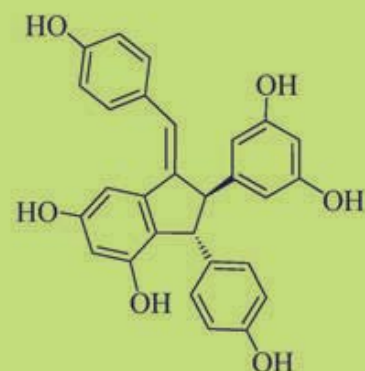
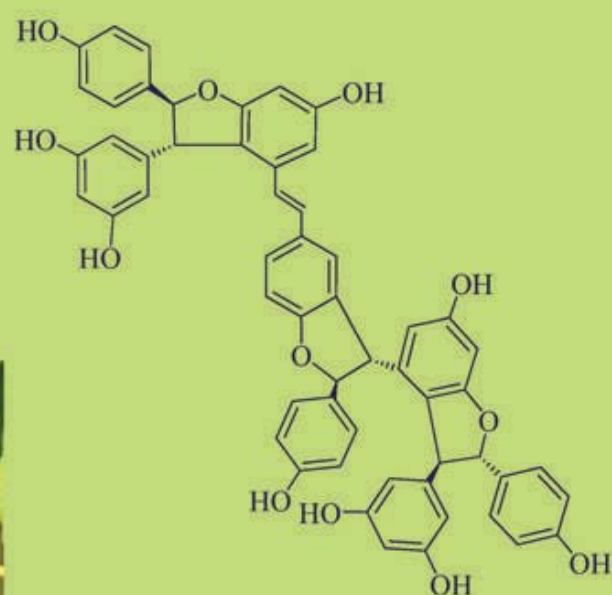
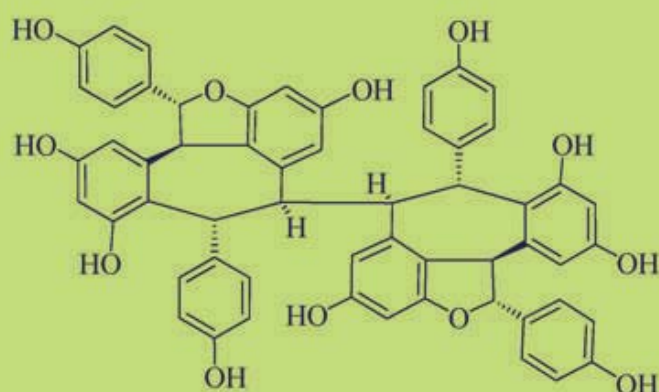


Isolierung und Strukturaufklärung von oligomeren Stilbenen aus Weinrebenextrakten



Isolierung und Strukturaufklärung von oligomeren Stilbenen aus Weinrebenextrakten

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 Andrea Julia Wilkens
aus Hannover

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2011

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2011

978-3-86955-640-6

1. Referent:	Professor Dr. Peter Winterhalter
2. Referent:	apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt
eingereicht am:	27.09.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am:	19.11.2010

Druckjahr 2011

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2011

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, 2011

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-640-6

Vorveröffentlichungen der Dissertation

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

Publikationen

Wilkens, A.; Paulsen, J.; Wray, V.; Winterhalter, P. Structures of Two Novel Trimeric Stilbenes Obtained by Horseradish Peroxidase Catalyzed Biotransformation of *trans*-Resveratrol and (-)- ϵ -Viniferin. *J. Agric Food Chem.* 58, 6754-6761 (2010).

Winterhalter, P.; Esatbeyoglu, T.; Wilkens, A. Preparative Isolation of Bioactive Constituents from Berries. In: Qian, MC, Rimando, AM (eds) Flavor and Health Benefits of Small Fruits. ACS Symposium Series 1035; Washington, DC: American Chemical Society; 267-279, (2010).

Müller, C.; Ullmann, K.; Wilkens, A.; Winterhalter, P.; Toyokuni, S.; Steinberg, P. Potent antioxidative activity of Vineatrol[®] 30 grapevine-shoot extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (8), 1831-1836 (2009).

Rentzsch, M.; Wilkens, A.; Winterhalter, P. Non-flavonoid phenolic compounds. In: Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (eds) Wine Chemistry and Biochemistry. New York: Springer, 509-527 (2009).

Tagungsbeiträge

Macke, S.; Wilkens, A.; Damm, A.; Nevo-Koch, E.; Steinberg, P.; Winterhalter, P. Isolierung und Charakterisierung von biologisch aktiven Resveratrol-Oligomeren aus Weinrebenextrakten mittels Gegenstromverteilungschromatographie. (Poster) 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart, (2010), Abstract in Druck.

Macke, S.; Wilkens, A.; Damm, A.; Winterhalter, P. Isolierung, Charakterisierung und Analytik von Resveratrol-Oligomeren aus Weinrebenextrakten mittels Gegenstromverteilungschromatographie. (Poster) Projekt: Oligomere Resveratrole als neue Functional Food Ingredients – ORFFI, 1. Statusseminar Ernährung vom BMBF, Februar 23-24, Bonn (2010).

Wilkens, A.; Paulsen, J.; Winterhalter, P. Oxidative Oligomerization of Stilbenes. (Poster) In: Proceedings of the Euro Food Chem XV. Food for the future - the contribution of chemistry to improvement of food quality. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark, Vol. II, pp 28-31 (2009).

Wilkens, A.; Rohrig, D.; Winterhalter, P. Isolierung von Stilbenen mittels High-Speed Countercurrent Chromatography. (Poster) 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, (2009), Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie 64: 84 (2010).

Wilkens, A.; Fiege, K.; Winterhalter, P. Isolation and Structure Determination of Stilbene Oligomers in Grapevine Extract (Poster) 24. International Conference of Polyphenols, Salamanca, Spanien, Polyphenols Communications, Volume I, pp. 277-278 (2008).

Wilkens, A.; Winterhalter, P.; Hermosín-Gutiérrez, I. Stilbene content of spanish Cencibel (Tempranillo) red wines. (Poster) D. Chassagne (ed), Wine Active Compounds. Proceedings of the WAC 2008 International Conference. Chaintre: OENOPLURIMEDIA, Part I, pp. 59-60 (2008).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Winterhalter für die Überlassung des interessanten Themas und das mir dabei entgegengebrachte Vertrauen. Ich bedanke mich für die großzügigen Freiräume, die Möglichkeit meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen präsentieren zu können und für die Realisierung zweier Forschungsaufenthalte im Ausland.

Herrn Prof. Dr. U. H. Engelhardt danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie Herrn Prof. Dr. I. Rustenbeck und Herrn Prof. Dr. H. Wätzig für ihr Mitwirken in der Prüfungskommission.

Ein besonders großer Dank gilt Herrn Dr. Victor Wray und seinen Mitarbeitern vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig für die Durchführung der NMR-Experimente. Seine Unterstützung, sein stetes Interesse an der Strukturaufklärung der Stilbenoligomere und seine vielen hilfreichen Anregungen haben wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Pablo Steinberg von der TiHo Hannover und Frau Prof. Dr. Sabine Kulling vom Max Rubner-Institut in Karlsruhe möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken ebenso der Firma Breko für die Bereitstellung des Weinrebenextraktes Vineatrol[®]30. Herrn Prof. Dr. Ulrich Fischer vom DLR-Rheinpfalz danke ich für die Bereitstellung der Weinreben der Rebsorte Spätburgunder und der Weine des internationalen Weinpreises „Mundus Vini“ 2008.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Dietrich von Baer von der Universidad de Concepción in Chile und Herrn Prof. Dr. Isidro Hermosín-Gutiérrez von der Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola in Ciudad Real, Spanien für die herzliche Aufnahme und kompetente Betreuung während meiner Forschungsaufenthalte. Die Zeit in ihren Instituten hat mich wissenschaftlich wie auch persönlich sehr bereichert.

Ein besonders großes Dankeschön an Frau Carola Balcke für ihre Hilfsbereitschaft, die vielen Korrekturen während der Jahre und für die sorgfältige Durchsicht meiner schriftlichen Arbeit. Frau Kathrin Fiege, Frau Doreen Rohrig und Frau Jana Paulsen danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Rahmen der Durchführung ihrer Diplomarbeiten.

Ein herzliches Dankeschön an die Mitarbeiter des Arbeitskreises, die alle durch konstruktive Gespräche und nette Teerunden für eine gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Insbesondere danke ich Frau Dr. Heike Scharnhop und Frau Dr. Stefanie Stoll für ihre Freundschaft und ihre fortwährende Unterstützung. Frau Annika Burmeister, Frau Tuba Esatbeyoglu, Herrn Dr. Nils Köhler und Herrn Fabian Weber möchte ich für ihre freundschaftliche Diskussionsbereitschaft und weiterführenden Ideen danken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie für ihre große Unterstützung während der gesamten Arbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Grundlagen und Kenntnisstand	3
2.1	Weinreben	3
2.2	Stilbene.....	4
2.2.1	Biosynthese und Vorkommen von Stilbenen	7
2.2.2	Funktion von Stilbenen in der Pflanze	10
2.2.3	Physiologische Wirkung von Stilbenen	11
2.2.4	Stilbene im Wein.....	14
2.3	Bestimmung der antioxidativen Aktivität (TEAC-Assay)	16
2.4	Enzymatische Synthese von Resveratrololigomeren	17
2.5	Countercurrent Chromatography (CCC).....	20
2.5.1	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC).....	21
2.5.2	Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC)	24
2.5.2.1	Durchführung einer Retentionsstudie	25
2.6	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie	27
2.6.1	Korrelationsspektroskopie (H,H-COSY)	29
2.6.2	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY-Experiment)	30
2.6.3	Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC-Experiment).....	30
2.6.4	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC-Experiment)	31
3	Ergebnisse und Diskussion.....	33
3.1	Stilbene: Extraktion und Probenaufarbeitung	33
3.1.1	Lösungsmittelfällung der Extrakte	35
3.2	Stilbene aus kommerziellem Weinrebenextrakt.....	37
3.2.1	Trennung und Isolierung von Stilbenen mittels HSCCC	39
3.2.2	Trennung von Stilbenen mittels LSRCCC	43
3.2.3	Strukturaufklärung der isolierten Stilbene	49
3.3	Weinrebenextrakt der Rebsorte Spätburgunder	62
3.4	Bestimmung der antioxidativen Aktivität	69
3.5	Enzymatische Synthese von Resveratrololigomeren	74
3.5.1	Synthese und Isolierung von Resveratrololigomeren.....	74

3.5.2	Strukturaufklärung der synthetisierten Resveratrololigomere	80
3.6	Stilbene im Wein	91
3.6.1	Stilbengehalte im Wein	92
3.6.2	Antioxidative Aktivität von Wein	97
4	Zusammenfassung	99
5	Material und Methoden	101
5.1	Pflanzenmaterial und Chemikalien	101
5.1.1	Pflanzenmaterial	101
5.1.2	Chemikalien	101
5.2	Geräte und Parameter	102
5.2.1	Photometer	102
5.2.2	Gefriertrocknung	102
5.2.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	103
5.2.3.1	HPLC-PDA	103
5.2.3.2	Präparative HPLC	103
5.2.3.3	HPLC-MS ⁿ	104
5.2.4	Massenspektrometer (MS)	104
5.2.5	High Resolution ESI-MS (HR-ESI-MS).....	104
5.2.6	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC).....	104
5.2.7	Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC).....	105
5.2.8	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	105
5.3	Analytische Methoden.....	105
5.3.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	105
5.3.2	HPLC-Methoden	106
5.3.3	LC-ESI-MS ⁿ	106
5.3.4	ESI-MS ⁿ	107
5.4	Präparative Methoden	107
5.4.1	Extraktion und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials.....	107
5.4.1.1	Herstellung des Weinrebenextraktes der Rebsorte Spätburgunder.....	107
5.4.1.2	Hexanfällung der Weinrebenextrakte	108
5.4.1.3	Hexanfällung der Fraktion 1 aus HSCCC-1	108
5.4.2	Enzymatische Synthese von Resveratrololigomeren	108
5.4.2.1	Reaktionsansatz zur Isolierung von <i>trans</i> - δ -Viniferin.....	108
5.4.2.2	Vorversuche für den Reaktionsansatz zur Isolierung mittels CCC.....	109
5.4.2.3	Reaktionsansatz zur Isolierung von Resveratrololigomeren mittels CCC	109
5.4.3	HSCCC-Methoden	109
5.4.4	LSRCCC-Methoden	110
5.4.5	Präparative HPLC-Methoden	110

5.5	Phloroglucinolyse des Weinrebenextraktes der Rebsorte Spätburgunder.....	111
5.6	Antioxidative Aktivität (TEAC).....	111
5.7	Weinanalytik	112
5.8	Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Reinsubstanzen.....	115
5.8.1	<i>Vitis vinifera</i>	115
5.8.2	Enzymatische Synthese	121
6	Literatur	125
7	Anhang	139

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Einheit	Bezeichnung
c	[g/L]	Konzentration
FE	[μ V*min]	Flächeneinheit
MW	[g/mol]	molare Masse
R_t	[min]	Retentionszeit
$\lambda_{\max}$	[nm]	Absorptionsmaximum

Symbol	Bezeichnung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Aceton-d ₆	deutერიertes Aceton
CCC	Countercurrent Chromatography
CHS	Chalconsynthase
CoA und CoASH	Coenzym A
COSY	Korrelationsspektroskopie (¹ H- ¹ H-Korrelationen)
DC	Dünnschichtchromatographie
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
ESI	Elektrospray-Ionisation
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
Glc	Glucosid
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horse radish peroxidase</i>)
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ID	Innendurchmesser

K ₂ S ₂ O ₈	Kaliumpersulfat
LDL-Oxidation	Low-Density Lipoprotein Oxidation
LSRCCC	Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography
m	Multiplett
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse/Ladung
NMR	Kernresonanzspektroskopie (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOE	Nuclear Overhauser Effect
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
p.a.	pro analysi
PDA	Photodiodenarray
PKS	Polyketidsynthase
ppm	parts per million
präp.	präparativ
PTFE	Polytetrafluorethylen
R ²	Bestimmtheitsmaß
RG	Reagenzglas
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSV	Resveratrol
s	Singulett
SG	Security Guard
STS	Stilbensynthase
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidative Capacity
TRAP	Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter
Trolox [®]	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure

1 Einleitung und Zielsetzung

Stilbene sind Phytoalexine und werden von der Pflanze als Reaktion auf Stressfaktoren wie z.B. Pilzbefall synthetisiert. Sie kommen hauptsächlich in Beeren, Rebhölzern und den dazugehörigen Produkten vor. Das bekannteste monomere Stilben ist *trans*-Resveratrol. Es gilt als potenter Radikalfänger und besitzt vielfältige positive Wirkungen auf den menschlichen Organismus. Durch oxidative Radikalreaktionen können aus dem Monomer vielseitige dimere und oligomere Verbindungen entstehen.

Immer öfter gelangen die oligomeren Stilbenoide in den Fokus des Interesses. Ihnen werden ebenfalls gesundheitsfördernde Eigenschaften nachgesagt, die zum Teil potenter als die des Monomers *trans*-Resveratrol sein sollen. Da die biologischen Aktivitäten der Oligomere jedoch noch nicht vollständig geklärt sind, besteht großes Interesse an weiterführenden Studien. Hierfür werden große Mengen an Reinsubstanzen benötigt, welche in den meisten Fällen zuvor erst mühsam aus dem Pflanzenmaterial isoliert werden müssen. Bei komplexen Naturstoffgemischen wie einem Weinrebenextrakt ist die Entwicklung effizienter Isolierungsstrategien erforderlich. Oft ist die Kombination unterschiedlicher Aufreinigungs-, Konzentrierungs- und Isolierungsverfahren nötig, um die bioaktiven Verbindungen in Standardqualität zu erhalten. Um die Stilben-Forschung voranzutreiben, ist die Entwicklung neuer, effizienter Isolierungstechniken zwingend erforderlich. Hierdurch wäre z.B. die Gewinnung großer Mengen hochaktiver Stilbenoligomere aus dem bei der Weinherstellung als Abfallstoff anfallenden Rebholz denkbar.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von Strategien zur Isolierung von Stilbenoiden aus Weinrebenextrakten. Im Vordergrund steht hierbei die Bereitstellung von oligomeren Resveratrol-Derivaten, welche als Minorkomponenten in diesen Extrakten vorliegen. Zur Isolierung der bioaktiven Verbindungen soll die High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) eingesetzt werden, da sie besonders gut für die Trennung von labilen Naturstoffen, wie den licht- temperatur- und sauerstoffempfindlichen Stilbenoiden geeignet ist. Dies umfasst zusätzlich die Entwicklung einer effizienten Probenaufarbeitung zur Eliminierung von Störsubstanzen. Ein Scale-up soll mittels Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) durchgeführt werden, um die Minorkomponenten der

Weinrebenextrakte im präparativen Maßstab zugänglich zu machen. Die Strukturaufklärung der isolierten Stilbenoide erfolgt anschließend mittels Massenspektrometrie sowie ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie. Ein alternativer biomimetrischer Weg zur Darstellung von Resveratrololigomeren eröffnet sich durch Einsatz der Meerrettichperoxidase. Im Fokus steht hierbei die Darstellung neuer, unbekannter Resveratrololigomere. Die antioxidative Aktivität von Stilbenoiden wird durch Anwendung des TEAC-Assays bewertet. Des Weiteren wird ein Screening zum Vorkommen von Stilbenoiden in Wein durchgeführt.

2 Grundlagen und Kenntnisstand

2.1 Weinreben

Die Weinrebe ist aus botanischer Sicht eine hochrankende Schlingpflanze, die als Wildrebe in lichten Wäldern wächst und große Ausmaße erlangen kann. Sie gehört zur Familie der Weinrebengewächse (*Vitaceae*), welche etwa 800 verschiedene Arten umfasst, die überwiegend als Kletterpflanzen oder Lianen, seltener in Form von Sträuchern oder Bäumen mit sukkulenten Stämmen, auftreten. Die Klettersträucher sind meist sommergrün und besitzen verzweigte oder unverzweigte Ranken (HILLEBRAND, 1978).

Fossile Funde zeigen, dass Reben schon seit etwa 80 Millionen Jahren existieren. Die Echte Weinrebe (*ssp. vinifera*), die auf die Wildrebe *Vitis silvestris* zurückzuführen ist, wird vermutlich seit etwa 5000 Jahren kultiviert (VOGT, 1977). Aufgrund von Mutation, Selektion und Kreuzung gibt es zahlreiche Sorten, von denen aber nur wenige angebaut werden (AICHELE und SCHWEGLER, 2000).

Mit ihren Früchten als Quelle von Wein ist *Vitis vinifera ssp. vinifera* einer der bekanntesten und wirtschaftlich bedeutendsten Vertreter der Weinrebengewächse. Die 5-12 cm breiten Blätter sind fünflappig, grob gezähnt und befinden sich gegenständig an den Trieben. Die Sprossen sind sympodial angeordnet. Die Blüten der Weinrebe bestehen aus einem kurzen Kelch mit fünf Kronblättern und wachsen in geschlossenen Blütenständen, den sogenannten Rispen. Nach der Blütezeit im Juni bilden die oberständigen Fruchtknoten saftige gelbgrüne oder blauviolette Beeren aus, die hartschalige Samen enthalten und im September oder Oktober reif werden (AICHELE und SCHWEGLER, 2000, HECKER, 1985, HILLEBRAND, 1978). Abbildung 2.1 stellt einen einjährigen Weinrebetrieb dar.



Abbildung 2.1: Einjähriger Weinrebetrieb (©Rainer Sturm/pixelio.de)

Weinreben können 200-300 Jahre alt werden und entwickeln dabei dicke Stämme. Sie wachsen auf fast allen Böden in gemäßigtem Klima (Jahresdurchschnittstemperatur von 9 °C) (HILLEBRAND, 1978). Die besten Bedingungen herrschen in den warm-gemäßigten Zonen, wie z.B. in Kalifornien, in Südafrika oder im Mittelmeerraum. In feucht-warmen Klimazonen treten vermehrt Pilzkrankheiten auf, wogegen in trockenen Klimazonen die Entwicklung tierischer Schädlinge begünstigt ist (VOGT, 1977).

Die Früchte der Weinrebe werden als frische Tafeltrauben oder getrocknet als Rosinen verspeist. Sie können auch zu Traubensaft oder fermentativ zu alkoholischen Getränken wie Wein und Schaumwein (Keltertrauben) oder weiter zu Essig verarbeitet werden. Aus den Kernen wird Traubenkernöl und aus den Beerenhülsen sowie dem Tester wird durch eine ethanolische Extraktion der Lebensmittelzusatzstoff E 163 gewonnen. E 163 setzt sich aus den Pflanzenfarbstoffen der Traube, den Anthocyanen (Polyphenole) zusammen und wird zum Färben von Lebensmitteln verwendet.

2.2 Stilbene

Stilbene gehören zu der Klasse der nichtflavonoiden Polyphenole. Unter der Bezeichnung „Polyphenole“ werden Verbindungen zusammengefasst, die zwei oder mehr aromatische Hydroxylgruppen im Molekül besitzen. Es handelt sich um unterschiedliche Substanzklassen, deren Übersicht in Abbildung 2.2 dargestellt ist. Polyphenole werden zu den sekundären Pflanzenstoffen gezählt. Sie tragen in vielen Obst und Gemüsesorten als bioaktive Substanzen zum Geschmack und zur Farbgebung bei (FRAGA, 2010).

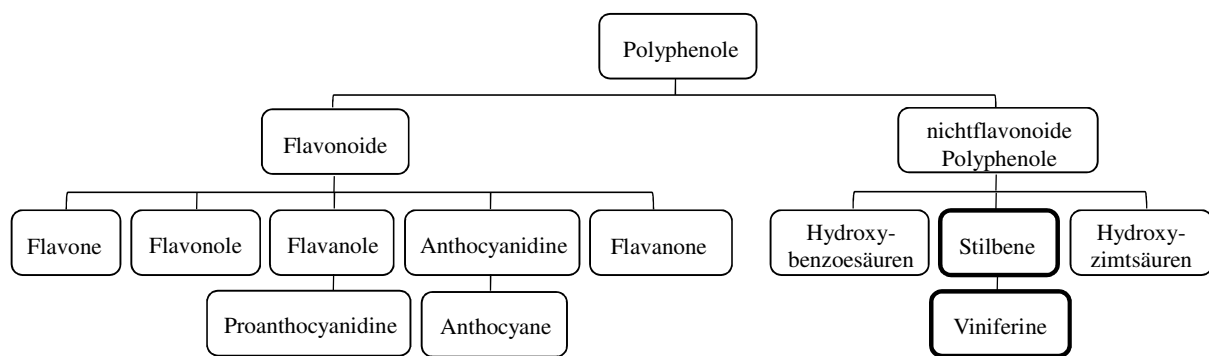


Abbildung 2.2: Übersicht über polyphenolische Substanzklassen (nach IRITI und FAORO, 2009)

Stilbene sind sauerstoff-, temperatur- und lichtempfindliche Verbindungen. Ihr Grundgerüst besteht aus einem C-14-Körper, welcher sich aus zwei Phenylringen, die durch eine Ethylenbrücke verbunden sind, zusammensetzt. In Pflanzen kommen Stilbene neben freien Hydroxyverbindungen auch als Methylester (Pterostilbene) oder in glycosilierter Form vor. Das bekannteste und meist erforschte Stilben ist das Resveratrol (3,4',5-Trihydroxystilben). Es kann in zwei isomeren Formen (*trans*- und *cis*-konfiguriert) sowie als Aglycon oder β -glucosiliertes Piceid (3,4',5-Trihydroxystilben-3- β -D-glucosid) vorliegen (HART, 1981). In Abbildung 2.3 werden die chemischen Strukturen verschiedener Stilbene vorgestellt. Die Isomere des Resveratrols sind in Form des *trans*-Resveratrols (**1**), *cis*-Resveratrols (**2**) und des *trans*-Piceids (**3**) abgebildet. Ein bekanntes Resveratrol-Derivat ist das 3,3',4',5-Tetrahydroxystilben Piceatannol (**4**), welches eine zusätzliche Hydroxygruppe trägt. Stilbene werden des Weiteren als oligomere Verbindungen, den sogenannten Viniferinen, in Pflanzen nachgewiesen. Sie entstehen durch oxidative Kopplung des Monomers Resveratrol und auch weiteren Stilbenoligomeren (vergl. Abschnitt 2.4). Beispiele für bekannte Resveratrol-Dimere (**5**, **6**, **7**, **8**, **9**), Trimere (**10**, **11**) und Tetramere (**12**, **14**) sind ebenfalls in Abbildung 2.3 zu finden. Bei den größten, bis heute strukturell vollständig aufgeklärten Oligomeren handelt es sich um Resveratrol-Octamere wie z.B. das Vateriaphenol A (**13**). Dieses Stilben wurde jedoch nicht aus *Vitis vinifera*, sondern aus der Rinde von *Vateria indica*, einer Dipterocarpaceae isoliert (ITO et al., 2001). Ein detaillierter Überblick über Stilbenoligomere wurde von CICHEWICZ und KOUZI (2002) sowie von YOSHIKI und MASATAKE (2001) zusammengestellt.

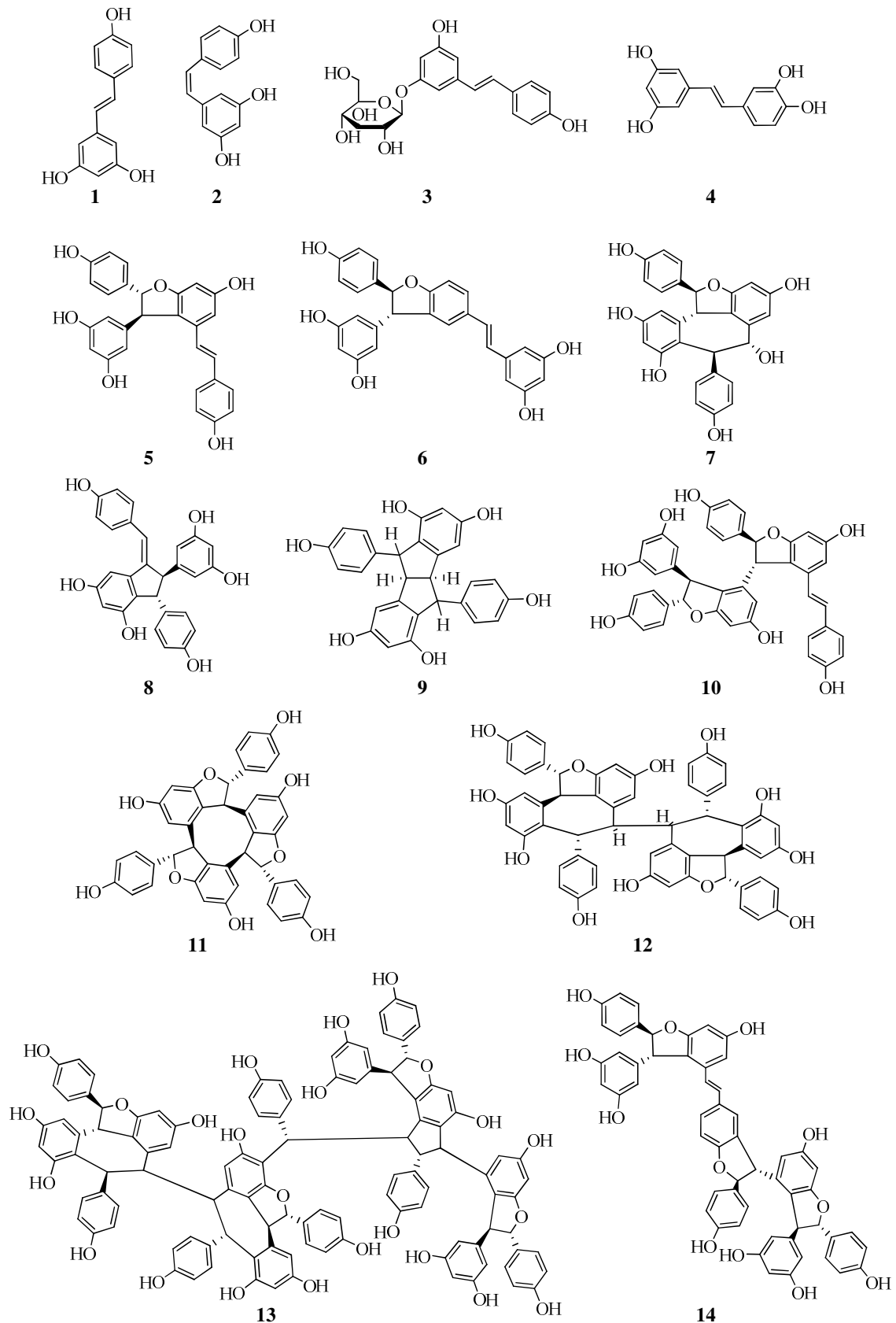


Abbildung 2.3: Chemische Strukturen von *trans*-Resveratrol (1), *cis*-Resveratrol (2), *trans*-Piceid (3), *trans*-Piceatannol (4), *trans*- ϵ -Viniferin (5), *trans*- δ -Viniferin (6), Ampelopsin A (7), Partenocissin A (8), Pallidol (9), Miyabenol C (10), α -Viniferin (11), Hopeaphenol (12), Vateriaphenol A (13), r-Viniferin (14)

SOTHEESWARAN und PASUPATHY (1993) verfassten eine einfache, dichotomische Klassifizierung, bei der Stilbenoligomere anhand eines Strukturmerkmals unterschieden werden. Zu der „Gruppe A“ gehören demnach Stilbene, die ein oder mehrere 2,3-Dihydrobenzofuransysteme enthalten, wie z.B. das Resveratrol-Dimer *trans-ε*-Viniferin (Abbildung 2.3, 5). Die „Gruppe B“ bilden alle Verbindungen ohne dieses Ringsystem (vergl. Abbildung 2.3, Pallidol 9). Des Weiteren kann die Einteilung auf die unterschiedliche Biogenese der Substanzen übertragen werden. Stilbenoligomere der Gruppe A werden ausnahmslos über das Intermediat *trans-ε*-Viniferin gebildet, während die Verbindungen der Gruppe B direkt aus Resveratrol-Einheiten ohne Bildung des Intermediates aufgebaut werden (ITO et al., 2005). In den folgenden Kapiteln wird die Substanzklasse der Stilbene näher erläutert.

2.2.1 Biosynthese und Vorkommen von Stilbenen

Biosynthese von Stilbenen

Stilbenoide entstammen dem generellen Phenylpropanoid-Stoffwechsel. Alle höheren Pflanzen können die für die Biosynthese benötigten Vorstufen Malonyl-CoA und CoA-veresterte Zimtsäurederivate synthetisieren, jedoch nur wenige Pflanzenarten sind zur Bildung von Stilbenoiden fähig (CHONG et al., 2009).

Das Schlüsselenzym für die Biosynthese von Stilbenen ist die Stilbensynthase (STS), welche nicht kontinuierlich exprimiert, sondern überwiegend infolge des Abwehrmechanismus der Pflanze als Antwort auf Stressfaktoren gebildet wird. Sie benötigt die gleichen Prekursoren wie die Chalconsynthase (CHS), ein essentielles Enzym, das an der Biosynthese von Chalconen, einer Vorstufe der Flavonoide, beteiligt ist. Beide Enzyme gehören zur Familie der Polyketidsynthasen (PKS) und unterscheiden sich in ihren Sequenzen lediglich an 35 Aminosäure-Positionen. Während das Enzym CHS ubiquitär in Pflanzen vorkommt, sind nur wenige Pflanzen in der Lage, die STS zu exprimieren (GORHAM, 1995, SCHRÖDER et al., 1993, TROPF et al., 1994, JEANDET et al., 2002).

Die anfänglichen Schritte der Stilbenoid- und Flavonoid-Synthese (Abbildung 2.4) sind äquivalent. Aus einem CoA-veresterten Zimtsäurederivat wird durch eine Kondensationsreaktion mit drei Malonyl-CoA das lineare Tetraketid-Intermediat Styryl-3,5,7-triketoheptansäure gebildet.

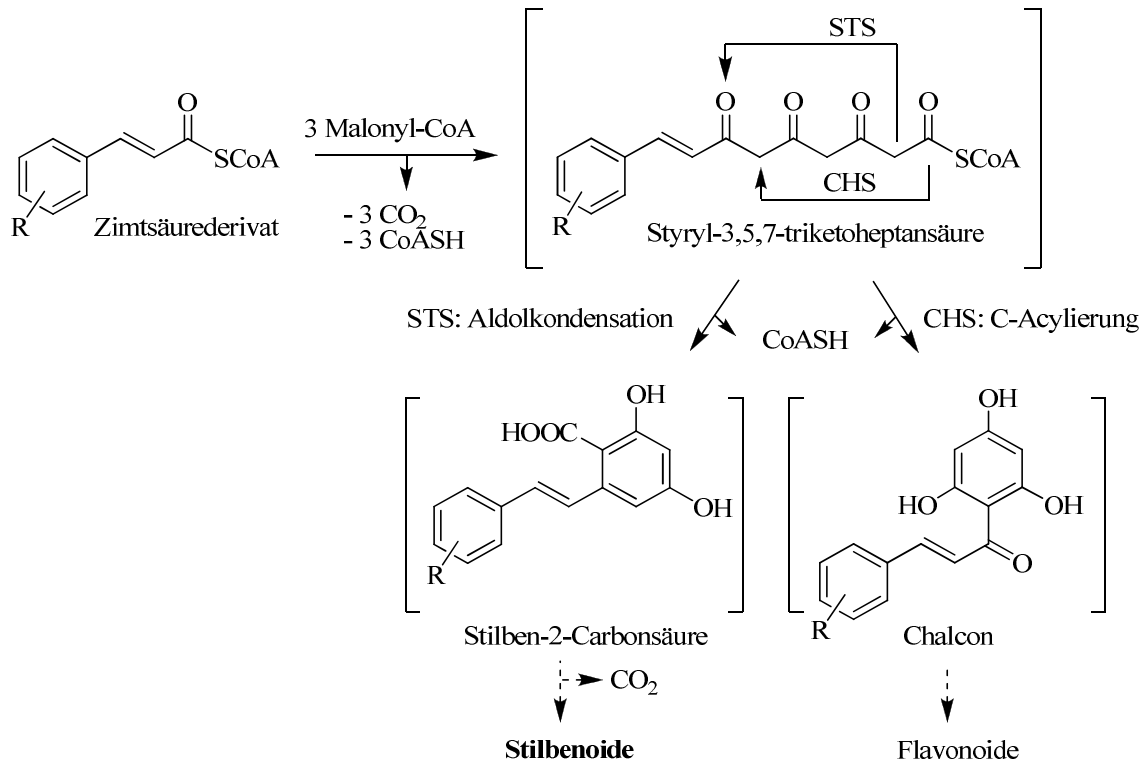


Abbildung 2.4: Schema des gemeinsamen Biosyntheseweges von Stilbenoiden und Flavonoiden (nach GORHAM, 1995 und TROPF et al., 1994)

Bei dem anschließenden intramolekularen Ringschluss des Intermediates trennen sich die beiden Biosynthesewege. Mittels STS katalysierter Aldolkondensation entsteht eine Stilben-2-Carbonsäure. Es folgt eine Abspaltung der endständigen Carboxyl-Gruppe in Form von Kohlendioxid, welches bei der Chalconsynthese-Reaktion nicht stattfindet. Durch die Decarboxylierung zum Stilbenoid entsteht ein C₆-C₂-C₆-Körper. Ein Phenylring der C₆-C₂-C₆-Grundstruktur stammt hierbei von dem Zimtsäurederivat, der andere Phenylring ist aus den drei Malonyl-CoA-Einheiten aufgebaut. Die CHS katalysiert hingegen eine C-Acylierung (Claisen-Kondensation), bei der ein Chalcon entsteht. Das Chalcon (C₆-C₃-C₆) wird zu dem Flavanon Naringenin konvertiert, welches eine Vorstufe für Flavone, Flavonole, Flavanole und Anthocyane ist (GORHAM, 1995, CHONG et al., 2009).

Die Aktivitäten der Enzyme STS und CHS werden abhängig von dem Entwicklungsstadium der Pflanze unterschiedlich reguliert. Während der Reifung nimmt die Stilbenakkumulation in den Trauben ab, während die Synthese von Anthocyanen zunimmt. Die rote Farbe der Trauben wird gebildet und gleichzeitig steigt aufgrund der geringeren Resveratrol-Konzentration die Empfindlichkeit gegenüber Grauschimmel an. Kommt es jedoch während der Erntezeit zu einer Grauschimmelinfection, wird die Synthese von

Resveratrol forciert, ohne die Farbentwicklung negativ zu beeinflussen (IRITI und FAORO, 2009, JEANDET et al., 1995b).

Aufgrund der Fähigkeit von Stilbenen, der Weinrebe Resistenzen gegen Krankheiten zu verleihen, gerät der STS-Gen-Transfer und somit die Herstellung von transgenen Pflanzen immer mehr in den Fokus des Interesses. Die Toleranzen der Pflanzen gegen pathogene Mikroorganismen sollen somit erhöht und die Qualität der gewonnenen Lebensmittel durch eine vermehrte Expression von bioaktiven Inhaltsstoffen gesteigert werden. Erste positive Ergebnisse von Stilbenexpression in neuen transgenen Pflanzen konnten bereits erzielt werden (JEANDET et al., 2002, THOMZIK et al., 1997, SCHRÖDER et al., 1993). So gelang es HAIN et al. (1993) erstmals, das aus Weinreben isolierte Stilbensynthase-Gen in die Tabakpflanze zu transferieren. Die Tabakpflanzen zeigten anschließend eine größere Resistenz gegen Infektionen von *Botrytis cinerea*.

Vorkommen von Stilbenen

Resveratrol und seine Derivate können von verschiedenen Pflanzenarten synthetisiert werden. Neben Weintrauben und Weinreben enthalten z.B. auch Erdnüsse, Pistazien, Kakaobohnen, Heidelbeeren, Cranberries, Maulbeeren, Jackfrüchte, Rhabarber, Hopfen, Eukalyptus sowie verschiedene Liliengewächse, Hülsenfrüchte, Kiefern und Süßgräser das Monomer Resveratrol und seine Derivate (AGGARWAL und SHISHODIA, 2006).

Die absoluten Gehalte der Stilbene sind in den einzelnen Pflanzen sehr unterschiedlich. Die höchsten Konzentrationen von Resveratrol wurden in Weintrauben und den zugehörigen Produkten (siehe Abschnitt 2.2.4) sowie dem japanischen Knöterich (*Polygonum cuspidatum*) gefunden. In den Wurzeln von *Polygonum cuspidatum*, welche zur Zubereitung des in Asien verbreiteten „Itadori-Tees“ verwendet werden, wurden *trans*-Resveratrolgehalte von bis zu 523 mg/kg und *trans*-Piceidgehalte von bis zu 1655 mg/kg bestimmt. Geröstete Erdnüsse und Erdnussbutter enthielten bis zu 0,08 mg/kg und 0,5 mg/kg *trans*-Resveratrol (BURNS et al., 2002). *Trans*-Piceid wurde in Erdnussbutter in Konzentrationen von 0,2-4,0 mg/kg gefunden (IBERN-GOMEZ et al., 2000). Ähnliche Gehalte wie in Erdnüssen wurden mit ca. 0,5 mg *trans*-Resveratrol pro Kilogramm sowie zusätzlich etwa 1-2 mg *trans*-Piceid pro Kilogramm in Hopfen (CALLEMIEN et al., 2005) und auch in Schokolade (COUNET et al., 2006) detektiert. Des Weiteren konnten *trans*-Resveratrolgehalte von bis zu 1,6 mg/kg in Pistazien nachgewiesen werden (TOKUSOGLU et al., 2005). Die Gehalte von Preissel-, Blau- und Heidelbeeren lagen bei 0,03 mg/kg (WANG et al., 2002a, LYONS et al., 2003).

Einige wichtige Nutzpflanzen wie Kartoffeln, Reis, Mais, Roggen, Weizen oder Hafer sind nicht zur Biosynthese von Stilbenen fähig und enthalten folglich keine dieser Verbindungen. Bei üblicher westlicher Ernährungsweise, bei der der Konsum von Itadori-Tee nicht eingeschlossen ist, kann unter Berücksichtigung der maximalen Gehalte von Resveratrolderivaten in Weinen, Trauben, Erdnüssen sowie Blau- und Heidelbeeren von einer maximalen täglichen Zufuhr zwischen 2-10 mg ausgegangen werden (SOMOZA, 1999).

2.2.2 Funktion von Stilbenen in der Pflanze

Stilbenoide sind ein Bestandteil des Abwehrsystems der Pflanze und werden als Reaktion auf Stressfaktoren wie z.B. Pilzbefall, Verletzung durch Insekten oder starke UV-Einstrahlung synthetisiert. Sie gehören zu der Gruppe der Phytoalexine, bei denen es sich um antimikrobiell wirksame Verbindungen handelt, die die Ausbreitung und das Wachstum von mikrobiellen Infektionen hemmen. Die potente, antimikrobielle Wirkung des Monomers Resveratrol ist seit Jahren bekannt und bei einigen seiner oligomeren Derivate wie z.B. *trans-ε*-Viniferin und *α*-Viniferin konnten hohe Phytoalexinaktivitäten nachgewiesen werden (JEANDET et al., 1995a, LANGCAKE, 1981). Die einzelnen Phasen der Pflanzenabwehr sollen im Folgenden am Beispiel einer mikrobiellen Infektion beschrieben werden.

Bei einer mikrobiellen Infektion der Pflanze wird die Expression des Enzyms Stilbensynthase erhöht, wodurch es zu einer schnellen, lokalen Akkumulation von Resveratrol um den betroffenen Bereich kommt. Bereits nach 24 h ist die Höchstkonzentration von Resveratrol erreicht. Anschließend wird das Monomer von der Pflanze in verschiedenste Oligomere metabolisiert, welches ein mehrstufiger, oxidativer Prozess ist (vergl. Abschnitt 2.4). Die entstehenden Stilbenoligomere besitzen unterschiedlichste antimikrobielle Aktivitäten und sorgen somit für ein breites Wirkungsspektrum gegenüber einer Vielzahl von Mikroorganismen.

Ein weiterer möglicher Grund für die Oligomerisierung des Resveratrols in der Pflanze ist seine inhibierende Wirkung auf die Photosynthese. Somit kann die oxidative Metabolisierung des Monomers als Entgiftung angesehen werden. Die Konzentration des freien Resveratrols sinkt, wodurch eine Inhibierung der Photosynthese verhindert wird. Die Stilbenoligomere werden anschließend in Form von Vesikeln gespeichert, in deren Umgebung keine Photosynthese stattfindet (CICHEWICZ und KOUZI, 2002, SOLEAS et al., 1997).

2.2.3 Physiologische Wirkung von Stilbenen

Zusätzlich zu der Wirkung als Phytoalexine in der Pflanze wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um das gesundheitsfördernde Potential von Resveratrol und seinen Oligomeren zu untersuchen. Die erfolgsversprechenden Anwendungsgebiete für Resveratrol bauen auf seiner kardioprotektiven und krebshemmenden Aktivität auf. Bei der Schädigung von Blutgefäßen und der Entstehung von koronaren Herzerkrankungen (KHK) spielen oxidative Prozesse eine große Rolle. Freie Radikale, wie reaktive Stickstoff- (RNS) und Sauerstoffspezies (ROS), entstehen als Nebenprodukte des Metabolismus im menschlichen Körper, wie z.B. bei der mitochondrialen Atmungskette. Sie bilden einen Teil des Immunsystems, da sie als Signalüberträger Phagocyten aktivieren, die Mikroorganismen im menschlichen Organismus abwehren. Die wichtigsten ROS sind das Superoxidanion- ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl- ($OH^{\cdot}$), Peroxyl- sowie das Alkoxyradikal ($RO^{\cdot}$). Unter normalen Umständen herrscht ein Gleichgewicht zwischen freien Radikalen und antioxidativen Systemen. Umwelteinflüsse wie UV-Strahlen, Luftverschmutzung, Zigarettenrauch und Ozon können das Gleichgewicht verschieben. Die Konzentration an freien Radikalen erhöht sich und es kommt zum sogenannten oxidativen Stress (HALLIWELL, 1994). Freie Radikale sind aufgrund ihres Elektronendefizits hoch reaktiv und können andere Moleküle schädigen, indem sie aus ihnen ein Elektron abstrahieren oder übertragen und damit radikalische Kettenreaktionen auslösen. Beschädigte Lipide, Proteine oder DNA-Schäden werden im Zusammenhang mit der Entstehung von chronischen Erkrankungen wie Arteriosklerose, Krebs, Rheuma, Diabetes mellitus und den allgemeinen Vorgängen des Alterns diskutiert.

Physiologische Wirkung von *trans*-Resveratrol

Die antioxidative Aktivität von Stilbenen beruht auf den Redox-Eigenschaften ihrer Hydroxylgruppen und dem Potential zur Elektronendelokalisierung innerhalb ihrer chemischen Struktur. Auch für *trans*-Resveratrol konnte bewiesen werden, dass es als Radikalfänger und potentes Antioxidans fungiert (GÜLCIN, 2010). Des Weiteren werden dem Stilben anti-arteriosklerotische, antivirale, neuroprotektive, cardioprotektive, entzündungshemmende, krebshemmende und den Alterungsprozess beeinflussende Eigenschaften zugeschrieben (AGGARWAL und SHISHODIA, 2006, FRAGA, 2010, SOMOZA, 1999, DELMAS et al., 2005). Die anti-arteriosklerotische Wirkung von *trans*-Resveratrol ist auf die Inhibierung der Lipidperoxidation und der Plättchenaggregation zurückzuführen. Zusätzlich soll die Hemmung der Synthese von pro-inflammatorisch wirksamen Eicosanoiden für die anti-arteriosklerotische Wirkung mit verantwortlich sein

(FANG et al., 2002, WANG et al., 2002b, PACE-ASCIAC et al., 1995). Die chemopräventive und krebshemmende Eigenschaft von Resveratrol beruht auf einer Inhibierung der verschiedenen Stadien der Tumorentstehung und -entwicklung (Initiation, Promotion und Progression). Unter Einfluss von Resveratrol kommt es zu einem vermehrten Absterben der Tumorzellen, der sogenannten Apoptose (ULRICH et al., 2005). Tumore werden durch Resveratrol am Wachsen gehindert und die Metastasenbildung sowie die Anzahl an Tumorzellen reduziert. Hierdurch wird immer öfter der Einsatz von *trans*-Resveratrol als Chemotherapeutikum diskutiert (AGGARWAL et al., 2004, BILLARD et al., 2002, GESCHER, 2008, RIMANDO und SUH, 2008). Die neuroprotektive Wirksamkeit von *trans*-Resveratrol wurde besonders in Hinblick auf die Prävention von Alzheimer-Erkrankungen in zahlreichen *in vitro* und *in vivo*-Studien erforscht. Hierbei wurden verschiedene Arten von Gehirnzellen nach der Inkubation mit dem Monomer auf ihr Zellwachstum und ihre Zellfunktion hin untersucht. Die wesentlichen Wirkungsmechanismen sind auf das antioxidative Potential von Resveratrol gegenüber zytotoxischen Sauerstoffspezies zurückzuführen (KARLSSON et al., 2000). Des Weiteren gelang SHARMA und GUPTA (2002) durch die intraperitoneale Applikation von *trans*-Resveratrol bei Ratten eine Reduzierung der Oxidationsprodukte im Gehirn und somit eine Verbesserung der kognitiven Funktionen.

Resveratrol soll ebenfalls lebensverlängernde Eigenschaften besitzen. Positiv auf die zelluläre Lebensdauer wirken sich bereits bekannte Faktoren, wie z.B. eine Reduzierung der Energiezufuhr aus. Hieraus resultiert eine reduzierte metabolische Rate, welche mit einer geringeren Freisetzung von ROS einher geht. Zusätzliche positive Wirkung wird der verminderten Produktion von Wachstumshormonen, sowie der Aktivierung von Sirtuinen zugeschrieben. Sirtuine sind Enzyme, die Proteine modifizieren, welche in die Reparaturmechanismen der DNA oder in die Suppression von Tumoren involviert sind und somit die zelluläre Lebensdauer verlängern können. *Trans*-Resveratrol zeigte eine ähnliche Wirkung auf die Aktivierung von Sirtuinen, wie sie durch eine Energierestriktion hervorgerufen wird. Es wurde bereits nachgewiesen, dass unter Einfluss von *trans*-Resveratrol die Lebensspanne von Hefen (HOWITZ et al., 2003), Würmern und Fruchtfliegen (WOOD et al., 2004) verlängert werden kann.

Zur Absicherung, dass auch mit der Nahrung aufgenommenes *trans*-Resveratrol diese physiologischen Wirksamkeiten aufweist, müssen jedoch weiterführende Humanstudien durchgeführt werden. Hierbei sollte vor allem die notwendige Dosierung berücksichtigt werden (SOMOZA, 1999).

Physiologische Wirkung von Resveratrololigomeren

Neben dem Monomer Resveratrol wurde die physiologische Wirkung vieler oligomerer Stilbene erforscht. Hierbei konnten ebenfalls antimikrobielle, anti-HIV, anti-inflammatorische, neuroprotektive sowie krebshemmende Aktivitäten für verschiedenste Resveratrololigomere nachgewiesen werden. Einige Oligomere zeigten sogar höhere gesundheitsfördernde Effekte als das Monomer (CICHEWICZ et al., 2002).

Bei der Testung auf antimikrobielle Aktivität (SULTANBAWA et al., 1987, LI et al., 2009) bewirkten Oligomere wie *trans-ε*-Viniferin und Miyabenol C eine Inhibierung von *Escherichia coli* und *Staphylococcus spp.* (KAWABATA et al., 1989, KURIHARA et al., 1991, KAWABATA et al., 1991). Einige Resveratrol-Dimere und Tetramere besaßen zusätzlich anti-HIV Aktivitäten, wobei jedoch die Reproduzierung des Virus nicht vollständig gehemmt wurde (DAI et al., 1998, CICHEWICZ et al., 2000, LIU et al., 2004). Die anti-inflammatorische Wirkung von Stilbenen beruht auf ihrer antioxidativen Aktivität und der Hemmung von Cyclooxygenasen. Cyclooxygenasen sind Enzyme, die bei der Prostaglandinsynthese beteiligt sind und eine zentrale Funktion in der Regulation des Entzündungsgeschehens im menschlichen Körper besitzen. Stilbene, denen eine anti-inflammatorische Wirkung nachgewiesen werden konnte, sind z.B. die Resveratrol-Trimere α -Viniferin und Miyabenol C sowie die Dimere *trans-δ*-Viniferin und *trans-ε*-Viniferin (ONO et al., 1997, CHUNG et al., 2003, CICHEWICZ et al., 2000, ZHANG et al., 2004).

Bei der Alzheimer-Erkrankung entstehen Ablagerungen von Beta-Amyloidpeptiden im Gehirn. Für das Dimer *trans-ε*-Viniferin und das Tetramer r-2-Viniferin konnte *in vitro* eine anti-amyloide Aktivität nachgewiesen werden, wodurch die Entstehung dieser Ablagerungen verringert wurde (RIVIERE et al., 2007, JANG et al., 2007). Auf der Suche nach neuen krebshemmenden Substanzen wurde auch die Wirkung von Stilbenoligomeren untersucht (KIM et al., 2002a, LI et al., 2009). ITO et al. (2003) konnten zeigen, dass oligomere Stilbene den molekularen Mechanismus der Apoptose induzieren und somit eine Cytotoxizität für verschiedenste Tumorzellen besitzen.

Die gesundheitsfördernden Wirkmechanismen von Stilbenoligomeren sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Besonders für die Übertragung der gewonnenen Anhaltspunkte aus *in vitro* Studien oder Tierversuchen auf den menschlichen Organismus werden großangelegte Humanstudien benötigt.

2.2.4 Stilbene im Wein

Stilbene werden von der Weinrebe als Abwehrmechanismus gegen Stress synthetisiert und während der Weinherstellung in den Most und Wein abgegeben (BUIARELLI et al., 2007). Der Gehalt von Stilbenen im Wein variiert stark, da er von vielen Faktoren wie Klima, Varietät des Weines, Pilzbefall (PERRONE et al., 2007, JEANDET et al., 1995c), UV-Einstrahlung, Schwermetallgehalte im Boden (PÜSSA et al., 2006) und angewendete önologische Methoden (VERSARI et al., 2001, GAMBUTI et al., 2004, SUN et al., 2003) beeinflusst wird. Des Weiteren wirkt sich die Enzymaktivität der Hefe, insbesondere der Enzyme Isomerase und Glucosidase, auf die resultierende Stilbenkonzentration aus. Zusätzlich sind Milchsäurebakterien zu beachten, welche für die Milchsäuregärung (HERNÁNDEZ et al., 2007) verantwortlich sind und ebenfalls einen Einfluss auf den Stilbengehalt besitzen können (POUSSIER et al., 2003).

Rotweine enthalten üblicherweise höhere Stilbengehalte als Rosé- und Weißweine. Grund hierfür ist der längere Kontakt des Mostes mit der Traubenschale während der Gärung und der allgemein höhere Polyphenolgehalt von roten Trauben (BUIARELLI et al., 2007). Abbildung 2.5 stellt die Weiß-, Rosé- und Rotweinherstellung schematisch dar.

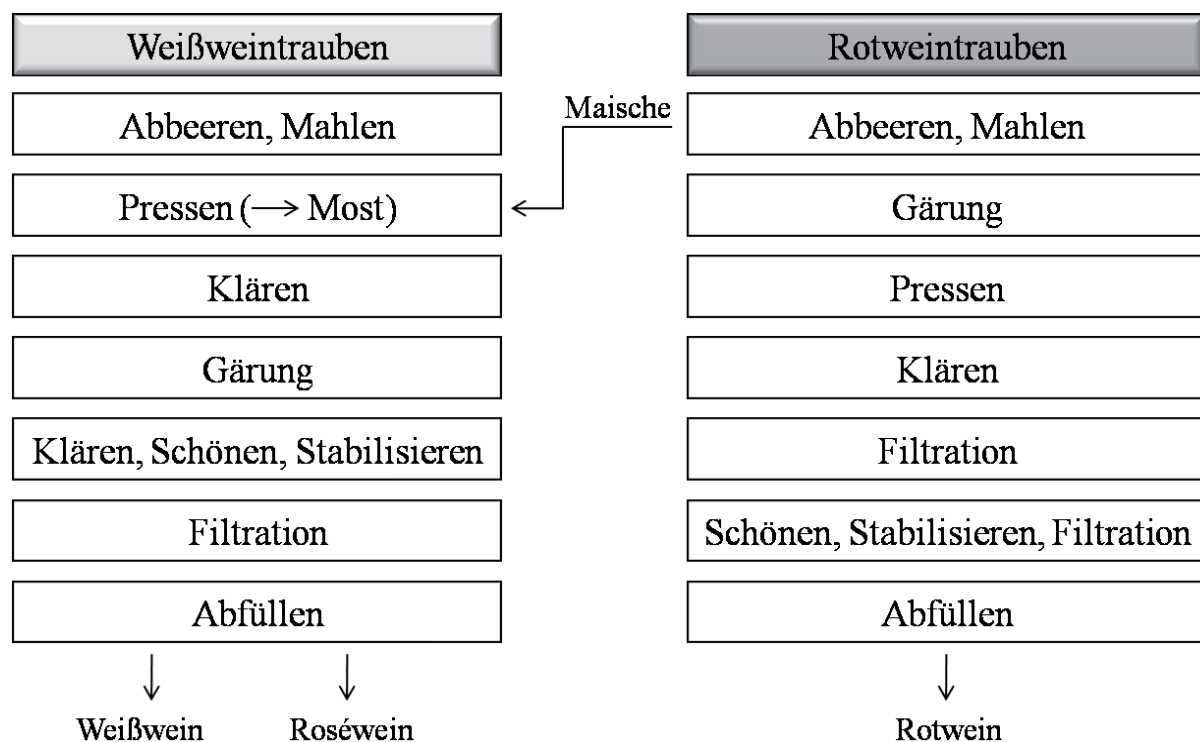


Abbildung 2.5: Schema der Weiß-, Rosé- und Rotweinherstellung (nach WÜRDIG und WOLLER, 1989, TROOST, 1988)

Im Gegensatz zu Weiß- und Roséwein, wo nur der Most nach Abpressung vergoren wird, wird für die Rotweinherstellung eine Maischegärung durchgeführt, bei der die Beeren mit Kernen und Schale vorliegen. Stilbene sind in den Beerenhäuten und Rappen lokalisiert. Durch den bei der Gärung entstehenden Alkohol werden sie in den Wein extrahiert.

Einen Überblick über die verschiedenen Stilbengehalte im Wein und analytischen Methoden zu ihrer Bestimmung geben RENTZSCH et al. (2009). Die Konzentrationen von freiem *trans*- und *cis*-Resveratrol liegen zwischen 0,2-13,0 mg/L für Rotweine und 0,1-0,8 mg/L für Weißweine (GOLDBERG et al., 1995a, NIKFARDJAM et al., 1999). Für das Resveratrol-Glucosid Piceid werden Gehalte von 0,3-9,0 mg/L in Rotwein und 0,1-2,2 mg/L in Weißwein beschrieben (GOLDBERG et al., 1996, LAMUELA-RAVENTÓS et al., 1995, SATO et al., 1997, NAUGLER et al., 2007, ROMERO-PÉREZ et al., 1996).

Bei Untersuchungen von kommerziell erhältlichen Weinen aus Südfrankreich konnten die Resveratrol-Dimere Pallidol und *trans*- ϵ -Viniferin nachgewiesen werden (LANDRAULT et al., 2002). *Trans*- ϵ -Viniferin wurde in Rotweinen und Weinen mit Botrytisbefall in Gehalten von 0,1-1,63 mg/L detektiert. Pallidol konnte in Weinen, deren Maische unter Zusatz der Rappen durchgeführt wurde, in Gehalten von 0,4-2,2 mg/L quantifiziert werden. Zusätzlich wurde das Tetramer Hopeaphenol in verschiedenen südafrikanischen Weinen (0,3-3,8 mg/L) gefunden (GUEBAILIA et al., 2006).

