

# **Antioxidative Polyphenole chinesischer Leguminosen und weiterer chinesischer Gemüse**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
**Nadine Caroline Weber**  
aus Saarlouis

Düsseldorf 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch

Koreferentin: Prof. Dr. Regine Kahl

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2007

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

**Herrn Prof. Dr. P. Proksch**

am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf erstellt.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Proksch möchte ich mich ganz herzlich für die sehr interessante und vielseitige Themenstellung bedanken. Besonderen Dank auch für die wissenschaftliche Betreuung, die sehr guten Arbeitsbedingungen und die Ermöglichung des Forschungsaufenthaltes in China.

Bei Frau Prof. Dr. Regine Kahl möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Korreferates und die sehr gute Kooperation bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Yi-jia Lou bedanke ich mich ganz herzlich für den netten Aufenthalt in China und die sehr gute Kooperation.



## Zusammenfassung

Gemüse und Obst enthalten sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie z.B. Polyphenole. Nahrungsergänzungsmittel, die aus Extrakten verschiedener Gemüse und Obstsorten bestehen, weisen diese Inhaltsstoffe in konzentrierter Form auf. Da die Art der Verbindung im Hinblick auf antioxidative oder zytotoxische Eigenschaften ausschlaggebend ist, sind Kenntnisse über Inhaltsstoffmuster und Gehalte dieser Konzentrate von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Polyphenol- bzw. Flavonoidmuster verschiedener frischer, getrockneter und essigsaurer vorwiegend aus China stammender Gemüse untersucht sowie die Hauptinhaltsstoffe isoliert und in verschiedenen *in vitro* Assays getestet.

Dabei zeigte sich, dass essigsaurer Lebensmittel eine Quelle für Flavonoidglykane, deren Methylderivate und C-Glycosyle darstellen, während die übrigen untersuchten Extrakte zum Teil eine größere Vielfalt in ihrem Flavonoidmuster aufwiesen.

Extrakte unterschiedlicher Ernten von 8 verschiedenen Leguminosen (*Vigna radiata*, *Vigna angularis*, *Glycine max*, *Phaseolus coccineus*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulg.* var. *vulgaris* sowie var. *nanus*) wurden auf Variationen des Flavonoidmusters hin untersucht, wobei der Gehalt mittels HPLC bestimmt wurde. Das Flavonoidmuster erwies sich innerhalb der jeweiligen Art als relativ stabil. Lediglich in einzelnen Extrakten konnten Ausnahmen hierzu festgestellt werden, wie z.B. das Vorliegen von Isoflavonoiden in vereinzelt Extrakten. Die Quantifizierung mittels HPLC ergab für *Glycine max*, *Vigna radiata* und *Vigna angularis* den höchsten Gehalt, gefolgt von den beiden *Phaseolus vulgaris*-Arten, während die restlichen Extrakte nur geringe Mengen der untersuchten Polyphenole enthielten. Eine Vergleichsbestimmung der Polyphenole nach Folin-Ciocalteu ergab jeweils höhere Werte, da bei dieser Methode weitere Inhaltsstoffe wie z.B. Proteine und Vitamin C miterfasst werden.

Es wurde außerdem das Flavonoidmuster weiterer Gemüse (*Allium sativum*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Solanum melongena* und *Raphanus sativus*) untersucht. Von diesen wies die Aubergine den höchsten Gehalt auf, während in den Kürbisgewächsen ein geringer Gehalt und in *Raphanus sativus* sowie *Allium sativum* keine Flavonoide nach der HPLC-Methode zu finden waren.

Insgesamt konnten 41 verschiedene Naturstoffe isoliert werden, die in nachfolgenden *in vitro* Assays auf ihre antioxidativen und zum Teil auf ihre proliferationsstimulierenden und zytotoxischen Eigenschaften hin untersucht wurden.

*Vigna radiata* enthielt Flavone (Vitexin, Isovitexin), wohingegen aus *Vigna angularis* Flavane (Catechin), Flavone (Myricetin-, Quercetin-3O-rutinosid, Quercetin) und Isoflavonoide (Daidzein) erhalten wurden. Myricetin-3O-rutinosid wurde erstmalig aus dieser Quelle beschrieben. *Glycine max* lieferte Isoflavonoide (Genistein, Daidzein, sowie die jeweiligen 7O-Glucoside), während *Phaseolus coccineus* anstelle von Daidzein Glycitin enthielt. Aus *Pisum sativum* wurde Kämpferol-3O-sophorotriosid isoliert. Aus den beiden *Phaseolus vulg.*-Arten konnten Catechin und Astragalin erhalten werden. Während die Varietät *vulgaris* zusätzlich auch Kämpferol und ein Procyanidin beinhaltete, wurden aus der Varietät *nanus* Galocatechin, Isoquercitrin, Dihydromyricetin sowie Isomyricitrin, Gallussäureethylester und Ferulasäure isoliert. Dihydromyricetin wurde zum ersten Mal aus *Phaseolus vulgaris* erhalten. *Vicia faba* lieferte Catechin, Epicatechin, Vitexin, Isovitexin, Isoschaftosid, Nicotiflorin und Kämpferol-3O-glucosid-7O-rhamnosid sowie weitere Apigenin-, Quercetin- und Kämpferol-Derivate. Obwohl eine große Vielfalt an Flavonoiden

## Zusammenfassung

für diese Pflanze bekannt ist, wurden die Verbindungen hier zum ersten Mal für die Samen von *Vicia faba* beschrieben.

Aus *Allium sativum* wurde lediglich Isoconiferin isoliert, während *Raphanus sativus* die Glucosinolate Glucobrassicin und 6-Methoxyglucobrassicin lieferte. Die NMR-Daten für letztere Verbindung sind bisher nicht in der Literatur veröffentlicht. *Solanum melongena* lieferte E-Chlorogensäure sowie E/Z-Paucin. *Cucumis sativus* enthielt Isoquercitrin, Isorhamnetin-3O-glucosid, Triandrin und Lycoperodin 1, sowie weitere Apigenin- und Luteolin-Derivate.

Im DPPH-Assay wiesen Verbindungen, die vicinale OH-Gruppen im B-Ring des Flavonoids besitzen, eine gute antioxidative Aktivität auf. Eine zusätzliche Doppelbindung an Position 2,3 sowie eine OH-Gruppe an Position 3 erhöhten die Aktivität. Daneben wiesen auch Verbindungen mit einer Doppelbindung an Position 2,3 sowie einer OH-Gruppe an Position 3, 5 und 4' eine antioxidative Aktivität auf. Phenylacrylsäuren wie Chlorogensäure und Ferulasäure besaßen ebenfalls die Fähigkeit das stabile DPPH-Radikal abzufangen.

Extrakte, die derartige Verbindungen enthielten, zeigten ebenfalls Aktivität im DPPH-Assay. So erwiesen sich die Extrakte von *Vigna angularis*, *Vicia faba*, beide *Phaseolus vulgaris* Extrakte, sowie die Extrakte von *Solanum melongena* erwartungsgemäß als aktiv. Jedoch zeigten auch die Extrakte von *Raphanus sativus* und *Cucurbita pepo* (Zierkürbis-Schale) antioxidative Aktivität, wobei die radikalfangenden Eigenschaften hier auf weitere nicht untersuchte Inhaltsstoffe zurückzuführen sind.

Die Aglyka Kämpferol, Quercetin, Myricetin, Luteolin und Genistein wiesen ab 50  $\mu\text{M}$  zytotoxische Eigenschaften gegenüber H4IIE-Hepatom Zellen auf, während Apigenin nur einen geringen Einfluss auf die Zellviabilität zeigte. Von den Glucosiden waren Isoquercitrin und Genistin ab 50 bzw. 100  $\mu\text{M}$  ebenfalls zytotoxisch. Daneben wiesen auch Dihydromyricetin und Myricetin-3O-rutinosid zytotoxische Eigenschaften auf, die auf die zusätzliche OH-Gruppe im B-Ring zurückzuführen sind, da analoge Quercetin-Derivate diesen Effekt nicht hervorriefen.

Die Untersuchung von Quercetin, Taxifolin und Rutin sowie den jeweiligen Myricetin-Derivaten ergab, dass lediglich Quercetin einen protektiven Effekt gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelter Apoptose zeigte, welcher mit der Aufnahme der Verbindungen in die Zelle korrelierte, denn nur Quercetin war intrazellulär nachweisbar.

Proliferationsstimulierende Effekte auf MCF7-Zellen konnten außer bei den Isoflavonoiden bei Apigenin, Kämpferol ab 1  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Isoflavonoide, im speziellen Daidzein, konnten in *Vigna angularis* für die proliferationsstimulierenden Effekte des Extraktes verantwortlich gemacht werden. Diese Inhaltsstoffe sind auch in *Glycine max* und *Phaseolus coccineus* für die Proliferationsstimulation verantwortlich.

Auf Grund der unterschiedlichen biologischen Effekte der verschiedenen Flavonoide sollten diese Verbindungen nicht allein unter dem Aspekt ihrer antioxidativen Eigenschaften betrachtet werden wie dies allzu oft in der Werbung geschieht. Eine ungewollte Supplementierung aller Personenkreise durch Anreicherung von Nahrungsmitteln mit Polyphenolen sollte kritisch betrachtet werden.

## Summary

Polyphenols are ingredients of fruits and vegetables, which are also used as food supplements in form of extracts, which may contain polyphenols in high concentrations. Since the structure of polyphenols determines its antioxidative or cytotoxic activity, knowledge of the polyphenolic pattern and content of the extracts is of major importance.

In this study the polyphenolic and flavonoid patterns, respectively, of fresh, dried, and pickled predominant Chinese vegetables were examined. The main constituents were isolated and tested in different *in vitro* assays.

Pickled vegetables are a source of flavonoid aglycones, their methyl derivatives and C-glycosyles, while some of the other extracts contained a wider range of different flavonoids.

Extracts of different crops from eight Leguminosae (*Vigna radiata*, *Vigna angularis*, *Glycine max*, *Phaseolus coccineus*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulg.* var. *vulgaris* as well as var. *nanus*) were investigated for their flavonoid patterns, whereby the contents were detected with HPLC. The flavonoid patterns were relatively stable, only single extracts showed exceptions (for example the occurrence of isoflavonoids). *Glycine max*, *Vigna radiata* and *Vigna angularis* showed the highest contents, followed by *Phaseolus vulgaris*, while the other extracts had only low flavonoid content. The polyphenolic content determined with Folin-Ciocalteu reagent was usually higher because of proteins and vitamin C, which are also detected with this colorimetric method.

Examination of further vegetables (*Allium sativum*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Solanum melongena* and *Raphanus sativus*) revealed that the flavonoid content was highest for the eggplant, while other extracts contained only small amounts (*Cucurbitaceae*) or no flavonoids (*Raphanus sativus* and *Allium sativum*).

Altogether this study yielded 41 different natural products, which were subsequently tested in *in vitro* assays for their antioxidative and to some extent for their proliferative and cytotoxic properties.

*Vigna radiata* contained flavones (vitexin, isovitexin), while *Vigna angularis* gave flavanoles (catechine), flavonoles (myricetin-, quercetin-3*O*-rutinoside, quercetin) and isoflavonoides (daidzein). Myricetin-3*O*-rutinoside was isolated for the first time from *Vigna angularis*. *Glycine max* provided isoflavonoides (genistein, daidzein, as well as their 7*O*-glucosides), whereas *Phaseolus coccineus* yielded glycitin instead of daidzein. Kaempferol-3*O*-sophorotrioside was isolated from *Pisum sativum* and catechine and astragalin from both kinds of *Phaseolus vulg.* The variety *vulgaris* also provided kaempferol and a procyanidin while the variety *nanus* produced gallocatechine, isoquercitrin, dihydromyricetin as well as isomyricitrin, gallic acid ethylester and ferulic acid. Dihydromyricetin was isolated from *Phaseolus vulgaris* for the first time. *Vicia faba* contained catechine, epicatechine, vitexin, isovitexin, isoschaftoside, nicotiflorin und kaempferol-3*O*-glucoside-7*O*-rhamnoside as well as further apigenin-, quercetin- and kaempferol derivatives. Although many compounds were previously known from this plant, none of these has been described for the seeds of *Vicia faba* until now. *Allium sativum* yielded only isoconiferin, while glucobrassicin and 6-methoxyglucobrassicin could be isolated from *Raphanus sativus*. In this study the NMR-data for 6-methoxyglucobrassicin are published for the first time. *Solanum melongena* yielded E-chlorogenic acid and E/Z-paucine. *Cucumis sativus* contained isoquercitrin, isorhametin-3*O*-glucoside, triandrin, and lycoperodine 1, as well as apigenin- and luteolin derivatives.

In the DPPH-Assay flavonoids with two vicinal OH-groups in the B-Ring possessed a good antioxidative activity. A double bond at position 2,3 combined with an OH-group at position 3 enhanced the activity. Compounds with a double bond at position 2,3 together with OH-groups at position 3, 5, and 4' possessed good antioxidative properties as well. Phenylacrylic acids like chlorogenic acid and ferulic acid were also good radical scavengers

Extracts, which contained radical scavengers, also possessed activity in the DPPH-Assay. The extracts of *Vigna angularis*, *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, and *Solanum melongena* were active but *Raphanus sativus* and *Cucurbita pepo* (ornamental pumpkin) showed antioxidative activity as well. In these two last extracts compounds other than flavonoids are most likely to be responsible for the observed activity.

Kaempferol, quercetin, myricetin, luteolin, and genistein showed cytotoxic properties against H4IIE-hepatoma cells, while apigenin had only weak influence on the cell viability. Apart from these only isoquercitrin and genistin showed an effect on H4IIE hepatoma cells as glucosides. But also dihydromyricetin and myricetin-3O-rutinoside had cytotoxic effects, which could be attributed to the additional OH-group in the B-Ring of the flavonoid. The analysis of quercetin, taxifolin and rutin as well as of the myricetin analogues showed that due to its cellular uptake only quercetin could protect the cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cell death.

Beside the isoflavonoids also apigenin and kaempferol showed a proliferative effect on MCF7 cells. Isoflavonoids, especially daidzein, were identified as the active compound in *Vigna angularis* extract. Isoflavonoids are also responsible for the proliferative effect of extracts of *Glycine max* and *Phaseolus coccineus*.

Because of different biological effects observed for flavonoids, the properties of these compounds should not be reduced to their antioxidative potential as it is often done in consumers advertising. An arbitrary supplementation of persons with polyphenolic enriched food should be regarded critically.

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<hr/>		
1.1.	<b>China</b>	<b>1</b>
1.1.1.	China im Überblick	1
1.1.2.	Provinz Zhejiang – Hangzhou	1
1.1.3.	Verbrauch und Produktion in China	2
1.2.	<b>Herkunft, Kultivierung und Verwendung der untersuchten Pflanzen</b>	<b>3</b>
1.3.	<b>Polyphenole</b>	<b>6</b>
1.4.	<b>Antioxidantien</b>	<b>9</b>
1.4.1.	Die Rolle von Antioxidantien im menschlichen Organismus	9
1.4.2.	Flavonoide als Antioxidantien	10
1.4.3.	Polyphenole und Krankheitsprävention	11
1.4.4.	Nahrungsergänzungsmittel, Novel-Food und diätetische Lebensmittel	12
1.4.5.	Nutzen und Risiko von Antioxidantienkonsum	14
1.5.	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<hr/>		
2.1.	<b>Probenmaterial</b>	<b>16</b>
2.1.1.	Leguminosen	16
2.1.2.	Aufzucht der Leguminosen im Gewächshaus und im Freiland	18
2.1.3.	weitere Gemüsesorten	20
2.1.4.	Essigsaures Gemüse	22
2.1.5.	Trockengemüse	22
2.2.	<b>Bearbeitung des Probenmaterials – Extraktionen</b>	<b>23</b>
2.2.1.	Extraktion der Leguminosen zur Isolierung und Testung im Zellkultursystem	23
2.2.2.	Extraktion der Leguminosen zur Quantifizierung	24
2.2.3.	Gewinnung der Extrakte beim Kochvorgang	24
2.2.4.	Extraktion der weiteren Gemüse zur Isolierung und Testung im Zellkultursystem	25
2.2.5.	Extraktion der weiteren Gemüse zur Quantifizierung	25
2.2.6.	Extraktion der essigsauren und getrockneten Gemüse zur qualitativen Untersuchung	26

<b>2.3. Isolierung der Naturstoffe</b>	<b>26</b>
2.3.1. Flüssig/Flüssig-Verteilung	26
2.3.2. Säulenchromatographie (SC)	27
2.3.3. Hochleistungsflüssigchromatographie	27
2.3.3.1. Analytische HPLC	28
2.3.3.2. Semipräparative HPLC	29
2.3.3.3. HPLC-MS	29
2.3.4. Dünnschichtchromatographie (DC)	30
2.3.5. Isolationsschemata und verwendete Methoden	32
<b>2.4. Identifizierung und Strukturaufklärung der Naturstoffe</b>	<b>44</b>
2.4.1. UV-Vis-Spektroskopie	44
2.4.2. Massenspektrometrie (MS)	44
2.4.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	45
2.4.4. Optische Drehung	46
<b>2.5. Quantifizierung des Polyphenolgehaltes</b>	<b>46</b>
2.5.1. Quantifizierung mittels HPLC-DAD	47
2.5.2. Quantifizierung nach Folin-Ciocalteu	49
<b>2.6. Untersuchung der Antioxidativen Eigenschaften der Reinsubstanzen und der Extrakte zur Quantifizierung mittels DPPH-Küvetten-Assay</b>	<b>49</b>
2.6.1. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften der Reinsubstanzen mittels DPPH – Assay	50
2.6.2. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften der Extrakte mittels DPPH – Assay	51
<b>2.7. Testung der Reinsubstanzen und Extrakte auf zelluläre Aktivität</b>	<b>51</b>
2.7.1. Zellkultur und Medium (H4IIE Hepatom Zellen)	51
2.7.1.1. Bestimmung der Zytotoxizität	52
2.7.1.2. Bestimmung der protektiven Effekte	52
2.7.1.3. Aufnahmestudien	53
2.7.2. Zellkultur und Medium (MCF7/BUS Zellen)	54
2.7.2.1. Bestimmung der zellproliferierenden Eigenschaften der Extrakte und Reinsubstanzen	54
2.7.2.2. Bestimmung des aktiven Inhaltsstoffs in <i>Vigna angularis</i>	55
2.7.3. Statistische Auswertung	56

<b>2.8. Verwendete Geräte, Chemikalien und Lösungen</b>	<b>56</b>
2.8.1. Geräte	56
2.8.2. Chemikalien und Materialien	57
2.8.3. Lösungen	59
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>3.1. Ergebnisse des Screenings verschiedener getrockneter und eingelegter chinesischer Lebensmittel</b>	<b>61</b>
3.1.1. Essigsaures Gemüse	61
3.1.2. Trockengemüse	62
<b>3.2. Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Leguminosenextrakte</b>	<b>64</b>
3.2.1. Extrakte von <i>Vigna radiata</i> (L.) R. Wilczek	64
3.2.2. Extrakte von <i>Vigna angularis</i> (Willd.) Ohwi & Ohashi	68
3.2.3. Extrakte von <i>Glycine max</i> (L.) Merr. convar. <i>max</i> var. <i>atra</i> Lehm.	72
3.2.4. Extrakte von <i>Phaseolus coccineus</i> L. var. <i>albiflorus</i> (DC.) Bailey	76
3.2.5. Extrakte von <i>Vicia faba</i> L. ssp. <i>faba</i> var. <i>faba</i> subvar. <i>faba</i>	78
3.2.6. Extrakte von <i>Pisum sativum</i> L. ssp. <i>sativum</i> convar. <i>sativum</i>	81
3.2.7. Extrakte von <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>vulgaris</i>	84
3.2.8. Extrakte von <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>nanus</i> (Jusl.) Aschers.	88
<b>3.3. Qualitative und quantitative Zusammensetzung weiterer Gemüseextrakte</b>	<b>93</b>
3.3.1. Extrakte von <i>Allium sativum</i> L.	93
3.3.2. Extrakte von <i>Cucumis sativus</i> L.	93
3.3.3. Extrakte von <i>Cucurbita pepo</i> - Arten zum Vergleich	96
3.3.4. Extrakte von <i>Raphanus sativus</i> L.	99
3.3.5. Extrakte von <i>Solanum melongena</i> L.	99
<b>3.4. Gegenüberstellung der erhaltenen Quantifizierungsergebnisse</b>	<b>103</b>
<b>3.5. Identifizierung der Isolierten Inhaltstoffe</b>	<b>107</b>
3.5.1. Flavonoide und Isoflavonoide	107
3.5.1.1. Flavanole	108
3.5.1.2. Flavone	117
3.5.1.3. Flavonole	136
3.5.1.4. Isoflavonoide	162

3.5.2.	Einfache Phenylpropan-Derivate und ähnliche Verbindungen	171
3.5.3.	Indol-Derivate	183
3.5.4.	Zuordnung der isolierten Inhaltsstoffe zu ihren Extrakten	190
<b>3.6.</b>	<b>Aktivität der Reinsubstanzen und Extrakte in <i>in vitro</i> Assays</b>	<b>195</b>
3.6.1.	Aktivität der Reinsubstanzen und Extrakte im quantitativen DPPH-Küvetten-Assay	195
3.6.1.1.	Antioxidative Aktivität der Flavanol-Derivate	196
3.6.1.2.	Antioxidative Aktivität der Flavone und Flavon-Derivate	196
3.6.1.3.	Antioxidative Aktivität der Flavonole und Flavonol-Derivate	197
3.6.1.4.	Antioxidative Aktivität der Isoflavonoide	198
3.6.1.5.	Antioxidative Aktivität der einfachen Phenylpropan-Derivate	199
3.6.1.6.	Antioxidative Aktivität der Indol-Derivate	199
3.6.1.7.	Quantifizierung der antioxidativen Aktivität der Extrakte	200
3.6.2.	Charakterisierung der zellulären Eigenschaften der Reinsubstanzen an H4IIE-Hepatom Zellen	202
3.6.2.1.	Eigenschaften von Flavon-Derivaten im Zellkultursystem	202
3.6.2.2.	Eigenschaften von ausgesuchten Quercetin- und Myricetin-Derivaten im Zellkultursystem	204
3.6.2.3.	Eigenschaften von weiteren Flavonol-Derivaten im Zellkultursystem	206
3.6.2.4.	Eigenschaften von Isoflavonoiden im Zellkultursystem	208
3.6.2.5.	Eigenschaften von einfachen Phenylpropan-Derivaten im Zellkultursystem	208
3.6.3.	Charakterisierung der proliferationsstimulierenden Eigenschaften der Reinsubstanzen und Extrakte der Leguminosen und weiterer Gemüsesorten an MCF7/BUS Zellen	209
3.6.3.1.	Bestimmung der proliferationsstimulierenden Eigenschaften der Extrakte	209
3.6.3.2.	Bestimmung der proliferationsstimulierenden Eigenschaften der Reinsubstanzen	211
3.6.3.3.	Bestimmung der aktiven Komponenten aus <i>Vigna angularis</i>	214
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>215</b>
<hr/>		
<b>4.1.</b>	<b>Qualitative und quantitative Untersuchungen der Leguminosenextrakte und Gemüse</b>	<b>217</b>
4.1.1.	Untersuchung der Extrakte aus Leguminosen	217
4.1.2.	Untersuchung der Extrakte der weiteren Gemüse	226

4.1.3. Untersuchung der eingelegten und getrockneten Gemüse	230
<b>4.2. Biologische Wirkungen</b>	<b>232</b>
4.2.1 Aktivität im quantitativen DPPH-Küvetten-Assay	233
4.2.1.1. Antioxidative Aktivität der Reinsubstanzen	233
4.2.1.2. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften der Extrakte	238
4.2.2. Zelluläre Eigenschaften der Reinsubstanzen und Extrakte	240
<b>4.3. Schlussbetrachtung</b>	<b>245</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>247</b>
<b>6. Abkürzungen</b>	<b>256</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>259</b>
7.1. Herbar-Bildmaterial	259
7.2. HPLC-Chromatogramme der eingelegten und getrockneten Gemüse	263
7.2.1. HPLC-Chromatogramme der eingelegten Gemüse	263
7.2.2. HPLC-Chromatogramme der getrockneten Gemüse	264
7.3. NMR-Spektren	265
7.3.1. NMR-Spektren der Flavanole	265
7.3.2. NMR-Spektren der Flavone	267
7.3.3. NMR-Spektren der Flavonole	272
7.3.4. NMR-Spektren der Isoflavonoide	280
7.3.5. NMR-Spektren der Phenylpropan-Derivate	283
7.3.6. NMR-Spektren der Indol-Derivate	286
7.4. Daten der Kalibriergeraden (HPLC-Methode)	287
7.5. Rohdaten der EC <sub>50</sub> -Bestimmung des DPPH-Assays	288
7.6. Rohdaten der Zelltests	289
7.6.1. Rohdaten der Zelltest an H4IIE-Hepatom Zellen	289
7.6.2. Rohdaten der Zelltest an MCF7/BUS Zellen	291

<b>7.7. Ermittlung der aktiven Komponente des <i>Vigna angularis</i>-Extraktes</b>	<b>293</b>
7.7.1. HPLC-Chromatogramme der P2d-Auftrennung( <i>Vigna angularis</i> )	293
7.7.2. NMR-Spektrum der P2d65%-Fraktion	295
<b>7.8. Lebenslauf und Veröffentlichungen</b>	<b>296</b>
<b>7.9. Danksagung</b>	<b>299</b>
<b>7.10. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>301</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. China

### 1.1.1. China im Überblick

Am 1. Oktober 1949 wurde die Volksrepublik China gegründet, 2004 belief sich die Anzahl der Bevölkerung auf 1.32 Milliarden Einwohner. Das Staatsgebiet erstreckt sich von 18-54° nördlicher Breite über 4200 km und 71-135° östlicher Länge über 4500 km. Insgesamt handelt es sich dabei um 9 560 980 km<sup>2</sup> wovon ca. 1.37 Mio. km<sup>2</sup> als Ackerland genutzt werden. Administrativ wird China in 22 Provinzen, 5 autonome Regionen, 4 regierungsunmittelbare Städte und die Sonderverwaltungszone Hongkong und Macao gegliedert. Wirtschaftlich ist besonders die Küste von Liaoning im Norden bis Guangxi im Süden von Bedeutung, die zum einen das Perlfuss-Delta um Hongkong zum anderen das Yangzi-Delta um Shanghai erfasst. Zu letzterem gehört neben Shanghai selbst der südliche Teil der Provinz Jiangsu mit den Städten Nanjing, Yangzhou, und Zhenjiang und der nördliche Teil der Provinz Zhejiang mit den Städten Hangzhou, Shaoxing und Ningbo. Das Gebiet stellt nicht nur die am dichtesten besiedelte Region, sondern auch den bedeutendsten Wirtschaftsraum Chinas dar. So leben 75 Mio. Menschen auf ca. 100 000 km<sup>2</sup> und bringen der Region 25% der Industrieproduktion (FAO 2004; Fülling 2000).

### 1.1.2. Provinz Zhejiang – Hangzhou

Die Provinz Zhejiang ist eine der kleinsten Provinzen Chinas und besteht hauptsächlich aus Berglandschaften (70%). 10% entfallen auf Wasserlandschaften (Land der meisten Inseln Chinas) und lediglich 20% auf Ackerland. Dennoch stellt die Provinz eine wichtige landwirtschaftlich genutzte Region Chinas dar. Seit 1950 wurden zusätzlich durch Aufschüttungen 155000 ha Land neu gewonnen, um diesen Sektor auszubauen. Ein hoher Pro-Kopf-Ertrag gelingt zum einen auf Grund der klimatischen Bedingungen, die 2-3 Ernten pro Jahr ermöglichen, zum anderen auch durch hochintensive Bodennutzung. Das Gebiet zwischen Hangzhou, Jiaxing und Huzhou wird daher auch als „Kornkammer“ bezeichnet. Seit jeher wird die Region auch „das Land von Fisch und Reis“ genannt. Sie ist außerdem der größte Produzent von Seide in China, daneben stellen unter anderem Tee, Zitrusfrüchte, Weizen, Mais und Faserpflanzen sowie die Forstwirtschaft einen wichtigen landwirtschaftlichen Faktor dar. Als herausragende Industriezweige sind die elektromechanische Industrie, Textilien und Chemikalien, aber auch die Nahrungsmittelverarbeitung zu nennen.

### 1.1.3. Verbrauch und Produktion in China

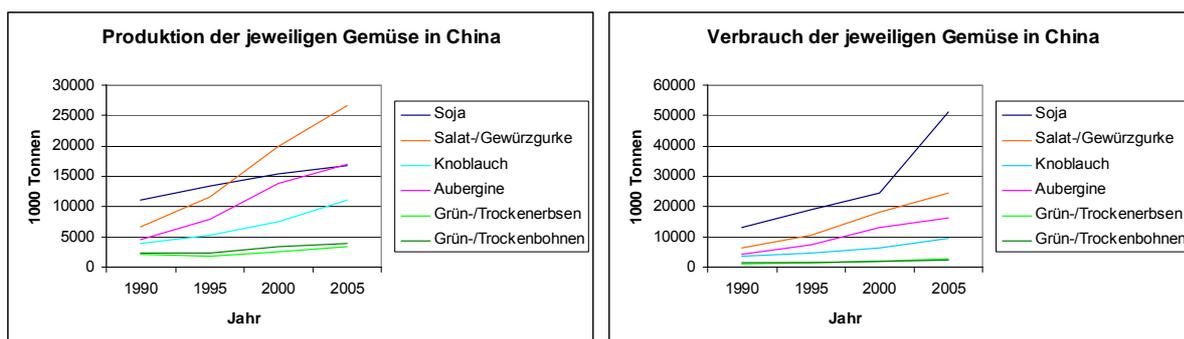


**Abb.EL1:** Warenangebot in einer chinesischen Markthalle in Hangzhou (N.Weber 2004)

In der vorliegenden Arbeit wurden neben Leguminosen wie Soja, verschiedenen Bohnen und Erbsen, auch Auberginen, Gurken, Rettich und Knoblauch untersucht, die auf lokalen Märkten bzw. in Supermärkten in der Provinz Zhejiang erstanden wurden (Abb.E1).

Zudem wurden sog. „pickled vegetables“ und getrocknete Gemüse analysiert, die in größerem Umfang in der chinesischen Küche Verwendung finden.

Der chinesische Markt expandiert in den letzten Jahren stark und Nahrungsmittel werden nicht nur allein zum eigenen steigenden Bedarf produziert (die Bevölkerung der Volksrepublik China wächst trotz der 1979 eingeführten 1-Kind Politik immer noch jährlich um 0.7% (Daten 2000-2005)), sondern gelangen vermehrt auch in den Export. Abb.EL2 verdeutlicht die steigende Produktion und den Verbrauch in China.



**Abb.EL2:** Entwicklung der Produktion und des Verbrauchs der aufgeführten Gemüse (1990-2005) in 1000 T aus FAO Statistical Yearbook ([www.faostat.fao.org/März 2007](http://www.faostat.fao.org/März 2007))

## 1.2. Herkunft, Kultivierung und Verwendung der untersuchten Pflanzen

Einige der untersuchten Kulturpflanzen stammen ursprünglich aus dem „Reich der Mitte“, auch wenn sie heute nicht mehr ausschließlich dort angebaut werden. Besonders im Falle der Leguminosen wird dies deutlich. In diesem Kapitel werden die einzelnen Pflanzen mit ihrem Ursprungsgebieten und den heutigen Hauptanbaugebieten vorgestellt und ihre Verwendung beschrieben, wobei die Anwendungen in der Volksmedizin mit dem Vorbehalt zu sehen sind, dass ihr Nutzen auf diesem Gebiet nicht wissenschaftlich belegbar ist (Brown 2005; Katzer 2005; Pahlow 2001; Schuchert 2007; Schuster et al. 1998; Teuscher et al. 2004).

*Allium sativum* stammt ursprünglich aus Zentralasien, wobei die Pflanze auch im Fernen Osten bereits vor Eintreffen der Europäer bekannt war. In Europa selbst war sie seit dem Römischen Reich ein beliebtes Gewürz und wird heute weltweit angebaut. Hauptanbaugebiete sind unter anderem China, Indien und Südeuropa. Die Kommission E schreibt *Allium sativum* antihypercholesterolämische und antiarteriosklerotische Eigenschaften zu, außerdem sollen Knoblauchextrakte antiasthmatische, immunmodulierende und antioxidative Wirkungen besitzen.

*Cucumis sativus* kommt vermutlich ursprünglich aus den Himalayatalern (Wildform *Cucumis hardwickii*) und wurde bereits vor 3000 Jahren in Indien und Ägypten angebaut. Heute wird sie weltweit sowohl in tropischen als auch in gemäßigten Klimazonen kultiviert, stellt jedoch hohe Ansprüche an Wärme und Feuchtigkeit. Verwendung findet sie besonders als Salat oder Gemüse, aber auch in der Volksmedizin bei Hitzeausschlägen, Verbrennungen und ihre Samen gegen Bandwürmer. Aus der gleichen Familie wie die Gurke stammt auch die Zucchini, eine Kulturform des Wildkürbis. Im Unterschied zur Gurke stammt die Zucchini wahrscheinlich ursprünglich aus Mexiko (Wildform *Cucurbita texana*), von wo aus sie nach der Entdeckung Amerikas ihren Weg nach Europa und darüber hinaus fand. Angebaut wird sie heute besonders im Mittelmeerraum, Amerika und China.

*Raphanus sativus* (Rettich) ist heute in den gemäßigten Klimazonen weltweit vertreten, wurde aber schon 2000 v. Chr. als Kulturpflanze in Ägypten genutzt (Stammpflanze vermutlich *Raphanus maritimus*). Verbreitung fand die Pflanze durch Römer und Griechen. Sie findet als Salat- und Gewürzpflanze vielseitige Verwendung. Der Saft von Glucosinolate enthaltenden Pflanzen wie *Raphanus sativus* wird bei Dyskinesien der Gallenwege oder Katarrhen der oberen Luftwege eingesetzt.

Die Heimat der Aubergine (*Solanum melongena*) liegt ursprünglich in Indien, von wo aus sie durch die Araber bis nach Europa gelangte. Seit 1550 wird sie in Italien angebaut, ebenso zählen heute China neben der Türkei, Japan und Ägypten zu den größten Produzenten. In verschiedenster Art trägt die Aubergine als Beilage zur Ernährung bei.

### Leguminosen

*Glycine max* (Sojabohne) zählt zu den ältesten Kulturpflanzen; sie wurde bereits seit 2800 v. Chr. in China angebaut. Erst im 17-ten Jhd. kam sie über Indonesien, Vorderindien, Ceylon und Palästina bis nach Nordafrika. 1829 gelangte sie nach Amerika, wo sie in immer stärkerem Maße angebaut wurde. Heute stellen Nord- und Südamerika neben China die Hauptanbaugebiete dar, wobei sie nicht nur als Nahrungsmittel besonders wegen ihres Eiweißgehaltes, sondern auch als Futtermittel und Industrierohstoff Verwendung findet.

Die Benennung der Gattungen *Phaseolus* und *Vigna* wurde in früherer Zeit meist überschneidend verwendet, so dass es auch zu Verwechslungen der Arten kam. Heute unterteilt man meist in die aus Amerika stammenden *Phaseolus*-Arten und die aus der „Alten Welt“ stammenden *Vigna*-Arten.

Die *Phaseolus*-Arten stammen wie bereits beschrieben aus der Neuen Welt. Sie wurden bereits früh von den süd-, mittel- und nordamerikanischen Ureinwohnern kultiviert. Die ältesten Funde für *Phaseolus vulgaris* gehen hier bis 6000-2700 v. Chr. in Peru zurück.

*Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne), die die wirtschaftlich wichtigste *Phaseolus*-Art darstellt, wird je nach Art ihres Habitus in Busch- oder Stangenbohne unterteilt, obwohl hier äußere Einflüsse starke Änderungen bewirken können. Die heute wichtigsten Anbaugebiete dieser Pflanze sind Brasilien, Mexiko und China. Während in diesen Ländern eine beachtliche Menge an Trockenbohnen produziert wird, werden in Europa wesentlich mehr „Grüne Bohnen“ für Frischmarkt und Konservenindustrie angebaut. Kühleres Klima und Wind hemmen jedoch das Wachstum von *Phaseolus vulgaris*, so dass es zu geringeren Erträgen kommt.

