

### 3 Zusammenfassung der Wissenschaftlichen Arbeit

#### 3.1 Sekundäre Inhaltsstoffe von Rhabarber

Bereits vor 4000 Jahren wurde der Rhabarber in China als Heilpflanze genutzt, um aus den Inhaltsstoffen der Wurzel ein Arzneimittel gegen Obstipationen herzustellen. Die laxierenden Wirkstoffe waren hierbei insbesondere die Anthracenderivate, welche in hohen Konzentrationen im Medizinalrhabarber (*Rheum officinale*) vorkommen.

Der Rhabarber gehört zur Familie der Knöterichgewächse (*Polygonaceae*). Generell gibt es neben dem bereits erwähnten Medizinalrhabarber ca. 50 weitere Arten, welche allesamt dem Genus *Rheum* zuzuordnen sind. Tab. 1 soll einen Überblick über die am häufigsten erwähnten Arten und deren Ursprung geben (Chin *et al.*, 1947; Matsuda *et al.*, 2001).

**Tab. 1** Überblick über ausgewählte Arten der Gattung *Rheum* und deren Ursprung (Chin *et al.*, 1947, Matsuda *et al.*, 2001)

Rheum-Art	Ursprungsort
<i>Rheum palmatum</i> (Handlappiger Rhabarber)	Nordosttibet, Nordwestchina
<i>Rheum officinale</i> (Medizinalrhabarber)	Südosttibet, Südwestchina, Burma
<i>Rheum rhaponticum</i> (Sibirischer Rhabarber)	Südsibirien
<i>Rheum rhabarbarum</i> (Wellblattrhabarber)	Nordwestchina, Mongolei
<i>Rheum emodi</i> (Emodi-Rhabarber)	Himalaya, Indien
<i>Rheum noblie</i>	Himalaya
<i>Rheum wittrockii</i>	Gebirgsrhabarber
<i>Rheum undulatum</i>	Korea

Die Mehrheit der in den Gärten Europas kultivierten Rhabarberpflanzen gehören zur Art *R. rhaponticum*. Allerdings neigt die Gattung *Rheum* sehr stark zur Bastardisierung, so dass unter dem Begriff „Gartenrhabarber“ sich häufig Kreuzungen zwischen *R. rhaponticum* und *R. rhabarbarum* verbergen (Schratz *et al.*, 1960). In vergangenen Arbeiten wurden hauptsächlich die Inhaltsstoffe der Wurzel aus *R. officinale*, *R. palmatum*, *R. undulatum* und *R. emodi* untersucht (Blundstone *et al.*, 1967; Krenn *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005). Der in Europa zur Zubereitung von Speisen genutzte Gartenrhabarber wurde bisher nur selten bezüglich seiner Inhaltstoffe charakterisiert. Demzufolge soll zunächst ein Überblick darüber gegeben werden, welche Substanzen bereits aus den verschiedenen Pflanzenteilen der unterschiedlichen Arten isoliert und hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt wurden.

Bisher wurden folgende Derivate von Polyphenolen im Rhabarber gefunden: Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyzimtsäuren, Chromone und Chromanone, Naphthalene, Anthracene, Stilbene und Flavonoide (Auronole, Flavone, Flavonole, Flavanole, Anthocyanidine und Tannine).

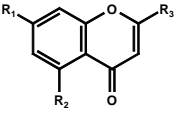
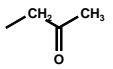
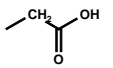
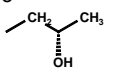
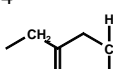
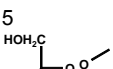
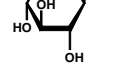

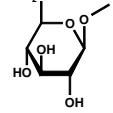
#### *Phenolcarbonsäuren*

Innerhalb der Klasse der Phenolcarbonsäuren (Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren) wurden folgende Substanzen aus der Wurzel von *R. palmatum*, *R. rhaponticum* und *R. undulatum* identifiziert: Ellagsäure, Chlorogensäure, Protocatechussäure, Homoprotocatechussäure, Kaffeesäure, *p*-Coumarsäure, Syringasäure, Vanillinsäure, Ferulasäure und *p*-Hydroxybenzoesäure (Medynska *et al.*, 2005). In der Wurzel von *Rheum officinale* konnten Gallussäure, *p*-Coumarsäure und Zimtsäure nachgewiesen werden (Friedrich *et al.*, 1966; Cai *et al.*, 2004). In den Stängeln von *R. undulatum* und *R. rhaponticum* wurden bisher folgende Phenolcarbonsäuren identifiziert: Ellagsäure, Gallussäure, Protocatechussäure, Homoprotocatechussäure, Kaffeesäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, *p*-Coumarsäure, Syringasäure, Vanillinsäure und Ferulasäure (Smolarz *et al.*, 2005). Von den hier bereits beschriebenen Hydroxyzimtsäuren wurden auch die Derivate, welche mit Glucose verestert sind, erhalten. Hierzu können die folgenden Verbindungen, isoliert aus den Stängeln von *R. rhaponticum*, genannt werden: Feruloylglucose, Sinaoylglucose und *p*-Coumarylglucose (Blundstone *et al.*, 1970). Weiterhin wurde Galloylsucrose, Hydroxycinnamoylglucose und Galloylglucose in der Wurzel vom Medizinalrhabarber identifiziert (Kashiwada *et al.*, 1986, 1988).

#### *Chromon- und Chromanonderivate*

In die Polyphenolklasse der Chromon- und Chromanonderivate konnten bisher ebenfalls zahlreiche Substanzen eingeordnet werden. Tab. 2 gibt hierzu eine Übersicht (Kashiwada *et al.*, 1984, 1990). Die aufgezählten Verbindungen wurden nach Aufarbeitung der Wurzel des Medizinalrhabarbers erhalten.

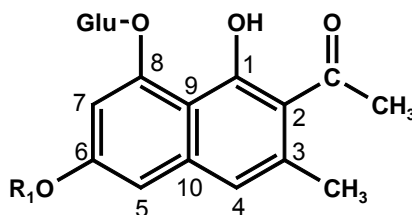
**Tab. 2** Chromon- und Chromanonderivate isoliert aus der Wurzel des Medizinalrhabarbers

Struktur	Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Substituenten
	2,5-Dimethyl-7-hydroxychromon	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1 
	2-Methyl-5-acetyl-7-hydroxychromon	OH	1	CH <sub>3</sub>	2 
	2-Methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxychromon	OH	2	CH <sub>3</sub>	3 
	2 <i>S</i> -2-(2'-Hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromon	OH	CH <sub>3</sub>	2	4 
	2 <i>S</i> -2-(2'-Hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromon-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranosid	5	CH <sub>3</sub>	2	5 
	Aleoson-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranosid	5	CH <sub>3</sub>	1	6 
	2-Methyl-5-(2-oxo-4'-hydroxypentyl)-7-hydroxychromon-7- <i>O</i> -β-D-glucopyranosid*	5	4	CH <sub>3</sub>	7 
Chromanone	2 <i>S</i> -2-Methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxychromanone	OH	2	-	8 

\*Die absolute Konfiguration des chiralen Kohlenstoffatoms konnte bisher nicht ermittelt werden

### Naphthalenglycoside

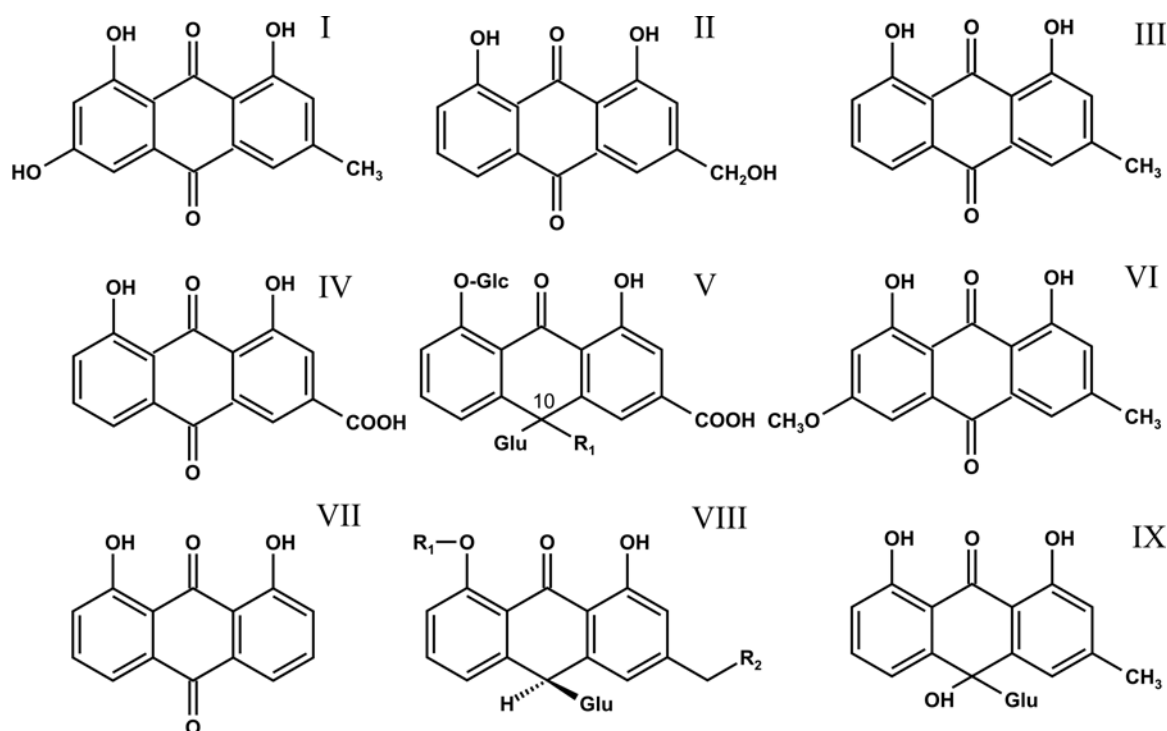
Aus der Wurzel des Medizinalrhabarbers wurden auch Naphthalenglycoside gewonnen (Tsuboi *et al.*, 1977). Das Grundgerüst dieser Substanzen ist in Abb. 2 dargestellt. Ermittelt wurden die Strukturen von 6-Hydroxymusizin-8-*O*-β-D-glucopyranosid (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H), Torachryson-8-*C*-β-D-glucopyranosid (R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H) und Torachryson-8-*C*-β-D-(6'-*O*-oxalyl)-glucopyranosid (R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = CO-COOH).

**Abb. 2** Grundstruktur der Naphthalenderivate

### Anthracenderivate

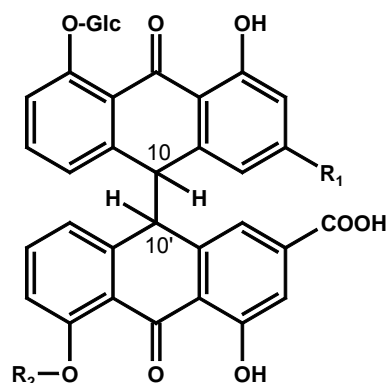
Ebenfalls aus der Wurzel des Rhabarbers wurden zahlreiche Anthracenderivate, zu denen auch die Anthrachinone zählen, hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt. Aus *R. undulatum* wurden die folgenden Substanzen erhalten: Chrysophanol, Chrysophanol-8-*C*-β-D-(6''-galloyl)-glucopyranosid, Chrysophanol-1-*O*-β-D-glucopyranosid, Chrysophanol-8-*O*-β-D-glucopyranosid, Aloe-emodin, Aloe-emodin-1-*O*-β-D-glucopyranosid, Aloe-emodin-8-*O*-β-D-glucopyranosid, Emodin, Emodin-8-*O*-β-D-glucopyranosid, Rhein, Rhein-8-*O*-β-D-gluco-

pyranosid, Physcion und Physcion-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (Matsuda *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2005, Komatsu *et al.*, 2006). Smolarz *et al.* (2005) hat Emodin ebenfalls in *R. rhaponticum* und *R. undulatum* nachgewiesen. Physcion wurde neben Emodin und Chrysophanol von Tuson *et al.* (2003) im Türkischen Rhabarber (*Rheum ribes*) identifiziert. Danthron wurde neben Emodin, Aloe-emodin, Chrysophanol, Rhein und Physcion in der Wurzel von *R. palmatum* aufgefunden (Huang *et al.*, 2006). Auch die Rheinoside A bis D lassen sich in der Wurzel des Medizinalrhabarbers nachweisen (Yamagishi *et al.*, 1987). Die Rheinoside A und B ( $R_1 = OH$ ) unterschieden sich wie die Rheinoside C und D ( $R_1 = H$ ) am C<sub>10</sub>-Kohlenstoff hinsichtlich der absoluten Konfiguration. In der Wurzel von *R. emodi* konnten zusätzlich folgende Substanzen nachgewiesen werden: Emodin-8-*O*- $\beta$ -D-gentiobiosid, Chrysophanol-8-*O*- $\beta$ -D-gentiobiosid, Physcion-8-*O*- $\beta$ -D-gentiobiosid, Sulfemodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Rhein-11-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Cascaroside A-D und Cassialoin (Krenn *et al.*, 2003, 2004). Die Grundstrukturen der bis hierher aufgezählten Anthracenderivate sind in Abb. 3 dargelegt.



**Abb. 3** Grundstrukturen der Anthracenderivate (I – Emodin; II – Aloe-Emodin; III – Chrysophanol; IV – Rhein; V – Rheinosid; VI – Physcion; VII – Danthron; VIII – Cascarosid A-D, A & B:  $R_1 = Glu$ ,  $R_2 = OH$ , C & D:  $R_1 = Glu$ ,  $R_2 = H$ ; IX - Cassialoin)

Dianthrone, zu denen die Sennoside gehören, wurden in ganz unterschiedlichen Rhabarberpflanzen hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt. Die Sennoside A bis F wurden in der Wurzel von *R. officinale* nachgewiesen (Oshio *et al.*, 1974; Komatsu *et al.*, 2006). In *Rheum palmatum* konnten wiederum nur die Sennoside A bis C identifiziert werden (Zwaving *et al.*, 1965). Dianthrone entstehen durch C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>-Bindungsknüpfung von zwei Anthrachinonen. Die Grundstruktur der Sennoside A und B ist in Abb. 4 dargestellt.



**Abb. 4** Sennoside A (10, 10'-*erythro*) und Sennoside B (10, 10'-*threo*), R<sub>1</sub> = COOH, R<sub>2</sub>=Glu (Komatsu *et al.*, 2006)

Die Sennoside C und D unterscheiden sich von der A- und B-Form durch eine CH<sub>2</sub>OH-Funktion an Position R<sub>1</sub>. Im Unterschied zum Sennosid A und B zeigen die Sennoside E und F an Position R<sub>2</sub> anstelle der Glucose die Glucuronsäure auf. Kuo *et al.* hatte 2003 auch die nichtglycosilierte Formen der Sennoside, welche als Sennidine bezeichnet werden, im Medizinalrhabarber nachgewiesen.