Seitdem SIEMANN und CREASY (1992) *trans*-Resveratrol in Wein nachgewiesen haben, wurden verschiedenste Methoden zur Bestimmung von Resveratrol und seinen Derivaten entwickelt (ROMERO-PÉREZ et al., 1996). Weit verbreitet ist die Analytik mittels RP18-HPLC in Verbindung mit Gradientenelution und UV-Detektion (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 1995, NAUGLER et al., 2007, RIBEIRO DE LIMA et al., 1999, VITRAC et al., 2005). *Trans*-konfigurierte Stilbene, wie *trans*-Resveratrol, *trans*-Pterostilben und *trans*- ϵ -Viniferin, zeigen zwei charakteristische UV-Maxima zwischen 306 und 336 nm sowie 281 und 313 nm. *Cis*-konfigurierte Stilbene, wie *cis*-Resveratrol, *cis*-Pterostilben und *cis*- ϵ -Viniferin, besitzen ein UV-Maximum von 285 nm (JEANDET et al., 1997).

Darüber hinaus wurde die Fluoreszenz von Stilbenen für ihren Nachweis genutzt. Die fluorimetrische Detektion z.B. von Resveratrol ist hoch selektiv und zweimal empfindlicher als seine UV-Detektion (STECHEER et al., 2001). Außerdem wurden Kopplungen von UV- und Fluoreszenz-Techniken zur Analytik eingesetzt (JEANDET et al., 1997, VITRAC et al., 2002). Die Identifizierung von Stilbenoiden mittels HPLC-PDA kann hingegen durch Coelution von mehreren strukturell sehr ähnlichen Verbindungen limitiert sein. In diesem Fall können moderne massenspektrometrische Techniken eingesetzt werden. Sie liefern neben der

Detektion auch Informationen über die Molekülstruktur und eignen sich somit zur Analyse von neuen Stilbenderivaten im Wein (MONAGAS et al., 2005, BUIARELLI et al., 2007, CARERI et al., 2004, JEAN-DENIS et al., 2006, KAMMERER et al., 2004, MARK et al., 2005, PÜSSA et al., 2006, STECHER et al., 2001). Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die massenspektrometrischen Techniken zur Identifizierung von Stilbenoiden in Wein und Weinreben.

Tabelle 2.1: Massenspektrometrische Techniken zur Identifizierung von Stilbenoiden in Wein und Weinreben (nach RENTZSCH et al., 2009)

Verbindung	Molekül-Ion [m/z]	Fragment [m/z]	Technik	Probe	Literatur
Monomere					
Resveratrol	227 [M-H] ⁻	185, 183, 159, 157, 143	HPLC-ESI-MS ²	Weinrebe	Püssa et al. (2006)
Piceatannol	243 [M-H] ⁻	225, 201, 200, 199, 175	HPLC-ESI-MS ²	Weinrebe	Püssa et al. (2006)
Astringin	405 [M-H] ⁻	243, 173, 159	HPLC-TIS-MS ²	Rotwein	Buiarelli et al. (2007)
Piceid	389 [M-H] ⁻	305, 289, 227, 175	HPLC-ESI-MS ²	Weinrebe	Püssa et al. (2006)
Dimere					
ε-Viniferin	453 [M-H] ⁻	435, 411, 369, 359, 347	HPLC-ESI-MS ²	Weinrebe	Püssa et al. (2006)
Pallidol	455 [M+H] ⁺	-	FAB-MS (+)	Rotwein	Vitrac et al. (2001)
Pallidol-3-O-glucosid	634 [M+NH ₄] ⁺	-	DCI-MS	Weißwein	Baderschneider & Winterhalter (2000)
Pallidol-3-3''-O-glucosid	777 [M-H] ⁻	615	HPLC-ESI-MS ²	Weißwein	Baderschneider & Winterhalter (2000)
ε-Viniferin-diglucosid	777 [M-H] ⁻	615	HPLC-ESI-MS ²	Weißwein	Baderschneider & Winterhalter (2000)
Tetramere					
Hopeaphenol	907 [M+H] ⁺	-	Maldi-TOF	Rotwein	Guebailia et al. (2006)

ESI-MS²: Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie, TIS-MS²: Turbo-Ionenspray-Massenspektrometrie, FAB-MS: Fast Atom Bombardment-Massenspektrometrie, DCI-MS: Desorption-Chemical-Ionisations-MS, Maldi-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight

2.3 Bestimmung der antioxidativen Aktivität (TEAC-Assay)

Viele Verbindungen, die aromatische Gruppen enthalten, sind in der Lage, als Antioxidantien zu fungieren. Sie können Radikale abfangen, indem sie resonanzstabilisierte Radikale bilden und somit die Oxidation weiterer Verbindungen verhindern. Der TEAC-Assay (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) ist eine photometrische Methode zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von hydrophilen und lipophilen Substanzen. Sie wurde erstmals von MILLER et al. (1993) für wasserlösliche Antioxidantien beschrieben und anschließend von RE et al. (1999) zusätzlich für lipophile Verbindungen modifiziert.

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) wird durch Kaliumpersulfat zu einem Radikalkation oxidiert. Das ABTS^+ -Radikalkation ist intensiv blaugrün gefärbt. Zugesezte Antioxidantien fangen das Radikalkation ab, wodurch die Farbintensität verringert wird. Die Minderung der Farbintensität wird photometrisch in Abhängigkeit von der Zeit bei 734 nm gemessen. Je stärker die Radikallösung entfärbt wird, desto höher ist die antioxidative Aktivität der Verbindung. Als Bezugssubstanz wird das Vitamin E-Derivat Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) verwendet und die Ergebnisse werden in Trolox-Äquivalenten angegeben (RE et al., 1999).

Prior et al. (2005) verglichen verschiedene Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität wie den TRAP-, ORAC-, LDL-Oxidations-, FRAP-, DPPH- und TEAC-Test. Die Vorteile des TEAC-Assays liegen in der schnellen und einfachen Handhabung, die sich gut automatisieren lässt. Des Weiteren ermöglicht die Löslichkeit des ABTS^+ -Kations in wässrigen sowie organischen Lösemitteln eine Anwendung des Testes für hydrophile und lipophile Substanzen. Nachteil der Methode ist, dass das ABTS^+ -Kation nicht im Organismus von Säugetieren bzw. Menschen vorkommt und damit der TEAC-Assay keinen physiologischen Test darstellt.

2.4 Enzymatische Synthese von Resveratrololigomeren

Resveratrololigomere werden in Pflanzen durch schrittweise oxidative Kopplung von Resveratrolradikalen synthetisiert. Hierbei katalysieren Peroxidasen die Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und den verschiedenen Reduktanten (CICHEWICZ et al., 2002, PEDREÑO et al., 1996).

Peroxidasen zählen zu den Oxidoreduktasen. Sie kommen ubiquitär in Pflanzen, Mikroorganismen und auch Tieren vor, wo sie Oxidationen katalysieren. Ihr Name verweist auf ihre Herkunft, wie z.B. bei der Meerrettichperoxidase (HRP, engl. horse radish peroxidase), die aus dem Meerrettich stammt. Der katalytische Wirkmechanismus der Meerrettichperoxidase wurde in der Vergangenheit eingehend erforscht. Ihre katalytische Reaktion wird durch Gleichung 2-1 beschrieben.



Wie die meisten Peroxidasen enthält auch die Meerrettichperoxidase als prosthetische Gruppe das Eisen-Protoporphyrin IX (ADAM et al., 1999). In Abbildung 2.6 ist der katalytische Zyklus der Meerrettichperoxidase dargestellt.

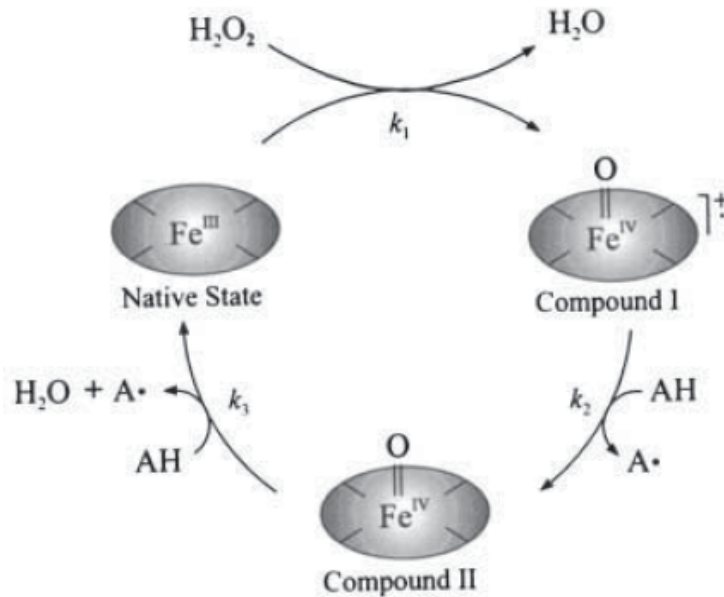


Abbildung 2.6: Katalytischer Zyklus der Meerrettichperoxidase (ADAM et al., 1999)

Die Katalyse einer Reaktion beginnt mit der Addition von Wasserstoffperoxid an das Fe^{III} des nativen Enzyms. Es entsteht ein Eisenoxoderivat (Compound I), welches ein Radikalkation darstellt. Das Radikalkation wird im nächsten Schritt reduziert (Compound II), wobei ein Phenol oder ein Enol (AH) zu einem Radikal oxidiert wird. Der native Zustand des Enzyms wird durch eine weitere Oxidation eines Phenols oder Enols erreicht. Die so gebildeten Radikale können nun z.B. miteinander oder mit anderen Phenolen reagieren und so Dimere, Trimere oder höhermolekulare Oligomere bis zu Polymeren bilden (ADAM et al., 1999).

Meerrettichperoxidase ist zahlreich für die *in vitro* Synthese von Stilbenoligomeren eingesetzt worden. Das Hauptprodukt bei der enzymatischen Umsetzung von *trans*-Resveratrol ist das Dehydrodimer *trans*- δ -Viniferin. In Abbildung 2.7 ist der hypothetische, biogenetische Syntheseweg von *trans*- δ -Viniferin unter dem Einfluss der Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid nach TAKAYA et al. (2005) dargestellt.

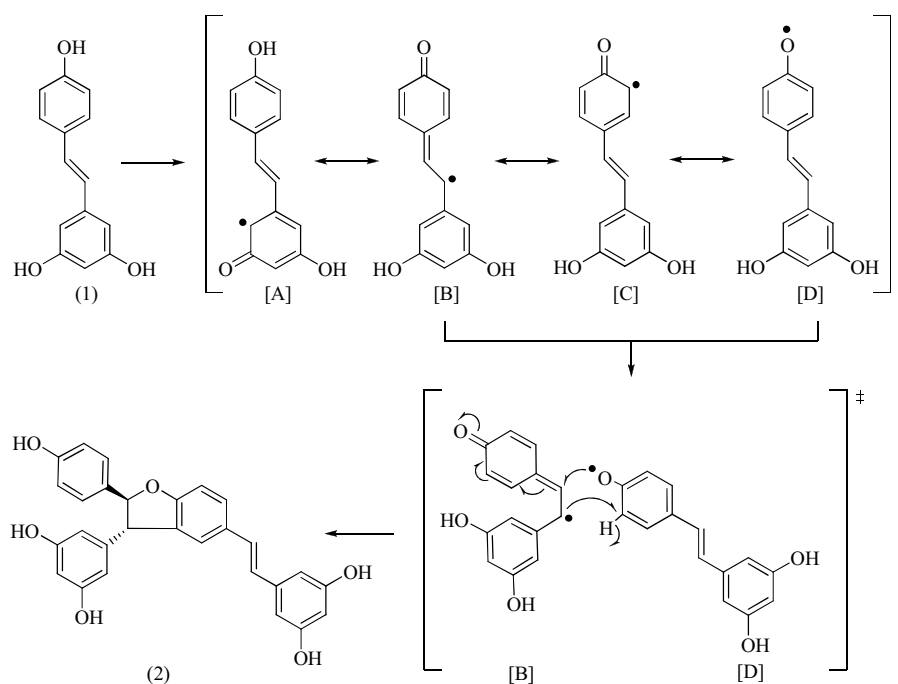


Abbildung 2.7: Hypothetischer Syntheseweg von *trans*- δ -Viniferin mittels Peroxidase und H_2O_2 :
trans-Resveratrol (1), radikalische Intermediate [A], [B], [C], [D], *trans*- δ -Viniferin (2) nach
 TAKAYA et al. (2005)

Zusätzlich zum abgebildeten Syntheseweg von *trans*- δ -Viniferin durch die Dimerisierung der radikalischen Intermediate [B] und [D] ist die Bildung von *trans*- ϵ -Viniferin über die Radikale [A] und [B] denkbar. Durch die Reaktion von zwei radikalischen Intermediaten [B] kann das symmetrische Dimer Pallidol (vergl. Abbildung 2.3, Strukturen **5** und **9**) gebildet werden (TAKAYA et al., 2005).

Es wurden bereits verschiedenste Studien über die Synthese von Stilbenoligomeren mittels Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid veröffentlicht. LANGCAKE und PRYCE (1977a, b) berichteten von der Biotransformation des *trans*-Resveratrols in sein *trans*-Dehydridomer. Des Weiteren wurde die Oligomerisierung von *trans*-Resveratrol zu Pallidol, *trans*- δ -Viniferin und Leachianol F untersucht (TAKAYA et al., 2005). Durch die enzymatische Umsetzung des Dimers *trans*- ϵ -Viniferin konnten die Stilbenoligomere (+)-Hopeaphenol, (-)-Isohopeaphenol, (-)-Vitisin B und (+)-Vitisin C synthetisiert werden (ITO und NIWA, 1996, TAKAYA et al., 2002).

Die oxidative Dimerisierung von *trans*-Resveratrol und *trans*- ϵ -Viniferin mittels Meerrettichperoxidase wurde von HE et al. (2006) publiziert, welchen die Generierung von (+)-Davidiol A, einem Resveratrol-Trimer, gelang. Zusätzlich wurden enzymatische

Umsetzungen von *trans*-Resveratrol mit verschiedenen Reaktanden wie Ferulasäure und Quadrangularin A durchgeführt (YU et al., 2007, HE et al., 2008).

2.5 Countercurrent Chromatography (CCC)

Bei der Erforschung bioaktiver Verbindungen in komplexen Substanzgemischen sind präparative Trenntechniken gefragt, die schonende, effiziente und kostengünstige Verfahren darstellen. Eine Technik, die diese Anforderungen erfüllt, ist die Countercurrent Chromatography (CCC, Gegenstromverteilungschromatographie). Es handelt sich hierbei um eine in den sechziger Jahren von ITO et al. (1966) entwickelte Isolierungstechnik, in der ausschließlich Flüssigkeiten als mobile und stationäre Phase verwendet werden. Die chromatographische Trennung erfolgt nach dem Nernst'schen Verteilungsgesetz durch die Verteilung der Substanzen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. Die CCC ist eine sehr schonende Technik, da es aufgrund des Verzichts auf festes Trägermaterial zu keinen irreversiblen Adsorptionen des Probenmaterials an der stationären Phase kommen kann.

Der grundlegende Aufbau einer CCC-Anlage (Abbildung 2.8) besteht aus einer HPLC-Pumpe, die das Fließmittelsystem befördert. Über ein Injektionsventil mit einer Injektionsschleife wird die Probe in das System eingebracht. Bei der eigentlichen Trennsäule (genannt „Multilayer-Coil“) handelt es sich um einen inerten PTFE-Schlauch, welcher in mehreren Lagen um einen Säulenhalter gewickelt ist. Das eine Ende des Coils wird als „Head“, das andere Ende als „Tail“ bezeichnet. Während der Trennung wird der Coil in Rotation versetzt. Durch die entstehenden Gravitations- und Zentrifugalkräfte verbleibt die stationäre Phase im Coil, während die mobile Phase im Gegenstromprinzip durch das System gepumpt wird. Ein Detektor (z.B. UV-Detektor) zeichnet die Trennung in Form eines Chromatogrammes auf. Zur Sammlung der entstehenden Fraktionen wird ein Fraktionensammler eingesetzt.

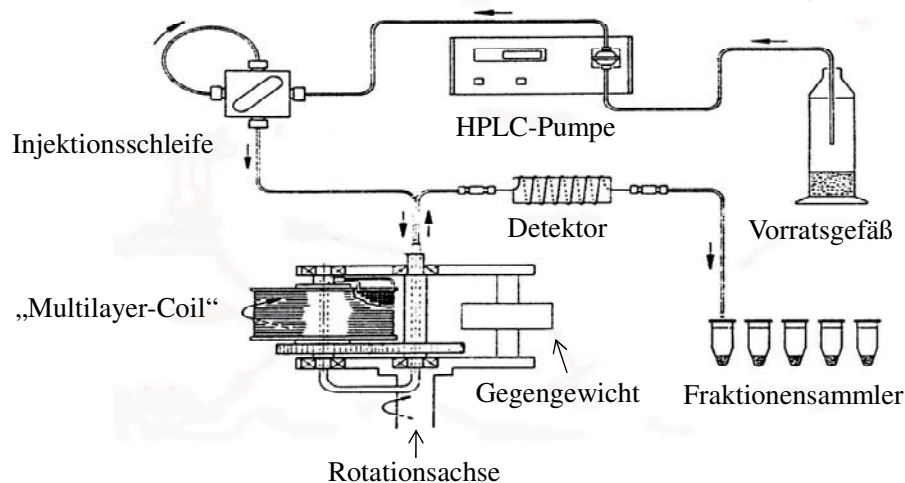


Abbildung 2.8: Aufbau einer CCC-Anlage mit Multilayer-Coil (SUTHERLAND, 1987)

Die CCC bietet im Vergleich zur konventionellen Säulenchromatographie diverse Vorteile. So erlaubt die Technik viele Variationsmöglichkeiten des Zweiphasensystems. Je nach Polarität des Fließmittels können polare und lipophile Substanzen getrennt werden. Dies ist beispielsweise bei der HPLC durch das Säulenmaterial begrenzt. Für präparative Trennungen ist die CCC hervorragend geeignet, da Substanzmengen im Gramm-Bereich injiziert werden können und die „Säulen“ deutlich preiswerter und langlebiger als vergleichbare präparative HPLC-Säulen sind.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene CCC-Anlagen, ein High-Speed Countercurrent Chromatograph und ein Low-Speed Countercurrent Chromatograph, für die Fraktionierung von Weinrebenextrakten verwendet. Im Folgenden werden ihre Trennprinzipien näher erläutert.

2.5.1 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Die HSCCC gehört zu den CCC-Anlagen, die nach einem hydrodynamischen Trennprinzip arbeiten. Dieses basiert auf den zwei grundlegenden Prinzipien, der Archimedischen Schraube und dem der Phasenmischung und Phasenentmischung. Zusammen bilden sie ein unilaterales hydrodynamisches Fließgleichgewicht, welches das gegenströmige Fließverhalten der beiden Lösemittelphasen im Coil ermöglicht (ITO, 1992). Je nach Rotation des Coils wird das in Drehrichtung zeigende Schlauchende als „Tail“ und das entgegengesetzte Schlauchende als „Head“ bezeichnet. Bei der J-Typ-HSCCC rotiert der Coil um die eigene Achse (Rotationsachse) und gleichzeitig um die Zentralachse (Revolutionsachse). Die entstehende planetare Bewegung (Abbildung 2.9 (A)) bewirkt ein alternierendes Mischen und Entmischen

der beiden Lösemittelphasen. In einem geschlossenen, rotierenden System wird die leichte Phase aufgrund der einwirkenden Kräfte zum Head-Ende gedrückt, wobei sie die schwere Phase zum Tail-Ende verdrängt (ITO, 2005). Abbildung 2.9 (B) zeigt das hydrodynamische Fließverhalten von zwei nicht miteinander mischbarer Lösemittelphasen in einem geschlossenen System und die einseitige Elution im „Head to Tail“- und „Tail to Head“-Modus nach ITO (2005). Die leichte Phase ist hierbei weiß, die schwere Phase schwarz dargestellt.

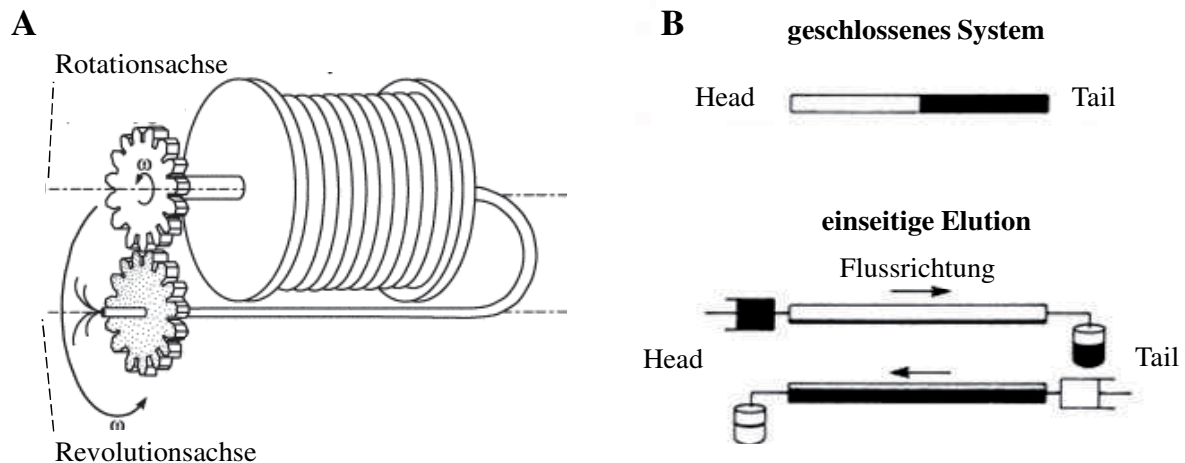


Abbildung 2.9: Planetare Bewegung eines „Multilayer-Coils“ (A), hydrodynamisches Fließverhalten im geschlossenen System, einseitige Elution von „Head to Tail“ und „Tail to Head“ (B) nach ITO (2005)

Bei der Elution von „Head to Tail“ wird die leichte Phase als stationäre Phase eingesetzt. Die schwere Phase dient als mobile Phase und wird zum Tail-Ende durch den Coil gepumpt. Im „Tail to Head“-Modus werden die stationäre und mobile Phase umgekehrt verwendet, so dass die schwere Phase nun als stationäre Phase fungiert.

Das Phasenmischverhalten in einem rotierenden Coil-System nach ITO (2005) ist in Abbildung 2.10 (A) dargestellt. Zur Unterscheidung sind die stationäre und mobile Phase in schwarz und weiß koloriert. In der Nähe der Revolutionsachse im Zentrum des Coils befindet sich die Phasenmischzone (proximaler Bereich), in der die Durchmischung der Phasen stattfindet. Im peripheren Bereich erfolgt die Phasentrennung. Durch die Rotation wandern die Mischungs- und Entmischungszonen (I-IV) vom Tail- zum Head-Ende, welches anhand Abbildung 2.10 (B) veranschaulicht wird.

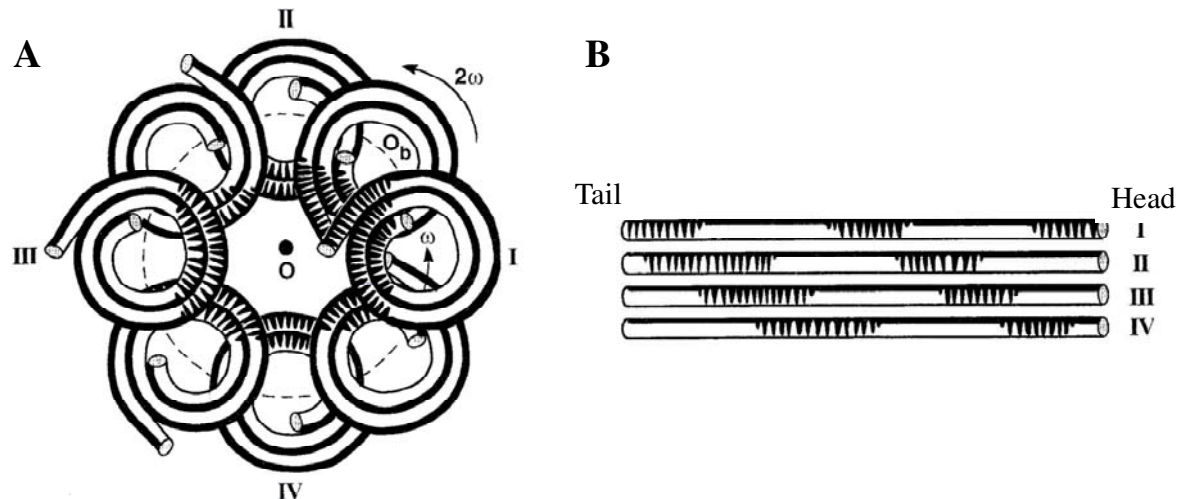


Abbildung 2.10: Phasenmischverhalten im rotierenden Coil-System der HSCCC (A), Bewegungsablauf der Mischzonen I bis IV von Tail nach Head (B) nach ITO (2005)

Die Effizienz der HSCCC liegt in ihrer hohen Anzahl an Verteilungsvorgängen pro Minute begründet. Bei einer Rotation von 800 rpm finden 13 Mischungs- und Entmischungsvorgänge in der Sekunde statt und ermöglichen somit bis zu 50000 Verteilungsvorgänge pro Stunde (ITO, 1986).

Der Erfolg einer Trennung mittels CCC hängt sehr stark vom eingesetzten Fließmittelsystem ab. Für die Auswahl eines Fließmittelsystems werden die Verteilungskoeffizienten der zu isolierenden Verbindungen bestimmt. Der Verteilungskoeffizient (K) ergibt sich aus der Löslichkeit der Komponenten in der leichten und schweren Phase (Gleichung 2-2).

$$K = \frac{c \text{ (Substanz leichte Phase)}}{c \text{ (Substanz schwere Phase)}} \quad 2-2$$

Optimale Verteilungskoeffizienten liegen im Bereich von 0,5 bis 1,5. Dies bedeutet, dass sich die zu isolierenden Substanzen in beiden Phasen verteilen. Ist der Verteilungskoeffizient kleiner als 0,5, ist in der Regel eine zu rasche Elution und eine ungenügende Auftrennung der Substanzen die Folge. Bei Verteilungskoeffizienten größer als 1,5 eluieren die Verbindungen spät, wodurch sich die Trennzeit verlängert und eine Peakverbreiterung aufgrund von Diffusion entsteht. Bei sehr hohen Verteilungskoeffizienten eluieren die Substanzen nicht und verbleiben auf dem Coil (CONWAY, 1991, ITO, 2005).

Ein weiterer wichtiger chromatographischer Parameter neben dem Verteilungskoeffizienten ist die Retention der stationären Phase (R_s). Sie kann mit Gleichung 2-3 berechnet werden (ITO und CONWAY 1996).

$$R_s = \frac{V_s}{V_c} = \frac{V_c - V_m}{V_c} \quad 2-3$$

mit V_s =Volumen der stationären Phase, V_c =Coilvolumen, V_m =Volumen der mobilen Phase

Je größer das Volumen der im Coil verbleibenden stationären Phase ist, desto höher ist die resultierende Retention. Ein Faktor, welcher die Retention negativ beeinflusst, ist das „Carry-over“ der stationären Phase. Hierbei handelt es sich um den Verlust an stationärer Phase aufgrund von Emulsionsbildung während der Trennung. Grenzflächenaktive Verbindungen können ein „Carry-over“ der stationären Phase verursachen. Eine Eliminierung dieser Störsubstanzen vor einer CCC-Trennung ist somit sinnvoll. Zur Trennung von Weinrebenextrakten und eines Biosyntheseansatzes von Stilbenen im Großmaßstab wurde in dieser Arbeit eine HSCCC des J-Typs mit Triple-Coil eingesetzt. Der verwendete Trennschlauch des Coils besaß einen Innendurchmesser von 2,5 mm.

In der Literatur werden verschiedene Applikationen der HSCCC für die Trennung von Stilbenoiden beschrieben. So wurde die HSCCC zur Isolierung von *trans*-Resveratrol und *trans*-Piceid aus *Polygonum cuspidatum* unter Verwendung verschiedener Fließmittelsysteme eingesetzt (CHEN et al., 2001, YANG et al., 2001, CHU et al., 2005). Des Weiteren konnten mittels HSCCC die Stilbenoligomere Quadrangularin A und Parthenocissin A aus *Parthenocissus laetevirens* (HE et al., 2007) sowie Hopeaphenol, Vitisin A und Amurensin G aus *Vitis chunganensis* gewonnen werden (HE et al., 2009).

2.5.2 Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC)

Die LSRCCC wird für die Isolierung von Naturstoffen im Großmaßstab verwendet. Abhängig vom Coilvolumen sind Trennungen von Probenmengen bis zu 500 g möglich (DU et al., 2005). Im Vergleich zur HSCCC werden bei der LSRCCC geringere Rotationsgeschwindigkeiten zwischen 20 und 150 rpm eingesetzt. Bei langsamen Rotationen bis 20 rpm bewegen sich beide Phasen aufgrund der Archimedischen Schraubwirkung zum

Head-Ende. Mit steigender Rotationsgeschwindigkeit nehmen die Fliehkräfte zu und ähnlich wie bei der HSCCC entsteht ein heterogenes Kraftfeld, welches jedoch in abgeschwächter Form vorliegt. Aufgrund der Rotation um die horizontale Achse und der somit nicht vorhandenen Planetarbewegung des Coils ist das Prinzip des hydrodynamischen Gleichgewichts für die Trennung mittels LSRCCC ausschlaggebend (KÖHLER, 2006). In Abbildung 2.11 ist ein Prototyp einer LSRCCC-Anlage abgebildet.

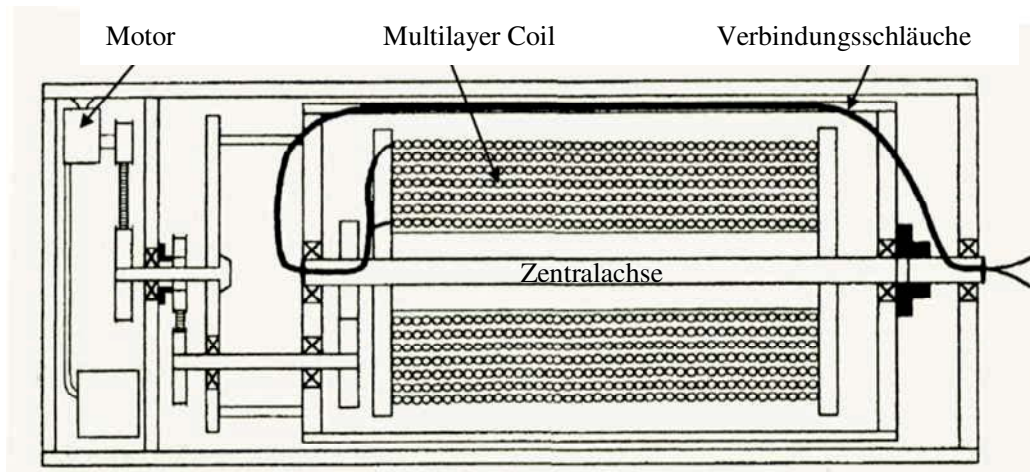


Abbildung 2.11: Prototyp einer LSRCCC-Anlage nach DU et al. (2000)

Bei dem verwendeten LSRCCC-Prototyp handelt es sich um eine Durchflusszentrifuge mit einer Achsenlänge von 48,5 cm. Die Säulenhalterung ist horizontal ausgerichtet und rotiert um die eigene Achse. Der Coil besteht aus vier Schichten helical um einen Halter gewickelten Teflonschläuchen, den sogenannten „convoluted tubings“, welche einen mittleren Innendurchmesser von 8,5 mm besitzen. Die speziellen Schläuche reduzieren das „Carry-Over“ der stationären Phase und führen somit zu effektiveren Retentionen (DU et al., 2000, DU et al., 2003, DU und Ito 2003).

Für die Anwendung der LSRCCC ist ein unilaterales hydrodynamisches Fließverhalten des Fließmittelsystems notwendig. Dieses ist besonders wirkungsvoll, wenn eine hohe Retention der stationären Phase vorliegt. Zur Überprüfung der Retention kann eine Retentionsstudie durchgeführt werden.

2.5.2.1 Durchführung einer Retentionsstudie

Um eine erfolgreiche LSRCCC-Trennung durchführen zu können, müssen die Parameter wie Trennmodus, Flussrate und Rotationsgeschwindigkeit für das zu verwendende

Fließmittelsystem optimiert werden. Dies ist mit Hilfe einer Retentionsstudie möglich, mit welcher das hydrodynamische Verhalten des eingesetzten Fließmittelsystems während einer Trennung beurteilt werden kann. Hierbei wird die Retention des Fließmittelsystems in Abhängigkeit von der Rotationsgeschwindigkeit bestimmt.

Für die Durchführung einer Retentionsstudie wird ein geringeres Coilvolumen von 550 mL aus „convoluted tubings“ mit 15 Windungen verwendet, die sich als fünfte Lage gewickelt auf dem Coil befinden. Zuerst wird der Coil mit der stationären Phase gefüllt. Anschließend erfolgt unter jeweils definierten Rotations- und Fließgeschwindigkeiten die Elution der mobilen Phase. Die Elution wird bis zum Erreichen des hydrodynamischen Gleichgewichtes fortgeführt, d. h. solange bis kein „Carry-Over“ der stationären Phase mehr stattfindet. Der verbleibende Anteil an stationärer Phase auf dem Coil entspricht der Retention der stationären Phase. Es kann in den vier verschiedenen Elutionsmodi L-T, L-H, U-T und U-H (Tabelle 2.2) getrennt werden (KÖHLER, 2006). Die Abkürzung des Modus definiert die verwendete mobile Phase und von welchem Schlauchende die Trennung erfolgt. L-T bedeutet somit, dass von „Tail to Head“ eluiert und als mobile Phase die schwere Phase (Lower Phase) eingesetzt wird.

Tabelle 2.2: Elutionsmodi der LSRCCC

Modus	Mobile Phase	Elution	Lage Head
L-T	schwere Phase	von Tail zu Head	Peripherie
L-H	schwere Phase	von Head zu Tail	Peripherie
U-T	leichte Phase	von Tail zu Head	zentral zur Hauptachse
U-H	leichte Phase	von Head zu Tail	zentral zur Hauptachse

L = Lower Phase, U = Upper Phase, T = Tail, H = Head

Über die Rotationsrichtung des Coils wird die Lage von Head und Tail definiert. Einer der Coil-Ausgänge befindet sich in der Peripherie, der zweite liegt zentral zur Achse des Coils. In Abbildung 2.12 werden die verschiedenen Elutionsmodi schematisch dargestellt.

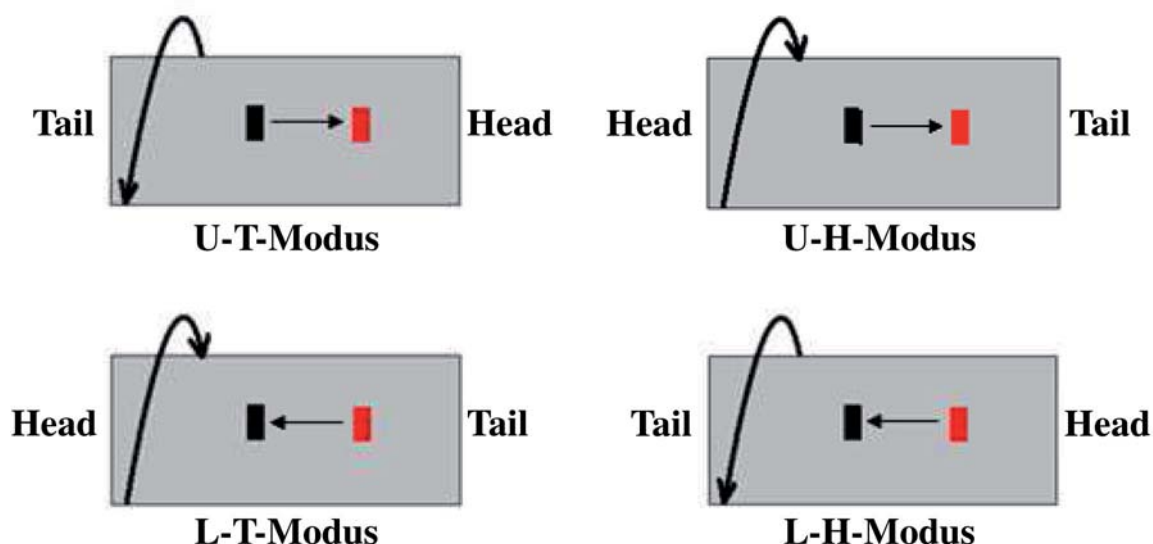


Abbildung 2.12: Darstellung der vier Elutionsmodi: U-T, U-H, L-T und L-H

In der LSRCCC mit „convoluted tubings“ zeigen viele apolare und polare Fließmittelsysteme ein unilaterales hydrodynamisches Fließverhalten der schweren Phase zum Head-Ende. Folglich werden höhere Retentionen der stationären Phase bei Trennungen in den Elutionsmodi L-T und U-H erreicht. Mittelpolare Fließmittelsysteme zeigen oft eine Umkehr des hydrodynamischen Fließverhaltens. Es findet eine Bewegung der schweren Phase zum Tail-Ende statt, wodurch eine hohe Retention der stationären Phase beim Elutionsmodus U-T erreicht wird. Der L-H-Modus weist häufig eine niedrige Retention der stationären Phase auf (KÖHLER, 2006).

In der Literatur sind Fraktionierungen im Großmaßstab eines Teeextraktes (DU et al., 2000), von Rohextrakten bestehend aus Salicin und Amygdalin (DU et al., 2005) sowie die Fraktionierung von Procyanidinen und Anthocyanen aus verschiedenen Pflanzenmaterialien (KÖHLER, 2006, WINTERHALTER, 2007) mittels LSRCCC beschrieben. Bis heute sind jedoch keine Applikationen für die Auftrennung von Weinrebenextrakten mittels LSRCCC publiziert worden. Demzufolge wurde in dieser Arbeit die LSRCCC erstmals zur Trennung eines Weinrebenextraktes im Großmaßstab eingesetzt.

2.6 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Die NMR- (Nuclear Magnetic Resonance) Spektroskopie zählt zu den wichtigsten und leistungsfähigsten spektroskopischen Techniken zur Molekülstrukturaufklärung. Ihre

Anwendungsbreite reicht von der Identifizierung einfacher organischer oder anorganischer Verbindungen über die Polymeranalytik, bis hin zur vollständigen Bestimmung der dreidimensionalen Struktur komplexer Protein- oder RNA-Biomoleküle in Lösung.

Die physikalische Grundlage der NMR-Spektroskopie ist der Kernmagnetismus. Die Wechselwirkung der magnetischen Kernmomente einer Substanz mit einem äußeren Magnetfeld führt zu einem Kern-Energieniveauschema, da die Kerne bezüglich ihrer magnetischen Energie nur in diskreten Energiezuständen existieren können. Durch einen Hochfrequenzsender können in diesem Energieniveauschema Übergänge einzelner Kerne angeregt werden. Die Absorption der Energie wird als Spektrallinie registriert, wodurch ein Spektrum entsteht, dessen Aufnahme nur bei Kernen möglich ist, welche ein magnetisches Moment besitzen. Hierzu gehören z.B. das Proton ^1H und das Kohlenstoff-Isotop ^{13}C .

Für die Protonen und Kohlenstoffatome eines Moleküls werden im ^1H - und ^{13}C -Spektrum mehrere Resonanzsignale erhalten. Die einzelnen Resonanzfrequenzen unterscheiden sich aufgrund der verschiedenen chemischen Umgebung der Kerne, welches als chemische Verschiebung bezeichnet wird. Im Protonenresonanz-Spektrum ist die Fläche unter den Resonanzsignalen der Anzahl an Protonen proportional, die das Signal hervorrufen und kann durch eine Integration bestimmt werden. Nicht alle Kerne liefern einfache Spektrallinien (Singulets). Für einige werden charakteristische Aufspaltungsmuster (z.B. Dubletts, Triplets und Quartetts) beobachtet. Diese Signalaufspaltung kommt durch Wechselwirkungen von Atomkernen mit Nachbarkernen zustande und wird Spin-Spin-Kopplung genannt. Die Zusammenhänge zwischen chemischer Verschiebung und Spin-Spin-Kopplung in Verbindung mit der relativen Signalintensität bilden die grundlegenden, spektralen Parameter für die Strukturaufklärung unbekannter Moleküle (HESSE et al., 1991, GÜNTHER, 1983).

Der Vorteil mehrdimensionaler Verfahren im Vergleich zu herkömmlichen 1D-NMR-Experimenten besteht darin, dass Kopplungen zwischen den einzelnen Kernen sichtbar gemacht werden können. Es handelt sich dabei sowohl um indirekte Spin-Spin-Kopplungen über Bindungen als auch um direkte Spin-Spin-Kopplungen durch den Raum. Somit ergibt sich die Möglichkeit, mittels 2D-Lösungs-NMR-Spektroskopie Informationen über die räumliche Struktur von Molekülen zu erhalten, welches sonst nur mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektren möglich ist. Die Messung von 2D-NMR-Spektren wird vorrangig zur Strukturaufklärung von zum Teil sehr komplexen Verbindungen eingesetzt. Es gibt in Abhängigkeit der jeweiligen Problemstellung eine Vielzahl verschiedenster 2D-Messtechniken. Hierzu zählen z.B. COSY- und ROESY-Experimente als Vertreter der homonuklearen (H,H)-korrelierten NMR-Spektroskopie, sowie HSQC- und HMBC-

Experimente, welche zu der heteronuklearen (H,C)-korrelierten NMR-Spektroskopie zählen. Bei einem 1D-NMR-Spektrum wird auf der x-Achse die Frequenz (bzw. chemische Verschiebung) aufgetragen und die y-Achse spiegelt die Intensität der Signale wieder. Ein 2D-NMR-Spektrum besitzt zwei Frequenzachsen (Abszisse und Ordinate), wobei die Intensität als dritte Dimension vorliegt (HESSE et al., 1991, GÜNTHER, 1983, FRIEBOLIN, 1988, MITCHELL und COSTISELLA, 2004).

2.6.1 Korrelationsspektroskopie (H,H-COSY)

Das zweidimensionale homonukleare (H,H)-korrelierte NMR-Experiment wurde unter dem Namen COSY (correlated spectroscopy) bekannt. Das grundlegende Prinzip ist, dass durch einen 90° Puls auf durch Kopplung entstandene Antiphasen-Magnetisierung ein Magnetisierungstransfer stattfindet. Dies zeigt die Nachbarschaftsbeziehungen aller über chemische Bindungen koppelnden Kerne und wird daher für die Zuordnung von ^1H -Resonanzen eingesetzt. Im H,H-COSY-Diagramm ist sowohl auf der x-Achse als auch auf der y-Achse das ^1H -NMR-Spektrum der Substanz aufgetragen. Hierbei sind J-Kopplungen über 2 bis 3 Bindungen sichtbar. Abbildung 2.13 stellt ein H,H-COSY-Diagramm mit gekennzeichneten Diagonalen sowie Kreuz- und Diagonalsignalen dar. Die verwendeten Daten stammen aus dieser Arbeit von dem Resveratrol-Tetramer Hopeaphenol.

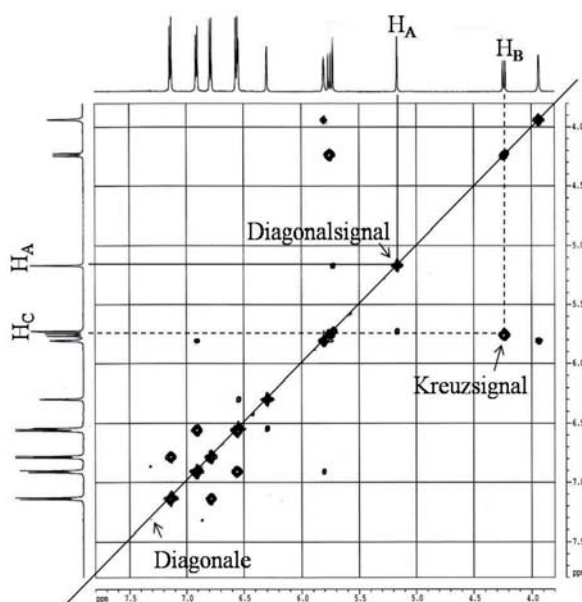


Abbildung 2.13: H,H-COSY-Diagramm von Hopeaphenol (600 MHz, CD_3COCD_3)

Die auf einer Diagonalen des Diagramms liegenden Signale (Diagonalsignale, z.B. $\text{H}_\text{A}/\text{H}_\text{A}$) verbinden jeweils gleiche Signale der beiden ^1H -NMR-Spektren. Außerhalb der Diagonalen

liegen die Kreuzsignale (z.B. H_B/H_C), welche die Kopplung zweier unterschiedlicher Kerne darstellen. Auf diese Weise können in Molekülen auch Kopplungen aufgefunden werden, die mit Hilfe von eindimensionalen Methoden nicht erkannt werden.

2.6.2 Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY-Experiment)

Ebenfalls zu den zweidimensionalen homonuklearen Protonenkorrelationen gehört das ROESY-Experiment. Es beruht auf dem Kern-Overhauser-Effekt (NOE, Nuclear-Overhauser-Effekt), welcher im Folgenden näher beschrieben wird. Befinden sich zwei Wasserstoffatome in räumlicher Nähe, so kann die Relaxation des einen Kerns weitgehend durch die Wechselwirkungen mit den Nachbarkernen stattfinden. Bei Einstrahlung der Resonanzfrequenz in den einen Kern wird dessen Energie auf den zweiten Kern übertragen, so dass die relative Intensität seines Signals und damit seines Integrals ansteigt. Das Verfahren kann zur Untersuchung des Abstandes von Protonen im Molekül herangezogen werden.

Bei ROESY-Experimenten werden analoge Diagramme wie beim H,H-COSY erhalten (vergl. Abbildung 2.13), jedoch zeigen die Kreuzsignale nicht die über die chemischen Bindungen koppelnden Protonen, sondern die durch den NOE als räumlich nah erkannten Kerne an. Es werden somit Informationen über die räumliche Anordnung der Protonen im Molekül erhalten, wodurch dreidimensionale Strukturen in Lösung studiert werden können.

2.6.3 Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC-Experiment)

Das zweidimensionale heteronukleare C,H-Coherence-Experiment „HSQC“ liefert Informationen, welche Wasserstoffatome an die jeweiligen Kohlenstoffatome gebunden sind. Hierbei handelt es sich um Kopplungen von ^{13}C - und ^1H -Atomen über eine Bindung $^1J(\text{C,H})$. Während der Messung wird die Magnetisierung des weniger empfindlichen Kerns auf das Wasserstoffatom übertragen. Im HSQC-Spektrum (Abbildung 2.14) sind auf der x- und y-Achse das ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum der Substanz aufgetragen. Es enthält keine Signale auf einer Diagonalen, sondern zeigt in Form der Kreuzsignale die Wechselwirkungen der zwei verschiedenen Kernsorten (^1H - mit ^{13}C -Kernen) an. Das verwendete Spektrum stammt aus dieser Arbeit von dem Resveratrol-Dimer Parthenocissin A.

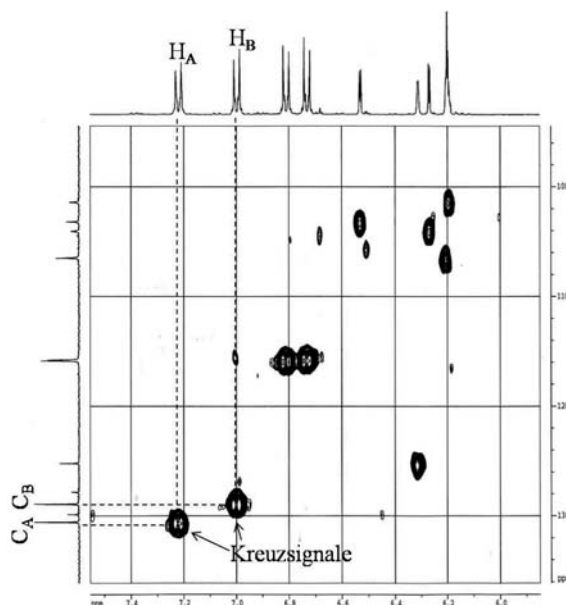


Abbildung 2.14: HSQC-Spektrum von Parthenocissin A (600 MHz, CD₃COCD₃)

Aus den $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -korrelierten NMR-Spektren lassen sich chemisch nicht äquivalente H-Atome an einem C-Atom detektieren, wie z.B. die diastereotopen H-Atome einer CH₂-Gruppe oder die H-Atome einer CH₂-Gruppe in einem Ethylen-Derivat. Quartäre Kohlenstoffatome können auf diese Weise jedoch nicht zugeordnet werden.

2.6.4 Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC-Experiment)

Ein weiteres zweidimensionales heteronukleares C,H-Korrelationsexperiment ist die Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC-Experiment). Das resultierende Diagramm ist dem HSQC-Spektrum ähnlich (vergl. Abbildung 2.14), da es ebenfalls auf der x- und y-Achse das ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum der Substanz besitzt und keine Signale auf einer Diagonalen enthält. Im HMBC-Spektrum werden C,H-Fernkorrelationen vorwiegend über zwei $^2\text{J}(\text{C},\text{H})$ und drei Bindungen $^3\text{J}(\text{C},\text{H})$ als Kreuzsignale angezeigt. Mit diesem Experiment können im Vergleich zum HSQC-Experiment auch die quartären C-Atome sicher zugeordnet und einzelne Teilstrukturen des Moleküls in Verbindung gebracht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Stilbenprofil verschiedener Weinrebenextrakte aus *Vitis vinifera* charakterisiert und Methoden zur Isolierung der oligomeren Resveratrol-Derivate mittels Gegenstromverteilungschromatographie entwickelt. Anhand von Massenspektrometrie und 2D-NMR-Spektroskopie erfolgte die Strukturaufklärung der Stilbene. Ihre antioxidative Aktivität wurde mittels des TEAC-Assays untersucht. Neben der enzymatischen Synthese neuer Resveratrololigomere mit Hilfe von Meerrettichperoxidase erfolgte auch ein Screening über das Vorkommen von Stilbenen im Wein.

3.1 Stilbene: Extraktion und Probenaufarbeitung

Zur Isolierung und Charakterisierung von Stilbenen standen zwei verschiedene Pflanzenmaterialien, der kommerziell erhältliche Weinrebenextrakt Vineatrol®30 (Breko) und ein Rebholz der Rebsorte Spätburgunder (Neustadt a.d. Weinstraße), zur Verfügung. In Abbildung 3.1 ist das verwendete Probenmaterial fotografisch dargestellt.



Abbildung 3.1: A: Weinrebenextrakt Vineatrol®30; B, C: Rebholz der Rebsorte Spätburgunder

Vineatrol®30 ist ein kommerziell erhältlicher Weinrebenextrakt, der in Form eines braunen Pulvers vorliegt. Für die Herstellung des Weinrebenextraktes werden die Weinreben zwischen Januar und März in Bordeaux (Frankreich) geerntet, sechs Monate in Bündeln im Freien getrocknet und anschließend zerkleinert. Es folgen eine Extraktion mit Ethanol und ein

Aufreinigungsschritt. Der so gewonnene Extrakt wird bei etwa 70 °C getrocknet und pulverisiert. Aus einer Tonne Weinreben werden 5 kg Vineatrol®30 produziert. Laut Hersteller enthält der verwendete Extrakt insgesamt 40,97 % Stilbenoide. Die Hauptkomponenten stellen das Monomer *trans*-Resveratrol und das Dimer *trans*- ϵ -Viniferin dar. In Tabelle 3.1 sind die Herstellerangaben zur Zusammensetzung von Vineatrol®30 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Herstellerangaben zu Vineatrol®30

Stilbenoide	Molare Masse [g/mol]	Stilben-Typ	PDA*- λ_{max} [nm]	Gehalte [g/100g]
Ampelopsin A	470	Dimer	282	3,44
Hopeaphenol	906	Tetramer	282	4,24
<i>trans</i> -Piceatannol	244	Monomer	324	0,44
<i>trans</i> -Resveratrol	228	Monomer	306	8,57
r-2-Viniferin	906	Tetramer	328	6,63
Miyabenol C	680	Trimer	322	1,91
<i>trans</i> - ϵ -Viniferin	454	Dimer	322	12,80
r-Viniferin	906	Tetramer	323	1,25
iso- ϵ -Viniferin	454	Dimer	322	1,69
Stilbengehalt				40,97

* firmeninterner HPLC-Gradient (Methanol/Wasser)

Das Rebholz der Rebsorte Spätburgunder stammte aus dem Staatsweingut Neustadt-Mußbach an der Weinstraße. Zur Extrakterstellung wurde das Pflanzenmaterial gefriergetrocknet, zerkleinert und mit Ethanol (80 %) extrahiert.

In Abbildung 3.2 ist der Prozess zur Isolierung von Stilbenoiden aus Weinrebenextrakt dargestellt.

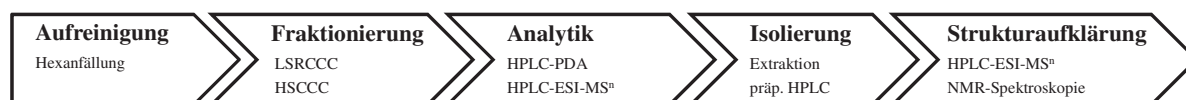


Abbildung 3.2: Prozess zur Isolierung von Stilbenoiden aus Weinrebenextrakt

Zur weiteren Aufarbeitung beider Extrakte diente eine Lösungsmittelfällung. Anschließend wurde unter Verwendung der Gegenstromverteilungschromatographie (CCC) fraktioniert und die erhaltenen Fraktionen mittels HPLC-PDA und HPLC-ESI-MSⁿ analysiert. Zur Isolierung der Zielverbindungen wurden komplex zusammengesetzte Fraktionen mit Hilfe der

präparativen HPLC erneut aufgetrennt. Die Strukturaufklärung der isolierten Reinsubstanzen wurde anhand von ESI-MSⁿ-Daten sowie 1D- und 2D-NMR Experimenten durchgeführt.

3.1.1 Lösungsmittelfällung der Extrakte

Die Weinrebenextrakte wurden zur Reduzierung von polymeren Verbindungen einer *n*-Hexanfällung (5.4.1.2) unterzogen. Polymere Verbindungen stören bei der Trennung des Probenmaterials mittels Gegenstromverteilungschromatographie. Aufgrund ihrer grenzflächenaktiven Wirkung beeinflussen sie das Phasenmischverhalten der CCC und können zum Zusammenbrechen des Zweiphasensystems führen (KÖHLER et al., 2008). Mit Hilfe der Lösungsmittelfällung ist es möglich, die polaren, höheroligomeren und polymeren Verbindungen von den Zielverbindungen abzutrennen. Die Zugabe von lipophilen Lösemitteln bewirkt eine Abnahme der Polarität der Lösung, wodurch die polymeren Verbindungen ausfallen und als Präzipitat abgetrennt werden können.

Zur Aufarbeitung der Weinrebenextrakte wurde die Methode von SAUCIER et al. (2001) modifiziert. Das Probenmaterial wurde, im Unterschied zu SAUCIER, in Ethanol gelöst und die Polymere durch Zugabe von *n*-Hexan gefällt. Da es sich bei den Stilbenoligomeren ebenfalls um höhermolekulare Inhaltsstoffe handelt, musste ein optimales Verhältnis von Ethanol/*n*-Hexan gewählt werden, bei dem die oligomeren Zielverbindungen in Lösung bleiben und nicht zusammen mit den Polymeren gefällt werden. Zur Optimierung wurden drei quantitative Fällungen mit den Verhältnissen Ethanol/*n*-Hexan 1:3, 1:3,5 und 1:4 (v:v) durchgeführt. Die Präzipitate wurden anschließend mittels HPLC-PDA und HPLC-MSⁿ untersucht. Abbildung 3.3 zeigt die HPLC-Chromatogramme der drei Versuchsansätze A-C bei 280 nm.