Eine Art, die wesentlich unempfindlicher ist und auch unter deutlich kühleren und raueren Bedingungen gedeiht, ist *Phaseolus coccineus*, die sog. Feuerbohne oder Prunkbohne. Im Gegensatz zur einjährigen Gartenbohne kann die Feuerbohne auch zwei- oder mehrjährig sein, daneben wird sie häufig auch als Zierpflanze angebaut.

Beide *Phaseolus*-Arten kommen mit unterschiedlichen Blütenfarben und Samenmerkmalen vor. Sie dienen sowohl zur Lebens- als auch Futtermittelherstellung. Jedoch kann der Anteil an Blausäure besonders bei dunkelsamigen Varietäten ca. 3-4% betragen. Auch das giftige Lectin Phasin, das in ungekochtem Zustand in den Samen enthalten ist, führt zu Beschränkungen in der Verwendung. Aus diesen Gründen sollten die weißen Varietäten in gekochtem Zustand in der Küche bevorzugt werden. Bohnenhülsen werden zusammen mit Birkenblättern und Schachtelhalm als Diuretikum genutzt, wohingegen die Anwendung bei Diabetes eher eine Anwendung in der Volksmedizin ist, die wissenschaftlich nicht belegt ist.

Die Mungbohne (*Vigna radiata*=*Phaseolus radiatus*=*Vigna/Phaseolus aureus*), die nicht mit der nahe verwandten Urbohne (*Vigna/Phaseolus mungo*) verwechselt werden sollte, stammt ursprünglich aus Indien, wurde jedoch früh bis Süd- und Ostasien verbreitet. Viel später erst erfolgte ihre Verbreitung auch auf die anderen Kontinente. Zum Hauptanbaugebiet zählt auch

heute noch Indien, wobei *Vigna radiata* in den letzten Jahren vermehrt auch in China und den USA zur Erzeugung von Mungsprossen angebaut wird. Neben der Nutzung als Lebensmittel (als ganze Bohne oder als Mehl) wird auch die Mungbohne als Futtermittel verwendet. Zusätzlich wird diese Bohne aber auch in der Volksmedizin genutzt wie z.B. bei Blähungen, Rheumatismus und Erkältungen. In den asiatischen Regionen werden Extrakte aus Mungbohnen auch in der Kosmetikindustrie eingesetzt, hierbei stehen gesichtshautaufhellende Eigenschaften im Vordergrund (Ahn et al. 2003).

Auch die Art *Vigna angularis* (Adzukibohne) stammt ursprünglich aus Asien, wird heute aber ebenso in anderen subtropischen bis gemäßigten Klimazonen wie den USA, Südamerika, Afrika und Neuseeland kultiviert. Die Verwendung ist ähnlich der der Mungbohne; in diesem Fall ist der volksmedizinische Nutzen besonders in der Geburtshilfe, bei Nierenproblemen, Abszessen und bestimmten Tumoren zu sehen.

*Pisum sativum*, die Erbse, scheint ihr Ursprungsgebiet in Vorder- bis Mittelasien zu haben. Sie fand aber bereits sehr früh in ganz Europa Verbreitung. So wurden in Polen und Deutschland in Ausgrabungen Bandkeramiken aus dem 5. Jahrtausend v. Chr. zusammen mit Erbsen gefunden. Auf Grund ihrer guten Anpassungsfähigkeit ist die Erbse heute weltweit verbreitet. Sie wird sowohl als Lebens- und Futtermittel als auch bei der Erzeugung abbaubarer Kunststoffe genutzt, außerdem soll sie in der Volksmedizin bei Entzündungen, Hühneraugen und Warzen geholfen haben.

*Vicia faba*, die Ackerbohne, ist ebenfalls eine der ältesten Kulturpflanzen. Funde werden aus Israel bereits im 7. Jahrtausend v. Chr. beschrieben, ebenso aus dem südlichen Mittelmeerraum wie Ägypten (ca. 2300 v. Chr.) und Griechenland (um 4300-2800 v. Chr.). Erst später breitete sie sich auch weiter nördlich aus. Im Mittelalter war sie eine der wichtigsten Nahrungspflanzen, wurde aber mit Einführung der amerikanischen Gartenbohne langsam verdrängt. Heute wird sie wieder verstärkt besonders in China kultiviert. Als Heilmittel wurde sie unter anderem in Umschlägen gegen Sommersprossen und Geschwüre, innerlich bei Nierensteinen und Husten angewendet.

### 1.3. Polyphenole

Nahrungspflanzen enthalten neben Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten, über die der menschliche Energiebedarf gedeckt wird, auch weitere wichtige Stoffe, die für den menschlichen Stoffwechsel essentiell sind. So zeichnen sich verschiedene Gemüse darunter Leguminosen auch durch einen hohen Gehalt an Vitaminen aus. Flavonoide sind eine weitere Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die weit verbreitet sind und zu den Polyphenolen gerechnet werden.

Polyphenole sind Verbindungen, die zusätzlich zu ihrem aromatischen Charakter mehrere bis viele Hydroxyfunktionen besitzen. In diese Klasse von Verbindungen gehören neben Stilbenen, Lignanen und Phenolsäuren auch Flavonoide (Beispiele siehe Abb.EL4). Die beiden letztgenannten stellen die zwei wichtigsten Klassen der Polyphenole dar. Sie sind fast im ganzen Pflanzenreich verbreitet und gehen aus dem Shikimat-Stoffwechsel oder Zwischenprodukten dieses Stoffwechsels hervor. Die Biogenese ist schematisch in Abb.EL3 dargestellt (Rimpler 1999).

Phenolsäuren liegen meist nicht frei, sondern verestert unter anderem mit Zimtalkoholen, Chinasäure und Zuckern vor. Die Chlorogensäure, ein Chinasäureester der Kaffeesäure, ist dabei ein häufig anzutreffendes Derivat. Sie kommt in vielen Früchten, Gemüse und ganz besonders in Kaffee vor. Ebenso liegt Gallussäure in den meisten Fällen als Ester vor, wobei die meisten Derivate zu den Gerbstoffen gezählt werden.

Flavonoide schließlich werden eingeteilt nach dem Substitutions- und Oxidationsgrad des heterocyclischen Ringes (siehe Abb.EL3). Es existieren viele strukturelle Variationen, unter anderem *O*-Glycoside oder *C*-Glycosyle, methylierte oder prenylierte Derivate und Kondensationsprodukte, so dass bisher von diesen Verbindungen über 6500 Vertreter identifiziert wurden. Zum einen geben sie Früchten und Gemüse wie Kirschen, Erdbeeren, Himbeeren oder Auberginen und Rotkohl ihre rote Farbe (Anthocyanidine) oder verleihen vielen Blüten ihre Leuchtkraft (lat. *flavus* gelb), zum anderen dienen sie der Pflanze als Schutz vor UV-Strahlung (u.a. Quercetin/Kämpferol (Rozema et al. 2002; Yaginuma et al. 2002)) oder als Fraßschutz bzw. als Schutz vor Mikroorganismen (Isoflavonoide, (Tsukahara et al. 1985)). Da diese Einflüsse häufig von außen auf die Pflanze einwirken, befinden sich die Flavonoide meist vermehrt in den äußeren Schichten.

# Einleitung

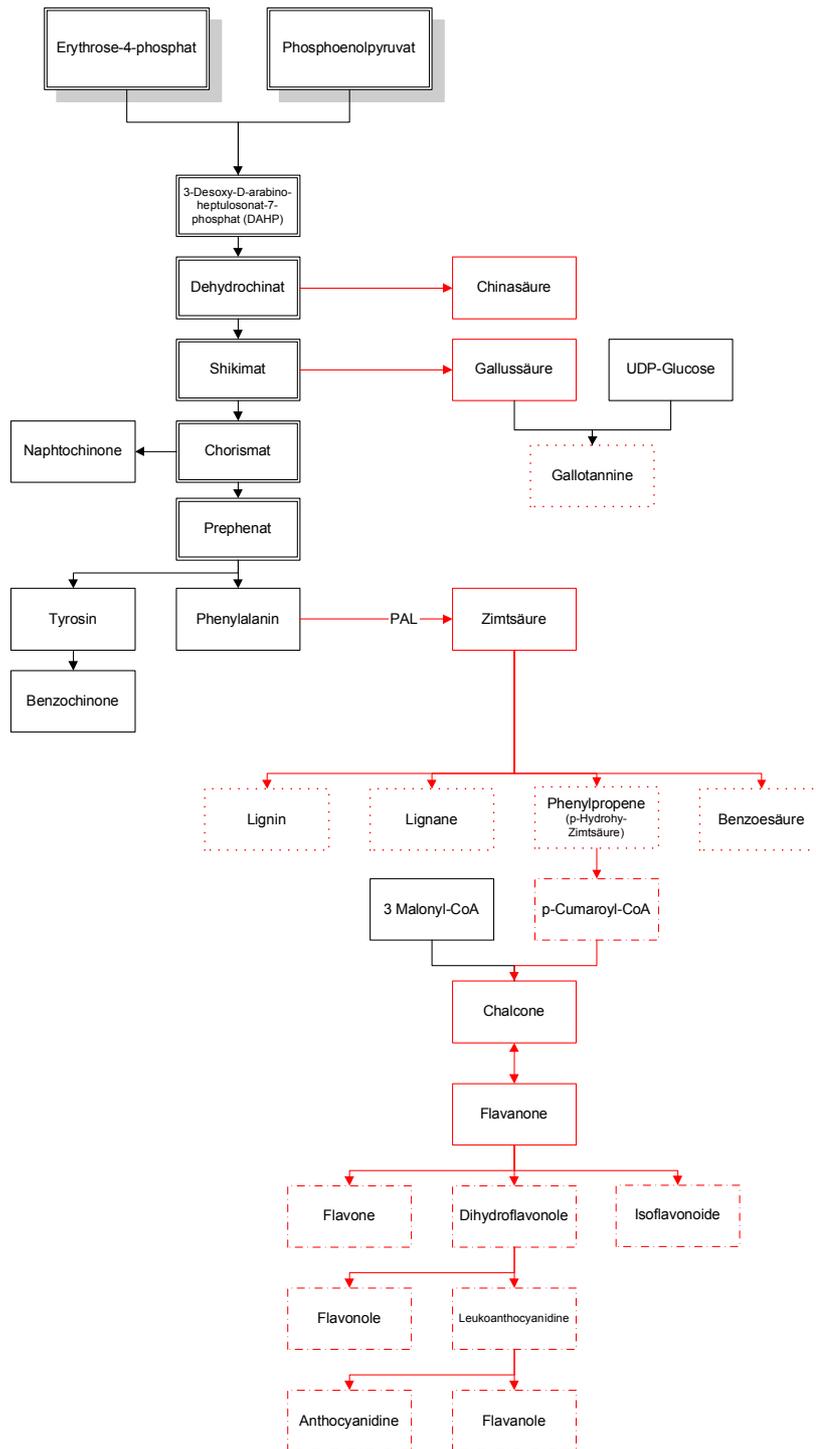
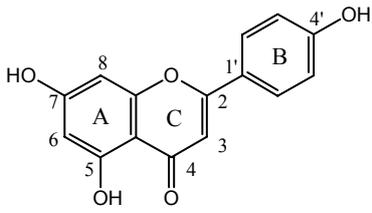
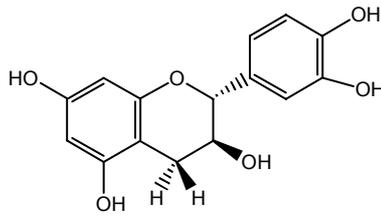


Abb.EL3: Schematische Darstellung des Shikimatstoffwechsels modifiziert nach Rimpler (1999), --- Derivate des Sekundärstoffwechsels

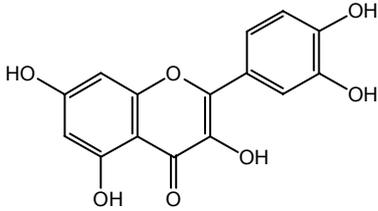
# Einleitung



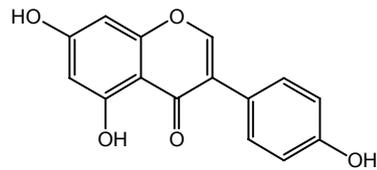
Apigenin (Flavon)



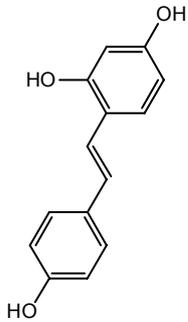
Catechin (Flavanol)



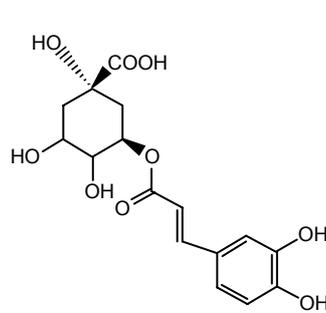
Quercetin (Flavonol)



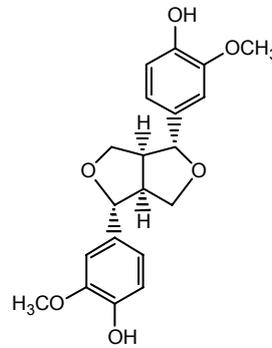
Genistein (Isoflavon)



Resveratrol (Stilben)



Chlorogensäure (Phenolsäure)



Pinoresinol (Lignan)

Abb.EL4: Beispiele einiger Polyphenole

## 1.4. Antioxidantien

### 1.4.1. Die Rolle von Antioxidantien im menschlichen Organismus

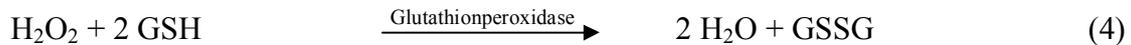
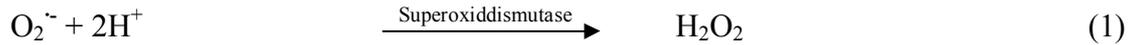
#### Reaktive Sauerstoffspezies

Im menschlichen Organismus werden reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) während der normalen Zellaktivität produziert. So werden sie von Phagozyten bei immunologischen Vorgängen („respiratory burst“) zur Abwehr von Mikroorganismen freigesetzt oder entstehen in den stark stoffwechselaktiven Mitochondrien oder den Peroxisomen. Auch die Aktivität der CYP P450 Enzyme, die an vielen Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind, trägt zur zelleigenen ROS Bildung bei (Gordon 1996). Zu den entstehenden Verbindungen zählen zum einen Radikale wie das Hydroxylradikal (OH $\cdot$ ), das Peroxylradikal (ROO $\cdot$ ) oder das Superoxidradikal (O $_2^{\cdot-}$ ), zum anderen auch nicht-radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H $_2$ O $_2$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1$ O $_2$ ) oder hypochlorige Säure (HOCl), die zur Entstehung von Radikalen führen können. So bildet sich aus Wasserstoffperoxid unter Einwirkung von redoxaktiven Metallionen (Fe $^{2+/3+}$ , Cu $^{2+/3+}$ , Cr $^{2+/3+}$ ) Hydroxylanion und Hydroxylradikal (Fenton-Reaktion), von denen letzteres das reaktivste Radikal im menschlichen Organismus darstellt.

#### Schutzmechanismen des Organismus gegen ROS

Da Radikale auf Grund ihrer ungepaarten Elektronen sehr reaktiv sind, greifen sie nicht nur gezielt körperfremde Bestandteile an, sondern reagieren ebenso mit körpereigenen Molekülen wie DNA, Proteinen und den Lipiden der Zellmembranen. Dies kann zu Veränderungen und Schädigungen der jeweiligen Biomoleküle führen. Daher stehen der Zelle bzw. dem Organismus mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, um in diesen Mechanismus einzugreifen. Fehlerhafte Moleküle können von der Zelle erkannt und abgebaut werden, womit einer Fehlfunktion oder Mutation vorgebeugt wird. Des Weiteren ist die Zelle in der Lage bereits entstandene Schäden zu erkennen und zu beseitigen (DNA-Reparatur-Enzyme).

Die Bildung von ROS kann verhindert oder aber ihre Konzentration verringert werden, indem antioxidative Enzyme ROS reduzieren oder aber niedermolekulare Substanzen diese abfangen oder ihre Bildung verhindern. Zu den Enzymen gehören die Superoxiddismutase (1), die die Reaktion vom Superoxidradikal zu Wasserstoffperoxid katalysiert, ebenso wie die Glutathionperoxidasen und die Katalase, die Wasserstoffperoxid zu H $_2$ O umsetzen (2-4).



**Abb.EL5:** Reaktion von antioxidativen Enzymen, GSH=Glutathion

Plasmaproteine wie Transferrin, Ceruloplasmin und Albumin komplexieren  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  und verhindern so die Entstehung von Hydroxylradikalen, welche in der Fenton-Reaktion gebildet würden. Antioxidative Moleküle im Plasma, zu denen Harnstoff, Bilirubin und Glutathion gehören, fangen Radikale ab, indem sie diese reduzieren, selbst jedoch oxidiert werden. Die gleichen Eigenschaften besitzen auch einige Vitamine wie zum Beispiel Vitamin C (Ascorbinsäure), E ( $\alpha$ -Tocopherol) und A (Retinol), sowie deren Vorstufen, die Carotinoide und das Coenzym Q (Ubichinon). Diese Verbindungen werden genauso wie die Flavonoide und weitere Polyphenole, die ebenfalls antioxidative Eigenschaften aufweisen, über die Nahrung zugeführt.

### 1.4.2. Flavonoide als Antioxidantien

Flavonoide bestehen aus zwei aromatischen Ringen (A- und B-Ring), die über eine C3-Brücke miteinander verknüpft sind. Die C3-Brücke bildet den eingangs bereits erwähnten heterocyclischen Ring (C-Ring), dessen Oxidationsgrad der Einteilung der Flavonoide in die in Abb.EL3 dargestellten Typen zugrunde liegt. Beispielsweise besitzen Flavanole wie das Catechin (Abb.EL4) weder eine Doppelbindung noch eine Ketofunktion im C-Ring, sondern lediglich eine OH-Gruppe an C3. Flavone und Flavonole hingegen zeichnen sich durch die Anwesenheit von sowohl einer Doppelbindung als auch einer Ketofunktion aus, letztere tragen zusätzlich eine OH-Funktion an C3. Des Weiteren können alle Typen von Flavonoiden sowohl am A- als auch am B-Ring zahlreiche Substitutionen aufweisen, zu denen unter anderem Hydroxyl- und Methoxyfunktionen zählen.

Die phenolischen OH-Gruppen stellen gleichzeitig auch die wesentliche Voraussetzung für die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide dar. Man geht davon aus, dass Flavonoide durch Protonentransfer in der Lage sind ROS wie  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{ROO}^{\cdot}$  oder  $\text{O}_2^{\cdot-}$  zu reduzieren. Hierbei stellen eine Catechol-Gruppierung (*ortho*-Dihydroxy-Funktion) im B-Ring, eine 2,3-Doppelbindung mit einer 4-Oxogruppierung im C-Ring sowie eine zusätzliche Hydroxyfunktion an 3 Position wichtige strukturelle Voraussetzungen für die antioxidative Aktivität dar (Cotelle et al. 1996; Pannala et al. 2001; Rice-Evans et al. 1996). Während Quercetin eine hohe antioxidative Aktivität aufweist, zeigt Galangin, ein Derivat ohne Hydroxyfunktionen im B-Ring, eine vergleichsweise geringere Aktivität.

Flavonoide besitzen außerdem die strukturellen Voraussetzungen, um Metallionen zu chelatisieren, so dass die Entstehung von OH-Radikalen im Zuge der Fenton-Reaktion vermieden wird. Ein weiterer Ansatzpunkt, über den Flavonoide die Entstehung freier

Radikale senken und somit zur Vermeidung von oxidativem Stress für die Zelle beitragen, ist die Hemmung von ROS-produzierenden Enzymen wie der Xanthinoxidase (Cotelle et al. 1996; Hayashi et al. 1988; Pietta 2000).

Demgegenüber sind jedoch auch die prooxidativen Eigenschaften der Flavonoide in höheren Konzentrationen zu nennen, die in Anwesenheit von OH-Gruppen im B-Ring zu beobachten sind (Michels et al. 2005). Ebenso werden bei steigenden Konzentrationen vermehrt Zytotoxizität oder DNA-Strangbrüche beobachtet (Michels et al. 2005; Wätjen et al. 2005). Des Weiteren können die entstehenden Oxidationsprodukte mit Thiolgruppen reagieren, so dass es unter Umständen zur Inaktivierung von Enzymen kommen kann (Michels et al. 2004).

### **1.4.3. Polyphenole und Krankheitsprävention**

Obwohl die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in einem gewissen Umfang zum normalen Stoffwechsel gehört, kann die übermäßige Bildung generell oder in einem Kompartiment negative Auswirkungen besitzen, d. h. die endogene ROS-Bildung kann nicht mehr kompensiert werden und führt zu oxidativem Stress für den Organismus. Faktoren, die dieses Gleichgewicht zusätzlich negativ beeinflussen, sind zum Beispiel UV-Strahlung, Chemotherapeutika, Ozon, Zigarettenkonsum oder aber auch Leistungssport.

Betroffen sein können zum einen Proteine und daraus resultierende Enzymfunktionen. Zum anderen können auch Membranen oder die DNA selbst angegriffen werden. Mit zunehmendem Alter können diese Ereignisse akkumulieren und sich schließlich manifestieren. Dies führt in der Zelle zu Schäden, in deren Folge Krankheiten entstehen können. Solche Prozesse werden bei Erkrankungen wie Krebs, Atherosklerose oder neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer bzw. Morbus Parkinson als Ursache gesehen.

Die protektiven Eigenschaften der Polyphenole bei Krebserkrankungen sind auf vielfältige Mechanismen zurückzuführen. Dabei sind wie im Falle der phytoestrogenen Wirkung der Isoflavonoide nicht nur antioxidative Aspekte ausschlaggebend. Isoflavonoide wie Genistein (Abb.EL4) zeigen eine Affinität zum Estrogenrezeptor, jedoch weisen sie eine geringere intrinsische Aktivität auf als der endogene Ligand und können somit unter Umständen antiestrogene Wirkung besitzen. Dies ist besonders für estrogenabhängige Tumore ausschlaggebend (Dixon et al. 2002; Kris-Etherton et al. 2002).

Zur Entstehung von Atherosklerose trägt die Oxidation von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) bei, die von Makrophagen aufgenommen werden. Infolge dessen reichert sich Cholesterin in den Makrophagen an und führt zur Umwandlung dieser Zellen in Schaumzellen. Diese schließlich verursachen die Entstehung von atherosklerotischen Plaques (Steinberg et al. 2002). Ob die Erniedrigung von oxidativem Stress zur Vorbeugung von Atherosklerose dient, ist nicht eindeutig geklärt. Demzufolge wird auch die Wirkung antioxidativer Substanzen wie der Polyphenole in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert (Scalbert et al. 2005).

Flavonoide wie auch alle anderen Antioxidantien werden während ablaufender Redoxreaktionen verbraucht, sie stehen dem Körper somit nicht mehr zur Verfügung. Es besteht entweder die Möglichkeit, dass die Substanz von einem weiteren Antioxidans reduziert, d.h. regeneriert wird, wie es bei Vitamin E durch Ascorbinsäure der Fall sein kann, oder sie muss ständig neu zugeführt werden. Liegt eine Erkrankung wie Atherosklerose vor, die mit vermehrtem oxidativem Stress in Verbindung steht, so ist unter Umständen ein erhöhter Bedarf an Antioxidantien notwendig.

Viele Organisationen unter anderem die „American Dietetic Association“ (ADA) raten daher zu einer ausgewogenen und abwechslungsreichen Ernährung, die die Bevölkerung unter anderem mit Antioxidantien versorgt. Es werden zum Beispiel 5 bis 9 Mahlzeiten mit Früchten und Gemüse empfohlen. Die Aufnahme von grünem und schwarzem Tee oder Rotwein wird von einigen Experten befürwortet, da in diesen Getränken Catechine bzw. Resveratrol einen gesundheitsfördernden Einfluss ausüben könnten (ADA 1999). Vielfach werden Nahrungsmittel, die solche gesundheitsfördernden Verbindungen enthalten oder mit ihnen angereichert sind, als „functional foods“ bezeichnet, weil sie über die einfache Ernährung hinaus positiven Einfluss auf die Gesundheit zeigen.

#### **1.4.4 Nahrungsergänzungsmittel, Novel-Food und diätetische Lebensmittel**

Innerhalb dieser Arbeit galt ein besonderes Interesse den pflanzlichen Polyphenolen, die in den einzelnen Extrakten der oben beschriebenen Pflanzen nachzuweisen waren. Die Diskussion über die Rolle der Polyphenole als Antioxidantien und damit als potentielle Mittel in der Krankheitsprävention sowie der Therapie von Erkrankungen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Dabei kommt dem Konsumverhalten der Bevölkerung ebenfalls eine Bedeutung zu, da vielfach hoch dosierte Einzelsubstanzen (z.B. Vitamin E, Quercetin), aber auch Extrakte aus Früchten (u.a. Orangen-, Hagebutten-, Johannisbeer-, Himbeer-, Birnenextrakten), oft mit Zusätzen an weiteren Vitaminen, Enzymen und Mikroorganismen, in großer Menge und in großer Vielfalt auf dem Markt angeboten werden.

Derartige Produkte unterliegen in Deutschland entweder der Novel-Food-Verordnung oder Nahrungsergänzungsmittelverordnung. Erstere tritt in Kraft, wenn es sich dabei um neuartige Lebensmittel oder neuartige Lebensmittelzutaten (Novel-Food, NF) handelt. Neuartige Lebensmittel oder Lebensmittelzutaten liegen vor, wenn die Produkte „Lebensmittel mit neuer oder gezielt modifizierter primärer Molekularstruktur“ darstellen. Außerdem handelt es sich um neuartige Lebensmittel gemäß dieser Verordnung, wenn sie aus Mikroorganismen, Pilzen oder Algen bestehen oder aus diesen isoliert wurden. In speziellen Fällen gehören dazu auch Produkte, die aus Pflanzen bestehen oder aus ihnen isoliert wurden, oder aus Tieren isolierte Lebensmittelzutaten darstellen. Ausgenommen davon sind Lebensmittel, die „mit herkömmlichen Vermehrungs- und Zuchtmethoden gewonnen wurden und die

erfahrungsgemäß als unbedenkliche Lebensmittel gelten“ können. Ebenso fallen solche Produkte unter diese Verordnung, „bei deren Herstellung ein nicht übliches Herstellungsverfahren angewandt wurde“, so dass eine bedeutende Veränderung der Zusammensetzung oder der Struktur des Lebensmittels hervorgerufen wurde (z.B. Änderungen im Nährwert, dem Stoffwechsel, der Menge der unerwünschten Stoffe).

Neuartige Lebensmittel und Lebensmittelzutaten unterliegen einer einheitlichen Regelung (Verordnung (EG) Nr. 258/97) zum Schutz der öffentlichen Gesundheit. Dabei werden sie einer einheitlichen Sicherheitsprüfung unterzogen. Sind Produkte im Wesentlichen gleichwertig mit einem bestimmten konventionellen Lebensmittel, so können sie über ein vereinfachtes Notifizierungsverfahren in Verkehr gebracht werden. Außerdem kann ein vereinfachtes Verfahren angewandt werden, wenn nach dem Grundsatz des freien Warenverkehrs das Produkt bereits in einem Mitgliedsstaat der Europäischen Gemeinschaft im Verkehr ist. Dabei muss ein Antrag auf eine Allgemeinverfügung nach § 54 LFGB gestellt werden, die es dem Hersteller erlaubt Waren, die den deutschen Vorschriften nicht entsprechen, dennoch in Deutschland einzuführen. Dem geht jedoch eine Prüfung des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) voraus, mit der festgestellt wird, ob gesundheitliche Einwände bestehen. Wird dem Antrag stattgegeben, so erhalten damit auch alle gleichartigen Produkte anderer Hersteller über dieselbe Allgemeinverfügung die Verkehrsfähigkeit.

Die Produkte können andererseits unter die Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung (NemV) fallen. Sie unterliegen dann lediglich einer Anzeigepflicht beim BVL, wenn sie die allgemeine Ernährung ergänzen, also ein „Konzentrat von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung allein oder in Zusammensetzung“ darstellen und zusätzlich in dosierter bzw. abgeteilter Form (Kapseln, Tabletten, Pulverbeutel, Ampullen, u.s.w.) in den Verkehr gebracht werden. Auch hier besteht die Möglichkeit einer Allgemeinverfügung oder zusätzlich einer Ausnahmegenehmigung, wenn das Produkt nicht der NemV entspricht.

In beiden Fällen besteht jedoch eine Kennzeichnungspflicht, die es dem Verbraucher erlaubt, festzustellen, um welches Produkt es sich handelt. Bei Nahrungsergänzungsmitteln ist in jedem Fall der Hinweis anzubringen, dass das Produkt „nicht als Ersatz für eine ausgewogene und abwechslungsreiche Ernährung verwendet werden“ sollte. Außerdem muss der Warnhinweis enthalten sein, dass die empfohlene tägliche Verzehrmenge nicht überschritten werden darf.

Daneben gibt es auch diätetische Lebensmittel, „die für eine besondere Ernährung bestimmt sind“, d.h. für bestimmte Personengruppen mit besonderen Anforderungen an die Ernährung. Hierzu zählen unter anderem Schwangere, Stillende, Säuglinge und Kleinkinder oder auch Diabetiker und Sportler. Die Verordnung (DiätV) sieht für diese Lebensmittel eine gesonderte Zusammensetzungs- und Kennzeichnungspflicht vor, außerdem muss der Ernährungszweck, zu dem sie besonders geeignet sind, angegeben werden. Für die meisten dieser diätetischen Lebensmittel sind keine gesonderten Anzeigepflichten zu beachten, sofern sie für die in der

Verordnung genannten Personenkreise oder für die genannten Verwendungszwecke deklariert werden.

#### **1.4.5. Nutzen und Risiko von Antioxidantienkonsum**

In der Nährwert-Kennzeichnungsverordnung ist festgelegt, welche Inhaltsstoffe gesondert auf Produkten angegeben werden müssen. Außerdem ist dort auch festgelegt, dass von Verbindungen wie Vitamin C oder E sowohl die enthaltene Menge als auch der enthaltene Prozentsatz der empfohlenen Tagesdosis angegeben werden muss. Es liegen jedoch bisher für einige Substanzklassen wie z. B. Flavonoide keine Verzehrempfehlungen vor, die den Verbraucher darüber informieren könnten, ob er zu viel oder zu wenig dieses Stoffes einnimmt. Die EFSA (European Food Safety Authority) hat Anfang 2006 zwar einen Bericht über tolerierbare Aufnahmemaximalkonzentrationen von Vitaminen und Mineralstoffen veröffentlicht, jedoch sind Flavonoide auch hier nicht enthalten (Scientific Committee on Food/ Scientific Panel on Dietetic Products 2006). So ist es unter Umständen möglich, dass der Verbraucher seinen Körper mit überhöhten Konzentrationen an Flavonoiden konfrontiert, die er zum einen über eine normale Ernährung niemals zu sich nehmen würde, deren Auswirkungen zum anderen nach dem heutigen Stand der Wissenschaft kaum einzuschätzen sind.

So konnte der schädliche Einfluss von hohen Dosen  $\beta$ -Carotin für Raucher (30 mg/ d) vor noch nicht allzu langer Zeit in einer Studie (CARET-Studie) beobachtet werden (Goodman et al. 2004). In diesem Zusammenhang kommen Metaanalysen auch zu dem Schluss, dass die zusätzliche Einnahme von Antioxidantien die Sterblichkeit signifikant erhöht oder Hinweise für negative Einflüsse zu finden sind (Bjelakovic et al. 2007; Miller et al. 2005). Bjelakovic et al. vermuten, dass eine zu hohe Dosis an Antioxidantien körpereigene Abwehrmechanismen sowie notwendige körpereigene Radikalbildung stören könnte. Kritiker dieser Metaanalyse wenden zwar ein, dass besonders Studien zu Grunde gelegt wurden, die bereits erkrankte Probanden enthielten, ebenso, dass Studien ohne Todesfälle nicht berücksichtigt wurden und die Dosierungen zum Teil die empfohlenen Höchstdosen um das 20-fache überstiegen (28. Februar 2007 Stellungnahme der Gesellschaft für angewandte Vitaminforschung e.V.). Dennoch zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass weitere Forschung im Hinblick auf Wirkungsmechanismen von Antioxidantien betrieben werden muss, um eventuelle gesundheitliche Risiken besser erkennen und einschätzen zu können.

#### **1.5. Zielsetzung der Arbeit**

Verschiedene Polyphenole bzw. Flavonoide besitzen unterschiedliche Wirkungen zum Beispiel im Hinblick auf anti- bzw. prooxidative Eigenschaften, Toxizität und proliferative Einflüsse, wie vielfache Untersuchungen auf dem Gebiet der Struktur-Wirkungsbeziehungen gezeigt haben (Michels et al. 2006; Wang et al. 2006; Wätjen et al. 2007). Daher sind Kenntnisse sowohl über die Qualität als auch die Quantität der enthaltenen Inhaltsstoffe

wünschenswert, um Nahrungsmittel oder Nahrungsmittelkonzentrate besser einschätzen zu können. Ziel der Arbeit war es daher einerseits, einen Überblick über das Polyphenolmuster verschiedener Gemüse im Sinne des „Plant metabolomics“ zu erhalten, andererseits den Gehalt der untersuchten Proben zu ermitteln, um eine Einschätzung der aufgenommenen Polyphenolmenge machen zu können. Außerdem standen Umwelteinflüsse wie Standort (China-Deutschland) und natürliche sowie künstliche Sonneneinstrahlung (Freiland- und Gewächshauskulturen) im Fokus, um deren Einwirkung auf das Polyphenolmuster zu untersuchen. Ebenso wurden Polyphenole während des Kochvorgangs beobachtet.

Weiterhin war es Ziel der Arbeit, die in den untersuchten Pflanzen enthaltenen Polyphenole zu isolieren, und mit Hilfe von HPLC-DAD, HPLC-MS sowie NMR-Experimenten zu identifizieren. Nachfolgend sollten die erhaltenen Reinsubstanzen in *in-vitro*-Assays und Zellkultursystemen charakterisiert werden.

Dabei wurden die antioxidativen Eigenschaften mit Hilfe des DPPH-Assays ermittelt, wobei hier auch auf die antioxidativen Eigenschaften der Gesamtextrakte eingegangen wurde, um die Wirkung der jeweils enthaltenen Flavonoide im Hinblick auf deren Qualität und Quantität einzuschätzen.

Ferner wurde die Wirkung der Reinsubstanzen auf die Viabilität von H4IIE-Hepatom Zellen im Neutralrot/MTT-Assay ermittelt. Diese Arbeiten wurden innerhalb einer Kooperation am Institut für Toxikologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt.

Zusätzlich wurden auch die proliferationsstimulierenden Eigenschaften an estrogensensitiven Zellen untersucht. Hierzu wurde der Einfluss der Reinsubstanzen und Extrakte auf MCF7/BUS Zellen genauer charakterisiert. Diese Arbeiten wurden am „Department of Pharmacology and Toxicology“ der Zhejiang Universität/Hangzhou, China durchgeführt.