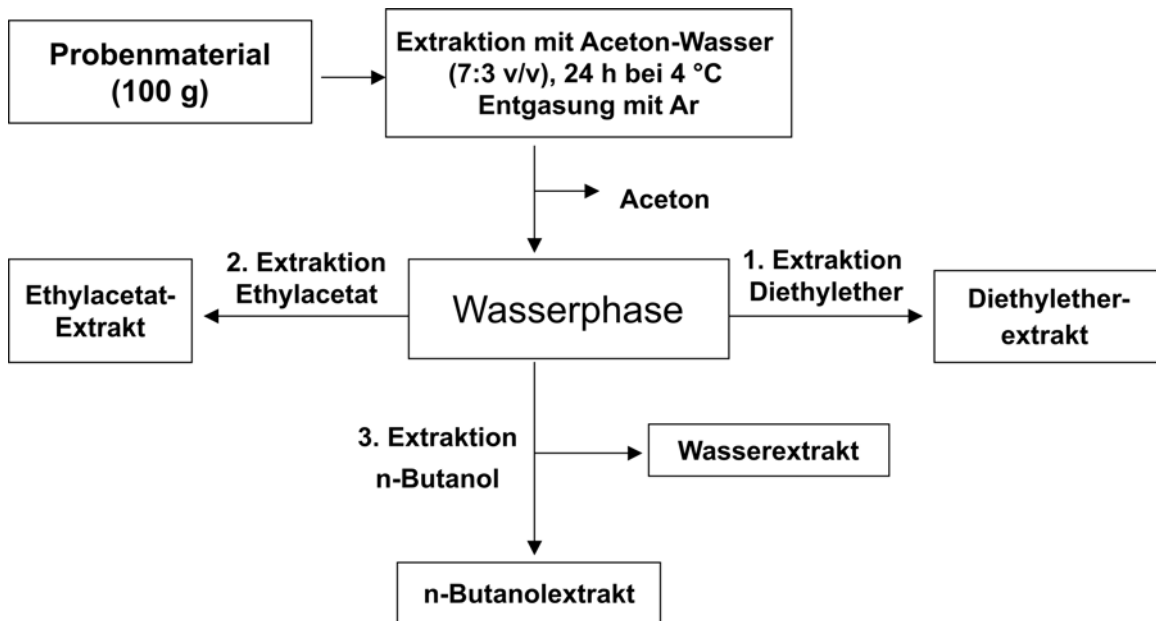
### Stilbene

Die bisher bekannten Stilbene des Rhabarbers sind hauptsächlich aus der Wurzel der Pflanze isoliert worden. Die identifizierten Substanzen bestehen alle aus einem C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Grundkörper, dem Stilben. Aus diesem Grund sind stets 2 mögliche Isomere zu erwarten. Grundsätzlich wurden die meisten Stilbenderivate aus der Wurzel des Chinesischen Rhabarbers (*Rheum officinale*) von Kashiwada *et. al.* (1986, 1988, 1989) und Nonaka *et al.* (1977) charakterisiert. Hierzu zählen die folgenden Verbindungen: 3,4',5-Trihydroxystilbene (Resveratrol), 3,4',5-Trihydroxystilben-4'-O-β-D-(6''-O-galloyl)-glucopyranosid, *cis*-3,3',5-Trihydroxy-4'-methoxystilben-3-O-β-D-glucopyranosid (Rhaponticin), *cis*-3,3',5-Trihydroxy-4'-methoxystilben-3-O-β-D-(6''-O-galloyl)-glucopyranosid, *cis*-3,5-Dihydroxy-4'-methoxystilben-3-O-β-D-glucopyranosid (Desoxyrhaponticin), *cis*-3,3',5-Trihydroxy-4'-methoxystilben (Rhapontigenin), Resveratrol-4'-O-β-D-glucopyranosid, Resveratrol-4'-O-β-D-(6''-O-

galloyl)-glucopyranosid, Resveratrol-4'-*O*- $\beta$ -D-(2''-*O*-galloyl)-glucopyranosid, Rhaponticin-2''-*O*-gallat, Rhaponticin-2''-*O*-*p*-coumarat, Desoxyrhaponticin-6''-*O*-gallat, Rhapontigenin-3'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Piceatannol, Piceatannol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Piceatannol-3'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Piceatannol-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Piceatannol-3'-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosid, Piceatannol-3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloyl)-glucopyranosid und Piceatannol-4'-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloyl)-glucopyranosid. Weiterhin wurden Stilbenderivate aus der Wurzel von *Rheum undulatum* L. (syn. *R. rhabarbarum*) isoliert. Hierbei wurden die folgenden Strukturen identifiziert: Rhaponticin, Rhaponticin-2''-*O*-gallat, Rhaponticin-6''-*O*-gallat, Desoxyrhaponticin, Isorhaponticin, Isorhapontigenin, Rhapontigenin, Desoxyrhapontigenin, Resveratrol, Piceatannol, Piceatannol-3'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid und Piceatannol-3,4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (Matsuda *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2005; Ko, 2000). Komatsu *et al.* (2006) isolierte aus der Japanischen Rhabarberwurzel Resveratrol-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid und Resveratrol-4'-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloyl)-glucopyranosid. Stilbene, welche bisher explizit aus der Wurzel von *Rheum rhaponticum* isoliert wurden, sind Desoxyrhaponticin, Rhaponticin, Resveratrol, Resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Piceatannol-3'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Rhapontigenin, Desoxyrhapontigenin, (Banks *et al.*, 1971 ; Csupor, 1970 ; Rupprich *et al.*, 1980; Grazka, 1984 ; Aviksar *et al.*, 2003).

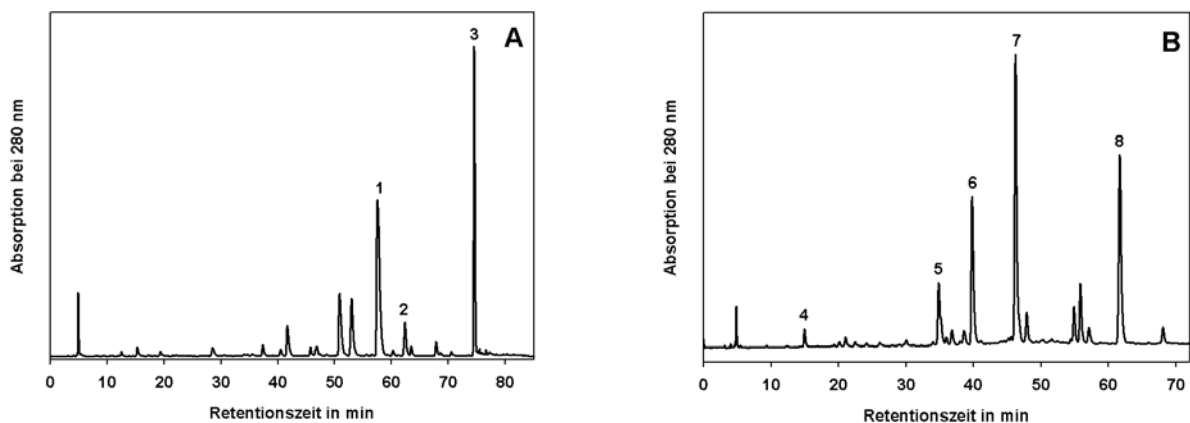
Die Stilbene sollten nun in der vorliegenden Arbeit erforscht werden. Einerseits, um weitere, neuartige Strukturen aus der Wurzel des Haushaltsrhabarbers zu identifizieren, andererseits um die bereits bekannten Strukturen von *Rheum rhaponticum* bzw. *Rheum rhabarbarum* erneut zu isolieren, da die vorliegenden Literaturstellen nur fragmenthafte Informationen zur Strukturaufklärung liefern. Bei den bereits aufgezählten Verbindungen ist in der Literatur kaum eine Angabe darüber vorhanden, ob es sich bei den Stilbenen jeweils um *cis*- oder *trans*- Verbindungen handelt.

Die Inhaltsstoffe der Rhabarberwurzel wurden zur Isolation der phenolischen Verbindungen nach der Gefriertrocknung zunächst auf verschiedene Extrakte aufgeteilt (Abb. 5).



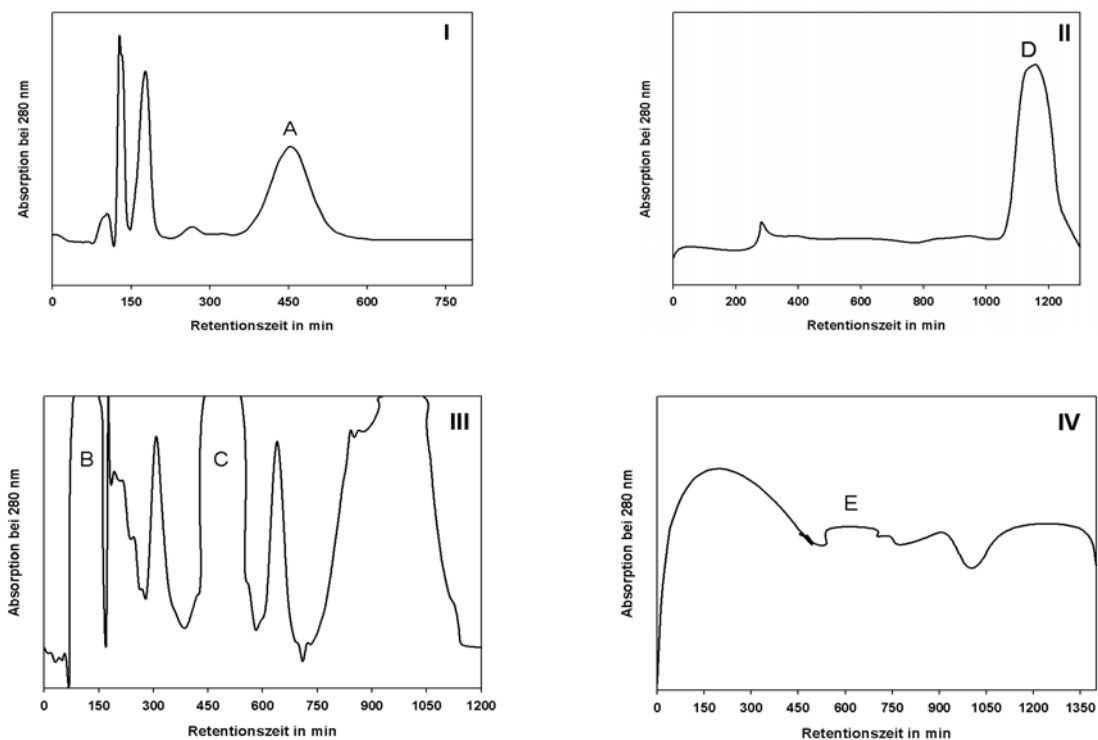
**Abb. 5** Aufarbeitungsschema des Pflanzenmaterials

Der resultierende Diethylether- und Ethylacetatextrakt wurde anschließend durch die analytische HPLC-DAD aufgetrennt. Abb. 6 zeigt die entsprechenden Chromatogramme (280 nm).



**Abb. 6** HPLC-DAD-Chromatogramm vom Diethyletherextrakt (A) und Ethylacetatextrakt (B) der Rhabarberwurzel. (1 – *trans*-Rhapontigenin (57,5 min); 2 – *cis*-Desoxyrhaponticin (62,4 min); 3 – *trans*-Desoxyrhapontigenin (74,5 min); 4 – (+)-Catechin (15,3 min); 5 – *trans*-Resveratrol-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (34,4 min); 6 – *trans*-Piceatannol-3'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (38,8 min); 7 – *trans*-Rhaponticin (46,2 min); 8 – *trans*-Desoxyrhaponticin (62,4 min).

Der erste präparative Auftrennungsschritt der Extrakte erfolgte mittels MLCCC, wobei jeweils die zurückbleibende stationäre Phase erneut mit einem veränderten Fließmittelsystem zur Trennung gegeben wurde. Die Detektion der phenolischen Substanzen erfolgte bei 280 nm. Die Chromatogramme des Diethylether- und Ethylacetatextraktes sind in Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 7** MLCCC-Chromatogramme nach Auftrennung des Diethyletherextraktes I&III und des Ethylacetatextraktes II&IV (III&IV stellt jeweils die Auftrennung der stationären Phase von I & II dar). **A** – *cis*-Desoxyrhaponticin, **B** – *trans*-Desoxyrhapontigenin, **C** – *trans*-Rhapontigenin, **D** – *trans*-Rhaponticin, *trans*-Resveratrol-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, *trans*-Piceatannol-3'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, (+)-Catechin, **E** – *trans*-Desoxyrhaponticin.

Die Signale A – E bestehen noch aus Gemischen mehrerer Verbindungen. Deshalb wurden sie durch die präparative HPLC-UV weiter aufgetrennt. Die reinen Substanzen wurden dann der Strukturaufklärung (NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , APT, HMQC, HMBC) und HR-MS) unterzogen. Tab. 3 gibt einen Überblick über die isolierten Stilbenderivate aus der Rhabarberwurzel. *Trans*-Resveratrol-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid und *cis*-Desoxyrhaponticin wurden erstmalig aus der Wurzel von *Rheum rhaponticum* isoliert. Weiterhin konnten die Strukturen der übrigen Stilbene hinsichtlich der Konfiguration manifestiert werden (Tab. A1 – A3).



**Tab. 3** Strukturübersicht der Stilbenderivate, isoliert aus der Wurzel von Gartenrhabarber

Diethyletherextrakt		Ethylacetatextrakt	
Substanzbezeichnung	Strukturen		Substanzbezeichnung
<i>trans</i> -Rhapontigenin <sup>1</sup>			<i>trans</i> -Resveratrol-4'- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid <sup>3</sup>
<i>trans</i> -Desoxyhapontigenin <sup>1</sup>			<i>trans</i> -Pieceatannol-3'- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid <sup>3</sup>
			<i>trans</i> -Rhaponticin <sup>4</sup>
<i>cis</i> -Desoxyrhaponticin <sup>2</sup>			<i>trans</i> -Desoxyrhaponticin <sup>4</sup>

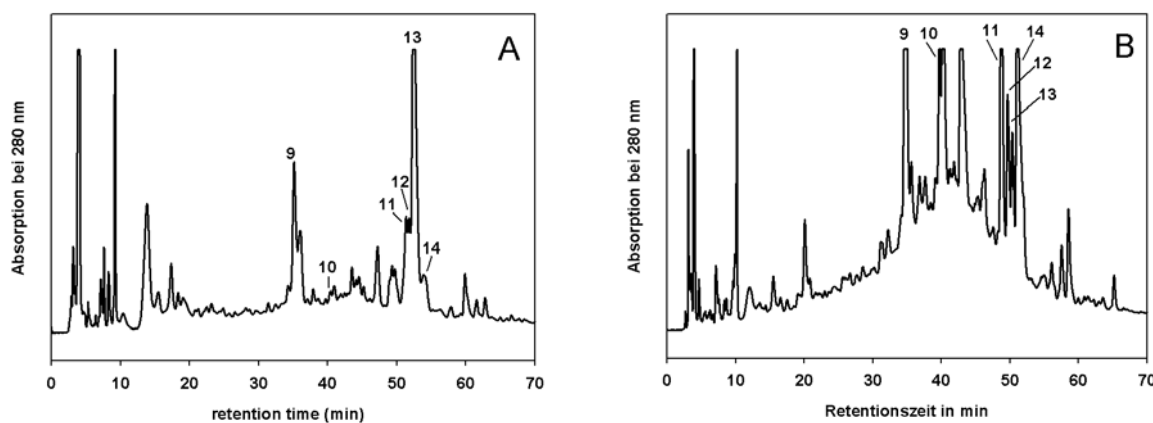
<sup>1</sup> NMR-Daten sind unter Tab. A1 angegeben; <sup>2</sup> NMR-Daten enthalten in 4.1; <sup>3</sup> NMR-Daten in Tab. A3; <sup>4</sup> NMR-Daten in Tab. A2

### Flavonoide

Die Flavonoide, welche bisher aus dem Rhabarber isoliert wurden, befanden sich mit Ausnahme der Flavan-3-ole alle in den Blättern und Stängeln des Rhabarbers. Aus den Blättern von *Rheum palmatum* wurden folgende Flavonoide identifiziert: Quercetin, Quercitrin, Hyperosid und Rutin (Fujita *et al.*, 1958). Tosun *et al.* (2003) konnte Quercetin, 5-Desoxyquercetin, Quercetin-3-*O*-rhamnosid, Quercetin-3-*O*-galactosid und Quercetin-3-*O*-rutinosid in den Stängeln eines türkischen Rhabarbers nachweisen. Auch *Rheum wittrocki*, welcher als Gebirgsrhabarber bezeichnet wird, ist auf Polyphenole untersucht worden (Alyukina *et al.*, 1977). Innerhalb dieser Arbeit konnte Quercetin, Rutin, Isoquercitrin und Quercetin-3,7-glucoarabinosid verifiziert werden. Aus den koreanischen Rhabarberblättern (die genaue botanische Bezeichnung liegt nicht vor) wurden folgende Komponenten erhalten: Vitexin (Apigenin-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid), Rutin und Kaempferol-3-*O*-(2,6-di-*O*-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (Ham *et al.*, 1994). Iwashina *et al.* (2004) hat Blätter der Rhabarberart *Rheum noblie* untersucht und dabei folgende Inhaltsstoffe herausgefunden: Quercetin-3-*O*-glucosid, Quercetin-3-*O*-galactosid, Quercetin-3-*O*-rutinosid und Quercetin-3-*O*-(6''-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)-glucosid.