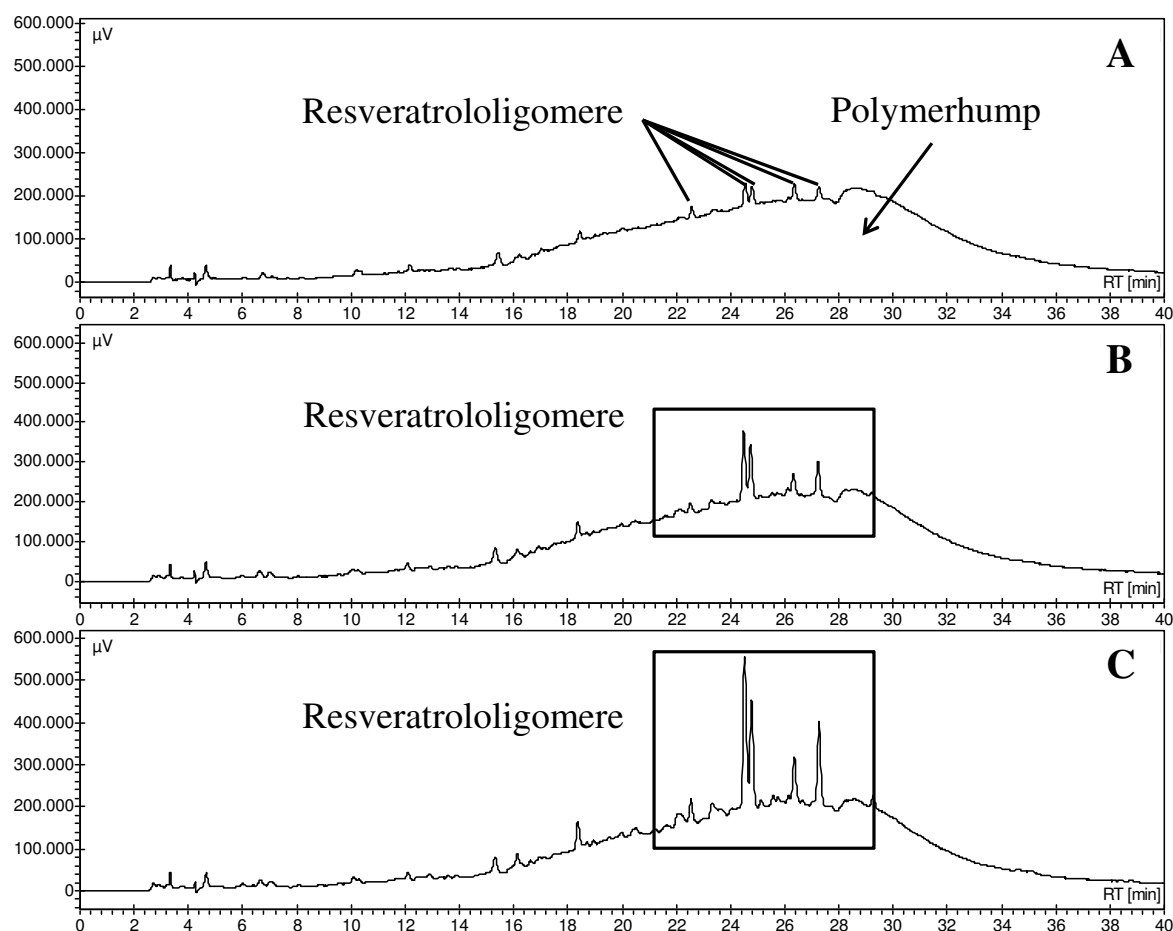


Abbildung 3.3: HPLC-Chromatogramme der Hexanfällungen A-C bei 280 nm (Ethanol/*n*-Hexan (v:v) 1:3 (A), 1:3,5 (B), 1:4 (C))

Die gefällten Polymere sind in den Chromatogrammen als „Hump“ zu erkennen. Die zusätzlich gefällten Resveratrololigomere werden als Peaks innerhalb des Polymerhumps detektiert. Bei allen drei Versuchsansätzen blieb die Größe des Polymerhumps (280 nm) annähernd gleich. Der erhöhte Einsatz von *n*-Hexan bewirkte jedoch eine verstärkte Fällung der Zielverbindungen. Tabelle 3.2 fasst die Optimierungsparameter der Lösungsmittelfällung zusammen.

Tabelle 3.2: Optimierungsparameter der Lösungsmittelfällung

Ansatz	EtOH/Hexan (v:v)	Präzipitat [%]	Oligomere FE[$\mu\text{V}\cdot\text{min}$]	Polymerhump FE[$\mu\text{V}\cdot\text{min}$]	Verhältnis Oligomere/Hump
A	1:3	22,34	27228,8	3205648,3	0,85
B	1:3,5	24,15	86924,4	3513266,4	2,47
C	1:4	24,67	174781,4	3365926,1	5,19

Der Vergleich der Oligomer/Polymerhump-Verhältnisse der Fällungen A, B und C zeigt, dass die größeren Hexanvolumina eine drei- bis fünffach höhere Fällung der Zielverbindungen hervorrufen, ohne weitere Störsubstanzen abzutrennen. Für die Aufarbeitung der Weinrebenextrakte mittels Lösungsmittelfällung wurde das Ethanol/*n*-Hexan-Verhältnis 1:3 (v:v) verwendet, da es eine quantitative Polymerabtrennung bei gleichzeitig geringem Verlust an Resveratrololigomeren erzielte.

Für drei in Folge durchgeführte HSCCC-Trennungen des Weinrebenextraktes Vineatrol®30 wurden von dem Extrakt 3,98 g zur Fällung eingesetzt. Hierbei wurden 2,82 g des aufgereinigten Extraktes erhalten (70,9 %) und somit 29,1 % als Polymerfraktion abgetrennt.

3.2 Stilbene aus kommerziellem Weinrebenextrakt

Um die Zusammensetzung von Vineatrol®30 zu bestimmen, wurde zuerst der unbehandelte Weinrebenextrakt mittels HPLC-PDA und HPLC-ESI-MSⁿ analysiert. Abbildung 3.4 zeigt das HPLC-Chromatogramm von Vineatrol®30 bei 280 und 306 nm sowie die enthaltenen Stilbenoide.

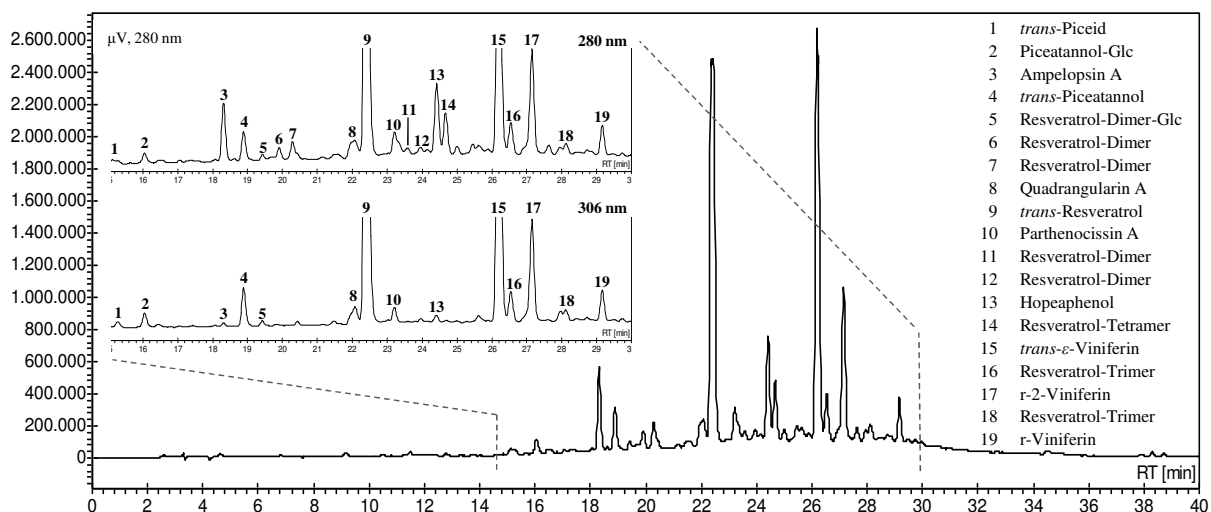


Abbildung 3.4: HPLC-Chromatogramm von Vineatrol®30 (280 nm) mit Vergrößerung des Zeitfensters von 15-30 min bei 280 und 306 nm

Die HPLC-Chromatogramme verdeutlichen die komplexe Zusammensetzung des Extraktes. Im vorderen Bereich der Chromatogramme (0-15 min) konnten verschiedene Proanthocyanidine mit Molekülonen m/z 577 $[M-H]^-$ sowie Catechin und Epicatechin

(m/z 289 $[M-H]^-$) im Vergleich mit PÜSSA et al. (2006) als Minorkomponenten nachgewiesen werden. Bei den Hauptverbindungen des Extraktes handelt es sich, wie bereits unter Abschnitt 3.1 beschrieben, um die Stilbene *trans*-Resveratrol (**S1**, Peak 9), *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**, Peak 15) und r-2-Viniferin (**S9**, Peak 17). In Tabelle 3.3 sind die in Vineatrol®30 enthaltenen Stilbenoide und ihre Parameter aufgelistet.

Tabelle 3.3: Parameter der Stilbenoide von Vineatrol®30

Peak	R _t [min]	PDA- $\lambda_{\max}$ [nm]	Molekülion m/z $[M-H]^-$	ESI-MS ² -Fragmente	Stilbenoide
1	15,6	306, 319	389	227, 185, 159, 143	<i>trans</i> -Piceid
2	16,1	327	405	243, 225, 215, 149	Piceatannol-Glc
3	18,3	283	469	451, 375, 363	Ampelopsin A
4	18,7	327	243	225, 215, 201, 175, 159	<i>trans</i> -Piceatannol
5	19,3	283	615	453, 435, 359, 347, 289	Resveratrol-Dimer-Glc
6	19,9	283	453	359, 347, 289, 225	Resveratrol-Dimer
7	20,3	283	453	359, 265	Resveratrol-Dimer
8	22,0	315	453	359, 289, 265	Quadrangularin A
9	22,4	306, 319	227	185, 183, 157	<i>trans</i> -Resveratrol
10	23,3	315	453	359, 341, 289, 265	Parthenocissin A
11	23,5	283	453	411, 359, 347, 289, 265	Resveratrol-Dimer
12	23,9	283	469	451, 385, 375, 359	Resveratrol-Dimer
13	24,4	283	905	811, 717, 611, 451, 357	Hopeaphenol
14	24,7	283	905	811, 717, 611, 451, 359	Resveratrol-Tetramer
15	26,1	323	453	435, 411, 369, 359, 347	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin
16	26,5	323	679	661, 585, 573, 451, 345	Resveratrol-Trimer
17	27,2	327	905	887, 811, 799, 705, 545	r-2-Viniferin
18	28,1	320	679	661, 585, 573, 555, 451	Resveratrol-Trimer
19	29,2	323	905	887, 811, 799, 451, 359	r-Viniferin

Glc = Glucosid

Die Resveratrol-Dimere Quadrangularin A (**S8**, Peak 8) und Parthenocissin A (**S7**, Peak 10) sowie das Resveratrol-Glucosid *trans*-Piceid (**S2**, Peak 1) konnten nach Isolierung und Strukturaufklärung erstmals in Vineatrol®30 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden weitere Stilbenoide und Stilben-Glucoside detektiert. In den folgenden Abschnitten werden die Isolierung und Strukturaufklärung der verschiedenen Stilbenoligomere diskutiert.

3.2.1 Trennung und Isolierung von Stilbenen mittels HSCCC

Um Substanzen mittels Gegenstromverteilungschromatographie isolieren zu können, muss zuerst ein geeignetes Fließmittelsystem entwickelt werden, mit dessen Hilfe sich die Inhaltsstoffe des Extraktes auftrennen lassen. Das Trennprinzip der CCC beruht auf der Verteilung von Verbindungen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. Für die Auswahl eines Fließmittelsystems werden die Verteilungskoeffizienten der zu isolierenden Verbindungen für verschiedene Systeme bestimmt. Der Verteilungskoeffizient (K) ergibt sich aus der Löslichkeit der Komponenten in der leichten und schweren Phase (vergl. Abschnitt 2.5.1, Gleichung 2-2). Ein optimaler Verteilungskoeffizient liegt im Bereich von 0,5 bis 1,5. Dies bedeutet, dass die zu isolierenden Substanzen in beiden Phasen löslich sind. Somit wird eine erfolgreiche Trennung und gleichzeitig auch die Elution der Verbindungen vom Coil (Head to Tail-Modus) gewährleistet. Verteilungskoeffizienten > 2 verlängern die Trennzeit oder die Verbindungen verbleiben auf dem Trennsystem.

Zur Ermittlung von K wurden geringe Mengen des Weinrebenextraktes in verschiedenen Fließmittelsystemen unter Schütteln gelöst, nach der Phasentrennung die Phasen separiert und diese mittels HPLC-PDA untersucht. Die Flächen der einzelnen Peaks im UV-Spektrum wurden in Gleichung 2-2 eingesetzt. Hiernach erwies sich das Fließmittelsystem *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/2/1/2, v/v/v/v) für die Trennung des Weinrebenextraktes als geeignet.

Zur Isolierung von Stilbenoiden wurden pro Trennung 800 mg des aufgereinigten Weinrebenextraktes Vineatrol[®]30 mittels Gegenstromverteilungschromatographie (HSCCC-1) unter Verwendung des Fließmittelsystems *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/2/1/2, v/v/v/v), einer Rotationsgeschwindigkeit von 850 rpm und einer Flussrate von 3 mL/min fraktioniert. Abbildung 3.5 zeigt das HSCCC-Chromatogramm der Vineatrol[®]30-Trennung bei 280 nm.

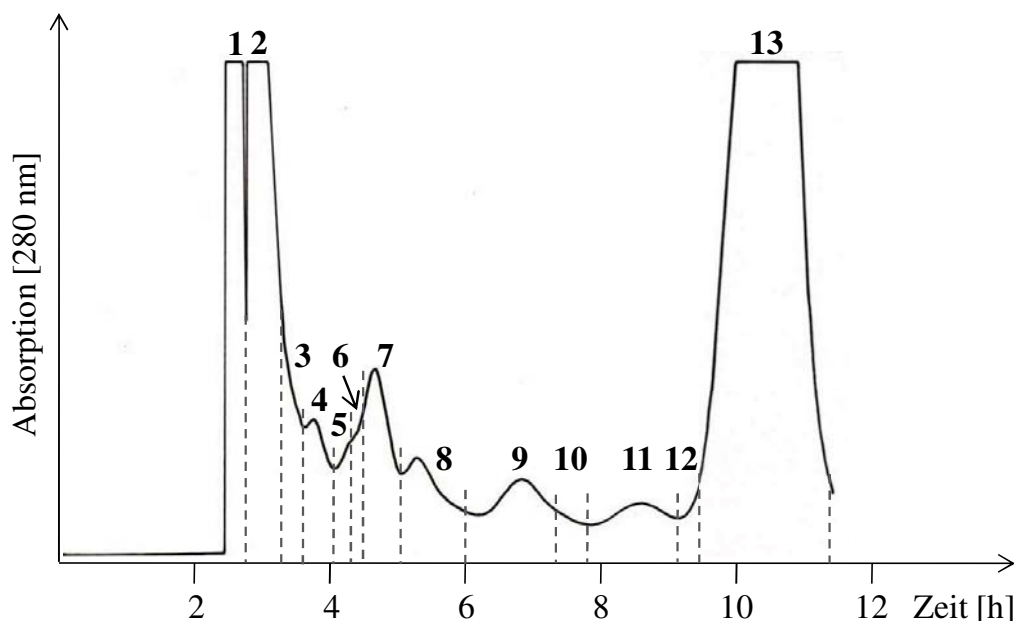


Abbildung 3.5: HSCCC-Chromatogramm der Vineatrol®30-Trennung (11,5 h) bei 280 nm

Die Fraktionierung des Extraktes wurde anhand des UV-Chromatogramms und dünnschichtchromatographischer Untersuchungen durchgeführt. Um größere Fraktionen für die weitere Isolierung zu erhalten, wurde die Trennung dreimal durchgeführt und die resultierenden Fraktionen vereinigt. Die HSCCC-Trennung lieferte 13 Fraktionen. Bei einem Abbruch der Trennung nach 9,5 h wurde Fraktion 13 als Coil-Fraktion erhalten. Obgleich die Trennzeit (9,5/11,5 h) aufgrund der hohen Komplexität des Extraktes verhältnismäßig lange gewählt wurde, konnte eine ausreichend hohe Retention der stationären Phase (R_s) von 61% erzielt werden. Tabelle 3.4 stellt die Parameter zur Berechnung der Retention nach Gleichung 2-3 (Abschnitt 2.5.1) dar.

Tabelle 3.4: HSCCC-Parameter zur Berechnung der Retention (R_s)

Parameter	HSCCC-Vineatrol® 30
Gesamtvolumen Coil [mL]	800
Volumen schwere Phase [mL]	315
Volumen leichte Phase [mL]	485
Retention R_s [%]	60,6

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels HPLC-PDA und HPLC-MS² untersucht. Fraktion 1 zeigte hierbei eine besonders komplexe Zusammensetzung. Zusätzlich zu den im Extrakt verbliebenen Polymeren und der Hauptverbindung *trans*-Piceid (S2)

(3,4',5-Trihydroxystilben-3-O- β -D-glucosid) konnten weitere Glucoside von Resveratrol und Piceatannol nachgewiesen werden. Außerdem gelang die Detektion zweier Resveratrol-Dimer-Glucoside mit Molekülonen m/z 615 $[M-H]^-$ und des Dimer-Diglucosids *trans*- ϵ -Viniferin-3,5-O-diglucosid (Vergleich mit Standard von BADERSCHNEIDER und WINTERHALTER, 2000) mit einem Molekülon m/z 777 $[M-H]^-$ (Tabelle 7.1, Fraktion 1). Das Resveratrol-Glucosid *trans*-Piceid (**S2**, 4,1 mg) konnte nach einer weiteren Aufarbeitung von Fraktion 1 mittels Hexanfällung und präparativer HPLC (Tabelle 5.4: HSCCC-Systeme, Nr. 3) isoliert werden.

Fraktion 2 setzte sich aus mehreren Dimeren und Tetrameren zusammen. Hieraus gelang die Isolierung des Dimers Ampelopsin A (**S5**, 5 mg) und des Tetramers Hopeaphenol (**S6**, 24 mg, präp. HPLC 4, Tabelle 5.6). Ein weiteres Dimer mit der Bezeichnung Quadrangularin A (**S8**) konnte mit einem Anteil von 45% ($\lambda_{\max} = 306$ nm) als Hauptverbindung der Fraktion 4 angereichert und mittels präparativer HPLC (Tabelle 5.6, Nr. 5) isoliert werden. Fraktion 5 bestand nahezu ausschließlich aus Parthenocissin A (**S7**, 78 %, $\lambda_{\max} = 306$ nm). Die Isolierung von 6 mg dieses Resveratrol-Dimers gelang ebenfalls durch den Einsatz der präparativen HPLC (Tabelle 5.6, Nr. 6). Parthenocissin A (**S7**, 44 %, $\lambda_{\max} = 306$ nm) wurde darüberhinaus zusammen mit dem Resveratrol-Tetramer r-2-Viniferin (**S9**, 46 %, $\lambda_{\max} = 306$ nm) in Fraktion 6 (29,3 mg) angereichert. Mit einer Reinheit von 77,5% ($\lambda_{\max} = 306$ nm) wurde r-2-Viniferin (**S9**) ebenfalls in Fraktion 7 angereichert und insgesamt 41,7 mg des Tetramers konnten isoliert werden.

Fraktion 8 bestand zu 28 % ($\lambda_{\max} = 306$ nm) aus dem Resveratrolderivat *trans*-Piceatannol (**S3**) und einem Gemisch weiterer Oligomere. Durch Einsatz der präparativen HPLC (Tabelle 5.6, Nr. 7) wurden 7,5 mg reines *trans*-Piceatannol (**S3**) erhalten. Das Monomer *trans*-Resveratrol (**S1**) wurde mit einer Reinheit von 71 % ($\lambda_{\max} = 306$ nm) in der Fraktion 12 angereichert. Fraktion 13 (Coil-Fraktion) setzte sich aus den beiden Hauptverbindungen des Weinrebenextraktes und dem Tetramer r-Viniferin (**S10**) zusammen. Aus 217 mg der Coil-Fraktion konnten 62 mg *trans*-Resveratrol (**S1**), 81 mg *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) und 3 mg r-Viniferin (**S10**) (präp. HPLC 9, Tabelle 5.6) isoliert werden. Die Chromatogramme der wichtigsten HSCCC-Fractionen bei 306 nm sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

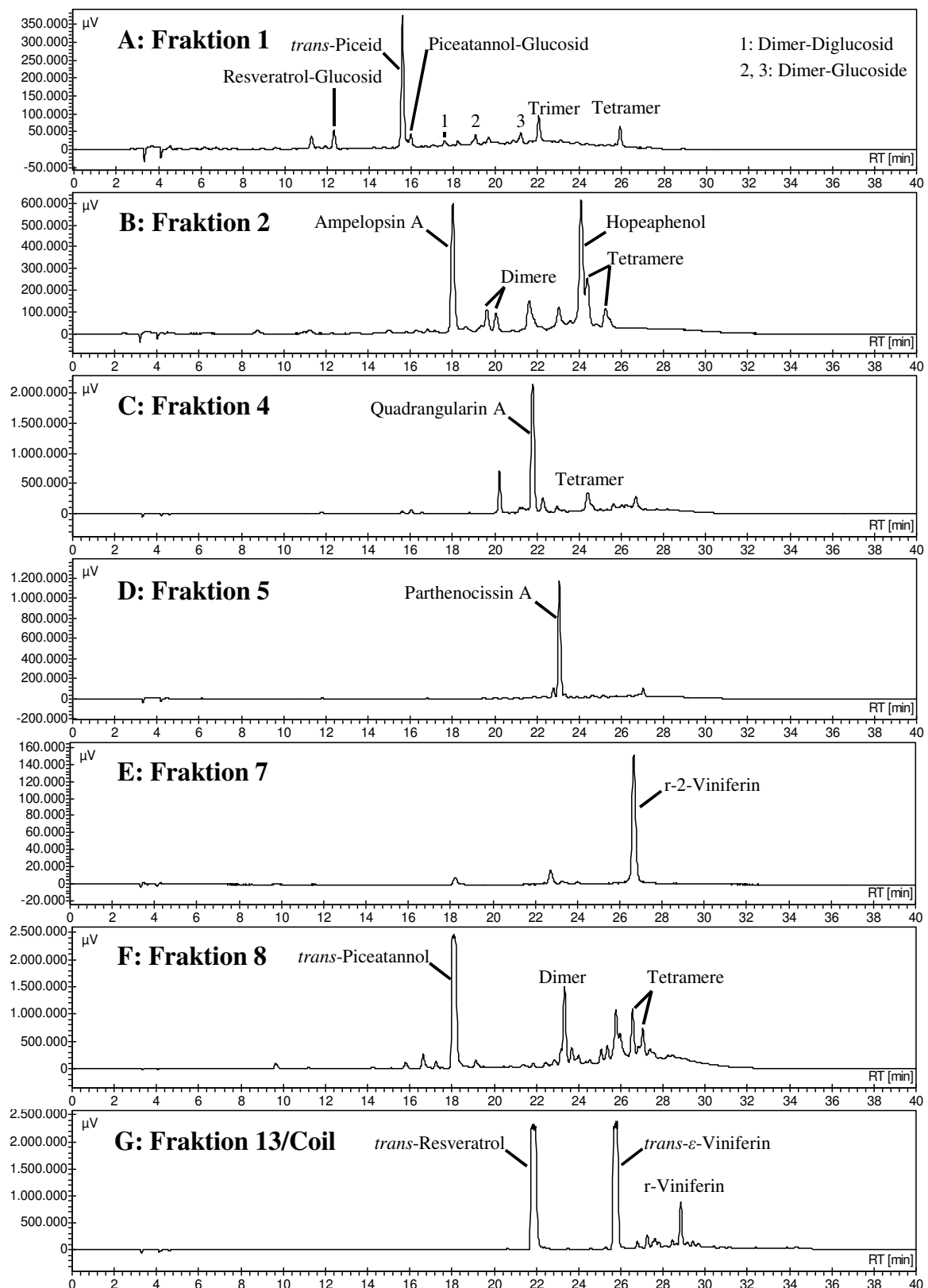


Abbildung 3.6: HPLC-Chromatogramme (A - G) der HSCCC-Fraktionen 1, 2, 4, 5, 7, 8 und 13/Coil bei 306 nm

Eine weitere Möglichkeit, mit der sich die lipophilen, auf dem Coil verbleibenden Stilbene auftrennen und eluieren lassen, ist die Anwendung der Elutions-Extrusions-Methode. Hierbei wurde nach 9,5 h die lipophile, stationäre Phase als mobile Phase eingesetzt, alle weiteren Parameter konstant gehalten und so die Zielverbindungen mit einem Verteilungskoeffizienten > 2 vom Coil eluiert. Als Folge davon konnten Fraktionen von *trans*-Resveratrol (**S1**) und *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) mit einer Reinheit von > 70 % erhalten werden.

Die Gegenstromverteilungschromatographie ist eine effiziente Methode zur Trennung und Anreicherung von Stilbenoiden. Alle isolierten Stilbenoide konnten in einer Reinheit von > 95 % ($\lambda_{\text{max}} = 306$ nm) gewonnen werden. Ein Überblick über die Zusammensetzung der einzelnen HSCCC-Fractionen anhand der HPLC-Chromatogramme und Massenspektren (ESI-MS²) der enthaltenen Hauptverbindungen befindet sich in Tabelle 7.1 des Anhangs. Die Strukturaufklärung der isolierten Stilbenoide wird in Abschnitt 3.2.3 diskutiert.

3.2.2 Trennung von Stilbenen mittels LSRCCC

Für den „Scale up“ der Isolierung von Stilbenen aus Vineatrol[®]30 im Bereich von 10-20 g wurde die LSRCCC eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine langsam rotierende CCC, welche für die Trennung von Naturstoffen im Großmaßstab eingesetzt wird (DU et al., 2000, DU et al., 2005). Ihre Trennleistung steigt proportional zur vorhandenen Retention der stationären Phase (R_s). Je höher die Retention ist, desto mehr Mischungs- und Entmischungsvorgänge zwischen mobiler und stationärer Phase sind gewährleistet. Um die optimalen Parameter für eine LSRCCC-Trennung zu finden, wird eine Retentionsstudie durchgeführt.

Retentionsstudie

Anhand einer Retentionsstudie (vergl. Abschnitt 2.5.2.1) kann das hydrodynamische Verhalten des eingesetzten Fließmittelsystems während einer CCC-Trennung beurteilt werden. Da zu dem verwendeten Fließmittelsystem *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser/*n*-Butanol (1/2/1/2/1, v/v/v/v/v) keine Daten bezüglich des hydrodynamischen Fließverhaltens bekannt waren, musste eine Retentionsstudie durchgeführt werden. Hierzu wurde die Retention der stationären Phase im Kleinmaßstab mit einem Coilvolumen von 550 mL, ohne Eintrag von Probenmaterial, mit einer konstanten Flussrate von 4 mL/min, bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten (30, 40, 70, 80 und 100 rpm) in den vier Modi U-T, U-H, L-T und L-H (vergl. Abschnitt 2.5.2.1) bestimmt. Die Graphen in Abbildung 3.7 veranschaulichen die Ergebnisse der Retentionsstudie. Sie

beschreiben den Zusammenhang zwischen der Retention und der Rotationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von dem Trennmodus.

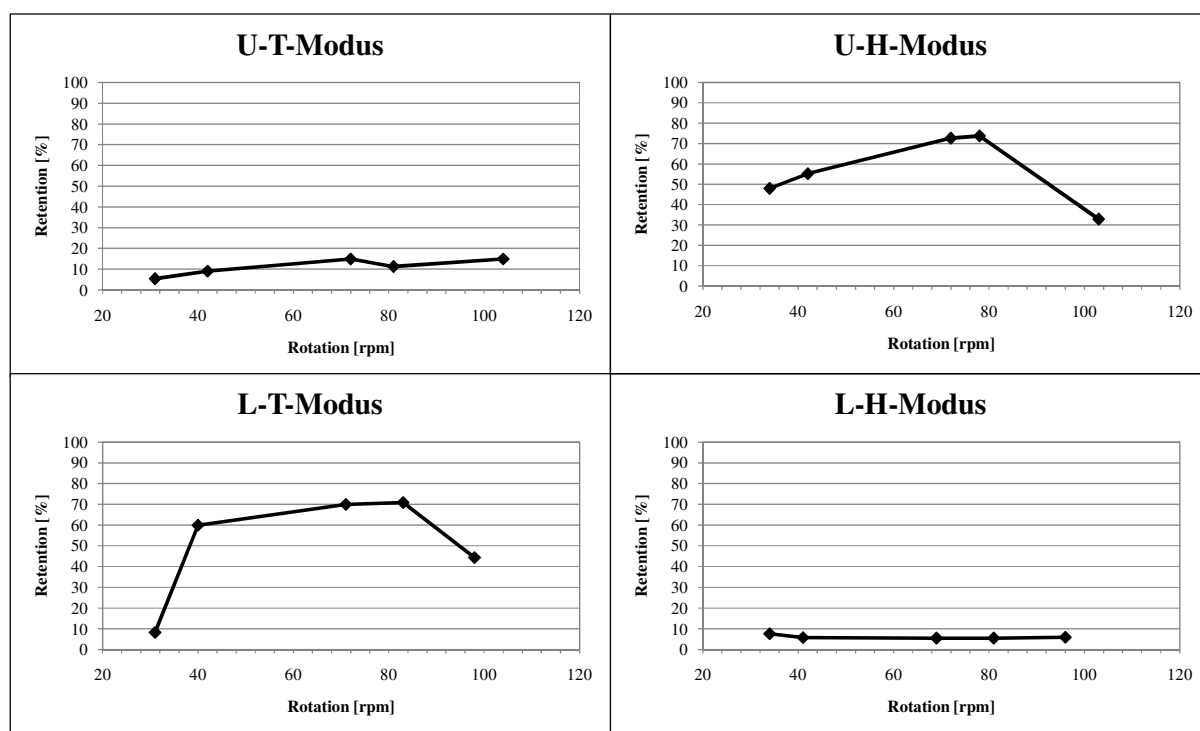


Abbildung 3.7: Retentionsstudie des Fließmittelsystems
n-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser/*n*-Butanol (1/2/1/2/1, v/v/v/v/v)

Anhand der Retentionsstudie erwiesen sich der U-H- und der L-T-Modus als geeignet. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 70-80 rpm verblieben > 70 % der stationären Phase auf dem Coil. Dies kann durch die Apolarität des getesteten Fließmittelsystems begründet werden. Als Folge besitzt das Fließmittelsystem ein unilaterales hydrodynamisches Fließverhalten der schweren Phase zum Head-Ende, wodurch höhere Retentionen der stationären Phase bei Trennungen in den Elutionsmodi L-T und U-H erreicht werden (vergl. Abschnitt 2.5.2.1). Unter Einsatz der U-T- und L-H-Modi konnten bei keiner Rotationsgeschwindigkeit ausreichende Retentionen erzielt werden. In Tabelle 7.2 des Anhangs sind die Parameter und Daten der Retentionsstudie zusammengefasst. Die nachfolgenden LSRCCC-Trennungen wurden im U-H- und L-T-Modus durchgeführt.

LSRCCC-Trennung

Zur Auftrennung von Stilbenoiden im Großmaßstab wurden 10,4 g des aufgereinigten Weinrebenextraktes Vineatrol[®]30 mittels LSRCCC (I) im U-H-Modus unter Verwendung

einer Rotationsgeschwindigkeit von 78 rpm, einer Flussrate von 4 mL/min und des zuvor getesteten Fließmittelsystems fraktionierte. In Abbildung 3.8 ist das LSRCCC-Chromatogramm der Vineatrol®30 Trennung bei 280 nm dargestellt. Ein Überblick über die Zusammensetzung der einzelnen LSRCCC-Fraktionen befindet sich in Tabelle 7.3 des Anhangs.

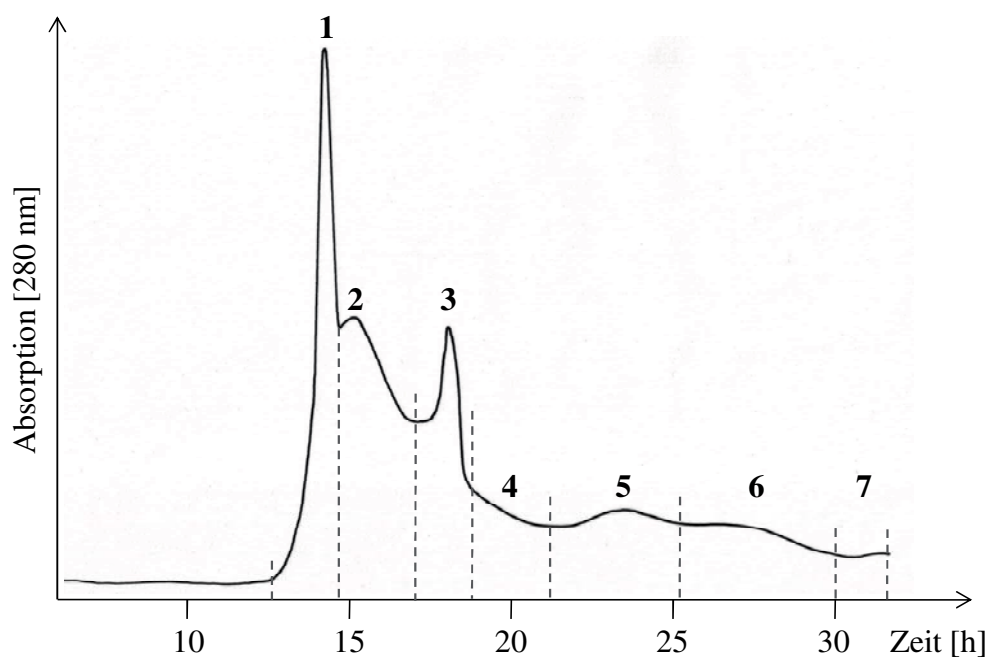


Abbildung 3.8: LSRCCC-Chromatogramm der Trennung (I) von Vineatrol®30 bei 280 nm

Im U-H-Modus wurde die organische Phase als mobile Phase (Head to Tail) eingesetzt. Lipophile Stilbenoligomere eluierten demzufolge vor polaren Verbindungen. Nach einer Trennzeit von 31,5 h konnten sieben Fraktionen und die Coilfraktion erhalten werden. Abbildung 3.9 zeigt die HPLC-Chromatogramme (A-D) der LSRCCC(I)-Fraktionen 1, 2, 3 und 6 bei 306 nm. Die Verschiebung der Retentionszeiten im Vergleich zu den bereits abgebildeten HPLC-Chromatogrammen (Abschnitt 3.2) beruht auf der Verwendung von HPLC-Säulen unterschiedlicher Chargen. Eine eindeutige Zuordnung der vorhandenen Peaks gelang allerdings anhand von LC-MSⁿ-Messungen.

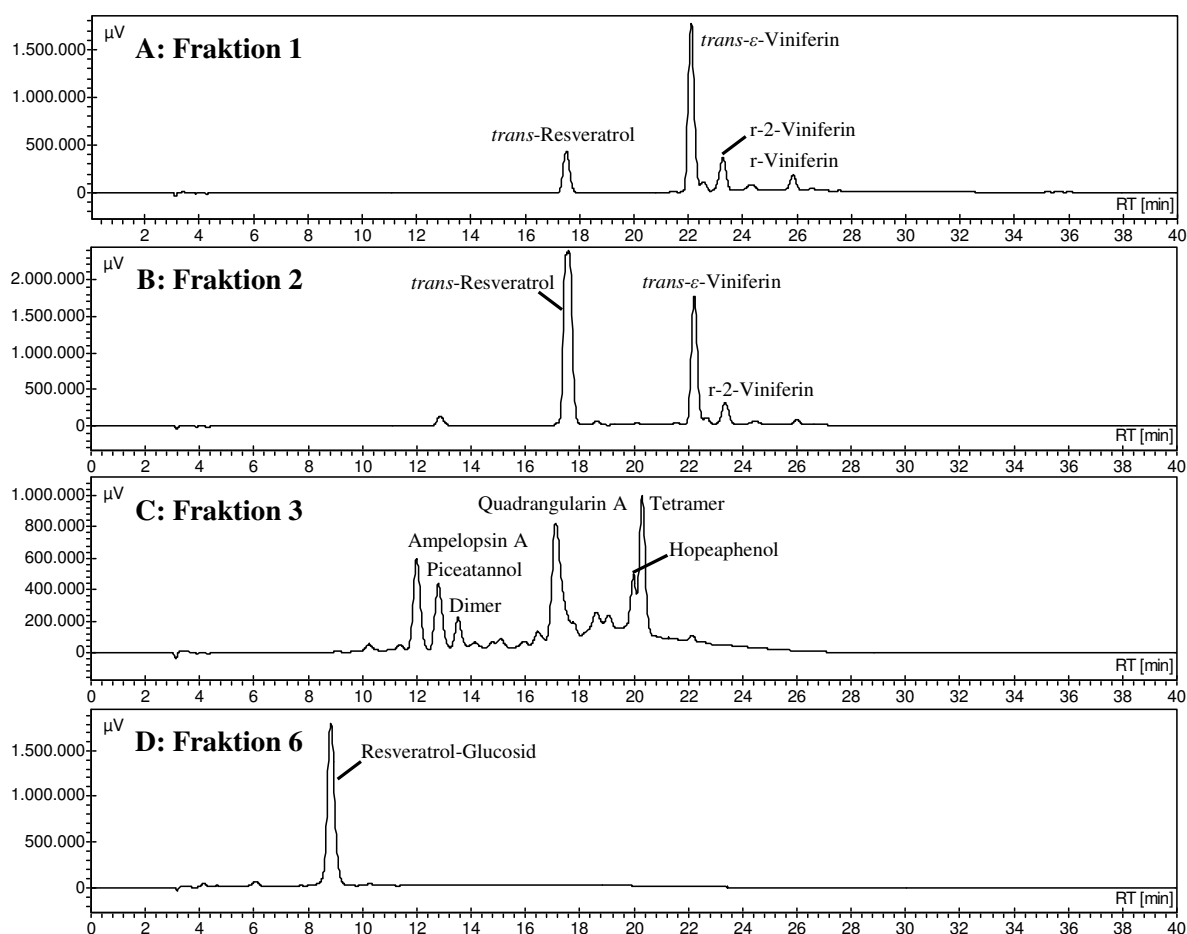


Abbildung 3.9: HPLC-Chromatogramme (A-D) der LSRCCC(I)-Fr. 1, 2, 3 und 6 bei 306 nm

Fraktion 1 der LSRCCC(I)-Trennung setzte sich aus der Hauptkomponente *trans-ε*-Viniferin (**S4**) und einem Gemisch aus *trans*-Resveratrol (**S1**), *r*-2-Viniferin (**S9**) und *r*-Viniferin (**S10**) zusammen. In Fraktion 2 konnten *trans*-Resveratrol (**S1**), *trans-ε*-Viniferin (**S4**) und *r*-2-Viniferin (**S9**) angereichert werden. Viele der Zielverbindungen wurden in den Fraktionen 3-5 aufkonzentriert, wodurch die Fraktionen sehr komplex zusammengesetzt waren (siehe Tabelle 7.3, 3-5). Die Anreicherung eines Resveratrol-Glucosids gelang in Fraktion 6. Hierbei handelt es sich um eine Minorkomponente, die im Weinrebenextrakt Vineatrol®30 nicht direkt nachgewiesen werden konnte. Nach Anreicherung mittels HSCCC-1 gelang die Detektion des Glucosids in Fraktion 1 bei einer Retentionszeit von 12,3 min (Abbildung 3.6). Durch die LSRCCC(I)-Trennung im Großmaßstab konnten 20 mg (90 % $\lambda_{\text{max}} = 306 \text{ nm}$) des Stilbens angereichert werden. Fraktion 7 und die Coilfraktion enthielten keine Zielverbindungen.

Die LSRCCC(I)-Fraktionen 2-4 konnten durch den Einsatz der HSCCC mit dem Fließmittelsystem *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/2/1/2, v/v/v/v), wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben, weiter aufgetrennt werden. Aufgrund der weniger komplexen Zusammensetzung der bereits chromatographierten Fraktionen, im Vergleich zur direkten Trennung des Weinrebenextraktes, lieferten diese HSCCC-Trennungen reinere Fraktionen, die zum Teil keine weitere Aufreinigung mittels präparativer HPLC benötigten. So wurden aus der LSRCCC(I)-Fraktion 3 (810 mg) 30 mg *trans*-Piceatannol (**S3**, **d**, 94 % λ_{max} = 306 nm) direkt mittels HSCCC isoliert. Abbildung 3.10 zeigt das HSCCC-Chromatogramm der Trennung von LSRCCC Fraktion 3 bei 280 nm und die in den Fraktionen enthaltenen Hauptverbindungen.

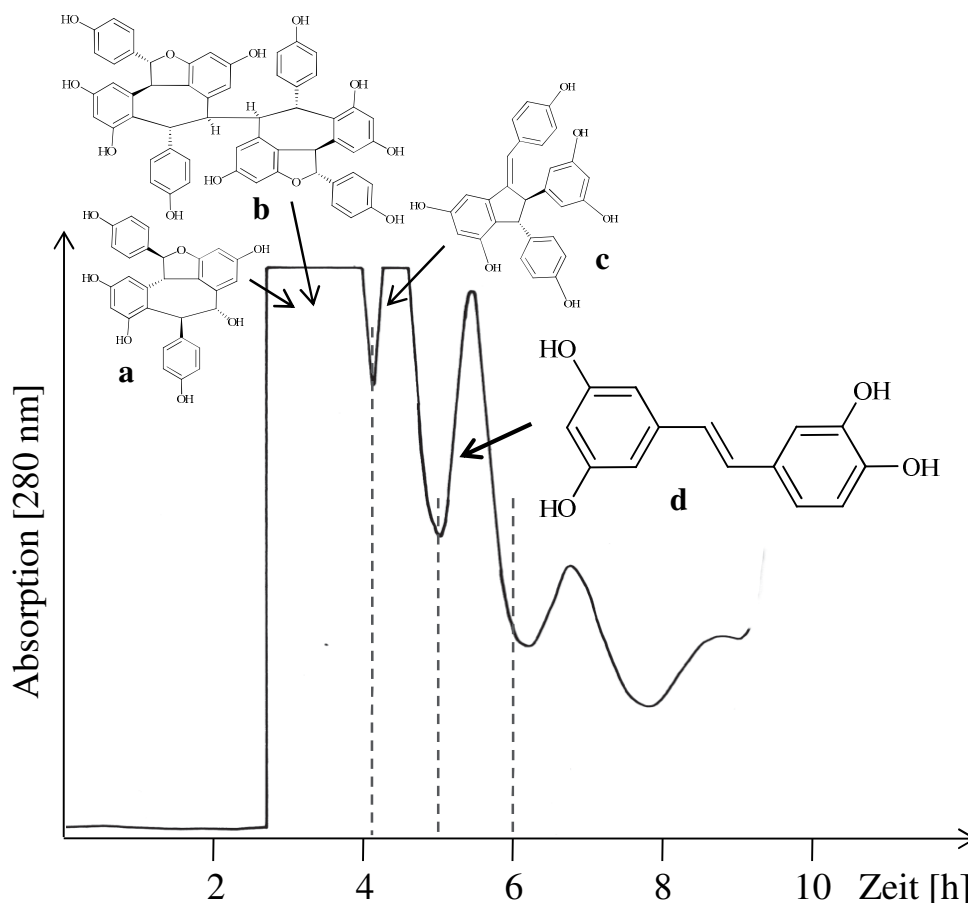


Abbildung 3.10: HSCCC-Chromatogramm der LSRCCC(I)-Fraktion 3 bei 280 nm und chemische Strukturen von Ampelopsin A (S5, a), Hopeaphenol (S6, b), Quadrangularin A (S8, c) und Piceatannol (S3, d)

Im Vergleich zu HSCCC-1 (Abschnitt 3.2.1) wurden weniger Peaks im HSCCC-Chromatogramm erhalten. Die Peakverteilung und Größe zeigt die Anreicherung der

in LSRCCC(I)-Fraktion 3 enthaltenen Stilbene. Die Elutionszeit des *trans*-Piceatannols (**S3**, **d**) nach 5-6 h ist bei beiden HSCCC-Trennungen gleich, wodurch die Reproduzierbarkeit der Trennung unter Einsatz des Fließmittelsystems *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/2/1/2, v/v/v/v) deutlich wird. Durch die Trennung der LSRCCC(I)-Fraktion konnte die Reinheit des Resveratrol-Derivates von 28 % (Fraktion 8, HSCCC-1) auf 94 % erhöht werden.

Eine weitere HSCCC-Fraktionierung der in Fraktion 2 (5,04 g) enthaltenen, lipophilen Stilbene wäre zusätzlich unter Einsatz des unpolaren Fließmittelsystems *n*-Hexan/Ethylacetat/ Methanol/Wasser (2/3/2/3, v/v/v/v) möglich.

Durch den Einsatz der LSRCCC im L-T-Modus (Trennung II) mit einer Probenmenge von 13,9 g eluierten die Stilbenoide in umgekehrter Reihenfolge. Aus dem fraktionierten Coilvolumen konnten insgesamt 31,8 mg des Tetramers *r*-Viniferin (**S10**) als Reinsubstanz (95 % $\lambda_{\max}$ = 306 nm) isoliert werden. In Abbildung 3.11 ist das HPLC-Chromatogramm der LSRCCC(II)-Fraktion 13 bei 306 nm dargestellt.

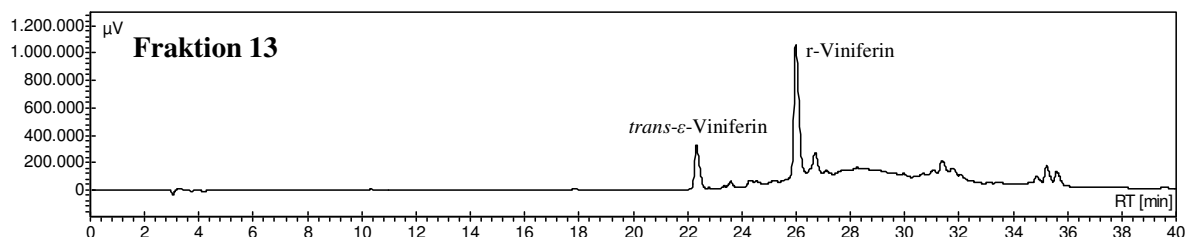


Abbildung 3.11: HPLC-Chromatogramm der LSRCCC(II)-Fraktion 13 (L-T-Modus) bei 306 nm

Die Fraktion 13 setzte sich aus den beiden Hauptverbindungen *r*-Viniferin (**S10**, 28 % $\lambda_{\max}$ = 306 nm) und *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) zusammen. Aus 174,3 mg wurden 26,7 mg *r*-Viniferin (**S10**) mittels präparativer HPLC (Nr. 10, Tabelle 5.6) gewonnen. Die weitere Aufarbeitung von Fraktion 12, einer ähnlich zusammengesetzten Fraktion, lieferte 5,1 mg des Resveratrol-Tetramers.

Um eine effektivere LSRCCC-Fraktionierung mit reineren Fraktionen zu erhalten, wäre der Einsatz eines unpolaren Fließmittelsystemes denkbar, in dem sich die Stilbenoide einheitlicher verteilen. So könnte das HSCCC-Fließmittelsystem *n*-Hexan/Ethylacetat/

Methanol/Wasser (1/2/1/2, v/v/v/v), ohne den Zusatz von *n*-Butanol, zur LSRCCC-Trennung verwendet werden.

Die LSRCCC eignet sich gut für die Vorfraktionierung des Weinrebenextraktes im präparativen Maßstab. In Kombination mit der HSCCC oder der präparativen HPLC lassen sich erfolgreich größere Mengen an reinen Stilbenoiden isolieren. Bis heute sind keine Applikationen für die Auftrennung von Weinrebenextrakten mittels LSRCCC publiziert worden. Folglich wurde in dieser Arbeit die LSRCCC erstmals zur Trennung eines Weinrebenextraktes eingesetzt.

3.2.3 Strukturaufklärung der isolierten Stilbene

Die Strukturaufklärung der aus dem Weinrebenextrakt Vineatrol[®]30 isolierten Stilbenoide wurde anhand von HPLC-ESI-MSⁿ, ¹H-, ¹³C-, DEPT-NMR- und 2D-NMR-Spektroskopie (vergl. Abschnitt 2.6) wie HSQC-, HMBC-, COSY- und ROESY-Experimenten durchgeführt. Die vollständigen Datensätze zur Strukturaufklärung befinden sich in Abschnitt 5.8.1.

Die Strukturaufklärung des isolierten Monomers *trans*-Resveratrol (**S1**) sowie seiner Derivate *trans*-Piceid (**S2**) und *trans*-Piceatannol (**S3**) wurde mit Hilfe von bereits publizierten Daten durchgeführt (BADERSCHNEIDER, 2000, TEGUO et al., 1996, FERRE-FILMON et al., 2005, TALVITIE et al., 1987). Die vollständigen NMR- und ESI-MSⁿ-Daten der drei Stilbenoide sind ebenfalls in Abschnitt 5.8.1 aufgeführt.

***trans-ε*-Viniferin (S4)**

Das Resveratrol-Dimer *trans-ε*-Viniferin (**S4**) wurde als beiges, amorphes Pulver mit Hilfe der präparativen HPLC (9) aus Fraktion 13/Coil der HSCCC-1 (Tabelle 5.6) isoliert. Die Verknüpfung der Monomer-Einheiten befindet sich zwischen der Doppelbindung des Ringsystems A und einer Hydroxygruppe von Ring B₂. Für die Strukturaufklärung konnten bereits publizierte NMR- und ESI-MSⁿ-Daten (KURIHARA et al., 1991, PEZET et al., 2003) herangezogen werden. In Abbildung 3.12 ist das ¹H-NMR-Spektrum und die chemische Struktur von *trans-ε*-Viniferin (**S4**) dargestellt.

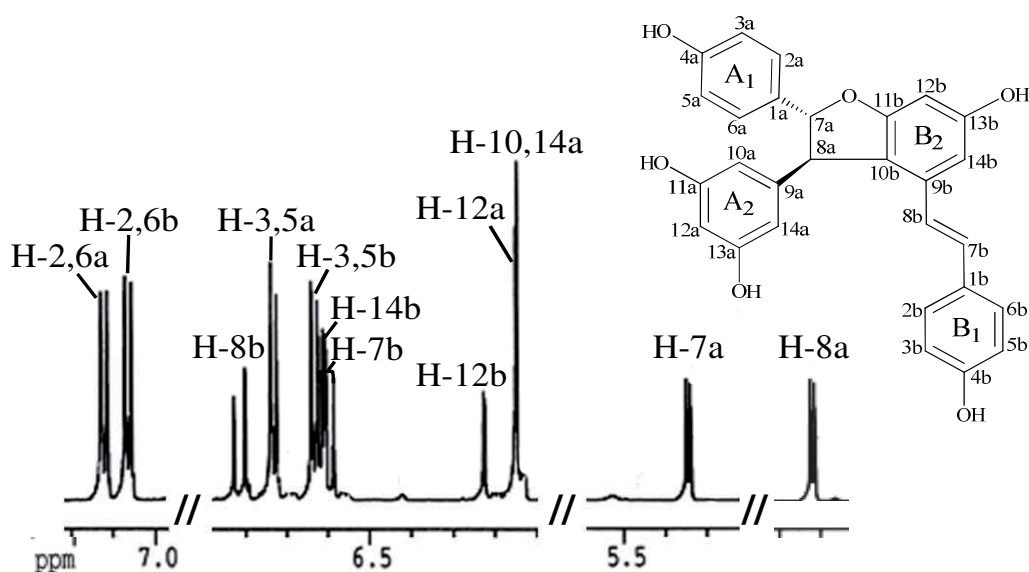


Abbildung 3.12: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CD_3COCD_3) und chemische Struktur von *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**)

Die Signale im Hochfeld des ^1H -Spektrums stehen für die aliphatischen Protonen H-8a und H-7a des Dihydrofuranringsystems. Bei einer chemischen Verschiebung von 6,14 - 6,15 ppm werden die aromatischen Protonen H-10,14a und H-12a des 1,3-Dihydroxybenzolrestes (Ring A₂) detektiert. Im Tieffeld befinden sich vier Dubletts des AA'BB'-Typs für die aromatischen Protonenpaare H-2,6a/H-3,5a und H-2,6b/H-3,5b. Des Weiteren sind die Protonen H-7b und H-8b mit der für *trans*-Doppelbindungen charakteristischen Kopplungskonstante von 16,3 Hz abgebildet.

Mittels LC-ESI-MSⁿ im negativen Modus wurde für *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) ein Molekülion mit der Masse m/z 453 $[\text{M}-\text{H}]^-$ gemessen, dessen Fragmente m/z 435, 411, 369, 359, 347, 333 detektiert werden konnten. Abbildung 3.13 zeigt das MS²-Spektrum von *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) mit einem möglichen Fragmentierungsmuster.

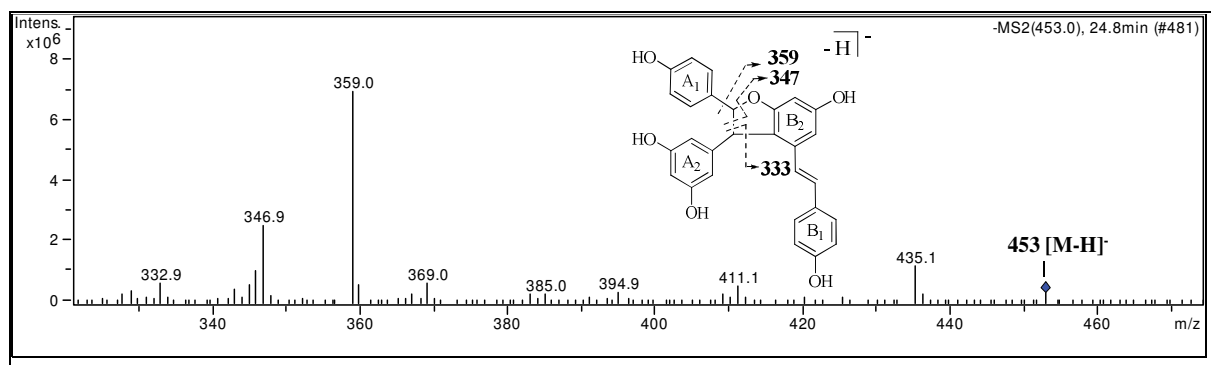


Abbildung 3.13: MS²-Fragmentierung von *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) im negativen Modus

Durch eine Wasserabspaltung kann das MS/MS-Fragment m/z 435 $[M-H-H_2O]^-$ mit einer Massendifferenz von $\Delta 18$ entstehen. Die beiden Fragmente m/z 411 ($\Delta 42$) und 369 ($\Delta 84$) sind nicht eindeutig zuzuordnen. Eine wiederholte Eliminierung als C_2H_2O oder C_3H_6 wäre in diesem Fall möglich. Im Vergleich mit SENDA et al. (1995) kann die Abspaltung eines Phenolrestes ($\Delta 94$) das Fragment m/z 359 freisetzen. Durch die Eliminierung eines Phenolrestes mit arylständiger CH-Gruppe ($\Delta 106$) wird das Fragment m/z 347 gebildet. Das negativ geladene Bruchstück m/z 333 ($\Delta 120$) kann durch eine Fragmentierung des Dimers zwischen Ringsystem A entstehen, wobei ein 1,3-Dihydroxybenzolrest mit arylständiger CH-Gruppe abgespalten wird.

Laut PEZET et al. (2003) ist eine Unterscheidung von *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) und dem strukturell sehr ähnlichen Resveratroldehydrodimer *trans*- δ -Viniferin (**S11**) (Abschnitt 3.5.2) anhand ihrer Massenspektren über den Vergleich der Fragmentierungsintensitäten von m/z 359 und 369 möglich. *Trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) zeigt eine stärkere Fragmentierung zu m/z 359, wohingegen *trans*- δ -Viniferin (**S11**) das Hauptfragment m/z 369 bildet.

Ampelopsin A (**S5**)

Das Resveratrol-Dimer Ampelopsin A (**S5**) wurde als beiges, amorphes Pulver mittels präparativer HPLC (4) aus Fraktion 2 der HSCCC-1 gewonnen. Im Vergleich zu den weiteren Stilbenoiden des Weinrebenextraktes besitzt es in seinem Strukturzentrum einen 7-Ring und eine zusätzliche Hydroxygruppe an Position C-8a. In Abbildung 3.14 ist ein Ausschnitt aus dem 1H -NMR-Spektrum in Aceton- d_6 dargestellt.

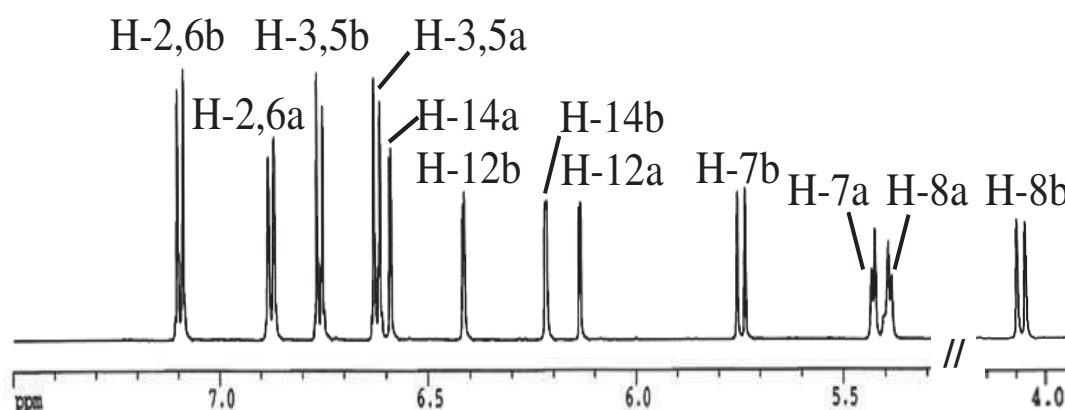


Abbildung 3.14: 1H -NMR-Spektrum von Ampelopsin A (**S5**) (600 MHz, CD_3COCD_3)

Die aliphatischen Protonen H-7a,b und H-8a,b befinden sich im Hochfeld des ^1H -NMR-Spektrums. Im olefinischen Bereich werden vier Dubletts für die aromatischen Protonen der zwei Phenolreste (Ring A₁ und B₁) und vier weitere Signale für die Protonen der 1,3-Dihydroxybenzolreste A₂ und B₂ erhalten. Aufgrund des Ringschlusses an C-10b werden keine Signale für die Stilben-typische *trans*-Doppelbindung detektiert.

Die Stereochemie des Resveratrol-Dimers konnte anhand von NOE-Messungen aufgeklärt werden. Abbildung 3.15 zeigt die chemische Struktur und einen Ausschnitt des ROESY-Spektrums von Ampelopsin A (**S5**).

