLC (*präpHPLC-System 6*) das Neolignan Morindolin, das Lignan 3,3'-Bisdemethylpinoresinol und 3,4-Dihydroxymitaldehyd isoliert werden.

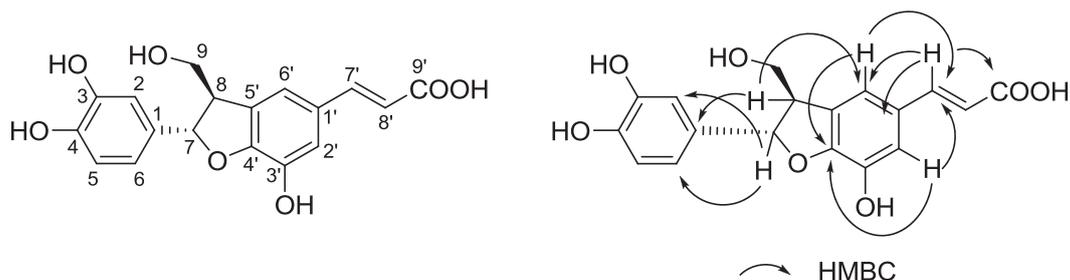


**Abb. 3-38:** UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Ethylacetat-Extrakts der Steine bei 280 nm. Es konnten acht Fraktionen (F1–F8) eingeteilt werden. Die Fraktionen F1–F5 wurden im Elutions-Modus und die Fraktionen F6–F8 im Extrusions-Modus erhalten. Die Trennung wurde mit *CCCSytem 3* durchgeführt.

Des Weiteren konnten aus Fraktion F8 die vier Neolignane Isoamericanol A, Isoamericaninsäure A, Americanin A und Americaninsäure A sowie Quercetin isoliert werden. Die Isolierung der Verbindungen aus Fraktion F8 erfolgte mittels präparativer HPLC (*präpHPLC-System 5*). Die Strukturaufklärung der genannten Verbindungen ist nachfolgend angegeben. Die NMR-Daten von Quercetin und 3,4-Dihydroxymitaldehyd befinden sich im Anhang unter 7.1.

## Morindolin

Aus Fraktion F7 der HSCCC-Trennung des Ethylacetat-Extraktes der Steine konnten 4,1 mg eines blassgelben Feststoffes isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels 1-D-<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie sowie 2-D-NMR-Experimenten. Die Daten der <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren sind in Tab. 3-27 aufgeführt.



**Abb. 3-39: Strukturaufklärung von Morindolin.** Struktur von Morindolin mit Nummerierung (links). Wichtige HMBC-Kopplungen in der Struktur von Morindolin (rechts).

Das Massenspektrum (HR-ESI-MS) zeigte eine Molekülmasse von  $m/z$  367.0785  $[M+Na]^+$ . Dieser Masse konnte die Summenformel  $C_{18}H_{16}O_7$  zugeordnet werden. Die Fragmentierungen mit den zugehörigen Intensitäten sind in Tab. 3-26 angegeben. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte ein ABC-Kopplungssystem mit  $\delta_{H-2}$  6.82 ( $d$ ,  $J=2.0$  Hz),  $\delta_{H-5}$  6.74 ( $d$ ,  $J=7.5$  Hz) und  $\delta_{H-6}$  6.71 ( $dd$ ,  $J=2.0, 7.5$  Hz), welches einer 1,3,4-trisubstituierten Phenylgruppe zuzuordnen war. Darüber hinaus waren zwei Signale von *meta*-koppelnden Protonen mit  $\delta_{H-2'}$  7.06 ( $d$ ,  $J=1.5$  Hz) und  $\delta_{H-6'}$  6.97 ( $d$ ,  $J=1.5$  Hz) in einem zweiten Phenylring zu erkennen.

**Tab. 3-26: Fragmentierung von Morindolin.** Angegeben sind die MS<sup>2</sup>-Fragmentierungen im negativen Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS).

Precursor-Ion	Fragmentierung MS <sup>2</sup> [ $m/z$ ]
$m/z$ 343 $[M-H]^-$	189, 159 (67), 269 (38), 325 (35), 312 (28), 267 (26), 299 (25), 233 (13), 109 (11), 281 (8), 171 (6)

Der aliphatische Teil der Verbindung wies eine *trans*-Doppelbindung zwischen C-7' ( $\delta_{C-7'}$  151.06) und C-8' ( $\delta_{C-8'}$  116.27) mit  $\delta_{H-7'}$  7.55 ( $d$ ,  $J=16.0$  Hz) und  $\delta_{H-8'}$  6.27 ( $d$ ,  $J=16.0$  Hz) auf. Das tieffeldverschobene quartäre Kohlenstoffatom an C-9' ( $\delta_{C-9'}$  171.00) deutete auf eine Carbonsäuregruppe hin, was durch den Verlust von 44 Da ( $CO_2$ ) bei der Fragmentierung bei MS<sup>2</sup> bestätigt werden konnte. Weiterhin wurden im aliphatischen Teil ein sauerstofftragendes Methinproton mit  $\delta_{H-7}$  5.51 ( $d$ ,  $J=6.0$  Hz), ein Methinproton mit  $\delta_{H-8}$  3.49 ( $br q$ ,  $J=6.0$  Hz) und Methylenprotonen mit  $\delta_{H-9}$  3.78 ( $dd$ ,  $J=7.0, 11.0$  Hz) und 3.83 ( $dd$ ,  $J=5.5, 11.0$  Hz) detektiert. Aufgrund der Kopplungskonstante und den COSY-Daten koppelte das Methinproton H-8 mit den Protonen H-7 und H-9.

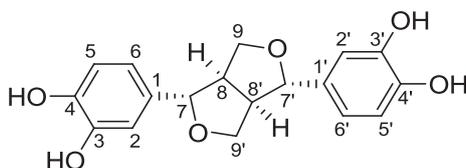
Die Struktur der Verbindung wurde anhand des HMBC-Spektrums ermittelt (Abb. 3-39). Dabei zeigten sich Korrelationen zwischen dem Sauerstoff-tragenden Methinproton  $\delta_{H-7}$  5.51 mit den Kohlenstoffatomen C-2 ( $\delta_C$  113.93) und C-6 ( $\delta_C$  118.65) des trisubstituierten Phenylrings. Weitere Korrelationen waren zwischen H-8 ( $\delta_H$  3.49) und C-1 ( $\delta_C$  134.65) sowie C-6' ( $\delta_C$  116.55) vorhanden. Das Proton der *trans*-Doppelbindung H-7' ( $\delta_H$  7.55) zeigte Kopplungen mit dem Carboxyl-Kohlenstoff C-9' ( $\delta_C$  171.00) und mit den Kohlenstoffatomen C-2' ( $\delta_C$  117.83) und C-6' ( $\delta_C$  116.55) des vierfach substituierten Phenylrings. Umgekehrt waren Kopplungen zwischen den Protonen H-2' ( $\delta_H$  7.06) und C-7' (151.06) bzw. C-4' (131.00) sowie H-6' ( $\delta_H$  6.97) und C-7' bzw. C-4' vorhanden. Die Kopplungskonstante von  $J_{H-7,H-8} = 6.0$  Hz deutete eine *trans*-Konfiguration des Furanrings an (254). Die erhaltenen Daten zeigten, dass es sich um die Verbindung Morindolin handelt. Morindolin gehört zur Gruppe der Neolignane und wurde erstmals von KAMIYA *et al.* 2004 aus Früchten von *M. citrifolia* isoliert (43).

**Tab. 3-27:  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von Morindolin.** Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Morindolin. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 150 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  aufgenommen.

C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]	C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]
1		134.65 s	1'		129.73 s
2	6.82 (d, $J=2.0$ Hz, 1H)	113.93 d	2'	7.06 (d, $J=1.5$ Hz, 1H)	117.83 d
3		146.87 s	3'		146.57 s
4		146.49 s	4'		131.00 s
5	6.74 (d, $J=7.5$ Hz, 1H)	116.35 d	5'		142.72 s
6	6.71 (dd, $J=2.0, 7.5$ Hz, 1H)	118.65 d	6'	6.97 (d, $J=1.5$ Hz, 1H)	116.55 d
7	5.51 (d, $J=6.0$ Hz, 1H)	89.52 d	7'	7.55 (d, $J=16.0$ Hz, 1H)	151.06 d
8	3.49 (br q, $J=6.0$ Hz, 1H)	55.18 d	8'	6.27 (d, $J=16.0$ Hz, 1H)	116.27 d
9	3.78 (dd, $J=7.0, 11.0$ Hz, 1H) 3.83 (dd, $J=5.5, 11.0$ Hz, 1H)	64.89 t	9'		171.00 s

### 3,3'-Bisdemethylpinoresinol

Fraktion F7 der CCC-Trennung des Ethylacetat-Extraktes der Steine enthielt nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC 4,0 mg 3,3'-Bisdemethylpinoresinol als blassgelbe Kristalle. Die Strukturaufklärung erfolgte anhand von  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Experimenten (Tab. 3-29).



**Abb. 3-40: Struktur von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol.**

Das Massenspektrum (HR-ESI-MS) der Verbindung zeigte eine Molekülmasse von  $m/z$  353.0994  $[M+Na]^+$ , was einer Molekülformel von  $C_{18}H_{18}O_6$  entspricht. Diese Molekülformel scheint im Gegensatz zu den  $^{13}C$ -NMR-Daten zu stehen, welche nur neun der Verbindung zuzuordnenden Signale zeigten. Im DEPT-Spektrum konnten eine Methylengruppe, fünf Methingruppen und drei quartäre Kohlenstoffatome identifiziert werden. Die Daten aus dem Massenspektrum ließen vermuten, dass es sich um ein symmetrisches Molekül handelt, welches aus 18 Kohlenstoffatomen, d.h. zwei Methylengruppen, zehn Methingruppen und sechs quartären Kohlenstoffatomen, besteht.

**Tab. 3-28: Fragmentierung von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol.** Angegeben sind die  $MS^2$ -Fragmentierungen im negativen Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS).

Precursor-Ion	Fragmentierung $MS^2$ [ $m/z$ ]
$m/z$ 329 $[M-H]^-$	137, 159 (20), 189 (16), 293 (8), 219 (6), 269 (5), 109 (4)

Im  $^1H$ -NMR konnte anhand der Kopplungskonstanten von  $\delta_{H-2/H-2'}$  6.80 ( $d$ ,  $J=2.0$  Hz),  $\delta_{H-5/H-5'}$  6.74 ( $d$ ,  $J=8.0$  Hz) und  $\delta_{H-6/H-6'}$  6.69 ( $dd$ ,  $J=2.0$ , 8.0 Hz) ein 1,3,4-trisubstituierter Phenylring mit einem ABC-Kopplungssystem identifiziert werden. Die in das tiefe Feld verschobenen Kohlenstoffatome C-3 bzw. C-3' (146.12) und C-4 bzw. C-4' (146.46) wiesen auf zwei Hydroxyl-Substituenten in diesen Positionen hin. Dies wurde unterstützt durch das Fragment mit  $m/z$  109 im Massenspektrum, welches einem dihydroxylierten Phenylring entspricht (Tab. 3-28).

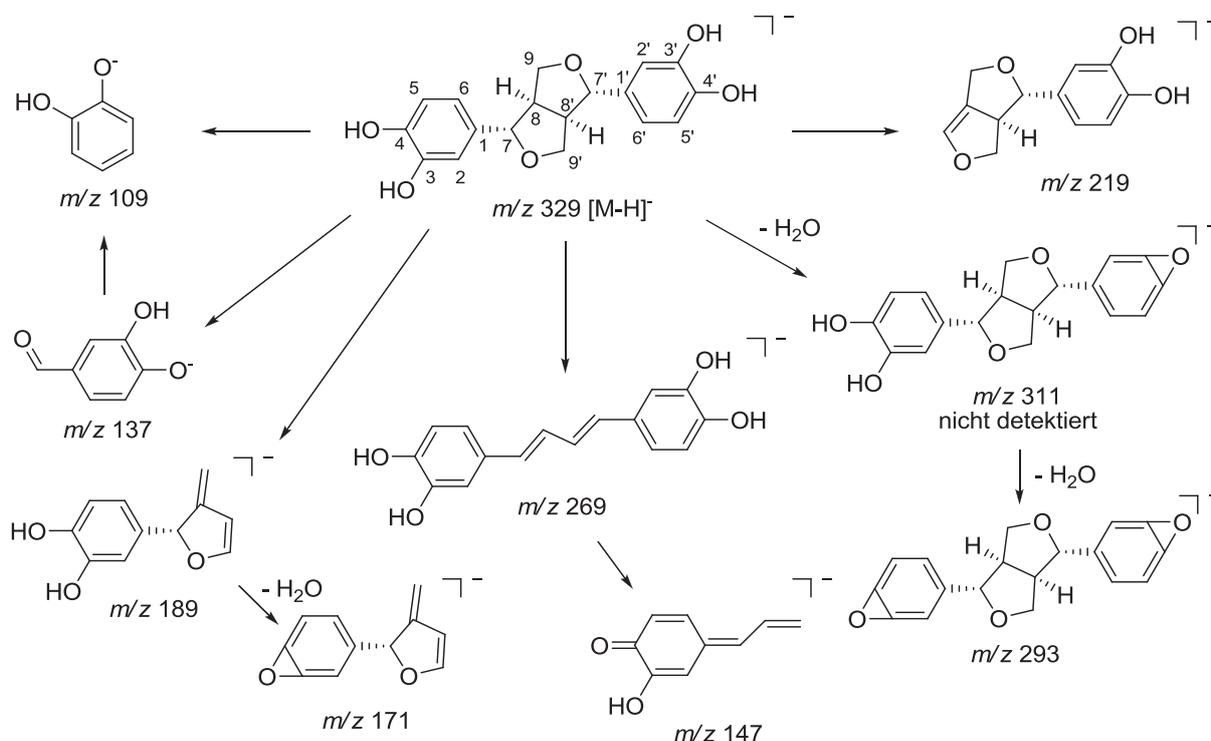
**Tab. 3-29:  $^1H$ -NMR- und  $^{13}C$ -NMR-Daten von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol.** Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1H$ -NMR- und  $^{13}C$ -NMR-Spektrum von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1H$ -NMR) bzw. 150 MHz ( $^{13}C$ -NMR) in  $CD_3OD$  aufgenommen.

C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]	C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]
1		133.85 s	1'		133.85 s
2	6.80 ( $d$ , $J=2.0$ Hz, 1H)	114.50 $d$	2'	6.80 ( $d$ , $J=2.0$ Hz, 1H)	114.50 $d$
3		146.12 s	3'		146.12 s
4		146.49 s	4'		146.49 s
5	6.74 ( $d$ , $J=8.0$ Hz, 1H)	116.27 $d$	5'	6.74 ( $d$ , $J=8.0$ Hz, 1H)	116.27 $d$
6	6.69 ( $dd$ , $J=8.0$ , 2.0 Hz, 1H)	118.93 $d$	6'	6.69 ( $dd$ , $J=8.0$ , 2.0 Hz, 1H)	118.93 $d$
7	4.63 ( $d$ , $J=4.5$ Hz, 1H)	87.51 $d$	7'	4.63 ( $d$ , $J=4.5$ Hz, 1H)	87.51 $d$
8	3.09 ( $m$ , 1H)	55.32 $d$	8'	3.09 ( $m$ , 1H)	55.32 $d$
9	3.79 ( $dd$ , $J=9.0$ , 3.5 Hz, 1H) 4.20 ( $dd$ , $J=9.0$ , 6.0 Hz, 1H)	72.61 $t$	9'	3.79 ( $dd$ , $J=9.0$ , 3.5 Hz, 1H) 4.20 ( $dd$ , $J=9.0$ , 6.0 Hz, 1H)	72.61 $t$

Hochfeldverschobene Methingruppen an C-8 bzw. C-8' mit  $\delta_{C-8/C-8'}$  55.32, die Methylengruppen mit  $\delta_{C-9/C-9'}$  72.61 und die Sauerstoff-tragende Methingruppe mit  $\delta_{C-7/C-7'}$  87.51 wiesen auf eine Furofuran-Einheit hin (43). Dies wurde bestätigt durch die Protonen im  $^1H$ -NMR mit H-7 bzw. H-7' 4.63 ( $d$ ,  $J=4.5$  Hz), H-8 bzw. H-8' 3.09 ( $m$ ) sowie H-9 bzw. H-9' 3.79

(*dd*,  $J=9.0, 3.5$  Hz) und 4.20 (*dd*,  $J=9.0, 6.0$  Hz). Die Stereochemie konnte anhand des Vergleiches des Drehwertes ( $[\lambda]_D^{24} = -3,70^\circ$  [ $c = 0,30$  g/L, MeOH]) mit Literaturangaben bestätigt werden (43). Anhand der NMR-Daten konnte diese Verbindung als (7*S*,7'*S*,8*R*,8'*R*)-7,9',7',9-diepoxyignan-3,3',4,4'-tetraol (3,3'-Bisdemethylpinoresinol) identifiziert werden (Abb. 3-40). Sie wurde erstmals als Abbauprodukt von Sesamin in Ratten identifiziert (255) und ist bereits aus den Steinen von *M. citrifolia* bekannt (43).

Darüber hinaus wurde das Fragmentierungsverhalten von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol mittels ESI-MS<sup>n</sup> untersucht (Abb. 3-41). Dafür wurde als Precursor-Ion das Molekül-Ion  $m/z$  329 [M-H]<sup>-</sup> gewählt. Der Hauptfragmentierungsweg ist bei diesem Furofuran-Lignan die Spaltung des Furanrings zwischen C-7 und C-8 sowie C-9' und dem Sauerstoff an C-7 (bzw. C-7' und C-8' sowie C-9 und dem Sauerstoff an C-7'), was zu einem Ion mit  $m/z$  137 und einem Ion mit  $m/z$  189 führt. Das Fragment mit  $m/z$  137 kann durch Abspaltung von CO zu einem Ion mit  $m/z$  109 fragmentieren. Es konnte beobachtet werden, dass dieses Ion auch direkt aus dem Precursor-Ion entstehen kann, wenn die Spaltung zwischen C-1 und C-7 erfolgt. Des Weiteren konnte ein Fragmentierungsweg mit  $m/z$  329 → 189 → 171 beobachtet werden. Das Ion mit  $m/z$  189 entsteht, wie oben erwähnt, durch Spaltung eines Furanrings. Das Folge-Ion wird durch den Verlust von 18 Da durch die Abspaltung von H<sub>2</sub>O gebildet. Das Ion mit  $m/z$  219 kommt durch einen Verlust von 110 Da zustande. Dies entspricht der Abspaltung der dihydroxylierten Phenylgruppe.



**Abb. 3-41: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von 3,3'-Bisdemethylpinoresinol.** Die Fragmentierung wurde ausgehend von  $m/z$  329 [M-H]<sup>-</sup> im negativen Modus (ESI-MS<sup>n</sup>) durchgeführt.

Aus dem Precursor-Ion war überdies das Fragment mit  $m/z$  293, welches durch den Verlust von 36 Da (zwei H<sub>2</sub>O-Moleküle) entsteht, nachzuweisen. Wahrscheinlich wird dies über eine Zwischenstufe mit  $m/z$  311 gebildet, welche jedoch nicht detektiert werden konnte. Weiterhin konnte der Fragmentierungsweg  $m/z$  329 → 269 → 147 detektiert werden. Das Ion mit  $m/z$  269 entspricht einer Abspaltung von 60 Da (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>). Das daraus gebildete Fragment mit  $m/z$  147 würde dann aus einer Spaltung dieses Moleküls zwischen C-7 und C-8 resultieren (Abb. 3-41).

### Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4)

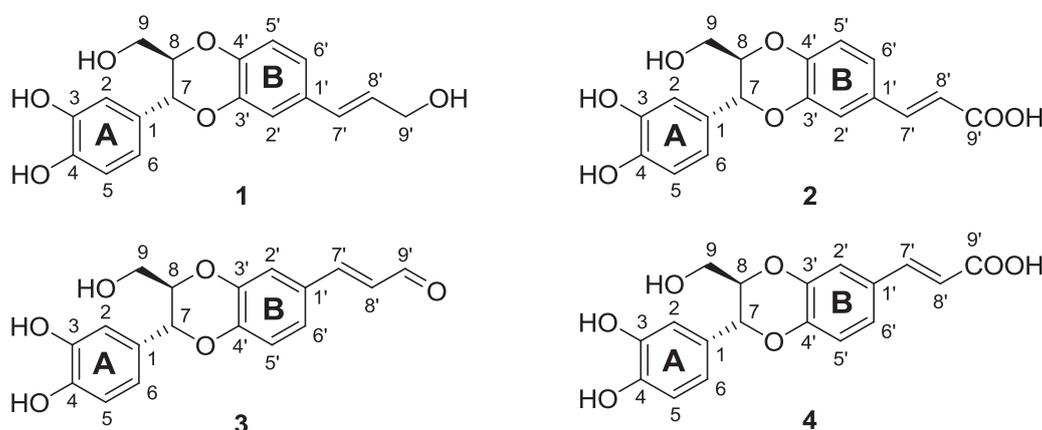
Aus der Fraktion F8 der CCC-Trennung des Ethylacetat-Extrakts der Steine wurden vier zur Gruppe der Neolignane gehörige Naturstoffe isoliert. Es konnten 4,7 mg Verbindung **1**, 4,9 mg Verbindung **2**, 5,8 mg Verbindung **3** und 2,2 mg Verbindung **4** mittels präparativer HPLC isoliert werden. Bei Verbindung **1** und **2** handelte es sich um weiße, bei Verbindung **3** und **4** um blassgelbe Feststoffe. Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte mittels <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie sowie 2D-NMR-Experimenten wie <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, HSQC, HMBC und NOESY.

Die Bestimmung der Molekülmassen mit HR-ESI-MS ergab für Verbindung **1** ein Molekül-Ion mit  $m/z$  353.0995 [M+Na]<sup>+</sup> und für Verbindung **3** ein Molekül-Ion mit  $m/z$  351.0838 [M+Na]<sup>+</sup>. Dies entspricht den Summenformeln C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub> für **1** bzw. C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> für **3**. Die Differenz von 2 Da zwischen den beiden Molekül-Ionen war ebenfalls bei den Fragment-Ionen vorhanden (Verbindung **1**  $m/z$  165 vs. Verbindung **2**  $m/z$  163, Verbindung **1**  $m/z$  299 vs. Verbindung **2**  $m/z$  297). Ansonsten waren die Fragmentierungsmuster der Verbindungen **1** und **3** sehr ähnlich, was für strukturell ähnliche Verbindungen spricht. Für Verbindung **2** ergab sich ein Molekül-Ion mit  $m/z$  367.0786 [M+Na]<sup>+</sup>, ebenso für Verbindung **4**, was der Summenformel C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub> entspricht. Die Verbindungen **2** und **4** wiesen überdies sehr ähnliche Fragmentierungsmuster auf (Tab. 3-30).

**Tab. 3-30: Fragmentierung der Neolignane Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4).** Angegeben sind die MS<sup>2</sup>-Fragmentierungen im negativen Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS).

Verbindung/Precursor-Ion	Fragmentierung MS <sup>2</sup> [ $m/z$ ]
Isoamericanol A (1) ( $m/z$ 329 [M-H] <sup>-</sup> )	<b>165</b> , 299 (40), 311 (28), 163 (24), 141 (9), 135 (2), 269 (1)
Isoamericaninsäure A (2) ( $m/z$ 343 [M-H] <sup>-</sup> )	<b>299</b> , 177 (83), 165 (66), 269 (65), 179 (36), 135 (31), 313 (22), 133 (20), 281 (18), 325 (16), 163 (11), 217 (3), 125 (2)
Americanin A (3) ( $m/z$ 327 [M-H] <sup>-</sup> )	<b>163</b> , 297 (17), 309 (16), 135 (4), 267 (3), 179 (3), 217 (2)
Americaninsäure A (4) ( $m/z$ 343 [M-H] <sup>-</sup> )	<b>299</b> , 177 (87), 165 (72), 269 (65), 179 (45), 135 (41), 163 (26), 217 (24), 133 (18), 125 (17), 325 (12), 313 (10)

Sowohl an den Massenspektren als auch anhand der Daten der  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren ist ersichtlich, dass es sich bei den vier Verbindungen um sehr ähnliche Strukturen handelt (Tab. 3-31 und Tab. 3-32). Die Verbindungen wiesen jeweils zwei 1,3,4-trisubstituierte Phenylringe mit  $\delta_{\text{H-2}}$  6.85–6.87 (*d*,  $J=2.0$  Hz),  $\delta_{\text{H-5}}$  6.80–6.81 (*d*,  $J=8.0$  Hz),  $\delta_{\text{H-6}}$  6.77–6.78 (*dd*,  $J=2.0, 8.0$  Hz) und  $\delta_{\text{H-2}'}$  6.96–7.27 (*d*,  $J=2.0$  Hz),  $\delta_{\text{H-5}'}$  6.89–7.04 (*d*,  $J=8.5$  Hz),  $\delta_{\text{H-6}'}$  6.93–7.25 (*dd*,  $J=2.0, 8.5$  Hz) auf. Weiterhin auffällig ist die große Kopplungskonstante von  $J=16$  Hz zwischen H-7' und H-8'. Diese deutet auf eine *trans*-ständige Doppelbindung zwischen C-7' und C-8' an der Propenylseitenkette hin.



**Abb. 3-42: Strukturformeln der vier isolierten Neolignane.** Dargestellt sind die Strukturen von Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4).

Des Weiteren zeigen sich Unterschiede in den  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren an dieser Propenylseitenkette. So konnten bei Verbindung 1 im  $^1\text{H-NMR}$  zwei Protonen mit  $\delta_{\text{H-9}'}$  4.19 (*dd*,  $J=1.5, 6.0$  Hz) identifiziert werden. Diese wiesen mit der Methylengruppe mit  $\delta_{\text{C-9}'}$  63.82, welche im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum identifiziert werden konnte, auf eine Hydroxylgruppe an C-9' hin. Bei Verbindung 2 konnte ein quartäres Kohlenstoffatom mit  $\delta_{\text{C-9}'}$  171.03 identifiziert werden, welches auf eine Carboxylgruppe hindeutete. Unterstützt wurde dies durch den Verlust von 44 Da, was der Abspaltung von  $\text{CO}_2$  entspricht und zu einem Fragment-Ion mit  $m/z$  299 führte. Die Verbindung 3 zeigte eine tieffeldverschobene Methingruppe mit  $\delta_{\text{C-9}'}$  196.13. Das zugehörige Proton wies eine Verschiebung von  $\delta_{\text{H-9}'}$  9.59 (*d*,  $J=8.0$  Hz) auf, was auf eine Aldehydgruppe hindeutet. Bei Verbindung 4 konnte wie bei Verbindung 1 eine Carboxylgruppe ( $\delta_{\text{C-9}'}$  169.58) identifiziert werden. Darüber hinaus zeigt sich eine Kopplungskonstante von  $J_{7,8}=8.0$  Hz. Diese weist auf eine *trans*-Konfiguration der Protonen an C-7 und C-8 in einem Dioxanring hin (256). Es handelt sich damit bei den Verbindungen um Propenylphenyldimere wie in Abb. 3-42 angegeben. Es bleibt jedoch unklar, an welcher Position die Verknüpfung der Propenylseitenkette stattfindet, d.h. ob es sich um die „normalen“ Verbindungen oder Iso-Verbindungen handelt. Dies wurde im Folgenden analysiert.

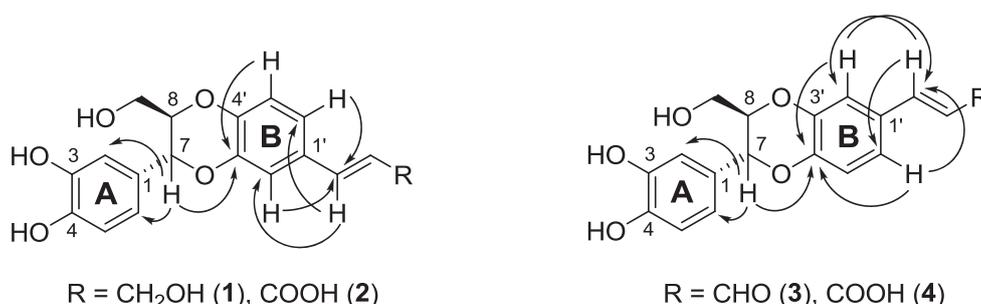
Tab. 3-31: <sup>1</sup>H-NMR-Daten der Neolignane Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4). Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale [ppm]. Die Spektren wurden bei 600 MHz (<sup>1</sup>H-NMR) in CD<sub>3</sub>OD aufgenommen.

H	Isoamericanol A (1)	Isoamericaninsäure A (2)	Americanin A (3)	Americaninsäure A (4)
2	6.85 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0 Hz, 1H)	6.86 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0 Hz, 1H)	6.87 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0 Hz, 1H)	6.85 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0 Hz, 1H)
5	6.80 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	6.81 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	6.81 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	6.81 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)
6	6.77 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.0, 8.0 Hz, 1H)	6.78 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.0, 8.0 Hz, 1H)	6.78 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.0, 8.0 Hz, 1H)	6.77 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.0, 8.0 Hz, 1H)
7	4.81 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	4.84 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	4.86 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	4.86 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)
8	3.99 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> =2.5, 4.5, 8.0 Hz, 1H)	4.05 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> =2.5, 4.5, 8.0 Hz, 1H)	4.09 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> =2.5, 4.5, 8.0 Hz, 1H)	4.02 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> =2.5, 4.5, 8.0 Hz, 1H)
9	3.67 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.5, 12.5 Hz, 1H)	3.49 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =4.5, 12.5 Hz, 1H)	3.50 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =4.5, 12.5 Hz, 1H)	3.49 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =4.5, 12.5 Hz, 1H)
	3.47 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =4.5, 12.5 Hz, 1H)	3.70 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.5, 12.5 Hz, 1H)	3.71 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.5, 12.5 Hz, 1H)	3.69 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.5, 12.5 Hz, 1H)
2'	6.96 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0 Hz, 1H)	7.17 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0 Hz, 1H)	7.27 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0 Hz, 1H)	7.22 ( <i>d</i> , <i>J</i> =2.0 Hz, 1H)
5'	6.89 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.5 Hz, 1H)	6.99 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.5 Hz, 1H)	7.04 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.5 Hz, 1H)	6.92 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.5 Hz, 1H)
6'	6.93 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.0, 8.5 Hz, 1H)	7.13 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.0, 8.5 Hz, 1H)	7.25 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.0, 8.5 Hz, 1H)	7.10 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =2.0, 8.5 Hz, 1H)
7'	6.49 ( <i>d</i> , <i>J</i> =16 Hz, 1H)	7.55 ( <i>d</i> , <i>J</i> =16.0 Hz, 1H)	7.51 ( <i>d</i> , <i>J</i> =16.0 Hz, 1H)	7.52 ( <i>d</i> , <i>J</i> =16.0 Hz, 1H)
8'	6.21 ( <i>dt</i> , <i>J</i> =6.0, 16.0 Hz, 1H)	6.33 ( <i>d</i> , <i>J</i> =16.0 Hz, 1H)	6.65 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =8.0, 16.0 Hz, 1H)	6.35 ( <i>d</i> , <i>J</i> =16.0 Hz, 1H)
9'	4.19 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =1.5, 6.0 Hz, 2H)		9.59 ( <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	

Tab. 3-32: <sup>13</sup>C-NMR-Daten der Neolignane Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4). Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale [ppm]. Die Spektren wurden bei 150 MHz (<sup>13</sup>C-NMR) in CD<sub>3</sub>OD aufgenommen.

C	Isoamericanol A (1)	Isoamericaninsäure A (2)	Americanin A (3)	Americaninsäure A (4)
1	129.58 <i>s</i>	129.43 <i>s</i>	129.13 <i>s</i>	129.25 <i>s</i>
2	115.53 <i>d</i>	115.67 <i>d</i>	115.57 <i>d</i>	115.53 <i>d</i>
3	146.70 <i>s</i>	147.42 <i>s</i>	147.34 <i>s</i>	146.74 <i>s</i>
4	147.19 <i>s</i>	146.87 <i>s</i>	148.23 <i>s</i>	147.30 <i>s</i>
5	116.35 <i>d</i>	116.52 <i>d</i>	116.39 <i>d</i>	116.38 <i>d</i>
6	120.43 <i>d</i>	120.60 <i>d</i>	120.47 <i>d</i>	120.46 <i>d</i>
7	77.65 <i>d</i>	77.74 <i>d</i>	77.60 <i>d</i>	77.96 <i>d</i>
8	80.12 <i>d</i>	80.53 <i>d</i>	80.55 <i>d</i>	80.03 <i>d</i>
9	62.14 <i>t</i>	62.16 <i>t</i>	61.96 <i>t</i>	62.07 <i>t</i>
1'	132.09 <i>s</i>	129.62 <i>s</i>	129.17 <i>s</i>	129.84 <i>s</i>
2'	115.65 <i>d</i>	117.58 <i>d</i>	118.22 <i>d</i>	117.30 <i>d</i>
3'	144.64 <i>s</i>	145.78 <i>s</i>	145.79 <i>s</i>	145.18 <i>s</i>
4'	145.37 <i>s</i>	147.27 <i>s</i>	146.76 <i>s</i>	147.36 <i>s</i>
5'	118.01 <i>d</i>	118.60 <i>d</i>	118.69 <i>d</i>	118.42 <i>d</i>
6'	120.90 <i>d</i>	123.29 <i>d</i>	124.04 <i>d</i>	122.91 <i>d</i>
7'	131.41 <i>d</i>	145.83 <i>d</i>	155.38 <i>d</i>	145.83 <i>d</i>
8'	128.17 <i>d</i>	118.15 <i>d</i>	127.86 <i>d</i>	119.01 <i>d</i>
9'	63.82 <i>t</i>	171.03 <i>s</i>	196.13 <i>d</i>	169.58 <i>s</i>

Nach Abb. 3-42 befindet sich die Propenylseitenkette in Position 1' oder in Position 6'. Nach der IUPAC-Nomenklatur ändert sich jedoch die Nummerierung, so dass bei den Iso-Verbindungen Position 6' zu 1' wird, der B-Ring also im Uhrzeigersinn gezählt wird. Genauerem Aufschluss über die Verknüpfung der einzelnen Komponenten einschließlich der Propenylseitenkette liefern die HMBC-Kopplungen, die in Abb. 3-43 dargestellt sind.



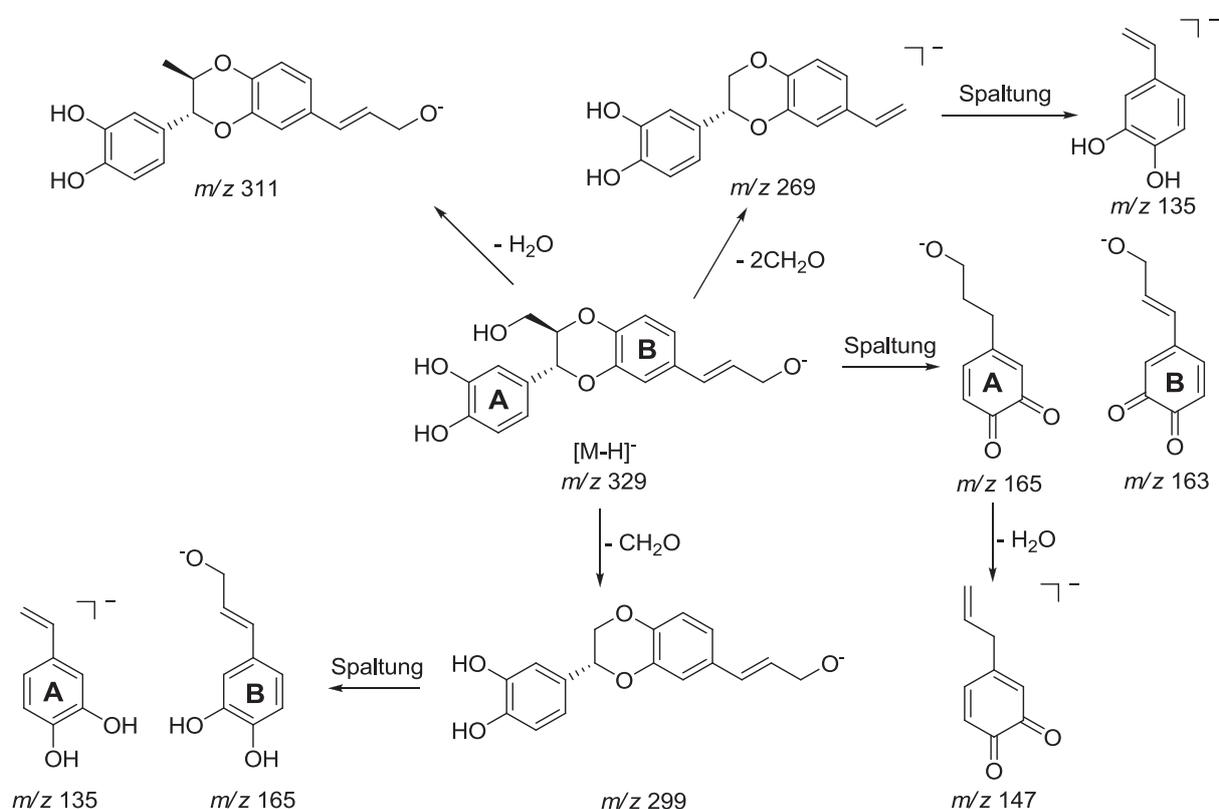
**Abb. 3-43: Strukturaufklärung von Isoamericanol A (1), Isoamericaninsäure A (2), Americanin A (3) und Americaninsäure A (4).** Gezeigt sind relevante HMBC-Kopplungen für die Strukturaufklärung.

Die Verknüpfung des A-Rings erfolgte bei den vier Verbindungen zwischen C-1 und C-7. Dies konnte durch die Korrelationen des Methin-Protons H-7 mit den Ringprotonen an C-2 und C-6 bestätigt werden. Für die Festlegung, in welcher Position die Verknüpfung der Propenylseitenkette stattfindet, wurde zunächst H-7 betrachtet. Hier zeigten sich bei den Verbindungen **1** und **2** HMBC-Kopplungen mit C-3' des B-Rings. Die Protonen H-2' mit  $\delta_{\text{H-2'}}$  6.96 ( $d$ ,  $J=2.0$  Hz) für Verbindung **1** bzw. mit  $\delta_{\text{H-2'}}$  7.17 ( $d$ ,  $J=2.0$  Hz) für Verbindung **2** und H-6' mit  $\delta_{\text{H-6'}}$  6.93 ( $dd$ ,  $J=2.0, 8.5$  Hz) für Verbindung **1** bzw. mit  $\delta_{\text{H-6'}}$  7.13 ( $dd$ ,  $J=2.0, 8.5$  Hz) für Verbindung **2** des B-Rings korrelierten mit dem Kohlenstoffatom C-7' ( $\delta_{\text{C-7'}}$  131.41 für Verbindung **1** und  $\delta_{\text{C-7'}}$  145.83 für Verbindung **2**) der Propenylseitenkette. Umgekehrt waren HMBC-Kopplungen von H-7' mit  $\delta_{\text{H-7'}}$  6.49 ( $d$ ,  $J=16$  Hz) für Verbindung **1** und mit  $\delta_{\text{H-7'}}$  7.55 ( $d$ ,  $J=16.0$  Hz) für Verbindung **2** mit C-2' ( $\delta_{\text{C-2'}}$  115.65 für Verbindung **1** und mit  $\delta_{\text{C-2'}}$  117.58 für Verbindung **2**) und C-6' ( $\delta_{\text{C-6'}}$  120.90 für Verbindung **1** und  $\delta_{\text{C-6'}}$  123.29 für Verbindung **2**) vorhanden. Die einzig nachweisbare Kopplung eines B-Ring-Protons bei Verbindung **1** und **2** mit C-3' ( $\delta_{\text{C-3'}}$  144.64 für Verbindung **1** und  $\delta_{\text{C-3'}}$  145.78 für Verbindung **2**) ging jedoch von H-5' mit  $\delta_{\text{H-5'}}$  6.89 ( $d$ ,  $J=8.5$  Hz) für Verbindung **1** und mit  $\delta_{\text{H-5'}}$  6.99 ( $d$ ,  $J=8.5$  Hz) für Verbindung **2** aus.

Bei den Verbindungen **3** und **4** zeigten sich HMBC-Kopplungen zwischen H-7 und C-4' des B-Rings. Die Protonen H-2' mit  $\delta_{\text{H-2'}}$  7.27 ( $d$ ,  $J=2.0$  Hz) für Verbindung **3** bzw. mit  $\delta_{\text{H-2'}}$  7.22 ( $d$ ,  $J=2.0$  Hz) für Verbindung **4** und H-6' mit  $\delta_{\text{H-6'}}$  7.25 ( $dd$ ,  $J=2.0, 8.5$  Hz) für Verbindung **3** bzw. mit  $\delta_{\text{H-6'}}$  7.10 ( $dd$ ,  $J=2.0, 8.5$  Hz) für Verbindung **4** korrelierten wieder mit C-7' ( $\delta_{\text{C-7'}}$  155.38 für Verbindung **3** und  $\delta_{\text{C-7'}}$  145.83 für Verbindung **4**). Umgekehrt korrelierte H-7' mit  $\delta_{\text{H-7'}}$  7.51 ( $d$ ,  $J=16$  Hz) für Verbindung **3** und mit  $\delta_{\text{H-7'}}$  7.52 ( $d$ ,  $J=16.0$  Hz) für Verbindung **4** mit C-2' ( $\delta_{\text{C-2'}}$

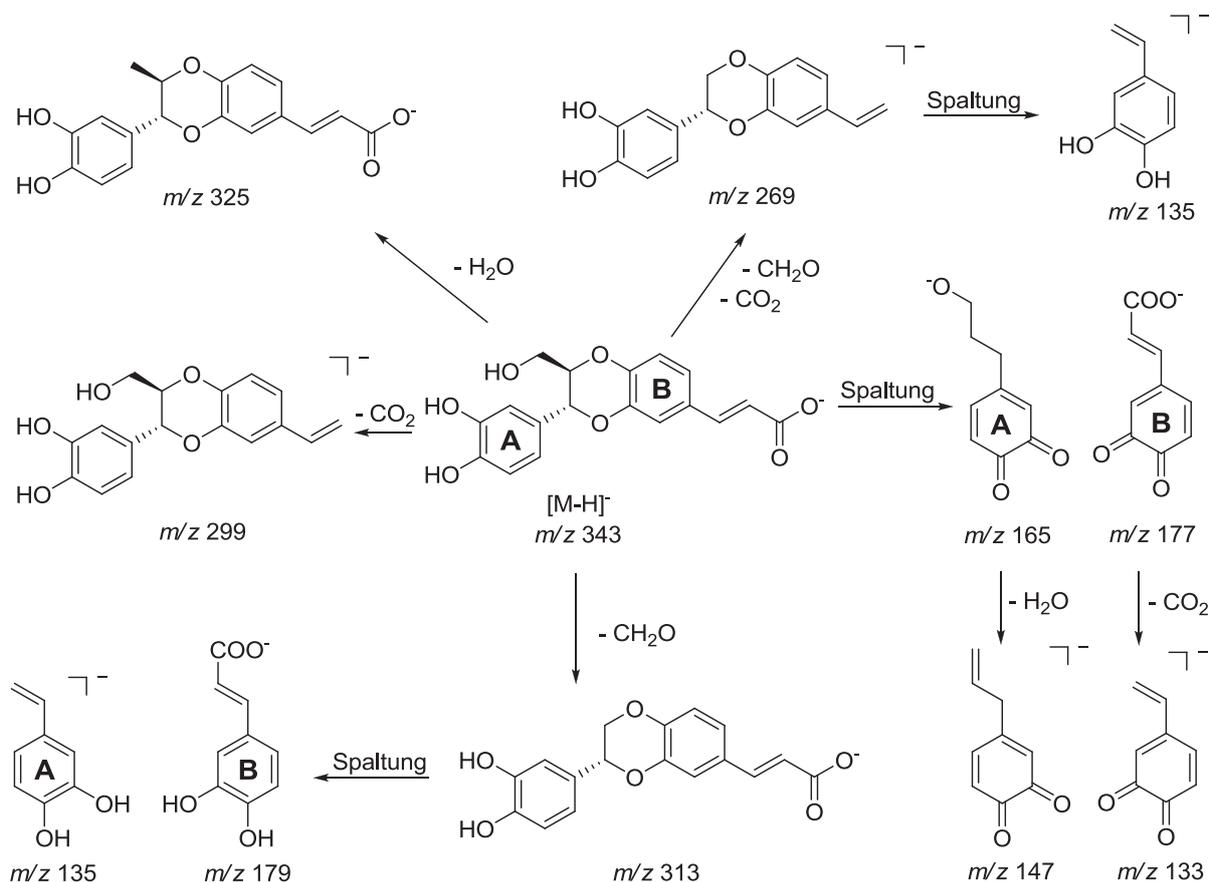
118.22 für Verbindung **3** und  $\delta_{C-2'}$  117.30 für Verbindung **4**) und C-6' ( $\delta_{C-6'}$  124.04 für Verbindung **3** und  $\delta_{C-6'}$  122.91 für Verbindung **4**). Bei Verbindung **3** und **4** zeigten sich jedoch im Gegensatz zu den Verbindungen **1** und **2** zwei HMBC-Kopplungen zu C-4' ausgehend von den Protonen H-2' und H-6'. Die Protonen konnten durch die Aufspaltung ihrer Signale unterschieden werden. So koppelte bei den Verbindungen **1** und **2** H-5', ein *d* mit  $J=8.5$  Hz, hervorgerufen durch ein *ortho*-ständiges-Proton, mit C-3', wohingegen bei den Verbindungen **3** und **4** H-2' und H-6' mit C-4' koppelten. Das Proton H-2' spaltete als *d* mit  $J=2.0$  Hz aufgrund der *meta*-Stellung zu Proton H-6' auf, und das Proton H-6' spaltete als *dd* mit  $J=2.0, 8.5$  Hz aufgrund der Kopplung mit C-2' (*meta*-Stellung) und C-5' (*ortho*-Stellung) auf. Die Verbindungen konnten demnach als Isoamericanol A (**1**), Isoamericaninsäure A (**2**), Americanin A (**3**) und Americaninsäure A (**4**) identifiziert werden.