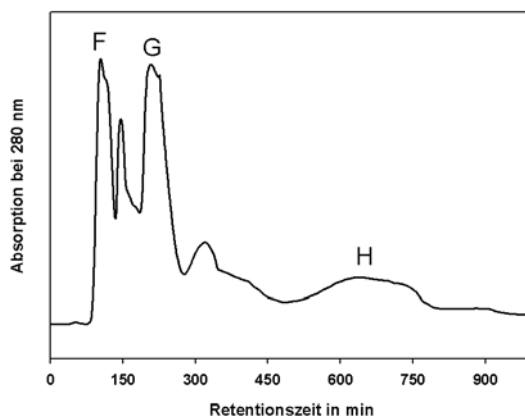
*Rheum rhaponticum* wurde hinsichtlich der Flavonoidkomponenten einzig von Blundstone *et al.* (1967) untersucht. Identifiziert wurden dabei Quercetin-3-*O*-glucosid, Quercetin-3-*O*-rhamnosid, Quercetin-3-*O*-rutinosid und Quercetin-4'-*O*-glucosid. Innerhalb dieser Arbeit sollten nun weitere Flavonoide des heimischen Rhabarbers identifiziert werden.

Hierzu wurden von den Blättern und Stängeln des Rhabarbers verschiedene Extrakte (Abb. 5) hergestellt und hinsichtlich der Inhaltsstoffe mittels analytischer HPLC-DAD untersucht. Der Diethyletherextrakt enthielt jeweils sehr wenig Substanzinhaltsstoffe. Das Substanzspektrum des *n*-Butanolextraktes war dem des Ethylacetatextraktes von Blatt und Stängel sehr ähnlich, wobei höhere Gehalte im *n*-Butanolextrakt der Blätter zu verzeichnen waren. Die HPLC-DAD-Chromatogramme vom *n*-Butanolextrakt der Blätter und Stängel sind in Abb. 8 dargestellt.



**Abb. 8** HPLC-DAD-Chromatogramm des *n*-Butanolextraktes der Stängel (A) und Blätter (B) bei  $\lambda = 280$  nm. (**9** – 6,8-Di-*C*- $\beta$ -D-glucosylapigenin (34,9 min); **10** – 6-*C*- $\beta$ -D-Glucosyl-8-*C*- $\beta$ -D-arabinosylapigenin (40,9 min); **11** – Isovitexin (48,9 min); **12** – 6-*C*- $\beta$ -D-Arabinosyl-8-*C*- $\beta$ -D-glucosylapigenin (49,1 min); **13** – Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucuronid (50,3 min); **14** – Rutin (51,4 min).

Die isolierten Substanzen befinden sich allesamt im Blatt- und Stänglextrakt, wobei die Gehalte der einzelnen Komponenten im Blattextrakt höher waren. Demzufolge wurde der *n*-Butanolextrakt der Blätter zur Substanzisolierung genutzt. Analog zur Aufarbeitung der Wurzel wurden auch die Blattextrakte zur Substanzisolierung durch die MLCCC aufgearbeitet. Das entsprechende MLCCC-Chromatogramm zeigt Abb. 9. Die einzelnen Signale F-H wurden mittels der präparativen-HPLC-UV weiter aufgereinigt.

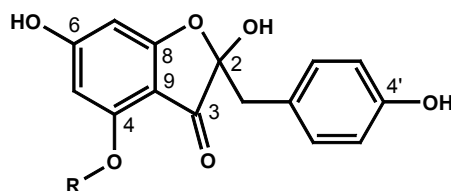


**Abb. 9** MLCCC-Chromatogramm vom *n*-Butanolextrakt der Blätter (**F** – 6,8-Di-*C*- $\beta$ -D-glucosylapigenin, 6-*C*- $\beta$ -D-Glucosyl-8-*C*- $\beta$ -D-arabinosylapigenin, 6-*C*- $\beta$ -D-Arabinosyl-8-*C*- $\beta$ -D-glucosylapigenin; **G** – Rutin; **H** – Isovitexin, Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucuronid).

Bis auf die Verbindung Rutin sind alle isolierten Substanzen erstmals aus den Blättern und Stängeln von *Rheum rhaponticum* isoliert und identifiziert worden. Diese Strukturen wurden noch nicht in anderen *Rheum*-Arten nachgewiesen. Die NMR-Daten der isolierten Substanzen befinden sich in Tab. A4 (Rutin) und unter 4.1.

Weitere Flavonoide, welche bereits aus den verschiedenen Rhabarberarten isoliert wurden, sind die Flavan-3-ole oder Catechinderivate, Anthocyanidine, Auronole und Tannine. Aus dem Bereich der Anthocyanidine wurden bisher nur zwei Verbindungen isoliert (Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-rutinosid). Diese wurden aus den Rhabarberstängeln von *Rheum rhaponticum* gewonnen und fungieren dort als rote Farbpigmente (Blundstone *et al.*, 1967; Hetmanski *et al.*, 1968). Allerdings ist davon auszugehen, dass die Cyanidine in allen Arten der Gattung *Rheum* vorkommen.

Krenn *et al.* (2003) hatte in *Rheum emodi* das Carpusin (R = CH<sub>3</sub>) und Maesopsin (R = H) entdeckt. Die Grundstruktur dieser beiden Auronole ist in Abb. 10 dargestellt.



**Abb. 10** Grundstruktur der Auronole

In zahlreichen Veröffentlichungen wird über das Vorhandensein von Catechinen und Catechinderivaten in ganz unterschiedlichen Rhabarberarten, meist in der Wurzel, berichtet (Nonaka *et al.*, 1983; Kashiwada *et al.*, 1986; Komatsu *et al.*, 2006, u.a.). Dabei wurden

innerhalb der Catechinderivate sowohl C-C-glycosidische Strukturen (z.B. (+)-Catechin-6-C- $\beta$ -D-glucoopyranosid) als auch C-O-glycosidische Substanzen (z.B. (+)-Catechin-5-O- $\beta$ -D-glucoopyranosid) identifiziert. Aufgrund der Vielzahl der beschriebenen Verbindungen soll hier nicht ins Detail gegangen werden. Auch innerhalb dieser Arbeit wurde das (+)-Catechin im Ethylacetatextrakt der Wurzel anhand von HR-MS und den verschiedenen NMR-Experimenten identifiziert (Abb. 6 & 7).

Eine weitere Substanzklasse der Flavonoide im Rhabarber stellen die Tannine dar. Diese Substanzklasse kann unterteilt werden in Gallotannine, Ellagitannine, komplexe Tannine und kondensierte Tannine (Khanbabae *et al.*, 2001). Prinzipiell sind Tannine in der Wurzel, aufgrund des Vorhandenseins von Gallussäure, Ellagsäure und zahlreichen anderen Catechinen, zu erwarten. Tatsächlich wurde in der Gattung *Rheum* eine Vielzahl von Gallotanninen und kondensierten Tanninen (Procyanidine) nachgewiesen, wobei auf einzelne Strukturen an dieser Stelle nicht weiter eingegangen wird (Kashiwada *et al.*, 1986; Nonaka *et al.*, 1981; u.a.).

## 3.2 Polyphenole aus *Aspalathus linearis*

### 3.2.1 Isolation und Strukturaufklärung

Der Rooibostee, welcher aus den Blättern und Blattstielen des *Aspalathus linearis* gewonnen wird, kann den Leguminosen zugeordnet werden. Von den rund 200 Arten der Gattung *Aspalathus*, welche alle in Südafrika vorkommen und das Aspalathin als wertgebenden Inhaltsstoff besitzen, kann einzig die Art *linearis* als genießbar bezeichnet werden. Dieser Tee wird im Handel in fermentierter und unfermentierter Form, aromatisiert oder pur angeboten. Alternativ wird der Rooibos auch als Rotbuschtee, Massaitee, Redbos, Buschmannstee oder Koopmans-Tea bezeichnet. Grundsätzlich verfügt dieses Lebensmittel über einen hohen Gehalt an Mineralstoffen und Spurenelementen (0,56 % Na; 0,20 % Ca; 0,33 % Fe; 0,33 % Mg; 0,99 % Al; 0,012 % Mn), ist koffeinfrei und besitzt außerdem einen sehr geringen Gehalt an Tanninen (Morton *et al.*, 1983). Diese Gerbstoffe bewirken die Herabsetzung der Resorption des Eisens im menschlichen Organismus. Einzig Catechin und Procyanidin B3 konnten bisher in geringen Mengen im Rooibos nachgewiesen werden (Bramati *et al.*, 2002). Weiterhin beinhaltet der Tee zahlreiche Flavonoide, wobei der hohe Gehalt an C-glycosidisch gebundenen Zuckern am Aglycon eine Besonderheit dieses Lebensmittels darstellt. Aufgrund der hochwertigen Inhaltsstoffe des Rooibos werden dem Tee auch zahlreiche gesundheitsfördernde Eigenschaften nachgesagt. Die antimutagene Wirkung der Teeinhaltsstoffe wurde bereits nachgewiesen (Marnewick *et al.*, 2000, Snijam *et al.*, 2007). Auch die antioxidative Wirkung des Teeextraktes konnte in vergangenen Arbeiten belegt werden (von Gandow *et al.*, 1997, McKay *et al.*, 2007).

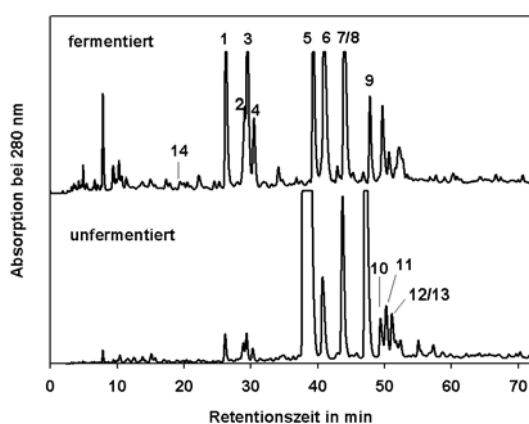
Erstmalig wurden die Inhaltsstoffe von *Aspalathus linearis* von Koeppen *et al.* (1962) untersucht. Hierbei wurden die Flavonoide Orientin, Isoorientin, Isoquercitrin und Rutin mittels Papierchromatographie, Massenspektrometrie, IR und UV nachgewiesen. Später wurden von ihm NMR-Daten zu den Substanzen Aspalathin, Orientin und Isoorientin veröffentlicht (Koeppen *et al.*, 1965). Die Verbindungen Quercetin and Luteolin wurden ebenfalls im Rooibostee identifiziert (Snyckers *et al.*, 1974).

Rabe *et al.* (2004) konnte weitere Inhaltsstoffe des Rooibos nachweisen. Hierbei handelte es sich um *p*-Hydroxybenzoesäure, Gallussäure, Protocatechussäure, Vanillinsäure, *p*-Coumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Chrysoeriol, Vitexin und Isovitexin. Die Substanzen Nothofagin, (*S*)- und (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -*D*-glucopyranosid, (+)-Catechin and Syringasäure wurden von Ferreira *et al.* (1995) und Marais *et al.* (2000) hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt.

Unabhängig von der Isolierung der Flavonoide wurden auch flüchtige Verbindungen bzw. Aromakomponenten, welche während der Teeextraktion entstehen, mittels GC-MS untersucht. Hierbei wurde eine Vielzahl von Substanzen (Alkohole, Aldehyde, Ketone, Lactone, Phenole, u.a.) identifiziert (Habu *et al.*, 1985; Kawakami *et al.*, 1993).

Grundsätzlich waren vor dem Beginn dieser Arbeit schon phenolische Inhaltsstoffe des Rooibos bekannt (Koeppen *et al.*, 1962, Koeppen *et al.*, 1965, Rabe *et al.*, 1994). Allerdings wurden NMR-Daten bzw. HR-MS-Daten dieser Verbindungen häufig sehr fragmenthaft angegeben. Ziel der Arbeit war es, neben den bereits bekannten Strukturen neuartige Substanzen zu isolieren. Als präparative Aufreinigungsmethode sollte die MLCCC erstmalig zur Isolation der Polyphenole aus dem Rooibos angewandt werden.

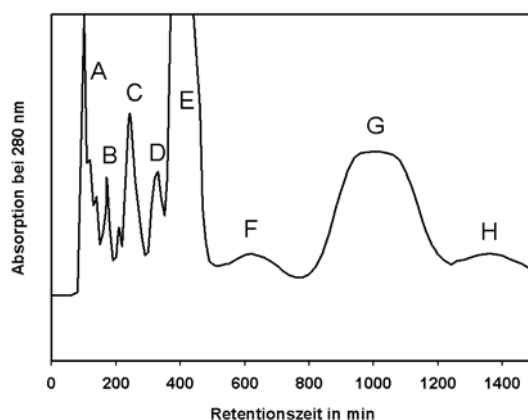
Die Inhaltsstoffe von unfermentierten (grünen) und fermentierten (rotbraunen) Rooibostee wurden zunächst auf verschiedene Extrakte (Diethylether-, Ethylacetat-, *n*-Butanol- und Wasserextrakt) aufgeteilt (Abb. 5). Der Diethyletherextrakt enthielt die Phenolcarbonsäuren sowie die reinen Aglycone. Die glycosilierten Flavonoide waren im Ethylacetat- und *n*-Butanolextrakt enthalten. Höhermolekulare Substanzen blieben im Wasserextrakt zurück. Die einzelnen Extrakte des fermentierten und unfermentierten Tees wurden durch analytische HPLC-DAD aufgetrennt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich die Inhaltsstoffe des Ethylacetatextraktes kaum von den Substanzen, welche im *n*-Butanolextrakt enthalten waren, unterschieden. Abb. 11 stellt ein Übersichtschromatogramm des Ethylacetatextraktes von fermentierten und unfermentierten Rooibostee dar.



**Abb. 11** HPLC-DAD-Chromatogramm des fermentierten und unfermentierten Ethylacetatextraktes bei  $\lambda = 280$  nm. **1** – (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (26,3 min); **2** – (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (29,1 min); **3** – (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (29,5 min); **4** – (*R*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (30,4 min); **5** – Aspalathin (39,4 min); **6** – Orientin (40,9 min); **7/8** – Isoorientin/ Vitexin (44,1 min); **9** – Nothofagin (47,8 min); **10** – Isovitexin (49,7 min); **11** – Rutin (50,6 min); **12** – Hyperosid (51,6 min); **13** – Isoquercitrin, (52,1 min) **14** – Chlorogensäure (19,3 min).