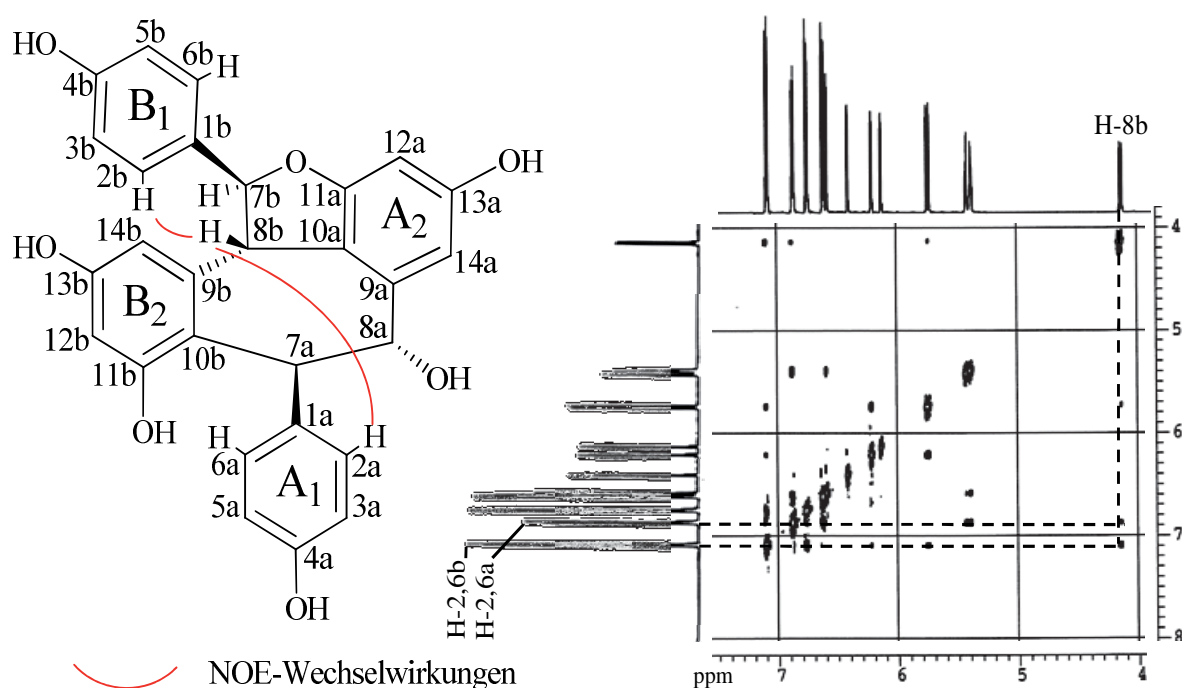


Abbildung 3.15: Chemische Struktur und Ausschnitt des ROESY-Spektrums (600 MHz, CD_3COCD_3) von Ampelopsin A (**S5**)

Die NOE-Korrelationen zwischen H-8b und H-2,6b sowie H-2,6a verdeutlichen die räumliche Anordnung der beiden Phenolreste und des Protons am 2,3-Dihydrofuransystem zueinander. Die für das isolierte Stilben erhaltenen 1D- und 2D-NMR-Daten stimmen mit dem Datensatz von LI et al. (1996) überein.

Hopeaphenol (**S6**)

Hopeaphenol (**S6**) wurde als beiges, amorphes Pulver ebenfalls aus Fraktion 2 der HSCCC-1 mit Hilfe der präparativen HPLC (4) (Tabelle 5.6) isoliert. Die erhaltenen Daten für die Strukturaufklärung entsprachen den bereits publizierten NMR-Daten von KAWABATA et al. (1992). Das Resveratrol-Tetramer besteht aus zwei dem Stilben Ampelopsin A (**S5**) sehr

ähnlichen Dimer-Einheiten. Aufgrund der vorhandenen Struktursymmetrie wird im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum ein vereinfachter Signaldatensatz eines Resveratrol-Dimers erhalten. Abbildung 3.16 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von Hopeaphenol (**S6**).

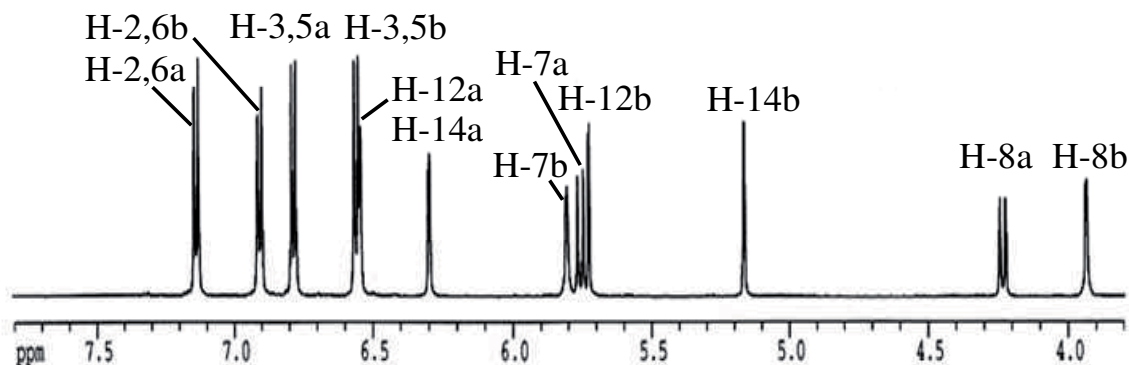


Abbildung 3.16: ^1H -NMR-Spektrum von Hopeaphenol (**S6**) (600 MHz, CD_3COCD_3)

Die Symmetrieachse des Tetramers verläuft vertikal zur Kohlenstoffbindung zwischen C-8b und C-8b'. Aufgrund der Symmetrie rufen die chemisch äquivalenten Protonen und Kohlenstoffatome jeweils nur ein Signal hervor, wodurch die vereinfachten Signalspektren entstehen. In Abbildung 3.17 ist die chemische Struktur und ein Ausschnitt des HMBC-Spektrums von Hopeaphenol (**S6**) dargestellt.

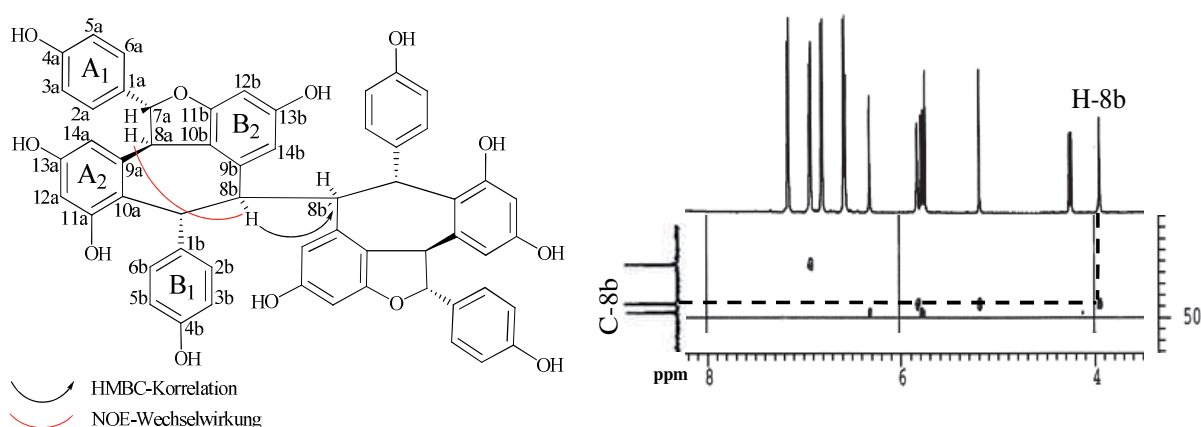


Abbildung 3.17: Chemische Struktur und Ausschnitt des HMBC-Spektrums (600 MHz, CD_3COCD_3) von Hopeaphenol (**S6**)

Die Korrelation von H-8b mit C-8b (C-8b') im HMBC-Spektrum (Abbildung 3.17) beweist die Verknüpfung der beiden Dimer-Einheiten zum Tetramer. Bei einem Resveratrol-Dimer würde diese Korrelation nur im HSQC-Spektrum zu sehen sein, in welchem die direkten

C-H-Verknüpfungen detektiert werden. Ein Ausschnitt des ROESY-Spektrums von Hopeaphenol (**S6**) ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

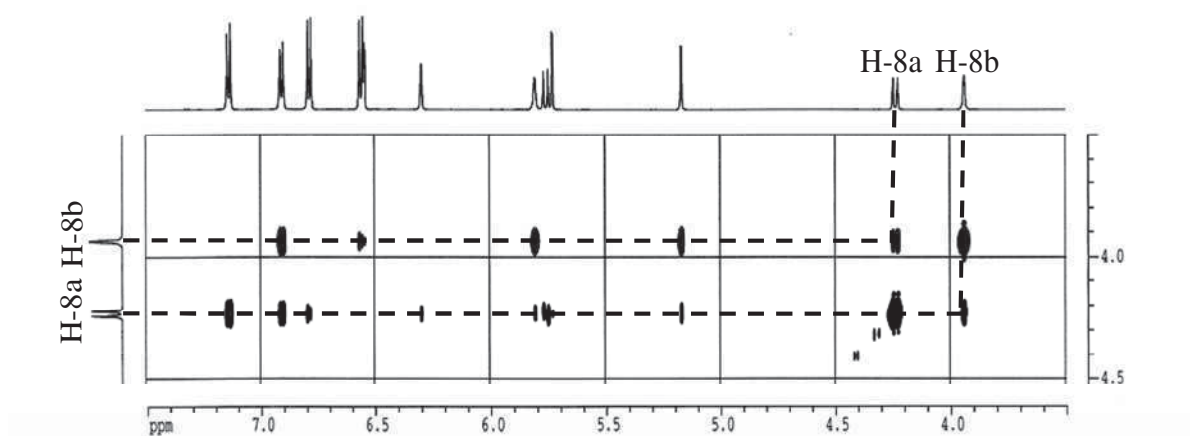


Abbildung 3.18: Ausschnitt des ROESY-Spektrums von Hopeaphenol (**S6**) (600 MHz, CD_3COCD_3)

Die NOE-Wechselwirkungen zwischen H-8a und H-8b im ROESY-Spektrum verdeutlichen ihre einheitliche Stereochemie in einer Ebene. Die vollständigen NMR- und ESI-MSⁿ-Daten von Hopeaphenol (**S6**) sind in Abschnitt 5.8.1 aufgeführt.

Parthenocissin A (**S7**)

Parthenocissin A (**S7**) wurde als beiges, amorphes Pulver mittels präparativer HPLC ((6), Tabelle 5.6) aus den HSCCC-Fractionen 5 und 6 (HSCCC-1) gewonnen. Es handelt sich um ein Resveratrol-Dimer, dessen Monomereinheiten über die Doppelbindungen verknüpft vorliegen. Somit besitzt diese Verbindung kein Dihydrofuranringsystem. Die chemische Struktur von Parthenocissin A (**S7**) ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

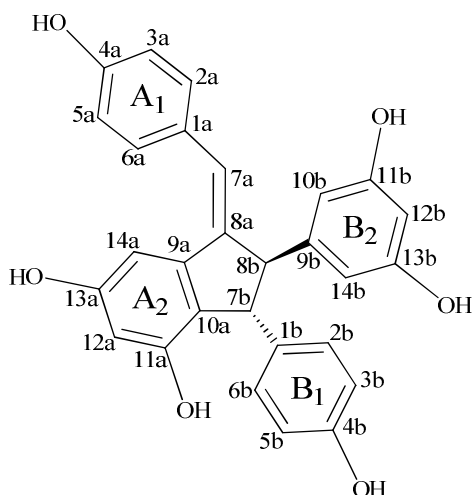


Abbildung 3.19: Chemische Struktur von Parthenocissin A (S7)

Mittels LC-ESI-MSⁿ im negativen Modus wurde ein Molekülion mit der Masse m/z 453 $[M-H]^-$ gemessen, dessen Fragmente m/z 359 und 289 detektiert werden konnten. Abbildung 3.20 zeigt das MS²-Spektrum von Parthenocissin A (S7) und ein mögliches Fragmentierungsschema.

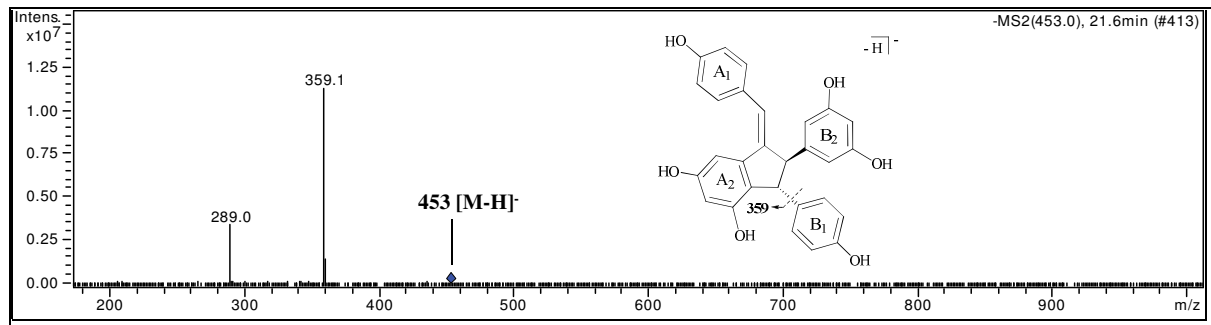


Abbildung 3.20: MS²-Fragmentierung von Parthenocissin A (S7) im negativen Modus

Das MS/MS-Fragment m/z 359 kann durch die Abspaltung eines Phenolrestes (Massendifferenz von Δ 94) entstehen (SENDA et al. 1995). Nicht eindeutig zuzuordnen ist das Fragment m/z 289, welches eine Massendifferenz von Δ 164 besitzt.

Die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie wurde durch die geringe Anzahl an zentralgebundenen Protonen erschwert. Zur Auswertung wurden daher hauptsächlich die Protonen H-7b, H-8b und H-7a herangezogen. Das ¹H-NMR Spektrum (Abbildung 3.21) von Parthenocissin A (S7) in Aceton-d₆ zeigt vier Paare aromatischer, ortho-koppelnder Protonen

des AA'XX' Typs bei δ 6,81 und 7,22 (2H, d, $J = 8,6$, $J = 8,4$ Hz) für Ring A₁ und δ 6,73 und 7,00 (beide 2H, d, $J = 8,6$ Hz) für Ring B₁. Des Weiteren wird eine Gruppe aromatischer, meta-koppelnder Protonen des AX₂ Typs bei δ 6,20 (2H, m, H-10b, H-14b) und 6,19 (1H, m, H-12b) für Ring B₂, sowie eine Gruppe aromatischer, meta-koppelnder Protonen bei δ 6,27 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-12a) und 6,53 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-14a) für Ring A₂ detektiert. Die aliphatischen Protonen der Verbindung sind bei δ 4,26 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H-7b) und 3,75 (1H, br. s, H-8b) zu finden. Das Proton der trisubstituierten Doppelbindung von Ringsystem A tritt bei δ 6,31 (1H, br. s, H-7a) in Resonanz.

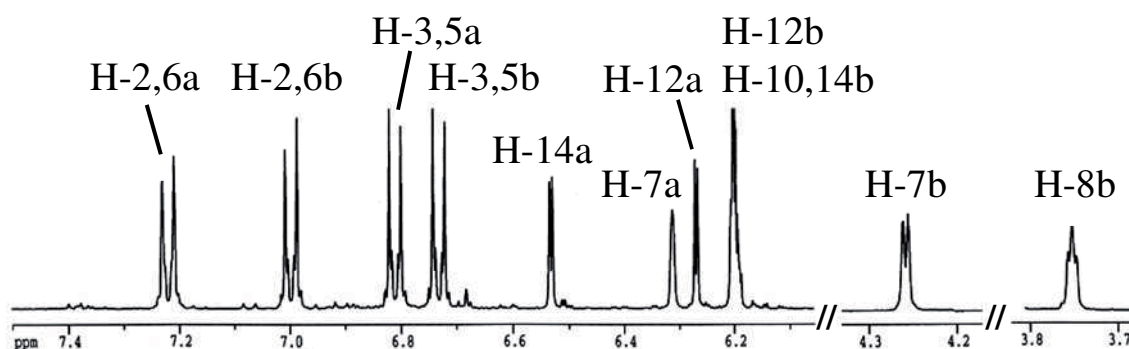


Abbildung 3.21: ¹H-NMR Spektrum von Parthenocissin A (S7) (600 MHz, CD₃COCD₃)

Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt zwei aliphatische C-Atome bei δ 55,0 und 64,5 (C-7b und C-8b). Die weiteren 26 Signale zwischen δ 101,4 und 159,4 repräsentierten die aromatischen und olefinischen C-Atome der Verbindung. Alle protonierten C-Atome waren ebenfalls im HSQC-Spektrum sichtbar. Die Wechselwirkungen der Ringsysteme, Doppelbindungen und aliphatischen Protonen wurden durch die Korrelationen des 2D ¹H-¹H-COSY-Spektrums bestätigt. Des Weiteren trugen HMBC-Messungen zur Strukturaufklärung bei. Abbildung 3.22 zeigt einen Ausschnitt des HMBC-Spektrums von Parthenocissin A (S7).

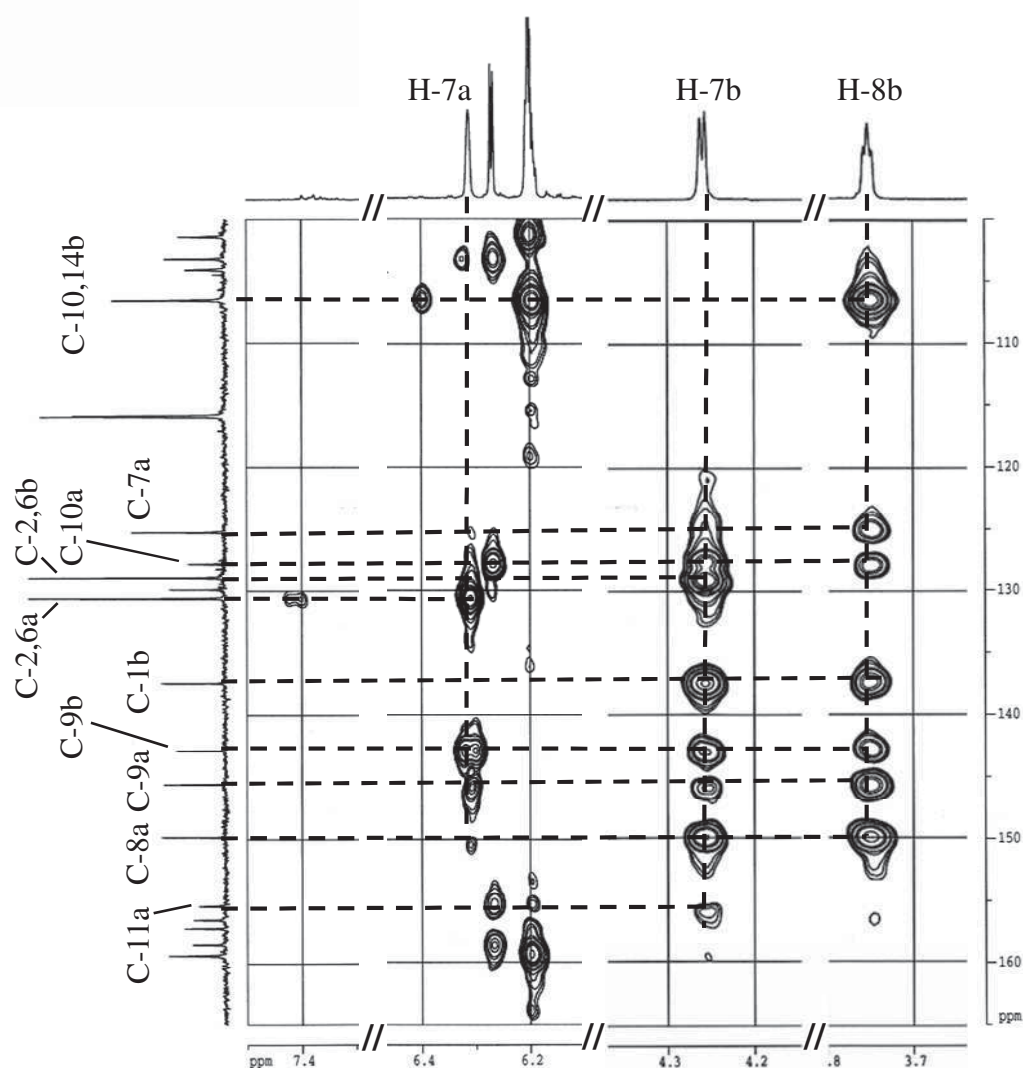


Abbildung 3.22: Ausschnitt des HMBC-Spektrums von Parthenocissin A (S7) (600 MHz, CD_3COCD_3)

Im HMBC-Spektrum sind wichtige CH-Fernkorrelationen über zwei oder drei Bindungen zwischen H-7b und acht Kohlenstoffsignalen [δ 137,5 (C-1b), 129,0 (C-2,6b), 64,5 (C-8b), 145,6 (C-9b), 149,8 (C-8a), 142,9 (C-9a), 127,9 (C-10a), 155,4 (C-11a)] zu finden. Ähnliche Korrelationen besitzt Proton H-8b [δ 137,5 (C-1b), 55,0 (C-7b), 145,6 (C-9b), 106,5 (C-10,14b), 125,2 (C-7a), 149,8 (C-8a), 142,9 (C-9a), 127,9 (C-10a)]. Die Art und Anzahl der Korrelationen belegt die zentrale Position von H-7b und H-8b innerhalb der Struktur. Proton H-7a korreliert mit den Kohlenstoffatomen C-2,6a, C-9a und C-8b und bestätigt damit ebenfalls die Verknüpfung der beiden Monomereinheiten A und B miteinander.

Zur Klärung der relativen Stereochemie von Parthenocissin A (**S7**) wurden ROESY-Messungen herangezogen. Ausgewählte CH-Fernkorrelationen und NOE-Wechselwirkungen sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

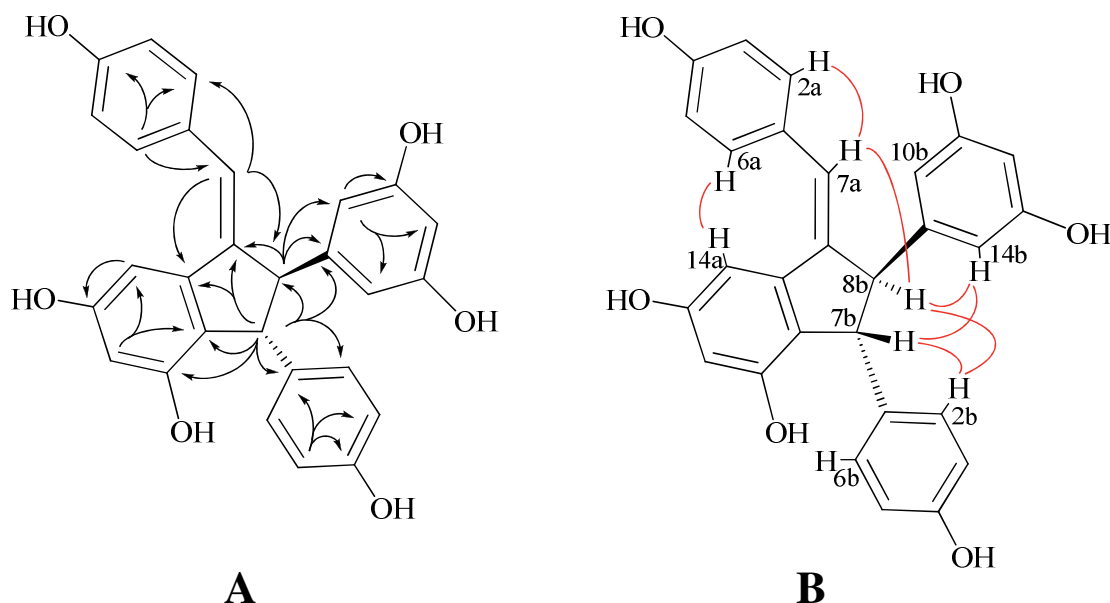


Abbildung 3.23: Ausgewählte CH-Fernkorrelationen (A) und NOE-Wechselwirkungen (B) von Parthenocissin A (**S7**)

Signifikante NOE-Wechselwirkungen sind zwischen H-8b und den Protonen H-7a, H-2,6b sowie H-10,14b zu finden. Des Weiteren korreliert H-7b mit den zwei Protonenpaaren H-10,14b und H-2,6b. Diese NOEs stimmen mit den Korrelationen einer *trans*-Konfiguration an C-7b und C-8b überein. Zusätzlich treten Korrelationen zwischen H-7a/H-2,6a und H-7a/H-8b auf. Die Wechselwirkungen zwischen H-14a und H-2,6a verdeutlichen die räumliche Anordnung des Ringes A₁ an der Doppelbindung. Abbildung 3.24 zeigt zwei Ausschnitte des ROESY-Spektrums von Parthenocissin A (**S7**).

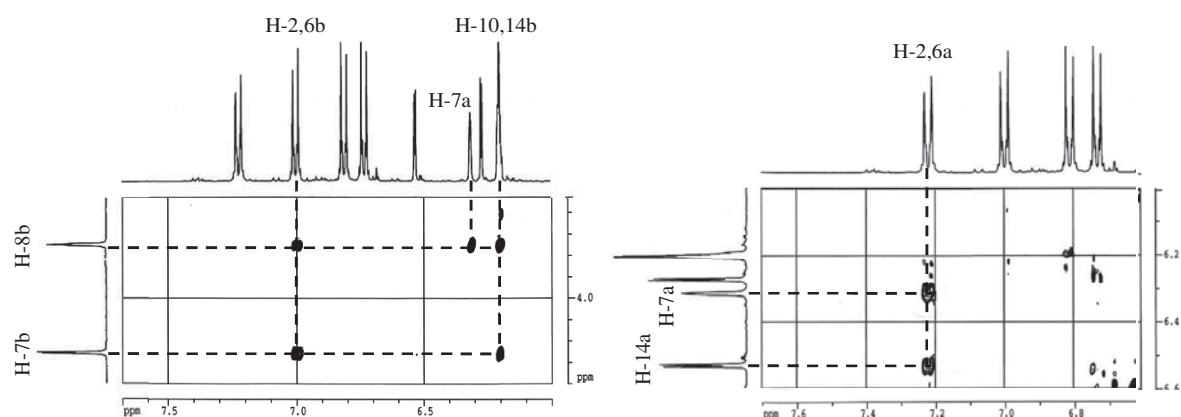


Abbildung 3.24: Ausschnitte des ROESY-Spektrums von Parthenocissin A (S7) (600 MHz, CD_3COCD_3)

Die durchgeführte Strukturaufklärung stimmt mit zuvor publizierten NMR-Daten (TANAKA et al., 1998) überein. So wurde das Resveratrol-Dimer bereits aus verschiedenen zur Familie der Vitaceae gehörenden Vertretern wie *Parthenocissus*-Varietäten (HE et al., 2007, HE et al., 2008, TANAKA et al., 1998), *Cyhostemma crotalarioides* (DUCROT et al., 1998) und aus dem französischen Rotwein Bergerac (VITRAC et al., 2001) isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals, Parthenocissin A (S7) im Weinrebenextrakt Vineatrol®30 aus *Vitis vinifera* nachzuweisen.

Quadrangularin A (S8)

Quadrangularin A (S8) wurde in Fraktion 4 der HSCCC-1 angereichert. Die Isolierung des Dimers mittels präparativer HPLC (Nr. 5, Tabelle 5.6) gelang in Form eines Gemisches (1:1) mit einem weiteren unbekannten Dimer. Anhand von 2D-NMR-Experimenten gelang es, Quadrangularin A (S8) als eines der enthaltenen Stilbene nachzuweisen. In Abbildung 3.25 ist die chemische Struktur des Resveratrol-Dimers mit der NOE-Wechselwirkung zwischen den Protonen H-14a und H-7a dargestellt.

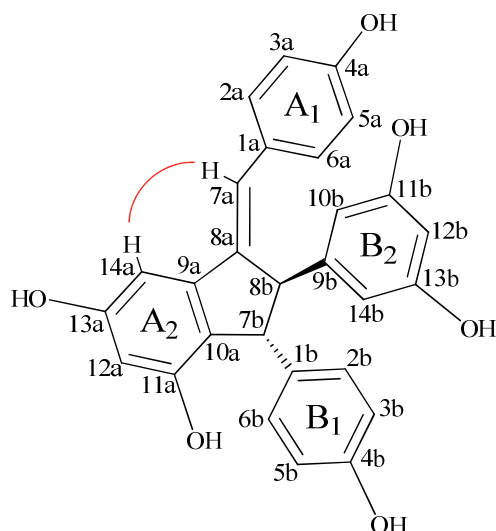


Abbildung 3.25: Chemische Struktur von Quadrangularin A (S8) mit NOE-Wechselwirkung

Quadrangularin A (S8) stellt ein Strukturisomer von Parthenocissin A (S7) dar, bei dem die Positionen von Ring A₁ und H-7a vertauscht vorliegen. Die NOE-Wechselwirkung zwischen H-14a und H-7a verdeutlicht die räumliche Anordnung von Ring A₁ an der Doppelbindung. Im Vergleich zu Parthenocissin A (S7) fehlten die NOE-Wechselwirkungen zwischen H-14a und H-2,6a, sowie H-7a und H-8b. Die HSQC-Daten und CH-Fernkorrelationen entsprachen den Daten von Parthenocissin A (S7). Die erhaltenen Daten zur Strukturaufklärung stimmten mit den bereits publizierten NMR-Daten von HE et al. (2007) überein.

Aus verschiedenen Vertretern der Familie der Vitaceae wie *Parthenocissus*-Varietäten (KIM et al., 2005, HE et al., 2007) und *Cissus quadrangularis* (ADESANYA et al., 1999) wurde Quadrangularin A (S8) bereits isoliert. Des Weiteren gelang LI et al. (2006) die Totalsynthese des Resveratrol-Dimers. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Quadrangularin A (S8) erstmals im Weinrebenextrakt Vineatrol[®]30 aus *Vitis vinifera* nachgewiesen.

r-2-Viniferin (S9) und r-Viniferin (S10)

Die Resveratrol-Tetramere r-2-Viniferin (S9) und r-Viniferin (S10) wurde als beiges amorphes Pulver mittels präparativer HPLC (Nr. 6, Tabelle 5.6) aus den HSCCC-Fractionen 6 und 7 sowie mittels präparativer HPLC (Nr. 9, Tabelle 5.6) aus Fraktion 13/Coil (HSCCC-1) isoliert. Die oberen Einheiten gleichen in ihrer chemischen Struktur denen von *trans-ε*-Viniferin (S4) an dessen Position C-3' eine weitere Dimer-Einheit gebunden vorliegt. Abbildung 3.26 zeigt die chemischen Strukturen der Stilbene mit ausgewählten NOE-Wechselwirkungen.

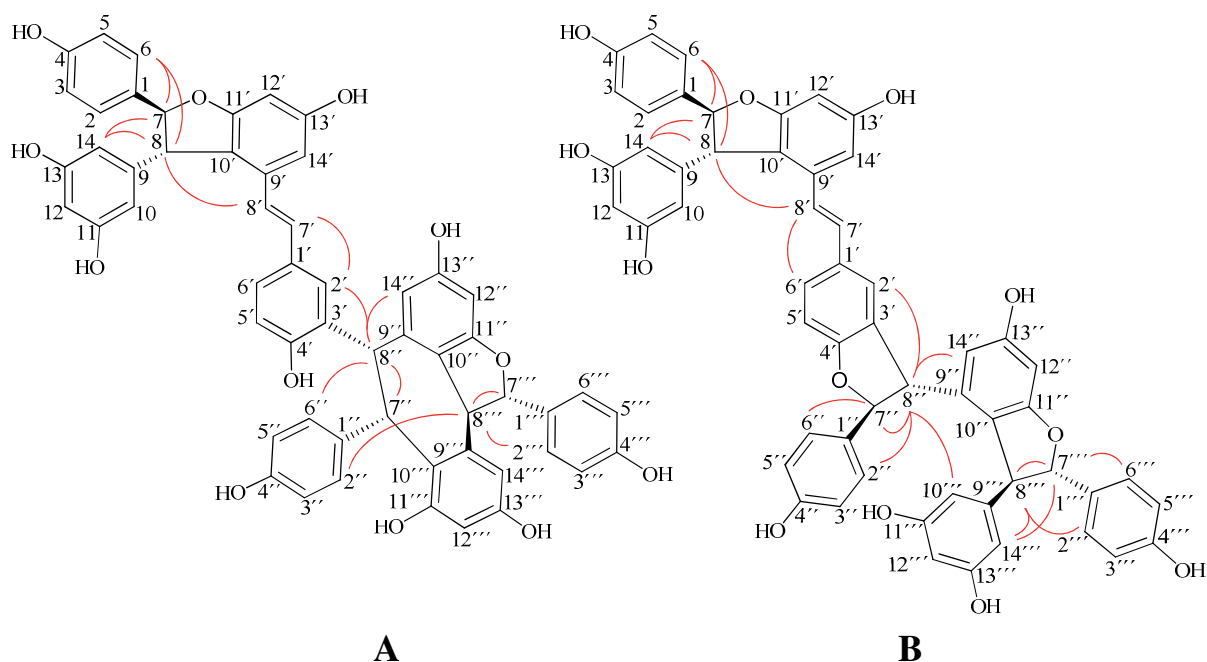


Abbildung 3.26: Chemische Strukturen von r-2-Viniferin (S9, A) und r-Viniferin (S10, B) mit ausgewählten NOE-Wechselwirkungen

Die Struktur von r-2-Viniferin (**S9**) enthält zwei Dihydrofuranringsysteme und einen Ringschluss zwischen den Kohlenstoffatomen C-7'' und C-10'''. Im Vergleich zu r-2-Viniferin (**S9**) besitzt r-Viniferin (**S10**) drei Dihydrofuranringsysteme. Die untere Dimer-Einheit ist zusätzlich zur Position C-3' über die Hydroxygruppe an Position C-4' gebunden, wodurch ein weiteres Ringsystem vorliegt.

Die Stereochemie der Resveratrol-Tetramere wurde über ROESY-Messungen ermittelt. Beide Stilbene zeigten NOE-Wechselwirkungen zwischen H-7/H-10,14 und H-8/H-2,6. Die NOE-Wechselwirkungen von r-2-Viniferin (**S9**) zwischen H-8'''/H-2'',6'' sowie H-8'''/H-2''',6''' bewiesen die Stereochemie der zwei Phenolreste und des Protons H-8''' in einer Ebene. Für die weitere Aufklärung der Stereochemie von r-Viniferin (**S10**) wurden die NOE-Wechselwirkungen zwischen H-8''/H-2'',6'' und H-8''/H-10''',14''' sowie H-8'''/H-2''',6''' herangezogen. In Abbildung 3.27 sind die ^1H -NMR-Spektren beider Stilbene dargestellt.

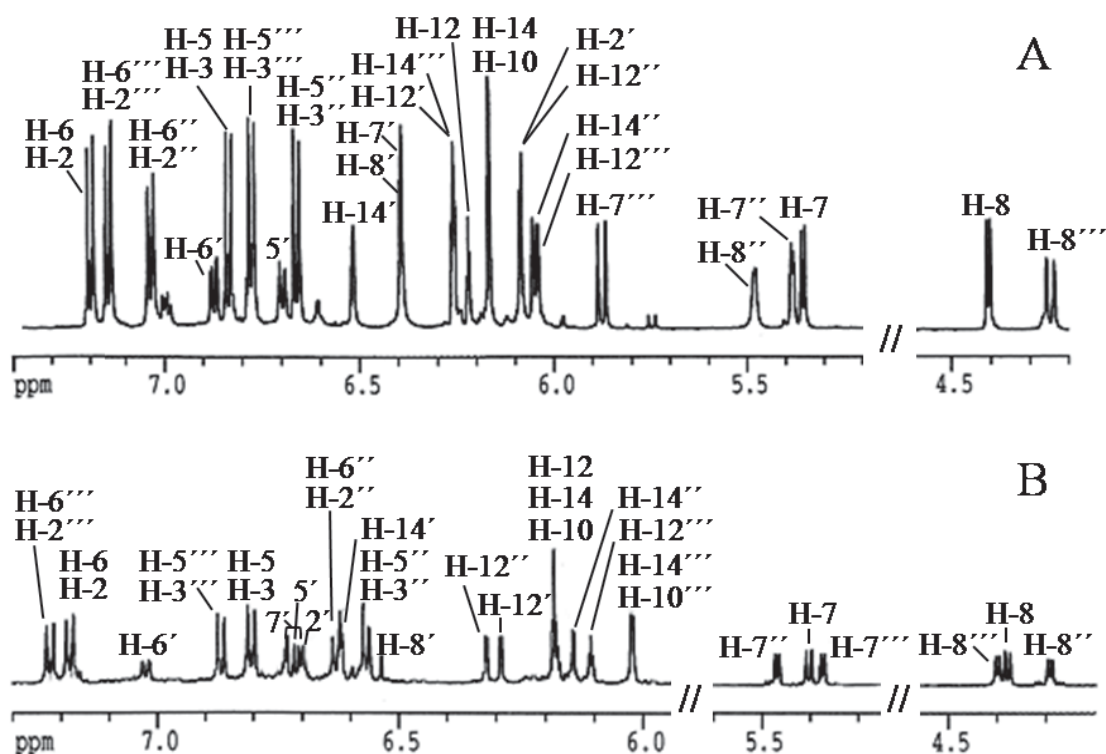


Abbildung 3.27: Ausschnitte aus den ¹H-NMR-Spektren von r-2-Viniferin (S9, A) und r-Viniferin (S10, B) (600 MHz, CD₃COCD₃)

Die strukturellen Unterschiede an Position C-3' werden durch einen Vergleich der ¹H-NMR-Spektren, insbesondere der chemischen Verschiebungen der Protonen H-8'' und H-2', sichtbar. Für r-2-Viniferin (S9) ist eine Tieffeldverschiebung von H-8'' im ¹H-NMR-Spektrum zu finden. H-2' ist indessen in dem Spektrum von r-Viniferin (S10) tieffeldverschoben. Protonen wie H-7 und H-8, die in beiden Strukturen nahezu identische, chemische Umgebungen besitzen, weisen in beiden Spektren die gleichen chemischen Verschiebungen auf. Die erhaltenen NMR-Datensätze beider Tetramere stimmten mit den vorhandenen Literaturdaten überein (MATTIVI und RENIERO, 1992, KORHAMMER et al., 1995).

3.3 Weinrebenextrakt der Rebsorte Spätburgunder

Zusätzlich zum kommerziellen Weinrebenextrakt Vineatrol[®]30 wurde das Stilbenoidprofil eines Rebholzes der Rebsorte Spätburgunder untersucht. Hierzu wurde ein ethanolischer Extrakt hergestellt und die enthaltenen Stilbene mit den Daten von Vineatrol[®]30 verglichen. Zur Extrakterstellung wurden 240 g gefriergetrocknetes und zerkleinertes Pflanzenmaterial

mit *n*-Hexan entfettet, mit 80 % Ethanol extrahiert und der gewonnene ethanolische Extrakt (17 g) einer Hexanfällung unterzogen. Nach der Entfernung der polymeren Inhaltsstoffe wurden 7,2 g des aufgereinigten Extraktes erhalten. Somit wurden 57,6 % polymere Verbindungen durch die Lösemittelfällung abgetrennt. Im Vergleich zu Vineatrol® 30 (29,1 % gefällte Polymere) enthielt der hergestellte Extrakt einen höheren Polymeranteil. In der Literatur ist beschrieben, dass Rebholz polymere Proanthocyanidine enthält (SOUQUET et al., 2000). Hierbei handelt es sich um kondensierte Tannine, die aus Flavan-3-ol-Bausteinen aufgebaut sind und oligomere sowie polymere Verbindungen bilden (SANTOS-BUELGA und SCALBERT, 2000, NASSIRI-ASL und HOSSEINZADEH, 2009). Um den polymeren, nichtstilbenoiden Anteil des Weinrebenextraktes der Rebsorte Spätburgunder näher zu analysieren, wurde eine Phloroglucinolyse durchgeführt.

Die Phloroglucinolyse wird in der Polymeranalytik von Proanthocyanidinen angewendet. Sie ist eine säurekatalysierte Degradation, bei der die interflavanoiden Bindungen der polymeren Proanthocyanidine gespalten und alle im Molekül enthaltenen Bausteine bis auf die terminale Einheit als positive Carbokationen erhalten werden. Das Nukleophil Phloroglucinol reagiert mit den Carbokationen zu charakteristischen Addukten, wodurch die Flavan-3-ol-Verteilung im Polymer zugänglich gemacht wird (KÖHLER, 2006).

Für die Durchführung einer Phloroglucinolyse wurde die von KENNEDY und JONES (2001) beschriebene Methode modifiziert. Abbildung 3.28 zeigt die auf einer Normalphase gemessenen HPLC-Chromatogramme des Spätburgunderextraktes vor und nach der Phloroglucinolyse.

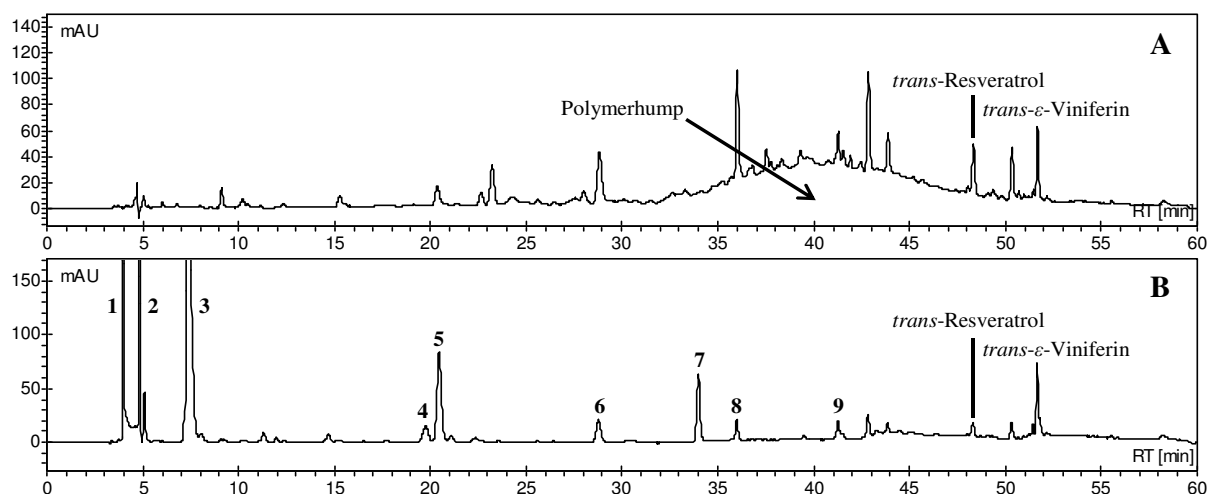


Abbildung 3.28: HPLC-Chromatogramme einer Phloroglucinolyse des Spätburgunderextraktes bei 280 nm, A: vor Degradation, B: Spaltprodukte nach der Phloroglucinolyse Ascorbinsäure (1), Dehydroascorbinsäure (2), Phloroglucinol (3) Catechin-Phloroglucinol (4), Epicatechin-Phloroglucinol (5), Catechin (6), Epicatechingallat-Phloroglucinol (7), Epicatechin (8), Epicatechingallat (9)

Neben den Reagenzien Ascorbinsäure und Phloroglucinol (Phl) konnten sechs typische Phloroglucinolyse-Spaltprodukte Catechin-Phloroglucinol (C-Phl), Epicatechin-Phloroglucinol (EC-Phl), Catechin (C), Epicatechingallat-Phloroglucinol (ECG-Phl), Epicatechin (EC) und Epicatechingallat (ECG) im HPLC-Chromatogramm (Abbildung 3.28, B) detektiert werden. Die erhaltenen oberen Einheiten setzten sich hierbei aus 18,5 % C-Phl, 74,3 % EC-Phl und 7,2 % ECG-Phl zusammen (ESATBEYOGLU et al., 2010). Der Polymerhump wurde bei der Umsetzung vollständig abgebaut. Anhand der Phloroglucinolyse konnte somit bewiesen werden, dass es sich bei einem Großteil der polymeren Verbindungen um Proanthocyanidin-Polymere handelt.

Um das Stilbenspektrum des Rebholzes zu bestimmen, wurde zuerst der unbehandelte Weinrebenextrakt mittels HPLC-PDA und HPLC-ESI-MSⁿ analysiert. Abbildung 3.29 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Spätburgunderextraktes bei 280 nm.

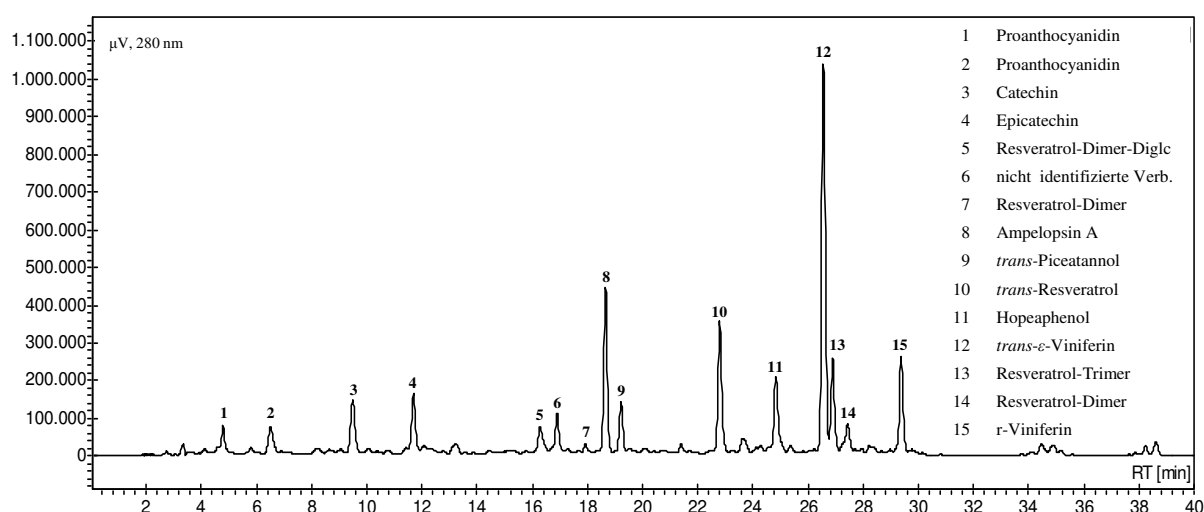


Abbildung 3.29: HPLC-Chromatogramm des Spätburgunderextraktes bei 280 nm

Im Vergleich zu Vineatrol[®]30 enthält der Spätburgunderextrakt einen größeren Anteil an nicht-stilbenoiden Polyphenolen. Peaks 1-4, im vorderen Bereich des Chromatogrammes (0-12 min), konnten zwei Proanthocyanidinen mit Molekülonen m/z 577 $[M-H]^-$ sowie Catechin und Epicatechin (m/z 289 $[M-H]^-$) zugeordnet werden (PÜSSA et al., 2006). Bei der Hauptverbindung des Extraktes handelt es sich um das Resveratrol-Dimer *trans-ε*-Viniferin (S4, Peak 12). Des Weiteren wurden Ampelopsin A (S5, Peak 8), *trans*-Piceatannol (S3, Peak 9), *trans*-Resveratrol (S1, Peak 10), Hopeaphenol (S6, Peak 11), r-Viniferin (S10, Peak 15) und weitere, nicht identifizierte Stilbenoligomere nachgewiesen. Eine Übersicht über die im Spätburgunder Rebholz enthaltenen Stilbenoide ist in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Parameter der Stilbenoide des Weinrebenextraktes der Rebsorte Spätburgunder

Peak	R _t [min]	PDA- λ_{max} [nm]	Molekülion m/z [M-H] ⁻	ESI-MS ² -Fragmente	Stilbenoide
1	4,8	275	577	559, 451, 425, 407, 289	Proanthocyanidin
2	6,5	279	577	559, 451, 425, 407, 289	Proanthocyanidin
3	9,5	280	289	245, 205, 179, 161	Catechin
4	11,7	280	289	245, 205, 179, 161	Epicatechin
5	16,3	283	777	615, 453	RSV-Dimer-Diglc
6	16,9	275	289	245, 205, 179, 161	nicht identifiziert
7	17,9	283	469	451, 385, 375, 359	Resveratrol-Dimer
8	18,7	283	469	451, 375, 363	Ampelopsin A (S5)
9	19,2	327	243	225, 215, 201, 175, 159	<i>trans</i> -Piceatannol (S3)
10	22,8	306, 319	227	185, 183, 157	<i>trans</i> -Resveratrol (S1)
11	24,8	283	905	811, 717, 611, 451, 357	Hopeaphenol (S6)
12	26,6	323	453	435, 411, 369, 359, 347	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin (S4)
13	26,9	323	679	661, 585, 573, 451, 345	Resveratrol-Trimer
14	27,4	323	453	435, 411, 369, 359, 347	Resveratrol-Dimer
15	29,4	323	905	887, 811, 799, 451, 359	r-Viniferin (S10)

RSV = Resveratrol, Diglc = Diglucosid

Zur Isolierung der enthaltenen Stilbenoligomere wurden 1000 mg des aufgereinigten Spätburgunderextraktes analog zur Vineatrol®30-Trennung mittels HSCCC-2 unter Verwendung des Fließmittelsystems *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/2/1/2, v/v/v/v), einer Rotationsgeschwindigkeit von 850 rpm und einer Flussrate von 3 mL/min im „Head to Tail“-Modus fraktioniert. Abbildung 3.30 zeigt das HSCCC-Chromatogramm der Trennung des Weinrebenextraktes bei 280 nm.

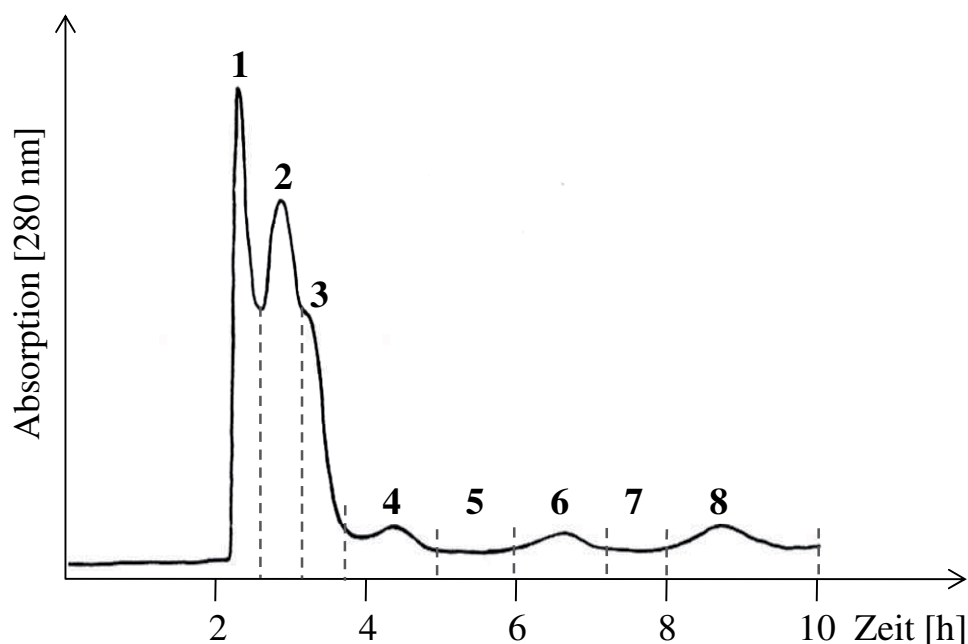


Abbildung 3.30: HSCCC-Chromatogramm der Späburgunder-Trennung bei 280 nm

Die HSCCC-Trennung lieferte nach 10 h Trennzeit 8 Fraktionen und die Coil-Fraktion. Die Retention der stationären Phase (R_s) betrug 53%. Tabelle 3.4 stellt die Parameter zur Berechnung der Retention nach Gleichung 2-3 aus Abschnitt 2.5.1 dar.

Tabelle 3.6: HSCCC-Parameter zur Berechnung der Retention (R_s)

Parameter	HSCCC-Späburgunder
Gesamtvolumen Coil [mL]	800
Volumen schwere Phase [mL]	376
Volumen leichte Phase [mL]	424
Retention R_s [%]	53

Mit einem Volumenanteil von 53 % wurde für HSCCC-2 im Vergleich zur Vineatrol[®]30-Trennung (61 %, Abschnitt 3.2.1) eine etwas geringere Retention an stationärer Phase erhalten. Ein Grund hierfür ist der höhere Anteil der im Späburgunderextrakt verbliebenen grenzflächenaktiven Polymere und die damit verbundene Emulsionsbildung (carry-over).

Anhand des UV-Chromatogramms bei 280 nm und dünnschichtchromatographischer Untersuchungen wurde die Fraktionierung der HSCCC-Trennung durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels HPLC-PDA und HPLC-MS² analysiert. Ein Überblick

über die Zusammensetzung der HSCCC-Fractionen mit Retentionszeiten und ESI-MS²-Daten der enthaltenen Hauptverbindungen befindet sich in Tabelle 7.4 des Anhangs. Abbildung 3.31 stellt die HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 1, 2, 6, 8 und des Coils bei 280 bzw. 306 nm vor.

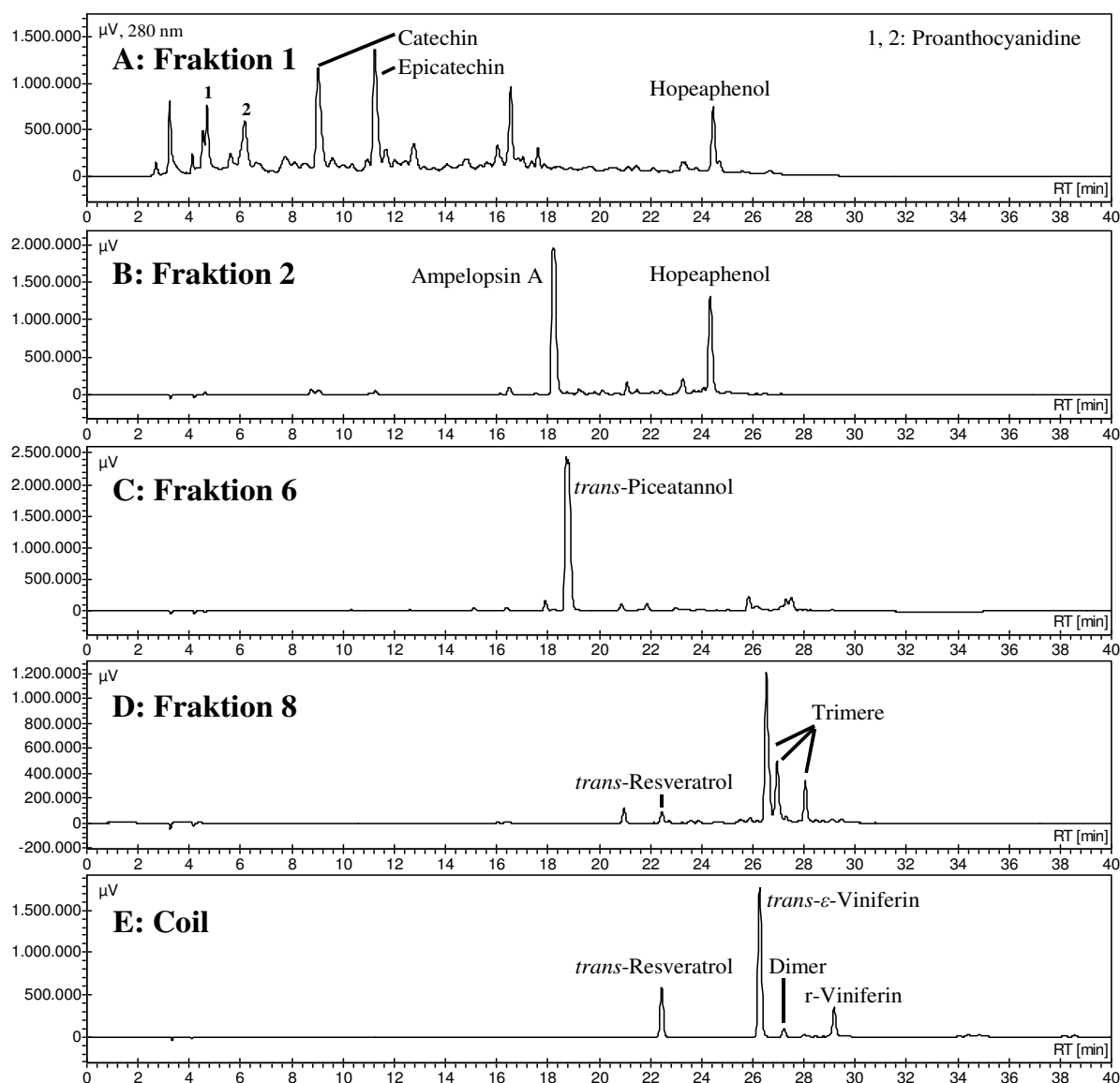


Abbildung 3.31: HPLC-Chromatogramme (A-E) der HSCCC-Fractionen 1 (280 nm), 2, 6 und 8 sowie der Coilfraktion der Späburgunder-Trennung bei 306 nm

Fraktion 1 wies eine komplexe Zusammensetzung auf, da die im Extrakt verbliebenen Polymere und nicht-stilbenoiden Polyphenole in dieser Fraktion aufkonzentriert wurden. Zusätzlich wurde das Resveratrol-Tetramer Hopeaphenol (**S6**) als Inhaltsstoff detektiert. Fraktion 2 bestand zu 44,9 % aus Ampelopsin A (**S5**) und zu 23,4 % ($\lambda_{\text{max}} = 306 \text{ nm}$) aus Hopeaphenol (**S6**). Nach einer weiteren Aufarbeitung mittels präparativer HPLC (Nr. 11,

Tabelle 5.6) konnten 7 mg bzw. 4 mg der Resveratrololigomere isoliert werden. *trans*-Piceatannol (**S3**) konnte in Fraktion 6 (75 %, $\lambda_{\max} = 306$ nm) angereichert werden. Aufgrund der geringen Substanzmenge von 7,8 mg war eine Isolierung des Resveratrol-Abkömmlings nicht möglich. Fraktion 8 setzte sich aus drei Resveratrol-Trimeren zusammen, bei denen es sich um das im Rohextrakt bereits detektierte Trimer (vergl. Peak 13, Tabelle 3.5) und zwei weitere, im Rohextrakt nicht nachweisbare, Minorkomponenten handelte. Die Coil-Fraktion bestand, analog zur Vineatrol[®]30-Trennung, aus der Hauptverbindung des Weinrebenextraktes *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) sowie *trans*-Resveratrol (**S1**) und r-Viniferin (**S10**). Aus 67,5 mg der Coil-Fraktion konnten 12 mg *trans*-Resveratrol (**S1**), 33 mg *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**) und 2 mg r-Viniferin (**S10**) (präp. HPLC Nr. 12, Tabelle 5.6) gewonnen werden. Alle isolierten Stilbenoide wurden mit einer Reinheit von > 95 % ($\lambda_{\max} = 306$ nm) erhalten. In den Abschnitten 3.2.3 und 5.8.1 wird ihre Strukturaufklärung diskutiert.

