

Stefanie Stoll

Bioaktive
Naturstoffe aus
chinesischen
Getreide-
und
Gemüsearten

Dissertation

Cuvillier Verlag Göttingen

Bioaktive Naturstoffe aus chinesischen Getreide- und Gemüsearten

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Stefanie Stoll
aus Braunschweig

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2008

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2008

978-3-86727-628-3

1. Referent:	Professor Dr. Peter Winterhalter
2. Referent:	apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt
eingereicht am:	14.04.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am:	06.06.2008

Druckjahr 2008

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig, Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2008

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

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, 2008

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-628-3

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:

Tagungsbeiträge

Stoll, S.; Jerz, G.; Winterhalter, P. Isolation and structure elucidation of Nasunin and N1,N10-di-dihydrocaffeoylspermidine of Chinese eggplants. (Poster) Euro Food Chem XIII, Hamburg (2005). Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie 60:91 (2006).

Stoll, S.; Winterhalter, P. Isolierung und Strukturaufklärung von Anthocyanen aus Chinesischem schwarzen Reis unter Anwendung der High-Speed Countercurrent Chromatography. (Vortrag) Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft innerhalb der GDCh, Oldenburg (2006).

Stoll, S.; Jerz, G.; Winterhalter, P. Isolierung und Strukturaufklärung von Anthocyanen aus Chinesischen Gemüse- und Getreidearten unter Anwendung der High-Speed Countercurrent Chromatography. Sino-German Workshop (chinesische Biowirkstoffe), Graduiertenkolleg am Lehrstuhl für Lebensmitteltechnologie (Food Technology), Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde Universität Kiel (2006).

Stoll, S.; Winterhalter, P. Isolierung und Strukturaufklärung von Anthocyanen aus Chinesischem schwarzem Reis unter Anwendung der High-Speed Countercurrent Chromatography. (Poster) Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden (2006). Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie 61:41 (2007).

Stoll, S.; Jerz, G.; Winterhalter, P. Antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe von *Perilla frutescens*. (Poster) Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg (2007). Abstract im Druck.

Nehring, O.; Stoll, S.; Winterhalter, P.; Jerz, G. Preparative Isolation of Hulpinic Acid from Hop Cones (*Humulus lupulus*) by 'High Speed Countercurrent Chromatography' (HSCCC). (Poster) Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg (2007). Abstract im Druck.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Winterhalter für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und den großzügigen Freiraum, der mir während meiner Forschungstätigkeit gewährt wurde.

Ein ganz herzliches Dankeschön an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dazu zählen vor allem die Mitarbeiter des Arbeitskreises, insbesondere Herr Dr. Gerold Jerz, der mich stets durch seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und seine Ideen unterstützt hat. Frau Dr. Heike Scharnhop und Frau Andrea Wilkens danke ich für ihre Freundschaft, für viele konstruktive Gespräche und für gemeinsame Sportstunden. Herrn Jens Witte danke ich für den freundschaftlichen gemeinsamen Weg vom Studium bis zum Ende der Promotion und für die tolle Atmosphäre in unserem Labor. Frau Dr. Katrien Schäfer danke ich ebenfalls für die schöne Zeit im Labor und Herrn Dr. Peter Quast für die abwechslungsreichen Teerunden und die Unterstützung bei Computerproblemen.

Frau Kathrin Ronneburg und Frau Tanya Petrova danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung im Rahmen der Durchführung ihrer Diplomarbeiten. Ein großes Dankeschön an Frau Carola Balcke für ihre Hilfsbereitschaft und für die unglaublich sorgfältige Durchsicht meiner schriftlichen Arbeit. Bei Frau Monika Messerer und Frau Dr. Silke Hillebrand bedanke ich mich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Herrn Prof. Dr. U. H. Engelhardt danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie Herrn Prof. Dr. D. Selmar und Herrn Prof. Dr. I. Rustenbeck für ihr Mitwirken in der Prüfungskommission. Bei Herrn Marschall und Herrn Kraft bedanke ich mich für den Anbau von *Perilla frutescens* auf einem Versuchsfeld im Botanischen Garten der Technischen Universität Braunschweig und bei Herrn Dr. H. Rawel des Instituts für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam für die Durchführung der MALDI-TOF-MS-Messungen.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem ‚Sino-German Center for Research Promotion‘ sowie dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die Finanzierung meines Forschungsaufenthaltes in China.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich ganz herzlich für ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und ihren Rückhalt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Grundlagen und Kenntnisstand.....	7
2.1	Polyphenole	7
2.1.1	Allgemeines und Klassifizierung der Polyphenole	7
2.1.2	Bedeutung der Polyphenole für die Pflanze	8
2.1.2.1	Schutz vor UV-B-Strahlung.....	9
2.1.2.2	Antimikrobielle Wirkung.....	9
2.1.2.3	Schutz vor Schädlingsbefall.....	9
2.1.3	Phenolische Säuren: Hydroxybenzoesäure und Hydroxyzimtsäuren	10
2.1.4	Flavonoide	11
2.1.5	Biosynthese der Polyphenole.....	15
2.1.6	Reaktionen der Polyphenole	18
2.1.6.1	Oxidation der Polyphenole	18
2.1.6.2	Verhalten bei pH-Wert-Änderung und Stabilität der Anthocyane	18
2.1.6.3	Copigmentierungsreaktionen der Anthocyane	20
2.1.7	Physiologische Wirkung der Polyphenole	21
2.1.7.1	Oxidativer Stress und reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies	21
2.1.7.2	Antioxidative Aktivität von Polyphenolen	23
2.1.7.3	Krankheitsprävention durch Polyphenole	24
2.1.7.4	Bioverfügbarkeit und Biotransformation von Anthocyanen	25
2.2	Polyamine	26
2.2.1	Allgemeines und Klassifizierung der Polyamine.....	26
2.2.2	Biosynthese der Polyamine	27
2.2.3	Physiologische Bedeutung	29
2.3	Untersuchtes Pflanzenmaterial	30
2.4	Aubergine (<i>Solanum melongena</i>).....	30
2.4.1	Pflanzenbeschreibung	30
2.4.2	Pflanzeninhaltsstoffe.....	31
2.5	Perilla (<i>Perilla frutescens</i>)	32

2.5.1	Pflanzenbeschreibung	32
2.5.2	Pflanzeninhaltsstoffe	33
2.6	Schwarzer Reis (<i>Oryza sativa</i>)	33
2.6.1	Pflanzenbeschreibung	33
2.6.2	Pflanzeninhaltsstoffe	35
2.7	Blauer Taro (<i>Xanthosoma violaceum</i>)	35
2.7.1	Pflanzenbeschreibung	35
2.7.2	Pflanzeninhaltsstoffe	36
2.8	Angewandte <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Test-Systeme	36
2.8.1	„TEAC-Test“ – Bestimmung der antioxidativen Aktivität <i>in vitro</i>	36
2.8.2	„Brine shrimp“-Bioassay – Bestimmung der zytotoxischen Aktivität <i>in vivo</i>	37
2.9	Präparative Trenntechniken	38
2.9.1	Countercurrent Chromatography	38
2.9.1.1	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)	39
2.9.1.2	Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC)	42
2.9.2	Gelchromatographie an Sephadex LH-20	43
3	Ergebnisse und Diskussion	45
3.1	Extraktion und Probenaufarbeitung	45
3.1.1	Fraktionierte Flüssig-Flüssig-Extraktion	46
3.1.2	Festphasenextraktion an Amberlite® XAD-7	47
3.1.3	Analytik und Strukturaufklärung der Fraktionen und Pflanzeninhaltsstoffe	47
3.2	Antioxidative und zytotoxische Aktivität der Pflanzenextrakte	48
3.3	Isolierung von Verbindungen aus der Aubergine (<i>Solanum melongena</i>)	51
3.3.1	Trennung und Isolierung der Hydroxymethylsäureamide	51
3.3.2	Beurteilung der antioxidativen und zytotoxischen Aktivität	62
3.3.2.1	Stabilität der Hydroxymethylsäureamide und Chlorogensäuren	63
3.3.3	Isolierung und Fraktionierung weiterer Polyphenole	65
3.3.3.1	Charakterisierung der Chlorogensäure-Isomere	68
3.3.3.2	Charakterisierung der Anthocyane	71
3.3.4	Beurteilung der antioxidativen und zytotoxischen Aktivität	76

3.4	Isolierung von Verbindungen aus Perilla (<i>Perilla frutescens</i>).....	78
3.4.1	Isolierung und Fraktionierung der Flavonoide.....	78
3.4.1.1	Charakterisierung der Flavone.....	81
3.4.1.2	Charakterisierung der Anthocyane.....	89
3.4.1.3	Charakterisierung von Syringasäure- β -D-glucoseester (P10).....	97
3.4.2	Beurteilung der antioxidativen und zytotoxischen Aktivität.....	98
3.5	Isolierung von Verbindungen aus schwarzem Reis (<i>Oryza sativa</i>).....	102
3.5.1	Isolierung und Charakterisierung der Anthocyane.....	102
3.5.2	Beurteilung der antioxidativen Aktivität.....	109
3.5.3	Charakterisierung der Polymerfraktion.....	111
3.5.3.1	Fraktionierte Pentanfällung der Sephadex-Fractionen 1 und 5.....	114
3.5.3.2	Charakterisierung der Neutralzucker.....	115
3.5.3.3	Charakterisierung der Oligomeren mittels MALDI-TOF-MS.....	117
3.6	Isolierung von Verbindungen aus violetter Taro (<i>Xanthosoma violaceum</i>).....	121
3.6.1	Trennung und Charakterisierung der Flavanole.....	121
3.6.2	Charakterisierung der Flavonole.....	126
3.6.3	Charakterisierung der Anthocyane.....	127
4	Zusammenfassung.....	131
5	Material und Methoden.....	137
5.1	Pflanzenmaterial und Chemikalien.....	137
5.1.1	Pflanzenmaterial.....	137
5.1.2	Chemikalien.....	137
5.2	Geräteparameter.....	138
5.2.1	Photometer.....	138
5.2.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	138
5.2.2.1	Analytische Anlagen.....	138
5.2.2.2	Präparative HPLC-Anlage.....	138
5.2.3	Massenspektrometer (MS).....	139
5.2.4	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC).....	139
5.2.5	Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC).....	139

5.2.6	Gaschromatographie (GC).....	139
5.2.7	Kernspinnresonanz (NMR)	140
5.2.8	Gelchromatographie an Sephadex LH-20	140
5.2.9	Adsorption an Amberlite XAD-7	140
5.3	Analytische Methoden.....	140
5.3.1	Dünnschichtchromatographie.....	140
5.3.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	141
5.3.2.1	Polyphenolanalytik.....	141
5.3.2.2	Polymeranalytik	141
5.3.3	Massenspektrometrie	142
5.3.3.1	LC-ESI-MS ⁿ	142
5.3.3.2	ESI-MS ⁿ	142
5.3.4	Bestimmung der Neutralzucker	142
5.3.5	MALDI-TOF-MS-Analyse der Polymerfraktion von <i>Oryza sativa</i>	144
5.3.6	Quantifizierung mittels HPLC-DAD.....	145
5.3.7	Phloroglucinolyse der Polymerfraktion von <i>O. sativa</i>	146
5.4	Präparative Methoden	146
5.4.1	Extraktion und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	146
5.4.1.1	Fraktionierte Flüssig-Flüssig-Extraktion	146
5.4.1.2	Adsorption an Amberlite XAD-7	147
5.4.2	Parameter für die Countercurrent Chromatography.....	147
5.4.2.1	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten	147
5.4.2.2	CCC-Systeme	148
5.4.3	Isolierung der Naturstoffe mittels präparativer HPLC	149
5.4.4	Gelchromatographie an Sephadex LH-20	150
5.4.5	Fraktionierte Pentanfällung	150
5.5	Antioxidative Aktivität - TEAC-Test.....	151
5.6	Zytotoxizität - „Brine shrimp“ – Test	152
5.7	Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Verbindungen	155
5.7.1	<i>Solanum melongena</i>	155
5.7.2	<i>Perilla frutescens</i>	160

5.7.3	<i>Oryza sativa</i>	165
5.7.4	<i>Xanthosoma violaceum</i>	168
6	Literaturverzeichnis	171
7	Anhang	185

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
br.	breit
BuOH	Butanol
CCC	Countercurrent Chromatography
CD ₃ OD	deuteriertes Methanol
CD ₃ SOCD ₃	deuteriertes Dimethylsulfoxid
δ	chemische Verschiebung
Da	Dalton
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil
d	Dublett
DAD	Diode Array Detector
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ESI	Electrospray Ionisation
ESR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
F	Fraktion
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
Glu	Glucose
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOAc	Essigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
ID	Innendurchmesser
J	Kopplungskonstante
K	Verteilungskoeffizient
kPa	Kilopascal
J	Symbol für Kopplungskonstante
LC	Liquid Chromatography
LSRCCC	Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography
m	Multipllett
mL	Mililiter
M	molare Masse
[M ⁺]	Molekülion (positiver Modus)
[M+H] ⁺	Pseudomolekülion (positiver Modus)
[M-H] ⁻	Pseudomolekülion (negativer Modus)
MeCN	Acetonitril
MHz	Megahertz

min	Minuten
mm	Milimeter
MS	Massenspektrometer
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n.n.	nicht nachweisbar
p.A.	per Analysis
PFFA	Pentafluorpropionsäure
ppm	parts per million
PTFE	Polytetrafluorethylen
Rha	Rhamnose
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
s	Singulett
s.	siehe
S.	Seite
Std.	Stunden
t	Triplett
tBME	<i>tert.</i> -Butylmethylether
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidative Capacity
TFA	Trifluoressigsäure
TFA(d_1)	deuterierte Trifluoressigsäure
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
UV	Ultraviolett

1 Einleitung und Zielsetzung

In der traditionellen chinesischen Kultur ist in der Ernährung die Unterscheidung von „fan“ und „ts'ai“ grundlegend. Im engeren Sinn bedeutet „fan“ Reis oder gekochter Reis und „ts'ai“ Gemüse. Im weiteren Sinn umfasst „fan“ alle getreide- und stärkehaltigen Gerichte und unter „ts'ai“ werden Gemüse-, Fleisch- und Fischgerichte verstanden. Aus traditioneller chinesischer Sicht ist ein Gericht dann als ausgewogen anzusehen, wenn es aus bestimmten Anteilen „fan“ und „ts'ai“ zusammengesetzt ist. „Fan“ ist in jedem Fall die entscheidende Komponente, sie wird als Basis eines jeden Gerichts verstanden. „Ts'ai“ hingegen wird als eine Art Zusatz betrachtet, eine Komponente, die „fan“ begleitet und das Gericht wohlschmeckend und appetitlich gestaltet. Weiterhin ist in der chinesischen Tradition eine gewisse Bescheidenheit beim Essen oberstes Gebot. Das heißt, dass der Mensch Nahrungsmittel mit Respekt gegenüber treten, und diese nur zum Stillen des Hungers aufnehmen sollte. Diese Genügsamkeit der Chinesen geht auf Chinas lange Zeit begrenzte Nahrungsmittelversorgung zurück (SIMOONS 1991).

In Entwicklungs- und Schwellenländern verzehren die meisten Menschen sehr wenige tierische Produkte. Die Ernährung besteht hauptsächlich aus Getreide, Hülsenfrüchten, Gemüse und Obst. Von der Landbevölkerung Chinas werden schätzungsweise 90% der täglichen Kalorienzufuhr in Form von Getreide und Gemüse aufgenommen. Reis stellt hierbei mit Abstand die wichtigste Getreideart dar, da ein Drittel der Weltproduktion nach wie vor aus China stammt (SIMOONS 1991, FAO 2005).

In vielen Regionen Chinas, vor allem in den urbanen Regionen, hat das Traditionsbewusstsein durch die zunehmende „Verwestlichung“ der letzten Jahre stark abgenommen. Die traditionelle chinesische Ernährung, viel Reis und Gemüse, aber wenig Fleisch und fast keine Milchprodukte, wird in vielen Regionen Chinas durch Fast Food, Steaks und Käse zurückgedrängt, während in der westlichen Welt bei vielen gesundheitsbewussten Menschen der Trend eher in die „Veröstlichung“ der Essgewohnheiten geht. Außerdem ist aufgrund der „Verwestlichung“ der Ernährung die Anzahl der überernährten Menschen ähnlich groß wie die der unterernährten. So müssen diese Länder einerseits versuchen, die Verbreitung von Degenerationskrankheiten, wie Krebs und Herzleiden, aufzuhalten, und

andererseits müssen sie die Infektionskrankheiten eliminieren, die oft eine Folge der Unterernährung darstellen (GARDENER und HALWELL 2000, GOODLAND 2001).

In Tabelle 1 ist die Entwicklung der Morbidität in China zwischen 1993 und 2003 anhand von Monitoring-Daten des Chinesischen Ministeriums der Öffentlichen Gesundheit dargestellt. Über eine Zeitspanne von 10 Jahren ist die Rate der Infektionskrankheiten stetig zurückgegangen, wohingegen sich die Zahl der Vorfälle von Stoffwechselkrankheiten verdoppelt hat. Weiterhin hat sich 2003 die Erkrankung an Diabetes im Vergleich zu 1993 verdreifacht und die Verbreitung von Bluthochdruck ist ebenfalls stark angestiegen.

Tabelle 1: Entwicklung der Morbidität in China pro 1000 Einwohner (WANG et al. 2007)

	1993	1998	2003	Zunahme pro Jahr
Infektionskrankheiten	5,3	4,8	2,7	-0,26
Krebs	1,9	2,1	2,1	0,02
Stoffwechselkrankheiten	3,1	4,7	7,5	0,44
<i>Diabetes</i>	1,9	3,2	5,6	0,37
Kreislaufkrankungen	31,4	38,8	50,0	1,86
<i>Herzkrankheiten</i>	13,1	14,2	14,3	0,12
<i>Bluthochdruck</i>	11,9	15,8	26,2	1,43
<i>Zerebrovaskuläre Krankheiten</i>	4,0	5,9	6,6	0,26

Vor allem in Bezug auf Diabetes muss jedoch die Verbreitung in urbanen Regionen von der der Landbevölkerung unterschieden werden. Demnach ist die Häufigkeit an Diabetes zu erkranken in sehr großen Städten fast viermal so hoch wie in ländlichen Regionen. In Abbildung 1 sind die Daten einer Studie zum Übergewicht der Stadt- und Landbevölkerung des Chinesischen Ministeriums der Öffentlichen Gesundheit von 1992 Untersuchungsergebnissen von 2002 gegenübergestellt. Bei der Stadt- sowie bei der Landbevölkerung ergaben die Daten eine stete Zunahme des Übergewichts der Bevölkerung, wobei Übergewicht bei der männlichen Stadtbevölkerung ein Drittel häufiger auftritt.

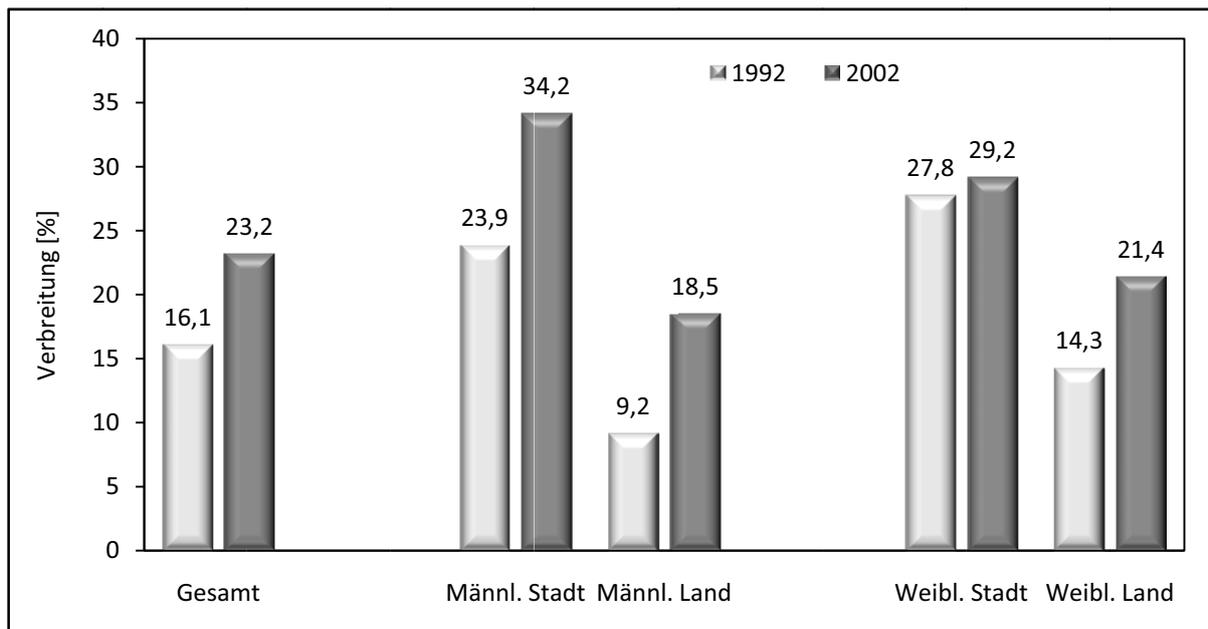


Abbildung 1: Verbreitung des Übergewichts der Stadt- und Landbevölkerung 1992 und 2002. Das Übergewicht wurde nach dem chinesischen Standard mit $\text{BMI} \geq 24 \text{ kg/m}^2$ berechnet (WANG et al. 2007)

Organisationen wie die World Health Organization (WHO) oder die Food and Agriculture Organization (FAO) haben weiterhin starke Bedenken bezüglich der Auswirkungen der industriellen Tierzucht und des Rückgangs des Getreide- und Gemüseanbaus auf die Landwirtschaft. So soll die Zunahme des Konsums an Tierprodukten in China, auch wenn der Verbrauch noch deutlich unter dem von Nordamerika und den meisten Industrieländern liegt, beträchtliche Auswirkungen auf die Umwelt besitzen. Während auf einem Hektar Land pro Jahr Kartoffeln für 22 und Reis für 19 Menschen angebaut werden könnten, sinkt die Zahl auf ein oder zwei Menschen, wenn man Rinder auf einer gleich großen Fläche halten würde. Auch die Nachfrage nach Wasser würde zu einem sehr großen Problem heranwachsen, denn es wird eine deutlich höhere Menge für tierische Produkte als für pflanzliche verbraucht (WHO/FAO 2002). Das International Food Policy Research Institute (IFPRI) beschreibt in einer Studie, dass voraussichtlich eine "Vieh-Revolution" stattfinden wird, in der sich der Konsum pro Kopf in den Entwicklungsländern bis 2020 auf 30 kg Fleisch, eine Zunahme von 43 % gegenüber 1993, und 62 kg Milch, eine Zunahme von 30 %, belaufen wird (DELGADO et al. 1999).

In vielen epidemiologischen Studien werden die positiven Eigenschaften des Verzehr von Früchten und Gemüse hervorgehoben und diskutiert. Dabei wird deren Verzehr vor allem mit einer Prävention von Krebs und koronaren Herzkrankheiten in Zusammenhang gebracht. Die präventive Wirkung von Früchten und Gemüse kann auf verschiedene Inhaltsstoffe, wie Vitamine, Mineralstoffe, Ballaststoffe und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, wie Flavonoide und anderen Polyphenole, zurückgeführt werden (SCALBERT et al. 2005, MANACH et al. 2004, PIETTA 2000).

Die „European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition“-Studie (EPIC), die weltweit bisher größte wissenschaftliche Untersuchung über die Zusammenhänge zwischen Krebs und Ernährung, kam bislang zu dem Ergebnis, dass bis zu 35 % aller Krebsfälle auf falscher Ernährung beruhen. Die Studie weist auf die schützende Wirkung von Obst und Gemüse hin (IARC 1992). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) plädiert im Rahmen ihrer „5-am-Tag“-Initiative dafür, möglichst 400 Gramm Gemüse und etwa 250 Gramm Obst über den Tag verteilt zu verzehren (5 am Tag 2000). Dabei kommt vor allem den sekundären Pflanzenstoffen bei der Vorbeugung von Krebs, Herz-Kreislaufkrankungen Osteoporose und Diabetes mellitus eine große Bedeutung zu (SCALBERT et al. 2005, WHO/FAO 2002).

Aufgrund der bioaktiven Wirkung sekundärer Pflanzenstoffe werden einige Gemüsearten in China, wie die Aubergine und *Perilla frutescens*, auch in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) eingesetzt. Diese ist eine aus China stammende Heilkunst, die sich dort vor über 2000 Jahren etabliert hat. Zu den therapeutischen Verfahren gehört neben der Akupunktur die Arzneitherapie. Für die Herstellung der Arzneimittel werden Pflanzenteile, wie Wurzeln, Rinden, Blüten und Blätter, aber auch tierische und mineralische Stoffe verwendet. In Asien finden mehr als 5.000 Pflanzenarten und 1.500 Tierarten als Bestandteile von Arzneien Anwendung. Die Arzneimittel werden für den Patienten individuell zusammengestellt, wobei eine Rezeptur aus 4 bis 15 Kräutern bestehen kann. Verabreicht wird die Arznei meist in Form von Tee oder als Granulat, welches dann in Wasser aufgelöst wird (HOU und JIN 2005). In der naturwissenschaftlich geprägten Medizin ist die Wirksamkeit vieler Behandlungsmethoden und der Arzneimittel der TCM jedoch vielfach umstritten (SHANG et al. 2007). Aufgrund der Popularität im asiatischen Raum und der steigenden Verbreitung der TCM in der westlichen Welt ist es unbedingt notwendig, die Forschung auf diesem Gebiet weiterzuführen (ERNST 2000).

In dieser Arbeit sollen vier traditionelle chinesische Gemüse- und Getreidearten im Hinblick auf bioaktive Inhaltsstoffe untersucht werden. Dazu sollen vor allem Polyphenole, wie Anthocyane, Flavone oder Hydroxyzimtsäureverbindungen, und andere bioaktive Verbindungen isoliert werden. Weiterhin sollen Kenntnisse über deren antioxidative Aktivität mit Hilfe des TEAC-Testes und über deren zytotoxische Aktivität mittels des „brine shrimp“-Bioassays erlangt werden. Bei den zu untersuchenden Pflanzen handelt es sich um die Beeren der chinesischen Aubergine (*Solanum melongena*), Blätter von Perilla (*Perilla frutescens*), um die Samen des schwarzen Reises (*Oryza sativa*) und um die Rhizome des violetten Taro (*Xanthosoma violaceum*). Für die präparative Isolierung der Pflanzeninhaltsstoffe werden verschiedene Methoden der Countercurrent Chromatography, wie die High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) und die Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) herangezogen. Als weitere präparative Trenntechnik soll die Gelchromatographie an Sephadex LH-20 zum Einsatz kommen, zum Teil in Kombination mit Methoden der Countercurrent Chromatography. Weiterhin sollen bislang unbekannte bioaktive Substanzen isoliert und deren Strukturen mittels spektroskopischer Methoden identifiziert werden.

2 Grundlagen und Kenntnisstand

2.1 Polyphenole

2.1.1 Allgemeines und Klassifizierung der Polyphenole

Phenolische Verbindungen sind im Pflanzenreich weit verbreitete Inhaltsstoffe. Sie zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, da sie nicht im Primärstoffwechsel der Pflanze gebildet und an Biosynthesewegen beteiligt sind, deren Produkte für das Überleben der Zellen notwendig sind, die aber für den Organismus nützlich sein könnten. In Abbildung 2 ist eine Übersicht über die verschiedenen Untergruppen der Polyphenole dargestellt.

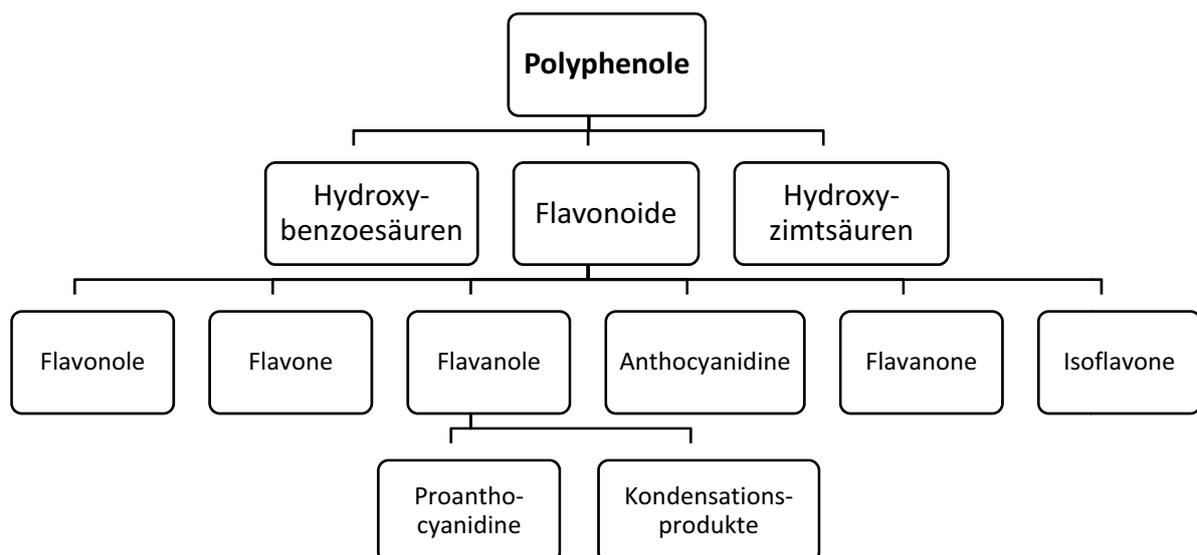


Abbildung 2: Klassifizierung der Polyphenole nach ENGELHARDT (1998)

Der Begriff „Polyphenol“ ist eine Sammelbezeichnung für aromatische Verbindungen mit meist mehr als zwei aromatischen Hydroxylgruppen im Molekül, die unterschiedlichen Stoffklassen angehören. Die Flavonoide stellen eine Untergruppe der Polyphenole dar und sind in der Natur sehr weit verbreitet und in vielen Obst- und Gemüsesorten nachweisbar. Zur Gesamtphenolaufnahme tragen Phenolsäuren, wie Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren, zu etwa einem Drittel und Flavonoide zu zwei Dritteln bei (WATZL und RECHKEMMER 2001a).

Flavonoide können aufgrund ihrer verschiedenen Oxidationsstufen am heterocyclischen Ring in sechs Hauptgruppen eingeteilt werden: Flavonole, Flavone, Flavanole, Anthocyanidine, Flavanone und Isoflavone. Außerdem können noch die aus mehreren Flavanol-Einheiten aufgebauten Proanthocyanidine und verschiedene Kondensationsprodukte unterschieden werden (WATZL und RECHKEMMER 2001b). Strukturell leiten sich die Flavonoide vom Flavangrundkörper (2-Phenylbenzodihydropyran, C₆-C₃-C₆-Grundkörper) ab (s. Abbildung 3).

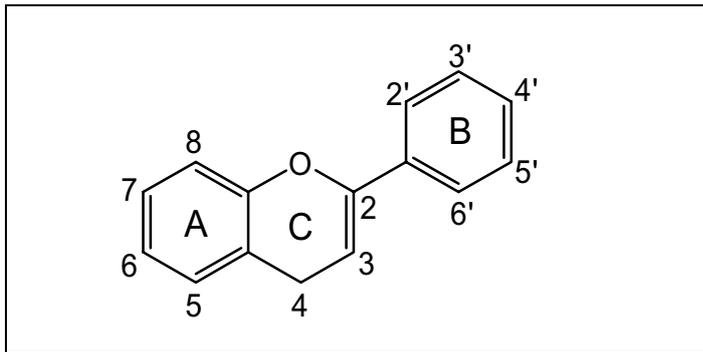


Abbildung 3: Flavangrundgerüst

Der Flavangrundkörper besteht aus zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C), wobei dessen große Variabilität hauptsächlich auf dem unterschiedlichen Hydroxylierungs- und/oder Methylierungsmuster der drei Ringe, sowie auf der Art, Anzahl und Anordnung nicht acylierter und acylierter Zuckerreste beruht (HARBORNE und WILLIAMS 2000, PIETTA 2000).

Flavonoide kommen in der Natur nicht frei als Aglykone vor, sondern sind mit Ausnahme der Flavanole meist O-glykosidisch gebunden. Die natürliche Anzahl der Polyphenole ist sehr groß, da sie aufgrund ihrer Reaktivität viele Kondensationreaktionen mit anderen Stoffklassen, wie Kohlenhydraten und organischen Säuren, und auch miteinander eingehen (ENGELHARDT und GALENSA 1997).

2.1.2 Bedeutung der Polyphenole für die Pflanze

Anthocyane dienen zum einen als Blüten- oder Fruchtfarbstoffe in Pflanzen Insekten als Attraktionsquelle und locken beispielsweise Bienen zur Bestäubung an (HARBORNE und WILLIAMS 2000). Darüber hinaus gibt es noch einige wichtige Funktionen der Flavonoide in Pflanzen, die im Folgenden erläutert werden.

2.1.2.1 Schutz vor UV-B-Strahlung

Bei UV-B-Strahlung (280 bis 315 nm) handelt es sich um die energiereichste der drei UV-Banden und vermutlich schädigt sie pflanzliche Zellen ebenso wie tierische oder menschliche Zellen. Pflanzen sind jedoch in der Lage, einen Schutzmechanismus gegen die stets intensiver werdende UV-B-Strahlung aufzubauen. Ein Faktor, der dabei möglicherweise eine bedeutende Rolle spielt, ist die Produktion von Flavonoiden in den Blättern der Pflanzen. Dort wurden unter anderem im Reis (*Oryza sativa*) Flavonoide in den äußeren Epidermiszellen der Blätter identifiziert (HARBORNE und WILLIAMS 2000). STAPLETON und WALBOT (1994) beobachteten eine stärkere DNA-Schädigung in grünen Blättern der Maispflanze (*Zea mays*) als in der violetten Varietät, die zusätzlich Anthocyane aufweist. Flavonoide absorbieren im Wellenlängenbereich von 280 nm bis 315 nm und wären somit in der Lage, als UV-B-Filter zu fungieren und das darunter liegende Photosynthese-Gewebe in den Blättern der Pflanze vor Schäden zu schützen. HARBORNE und WILLIAMS (2000) resümieren, dass generell von resistenten Genotypen eine größere Konzentration von Flavonen und Flavonolen in den Epidermiszellen und auch in den epicuticularen Wachsen synthetisiert wird.

2.1.2.2 Antimikrobielle Wirkung

Wichtige Funktionen der Flavonoide in der Pflanze sind weiterhin ein Schutz gegen mikrobielle Infektionen. Dabei handelt es sich bei den Polyphenolen vor allem um Isoflavone, Flavone oder Flavanone, die als Phytoalexine wirken und die Ausbreitung, das Wachstum oder die Vermehrung von Mikroorganismen hemmen (GRAYER und HARBORNE 1994).

2.1.2.3 Schutz vor Schädlingsbefall

Pflanzen können von verschiedenen Schädlingen befallen werden, die Ernten vernichten könnten oder in den Pflanzen zu Photosynthese- und Wachstumseinschränkungen führen würden. Im Phloem-Saft der Reispflanze fanden GRAYER et al. (1994) Glykoflavone, die ein Abschreckungspotential auf die braune Heuschrecke *Nilaparvata lugens* aufwiesen. Außerdem konnten in resistenten Reis-Varietäten höhere Konzentrationen dieser Flavone beobachtet werden.

Als ein weiterer Schädling der Reis-Pflanze ist die Nematode *Ditylenchus angustus* zu nennen, welche vor allem Reisfelder in den Anbauregionen Südost-Asiens befällt. Neben Chlorogensäure beschreiben DILLON et al. 1997 ebenfalls ein Flavonoid in den Blättern, welches für die Resistenz gegenüber *Ditylenchus angustus* verantwortlich sein soll.

2.1.3 Phenolische Säuren: Hydroxybenzoesäure und Hydroxyzimtsäuren

Zwei Klassen von phenolischen Säuren werden unterschieden, Benzoesäure-Derivate und Derivate der Zimtsäure. Der Gehalt an Hydroxybenzoesäuren ist in essbaren Pflanzen generell mit Gehalten von unter 100 mg pro kg Frischgewicht sehr gering, mit Ausnahme von verschiedenen roten Früchten, Zwiebeln oder schwarzem Rettich. Tee stellt eine bedeutende Quelle für Gallussäure dar, mit Gehalten von bis zu 4,5 g/kg Frischgewicht (MANACH et al. 2004). Protocatechusäure kommt sowohl natürlich vor, stellt aber auch ein Abbauprodukt von Cyanidin-Derivaten dar, wie zum Beispiel Cyanidin-3-glucosid, welches das in der Natur am weitesten verbreitete Anthocyan darstellt (WHITAKER und STOMMEL 2003).

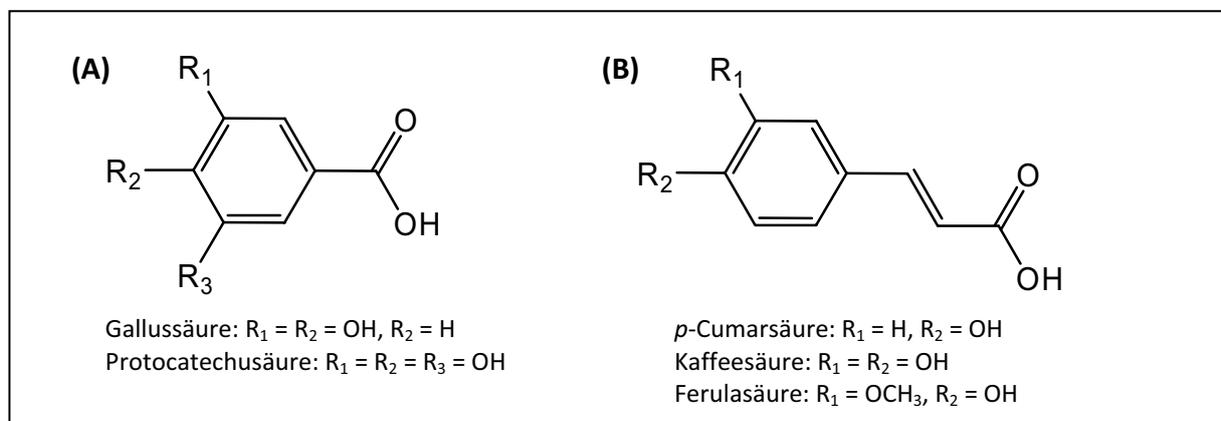


Abbildung 4: Hydroxybenzoesäure- (A) und Hydroxyzimtsäure-Derivate (B)

Die Gehalte an Hydroxyzimtsäuren in Pflanzen sind wesentlich höher. Als wichtige Derivate sind die p -Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und die Sinapinsäure zu nennen. Die Säuren liegen hauptsächlich glykosidisch gebunden oder mit Chinasäure, Shikimisäure oder Weinsäure verestert vor. In freier ungebundener Form kommen sie in der Natur selten vor. Häufiger sind sie in verarbeiteten Nahrungsmitteln zu finden, die zum Beispiel einer Gefriertrocknung oder Sterilisation ausgesetzt wurden. Hydroxyzimtsäure-Chinasäure-Ester

werden unter dem Begriff Chlorogensäuren zusammengefasst, wobei unter dem Trivialnamen „Chlorogensäure“ 5-Caffeoyl-Chinasäure verstanden wird. Chlorogensäure kommt in vielen Früchten und in hohen Konzentrationen in Kaffee vor und ist an Copigmentierungsreaktionen beteiligt, die die Farbstabilität von Anthocyanen beeinflussen (s. Kapitel 2.1.6.3). Die höchsten Gehalte an Hydroxycimtsäuren finden sich nach MACHEIX et al. (1990) in Blaubeeren, Kiwis, Pflaumen, Kirschen und Äpfeln mit Gehalten von 0,5 bis 2 g pro Kilogramm Frischgewicht. Kaffeesäure, sowohl in freier als auch in gebundener Form, stellt mit 75 bis 100 % des Hydroxycimtsäure-Gesamtgehalts das häufigste Derivat dar. Hydroxycimtsäuren kommen in allen Pflanzenteilen vor, in den höchsten Konzentrationen in den äußeren Regionen reifer Früchte. Allgemein nimmt der Gehalt während des Reifeprozesses ab. In Cerealien ist Ferulasäure die am häufigsten vorkommende Säure, wobei 98% der Ferulasäure in der Aleuronschicht und im Perikarp vorliegen. Der Gehalt in Weizenkörnern liegt bei 0,8 bis 2 g pro kg Trockengewicht, welches 90 % der Gesamtpolyphenole in den Körnern ausmacht. In Weizen-, Hafer-, und Reismehl sind bis zu 63 mg/kg enthalten, während die Konzentration in Maismehl das Dreifache beträgt (MANACH et al. 2004).

2.1.4 Flavonoide

Basierend auf dem Grad der Oxidation des C-Ringes, können Flavonoide in verschiedene Unterklassen eingeteilt werden.

Flavonole stellen die am häufigsten vorkommenden Flavonoide in Nahrungsmitteln dar. Oft liegen sie glykosyliert vor, wobei Quercetin und Kämpferol zu den wichtigsten Aglykonen zählen (s. Abbildung 5). Hohe Konzentrationen dieser Verbindungen von bis zu 1,2 g pro Kilogramm Frischgewicht sind in Grünkohl, Lauch, Broccoli und Blaubeeren enthalten. Flavonole akkumulieren in äußeren Regionen der Pflanze, wie zum Beispiel in der Schale von Früchten oder in den Blättern, da deren Biosynthese durch Licht angeregt wird (MANACH et al. 2004).

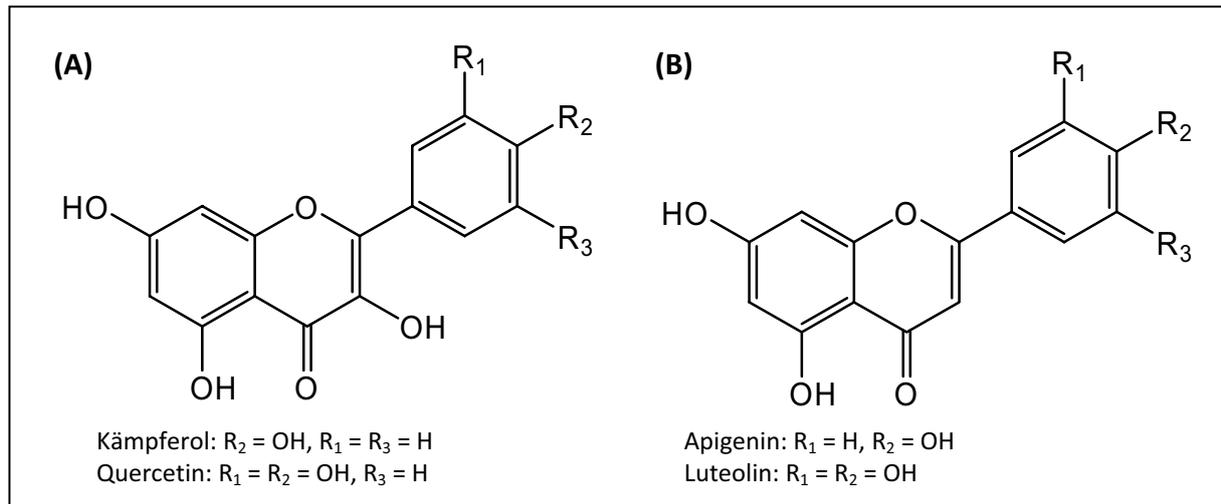


Abbildung 5: Flavonole (A) und Flavone (B)

Flavone sind in Gemüse und Früchten weniger verbreitet. Hauptsächlich liegen Luteolin und Apigenin glykosyliert vor (s. Abbildung 5). Von den essbaren Pflanzen sind bezüglich einer hohen Flavon-Konzentration Petersilie und Sellerie zu nennen. Der Gehalt in Petersilie beträgt dabei bis zu 1,8 g pro Kilogramm Frischgewicht (MANACH et al. 2004). Flavone, die mit Glucuronsäuren verestert vorliegen, sind ebenfalls in relativ hohen Konzentrationen in *Perilla frutescens* enthalten.

Isoflavone sind strukturell den Estrogenen sehr ähnlich. Dadurch besitzen sie pseudohormonelle Eigenschaften und können an Estrogen-Rezeptoren binden. Sie werden daher zu den Phytoestrogenen gezählt. Soja und Sojaprodukte stellen die Hauptlieferanten für Isoflavone in der menschlichen Ernährung dar (MANACH et al. 2004).

Flavanone sind in hohen Konzentrationen nur in Zitrusfrüchten zu finden, mit den Hauptaglykonen Naringenin in Grapefruit, Hesperetin in Orangen und Eriodictyol in Zitronen (s. Abbildung 6). Bei Flavanonen ist generell ein Disaccharid an der Position 7 glykosidisch gebunden, entweder Neohesperidose, die gebunden an Naringin für den bitteren Geschmack in Grapefruits verantwortlich ist, oder Rutinose (MANACH et al. 2004).

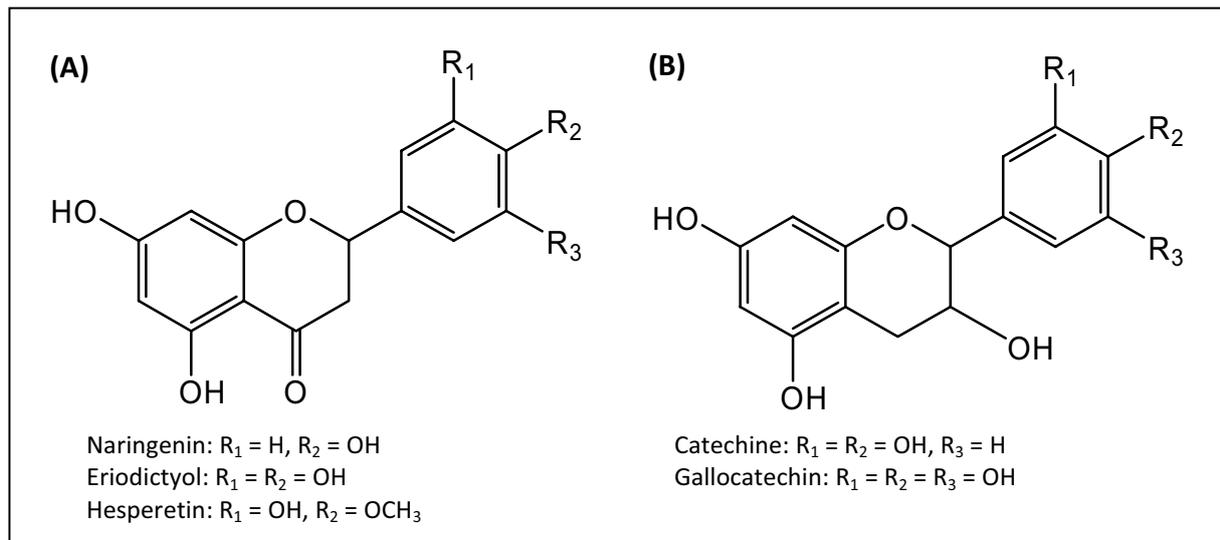


Abbildung 6: Flavanone (A) und Flavanole (B)

Flavanole existieren sowohl als Monomere, den Catechinen, und in polymerer Form, den Proanthocyanidinen. Catechine (s. Abbildung 6) sind in vielen Früchten enthalten. In Aprikosen ist der Gehalt mit 250 mg pro Kilogramm Frischgewicht dabei am höchsten. Weitere wichtige Flavanol-Quellen in der Nahrung sind Rotwein, mit bis zu 300 mg pro Liter, und vor allem Grüner Tee und Schokolade, in denen die höchsten Catechin-Gehalte zu finden sind (LAKENBRINK et al. 2000). In Schwarzem Tee sind weniger Monomere enthalten, da diese während der Fermentation zu kondensierten Phenolen, den Theaflavinen und Thearubiginen, oxidieren. Die Flavanole Catechin und das Epimer Epicatechin kommen in den meisten Früchten sehr häufig vor, während Gallocatechin, Epigallocatechin und Epigallocatechingallat in Gemüsepflanzen, Weintrauben und Tee bedeutend sind (MANACH et al. 2004).

Bei Proanthocyanidinen, auch kondensierte Tannine genannt, handelt es sich um Dimere, Oligomere oder Polymere. Es ist schwierig, den Polymerisationsgrad von Proanthocyanidinen abzuschätzen, da eine Vielzahl von Strukturen existiert. Sie sind durch Komplexbildung mit Speichelproteinen für den adstringierenden Charakter von Früchten und Getränken, wie bei Äpfeln, Kakis, Wein, Tee oder Schokolade verantwortlich (SANTOS-BUELGA und SCALBERT 2000). Als Procyanidine werden Proanthocyanidine bezeichnet, die nur aus Catechin- bzw. Epicatechin-Einheiten aufgebaut sind. Bei ihren Monomeren-Bausteinen handelt es sich hauptsächlich um die Stereoisomeren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin. Liegen zusätzlich im Molekül die Monomeren-Bausteine (-)-Galocatechin oder (-)-Epigallocatechin vor, so

werden die Verbindungen als Prodelphinidine bezeichnet. Beim Erhitzen mit verdünnten Säuren erfolgt eine Spaltung der C-C-Bindung an der Verknüpfungsstelle unter Entstehung eines Catechin- und ein bis mehrerer entsprechend gefärbter Anthocyanidine. Die einzelnen Verbindungen innerhalb einer Proanthocyanidin-Klasse können sich in ihrer Stereochemie, dem Polymerisationsgrad sowie in der Art der Interflavanverknüpfung unterscheiden. Letztere bildet die Grundlage zur Differenzierung zwischen B-Typen, die durch eine interflavanoide Bindung zwischen den Kohlenstoffatomen 4 der oberen Einheit und 8 der unteren Einheit oder zwischen 4 und 6 verknüpft sind, und A-Typen, die zur interflavanoiden Bindung eine zusätzliche Etherbrücke zwischen dem Kohlenstoffatom 2 des oberen Flavan-3-ols und dem Sauerstoffatom in Position 7 der Untereinheit aufweisen (s. Abbildung 7). Die Procyanidine vom B-Typ kommen weitaus häufiger in der Natur vor als die des A-Typs (PORTER et al. 1985, PORTER 1989).

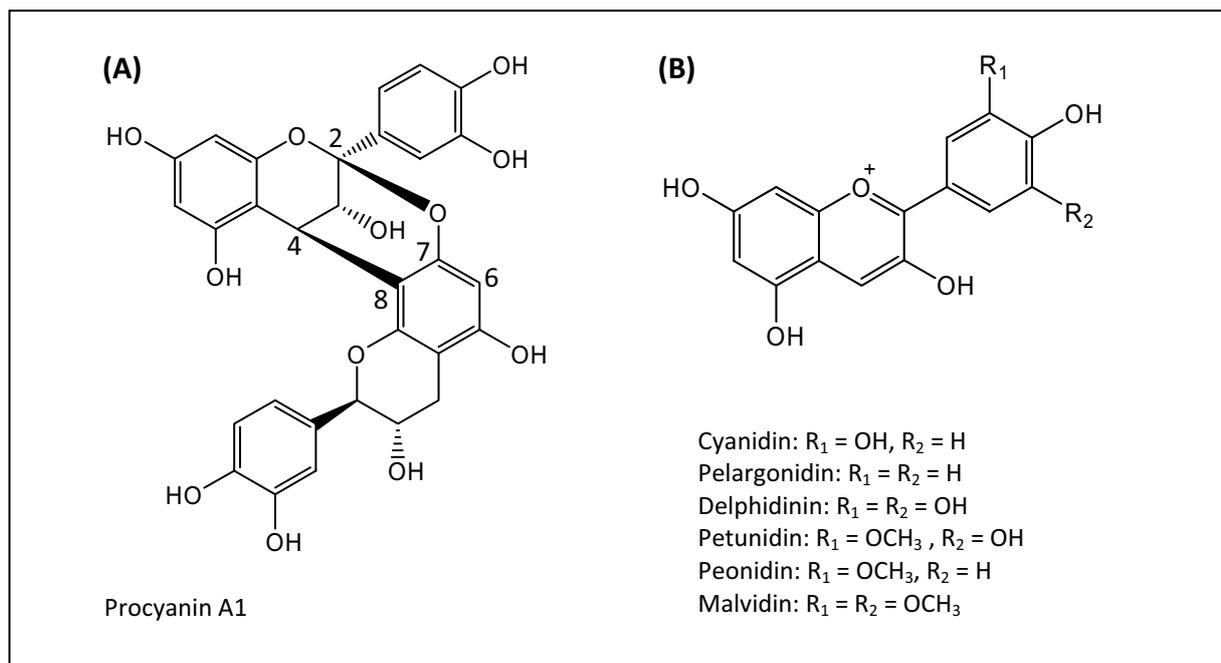


Abbildung 7: Procyanin A1 (A) und Anthocyanidine (B)

Anthocyane sind natürliche rote, violette, blaue oder blauschwarze Farbpigmente, die vor allem in dem Zellsaft der Vakuolen äußerer Epidermiszellen von Blüten und Früchten, Wurzeln und Blättern gelöst sind. Im Fruchtfleisch, wie in Kirschen oder Erdbeeren kommen sie selten vor. Der Name ergibt sich aus dem griechischen: „anthos“-Blume und „kyanos“-blau. Am häufigsten kommen in der Natur die Glykoside von Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und Petunidin vor, wobei Cyanidin das am weitesten verbreitete

Aglykon in Nahrungsmitteln darstellt (s. Abbildung 7). Es existieren verschiedene chemische Strukturen der Anthocyanidine, die abhängig vom pH-Wert entweder farbige oder farblos erscheinen (s. Kapitel 2.1.6.2). Im Unterschied zu anderen Flavonoiden findet sich ein kationisches Sauerstoffatom im Pyran-Ring, der meistens durch Chloridanionen ausgeglichen wird (MAZZA und MINIATI 1993). In freier Form ist das Aglykon sehr instabil und wird leicht durch pH-Wert-Änderung, Oxidationsmittel oder durch Licht abgebaut oder verändert. Wesentlich stabiler wird es durch Glykosylierung, vorwiegend an der Position 3 des C-Ringes. Wichtig dabei sind vor allem Glucose, Galactose, Rhamnose, Xylose und Arabinose und Veresterungen der Kohlenhydrate mit verschiedenen organischen und phenolischen Säuren, wie Essig-, Oxal-, Malon-, Ferula-, Sinapin-, *p*-Hydroxybenzoe-, *p*-Cumar- oder Kaffeesäure (WU und PRIOR 2005, MAZZA und MINIATI 1993). Neben Monomeren werden auch Di-, Tri- oder Tetramere, vorwiegend an der Position 3 und 5, glykosidisch gebunden. In seltenen Fällen können Anthocyane auch an der Position 7 oder sogar an 4' glykosyliert vorliegen (CLIFFORD 2000, HARBORNE und WILLIAMS 2000, FOSSEN et al. 2003). Weitere Stabilität erhalten Anthocyane auch durch Komplexbildung mit anderen Flavonoiden (Copigmentierung) (s. Kapitel 2.1.6.3) (MANACH et al. 2004).

2.1.5 Biosynthese der Polyphenole

In Abbildung 8 ist ein Überblick über die wichtigsten Schritte in der Biosynthese der Polyphenole dargestellt. Die Präkursoren der Polyphenole entstammen dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Zunächst entsteht Shikimisäure durch enzymatische Synthese aus den Vorstufen Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat. Nach mehreren Zwischenstufen werden die Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin gebildet, wobei durch Katalyse der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) aus Phenylalanin *trans*-Zimtsäure entsteht. Cumarsäure entsteht durch Hydroxylierung durch Zimtsäure-4-Hydroxylase in *para*-Stellung des Aromaten. Durch weitere Hydroxylierung und Methylierungsreaktionen können weiterhin Kaffeesäure und Ferulasäure entstehen. Die Cumarsäure reagiert als 4-Cumaroyl-CoA mit drei Malonyl-CoA-Einheiten mit Hilfe des Enzyms Chalcon-Synthase zum 4,2',4',6'-Tetrahydrochalkon, welches bereits das C₆-C₃-C₆-Grundgerüst der Flavonoide aufweist und durch Katalyse durch die Chalcon-Isomerase zum Naringenin cyclisieren kann. Von hier aus sind weitere vielfältige, in der Regel enzymatisch gesteuerte Verzweigungen des Stoffwechsels möglich. Aus Naringenin bilden sich Flavone, Isoflavone und

Dihydrokämpferol. Dihydrokämpferol kann durch Katalyse der Flavonol-Synthase, welche eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 ausbildet, in ein Flavonol überführt oder durch katalytische Reduktion zu einem Flavon-3,4-diol (Leucoanthocyanidin) umgewandelt werden. Flavon-3,4-diole werden als kurzlebige Vorstufen der Anthocyane und Flavan-3-ole sowie deren Kondensationsprodukte, den Proanthocyanidinen, angesehen (HARBORNE 1988, STAFFORD 1990, MACHEIX et al. 1990).

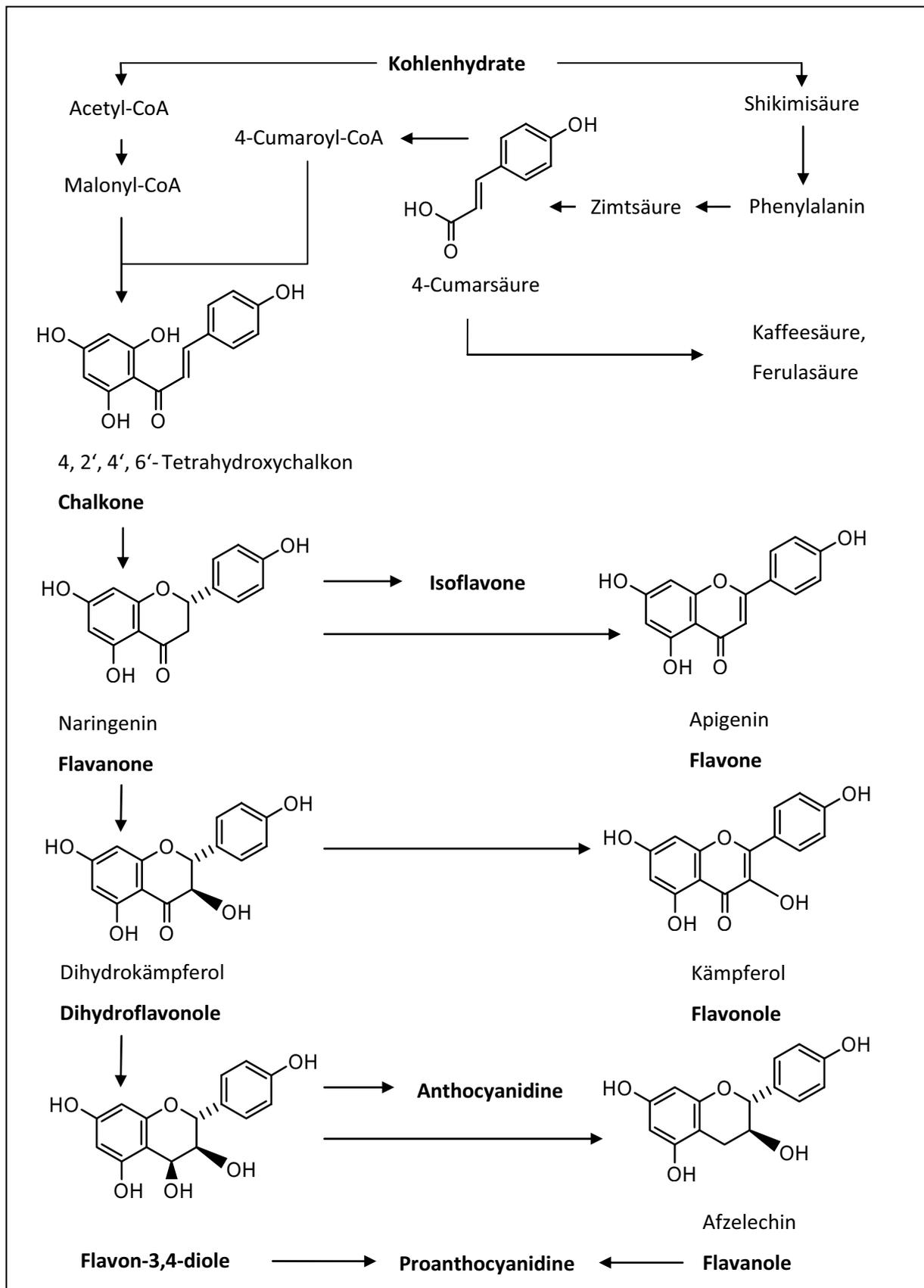


Abbildung 8: Biosynthese der Polyphenole (nach HARBORNE 1988 und MACHEIX et al. 1990)

2.1.6 Reaktionen der Polyphenole

Bei den Polyphenolen handelt es sich um reaktive Pflanzeninhaltsstoffe. Als Reaktionspartner kommen sowohl Proteine und Kohlenhydrate, als auch Vertreter der eigenen Stoffklasse in Frage. Im Folgenden werden wichtige Reaktionen der Polyphenole näher erläutert.

2.1.6.1 Oxidation der Polyphenole

Während der Verarbeitung von Gemüse und Früchten werden durch die Zerstörung der Zellstruktur enzymatische und nichtenzymatische Prozesse in Gang gesetzt, die meistens hydrolytischer und oxidativer Natur sind. Hydrolytische Prozesse führen in erster Linie zu einer Freisetzung der Aglykone aus den korrespondierenden Glykosiden. Bei oxidativen Prozessen werden aus den Phenolen Chinone gebildet, wobei *ortho*-Chinone eine der wichtigsten Zwischenstufen bezüglich Farbe, Geschmack und Stabilität während des Verarbeitungsprozesses von Gemüse und Früchten darstellen. Verantwortlich für die Bildung der *ortho*-Chinone und Bräunungsreaktionen sind unter anderem die Polyphenoloxidasen, die zu meist farblosen, reaktiven chinoiden Zwischenstufen führen, die dann durch Kondensation bzw. Polymerisation zu gelben bis braunen Produkten führen können. Das Enzym liegt in den intakten Zellen getrennt von dem Substrat vor und kann daher erst nach einer Zellzerstörung wirksam werden, wobei Sauerstoff als Wasserstoffakzeptor erforderlich ist (HERRMANN 1976 und 1978, MAYER und HAREL 1979).

2.1.6.2 Verhalten bei pH-Wert-Änderung und Stabilität der Anthocyane

Das Flavylumkation ist nur bei sehr niedrigem pH-Wert stabil und geht bei höheren pH-Werten leicht in die farblose Zwischenstufe der Carbinolbase über, bei der durch die Hydroxylierung das System von konjugierten Doppelbindungen aufgehoben wird (s. Abbildung 9). Durch Ansäuern können die Chinoidbase und die Carbinolbase schnell wieder in das Flavylumkation überführt werden, wobei die Rückbildung des Chalkons sehr langsam erfolgt. Bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes wird durch Dehydroxylierung erneut ein System von konjugierten Doppelbindungen, der blauen Chinoidbase, erzeugt. Ab dem pH-Wert 7 führt eine Anlagerung von Wasser zu der Öffnung des C-Ringes in eine offenkettige gelb gefärbte Chalkon-Struktur. Diese lagert sich über eine Keto-Enol-

Tautomerie in ein α -Diketon um. Dieses ist instabil und zerfällt rasch in einen Aldehyd und in die korrespondierende Phenolsäure (MAZZA und MINIATI 1993, HARBORNE 1988, JURD 1972).

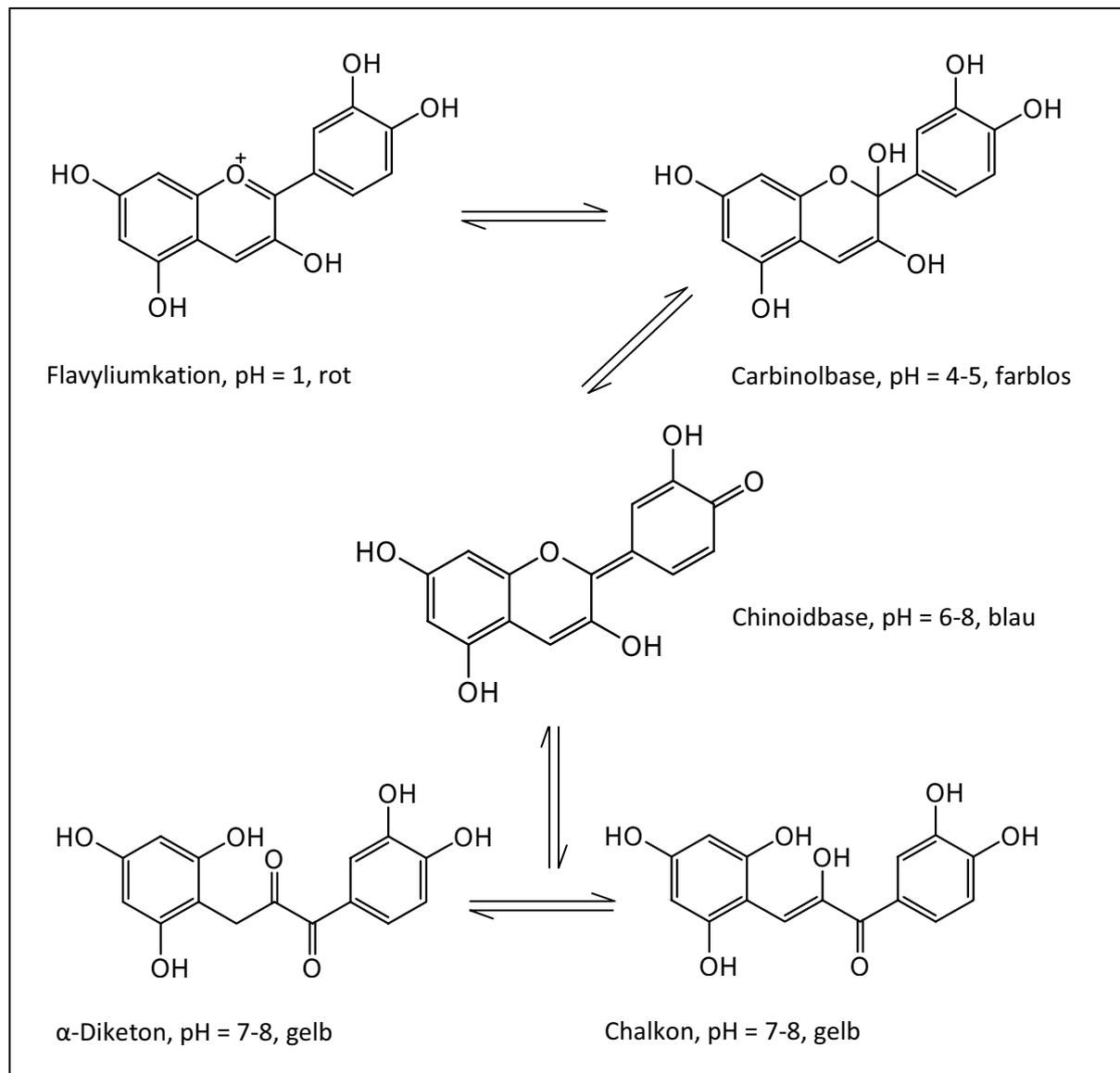


Abbildung 9: pH-Wert-Abhängigkeit von Anthocyanidinen am Beispiel von Cyanidin (nach FLESCHUT et al. 2006)

Ein vereinfachtes Schema zum Degradationsprozess der Anthocyanidine ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Stabilität wird von der Substitution am B-Ring beeinflusst. Hydroxy- und Methoxy-Gruppen verringern die Stabilität des Aglykons im neutralen Medium. Anthocyan-Monoglykoside und vor allem Anthocyan-Diglykoside verhalten sich weitaus stabiler als die

Aglykone, da die Zuckermoleküle den Abbau des instabilen α -Diketon-Intermediats zu der Phenolsäure und der Aldehydkomponente verhindern (FLESCHHUT et al. 2006).

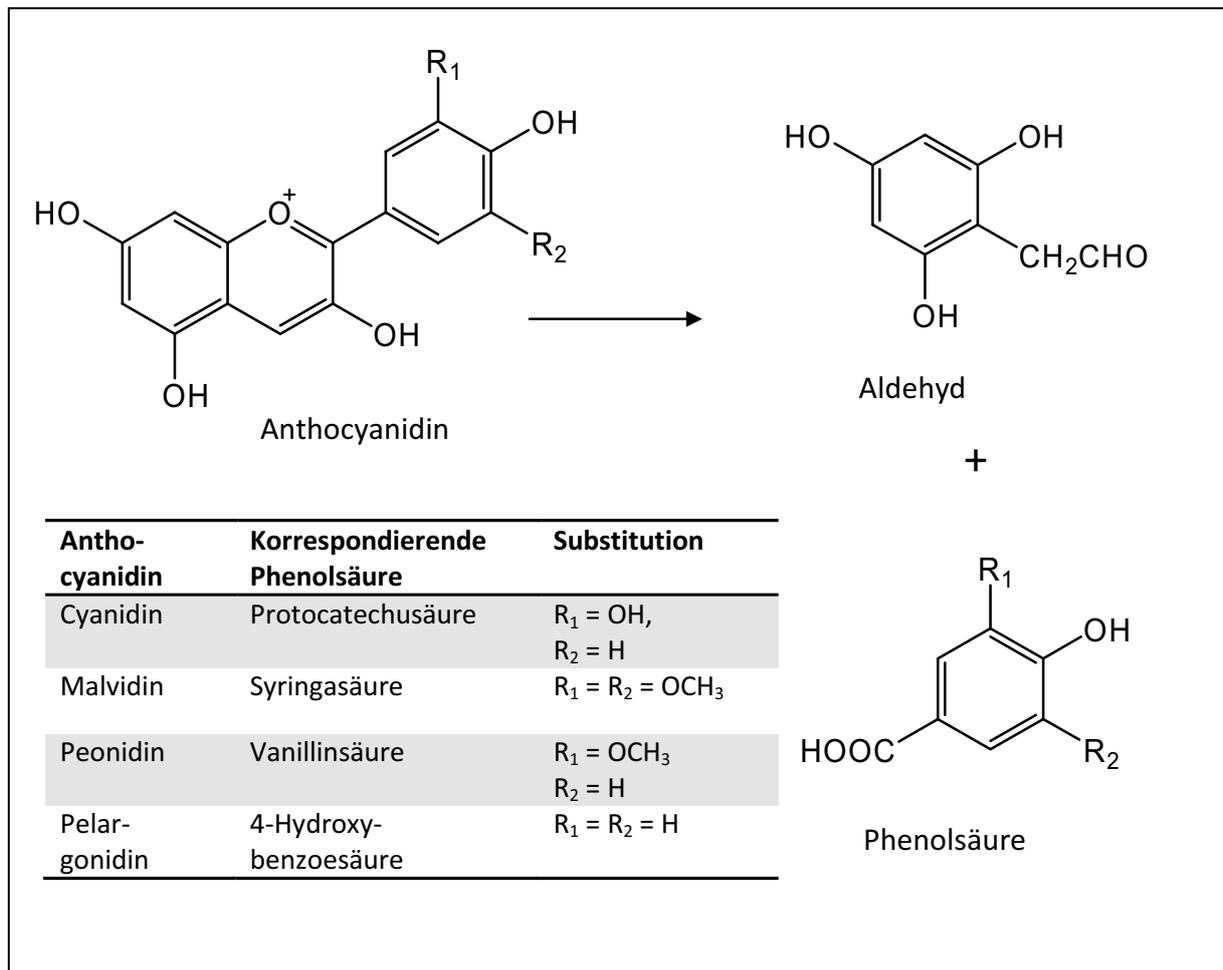


Abbildung 10: Degradationsprozess der Anthocyanidine (nach FLESCHHUT et al. 2006)

Des Weiteren sind Anthocyane empfindlich gegenüber Licht-, Temperatur- und Sauerstoffeinfluss. Auch eine Reihe von Inhaltsstoffen, wie Ascorbinsäure und verschiedene Enzyme üben einen abbauenden Effekt auf die Anthocyane aus (LALEH et al. 2006, SHENOY 1992).

2.1.6.3 Copigmentierungsreaktionen der Anthocyane

Die Farbstabilität der Anthocyane kann durch Copigmentierungsreaktionen beeinflusst werden. Es werden die intramolekulare und die intermolekulare Copigmentierung unterschieden. Bei der intramolekularen Copigmentierungsreaktion werden Copigmente kovalent an Anthocyane gebunden. Bei der intermolekularen Reaktion werden Copigmente

mit phenolischen Substituenten durch schwache hydrophobe Wechselwirkungen an Anthocyane gebunden, was vor allem bei Früchten und Beeren von Bedeutung ist. Copigmentierung äußert sich bei beiden Mechanismen als ein hyperchromer Effekt, bei welchem zum einen das Absorptionsmaximum ansteigt und die Farbe intensiver wird, und durch eine bathochrome Verschiebung, wobei das Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen verschoben wird (DANGLES et al. 1993, BLOOR und FALSHAW 2000, MAZZA und BROUILLARD 1990). Bei den Copigmenten handelt es sich meist um farblos bis leicht gelb gefärbte Verbindungen, die hauptsächlich Flavonoide und andere Polyphenole, Alkaloide, Aminosäuren und organische Säuren darstellen (BROUILLARD et al. 1989). Bei den Polyphenolen zeigen Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäurederivate, wie die Chlorogensäure, die in relativ hohen Konzentrationen in vielen Pflanzen zu finden ist, einen bedeutenden Einfluss auf die Stabilisierung der Anthocyane (MARKOVIC et al. 2000).