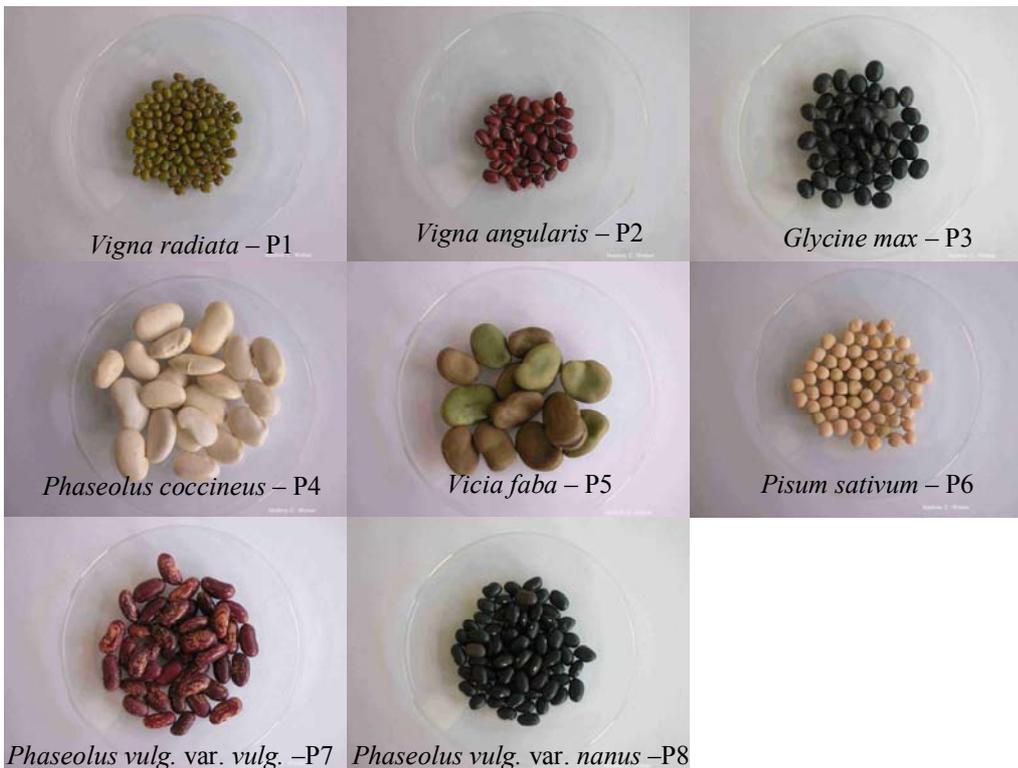
## 2. Material und Methoden

### 2.1. Probenmaterial

#### 2.1.1. Leguminosen

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit acht verschiedene Leguminosensamen untersucht. Die taxonomische Bestimmung wurde hierbei anhand der Pflanzen, die im Gewächshaus und im Freiland des botanischen Gartens der HHU Düsseldorf von Herrn Rogmann und seinen Mitarbeitern kultiviert wurden, durchgeführt. Das Samenmaterial stammte vom „Department of Pharmacology and Toxicology“ (Hangzhou/China). Es konnten zwei unterschiedliche chinesische Ernten (Oktober2003 und Mai2004) erhalten werden. Beide wurden sowohl zu den taxonomischen als auch zu den quantitativen/qualitativen Untersuchungen herangezogen.

Das Wachstum der Pflanzen wurde fotografisch dokumentiert bis hin zu Detailaufnahmen der Blüte und der erhaltenen Früchte. Ebenso wurden makroskopische Untersuchungen der Blüte und der Samen vorgenommen und Herbarexemplare im Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie angelegt (siehe Anhang 7.1).



**Abb.M1:** Samenmaterial der acht Leguminosen - Probencode(P1-8)

Eine Erstbestimmung wurde von Frau Dr. Sabine Etges, der Leiterin des botanischen Gartens, an den Pflanzen sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland zur Zeit der Blüte durchgeführt. Die endgültige Bestimmung erfolgte am Leibniz - Institut für Pflanzengenetik

und Kulturpflanzenforschung (IPK), Abteilung Genbank, Arbeitsgruppe Ressourcengenetik und Reproduktion in Gatersleben von Frau Dr. Ulrike Lohwasser. Hierzu wurde das fotografische Material ausgewertet und von zwei der Leguminosen (*Vicia faba* und *Glycine max*) eine Kultur in Gatersleben angelegt, um zu einer abschließenden Beurteilung zu gelangen.

**Tab.M1:** Taxonomische Bestimmung der Leguminosen

Code	Lat. Name	verwendete Literatur
P1	<i>Vigna radiata</i> (L.) R. Wilczek	(Maréchal et al. 1978)
P2	<i>Vigna angularis</i> (Willd.) Ohwi & Ohashi	(Maréchal et al. 1978)
P3	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. convar. <i>max</i> var. <i>atra</i> Lehm.	(Lehmann 1962)
P4	<i>Phaseolus coccineus</i> L. var. <i>albiflorus</i> (DC.) Bailey	(Bailey 1923)
P5	<i>Vicia faba</i> L. ssp. <i>faba</i> var. <i>faba</i> subvar. <i>faba</i>	(Kulturpflanze 1972)
P6	<i>Pisum sativum</i> L. ssp. <i>sativum</i> convar. <i>sativum</i>	(Lehmann 1954)
P7	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>vulgaris</i>	(Hanelt 2001)
P8	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>nanus</i> (Jusl.) Aschers.	(Hanelt 2001)

Abteilung: Spermatophyta  
 Unterabteilung: Magnoliophytina (Angiospermae)  
 Klasse: Rosopsida (Dicotyledonae)  
 Unterklasse: Rosidae  
 Ordnung: Fabales (Leguminosae)  
 Familie: Fabaceae  
 Tribus: Phaseoleae  
 Subtribus: Phaseolinae  
     - *Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*  
     - *Phaseolus vulgaris* L. var. *nanus* (Jusl.) Aschers.  
     - *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek  
     - *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi  
 Subtribus: Glycininae  
     - *Glycine max* (L.) Merr. convar. *max* var. *atra* Lehm.  
 Tribus: Viciae  
     - *Pisum sativum* L. ssp. *sativum* convar. *sativum*  
     - *Vicia faba* L. ssp. *faba* var. *faba* subvar. *faba*

**Abb.M2:** Taxonomische Einordnung der bearbeiteten Leguminosen nach Frohne (Frohne et al. 1998)

### 2.1.2. Aufzucht der Leguminosen im Gewächshaus und im Freiland

Zur taxonomischen Identifizierung der Pflanzen und zur Gewinnung weiterer Vergleichsextrakte der Leguminosen wurden diese im Garten und Freiland des Botanischen Gartens der HHU Düsseldorf durch Herrn Rogmann und seine Mitarbeiter kultiviert.



**Abb.M3:** Aufzucht der Leguminosen im Gewächshaus (links) und im Freiland (rechts)

Die Samen wurden bis zur Aussaat am 22.06.04 bei 8°C im Kühlschrank aufbewahrt, so dass größtenteils eine sehr hohe Keimungsrate erreicht werden konnte. Nachdem die Pflanzen eine ausreichende Größe erreicht hatten, wurden sie umgetopft. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus am 14.07.04 umgestellt bzw. ca. die Hälfte der jeweiligen Pflanzen wurde am 15.07.04 in das Freiland des botanischen Gartens transferiert. Vor dem Umstellen betrug die Tagestemperatur mehr als 24°C und die Nachttemperatur lag bei 20°C. Es stand 16h eine Hockdruckquecksilberdampf Lampe (HDK 400W, 60000 Lux, schattiert) als Lichtquelle zur Verfügung und die Luftfeuchte betrug 70%. Nach der Umstellung lagen die Tagestemperatur bei mehr als 15°C und die Nachttemperatur bei mehr als 10°C. Die Erde bestand aus Floraton 1, welche bei den Gewächshauspflanzen auch später beibehalten wurde. Im Freiland wurden die Leguminosen in normale Felderde gepflanzt. Bis Ende Oktober lagen die Temperaturen im Mittel über 10°C, am wärmsten war es Ende Juli und Anfang August. In diesem Zeitraum lagen die Temperaturen im Mittel über 20°C. Da die Pflanzen erst spät im Jahr ausgesät wurden, kamen einige erst sehr spät zur Blüte und damit auch zur Fruchtbildung und –reife. Die Ernte der Hülsen aus dem Freiland wurde daher so lange wie möglich bzw. wie nötig hinausgezögert (Daten siehe unten). Da vollständig auf eine chemische Behandlung der Pflanzen verzichtet wurde, konnte von *Vicia faba* leider keine Frucht erhalten werden. Sie

wuchs zwar bis zur Blütenbildung heran, wurde dann aber durch Schädlinge (Thysanoptera) befallen, die auch mit Nützlingen nicht mehr bekämpft werden konnten. Bei *Pisum sativum* wurde ebenfalls ein Befall mit Schädlingen (Thysanoptera, Tetranychidae) festgestellt, so dass es auch hier keine Ernte im Gewächshaus zu verzeichnen gab. *Phaseolus coccineus* blühte zwar im Gewächshaus, zeigte jedoch keine Fruchtbildung, was darauf zurückgeführt werden kann, dass *P. coccineus* selbststeril ist und es unter den Gewächshausbedingungen nicht zu einer Bestäubung durch Insekten kommen konnte. Eine Selbstbefruchtung wird unter diesen Bedingungen nur vereinzelt beobachtet (Schuster et al. 1998).

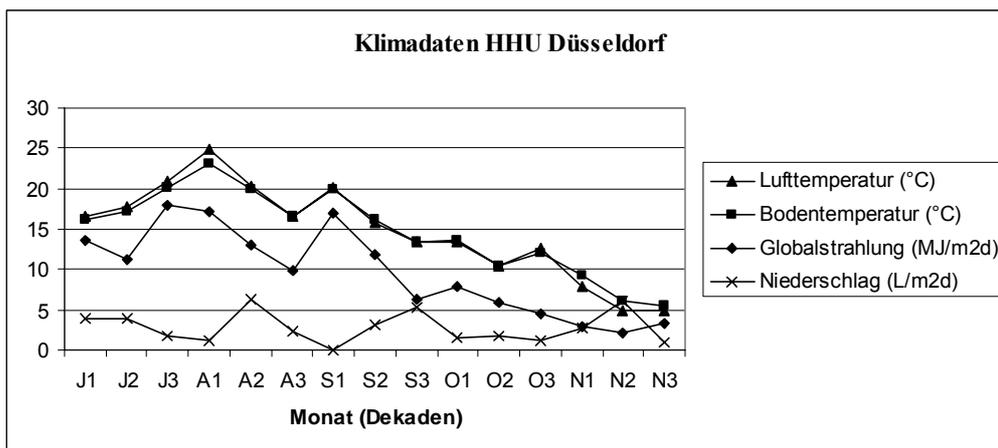


Abb.M4: Klimadaten der HHU Düsseldorf, J=Juli, A=August, S=September, O=Oktober, N=November, Zahlen 1-3 bezeichnen Dekaden, eine Dekade jeweils vom 1.-10., 11.-20. und 21.-30./31. des Monats)

Tab.M2: Zeitdaten der Pflanzenkultur

Leguminosae	Botanischer Garten			Gewächshaus	
	Aussaat	Auspflanzung	Ernte	Umstellen	Ernte
<i>Vigna radiata</i>	22.06.04	14.07.04	11.11.04	15.07.04	20.09.04
<i>Vigna angularis</i>	22.06.04	14.07.04	11.11.04	15.07.04	20.09.04
<i>Glycine max</i>	22.06.04	14.07.04	11.11.04	15.07.04	03.11.04
<i>Phaseolus coccineus</i>	22.06.04	14.07.04	11.11.04	15.07.04	-
<i>Vicia faba</i>	22.06.04	14.07.04	-	15.07.04	-
<i>Pisum sativum</i>	22.06.04	14.07.04	22.09.04	15.07.04	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>vulgaris</i>	22.06.04	14.07.04	20.09.04	15.07.04	15.09.04
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>nanus</i>	22.06.04	14.07.04	11.11.04	15.07.04	15.09.04

### 2.1.3. Weitere Gemüsesorten

Es wurden vier weitere chinesische Gemüsesorten untersucht. Das Pflanzenmaterial wurde im Mai 2004 auf einem Wochenmarkt in Hangzhou, China von den dortigen Mitarbeitern des „Department of Pharmacology and Toxicology“ erstanden. Die taxonomische Einordnung wurde in China an der Zhejiang Universität im „Department of Pharmacology and Toxicology“ (Hangzhou, China) vorgenommen.

**Tab.M3:** Taxonomische Bestimmung der weiteren Gemüsepflanzen

Code.	engl. Name	dt. Name	Lat. Bezeichnung
G	Cucumber	Gurke	<i>Cucumis sativus</i> L.
K	Garlic	Knoblauch	<i>Allium sativum</i> L.
R	Radish	Rettich	<i>Raphanus sativus</i> L.
A	Eggplant	Aubergine	<i>Solanum melongena</i> L.

Zum Vergleich wurden vier weitere Pflanzen aus Deutschland in die Untersuchungen mit einbezogen. Diese wurden bei „der Lidl-Dienstleistungs GmbH & Co. KG“ im September 2005 gekauft bzw. stammen aus heimischem Gartenanbau. Hierbei handelte es sich zum einen wiederum um *Cucumis sativus* L. und *Solanum melongena* L. und zum anderen um zwei Kürbisgewächse, nämlich Zucchini (*Cucurbita pepo* var.) und Zierkürbis (*Cucurbita pepo* var.).



**Abb.M5:** weitere bearbeitete chinesische Gemüse - Probenocode

Abteilung: Spermatophyta

Unterabteilung: Magnoliophytina (Angiospermae)

Klasse: Rosopsida (Dicotyledonae)

Unterklasse: Rosidae

Ordnung: Cucurbitales

Familie: Cucurbitaceae

**-*Cucumis sativus* L.**

**-*Cucurbita pepo* L.**

Ordnung: Capparales

Familie: Brassicaceae

**-*Raphanus sativus* L.**

Unterklasse: Asteridae

Ordnung: Solanales

Familie: Solanaceae

**-*Solanum melongena* L.**

Klasse: Liliopsida (Monocotyledonae)

Unterklasse: Liliidae

Ordnung: Asparagales

Familie: Alliaceae

**-*Allium sativum* L.**

**Abb.M6:** Taxonomische Einordnung der bearbeiteten weiteren Gemüsesorten nach Frohne (Frohne et al. 1998)

### 2.1.4. Essigsäures Gemüse

Die essigsäuren Gemüse wurden in Hangzhou, China in einem öffentlichen Supermarkt gekauft. Es handelt sich dabei um Lebensmittel, die in diesem eingelegten Zustand entweder sofort zum Verzehr geeignet sind oder als Beigabe zu verschiedenen Gerichten dienen. Eine Auflistung und Übersetzung erfolgte durch Prof. Yi-jia Lou und ihre Mitarbeiter.

**Tab.M4:** Auflistung der essigsäuren Lebensmittel

Code	Chinesische Bezeichnung	Englische Bezeichnung	Company	Lat. Name
E1	yan cài xin (zha cai)	Tube mustard	Zhejiang tong xiang yinxing Food Company Group LTD	<i>Brassica juncea</i> var.
E2	zhài cài	Tube mustard	Zhejiang tong xiang nanri 1 <sup>st</sup> Vegetable and Food Company	<i>Brassica juncea</i> var.
E3	zhai cai	Tube mustard	Hangzhou xiaoshan Hezhuang Food Co. LTD	<i>Brassica juncea</i> var.
E4	cu da suan	Garlic	Hangzhou jing yang guan tiao liao jiang pin Co.	<i>Allium sativum</i>
E5	la you sun si	Bamboo shoot	Fu jian da mao Food Industry Co. LTD	<i>Phyllostachys</i> spec.
E6	xiao shan luo bo gan	Radish	Hangzhou huilin Food Co. LTD	<i>Raphanus sativus</i>
E7	dao du cai (+sun)	Leaf mustard with bamboo shoot	China Hangzhou jian de shi qiu mei Food Co.	<i>Brassica juncea</i> var.
E8	xue cai wang (xue cai)	Leaf mustard (with fruit juice)	Ningbo yu yun vegetables Factory	<i>Brassica juncea</i> var.
E9	xue cai wang (xue cai + sun)	Leaf mustard with bamboo shoot	Shaoxing shi yu cheng qu dou men jiang cai chang Factory	<i>Brassica juncea</i> var./ <i>Phyllostachys</i> spec.
E10	suan la huang gua pian	Cucumber	Shanghai meifeng Food Co. LTD	<i>Cucumis sativus</i> var.
E11	ru huang gua	Cucumber (young, small) with chili	Zhejiang tong xiang nanri 1 <sup>st</sup> Vegetable and Food Company	<i>Cucumis sativus</i> var.

### 2.1.5. Trockengemüse

Ebenso wie das essigsäure Gemüse wurden die getrockneten Lebensmittel in einem chinesischen Supermarkt in Hangzhou erstanden. Hierbei handelt es sich weitestgehend um Lebensmittel, die nach speziellen Zubereitungsmethoden verzehrt werden. Meist werden sie in kaltem Wasser vorgequollen und dann gekocht oder gedämpft. Anschließend werden sie zu verschiedenen Fleisch-, Fisch-, oder Hühnchengerichten zugegeben oder der Kochvorgang

findet im gleichen Gefäß zusammen mit den später servierten Gerichten statt. Eine Auflistung erfolgte auch in diesem Fall durch Prof. Yi-jia Lou und ihre Mitarbeiter.

**Tab.M5:** Auflistung der getrockneten Lebensmittel

<b>Code</b>	<b>Chinesische Bezeichnung</b>	<b>Englische Bezeichnung</b>	<b>Company</b>	<b>Lat. Name</b>
T1	lian zi	Lotus seed	Shanghai Fengzhijian Trade Co. LTD	<i>Nelumbo nucifera</i> (Semen nelumbinis)
T2	mei gan cai	Dried fermentated leaf mustard	Shao Xing lanting luogong	<i>Brassica juncea</i> var.
T3	huang gi	Astragalus	Hangzhou jingli Food Co. LTD	<i>Astragalus membranaceus</i>
T4	huang hua cai	Day lily	Hangzhou jingli Food Co. LTD	<i>Hemerocallis</i> spec.
T5	bai he	Dried lily	Hangzhou jingli Enterprise Co. LTD	<i>Lilium</i> spec.
T6	yin er	Silver mushroom from wood	Fujian futian huacheng shiping Enterprise Co. LTD	<i>Tremella</i> spec.
T7	sun gan	Dried bamboo shoots	Hangzhou Wanglong Food Enterprise Co. LTD	<i>Phyllostachys</i> spec.
T8	huai shan yao	Yam	Hangzhou jingli Enterprise Co. LTD	<i>Dioscorea opposita</i>

## 2.2. Bearbeitung des Probenmaterials - Extraktionen

### 2.2.1. Extraktion der Leguminosen zur Isolierung und Testung an MCF7 Zellen

Die Extrakte zur Isolierung und Testung an MCF7 Zellen wurden an der Zhejiang Universität im „Department of Pharmacology and Toxicology“ (Hangzhou, China) erhalten und bearbeitet. Das Ausgangsmaterial wurde getrocknet, gewogen und zerkleinert. Über Nacht wurde das Material in Wasser eingelegt, am nächsten Tag mit der achtfachen Menge 70% wässrigen Ethanol auf Rückfluss erhitzt und 1.5 h sowie 1h extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden vereinigt und auf 4L unter Vakuum eingengt.

Die aufkonzentrierten Extrakte wurden zentrifugiert und der Überstand über eine Polyamidsäule aufgereinigt. Es wurde zuerst mit der 5-fachen Menge Wasser eluiert, dann mit 50%igem und 95%igem wässrigen Ethanol. Die Ethanolfraktionen wurden eingengt und durch Gefriertrocknung konnte der Ausgangsextrakt zur Isolierung und Testung an MCF7 Zellen erhalten werden.

### 2.2.2. Extraktion der Leguminosen zur Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Polyphenolfraction wurde eine geeignete Menge der Samen in einer Drogenmühle 1 Minute zerkleinert. Das gefriergetrocknete Pulver wurde gewogen und vier Mal mit 50 ml 70%igem wässrigem Methanol (0.2 % V/V HCOOH) 10 Minuten lang mit einem Ultra Turrax T18 basic (IKA Werke, Stufe4 =18000 U/min) extrahiert. Dazwischen wurde die Lösung jeweils bei 4000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und der Rückstand wieder in Lösungsmittel aufgenommen. Die Überstände wurden vereinigt und das Lösungsmittel bei 42°C unter Vakuum auf ein Drittel des Volumens eingengt. Das restliche Volumen wurde durch Gefriertrocknung entfernt, um eine Aufkonzentrierung der Säure und damit eine Hydrolyse der enthaltenen Zucker zu vermeiden. Die Wahl des Extraktionsmittels wurde der Literatur (Romani et al. 2003) entnommen, die Anzahl der Extraktionsschritte wurde an *Phaseolus vulgaris* L. var. *nanus* ermittelt. Dabei wurden die einzelnen Extrakte zuerst reduziert, dann auf gleiche Volumina aufgefüllt und mittels HPLC-DAD untersucht. Mit Hilfe der HPLC-Chromatogramme (280 nm, 320 nm, 340 nm, 520 nm) konnte festgestellt werden, dass nach der vierten Extraktion in allen beobachteten Wellenlängen eine erschöpfende Extraktion der untersuchten Polyphenole vorlag. In Vorversuchen zeigten 90% methanolische Extrakte einen wesentlich geringeren Phenolgehalt. Aus diesem Grund war die häufigere Extraktion mit saurem Lösungsmittel notwendig, da offensichtlich Begleitstoffe der Leguminosen hier störend wirken.

**Tab.M6:** Durchschnittlicher Wassergehalt der Leguminosen

<b>Leguminose</b>	<b>Durchschnittlicher Wassergehalt in %</b>
<i>Vigna radiata</i>	8.68
<i>Vigna angularis</i>	9.60
<i>Glycine max</i>	5.75
<i>Phaseolus coccineus</i>	9.56
<i>Vicia faba</i>	10.09
<i>Pisum sativum</i>	9.06
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i>	9.59
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>nanus</i>	9.19

### 2.2.3. Gewinnung der Extrakte beim Kochvorgang

Um herauszufinden, wie viel der Polyphenolfraction beim Kochvorgang in das überstehende Wasser abgegeben wird, ebenso ob es zu einer Veränderung des Polyphenolmusters kommt, wurden von allen Leguminosen der Ernte vom Oktober 2003 (P1-P8) so genannte Kochextrakte hergestellt. Dabei wurden die Samen mit dem 3-10 fachen an Wasser auf einer Heizplatte zum Kochen gebracht. Der Kochvorgang bei ca. 90-100°C wurde über drei Stunden durchgeführt. Das überstehende Wasser wurde über eine Fritte (Duran P3) abfiltriert und diente als Untersuchungsmaterial. Es wurden hierbei vier Ansätze pro Leguminose

bearbeitet, jedoch wurde auf Grund der Probenmenge und der sehr schlechten Verarbeitbarkeit der Samen nach dem Kochvorgang nur ein Rückstand bearbeitet (Extraktion mit 90% Methanol), um die in der Bohne verbleibende Polyphenolfraction zu untersuchen.

#### 2.2.4. Extraktion des weiteren Gemüses zur Isolierung und Testung im Zellkultursystem

Die Gemüse wurden auf einem Wochenmarkt in Hangzhou, China gekauft und durch „Hangzhou jian er health protectional food LTD company“ gefriergetrocknet und zerkleinert. Eine geeignete Menge des Pulvers wurde zwei mal 2h und einmal über Nacht mit jeweils 1L 90% wässrigen Methanol auf dem Schüttler extrahiert. Die Filtration erfolgte jeweils über einen großen Büchnertrichter mit einem Rundfilter (HHU Düsseldorf).

Das erhaltene Filtrat wurde unter Vakuum eingeeengt, dabei wurde die methanolische Phase vollständig entfernt und der eingeeengte Extrakt direkt weiter aufgereinigt. Die Probe wurde filtriert und nachfolgend der gelöste Anteil auf eine vorbereitete HP20 Säule aufgetragen. Der größte Teil der Aminosäuren- und Zuckerfraktion konnte so mit 1.5 L 100% Wasser eluiert werden. Aminosäuren und Zucker mussten zur Isolierung sowie Testung an MCF7 Zellen aus den Extrakten entfernt werden. Im nächsten Schritt wurde der Rückstand in 50% wässrigem Methanol aufgenommen und mit diesem auf die Säule aufgetragen. Dieser Vorgang wiederholte sich mit 100% Methanol. Das verwendete Volumen der methanolischen Lösungsmittelfractionen betrug jeweils 1L.

Die methanolischen Fraktionen wurden vereinigt, unter Vakuum eingeeengt und dienten als Ausgangsextrakt zur weiteren Isolierung und Testung.

Tab.M7: Auflistung der Wassergehalte der verschiedenen Gemüsesorten

Name	Bruttogewicht (kg)	Trockengewicht(kg)	Wassergehalt (%)
<i>Solanum melongena</i>	13.9	0.9	93.5
<i>Allium sativum</i>	6.2	1.8	70.8
<i>Cucumis sativus</i>	19.0	1.1	94.2
<i>Raphanus sativus</i>	8.0	0.6	92.5

#### 2.2.5. Extraktion des weiteren Gemüses zur Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Polyphenolgehalte der weiteren Gemüsesorten wurden Ameisensäure Extrakte hergestellt. Die aus China stammenden Gemüse lagen bereits als Pulver vor. Die in Deutschland gekauften Gemüse wurden zuerst gewogen, dann in Schale und Mark getrennt und gefriergetrocknet. Die erhaltenen getrockneten Probenteile wurden zerkleinert; das jeweilige Pulver wurde gewogen und mit einer geeigneten Menge 70% wässrigem Methanol (0.2 % HCOOH V/V) extrahiert. Die Polyphenole wurden in den äußeren Schichten erwartet, da diese im Falle der Gurke sehr gering ausfiel, wurde von der chinesischen Gurke (bestehend

aus Schalen- und Markgewebe) 10.0 g extrahiert. Von der Schale der deutschen Gurke wurden 2.5 g extrahiert, da nicht genug Probenmaterial vorlag. Von dem restlichen Gemüse wurden 5.0 g eingewogen.

Die Extraktion erfolgte 5 Minuten mit einem Ultra Turrax T18 basic (IKA Werke, Stufe4 =18000 U/min). Die Extraktion wurde drei Mal wiederholt (jeweils 10 min. zentrifugieren bei 4000 U/min). Die Überstände wurden vereinigt, unter Vakuum auf ein Drittel eingengt und das restliche Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt. Der erhaltene Extrakt diente als Ausgangsextrakt für weitere Untersuchungen.

### **2.2.6. Extraktion der essigsauren und getrockneten Gemüse zur qualitativen Untersuchung**

Die getrockneten und essigsauren Lebensmittel wurden lediglich qualitativ untersucht, daher wurde auf einen Säurezusatz verzichtet. Es wurde je nach Volumen der Probe 15 – 30 g der essigsauren Lebensmittel und 60-90 g der getrockneten Lebensmittel zwei Mal mit 300 mL 90% wässrigen Methanol als Lösungsmittel extrahiert. Es wurde ein Ultra Turrax T50 basic (IKA Werke, 6400 U/min) verwendet, danach wurde das Gemisch über einen Büchnertrichter mit Rundfilter (MN615, 10cm) filtriert. Die Extrakte wurden unter Vakuum eingengt. Eine geeignete Menge der Extrakte wurde entweder direkt (gelöst in 100% MeOH) oder nach Flüssig/Flüssig-Verteilung mittels HPLC-DAD und LC-MS/MS untersucht. Die Verteilung erfolgte dabei mit Ethylacetat/Wasser (1:1, je 500 µL in 2 mL Eppendorfgefäß, 3x extrahiert). Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden eingengt, der Rückstand in 100%MeOH aufgenommen (Ultraschallbehandlung, Zentrifugieren 3 min, 13000 U/min). Der Überstand diente als Untersuchungslösung.

## **2.3. Isolierung der Naturstoffe**

### **2.3.1. Flüssig/Flüssig-Verteilung**

Die Flüssig-Flüssig-Verteilung ist als erster Schritt in der Auftrennung komplexer Rohextrakte geeignet, da es hier idealerweise zur Anreicherung von Substanzen in den Phasen kommt. Jeder Trennungsvorgang wurde mindestens dreimal durchgeführt, unter Umständen wurde der Vorgang wiederholt, wenn eine weiterhin deutliche Färbung der extrahierenden Phase zu erkennen war. Die Phasenmischung und -trennung erfolgte per Hand in einem Scheidetrichter. Die zur Isolierung vorgesehenen Extrakte wurden in Methanol:Wasser (8:2) gelöst und zuerst gegen n-Hexan ausgeschüttelt, um sehr lipophile Substanzen wie zum Beispiel Fettsäuren abzutrennen. Die methanolische Wasserfraktion wurde nachfolgend eingengt und der Rückstand in einem Ethylacetat-Wasser Gemisch wie oben beschrieben einer Flüssig-Flüssig-Verteilung unterzogen. Für die Isolierung der Polyphenole aus den Leguminosen wurde zusätzlich die Wasserphase nochmals eingengt, um verbliebenes

Ethylacetat zu entfernen. Dann wurde gegen eine wassergesättigte n-Butanol-Phase ausgeschüttelt, um sicherzustellen, dass auch hydrophilere Polyphenole nicht in der Wasserphase verblieben. Die Überprüfung des Inhaltsstoffmusters der einzelnen Phasen erfolgte mit DC und HPLC-DAD. Die Extrakte der anderen Gemüse zur Isolierung wurden direkt auf eine LH20 Säule aufgetragen, außer der Extrakt von *Cucumis sativus*. Dieser Extrakt wurde vor Aufgabe auf die LH20 Säule gegen n-Hexan ausgeschüttelt, um das enthaltene Chlorophyll zu entfernen.

### 2.3.2. Säulenchromatographie (SC)

Die Säulenchromatographie wurde zur weiteren Auftrennung der Extrakte durchgeführt. Dabei spielte sowohl die Gelfiltration/Gelpermeationchromatographie über LH20 (Sephadex G25) als auch die Adsorptionschromatographie an Silika RP18 und HP20 eine Rolle. Bei der Gelpermeationschromatographie über LH20 sind neben der Größe des Moleküls auch adsorptive Effekte bei der Auftrennung beteiligt. Für die Auftrennung an HP20 ist besonders die Adsorption an die Polystyrenmatrix von Wichtigkeit. Bei Säulen mit Silika RP18 sind die Wechselwirkungen der Probe mit der hydrophoben Oberfläche des Materials zu nennen. Die letztgenannten Säulen wurden auf Grund der sehr hydrophilen Eigenschaften der Polyphenole eingesetzt, da diese in geringerem Maße an die hydrophobe Oberfläche des Materials binden und es so zu weniger Substanzverlust kommt. Die genauen Bedingungen und Fließmittel der jeweiligen Säule werden unter 2.3.5. und 2.7.2.2. beschrieben.

Die komplexen Substanzgemische wurden in konzentrierter Lösung auf das obere Ende der Säule aufgetragen und sowohl das Fließmittel als auch die Fließgeschwindigkeit wurden dem jeweiligen Trennproblem angepasst. Die Proben wurden entweder mit Hilfe eines Fraktionssammlers oder manuell aufgefangen.

Verwendete Materialien für die Säulenchromatographie:

- Sephadex G25 (LH 20), 25 – 100 µm Korngröße Amersham Biosciences
- Lobar Fertigsäule Gr. B (310-25) LiChroprep RP-18(40-63µm) Merck
- Lobar Fertigsäule Gr. A (240-10) LiChroprep RP-18(40-63µm) Merck
- HP20 – Diaion Sigma-Aldrich
- Kieselgel 60 RP18 (40-63µm) Merck

### 2.3.3. Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: high performance liquid chromatography) stellt eine besondere Form der Säulenchromatographie dar. Auf Grund der geringen Korngröße der stationären Phase wird die Trennleistung stark erhöht. Aus der dichteren Packung der Säulenpartikel jedoch resultiert ein höherer Druck, so dass es notwendig wird die

mobile Phase mit Hilfe von Pumpen auf das System aufzubringen (Dominik et al. 1996). Die Injektion der Probe erfolgt automatisch mit Hilfe einer Injektionsschleife, so dass es zu keinem Druckabfall kommt.

### 2.3.3.1. Analytische HPLC

Bei der analytischen HPLC handelte es sich um eine HPLC gekoppelt mit einem UV-Vis Detektor, die zur Auftrennung und Überprüfung einzelner Extrakte und Fraktionen diente. Es wurde ein binäres Lösungsmittelgemisch verwendet, dessen Gradientensystem in unten stehender Tabelle aufgeführt ist. Es wurde grundsätzlich dieser Standardgradient bzw. ein in allen Zeitangaben halbiertes Gradient (Standardgradient-semi) benutzt. Der letztgenannte Gradient kam teilweise beim Vergleich von Reinsubstanzen zum Einsatz. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, die bei 235 nm, 254 nm, 280 nm und 340 nm erhaltenen UV-Spektren mit einer Spektrenbibliothek zu vergleichen und so unter Umständen eine Identifizierung der Substanz vorzunehmen. Die Probe wurde dabei in 100% HPLC-Methanol oder einem Methanol/NANOPur Wasser Gemisch gelöst.

Dieses analytische System wurde ebenfalls zur Quantifizierung herangezogen, auf die verwendeten Gradienten und weiteren Bedingungen wird jedoch im Detail in Abschnitt 2.5.1. eingegangen.

**Tab.M8:** Standardgradient für die analytische HPLC-Analyse (Elutionsmittel A: NANOPur Wasser (pH2, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), Elutionsmittel B: 100% HPLC-Methanol), Fluss 1 mL/min

Zeit (min)	Elutionsmittel A(%)	Elutionsmittel B(%)
0	90	10
5	90	10
35	0	100
45	0	100
50	90	10
60	90	10

#### Analytische HPLC-Anlage:

Pumpe	P 580, Dionex
Steuerung	Chromleon V6.3
Probengeber	ASI-100, Injektionsvolumen 20 µl, Dionex
Säulenofen	STH 585, Dionex
Säule	Eurospher 100-C18, Knauer
Detektor	UVD 340 S, Dionex

### 2.3.3.2. Semipräparative HPLC

Zur Aufreinigung von Reinsubstanzen oder zur Bearbeitung kleinerer Probenmengen (bis ca. 30 mg) wurde die semipräparative HPLC gewählt. Als organisches Fließmittel wurde Methanol oder Acetonitril verwendet. Die wässrige Phase bestand aus NANOpur Wasser, dem, wenn erforderlich, 0.1 % Ameisensäure zugesetzt wurde. Die Probe wurde, sofern die Löslichkeit dies zuließ, in dem gleichen Lösungsmittelgemisch gelöst, mit dem der Gradient startete. Die Flussrate betrug 5 mL/min und die Injektionsmenge überstieg niemals 3 mg/mL, um eine Überladung und damit eine verschlechterte Trennleistung zu vermeiden. Es wurde ein binäres Lösungsmittelgemisch entweder als Stufengradient oder isokratisch genutzt.

#### **Semipräparative HPLC Anlage:**

Pumpe: L-7100, Merck/Hitachi

Detektor: UV-Detektor, L-7400, Merck/Hitachi

Schreiber: Flatbed Recorder Kipp&Zonen

Säule: Eurospher 100-C18, (10 µm; 300 mm x 8 mm), Knauer

Vorsäule: Eurospher 100-C18 (10 µm; 30 mm x 8 mm), Knauer

### 2.3.3.3. HPLC-MS

Die Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit der Elektronenspray-Massenspektrometrie ermöglicht neben der Auftrennung von Substanzgemischen auch die Bestimmung der relativen Molekülmasse der Einzelverbindungen. Auf Grund der Tatsache, dass nicht alle Substanzen eine UV-Absorption aufweisen und somit nicht über die analytische HPLC nachgewiesen werden konnten, ergab sich mit der HPLC-MS eine weitere Möglichkeit die Reinheit einer Probe zu überprüfen. Zusätzlich konnte mit dieser Methode eine Aussage über das Molekulargewicht einer Substanz getroffen werden. Das Verfahren der MS/MS-Fragmentierung lieferte weitergehende Hinweise zur Struktur der jeweiligen Verbindung. Das Fließmittel setzte sich aus NANOpur Wasser, das 0.1 % Ameisensäure enthielt, und Methanol bzw. Acetonitril zusammen. Die Flussrate betrug 0.4 mL/min. Die Proben waren in 100% HPLC-Methanol oder in einem Methanol-NANOpur Wasser-Gemisch gelöst. Gemessen wurde standardmäßig sowohl im positiven als auch im negativen Probenmodus. Der Gradient kann der unten stehenden Tabelle entnommen werden.