Das Rebholz der Rebsorte Spätburgunder stellte eine effiziente Quelle für die Gewinnung von Resveratrololigomeren dar. Im Vergleich zum kommerziellen Weinrebenextrakt Vineatrol[®]30 wies der Spätburgunderextrakt jedoch ein eingeschränkteres Stilbenprofil auf. So konnten Parthenocissin A (**S7**), Quadrangularin A (**S8**), r-2-Viniferin (**S9**) und *trans*-Piceid (**S2**) im Spätburgunderextrakt nicht detektiert werden. Grund hierfür könnte die direkte Verarbeitung des Pflanzenmaterials sein. Der kommerzielle Weinrebenextrakt Vineatrol[®]30 wird vor der Extraktion sechs Monate in Bündeln getrocknet. Hierbei kann es zu mikrobiellem Zellwandabbau kommen, wodurch die nachfolgende Extraktion der Stilbene vereinfacht wird. Bei der direkten Verarbeitung des Pflanzenmaterials mit intakten Zellwänden ist die Extraktausbeute geringer und Minorkomponenten des Rebholzes können gegebenenfalls nicht nachgewiesen werden.

Die nicht-stilbenoiden Polyphenole wie Catechin, Epicatechin, dimere und polymere Proanthocyanidine lagen beim Spätburgunderextrakt angereichert vor, da im Vergleich zu Vineatrol[®]30 kein Aufreinigungsschritt während der Extrakterstellung durchgeführt wurde.

Durch mehrfache Durchführung der HSCCC-2 wäre der Erhalt größerer Fraktionen für die Isolierung von *trans*-Piceatannol (**S3**) aus Fraktion 6 mittels präparativer HPLC (Nr. 11, Tabelle 5.6) möglich. Für eine Trennung im Großmaßstab könnte die LSRCCC eingesetzt werden. Die Anreicherung des Hopeaphenols (**S6**) aus Fraktion 1 (785,1 mg) wäre durch eine flüssig-flüssig-Extraktion mit Wasser und Ethylacetat denkbar, bei der sich das

Resveratrol-Tetramer in der organischen Phase und die Polymere sowie weitere hydrophile Verbindungen in der wässrigen Phase lösen.

3.4 Bestimmung der antioxidativen Aktivität

Mit Hilfe des TEAC-Assays nach RE et al. (1999) wurde die antioxidative Aktivität der Weinrebenextrakte der Rebsorte Spätburgunder und von Vineatrol[®]30, der HSCCC-Fractionen sowie der isolierten Reinsubstanzen bestimmt. Hierbei wurde die Fähigkeit der Testsubstanzen, das Radikalkation von 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) abzufangen, gemessen. Als Bezugssubstanz wurde das Vitamin E-Derivat Trolox[®] (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) verwendet und die Ergebnisse in Trolox-Äquivalenten (mmol Trolox/g) angegeben. Die Standardabweichung der Methode ($n = 10$, $\sigma = \pm 0,008$) wurde durch die antioxidative Aktivität der Reinsubstanz Hopeaphenol (**S6**) bestimmt, deren resultierender TEAC-Wert von 1,81 mmol Trolox/g repräsentativ für alle durchgeführten Bestimmungen war.

Der Vergleich der TEAC-Werte des Vineatrol[®]30-Rohextraktes, des aufgereinigten Extraktes (Filtrat der Fällung) und des resultierenden Präzipitates (Abbildung 3.32) zeigte die Auswirkung der Aufarbeitung auf die antioxidative Aktivität. Mit Hilfe der Lösungsmittelfällung konnten die Stilbenoide im Filtrat von den antioxidativ wirksamen Polymeren (vergl. Abschnitt 3.1.1) im Präzipitat getrennt werden. Dadurch stieg die antioxidative Aktivität des aufgereinigten Extraktes auf 1,64 mmol Trolox/g und die des Präzipitates auf 1,80 mmol Trolox/g. Die Lösungsmittelfällung lieferte somit zwei Fraktionen mit höheren antioxidativen Aktivitäten als der Vineatrol[®]30-Rohextrakt. Aufgrund der Komplexität des Präzipitates und einem Mangel an relevanten Zielverbindungen wurde diese Fraktion nicht weiter berücksichtigt.

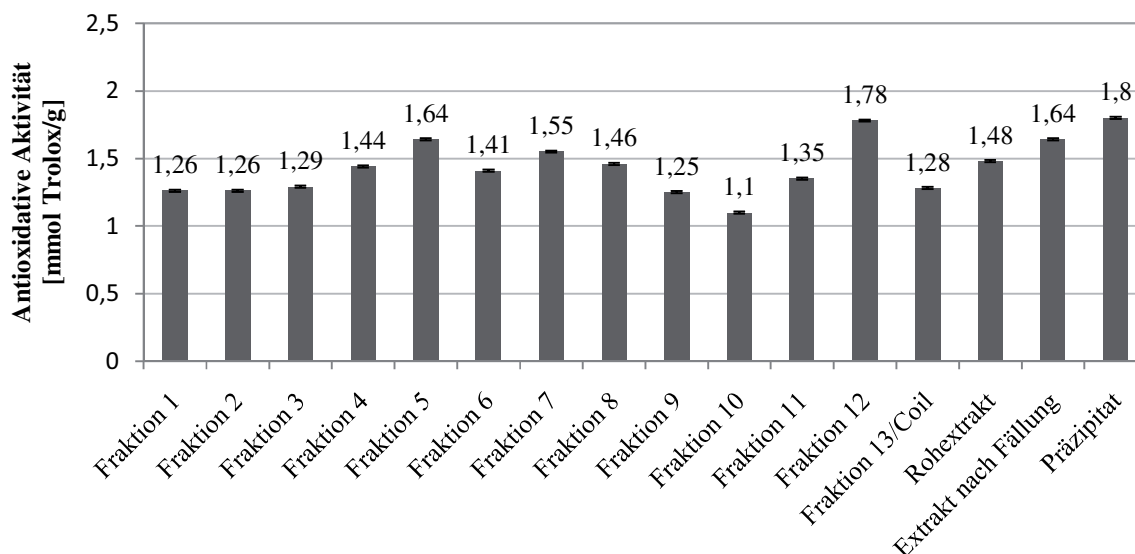


Abbildung 3.32: Antioxidative Aktivität der Extrakte und HSCCC-Fractionen von Vineatrol®30 (TEAC-Assay), Standardabweichung der Methode ($n = 10$, $\sigma = \pm 0,008$)

In Kooperation mit der Tierärztlichen Hochschule Hannover und der Universität Potsdam wurde die antioxidative Aktivität von Vineatrol®30 im Vergleich mit *trans*-Resveratrol (**S1**) anhand des TEAC-Assays und der Inhibierung der LDL-Peroxidation untersucht.

Vineatrol®30 zeigte bei beiden Methoden antioxidative Aktivität, jedoch fiel das Potential geringer aus als bei der Reinsubstanz *trans*-Resveratrol (**S1**). Dies zeigte, dass synergistische Effekte von Stilbenoiden im Weinrebenextrakt ausgeschlossen werden können (MÜLLER et al., 2009).

Diese Ergebnisse konnten mit den HSCCC-Fractionen bestätigt werden. Die antioxidativen Aktivitäten der einzelnen HSCCC-Fractionen (HSCCC-1, vergl. Abschnitt 3.2.1) unterschieden sich wenig (1,26-1,78 mmol Trolox/g). Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, lag der Gehalt von Stilbenoiden im aufgereinigten Extrakt bei über 60 %. Die mittels der Verteilungschromatographie hergestellten Fractionen erwiesen sich als antioxidativ gleichwertig, während sie sich in substanzieller und mengenmäßiger Stilbenoidzusammensetzung unterschieden.

Die höchste antioxidative Aktivität (1,78 mmol Trolox/g) wurde für Fraktion 12 nachgewiesen, welche zu 71 % aus *trans*-Resveratrol (**S1**) bestand. Als Reinsubstanz (> 95%) lieferte *trans*-Resveratrol (**S1**) im Vergleich zum aufgereinigten Weinrebenextrakt und der angereicherten Fraktion 12 einen höheren TEAC-Wert (2,19 mmol Trolox/g). Zusätzlich zeigten Fractionen 5, 7 und 8 hohe antioxidative Potentiale. Ebenso wie Fraktion 12 enthielten sie angereicherte Hauptverbindungen wie z.B. das Dimer Parthenocissin A (**S7**)

(Fraktion 5, 78 % Reinheit) oder die Stilbenoide *r*-2-Viniferin (**S9**, Fraktion 7, 77 %) und *trans*-Piceatannol (**S3**, Fraktion 8, 28 %).

Abbildung 3.33 zeigt die antioxidative Aktivität des mittels Lösungsmittelfällung aufgereinigten Spätburgunderextraktes, des Präzipitates und der isolierten Reinsubstanzen. Eine Übersicht der TEAC-Werte befindet sich in Tabelle 7.5 des Anhangs.

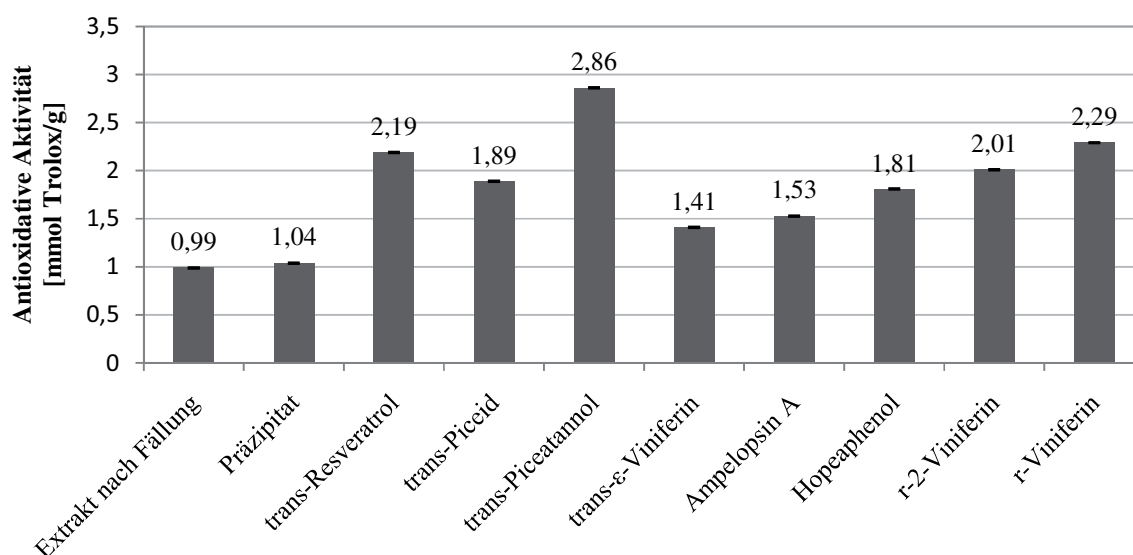


Abbildung 3.33: Antioxidative Aktivität der Spätburgunder-Extrakte und Reinsubstanzen (TEAC-Assay), Standardabweichung der Methode ($n = 10$, $\sigma = \pm 0,008$)

Der analog zu Vineatrol®³⁰ aufgearbeitete Weinrebenextrakt der Rebsorte Spätburgunder lieferte vergleichbare Ergebnisse, allerdings fielen die TEAC-Werte aufgrund des niedrigeren Stilbengehaltes (vergl. Abschnitt 3.3) geringer aus.

Die isolierten Reinsubstanzen zeigten insgesamt höhere TEAC-Werte als die HSCCC-Fractionen. *Trans*-Piceatannol (**S3**) (3,3',4',5-Tetrahydroxystilben) besaß mit 2,86 mmol Trolox/g die höchste antioxidative Aktivität. Im Vergleich zu *trans*-Resveratrol (**S1**) und *trans*-Piceid (**S2**) verstärkt die zusätzliche OH-Gruppe des Resveratrollderivates den antioxidativen Effekt. FANG und ZHOU (2008) begründeten dies mit der vorhandenen *ortho*-Stellung der zwei OH-Gruppen. Verbindungen, die Hydroxylgruppen in *ortho*- oder *para*-Stellung besitzen, erzielen eine höhere antioxidative Aktivität, da die Phenoxyradikale durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert werden.

In dieser Arbeit zeigten die Stilbenoligomere TEAC-Werte von 1,41 bis 2,29 mmol Trolox/g. Über die Anordnung *trans*- ϵ -Viniferin (**S4**), Ampelopsin A (**S5**), Hopeaphenol (**S6**),

r-2-Viniferin (**S9**) und r-Viniferin (**S10**) konnte eine Aktivitätssteigerung beobachtet werden. Die chemischen Strukturen der Resveratrololigomere sind in Abbildung 3.34 dargestellt.

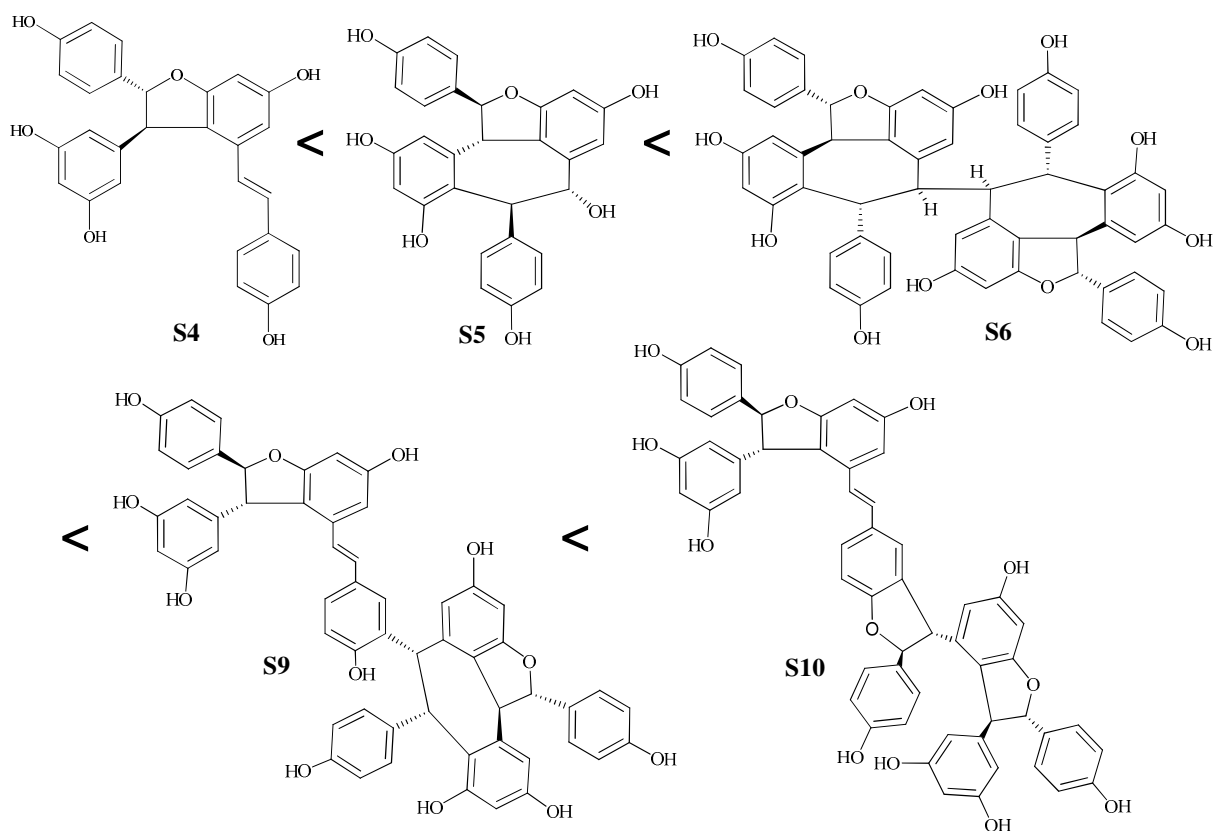


Abbildung 3.34: Chemische Strukturen von *trans*- ϵ -Viniferin (S4**), Ampelopsin A (**S5**), Hopeaphenol (**S6**), r-2-Viniferin (**S9**) und r-Viniferin (**S10**) mit steigendem antioxidativen Potential**

HA et al. (2009) diskutierten den Zusammenhang zwischen antioxidativer Aktivität und der chemischen Struktur von Stilbenen. Hiernach besitzen Resveratrololigomere mit einer Dibenzo-a,d-cycloheptadien-1,2,3,5-Einheit ein höheres antioxidatives Potential als Stilbenoide ohne Cyclisierung an dieser Position. Für Strukturen, die des Weiteren eine *trans*-Doppelbindung aufweisen, wird ein zusätzlich erhöhtes Potential nachgewiesen. Hierdurch können die Unterschiede im antioxidativen Potential von Ampelopsin A (**S5**), das die Cyclisierung beinhaltet und dem aktiveren r-2-Viniferin (**S9**), welches den Ringschluss und eine zusätzliche *trans*-Doppelbindung enthält, begründet werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen HAs Theorie bis auf eine Ausnahme. Das Resveratrol-Tetramer r-Viniferin (**S10**) besitzt zwar eine *trans*-Doppelbindung, aber keine Dibenzo-a,d-cycloheptadien-1,2,3,5-Einheit, stellte jedoch mit einer antioxidativen Aktivität von 2,29 mmol Trolox/g das antioxidativ wirksamste Stilbenoligomer dar. Für HAs

Studie stand dieses Tetramer nicht zur Verfügung. Der Zusammenhang zwischen antioxidativer Aktivität und der chemischen Struktur von Stilbenen ist folglich nicht eindeutig geklärt. In der Literatur wurden die TEAC-Werte einzelner Stilbenoligomere miteinander verglichen (HUANG et al., 2005, NGOC et al., 2008, HA et al., 2009). Eine einheitliche Studie zur antioxidativen Aktivität von Stilbenoiden wurde bislang noch nicht publiziert. Grund hierfür ist, dass Stilbenoligomere nicht käuflich zu erwerben sind, sondern größtenteils zuvor aus Pflanzenmaterial isoliert werden müssen. Der Vergleich von TEAC-Werten verschiedener Arbeitsgruppen ist jedoch schwierig, da für gleiche Verbindungen oftmals unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden (Prior et al., 2005).

In der Literatur wurde die antioxidative Aktivität von Stilbenoiden neben dem TEAC-Assay auch anhand von weiteren, bekannten Testsystemen bestimmt. Hierzu gehören der DPPH-Radikalfänger-Assay (WANG et al., 1999, KIM et al., 2005), die Inhibierung der LDL-Peroxidation (FRANKEL et al. 1993), der Lipidperoxidation (KIM et al., 2002b, KIM et al., 2005), sowie der Lipoxigenase (NGOC et al., 2008). Des Weiteren wurde der Inhibierungseffekt von Hydroxystilbenen auf den Bruch von DNA-Strängen unter Einwirkung von Wasserstoffperoxid untersucht (OVESNÁ et al., 2006). Hierbei konnte im Vergleich zu *trans*-Resveratrol für *trans*-Piceatannol ein stärkeres antioxidatives Potential aufgezeigt werden. Bei der Untersuchung der α -Tocopherol-Regenerations-Aktivität von *trans*-Resveratrol wurde dem Monomer eine synergistische Wirkung mit α -Tocopherol nachgewiesen (FANG und ZHOU, 2008). PRIVAT et al. (2002) verglichen die antioxidative Aktivität von Resveratrol und *trans*- ϵ -Viniferin mit weiteren Hydroxystilbenen über die Inhibierung von Superoxidanionen in polaren und unpolaren Lösungen. Das Resveratrol-Dimer *trans*- ϵ -Viniferin besaß hierbei in polarer Lösung mit Dimethylsulfoxid das höchste antioxidative Potential.

Weitere Studien beschäftigten sich mit dem Zusammenhang der homolytischen Dissoziationsenthalpie der OH-Gruppen von Stilbenen und der daraus abzuleitenden antioxidativen Aktivität. Den gesamten, von MIKULSKI und MOLSKI (2010) untersuchten Resveratrololigomeren wie z.B. *trans*- ϵ -Viniferin, *trans*- δ -Viniferin, Pallidol, Gnetin H und verschiedenen Resveratrol-Glykosiden konnte ein höheres antioxidatives Potential als *trans*-Resveratrol zugeordnet werden. Außerdem wurde für die *cis*-Stereoisomere von Resveratrol, Piceid und ϵ -Viniferin eine geringere Aktivität als für ihre *trans*-Stereoisomere berechnet.

Der Weinrebenextrakt Vineatrol[®]30 erwies sich als potentes Antioxidans, welches jedoch im Vergleich zu *trans*-Resveratrol (**S1**) eine geringere antioxidative Aktivität besaß. Seine

enthaltenen Stilbenoide hingegen zeigten einen höheren antioxidativen Effekt als der Rohextrakt und die meisten HSCCC-Fractionen. Der von Müller et al. (2009) postulierte Ausschluss eines synergistischen Effektes konnte mit der Untersuchung der isolierten Reinsubstanzen bestätigt werden.

3.5 Enzymatische Synthese von Resveratrololigomeren

Die Weinrebe ist bekannt für ihre große Vielfalt an Stilbenoligomeren, doch sind die chemischen Strukturen vieler Stilbenoide bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Analyse des kommerziellen Weinrebenextraktes Vineatrol[®]30 (Abschnitt 3.2) und des Rebholzes der Rebsorte Spätburgunder (Abschnitt 3.3) hat die Komplexität der Stilbenprofile aufgezeigt. Da sich besonders die Isolierung von Minorkomponenten in ausreichenden Mengen als schwierig erwies, wurde ein alternativer Weg für ihre Darstellung gesucht. Die *in vitro* Biotransformation von Resveratrololigomeren mittels Meerrettichperoxidase verläuft analog der natürlichen Biosynthese von Stilbenoligomeren in der Weinrebe (TAKAYA et al., 2005, ADAM et al., 1999, LANGCAKE und PRYCE, 1977b, ITO und NIWA, 1996, TAKAYA et al., 2002, HE et al., 2006, YU et al., 2007, HE et al., 2008, vergl. Abschnitt 2.4). In Kombination mit der HSCCC sollten sich somit ausreichende Mengen an Stilbenen für die nachfolgende Strukturaufklärung gewinnen lassen.

Um das Spektrum an isolierten Resveratrololigomeren zu erweitern, wurde somit neben der Isolierung der nativ in Weinreben vorkommenden Stilbene, die enzymatische Synthese mittels Meerrettichperoxidase durchgeführt (WILKENS et al., 2010).

3.5.1 Synthese und Isolierung von Resveratrololigomeren

Vorversuche zur Peroxidase-Umsetzung von *trans*-Resveratrol und (-)- ϵ -Viniferin

Als Vorversuche wurde die enzymatische Umsetzung von *trans*-Resveratrol (**S1**), (-)- ϵ -Viniferin (**S4**) sowie einem Gemisch aus beiden Stilbenen durch Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid im Kleinmaßstab durchgeführt. Die Transformation wurde mittels HPLC-PDA und HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Die aufgeführten Stilben-Gehalte wurden mit Hilfe der UV-Spur bei 306 nm bestimmt. Unter optimierten Bedingungen konnten 95 % des verwendeten Monomers *trans*-Resveratrol (**S1**) (Abbildung 3.35, Chromatogramm A, Peak a) in 83 % seines *trans*-Dehydrodimers *trans*- δ -Viniferin (**S11**, Peak c) umgesetzt werden.

Zusätzlich wurden zwei Resveratrol-Trimere [Trimer A (Peak b), 1 %; Trimer B (Peak d), 2 %] mit Molekülonen von m/z 679 $[M-H]^-$, sowie 9 % polymere Verbindungen (e) erhalten.

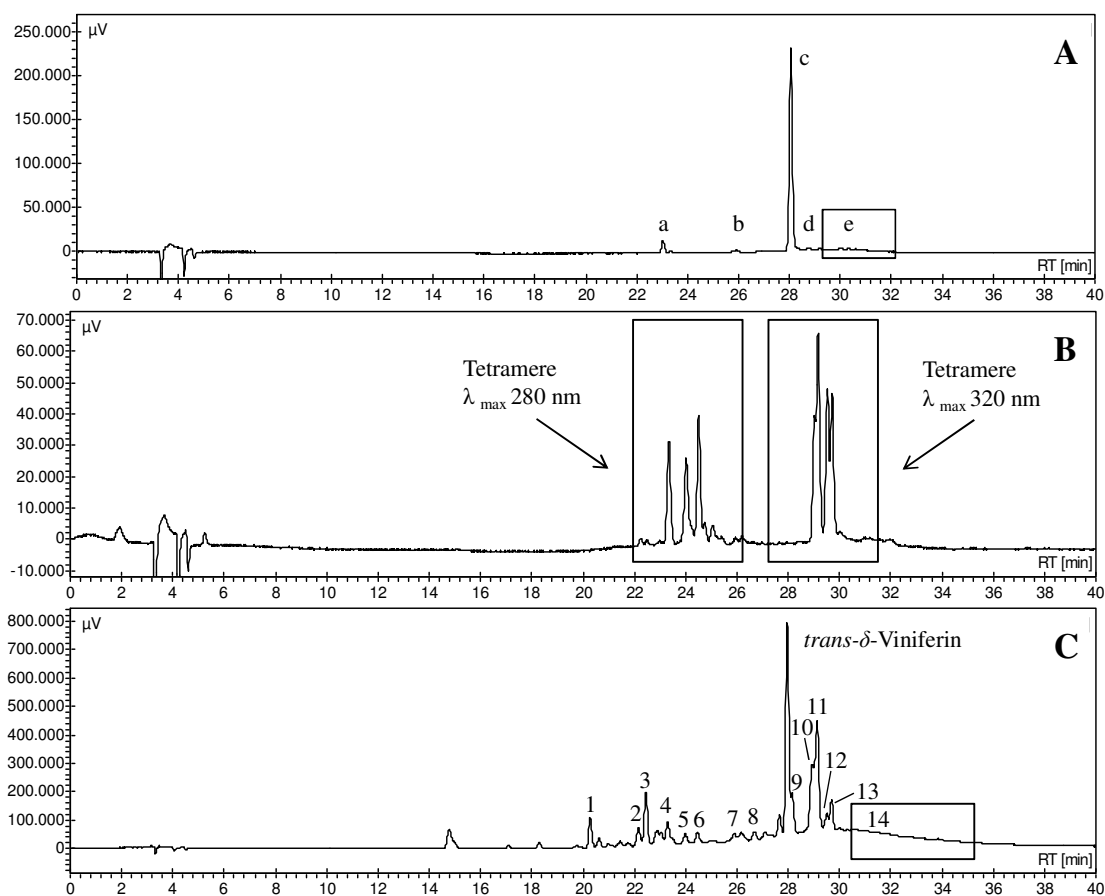


Abbildung 3.35: HPLC-Chromatogramme der Vorversuche zur Peroxidase-Umsetzung:
A: Chromatogramm des biotransformierten *trans*-Resveratrols bei 306 nm: *trans*-Resveratrol (**S1**, a), Trimer A (b), *trans*- δ -Viniferin (**S11**, c), Trimer B (d) und polymere Verbindungen (e); **B:** Chromatogramm des biotransformierten (-)- ϵ -Viniferins bei 280 nm: Tetramere (λ_{max} 280 nm) und Tetramere (λ_{max} 320 nm); **C:** Chromatogramm des mittels Peroxidase umgesetzten Gemisches von *trans*-Resveratrol und (-)- ϵ -Viniferin bei 280 nm: Dimer (1), Trimere (2, 3, 4, 5), Tetramer (6), Trimer (7), (-)- ϵ -Viniferin (**S4**, 8), *trans*- δ -Viniferin (**S11**), Trimere (9, 10, 11), Tetramere (12, 13) und polymere Verbindungen (14)

Die enzymatische Umsetzung von *trans*-Resveratrol (**S1**) im präparativen Maßstab lieferte nach weiterer Aufreinigung mittels HPLC (präp. HPLC Nr. 1, Tabelle 5.6) 2,2 mg *trans*- δ -Viniferin (**S11**) in einer Reinheit > 96 %. Der hypothetische, biogenetische Syntheseweg von *trans*- δ -Viniferin (**S11**) unter Einfluss von Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid ist in Abbildung 2.7. in Abschnitt 2.4 dargestellt. Die Strukturaufklärung des Stilbens wird in Abschnitt 3.5.2 diskutiert.

Die Biotransformation von (-)- ϵ -Viniferin (**S4**) ergab vier Hauptkomponenten, welche jeweils ein UV-Maximum bei 320 nm (Abbildung 3.35, Chromatogramm B) und ein Molekülion von

m/z 905 $[M-H]^-$ besaßen. Aufgrund der molekularen Masse von 906 g/mol konnten sie als Resveratrol-Tetramere identifiziert werden, die über eine Dimerisierung von intermediär generierten *trans*- ϵ -Viniferin-Radikalen synthetisiert wurden. Alle vier Tetramere zeigten eine ähnliche MS/MS-Fragmentierung mit drei Hauptfragmenten von m/z 811 $[M-H-C_6H_5-OH]^-$, Δ 94; 799 $[M-H-C_7H_5-OH]^-$, Δ 106 und 451 $[M-H-Dimer]^-$, Δ 454, sowie ein kleines, variables Fragment.

Drei weitere Minorkomponenten mit UV-Maxima bei 280 nm und Molekülmassen von m/z 905 $[M-H]^-$ wurden als Resveratrol-Tetramere identifiziert. Im Gegensatz zu den Hauptverbindungen präsentierten alle drei Stilbene die gleichen MS/MS-Fragmente von m/z 811 $[M-H-C_6H_5-OH]^-$, Δ 94; 717, Δ 188; 611, Δ 294; 451 $[M-H-Dimer]^-$, Δ 454 und 357, Δ 548. Die Stilbene unterschieden sich nur durch variable Intensitäten der MS/MS-Fragmente und ihre charakteristische Retentionszeit. In Abbildung 3.36 ist die Bildung der radikalischen Intermediate von (-)- ϵ -Viniferin (**S4**) unter dem Einfluss von Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid nach TAKAYA et al. (2002) dargestellt.

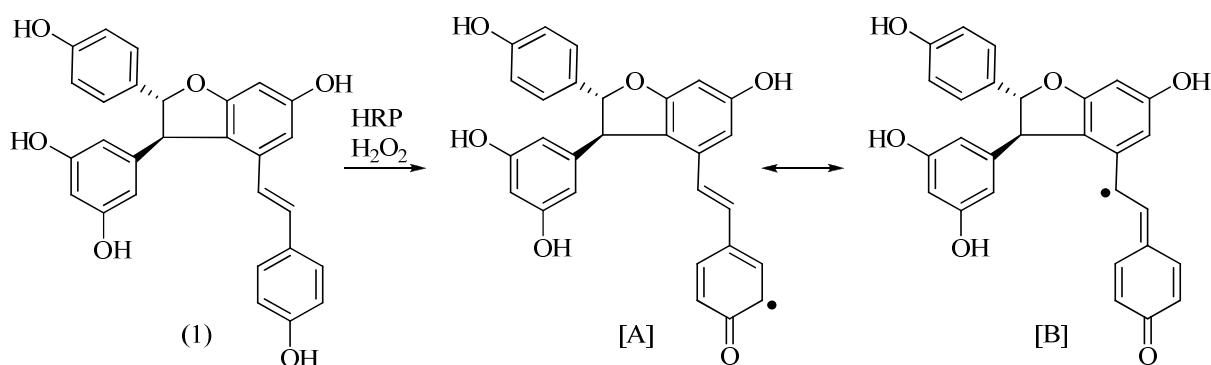


Abbildung 3.36: Bildung der radikalischen Intermediate von (-)- ϵ -Viniferin durch Einfluss von Meerrettichperoxidase und H_2O_2 : (-)- ϵ -Viniferin (1) und radikalische Intermediate [A], [B]

Durch die Verknüpfung solcher Radikale können verschiedenste Stilbenoligomere wie z. B. (+)-Vitisin A-C, (+)-Hopeaphenol und (-)-Isohopeaphenol, (ITO und NIWA, 1996, TAKAYA et al., 2002) synthetisiert werden, welches die große Vielfalt der detektierten Tetramere im HPLC-Chromatogramm B (Abbildung 3.35) erklärt.

In weiteren Experimenten wurde die Umsetzung eines Gemisches aus *trans*-Resveratrol (**S1**) und (-)- ϵ -Viniferin (**S4**) untersucht. Chromatogramm C (Abbildung 3.35) zeigt die Komplexität der Konversionsprodukte. Eine der Hauptverbindungen konnte mit einem Molekülion von m/z 453 $[M-H]^-$ als *trans*- δ -Viniferin (**S11**) identifiziert werden. Aufgrund ihrer molekularen Masse konnten weitere Stilbenoligomere, d.h. ein Resveratrol-Dimer (1),

die Resveratrol-Trimere (2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11) und Tetramere (6, 12, 13) sowie das nicht umgesetzte (-)- ϵ -Viniferin (**S4**, 8) detektiert werden. Polymere Verbindungen (14) eluierten bei späteren Retentionszeiten. Alle Blindproben lieferten keine Transformationsprodukte.

Unter den optimierten Reaktionsbedingungen lag die Umsetzungsrate der enzymatischen Biotransformationen bei über 95 %. Die Vorversuche im Kleinmaßstab bestätigten, dass die Meerrettichperoxidase-katalysierten Reaktionen von *trans*-Resveratrol (**S1**) und (-)- ϵ -Viniferin (**S4**) eine umfangreiche Quelle für verschiedenste Stilbenoligomere darstellen. Mit dem Ziel, Minorkomponenten isolieren und charakterisieren zu können, wurde infolgedessen ein Scale-up der oben vorgestellten Reaktion durchgeführt.

Präparative Peroxidase-Umsetzung und HSCCC-Trennung

Für die präparative Synthese von Resveratrololigomeren wurde eine Mischung von *trans*-Resveratrol (**S1**) und (-)- ϵ -Viniferin (**S4**) mit Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das oligomere Reaktionsprodukt wurde anschließend mittels High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC-3) unter Verwendung des Fließmittelsystems *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (2/3/2/3, v/v/v/v), einer Rotationsgeschwindigkeit von 850 rpm und einer Flussrate von 3 mL/min fraktioniert. Das HSCCC-Chromatogramm der aufgetrennten Stilbenoligomere bei 280 nm ist in Abbildung 3.37 dargestellt.

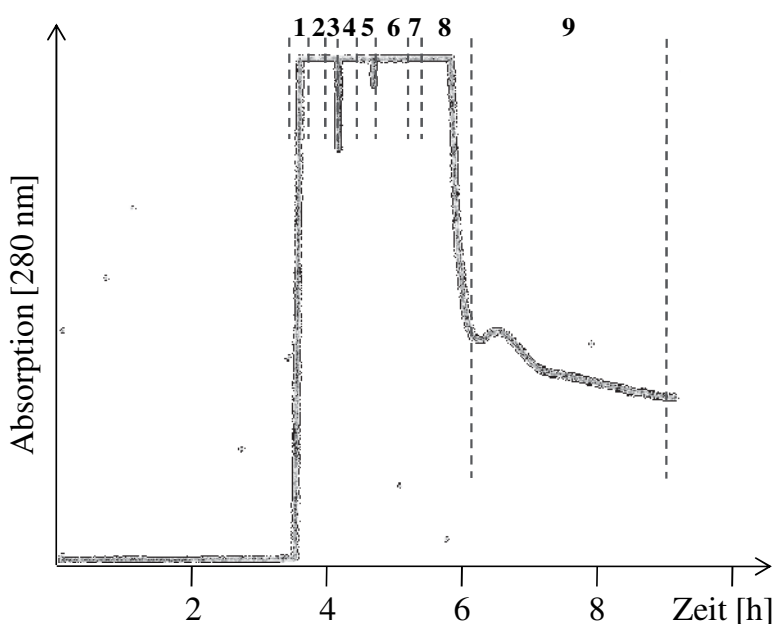


Abbildung 3.37: HSCCC-Chromatogramm der biotransformierten Stilbenoligomere bei 280 nm

Aufgrund der hohen Absorption bei 280 nm wurde die Fraktionierung der Stilbenoligomere anhand von dünnschichtchromatographischen Untersuchungen durchgeführt. Die HSCCC-Trennung lieferte neun Fraktionen. Mit Hilfe von HPLC-PDA- und HPLC-ESI-MS/MS-Analysen konnten mehr als 20 verschiedene Stilbenoligomere detektiert werden. Die Hauptverbindungen jeder HSCCC-Fraktion sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: Hauptverbindungen der HSCCC-Fraktionen 1-9

Fraktion	Auswaage [mg]	[M-H] ⁻	Oligostilbene
1	341,9	-	polymere Verbindungen
		679	3 Trimere
		905	2 Tetramere
2	29,2	-	polymere Verbindungen
		453	Dimer
		679	Trimer
3	6,8	679	Trimer
		905	Tetramer
4	50,8	905	Tetramer
5	25,6	679	2 Trimere
		905	2 Tetramere
6	38,8	679	Resviniferin A (S12)
		679	Resviniferin B (S13)
		905	2 Tetramere
7	9,9	453	<i>trans</i> - δ -Viniferin (S11)
		679	Trimer
8	28,3	227	<i>trans</i> -Resveratrol (S1)
		453	<i>trans</i> - δ -Viniferin (S11)
		679	Trimer
9	11,6	453	<i>trans</i> - δ -Viniferin (S1)

Fraktion 1 und 2 bestanden überwiegend aus polymeren Verbindungen. Aufgrund ihrer polaren Eigenschaften eluieren diese im „Head to Tail“-Modus der HSCCC-Trennung vorwiegend direkt nach dem Durchbruch der mobilen Phase. In Fraktion 3 wurden als Hauptverbindungen ein Resveratrol-Trimer und ein Resveratrol-Tetramer detektiert. Eine weitere Aufreinigung der Stilbene konnte jedoch wegen der geringen Substanzmenge (6,8 mg) nicht durchgeführt werden. Ein zusätzliches Resveratrol-Tetramer wurde in Fraktion 4 angereichert. Mit einer Fraktionsgröße von 50,8 mg war eine präparative Isolierung dieses Stilbens möglich. Fraktion 5 setzte sich aus verschiedenen

Stilbenoligomeren zusammen, welche sehr ähnliche Retentionszeiten aufzeigten. Aus Fraktion 6 wurden mittels präparativer HPLC (Nr. 2, Tabelle 5.6) 4 mg und 8 mg zweier Resveratrol-Trimere (Resviniferin A **S12**, Resviniferin B, **S13**) mit Reinheiten von > 96 % (HPLC-PDA: λ_{max} = 306 nm) isoliert. Die Strukturaufklärung der Stilbene wird in Abschnitt 3.5.2 diskutiert. Abbildung 3.38 zeigt die HPLC-Chromatogramme der HSCCC-Fractionen 1, 4, 6, 8 bei 280 nm.

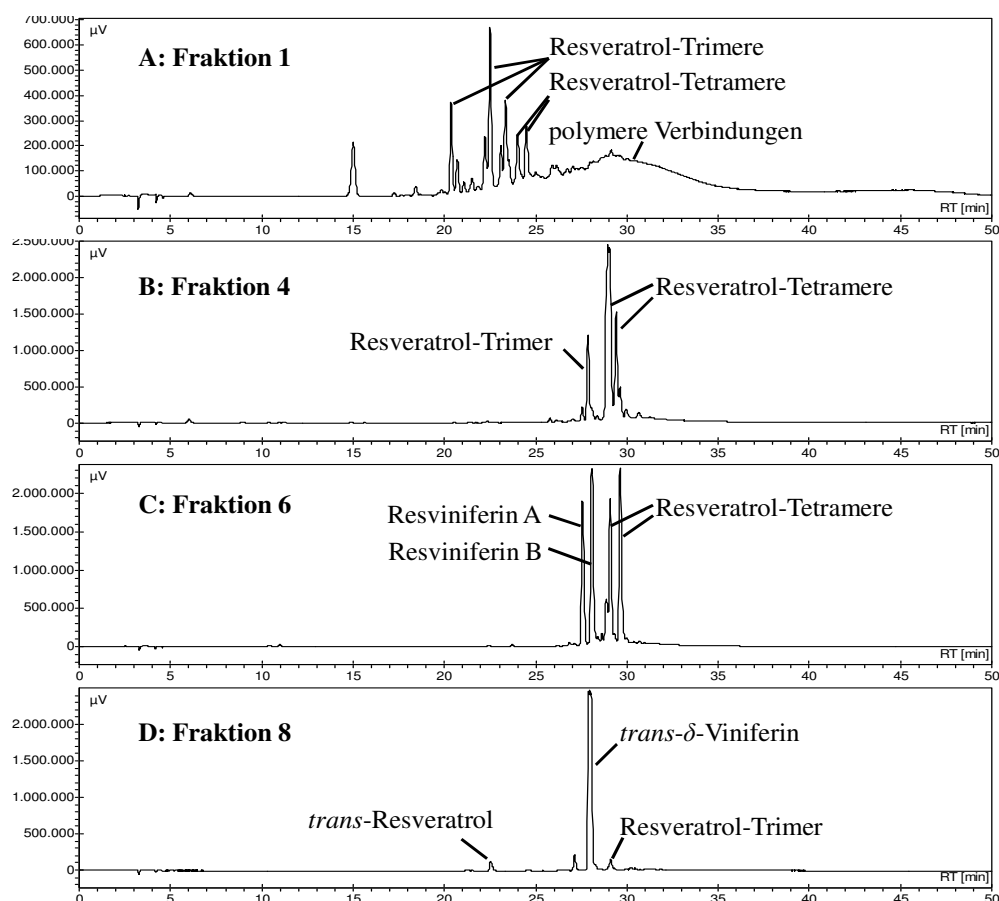


Abbildung 3.38: HPLC-Chromatogramme (A - D) der HSCCC-Fractionen 1, 4, 6, 8 der biotransformierten Stilbenoligomere bei 280 nm

Die HSCCC-Fraktion 7 bestand aus einem Gemisch des Dehydrodimer *trans*- δ -Viniferin (**S11**) und einem Resveratrol-Trimer mit einem Molekülion von m/z 679 $[\text{M-H}]^-$. In Fraktion 8 wurde das gleiche Dimer in einer Reinheit von > 87 % angereichert. Aufgrund der Substanzmenge von 28,3 mg und der hohen Anreicherung von *trans*- δ -Viniferin (**S11**) zeigte sich Fraktion 8 als ergiebigere Quelle für das Dehydrodimer als die direkte enzymatische Umsetzung des Monomers *trans*-Resveratrol (**S1**). Fraktion 9 enthielt ebenfalls *trans*- δ -Viniferin (**S11**) zusammen mit weiteren Stilbenoligomeren.

3.5.2 Strukturaufklärung der synthetisierten Resveratrololigomere

Die Strukturaufklärung der enzymatisch synthetisierten Resveratrololigomere wurde über HPLC-ESI-MSⁿ, HR-ESI-MS, ¹H-, ¹³C-, DEPT-NMR und 2D-NMR Experimente (HSQC, HMBC, COSY, ROESY) durchgeführt.

trans- δ -Viniferin (S11)

Das Resveratroldehydrodimer *trans*- δ -Viniferin (S11) wurde als beiges, amorphes Pulver isoliert, dessen erhaltene NMR- und LC-ESI-MSⁿ-Daten mit den bereits publizierten Daten übereinstimmten (PEZET et al., 2003, HUANG et al., 2000). Es besitzt eine dem Dimer *trans*- ϵ -Viniferin (S4) ähnliche Struktur. Der Unterschied besteht in der Verknüpfung der beiden Resveratrol-Einheiten, die beim vorliegenden Dehydrodimer über die Hydroxygruppe des Phenolrestes (Ring B₁) geschlossen wird. Abbildung 3.39 zeigt die chemische Struktur von *trans*- δ -Viniferin (S11).

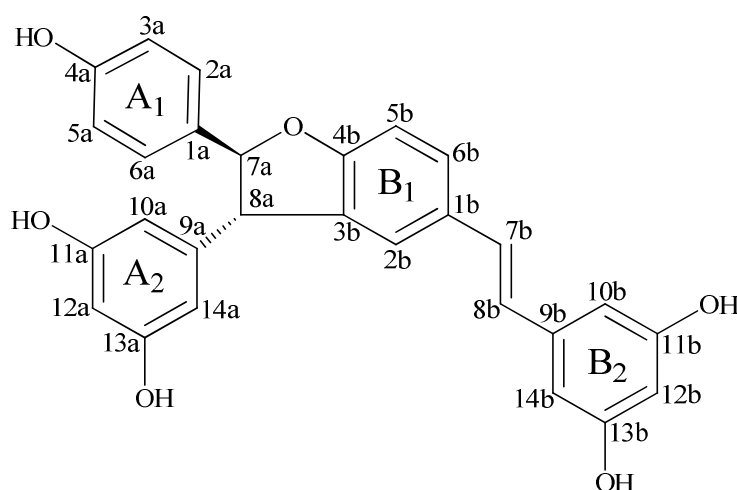


Abbildung 3.39: Chemische Struktur von *trans*- δ -Viniferin (S11)

Mittels LC-ESI-MSⁿ im negativen Modus wurde ein Molekülion von m/z 453 [M-H]⁻ gemessen, dessen Fragmente m/z 435, 411, 369, 359, 347, 333 detektiert werden konnten. Das MS²-Spektrum und ein mögliches Fragmentierungsmuster ist in Abbildung 3.40 dargestellt.

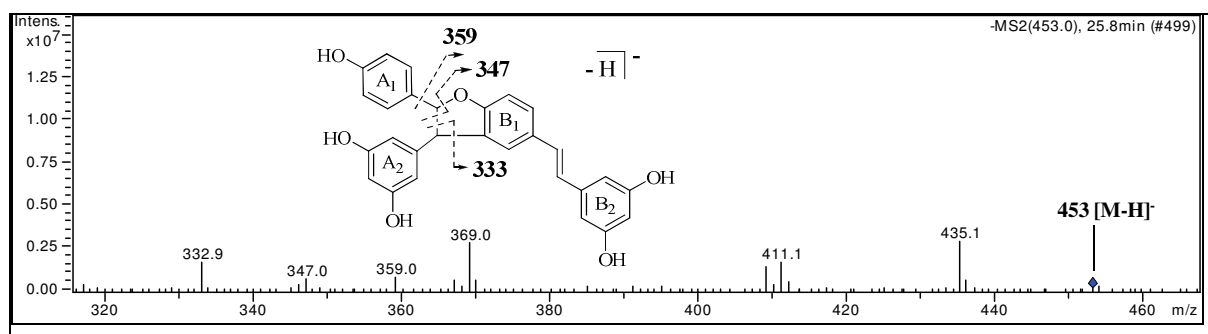


Abbildung 3.40: MS²-Fragmentierung von *trans*- δ -Viniferin (S11) im negativen Modus

Das MS/MS-Fragment m/z 435 $[M-H-H_2O]^-$ kann durch eine Wasserabspaltung der Massendifferenz von Δ 18 entstehen. Die beiden Fragmente m/z 411 (Δ 42) und 369 (Δ 84) sind nicht eindeutig zuzuordnen. Eine wiederholte Eliminierung als C_2H_2O oder C_3H_6 wäre in diesem Fall denkbar. Im Vergleich mit SENDA et al. (1995) kann die Abspaltung eines Phenolrestes (Δ 94) das Fragment m/z 359 freisetzen. Durch die Eliminierung eines Phenolrestes mit arylständiger CH-Gruppe (Δ 106) wird das Fragment m/z 347 gebildet. Das negativ geladene Bruchstück m/z 333 (Δ 120) kann durch eine Fragmentierung des Dimers zwischen Ringsystem A entstehen, wobei ein 1,3-Dihydroxybenzolrest mit arylständiger CH-Gruppe abgespalten wird. Eine Unterscheidung von *trans*- δ -Viniferin (S11) und *trans*- ϵ -Viniferin (S4) (Abschnitt 3.2.3) anhand ihrer Massenspektren ist laut PEZET et al. (2003) über den Vergleich der Intensitäten der Fragmente m/z 359 und 369 möglich. *Trans*- δ -Viniferin (S11) zeigt eine stärkere Fragmentierung zu m/z 369, wohingegen *trans*- ϵ -Viniferin (S4) das Hauptfragment m/z 359 besitzt.

Das 1H -NMR Spektrum (Abbildung 3.41) von *trans*- δ -Viniferin (S11) in Methanol- d_4 zeigt zwei Paare aromatischer, ortho-koppelnder Protonen des AA'XX' Typs bei δ 6,68 und 7,07 (beide 2H, d, J = 8,5 Hz) für Ring A₁, zwei Gruppen aromatischer, meta-koppelnder Protonen des AX₂ Typs bei δ 6,02 (2H, d, J = 2,2 Hz) und 6,08 (1H, t, J = 2,2 Hz) für Ring A₂, 6,32 (2H, d, J = 2,1 Hz) und 6,03 (1H, t, J = 2,2 Hz) für Ring B₂, eine Gruppe aromatischer, ortho-meta-koppelnder Protonen des ABX Typs bei δ 7,09 (1H, brs), 6,75 (1H, d, J = 8,3 Hz) und 7,27 (1H, dd, J = 8,2 und 1,6 Hz) für Ring B₁, zwei aliphatische Protonen bei δ 5,29 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-7a) und 4,30 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-8a), sowie zwei koppelnde Dubletts bei δ 6,88 und 6,69 (beide 1H, d, J = 16,0 Hz, H-7b, H-8b) für eine *trans*-konfigurierte Doppelbindung.

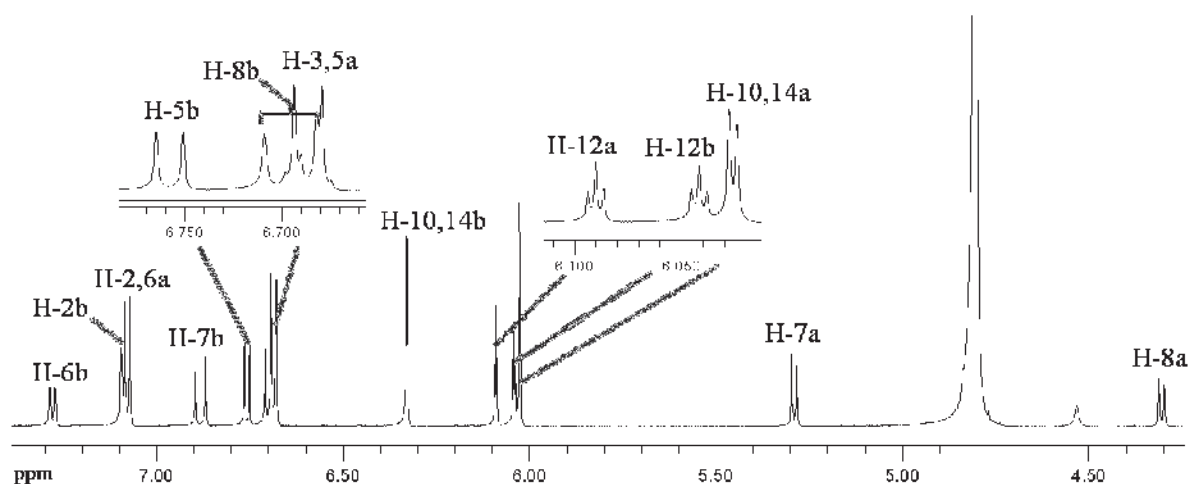


Abbildung 3.41: ^1H -NMR-Spektrum von *trans*- δ -Viniferin (S11) (600 MHz CD_3OD)

Das ^{13}C -NMR Spektrum zeigt zwei aliphatische C-Atome bei δ 94,9 und 58,8 (C-7a, und C-8a). Die weiteren 26 Signale zwischen δ 102,5 und 161,0 repräsentieren die aromatischen und olefinischen C-Atome der Verbindung. Die ^1H - und ^{13}C -NMR Daten sind in Tabelle 7.6 des Anhangs aufgeführt.

Resviniferin A (S12)

Resviniferin A (S12) wurde als beiges, amorphes Pulver mittels präparativer HPLC (Nr. 2, Tabelle 5.6) aus Fraktion 6 der HSCCC-3 erhalten. Unter Verwendung von hochauflösender Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) wurde sein positives Molekölion m/z 681,2111 $[\text{M}+\text{H}]^+$ detektiert, welches mit dem kalkulierten Molekölion m/z 681,2119 $[\text{M}+\text{H}]^+$ für die Summenformel $\text{C}_{42}\text{H}_{32}\text{O}_9$ eines Resveratroltrimers übereinstimmt. Die chemische Struktur von Resviniferin A (S12) ist in Abbildung 3.42 dargestellt.

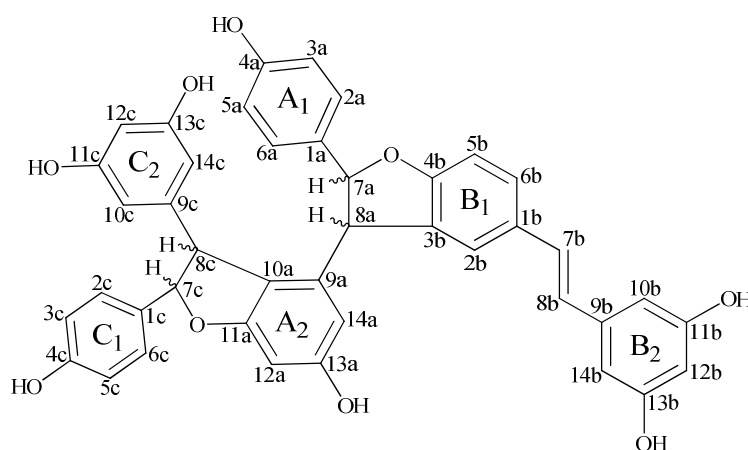


Abbildung 3.42: Chemische Struktur von Resviniferin A (S12)

Die HPLC-ESI-MSⁿ-Analyse im negativen Modus ergab das MolekÜlion m/z 679 $[M-H]^-$ und MS/MS-Fragmente von m/z 661, 643, 621, 585, 573, 451, 333. Abbildung 3.43 zeigt das MS²-Spektrum von Resviniferin A (**S12**) mit einem möglichen Fragmentierungsmuster.

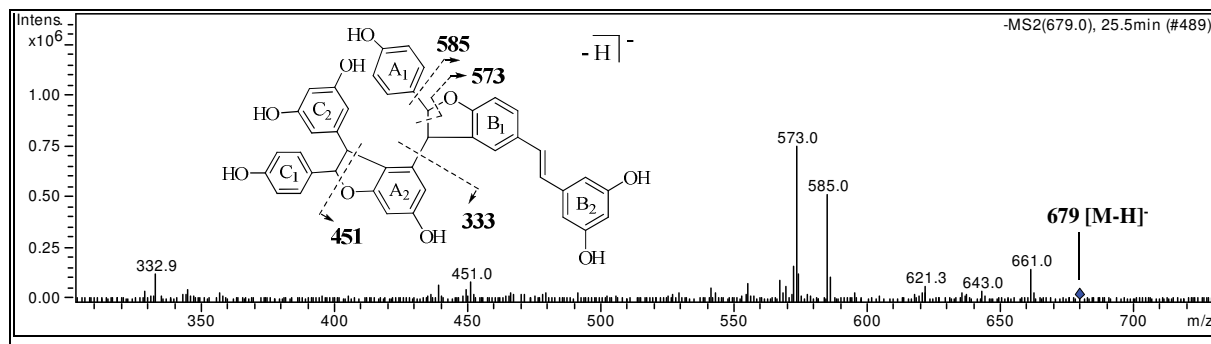


Abbildung 3.43: MS²-Fragmentierung von Resviniferin A (S12**) im negativen Modus**

Bei den MS/MS-Fragmenten m/z 661 $[M-H-H_2O]^-$ und 643 $[M-H-2H_2O]^-$ handelt es sich wahrscheinlich um eine wiederholte Wasserabspaltung (Massendifferenz von $\Delta 18$). Das Fragment m/z 621 ($\Delta 58$) kann nicht eindeutig zugeordnet werden. Eine Eliminierung als C_3H_6O wäre möglich. Die beiden Hauptfragmente m/z 585 und 573 stammen von einer Phenolabspaltung ($\Delta 94$) und der Fragmentierung eines Phenolrestes mit arylständiger CH-Gruppe ($\Delta 106$), die an den Ringen A₁ und C₁ stattfinden kann (SENDA et al., 1995). Denkbar ist auch die Abspaltung des vollständigen Ringsystems C ($\Delta 228$) mit dem Fragment m/z 451. Das negativ geladene Bruchstück m/z 333 ($\Delta 346$) kann durch eine Fragmentierung des Trimers zwischen Ring A₂ und den aliphatischen Protonen des A-Systems entstehen.

Das ¹H-NMR Spektrum (Abbildung 3.44) von Resviniferin A (**S12**) in Aceton-d₆ zeigt zwei Paare aromatischer, ortho-koppelnder Protonen des AA'XX' Typs bei δ 6,67 und 6,61 (beide 2H, d, $J = 8,6$ Hz) für Ring A₁, 7,27 und 6,91 (beide 2H, d, $J = 8,5$ und 8,4 Hz) für Ring C₁, zwei Gruppen aromatischer, meta-koppelnder Protonen des AX₂ Typs bei δ 6,49 (2H, d, $J = 2,1$ Hz) und 6,25 (1H, m) für Ring B₂, 6,14 (2H, d, $J = 2,1$ Hz) und 6,25 (1H, m) für Ring C₂, eine Gruppe von aromatischen, meta-koppelnden Protonen bei δ 6,33 und 6,27 (beide 1H, d, $J = 2,0$ und 2,1 Hz) für Ring A₂, eine Gruppe aromatischer, ortho-meta-koppelnder Protonen des ABX Typs bei δ 7,11 (1H, br. s), 6,87 (1H, d, $J = 8,3$ Hz) und 7,36 (1H, dd, $J = 8,3$ und 1,5 Hz) für Ring B₁, zwei Paare aliphatischer Protonen bei δ 5,60 (1H, d, $J = 4,9$ Hz, H-7a) und 4,38 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H-8a), δ 5,43 (1H, d, $J = 4,4$ Hz, H-7c) und 4,58 (1H, d, $J =$

4,4 Hz, H-8c) sowie zwei koppelnde Dubletts bei δ 6,91 und 6,73 (beide 1H, d, $J = 16,8$ und 16,3 Hz, H-7b, H-8b) für eine *trans*-konfigurierte Doppelbindung.