Hinsichtlich der Signalintensitäten der einzelnen Flavonoide wurden deutliche Unterschiede zwischen dem fermentierten und unfermentierten Tee festgestellt. Insbesondere der Gehalt der Dihydrochalcone wurde durch den Fermentationsprozess verringert, wobei die Signalintensitäten der Eriodictyole und Flavone (Orientin, Isoorientin, Vitexin und Isovitexin) deutlich angestiegen sind.

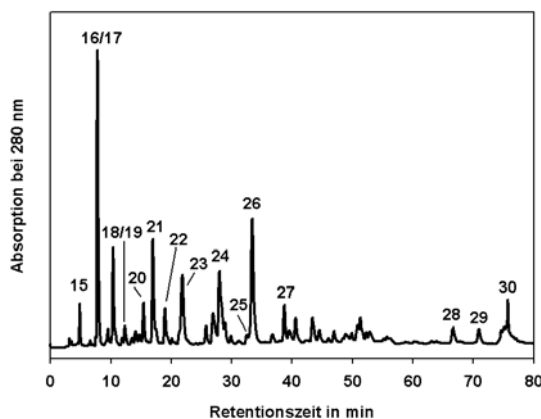
Zur Isolation der beschriebenen Verbindungen wurde der Ethylacetat- und *n*-Butanolextrakt des unfermentierten und fermentierten Tees eingesetzt. Der erste präparative Auftrennungsschritt der Teeextrakte erfolgte mittels MLCCC. In Abb. 12 ist ein solches Chromatogramm dargestellt, wobei der Ethylacetatextrakt des unfermentierten Rooibos aufgereinigt wurde.



**Abb. 12** MLCCC-Chromatogramm nach Auftrennung des Ethylacetatextraktes von unfermentiertem Rooibostee. (A – Flavonoidgemisch; B - (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glycopyranosid **2**; C – Chlorogensäure **14**, (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glycopyranosid **1**, (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glycopyranosid **3**, (*R*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glycopyranosid **4**, Rutin **11** (Tab. A 4); D - Isoorientin **7**; E - Aspalathin **5**; F - Orientin **6**, Vitexin **8**; G - Nothofagin **9**, Isovitexin **10**; H - Hyperosid **12**, Isoquercitrin **13**).

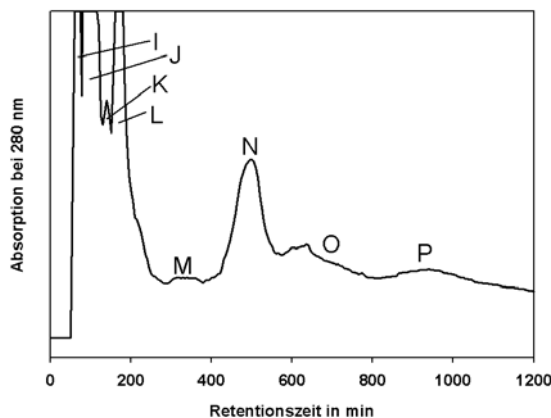
Nach der Auftrennung der einzelnen Signale B-H durch präparative HPLC-UV wurden reine Substanzen erhalten, deren Strukturen anhand von verschiedenen NMR-Experimenten ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , APT, HMBC, HMQC) und der HR-MS identifiziert wurden.

Die Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren wurden aus dem Diethyletherextrakt isoliert. Das Übersichtschromatogramm vom Diethyletherextrakt, woraus insgesamt 16 Substanzen hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt wurden, ist in Abb. 13 dargestellt.



**Abb. 13** HPLC-DAD-Chromatogramm des Diethyletherextraktes von unfermentierten Rooibos bei  $\lambda = 280$  nm. **15** - Gallussäure (4,9 min); **16** - Protocatechussäure (7,8 min); **17** - 3,5-Dihydroxybenzoesäure (7,8 min); **18** - Gentisinsäure (12,3 min); **19** - *p*-Hydroxybenzoesäure (12,3 min); **20** - (+)-Catechin (15,9 min); **21** - Vanillinsäure (17,0 min); **22** - Kaffeesäure (19,0 min); **23** - Syringasäure (21,9 min); **24** - *p*-Coumarsäure (28,0 min); **25** - Salicylsäure (32,7 min); **26** - Ferulasäure (33,4 min); **27** - Sinapinsäure (38,7 min); **28** - Quercetin (66,7 min); **29** - Luteolin (70,9 min); **30** - Chrysoeriol (75,7 min).

Analog zum Ethylacetatextrakt wurde auch hier die MLCCC zur Extrakttaufrennung genutzt (Abb. 14). Die Inhaltsstoffe der einzelnen Signale L-P wurden nach Derivatisierung mittels GC-MS weiter aufgetrennt und durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen identifiziert.



**Abb. 14** MLCCC-Chromatogramm vom Diethyletherextrakt ( $\lambda = 280$  nm). **I/J/K** - Substanzgemisch; **L** - Gallussäure **15**; **M** - Gentisinsäure **18**; **N** - Protocatechussäure **16**; **O** - Syringasäure **23**; **P** - Vanillinsäure **21**, Kaffeesäure **22**.

Die nach der MLCCC-Auftrennung des Diethyletherextraktes resultierende stationäre Phase wurde ebenfalls auf Polyphenole untersucht. Hierin befanden sich die hydrophoben Aglycone (Quercetin, Luteolin und Chrysoeriol) neben weiteren Phenolsäuren (3,5-Dihydroxybenzoesäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, *p*-Coumarsäure, Salicylsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure). Zum Nachweis dieser Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren wurde das



eingeeingte Extrakt der stationären Phase silyliert, durch GC-MS aufgetrennt und mit authentischen Standardsubstanzen verglichen. Zur Identifizierung der Aglycone wurde das Extrakt der stationären Phase durch präparative DC aufgetrennt, wobei nach Elution des Kieselgels aufkonzentrierte Fraktionen der drei Aglycone erhalten wurden. Nach Derivatisierung wurden diese Fraktionen am GC-MS weiter aufgetrennt und deren Strukturen anhand von Referenzsubstanzen identifiziert.

Folgende Substanzen wurden erstmalig aus dem Rooibostee isoliert: (*S*)- und (*R*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucoopyranosid, Hyperosid, Chlorogensäure, 3,5-Dihydroxybenzoesäure, Gallussäure, Salicylsäure, Sinapinsäure und Gentisinsäure. Durch die präparativen Auftrennungen der Extrakte durch die MLCCC wurden simultan verschiedene phenolische Strukturen aus den Extrakten des Rooibostees isoliert.

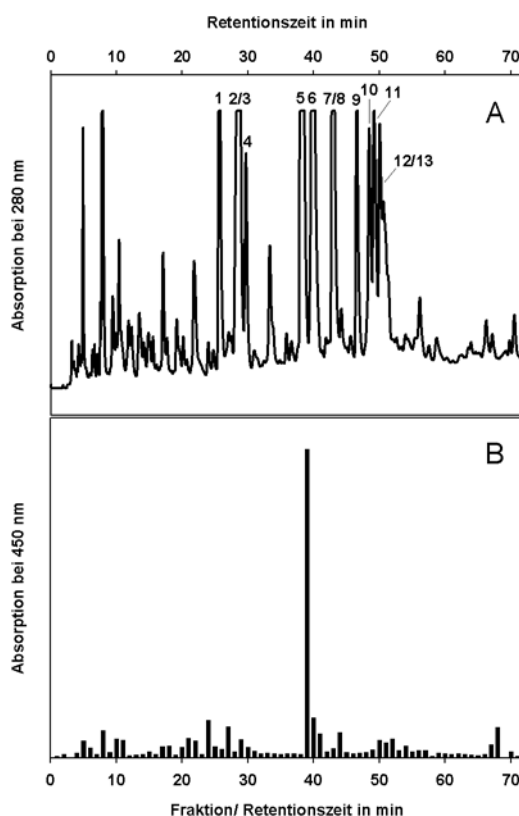
### 3.2.2 Reaktionen der Flavonoide

Während der Fermentation des Rooibostees wird die Zusammensetzung der Flavonoide verändert. Insbesondere die Dihydrochalcone des unfermentierten Tees werden abgebaut (Abb. 11). Gleichzeitig steigt während des Fermentationsprozesses der Gehalt an Flavanonen und Flavonen im Tee. In vorangegangenen Arbeiten wurde der Abbau der Dihydrochalcone untersucht. So wurde von Marais *et al.* die Reaktion von Aspalathin zu (*R*)- und (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucoopyranosid nachgewiesen (Marais *et al.*, 2000). Eine weitere Reaktion von Aspalathin wurde von Koeppen *et al.* beschrieben, wobei das Dihydrochalcon zu Phloroglucinol und Protocatechussäure abgebaut werden kann (Koeppen *et al.*, 1966).

Durch die Fermentation wird vor allem die Farbgebung des Tees verändert. So geht die eher grüne Erscheinung des unfermentierten Tees während der Fermentation verloren. Der wässrige Extrakt des fermentierten Tees erscheint rotbraun. Die bereits in der Literatur beschriebenen Folgeverbindungen sind aber nicht für diese Farbgebung verantwortlich, da diese im UV-Bereich ihr Absorptionsmaximum aufweisen. Aus diesem Grund sollte den Folgereaktionen der Dihydrochalcone am Beispiel von Aspalathin nachgegangen werden.

Bräunungsreaktionen von Polyphenolen sind im Tee (*Camellia sinensis*) bekannt. Die typischen Komponenten der grünen, unfermentierten Form sind hierbei die Catechine. Diese werden während der Fermentation durch das Enzym PPO abgebaut, wobei als Folgeprodukte Bisflavanole, Theaflavine, Thearubigene und andere Oligomere entstehen. Mit Ausnahme der Bisflavanole weisen diese Verbindungen eine rotbraune Farbe auf (Harold *et al.*, 1992).

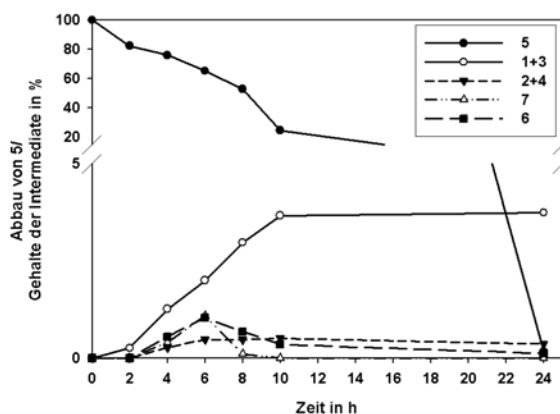
Zur näheren Charakterisierung der Bräunungsreaktion des Rooibos wurden zunächst vom Ethylacetatextrakt des fermentierten Tees nach Auftrennung mittels analytischer HPLC-DAD Fraktionen gesammelt. Diese wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h photometrisch bei 450 nm vermessen. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum der Bräunungsprodukte nach Aspalathininkubation. Somit konnten die an der Bräunungsreaktion beteiligten Verbindungen ermittelt werden. In Abb. 15 ist das Resultat dieses Experiments dargelegt.



**Abb. 15** A: HPLC-DAD Chromatogramm des Ethylacetatextraktes vom fermentierten Rooibostee bei  $\lambda = 280$  nm. **1** - (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (26,3 min); **2** - (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (29,1 min); **3** - (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (29,5 min); **4** - (*R*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (30,4 min); **5** - Aspalathin (39,4 min); **6** - Orientin (40,9 min); **7/8** - Isoorientin/Vitexin (44,1 min); **9** - Nothofagin (47,8 min); **10** - Isovitexin (49,7 min); **11** - Rutin (50,6 min); **12** - Hyperosid (51,6 min); **13** - Isoquercitrin (52,1 min). B: Absorption der Fraktionen bei 450 nm.

Die Beteiligung von Aspalathin an der Teebräunung konnte durch diesen Versuch eindeutig nachgewiesen werden. Aufgrund dessen wurde das isolierte Aspalathin einzeln inkubiert (48 h). Nach definierten Zeitabständen wurden jeweils Proben dieser Lösung durch HPLC-DAD aufgetrennt. Dabei wurde festgestellt, dass simultan mit der Abnahme der Konzentration des Aspalathins die Signalintensitäten der Eriodictyole zunächst angestiegen sind; zusätzlich wurden Orientin und Isoorientin gebildet. Letztendlich war aber keines dieser

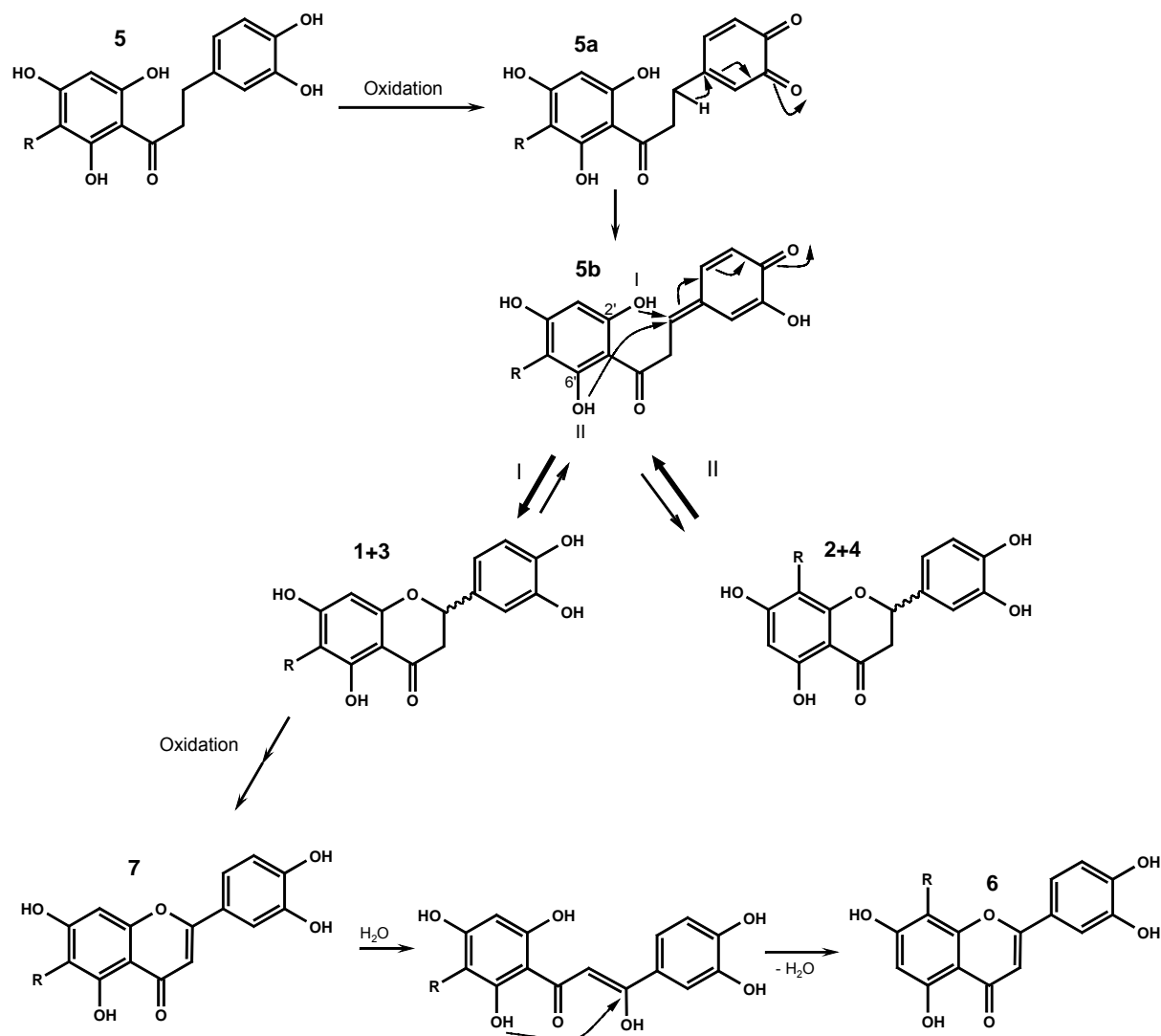
Intermediate nach 24 h mehr nachweisbar, da sie offensichtlich zu höhermolekularen Strukturen reagierten (Abb.16).