Nach WAIBEL *et al.* kann eine Unterscheidung von Americanol A und Isoamericanol A durch die Verschiebungen der Protonen H-2' und H-5' erfolgen. Beträgt der Abstand der Signale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zwischen diesen beiden Protonen 0.2 ppm, dann liegt Americanol A vor. Beträgt dieser Abstand 0.07 ppm, so liegt Isoamericanol A vor (83). Die Verschiebungen im  $^1\text{H-NMR}$  von Verbindung 2 zeigten eine Differenz von 0.07 ppm zwischen H-2' mit  $\delta_{\text{H-2'}}$  6.96 ppm und H-5' mit  $\delta_{\text{H-5'}}$  6.89 ppm. Hierdurch kann zusätzlich bestätigt werden, dass es sich bei der isolierten Verbindung um Isoamericanol A und nicht um Americanol A handelt.



**Abb. 3-44: Vorgeschlagene Fragmentierungen von Isoamericanol A.** Als Precursor-Ion wurde  $m/z$  329  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ausgewählt. Die Fragmentierungen wurden im negativen Modus (ESI- $\text{MS}^n$ ) durchgeführt.

Als Precursor-Ion für die Fragmentierung von Isoamericanol A im negativen Modus (ESI-MS<sup>n</sup>) wurde  $m/z$  329 [M-H]<sup>-</sup> ausgewählt (Abb. 3-44, Tab. 3-30). Der Hauptweg der Fragmentierung verläuft über die Spaltung des Molekül-Ions am zentralen Dioxanring, wobei die Fragmente  $m/z$  165 (A-Ring) und  $m/z$  163 (B-Ring) gebildet werden. Der Verlust von 18 Da (H<sub>2</sub>O) beim Fragment-Ion mit  $m/z$  165 führt zum Folge-Ion mit  $m/z$  147. Weiterhin konnte die Abspaltung der Hydroxymethyl-Gruppe (30 Da) an C-8 beobachtet werden. Dies führte zum Fragment-Ion mit  $m/z$  299. Durch eine Spaltung des Dioxanrings entanden über den Weg  $m/z$  329 → 299 die Fragment-Ionen mit  $m/z$  165 (B-Ring) und  $m/z$  135 (A-Ring). Durch den Verlust von 18 Da (H<sub>2</sub>O) an C-9 des Molekül-Ions entstand das Ion mit  $m/z$  311. Das Sekundär-Ion mit  $m/z$  269 wurde durch den Verlust von zwei Hydroxymethyl-Gruppen (60 Da) an C-8 und C-8' gebildet. Die weitere Fragmentierung des Ions mit  $m/z$  269 führte zu einem Ion mit  $m/z$  135, welches durch Spaltung des Dioxanrings zustande kam.



**Abb. 3-45: Vorgeschlagene Fragmentierungen von Isoamericaninsäure A.** Als Precursor-Ion wurde  $m/z$  343 [M-H]<sup>-</sup> ausgewählt. Die Fragmentierungen wurden im negativen Modus (ESI-MS<sup>n</sup>) durchgeführt.

Für die Untersuchung der Fragmentierung (negativer Modus) von Isoamericaninsäure A wurde vom Ion  $m/z$  343 [M-H]<sup>-</sup> ausgegangen (Abb. 3-45, Tab. 3-30). Als Hauptfragment wurde  $m/z$  299 gebildet. Der Verlust von 44 Da des Molekül-Ions entsteht durch Abspaltung

von CO<sub>2</sub>. Die Spaltung des zentralen Dioxanrings des Molekül-Ions führt zu den Ionen  $m/z$  165 (A-Ring) und  $m/z$  177 (B-Ring). Der weitere Verlust von 18 Da (H<sub>2</sub>O) bei  $m/z$  165 führt zum Ion mit  $m/z$  147. Bei  $m/z$  177 wurde der Verlust von 44 Da beobachtet, was der Abspaltung von CO<sub>2</sub> entspricht und zum Fragment mit  $m/z$  133 führt. Des Weiteren wird die Abspaltung von H<sub>2</sub>O aus dem Molekül-Ion mit  $m/z$  343 beobachtet, was zu  $m/z$  325 führt. Der Verlust von 74 Da kommt durch die Abspaltung der Hydroxymethyl-Gruppe an C-8 und CO<sub>2</sub> an C-8' zustande. Die folgende Spaltung (MS<sup>3</sup>) führt dann, wie bei Isoamericanol A, zu  $m/z$  135. Das Sekundär-Ion mit  $m/z$  313 entsteht durch Verlust der Hydroxymethyl-Gruppe an C-8 (30 Da). Durch Spaltung des Dioxanrings entstehen die Fragment-Ionen  $m/z$  135 und  $m/z$  179.

#### 3.1.2.4.2 Pulpe

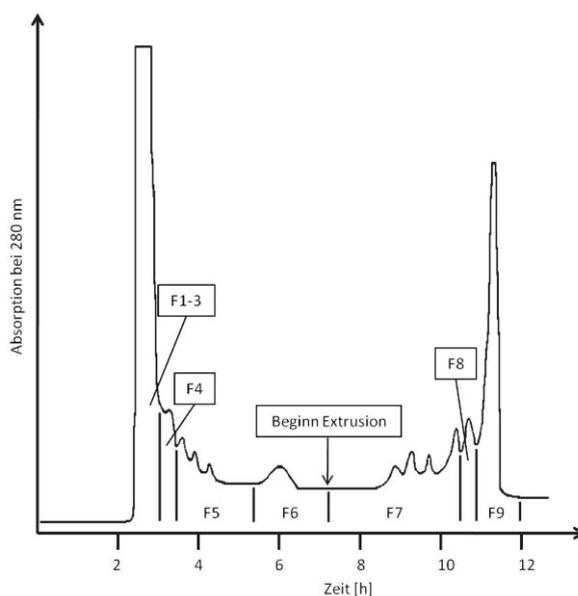
Aus der Pulpe von Früchten von *M. citrifolia* wurden Isolierungen aus dem Hexan- und Ethylacetat-Extrakt realisiert, auf die nachfolgend näher eingegangen werden soll.

##### Hexan-Extrakt

Der *in vacuo* eingeengte und gefriergetrocknete Hexan-Extrakt der Pulpe (1000 mg) wurde mittels HSCCC (*CCCSystem 5*) aufgetrennt. Dabei wurden sechs Fraktionen (F1–F6) sowie die Coil-Fraktion (F7) erhalten, die anhand des Chromatogramms bei 262 nm und mittels DC (*DCSystem 4*) eingeteilt werden konnten. In Fraktion F4 wurde mittels HPLC (*HPLCSystem 1*) (*2E,4Z,7Z*)-Decatriensäure mit einer chromatographischen Reinheit von >95 % bei 262 nm identifiziert. Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wiesen jedoch Störsignale auf. Deshalb wurde Fraktion F4 mittels präparativer HPLC (*präpHPLCSystem 1*) aufgereinigt. So konnten 3,8 mg (*2E,4Z,7Z*)-Decatriensäure isoliert werden. Die Strukturaufklärung ist unter 7.1 angegeben. In Fraktion F5 konnte Octansäure und in Fraktion F6 Linolsäure mittels <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie identifiziert werden (Daten nicht aufgeführt).

##### Ethylacetat-Extrakt

Der gefriergetrocknete Ethylacetat-Extrakt der Pulpe (700 mg) wurde mittels HSCCC (*CCCSystem 3*) aufgetrennt. Anhand des UV-Chromatogramms bei 280 nm und dünnschichtchromatographischer Analyse (*DCSystem 1/DCSystem 2*) wurden neun Fraktionen (F1–F9) separiert (Abb. 3-46).



**Abb. 3-46: UV-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Ethylacetat-Extrakts der Pulpe bei 280 nm.** Es konnten neun Fraktionen (F1–F9) eingeteilt werden. Die Fraktionen F1–F6 wurden im Elutions-Modus, die Fraktionen F7–F9 wurden im Extrusions-Modus erhalten. Die Trennung wurde mit *CCCSystem 3* durchgeführt.

Die Fraktionen F1 und F3 wurden mittels präparativer HPLC weiter aufgereinigt. Dafür wurden die Systeme *präpHPLCSystem 9* (Fraktion F1) bzw. *präpHPLCSystem 7* (Fraktion F3) verwendet. Aus Fraktion F1 konnte 2,6-Di-*O*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-*O*-octanoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (Noniosid B) und aus Fraktion F3 2-*O*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-octanoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (Noniosid J) isoliert werden. Die Strukturaufklärung der Verbindungen ist nachfolgend angegeben.

### Noniosid B und Noniosid J

Aus Fraktion F1 und Fraktion F3 des mit HSCCC getrennten Ethylacetat-Extrakts der Pulpe wurden 29 mg bzw. 4 mg eines weißen Feststoffes isoliert. Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte mittels  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie sowie 2D-NMR-Experimenten wie  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, HSQC, HMBC und NOESY.

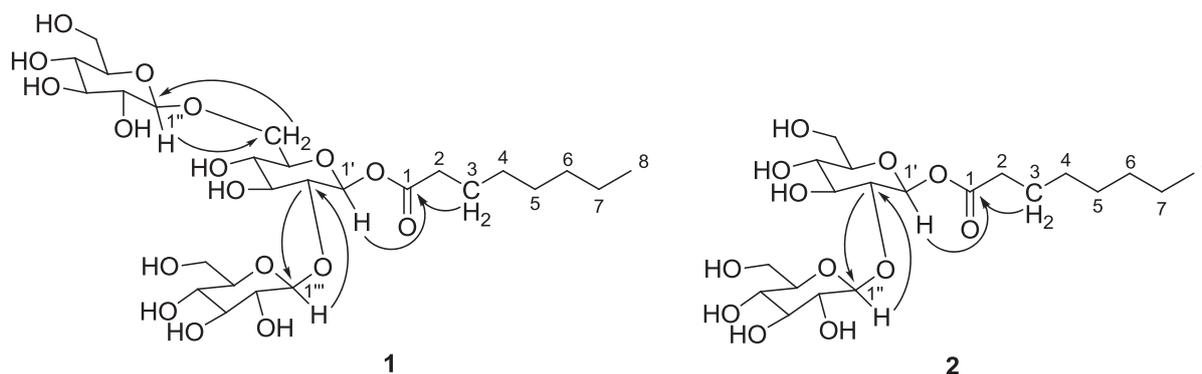
Verbindung 1 zeigte im HR-ESI-MS eine Molekülmasse von  $m/z$  653.2627  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  und Verbindung 2 eine Molekülmasse von  $m/z$  491.2099  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Dies entspricht den Molekülformeln  $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{O}_{17}$  für 1 und  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$  für 2. Die Fragmentierungen mit ESI-MS sind in Tab. 3-33 angegeben. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 1 zeigte Signale für drei anomere Protonen mit  $\delta_{\text{H-1}'}$  5.60 ( $d$ ,  $J=8.0$  Hz),  $\delta_{\text{H-1}''}$  4.56 ( $d$ ,  $J=8.0$  Hz) und  $\delta_{\text{H-1}'''}$  4.32 ( $d$ ,  $J=8.0$  Hz). Dies deutete auf drei Monosaccharid-Einheiten mit einer  $\beta$ -Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom hin. Die Protonen H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  3.49), H-4'' ( $\delta_{\text{H}}$  3.26–3.29) und H-4''' ( $\delta_{\text{H}}$  3.26–3.29) zeigten, dass es sich um drei  $\beta$ -Glucopyranose-Moleküle handelt (235).

**Tab. 3-33: Fragmentierung der Nonioside B und J.** Angegeben sind die MS<sup>2</sup>-Fragmentierungen im negativen und positiven Modus inklusive der Intensitäten (ESI-MS).

Verbindung/Precursor-Ion	Fragmentierung MS <sup>2</sup> [m/z]
Noniosid B (m/z 629 [M-H] <sup>-</sup> )	305, 179 (46), 407 (44), 611 (25), 431 (28), 503 (18), 485 (11)
Noniosid B (m/z 653 [M+Na] <sup>+</sup> )	509, 347 (11)
Noniosid J (m/z 491 [M+Na] <sup>+</sup> )	347, 329 (9)

Zusätzlich zu den Signalen der drei Glucopyranose-Moleküle konnten folgende Protonen identifiziert werden:  $\delta_{H-2a}$  2.38 (*dt*,  $J=7.5, 16.0$  Hz, 1H),  $\delta_{H-2b}$  2.43 (*dt*,  $J=7.5, 16.0$  Hz, 1H),  $\delta_{H-3}$  1.62 (*quint*,  $J=7.5$  Hz, 2H),  $\delta_{H-4}/\delta_{H-5}/\delta_{H-6}/\delta_{H-7}$  1.27–1.37 (*m*, 8H) und  $\delta_{H-8}$  0.91 (*t*,  $J=7.0$  Hz, 3H). Diese Protonen deuteten auf Octansäure hin, was durch die Signale C-1 ( $\delta_C$  173.99), C-2 ( $\delta_C$  34.93), C-3 ( $\delta_C$  25.58), C-4 ( $\delta_C$  30.19), C-5 ( $\delta_C$  30.17), C-6 ( $\delta_C$  32.91), C-7 ( $\delta_C$  23.73) und C-8 ( $\delta_C$  14.48) im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum gestützt wurde.

Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum wies darüber hinaus die Signale C-1' ( $\delta_C$  93.98), C-2' ( $\delta_C$  82.38), C-3' ( $\delta_C$  77.32), C-4' ( $\delta_C$  70.27), C-5' ( $\delta_C$  77.39) und C-6' ( $\delta_C$  69.15) auf, die durch die Verschiebungen von C-1', C-2' und C-6' einer zentralen Glucose-Einheit zugeordnet werden konnten. Dabei wurde vermutet, dass die Verknüpfung von Octansäure über eine Veresterung an C-1', und die beiden übrigen Glucose-Einheiten über glykosidische Bindungen an C-2' bzw. C-6' stattfinden. Die Verschiebungen von C-1'' mit  $\delta_C$  105.60 und C-1''' mit  $\delta_C$  104.59 deuten auf die Verknüpfung an diesen Positionen hin. Die komplette Zuordnung der Signale der <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren ist in Tab. 3-34 angegeben.



**Abb. 3-47: Strukturaufklärung von Noniosid B (1) und Noniosid J (2).** Gezeigt sind wichtige HMBC-Kopplungen.

Die Verknüpfung der einzelnen Strukturelemente konnte mittels HMBC aufgeklärt werden (Abb. 3-47). Das Proton H-1' mit  $\delta_H$  5.60 (*d*,  $J=8.0$  Hz) der zentralen Glucose-Einheit zeigte eine Korrelation mit dem Kohlenstoffatom C-1 ( $\delta_C$  173.99) der Octansäure. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen H-1''' mit  $\delta_H$  4.32 (*d*,  $J=8.0$  Hz) der terminalen Glucose und C-2' der

zentralen Glucose ( $\delta_C$  82.38) beobachtet werden. Für die übrige Glucose-Einheit konnte die Verknüpfung an C-6' nachgewiesen werden, da Korrelationen zwischen H-6' mit  $\delta_H$  3.77 (*dd*,  $J=5.0$ , 11.5 Hz) bzw. 4.15 (*dd*,  $J=2.0$ , 11.5 Hz) und C-1'' ( $\delta_C$  105.60) sowie H-1'' mit  $\delta_H$  4.56 (*d*,  $J=8.0$  Hz) und C-6' ( $\delta_C$  69.15) beobachtet wurden.

**Tab. 3-34:**  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von Noniosid B und Noniosid J. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Noniosid B und Noniosid J. Die Spektren wurden bei 600 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 150 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  aufgenommen.

Noniosid B			Noniosid J	
C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]
1		173.99 <i>s</i>		174.05 <i>s</i>
2a	2.38 ( <i>dt</i> , $J=7.5$ , 16.0 Hz, 1H)	34.93 <i>t</i>	2.35 ( <i>dt</i> , $J=7.5$ , 16.0 Hz, 1H)	34.97 <i>t</i>
2b	2.43 ( <i>dt</i> , $J=7.5$ , 16.0 Hz, 1H)		2.42 ( <i>dt</i> , $J=7.5$ , 16.0 Hz, 1H)	
3	1.62 ( <i>quint</i> , $J=7.5$ Hz, 2H)	25.58 <i>t</i>	1.52–1.57 ( <i>m</i> , 2H)	25.61 <i>t</i>
4	1.27–1.37 ( <i>m</i> , 2H)	30.19 <i>t</i>	1.23–1.30 ( <i>m</i> , 2H)	30.22 <i>t</i>
5	1.27–1.37 ( <i>m</i> , 2H)	30.17 <i>t</i>	1.23–1.30 ( <i>m</i> , 2H)	30.19 <i>t</i>
6	1.27–1.37 ( <i>m</i> , 2H)	32.91 <i>t</i>	1.23–1.30 ( <i>m</i> , 2H)	32.95 <i>t</i>
7	1.27–1.37 ( <i>m</i> , 2H)	23.73 <i>t</i>	1.23–1.30 ( <i>m</i> , 2H)	23.75 <i>t</i>
8	0.91 ( <i>t</i> , $J=7.0$ Hz, 3H)	14.48 <i>q</i>	0.84 ( <i>t</i> , $J=7.0$ Hz, 3H)	14.49 <i>q</i>
1'	5.60 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	93.98 <i>d</i>	5.55 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	94.01 <i>d</i>
2'	3.58–3.64 ( <i>m</i> , 1H)	82.38 <i>d</i>	3.73–3.77 ( <i>m</i> , 1H)	82.57 <i>d</i>
3'	3.58–3.64 ( <i>m</i> , 1H)	77.32 <i>d</i>	3.73–3.77 ( <i>m</i> , 1H)	77.81 <i>d</i>
4'	3.49 ( <i>dd</i> , $J=9.0$ , 10.0 Hz, 1H)	70.27 <i>d</i>	3.55 ( <i>dt</i> , $J=9.0$ , 17.0 Hz, 1H)	70.79 <i>d</i>
5'	3.55 ( <i>ddd</i> , $J=2.0$ , 5.0, 10.0 Hz, 1H)	77.39 <i>d</i>	3.55 ( <i>dt</i> , $J=9.0$ , 17.0 Hz, 1H)	77.85 <i>d</i>
6'	3.77 ( <i>dd</i> , $J=5.0$ , 11.5 Hz, 1H)	69.15 <i>t</i>	3.61 ( <i>dd</i> , $J=5.0$ , 12.0 Hz, 1H)	62.73 <i>t</i>
	4.15 ( <i>dd</i> , $J=2.0$ , 11.5 Hz, 1H)		4.15 ( <i>dd</i> , $J=2.0$ , 11.5 Hz, 1H)	
1''	4.56 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	105.60 <i>d</i>	4.50 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	105.65 <i>d</i>
2''	3.19 ( <i>dd</i> , $J=6.0$ , 7.0 Hz, 1H)	76.01 <i>d</i>	3.18–3.20 ( <i>m</i> , 1H)	76.06 <i>d</i>
3''	3.32–3.37 ( <i>m</i> , 1H)	77.73 <i>d</i>	3.32–3.37 ( <i>m</i> , 1H)	78.30 <i>d</i>
4''	3.26–3.29 ( <i>m</i> , 1H)	71.13 <i>d</i>	3.26–3.29 ( <i>m</i> , 1H)	71.46 <i>d</i>
5''	3.22–3.26 ( <i>m</i> , 1H)	78.27 <i>d</i>	3.22–3.26 ( <i>m</i> , 1H)	78.78 <i>d</i>
6''	3.66 ( <i>m</i> , 1H)	62.45 <i>t</i>	3.61 ( <i>dd</i> , $J=5.0$ , 12.0 Hz, 1H)	62.25 <i>t</i>
	3.83 ( <i>dd</i> , $J=2.0$ , 12.0 Hz, 1H)		3.77 ( <i>m</i> , 1H)	
1'''	4.32 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	104.59 <i>d</i>		
2'''	3.21 ( <i>dd</i> , $J=6.0$ , 7.0 Hz, 1H)	75.09 <i>d</i>		
3'''	3.32–3.37 ( <i>m</i> , 1H)	77.75 <i>d</i>		
4'''	3.26–3.29 ( <i>m</i> , 1H)	71.25 <i>d</i>		
5'''	3.22–3.26 ( <i>m</i> , 1H)	78.01 <i>d</i>		
6'''	3.66 ( <i>m</i> , 1H)	62.45 <i>t</i>		
	3.86 ( <i>dd</i> , $J=2.0$ , 12.0 Hz, 1H)			

Die Verbindung konnte eindeutig als 2,6-Di-*O*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-*O*-octanoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (Noniosid B) identifiziert werden. Die Verbindung wurde erstmals von WANG *et al.* aus Früchten von *M. citrifolia* isoliert (67).

Die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Verbindung 2 zeigten, dass die Struktur sehr ähnlich zu Noniosid B ist. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung 2 zeigte jedoch Signale für nur zwei anomere Protonen mit  $\delta_{\text{H-1}'}$  5.55 (*d*,  $J=8.0$  Hz) und  $\delta_{\text{H-1}''}$  4.50 (*d*,  $J=8.0$  Hz). Diese Signale deuteten auf zwei Monosaccharid-Einheiten mit einer  $\beta$ -Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom hin. Die Protonen H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  3.55) und H-4'' ( $\delta_{\text{H}}$  3.26–3.29) zeigten, dass es sich um  $\beta$ -Glucopyranose-Moleküle handelt (235). Es konnten die Protonen  $\delta_{\text{H-2a}}$  2.35 (*dt*,  $J=7.5$ , 16.0 Hz, 1H),  $\delta_{\text{H-2b}}$  2.42 (*dt*,  $J=7.5$ , 16.0 Hz, 1H),  $\delta_{\text{H-3}}$  1.52–1.57 (*m*, 2H),  $\delta_{\text{H-4}}/\delta_{\text{H-5}}/\delta_{\text{H-6}}/\delta_{\text{H-7}}$  1.23–1.30 (*m*, 8H) und  $\delta_{\text{H-8}}$  0.84 (*t*,  $J=7.0$  Hz, 3H) identifiziert werden, welche auf das Vorhandensein einer Octansäure hindeuten. Die Signale im  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta_{\text{C-1}}$  174.05,  $\delta_{\text{C-2}}$  34.97,  $\delta_{\text{C-3}}$  25.61,  $\delta_{\text{C-4}}$  30.22,  $\delta_{\text{C-5}}$  30.19,  $\delta_{\text{C-6}}$  32.95,  $\delta_{\text{C-7}}$  23.75 und  $\delta_{\text{C-8}}$  14.49 unterstützten diese Vermutung. Die zentrale Glucopyranose-Einheit wies Verschiebungen im  $^{13}\text{C}$ -NMR von C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  94.01), C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  82.57), C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  77.81), C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  70.79), C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  77.85) und C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  62.73) auf, was für eine Verknüpfung der zweiten  $\beta$ -Glucopyranose-Einheit an C-2' und für eine Verknüpfung der Octansäure über eine Esterbindung an C-1' sprach. Diese Vermutung wurde durch HMBC-Experimente überprüft. Hier konnten Kopplungen zwischen dem Proton H-1' mit  $\delta_{\text{H}}$  5.55 (*d*,  $J=8.0$  Hz) der Glucose und C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  174.05) der Fettsäure, dem Proton H-1'' mit  $\delta_{\text{H}}$  4.50 (*d*,  $J=8.0$  Hz) der terminalen Glucose und C-2' der zentralen Glucose ( $\delta_{\text{C}}$  82.57) beobachtet werden. Weitere HMBC-Korrelationen sind in Abb. 3-47 gezeigt. Die Verbindung konnte folglich als 2-*O*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-*O*-octanoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (Noniosid J) identifiziert werden. Die Verbindung wurde erstmals von AKIHISA *et al.* 2007 aus Früchten von *M. citrifolia* isoliert (257).

## 3.2 Flüchtige Bestandteile

### 3.2.1 Übersicht über die flüchtigen Verbindungen in frischen Säften

Um eine Übersicht über die flüchtigen Verbindungen in Säften aus *M. citrifolia* zu erstellen, wurden frische Säfte unreifer und reifer Früchte aus Tahiti (TAreif/TAunreif) und Hawai'i (HAreif/HAunreif) sowie reifer Früchte aus Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif) analysiert. Die Probenaufarbeitung erfolgte mittels Festphasenextraktion (Solid phase extraction, SPE). Die Zuordnung der Signale wurde anhand der Retentionsindices und des Vergleichs mit Massenspektren aus der institutseigenen Datenbank durchgeführt. Die Quantifizierung der einzelnen Verbindungen erfolgte mithilfe zweier interner Standards.

Insgesamt konnten in den frischen Säften 43 Verbindungen nachgewiesen werden. Die einzelnen Substanzen wurden Gruppen zugeordnet. Auf diese Weise konnten elf Alkohole, acht Ester, 13 Säuren, zwei Amide, zwei Ketone und sieben sonstige Verbindungen nachgewiesen werden (Tab. 3-35).

**Tab. 3-35: Flüchtige Verbindungen in frischen Säften.** Gehalte der flüchtigen Verbindungen [ppm], die in frischen Säften unreifer Früchten aus Tahiti und Hawai'i sowie in frischen Säften reifer Früchten aus Tahiti, Hawai'i, Costa Rica und Kuba nachgewiesen werden konnten (n.n. nicht nachweisbar, n.q. nicht quantifizierbar).

RI	RI (Lit.*)	Verbindung	Gehalte [ppm]						
			TA unreif	TAreif	HA unreif	HAreif	CRreif	CUreif	
<b>Alkohole</b>									
1047	1026	2-Methyl-3-buten-2-ol	1,07	2,62	13,65	2,24	7,45	11,61	
1100	1083	2-Methylpropanol	2,89	0,91	1,72	2,90	n.q.	1,97	
1150	1136	1-Butanol	7,59	10,27	1,19	6,87	5,85	24,14	
1210	1205/ 1208	3-Methyl-1-butanol/ 2-Methyl-1-butanol	n.q.	1,14	n.q.	1,93	n.q.	3,36	
1250	1236	3-Methyl-3-buten-1-ol	1,1x10 <sup>3</sup>	457,42	451,82	131,96	388,66	670,25	
1322	1321	3-Methyl-2-buten-1-ol	51,48	20,78	42,06	7,50	25,77	38,10	
1324	1318	2-Heptanol	4,55	6,38	n.q.	9,24	n.q.	1,63	
1357	1353	1-Hexanol	8,28	1,92	1,95	25,83	6,02	17,27	
1710	1668	3-Methylthio-propanol	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	0,32	
1867	1864	Benzylalkohol	0,37	0,57	0,76	0,68	0,66	0,69	
<b>Ester</b>									
986	961	Methylbutanoat**							
1033	1031	Ethylbutanoat	11,54	45,97	n.q.	9,38	n.q.	1,53	
1184	1164	Methylhexanoat	26,05	24,73	3,93	26,08	6,01	7,35	
1232	1217	Ethylhexanoat	15,81	78,67	n.q.	24,65	n.q.	n.q.	
1385	1374	Methyloctanoat	6,38	6,45	0,84	8,68	5,24	4,88	

FLÜCHTIGE BESTANDTEILE

RI	RI (Lit. *)	Verbindung	Gehalte [ppm]					
			TA unreif	TAreif	HA unreif	HAreif	CRreif	CUreif
1440	1436	Ethyl-octanoat	5,36	13,90	n.q.	13,06	n.q.	n.q.
1512	—	Methyl-3-(methylthio)-propanoat	0,69	0,43	0,41	0,96	n.q.	0,29
1558	1538	Ethyl-3-(methylthio)-propanoat	0,52	1,70	8,32	0,97	0,45	0,42
<b>Säuren</b>								
1432	1415	Essigsäure	20,00	186,16	15,51	192,84	39,64	32,33
1531	1505	Propansäure	0,58	0,23	0,19	0,24	n.n.	n.n.
1561	1553	2-Methylpropan-säure	23,28	14,07	36,55	17,42	31,55	19,82
1619	1598	Butansäure	23,28	14,07	36,55	17,42	31,55	19,82
1664	1649	2-Methyl-butansäure	12,31	4,96	32,81	6,49	9,85	6,11
1731	1710	Pentansäure	1,38	0,19	0,24	0,35	n.n.	n.n.
1788	—	3-Methylbut-2-ensäure	0,19	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.n.
1806	—	3-Methylbut-3-ensäure	4,72	4,21	2,8	0,90	0,52	7,47
1843	1802	Hexansäure	262,58	115,28	294,68	246,37	206,98	183,00
1947	1931	Heptansäure	n.q.	n.q.	5,18	1,55	4,06	1,76
2060	2025	Octansäure	253,76	164,32	107,30	238,92	284,82	279,08
2268	2270	Decansäure	1,06	0,32	0,67	0,95	1,37	0,37
2282	—	3-Methylthio-propansäure	5,82	2,35	8,33	4,83	4,95	1,14
<b>Ketone</b>								
979	984	2-Pentanon**						
1178	1178	2-Heptanon	31,36	15,47	2,63	46,93	13,61	21,69
<b>Amide</b>								
2106	—	Hexanamid	n.q.	0,20	0,46	0,48	0,49	0,83
2323	—	Octanamid	n.q.	n.q.	n.q.	n.n.	n.n.	0,20
<b>sonstige Verbindungen</b>								
1276	1278	Acetoin	3,12	9,05	10,63	12,79	14,91	2,01
1684	1675	5-Ethyl-dihydro-2-3(H)-furanon	n.q.	n.q.	n.q.	0,62	n.q.	n.q.
1900	1889	5-Butyl-dihydro-2-3(H)-furanon	0,36	0,98	n.q.	0,26	n.q.	n.q.
1977	1957	3-OH-[2H]-Pyran-2-on	n.q.	n.n.	n.n.	n.q.	n.q.	n.q.
2153	2141	Eugenol	n.q.	n.q.	n.q.	n.n.	n.q.	n.q.
3045	—	Vomifolol**						
3168	—	Scopoletin**						

\*angegeben unter 4.4.1.2

\*\*Quantifizierung aufgrund ungenügender Peakform bzw. Überlappung mit dem Lösungsmittelpeak nicht möglich

Diese Beobachtung stimmt mit den bereits publizierten Werten von FARINE *et al.* überein (85). Dort konnten 50 flüchtige Verbindungen aus Früchten mittels GC-MS (CI und EI)

nachgewiesen werden, wobei jedoch auch längerkettige Fettsäuren detektiert wurden (>C10), die hier nicht nachgewiesen werden konnten. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2010 von PINO *et al.* wurden 96 flüchtige Verbindungen in Früchten von *M. citrifolia* identifiziert (87).

Bei den detektierten Alkoholen konnten neben den unverzweigten Alkoholen 1-Butanol, 2-Heptanol und 1-Hexanol sechs verzweigte Alkohole nachgewiesen werden. Die höchsten Gehalte in allen Säften wies die Verbindung 3-Methyl-3-buten-1-ol auf. In den Säften aus unreifen Früchten konnten 1077,97 ppm (TAunreif) bzw. 451,82 ppm (HAunreif) dieser Verbindung detektiert werden. In den Säften aus reifen Früchten waren Konzentrationen von 131,91–670,25 ppm an 3-Methyl-3-buten-1-ol nachweisbar. Des Weiteren konnten bei den Alkoholen 3-Methylthiopropanol (nur in einem Saft quantifizierbar) und Benzylalkohol nachgewiesen werden.

Bei den Esterverbindungen konnten die Methyl- und Ethylester von Butan-, Hexan- und Octansäure sowie von 3-Methylthiopropansäure nachgewiesen werden. So konnten in allen Säften sämtliche genannten Esterverbindungen nachgewiesen werden, die Gehalte schwankten jedoch stark. Als Hauptverbindungen unter den Carbonsäureestern konnten Ethylbutanoat, Methyl- und Ethylhexanoat sowie Methyl- und Ethyloctanoat identifiziert werden.

Bei den Säuren wurden Essig-, Propan-, Butan-, Pentan-, Hexan-, Heptan-, Octan- und Decansäure nachgewiesen. Diese Säuren waren mit Ausnahme von Propan- und Pentansäure in allen Säften nachweisbar. Propan- und Pentansäure sind in den Säften aus Früchten aus Kuba und Costa Rica nicht detektierbar (Anhang Tab. 7-10). Zusätzlich konnten 2-Methylpropansäure, 2-Methylbutansäure, 3-Methylbut-2-ensäure, 3-Methylbut-3-ensäure und 3-Methylthiopropansäure detektiert werden. Hexan- und Octansäure wiesen unter den Säuren die höchsten Gehalte in den Säften von *M. citrifolia* auf. Die Gehalte an Hexansäure lagen in Säften aus unreifen Früchten bei 262,58 ppm (TAunreif) und 294,68 ppm (HAunreif), in Säften aus reifen Früchten bei 115,28–246,37 ppm. Die Gehalte an Octansäure betrugen in Säften aus unreifen Früchten 253,76 ppm (TAunreif) bzw. 107,30 ppm (HAunreif) sowie in Säften aus reifen Früchten 164,32–284,82 ppm.

Bei den Ketonen konnten die Verbindungen 2-Pentanon und 2-Heptanon in allen Säften nachgewiesen werden. Hexanamid war in allen Säften detektierbar. Octanamid war mit Ausnahme von zwei Säften in allen Proben nachweisbar (Anhang Tab. 7-10). Bei den sonstigen Verbindungen konnten Acetoin, 5-Ethyldihydro-2-3(H)-furanon ( $\gamma$ -Hexalacton), 5-Butyldihydro-2-3(H)-furanon ( $\gamma$ -Octalacton), 3-OH-[2H]-Pyran-2-on, Eugenol, Vomifoliol und Scopoletin nachgewiesen werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Säfte aus den unterschiedlichen Regionen die gleichen flüchtigen Verbindungen enthalten. Die Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen der einzelnen Säfte variiert jedoch stark, was wahrscheinlich mit den unterschiedlichen klimatischen Verhältnissen an den verschiedenen Wachstumsstandorten zusammenhängt. Darüber hinaus konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen der Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen in Säften aus unreifen und reifen Früchten nachgewiesen werden.

### 3.2.2 Übersicht über die flüchtigen Verbindungen in fermentierten Säften

Weiterhin wurden die flüchtigen Verbindungen der fermentierten Säfte näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass zusätzlich zu den 43 Verbindungen, die in den frischen Säften detektiert werden konnten, weitere zwölf Verbindungen in fermentierten Säften nachgewiesen werden konnten. Diese Verbindungen waren jedoch nicht alle quantifizierbar. Die flüchtigen Verbindungen, bei denen eine Quantifizierung möglich war, sind in Tab. 3-36 aufgeführt. Zusätzlich wurde in Tab. 3-36 die Verbindung 3-OH-[2H]-Pyran-2-on aufgenommen. Diese Verbindung war in den frischen Säften zwar nachweisbar, jedoch nicht quantifizierbar. Tab. 3-37 zeigt zusätzlich die Verbindungen, die mittels GC-MS nachweisbar, jedoch nicht quantifizierbar waren.

**Tab. 3-36: Flüchtige Verbindungen in fermentierten Säften.** Gehalte der flüchtigen Verbindungen [ppm], die zusätzlich in allen fermentierten Säften nachgewiesen und in mehr als der Hälfte der Säfte quantifiziert werden konnten (n.q. nicht quantifizierbar).

RI	RI (Lit.)*	Verbindung	Gehalte [ppm]			
			TAmed ferm	TAfull ferm	HAmmed ferm	HAFull ferm
1322	1313	Methylactat	7,47	4,93	2,81	3,47
1349	1358	Ethylactat	24,70	24,29	10,45	23,20
1450	1455	2-Furfural	39,37	3,74	n.q.	3,35
1579	1583	2,3-Butandiol	0,27	0,51	0,60	0,21
1608	1599	$\gamma$ -Butyrolacton	1,28	2,36	0,25	0,72
1920	1925	2-Phenylethanol	0,78	0,67	1,23	1,22
1977	1957	3-OH-[2H]-Pyran-2-on	1,45	n.q.	1,89	0,51
2401	2383	Furan-2-carbonsäure	0,64	0,77	0,79	0,65
2488	2486	5-Hydroxy-methylfurfural	1,44	1,40	0,68	0,80

\*angegeben unter 4.4.1.2

In Tab. 3-36 zeigt sich, dass es sich bei den zusätzlich detektierten Verbindungen einerseits um Produkte aus der MAILLARD-Reaktion handelt (2-Furfural, 2-Furancarbonsäure und 5-Hydroxymethylfurfural) und andererseits um mikrobielle Fermentationsprodukte (Methylactat, Ethylactat, 2,3-Butandiol,  $\gamma$ -Butyrolacton, und 2-Phenylethanol).

Die MAILLARD-Reaktionsprodukte wie 2-Furfural, 2-Furancarbonsäure und 5-Hydroxymethylfurfural bilden sich wahrscheinlich während der Pasteurisation der Säfte zur Haltbarmachung. Zusätzlich ist aber auch eine Bildung bei der Fermentation unter den vorherrschenden Umgebungstemperaturen denkbar.

Einen größeren Einfluss als diese Verbindungen scheinen jedoch die mikrobiellen Fermentationsprodukte wie Methyllactat, Ethyllactat, 2,3-Butandiol,  $\gamma$ -Butyrolacton, und 2-Phenylethanol, die ausschließlich in den fermentierten Säften nachgewiesen werden konnten, zu haben. Diese Verbindungen werden beispielsweise von verschiedenen Hefen der Gattung *Saccharomyces* gebildet. In besonders hohen Konzentrationen wurden dabei Ethyllactat,  $\gamma$ -Butyrolacton und 2-Phenylethanol detektiert, die Verbindungen, welche auch in fermentierten Säften anderer Früchte nachgewiesen worden sind (258, 259). Darüber hinaus wurden diese Verbindungen auch nach Wildfermentation exotischer Gabiroba-Früchte (*Campomanesia pubescens*) identifiziert (260). Dies ist nicht weiter auffällig, da fermentierter Noni-Saft im Allgemeinen ebenfalls durch eine unkontrollierte Wildfermentation hergestellt wird.

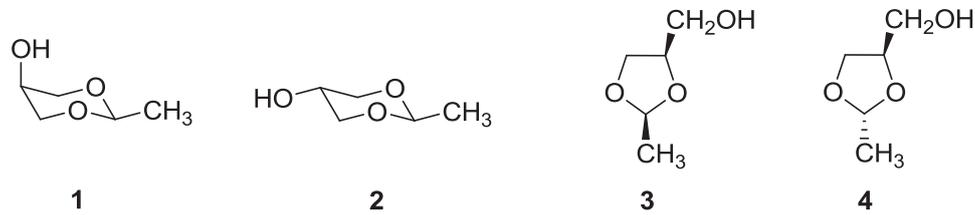
**Tab. 3-37: Flüchtige Verbindungen, die mittels GC-MS in fermentierten Säften nachgewiesen werden konnten.** Diese Verbindungen waren mittels GC-FID nicht quantifizierbar (x nachweisbar, o nicht nachweisbar).

RI	RI (Lit.)*	Verbindung	detektierte Massen	TAméd ferm	TAfull ferm	HAméd ferm	HAfull ferm
1492	1511	<i>cis</i> -5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan	117, 103, 88	x	x	x	x
1604	1610	<i>cis</i> -4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan	117, 103, 87	x	x	o	x
1670	1668	<i>trans</i> -4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan	117, 103, 87	x	x	x	x
1807	1810	<i>trans</i> -5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan	117, 103, 88	o	x	o	x
1988	1993	3-Phenylpropanol	136, 117, 91	o	o	x	x
2540	2551	Phenylessigsäure	136, 91	x	x	x	x

\*angegeben unter 4.4.1.2

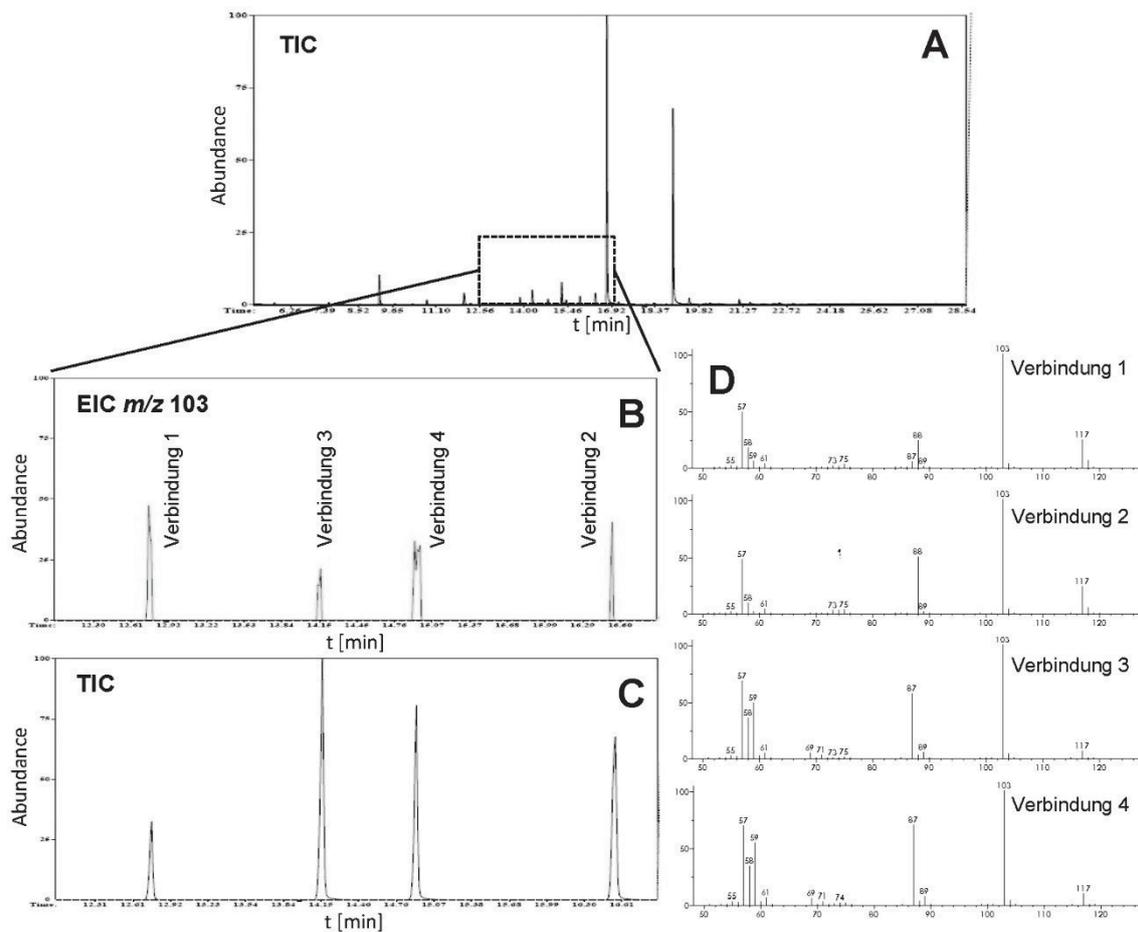
In Tab. 3-37 sind vier weitere Verbindungen aufgeführt, die ausschließlich in fermentierten Säften nachgewiesen werden konnten. Davon stellen 3-Phenylpropanol und Phenylessigsäure wiederum mikrobielle Fermentationsprodukte dar (258, 259). 3-Phenylpropanol konnte jedoch nur in den fermentierten Säften aus Hawai'i detektiert werden. Interessanter erschienen jedoch hinsichtlich ihrer Bildung vier Verbindungen, die zunächst aufgrund niedriger Konzentrationen nicht identifiziert werden konnten. Ein Vergleich der erhaltenen Massenspektren deutete auf die Verbindungen *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan (**1**), *trans*-

5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan (**2**), *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan (**3**) und *trans*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan (**4**) hin (Abb. 3-48).



**Abb. 3-48: Nachgewiesene Oxolane und Dioxane in fermentierten Noni-Säften.** Dargestellt sind die Strukturformeln von *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan (**1**), *trans*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan (**2**), *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan (**3**), *trans*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan (**4**).

Um dies abzusichern, wurden diese heterocyclischen Acetale, wie unter 4.4.1.4 angegeben, synthetisiert und mittels CCC (CCCSytem 7) getrennt. Dadurch wurden die heterocyclischen Acetale erhalten, welche dadurch eindeutig in den fermentierten Säften identifiziert werden konnten (Abb. 3-49).



**Abb. 3-49: Identifizierung der Oxolane und Dioxane in fermentiertem Saft.** Dargestellt ist das TIC von TAfullform (A). In B ist der relevante Ausschnitt von A als EIC ( $m/z$  103) dargestellt. Die zugehörigen Massenspektren der Verbindungen sind unter D dargestellt. Chromatogramm C zeigt die synthetisierten und mittels HSCCC aufgereinigten Oxolane und Dioxane im TIC.

Diese Verbindungen wurden bereits in den 1960ern beschrieben (261). Sowohl die *cis*- (**1**, **3**) als auch die *trans*-Verbindungen (**2**, **4**) sind in Sherry, Portweinen und Madeira-Weinen nachgewiesen worden und können dort zur Altersbestimmung eingesetzt werden, da die Gehalte während der Alterung ansteigen (262-264).

Im Saft Hamedferm konnte Verbindung **3** nicht nachgewiesen werden. In Tamedferm und Hamedferm konnte überdies die *trans*-Verbindung **2** nicht identifiziert werden. Dies könnte daran liegen, dass die *cis*-Verbindungen bevorzugt gebildet werden und damit in deutlich höheren Konzentrationen vorliegen (262).

Die Bildung dieser Dioxane und Oxolane erfolgt aus Acetaldehyd und Glycerol bei sauren pH-Werten und unter Ausschluss von SO<sub>2</sub>. Eine Beschreibung des Bildungsweges ist bei DA SILVA FERREIRA *et al.* angegeben (265). Bei der unkontrollierten Fermentation der Früchte ist die Entstehung von Acetaldehyd und Glycerol, welche als Edukte für die Bildung von **1–4** dienen, denkbar. Dies würde auch erklären, warum diese Verbindungen in frischen Säften, die keiner Fermentation unterworfen wurden, nicht nachweisbar waren.