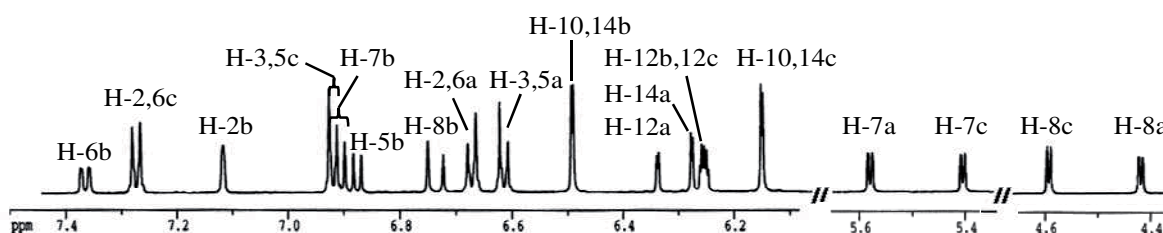


Abbildung 3.44: ^1H -NMR-Spektrum von Resviniferin A (S12) (600 MHz, CD_3COCD_3)

Die Anordnung der Ringsysteme, Doppelbindung und aliphatischen Protonen konnte durch die Korrelationen im 2D ^1H - ^1H -COSY-Spektrum bestätigt werden. Das ^{13}C -NMR Spektrum von Resviniferin A (S12) zeigt vier aliphatische C-Atome bei δ 91,2, 52,3, 94,0 und 56,9 (C-7a, C-8a, C-7c, C-8c). Die weiteren 38 Signale zwischen δ 102,4 und 162,4 repräsentieren die aromatischen und olefinischen C-Atome der Verbindung. Alle protonierten C-Atome sind ebenfalls im HSQC Spektrum zu finden. Die ^1H - und ^{13}C -NMR Daten sind in Tabelle 7.6 des Anhangs aufgeführt.

Unterstützende NMR-Daten für den postulierten Strukturvorschlag von Resviniferin A (S12) konnten anhand von HMBC-Messungen erhalten werden. Ausgewählte CH-Fernkorrelationen werden in Abbildung 3.45 gezeigt.

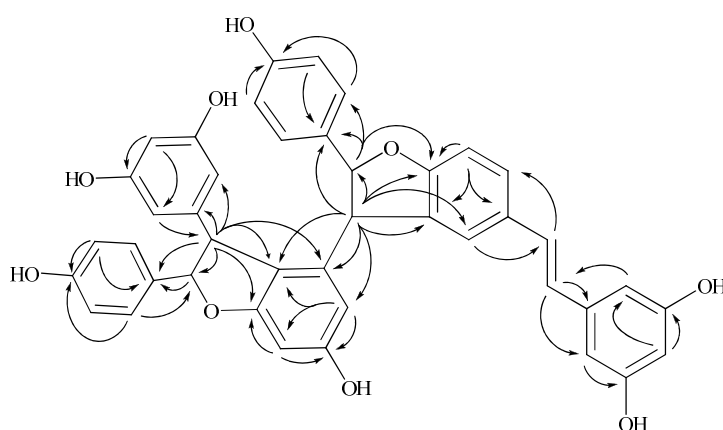


Abbildung 3.45: Ausgewählte CH-Fernkorrelationen von Resviniferin A (S12)

Im HMBC Spektrum sind wichtige CH-Fernkorrelationen über zwei oder drei Bindungen zwischen H-8a und acht Kohlenstoffsignalen [δ 132,3 (C-1a), 91,2 (C-7a), 142,2 (C-9a),

119,8 (C-10a), 106,7 (C-14a), 123,7 (C-2b), 133,0 (C-3b), 159,7 (C-4b)] zu finden. Ähnliche Korrelationen besitzt Proton H-8c [δ 134,3 (C-1c), 94,0 (C-7c), 147,4 (C-9c), 106,8 (C-10c,14c), 142,2 (C-9a), 119,8 (C-10a), 162,4 (C-11a)]. Die Art und Anzahl der Korrelationen belegt die zentrale Position von H-8a und H-8c innerhalb der Struktur. Beide Protonen befinden sich an den C-Atomen, über welche die Monomereinheiten A, B und C miteinander verbunden sind. Die Korrelationen zwischen H-10b und dem Kohlenstoffsignal bei δ 127,1 (C-8b) sowie H-7b und C-6b (δ 128,3) verifizieren die Verbindung des olefinischen Systems mit den zwei aromatischen Ringen B₁ und B₂.

Um die relative Stereochemie von Resviniferin A (**S12**) an C-7a/ C-8a und C-7c/ C-8c bestimmen zu können, wurden NOE-Messungen herangezogen. In der Literatur existiert eine Reihe von Publikationen über die Strukturaufklärung von Resveratrololigomeren, welche die Ringsysteme A₁, A₂, und B₁ besitzen und bei denen die ersten beiden Ringe *trans*-konfiguriert an der C-7a/ C-8a Bindung des 2,3-Dihydrofuransystems vorliegen (ITO und NIWA, 1996, HUANG et al., 2000, YAN et al., 2001, ILIYA et al., 2002). Hierbei wurden Werte für die vicinalen Kopplungskonstanten zwischen H-7a und H-8a im Bereich von 4,0 bis 10,0 Hz gefunden. Der ausgedehnte Bereich lässt vermuten, dass anhand der Größe der Kopplungskonstanten nicht direkt auf die Konfiguration der Ringe geschlossen werden kann. Für Verbindungen, die keine Substituenten an den Ringen A₁, A₂, und B₁ in ortho-Stellung zum 2,3-Dihydrofuransystem besitzen, wurden große Kopplungskonstanten erhalten, während das Vorhandensein von Substituenten zu kleineren Werten führte. Vermutlich hängt dies mit einer Änderung der Konformation des Ringsystems zusammen und einer hieraus resultierenden Abnahme der vicinalen Kopplung. Aus diesem Grund kann die *trans*-Orientierung des Aryl-Paares (A₁/ A₂) nur eindeutig durch die NOE Korrelationen zwischen H-7a und den ortho-ständigen Protonen von Ring A₂, sowie H-8a und den ortho-ständigen Protonen von Ring A₁ abgeleitet werden (ILIYA et al., 2002, BORALLE et al., 1993). Ein Ausschnitt des ROESY-Spektrums von Resviniferin A (**S12**) ist in Abbildung 3.46 dargestellt. Wichtige NOE-Wechselwirkungen für die Diskussion der relativen Stereochemie der zwei 2,3-Dihydrofuran-Systeme sind in Abbildung 3.47 zusammengefasst.

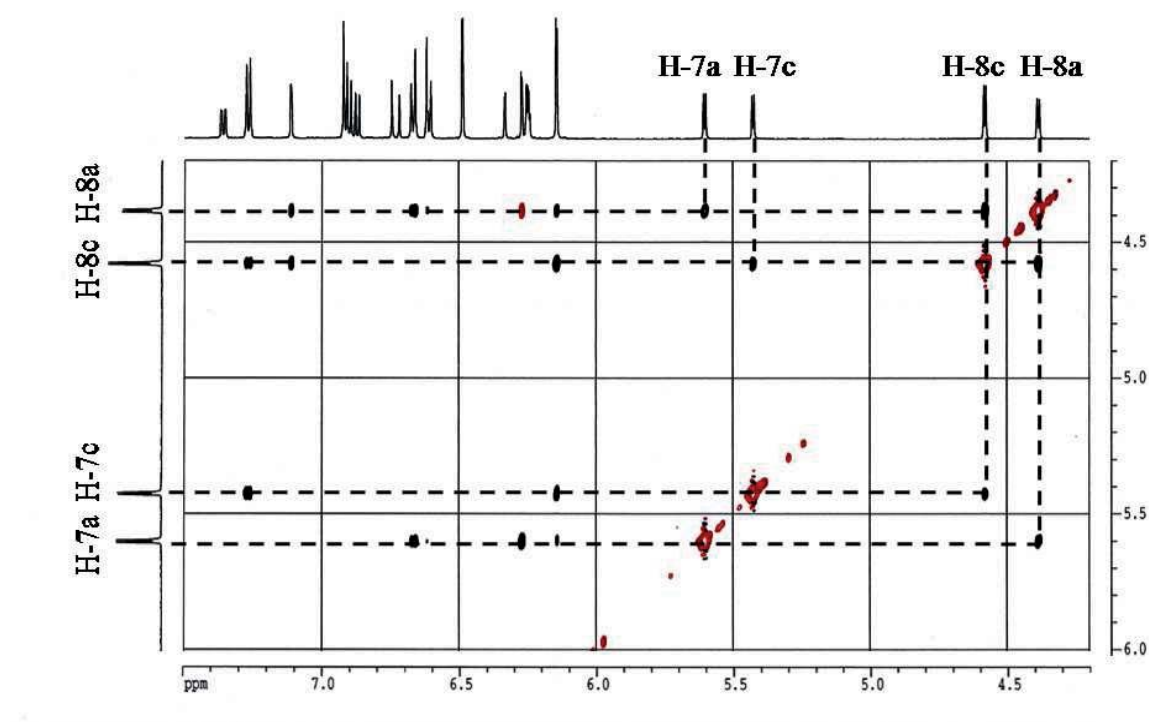


Abbildung 3.46: Ausschnitt des ROESY-Spektrums von Resviniferin A (S12) (600 MHz, CD_3COCD_3)

In beiden Fällen stimmen die erhaltenen NOEs mit Korrelationen einer *trans*-Konfiguration an C-7 und C-8 überein. Des Weiteren bestätigen die signifikanten NOE-Wechselwirkungen zwischen H-7a und H-8a sowie H-7c und H-8c die nicht-pseudo-axiale Position der beiden vicinalen Protonenpaare und die daraus folgenden kleinen Kopplungskonstanten.

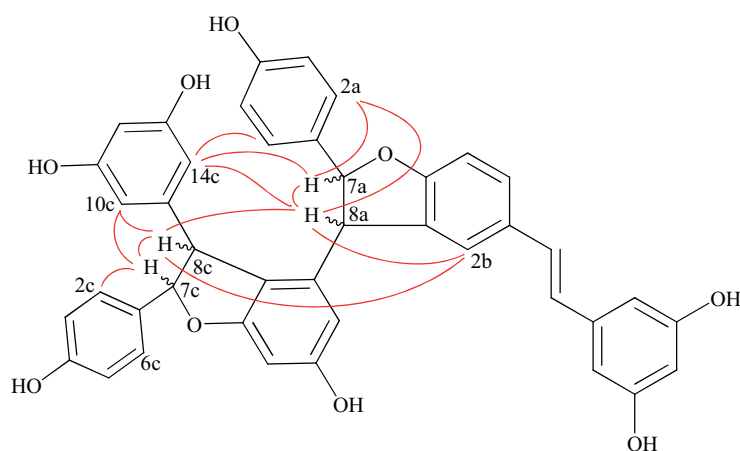


Abbildung 3.47: Ausgewählte NOE-Wechselwirkungen von Resviniferin A (S12)

Die für Resviniferin A (**S12**) gemessenen NOE-Wechselwirkungen weisen große Ähnlichkeiten mit dem publizierten Datensatz für *trans*-Diptoindonesin B auf, einem in der Rinde von *Dryobalanops oblongifolia* natürlich vorkommenden Oligostilben (SYAH et al., 2003). Dennoch besitzen Resviniferin A (**S12**) und *trans*-Diptoindonesin B signifikante Unterschiede in der chemischen Verschiebung ($> 0,6$ ppm) der C-Atome C-7a, C-8a, C-9a, C-10a, C-3b, C-1c, C-2c, 6c und C-8c. Die chemische Verschiebung dieser Kohlenstoffatome wird durch die jeweilige Konfiguration von H-7a/ H-8a und H-7c/ H-8c beeinflusst und beweist somit die alternative Stereochemie der zwei 2,3-Dihydrofuran-Systeme im Vergleich zu *trans*-Diptoindonesin B. Folglich handelt es sich bei Resviniferin A (**S12**) um ein neues Stereoisomer von *trans*-Diptoindonesin B. Die absolute Stereochemie beider Verbindungen lässt sich abschließend nur über Röntgenstrukturanalyse klären.

Resviniferin B (**S13**)

Die Reinsubstanz Resviniferin B (**S13**) wurde als beiges, amorphes Pulver mittels präparativer HPLC (Nr. 2, Tabelle 5.6) aus Fraktion 6 der HSCCC-3 isoliert, deren HR-ESI-MS-Analyse ein für ein Resveratroltrimer typisches Molekülion von m/z 681,2099 $[M+H]^+$ (berechnet $C_{42}H_{32}O_9+H$ 681,2119) ergab. Abbildung 3.48 zeigt die chemische Struktur von Resviniferin B (**S13**).

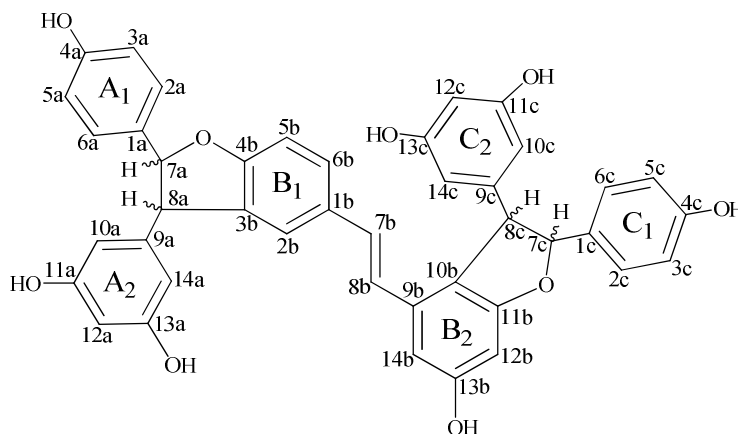


Abbildung 3.48: Chemische Struktur von Resviniferin B (**S13**)

Die MS/MS-Fragmentierung des Molekülions m/z 679 $[M-H]^-$ im negativen Modus zeigte die Fragmente m/z 661, 637, 619, 585, 573, 359, 319. Das MS^2 -Spektrum und ein mögliches Fragmentierungsmuster ist in Abbildung 3.49 dargestellt.

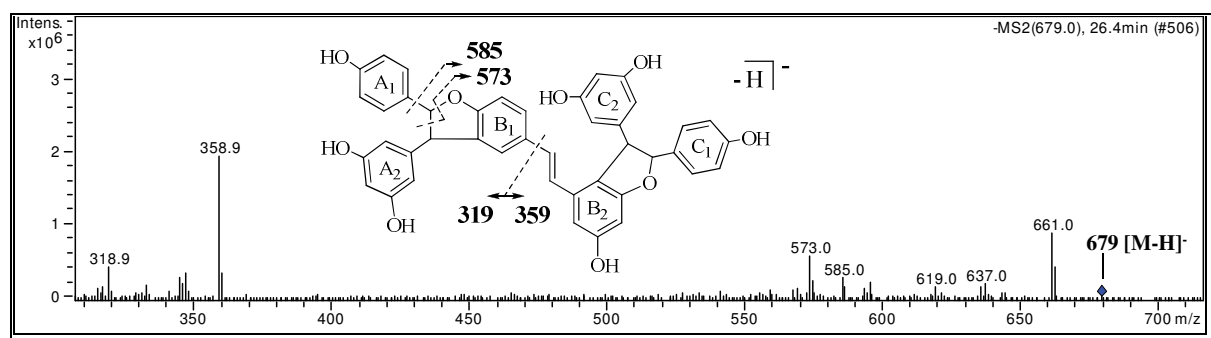


Abbildung 3.49: MS²-Fragmentierung von Resviniferin B (S13) im negativen Modus

Das MS/MS-Fragment m/z 661 $[M-H-H_2O]^-$ kann durch eine Wasserabspaltung (Massendifferenz von Δ 18) entstehen. Die beiden Fragmente m/z 637 (Δ 42) und 619 (Δ 60) sind nicht eindeutig zuzuordnen. Eine Möglichkeit ist die Eliminierung als C_2H_2O oder C_3H_6 sowie für Δ 60 als C_3H_8O . Im Vergleich mit SENDA et al. (1995) kann die Abspaltung eines Phenolrestes (Δ 94) das Fragment m/z 585 freisetzen. Durch die Eliminierung eines Phenolrestes mit arylständiger CH-Gruppe (Δ 106) ist das Fragment m/z 573 denkbar. Die negativ geladenen Bruchstücke m/z 359 (Δ 320) und m/z 319 (Δ 360) entstehen vermutlich durch eine zentrale Fragmentierung des Trimers zwischen Ring B₁ und der Doppelbindung.

In Tabelle 7.6 (Anhang) sind die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von Resviniferin B (S13) zu finden. Das ¹H-NMR Spektrum in Aceton-d₆ zeigt zwei Paare aromatischer, ortho-koppelnder Protonen des AA'XX' Typs bei δ 7,19 und 6,82 (beide 2H, d, J = 8,5 und 8,6 Hz) für Ring A₁, 7,20 und 6,83 (beide 2H, d, J = 8,5 Hz) für Ring C₁, zwei Gruppen aromatischer, meta-koppelnder Protonen des AX₂ Typs bei δ 6,16 (2H, d, J = 2,2 Hz) und 6,26 (1H, d, J = 2,2 Hz) für Ring A₂, 6,22 (2H, m) und 6,22 (1H, m) für Ring C₂, ein Paar aromatischer, meta-koppelnder Protonen bei δ 6,32 und 6,70 (beide 1H, d, J = 2,0 und 2,1 Hz) für Ring B₂, eine Gruppe aromatischer, ortho-meta-koppelnder Protonen des ABX Typs bei δ 6,99 (1H, br. s), 6,76 (1H, d, J = 8,4 Hz) und 7,20 (1H, m) für Ring B₁, zwei Paare aliphatischer Protonen bei δ 5,41 (1H, d, J = 7,7 Hz, H-7a) und 4,39 (1H, d, J = 7,7 Hz, H-8a), δ 5,42 (1H, d, J = 5,4 Hz, H-7c) und 4,46 (1H, d, J = 5,5 Hz, H-8c) sowie zwei koppelnde Dubletts bei δ 6,93 und 6,72 (beide 1H, d, J = 16,3 Hz, H-7b, H-8b) für eine *trans*-konfigurierte Doppelbindung. Abbildung 3.50 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum von Resviniferin B (S13).

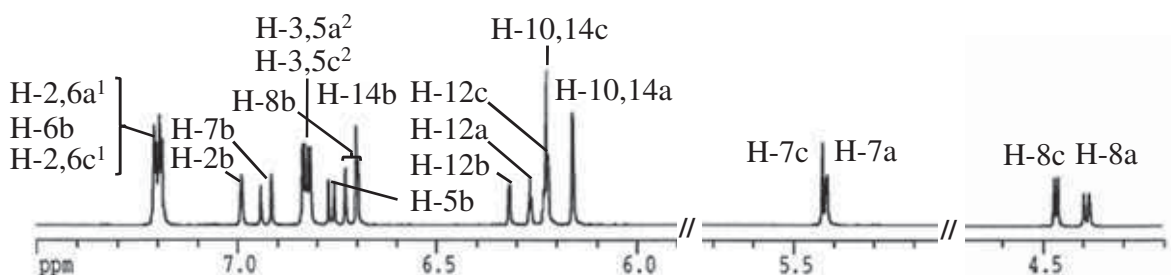


Abbildung 3.50: ^1H -NMR-Spektrum von Resviniferin B (**S13**) (600 MHz, CD_3COCD_3)

Das ^{13}C -NMR Spektrum von Resviniferin B (**S13**) zeigt vier aliphatische Kohlenstoffatome bei δ 93,9, 57,7, 93,9 und 57,1 (C-7a, C-8a, C-7c, C-8c). Die weiteren 38 Signale zwischen δ 102,1 und 162,4 repräsentieren die aromatischen und olefinischen C-Atome der Verbindung. Alle protonierten C-Atome sind ebenfalls im HSQC-Spektrum zu finden.

Im Gegensatz zu Resviniferin A (**S12**) besitzen die Ringsysteme A und C von Resviniferin B (**S13**) eine identische chemische Struktur und damit sehr ähnliche chemische Verschiebungen. Aus diesem Grunde ist eine exakte Zuordnung der Protonen H-2a, H-6a (δ 7,19) und H-2c, H-6c (δ 7,20) sowie H-3a, H-5a (δ 6,82) und H-3c, H-5c (δ 6,83) nicht möglich. In Abbildung 3.50 sind die austauschbaren chemischen Verschiebungen mit Nummern von 1-2 markiert.

Im HMBC-Spektrum wurden zwischen H-2b und dem Kohlenstoffatom bei δ 130,3 (C-7b), H-8b und δ 131,8 (C-1b) und H-8b und δ 104,4 (C-14b) signifikante Korrelationen gefunden, die von dem Stilbengrundgerüst (Ring B₁-C-7b-C-8b-Ring B₂) stammen. Abbildung 3.51 stellt die wichtigsten CH-Fernkorrelationen von Resviniferin B (**S13**) dar.

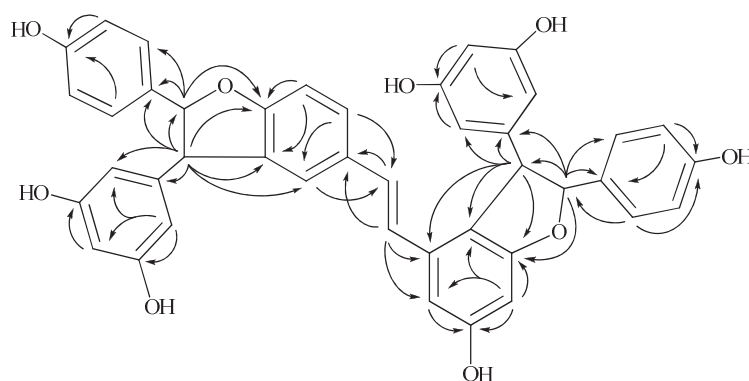


Abbildung 3.51: Ausgewählte CH-Fernkorrelationen von Resviniferin B (**S13**)

Weitere aufschlussreiche CH-Fernkorrelationen wurden zwischen H-8a und sieben C-Atomen [δ 132,6 (C-1a), 93,9 (C-7a), 145,2 (C-9a), 107,3 (C-10a,14a), 125,0 (C-2b), 131,9 (C-3b),

160,6 (C-4b)] detektiert. Ähnliche Korrelationen konnten Proton H-8c [δ 133,8 (C-1c), 93,9 (C-7c), 147,3 (C-9c), 107,0 (C-10,14c), 136,4 (C-9b), 120,0 (C-10b), 162,4 (C-11b)] zugeordnet werden. Die CH-Fernkorrelationen von H-8a und H-8c definieren die Verbindung zwischen den drei Monomeren der Ringsysteme A, B und C.

Die relative Konfiguration von Resviniferin B (**S13**) wurde auf der Basis von NOE-Experimenten bewiesen. ROESY-Wechselwirkungen zwischen H-7a und H-8a sowie H-7c und H-8c weisen erneut auf eine *trans*-Orientierung beider Protonenpaare hin. Abbildung 3.52 zeigt einen Ausschnitt des ROESY-Spektrums von Resviniferin B (**S13**) mit den Wechselwirkungen der vier aliphatischen Protonen.

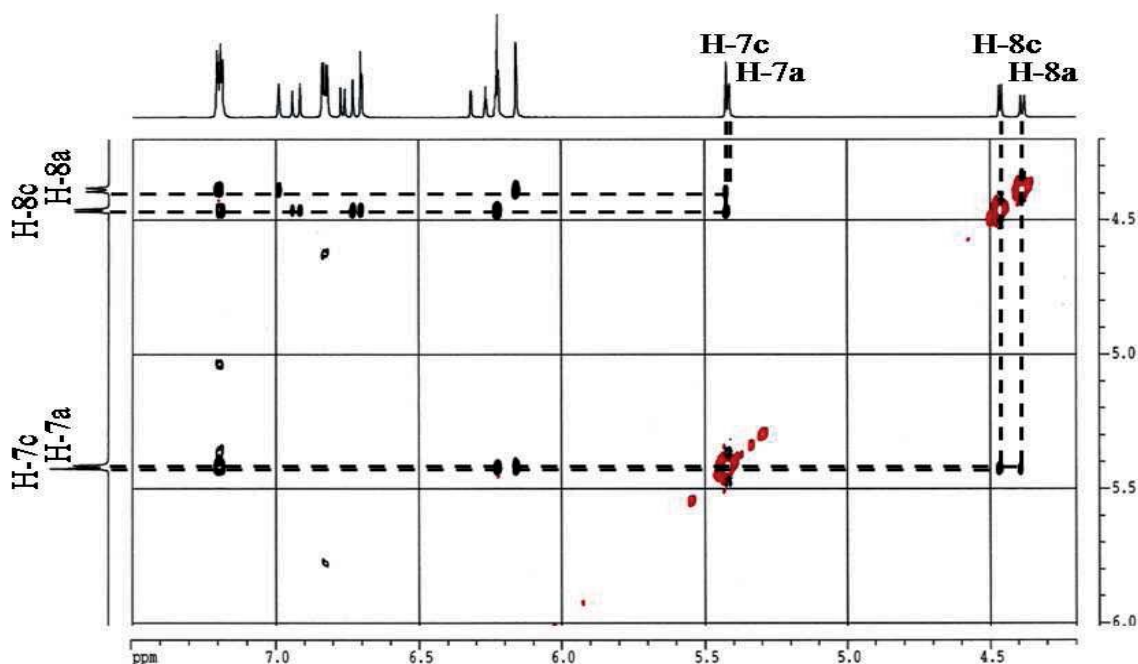


Abbildung 3.52: Ausschnitt des ROESY-Spektrums von Resviniferin B (**S13**) (600 MHz, CD_3COCD_3)

Im Gegensatz zu Resviniferin A (**S12**) wurden keine Wechselwirkungen zwischen H-8a und H-8c detektiert. Dies ist nicht überraschend, da die zwei Furanringe in der linearen Struktur des Stilbens weit auseinander liegen. Weitere NOE-Wechselwirkungen (Abbildung 3.53), beispielsweise zwischen H-8a/H-2b, H-2b/H-8b, H-8b/H-8c und H-8b/H-14c, bestätigen die chemische Struktur von Resviniferin B (**S13**).

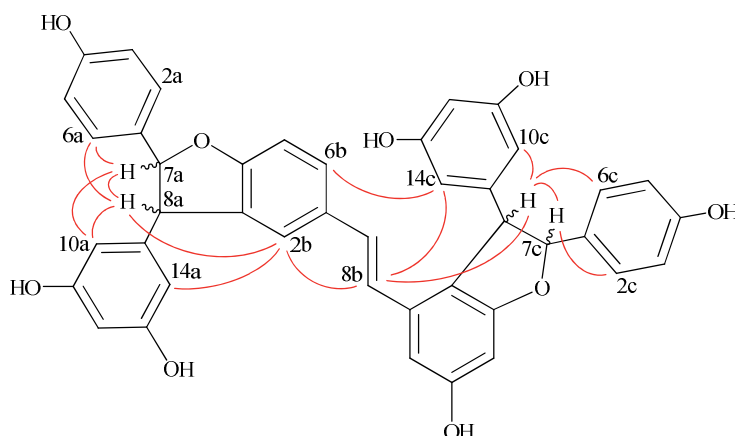


Abbildung 3.53: Ausgewählte NOE-Wechselwirkungen von Resviniferin B (S13)

Da dieses Stilben, unabhängig von seiner Stereochemie, noch nicht in der Literatur beschrieben ist, handelt es sich um ein neues Resveratrololigomer. Auch in diesem Fall kann die absolute Stereochemie nur über Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden.

Durch die Biotransformation von *trans*-Resveratrol (**S1**) und (-)- ϵ -Viniferin (**S4**) mittels Meerrettichperoxidase konnte eine große Vielfalt verschiedenster Stilbenoligomere zugänglich gemacht werden. Mit der optimierten enzymatischen Umsetzung von *trans*-Resveratrol (**S1**) ist eine schnelle Methode zur Synthese von *trans*- δ -Viniferin (**S11**) entwickelt worden. Unter Verwendung der HSCCC für die Fraktionierung der biotransformierten Stilbenoligomere gelang die Anreicherung von zwei Minorkomponenten (**S12**, **S13**). Die Biosynthese und Strukturaufklärung dieser Resveratrol-Trimere wurde erstmals in WILKENS et al. (2010) beschrieben. Da die neuen Resveratrol-Trimere auch natürlich in der Weinrebe vorkommen können, leisten die erhaltenen Referenzdaten einen Beitrag für die Detektion der Minorkomponenten bei der zukünftigen Erforschung von Weinrebenextrakten.

3.6 Stilbene im Wein

Neben der Isolierung und Charakterisierung von oligomeren Resveratrol-Derivaten aus Weinrebenextrakten und ihrer enzymatischen Synthese mittels Peroxidase, erfolgte ein Screening zum Vorkommen von Stilbenen in Wein. Hierbei wurden die Stilbengehalte der Weine quantifiziert und ihr Einfluss auf die antioxidative Aktivität von Wein untersucht.

3.6.1 Stilbengehalte im Wein

Es wurde ein Screening von Weinen verschiedenster Jahrgänge, Herkunft und Rebsorte durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Stilbengehalte in 161 Weinen der Verkostung anlässlich des internationalen Weinpreises „Mundus Vini“ 2008 mittels HPLC-PDA und HPLC-ESI-MS² bestimmt. Zusätzlich zu den Standardsubstanzen *trans*-Resveratrol (**S1**) und *trans*-Piceid (**S2**) standen vier bereits aus Weißwein isolierte Stilbene (Pallidol-3,3"-O- β -D-diglucosid, *trans*-Resveratrol-2-C- β -D-glucosid, Pallidol-3-O- β -D-glucosid und 7S,8S-*trans*- ϵ -Viniferin-3,5-O- β -D-diglucosid) zur Verfügung (BADERSCHNEIDER und WINTERHALTER, 2000). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Kalibrierfunktion der Standardsubstanzen *trans*-/*cis*-Resveratrol und *trans*-/*cis*-Piceid. Zur Gewinnung der *cis*-Isomere wurden die *trans*-Verbindungen mittels UV-Licht umgesetzt und die erhaltene Konzentration über den Anteil an nicht isomerisiertem *trans*-Stilben bestimmt. Abbildung 3.54 stellt die repräsentativen HPLC-Chromatogramme (A-D) verschiedener Rebsorten bei 306 nm vor. Die Zuordnung der Weine und Nummern sind in Tabelle 3.9 zu finden.

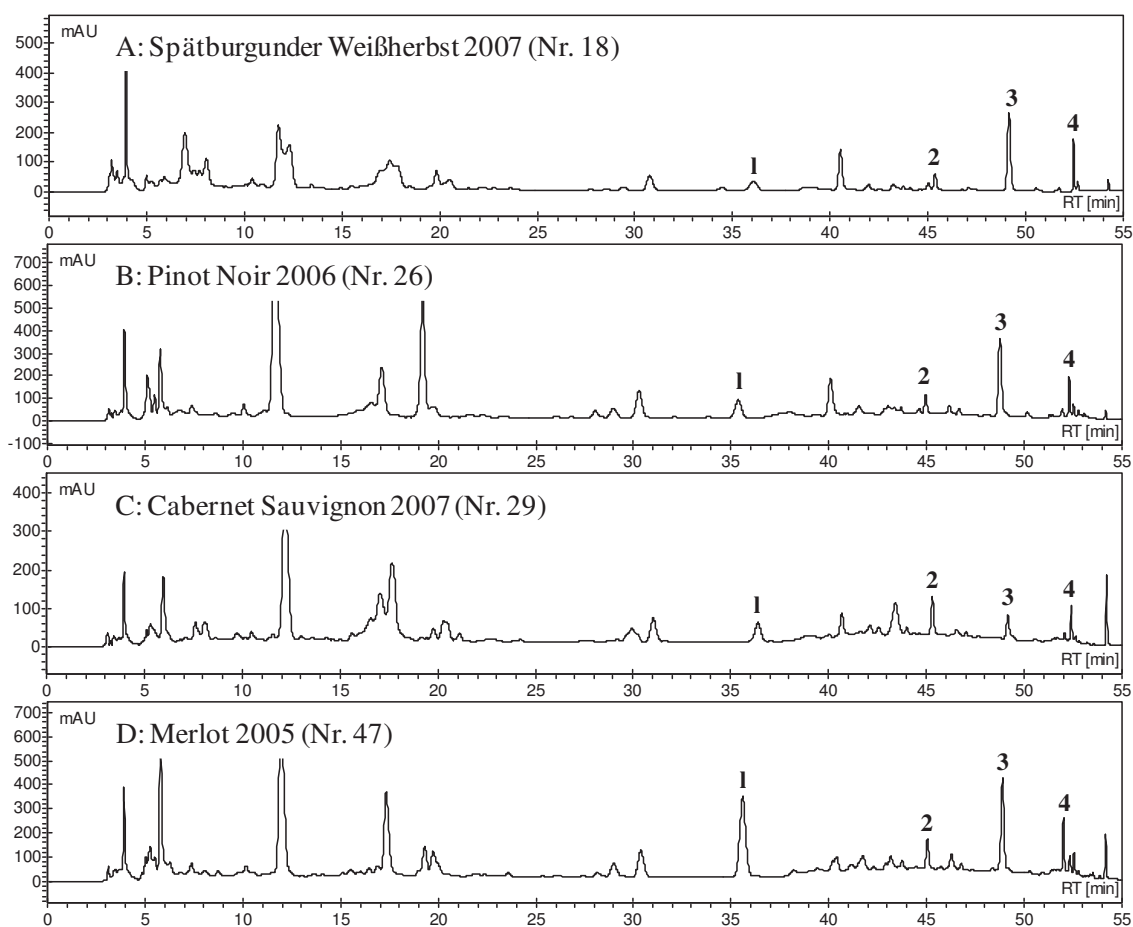


Abbildung 3.54: HPLC-Chromatogramme (A-D) ausgewählter Weine bei 306 nm: *trans*-Piceid (1), *cis*-Piceid (2), *trans*-Resveratrol (3), *cis*-Resveratrol (4)

In Tabelle 3.8 sind die Retentionszeiten und UV-Maxima der für die Quantifizierung verwendeten Standardsubstanzen aufgeführt.

Tabelle 3.8: Retentionszeiten und UV-Maxima der Standardsubstanzen

Nr.	Verbindung	Rt [min]	PDA- λ_{max} [nm]
1	<i>trans</i> -Piceid	36,9	306, 319
2	<i>cis</i> -Piceid	45,4	284
3	<i>trans</i> -Resveratrol	49,1	306, 319
4	<i>cis</i> -Resveratrol	52,3	284
5	Pallidol-3,3"-O- β -D-diglucosid	18,8	282
6	<i>trans</i> -Resveratrol-2-C- β -D-glucosid	22,0	302
7	Pallidol-3-O- β -D-glucosid	38,8	282
8	7S,8S- <i>trans</i> - ϵ -Viniferin-3,5-O- β -D-diglucosid	43,9	323

Von 161 analysierten Weiß-, Rosé- und Rotweinen enthielten 94 Weine mindestens eines der Stilbene. Hiervon lagen bei 60 Weinen die Gehalte von *trans*-/*cis*-Resveratrol und *trans*-/*cis*-Piceid unterhalb der Bestimmungsgrenze. In 67 Weinen wurde keines der untersuchten Stilbene detektiert. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Rosé- und Weißweine der Rebsorten Sauvignon blanc, Riesling, Rieslaner, Grauburgunder, Welschriesling und Spätburgunder Weißherbst, welche herstellungsbedingt grundsätzlich geringere Stilben-Konzentrationen aufweisen. Bei der Weintraube sind die enthaltenen Stilbene vorwiegend in der Traubenschale lokalisiert. Aufgrund der im Vergleich zur Rotweinherstellung kurzen Maischezeit von wenigen Stunden und des Kelterns vor der Gärung (vergl. Abschnitt 2.2.4) enthalten Rosé- und Weißweine insgesamt weniger Polyphenole (BUIARELLI et al., 2007, PERRONE et al., 2007).

In keinem der untersuchten Weine konnten die aus Weißwein (Riesling, QbA, Rheinpfalz 1992) isolierten Stilbene Pallidol-3,3"-O- β -D-diglucosid (5), *trans*-Resveratrol-2-C- β -D-glucosid (6), Pallidol-3-O- β -D-glucosid (7) und 7S,8S-*trans*- ϵ -Viniferin-3,5-O- β -D-diglucosid (8) (BADERSCHNEIDER und WINTERHALTER, 2000) mittels HPLC-PDA und HPLC-ESI-MS² detektiert werden. Die Minorkomponenten des Rieslings sind generell höchstens in Spuren enthalten und konnten somit auch in den untersuchten Weißweinen der Rebsorte Riesling nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 3.55 stellt die Stilbengehalte der analysierten Weine graphisch dar. Die zugehörigen Konzentrationen von *trans*-/*cis*-Resveratrol und *trans*-/*cis*-Piceid sind in Tabelle 3.9 aufgelistet.

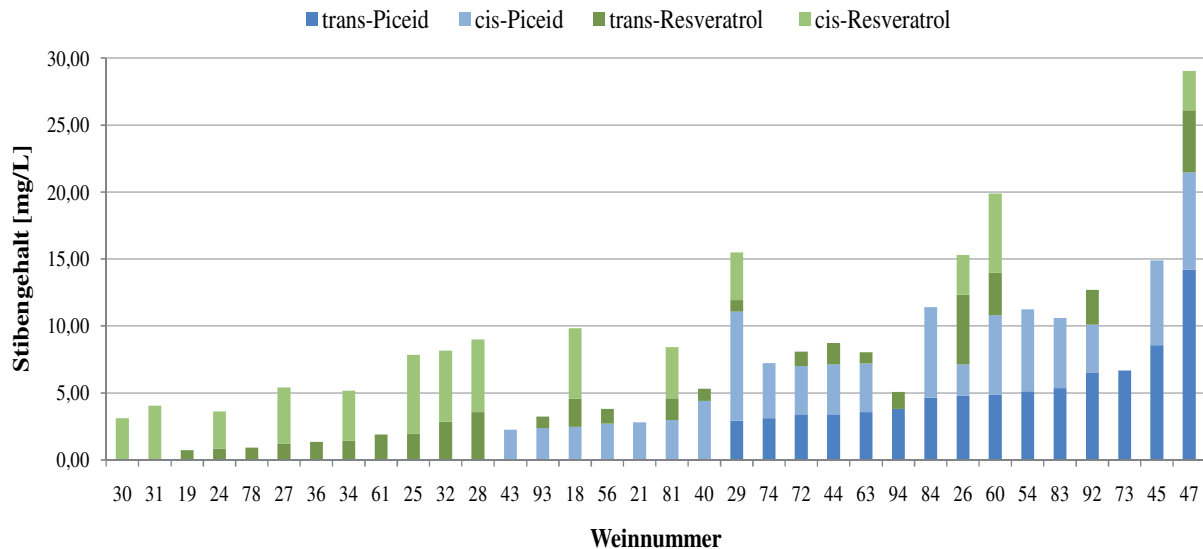


Abbildung 3.55: Stilbengehalt in Weinen des internationalen Weinpreises Mundus Vini 2008, sortiert nach aufsteigendem *trans*-Piceid-Gehalt

Die höchsten *trans*-Piceid-Konzentrationen von 14,19 und 8,57 mg/L besaßen zwei Weine der Rebsorte Merlot (Nr. 47, Nr. 45). Hohe *trans*-Resveratrol-Gehalte von 5,20 und 3,57 mg/L zeigten zwei Pinot Noir Weine (Nr. 26, Nr. 28). In den meisten Weinen ließen sich jeweils beide Formen, das *trans*- und auch das *cis*-Stilben detektieren. Die untersuchten Rotweine enthielten, in Übereinstimmung mit der Literatur, insgesamt höhere Stilbengehalte als die Rosé- und Weißweine.

In der Literatur werden durchschnittliche Konzentrationen von *trans*- und *cis*-Resveratrol zwischen 0,2-13 mg/L für Rotweine und 0,1-0,8 mg/L für Weißweine angegeben (GOLDBERG et al., 1995a, NIKFARDJAM et al. 1999). Besonders hohe *trans*-Resveratrol-Gehalte sind in Pinot Noir zu finden. Carbernet Sauvignon Weine besitzen einen weiten Konzentrationsbereich für Stilbene. Ein aus Ländern mit gemäßigttem Klima stammender Carbernet Sauvignon wie aus Ontario (Kanada) und der Bordeaux-Region in Frankreich enthält höhere Resveratrolgehalte als ein Carbernet Sauvignon aus wärmeren Gegenden wie Kalifornien, Südafrika oder Australien (GOLDBERG et al., 1995b). Für Piceid werden Gehalte von 0,3-9 mg/L in Rotwein und 0,1-2,2 mg/L in Weißwein beschrieben (GOLDBERG et al., 1996, LAMUELA-RAVENTÓS et al., 1995, SATO et al., 1997, NAUGLER et al. 2007, ROMERO-PÉREZ et al., 1996). In portugiesischem Rotwein wurden sogar Piceid-Gehalte von über 25 mg/L aufgezeigt (RIBEIRO DE LIMA et al., 1999).

Des Weiteren konnten in einer Untersuchung von kommerziell erhältlichen Weinen aus Südfrankreich Gehalte der Resveratrol-Dimere Pallidol und *trans*- ϵ -Viniferin nachgewiesen

werden (LANDRAULT et al., 2002). *Trans-ε-Viniferin* wurde in Rotweinen und Weinen mit Botrytisbefall in Gehalten von 0,1-1,63 mg/L detektiert. Pallidol konnte in Weinen, deren Maische unter Zusatz der Rappen durchgeführt wurde, in Gehalten von 0,36-2,22 mg/L quantifiziert werden. Zusätzlich wurde das Tetramer Hopeaphenol in verschiedenen südafrikanischen Weinen (0,3-3,8 mg/L) gefunden (GUEBAILIA et al., 2006). Diese in der Literatur beschriebenen Stilbenoligomere waren in den untersuchten Weinen des internationalen Weinpreises „Mundus Vini“ 2008 weder mittels HPLC-PDA noch unter Einsatz von HPLC-ESI-MS² detektierbar.

Tabelle 3.9: Stilbengehalte in Weinen des internationalen Weinpreises „Mundus Vini“ 2008

Nr.	Wein	<i>trans</i> -Piceid [mg/L]	<i>cis</i> -Piceid [mg/L]	<i>trans</i> -RSV [mg/L]	<i>cis</i> -RSV [mg/L]
18	2007 Iphöfer Kalb Pfiffikus Spätburgunder Weißherbst Kabinett	+	2,47	2,11	5,25
19	2007 Spätburgunder Rosé	+	+	0,74	+
21	2007 Rudolf Müller Spätburgunder Rosé QbA halbtrocken Mosel	+	2,80	+	+
24	2006 St. Laurent Reserve	n.d.	n.d.	0,83	2,78
25	2006 Leopold Aumann St.Laurent Qualitätswein trocken	n.d.	n.d.	1,96	5,88
26	2006 Pinot Noir "Hundertpfunder"	4,80	2,33	5,20	2,95
27	2005 Cavallo Pinot Noir	n.d.	n.d.	1,23	4,17
28	2005 Pinot Noir	n.d.	n.d.	3,57	5,42
29	2007 Cabernet Sauvignon Qualitätswein Niederösterreich	2,93	8,15	0,85	3,55
30	2006 Cabernet Sauvignon	n.d.	n.d.	+	3,13
31	2006 Cablot	n.d.	n.d.	+	4,03
32	2006 Malteser Ritterorden	n.d.	n.d.	2,85	5,30
34	2005 SYMBIOSE Cuvée Barrique	n.d.	n.d.	1,46	3,70
36	2005 Vöslauer Cabernet Merlot Qualitätswein	+	n.d.	1,36	+
40	2007 Bastardo - Merlot "Taking root"	+	4,41	0,90	+
43	2006 La Cetate Shiraz	+	2,25	n.d.	n.d.
44	2005 Vale das Areias Syrah	3,40	3,72	1,61	+
45	2007 Val Duna Merlot	8,57	6,32	+	+
47	2005 Fonko Merlot	14,19	7,28	4,64	2,93
54	2006 Sasyr Sangiovese & Syrah	5,10	6,13	+	+
56	2005 Ad Astra Maremma Toscana	+	2,71	1,08	+
60	2004 Ser Gioveto IGT	4,86	5,95	3,17	5,90
61	2004 Roccato IGT	+	+	1,89	+

Nr.	Wein	<i>trans</i> -Piceid [mg/L]	<i>cis</i> -Piceid [mg/L]	<i>trans</i> -RSV [mg/L]	<i>cis</i> -RSV [mg/L]
63	2004 Redi Orbaio Rosso Toscana IGT	3,57	3,63	0,84	+
72	2005 Martin Sarmiento Mencía	3,39	3,60	1,11	+
73	2006 Aldonza Selección	6,69	+	+	+
74	2004 Buezo Varietales	3,13	4,09	+	+
78	2007 Rondo Spezial Jylland	+	+	0,92	+
81	2005 Kakhetian Noble Badagoni	+	2,99	1,61	3,80
83	2006 Dingac Barrique	5,35	5,24	+	+
84	2007 Val Duna Pinot Noir	4,65	6,76	+	+
92	2003 Monteiros DÃO D.O.C. Portugal	6,55	3,54	1,60	n.d.
93	2007 Cabernet Sauvignon/Merlot South Australia	+	2,36	0,89	+
94	2004 Carmenère Chi Mú Valle Central Chile	3,82	+	1,24	+

+: Stilbengehalt > Nachweisgrenze, n.d.: nicht detektierbar

Die unterschiedlichen Jahrgänge (2003 bis 2007) der Weine stellten kein Kriterium für die Beeinflussung der Stilbenkonzentration dar. JEANDET et al. (1995c) zeigten, dass die Alterung von Weinen keinen Einfluss auf die Stilbenkonzentration besitzt. Hiernach ist Resveratrol in Wein über Jahre stabil. Einige ältere Weine des Weinpreises „MundusVini“, wie z.B. Ser Gioveto von 2004 (Nr. 60) und der Merlot von 2005 (Nr. 47) besaßen höhere Stilbengehalte als Weine späterer Jahrgänge und bestätigen diese Ergebnisse. Der beeinflussende Faktor ist laut JEANDET et al. der gesundheitliche Zustand der Weinrebe während der Reifung und Ernte der Trauben. Eine Botrytisinfektion beispielsweise kann höhere Stilbenkonzentrationen hervorrufen, so dass bei dem Vergleich von Weinen unterschiedlichen Alters zusätzlich der fungizide Befall der Pflanze berücksichtigt werden muss.

Bei den Weinen des internationalen Weinpreises „Mundus Vini“ 2008 handelte es sich um qualitativ besonders hochwertige Weine. Die Trauben wurden einer starken Auslese unterzogen, bei der Trauben mangelnder Qualität, wie z.B. infizierte Trauben, aussortiert und nicht zur Weinherstellung eingesetzt wurden. Der resultierende Stilbengehalt ist dementsprechend niedrig, wodurch die hohe Anzahl an Weinen ohne nachweisbarem oder mit nur geringem Stilbengehalt zustande kommt.

3.6.2 Antioxidative Aktivität von Wein

Um einen möglichen Einfluss der enthaltenen Stilbene auf die antioxidative Aktivität zu erkennen, wurde eine Auswahl an verschiedenen Weinen mittels des TEAC-Assays (vergl. Abschnitt 3.4) analysiert. Hierzu wurde der Gesamtstilbengehalt bestehend aus der Summe von *cis-/trans*-Resveratrol und *cis-/trans*-Piceid mit der resultierenden antioxidativen Aktivität der Weine in Bezug gesetzt. Abbildung 3.56 stellt die Ergebnisse der Untersuchung graphisch dar. Tabelle 3.9 enthält die Zuordnung der untersuchten Weine. In Tabelle 7.8 des Anhangs sind die zugehörigen Wertepaare aufgelistet.

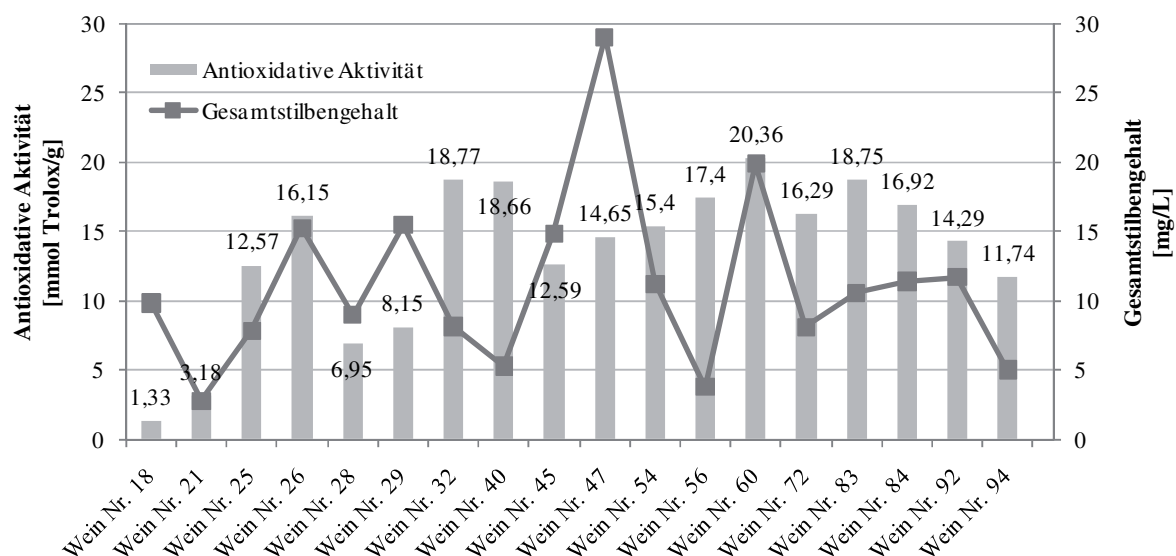


Abbildung 3.56: Antioxidative Aktivität und Gesamtstilbengehalt ausgewählter Weine

Es wurde eine große Varianz zwischen der antioxidativen Aktivität von 1,33 bis 20,36 mmol Trolox/g und den Stilbengehalten von 2,80 bis 29,04 mg/L der Weine festgestellt. Kongruenzen in der antioxidativen Aktivität und der Stilbenkonzentration wurden z.B. bei dem Spätburgunder Rosé (Nr. 21), Pinot Noir (Nr. 26) und Ser Gioveto (Nr. 60) gefunden. Es ist jedoch keine Korrelation der Datenpaare aller Weine möglich. Bei dem Großteil der Weine konnte das antioxidative Potential nicht direkt mit dem Stilbengehalt in Bezug gesetzt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von NIKFARDJAM et al. (1999), welche sich mit dem Gehalt von *trans*-Resveratrol und der antioxidativen Aktivität deutscher Weine beschäftigten. Hiernach besitzen Weißweine einen durchschnittlichen TEAC-Wert von unter 1 mmol Trolox/g. Rotweine zeigen aufgrund ihres höheren Polyphenolgehaltes ein

antioxidatives Potential von 3 bis 17 mmol Trolox/g. Anhand der graphischen Auswertung der Korrelation zwischen *trans*-Resveratrol und der TEAC-Werte (Lineare Regression: $R^2 = 0,30$, $n = 128$), sowie der Korrelation des Gesamtpolyphenolgehaltes und der TEAC-Werte (Lineare Regression: $R^2 = 0,94$, $n = 128$) konnten NIKFARDJAM et al. mittels des geringen Bestimmtheitsmaßes R^2 zeigen, dass der Einfluss des *trans*-Resveratrol-Gehaltes auf die antioxidative Aktivität nebensächlich ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten verdeutlichen ebenfalls, dass zwischen der antioxidativen Aktivität und der Stilbenkonzentration der Weine kein direkter Zusammenhang besteht. Wein enthält zusätzlich zu Stilbenen viele weitere, antioxidativ wirksame Polyphenole und Säuren, welche ebenfalls das antioxidative Potential beeinflussen. Die Konzentration der Stilbene ist zu gering, um einen signifikanten Einfluss auf das Potential ausüben zu können. Vielmehr resultiert die antioxidative Aktivität aus der Summe der enthaltenen polyphenolischen Verbindungen, zu denen z.B. Catechin, Myricetin, Anthocyane, Gallussäuren und Kaffeesäuren gehören (FRANKEL et al., 1995).

4 Zusammenfassung

Stilbenen werden gesundheitsfördernde Eigenschaften nachgesagt, deren Mechanismen im Einzelnen jedoch noch nicht vollständig geklärt sind. Zu ihrer Erforschung werden weitere Studien benötigt, mit deren Durchführung ein großer Bedarf an Reinsubstanzen einhergeht. Die Entwicklung neuer, effizienter Isolierungstechniken zur Gewinnung hochaktiver Stilbenoligomere im präparativem Maßstab, wie z.B. aus dem bei der Weinherstellung als Abfallstoff anfallenden Rebholz, ist hierfür zwingend erforderlich.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Isolierungsstrategien zur Bereitstellung von Stilbenoiden aus Weinrebenextrakten. Zur Isolierung der bioaktiven Verbindungen wurde die High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) eingesetzt. Dies umfasste zusätzlich die Entwicklung einer effizienten Probenaufarbeitung zur Eliminierung von polymeren Störsubstanzen, welches durch eine Hexanfällung erreicht werden konnte. Unter Verwendung des Fließmittelsystems *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/2/1/2, v/v/v/v) wurde in Kombination mit der präparativen HPLC die Isolierung der Stilbene *trans*-Resveratrol, *trans*-Piceid, *trans*-Piceatannol, *trans*- ϵ -Viniferin, Ampelopsin A, Hopeaphenol, Parthenocissin A, Quadrangularin A, r-2-Viniferin und r-Viniferin in einer Reinheit von > 95 % aus dem Weinrebenextrakt Vineatrol®³⁰ ermöglicht. Die Resveratrol-Dimere Quadrangularin A und Parthenocissin A sowie das Resveratrol-Glucosid *trans*-Piceid konnten hierbei erstmals in Vineatrol®³⁰ nachgewiesen werden.

Ferner konnte gezeigt werden, dass sich die Low-Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC) gut für die Vorfraktionierung des Weinrebenextraktes im präparativen Maßstab eignet. In Kombination mit der HSCCC oder der präparativen HPLC lassen sich erfolgreich größere Mengen an reinen Stilbenoiden isolieren. So wurden 30 mg *trans*-Piceatannol direkt mittels HSCCC isoliert. Durch die Vorschaltung der LSRCCC-Trennung konnte die Reinheit des Resveratrol-Derivates von 28 % auf 94 % erhöht werden. Auch die Isolierung von 27 mg des Tetramers r-Viniferin aus einer LSRCCC-Fraktion war mittels präparativer HPLC möglich. Bis heute sind keine Applikationen für die Auftrennung von Weinrebenextrakten mittels LSRCCC publiziert worden. Folglich wurde in dieser Arbeit die LSRCCC erstmals zur Trennung eines Weinrebenextraktes eingesetzt. Die Strukturaufklärung der aus dem Weinrebenextrakt Vineatrol®³⁰ isolierten Stilbenoide erfolgte

anhand von HPLC-ESI-MSⁿ, ¹H-, ¹³C-, DEPT-NMR- und 2D-NMR-Spektroskopie wie HSQC-, HMBC-, COSY- und ROESY-Experimenten.

Zusätzlich zum kommerziellen Weinrebenextrakt Vineatrol®³⁰ wurde das Stilbenoidprofil eines Rebholzes der Rebsorte Spätburgunder untersucht und die jeweils enthaltenen Stilbenoide miteinander verglichen. Der polymere, nicht-stilbenoide Anteil des Rebholzextraktes wurde mittels Phloroglucinolyse analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es sich bei einem Großteil der polymeren Verbindungen um Proanthocyanidin-Polymere handelt. Das Rebholz der Rebsorte Spätburgunder stellte eine effiziente Quelle für die Gewinnung von Resveratrololigomeren dar. So gelang die Isolierung von *trans*-Resveratrol, *trans*- ϵ -Viniferin, Ampelopsin A, Hopeaphenol, *r*-Viniferin sowie die Anreicherung von *trans*-Piceatannol.

Mit Hilfe des TEAC-Assays wurde die antioxidative Aktivität der Weinrebenextrakte der Rebsorte Spätburgunder und Vineatrol®³⁰, der HSCCC-Fractionen sowie der isolierten Reinsubstanzen bestimmt. Die isolierten Reinsubstanzen zeigten insgesamt höhere TEAC-Werte als die HSCCC-Fractionen und die Extrakte, wodurch ein synergistischer Effekt von Stilbenen im Weinrebenextrakt ausgeschlossen werden konnte. Das Resveratrol-Derivat *trans*-Piceatannol besaß von allen Reinsubstanzen aufgrund der zusätzlichen OH-Gruppe mit 2,86 mmol Trolox/g die höchste antioxidative Aktivität. Weiterführend wurde ein Screening von 161 Weinen verschiedenster Jahrgänge, Herkunft und Rebsorte durchgeführt. Hierbei wurden der Stilbengehalt und die antioxidative Aktivität verglichen. Es zeigte sich, dass die antioxidative Aktivität nur gering durch die Stilbenkonzentration beeinflusst wird, sondern aus der Summe der enthaltenen polyphenolischen Verbindungen resultiert.