**Abb. 16** Abbau des Aspalathins **5** zu (*R*)/(*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid **1+3**, (*R*)/(*S*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid **2+4**, Orientin **6** und Isoorientin **7**. (Die Gehalte der Folgeprodukte wurden prozentual auf die Ausgangskonzentration des Aspalathins umgerechnet).

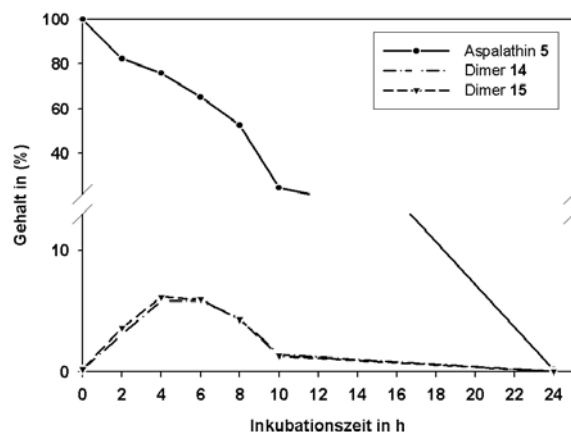
Um den tatsächlichen Reaktionsmechanismus von Aspalathin aufzuklären, wurden mit allen an dieser Reaktion beteiligten Intermediate Einzelinkubationen durchgeführt. Die Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glycoside **2+4** zeigten nach Inkubation Signale der Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glycoside **1+3**, wohingegen die Substanzen **1+3** zu Isoorientin **7**, neben sehr geringen Mengen an Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glycosiden **2+4** reagierten. Isoorientin **7** lagerte sich zu Orientin **6** um. Diese Reaktion wird auch als Wessely-Moser-Umlagerung bezeichnet (Koeppen *et al.*, 1965). Die Halbwertszeiten der beiden Flavon-*C*-glycosidischen Verbindungen betragen 135 h (Isoorientin) und 208 h (Orientin). Der erste Schritt der Reaktion von Aspalathin zu den Eriodictyolen erfolgt durch Oxidation dieses Dihydrochalcon zum Chinon. Dieses Chinon wird über die Chinomethid-Struktur auf zwei unterschiedlichen Wegen zu den Eriodictyolen umgelagert. Einerseits kann die OH-Funktion an Position 6' des A-Rings mit der  $\beta$ -Position des Chinomethids zum (*S*)- oder (*R*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid reagieren. Andererseits ist diese Reaktion mit der 2'-Position des A-Rings möglich, wobei hier das (*S*)- oder (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid bildet. Der zuletzt beschriebene Reaktionsweg scheint der bevorzugte Bildungsweg zu sein, da das Verhältnis der Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranoside zu den Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosiden 10:1 beträgt. Weiterhin wurde bei der Inkubation der Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranoside eine fast vollständige Umlagerung zu den Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosiden beobachtet. Während der Inkubation der Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranoside erfolgte die Reaktion zum Orientin **6**,

wobei nur sehr geringe Mengen an Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosiden gebildet wurden. Das Reaktionsschema des Abbaus von Aspalathin ist in Abb. 17 dargestellt.



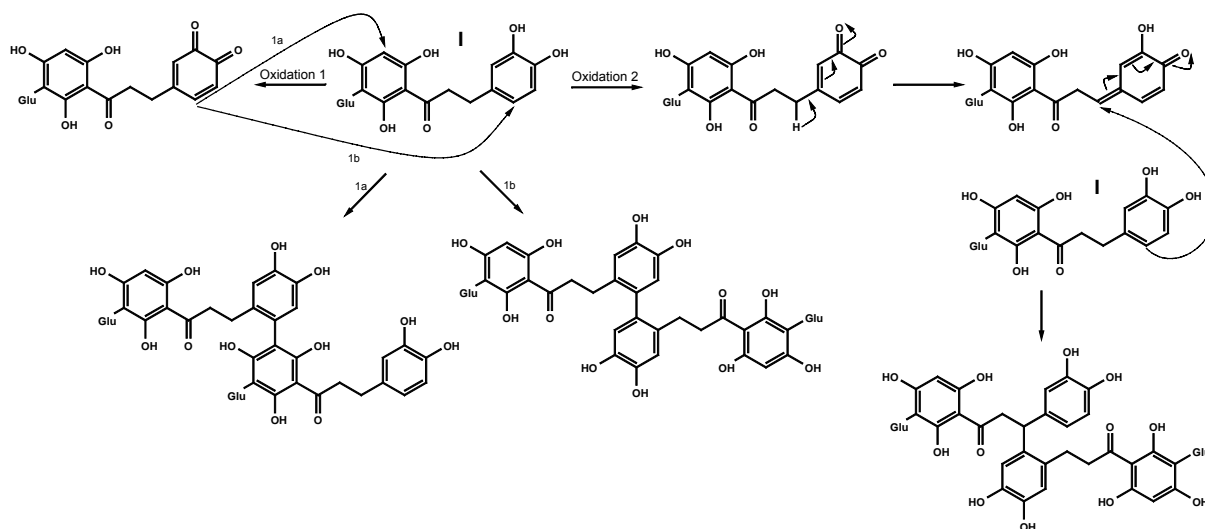
**Abb. 17** Oxidativer Abbau des Aspalathins **5** zu Orientin **6** und Isoorientin **7**. Die Eriodictyole **1-4** (**1**-(*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid, **2**-(*S*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid, **3**-(*R*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid, **4**-(*R*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid) sind die Schlüsselintermediate der Reaktion (R = Glucose).

Allerdings kann der in Abb. 17 dargestellte Mechanismus nicht der einzige Reaktionsweg des Aspalathins sein, da die Verbindungen **1-7** kein Absorptionsmaximum bei 450 nm besitzen. Demzufolge wurde den Signalen, welche während der Inkubation von Aspalathin zusätzlich in der HPLC aufgetreten sind, besondere Beachtung geschenkt. Hinsichtlich der Bräunungsreaktion des Aspalathins wurden zunächst zwei weitere Folgeprodukte während der Inkubation beobachtet. Diese beiden Signale entstanden im Verhältnis 1:1, wobei das Maximum dieser Substanzen während der Inkubation bei etwa 5 h lag (Abb. 18). Nach 24 h waren alle an der Reaktion beteiligten Verbindungen zu offensichtlich höhermolekularen Verbindungen übergegangen, welche ein Absorptionsmaximum bei 450 nm besitzen.



**Abb.18** Inkubation von Aspalathin über einem Zeitraum von 24 h. Die prozentualen Gehalte der Folgeprodukte wurden bezogen auf die Ausgangskonzentration des Aspalathins berechnet.

Zunächst sollten die Strukturen der beiden Signale **14+15** identifiziert werden. Nach Auftrennung an der analytischen HPLC-DAD wurden diese jeweils massenspektrometrisch detektiert. Hierbei wurde festgestellt, dass die Substanzen **14+15** über denselben Molekülpeak ( $m/z$  925  $[M+Na]^+$ ) verfügen und identische Absorptionsmaxima besitzen ( $\lambda_{\max} = 285$  nm). Vermutet wurde hinter diesen beiden Signalen Dimere des Aspalathins, deren Bildung prinzipiell auf drei unterschiedlichen Wegen möglich ist. In Abb. 19 sind die möglichen Mechanismen der ersten Stufe der Bräunungsreaktion aufgezeigt.



**Abb. 19** Mögliche Reaktionsmechanismen zur Dimerbildung von Aspalathin (I).

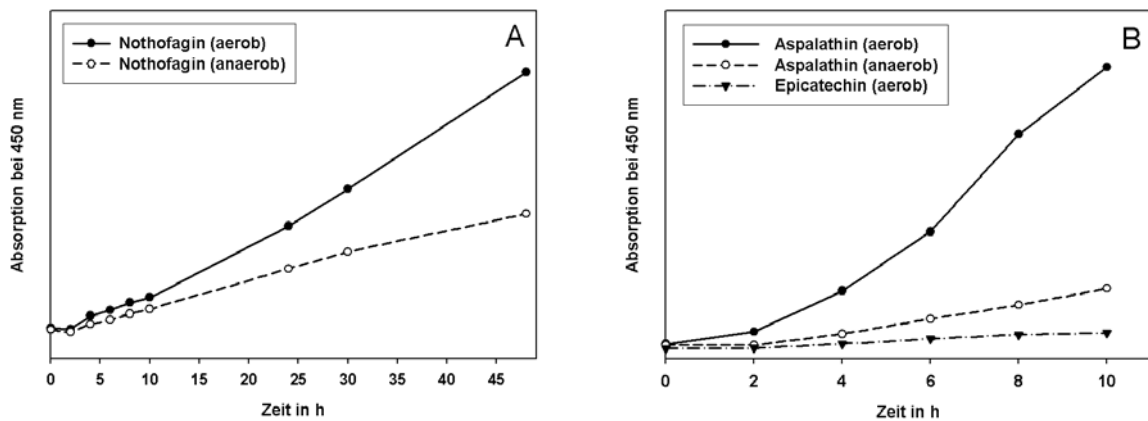
Zur Isolation der beiden Substanzen **14+15** wurde nach Inkubation von Aspalathin die Reaktion durch Säurezusatz abgestoppt. Dieser Inkubationsansatz wurde zur Isolation der beiden Dimere mittels präparativer HPLC-UV aufgetrennt. Die hochauflösenden

Massenspektren bestätigten die vermuteten Strukturen (Dimer 1:  $m/z$  925,2374  $[M+Na]^+$ ; Dimer 2:  $m/z$  925,2380  $[M+Na]^+$ ;  $m/z$  925,2373 berechnet für  $C_{42}H_{46}O_{22}Na$ ). Allerdings konnte bisher noch nicht verifiziert werden, welches der drei möglichen Dimere dem Signal **14** oder **15** entspricht. Hierfür ist eine weitere Isolierung der Strukturen nötig, um ausreichend Substanz für die NMR zu erhalten. Dennoch stellen beiden Substanzen **14+15** wichtige Intermediate auf dem Weg des Aspalathins zu den braunen Strukturen dar. Auch die Folgeverbindungen der Dimere wurden bisher noch nicht näher charakterisiert.

Die bisher beschriebenen Reaktionen des Aspalathins sind ebenfalls für Nothofagin, ein weiteres Dihydrochalcon welches aus dem Rooibos isoliert wurde, zu erwarten. Nothofagin wird demnach während der Fermentation zu Vitexin und Isovitexin über die Flavanone (*R*)- und (*S*)-Naringenin-6-*C*- $\beta$ -D-glucosid und (*R*)- und (*S*)-Naringenin-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid abgebaut. Die Konzentration des Nothofagins im Tee ist geringer im Vergleich zum Aspalathin, zudem ist die Tendenz zur Oxidation durch die fehlende Katecholgruppe am B-Ring wesentlich schwächer. Dies zeigt sich auch in dem nur geringen Unterschied von 2:1 im unfermentierten und fermentierten Ethylacetatextrakt. Deshalb ließen sich auch die korrespondierenden Flavanone des Nothofagins nur in sehr geringen Mengen erfassen, wodurch eine Strukturaufklärung mittels NMR nicht möglich war.

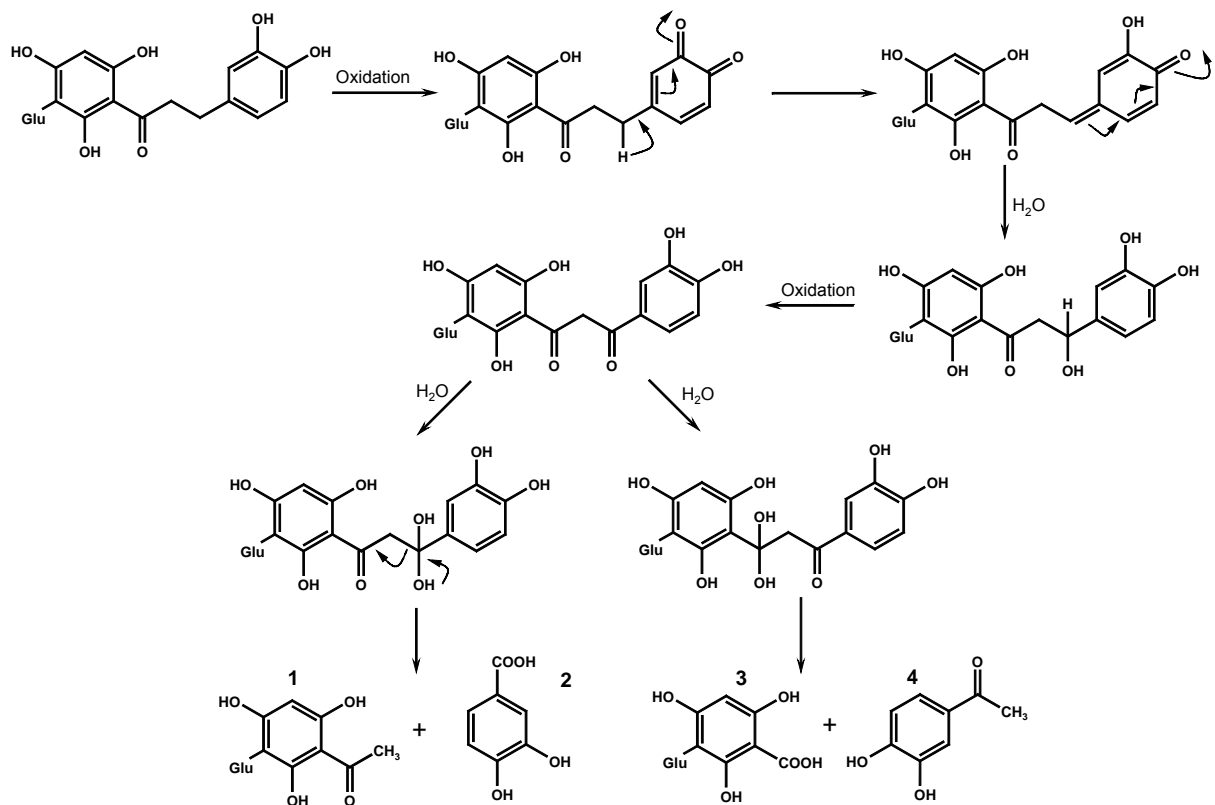
Nothofagin zeigte während der Inkubation ebenso wie Aspalathin eine Bräunungsreaktion, welche aber wesentlich langsamer verlief. Durch anaerobe Bedingungen wurde diese Reaktion zusätzlich gehemmt (Abb. 20). In der ersten Stufe der Bräunung ist einzig der B-Ring der Dihydrochalcone beteiligt. Der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Dihydrochalconen besteht in der Substitution des B-Rings. Aspalathin verfügt über eine *ortho*-Dihydroxyfunktion (C3 und C4), wobei Nothofagin nur eine einzige OH-Funktion an Position C4 enthält. Eine *ortho*-Dihydroxyfunktion am B-Ring beschleunigt die erste Phase der Bräunungsreaktion der Dihydrochalcone.