2.1.7 Physiologische Wirkung der Polyphenole

In den letzten Jahren sind Polyphenole in der Forschung und bei Lebensmittelherstellern in den Fokus des Interesses gerückt. Der Grund dafür liegt in der Erkenntnis des hohen antioxidativen Potentials, ihres ubiquitären Vorkommens in der menschlichen Ernährung und ihre potentielle Bedeutung in der Prävention verschiedener Krankheiten, die auf oxidativen Stress zurückzuführen sind (SCALBERT et al. 2005, MANACH et al. 2004).

2.1.7.1 Oxidativer Stress und reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies

Im menschlichen Organismus herrscht ein Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Systemen. Reaktive Stickstoff- (RNS) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden unter anderem produziert, um Phagozyten zu aktivieren, welche Mikroorganismen im menschlichen Organismus abwehren und somit ein Teil des Immunsystems darstellen (HALLIWELL 1994). Bei einer vermehrten Bildung freier Radikale kommt es zu einem Ungleichgewicht beider Systeme zugunsten der prooxidativen Seite. Dieses resultiert in oxidativem Stress. Es gilt als erwiesen, dass oxidativer Stress bei einer Reihe von Erkrankungen und Symptomen als ursächlicher oder häufiger als begleitender Faktor eine Rolle spielt (SIEMS et al. 1998).

Freie Radikale, insbesondere RNS und ROS werden in den Zellen aller sauerstoffabhängigen Organismen als Nebenprodukte des Metabolismus gebildet. Entstehungsorte sind die mitochondriale Atmungskette, der Purinabbau, der Katecholamin-Stoffwechsel, Substratautoxidationen, die Detoxifikation von Xenobiotika und der Arachidonsäuremetabolismus. Die Einwirkung von Strahlung auf die Haut, insbesondere von UV-Strahlung, führt ebenfalls zur Entstehung (SIEMS et al. 1998). Auch die Luftverschmutzung, Zigarettenrauch und Ozon sollen einen Beitrag zur Bildung freier Radikale leisten (HALLIWELL 1994).

Ein kleiner Teil des Sauerstoffs kann in der Zelle durch Übertragung eines Elektrons zu einem Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot -}$) reagieren, welchem jedoch nur eine geringe Reaktivität zugeschrieben wird. Schäden im Organismus entstehen nach REITER et al. (2002), wenn $O_2^{\cdot -}$ mit Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) reagiert, welches durch eine Stickstoffmonoxid-Synthase aus der Aminosäure Arginin gebildet wird. Stickstoffmonoxid ist für viele Reaktionen wichtig und schützt zum Beispiel als Inhibitor Low Density Lipoproteine (LDL) vor oxidativen Prozessen. Reagiert jedoch Stickstoffmonoxid mit Superoxidradikalanionen, entsteht Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$), welches mit Biomolekülen reagieren kann (RUBBO et al. 2002, ICHIYANAGI et al. 2004).

Freie Radikale können Kettenreaktionen initiieren und an Lipiden, Proteinen oder DNA Schäden verursachen, die mit der Entstehung von chronischen Erkrankungen wie Arteriosklerose, Krebs, Rheuma oder Diabetes mellitus, sowie den allgemeinen Vorgängen des Alterns in Beziehung stehen (BÖHM et al. 1998).

Im menschlichen Organismus gibt es natürliche enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen gegen reaktive Sauerstoffspezies. Zum Beispiel ist die Superoxiddismutase ein enzymatisches System, welches die Umwandlung eines reaktiven Superoxidradikals in Wasserstoffperoxid katalysiert. Da aber auch Wasserstoffperoxid für die Zelle schädigend wirkt, muss dieses ebenfalls abgebaut werden, welches mit Hilfe von Katalase oder Glutathionperoxidase geschieht. Nach REITER et al. (2002) wird allerdings Wasserstoffperoxid bei Anwesenheit von Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} zu OH^{\cdot} abgebaut. Bei den nichtenzymatischen Vorgängen spielen zum Beispiel Ascorbinsäure, Glutathion oder Tocopherol eine Rolle. Sie fungieren als Radikalfänger und werden dabei oxidiert.

2.1.7.2 Antioxidative Aktivität von Polyphenolen

Nach HALLIWELL und GUTTERIDGE (1999) ist der Mechanismus der antioxidativen Aktivität *in vitro* entweder auf die Suppression der Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies durch Enzym-Inhibitoren oder Chelatisierung von Metallionen, oder durch Antioxidantien, die reaktive Sauerstoffspezies abfangen, zurückzuführen. In Abbildung 11 ist der Mechanismus der radikalfangenden Wirkung von Flavonoiden dargestellt. Die antioxidative Wirkung von Polyphenolen erfolgt dabei über den Transfer von Elektronen oder Wasserstoffatomen von Hydroxylgruppen auf die freien Radikale. Durch ihr niedriges Redoxpotential sind Polyphenole in der Lage, oxidierende freie Radikale, wie zum Beispiel Superoxid-, Peroxid- oder Hydroxyl-Radikale zu reduzieren. Das konjugierte Doppelbindungssystem stabilisiert die Aglykone durch Ausbildung chinoider Strukturen und Radikalkettenreaktionen können unterbrochen werden (PIETTA 2000, KONG et al. 2003, CHEN und HO 1997, RICE-EVANS et al. 1996).

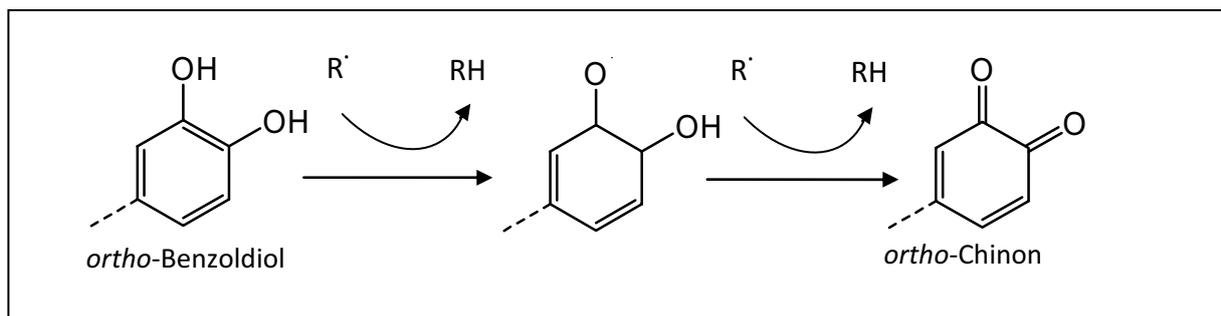


Abbildung 11: Mechanismus des Abfangens von reaktiven Sauerstoffspezies (R^\cdot) von Benzoldiol-Strukturen (nach PIETTA 2000)

Flavonoiden wird eine hemmende Wirkung auf Enzymsysteme nachgesagt, die sich verantwortlich zeichnen für die Generation von Superoxidanionen und der Bildung von ROS (HANASAKI et al. 1994). Einige Flavonoide besitzen ebenfalls die Eigenschaft, Metallionen wie Eisen und Kupfer zu chelatisieren, welche zu einer potentiellen Erhöhung der Produktion von ROS führen sollen, oder die Lipidperoxidation in den Zellmembranen zu inhibieren, da LDL eine spezifische Bindungsstelle für Kupfer aufweist (SATUÉ-GRACIA et al. 1997, BROWN et al. 1998). NODA et al. (2000) führten Untersuchungen über die antioxidative Wirkung des für Auberginen typischen Anthocyans Nasunin (s. Kapitel 2.4.2) mit Hilfe einer Elektronenspinresonanz-Technik (ESR) durch. Sie konnten zeigen, dass freie Radikale durch

Nasunin abgefangen werden und die Bildung von $O_2^{\cdot -}$ und OH^{\cdot} in einem Fenton-Reaktions-System wahrscheinlich durch die Chelatisierung von Eisen-Ionen inhibiert werden könnte. TSUDA et al. (1994) konnten dieses in einer ähnlichen Studie mit Cyanidin und Cyanidin-3-glucosid, welches unter anderem das Hauptanthocyan in schwarzem Reis darstellt, bestätigen. Weiterhin zeigte ein Extrakt von schwarzem Reis nach HU et al. (2003) eine Minderung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies in chemischen und biologischen *in vitro*-Modellversuchen, welche auf die Anthocyane Cyanidin-3-glucosid und Peonidin-3-glucosid zurückgeführt wird. Nach OKI et al. (2002) sind polymere Procyanidine für die radikalfangende Wirkung eines Extraktes aus rotem Reis verantwortlich. Flavonoide, und vor allem Anthocyane, besitzen demnach *in vitro* ein ausgeprägtes antioxidatives Potential, jedoch ist *in vivo* eine systemische antioxidative Wirkung der Anthocyane wegen der geringen Bioverfügbarkeit im menschlichen Organismus zu diskutieren (s. Kapitel 2.1.7.4) (WATZL et al. 2002). Auch Hydroxyzimtsäuren, wie die Chlorogensäure-Derivate, zeigen eine hohe antioxidative Aktivität in DPPH-Testsystemen, mit Hilfe von Elektronenspinresonanz-Technik und gegenüber LDL-Oxidation durch Cu^{2+} -Ionen (HUNG et al. 2006, LUGASI et al. 1999, ZHANG et al. 2003).

2.1.7.3 Krankheitsprävention durch Polyphenole

Schutz vor koronaren Herzerkrankungen. Durch oxidative Schädigung von Lipoproteinen, insbesondere LDL, können modifizierte Verbindungen entstehen. Koronare Herzerkrankungen, die auf die Oxidation von LDL zurückzuführen sind, beruhen nach BENNETT (2001) auf einer Reaktion von freien Radikalen mit Lipiden, Cholesterin und dem Proteinanteil von LDL-Molekülen. Dieses führt zu einer verstärkten Ablagerung von oxidiertem LDL an den Gefäßwänden und zur Entstehung von Arteriosklerose. Zahlreiche *in vitro*-Studien bezüglich der Prävention vor Oxidation von LDL diskutieren einen potentiellen positiven Einfluss von phenolischen Verbindungen (HEINONEN et al. 1998, FUHRMAN und AVIRAM 2001, NADERI et al. 2003). Auch eine *in vivo*-Studie, bei der ein Extrakt von schwarzem Reis Mäusen verabreicht wurde, belegt eine Verminderung des Atheroskleroserisikos bei Mäusen. Dieser Effekt war bei der Aufnahme eines Extraktes der nicht pigmentierten Varietät nicht zu beobachten (XIA et al. 2003).

Krebsprävention. Weiterhin ist in der Literatur häufig ein Zusammenhang zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und Krebsentstehung beschrieben. Nicht erkannte DNA-Schäden

können bei der Zellteilung auf die DNA der Tochterzellen übertragen werden, die sich in Mutationen manifestieren können und letztlich zu Störungen der Zellfunktion und zu Krebs führen (HOEIJMAKERS 2001). Der Fokus liegt aber nicht nur auf einer direkten DNA-Schädigung, sondern ebenso auf einer Beeinflussung der Zellproliferation, Signaltransduktion, Apoptose und der interzellulären Kommunikation (FERGUSON et al. 2004). Auch Proteine können durch Reaktionen mit ROS oder Lipidoxidations-Folgeprodukten geschädigt werden. Dabei werden unter Umständen die Aktivitäten von Enzymen beeinflusst, wenn sie in der Nähe des katalytischen Zentrums verändert werden (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1999, VALKO et al. 2006).

Antimikrobielle Wirkung. In Kapitel 2.1.2.2 wurde bereits auf die antimikrobielle Wirkung der Polyphenole hingewiesen. Diese beruht auf der Änderung der Permeabilität der Zellmembran sowie auf der Bindung und Denaturierung von lebenswichtigen Enzymen in Bakterien, Pilzen und Viren (SCALBERT 1991). Nach LEE et al. (2004) weisen verschiedene phenolische Amide aus dem Nachtschattengewächs *Lycium chinense* Miller antifungale Aktivitäten gegenüber *C. albicans* auf. Neben der antifungalen Wirkung wird auch eine antivirale Wirkung der Polyphenole diskutiert. Dabei wurde bei einigen Flavonoiden eine direkte Inhibition des Human Immunodeficiency Virus (HIV) beobachtet (LI et al. 1997). Andere Flavonoide hemmen die Enzyme, die für die virale Replikation verantwortlich sind (KIM et al. 1998). Nach KNOX et al. (2001) sind Anthocyane für die antivirale Aktivität eines Extraktes der Schwarzen Johannisbeere gegenüber den Influenza-Viren A und B verantwortlich. Durch ihre Fähigkeit, Krankheitskeime in Pflanzen zu hemmen, wird eine potentielle Anwendung auch für den Schutz vor Keimen bei Menschen diskutiert (HARBORNE und WILLIAMS 2000).

2.1.7.4 Bioverfügbarkeit und Biotransformation von Anthocyanen

Die in 2.1.7 beschriebenen positiven Eigenschaften von Polyphenolen, die möglicherweise Schutz vor vielen Krankheiten bieten, hängen von der Absorption und Metabolisierung im Organismus ab.

In den letzten Jahren wurden viele Studien zur biologischen Aktivität von Anthocyanen durchgeführt. Die meisten Untersuchungen, zum Beispiel die Bestimmung des hohen antioxidativen Potentials von Anthocyanen, wurden zunächst *in vitro* durchgeführt und

konnten keine Informationen bezüglich der Metabolisierung liefern (KÄHKÖNEN und HEINONEN 2003). Neue Studien fokussieren daher auf die Bioverfügbarkeit und Biotransformation von Anthocyanen *in vivo*. Dabei wurde in einigen Untersuchungen die Bioverfügbarkeit nach anthocyanreicher Ernährung durch die Zufuhr von Erdbeeren, Brombeeren, Holunderbeeren, Blaubeeren, rotem Traubensaft oder Rotwein entweder in Human-Studien oder in Tierversuchen mit Ratten oder Schweinen ermittelt (FELGINES et al. 2003 und 2007, WU et al. 2002, BUB et al. 2001, NETZEL et al. 2001). Die Anthocyan-Konzentration wurde anschließend in Urin und Blutplasma oder Blutserum bestimmt. In diesen Studien konnte festgestellt werden, dass die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen sehr gering ist und dass nur ungefähr 0,02 bis 1,80 % der aufgenommenen Anthocyan-Dosis entweder intakt oder als Phase II-Metabolite mit dem Urin ausgeschieden wurden. FELGINES et al. (2007) beobachteten weiterhin, dass die Ausscheidungsmenge von Cyanidin-3-glucosid nach dem Konsum von Brombeeren um die zehnfache Konzentration geringer ist, als nach Aufnahme von Pelargonidin-3-glucosid aus Erdbeeren. Dadurch wurden Hinweise gewonnen, dass verschiedene Aglykone eine unterschiedliche Metabolisierung zur Folge hätten. In einer Studie von FLESCHHUT et al. (2006) wurde die Biotransformation von Anthocyanen durch zwei *in vitro*-Modelle untersucht, um Hinweise auf den Verbleib der restlichen der aufgenommenen Anthocyane (rund 98 %) zu erlangen. In dem ersten Modell wurden Anthocyan-Standards mit Fäkal-Mikroflora anaerob inkubiert. Weiterhin wurden dann Anthocyan-Standards mit Ratten-Leber-Mikrosomen inkubiert, um die Phase I-Metabolisierung durch Cytochrom P450-Enzyme und die Phase II-Metabolisierung durch Glukuronyltransferasen zu untersuchen. Glykosylierte und acylierte Anthocyane werden demnach schnell von der Darmflora abgebaut. Die stabilsten Produkte des Anthocyanabbaus stellen die korrespondierenden Phenolsäuren des Anthocyans dar, zum Beispiel Protocatechusäure aus dem Abbau von Cyanidin-3-glucosid. Der schnelle Abbau der Anthocyane wird hierbei als Hauptgrund für die geringe Bioverfügbarkeit angesehen.

2.2 Polyamine

2.2.1 Allgemeines und Klassifizierung der Polyamine

Polyamine oder auch Biogene Amine sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitete Inhaltsstoffe, die während Stoffwechselprozessen entstehen. Viele dieser Substanzen und

deren Derivate besitzen eine große Bedeutung in biologischen Prozessen und besitzen eine pharmakologische Aktivität. Es handelt sich dabei um basische organische Verbindungen, die aus einer gesättigten Kohlenwasserstoffkette mit endständigen Aminfunktionen, unterbrochen von einer wechselnden Anzahl sekundärer Aminogruppen, aufgebaut sind (s. Abbildung 12). Zu den wichtigsten Vertretern zählen Spermidin (1,8-Diamino-4-aza-octan), Spermin (1,12-Diamino-4,9-diazadodecan) und deren Präkursor Putrescin (1,4-Diaminobutan) (WALTERS 2000, GENESTE und HESSE 1998).

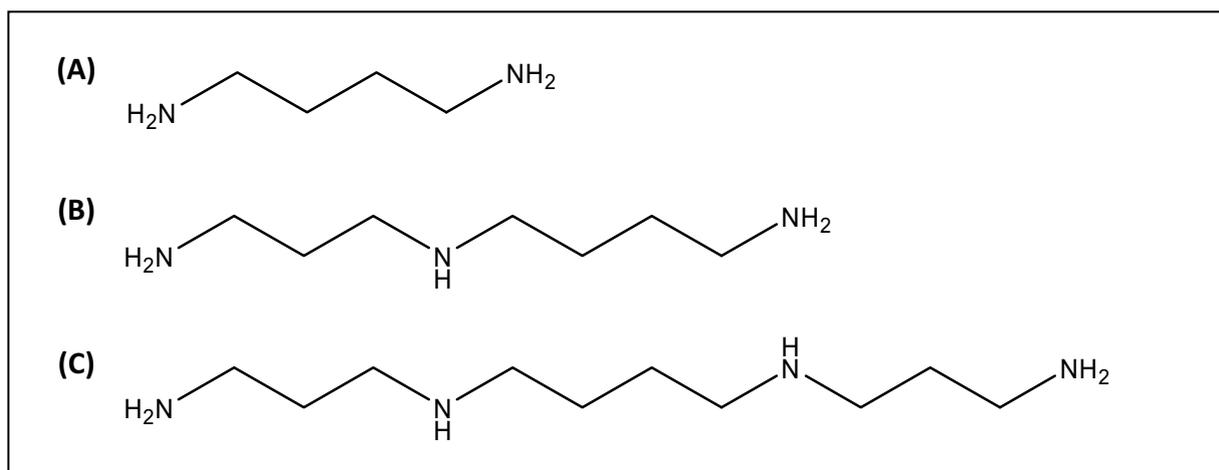


Abbildung 12: Putrescin (A), Spermidin (B), Spermin (C)

Polyamine sind in Pflanzenzellen sowohl in freier Form zu finden, als auch konjugiert mit zum Beispiel Aminosäuren, Alkaloiden oder Phenolsäuren, und vor allem Hydroxycimtsäurederivaten, wie *p*-Cumarsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure (WALTERS 2000, KARIGIANNIS und PAPAIOANNOU 2000). PARR et al. (2005) identifizierten Dihydrocaffeoyl-Polyamine aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*), die wie die Aubergine zu der Pflanzenfamilie der Nachtschattengewächse zählt.

2.2.2 Biosynthese der Polyamine

Der erste Schritt bei der Polyamin-Biosynthese in höheren Pflanzen und Bakterien ist die Bildung von Putrescin (s. Abbildung 13). Dabei wird Putrescin entweder aus Arginin oder Ornithin und den entsprechenden Reaktionen durch Katalyse der Enzyme Ornithin-Decarboxylase (ODC) und Arginin-Decarboxylase (ADC) gebildet. In menschlichen und Säugetierzellen und bei den meisten Pilzen führt nur die Reaktion durch ODC zu Putrescin. Die Bildung von Putrescin stellt in der Biosynthese der Polyamine den

geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Die Aminopropyl-Gruppen in Spermidin und Spermin entstehen durch Übertragung durch die decarboxylierte S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (dcSAM), welche wiederum durch die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAM) gebildet wird. Die Übertragungsreaktion der Aminopropyl-Gruppe wird durch Spermidin- und Spermin-Synthase katalysiert, welche anschließend 5'-Methylthioadenosin (MTA) erzeugt. Putrescin und Spermidin können weiterhin durch spezifische Transferasen Hydroxyzimtsäure-CoA übertragen werden (NEGREL 1989, KUKSA et al. 2000, WALTERS 2000, WU et al. 2007).

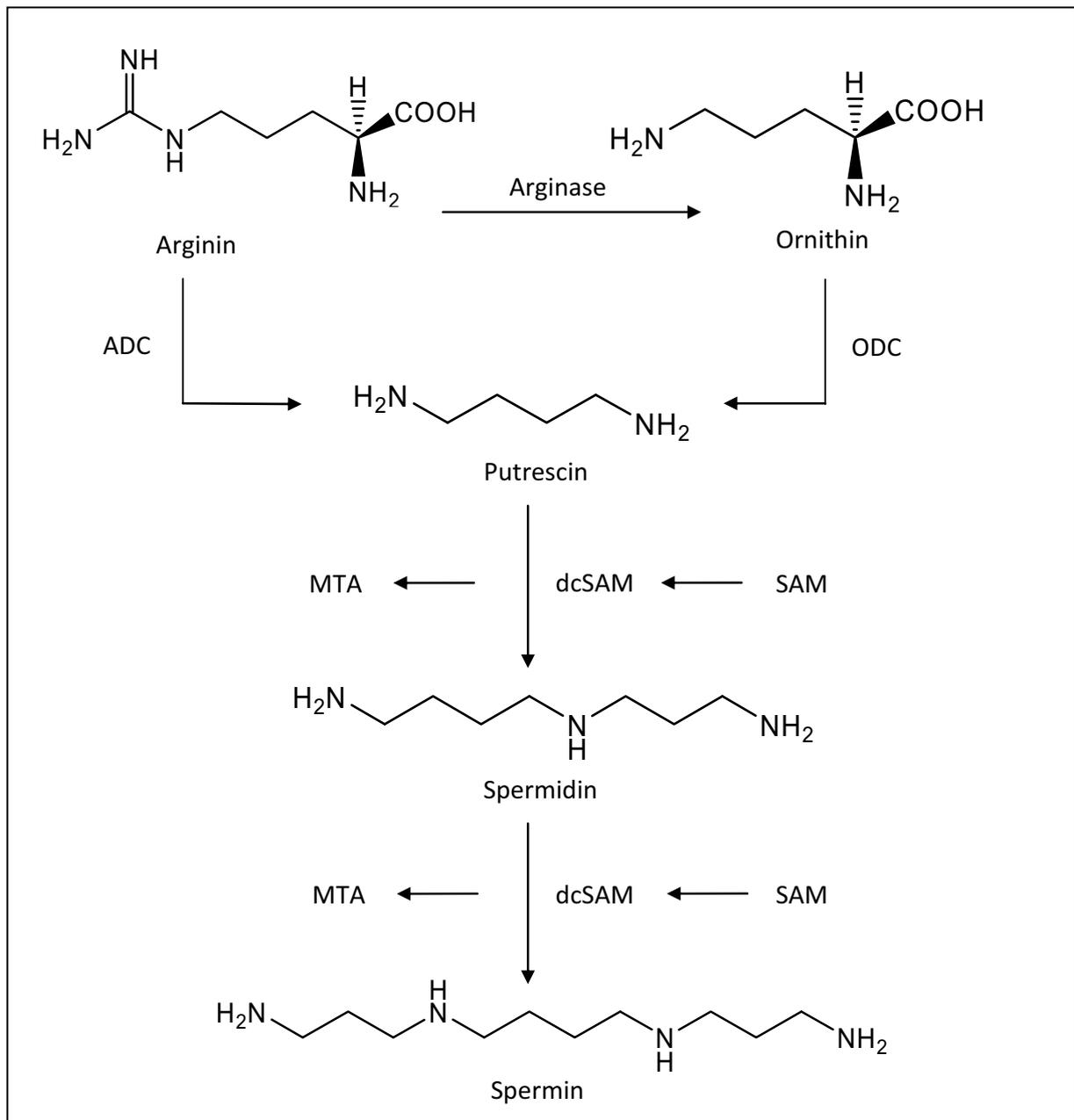


Abbildung 13: Biosynthese der Polyamine (nach KUKSA et al. 2000 und WALTERS 2000)

2.2.3 Physiologische Bedeutung

Polyamine stellen ubiquitäre Zellinhaltsstoffe dar, die eine große Bedeutung in prokaryontischen und eukaryontischen Zellen besitzen. Sie sind bei physiologischen pH-Werten Kationen und können so mit Nukleinsäuren, Proteinen oder Phospholipiden interagieren. Nach PEGG (1988) beeinflussen sie die DNA-Konformation *in vitro* und *in vivo* und somit viele biologische Prozesse, wie Transkription, Regulationen und Zell-Rekombination. WANG et al. (2004) führten eine Studie mit transgenen Mäusen durch, deren Spermin-Synthese inhibiert wurde. Alle Mäuse zeigten ausgeprägte Entwicklungsstörungen und neurologische Abnormitäten, wie Hyperaktivität, Taubheit, Wachstumsstörungen oder Unfruchtbarkeit. Da Polyamine am Zellwachstum und an der Proliferation beteiligt sind, wird in vielen Studien ein Zusammenhang mit Tumorwachstum und einer möglichen Krebsprävention diskutiert (WU et al. 2007). Nach GERNER und MEYSKENS (2004) stellt die Inhibition der Polyamin-Synthese keine empfehlenswerte Strategie in einer klinischen Krebstherapie dar, könnte jedoch eine mögliche Bedeutung in der Krebsprävention darstellen. KALAČ und KRAUSOVÁ (2005) diskutieren in diesem Zusammenhang einen Einsatz von Polyaminen nach Operationen, um zum Beispiel die Wundheilung zu beschleunigen.

In einer Studie von KANEKO et al. (2007) wurde im Gegensatz zu zahlreichen Untersuchungen, die die zellvermehrende Wirkung von Polyaminen bestätigten, eine zytotoxische Wirkung von Spermin in retinalen Pigmentepithelzellen nachgewiesen.

Zwischen der Entwicklung der Pflanze und dem Auftreten von Hydroxyzimtsäureamiden besteht eine Wechselbeziehung. Polyamin-Konjugate können als Vorläufer vieler makrocyclischer Polyamin-Alkaloide betrachtet werden. Sie treten erst spät in der Pflanzenentwicklung auf und wirken zwar bei der Bildung der Knospe, nicht aber beim Pflanzenwachstum oder der Blüte mit. Die Hydroxyzimtsäurepolyamide werden in den Fortpflanzungsorganen gespeichert. In manchen Fällen unterscheiden sich dabei männliche und weibliche Blütenorgane voneinander. Fruchtknoten der Tabakpflanze enthalten meistens basische Hydroxyzimtsäureamide in Form von Caffeylputrescin und -spermidin. In den männlichen Staubbeuteln (Antheren) liegen im Unterschied dazu neutrale Hydroxyzimtsäureamide, wie Di-*p*-cumaroylputrescin und -spermidin sowie *p*-Cumaroyltyramin vor. Die Amide werden demnach nur bei Fruchtbarkeit gespeichert,

daher ist anzunehmen, dass sie bei der Vermehrung durch Zellteilung von Bedeutung sind (GENESTE und HESSE 1998).

2.3 Untersuchtes Pflanzenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Pflanzenteile im Hinblick auf bioaktive Inhaltsstoffe untersucht:

- Beeren der Aubergine (*Solanum melongena*)
- Blätter von Perilla (*Perilla frutescens*)
- Samen von schwarzem Reis (*Oryza sativa*)
- Rhizome des violetten Taro (*Xanthosoma violaceum*)

2.4 Aubergine (*Solanum melongena*)

2.4.1 Pflanzenbeschreibung

Die Aubergine ist eine subtropische Pflanzenart und gehört, wie auch die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) oder die Tomate (*Solanum lycopersicum*), zu der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae). Die Pflanze stammt ursprünglich aus Asien und wurde erst im Mittelalter in Europa kultiviert. Den Namen „Eierfrucht“ erhielt sie in Anlehnung an das Aussehen der Wildform, die durch ihre weiß-gelbliche Farbe, Größe und Form einem Hühnerei ähnelt (HEGNAUER 1969).

Die wirtschaftlich größte Bedeutung besitzt die Aubergine in China. Im Jahr 2005 wurden über 17 Millionen Tonnen produziert, gefolgt von Indien mit 9,8 Millionen Tonnen und Ägypten mit einer Million Tonnen. In Europa werden die meisten Auberginen in Italien (338 800 Tonnen) angebaut, gefolgt von Spanien (160 000 Tonnen) und Rumänien (124 710 Tonnen) (FAO 2005).

Die Beeren können in ihrer Form und Farbe sehr variieren. Während in Europa eher keulenartige schwarz-violette Früchte bevorzugt werden, ist in China eine größere Vielfalt vorhanden. Die Form der Früchte kann länglich, eiförmig oder rund ausfallen und das

Exokarp weist eine schwarz-violette, violette, hellgelbe oder weiße Färbung auf (SIMOONS 1991, HU 2005). Bevorzugt werden in China längliche violette Früchte.

Neben der Bedeutung als Gemüsepflanze wird die Aubergine auch in der Traditionellen Chinesischen Medizin eingesetzt. Die Beeren und deren Saft sollen eine diuretische Wirkung besitzen oder als Antidot nach dem Verzehr von Giftpilzen wirken. Weiterhin werden auch die Wurzeln und Blätter bei Beschwerden eingesetzt (PERRY 1980, CHEVALLIER 1996).

2.4.2 Pflanzeninhaltsstoffe

Im Exokarp der violetten Auberginen-Varietäten wurden von den Anthocyanen ausschließlich Delphinidin-Derivate charakterisiert, welche mit Glucose, Rhamnose und/oder Cumarsäure glykosiliert vorliegen und mit Kaffeesäure verestert sein können. Als wichtigstes Anthocyan wird Delphinidin-3-O- β -D-(p-Cumaroylrutinosid)-5-O- β -D-glucosid genannt, welches auch unter dem Trivialnamen „Nasunin“ bekannt ist. Dieses Anthocyan wurde von den Japanern KURODA und WADA (1933 und 1935) isoliert, die der Verbindung die Bezeichnung „Nasunin“ als einen japanischen Ausdruck für die violette Aubergine vergaben (MAZZA und MINIATI 1993, LIN et al. 2001, ICHIYANAGI et al. 2005).

Die Aubergine gehört nach CAO et al. (1996) zu den zehn Gemüsesorten mit der größten Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen, welche mittels des ORAC-Tests (Oxygen Radical Absorbance Capacity) *in vitro* bestimmt wurde. Für die antioxidative Aktivität sind sowohl Anthocyane, wie Nasunin und phenolische Säuren verantwortlich (IGARASHI et al. 1993, NODA et al. 2000). Weiterhin beschreiben MATSUBARA et al. (2005) eine antiangiogenetische Aktivität von Nasunin *in vitro*, die Fähigkeit, Gefäßneubildung von Tumoren zu verhindern. Sowohl dessen antioxidative Aktivität als auch die antiangiogenetische Wirkung sollen zur Prävention von Krankheiten beitragen, die durch Angiogenese verursacht werden.

STOMMEL und WHITAKER (2003) identifizierten verschiedene Phenolsäure-Derivate, wie Chlorogensäure-, Isochlorogensäure-, acetylierte Chlorogensäure-Derivate, sowie Hydroxyzimtsäureamide und Kaffeesäure-Konjugate. Chlorogensäure kommt in allen Solanaceen vor und soll bei Kartoffelarten zum Beispiel einen wichtigen Resistenzfaktor gegenüber Pilzinfektionen darstellen (WINTER und HERRMANN 1986, HEGNAUER 1969). Die

Konzentration an Chlorogensäuren beträgt nach HERRMANN (2001) in Auberginen bis zu 63 mg pro 100 g Frischgewicht. Nach SUDHEESH et al. (1997) vermindern Flavonoide, die aus den Beeren der Aubergine gewonnen wurden, in einem *in vivo*-Test den Blutfettgehalt von Ratten. WHITAKER und STOMMEL (2003) identifizierten weitere Hydroxyzimtsäurederivate in Auberginen, die mit Amiden konjugiert vorliegen und die nach PARR et al. (2005) auch in *Solanum tuberosum* vorkommen.

Eine unreife Aubergine enthält Solanin und sollte demnach nur reif verarbeitet werden. Ein weiteres Toxin ist Nikotin, welches in verschiedenen Studien in zum Teil großen Konzentrationen in reifen Früchten quantifiziert wurde und nach der Tabakpflanze in Auberginen den größten Gehalt aufweisen soll (ANDERSSON et al. 2003).

2.5 Perilla (*Perilla frutescens*)

2.5.1 Pflanzenbeschreibung

Perilla gehört zu der Familie der Lippenblütler (Lamiaceae) und wird mit botanischem Namen *Perilla frutescens* genannt. Es gibt daneben noch einige andere Bezeichnungen, wie „Schwarznessel“, „Wilder Sesam“, „Chinesische Melisse“, „Sesamblatt“ oder „Shiso“. Als Ursprungsländer der Pflanze gelten China, Japan und die Himalayaregion. Es existieren zwei Hauptsorten von Perilla, wobei die eine grüne Blätter trägt und die der anderen eine violette Farbe durch Pigmentierung durch Anthocyane aufweisen (YU et al. 1997).

Aufgrund der intensiven Färbung findet der Perilla-Extrakt in Japan auch als Lebensmittelfarbstoff Anwendung (YU et al. 1997). In China wird die Pflanze nur eingeschränkt als Gemüse- und Gewürzpflanze verwendet, eine wesentlich größere Bedeutung besitzt sie in der Traditionellen Chinesischen Medizin. Dort werden die Blätter, Stiele und Samen hauptsächlich zur Behandlung von Erkältungskrankheiten mit Fieber und Schüttelfrost eingesetzt (CHEN 1997). Auch ist es gebräuchlich, Krebse und andere Meeresfrüchte mit Perilla-Blättern zu kochen oder einen Perilla-Sud vor deren Verzehr zu trinken, da den Blättern entgiftende Eigenschaften nachgesagt werden und somit Lebensmittelvergiftungen vorgebeugt werden könnten (TABATA 1997). Aus dem Perilla-Aldehyd wird Perillartin gewonnen, welches die 2000fache Süßkraft von Zucker aufweist und in Japan als Süßungsmittel für bestimmte Produkte zugelassen ist (SCHÖNFELDER 2004).

2.5.2 Pflanzeninhaltsstoffe

In den Blättern von *Perilla frutescens* wurden verschiedene Cyanidin-Derivate isoliert und identifiziert. Als typische Perilla-Anthocyane gelten Cyanidin-3-(*p*-cumaroylglucosid)-5-malonylglucosid (Malonylshisonin) und dessen Abbauprodukt Shisonin, bei dem die Malonsäure hydrolysiert ist. Weiterhin werden auch andere Cyanidinderivate beschrieben, die unter anderem mit Kaffeesäure verestert vorliegen (YOSHIDA et al. 1990, KONDO et al. 1989). Neben den Anthocyanen werden auch Flavone als charakteristische Inhaltsstoffe beschrieben (ISHIKURA 1981). Es handelt sich dabei um Luteolin-, Apigenin- und Scutelarein-Derivate, hauptsächlich verestert mit Glucuronsäuren, Glucose und/oder Kaffeesäure. Die antioxidative Aktivität von Perilla-Blättern wird neben den Anthocyan- und Flavon-Gehalten auch Rosmarinsäure zugesprochen (NATSUME et al. 2006, NAKAMURA et al. 1998).

Perilla frutescens besitzt vor allem in Japan eine große Bedeutung, welche die Anzahl und Herkunft der Studien und Publikationen belegen. Untersuchungen von MAKINO et al. (2001a und 2001b) ergaben für Perilla eine antiallergische und entzündungshemmende Wirkung. Dabei wird in einer Studie von UEDA et al. (2002) die entzündungshemmende Wirkung von Perilla dem Flavon Luteolin zugesprochen, welches ebenfalls das dorsale Tumorstadium in Mäusen hemmen soll. Nach OSAKABE et al. (2004) besitzt Rosmarinsäure aus *Perilla frutescens* ebenfalls eine aktive Wirkung bezüglich der Tumorgenese. Die Rosmarinsäure in einem Perilla-Extrakt wirkt sich nach TAKANO et al. (2004) und MAKINO et al. (2003) auch positiv auf einen saisonalen allergischen Schnupfen aus und sie empfehlen daher einen Perilla-Extrakt als alternative Behandlungsmethode. TAKEDA et al. (2002) zeigen in einer *in vivo*-Studie mit Mäusen eine antidepressive Wirkung eines Perilla-Extraktes in dem „Forced Swimming Test“, welche ebenfalls auf Rosmarinsäure zurückgeführt wird.

2.6 Schwarzer Reis (*Oryza sativa*)

2.6.1 Pflanzenbeschreibung

Reis stellt eine Pflanzengattung aus der Familie der Süßgräser (Poaceae) dar. Die Domestizierung fand in unterschiedlichen Teilen Asiens statt, als Ursprungsregion gilt Indien und Südchina. Es gibt verschiedene Reis-Arten, wobei *Oryza sativa* die größte wirtschaftliche

Bedeutung besitzt. Die wichtigsten Varietäten von *Oryza sativa* sind *Oryza sativa* var. *japonica*, der typische Klebreis mit kurzem Korn, *Oryza sativa* var. *indica*, der Langkornreis und *Oryza sativa* var. *javanica* (BRÜCHER 1977)

Der am weitesten verbreitete Typ ist der weiße Reis, aber es gibt auch Sorten wie den schwarzen Reis, der Anthocyane in der äußeren Aleuronschicht des Kornes bildet. Im alten China soll dieser Reis, aufgrund des Nährwertes und der Seltenheit, ausschließlich für den Kaiser vorbehalten gewesen sein, für die Bevölkerung Chinas war der Konsum verboten, wodurch der Name „Forbidden Rice“ entstanden ist. Der schwarze Reis wird ungeschliffen auf dem Markt angeboten und hat somit im Vergleich zu geschliffenem Reis einen wesentlich höheren Mineralstoffgehalt (SIMOONS 1991). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt Reis die wichtigste Kulturpflanze der Welt dar. In Tabelle 2 sind die zehn wichtigsten Produktionsländer mit ihren jährlichen Produktionsmengen dargestellt. Im Jahr 2005 wurden weltweit 618 Millionen Tonnen Reis produziert, 182 Millionen Tonnen davon in China (FAO 2005). In erster Linie wird Reis verzehrt, es werden aber in Asien auch verschiedene alkoholfreie und alkoholhaltige Getränke aus Reis hergestellt, wie Reiswein, Bier, Reissessig, Reismilch oder Branntweine, wie zum Beispiel der Arrak (TAKAHASHI und YOSHIZAWA 1987, TERAHARA et al. 1994).

Tabelle 2: Reisproduktion weltweit (FAO 2005)

Land	Produktionsmenge (in 1000 Tonnen)
1. China	181.900
2. Indien	130.513
3. Indonesien	53.985
4. Bangladesch	40.054
5. Vietnam	36.341
6. Thailand	27.000
7. Birma	24.500
8. Philippinen	14.615
9. Brasilien	13.141
10. Japan	11.342

2.6.2 Pflanzeninhaltsstoffe

Von den Polyphenolen in schwarzem Reis sind vor allem Anthocyane bekannt. Sie sind in der Aleuronschicht des Reiskorns und in den Samen pigmentierter Reissorten enthalten. Es handelt sich dabei um Cyanidin-, Malvidin-, Delphinidin- und Peonidin-Glykoside und Diglykoside, wobei Cyanidin-3-glucosid und in geringeren Mengen Peonidin-3-glucosid am häufigsten vorkommen (MAZZA und MINIATI 1993, YOON et al. 1995, RYU et al. 1998, HYUN et al. 2004, ESCRIBANO-BAILÓN et al. 2004). HU et al. (2003) isolierten die pigmentierte Fraktion eines Extraktes von schwarzem Reis mittels Bio-Gel P-2-Säulenchromatographie und quantifizierten den Anthocyangehalt. In der Aleuronschicht beträgt dieser demnach 1,36% und im intakten Korn 0,16%.

Es gibt *in vitro*-Studien über die antioxidative Aktivität von schwarzem Reis, welche auf den hohen Gehalt von Cyanidin-3-glucosid zurückgeführt wird (ICHIKAWA et al. 2001). HU et al. (2003) zeigen in einer Studie mit Modell-Zellkulturen, dass ein Anthocyanextrakt von schwarzem Reis reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies neutralisiert. Nach XIA et al. (2003) reduziert eine Nahrungsergänzung mit schwarzem Reis bei Mäusen den oxidativen Stress und wird somit mit einem möglichen Schutz vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. In einer *in vitro*-Studie mit organischer Ratten-Linsen-Kultur nach MORIMITSU et al. (2002), wirken sich Anthocyane aus schwarzem Reis als potentielle Inhibitoren in Bezug auf die Bildung des Grauen Stars aus. Weiterhin ergaben neuere Forschungsergebnisse (KIM et al. 2007, HYUN und CHUNG 2004) eine zytotoxische Aktivität und anti-Tumor-Wirkung von Reisschalen, und nach LEE et al. (2006) soll sich ein Extrakt aus schwarzem Reis günstig auf die Behandlung von Asthma-Erkrankungen auswirken.

2.7 Blauer Taro (*Xanthosoma violaceum*)

2.7.1 Pflanzenbeschreibung

Der Blaue Taro (*Xanthosoma violaceum*) gehört der Familie der Aronstabgewächse (Araceae) und der Gattung *Xanthosoma* Schott an und stammt ursprünglich aus den Tropen Südamerikas. Der blaue Taro ist nicht zu verwechseln mit dem bekannteren Taro (*Colocasia esculenta*), der zwar ebenfalls zu den Araceae zählt, jedoch zur Gattung der *Colocasia*. Die

essbaren Pflanzenteile des blauen Taros stellen die unterirdisch an den Wurzeln wachsenden Rhizome dar, in denen, wie auch in den oberirdisch wachsenden Pflanzenteilen, Anthocyane in geringen Konzentrationen eingelagert sind, welches ausschlaggebend für den Namenszusatz „blauer“ Taro oder „violet stemmed“ Taro war (HEGNAUER 1969, WILLIAMS et al. 1981).

2.7.2 Pflanzeninhaltsstoffe

Bislang ist wenig über polyphenolische Verbindungen in der Pflanze und in den Rhizomen publiziert. PICERNO et al. (2003) untersuchten die Blätter von *Xanthosoma violaceum* im Hinblick auf phenolische Inhaltsstoffe und isolierten einige Flavon-Glykoside. WILLIAMS et al. (1981) führten ein Screening über die Anthocyan-Zusammensetzung verschiedener Pflanzenarten der Familie Araceae durch. In den Blättern und in den Pflanzenstielen von *Xanthosoma violaceum* identifizierten sie Cyanidin-3-rutinosid und bei anderen Araceae-Arten vorwiegend Cyanidin- und Pelargonidin-3-glucosid und Rutinosid, selten Delphinidin-Derivate. Über Anthocyane in der Wurzel liegen bislang noch keine Erkenntnisse vor.

2.8 Angewandte *in vitro*- und *in vivo*-Test-Systeme

2.8.1 „TEAC-Test“ – Bestimmung der antioxidativen Aktivität *in vitro*

Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität kann durch verschiedene Methoden erfolgen, wobei sich vor allem photometrische, biochemische und spektroskopische Methoden durchgesetzt haben. Unter den photometrischen Methoden sind beispielsweise die TEAC-, die DPPH- und die ORAC-Methode zu nennen (PRIOR et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wird die TEAC-Methode (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Pflanzenextrakten und Reinsubstanzen herangezogen. Der TEAC-Test wurde zunächst von MILLER et al. (1993) beschrieben und von RE et al. (1999) in die in dieser Arbeit angewandte Methode modifiziert. Es wird dabei die Eigenschaft antioxidativ aktiver Substanzen ausgenutzt, das Radikal ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) abzufangen. ABTS wird zunächst durch Kaliumpersulfat zu einem Radikalkation oxidiert, welches eine intensiv blaue Farbe aufweist. Die Zugabe von Antioxidantien führt zu einer Minderung der Farbintensität, welche photometrisch gemessen werden kann. Als

Bezugssubstanz dient das Vitamin A-Derivat Trolox und die Ergebnisse werden in Trolox-Äquivalenten angegeben. Als ein Vorteil der TEAC-Methode kann die Testung von sowohl lipophilen als auch hydrophilen Substanzen gesehen werden (PRIOR et al. 2005).

2.8.2 „Brine shrimp“-Bioassay – Bestimmung der zytotoxischen Aktivität *in vivo*

Die Letalität von brine shrimps (*Artemia salina*) in Form eines Bioassays auszunutzen, wurde zunächst von MEYER et al. (1982) beschrieben. Nach MCLAUGHLIN et al. (1998) ist es von großer Bedeutung, chromatographische Trenntechniken, spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung und Biotestsysteme miteinander zu verbinden, um wesentliche Aussagen über eine Substanzklasse oder Pflanzenextrakte und Pflanzeninhaltsstoffe treffen zu können. Der brine shrimp-Bioassay stellt eine schnelle und technisch einfach durchzuführende, sowie preislich günstige Methode zur Beurteilung von Bioaktivitäten dar. MCLAUGHLIN et al. (1998) diskutieren eine Korrelation der brine shrimp-Toxizität und des 9KB-Zytotoxizitätstests auf nasopharyngeale Karzinome (Tumore des Nasen- und Rachenraums). ANDERSON et al. (1991) beurteilen den brine shrimp-Test als effektive Screening-Methode auf zytotoxische Aktivität und eine potentielle anti-Tumor-Aktivität.

Durchgeführt wird der Test mit Salinenkrebse, den sogenannten „brine shrimps“ (*Artemia salina*). Eine bestimmte Anzahl von frisch geschlüpften Nauplien dieser Krebse wird mit der zu untersuchenden Probe in künstlichem Meerwasser inkubiert. Nach einer definierten Inkubationszeit wird durch einfaches Auszählen der überlebenden und toten Krebse die Absterberate bestimmt (MEYER et al. 1982, MCLAUGHLIN et al. 1998). Als Standardsubstanz wird Podophyllotoxin (Podophyllinsäurelacton) verwendet, um die Funktion des Testsystems zu bestätigen. Es handelt sich dabei um ein antiviral, antineoplastisch und zytotoxisch wirkendes Lignan aus der Wurzel von *Podophyllum*-Arten, welches durch die Hemmung der Topoisomerase II als Mitosegift wirkt (CANEL et al. 2000). In dieser Arbeit wurden durchschnittliche Absterberaten der Shrimps durch Podophyllotoxin-Lösungen in den Konzentrationen 10, 100 und 500 µg/mL von circa 10, 45 und 80 % beobachtet. Ein Testdurchlauf wurde als erfolgreich angesehen, wenn diese Werte erreicht worden sind. Die Ergebnisse der Standardlösungen werden im Folgenden nicht angegeben, da sie nicht als Bezugswerte dienen.

Der Bioassay wurde bereits zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität vieler Substanzen verschiedener Klassen und Pflanzen herangezogen, wie zum Beispiel Pestizid-Rückständen, Mykotoxinen, marinen Pflanzen und verschiedenen anderen chemischen und pharmakologischen Verbindungen (CARBALLO et al. 2002, LIEBERMANN 1999).

2.9 Präparative Trenntechniken

2.9.1 Countercurrent Chromatography

Die Trenntechnik der Countercurrent Chromatography (CCC) wurde von ITO et al. (1966) in den sechziger Jahren entwickelt. Es handelt sich dabei um eine verteilungsschromatographische Trenntechnik, bei der zum Beispiel komplexe Pflanzenextrakte durch Verteilung zwischen zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen in Fraktionen unterschiedlicher Polarität getrennt werden. Die Trennmethode besitzt im Vergleich zu konventionellen Säulenchromatographie-Techniken mit festen stationären Phasen den Vorteil, dass die Kapazität der stationären Phase nicht limitiert ist und keine irreversible Adsorption auftritt. Durch die Entwicklung der „Multi-Layer Coil Countercurrent Chromatography“ (MLCCC) und der Weiterentwicklung zur „High-Speed Countercurrent Chromatography“ (HSCCC) Ende der achtziger Jahre konnte eine präparative Trenntechnik für Trennungen im Gramm-Bereich geschaffen werden, die eine Trennung und Reinigung einer Vielzahl von Pflanzenextrakten oder synthetischen Proben ermöglicht. In den letzten dreißig Jahren wurde eine große Anzahl an Forschungsergebnissen publiziert, die sich einerseits mit der Technik, deren Weiterentwicklung und neuen theoretischen Ansätzen befassen, und sich andererseits auf die praktische Anwendung der Technik fokussieren (ITO 2005, WEI et al. 2003, DU et al. 2003a, DEGENHARDT et al. 2000a und 2000b). Die Technik der Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) wurde erst ab dem Jahr 2000 als präparative Trenntechnik eingesetzt. Es handelt sich dabei um einen langsam rotierenden Coil, welcher eine wesentlich größere Probenaufgabemenge ermöglicht (DU et al. 2000).

Der Aufbau einer HSCCC- oder LSRCCC-Anlage besteht aus einer HPLC-Pumpe, einem Injektionsventil mit einer Probenschleife, der Trennsäule, einem Detektor und gegebenenfalls einem Fraktionssammler. Als Trennsäule wird ein „Multilayer Coil“

verwendet, welcher aus Polytetrafluorethylen-Schläuchen besteht und in mehreren Lagen um einen Säulenhalter gewickelt ist. Das eine Ende der Säule wird „head“ genannt und das andere Ende „tail“. Während der Trennung werden die Coils in Rotation gebracht, wodurch die stationäre Phase in der Trennsäule verbleibt und die Trennung stattfinden kann.

2.9.1.1 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Das Prinzip der Countercurrent Chromatography wird im Folgenden am Beispiel der High-Speed Countercurrent Chromatography erläutert. Die PTFE-Schläuche in der HSCCC besitzen in der Regel einen Innendurchmesser von 2,6 mm für präparative, 1,6 mm für semipräparative und 0,85 bis 1,0 mm für analytische Trennungen. HSCCC-Anlagen bestehen aus einem oder mehreren Coils, die sich auf einer Planetenbahn bewegen. Die planetare Bewegung wird erzeugt, indem die Trennsäule (Multilayer Coil, s. Abbildung 14 (A)) durch ein planetares Zahnrad um die eigene Achse, die Rotationsachse, rotiert und sich gleichzeitig mit der gleichen Geschwindigkeit ω und gleicher Richtung um die mit einem identischen Zahnrad ausgestattete Zentralachse (Revolutionsachse) bewegt. Diese 1:1 Zahnrad-Kopplung erlaubt eine planetare Bewegung der Halterung des Multilayer Coils, wodurch die beiden Hauptfunktionsweisen zur Durchführung der Countercurrent Chromatography erzeugt werden. Zum einen kann die mobile Phase kontinuierlich durch die rotierende Trennsäule fließen und zum anderen wird dadurch eine besondere hydrodynamische Bewegung zweier Lösungsmittelphasen in dem rotierenden System nach dem Prinzip der Archimedischen Schraube generiert (ITO 1992 und 2005). In dieser Arbeit wurde eine Triple-Coil HSCCC zur Trennung der Pflanzenextrakte benutzt.

Wenn zwei nicht miteinander mischbare Lösungsmittelphasen, in Abbildung 14 (B) als schwarze und weiße Phase dargestellt, sich in einer beidseitig geschlossenen Trennsäule befinden, würde bei einer Rotation die leichtere („weiße“ Phase) der beiden Phasen zum Head-Ende fließen und sich die schwerere („schwarze“ Phase) zum Tail-Ende bewegen. Dieses Prinzip wird in der CCC ausgenutzt. Zunächst wird der Coil vollständig mit der als stationäre Phase fungierenden Phase gefüllt und es wird schließlich die mobile Phase in das System gepumpt. Entweder wird die schwere Phase als mobile Phase gewählt und vom Head-Ende in das System befördert (s. Abbildung 14 (C), obere Grafik), oder die leichte als mobile Phase in den mit schwerer Phase gefüllten Coil vom Tail-Ende gesehen gepumpt (Abbildung 14 (C), untere Grafik) In beiden Fällen bewegt sich die mobile Phase schnell durch

den Coil und es wird ein großer Teil der jeweils anderen, welche als stationäre Phase fungiert, im Coil zurückgelassen (ITO 1992 und 2005).

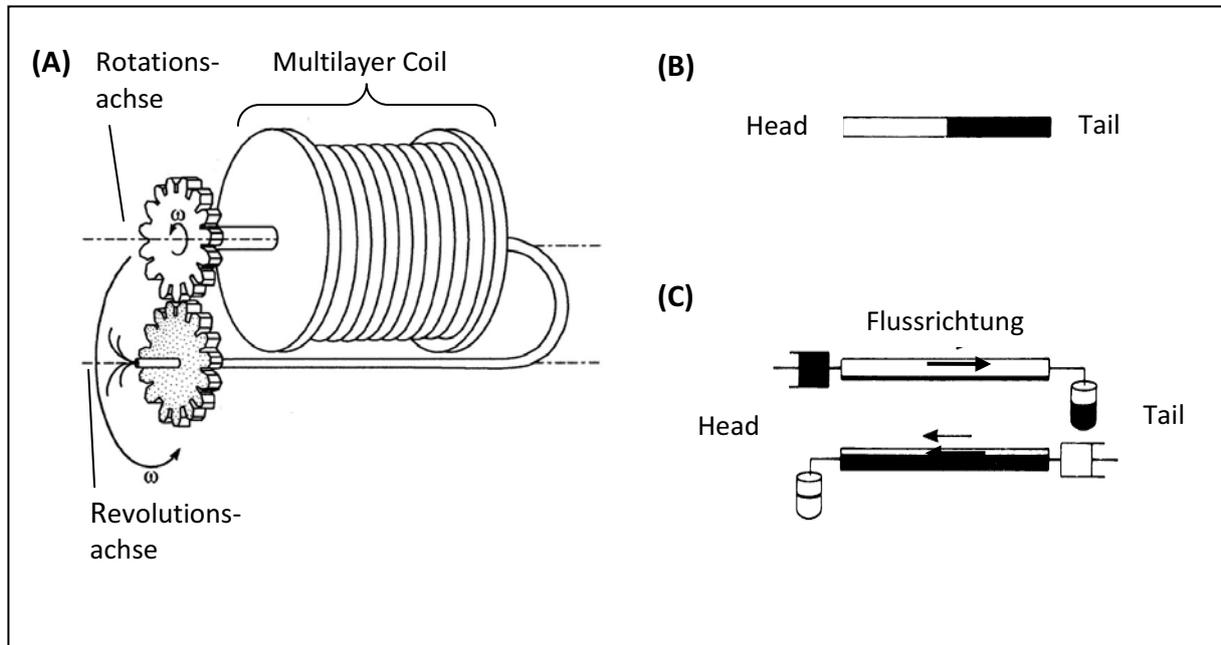


Abbildung 14: Planetare Bewegung eines Multilayer Coils (A), bilaterales hydrodynamisches Gleichgewicht in einem geschlossenen System (B), einseitige Elutionsmodi (C), nach ITO (2005)

Das Phasenmischverhalten in dem rotierenden Coil ist in Abbildung 15 (A) dargestellt. Es können im Coil zwei Bereiche unterschieden werden. Die Phasenmischzone (proximaler Bereich) beträgt schätzungsweise ein Viertel des Coils und ist nahe der Revolutionsachse im Zentrum zu finden, in der Abbildung als schwarzer Bereich skizziert. Der Bereich der Phasentrennung (distaler Bereich) stellt den übrigen Coil dar, in der Abbildung als weißer Bereich dargestellt. Abbildung 15 (B) zeigt die vier Positionen der Trennsäule von (A) gestreckt und in die vier Bereiche separiert. Die Zone der Phasenmischung wird demnach bei einer Revolution des Coils eine Runde bewegt (ITO 1992 und 2005).

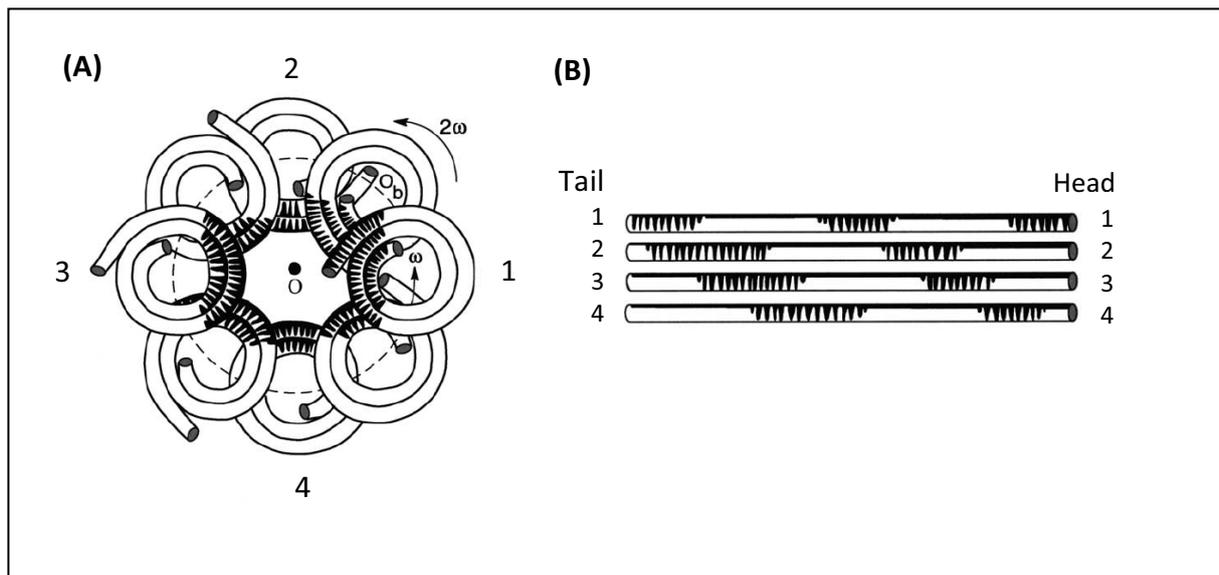


Abbildung 15: Phasenmischverhalten in einem rotierenden System (A), Bewegungverlauf der Mischzonen 1 bis 4 (B) nach ITO (2005)

Die Planetenbewegung führt demnach neben einer Retention der stationären Phase zu permanent wechselnden Kräften auf die beiden Phasen, woraus alternierende Mischungs- und Entmischungsvorgänge in der Trennsäule resultieren. Der eigentliche Verteilungsprozess findet dadurch statt, dass sich in den zur Revolutionsachse proximalen Windungen die beiden Phasen durchmischen (schwaches Kraftfeld) und im distalen Teil (starkes Kraftfeld) wieder trennen. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 800 rpm werden somit 13 Misch- und Entmischungsphasen pro Sekunde erreicht, welches die hohe Effizienz der High-Speed Countercurrent Chromatography ausmacht (ITO 2005).

Da die Trennung eines Stoffgemisches in der Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie durch eine Verteilung der Substanzen zwischen den beiden Phasen erfolgt, ist für den Erfolg der Trennung die Auswahl eines für das jeweilige Trennproblem geeigneten Fließmittelsystems wichtig. Normalerweise handelt es sich dabei um ein binäres, tertiäres oder quartäres Lösungsmittelgemisch, welches ein stabiles zwei-Phasensystem bildet. ITO (2005) beschreibt für verschiedene Substanzklassen eine Auswahl von Fließmittelsystemen, die zur Durchführung der HSCCC geeignet sind. Zur Auswahl eines Systems wird zunächst die Polarität der Zielverbindung bzw. dessen Verteilung in einem gewählten Fließmittelsystem ermittelt. Es gilt hierbei das Nernst'sche Verteilungsgesetz:

$$K = \frac{c \text{ (stationäre Phase)}}{c \text{ (mobile Phase)}}$$

(K = Verteilungskoeffizient, c = Konzentration)

Für eine erfolgreiche Trennung sollte der Verteilungskoeffizient der Zielverbindung einen Verteilungskoeffizienten von 0,5 bis 1,5 aufweisen. Ein Koeffizient kleiner als 0,5 führt zu einer schnellen Elution des Analyten mit unzureichender Trennung. Verteilungskoeffizienten größer als zwei haben sehr lang andauernde Trennungen zur Folge, bei der die zu trennenden Verbindungen unter Umständen auf dem Coil verbleiben. Weiterhin sind die physikochemischen Eigenschaften eines Lösungsmittelsystems für eine erfolgreiche Trennung entscheidend. Fließmittelsysteme mit niedriger Viskosität, hoher Grenzflächenspannung und großem Dichteunterschied weisen in der Regel ein geeignetes hydrodynamisches Phasenmischverhalten auf (ITO 1986). Für die Anthocyananalytik ist die Zugabe einer starken Säure wie Trifluoressigsäure (TFA) wichtig, um das ausschließliche Vorliegen der jeweiligen Flavylumformen zu garantieren (DEGENHARDT et al. 2000a).

2.9.1.2 Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC)

Bei der Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography können mit Rotationsgeschwindigkeiten von 20 bis 150 rpm Probenmengen von bis zu 500 g getrennt werden (DU et al. 2005). Bei dieser Trenntechnik werden spezielle PTFE-Trennschläuche, sogenannte „convoluted tubes“, eingesetzt, mit Innendurchmessern von mindestens 1,5 cm und helicalen Ausbuchtungen. Dieses führt zu einer effektiveren Retention der stationären Phase und zu einer gesteigerten Durchmischung der Phasen (DU et al. 2000 und 2003b, DU und ITO 2003). Die Säulenhalterung ist horizontal ausgerichtet und dreht sich bei Rotation um die eigene Achse. Abhängig von den Fließmitteleigenschaften ist ein hydrodynamisches Fließverhalten der schweren Phase zum Head-Ende des Coils zu beobachten. In Abbildung 16 ist ein Prototyp einer LSRCCC-Anlage abgebildet, die vom Institute of Food and Biological Engineering der Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, China entworfen wurde, und welche auch in dieser Arbeit zur Trennung verwendet wurde. Das Coilvolumen von den insgesamt drei Lagen beträgt 40 Liter, die convoluted PTFE-Schläuche weisen einen Innendurchmesser von 1,7 cm auf und die Coilhalterung besitzt eine Gesamtlänge von 2,2 m (DU et al. 2005).

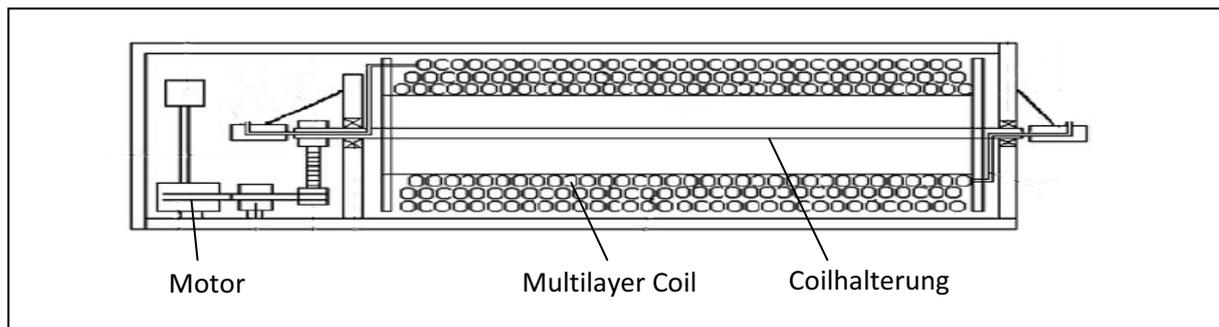


Abbildung 16: Prototyp einer LSRCCC-Anlage nach DU et al. (2005)

In der LSCCC reichen Rotationsgeschwindigkeiten von bis zu 100 rpm zur Ausbildung des hydrodynamischen Fließverhaltens aus. Im Gegensatz zur HSCCC ist dabei ein Fließverhalten der schweren Phase zum Head-Ende zu beobachten. Auf Grund der nicht vorhandenen Planetenbewegung des Coils ist das Prinzip des hydrodynamischen Gleichgewichts ausschlaggebend. Erst bei hohen Rotationsgeschwindigkeiten nehmen die radialen Kräfte (Fliehkräfte) zu, die jedoch im Vergleich zur HSCCC in sehr abgeschwächter Form auftreten (KÖHLER 2006).

2.9.2 Gelchromatographie an Sephadex LH-20

Die präparative Säulenflüssigkeits-Chromatographie stellt einen wesentlichen Bestandteil bei der Trennung von Naturstoffen und der Isolierung von Verbindungen dar. Sephadex LH-20 hat sich dabei als Trennmateriale bei der Trennung von Pflanzenextrakten bewährt (AMAROWICZ et al. 2003, KANTZ und SINGLETON 1991). Neben dem Molekularsiebeffekt führen hierbei auch Adsorptionen an das Säulenmateriale zu einer chromatographischen Trennung. Bei Sephadex LH-20 handelt es sich um ein lipophiles und gleichzeitig hydrophiles Dextrangel. Durch Hydroxypropylierung des mit Epichlorhydrin quervernetzten Dextrans wird eine zusätzliche Lipophilisierung erreicht, die es ermöglicht, mit organischen Lösungsmitteln auch lipophile Substanzgemische zu trennen. Die Hydrophilie wird von den zahlreichen Hydroxyl-Funktionen verursacht. Diese strukturellen Eigenschaften ermöglichen eine Quellung von Sephadex LH-20 sowohl in schwach-, mittel- als auch in stark polaren Lösungsmitteln, wobei der Quellungsgrad mit zunehmender Polarität der mobilen Phase ebenfalls zunimmt. Bei stärkster Quellung, wie in Wasser, Dimethylsulfoxid oder Methanol beträgt die Ausschlussgrenze 4000 Da. Moleküle mit einer größeren Molmasse können

demnach nur das Zwischenkornvolumen passieren und eluieren sofort, ohne eine vorherige Trennung. Neben der Trennung nach dem Molekularsiebeffekt nach abnehmenden Molmassen der Verbindungen können auch sehr selektive Trennungen mit verschiedenen reinen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Dabei sind die adsorptionschromatographischen Trennungen von Verbindungen mit einer Molmasse von weniger als 1000 Da am effektivsten. Ein gut lösliches Substanzgemisch in dem gewählten Lösungsmittel stellt in der Regel eine Trenngarantie dar. Die Verwendung von Methanol als mobile Phase führt zu einer selektiven Retardierung aromatischer und heterocyclischer Verbindungen, welches sich bei der Trennung von Flavonoiden als geeignet erweist (HENKE 1994).

DU et al. (2001) und GUTZEIT et al. (2007) vergleichen in einer Studie zur Trennung von Pflanzenextrakten die beiden chromatographischen Trenntechniken der HSCCC und der Sephadex LH-20 miteinander. Mit beiden Techniken werden ähnliche Ergebnisse erhalten, wobei die Trennung mit Sephadex LH-20 eine längere Trennzeit erfordert. RAMOS et al. (2004) setzen eine Kombination von HSCCC und Sephadex LH-20 erfolgreich zur Trennung eines Extrakts von Avocado-Samen ein.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Extraktion und Probenaufarbeitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pflanzenteile von vier verschiedenen Pflanzenarten untersucht. Diese besitzen entweder eine große Bedeutung in der chinesischen Ernährung oder werden in der Traditionellen Chinesischen Medizin verwendet. Die Pflanzenteile sind violett gefärbt. Diese Pigmentierung wird von Anthocyanen verursacht, deren Analytik einen Schwerpunkt in dieser Arbeit darstellt. Eine fotografische Darstellung der untersuchten Pflanzenteile findet sich in Abbildung 17.

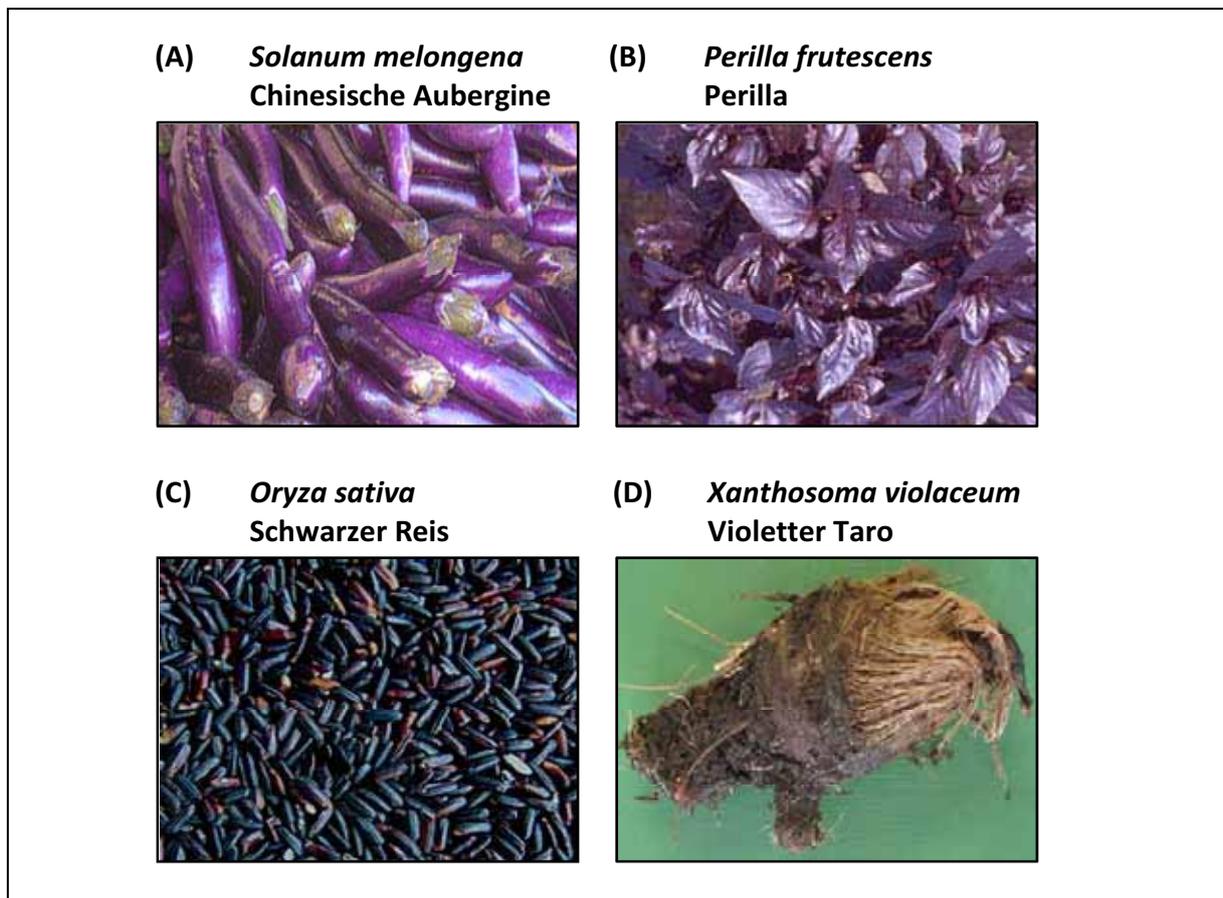


Abbildung 17: Beeren von *Solanum melongena*, (B) Blätter von *Perilla frutescens*, (C) Samen von *Oryza sativa*, (D) Rhizome von *Xanthosoma violaceum*

Die Beeren der Aubergine sowie die Rhizome des violetten Taros wurden im Jahr 2004 und 2005 von Mitarbeitern des Institute of Food and Biological Engineering der Zhejiang

Gongshang University in Hangzhou, China, zerkleinert, gefriergetrocknet und versendet. Von dort stammen auch die Samen des Schwarzen Reis, welche intakt und ungeschliffen im Jahr 2005 erhalten wurden. Weiterhin wurden Blätter von *Perilla frutescens* untersucht, welche einer Ernte 2006 eines Versuchsfeldes des Botanischen Gartens der Technischen Universität Braunschweig entstammen und dort getrocknet wurden. Oberirdische Pflanzenteile von *Xanthosoma violaceum* wurden im Jahr 2006 ebenfalls in dem Botanischen Garten geerntet.

Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde zunächst mit Hilfe einer Mühle (Retsch-Mühle S 1) zerkleinert und anschließend einer fraktionierten Flüssig-Flüssig-Extraktion unterzogen.

3.1.1 Fraktionierte Flüssig-Flüssig-Extraktion

Eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durch Ausschütteln mit Extraktionsmitteln unterschiedlicher Polaritäten diente dem Ziel, Substanzen verschiedener Verbindungsklassen zu fraktionieren. In Abbildung 18 ist das Extraktionsschema dargestellt.