Als alternativer Weg zur Darstellung von Resveratrololigomeren wurde eine *in vitro* Biosynthese unter Einsatz von Meerrettichperoxidase durchgeführt. Im Fokus stand hierbei die Synthese neuer, unbekannter Resveratrololigomere. Die enzymatische Umsetzung von *trans*-Resveratrol lieferte das Dimer *trans*- δ -Viniferin. Durch die Biotransformation eines Gemisches von *trans*-Resveratrol und (-)- ϵ -Viniferin konnte eine große Vielfalt verschiedenster Stilbenoligomere zugänglich gemacht werden. Unter Verwendung der HSCCC und präparativer HPLC für die Fraktionierung der biotransformierten Stilbenoligomere gelang die Isolierung von zwei neuen Resveratrol-Trimeren (Resviniferin A und Resviniferin B).

5 Material und Methoden

5.1 Pflanzenmaterial und Chemikalien

5.1.1 Pflanzenmaterial

Weinrebenextrakt (*Vitis vinifera*)

Extrakt: Vineatrol®30, (Batch-Nr. R191-07), Breko GmbH (Bremen)

Weinrebe (*Vitis vinifera*)

Rebholz, Rebsorte Spätburgunder, Herkunft: Staatsweingut mit Johannitergut Neustadt-Mußbach a.d. Weinstraße

5.1.2 Chemikalien

ABTS	98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	p.a.	Roth, Karlsruhe
Aceton-d ₆	99,8 %	Deutero GmbH, Kastellaun
Acetonitril	HPLC	Fisher, Scientific Loughborough, UK
Ascorbinsäure	p.a.	Merk, Darmstadt
Citronensäure	p.a., wasserfrei	Fluka, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	p.a.	Merk, Darmstadt
Essigsäure	HPLC	Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	techn., destilliert	
Ethanol	p.a., 99,8 %	Riedel-de Haën, Seelze
Ethylacetat	p.a.	Fisher, Scientific Loughborough, UK
n-Hexan	techn., destilliert	
n-Hexan	p.a.	Riedel-de Haën, Seelze
n-Butanol	p.a.	Riedel-de Haën, Seelze

Kaliumpersulfat	p.a.	Riedel-de Haën, Seelze
Meerrettichperoxidase	970 U/mg	Fluka, Steinheim
Methanol	HPLC	Acros, New Jersey, USA
Methanol-d ₄	99,6 %	Deutero GmbH, Kastellaun
Methanol	techn., destilliert	
Natriumacetat	p.a., wasserfrei	Riedel-de Haën, Seelze
Phloroglucinol	p.a.	Merk, Darmstadt
Salzsäure	37 %	Riedel-de Haën, Seelze
<i>trans</i> -Piceid	99,41 % (303 nm)	Phytolab, Vestenbergsgreuth
<i>trans</i> -Resveratrol	99,44 % (305 nm)	Phytolab, Vestenbergsgreuth
Trolox [®]	>98 %	Fluka, Steinheim
Wasser	HPLC	Fisher, Scientific Loughborough, UK
Wasser	doppelt deionisiert	Barnstead, NANOpure [®]
Wasserstoffperoxid	p.a., 30 %	Merck, Darmstadt

Für die Extraktion, Probenaufarbeitung, Fraktionierung und dünnschichtchromatographische Untersuchung wurden destillierte Fasswaren und Lösungsmittel zur Analyse verwendet. Für den Einsatz von analytischer sowie präparativer HPLC wurden Lösemittel in HPLC-Qualität benutzt.

5.2 Geräte und Parameter

5.2.1 Photometer

Gerät: Shimadzu UV-2101PC UV-VIS Scanning Spectralphotometer
 Software: UV-2101PC Version 2.21

5.2.2 Gefriertrocknung

Gerät: Christ Alpha 2-4
 Pumpe: Edwards High Vacuum Pump

5.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

5.2.3.1 HPLC-PDA

System 1: Extraktanalytik

Pumpe:	Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Degasser:	Jasco DG-980-50 3-Line Degasser
Gradientenformer:	Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit
Injektor:	Rheodyne 7125, 20 µL Probenschleife
Detektor:	Jasco MD-910 Multiwavelength Detector
Software:	Borwin-PDA Version 1.5

System 2: Weinanalytik

Pumpe:	Jasco PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump
Degasser:	Jasco DG-2080-53 3-Line Degasser
Gradientenformer:	Jasco LG-2080-02 Ternary Gradient Unit
Autosampler:	Jasco AS-2057 Plus Intelligent Sampler
Detektor:	Jasco MD-2010 Plus Multiwavelength Detector
Säulenofen:	Jasco
Software:	ChromPass Chromatography Data System Version 1.8

5.2.3.2 Präparative HPLC

Gerät 1

Pumpe:	Knauer Wellchrom HPLC Pump K-1001
Degasser:	Knauer Wellchrom 4 Channel Degasser K-5004
Gradientenformer:	Knauer Solvent organizer K-1500
Injektor:	Knauer 55900, 100 µL Probenschleife
Detektor:	Knauer Wellchrom UV Detector K-2600
Software:	Knauer Eurochrom 2000 Version 2.05

Gerät 2

Pumpe:	Knauer Smartline Pump 1000
Steuereinheit:	Knauer Smartline Manager 5000
Injektor:	Knauer 96650, 200 µL Probenschleife
Detektor:	Knauer Wellchrom UV Detector K-2600

Software: Chromgate Version 3.1.7

5.2.3.3 HPLC-MSⁿ

Pumpe: Hewlett Packard System 1100 Binary Pump G1312A

Autosampler: Agilent Technologies 1200 ALS SL G1329B

MS: Esquire-LC-MS/MS Ion Trap mit Elektrospray-Ionisierung (Bruker Daltronik GmbH, Bremen)

Software: HP Kayak XA, HP ChemStation, Esquire Control

5.2.4 Massenspektrometer (MS)

MS: Esquire-LC-MS/MS Ion Trap mit Elektrospray-Ionisierung (Bruker Daltronik GmbH, Bremen)

Spritzenpumpe: Cole Parmer 74900 series

5.2.5 High Resolution ESI-MS (HR-ESI-MS)

MS: Thermo Science LTQ Orbitrap mass spectrometer

5.2.6 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

HSCCC A

Gerät: Pharma Tech Research, model CCC-1000

Pumpe: Biotronik HPLC Pump BT 3020

Injektor: Rheodyne 5041 4-Wegeventil, 20 mL Teflonschleife

Coilvolumen: 800 mL (Schlauch I.D. 2,5 mm)

Detektor: Knauer Variable Wavelength Detector

Fraktionensammler: Pharmacia LKB Super Frac

Schreiber: BBC Goerz SE 120

HSCCC B

Gerät: Pharma Tech Research, model CCC-1000

Pumpe: Beckmann System Gold programmable Solvent Module 116

Injektor: Rheodyne 5041 4-Wegeventil, 30 mL Teflonschleife

Coilvolumen: 850 mL (Schlauch I.D. 2,5 mm)

Detektor: Beckmann System Gold programmable Detector Module 166
Fraktionensammler: LKB 2111 Multirac
Software: CWC Chromatography Station Beckman 166 Version 1.7

5.2.7 Low Speed Rotary Countercurrent Chromatography (LSRCCC)

Gerät: Prototyp Durchflusszentrifuge, Coil-Länge 48,5 cm
Pumpe: Knauer HPLC Pumpe 64
Coilvolumen: 5500 mL (für Retentionsstudie: 550 mL)
Schlauch: „convoluted“ PTFE Schlauch, 107 m, I.D. 8,5 mm
Detektor: Knauer Variable Wavelength Monitor
Fraktionensammler: Pharmacia LKB Super Frac
Schreiber: ABB Goerz SE 120

5.2.8 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Gerät 1: Bruker DMX-600
Messfrequenz: ^1H : 600.0 MHz, ^{13}C : 150.9 MHz
Temperatur: 300,0 K

Gerät 2: Bruker Avance II-600
Messfrequenz: ^1H : 600.1 MHz, ^{13}C : 150.9 MHz
Temperatur: 301,2 K

Gerät 3: Bruker AMX-300
Messfrequenz: ^1H : 300.1 MHz, ^{13}C : 75.5 MHz
Temperatur: 300,0 K

Als deuterierte Lösungsmittel wurden Aceton und Methanol verwendet (siehe 5.1.2).

5.3 Analytische Methoden

5.3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Trägermaterial: Merck Kieselgel 60 (F₂₅₄), Aluminiumfolie

Fließmittel: Chloroform/Ethylacetat/Methanol/Wasser (25/55/5/1, v/v/v/v)
 Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (STAHL, 1967)

5.3.2 HPLC-Methoden

Methode 1: Stilbenanalytik für Extrakte

Säule: Phenomenex Luna 5 μ C18(2) 250 x 4,6 mm (SG: C18 4 x 3.0 mm)
 Fließmittel A: Essigsäure 1 %ig
 Fließmittel B: Acetonitril
 Flussrate: 0,8 mL/min
 Gradient: 1 min 15 % B, 10 min 24 % B, 45 min 90 % B, 50 min 100 % B,
 55 min 15 % B

Methode 2: Stilbenanalytik für Wein

Säule: Phenomenex Luna 5 μ C18(2) 250 x 4,6 mm (SG: C18 4 x 3.0 mm)
 Fließmittel A: Essigsäure 2 %ig
 Fließmittel B: Acetonitril/Essigsäure 2 %ig (80/20, v/v)
 Flussrate: 0,8 mL/min
 Gradient: 0 min 10 % B, 10 min 15 % B, 31 min 20 % B, 46 min 40 % B, 51 min
 100 % B, 56 min 100 % B, 60 min 10 % B

Die oben genannten HPLC-Methoden wurden für die HPLC-PDA und für die HPLC-ESI-MSⁿ eingesetzt.

5.3.3 LC-ESI-MSⁿ

Tabelle 5.1: Parameter ESI-MSⁿ für LC-ESI-MSⁿ

Parameter	Stilben-Analytik
Ion Polarity	negativ
Scan Range	m/z 50-2200
Dry Gas Temperature	310 °C
Dry Gas Flow	9 L/min
Nebulizer Gas (N ₂)	40 psi
Capillary	1500 V
Capillary Exit	-120,4 V
End Plate Offset	-500 V
Trap Drive	54,2

5.3.4 ESI-MSⁿ

Tabelle 5.2: Parameter ESI-MSⁿ für Spritzenproben

Parameter	Stilben-Analytik
Ion Polarity	negativ
Scan Range	<i>m/z</i> 50-2000
Dry Gas Temperature	300 °C
Dry Gas Flow	4 L/min
Nebulizer Gas (N ₂)	5 psi
Capillary	2500 V
Capillary Exit	-129,9V
End Plate Offset	-500 V
Trap Drive	76,3

5.4 Präparative Methoden

5.4.1 Extraktion und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung, Aufarbeitung und Fraktionierung der Weinrebenextrakte, sowie die Enzymumsetzungen zur Synthese von Resveratrololigomeren fanden unter Lichtausschluss statt. Die Evaporation von Lösemitteln mittels Rotationsverdampfer wurde bei Temperaturen unter 30 °C durchgeführt.

5.4.1.1 Herstellung des Weinrebenextraktes der Rebsorte Spätburgunder

Das gefriergetrocknete Rebholz der Rebsorte Spätburgunder (240 g) wurde mit einer Mühle (AEG Retsch-Mühle, Type: AM 90 LX, Siebgröße 4x4 mm) gemahlen und zur Entfernung der lipophilen Verbindungen fünfmal mit *n*-Hexan (1000 mL) für jeweils 10 h bei Raumtemperatur extrahiert. Das entfettete Pflanzenmaterial wurde dreimal mit 80 % Ethanol (750 mL) bei Raumtemperatur für 10 h extrahiert. Zur Entfernung der verbliebenen, lipophilen Verbindungen wurden die ethanolischen Extrakte dreimal gegen *n*-Hexan (500 mL) ausgeschüttelt, vereinigt und am Rotationsverdampfer einrotiert. Der wässrige Rückstand wurde anschließend lyophilisiert.

5.4.1.2 Hexanfällung der Weinrebenextrakte

Optimierung der Lösemittelvolumina im Kleinmaßstab

Zur Optimierung der Hexanfällung wurden Versuche im Kleinmaßstab durchgeführt. Hierfür wurden 50 mg Vineatrol®30 in Ethanol gelöst und unter Rühren *n*-Hexan zugetropft. Die Einwaagen des Weinrebenextraktes sowie die Volumina von Ethanol und *n*-Hexan sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tabelle 5.3: Parameter der Hexanfällung

Ansatz	EtOH/Hexan (v:v)	Einwaage Extrakt [mg]	Volumen Ethanol [mL]	Volumen <i>n</i> -Hexan [mL]
A	1:3	52,8	5,0	15,0
B	1:3,5	53,0	4,4	15,6
C	1:4	52,7	4,0	16,0

Die Präzipitate wurden abfiltriert, getrocknet und anschließend mittels HPLC-PDA (5.2.3.1, System 1 und 5.3.2, Methode 1) und HPLC-MS (5.2.3.3 und 5.3.2, Methode 1) untersucht.

Allgemeine Durchführung der Hexanfällung

Die Hexanfällung wurde für alle Weinrebenextrakte einheitlich durchgeführt. Hierfür wurde der Extrakt (1 g) in Ethanol (100 mL) gelöst und tropfenweise, unter Rühren, *n*-Hexan (300 mL) zugeführt. Nach 30 min wurde das Präzipitat abfiltriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert.

5.4.1.3 Hexanfällung der Fraktion 1 aus HSCCC-1

Zur Fällung der polymeren Verbindung wurde Fraktion 1 (294,4 mg) der HSCCC-1 in 30 mL Ethanol gelöst und tropfenweise unter Rühren 60 mL *n*-Hexan zugeführt. Nach 30 min wurde das Präzipitat abfiltriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert.

5.4.2 Enzymatische Synthese von Resveratrololigomeren

5.4.2.1 Reaktionsansatz zur Isolierung von *trans*- δ -Viniferin

Die enzymatische Umsetzung wurde unter optimierten Bedingungen nach TAKAYA et al. (2005) durchgeführt. Eine Suspension aus Meerrettichperoxidase (1,33 mg in 1 mL McIlvaine Pufferlösung, pH 6) wurde zu einer Lösung von *trans*-Resveratrol (22,8 mg in 4 mL Aceton,

4 mL Wasser und 1,6 mL Pufferlösung, pH 6) gegeben und bei 22 °C für 5 min gerührt. Dem Gemisch wurde Wasserstoffperoxid (10 %, 40 µL) zugeführt und für 45 min bei 22 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten, organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingengt und der wässrige Rückstand lyophilisiert.

5.4.2.2 Vorversuche für den Reaktionsansatz zur Isolierung mittels CCC

Die enzymatische Umsetzung von *trans*-Resveratrol (5 mg), (-)- ϵ -Viniferin (5 mg), sowie einem Gemisch aus beiden Stilbenen (5 mg) wurde im Kleinmaßstab mit aliquoten Lösungen wie unter 5.4.2.1 beschrieben, durchgeführt. Für Blindproben wurden die Edukte mit Aliquoten von Wasserstoffperoxid und Pufferlösung umgesetzt. Die vereinigten, organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingengt und mittels HPLC-PDA (5.2.3.1, System 1 und 5.3.2, Methode 1) und HPLC-MS (5.2.3.3 und 5.3.2, Methode 1) analysiert.

5.4.2.3 Reaktionsansatz zur Isolierung von Resveratrololigomeren mittels CCC

Eine Suspension aus Meerrettichperoxidase (6,3 mL, *c* 1 g/L) wurde zu einem Gemisch aus *trans*-Resveratrol (415,7 mg) und (-)- ϵ -Viniferin (214,3 mg), gelöst in 250 mL Aceton/Wasser (1/1, v/v) und 50 mL McIlvaine Puffer (pH 6), zugefügt und bei 22 °C für 5 min gerührt. Anschließend wurde Wasserstoffperoxid (10 %, 1,25 mL) zugegeben und für 45 min bei 22 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt.

5.4.3 HSCCC-Methoden

Tabelle 5.4: HSCCC-Systeme

Nr.	Probenmaterial	Parameter: Fließmittel, Einwaage, Gerätetyp, Flussrate, Modus Rotationsgeschwindigkeit, Detektionswellenlänge
1	Vineatrol [®] 30 (5.4.1.2)	<i>n</i> -Hexan/ Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (1/2/1/2, v/v/v/v), 800 mg, Gerät: HSCCC A, 3 mL/min, H-T-Modus, 850 rpm, 280 nm
2	Spätburgunder (5.4.1.1, 5.4.1.2)	<i>n</i> -Hexan/ Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (1/2/1/2, v/v/v/v), 1000 mg, Gerät: HSCCC B, 3 mL/min, H-T-Modus, 850 rpm, 280 nm
3	Enzymumsetzung (5.4.2.3)	<i>n</i> -Hexan/ Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (2/3/2/3, v/v/v/v), 630 mg, Gerät: HSCCC A, 3 mL/min, H-T-Modus, 850 rpm, 280 nm

5.4.4 LSRCCC-Methoden

Tabelle 5.5: LSRCCC-Systeme

Probenmaterial	Parameter: Fließmittel, Einwaage, Flussrate, Modus Rotationsgeschwindigkeit, Detektionswellenlänge
Weinrebenextrakt (5.4.1.2)	<i>n</i> -Hexan/ Ethylacetat/ Methanol/ Wasser/ <i>n</i> -Butanol (1/2/1/2/1, v/v/v/v/v), 10,41 g (I), 13,9 g (II), 4 mL/min, U-H (I), L-T-Modus (II), 78 rpm, 280 nm

(I): 1. LSRCCC-Trennung; (II): 2. LSRCCC-Trennung

5.4.5 Präparative HPLC-Methoden

Zur Isolierung von Stilbenen mittels präparativer HPLC wurden pro Injektion 5-15 mg der Fraktionen in 200 µL Methanol/Wasser (1/1, v/v) gelöst und membranfiltriert.

Säule: Phenomenex Luna 5µ C18(2) 100A, 250 x 15 mm mit Vorsäule

System 1: Fließmittel A: Wasser, Fließmittel B: Methanol

System 2: Fließmittel A: Wasser, Fließmittel B: Acetonitril

System 3: Fließmittel A: 1% Essigsäure, Fließmittel B: Acetonitril

Tabelle 5.6: Parameter der präparativen HPLC

Nr.	Probenmaterial	Fließmittelsystem, Gradient	Flussrate	Gerät
1	<i>trans</i> - δ -Viniferin (5.4.2.1)	System 1, 0 min 25 % B, 35 min 45 % B, 50 min 60 % B	4 mL/min	2
2	HSCCC-3 F6	System 1, 0 min 45 % B, 20 min 53 % B, 53 min 63 % B	4 mL/min	2
3	HSCCC-1 F1 (5.4.1.3)	System 1, 0 min 25 % B, 35 min 45 % B, 50 min 60 % B, 60 min 80 % B	4 mL/min	2
4	HSCCC-1 F2	System 2, 0 min 30 % B, 25 min 48 % B	5 mL/min	2
5	HSCCC-1 F4	System 2, 0 min 25 % B, 25 min 60 % B	4 mL/min	2
6	HSCCC-1 F5/6/7	System 2, 0 min 30 % B, 22 min 61 % B	5 mL/min	2
7	HSCCC-1 F8	System 2, 0 min 30 % B, 5 min 30 % B, 30 min 55 % B	4 mL/min	2
8	HSCCC-1 F12	System 2, 0 min 35 % B, 25 min 45 % B	5 mL/min	2
9	HSCCC-1 F13/Coil	System 2, 0 min 35 % B, 25 min 45 % B	5 mL/min	2
10	LSRCCC(II) F12,13	System 3, 0 min 45 % B, 22 min 62 % B	5 mL/min	1
11	HSCCC-2 F2,6	System 2, 0 min 30 % B, 25 min 48 % B	5 mL/min	2
12	HSCCC-2 Coil	System 2, 0 min 35 % B, 25 min 45 % B	5 mL/min	2

5.5 Phloroglucinolyse des Weinrebenextraktes der Rebsorte Spätburgunder

Für die Durchführung der Phloroglucinolyse wurde die von KENNEDY und JONES (2001) beschriebene Methode herangezogen:

Reaktionslösung:

Es werden 50 mg Ascorbinsäure und 250 mg Phloroglucinol in 5 mL 0,1 N methanolischer HCl gelöst.

Stopplösung:

Es wird eine 40 mM wässrige Natriumacetatlösung hergestellt.

Durchführung:

200 µL des Weinrebenextraktes der Rebsorte Spätburgunder (5,75 mg/mL, in Methanol) werden in verschließbare 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Nach Zugabe von 200 µL Reaktionslösung wird die Lösung 20 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch die Zugabe von 1,0 mL einer wässrigen Natriumacetatlösung (40 mM) gestoppt. Zur Analyse der Reaktionslösung werden die HPLC-Parameter von ESATBEYOGLU und WINTERHALTER (2010) verwendet.

5.6 Antioxidative Aktivität (TEAC)

Zur Durchführung des TEAC-Assays nach RE et al. (1999) werden folgende Lösungen hergestellt:

ABTS^{•+}-Stammlösung:

Es werden 38,44 mg ABTS und 6,91 mg K₂S₂O₈ in 10 mL demineralisiertem Wasser gelöst. Anschließend wird die Stammlösung zur Radikalbildung über Nacht (> 12 h) im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

ABTS^{•+}-Arbeitslösung:

Die ABTS^{•+}-Stammlösung wird mit Ethanol (p.a.) verdünnt, bis sie eine Extinktion zwischen 0,7-0,9 (734 nm) aufweist.

Trolox[®]-Stammlösung:

Es werden 12,50 mg Trolox in 5 mL Ethanol (p.a.) gelöst.

Trolox[®]-Kalibrierlösungen:

Es werden jeweils (50 µL), 100 µL, 250 µL, 500 µL bzw. 750 µL der Trolox-Stammlösung in 5 mL Ethanol (p.a.) gelöst.

Probelösungen:

Es werden jeweils ca. 3 mg der einzelnen Fraktionen, Rohextrakte, aufgereinigten Extrakte, Präzipitate und Reinsubstanzen in 5 mL eines Ethanol-Wasser-Gemisches (1/1, v/v) gelöst..

Durchführung:

Es wird je 1 mL ABTS⁺-Arbeitslösung in eine Semimikroküvette (Polystyrol 10×4×45 mm) pipettiert und die Extinktion bei 734 nm gemessen (Leerwert E1). Anschließend werden jeweils 20 µL Ethanol (Blindwert), Trolox[®]-Kalibrierlösung bzw. Probelösung in die Semimikroküvette pipettiert und durchmischt. Nach genau 6 Minuten wird die Extinktion gemessen (E2).

Auswertung:

Die Extinktion der Kalibrier- bzw. Probelösung (E2) wird von der Extinktion des Leerwertes (E1) subtrahiert. Anschließend wird die Extinktionsdifferenz des Blindwerts von der Differenz des Standards bzw. der Probe berechnet (Gleichung 5-1).

$$E = (E1 - E2)_{\text{Standard bzw. Probe}} - (E1 - E2)_{\text{Blindwert}} \quad 5-1$$

Es wird eine Kalibriergerade der Trolox[®]-Lösungen erstellt und mittels einer Geradengleichung die antioxidative Aktivität der Proben als Troloxäquivalente berechnet (Gleichung 5-2).

$$\text{Antioxidative Aktivität [Trolox[®]/g Probe]} = \frac{x}{c [\text{g/L}]} \quad 5-2$$

Die Standardabweichung der Methode wird durch eine wiederholte Messung (n = 10) der antioxidativen Aktivität einer Standardsubstanz bestimmt.

5.7 Weinanalytik

Zur Quantifizierung des Stilbengehaltes in Wein mittels HPLC-PDA wurden das System 2 (Abschnitt 5.2.3.1) und Methode 2 (Abschnitt 5.3.2) verwendet. Von den Weiß- und Roséweinen wurden 100 µL, von den Rotweinen 60 µL nach Membranfiltration direkt injiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch Heranziehen einer Kalibriergeraden mit Hilfe von

Standardsubstanzen (*trans*-Resveratrol und *trans*-Piceid, 99,4 %). Zur Gewinnung der *cis*-Isomere wurden die Standards als 50% methanolische Lösung in Quarzküvetten bei 366 nm für 20 min inkubiert und die erhaltene Konzentration über den Anteil an nicht isomerisiertem *trans*-Stilben bestimmt. Die Berechnung der analytischen Grenzwerte wie Nachweis- und Bestimmungsgrenze (Gleichung 5-3 und 5-4) wurde über die Daten der Kalibriergeraden der Substanzen mit Hilfe der DIN-Methode 32645 berechnet (Tabelle 7.9 im Anhang).

Nachweisgrenze:

$$X_{NG} = S_{x0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{Q_x}} \quad 5-3$$

Bestimmungsgrenze:

$$X_{BG} = k * S_{x0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{BG} - \bar{X})^2}{Q_x}} \quad 5-4$$

S_{x0}	Verfahrensstandardabweichung
n	Anzahl der Kalibrationspunkte
m	Anzahl der Messungen
Q_x	Summe der Abweichungsquadrate
$\bar{X}$	Mittelwert der Kalibratorkonzentrationen
t	Quantil der t-Verteilung
k	relative Ergebnisunsicherheit
X	Konzentration

5.8 Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Reinsubstanzen

5.8.1 *Vitis vinifera*

***trans*-Resveratrol (3,4',5-Trihydroxystilben) (S1)**

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol®30, Weinrebe der Rebsorte Spätburgunder

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 228 g/mol

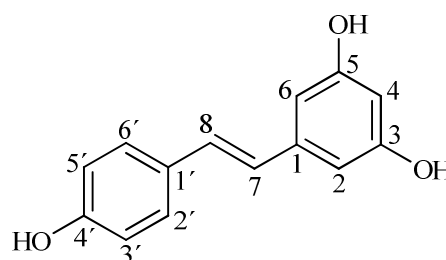
Summenformel: C₁₄H₁₂O₃

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

$\lambda_{\max}$ = 306, 319 nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 227 [M-H]⁻

MS/MS Fragmente: m/z 185, 183, 157



¹H-NMR (300 MHz, Methanol-d₄): 7,35 (m, H-2', H-6'), 6,96 (d, J = 16 Hz, H-8), 6,80 (d, J = 16 Hz, H-7), 6,45 (d, J = 2 Hz, H-2, H-6), 6,76 (m, H-3', H-5'), 6,15 (t, J = 2 Hz, H-4)

¹³C-NMR (75 MHz, Methanol-d₄): 141,3 (C-1), 105,8 (C-2, C-6), 159,6 (C-3, C-5), 102,7 (C-4), 127,1 (C-7), 129,4 (C-8), 130,4 (C-1'), 128,8 (C-2', C-6'), 116,5 (C-3', C-5'), 158,3 (C-4')

***trans*-Piceid (3,4',5-Trihydroxystilben-3-O-β-D-glucosid) (S2)**

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol®30

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 390 g/mol

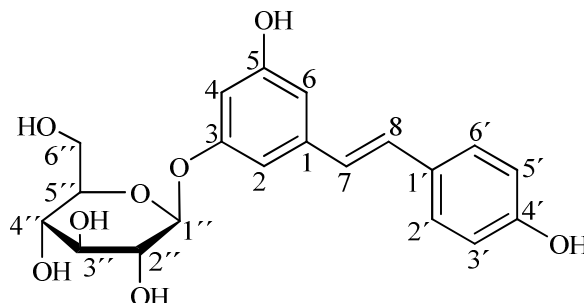
Summenformel: C₂₀H₂₂O₈

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

$\lambda_{\max}$ = 306, 319 nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 389 [M-H]⁻

MS/MS Fragmente: m/z 227, 185, 159, 143



¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d₄): 7,27 (d, J = 8,5 Hz, H-2', H-6'), 6,92 (d, J = 16,3 Hz, H-8), 6,75 (d, J = 16,3 Hz, H-7), 6,69 (t, J = 1,7 Hz, H-2), 6,66 (d, J = 8,6 Hz, H-3', H-5'),

6,51 (t, $J = 1,6$ Hz, H-6), 6,35 (t, $J = 2,2$ Hz, H-4), 4,79 (d, 7,5 Hz, H-1''), 3,83 (dd, $J = 12,1$, 2,2 Hz H-6b''), 3,61 (dd, $J = 12,1$, 6,0 Hz H-6a''), 3,27 - 3,39 (m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'')

^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4): 141,4 (C-1), 107,0 (C-2), 160,5 (C-3), 104,1 (C-4), 159,6 (C-5), 108,3 (C-6), 126,7 (C-7), 130,0 (C-8), 130,3 (C-1'), 128,9 (C-2', C-6'), 116,5 (C-3', C-5'), 158,5 (C-4'), 102,4 (C-1''), 75,0 (C-2''), 78,1 (C-3''), 71,5 (C-4''), 78,3 (C-5''), 62,6 (C-6'')

***trans*-Piceatannol (3,3',4',5-Tetrahydroxystilben) (S3)**

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol®30

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 244 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

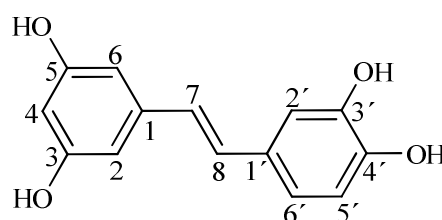
$\lambda_{\text{max}} = 327$ nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 243 $[\text{M-H}]^-$

MS/MS Fragmente: m/z 225, 215, 201, 175, 159

^1H -NMR (600 MHz, Aceton- d_6): 7,06 (d, $J = 2,0$ Hz H-2'), 6,97 (d, $J = 16,3$ Hz, H-8), 6,89 (dd, $J = 8,2$, 2,0 Hz H-6'), 6,82 (d, $J = 16,3$ Hz, H-7), 6,79 (d, $J = 8,2$ Hz H-5'), 6,52 (d, $J = 2,0$ Hz, H-2, H-6), 6,26 (br. s, H-4)

^{13}C -NMR (150 MHz, Aceton- d_6): 140,8 (C-1), 105,6 (C-2, C-6), 159,6 (C-3, C-5), 102,4 (C-4), 129,4 (C-7), 126,8 (C-8), 130,6 (C-1'), 113,8 (C-2'), 120,0 (C-6'), 116,2 (C-5'), 146,2 (C-4', C-3')



***trans*- ϵ -Viniferin (S4)**

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol®30,

Weinrebe der Rebsorte Spätburgunder

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 454 g/mol

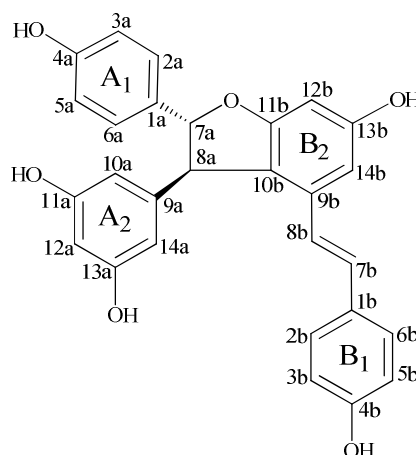
Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_6$

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

$\lambda_{\text{max}} = 323$ nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 453 $[\text{M-H}]^-$

MS/MS Fragmente: m/z 435, 411, 369, 359, 347, 333



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6): 7,12 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2a, H-6a), 6,73 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3a, H-5a), 5,43 (d, $J = 5,9$ Hz, H-7a), 4,36 (d, $J = 5,9$ Hz, H-8a), 6,14 (br. s., H-10a, H-14a), 6,15 (br. s., H-12a), 7,06 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2b, H-6b), 6,63 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3b, H-5b), 6,82 (d, $J = 16,3$ Hz, H-7b), 6,60 (d, $J = 16,3$ Hz, H-8b), 6,22 (d, $J = 2,0$ Hz, H-12b), 6,61 (d, $J = 2,0$ Hz, H-14b)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Aceton- d_6): 133,7 (C-1a), 128,0 (C-2a, C-6a), 116,1 (C-3a, C-5a), 158,3 (C-4a), 94,2 (C-7a), 57,5 (C-8a), 147,4 (C-9a), 107,0 (C-10a, C-14a), 159,9 (C-11a, C-13a), 101,9 (C-12a), 130,0 (C-1b), 128,7 (C-2b, C-6b), 116,3 (C-3b, C-5b), 158,3 (C-4b), 130,1 (C-7b), 123,4 (C-8b), 136,5 (C-9b), 119,8 (C-10b), 162,5 (C-11b), 96,7 (C-12b), 159,7 (C-13b), 104,1 (C-14b)

Ampelopsin A (S5)

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol[®]30,

Weinrebe der Rebsorte Spätburgunder

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 470 g/mol

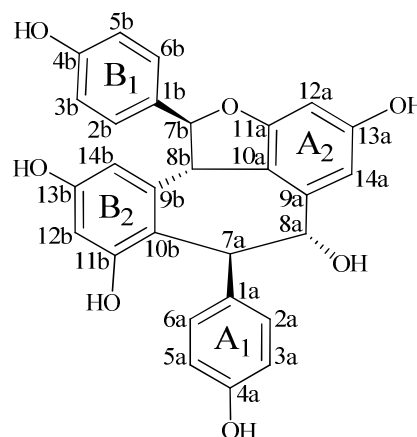
Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_7$

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

$\lambda_{\text{max}} = 283$ nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 469 $[\text{M-H}]^-$

MS/MS Fragmente: m/z 451, 375, 363



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6): 6,90 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2a, H-6a), 6,63 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3a, H-5a), 5,43 (d, 4,8 Hz, H-7a), 5,39 (d, 4,8 Hz, H-8a), 6,14 (d, 2,2 Hz, H-12a), 6,60 (d, $J = 2,2$ Hz, H-14a), 7,10 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2b, H-6b), 6,76 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3b, H-5b), 5,75 (d, $J = 11,4$ Hz, H-7b), 4,14 (d, $J = 11,4$ Hz, H-8b), 6,41 (d, $J = 2,0$ Hz, H-12b), 6,22 (d, 2,0 Hz, H-14b)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Aceton- d_6): 131,0 (C-1a), 128,7 (C-2a, C-6a), 115,4 (C-3a, C-5a), 158,9 (C-4a), 43,9 (C-7a), 71,2 (C-8a), 140,5 (C-9a), 118,4 (C-10a), 160,1 (C-11a), 97,0 (C-12a), 160,0 (C-13a), 110,5 (C-14a), 132,7 (C-1b), 129,9 (C-2b, C-6b), 116,0 (C-3b, C-5b), 158,5 (C-4b), 88,4 (C-7b), 49,6 (C-8b), 143,1 (C-9b), 118,9 (C-10b), 157,2 (C-11b), 101,5 (C-12b), 156,0 (C-13b), 105,4 (C-14b)

Hopeaphenol (S6)

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol®³⁰,

Weinrebe der Rebsorte Spätburgunder

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 906 g/mol

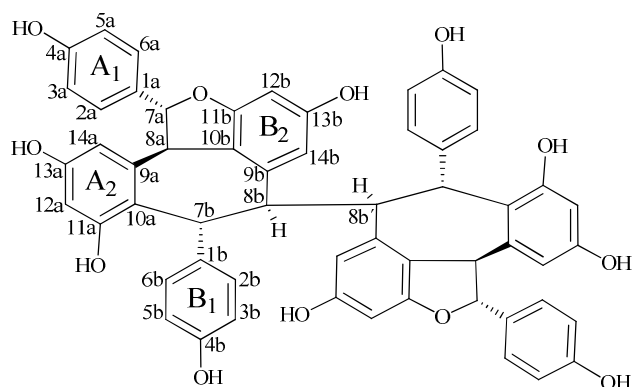
Summenformel: C₅₆H₄₂O₁₂

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

$\lambda_{\max}$ = 283 nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 905 [M-H]⁻

MS/MS Fragmente: m/z 811, 717, 611, 451, 357



¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): 7,14 (4H, d, J = 8,6 Hz, H-2a, H-6a), 6,78 (4H, d, J = 8,5 Hz, H-3a, H-5a), 5,76 (2H, d, J = 12,0 Hz, H-7a), 4,23 (2H, d, J = 12,0 Hz, H-8a), 6,54 (2H, d, J = 2,1 Hz, H-12a), 6,30 (2H, br. s, H-14a), 6,91 (4H, d, J = 8,5 Hz, H-2b, H-6b), 6,55 (4H, d, J = 8,6 Hz, H-3b, H-5b), 5,80 (2H, br. s, H-7b), 3,94 (2H, br. s, H-8b), 5,73 (2H, d, J = 2,0 Hz, H-12b), 5,17 (2H, d, J = 2,0 Hz, H-14b)

¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-d₆): 131,0 (2C, C-1a), 130,2 (4C, C-2a, C-6a), 115,9 (4C, C-3a, C-5a), 158,4 (2C, C-4a), 88,2 (2C, C-7a), 49,8 (2C, C-8a), 142,5 (2C, C-9a), 121,1 (2C, C-10a), 158,7 (2C, C-11a), 101,0 (2C, C-12a), 157,2 (2C, C-13a), 106,3 (2C, C-14a), 135,2 (2C, C-1b), 129,3 (4C, C-2b, C-6b), 115,1 (4C, C-3b, C-5b), 155,5 (2C, C-4b), 41,2 (2C, C-7b), 48,3 (2C, C-8b), 140,5 (2C, C-9b), 118,6 (2C, C-10b), 159,3 (2C, C-11b), 95,2 (2C, C-12b), 157,1 (2C, C-13b), 111,2 (2C, C-14b)

Parthenocissin A (S7)

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol®³⁰

beiges, amorphes Pulver

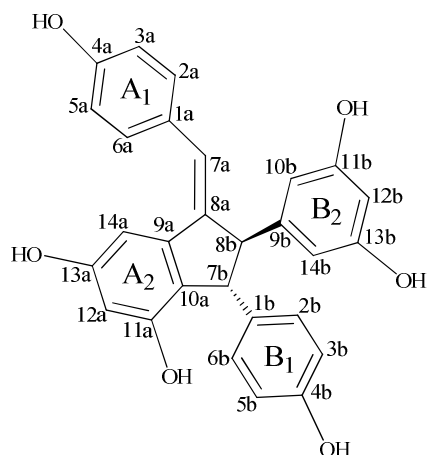
Molekülmasse: 454 g/mol

Summenformel: C₂₈H₂₂O₆

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1): $\lambda_{\max}$ = 315 nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 453 [M-H]⁻

MS/MS Fragmente: m/z 359, 289



¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): 7,22 (d, J = 8,4 Hz, H-2a, H-6a), 6,81 (d, J = 8,6 Hz, H-3a, H-5a), 6,31 (br. s, H-7a), 6,27 (d, 2,0 Hz, H-12a), 6,53 (d, J = 2,0 Hz, H-14a), 7,00 (d, J =

8,6 Hz, H-2b, H-6b), 6,73 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3b, H-5b), 4,26 (d, $J = 2,3$ Hz, H-7b), 3,75 (br. s, H-8b), 6,20 (m, H-10b, H-14b), 6,19 (m, H-12b)

^{13}C -NMR (150 MHz, Aceton- d_6): 129,9 (C-1a), 130,6 (C-2a, C-6a), 115,9 (C-3a, C-5a), 157,2 (C-4a), 125,2 (C-7a), 149,8 (C-8a), 142,9 (C-9a), 127,9 (C-10a), 155,4 (C-11a), 104,1 (C-12a), 158,5 (C-13a), 103,2 (C-14a), 137,5 (C-1b), 129,0 (C-2b, C-6b), 115,8 (C-3b, C-5b), 156,5 (C-4b), 55,0 (C-7b), 64,5 (C-8b), 145,6 (C-9b), 106,5 (C-10b, C-14b), 159,4 (C-11b, C-13b), 101,4 (C-12b)

Quadrangularin A (S8)

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol[®] 30

beiges, amorphes Pulver

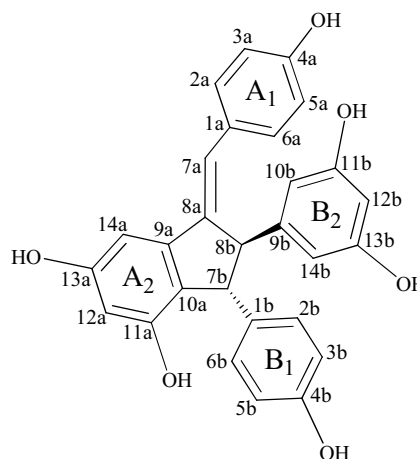
Molekülmasse: 454 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_6$

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1): $\lambda_{\text{max}} = 315$ nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 453 $[\text{M}-\text{H}]^-$

MS/MS Fragmente: m/z 359, 289, 265



^1H -NMR (600 MHz, Aceton- d_6): 7,17 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2a, H-6a), 6,68 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3a, H-5a), 7,04 (br. s, H-7a), 6,29 (d, 2,0 Hz, H-12a), 6,80 (d, $J = 2,0$ Hz, H-14a), 6,92 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2b, H-6b), 6,66 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3b, H-5b), 4,27 (br. s, H-7b), 4,14 (br. s, H-8b), 6,31 (d, 1,9 Hz, H-10b, H-14b), 6,19 (t, 1,9 Hz, H-12b)

^{13}C -NMR (150 MHz, Aceton- d_6): 128,6 (C-1a), 130,0 (C-2a, C-6a), 115,3 (C-3a, C-5a), 156,3 (C-4a), 121,9 (C-7a), 141,7 (C-8a), 146,4 (C-9a), 123,5 (C-10a), 154,9 (C-11a), 102,7 (C-12a), 158,7 (C-13a), 97,3 (C-14a), 136,8 (C-1b), 127,7 (C-2b, C-6b), 114,8 (C-3b, C-5b), 155,6 (C-4b), 56,6 (C-7b), 59,6 (C-8b), 148,0 (C-9b), 105,2 (C-10b, C-14b), 158,7 (C-11b, C-13b), 100,6 (C-12b)

r-2-Viniferin (S9)

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol[®] 30

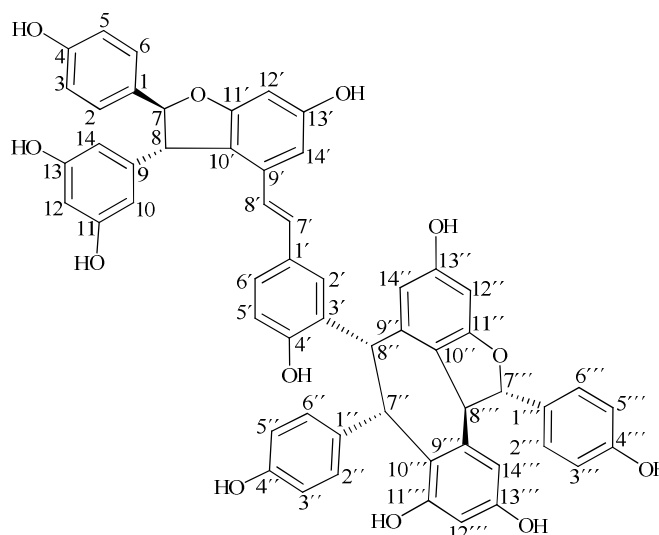
beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 906 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{56}\text{H}_{42}\text{O}_{12}$

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

$\lambda_{\text{max}} = 327$ nm



ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 905 [M-H]⁻

MS/MS Fragmente: m/z 887, 811, 799, 705, 545

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆):

7,19 (d, J = 8,6 Hz, H-2, H-6), 6,83 (d, J = 8,6 Hz, H-3, H-5), 5,36 (d, J = 5,3 Hz, H-7), 4,40 (d, J = 5,3 Hz, H-8), 6,16 (d, J = 2,1 Hz, H-10, H-14), 6,22 (m, H-12), 6,08 (d, J = 2,0 Hz, H-2', H-12'), 6,69 (d, J = 8,4 Hz, H-5'), 6,87 (dd, J = 8,4 Hz, 2,1 Hz, H-6'), 6,39 (br. s, H-7', H-8'), 6,26 (m, H-12', H-14''), 6,51 (d, J = 1,7 Hz, H-14'), 7,03 (d, J = 8,7 Hz, H-2'', H-6''), 6,66 (d, J = 8,7 Hz, H-3'', H-5''), 5,38 (d, J = 3,7 Hz, H-7''), 5,48 (br. s, H-8''), 6,05 (d, J = 2,0 Hz, H-14''), 7,14 (d, J = 8,6 Hz, H-2''', H-6'''), 6,77 (d, J = 8,6 Hz, H-3''', H-5'''), 5,88 (d, J = 11,5 Hz, H-7'''), 4,25 (d, J = 11,5 Hz, H-8'''), 6,04 (d, J = 2,1 Hz, H-12''')

¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-d₆): 133,9 (C-1), 127,9 (C-2, C-6), 116,1 (C-3, C-5), 157,9 (C-4), 93,8 (C-7), 57,1 (C-8), 147,2 (C-9), 106,9 (C-10, C-14), 159,8 (C-11, C-13), 102,1 (C-12), 129,0 (C-1'), 132,5 (C-2'), 132,8 (C-3'), 155,2 (C-4'), 115,4 (C-5', 3'', 5'), 123,6 (C-6'), 122,6 (C-7'), 131,0 (C-8'), 136,6 (C-9'), 119,1 (C-10'), 162,5 (C-11'), 96,5 (C-12'), 158,2 (C-13'^a), 104,4 (C-14'), 135,5 (C-1''), 128,8 (C-2'', C-6''), 155,9 (C-4''), 40,7 (C-7''), 41,3 (C-8''), 141,2 (C-9''), 120,4 (C-10''), 158,5 (C-11'', C-13''^a), 96,1 (C-12''), 110,0 (C-14''), 131,0 (C-1'''), 130,1 (C-2''', C-6'''), 116,0 (C-3''', C-5'''), 159,5 (C-4'''), 88,5 (C-7'''), 49,5 (C-8'''), 142,3 (C-9'''), 120,1 (C-10'''), 160,3 (C-11'''), 100,8 (C-12'''), 156,9 (C-13'''), 105,0 (C-14''')

^a Signale mit gleicher Kennzeichnung sind austauschbar

r-Viniferin (S10)

Herkunft: Weinrebenextrakt Vineatrol®30,

Weinrebe der Rebsorte Spätburgunder

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 906 g/mol

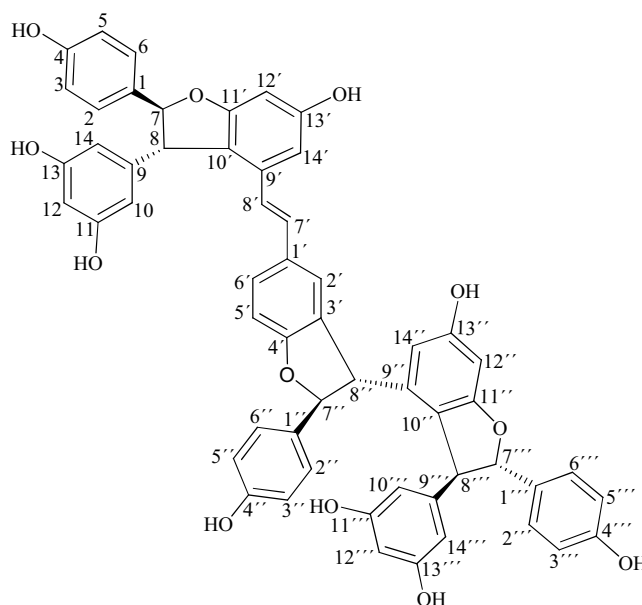
Summenformel: C₅₆H₄₂O₁₂

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

$\lambda_{\max}$ = 323 nm

ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 905 [M-H]⁻

MS/MS Fragmente: m/z 887, 811, 799, 451, 545, 359



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6 , auf Methanol- d_4 kalibriert):

7,18 (d, $J = 8,5$ Hz, H-2, H-6), 6,81 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3, H-5), 5,40 (d, $J = 6,5$ Hz, H-7), 4,38 (d, $J = 6,5$ Hz, H-8), 6,18 (m, H-10, H-14), 6,18 (m, H-12), 6,70 (d, $J = 1,9$ Hz, H-2'), 6,73 (d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,03 (dd, $J = 8,4$ Hz, 1,6 Hz, H-6'), 6,73 (d, $J = 16,3$ Hz, H-7'), 6,55 (d, $J = 16,3$ Hz, H-8'), 6,29 (d, $J = 2,0$ Hz, H-12'), 6,62 (d, $J = 2,0$ Hz, H-14'), 6,63 (d, $J = 8,5$ Hz, H-2'', H-6''), 6,57 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3'', H-5''), 5,47 (d, $J = 5,0$ Hz, H-7'), 4,29 (d, $J = 5,0$ Hz, H-8''), 6,32 (d, $J = 2,0$ Hz, H-12''), 6,14 (d, $J = 2,0$ Hz, H-14''), 7,22 (d, $J = 8,5$ Hz, H-2''', H-6'''), 6,87 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3''', H-5'''), 5,38 (d, $J = 4,5$ Hz, H-7'''), 4,40 (d, $J = 4,5$ Hz, H-8'''), 6,02 (d, $J = 2,2$ Hz, H-10''', H-14'''), 6,11 (br. s, H-12''')

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Aceton- d_6): 134,0 (C-1), 127,7 (C-2, C-6), 116,1 (C-3, C-5), 157,9 (C-4), 93,8 (C-7), 56,9 (C-8), 147,2 (C-9), 106,8 (C-10, C-14), 159,8 (C-11, C-13), 102,1 (C-12), 131,5 (C-1'), 125,3 (C-2'), 132,0 (C-3'), 162,2 (C-4'), 110,2 (C-5'), 126,3 (C-6'), 123,9 (C-7'), 130,1 (C-8'), 136,1 (C-9'), 119,6 (C-10'), 162,3 (C-11'), 96,6 (C-12'), 159,6 (C-13'), 104,3 (C-14'), 132,4 (C-1''), 127,5 (C-2'', C-6''), 115,9 (3'', 5''), 157,8 (C-4''), 91,0 (C-7''), 52,0 (C-8''), 141,7 (C-9''), 119,6 (C-10''), 162,3 (C-11''), 96,2 (C-12''), 159,8 (C-13''), 106,6 (C-14''), 133,7 (C-1'''), 127,7 (C-2''', C-6'''), 116,3 (C-3''', C-5'''), 158,1 (C-4'''), 93,9 (C-7'''), 56,7 (C-8'''), 147,2 (C-9'''), 106,7 (C-10''', C-14''') 159,2 (C-11''', C-13'''), 102,2 (C-12''')

5.8.2 Enzymatische Synthese

trans- δ -Viniferin (Resveratroldehydrodimer) (S11)

Herkunft: Enzymatische Synthese (5.4.2)

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 454 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_6$

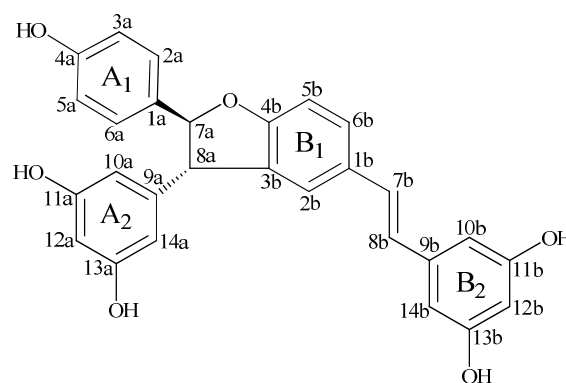
UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

$\lambda_{\text{max}} = 311$ nm

ESI- MS^n (negativer Modus): m/z 453 $[\text{M-H}]^-$

MS/MS Fragmente: m/z 435, 411, 369, 359,

347, 333



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Methanol- d_4): 7,07 (d, $J = 8,5$ Hz, H-2a, H-6a), 6,68 (d, $J = 8,5$ Hz, H-3a, H-5a), 5,29 (d, $J = 8,4$ Hz, H-7a), 4,30 (d, $J = 8,4$ Hz, H-8a), 6,02 (d, $J = 2,2$ Hz, H-10a, H-14a), 6,08 (t, $J = 2,2$ Hz, H-12a), 7,09 (br. s, H-2b), 6,75 (d, $J = 8,3$ Hz, H-5b), 7,27 (dd, $J =$

8,2 Hz, 1,6 Hz, H-6b), 6,88 (d, $J = 16,0$ Hz, H-7b), 6,69 (d, $J = 16,0$ Hz, H-8b), 6,32 (d, $J = 2,1$ Hz, H-10b), 6,03 (t, $J = 2,2$ Hz, H-12b), 6,32 (d, $J = 2,1$ Hz, H-14b)

^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4): 132,4 (C-1a), 128,9 (C-2a, C-6a), 116,3 (C-3a, C-5a), 158,8 (C-4a), 94,9 (C-7a), 58,8 (C-8a), 145,4 (C-9a), 107,7 (C-10a), 160,0 (C-11a), 102,5 (C-12a), 160,0 (C-13a), 107,7 (C-14a), 132,4 (C-1b), 124,2 (C-2b), 132,8 (C-3b), 161,0 (C-4b), 110,4 (C-5b), 128,9 (C-6b), 129,4 (C-7b), 127,5 (C-8b), 141,2 (C-9b), 105,8 (C-10b), 159,7 (C-11b, C-13b), 102,7 (C-12b), 105,8 (C-14b)

Resviniferin A (S12)

Herkunft: Enzymatische Synthese (5.4.2)

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 680 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{42}\text{H}_{32}\text{O}_9$

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

$\lambda_{\text{max}} = 323$ nm

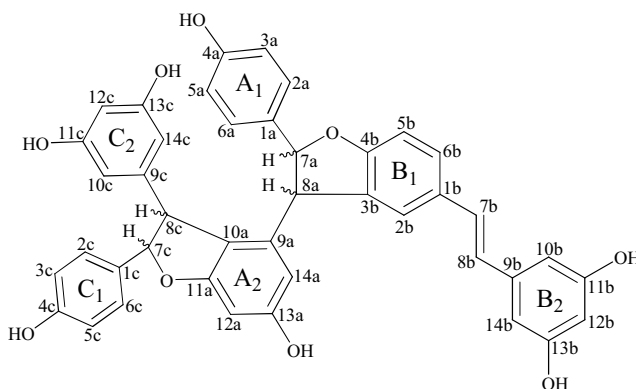
ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 679 $[\text{M}-\text{H}]^-$

MS/MS Fragmente: m/z 661, 643, 621, 585, 573, 451, 333

HR-ESI-MS: m/z 681,2111 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. $\text{C}_{42}\text{H}_{32}\text{O}_9+\text{H}$ 681,2119)

^1H -NMR (600 MHz, Aceton- d_6): 6,67 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2a, H-6a), 6,61 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3a, H-5a), 5,60 (d, $J = 4,9$ Hz, H-7a), 4,38 (d, $J = 4,8$ Hz, H-8a), 6,33 (d, $J = 2,0$ Hz, H-12a), 6,27 (d, $J = 2,1$ Hz, H-14a), 7,11 (br. s, H-2b), 6,87 (d, $J = 8,3$ Hz, H-5b), 7,36 (dd, $J = 8,3$ Hz, 1,5 Hz, H-6b), 6,91 (d, $J = 16,8$ Hz, H-7b), 6,73 (d, $J = 16,3$ Hz, H-8b), 6,49 (d, $J = 2,1$ Hz, H-10b), 6,25 (m, H-12b), 6,49 (d, $J = 2,1$ Hz, H-14b) 7,27 (d, $J = 8,5$ Hz, H-2c, H-6c), 6,91 (d, $J = 8,4$ Hz, H-3c, H-5c), 5,43 (d, $J = 4,4$ Hz, H-7c), 4,58 (d, $J = 4,4$ Hz, H-8c), 6,14 (d, $J = 2,1$ Hz, H-10c, H-14c), 6,25 (m, H-12c)

^{13}C -NMR (150 MHz, Aceton- d_6): 132,3 (C-1a), 127,4 (C-2a, C-6a), 115,9 (C-3a, C-5a), 157,7 (C-4a), 91,2 (C-7a), 52,3 (C-8a), 142,2 (C-9a), 119,8 (C-10a), 162,4 (C-11a), 96,4 (C-12a), 160,3 (C-13a), 106,7 (C-14a), 131,7 (C-1b), 123,7 (C-2b), 133,0 (C-3b), 159,7 (C-4b), 110,4 (C-5b), 128,3 (C-6b), 129,1 (C-7b), 127,1 (C-8b), 140,7 (C-9b), 105,7 (C-10b), 159,5 (C-11b, C-13b), 102,7 (C-12b), 105,7 (C-14b), 134,3 (C-1c), 127,8 (C-2c, C-6c), 116,4 (C-3c, C-5c), 158,1 (C-4c), 94,0 (C-7c), 56,9 (C-8c), 147,4 (C-9c), 106,8 (C-10c, C-14c), 160,1 (C-11c, C-13c), 102,4 (C-12c)



Resviniferin B (S13)

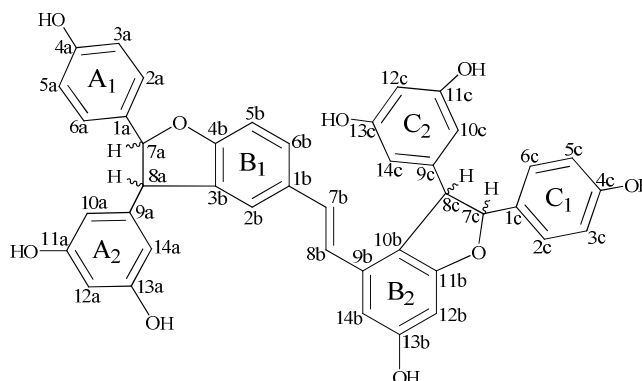
Herkunft: Enzymatische Synthese (5.4.2)

beiges, amorphes Pulver

Molekülmasse: 680 g/mol

Summenformel: $C_{42}H_{32}O_9$

UV (Spektrum nach HPLC 5.3.2, M 1):

 $\lambda_{\max} = 331 \text{ nm}$ ESI-MSⁿ (negativer Modus): m/z 679 [M-H]⁻MS/MS Fragmente: m/z 661, 637, 619, 585, 573, 359, 319HR-ESI-MS: m/z 681,2099 [M+H]⁺ (calc. $C_{42}H_{32}O_9 + H$ 681,2119)

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): 7,19 (d, J = 8,5 Hz, H-2a, H-6a)¹, 6,82 (d, J = 8,6 Hz, H-3a, H-5a)², 5,41 (d, J = 7,7 Hz, H-7a), 4,39 (d, J = 7,7 Hz, H-8a), 6,16 (d, J = 2,2 Hz, H-10a, H-14a), 6,26 (d, J = 2,2 Hz, H-12a), 6,99 (br. s, H-2b), 6,76 (d, J = 8,4 Hz, H-5b), 7,20 (m, H-6b), 6,93 (d, J = 16,3 Hz, H-7b), 6,72 (d, J = 16,3 Hz, H-8b), 6,32 (d, J = 2,0 Hz, H-12b), 6,70 (d, J = 2,1 Hz, H-14b) 7,20 (d, J = 8,5 Hz, H-2c, H-6c)¹, 6,83 (d, J = 8,5 Hz, H-3c, H-5c)², 5,42 (d, J = 5,4 Hz, H-7c), 4,46 (d, J = 5,5 Hz, H-8c), 6,22 (m, H-10c, H-14c), 6,22 (m, H-12c)

¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-d₆): 132,6 (C-1a), 128,0 (C-2a, C-6a)¹, 116,1 (C-3a, C-5a), 158,2 (C-4a)³, 93,9 (C-7a), 57,7 (C-8a), 145,2 (C-9a), 107,3 (C-10a), 159,6 (C-11a), 102,3 (C-12a), 159,6 (C-13a), 107,3 (C-14a), 131,8 (C-1b)⁴, 125,0 (C-2b), 131,9 (C-3b)⁴, 160,6 (C-4b), 110,2 (C-5b), 127,7 (C-6b), 130,3 (C-7b), 124,2 (C-8b), 136,4 (C-9b), 120,0 (C-10b), 162,4 (C-11b), 96,8 (C-12b), 159,7 (C-13b), 104,4 (C-14b), 133,8 (C-1c), 128,5 (C-2c, C-6c)¹, 116,1 (C-3c, C-5c), 158,4 (C-4c)³, 93,9 (C-7c), 57,1 (C-8c), 147,3 (C-9c), 107,0 (C-10c, C-14c), 159,7 (C-11c, C-13c), 102,1 (C-12c)

¹⁻⁴ Signale mit gleicher Kennzeichnung sind austauschbar

6 Literatur

- ADAM, W., Lazarus, M., Saha-Möller, C. R., Weichold, O., Hoch, U., Häring, D. and Schreier P. (1999) Biotransformations with peroxidases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 63: 73-108.
- ADESANYA, S.A., Nia, R., Martin, M.-T., Boukamcha, N., Montagnac, A. and Paies, M. (1999) Stilbene derivatives from *Cissus quadrangularis*. *J. Nat. Prod.* 62: 1694-1695.
- AGGARWAL, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S. and Takada, Y. (2004) Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 24: 2783-2840.
- AGGARWAL, B.B. and Shishodia, S. (2006) Resveratrol in health and disease. Taylor and Francis Group: Boca Raton, Florida, 679 pp.
- AICHELE, D. and Schwegler, H.-W. (2000) Die Blütenpflanzen Mitteleuropas. Bd.3. Franckh'sche Verlagshandlung: Stuttgart, 576 pp.
- BADERSCHNEIDER, B. (2000) Isolierung und Strukturaufklärung antioxidativ wirksamer Verbindungen aus Weißwein. *Dissertation*, TU-Braunschweig. Clausthal-Zellerfeld: Papierflieger 2000.
- BADERSCHNEIDER, B. and Winterhalter, P. (2000) Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2681-2686.
- BILLARD, C., Izard, J.-C., Roman, V., Kern, C., Mathiot, C., Mentz, F. and Kolb, J.-P. (2002) Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shoots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk. Lymphoma* 43: 1991-2002.
- BORALLE, N., Gottlieb, H.E., Gottlieb, O.R., Kubitzki, K., Lopes, L.M.X., Yoshida, M. and Young, M.C.M. (1993) The chemistry of Brazilian *Gnetaceas*. Part 2. Oligostilbenoids from *Gnetum venosum*. *Phytochemistry* 34: 1403-7.
- BUIARELLI, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., Merolle, M. and Terracciano, A. (2007) Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 2955-2964.
- BURNS, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. and Crozier, A. (2002) Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3337-3340.