#### Betrachtung der kommerziellen Säfte hinsichtlich *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan und *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan

Aufgrund des Nachweises der Dioxane und Oxolane in fermentiertem Saft von *M. citrifolia* wurden 21 kommerzielle Säfte auf die Verbindungen *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan und *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan, die laut Literatur bevorzugt gebildet werden, gescreent (Tab. 3-38).

**Tab. 3-38: Untersuchung von 21 kommerziellen Säften hinsichtlich *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan und *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan.** Dargestellt sind die Daten der 21 kommerziellen Säfte, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft enthalten (SR1–13) und der Säfte, die mit anderen Säften (SZ1–8) versetzt sind (x nachweisbar, o nicht nachweisbar).

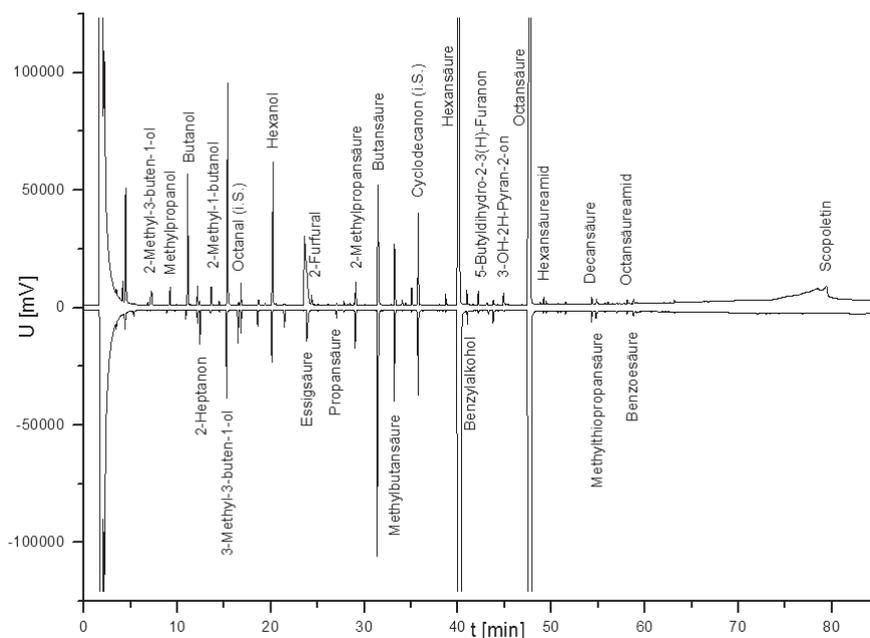
Verbindung	SR1	SR2	SR3	SR4	SR5	SR6	SR7	SR8
<i>cis</i> -5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan	x	x	x	x	o	x	x	x
<i>cis</i> -4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan	o	o	o	x	o	x	x	x
	SR9	SR10	SR11	SR12	SR13			
<i>cis</i> -5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan	x	x	x	o	o			
<i>cis</i> -4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan	x	o	x	o	o			
	SZ1	SZ2	SZ3	SZ4	SZ5	SZ6	SZ7	SZ8
<i>cis</i> -5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan	o	x	x	o	o	o	o	o
<i>cis</i> -4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan	o	x	o	o	o	o	o	o

Das Screening ergab, dass in 12 von 21 Säften (SR1–4, SR6–11, SZ2 und SZ3), mindestens die Verbindung *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan nachgewiesen werden konnte. In 7 dieser 12 Säfte (SR4, SR6–9, SR11 und SZ2) konnte des Weiteren *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan detektiert werden. Bei den Säften von *M. citrifolia* ohne andere Zusätze (SR1–13) konnte in drei Säften (SR5, SR12 und SR13) keine dieser Verbindungen nachgewiesen werden. Diese Noni-Säfte wurden demnach keiner Fermentation unterworfen und können somit als frische Säfte eingestuft werden. Bei den Säften von *M. citrifolia*, die laut Hersteller einen Zusatz anderer Säfte enthielten, wurde in sechs von acht Säften (SZ1 und SZ4–8) weder *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan noch *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan detektiert. Die Noni-Säfte mit Zusatz anderer Säfte zeigten demnach eine deutlich höhere Anzahl an frischen Säften. Zu beachten bleibt hier jedoch, dass die starke Verdünnung der Säfte von *M. citrifolia* auch dazu führen kann, dass die Verbindungen nicht detektierbar waren.

### 3.2.3 Vergleich der flüchtigen Verbindungen

#### 3.2.3.1 Alkohole

Im Folgenden sollen die Gehalte der flüchtigen Verbindungen in frischen und fermentierten Säften näher betrachtet werden. Bei der Analyse der Chromatogramme (GC-FID) von frischem und fermentiertem Saft fallen nur wenige offensichtliche Unterschiede auf (Abb. 3-50).



**Abb. 3-50: Chromatogramme von fermentiertem und frischem Saft.** Dargestellt sind die Chromatogramme (GC-FID) der flüchtigen Verbindungen von fermentiertem (oben) und frischem Noni-Saft (unten). Als interne Standards (i.S.) wurden Octanal und Cycloodecanon verwendet.

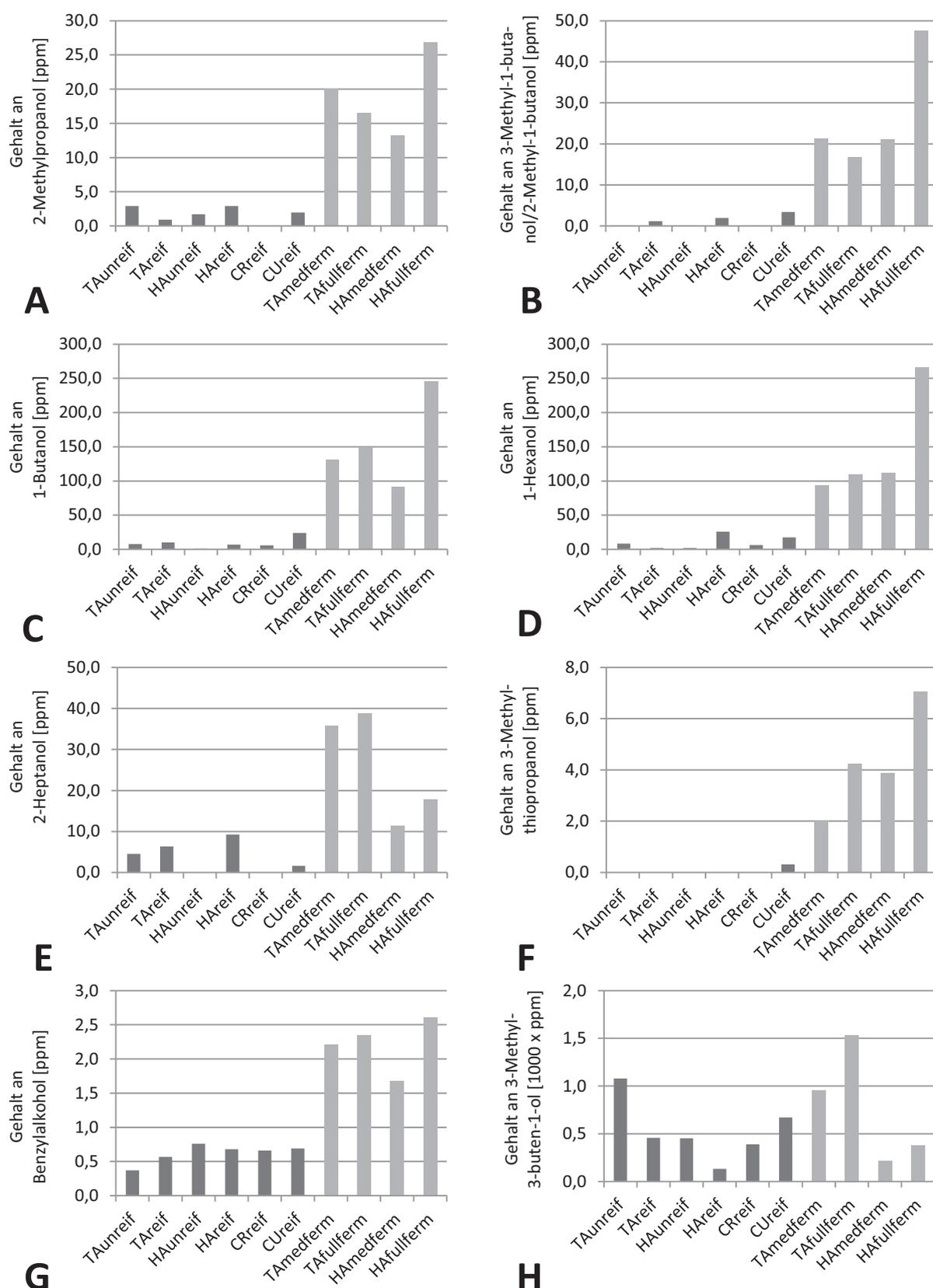
Am stärksten unterscheiden sich die Chromatogramme bei den  $R_t$  von 70–80 min. Das Chromatogramm des fermentierten Saftes weist bei dieser  $R_t$  einen breiten Scopoletin-Peak auf. Es ist bekannt, dass die Konzentration an Scopoletin während der Fermentation ansteigt (57). Dies wird ausführlich unter 3.3.1.2 diskutiert.

Zunächst soll detailliert auf die Unterschiede der alkoholischen Verbindungen zwischen frischen und fermentierten Säften eingegangen werden. Die Abb. 3-51 zeigt die Gehalte der neun Alkohole 2-Methylpropanol (A), 3-Methyl-1-butanol/2-Methyl-1-butanol (B), 1-Butanol (C), 1-Hexanol (D), 2-Heptanol (E), 3-Methylthiopropyl (F), Benzylalkohol (G) und 3-Methyl-3-buten-1-ol (H) in den frischen und fermentierten Säften. Die verzweigten Alkohole 2-Methylpropanol (A) und 3-Methyl-1-butanol/2-Methyl-1-butanol (B) stellen typische Fermentationsalkohole dar. Diese werden u.a. von Hefen der Gattung *Saccharomyces* bei fermentativen Prozessen synthetisiert und wurden bereits in Wein nachgewiesen (258, 266). Die Bildung der Verbindungen durch Hefen würde erklären, warum die Gehalte in den fermentierten Säften mit 13,18–26,83 ppm an 2-Methylpropanol bzw. 16,80–47,55 ppm an 3-Methyl-1-butanol/2-Methyl-1-butanol deutlich höher lagen als in den frisch hergestellten Säften, in welchen die Werte <3 ppm 2-Methylpropanol bzw. <4 ppm 3-Methyl-1-butanol/2-Methyl-1-butanol betragen. Innerhalb der Gruppe der fermentierten Säfte war jedoch keine Tendenz zu verzeichnen. Die Alkohole 1-Butanol (Abb. 3-51 C) und 1-Hexanol (Abb. 3-51 D) wiesen in den frischen Säften maximale Gehalte von 24,14 ppm bzw. 25,83 ppm auf. In den fermentierten Säften lagen die Gehalte mit >91 ppm 1-Butanol und >93 ppm 1-Hexanol deutlich höher. Beide Alkohole sind ebenfalls als Fermentationsprodukte von Hefen bekannt (259).

In Abb. 3-51 E sind die Gehalte an 2-Heptanol dargestellt. In den frischen Säften lag die Konzentration an 2-Heptanol teilweise unterhalb der Bestimmungsgrenze. In HAreif waren jedoch Gehalte von 9,24 ppm nachweisbar. Die Werte in den fermentierten Säften lagen mit 11,31 ppm in Hamedferm etwas und mit 17,88–38,74 ppm in den restlichen fermentierten Säften zwei- bis viermal so hoch. Die Verbindung 2-Heptanol wurde mit erhöhten Konzentrationen in fermentierten Bambussprösslingen (*Phyllostachys pubescens*) sowie fauligen Trauben (*Vitis vinifera*) und daraus hergestellten Weinen nachgewiesen (267, 268). Es ist deshalb nicht weiter auffällig, dass diese Verbindung ebenfalls in fermentiertem Noni-Saft nachgewiesen werden konnte.



## FLÜCHTIGE BESTANDTEILE



**Abb. 3-51: Gehalte an Alkoholen in Säften von *M. citrifolia*.** Dargestellt sind die Gehalte [ppm] von 2-Methylpropanol (A), 3-Methyl-1-butanol/2-Methyl-1-butanol (B), 1-Butanol (C), 1-Hexanol (D), 2-Heptanol (E), 3-Methylthioopropanol (F), Benzylalkohol (G) und 3-Methyl-3-buten-1-ol (H).

Die Verbindung Benzylalkohol (G) war sowohl in frischen als auch in fermentierten Säften quantifizierbar. In den frischen Säften lagen die Gehalte bei 0,37–0,76 ppm. In den fermentierten Säften betrugen diese 1,67–2,60 ppm. Dies könnte mit der mikrobiellen Fermentation von Noni zusammenhängen, da Benzylalkohol ebenfalls ein typisches Fermentationsprodukt darstellt (259). Bei 1-Butanol, 1-Hexanol, 2-Heptanol, 3-Methylthiopropyl- und Benzylalkohol zeigte sich überdies innerhalb der Gruppe der fermentierten Säfte der Trend, dass mit zunehmender Dauer der Fermentation diese Gehalte ansteigen.

In Abb. 3-51 H sind die Gehalte an 3-Methyl-3-buten-1-ol angegeben. Diese Verbindung stellte die Hauptkomponente der Alkohole in frischen Säften aus *M. citrifolia* dar. Die Gehalte lagen zwischen 131,96 ppm und 1077,97 ppm in den frischen Säften und zwischen 216,49 ppm und 1534,07 ppm in den fermentierten Säften. Hier konnten keine Unterschiede zwischen frischen und fermentierten Säften festgestellt werden. 3-Methyl-3-buten-1-ol wird biosynthetisch in Noni-Früchten gebildet und liegt ebenfalls glykosidisch gebunden in den Früchten vor. Auf diese Untersuchungen wird unter 3.2.4 eingegangen.

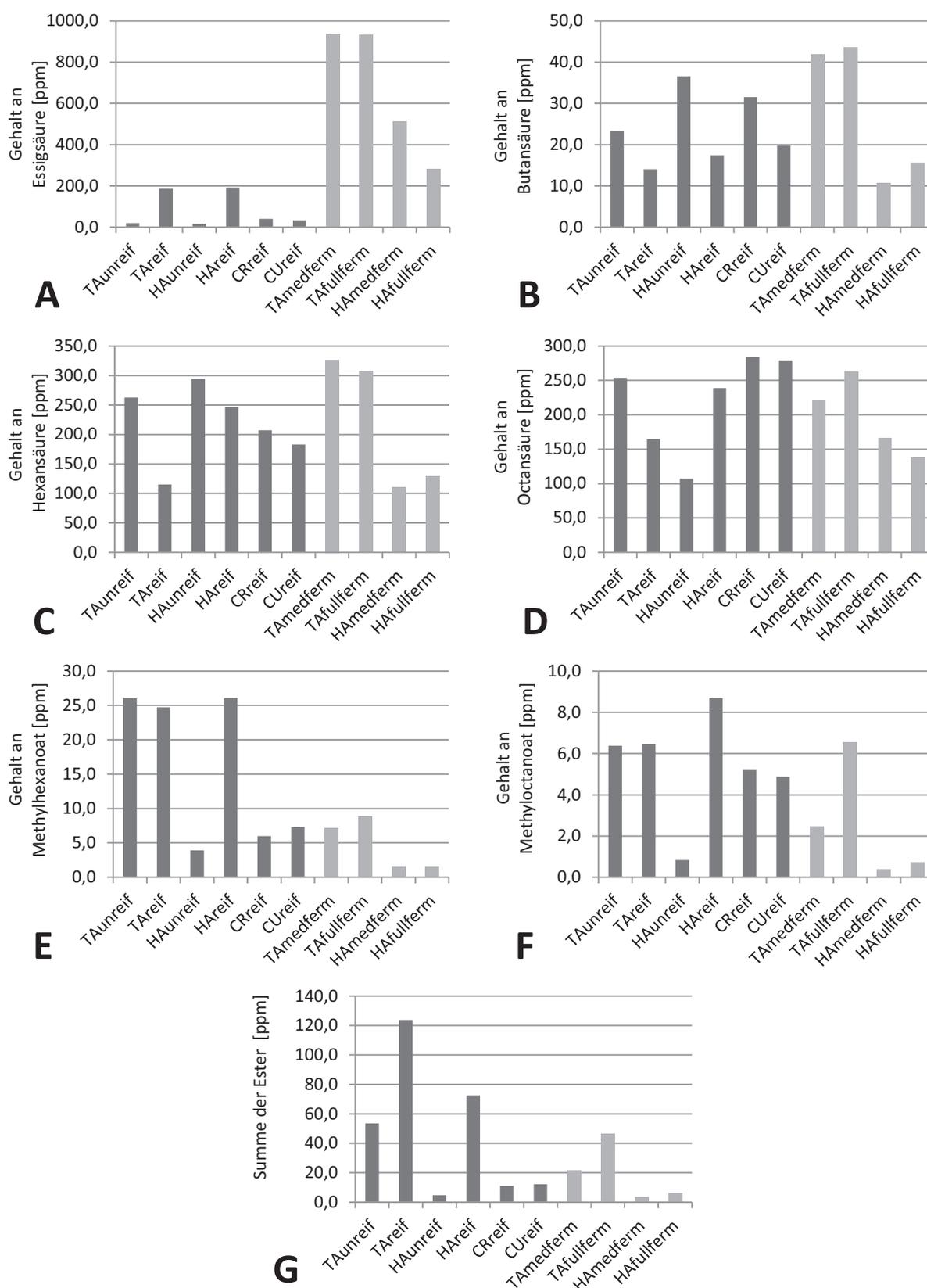
### 3.2.3.2 Carbonsäuren und Carbonsäureester

Aufgrund der Beobachtung, dass sich die Gehalte flüchtiger Carbonsäuren und deren zugehöriger Ester gegenseitig beeinflussen können (durch die Bildung von Estern aus diesen Säuren), wurden diese beiden Verbindungsklassen gemeinsam analysiert (269, 270). In Abb. 3-52 sind die Gehalte an den Säuren Essigsäure (A), Butansäure (B), Hexansäure (C) und Octansäure (D), den Estern Methylhexanoat (E) und Methyloctanoat (F), sowie die Summe der Carbonsäureester Methylhexanoat, Methyloctanoat, Ethylhexanoat und Ethyloctanoat (G) in frischen und fermentierten Säften dargestellt.

Der Gehalt an Essigsäure (Abb. 3-52 A) lag in frischen Säften bei 15,51–192,84 ppm. In den fermentierten Säften konnten deutlich höhere Gehalte von 282,28–936,88 ppm detektiert werden. Der Essigsäuregehalt steigt demnach bei der Fermentation an. Dieser Zusammenhang ist offensichtlich, da Essigsäure ein typisches Stoffwechselprodukt verschiedener Bakterien ist (270). Butansäure war mit Gehalten von 10,68–43,57 ppm in den Säften aus *M. citrifolia* enthalten. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen frischen und fermentierten Säften. So waren in den fermentierten Säften mit Ursprung Tahiti die höchsten Werte mit 41,91 ppm (TAmedferm) bzw. 43,57 ppm (TAfullferm) nachzuweisen, wohingegen in den fermentierten Säften von Hawai'i die Gehalte mit 10,68 ppm (HAmeferm) bzw. 15,66 ppm (HAfullferm) relativ niedrig lagen.



## FLÜCHTIGE BESTANDTEILE



**Abb. 3-52: Gehalte an flüchtigen Carbonsäuren und Carbonsäureestern in Säften aus *M. citrifolia*.** Dargestellt sind die Gehalte [ppm] der Säuren Essigsäure (A), Butansäure (B), Hexansäure (C) und Octansäure (D) sowie der Ester Methylhexanoat (E) und Methyloctanoat (F) in frischen und ferment-

tierten Säften aus *M. citrifolia*. Zusätzlich ist die Summe der Ester Methylhexanoat, Methyloctanoat, Ethylhexanoat und Ethyloctanoat in den Säften aus *M. citrifolia* (G) gezeigt.

Hexan- und Octansäure bildeten mengenmäßig den größten Anteil der flüchtigen Säuren frischer Säfte. So lagen die Gehalte in den frischen Säften an Hexansäure zwischen 115,28–294,68 ppm bzw. an Octansäure zwischen 107,30–284,82 ppm. In den fermentierten Säften von Tahiti konnten höhere Gehalte an Hexansäure mit 326,58 ppm (TAMEDferm) und 307,17 ppm (TAfullferm) festgestellt werden. Die Gehalte der fermentierten Säfte von Hawai'i lagen deutlich niedriger mit 110,53 ppm (HAMedferm) und 128,96 ppm (HAfullferm) als die der Säfte von Tahiti.

Die Gehalte an Octansäure in den fermentierten Säften lagen innerhalb der angegebenen Werte für frische Säfte (Tab. 3-35). Es konnten keine Unterschiede bei den Gehalten an Hexan- und Octansäure in frischen und fermentierten Säften nachgewiesen werden. Abschließend kann für die untersuchten flüchtigen Carbonsäuren festgestellt werden, dass nur im Fall von Essigsäure eine eindeutige Veränderung der Konzentration während der Fermentation auftritt. Der Einfluss der in Noni vorkommenden Fettsäure-Saccharide auf die Gehalte an Butansäure, Hexansäure und Octansäure scheint eine große Rolle zu spielen (vgl. 3.2.4).

Bezüglich der Carbonsäureester zeigten sich für die einzelnen Säfte sehr unterschiedliche Werte. So konnten in den frischen Säften Gehalte an Methylhexanoat von 3,93–26,08 ppm und für die fermentierten Säfte Gehalte von 1,51–8,86 ppm detektiert werden (Abb. 3-52 E). Die Konzentrationen des Esters Methyloctanoat lagen mit 0,84–8,68 ppm in frischen Säften und 0,38–6,56 ppm in fermentierten Säften niedriger als die Werte für Methylhexanoat (Abb. 3-52 F).

Anhand dieser Ester konnten jedoch keine Veränderungen während der Reifung bzw. Fermentation verfolgt werden. Sinnvoll erschien es deshalb, die Summe der relevanten Ester Methylhexanoat, Methyloctanoat, Ethylhexanoat und Ethyloctanoat zu betrachten. Während der Reifung der Früchte scheinen Carbonsäureester gebildet worden zu sein. So stiegen die Werte von 53,60 ppm auf 123,75 ppm für die frischen Säfte von Tahiti und von 4,77 ppm auf 72,47 ppm für die frischen Säfte von Hawai'i. Solch ein Anstieg war, wenn auch nicht so ausgeprägt, während der Fermentation zu verzeichnen. Hier stiegen die Gehalte von 21,93 ppm auf 46,43 ppm in den fermentierten Säften von Tahiti und von 3,93 ppm auf 6,46 ppm in den fermentierten Säften von Hawai'i. Die Gehalte an den Estern in den vier Wochen fermentierten Säften haben sich damit im Gegensatz zu den zwei Wochen fermentierten Säften verdoppelt (Abb. 3-52 G). Die Bildung von Estern während der Fruchtreifung reifer und überreifer Früchte sowie während des Fermentationsprozesses wurde von PINO *et al.* beschrieben (87, 88).

### 3.2.4 Gebundene flüchtige Verbindungen

Aus den Früchten von *M. citrifolia* wurden sowohl glykosidisch gebundene flüchtige Verbindungen als auch über eine Esterbindung an Saccharide gebundene flüchtige Substanzen isoliert (69, 271, 272). Es existieren jedoch bis zu diesem Zeitpunkt keine Daten über die Gehalte an freizusetzenden Verbindungen aus gebundenen flüchtigen Vorstufen aus Säften aus *M. citrifolia*. Aus diesem Grund wurde eine Bestimmung der Gehalte an freizusetzenden Verbindungen aus frischem Saft von unreifen Früchten (HAunreif), reifen Früchten (HAreif) und fermentiertem Saft (HAMEDferm) durchgeführt.

Dafür wurden XAD-2-Extrakte der Säfte einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen (s. 4.4.1.3). Das Adsorbens XAD-2 eignet sich hierbei besonders gut für die Anreicherung an Kohlenhydraten gebundener Verbindungen (190). Das eingesetzte Enzym Rapidase AR2000 ist ein kommerziell erhältliches Präparat, welches vorwiegend in der Weinbereitung zur Freisetzung von Aromavorstufen eingesetzt wird. Es besitzt neben der Hauptaktivität als  $\beta$ -D-Glykosidase die Fähigkeit, weitere andersartig gebundene Glykosidreste abzuspalten. Der Einsatz des Enzyms zur Freisetzung gebundener flüchtiger Verbindungen ist hinlänglich bekannt (273, 274). Bei der Einschätzung der Gehalte an freizusetzenden Verbindungen war zu beachten, dass zum Einen die eingesetzten XAD-2-Extrakte trotz vorheriger Gefriertrocknung geringe Mengen flüchtiger Substanzen enthalten und zum Anderen, dass das eingesetzte Enzym ebenfalls flüchtige Verbindungen beinhalten kann. Beide Fehlerquellen wurden durch mitgeführte Vergleichsproben ausgeschlossen. Nach enzymatischer Hydrolyse der XAD-2-Extrakte von HAunreif, HAreif und HAMEDferm konnten elf Hauptverbindungen identifiziert und quantifiziert werden (Tab. 3-39). Unter den Verbindungen befindet sich auch (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure, welche durch Vergleich der EI-MS-Daten und des Retentionsindex mit der isolierten und identifizierten Standardsubstanz (s. 7.1) eindeutig identifiziert werden konnte.

Es zeigte sich, dass die flüchtigen Hauptverbindungen 3-Methyl-3-buten-1-ol, Hexansäure und Octansäure in Saft aus *M. citrifolia* auch die Verbindungen waren, welche hauptsächlich als Vorstufen gebunden an Kohlenhydrate im Saft vorlagen. So konnten an 3-Methyl-3-buten-1-ol aus HAunreif 19,62 ppm, aus HAreif 409,70 ppm und aus HAMEDferm 148,21 ppm freigesetzt werden. Durch das Enzym Rapidase AR2000 scheinen überdies auch Esterbindungen aus Kohlenhydraten und Fettsäuren im großen Umfang gespalten zu werden. An Hexansäure konnten aus HAunreif 36,10 ppm, aus HAreif 174,68 ppm und HAMEDferm 5,52 ppm freigesetzt werden. Bei Octansäure, welche in ähnlichen Konzentrationen wie Hexansäure in Noni-Saft enthalten war, ergaben sich etwa doppelt so hohe Werte wie für Hexansäure mit 71,30 ppm für HAunreif, 474,69 ppm für HAreif und 9,70 ppm

für HAmeferm. Als weitere Verbindungen, die einer Freisetzung unterlagen, konnten 3-Methyl-2-buten-1-ol, 1-Hexanol, Butansäure, 2-Methylbutansäure, 3-Methyl-3-butensäure, Benzylalkohol, Decansäure und (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure identifiziert werden.

**Tab. 3-39: Gehalte der freigesetzten Verbindungen aus Saft aus *M. citrifolia*.** Massengehalte [ppm] der enzymatisch freigesetzten Verbindungen aus XAD-2-Extrakten von HAunreif, HAreif und HAmeferm (n.q. nicht quantifizierbar).

RI	RI (Lit.)*	Verbindung	Gehalt [ppm]		
			HAunreif	HAreif	HAmeferm
1252	1236	3-Methyl-3-buten-1-ol	19,62	409,70	148,21
1324	1326	3-Methyl-2-buten-1-ol	4,63	40,84	13,05
1355	1353	1-Hexanol	0,99	3,31	1,84
1639	1598	Butansäure	1,51	19,12	2,14
1682	1649	2-Methylbutansäure	1,22	10,64	3,03
1828	—	3-Methyl-3-butensäure	n.q.	1,84	0,47
1843	1802	Hexansäure	36,10	174,68	5,52
1870	1864	Benzylalkohol	1,97	2,17	1,38
2060	2025	Octansäure	71,30	474,69	9,70
2268	2270	Decansäure	1,13	10,84	n.q.
2281	2280**	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> )-Decatriensäure	0,88	4,03	0,48

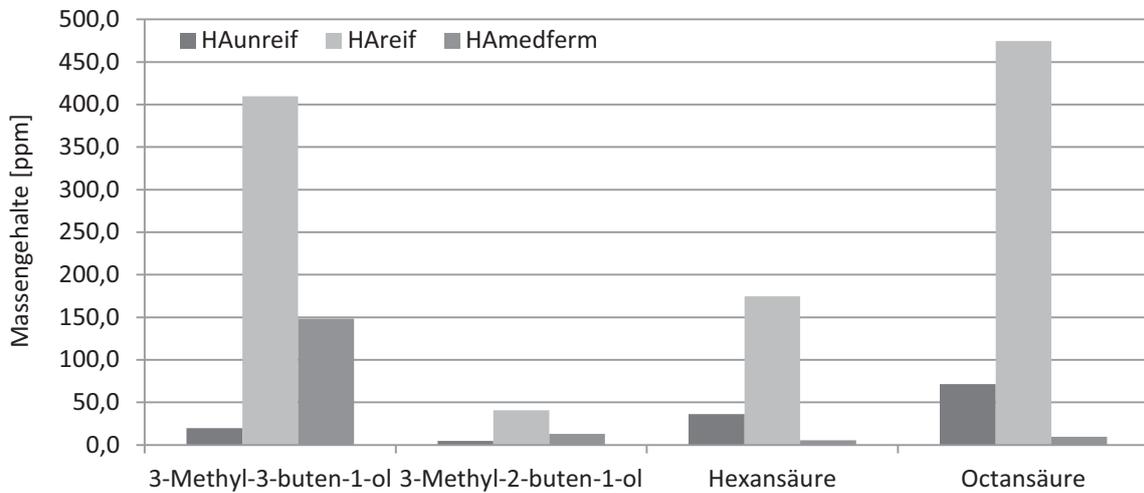
\*angegeben unter 4.4.1.2

\*\*bestimmt mit isolierter Reinsubstanz

Für die Verbindung 3-Methyl-3-buten-1-ol sind u.a. die glykosidisch gebundenen Vorstufen 1-*O*-(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranose und Noniosid A bekannt, welche auch in dieser Arbeit isoliert und identifiziert werden konnten (s. Anhang 7.1). Für Hexansäure sind die durch Esterbindungen an Saccharide gebundenen Vorstufen Noniosid C und H, für Octansäure die Vorstufen Noniosid B, D, G und H sowie für Decansäure die Vorstufe Noniosid E bekannt (Verbindungen sind in Abb. 2-9 angegeben). Darüber hinaus wurden Vorstufen von 2-Methylbutansäure isoliert (271). Die Verbindungen 1-Hexanol und Benzylalkohol sind aus verschiedenen Früchten als glykosidisch gebundene Vorstufen bekannt, die durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt werden können (275, 276). Für die dreifach ungesättigte Fettsäure (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine glykosidisch gebundene Vorstufe isoliert werden (s. Abb. 3-21).

Bei allen freigesetzten flüchtigen Verbindungen fällt auf, dass die Werte für die freigesetzten Verbindungen für die reifen Früchte am höchsten waren. Während der Reifung der Früchte steigen die Gehalte der an Saccharide gebundenen flüchtigen Verbindungen an, weshalb die Gehalte im Saft aus unreifen Früchten bei den meisten Verbindungen deutlich niedriger lagen. Im fermentierten Saft wurden deutlich niedrigere Konzentrationen an freigesetzten Verbindungen detektiert. Während der Fermentation der Säfte sinken die Gehalte der gebundenen flüchtigen Verbindungen stark ab. Dies deutet auf eine Spaltung dieser Ver-

bindungen unter Fermentationsbedingungen hin. In Abb. 3-53 wird dies für 3-Methyl-3-buten-1-ol, 3-Methyl-2-buten-1-ol, Hexansäure und Octansäure verdeutlicht.



**Abb. 3-53: Freigesetzte flüchtige Verbindungen aus Saft aus *M. citrifolia*.** Dargestellt sind die enzymatisch freigesetzten Verbindungen 3-Methyl-3-buten-1-ol, 3-Methyl-2-buten-1-ol, Hexansäure und Octansäure in Saft von unreifen Früchten (HAunreif), reifen Früchten (HAreif) und fermentiertem Saft (Hamedferm).

Im fermentierten Saft konnten höhere Gehalte der Alkohole 3-Methyl-3-buten-1-ol mit 148,21 ppm und 3-Methyl-2-buten-1-ol mit 13,05 ppm im Gegensatz zu den Carbonsäuren Hexansäure mit 5,52 ppm und Octansäure mit 9,70 ppm enzymatisch freigesetzt werden. Wird die Freisetzung der flüchtigen Verbindungen im fermentierten Saft in Bezug zum frischen Saft gesetzt, beträgt die Freisetzung bei 3-Methyl-3-buten-1-ol bzw. 3-Methyl-2-buten-1-ol etwa 30 % und bei Hexan- bzw. Octansäure lediglich 3 % bzw. 2 %. Diese Beobachtung kann mit der Stabilität der Bindung zwischen dem Kohlenhydrat-Teil und dem Aglykon erklärt werden. So ist bei den Alkoholen 3-Methyl-3-buten-1-ol und 3-Methyl-2-buten-1-ol eine glykosidische Bindung vorhanden, die im Gegensatz zur Esterbindung bei Hexan- und Octansäure deutlich stabiler ist und nicht so einfach hydrolysiert wird. Dies deckt sich mit den Untersuchungen, welche unter 3.1.1.2.2 und 3.1.1.2.3 aufgeführt sind.

### 3.3 Quantifizierung von Inhaltsstoffen in Früchten von *Morinda citrifolia*

#### 3.3.1 Quantifizierungen und deren Nutzen für die Authentifizierung

Im folgenden Abschnitt wird auf die Quantifizierung von verschiedenen Inhaltsstoffen in Fruchtsäften von *M. citrifolia* eingegangen. Ziel dieser Untersuchungen war es nähere Informationen über die Zusammensetzung der Sekundärmetabolite in Noni-Fruchtsäften zu erhalten. So sollten Verbindungen identifiziert werden, die zum Einen als Marker für Noni-Säfte im Allgemeinen in Frage kommen könnten und zum Anderen als Indikatoren für Verfälschungen von Noni-Säften, durch Verdünnung mit Wasser oder günstigeren Fruchtsäften, dienen könnten. Darüber hinaus ist hinsichtlich der Authentizität von Noni-Säften bisher unklar, ob frische oder fermentierte Früchte für das Endprodukt eingesetzt wurden. Einen ersten Ansatz zur Evaluierung des Problems bieten die unter 3.2.2 aufgeführten Oxolane und Dioxane. Hier sollte eine Methode anhand nichtflüchtiger Verbindungen entwickelt werden, so dass relativ einfach eine eindeutige Unterscheidung zu treffen ist. Folgende Verbindungen wurden in den Fruchtsäften von *M. citrifolia* quantifiziert: Asperulosidsäure, Scopoletin, (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure, Furan-2-carbonsäure, Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A. Die untersuchten kommerziell erhältlichen Säfte wurden nach Tab. 4-2 in reine Noni-Säfte (SR1–13) und Säfte mit Zusatz anderer Säfte (SZ1–8) anhand der Herstellerangabe eingeteilt. Für die Auswertung wurden die Säfte vorher unter Berücksichtigung ihrer Gruppe zufällig nummeriert.

##### 3.3.1.1 Asperulosidsäure

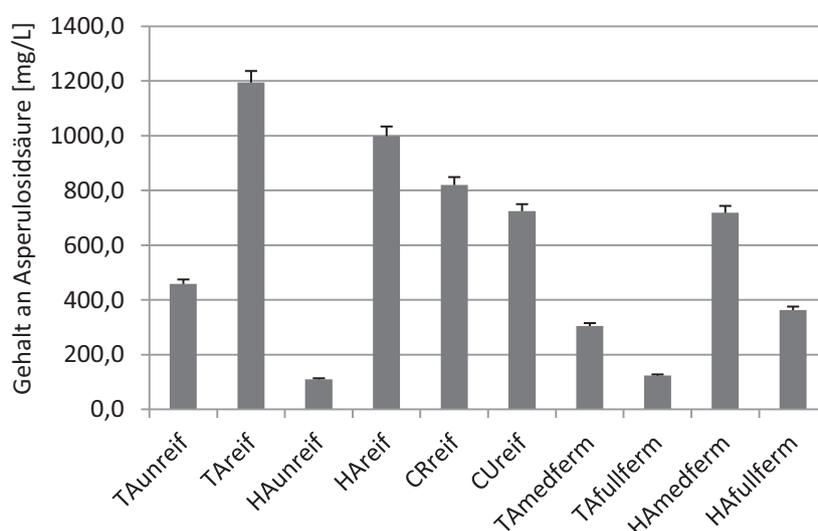
Asperulosidsäure gehört zur Substanzklasse der Iridoide. Iridoide sind im Pflanzenreich weit verbreitet und sind auffallend häufig Bestandteil von Volksheilmitteln (115). Chemotaxonomisch sind Iridoide nützliche Marker. So wurde z.B. Aucubin als Marker für die Pflanzenfamilie *Plantago* (Plantaginaceae), Asperulosid für *Galium* (Rubiaceae) und Harpagid für *Scrophularia* (Scrophulariaceae) vorgeschlagen (116, 117, 277).

**Tab. 3-40: Parameter für die Bestimmung von Asperulosidsäure.** Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die Quantifizierung von Asperulosidsäure.

Geradengleichung		linearer Bereich	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	$R^2$
<i>m</i>	<i>n</i>	(mg/mL)			
$1,494 \times 10^8$	$-1,439 \times 10^6$	0,013–0,130	0,005	0,019	0,999

Asperulosidsäure konnte bis jetzt neben *M. citrifolia* aus *Galium spec.*, *Hedyotis corymbosa* und *Genipa americana* isoliert werden (278-280). Alle aufgeführten Arten gehören zur

Gattung der Rötengewächse (Rubiaceae). Aus diesen Pflanzen wurde Asperulosidsäure jedoch nicht aus Früchten, sondern aus den grünen Pflanzenteilen, wie den Blättern, isoliert. In Früchten ist Asperulosidsäure bis jetzt nur in Noni nachgewiesen wurden. Es könnte deshalb als Marker für Noni-Saft in Frage kommen. Nebenbei konnte es auch in anderen Pflanzenteilen von *M. citrifolia*, wie den Blättern, nachgewiesen werden (72). In den Früchten von *M. citrifolia* stellt Asperulosidsäure zusammen mit 10-Deacetylasperulosidsäure das Hauptiridoid dar (82). Darüber hinaus sind Iridoide in Fruchtsäften eher selten anzutreffen, wie die geringe Anzahl an Publikationen zeigt. So sind über Früchte von *M. citrifolia* hinaus lediglich Daten über die Iridoidglykoside Monotropein und 6,7-Dihydromonotropein in europäischen und amerikanischen Cranberrys (*Vaccinium macrocarpon* bzw. *Vaccinium oxycoccos*), Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus*) und Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) verfügbar (281). Aufgrund dessen sollte Asperulosidsäure in Säften aus *M. citrifolia* quantifiziert werden. In Tab. 3-40 sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD und LOQ angegeben. Die Standardabweichung für die Quantifizierung von Asperulosidsäure betrug 3,6 %. Die Verbindung Asperulosidsäure ist kommerziell als Standard bis zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar. Für die Kalibrierung wurde deshalb die isolierte und strukturell aufgeklärte Verbindung aus 3.1.1.6.2 verwendet.

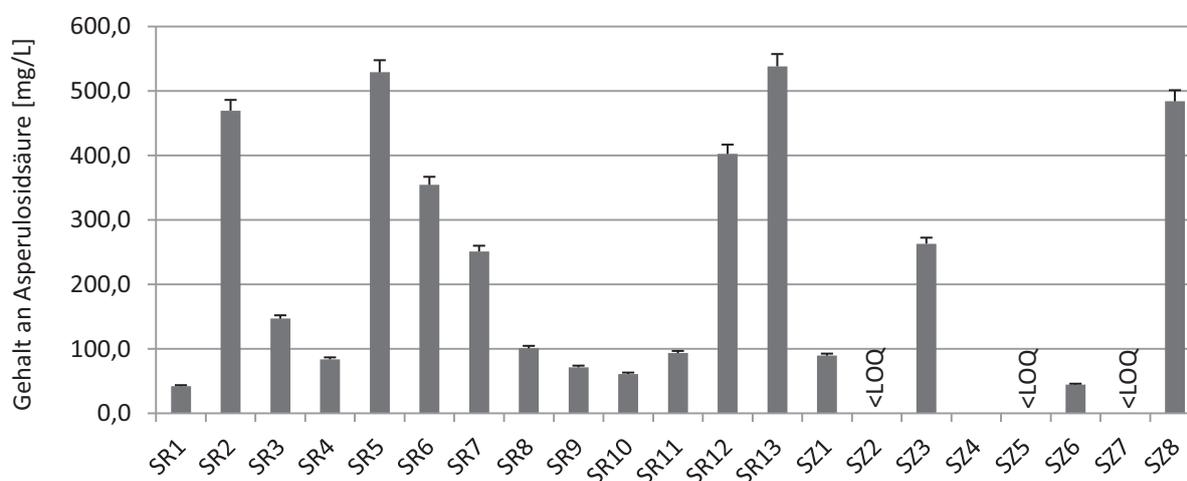


**Abb. 3-54: Gehalte an Asperulosidsäure in zehn authentischen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an Asperulosidsäure [mg/L] in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (TAmeferm und TAffullferm) und Hawai'i (HAmeferm und HAffullferm).

In den Säften aus reifen Früchten konnten durchschnittlich die höchsten Gehalte an Asperulosidsäure mit 724–1195 mg/L Saft detektiert werden (Abb. 3-54). Anzumerken ist, dass die Gehalte der Säfte trotz unterschiedlicher Herkunft (Tahiti, Hawai'i, Costa Rica und

Kuba) sich in engen Grenzen bewegen. In den Säften aus unreifen Früchten konnten Gehalte von 110 mg/L für HAunreif und 459 mg/L Saft für TAunreif nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass im Verlauf der Reifung der Früchte Asperulosidsäure in den Früchten entsteht. Diese Beobachtungen stimmten im Wesentlichen mit den von DENG *et al.* überein (82). Die Gehalte der fermentierten Säfte lagen zwischen 124 und 718 mg/L Saft. Darüber hinaus war innerhalb der fermentierten Säfte der Trend zu sehen, dass mit steigender Fermentationsdauer die Gehalte an Asperulosidsäure abnahmen. So wurden in Tamedferm 305 mg/L Saft detektiert, wohingegen in Taffullferm nur noch 124 mg/L Saft nachweisbar waren, was einer Abnahme an Asperulosidsäure um 60 % entsprach. In Hamedferm konnten 718 mg/L Saft nachgewiesen werden und in HAfullferm nur noch 363 mg/L Saft (Abnahme von Asperulosidsäure um 50 %).

Werden alle untersuchten Noni-Säfte (unreif, reif, fermentiert) betrachtet, zeigen sich starke Konzentrationsunterschiede an Asperulosidsäure. Aufgrund dieser Schwankungen ist es wenig sinnvoll, eine Verdünnung der Säfte anhand von Asperulosidsäure nachzuweisen. Auch der Verarbeitungsgrad der Früchte, d.h. frisch oder fermentiert, ist mit diesem Parameter nicht sinnvoll. Jedoch ist aufgrund des seltenen Vorkommens dieser Verbindung in Fruchtsäften ein Einsatz als Marker im Allgemeinen denkbar.



**Abb. 3-55: Gehalte an Asperulosidsäure in 21 kommerziell erhältlichen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an Asperulosidsäure [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert.

Bei den kommerziell erhältlichen Säften, die laut Hersteller nicht mit anderen Säften versetzt sind (SR1–13), waren Gehalte an Asperulosidsäure von 42–539 mg/L Saft nachweisbar (Abb. 3-55). Diese Beobachtungen befinden sich in guter Übereinstimmung mit den von

POTTERAT *et al.* bestimmten Werten (282). Die starken Schwankungen bei den Gehalten könnten durch die Verwendung von Früchten unterschiedlicher Reifestadien oder der Verwendung von fermentierten Früchten verursacht werden. In den Säften, die laut Hersteller mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1–8), konnte in einem Saft keine Asperulosidsäure bestimmt werden (SZ4). In drei Säften lagen die Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze (SZ2, SZ5 und SZ7). In den übrigen Säften (SZ1, SZ3, SZ6 und SZ8) konnten Gehalte an Asperulosidsäure von 45–484 mg/L Saft nachgewiesen werden. Durch die nachgewiesenen schwankenden Gehalte in den authentischen Säften kann abschließend festgehalten werden, dass die Aussagekraft von Asperulosidsäure bezüglich der Verfälschung und Unterscheidung von Noni-Säften gering ist.

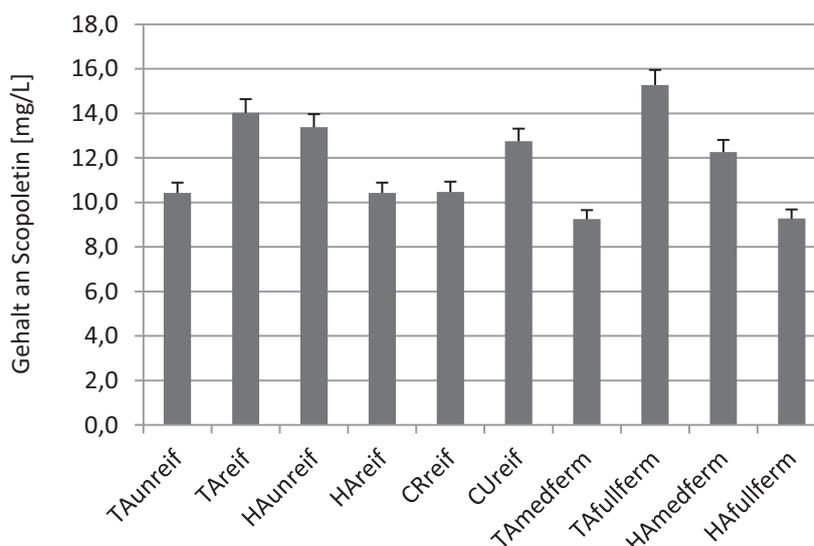
### 3.3.1.2 Scopoletin

Für Scopoletingehalte in diversen Noni-Säften liegen bereits Daten in der Literatur vor (249, 282). Darüber hinaus wird von BASAR *et al.* berichtet, dass die Fermentation von Noni-Früchten die Scopoletingehalte in den Säften beeinflusst (80). Aus diesem Grund wurden die Scopoletingehalte in authentischen und kommerziellen Säften bestimmt. In Tab. 3-41 sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD und LOQ für die Bestimmung von Scopoletin angegeben. Die Standardabweichung für die Quantifizierung von Scopoletin betrug 4,4 %.