**Tab.M9:** Standardgradient für die HPLC-MS-Analyse (Elutionsmittel A: NANOpur Wasser (0.1 % Ameisensäure), Elutionsmittel B: Methanol bzw. Acetonitril) Fluss 0.4 mL/min.

Zeit (min)	Elutionsmittel A(%)	Elutionsmittel B(%)
0	90	10
2	90	10
35	0	100
45	0	100
47	90	10
60	90	10

**HPLC-MS-Anlage:**

HPLC	HP 1100, Agilent
MS	Finnigan LCQ <sup>Deca</sup> , Thermoquest
Ionenquelle	ESI und APCI, Thermoquest
Pumpe	Edwards 30, BOC
Injektor	G 1313 A ALS 1100, Agilent
Säule	Knauer Eurospher 100; C-18A
Detektor	G 1315 B DAD 1100, Agilent
Steuerung	Xcalibur, Version 1.3

**2.3.4. Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte erfolgte auf Kieselgelalufolien (Kieselgel 60, F<sub>254</sub>), ebenso wie die Auswertung der einzelnen Isolationschritte. Das Fließmittelgemisch bestand aus Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser (85:10:5).

Zu Vorversuchen für die Säulenchromatographie (Silika RP18) wurden Alugram RP18 Platten verwendet. Das Fließmittelgemisch variierte, in der Regel bestand es aus Methanol und Wasser, in manchen Fällen wurde auch hier dem Wasser Ameisensäure zugesetzt. Zur präparativen DC wurden ebenfalls Alugram RP18 Platten in einem Methanol–Wassergemisch benutzt.

Alle DC-Platten wurden bei Kammersättigung über eine Laufstrecke von ca. 8 cm entwickelt. Die Auswertung erfolgte zunächst visuell mit Hilfe der UV-Detektion bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung) und bei 366 nm (Eigenfluoreszenz). Je nach Fragestellung wurden die Platten nachträglich mit verschiedenen Sprühreagenzien bearbeitet. Zur Überprüfung der Trennung während der Isolationschritte wurden die Platten mit Anisaldehyd-Schwefelsäure besprüht, sowie nachfolgend bei 110 °C ca. 3 min erhitzt. Zur Visualisierung der Flavonoide wurde Naturstoffreagenz A und B verwendet. Für den Nachweis von Aminosäuren in den Ausgangsextrakten wurden die Platten mit Ninhydrin-Reagenz besprüht und nachfolgend bei

105 °C für 15-20 min erhitzt. Die antioxidative Aktivität der enthaltenen Komponenten wurde mit DPPH-Reagenz sichtbar gemacht.

Verwendete Materialien für die Dünnschichtchromatographie:

- Alugram RP-18/UV<sub>254</sub> (5x10 cm, 0.15 mm) Macherey-Nagel
- Alugram RP-18/UV<sub>254</sub> (10x10 cm, 0.2 mm) Macherey-Nagel
- DC-Alufolien, Kieselgel 60, F<sub>254</sub> (20x20 cm, 0.2 mm) Merck

Zur Herstellung des Anisaldehyd-Sprühreagenz benötigte Chemikalien:

- 85 mL Methanol (destilliert)
- 10 mL Essigsäure (100%) Merck
- 5 mL Schwefelsäure (conc.) Merck
- 0.5 mL 4-Methoxybenzaldehyd Merck

Zur Herstellung der Naturstoffreagenzien A und B benötigte Chemikalien:

- Diphenylborsäure-2-aminoethylester (Naturstoffreagenz A) Fluka  
(1%ig in Methanol)
- Polyethylenglycol 400 (Naturstoffreagenz B) Janssen Chimica  
(1%ig in Ethanol)

Zur Herstellung des Ninhydrin-Reagenz benötigte Chemikalien:

- 0.3 mg Ninhydrin Riedel-de Haën
- 100 ml n-Butanol
- 3 ml 100% Essigsäure

Zur Herstellung des DPPH-Reagenz benötigte Chemikalien:

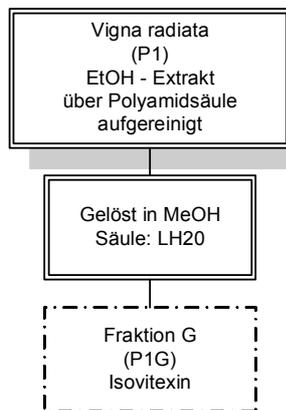
- Diphenylpicrylhydrazyl Sigma/Alfa Aesar  
(1%ig in Methanol)

### 2.3.5. Isolationsschemata und verwendete Methoden

Als erster Schritt der Isolierung stand in den meisten Fällen die Flüssig-Flüssig-Verteilung wie sie in Kapitel 2.3.1. beschrieben wurde. Säulen mit LH20 als stationäre Phase wurden immer mit 100% Methanol als mobile Phase durchgeführt. Unterschiede bestanden hauptsächlich in den Gradientensystemen während der RP18-Säulenchromatographie und der semipräparativen HPLC. Die Fraktionen wurden entweder manuell oder mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen und über dünnschichtchromatographische Verfahren, wie sie in Kapitel 2.3.4. beschrieben sind, überprüft und gemäß ihrer Inhaltsstoffmuster vereinigt.

Die Isolierung wird nachfolgend in der Reihenfolge beschrieben, in der die Extrakte zur Isolierung bearbeitet wurden (siehe Kapitel 2.2.1. und 2.2.4.)

#### Isolierung von Naturstoffen aus *Vigna radiata*

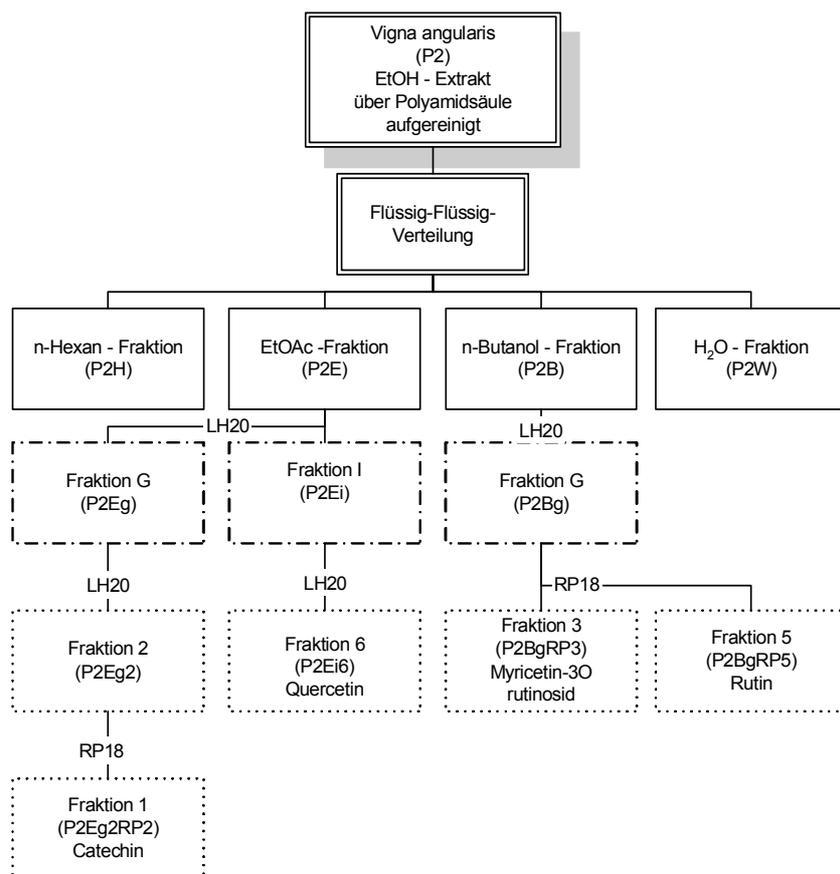


**Abb.M7:** Isolationsschema von *Vigna radiata*

Zur Auftrennung dieses Extraktes wurde eine große LH20 Säule mit 100% Methanol durchgeführt. Es wurde über einen Fraktionssammler fraktioniert, die Überprüfung erfolgte über DC und HPLC-DAD. Isovitexin konnte als Hauptinhaltsstoff identifiziert werden. Es wurde in Fraktion G neben geringen Mengen an Vitexin erhalten. Da diese beiden Substanzen in späteren Fraktionen (s.u. Isolierung von Naturstoffen aus *Vicia faba*) in reiner Form vorlagen, erfolgte keine weitere Aufreinigung.

**Isolierung von Naturstoffen aus *Vigna angularis***

Es erfolgte die Aufgabe der erhaltenen Ethylacetat-Phase (Flüssig-Flüssig-Verteilung siehe Kapitel 2.3.1.) auf eine LH20-Säule (L:41 cm/Ø3 cm). Von den Fraktionen dieser Säule wurden Fraktion G und I erneut über eine LH20 – Säule aufgetrennt. In diesem Fall handelte es sich jedoch um eine weitaus kleinere Säule (L:30 cm/ Ø2 cm), mit der eine bessere und schärfere Trennung der Substanzen erreicht werden sollte. Im Falle von Fraktion I führte dies zur Isolierung von Quercetin (Fraktion P2Ei6). Fraktion G wies leider auch nach diesem



**Abb.M8:** Isolationsschema von *Vigna angularis*

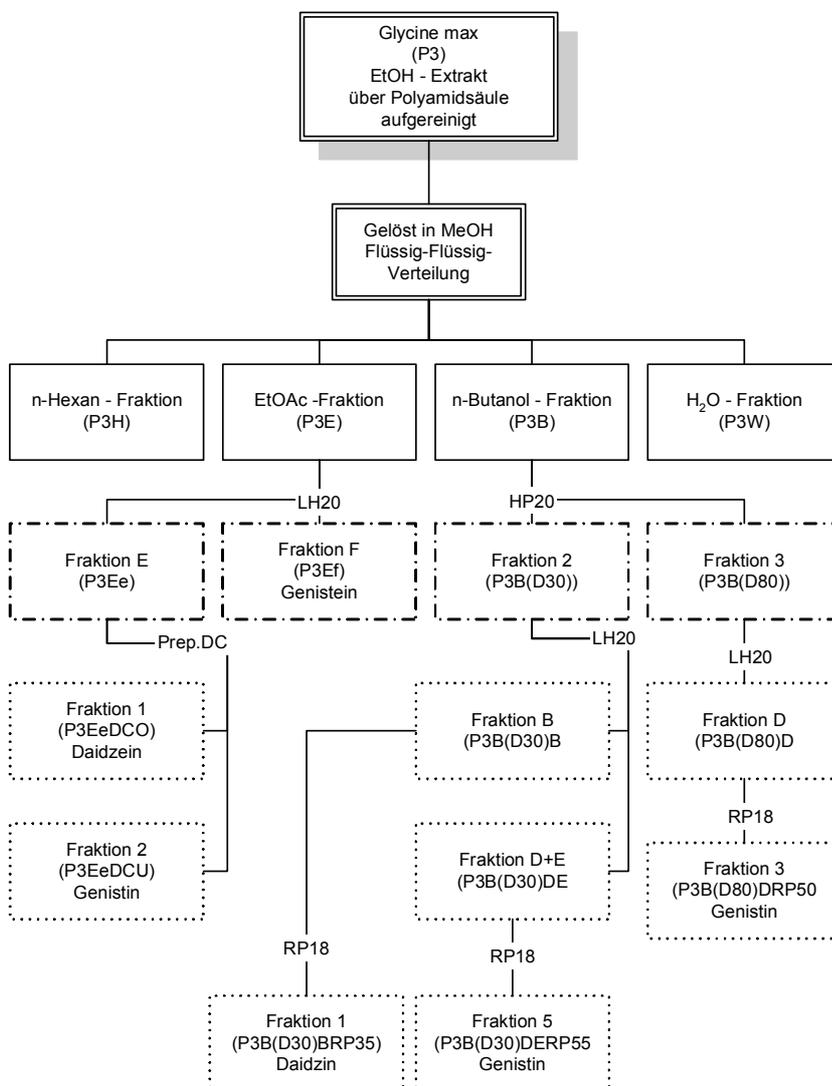
dem Fließmittelgemisch Methanol:Wasser (4:6). Dabei wurden die 3O-Rutinoside von Quercetin und Myricetin erhalten.

Trennungsschritt  
Verunreinigungen auf, die daraufhin mit Hilfe einer Fraktionierung über eine Lobar A-RP18-Säule mit einem Fließmittelgemisch Methanol:Wasser (4:6) bei einem Druck von ca. 45 bar entfernt wurden. In Fraktion P2Eg2RP2 konnte so Catechin isoliert werden. Die n-Butanol-Phase wurde ebenfalls auf eine LH20-Säule (L:41cm/Ø3cm) aufgegeben. In Fraktion G konnten im HPLC-Chromatogramm zwei Hauptverbindungen detektiert werden. Die Trennung erfolgte über eine Lobar A-RP18-Säule mit

**Isolierung von Naturstoffen aus *Glycine max***

In der Ethylacetat-Phase, die über eine LH20-Säule gegeben wurde, konnte in Fraktion F Genistein erhalten werden. Beim Lösen der Fraktion E in 40% Methanol wurde ein weißlicher Niederschlag beobachtet, der die beiden Hauptkomponenten enthielt. Da auf Grund dieser Löslichkeitsprobleme eine Aufgabe der Fraktion in einem zur Trennung geeigneten Lösungsmittel nicht möglich war, wurde der Niederschlag abzentrifugiert und über präparative Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Der Rückstand wurde hierzu in 100% Methanol gelöst und auf DC-Alufolien, Kieselgel 60, F<sub>254</sub> (20x20 cm, 0.2 mm) in einer

Konzentration von 6 mg/20 cm aufgetragen. Es erfolgte eine Aufkonzentrierung der Startbande durch Zweifachentwicklung in Ethylacetat bis zur Startlinie und anschließende Trennung durch Zweifachentwicklung der DC-Platte über 8 cm in einem Ethylacetat, Methanol, Wasser-Gemisch (85/10/5). Die beiden Hauptkomponenten konnten mittels Fluoreszenzlösung bei Bestrahlung mit UV-Licht 254 nm im oberen Drittel der Platte detektiert werden. Das DC-Material wurde drei Mal mit 100% Methanol extrahiert, wobei Daidzein und Genistin (Genistein-7-O-Glucosid) erhalten wurden. Die n-



**Abb.M9:** Isolationsschema von *Glycine max*

Butanol Fraktion wurde im Gegensatz zu den anderen Fraktionen zuerst über eine HP-20 Säule gegeben, um verbliebene Aminosäuren oder Zucker zu entfernen. Dazu wurde das Säulenmaterial über Nacht in 100% Methanol vorgequollen. Es erfolgte ein Waschschrift mit 100% Wasser. Die Probe wurde in 100% Wasser gelöst und auf das Material aufgegeben. Es

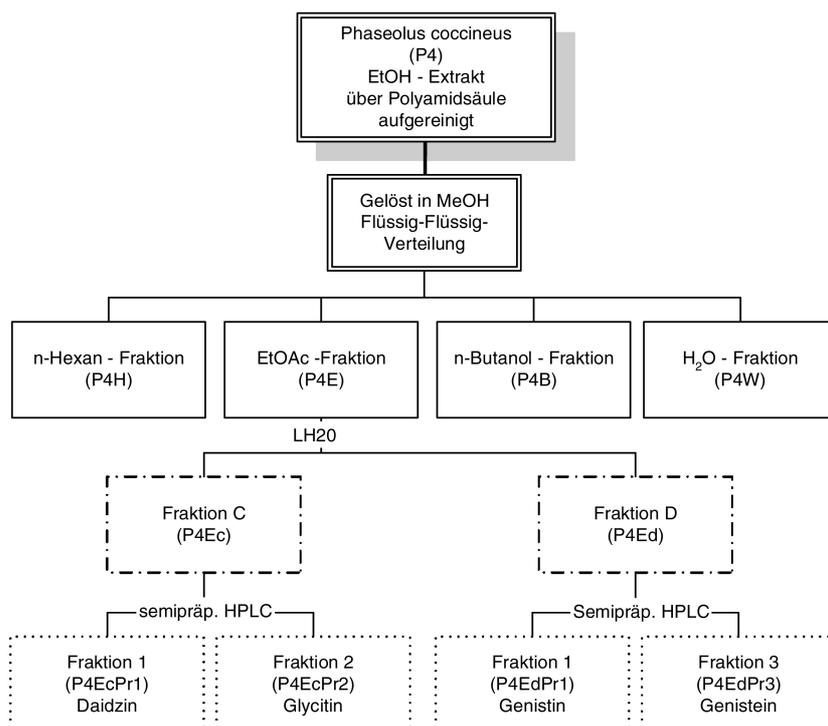
folgten Elutionsschritte mit 30%igem und 80%igem wässrigem Methanol, danach wurde die Säule mit 100% Methanol gewaschen. Die 30% und 80% Methanol Fraktionen wurden jeweils über LH20-Säulen aufgetrennt (L:28 cm/Ø2 cm; L:41 cm/Ø3 cm). In den Fraktionen P3B(D30)B und DE konnten so Daidzin (Daidzein-7*O*-glucosid) und Genistin erhalten werden, jedoch mussten beide Fraktionen über eine Lobar A-RP18-Säule aufgereinigt werden (Fließmittel s.u.) Bei Trennung der Fraktion P3B(D80)D ebenfalls über eine LobarA-RP18-Säule wurde leider nur wieder Genistin erhalten. Die Fließmittelzusammensetzung der jeweiligen Säule ist unten dargestellt. Es wurden jeweils 50 mL für den ersten Elutionsschritt und 35 mL für alle weiteren Schritte aufgefangen. Der Druck betrug 45 bar.

**Tab.M10:** Fließmittelzusammensetzung der Fraktionen angegeben in % wässrigem Methanol

Fraktion P3B(D30)B	Fraktion P3B(D30)DE	Fraktion P3B(D80)D
30%	40%	30%
35%	50%	40%
40%	55%	50%
45%	60%	60%
50%	65%	

### Isolierung von Naturstoffen aus *Phaseolus coccineus*

Es erfolgte eine Flüssig-Flüssig-Verteilung. Die Ethylacetat-Phase lieferte nach Trennung über LH20 (L:28 cm/Ø2 cm) zwei Fraktionen, aus denen mit Hilfe der semipräparativen



**Abb.M10:** Isolationschema von *Phaseolus coccineus*

HPLC nach nebenstehendem Schema Daidzin, Glycitin (Glycitein-7*O*-glucosid), Genistin und Genistein isoliert werden konnten. Es wurden jeweils zwei binäre Gradienten gefahren, deren Zeitverlauf wie unten dargestellt aufgebaut war. Die Säule wurde jeweils für 10 min im Ausgangslösungsmittelgemisch äquilibriert.

**Tab.M11:** Fließmittelgradienten für die semipräparative HPLC der Fraktionen P4Ec und Ed; Fließmittel A: NANOpur Wasser; Fließmittel B: HPLC-Methanol

Zeit (min)	Fraktion P4Ec		Zeit (min)	Fraktion P4Ed	
	A	B		A	B
0	70	30	0	70	30
5	70	30	2	70	30
25	30	70	10	50	50
30	0	100	25	25	75
			30	0	100

### Isolierung von Naturstoffen aus *Vicia faba*

Der *Vicia faba*-Extrakt wurde im ersten Schritt einer Flüssig-Flüssig-Verteilung, wie sie in Kapitel 2.3.1. bereits beschrieben wurde, unterzogen. Leider konnte damit keine Anreicherung einzelner Komponenten in den jeweiligen Phasen erreicht werden. Auf Grund dieser Tatsache mussten einige Fraktionen, die durch Trennung über LH20 und nachfolgender semipräparativer HPLC erhalten wurden basierend auf Retentionszeiten-, UV-Spektren-, LC-MS/MS-Mustervergleich und Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren vereinigt werden, um die notwendigen Substanzmengen für eine Strukturaufklärung zu erhalten. Die Fließmittelsysteme der semipräparativen HPLC sind in Tab.M12 aufgeführt. Die Fraktionen P5Bc und P5Bd wurden isokratisch mit NANOpur Wasser/HPLC-Methanol eluiert (bei 25% und 23% Fließmittel B). Im Falle der Fraktionen P5Ee und P5Ef wurde ebenfalls isokratisch gearbeitet, jedoch mit einem NANOpur Wasser/Acetonitril – Gemisch (15% und 5% Acetonitril).

Folgende Fraktionen wurden vereinigt: P5EdPr2, P5BcPr2, P5BdPr2 = P5MW564A  
 P5EdPr2a, P5BcPr3, P5BdPr3 = P5MW564B  
 P5BcPr1, P5BdPr1 = P5MW594  
 P5BcPr4, P5EcPr2 = P5MW772

**Tab.M12:** Fließmittelgradienten für die semipräparative HPLC der Fraktionen P5Ec und Ed; Fließmittel A: NANOpur Wasser; Fließmittel B: HPLC-Methanol

Zeit (min)	Fraktion P5Ec		Zeit (min)	Fraktion P5Ed	
	A	B		A	B
0	70	30	0	70	30
5	70	30	5	70	30
35	20	80	30	30	70
37	0	100	32	0	100

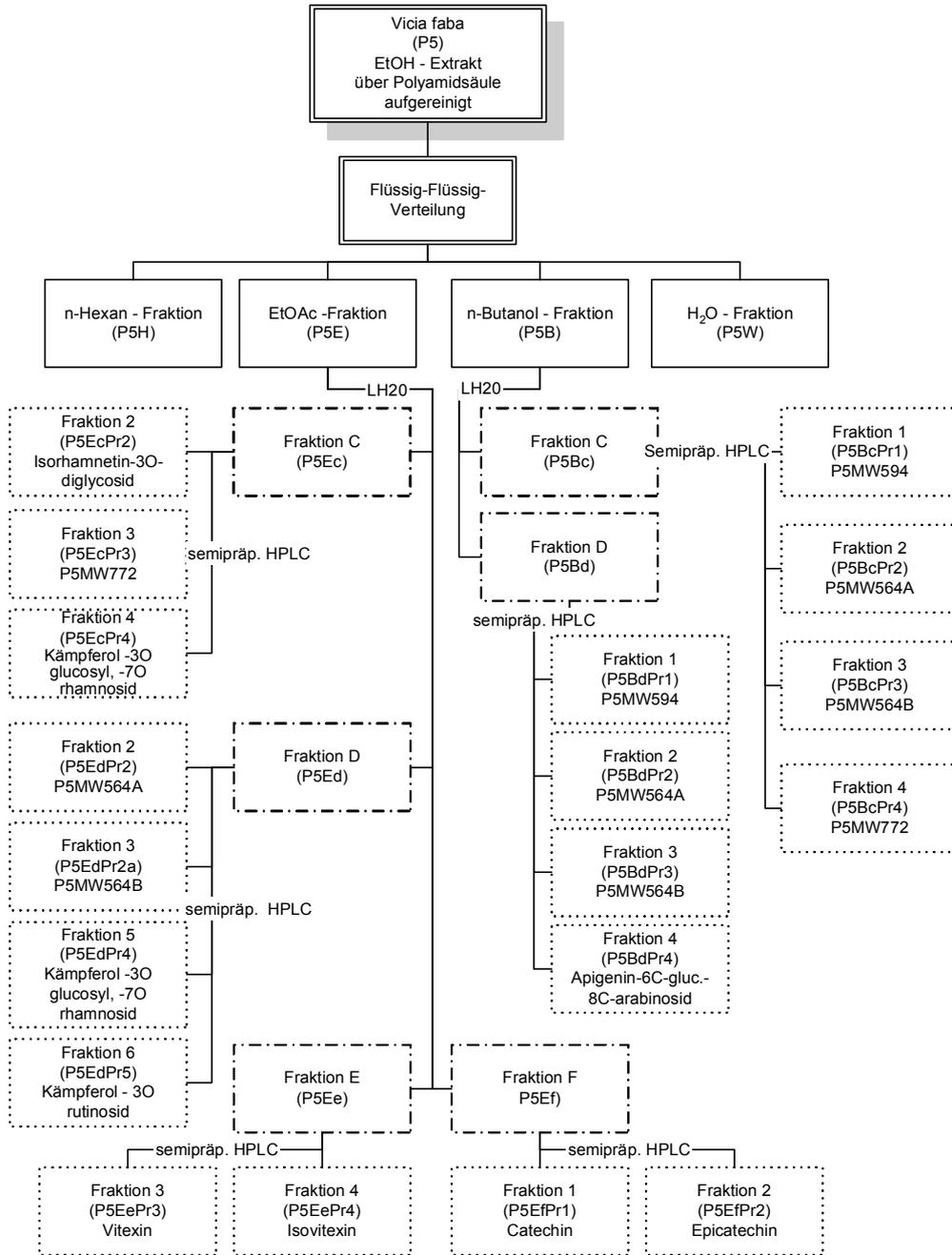


Abb.M11: Isolationschema von *Vicia faba*

**Isolierung von Naturstoffen aus *Pisum sativum***

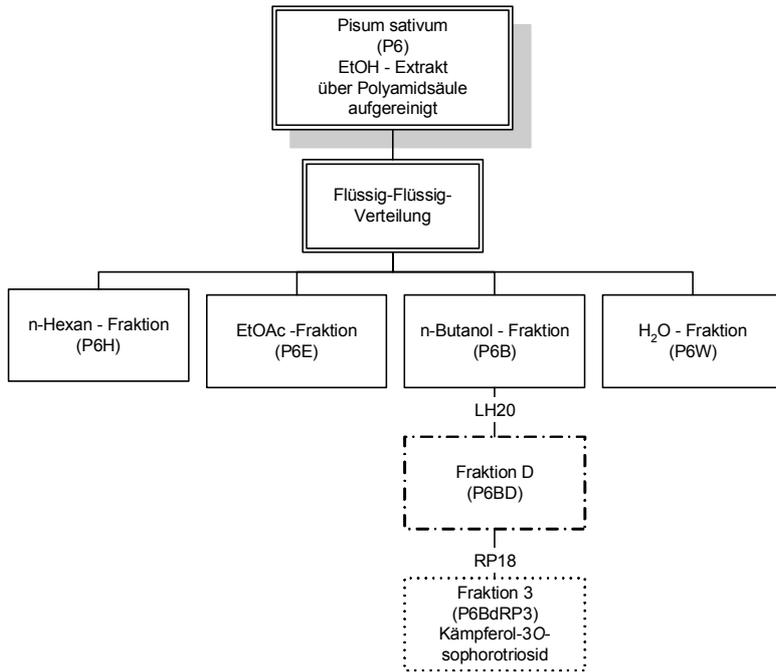
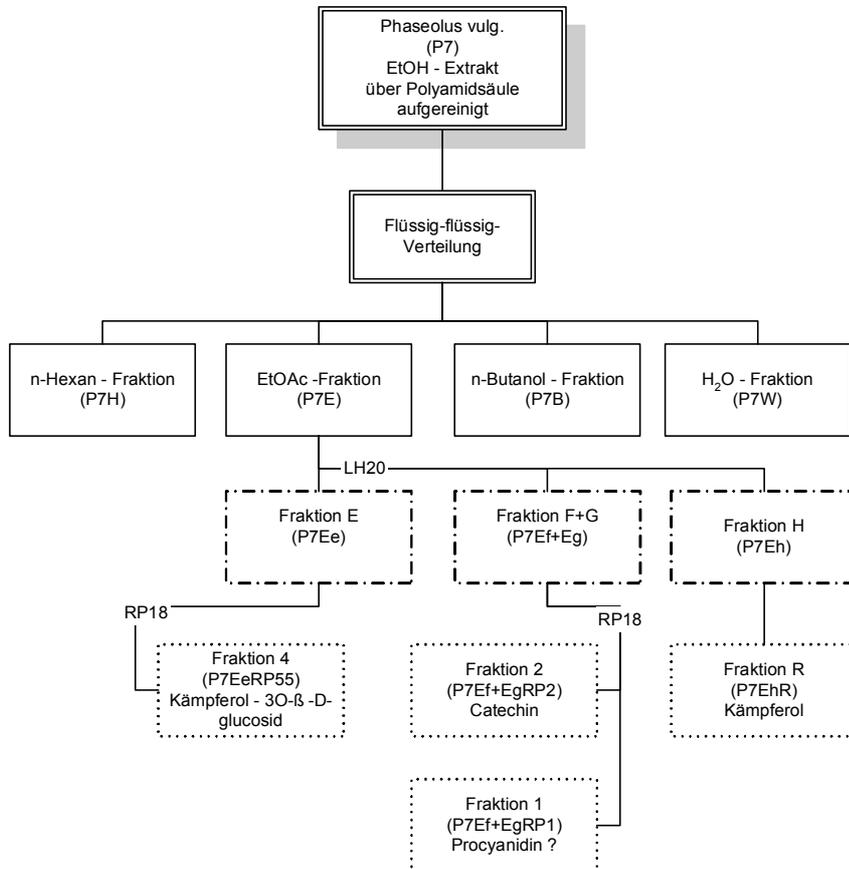


Abb.M12: Isolationsschema von *Pisum sativum*

In *Pisum sativum* war Kämpferol-3-O-sophorotriosid, ein Flavonol als einziger Hauptinhaltsstoff enthalten. Das Flavonol konnte in der n-Butanol-Phase angereichert werden. Es wurde durch eine LH20 sowie eine Lobar A-RP18-Säule aufgereinigt. Das Fließmittelgemisch der Lobar-Säule bestand dabei aus Wasser/Methanol (9/11).

**Isolierung von Naturstoffen aus *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris***



Die Hauptinhaltsstoffe von *Phaseolus vulg.* var *vulg.* konnten alle aus der Ethylacetat-Phase erhalten werden. Besonders die letzten vier Fraktionen der LH20-Säule enthielten interessante Verbindungen. Es wurden zur Aufreinigung oder Trennung der enthaltenen Substanzen Lobar-Säulen jeweils passender Größe verwendet. Für die kleinere Säule (Fraktion P7Ee) wurde anfangs 50 mL und für alle weiteren Fraktionen 35 mL

Abb.M13: Isolationsschema von *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris*

aufgefangen (Fraktionierungsschritte: 25, 40, 50, 55, 60, 65 und 100% wässrige Methanollösung, Druck 45 bar). Kämpferol-3*O*-glucosid konnte in Fraktion P7EeRP55 isoliert werden. Aus den Fraktionen P7Ef und Eg konnten Catechin und ein nicht vollständig zu identifizierendes Procyanidin erhalten werden (Fließmittel siehe Tab.M13). Eine Aufreinigung der als Gemisch vorliegenden Procyanidine mittels säurehaltigem Fließmittel führte leider zum Zerfall der Verbindungen. Kämpferol wurde aus Fraktion P7EhR durch Ausfällen aus einem 25% Methanol-Wasser Gemisch in reiner Form erhalten.

**Tab.M13:** Fließmittelgradienten für die LobarB-RP18-Säulen der Fraktionen P7Ef und Eg; Fließmittel: wässrige Methanol Gemische

<b>Fraktion P7Ef</b>		<b>Fraktion P7Eg</b>	
%Methanol	mL	%Methanol	mL
25	350	20	200
30	400	25	150
35	400	30	150
40	400	35	150
50	200	50	150
100	300	100	100

#### **Isolierung von Naturstoffen aus *Phaseolus vulgaris* var. *nanus***

Nach der Flüssig-Flüssig-Verteilung konnte in der n-Butanol Phase Myricetin-3*O*-glucosid durch eine LH20-Säule aufgereinigt werden.

Dagegen konnten aus der Ethylacetat-Phase mehrere Verbindungen erhalten werden. Durch die Größenausschlusschromatographie reicherten sich in Fraktion P8Ec Ethylgallat und Ferulasäure an, die mit Hilfe der semipräparativen HPLC getrennt wurden. In Fraktion P8Ee konnte Kämpferol-3*O*-glucosid eluiert werden, welches nachfolgend aufgereinigt wurde. Fraktion P8Ef enthielt neben dem bereits isolierten Kämpferol-Derivat auch Catechin. Diese wurden mittels semipräparativen HPLC in reiner Form erhalten. Die Fraktion P8Eg wurde über eine LobarA-RP18-Säule gegeben (45 bar, 30, 45, 55, 60, 70, 100% wässrige Methanol-Fraktionen, Volumina siehe *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris*). So konnten Dihydromyricetin und das bereits in der n-Butanol-Phase identifizierte Myricetin-Derivat erhalten werden. Fraktion P8EgRP30 musste nochmals über semipräparative HPLC aufgetrennt werden, um Catechin und Galocatechin in reiner Form zu erhalten. Die jeweiligen Gradienten-Systeme sind in Tab.M14 aufgeführt.

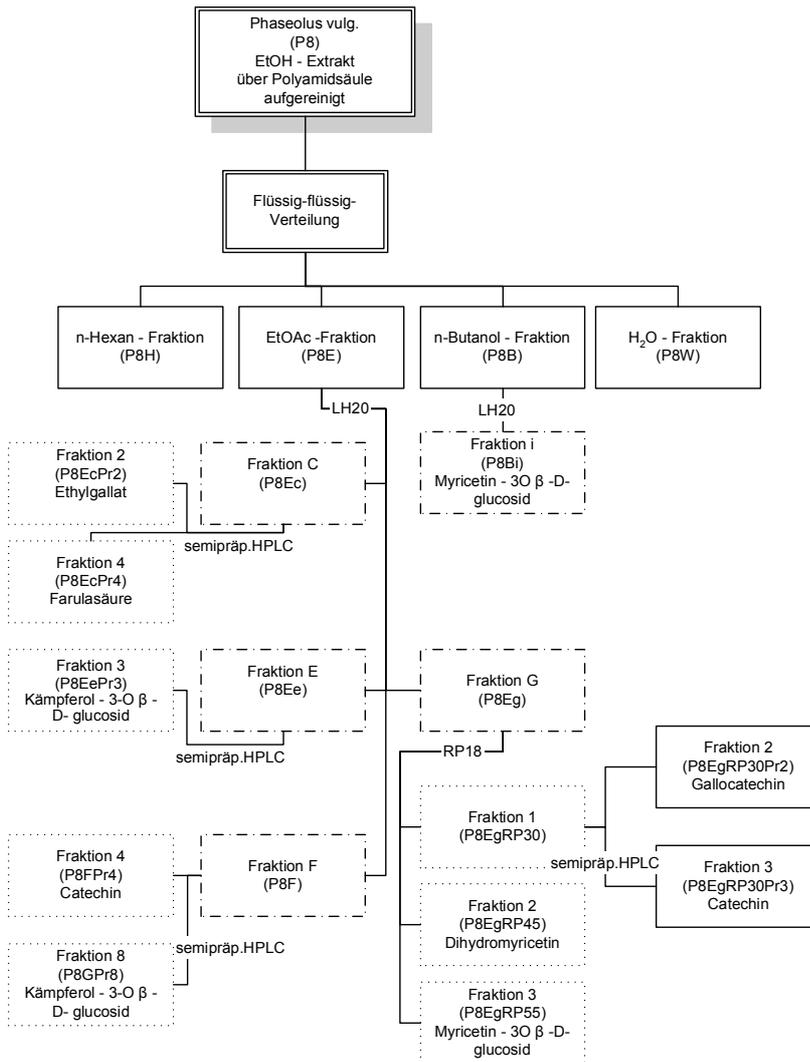
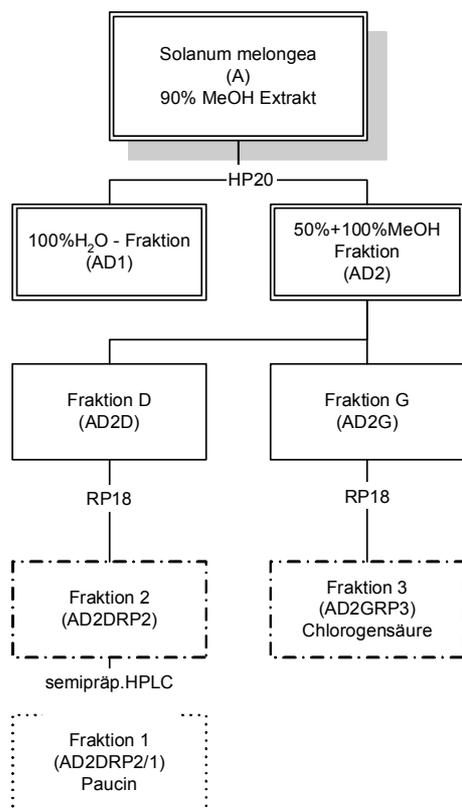


Abb.M14: Isolationsschema von *Phaseolus vulgaris* var. *nanus*

Tab.M14: Fließmittelgradienten für die semipräparative HPLC der Fraktionen P8Ec, P8Ee und Ef; Fließmittel: A: NANOpur Wasser; B: HPLC-Methanol (Fraktion P8Ec: Wasser enthielt 0.1%TFA)

Zeit (min)	Fraktion P8Ec		Zeit (min)	Fraktion P8Ee		Zeit (min)	Fraktion P8Ef	
	A	B		A	B		A	B
0	85	15	0	90	10	0	90	10
5	85	15	2	90	10	3	90	10
10	70	30	10	60	40	10	62	38
40	40	60	20	20	80	30	40	60
42	0	100	23	0	100	32		100

**Isolierung von Naturstoffen aus *Solanum melongena***

**Abb.M15:** Isolationsschema von *Solanum melongena*

**Isolierung von Naturstoffen aus *Cucumis sativus***

Der Extrakt wurde über HP20 Material aufgereinigt sowie dann durch Flüssig-Flüssig-Verteilung gegen n-Hexan von Chlorophyll befreit. Die nachfolgende LH20 Säule erbrachte in Fraktion K Isoquercitrin (Quercetin-3O-glucosid), während das Isorhamnetin-3O-glucosid nochmals über die semipräparative HPLC (Fließmittel: 10%ACN) aus Fraktion I aufgereinigt wurde. Fraktion H wurde über eine RP18-Säule (L:31 cm/Ø3 cm) gegeben, wobei der Anteil des Methanols im Fließmittel langsam erhöht wurde, um die Elutionskraft zu steigern (Methanolgehalt: 25, 35 und 50%).