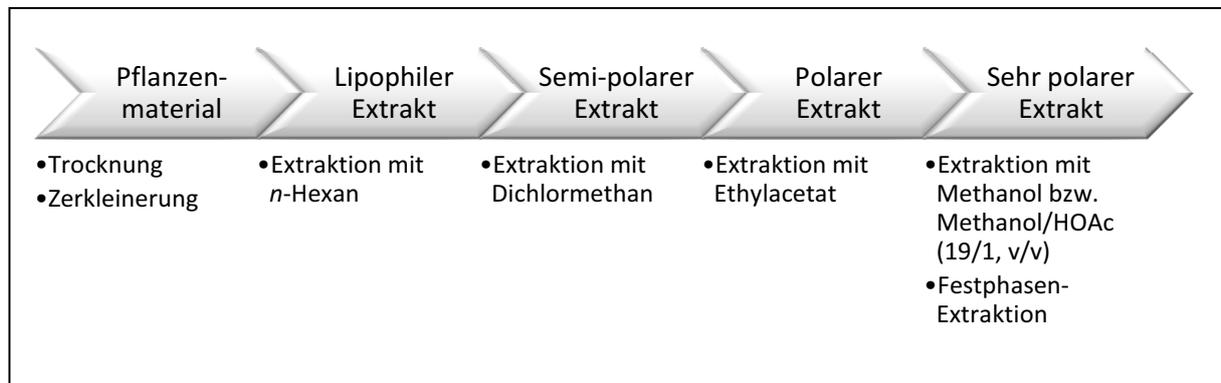


Abbildung 18: Fließschema der Flüssig-Flüssig-Extraktion

Zunächst wurde das getrocknete und zerkleinerte Pflanzenmaterial mit dem lipophilen Lösungsmittel *n*-Hexan extrahiert, um Chlorophyll, Oberflächenwachse und Fette zu entfernen. Daraufhin erfolgte eine Behandlung des Pflanzenmaterials mit Dichlormethan, um semi-polare Verbindungen aus dem Pflanzenmaterial zu erhalten. Eine weitere Extraktion mit Ethylacetat führte zu der Extraktion von polaren Verbindungen, wie Flavonoiden. Schließlich führte eine Extraktion mit einer Mischung aus Methanol und Essigsäure im Verhältnis von 19:1 (v/v) zu einer Abtrennung von sehr polaren Verbindungen, wie Hydroxyzimtsäure-Derivaten oder Flavonoiden, insbesondere der Anthocyane.

Der Säurezusatz ist für die Extraktion von Anthocyanen von entscheidender Bedeutung. Dieser führt zu einer Stabilisierung des Anthocyan-Moleküls durch Ausbildung der Flavylumkation-Struktur, welche bei niedrigem pH-Wert dominiert und die stabilste Anthocyanstruktur darstellt (MAZZA und MINIATI 1993) (s. Abbildung 9, S. 19). Weiterhin wurde das Pflanzenmaterial der Aubergine zusätzlich mit Methanol ohne Säurezusatz behandelt, welches sich zur Extraktion phenolischer Polyamide eignet.

3.1.2 Festphasenextraktion an Amberlite® XAD-7

Polyphenole werden zur weiteren Aufarbeitung durch Festphasenextraktion an Amberlite® XAD-7 angereichert. Es handelt sich dabei um ein schwach polares Acrylsäureester-Polymer, welches phenolische Verbindungen adsorbiert. Proteine, Aminosäuren, Zucker, hydrophile organische Säuren und Salze können nach Waschvorgängen mit Wasser eliminiert werden. Die Elution der Polyphenole erfolgt anschließend durch Methanol oder durch Methanol mit Essigsäure-Zusatz bei dem Vorliegen von Anthocyanen. Aus dem Eluat kann das Methanol anschließend durch Destillation entfernt und der Extrakt nach Zusatz von Wasser lyophilisiert werden. Das Lyophilisat kann schließlich direkt zur Trennung mittels High-Speed- oder Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography eingesetzt werden.

3.1.3 Analytik und Strukturaufklärung der Fraktionen und Pflanzeninhaltsstoffe

Bei den untersuchten und isolierten Substanzen handelte es sich ausschließlich um phenolische aromatische Verbindungen. Für die Analytik wurde eine HPLC-Anlage mit einem Diode Array Detektor bevorzugt. Die Trennung erfolgte mit Hilfe von RP12 und RP18-HPLC-Säulen. Zur Einteilung der Fraktionen nach präparativen Trennungen wurde auch die dünnschichtchromatographische Analyse herangezogen. Als stationäre Phasen dienten Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator, Cellulose- und RP18-Platten. Als Sprühreagenz hat sich zur Detektion das Anisaldehydreagenz nach STAHL (1967) bewährt. Die Strukturaufklärung erfolgte durch ESI-Massenspektrometrie und eindimensionaler sowie zweidimensionaler NMR-Spektroskopie. Zur Charakterisierung wurden weiterhin UV-Spektren herangezogen.

3.2 Antioxidative und zytotoxische Aktivität der Pflanzenextrakte

In dieser Arbeit steht die Fraktionierung und Isolierung von Verbindungen im Vordergrund, denen eine antioxidative Aktivität *in vitro* nachgewiesen wird und/oder Substanzen, bei denen sich Hinweise auf eine zytotoxische Aktivität *in vivo* ergeben. Zur Auswahl relevanter Substanzgemische wurde zunächst ein Screening der Extrakte der fraktionierten Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt. In Abbildung 19 bis Abbildung 22 sind die Ergebnisse des TEAC- und des „Brine-shrimp“-Tests der Pflanzenextrakte dargestellt. Für weitere Untersuchungen und Trennungen wurden nur die aktiven Extrakte ausgewählt.

Die Extrakte der Aubergine weisen im Vergleich zu denen der anderen Pflanzen die größten antioxidativen und zytotoxischen Aktivitäten auf (s. Abbildung 19). Zur weiteren Untersuchung wurden der polare essigsäure Methanol-Extrakt und der methanolische Extrakt ausgewählt. Dem essigsäuren Extrakt konnte eine antioxidative Aktivität von 2,91 mmol Trolox/g nachgewiesen werden. Der Schwerpunkt wurde daher auf die Isolierung antioxidativer polyphenolischer Verbindungen gesetzt. Bei dem methanolischen Extrakt standen Verbindungen im Vordergrund, die Hinweise auf eine zytotoxische Aktivität lieferten.

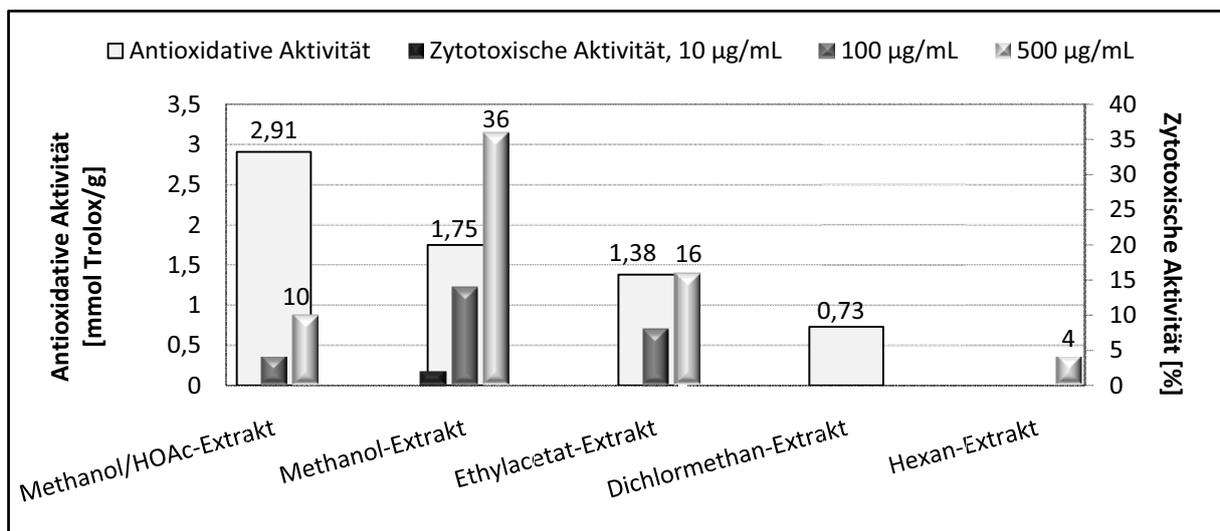


Abbildung 19: Antioxidative und zytotoxische Aktivitäten der *Solanum melongena*-Extrakte

Der Ethylacetat-Extrakt wies nach einer HPLC-DAD-Analyse eine ähnliche Zusammensetzung auf wie der methanolische Extrakt und wurde nicht weiter untersucht. Der Dichlormethan-

und Hexan-Extrakt wiesen geringe Aktivitäten auf und wurden ebenfalls nicht weiter separiert. In diesem Zusammenhang muss auf die eventuell geringe Löslichkeit des Dichlormethan- und des Hexan-Extraktes bei der Durchführung des TEAC und des Brine-shrimp-Tests hingewiesen werden. Möglicherweise sind die geringen Aktivitäten auch daraufhin zurückzuführen.

Nennenswerte zytotoxische Aktivitäten konnten bei den Extrakten von *Perilla frutescens* nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 20). Der Focus richtete sich hierbei auf polare Polyphenole aus dem essigsauren Methanol-Extrakt, die insgesamt eine antioxidative Aktivität von 1,31 mmol Trolox/g aufweisen.

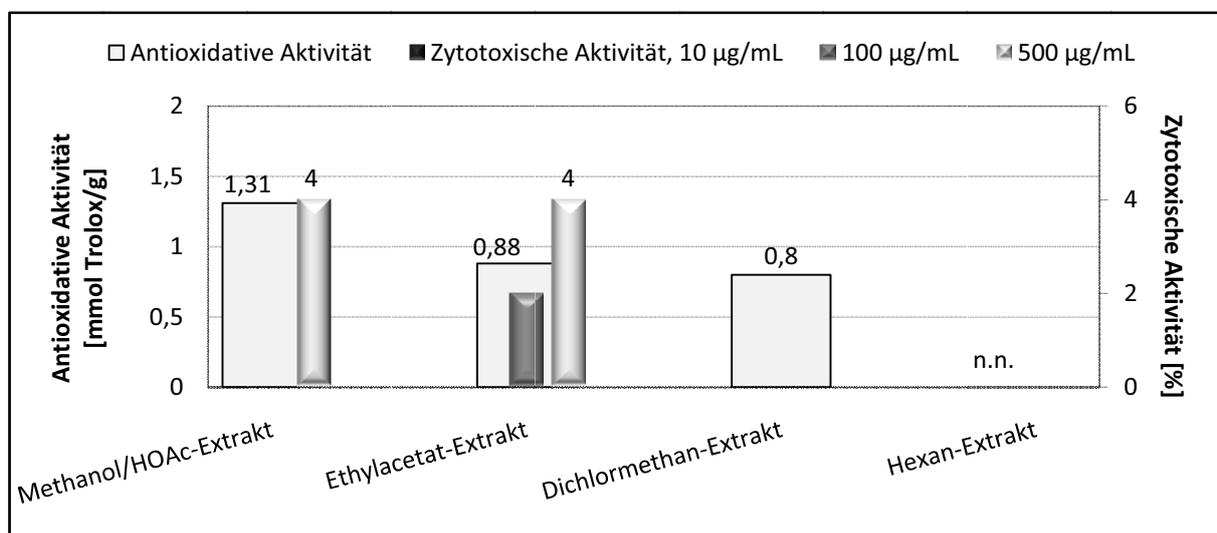


Abbildung 20: Antioxidative und zytotoxische Aktivität der *Perilla frutescens*-Extrakte

Bei dem schwarzen Reis wurde ähnlich wie bei *Perilla* der Schwerpunkt auf antioxidative Verbindungen aus dem essigsauren methanolischen Extrakt gesetzt (s. Abbildung 21). Antioxidative und zytotoxische Aktivitäten konnten im Ethylacetat, Dichlormethan- und Hexan-Extrakt kaum oder nicht nachgewiesen werden und wurden somit im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

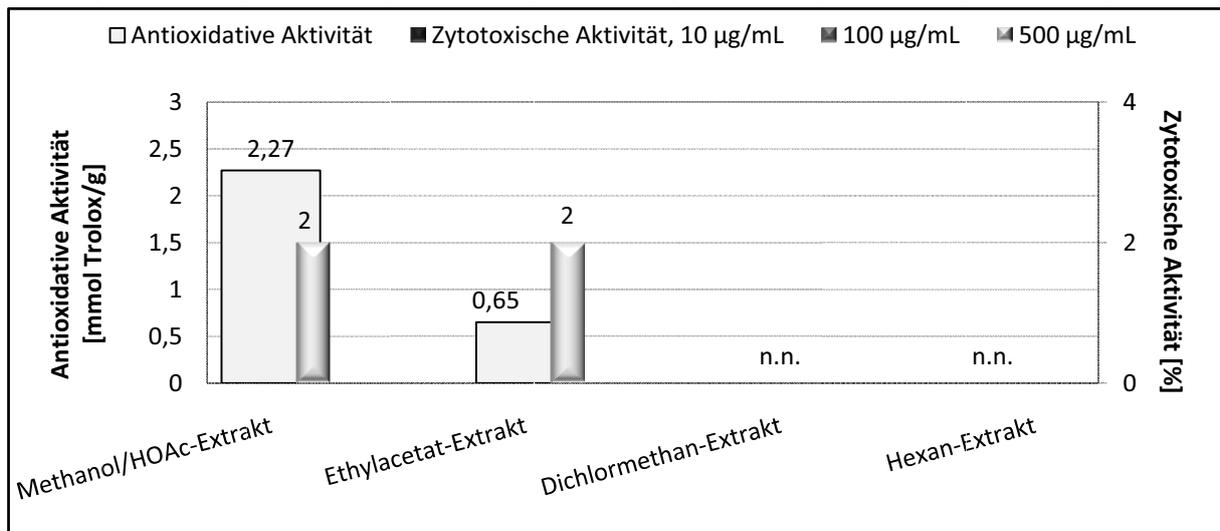


Abbildung 21: Antioxidative und zytotoxische Aktivität der *Oryza sativa*-Extrakte

Die Ausbeuten der Taro-Extrakte nach der fraktionierten Extraktion waren sehr gering, so dass eine detaillierte Untersuchung des essigsauren Methanol-Extraktes im Hinblick auf antioxidative Verbindungen und die Analyse des Ethylacetat-Extraktes hinsichtlich der antioxidativen und hohen zytotoxischen Aktivität nur eingeschränkt möglich war (s. Abbildung 22).

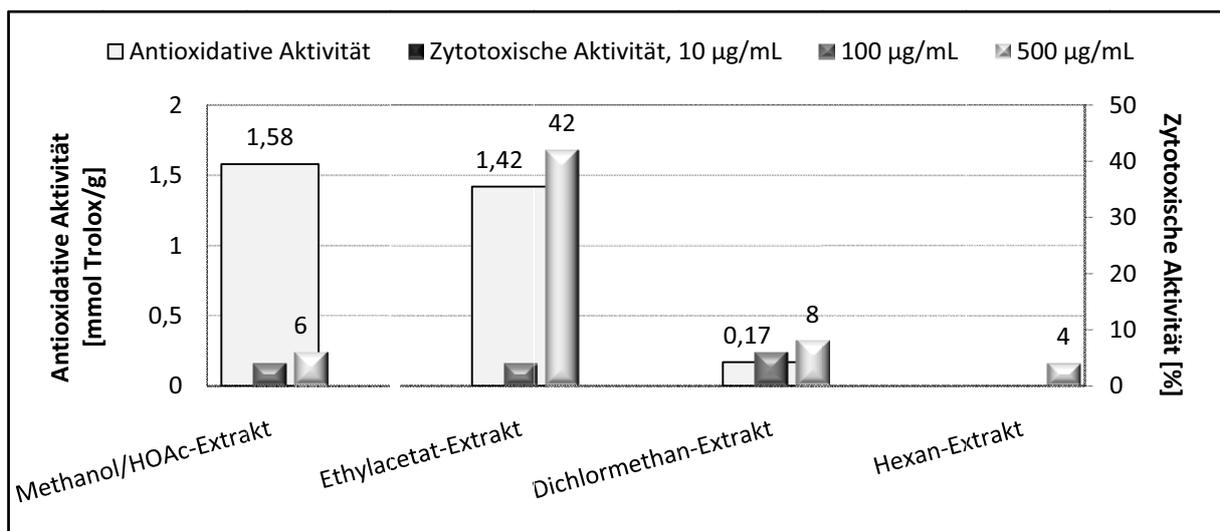


Abbildung 22: Antioxidative und zytotoxische Aktivität der *Xanthosoma violaceum*-Extrakte

3.3 Isolierung von Verbindungen aus der Aubergine (*Solanum melongena*)

3.3.1 Trennung und Isolierung der Hydroxyzimtsäureamide

Den ersten Hinweis auf das Vorliegen von stickstoffhaltigen Verbindungen im methanolischen Extrakt lieferten die Massenspektren einer LC-ESI-MSⁿ-Analyse. Durch das Vorliegen ungerader Massen der Molekülionen konnte auf eine ungerade Anzahl von Stickstoffatomen geschlossen werden.

Von verschiedenen Arten der Pflanzenfamilie der Solanaceen, wie *Lycium chinense*, *Solanum tuberosum* oder *Lochroma cyaneum* und auch *Solanum melongena* wurden Hydroxyzimtsäureamid-Derivate beschrieben (SATTAR et al. 1990, PARR et al. 2005, FUNAYAMA et al. 1980, WHITAKER und STOMMEL 2003). Durch einen Vergleich der Massendaten mit denen der Literatur wurden Hydroxyzimtsäureamide bzw. Caffeoylspermidinderivate vermutet, die durch Anwendung der High-Speed Countercurrent Chromatography getrennt und anschließend identifiziert wurden. Spermidinderivate werden weiterhin in der Literatur als Substanzen mit zytotoxischer Aktivität beschrieben, wodurch die hohe Aktivität des methanolischen Extraktes im Brine-shrimp-Test erklärt werden konnte (WU et al. 2007, KALAČ und KRAUSOVÁ 2005).

In Abbildung 23 ist ein HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes dargestellt. Es handelt sich hauptsächlich um vier Hydroxyzimtsäureamid-Derivate, die Retentionszeiten von 27 bis 33 Minuten aufweisen. Auf die Trennung der Chlorogensäure-Isomere, die ebenfalls in dem Extrakt vorkommen, wird in Kapitel 3.3.3.1 näher eingegangen.

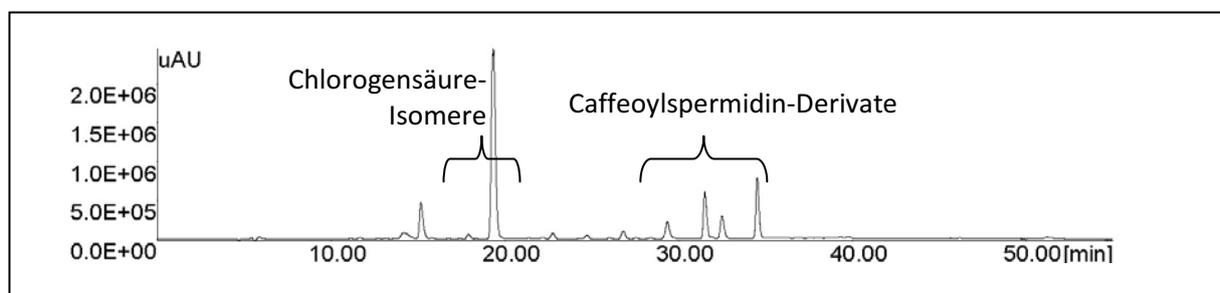


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes bei 290 nm

Die Trennung des methanolischen Extraktes wurde mittels einer HSCCC-Anlage und einem Fließmittelsystem, bestehend aus Ethylacetat, *n*-Butanol, Wasser (3/2/5, v/v/v), einer Rotationsgeschwindigkeit von 800 rpm und einer Flussrate von 3 mL/min durchgeführt. Es konnten maximal 400 mg des Extraktes eingesetzt werden, um eine ausreichende Trennung zu gewährleisten. In Abbildung 24 ist das Chromatogramm bei einer Absorption von 290 nm dargestellt.

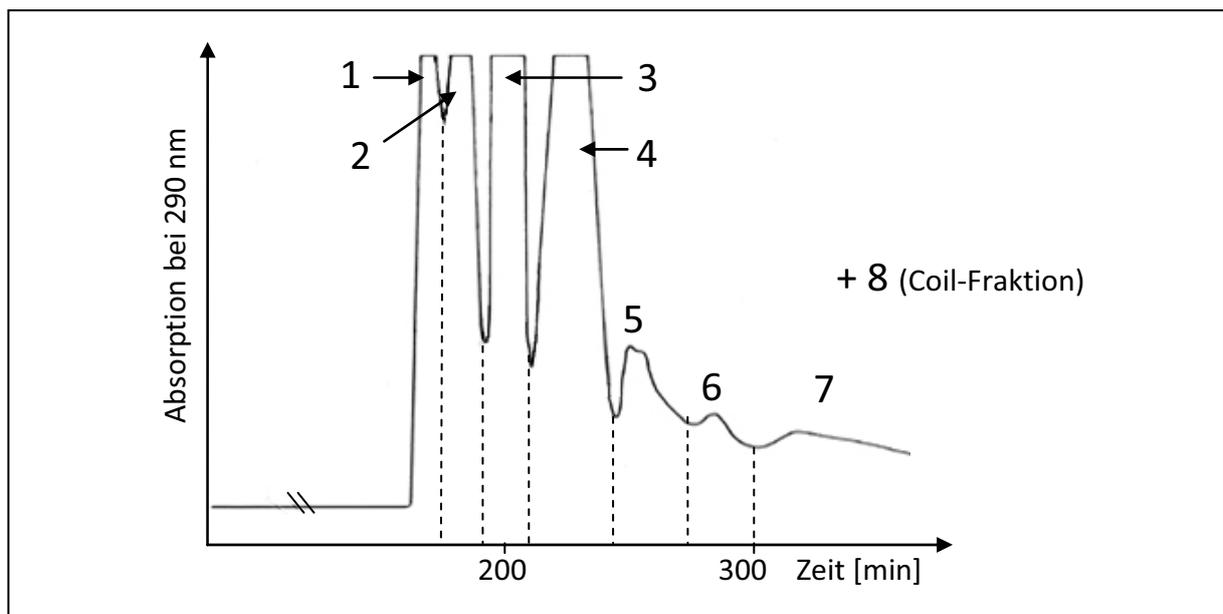


Abbildung 24: HSCCC-Chromatogramm der Trennung des methanolischen Extraktes

Anhand des UV-Chromatogramms konnten einschließlich der auf dem Coil retardierten Fraktion sieben Fraktionen eingeteilt werden. In Abbildung 25 sind die HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 1 bis 4 dargestellt, auf die bei weiteren Analysen und Trennungen der Schwerpunkt gesetzt wurde.

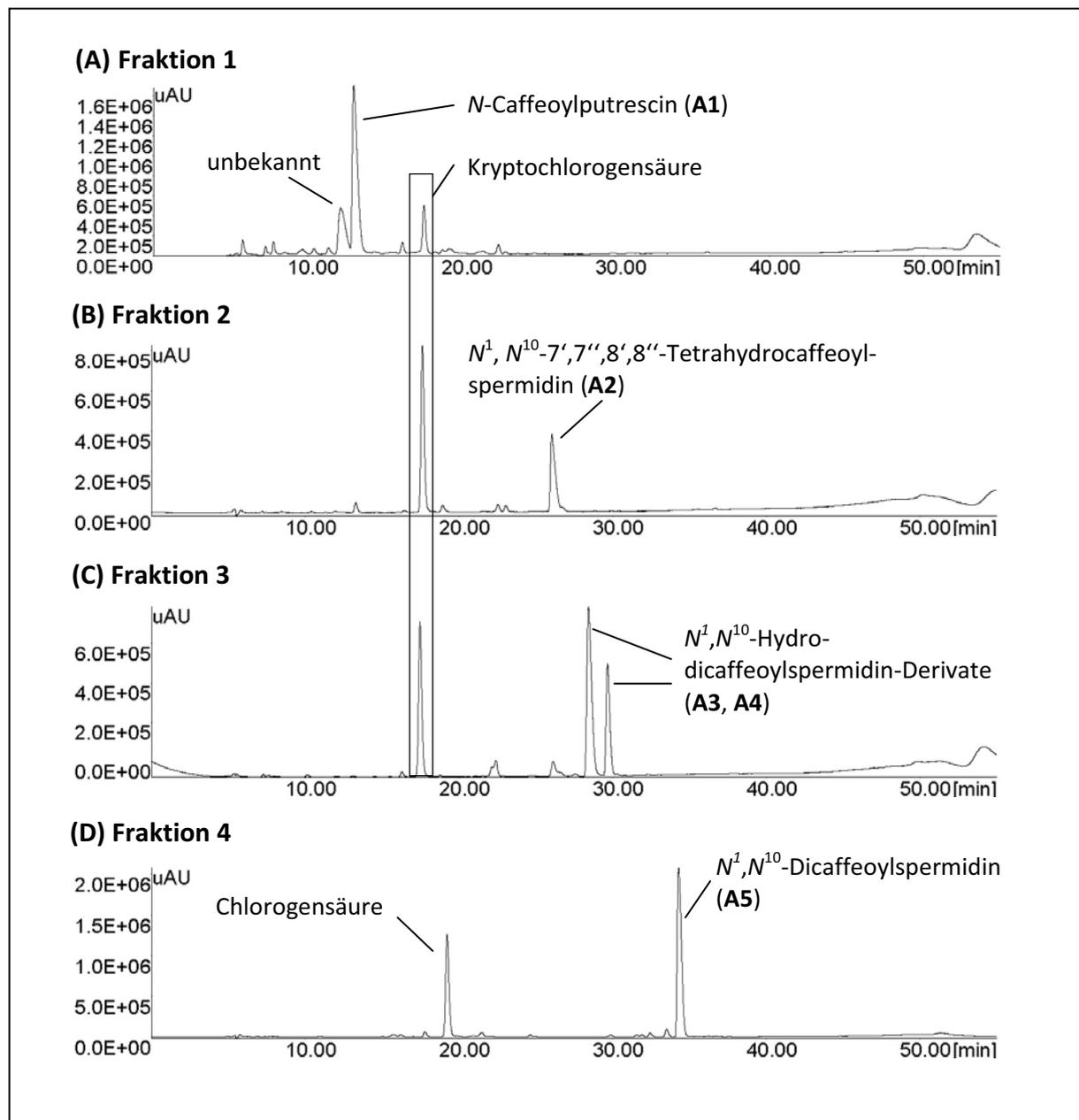


Abbildung 25: (A - D) HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 1 bis 4 der HSCCC-Trennung des methanolischen Auberginen-Extraktes bei 290 nm

Die Methode der HSCCC konnte erfolgreich zur Trennung der Hydroxyzimtsäure-Derivate **A1** bis **A5** eingesetzt werden. In allen Fraktionen konnten zusätzlich Chlorogensäure-Isomere nachgewiesen werden. Für die Isolierung der Hydroxyzimtsäureamide waren daher weitere Trennungen mit präparativer HPLC notwendig (Methoden s. Kapitel 5.4.3).

HSCCC-Fraktion 1 enthält neben einer unbekanntem Verbindung und Kryptochlorogensäure *N*-Caffeoylputrescin (**A1**). Das Diamin Putrescin (1,4-Diaminobutan) stellt in der Pflanze eine

Vorstufe von weiteren Polyaminen dar. Es wird in der Biosynthese in Pflanzen und einigen Bakterien aus der Aminosäure Arginin gebildet.

In Pflanzen kommen Polyamine oft in Form von Polyamin-Konjugaten vor, die zum Beispiel als Säureamide mit Hydroxyzimtsäure-Derivaten verestert vorliegen (GENESTE und HESSE 1998). Die Struktur von **A1** wurde durch massenspektrometrische Daten und durch einen Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Referenzdaten von SATTAR et al. (1990) bestimmt. Die NMR-Daten der isolierten Hydroxyzimtsäureamid-Derivate **A1** bis **A5** sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 ab Seite 57 dargestellt. Das Massenspektrum und die Struktur zeigt Abbildung 26.

Die Molekülmasse von **A1** beträgt im positiven Modus m/z 251 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Das Hauptfragment mit m/z 234 entsteht durch die Abspaltung der Aminofunktion und das Fragment mit m/z 163 $[\text{M}+\text{H}-88]^+$ durch Eliminierung des Kaffeesäurerestes zwischen C-9' und N-6.

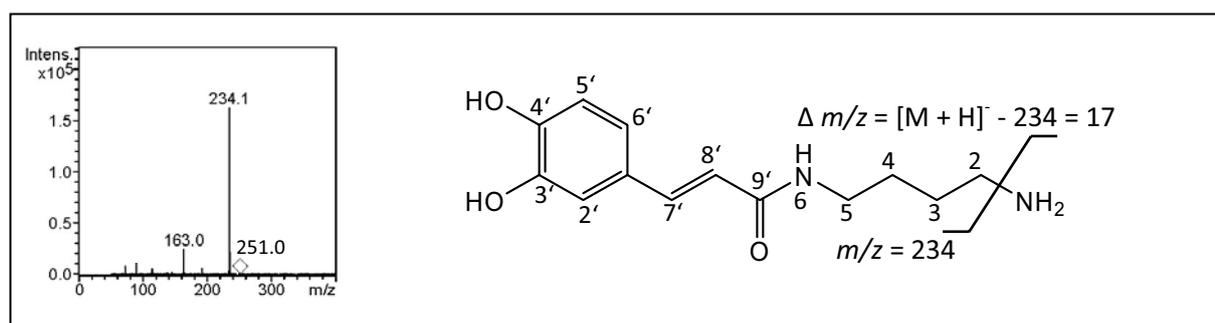


Abbildung 26: Massenspektrum (MS^2 , positiver Modus) und Struktur von *N*-Caffeoylputrescin (A1**), $[\text{M} + \text{H}]^+ = 251$**

N^1, N^{10} -7',7'',8',8''-Tetrahydrocaffeoylspermidin (**A2**), welches aus der Fraktion 2 isoliert wurde, konnte von SATTAR et al. (1990) bereits aus dem Blauen Veilchenstrauch (*Lochroma cyaneum*) isoliert werden, welcher ebenfalls eine Pflanzenart aus der Familie der Solacaceen darstellt. In *Solanum melongena* konnte dieses Spermidinderivat bislang noch nicht identifiziert werden. In Abbildung 27 ist das Massenspektrum und die Struktur der Verbindung dargestellt. Das Molekül besteht aus Spermidin, welches mit zwei Molekülen Kaffeesäure verestert ist. Die Bindungsspaltung erfolgt zwischen C-4 und der mittleren sekundären Aminogruppe des Spermidinrests, wodurch das Fragment m/z 222 $[\text{M}+\text{H}-252]^+$ entsteht. Das Fragment mit m/z 165 entsteht durch Eliminierung der Dihydrokaffeesäurereste. Zur vollständigen Strukturaufklärung wurden ^1H - und ^{13}C -NMR-

Daten mit Referenzdaten verglichen und bestätigt (SATTAR et al. 1990) (s. Tabelle 3 und Tabelle 4).

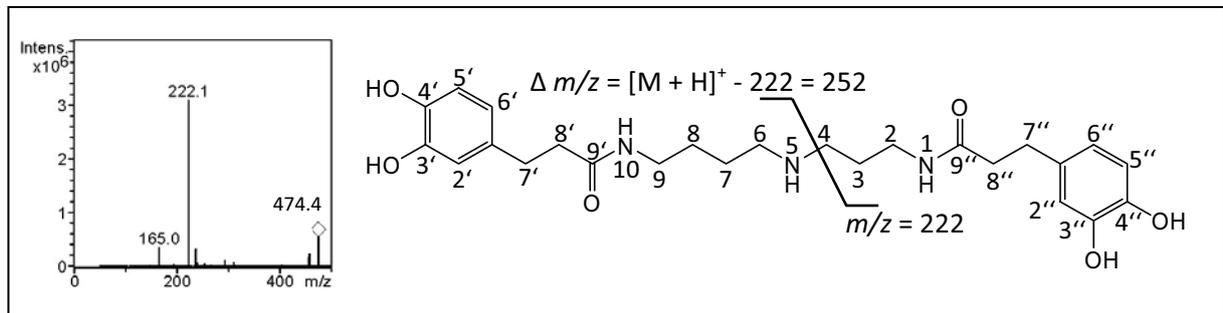


Abbildung 27: Massenspektrum (MS^2 , positiver Modus) und Struktur von N^1, N^{10} -7', 7'', 8', 8''-Tetrahydrocaffeoylspermidin (A2), $[M + H]^+ = 474$

HSCCC-Fraktion 3 besteht aus einem Gemisch von zwei N, N' -Hydrodicaffeoylspermidin-Derivaten, die bei 28,1 und 29,5 Minuten eluieren. Deren Molekülonen weisen mit m/z 472 $[M+H]^+$ eine identische Masse auf; die Fragmentierungsmuster differieren jedoch um zwei Masseneinheiten der Hauptfragmente. In Abbildung 28 sind die MS^2 -Massenspektren und die Strukturen der beiden Verbindungen dargestellt. Die Fragmentierung findet an der gleichen Position statt wie in **A2**.

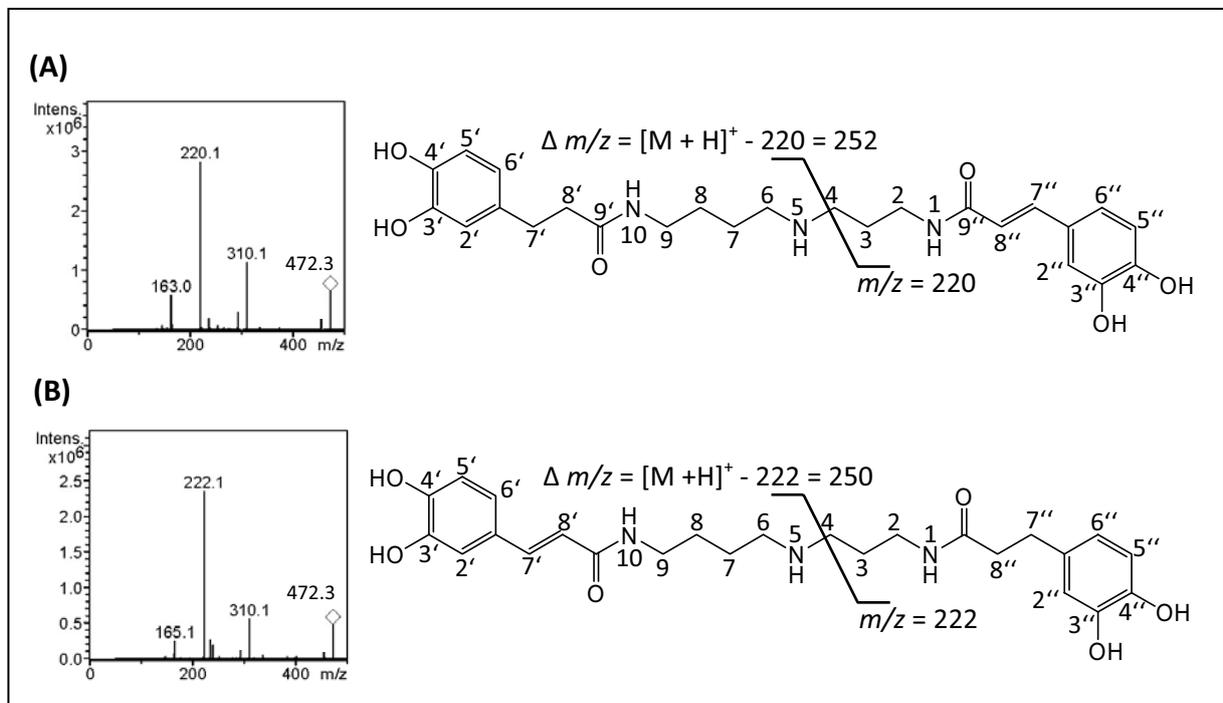


Abbildung 28: Massenspektren (MS^2 , positiver Modus) und Strukturen von (A) N^1 -Caffeoyl- N^{10} -7', 8'-dihydrocaffeoylspermidin (A3) und (B) N^{10} -Caffeoyl- N^1 -7'', 8''-dihydrocaffeoylspermidin (A4), $[M + H]^+ = 472$

Bei der Verbindung N^1 -Caffeoyl- N^{10} -7',8'-dihydrocaffeoylspermidin (**A3**) entsteht ein Hauptfragment mit m/z 220. Die Differenz zur Molekülmasse beträgt $\Delta m/z$ 252. Bei der Verbindung N^{10} -Caffeoyl- N^1 -7'',8''-dihydrocaffeoylspermidin (**A4**) entsteht das Fragment m/z 222, mit einer Differenz von $\Delta m/z$ 250. Diese Differenz von zwei Masseneinheiten ist auf die unterschiedliche Position der Doppelbindung der Hydroxyzimtsäuren zurückzuführen. Die Fragmente mit m/z 310, die in beiden Spektren erscheinen, resultieren aus der Abspaltung von Kaffeesäure $[M+H-162]^+$. Weiterhin ist im Massenspektrum von **A3** das Fragment einer eliminierten Kaffeesäure mit m/z 163, und in dem Spektrum von **A4** das der Dihydrokaffeesäure mit m/z 165 zu erkennen. WHITAKER und STOMMEL (2003) beschreiben in einer Publikation über Hydroxyzimtsäure-Konjugate in den Beeren der Aubergine die beiden Derivate mit identischen Massen der Molekülonen und unterschiedlichen Retentionszeiten, konnten jedoch deren Struktur nicht aufklären.

Da es sich bei den Verbindungen **A3** und **A4** um bislang unbekannte Verbindungen handelt, wurden zur vollständigen Strukturaufklärung zweidimensionale NMR-Spektren herangezogen. Dies wird auf S. 60 bis 62 beschrieben.

In Fraktion 4 konnte schließlich N^1, N^{10} -Dicafeoylspermidin (**A5**) mit einer Masse des Molekülonen von m/z 470 $[M+H]^+$ und dem Hauptfragment mit m/z 220 $[M+H-250]^+$ isoliert werden. Vermutlich wird dieses Derivat genuin gebildet, wohingegen die drei anderen Spermidinderivate Artefakte darstellen, die entweder in der Beere oder bei der Aufarbeitung des Pflanzenextraktes entstanden sein könnten. WHITAKER und STOMMEL (2003) isolierten diese Verbindung bereits aus der Aubergine. Ein Vergleich dieser NMR-Referenzdaten wurde zur Strukturaufklärung herangezogen. In Abbildung 29 ist die Struktur dargestellt. Es handelt sich dabei um Spermidin, welches mit zwei Kaffeesäureresten an N-1 und N-10 verestert ist.

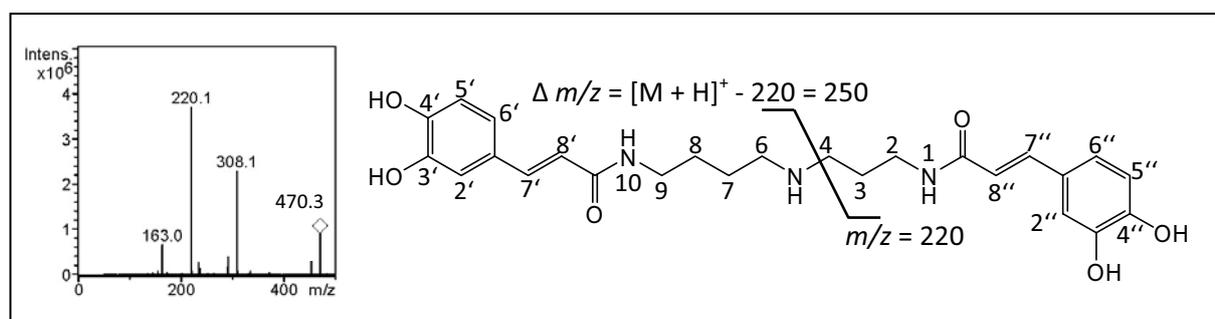


Abbildung 29: Massenspektrum (MS^2 , positiver Modus) und Struktur von N^1, N^{10} -Dicafeoylspermidin (A5**), $[M + H]^+ = 470$**

Die ähnlichen Fragmentierungsmuster geben wesentliche Hinweise auf die Strukturen und Positionen der Doppelbindungen der Spermidinderivate. Die Moleküle weisen entweder m/z 473, 471 oder m/z 469 auf, d.h. sie differieren um bis zu vier Protonen an den Positionen 7' und 8' und/oder 7'' und 8''. Weiterhin zeigen die Spermidinderivate **A1**, **A3**, **A4** und **A5** im UV-Spektrum aufgrund der Doppelbindungen zwischen C-7' und C-8', bzw. C-7'' und C-8'' der Kaffeesäuren, zwei Absorptionsbanden bei 290 und 320 nm. Die Verbindung **A2** besitzt dagegen nur ein Absorptionsmaximum bei 281 nm (s. Abbildung 87 im Anhang).

Zur Strukturaufklärung werden weiterhin ^1H -, ^{13}C -NMR und DEPT 135-Spektren herangezogen. Die ^{13}C -NMR-Spektren der Verbindungen **A2** bis **A5** zeigen zwei Carbonyl-Signale und sechs quartäre C-Signale (s. Tabelle 3). Ein Vergleich der DEPT-135-Spektren der Verbindungen **A3** und **A4** mit **A2** und **A5** führt durch die Differenzierung zwischen primären, sekundären, tertiären und quartären C-Atomen zu dem Ergebnis, dass durch das Fehlen von zwei Methylen-Signalen in den Spektren von **A3** und **A4** beide Moleküle jeweils eine zusätzliche Doppelbindung aufweisen im Vergleich zu **A2**, bzw. eine Doppelbindung weniger als **A5**. Die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 3 hervorgehoben. Eine Doppelbindung führt zu einer Tieffeldverschiebung des Kohlenstoffatoms von circa δ 139 ppm des C-7' bzw. C-7'' und δ 118 ppm des C-8' bzw. C-8''. Die chemische Verschiebung aller weiteren ^{13}C -NMR-Signale der sekundären Kohlenstoffatome sowie der tertiären C-Atome der beiden Aromaten in den Molekülen sind vergleichbar.

Tabelle 3: Chemische Verschiebung der Kohlenstoffatome in den ^{13}C -NMR-Spektren der Hydroxyzimtsäureamid-Derivate A1 bis A5

C-Atom	A1	A2	A3	A4	A5
2 (CH ₂)	39.79	36.56	36.14	35.69	36.29
3 (CH ₂)	28.04	27.61	26.73	26.78	27.30
4 (CH ₂)	24.35	45.99	44.99	45.03	45.60
5 (CH ₂)	38.54	-	-	-	-
6 (CH ₂)	-	48.63	46.86	47.03	47.36
7 (CH ₂)	-	27.44	26.54	26.71	26.82
8 (CH ₂)	-	24.47	23.69	24.00	24.41

C-Atom	A1	A2	A3	A4	A5
9 (CH ₂)	-	39.29	37.96	38.25	38.30
1' (C)	128.59	133.79	132.26	126.46	126.51
2' (CH)	115.44	116.49	114.07	114.04	113.99
3' (C)	147.06	146.21	147.77	147.76	147.71
4' (C)	149.13	144.71	145.90	145.96	147.62
5' (CH)	116.81	116.82	115.90	116.04	115.99
6' (CH)	122.41	120.79	118.84	120.59	120.71
7'	142.83	32.32 (CH₂)	30.80 (CH₂)	139.34 (CH)	139.30 (CH)
8'	118.55	39.29 (CH₂)	37.77 (CH₂)	118.56 (CH)	118.61 (CH)
9' (C=O)	169.85	176.63	171.62	165.68	165.02
1'' (C)	-	133.46	126.35	132.16	126.42
2'' (CH)	-	116.49	115.66	115.95	113.99
3'' (C)	-	146.11	145.26	145.34	145.86
4'' (C)	-	144.58	143.57	143.67	145.85
5'' (CH)	-	116.82	116.01	115.70	115.99
6'' (CH)	-	120.71	120.58	118.91	120.70
7''	-	31.92 (CH₂)	139.56 (CH)	30.75 (CH₂)	139.56 (CH)
8''	-	38.46 (CH₂)	118.25 (CH)	37.65 (CH₂)	118.32 (CH)
9'' (C=O)	-	175.63	166.02	172.15	166.00

Als Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie der Spermidin-Derivate hat sich deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO) als geeignet erwiesen. In DMSO wird der Protonenaustausch von OH- und NH-Gruppen verlangsamt, wodurch die Kopplungsmuster dieser Protonen mit vicinalen CH-Protonen sichtbar werden. Unterschiede in den chemischen Verschiebungen sowie den Kopplungsmustern der Spermidin-Derivate ergeben sich für die Protonen an C-7' und C-8' sowie an C-7'' und C-8'' des Kaffeesäurerestes. Die Unterschiede sind in der Tabelle 4 hervorgehoben.

Tabelle 4: Chemische Verschiebungen und Kopplungsmuster der Protonen in den ¹H-NMR-Spektren der Hydroxyzimtsäureamid-Derivate A1-A5

Proton	A1	A2	A3	A4	A5
2	3.09 (m)	3.24 (t, 6 Hz)	3.21 (dd, 6/10 Hz)	3.06 (dd, 6/10 Hz)	3.20 (dd, 7/12 Hz)
3	1.71 (m)	1.75 (m)	1.74 (m)	1.64 (m)	1.71 (m)
4	1.71 (m)	2.69 (t, 7 Hz)	2.81 (m)	2.68 (t, 7 Hz)	2.78 (m)
5	3.35 (m)	-	-	-	-
6	-	2.77 (m)	2.81 (m)	2.76 (t, 7 Hz)	2.78 (m)
7	-	1.50 (m)	1.39 (m)	1.47 (m)	1.41 (m)
8	-	1.52 (m)	1.50 (m)	1.55 (m)	1.53 (m)
9	-	3.17 (t, 6 Hz)	3.02 (dd, 6/12 Hz)	3.15 (dd, 6/12 Hz)	3.16 (m)
2'	7.00 (d, 1.5 Hz)	6.66 (d, 2 Hz)	6.59 (d, 2 Hz)	6.93 (d, 1.5 Hz)	6.93 (d, 1.5 Hz)
5'	6.77 (d, 8 Hz)	6.69 (d, 8 Hz)	6.54 (d, 8 Hz)	6.72 (d, 8 Hz)	6.73 (d, 8 Hz)
6'	6.90 (dd, 1.5/8 Hz)	6.54 (dd, 2/8 Hz)	6.39 (dd, 2/8 Hz)	6.80 (dd, 1.5/8 Hz)	6.82 (dd, 1.5/8 Hz)
7'	7.40 (d, 16 Hz)	2.80 (m)	2.60 (t, 8 Hz)	7.21 (d, 16 Hz)	7.23 (d, 16 Hz)
8'	6.35 (d, 16 Hz)	2.50 (t, 7 Hz)	2.24 (t, 8 Hz)	6.31 (d, 16 Hz)	6.30 (d, 16 Hz)
2''	-	6.64 (d, 2 Hz)	6.94 (d, 1.5 Hz)	6.55 (d, 2 Hz)	6.92 (d, 1.5 Hz)
5''	-	6.68 (d, 8 Hz)	6.73 (d, 8 Hz)	6.59 (d, 8 Hz)	6.72 (d, 8 Hz)
6''	-	6.53 (dd, 2/8 Hz)	6.81 (dd, 1.5/8 Hz)	6.39 (dd, 2/8 Hz)	6.81 (dd, 1.5/8 Hz)
7''	-	2.80 (m)	7.23 (d, 16 Hz)	2.61 (t, 7.5 Hz)	7.21 (d, 16 Hz)
8''	-	2.42 (t, 7 Hz)	6.30 (d, 16 Hz)	2.27 (t, 7.5 Hz)	6.30 (d, 16 Hz)
NH-1	-	8.08 (t, 6 Hz)	8.21 (t, 6 Hz)	7.97 (t, 6 Hz)	8.17 (t, 6 Hz)
NH-6	-	-	-	-	-
NH-10	-	7.98 (t, 6 Hz)	7.84 (t, 6 Hz)	8.08 (t, 6 Hz)	8.06 (t, 6 Hz)

Bei dem Vorliegen einer Methylengruppe, wie in **A1** und **A3** bis **A5**, liegen tieffeldverschobene Dubletts mit einer Kopplungskonstante von 16 Hz für eine *trans*-

Doppelbindung vor. Handelt es sich um Hydrokaffeensäure, wie in den Verbindungen **A2** bis **A4**, liegen hochfeldverschobene Triplets vor. Die aromatischen Protonen 2', 2'', 5', 5'' sowie 6' und 6'' der Kaffeensäuren zeigen eine charakteristische ABX-Aufspaltung. Das Dublett mit einer kleinen Kopplungskonstante von $J = 1.5-2.0$ Hz bei einer chemischen Verschiebung von δ 6.64 bis δ 7.00 ppm für die Verbindungen **A1** bis **A5** ist dem *meta*-koppelnden Proton an C-2' bzw. C-2'' zuzuordnen. Die Dubletts mit einer großen Konstante von 8.0 Hz bei δ 6.54 bis δ 6.77 ppm sind auf die *ortho*-koppelnden Protonen an C-5' und C-5'' zurückzuführen. Die Protonen an C-6' und C-6'' zeigen dementsprechend Dubletts von 1.5-2.0 Hz und 8.0 Hz bei δ 6.39 bis 6.90 ppm.

Die Protonen H-3 bis H-8 der Methylen-Funktionen des Spermidinrestes sind in fast allen Spektren der Verbindungen **A2** bis **A5** als nicht interpretierbare Multipletts zu sehen. Bei den Protonen H-2 und H-9 sind weiterhin Aufspaltungen in Triplets ($J = 6.0$ Hz) oder Dubletts von Dubletts ($J_1 = 6.0-7.0$ Hz und $J_2 = 10.0-12.0$ Hz) zu beobachten. Diese Protonen sind durch den Einfluss der Amid-Gruppe stärker entschirmt und dementsprechend tieffeldverschobener. Das ^1H -NMR-Spektrum von **A4** mit vergrößerten Ausschnitten aus den Bereichen der Säureamidfunktionen und der Kaffeensäure-Doppelbindungen ist in Abbildung 30 dargestellt.

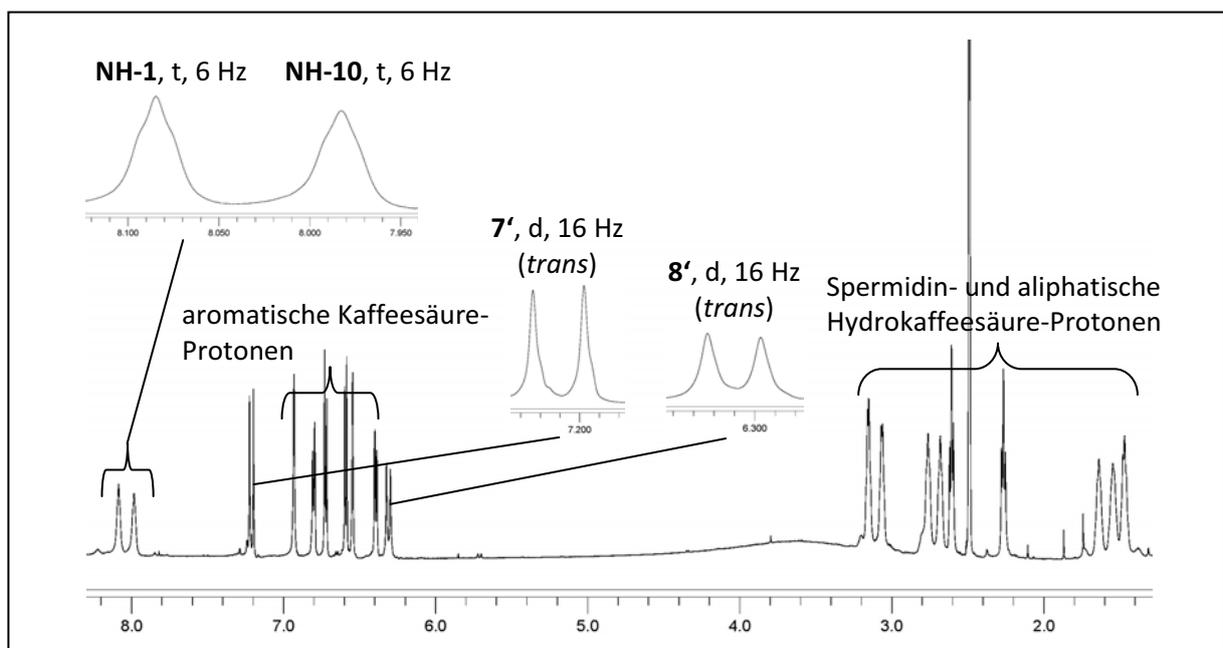


Abbildung 30: ^1H -NMR-Spektrum von N^{10} -Caffeoyl- N^1 -7',8''-dihydrocaffeoylspermidin (**A4**) (600 MHz, CD_3SOCD_3) mit vergrößerten Ausschnitten der Säureamidfunktionen und der Kaffeensäure-Doppelbindung

Die exakte Position der Doppelbindungen in den Verbindungen **A3** und **A4** wurde durch die Aufnahme von 2D-NMR-Spektren bestätigt. Durch HSQC-Spektren (Heteronuclear Single Quantum Coherence) können Signale von direkt gebundenen C- und H-Atomen sichtbar gemacht werden ($^nJ_{C,H}$ mit $n = 1$), wohingegen bei HMBC-Experimenten (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) Korrelationen über mehrere Bindungen zwischen C- und H-Atomen sichtbar werden ($^nJ_{C,H}$ mit $n = 2$ bis 4).

Abbildung 31 zeigt einen Ausschnitt des HMBC-Spektrums der Verbindung **A4**.

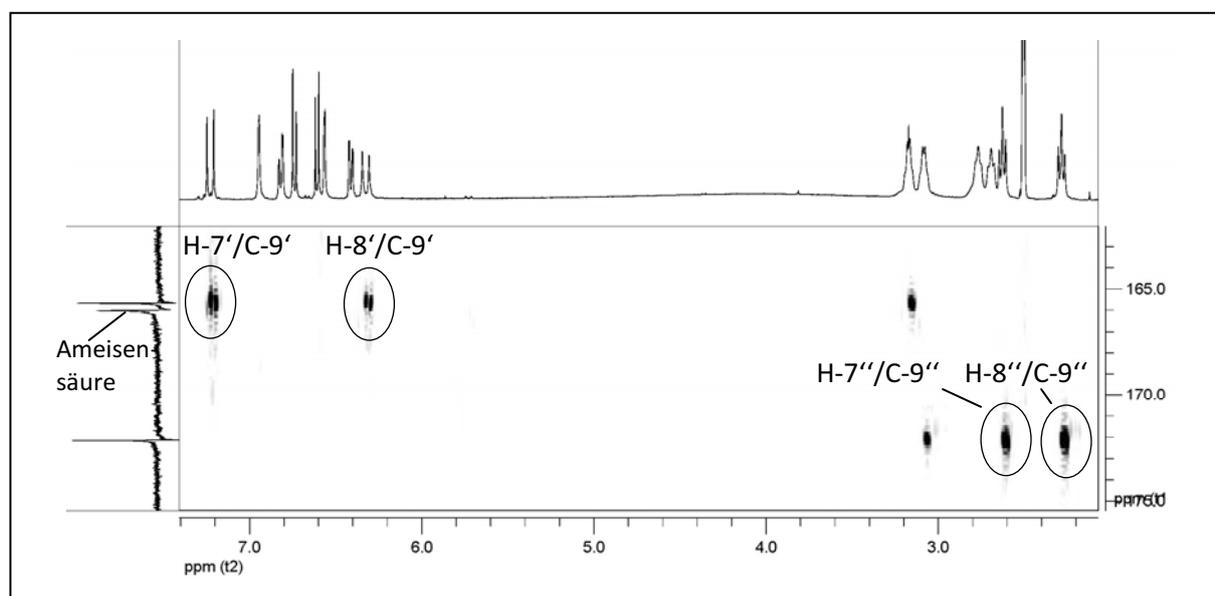


Abbildung 31: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der Verbindung A4 aus dem Bereich der Kreuzsignale der Kaffeesäure-Doppelbindung sowie der Methylengruppe der Dihydrokaffeesäure (CD_3SOCD_3)

Entscheidend für die Bestimmung der Doppelbindungen erwiesen sich die Korrelationen von H-7' (δ 7.21 ppm) und H-8' (δ 6.31 ppm) zu C-9' (δ 165.68 ppm) sowie H-7'' (δ 2.61 ppm) und H-8'' (δ 2.27 ppm) zu C-9'' (δ 172.15 ppm). C-9'' war eindeutig festgelegt anhand der stärkeren Tieffeldverschiebung durch das Fehlen der Doppelbindung sowie durch die Korrelation von H-6 (δ 2.76 ppm) zu C-4 (δ 45.03 ppm), von H-4 (δ 2.68 ppm) zu C-2 (δ 35.69 ppm) und durch ein Kreuzsignal von H-2 (δ 3.06 ppm) zu C-9'' (δ 172.15 ppm). Weitere Korrelationen, die im HMBC-Spektrum sichtbar wurden, sind in Abbildung 32 dargestellt. Die erwähnten Korrelationen sind durch stärkere Pfeile markiert.

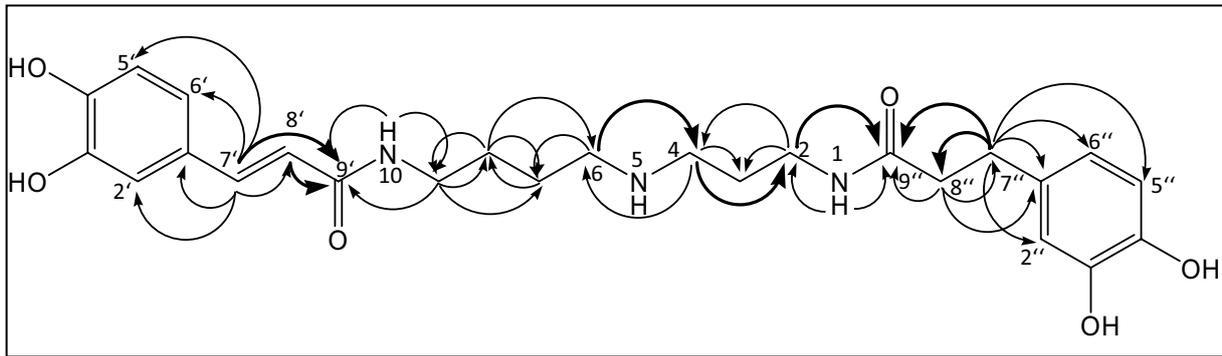


Abbildung 32: ^1H - ^{13}C -Fernkorrelationen bei Verbindung **A4**

Die Bestätigung der Strukturen von Verbindung **A3** und **A5** erfolgten ebenfalls durch Bestimmung der Fernkorrelationen.

Fraktion 5 enthält neben geringen Konzentrationen von **A5** Chlorogensäure, welche auch in den Fraktionen 6 und 7 zu finden ist und die Hauptverbindung in der Coil-Fraktion darstellt.

Eine Quantifizierung der Hydroxyzimtsäureamide (s. Kapitel 5.3.6, S. 145) **A1** bis **A5** ergab einen Gesamtgehalt von 1,19 g pro 100 g getrockneten Pflanzenmaterials (vgl. Tabelle 23 im Anhang). In der Literatur ist ein durchschnittlicher Wassergehalt der Auberginen-Beeren von 93 % beschrieben (SOUCI et al. 1986). Somit würde der Gehalt 833 mg pro Kilogramm Frischgewicht betragen. Im Anhang sind in der Tabelle 22 und Tabelle 23 die Kalibrierfunktionen und die Gehalte der isolierten Verbindungen dargestellt.

3.3.2 Beurteilung der antioxidativen und zytotoxischen Aktivität

Der methanolische Extrakt weist eine hohe antioxidative und zytotoxische Aktivität auf. Die Mortalität der Brine Shrimps lag bei der höchsten Konzentration des Extraktes im Test bei 36 %. Nach der HSCCC-Trennung wurden die Fraktionen ebenfalls untersucht. Weiterhin wurde die Reinverbindung **A2** getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

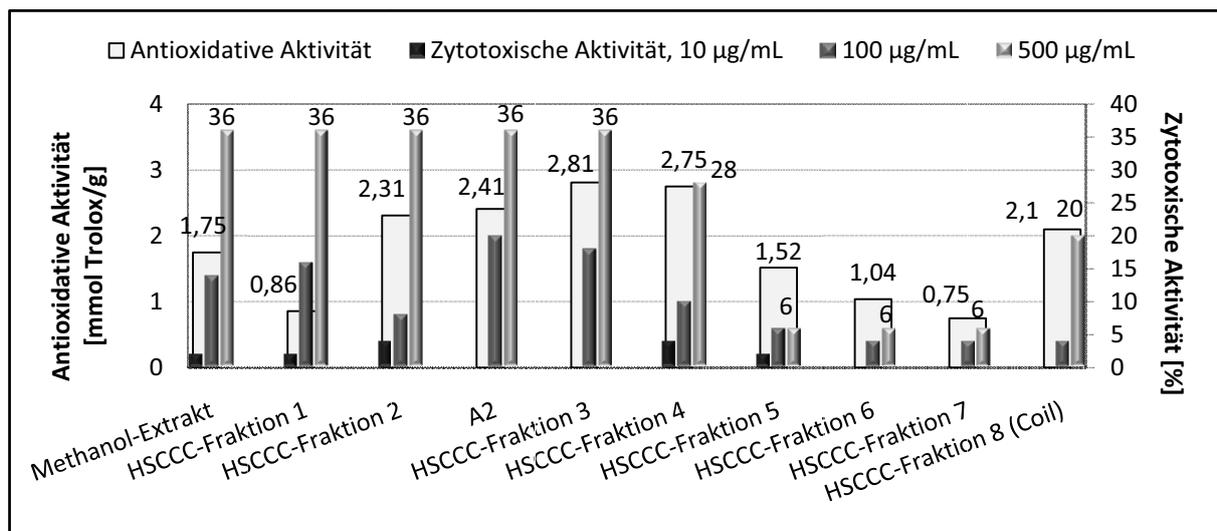


Abbildung 33: Antioxidative und zytotoxische Aktivität der HSCCC-Fractionen und von Verbindung A2

Die Zytotoxizität der HSCCC-Fractionen 1 bis 4 ist nahezu identisch. Auch die Verbindung **A2** weist eine ähnlich hohe Aktivität wie die Fractionen auf, die Caffeoylspermidin-Derivate enthalten. Es wird postuliert, dass auch die anderen Derivate eine hohe zytotoxische Aktivität aufweisen. KANEKO et al. (2007) konnten zum Beispiel eine zytotoxische Wirkung von Spermin in retinalen Pigmentepithelzellen nachweisen. Weitere isolierte Hydroxyzimtsäureamide wurden aufgrund des hohen Substanzverbrauchs nicht getestet.

Vor allem die HSCCC-Fractionen 2 bis 4 und die Coil-Fraktion 8 weisen eine hohe antioxidative Aktivität von über zwei mmol Trolox pro Gramm auf, welches auf die radikalfangende Eigenschaft phenolischer Gruppen der Kaffeesäure, Hydrokaffeesäure, Hydroxyzimtsäureamide und Chlorogensäure-Isomere zurückgeführt werden kann (s. Abbildung 11, S. 23). Auf die antioxidative Aktivität der Chlorogensäuren wird in Abschnitt 3.3.4 näher eingegangen. Als Beispiel für Hydroxyzimtsäureamide diene ebenfalls Verbindung **A2**, welche als Reinsubstanz eine ähnlich hohe antioxidative Aktivität aufweist wie die Fraktion 2, aus der diese Substanz isoliert wurde.

3.3.2.1 Stabilität der Hydroxyzimtsäureamide und Chlorogensäuren

Durch den Nachweis der zytotoxischen Aktivität der Caffeoylspermidin-Derivate und der Chlorogensäuren im Brine shrimp-Test, waren Untersuchungen hinsichtlich der Stabilität

dieser Verbindungen bei der Zubereitung von Auberginen-Beeren von Interesse. Dazu wurde gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial mit Wasser versetzt und zwanzig Minuten gekocht, welches eine reguläre Kochzeit von Auberginen simulieren sollte. In einem weiteren Versuch wurde zwanzig Minuten kalt extrahiert.

Nach dem Abkühlen wurde das Kochwasser filtriert, das Material mit einer Mühle zerkleinert und die Extrakte per HPLC untersucht. In dem Kochwasser sowie in dem gekochten Pflanzenmaterial konnten keine Peaks der Caffeoylspermidin-Derivate detektiert werden. In der kalt extrahierten Lösung hingegen waren die Peaks noch vorhanden. Es konnte keine Degradation festgestellt werden. Die Chlorogensäure-Isomere weisen keine Hitzelabilität auf und sind auch nach dem Kochvorgang in der Aubergine enthalten. In Abbildung 34 sind die HPLC-Chromatogramme des gekochten und des kalt extrahierten Pflanzenmaterials dargestellt.

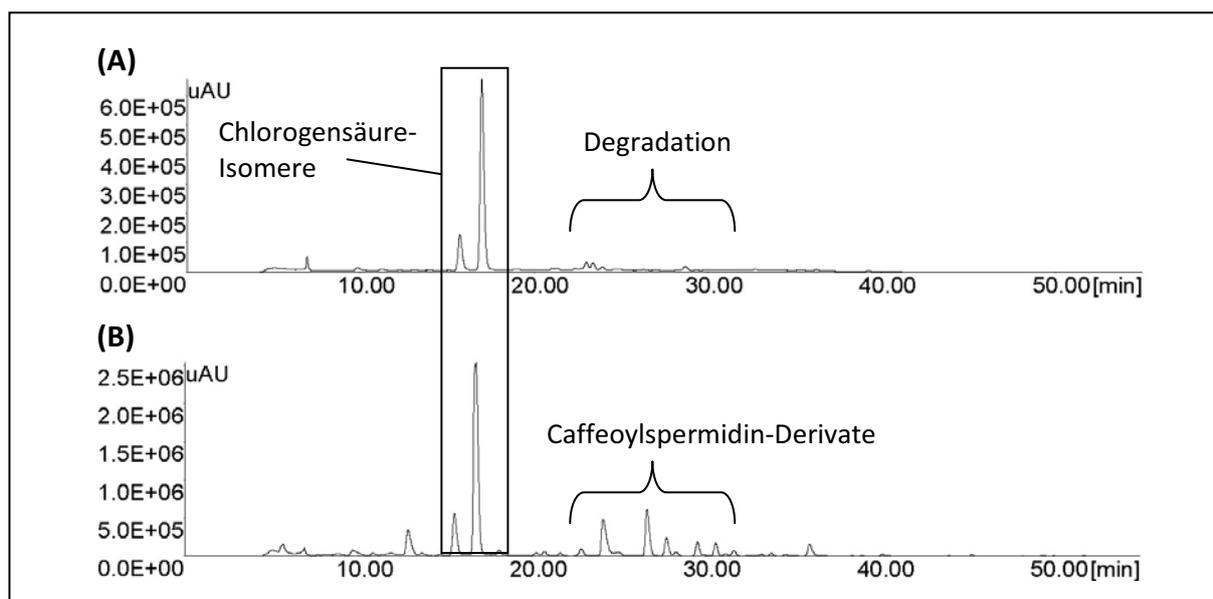


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme des (A) gekochten Pflanzenmaterials und (B) des kalt extrahierten Pflanzenmaterials bei 281 nm

Folglich wird bedingt durch die Hitzelabilität der Caffeoylspermidinderivate keine dieser Verbindungen vom Menschen aufgenommen. Chlorogensäuren werden im Gegensatz dazu beim Verzehr aufgenommen. Diesbezüglich wären weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Bioverfügbarkeiten dieser Verbindungen und weitere Methoden zur Bestimmung der potentiellen zytotoxischen Aktivitäten notwendig.

3.3.3 Isolierung und Fraktionierung weiterer Polyphenole

Wie in Kapitel 3.1 bereits erwähnt, standen bei der Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen die Anthocyane im Vordergrund. Zur Isolierung der Anthocyane aus dem Pflanzenmaterial wurde die Extraktionslösung mit Essigsäure versetzt, da Anthocyane in sauren Medien als stabile Flavyliumkationen vorliegen (s. Kapitel 2.1.6.2).

Für die Anthocyan-Trennung mittels High-Speed Countercurrent Chromatography haben sich quartäre Fließmittelsysteme bestehend aus *tert.*-Butylmethylether, *n*-Butanol, Acetonitril und Wasser bewährt (DEGENHARDT et al. 2000a und 2000b, DU et al. 2004). Zur Stabilisierung der Anthocyane wird dem Fließmittel Trifluoressigsäure (TFA) in einer Konzentration von 0,1 % zugesetzt. TFA besitzt zusätzlich die Eigenschaft, als lipophiles Gegenion Anthocyane in die stationäre leichte Phase von CCC-Fließmittelsystemen zu drängen, wodurch eine Verteilung der Anthocyane in beiden Phasen gewährleistet wird.

In Abbildung 35 ist das HPLC-Chromatogramm des essigsauren Methanol-Extrakts bei 290 nm dargestellt. Bei den Hauptverbindungen handelt es sich um drei Chlorogensäure-Isomere und das Anthocyan Delphinidin-3-O- β -D-[4'''-(*trans*-*p*-cumaroyl)- α -L-rhamnosyl(1''' \rightarrow 6'')]glucopyranosid]-5-O- β -D-glucopyranosid (*trans*-Nasunin).

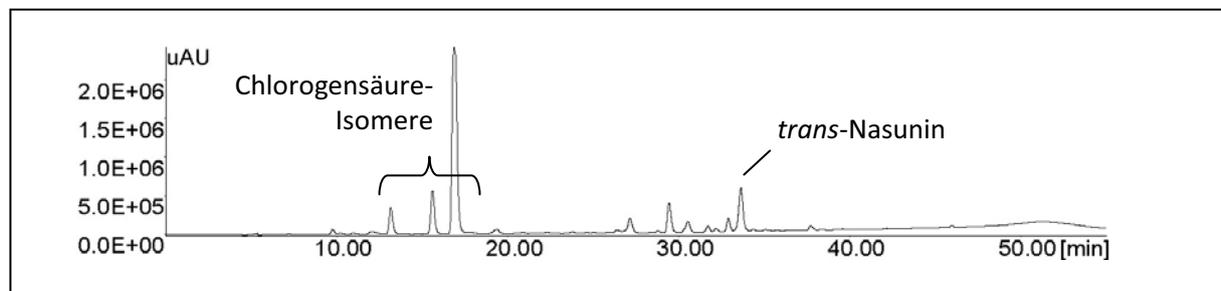


Abbildung 35: HPLC-Chromatogramm des essigsauren Methanol-Extraktes der Aubergine bei 290 nm

Zur Trennung des essigsauren Methanol-Extrakts von *Solanum melongena* hat sich das oben beschriebene Fließmittel in einem Verhältnis von 2/2/1/5 (v/v/v/v) mit einem Zusatz von 0,1 % TFA, einer Flussrate von 3 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit von 800 rpm als geeignet erwiesen. Es konnten insgesamt sieben Fraktionen erhalten werden, die anhand des UV-Chromatogramms bei 290 nm eingeteilt wurden. Auf dem Coil wurde keine

nennenswerte Substanzmenge retardiert. Das HSCCC-Chromatogramm ist in Abbildung 36 dargestellt.

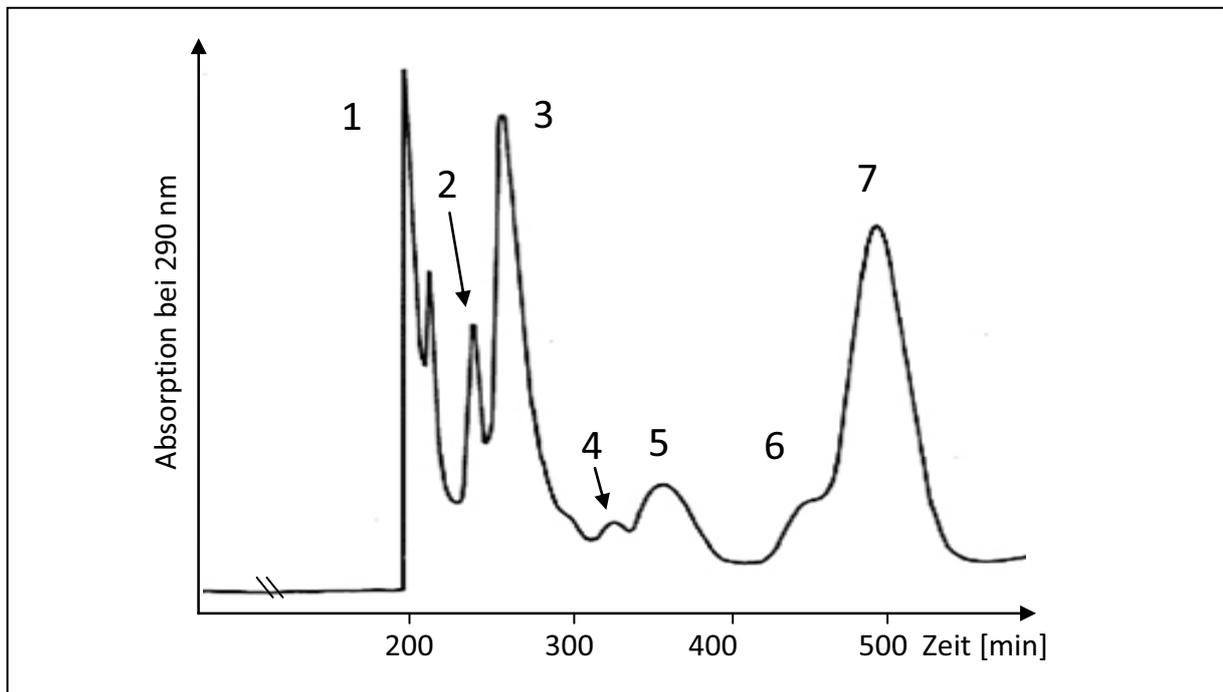


Abbildung 36: HSCCC-Chromatogramm des essigsauren Methanol-Extrakts der Aubergine bei 290 nm

Die Fraktionen wurden anschließend mit HPLC-DAD und LC-ESI-MSⁿ analysiert. In Abbildung 37 sind die HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 1 bis 7 der HSCCC-Trennung bei 290 nm dargestellt.