Auch (-)-Epicatechin, eine typische Verbindung, welche an Bräunungsreaktionen des grünen, unfermentierten Tees (*Camelia sinensis*) beteiligt ist, wurde in diesen Versuch integriert. Allerdings konnte bei (-)-Epicatechin, selbst unter aeroben Bedingungen, kaum eine Änderung der Farbgebung beobachtet werden, obwohl diese Substanz eine *ortho*-Dihydroxyfunktion am B-Ring besitzt (Abb. 20 B). Wie eingangs erwähnt, ist an der Bräunung von *Camellia sinensis* ein Enzym (PPO) beteiligt. Damit ist eindeutig belegt, dass die Bräunung der Dihydrochalcone des Rooibostees nach einem völlig verschiedenen, nicht-enzymatischen Mechanismus ablaufen muss.



**Abb. 20** Anaerobe und aerobe Bräunung von Nothofagin (A), Aspalathin und Epicatechin (B).

Auch wenn weitere, mögliche Folgereaktionen von Aspalathin innerhalb dieser Arbeit nicht untersucht wurden, so soll doch an dieser Stelle auf sie eingegangen werden. Im wässrigen Medium unter aeroben Bedingungen kann die Dihydrochalcon-Struktur von Aspalathin durch eine  $\beta$ -Carbonylspaltung fragmentieren, wobei niedermolekulare Substanzen entstehen. Abb. 21 soll den möglichen Mechanismus dieser Reaktion verdeutlichen.



**Abb. 21** Oxidativer Abbau des Aspalathins durch  $\beta$ -Carbonylspaltung.

Eines der Endprodukte dieser Reaktion stellt die Protocatechussäure (Substanz 2) dar. Diese Substanz ist im fermentierten Tee nachgewiesen worden. Bei den übrigen Zerfallsprodukten handelt es sich um 2,4,6-Trihydroxyphenyl-3-glycosyl-1-ethanon (1), 2,4,6-Trihydroxy-3-glycosylbenzoesäure (3) und 3,4-Dihydroxyphenyl-1-ethanon (4). Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass Phloroglucinol während des oxidativen Abbaus von Aspalathin entsteht (Vgl. S. 22).

### 3.2.3 Struktur-Aktivitätsbeziehungen ausgewählter Polyphenole

Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in der Lage Biomoleküle im menschlichen Organismus anzugreifen. Ihre schädigende Wirkung ist auf die hohe Affinität zu biologischen Substraten (Lipide, Proteine, DNA, Kohlenhydrate, u.a.) sowie auf ihre oxidativen Eigenschaften zurückzuführen. Aufgrund dieser Zell- und Gewebsschädigungen können sie zahlreiche Erkrankungen, wie z. B. Atherosklerose und Krebs auslösen. Insbesondere die atherosklerotischen Erkrankungen sind eine Folge der Peroxidation von LDL durch reaktive Sauerstoffspezies. In vielen *in-vitro*-Studien konnte bisher eine Hemmung des oxidativen Angriffs durch phenolische Substanzen beobachtet werden. Aufgrund des antioxidativen Charakters der Polyphenole sind diese in der Lage, die Anzahl der freien Radikale zu reduzieren und ROS einzufangen (Heinecke *et al.*, 1998).

Die antioxidative Kapazität der phenolischen Substanzen ist zum einen abhängig von deren Polyphenolklasse, und zum anderen von der Anzahl und Position der Hydroxylgruppen im Molekül. Somit sind Hydroxyzimtsäuren bei gleicher Substitution wirksamer als Hydroxybenzoesäuren und Chalcone effektiver als die korrespondierenden Flavone und Flavanone (Rice-Evans *et al.*, 1996). Dihydrochalcone sind hinsichtlich der antioxidativen Kapazität effektiver als die zugehörigen Chalcone (Pratt *et al.*, 1990). Die Anzahl der Hydroxylfunktionen erhöht das antioxidative Potenzial einer Substanz, insbesondere wenn sich diese in *ortho*-Stellung zueinander befinden. Andererseits setzen Methoxyfunktionen die antioxidative Kapazität einer Substanz herab.

Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität existiert eine Vielzahl von Analysemethoden. Letztendlich sollen alle *in-vitro*-Verfahren dazu beitragen, das antioxidative Potenzial *in vivo* abzuschätzen, jedoch sind aufgrund der Vielzahl von Methoden und deren unterschiedliche Umsetzungsvarianten die Aussagen untereinander nur wenig vergleichbar.

Um die antioxidative Kapazität der Polyphenole zu ermitteln, wird bei allen Methoden deren radikalabfangende Eigenschaft ausgenutzt. Grundsätzlich lassen sich diese Testsysteme in 2 Kategorien einteilen. Einerseits gibt es Verfahren bei denen die Effektivität der



Antioxidantien untersucht wird, ein Substrat (PC, Lipide oder Lipoproteine) in Gegenwart von Initiatoren von Radikalreaktionen ( $\text{Cu}^{2+}$ , AAPH, AMVN, u.a.) zu schützen (Hydrophobe Testsysteme). Andererseits werden in wässriger Lösung Radikale vorgelegt, wobei nach Zugabe der Antioxidantien deren Abbau in einem definierten Zeitraum bestimmt wird (Hydrophile Testsysteme) (Rice-Evans *et al.*, 1996). Tab. 4 soll zunächst einen Überblick über die anwendbaren Methoden zur Bestimmung des antioxidativen Potenzials geben (Frankel *et al.*, 2000).

#### *Hydrophile Testsysteme*

Das wohl am häufigsten angewandte Testsystem ist der TEAC-Assay. Beim diesem Testverfahren wird nach Inkubation von ABTS ein  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikalkation erzeugt, welches in einer bestimmten Menge vorgelegt und mit den entsprechenden Flavonoiden für eine definierte Zeit in Wechselwirkung tritt. Die Detektion des noch vorhandenen Radikals erfolgt photometrisch bei 734 nm. Die Erzeugung des Radikals kann auf 2 unterschiedlichen Wegen erfolgen. Einerseits wird Kaliumperoxodisulfonat eingesetzt, zum anderen Methmyoglobin und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Standardisiert wird diese Methode mit dem wasserlöslichen Vitamin-E-derivat Trolox<sup>®</sup>. Das Ergebnis wird demzufolge in Trolox-Equivalenten (bezogen auf 1 mM Standardsubstanz) angegeben. Dieses antioxidative Testsystem kann auch online an ein HPLC-DAD-System gekoppelt werden (Koleva *et al.*, 2001). Hierbei werden die einzelnen Fraktionen von Substanzen nach Auftrennung mittels HPLC-DAD mit der radikalischen  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Lösung in Kontakt gebracht. Danach wird der Abbau des Radikals über einen 2. photometrischen Detektor quantifiziert. Zur elektrochemischen Erzeugung von  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  aus einer ABTS-Lösung wurde ein Verfahren von Ivekovic *et al.* (2005) etabliert. Somit kann die Inkubationszeit zur Erzeugung der Radikalkationen umgangen werden.

Bramati *et al.* hat verschiedene Extrakte des Grünen- und Schwarzen Tees (*Camellia sinensis*) sowie vom fermentierten und unfermentierten Rooibostee anhand des TEAC-Assays untersucht (Bramati *et al.* 2003). Hierbei wurde festgestellt, dass die Teeextrakte von *Camellia sinensis* ein ähnliches Potenzial besitzen, wobei deren antioxidative Kapazität höher war (1,7-1,8 Trolox meq/g (fermentiert und unfermentiert)) als die der Extrakte vom Rooibos (0,8 Trolox meq/g (unfermentiert); 0,4 Trolox meq/g (fermentiert)).

**Tab. 4** Überblick über ausgewählte antioxidative Testverfahren in hydrophilen und lipophilen Medien.

Methodenbezeichnung	Initiatoren/Bedingungen	reaktive Spezies	Detektion
<i>Hydrophile Testsysteme</i>			
TEAC-Assay (Re <i>et al.</i> , 1999)	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> oder Methmyoglobin und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ABTS <sup>•+</sup>	Abbau von ABTS <sup>•+</sup> bei 734 nm
DPPH-Assay (Smet <i>et al.</i> , 2006; Inoue <i>et al.</i> , 2005)	-	DPPH <sup>•</sup>	Abbau von DPPH <sup>•</sup> bei 515 nm oder Abnahme der Signalintensität durch ESR
Superoxid- Radikalfängertest (Robak <i>et al.</i> , 1988)	Phenazin + NADH- methosulfat, NBT	Superoxid O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	NBT-Reduktion in % durch Superoxidanionen (560 nm)
Hyperchlorsäuretest (Aruoma <i>et al.</i> , 1993)	HOCl, α-Antiproteinase + Elastase	CCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Abnahme der Elastaseaktivität bei 410 nm nach Substratumsetzung
Fremy's Salz (Rösch <i>et al.</i> , 2003)		(KSO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NO <sup>•</sup>	Abnahme der Signalintensität des Fremy's-Salz durch ESR
DMPO-Test (Unno <i>et al.</i> , 2000)	FeSO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Abnahme der Signalintensität (ESR)
PBN-Test (Andersen <i>et al.</i> , 2000)	Wärme		Abnahme der Signalintensität (ESR)
FRAP-Assay (Smet <i>et al.</i> , 2006)	TPTZ + FeCl <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O+HCl	Fe <sup>3+</sup> -TPTZ	Bildung von Fe <sup>2+</sup> -TPTZ bei 593 nm
<i>Hydrophobe Testsysteme</i>			
Fenton-Reaktion (Joubert <i>et al.</i> , 2005)	FeCl <sub>3</sub> -EDTA+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 37°C + TBA	OH <sup>•</sup>	Gehalt an Malondialdehyd (Absorption bei 532 nm oder ESR)
TRAP-Assay (Wayner <i>et al.</i> , 1985)	AAPH + Plasma/ Serum oder Linolsäure		Elektrochemische Messung der Sauerstoffaufnahme
ORAC-Assay (Cao <i>et al.</i> , 1993)	β-PE+AAPH		Abnahme der Fluoreszenz von β- PE (Anregung: 540 nm; Emission 565 nm)
Human-LDL (LDL- Oxidationstest) (Esterbauer <i>et al.</i> , 1989) (Frankel <i>et al.</i> , 1992)	Cu <sup>2+</sup> , 37 °C		Absorption der Diene (234 nm) oder Headspace-GC-MS zur Quantifizierung des Aldehyds Hexanal
Tween-emulgierte Linolsäure mit β-Carotin (β-Carotin-Bleichung) (Aziz <i>et al.</i> , 1971)	Verschiedene Enzyme (Lipoxygenase oder Peroxidase); 25 °C		Abnahme der Absorption β- Carotin (460 nm)
Tween-emulgierte Linolsäure (TBA-Assay) (Tomura <i>et al.</i> , 1994)	FeSO <sub>4</sub> ; 37 °C		Gehalt an Malondialdehyd (Absorption bei 535 nm)
SDS-emulgierte Linolsäure (Foti <i>et al.</i> , 1996)	AAPH; 37 °C		Absorption der Diene (234 nm)
Methylinolenat (Watanabe, 1998)	AMVN; 37 °C		HPLC-UV-Messung der Methylinolenathydroperoxide
LDL oder Membranphospholipide (Faustino <i>et al.</i> , 2004)	AAPH od. AMVN		Absorption der Diene (234 nm)
Verschiedene Lipide (Rancimat-Test) (von Gandow <i>et al.</i> , 1997)	98 °C oder 50 °C; O <sub>2</sub>		Konduktometrische Indikation
PC mit Phenylpropionsäure (Wang <i>et al.</i> , 1999)	FeCl <sub>2</sub> , 23°C, PC + 3-[p-(6- phenyl)-1,3,5-hexatrienyl]- phenylpropionsäure		Abnahme der Fluoreszenz (384 nm)

Der DPPH-Assay legt als Radikal DPPH<sup>•</sup> in methanolischer Lösung vor. Detektiert werden kann das nach der Reaktion mit dem Antioxidans noch vorhandene Radikal entweder photometrisch (515 nm) (Smet *et al.*, 2006) oder mittels ESR (Inoue *et al.*, 2005). In der Vergangenheit wurden bereits ausgewählte Substanzen aus dem Rooibostee bezüglich ihres antioxidativen Potenzials anhand des DPPH-Assays durch photometrische Detektion untersucht (von Gadow *et al.*, 1997). Hierbei konnte festgestellt werden, dass Aspalathin, Isoquercitrin, Quercetin, Luteolin, Rutin, (+)-Catechin und Kaffeesäure einen hohen Abbau des DPPH-Radikals bewirken (<90 %), wobei eine Radikalhemmung bei Vitexin, *p*-Hydroxybenzoesäure und *p*-Coumarsäure kaum zu beobachten war (>10 %). Allerdings zeigte dieser Versuch nur wenige Unterschiede zwischen den einzelnen Flavonoidklassen auf, womit der DPPH-Test relativ unspezifisch erscheint. Der DPPH-Assay wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit zur Ermittlung des antioxidativen Potenzials ebenfalls getestet, wobei die Detektion ESR-spektroskopisch erfolgte. Hierbei wurde festgestellt, dass dieses Verfahren eine geringere Empfindlichkeit im Vergleich zum TEAC-Assay und dem Fremy's-Salz-Test besitzt. Aus diesem Grund wurde dieses antioxidative Testsystem nicht weiter verfolgt.

Der Fremy's-Salz-Test ist ebenfalls ein hydrophiles Verfahren, bei dem das Radikal Fremy's-Salz in wässriger Lösung vorgelegt wird. Der mögliche Abbau durch Antioxidantien kann anhand der Abnahme der Signalintensität von Fremy's-Salz mittels ESR charakterisiert werden. Dieses Testsystem wurde bereits erfolgreich zur Ermittlung des antioxidativen Potenzials von Flavonoiden, isoliert aus dem Sanddorn und der Zwiebel, angewandt (Rösch *et al.*, 2003; Buchner *et al.*, 2006).

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Kapazität von Antioxidantien stellt der Einsatz von sogenannten Spin-Traps, wie PBN oder DMPO dar. PBN und DMPO sind selbst keine Radikale, sie können aber reaktivere, kurzlebige Radikale abfangen und dadurch stabilisieren. Sie werden generell zum Nachweis von Radikalen genutzt, und sind deshalb weniger geeignet polyphenolische Verbindungen hinsichtlich ihres Potenzials zu bestimmen.

Superoxidradikalanionen können prinzipiell auf zwei unterschiedlichen Wegen, enzymatisch und nichtenzymatisch generiert werden. Bei dem Superoxidradikal-Anionentest wird nach Erzeugung der Radikale der Abbau von NBT photometrisch verfolgt. Angewandt wurde dieses Verfahren von Standley *et al.* im Vergleich zum DPPH-Assay um unterschiedliche Teeextrakte zu charakterisieren (Standley *et al.*, 2001). Bei beiden Testsystemen wurden ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des antioxidativen Potenzials erhalten. So war unfermentierter Tee effektiver als die fermentierte Form. Nach einem ähnlichen Prinzip

verläuft auch der Hyperchlorsäuretest. Ein Radikal  $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$  wird erzeugt und dessen Einfluss auf die Elastaseaktivität photometrisch verfolgt.

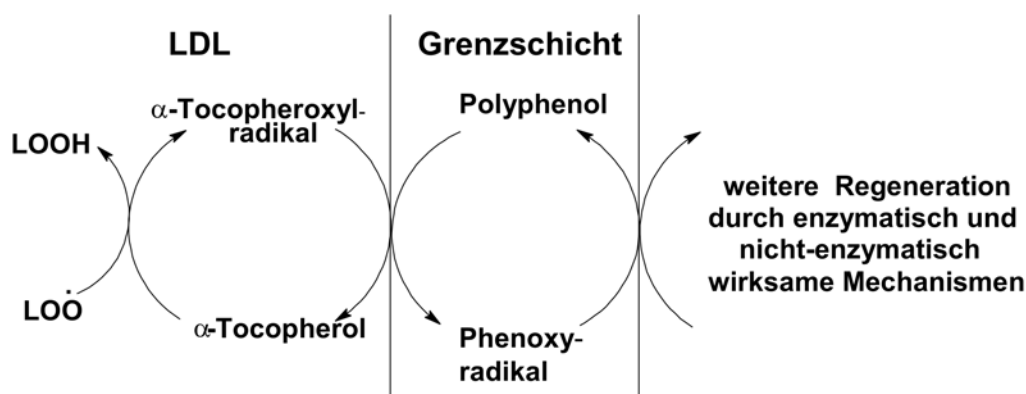
Bei dem sogenannten FRAP-Assay wird eine Redoxreaktion des  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ-Komplexes ausgenutzt. In Gegenwart von Antioxidantien bei niedrigen pH-Werten kann dieser Komplex zu  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ reduziert werden, wobei sich eine blaue Färbung ausbildet. Somit kann diese Reduktion photometrisch vermessen werden.