Die erhaltenen Fraktionen wurden über eine LobarA-RP18-Säule (Fließmittel: Wasser/Methanol (75/15)), präparative DC und semipräparative HPLC aufgereinigt. Für die DC wurden Alugram RP-18/UV<sub>254</sub> (10x10 cm, 0.2 mm) DC-Platten der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Probe wurde in einer Konzentration von 6 mg/20 cm aufgetragen und durch zweimaliges Entwickeln mit Ethylacetat an der Startlinie aufkonzentriert. Als Fließmittel zur Trennung diente Wasser-Methanol (8/2). Die Verbindung konnte im unteren Drittel der DC-Platte auf Grund ihrer Fluoreszenz bei 366 nm detektiert werden. Das Material wurde 3mal mit Methanol extrahiert und unter Vakuum eingedunstet. Die Auftrennung der letzten Fraktionen H und L erfolgte über semipräparative HPLC. Die Säule wurde jeweils mit

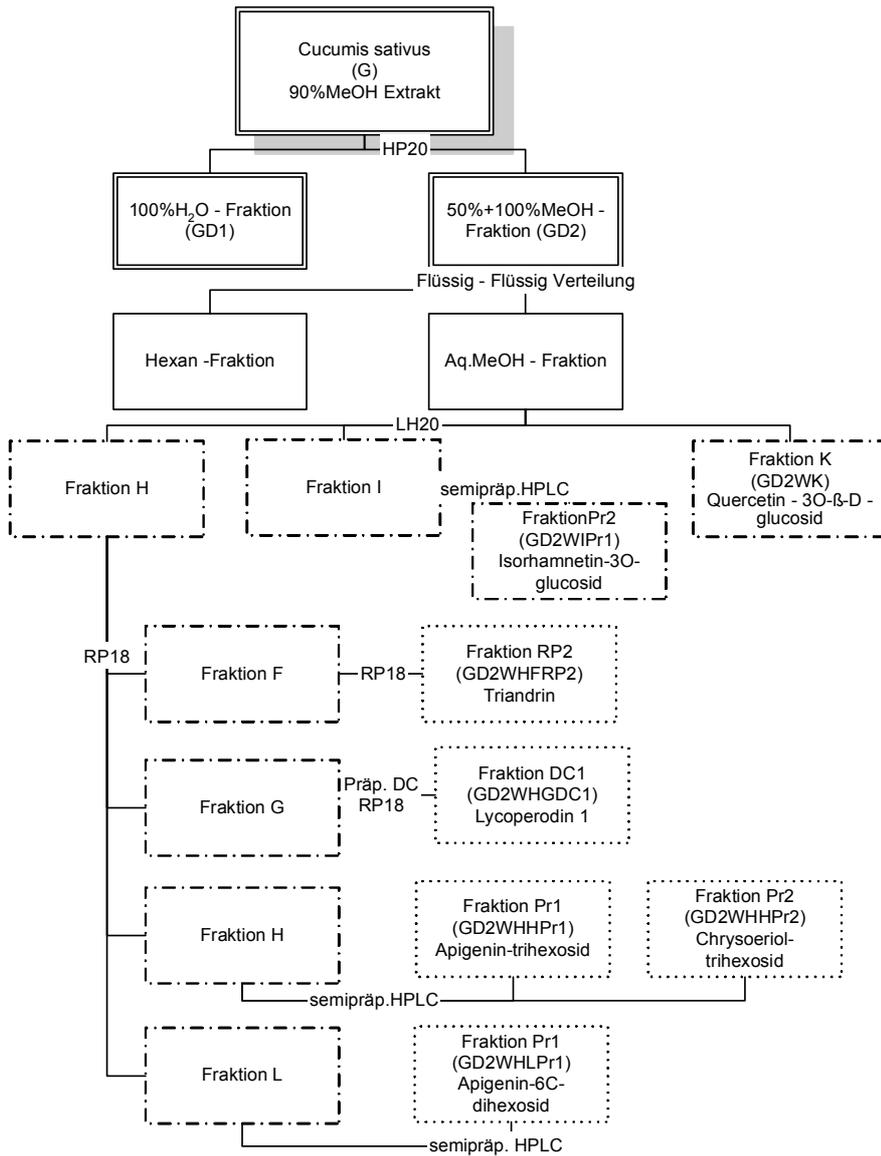
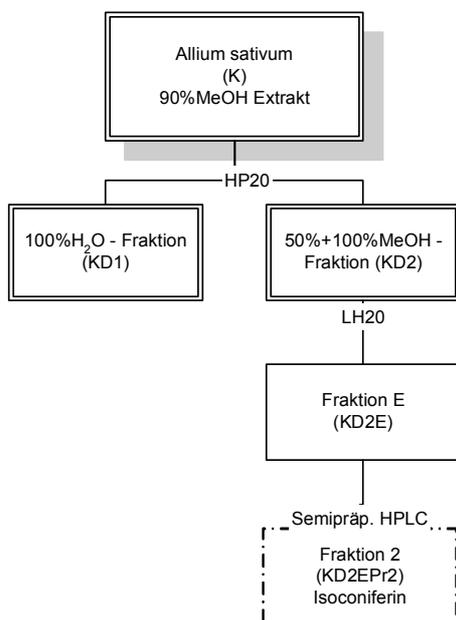


Abb.M16: Isolationsschema von *Cucumis sativus*

einem Acetonitril/Wasser Gemisch (1/9) gestartet. Nach 14 bzw. 10 Minuten wurde der Anteil an ACN auf 15% erhöht. Die Verbindungen wurden hierbei während der ersten 10 Minuten auf der Säule getrennt. Da jedoch bei dieser Fließmittelzusammensetzung die Elution der Verbindungen ein Vielfaches an Lösungsmitteln benötigt hätte, wurde der Anteil an ACN vorzeitig gesteigert, um die Verbindungen zu eluieren. Die Trennungsschritte lieferten Triandrin (p-Coumarylalkohol-9O-glucosid), Lycoperodin 1, sowie Apigenin- bzw. Chrysoeriolglycoside (s. Abb.M16)

### Isolierung von Naturstoffen aus *Allium sativum*



Der Extrakt wurde mit Hilfe von HP20 Material von Zuckern und Aminosäuren befreit. Durch eine LH20 Säule wurde ein Coniferylalkohol-Derivat erhalten (Isoconiferin), das mittels semipräparativer HPLC gereinigt wurde. Das Standardprogramm der analytischen HPLC zeigte hierbei eine gute Trennung. Im Gegensatz zur Küchenzwiebel (*Allium cepa*), die große Mengen an Flavonoiden enthält, konnten aus Knoblauch keine Verbindungen dieses Typs erhalten werden.

Abb.M17: Isolierungsschema von *Allium sativum*

### Isolierung von Naturstoffen aus *Raphanus sativus*

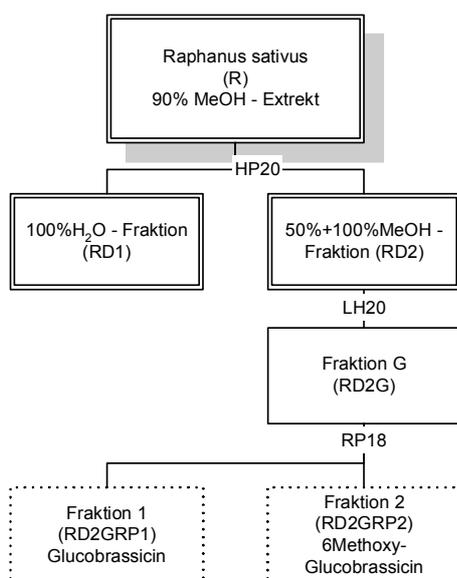


Abb.M18: Isolierungsschema von *Raphanus sativus*

Aus *Raphanus sativus* konnten zwei Indol-Derivate (Glucobrassicin sowie 6-Methoxyglucobrassicin) isoliert werden, die sich wiederum in der methanolischen Fraktion der HP20-Säule befanden. Eine Trennung erfolgte über eine LobarA-RP18-Säule (Fließmittel: 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% wässriges Methanol, je 100 ml aufgefangen)

## **2.4. Identifizierung und Strukturaufklärung der Naturstoffe**

Mit Hilfe der hier aufgeführten Methoden konnten Aussagen zu Reinheit und Identität der isolierten Verbindungen getroffen werden. Über die analytische HPLC (siehe 2.3.3.1.) war es möglich UV-aktive Verunreinigungen zu erkennen sowie das erhaltene UV-Spektrum sowohl mit der internen Spektrenbibliothek als auch mit Literaturstellen zu vergleichen. Die Massenspektrometrie lieferte eine weitere Möglichkeit die Reinheit der Probe zu überprüfen und gab Hinweise auf die Molmassen sowie evt. weitere Informationen zu den Molekülen (z.B. Glykosidierungen). Die Methoden der NMR bestätigten Verknüpfungen oder stereochemische Aspekte. Letztere wurden ebenso durch die optische Drehung bestimmt.

### **2.4.1. UV-Vis-Spektroskopie**

Die UV-Spektren sind ein charakteristisches Merkmal für Substanzen bzw. Substanzfamilien und können als weitere Indizien bei der Strukturaufklärung herangezogen werden. Gemessen wurden die Spektren an der analytischen HPLC mit Hilfe des DAD-Detektors (siehe 2.3.3.1.) Der Messbereich lag bei 210-595nm und die erhaltenen Spektren wurden anschließend mit einer Spektrenbibliothek sowie den Literaturangaben verglichen.

### **2.4.2. Massenspektrometrie (MS)**

Die Massenspektrometrie stellt einen weiteren wichtigen Schritt in der Strukturaufklärung dar. Mit ihr können Aussagen über das Molekulargewicht einer Substanz gemacht oder über Fragmentierungen Rückschlüsse auf die Struktur gezogen werden. Über die hochauflösende Massenspektrometrie können die an der Struktur beteiligten Elemente bestimmt werden. Damit lässt sich die Summenformel einer Verbindung aufstellen.

### **Elektro-Spray-Ionisation – Massenspektrometrie (ESI-MS)**

Bei dieser Ionisierungsmethode wird die Probe bei Atmosphärendruck über eine Potentialdifferenz von mehreren Kilovolt (ca.2-5kV) durch eine Kapillare in das Massenspektrometer gesprüht. Das Lösungsmittel verdampft und die entstehenden Tropfen werden elektrostatisch aufgeladen. Sie können im Analysatorteil gemäß ihrer Größe und Ladung detektiert werden. Man erhält so die Massenzahl ( $m/z$ ) für das Gesamtmolekül oder eventuelle Fragmente. Im Falle einer vorherigen Auftrennung über die HPLC besteht die Möglichkeit die Massen der Substanzen aus Gemischen zu bestimmen. Im Falle eines Direkteinlasses kann eine Reinsubstanz auch sofort vermessen werden. Die Komponenten dieser Anlage wurden bereits in Kapitel 2.3.3.3. beschrieben.

### **Elektron-Impact-Massenspektrometrie (EI-MS)**

Während die ESI-Methode eine schonende Fragmentierung darstellt, wird das Molekül bei der EI-Methode wesentlich stärker beansprucht und damit auch wesentlich stärker fragmentiert. Bei dieser Methode wird die Probe in die Gasphase überführt, wobei sie entweder in gelöstem oder trockenem Zustand bei 200-360°C verdampft wird. Die Injektion erfolgt entweder als Direkteinlass oder kann mit einer gaschromatographischen Anlage (GC) gekoppelt sein. Im Falle der Kopplung mit einer GC-Anlage wird die Probe injiziert und mit Hilfe eines Trägergases (Helium) über eine Kapillarsäule (15 m x 0.25 mm, SGD) geleitet. Es können so ebenfalls Substanzen in Gemischen bestimmt werden, sofern sie sich bei diesem Verfahren unzersetzt in die Gasphase überführen lassen. Nach dem Verdampfen wird die Probe in ein Hochvakuum überführt, mit einem Elektronenstrahl (10-100 eV) ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die erreichte Geschwindigkeit ist abhängig von der Masse des Moleküls, seiner Ladung und der angelegten Spannung des elektrischen Feldes. Die Auftrennung erfolgt in einem Magnetfeld, in dem die beschleunigten Ionen auf eine Kreisbahn abgelenkt werden, die von dem Quotienten Masse/Ladung der Teilchen und von der Feldstärke des Magnetfeldes abhängig ist. Der Radius wird umso größer, je größer die Masse, je größer die Geschwindigkeit und je kleiner das Magnetfeld ist.

Die Aufnahmen der GC-EI-MS/EI-MS-Spektren erfolgten am Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

#### **GC-EI-MS-Analge:**

GC: Finnigan Trace GC-Ultra

MS: Finnigan Trace DSQ

### **High-Resolution-Massenspektrometrie (HR-MS)**

Bei der hochauflösenden Massenspektrometrie wird die Auflösung durch doppelte Fokussierung erhöht. Dabei wird der Ionenstrahl sowohl durch ein Magnetfeld als auch durch ein elektrisches Feld geleitet. Es ist so möglich, die Masse eines Moleküls auf mehrere Nachkommastellen genau zu bestimmen und damit eine Aussage über die Summenformel zu treffen.

Die Messung der HR-MS-Spektren erfolgte im Institut für Strukturbiologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig.

#### **2.4.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)**

Die meisten NMR-Spektren wurden am Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem DRX-500-Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen. In besonderen Fällen wurden die Proben am Institut für

Strukturbiologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig von Dr. Victor Wray und seinen Mitarbeitern an einem AM-300, ARX-400 bzw. DMX-600 der Firma Bruker vermessen. Als deuterierte Lösungsmittel dienen Dimethylsulfoxid (DMSO- $d_6$ , euriso-top) oder Methanol ( $CD_3OD$ , euriso-top). Die Daten wurden mit der 1D- oder 2D WinNMR Software der Firma Bruker bearbeitet. Die chemische Verschiebung wurde in ppm relativ zu Tetramethylsilan (TMS) und die Kopplungskonstanten in Hertz (Hz) angegeben. Zusätzlich zu  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Spektren als eindimensionale Verfahren wurden auch zweidimensionale NMR-Experimente ausgewertet (H,H-COSY, H,C-Korrelationen wie HMBC und HMQC, ferner nOe-, Noesy- und ROESY-Experimente). Durch Vergleich der chemischen Verschiebungen, der Integration der Signale und der Kopplungskonstanten mit Literaturdaten konnten die Strukturen der isolierten Verbindungen aufgeklärt werden.

#### 2.4.4. Optische Drehung

Chirale Moleküle sind in der Lage die Ebene des linear polarisierten Lichts zu drehen. Dabei wird der Drehwinkel  $\alpha$ , um den die Schwingungsebene des Lichtes beim Durchstrahlen einer Probe gedreht wird, als optische Drehung bezeichnet. Die spezifische Drehung  $[\alpha]_{20}^D$  einer Lösung wird bei 20°C mit Licht der D-Linie des Natriums ( $\lambda=589.3$  nm) gemessen. Die Konzentration der Lösung beträgt hierbei 1 g/mL bei einer Schichtdicke der Küvette von 10 cm. Die optische Drehung ist außerdem abhängig vom verwendeten Lösungsmittel.

Die Vermessung der Proben erfolgte bei der Natrium-D-Linie mit einem Polarimeter 341 LC der Firma Perkin Elmer bei einer Temperatur von 20°C (Ultra Thermostat NB5, Colora) und einer Schichtdicke von 10 cm.

Lösungsmittel:

Methanol (99.9%) für die Spektroskopie	Aldrich
Uvasol Aceton für die Spektroskopie	Merck

#### 2.5. Quantifizierung des Polyphenolgehaltes

Die Quantifizierung erfolgte mit den Extrakten, die unter Kapitel 2.2.2. und 2.2.5. beschrieben wurden. Die Extrakte wurden gefriergetrocknet und anschließend den Testverfahren unterzogen.

Die Quantifizierung mittels HPLC wurde mit der in Kapitel 2.3.3.1. beschriebenen analytischen HPLC Anlage durchgeführt. Die Quantifizierung nach Folin-Ciocalteu erfolgte an einem Perkin Elmer UV-Vis Spektrophotometer.

### 2.5.1. Quantifizierung mittels HPLC-DAD

Zur Quantifizierung mittels HPLC wurde eine modifizierte Methode nach Tsao und Wen (Tsao et al. 2003; Wen et al. 2005) verwendet.

Die Quantifizierung der einzelnen Flavonoidgruppen erfolgte bei dem jeweiligen Absorptionsmaximum mit Hilfe eines externen Standards. Die Standards wurden käuflich erworben. Die Flavanole bzw. Isoflavonoide wurde als Catechin bzw. Genistein bei 280 nm quantifiziert, die Phenolsäuren bei 320 nm als Chlorogensäure, die Flavone bzw. Flavonole wurden als Apigenin bzw. Quercetin bei 340 nm bestimmt, sowie die Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm. Die Standards wurden in 100% HPLC-Methanol gelöst. Der Einfluss von Wasser- und Säurezusatz wurde hierbei untersucht, es zeigte sich jedoch keine Änderung der Peakflächen. Es wurden zur Erstellung der Kalibriergeraden verschiedene Konzentrationen und Lösungen vermessen. Die erhaltenen Peakfläche/Masse-Korrelationen sind unten dargestellt und dienen als Grundlage für die Berechnung der Inhaltsstoffmenge der Extrakte. Die vermessenen Konzentrationen sind in Tab.A1 im Anhang nochmals aufgeführt.

Apigenin:	$y = 74.471 x$	$(r^2=0.99)$
Catechin:	$y = 12.178 x$	$(r^2=0.99)$
Chlorogensäure:	$y = 45.022 x$	$(r^2=0.99)$
Cyanidinchlorid:	$y = 59.656$	$(r^2=0.99)$
Genistein:	$y = 42.987 x$	$(r^2=0.99)$
Quercetin:	$y = 32.996 x$	$(r^2=0.99)$

Die Auftrennung der Extrakte bzw. die Messung der Peakflächen wurde bei unterschiedlichen Gradientensystemen durchgeführt. Die unterschiedliche Behandlung der Extrakte wurde notwendig, da der Standardgradient nicht für alle Proben eine optimale Trennung der Peaks erreichte. Unter Umständen war es sogar notwendig, die einzelnen Flavonoidgruppen nicht nur bei einer unterschiedlichen Wellenlänge zu beobachten, sondern auch gesondert in verschiedenen Gradientensystemen. Die Robustheit des Systems wurde diesbezüglich für jede der Standardsubstanzen überprüft. Die Identifizierung der zur Quantifizierung herangezogenen Peakflächen erfolgte mittels eines UV-Spektrenvergleichs mit einer internen Spektrenbibliothek sowie durch Vergleich mit den Retentionszeiten, UV- und MS-Spektren der isolierten Verbindungen.

**Tab.M15:** Gradientensysteme für die Quantifizierung mittels HPLC-DAD

Zeit (min)	% MeOH										
Nr.1		Nr.2		Nr.3		Nr.4		Nr.5		Nr.6	
0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
5	10	5	10	10	10	5	10	5	10	5	10
35	70	35	60	15	30	7	20	30	25	10	30
40	100	40	100	35	50	30	30	35	50	35	50
50	100	50	100	40	100	35	50	38	100	40	100
55	10	55	10	50	100	40	100	48	100	50	100
60	10	60	10	55	10	50	100	50	10	55	10
				60	10	55	10	60	10	60	10
						60	10				

Zur Quantifizierung wurde eine geeignete Menge des Extraktes in 70% Methanol/NANOpur Wasser (pH2, meta-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) gelöst, im Ultraschallbad für 15 Minuten behandelt und anschließend zentrifugiert (13000 U/min, 5 min.). Die so erhaltenen Proben wurden mittels HPLC-DAD und gegebenenfalls mittels HPLC-MS untersucht. Die Extrakte von *Allium sativum* und *Raphanus sativus* wurden nicht mittels HPLC quantifiziert, da hier auch in höheren Konzentrationen keine typischen UV-Spektren erkennbar waren.

**Tab.M16:** Extrakte und verwendete Gradientensysteme. Für *Allium sativum* und *Raphanus sativus* erfolgte keine Bestimmung mittels HPLC

Extrakt	Wellenlänge und verwendetes Programm
<i>Vigna radiata</i> (L.)	Standardprogramm (340 nm)
<i>Vigna angularis</i>	Prog. Nr.2 (280 nm, 340 nm)
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. convar. <i>max</i> var. <i>atra</i>	Prog. Nr.1 (280 nm, 520 nm)
<i>Phaseolus coccineus</i> L. var. <i>albiflorus</i>	Prog. Nr.5 (320 nm)
<i>Vicia faba</i> L. ssp. <i>faba</i> var. <i>faba</i> subvar. <i>faba</i>	Prog. Nr.6 (280 nm, 340 nm)
<i>Pisum sativum</i> L. ssp. <i>sativum</i> convar. <i>sativum</i>	Prog. Nr.2 (340 nm)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>vulgaris</i>	Prog. Nr.1 (280 nm, 340 nm), Prog. Nr.5 (320 nm), Prog. Nr.4 (520 nm)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>nanus</i>	Prog. Nr.2 (280 nm, 340 nm), Prog. Nr.5 (320 nm), Prog. Nr.4 (520 nm)
Kochextrakte der Leguminosen	Es wurden die gleichen Gradienten zugrunde gelegt. Ausnahme: <i>Vigna angularis</i> Prog. Nr.3 (340 nm)
<i>Solanum melongena</i>	Prog. Nr.1 (340 nm)
<i>Cucumis sativus</i>	Prog. Nr.1 (340 nm)
<i>Cucurbita pepo</i> var. (Zucchini)	Prog. Nr.1 (340 nm)
<i>Cucurbita pepo</i> var. (Zierkürbis)	Prog. Nr.1 (340 nm)

### 2.5.2. Quantifizierung nach Folin-Ciocalteu

Bei dieser Bestimmung werden die in dem Reagenz enthaltenen Molybdationen ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot x2\text{H}_2\text{O}$ ) und Wolframationen ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot x2\text{H}_2\text{O}$ ) reduziert. Die Reduktion kann durch Substanzen, die phenolische OH-Gruppen tragen, verursacht werden. Es kommt so zur Ausbildung eines blaufarbenen Komplexes, dessen Absorption gegen einen Standardsubstanz quantifiziert werden kann.

Es wurden zwei verschiedene Gehalte an Phenolen bestimmt. Zum einen die bereits frei in der Lösung vorliegenden phenolischen Verbindungen, zum anderen auch die, die nach Hydrolyse glycosidischer Bindungen freigesetzt wurden. Dazu wurde eine Methode nach Vinson und Hertog benutzt (Hertog et al. 1992; Vinson et al. 2001). Für beide Ansätze wurden ca. 20 mg des Extraktes eingewogen. Die Proben wurden mit 2.5 ml 50% wässrigem Methanol überschichtet, wohingegen das Lösungsmittel zur Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes zusätzlich 1.2 M HCl enthielt. Es erfolgte eine 10 minütige Behandlung im Ultraschallbad. Während nun die Probe zur Bestimmung der freien Polyphenole bei Raumtemperatur aufbewahrt sowie unter gelegentlichem Schütteln extrahiert wurde, erfolgte bei den restlichen Proben eine Hydrolyse (bei 90°C, für 3h im Wasserbad). Nach dem Abkühlen der hydrolysierten Proben wurden alle Proben mit 100% Methanol auf 5 ml aufgefüllt.

Die Quantifizierung der Polyphenole folgte gemäß einer angepassten Methode des Europäischen Arzneibuchs zur Bestimmung des Gerbstoffgehaltes (EuAB 5.5 Kapitel 2.8.14.). Zur Vermeidung größerer Mengen an Schwermetallabfällen wurde das Volumen der Materialien auf ein Zehntel reduziert. Da im vorliegenden Fall Flavonoide bearbeitet wurden, diente Catechin (Vinson et al. 1998) als externer Standard (vermessene Konzentrationen: 0.1, 0.0875, 0.075, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.01, 0.001 mg/ml). Die Probe (200 µL je nach Gehalt verdünnt) wurde mit 100 µL Folin-Ciocalteu-Reagenz versetzt, das zuvor mit 1 ml NANOpur Wasser verdünnt worden war. Nach 3 Minuten erfolgte die Zugabe von 1.2 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (1.96 g/25 ml). Das Gemisch wurde nun 2 Stunden bei 29°C im Wasserbad aufbewahrt, um eine vollständige Farbentwicklung abzuwarten. Danach wurde die Probe zentrifugiert (13000 U/min, 3 min.) und im Spektrophotometer bei 760 nm vermessen. Die Zeitabstände wurden entweder der Literatur (Singleton et al. 1965) entnommen oder experimentell ermittelt.

Catechinkalibriergerade:  $y = 9.2526 x$  ( $r^2=0.98$ )

### 2.6. Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften der Reinsubstanzen und der Extrakte zur Quantifizierung mittels DPPH-Küvetten-Assay

Bei dieser Bestimmung wird das stabile Diphenylpicrylhydrazyl Radikal bei Anwesenheit von Stoffen, die in der Lage sind dieses Radikal abzufangen, zu einem farblosen Produkt

umgesetzt. Die Absorption verhält sich dabei gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz und ist proportional zur Konzentration des DPPH-Radikals (siehe Abb.M15). Es wurde nach einer modifizierten Methode nach Li (Li et al. 1999) vorgegangen. Die Absorptionsabnahme wurde über zwei Minuten bei 517 nm beobachtet.

$$\Delta A = A_0 - A_2$$

$\Delta A$ : Absorptionsabnahme nach 2 Minuten

$A_0$ : Absorption bei Start der Reaktion

$A_2$ : Absorption nach 2 Minuten

### 2.6.1. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften der Reinsubstanzen mittels DPPH – Assay

Zur Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften der Reinsubstanzen wurde zu 10  $\mu\text{L}$  der Probenlösung 490  $\mu\text{L}$  der DPPH-Lösung (4.5 mg/100 ml) zupipettiert. Es wurden zuerst alle isolierten Substanzen bei einer einheitlichen Konzentration von 76  $\mu\text{M}$  vermessen. Sofern hier bereits Aktivität vorlag, wurden weitere geeignete Konzentrationen ausgewählt, um den  $\text{EC}_{50}$  Wert zu bestimmen. Dieser gibt die Konzentration der Verbindung an, die eine Abnahme der Absorption der DPPH-Lösung um die Hälfte bewirkt. Zur Berechnung wurde die Absorptionsabnahme gegen die Konzentration der jeweiligen Verbindung graphisch aufgetragen und der  $\text{EC}_{50}$ -Wert aus der erhaltenen Geradengleichung ermittelt.

$$\Delta A = m * (cV) + a$$

$\Delta A$ : Absorptionsabnahme nach 2 Minuten

m: Steigung der Geradengleichung

cV: Konzentration der Verbindung in  $\mu\text{M}$

a: Achsenabschnitt der Geradengleichung

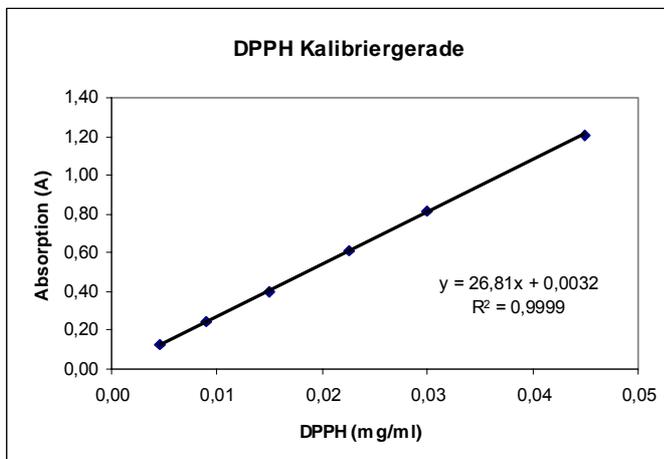


Abb.M19: DPPH Kalibriergerade, Auftragung Konzentration DPPH in mg/ml gegen die Absorption bei 517 nm

### **2.6.2. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften der Extrakte mittels DPPH – Assay**

Die Untersuchung erfolgte analog der unter 2.6. beschriebenen Methode. Die Extrakte wurden in 100% Methanol gelöst, im Ultraschallbad für 15 Minuten belassen und dann bei 13000 U/min 5 Minuten zentrifugiert (In Konzentrationen höher als 1 mg/ml wurde eine zweifache Extraktion durchgeführt). Der Überstand diente jeweils als Untersuchungslösung. Die Extrakte wurden zuerst in einer Konzentration von 0.4 mg/mL vermessen. Zeigte sich eine Absorptionsabnahme um mehr als 0.15 Einheiten wurde der EC<sub>50</sub>-Wert bestimmt. Hierzu wurden zusätzlich mindestens drei weitere Konzentrationen vermessen und die EC<sub>50</sub>-Werte wie oben berechnet.

### **2.7. Testung der Reinsubstanzen und Extrakte auf zelluläre Aktivität**

Die folgenden Experimente zur Zytotoxizität, zu den protektiven Eigenschaften und die Aufnahmestudien (2.7.1. und Unterkapitel) wurden von Gudrun Michels, Petra Niering, Andreas Kulawik, Dominique Gollembeck, Sandra Ohler und Dr. Wim Wätjen am Institut für Toxikologie (Leitung: Prof. Dr. med. Regine Kahl) der HHU Düsseldorf durchgeführt.

Die zellproliferierenden Eigenschaften wurden getestet von Qing-wei Zhao und Zhi - qiang Wang an der Zhejiang Universität im „Department of Pharmacology and Toxicology“ Hangzhou, China (Leitung: Prof. Dr. Yi-jia Lou).

#### **2.7.1. Zellkultur und Medium (H4IIE Hepatom Zellen)**

##### **Zelllinie (H4IIE Hepatom Zellen)**

H4IIE Zellen wurden 1964 von Pitot (Pitot et al. 1964) isoliert. Sie entstammen einem Subklon des H35 Reuber-Hepatoms (Rattenhepatom), stellen relativ differenzierte Zellen dar und dienen als Modellsystem für Hepatocyten der Ratte.

Die Zelllinie wurde unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten und zweimal wöchentlich in neues Medium passagiert. Für die durchgeführten Tests wurden H4IIE Zellen der 23. bis 40. Passage verwendet.

##### **Medium**

Es wurde „Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) high Glucose“ genutzt, das 4.5 g/L Glucose und 2mM L-Glutamin enthält. Diesem wurden 10% fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt, außerdem Penicillin (100 units/mL) und Streptomycin (100 µg/mL).

### **2.7.1.1. Bestimmung der Zytotoxizität**

Sowohl der Neutralrot- als auch der MTT-Assay dienen der Bestimmung der Zellviabilität.

#### **Neutralrotassay**

Bei diesem Assay wurden die Zellen mit dem kationischen Farbstoff Neutralrot ( $\lambda_{\text{max}} = 560$  nm) versetzt. Dieser wird von lebenden Zellen aufgenommen und in den Lysosomen angereichert. Intrazellulär findet wegen des niedrigeren pH-Wertes eine Protonierung des Farbstoffs statt, wodurch er an der Rückdiffusion gehindert wird.

Die Zellen (10000 Zellen/Well) wurden hierfür in 96-Well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden Anwuchszeit mit den zu untersuchenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das Medium entfernt und pro Well 200  $\mu\text{L}$  Neutralrot-Gebrauchslösung hinzugegeben. Nach weiteren 3 Stunden bei 37°C wurde der Farbstoff wieder entfernt und die Zellen mit Fixierlösung (200  $\mu\text{L}$ /Well) fixiert. Die Fixierlösung wurde nach wenigen Sekunden wieder abgenommen und die Zellen mit Neutralrot-Extraktionslösung (200  $\mu\text{L}$ /Well) lysiert. Der intrazellulär gespeicherte Farbstoff wurde so freigesetzt und nach Homogenisierung der Lösung bei 560nm in einem ELISA-Reader ausgewertet. Die Homogenisierung erfolgte dabei entweder durch Schütteln (200rpm, Edmund Bühler Swip KL-2) oder durch Stehenlassen (über Nacht bei 4°C).

#### **MTT-Assay**

Hierbei wurde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-Tetrazoliumbromid (MTT) als kationischer Farbstoff verwendet. In lebenden Zellen findet eine enzymatische Reduktion statt, durch die ein blaues unlösliches Formazan gebildet wird. Die Behandlung der Zellen erfolgte analog der Methode des Neutralrotassays. In diesem Fall wurde jedoch eine Extraktionslösung bestehend aus Isopropanol/Ameisensäure (95:5) (HHU Düsseldorf) bzw. DMSO (Zhejiang University) verwendet.

### **2.7.1.2. Bestimmung der protektiven Effekte**

#### **Nachweis der Apoptosehemmung: Aktivität der Caspase**

Im Verlauf der Apoptoseinduktion werden proteolytische Enzyme spezifisch aktiviert. Hierzu zählen die Caspasen, die Substrate innerhalb einer spezifischen Tetrapeptidsequenz schneiden. Zur Bestimmung der Caspase-3 Aktivität wurden  $1.5 \times 10^6$  Zellen auf Zellkulturschalen (10 cm) ausgesät. Nach 48 Stunden Anwuchszeit wurden die Zellen mit den

Testsubstanzen vorinkubiert (1 h). Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden die Zellen 14 Stunden inkubiert, dann gelöst, in Medium aufgenommen und zentrifugiert (2000 U/min, 3 min.). Das Pellet wurde mit PBS-Puffer gewaschen, wieder zentrifugiert (5000 U/min, 2 min.) und in 70 µL Lyse-Gebrauchslösung aufgenommen. Mit Hilfe eines Metallrührers (500 U/min, 15 min.) wurden die Zellen bei 4°C suspendiert und danach unverzüglich bei -80°C über Nacht eingefroren. Nach Auftauen und Zentrifugation (15300 U/min, 10 min., 4°C) wurde ein Überstand erhalten, der sowohl zur Bestimmung der Proteinkonzentration als auch für den Assay selbst verwendet wurde. Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte. Es wurden 10 µL Caspasesubstrat (2 mM) mit 90 µL Assaygebrauchslösung versetzt, um den Blindwert zu bestimmen. Im Falle der Proben wurden 10 µL der Gebrauchslösung durch Probenlösung ersetzt. Durch die Reaktion wird Nitrophenol freigesetzt, das photometrisch bei 405 nm über einen Zeitraum von 3 Stunden im ELISA-Reader vermessen wurde.