- CALLEMIEN, D., Jerkovic, V., Rozenberg, R. and Collin, S. (2005) Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: Optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 424-429.
- CARERI, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, I. and Zagnoni, I. (2004) Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of *cis*-resveratrol and *trans*-resveratrol: Development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6868-6874.
- CHEN, L., Han, Y., Yang, F. and Zhang, T. (2001) High-speed counter-current chromatography separation and purification of resveratrol and piceid from *Polygonum cuspidatum*. *J. Chromatogr. A* 907: 343-346.
- CHONG, J., Poutaraud, A. and Hugueney, P. (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci. (Shannon, Irel.)* 177 : 143-155.
- CHU, X., Sun, A. and Liu, R. (2005) Preparative isolation and purification of five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1097: 33-39.
- CHUNG, E.Y., Kim, B.H., Lee, M.K., Yun, Y.-P., Lee, S.H., Min, K.R. and Kim, Y. (2003) Anti-inflammatory effect of the oligomeric stilbene alpha-viniferin and its mode of the action through inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Planta Med.* 69: 710-714.
- CICHEWICZ, R.H. and Kouzi, S.A. (2002) Resveratrol oligomers: Structure, chemistry, and biological activity. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 26: 507-579.
- CICHEWICZ, R.H., Kouzi, S.A. and Hamann, M.T. (2000) Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* 63: 29-33.
- CONWAY, W.D. (1991) Counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* 538: 27-35.
- COUNET, C., Callemien, D. and Collin, S. (2006) Chocolate and cocoa: New sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chem.* 98: 649-657.
- DAI, J.-R., Hallock, Y.F., Cardellina, J.H.I. and Boyd, M.R. (1998) HIV-Inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*. *J. Nat. Prod.* 61: 351-353.
- DELMAS, D., Jannin, B. and Latruffe, N. (2005) Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 377-395.
- DIN 32645 (2008) Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Beuth Verlag: Berlin.
- DU, Q., Wu, P. and Ito, Y. (2000) Low-speed rotary countercurrent chromatography using a convoluted multilayer helical tube for industrial separation. *Anal. Chem.* 72: 3363-3365.
- DU, Q. and Ito, Y. (2003) Slow rotary countercurrent chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26: 1827-1838.

- DU, Q., Winterhalter, P. and Ito, Y. (2003) Large convoluted tubing for scale-up of slow rotary countercurrent chromatograph. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26: 1991-2002.
- DU, Q., Jerz, G., He, Y., Li, L., Xu, Y., Zhang, Q., Zheng, Q., Winterhalter, P. and Ito, Y. (2005) Semi-industrial isolation of salicin and amygdalin from plant extracts using slow rotary counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1074: 43-46.
- DUCROT, P.-H., Kollmann, A., Bala, A.E., Majira, A., Kerhoas, L., Delorme, R. and Einhorn, J. (1998) Cyphostemmins A-B, two new antifungal oligostilbenes from *Cyphostemma crotalarioides* (Vitaceae). *Tetrahedron Lett.* 39: 9655-9658.
- ESATBEYOGLU, T. and Winterhalter, P. (2010) Preparation of dimeric procyanidins B1, B2, B5, and B7 from a polymeric procyanidin fraction of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *J. Agric. Food Chem.* 58: 5147-5153.
- ESATBEYOGLU, T., Wray, V. and Winterhalter, P. (2010) Dimeric procyanidins: Screening for B1 to B8 and semisynthetic preparation of B3, B4, B6, and B8 from a polymeric procyanidin fraction of white willow bark (*Salix alba*). *J. Agric. Food Chem.* 58: 7820-7830.
- FANG, J.-G., Lu, M., Chen, Z.-H., Zhu, H.-H., Li, Y., Yang, L., Wu, L.-M. and Liu, Z.-L. (2002) Antioxidant effects of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chem.-Eur. J.* 8: 4191-4198.
- FANG, J.-G. and Zhou, B. (2008) Structure-activity relationship and mechanism of the tocopherol-regenerating activity of resveratrol and its analogues. *J. Agric. Food Chem.* 56: 11458-11463.
- FERRE-FILMON, K., Delaude, L., Demonceau, A. and Noels, A.F. (2005) Stereoselective synthesis of (E)-hydroxystilbenoids by ruthenium-catalyzed cross-metathesis. *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 3319-3325.
- FRAGA, C.G. (2010) Plant phenolics and human health: Biochemistry, nutrition, and pharmacology. Wiley: Hoboken, N.J., 593 pp.
- FRANKEL, E.N., Waterhouse, A.L. and Kinsella, J.E. (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 341, 1103-4.
- FRANKEL, E.N., Waterhouse, A.L. and Teissedre, P.L. (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 43: 890-894.
- FRIEBOLIN, H. (1988) Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, Deutschland.
- GAMBUTI, A., Strollo, D., Ugliano, M., Lecce, L. and Moio, L. (2004) *Trans*-Resveratrol, Quercetin, (+)-Catechin, and (-)-Epicatechin content in south Italian monovarietal wines: Relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5747-5751.
- GESCHER, A.J. (2008) Resveratrol from red grapes - pedestrian polyphenol or useful anticancer agent? *Planta Med.* 74: 1651-1655.

- GOLDBERG, D.M., Ng, E., Karumanchiri, A., Yan, J., Diamandis, E.P. and Soleas, G.J. (1995a) Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 708: 89-98.
- GOLDBERG, D.M., Yan, J., Ng, E., Diamandis, E.P., Karumanchiri, A., Soleas, G. and Waterhouse, A.L. (1995b) A global survey of *trans*-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 159-165.
- GOLDBERG, D.M., Tsang, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E.P., Soleas, G. and Ng, E. (1996) Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal. Chem.* 68: 1688-1694.
- GORHAM, J. (1995) The biochemistry of the stilbenoids. Chapman and Hall: London, 262 pp.
- GUEBAILIA, H.A., Chira, K., Richard, T., Mabrouk, T., Furiga, A., Vitrac, X., Monti, J.-P., Delaunay, J.-C. and Merillon, J.-M. (2006) Hopeaphenol: The first resveratrol tetramer in wines from North Africa. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9559-9564.
- GÜLCIN, I. (2010) Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 11: 210-218.
- GÜNTHER, H. (1983) NMR-Spektroskopie. Eine Einführung in die Protonenresonanz-Spektroskopie und ihre Anwendungen in der Chemie. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
- HA, D.T., Kim, H., Thuong, P.T., Ngoc, T.M., Lee, I., Nguyen, D.H. and Bae, K.H. (2009) Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of *Vitis amurensis*. *J. Ethnopharmacol* 125: 304-309.
- HAIN, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H. and et al (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature (London)* 361: 153-156.
- HALLIWELL, B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-724.
- HART, J.H. (1981) Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19: 437-458.
- HE, Y.-H., Takaya, Y., Terashima, K. and Niwa, M. (2006) Determination of absolute structure of (+)-davidiol A. *Heterocycles* 68: 93-100.
- HE, S., Lu, Y., Wu, B. and Pan, Y. (2007) Isolation and purification of antioxidative isomeric polyphenols from the roots of *Parthenocissus laetevirens* by counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1151: 175-179.
- HE, S., Wu, B., Pan, Y. and Jiang, L. (2008) Stilbene oligomers from *Parthenocissus laetevirens*: Isolation, biomimetic synthesis, absolute configuration, and implication of antioxidative defense system in the plant. *J. Org. Chem.* 73: 5233-5241.

- HE, S., Lu, Y., Jiang, L., Wu, B., Zhang, F. and Pan, Y. (2009) Preparative isolation and purification of antioxidative stilbene oligomers from *Vitis chunganensis* using high-speed counter-current chromatography in stepwise elution mode. *J. Sep. Sci.* 32: 2339-2345.
- HECKER, U. (1985) Laubgehölze: Wildwachsende Bäume, Sträucher und Zwerggehölze. BLV Verlagsgesellschaft: München, 224-225.
- HERNANDEZ, T., Estrella, I., Perez-Gordo, M., G.-Alegria, E., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F. and Moreno-Arribas, M.V. (2007) Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5260-5266.
- HESSE, M., Meier, H. and Zeeh, B. (1991) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
- HILLEBRAND, W. (1978) Taschenbuch der Rebsorten. Zeitschriftenverlag Dr. Bilz & Dr. Fraund KG: Wiesbaden, 21-28.
- HOWITZ, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.-L., Scherer, B. and Sinclair, D.A. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature (London)* 425 : 191-196.
- HUANG, K.-S., Wang, Y.-H., Li, R.-L. and Lin, M. (2000) Five new stilbene dimers from the lianas of *Gnetum hainanense*. *J. Nat. Prod.* 63: 86-89.
- HUANG, Y.-L., Tsai, W.-J., Shen, C.-C. and Chen, C.-C. (2005) Resveratrol derivatives from the roots of *Vitis thunbergii*. *J. Nat. Prod.* 68: 217-220.
- IBERN-GOMEZ, M., Roig-Perez, S., Lamuela-Raventos, R.M. and de la Torre-Boronat, M.C. (2000) Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters. *J. Agric. Food Chem.* 48: 6352-6354.
- ILIYA, I., Ali, Z., Tanaka, T., Iinuma, M., Furusawa, M., Nakaya, K., Murata, J. and Darnaedi, D. (2002) Stilbenoids from the stem of *Gnetum latifolium* (Gnetaceae). *Phytochemistry* 61: 959-961.
- IRITI, M. and Faoro, F. (2009) Bioactivity of grape chemicals for human health. *Nat. Prod. Commun.* 4: 611-634.
- ITO, Y. (1986) High-speed countercurrent chromatography. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 17: 65-143.
- ITO, Y. (1992) Speculation on the mechanism of unilateral hydrodynamic distribution of two immiscible solvent phases in the rotating coil. *J. Liq. Chromatogr.* 15: 2639-2675.
- ITO, Y. (2005) Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1065: 145-168.
- ITO, Y. and Conway, W.D. (1996) High-speed countercurrent chromatography. Wiley: New York [u.a.], 454 pp.

- ITO, J. and Niwa, M. (1996) Absolute structures of new hydroxystilbenoids, vitisin C and viniferal, from *Vitis vinifera* 'Kyohou'. *Tetrahedron* 52: 9991-9998.
- ITO, Y., Weinstein, M., Aoki, I., Harada, R., Kimura, E. and Nunogaki, K. (1966) Coil planet centrifuge. *Nature (London)* 212 : 985-987.
- ITO, T., Tanaka, T., Nakaya, K., Iinuma, M., Takahashi, Y., Naganawa, H., Ohyama, M., Nakanishi, Y., Bastow, K.F. and Lee, K.-H. (2001) A new resveratrol octamer, vateriaphenol A, in *Vateria indica*. *Tetrahedron Lett.* 42: 5909-5912.
- ITO, T., Akao, Y., Yi, H., Ohguchi, K., Matsumoto, K., Tanaka, T., Iinuma, M. and Nozawa, Y. (2003) Antitumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vateranol C. *Carcinogenesis* 24: 1489-1497.
- ITO, T., Ali, Z., Furusawa, M., Iliya, I., Tanaka, T., Nakaya, K., Murata, J., Darnaedi, D., Oyama, M. and Iinuma, M. (2005) Two novel trimeric resveratrol derivatives from *Cotylelobium lanceolatum*. *Chem. Biodiversity* 2: 1200-1216.
- JANG, M.H., Piao, X.L., Kim, H.Y., Cho, E.J., Baek, S.H., Kwon, S.W. and Park, J.H. (2007) Resveratrol oligomers from *Vitis amurensis* attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. *Bio. Pharm. Bull.* 30: 1130-1134.
- JEAN-DENIS, J.B., Pezet, R. and Tabacchi, R. (2006) Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1112: 263-268.
- JEANDET, P., Bessis, R., Sbaghi, M. and Meunier, P. (1995a) Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *J. Phytopathol.* 143: 135-139.
- JEANDET, P., Sbaghi, M., Bessis, R. and Meunier, P. (1995b) The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins. *Vitis* 34: 91-94.
- JEANDET, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P. and Trollat, P. (1995c) Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 1-4.
- JEANDET, P., Breuil, A.C., Adrian, M., Weston, L.A., Debord, S., Meunier, P., Maume, G. and Bessis, R. (1997) HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Anal. Chem.* 69: 5172-5177.
- JEANDET, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. and Adrian, M. (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2731-2741.
- KAMMERER, D., Claus, A., Carle, R. and Schieber, A. (2004) Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4360-4367.

- KARLSSON, J., Emgard, M., Brundin, P. and Burkitt, M.J. (2000) *Trans*-resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tert-butyl hydroperoxide: electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism. *J. Neurochem.* 75: 141-150.
- KAWABATA, J., Ichikawa, S., Kurihara, H. and Mizutani, J. (1989) Kobophenol A, a unique tetrastilbene from *Carex kobomugi* Ohwi (Cyperaceae). *Tetrahedron Lett.* 30: 3785-3788.
- KAWABATA, J., Mishima, M., Kurihara, H. and Mizutani, J. (1991) Kobophenol B, a tetrastilbene from *Carex pumila*. *Phytochemistry* 30: 645-647.
- KAWABATA, J., Fukushi, E., Hara, M. and Mizutani, J. (1992) Detection of connectivity between equivalent carbons in a C₂ molecule using isotopomeric asymmetry: identification of hopeaphenol in *Carex pumila*. *Magn. Reson. Chem.* 30: 6-10.
- KENNEDY, J.A. and Jones, G.P. (2001) Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1740-1746.
- KIM, H.J., Chang, E.J., Bae, S.J., Shim, S.M., Park, H.D., Rhee, C.H., Park, J.H. and Choi, S.W. (2002a) Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Arch. Pharmacol. Res.* 25: 293-299.
- KIM, H.J., Chang, E.J., Cho, S.H., Chung, S.K., Park, H.D. and Choi, S.W. (2002b) Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 66: 1990-1993.
- KIM, H.J., Saleem, M., Seo, S.H., Jin, C. and Lee, Y.S. (2005) Two new antioxidant stilbene dimers, parthenostilbenins A and B from *Parthenocissus tricuspidata*. *Planta Med.* 71: 973-976.
- KÖHLER, N. (2006) Entwicklung und Anwendung leistungsfähiger präparativer gegenstromverteilungschromatographischer Trenntechniken. *Dissertation*, TU-Braunschweig, Cuvillier: Göttingen 2006.
- KÖHLER, N., Wray, V. and Winterhalter, P. (2008) Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1177: 114-125.
- KORHAMMER, S., Reniero, F. and Mattivi, F. (1995) An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry* 38: 1501-1504.
- KURIHARA, H., Kawabata, J., Ichikawa, S., Mishima, M. and Mizutani, J. (1991) Oligostilbenes from *Carex kobomugi*. *Phytochemistry* 30: 649-653.
- LAMUELA-RAVENTOS, R.M., Romero-Perez, A.I., Waterhouse, A.L. and de la Torre-Boronat, M.C. (1995) Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J. Agric. Food Chem.* 43: 281-283.

- LANDRAULT, N., Larronde, F., Delaunay, J.-C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J.-M., Gasc, F., Cros, G. and Teissedre, P.-L. (2002) Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2046-2052.
- LANGCAKE, P. (1981) Disease resistance of *Vitis spp.* and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin alpha-viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* 18: 213-226.
- LANGCAKE, P. and Pryce, R.J. (1977a) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33: 151-152.
- LANGCAKE, P. and Pryce, R.J. (1977b) Oxidative dimerization of 4-hydroxystilbenes in vitro: production of a grapevine phytoalexin mimic. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1977: 208-210.
- LI, W.-W., Ding, L.-S., Li, B.-G. and Chen, Y.-Z. (1996) Oligostilbenes from *Vitis heyneana*. *Phytochemistry* 42: 1163-1165.
- LI, W., Li, H., Li, Y. and Hou, Z. (2006) Total synthesis of (+)-quadrangularin A. *Angew. Chem., Int. Ed.* 45: 7609-7611.
- LI, L., Henry, G.E. and Seeram, N.P. (2009) Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7282-7287.
- LIU, D.-Y., Ye, J.-T., Yang, W.-H., Yan, J., Zeng, C.-H. and Zeng, S. (2004) Ampelopsin, a small molecule inhibitor of HIV-1 infection targeting HIV entry. *Biomed. Environ. Sci.* 17: 153-164.
- LYONS, M., Yu, C., Toma, R.B., Cho, S.Y., Reiboldt, W., Lee, J. and van Breemen, R.B. (2003) Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5867-5870.
- MARK, L., Nikfardjam, M.S.P., Avar, P. and Ohmacht, R. (2005) A validated HPLC method for the quantitative analysis of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid in Hungarian wines. *J. Chromatogr. Sci.* 43: 445-449.
- MATTIVI, F. and Reniero, F. (1992) Oligostilbenes from the roots of genus *Vitis*. *Bulletin de Liaison - Groupe Polyphenols* 16: 116-119.
- MIKULSKI, D. and Molski, M. (2010) Quantitative structure-antioxidant activity relationship of *trans*-resveratrol oligomers, *trans*-4,4'-dihydroxystilbene dimer, *trans*-resveratrol-3-O-glucuronide, glucosides: *Trans*-piceid, *cis*-piceid, *trans*-astringin and *trans*-resveratrol-4'-O-beta-D-glucopyranoside. *Eur. J. Med. Chem.* 45: 2366-2380.
- MILLER, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci. (Lond)* 84: 407-412.
- MITCHELL, T.N. and Costisella, B. (2004) NMR - from spectra to structures. Springer: Berlin.

- MONAGAS, M., Suarez, R., Gomez-Cordoves, C. and Bartolome, B. (2005) Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 139-147.
- MÜLLER, C., Ullmann, K., Wilkens, A., Winterhalter, P., Toyokuni, S. and Steinberg, P. (2009) Potent antioxidative activity of Vineatrol 30 grapevine-shoot extract. *Biocsi. Biotechnol. Biochem.* 73: 1831-1836.
- NASSIRI-ASL, M. and Hosseinzadeh, H. (2009) Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytother. Res.* 23: 1197-1204.
- NAUGLER, C., McCallum, J.L., Klassen, G. and Strommer, J. (2007) Concentrations of *trans*-resveratrol and related stilbenes in Nova Scotia wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 58: 117-123.
- NGOC, T.M., Minh, P.T.H., Hung, T.M., Thuong, P.T., Lee, I.-S., Min, B.-S. and Bae, K.-H. (2008) Lipxygenase inhibitory constituents from rhubarb. *Arch. Pharmacol. Res.* 31: 598-605.
- NIKFARDJAM, M.P., Rechner, A., Patz, C.-D. and Dietrich, H. (1999) *Trans*-resveratrol content of German wines. *Wein-Wiss.* 54: 17-20.
- ONO, M., Masuoka, C., Ito, Y., Niiho, Y., Kinjo, J. and Nohara, T. (1997) Antioxidative and antihyaluronidase activities of some constituents from *Foeniculi Fructus* (fruit of *Foeniculum vulgare* Miller). *Food Sci. Technol. Int., Tokyo* 3: 53-55.
- OVESNA, Z., Kozics, K., Bader, Y., Saiko, P., Handler, N., Erker, T. and Szekeres, T. (2006) Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-*trans*-stilbene in three leukemia cell lines. *Oncol. Rep.* 16: 617-624.
- PACE-ASCIAC, C.R., Hahn, S., Diamandis, E.P., Soleas, G. and Goldberg, D.M. (1995) The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* 235: 207-219.
- PEDRENO, M.A., Morales, M., Calderón, J., Zapata, M. and Ros Barceló, A. (1996) A *trans*-Resveratrol oxidizing basic peroxidase isoenzyme from *Vitis vinifera*. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*; Obinger, C., Burner, V., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Eds.), University of Geneva, Geneva: 338-344.
- PERRONE, G., Nicoletti, I., Pascale, M., De Rossi, A., De Girolamo, A. and Visconti, A. (2007) Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6807-6812.
- PEZET, R., Perret, C., Jean-Denis, J.B., Tabacchi, R., Gindro, K. and Viret, O. (2003) Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5488-92.
- POUSSIER, M., Guilloux-Benatier, M., Torres, M., Heras, E. and Adrian, M. (2003) Influence of different maceration techniques and microbial enzymatic activities on wine stilbene content. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 261-266.

- PRIOR, R.L., Wu, X. and Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- PRIVAT, C., Telo, J.P., Bernardes-Genisson, V., Vieira, A., Souchard, J.-P. and Nepveu, F. (2002) Antioxidant properties of *trans*-epsilon-Viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1213-1217.
- PÜSSA, T., Floren, J., Kuldkepp, P. and Raal, A. (2006) Survey of grapevine *Vitis vinifera* ptem Polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7488-7494.
- RE, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- RENTZSCH, M., Wilkens, A. and Winterhalter, P. (2009) Non-flavonoid phenolic compounds. In: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.) *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer: New York, 509-527.
- RIBEIRO DE LIMA, M.T., Waffo-Teguo, P., Teissedre, P.L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J.C. and Merillon, J.M. (1999) Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2666-2670.
- RIMANDO, A.M. and Suh, N. (2008) Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer. *Planta Med.* 74: 1635-1643.
- RIVIERE, C., Richard, T., Quentin, L., Krisa, S., Merillon, J.-M. and Monti, J.-P. (2007) Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 1160-1167.
- ROMERO-PEREZ, A.I., Lamuela-Raventos, R.M., Waterhouse, A.L. and de la Torre-Boronat, M.C. (1996) Levels of *cis*- and *trans*-resveratrol and their glucosides in white and rose *Vitis vinifera* wines from Spain. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2124-2128.
- SANTOS-BUELGA, C. and Scalbert, A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1094-1117.
- SATO, M., Suzuki, Y., Okuda, T. and Yokotsuka, K. (1997) Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 61: 1800-1805.
- SAUCIER, C., Mirabel, M., Daviaud, F., Longieras, A. and Glories, Y. (2001) Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5732-5735.
- SCHRÖDER, J., Schanz, S., Tropf, S., Kärcher, B. and Schröder, G. (1993) Phytoalexin biosynthesis: stilbene synthase and co-action of a reductase with chalcone synthase. In: Fritig, B., Legrand, M. (Eds.) *Mechanism of Plant Defense Responses*. Kluwer, Dordrecht, pp 257-267.

- SENDA, N., Kubota, Y., Hoshino, T., Nozaki, H., Hayashi, H. and Nakayama, M. (1995) Mass spectra of some stilbene oligomers from *Carex species*. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 43: 45-51.
- SHARMA, M. and Gupta, Y.K. (2002) Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life Sci.* 71: 2489-2498.
- SHEN, T., Wang, X.-N. and Lou, H.-X. (2009) Natural stilbenes: an overview. *Nat. Prod. Rep.* 26: 916-935.
- SIEMANN, E.H. and Creasy, L.L. (1992) Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 49-52.
- SOLEAS, G.J., Diamandis, E.P. and Goldberg, D.M. (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30: 91-113.
- SOMOZA, V. (1999) Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe: Resveratrol. In: Erbersdobler, H.F., Meyer, A.H. Praxishandbuch Functional Food, Behr's Verlag: Kapitel 6.5, 1-26.
- SOTHEESWARAN, S. and Pasupathy, V. (1993) Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry* 32: 1083-1092.
- SOUQUET, J.-M., Labarbe, B., Le Guerneve, C., Cheynier, V. and Moutounet, M. (2000) Phenolic composition of grape stems. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1076-1080.
- STAHL, E. (1967) Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Springer Verlag: Berlin, 979 pp.
- STECHER, G., Huck, C.W., Popp, M. and Bonn, G.K. (2001) Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS/MS. *Fresen. J. Anal. Chem.* 371: 73-80.
- SULTANBAWA, M.U.S., Surendrakumar, S. and Bladon, P. (1987) Distichol, an antibacterial polyphenol from *Shorea disticha*. *Phytochemistry* 26: 799-801.
- SUN, B., Ferrao, C. and Spranger, M.I. (2003) Effect of wine style and winemaking technology on resveratrol levels in wines. *Cienc. Tec. Vitivinic.* 18: 77-91.
- SUTHERLAND, I.A. (1987) Countercurrent chromatography. *Lab. Practice* 36: 37-8, 41-2.
- SYAH, Y.M., Aminah, N.S., Hakim, E.H., Aimi, N., Kitajima, M., Takayama, H. and Achmad, S.A. (2003) Two oligostilbenes, *cis*- and *trans*-diptoinonesin B, from *Dryobalanops oblongifolia*. *Phytochemistry* 63: 913-917.
- TAKAYA, Y., Yan, K.-X., Terashima, K., He, Y.-H. and Niwa, M. (2002) Biogenetic reactions on stilbenetetramers from Vitaceaeous plants. *Tetrahedron* 58: 9265-9271.
- TAKAYA, Y., Terashima, K., Ito, J., He, Y.-H., Tateoka, M., Yamaguchi, N. and Niwa, M. (2005) Biomimetic transformation of resveratrol. *Tetrahedron* 61: 10285-10290.
- TALVITIE, A., Mannila, E. and Hamunen, A. (1987) Carbon NMR spectroscopic study of four stilbenes from the bark of *Picea abies*. *Finn. Chem. Lett.* 14: 43-48.

- TANAKA, T., Iinuma, M. and Murata, H. (1998) Stilbene derivatives in the stem of *Parthenocissus quinquefolia*. *Phytochemistry* 48: 1045-1049.
- TEGUO, P.W., Decendit, A., Vercauteren, J., Deffieux, G. and Merillon, J.-M. (1996) *Trans*-Resveratrol-3-O-beta-glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* 42: 1591-1593.
- THOMZIK, J.E., Stenzel, K., Stocker, R., Schreier, P.H., Hain, R. and Stahl, D.J. (1997) Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51: 265-278.
- TOKUSOGLU, O., Uenal, M.K. and Yemis, F. (2005) Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J. Agric. Food Chem.* 53: 5003-5009.
- TROOST, G. (1988) *Die Technologie des Weines*. Eugen Ulmer: Stuttgart.
- TROPF, S., Lanz, T., Rensing, S.A., Schroeder, J. and Schroeder, G. (1994) Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *J. Mol. Evol.* 38: 610-618.
- ULRICH, S., Wolter, F. and Stein, J.M. (2005) Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 452-461.
- VERSARI, A., Paola Parpinello, G., Battista Tornielli, G., Ferrarini, R. and Giulivo, C. (2001) Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5531-5536.
- VITRAC, X., Castagnino, C., Waffo-Teguo, P., Delaunay, J.-C., Vercauteren, J., Monti, J.-P., Deffieux, G. and Merillon, J.-M. (2001) Polyphenols newly extracted in red wine from Southwestern France by centrifugal partition chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5934-5938.
- VITRAC, X., Monti, J.-P., Vercauteren, J., Deffieux, G. and Merillon, J.-M. (2002) Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 458: 103-110.
- VITRAC, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J.-C., Merillon, J.-M. and Teissedre, P.-L. (2005) Determination of stilbenes (delta-viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, epsilon-viniferin) in Brazilian wines. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5664-5669.
- VOGT, E. (1977) *Weinbau*. Eugen Ulmer: Stuttgart, 13-19.
- WANG, M., Jin, Y. and Ho, C.-T. (1999) Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3974-3977.

- WANG, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick, R. and van Breemen, R.B. (2002a) An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J. Agric. Food Chem.* 50: 431-435.
- WANG, Z., Zou, J., Huang, Y., Cao, K., Xu, Y. and Wu, J.M. (2002b) Effect of resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Chin. Med. J.* 115: 378-380.
- WILKENS, A., Paulsen, J., Wray, V. and Winterhalter, P. (2010) Structures of two novel trimeric stilbenes obtained by horseradish peroxidase catalyzed biotransformation of *trans*-Resveratrol and (-)- ϵ -Viniferin. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6754-6761.
- WINTERHALTER, P. (2007) Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 507-513.
- WOOD, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M. and Sinclair, D. (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature (London)* 430: 686-689.
- WÜRDIG, G. and Woller, R. (1989) *Chemie des Weines*. Eugen Ulmer: Stuttgart.
- YAN, K.-X., Terashima, K., Takaya, Y. and Niwa, M. (2001) A novel oligostilbene named (+)-viniferol A from the stem of *Vitis vinifera* 'Kyohou'. *Tetrahedron* 57: 2711-2715.
- YANG, F., Zhang, T. and Ito, Y. (2001) Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 919: 443-448.
- YOSHIKI, T. and Masatake, N. (2001) Oligostilbenes from Vitaceaeous plants. *Trends Heterocycl. Chem.* 7: 41-54.
- YU, B.-B., Han, X.-Z. and Lou, H.-X. (2007) Oligomers of resveratrol and ferulic acid prepared by peroxidase-catalyzed oxidation and their protective effects on cardiac injury. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7753-7757.
- ZHANG, Y., Jayaprakasam, B., Seeram, N.P., Olson, L.K., DeWitt, D. and Nair, M.G. (2004) Insulin secretion and cyclooxygenase enzyme inhibition by Cabernet Sauvignon grape skin compounds. *J. Agric. Food Chem.* 52: 228-233.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Übersicht der HSCCC-Fractionen resultierend aus 3 Trennungen von Vineatrol® 30

Fraktion	Auswaage [mg]	R _t [min]	Molekülion <i>m/z</i> [M-H] ⁺	MS ² -Fragmente	Hauptkomponenten
1	335,5	12,3	389	227, 185, 159, 143	Resveratrol-Glucosid
		15,6	389	227, 185, 159, 143	<i>trans</i> -Piceid (S2)
		15,9	405	243, 225, 215, 149	Piceatannol-Glucosid
		17,6	777	615, 453	ϵ -Viniferin-3,5-O-Diglc
		19,1	615	453, 435, 359, 347, 289	Dimer-Glucosid
		21,2	615	453, 435, 359, 347, 289	Dimer-Glucosid
		22,3	679	435, 409, 359, 333, 329	Trimer
		25,9	905	811, 717, 611, 451, 357	Tetramer
2	437,5	18,1	469	451, 375, 363	Ampelopsin A (S5)
		19,6	453	359, 347, 289, 225	Dimer
		20,1	453	359, 265	Dimer
		24,2	905	811, 717, 611, 451, 357	Hopeaphenol (S6)
		24,5	905	811, 717, 611, 451, 359	Tetramer
		25,2	905	811, 717, 611, 357	Tetramer
3	122,2	18,9	453	359	Dimer
		19,6	453	359, 347, 289, 225	Dimer
		21,3	453	359, 347, 265	Dimer
		23,5	679	585, 491, 479, 385	Trimer
		24,8	905	811, 717, 611	Tetramer
		25,5	905	811, 717, 611	Tetramer
4	47,2	21,8	453	359, 289, 265	Quadrangularin A (S8)
		24,4	905	887, 811, 717	Tetramer
5	18,1	23,2	453	359, 341, 289, 265	Parthenocissin A (S7)
6	29,3	23,2	453	359, 341, 289, 265	Parthenocissin A (S7)
		27,0	905	887, 811, 799, 705, 545	r-2-Viniferin (S9)
7	67,9	23,2	453	359, 341, 289, 265	Parthenocissin A (S7)
		23,9	453	411, 359, 347, 289, 265	Dimer
		24,5	453	411, 359, 347, 289, 265	Dimer
		27,0	905	887, 811, 799, 705, 545	r-2-Viniferin (S9)
8	68,5	18,1	243	225, 215, 201, 175, 159	<i>trans</i> -Piceatannol (S3)
		23,3	469	451, 385, 375, 359	Dimer
		26,7	905	887, 811, 705	Tetramer
		27,0	905	887, 811, 799, 705, 545	r-2-Viniferin (S9)

Fraktion	Auswaage [mg]	R _t [min]	Molekülion <i>m/z</i> [M-H] ⁺	MS ² -Fragmente	Hauptkomponenten
9	40,9	25,7	679	661, 585, 573, 451, 345	Trimer
		26,3	679	661, 585, 573, 451, 345	Trimer
		27,4	679	661, 585, 573, 555, 451	Trimer
10	11,2	26,1	453	435, 411, 359, 347, 333	Dimer
		26,3	679	661, 585, 573, 451, 345	Trimer
		26,5	453	435, 411, 391, 359, 347	Dimer
		27,4	679	661, 585, 573, 555, 451	Trimer
11	37,6	26,6	453	435, 411, 369, 359, 347	Dimer
12	4,4	22,0	227	185, 183, 157	<i>trans</i> -Resveratrol (S1)
13/Coil	657,7	22,0	227	185, 183, 157	<i>trans</i> -Resveratrol (S1)
		25,7	453	435, 411, 369, 359, 347	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin (S4)
		28,8	905	887, 811, 799, 451, 359	r-Viniferin (S10)

Tabelle 7.2: Parameter und Daten der LSRCCC-Retentionsstudie

U-T-Modus		U-H-Modus		L-T-Modus		L-H-Modus	
Rotation [rpm]	R _s [%]	Rotation [rpm]	R _s [%]	Rotation [rpm]	R _s [%]	Rotation [rpm]	R _s [%]
31	5,5	34	48,0	31	8,4	34	7,6
42	9,1	42	55,3	40	60,0	41	5,8
72	14,9	72	72,7	71	70,0	69	5,5
81	11,3	78	73,8	83	70,9	81	5,5
104	14,9	103	32,9	98	44,4	96	6,0

R_s: Retention der stationären Phase

Tabelle 7.3: Übersicht der LSRCCC-Fractionen (Vineatrol®30-Trennung I)

Fraktion	Auswaage [g]	R _t * [min]	Molekülion <i>m/z</i> [M-H] ⁺	MS ² -Fragmente	Hauptkomponenten
1	0,74	17,5	227	185, 183, 157	<i>trans</i> -Resveratrol (S1)
		22,2	453	435, 411, 369, 359, 347	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin (S4)
		23,4	905	887, 811, 799, 705, 545	r-2-Viniferin (S9)
		25,8	905	887, 811, 799, 451, 359	r-Viniferin (S10)
2	5,04	17,5	227	185, 183, 157	<i>trans</i> -Resveratrol (S1)
		22,2	453	435, 411, 369, 359, 347	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin (S4)
		23,4	905	887, 811, 799, 705, 545	r-2-Viniferin (S9)
3	0,81	12,1	469	451, 375, 363	Ampelopsin A (S5)
		12,7	243	225, 215, 201, 175, 159	<i>trans</i> -Piceatannol (S3)
		13,7	453	359, 347, 265	Dimer

Fraktion	Auswaage [g]	R _t * [min]	Molekülion m/z [M-H] ⁺	MS ² -Fragmente	Hauptkomponenten
4	0,66	17,3	453	359, 289, 265	Quadrangularin A (S8)
		20,0	905	811, 717, 611, 451, 357	Hopeaphenol (S6)
		20,3	905	811, 717, 611, 451, 359	Tetramer
		12,1	469	451, 375, 363	Ampelopsin A (S5)
		12,7	243	225, 215, 201, 175, 159	<i>trans</i> -Piceatannol (S3)
		13,7	453	359, 347, 265	Dimer
		17,3	453	359, 289, 265	Quadrangularin A (S8)
5	0,32	18,4	679	435, 409, 359, 333, 329	Trimer
		20,0	905	811, 717, 611, 451, 357	Hopeaphenol (S6)
		8,3	289	245, 205	Catechin
		10,2	289	245, 205	Epicatechin
6	0,02	16,7	615	453, 435, 359, 347, 289	Dimer-Glucosid
		17,3	453	359, 289, 265	Quadrangularin A (S8)
7	0,57	-	-	-	polymere Verbindungen
8/Coil	0,92	-	-	-	polymere Verbindungen

*säulenbedingte Abweichung der Retentionszeiten

Tabelle 7.4: Überblick der HSCCC-Fractionen der Späburgunderextrakt-Trennung

Fraktion	Auswaage [mg]	R _t [min]	Molekülion m/z [M-H] ⁺	MS ² -Fragmente	Hauptkomponenten
1	785,1	4,5	577	559, 451, 425, 407, 289	Proanthocyanidin
		6,2	577	559, 451, 425, 407, 289	Proanthocyanidin
		9,2	289	245, 205, 179, 161	Catechin
		11,5	289	245, 205, 179, 161	Epicatechin
		16,4	289	245, 205, 179, 161	nicht identifiziert
		24,5	905	811, 717, 611, 451, 357	Hopeaphenol (S6)
2	59,5	18,2	469	451, 375, 363	Ampelopsin A (S5)
		24,3	905	811, 717, 611, 451, 357	Hopeaphenol (S6)
3	18,0	18,2	469	451, 375, 363	Ampelopsin A (S5)
		23,5	679	585, 491, 479, 385	Trimer
		24,3	905	811, 717, 611, 451, 357	Hopeaphenol (S6)
4	2,9	18,2	469	451, 375, 363	Ampelopsin A (S5)
		23,5	679	585, 491, 479, 385	Trimer
		27,2	905	887, 811, 799, 718	Tetramer
5	1,5	18,7	243	225, 215, 201, 175, 159	<i>trans</i> -Piceatannol (S3)
		27,0	679	661, 585, 573, 451, 345	Trimer
		27,2	905	887, 811, 799, 718	Tetramer

Fraktion	Auswaage [mg]	R _t [min]	Molekülion <i>m/z</i> [M-H] ⁺	MS ² -Fragmente	Hauptkomponenten
6	7,8	18,7	243	225, 215, 201, 175, 159	<i>trans</i> -Piceatannol (S3)
7	1,4	18,7	243	225, 215, 201, 175, 159	<i>trans</i> -Piceatannol (S3)
		24,2	469	451, 385, 375, 359, 333	Dimer
		24,5	469	451, 375, 359, 347	Dimer
		26,5	453	375, 359, 347, 333	Dimer
		27,2	679	661, 585, 573, 451, 345	Trimer
		27,7	905	887, 811, 705, 559, 451	Tetramer
8	8,9	26,5	679	661, 585, 573, 451, 345	Trimer
		27,0	679	661, 585, 573, 451, 345	Trimer
		28,1	679	661, 585, 573, 451, 345	Trimer
Coil	67,5	22,5	227	185, 183, 157	<i>trans</i> -Resveratrol (S1)
		26,3	453	435, 411, 369, 359, 347	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin (S4)
		27,3	453	435, 411, 369, 359, 347	Dimer
		29,1	905	887, 811, 799, 451, 359	r-Viniferin (S10)

Tabelle 7.5: Antioxidative Aktivität der Extrakte, HSCCC-Fractionen und Reinsubstanzen

Probe	TEAC* [mmol Trolox [®] /g]	Probe	TEAC* [mmol Trolox [®] /g]
Fraktion 1 (HSCCC-1)	1,26	Vineatrol [®] 30, Rohextrakt	1,48
Fraktion 2	1,26	Vineatrol [®] 30, gefällt	1,64
Fraktion 3	1,29	Vineatrol [®] 30, Präzipitat	1,80
Fraktion 4	1,44	Spätburgunder, gefällt	0,99
Fraktion 5	1,64	Spätburgunder, Präzipitat	1,04
Fraktion 6	1,41	<i>trans</i> -Resveratrol (S1)	2,19
Fraktion 7	1,55	<i>trans</i> -Piceid (S2)	1,89
Fraktion 8	1,46	<i>trans</i> -Piceatannol (S3)	2,86
Fraktion 9	1,25	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin (S4)	1,41
Fraktion 10	1,10	Ampelopsin A (S5)	1,53
Fraktion 11	1,35	Hopeaphenol (S6)	1,81
Fraktion 12	1,78	r-2-Viniferin (S9)	2,01
Fraktion 13/Coil	1,28	r-Viniferin (S10)	2,29

*nach RE et al. (1999)

Tabelle 7.6: ^1H - und ^{13}C -NMR-NMR Daten von *trans*- δ -Viniferin, Resviniferin A, Resviniferin B

Position	<i>trans</i> - δ -Viniferin ^a (S11)		Resviniferin A ^b (S12)		Resviniferin B ^b (S13)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1a		132,4		132,3		132,6
2(6)a	7,07 d (8,5)	128,9	6,67 d (8,6)	127,4	7,19 d (8,5) ¹	128,0 ¹
3(5)a	6,68 d (8,5)	116,3	6,61 d (8,6)	115,9	6,82 d (8,6) ²	116,1
4a		158,8		157,7		158,2 ³
7a	5,29 d (8,4)	94,9	5,60 d (4,9)	91,2	5,41 d (7,7)	93,9
8a	4,30 d (8,4)	58,8	4,38 d (4,8)	52,3	4,39 d (7,7)	57,7
9a		145,4		142,2		145,2
10a	6,02 d (2,2)	107,7		119,8	6,16 d (2,2)	107,3
11a		160,0		162,4		159,6
12a	6,08 t (2,2)	102,5	6,33 d (2,0)	96,4	6,26 d (2,2)	102,3
13a		160,0		160,3		159,6
14a	6,02 d (2,2)	107,7	6,27 d (2,1)	106,7	6,16 d (2,2)	107,3
1b		132,4		131,7		131,8 ⁴
2b	7,09 br. s	124,2	7,11 br. s	123,7	6,99 br. s	125,0
3b		132,8		133,0		131,9 ⁴
4b		161,0		159,7		160,6
5b	6,75 d (8,3)	110,4	6,87 d (8,3)	110,4	6,76 d (8,4)	110,2
6b	7,27 dd (8,2; 1,6)	128,9	7,36 dd (8,3; 1,5)	128,3	7,20 m	127,7
7b	6,88 d (16,0)	129,4	6,91 d (16,8)	129,1	6,93 d (16,3)	130,3
8b	6,69 d (16,0)	127,5	6,73 d (16,3)	127,1	6,72 d (16,3)	124,2
9b		141,2		140,7		136,4
10b	6,32 d (2,1)	105,8	6,49 d (2,1)	105,7		120,0
11b		159,7		159,5		162,4
12b	6,03 t (2,2)	102,7	6,25 m	102,7	6,32 d (2,0)	96,8
13b		159,7		159,5		159,7
14b	6,32 d (2,1)	105,8	6,49 d (2,1)	105,7	6,70 d (2,1)	104,4
1c				134,3		133,8
2(6)c			7,27 d (8,5)	127,8	7,20 d (8,5) ¹	128,5 ¹
3(5)c			6,91 d (8,4)	116,4	6,83 d (8,5) ²	116,1
4c				158,1		158,4 ³
7c			5,43 d (4,4)	94,0	5,42 d (5,4)	93,9
8c			4,58 d (4,4)	56,9	4,46 d (5,5)	57,1
9c				147,4		147,3
10(14)c			6,14 d (2,1)	106,8	6,22 m	107,0
11(13)c				160,1		159,7
12c			6,25 m	102,4	6,22 m	102,1

^a gemessen in CD₃OD, ^b gemessen in CD₃COCD₃, ^{1, 2, 3, 4} Signale mit gleicher Kennzeichnung sind austauschbar

Tabelle 7.7: Stilbengehalte in Weinen des internationalen Weinpreises „Mundus Vini“ 2008

Nr.	Wein	<i>trans</i> -Piceid [mg/L]	<i>cis</i> -Piceid [mg/L]	<i>trans</i> -RSV [mg/L]	<i>cis</i> -RSV [mg/L]
1	2007 "Horse Valley" Sauvignon Blanc Premium	+	+	+	+
2	2007 Val Duna Sauvignon Blanc Romania	+	+	n.d.	n.d.
3	2007 Chapel Hill Sauvignon Blanc	+	+	+	+
4	2007 Sauvignon Blanc Grand vin de la Côte AOC	+	n.d.	+	+
5	2007 Sauvignon Blanc Twanner AOC Bielersee	n.d.	n.d.	+	n.d.
6	Sommelier Club - Sauvignon	+	+	n.d.	n.d.
7	György Villa Etyeki Sauvignon Blanc	n.d.	n.d.	+	+
8	2007 Sauvignon Blanc Golden Age	+	n.d.	n.d.	n.d.
9	Sauvignon Daruvar	n.d.	n.d.	+	+
10	2007 WOW Riesling Italico	n.d.	n.d.	+	+
11	2007 Pinot Blanc Tatschler	n.d.	n.d.	+	+
12	2007 Select Pinot Blanc	+	+	n.d.	n.d.
13	2007 Weißburgunder Ried Roland	+	+	n.d.	n.d.
14	2007 Spätburgunder Rosé "Eco Vin" QbA trocken	+	+	n.d.	n.d.
15	2007 Burkheimer Rosé Qualitätswein trocken	+	+	+	+
16	2007 Bree Pinot Noir Rosé Pfalz Qualitätswein trocken	+	n.d.	+	n.d.
17	2007 Baden Spätburgunder Rosé trocken	n.d.	n.d.	+	+
18	2007 Iphöfer Kalb Pfiffikus Spätburgunder Weißherbst Kabinett trocken	+	2,47	2,11	5,25
19	2007 Claus C. Jacob Spätburgunder Rosé	+	+	0,74	+
20	2007 Kressbronner Berghalde Spätburgunder Weißherbst halbtrocken QbA	n.d.	n.d.	+	+
21	2007 Rudolf Müller Spätburgunder Rosé QbA halbtrocken Mosel	+	2,80	+	+
22	Krughof - Rotling - Feinherb Spätburgunder/Grauburgunder Serie Terrior	+	+	+	+
23	2007 Ritratti Pinot Grigio Trentino DOC	n.d.	n.d.	+	+
24	2006 St. Laurent Reserve	n.d.	n.d.	0,83	2,78

Nr.	Wein	<i>trans</i> -Piceid [mg/L]	<i>cis</i> -Piceid [mg/L]	<i>trans</i> -RSV [mg/L]	<i>cis</i> -RSV [mg/L]
25	2006 Leopold Aumann St.Laurent Qualitätswein trocken	n.d.	n.d.	1,96	5,88
26	2006 Pinot Noir "Hundertpfunder"	4,80	2,33	5,20	2,95
27	2005 Cavallo Pinot Noir	n.d.	n.d.	1,23	4,17
28	2005 Pinot Noir	n.d.	n.d.	3,57	5,42
29	2007 Cabernet Sauvignon Qualitätswein Niederösterreich Ing. W. Baumgartner	2,93	8,15	0,85	3,55
30	2006 Cabernet Sauvignon	n.d.	n.d.	+	3,13
31	2006 Cablot	n.d.	n.d.	+	4,03
32	2006 Malteser Ritterorden Kommende Mailberg	n.d.	n.d.	2,85	5,30
33	2006 Tesoro	+	+	+	+
34	2005 SYMBIOSE Cuvée Barrique	n.d.	n.d.	1,46	3,70
35	2005 Klosterkeller Siegendorf Siegendorf Rot	+	+	+	+
36	2005 Vöslauer Cabernet Merlot Qualitätswein aus Vöslau	+	n.d.	1,36	+
37	M.C.S. Merlot Cabernet Sauvignon	+	+	+	+
38	2005 Klosterkeller Siegendorf O'Dora	n.d.	n.d.	+	+
39	2003 Private Reserve - Cabernet Sauvignon Weingut Domäne Müller	+	+	n.d.	n.d.
40	2007 Bastardo - Merlot "Taking root"	+	4,41	0,90	+
41	2007 Elephant Hill Syrah	+	+	+	+
42	Syrah	+	+	n.d.	n.d.
43	2006 La Cetate Shiraz	+	2,25	n.d.	n.d.
44	2005 Vale das Areias Syrah	3,40	3,72	1,61	+
45	2007 Val Duna Merlot	8,57	6,32	+	+
46	2006 Val Duna Merlot Romania	+	+	+	+
47	2005 Fonko Merlot	14,19	7,28	4,64	2,93
48	2006 Silver Red	+	+	+	+
49	2003 CUVÉE "ÜBERLAND"	+	+	+	+
50	Amaro de la Valea Perjei Moldova	+	+	+	+
51	2007 Le Focaie Sangiovese Maremma Toscana IGT - Rocca di Montemassi	+	+	n.d.	+
52	2006 Val di Toro Maremma Toscana	+	+	+	+
53	2006 Brancaia Tre	+	+	+	+
54	2006 Sasyr Sangiovese & Syrah	5,10	6,13	+	+
55	2005 Bracciale Maremma Toscana Jacopo Biondi Santi	+	+	+	+
56	2005 Ad Astra Maremma Toscana	+	2,71	1,08	+
57	"Il Querciolaia" - Castello di Querceto	+	+	+	+

Nr.	Wein	<i>trans</i> -Piceid [mg/L]	<i>cis</i> -Piceid [mg/L]	<i>trans</i> -RSV [mg/L]	<i>cis</i> -RSV [mg/L]
58	2004 Villa di Corsano IGT	+	+	+	+
59	2004 Ampeleia IGT Maremma Toscana	+	+	+	+
60	2004 Ser Gioveto IGT	4,86	5,95	3,17	5,90
61	2004 Roccato IGT	+	+	1,89	+
62	2004 Elena Toscana IGT	+	+	n.d.	+
63	2004 Redi Orbaio Rosso Toscana IGT	3,57	3,63	0,84	+
64	Vigorello Toscana IGT San Felice	+	+	n.d.	n.d.
65	2007 CLEES Ramsthaler St. Klausen Rieslaner Spätlese feinsüß	n.d.	n.d.	+	n.d.
66	2007 Würzburger Stein Rieslaner Spätlese	n.d.	n.d.	+	n.d.
67	2007 Randersackerer Pfülsen Rieslaner Auslese	n.d.	n.d.	+	n.d.
68	2007 Sommeracher Katzenkopf Rieslaner Trockenbeerenauslese	n.d.	n.d.	+	+
69	2006 Abadia da Cova Barrica Ribeira Sacra	+	+	+	+
70	2006 Cuatro Pasos Mencia	+	+	+	+
71	2006 El Cayado Mencia	+	+	+	+
72	2005 Martin Sarmiento Mencia	3,39	3,60	1,11	+
73	2006 Aldonza Seleccion	6,69	+	+	+
74	2004 Buezo Varietales	3,13	4,09	+	+
75	2007 Ponte da Boga Mencia Ribeira Sacra	+	+	+	+
76	2005 Blatina Zadro	+	+	n.d.	n.d.
77	2007 Rondo Premium Regional vin fra Jylland	+	+	+	+
78	2007 Rondo Spezial Regional vin fra Jylland	+	+	0,92	+
79	2005 Saperavi Badagoni	+	+	+	+
80	2005 Mukuzani Badagoni	+	+	+	+
81	2005 Kakhethian Noble Badagoni	+	2,99	1,61	3,80
82	2005 Georgian Valleys Mukuzani	+	+	+	+
83	2006 Dingac Barrique	5,35	5,24	+	+
84	2007 Val Duna Pinot Noir	4,65	6,76	+	+
85	2007 Rotglut lieblich Mazedonien	+	n.d.	n.d.	n.d.
86	2007 Khvanchkara Badagoni	+	+	+	+
87	2007 Mosel Ürziger Würzgarten Riesling Auslese	n.d.	n.d.	+	+
88	2007 Horrheimer Klosterberg Riesling Auslese	n.d.	n.d.	+	+

Nr.	Wein	<i>trans</i> -Piceid [mg/L]	<i>cis</i> -Piceid [mg/L]	<i>trans</i> -RSV [mg/L]	<i>cis</i> -RSV [mg/L]
89	2007 Würzburger Stein Riesling Auslese	n.d.	n.d.	+	+
90	2002 Syrah Spanien Denominação de Origen Utiel Requena	+	n.d.	n.d.	n.d.
91	2007 La Misión Cabernet Sauvignon William Vèvre Chile D.O. Pirque- Maipo Valley	n.d.	n.d.	+	n.d.
92	2003 Monteiros DÃO D.O.C. Portugal	6,55	3,54	1,60	n.d.
93	2007 Cabernet Sauvignon/Merlot Wildcard Peter Lehmann South Australia	+	2,36	0,89	+
94	2004 Carmenère Chi Mú Valle Central Chile	3,82	+	1,24	+

+ Stilbengehalt > Nachweisgrenze, n.d. nicht detektierbar

Tabelle 7.8: TEAC-Werte und Gesamtstilbengehalt ausgewählter Weine

Wein-Nr.	TEAC ¹ [mmol Trolox/g]	Gesamtstilbengehalt ² [mg/L]
18	1,33	9,83
21	3,18	2,8
25	12,57	7,84
26	16,15	15,28
28	6,95	8,99
29	8,15	15,48
32	18,77	8,15
40	18,66	5,31
45	12,59	14,89
47	14,65	29,04
54	15,4	11,23
56	17,4	3,79
60	20,36	19,88
72	16,29	8,1
83	18,75	10,59
84	16,92	11,41
92	14,29	11,69
94	11,74	5,06

¹nach RE et al. (1999), ²*cis*-/*trans*-Resveratrol- und *cis*-/*trans*-Piceid-Konzentration

Tabelle 7.9: Parameter für die Quantifizierung des Stilbengehaltes im Wein mittels HPLC-PDA

Standardsubstanz	Konzentration [mg/L]	Peakfläche [μV.min]	Funktion und Grenzen*
<i>trans</i> -Resveratrol	0,104	13,8	$y = 276,55476x - 23,44739$
	1,044	268,0	$R^2 = 0,999$
	2,088	549,8	
	10,440	2849,5	Nachweisgrenze = 0,165 mg/L
	20,880	5758,4	Bestimmungsgrenze = 0,627 mg/L
<i>trans</i> -Piceid	0,532	37,6	$y = 132,20988x - 9,651746$
	1,064	134,9	$R^2 = 0,999$
	2,128	270,8	
	5,32	716,4	Nachweisgrenze = 0,573 mg/L
	42,56	5614,6	Bestimmungsgrenze = 2,169 mg/L
<i>cis</i> -Resveratrol	0,685	25,0	$y = 46,51861x - 8,445524$
	1,342	59,7	$R^2 = 0,999$
	6,787	298,7	
	13,008	595,2	Nachweisgrenze = 0,588 mg/L
	24,406	1129,7	Bestimmungsgrenze = 2,154 mg/L
<i>cis</i> -Piceid	0,542	27,7	$y = 56,43273x - 4,87317$
	0,909	52,0	$R^2 = 0,999$
	1,949	96,5	
	18,499	1041,5	Nachweisgrenze = 0,467 mg/L
	25,052	1407,5	Bestimmungsgrenze = 1,743 mg/L

* Berechnung der Grenzen mit DINTEST nach DIN 32645 (vergl. Abschnitt 5.7)