**Tab. 3-41: Parameter für die Bestimmung von Scopoletin.** Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die Quantifizierung von Scopoletin.

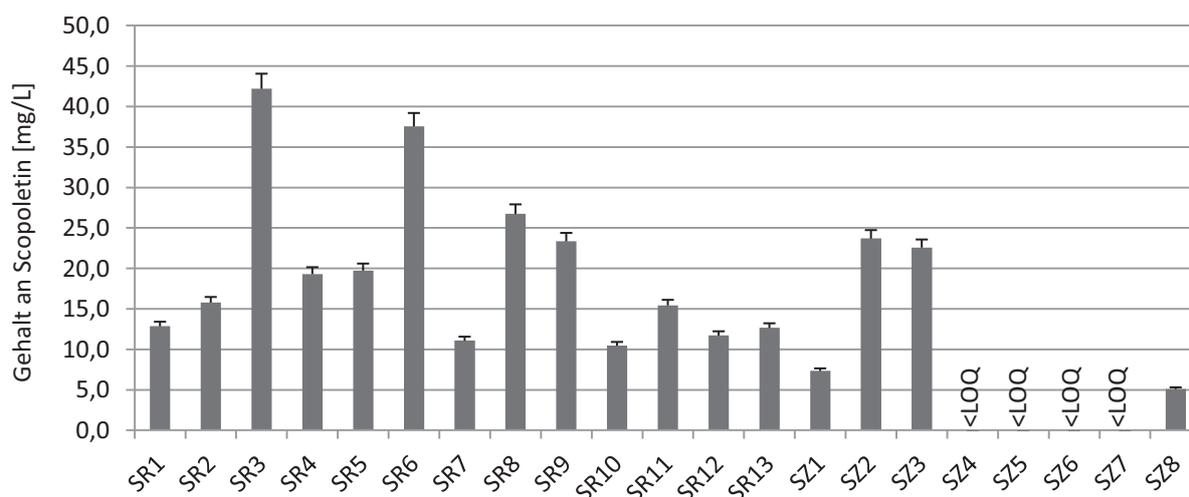
Geradengleichung		linearer Bereich (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	$R^2$
$m$	$n$				
$1,308 \times 10^8$	$-8,342 \times 10^4$	0,006–0,141	0,002	0,005	0,996

In den Säften aus den reifen Früchten (TAreif, HAreif, CRreif und CUreif) wurden Gehalte an Scopoletin von 10,4–14,0 mg/L Saft detektiert (Abb. 3-56). Die beiden Säfte aus unreifen Früchten wiesen Werte von 10,4 mg/L Saft für TAunreif und von 13,4 mg/L Saft für HAunreif auf. Die fermentierten Säfte (TAmeferm, TAFullferm HAmeferm und HAFullferm) zeigten Gehalte an Scopoletin von 9,3–15,3 mg/L Saft. Diese Beobachtungen stimmen gut mit den bisher publizierten Werten von IKEDA *et al.* überein (249). Bei den untersuchten Noni-Saft-Proben von BASAR *et al.* waren z.T. sehr viel höhere Werte und größere Schwankungen bei den Scopoletingehalten zwischen verschiedenen Noni-Säften feststellbar (80).



**Abb. 3-56: Gehalte an Scopoletin in zehn authentischen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an Scopoletin [mg/L] in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (TAmeferm und TAffullferm) und Hawai'i (HAmeferm und HAffullferm).

Die engen Grenzen von 9,3–15,3 mg/L Saft, in denen sich die Scopoletingehalte in den hier untersuchten Proben befanden, zeigen, dass kaum ein Einfluss der Herkunft sowie des Verarbeitungsgrades der Früchte auf den Gehalt an Scopoletin in Noni-Säften besteht. Der Scopoletingehalt könnte so einen Anhaltspunkt auf eine mögliche Verdünnung eines Noni-Saftes darstellen.



**Abb. 3-57: Gehalte an Scopoletin in 21 kommerziell erhältlichen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an Scopoletin [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert.

Bei der Untersuchung der 21 kommerziell erhältlichen Säfte wurden in den Säften, welche laut Herstellerangaben keine Zusätze anderer Säfte enthielten (SR1–13), Gehalte an Scopoletin von 10,5–42,2 mg/L Saft detektiert (Abb. 3-57). In den Fruchtsäften, welche mit anderen Säften versetzt wurden (SZ1–8), lagen bei der Hälfte der Proben die Scopoletingehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze (SZ4–7). In den übrigen vier Säften (SZ1–3 und SZ8) konnten Gehalte von 5,1–23,7 mg/L Saft bestimmt werden. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Untersuchung kommerzieller Noni-Säfte von POTTERAT *et al.*, bei welcher Scopoletingehalte von nicht detektierbar bis 23,2 mg/L Saft nachgewiesen wurden (282). Die bestimmten Gehalte decken sich zudem mit den Untersuchungen von 13 kommerziellen Noni-Säften von DENG *et al.*, bei welchen 0,88–34,01 µg Scopoletin/mL Saft detektiert werden konnten (283). Festzustellen bleibt, dass das Gros der Säfte innerhalb der Grenzen, die nach Bestimmung der Gehalte an Scopoletin in den authentischen Säften zu erwarten waren, liegt. Die beiden Säfte SR3 und SR6 weisen jedoch recht hohe Werte an Scopoletin von 42,2 bzw. 37,6 mg/L Saft auf. Hier ist es denkbar, dass ein Konzentrat zur Herstellung des Safts eingesetzt wurde, welches rückverdünnt wurde. Durch die geringen Schwankungen bei den Gehalten an Scopoletin in den authentischen Säften ist es zweifelhaft, dass Saft SR4 99,6% Noni-Saft enthält.

### 3.3.1.3 (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure und dessen Glucose-Ester

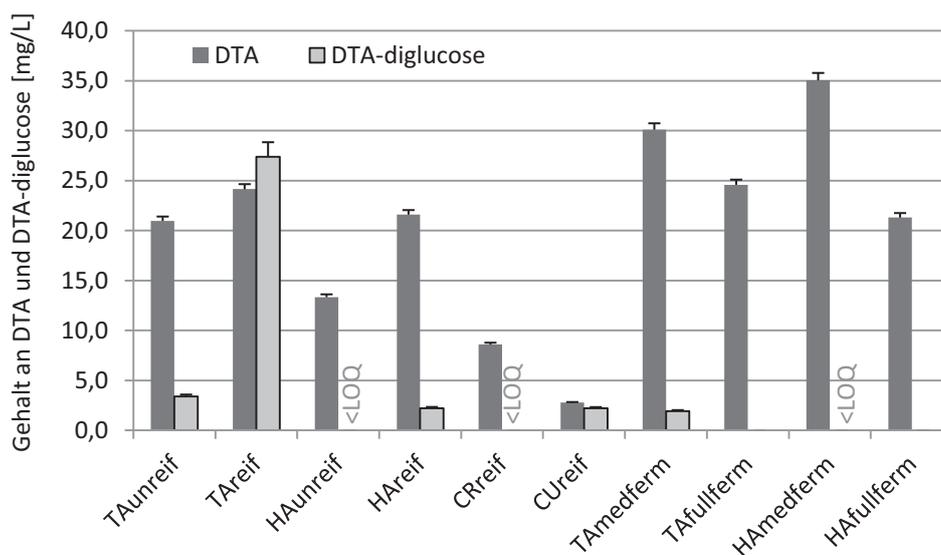
Die dreifach ungesättigte Fettsäure (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (DTA) wurde erstmals 1999 von MAIER *et al.* als Metabolit von *Streptomyces viridochromogenes* Tu 6105 mit Herbizidwirkung beschrieben (232). Des Weiteren ist die entsprechende Verbindung mit Aldehydfunktion, (2E,4Z,7Z)-Decatrienal, bekannt. Diese wurde bereits im Jahr 1972 von MEIJBOOM und STROINK identifiziert. Die Verbindung (2E,4Z,7Z)-Decatrienal konnte hier in stark oxidierten Ölen, die Linolensäure und andere ω-3, ω-6 und ω-9-Fettsäuren enthalten, identifiziert werden und ist für deren fischiges Off-Flavor verantwortlich (284). Im Jahr 2010 wurde DTA aus Noni-Früchten von BASAR *et al.* isoliert und identifiziert. Darüber hinaus wurde eine Vorstufe von DTA mit Kohlenhydratkomponente angegeben, von welcher jedoch keine Struktur veröffentlicht wurde (80). Anhand dieser Verbindungen wurde eine Methode zur Qualitätssicherung von Noni-Säften vorgeschlagen (vgl. 2.1.8.2). Im Rahmen dieser Arbeit konnten sowohl DTA als auch 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose (DTA-diglucose) isoliert und strukturell aufgeklärt werden (s. 7.1 und 3.1.1.6.1). Aufgrund dessen, dass DTA und DTA-diglucose bis zu diesem Zeitpunkt für Früchte und daraus hergestellte Fruchtsäfte einzigartig sind, sollen diese Verbindungen im Folgenden in Noni-Fruchtsäften quantifiziert werden. Für die Bestimmung von DTA wurde aufgrund der Flüchtigkeit der Verbindung die Methode von BASAR *et al.* verwendet, bei der ohne zusätz-

liches Einengen des Extraktes vorgegangen wird (80). Die Bestimmung von DTA-diglucose wurde nach 4.4.2.9.3 durchgeführt.

**Tab. 3-42: Parameter für die Bestimmung von (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (DTA) und 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose (DTA-diglucose).** Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup> für die Quantifizierung von DTA und DTA-diglucose.

	Geradengleichung		linearer Bereich (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	R <sup>2</sup>
	m	n				
DTA	2,046x10 <sup>3</sup>	1,995	0,001–0,100	0,001	0,002	0,999
DTA-diglucose	0,840x10 <sup>3</sup>	-0,068	0,005–0,100	0,004	0,016	0,998

In Tab. 3-42 sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD und LOQ angegeben. Die Standardabweichung für die Quantifizierung von DTA wurde mit 2,1 % und die für DTA-diglucosid mit 5,4 % bestimmt. Für die Kalibrierungen wurden die isolierten und strukturell aufgeklärten Verbindungen verwendet.



**Abb. 3-58: Gehalte an (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid (DTA) und 2-O-(β-D-glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose (DTA-diglucose) in zehn authentischen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an DTA und DTA-diglucose in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (TAmeferm und TAffullerm) und Hawai'i (HAmeferm und HAffullerm).

In den frischen Säften wurden Gehalte an DTA von 2,8–24,1 mg/L Saft nachgewiesen. Die Gehaltsunterschiede zwischen den Säften mit unterschiedlichen Herkunftsländern sind demnach beträchtlich. Die Säfte aus unreifen Noni-Früchten zeigten Werte von 21,0 mg/L für TAunreif bzw. 13,3 mg/L Saft für HAunreif. Die entsprechenden Säfte aus reifen Früchten TAreif und HAreif wiesen geringfügig höhere Werte mit 24,1 mg/L bzw. 21,6 mg/L Saft auf.

Dieser Anstieg an DTA könnte auf eine Bildung während der Fruchtreifung hindeuten. Die Säfte aus Costa Rica und Kuba beinhalten deutlich geringere Mengen an DTA mit 8,6 mg/L bzw. 2,8 mg/L Saft im Gegensatz zu den Säften aus Tahiti und Hawai'i. Im Vergleich mit den bestimmten Werten von durchschnittlich 492 µg/mL Saft von BASAR *et al.* (80) lagen die Werte für die hier untersuchten Noni-Säfte deutlich niedriger.

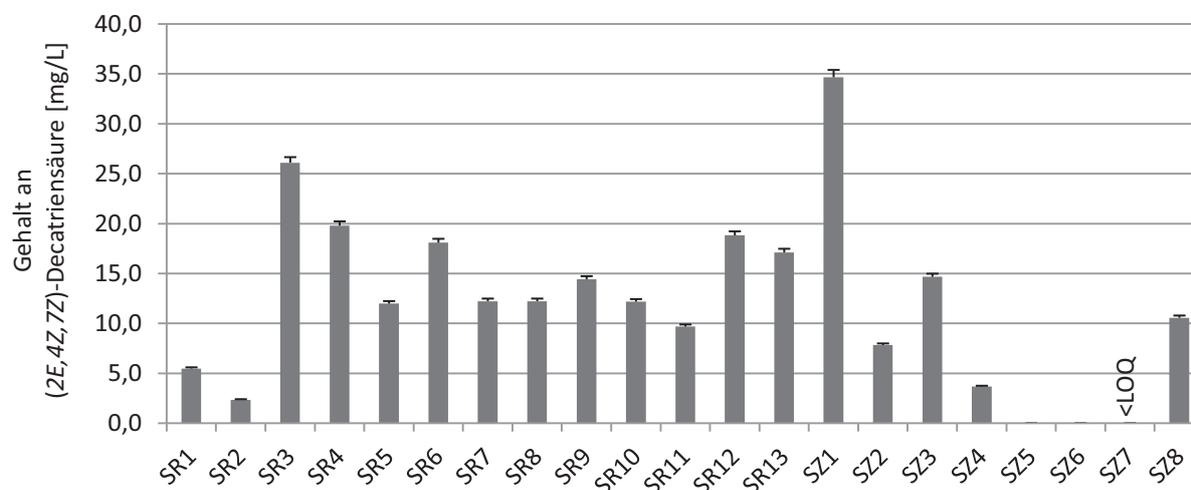
Unter den fermentierten Säften (TAmeferm, TAFullferm, HAmeferm und HAFullferm) konnten DTA-Gehalte von 21,3–35,0 mg/L detektiert werden. Die Betrachtung der Mittelwerte der frischen und fermentierten Säfte zeigte, dass die frischen Säfte durchschnittlich geringere Konzentrationen an DTA mit 15,2 mg/L Saft im Gegensatz zu den fermentierten Säften mit 27,8 mg/L Saft enthielten. Dieser Anstieg während der Fermentation könnte bedingt sein durch die Freisetzung von DTA aus den entsprechenden Kohlenhydrateestern während dieses Prozesses.

Eine solche Verbindung stellt die Verbindung 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose (DTA-diglucose) dar (s. Abb. 3-21). In den frischen Säften konnten stark unterschiedliche Gehalte an DTA-diglucose nachgewiesen werden. In HAunreif und in CRreif lagen die Werte für DTA-diglucose unterhalb der Bestimmungsgrenze. In den übrigen frischen Säften konnten Gehalte an DTA-diglucose von 2,2–27,4 mg/L nachgewiesen werden (Abb. 3-58). Darüber hinaus zeigte sich ein starker Einfluss des Reifegrades auf den Gehalt dieser Verbindung. In TAunreif wurden 3,4 mg/L Saft und in TAreif 27,4 mg/L Saft an DTA-diglucose detektiert. Unter den fermentierten Säften zeigte TAmeferm mit 1,9 mg/L Saft die höchsten Gehalte an DTA-diglucose. In TAFullferm und HAFullferm war die Verbindung DTA-diglucose nicht nachweisbar. Die starke Abnahme der Gehalte an DTA-diglucose im Verlauf der Fermentation deutet auf eine Spaltung der Verbindung unter Freisetzung von DTA hin. Das Potential der Freisetzung von DTA ist, wie unter 3.2.4 gezeigt, in den Säften aus reifen Früchten vorhanden.

Die großen Konzentrationsunterschiede von DTA und DTA-diglucose bei den Säften mit unterschiedlicher Herkunft lassen keinen Nachweis der Verdünnung von Noni-Saft zu. Auch das Verhältnis von DTA zu DTA-diglucose erlaubt hier aufgrund starker Unterschiede bei den einzelnen Fruchtsäften keine Unterscheidung von frischen und fermentierten Säften. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Pulpe deutlich größere Mengen an DTA-diglucose enthält und durch unterschiedliche Pressung der Früchte der Gehalt dieser Verbindung stark beeinflusst wird (vgl. 4.4.2.9.8).

Hingewiesen werden soll noch auf die Abnahme der Gehalte an DTA in den Säften im weiteren Verlauf der Fermentation. So ist bei TAmeferm zu TAFullferm ein Verlust an DTA von etwa 20 % zu verzeichnen, bei HAmeferm zu HAFullferm sogar von etwa 40 %. Unter 3.2.4 konnte gezeigt werden, dass im kurzzeitig fermentierten Saft bereits keine enzymatisch

spaltbaren Vorstufen mehr vorliegen. Durch diesen Fakt und die Flüchtigkeit von DTA könnte die Abnahme der Gehalte zu erklären sein.



**Abb. 3-59: Gehalte an (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (DTA) in 21 kommerziell erhältlichen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an DTA [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert.

Bei den 21 kommerziellen Säften wurden aufgrund der begrenzten Aussagekraft der Gehalte von DTA-diglucose nur die Werte für DTA bestimmt. Dabei zeigten sich in den Säften, die laut Herstellerangabe ohne Zusatz anderer Säfte hergestellt wurden (SR1–13), Gehalte an DTA von 2,3–26,1 mg/L Saft. Die Noni-Säfte, die mit anderen Säften versetzt wurden (SZ1–8), wiesen größere Gehaltsunterschiede auf. So konnten in fünf Säften (SZ1–4 und SZ8) Gehalte von 3,7–34,7 mg/L Saft detektiert werden. In zwei Säften (SZ5 und SZ6) lagen die Gehalte an DTA unterhalb der Nachweisgrenze. In Saft SZ7 konnten nur Spuren an DTA nachgewiesen werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass DTA aufgrund seiner bisherigen Einzigartigkeit für Früchte bzw. Fruchtsäfte ein gutes Qualitätsmerkmal darstellt, ob Noni-Saft verwendet wurde. Eine Abschätzung der Gehalte an Noni-Saft ist aber weder mit DTA noch mit DTA-diglucose aufgrund der Schwankungen dieser Parameter möglich. Darüber hinaus konnte anhand dieser Verbindungen keine Aussage zur Unterscheidung zwischen frischem und fermentiertem Saft getroffen werden.

### 3.3.1.4 Furan-2-carbonsäure

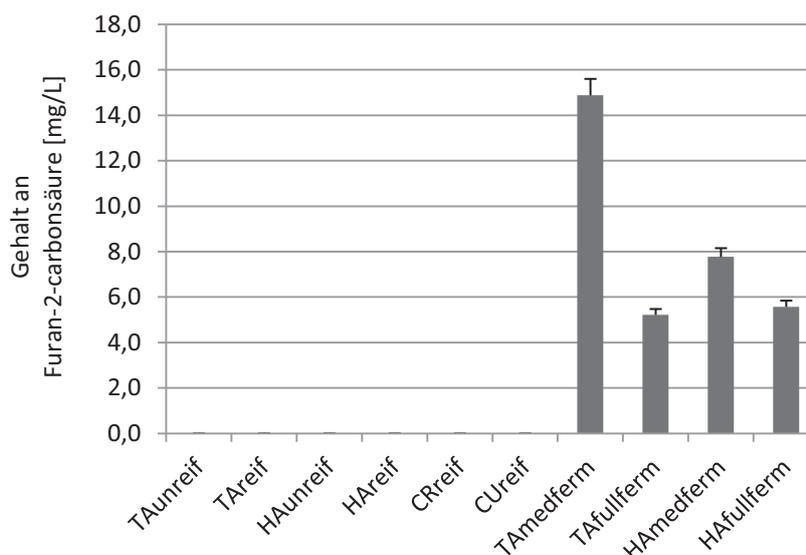
Im Rahmen der Methodenentwicklung für die Quantifizierung von Scopoletin in Noni-Säften fiel eine Verbindung auf, welche lediglich in fermentierten Säften, nicht aber in frischen

Säften auftrat. Daher wurde angenommen, dass diese Verbindung im Zuge der Fermentation der Früchte entsteht und somit als Marker für fermentierte Fruchtsäfte aus *M. citrifolia* in Frage kommen könnte. Die Verbindung konnte isoliert werden und als Furan-2-carbonsäure anhand eines authentischen Standards identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Furan-2-carbonsäure (Brenzschleimsäure) gehört zu den Furanverbindungen, die beim Abbau von Zuckern und Ascorbinsäure unter Wärmeeinwirkung in Fruchtkonzentrat, Wein und Bier entstehen. YUAN und CHEN entwickelten eine HPLC-Methode zur Trennung und Quantifizierung der in Fruchtsäften und anderen Getränken vorkommenden Furanverbindungen. Dabei wurde festgestellt, dass der Gehalt an Furan-2-carbonsäure in Birnen- und Apfelsaft am höchsten ist. Überdies kommt Furan-2-carbonsäure auch, jedoch nur in geringen Mengen, in Orangensaft, Traubensaft, Rotwein, Bier und Cola vor (285). Des Weiteren fanden VORAGEN *et al.* heraus, dass Furan-2-carbonsäure ein Abbauprodukt von Galakturoniden bei der nicht-enzymatischen Bräunung ist. Galakturonide sind Reaktionsprodukte des enzymatischen Pektinabbaus. Die Bildung von Furan-2-carbonsäure ist dabei abhängig vom pH-Wert. Wird der pH-Wert erniedrigt, dann steigt der Gehalt an Furan-2-carbonsäure an (286). Da bei der Fermentation von Noni-Saft der pH-Wert erniedrigt wird, liegt die Vermutung nahe, dass bei der Fermentation die in den Zellwänden vorkommenden Galakturonide extrahiert werden könnten und in den Saft übergehen. Dies könnte erklären, weshalb Furan-2-carbonsäure nur im UV-Chromatogramm von fermentiertem Saft vorkommt. In Tab. 3-43 sind die Parameter für die Bestimmung von Furan-2-carbonsäure angegeben. Für die Standardabweichung der Methode wurde ein Wert von 4,9 % ermittelt.

**Tab. 3-43: Parameter für die Bestimmung von Furan-2-carbonsäure.** Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die Quantifizierung von Furan-2-carbonsäure.

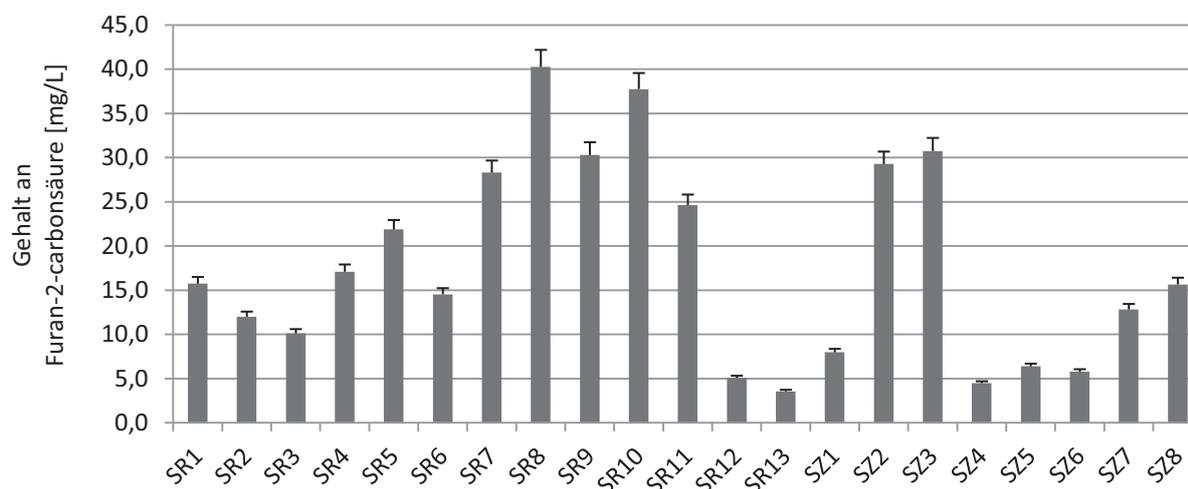
Geradengleichung		linearer Bereich (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	$R^2$
<i>m</i>	<i>n</i>				
$3,134 \times 10^3$	1,308	0,006–0,200	0,006	0,014	0,999

In den frischen Säften von *M. citrifolia* (TAunreif, TAreif, HAunreif, HAreif, CRreif und CUreif) konnte mit Ausnahme der zwei Säfte HAreif und CRreif keine Furan-2-carbonsäure nachgewiesen werden. Lediglich Spuren von Furan-2-carbonsäure konnten in HAreif und CRreif nachgewiesen werden. In den fermentierten Säften (TAmeferm, TAffullferm, HAmeferm und HAffullferm) konnten Gehalte von 5,2–14,8 mg/L Saft nachgewiesen werden (Abb. 3-60). Die oben angeführte Beobachtung, dass Furan-2-carbonsäure ausschließlich in fermentierten Säften vorkommt, konnte damit bestätigt werden.



**Abb. 3-60: Gehalte an Furan-2-carbonsäure in zehn authentischen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an Furan-2-carbonsäure [mg/L] in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (TAm edferm und TAFullferm) und Hawai'i (HAm edferm und HAfullferm).

Die für fermentierten Noni-Saft bestimmten Gehalte liegen damit im Bereich für die von YUAN und CHEN angegebene Werte für Apfelsaft mit 10,67 mg/L Saft, jedoch niedriger als die bestimmten Gehalte für Birnensaft mit 33,35 mg/L Saft (287).

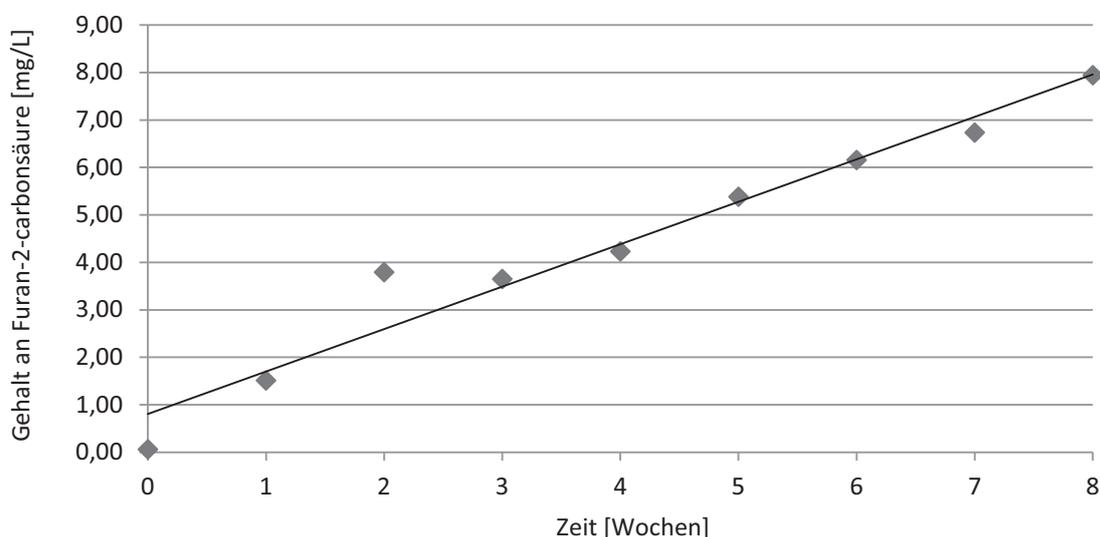


**Abb. 3-61: Gehalte an Furan-2-carbonsäure in 21 kommerziell erhältlichen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an Furan-2-carbonsäure [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert.

In den 21 kommerziellen Säften zeigte sich, dass Furan-2-carbonsäure in allen Säften nachweisbar und quantifizierbar war (Abb. 3-61). Die Gehalte der einzelnen Säfte unterscheiden sich jedoch extrem. So konnten Werte von Furan-2-carbonsäure von 3,6–40,3mg/L Saft für die Säfte, die laut Hersteller ausschließlich Noni-Saft enthalten (SR1–13), bestimmt werden.

### Einfluss der Lagerung von Noni-Saft auf Furan-2-carbonsäure

Aufgrund des möglichen Einflusses der Lagerung von Noni-Saft auf die Gehalte von Furan-2-carbonsäure sollte diese untersucht werden. Frischer Noni-Saft wurde dafür acht Wochen bei  $T = 37\text{ °C}$  gelagert. Die Probenahme wurde jeweils in Abständen von sieben Tagen durchgeführt.



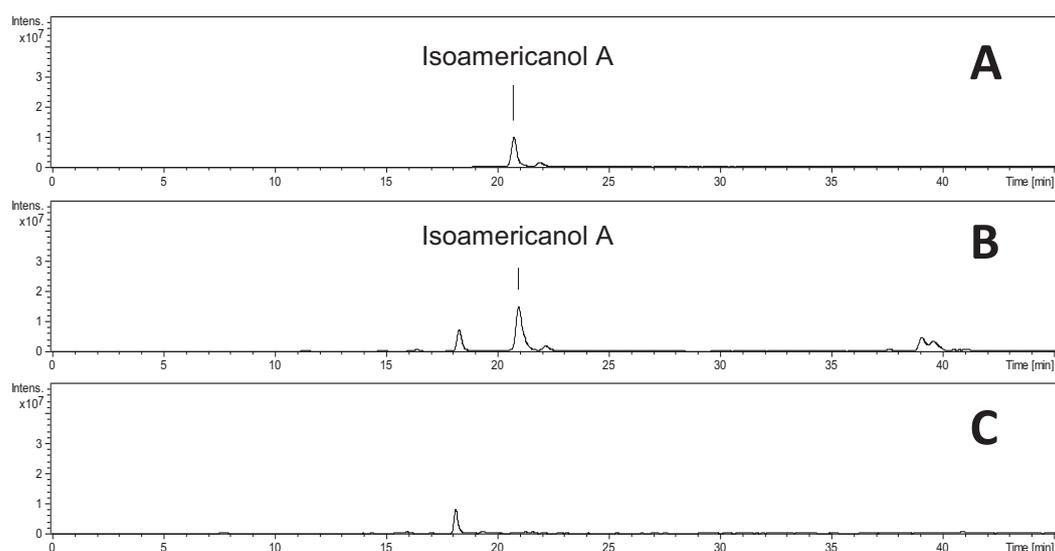
**Abb. 3-62: Entwicklung des Gehaltes an Furan-2-carbonsäure während der Lagerung.** Frischer Saft von *M. citrifolia* wurde acht Wochen bei  $T = 37\text{ °C}$  gelagert. Der Gehalt an Furan-2-carbonsäure wurde jeweils in Abständen von sieben Tagen bestimmt ( $R^2 = 0,956$ ).

Die Untersuchung ergab, dass der Gehalt an Furan-2-carbonsäure im Verlauf der acht Wochen linear ansteigt ( $R^2 = 0,956$ ). Zu Beginn der Untersuchung konnte keine Furan-2-carbonsäure im Saft nachgewiesen werden. Nach acht Wochen stieg der Gehalt auf 7,9 mg/L Saft an. Die starke Abhängigkeit der Bildung von Furan-2-carbonsäure im Saft von der Lagerung lässt damit keine Unterscheidung von frischen und fermentierten Säften zu.

#### 3.3.1.5 Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A

Beim Screening der Ethylacetat-Extrakte der frischen und fermentierten Säfte fiel zunächst auf, dass bestimmte Lignane und Neolignane wie Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A in Noni-Säften identifiziert werden können (vgl. 3.1.1.2.2). Des Weiteren wiesen die

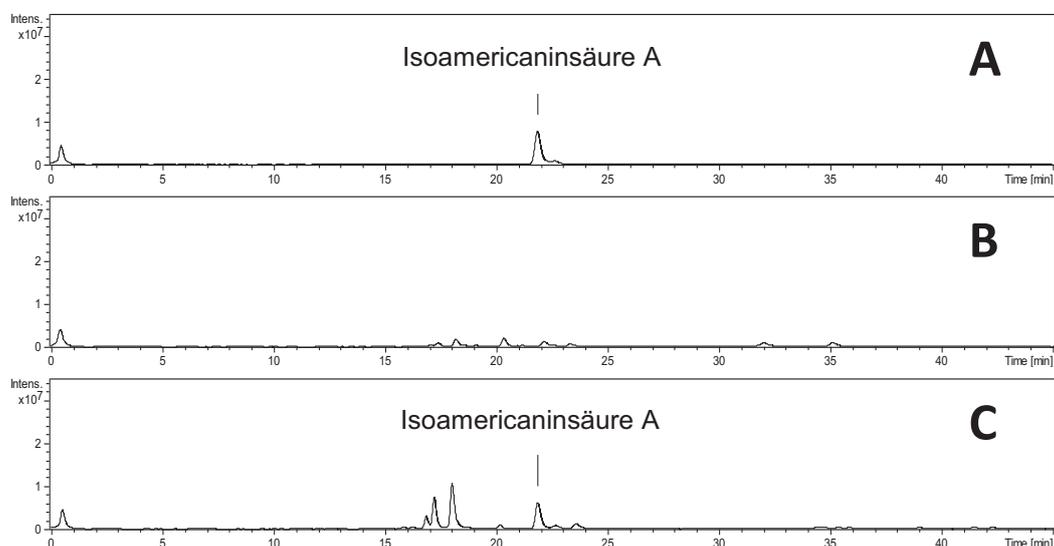
Ethylacetat-Extrakte der fermentierten Säfte die niedrigsten  $LC_{50}$ -Werte im Brine-shrimp-Assay auf (s. 3.1.1.3). Nach Trennung des Ethylacetat-Extrakts mittels HSCCC wurden die erhaltenen Fraktionen mit HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Dabei konnten in einer der zytotoxisch aktiven Fraktionen Neolignane nachgewiesen werden (vgl. 3.1.1.3). Diese Neolignane wurden bisher jedoch nur aus der kompletten gefriergetrockneten und zerkleinerten Frucht von *M. citrifolia* isoliert (43, 79). Da sowohl Lignane als auch Neolignane aber vorwiegend in den Steinen vorkommen, wurde angenommen, dass diese bei der Fermentation von Noni-Saft aus den Steinen extrahiert werden und in den Fruchtsaft übergehen könnten. Deshalb wurden die Säfte auf das Lignan 3,3'-Bisdemethylpinoresinol und die Neolignane Isoamericanol A, Isoamericaninsäure A, Americanin A und Americaninsäure A hin näher untersucht. Alle aufgeführten Verbindungen konnten in den Noni-Säften nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte dabei festgestellt werden, dass Isoamericanol A scheinbar ausschließlich in frischen Noni-Säften vorkommt, wohingegen Isoamericaninsäure A eher in fermentierten Noni-Säften zu finden ist. In Abb. 3-63 sind dazu die extracted ion Chromatogramme ( $m/z$  329  $[M-H]^-$ ) aufgeführt.



**Abb. 3-63: Extracted ion Chromatogramme (EIC) bei  $m/z$  329 von Isoamericanol A sowie frischem und fermentiertem Noni-Saft.** Dargestellt ist das EIC der isolierten Standardsubstanz Isoamericanol A (A), das EIC des Ethylacetat-Extrakts eines frischen Noni-Safts (B) und das EIC des Ethylacetat-Extrakts eines fermentierten Noni-Safts (C) jeweils bei  $m/z$  329.

Die ausgewählte Masse entspricht dem PseudoMolekül-Ion von Isoamericanol A ( $M = 330$  Da). Der Peak mit der Retentionszeit  $R_t$  20,8 min tritt ausschließlich im Ethylacetat-Extrakt des frischen Safts auf (Abb. 3-63 B). Darüber hinaus sind unter Abb. 3-64 die EIC ( $m/z$  343 $[M-H]^-$ ) dargestellt. Die Molekülmasse von Isoamericaninsäure A beträgt  $M = 344$  Da. Der Peak mit der Retentionszeit  $R_t$  21,8 min ist ausschließlich im Ethylacetat-Extrakt des fermentierten Safts (Abb. 3-64 C) zu sehen. Die Verbindungen Isoamericanol A und Isoameri-

caninsäure A kommen somit potentiell als Markersubstanzen zur Unterscheidung von frischen und fermentierten Noni-Säften in Frage.



**Abb. 3-64:** Extracted ion Chromatogramme (EIC) bei  $m/z$  343 von Isoamericaninsäure A sowie von frischem und fermentiertem Noni-Saft. Dargestellt ist die isolierte Standardsubstanz Isoamericaninsäure A (A), das EIC des Ethylacetat-Extrakts eines frischen Noni-Safts (B) und das EIC des Ethylacetat-Extrakts eines fermentierten Noni-Safts (C) jeweils bei  $m/z$  343.

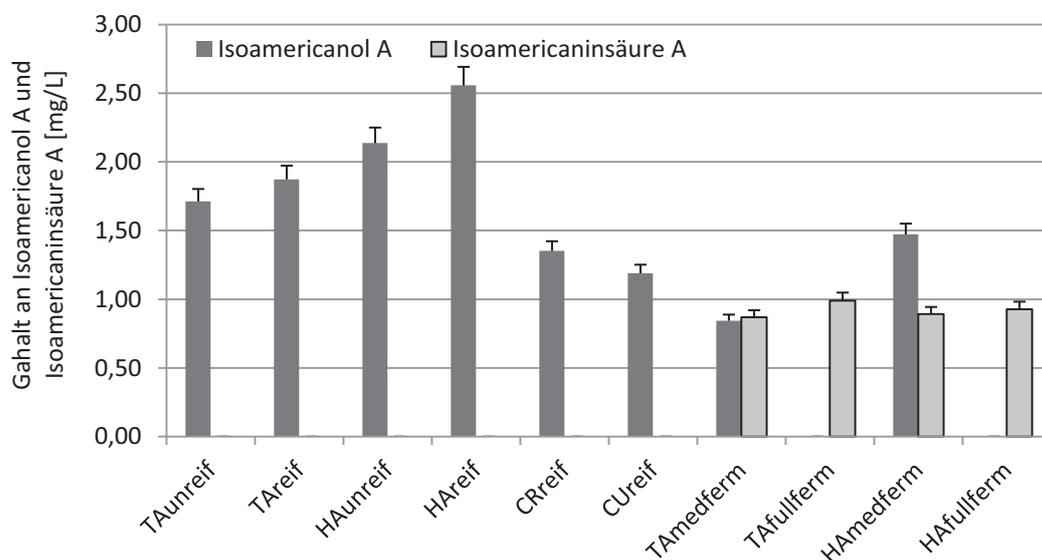
Um dies zu evaluieren, sollen diese Verbindungen nachfolgend in authentischen Noni-Säften quantifiziert werden. Die Quantifizierung von Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A erfolgte mit LC-ESI-MS/MS unter Verwendung von *HPLCSystem 6* der nach 4.4.2.9.5 aufbereiteten Säfte.

**Tab. 3-44:** Parameter für die Bestimmung von Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A. Angegeben sind die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich, LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation) und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die Quantifizierung der Neolignane Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A.

	Geradengleichung		linearer Bereich (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	$R^2$
	$m$	$n$				
Isoamericanol A	$1,018 \times 10^9$	$-6,396 \times 10^6$	0,006–0,041	0,002	0,007	0,999
Isoamericaninsäure A	$1,420 \times 10^8$	$-7,129 \times 10^5$	0,005–0,045	0,002	0,005	0,999

In Tab. 3-44 sind die Parameter der Geradengleichungen, die linearen Bereiche und die Bestimmtheitsmaße  $R^2$  der Kalibrierreihen sowie der LOD und LOQ der jeweiligen Neolignane angegeben. Die Standardabweichung beträgt 5,3 % für Isoamericanol A und 6,0 % für Isoamericaninsäure A. Die Gehalte an Isoamericanol A in den frischen Säften (TAunreif, TAreif, HAunreif, HAreif, CRreif und CUreif) lagen im Bereich von 1,19–2,56 mg/L Saft. Neben Isoamericanol A konnte wie zu erwarten keine Isoamericaninsäure A in den frischen Säften

identifiziert werden (Abb. 3-65). Bei der Untersuchung der fermentierten Säfte konnte in der Hälfte der Säfte Isoamericanol A identifiziert und quantifiziert werden. So wurden in den kurzzeitig fermentierten Säften TAmeferm und HAmeferm Gehalte an Isoamericanol A von 0,84 mg/L bzw. 1,47 mg/L Saft nachgewiesen. Weiterhin wurde in allen untersuchten fermentierten Säften (TAmeferm, TAfferm, HAmeferm und HAfferm) Isoamericaninsäure A detektiert. Die Gehalte lagen hier im Bereich von 0,87–0,99 mg/L Saft. Festzuhalten bleibt, dass in den kurzzeitig fermentierten Säften sowohl Isoamericanol A als auch Isoamericaninsäure A nachzuweisen war. Diese Beobachtung deutet auf eine Abnahme von Isoamericanol A im Verlauf der Fermentation hin, wohingegen Isoamericaninsäure A gebildet wird. Es scheint also eine Oxidation von Isoamericanol A stattzufinden. Es scheint sich somit zu bestätigen, dass der Verarbeitungsgrad der Früchte einen bedeutenden Einfluss auf den Gehalt von Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A besitzt. Diese beiden Verbindungen können somit als Markersubstanzen für die Unterscheidung frischer und fermentierter Noni-Säfte dienen. Des Weiteren ist aufgrund der relativen Einzigartigkeit des Vorkommens dieser Verbindungen in Fruchtsäften eine Beurteilung möglich ob es sich um Saft von *M. citrifolia* handelt.

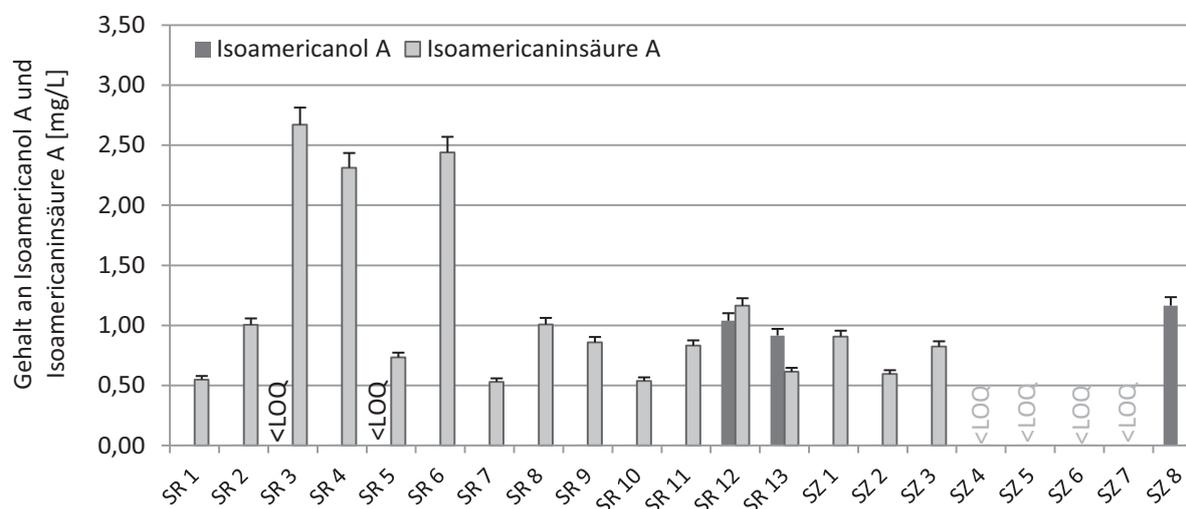


**Abb. 3-65: Gehalte an Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A in zehn authentischen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A [mg/L] in sechs frischen Säften von Tahiti (TAunreif und TAreif), von Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif) sowie vier authentischen fermentierten Säften von Tahiti (TAmeferm und TAfferm) und Hawai'i (HAmeferm und HAfferm).

Die Untersuchung von 21 kommerziellen Säften zeigte in den 13 Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft enthielten (SR1–13), Gehalte an Isoamericaninsäure A von 0,53–2,67 mg/L Saft (Abb. 3-66). Darüber hinaus konnte in vier Säften

Isoamericanol A identifiziert werden. In zwei Säften (SR3 und SR5) lagen die Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze, in den Säften SR12 und SR13 konnten Gehalte von 1,04 mg/L bzw. 0,92 mg/L Saft nachgewiesen werden. Diese beiden Säfte scheinen demnach nur einer kurzzeitigen Fermentation unterworfen worden zu sein.

Bei den Säften mit Zusatz anderer Säfte (SZ1–8) konnte in allen Säften bis auf Saft SZ8 Isoamericaninsäure A identifiziert werden. Bei vier Säften lagen die Gehalte jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze (SZ4–7). Hier zeigte sich das gleiche Bild hinsichtlich der Verdünnung der Säfte wie bei der Bestimmung von Scopoletin (s. 3.3.1.2). Die Säfte SZ4–7 beinhalten scheinbar sehr geringe Mengen an Noni-Saft. Besonders bei Saft SZ4, der nach Herstellerangabe 99,6 % Noni-Saft enthalten soll, ist der Einsatz so großer Mengen an Noni zu bezweifeln.



**Abb. 3-66: Gehalte an Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A in 21 kommerziell erhältlichen Säften.** Dargestellt sind die Gehalte an Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A [mg/L] in kommerziellen Säften, die laut Herstellerangabe ausschließlich Noni-Saft als Zutat enthalten (SR1–13) oder mit anderen Fruchtsäften versetzt sind (SZ1 89 %; SZ2 99,6 %; SZ3 k.A.; SZ4 99,6 %; SZ5 k.A.; SZ6 k.A.; SZ7 k.A., SZ8 27 % Noni-Saft). Die Prozentzahlen geben den Gehalt an Noni-Saft an, k.A. bedeutet keine Angabe. Bei den Säften, bei denen die Gehalte an Noni-Saft angegeben waren, wurden diese auf 100 % Noni-Saft extrapoliert.