### **Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch mit Rinderserumalbumin als Standard (Modifizierte Bestimmung nach Bradford (Bradford 1976)).

Es wurden dazu 20 µL der Probenlösung mit 1 mL Bradford-Farbreagenz (1:5 mit entmineralisiertem Wasser verdünnt, filtriert) in Plastikküvetten gemischt. Die Extinktion der Probe wurde bei 595 nm (Inkubation 15 Minuten bei Raumtemperatur) gegen eine Blindprobe (20 µL Puffer, 1 mL Bradford-Farbreagenz) vermessen. Der Proteingehalt der Probe ergab sich aus der BSA-Eichkurve im Bereich von 25-300 µg/mL. Der Proteingehalt diente beim Caspase-Assay als Normierung.

### **2.7.1.3. Aufnahmestudien**

Um festzustellen ob, und in welchem Umfang die untersuchten Substanzen von den Zellen (H4IIE) aufgenommen werden, wurde mit dieser Zelllinie Aufnahmestudien durchgeführt. Die Inkubation und Lyse der Zellen erfolgte dabei am Institut für Toxikologie (HHU Düsseldorf), die Extraktion, Analyse und Quantifizierung der aufgenommenen Substanzen erfolgte am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie (HHU Düsseldorf). Es wurde dabei analog der Methode nach Steffan vorgegangen (Steffan 2005).

Dazu wurden  $1.5 \times 10^6$  Zellen ausgesät und nach einer Anwachszeit von 72 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen versetzt (Konzentrationen: 500 µM). Nach 1 Stunde wurden die Zellen im Medium suspendiert und zentrifugiert (5000 U/min, 2 min.) und das Pellet dreimal mit je 1 mL PBS-Puffer gewaschen, um die extrazellulär anhaftenden Substanzreste zu entfernen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von Methanol und Vortexen, der Aufschluss der Zellen durch 4 x 10 Sek. Eintauchen einer Ultraschallspitze (100 W) unter Eiskühlung. Bis zur Extraktion wurden die Zellen bei -20° aufbewahrt. Zur Extraktion wurde das Lysat aufgetaut, 1 Minute im Ultraschallbad behandelt und 5 Stunden auf einem Schüttler

bei 200 U/min extrahiert. Danach wurde zentrifugiert (13000 U/min, 5 min.) und der Überstand mittels HPLC – DAD und/oder HPLC-MS untersucht. Die Peaks wurden jeweils anhand ihres UV-Spektrums identifiziert; die Peakfläche bei 254 nm diente als Grundlage für die Quantifizierung der Aufnahme, ausgedrückt als nmol/10<sup>6</sup> Zellen. Hierbei wurde mittels eines externen Standards quantifiziert. Die jeweiligen Reinsubstanzen wurden käuflich erworben und in unterschiedlichen Konzentrationen mittels HPLC-DAD untersucht (Kalibriergeraden der Standardsubstanzen). Jede Aufnahmestudie wurde mindestens dreimal wiederholt.

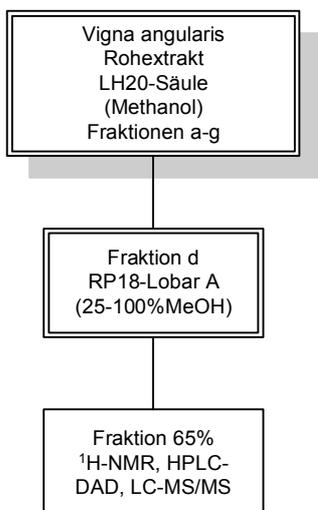
### **2.7.2. Zellkultur und Medium (MCF7/BUS Zellen)**

Die MCF7/BUS Zelllinie ist eine menschliche Brustkrebszelllinie, die Estrogenrezeptoren exprimiert und damit estrogensensitiv ist. Sie wurde vom „Institute of Biochemistry and Cell Biology (IBCB) Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences“ erhalten. Die Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert, dem 100 IU/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin sowie 10% FCS zugesetzt wurden. Die Zellen wurden unter 95% Luft und 5%CO<sub>2</sub> in einer luftbefeuchteten Umgebung kultiviert und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Da das Serum Reste von Estrogenwirkung aufweisen kann, wurde es über Aktivkohle und Dextran von Steroidhormonen befreit, filtriert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

#### **2.7.2.1. Bestimmung der zellproliferierenden Eigenschaften der Extrakte und Reinsubstanzen**

Zur Bestimmung der zellproliferierenden Eigenschaften der Extrakte und Reinsubstanzen wurden konfluente MCF7/BUS Zellen zweimal mit D-Hanks Lösung gewaschen und mit einer 0.25% Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Die gelösten Zellen wurden in DMEM-Medium suspendiert, ausgezählt und in einer Dichte von 8 x 10<sup>3</sup> Zellen/Well in 96-Well-Platten bzw. 1 x 10<sup>4</sup> Zellen/Well in 24-Well-Platten ausgesät. Nach einer Anwachszeit von 48 Stunden wurden die Zellen wieder vorsichtig mit D-Hanks-Lösung gewaschen und mit estrogenfreiem Medium (DMEM-Medium, phenolrotfrei, 5% Aktivkohle-dextran gereinigtes menschliches Serum) versetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Testsubstanzen und 17β-Estradiol zugegeben. Nach 5-7 Tagen wurde die Zellproliferation im Vergleich zu 17β-Estradiol ausgewertet, indem das Medium mit 10 µL einer 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid-Lösung (MTT-Lösung, 5 mg/mL) versetzt wurde. Nach vier Stunden wurde das Medium entfernt und 500 µL DMSO wurden zugegeben. Die Absorption wurde bei 570 nm mit einem ELx800 Universal-Mikroplattenlesegerät (BioRad) ausgewertet. Die Zellproliferation wird hierbei über die Aufnahme der MTT-Lösung in die Zellen definiert (s.o.). Dabei wird die Zellproliferation bei Behandlung mit einer 0.1 bzw. 1 nM Lösung 17β-Estradiol als 100%-Wert definiert und die Aktivität der Testsubstanzen dagegen berechnet.

### 2.7.2.2. Bestimmung des aktiven Inhaltsstoffs in *Vigna angularis*



**Abb.M20:** Assay geleitete Isolierung von *Vigna angularis*

Im Test mit den Extrakten der acht Leguminosen zeigte *Vigna angularis* neben *Glycine max* und *Phaseolus coccineus* eine signifikante Steigerung der Zellproliferation. Da jedoch keine der aus *Vigna angularis* isolierten Reinsubstanzen eine derartige signifikante Zellproliferation hervorrief, wurde eine assaygeleitete Isolierung durchgeführt, um die aktive Komponente zu identifizieren. Der Rohextrakt wurde hierzu erst über eine LH20-Säule aufgetrennt (Fließmittel 100% MeOH), wobei die aktivste Fraktion über eine LobarA-RP18-Säule nachfolgend fraktioniert wurde (Fließmittel 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 und 100% wässriger Methanol). Es wurden erst 50 mL, dann jeweils 35 mL aufgefangen. Die aktiven Fraktionen der Lobar-Säule wurden mittels HPLC-DAD und HPLC-MS untersucht. Als aktivste Fraktion wurde Fraktion

P2d65% ermittelt, die eine Hauptkomponente enthielt. Diese Hauptkomponente wurde zusätzlich mit NMR-spektroskopischen Methoden charakterisiert.

### 2.7.3. Statistische Auswertung

#### H4IIE-Zelltests

Zum Vergleich der Mittelwerte der Einzelversuche wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA-analysis of variance). Als post-hoc Test wurde der LSD-Test (least significance difference, Analyse-it) verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens drei Einzelversuchen.

#### MCF7/BUS-Zelltests

Zum Vergleich der Mittelwerte der Einzelversuche wurde der Student t-Test verwendet. (Mikrosoft-Exel). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens drei Einzelversuchen.

## 2.8. Verwendete Geräte, Chemikalien und Lösungen

### 2.8.1. Geräte

Aufgeführt sind die Geräte, die in den vorangegangenen Kapiteln nicht ausführlich vorgestellt wurden oder keiner speziellen Methode zuzuordnen sind.

Lambda 10UV/Vis-Spektrophotometer	Perkin Elmer
Lambda 25UV/Vis-Spektrophotometer	Perkin Elmer
Steuerung: UV WinLab	
CO <sub>2</sub> – Inkubator IG150	Jouan
Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal	Brand
Autoklav Varioklav	H&P
Autoklav	Fedegari
Multiwell-Lesegerät Wallac Victor <sup>2</sup>	Perkin Elmer
Steuerung: Wallac 1420 software vers.2.00 release 9	
Mikroplatten-Lesegerät (ELx800 universal)	BioRad
Mikroskop Zellkultur	Zeiss
Kamera Cool SNAP Pro	Intas
Zentrifugen: Minifuge 2, Typ:423	Heraeus Christ
Universal 30 F	Hettich
MR1812	Jouan
Biofuge pico	Heraeus
Rührer MR2002	Heidolph
Heiz-Magnetrührer Combi Mag	IKA
Digital pH-Meter 420 Aplus	Orion

Gefriertruhe -80°C, 86-Freezer	Forma Scientific
Rotationsverdampfer Rotavapor R200	Büchi
Wasserbad (Heating bath B-490)	Büchi
Vakuumpumpe CVC2	Vacuubrand
Stickstoffgenerator UHPN 3001	Nitrox
Schüttler (Swip KL-2)	Edmund Bühler
Drogenmühle	IKA
Ultraschallbad Sonorex RK 510H	Bandelin
UV-Lampe	Camag
Vakuumentrifuge SpeedVac SPD 111V	Savant
Kühlfalle RVT 400	Savant
Digitalwaagen 2354/TE1502S	Sartorius
Analysenwaage MC1	Sartorius
Trockenschrank ET6130	Haereus
Ultraschallspitze Labsonic 1510	Braun
Sterilbank LC2	Jouan
Sterilbank BSB 4	Bartholomei

### 2.8.2. Chemikalien und Materialien

96-Well-Platten (zur Zellkultur)	Nunc
Eppendorfpipetten 20/100/200/1000	Eppendorf
Injektionsspritze	Hamilton
Küvetten (Quarz, 10,00 mm)	Perkin Elmer
Plastikküvetten (10x4x45 mm)	Sarstedt
Petrischalen	Nunc
Sixwells (zur Zellkultur)	Nunc
Rundfilter 595 Ø90 mm /200 mm	Schleicher & Schuell
2,2-Diphenyl-1-picrylhydracyl	Sigma/Alfa Aesar
17β-Estradiol	Sigma
Ameisensäure	Riedel-de Haen
Apigenin	BioChemika/Extrasynthese
Apo-ONE homogeneous Caspase-3/7-Assay	Promega
Ascorbinsäure	Caelo
Bradford-Reagenz	BioRad
Borsäure	Merck
Calciumchlorid	Merck

Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-PNA)	ICN Biochemicals
Catechin	Sigma
CHAPS	ICN Biochemicals
Chloroform	Merck
Chlorogensäure	Fluka
Cyanidinchlorid	Roth GmbH
Dihydrokämpferol	TranMIT GmbH Marburg
Dimethylsulfoxid	Sigma
DMEM (Phenolrotfrei)	PAA
DTT	ICN Biochemicals
Dulbecco`s modified Eagles medium (DMEM) High Glucose: (4500mg/mL Glucose, L-Glutamin, ohne Pyrovat)	Gibco
DMEM (Phenolrotfrei)	Sigma
EDTA	ICN Biochemicals
Essigsäure	Baker
Ethanol	Riedel-de Haen
FCS Gold (Fötales Kälberserum)	PAA/Gibco
Ferulasäure	Rotichrom
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck
Formaldehyd 37%	Merck
Genistein	Sigma
Glucose	Sigma
L-Glutamin	Merck
L-Glutaminsäure	Fluka
Glycerol	Sigma
D,L-Glycin	Sigma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma/Fluka
HEPES	Biosolve
Human Serum(Blood Central of Zhejiang Province)	Hangzhou, China
Isopropanol	Merck
Kämpferol	Roth GmbH
Kaffeensäure	Rotichrom
KCl	Merck
Luteolin	Sigma
Luteolintetramethylether	Extasynthese
D,L-Lysin	ICN Biomedicals, USA
Ortho-Phosphorsäure	Normapur
MTT	Sigma
Myricetin	BioChemika/Calbiochem
NaCl	Merck

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Riedel-de Haen
Neutralrot	Sigma
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Proteinstandard	Sigma
Propylgallat	Sigma
Quercetin	Merck/Sigma
Roti- Phenol (gepuffert)	Roth
Rutin	Sigma
Taxifolin	Sigma
D,L-Tyrosin	ICN Biomedicals, USA
Triton-X 100	Merck/Sigma
Trockenmilch (nonfat-dried milk, bovine)	Sigma/Roth
Trypsin	Gibco
D,L-Tryptophan	Roth
D,L-Valin	ICN Biomedicals, USA
Vitexin	Roth GmbH/Extrasynthese
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck

### 2.8.3. Lösungen

Neutralrot-Gebrauslösung:	20 ml Medium, 250 µL Neutralrotstammlösung (0.4% (m/V), vor Gebrauch frisch hergestellt)
Fixierlösung:	1% Formaldehyd, 1% Calciumchlorid
NR-Extraktionslösung:	50% Ethanol, 1% Eisessig
MTT-Extraktionslösung:	95% Isopropanol, 5% Ameisensäure
Lysispuffer-Caspase:	50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 100 µM EDTA, pH 7.4 (autoklaviert, Lagerung bei 4°C)
Assaypuffer-Caspase:	55 mM Hepes, 110 mM NaCl, 110 µM EDTA, pH 7.4 (autoklaviert, Lagerung bei 4°C)
Lyse-Gebrauchslösung-Caspase:	5 mg CHAPS, 5 µL DTT Lösung (1M) in 4.990 mL Lysepuffer
Assay-Gebrauchslösung-Caspase:	5.334 mL Assaypuffer, 6 mg CHAPS, 60 µL 1M DTT Lösung, 600 µL Glycerol (frisch hergestellt)
TBE-Puffer (10x):	108 g Trisma-Base, 55 g Borsäure, 40 mL 0.5 M EDTA (pH 8) ad 1 L dH <sub>2</sub> O, autoklaviert
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8), autoklaviert, Lagerung bei 4°C
5 M NaCl Lösung:	5 M NaCl Lösung, autoklaviert
EDTA-Lösung:	0.5 M EDTA, pH 8, autoklaviert

## Material und Methoden

---

Tris-HCl:	0.1 M Trizma-Base, pH 8, autoklaviert
PBS (10x)	1.37 M NaCl, 27 M KCl, 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in Wasser, pH 7.4, autoklaviert
D-Hanks-Lösung:	0.4 g KCl, 0.06 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.8 g NaCl, 0.35 g NaHCO <sub>3</sub> , 0.00475 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 1000 ml Wasser

### 3. Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit werden zunächst die Ergebnisse der getrockneten und eingelegten Gemüse aus China beschrieben. Dabei wird lediglich auf das Vorhandensein von Flavonoiden eingegangen, d.h. die qualitativen Aspekte stehen im Vordergrund.

Im Kapitel 3.2. sowie 3.3. über Leguminosen und weitere chinesisch Gemüse ist dagegen nicht nur die qualitative Zusammensetzung der Extrakte, sondern sind auch die Gehalte an Flavonoiden von Bedeutung.

#### 3.1. Ergebnisse des Screenings verschiedener getrockneter und eingelegter chinesischer Lebensmittel

Getrocknete und in Essig eingelegte Gemüse verschiedener Art werden in China häufig konsumiert. Daher erfolgte im Rahmen der Kooperation mit der Zhejiang Universität – Hangzhou/China (Department of Pharmacology and Toxicology) eine qualitative Untersuchung verschiedener Gemüse, die entweder direkt gegessen oder zu verschiedenen Gerichten hinzugefügt werden.

##### 3.1.1. Essigsaures Gemüse

Untersucht wurden die elf in Tab.M4 aufgelisteten eingelegten Produkte. Die ersten drei Extrakte von *Brassica juncea* var., ebenso wie die Extrakte von *Raphanus sativus* und *Phyllostachys* spec. zeigten weder bei direkter Untersuchung noch nach Aufreinigung mittels Flüssig/Flüssig-Verteilung in ihren HPLC-Chromatogrammen UV-Spektren von Flavonoiden. In den restlichen Extrakten konnte jedoch jeweils mindestens ein Flavonoid detektiert werden. In Abb.E1 ist beispielhaft das HPLC-Chromatogramm des *Allium sativum*-Extraktes abgebildet. Es konnten in diesem Extrakt ohne Aufreinigung zwei Flavonoide, nämlich Kämpferol und ein Methylderivat des Quercetins, detektiert werden.

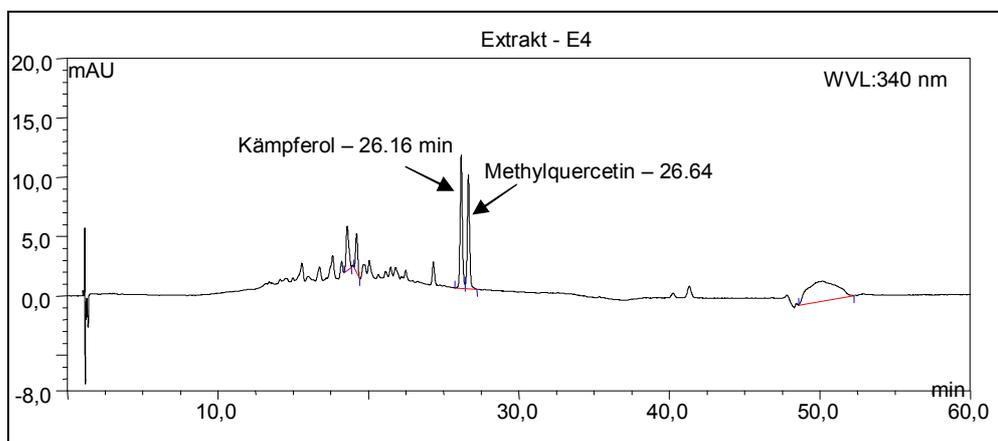


Abb.E1: HPLC-Chromatogramm des E4-Extraktes (*Allium sativum*), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm

In den Extrakten der Blätter von *Brassica juncea* var. konnten im Gegensatz zu den Extrakten der Wurzelknolle Flavonoide gefunden werden. Alle drei Produkte enthielten Quercetin, Kämpferol und ein Methylderivat des Quercetins.

Im Gegensatz hierzu waren in den *Cucumis sativus* var.-Proben ein Methylderivat des Luteolins, ein Apigenin-C-hexosid sowie ein Flavonol zu finden.

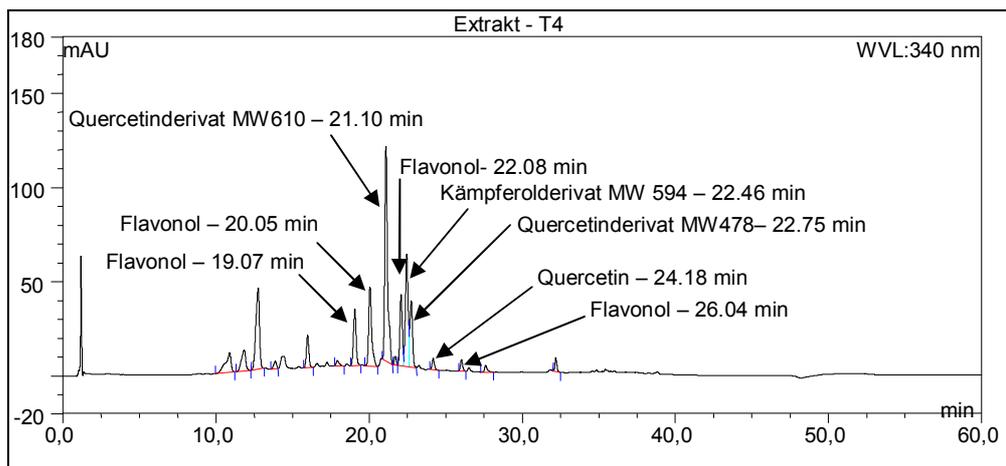
Es konnten somit nur Aglyka, deren Methylderivate und C-Glycosyle detektiert werden, d.h. Derivate, die im essigsauren Milieu erhalten bleiben (Die übrigen HPLC-Chromatogramme befinden sich im Anhang.).

**Tab.E1:** Liste des eingelegten Gemüse mit Angabe über das Vorkommen von Flavonoiden und sofern möglich weiterer Charakterisierung

Code	Lat. Name	Flavonoide (Anzahl)	Charakterisierung
E1	<i>Brassica juncea</i> var. (Knolle)	-	
E2	<i>Brassica juncea</i> var. (Knolle)	-	
E3	<i>Brassica juncea</i> var. (Knolle)	-	
E4	<i>Allium sativum</i> (Zwiebel)	+ (2x)	Kämpferol, Methylquercetin
E5	<i>Phyllostachys</i> spec.	-	
E6	<i>Raphanus sativus</i> (Knolle)	-	
E7	<i>Brassica juncea</i> var. (Blätter)	+ (3x)	Quercetin, Kämpferol, Methylquercetin
E8	<i>Brassica juncea</i> var. (Blätter)	+ (3x)	Quercetin, Kämpferol, Methylquercetin
E9	<i>Brassica juncea</i> var. (Blätter)/ <i>Phyllostachys</i> spec.	+ (3x)	Quercetin, Kämpferol, Methylquercetin
E10	<i>Cucumis sativus</i> var.(Früchte)	+ (2x)	Methyluteolin-C-hexosid, Flavonol
E11	<i>Cucumis sativus</i> var. (Früchte)	+ (2x)	Apigenin-C-hexosid Methyluteolin-C-hexosid

### 3.1.2. Trockengemüse

In der Hälfte der Extrakte der getrockneten Gemüsesorten konnten Flavonoide nachgewiesen werden. *Lilium* spec., *Tremella* spec., *Phyllostachys* spec. und *Dioscorea opposita* lieferten dabei keine detektierbaren Peaks. In den Samen von *Nelumbo nucifera* (Lotussamen) und den getrockneten Blüten von *Hemerocallis* spec.(Lilienblüten) konnten jeweils mehrere Flavonoide nachgewiesen werden. Das HPLC-Chromatogramm des *Hemerocallis*-Extraktes ist beispielhaft in Abb.E2 dargestellt. Im speziellen Fall der Blätter von *Brassica juncea* var. konnten zusätzlich zu den in den essigsauren Proben nachgewiesenen Verbindungen weitere Flavonoide beobachtet werden (Die HPLC-Chromatogramme der übrigen Extrakte sind im Anhang zu finden)



**Abb.E2:** HPLC-Chromatogramm des T4-Extraktes (100% MeOH, *Hemerocallis spec.*), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm

**Tab.E2:** Liste der getrockneten Gemüse mit Angabe über das Vorkommen von Flavonoiden und sofern möglich weiterer Charakterisierung

Code	Lat. Name	Flavonoide (Anzahl)	Charakterisierung
T1	<i>Nelumbo nucifera</i> (Semen nelumbinis)	+ (5x)	Flavone, Flavonole
T2	<i>Brassica juncea</i> var. (Blätter)	+ (6x)	Flavone, Flavonole (Kämpferol, Methylquercetin)
T3	<i>Astragalus membranaceus</i> (Wurzel)	+ (1x)	Flavonol
T4	<i>Hemerocallis spec.</i> (Blüten)	+ (8x)	Flavonole
T5	<i>Lilium spec.</i> (Zwiebel)	-	
T6	<i>Tremella spec.</i>	-	
T7	<i>Phyllostachys spec.</i>	-	
T8	<i>Dioscorea opposita</i>	-	

### 3.2. Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Leguminosenextrakte

#### Untersuchung der Extrakte mittels HPLC-DAD und nach Folin-Ciocalteu

Die Extrakte wurden mittels HPLC-DAD auf den Gehalt von Flavanolen, Flavonen, Flavonolen, Isoflavonoiden, Anthocyanidinen und Zimtsäure-Derivaten hin untersucht. Die Extrakte wurden hierzu in die analytische HPLC-Anlage (Material und Methoden 2.3.3.1.) injiziert und mit Hilfe unterschiedlicher Gradienten aufgetrennt. Der Einsatz der unterschiedlichen Gradienten wurde notwendig, weil mehrere Substanzgruppen betrachtet wurden, die unterschiedliche chemische und somit chromatographische Eigenschaften besaßen, es jedoch Ziel war, einen Gesamteindruck über die polyphenolischen Inhaltsstoffe zu bekommen, um so die Ergebnisse in den weiteren Versuchen zu beurteilen. Somit waren sowohl quantitative als auch qualitative Aspekte von ausschlaggebender Bedeutung. Die Zuordnung der Peaks zu den einzelnen Substanzklassen wurde mit Hilfe der isolierten Inhaltsstoffe sowie deren chromatographischer Parameter (Retentionszeit, UV-Spektrum) vorgenommen und wurden außerdem über UV-Spektren-Vergleich mit einer internen Datenbank, die Daten von mehr als 90 verschiedenen Polyphenolen enthielt, überprüft. Die Gehaltsangaben erfolgten jeweils als mg Polyphenole/100 g Frischgewicht (FG).

Zur Untersuchung des Kochwassers wurden 3-4 unabhängige Proben der Ernte vom Oktober 2003 herangezogen, jedoch wurde im Falle des rückständigen Samenmaterials nur auf eine Probe zurückgegriffen, d.h. die Bilanzierung erfolgte mit  $n=1$ .

Für die quantitative Bestimmung der Polyphenole nach Folin-Ciocalteu hingegen wurden die Proben vom Mai 2004 aus China verwendet, da ausreichend Samenmaterial zur Verfügung stand. Die Angaben des Polyphenolgehaltes erfolgten als mg freie Polyphenole (FP) bzw. nach Hydrolyse als Gesamtpolyphenole (GP) pro 100 g Frischgewicht (FG), bestimmt jeweils als Catechin. Die Besprechung der Ergebnisse erfolgt in diesem Fall in der Reihenfolge des Probencodes.

#### 3.2.1. Extrakte von *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek

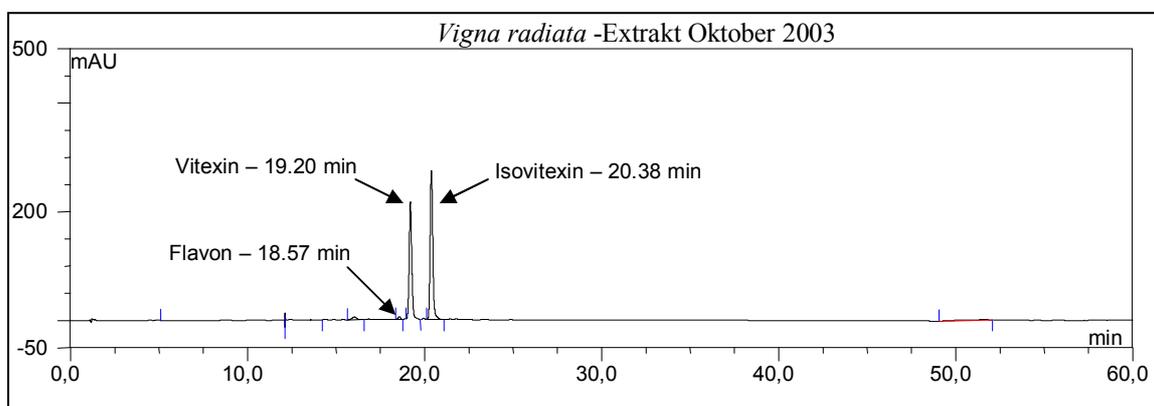
##### Qualitative Zusammensetzung

In den Extrakten von *Vigna radiata* konnten als Hauptinhaltsstoffe Vitexin und Isovitexin identifiziert und auch isoliert werden. Diese beiden Substanzen stellten die Hauptinhaltsstoffe aller vier untersuchten Extrakte dar. (Abb.E4 zeigt beispielhaft das Chromatogramm eines Extraktes von *Vigna radiata*). Zusätzlich zu diesen beiden Hauptverbindungen konnten bis zu vier weitere Substanzen in den Extrakten beobachtet werden, die sich jedoch am unteren Detektionslimit befanden und Minoritätskomponenten darstellten. Drei dieser Komponenten wiesen ein UV-Maximum bei ca. 337 nm auf, das eindeutig auf Flavon-Derivate ( $R_f= 21.45$ ,

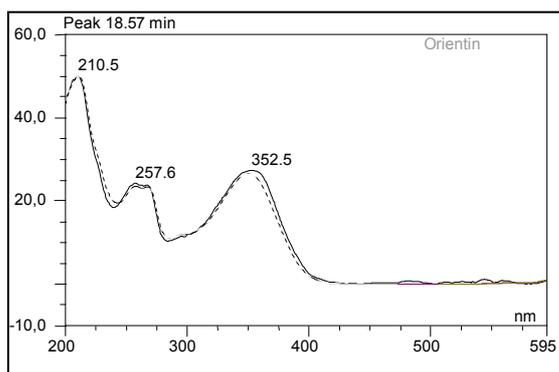
21.78 und 23.3 min) hindeutete, während eine dieser Minoritätskomponenten ein UV-Maximum bei ca. 350 nm (Rf=18.57 min) zeigte.

Diese Komponente bei 18.57 min war in allen Extrakten vorhanden und konnte mit Hilfe des Massenspektrums genauer charakterisiert werden. Das Molekulargewicht belief sich auf 448 amu, gleichzeitig konnte die Abspaltung eines Fragmentes von 120 amu beobachtet werden, die für eine C-C-gebundene Hexose typisch ist. Die Informationen aus UV-Spektrum und Massenspektrum lieferten somit als mögliche Strukturen der Verbindung Orientin bzw. Isoorientin.

In den chinesischen Extrakten („Extrakt Oktober 2003“, „Extrakt Mai 2004“) konnte ein weiteres Flavon bei 23.3 min beobachtet werden, das in den deutschen Extrakten („Extrakt Bot. Garten“, „Extrakt Gewächshaus“) nicht nachzuweisen war. In der Probe „Extrakt Botanischer Garten“ erschien dafür ein Flavon bei 21.78 min, zusätzlich dazu war in der Probe „Extrakt Gewächshaus“ ein weiteres Flavon bei 21.45 min zu finden.



**Abb.E3:** HPLC-Chromatogramm des *Vigna radiata*-Extraktes Oktober 2003 (Wellenlänge: 340 nm, Standardgradient)



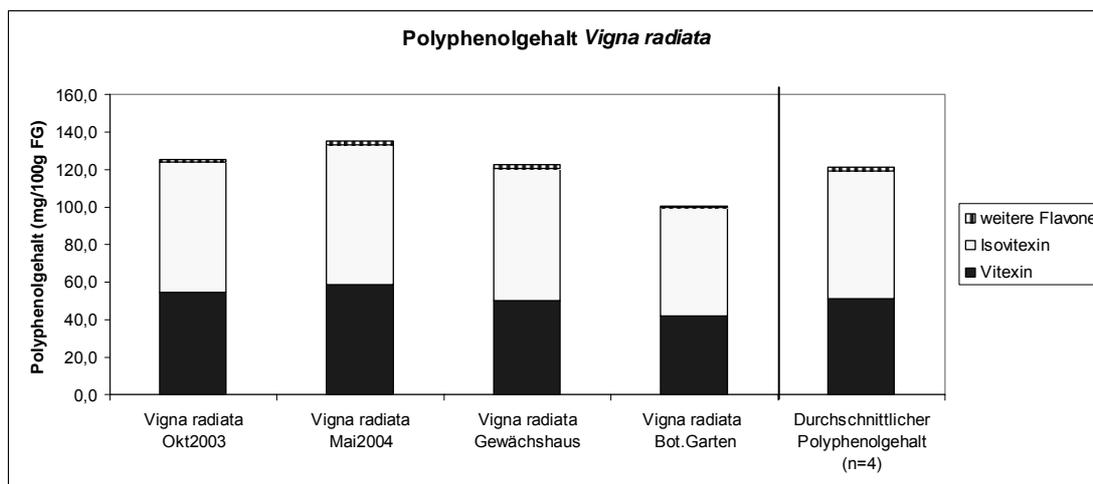
**Abb.E4:** UV-Spektren-Vergleich für Minoritätskomponente (18.57 min) mit Orientin (schwarz-weiße Linie)

Quantitative Untersuchung mittels HPLC - DAD

Bei der quantitativen Untersuchung der Extrakte konnte festgestellt werden, dass in allen Fällen der Gehalt des Isovitexins höher lag als der des Vitexins. Die beiden aus China stammenden Extrakte zeigten mit einem Gesamtgehalt von 125.5 mg ( $\pm 2.47$  mg)/100 g FG und 135.2 mg ( $\pm 3.76$  mg)/100 g FG den höheren Gehalt. Dieser wurde von dem Extrakt der im Gewächshaus gewonnenen Pflanze mit 123.0 mg ( $\pm 5.16$  mg)/100 g FG fast erreicht, wohingegen der Extrakt der im Botanischen Garten gezogenen Pflanze mit 100.7 mg ( $\pm 2.05$  mg) den geringsten Gehalt aufwies. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Proben erwiesen sich als recht klein; im Durchschnitt besaß *Vigna radiata* einen Polyphenolgehalt von 121.1 mg ( $\pm 9.99$  mg)/100 g FG. Die Absolutwerte können der Tab.E3 entnommen werden und sind graphisch in Abb.E5 dargestellt.

**Tab.E3:** Absolutwerte der Polyphenolgehalte von *Vigna radiata*. Bestimmung der Flavone als Apigenin bei 340 nm ermittelt aus drei Messungen.

Extrakt Komponente (mg ( $\pm$ SD)/100g FG)	Oktober 2003	Mai 2004	Gewächs- haus	Bot. Garten	Durchschnitt- licher Gehalt
Vitexin	54.4 $\pm$ 1.63	58.7 $\pm$ 2.17	50.1 $\pm$ 2.84	42.2 $\pm$ 1.04	51.3 $\pm$ 7.06
Isovitexin	69.8 $\pm$ 1.82	74.4 $\pm$ 3.07	70.6 $\pm$ 4.28	58.2 $\pm$ 1.61	68.2 $\pm$ 7.02
weitere Flavone/Flavonole	1.3 $\pm$ 0.40	2.1 $\pm$ 0.09	2.3 $\pm$ 0.48	0.4 $\pm$ 0.72	1.5 $\pm$ 0.86
Gesamtgehalt	125.5 $\pm$ 2.47	135.2 $\pm$ 3.76	123.0 $\pm$ 5.16	100.7 $\pm$ 2.05	121.1 $\pm$ 9.99

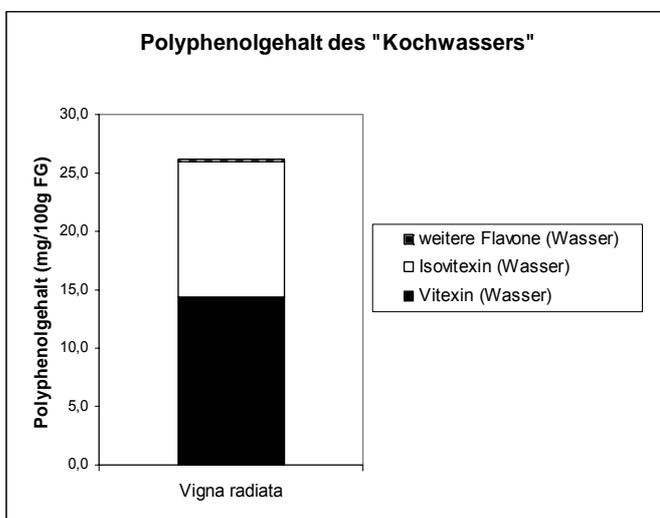


**Abb.E5:** Polyphenolgehalt der vier Extrakte von *Vigna radiata* (jeweils n=1) und durchschnittlicher Polyphenolgehalt innerhalb der untersuchten Proben (n=4). Quantifizierung der Flavone als Apigenin bei 340 nm.