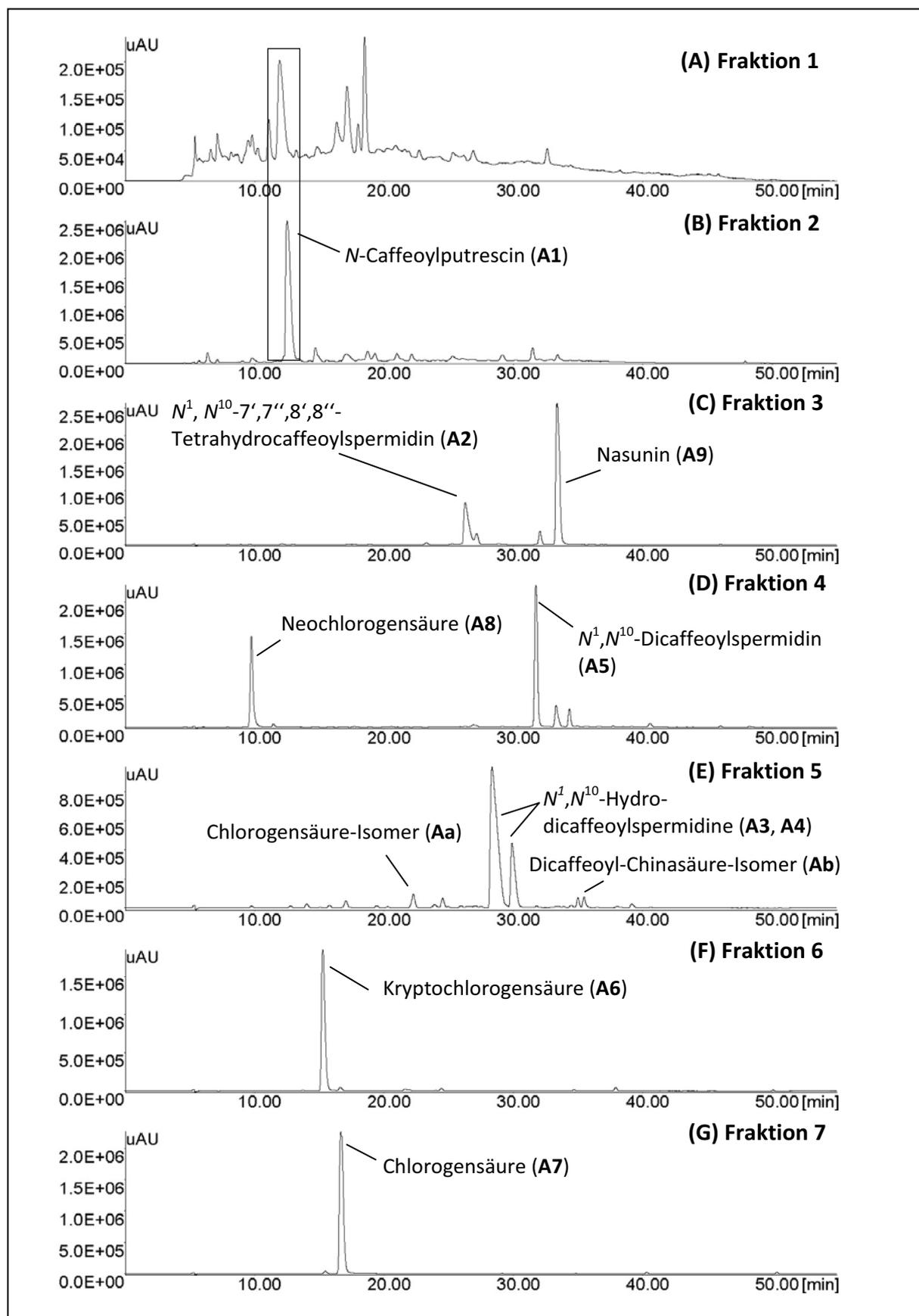


Abbildung 37: (A - G) HPLC-Chromatogramme der HSCCC-Fractionen 1 bis 7 des essigsauren Methanol-Extrakts der Aubergine bei 290 nm

3.3.3.1 Charakterisierung der Chlorogensäure-Isomere

Die Charakterisierung der Chlorogensäure-Isomere war von großer Bedeutung, da sie sowohl eine hohe antioxidative als auch eine hohe zytotoxische Aktivität aufweisen (s. Kapitel 3.3.4).

Aus der HSCCC-Fraktion 6 konnte mit einer Reinheit von 90,3 % 4-Caffeoyl(-)-Chinasäure (Kryptochlorogensäure) (**A6**) und aus der Fraktion 7 5-Caffeoyl(-)-Chinasäure (Chlorogensäure) (**A7**) in einer Reinheit von 92,4 % gewonnen werden. 3-Caffeoyl(-)-Chinasäure (Neochlorogensäure) (**A8**) ist neben N^1,N^{10} -DicaFFEoylspermidin in Fraktion 4 enthalten und konnte durch Co-Chromatographie und einem Vergleich der Retentionszeiten und Massendaten mit einer Standardsubstanz identifiziert werden (HILLEBRAND 2004). Die drei Chlorogensäure-Isomere wurden von WHITAKER und STOMMEL (2003) bereits als Inhaltsstoffe von *Solanum melongena* beschrieben.

Unter Berücksichtigung des Wassergehalts von 93 % (SOUCI et al. 1986), beträgt der Gesamtgehalt der Chlorogensäure-Isomere **A6** bis **A8** 509 mg pro Kilogramm frischer Auberginen-Beeren. 5-Caffeoyl-Chinasäure stellt mit 404 mg/kg davon den größten Anteil dar (Methode s. Kapitel 5.3.6, Werte Tabelle 23).

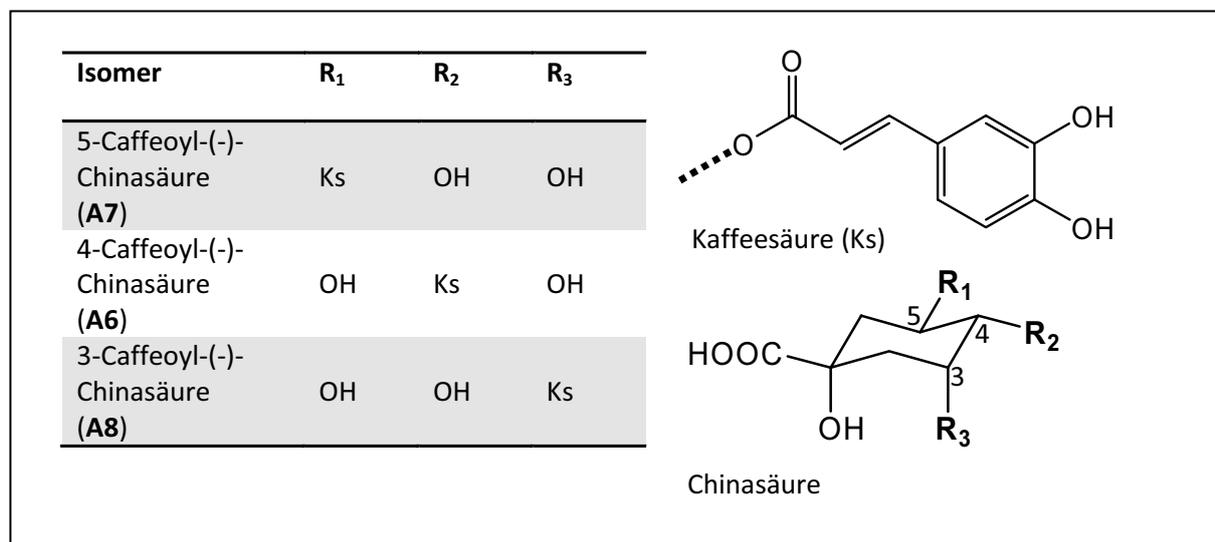


Abbildung 38: Strukturen der Chlorogensäure-Isomere A6 bis A8

Die Chlorogensäure-Isomere sind durch die unterschiedliche chemische Verschiebung und Kopplungsmuster der Protonen an Position 3, 4 und 5 der Chinasäure gut im $^1\text{H-NMR}$ zu unterscheiden (s. Abbildung 39).

Das Proton an Position 4 der drei Isomere spaltet durch äquivalente Nachbarprotonen in ein Dublett von Dubletts auf. Die Protonen an Position 3 und 5 ergeben jeweils ein Dublett von Dubletts. Da diese bei der 4-Caffeoyl(-)-Chinasäure eine ähnliche chemische Verschiebung aufweisen, ist nur noch ein Multiplett (m) sichtbar. Die Esterbindung mit Kaffeesäure bewirkt bei jedem Isomer eine Tieffeldverschiebung des jeweiligen Protons.

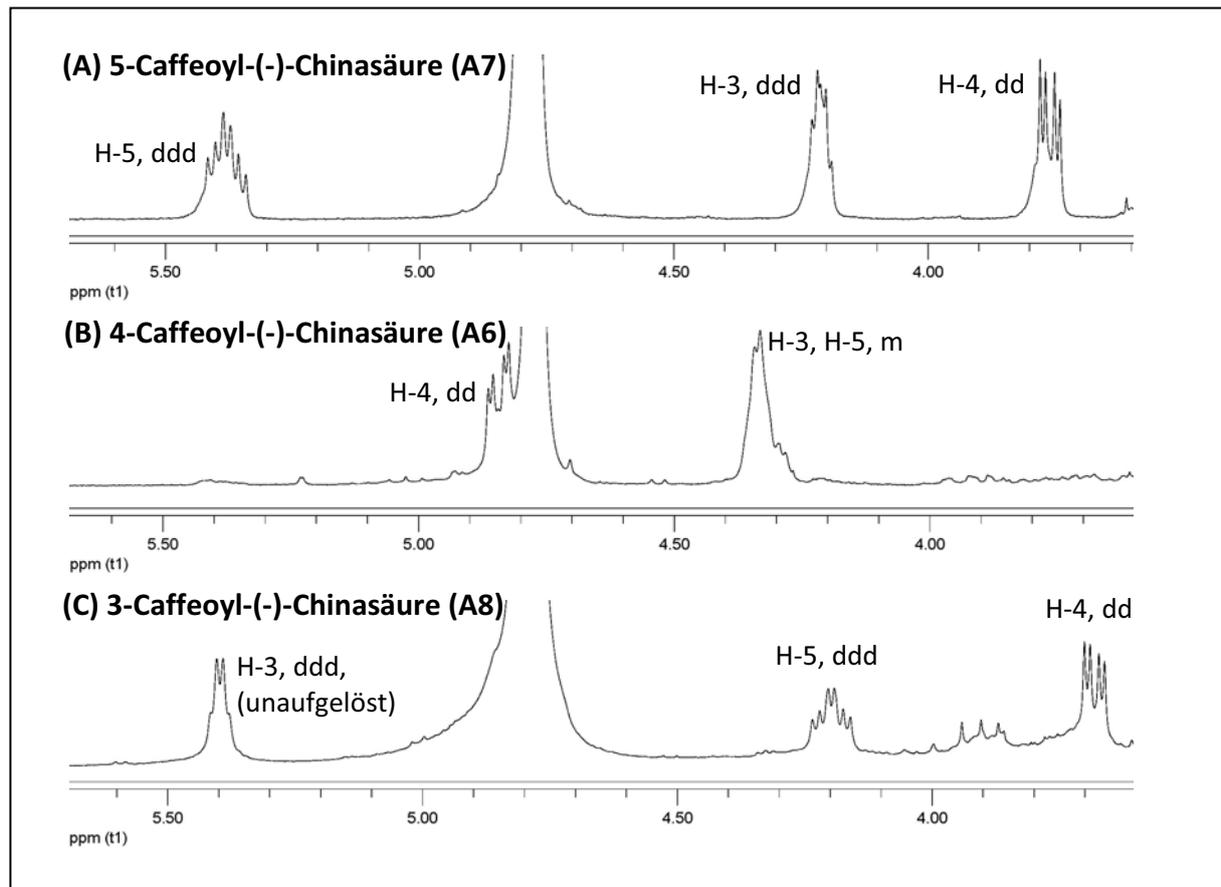


Abbildung 39: Abbildung 40: (A - C) Ausschnitte der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Chlorogensäure-Isomere aus dem Bereich der Chinasäure-Protonen H-3 bis H-5 (300 MHz, CD_3OD)

Eine weitere Unterscheidung der Chlorogensäure-Isomere ist durch MS^n -Spektren möglich, da nach CLIFFORD et al. (2005) deren Fragmentierungsmuster charakteristisch sind. Die Intensitäten der MS^n -Ionen in den Extrakten der Aubergine differieren im Vergleich zu den Literaturwerten etwas. Eine Unterscheidung der Isomere anhand ihres Fragmentierungsmusters kann jedoch bestätigt werden. Die Massenspektren und die Intensitäten der Fragmente der Chlorogensäure-Isomere sind in Abbildung 41 und Tabelle 5 dargestellt.

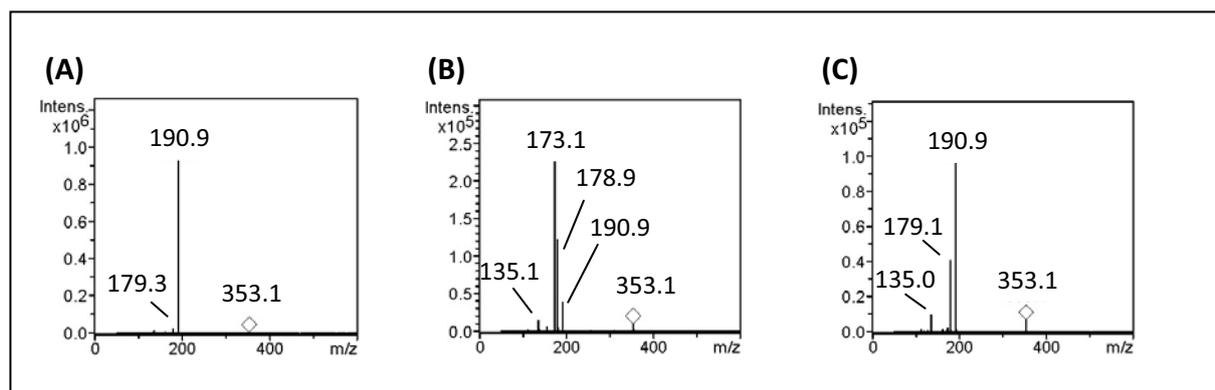


Abbildung 41: Massenspektren (MS^n) der Chlorogensäure-Isomere (negativer Modus). (A) 5-Caffeoyl-Chinasäure (A7), (B) 4-Caffeoyl-Chinasäure (A6), (C) 3-Caffeoyl-Chinasäure (A8)

Ein charakteristisches Fragment von **A7** und **A8**, das durch die Spaltung der Esterbindung entsteht, stellt mit m/z 190 $[M-H]^-$ Chinasäure dar. Den Basispeak in Verbindung **A6** stellt dagegen das Fragment mit m/z 173 dar, welches durch Abspaltung der Kaffeesäure $[M-H-180]^-$ entsteht. Nach CLIFFORD et al. (2005) sind für diesen Unterschied zwei charakteristische Fragmentierungsmechanismen der jeweiligen Chlorogensäure-Isomere verantwortlich.

Tabelle 5: Intensitäten der MS^n -Ionen der Chlorogensäure-Isomere der Aubergine in den Massenspektren (negativer Modus)

Chlorogensäure-Isomer	Molekülion $[M-H]^-$ [m/z]	Basispeak MS^2 [m/z]	MS^n -Ionen [m/z] und Intensitäten
5-Caffeoyl-Chinasäure (A7)	353.1	190.9	179.3 (2 %)
4-Caffeoyl-Chinasäure (A6)	353.1	173.1	178.9 (54 %), 190.9 (17 %), 135.1 (6 %)
3-Caffeoyl-Chinasäure (A8)	353.1	190.9	179.1 (42 %), 135.0 (10 %)
Chlorogensäure-Isomer (Aa)	353.1	190.9	179.1 (4 %)
Dicafeoyl-Chinasäure-Isomer (Ab)	514.8	353.1	335.1 (14 %), 317.3 (3 %), 255.3 (3 %), 210.1 (3 %), 190.9 (15 %), 178.8 (9 %), 173.0 (22 %)

In HSCCC-Fraktion 5 konnte durch LC-MSⁿ-Analysen bei einer Retentionszeit von 25 min ein viertes Isomer mit der Molekülmasse von m/z 353 [M-H]⁻ und dem Basispeak von m/z 190 [M-H-Kaffeensäure]⁻ charakterisiert werden (s. Chromatogramm E in Abbildung 37, Tabelle 5). Nach CLIFFORD et al. (2005) könnte es sich durch die Ähnlichkeit des Fragmentierungsmusters mit dem von 5-Caffeoyl-Chinasäure um 1-Caffeoyl-Chinasäure handeln. Viele Pflanzen produzieren Chlorogensäure-Derivate, die an Position 3, 4 und 5 der Chinasäure mit zum Beispiel Kaffeensäure verestert vorliegen. Eine Bindung an Position 1 wird dagegen sehr selten beobachtet.

In der Fraktion 5 kann ein weiteres Dicafeoyl-Chinasäure-Isomer mit m/z 515 im negativen Modus und dem charakteristischen MS²-Ion m/z 353 [M-H-Kaffeensäure] nachgewiesen werden. CLIFFORD et al. (2005) diskutieren ebenfalls eine Zuordnung von Dicafeoyl-Chinasäure-Isomere durch Bestimmung der Intensitäten der Fragmente. Das in der Fraktion 5 enthaltene Isomer kann jedoch dadurch nicht charakterisiert werden, da die Intensitäten im Vergleich zu den Literaturdaten variieren. Die Massenspektren der postulierten Chlorogensäure-Isomere **Aa** und **Ab** sind in Abbildung 42 dargestellt.

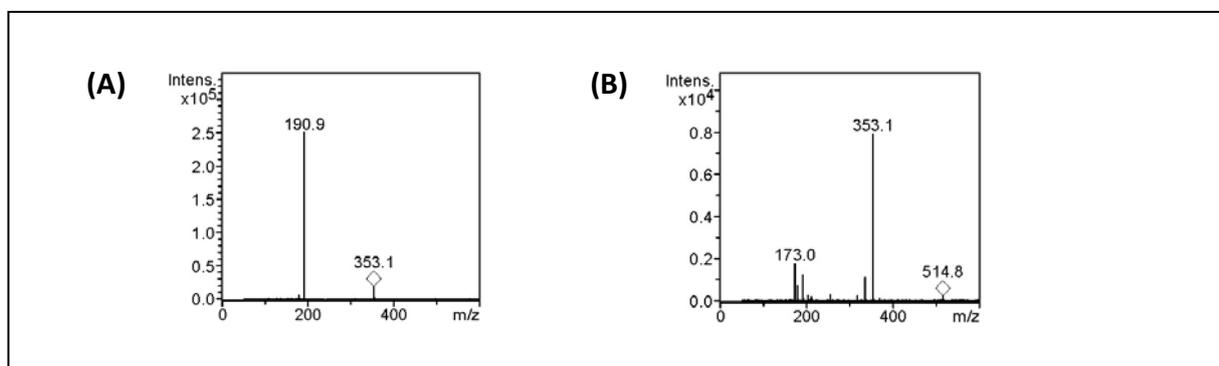


Abbildung 42: Massenspektren der postulierten Chlorogensäure-Isomere aus der HSCCC-Fraktion 5 des essigsauren Auberginen-Extraktes im negativen Modus. (A) Chlorogensäure-Isomer (1-Chlorogensäure) (Aa), (B) Dicafeoyl-Chinasäure-Isomer (Ab)

3.3.3.2 Charakterisierung der Anthocyane

Für die charakteristische blau-violette Färbung der Beeren der Aubergine sind acetylierte Delphinidin-Derivate in den äußeren Epidermiszellen verantwortlich. Bei dem Hauptanthocyan in der Aubergine handelt es sich um das *trans*-Isomer von Delphinidin-3-O-

β -D-[4'''-(*trans-p*-cumaroyl)- α -L-rhamnosyl(1''' \rightarrow 6'')]glucopyranosid]-5-O- β -D-glucopyranosid (*trans*-Nasunin) (**A9**).

Die drei Hydroxylgruppen am B-Ring des Delphinidin-Aglykons, die Glykosilierungen an den Positionen 3 und 5 des Aglykons, und eine intramolekulare Co-Pigmentierung zwischen Delphindin und Cumarsäure, führen zu einem bathochromen Shift, also zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima zu einer längeren Wellenlänge, wodurch die charakteristische Färbung der Auberginen-Beeren entsteht (SHRIKHANDE 1976, HONDA und SAITO 2002, DANGLES et al. 1993). Acetylierte Anthocyane zeichnen sich weiterhin durch eine hohe Stabilität aus und werden als geeignete natürliche Farbstoffe in der Lebensmittelproduktion diskutiert (GIUSTI und WROLSTAD 2003, HONDA und SAITO 2002).

Nasunin konnte durch eine Trennung mittels präparativer HPLC aus HSCCC-Fraktion 3 erhalten werden (Methode s. Kapitel 5.4.3). Nach ICHIYANAGI et al. (2005) umfasst Nasunin sowohl das *trans*-, als auch das *cis*-Isomer der *p*-Cumarsäure, welches durch Einwirkung von UV-Licht gebildet werden soll. *Trans*-Nasunin konnte durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie und durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden. *Cis*-Nasunin weist eine identische Molekülmasse und Fragmentierungsmuster auf und wurde durch massenspektrometrische Untersuchungen charakterisiert. Die Differenz der Retentionszeiten beträgt etwa 2,5 Minuten. Nach Einwirkung von UV-Strahlung auf das mittels präparativer HPLC isolierte *trans*-Nasunin stellte sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht der beiden Isomere von ungefähr 94 % zu 6 % ein, welches auch in den aufgearbeiteten Extrakten und den HSCCC-Fractionen zu beobachten war. YOSHIDA et al. (2003) untersuchten die Einflüsse, die zur *cis/trans*-Isomerisierung in acetylierten Anthocyanen führen. Demnach soll die Isomerisierung in neutralen Lösungsmitteln am geringsten sein.

In Abbildung 43 (A) ist das Chromatogramm der HSCCC-Fraktion 3 bei 520 nm dargestellt. In geringen Konzentrationen sind auch in der Fraktion 1 Anthocyane enthalten, die durch massenspektrometrische Daten charakterisiert werden (s. Abbildung 43 (B)).

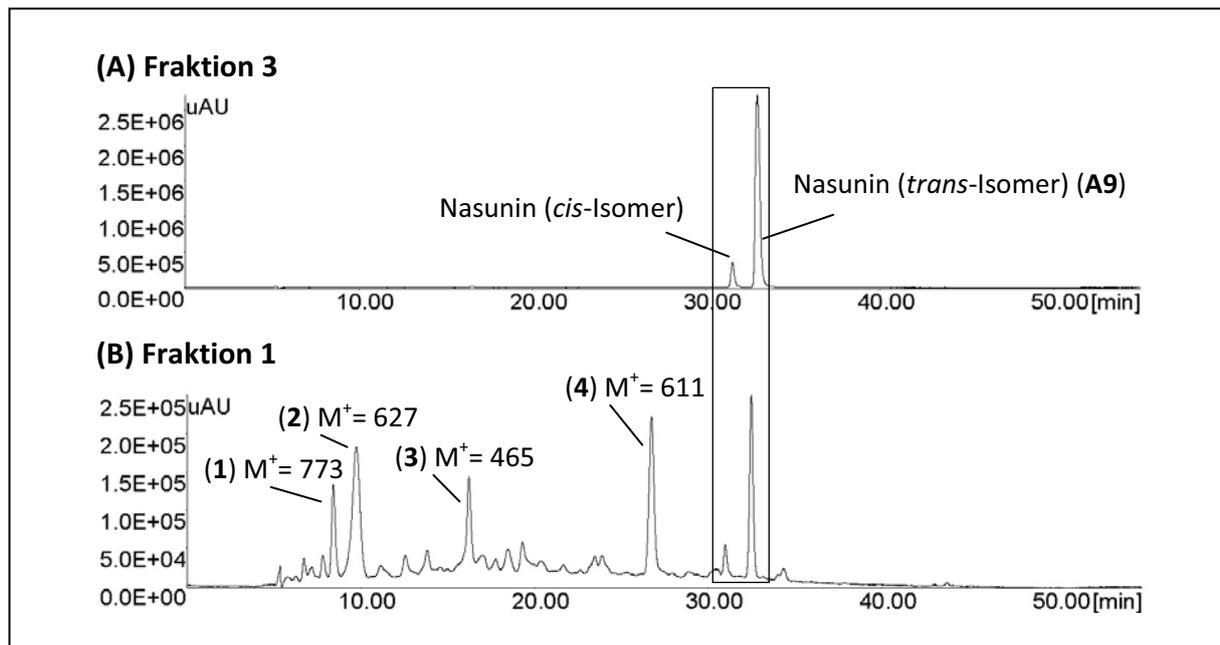


Abbildung 43: (A, B) HPLC-Chromatogramme der HSCCC Fraktionen 3 und 1 bei 520 nm

Neben *trans*- und *cis*-Nasunin konnten in der Fraktion 1 auch Anthocyan-Minorkomponenten charakterisiert werden. Es handelt sich dabei um Delphinidin-Derivate, die möglicherweise Artefakte von Nasunin darstellen. Ein Vergleich der MSⁿ-Daten der Derivate mit denen des Massenspektrums von *trans*-Nasunin in Abbildung 44 deutet darauf hin. Nasunin weist ein Molekülion mit m/z 919 [M]⁺ auf. Ein Fragment bei m/z 757 zeigt die Cumarsäure-Abspaltung [M-162]⁺ an Position 5 des Aglykons. Ein weiteres Fragment bei m/z 611 resultiert aus der Rhamnose-Abspaltung [M-162-146]⁺ und das Fragment bei m/z 465 durch die Glucose-Abspaltung [M-162-146-162]⁺. Das ESI-Massenspektrum des Aglykons zeigt den Basispeak im positiven Modus [303]⁺ durch eine weitere Glucose-Abspaltung [M-162-146-162-162]⁺, welches dem Molekulargewicht von Delphinidin entspricht. Somit könnte es sich bei dem Delphinidin-Derivat mit m/z 611 [M]⁺ um Delphinidin-3-rutinosid (**4**) und bei dem Derivat mit m/z 465 (**3**) um Delphinidin-3-glucosid handeln.

Auffällig ist, dass Nasunin im Vergleich zu Shisonin, welches ebenfalls acetyliert vorliegt und das Hauptanthocyan in *Perilla frutescens* darstellt (s. Kapitel 3.4.1.2, S. 89), eine große Stabilität aufweist und mögliche Artefakte nur als Minorbestandteile auftreten.

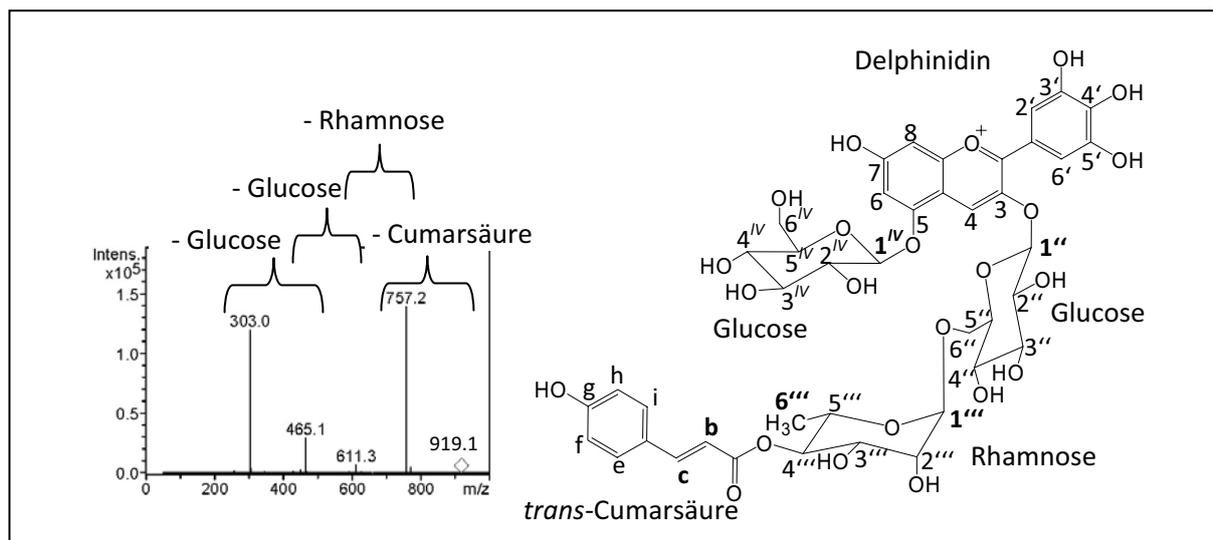


Abbildung 44: Massenspektrum (positiver Modus) und Struktur von *trans*-Nasunin, $[M]^+ = 919$

In Abbildung 45 ist das Protonenspektrum von *trans*-Nasunin dargestellt. Die zur Strukturaufklärung wichtigsten Signale sind in dem Spektrum vergrößert hervorgehoben. Die Signale der anomeren Protonen 1^{IV} und $1''$ der Glucose-Moleküle an Position 3 und 5 des Delphinidin-Aglykons spalten bei δ 5.18 und δ 5.48 ppm jeweils in ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 8.0 Hz auf. Die Größe der Kopplungskonstante weist eindeutig auf eine β -verknüpfte glykosidische Bindung der beiden D-Glucose-Moleküle hin. Das charakteristische Signal der Rhamnose stellt die Methylgruppe $6'''$ dar, welches hochfeldverschoben in ein Dublett mit 6.0 Hz bei δ 1.01 ppm aufspaltet. Das anomere Proton der L-Rhamnose ist als breites Singulett bei δ 4.70 ppm sichtbar, welches auf eine axial-äquatoriale Stellung zu H- $2'''$ deutet. Die restlichen Signale der Zucker erscheinen zwischen δ 3.40 und δ 4.07 ppm als nicht aufgelöste Multipletts.

Das für Anthocyane charakteristische Signal stellt das tieffeldverschobene Singulett des Protons an C-4 des C-Rings bei δ 8.90 ppm dar. Die *meta*-koppelnden Protonen an C-6 und C-8 spalten bei δ 7.05 und δ 7.04 ppm jeweils in ein Dublett mit kleiner Kopplungskonstante von 2.0 Hz auf. Die Protonen an C-2' und C-6' sind chemisch äquivalent und zeigen ein intensives tieffeldverschobenes Singulett bei δ 7.78 ppm.

In dem Bereich von δ 6.81 bis δ 8.9 ppm sind die für aromatische Protonen typische Signale zu finden. Die *trans*-ständigen Protonen an Position b und c der Cumarsäure spalten in Dubletts mit einer großen Kopplungskonstante von 16 Hz auf. Die aromatischen Protonen

der *p*-Cumarsäure stellen ein AA'BB'-Spinsystem dar. Die Protonen an C-i und C-e sowie an C-h und C-f erscheinen jeweils als Dublett von Dubletts mit identischen chemischen Verschiebungen. Die vollständigen $^1\text{H-NMR}$ -Daten sind in Tabelle 6 zu finden. Die Werte sind in Einklang mit denen von ICHIYANAGI et al. (2005).

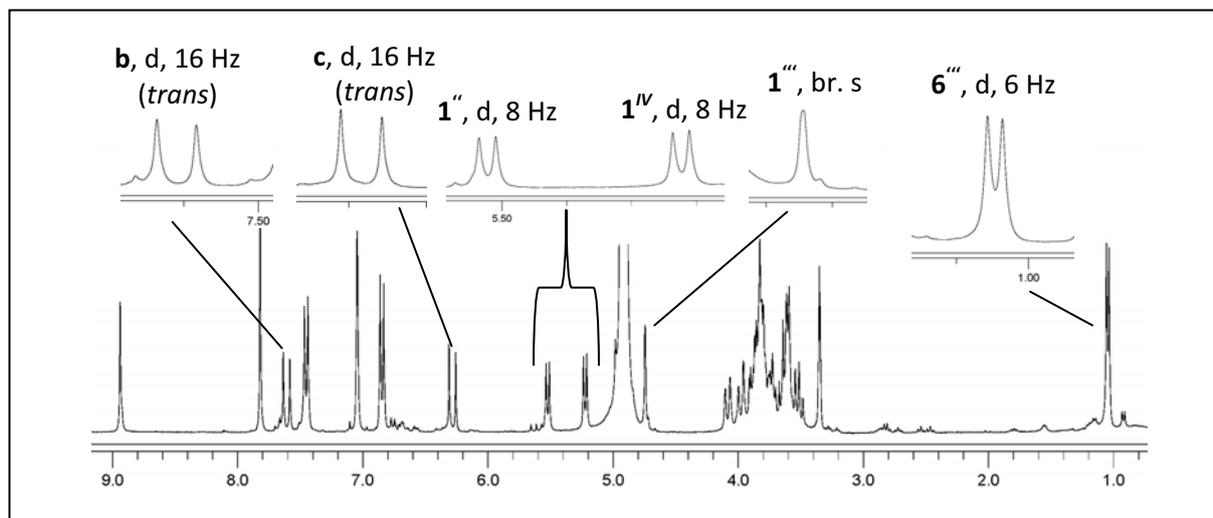


Abbildung 45: $^1\text{H-NMR}$ von *trans*-Nasunin (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}(\text{d}_1)$) mit vergrößerten Ausschnitten aus dem Bereich der Cumarsäure-Doppelbindung, der anomeren Protonen und dem charakteristischen Signal der Rhamnose

Tabelle 6: Chemische Verschiebung und Kopplungsmuster der Protonen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *trans*-Nasunin

Proton	Chemische Verschiebung [ppm], Kopplungsmuster	Proton	Chemische Verschiebung [ppm], Kopplungsmuster
4	8.90 (s)	2'''-5'''	3.40 – 4.07 (m)
6	7.05 (d, 2 Hz)	6'''	1.01 (d, 6 Hz)
8	7.04 (d, 2 Hz)	1 ^{IV}	5.18 (d, 8 Hz)
2'	7.78 (s)	2 ^{IV} -6 ^{IV}	3.40 – 4.07 (m)
6'	7.78 (s)	b	7.57 (d, 16 Hz)
1''	5.48 (d, 8 Hz)	c	6.26 (d, 16 Hz)
2''-6''	3.40 – 4.07 (m)	i, e	7.41 (dd, 2/7 Hz)
1'''	4.70 (br. s)	h, f	6.81 (dd, 1.5/7 Hz)

3.3.4 Beurteilung der antioxidativen und zytotoxischen Aktivität

In Abbildung 46 sind die antioxidativen und zytotoxischen Aktivitäten der HSCCC-Fractionen der Trennung des essigsauren methanolischen Extraktes und die der isolierten Verbindungen **A6**, **A7** und **A9** dargestellt. Kryptochlorogensäure und Chlorogensäure (**A6**, **A7**), die die HSCCC-Fractionen 6 und 7 darstellen, weisen eine sehr hohe antioxidative Aktivität von 3,14 und 3,29 mmol Trolox pro Gramm auf. Von der Fraktion 4, die neben der Verbindung **A5** Neochlorogensäure (**A8**) enthält, wurde ebenfalls eine recht hohe antioxidative Aktivität bestimmt. Nach CHEN und HO (1997) besitzen *ortho*- und *para*-Benzoldiol-Derivate hohe radikalfangende Aktivitäten, da diese sich in stabile *ortho*- und *para*-Chinone umwandeln können. Die radikalfangenden Eigenschaften der Chlorogensäure-Isomere wurden von NAKATANI et al. (2000) mit Elektronenresonanzspektroskopie (ESR) bestimmt. Es konnten ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede in den Aktivitäten der Isomere festgestellt werden.

Kryptochlorogensäure und Chlorogensäure weisen weiterhin hohe zytotoxische Eigenschaften auf. In dem „Brine shrimp“-Bioassay betrug die Mortalität der Brine shrimps bei der höchsten Probenkonzentration von 500 µg/mL mehr als ein Drittel. Die Aktivität der Fraktion 4 kann somit vermutlich Neochlorogensäure zugeschrieben werden. Eine potentielle Zytotoxizität der Chlorogensäure-Isomere ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Die Verbindung **A1** ist vermutlich für die zytotoxischen Aktivitäten der Fraktionen 1 und 2 verantwortlich.

Die hohe antioxidative Aktivität der HSCCC-Fraktion 3 ist auf die Verbindung **A2** und *trans*-Nasunin zurückzuführen, welches als Reinsubstanz ebenfalls getestet wurde und eine Aktivität von 1,87 mmol Trolox pro Gramm aufweist. NODA et al. (2000) beschreiben die Fähigkeit von Nasunin, Superoxidradikal-Anionen abfangen zu können und eine protektive Aktivität von Nasunin gegenüber Lipidperoxidation.

Die zytotoxische Aktivität der Fraktion 3 ist auf das Hydroxyzimtsäureamid-Derivat **A2** zurückzuführen, da *trans*-Nasunin (**A9**) auch bei der höchsten Probenkonzentration keine Aktivität zeigt.

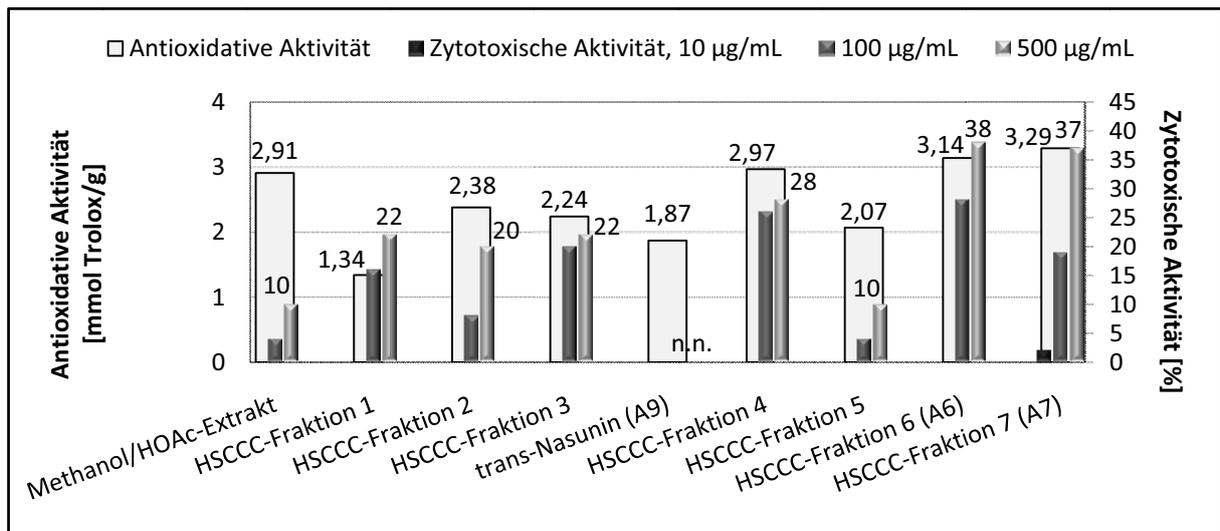


Abbildung 46: Antioxidative und zytotoxische Aktivität der HSCCC-Fractionen und der isolierten Verbindungen A6, A7 und A9

3.4 Isolierung von Verbindungen aus *Perilla* (*Perilla frutescens*)

3.4.1 Isolierung und Fraktionierung der Flavonoide

Bei den in *Perilla frutescens* enthaltenen Polyphenolen handelt es sich hauptsächlich um Anthocyane und Flavone. Flavone können in einem HPLC-Chromatogramm anhand ihrer Absorptionsbanden erkannt werden. Sie besitzen je nach Derivat neben der UV-Bande für aromatische Systeme bei circa 260 nm eine zusätzliche Absorptionsbande bei ungefähr 340 nm (s. Abbildung 88 im Anhang).

In Abbildung 47 sind die Chromatogramme des essigsauren methanolischen *Perilla*-Extraktes bei 330 nm und 520 nm dargestellt. Wie in dem Chromatogramm (B) bei 520 nm zu erkennen ist, sind in dem Extrakt Anthocyane enthalten, die relativ hohe Retentionszeiten aufweisen. Dadurch wurde auf das Vorliegen von acetylierten Derivaten geschlossen, welche eine größere Lipophilie aufweisen. Das Chromatogramm (A) ist bei einer Absorption von 330 nm dargestellt. Bei diesen Verbindungen handelt es sich größtenteils um Flavone.

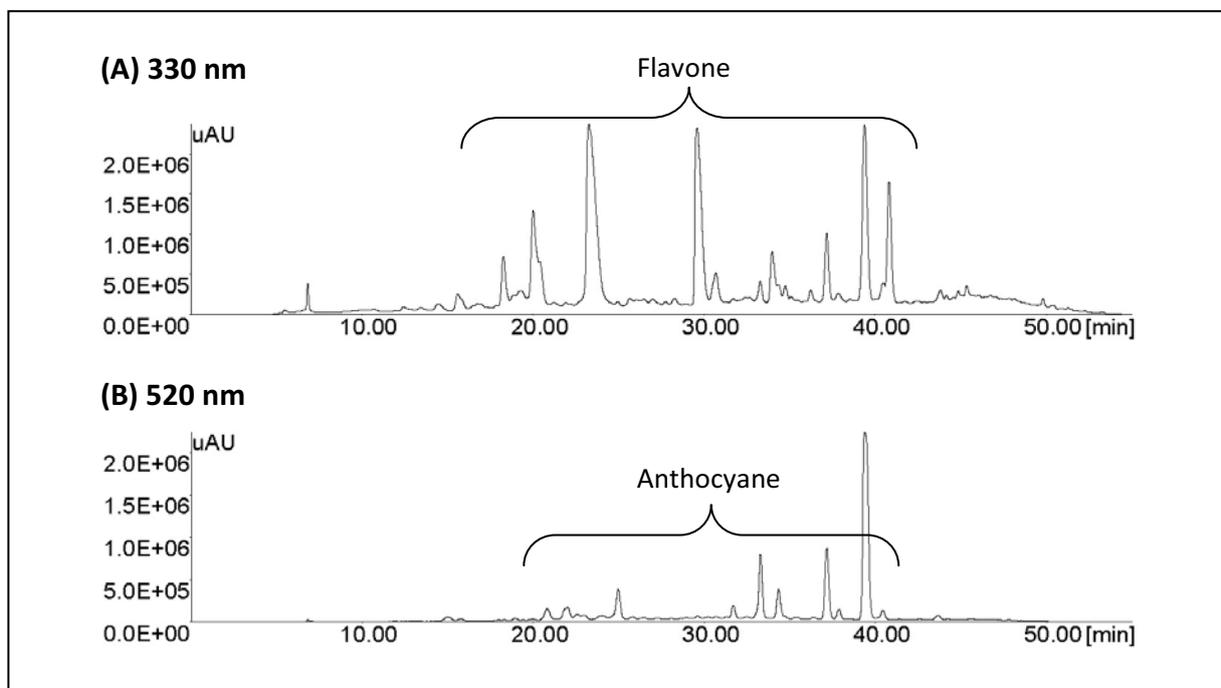


Abbildung 47: (A, B) HPLC-Chromatogramme des essigsauren Methanol-Extrakts von *Perilla frutescens* bei 330 und 520 nm

Zur Fraktionierung und Isolierung der Flavonoide wird der Extrakt einer HSCCC-Trennung unterzogen. Das Fließmittelgemisch aus tBME, *n*-Butanol, Acetonitril und Wasser (2/2/1/5, v/v/v/v) mit einem Zusatz von 0,1 % Trifluoressigsäure hat sich bei den Tests zur Ermittlung der Verteilungskoeffizienten als geeignet erwiesen. Die Trennung wurde mit einer Flussrate von 3,0 mL/min bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 900 rpm durchgeführt. In Abbildung 48 ist das HSCCC-Chromatogramm nach einer Trennung bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm dargestellt.

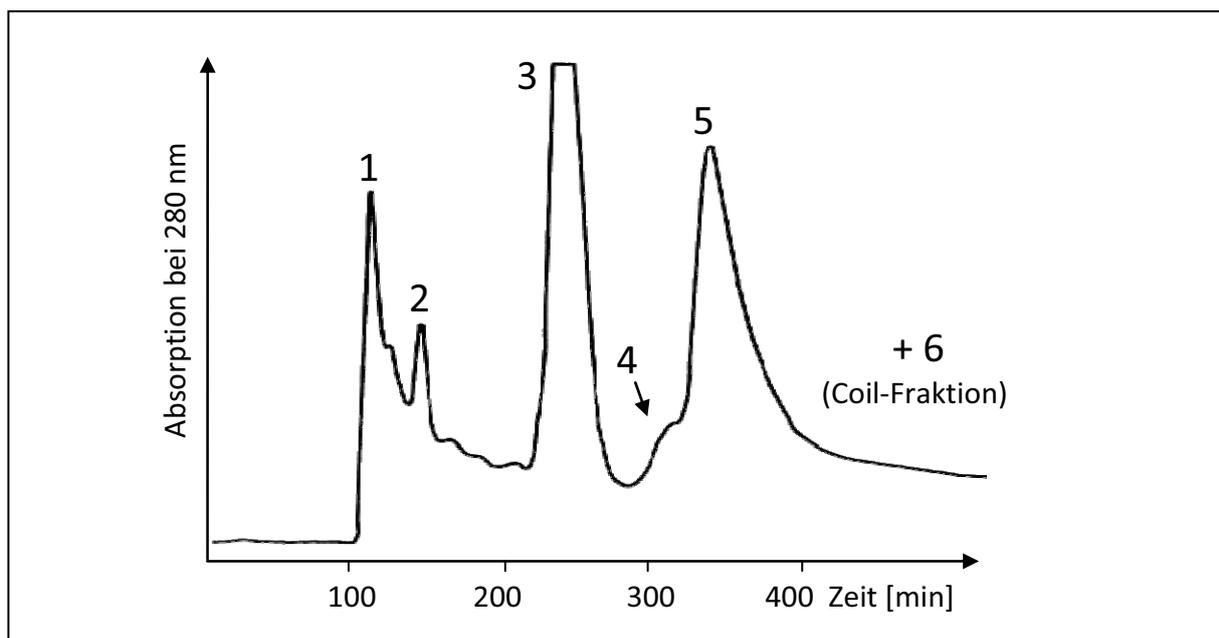


Abbildung 48: HSCCC-Chromatogramm des essigsauren Methanol-Extrakts von *Perilla frutescens* bei 280 nm

Einschließlich der Fraktion, die auf dem Coil retardierte, wurden sechs Fraktionen erhalten, die anschließend mit HPLC-DAD und LC-ESI-MSⁿ analysiert wurden. In Abbildung 49 sind die HPLC-Chromatogramme der HSCCC-Fraktionen bei 280 nm dargestellt.

Die Fraktion 1 und die Coil-Fraktion 6 wurden aufgrund ihrer Komplexizität rechromatographiert. Weiterhin waren diese Fraktionen von Interesse, da sie eine hohe antioxidative Aktivität aufwiesen und die Coil-Fraktion zusätzlich Hinweise auf das Vorliegen von zytotoxischen Substanzen bot (s. Abbildung 60, S. 99). In den HSCCC-Fraktionen 3, 5 und 6 sind hauptsächlich Flavone enthalten, die in Kapitel 3.4.1.1 näher behandelt werden. Flavone konnten weiterhin auch nach einer Rechromatographie mittels Sephadex LH-20 isoliert werden. In Kapitel 3.4.1.2 werden die Anthocyane beschrieben, die aus der HSCCC-

Fraktion 3 und nach einer HSCCC-Rechromatographie aus Fraktion 1 isoliert und charakterisiert wurden.

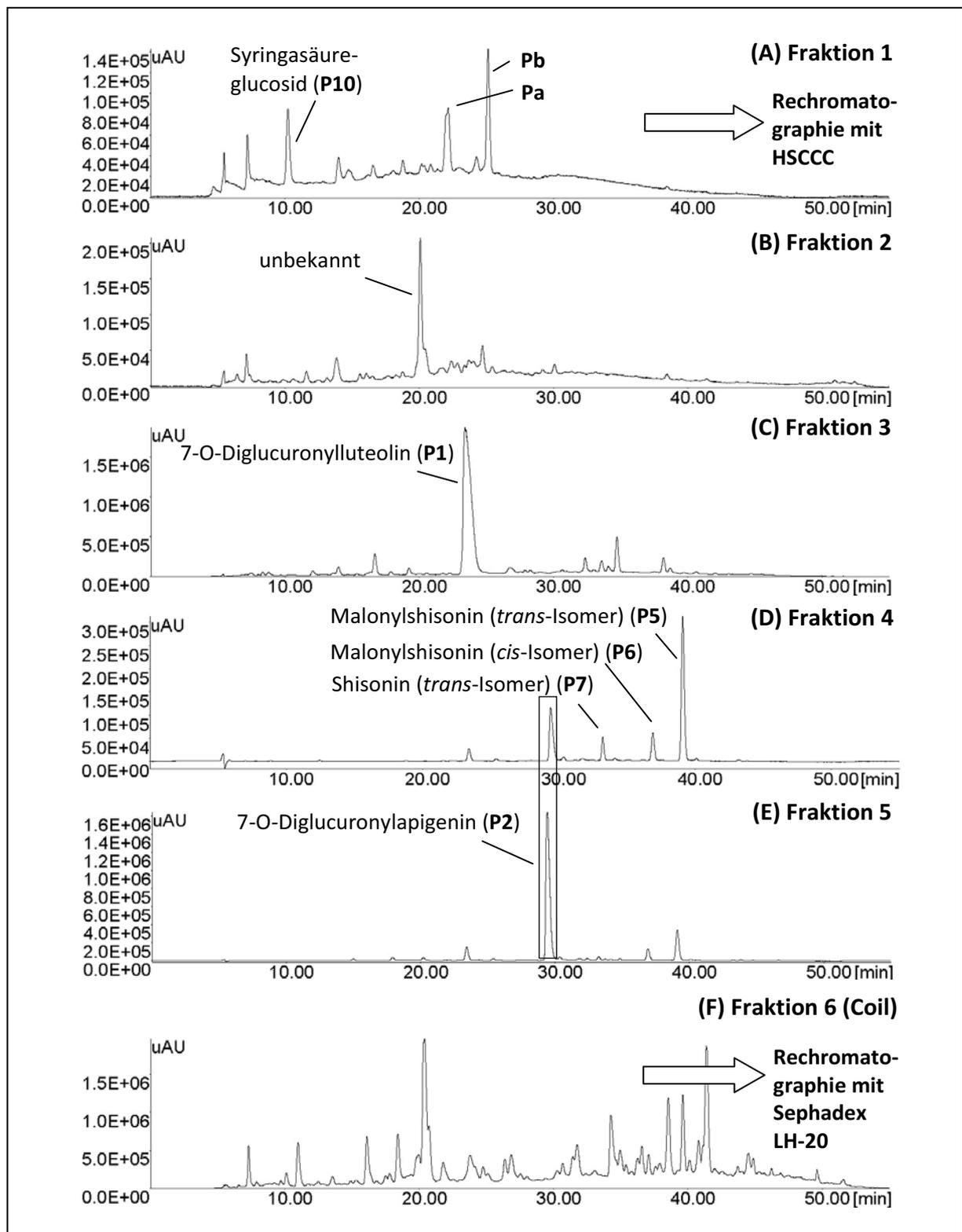


Abbildung 49: (A - F) HPLC-Chromatogramme der HSCCC-Fraktionen 1 bis 6 der Trennung des essigsauren methanolischen Perilla-Extrakts bei 280 nm

3.4.1.1 Charakterisierung der Flavone

In den HSCCC-Fractionen 3 und 5 sind die Flavon-Diglucuronide 7-O-Diglucuronylluteolin (**P1**) und 7-O-Diglucuronylapigenin (**P2**) als Hauptverbindungen enthalten. Die Flavone können in reiner Form durch eine Präzipitationsreaktion gewonnen werden, die circa 24 Stunden nach der HSCCC-Trennung in den Reagenzgläsern stattfindet. Beschleunigt werden kann diese Reaktion durch Kälteeinwirkung. 7-O-Diglucuronylluteolin wird als gelbe Kristalle und 7-O-Diglucuronylapigenin als farblose Substanz erhalten. Es konnten auf diese Weise bei einem Einsatz von 750 mg Extrakt zur Chromatographie etwa 27 mg der Verbindung **P1** und 18 mg der Substanz **P2** in reiner Form isoliert werden. Eine Quantifizierung mittels HPLC-DAD ergab einen Gehalt an **P1** von 449 mg und an **P2** von 67 mg pro 100 g getrockneten Pflanzenmaterials (Methode s. Kapitel 5.3.6, Werte Tabelle 23 im Anhang). Der Wassergehalt der Blätter von *Perilla frutescens* wurde nicht bestimmt.

Durch Rechromatographie der Coil-Fraktion an Sephadex LH-20, unter Verwendung des Elutionsmittels Methanol und anschließender Trennung der Fraktionen mittels präparativer HPLC, wurden weitere Flavone isoliert und charakterisiert. Die Einteilung in Fraktionen erfolgte mittels HPLC- und DC-Analysen (Methoden s. Kapitel 5.3.2.1 und 5.3.1 DC-System 1). Nach der Sephadex-Rechromatographie wurden acht Fraktionen erhalten.

In Abbildung 50 sind die HPLC-Chromatogramme der Sephadex-Fractionen 6.1, 6.4 und 6.6 bis 6.8 dargestellt.

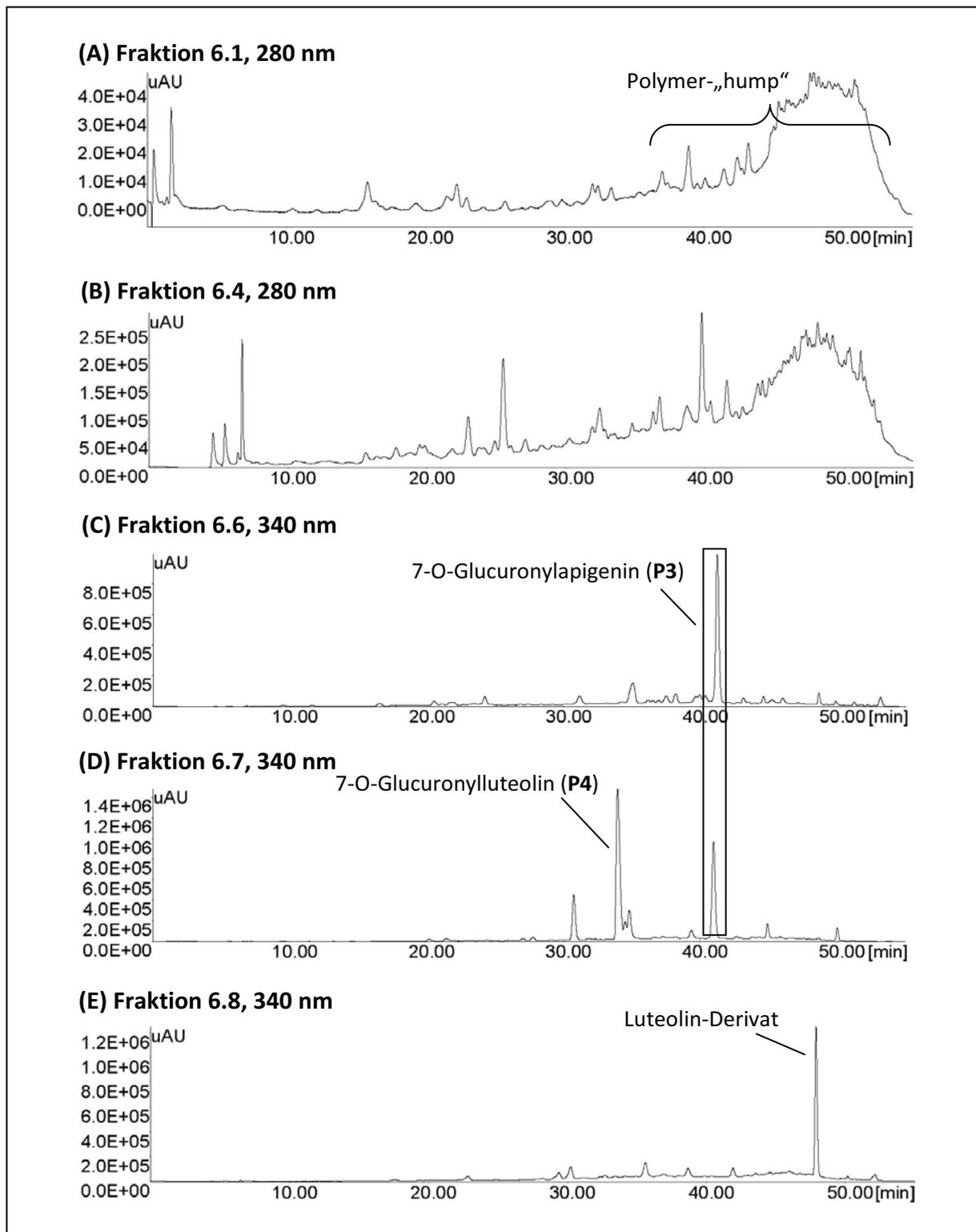


Abbildung 50: (A - E) HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 6.1, 6.4 und 6.6 bis 6.8

Die Fraktionen 6.1 bis 6.4 bestehen zum größten Teil aus polymeren Verbindungen, welches durch den Polymer-,hump" im HPLC-DAD-Chromatogramm bei Retentionszeiten ab circa 40 Minuten erkennbar ist. In Abbildung 50 (A) sind die Chromatogramme der HSCCC-

Fraktionen 6.1 und 6.4 bei 280 nm dargestellt. Moleküle, die eine Größe von 4000 Da überschreiten, können bei Sephadex LH-20-Material nur das Zwischenkornvolumen passieren und eluieren sofort. Die Anreicherung erfolgt somit in den ersten Fraktionen der Sephadex-Trennung. Die Fraktionen 6.1 und 6.4 sind durch ihre hohen zytotoxischen Aktivitäten aufgefallen (s. Kapitel 3.4.2). Weitere Untersuchungen waren durch die vorliegenden geringen Substanzmengen jedoch nicht möglich. Fraktion 6.5 bestand hauptsächlich aus den Anthocyanen **P5** bis **P7**, die in Kapitel 3.4.1.2 näher erläutert werden.

Die HPLC-Chromatogramme der Sephadex-Fraktionen 6.6 bis 6.8 wurden aufgrund des Flavongehalts bei 340 nm dargestellt. Aus den Fraktionen 6 und 7 wurden die Flavone 7-O-Glucuronylapigenin (**P3**) und 7-O-Glucuronylluteolin (**P4**) mittels präparativer HPLC isoliert (Methode s. Kapitel 5.4.3). In Fraktion 6.8 ist eine Verbindung enthalten, bei der es sich vermutlich um ein Luteolin-Derivat handelt. Von dieser Substanz konnten keine NMR-Spektren aufgenommen werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels ESI-MSⁿ-Daten.

Abbildung 51 (A) zeigt beispielhaft das Massenspektrum der Verbindung **P2** im positiven Modus sowie die Massen der Moleküllionen und Fragmente der Verbindungen **P1** bis **P4**. Die Fragmente m/z 447 und m/z 271, welches das Apigenin-Aglykon darstellt, wurden durch die Abspaltung von einem bzw. von zwei Glucuronsäure-Molekülen generiert. Die Glucuronsäuren sind bei den Verbindungen **P1** bis **P4** durch eine 1''→7-glykosidische Bindung und bei **P1** und **P2** eine weitere Glucuronsäure über eine 2''→1'''-glykosidische Bindung verknüpft. Das Aglykon Luteolin unterscheidet sich von Apigenin durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe am B-Ring der Flavylum-Struktur.

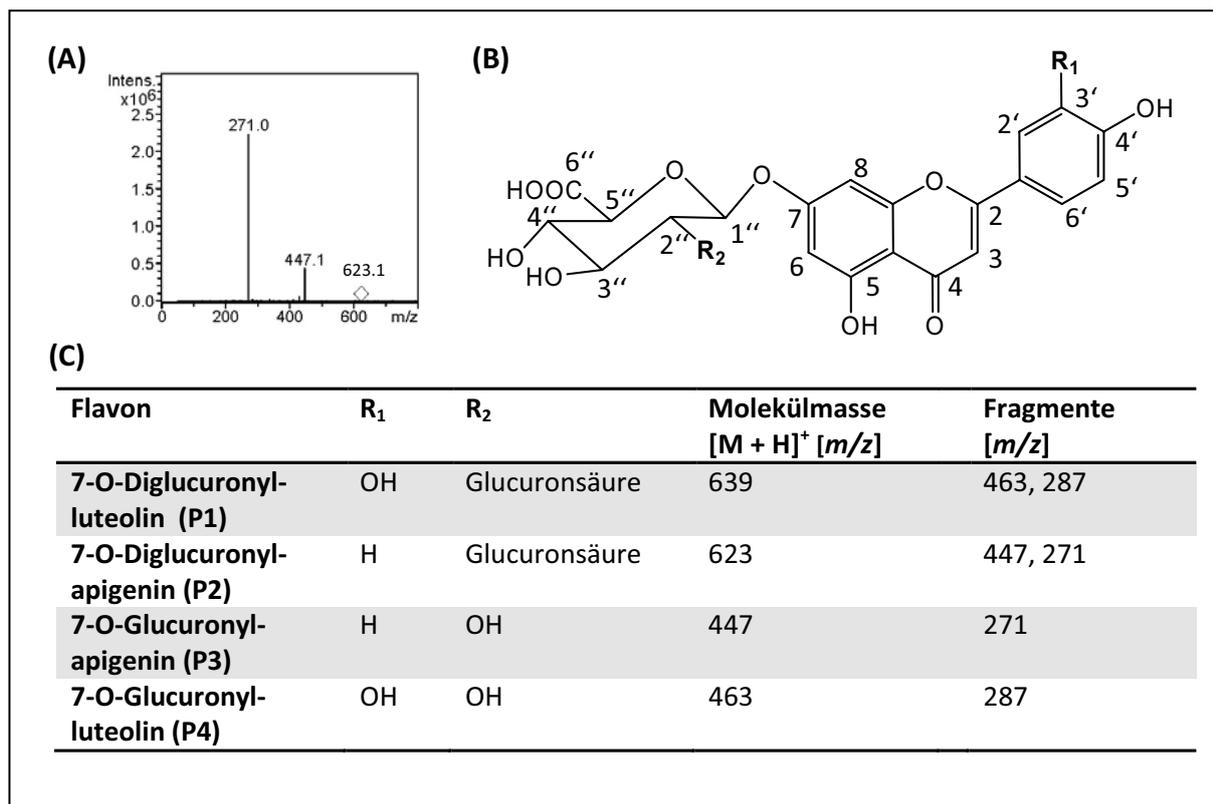


Abbildung 51: (A) Massenspektrum (positiver Modus) von Diglucuronylapigenin (P2) $[M + H]^+ = 623$, (B) Strukturen der Flavon-Glucuronide und (C) die entsprechenden Molekülmassen $[M + H]^+$ und Fragmente

Das postulierte Luteolin-Derivat aus der Fraktion 8 weist eine Masse von m/z 519 $[M+H]^+$ auf sowie einen Basispeak mit m/z 287 $[M+H-232]$. Anhand der Molekülmasse und der charakteristischen Absorptionsmaxima von 259 und 346 nm könnte es sich bei dem Aglykon um Luteolin handeln. Im Massenspektrum im negativen Modus sind weiterhin die Fragmente mit m/z 461 $[M-H-56]^-$ und m/z 341 $[M-H-176]^-$ zu sehen. Bei der Abspaltung des Fragments mit m/z 176 könnte es sich wiederum um Glucuronsäure handeln. Die Abspaltung von m/z 56 ist nicht sicher zu interpretieren. Es könnte sich dabei um eine Eliminierung als C_4H_8 , C_3H_4O oder C_2O_2 handeln. Ein Strukturvorschlag kann nicht gegeben werden.

Zur Strukturaufklärung der Flavone **P1** bis **P4** wurden neben den massenspektrometrischen Daten 1H - und ^{13}C -NMR-Daten herangezogen, die zum Teil eine gute Übereinstimmung mit Literaturdaten ergaben (YOSHIDA et al. 1993, NAKAZAWA und OHSAWA 2000, LU und FOO 2000).

Die chemischen Verschiebungen der Protonen und Kohlenstoffatome in NMR-Spektren sind in Tabelle 7 und in Tabelle 8 auf S. 88 dargestellt. Die charakteristischen Unterschiede der Aglykone sind in den Tabellen markiert.

Tabelle 7: Chemische Verschiebung und Kopplungsmuster der Protonen im ^1H -NMR-Spektrum der Perilla-Flavone P1 bis P4

Proton	P1	P2	P3	P4
3	6.40 (s)	6.82 (s)	6.87 (s)	6.74 (s)
5 (OH)	12.96 (br. s)	12.94 (br. S)	12.96 (br. s)	12.99 (br. s)
6	6.70 (d, 2 Hz)	6.75 (d, 2 Hz)	6.42 (d, 2 Hz)	6.44 (d, 2 Hz)
8	6.70 (d, 2 Hz)	6.41 (d, 2 Hz)	6.82 (d, 2 Hz)	6.80 (d, 2 Hz)
2'	7.41 (d, 2 Hz)	7.95 (dd, 2/9 Hz)	7.95 (dd, 2/9 Hz)	7.41 (d, 2 Hz)
3'	9.34 (br. s, OH)	6.95 (d, 9 Hz)	6.92 (d, 9 Hz)	9.50 (br. s, OH)
4' (OH)	9.91 (br. s)	10.35 (br. s)	-	10.02 (br. s)
5'	6.90 (d, 9 Hz)	6.95 (d, 9 Hz)	6.92 (d, 9 Hz)	6.89 (d, 9 Hz)
6'	7.42 (dd, 2/9 Hz)	7.95 (dd, 2/9 Hz)	7.95 (dd, 2/9 Hz)	7.44 (dd, 2/9 Hz)
1''	5.42 (d, 7 Hz)	5.40 (d, 7 Hz)	5.20 (d, 7 Hz)	5.22 (d, 7.5 Hz)
2''- 4''	3.00 - 3.60 (m)	3.00 - 3.60 (m)	3.15 - 3.37 (m)	3.40 - 3.90 (m)
5''	4.10 (d, 9 Hz)	4.09 (d, 9 Hz)	3.15 - 3.37 (m)	3.40 - 3.90 (m)
1'''	4.55 (d, 7.5 Hz)	4.58 (d, 7.5 Hz)	-	-
2''' - 4'''	3.00 - 2.60 (m)	3.00 - 3.60 (m)	-	-
5'''	3.64 (d, 9 Hz)	3.66 (d, 9 Hz)	-	-

Die Protonen 2', 5' und 6' des B-Rings der Luteolin-Aglykone der Verbindungen **P1** und **P4** zeigen eine ABX-Aufspaltung. Das Dublett von Dubletts bei δ 7.42 (δ 7.44) ppm, mit $J_1 = 2.0$ und $J_2 = 9.0$ Hz ist dem Proton an der Position C-6' zuzuordnen. Das Dublett bei δ 6.90 (δ 6.89) ppm mit einer großen Kopplungskonstante von 9.0 Hz zeigt eine *ortho*-Kopplung des Protons an C-5'. Das Dublett mit einer kleinen Kopplungskonstante von 2.0 Hz bei δ 7.41 ppm kann dem Proton an C-2' zugeordnet werden.

Als Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie wurde deuteriertes Dimethylsulfoxid gewählt; Protonen von Hydroxylgruppen koppeln demnach auch mit vicinalen Protonen.

Bei δ 12.96 (δ 12.99) ppm erscheint das charakteristische Singulettsignal für eine freie OH-Gruppe am Kohlenstoffatom 5 einer flavonoiden Verbindung. Die starke Tieffeldverschiebung dieses Protons wird durch Wasserstoffbrückenbindung des Hydroxylprotons mit der Carbonylgruppe am C-4 verursacht. Die Hydroxyl-Protonen am Luteolin-B-Ring sind bei δ 9.34 (δ 9.50) und δ 9.91 (δ 10.02) ppm als breite Singulett zu sehen.

Das Proton der Hydroxygruppe an C-4' von Diglucuronylapigenin ist als breites Singulett sichtbar. Bei dem entsprechenden Monoglucuronid **P3** kann dieses Signal nicht beobachtet werden. Das für Flavone typische Singulett des Protons am C-3 ist bei δ 6.40 (δ 6.74) ppm sichtbar. Die *meta*-koppelnden Protonen an C-6 und C-8 spalten in Dubletts mit kleinen Kopplungskonstanten von 2.0 Hz bei δ 6.70 (δ 6.44) und δ 6.72 (δ 6.80) ppm auf. Die anomeren Protonen der Glucuronsäuren 1'' und 1''' sind hochfeldverschoben bei δ 5.42 (δ 5.22) und δ 4.55 ppm sichtbar. Die Aufspaltung in jeweils ein Dublett mit 7.0 Hz bzw. 7.5 Hz deutet auf eine β -Verknüpfung der Glucuronsäuren hin. In Verbindung **P1** sind die Glucuronsäure-Protonen an C-5'' und C-5''' jeweils durch den Einfluss der Carboxylgruppe in unmittelbarer Nachbarschaft hochfeldverschoben als Dubletts bei δ 4.10 und δ 3.64 ppm zu finden. Alle weiteren Protonen der Glucuronsäuren sind als nicht auswertbare Multipletts zu sehen.

In Abbildung 52 ist das ^1H -NMR-Spektrum von Diglucuronylluteolin (**P1**) dargestellt.

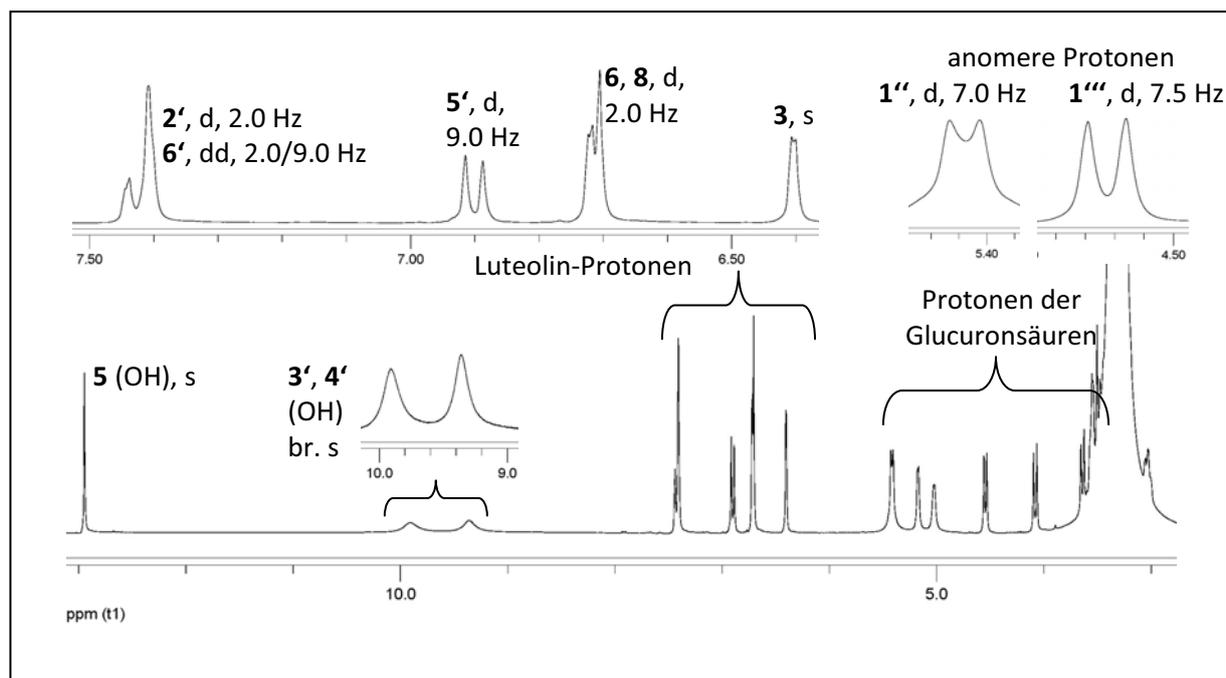


Abbildung 52: $^1\text{H-NMR}$ von Diglucuronyluteolin (**P1**) (300 MHz, CD_3SOCD_3)

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Apigenin-Glucuronide **P2** und **P3** zeigen im aromatischen Bereich nur fünf Signale. Der Unterschied zu Luteolin liegt in der fehlenden Hydroxylgruppe an C-3' des B-Rings. Charakteristisch für diesen *para*-substituierten Aromaten sind die beiden Dubletts bei δ 6.95 (δ 6.92) ppm von H-3' und H-5' am B-Ring mit jeweils einer Kopplungskonstante von 9.0 Hz und die beiden Dublett von Dubletts mit $J_1 = 2.0$ Hz und $J_2 = 9.0$ Hz bei δ 7.95 ppm von H-2' und H-6'.