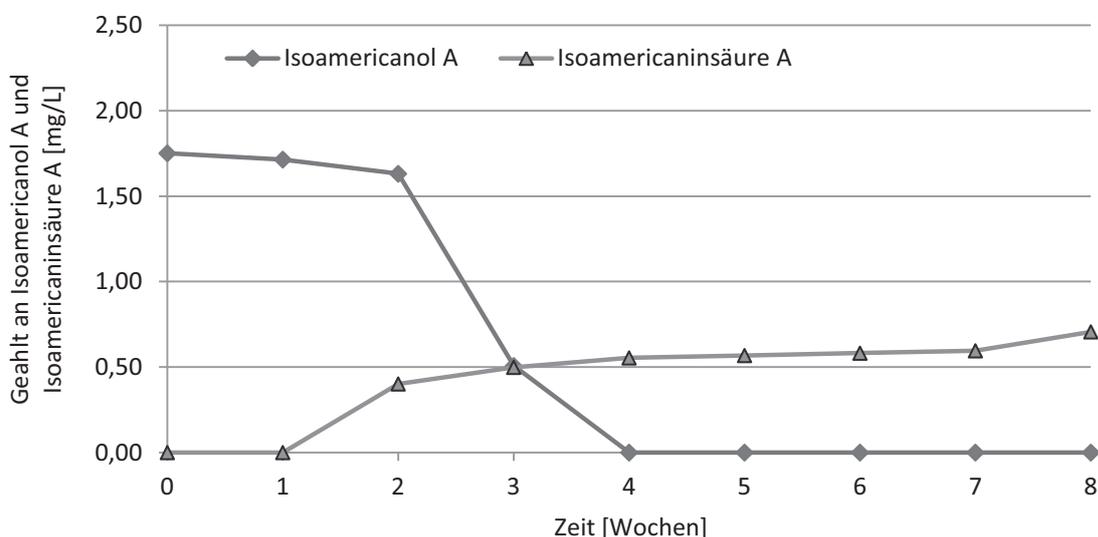
In den Säften SZ1–3 wurden Gehalte an Isoamericaninsäure A von 0,60–0,91 mg/L Saft detektiert. In Saft SZ8 konnte ausschließlich Isoamericanol A mit einem Gehalt von 1,17 mg/L Saft nachgewiesen werden. Das deutet daraufhin, dass bei der Herstellung von SZ8 frischer Noni-Saft verwendet wurde. Die Ergebnisse decken sich im Großen und Ganzen mit den Untersuchungen zu *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan und *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan (3.2.2). Dort konnten ebenfalls die Säfte SR12, SR13 und SZ8 zweifelsfrei als frische Säfte identifiziert werden. Darüber hinaus wurden jedoch noch weitere Säfte als

frisch eingeordnet. Deshalb soll im Weiteren der Einfluss der Lagerung auf die Verbindungen Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A abgeschätzt werden.

### Einfluss der Lagerung von Noni-Saft auf Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A

Der Einfluss der Lagerung auf die Verbindungen Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A wurde über acht Wochen untersucht. Die Lagerung von frischem Noni-Saft erfolgte bei 37 °C. Dabei wurde beobachtet, dass sich der anfangs goldfarbene Saft mit zunehmender Lagerung dunkelbraun verfärbte. In jeder Woche wurde ein Aliquot entnommen und untersucht (Abb. 3-67).

Der Gehalt an Isoamericanol A war innerhalb der ersten zwei Wochen mit einem geringen Abfall von 1,75 mg/L auf 1,63 mg/L Saft relativ stabil. In Woche drei der Lagerung nahm der Gehalt von Isoamericanol A jedoch stark, auf nur noch 0,51 mg/L Saft, ab. Nach vier Wochen konnte Isoamericanol A nicht mehr nachgewiesen werden. Isoamericaninsäure A war am Anfang und nach Woche eins der Lagerung nicht im Saft nachweisbar. Ab Woche zwei der Lagerung war Isoamericaninsäure A mit 0,45 mg/L im Saft nachweisbar. Die Gehalte an Isoamericaninsäure A stiegen dann innerhalb der acht Wochen von 0,45 mg/L Saft auf 0,65 mg/L Saft an.



**Abb. 3-67: Entwicklung der Gehalte von Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A während der Lagerung.** Frischer Saft von *M. citrifolia* wurde acht Wochen bei T = 37 °C gelagert. Die Gehalte von Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A wurden jeweils in Abständen von sieben Tagen bestimmt.

Die Untersuchung hat gezeigt, dass die Lagerung bei T = 37 °C von Noni-Säften einen erheblichen Einfluss auf den Gehalt von Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A hat. Während Isoamericanol A nach vier Wochen nicht mehr nachweisbar war, erhöhte sich der Gehalt an Isoamericaninsäure A ab der zweiten Woche stetig.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die beiden Neolignane Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A mögliche Marker für den Nachweis einer Fermentation darstellen. Die Gehalte dieser Verbindungen werden jedoch von der Lagerung der Säfte stark beeinflusst. Eine verlässliche Aussage über den Grad der Verarbeitung der Früchte besonders nach längerer Lagerung der Säfte kann somit nicht getroffen werden.

### 3.3.2 Quantifizierungen in Pulpe und Steine

Weiterhin interessant für die Beurteilung von Produkten aus Noni-Früchten ist die Zusammensetzung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in der Pulpe und den Steinen von *M. citrifolia*. Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Daten über diese Fruchtbestandteile hinsichtlich der Mengen an Inhaltsstoffen vorliegen, sollen ausgewählte Hauptverbindungen im Folgenden untersucht werden. Bei den untersuchten Verbindungen handelt es sich um Asperulosidsäure, Scopoletin und (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure. Asperulosidsäure und Scopoletin wurden aus gefriergetrockneter Pulpe und Steinen quantifiziert. Die Bestimmung von (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure wurde aus den frischen Bestandteilen quantifiziert. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit publizierten Daten wurden darüberhinaus die Trockensubstanzgehalte der einzelnen Fruchtbestandteile bestimmt (Tab. 3-45).

**Tab. 3-45: Trockensubstanzgehalte der Fruchtbestandteile von *M. citrifolia*.** Dargestellt sind die Trockensubstanzgehalte der Pulpe, Steine und des Saftes von Früchten von *M. citrifolia* [g/100 g]. Für die Bestimmung wurden Pulpe, Steine und Saft eingewogen, lyophilisiert und anschließend ausgewogen.

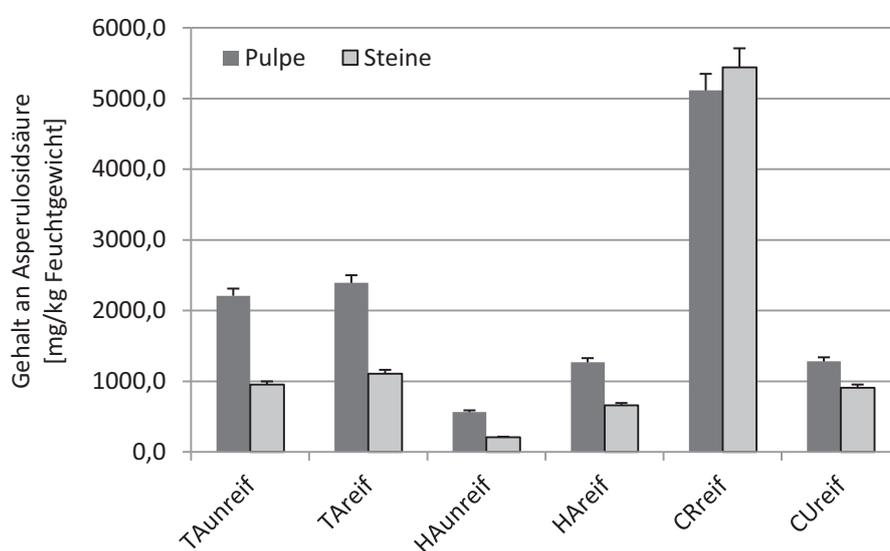
	Trockensubstanzgehalt Pulpe [g/100 g]	Trockensubstanzgehalt Steine [g/100 g]	Trockensubstanzgehalt Saft [g/100 g]
TAunreif	22,5	63,3	9,1
TAreif	22,3	62,6	9,6
HAunreif	24,6	60,4	9,9
HAreif	18,0	59,0	10,0
CRreif	26,9	64,3	6,9
CUreif	19,6	68,1	8,8

#### 3.3.2.1 Asperulosidsäure

Die Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der Kalibriergerade sowie der LOD und LOQ für die Bestimmung von Asperulosidsäure sind in Tab. 3-40 angegeben. Die relativen Standardabweichungen für die Bestimmungen von Asperulosidsäure in der Pulpe und den Steinen betragen 4,6 % bzw. 5,0 % und lagen damit etwas höher als die für die Bestimmung in den Fruchtsäften (3,6 %).

In der Pulpe der Früchte konnten Gehalte an Asperulosidsäure von 564,8–5114,1 mg/kg Feuchtgewicht bestimmt werden. Für die Steine ergaben sich Werte an Asperulosidsäure

von 207,3–5438,8 mg/kg Feuchtgewicht (Abb. 3-68). Die niedrigsten Werte ergaben sich jeweils für die Fruchtbestandteile von HAunreif und die höchsten Gehalte für die Bestandteile von CRreif. In CRreif konnten darüber hinaus höhere Gehalte an Asperulosidsäure in den Steinen als in der Pulpe nachgewiesen werden (bezogen auf das Feuchtgewicht). Es zeigte sich zudem wie in den Säften die Tendenz, dass in der Pulpe aus den unreifen Früchten TAunreif und HAunreif niedrigere Werte an Asperulosidsäure mit 2211,0 mg/kg bzw. 564,8 mg/kg im Gegensatz zu den reifen Früchten TAreif und HAreif mit 2391,8 mg/kg bzw. 1270,5 mg/kg Pulpe enthalten waren. Dies bestätigte sich auch in den Steinen. Es scheint demnach eine Biosynthese dieser Verbindung während der Reifung der Frucht stattzufinden.



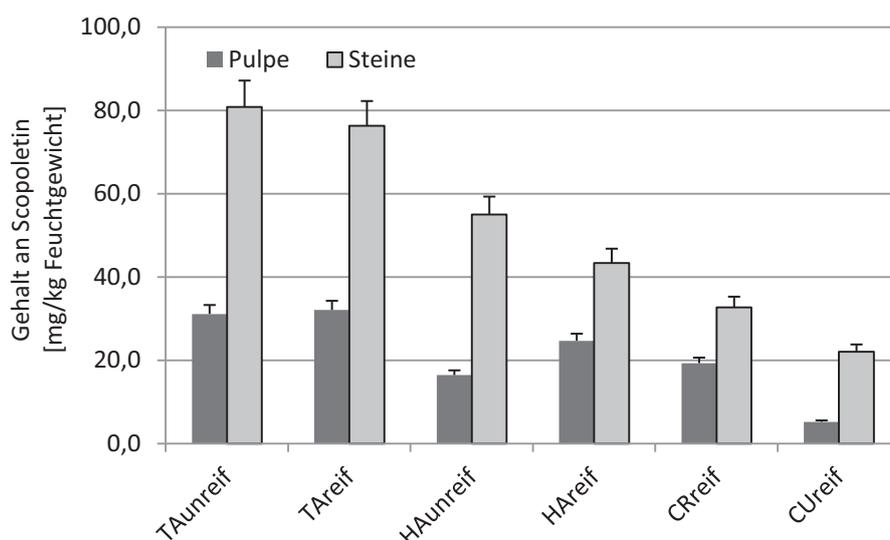
**Abb. 3-68: Gehalte an Asperulosidsäure in den Fruchtbestandteilen Pulpe und Steine.** Dargestellt sind die Gehalte an Asperulosidsäure [mg/kg Feuchtgewicht] in der Pulpe und den Steinen von Früchten aus Tahiti (TAunreif und TAreif), Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif).

Wurden die Gehalte an Asperulosidsäure auf die trockenen Bestandteile umgerechnet (vgl. Tab. 3-45), zeigte sich, dass die höchsten Gehalte in der Pulpe und im Saft vorhanden waren. So konnten berechnet auf Trockensubstanz z.B. 19011,7 mg Asperulosidsäure/kg Pulpe bzw. 11884,6 mg Asperulosidsäure/kg Saft in CRreif detektiert werden. Die hier bestimmten Werte für Asperulosidsäure stimmen mit den Gehalten, die von DENG *et al.* in methanolischen Extrakten von Früchten von *M. citrifolia* aus sechs verschiedenen Herkunftsländern bestimmt wurden, überein (82). Früchte von *M. citrifolia* stellen demnach eine exzellente Quelle für diese Verbindung dar. Jedoch sind bedeutende Unterschiede in der phytochemischen Zusammensetzung der Früchte mit unterschiedlicher Herkunft zu erkennen.

### 3.3.2.2 Scopoletin

Die Bestimmung von Scopoletin wurde anhand der Parameter für die Geradengleichung, den linearen Bereich und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der Kalibriergerade sowie den LOD und LOQ nach Tab. 3-41 durchgeführt. Hier lagen die Werte für die relativen Standardabweichungen der Bestimmung von Scopoletin aufgrund der komplexeren Matrix mit 6,8 % für die Pulpe bzw. 7,8 % für die Steine höher als für die Bestimmung in den Säften (4,4 %).

Die Gehalte an Scopoletin lagen in den untersuchten Fruchtbestandteilen von *M. citrifolia* im Bereich von 5,2–32,1 mg/kg Feuchtgewicht für die Pulpe und 22,1–80,9 mg/kg Feuchtgewicht für die Steine (Abb. 3-69). Damit liegen die Gehalte in den Grenzen, die von DENG *et al.* für methanolische Extrakte von Früchten von *M. citrifolia* angegeben wurden. Hier konnten jedoch deutlich größere Schwankungen von 64–6870 mg/kg Frucht nachgewiesen werden (283).



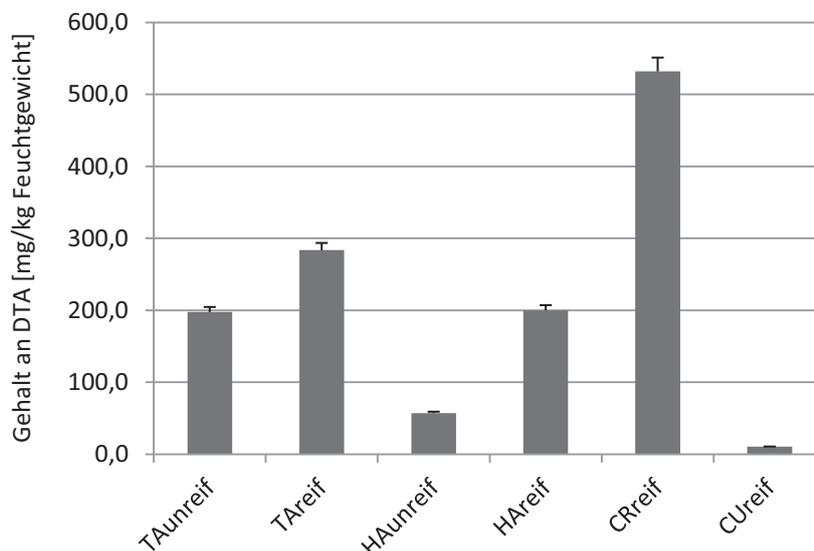
**Abb. 3-69: Gehalte an Scopoletin in den Fruchtbestandteilen Pulpe und Steine.** Dargestellt sind die Gehalte an Scopoletin [mg/kg Feuchtgewicht] in der Pulpe und den Steinen von Früchten aus Tahiti (TAunreif und TAreif), Hawai'i (HAunreif und HAReif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif).

Darüber hinaus waren die hier detektierten Schwankungen in der Pulpe und den Steinen höher im Gegensatz zu den Säften (vgl. 3.3.1.2). Für die Steine wurden in allen Früchten höhere Gehalte bezogen auf das Feuchtgewicht als für die Pulpe detektiert. Wurden die Werte für Scopoletin bezogen auf den Trockensubstanzgehalt der einzelnen Fruchtbestandteile betrachtet, konnten für die Pulpe und den Saft ähnliche Gehalte detektiert werden (67,0–143,7 mg/kg Pulpe vs. 104,1–151,6 mg/kg Saft). Lediglich bei CUreif bestand mit 26,5 mg/kg für die Pulpe und 144,9 mg/kg für den Saft eine deutliche Diskrepanz.

### 3.3.2.3 (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure und dessen Glucose-Ester

Die Parameter der Geradengleichung, den linearen Bereich und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der Kalibriergerade sowie den LOD und LOQ für die Bestimmung von (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (DTA) und 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (DTA-diglucose) sind in Tab. 3-42 aufgeführt. Die relativen Standardabweichungen für die Bestimmung von DTA und DTA-diglucose lagen für die Pulpe bei 2,2 % bzw. 4,8 % und für die Steine bei 3,6 % (DTA).

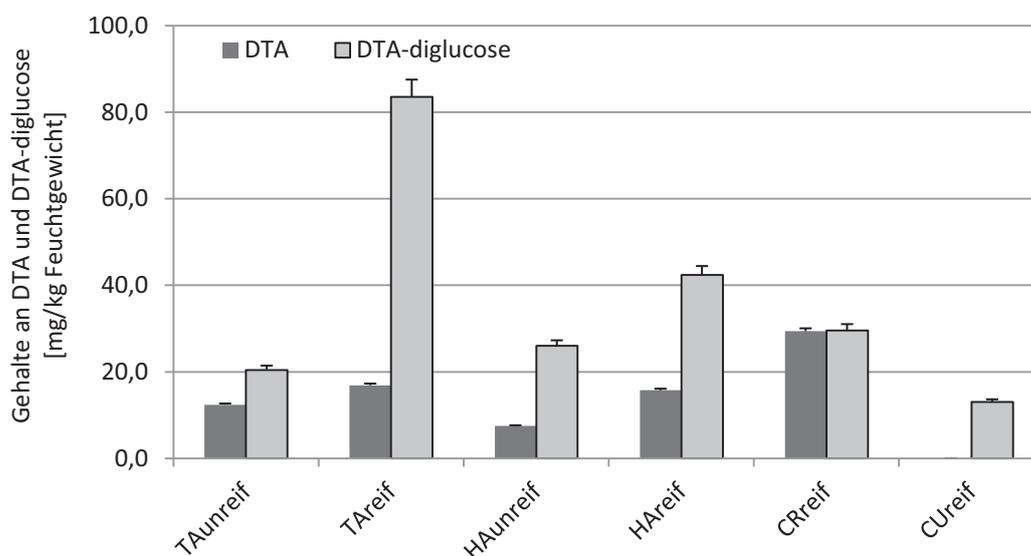
Die Steine von *M. citrifolia* wiesen stark unterschiedliche Werte an DTA auf. So konnten Gehalte an DTA in den Steinen von 10,5–532,2 mg/kg nachgewiesen (Abb. 3-71). Dabei waren die höchsten Werte in den Steinen von CRreif und die niedrigsten Werte in den Steinen von CUreif detektiert worden. Auch in den Steinen war der Effekt des Anstiegs von DTA während der Reifung der Frucht detektierbar. Die Werte an DTA stiegen von 197,7 mg/kg für TAunreif auf 283,6 mg/kg für TA reif an. In den Steinen von HAunreif und HAreif war dieser Effekt noch deutlicher ausgeprägt mit einem Anstieg von 57,2 mg/kg für HAunreif auf 200,1 mg/kg für HAreif. Die Verbindung DTA-diglucose konnte in den Steinen nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 3-70: Gehalte an (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (DTA) in den Steinen.** Dargestellt sind die Gehalte an DTA [mg/kg Feuchtgewicht] in den Steinen von Früchten aus Tahiti (TAunreif und TAreif), Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif).

In der Pulpe konnten sowohl DTA als auch dessen Disaccharid-Fettsäure-Ester DTA-diglucose nachgewiesen werden. In CUreif lag der Gehalt an DTA unterhalb der Nachweisgrenze. Dies bestätigt das Ergebnis des Saftes von CUreif, in welchem ebenfalls nur geringe Gehalte an DTA mit 2,8 mg/L detektiert werden konnten. Die Pulpe der übrigen Früchte zeigte Werte an

DTA von 7,5–29,4 mg/kg (Abb. 3-71). Wie schon bei den Säften zeigte sich hier wieder der Einfluss des Reifestadiums der Früchte. In TAunreif konnten Gehalte von 12,4 mg/kg Pulpe wohingegen in TAreif Werte von 16,9 mg/kg Pulpe detektiert werden konnten. Bei HAunreif und HAreif zeigte sich mit dem Anstieg des Gehalts an DTA von 7,5 mg/kg (HAunreif) auf 15,7 mg/kg (HAreif) das gleiche Bild.



**Abb. 3-71: Gehalte an (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure (DTA) und 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose (DTA-diglucose) in der Pulpe.** Dargestellt sind die Gehalte an DTA und DTA-diglucose [mg/kg Feuchtgewicht] in der Pulpe von Früchten aus Tahiti (TAunreif und TAreif), Hawai'i (HAunreif und HAreif), Costa Rica (CRreif) und Kuba (CUreif).

Die Gehalte an DTA-diglucose in der Pulpe lagen im Bereich von 13,0–83,5 mg/kg (Abb. 3-71). Die höchsten Werte konnten für TAreif und die niedrigsten für CUreif detektiert werden. Sowohl bezogen auf das Feuchtgewicht als auch auf den Trockensubstanzgehalt lagen die Werte für die Pulpe damit immer deutlich höher (TAunreif: 90,6 mg/kg, TAreif: 3742 mg/kg, HAunreif: 106,0 mg/kg, HAreif: 235,9 mg/kg, CRreif: 109,8 mg/kg und CUreif: 66,3 mg/kg gefriergetrocknete Pulpe) als für die Säfte von *M. citrifolia*. Die Verbindung DTA-diglucose scheint demnach beim Abpressen nur zu einem geringen Teil in den Saft überzugehen. In allen Früchten mit Ausnahme von CRreif lagen die Werte für DTA deutlich unter den Werten für DTA-diglucose. Dies ist gegensätzlich zu den Säften, in welchen, mit Ausnahme von TAreif, DTA immer in deutlich höheren Konzentrationen als DTA-diglucose vorlag. Abschließend bleibt festzustellen, dass ein starker Einfluss der Herkunft sowie des Reifegrades der Früchte auf die Gehalte an DTA sowie DTA-diglucose in der Pulpe und den Gehalt an DTA in den Steinen existiert. Darüber hinaus konnten in der Pulpe deutlich höhere Gehalte an DTA-diglucose als in den Säften nachgewiesen werden.





## 4 EXPERIMENTELLER TEIL

### 4.1 Untersuchungsmaterialien

#### 4.1.1 Authentische Untersuchungsmaterialien

In Tab. 4-1 sind die authentischen Früchte und fermentierten Säfte von *M. citrifolia* mit Herkunft, Datum der Probenahme und Menge der Probe aufgeführt. Die Früchte bzw. daraus hergestellte Säfte wurden bis zu ihrer weiteren Verarbeitung tiefgefroren und bei -20°C gelagert. Die Säfte wurden zusätzlich vor dem Einfrieren mit Argon überschichtet.

**Tab. 4-1: Authentische Untersuchungsmaterialien von *M. citrifolia*.** Angegeben sind die Herkunft, das Datum der Probenahme und die Menge der Probe.

Abkürzung	Herkunft	Datum der Probenahme	Menge	Sonstiges
<b>Früchte</b>				
TAreif	Französisch-Polynesien (Tahiti)	April 2008	15 kg	—
TAunreif	Französisch-Polynesien (Tahiti)	April 2008	15 kg	—
HAreif	Vereinigte Staaten (Hawai'i, Big Island)	September 2008	20 kg	—
HAunreif	Vereinigte Staaten (Hawai'i, Big Island)	September 2008	10 kg	—
CRreif	Costa Rica	Juli 2009	10 kg	WeserGold Getränkeindustrie GmbH & Co. KG
CUreif	Kuba	Oktober 2009	2,2 kg	—
<b>Fermentierte Säfte</b>				
TAmeferm	Französisch-Polynesien (Tahiti)	Februar 2008	15 L	Life Light Handels GmbH
TAfullferm	Französisch-Polynesien (Tahiti)	April 2008	0,75 L	Royal Tahiti Noni
HAmeferm	Vereinigte Staaten (Hawai'i, Big Island)	September 2008	10 L	Healing Noni
HAfullferm	Vereinigte Staaten (Hawai'i, Big Island)	September 2008	0,5 L	S.T. Trading Company

#### 4.1.2 Kommerzielle Untersuchungsmaterialien

In Tab. 4-2 sind alle verwendeten Säfte mit Herstellerangaben und Herkunft, soweit auf der Verpackung angegeben, aufgeführt. Nach dem Öffnen der Säfte wurden diese mit Argon

überschichtet und verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt. Ferner wurden von jedem Saft 200 mL als Rückstellmuster bei -20°C zurückbehalten.

**Tab. 4-2: Kommerziell erhältliche Säfte von *M. citrifolia*.** Angegeben ist der Hersteller bzw. Vertrieb und Herkunft der Säfte (k.A. keine Angabe).

Hersteller/Vertrieb	Sonstige Angaben	Herkunft
<b>Noni-Säfte ohne weitere Zusätze</b>		
Anton Hübner GmbH & Co. KG, 79236 Ehrenkirchen	kontrolliert biologischer Anbau (MHD: 11/2009)	k.A.
Anton Hübner GmbH & Co. KG, 79236 Ehrenkirchen	kontrolliert biologischer Anbau (MHD: 11/2010)	k.A.
GSE-Vertrieb GmbH 66119 Saarbrücken	kontrolliert biologischer Anbau	Cook Islands
Maneva GmbH Naturprodukte, 87700 Memmingen	Direktsaft aus sonnengereiften, handgepflückten, vollaromatischen, tropischen Wildfrüchten; traditionell fermentiert	Fidschi
Hersteller: Herbex Ltd. P.O. Box 11033 Laucala Beach Fidschi; Vertrieb: Goodlife, Enzianweg 1, 93073 Neutraubling	Noni Fruchtsaft original	Fidschi
Golden Heart Products GmbH, 37120 Bovenden	Noni Saft Zauberfrucht der Südsee	k.A.
Sonnenmacht International, Vor dem Kreuzberg 28, 72070 Tübingen	—	Tahiti
G&M Naturwaren Import GmbH & Co. KG, In der Hohl 8, 56630 Kretz	—	Cook Islands
allcura Naturheilmittel GmbH, 97877 Wertheim	—	Tahiti
Medicura Naturprodukte AG, Am Baumfeld 14, 97616 Bad Neustadt (Saale)	Noni 100 % direct juice from certified organic agriculture	k.A.
Hanoju-Europe Ltd., Wendelenkamp 58, NL-7091 TZ Dinxperlo	Bio, 100 % reiner Bio-Direktsaft	Cook-Islands
Hanoju-Europe Ltd., Wendelenkamp 58, NL-7091 TZ Dinxperlo	100 % reiner Fruchtsaft aus Morinda Citrifolia L., hergestellt und abgefüllt auf den Fiji-Inseln	Fidschi
Hanoju-Europe Ltd., Wendelenkamp 58, NL-7091 TZ Dinxperlo	100 % Direktsaft aus der Frucht der Spezies Morinda Citrifolia L.	Hawai'i

Hersteller/Vertrieb	Sonstige Angaben	Herkunft
<b>Noni-Säfte mit Zusätzen anderer Fruchtsäfte</b>		
Tahitian Noni International UK LTD, 24th Floor, Centre Point Tower, 103 New Oxford Street, London, WC1A 1DD, United Kingdom	Noni Saft, Traubensaftkonzentrat, Heidelbeersaftkonzentrat und Geschmacksstoffe aus natürlichen Fruchtsäften	Französisch-Polynesien
Medicura Naturprodukte AG, Tulpenweg 6, 97724 Burglauer	Noni Direktsaft aus Nonifrüchten mit Himbeeraroma	k.A.
Mepha GmbH, 71509 Backnang	Mönchs Noni plus, reiner Natursaft der <i>Morinda citrifolia</i> und roter Traubensaft und natürliches Vitamin C der Acerola-Kirsche	k.A.
Hirundo Products Vertriebsanstalt, Postfach 367, FL-9493 Mauren	Bioactive NONI, naturreiner Direktsaft mit Himbeerkonzentrat	k.A.
Vitaminshop Direct Inc., Dover, DE 19904 USA	Via Biona NONI Saft mit Himbeeraroma und Citronensäure	k.A.
Medwed & Werner GbR, Wetzelsrieder Str. 18, 88260 Argenbühl	m & w Best of nature, Das Original aus Polynesien NONI <i>Morinda citrifolia</i> mit Himbeeraroma und Citronensäure	k.A.
k.A.	NONI <i>Morinda citrifolia</i> , aus Nonifrüchten, Traubensaft und Apfelsaft	k.A.
Richard Hartinger, Am Park 1, 19230 Schwachow	Schwachower Noni, Sanddorn Fruchtnektar teilweise aus Fruchtsaftkonzentrat mit der Süße aus Früchten	Costa Rica

#### 4.1.3 Verarbeitung der Untersuchungsmaterialien

##### 4.1.3.1 Herstellung von Saft

Die Herstellung von selbstgepresstem Noni-Saft erfolgte mit einer hydrostatischen Presse (Para Press-Saftpresse Arauner, Germany). Die Presse bestand aus einem 5-L-Eimer, einem Edelstahlsieb und Edelstahldeckel, in welchem ein Gummiballon installiert war. Das Sieb und der Deckel wurden durch einen Kunststoffring verbunden. Die Gummiblase wurde über ein Zweiwegeventil mit der Wasserleitung verbunden. Die Noni-Früchte wurden in das Sieb gelegt bzw. zusätzlich in das mitgelieferte Netz gelegt. Der Gummiballon wurde anschließend gefüllt und drückte mit 4 bar auf die Früchte und der Saft lief in den Eimer. Die Pulpe verblieb im Sieb bzw. Netz. Nach Beendigung der Pressung wurde der Gummiballon durch Umschalten des Zweiwegeventils entleert. Der erhaltene Saft wurde mit Argon überschichtet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

#### 4.1.3.2 Pulpe und Steine

Die nach 4.1.3.1 abgepressten Früchte wurden manuell in Pulpe und Steine getrennt. Pulpe sowie Steine wurden anschließend lyophilisiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

## 4.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Bei dem verwendeten Wasser handelte es sich immer, sofern nicht anders beschrieben, um doppelt demineralisiertes Wasser (Barnstead, UK). Die für die HPLC-Analytik eingesetzten Lösungsmittel besaßen HPLC-Qualität. Die Extraktionen, CCC-Trennungen und dünn-schicht-chromatographischen Trennungen wurden mit Lösungsmitteln in p.a.-Qualität durchgeführt. Die Lösungsmittel und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich bzw. Fluka (Steinheim, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Fisher Scientific (Loughborough, UK), AppliChem (Darmstadt, Germany), Deutero (Kastellaun, Germany) und Riedel-de Haën (Seelze, Germany) bezogen. Eine genaue Auflistung der verwendeten Chemikalien sowie deren Reinheit und Hersteller befindet sich in Tab. 4-3.

**Tab. 4-3: Verwendete Chemikalien mit Hersteller und Reinheit.**

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Acetonitril	p.a.	Sigma-Aldrich
Acetonitril	HPLC grade	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	p.A. (98–100 %)	Roth
Amberlite XAD-7	—	Sigma-Aldrich
Amberlite XAD-2	—	Sigma-Aldrich
Anisaldehyd	p.a.	Merck
<i>n</i> -Butanol	p.a.	Fisher Scientific
Chloroform	HPLC grade	Fisher Scientific
Citronensäure	p.a.	Fluka
Cyclodecanon	≥96 % (GC)	Fluka
Dichlormethan	p.a.	Fisher Scientific
Dichlormethan	HPLC grade	Fisher Scientific
Diethylether	bidestilliert	—
Dimethylsulfoxid-d6	99,9 % deuteriert	Deutero GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat	p.a.	Fluka
Essigsäure (100 %)	p.a.	Roth
Essigsäure (100 %)	HPLC grade	AppliChem
Ethanol	p.a.	Riedel-de Haën
Ethylacetat	p.a.	Riedel-de Haën
Folin-Ciocalteu-Reagenz	—	Fluka
Gallussäure Monohydrat	p.a.	Fluka
Methanol	HPLC grade	Fisher Scientific
Methanol	MS grade	Fisher Scientific
Methanol-d4	99,8 % deuteriert	Deutero GmbH

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Methanol-d4	99,96 % deuteriert	Deutero GmbH
Natriumcarbonat	p.a.	Merck
Natriumsulfat	≥99 %	Roth
Octanal	99 % (GC)	Sigma-Aldrich
ODGP	≥99 % (GC)	Riedel-de Haën
Podophyllotoxin	≥98 % (HPLC)	Sigma-Aldrich
Sephadex LH-20 (25-10 µm)	—	Sigma-Aldrich
tert.-Butylmethylether	p.a.	Fluka
Trifluoressigsäure (TFA)	>98,0 %	Fluka

Der Citronensäure-Phosphat-Puffer nach MCLVAINE wurde nach (288) hergestellt. Dafür wurden aus 0,1 mol Citronensäure (21,0 g  $C_6H_8O_7 \times H_2O/L$ ; Lösung A) und 0,2 mol Dinatriumhydrogenphosphat (35,6 g  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O/L$ ; Lösung B) Pufferlösungen hergestellt. Anschließend wurden x mL Lösung A mit Lösung B wie in Tab. 4-4 aufgeführt auf 100 mL aufgefüllt.

Tab. 4-4: Citronensäure-Phosphat-Puffer nach MCLVAINE.

pH	mL Lösung A	pH	mL Lösung A	pH	mL Lösung A
2,2	98,00	4,2	58,60	6,2	33,90
2,4	93,80	4,4	55,90	6,4	30,75
2,6	89,10	4,6	53,25	6,6	27,25
2,8	84,15	4,8	50,70	6,8	22,75
3,0	79,45	5,0	48,50	7,0	18,15
3,2	75,30	5,2	46,40	7,2	13,05
3,4	71,50	5,4	44,25	7,4	9,15
3,6	67,80	5,6	42,00	7,6	6,35
3,8	64,50	5,8	39,55	7,8	4,30
4,0	61,45	6,0	36,85	8,0	2,75

## 4.3 Geräteparameter und Fließmittelsysteme

### 4.3.1 Flüssigchromatographie

#### 4.3.1.1 HPLC-DAD

Pumpe	Intelligent HPLC Pump PU-980 (Jasco, Germany)
Degasser	Three-Line-Degasser DG-980-50 (Jasco, Germany)
Gradientenmischer	Niederdruckgradientenformer LG-980-02 Ternary Gradient Unit (Jasco, Germany)
Detektor	Jasco Multiwavelength Detector MD-910 220–650 nm (Jasco, Germany)
Autosampler	Intelligent Sampler AS-950 (Jasco, Germany)

Datenverarbeitung Borwin PDA chromatography software Version 1.0

#### 4.3.1.2 HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>

##### 4.3.1.2.1 HPLC

Pumpe Binäre HPLC-Pumpe, HP Series 1100, G1312A, Hewlett Packard (Agilent, Germany)

Autosampler HP Series 1200, G1329B ALS SL, Hewlett Packard (Agilent, Germany)

##### 4.3.1.2.2 ESI-MS/MS

Datenverarbeitung HP Kayat, HP Chemstation A.06.01, Esquire NT 4.0, Esquire Control Software

Massenspektrometer Esquire-LC-MS/MS Ion Trap mit Elektrospray-Ionisierung (Bruker Daltonik, Germany)

**Tab. 4-5: Einstellungen für den massenspektrometrischen Detektor.**

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Source Type	ESI	DryTemp (Set)	320 °C
Ion Polarity	negative/positive	Dry Gas	12 mL/min
Trap Drive	49,2/52,1	Capillary Exit	106,7 V
Octopole RF Amplitude	200,0 Vpp	Nebulizer (Set)	40,00 psi
Lens 1	+/- 5,0 V	HV Capillary	3500 V
Lens 2	+/- 60,0 V		

##### 4.3.1.2.3 DAD-ESI-MS<sup>n</sup>

DAD Agilent 1100 Series G1315B, Hewlett Packard (Agilent, Germany)

Datenverarbeitung Compass 1.3 for Esquire/HCT

Massenspektrometer HCT ultra PTM Discovery System Ion Trap mit Elektrospray-Ionisierung (Bruker Daltonik, Germany)

**Tab. 4-6: Einstellungen für den MSD zur Verwendung mit HPLCSystem 2–4 und 6.**

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Mass Range Mode	Ultra Scan	Dry Gas	11,00 L/min
Ion Polarity	negative	HV Capillary	3000 V
Ion Source Type	ESI	Current Capillary	18,311 nA
Alternating Ion Polarity	on	Current End Plate	605,000 nA
Trap Drive	43,7	HV End Plate Offset	-500 V
Octopole RF Amplitude	162,2 Vpp	Target Mass	350 m/z

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Lens 2	60,0 V	Compound Stability	60 %
Capillary Exit	-117,3 V	Trap Drive Level	100 %
Skimmer	-40,0 V	Scan Begin	100 m/z
Lens 1	5,0 V	Scan End	1000 m/z
Oct 1 DC	-8,00 V	Max. AccuTime	200000 µs
Oct 2 DC	-1,70 V	ICC Target	100000
Dry Temp (Set)	350 °C	Averages	5 spectra
Nebulizer (Set)	60,00 psi		

**Tab. 4-7: Einstellungen für den MSD zur Verwendung mit HPLCSystem 7.**

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Mass Range Mode	Ultra Scan	Dry Gas	8,00 L/min
Ion Polarity	negative	HV Capillary	3000 V
Ion Source Type	ESI	Current Capillary	41,504 nA
Alternating Ion Polarity	on	Current End Plate	640,000 nA
Trap Drive	48,2	HV End Plate Offset	-500 V
Octopole RF Amplitude	162,2 Vpp	Target Mass	350 m/z
Lens 2	60,0 V	Compound Stability	60 %
Capillary Exit	-103,6 V	Trap Drive Level	100 %
Skimmer	-40,0 V	Scan Begin	50 m/z
Lens 1	5,0 V	Scan End	1000 m/z
Oct 1 DC	-8,00 V	Max. AccuTime	200000 µs
Oct 2 DC	-1,70 V	ICC Target	100000
Dry Temp (Set)	350 °C	Averages	5 spectra
Nebulizer (Set)	40,00 psi		

**Tab. 4-8: Einstellungen des MSD für die Direktinjektionen.**

Parameter	Einstellung		Parameter	Einstellung	
	negative	positive		negative	positive
Mass Range Mode	Ultra Scan	Ultra Scan	Dry Gas	11,00 L/min	11,00 L/min
Ion Polarity	negative	positive	HV Capillary	3500 V	-3500 V
Ion Source Type	ESI	ESI	Current Capillary	6,104 nA	4,883 nA
Trap Drive	48,1	42,5	Current End Plate	32,500 nA	40,000 nA
Octopole RF Amplitude	171,0 Vpp	171,0 Vpp	HV End Plate Offset	-500 Volt	-500 V
Lens 2	60,0 Volt	-60,0 V	Target Mass	400 m/z	400 m/z
Capillary Exit	-115,0 V	121,0 V	Compound Stability	80 %	80 %
Skimmer	-40,0 V	40,0 V	Trap Drive Level	100 %	100 %
Lens 1	5,0 V	-5,0 V	Scan Begin	100 m/z	100 m/z
Oct 1 DC	-8,00 V	8,00 V	Scan End	3000 m/z	3000 m/z
Oct 2 DC	-1,70 V	1,70 V	Max. AccuTime	200000 µs	200000 µs
Dry Temp (Set)	330 °C	330 °C	ICC Target	70000	100000
Nebulizer (Set)	60,00 psi	60,00 psi	Averages	5 spectra	5 spectra

### 4.3.1.3 HR-ESI-MS

Massenspektrometer	Linear iontrap coupled with orbitrap mass analyser LTQ-Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Germany)
Auflösung	100000 FWHM bei 400 u
Scan	50–2000 u
Konzentration	ca. 50 µg/mL in Methanol versetzt mit 0,1 mg/mL Tetradecyltrimethylammoniumbromid

Die Messungen wurden im Direktaufgabe-Modus mit einem selbstgebauten Microspray-device (positiver Modus, sprayvoltages: 2,3–2,8 kV) durchgeführt. Die genauen Massenbestimmungen wurden mit der lock mass option, mit dem Kation von Tetradecyltrimethylammoniumbromid (256,29988 u) als interner Massenreferenz, durchgeführt.

### 4.3.1.4 Fließmittelsysteme

#### **HPLCSystem 1** Analytik der Hexan- und Dichlormethan-Extrakte

Säule	Luna 5 µ, MAX-RP (C18) 80 A, mit Vorsäule, 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Germany)
Fließmittel	<b>A</b> Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v) <b>B</b> Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)
Flussrate	0,8 mL/min
Gradient	20 % B $\xrightarrow{35 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{45 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{50 \text{ min}}$ 20 % B

#### **HPLCSystem 2** Analytik der Ethylacetat-Extrakte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion

Säule	vgl. <i>HPLCSystem 1</i>
Fließmittel	<b>A</b> Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v) <b>B</b> Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)
Flussrate	0,8 mL/min
Gradient	10 % B $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 50 % B $\xrightarrow{45 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{55 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{60 \text{ min}}$ 10 % B

#### **HPLCSystem 3** Analytik der XAD-2-Extrakte

Säule	vgl. <i>HPLCSystem 1</i>
Fließmittel	<b>A</b> Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v) <b>B</b> Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)
Flussrate	0,8 mL/min
Gradient	20 % B $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 20 % B $\xrightarrow{25 \text{ min}}$ 45 % B $\xrightarrow{35 \text{ min}}$ 45 % B $\xrightarrow{45 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{55 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{60 \text{ min}}$ 20 % B



**HPLCSystem 4** Analytik des XAD-7-Extrakts

Säule Synergi 4  $\mu$ , MAX-RP 80 A, mit Vorsäule, 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Germany)

Fließmittel **A** Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, 87/3/10 (v/v/v)  
**B** Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, 40/50/10 (v/v/v)

Flussrate 0,5 mL/min

Gradient 6 % B  $\xrightarrow{20 \text{ min}}$  20 % B  $\xrightarrow{35 \text{ min}}$  40 % B  $\xrightarrow{40 \text{ min}}$  60 % B  $\xrightarrow{45 \text{ min}}$  90 % B  $\xrightarrow{55 \text{ min}}$  6 % B

**HPLCSystem 5** Quantifizierung von Scopoletin und Furan-2-carbonsäure

Säule vgl. *HPLCSystem 1*

Fließmittel **A** Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
**B** Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)

Flussrate 0,8 mL/min

Gradient

20 % B  $\xrightarrow{5 \text{ min}}$  20 % B  $\xrightarrow{15 \text{ min}}$  45 % B  $\xrightarrow{25 \text{ min}}$  45 % B  $\xrightarrow{35 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{40 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{45 \text{ min}}$  20 % B

**HPLCSystem 6** Quantifizierung von Isoamericanol A, Isoamericaninsäure A, DTA und DTA-diglucose

Säule vgl. *HPLCSystem 1*

Fließmittel **A** Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
**B** Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)

Flussrate 0,8 mL/min

Gradient

20 % B  $\xrightarrow{5 \text{ min}}$  20 % B  $\xrightarrow{15 \text{ min}}$  45 % B  $\xrightarrow{25 \text{ min}}$  45 % B  $\xrightarrow{35 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{45 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{50 \text{ min}}$  20 % B

**HPLCSystem 7** Quantifizierung von Asperulosidsäure

Säule Kinetex 2.6  $\mu$ , C18 100 Å, mit Vorsäule, 150 x 2,0 mm (Phenomenex, Germany)

Fließmittel **A** Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
**B** Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)

Flussrate 0,15 mL/min

Gradient

10 % B  $\xrightarrow{3 \text{ min}}$  10 % B  $\xrightarrow{9 \text{ min}}$  45 % B  $\xrightarrow{15 \text{ min}}$  45 % B  $\xrightarrow{21 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{27 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{30 \text{ min}}$  20 % B

**HPLCSystem 8** Analytik der CCC-Fractionen des Dichlormethan-Extrakts

Säule	Luna 3 $\mu$ , MAX-RP (C18) 80 A, mit Vorsäule, 150 x 2,0 mm (Phenomenex, Germany)
Fließmittel	<b>A</b> Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v) <b>B</b> Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)
Flussrate	0,2 mL/min
Gradient	20 % B $\xrightarrow{35 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{45 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{50 \text{ min}}$ 20 % B

**4.3.1.5 Präparative HPLC-UV/VIS**

Pumpe	Smartline Pump 1000 (Knauer, Germany)
Gradientenmischer	Smartlinemanager 5000, Dynamic Mixing Chamber (Knauer, Germany)
Detektor	Wellchrom UV-Detector K-2600 (Knauer, Germany)
Injektion	Sechswegventil, Volumen: 200 $\mu$ L (Knauer, Germany)
Datenverarbeitung	ChromGate Client/Server Version 3.1.7 Build 3.1.7.11

**präpHPLCSystem 1**

Säule	Luna 5 $\mu$ , C18 100 A, mit Vorsäule, 250 x 15,0 mm (Phenomenex, Germany)
Fließmittel	<b>A</b> Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v) <b>B</b> Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)
Flussrate	4,0 mL/min
Gradient	10 % B $\xrightarrow{25 \text{ min}}$ 50 % B $\xrightarrow{26 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{31 \text{ min}}$ 10% B

**präpHPLCSystem 2**

Säule	vgl. <i>präpHPLCSystem 1</i>
Fließmittel	<b>A</b> Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v) <b>B</b> Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)
Flussrate	4,5 mL/min
Gradient	30 % B $\xrightarrow{25 \text{ min}}$ 50 % B $\xrightarrow{26 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{31 \text{ min}}$ 30 % B

**präpHPLCSystem 3**

Säule	vgl. <i>präpHPLCSystem 1</i>
Fließmittel	<b>A</b> Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v) <b>B</b> Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)
Flussrate	4,5 mL/min
Gradient	20 % B $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 20 % B $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 50 % B $\xrightarrow{21 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{31 \text{ min}}$ 20 % B

**präpHPLCSystem 4**

Säule vgl. *präpHPLCSystem 1*  
 Fließmittel Wasser/Methanol/Essigsäure, 40/60/1 (v/v/v)  
 Flussrate 4,5 mL/min  
 Modus isokratisch

**präpHPLCSystem 5**

Säule vgl. *präpHPLCSystem 1*  
 Fließmittel **A** Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
**B** Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
 Flussrate 4,0 mL/min  
 Gradient 40 % B  $\xrightarrow{30 \text{ min}}$  80 % B  $\xrightarrow{31 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{35 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{36 \text{ min}}$  40 % B

**präpHPLC-System 6**

Säule Aqua 5  $\mu$ , C18 125 A, mit Vorsäule, 250 x 15,0 mm (Phenomenex, Germany)  
 Fließmittel **A** Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
**B** Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
 Flussrate 4,0 mL/min  
 Gradient 20 % B  $\xrightarrow{5 \text{ min}}$  20 % B  $\xrightarrow{35 \text{ min}}$  60 % B  $\xrightarrow{40 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{50 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{51 \text{ min}}$  20 % B

**präpHPLC-System 7**

Säule vgl. *präpHPLCSystem 1*  
 Fließmittel **A** Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
**B** Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
 Flussrate 4,5 mL/min  
 Gradient 20 % B  $\xrightarrow{5 \text{ min}}$  20 % B  $\xrightarrow{25 \text{ min}}$  60 % B  $\xrightarrow{45 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{55 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{56 \text{ min}}$  20 % B

**präpHPLC-System 8**

Säule vgl. *präpHPLCSystem 1*  
 Fließmittel **A** Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
**B** Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)  
 Flussrate 3,5 mL/min  
 Gradient 70 % B  $\xrightarrow{10 \text{ min}}$  70 % B  $\xrightarrow{30 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{35 \text{ min}}$  100 % B  $\xrightarrow{36 \text{ min}}$  70 % B

**präpHPLC-System 9**

Säule	vgl. präpHPLCSystem 1
Fließmittel	<b>A</b> Wasser/Essigsäure, 99/1 (v/v) <b>B</b> Methanol/Essigsäure, 99/1 (v/v)
Flussrate	4,0 mL/min
Gradient	5 % B $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 5 % B $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 50 % B $\xrightarrow{40 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{45 \text{ min}}$ 100 % B $\xrightarrow{46 \text{ min}}$ 5 % B

**4.3.2 Gaschromatographie****4.3.2.1 GC-FID**

Gerät	HRGC Mega Series 8560 (CE Instruments, Italy)
Trennsäule	DB-Wax 0,25 mm i.D., 0,25 µm Schichtdicke, 30 m Länge (J & W Scientific, USA)
Trärgas	Helium (220 kPa)
Brenngase	Wasserstoff (70 kPa), synthetische Luft (90 kPa)
Injektor	Split/Splitless (1:20), 240 °C
Injektionsvolumen	1 µL
Detektor	FID, 240 °C
Temperaturprogramm	35 °C 2 min isotherm, 3 °C/min auf 240 °C, 240 °C 20 min isotherm

**4.3.2.2 GC-MS**

Gerät	HP 5890 Series II Plus Gaschromatograph (Agilent, USA)
Trennsäule	Wax plus 0,25 mm i. D., 0,25 µm Schichtdicke, 30 m Länge (Phenomenex, USA)
Trärgas	Helium (1,0 mL/min)
Autosampler	HP 6890 Series Injector mit HP 7673 Controller (Agilent, USA)
Injektor	Split/Splitless (1:10), 230 °C
Injektionsvolumen	1 µL
Detektor	HP 5972 Series Mass selective detector (Agilent, USA)
Ionisation	EI 70 eV
Ionenquelle	180 °C
Scanbereich	50–550 u, 1,53 Scans/s
Temperaturprogramm	vgl. 4.3.2.1

### 4.3.3 High-Speed Countercurrent Chromatography

Gerät	High Speed Countercurrent Chromatograph CCC-1000 (Pharma-Tech Research, USA)
Coil	Triplecoil, Volumen: 850 mL
Probenschleife	20 mL/50 mL
Pumpe	Biotronik HPLC Pump BT 3020 (Jasco, Germany)
Detektor	Variable Wavelength Monitor, A0293 (Knauer, Germany)
Schreiber	Servogor 120, BBC Goerz Metrawatt
Fraktionssammler	LKB Bromma 2211 SuperFrac (Pharmacia, Sweden)

**Tab. 4-9: Parameter für die HSCCC-Trennungen.** Angewendete Fließmittelsysteme, Flussraten und Rotationsgeschwindigkeiten für die HSCCC-Trennungen. Alle Trennungen wurden im head-to-tail-Modus durchgeführt.