### Polyphenole im Kochwasser von *Vigna radiata*

Auch in diesen Proben, die aus den Samen vom Oktober 2003 stammten, konnten Vitexin und Isovitexin als Hauptinhaltsstoffe identifiziert werden. Das Luteolin-Derivat bei 18.57 min und das Flavon bei 23.3 min waren ebenfalls enthalten, zusätzlich zeigten sich nach dem Kochvorgang jedoch auch Flavone bei 17.09 min und 24.82 min.

In der Wasserfraktion waren nach dem Kochvorgang insgesamt 26.2 mg ( $\pm$  3.64 mg)/100 g FG Polyphenole zu finden, während gleichzeitig der Vitexingehalt mit 14.4 mg ( $\pm$  2.83 mg)/100 g FG höher lag als der Isovitexingehalt (11.6 mg ( $\pm$  1.37 mg)/100 g FG). Bei Untersuchung des zurückbleibenden gekochten Samenmaterials stellte jedoch Isovitexin die Hauptkomponente dar. Bei der Gegenüberstellung der gefundenen Gehalte in Wasser und Samenmaterial zeigte sich ein Übergang der Polyphenole von 49.05 % (= 26.2 mg ( $\pm$  3.64 mg)/100 g FG) in das Kochwasser. Jedoch ergab sich ein Gesamtpolyphenolgehalt von lediglich 53.4 mg/100 g, der niedriger ausfiel als der oben mittels HPLC-DAD ermittelte Polyphenolgehalt. Vermutlich ist dies auf das unterschiedliche Extraktionsmittel zurückzuführen (90% wässriger Methanol –im Gegensatz zu 70% Ameisensäuremethanol im Falle der übrigen Extrakte, siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.)



**Abb.E6:** *Vigna radiata*: Polyphenolgehalt der Wasserfraktion nach dem Kochvorgang (n=4)

### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

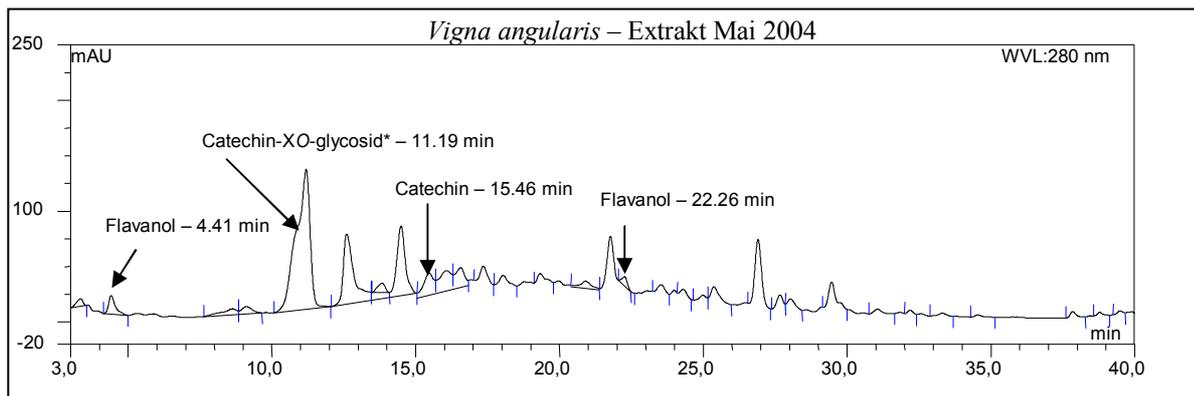
Der untersuchte Extrakt vom Mai 2004 enthielt bei der Bestimmung nach Folin-Ciocalteu einen Polyphenolgehalt von 186.1 mg ( $\pm$  4.67 mg) FP/ 100g FG. Nach Hydrolyse waren 298.3 mg ( $\pm$  13.26 mg) GP/ 100 g FG festzustellen. Beide Werte lagen somit geringfügig oberhalb der Werte, die mit Hilfe der HPLC erhalten wurden.

### 3.2.2. Extrakte von *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi

#### Qualitative Zusammensetzung

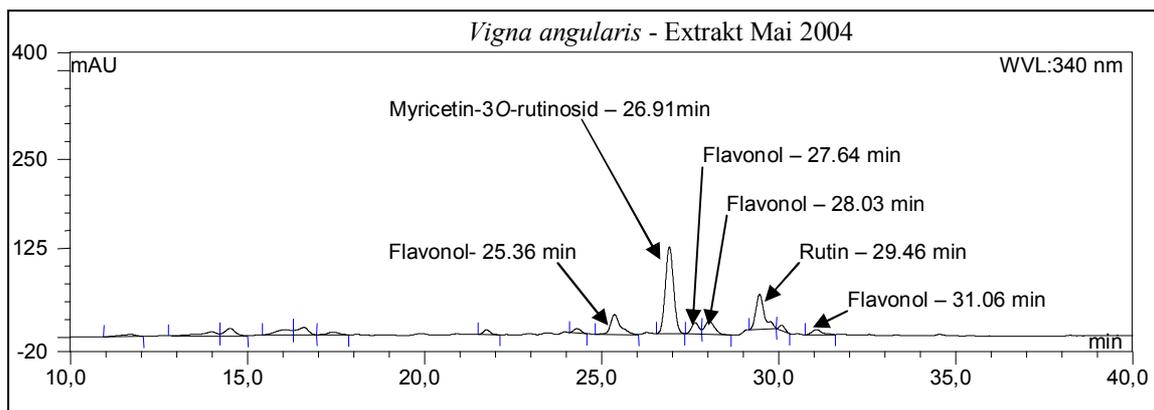
In den Extrakten von *Vigna angularis* wurden sowohl vier Flavanole als auch sechs Flavonole gefunden, die bei 280 nm und 340 nm ausgewertet wurden.

Catechin konnte aus dem Extrakt von *Vigna angularis* isoliert werden, lag aber in allen mittels HPLC-DAD untersuchten Extrakten lediglich als Minoritätskomponente vor. Es konnte jedoch ein Derivat identifiziert werden, das ein Molekulargewicht von 452 amu aufwies und zusätzlich im Massenspektrum die Abspaltung einer Hexose (162 amu) zeigte, welche dann zu einem Aglykon mit einer Masse von 290 amu führte. Für *Vigna angularis* ist bereits das Catechin-7*O*-glucosid bekannt (Yoshida et al. 2005); sehr wahrscheinlich handelte es sich um diese Verbindung (im Folgenden als Catechin-XO-glycosid bezeichnet). In Abb.E7 ist das Chromatogramm bei 280 nm abgebildet.



**Abb.E7:** HPLC-Chromatogramm des *Vigna angularis* – Extraktes Mai 2004 (Wellenlänge: 280 nm, HPLC-Programm Nr.2) \*siehe Literatur im Text

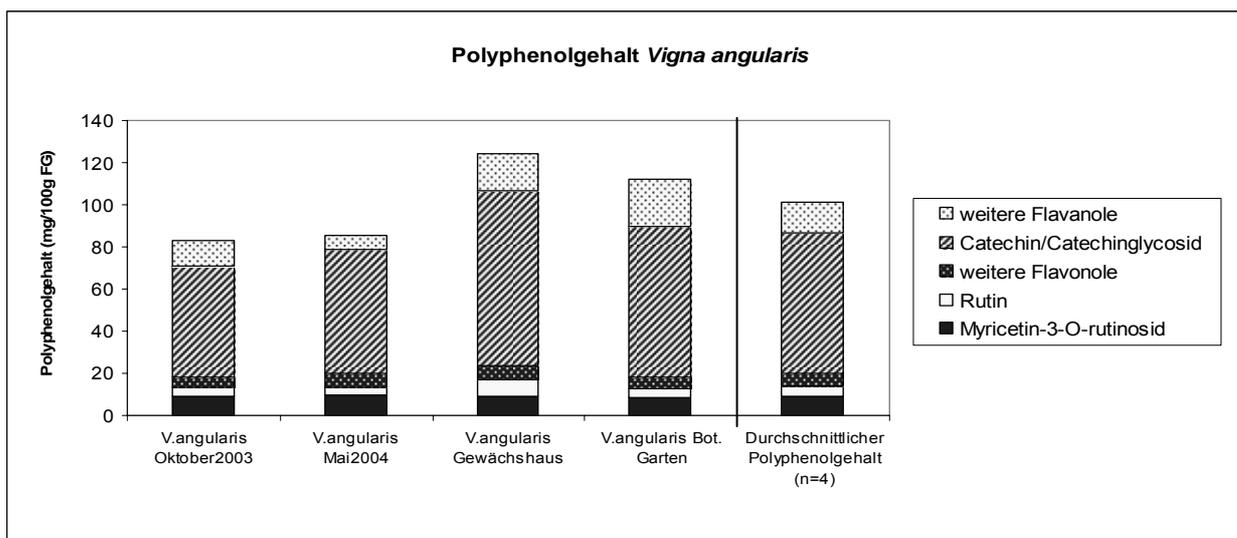
In der Gruppe der Flavonole konnten sechs verschiedene Substanzen detektiert werden. Diese waren in allen untersuchten Extrakten enthalten, so dass sich auch keine Unterschiede im Flavonolmuster zwischen chinesischen oder deutschen Extrakten ergaben. Als Hauptkomponenten konnten Myricetin-3*O*-rutinosid (26,91 min) und Rutin (29,46 min) identifiziert und isoliert werden. Die vier Minoritätskomponenten konnten an Hand ihrer UV-Spektren als Flavonole identifiziert werden, wobei die ersten drei ein dem Rutin vergleichbares Spektrum aufwiesen. Das Spektrum der vierten Komponente (31,06 min) hingegen zeigte ein UV-Spektrum ähnlich dem des Kämpferols. Das HPLC-Chromatogramm des Extraktes Mai 2004 ist beispielhaft abgebildet (Abb.E8).



**Abb.E8:** HPLC-Chromatogramm des *Vigna angularis* – Extraktes Mai 2004 (Wellenlänge: 340 nm, HPLC-Programm Nr.2)

### Quantitative Untersuchung mittels HPLC - DAD

Bei der Untersuchung der Extrakte von *Vigna angularis* konnte festgestellt werden, dass in allen untersuchten Proben der Flavanol – Gehalt gegenüber dem Flavonol – Gehalt höher ausfiel. Der Gesamtpolyphenolgehalt der Extrakte aus China (Oktober 2003 und Mai 2004) (82.9 mg ( $\pm$  7.00 mg)/100 g FG und 85.3 mg ( $\pm$  2.70 mg)/100 g FG) war geringer als der Gehalt der Extrakte Gewächshaus (124.3 mg ( $\pm$  11.33 mg)/100 g FG) oder Botanischer Garten (112.2 mg ( $\pm$  7.53 mg)/100 g FG). Der höhere Gehalt der „deutschen“ Extrakte ist dabei hauptsächlich auf die Flavanol-Fraktion zurückzuführen, während die Einzelkomponenten der Flavonol-Fraktion nur geringere Schwankungen aufwiesen (siehe Abb.E9). Im Durchschnitt enthielt *Vigna angularis* in den untersuchten Proben 101.2 mg ( $\pm$  13.33 mg)/ 100 g FG Polyphenole. Die Absolutwerte für die einzelnen Hauptkomponenten können Tab.E4 entnommen werden.



**Abb.E9:** Polyphenolgehalt der vier Extrakte von *Vigna angularis* und durchschnittlicher Polyphenolgehalt innerhalb der untersuchten Proben. Quantifizierung der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Flavanole als Catechin bei 280 nm (n=1)

**Tab.E4:** Absolutwerte der Polyphenolgehalte von *Vigna angularis*. Bestimmung der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Flavanole als Catechin bei 280 nm ermittelt aus drei Messungen.

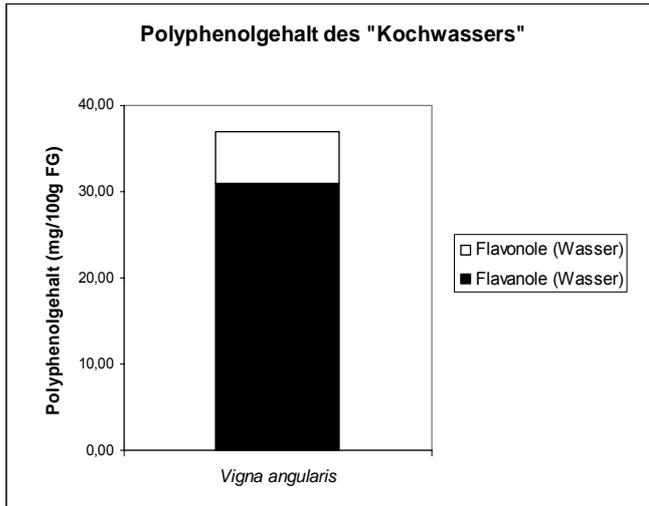
Extrakt Komponente (mg (±SD) /100g FG)	Oktober 2003	Mai 2004	Gewächs- haus	Bot. Garten	Durchschnitt- licher Gehalt
Myricetin-3O- rutosid	9.0± 0.86	9.5± 0.44	9.1± 0.99	8.5± 0.46	9.1± 0.37
Rutin	4.3± 1.09	4.0± 0,23	8.0± 1.29	4.2± 0.80	5.1± 1.64
weitere Flavonole	5.1± 0.50	6.2± 0.39	6.6± 0.69	5.3± 0.27	5.8± 0.61
Catechin/ Catechin-XO- glycosid	52.4± 5.20	59.1± 2.59	83.1± 9.46	71.8± 6.78	66.6± 11.79
weitere Flavanole	12.1± 4.45	6.5± 0.42	17.6± 5.98	22.4± 3.12	14. 6± 5.96
Gesamtgehalt	82.9± 7.00	85.3± 2.70	124.3± 11.33	112.2± 7.53	101.2± 13.33

#### Polyphenole im Kochwasser von *Vigna angularis*

Bei den Flavanolen, die im Kochwasser von *Vigna angularis* detektiert wurden, handelte es sich um Catechin-XO-glycosid (Yoshida et al. 2005), Catechin und ein weiteres Flavanol mit einer Retentionszeit von 17.86 min. Es war festzustellen, dass es während des Kochvorgangs zu einer Hydrolyse des Catechinglycosids kam, während gleichzeitig die Peakfläche für das Catechin selbst zunahm.

Innerhalb der Gruppe der Flavonole konnten die bereits oben beschriebenen Komponenten beobachtet werden. Zusätzlich erschienen noch Komponenten im späteren Verlauf des Chromatogramms, die das UV-Spektrum eines Flavons bzw. eines Flavonols aufwiesen (Chromatogramm nicht abgebildet). Dabei könnte es sich um Spaltprodukte der zuvor detektierten Flavonole oder um Verbindungen, die vorher unterhalb des Detektionslimits lagen, handeln.

Insgesamt konnte ein Übergang der untersuchten Polyphenole von 64.0 % (= 36.9 mg ± 9.10 mg/100g) in das Kochwasser bei einem Gesamtpolyphenolgehalt (n=1) von 57.7 mg / 100 g FG festgestellt werden. Die Flavanole bildeten einen deutlich größeren Anteil (31.0 mg (± 8.61 mg)/ 100 g FG) am Polyphenolgehalt des Kochwassers verglichen mit den Flavonolen (5.9 mg (± 1.27 mg)/ 100 g FG).



**Abb.E10:** *Vigna angularis*: Polyphenolgehalt der Wasserfraktion nach dem Kochvorgang (n=4)

### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

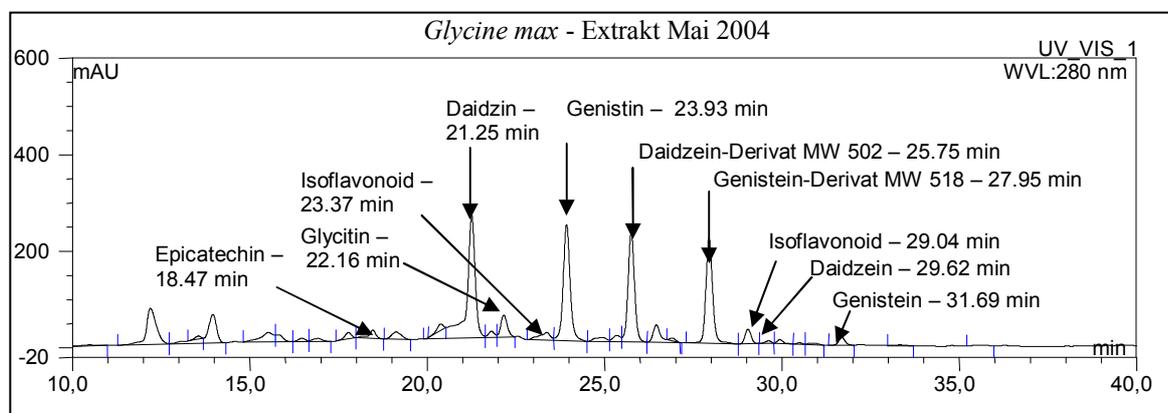
Der Extrakt vom Mai 2004 von *Vigna angularis* wurde ebenfalls nach Folin-Ciocalteu untersucht. Dabei lag ein Gehalt an freien Polyphenolen von 498.7 mg ( $\pm$  8.47 mg) FP/100 g FG vor, wobei der Gehalt nach Hydrolyse auf 637.7 mg ( $\pm$  11.91 mg) GP/100 g anstieg. Diese Werte lagen mehr als 6-mal so hoch wie die Werte, die mittels HPLC – DAD bestimmt wurden.

### 3.2.3. Extrakte von *Glycine max* (L.) Merr. convar. *max* var. *atra* Lehm.

#### Qualitative Zusammensetzung

In den Extrakten der Sojabohne wurden hauptsächlich Isoflavonoide detektiert, aber es konnten auch Flavanole, Flavone/Flavonole und Anthocyanidine beobachtet werden. Die Detektion der Isoflavonoide und Flavanole wurde bei 280 nm durchgeführt, während die Flavonole bei 340 nm und die Anthocyanidine bei 520 nm beobachtet wurden.

In der Gruppe der Flavanole war Epicatechin (Rf = 18.47 min) zu beobachten, wohingegen innerhalb der Isoflavonoide Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein und Genistein identifiziert werden konnten. Außerdem waren noch vier weitere Isoflavonoid-Derivate enthalten, von denen zwei Substanzen Hauptkomponenten innerhalb des Extraktes darstellten. Diese beiden wiesen ein Molekulargewicht von 502 amu (25.75 min) und 518 amu (27.95 min) auf und zeigten eine Abspaltung von 248 amu und somit Daidzein bzw. Genistein als Grundkörper. Eine Datenbankanalyse ergab, dass es sich um 6''-O-Malonyl-Derivate des Daidzins und Genistins handeln könnte, die zusätzlich auch in verschiedenen Literaturstellen beschrieben wurden (DNP 2006; Lin et al. 2006; Romani et al. 2003).

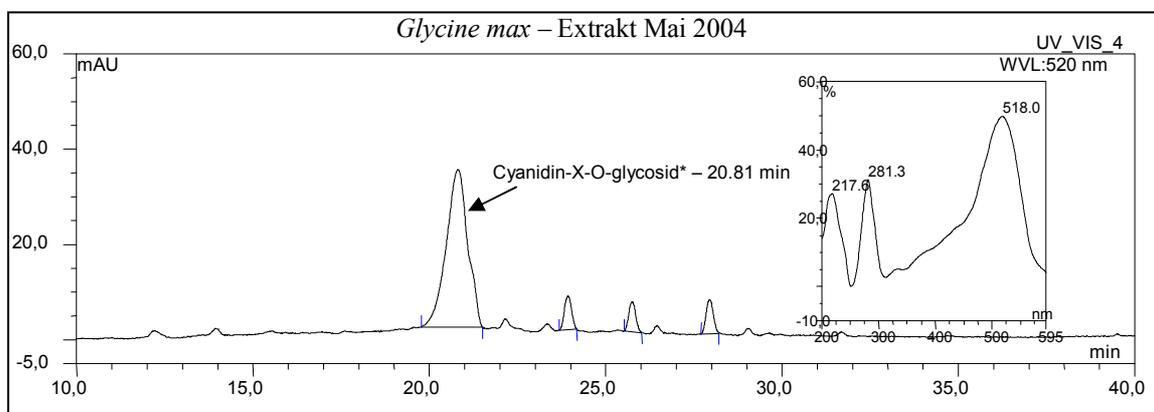


**Abb.E11:** HPLC-Chromatogramm des *Glycine max* – Extraktes Mai 2004 (Wellenlänge: 280 nm, HPLC-Programm Nr.1)

Flavone/Flavonole waren in den Extrakten von *Glycine max* mit zwei Minoritätskomponenten nur in sehr geringem Maße vertreten. Die erste Verbindung (25.33 min) wies das UV-Spektrum eines Flavons auf mit einem UV - Maximum bei 334 nm. Die zweite Verbindung (30.79 min) hingegen hatte ihr UV-Maximum bei 360 nm, was für ein Flavonol typisch ist. (Chromatogramme nicht abgebildet)

In der Reihe der Anthocyanidine konnte ein Hauptpeak (20.81 min) beobachtet werden, dessen Molekulargewicht mit 449 amu bestimmt wurde. Die Abspaltung einer Hexose (162 amu) lieferte Cyanidin (MW 287) als Aglykon. Cyanidin ist ein weit verbreitetes

Anthocyanidin, welches in vielfältiger Weise in der Natur vorkommt. Sein 3*O*-Glucosid wurde bereits aus *Glycine max* isoliert (Katsuzaki et al. 2003). Die Verbindung wird im Folgenden als Cyanidin-X*O*-glycosid bezeichnet.

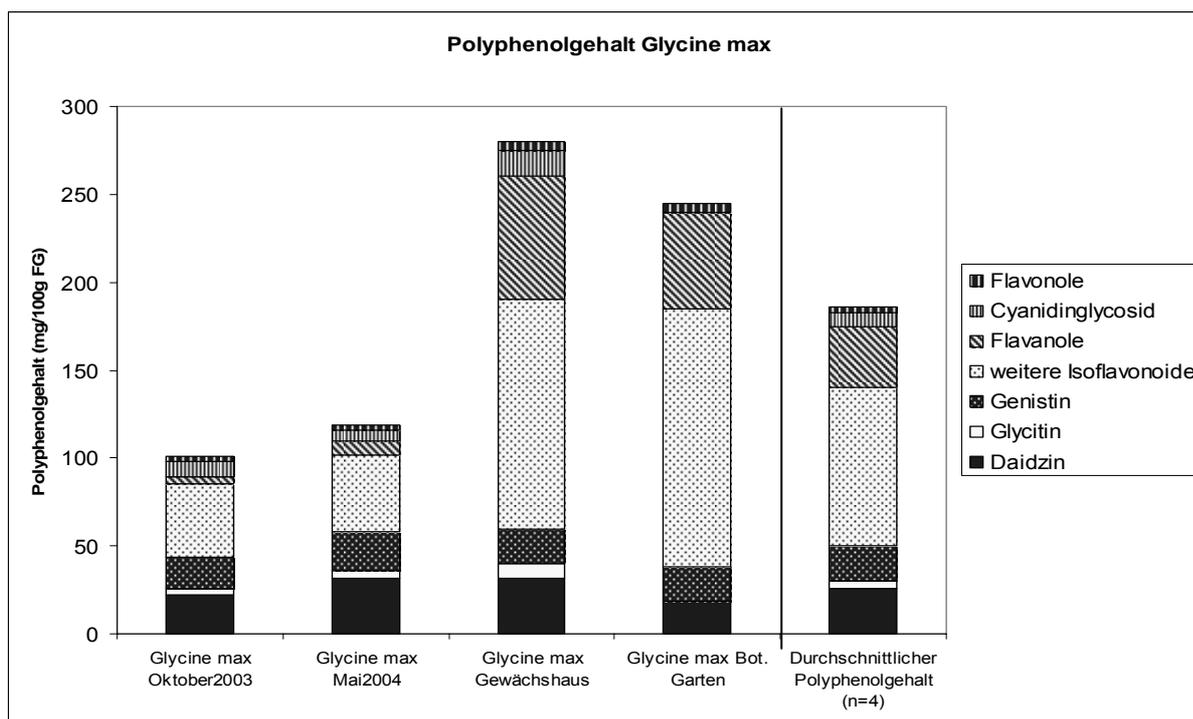


**Abb.E12:** HPLC-Chromatogramm des *Glycine max* – Extraktes Mai 2004 (Wellenlänge: 520 nm, HPLC-Programm Nr.1) \*siehe Literatur im Text

### Quantitative Untersuchung mittels HPLC - DAD

Die oben erwähnten Komponenten wurden mittels HPLC-DAD bei ihren jeweiligen UV-Maxima ausgewertet. Sowohl Flavanole, Flavone/Flavonole als auch die Isoflavonoide waren in allen Extrakten enthalten, wohingegen die Anthocyanidine in den Extrakten aus den im Freiland des Botanischen Gartes gezogenen Pflanzen kaum oder gar nicht detektierbar waren. Im Speziellen konnte auch Glycitin in diesem Extrakt nicht nachgewiesen werden. Allgemein konnte beobachtet werden, dass die Extrakte aus den in China gesammelten Samen („Extrakt Oktober 2003“, „Extrakt Mai 2004“) einen geringeren Polyphenolgehalt (100,7 mg ( $\pm$  6,90 mg)/ 100 g FG bzw. 118,5 mg ( $\pm$  4,27 mg)/ 100 g FG) aufwiesen als die beiden Extrakte aus den in Deutschland gezogenen Pflanzen („Extrakt Gewächshaus“, „Extrakt Bot. Garten“), die einen Polyphenolgehalt von 280,1 mg ( $\pm$  17,18 mg)/ 100 g FG bzw. 244,9 mg ( $\pm$  7,27 mg)/ 100 g FG besaßen. Während der Anteil des Genistins, Daidzins und der Flavonole in etwa gleich war, wurde bei den Flavanolen und den weiteren Isoflavonoiden ein deutlich höherer Gehalt gemessen. Dies war hauptsächlich auf die größeren Peakflächen des Epicatechins und der beiden Malonyl-Derivate des Daidzeins und Genisteins zurückzuführen.

Im Durchschnitt enthielt somit *Glycine max* 186,0 mg ( $\pm$  65,84 mg)/ 100 g FG, gleichzeitig stellten Isoflavonoide die Hauptinhaltsstoffe dar. Die Absolutwerte der Komponenten können Tab.E5 entnommen werden.



**Abb.E13:** Polyphenolgehalt der vier Extrakte von *Glycine max* (jeweils n=1) und durchschnittlicher Polyphenolgehalt (n=4) innerhalb der untersuchten Proben. Quantifizierung der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Flavanole als Catechin bei 280 nm, der Isoflavonoide als Genistein bei 280 nm und der Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm

**Tab.E5:** Absolutwerte der Polyphenolgehalte von *Glycine max*. Bestimmung der Isoflavonoide als Genistein bei 280 nm, der Flavanole als Catechin bei 280 nm, der Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm, der Flavone/Flavanole als Quercetin bei 340 nm ermittelt aus drei Messungen.

Extrakt Komponente (mg(±SD)/100g FG)	Oktober 2003	Mai 2004	Gewächs- haus	Bot. Garten	Durchschnitt- licher Gehalt
Daidzin	22.6± 5.48	31.7± 0.61	31.2± 10.66	18.4± 8.16	26.0± 5.68
Glycitin	3.1± 0.11	3.8± 0.06	8.6± 0.34	0.00	3.9± 3.09
Genistin	17.9± 0.67	22.6± 0.38	19.3± 0.99	19.8± 8.67	19.9± 1.71
weitere Isoflavonoide	41.9± 1.00	43.6± 2.64	131.4± 5.78	146.7± 63.63	90.9± 48.44
Flavanole	4.3± 0.18	7.4± 2.14	69.9± 6.87	55.1± 23.99	34.2± 28.83
Cyanidin-XO- glycosid	8.5± 0.31	6.9± 0.25	14.8± 0.31	0.1± 0.14	7.6± 5.23
Flavone/ Flavanole	2.4± 0.10	2.3± 0.11	4.8± 1.14	4.8± 2.24	3.6± 1.23
Gesamtgehalt	100.7± 6.90	118.5± 4.27	280.1± 17.18	244.9± 7.27	186.0± 65.84

### Polyphenole im Kochwasser von *Glycine max*

Das Kochexperiment wurde mit den Samen der Ernte vom Oktober 2003 durchgeführt. Im Chromatogramm des Samenmaterials ließen sich alle Komponenten detektieren, die auch im Extrakt selbst nachzuweisen waren. In der Wasserfraktion konnten die Malonyl-Derivate nur noch in Spuren gefunden werden. Zusätzlich konnte in der Gruppe der Flavanole ein zusätzlicher Peak (14.64 min) beobachtet werden, der dem des Catechins entsprach.

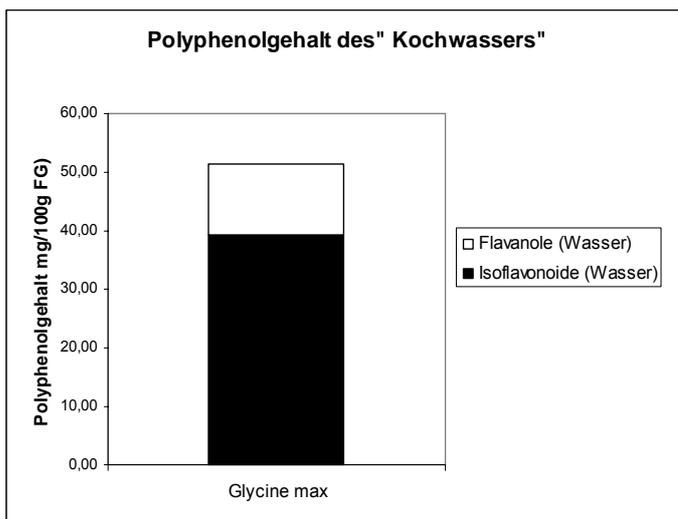


Abb.E14: *Glycine max*: Polyphenolgehalt der Wasserfraktion nach dem Kochvorgang (n=3)

Insgesamt konnte ein Übergang der Polyphenole von 48.8% in das Kochwasser festgestellt werden. Dies entsprach 51.4 mg ( $\pm$  10.66 mg)/100 g FG. Die Isoflavonoide waren hierin mit 39.4 mg ( $\pm$  8.13 mg)/100 g stärker vertreten als die Flavanole mit 12.0 mg ( $\pm$  6.90 mg)/100 g FG. Insgesamt wurde in Wasserfraktion und Samenmaterial ein Gesamtpolyphenolgehalt von 105.3 mg/100 g FG detektiert (n=1). Dieser Wert entsprach dem bereits oben beschriebenen Gehalt.

### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

Bei der Bestimmung des Polyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu konnten vor Hydrolyse 250.8 mg ( $\pm$  3.12 mg) FP/100 g FG bestimmt werden, wohingegen nach Hydrolyse 521.8 mg ( $\pm$  13.61 mg) GP/100 g FG nachzuweisen waren. Mit der HPLC-Methode war davon nur die Hälfte bzw. ein Fünftel gefunden worden.

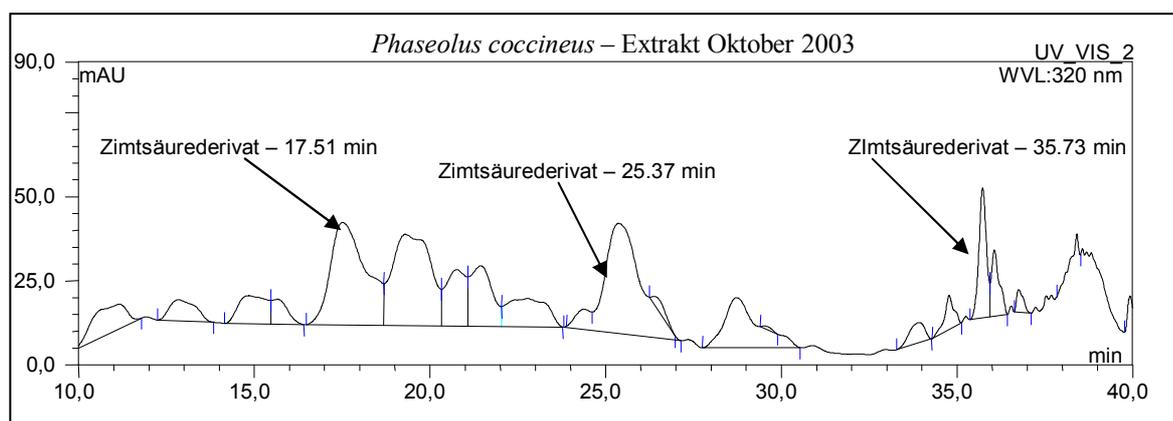
### 3.2.4. Extrakte von *Phaseolus coccineus* L. var. *albiflorus* (DC.) Bailey

#### Qualitative Zusammensetzung

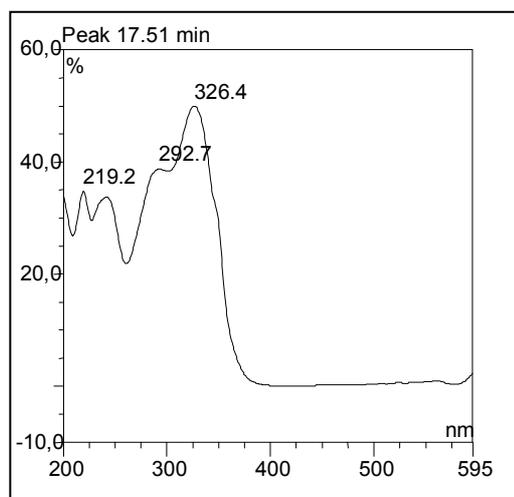
Da die Pflanze im Gewächshaus keine Früchte bildete, konnten von ihr im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Leguminosen nur drei Extrakte erhalten werden.

Aus dem Extrakt zur Isolierung konnten verschiedene Isoflavonoide (Daidzin, Glycitin, Genistin und Genistein) erhalten werden. Jedoch wurde weder eine dieser Substanzen noch sonst ein Isoflavonoid in den Extrakten zur Quantifizierung nachgewiesen, obwohl bis zu einer Konzentration von etwa 240 – 270 mg Extrakt/ml aufkonzentriert wurde.

Allerdings konnten in den HPLC-Chromatogrammen Zimtsäure-Derivate nachgewiesen werden, welche anhand ihrer UV-Spektren eindeutig als solche identifiziert werden konnten. Insgesamt wurden in allen Extrakten drei verschiedene Derivate beobachtet (17.59 min, 25.45 min und 35.76 min).



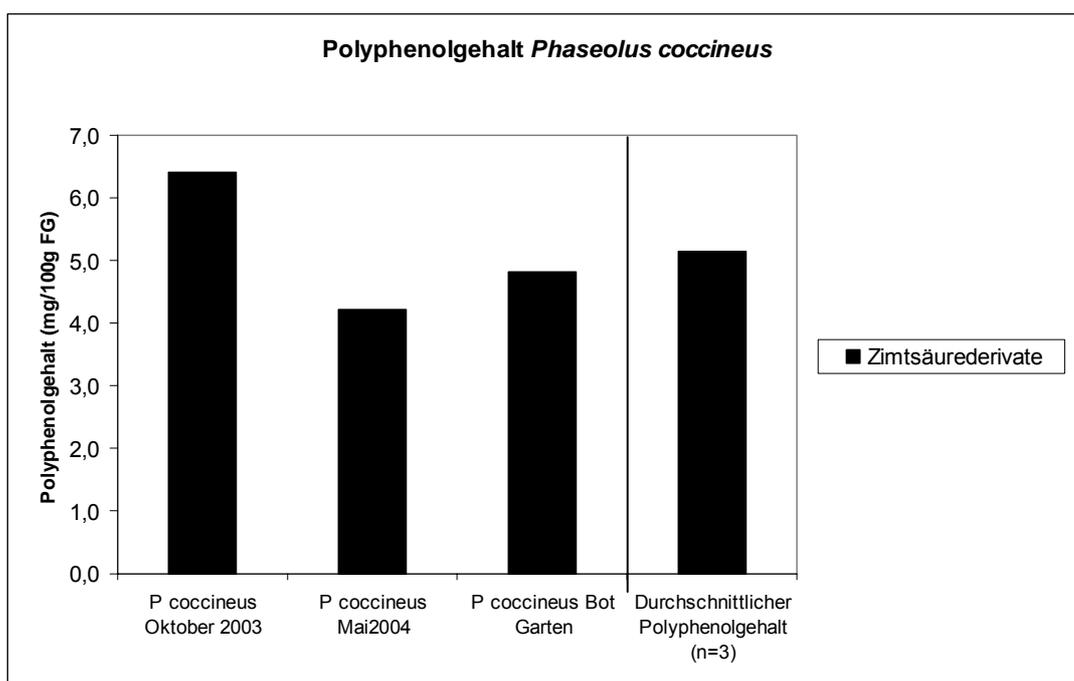
**Abb.E15:** HPLC-Chromatogramm des *Phaseolus coccineus* – Extraktes Oktober 2003 (Wellenlänge: 320 nm, HPLC-Programm Nr.5)



**Abb.E16:** UV-Spektrum von Peak 17.51 min

Quantitative Untersuchung mittels HPLC - DAD

Die Peakflächen der oben ermittelten Zimtsäure-Derivate wurden ausgewertet, wobei sich insgesamt ein sehr geringer Gehalt an Polyphenolen ergab. Der Extrakt Oktober 2003 hatte einen Gehalt von 6.4 mg ( $\pm$  0.93 mg)/ 100 g FG, wohingegen die Extrakte Mai 2004 und Botanischen Garten mit 4.2 mg ( $\pm$  1.69 mg)/ 100 g FG und 4.8 mg ( $\pm$  2.25 mg)/ 100 g FG einen niedrigeren Gehalt aufwiesen. Im Durchschnitt ergab sich für *Phaseolus coccineus* somit ein Polyphenolgehalt von 5.2 mg ( $\pm$  1.13 mg)/ 100 g FG.