### *Hydrophobe Testsysteme*

Neben den Superoxidradikalanionen sind auch Hydroxylradikale tatsächlich *in vivo* vorkommende Spezies. Hydroxylradikale können durch die Fenton-Reaktion erzeugt werden. Bei dem Fenton-Reaktionstest werden Lipidproben mit den Hydroxylradikalen in Gegenwart von TBA inkubiert. Die durch Lipidperoxidation gebildete Aldehyde (Hexanal, MDA, u.a.) reagieren mit TBA unter Ausbildung von Folgeverbindungen, welche photometrisch erfasst werden können. Anhand dieses Testsystems hatte Joubert *et al.* entgegen den allgemeinen Erwartungen festgestellt, dass der Ethylacetatextrakt vom unfermentierten Rooibostee eine höhere Bildungsrate an TBARS ( $\mu\text{M}$  MDA) induziert als der fermentierte Extrakt (Joubert *et al.*, 2005).

Beim TRAP-Assay wird AAPH mit Plasma oder Serum in Kontakt gebracht, wobei nach bestimmten Zeitabständen die  $\text{O}_2$ -Aufnahme elektrochemisch detektiert wird. Allerdings ist diese Methode zur Bestimmung eher ungeeignet, vor allem hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Ergebnissen, da das Plasma oder Serum als zu oxidierende Matrix verwendet wird. In diesen Probenmaterialien befinden sich jeweils unterschiedliche Konzentrationen an weiteren antioxidativ wirksamen Substanzen, wie Vitamin C,  $\beta$ -Carotin, Bilirubin, Albumin und Tocopherole, die letztendlich bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt werden (Cao *et al.*, 1993). Der ORAC-Assay stellt eine Weiterentwicklung des TRAP-Assays dar, wobei Serum oder Plasma gegen  $\beta$ -PE ausgetauscht werden. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von  $\beta$ -PE wird in diesem Assay auch gleichzeitig ein spezifischeres Detektionssystem verwendet. Marnewick *et al.* hat verschiedene Teegetränke, u.a. auch fermentierten und unfermentierten Rooibostee für 10 Wochen an Ratten verabreicht (Marnewick *et al.*, 2003). Die Extrakte der Leber wurden nach diesem Versuch anhand des ORAC-Tests hinsichtlich ihres antioxidativen Potenzials untersucht. Allerdings konnten keine Unterschiede zwischen dem Kontrollexperiment und den Versuchsreihen festgestellt werden.

Der LDL-Oxidationstest ist ebenfalls ein sehr häufig beschriebenes Testsystem, wobei meistens Human-LDL als Substrat eingesetzt wird. Aufgrund seiner Nähe zum biologischen System kann dieser Test in die Kategorie *ex-vivo* eingeordnet werden. Die Induktion der Oxidation erfolgt anhand von 3 unterschiedlichen Initiatoren ( $\text{Cu}^{2+}$ , AAPH und AMVN), wobei am häufigsten  $\text{Cu}^{2+}$  eingesetzt wird. Die Detektion kann einerseits durch die Beobachtung der Absorption der Diene bei 234 nm erfolgen. Andererseits können auch die in der fortgeschrittenen Phase der Lipidperoxidation gebildeten Aldehyde (Hexanal) durch Headspace-GC-MS quantifiziert werden. Beim Einwirken der polyphenolischen Substanzen, welche eher hydrophile Eigenschaften aufweisen, kann kein direkter Kontakt mit den Lipiden der LDLs angenommen werden. Der Schutz der Lipide erfolgt deshalb eher auf indirektem Wege über die Regeneration von möglichen Tocopheryloxylradikalen. Ein entsprechendes Schema ist in Abb. 22 dargestellt.



**Abb. 22** Mögliche Wechselwirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und Polyphenolen an der Phasengrenzfläche der LDL

Es existieren aber auch Verfahren, welche die Phasengrenzfläche durch Zugabe von Emulgatoren (Tween, SDS) umgehen (Tomura *et al.*, 1994; Foti *et al.*, 1996). Hierzu gehört auch der  $\beta$ -Carotinbleichungstest (Aziz *et al.*, 1971). Auch dieser wurde schon im Zusammenhang mit Rooibosteeextrakten untersucht (von Gadow *et al.*, 1997). Durch Oxidation des Reaktionsansatzes, indem u.a. auch  $\beta$ -Carotin enthalten ist, wird die Abnahme der Farbgebung, verursacht durch den Abbau des  $\beta$ -Carotins, photometrisch charakterisiert. Neben den LDLs und spezifischen Fettsäuren (Linolsäure) wird auch häufig PC als Matrix für die hydrophoben Assays angewandt (Wang *et al.*, 1999).

Unter definierten Bedingungen kann im Rancimatstest die Lipidperoxidation ausgelöst werden. In einer abgeschlossenen Apparatur werden hier definierte Bedingungen ( $\text{O}_2$ -Einstrom und Temperatur) eingestellt, um dann die Bildung von Oxidationsprodukten konduktometrisch zu erfassen. Der Einfluss von verschiedenen wässrigen Rooibosteeextrakten, die sich hinsichtlich

der Extraktionszeit unterschieden, wurde anhand dieses Verfahrens untersucht (von Gandow *et. al.*, 1997), wobei in diesem Test im Gegensatz zum  $\beta$ -Carotinbleichungstest der Tee mit der längsten Extraktionszeit das höhere antioxidative Potenzial aufwies.

#### Anwendung ausgewählter in-vitro-Testsysteme

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die im Rooibostee enthaltenen Phenole hinsichtlich ihres antioxidativen Potenzials charakterisiert werden. Insgesamt wurden hierzu 3 unterschiedliche Testsysteme (TEAC-Test, Fremy's-Salz-Test und LDL-Oxidationstest) ausgewählt. Die Resultate dieser drei Verfahren wurden anschließend miteinander verglichen, um Struktur-Aktivitätsbeziehungen ableiten zu können. Andererseits sollte die Selektivität dieser Testsysteme für bestimmte Polyphenolstrukturen charakterisiert werden.

Der TEAC-Test wurde angewandt, da dieser eine hohe Empfindlichkeit für polyphenolische Substanzen besitzt. Die Ergebnisse des TEAC-Assays sollten außerdem genutzt werden, um die in der Literatur zahlreich beschriebenen TEAC-Werte mit den Inhaltsstoffen des Rooibostees vergleichen zu können. Der Fremy's-Salz-Test wurde genutzt, um das Verhalten der Inhaltsstoffe von *Aspalathus linearis* auf ein weiteres radikalisches, wässriges System charakterisieren zu können. Das Ziel hierbei bestand darin, die Selektivität der beiden Assays zu bestimmen. Tab. 5 stellt nun die Ergebnisse dieser beiden Verfahren, angewandt auf die isolierten Inhaltsstoffe des Rooibostees, vor.

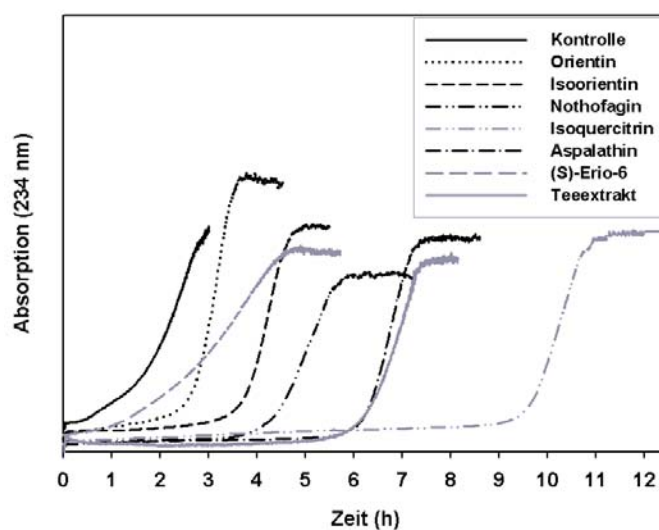
**Tab. 5** Ergebnisse des TEAC- und Fremy's-Salz-Tests von isolierten Substanzen aus den Rooibostee

Verbindung	freie OH-Substituenten	Glycosylierungsposition	TEAC [mM] (n=3)	AC (mol Fremy's salz/mol) (n=3)
<i>Dihydrochalcone</i>				
Aspalathin	3, 4, 2', 4', 6'	5'-glu	2.62 ± 0.07	4.81 ± 0.03
Nothofagin	4, 2', 4', 6'	5'-glu	2.06 ± 0.14	0.02 ± 0.01
<i>Flavanones</i>				
(S)-Erio-6-C- $\beta$ -D-glucopyranosid	5, 7, 3', 4'	6-glu	0.88 ± 0.08	2.67 ± 0.19
(R)-Erio-6-C- $\beta$ -D-glucopyranosid	5, 7, 3', 4'	6-glu	1.04 ± 0.02	3.13 ± 0.22
<i>Flavones</i>				
Orientin	5, 7, 3', 4'	8-glu	1.47 ± 0.04	3.48 ± 0.03
Isoorientin	5, 7, 3', 4'	6-glu	1.54 ± 0.05	3.00 ± 0.03
Vitexin	5, 7, 4'	8-glu	0.86 ± 0.03	1.57 ± 0.10
Isovitexin	5, 7, 4'	6-glu	0.81 ± 0.04	1.58 ± 0.14
<i>Flavonols</i>				
Rutin	5, 7, 3', 4'	3- $\alpha$ -L-Rha-1 $\rightarrow$ 6- $\beta$ -D-glu	1.20 ± 0.07	3.70 ± 0.07
Isoquercitrin	5, 7, 3', 4'	3-glu	1.23 ± 0.05	4.08 ± 0.11
Hyperoside	5, 7, 3', 4'	3-gal	1.33 ± 0.08	4.21 ± 0.02
Quercetin	3, 5, 7, 3', 4'		2.70 ± 0.13	4.48 ± 0.03
Tea extract*			3.20 ± 0.01	17.65 ± 1.12

\*Bezogen auf Aspalathin; glu – Glucose; rha – Rhamnose; gal – Galactose

Das Dihydrochalcon Aspalathin, welches in hohen Konzentrationen im unfermentierten Rooibostee auftritt (50 mg/g Aspalathin/wässriger Teeextrakt), erzielte sowohl als Reinsubstanz als auch im Teeextrakt in beiden Testsystemen ein sehr hohes antioxidatives Potenzial. Der Effekt des Aspalathins kann dem des Quercetins gleichgestellt werden. Für Quercetin wurde in vorangegangenen Arbeiten stets ein hohes Potenzial *in vitro* ermittelt (Rice-Evans *et al.*, 1996). Allerdings wurde Aspalathin hier zum ersten Mal mit Quercetin in diesen beiden Testverfahren verglichen. Aspalathin besitzt gegenüber dem Quercetin einige Vorteile. Die im Aspalathin gebundene Glucose am Aglycon bewirkt eine höhere Löslichkeit in wässriger Lösung. Demzufolge geht bei der Extraktion eine relativ hohe Substanzmenge in den Tee über. Auch die übrigen Strukturen, welche für den Rooibostee typisch sind (Orientin, Isoorientin, Isoquercitrin) besitzen ein relativ hohes antioxidatives Potenzial bei ebenfalls noch guter Wasserlöslichkeit. Unterschiede zwischen diesen beiden Testverfahren konnten vor allem anhand des Nothofagins festgestellt werden. Im TEAC-Test besaß Nothofagin ein ebenfalls hohes Potenzial, wohingegen diese Struktur im Fremy'-Salz-Assay kaum einen Radikal-Abbau induzierte. Aufgrund der fehlenden OH-Funktion am B-Ring im Vergleich zu Aspalathin, Orientin und Isoorientin, sowie der nicht auftretenden 2,3-Doppelbindung in Konjugation zur 4-Ketofunktion am C-Ring im Vergleich zu Vitexin und Isovitexin erzielt die Konstellation der Nothofaginstruktur gegenüber Fremy's-Salz keinen Effekt. Der Fremy's-Salz-Test scheint vor allem auf die Substitution des B-Rings anzusprechen, denn alle getesteten Strukturen mit einer Dihydroxyfunktion in *ortho*-Stellung bewirkten auch einen hohen Abbau dieses Radikals.

Der LDL-Oxidationstest wurde angewandt, um die bereits erläuterten hydrophilen Systeme mit einem hydrophoben Assay zu vergleichen. Als Initiator wurde  $\text{Cu}^{2+}$  verwendet, um auch die metallkomplexierenden Eigenschaften der Flavonoide beschreiben zu können. Im LDL-Oxidationstest wurden folgende Substanzen untersucht (1 nmol): Orientin, Isoorientin, Nothofagin, Aspalathin, Isoquercitrin, (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid und der Teeextrakt (eingestellt auf die entsprechende Menge an Aspalathin). Die durch die eingesetzten Flavonoide induzierten *lag*-Phasen sind in Abb. 23 dargestellt.

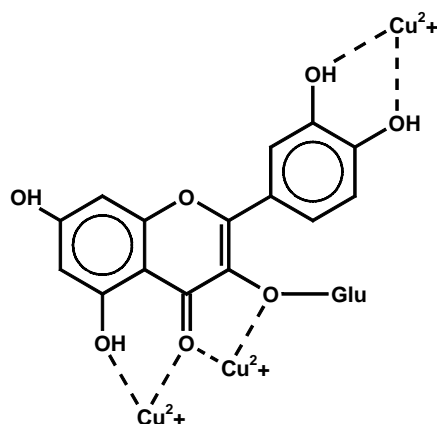


**Abb. 23** LDL-Oxidationstest, induziert durch  $\text{Cu}^{2+}$ . Die *lag*-Phasenverschiebung wurde erzielt durch 1 nmol folgender Substanzen: (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (2,1 h); Aspalathin (6,2 h); Orientin (2,7 h); Isoorientin (3,8 h); Nothofagin (4,3 h); Isoquercitrin (9,6 h); Teeextrakt (eingestellt auf 1 nmol Aspalathin) (6,2 h). *Lag*-Phase der Kontrollreaktion betrug 1,4 h.

An den Ergebnissen dieses Testsystems war die *lag*-Phasenverschiebung, induziert durch Isoquercitrin (9,6 h) besonders auffällig. Die antioxidative Kapazität von Isoquercitrin war in diesem hydrophoben Assay höher als das Potenzial von Aspalathin und Aspalathin im Teeextrakt. Die identischen *lag*-Phasenverschiebungen von Aspalathin und Teeextrakt können durch die Bräunungsreaktion des Aspalathins im Teeextrakt erklärt werden. Befindet sich Aspalathin in einer neutralen Lösung und in Gegenwart von weiteren, an der Bräunungsreaktion beteiligten Substanzen, so findet die Bräunungsreaktion des noch vorhandenen Aspalathins beschleunigt statt. Ist das Dihydrochalcon als Reinsubstanz in neutraler Lösung vorhanden, so ist der erste Schritt der Bräunungsreaktion der zeitlich limitierende Faktor für alle weiteren Folgereaktionen. Somit waren beim reinen Aspalathinversuch weniger Bräunungsprodukte während der Inkubationszeit zu erwarten, als beim Einsatz des Teeextraktes. Für beide Versuche wurden demzufolge ähnliche *lag*-Phasenverschiebungen erreicht, da mit der Oxidation von Aspalathin das antioxidative Potenzial der Folgeprodukte abnimmt. Im Teeextrakt waren neben dem Aspalathin aber noch weitere wasserlösliche, antioxidativ wirksame Bestandteile enthalten, welche die LDLs zusätzlich vor Oxidation geschützt haben. Beim TEAC-Test und Fremy's-Salz-Test ist dieses Phänomen nicht beobachtet worden, da die Versuchszeit nur 2,5 min bzw. 20 min betrug.