CCC-System	Probe	Flussrate [mL/min]	Rotation [rpm]	Zusammensetzung des Fließmittels
1	XAD-7-Extrakt	4,0	850	Ethylacetat/ <i>n</i> -Butanol/Wasser 4/1/5 (v/v/v)
2	XAD-2-Extrakt	3,0	850	<i>n</i> -Butanol/Wasser 1/1 (v/v)
3	Ethylacetat-Extrakt	3,0	1000	Ethylacetat/Wasser 1/1 (v/v)
4	Durchbruchfraktion des XAD-7-Extrakts	3,0	1000	tBME/ <i>n</i> -Butanol/Acetonitril/ Wasser 2/2/1/5 (v/v/v/v) + 0,1 % TFA
5	Hexan-Extrakt Pulpe	3,0	900	<i>n</i> -Hexan/Acetonitril/tBME 10/10/1 (v/v/v)
6	Dichlormethan-Extrakt	4,0	1000	tBME/Methanol/Wasser 3/1,2/2 (v/v/v)
7	Reaktionsgemisch heterocyclische Acetale	3,0	1000	Hexan/Methanol 2/1 (v/v)

### 4.3.4 Dünnschichtchromatographie

Sorbens	Kieselgel 60 HF <sub>254</sub> (Merck, Germany)
Detektion	visuell unter UV-Licht bei 254 nm und 360 nm visuell nach Besprühen mit Anisaldehyd und Erhitzen im Trockenschrank bei 100 °C für 10 min
Sprühreagenz	200 mL konzentrierte Essigsäure wurden mit 5 mL Anisaldehyd versetzt. Anschließend wurden dazu vorsichtig 10 mL Schwefelsäure gegeben und auf 500 mL mit Essigsäure aufgefüllt (289).

**Tab. 4-10: Fließmittelsysteme für die durchgeführten DC-Trennungen.** Zusammensetzungen der verwendeten Fließmittelsysteme für die DC-Trennungen.

DCSystem	Probe	Zusammensetzung des Fließmittels
1	HSCCC-Fractionen der XAD-2- und XAD-7-Extrakte, Ethylacetat- und Wasserextrakte, Fractionen der Sephadex LH-20 Trennung	Chloroform/Ethylacetat/Methanol/Wasser, 15/50/35/10 (v/v/v/v)
2	Durchbruchfraction der HSCCC des XAD-2-, XAD-7- und Ethylacetat-Extrakts	Dichlormethan/Methanol/Wasser, 75/25/1 (v/v/v)
3	Dichlormethan-Extrakte	Dichlormethan/Methanol/Wasser, 95/5/1 (v/v/v)
4	Hexan-Extrakt	Dichlormethan/Acetonitril, 95/5 (v/v)
5	HSCCC-Fractionen heterocyclische Acetale	Chloroform/Aceton 95/5 (v/v) Dichlormethan/n-Hexan 2/1 (v/v)

#### 4.3.5 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Gerät AMX-300 (Bruker Daltonik, Germany)  
Messfrequenz  $^1\text{H}$ : 300,1 MHz  
 $^{13}\text{C}$ : 75,5 MHz

Gerät DRX-400 (Bruker Daltonik, Germany)  
Messfrequenz  $^1\text{H}$ : 400,1 MHz  
 $^{13}\text{C}$ : 100,6 MHz

Gerät AVII-600 (Bruker Daltonik, Germany)  
Messfrequenz  $^1\text{H}$ : 600,0 MHz  
 $^{13}\text{C}$ : 150,0 MHz

#### 4.3.6 UV-Spektrometer

Gerät UV/VIS/NIR Spectrophotometer V-570 (Jasco, Germany)  
Software Spectramanager v1.27.02

#### 4.3.7 Polarimeter

Gerät 241 Polarimeter (Perkin-Elmer, Germany)

#### 4.3.8 Datenauswertung

Die Berechnungen der Gehalte wurden mit Excel 2007 durchgeführt. Zur Ermittlung der  $\text{LC}_{50}$ -Werte mittels Logit-Analyse nach HAFNER *et al.* wurde das Programm StatPlus 2008 verwendet (168).

## 4.4 Methoden

### 4.4.1 Flüchtige Verbindungen

#### 4.4.1.1 Probenvorbereitung

Durch einen Faltenfilter (Macherey-Nagel 615¼) filtrierter Saft von *M. citrifolia* (25,0 mL) wurde mit 25 µL Cyclodecanon/Octanal (jeweils 10 µL/mL) als internem Standard versetzt. 5 mL davon wurden zur Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion, wie nachfolgend angegeben, eingesetzt. Für die Festphasenextraktion wurden die Kartuschen von Merck (Lichrolut EN 200 mg/3 mL) verwendet. Für die Konditionierung der Phasen wurden die Kartuschen jeweils mit 3 mL Dichlormethan und danach mit 3 mL Methanol gespült. Anschließend wurden die Kartuschen mit 3 mL Wasser vorkonditioniert. Die Tropfgeschwindigkeit betrug jeweils 2 mL/min. Nachfolgend wurden 5 mL des filtrierten Safts auf die Kartuschen gegeben und langsam eluiert. Daraufhin wurden die SPE-Kartuschen 15 min unter maximalem Vakuum getrocknet.

Die Elution der adsorbierten Verbindungen wurde mit jeweils 1 mL Dichlormethan durchgeführt, welches mit einem Fluss von 0,5 mL/min durch die Kartuschen geschickt und in ein Vial eluiert wurde. Die Bestimmung der Substanzen erfolgte durch Injektion von 1 µL Probenvolumen in den GC-FID und GC-MS.

#### 4.4.1.2 Qualifizierung und Quantifizierung der flüchtigen Verbindungen

##### 4.4.1.2.1 Qualifizierung

Die Identifizierung der Substanzen anhand der Massenspektren nach Analyse mit GC-MS erfolgte durch die Programme AMDIS Version 2.1 und NIST MS Search 2.0 mithilfe der institutseigenen Spektrendatenbank. Die Retentions-Indices nach KOVÁTS wurden nach Gleichung 4-1 berechnet. Die Vergleichsindices wurden der institutseigenen Datenbank sowie den im Internet zugänglichen Datenbanken FLAVORNET und PHEROBASE entnommen (290, 291).

$$I = 100 \times \left[ \frac{t_{Ri} - t_{Rz}}{t_{Rz+1} - t_{Rz}} + z \right] \quad \text{Gleichung 4-1}$$

I	Retentions-Index
$t_R$	Retentionszeit
z	Anzahl der C-Atome des Alkans, welches vor der Verbindung eluiert
z+1	Anzahl der C-Atome des Alkans, welches nach der Verbindung eluiert

#### 4.4.1.2.2 Quantifizierung

Die semiquantitative Bestimmung der flüchtigen Verbindungen aus Säften von *M. citrifolia* erfolgt anhand zweier interner Standards (Octanal/Cyclodecanon). Die Berechnung der einzelnen Komponenten erfolgt aus diesem Grund für alle Verbindungen, die eine Retentionszeit < 2-Furfural besitzen, nach Gleichung 4-2 und für alle Substanzen mit Retentionszeiten  $\geq$  2-Furfural nach Gleichung 4-3. Für die Nachweisgrenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von  $S/N = 3$  und für die Bestimmungsgrenze ein  $S/N = 10$  festgelegt.

$$\text{MG [ppm]} = \frac{8,24 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \times \text{area}(\text{Substanz})}{\text{area}(\text{Octanal})} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

$$\text{MG [ppm]} = \frac{9,58 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \times \text{area}(\text{Substanz})}{\text{area}(\text{Cyclodecanon})} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

area Fläche  
MG Massengehalt

Die Integration der Flächen nach Analyse mit GC-FID wurde mit dem Programm Chromcard Version 1.19 durchgeführt.

#### 4.4.1.3 Enzymatische Freisetzung gebundener Aromastoffe

XAD-2-Extrakt (50 mg) wurden in 50 mL MCLVAINE-Puffer pH 5 gelöst und mit 50 mg Enzym AR2000 für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Herstellung von MCLVAINE-Puffer ist unter 4.2 angegeben. Nach der Inkubation wurden 25  $\mu\text{L}$  interner Standard Octanal/Cyclodecanon (jeweils 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) hinzugegeben. Anschließend wurde dieses Gemisch dreimal mit jeweils 50 mL Diethylether/Pentan 1:1 (v/v) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, getrocknet und an der Vigreuxkolonne auf ca. 1 mL aufkonzentriert. Die Probe wurde schließlich im Stickstoffstrom auf 0,25 mL eingengt. Als Kontrolle diente der jeweilige XAD-2-Extrakt ohne Enzym.

Da das Enzympräparat bereits ohne die Zugabe von XAD-2-Extrakt flüchtige Verbindungen freisetzen kann, wurden die freigesetzten flüchtigen Verbindungen kontrolliert, indem 50 mg Enzym mit 50 mL MCLVAINE-Puffer versetzt wurde und wie oben beschrieben behandelt wurde. Zusätzlich wurde die Funktion des Enzyms anhand der Freisetzung von Octanol aus Octyl-D-glucopyranosid (ODGP) überprüft. Dafür wurden 50 mL MCLVAINE-Puffer mit 2 mL ODGP-Lösung (10 mg/mL) versetzt und wie oben angegeben weiter behandelt.

Die quantitative Bestimmung der Freisetzung flüchtiger Verbindungen aus den Extrakten wurde nach Gleichung 4-4 für Substanzen mit Retentionszeiten < 2-Furfural bzw. Gleichung 4-5 für Substanzen mit Retentionszeiten ≥ 2-Furfural berechnet.

$$\text{MG [ppm]} = \frac{0,21 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \times \text{area}(\text{Substanz}) \times F}{\text{area}(\text{Octanal})} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

$$\text{MG [ppm]} = \frac{0,24 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \times \text{area}(\text{Substanz}) \times F}{\text{area}(\text{Cyclodecanon})} \quad \text{Gleichung 4-5}$$

area	Fläche
MG	Massengehalt
F	Faktor, der sich aus den Extraktmengen ergibt

Die Integration der Flächen nach Analyse mit GC-FID wurde mit dem Programm Chromcard Version 1.19 durchgeführt.

#### 4.4.1.4 Synthese der heterocyclischen Acetale

Die Synthese der heterocyclischen Acetale wurde nach der Methode von HILL *et al.* durchgeführt (292). Dafür wurden 27,6 g Glycerin in einem 250 mL Dreihalskolben mit 0,5 mL 50 %iger Schwefelsäure-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde auf einem siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden 14,4 g Paraldehyd innerhalb von 90 Minuten gleichmäßig zu dem Reaktionsgemisch zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für drei Stunden bei 100 °C unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen der Lösung wurden 15 mL Diethylether und 25 mL Wasser zu der Lösung gegeben. Die Phasen wurden voneinander abgetrennt und jeweils mit Diethylether und Wasser dreimal extrahiert. Anschließend wurde die Diethylether-Phase über Natriumsulfat getrocknet und *in vacuo* aufkonzentriert. Übrige Lösungsmittelreste wurden letztlich im Stickstoffstrom entfernt.

#### 4.4.2 Nichtflüchtige Verbindungen

##### 4.4.2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Saft

Die Säfte wurden durch einen Faltenfilter (Macherey-Nagel 615 ¼) filtriert und anschließend mit wenig Methanol zur besseren Phasentrennung versetzt. Zunächst wurden die Säfte dreimal mit 1,5 L Hexan entfettet. Die wässrige Phase wurde danach zunächst mit Dichlormethan und weiter mit Ethylacetat extrahiert. Die Extraktionen erfolgten jeweils dreimal mit 1,5 L Lösungsmittel in einem 5-L-Kanister unter ständigem Umschütteln für

jeweils 12 h. Zur Abtrennung der Lösungsmittelphase von der wässrigen Phase wurde das Gemisch in einen 2 L Scheidetrichter überführt und gewartet, bis sich eine Phasentrennung einstellte. Die Lösungsmittelphasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die übriggebliebene Saft-Phase wurde ebenfalls *in vacuo* eingeeengt und lyophilisiert. Jeweils 10 g dieser Extrakte wurden zusätzlich an Amberlite XAD-2 aufgereinigt (vgl. 4.4.2.3).

#### 4.4.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Pulpe und Steinen

Die bei der Saftgewinnung verbliebenen Steine wurden von der Pulpe befreit, lyophilisiert und mit einem Ultra-Turrax zerkleinert. Zuerst erfolgte die Entfettung der zerkleinerten Steine sowie der Pulpe mittels dreimaliger Extraktion mit jeweils 3 L *n*-Hexan. Die erhaltenen Hexan-Phasen der Steine bzw. Pulpe wurden vereinigt, unter vermindertem Druck eingeeengt und ausgewogen. Die verbliebenen Steine bzw. Pulpe wurden dann dreimal mit jeweils 3 L Methanol und anschließend jeweils mit einem 2 L-Gemisch aus Wasser und Methanol (1/1, v/v) extrahiert. Aus den wässrigen Methanol-Extrakten der Steine bzw. Pulpe wurden zunächst ein Dichlormethan-Extrakt und anschließend ein Ethylacetat-Extrakt hergestellt. Dazu wurde der wässrige Methanol-Extrakt zuerst einer dreimaligen Flüssig-Flüssig-Extraktion mit jeweils 1,5 L Dichlormethan unterzogen. Die Dichlormethan-Phasen der Steine bzw. Pulpe wurden jeweils vereinigt, unter vermindertem Druck eingeeengt und gefriergetrocknet. Mit der übrigen Methanol-Phase wurde ein Ethylacetat-Extrakt analog zum Dichlormethan-Extrakt hergestellt. Nach Vereinigung der jeweiligen Ethylacetat-Phasen der Steine bzw. Pulpe wurden diese jeweils mit Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit den gesammelten, dazugehörigen Methanol-Phasen der Steine bzw. Pulpe vereinigt und *in vacuo* aufkonzentriert. Diese Phasen wurden abschließend an Amberlite XAD-2 aufgereinigt (vgl. 4.4.2.3).

#### 4.4.2.3 Herstellung von Extrakten mit Amberlite XAD-7 und XAD-2

Eine Glassäule mit den Dimensionen 80 x 5,5 cm wurde mit in Methanol aufgeschlämmtem XAD-7-Material gefüllt. Das Material wurde mit 4 L Methanol gereinigt und anschließend mit 4 L Wasser vorkonditioniert. Danach wurde der filtrierte Saft auf die so vorbereitete Säule gegeben. Die Säule wurde mit 4 L Wasser gewaschen, um Proteine, freie Kohlenhydrate, organische Säuren, Salze und glykosidische Komponenten, die nicht polyphenolischen Ursprungs sind, zu entfernen. Das wässrige Eluat aus dem Waschschrift (Wascheluat) wurde für eine nachfolgende Adsorption an XAD-2-Material aufbewahrt. Die am XAD-7-Material

adsorbierten Verbindungen wurden mit 2 L Methanol eluiert und anschließend unter vermindertem Druck vom Methanol befreit. Der eingeeengte Extrakt wurde nach Zugabe von Wasser gefriergetrocknet.

Das Wascheluat der XAD-7-Säule wurde, wie zuvor bei der Herstellung der XAD-7-Säule beschrieben, auf eine vorkonditionierte XAD-2-Säule (80 x 5,5 cm) gegeben. Der Waschvorgang wurde mit 4 L Wasser durchgeführt, um Proteine, freie Kohlenhydrate, organische Säuren und Salze zu entfernen. Der folgende Elutionsschritt zur Desorption der adsorbierten Verbindungen wurde mit 2 L Methanol durchgeführt. Nachfolgend wurde das Methanol *in vacuo* entfernt, wenn nötig Wasser zugesetzt und der Extrakt lyophilisiert.

#### 4.4.2.4 Gelchromatographie

Das Sephadex LH-20-Gel wurde in Methanol/Essigsäure 99/1 (v/v) zehn Minuten Quellen gelassen und luftblasenfrei in eine Glassäule (50 x 2,5 cm) gegeben. Anschließend wurde die Säule mit dem dreifachen ihres Säulenvolumens (ca. 0,75 L) Methanol/Essigsäure 99/1 (v/v) vorkonditioniert. Die Probe wird nun in möglichst wenig Fließmittel aufgenommen und als eine schmale Bande auf die Säule gegeben. Der Durchfluss der Säule wurde auf 0,15 mL/min eingestellt. Das Eluat wurde mittels eines Fraktionssammlers (LKB Bromma SuperFrac 2211 [Pharmacia, Sweden]) in Fraktionen zu je 3 mL gesammelt. Die Einteilung der Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (*DCSystem 1*).

#### 4.4.2.5 Brine-shrimp-Assay

Etwa 60 mg Brine-shrimp-Eier (*Artemia salina* LEACH, Hobby Dohse Aquaristik KG, Germany) wurden in 80 mL künstlichem Meerwasser (2,56 g Seesalz in 80 mL Wasser) in einer Woulff'schen Flasche mit einem Wasserbad auf 23°C temperiert. Das Schlüpfen der Nauplien wurde durch leichtes Einblasen von Luft mit einer Aquariumpumpe (Lapis Hi-Tech 1500, Germany) zur Bewegung der Eier und durch Beleuchten beschleunigt. Nach 24–48 h zeigten sich die Brine shrimp-Nauplien. In mit jeweils 3 mL künstlichen Meerwassers beschickte Substanzgläser (d = 1,2 cm, h = 4,3 cm) wurden anschließend je zehn Nauplien eingezählt. Als Nährlösung wurden in jedes Glas drei Tropfen einer Hefe-Suspension (3 mg Trockenhefe gelöst in 5 mL künstlichem Meerwasser) gegeben.

Für den Test auf zytotoxische Aktivität wurden die verschiedenen hergestellten Extrakte der Noni-Säfte verwendet. Von jedem Extrakt wurden 11 mg eingewogen und mit 1100 µL Lösungsmittel versetzt (Lösung A: 1 mg/100 µL). Der lyophilisierte Dichlormethan-Extrakt wurde in Dichlormethan aufgenommen, die anderen Extrakte und das Podophyllotoxin wurden in Methanol gelöst. Von Lösung A wurden 100 µL mit 900 µL des jeweiligen

Lösungsmittels verdünnt. Von jedem Ansatz wurde eine Fünffachbestimmung durchgeführt. Dafür wurden 30 µL B, 30 µL A und 150 µL A auf je fünf Antibiotika-Testplättchen (d = 9 mm, Schleicher & Schuell Micro Science, Germany) mittels Mikroliterpipette aufgetragen. Bezogen auf die vorgelegten 3 mL künstliches Meerwasser betrug die Probenkonzentration 10, 100 und 500 µg/mL. Neben den Extrakten wurde Podophyllotoxin in den gleichen Konzentrationen als Positivkontrolle mitgeführt sowie ein Blindwert mit den entsprechenden Volumina Methanol bzw. Dichlormethan. Die getrockneten Testplättchen wurden in die vorbereiteten Substanzgläschen gegeben. Anschließend wurden die Gläschen bei 24°C unter permanenter Beleuchtung und Sauerstoffzufuhr mit Hilfe einer Pumpe inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Mortalität der Brine shrimps durch Auszählen bestimmt. Um die prozentuale Absterberate zu ermitteln, subtrahiert man von der Zahl der im Test gestorbenen Brine shrimps die Menge an natürlich gestorbenen im Blindwert. Der erhaltene Wert wird durch die Summe der überlebenden Brine shrimps im Blindwert dividiert und mit 100 multipliziert (Gleichung 4-6).

$$A[\%] = \left[ \frac{T - L_{\text{tot}}}{L_{\text{lebend}}} \right] \times 100 \quad \text{Gleichung 4-6}$$

A	Absterberate
T	gestorbene shrimps inkubiert mit Testsubstanz
L <sub>tot</sub>	gestorbene shrimps im Blindwert
L <sub>lebend</sub>	überlebende shrimps im Blindwert

Aus den so ermittelten Absterberaten wurden mittels Logit-Transformation die LC<sub>50</sub>-Werte berechnet (168).

#### 4.4.2.6 Resazurin (Alamar Blue) Assay

Der Zytotoxizitätstest mit Resazurin wurde nach der Methode von O'BRIEN *et al.* (173) mit Modifikationen von SCHMIDT *et al.* (293) durchgeführt. Für die Testungen wurden Hepatozyten von adulten männlichen Wistar-Ratten in Primärkultur verwendet. Die Hepatozyten wurden mit den Testsubstanzen, gelöst in DMSO, oder nur mit Lösungsmittel (DMSO), 4–5 h nach dem ersten Mediumwechsel, inkubiert. Das Medium wurde nach 17 h gewechselt und die Zellen wurden mit 40 µM Resazurin inkubiert. Das von vitalen Zellen produzierte Resorufin wurde mittels Fluoreszenzmessung (Anregungswellenlänge: 544 nm, Emissionswellenlänge: 590 nm) bestimmt.

#### 4.4.2.7 Bestimmung der antioxidativen Aktivität

Die antioxidative Aktivität wurde nach der Methode von RE *et al.* bestimmt (183). Zur Herstellung der ABTS<sup>+</sup>-Stammlösung wurden 38,43 mg ABTS und 6,9 mg Kaliumpersulfat in 10 mL Wasser in einem lichtundurchlässigen, verschließbaren Gefäß gelöst. Die Lösung wurde 12 h ruhen gelassen, damit sich die Radikale bilden konnten. Die Extinktion der ABTS<sup>+</sup>-Stammlösung wurde anschließend bei 734 nm durch Verdünnen mit Ethanol auf eine Extinktion von etwa 0,8 eingestellt (ABTS<sup>+</sup>-Arbeitslösung). Für die Trolox-Stammlösung wurden 12,52 mg Trolox mit Ethanol auf 5 mL aufgefüllt. Davon wurden 250; 500; 750 und 1000 µL mit Ethanol auf 5 mL aufgefüllt, um die Konzentrationen 0,5; 1,0; 1,5 und 2,0 mmol Trolox/L zu erhalten. Zur Herstellung der Probenlösungen wurden bei festen Proben 3 mg in 5 mL Ethanol gelöst bzw. bei flüssigen Proben membranfiltriert und wenn nötig verdünnt.

1 mL ABTS<sup>+</sup>-Arbeitslösung wurden mit 10 µL Ethanol (Blindwert) bzw. 10 µL Probelösung oder 10 µL Standardlösung in Halbmikroküvetten pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 6 min bei Raumtemperatur wurde bei 734 nm die Extinktion gemessen. Es erfolgte jeweils eine Zweifachbestimmung jeder Proben- und Kalibrierlösung.

Für die Berechnung wurde die Differenz der Extinktionen der Probe- bzw. Kalibrierlösung und des Blindwertes gebildet. Die Extinktionsdifferenzen der Kalibrierlösungen wurden gegen die zugehörigen Konzentrationen aufgetragen. Nach Ermittlung der Geradengleichung mittels linearer Regression wurde die antioxidative Kapazität der Proben in mmol Trolox/L bzw. µmol Trolox/g berechnet.

#### 4.4.2.8 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes wurde nach der Methode von SINGLETON *et al.* durchgeführt (185). Dafür wurde das Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz 1:10 verdünnt und eine Gallussäure-Stammlösung mit einer Konzentration von 500 mg/L hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden Kalibrierlösungen mit den Konzentrationen von 10; 20; 30; 40 und 50 mg Gallussäure/L hergestellt. Die Säfte wurden im Bereich von 1:10 bis 1:20 verdünnt.

Es wurden jeweils 200 µL Probenlösung, Wasser (Blindwert) bzw. Gallussäure-Kalibrierlösung in Semimikroküvetten pipettiert. Dazu wurden 1000 µL Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz gegeben und nach genau 4 min wurden 800 µL 7,5 %ige Natriumcarbonatlösung hinzugefügt. Nach 2 h wurden die Extinktionen der Lösungen bei 760 nm gemessen.

Aus den Extinktionen der Kalibrier- bzw. Probenlösungen und dem Blindwert wird die Differenz gebildet. Die Extinktionsdifferenzen der Kalibrierlösungen wurden gegen die zugehörigen Konzentrationen aufgetragen. Nach Ermittlung der Geradengleichung mittels

linearer Regression wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung der Gesamtphenolgehalt der Säfte berechnet.

#### 4.4.2.9 Quantifizierungen in Säften, Pulpe und Steinen von *Morinda citrifolia*

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung der Standardabweichungen der einzelnen Methoden wurde jeweils ein Saft fünfmal aufgearbeitet und gemessen. Die Berechnungen wurden mit Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt. Die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze wurden nach DIN 32645 mit dem Programm DINTTEST nach Gleichung 4-7 bzw. Gleichung 4-8 berechnet (294, 295). Die Kalibrierfunktionen wurden jeweils mit Origin 5.0 erstellt.

$$x_{NG} = s_{XO} \times t \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad \text{Gleichung 4-7}$$

$$x_{BG} = k \times s_{XO} \times t \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(x_{BG} - \bar{x})^2}{Q_x}} \quad \text{Gleichung 4-8}$$

$s_{XO}$	Verfahrensstandardabweichung
$t$	Quantile der t-Verteilung
$m$	Anzahl der Messungen der Analysenproben
$n$	Anzahl der Messungen der Kalibrierproben
$\bar{x}$	arithmetisches Mittel der Konzentrationen der Kalibrierproben
$Q_x$	Summe der Abweichungsquadrate von $x_i$
$1/k$	relative Ergebnisunsicherheit

##### 4.4.2.9.1 Asperulosidsäure in Säften

Die Säfte wurden mikrofiltriert, wenn nötig verdünnt und zur Analyse mittels LC-ESI-MS/MS (*HPLCSystem 7*) eingesetzt. Für die Quantifizierung wurde eine Kalibrierfunktion mit den Konzentrationen an Asperulosidsäure von 0,013; 0,033; 0,065; 0,091 und 0,130 mg/mL erstellt. Die Identifizierung von Asperulosidsäure wurde anhand des Vergleiches der Retentionszeit, des Masse zu Ladungsverhältnisses sowie zweier charakteristischer Fragmentierungen vorgenommen. Die Quantifizierung erfolgt anhand der Peakfläche im extracted-ion-mode mit  $m/z$  431 im negativen Modus. Die eingesetzte Standardsubstanz Asperulosidsäure wurde aus Früchten von *M. citrifolia* isoliert (s. 3.1.1.6.2).

#### 4.4.2.9.2 Scopoletin in Säften

Filtrierter Saft von *M. citrifolia* (10,0 mL) wurde dreimal mit jeweils 20 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten gewaschenen organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck auf ca. 1 mL eingeeengt. Die Lösung wurde anschließend im Stickstoffstrom bei T = 40 °C getrocknet und in 1000 µL Wasser/Methanol, 1/1 (v/v) aufgenommen. Die Lösung wurde mikrofiltriert, wenn nötig verdünnt, und zur Analyse mittels HPLC-UV bei einer Wellenlänge von 344 nm (*HPLCSystem 5*) eingesetzt. Die Identifizierung wurde anhand des Vergleiches der Retentionszeit und des UV-Spektrums vorgenommen. Für die Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade mit den Konzentrationen an Scopoletin von 0,010; 0,025; 0,050; 0,075 und 0,100 mg/mL erstellt. Die Standardsubstanz Scopoletin wurde aus Früchten von *M. citrifolia* isoliert (s. 7.1).

#### 4.4.2.9.3 2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose (DTA-diglucose) in Säften

Die Säfte wurden wie unter 4.4.2.9.2 angegeben aufgearbeitet. Die Analyse wurde mittels HPLC-UV bei einer Wellenlänge von 274 nm (*HPLCSystem 6*) durchgeführt. Die Identifizierung wurde anhand des Vergleiches der Retentionszeit und des UV-Spektrums vorgenommen. Für die Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade mit den Konzentrationen an DTA-diglucose von 0,010; 0,025; 0,050; 0,075 und 0,100 mg/mL erstellt. Die Standardsubstanz wurde aus Früchten von *M. citrifolia* isoliert (vgl. 3.1.1.6.2).

#### 4.4.2.9.4 (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid in Säften

Filtrierter Saft von *M. citrifolia* (500 µL) wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 500 µL Ethylacetat versetzt und gut gemischt. Die Lösungen wurden bei 6000 rpm 2 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und mittels HPLC-UV bei einer Wellenlänge von 262 nm (*HPLCSystem 6*) gemessen. Die Identifizierung von (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid wurde anhand des Vergleiches der Retentionszeit und des UV-Spektrums vorgenommen. Für die Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade mit den Konzentrationen an (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid von 0,010; 0,025; 0,050; 0,075 und 0,100 mg/mL erstellt. Die Standardsubstanz (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid wurde aus Früchten von *M. citrifolia* isoliert (s. 7.1).

#### 4.4.2.9.5 Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A in Säften

Die Probenaufarbeitung erfolgte wie unter 4.4.2.9.2 angegeben. Die Lösungen wurden zur Analyse mittels LC-ESI-MS/MS eingesetzt. Die Identifizierung von Isoamericanol A und Iso-

americanisäure A wurde anhand des Vergleiches der Retentionszeit, des Masse zu Ladungsverhältnisses sowie jeweils zweier charakteristischer Fragmentierungen vorgenommen. Für die Kalibrierreihe wurden 1,10 mg Isoamericanol A und 0,90 mg Isoamericaninsäure A eingewogen und in 1 mL Methanol gelöst. Daraus wurden die Isoamericanol A-Konzentrationen 0,0110; 0,0165; 0,0220; 0,0275 und 0,0550 mg/mL hergestellt. Die hergestellten Isoamericaninsäure A-Konzentrationen betragen 0,006; 0,007; 0,008; 0,009; 0,014 und 0,023 mg/mL. Sowohl für Isoamericanol A als auch für Isoamericaninsäure A erfolgte die Quantifizierung mittels LC-ESI-MS/MS unter Verwendung von *HPLCSystem 6*. Dafür wurden die extracted ion chromatograms (EIC) bei  $m/z$  329 (Isoamericanol A) bzw.  $m/z$  343 (Isoamericaninsäure A) erstellt. Die Standardsubstanzen Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A wurden aus Früchten von *M. citrifolia* isoliert (s. 3.1.2.4.1).

#### 4.4.2.9.6 Furan-2-carbonsäure in Säften

Die frischen selbsthergestellten Säfte wurden für die Bestimmung von Furan-2-carbonsäure für 1 min auf 95°C erhitzt und sofort abgekühlt. Die weitere Probenaufarbeitung erfolgte wie unter 4.4.2.9.2 angegeben. Die Lösungen wurden zur Analyse mittels HPLC-UV bei einer Wellenlänge von 254 nm (*HPLCSystem 5*) eingesetzt. Die Identifizierung von Furan-2-carbonsäure wurde anhand des Vergleiches der Retentionszeit und des UV-Spektrums vorgenommen. Für die Quantifizierung wurde eine Kalibrierreihe mit den Konzentrationen 0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,050; 0,100 und 0,200 mg/mL erstellt.

#### 4.4.2.9.7 Asperulosidsäure, Scopoletin und 2-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-O-(2E,4Z,7Z)-deca-trienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose (DTA-diglucose) in Pulpe und Steinen

Lyophilisierte Steine (1,000 g) respektive Pulpe (0,500 g) von *M. citrifolia* wurden genau eingewogen, mit 50 mL Methanol versetzt und mit einem Ultraturrax zunächst bei 8000 rpm und danach bei 20500 rpm zerkleinert. Dieses Gemisch wurde im Ultraschallbad für 1 h sonifiziert. Anschließend wurde das Methanol durch ein Filterpapier (Macherey-Nagel 615¼) abdekantiert. Die Extraktion wurde anschließend noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Methanolphasen wurden am Rotationsverdampfer auf ca. 5 mL eingengt und in einen 10-mL-Messkolben quantitativ unter mehrmaligem Nachspülen überführt und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösungen wurden membranfiltriert, wenn nötig verdünnt und zur Messung mittels HPLC-DAD bzw. LC-ESI-MS/MS eingesetzt. Die Parameter für die Trennung und die Kalibrierung sind für Asperulosidsäure unter 4.4.2.9.1, für Scopoletin unter 4.4.2.9.2 und für DTA-diglucose unter 4.4.2.9.3 angegeben.

#### 4.4.2.9.8 (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid in Pulpe und Steinen

Frische Steine (1,000 g) bzw. Pulpe (2,000 g) von *M. citrifolia* wurden in einem stabilen Gefäß mit 7 mL Methanol versetzt und mit einem Ultraturrax zunächst bei 8000 rpm und danach bei 20500 rpm zerkleinert. Die methanolische Lösung wurde inklusive fester Bestandteile quantitativ unter Nachspülen in einen 10-mL-Messkolben überführt. Diese Lösungen wurden im Ultraschallbad 1 h sonifiziert. Schließlich wurden diese Lösungen membranfiltriert, wenn nötig verdünnt und zur Messung mittels HPLC-DAD eingesetzt. Die Parameter für die Trennung und die Kalibrierung sind unter 4.4.2.9.4 angegeben.



---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Fruchtsäfte von *M. citrifolia* erfreuen sich seit ihrer Einführung auf dem amerikanischen Markt im Jahr 1996 und der Zulassung 2003 in der Europäischen Union einer wachsenden Beliebtheit bei der Bevölkerung. Ziel dieser Arbeit war es, zunächst eine Bestandsaufnahme der nichtflüchtigen Verbindungen in den Säften von *M. citrifolia* durchzuführen. Dafür wurden auch Isolierungen vorgenommen, um bis dato unbekannte Verbindungen strukturell aufklären zu können und Standardsubstanzen für weitere Quantifizierungen zur Verfügung zu stellen. Anschließend sollten auf Grundlage dieser Ergebnisse zum Einen die zytotoxischen Eigenschaften abgeschätzt und zum Anderen die antioxidativen Potentiale der Säfte beurteilt werden. Darüber hinaus war es sinnvoll, diese Untersuchungen auf die weiteren Fruchtbestandteile, wie Pulpe und Steine, auszudehnen. Bestimmungen von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in den Säften wurden zum Zwecke der Authentifizierung durchgeführt. Zur Beurteilung der flüchtigen Verbindungen in den Säften wurde ebenfalls zunächst eine Bestandsaufnahme durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls in die Beurteilung von Säften aus *M. citrifolia* mit einbezogen.

Für die Untersuchungen standen authentisches Probenmaterial aus den Gebieten Französisch-Polynesien (Tahiti), USA (Hawai'i, Big Island), Costa Rica und Kuba sowie vier fermentierte Saftproben aus Französisch-Polynesien (Tahiti) und den USA (Hawai'i, Big Island) zur Verfügung. Des Weiteren wurden Untersuchungen an 21 kommerziell erhältlichen Säften vorgenommen. Für die Bestandsaufnahme der nichtflüchtigen Verbindungen bot sich aufgrund der komplexen Zusammensetzung eine Extraktion der Säfte mit Lösungsmitteln ansteigender Polarität (Hexan, Dichlormethan, Ethylacetat) an. In den einzelnen Extrakten konnten Verbindungen aus den Substanzklassen der Anthrachinone, Flavonole und Flavonolglykoside, Phytosterole, Cumarinderivate, Lignane und Neolignane, Nonioside und Iridoide nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung dieser Extrakte hinsichtlich ihrer Zytotoxizität im Brine-shrimp-Assay wurden im Ethylacetat-Extrakt aus fermentierten Säften zytotoxische Wirkungen nachgewiesen. Die weitere Analyse dieses Extraktes zeigte, dass drei Neolignane und ein Lignan hauptverantwortlich für die zytotoxischen Wirkungen waren. Diese Beobachtung konnte außerdem durch Untersuchung des Ethylacetat-Extraktes der Steine bestätigt werden, in denen diese Verbindungen hauptsächlich vorkommen.

Aufgrund mehrerer publizierter Fälle von lebertoxischen Wirkungen im Zusammenhang mit der Einnahme von Produkten von *M. citrifolia* wurde ferner die Zytotoxizität der Saft-

Extrakte in Rattenhepatozyten evaluiert. Dabei konnten toxische Wirkungen im Dichlormethan-Extrakt des Safts von *M. citrifolia* festgestellt werden. Diese zytotoxischen Wirkungen konnten nach Separierung in elf Fraktionen auf drei dieser Fraktionen zurückgeführt werden. Hier konnte in einer Fraktion Scopoletin, ein Cumarinderivat, und (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatriensäure in einer weiteren Fraktion nachgewiesen werden, die für die toxischen Wirkungen in primären Rattenhepatozyten verantwortlich sind. Des Weiteren wurde die übrige hochkomplexe Fraktion in 13 Subfraktionen aufgetrennt. Eine Fraktion davon zeigte starke toxische Wirkungen in den primären Rattenhepatozyten. In dieser Fraktion konnte Syringaldehyd als toxische Substanz identifiziert werden. Diese Ergebnisse können als erste Hinweise auf eine mögliche hepatotoxische Wirkung von Saft aus *M. citrifolia* dienen. Zur Abschätzung lebertoxischer Effekte im menschlichen Organismus sind jedoch weitere Studien unabdingbar.

Zur Bereitstellung von Reinsubstanzen zur Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen und zur Quantifizierung von Inhaltsstoffen von *M. citrifolia* wurden Isolierungen aus Extrakten der Säfte, Pulpe und Steine vorgenommen. Dabei erwies sich bei den Säften die Festphasenadsorption an Amberlite XAD-7 und XAD-2 und für die Pulpe und Steine eine Lösungsmittel-Extraktion zur Gewinnung von Ausgangsmaterial als zielführend. Die weitere Auftrennung erfolgte mittels Gegenstromverteilungschromatographie, Größenausschlusschromatographie und präparativer HPLC. So konnten 24 Verbindungen isoliert und strukturell aufgeklärt werden, von denen vier Verbindungen neu für *M. citrifolia* waren (Hymexelsin, 3,4-Dihydroxymaldehyd, 10-Dehydrogardenosid und dessen Dimer) und weitere drei Verbindungen, die bis dato nach bestem Wissen nicht bekannt waren (Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid, 2-*O*-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-1-*O*-(2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoyl- $\beta$ -D-glucopyranose und 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -Epoxy-10-dehydrogardenosid).

Bei der Quantifizierung ausgewählter Verbindungen in den Fruchtbestandteilen Saft, Pulpe und Steinen zeigte sich ein starker Einfluss der Herkunft, des Reifegrades und der Verarbeitung der Früchte auf die untersuchten Verbindungen. Die geringsten Schwankungen konnten bei der Verbindung Scopoletin detektiert werden, die damit einen Hinweis auf starke Verdünnungen von Noni-Säften liefern kann. Darüber hinaus ist durch die Neolignane Isoamericanol A und Isoamericaninsäure A die Unterscheidung von frischen und fermentierten Säften mit Einschränkungen möglich.

Bei der Bestandsaufnahme der flüchtigen Verbindungen konnten in den frischen Säften 43 Verbindungen identifiziert werden. Neben diesen Verbindungen konnten in fermentiertem Saft zwölf weitere Substanzen identifiziert werden, bei welchen es sich zumeist um mikrobielle Fermentationsprodukte handelte. Darüber hinaus konnten erhebliche Konzentrationsunterschiede zwischen frischen und fermentierten Säften bei den Fermentationsalkoholen

nachgewiesen werden. Als sehr interessant hinsichtlich der Unterscheidung frischer und fermentierter Säfte erschienen die Verbindungen *cis*-5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan und *cis*-4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan, die aus Sherry und Portwein bekannt sind. Diese aus Acetaldehyd und Glycerin gebildeten Substanzen sind ausschließlich in fermentierten Säften nachweisbar und können zur eindeutigen Unterscheidung frischer und fermentierter Säfte herangezogen werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Ziele dieser Arbeit, die Bestandsaufnahme der nichtflüchtigen und flüchtigen Verbindungen in Säften, die Strukturaufklärung unbekannter Substanzen in Säften, Pulpe und Steinen, die Einschätzung des antioxidativen Potentials und des Gesamtphenolgehalts, die Abschätzung zytotoxischer Wirkungen mittels Brine-shrimp-Assay bzw. Resazurin-Reduktions-Test an primären Rattenhepatozyten sowie die Unterscheidung der Herstellungsverfahren von Säften aus *M. citrifolia*, erreicht wurden.



## 6 LITERATUR

1. Whistler, W. A., Herbal medicine in the Kingdom of tonga. *J Ethnopharmacol* **1991**, 31, (3), 339-372.
2. Singh, Y. N.; Ikaahifo, T.; Panuve, M.; Slatter, C., Folk medicine in Tonga. A study on the use of herbal medicines for obstetric and gynaecological conditions and disorders. *J Ethnopharmacol* **1984**, 12, (3), 305-329.
3. 2003/426/EC, Commission decision of 5 June 2003 authorising the placing on the market of "noni juice" (juice of the fruit of *Morinda citrifolia* L.) as a novel food ingredient under regulation (EC) No 258/97 of the European parliament and of the council. *Off J Eur Union* **2003**, L144/12.
4. 2008/985/EC, Commission decision of 15 December 2008 authorising the placing on the market of leaves of *Morinda citrifolia* as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. *Off J Eur Union* **2008**, L352/46.
5. 2010/228/EU, Commission decision of 21 April 2010 authorising the placing on the market of puree and concentrate of the fruits of *Morinda citrifolia* as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council *Off J Eur Union* **2010**, L102/49.
6. Pawlus, A. D.; Kinghorn, D. A., Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *J Pharm Pharmacol* **2007**, 59, (12), 1587-1609.
7. Potterat, O.; Hamburger, M., *Morinda citrifolia* (noni) fruit - Phytochemistry, pharmacology, safety. *Planta Med* **2007**, 73, (3), 191-199.
8. Yüce, B.; Gülberg, V.; Diebold, J.; Gerbes, A. L., Hepatitis induced by Noni juice from *Morinda citrifolia*: A rare cause of hepatotoxicity or the tip of the iceberg? *Digestion* **2006**, 73, (2-3), 167-170.
9. Stadlbauer, V.; Weiss, S.; Payer, F.; Stauber, R. E., Herbal does not at all mean innocuous: The sixth case of hepatotoxicity associated with *Morinda citrifolia* (Noni). *Am J Gastroenterol* **2008**, 103, (9), 2406-2407.
10. EFSA, Opinion on the safety of Tahitian Noni "*Morinda citrifolia* (noni) fruit puree and concentrate" as a novel food ingredient. *The EFSA Journal* **2009**, 998, 1-16.
11. Morton, J. F., The ocean-going noni, or Indian Mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its "colorful" relatives. *Econ Bot* **1992**, 46, (3), 241-256.
12. Razafimandimbison, S. G.; McDowell, T. D.; Halford, D. A.; Bremer, B., Origin of the pantropical and nutraceutical *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae): Comments on its distribution range and circumscription. *J Biogeogr* **2010**, 37, (3), 520-529.
13. Razafimandimbison, S. G.; McDowell, T. D.; Halford, D. A.; Bremer, B., Molecular phylogenetics and generic assessment in the tribe Morindeae (Rubiaceae-Rubioideae): How to circumscribe *Morinda* L. to be monophyletic? *Mol Phylogenet Evolution* **2009**, 52, (3), 879-886.
14. Nelson, S. C. *Morinda citrifolia* (Noni). [www.traditionaltree.org](http://www.traditionaltree.org) (22/02/2010)
15. McClatchey, W. C. In: *Proceedings of the 2002 Hawai'i Noni Conference*, Diversity of Growth Forms and Uses in the *Morinda Citrifolia* Linn Complex Nelson, S. C., Ed. University of Hawai'i at Manoa: College of Tropical Resources and Agriculture, 2003; pp 5-10.
16. Dixon, A. R.; McMillen, H.; Etkin, N. L., Ferment this: The transformation of noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). *Econ Bot* **1999**, 53, (1), 51-68.
17. Keeler, K. H., Extrafloral nectaries on plants in communities without ants: Hawaii. *Oikos* **1985**, 44, (3), 407-414.