In Tabelle 8 sind die $^{13}\text{C-NMR}$ -Signale der Verbindungen **P1**, **P2** und **P4** dargestellt. Das Spektrum der Verbindung **P3** konnte nicht ausgewertet werden. Unterschiede in der chemischen Verschiebung des Luteolin- und Apigenin-Aglykons ergeben sich für die Kohlenstoffatome des B-Rings. In dem Spektrum der Verbindung **P2** deuten die Signale bei δ 128.73 und δ 116.14 ppm durch die intensivere Signalstärke auf einen symmetrischen Aufbau eines Molekülteils hin und konnten den Kohlenstoffatomen C-2', C-6' und C-3', C-5' zugeordnet werden. Für die Glucuronsäuren finden sich 12 Signale für die Diglucuronide **P1** und **P2** und 6 Signale für das Monoglucuronid **P4**. Die Signale der oxidierten Kohlenstoffatome der Carboxylfunktion der Glucuronsäuren und der Carbonylfunktion an C-4 befinden sich im tieferen Feld. Die anomeren Glucuronsäure-Signale für die direkt gebundenen Glucuronsäuren erscheinen bei δ 97.58 bis δ 99.72 ppm und δ 105.46 bzw. δ 105.66 ppm für das zweite Glucuronsäure-Molekül.

Tabelle 8: Chemische Verschiebung der Kohlenstoffatome im ^{13}C -NMR-Spektrum der Flavone. Die wesentlichen Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Kohlenstoffatome der Aglykone sind markiert dargestellt.

C	P1	P2	P4	C	P1	P2	P4
2	164.46	164.50	164.71	6'	118.89	128.73	119.41
3	103.27	103.28	103.41	1''	97.58	97.87	99.72
4	181.87	182.17	182.14	2''	82.25	82.51	73.64
5	156.86	157.02	157.19	3''	74.84	75.03	76.09
6	99.25	99.37	99.42	4''	70.69	70.89	71.70
7	162.13	162.37	162.87	5''	75.02	75.24	75.16
8	94.65	94.95	94.74	6''	169.70	169.85	172.06
9	161.14	161.45	161.36	1'''	105.46	105.66	-
10	104.31	104.59	105.63	2'''	74.09	74.31	-
1'	121.44	121.27	121.56	3'''	75.59	75.77	-
2'	113.31	128.73	113.75	4'''	71.57	71.76	-
3'	145.71	116.14	146.02	5'''	75.75	75.99	-
4'	149.82	161.35	150.17	6'''	170.06	170.25	-
5'	116.12	116.14	116.22				

In der Literatur wird neben den Aglykonen Apigenin und Luteolin auch häufig Scutelarein beschrieben, welches eine identische Molekülmasse wie Luteolin aufweist, die Hydroxylgruppe jedoch nicht am C-5', sondern an dem Kohlenstoffatom 6 gebunden ist (YAMAZAKI et al. 2003, YOSHIDA et al. 1993). Bei den Analysen der in dieser Arbeit verwendeten Perilla-Extrakte konnte dieses Flavon nicht identifiziert werden. Vermutlich kann dieses auf die unterschiedlichen klimatischen Verhältnisse zurückgeführt werden. Während die meisten publizierten Untersuchungen an Perilla-Pflanzen aus Japan durchgeführt wurden, wurde in dieser Arbeit Pflanzenmaterial verwendet, welches in Norddeutschland geerntet wurde.

3.4.1.2 Charakterisierung der Anthocyane

Die Anthocyane sind hauptsächlich in den HSCCC-Fractionen 1 und 4 enthalten, welche daher zur weiteren Trennung und Isolierung herangezogen wurden. In Abbildung 53 sind die HPLC-Chromatogramme dieser Fractionen bei 520 nm dargestellt. Fraction 1 ist im Vergleich zu Fraction 4 komplex zusammengesetzt und enthält neben den beiden Hauptanthocyanen weitere Verbindungen, welche in dem HPLC-Chromatogramm A in Abbildung 49 bei 280 nm zu sehen sind.

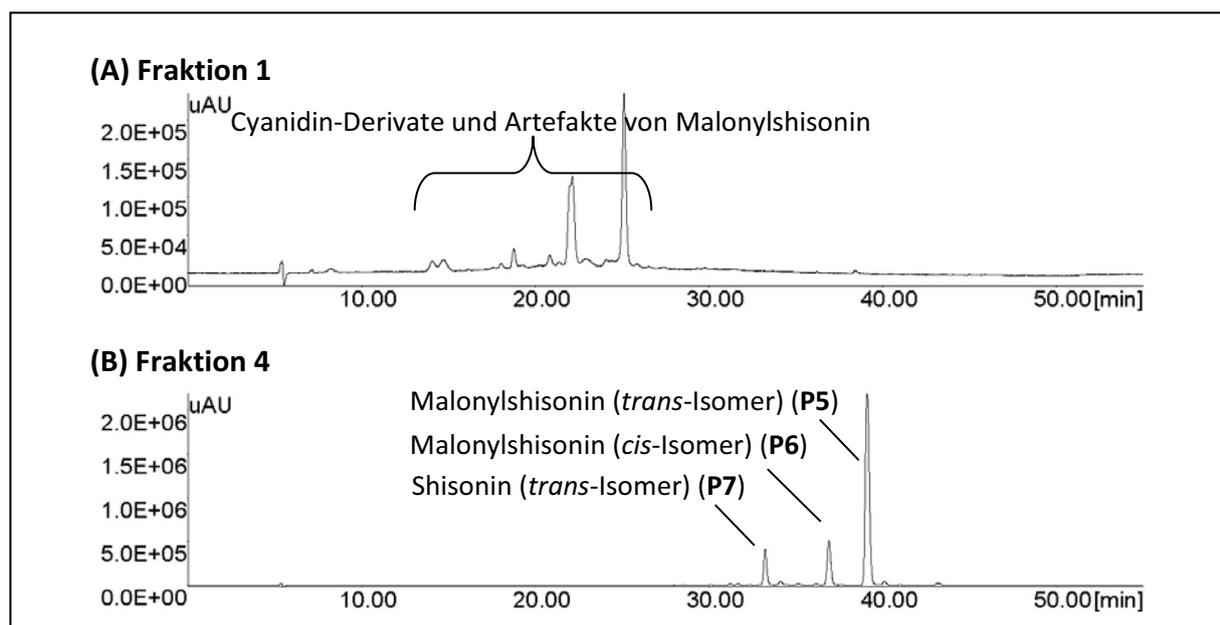


Abbildung 53: (A, B) HPLC-Chromatogramme der HSCCC-Fractionen 1 und 4 bei 520 nm

Analog zu den Referenzdaten konnten ausschließlich Cyanidin-Derivate in den Perilla-Extrakten und Fractionen charakterisiert und identifiziert werden (MAZZA und MINIATI 1993, YAMAZAKI et al. 2003). Bei dem bekanntesten und für *Perilla frutescens* charakteristischen Anthocyan handelt es sich um Cyanidin-3-O- β -D-[6''-(*trans-p*-cumaroyl)glucopyranosid]-5-O- β -D-6'''-malonylglucopyranosid, welches unter der Trivialbezeichnung „Malonylshisonin“ bekannt ist. Nach KONDO et al. (1989) handelt es sich bei Malonylshisonin um das genuine Anthocyan und andere Cyanidin-Derivate wie Shisonin stellen Artefakte von Malonylshisonin dar.

Die Malonylshisonin-Derivate und Artefakte aus Fraction 4 wurden mittels präparativer HPLC isoliert (Methode s. Kapitel 5.4.3).

Malonylshisonin ist sehr instabil. Durch Abspaltung von Malonsäure entsteht Shisonin (**P7**), welches das am häufigsten vorkommende Malonylshisonin-Derivat darstellt. Shisonin wurde bereits 1935 von KURODA und WADA isoliert und bis zur Isolierung von Malonylshisonin als das genuine Pigment in *Perilla frutescens* beschrieben (KONDO et al. 1989). Abbildung 54 zeigt das Massenspektrum und die Struktur von Malonylshisonin mit *trans-p*-Cumarsäure.

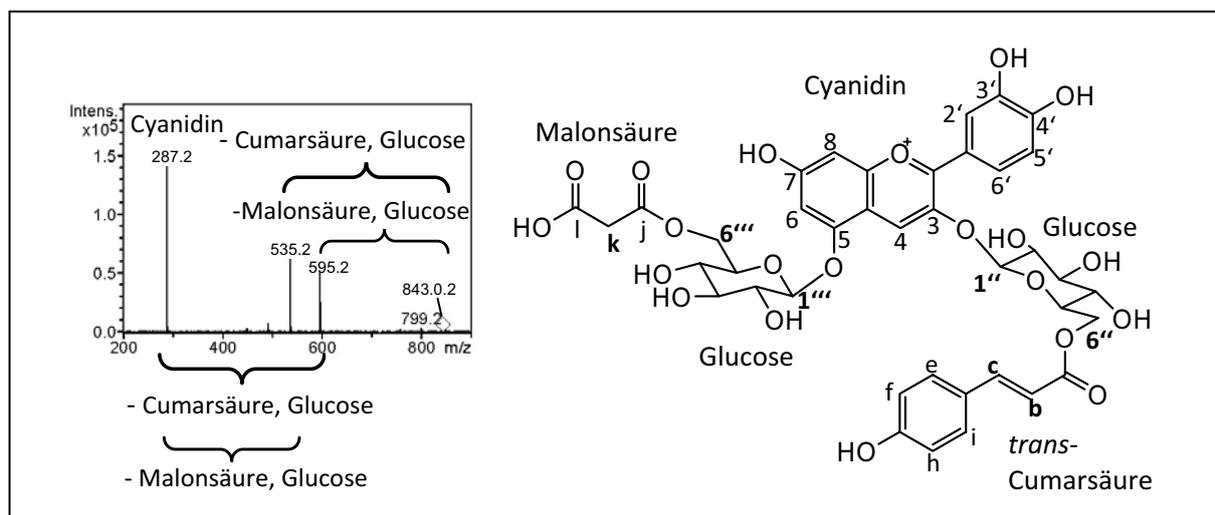


Abbildung 54: MS²-Massenspektrum und Struktur von *trans*-Malonylshisonin (P5**) im positiven Modus, [M]⁺ = 843**

Die Molekülmasse von *trans*-Malonylshisonin beträgt m/z 843 [M]⁺. Durch Abspaltung der Malonsäure und des Glucosemoleküls an der Position 5 des Cyanidinaglykons entsteht das Fragment mit m/z 595. Durch Verlust der Cumarsäure und der Glucose an der Position 3 entsteht das Fragment mit m/z 535. Das Cyanidin-Aglykon weist eine Molekülmasse von m/z 287 [M]⁺ auf. Ein Vergleich der Signale in ¹H-NMR und ¹³C-Spektren mit Referenzdaten bestätigte die Struktur von **P5** (HOSOKAWA et al. 1995). Weiterhin konnte auch das *cis*-Isomer isoliert werden. Nach YOSHIDA et al. (1990) ist für die Isomerisierung künstliches UV-Licht während der Extraktaufarbeitung und natürliches während zum Beispiel Wachstumsphasen verantwortlich, welches auf die Blätter von *Perilla* einwirkt.

Nach der Isolierung mittels präparativer HPLC und Lyophilisierung wurde von *cis*-Malonylshisonin unmittelbar ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen (s. Abbildung 55). Die ¹H-NMR-Daten sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Daten stimmen mit Referenzdaten überein (YOSHIDA et al. 1990).

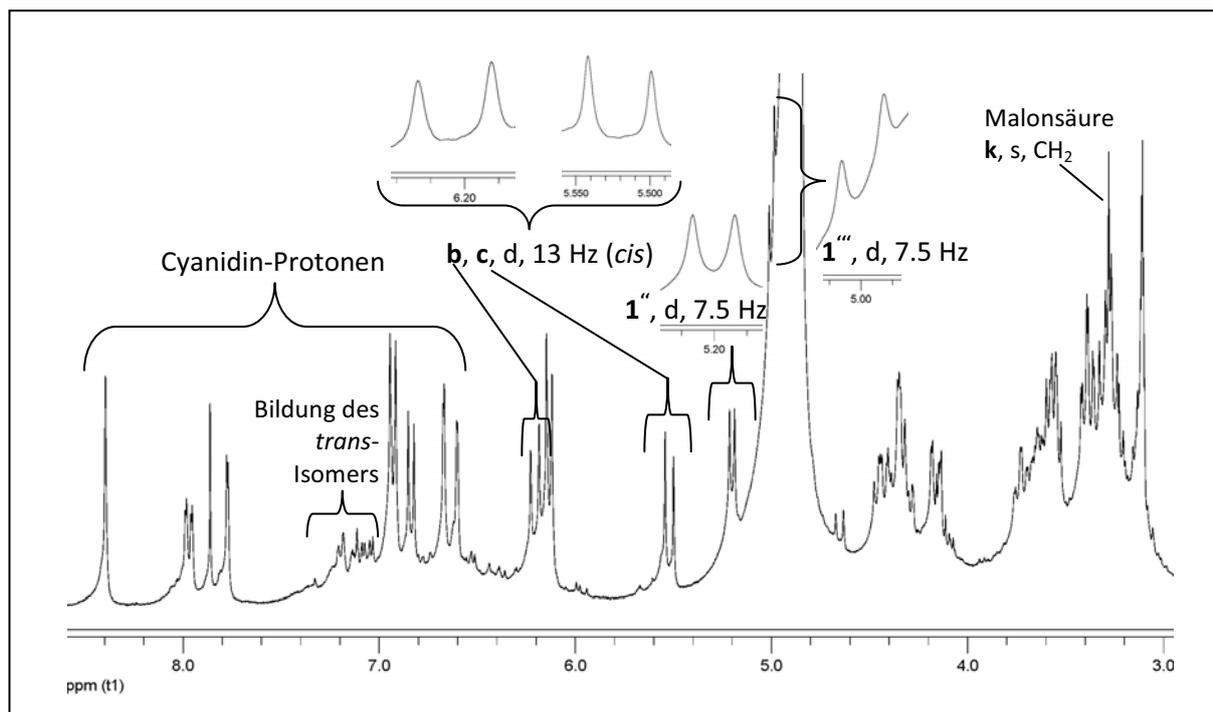


Abbildung 55: ^1H -NMR-Spektrum von *cis*-Malonylshisonin (**P6**) (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}(\text{d}_{11})$) mit vergrößerten Ausschnitten aus dem Bereich der Cumarsäure-Doppelbindung und der anomeren Protonen

Schon nach kurzer Zeit ist eine Bildung des Signals des *trans*-ständigen Protons *b* der Cumarsäure in dem Bereich von δ 7.0 – δ 7.2 ppm zu beobachten. Die Kopplungskonstanten der Dubletts der *cis*-ständigen Protonen *b* und *c* der *cis*-Cumarsäure weisen im Vergleich zu *trans*-Cumarsäure ($J = 16.0$ Hz) kleine Werte von jeweils 13.0 Hz auf und sind mit einer chemischen Verschiebung von δ 6.21 und δ 5.52 ppm hochfeldverschoben. Auffällig ist weiterhin, dass die Signale des Cyanidin-Aglykons bei dem *cis*-Isomer ebenfalls hochfeldverschobener sind als bei den *trans*-Cumarsäure-Derivaten **P5** und **P7**.

Die anomeren Protonen der Glucose-Moleküle $1''$ und $1'''$ sind bei δ 5.20 und δ 5.02 ppm mit Kopplungskonstanten von jeweils 7.5 Hz zu finden, welche auf β -glykosidische Bindungen hinweisen. Die chemische Verschiebung von allen weiteren Signalen der Protonen der Glucosemoleküle sind in Tabelle 9 dargestellt. Während bei **P5** und **P7** gut aufgelöste Kopplungsmuster vorliegen, ist bei **P6** nur ein nicht interpretierbares Multiplett zu sehen.

Die Signale der Protonen des Cyanidin B-Rings sind durch eine ABX-Aufspaltung mit denen des Luteolin-Aglykons vergleichbar (s. Tabelle 7, S. 85). Die beiden Protonen der Methylen-

Gruppe an C-k von Malonsäure bei **P5** und **P6** finden sich bei δ 3.40 bzw. δ 3.28 ppm als intensives Singulett. Dieses Signal ist durch das Fehlen der Malonsäure bei **P7** nicht zu beobachten. Die Signale der Protonen an C-6'' sind dadurch eher hochfeldverschoben als die in **P5**. Die Signale der Protonen der Cumarsäure sind vergleichbar mit den denen von *trans*-Nasunin (s. S. 75).

Tabelle 9: Chemische Verschiebung und Kopplungsmuster der Protonen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Anthocyane P5 bis P7

Proton	P5	P6	P7
4	8.92 (s)	8.40 (s)	9.01 (s)
6	6.99 (d, 2 Hz)	6.67 (d, 2 Hz)	7.07 (d, 2 Hz)
8	6.95 (d, 2 Hz)	6.60 (d, 2 Hz)	6.99 (d, 2 Hz)
2'	8.01 (d, 2 Hz)	7.74 (d, 2 Hz)	8.07 (d, 2 Hz)
5'	7.01 (d, 9 Hz)	6.83 (d, 9 Hz)	7.07 (d, 9 Hz)
6'	8.25 (dd, 2/9 Hz)	7.97 (dd, 2/9 Hz)	8.34 (dd, 2.5/9 Hz)
1''	5.40 (d, 7.5 Hz)	5.20 (d, 7.5 Hz)	5.47 (d, 8 Hz)
2''	3.59 (dd, 9/7.5 Hz)	} 4.50 - 3.22 (m)	3.77 - 3.80 (m)
3''	3.56 (t, 9 Hz)		3.65 (t, 9 Hz)
4''	3.35 (t, 9 Hz)		3.58 (t, 9 Hz)
5''	3.72 (ddd, 2.5/7.5/9)		3.95 (ddd, 3.5/6.5/9 Hz)
6''a	4.52 (dd, 2.5/12 Hz)		4.55 (dd, 3/12 Hz)
6''b	4.43 (dd, 7.5/12 Hz)		4.53 (dd, 6.5/12 Hz)
1'''	5.17 (d, 7.5 Hz)	5.02 (d, 7.5 Hz)	5.23 (d, 8 Hz)
2'''	3.74 (dd, 7.5/9.5 Hz)	} 4.50 - 3.22 (m)	3.65 (m)
3'''	3.48 (t, 9 Hz)		3.62 (t, 9 Hz)
4'''	3.42 (t, 9 Hz)		3.50 (t, 9 Hz)
5'''	3.92 (ddd, 2.5/7.5/9)		3.77 - 3.80 (m)
6'''a	4.54 (dd, 2.5/12 Hz)		4.04 (dd, 2/12 Hz)
6'''b	4.23 (dd, 7/12 Hz)		3.80 (dd, 6/12 Hz)

Proton	P5	P6	P7
k	3.40 (s)	3.28 (s)	-
b	6.22 (d, 16 Hz)	5.52 (d, 13 Hz)	6.30 (d, 16 Hz)
c	7.37 (d, 16 Hz)	6.21 (d, 13 Hz)	7.44 (d, 16 Hz)
e, i	7.22 (dd, 2/7 Hz)	6.92 (dd, 2/7 Hz)	7.36 (dd, 2/7.5 Hz)
h, f	6.72 (dd, 2/7 Hz)	6.12 (dd, 2/7 Hz)	6.82 (dd, 2/7.5 Hz)

Die chemische Verschiebung der Kohlenstoffatome in den ^{13}C -NMR-Spektren von **P5** und **P7** sind in Kapitel 5.7.2 dargestellt. Das Spektrum von **P6** konnte nicht ausgewertet werden. Vermutlich war die Bildung des *trans*-Isomeren schon zu weit fortgeschritten.

Die isolierte Substanz **P7** diente zur Quantifizierung von *trans*-Malonylshisonin (**P5**) und *trans*-Shisonin (**P7**). Demnach beträgt der Gehalt von **P5** 280 mg und von **P7** 53 mg pro 100 g getrockneten Pflanzenmaterials.

Zur weiteren Fraktionierung und Trennung der Anthocyane wird HSCCC-Fraktion 1 einer Rechromatographie mittels HSCCC unterzogen. Zunächst wurden die Verteilungskoeffizienten verschiedener polarer Fließmittelsysteme bestimmt. Da es sich bei den Verbindungen der Fraktion 1 aufgrund deren schnellen Elutionen um sehr polare Substanzen handelt, wurden den Systemen Ionenpaarreagenzien in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Diese Reagenzien können mit den Flavylium-Kationen der Anthocyane ungeladene lipophilere Ionenpaare bilden, die eine größere Löslichkeit in der stationären Phase besitzen und dadurch zu einer erhöhten Retention der Verbindungen führen.

Bei den zugesetzten Perfluorcarbonsäuren handelt es sich um Trifluoressigsäure (TFA, $\text{F}_3\text{C-COOH}$), Pentafluorpropionsäure (PFPA, $\text{F}_5\text{C}_2\text{-COOH}$) sowie Heptafluorbuttersäure (HFBA, $\text{F}_7\text{C}_3\text{-COOH}$). Die Zunahme der Kettenlänge des Perfluoralkylrestes führt zu einer größeren Lipophilie des Ionenpaares. Perfluorierte Carbonsäuren besitzen durch ihre Flüchtigkeit gegenüber anderen Ionenpaarreagenzien den Vorteil, dass sie durch Destillation zusammen mit dem Lösungsmittel entfernt werden können.

Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten wurden die drei Hauptverbindungen der Fraktion ausgewählt. Es handelt sich dabei um die Verbindung Syringasäure- β -D-

glucoseester (**P10**) (s. Kapitel 3.4.1.3, S. 97) sowie um die Anthocyane **Pa** und **Pb**. Das HPLC-Chromatogramm der Fraktion 1 bei 280 nm ist in Abbildung 49 A auf Seite 80 dargestellt. Die gewählten Fließmittelzusammensetzungen und ermittelten Verteilungskoeffizienten finden sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Verteilungskoeffizienten verschiedener Fließmittelsysteme für die Rechromatographie der HSCCC-Fraktion 1 des Perilla-Extraktes

Fließmittelsystem, Verhältnis von tBME/ <i>n</i> -Butanol/Acetonitril/Wasser, Säurezusatz		K (P10)	K (Pa)	K (Pb)
2/2/1/5	a) 0,7 % TFA ¹	0,09	0,12	0,00
	b) 0,1 % PFPA ²	0,42	1,14	0,28
	c) 0,7 % PFPA ²	0,36	0,41	0,00
1/3/1/5	d) 0,7 % TFA ¹	0,93	0,21	1,55
	e) 0,1 % PFPA ²	0,31	0,74	0,32
	f) 0,7 % PFPA ²	0,39	0,55	0,39
	g) 1,0 % PFPA²	0,88	0,51	1,22
	h) 0,7 % HFBA ³	2,00	0,25	2,24

¹ Trifluoressigsäure; ² Pentafluorpropionsäure; ³ Heptafluorbuttersäure

Die Fließmittelsysteme aus tBME, *n*-Butanol, Acetonitril, Wasser (2/2/1/5, v/v/v/v) sind generell zu unpolar. Die Substanzen lösen sich hauptsächlich in der mobilen schweren Phase, welches eine schnelle Elution zur Folge hätte. Durch Erhöhung des *n*-Butanol-Anteils und Erniedrigung der tBME-Konzentration wird eine bessere Löslichkeit der Substanzen in der leichten stationären Phase erreicht. Anhand der Testergebnisse ist ersichtlich, dass eine hohe Säurekonzentration zu besseren Ergebnissen führt. Vor allem die Koeffizienten der Systeme d) mit einem Zusatz von 0,7 % TFA sowie g) mit einem Zusatz von 1,0 % PFPA weisen genügend große Unterschiede und somit eine Gewährleistung für eine Trennung auf. Allgemein ist zu sagen, dass bei verschiedenen Zusätzen von HFBA zum Teil erhebliche Verzögerungen bei der Phasentrennung auftraten und diese Systeme aus diesem Gesichtspunkt her ungeeignet erschienen.

Zur Trennung wurden 558 mg der Fraktion 1 eingesetzt. Eine Wiederholung bzw. Optimierung der Trennungparameter konnte nicht durchgeführt werden. Zur

Rechromatographie wurde schließlich ein Fließmittelsystem bestehend aus tBME, *n*-Butanol, Acetonitril, Wasser (1/3/1/5, v/v/v/v), mit einem Zusatz von 1,0 % PFFA gewählt. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug 850 ppm und die Flussrate 3,0 mL/min.

Das UV-Chromatogramm der Trennung zeigt Abbildung 56. Die Einteilung in die dargestellten Fraktionen erfolgte durch dünnschichtchromatographische Untersuchung (s. Kapitel 5.3.1, System 3). Es wurden insgesamt sieben Fraktionen erhalten, die mittels HPLC-DAD und LC-MSⁿ analysiert wurden.

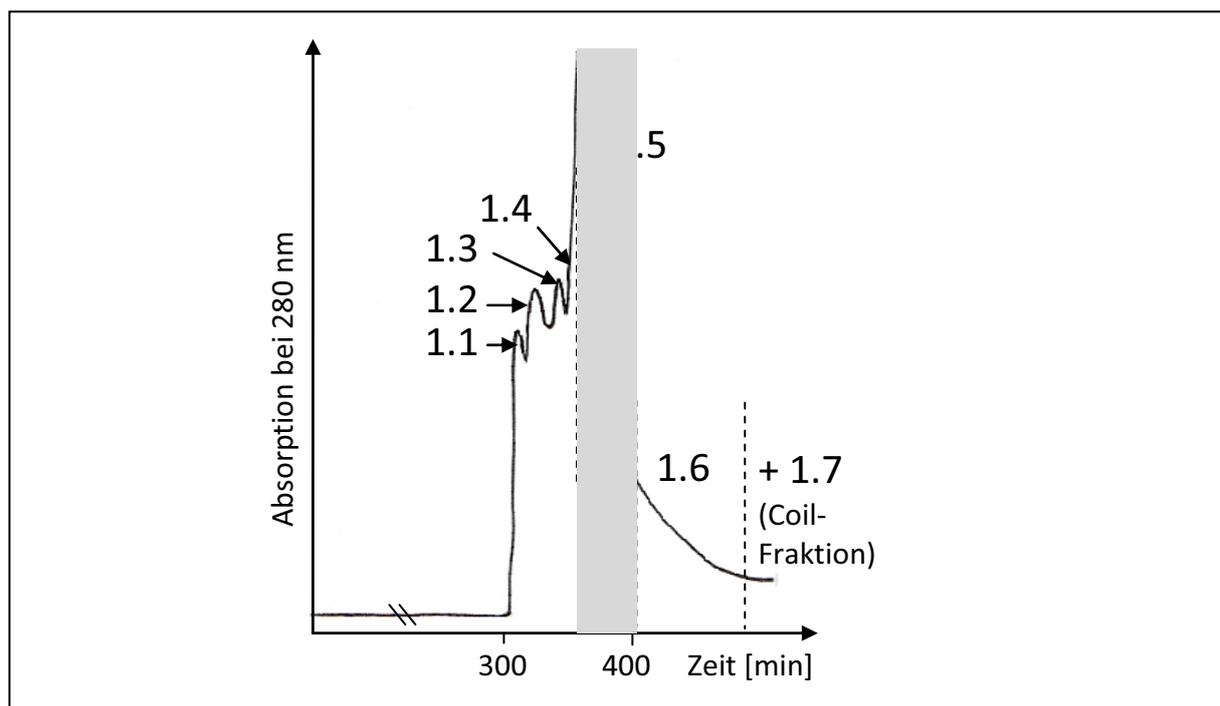


Abbildung 56: Chromatogramm der HSCCC-Rechromatographie der Fraktion 1 bei 280 nm

In den Fraktionen 1.1 bis 1.4 sowie 1.6 und 1.7 sind hauptsächlich Minorkomponenten enthalten, allerdings in so geringen Mengen, dass von weiteren Untersuchungen abgesehen wurde.

Die interessante Fraktion stellt die Fraktion 1.5 dar, in der die Hauptanthocyane zwar nicht getrennt, jedoch angereichert werden konnten. Wie in dem Chromatogramm bei 280 nm (s. Abbildung 57) zu sehen ist, konnten die Anthocyane von den anderen Verbindungen in der ursprünglichen Fraktion getrennt werden (Vergleich s. Abbildung 49, S. 80). Die Charakterisierung der Anthocyane erfolgte über ESI-MSⁿ-Spektren. Die Identifizierung von Cyanidin-3-glucosid (**P8**) und Cyanidin-3,5-diglucosid (**P9**) erfolgte über eine HPLC-Co-

Chromatographie mit Zusätzen von Referenzsubstanzen, die aus *Oryza sativa* (s. Kapitel 3.5.1) isoliert wurden.

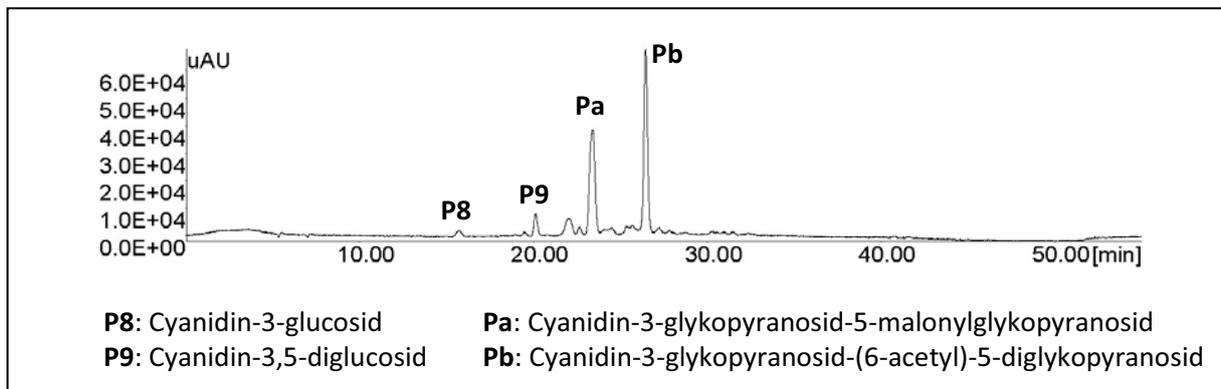


Abbildung 57: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 1.5 bei 280 nm

In Abbildung 58 sind die Massenspektren der Verbindungen **P8** und **P9** sowie den charakterisierten Anthocyanen **Pa** und **Pb** dargestellt. Bei **P8** und **P9** handelt es sich vermutlich um Artefakte von Malonylshisonin. In **P8** ist an dem Kohlenstoffatom C-3 ein Glucosemolekül gebunden, wodurch die Molekülmasse von m/z 449 $[M]^+$ resultiert. Bei **P9** mit einer Molekülmasse von m/z 611 liegt Cyanidin sowohl an C-3 als auch an C-5 glucosyliert vor, welches durch Hydrolyse von Malon- und Cumarsäure aus Malonylshisonin entstanden sein könnte. Das Fragment m/z 287 stellt das Cyanidin-Aglykon dar.

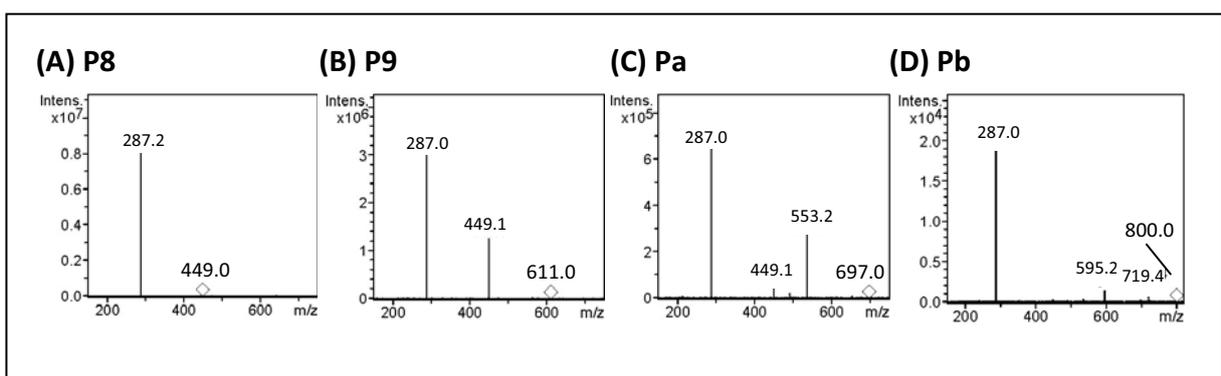


Abbildung 58: (A-D) Massenspektren der Anthocyane P8, P9, Pa und Pb im positiven Modus

Durch massenspektrometrische Untersuchungen kann die Verbindung **Pa** als Cyanidin-3-glykopyranosid-5-malonylglykopyranosid charakterisiert werden. Die Molekülmasse beträgt m/z 697 $[M]^+$. Vermutlich handelt es sich dabei ebenfalls um ein Artefakt von

Malonylshisonin, welches durch die Abspaltung der Cumarsäure mit m/z 146 und einer resultierenden Molekülmasse von m/z 697 erklärt werden könnte. In diesem Fall kann die Verbindung als Cyanidin-3-O-glucosid-5-O-malonylglucosid charakterisiert werden. Die Verbindung **Pb** weist ein Fragment mit m/z 595 auf, welches auf ein glucosiliertes und cumaryliertes Cyandin-Aglykon schließen lässt. Durch ein weiteres Glucosemolekül und vermutlicher Acetylierung lässt sich das Molekölion mit der Masse m/z 800 erklären.

3.4.1.3 Charakterisierung von Syringasäure- β -D-glucoseester (**P10**)

Aus der HSCCC-Fraktion 1 konnte mittels präparativer HPLC eine bislang für *Perilla frutescens* unbekannt Verbindung isoliert werden (s. HPLC-DAD-Chromatogramm (A) in Abbildung 49, S. 80). Eine ESI-MSⁿ-Analyse zeigte ein Molekölion mit m/z 359 [M-H]⁻ und einen Basispeak, welcher durch die Abspaltung eines Glucose-Moleküls entstanden ist, mit m/z 197 [M-H-Glucose].

Ein Vergleich der ¹H- und vor allem ¹³C-NMR-Daten mit den Literaturwerten von KLINK und HERRMANN (1988) bestätigte die Struktur als das Hydroxybenzoesäure-Derivat Syringasäure- β -D-glucoseester (**P10**). Die NMR-Daten sind in Kapitel 5.7.2 angegeben.

In Abbildung 59 ist das Massenspektrum in negativem Modus und die Struktur von **P10** dargestellt.

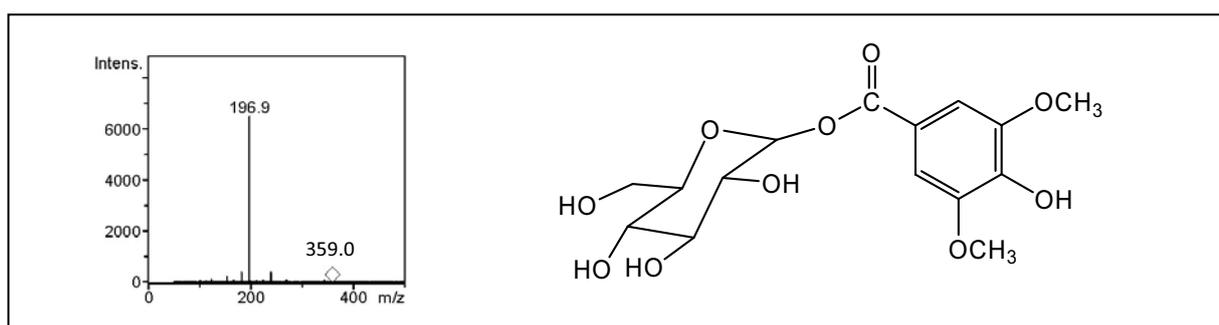


Abbildung 59: Massenspektrum im negativen Modus und Struktur von P10

Syringasäure-Derivate kommen in vielen Pflanzen genuin vor. Bei Syringasäure handelt es sich auch um ein Degradationsprodukt von Malvidin, welches in *Perilla frutescens* jedoch nicht identifiziert werden konnte und auch in der Literatur bislang nicht beschrieben ist (s. Abbildung 10, S. 20).

3.4.2 Beurteilung der antioxidativen und zytotoxischen Aktivität

Bei dem essigsauren methanolischen Extrakt von *Perilla* wurden eine geringe zytotoxische Aktivität und eine relativ hohe antioxidative Aktivität von 1,31 mmol Trolox/g beobachtet. Demnach wurde bei den Fraktionen nach der HSCCC-Trennung sowie bei den Fraktionen nach den Rechromatographien der Schwerpunkt auf die Charakterisierung im Hinblick auf antioxidative Aktivitäten gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 60 bis Abbildung 62 dargestellt.

Die antioxidativen Aktivitäten der HSCCC-Fraktionen 3, 4 und 5 von 0,87 bis 0,95 mmol Trolox/g sind auf die Flavon-Diglucuronide **P1** und **P2** sowie auf die Anthocyane Malonylshisonin (**P5**, **P6**) und *trans*-Shisonin (**P7**) zurückzuführen (s. Abbildung 60). Die ermittelten Aktivitäten dieser isolierten Reinverbindungen von 0,74 bis 1,03 mmol Trolox/g erscheinen insgesamt unerwartet niedrig, welches auf die Molekülgröße bzw. auf die Anzahl der gebundenen Glucose-, Glucuronsäuremoleküle und Copigmente zurückgeführt wird. Ein höherer Anteil dieser Strukturen im Molekül führt zu einer insgesamt prozentual geringeren Effektivität der radikalfangenden Hydroxylgruppen am B-Ring der Flavonoide. Daher erklärt sich auch die etwas höhere Aktivität von Shisonin (**P7**) gegenüber Malonylshisonin (**P5**), welches keine Malonsäure im Molekül aufweist. Für die höhere Aktivität von 7-O-Diglucuronylluteolin (**P1**) gegenüber 7-O-Diglucuronylapigenin (**P2**) ist vermutlich die zusätzliche Hydroxylgruppe am B-Ring des Luteolinaglykons verantwortlich.

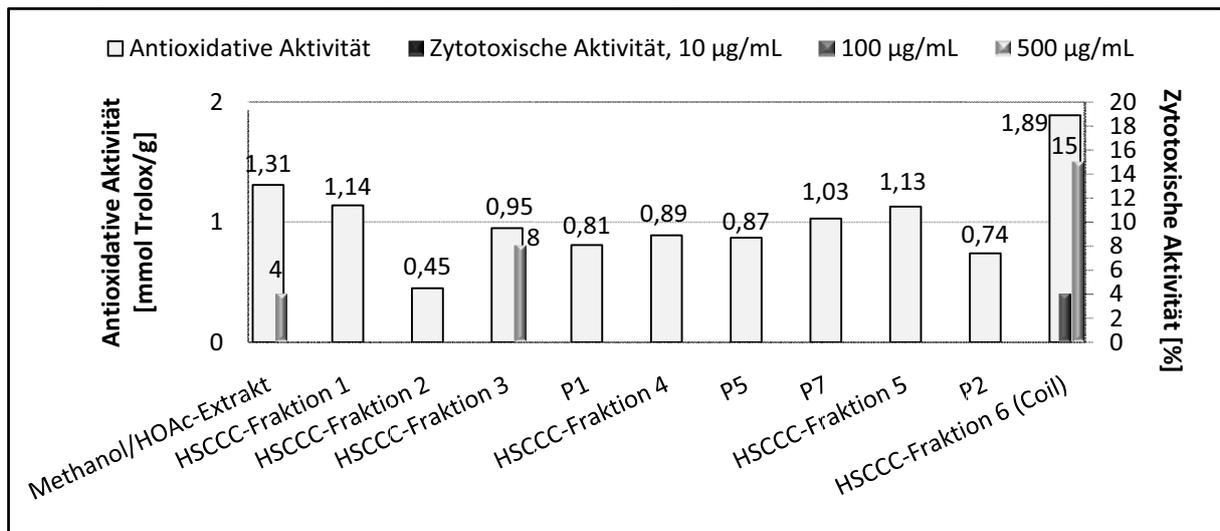


Abbildung 60: Antioxidative und zytotoxische Aktivität der HSCCC-Fractionen und der isolierten Verbindungen P1, P2, P5 und P7

Die HSCCC-Fraktion 1 wurde aufgrund der Komplexizität mittels HSCCC rechromatographiert. Hierbei stand die Bestimmung von antioxidativ wirksamen Substanzen im Vordergrund. In Abbildung 61 sind die antioxidativen Aktivitäten der Fraktionen 1.1 bis 1.7 der Rechromatographie dargestellt. Auf eine Testung hinsichtlich zytotoxischer Aktivität wurde verzichtet, da die ursprüngliche Fraktion 1 keine Aktivität aufwies.

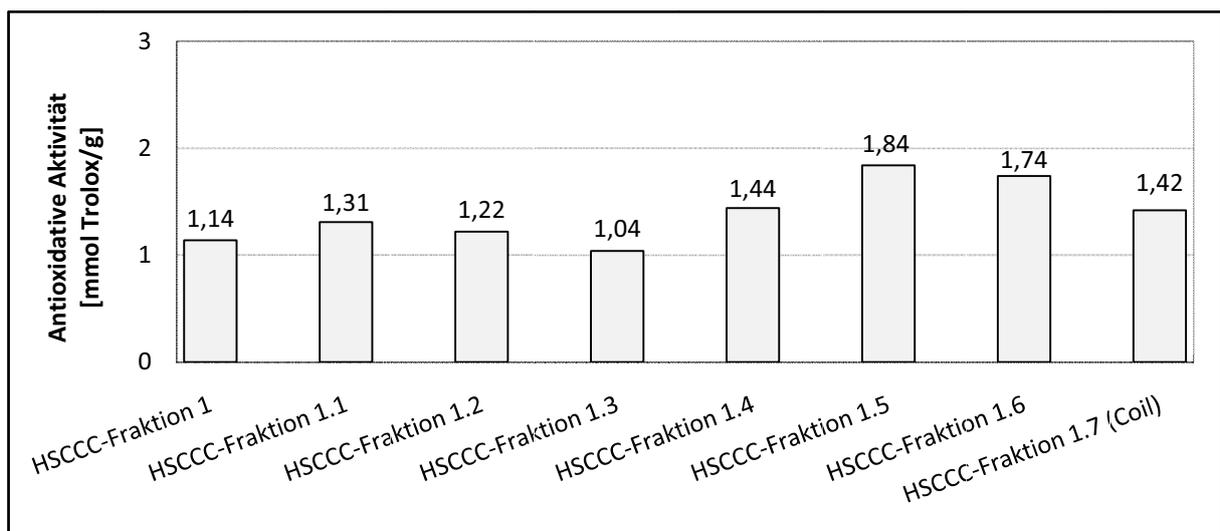


Abbildung 61: Antioxidative Aktivität der Fraktionen der Rechromatographie der Fraktion 1 mittel HSCCC

Bezüglich der antioxidativen Aktivität können bei den Fraktionen nach der Rechromatographie kaum Unterschiede festgestellt werden. Die Aktivitäten betragen zwischen 1,04 und 1,84 mmol Trolox/g. Der hohe Wert der Fraktion 1.5 wird auf das Vorliegen der Anthocyane **P8**, **P9**, **Pa** und **Pb** zurückgeführt. Die hohe antioxidative Aktivität von Cyanidin-3-glucosid (**P8**) wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (WANG et al. 1997, MACHEIX et al. 1990, ICHIKAWA et al. 2001). **P8** wurde weiterhin aus *Oryza sativa* isoliert. Die Aktivität der Reinverbindung ist in Kapitel 3.5.2 dargestellt.

Eine geringe Zytotoxizität mit einer Absterberate von 15 % in einer Probenkonzentration von 500 µg/mL konnte in der Coil-Fraktion 6 festgestellt werden. Dieses und die hohe antioxidative Aktivität von 1,89 mmol Trolox/g der Coil-Fraktion weckten das Interesse an einer weiteren Trennung dieser Fraktion. In Abbildung 62 sind die Ergebnisse nach der Rechromatographie der Coil-Fraktion mittels Sephadex LH-20 dargestellt. Die Fraktionen wurden im Hinblick auf antioxidative sowie auf zytotoxische Aktivität untersucht.

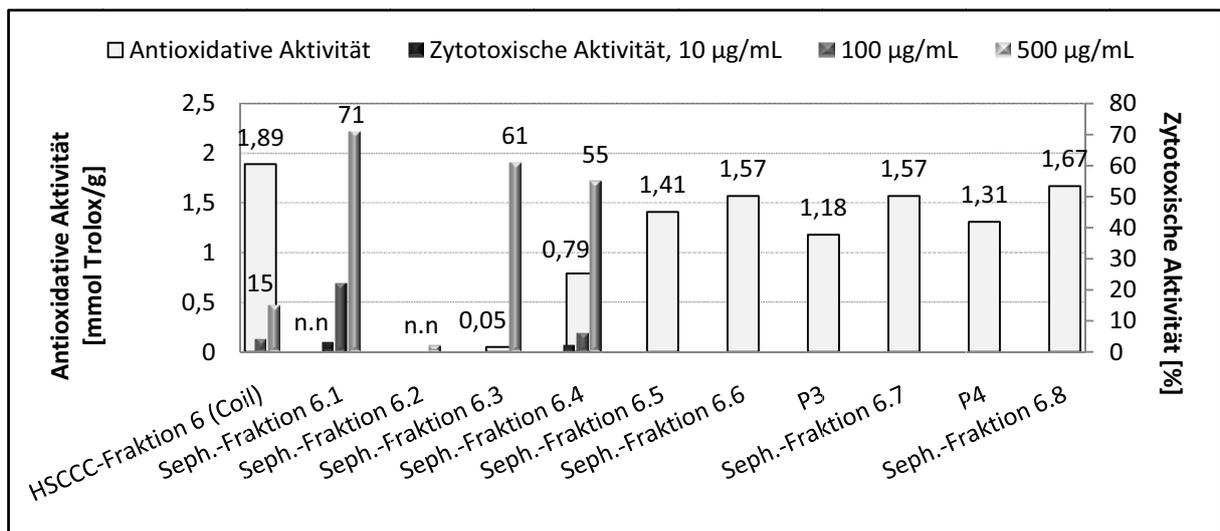


Abbildung 62: Antioxidative und zytotoxische Aktivität der Fraktionen der Sephadex-LH-20-Trennung der HSCCC-Coil-Fraktion 6

Es ist eine Anreicherung von zytotoxisch aktiven Verbindungen in den ersten Fraktionen zu beobachten. Vor allem die Fraktion 6.1, 6.3 und 6.4 weisen mit einer Absterberate von bis zu 71 % sehr hohe Werte auf. Bei diesen Fraktionen handelt es sich um komplex zusammengesetzte Substanzgemische mit relativ hohen Polymeranteilen. Eine genaue Identifizierung der Substanzen war aufgrund der geringen Substanzmenge nicht möglich.

Die Fraktionen 6.5 bis 6.8 weisen im Gegensatz zu den vorherigen Fraktionen hohe antioxidative Aktivitäten auf. Zytotoxische Eigenschaften konnten bei diesen Fraktionen nicht festgestellt werden. Bei den vorliegenden Verbindungen handelt es sich größtenteils um Anthocyane und Flavone, wie den Verbindungen **P3** und **P4**. Auffällig ist hierbei, dass das Apigenin-Derivat **P3** eine etwas geringere Aktivität aufweist als das Luteolin-Derivat **P4**. Insgesamt konnten für die Monoglucuronide etwas höhere Werte verzeichnet werden als für **P1** und **P2**. Eine Erklärung hierfür wäre wiederum das Fehlen eines Glucuronsäure-Moleküls, welches zu einer geringeren Aktivität führt.

3.5 Isolierung von Verbindungen aus schwarzem Reis (*Oryza sativa*)

3.5.1 Isolierung und Charakterisierung der Anthocyane

Bei den isolierten und charakterisierten Polyphenolen in schwarzem Reis handelt es sich um Anthocyane und deren Abbauprodukte. In Abbildung 63 sind die HPLC-Chromatogramme des essigsauren Methanol-Extrakts bei 520 und 280 nm dargestellt. Abgesehen von einer Verbindung, die nach circa 10 min eluiert (s. Abbildung 63 (B)), sind ausschließlich Anthocyane in dem Extrakt enthalten. Cyanidin-3-glucosid stellt die Hauptverbindung dar und wird von RYU et al. 1998, HU et al. 2003 und CHO et al. 1996 als das bedeutendste Anthocyan in schwarzem Reis beschrieben.

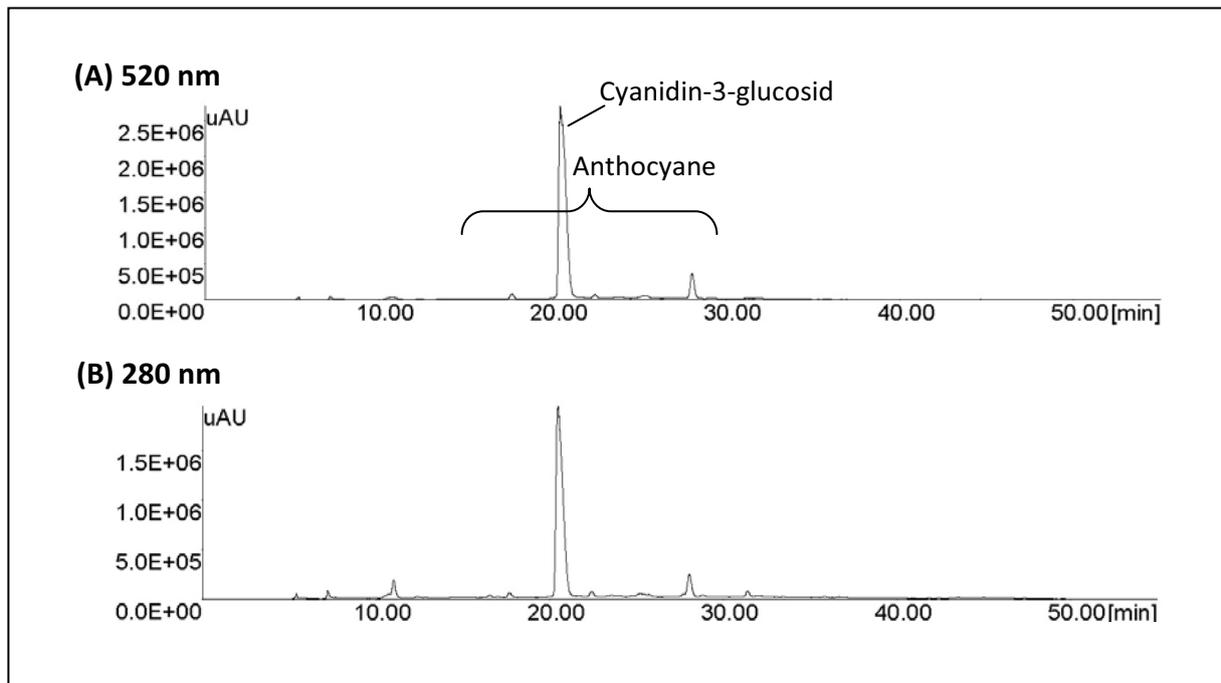


Abbildung 63: (A, B) HPLC-Chromatogramm des essigsauren Methanol-Extrakts von schwarzem Reis bei 520 und 280 nm

Zur Trennung des Extraktes wurde ebenfalls die präparative Trennung mittels HSCCC herangezogen. Zunächst wurden von verschiedenen Fließmittelsystemen die Verteilungskoeffizienten bestimmt. Das Fließmittelsystem, bestehend aus tBME, *n*-Butanol, Acetonitril und Wasser (2/2/1/5, v/v/v/v) mit einem Zusatz von 0,1 % TFA hat sich zur Trennung dieses Extraktes bewährt. Die Trennung wurde bei einer Flussrate von 3,0 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit des Coils von 800 rpm durchgeführt. Die Einteilung der

Fraktionen erfolgte anhand des UV-Chromatogramms sowie durch dünn-schichtchromatographische Untersuchung (Methode s. Kapitel 5.3.1, DC-System 3). Das HSCCC-Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm ist in Abbildung 64 dargestellt. Insgesamt wurden einschließlich der auf dem Coil retardierten Substanzen vier Fraktionen erhalten.

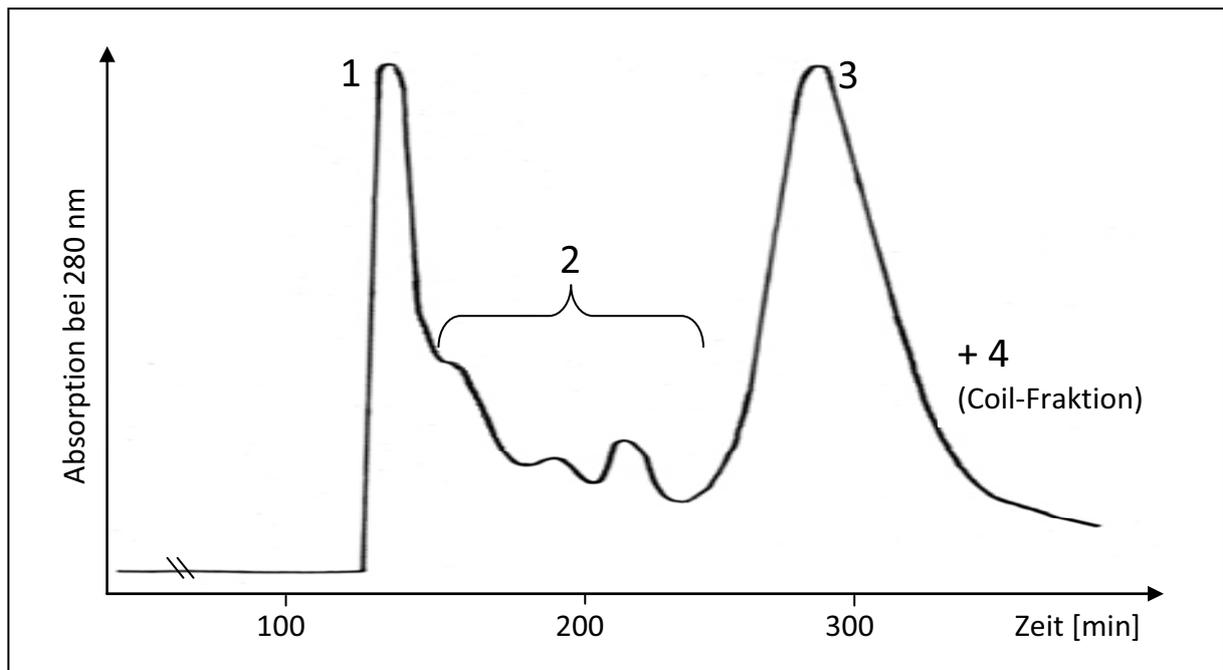


Abbildung 64: HSCCC-Chromatogramm der Trennung des essigsauren Methanol-Extrakts von *Oryza sativa* bei 280 nm

Die HPLC-Chromatogramme der HSCCC-Fraktionen 1 bis 4 sind in Abbildung 65 dargestellt. Da es sich bei den Verbindungen in Fraktion 1 bis 3 (A-C) ausschließlich um Anthocyane handelt, sind die HPLC-Chromatogramme bei 520 nm dargestellt. Für die Darstellung des Chromatogramms der Coil-Fraktion (D) wurde eine Wellenlänge von 265 nm gewählt.

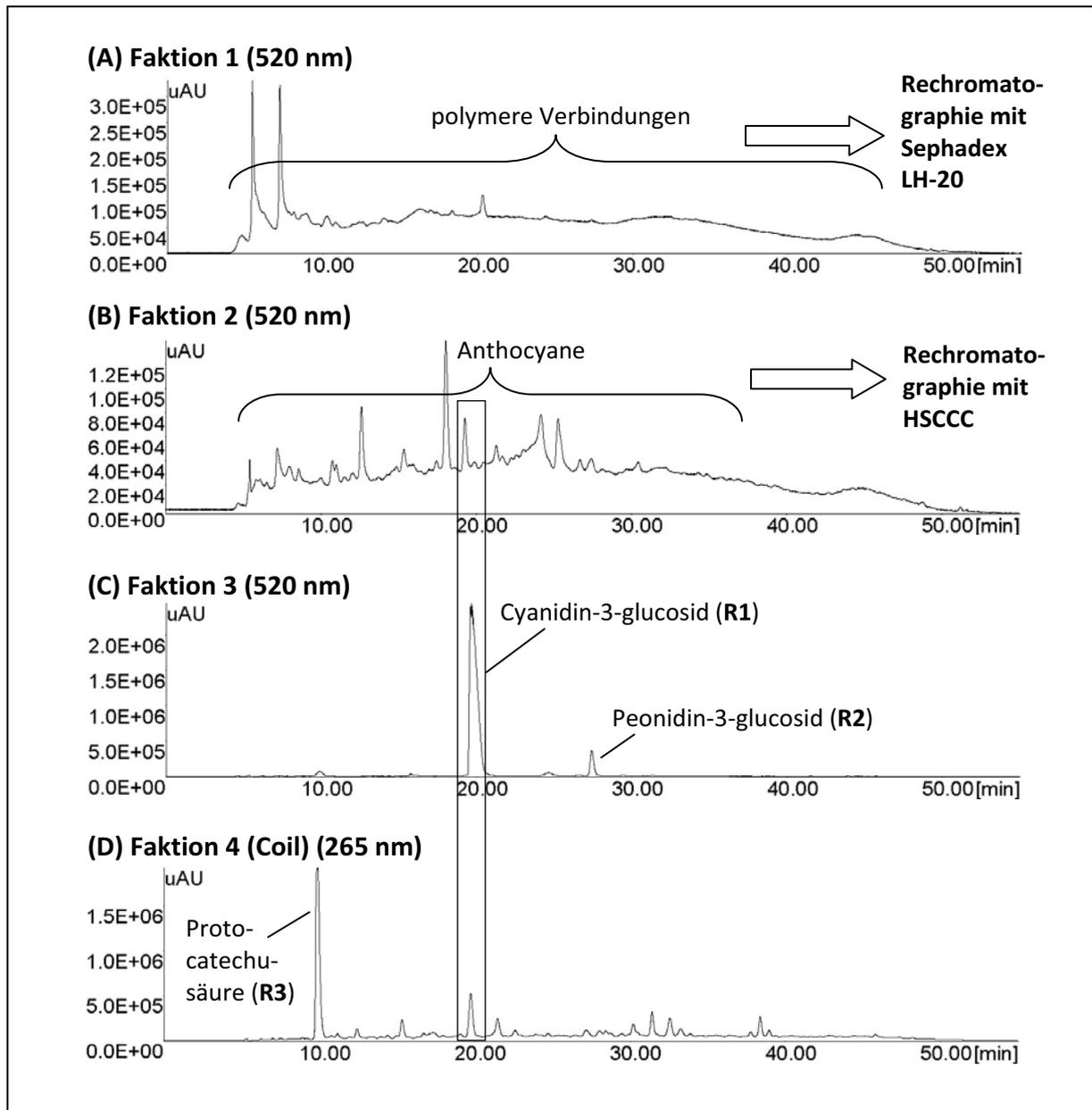


Abbildung 65: (A - D) HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 1 bis 4 der HSCCC-Trennung des essigsäuren methanolischen Reis-Extrakts. (A - C) bei 520 nm, (D) bei 265 nm

Bei der Fraktion 1 stand die Untersuchung von polymeren Verbindungen im Vordergrund. Die Polymeranalyse ist in Kapitel 3.5.3 näher erläutert. Die Trennung der Verbindungen, die nach der Fraktion 1 und vor der Hauptfraktion 3 eluierten, konnte nicht reproduzierbar durchgeführt werden. Die Substanzen wurden daher als Fraktion 2 zusammengefasst. Durch weitere Trennvorgänge wurde die Fraktion 2 angereichert und durch eine Rechromatographie mittels HSCCC erneut getrennt.

bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm dargestellt. Es konnten vier Fraktionen erhalten werden, die anhand des UV-Chromatogramms eingeteilt wurden.

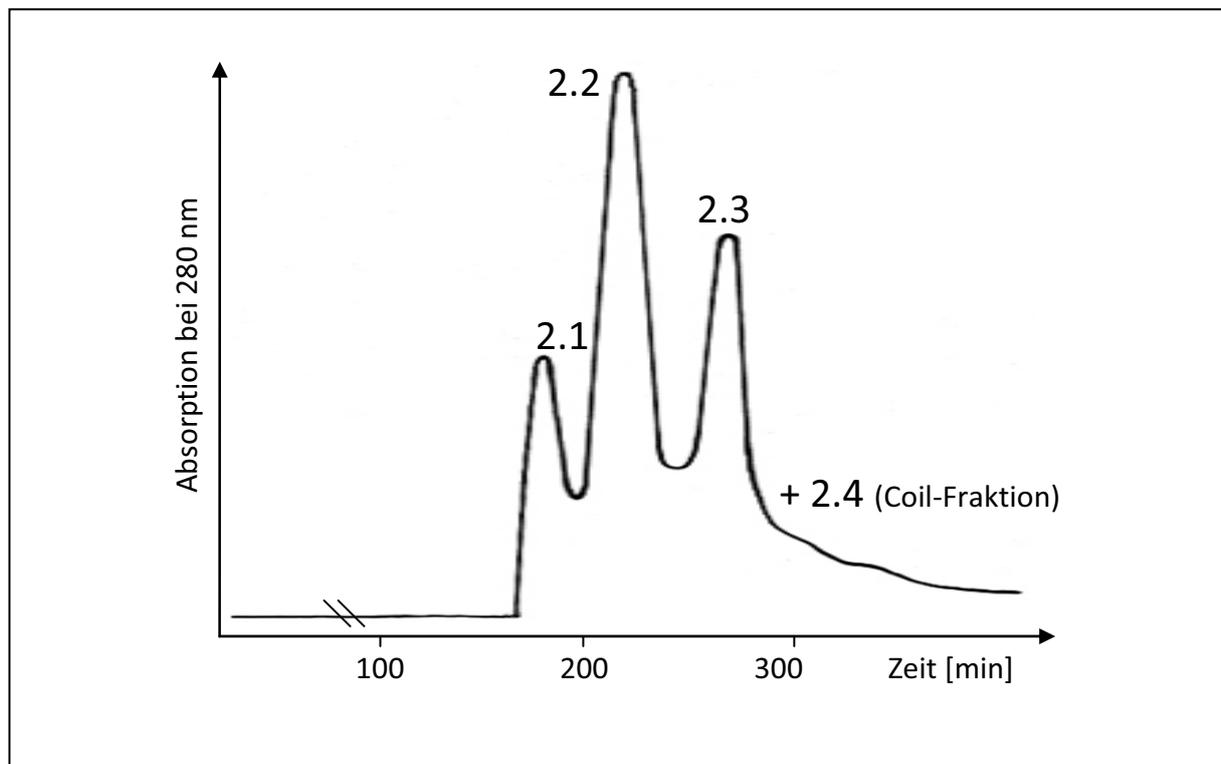


Abbildung 67: HSCCC-Chromatogramm der Rechromatographie der Fraktion 2 bei 280 nm

Wie die HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 2.1 und 2.2 in Abbildung 68 zeigen, konnten durch die Rechromatographie die Diglucoside Cyanidin-3,5-diglucosid (**R4**), Cyanidin-3-sophorosid (**R5**) und Cyanidin-3-rutinosid (**R6**) fraktioniert werden. Anhand von ESI-MSⁿ-Daten und einer Co-Chromatographie mit Referenzsubstanzen konnten **R5** und **R6** identifiziert werden (HILLEBRAND 2004). Die Strukturaufklärung von **R4** erfolgte nach einer weiteren Trennung mittels präparativer HPLC durch ¹H- und ¹³C-NMR-Daten (s. Kapitel 5.7.3). Die Daten ergaben eine gute Übereinstimmung mit Referenzdaten (HILLEBRAND 2004). Die Fraktionen 2.3 und 2.4 waren komplex zusammengesetzt und wurden nicht weiter untersucht.

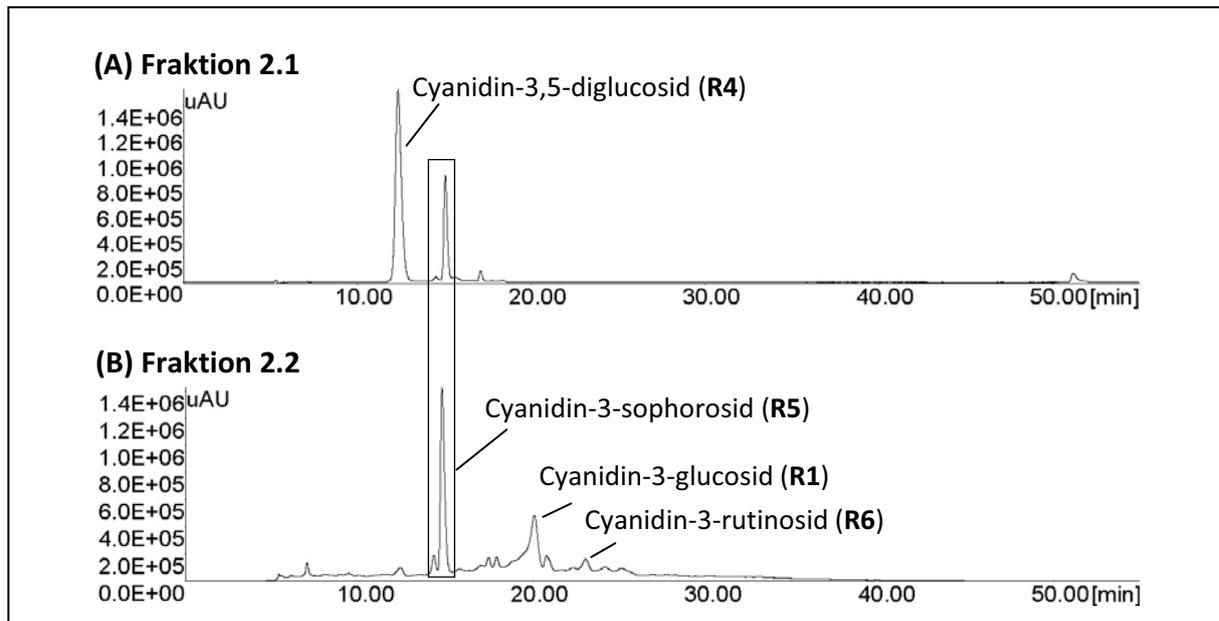


Abbildung 68: HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 2.1 und 2.2 der Rechromatographie bei 280 nm

In Abbildung 69 sind die Strukturen der identifizierten Anthocyan-Monoglucoside (A) und Anthocyan-Diglykoside (B) dargestellt. Das Peonidin-Aglykon unterscheidet sich von Cyanidin durch eine Methoxy-Gruppe an Position 3' des B-Ringes. Die glykosidische Bindung erfolgt an Position 3 und/oder 5 des Aglykons. Bei den Diglykosiden **R5** und **R6** ist jeweils ein Disaccharid an der Position 3 gebunden. Sophorose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die β -glykosidisch 1'' \rightarrow 2'' verknüpft sind; Rutinose aus Glucose und Rhamnose, die α -glykosidisch 1'' \rightarrow 6'' verknüpft sind.

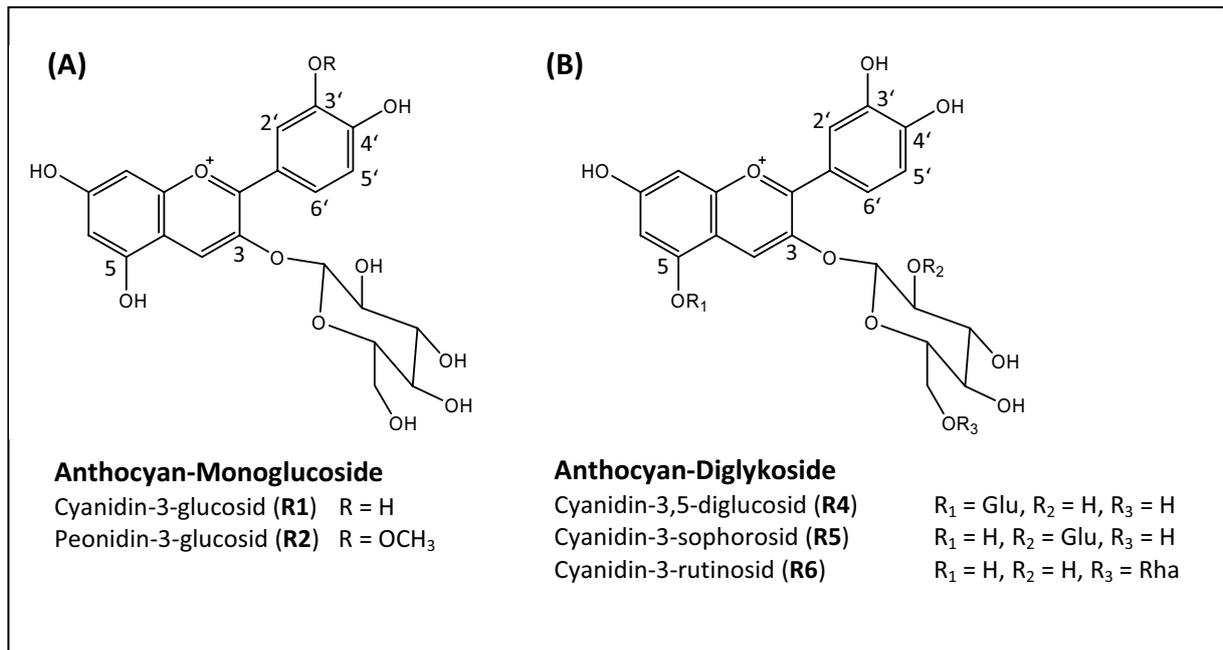


Abbildung 69: Strukturen der identifizierten Anthocyane aus *Oryza sativa*

Es konnten somit vier Cyanidin-Derivate **R1** und **R4** bis **R6** mit einer Molekülmasse des Aglykons von m/z 287 und das Peonidin-Derivat **R2** mit m/z 301 des Peonidin-Aglykons identifiziert werden. **R4** und **R5** weisen eine identische Molekülmasse von m/z 611 $[M]^+$ auf. Sie sind anhand von ESI-MSⁿ-Spektren gut zu unterscheiden, da **R5** im Gegensatz zu **R4** kein Fragment mit m/z 449 $[M\text{-Glucose}]^+$ aufweist, d.h. die beiden Glucosemoleküle zusammen abgespalten werden.

Kenntnisse über das Vorkommen von Cyanidin-3-sophorosid in *Oryza sativa* liegen in der Literatur bislang nicht vor. Diese Verbindung konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden.

In Tabelle 11 sind die massenspektrometrischen Daten der identifizierten Anthocyane dargestellt. Bei den Verbindungen **R1** bis **R5** treten ausschließlich Massendifferenzen von $\Delta m/z$ 162 der abgespaltenen Glucosemoleküle auf. **R6** weist weiterhin eine Massendifferenz von $\Delta m/z$ 146 eines eliminierten Rhamnose-Moleküls auf.

Tabelle 11: Massenspektrometrische Daten der Anthocyane R1 bis R6 aus *Oryza sativa*

Anthocyan	Molekülion [M] ⁺ [m/z]	Fragmente MS ⁿ [m/z]
R1	449	287 [M-Glucose] ⁺
R2	463	301 [M-Glucose] ⁺
R4	611	449 [M-Glucose] ⁺ , 287 [M-Glucose-Glucose] ⁺
R5	611	287 [M-Glucose-Glucose] ⁺
R6	595	449 [M-Rhamnose] ⁺ , 287 [M-Rhamnose-Glucose] ⁺

Erwähnenswert ist der hohe Gehalt der Hauptverbindungen **R1** und **R2** von 382 mg pro 100 g (Methode s. Kapitel 5.3.6, Werte Tabelle 23 im Anhang). Damit liegt der Gehalt über der Pigment-Konzentration von Holunderbeer-Saft (*Sambucus nigra*), der als eine der wichtigsten Anthocyan-Quellen gilt (128 – 243 mg/100 mL) (MAZZA und MINIATI 1993, HILLEBRAND 2004).

3.5.2 Beurteilung der antioxidativen Aktivität

In Abbildung 70 sind die antioxidativen Aktivitäten der HSCCC-Fractionen, der Fractionen nach der Rechromatographie mittels HSCCC und der isolierten Verbindungen **R1** bis **R4** dargestellt.