Die intensive *lag*-Phasenverschiebung des Isoquercitrins kann durch die metallkomplexierenden Eigenschaften der Flavonole beschrieben werden (Gonzalez-Alvarez *et al.*, 2005). Die möglichen Bindungsstellen des Isoquercitrins sind in Abb. 24 dargestellt.

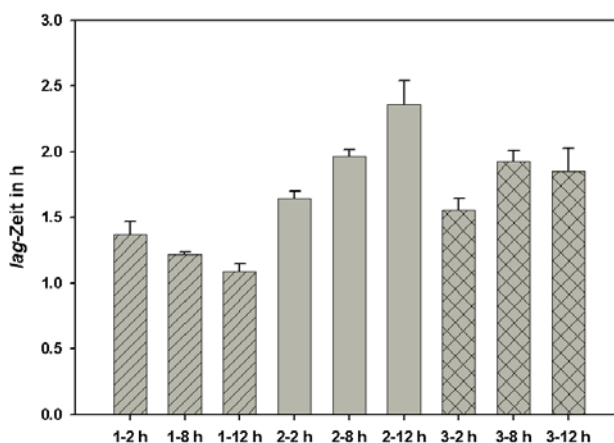




**Abb. 24** Bindungsstellen von  $\text{Cu}^{2+}$  an Isoquercitrin (Gonzalez-Alvarez *et al.*, 2005).

Verglichen mit dem klassischen LDL-Oxidationstest muss die Situation *in vivo* als nahezu frei von verfügbaren Metallionen beschrieben werden.

Um sich besser der tatsächlichen Situation *in vivo* hinsichtlich des antioxidativen Potenzials der Flavonoide zu nähern, wurde ein entkoppeltes LDL-Oxidationssystem entwickelt, bei dem zuerst die LDLs mit den Flavonoiden für eine bestimmte Zeit inkubiert wurden. Nach Dialyse wurden die LDLs dann wiederum dem oxidativen System in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$  unterzogen. Somit wurde verhindert, dass ein direkter Kontakt zwischen den Flavonoiden und den Metallionen bestand. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abb. 25 dargestellt. Es wurden hierfür unterschiedliche Inkubationszeiten (2 h, 8 h, 12 h) bei der Inkubation der LDLs mit Aspalathin, Isoquercitrin und dem Kontrollversuch getestet.



**Abb. 25** Entkoppelter LDL-Oxidationstest. (1: Kontrolle, 2: Aspalathin, 3: Isoquercitrin)

Nach einer Inkubationszeit von 12 h konnte eindeutig festgestellt werden, dass Aspalathin ein höheres Potenzial besitzt, die LDLs vor Oxidation zu schützen, als Isoquercitrin. Dies deutet auf Aspalathin als die *in vivo* wirksamere Spezies hin.

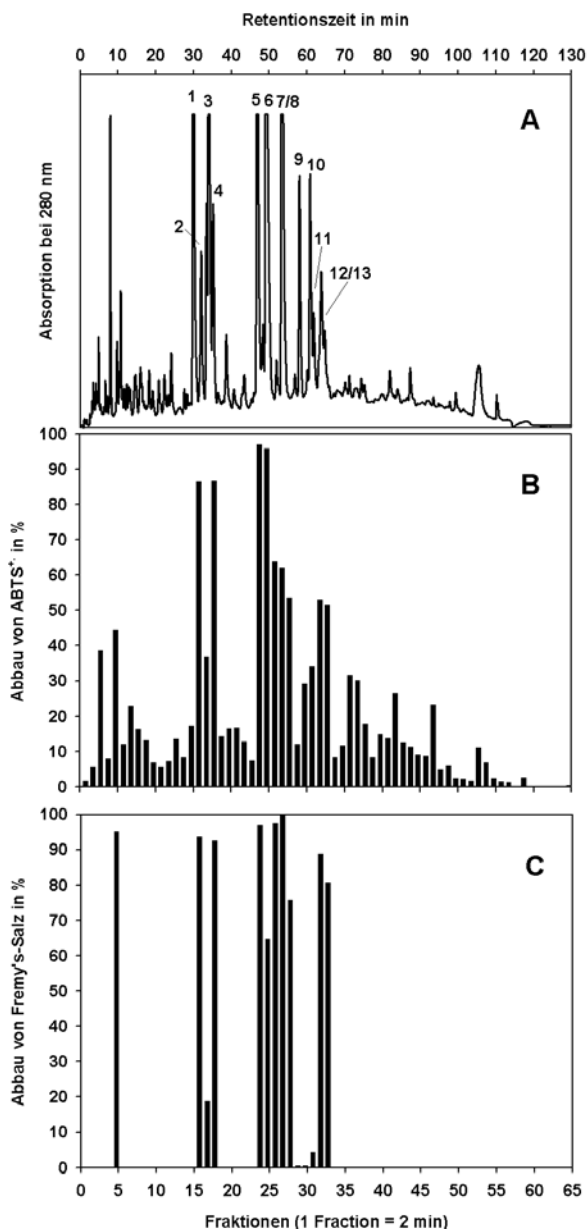
Der tatsächliche *in vivo*-Versuch wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Hierzu wurden die isolierten Flavonoide Isoquercitrin, Aspalathin, Isoorientin und der Teeextrakt (eingestellt auf die entsprechende Menge an Aspalathin wie bei der Gabe der Reinsubstanz) an Sprague-Dawley-Ratten (8 Tiere pro Versuchsreihe) per Schlundsonde verabreicht (6 mg/d). Ein Tier aus jeder Versuchsreihe wurde in einem metabolischen Käfig gehalten, wobei täglich Kot und Urin der Tiere auf Polyphenole untersucht wurden. Nach insgesamt 14 Tagen wurden die LDLs aus dem Blut der Tiere nach Dekaptierung isoliert und anschließend in das LDL-Oxidationssystem eingebracht. Hier konnte kein Einfluss der Antioxidantien auf den Oxidationsstatus der LDLs beobachtet werden. *Die lag*-Phasen unterschieden sich nicht von der Kontrollversuchsreihe. Einzig die Versuchsreihe Isoquercitrin wies einen nichtsignifikanten Unterschied zu den Kontrollproben auf. Analytisch nachgewiesen werden konnte lediglich das Aspalathin in sehr geringen Mengen und nur an ausgewählten Versuchstagen im Kot der Tiere. Generell ist die Metabolisierung der Dihydrochalcone und der Einfluss C-glycosidisch gebundener Zucker am Aglycon in Organismen nur sehr wenig erforscht. Tomas-Baberan *et al.* hatte das mögliche Verhalten der Dihydrochalcone *in vivo* beschrieben (Tomas-Baberan *et al.*, 2000). Überträgt man dessen Theorie anhand des Naringins auf das Aspalathin, so könnte *in vivo* in Gegenwart von Mikroorganismen die in Abb. 21 dargestellte Reaktion ablaufen. Bei den C-O-glycosidisch gebundenen Zuckern am Aglycon sind die Mikroorganismen weiterhin in der Lage diese Bindung durch Enzyme zu spalten. (Karakaya, 2004). Das Verhalten derer gegenüber C-C-glycosidischen Strukturen ist aber nicht geklärt.

#### *Entwicklung eines Screening-Testsystems*

Generell ist die polyphenolische Zusammensetzung aller Pflanzen noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben der Isolierung und Strukturaufklärung von neuartigen Inhaltsstoffen wird vor allem nach antioxidativ-hochwirksamen Substanzen gesucht. Durch den Einsatz eines Screening-Testsystems kann das antioxidative Potenzial einer Substanz bereits vor der eigentlichen Isolierung ermittelt werden. Somit kann gezielt vor der meist zeitaufwendigen Isolierung von Antioxidantien eine Selektion vorgenommen werden.

Ein Screening-Testverfahren wurde für die drei *in vitro* angewandten Testsysteme etabliert, und soll nun zusammenfassend anhand des Ethylacetatextraktes erläutert werden. Dieser Extrakt wurde für alle 3 Systeme mittels analytischer HPLC-DAD aufgetrennt. Das Eluat wurde in 2-mL-Fractionen gesammelt und nach dem Abziehen des Lösungsmittels den Testsystemen unterzogen. Abb. 26 stellt die Ergebnisse des ABTS<sup>•+</sup>-und Fremy's-Salz-

Abbaus vor. Anhand dieser Resultate wurde festgestellt, dass das Radikal  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  im Vergleich zum Fremy's-Salz-Radikal einen wesentlich dynamischeren Konzentrationsbereich besitzt. So konnten mit dem  $\text{ABTS}^{*\cdot}$ -Radikal auch geringere Signale hinsichtlich ihrer antioxidativen Kapazität erfasst und vergleichend bewertet werden.



**Abb. 26** Screening-Testverfahren bezogen auf den Ethylacetatextrakt des fermentierten Rooibostees. A: HPLC-DAD-Chromatogramm bei  $\lambda = 280$  nm. 1: (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (29,9 min); 2: (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (33,3 min); 3: (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (34,1 min); 4: (*R*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (35,1 min); 5: Aspalathin (46,8 min); 6: Orientin (49,2 min); 7/8: Isoorientin/ Vitexin (53,2 min); 9: Nothofagin (58,0 min); 10: Isovitexin (60,8 min); 11: Rutin (61,7 min); 12: Hyperosid (63,7 min); 13: Isoquercitrin, (64,7 min); B: Abbau von  $\text{ABTS}^{*\cdot}$ ; C: Abbau von Fremy's-Salz.

Das angewandte System verbietet jedoch einen direkten Vergleich der antioxidativen Kapazität des eluierenden Materials, da das Ergebnis konzentrationsabhängig ist. Geringe Konzentrationen führen zu einem geringen ABTS<sup>•+</sup>-Abbau. Aufgrund dessen wurden aus den Peakflächen der Substanzen und dem ABTS<sup>•+</sup>-Abbau Verhältniszahlen berechnet. Dabei wurde bei der Ermittlung der Peakflächen das Absorptionsmaximum der Verbindungen mit berücksichtigt. Detektiert wurden die Substanzen des Ethylacetatextraktes bei 280 nm und 350 nm. Die im Extrakt enthaltenen Flavanone und Dihydrochalcone besitzen allesamt ein Absorptionsmaximum in der Nähe von 280 nm, wobei das Maximum der Flavone und Flavonole hinsichtlich der Absorption in der Nähe von 350 nm liegt. Tab. 6 beinhaltet die berechneten Verhältniszahlen, bezogen auf die Inhaltsstoffe des Rooibosteess.

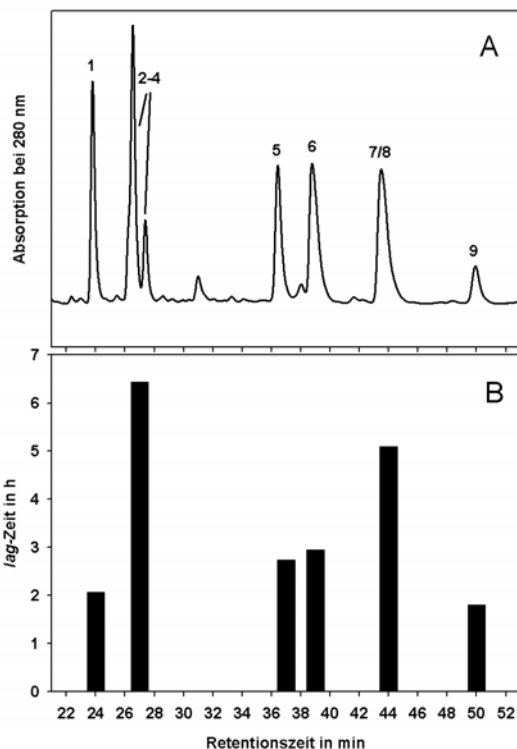
**Tab. 6** Verhältniszahlen (ABTS<sup>•+</sup>-Abbau) /HPLC-DAD-Peakfläche<sup>a</sup> von Flavonoiden aus dem Ethylacetatextrakt des Rooibosteess.

Flavonoide			
Strukturen (280 nm)	Verhältniszahlen <sup>a</sup>	Substanzen (350 nm)	Verhältniszahlen <sup>a</sup>
Aspalathin	9.53·10 <sup>-5</sup>	Orientin	6.13·10 <sup>-5</sup>
Nothofagin	5.52·10 <sup>-5</sup>	Isoorientin/Vitexin	4.93·10 <sup>-5</sup>
(S)-Eriodictyol-6-C-β-D-glucoopyranosid*	9.36·10 <sup>-5</sup>	Isovitexin/Rutin	3.50·10 <sup>-5</sup>
		Hyperosid*	7.94·10 <sup>-5</sup>
(R)-Eriodictyol-6-C-β-D-glucoopyranosid*	10.22·10 <sup>-5</sup>	Isoquercitrin*	7.74·10 <sup>-5</sup>

\*Fraktionen, welche mit weiteren Verbindungen coeluieren.

Das ermittelte antioxidative Potenzial anhand des TEAC-Assays wird durch die Fraktionen, welche reine Flavonoide enthalten, bestätigt. Wie auch im *in vitro*-Testsystem erreicht hier das Aspalathin das höchste Potenzial, gefolgt von Orientin und Nothofagin. Allerdings ist dieses Verfahren nicht anwendbar auf Fraktionen, welche Gemische von Substanzen enthalten. Liegen dagegen reine Fraktionen von Antioxidantien vor, kann zur Ermittlung der antioxidativen Kapazität eine Isolierung der Flavonoide umgangen werden.

Ebenfalls wurde das Screeningtestverfahren in Bezug auf den LDL-Oxidationstest angewandt. Hierzu wurden ausgewählte Fraktionen in das Testsystem eingebracht. Das Ergebnis ist in Abb. 27 dargestellt.



**Abb. 27** LDL-Oxidations-Screeningtestsystem, angewandt auf den Ethylacetatextrakt von fermentierten Rooibostee. (A: HPLC-DAD-Chromatogramm. 1: (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glycopyranosid (24,1 min), 2: (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (26,9 min); 3: (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (26,9 min); 4: (*R*)-Eriodictyol-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranosid (27,8 min); 5: Aspalathin (37,2 min); 6: Orientin (39,6 min); 7/8: Isoorientin/Vitexin (44,4 min); 9: Nothofagin (51,1 min); B: Einfluss der Fraktionen auf die *lag*-Phase der LDLs; Die *lag*-Phase der Kontrollreaktion betrug 1,6 h.

Analog zum ABTS<sup>•+</sup>-Screeningverfahren ist auch dieses Testsystem nur anwendbar auf reine Substanzen. Auch wenn von den Fraktionen vergleichbare Antworten in Bezug auf das *in vitro*-Testverfahren unter Berücksichtigung der Peakflächen erzielt wurden, so ist doch der Aufwand, jede einzelne Fraktion in ein LDL-Oxidationstest einzubringen, ein höherer im Vergleich zum ABTS<sup>•+</sup>-Screeningverfahren. Dieses Verfahren sollte damit nur bei ausgewählten Fragestellungen zur Anwendung kommen.