18. Guppy, H. B., *Plants, seeds, and currents in the West Indies and Azores*. Williams and Norgate (London) 1917.
19. Johansson, J. T., The genus *Morinda* (Morindeae, Rubioideae, Rubiaceae) in New Caledonia: Taxonomy and phylogeny. *Opera Bot* **1994**, 122, 1-67.
20. McClatchey, W., From Polynesian healers to health food stores: Changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *Integr Cancer Ther* **2002**, 1, (2), 110-120.
21. Abbott, I. A.; Shimazu, C., The geographic origin of the plants most commonly used for medicine by Hawaiians. *J Ethnopharmacol* **1985**, 14, (2-3), 213-222.
22. Whistler, W. A., Traditional and herbal medicine in the cook islands. *J Ethnopharmacol* **1985**, 13, (3), 239-280.
23. von Anderson, T., Ueber den Farbstoff der *Morinda citrifolia*. *Liebigs Ann Chem* **1849**, 71, (2), 216-224.
24. Leistner, E., Biosynthesis of morindone and alizarin in intact plants and cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Phytochemistry* **1973**, 12, (7), 1669-1674.
25. Parkinson, S. Journal of a Voyage to the South Seas, in His Majesty's Ship, The Endeavour. [http://southseas.nla.gov.au/index\\_voyaging.html](http://southseas.nla.gov.au/index_voyaging.html) (21/02/2011)
26. Brown, F. B. H., *Flora of southeastern Polynesia: III. Dicotyledons*. Bernice P. Bishop Museum: Honolulu, 1935.
27. Degener, O., *Plants of Hawaii National Park illustrative of plants and customs of the south seas*. Braun-Brumfield: Ann Arbor, 1984.
28. Haji Mohiddin, M. Y.; Chin, W.; Holdsworth, D., Traditional medicinal plants of Brunei Darussalam part III. Sengkurong. *Int J Pharmacogn* **1992**, 30, (2), 105-108.
29. Cambie, R. C.; Ash, J., *Fijian medicinal plants*. CSIRO Publishing Australia: East Melbourne, Victoria, 1994.
30. Cambie, R. C.; Brewis, A., *Anti-fertility plants of the Pacific*. CSIRO Publishing Australia: Collingwood, Victoria, 1997.
31. Locher, C. P.; Burch, M. T.; Mower, H. F.; Berestecky, J.; Davis, H.; Van Poel, B.; Lasure, A.; Van den Berghe, D. A.; Vlietinck, A. J., Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* **1995**, 49, (1), 23-32.
32. Ross, I. A., *Medicinal Plants of the World, Volume 2: Chemical Constituents, Traditional and Modern Uses*. Springer-Verlag: Berlin, 2001.
33. Weiner, M. A., *Secrets of Fijian Medicine*. University of California Press: Berkeley, Californien, 1976; Vol. 1.
34. Dittmar, A., *Morinda citrifolia* L. -- Use in Indigenous Samoan Medicine. *J Herbs Spices Med Plants* **1993**, 1, (3), 77-92.
35. Aalbersberg, W. G. L.; Hussein, S.; Sotheeswaran, S.; Parkinson, S., Carotenoids in the Leaves of *Morinda citrifolia*. *J Herbs Spices Med Plants* **1993**, 2, (1), 51 - 54.
36. McClatchey, W., The ethnopharmacopoeia of Rotuma. *J Ethnopharmacol* **1996**, 50, (3), 147-156.
37. SCF, Opinion of the Scientific Committee on Food on Tahitian Noni® juice. **2002**, expressed on 4 December 2002.
38. Notifications pursuant to article 5 of regulation (EC) N° 258/97 of the European Parliament and of the Council. [http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/notif\\_list\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/notif_list_en.pdf) (10/12/2009)
39. EFSA, Safety of 'leaves from *Morinda citrifolia* L.' *The EFSA Journal* **2008**, 769, (26.10.2009), 1 - 17.
40. EFSA, Opinion on the safety of Tahitian Noni® 'Morinda citrifolia (noni) fruit puree and concentrate' as a novel food ingredient. *The EFSA Journal* **2009**, 998, 1 - 16.

41. Hirazumi, A.; Furusawa, E., An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. *Phytother Res* **1999**, *13*, (5), 380-387.
42. Saludes, J. P.; Garson, M. J.; Franzblau, S. G.; Aguinaldo, A. M., Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phytother Res* **2002**, *16*, (7), 683-685.
43. Kamiya, K.; Tanaka, Y.; Endang, H.; Umar, M.; Satake, T., Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem* **2004**, *52*, (19), 5843-5848.
44. Issell, B. F.; Gotay, C.; Pagano, I.; Franke, A., Quality of life measures in a phase I trial of noni *J Clin Oncol*, *2005 ASCO Annual Meeting Proceedings* **2005**, *23*, no. 16\_suppl 8217.
45. Nayak, B. S.; Isitor, G. N.; Maxwell, A.; Bhogadi, V.; Ramdath, D. D., Wound-healing activity of *Morinda citrifolia* fruit juice on diabetes-induced rats. *J Wound Care* **2007**, *16*, (2), 83-86.
46. Nayak, B. S.; Sandiford, S.; Maxwell, A., Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evid Based Complement Alternat Med* **2009**, *6*, (3), 351-356.
47. Palu, A.; Su, C.; Zhou, B. N.; West, B.; Jensen, J., Wound healing effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) leaves: A mechanism involving its PDGF/A2A receptor ligand binding and promotion of wound closure. *Phytother Res* **2010**, *24*, (10), 1437-1441.
48. Nayak, S.; Mengi, S., Immunostimulant activity of noni (*Morinda citrifolia*) on T and B lymphocytes. *Pharm Biol* **2010**, *48*, (7), 724-731.
49. Basar, S.; Uhlenhut, K.; Högger, P.; Schöne, F.; Westendorf, J., Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) fruit. *Phytother Res* **2010**, *24*, (1), 38-42.
50. Harada, S.; Fujita-Hamabe, W.; Kamiya, K.; Mizushina, Y.; Satake, T.; Tokuyama, S., *Morinda citrifolia* fruit juice prevents ischemic neuronal damage through suppression of the development of post-ischemic glucose intolerance. *J Nat Med* **2010**, *64*, (4), 468-473.
51. Nayak, B. S.; Marshall, J. R.; Isitor, G.; Adogwa, A., Hypoglycemic and hepatoprotective activity of fermented fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) in diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**, art. no. 875293.
52. Heinicke, R. M., The pharmacologically active ingredient of Noni. *Bulletin of the National Tropical Botanical Garden Hawai'i* **1985**, *15*, 10-14.
53. TahitianNoniInternational TNI-Zeitleiste.  
<http://www.tni.com/germany/german/tahitiannoni/company/timeline.html> (28/02/2011)
54. Nelson, S. C.; Abad, Z. G., *Phytophthora morindae*, a new species causing black flag disease on noni (*Morinda citrifolia* L.) in Hawaii. *Mycologia* **2010**, *102*, (1), 122-134.
55. Erratum to *Phytophthora morindae*, a new species causing black flag disease on noni (*Morinda citrifolia* L.) in Hawaii, [*Mycologia*, (2010), 101, 122-134]. *Mycologia* **2010**, *102*, (2), 491.
56. Nelson, S. C. In: *Proceedings of the 2002 Hawai'i Noni Conference* Noni Cultivation and Production in Hawai'i, Nelson, S. C., Ed. University of Hawai'i at Manoa: College of Tropical Agriculture and Human Resources, 2003; pp 33-50.
57. Chan-Blanco, Y.; Vaillant, F.; Pérez, A. M.; Belleville, M. P.; Zúniga, C.; Brat, P., The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.): Microbiological flora and antioxidant compounds. *J Sci Food Agric* **2007**, *87*, (9), 1710-1716.
58. Kantachote, D.; Kowpong, K.; Charernjitrakul, W.; Pengnoo, A., Microbial succession in a fermenting of wild forest noni (*Morinda coreia* Ham) fruit plus molasses and its role in producing a liquid fertilizer. *Electron J Biotechnol* **2009**, *12*, (3).
59. Bushnell, O. A.; Fukuda, M.; Makinodan, T., The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. *Pac Sci* **1950**, *4*, (3), 167-183.
60. Atkinson, N., Antibacterial Substances from Flowering Plants. *Aust J Exp Biol Med Sci* **1956**, *34*, (1), 17-26.

61. Chunhieng, T.; Hay, L.; Montet, D., Detailed study of the juice composition of noni (*Morinda citrifolia*) fruits from Cambodia. *Fruits* **2005**, 60, (1), 13-24.
62. Bui, A. K. T.; Bacic, A.; Pettolino, F., Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). *Phytochemistry* **2006**, 67, (12), 1271-1275.
63. Furusawa, E.; Hirazumi, A.; Story, S.; Jensen, J., Antitumour Potential of a Polysaccharide-rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on Sarcoma 180 Ascites Tumour in Mice. *Phytother Res* **2003**, 17, (10), 1158-1164.
64. Shovic, A. C.; Whistler, W. A., Food sources of provitamin A and vitamin C in the American Pacific. *Trop Sci* **2001**, 41, (4), 199-202.
65. Wang, M.; Kikuzaki, H.; Jin, Y.; Nakatani, N.; Zhu, N.; Csiszar, K.; Boyd, C.; Rosen, R. T.; Ghai, G.; Ho, C. T., Novel glycosides from noni (*Morinda citrifolia*). *J Nat Prod* **2000**, 63, (8), 1182-1183.
66. Pawlus, A. D.; Su, B. N.; Keller, W. J.; Kinghorn, A. D., An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *J Nat Prod* **2005**, 68, (12), 1720-1722.
67. Wang, M.; Kikuzaki, H.; Csiszar, K.; Boyd, C. D.; Maunakea, A.; Fong, S. F. T.; Ghai, G.; Rosen, R. T.; Nakatani, N.; Ho, C. T., Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). *J Agric Food Chem* **1999**, 47, (12), 4880-4882.
68. Deng, S.; Palu, A. K.; West, B. J.; Su, C. X.; Zhou, B. N.; Jensen, J. C., Lipxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *J Nat Prod* **2007**, 70, (5), 859-862.
69. Dalsgaard, P. W.; Potterat, O.; Dieterle, F.; Paululat, T.; Kühn, T.; Hamburger, M., Noniosides E-H, new trisaccharide fatty acid esters from the fruit of *Morinda citrifolia* (noni). *Planta Med* **2006**, 72, (14), 1322-1327.
70. Akihisa, T.; Seino, K.; Kaneko, E.; Watanabe, K.; Tochizawa, S.; Fukatsu, M.; Banno, N.; Metori, K.; Kimura, Y., Melanogenesis inhibitory activities of iridoid-, Hemiterpene-, and fatty Acid-glycosides from the fruits of *Morinda Citrifolia* (Noni). *J Oleo Sci* **2009**, 59, (1), 49-57.
71. Su, B. N.; Pawlus, A. D.; Jung, H. A.; Keller, W. J.; McLaughlin, J. L.; Kinghorn, A. D., Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. *J Nat Prod* **2005**, 68, (4), 592-595.
72. Sang, S.; Cheng, X.; Zhu, N.; Wang, M.; Jhoo, J. W.; Stark, R. E.; Badmaev, V.; Ghai, G.; Rosen, R. T.; Ho, C. T., Iridoid glycosides from the leaves of *Morinda citrifolia*. *J Nat Prod* **2001**, 64, (6), 799-800.
73. Kamiya, K.; Tanaka, Y.; Endang, H.; Umar, M.; Satake, T., New anthraquinone and iridoid from the fruits of *Morinda citrifolia*. *Chem Pharm Bull* **2005**, 53, (12), 1597-1599.
74. Sang, S.; Wang, M.; He, K.; Liu, G.; Dong, Z.; Badmaev, V.; Zheng, Q. Y.; Ghai, G.; Rosen, R. T.; Ho, C. T., Chemical components in noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L.). In *ACS Symp Ser*, 2002; Vol. 803, pp 134-150.
75. Kim, S. W.; Jo, B. K.; Jeong, J. H.; Choi, S. U.; Hwang, Y. I., Induction of extracellular matrix synthesis in normal human fibroblasts by anthraquinone isolated from *Morinda citrifolia* (Noni) fruit. *J Med Food* **2005**, 8, (4), 552-555.
76. Schripsema, J.; Caprini, G. P.; Dagnino, D., Revision of the structures of citrifolinin A, citrifolinoside, yopaaoside A, yopaaoside B, and morindacin, iridoids from *Morinda citrifolia* L. and *Morinda coreia* Ham. *Org Lett* **2006**, 8, (23), 5337-5340.
77. Samoylenko, V.; Zhao, J.; Dunbar, D. C.; Khan, I. A.; Rushing, J. W.; Muhammad, I., New constituents from noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. *J Agric Food Chem* **2006**, 54, (17), 6398-6402.
78. Liu, C. h.; Xue, Y. r.; Ye, Y. h.; Yuan, F. f.; Liu, J. y.; Shuang, J. I., Extraction and Characterization of Antioxidant Compositions From Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni). *Agr Sci China* **2007**, 6, (12), 1494-1501.

79. Lin, C. F.; Ni, C. L.; Huang, Y. L.; Sheu, S. J.; Chen, C. C., Lignans and anthraquinones from the fruits of *Morinda citrifolia*. *Nat Prod Res* **2007**, 21, (13), 1199-1204.
80. Basar, S.; Westendorf, J., Identification of (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid in noni fruit and its use in quality screening of commercial noni products. *Food Anal Methods* **2010**, 4, (1), 57-65.
81. Deng, S.; West, B. J.; Jensen, C. J.; Basar, S.; Westendorf, J., Development and validation of an RP-HPLC method for the analysis of anthraquinones in noni fruits and leaves. *Food Chem* **2009**, 116, (2), 505-508.
82. Deng, S.; West, B. J.; Palu, K.; Jensen, C. J., Determination and comparative analysis of major iridoids in different parts and cultivation sources of *Morinda citrifolia*. *Phytochem Analysis* **2011**, 22, (1), 26-30.
83. Waibel, R.; Benirschke, G.; Benirschke, M.; Achenbach, H., Sesquieolignans and other constituents from the seeds of *Joannesia princeps*. *Phytochemistry* **2003**, 62, (5), 805-811.
84. Takahashi, H.; Yanagi, K.; Ueda, M.; Nakade, K.; Fukuyama, Y., Structures of 1,4-benzodioxane derivatives from the seeds of *Phytolacca americana* and their neurotogenic activity in primary cultured rat cortical neurons. *Chem Pharm Bull* **2003**, 51, (12), 1377-1381.
85. Farine, J. P.; Legal, L.; Moreteau, B.; Le Quere, J. L., Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. *Phytochemistry* **1996**, 41, (2), 433-438.
86. Pino, J. A.; Márquez, E.; Castro, D., Volatile and non-volatile acids of noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit. *J Sci Food Agric* **2009**, 89, (7), 1247-1249.
87. Pino, J. A.; Márquez, E.; Quijano, C. E.; Castro, D., Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.) at two ripening stages. *Ciênc Tecnol Aliment* **2010**, 30, (1), 183-187.
88. Pino, J.; Márquez, E.; Castro, D., Changes in volatile compounds during the fermentation/aging of noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) by the ancient traditional process. *Acta Aliment Hung* **2010**, 39, (3), 337-342.
89. Umezawa, T., Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem Rev* **2003**, 2, (3), 371-390.
90. Haworth, R. D., Natural resins. *Annu Rep Prog Chem* **1936**, 33, 266-279.
91. Whiting, D. A., Lignans and neolignans. *Nat Prod Rep* **1985**, 2, (3), 191-211.
92. Umezawa, T.; Okunishi, T.; Shimada, M., Stereochemical Diversity in Lignan Biosynthesis. *Wood research : bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University* **1997**, 84, 62-75.
93. Lewis, N. G.; Davin, L. B.; Sarkanen, S., Lignin and Lignan Biosynthesis: Distinctions and Reconciliations. In *ACS Symp Ser*, 1998; Vol. 697, pp 1-27.
94. Holmbom, B.; Eckerman, C.; Eklund, P.; Hemming, J.; Nisula, L.; Reunanen, M.; Sjöholm, R.; Sundberg, A.; Sundberg, K.; Willför, S., Knots in trees - A new rich source of lignans. *Phytochem Rev* **2003**, 2, (3), 331-340.
95. Gang, D. R.; Kasahara, H.; Xia, Z.-Q.; Vander Mijnsbrugge, K.; Bauw, G.; Boerjan, W.; Van Montagu, M.; Davin, L. B.; Lewis, N. G., Evolution of Plant Defense Mechanisms. *J Biol Chem* **1999**, 274, (11), 7516-7527.
96. Mazur, W.; Fotsis, T.; Wähälä, K.; Ojala, S.; Salakka, A.; Adlercreutz, H., Isotope Dilution Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Method for the Determination of Isoflavonoids, Coumestrol, and Lignans in Food Samples. *Anal Biochem* **1996**, 233, (2), 169-180.
97. Bylund, A.; Lundin, E.; Zhang, J. X.; Nordin, A.; Kaaks, R.; Stenman, U. H.; Å...man, P.; Adlercreutz, H.; Nilsson, T. K.; Hallmans, G.; Bergh, A.; Stattin, P., Randomised controlled short-term intervention pilot study on rye bran bread in prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* **2003**, 12, (5), 407-415.
98. Thompson, L. U.; Chen, J. M.; Li, T.; Strasser-Weippl, K.; Goss, P. E., Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. *Clin Cancer Res* **2005**, 11, (10), 3828-3835.

99. Adlercreutz, H.; Mousavi, Y.; Clark, J.; Höckerstedt, K.; Hämäläinen, E.; Wähälä, K.; Mäkelä, T.; Hase, T., Dietary phytoestrogens and cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1992**, *41*, (3-8), 331-337.
100. Welshons, W. V.; Murphy, C. S.; Koch, R.; Calaf, G.; Jordan, V. C., Stimulation of breast cancer cells *in vitro* by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol. *Breast Cancer Res Treat* **1987**, *10*, (2), 169-175.
101. Harper, A.; Kerr, D. J.; Gescher, A.; Chipman, J. K., Antioxidant effects of isoflavonoids and lignans, and protection against DNA oxidation. *Free Radical Res* **1999**, *31*, (2), 149-160.
102. Kitts, D. D.; Yuan, Y. V.; Wijewickreme, A. N.; Thompson, L. U., Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol Cell Biochem* **1999**, *202*, (1-2), 91-100.
103. Wang, C.; Makela, T.; Hase, T.; Adlercreutz, H.; Kurzer, M. S., Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1994**, *50*, (3-4), 205-212.
104. Adlercreutz, H.; Bannwart, C.; Wahala, K.; Makela, T.; Brunow, G.; Hase, T.; Arosemena, P. J.; Kellis Jr, J. T.; Vickery, L. E., Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1993**, *44*, (2), 147-153.
105. Davin, L. B.; Lewis, N. G., An historical perspective on lignan biosynthesis: Monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism. *Phytochem Rev* **2003**, *2*, (3), 257-288.
106. Beejmohun, V.; Fliniaux, O.; Hano, C.; Pilard, S.; Grand, E.; Lesur, D.; Cailleu, D.; Lamblin, F.; Lainé, E.; Kovensky, J.; Fliniaux, M. A.; Mesnard, F., Coniferin dimerisation in lignan biosynthesis in flax cells. *Phytochemistry* **2007**, *68*, (22-24), 2744-2752.
107. Iida, T.; Ichino, K.; Ito, K., Neolignans from *Magnolia denudata*. *Phytochemistry* **1980**, *21*, (12), 2939-2941.
108. Jensen, S.; Hansen, J.; Boll, P. M., Lignans and neolignans from piperaceae. *Phytochemistry* **1993**, *33*, (3), 523-530.
109. Dodson, C. D.; Stermitz, F. R.; Oscar, C. C.; Janzen, D. H., Neolignans from fruits of *Ocotea veraguensis*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, (7), 2037-2040.
110. Gottlieb, O. R., Chemosystematics of the lauraceae. *Phytochemistry* **1972**, *11*, (5), 1537-1570.
111. Gottlieb, O. R., Neolignans. In *Fort Chem Org Nat*, Springer-Verlag: Wien New York, 1978; Vol. 35.
112. Apers, S.; Vlietinck, A.; Pieters, L., Lignans and neolignans as lead compounds. *Phytochem Rev* **2003**, *2*, (3), 201-217.
113. Seigler, D. S., *Plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers: Norwell, Massachusetts, 1998; Vol. 1.
114. Roth, L. M.; Eisner, T., Chemical Defenses of Arthropods. *Ann Rev Entomol* **1962**, *7*, (1), 107-136.
115. Dinda, B.; Debnath, S.; Harigaya, Y., Naturally occurring iridoids. A Review, part 1. *Chem Pharm Bull* **2007**, *55*, (2), 159-222.
116. Taskova, R.; Evstatieva, L.; Handjieva, N.; Popov, S., Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance. *Z Naturforsch C* **2002**, *57*, (1-2), 42-50.
117. Mitova, M. I.; Anchev, M. E.; Handjieva, N. V.; Popov, S. S., Iridoid patterns in *Galium* L. and some phylogenetic considerations. *Z Naturforsch C* **2002**, *57*, (3-4), 226-234.
118. Jensen, S. R. In: *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*, Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms, Harborne, J. B.; Tomas-Barberan, F. A., Eds. Clarendon Press: Oxford, 1991; pp 133-158.
119. Escher, S.; Loew, P.; Arigoni, D., The role of hydroxygeraniol and hydroxynerol in the biosynthesis of loganin and indole alkaloids. *J Chem Soc Chem Comm* **1970**, (13), 823-825.

120. Hänsel, R.; Sticher, O., *Pharmakognosie- Phytopharmazie*. Springer Medizin Verlag: Heidelberg, 2009; Vol. 9.
121. Inouye, H.; Uesato, S., Biosynthesis of iridoids and secoiridoids. *Progr Chem Org Nat Prod* **1986**, *50*, 169-236.
122. Roengsumran, S.; Sookkongwaree, K.; Jaiboon, N.; Chaichit, N.; Petsom, A., Crystal Structure of Ipolamiide Monohydrate from *Stachytarpheta indica*. *Anal Sci* **2002**, *18*, (9), 1063-1064.
123. Fokina, G.; Bukreeva, T., Lamiide from *Phlomis cancellata*. *Chem Nat Compd* **1990**, *26*, (6), 715-715.
124. Stadlbauer, V.; Fickert, P.; Lackner, C.; Schmerlaib, J.; Krisper, P.; Trauner, M.; Stauber, R. E., Hepatotoxicity of noni juice: Report of two cases. *World J Gastroenterol* **2005**, *11*, (30), 4758-4760.
125. Millionig, G.; Stadlmann, S.; Vogel, W., Herbal hepatotoxicity: Acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). *Eur J Gastroenterol Hepat* **2005**, *17*, (4), 445-447.
126. EFSA, Opinion on a request from the Commission related to the safety of noni juice (juice of the fruits of *Morinda citrifolia*). *The EFSA Journal* **2006**, *376*, 1-12.
127. Juluri, R.; Vuppulanchi, R., Liver injury after consumption of high dose of Tahitian Noni juice. *American College of Gastroenterology (ACG) Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course* **2008**, Abstract ID# P899.
128. Matrana, M.; Patel, K.; Barlapudi, S.; Daste, C.; Duet, J., Acute drug-induced hepatitis associated with Noni Juice ingestion. *Ochsner J* **2007**, *7*, (2), 94.
129. López-Cepero Andrada, J.; Lerma Castilla, S.; Fernández Olvera, M. D.; Amaya Vidal, A., Hepatotoxicidad grave asociada al consumo de Noni (*Morinda citrifolia*). *Rev Esp Enferm Dig* **2007**, *99*, (3), 179-181.
130. Evira, Letter of the Finnish Food Safety Authority Evira to EFSA, Subject: Noni Juice suspected to be behind of two hepatotoxicity cases. **2008**, unpublished.
131. Yu, E. L.; Sivagnanam, M.; Ellis, L.; Huang, J. S., Acute hepatotoxicity after ingestion of *Morinda citrifolia* (Noni Berry) juice in a 14-year-old boy. *J Pediatr Gastr Nutr* **2011**, *52*, (2), 222-224.
132. Westendorf, J.; Effenberger, K.; Iznaguen, H.; Basar, S., Toxicological and analytical investigations of noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. *J Agric Food Chem* **2007**, *55*, (2), 529-537.
133. West, B. J.; Su, C. X.; Jensen, C. J., Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. *J Toxicol Sci* **2009**, *34*, (5), 581-585.
134. West, B. J.; Su, C. X.; Jensen, C. J., Prenatal toxicity test of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. *J Toxicol Sci* **2008**, *33*, (5), 647-649.
135. Müller, J. C.; Botelho, G. G. K.; Bufalo, A. C.; Boareto, A. C.; Rattmann, Y. D.; Martins, E. S.; Cabrini, D. A.; Otuki, M. F.; Dalsenter, P. R., *Morinda citrifolia* L. (Noni): In vivo and in vitro reproductive toxicology. *J Ethnopharmacol* **2009**, *121*, (2), 229-233.
136. Marques, N. F. Q.; Marques, A. P. B. M.; Iwano, A. L.; Golin, M.; De-Carvalho, R. R.; Paumgarten, F. J. R.; Dalsenter, P. R., Delayed ossification in Wistar rats induced by *Morinda citrifolia* L. exposure during pregnancy. *J Ethnopharmacol* **2010**, *128*, (1), 85-91.
137. Schlicht, C.; Lander, V., Authenticity control at juices from "*Morinda citrifolia*" (noni-fruit), Proof of addition of water, sugar and/or acids with the aid of stable isotope technique. *Abstract veröffentlicht in Lebensmittelchemie* **2007**, *61*, (4), 96-97.
138. Lachenmeier, K.; Mußhoff, F.; Madea, B.; Reusch, H.; Lachenmeier, D. W., Authentifizierung von Noni (*Morinda citrifolia*)-Saft. *Deut Lebensm-Rundsch* **2006**, *102*, (2), 58-61.
139. Ito, Y., Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* **2005**, *1065*, (2), 145-168.
140. Ito, Y.; Conway, W. D., *High-Speed Countercurrent Chromatography*. John Wiley & Sons: New York, 1996.

141. Conway, W. D., Counter-current chromatography. *J Chromatogr* **1991**, 538, (1), 27-35.
142. Conway, W. D., *Countercurrent chromatography: apparatus, theory, and applications*. VCH Publishers: New York, 1990.
143. Pauli, G. F.; Pro, S. M.; Friesen, J. B., Countercurrent separation of natural products. *J Nat Prod* **2008**, 71, (8), 1489-1508.
144. Winterhalter, P., Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments. *Trends Food Sci Tech* **2007**, 18, (10), 507-513.
145. Ito, Y.; Weinstein, M.; Aoki, I.; Harada, R.; Kimura, E.; Nunogaki, K., The coil planet centrifuge. *Nature* **1966**, 212, (5066), 985-987.
146. Marston, A.; Hostettmann, K., Counter-current chromatography as a preparative tool - Applications and perspectives. *J Chromatogr A* **1994**, 658, (2), 315-341.
147. Sutherland, I. A., Countercurrent chromatography. *Lab Pract* **1987**, 36, 37-42.
148. Ito, Y., Experimental observations of the hydrodynamic behavior of solvent systems in high-speed counter-current chromatography. I. Hydrodynamic distribution of two solvent phases in a helical column subjected to two types of synchronous planetary motion. *J Chromatogr A* **1984**, 301, (2), 377-386.
149. Cao, X. L.; Tian, Y.; Zhang, T. Y.; Liu, Q. H.; Jia, L. J.; Ito, Y., Separation of dammarane-saponins from notoginseng, root of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen, by HSCCC coupled with evaporative light scattering detector. *J Liq Chromatogr R T* **2003**, 26, (9-10), 1579-1591.
150. Jerz, G.; Wybraniec, S.; Gebers, N.; Winterhalter, P., Target-guided separation of *Bougainvillea glabra* betacyanins by direct coupling of preparative ion-pair high-speed countercurrent chromatography and electrospray ionization mass-spectrometry. *J Chromatogr A* **2010**, 1217, (27), 4544-4554.
151. Berthod, A.; Ruiz-Angel, M. J.; Carda-Broch, S., Elution-Extrusion Countercurrent Chromatography. Use of the Liquid Nature of the Stationary Phase To Extend the Hydrophobicity Window. *Anal Chem* **2003**, 75, (21), 5886-5894.
152. Du, Q.; Jiang, H.; Ito, Y., Separation of theaflavins of black tea. High-speed countercurrent chromatography vs. Sephadex LH-20 gel column chromatography. *J Liq Chromatogr R T* **2001**, 24, (15), 2363-2369.
153. Amarowicz, R.; Shahidi, F., Application of Sephadex LH-20 chromatography for the separation of cyanogenic glycosides and hydrophylic phenolic fraction from flaxseed. *J Liq Chromatogr* **1994**, 17, (6), 1291-1299.
154. Ramos, L. S.; Prohaska, P. G., Sephadex LH-20 chromatography of extracts of marine sediment and biological samples for the isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J Chromatogr A* **1981**, 211, (2), 284-289.
155. GEHealthcareBio-SciencesAB Sephadex LH-20. [www.healthcare.com/protein-purification](http://www.healthcare.com/protein-purification) (27/04/2011)
156. Henke, H., *Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20*. Hüthig GmbH: Heidelberg, 1994; Vol. 1.
157. McLaughlin, J. L.; Rogers, L. L.; Anderson, J. E., The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J* **1998**, 32, (2), 513-524.
158. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L., Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* **1982**, 45, (5), 31-34.
159. Nunes, B. S.; Carvalho, F. D.; Guilhermino, L. M.; Van Stappen, G., Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Poll* **2006**, 144, (2), 453-462.
160. Barahona, M. V.; Sánchez-Fortún, S., Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environ Poll* **1999**, 104, (3), 469-476.

161. Carballo, J. L.; Hernández-Inda, Z. L.; Pérez, P.; García-Grávalos, M. D., A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol* **2002**, *2*, (1), 17.
162. Abernethy, S. G.; Mackay, D.; McCarty, L. S., "Volume fraction" correlation for narcosis in aquatic organisms: The key role of partitioning. *Environ Toxicol Chem* **1988**, *7*, (6), 469-481.
163. Kinghorn, A. D.; Harjes, K. K.; Doorenbos, N. J., Screening procedure for phorbol esters using brine shrimp (*Artemia salina*) larvae. *J Pharm Sci* **1977**, *66*, (9), 1362-1363.
164. Ajuzie, C. C., Palatability and fatality of the dinoflagellate *Prorocentrum lima* to *Artemia salina*. *J Appl Phycol* **2007**, *19*, (5), 513-519.
165. Hartl, M.; Humpf, H. U., Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food Chem Toxicol* **2000**, *38*, (12), 1097-1102.
166. Hlywka, J. J.; Beck, M. M.; Bullerman, L. B., The use of the chicken embryo screening test and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassays to assess the toxicity of fumonisin B1 mycotoxin. *Food Chem Toxicol* **1997**, *35*, (10-11), 991-999.
167. Núñez, F.; Rodríguez, M. M.; Bermúdez, M. E.; Córdoba, J. J.; Asensio, M. A., Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *Int J Food Microbiol* **1996**, *32*, (1-2), 185-197.
168. Hafner, D.; Heinen, E.; Noack, E., Mathematical analysis of concentration response relationships. Method for the evaluation of the ED50 and the number of binding sites per receptor molecule using the logit transformation. *Arzneimittel-Forsch* **1977**, *27*, (10), 1871-1873.
169. Canel, C.; Moraes, R. M.; Dayan, F. E.; Ferreira, D., Molecules of interest: Podophyllotoxin. *Phytochemistry* **2000**, *54*, (2), 115-120.
170. Teschke, R.; Gaus, W.; Loew, D., Kava extracts: Safety and risks including rare hepatotoxicity. *Phytomedicine* **2003**, *10*, (5), 440-446.
171. Mazzanti, G.; Menniti-Ippolito, F.; Moro, P.; Cassetti, F.; Raschetti, R.; Santuccio, C.; Mastrangelo, S., Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *Eur J Clin Pharmacol* **2009**, *65*, (4), 331-341.
172. Benninger, J.; Schneider, H. T.; Schuppan, D.; Kirchner, T.; Hahn, E. G., Acute hepatitis induced by greater celandine (*Chelidonium majus*). *Gastroenterology* **1999**, *117*, (5), 1234-1237.
173. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **2000**, *267*, (17), 5421-5426.
174. Pesch, K. L.; Simmert, V., Untersuchungen über den Frischheitszustand der Milch. Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration und der Reduktionszeit. *Milchw Forsch* **1929**, *8*, 551.
175. Erb, R. E.; Ehlers, M. H., Resazurin Reducing Time as an Indicator of Bovine Semen Fertilizing Capacity. *J Dairy Sci* **1950**, *33*, (12), 853-864.
176. De Fries, R.; Mitsushashi, M., Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarbluetm assay to 3h-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal* **1995**, *9*, (2), 89-95.
177. Voytik-Harbin, S.; Brightman, A.; Waisner, B.; Lamar, C.; Badylak, S., Application and evaluation of the alamarblue assay for cell growth and survival of fibroblasts. *In Vitro Cell Dev-An* **1998**, *34*, (3), 239-246.
178. Page, B.; Page, M.; Noel, C., A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int J Oncol* **1993**, *3*, (3), 473-476.
179. Rice-Evans, C.; Miller, N. J., Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Method Enzymol* **1994**, *234*, 279-293.
180. Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* **1993**, *84*, (4), 407-412.

181. Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L., Total Antioxidant Capacity of Fruits. *J Agric Food Chem* **1996**, *44*, (3), 701-705.
182. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med* **1996**, *20*, (7), 933-956.
183. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* **1999**, *26*, (9-10), 1231-1237.
184. Singleton, V. L.; Rossi Jr., J. A., Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* **1965**, *16*, (3), 144-158.
185. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method Enzymol* **1998**, *299*, 152-178.
186. Waterhouse, A. L., Unit I1.1.1-I1.1.8 Determination of Total Phenolics. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wrolstad, R. E., Ed. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2002.
187. Folin, O.; Ciocalteu, V., On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *J Biol Chem* **1927**, *73*, (2), 627-650.
188. Pope, M. T., Molybdenum Oxygen Chemistry: Oxides, Oxo Complexes, and Polyoxoanions. In *Progress in Inorganic Chemistry*, Lippard, S. J., Ed. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 1991; Vol. 39, pp 181-257.
189. Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P., Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, (2), 338-343.
190. Günata, Y. Z.; Bayonove, C. L.; Baumes, R. L.; Cordonnier, R. E., The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J Chromatogr A* **1985**, *331*, (1), 83-90.
191. Fabre, N.; Rustan, I.; De Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J., Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr* **2001**, *12*, (6), 707-715.
192. Dussossoy, E.; Brat, P.; Bony, E.; Boudard, F.; Poucheret, P.; Mertz, C.; Giaimis, J.; Michel, A., Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *J Ethnopharmacol* **2011**, *133*, (1), 108-115.
193. Sang, S.; Lapsley, K.; Jeong, W.-S.; Lachance, P. A.; Ho, C.-T.; Rosen, R. T., Antioxidative Phenolic Compounds Isolated from Almond Skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, (8), 2459-2463.
194. Kite, G. C.; Veitch, N. C.; Boalch, M. E.; Lewis, G. P.; Leon, C. J.; Simmonds, M. S. J., Flavonol tetraglycosides from fruits of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and the authentication of Fructus Sophorae and Flos Sophorae. *Phytochemistry* **2009**, *70*, (6), 785-794.
195. Rao, P. S.; Asheervadam, Y.; Khaleelullah, M.; Rao, N. S.; Murray, R. D. H., Hymexelsin, an apiose-containing scopoletin glycoside from the stem bark of *Hymenodictyon excelsum*. *J Nat Prod* **1988**, *51*, (5), 959-961.
196. Ishii, H.; Okada, Y.; Baba, M.; Okuyama, T., Studies of coumarins from the Chinese drug qianhu, XXVII: Structure of a new simple coumarin glycoside from Bai-Hua Qianhu, *Peucedanum praeruptorum*. *Chem Pharm Bull* **2008**, *56*, (9), 1349-1351.
197. Liu, R.; Sun, Q.; Sun, A.; Cui, J., Isolation and purification of coumarin compounds from *Cortex fraxinus* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* **2005**, *1072*, (2), 195-199.
198. Gil-Izquierdo, A.; Mellenthin, A., Identification and quantitation of flavonols in rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.) juice. *Eur Food Res Technol* **2001**, *213*, (1), 12-17.

199. Lee, T. H.; Qiu, F.; Waller, G. R.; Chou, C. H., Three new flavonol galloylglycosides from leaves of *Acacia confusa*. *J Nat Prod* **2000**, 63, (5), 710-712.
200. Moharram, F. A.; Marzouk, M. S. A.; Ibrahim, M. T.; Mabry, T. J., Antioxidant galloylated flavonol glycosides from *Calliandra haematocephala*. *Nat Prod Res* **2006**, 20, (10), 927-934.
201. Kumarasamy, Y.; Cox, P. J.; Jaspars, M.; Rashid, M. A.; Sarker, S. D., Bioactive flavonoid glycosides from the seeds of *Rosa canina*. *Pharm Biol* **2003**, 41, (4), 237-242.
202. Galotta, A. L. Q. A.; Boaventura, M. A. D.; Lima, L. A. R. S., Antioxidant and cytotoxic activities of 'Acai' (*Euterpe precatorea* mart.). *Quim Nova* **2008**, 31, (6), 1427-1430.
203. Nitao, J. K.; Nair, M. G.; Thorogood, D. L.; Johnson, K. S.; Scriber, J. M., Bioactive neolignans from the leaves of *Magnolia virginiana*. *Phytochemistry* **1991**, 30, (7), 2193-2195.
204. Ma, W. W.; Kozlowski, J. F.; McLaughlin, J. L., Bioactive neolignans from *Endlicheria dysodantha*. *J Nat Prod* **1991**, 54, (4), 1153-1158.
205. Shoeb, M.; MacManus, S. M.; Kumarasamy, Y.; Jaspars, M.; Nahar, L.; Thoo-Lin, P. K.; Nazemiyeh, H.; Sarker, S. D., Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry* **2006**, 67, (21), 2370-2375.
206. Li, X. H.; McLaughlin, J. L., Bioactive compounds from the root of *Myrsine africana*. *J Nat Prod* **1989**, 52, (3), 660-662.
207. Novelo, M.; Cruz, J. G.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H.; Mar, W.; Pezzuto, J. M., Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *J Nat Prod* **1993**, 56, (10), 1728-1736.
208. Chin, Y. W.; Jones, W. P.; Rachman, I.; Riswan, S.; Kardono, L. B. S.; Chai, H. B.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Swanson, S. M.; Cassady, J. M.; Kinghorn, A. D., Cytotoxic lignans from the stems of *Helicteres hirsuta* collected in Indonesia. *Phytother Res* **2006**, 20, (1), 62-65.
209. Lee, D. Y.; Song, M. C.; Yoo, K. H.; Bang, M. H.; Chung, I. S.; Kim, S. H.; Kim, D. K.; Kwon, B. M.; Jeong, T. S.; Park, M. H.; Baek, N. I., Lignans from the fruits of *Cornus kousa* Burg. and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *Arch Pharm Res* **2007**, 30, (4), 402-407.
210. Adesanwo, J. K.; Aiyelaagbe, O. O.; Moronkola, D. O., Antimicrobial and cytotoxic activity of the stem and root bark extracts of *Quassia undulata* and isolated constituents. *Toxicol Environ Chem* **2009**, 91, (5), 999-1003.
211. Ferrigni, N. R.; McLaughlin, J. L.; Powell, R. G.; Smith Jr, C. R., Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. *J Nat Prod* **1984**, 47, (2), 347-352.
212. Alamsjah, M. A.; Ishibe, K.; Kim, D.; Yamaguchi, K.; Ishibashi, F.; Fujita, Y.; Oda, T., Selective toxic effects of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* on red tide phytoplankter species. *Biosci Biotechnol Biochem* **2007**, 71, (1), 265-268.
213. Khalid, M. N.; Shameel, M., Studies on the bioactivity and phytochemistry of *Lyngbya Agardh* (Cyanophycota). *Int J Algae* **2011**, 13, (3), 234-249.
214. Ezeanyika, L. U. S.; Obidoa, O., Comparative effects of scopoletin and cyanide on glucose-6-phosphatase and glutathione S-transferase activities of rat liver microsomes. *Nutr Res* **2000**, 20, (2), 309-313.
215. Kang, S.; Sung, S.; Park, J.; Kim, Y., Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solanum lyratum*. *Arch Pharm Res* **1998**, 21, (6), 718-722.
216. Mohamed, M. A.; Marzouk, M. S. A.; Moharram, F. A.; El-Sayed, M. M.; Baiuomy, A. R., Phytochemical constituents and hepatoprotective activity of *Viburnum tinus*. *Phytochemistry* **2005**, 66, (23), 2780-2786.
217. Lake, B. G., Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food Chem Toxicol* **1999**, 37, (4), 423-453.

218. Abraham, K.; Wöhrlin, F.; Lindtner, O.; Heinemeyer, G.; Lampen, A., Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data. *Mol Nutr Food Res* **2010**, *54*, (2), 228-239.
219. Lake, B. G.; Gray, T. J. B.; Evans, J. G.; Lewis, D. F. V.; Beaman, J. A.; Hue, K. L., Studies on the mechanism of coumarin-induced toxicity in rat hepatocytes: Comparison with dihydrocoumarin and other coumarin metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1989**, *97*, (2), 311-323.
220. Liu, S.; Hou, W.; Yao, P.; Zhang, B.; Sun, S.; Nüssler, A. K.; Liu, L., Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicol in Vitro* **2010**, *24*, (2), 516-522.
221. Gao, W. N.; Guo, C. J.; Wei, J. Y.; Yang, J. J., Protective effects of quercetin on primary cultured rat hepatocytes against oxidative stress. *Chin J Clin Nutr* **2007**, *15*, (4), 209-213.
222. Sousa, C.; Pontes, H.; Carmo, H.; Dinis-Oliveira, R. J.; Valentao, P.; Andrade, P. B.; Remiao, F.; Bastos, M. L.; Carvalho, F., Water extracts of *Brassica oleracea* var. *costata* potentiate paraquat toxicity to rat hepatocytes in vitro. *Toxicol in Vitro* **2009**, *23*, (6), 1131-1138.
223. Chin, Y. W.; Song, W. L.; Young, C. K.; Sang, Z. C.; Kang, R. L.; Kim, J., Hepatoprotective flavonol glycosides from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. *Planta Med* **2004**, *70*, (6), 576-577.
224. Sanz, M.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Munoz, Á. M.; Fernández de Simón, B.; Hernández, T.; Estrella, I., Phenolic Compounds in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Heartwood. Effect of Toasting at Cooperage. *J Agric Food Chem* **2008**, *58*, (17), 9631-9640.
225. Bramorski, A.; Cherem, A. R.; Marmentini, C. P.; Torresani, J.; Mezdari, T.; Costa, A. A., Total polyphenol content and antioxidant activity of commercial Noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and its components. *Braz J Pharm Sci* **2011**, *46*, (4), 652-656.
226. Abu-Amsha, R.; Croft, K. D.; Puddey, I. B.; Proudfoot, J. M.; Beilin, L. J., Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: Identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci* **1996**, *91*, (4), 449-458.
227. Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. A. M., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **2001**, *74*, (4), 418-425.
228. Hillebrand, S. *Analytik von Polyphenolen in Buntsäften in Hinblick auf Saftqualität, Farbe und antioxidative Aktivität*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Cuvillier Verlag Göttingen, 2004.
229. Yang, J.; Paulino, R.; Janke-Stedronsky, S.; Abawi, F., Free-radical-scavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage. *Food Chem* **2007**, *102*, (1), 302-308.
230. Pietta, P.-G., Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* **2000**, *63*, (7), 1035-1042.
231. Lin, H.-C.; Tsai, S.-H.; Chen, C.-S.; Chang, Y.-C.; Lee, C.-M.; Lai, Z.-Y.; Lin, C.-M., Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochem Pharmacol* **2008**, *75*, (6), 1416-1425.
232. Maier, A.; Muller, J.; Schneider, P.; Fiedler, H. P.; Groth, I.; Tayman, F. S. K.; Teltschik, F.; Gunther, C.; Bringmann, G., (2E,4Z)-Decadienoic acid and (2E,4Z,7Z)-decatrienoic acid, two herbicidal metabolites from *Streptomyces viridochromogenes* Tu 6105. *Pestic Sci* **1999**, *55*, (7), 733-739.
233. Machida, K.; Nakano, Y.; Kikuchi, M., Phenolic glycosides from *Viburnum dilatatum*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, (6), 2013-2014.
234. Sang, S.; Cheng, X.; Zhu, N.; Stark, R. E.; Badmaev, V.; Ghai, G.; Rosen, R. T.; Ho, C. T., Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. *J Agric Food Chem* **2001**, *49*, (9), 4478-4481.
235. Agrawal, P. K., NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* **1992**, *31*, (10), 3307-3330.