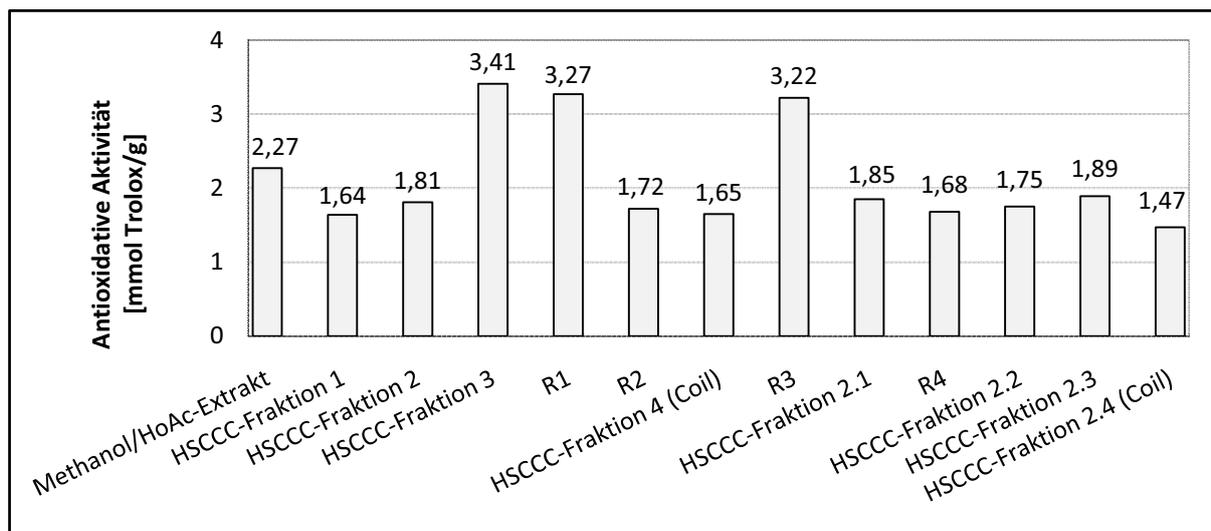


Abbildung 70: Antioxidative Aktivität der HSCCC-Fractionen und der isolierten Verbindungen R1 bis R4

Insgesamt weisen durch das Vorliegen von mono- und diglykosylierten Anthocyanen alle Fraktionen eine hohe Aktivität von 1,47 bis zu 3,41 mmol Trolox/g auf. Die auffällig hohe Aktivität der Fraktion 3 von 3,41 mmol Trolox/g ist auf Cyanidin-3-glucosid (**R1**) zurückzuführen. Das ebenfalls aus dieser Fraktion isolierte Peonidin-3-glucosid (**R2**) weist mit 1,72 mmol Trolox/g eine vergleichsweise geringe Aktivität auf. In Kapitel 3.4.2 wurde bereits die hohe Aktivität von Cyanidin-3-glucosid angesprochen. Diese ist nach CHEN und HO (1997) auf das Vorliegen der *ortho*-Benzoldiol-Struktur und die Möglichkeit zur Ausbildung stabiler *ortho*-Chinone zurückzuführen. Durch die Methoxy-Funktion an der Position 3' des Peonidin-Aglykons ist diese Umlagerung nicht möglich. Nach ICHIKAWA et al. (2001) besitzt **R1** ausgeprägte radikalfangende Eigenschaften bezüglich Superoxidradikalanionen.

Eine hohe antioxidative Aktivität von 3,22 mmol Trolox/g besitzt weiterhin das Cyanidin-Degradationsprodukt Protocatechusäure (**R3**), welches aus der HSCCC-Fraktion 4 isoliert wurde. SAITO et al. (2004) untersuchten die radikalfangenden Eigenschaften von Protocatechusäure und dessen Alkyl-Estern bezüglich DPPH- und ABTS-Radikalen in verschiedenen Lösungsmitteln. Demnach besitzen Lösungsmittel einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse. In Lösungsmitteln wie Ethanol wurde eine doppelt so hohe Aktivität festgestellt als in aprotischen Lösungsmitteln wie Aceton.

3.5.3 Charakterisierung der Polymerfraktion

Bei der HSCCC-Fraktion 1 der Trennung des essigsauen Extraktes handelt es sich um polymere Verbindungen (s. Chromatogramm (A) in Abbildung 65, S. 104).

Für weitere Trennungs- und Präzipitationsvorgänge der polymeren Verbindungen wurde eine größere Menge der Polymer-Fraktion benötigt. Dazu wird eine präparative Trennung mittels Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) herangezogen. Es wurden auf diese Weise 50 g eines aufgearbeiteten essigsauen methanolischen Extrakts aus schwarzem Reis getrennt. Die Trennung erfolgte auf einer LSRCCC-Anlage mit einem Coil-Volumen von 26 L, einer Flussrate von 8 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit von 50 rpm. Als Fließmittelsystem wurde das System der HSCCC-Trennung, bestehend aus tBME, *n*-Butanol, Acetonitril und Wasser in einem Verhältnis von 2/2/1/5 (v/v/v/v) mit einem Zusatz von 0,1 % TFA herangezogen. Die Detektion erfolgte mittels dünnschichtchromatographischer Analyse (Methode s. Kapitel 5.3.1, DC-System 2). Es konnten 10,4 g der Fraktion 1 erhalten werden.

Anschließend erfolgte eine Säulenchromatographie mittels Sephadex LH-20-Material, unter Verwendung des Elutionsmittels Methanol und Wasser in einem Verhältnis von 80/20 (v/v) und einem Zusatz von 0,5 % Essigsäure. Diese Trennung diente dem Ziel, monomere Bestandteile wie Anthocyan-Derivate und -Artefakte grob abzutrennen, die ebenfalls in der Fraktion 1 enthalten sind.

Das Chromatogramm bei 520 nm der Sephadex-Trennung ist in Abbildung 71 (A) dargestellt. Die Fraktionen SF1 und SF5 wurden markiert, da diese für weitere Untersuchungen ausgewählt wurden. Die Detektion erfolgte zunächst durch UV-Spektroskopie. Dazu wurde eine 1:10-Verdünnung des Volumens eines Reagenzglases bei einer Absorption von 520 nm photometrisch gemessen. Dieses Verfahren musste angewendet werden, da ein zuvor angeschlossener UV-Detektor aufgrund der hohen Probenkonzentrationen kein Chromatogramm liefern konnte. Zur Einteilung in die dargestellten Fraktionen 1 bis 5 wurde die dünnschichtchromatographische Analyse herangezogen (Methode s. Kapitel 5.3.1, DC-System 2). Anschließend erfolgte eine Untersuchung mittels HPLC-DAD.

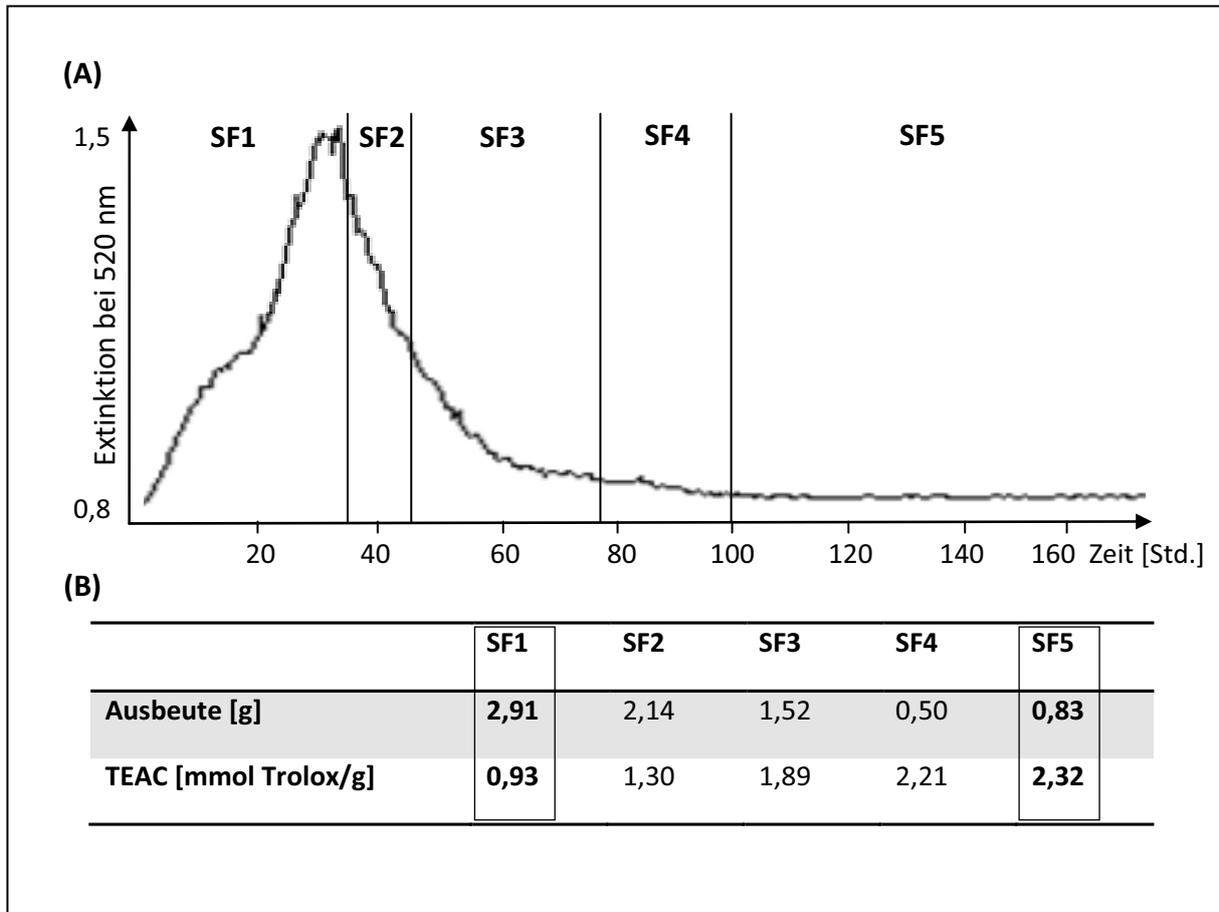


Abbildung 71: (A) Chromatogramm der Sephadex LH-20-Trennung von Fraktion 1 bei 520 nm und Fraktionierung. (B) Ausbeuten und antioxidative Aktivität der Fraktionen SF1 bis SF5

In Abbildung 71 (B) sind die Ausbeuten und die antioxidativen Aktivitäten der Fraktionen aufgeführt. Die hohe Aktivität von 2,21 mmol Trolox/g in Fraktion SF4 ist auf Protocatechusäure zurückzuführen, die die Hauptverbindung darstellt. Hauptverbindung in Fraktion SF3 stellt Cyanidin-3-rutinosid (**R6**) dar. Bei Fraktion SF2 handelt es sich um ein Substanzgemisch aus monomeren Bestandteilen. Die Fraktionen SF1 und SF5 wurden für eine Präzipitationsreaktion ausgewählt. Es handelt sich dabei um Fraktionen, die kaum monomere Bestandteile aufweisen. Die Fraktion SF5 zeigte zudem mit 2,32 mmol Trolox/g die größte antioxidative Aktivität. In Abbildung 72 sind die HPLC-DAD-Isocontourplots und Chromatogramme bei 280 nm der Fraktionen SF1 und SF5 dargestellt.

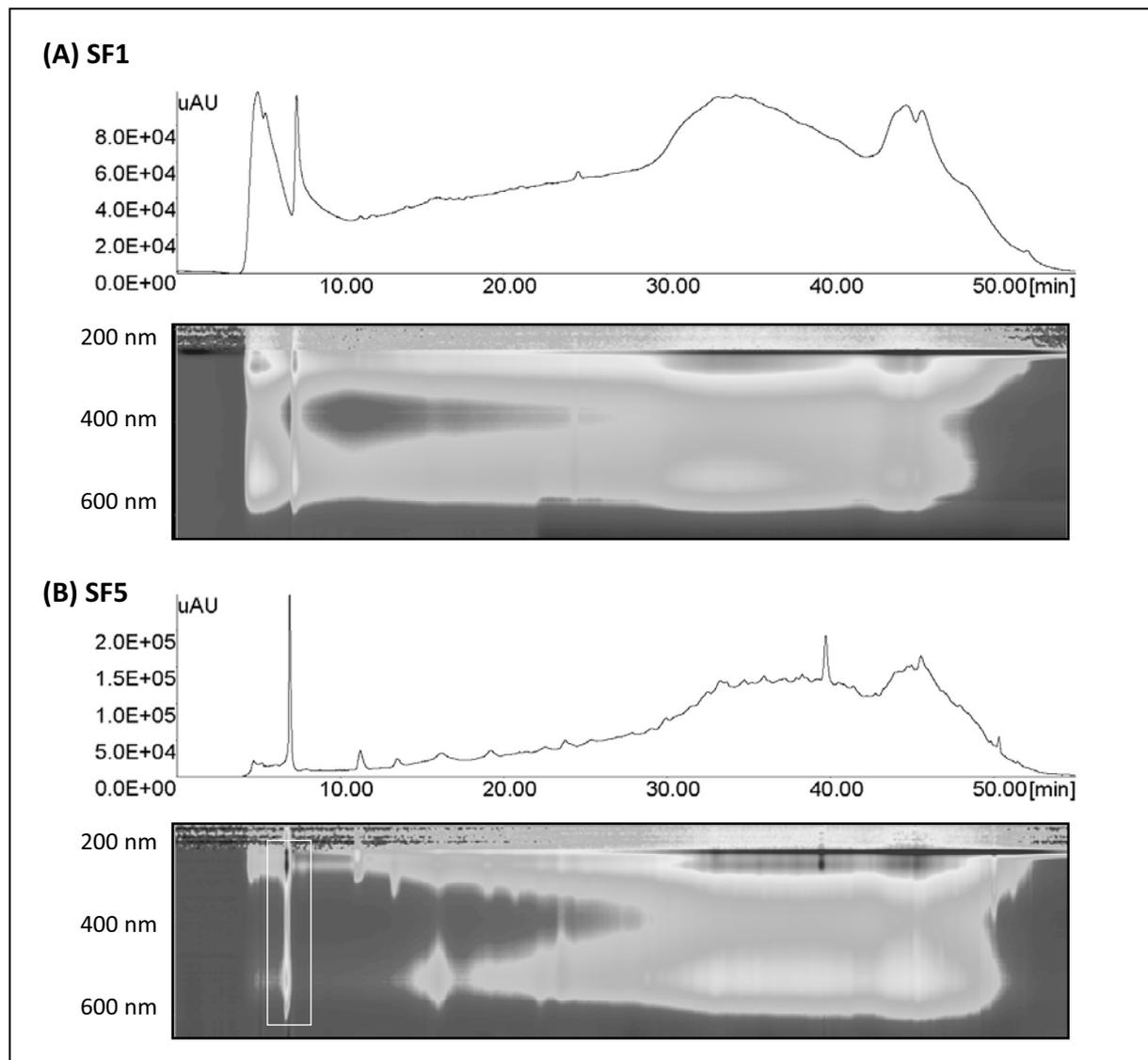


Abbildung 72: (A, B) Chromatogramme bei 280 nm und HPLC-DAD-Isocontourplots (200-650 nm, hohe Absorptionen sind durch hellere Bereiche dargestellt) der Fraktionen SF1 und SF5

Es treten in beiden Fraktionen Polymer-„humps“, sowohl im UV-Bereich, als auch im visuellen Absorptionsbereich auf. Auffällig in Chromatogramm (B) ist weiterhin ein Peak mit einer Retentionszeit von 5 bis 6 Minuten, welcher auch bereits in anderen Fraktionen beobachtet wurde. Versuche, diese Substanz zu isolieren, scheiterten, da es sich dabei wahrscheinlich ebenfalls um ein Substanzgemisch handelt. Anhand der Absorptions-Intensität dieses „Peaks“ in dem markierten Bereich von (B) ist ersichtlich, dass der Anthocyan-Anteil gering sein müsste, da der Absorptionsbereich bei 500 bis 600 nm weniger

intensiv ist als der UV-Bereich. Anthocyane weisen in der Regel eine größere Absorption im visuellen Bereich auf.

Zur Abtrennung aller monomeren Bestandteile wurde weiterhin eine fraktionierte Pentanfällung durchgeführt.

3.5.3.1 Fraktionierte Pentanfällung der Sephadex-Fraktionen 1 und 5

Die Fraktionen SF1 und SF5 werden in Ethanol gelöst, filtriert und einer fraktionierten Fällung mit *n*-Pentan unterzogen, um monomere, oligomere und polymere Bestandteile voneinander zu trennen (Methode s. Kapitel 5.4.5). In Tabelle 12 sind die Parameter der Pentanfällung, die Ausbeuten, die antioxidativen Aktivitäten und die Stickstoffgehalte der Fraktionen dargestellt.

Tabelle 12: Parameter, Ausbeute, antioxidative Aktivität und Stickstoffgehalt der Fraktionen der Pentanfällung

	SF1			SF5	
	2,00 g in 150 ml Ethanol, filtriert			0,66 g in 50 ml Ethanol, filtriert	
Präzipitat-Fraktion	1.1	1.2	1.3	5.1	5.2
<i>n</i> -Pentan-Konzentration [Vol.-%]	20	30	40	10	25
Ausbeute [mg]	15	242	38	29	51
TEAC [mmol Trolox/g]	1,10	0,92	1,17	1,22	1,64
Stickstoffgehalt [g/100 g]	0,59	0,65	0,60	n.n.	n.n.

Die Präzipitat-Fraktionen 1.1 bis 1.3 wurden aus der Fraktion SF1 durch eine Fällung mit 20, 30 und 40%iger Pentan-Konzentration erhalten, 5.1 und 5.2 durch einen 10 bzw. 25%igen Gehalt. Das Präzipitat 1.2 stellt mit 242 mg die größte Fraktion dar. Die antioxidativen Aktivitäten betragen zwischen 0,92 und 1,64 mmol Trolox/g. Die Präzipitate von SF5 weisen insgesamt etwas größere TEAC-Werte auf als die von SF1.

Weiterhin wurden Filtrat-Fractionen von SF1 und SF5 erhalten, die zur SELDI-TOF-MS-Analyse herangezogen wurden.

Ein weiterer Parameter, der zur Charakterisierung herangezogen wurde, ist der Stickstoffgehalt in den Fraktionen. Dieser wurde mittels Elementaranalyse bestimmt. Durch den Stickstoffgehalt können Rückschlüsse auf die Beteiligung von Proteinen und/oder Aminosäuren an der Polymerisation gezogen werden.

Der ermittelte Stickstoffgehalt in den Fraktionen ist sehr gering und beträgt bei den Fraktionen 1.1 bis 1.3 0,59 bis 0,65 g/100 g. Bei 5.1 und 5.2 liegt der Gehalt sogar unterhalb der Nachweisgrenze von circa 0,3 g/100 g. Es lässt sich daraus schließen, dass nur eine geringe Konzentration an stickstoffhaltigen Verbindungen an der Polymerisation beteiligt ist. Der durchschnittliche Stickstoffgehalt eines Proteins beträgt ungefähr 16 %. Bei einem Stickstoffgehalt von 0,6 g/100 g würde ein Proteingehalt von unter 4 % resultieren.

Eine HPLC-Analyse der Präzipitationsfraktionen ergab, dass alle Fraktionen frei von monomeren Bestandteilen vorliegen, welche in dem Filtrat angereichert werden konnten.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Methode der Phloroglucinolyse herangezogen und die Präzipitationsfraktionen säurekatalysiert degradiert (Methode nach KENNEDY und JONES 2001, s. Kapitel 5.3.7). Es wurden verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Reaktionszeiten und Reaktionstemperaturen gewählt und die Reaktionsprodukte anschließend mittels HPLC-DAD untersucht (Methode s. Kapitel 5.3.2.2). Auch nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 65°C konnte kaum Degradation festgestellt werden. Bei den entstandenen Verbindungen handelt es sich weiterhin nicht um die von KÖHLER (2006) beschriebenen Verbindungen. Das Vorkommen und die Beteiligung von Flavanolen wie Catechin oder Epicatechin an der Polymerisation werden somit ausgeschlossen.

3.5.3.2 Charakterisierung der Neutralzucker

Zur weiteren Charakterisierung der Polymerfraktion wurden nach einer Hydrolyse die an der Polymerisation beteiligten Kohlenhydrate bestimmt.

Die Analyse wurde gaschromatographisch nach einer Derivatisierung der hydrolysierten Monosaccharide zu den entsprechenden Alditolacetaten durchgeführt (Methode s. Kapitel 5.3.4). Zur qualitativen Analyse diente ein Mischstandard aus den

Monosacchariden D(+)-Xylose, L(+)-Arabinose, L(+)-Rhamnose, L(+)-Mannose, D(+)-Glucose, D(+)-Galactose sowie myo-Inosit (s. Abbildung 73). Die Zuordnung erfolgt über einen Vergleich der Retentionszeiten.

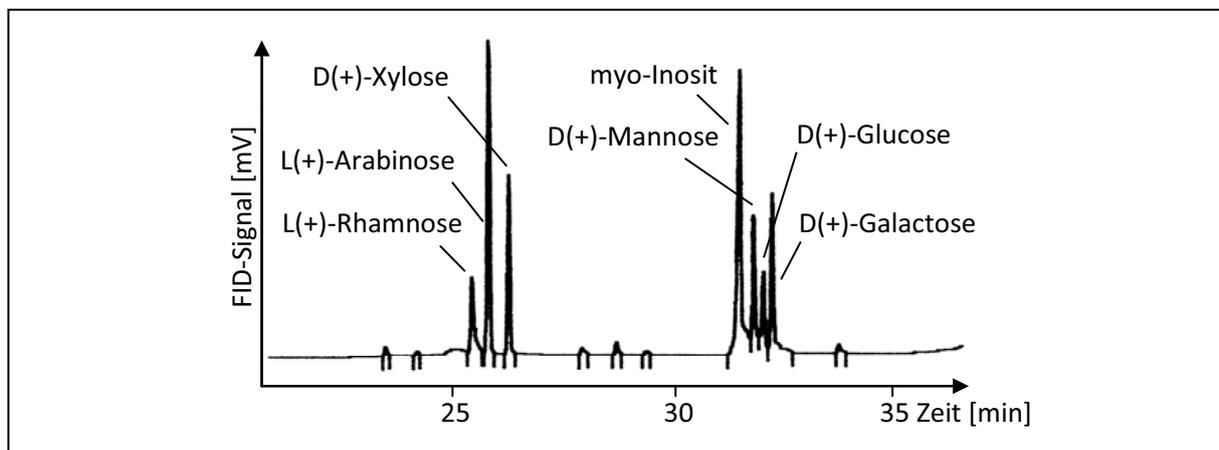


Abbildung 73: GC-FID-Chromatogramm des Mischstandards zur qualitativen Bestimmung der Monosaccharide

Zur quantitativen Analyse der zu Alditolacetaten derivatisierten Zucker werden die Integrationsflächen in Bezug zu einem inneren Standard berechnet. Als innerer Standard dient myo-Inosit.

Es wurden sowohl die Sephadex-Fractionen SF1 bis SF5 als auch die Präzipitations-Fractionen 1.1 bis 5.2 untersucht. In allen Fractionen konnten ausschließlich die Monosaccharide D(+)-Glucose und D(+)-Galactose bestimmt werden. Eine gewisse Konzentration von Glucose wurde durch den hohen Cyanidin-3-glucosid-Gehalt in *Oryza sativa* erwartet. D(+)-Galactose konnte als Monomer-Bestandteil jedoch nicht identifiziert werden. In Tabelle 13 sind die prozentualen Gehalte in den Fractionen angegeben.

Tabelle 13: Gehalte der Monosaccharide D(+)-Glucose und D(+)-Galactose in den Fractionen

Fraktion	D(+)-Glucose [%]	D(+)-Galactose [%]	Gesamtgehalt [%]
Sephadex-Fraktion SF1	25,41	21,38	46,79
Präz.-Fraktion 1.1	7,80	5,85	13,65
Präz.-Fraktion 1.2	6,71	6,91	13,62

Fraktion	D(+)-Glucose [%]	D(+)-Galactose [%]	Gesamtgehalt [%]
Präz.-Fraktion 1.3	7,65	5,72	13,37
Sephadex-Fraktion SF2	20,74	19,47	40,21
Sephadex-Fraktion SF3	43,52	33,54	77,06
Sephadex-Fraktion SF4	18,74	16,83	35,57
Sephadex-Fraktion SF5	20,43	23,67	44,10
Präz.-Fraktion 5.1	4,31	5,44	9,75
Präz.-Fraktion 5.2	4,24	9,12	13,36

Auffällig ist, dass die Glucose- und Galactose-Gehalte in den Sephadex-Fraktionen mit 16,83 bis 43,52 % wesentlich höher sind als in die in den Präzipitaten. Zunächst wurde vermutet, dass die Hydrolyse unzureichend durchgeführt wurde. Aber auch nach Erhöhung der Temperatur und Hydrolysezeit wurden diese Ergebnisse erhalten. Demnach sind in den Präzipitations-Fraktionen ungefähr die gleichen Gehalte von Glucose und Galactose enthalten. An der Polymerisation sind somit insgesamt nur 9,75 bis 13,65 % der beiden Monosaccharide beteiligt.

3.5.3.3 Charakterisierung der Oligomeren mittels MALDI-TOF-MS

Zur Charakterisierung der oligomeren Polyphenole wurden MALDI-TOF-MS-Spektren herangezogen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte durch Herrn Privatdozent Dr. H. Rawel vom Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam.

Es wurden sowohl die fünf Präzipitat-Fraktionen 1.1 bis 5.2 als auch die Filtrate der Fraktionen SF1 und SF5 nach den Pentanfällungsreaktionen untersucht. Als Matrixsubstanz wurde 2', 4', 6'-Trihydroxyacetophenon (THAB) verwendet; weitere Parameter sowie die Durchführung der Probenvorbereitung sind in Kapitel 5.3.5 angegeben.

Die Spektren der Präzipitat-Fraktion 1.1 bis 1.3, die von 5.1 und 5.2 sowie die Spektren der beiden Filtrate sind sich jeweils sehr ähnlich. In Abbildung 74 sind beispielhaft die Spektren der Fraktionen 1.3, 5.2 und das Spektrum des Filtrats der Fraktion SF5 dargestellt. In den Spektren (A) und (B) sind verschiedene Ionen in „Bergen“ beziehungsweise „Oligomer-

Fraktionen“ zu erkennen. Ausschnitte von vier dieser Fraktionen der Fraktion 5.2 mit m/z 800 bis ca. m/z 1350 sind vergrößert dargestellt. Es handelt sich bei den Ionen einer „Oligomer-Fraktion“ wahrscheinlich um verschiedene Addukte mit Metallionen wie Natrium oder Kalium, neben der üblichen Form mit Wasserstoff $[M+H]^+$. In Spektrum (A) ist weiterhin ab m/z 2500 der Einfluss der Matrix-Substanz als flacher Berg erkennbar.

Fraktion 5.2 enthält vermutlich die höchste Konzentration von oligomeren Verbindungen, die mit m/z 700 bis m/z 2300 in Form von zwölf „Oligomer-Fraktionen“ erkennbar sind. Es ist schwierig, eine Zuordnung der einzelnen Massen vorzunehmen, auf Grund der Bildung mehrerer Ionen. In der Filtrat-Fraktion 5 (C) sind keine Oligomere erkennbar.

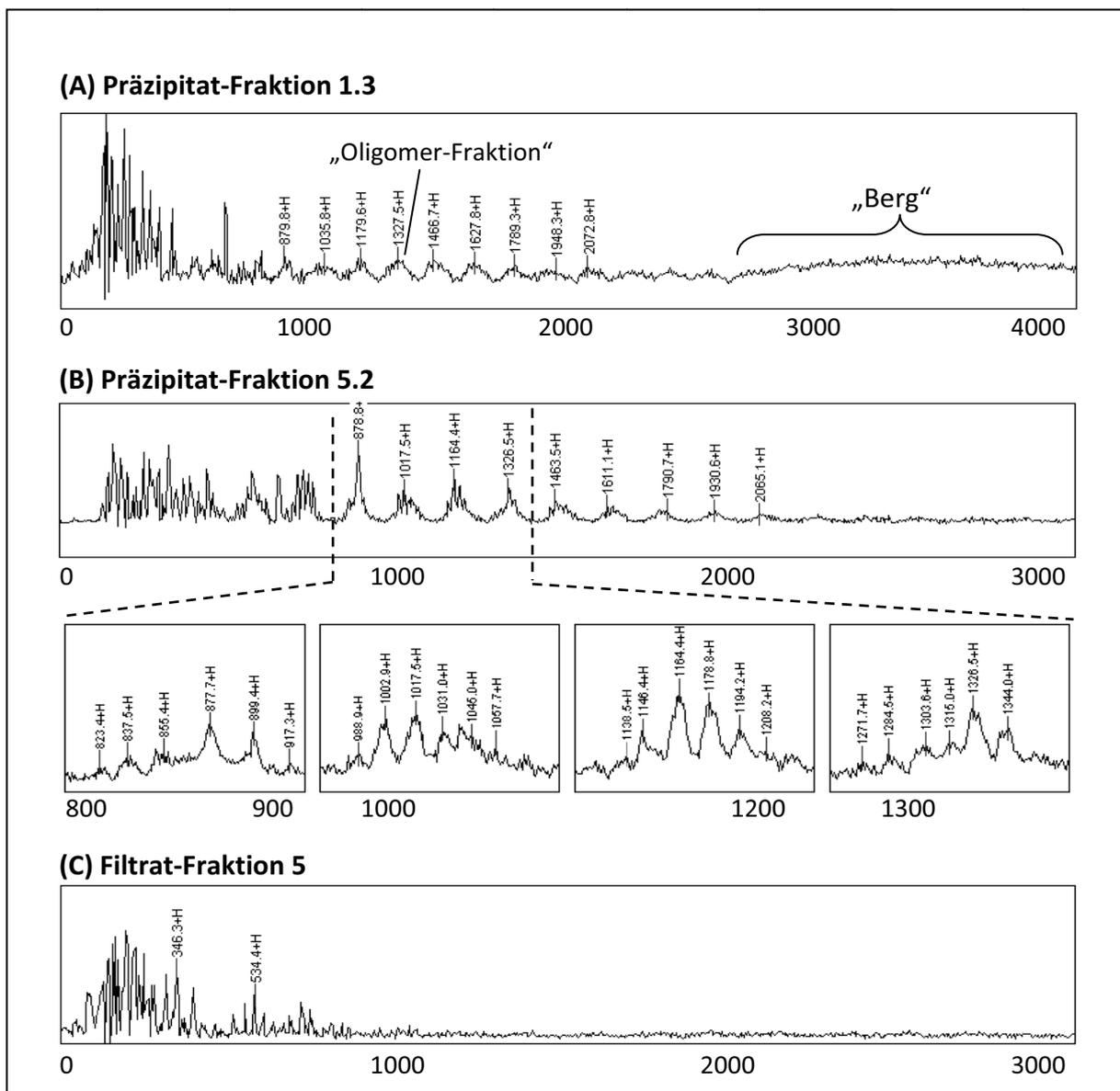


Abbildung 74: (A - C) MALDI-TOF-MS-Spektren der Präzipitations-Fractionen 1.3, 5.2 und der Filtrat-Fraktion 5

REED et al. (2005) zeigen MALDI-TOF-MS-Spektren von Oligomer-Serien mit Catechin und Epicatechin-Einheiten in Samen von Weintrauben. Demnach sind in den Spektren zwei Flavanol-Serien zu erkennen, wobei das eine Oligomer durch einen zusätzlichen Gallussäure-Rest eine etwas höhere Molekülmasse besitzt. Ähnliche Spektren wurden von den Präzipitat-Fractionen von *Oryza sativa* erhalten. Da es keine Anhaltspunkte für das Vorkommen von Flavanolen gibt, werden durch den hohen Cyanidin-3-glucosid-Gehalt Cyanidin-Addukte postuliert. VIDAL et al. (2004) identifizierten oligomere Anthocyan-Dimere und -Trimere in Traubenschalen. Demnach liegt die terminale Einheit als Flavylum-Kation-Struktur vor, welches sich in einem UV-Vis-Spektrum in der Absorption im visuellen Bereich äußert.

In Abbildung 75 ist das MALDI-TOF-MS-Spektrum von Fraktion 5.2 mit Kennzeichnung der postulierten Cyanidin-Serien dargestellt. Es wird vermutet, dass es sich bei den Verbindungen in den Präzipitat-Fractionen um eine Serie von Cyanidin-Aglykonen (A) und eine Cyanidin-Serie, erweitert um eventuell Glucose- oder Galactose Moleküle (B), handelt. Glucose sowie Galactose werden auf Grund des gaschromatographisch ermittelten Gehalts von 13,36 % in der Fraktion 5.2 vermutet (s. Kapitel 3.5.3.2). In der Fraktion 5.2 könnten somit Hexa- sowie Heptamere vorliegen. Vermutlich sind an der Polymerisation auch Peonidin-Aglykone beteiligt, welches sich bei einem Aglykon im Heptamer in einer Massendifferenz von $\Delta m/z$ 14 äußern würde. Dieses wäre eine weitere Erklärung für das Auftreten der „Oligomer-Fractionen“.

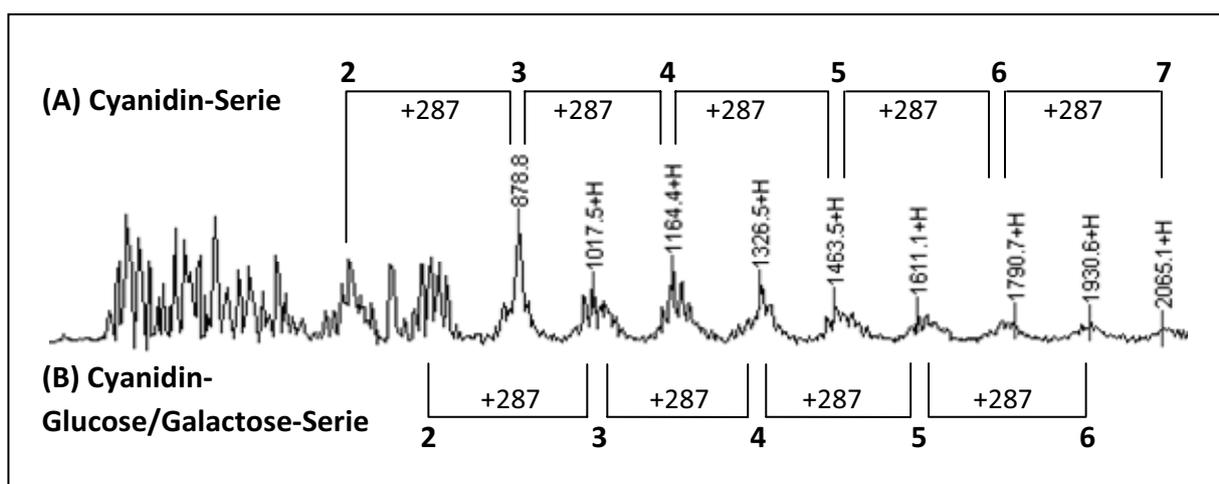


Abbildung 75: Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-MS-Spektrum der Präzipitat-Fraktion 5.2 mit Kennzeichnung (A) der postulierten Cyanidin-Serie und (B) der Cyanidin-Glucose/Galactose-Serie

In Abbildung 76 ist in (A) beispielhaft das UV/Vis-Spektrum der Fraktion 5.2 nach der HPLC-DAD-Analyse bei einer Retentionszeit von 25 min und in (B) das Spektrum von Cyanidin-3-glucosid dargestellt. Anhand der Absorptionsbande bei 525 nm ist ersichtlich, dass an der Polymerisation Anthocyane beteiligt sein müssen, die in der Flavylum-Kation-Struktur vorliegen. Ein Vergleich mit dem Spektrum von Cyanidin-3-glucosid zeigt, dass jedoch vorwiegend Moleküle vorliegen, die keine Absorption im Vis-Bereich aufweisen. Dieses kann beispielsweise durch 4→8-Verknüpfung des oberen Cyanidin-Moleküls mit der unteren Einheit geschehen, da durch Delokalisierung der Elektronen die Flavylum-Kation-Struktur des oberen Moleküls aufgehoben wird.

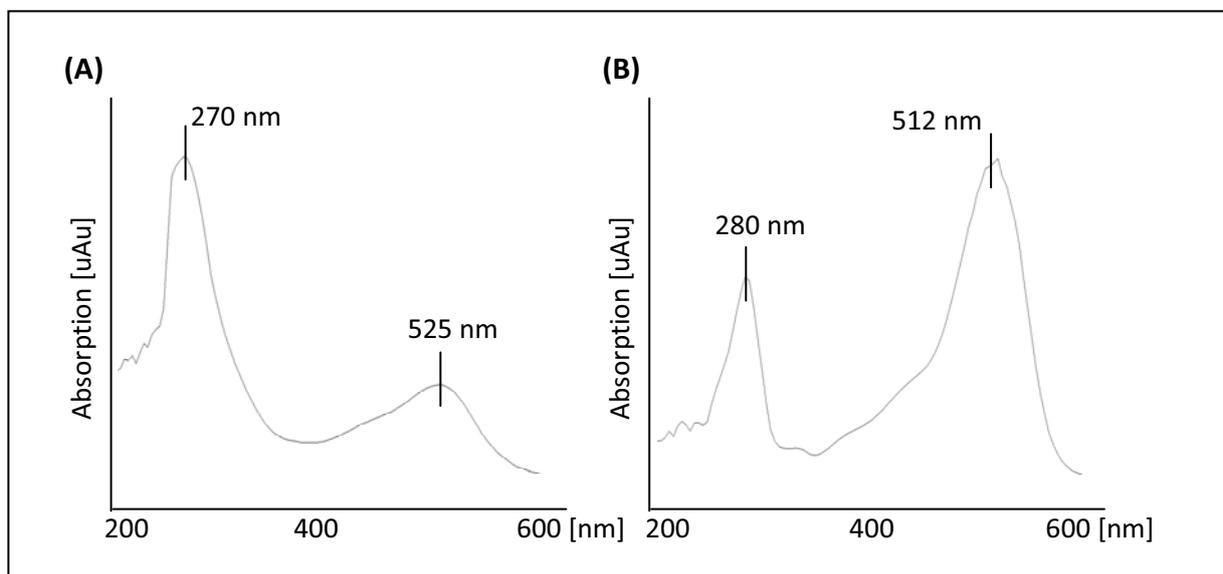


Abbildung 76: (A) UV/Vis-Spektrum nach HPLC-DAD-Analyse der Präzipitat-Fraktion 5.2 bei einer Retentionszeit von 25 Minuten, (B) UV/Vis-Spektrum von Cyanidin-3-glucosid

Weiterhin ist es schwierig, Aussagen über die Molekülgröße des Oligomers zu treffen, wenn mehrere Flavylum-Kation-Strukturen vorliegen. Das im Massenspektrum angezeigte Masse-zu-Ladungs-Verhältnis entspricht in diesem Fall nicht der tatsächlichen Massenzahl und täuscht kleinere Werte vor.

3.6 Isolierung von Verbindungen aus violetterem Taro (*Xanthosoma violaceum*)

3.6.1 Trennung und Charakterisierung der Flavanoide

Der Ethylacetat-Extrakt der Rhizome von *Xanthosoma violaceum* wies eine zytotoxische Aktivität auf und wurde daraufhin untersucht (s. Abbildung 22, S. 50). In Abbildung 77 ist das HPLC-Chromatogramm des Ethylacetat-Extrakts bei 280 nm dargestellt.

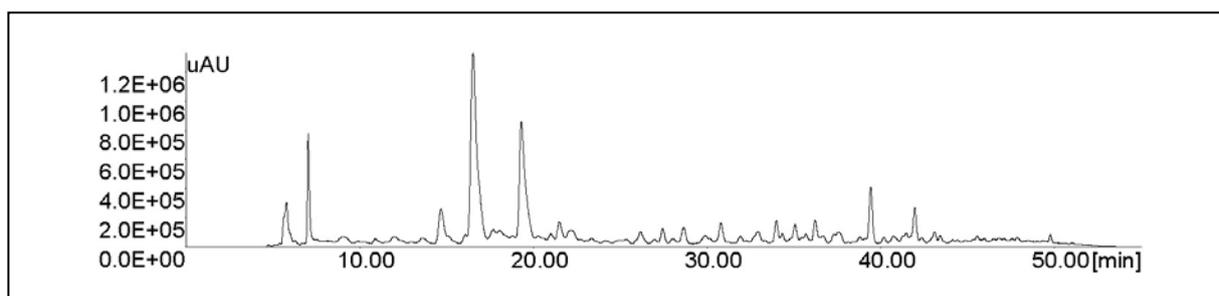


Abbildung 77: HPLC-Chromatogramm des Ethylacetat-Extrakts von *Xanthosoma violaceum* bei 280 nm

Zur Trennung und Fraktionierung der Verbindungen wurde die HSCCC herangezogen. Für die Trennung hat sich nach der Ermittlung des Verteilungskoeffizienten der Hauptverbindungen ein Fließmittelsystem aus *n*-Hexan, Ethylacetat, Methanol und Wasser in einem Verhältnis von 1/5/1/5 (v/v/v/v) als geeignet erwiesen. Die Trennung wurde mit einer Flussrate von 3,0 mL/min und einer Rotationsgeschwindigkeit des Coils von 900 rpm durchgeführt. In Abbildung 78 ist das HSCCC-Chromatogramm bei 280 nm dargestellt.

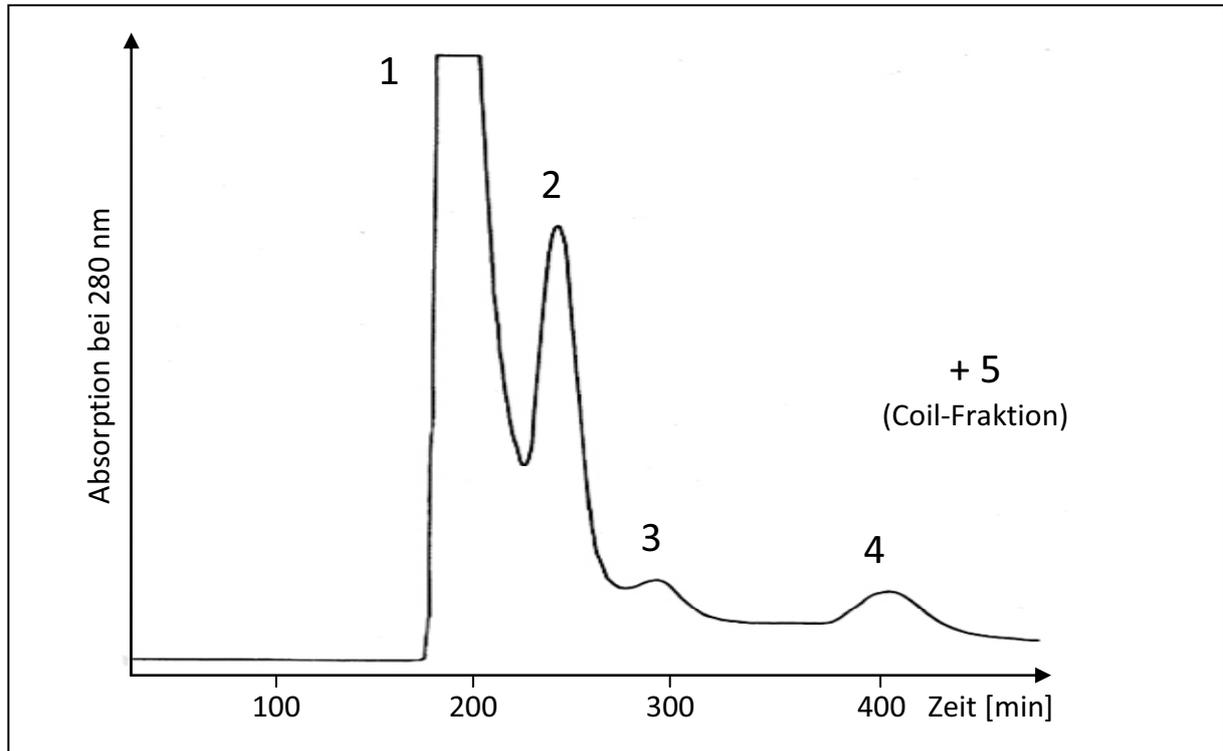


Abbildung 78: HSCCC-Chromatogramm der Trennung des Ethylacetat-Extrakts von *Xanthosoma violaceum* bei 280 nm

Die Einteilung der Fraktionen erfolgte anhand des UV-Chromatogramms. Einschließlich der Coil-Fraktion 5 wurden fünf Fraktionen erhalten. Die HPLC-Chromatogramme der HSCCC-Fraktionen 1, 2 und 3 zeigt Abbildung 79.

Die Fraktionen 1 und 2 stellen den größten Massenanteil dar. Die Hauptverbindungen wurden mittels präparativer HPLC isoliert und ihre Struktur mittels ESI-MSⁿ und Kernresonanzspektroskopie aufgeklärt.

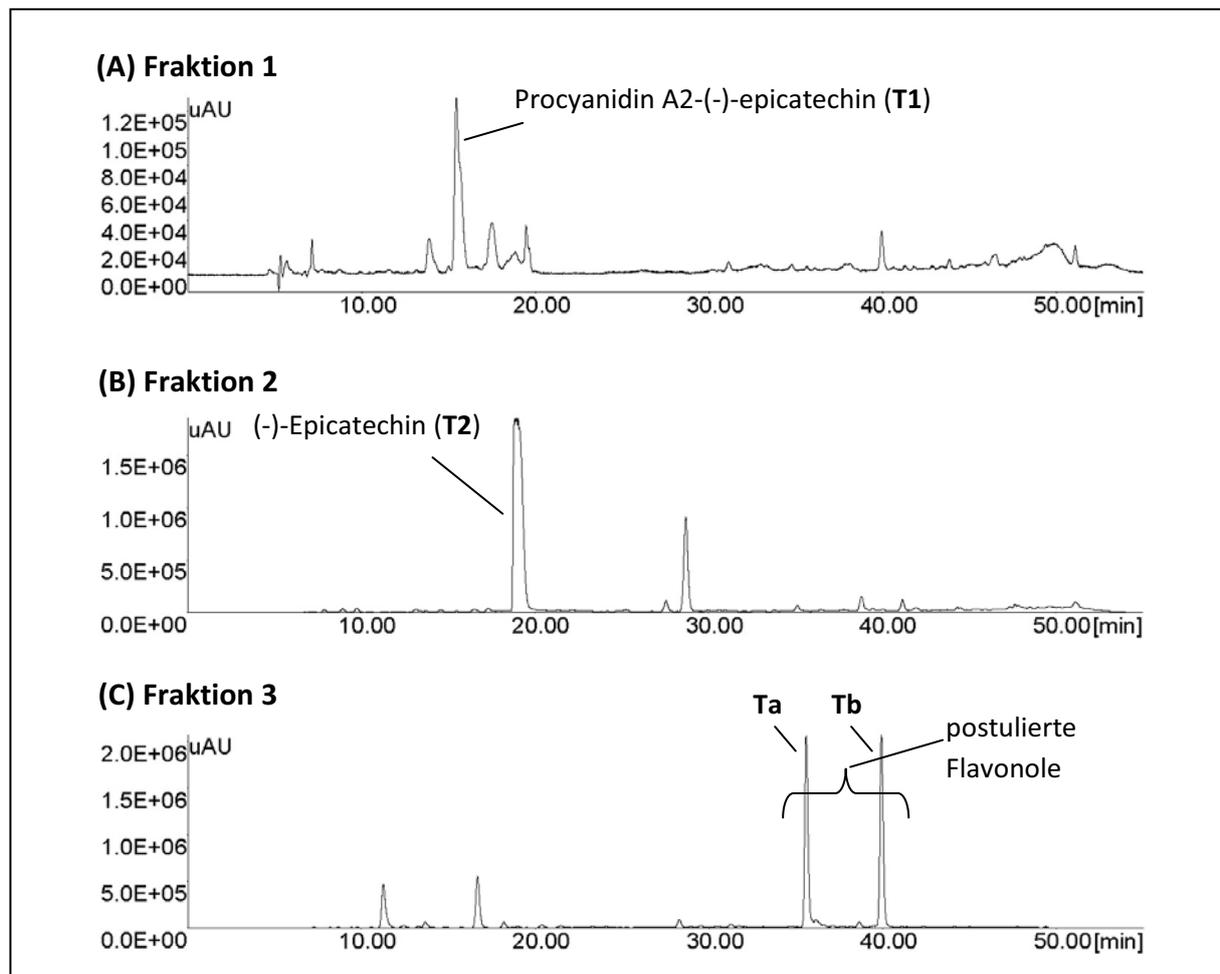


Abbildung 79: (A - C) HPLC-Chromatogramme der HSCCC-Fractionen 1 bis 3

Eine LC-MS-Analyse der HSCCC-Fraktion 1 zeigte eine hohe Konzentration eines trimeren Proanthocyanidins mit m/z 863 $[M-H]^-$ (s. Abbildung 80). Durch MS^n -Experimente des Molekülions konnten das charakteristische Fragment bei m/z 289 $[M-H]^-$ und ein Signal bei m/z 573 für eine dimere Partial-Struktur durch den Verlust einer Flavan-3-ol-Einheit erkannt werden.

RAMOS-JERZ (2007) isolierte kürzlich trimere Proanthocyanidine aus Avocado-Kernen. Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren bestätigte die Verbindung als Epicatechin-[4 β →8, 2 β →O→7]-epicatechin-[4 β →8]-epicatechin (Proanthocyanidin A2-(-)-epicatechin). Das Molekül ist somit aus drei Epicatechin-Einheiten aufgebaut, welches zusätzlich zur interflavonoiden Bindung eine Etherbrücke zwischen dem Kohlenstoffatom C2 des oberen Epicatechin-Moleküls und dem Sauerstoffatom in Position 7 des mittleren Epicatechin-Moleküls aufweist. In Abbildung 80 ist die Struktur des Proanthocyanidins (**T1**) dargestellt.

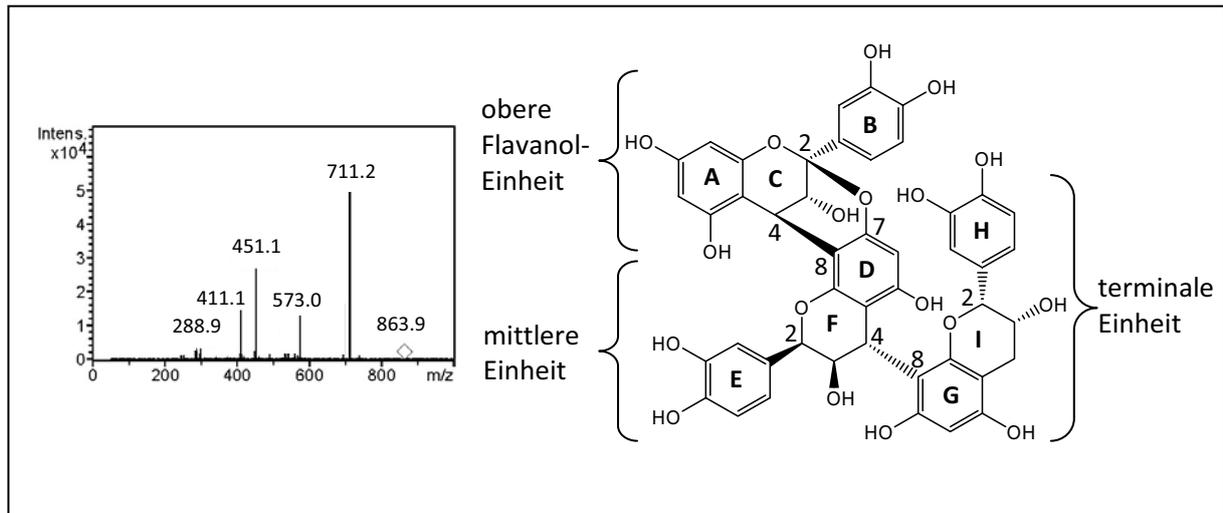


Abbildung 80: Massenspektrum im negativen Modus und Struktur von Proanthocyanidin A2-(-)-epicatechin (T1), $[M - H]^- = 863$

Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome im ^{13}C -NMR-Spektrum sind in Kapitel 5.7.4 auf S. 168 angegeben. Das Spektrum zeigt 45 Kohlenstoffatom-Signale. Wichtig für die Auswertung des ^{13}C -Spektrums waren vor allem die Signale bei δ 77.9 ppm für C2/F und δ 79.5 ppm für C2/I, welche charakteristisch zur Unterscheidung von Catechin und Epicatechin-Einheiten sind. Das ^1H -NMR-Spektrum konnte leider nicht ausgewertet werden. Ein Grund für eine mögliche Signalverdopplung im Protonenspektrum ist das Auftreten von Rotationsisomeren (Rotation der terminalen Einheit). Eine Rotation der oberen und mittleren Flavanol-Einheit ist durch eine Stabilisierung durch die zusätzliche Etherbrücke nicht möglich.

Weiterhin wurde aus der HSCCC-Fraktion 2 die Hauptverbindung isoliert. In Abbildung 81 ist das Massenspektrum und die Struktur der isolierten Verbindung dargestellt.

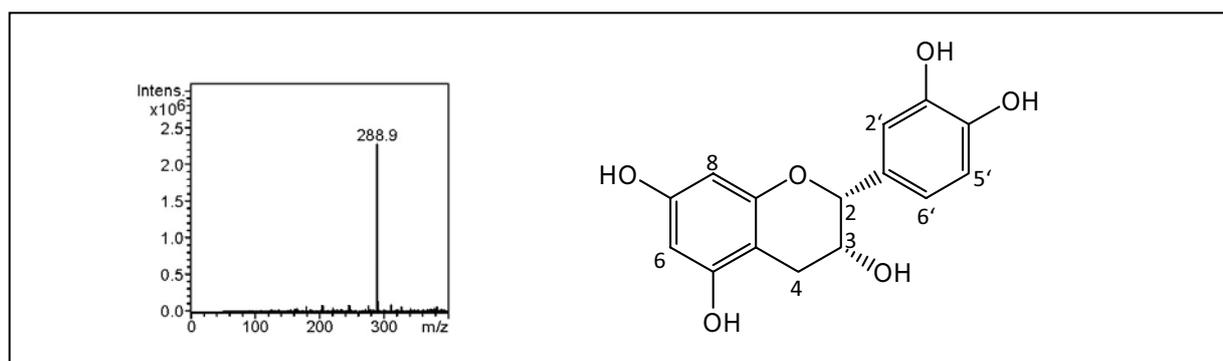


Abbildung 81: Massenspektrum im negativen Modus und Struktur von (-)-Epicatechin (T2)

Die Verbindung zeigt im ESI-MS-Spektrum ein Molekölion mit m/z 289 $[M-H]^-$. Die Strukturaufklärung erfolgte durch Co-Chromatographie und durch einen Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten einer Referenzsubstanz. Es konnte somit bestätigt werden, dass es sich bei der Substanz um (-)-Epicatechin handelt.

Das ^1H -NMR-Spektrum in Abbildung 82 zeigt die Protonensignale und Kopplungsmuster der Verbindung **T2**.

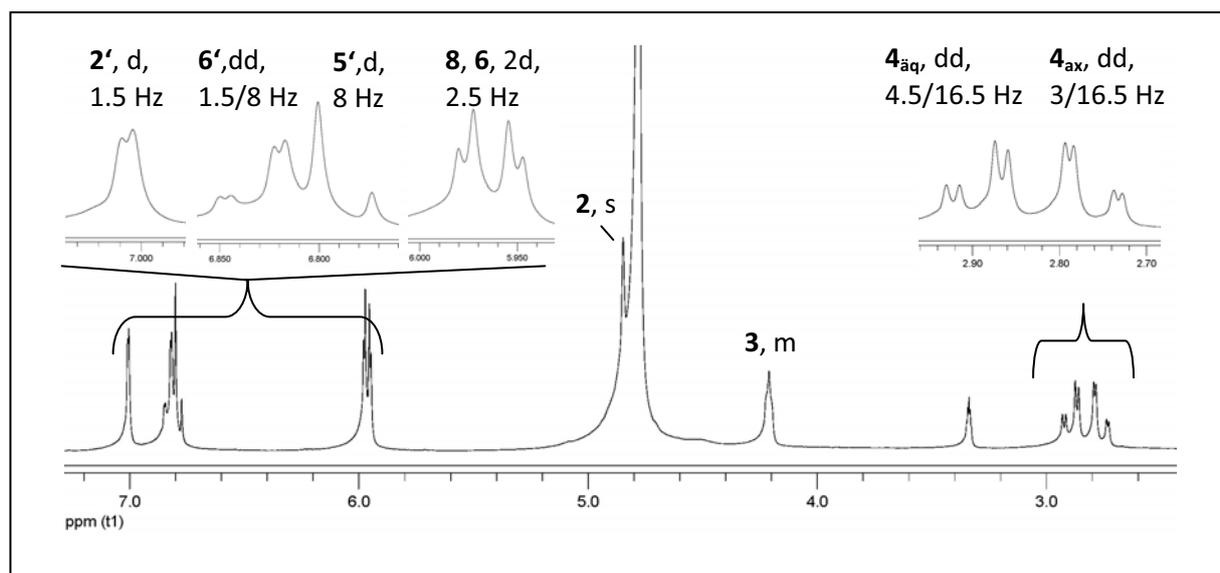


Abbildung 82: ^1H -NMR-Spektrum von (-)-Epicatechin (300 MHz, CD_3OD)

Vergleichbar mit den Signalen der Protonen des B-Rings des Cyanidin- sowie Luteolin-Aglykons erscheinen das Dublett von H2' bei δ 7.01 ppm ($J = 1.5$ Hz), das Dublett von Dubletts von H6' bei δ 6.83 ppm ($J = 1.5/8.0$ Hz) und das Dublett von H5' bei δ 6.79 ppm ($J = 8.0$ Hz). Die *meta*-koppelnden Protonen von H6 und H8 sind als Dubletts ($J = 2.5$ Hz) bei δ 5.98 ppm und δ 5.96 ppm zu sehen. Die beiden Protonen H4 der Methylen-Gruppe spalten in Dublett von Dubletts bei δ 2.90 ppm ($J = 4.5/16.5$ Hz) für das äquatoriale Proton und bei δ 2.73 ppm ($J = 3.0/16.5$ Hz) für das axiale Proton auf. H2 erscheint als leicht verbreitertes Singulett bei δ 4.42 ppm und H3 als nicht interpretierbares Multipllett bei δ 4.21 ppm.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum stimmen die Resonanzsignale von C2 (δ 79.8 ppm), C3 (δ 67.5 ppm) und C4 (29.3 ppm), zur Unterscheidung von Catechin, ebenfalls mit den Werten der (-)-Epicatechin-Standardsubstanz überein.

RAMOS-JERZ (2007) führte ein Screening mit Proanthocyanidinen und monomeren Flavanolen hinsichtlich deren zytotoxischer Aktivitäten durch. Demnach weisen die Verbindungen **T1** und **T2** im „Brine shrimp“-Bioassay keine nennenswerten Aktivitäten auf. Da leider nur begrenzt Pflanzenmaterial zur Verfügung stand, konnten keine weiteren Untersuchungen im Hinblick auf zytotoxisch aktive Substanzen in dem Ethylacetat-Extrakt durchgeführt werden.

3.6.2 Charakterisierung der Flavonole

In der HSCCC-Fraktion 3 eluierten bei einer HPLC-DAD-Trennung zwei Verbindungen mit Retentionszeiten von 34,9 min und 39,5 min (s. Chromatogramm C in Abbildung 79). Eine dünnschichtchromatographische Trennung der Substanzen und anschließender Detektion mit Anisaldehyd-Sprühreagenz (STAHL 1967) ergab gelb-grün gefärbte Spots, welches auf Flavonoidglykoside hinweist. Die UV-Spektren zeigen für die Verbindung **Ta** zwei Absorptionsbanden bei 263 und 346 nm sowie für **Tb** bei 263 und 344 nm (s. Abbildung 89 im Anhang). Die Spektren der beiden Verbindungen sind sehr ähnlich, welches auf die Zugehörigkeit zu derselben Substanzklasse schließen lässt.

In Abbildung 83 sind die Massenspektren (MS^2) von **Ta** und **Tb** im negativen Modus dargestellt. **Ta** weist einen Basispeak mit m/z 301 $[M-H]^-$ und **Tb** einen Basispeak mit m/z 285 $[M-H]^-$ auf. Die Differenz beträgt in beiden Verbindungen $\Delta m/z$ 308.

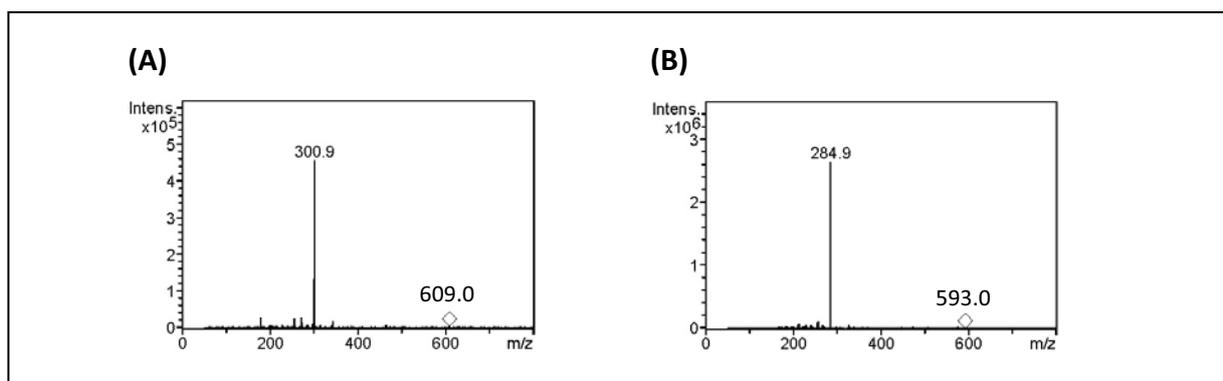


Abbildung 83: Massenspektren der postulierten Flavonole (A) **Ta und (B) **Tb** im negativen Modus**

Es könnte sich bei den Verbindungen um Flavonol-Derivate handeln. Eine Isolierung und Strukturaufklärung der Substanzen war leider nicht möglich. Die Verbindung **Ta** weist durch

die Molekülmasse des Aglykons mit m/z 302 auf ein Quercetin-Derivat und **Tb** durch das Aglykon mit m/z 286 auf ein Kämpferol-Derivat hin. Die Fragmente könnten durch die Abspaltung von Rutinose-Molekülen mit $\Delta m/z$ 308 entstanden sein.

3.6.3 Charakterisierung der Anthocyane

Über das Vorkommen und die Verteilung von Anthocyanen in den Rhizomen von *Xanthosoma violaceum* liegen in der Literatur keine Kenntnisse vor. WILLIAMS et al. (1981) untersuchten die Blätter von Pflanzen, die der Familie der Araceae angehören, im Hinblick auf Anthocyane. Demnach wurde in violetter Taro ausschließlich Cyanidin-3-rutinosid identifiziert.

In Abbildung 84 ist das HPLC-Chromatogramm des essigsauren methanolischen Extrakts bei 280 und 520 nm dargestellt. Wie in (A) zu erkennen ist, ist der Extrakt sehr komplex zusammengesetzt. Bei den beiden Anthocyanen in (B) mit Retentionszeiten von 24 und 29 Minuten, handelt es sich nur um Minorbestandteile, wie an den Absorptionsdifferenzen der beiden Chromatogramme zu sehen ist.

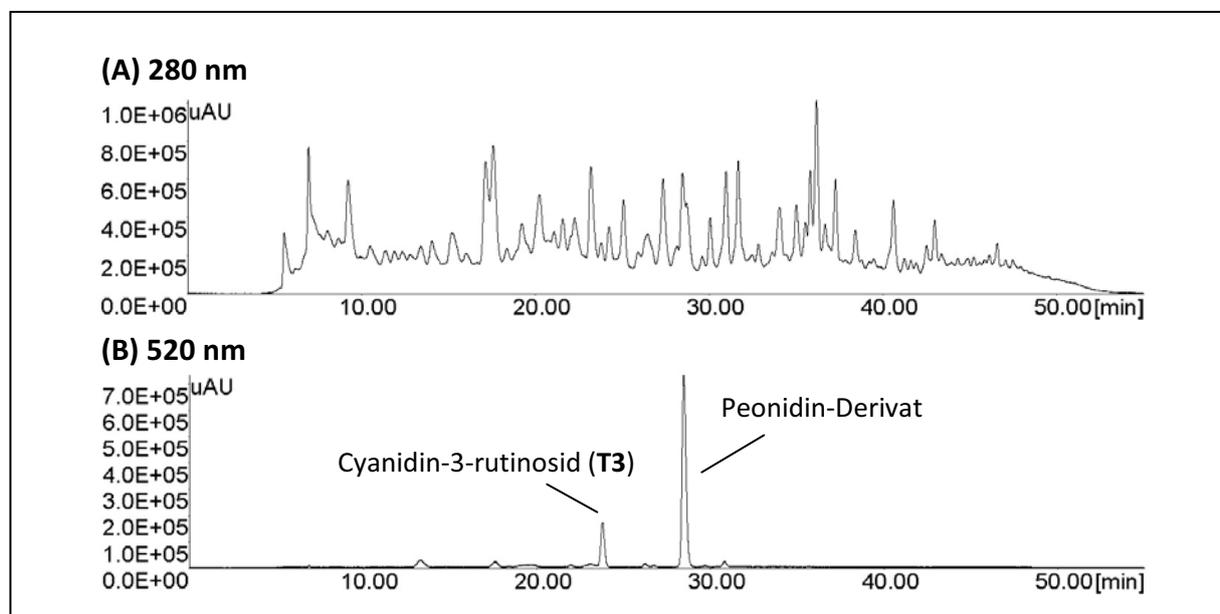


Abbildung 84: (A, B) HPLC-Chromatogramme des essigsauren Methanol-Extrakts von *Xanthosoma violaceum* bei 280 und 520 nm

Die Charakterisierung der Anthocyane erfolgt zunächst anhand von massenspektrometrischen Daten. In Abbildung 85 sind die Massenspektren dargestellt. Das Anthocyan in (A) weist ein Molekülion mit m/z 595 $[M]^+$ und den Fragmenten mit m/z 449 $[M\text{-Rhamnose}]^+$ und m/z 287 für das Cyanidin-Aglykon auf $[M\text{-Rhamnose-Glucose}]^+$ auf. Eine Co-Chromatographie mit einer Standardsubstanz und der Vergleich der Retentionszeiten bestätigt die Substanz als Cyanidin-3-rutinosid (**T3**), welche auch in *Oryza sativa* identifiziert wurde (HILLEBRAND 2004). Als Hauptanthocyan in dem Extrakt wird ein Pelargonidin-Derivat postuliert. Das Massenspektrum in (B) zeigt für das Molekülion mit m/z 579 $[M]^+$ Fragmente mit m/z 433 und m/z 271, die eine identische Massendifferenz aufweisen wie bei **T3**. Bei dem Aglykon mit m/z 271 könnte es sich um Pelargonidin handeln.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Isolierung und Strukturaufklärung dieses Anthocyans war durch das Fehlen von weiterem Probenmaterial nicht möglich.

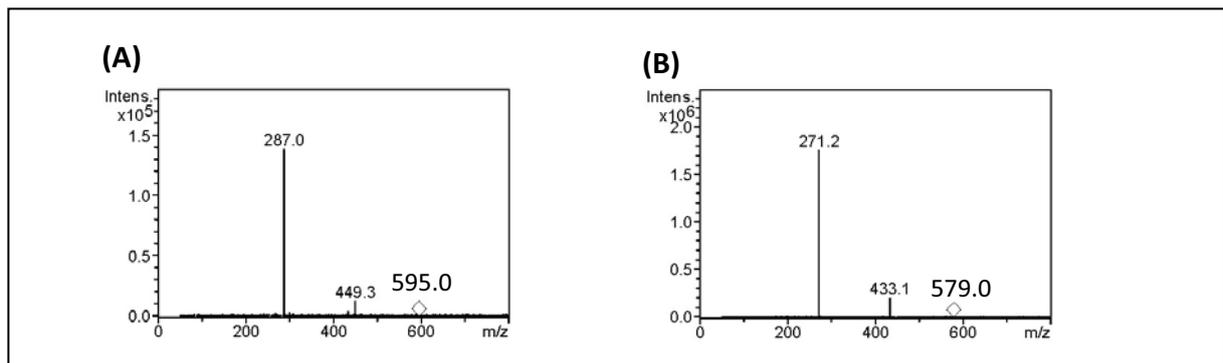


Abbildung 85: Massenspektren im positiven Modus von (A) Cyanidin-3-rutinosid (T3) und (B) dem postulierten Pelargonidin-Derivat

Zum Vergleich wurde ein frischer Extrakt aus den Blattstielen und Blättern des blauen Taros angefertigt. Das HPLC-Chromatogramm zeigt Abbildung 86. Es konnte ebenfalls Cyanidin-3-rutinosid identifiziert werden. Das vermeintliche Peonidin-Derivat ist demnach nur in den Rhizomen enthalten.

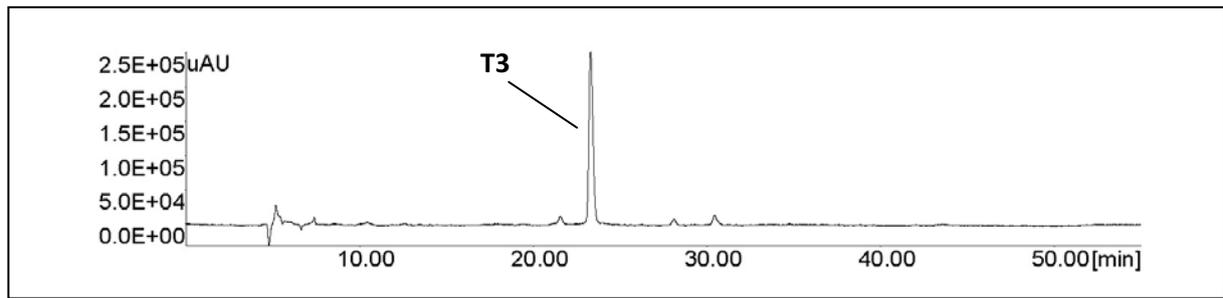


Abbildung 86: HPLC-Chromatogramm eines essigsauren Methanol-Extrakts der Blattstiele von *Xanthosoma violaceum* bei 520 nm

4 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Isolierung von Naturstoffen aus traditionellen Chinesischen Getreide- und Gemüsesorten, welche antioxidative oder zytotoxische Eigenschaften aufweisen. Bei den untersuchten Pflanzenmaterialien handelte es sich um die Beeren der Aubergine (*Solanum melongena*), die Blätter von Perilla (*Perilla frutescens*), den Samen von schwarzem Reis (*Oryza sativa*) und den Rhizomen des blauen Taros (*Xanthosoma violaceum*). Zur Trennung der Pflanzeninhaltsstoffe wurde die *Countercurrent Chromatography* (CCC) herangezogen, zum Teil in Kombination mit Gelchromatographie an Sephadex LH-20 und präparative HPLC. Die Anwendung von *in vitro* und *in vivo*-Testsystemen lieferte wesentliche Aussagen über antioxidative (TEAC) und zytotoxische Eigenschaften (Brine shrimp-Test) der Pflanzenextrakte, isolierten Fraktionen und Reinsubstanzen. Der Fokus richtete sich vor allem auf die Isolierung und Charakterisierung von Flavonoiden, wie insbesondere den Anthocyanen, Flavonen und Flavanolen, sowie auf Hydroxyzimtsäurederivate.

Nach einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität erfolgte ein Screening der Fraktionen im Hinblick auf antioxidative Aktivität und Zytotoxizität. Die aktiven Extrakte wurden dann systematisch auf bioaktive Leitsubstanzen hin analysiert.

Zur Trennung und Analytik der Beeren der Aubergine wurden der methanolische und der essigsäure methanolische Extrakt ausgewählt, welche sowohl eine hohe zytotoxische Aktivität als auch eine hohe antioxidative Aktivität von bis zu 2,91 mmol Trolox pro Gramm Extrakt aufwiesen. Die zytotoxische Aktivität konnte auf Hydroxyzimtsäureamid-Derivate und auf Chlorogensäure-Isomere zurückgeführt werden, wobei eine Brine shrimp-Zytotoxizität der Chlorogensäuren erstmals beschrieben werden konnte. Weiterhin ist es erstmals gelungen, Verbindungen der Substanzklasse der Hydroxyzimtsäureamide mittels High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) erfolgreich zu trennen und fünf Derivate zu isolieren. Die Strukturen der Caffeoylspermidin-Derivate N^1 -Caffeoyl- N^{10} -7',8'-dihydrocaffeoylspermidin und N^{10} -Caffeoyl- N^1 -7'',8''-dihydrocaffeoylspermidin wurden in der Literatur bislang noch nicht beschrieben und konnten anhand von zweidimensionalen NMR-Daten aufgeklärt werden. Das ebenfalls isolierte 7',7'',8',8''-Tetrahydrocaffeoylspermidin wurde erstmals in *Solanum melongena* identifiziert. Durch

Simulation eines zwanzig minütigen Kochvorgangs der Auberginen-Beeren konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Caffeoylspermidin-Derivate hitzelabil sind und abgebaut werden. Bei den Chlorogensäure-Isomeren konnte dagegen keine Degradation beim Kochen festgestellt werden. Die Trennung des Anthocyans mit dem Trivialnamen „Nasunin“ und der Caffeoyl-chinasäure-Isomere erfolgte ebenfalls mittels HSCCC. Neben den drei Isomeren 3-, 4- und 5-Caffeoyl-Chinasäure konnte 1-Caffeoyl-Chinasäure charakterisiert werden, welche für *Solanum melongena* bislang unbekannt war.