236. Damtoft, S.; Rosendal, S.; Jensen; Nielsen, B. J.,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy as a tool in the configurational analysis of iridoid glucosides. *Phytochemistry* **1981**, 20, (12), 2717-2732.
237. Uesato, S.; Ali, E.; Nishimura, H.; Kawamura, I.; Inouye, H., Four iridoids from *Randia canthioides*. *Phytochemistry* **1982**, 21, (2), 353-357.
238. Deliorman, D.; Calis, I.; Ergun, F., Iridoids from *Galium aparine*. *Pharm Biol* **2001**, 39, (3), 234 - 235.
239. Wang, M. Y.; West, B. J.; Jensen, C. J.; Nowicki, D.; Su, C.; Palu, A. K.; Anderson, G., *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sin* **2002**, 23, (12), 1127-1141.
240. Chen, X. Q.; Zan, K.; Yang, J.; Liu, X. X.; Mao, Q.; Zhang, L.; Lai, M. X.; Wang, Q., Quantitative analysis of triterpenoids in different parts of *Ilex hainanensis*, *Ilex stewardii* and *Ilex pubescens* using HPLC-ELSD and HPLC-MSn and antibacterial activity. *Food Chem* **2011**, 126, (3), 1454-1459.
241. Masuda, M.; Murata, K.; Fukuhama, A.; Naruto, S.; Fujita, T.; Uwaya, A.; Isami, F.; Matsuda, H., Inhibitory effects of constituents of *Morinda citrifolia* seeds on elastase and tyrosinase. *J Nat Med* **2009**, 63, (3), 267-273.
242. Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nah, N. L., Recovery of phytochemical components from various parts of *Morinda citrifolia* extracts by using membrane separator. *J Appl Sci* **2007**, 7, (15), 2093-2098.
243. Pongnaravane, B.; Goto, M.; Sasaki, M.; Anekpankul, T.; Pavasant, P.; Shotipruk, A., Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: Antioxidant activity of extracts. *J Supercrit Fluid* **2006**, 37, (3), 390-396.
244. Zin, Z. M.; Abdul Hamid, A.; Osman, A.; Saari, N., Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chem* **2006**, 94, (2), 169-178.
245. Zin, Z. M.; Abdul-Hamid, A.; Osman, A., Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chem* **2002**, 78, (2), 227-231.
246. Calzuola, I.; Luigi Gianfranceschi, G.; Marsili, V., Comparative activity of antioxidants from wheat sprouts, *Morinda citrifolia*, fermented papaya and white tea. *Int J Food Sci Nutr* **2006**, 57, (3-4), 168-177.
247. West, B. J.; Jarakae Jensen, C.; Westendorf, J., A new vegetable oil from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. *Int J Food Sci Tech* **2008**, 43, (11), 1988-1992.
248. Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A. R.; Simonic, M.; Knez, Z., Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* **2005**, 89, (2), 191-198.
249. Ikeda, R.; Wada, M.; Nishigaki, T.; Nakashima, K., Quantification of coumarin derivatives in Noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species. *Food Chem* **2008**, 113, (4), 1169-1172.
250. Piccinelli, A. L.; Arana, S.; Caceres, A.; Di Villa Bianca, R. D.; Sorrentino, R.; Rastrelli, L., New lignans from the roots of *Valeriana prionophylla* with antioxidative and vasorelaxant activities. *J Nat Prod* **2004**, 67, (7), 1135-1140.
251. Baderschneider, B.; Winterhalter, P., Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **2001**, 49, (6), 2788-2798.
252. Cioffi, G.; D'Auria, M.; Braca, A.; Mendez, J.; Castillo, A.; Morelli, I.; De Simone, F.; De Tommasi, N., Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activity of Constituents of the Leaves of *Tachigalia paniculata*. *J Nat Prod* **2002**, 65, (11), 1526-1529.
253. Liu, A.-H.; Guo, H.; Ye, M.; Lin, Y.-H.; Sun, J.-H.; Xu, M.; Guo, D.-A., Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2007**, 1161, (1-2), 170-182.

254. Matsuda, N.; Sato, H.; Yaoita, Y.; Kikuchi, M., Isolation and absolute structures of the neolignan glycosides with the enantiometric aglycones from the leaves of *Viburnum awabuki* K. KOCH. *Chem Pharm Bull* **1996**, *44*, (5), 1122-1123.
255. Nakai, M.; Harada, M.; Nakahara, K.; Akimoto, K.; Shibata, H.; Miki, W.; Kiso, Y., Novel Antioxidative Metabolites in Rat Liver with Ingested Sesamin. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, (6), 1666-1670.
256. Arnoldi, A.; Merlini, L., Asymmetric synthesis of 3-methyl-2-phenyl-1,4-benzodioxanes. Absolute configuration of the neolignans eusiderin and eusiderin C and D. *J Chem Soc Perkin Trans 1* **1985**, 2555-2557.
257. Akihisa, T.; Matsumoto, K.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Seino, K. I.; Nakamoto, K.; Kuninaga, H.; Suzuki, T.; Kimura, Y., Anti-inflammatory and potential cancer chemopreventive constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). *J Nat Prod* **2007**, *70*, (5), 754-757.
258. Carrau, F. M.; Medina, K.; Farina, L.; Boido, E.; Henschke, P. A.; Dellacassa, E., Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res* **2008**, *8*, (7), 1196-1207.
259. Antonelli, A.; Castellari, L.; Zambonelli, C.; Carnacini, A., Yeast influence on volatile composition of wines. *J Agric Food Chem* **1999**, *47*, (3), 1139-1144.
260. Duarte, W. F.; Dias, D. R.; De Melo Pereira, G. V.; Gervásio, I. M.; Schwan, R. F., Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabiropa (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2009**, *36*, (4), 557-569.
261. Aksnes, G.; Albrigtsen, P.; Juvvik, P., Studies of cyclic acetal and ketal isomers of glycerol. *Acta Chem Scand* **1965**, *19*, (4), 920-30.
262. Simpson, R. F., Volatile aroma components of Australian port wines. *J Sci Food Agric* **1980**, *31*, (2), 214-222.
263. Câmara, J. S.; Marques, J. C.; Alves, A.; Silva Ferreira, A. C., Heterocyclic acetals in Madeira wines. *Anal Bioanal Chem* **2003**, *375*, (8), 1221-1224.
264. Muller, C. J.; Kepner, R. E.; Webb, A. D., 1,3-Dioxanes and 1,3-Dioxolanes as Constituents of the Acetal Fraction of Spanish Fino Sherry. *Am J Enol Vitic* **1978**, *29*, (3), 207-212.
265. Da Silva Ferreira, A. C.; Barbe, J. C.; Bertrand, A., Heterocyclic acetals from glycerol and acetaldehyde in port wines: Evolution with aging. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, (9), 2560-2564.
266. Bailly, S.; Jerkovic, V.; Meurée, A.; Timmermans, A.; Collin, S., Fate of key odorants in sauternes wines through aging. *J Agric Food Chem* **2009**, *57*, (18), 8557-8563.
267. Fu, S. G.; Yoon, Y.; Bazemore, R., Aroma-active components in fermented bamboo shoots. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, (3), 549-554.
268. La Guerche, S.; Dauphin, B.; Pons, M.; Blancard, D.; Darriet, P., Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *J Agric Food Chem* **2006**, *54*, (24), 9193-9200.
269. Vianna, E.; Ebeler, S. E., Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography - Mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **2001**, *49*, (2), 589-595.
270. Lee, P. R.; Yu, B.; Curran, P.; Liu, S. Q., Kinetics of volatile organic compounds during papaya juice fermentation by three commercial wine yeasts. *Nutr Food Sci* **2010**, *40*, (6), 566-580.
271. Akihisa, T.; Seino, K.; Kaneko, E.; Watanabe, K.; Tochizawa, S.; Fukatsu, M.; Banno, N.; Metori, K.; Kimura, Y., Melanogenesis inhibitory activities of iridoid-, Hemiterpene-, and fatty acid-glycosides from the fruits of *Morinda Citrifolia* (Noni). *J Oleo Sci* **2010**, *59*, (1), 49-57.
272. Kim, H. K.; Kwon, M. K.; Kim, J. N.; Kim, C. K.; Lee, Y. J.; Shin, H. J.; Lee, J.; Lee, H. S., Identification of novel fatty acid glucosides from the tropical fruit *Morinda citrifolia* L. *Phytochem Lett* **2010**, *3*, (4), 238-241.

273. Kang, W.; Xu, Y.; Qin, L.; Wang, Y., Effects of different  $\beta$ -D-glycosidases on bound aroma compounds in muscat grape determined by HS-SPME and GC-MS. *J J Brewing* **2010**, 116, (1), 70-78.
274. Fundira, M.; Blom, M.; Pretorius, I. S.; Van Rensburg, P., Comparison of commercial enzymes for the processing of marula pulp, wine, and spirits. *J Food Sci* **2002**, 67, (6), 2346-2351.
275. Krammer, G.; Winterhalter, P.; Schwab, M.; Schreier, P., Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of Prunus species: apricot (*P. armeniaca*, L.), peach (*P. persica*, L.), yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. syriaca). *J Agric Food Chem* **1991**, 39, (4), 778-781.
276. Sakho, M.; Chassagne, D.; Crouzet, J., African Mango Glycosidically Bound Volatile Compounds. *J Agric Food Chem* **1997**, 45, (3), 883-888.
277. De Santos Galindez, J.; Matellano Fernández, L.; Diaz Lanza, A. M., Iridoids from *Scrophularia* genus. *Z Naturforsch C* **2001**, 56, (7-8), 513-520.
278. Noiarsa, P.; Ruchirawat, S.; Otsuka, H.; Kanchanapoom, T., Chemical constituents from *Oldenlandia corymbosa* L. of Thai origin. *J Nat Med* **2008**, 62, (2), 249-250.
279. Peng, J. N.; Feng, X. Z.; Liang, X. T., Iridoids from *Hedyotis hedyotideae*. *Phytochemistry* **1998**, 47, (8), 1657-1659.
280. Ono, M.; Ueno, M.; Masuoka, C.; Ikeda, T.; Nohara, T., Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. *Chem Pharm Bull* **2005**, 53, (10), 1342-1344.
281. Jensen, H. D.; Krogfelt, K. A.; Cornett, C.; Hansen, S. H.; Christensen, S. B., Hydrophilic carboxylic acids and iridoid glycosides in the juice of American and European cranberries (*Vaccinium macrocarpon* and *V. oxycoccos*), lingonberries (*V. vitis-idaea*), and blueberries (*V. myrtillus*). *J Agric Food Chem* **2002**, 50, (23), 6871-6874.
282. Potterat, O.; Von Felten, R.; Dalsgaard, P. W.; Hamburger, M., Identification of TLC markers and quantification by HPLC-MS of various constituents in noni fruit powder and commercial noni-derived products. *J Agric Food Chem* **2007**, 55, (18), 7489-7494.
283. Deng, S.; West, B. J.; Jensen, C. J., A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. *Food Chem* **2010**, 122, (1), 267-270.
284. Meijboom, P.; Stroink, J., 2-trans,4-cis,7-cis-Decatrienal, the fishy off-flavor occurring in strongly autoxidized oils containing linolenic acid or  $\omega$  3,6,9, etc., fatty acids. *J Am Oil Chem Soc* **1972**, 49, (10), 555-558.
285. Yuan, J.-P.; Chen, F., Separation and Identification of Furanic Compounds in Fruit Juices and Drinks by High-Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection. *J Agric Food Chem* **1998**, 46, (4), 1286-1291.
286. Voragen, A. G. J.; Schols, H. A.; Pilnik, W., Non-enzymatic browning of oligogalacturonides in apple juice models. *Z Lebensm Unters Forsch* **1988**, 187, (4), 315-320.
287. Yuan, J. P.; Chen, F., Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC - Dual detection. *Food Chem* **1999**, 64, (3), 423-427.
288. McIlvaine, T. C., A Buffer Solution for Colorimetric Comparison. *J Biol Chem* **1921**, 49, (1), 183-186.
289. Stahl, E.; Kaltenbach, U., Dünnschicht-Chromatographie: VI. Mitteilung. Spurenanalyse von Zuckergemischen auf Kieselgur G-Schichten. *J Chromatogr A* **1961**, 5, 351-355.
290. Acree, T.; Arn, H. Flavornet and human odor space <http://www.flavornet.org/flavornet.html> (01/11/2007)
291. El-Sayed, A. M. The Pherobase - Database of pheromones and semiochemicals. <http://www.pherobase.com/> (01/11/2007)
292. Hill, H. S.; Hill, A. C.; Hibbert, H., Studies on the reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XVI. Separation and identification of the isomeric ethylidene glycerols. *J Am Chem Soc* **1928**, 50, (8), 2242-2249.



## LITERATUR

---

293. Schmidt, M.; Schmitz, H. J.; Baumgart, A.; Guédon, D.; Netsch, M. I.; Kreuter, M. H.; Schmidlin, C. B.; Schrenk, D., Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food Chem Toxicol* **2005**, 43, (2), 307-314.
294. DIN32645, *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze*. Beuth Verlag: Berlin, 2008.
295. Kolb, M.; Bahr, A.; Hippich, S.; Schulz, W., Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 mit Hilfe eines Programms. *Acta Hydroch Hydrob* **1993**, 21, (6), 308-311.

## 7 APPENDIX

### 7.1 Daten weiterer isolierter Verbindungen

#### a) Quercetin-3-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'''' $\rightarrow$ 6''']- $\beta$ -D-glucopyranosid) (Rutin)

Isolierungsweg: XAD-7-Extrakt TAreif  $\rightarrow$  CCCSystem 1 (Fraktion F3)

Molekülmasse: berechnet 610 g/mol; bestimmt mit ESI-MS 609 [M-H]<sup>-</sup>, 633 [M+Na]<sup>+</sup>

Fragmentierungen ESI-MS/MS positiv: **331**, 487 (15), 325 (7)

Fragmentierungen ESI-MS/MS negativ: **301**, 271 (9), 255 (6), 343 (5)

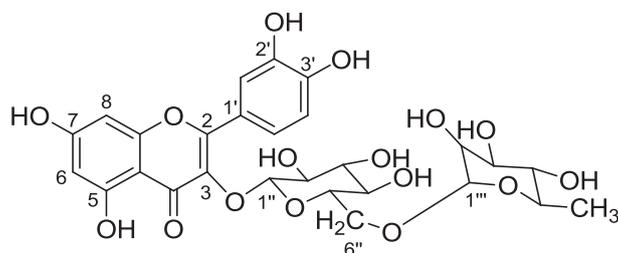


Abb. 7-1: Quercetin-3-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'''' $\rightarrow$ 6''']- $\beta$ -D-glucopyranosid).

Tab. 7-1: <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Quercetin-3-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'''' $\rightarrow$ 6''']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup>H-NMR- ( $\delta_H$ ) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum ( $\delta_C$ ) von Quercetin-3-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-[1'''' $\rightarrow$ 6''']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Die Spektren wurden bei 600 MHz (<sup>1</sup>H-NMR) bzw. 150 MHz (<sup>13</sup>C-NMR) in CD<sub>3</sub>OD aufgenommen.

C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]	C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]
2		159.37 s	6'	7.55 (dd, J=2.0, 8.5 Hz, 1H)	123.58 d
3		135.65 s	1''	5.03 (d, J=8.0 Hz, 1H)	104.75 d
4		179.46 s	2''	3.38 (m, 1H)	75.76 d
5		163.06 s	3''	CD <sub>3</sub> OD	77.25 d
6	6.13 (d, J=2.0 Hz, 1H)	99.99 d	4''	3.19 (m, 1H)	71.41 d
7		166.19 s	5''	3.32 (m, 1H)	78.20 d
8	6.32 (d, J=2.0 Hz, 1H)	94.90 d	6''	3.30 (m, 1H) 3.72 (dd, J=1.5, 11.0 Hz, 1H)	68.57 t
9		158.58 s	1''''	4.43 (d, J=1.5 Hz, 1H)	102.47 d
10		105.63 s	2''''	3.54 (dd, J=1.5, 3.5 Hz, 1H)	72.14 d
1'		123.13 s	3''''	3.45 (dd, J=3.5, 9.5 Hz, 1H)	72.24 d
2'	7.58 (d, J=2.0 Hz, 1H)	117.69 d	4''''	3.19 (t, J=8.0 Hz, 1H)	73.95 d
3'		149.88 s	5''''	3.35 (m, 1H)	69.76 d
4'		145.91 s	6''''	1.03 (d, J=6.0 Hz, 1H)	17.94 d
5'	6.79 (d, J=8.5 Hz, 1H)	116.07 d			

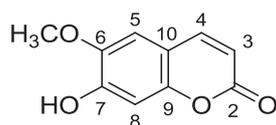
**b) Scopoletin**

Isolierungsweg: XAD-7-Extrakt TAreif → CCCSystem 1 (Fraktion F6) → präpHPLCSystem 4

Molekülmasse: berechnet 192 g/mol; bestimmt mit ESI-MS 191 [M-H]<sup>-</sup>, 215 [M+Na]<sup>+</sup>

Fragmentierungen ESI-MS/MS positiv: **156**, 174 (35), 103 (15), 200 (14)

Fragmentierungen ESI-MS/MS negativ: **176**, 131 (6)



**Abb. 7-2: Scopoletin.**

**Tab. 7-2: <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Scopoletin.** Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup>H-NMR- ( $\delta_H$ ) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum ( $\delta_C$ ) von Scopoletin. Die Spektren wurden bei 300 MHz (<sup>1</sup>H-NMR) bzw. 75 MHz (<sup>13</sup>C-NMR) in CD<sub>3</sub>OD aufgenommen.

C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]	C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]
<b>2</b>		164.01 s	<b>7</b>		151.51 s
<b>3</b>	6.10 (d, J=9.5 Hz, 1H)	110.14 d	<b>8</b>	6.67 (s, 1H)	103.97 d
<b>4</b>	7.74 (d, J=9.5 Hz, 1H)	147.06 d	<b>9</b>		146.05 s
<b>5</b>	7.00 (s, 1H)	110.09 d	<b>10</b>		112.64 s
<b>6</b>		153.02 s	<b>OCH<sub>3</sub></b>	3.81 (s, 3H)	56.90 q

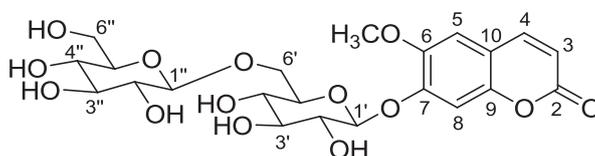
**c) Scopoletin-7-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1''→6']- $\beta$ -D-glucopyranosid)**

Isolierungsweg: XAD-7-Extrakt TAreif → CCCSystem 1 (Fraktion F1) → CCCSystem 4 (Fraktion F1) → präpHPLCSystem 1

Molekülmasse: berechnet 516.1479 g/mol; bestimmt mit HR-ESI-MS 539.1370 [M+Na]<sup>+</sup>

Fragmentierungen ESI-MS/MS positiv: **347**, 215 (4), 203 (2)

Fragmentierungen ESI-MS/MS negativ: **191**



**Abb. 7-3: Scopoletin-7-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1''→6']- $\beta$ -D-glucopyranosid).**

**Tab. 7-3:  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H-NMR}$ - ( $\delta_{\text{H}}$ ) und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum ( $\delta_{\text{C}}$ ) von Scopoletin-7-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-[1'' $\rightarrow$ 6']- $\beta$ -D-glucopyranosid). Die Spektren wurden aufgenommen bei 600 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 150 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in  $\text{DMSO-d}_6$ .**

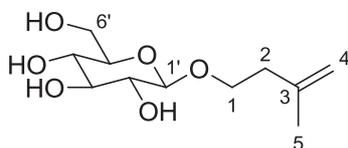
C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]
2		160.45 <i>s</i>	2'	3.24–3.31 ( <i>m</i> , 3H)	72.89 <i>d</i>
3	6.35 ( <i>d</i> , $J=9.5$ Hz, 1H)	113.19 <i>d</i>	3'	3.24–3.31 ( <i>m</i> , 3H)	76.46 <i>d</i>
4	7.98 ( <i>d</i> , $J=9.5$ Hz, 1H)	144.09 <i>d</i>	4'	3.24–3.31 ( <i>m</i> , 3H)	69.11 <i>d</i>
5	7.30 ( <i>s</i> , 1H)	109.46 <i>d</i>	5'	3.05–3.55 ( <i>m</i> , 5H)	75.03 <i>d</i>
6		145.81 <i>s</i>	6'	3.05–3.55 ( <i>m</i> , 5H)	68.45 <i>t</i>
7		148.85 <i>s</i>	1''	4.39 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	103.50 <i>d</i>
8	7.27 ( <i>s</i> , 1H)	102.97 <i>d</i>	2''	3.65–3.80 ( <i>m</i> , 2H)	73.30 <i>d</i>
9		149.62 <i>s</i>	3''	3.05–3.55 ( <i>m</i> , 5H)	76.91 <i>d</i>
10		112.15 <i>s</i>	4''	3.05–3.55 ( <i>m</i> , 5H)	69.93 <i>d</i>
OCH <sub>3</sub>	3.82 ( <i>s</i> , 3H)	55.85 <i>q</i>	5''	3.65–3.80 ( <i>m</i> , 2H)	76.67 <i>d</i>
1'	5.14 ( <i>d</i> , $J=11.5$ Hz, 1H)	99.20 <i>d</i>	6''	3.05–3.55 ( <i>m</i> , 5H)	60.92 <i>t</i>

#### d) 1-*O*-(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -D-glucopyranose

Isolierungsweg: XAD-2-Extrakt TAreif  $\rightarrow$  CCCSystem 2 (Fraktion F6)  $\rightarrow$  präpHPLCSystem 3

Molekülmasse berechnet: 248 g/mol; bestimmt mit ESI- MS 271 [M+Na]<sup>+</sup>

Fragmentierungen ESI-MS/MS positiv: 203, 143 (69)



**Abb. 7-4: 1-*O*-(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -D-glucopyranose.**

**Tab. 7-4:  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von 1-*O*-(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -D-glucopyranose. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 1-*O*-(3-Methylbut-3-enyl)- $\beta$ -D-glucopyranose. Die Spektren wurden aufgenommen bei 300 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 75 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .**

C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]
1	3.53 ( <i>ddd</i> , $J=9.5, 8.0, 6.5$ Hz, 1H) 3.86 ( <i>ddd</i> , $J=9.5, 8.0, 7.0$ Hz, 1H)	67.03 <i>t</i>	2'	2.92 ( <i>dd</i> , $J=9.0, 8.0$ Hz, 1H)	73.33 <i>d</i>
2	2.25 ( <i>t</i> , $J=8.0$ Hz, 2H)	37.25 <i>t</i>	3'	3.12 ( <i>dd</i> , $J=9.0, 9.0$ Hz, 1H)	76.74 <i>d</i>
3		142.46 <i>s</i>	4'	3.03 ( <i>dd</i> , $J=9.0, 9.5$ Hz, 1H)	69.99 <i>d</i>
4	4.73 ( <i>dm</i> , $J=8.0$ Hz, 2H)	111.53 <i>t</i>	5'	3.08 ( <i>ddd</i> , $J=9.5, 6.0, 2.0$ Hz, 1H)	76.84 <i>d</i>
5	1.70 ( <i>s</i> , 3H)	22.66 <i>q</i>	6'	3.42 ( <i>dd</i> , $J=12.0, 6.0$ Hz, 1H) 3.66 ( <i>dd</i> , $J=11.5, 1.5$ Hz, 1H)	61.03 <i>t</i>
1'	4.13 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	102.75 <i>d</i>			

## e) Noniosid A

Isolierungsweg: XAD-2-Extrakt Tareif → CCCSystem 2 (Fraktion F3) → Sephadex LH-20

Molekülmasse: berechnet 410 g/mol; bestimmt mit ESI-MS 409 [M-H]<sup>-</sup>, 433 [M+Na]<sup>+</sup>

Fragmentierungen ESI-MS/MS positiv: **271**

Fragmentierungen ESI-MS/MS negativ: **247**

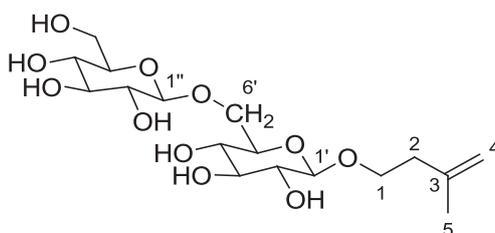


Abb. 7-5: Noniosid A.

Tab. 7-5: <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Noniosid A. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Noniosid A. Die Spektren wurden aufgenommen bei 300 MHz (<sup>1</sup>H-NMR) bzw. 75 MHz (<sup>13</sup>C-NMR) in CD<sub>3</sub>OD.

C/H	δ <sub>H</sub> [ppm]	δ <sub>C</sub> [ppm]	C/H	δ <sub>H</sub> [ppm]	δ <sub>C</sub> [ppm]
1	3.68 (m, 1H)	69.53 t	5'	3.50 (m, 1H)	77.07 d
	3.99 (m, 1H)				
2	2.36 (t, J=7.0 Hz, 1H)	38.80 t	6'	4.09 (dd, J=11.0, 5.0 Hz, 1H)	69.89 t
				3.75 (dd, J=11.0, 5.0 Hz, 1H)	
3		144.04 s	1''	4.30 (d, J=8.0 Hz, 1H)	105.57 d
4	4.84 (dm, J=8.0 Hz, 2H)	122.09 t	2''	3.20 (m, 1H)	75.12 d
5	1.76 (s, 3H)	22.98 q	3''	CD <sub>3</sub> OD	78.09 d
1'	4.26 (d, J=8.0 Hz, 1H)	104.45 d	4''	CD <sub>3</sub> OD	71.64 d
2'	3.17 (m, 1H)	74.91 d	5''	3.24 (m, 1H)	78.09 d
3'	3.34 (m, 1H)	77.74 d	6''	3.87 (dd, J=11.0, 5.0 Hz, 1H)	62.91 t
				3.66 (dd, J=2.5, 5.0 Hz, 1H)	
4'	3.10 (m, 1H)	71.26 d			

## f) Quercetin

Isolierungsweg: Ethylacetat-Extrakt der Steine von *M. citrifolia* → CCCSystem 3 (Fraktion F8)

→ präpHPLCSystem 5

Molekülmasse: berechnet 302 g/mol; bestimmt mit ESI-MS 301 [M-H]<sup>-</sup>

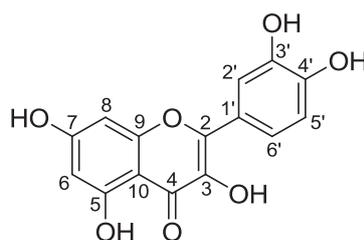


Abb. 7-6: Quercetin.

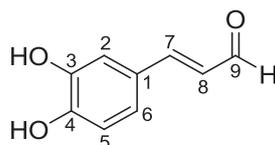
**Tab. 7-6:  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von Quercetin.** Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Quercetin. Die Spektren wurden aufgenommen bei 300 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 75 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]
2		158.26 s	10		104.54 s
3		133.25 s	1'		121.69 s
4		175.80 s	2'	7.72 (d, $J=2.0$ Hz, 1H)	116.22 d
5	6.21 (d, $J=2.0$ Hz, 1H)	162.52 d	3'		148.78 s
6		99.26 s	4'		146.23 s
7		165.57 s	5'	6.85 (d, $J=8.5$ Hz, 1H)	116.25 d
8	6.39 (d, $J=2.0$ Hz, 1H)	94.43 d	6'	7.65 (dd, $J=2.0, 8.5$ Hz, 1H)	124.17 d
9		158.26 s			

### g) 3,4-Dihydroxyzimtaldehyd

Isolierungsweg: Ethylacetat-Extrakt der Steine von *M. citrifolia* → CCCSystem 3 (Fraktion F7)  
→ präpHPLCSystem 6

Molekülmasse: berechnet 164 g/mol; bestimmt mit ESI-MS 163 [M-H]<sup>-</sup>



**Abb. 7-7: 3,4-Dihydroxyzimtaldehyd.**

**Tab. 7-7:  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von 3,4-Dihydroxyzimtaldehyd.** Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 3,4-Dihydroxyzimtaldehyd. Die Spektren wurden aufgenommen bei 400 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 100 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]
1		127.62 s	6	7.05 (dd, $J=2.0, 8.0$ Hz, 1H)	124.04 d
2	7.11 (d, $J=2.0$ Hz, 1H)	115.57 d	7	7.54 (d, $J=15.5$ Hz, 1H)	147.05 d
3		156.56 s	8	6.55 (d, $J=8.0, 15.5$ Hz, 1H)	126.37 d
4		156.58 s	9	9.55 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)	196.28 d
5	6.82 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)	116.64 d			

h) 4-*epi*-Borreriagenin und 10-Deacetylasperulosidsäure

Isolierungsweg: Ethylacetat-Extrakt der Steine von *M. citrifolia* → CCCSystem 3 (Fraktion F1)  
→ präpHPLCSystem 6 (1:1 Gemisch der Verbindungen bestimmt mit  $^1\text{H-NMR}$ )

Molekülmasse für **1**: berechnet 214.0841 g/mol; bestimmt mit HR-ESI-MS 237.0734  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Molekülmasse für **2**: berechnet 390.1162 g/mol; bestimmt mit HR-ESI-MS 413.1054  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Fragmentierungen ESI-MS/MS negativ für **1**: **195**, 177 (49), 121 (9)

Fragmentierungen ESI-MS/MS negativ für **2**: **137**, 209 (88), 183 (50), 165 (46), 227 (20)

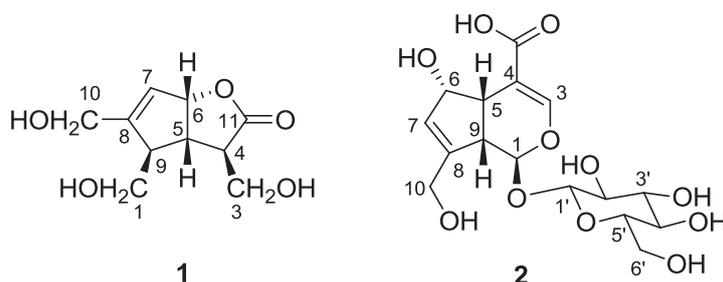


Abb. 7-8: 4-*epi*-Borreriagenin (**1**) und 10-Deacetylasperulosidsäure (**2**).

Tab. 7-8:  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von 4-*epi*-Borreriagenin und 10-Deacetylasperulosidsäure. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 4-*epi*-Borreriagenin und 10-Deacetylasperulosidsäure. Die Spektren wurden aufgenommen bei 600 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 125 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

4- <i>epi</i> -Borreriagenin			10-Deacetylasperulosidsäure	
C/H	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]
<b>1</b>	3.79 ( <i>dd</i> , $J=11.5, 4.5$ Hz, 1H)	60.79 <i>t</i>	5.06 ( <i>d</i> , $J=9.0$ Hz, 1H)	100.43 <i>d</i>
	3.72 ( <i>dd</i> , $J=11.5, 7.0$ Hz, 1H)			
<b>3</b>	3.91 ( <i>dd</i> , $J=4.5, 11.0$ Hz, 1H)	62.88 <i>t</i>	7.66 ( <i>d</i> , $J=1.5$ Hz, 1H)	155.50 <i>d</i>
	3.82–3.86 ( <i>m</i> , 2H)*			
<b>4</b>	2.96 ( <i>ddd</i> , $J=6.0, 4.5, 4.0$ Hz, 1H)	45.97 <i>d</i>		108.48 <i>d</i>
<b>5</b>	3.33 ( <i>dt</i> , $J=7.5, 6.0$ Hz, 1H)	44.00 <i>d</i>	3.01 ( <i>ddd</i> , $J=1.5, 6.0, 7.5$ Hz, 1H)	42.79 <i>d</i>
<b>6</b>	5.41 ( <i>br d</i> , $J=7.5$ Hz, 1H)	88.33 <i>d</i>	3.39 ( <i>m</i> , 1H)	75.01 <i>d</i>
<b>7</b>	5.84 ( <i>wie quint</i> )	125.10 <i>d</i>	6.02 ( <i>d</i> , $J=2.0$ Hz, 1H)	129.89 <i>d</i>
<b>8</b>		153.42 <i>s</i>		151.55 <i>s</i>
<b>9</b>	3.10 ( <i>m</i> , 1H)	50.01 <i>d</i>	2.56 ( <i>dd</i> , $J=7.5, 9.0$ Hz, 1H)	45.85 <i>d</i>
<b>10</b>	4.22 ( <i>ddd</i> , $J=15.0, 2.5, 1.5$ Hz, 1H)	60.60 <i>t</i>	4.73 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	61.76 <i>t</i>
	4.16 ( <i>ddd</i> , $J=15.0, 2.5, 1.5$ Hz, 1H)		4.81–4.82 ( <i>m</i> , 1H)	
<b>11</b>		181.01 <i>s</i>		170.82 <i>s</i>
<b>1'</b>			4.66 ( <i>d</i> , $J=8.0$ Hz, 1H)	101.47 <i>d</i>
<b>2'</b>			3.23–3.35 ( <i>m</i> , 4H)	75.43 <i>d</i>
<b>3'</b>			3.23–3.35 ( <i>m</i> , 4H)	77.84 <i>d</i>
<b>4'</b>			3.23–3.35 ( <i>m</i> , 4H)	71.67 <i>d</i>
<b>5'</b>			3.23–3.35 ( <i>m</i> , 4H)	78.57 <i>d</i>
<b>6'</b>			3.62 ( <i>dd</i> , $J=5.9, 12.0$ Hz, 1H)	62.84 <i>s</i>
			3.82–3.86 ( <i>m</i> , 2H)*	

\*Signale überlappen

## i) (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure

Isolierungsweg: Hexan-Extrakt Pulpe → CCCSystem 5 (Fraktion F4) → präpHPLCSystem 1

Molekülmasse: berechnet 166.0994 g/mol; bestimmt mit HR-ESI-MS 189.0886 [M+Na]<sup>+</sup>

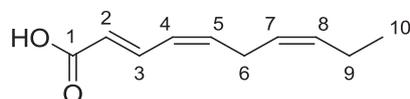


Abb. 7-9: (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure.

Tab. 7-9: <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR-Daten von (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure. Übersicht der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale im <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von (2E,4Z,7Z)-Decatriensäure. Die Spektren wurden aufgenommen bei 600 MHz (<sup>1</sup>H-NMR) bzw. 150 MHz (<sup>13</sup>C-NMR) in CDCl<sub>3</sub>.

C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]	C/H	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]
1		172.00 s	6	3.06 (dd, J=7.5, 7.5 Hz, 2H)	26.53 t
2	5.89 (d, J=14.5 Hz, 1H)	120.72 d	7	5.30 (ttd, J=1.5, 7.5, 10.0 Hz, 1H)	125.08 d
3	7.72 (dd, J=11.5, 14.5 Hz, 1H)	141.29 d	8	5.47 (ttd, J=1.5, 7.5, 10.0 Hz, 1H)	133.45 d
4	6.16 (dd, J=11.5, 11.5 Hz, 1H)	126.21 d	9	2.07 (quind, J=1.5, 7.5 Hz, 2H)	20.61 t
5	5.82 (dt, J=11.5, 7.5 Hz, 1H)	140.44 d	10	0.97 (t, J=7.5 Hz, 3H)	14.14 q

## 7.2 Daten der flüchtigen Verbindungen

Tab. 7-10: **Identifizierte flüchtige Verbindungen in Säften aus *M. citrifolia*.** Dargestellt sind die identifizierten flüchtigen Verbindungen in den Säften aus reifen Früchten (TAreif, HAreif, CRreif und CUreif), aus unreifen Früchten (TAunreif und HAunreif) sowie fermentierten Säften (TAmeferm, TAfullferm, HAmeferm und HAfullferm) und deren bestimmte Massengehalte [ppm] (n.q. nicht quantifizierbar, n.n. nicht nachweisbar).

RI	RI (Lit.*)	Verbindung	TA unreif	TA reif	HA unreif	HA reif	CR reif	CU reif	TAmeferm	TAfullferm	HAmeferm	HAfullferm
979	984	2-Pentanon**										
986	961	Methylbutanoat**										
1033	1031	Ethylbutanoat	11,54	45,97	n.q.	9,38	n.q.	1,53	3,74	7,45	8,57	17,79
1047	1026	2-Methyl-3-buten-1-ol	1,07	2,62	13,65	2,24	7,45	11,61	95,04	77,94	17,95	27,06
1100	1083	2-Methylpropanol	2,89	0,91	1,72	2,90	n.q.	1,97	20,01	16,52	13,18	26,83
1150	1136	1-Butanol	7,59	10,27	1,19	6,87	5,85	24,14	130,66	149,03	91,62	245,11
1178	1178	2-Heptanon	31,36	15,47	2,63	46,93	13,61	21,69	19,25	n.q.	n.q.	5,32
1184	1164	Methylhexanoat	26,05	24,73	3,93	26,08	6,01	7,35	7,15	8,86	1,51	1,52
1210	1205	3-Methyl-1-butanol	n.q.	1,14	n.q.	1,93	n.q.	3,36	21,25	16,80	21,16	47,55
1208	1208	2-Methyl-1-butanol										
1232	1217	Ethylhexanoat	15,81	78,67	n.q.	24,65	n.q.	n.q.	12,30	31,00	2,04	4,23
1250	1236	3-Methyl-3-buten-1-ol	1077,97	457,42	451,82	131,96	388,66	670,25	951,59	1534,07	216,49	376,87
1276	1278	Acetoin	3,12	9,05	10,63	12,79	14,91	2,01	180,30	13,12	17,34	74,73
1322	1313	Methylactat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,47	4,93	2,81	3,47
1322	1321	3-Methyl-2-buten-1-ol	51,48	20,78	42,06	7,50	25,77	38,10	10,89	23,60	3,14	8,98
1324	1318	2-Heptanon	4,55	6,38	n.q.	9,24	n.q.	1,63	35,75	38,74	11,31	17,88
1349	1358	Ethylactat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	24,70	24,29	10,45	23,20
1357	1353	1-Hexanol	8,28	1,92	1,95	25,83	6,02	17,27	93,61	109,68	111,08	265,33
1385	1374	Methyloctanoat	6,38	6,45	0,84	8,68	5,24	4,88	2,48	6,56	0,38	0,72
1440	1436	Ethyloctanoat	5,36	13,90	n.q.	13,06	n.q.	n.q.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
1432	1415	Essigsäure	20,00	186,16	15,51	192,84	39,64	32,33	936,88	931,90	514,30	282,28
1450	1455	2-Furfural	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,37	3,74	n.q.	3,35

RI	RI (Lit. *)	Verbindung	TA unreif	TA reif	HA unreif	HA reif	CR reif	CU reif	TAméd ferm	TAfull ferm	HAméd ferm	HAfull ferm
1492	1511	<i>cis</i> -5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
1512	—	Methyl-3-(methylthio)-propionat	0,69	0,43	0,41	0,96	n.q.	0,29	0,75	n.q.	n.q.	0,32
1531	1505	Propansäure	0,58	0,23	0,19	0,24	n.q.	n.q.	0,93	0,79	0,51	0,43
1558	1538	Ethyl-3-(methylthio)-propionat	0,52	1,70	8,32	0,97	0,45	0,42	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
1579	1583	2,3-Butandiol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,27	0,51	0,60	0,21
1561	1553	2-Methyl-propansäure	2,60	1,50	8,32	3,02	2,61	1,82	5,62	5,30	2,78	2,80
1604	1610	<i>cis</i> -4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.q.	n.q.	n.n.	n.q.
1608	1599	$\gamma$ -Butyrolacton	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,28	2,36	0,25	0,72
1619	1598	Butansäure	23,28	14,07	36,55	17,42	31,55	19,82	41,91	43,57	10,68	15,66
1664	1649	2-Methylbutansäure	12,31	4,96	32,81	6,49	9,85	6,11	15,39	13,94	4,34	4,60
1670	1668	<i>trans</i> -4-Hydroxymethyl-2-methyl-1,3-oxolan	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
1684	1675	5-Ethylidihydro-2(3H)-Furanon	n.q.	n.q.	n.q.	0,62	n.q.	n.q.	0,49	0,39	0,84	0,52
1710	1668	3-Methylthio-propanol	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	0,32	2,01	4,24	3,90	7,06
1731	1710	Pentansäure	1,38	0,19	0,24	0,35	n.q.	n.q.	0,37	n.q.	0,45	n.q.
1788	—	3-Methylbut-2-ensäure	0,19	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	0,52	n.q.	n.q.	n.q.
1806	—	3-Methylbut-3-ensäure	4,72	4,21	2,84	0,90	0,52	7,47	11,79	11,91	2,77	1,00
1807	1810	<i>trans</i> -5-Hydroxy-2-methyl-1,3-dioxan	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.q.	n.n.	n.q.
1843	1802	Hexansäure	262,58	115,28	294,68	246,37	206,98	183,00	326,58	307,17	110,53	128,96
1867	1864	Benzylalkohol	0,37	0,57	0,76	0,68	0,66	0,69	2,21	2,35	1,67	2,60
1900	1889	5-Butylidihydro-2-3(H)-Furanon	0,36	0,98	n.q.	0,26	n.q.	n.q.	0,44	n.q.	0,52	1,00
1920	1925	2-Phenylethanol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,78	0,67	1,23	1,22

RI	RI (Lit.*)	Verbindung	TA unreif	TA reif	HA unreif	HA reif	CR reif	CU reif	TAmid ferm	TAfull ferm	HAmid ferm	HAfull ferm
1947	1931	Heptansäure	n.q.	n.q.	5,18	1,55	4,06	1,76	0,88	1,89	2,83	1,81
1977	1957	3-OH-2H-Pyran-2-on	n.q.	n.n.	n.n.	n.q.	n.q.	n.q.	1,45	n.q.	1,89	0,51
1988	1993	3-Phenylpropanol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.q.	n.q.
2060	2025	Octansäure	253,76	164,32	107,30	238,92	284,82	279,08	220,67	262,30	165,94	137,78
2106	—	Hexanamid	n.q.	0,20	0,46	0,48	0,49	0,83	3,30	5,74	5,04	10,26
2153	2141	Eugenol	n.q.	n.q.	n.q.	n.n.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
2268	2270	Decansäure	1,06	0,32	0,67	0,95	1,37	0,37	n.q.	0,50	0,28	n.q.
2282	—	3-Methylthio-propansäure	5,82	2,35	8,33	4,83	4,95	1,14	5,40	8,78	2,31	2,48
2323	—	Octanamid	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	0,20	0,85	1,23	1,41	2,37
2401	2383	2-Furancarbonsäure	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,64	0,77	0,79	0,65
2488	2486	5-Hydroxy-methylfurfural	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,44	1,40	0,68	0,80
2540	2551	Phenyllessigsäure	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
3045	—	Vomifolij**										
3168	—	Scopoletin**										

\*angegeben unter 4.4.1.2

\*\*Quantifizierung aufgrund ungenügender Peakform bzw. Interferenz mit dem Lösungsmittelpeak nicht möglich



### 7.3 Daten der nichtflüchtigen Verbindungen

**Tab. 7-11: Gehalte der nichtflüchtigen Verbindungen in Früchten und Fruchtsäften von *M. citrifolia*.** Dargestellt sind die bestimmten Gehalte an Asperulosidsäure (ASP), Scopoletin (SCO), (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Decatrienoic acid (DTA), 2-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-1-*O*-(2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoyl-β-D-glucopyranose (DTA-digl), Furan-2-carbonsäure (F2C), Isoamericanol A (IAM) und Isoamericaninsäure A (IAA) in den authentischen Früchten (TAunreif, TAreif, HAunreif, HAreif, CRreif und CUreif) [mg/kg] und Fruchtsäften (TAunreif, TAreif, HAunreif, HAreif, CRreif und CUreif sowie zusätzlich Tamedferm, TAFullferm, Hamedferm, HAFullferm) [mg/L] (LOD—limit of detection, LOQ—limit of quantition, leere Felder—Daten nicht bestimmt).

	ASP	SCO	DTA	DTA-digl	F2C	IAM	IAA
<b>Pulpe [mg/kg Feuchtwicht]</b>							
TAunreif	2210,98	31,14	12,38	20,43			
TAreif	2391,79	32,09	16,89	83,52			
HAunreif	564,80	16,45	7,46	26,02			
HAreif	1270,54	24,68	15,74	42,40			
CRreif	5114,14	19,30	29,39	29,58			
CUreif	1281,89	5,20	<LOD	13,01			
<b>Steine [mg/kg Feuchtwicht]</b>							
TAunreif	952,52	80,85	197,70	<LOD			
TAreif	1108,13	76,29	283,60	<LOD			
HAunreif	207,32	55,00	57,24	<LOD			
HAreif	661,43	43,40	200,11	<LOD			
CRreif	5438,77	32,70	532,24	<LOD			
CUreif	909,91	22,06	10,54	<LOD			
<b>Säfte [mg/L]</b>							
TAunreif	458,53	10,43	20,97	3,41	<LOD	1,71	<LOD
TAreif	1194,52	14,02	24,15	27,37	<LOD	1,87	<LOD
HAunreif	109,88	13,38	13,35	<LOD	<LOD	2,14	<LOD
HAreif	998,62	10,43	21,61	2,23	<LOD	2,56	<LOD
CRreif	820,04	10,47	8,60	<LOQ	<LOD	1,35	<LOD
CUreif	724,46	12,75	2,79	2,22	<LOD	1,19	<LOD
Tamedferm	304,64	9,25	30,11	1,93	14,88	0,84	0,87
TAFullferm	123,55	15,28	24,59	<LOD	5,22	<LOD	0,99
Hamedferm	718,33	12,27	35,05	<LOQ	7,78	1,47	0,89
HAFullferm	362,91	9,3	21,31	<LOD	5,57	<LOD	0,93