Bei *Perilla frutescens* galt unser Interesse der Isolierung von Flavonoiden aus dem polaren essigsauren Methanol-Extrakt der Blätter. Nach einer Trennung mittels HSCCC waren aufgrund der Komplexität von Fraktion 1 und der lipophilen Fraktion, die auf dem Coil verblieben war, weitere Aufreinigungen erforderlich. Für die Rechromatographie der Fraktion 1 konnte eine HSCCC-Methode entwickelt werden, bei der ein Zusatz eines Ionenpaarreagenzes zu einer erhöhten Lipophilie und somit erhöhten Retention von sehr polaren Anthocyanen führte. Demnach eignet sich das Fließmittelsystem bestehend aus *tert.*-Butylmethylether, *n*-Butanol, Acetonitril und Wasser (1/3/1/5, v/v/v/v) mit einem Zusatz von 1,0 % Pentafluorpropionsäure zur Trennung. Es konnten insgesamt sieben Cyanidin-Derivate isoliert und charakterisiert werden. Unter anderem ist es gelungen, das *cis*-Isomer von Malonylshisonin zu isolieren. Nach einer Rechromatographie der Coil-Fraktion mittels Gelchromatographie an Sephadex LH-20 konnten die beiden Flavonmonoglucuronide 7-O-Glucuronylluteolin und 7-O-Glucuronylapigenin sowie die Flavon diglucuronide 7-O-Diglucuronylluteolin und 7-O-Diglucuronylapigenin isoliert werden. Die Diglucuronide konnten weiterhin durch eine Präzipitationsreaktion nach einer HSCCC-Trennung in reiner Form erhalten werden. Erstmals konnte das für *Perilla frutescens* bislang unbekanntes Hydroxyzimtsäure-Derivat Syringasäure- β -D-glucoseester isoliert werden. Interessant erwies sich die Untersuchung der Sephadex LH-20-Fractionen im Hinblick auf antioxidative und zytotoxische Aktivität. Demnach können den oligo- und polymeren Verbindungen potentiell zytotoxische Eigenschaften zugesprochen werden.

Zur Analytik und Trennung wurde weiterhin der essigsaure methanolische Extrakt der Samen von *Oryza sativa* herangezogen, welcher eine hohe antioxidative Aktivität von über 2,0 mmol Trolox pro Gramm aufwies. Nach sukzessiven Trennungen mittels HPLC und präparativer HPLC konnten fünf Anthocyan-Derivate isoliert und identifiziert werden. Cyanidin-3-O-

sophorosid konnte erstmals als Inhaltsstoff von *Oryza sativa* beschrieben werden. Die Charakterisierung der polymeren Verbindungen in schwarzem Reis stellte einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt dar. Nach Anreicherung der Polymerfraktion mittels *Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography* (LSRCCC) und sich anschließender Gelchromatographie an Sephadex LH-20 konnten polymere Verbindungen durch eine fraktionierte Pentanfällung gewonnen werden. Gaschromatographische Analysen ergaben, dass vermutlich geringe Mengen der Saccharide Glucose sowie Galactose in den Polymerstrukturen eingebaut sind. Eine Analyse mittels SELDI-TOF-MS ergab Hinweise für das Auftreten von bis zu heptameren „Cyanidin-Serien“ bzw. „Cyanidin-Glucose/Galactose-Serien“.

Erstmalig konnte weiterhin ein Ethylacetat-Extrakt der Rhizome von *Xanthosoma violaceum* mittels HSCCC getrennt werden und das Flavanol (-)-Epicatechin sowie das trimere Proanthocyanidin Procyanidin A2-(-)-epicatechin isoliert werden. In einem polaren Extrakt der Rhizome und frischen Blattstielen konnte zudem das Anthocyan Cyanidin-3-O-rutinosid identifiziert werden.

Summary

The present work describes the preparative isolation of antioxidants as well as cytotoxic compounds from different traditional Chinese grains and vegetables. Investigated plant materials were eggplant berries (*Solanum melongena*), perilla leaves (*Perilla frutescens*), black rice seeds (*Oryza sativa*), and rhizomes of violet stemmed Taro (*Xanthosoma violaceum*). Different methods of Countercurrent Chromatography (CCC) in combinations with gel chromatography on Sephadex LH-20 and preparative HPLC were used for the separation of plant extracts. *In vitro* and *in vivo* assays regarding antioxidant (TEAC) and cytotoxic activities (Brine shrimp-assay) provided essential information of plant extracts, isolated fractions and purified compounds. The phytochemical focus was on hydroxycinnamoyl acid derivatives and flavonoids, in particular anthocyanins, flavones, and flavanols.

Extracts of different polarities were obtained by liquid-liquid-solvent-extraction and screened from viewpoint of antioxidant and cytotoxic properties. Further investigations were only performed with the respective bioactive extracts.

Investigations of eggplant berries were performed with the methanol- and methanol-acetic acid-extract due to their strong cytotoxic and antioxidant activities up to 2.91 mmol Trolox per gram extract. Cytotoxic activities were due to hydroxycinnamoyl amide derivatives as well as chlorogenic acid isomers. The activities of chlorogenic acid isomers were firstly observed in the Brine shrimp-assay. Separation of hydroxyl-cinnamoyl amide derivatives by High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) was successfully performed leading to five compounds – which included two new natural products. Structure elucidation of caffeoylspermidines N^1 -caffeoyl- N^{10} -7',8'-dihydrocaffeoylspermidine and N^{10} -caffeoyl- N^1 -7'',8''-dihydrocaffeoylspermidine was performed by means of two dimensional NMR spectroscopy. Furthermore 7',7'',8',8''-tetrahydrocaffeoylspermidine is firstly described as constituent of eggplant. Heat instability and degradation of caffeoylspermidine derivatives was demonstrated by a simulated cooking process. HSCCC was also used for separation of anthocyanin “nasunin” and caffeoyl quinic acid isomers. 3-, 4-, and 5-Caffeoyl quinic acid isomers were identified, and 1-caffeoyl quinic acid was for the first time characterized as compound of *Solanum melongena*.

Principal compounds isolated from the polar methanol-acetic acid-extract of *Perilla* leaves were anthocyanins, and flavones (glycosides and glucuronides). Separation of polar plant extracts was carried out by means of HSCCC. Rechromatography of the most polar fraction 1 was performed with HSCCC using ion pair reagents resulting in a better retention of polar anthocyanins. Successful separation was carried out with the solvent system consisting of methyl tert-butyl ether, *n*-butanol, acetonitrile, and water (1/3/1/5, v/v/v/v) with 1.0 % pentafluor-propionic acid. Seven cyanidin derivatives were isolated and characterized, in particular the *cis*-isomer of malonylshisonin. Gel chromatography on Sephadex LH-20 was successfully used for rechromatography of the HSCCC coil fraction. Four flavonoids, luteolin and apigenin monoglucuronide, and diglucuronides were obtained. In the case of *Perilla frutescens*-leaves – to the best of our knowledge – the hydroxycinnamoyl acid derivative syringic acid β -D-glucose ester was isolated for the first time. Potential cytotoxic activities of oligomeric and polymeric compounds of the fractions of Sephadex LH-20 separation are also described.

Strong antioxidant activity of methanol-acetic acid-extract of black rice seed extract with more than 2.0 mmol Trolox per gram was detected. HSCCC chromatography and subsequent rechromatography of HSCCC fraction 2 led to the isolation of five anthocyan derivatives. Cyanidin-3-O-sophoroside was firstly described in seeds of *Oryza sativa*. Further investigations were directed to the elucidation of the structure of polymeric compounds. Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) in combination with gel chromatography on Sephadex LH-20 was used to enrich the polymeric fraction. Precipitation steps with *n*-pentane eliminated monomeric compounds. Sugar analysis showed a minor content of glucose and galactose in the precipitated fractions. SELDI-TOF-MS analyses indicated the presence of up to heptameric “cyanidine series”, and “cyanidin glucose/galactose series”, respectively.

For the first time an ethyl acetate extract of *Xanthosoma violaceum* rhizomes was separated by means of HSCCC. The flavanols (-)-epicatechin and the proanthocyanidin trimer proanthocyanidin A2-(-)-epicatechin were recovered and described as new compounds from violet stemmed Taro. Furthermore the anthocyanidin cyanidin-3-O-rutinoside was identified in a polar extract of *Xanthosoma violaceum* rhizomes, as well as in fresh plant leaves and leave stalks.

5 Material und Methoden

5.1 Pflanzenmaterial und Chemikalien

5.1.1 Pflanzenmaterial

Aubergine (Beeren) - *Solanum melongena* L.

Perilla (Blätter) - *Perilla frutescens*

Schwarzer Reis (Samen) - *Oryza sativa*

Violetter Taro (Rhizome) - *Xanthosoma violaceum*

Das Pflanzenmaterial der Aubergine wurde im Jahr 2004 und die Reissamen sowie die Rhizome des violetten Taros 2005 auf einem Markt in der Stadt Hangzhou, VR China, erstanden. Das Material wurde von Mitarbeitern des Institute of Food and Biological Engineering der Zhejiang Gongshang University in Hangzhou, VR China, zerkleinert, gefriergetrocknet und versendet. Perilla wurde im Jahr 2006 auf einem Versuchsfeld des Botanischen Gartens der Technischen Universität Braunschweig angebaut. Oberirdische Pflanzenteile von *Xanthosoma violaceum* wurden im Jahr 2006 ebenfalls in dem Botanischen Garten geerntet.

5.1.2 Chemikalien

Für die HPLC- und LC-MSⁿ-Analytik sowie Trennungen mittels präparativer HPLC wurden Lösungsmittel in HPLC-Qualität eingesetzt. Bei den Probenaufarbeitungen, CCC-Trennungen, Sephadex LH-20-Trennungen und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen kamen destillierte Fasswaren und Lösungsmittel der p.A.-Qualität zum Einsatz.

Die Lösungsmittel und Chemikalien stammen von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Acros Organics (Geel, Belgien), VWR (Leuven, Belgien), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fisher Scientific (Loughborough, England), Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland).

Das verwendete Wasser wurde mit Hilfe eines Reinstwassersystems (Nanopure[®], Barnstead) aufbereitet. Für die Methoden in Abschnitt 5.3.4, 5.5 und 5.6 sind die verwendeten Chemikalien entsprechend aufgeführt.

5.2 Geräteparameter

5.2.1 Photometer

Gerät: Shimadzu UV-2101PC UV-VIS Scanning Spectralphotometer
Software: UV-2101PC

5.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

5.2.2.1 Analytische Anlagen

HPLC-Diodenarray Detektor

Pumpe: Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Gradientenformer: Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit
Degasser: Jasco DG-980-50 3-Line Degasser
Detektor: Jasco MD-910 Multiwavelength Detector
Injektor: Rheodyne 7125, Probenschleife 20 µL
Software: Borwin-PDA Version 1.0

LC-Massenspektrometer

Pumpe: Hewlet Packard Series 1000 G 1328 A Bin pump
Detektor: Merck Hitachi L-4000 UV-Detektor
Injektor: Rheodyne 7125, Probenschleife 20 µL
MS: Bruker Daltonics Esquire-LC-MS/MS mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) und Ion-Trap-Detektor
Integrator: Shimadzu C-R6A Chromatopac
Software: HP Kayak XA, HP Chemstation, Esquire Control

5.2.2.2 Präparative HPLC-Anlage

Pumpe: Knauer WellChrom HPLC Pump K-1001

Gradientenformer: Knauer Solvent Organizer K-1500
Degasser: Knauer
Detektor: Knauer WellChrom UV Detector K-2600
Injektor: Knauer Nr. 55960, Probenschleifen 100-200 µL
Software: Eurochrom 2000 für Windows Version 2.05

5.2.3 Massenspektrometer (MS)

Spektrometer: Bruker Daltonik Esquire-LC-MS/MS Ion Trap mit Elektrospray-Ionisierung
Spritzenpumpe: Cole Parmer 74900 series

5.2.4 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Gerät: Pharma Tech Research Corporation, High Speed Model CCC-1000, Triplecoil
Coilvolumen: 850 mL
Pumpe: Jasco Biotronik HPLC Pump BT 3020
Detektor: Knauer UV K-2501
Fraktionsssammler: Pharmacia LKB Super Frac fraction collector
Schreiber: BBC Goerz SE 120

5.2.5 Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC)

Gerät: Prototyp nach DU et al. (2005)
Coilvolumen: 40 L, davon 24 L genutzt
Pumpe: Knauer WellChrom HPLC Pump K-1800
Fraktionsssammler: Büchi B-684

5.2.6 Gaschromatographie (GC)

Gerät: Carlo Erba GC 6000
Injektor: Split (1:20)
Detektor: FID
Integrator: Shimadzu C-R6 A

5.2.7 Kernspinnresonanz (NMR)

Gerät: Bruker AMX-300
Temperatur: 298 K
Messfrequenz: ^1H : 300.1 MHz, ^{13}C : 75.5 MHz

Gerät: Bruker DRX-400
Temperatur: 300 K
Messfrequenz: ^1H : 400.1 MHz, ^{13}C : 100.6 MHz

Gerät: Bruker Avance II-600
Temperatur: 310 K
Messfrequenz: ^1H : 600.1 MHz, ^{13}C : 150.9 MHz

5.2.8 Gelchromatographie an Sephadex LH-20

Glassäule: ID = 2,5 cm, Länge = 85 cm
Fraktionssammler: Pharmacia LKB Super Frac fraction collector

5.2.9 Adsorption an Amberlite XAD-7

Glassäule: ID = 5,3 cm, Länge = 88 cm
Elutionsmittel: Methanol/Essigsäure (19/1, v/v)

5.3 Analytische Methoden

5.3.1 Dünnschichtchromatographie

DC-System 1

Trägermaterial: Merck Kieselgel 60 (F₂₅₄), Aluminiumfolie
Fließmittel: Chloroform/Ethylacetat/Methanol/Wasser (3/10/7/2, v/v/v/v)
Detektion: UV 366 nm und 254 nm, Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (STAHL 1967)

DC-System 2

Trägermaterial:	Merck Cellulose, Aluminiumfolie
Fließmittel:	obere Phase des Systems <i>n</i> -Butanol/Essigsäure/Wasser (4/1/5, v/v/v)
Detektion:	UV 366 nm und 254 nm, visuell

DC-System 3

Trägermaterial:	Merck Kieselgel 60 (F ₂₅₄), Aluminiumfolie
Fließmittel:	Ethylacetat/Ethylmethylketon/Ameisensäure/Wasser (8/7/2/2)
Detektion:	UV 366 nm und 254 nm, visuell

DC-System 4

Trägermaterial:	Macherey-Nagel, Alugram RP-18W/UV ₂₅₄
Fließmittel:	Acetonitril/Wasser (1/5, v/v) + 0,6 % TFA
Detektion:	UV 366 nm und 254 nm, Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach STAHL (1967)

5.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Folgende Methoden wurden für die HPLC-DAD sowie für die LC-ESI-MS herangezogen:

5.3.2.1 Polyphenolanalytik

Säule:	Phenomenex Synergi 4 μ MAX-RP 250 x 4,6 mm (C12)
Fließmittel A:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (87/3/10, v/v/v)
Fließmittel B:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (40/50/10, v/v/v)
Flussrate:	0,5 mL/min
Gradient:	0 min 6 % B, 20 min 20 % B, 35 min 40 % B, 40 min 60 % B, 45 min 90 % B, 55 min 6 % B

5.3.2.2 Polymeranalytik

Säule:	Phenomenex Aqua 5 μ C-18, 125 Å 250 x 4,6 mm
Fließmittel A:	Essigsäure 2%ig
Fließmittel B:	Acetonitril

Flussrate: 0,8 mL/min
 Gradient: 0 min 3 % B, 25 min 10 % B, 45 min 35 % B, 50 min 75 % B, 55 min 75 % B, 60 min 3 % B

5.3.3 Massenspektrometrie

5.3.3.1 LC-ESI-MSⁿ

Tabelle 14: Parameter ESI-MS/MS

Parameter	HPLC-Methode 5.3.2.1	HPLC-Methode 5.3.2.2
Dry Gas Temperature	325°C	325°C
Dry Gas Flow	11 L/min	9 L/min
Nebulizer Gas (N ₂)	60,0 psi	40,0 psi
Capillary	2500 V	3000 V
End Plate Offset	-500 V	-500 V
Cap Exit Offset	-70,0 V	-105,0 V
Trap Drive	50,0	54,2
Scan Range	<i>m/z</i> 50 - 2200	<i>m/z</i> 50-2200

5.3.3.2 ESI-MSⁿ

Zur Aufnahme der ESI-MSⁿ-Spektren erfolgt der Probeneinlass über eine Spritzenpumpe mit 120 µL/min. Die Interface- und Massenspektrometer-Parameter werden für die Proben individuell angepasst.

Folgende Interface-Einstellungen blieben bei allen Messungen konstant: Dry Temperature 330°C, Dry Gas 4 mL/min, Nebulizer Gas Stickstoff 10 psi

5.3.4 Bestimmung der Neutralzucker

Prinzip der Methode

Die Bestimmung der Kohlenhydrate in den polymeren Verbindungen erfolgt mittels Gaschromatographie. Nach Hydrolyse mit TFA werden die schwerflüchtigen

Monosaccharide zu flüchtigen Alditolacetaten derivatisiert. Die qualitative Analyse erfolgt durch Co-Chromatographie mit einer Standardsubstanz. Quantitativ werden die Gehalte mit einem inneren Standard berechnet.

Material

- myo-Inosit, p.a.
- L(+)-Arabinose, p.a.
- D(+)-Galactose, p.a.
- D(+)-Glucose, p.a.
- D(+)-Mannose, p.a.
- L(+)-Rhamnose, p.a.
- D(+)-Xylose, p.a.
- TFA, p.a., 2 M
- Toluol, p.a.
- Reduktionslösung: 0,5 M NaBH₄-Lösung in 2 M Ammoniak-Lösung
- Eisessig, 99-100%ig
- methanolische Essigsäure, 15%ig
- Acetanhydrid, p.a.
- Pyridin, p.a.
- Natriumhydrogencarbonat, p.a.
- Dichlormethan, HPLC
- Calciumchlorid, p.a.
- Salzsäure, 0,1 M

Durchführung

Hydrolyse der Desoxyzucker, Pentosen, Hexosen: Es werden 10 bis 15 mg der Proben bzw. 4 bis 5 mg der Standardsubstanzen in einem 1 mL V-Vial eingewogen und mit 1 mL 2 M TFA für zwei Stunden bei 120°C hydrolysiert. Nach dem Abkühlen werden ca. 5 mg des internen Standards myo-Inosit hinzugefügt und die Säure durch fünfmalige Kodestillation mit Toluol entfernt.

Reduktion: Es werden 0,5 mL einer 0,5 M NaBH₄-Lösung in 2 N NH₃ zugegeben und für zwei Stunden bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen werden ca. 6 Tropfen Eisessig hinzugegeben und dreimal mit 15%iger methanolischer Essigsäure codestilliert.

Acetylierung: Die reduzierte Probe wird mit 200 µL Acetanhydrid und 50 µL Pyridin versetzt und drei Stunden bei 90°C gerührt.

Extraktion der Alditolacetate: Der Rückstand wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt, bis nach dem Schütteln keine Gas- und Schaumbildung mehr auftritt. Die Alditolacetate werden danach mit Dichlormethan extrahiert und die organische Phase zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, einmal mit kalter 0,1 M HCl und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wird über Calciumchlorid getrocknet.

Quantifizierung: Die Quantifizierung wurde durch Vergleich der Peakflächen zu dem internen Standard myo-Inosit durchgeführt.

Gaschromatographie der Alditolacetate

Säule: DB-5, Länge 30 m, ID 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm

Injektionsvolumen: 1 µL

Trägergas: Helium

Druck: 90 kPa

Brenngase: Wasserstoff, synthetische Luft

Temp.-Programm: 60°C (1 min isotherm), 20°C/min bis 130°C, 4°C/min bis 250°C, 20°C/min bis 290 °C (30 min isotherm)

5.3.5 MALDI-TOF-MS-Analyse der Polymerfraktion von *Oryza sativa*

Zur Charakterisierung der Polymerfraktion von *Oryza sativa* wurden Analysen mittels Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)- Time Of Flight (TOF)-Massenspektrometrie herangezogen. Die Messungen wurden von Herrn Privatdozent Dr. H. Rawel des Instituts für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam durchgeführt.

Parameter

Gerät:	SELDI-TOF-MS (Ciphergen Biosystems, Fremont, USA)
Trägermaterial:	Aluminium-Oberfläche mit Gold-Beschichtung
Matrix:	THAB (2', 4', 6'-Trihydroxyacetophenon)
Präparationstechnik:	Dried Droplet
Laserintensität:	150-200, für jede Probe optimiert

Probenvorbereitung

Es werden 1 mg der Probe in 100 µL Methanol gelöst sowie 200 mg THAP in 1 mL Tetrahydrofuran. Anschließend wird eine Lösung aus 1 µL Probe mit 9 µL destilliertem Wasser und 10 µL der Matrix-Lösung hergestellt. Nach dem Mischen werden 1-2 µL auf das Trägermaterial aufgetragen, getrocknet und in die Ionenquelle des Massenspektrometers eingeführt.

5.3.6 Quantifizierung mittels HPLC-DAD

Zur Quantifizierung der isolierten Verbindungen in den Beeren von *Solanum melongena*, in den Samen von *Oryza sativa* und den Blättern von *Perilla frutescens* wurden in einer Doppelbestimmung 4 bis 14 g des Pflanzenmaterials genau eingewogen. Die Extraktion erfolgte mit jeweils 150 mL Methanol bzw. einem Gemisch aus Methanol und Essigsäure (19/1, v/v) in einer Zeit von sechs Stunden mit Hilfe einer Tischschüttelapparatur. Anschließend wurde der Extrakt durch Festphasenextraktion an Amberlite® XAD-7 aufgereinigt (s. Kapitel 5.4.1.2) und mit einem Gemisch aus Methanol und Essigsäure (19/1, v/v) in einen 100 mL-Messkolben eluiert.

Die isolierten Reinsubstanzen dienen zum Aufstellen einer Kalibriergeraden mit mindestens vier Konzentrationen. Die Quantifizierung erfolgt mit einer RP-12-HPLC-Säule bei dem jeweiligen Absorptionsmaximum (HPLC-Methode s. Kapitel 5.3.2.1). Die Caffeoylspermidinderivate und *N*-Caffeoylputrescin wurden als *N*¹⁰,7',8'-Dihydrocaffeoyl-*N*¹-caffeoylspermidin (**A3**) bei 290 nm quantifiziert. Die Bestimmung der Chlorogensäure-Isomere erfolgte als 5-Caffeoyl-Chinasäure bei 326 nm, die Perilla-Flavone **P1** und **P2** als 7-O-Diglucuronylluteolin (**P1**) bei 347 nm, *trans*-Shisonin (**P7**) und *trans*-Malonylshisonin (**P5**) als **P7** bei 519 nm und

die Anthocyane **R1** bis **R3** als Cyanidin-3-glucosid (**R1**) bei 512 nm. Die Konzentrationen und Peakflächen der Standardlösungen, die Kalibrierfunktionen sowie die Gehalte der isolierten Verbindungen in den Pflanzenteilen befinden sich in Tabelle 22 und Tabelle 23 im Anhang.

5.3.7 Phloroglucinolyse der Polymerfraktion von *O. sativa*

Für die Durchführung der Phloroglucinolyse wurde die Methode nach KENNEDY und JONES (2001) herangezogen und modifiziert.

Material

- Reaktionslösung: 50 mg Ascorbinsäure (reinst), 250 mg Phloroglucinol (p.A.) in 5 mL 0,1 N methanolischer HCl-Lösung
- wässrige Natriumacetatlösung, 40 mM

Durchführung

100 µL des methanolischen Probenextrakts (5 mg/mL) werden in verschließbare 1,5 mL Reaktionsgefäße eingewogen und mittels Stickstoffstrom getrocknet. Nach Zugabe von 100 µL der Reaktionslösung werden verschiedene Ansätze für 20 bis 60 Minuten bei 50°C bis 65°C zur Reaktion gebracht. Das Stoppen der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 500 µL einer wässrigen Natriumacetat-Lösung. Zur Analyse der Reaktionslösung wurde das HPLC-System in Kapitel 5.3.2.2 herangezogen.

5.4 Präparative Methoden

5.4.1 Extraktion und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

5.4.1.1 Fraktionierte Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde zunächst mit Hilfe einer Mühle (Retsch-Mühle S 1) bei Raumtemperatur gemahlen und zum Entfetten und zur Abtrennung der lipophilen Verbindungen zwei bis dreimal mit *n*-Hexan auf einer Tischschüttelapparatur für jeweils fünf Stunden extrahiert. Das entfettete Pflanzenmaterial wurde anschließend bei Raumtemperatur 12 Stunden getrocknet. Weiterhin wird das Pflanzenmaterial in der

gleichen Weise mit Dichlormethan extrahiert, um semi-polare Substanzen zu extrahieren, anschließend mit Ethylacetat zur Abtrennung der polaren Verbindungen und schließlich mit Methanol oder mit einem Extraktionsmittel aus Methanol und Essigsäure im Verhältnis 19:1 zur Extraktion sehr polarer Substanzen. Dieser Extrakt wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers vom Lösungsmittel befreit, lyophilisiert und konnte anschließend durch Festphasenextraktion an Amberlite XAD-7 aufgearbeitet werden. Die *n*-Hexan-, Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakte wurden mittels Stickstoffstrom getrocknet.

5.4.1.2 Adsorption an Amberlite XAD-7

Das XAD-7-Material wurde zunächst durch Suspendieren mit Wasser in eine Glassäule gebracht und anschließend mit 2%iger Essigsäure vorkonditioniert. Die Aufgabe des wässrigen Probenextraktes erfolgte langsam mit einer Tropfengeschwindigkeit von circa einem Tropfen pro Sekunde. Nach anschließendem Waschen mit Wasser führte Methanol oder essigsaures Methanol (19:1) zur Elution des aufgearbeiteten Extraktes. Dieser konnte mittels Destillation vom Methanol befreit und nach Zusatz von Wasser lyophilisiert werden.

5.4.2 Parameter für die Countercurrent Chromatography

5.4.2.1 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Zur Ermittlung des Verteilungskoeffizienten werden zunächst verschiedene Fließmittelsysteme in kleinem Maßstab hergestellt. Anschließend wird der zu trennende Extrakt in einem Gefäß in gleichen Volumina schwerer und leichter Phase gelöst und für circa 20 Sekunden geschüttelt. Dabei wird eine Probenkonzentration hergestellt, die in etwa der bei der Trennung vorliegenden Konzentration im Coil entsprechen würde. Es wird weiterhin darauf geachtet, dass das Einstellen der vollständigen Phasentrennung in weniger als 30 Sekunden erfolgt. Von beiden Phasen werden aliquote Volumina mit Wasser versetzt und lyophilisiert. Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten erfolgt über die Peakflächenverhältnisse der zu trennenden Substanzen in beiden Phasen nach einer HPLC-DAD-Messung (s. Methode 5.3.2.1).

5.4.2.2 CCC-Systeme

Tabelle 15: HSCCC-Systeme

Fraktion	Methode (Fließmittel, Rotationsgeschwindigkeit, Flussrate, Einwaage, Detektionswellenlänge)
<i>Solanum melongena</i>	
MeOH/HOAc-Extrakt	<i>tert</i> -Butylmethylether/ <i>n</i> -Butanol/Acetonitril/Wasser (2/2/1/5, v/v/v/v) + 0,1 % TFA, 800 rpm, 3,0 mL/min, 400 mg, 280 nm
Methanol-Extrakt	Ethylacetat/ <i>n</i> -Butanol/Wasser (3/2/5, v/v/v), 800 rpm, 3,0 mL/min, 451 mg, 290 nm
<i>Perilla frutescens</i>	
MeOH/HOAc -Extrakt	<i>tert</i> -Butylmethylether/ <i>n</i> -Butanol/Acetonitril/Wasser (2/2/1/5, v/v/v/v) + 0,1 % TFA, 900 rpm, 3,0 mL/min, 680 mg, 280 nm
HSCCC-Fraktion 1	<i>tert</i> -Butylmethylether/ <i>n</i> -Butanol/Acetonitril/Wasser (1/3/1/5, v/v/v/v) + 1 % PFFA, 850 rpm, 3,0 mL/min, 558 mg, 280 nm
<i>Oryza sativa</i>	
MeOH/HOAc-Extrakt	<i>tert</i> -Butylmethylether/ <i>n</i> -Butanol/Acetonitril/Wasser (2/2/1/5, v/v/v/v) + 0,1 % TFA, 800 rpm, 3,0 mL/min, 475 mg, 280 nm
HSCCC-Fraktion 2	<i>tert</i> -Butylmethylether/ <i>n</i> -Butanol/Acetonitril/Wasser (2/2/1/5, v/v/v/v) + 0,1 % TFA, 800 rpm, 3,0 mL/min, 183 mg, 280 nm
<i>Xanthosoma violaceum</i>	
Ethylacetat-Extrakt	<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/5/1/5, v/v/v/v), 900 rpm, 3,0 mL/min, 385 mg, 280 nm

Tabelle 16: LSRCCC-System

Fraktion	Methode (Fließmittel, Rotationsgeschwindigkeit, Flussrate, Einwaage, Detektionswellenlänge)
<i>Oryza sativa</i>	
MeOH/HOAc -Extrakt	<i>tert</i> -Butylmethylether/ <i>n</i> -Butanol/Acetonitril/Wasser (2/2/1/5, v/v/v/v) + 0,1 % TFA, 50 rpm, 8,0 mL/min, 50 g

5.4.3 Isolierung der Naturstoffe mittels präparativer HPLC

Die Fließmittel zur präparativen Isolierung der Substanzen setzen sich aus den Fließmitteln A und B zusammen. Abweichende Fließmittel sind in den Tabellen angegeben.

Fließmittel A: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (87/3/10, v/v/v)

Fließmittel B: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (40/50/10, v/v/v)

Folgende HPLC-Säulen wurden verwendet:

1. Phenomenex Luna 5 μ C18(2) 100A, 250 x 10 mm mit Vorsäule
2. Phenomenex Luna 5 μ C18(2) 100A, 250 x 15 mm mit Vorsäule

Tabelle 17: Aubergine, Parameter der präparativen HPLC-Trennung

Substanz	Gradient	Flussrate	Säule
<i>Solanum melongena</i>			
A1	Isokratisch, Acetonitril/Wasser/TFA (1,5/8,5/0,01, v/v/v)	4,0 mL/min	1
A2	Isokratisch, Acetonitril/Wasser/TFA (1,8/8,2/0,01, v/v/v)	4,0 mL/min	1
A3/A4	6 % B, 20 min 15 % B, 35 min 30 % B, 40 min 60 % B, 45 min 90 % B	6,0 mL/min	2
A5	6 % B, 40 min 60 % B	6,0 mL/min	2
A9	Isokratisch, Acetonitril/Wasser/TFA (1,8/8,2/0,01, v/v/v)	4,0 mL/min	1
<i>Perilla frutescens</i>			
P3	15 % B, 30 min 40 % B, 35 min 60 % B	3,0 mL/min	1
P4	6 % B, 25 min 20 % B, 30 min 40 % B	3,0 mL/min	1
P5/P6/P7	6 % B, 15 min 20 % B, 30 min 40 % B, 35 min 60 % B, 40 min 90 % B	2,5 mL/min	1
P10	6 % B, 20 min 20 % B	2,5 mL/min	1
<i>Oryza sativa</i>			
R1/R2	6 % B, 10 min 20 % B, 22 min 30 % B	3,0 mL/min	1

Substanz	Gradient	Flussrate	Säule
R3	6 % B, 20 min 22 % B	3,0 mL/min	1
R4	6 % B, 25 min 25 % B	3,0 mL/min	1
<i>Xanthosoma violaceum</i>			
T1	Isokratisch, Acetonitril/Wasser (50/50, v/v)	5,0 mL/min	2
T2	Isokratisch, Acetonitril/Wasser (20/80, v/v)	3,0 mL/min	1

5.4.4 Gelchromatographie an Sephadex LH-20

Tabelle 18: Gelchromatographie an Sephadex LH-20

Fraktion	Elutionsmittel	Einwaage	Detektion
<i>Perilla frutescens</i>			
HSCCC-Coil-Fraktion	Methanol	0,68 g	DC-System 1 (vgl. 5.3.1)
<i>Oryza sativa</i>			
HSCCC-Fraktion 1	Methanol/Wasser (80/20, v/v), + 0,5 % Essigsäure	10,4 g	DC-System 2 (vgl. 5.3.1), HPLC (vgl. 5.3.2.1), photometrisch 520 nm

5.4.5 Fraktionierte Pentanfällung

Die Fraktionen werden in 96%igem Ethanol gelöst und filtriert. Die *n*-Pentanzugabe erfolgt schrittweise durch langsames Zutropfen des Lösungsmittels. Anschließend wird die Suspension bei 4000 U/min zentrifugiert und die klare Lösung abdekantiert. Das Dekantat wird daraufhin zweimal mit einer entsprechenden Ethanol/Pentan-Lösung versetzt und erneut zentrifugiert.

5.5 Antioxidative Aktivität - TEAC-Test

Material

- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)
- 6-Hydroxy-2-5-7-8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)
- Kaliumpersulfat ($K_2S_2O_8$), p.a.
- Ethanol, p.a.
- Kunststoff-Halbmikroküvetten

Herstellen der Lösungen

ABTS⁺-Stammlösung:

- 38,43 mg ABTS, 6,90 mg $K_2S_2O_8$ mit demin. Wasser auf 10 mL auffüllen
- Lösung vor Gebrauch mindestens 12 Stunden stehen lassen, damit sich das Radikal bildet

ABTS⁺-Arbeitslösung:

- Stammlösung verdünnen bis Extinktion von ca. 0,7 erreicht ist

Trolox-Stammlösung:

- 12,52 mg Trolox mit Ethanol auf 5 mL auffüllen

Trolox-Kalibrierlösungen:

- jeweils 250, 500, 750, 100 μ L Trolox-Stammlösung mit Ethanol auf 5 mL auffüllen (Konzentrationsbereich 0,5 bis 2,0 mmol/L)

Probenlösungen:

- 1 bis 3 mg mit Ethanol auf 5 mL auffüllen

Durchführung

Die Extinktion der ABTS⁺-Arbeitslösung bei 734 nm wird notiert (Leerwert E1). Anschließend werden 10 μ L Ethanol (Blindwert), Trolox-Kalibrierlösungen und Probenlösungen in eine Küvette pipettiert. Anschließend werden nacheinander 1 mL der ABTS⁺-Arbeitslösung dazugegeben und die Reaktionszeit nach genau 6 Minuten bei Raumtemperatur bei 734 nm gemessen (E2).

Auswertung

Von der Extinktion des Leerwertes (E1) wird die Extinktion der Kalibrier- bzw. Probenlösungen (E2) subtrahiert (ΔE) und schließlich die Extinktionsdifferenzen aus $\Delta E_{\text{Standard/Probe}}$ und $\Delta E_{\text{Blindwert}}$ berechnet. Es wird eine Kalibriergerade der Trolox-Lösungen erstellt und mittels einer Geradengleichung die antioxidative Aktivität der Proben berechnet, angegeben in mmol Trolox/g Probe.

5.6 Zytotoxizität - „Brine shrimp“ – Test

Material

- Seesalzlösung, 3,2%ig
- Wasser, HPLC-Qualität
- *Artemia salina*-Eier (Dohse Aquaristik)
- Hefe-Suspension, ca. 3 mL Trockenhefe in 5 mL Seesalzlösung
- Methanol, HPLC
- Podophyllotoxin, $\geq 98\%$ (Fluka)
- Antibiotika Testblättchen, \varnothing 9 mm (Schleicher & Schuell)
- Wasserbad
- Aquariumpumpe
- Glasgefäße, \varnothing 10 mm, H 40 mm

Ausbrüten der Eier

50 mg *Artemia salina*-Eier werden mit 80 mL 3,2%iger Seesalz-Lösung versetzt und bei 23°C in einem Wasserbad temperiert. Durch Einblasen von Luft mit Hilfe einer Aquariumpumpe werden die Eier in ständiger Bewegung gehalten. Bei konstanter Belichtung schlüpfen die Nauplien nach 24 bis 48 Stunden. Mit einer Pasteurpipette werden 10 „brine shrimps“ in Glasgefäße transferiert, welche 3 mL Seesalzlösung enthalten. Anschließend werden jedem Glas drei Tropfen einer Hefe-Suspension hinzugefügt.

Probenvorbereitung und Durchführung

Von den Testsubstanzen und dem Podophyllotoxin-Standard werden genau 11 mg eingewogen und mit 1100 μ L Methanol versetzt (Lösung A, Konzentration: 1 mg/100 μ L).

Von dieser Lösung werden 100 μL abgenommen und 900 μL Methanol hinzugefügt (Lösung B, Konzentration: 0,1 mg/100 μL). Die Probelösungen und Methanol als Blindwert werden auf Antibiotika Testblättchen pipettiert, so dass von jeder Probe drei verschiedene Konzentrationen in einer Fünffachbestimmung vorliegen (Konzentration 1: 30 μL Lösung B, Konzentration 2: 30 μL Lösung A, Konzentration 3: 150 μL Lösung A). Somit liegen Endkonzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Seesalzlösung vor. Die Antibiotika Testblättchen werden 12 bis 24 Stunden getrocknet und schließlich in die vorbereiteten Glasgefäße gegeben.

Die Glasgefäße werden 24 Stunden bei 23°C unter künstlicher Belichtung inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit werden die toten und die lebenden „brine shrimps“ in den Glasgefäßen gezählt.

Auswertung

Zur Berechnung der prozentualen Absterberate werden die toten „brine shrimps“ von den auf natürliche Weise gestorbenen Nauplien im Blindwert subtrahiert, durch die Summe der im Blindwert lebenden dividiert und mit einhundert multipliziert.

$$\text{Absterberate [\%]} = \frac{\text{Test-Blindwert (gestorben)}}{\text{Blindwert (lebend)}} \times 100$$

5.7 Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Verbindungen

5.7.1 *Solanum melongena*

N-Caffeoylputrescin (A1)

Herkunft: *Solanum melongena*

Summenformel: C₁₃H₁₈N₂O₃

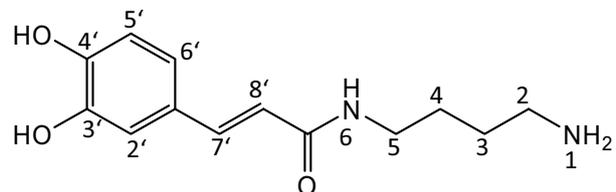
Molekülmasse: 250,30 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): λ_{max} = 295, 318 nm

ESI-MSⁿ (positiver Modus): (m/z) 251 [M+H]⁺, MS/MS² (m/z) 234 [M+H-17]⁺, MS/MS² (m/z) 163 [M+H-88]⁺

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): 1.71 (m, 4H, H3, H4), 3.09 (m, 2H, H2), 3.35 (m, 2H, H5), 6.35 (d, J = 16.0 Hz, 1H, H8'), 6.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H5'), 6.90 (dd, J₁ = 1.5 Hz, J₂ = 8.0 Hz, 1H, H6'), 7.00 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H2'), 7.40 (d, J = 16.0 Hz, 1H, H7')

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD, ppm): 24.35 (C4), 28.04 (C3), 38.54 (C5), 39.79 (C2), 115.44 (C2'), 116.81 (C5'), 118.55 (C8'), 122.41 (C6'), 128.59 (C1'), 142.83 (C7'), 147.06 (C3'), 149.13 (C4'), 169.85 (C9')



N¹,N¹⁰-7',7'',8',8''-Tetrahydrocaffeoylspermidin (A2)

Herkunft: *Solanum melongena*

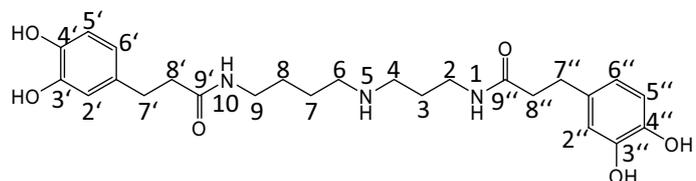
Summenformel: C₂₅H₃₅N₃O₆

Molekülmasse: 473,25 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): λ_{max} = 281 nm

ESI-MSⁿ (positiver Modus): (m/z) 474 [M+H]⁺, MS/MS² (m/z) 222 [M+H-252]⁺, MS/MS² (m/z) 165 [M+H-309]⁺

¹H-NMR (300 MHz, CD₃SOCD₃, ppm): 1.52 (m, 2H, H8), 1.50 (m, 1H, H7), 1.75 (m, 2H, H3), 2.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H8''), 2.50 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H8'), 2.69 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H4), 2.77 (m, 2H, H6), 2.80 (m, 2H, H7', H7''), 3.17 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H9), 3.24 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H2), 6.53



(dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H, H6''), 6.54 (dd, $J_1 = 2$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H, H6'), 6.64 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2''), 6.66 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2'), 6.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5''), 6.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5'), 7.89 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH10), 8.08 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH1)

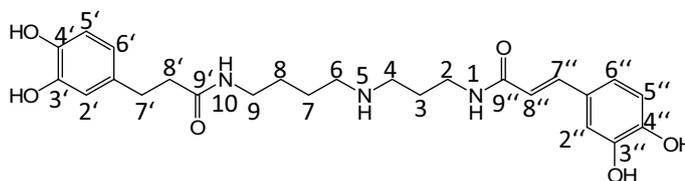
^{13}C -NMR (75.5 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 24.47 (C8), 27.44 (C7), 27.61 (C3), 31.92 (C7''), 32.32 (C7'), 36.56 (C2), 38.46 (C8''), 39.29 (C8', C9), 45.99 (C4), 48.63 (C6) 116.49 (C2', C2''), 116.82 (C5', C5''), 120.71 (C6''), 120.79 (C6'), 133.46 (C1''), 133.79 (C1'), 144.58 (C4''), 144.71 (C4'), 146.11 (C3''), 146.21 (C3'), 175.63 (C9''), 176.63 (C9')

***N*¹-Caffeoyl-*N*¹⁰,7',8'-dihydrocaffeoylspermidin (A3)**

Herkunft: *Solanum melongena*

Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$

Molekülmasse: 471,24 g/mol



UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 250, 290, 320$ nm

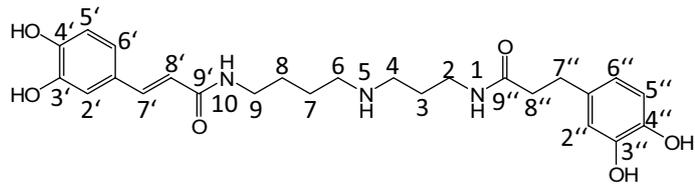
ESI-MSⁿ (positiver Modus): (m/z) 472 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, MS/MS² (m/z) 310 [$\text{M}+\text{H}$ -Kaffeensäure]⁺, MS/MS² (m/z) 220 [$\text{M}+\text{H}$ -252]⁺, MS/MS² (m/z) 163 [$\text{M}+\text{H}$ -309]⁺

^1H -NMR (600 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 1.39 (m, 2H, H7), 1.50 (m, 2H, H8), 1.74 (m, 2H, H3), 2.24 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, H8'), 2.81 (m, 2H, H4), 2.60 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, H7'), 2.81 (m, 2H, H6), 3.02 (dd, $J_1 = 6.0$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 2H, H9), 3.21 (dd, $J_1 = 6.0$ Hz, $J_2 = 10.0$ Hz, 2H, H2), 6.30 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H8''), 6.39 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H, H6'), 6.54 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H5'), 6.59 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2'), 6.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5''), 6.81 (dd, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H, H6''), 6.94 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H2''), 7.23 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H7''), 7.84 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH10), 8.21 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH1)

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 23.69 (C8), 26.54 (C7), 26.73 (C3), 30.80 (C7'), 36.14 (C2), 37.77 (C8'), 37.96 (C9), 44.99 (C4), 46.86 (C6), 114.07 (C2'), 115.66 (C2''), 115.90 (C5'), 116.01 (C5''), 118.25 (C8''), 118.84 (C6'), 120.58 (C6''), 126.35 (C1''), 132.26 (C1'), 139.56 (C7''), 143.57 (C4''), 145.26 (C3''), 145.90 (C4'), 147.77 (C3'), 166.02 (C9''), 171.62 (C9')

N^{10} -Caffeoyl- $N^1,7'',8''$ -dihydrocaffeoylspermidin (A4)Herkunft: *Solanum melongena*Summenformel: $C_{25}H_{33}N_3O_6$

Molekülmasse: 471,24 g/mol

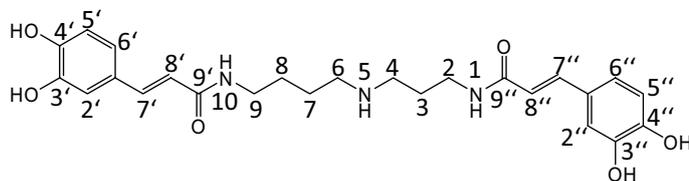
UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\max} = 250, 290, 320 \text{ nm}$ ESI- MS^1 (positiver Modus): (m/z) 472 $[M+H]^+$, MS/MS^2 (m/z) 310 $[M+H\text{-Kaffeessäure}]^+$, MS/MS^2 (m/z) 222 $[M+H\text{-250}]^+$, MS/MS^2 (m/z) 165 $[M+H\text{-307}]^+$

1H -NMR (600 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 1.47 (m, 2H, H7), 1.55 (m, 2H, H8), 1.64 (m, 2H, H3), 2.27 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H8''), 2.61 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H7''), 2.68 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H4), 2.76 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H6), 3.06 (dd, $J_1 = 6.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 10.0 \text{ Hz}$, 2H, H2), 3.15 (dd, $J_1 = 6.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 12.0 \text{ Hz}$, 2H, H9), 6.31 (d, $J = 16.0 \text{ Hz}$, 1H, H8'), 6.39 (dd, $J_1 = 2.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H6''), 6.55 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H2''), 6.59 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H5''), 6.72 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H5'), 6.80 (dd, $J_1 = 1.5 \text{ Hz}$, $J_2 = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H6'), 6.93 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H2'), 7.21 (d, $J = 16.0 \text{ Hz}$, 1H, H7'), 7.97 (t, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H, NH1), 8.08 (t, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H, NH10)

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 24.00 (C8), 26.71 (C7), 26.78 (C3), 30.75 (C7''), 35.69 (C2), 37.65 (C8''), 38.25 (C9), 45.03 (C4), 47.03 (C6), 112.59 (C6'), 114.04 (C2'), 115.70 (C5''), 115.95 (C2''), 116.04 (C5'), 118.56 (C8'), 118.91 (C6''), 132.16 (C1''), 126.46 (C1'), 139.34 (7') 143.67 (C4''), 145.34 (C3''), 145.96 (C4'), 147.76 (C3'), 165.68 (C9'), 172.15 (C9'')

 N^1, N^{10} -Dicafeoylspermidin (A5)Herkunft: *Solanum melongena*Summenformel: $C_{25}H_{31}N_3O_6$

Molekülmasse: 469,22 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\max} = 251, 294, 319 \text{ nm}$ ESI- MS^1 (positiver Modus): (m/z) 470 $[M+H]^+$, MS/MS^2 (m/z) 308 $[M+H\text{-Kaffeessäure}]^+$, MS/MS^2 (m/z) 220 $[M+H\text{-250}]^+$, MS/MS^2 (m/z) 163 $[M+H\text{-307}]^+$

1H -NMR (600 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 1.41 (m, 2H, H7), 1.53 (m, 2H, H8), 1.71 (m, 2H, H3), 2.78 (m, 4H, H6, H4), 3.16 (m, 2H, H9), 3.20 (dd, $J_1 = 7.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 12.0 \text{ Hz}$, 2H, H2), 6.30 (2d, $J = 16.0 \text{ Hz}$, 2H, H8', H8''), 6.72 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H5''), 6.73 (d, $J = 8.0$, 1H, H5'), 6.81 (dd,

$J_1 = 1.5 \text{ Hz}$, $J_2 = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H6''), 6.82 (dd, $J_1 = 1.5 \text{ Hz}$, $J_2 = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H6'), 6.92 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H2''), 6.93 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H2'), 7.21 (d, $J = 16.0 \text{ Hz}$, 1H, H7''), 7.23 (d, $J = 16.0 \text{ Hz}$, 1H, H7'), 8.06 (t, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H, NH10), 8.17 (t, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H, NH1)

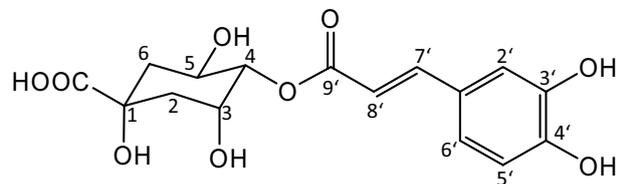
^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 24.41 (C8), 26.82 (C7), 27.30 (C3), 36.29 (C2), 38.30 (C9), 45.60 (C4), 47.36 (C6), 113.99 (C2'', C2'), 115.99 (C5'', C5'), 118.32 (C8''), 118.61 (C8'), 120.70 (C6''), 120.71 (C6'), 126.42 (C1''), 126.51 (C1'), 139.30 (C7'), 139.56 (C7''), 145.85 (C4''), 145.86 (C3''), 147.62 (C4'), 147.71 (C3'), 165.02 (C9'), 166.00 (C9'')

4-Caffeoyl(-)-Chinasäure (Kryptochlorogensäure) (A6)

Herkunft: *Solanum melongena*

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$

Molekülmasse: 354,10 g/mol



UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 326 \text{ nm}$

ESI-MSⁿ (negativer Modus): (m/z) 353 [M-H]⁻, MS/MS² (m/z) 190 [M-H-Kaffeoesäure], (m/z) 178, 173, 135

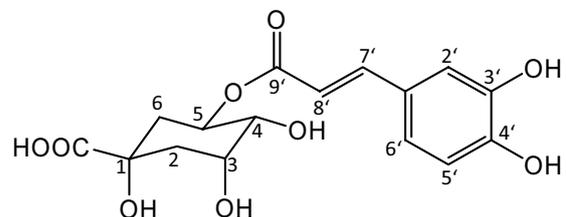
^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): 2.23-1.97 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b), 4.30 (m, 2H, H3, H5), 4.80 (dd, $J_1 = 3.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, H4), 6.37 (d, $J = 16.0 \text{ Hz}$, 1H, H8'), 6.79 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H5'), 6.97 (dd, $J_1 = 2.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, H6'), 7.06 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H2'), 7.64 (d, $J = 16.0 \text{ Hz}$, 1H, H7')

5-Caffeoyl(-)-Chinasäure (Chlorogensäure) (A7)

Herkunft: *Solanum melongena*

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$

Molekülmasse: 354,10 g/mol



UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 326 \text{ nm}$

ESI-MSⁿ (negativer Modus): = (m/z) 353 [M-H]⁻, MS/MS² (m/z) 191 [M-H-Kaffeoesäure], (m/z) 179

^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): 2.02-2.26 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b), 3.72 (dd, $J_1 = 3.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 8.5 \text{ Hz}$, 1H, H4), 4.17 (ddd, $J_1 = 3.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 5.0 \text{ Hz}$, $J_3 = 3.0 \text{ Hz}$, 1H, H3), 5.34

(ddd, $J_1 = 5.0$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, $J_3 = 5.0$ Hz, 1H, H5), 6.26 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H8'), 6.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5'), 6.96 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H, H6'), 7.05 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2'), 7.56 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H, H7')

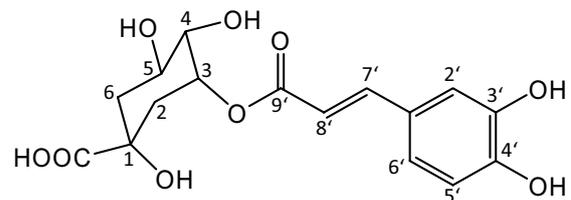
^{13}C -NMR (75.5 MHz, CD_3OD , ppm): 38.28 (C2 oder C6), 38.90 (C2 oder C6), 71.39 (C3), 72.02 (C4), 73.62 (C5), 76.23 (C1), 115.35 (C8'), 115.28 (C2'), 116.50 (C5'), 122.92 (C6'), 127.89 (C1'), 146.82 (C3'), 149.56 (C7'), 168.70 (C9'), 177.04 (COOH)

3-Caffeoyl(-)-Chinasäure (Neochlorogensäure) (A8)

Herkunft: *Solanum melongena*

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$

Molekülmasse: 354,10 g/mol



UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 326$ nm

ESI- MS^n (negativer Modus): = (m/z) 353 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, MS/MS^2 (m/z) 190 [$\text{M}-\text{H}-\text{Kaffeoesäure}$] $^-$, (m/z) 179, 135

^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): 1.90-2.25 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b), 3.64 (dd, $J_1 = 3.5$ Hz, $J_2 = 8.5$ Hz, 1H, H4), 4.16 (ddd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, $J_3 = 8.5$ Hz, 1H, H5), 5.34 (ddd_{unaufgelöst}, 1H, H3), 6.30 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H8'), 6.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5'), 6.93 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H, H6'), 7.04 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2'), 7.58 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H7')

Delphinidin-3-O- β -D-[4'''-(*trans-p*-cumaroyl)- α -L-rhamnosyl(1''' \rightarrow 6'')]

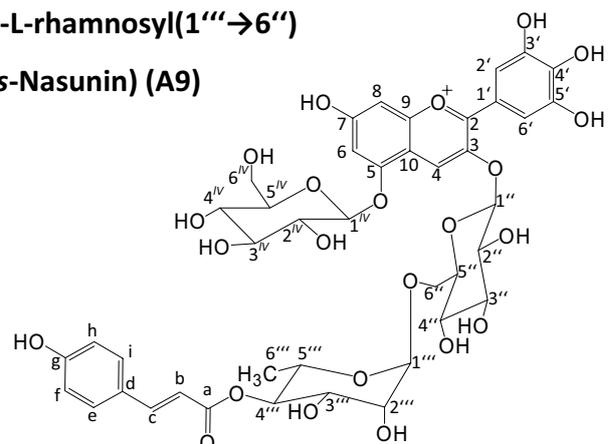
glucopyranosid]-5-O- β -D-glucopyranosid (*trans*-Nasunin) (A9)

Herkunft: *Solanum melongena*

Summenformel: $\text{C}_{42}\text{H}_{47}\text{O}_{23}^+$

Molekülmasse: 919,25 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 292, 530$ nm



ESI- MS^n (positiver Modus):

m/z 919 [M] $^+$, MS/MS^2 (m/z) 757 [$\text{M}-\text{Cumarsäure}$] $^+$, MS/MS^3 (m/z) 611 [$\text{M}-\text{Cumarsäure}-\text{Rhamnose}$] $^+$, MS/MS^4 (m/z) 465 [$\text{M}-\text{Cumarsäure}-\text{Rhamnose}-\text{Glucose}$] $^+$, MS/MS^5 (m/z) 303 [$\text{M}-\text{Cumarsäure}-\text{Rhamnose}-\text{Glucose}-\text{Glucose}$] $^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TFA}(d_1)$ 19:1, ppm): 1.01 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, $\text{H6}'''$), 3.40-4.07 (m, 16H, $\text{H2}''\text{-H6}''$, $\text{H2}'''\text{-H5}'''$, $\text{H2}^{\text{IV}}\text{-H6}^{\text{IV}}$), 4.70 (br. s, 1H, $\text{H1}''''$), 5.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H1^{IV}), 5.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $\text{H1}''$), 6.26 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Hc), 6.81 (dd, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 2H, Hh, Hf), 7.04 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H8), 7.05 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H6), 7.41 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 2H, Hi, He), 7.57 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Hb), 7.78 (s, 2H, $\text{H2}'$, $\text{H6}'$), 8.90 (s, 1H, H4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TFA}(d_1)$ 19:1, ppm): 18.13 ($\text{C6}''''$), 62.55 ($\text{C6}''$), 67.58 (C6^{IV}), 68.11 ($\text{C5}''''$), 70.69 ($\text{C2}''''$, $\text{C3}''''$), 71.37 (C4^{IV}), 71.70 ($\text{C4}''$), 72.43 ($\text{C2}''$), 75.18 (C2^{IV}), 75.72 ($\text{C4}''$), 77.95 ($\text{C4}''''$), 78.33 (C5^{IV}), 78.34 ($\text{C5}''$), 78.44 (C3^{IV}), 79.10 ($\text{C3}''$), 97.66 (C8), 102.33 ($\text{C1}''$), 102.77 ($\text{C1}''''$), 103.21 (C1^{IV}), 105.93 (C6), 115.33 (Cb), 117.17 (Ch, Cf), 127.49 (Cd), 113.56 ($\text{C2}'$), 114.47 (C10), 120.16 ($\text{C1}'$), 131.66 (Ce, Ci), 134.12 (C4), 146.16 (C3), 146.57 ($\text{C4}'$) 148.04 (Cc, $\text{C3}'$), 157.01 (C5), 157.28 (C9), 161.59 (Cg), 165.00 (C2), 169.30 (Ca), 169.72 (C7)

5.7.2 *Perilla frutescens*

7-O- β -D-Diglucuronylluteolin (P1)

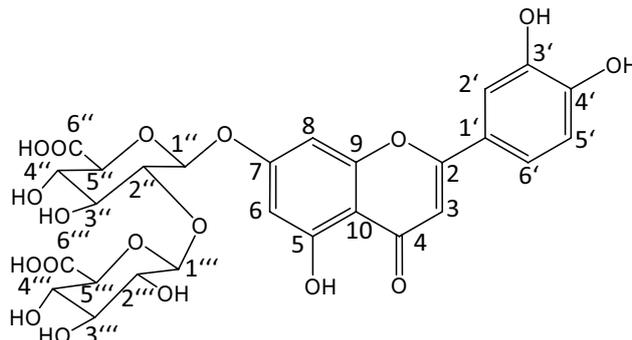
Herkunft: *Perilla frutescens*

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{18}$

Molekülmasse: 638,11 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC):

$\lambda_{\text{max}} = 260, 347$ nm



ESI- MS^n (positiver Modus): m/z 639 $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS/MS^2 (m/z) 463 $[\text{M}+\text{H-Galacturonsäure}]^+$, MS/MS^3 (m/z) 287 $[\text{M}+\text{H-Galacturonsäure-Galacturonsäure}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 3.00-3.60 (m, 6H, $\text{H2}''\text{-H4}''$, $\text{H2}'''\text{-H4}'''$), 3.64 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H5}''''$), 4.10 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H5}''$), 4.55 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, $\text{H1}''''$), 5.42 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, $\text{H1}''$), 6.40 (s, 1H, H3), 6.70 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H7), 6.70 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H6) 6.72 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H8), 7.41 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, $\text{H2}'$), 7.42 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H6}'$), 9.34 (br. s, 1H, $\text{OH3}'$), 9.91 (br. s, 1H, $\text{OH4}'$), 12.96 (br. s, 1H, OH5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 70.69 ($\text{C4}''$), 71.57 ($\text{C4}''''$), 74.09 ($\text{C2}''''$), 74.84 ($\text{C3}''$), 75.02 ($\text{C5}''$), 75.59 ($\text{C3}''''$), 75.75 ($\text{C5}''''$), 82.25 ($\text{C2}''$), 94.65 (C8), 97.58 ($\text{C1}''$), 99.25 (C6), 103.27 (C3), 104.31 (C10), 105.46 ($\text{C1}''''$), 113.31 ($\text{C2}'$), 116.12 ($\text{C5}'$), 118.89 ($\text{C6}'$), 121.44

(C1'), 145.71 (C3'), 149.82 (C4'), 156.86 (C5), 161.14 (C9), 162.13 (C7), 164.46 (C2), 169.70 (C6''), 170.06 (C6'''), 181.87 (C4)

7-O- β -D-Diglucuronylapigenin (P2)

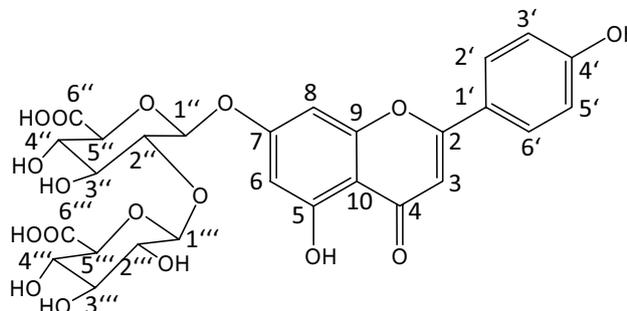
Herkunft: *Perilla frutescens*

Summenformel: C₂₇H₂₆O₁₇

Molekülmasse: 622,12 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC):

λ_{\max} = 268, 331 nm



ESI-MSⁿ (positiver Modus): m/z 623 [M+H]⁺, MS/MS² (m/z) 447 [M+H-Galacturonsäure]⁺, MS/MS³ (m/z) 271 [M+H-Galacturonsäure-Galacturonsäure]⁺

¹H-NMR (300 MHz, CD₃SOCD₃, ppm): 3.00-3.60 (m, 6H, H2''-H4'', H2'''-H4'''), 3.66 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H5'''), 4.09 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H5''), 4.58 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H1'''), 5.40 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H1''), 6.41 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H8), 6.75 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H6), 6.82 (s, 1H, H3), 6.95 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H3', H5'), 7.95 (dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 2H, H2', H6'), 10.35 (br. s, 1H, OH4'), 12.94 (br. s, 1H, OH5)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃SOCD₃, ppm): 70.89 (C4''), 71.76 (C4'''), 74.31 (C2'''), 75.03 (C3''), 75.24 (C5''), 75.77 (C3'''), 75.99 (C5'''), 82.51 (C2''), 94.95 (C8), 97.87 (C1''), 99.37 (C6), 103.28 (C3), 104.59 (C10), 105.66 (C1'''), 116.14 (C3', C5'), 121.27 (C1'), 128.73 (C2', C6'), 157.02 (C5), 161.35 (C4'), 161.45 (C9), 162.37 (C7), 164.50 (C2), 169.85 (C6''), 170.25 (C6'''), 182.17 (C4)

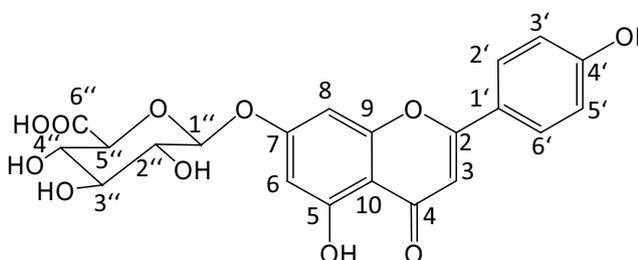
7-O- β -D-Glucuronylapigenin (P3)

Herkunft: *Perilla frutescens*

Summenformel: C₂₁H₁₈O₁₁

Molekülmasse: 446,08 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): λ_{\max} = 250, 327 nm



ESI-MSⁿ (positiver Modus): m/z 447 [M+H]⁺, MS/MS² (m/z) 271 [M+H-Galacturonsäure]⁺

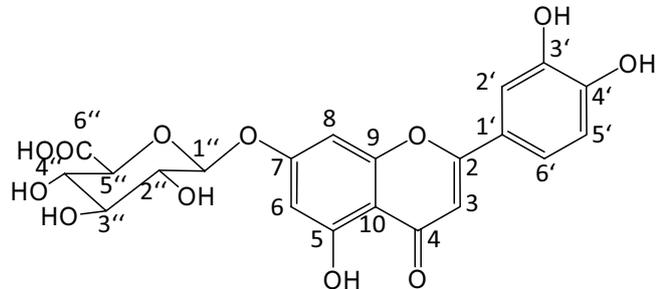
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 3.15-3.37 (m, 4H, H2''-H5''), 5.20 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H1''), 6.42 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H6), 6.82 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H8), 6.87 (s, 1H, H3), 6.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H3', H5'), 7.95 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 2H, H2', H6'), 12.96 (br. s, 1H, OH5)

7-O- β -D-Glucuronylluteolin (P4)

Herkunft: *Perilla frutescens*

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$

Molekülmasse: 462,08 g/mol



UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 251, 346$ nm

ESI-MSⁿ (positiver Modus): m/z 463 $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS/MS² (m/z) 287 $[\text{M}+\text{H-Galacturonsäure}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 3.40-3.90 (m, 4H, H2''-H5''), 5.22 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H1''), 6.44 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H6), 6.74 (s, 1H, H3), 6.80 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H8), 6.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H5'), 7.41 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2'), 7.44 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1H, H6'), 9.50 (br. s, 1H, OH3'), 10.02 (br. s, 1H, OH4'), 12.99 (br. s, 1H, OH5)

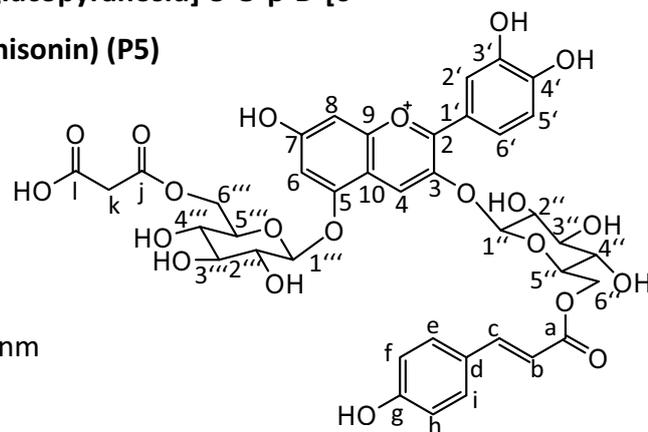
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3SOCD_3 , ppm): 71.70 (C4''), 73.64 (C2''), 75.16 (C5''), 76.09 (C3''), 94.74 (C8), 99.42 (C6), 99.72 (C1''), 103.47 (C3), 105.63 (C10), 113.75 (C2'), 116.22 (C5'), 119.41 (C6'), 121.56 (C1'), 146.02 (C3'), 150.17 (C4'), 157.19 (C5), 161.36 (C9), 162.87 (C7), 164.71 (C2), 172.06 (C6''), 182.14 (C4)

Cyanidin-3-O- β -D-[6''-(*trans-p*-cumaroyl)glucopyranosid]-5-O- β -D-[6'''-(malonyl)glucopyranosid] (*trans*-Malonylshisonin) (P5)

Herkunft: *Perilla frutescens*

Summenformel: $\text{C}_{39}\text{H}_{39}\text{O}_{21}^+$

Molekülmasse: 843,20 g/mol



UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 280, 521$ nm

ESI-MSⁿ (positiver Modus):

m/z 843 $[\text{M}]^+$, MS/MS² (m/z) 757 $[\text{M-Malonsäure}]^+$, MS/MS³ (m/z) 595 $[\text{M-Malonsäure-Glucose}]^+$, MS/MS³ (m/z) 535 $[\text{M-Cumarsäure-Glucose}]^+$, MS/MS⁴ (m/z) 287 $[\text{M-Malonsäure-Glucose-Cumarsäure-Glucose}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TFA}(d_1)$ 19:1, ppm): 3.40 (s, 2H, Hk), 3.35 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H4}''$), 3.42 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H4}'''$), 3.48 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H3}'''$), 3.56 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H3}''$), 3.59 (dd, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, 1H, $\text{H2}''$), 3.74 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, 1H, $\text{H2}'''$), 3.72 (ddd, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, $J_3 = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H5}''$), 3.92 (ddd, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, $J_3 = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H5}'''$), 4.23 (dd, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, $\text{H6}'''b$), 4.43 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, $\text{H6}''b$), 4.52 (dd, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, $\text{H6a}''$), 4.54 (dd, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz, 1H, $\text{H6}'''a$), 5.17 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, $\text{H1}'''$), 5.40 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, $\text{H1}''$), 6.22 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Hb), 6.72 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 2H, Hf, Hh), 6.95 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H8), 6.99 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H6), 7.01 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H5}'$), 7.22 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 2H, Hi, He), 7.37 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Hc), 8.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, $\text{H2}'$), 8.25 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H6}'$), 8.92 (s, 1H, H4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TFA}(d_1)$ 19:1, ppm): 64.48 ($\text{C4}'''$), 65.17 ($\text{C4}''$), 71.10 ($\text{C6}''$), 72.21 ($\text{C6}'''$), 74.44 ($\text{C2}''$), 74.79 ($\text{C2}'''$), 75.65 ($\text{C5}''$), 76.02 ($\text{C5}'''$), 77.82 ($\text{C3}'''$), 78.17 ($\text{C3}''$), 97.41 (C8), 102.71 ($\text{C1}''$), 103.01 ($\text{C1}'''$), 106.33 (C6), 113.28 (C10), 114.82 (Cb), 116.76 (Ch, Cf), 117.60 ($\text{C5}'$), 118.63 ($\text{C2}'$), 121.10 ($\text{C1}'$), 126.84 (Cd), 129.01 ($\text{C6}'$), 131.35 (Ce, Ci), 135.22 (C4), 146.01 (C3), 146.93 (Cc), 147.65 ($\text{C3}'$), 156.62 (C5), 156.73 (C9), 157.02 ($\text{C4}'$), 161.27 (Cg), 165.15 (C2), 168.44 (Cj), 169.11 (Ca), 169.53 (C7), 170.30 (Ci)

Cyanidin-3-O- β -D-[6''-(*cis-p*-cumaroyl)glucopyranosid]-5-O- β -D-[6'''-(malonyl)glucopyranosid (*cis*-Malonylshisonin) (P6)

Herkunft: *Perilla frutescens*

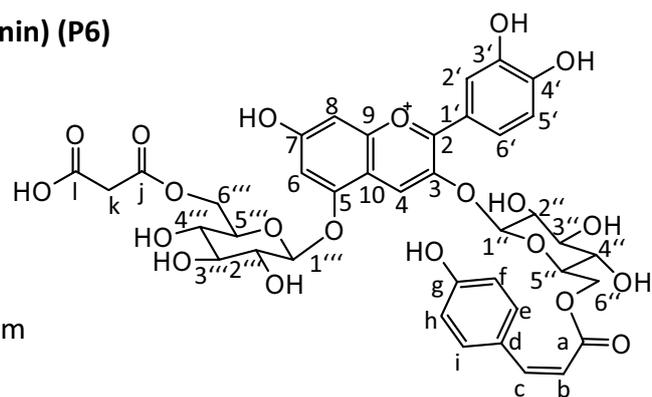
Summenformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{O}_{18}^+$

Molekülmasse: 843,20 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 279, 524$ nm

ESI-MSⁿ (positiver Modus):

m/z 843 [$\text{M}]^+$, MS/MS² (m/z) 757 [$\text{M-Malonsäure}]^+$, MS/MS³ (m/z) 595 [$\text{M-Malonsäure-Glucose}]^+$, MS/MS³ (m/z) 553 [$\text{M-Cumarsäure-Glucose}]^+$, MS/MS⁴ (m/z) 287 [$\text{M-Malonsäure-Glucose-Cumarsäure-Glucose}]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TFA}(d_1)$ 19:1, ppm): 4.50-3.22 (m, 10H, $\text{H2}''\text{-H6}''$, $\text{H2}'''\text{-H6}'''$), 3.28 (s, 2H, Hk), 5.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, $\text{H1}'''$), 5.20 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, $\text{H1}''$), 5.52 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, Hb), 6.12 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 2H, Hf, Hh), 6.21 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, Hc), 6.60 (d,

J = 2.0 Hz, 1H, H8), 6.67 (d, J = 2.0 Hz, H6), 6.83 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H5'), 6.92 (dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 7.0 Hz, 2H, Hi, He), 7.74 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H2'), 7.97 (dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H6'), 8.40 (s, 1H, H4)

**Cyanidin-3-O-β-D-[6''-(*trans-p*-cumaroyl)glucopyranosid]-
5-O-β-D-glucopyranosid (*trans*-Shisonin) (P7)**

Herkunft: *Perilla frutescens*

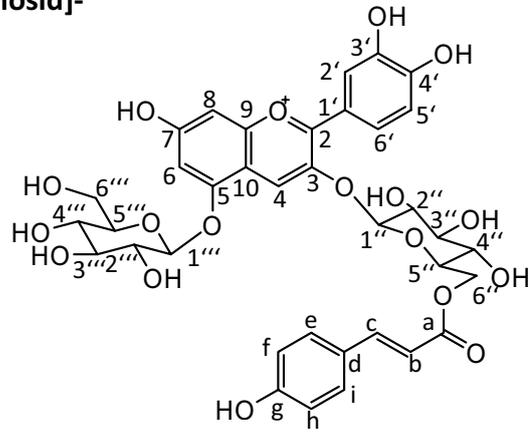
Summenformel: C₃₆H₃₇O₁₈⁺

Molekülmasse: 757,68 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): λ_{max} = 280, 519 nm

ESI-MSⁿ (positiver Modus):

m/z 757 [M]⁺, MS/MS² (*m/z*) 595 [M-Glucose]⁺, MS/MS³ (*m/z*) 449 [M-Glucose-Cumarsäure]⁺, MS/MS⁴ (*m/z*) 287 [M-Glucose-Cumarsäure-Glucose]⁺

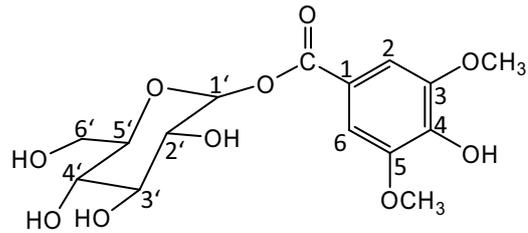


¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD/TFA(d₁) 19:1, ppm): 3.50 (t, J = 9.0 Hz, 1H, H4'''), 3.58 (t, J = 9.0 Hz, 1H, H4''), 3.62 (t, J = 9.0 Hz, 1H, H3'''), 3.65 (t, J = 9.0 Hz, 1H, H3''), 3.65 (m, 1H, H2'''), 3.77-3.80 (m, 2H, H2'', H5'''), 3.80 (dd, J₁ = 6.0 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H6'''), 3.95 (ddd, J₁ = 3.5 Hz, J₂ = 6.5 Hz, J₃ = 9.0 Hz, 1H, H5''), 4.04 (dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H6'''), 4.53 (dd, J₁ = 6.5 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H6'''), 4.55 (dd, J₁ = 3.0 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H6'''), 5.23 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H1'''), 5.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H1''), 6.30 (d, J = 16.0 Hz, 1H, Hb), 6.82 (2dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 7.5 Hz, 2H, Hh, Hf), 6.99 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H8), 7.07 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H6), 7.07 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H5'), 7.36 (2dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 7.5 Hz, 2H, Hi, He), 7.44 (d, J = 16.0 Hz, 1H, Hc), 8.07 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H2'), 8.34 (dd, J₁ = 2.5 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H6'), 9.01 (s, 1H, H4)

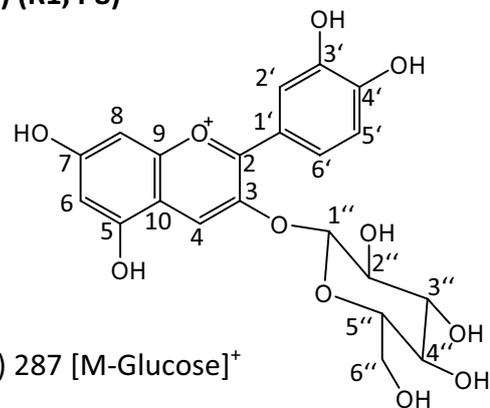
¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD/TFA(d₁) 19:1, ppm): 62.57 (C4'''), 64.19 (C4''), 71.25 (C6''), 71.87 (C6'''), 74.49 (C2''), 74.77 (C2'''), 75.72 (C5''), 77.90 (C3'''), 78.04 (C5'''), 78.92 (C3''), 97.37 (C8), 102.87 (C1''), 103.10 (C1'''), 106.99 (C6), 113.21 (C10), 114.62 (Cb), 116.81 (Ch, Cf), 117.66 (C5'), 118.47 (C2'), 121.07 (C1'), 126.77 (Cd), 129.02 (C6'), 131.44 (Ce, Ci), 135.62 (C4), 145.88 (C3), 146.98 (Cc), 147.68 (C3'), 156.65 (C5), 156.76 (C9), 157.07 (C4'), 161.38 (Cg), 165.14 (C2), 169.09 (Ca), 169.70 (C7)

Syringasäure- β -D-glucoseester (P10)Herkunft: *Perilla frutescens*Summenformel: C₁₅H₂₀O₁₀

Molekülmasse: 360,31 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): λ_{\max} = 283 nmESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 359 [M-H]⁻, MS/MS² (m/z) 197 [M-H-Glucose]⁻¹H-NMR (300 MHz, CD₃SOCD₃, ppm): 3.26-3.50 (m, H₂'-H₆'), 3.81 (s, 6H, 2x OCH₃), 5.52 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₁'), 7.26 (s, 2H, H₂, H₆)¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃SOCD₃, ppm): 56.10 (2x OCH₃), 60.52 (C₆'), 69.49 (C₄'), 72.40 (C₂'), 76.28 (C₅'), 77.79 (C₃'), 94.76 (C₁'), 107.32 (C₂, C₆), 118.69 (C₁), 141.13 (C₄), 147.50 (C₃, C₅), 164.36 (C=O)**5.7.3 *Oryza sativa*****Cyanidin-3-O- β -D-glucopyranosid (Cyanidin-3-glucosid) (R1, P8)**Herkunft: *Oryza sativa*, *Perilla frutescens*Summenformel: C₂₁H₂₁O₁₁⁺

Molekülmasse: 449,11 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): λ_{\max} = 280, 512 nmESI-MSⁿ (positiver Modus): m/z 449 [M]⁺, MS/MS² (m/z) 287 [M-Glucose]⁺¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD/TFA(d₁) 19:1, ppm): 3.46 (dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H₄''), 3.55 (dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H₃''), 3.55 (ddd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 6.0 Hz, J₃ = 12.0 Hz, 1H, H₅''), 3.68 (dd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H₂''), 3.73 (dd, J₁ = 6.0 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H_{6b}''), 3.93 (dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H_{6a}''), 5.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₁''), 6.65 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H₈), 6.87 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H₆), 6.99 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H₅'), 8.00 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H₂'), 8.21 (dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H₆'), 8.98 (s, 1H, H₄)¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD/TFA(d₁) 19:1, ppm): 62.38 (C₆''), 71.11 (C₄''), 74.79 (C₂''), 78.13 (C₃''), 78.78 (C₅''), 95.16 (C₈), 103.44 (C₆), 103.78 (C₁''), 113.36 (C₁₀), 117.41 (C₂'), 118.43

(C5'), 121.20 (C1'), 128.24 (C6'), 136.86 (C4), 145.56 (C3), 147.36 (C3'), 155.78 (C4'), 157.65 (C9), 159.25 (C5), 164.17 (C2), 170.52 (C7)

Peonidin-3-O- β -D-glucopyranosid (Peonidin-3-glucosid) (R2)

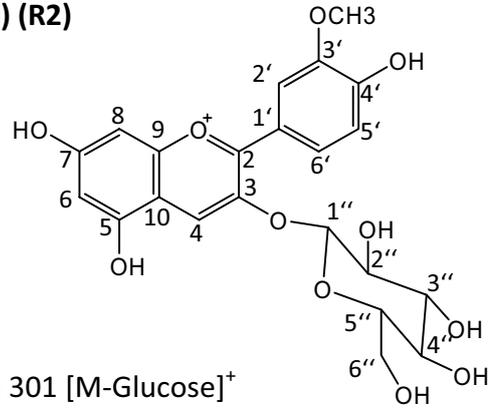
Herkunft: *Oryza sativa*

Summenformel: C₂₂H₂₃O₁₁⁺

Molekülmasse: 463,12 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): λ_{\max} = 279, 516 nm

ESI-MSⁿ (positiver Modus): m/z 463 [M]⁺, MS/MS² (m/z) 301 [M-Glucose]⁺



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD/TFA(d₁) 19:1, ppm): 3.42 (dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H4''), 3.55 (dd, J₁ = 9.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H3''), 3.55 (ddd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 6.0, J₃ = 12.0 Hz, 1H, H5''), 3.65 (dd, J₁ = 7.5 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H2''), 3.70 (dd, J₁ = 6.0 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H6''b), 3.92 (dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 12.0 Hz, 1H, H6''a), 5.00 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H1''), 6.67 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H8), 6.93 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H6), 7.06 (dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H5'), 8.07 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H2'), 8.25 (dd, J₁ = 2.0 Hz, J₂ = 9.0 Hz, 1H, H6'), 9.06 (s, 1H, H4)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD/TFA(d₁) 19:1, ppm): 56.99 (OCH₃), 62.47 (C6''), 71.25 (C4''), 74.25 (C2''), 78.24 (C3''), 78.93 (C5''), 95.33 (C8), 103.48 (C6), 104.04 (C1''), 113.66 (C10), 114.17 (C5'), 117.94 (C2'), 121.18 (C1'), 128.92 (C6'), 137.57 (C4), 145.57 (C3), 149.61 (C3'), 156.58 (C4'), 158.73 (C9), 159.29 (C5), 164.38 (C2), 171.80 (C7)

3,4-Dihydroxybenzoessäure (Protocatechusäure) (R3)

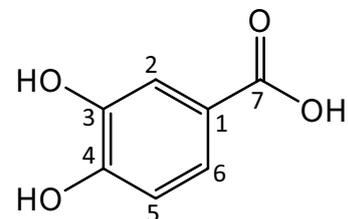
Herkunft: *Oryza sativa*

Summenformel: C₇H₆O₄⁺

Molekülmasse: 154,12 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): λ_{\max} = 260, 294 nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 153 [M-H]⁻, MS/MS² (m/z) 109 [M-H-CO₂]⁻



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): 6.80 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H5), 7.41 (dd, J₁ = 1.5 Hz, J₂ = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.44 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H2)

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CD_3OD , ppm): 115.79 (C5), 117.78 (C2), 123.19 (C6), 123.91 (C1), 146.06 (C3), 151.53 (C4), 170.20 (C7)

Cyanidin-3,5-O- β -D-di-glucopyranosid

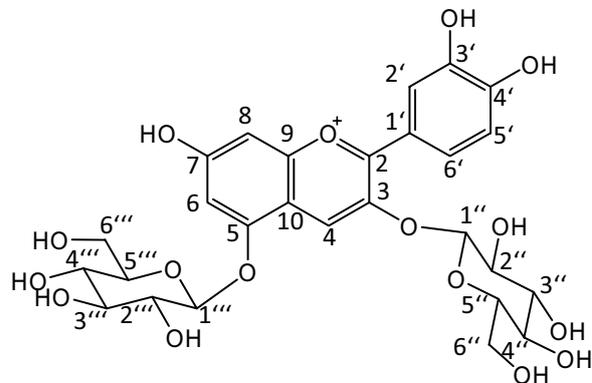
(Cyanidin-3,5-diglucosid) (R4, P9)

Herkunft: *Oryza sativa*, *Perilla frutescens*

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{16}^+$

Molekülmasse: 611,54 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 279, 525 \text{ nm}$



ESI- MS^n (positiver Modus):

m/z 611 $[\text{M}]^+$, MS/MS^2 (m/z) 449 $[\text{M-Glucose}]^+$, MS/MS^3 (m/z) 287 $[\text{M-Glucose-Glucose}]^+$

^1H -NMR (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TFA}(\text{d}_1)$ 19:1, ppm): 3.47-3.80 (m, 8H, $\text{H}2''$ - $5''$, $\text{H}2'''$ - $5'''$), 3.81 (dd, $J_1 = 5.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 10.0 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}6''\text{b}$, $\text{H}6'''\text{b}$), 3.98 (dd, $J_1 = 2.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 12.0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}6'''\text{a}$), 3.99 (dd, $J_1 = 2.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 12.0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}6''\text{a}$), 5.26 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}1'''$), 5.40 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}1''$), 7.09 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H8), 7.11 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}5'$), 7.16 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H6), 8.12 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}2'$), 8.30 (dd, $J_1 = 2.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}6'$), 9.13 (s, 1H, H4)

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TFA}(\text{d}_1)$ 19:1, ppm): 62.03 ($\text{C}6'''$), 62.27 ($\text{C}6''$), 70.85 ($\text{C}4'''$), 71.01 ($\text{C}4''$), 74.23 ($\text{C}2'''$), 74.44 ($\text{C}2''$), 77.32 ($\text{C}3'''$), 77.80 ($\text{C}3''$), 78.21 ($\text{C}5'''$), 78.56 ($\text{C}5''$), 97.56 (C8), 102.17 ($\text{C}1'''$), 103.49 ($\text{C}1''$), 105.63 (C6), 113.96 (C10), 117.73 ($\text{C}5'$), 118.78 ($\text{C}2'$), 122.60 ($\text{C}1'$), 128.86 ($\text{C}6'$), 135.98 (C4), 146.36 (C3), 147.08 ($\text{C}3'$), 156.06 ($\text{C}4'$), 156.53 (C5), 157.12 (C9), 165.14 (C2), 169.62 (C7)

Cyanidin-3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-($1''' \rightarrow 2''$)- β -D-glucopyranosid]

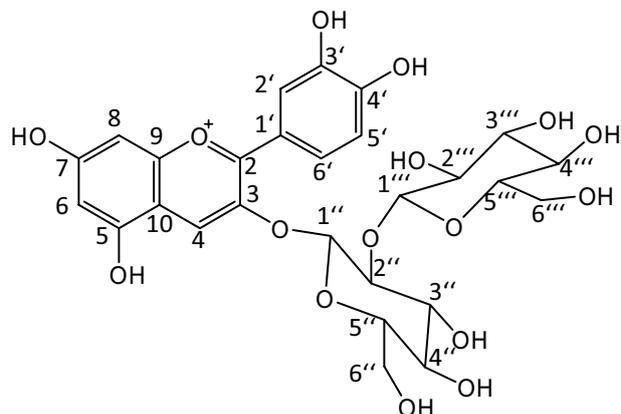
(Cyanidin-3-O-sophorosid) (R5)

Herkunft: *Oryza sativa*

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{16}^+$

Molekülmasse: 611,54 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 279, 525 \text{ nm}$



ESI-MS (positiver Modus):

m/z : 611 $[M]^+$, MS/MS^2 (m/z) 287 $[M\text{-Glucose-Glucose}]^+$

Cyanidin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranosid]

(Cyanidin-3-O-rutinosid) (R6, T3)

Herkunft: *Oryza sativa*, *Xanthosoma violaceum*

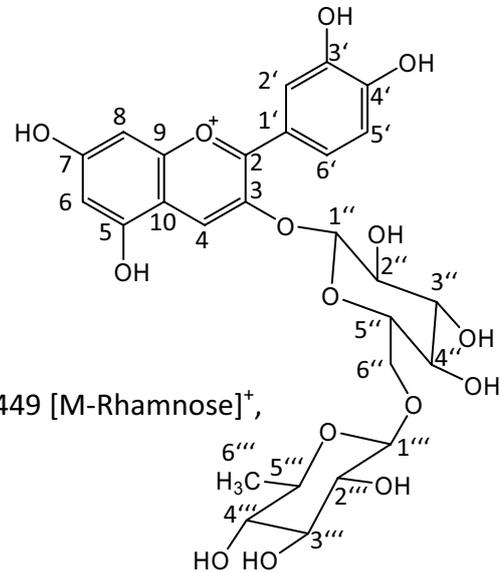
Summenformel: $C_{27}H_{31}O_{15}^+$

Molekülmasse: 595,53 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): λ_{\max} = 279, 530 nm

ESI-MS (positiver Modus) m/z : 595 $[M]^+$, MS/MS^2 (m/z) 449 $[M\text{-Rhamnose}]^+$,

MS/MS^3 (m/z) 287 $[M\text{-Rhamnose-Glucose}]^+$



5.7.4 *Xanthosoma violaceum*

(-)-Epicatechin-[4 β \rightarrow 8, 2 β \rightarrow O \rightarrow 7]-epicatechin-[4 β \rightarrow 8]-epicatechin

(Proanthocyanidin A2(-)-epicatechin) (T1)

Herkunft: *Xanthosoma violaceum*

Summenformel: $C_{45}H_{36}O_{18}$

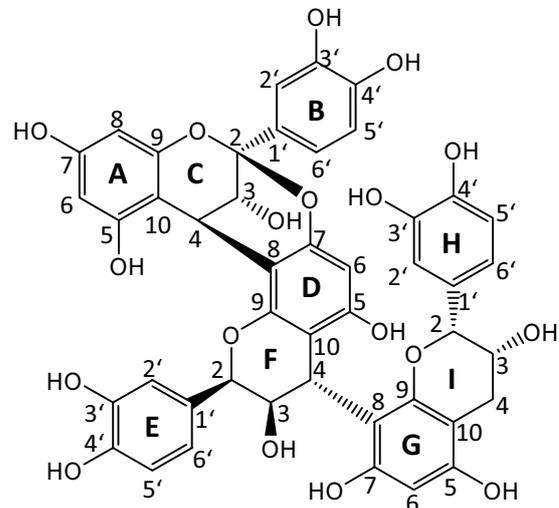
Molekülmasse: 864,76 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): 248, 279 nm

ESI- MS^n (negativer Modus):

m/z 863 $[M-H]^-$, MS/MS^2 (m/z) 711, 573, 451,

MS/MS^3 (m/z) 411, 289



^{13}C -NMR (75.5 MHz, CD_3OD , ppm): 29.2 (C4/C), 29.3 (C4/I), 37.7 (C4/F), 66.7 (C3/C, C3/I), 71.2 (C3/F), 77.9 (C2/F), 79.5 (C2/I), 95.6 (C6/D), 96.5 (C8/A, C6/G), 98.1 (C6/A), 99.47 (C8/D), 100.3 (C10/G), 104.6 (C2/C), 106.2 (C10/A), 108.3 (C8/G), 115.3 (C5'/E), 115.7 (C2'/H), 115.8 (C2'/B), 116.0 (C5'/H, C5'/B), 116.5 (C2'/E), 119.0 (C6'/B), 119.4 (C6'/H), 121.1 (C6'/E), 131.8 (C1'/B), 132.5 (C1'/H), 132.6 (C1'/E), 144.8 (C3'/E), 144.9 (C4'/H), 145.1

(C4'/B), 145.4 (C4'/E), 145.5 (C3'/H), 145.9 (C3'/B), 153.5 (C5/D), 154.5 (C7/G, C9/A), 155.2 (C9/G, C7/D), 157.2 (C5/G, C9/D, C5/A)

(-)-Epicatechin (T2)

Herkunft: *Xanthosoma violaceum*

Summenformel: C₁₅H₁₄O₆

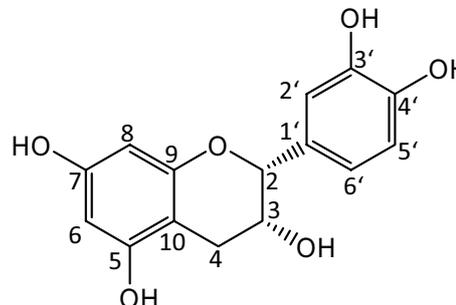
Molekülmasse: 290,27 g/mol

UV (Spektrum nach HPLC): 279 nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): *m/z* 289 [M-H]⁻

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, ppm): 2.73 (dd, *J*₁ = 16.5 Hz, *J*₂ = 3.0 Hz, 1H, H4_{ax}), 2.90 (dd, *J*₁ = 16.5 Hz, *J*₂ = 4.5 Hz, 1H, H4_{äq}), 4.21 (m, 1H, H3), 4.42 (br. s, 1H, H2), 5.98 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H6), 5.96 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H8), 6.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5'), 6.83 (dd, *J*₁ = 1.5 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H, H6'), 7.01 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H2')

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD, ppm): 29.3 (C4), 67.5 (C3), 79.8 (C2), 95.9 (C6), 96.5 (C8), 100.0 (C4_{äq}), 115.3 (C2'), 115.9 (C5'), 119.4 (C6'), 132.2 (C1'), 145.8 (C3'), 145.9 (C4'), 157.4 (C5), 158.1 (C7)



6 Literaturverzeichnis

Amarowicz, R.; Kolodziejczyk, P.-P.; Pegg, R.-B.: Chromatographic separation of phenolic compounds from rape seed by a sephadex LH-20 column with ethanol as the mobile phase, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2003**, *26*, 2157-2165.

Anderson, J. E.; Goetz, C. M.; McLaughlin, J. L.; Suffness, M.: A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens, *Phytochem. Anal.*, **1991**, *2*, 107-111.

Andersson, H. C.; Wennström, P.; Gry, J.: *Nicotine alkaloids in Solanaceous food plants*, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, **2003**.

Bennett, M. R.: Reactive oxygen species and death: oxidative DNA damage in atherosclerosis, *Circ. Res.*, **2001**, *88*, 648-650.

Bloor, S. J.; Falshaw, R.: Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue Agapanthus flowers, *Phytochemistry*, **2000**, *53*, 575-579.

Brouillard, R.; Mazza, G.; Saad, Z.; Albrecht-Gary, A. M.; Cheminat, A.: The co-pigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 2604-2610.

Brown, J. E.; Khodr, H.; Hider, R. C.; Rice-Evans, C. A.: Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties, *Biochem. J.*, **1998**, *330*, 1173-1178.

Brücher, H.: *Tropische Nutzpflanzen*, Springer-Verlag, Berlin, **1977**.

Bub, A.; Watzl, B.; Heeb, D.; Rechkemmer, G.; Briviba, K.: Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine and red grape juice, *Eur. J. Nutr.*, **2001**, *40*, 113-120.

Böhm, H.; Boeing, H.; Hempel, J.; Raab, B.; Kroke, A.: Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen, *Z. Ernährungswiss.*, **1998**, *37*, 147-163.

Canel, C.; Moraes, R. M.; Dayan, F. E.; Ferreira, D.: Molecules of interest: Podophyllotoxin, *Phytochemistry*, **2000**, *54*, 115-120.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L.: Antioxidant capacity of tea and common vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 3426-3431.

Carballo, J. L.; Hernández-Inda, Z. L.; Pérez, P.; García-Grávalos, G.-G.: A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products, *BMC Biotechnol.*, **2002**, *2*, 17-21.

Chen, J. H.; Ho, C.-T.: Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 2374-2378.

- Chen, Y.-P.: Applications and Prescriptions of Perilla in Traditional Chinese Medicine. in: *Perilla: the genus perilla*, (Eds.: H.-C. Yu, K. Kosuna, M. Haga), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1997**, 37-46.
- Chevallier, A.: The encyclopedia of medicinal plants, Dorling Kindersley, London, 1996.
- Cho, M.-H.; Paik, Y.-S.; Yoon, H.-H.; Hahn, T.-R.: Chemical structure of the major color component from a Korean pigmented rice variety, *Korean J. Agric. Chem. Biotechnol.*, **1996**, *39*, 304-308.
- Chung, H. S.; Woo, W. S.: A quinolone alkaloid with antioxidant activity from the aleurone layer of anthocyanin-pigmented rice, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1579-1580.
- Clifford, M. N.: Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, *80*, 1063-1072.
- Clifford, M. N.; Knight, S.; Kuhnert, N.: Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 3821-3832.
- Dangles, O.; Saito, N.; Brouillard, R.: Anthocyanin intramolecular copigment effect, *Phytochemistry*, **1993**, *34*, 119-124.
- Degenhardt, A.; Hofmann, S.; Knapp, H.; Winterhalter, P.: Preparative isolation of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and application of the color activity concept to red wine, *J. Agric. Food Chem.*, **2000a**, *48*, 5812-5818.
- 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.*, **2000b**, *48*, 338-343.
- Delgado, C.; Rosegrant, M.; Steinfeld, H.; Ehui, S.; Courbois, C.: *Livestock to 2020, the next food revolution*, Food, Agriculture, and the Environment Discussion Paper 28, Washington DC, **1999**.
- Dillon, V. M.; Overton, J.; Grayer, R. J.; Harborne, J. B.: Differences in phytoalexin response among rice cultivars of different resistance to blast, *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 599-603.
- Du, Q.; Jerz, G.; Waibel, R.; Winterhalter, P.: Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2003a**, *1008*, 173-180.
- Du, Q.; Jerz, G.; He, Y.; Li, L.; Xu, Y.; Zhang, Q.; Zheng, Q.; Winterhalter, P.; Ito, Y.: Semi-industrial isolation of salicin and amygdalin from plant extracts using slow rotary counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1074*, 43-46.
- Du, Q.; Winterhalter, P.; Ito, Y.: Large convoluted tubing for scale-up of slow rotary countercurrent chromatograph, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2003b**, *26*, 1991-2001.
- 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. Relat. Technol.*, **2001**, *24*, 2363-2369.

Du, Q.; Wu, P.; Ito, Y.: Low-speed rotary countercurrent chromatography using a convoluted multilayer helical tube for industrial separation, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 3363-3365.

Du, Q.; Jerz, G.; Winterhalter, P.: Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1045*, 59-63.

Du, Y.; Ito, Y.: Slow rotary countercurrent chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2003**, *26*, 1827-1838.

Engelhardt, U.: Polyphenole in Tee, W.I.T. -*Wissenschaftlicher Informationsdienst Tee*, Deutsches Tee-Institut, Hamburg, **Frühjahr 1998**.

Engelhardt, U., Galensa, R.: Analytik und Bedeutung von Polyphenolen in Lebensmitteln, in: *Analytiker-Taschenbuch Bd. 15*, Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, 149-178.

Ernst, E.: Herbal medicines: where is the evidence?, *BMJ*, **2000**, *321*, 395-396.

Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C.: Anthocyanins in cereals, *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1054*, 129-141.

FAO 2005: FAO Statistics - major food and agricultural commodities and producers, **2005** (<http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=27&year=2005>, zuletzt besucht am 10.01.2008).

Felgines, C.; Talavéra, S.; Gonthier, M. P.; Texier, O.; Scalbert, A.; Lamaison, J. L.; Rémésy, C.: Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans, *J. Nutr.*, **2003**, *133*, 1296-1301.

Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Lyan, B.; Lamaison, J. L.; Scalbert, A.: Strawberry pelargonidin glycosides are excreted in urine as intact glycosides and glucuronidated pelargonidin derivatives in rats, *Br. J. Nutr.*, **2007**, *98*, 1126-1131.

Ferguson, P. J.; Kurowska, E.; Freeman, D. J.; Chambers, A. F.; Koropatnick, D. J.: A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines, *J. Nutr.*, **2004**, *134*, 1529-1535.

Fleischhut, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G.; Kulling, S. E.: Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro, *Eur. J. Nutr.*, **2006**, *45*, 7-18.

Fossen, T.; Sliestad, R.; Andersen, O. M.: Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*, *Phytochemistry*, **2003**, *64*, 1367-1374.

Fuhrman, B.; Aviram, M.: Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.*, **2001**, *12*, 41-48.

Funayama, S.; Yoshida, K.; Konno, C.; Hikino, H.: Structure of kukoamine A, a hypotensive principle of *Lycium Chinense* root barks, *Tetrahedon Lett.*, **1980**, *21*, 1355-1356.

5 am Tag e.V.: 5 am Tag – Obst und Gemüse, **2000** (<http://www.5amtag.de/index2.htm>, zuletzt besucht am 10.01.2008).

Gardner, G.; Halwell, B.: *Underfed and overfed: the global epidemic of malnutrition*, World Watch Institute Paper 150, Washington DC: Worldwatch Inst., **2000**.

Geneste, H.; Hesse, M.: Polyamine und Polyamin-Derivate in der Natur, *Chemie in Unserer Zeit*, **1998**, 32(4), 206-218.

Gerner, E. W.; Meyskens, F. L.: Polyamines and cancer: old molecules, new understanding, *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, 4, 781-792.

Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E.: Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems, *Biochem. Eng. J.*, **2003**, 14, 217-225.

Goodland, R.: The westernization of diets: the assessment of impacts in developing countries - with special reference to China, *Global Hunger Alliance*, **2001**, <http://www.globalhunger.net/GoodlandChina.pdf>

Grayer, R. J.; Harborne, J. B.: A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993, *Phytochemistry*, **1994**, 37, 19-42.

Grayer, R. J.; Harborne, J. B.; Kimmins, F. M.; Stevenson, P. C.; Wijayagunsekera, H. N. P.: Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*), *Acta Hort. (ISHS)*, **1994**, 381, 691-694.

Gutzeit, D.; Wray, V.; Winterhalter, P.; Jerz, G.: Preparative isolation and purification of flavonoids and protocatechuic acid from sea buckthorn juice concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by high-speed counter-current chromatography, *Chromatographia*, **2007**, 65, 1-7.

Halliwell, B.: Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?, *Lancet*, **1994**, 344, 721-724.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, **1999**.

Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S.: The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radic. Biol. Med.*, **1994**, 16, 845-850.

Harborne, J. B.: The flavonoids: Recent advances, in: *Plant Pigments*, (Ed.: T. W. Goodwin), Academic Press, London, **1988**, 299-343.

Harborne, J. B.; Williams, C.: Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, **2000**, 55, 481-504.

Hegnauer, R.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 5: Dicotyledoneae, Birkhäuser, Basel, Stuttgart, **1969**.

Heinonen, I. M.; Meyer, A. S.; Frankele, E. N.: Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 4107-4112.

Henke, H.: *Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20*, Privatdruck Henke, Obernburg, **1994**.

- Herrmann, K.: Über Verfärbung des Gemüses durch phenolische Inhaltsstoffe, *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, **1976**, 72, 90-94.
- Herrmann, K.: Vorkommen und Bedeutung von phenolischen Substanzen in Lebensmitteln, *Lebensmittelindustrie*, **1978**, 25, 305-307.
- Herrmann, K.: *Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse*, Ulmer, Stuttgart, **2001**.
- Hillebrand, S.: Analytik von Polyphenolen in Buntsäften im Hinblick auf Saftqualität, Farbe und antioxidative Aktivität, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig, **2004**.
- Hoeijmakers, J. H.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature*, **2001**, 411, 366-374.
- Honda, T.; Saito, N.: Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower color pigments, *Heterocycles*, **2002**, 56, 633-692.
- Hosokawa, K.; Fukunaga, Y.; Fukushi, E.; Kawabata, J.: Acylated anthocyanins from red *Hyacinthus orientalis*, *Phytochemistry*, **1995**, 39, 1437-1441.
- Hou, J. P.; Jin, Y.: *The healing power of Chinese herbs and medicinal recipes*, Haworth Press, New York, **2005**.
- Hu, C.; Zawistowski, J.; Ling, W.; Kitts, D. D.: Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 5271-5277.
- Hu, S.-Y.: *Food plants of China*, The Chinese University Press, Hong Kong, **2005**.
- Hung, T. M.; Na, M.; Thuong, P. T.; Su, N. D.; Sok, D.; Song, K. S.; Seong, Y. H.; Bae, K.: Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall, *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, 108, 188-192.
- Hyun, J. W.; Chung, H. S.: Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G₂/M phase and induction of apoptosis, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 2213-2217.
- IARC (International Agency for Research on Cancer): EPIC - European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, **1992**, (<http://www.iarc.fr/epic/Sup-default.html>, zuletzt besucht am 10.01.2008).
- Ichikawa, H.; Ichiyangi, T.; Xu, B.; Yoshii, Y.; Nakajima, M.; Konishi, T.: Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice, *J. Med. Food*, **2001**, 4, 211-218.
- Ichiyangi, T.; Hatano, Y.; Matsuo, S.; Konishi, T.: Simultaneous comparison of relative reactivities of twelve major anthocyanins in bilberry towards reactive nitrogen species, *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, 52, 1312-1315.
- Ichiyangi, T.; Kashiwada, Y.; Shida, Y.; Ikeshiro, Y.; Kaneyuki, T.; Konishi, T.: Nasunin from eggplant consists of cis-trans isomers of delphinidin 3-[4-(p-coumaroyl)-L-rhamnosyl (1→6)glucopyranoside]-5-glucopyranoside, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 9472-9477.

- Igarashi, K.; Yoshida, T.; Suzuki, E.: Antioxidative activity of nasunin in chouja-nasu (little eggplant, *Solanum melongena* L. 'chouja'), *J. Japan. Soc. Food Sci. Tech.*, **1993**, *40*, 138-143.
- Ishikura, N.: Anthocyanins and flavones in leaves and seeds of Perilla plant, *Agric. Biol. Chem.*, **1981**, *45*, 1855-1860.
- Ito, Y.: High-Speed Countercurrent Chromatography, *CRC Critic. Rev. Anal. Chem.*, **1986**, *17*, 65-142.
- Ito, Y.: Speculation on the mechanism of unilateral hydrodynamic distribution of two immiscible solvent phases in the rotating coil, *J. Liq. Chromatogr.*, **1992**, *15*, 2639-2675.
- Ito, Y.; Weinstein, M. A.; Aoki, I.; Harada, R.; Kimura, E.; Nunogaki, K.: The coil planet centrifuge, *Nature*, **1966**, *212 No. 5066*, 985-987.
- Ito, Y.: Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1065*, 145-168.
- Jurd, L.: Some advances in the chemistry of anthocyanin type plant pigments, in: *The Chemistry of Plant Pigments*, (Ed.: C. O. Chichester), Academic Press, New York, **1972**, 123-142.
- Kähkönen, M. P.; Heinonen, H.: Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 628-633.
- Kalač, P.; Krausová, P.: A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods, *Food Chem.*, **2005**, *90*, 219-230.
- Kaneko, S.; Ueda-Yamada, M.; Ando, A.; Matsumura, S.; Okuda-Ashitaka, E.; Matsumura, M.; Uyama, M.; Ito, S.: Cytotoxic effect of spermine on retinal pigment epithelial cells, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **2007**, *48*, 455-463.
- Kantz, K.; Singleton, V.-L.: Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using sephadex LH-20, *Am. J. Enol. Vitic.*, **1991**, *42*, 309-316.
- Karigiannis, G.; Papaioannou, D.: Structure, biological activity and synthesis of polyamine analogues and conjugates, *Eur. J. Organ. Chem.*, **2000**, 1841-1863.
- Kennedy, J. A.; Jones, G. P.: Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 1740-1746.
- Kim, H. J.; Woo, E. R.; Shin, C. G.; Park, H.: A new flavonol glycoside gallate ester from *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase, *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 145-148.
- Kim, S.-J.; Park, H.-R.; Park, E.; Lee, S.-C.: Cytotoxic and antitumor activity of momilactone B from rice hulls, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 1702-1706.
- Klick, S.; Herrmann, K.: Glucosides and glucose esters of hydroxybenzoic acids in plants, *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 2177-2180.
- Knox, Y. M.; Hayashi, K.; Suzutani, T.; Ogasawara, M.; Yoshida, I.; Shiina, R.; Tsukui, A.; Terahara, N.; Azuma, M.: Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses, *Acta Virol.*, **2001**, *45*, 209-215.

- Köhler, N.: Entwicklung und Anwendung leistungsfähiger präparativer gegenstromverteilungschromatographischer Trenntechniken, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig, **2006**.
- Kondo, T.; Tamura, H.; Yoshida, K.; Goto, T.: Structure of malonylshisonin, a genuine pigment in purple leaves of *Perilla ocimoides* L. var. *crispa* benth, *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, *53*, 797-800.
- Kong, J.-M.; Chia, L.-S.; Goh, N.-K.; Chia, T.-F.; Brouillard, R.: Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, **2003**, *64*, 923-933.
- Kuksa, V.; Buchan, R.; Lin, P. K. T.: Synthesis of polyamines, their derivatives, analogues and conjugates, *Synthesis*, **2000**, *9*, 1189-1207.
- Kuroda, C.; Wada, M.: The colouring matter of eggplant (nasu), *Proc. Imp. Acad.*, **1933**, *9*, 51-52.
- Kuroda, C.; Wada, M.: The colouring matter of eggplant (nasu). Part II, *Proc. Imp. Acad.*, **1935**, *11*, 235-237.
- Lakenbrink, C.; Lapczynski, S.; Maiwald, B.; Engelhardt, U. H.: Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 2848-2852.
- Laleh, G. H.; Frydoonfar, H.; Heidary, R.; Jameei, R.; Zare, S.: The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four *berberis* species, *Pakistan J. Nutr.*, **2006**, *5*, 90-92.
- Lee, D. G.; Park, Y.; Kim, M.-R.; Jung, H. J.; Seu, Y. B.; Hahm, K.-S.; Woo, E.-R.: Anti-fungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*, *Biotechnol. Lett.*, **2004**, *26*, 1125-1130.
- Lee, S.-H.; Sohn, Y. S.; Kang, K. K.; Kwon, J. W.; Yoo, M.: Inhibitory effect of DA-9201, an extract of *Oryza sativa* L., on airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in mouse asthma model, *Biolog. Pharm. Bulletin*, **2006**, *29*, 1148-1153.
- Li, B. Q.; Fu, T.; Yan, Y. D.; Baylor, N. W.; Ruscetti, F. W.; Kung, H. F.: Inhibition of HIV by baicalin – a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine, *Cell. Mol. Biol. Res.*, **1997**, *39*, 119-124.
- Lieberman, M.: A brine shrimp bioassay for measuring toxicity and remediation of chemicals, *J. Chem. Educ.*, **1999**, *76*, 1689-1690.
- Lin, H.-C.; Liou, C.-C.; Tsai, T.-C.: Anthocyanins in eggplant, *Taiwan. J. Agric. Chem. Food Sci.*, **2001**, *39*, 370-378.
- Lu, Y.; Foo, L. Y.: Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*, *Phytochemistry*, **2000**, *55*, 263-267.
- Lugasi, A.; Almeida, D. P. F.; Dworchák, E.: Chlorogenic acid content and antioxidant properties of potato tubers as related to nitrogen fertilisation, *Acta alimentaria*, **1999**, *28*, 183-195.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J.: *Fruit phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, **1990**.
- Makino, T.; Furuta, Y.; Fujii, H.; Nakagawa, T.; Wakushima, H.; Saito, K.-I.; Kano, Y.: Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-I allergy in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, **2001a**, *24*, 1206-1209.

- Makino, T.; Furuta, Y.; Wakushima, H.; Fujii, H.; Saito, K.-I.; Kano, Y.: Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents, *Phytother. Res.*, **2003**, *17*, 240-243.
- Makino, T.; Nakamura, T.; Ono, T.; Muso, E.; Honda, G.: Suppressive effects of *Perilla frutescens* on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **2001b**, *24*, 172-175.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L.: Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, *79*, 727-747.
- Markovic, J. M. D.; Petranovic, N. A.; Baranac, J. M.: A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 5530-5536.
- Matsubara, K.; Kaneyuki, T.; Miyake, T.; Mori, M.: Antiangiogenic activity of nasunin, an antioxidant anthocyanin, in eggplant peels, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 6272-6275.
- Mayer, A. M.; Harel, E.: Polyphenol oxidases in plants, *Phytochemistry*, **1979**, *18*, 193-215.
- Mazza, G.; Brouillard, R.: The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions, *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 1097-1102.
- Mazza, G.; Miniati, E.: *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*, CRC Press, Boca Raton, **1993**.
- McLaughlin, J. L.; Rogers, L. L.; Anderson, J. E.: The use of biological assays to evaluate botanicals, *Drug Inf. J.*, **1998**, *32*, 513-524.
- 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*, 31-34.
- 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*, 407-412.
- Morimitsu, Y.; Kubota, K.; Tashiro T.; Hashizume E.; Kamiya T.; Osawa T.: Inhibitory effect of anthocyanins and colored rice on diabetic cataract formation in the rat lenses, *International Congress Series*, **2002**, *1245*, 503-508.
- Naderi, G. A.; Asgary, S.; Sarraf-Zadegan, N.; Shirvany, H.: Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation, *Mol. Cell. Biochem.*, **2003**, *246*, 193-196.
- Nakamura, Y.; Ohto, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H.: Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* britton var. *acuta* f. *viridis*, *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 4545-4550.
- Nakatani, N.; Kayano, S.; Kikuzaki, H.; Sumino, K.; Katagiri, K.; Mitani, T.: Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.), *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 5512-5516.
- Nakazawa T.; Ohsawa, K.: Metabolites of orally administered *Perilla frutescens* extract in rats and humans, *Biol. Pharm. Bull.*, **2000**, *23*, 122-127.
- Natsume, M.; Muto, Y.; Fukuda, K.; Tokunaga, T.; Osakabe, N.: Determination of rosmarinic acid and luteolin in *Perilla frutescens* britton (labiatae), *J. Sci. Food. Agric.*, **2006**, *86*, 897-901.

- Negrel, J.: The biosynthesis of cinnamoylputrescines in callus tissue cultures of *Nicotiana tabacum*, *Phytochemistry*, **1989**, *28*, 477-481.
- Netzel, M.; Strass, G.; Janssen, M.; Bitsch, I.; Bitsch, R.: Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **2001**, *20*, 89-95.
- Noda, Y.; Kneyuki, T.; Igarashi, K.; Mori, A.; Packer, L.: Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels, *Toxicology*, **2000**, *148*, 119-123.
- Oki, T.; Masuda, M.; Kobayashi, M.; Nishiba, Y.; Furuta, S.; Suda, I.; Sato, T.: Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 7524-7529
- Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Yoshikawa, T.: Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model, *Carcinogenesis*, **2004**, *25*, 549-557.
- Parr, A.; Mellon, F.; Colquhoun, I. J.; Davies, H. V.: Dihydrocaffeoyl polyamines (kukoamine and allies) in potato (*Solanum tuberosum*) tubers detected during metabolite profiling, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 5461-5466.
- Pegg, A. E.: Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy, *Cancer Res.*, **1988**, *48*, 759-774.
- Perry, L. M.; Metzger, J.: *Medicinal plants of east and southeast Asia: attributed properties and uses*, MIT Press, London, **1980**.
- Picerno, P.; Mencherini, T.; Lauro, M. R.; Barbato, F.; Aquino, R.: Phenolic constituents and antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* leaves, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 6423-6428.
- Pietta, P.: Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 1035-1042.
- Porter, L. J.: Tannins, in: *Methods in plant biochemistry*, Vol. 1 Plant Phenolics (ed. J. B. Harborne), **1989**, 389-419.
- Porter, L. J.; Hrstich, L. N.; Chan, B. G.: The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, *Phytochemistry*, **1985**, *25*, 223-230.
- Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K.: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 4290-4302.
- Ramos, M. del R.; Jerz, G.; Villanueva, S.; López-Dellamary, F.; Waibel, R.; Winterhalter, P.: Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass), *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 955-962.
- Ramos-Jerz, M. del R.: Phytochemical analysis of avocado seeds (*Persea americana* Mill., c.v. Hass), *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig, **2007**.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, *26*, 1231-1237.

- Reed, J. D.; Krueger, C. G.; Vestling, M. M.: MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols, *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 2248-2263.
- Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; Burkhardt, S.: Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin, *Mech. Ageing Dev.*, **2002**, *123*, 1007-1019.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, *20*, 933-956.
- Rubbo, H.; Trostchansky, A.; Botti, H.; Batthyány, C.: Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein, *Biol. Chem.*, **2002**, *383*, 547-552.
- Ryu, S. N.; Park, S. Z.; Ho, C.-T.: High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice, *J. Food Drug Anal.*, **1998**, *6*, 729-736.
- Sadilova, E.; Stintzing, F. C.; Carle, R.: Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins, *J. Food Sci.*, **2006**, *71*, C504-C512.
- Saito, S.; Okamoto, Y.; Kawabata, J.: Effects of alcoholic solvents on antiradical abilities of protocatechuic acid and its alkyl esters, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *68*, 1221-1227.
- Santos-Buelga, C.; Scalbert, A.: Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health, *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, *80*, 1094-1117.
- Sattar, E. A.; Glasl, H.; Nahrstedt, A.; Hilal, S. H.; Zaki, A. Y.; El Zalabani, S. M. H.: Hydroxycinnamic acid amides from *Lochroma cyaneum*, *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 3931-3933.
- Satué-Gracia, M.; Heinonen, M.; Frankel, E.: Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 3362-3367.
- Scalbert, A.: Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 3875-3883.
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L.: Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2005**, *45*, 287-306.
- Schönfelder, I. u. P.: *Das neue Handbuch der Heilpflanzen*, Franck-Kosmos Verlags GmbH, Stuttgart, **2004**.
- Shang, A.; Huwiler, K.; Nartey, L.; Jüni, P.; Egger, M.: Placebo-controlled trials of Chinese herbal medicine and conventional medicine - comparative study, *Int. J. Epidemiol.*, **2007**, *36*, 1086-1092.
- Shenoy, V. R.: Anthocyanins - prospective food colours, *Curr. Sci.*, **1992**, *64*, 575-579.
- Shrikhande, A. J.: Anthocyanins in foods, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1976**, *7*, 193-218.
- Siems, W. G.; Sommerburg, O.; Mayer, H.; Grune, T.: Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus, *Pharmazeutische Zeitung*, **1998**, *19*, 11-25.
- Simoons, F. J.: *Food in China, a cultural and historical inquiry*, CRC Press, Boca Raton, **1991**.
- Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H.: *Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwerttabellen 1986/87*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1986**.

- Stafford, H. A.: *Flavonoid metabolism*, CRC Press, Boca Raton, **1990**.
- Stahl, E.: *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, **1967**.
- Stapleton, A. E.; Walbot, V.: Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage, *Plant Physiol.*, **1994**, *105*, 881-889.
- Stommel, J. R.; Whitaker, B. D.: Phenolic acid content and composition of eggplant fruit in a germplasm core subset, *J. Am. Soc. Horticult. Sci.*, **2003**, *128*, 704-710.
- Sudheesh, S.; Presannakumar, G.; Vijayakumar, S.; Vijayalakshmi, N. R.: Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongena*, *Plant Foods Human Nutr.*, **1997**, *51*, 321-330.
- Tabata, M.: Chemotypes and pharmacological activities of *Perilla*, in: *Perilla: the genus perilla*, (Eds.: H.-C. Yu, K. Kosuna, M. Haga), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1997**, 129-142.
- Takahashi, K.; Yoshizawa, K.: Red rice pigments and brewing of alcoholic beverages containing them, *J. Brew. Soc. Japan*, **1987**, *82*, 740-747.
- Takano, H.; Osakabe, N.; Sanbongi, C.; Yanagisawa, R.; Inoue, K.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Baba, S.; Ichiishi, E.; Yoshikawa, T.: Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans, *Exp. Biol. Med.*, **2004**, *229*, 247-254.
- Takeda, H.; Tsuji, M.; Inazu, M.; Egashira, T.; Matsumiya, T.: Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, **2002**, *449*, 261-267.
- Terahara, N.; Saigusa, N.; Ohba, R.; Ueda, S.: Composition of anthocyanin pigments in aromatic red rice and its wine, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **1994**, *41*, 519-522.
- Tsuda, T.; Ohshima, K.; Kawakishi, S.; Osawa, T.: Oxidation products of cyanidin 3-O- β -D-glucoside with a free radical initiator, *Lipids*, **1996**, *31*, 1259-1263.
- Tsuda, T.; Watanabe, M.; Ohshima, K.; Norinobu, S.; Choi, S.-W.; Kawakishi, S.; Osawa, T.: Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -glucoside and cyanidin, *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, *42*, 2407-2410.
- Ueda, H.; Yamazaki, C.; Yamazaki, M.: Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*, *Biol. Pharm. Bull.*, **2002**, *25*, 1197-1202.
- Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, *160*, 1-40.
- Vidal, S.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Skouroumounis, G.; Hayasaka, Y.: Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 7144-7151.
- Vitaglione, P.; Donnarumma, G.; Napolitano, A.; Galvano, F.; Gallo, A.; Scalfi, L.; Fogliano, V.: Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides, *J. Nutr.*, **2007**, *137*, 2043-2048.

- Walters, D. R.: Polyamines in plant-microbe interactions, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **2000**, *57*, 137-146.
- Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L.: Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 304-309.
- Wang, X.; Ikeguchi, Y.; McCloskey, D. E.; Nelson, P.; Pegg, A. E.: Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 51370-51375.
- Wang, Y.; Mi, J.; Shan, X. Y.; Wang, Q. J.; Ge, K. Y.: Is China facing an obesity epidemic and the consequences? The trends in obesity and chronic disease in China, *Int. J. Obesity*, **2007**, *31*, 177-188.
- Watzl, B.; Briviba, K.; Rechkemmer, G.: Anthocyane, *Ernähr.-Umsch.*, **2002**, *49*, 148-150.
- Watzl, B.; Rechkemmer, G.: Flavonoide, *Ernähr.-Umsch.*, **2001b**, *48*, 499-503.
- Watzl, B.; Rechkemmer, G.: Phenolsäuren, *Ernähr.-Umsch.*, **2001a**, *48*, 413-416.
- Wei, Y.; Zhang, T.; Ito, Y.: Preparative separation of rhein from chinese traditional herb by repeated high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2003**, *1017*, 125-130.
- Whitaker, B. D.; Stommel, J. R.: Distribution of hydroxycinnamic acid conjugates in fruit of commercial eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 3448-3454
- WHO/FAO - Report of the Joint WHO/FAO expert consultation: Diet, nutrition, and the prevention of chronic disease, *WHO Technical Report Series*, **2002**, *916*.
- Williams, C. A.; Harborne, J. B.; Mayo, S. J.: Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family araceae, *Phytochemistry*, **1981**, *20*, 217-234.
- Winter, M.; Herrmann, K.: Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, **1986**, *34*, 616-620.
- Wu, H.; Min, J.; Ikeguchi, Y.; Zeng, H.; Dong, A.; Loppnau, P.; Pegg, A. E.; Plotnikov, A. N.: Structure and mechanism of spermidine synthases, *Biochemistry*, **2007**, *46*, 8331-8339.
- Wu, X.; Cao, G.; Prior, R. L.: Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry, *J. Nutr.*, **2002**, *132*, 1865-1871.
- Wu, X.; Prior, R. L.: Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 3101-3113.
- Xia, M.; Ling, W. H.; Ma, J.; Kitts, D. D.; Zawistowski, J.: Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice, *J. Nutr.*, **2003**, *133*, 744-751.
- Yamazaki, M.; Nakajima, J.-I.; Yamanashi, M.; Sugiyama, M.; Makita, Y.; Springob, K.; Awazuhara, M.; Saito, K.: Metabolomics and differential gene expression in anthocyanin chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*, *Phytochemistry*, **2003**, *62*, 987-995.

Yoon, H. H.; Paik, Y. S.; Kim, J. B.; Hahn, T. R.: Identification of anthocyanins from Korean pigmented rice, *Kor. J. Agric. Chem. Soc.*, **1995**, *38*, 581-583.

Yoshida, K.; Kameda, K.; Kondo, T.: Diglucuronoflavones from purple leaves of *Perilla ocimoides*, *Phytochemistry*, **1993**, *33*, 917-919.

Yoshida K.; Kondo, T.; Kameda, K.; Goto, T.: Structure of anthocyanins isolated from purple leaves of *Perilla ocimoides* L. var. *crispa* benth and their isomerization by irradiation of light, *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, *54*, 1745-1751.

Yoshida, K.; Okuno, R.; Kameda, K.; Mori, M.; Kondo, T.: Influence of E,Z-isomerization and stability of acylated anthocyanins under the UV irradiation, *Biochem. Eng.*, **2003**, *14*, 163-169.

Yu, H.-C.: Perilla and the treatment of allergy – A review, in: *Perilla: the genus perilla*, (Eds.: H.-C. Yu, K. Kosuna, M. Haga), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1997**, 55-70.

Zhang, L.-Y.; Cosma, G.; Gardner, H.; Vallyathan, V.; Castranova, V.: Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical, *Mol. Cell. Biochem.*, **2003**, *247*, 205-210.

7 Anhang

Tabelle 19: Ausbeuten der Pflanzenextrakte

	<i>Solanum melongena</i>	<i>Perilla frutescens</i>	<i>Oryza sativa</i> *	<i>Xanthosoma violaceum</i>
Einwaage Pflanzenmaterial [g]	(a) 401,3 (b) 370,0	646,0	915,8	4900,0
Auswaage <i>n</i>-Hexan-Extrakt [g]	(a) 0,7 (b) 0,5	6,4	0,4	2,1
Auswaage Dichlormethan-Extrakt [g]	(a) 0,1 (b) 0,2	1,8	0,1	0,6
Auswaage Ethylacetat-Extrakt [g]	(a) 0,2 (b) 0,3	2,2	0,3	1,6
Auswaage Methanol-Extrakt [g]	(a) 8,2	-	-	-
Auswaage essigsaurer Methanol-Extrakt [g]	(b) 7,1	17,4	5,2	0,3

* von *Oryza sativa* wurde für die Trennung mittels LSRCCC ein weiterer Extrakt hergestellt. Auf die Extraktion mit Ethylacetat und Dichlormethan wurde verzichtet. 12,8 kg Reissamen wurden eingewogen und nach Entfetten mit *n*-Hexan direkt mit Methanol/HOAc (19/1) extrahiert. Die Auswaage des essigsauren Methanol-Extraktes betrug 52,1 g.

Tabelle 20: Ausbeuten der präparativen Trennungen der Pflanzenextrakte

Extrakt/Fraktion	Ausbeute [mg]	Extrakt/Fraktion	Ausbeute [mg]
<i>Solanum melongena</i>			
<u>Methanol-Extrakt</u>		<u>Methanol/HOAc-Extrakt</u>	
Einwaage: 451,2 mg		Einwaage: 400,1 mg	
HSCCC-Fraktion 1	101,5	HSCCC-Fraktion 1	163,2
HSCCC-Fraktion 2	21,45	HSCCC-Fraktion 2	16,1
HSCCC-Fraktion 3	125,1	HSCCC-Fraktion 3	124,7

Extrakt/Fraktion	Ausbeute [mg]	Extrakt/Fraktion	Ausbeute [mg]
HSCCC-Fraktion 4	79,8	HSCCC-Fraktion 4	12,7
HSCCC-Fraktion 5	35,3	HSCCC-Fraktion 5	26,2
HSCCC-Fraktion 6	7,7	HSCCC-Fraktion 6	45,2
HSCCC-Fraktion 7	6,3	HSCCC-Fraktion 7	112,0
HSCCC-Fraktion 8	74,0		

Perilla frutescens

<u>Methanol/HOAc-Extrakt</u>		<u>HSCCC-Fraktion 1</u>	
Einwaage: 680,1 mg		Einwaage: 557,6 mg	
HSCCC-Fraktion 1	116,9	HSCCC-Fraktion 1.1	85,2
HSCCC-Fraktion 2	75,6	HSCCC-Fraktion 1.2	52,3
HSCCC-Fraktion 3	128,7	HSCCC-Fraktion 1.3	79,4
HSCCC-Fraktion 4	37,6	HSCCC-Fraktion 1.4	102,5
HSCCC-Fraktion 5	111,7	HSCCC-Fraktion 1.5	190,7
HSCCC-Fraktion 6	209,6	HSCCC-Fraktion 1.6	27,7
		HSCCC-Fraktion 1.7	19,8
<u>HSCCC-Fraktion 6</u>			
Einwaage: 682,5 mg			
Seph.-Fraktion 1	69,5	Seph.-Fraktion 5	152,9
Seph.-Fraktion 2	39,4	Seph.-Fraktion 6	34,4
Seph.-Fraktion 3	48,3	Seph.-Fraktion 7	16,4
Seph.-Fraktion 4	27,1	Seph.-Fraktion 8	165,1

Oryza sativa

<u>Methanol/HOAc-Extrakt</u>		<u>HSCCC-Fraktion 2</u>	
Einwaage: 474,8 mg		Einwaage: 183,4 mg	
HSCCC-Fraktion 1	168,5	HSCCC-Fraktion 2.1	32,3
HSCCC-Fraktion 2	72,5	HSCCC-Fraktion 2.2	68,3

Extrakt/Fraktion	Ausbeute [mg]	Extrakt/Fraktion	Ausbeute [mg]
HSCCC-Fraktion 3	149,6	HSCCC-Fraktion 2.3	46,8
HSCCC-Fraktion 4	84,2	HSCCC-Fraktion 2.3	36,0
<u>HSCCC-Fraktion 1</u>		<u>Seph.-Fraktion 1 und 5</u>	
Einwaage: 10,4 g		Einwaagen: 2,0 g, 0,66 g	
Seph.-Fraktion 1	2,9	Präz.-Fraktion 1.1	15,0
Seph.-Fraktion 2	2,1	Präz.-Fraktion 1.2	241,9
Seph.-Fraktion 3	1,5	Präz.-Fraktion 1.3	38,2
Seph.-Fraktion 4	0,5	Präz.-Fraktion 5.1	28,1
Seph.-Fraktion 5	0,8	Präz.-Fraktion 5.2	50,8

Xanthosoma violaceum

<u>Ethylacetat-Extrakt</u>			
Einwaage: 384,8 mg			
HSCCC-Fraktion 1	213,9	HSCCC-Fraktion 4	18,9
HSCCC-Fraktion 2	112,2	HSCCC-Fraktion 5	17,5
HSCCC-Fraktion 3	22,3		

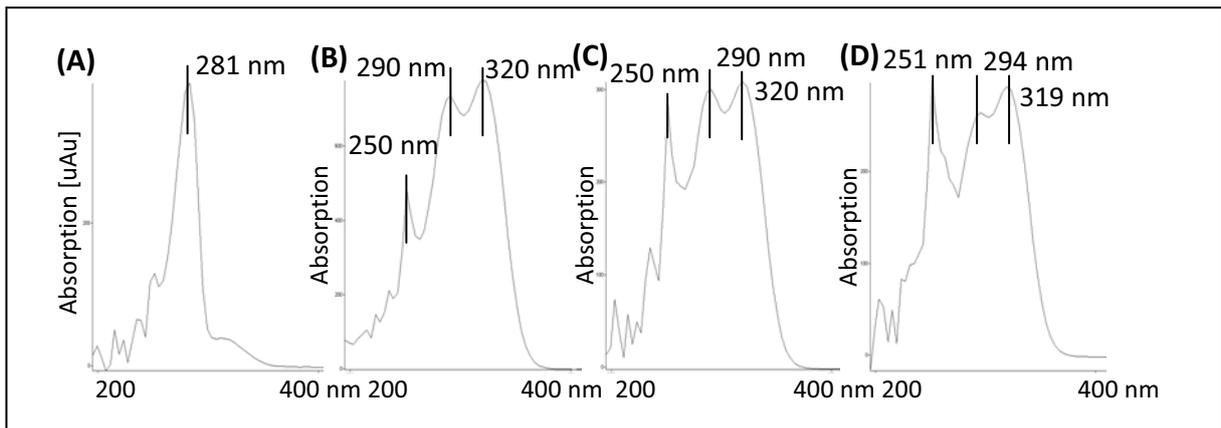


Abbildung 87: UV-Spektren der Caffeoylspermidin-Derivate (A) A2, (B) A3, (C) A4, (D) A5 aus *Solanum melongena*

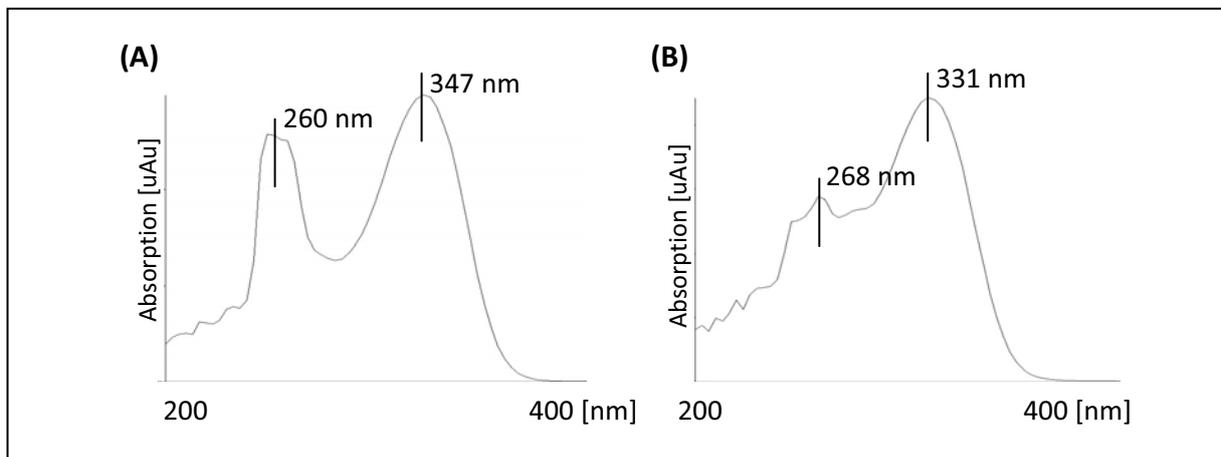


Abbildung 88: UV-Spektren der Flavone (A) P1 und (B) P2 aus *Perilla frutescens*

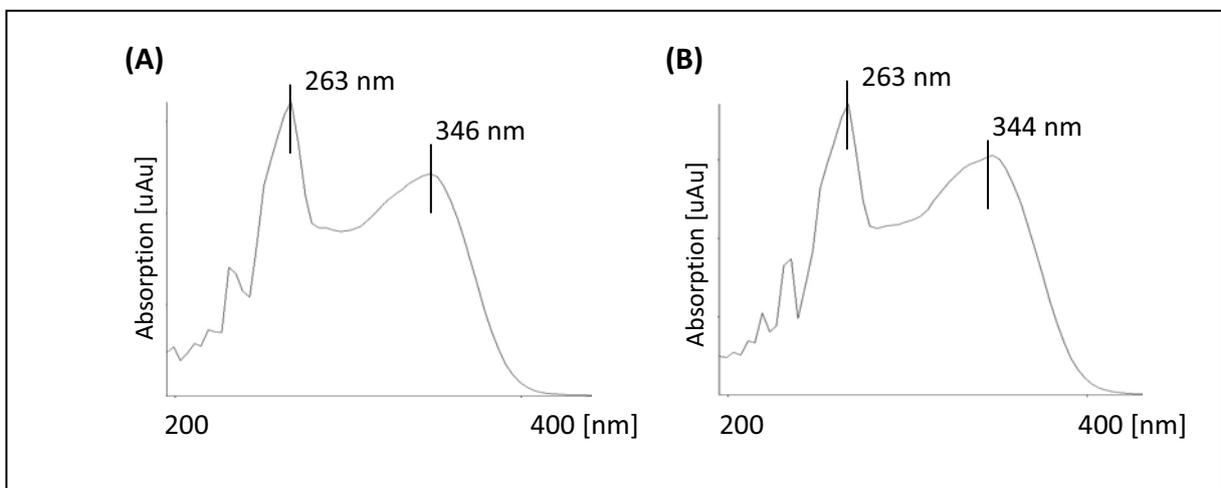


Abbildung 89: UV-Spektren der Flavonole (A) Ta und (B) Tb aus *Xanthosoma violaceum*

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der antioxidativen und zytotoxischen Aktivitäten der Pflanzenextrakte, Fraktionen und Reinverbindungen

	Antioxidative Aktivität [mmol Trolox/g]	Zytotoxizität Probenkonzentration [%]:		
		10 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL
<i>Solanum melongena</i>				
Methanol-Extrakt	1,75	2	14	36
HSCCC-Fraktion 1	0,86	2	16	36
HSCCC-Fraktion 2	2,31	4	8	36
A2	2,41	0	20	36
HSCCC-Fraktion 3	2,81	0	18	36
HSCCC-Fraktion 4	2,75	4	10	28
HSCCC-Fraktion 5	1,52	2	6	6
HSCCC-Fraktion 6	1,04	0	4	6
HSCCC-Fraktion 7	0,75	0	4	6
HSCCC-Fraktion 8	2,10	0	4	20
Methanol/HOAc-Extrakt	2,91	0	4	10
HSCCC-Fraktion 1	1,34	0	16	22
HSCCC-Fraktion 2	2,38	0	8	20
HSCCC-Fraktion 3	2,24	0	20	22
A9	1,87	0	0	0
HSCCC-Fraktion 4	2,97	0	26	28
HSCCC-Fraktion 5	2,07	0	4	10
HSCCC-Fraktion 6 (A6)	3,14	0	28	38
HSCCC-Fraktion 7 (A7)	3,29	2	19	37
Ethylacetat-Extrakt	1,38	0	8	16
Dichlormethan-Extrakt	0,73	0	0	0
Hexan-Extrakt	n.n.	0	0	4

	Antioxidative Aktivität	Zytotoxizität		
		Probenkonzentration [%]:		
	[mmol Trolox/g]	10 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL
<i>Perilla frutescens</i>				
Methanol/HOAc-Extrakt	1,31	0	0	4
HSCCC-Fraktion 1	1,14	0	0	0
HSCCC-Fraktion 1.1	1,31	-	-	-
HSCCC-Fraktion 1.2	1,22	-	-	-
HSCCC-Fraktion 1.3	1,04	-	-	-
HSCCC-Fraktion 1.4	1,44	-	-	-
HSCCC-Fraktion 1.5	1,84	-	-	-
HSCCC-Fraktion 1.6	1,74	-	-	-
HSCCC-Fraktion 1.7	1,42	-	-	-
HSCCC-Fraktion 2	0,45	0	0	0
HSCCC-Fraktion 3	0,95	0	0	8
P1	0,81	0	0	0
HSCCC-Fraktion 4	0,89	0	0	0
P5	0,87	0	0	0
P7	1,03	0	0	0
HSCCC-Fraktion 5	1,13	0	0	0
P2	0,74	0	0	0
HSCCC-Fraktion 6	1,89	0	4	15
Seph.-Fraktion 6.1	0	3	22	71
Seph.-Fraktion 6.2	0	0	0	2
Seph.-Fraktion 6.3	0,05	0	0	61
Seph.-Fraktion 6.4	0,79	2	6	55
Seph.-Fraktion 6.5	1,41	0	0	0
Seph.-Fraktion 6.6	1,57	0	0	0
P3	1,18	0	0	0
HSCCC-Fraktion 6.7	1,57	0	0	0

	Antioxidative Aktivität	Zytotoxizität		
		Probenkonzentration [%]:		
	[mmol Trolox/g]	10 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL
P4	1,31	0	0	0
HSCCC-Fraktion 6.8	1,67	0	0	0
Ethylacetat-Extrakt	0,88	0	2	4
Dichlormethan-Extrakt	0,80	0	0	0
Hexan-Extrakt	n.n.	0	0	0

Oryza sativa

Methanol/HOAc-Extrakt	2,27	-	-	2
HSCCC-Fraktion 1	1,64	-	-	-
Seph.-Fraktion 1	0,93	-	-	-
Präz.-Fraktion 1.1	1,10	-	-	-
Präz.-Fraktion 1.2	0,92	-	-	-
Präz.-Fraktion 1.3	1,17	-	-	-
Seph.-Fraktion 2	1,30	-	-	-
Seph.-Fraktion 3	1,89	-	-	-
Seph.-Fraktion 4	2,21	-	-	-
Seph.-Fraktion 5	2,32	-	-	-
Präz.-Fraktion 5.1	1,22	-	-	-
Präz.-Fraktion 5.2	1,64	-	-	-
HSCCC-Fraktion 2	1,81	-	-	-
HSCCC-Fraktion 2.1	1,85	-	-	-
R4	1,68	-	-	-
HSCCC-Fraktion 2.2	1,75	-	-	-
HSCCC-Fraktion 2.3	1,89	-	-	-
HSCCC-Fraktion 2.4	1,47	-	-	-
HSCCC-Fraktion 3	3,41	-	-	-
R1	3,27	-	-	-

	Antioxidative Aktivität	Zytotoxizität		
		Probenkonzentration [%]:		
	[mmol Trolox/g]	10 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL
R2	1,72	-	-	-
HSCCC-Fraktion 4	1,65	-	-	-
R3	3,22	-	-	-
Ethylacetat-Extrakt	0,65	0	0	2
Dichlormethan-Extrakt	n.n.	0	0	0
Hexan-Extrakt	n.n.	0	0	0
<i>Xanthosoma violaceum</i>				
Methanol/HOAc-Extrakt	1,58	0	4	6
Ethylacetat-Extrakt	1,42	0	4	42
Dichlormethan-Extrakt	0,17	0	6	8
Hexan-Extrakt	n.n.	0	0	4

Tabelle 22: Konzentrationen der Standardlösungen, Kalibrierfunktionen und Bestimmtheitsmaß R^2 der Kalibrierreihen der Quantifizierung mittels HPLC-DAD

Standardsubstanz	Konzentration [mg/mL]	Peakfläche [uAU.Sec]	Funktion	Bestimmtheitsmaß R^2
<i>N</i> ¹ -Caffeoyl- <i>N</i> ¹⁰ ,7',8'-dihydrocaffeoyl-spermidin (A3)	0,15	301756	$y = 19109777,29x - 970063,27$	0,99
	0,45	9014720		
	0,90	17074183		
	1,80	32791354		
5-Caffeoyl(-)-Chinasäure (A7)	0,03	4191901	$y = 71419715,57x + 3217211,03$	0,99
	0,15	15762859		
	0,29	23285437		
	0,74	55.789.392		

Standardsubstanz	Konzentration [mg/mL]	Peakfläche [uAU.Sec]	Funktion	Bestimmtheitsmaß R ²
7-O-Diglucuronylluteolin (P1)	0,06	3329993		
	0,22	14204059	$y = 46793,84x + 2275198,56$	0,99
	0,58	30308818		
	0,90	43521500		
<i>trans</i> -Shisonin (P7)	0,01	630591		
	0,10	5705913	$y = 56914030,04x + 201319,04$	0,99
	0,20	12091826		
	0,45	25631609		
Cyanidin-3-glucosid (R1)	9,44	3347249		
	18,88	6514743	$y = 398662,86x - 662394,20$	0,99
	37,76	14454905		
	47,20	18194055		
Protocatechusäure (R3)	2,85	5025892		
	5,70	10994343		
	14,25	26481972		
	28,50	56971714		

Tabelle 23: Gehalte der isolierten Verbindungen in den Pflanzenteilen [mg/100 g]

Substanz	Peakfläche [uAU.Sec]	Berechnet nach Kalibrierreihe	Gehalt [mg/100 mL Eluat]	Gehalt ¹ [mg/100 g]
<i>Solanum melongena</i>				
<u>Probeneinwaage:</u>				
(a) 13,54 g, (b) 10,09 g (getrocknetes Pflanzenmaterial, Methanol-Extrakt)				
<i>N</i> -Caffeoylputrescin (A1)	(a) 2391171	A3	(a) 17,59	118,51
	(b) 1801899		(b) 14,51	
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹⁰ -7',7'',8',8''-tetrahydrocaffeoylspermidin (A2)	(a) 2686034	A3	(a) 19,13	147,65
	(b) 1999531		(b) 15,54	

Substanz	Peakfläche [uAU.Sec]	Berechnet nach Kalibrierreihe	Gehalt [mg/100 mL Eluat]	Gehalt ¹ [mg/100 g]
<i>N</i> ¹ -Caffeoyl- <i>N</i> ¹⁰ ,7',8'- dihydrocaffeoylspermidin (A3)	(a) 7388220	A3	(a) 14,74	332,98
	(b) 5641177		(b) 34,60	
<i>N</i> ¹⁰ -Caffeoyl- <i>N</i> ¹ ,7'',8''- dihydrocaffeoylspermidin (A4)	(a) 2880997	A3	(a) 20,15	156,62
	(b) 2200917		(b) 16,59	
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹⁰ -Dicaffeoylspermidin (A5)	(a) 9318113	A3	(a) 53,84	431,97
	(b) 6723853		(b) 40,26	
<u>Probeneinwaage:</u>				
(a) 18,07 g, (b) 15,02 g (getrocknetes Pflanzenmaterial , Methanol/HOAc-Extrakt, 19/1, v/v)				
4-Caffeoyl(-)-Chinasäure (A6)	(a) 13692359	A7	(a) 14,67	81,90
	(b) 12081252		(b) 12,41	
5-Caffeoyl(-)-Chinasäure (A7)	(a) 55230812	A7	(a) 81,84	434,78
	(b) 47908511		(b) 62,58	
3-Caffeoyl(-)-Chinasäure (A8)	(a) 7398985	A7	(a) 5,86	30,76
	(b) 6340125		(b) 4,37	

Perilla frutescensProbeneinwaage:

(a) 5,94 g, (b) 4,03 g (getrocknetes Pflanzenmaterial, Methanol/HOAc-Extrakt, 19/1, v/v)

7-O-Diglucuronylluteolin (P1)	(a) 14992137	P1	(a) 27,18	448,73
	(b) 10571433		(b) 17,73	
7-O-Diglucuronylapigenin (P2)	(a) 4590481	P1	(a) 4,95	66,55
	(b) 3214417		(b) 2,01	
<i>trans</i> -Shisonin (P7)	(a) 1988519	P7	(a) 3,14	52,73
	(b) 1407251		(b) 2,12	
<i>trans</i> -Malonylshisonin (P5)	(a) 9908396	P7	(a) 17,06	279,96
	(b) 6458972		(b) 10,99	

Substanz	Peakfläche [uAU.Sec]	Berechnet nach Kalibrierreihe	Gehalt [mg/100 mL Eluat]	Gehalt ¹ [mg/100 g]
<i>Oryza sativa</i>				
<u>Probeneinwaagen:</u>				
(a) 7,71 g, (b) 8,73 g (Reissamen gemahlen, Methanol/HOAc-Extrakt, 19/1, v/v)				
Cyanidin-3-glucosid (R1)	(a) 9131961	R1	(a) 24,57	331,86
	(b) 11412099		(b) 30,29	
Peonidin-3-glucosid (R2)	(a) 917244	R1	(a) 3,96	49,88
	(b) 1031480		(b) 4,25	
Protocatechusäure (R3)	(a) 1393584	R3	(a) 1,18	15,12
	(b) 1673818		(b) 1,32	

¹Durchschnittlicher Gehalt