**Abb.E17:** Polyphenolgehalt der drei Extrakte von *Phaseolus coccineus* (jeweils n=1) und durchschnittlicher Polyphenolgehalt (n=3) innerhalb der untersuchten Proben. Quantifizierung der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm

Polyphenole im Kochwasser von *Phaseolus coccineus*

Zur Herstellung der Kochextrakte wurden Samen der Ernte vom Oktober 2003 verwendet. Es konnten die bereits oben beschriebenen Zimtsäure-Derivate beobachtet werden, zusätzlich hierzu wurde noch ein weiterer Peak (19.8 min) detektiert, der ebenfalls ein deutliches zimtsäureartiges UV-Spektrum zeigte. Es konnte ein Übergang der Zimtsäure-Derivate in das Kochwasser von 66.5 % beobachtet werden, entsprechend 5.9 mg ( $\pm$  0.17 mg)/ 100 g FG. Der Gesamtpolyphenolgehalt wurde mit 8.9 mg/ 100 g FG ermittelt (n=1).

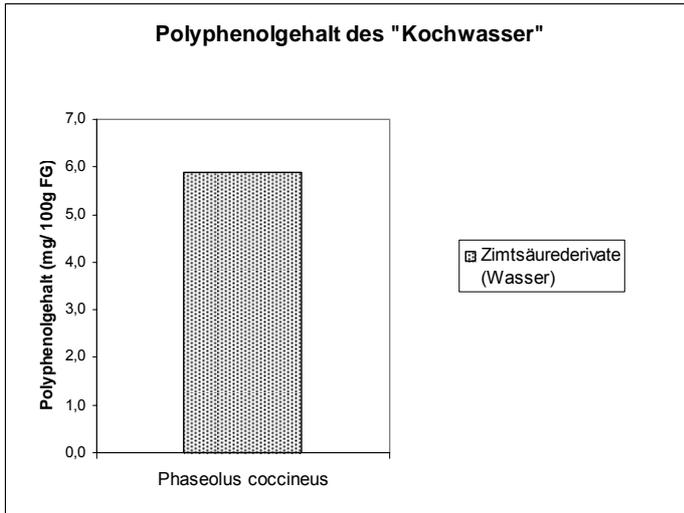


Abb.E18: *Phaseolus coccineus*: Polyphenolgehalt der Wasserfraktion nach dem Kochvorgang (n=4)

### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

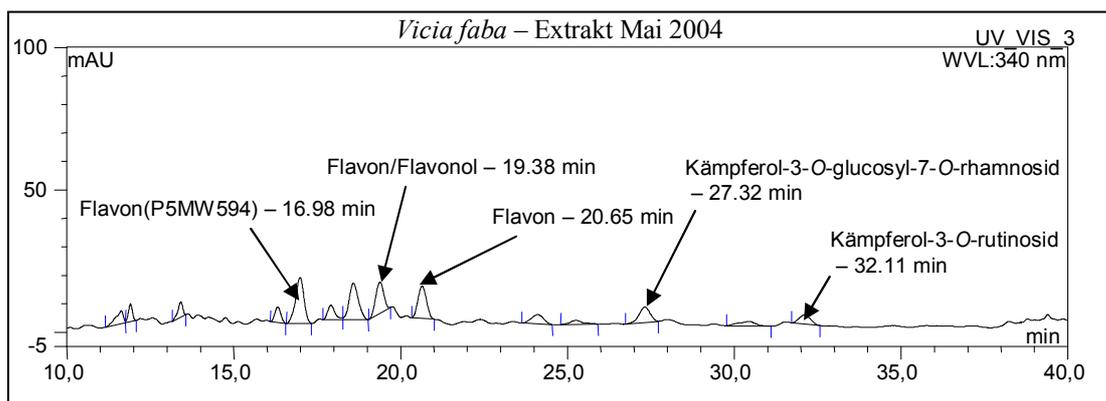
Nach Folin-Ciocalteu waren in dem Extrakt Mai 2004 71.8 mg ( $\pm$  2.12 mg) FP/100 g FG enthalten, dieser Wert stieg nach Hydrolyse auf 193.3 mg ( $\pm$  4.31 mg) GP/100 g FG an, und war damit wesentlich höher als der vorher mit HPLC-DAD bestimmte Polyphenolgehalt.

### 3.2.5.Extrakte von *Vicia faba* L. ssp. *faba* var. *faba* subvar. *faba*

#### Qualitative Zusammensetzung

Es gelang nicht von dieser Leguminose Früchte aus dem Botanischen Garten oder dem Gewächshaus zu erhalten, so dass nur die Extrakte Oktober 2003 und Mai 2004 zur Untersuchung vorlagen.

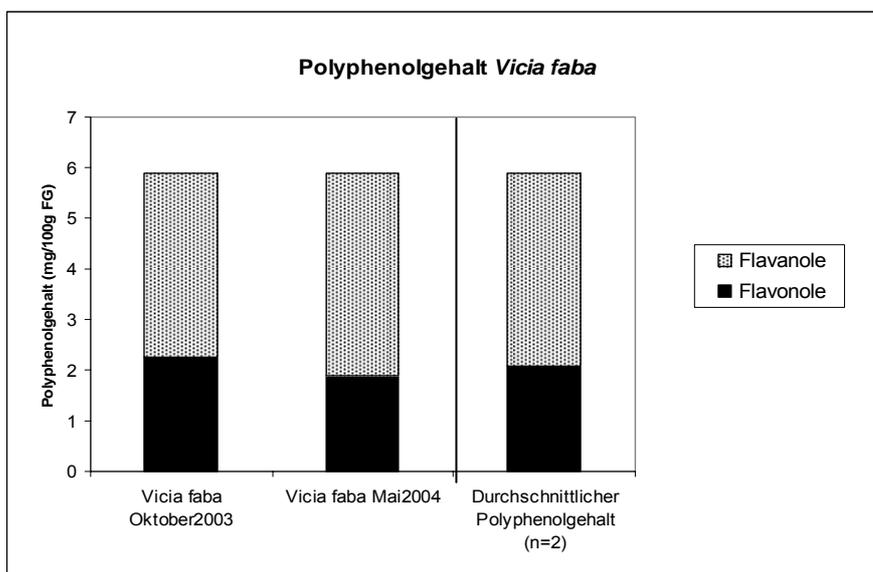
Innerhalb dieser beiden Extrakte konnten fünf verschiedene Flavone/Flavonole und ein Flavanol detektiert werden. Während das Flavanol als Epicatechin (Chromatogramm nicht abgebildet) identifiziert werden konnte, stellten unter den Flavonen/Flavonolen die beiden Peaks bei 27.32 min bzw. 32.11 min Kämpferol-3*O*-glucosyl-7*O*-rhamnosid bzw. Kämpferol-3*O*-rutinosid dar. Dagegen konnte bei den drei früheren Peaks nur der erste eindeutig der Substanz zugeordnet werden, die auch aus Fraktion P5MW594 (partielle Strukturaufklärung/ Strukturvorschlag: Vicenin 2) isoliert wurde. Die beiden verbleibenden Komponenten konnten nicht eindeutig mit den isolierten Komponenten in Einklang gebracht werden, da sowohl Retentionszeiten als auch UV-Spektren nicht übereinstimmten.



**Abb.E19:** HPLC-Chromatogramm des *Vicia faba* - Extraktes Mai 2004 (Wellenlänge: 340 nm, HPLC-Programm Nr.6)

### Quantitative Untersuchung mittels HPLC - DAD

Bei der quantitativen Untersuchung der beiden Extrakte von *Vicia faba* wurde ein niedriger Gehalt von 5.9 mg ( $\pm 0.65$  mg)/ 100 g FG bzw. 5.9 mg ( $\pm 0.53$  mg)/ 100 g FG ermittelt, so dass im Durchschnitt 5.9 mg/ 100 g FG enthalten waren. Hauptsächlich konnten in den Extrakten Flavonole detektiert werden neben einem geringeren Gehalt an Flavonen und Flavonolen.



**Abb.E20:** Polyphenolgehalt der zwei Extrakte von *Vicia faba* (jeweils n=1) und durchschnittlicher Polyphenolgehalt (n=2) innerhalb der untersuchten Proben. Quantifizierung der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Flavone als Apigenin bei 340 nm, der Flavonole als Catechin bei 280 nm

**Tab.E6:** Absolutwerte der Polyphenolgehalte von *Vicia faba*. Bestimmung der Flavone als Apigenin bei 340 nm, der Flavonole als Quercetin bei 340 nm und der Flavanole als Catechin bei 280 nm ermittelt aus drei Messungen.

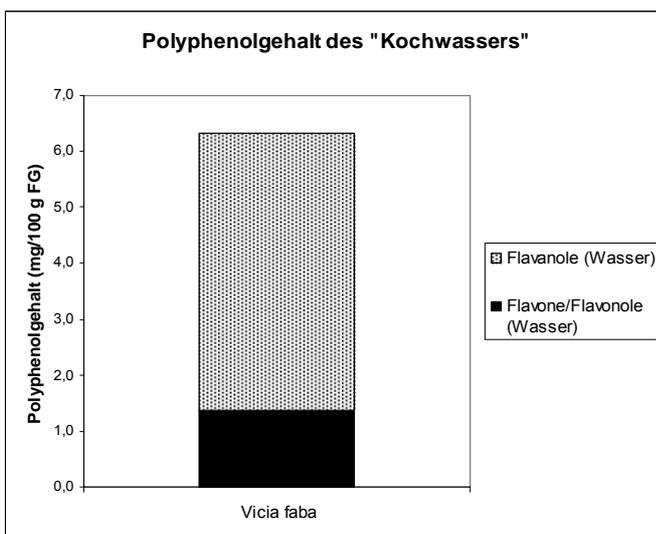
Extrakt Komponente (mg(±SD) /100g FG)	Oktober 2003	Mai 2004	Durchschnittlicher Gehalt
Flavone/Flavonole	2.3± 0.11	1.9± 0.34	2.07
Flavanole	3.6± 0.64	4.0± 0.40	3.82
Gesamtgehalt	5.9± 0.65	5.9± 0.53	5.88

Polyphenole im Kochwasser von *Vicia faba*

Nach dem Kochvorgang konnten in dem zurückbleibenden gekochten Samenmaterial und auch im Kochwasser die beiden oben erwähnten Flavone (16.98 min, 20.65 min) detektiert werden. Im Samenmaterial waren außerdem die beiden Kämpferol - Derivate bei 27.32 min bzw. 32.11 min zu finden. Zwei weitere Minoritätskomponenten (Flavone/Flavonole) sowie zwei Flavanole, die als Catechin und Epicatechin identifiziert wurden, waren zu beobachten.

Insgesamt konnten im Kochwasser 78.2 % der Polyphenole gefunden werden. Dies entspricht 6.3 mg (± 2.49 mg)/ 100 g FG. Die Flavanole (5.0 mg (± 2.46 mg)/ 100g FG) waren dabei in größerem Umfang im Wasser nachweisbar als die detektierten Flavone (1.4 mg (± 0.37 mg)/ 100 g FG).

Der bestimmte Gesamtpolyphenolgehalt (n=1) liegt mit 8.1 mg / 100 g FG etwas über dem Wert, der für den Extrakt Oktober 2003 bestimmt wurde, welcher zum Kochvorgang herangezogen wurde.



**Abb.E21:** *Vicia faba*: Polyphenolgehalt der Wasserfraktion nach dem Kochvorgang (n=3)

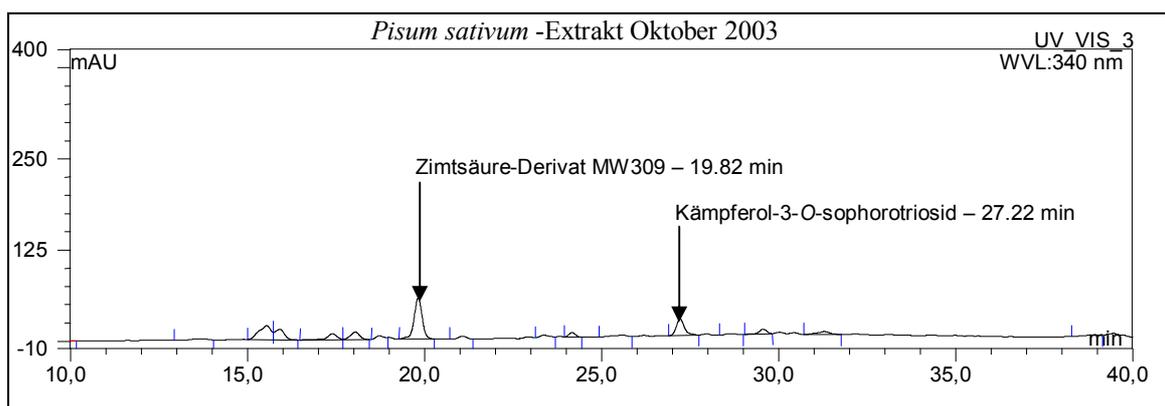
### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

Im Extrakt Mai 2004 konnten in *Vicia faba* 167.8 mg ( $\pm$  1.53 mg) FP/100 g FG festgestellt werden. Der Wert stieg nach Hydrolyse auf 214.3 mg ( $\pm$  8.38 mg)/100 g FG an. Auch hier lag der Polyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu über dem mittels HPLC-DAD bestimmten Wert.

### **3.2.6.Extrakte von *Pisum sativum* L. ssp. *sativum* convar. *sativum***

#### Qualitative Zusammensetzung

Von *Pisum sativum* standen nur drei Extrakte zur Verfügung, zum einen die beiden Extrakte Oktober 2003 und Mai 2004 und zum anderen der Extrakt aus den Pflanzen, die im Botanischen Garten kultiviert wurden. In allen drei Extrakten konnte sowohl ein Zimtsäure-Derivat als auch ein Flavonol identifiziert werden.



**Abb.E22:** HPLC-Chromatogramm des *Pisum sativum* Extraktes Oktober 2003 (Wellenlänge: 340 nm, HPLC-Programm Nr.2) (Chromatogramm bei 320 nm für die Zimtsäure-Derivate analog dem hier abgebildeten)

Das Flavonol wurde aus dem Extrakt der Erbse isoliert und als Kämpferol-3O-sophorotriosid identifiziert. Für das Zimtsäure-Derivat wurde ein Molekulargewicht von 309 amu ermittelt, wobei durch eine Datenbankanalyse als mögliches Derivat eine N-Feroyl-Asparaginsäure gefunden werden konnte. Dies wird bestätigt durch die Pseudomolekülmassen von 177 amu und 133 amu bei negativer Ionisierung, die durch Spaltung der Amidbindung entstehen.

#### Quantitative Untersuchung mittels HPLC – DAD

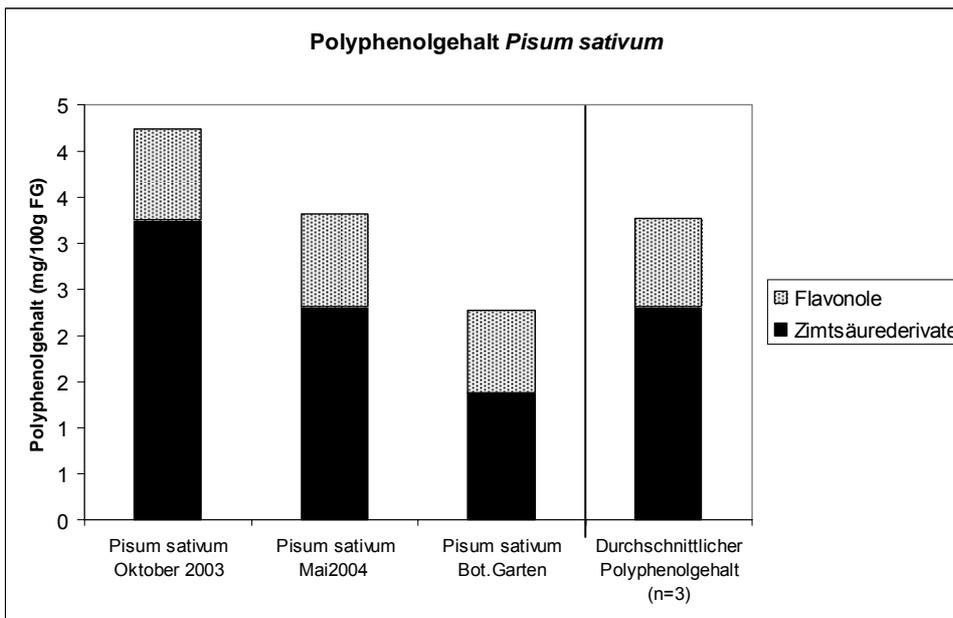
Während der Flavonolgehalt in allen untersuchten Proben annähernd gleich war, kam es aufgrund der unterschiedlichen Zimtsäuregehalte zu einer Rangfolge des Gesamtpolyphenolgehaltes mit der Reihung „Oktober 2003“ > „Mai 2004“ > „Botanischer Garten“. So enthält der Extrakt Oktober 2003 4.3 mg ( $\pm$  0.17 mg)/ 100 g FG Polyphenole, der Extrakt Mai 2004 3.3 mg ( $\pm$  0.38 mg)/ 100 g FG sowie der Extrakt Botanischen Garten noch

2.3 mg ( $\pm 0.07$  mg)/ 100 g FG. Es ergibt sich ein durchschnittlicher Gehalt an Polyphenolen von 3.3 mg (0.95 mg)/ 100 g FG.

**Tab.E7:** Absolutwerte der Polyphenolgehalte von *Pisum sativum*. Bestimmung der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm, der Flavonole als Quercetin bei 340 nm ermittelt aus drei Messungen.

Extrakt Komponente (mg( $\pm$ SD)/100g FG)	Oktober 2003	Mai 2004	Bot. Garten	Durchschnittlicher Gehalt
Zimtsäure- Derivate	3.3 $\pm$ 0.16	2.3 $\pm$ 0.33	1.4 $\pm$ 0.02	2.3 $\pm$ 0.77
Kämpferol-3- <i>O</i> - sophorotriosid	1.0 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.18	0.9 $\pm$ 0.07	1.0 $\pm$ 0.04
Gesamtgehalt	4.3 $\pm$ 0.17	3.3 $\pm$ 0.38	2.3 $\pm$ 0,07	3.3 $\pm$ 0.95

Trotz des abnehmenden Gehalts des Zimtsäure-Derivates blieb der Gehalt an Flavonolen in allen drei Extrakten im Vergleich geringer.



**Abb.E23:** Polyphenolgehalt der drei Extrakte von *Pisum sativum* (jeweils n=1) und durchschnittlicher Polyphenolgehalt (n=3) innerhalb der untersuchten Proben. Quantifizierung der Flavonole als Quercetin bei 340 nm und der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm

Polyphenole im Kochwasser von *Pisum sativum*

Nach dem Kochprozess konnten neben dem bereits oben erwähnten Flavonol drei weitere Flavonole bei 25.3 min, 27.6 min und 29.3 min beobachtet werden.

Insgesamt war ein Übergang der Polyphenole von 34.8% in das Kochwasser zu beobachten. Dies entsprach 1.0 mg ( $\pm 0.17$  mg)/ 100 g FG, wobei die Zimtsäure-Derivate auch im Wasser mit 0.6 mg ( $\pm 0.32$  mg)/ 100 g FG einen höheren Gehalt aufwiesen als die Flavonole mit 0.3 mg ( $\pm 0.27$  mg)/ 100 g FG.

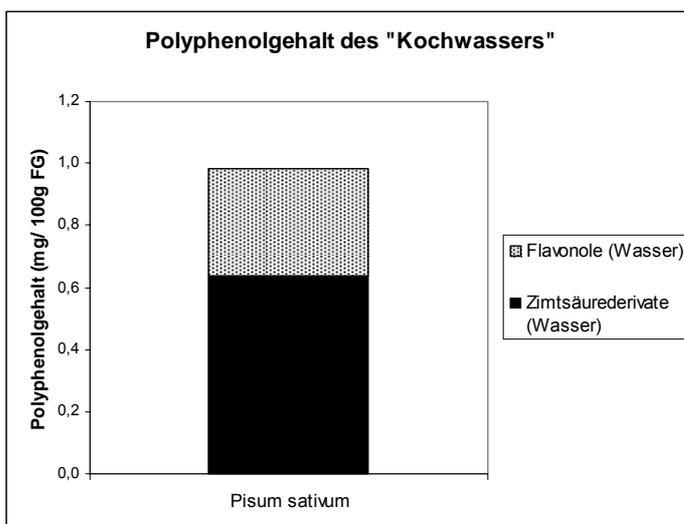


Abb.E24: *Pisum sativum*: Polyphenolgehalt der Wasserfraktion nach dem Kochvorgang (n=3)

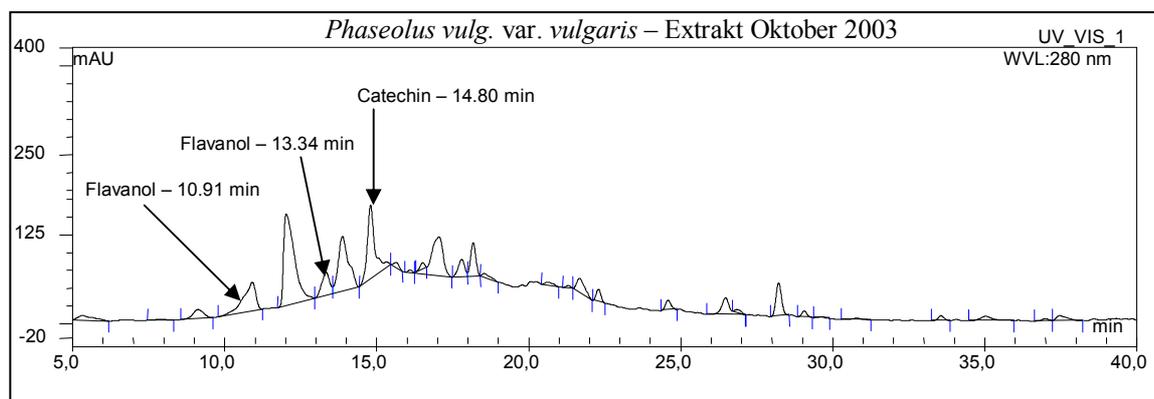
Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

Nach Folin-Ciocalteu konnten im Extrakt Mai 2004 von *Pisum sativum* 94.3 mg ( $\pm 3.00$  mg) FP/100 g FG bestimmt werden. Nach Hydrolyse stieg dieser Wert um das dreifache auf 286.2 mg ( $\pm 12.37$  mg) GP/100 g FG an. Auch hier lagen die Werte nach Folin-Ciocalteu höher als bei der HPLC-Quantifizierung.

### 3.2.7. Extrakte von *Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*

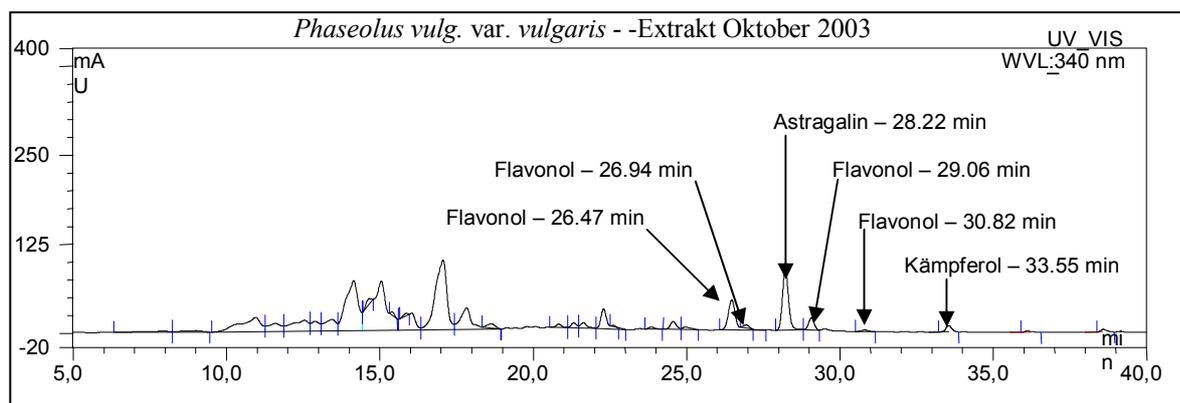
#### Qualitative Zusammensetzung

In den HPLC-Chromatogrammen der Extrakte dieser Leguminose konnten sowohl Flavanole, Flavonole, Zimtsäure-Derivate als auch Anthocyanidine nachgewiesen werden. Es wurden drei verschiedene Flavanole detektiert, darunter auch Catechin, welches im benutzten Gradienten bei einer Retentionszeit von 14,8 min zu beobachten war. Außerdem zwei weitere Flavanole bei 10,91 min und 13,34 min.



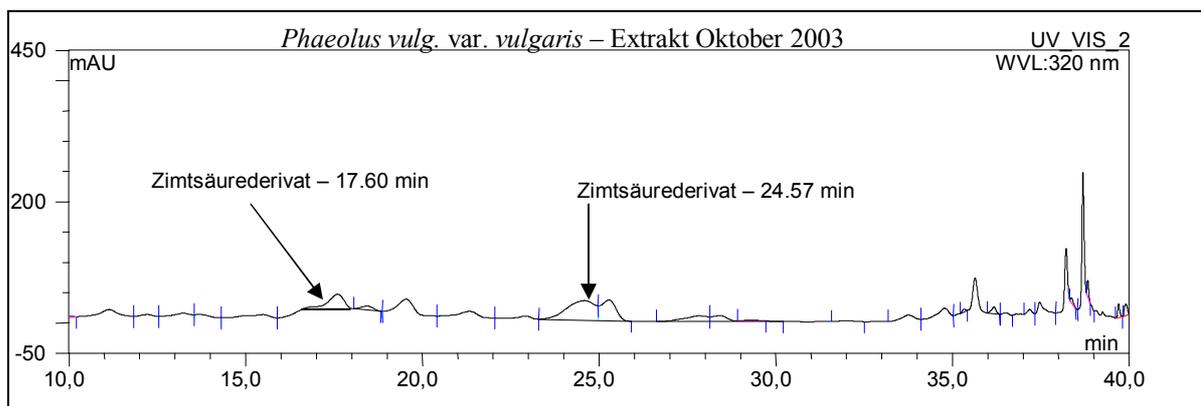
**Abb.E25:** HPLC-Chromatogramm des *Phaseolus vulg.* var. *vulgaris* Extraktes Oktober 2003 (Wellenlänge: 280 nm, HPLC-Programm Nr.1)

In der Gruppe der Flavonole konnte Astragalin als Hauptkomponente dieser Leguminose beobachtet werden, außerdem war Kämpferol als Aglykon in allen Extrakten enthalten. Neben diesen beiden Flavonolen konnten noch vier weitere Flavonole bei 26,47 min, 26,94 min, 29,06 min und 30,82 min detektiert werden.



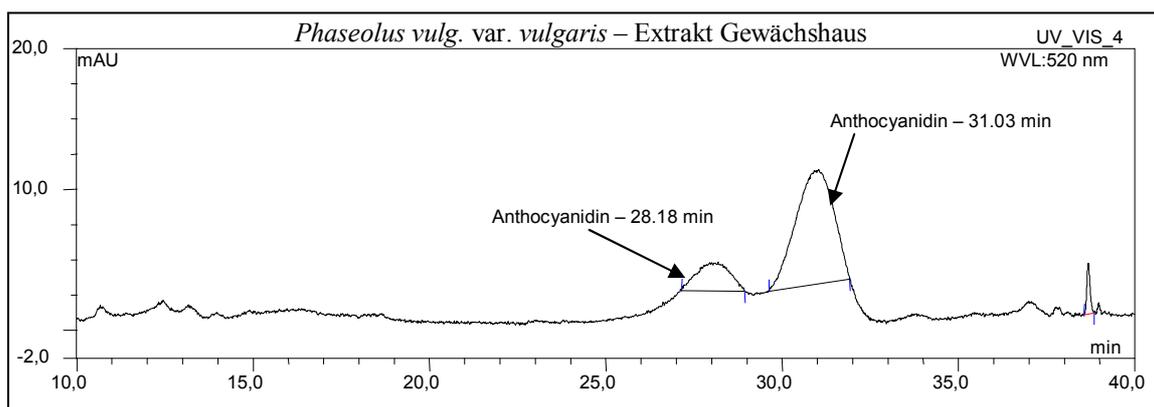
**Abb.E26:** HPLC-Chromatogramm des *Phaseolus vulg.* var. *vulgaris* Extraktes Oktober 2003 (Wellenlänge: 340 nm, HPLC-Programm Nr.1)

Im untersuchten Extrakt waren auch Zimtsäure-Derivate vorhanden, die bei 17,60 min und 24,57 min eluierten.



**Abb.E27:** HPLC-Chromatogramm des *Phaseolus vulg. var. vulgaris* Extraktes Oktober 2003 (Wellenlänge: 320 nm, HPLC-Programm Nr.5)

Die Anthocyanidine wurden bei 520 nm beobachtet. In allen Extrakten wurden zwei Derivate gefunden, die jedoch nicht weiter charakterisiert werden konnten.



**Abb.E28:** HPLC-Chromatogramm des *Phaseolus vulg. var. vulgaris* Extraktes Gewächshaus (Wellenlänge: 520 nm, HPLC-Programm Nr.4)

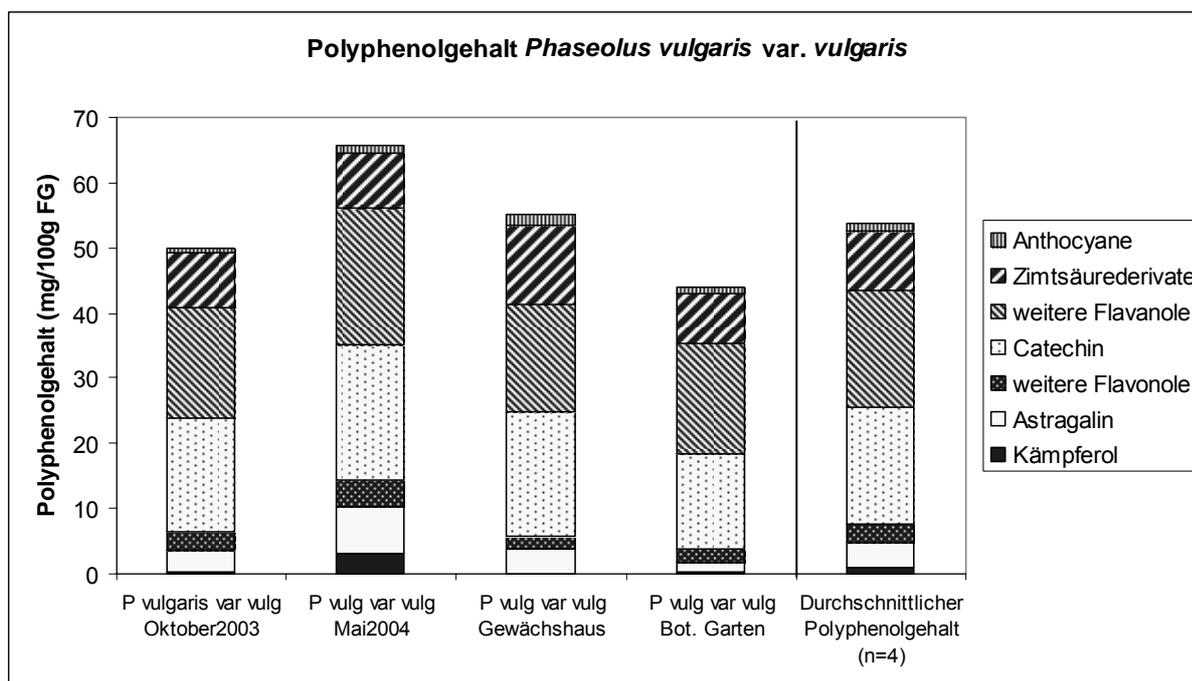
### Quantitative Untersuchung mittels HPLC - DAD

Die Extrakte „Oktober 2003“ und „Botanischen Garten“ sowie „Gewächshaus“ wiesen Polyphenolgehalte von (49.8 mg ( $\pm$  9.10 mg)/ 100 g FG, 44.0 mg ( $\pm$  2.65 mg)/ 100 g FG), sowie 55.2 mg ( $\pm$  3.38 mg)/ 100 g FG auf. Der Extrakt „Mai 2004“ zeigte innerhalb der von dieser Leguminose untersuchten Extrakte den höchsten Gehalt mit 65.7 mg ( $\pm$  7.58 mg)/ 100 g FG. In allen Extrakten konnten Kämpferol, Astragalin und Catechin als Einzelsubstanzen nachgewiesen und quantifiziert werden. Es wurde festgestellt, dass der Extrakt „Mai 2004“ von den genannten Substanzen jeweils den höchsten Gehalt aufwies. Im Durchschnitt konnte so für *Phaseolus vulg. var. vulgaris* ein Polyphenolgehalt von 53.7 mg ( $\pm$  7.97 mg)/ 100 g FG ermittelt werden.

**Tab.E8:** Absolutwerte der Polyphenolgehalte von *Phaseolus vulg.* var. *vulgaris*. Bestimmung der Flavonole als Catechin bei 280 nm, der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm und der Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm ermittelt aus drei Messungen.

Extrakt Komponente (mg(±SD)/100g FG)	Oktober 2003	Mai 2004	Gewächs- haus	Bot. Garten	Durchschnitt- licher Gehalt
Kämpferol	0.3± 0.04	3.2± 0.28	0.1± 0.07	0.2± 0.02	0.9± 1.29
Astragalin	3.3± 0.45	7.2± 0.73	3.8± 0.35	1.6± 0.07	4.0± 2.03
weitere Flavonole	2.9± 0.42	4.0± 0.41	1.8± 0.24	2.1± 0.14	2.7± 0.83
Catechin	17.4± 4.38	20.8± 1.55	19.2± 2.43	14.5± 1.46	18.0± 2.33
weitere Flavonole	16.9± 7.71	21.0± 7.25	16.5± 1.88	17.0± 2.01	17.8± 1.83
Zimtsäure- Derivate	8.5± 1.95	8.5± 1.27	12.1± 1.23	7.8± 0.90	9.3± 1.68
Anthocyanidine	0.5± 0.33	1.1± 0.40	1.7± 0.56	0.9± 0.02	1.1± 0.44
Gesamtgehalt	49.8± 9.10	65.7± 7.58	55.2± 3.38	44.0± 2.65	53.7± 4.94

Abbildung Abb.E29 veranschaulicht nochmals graphisch den Beitrag der einzelnen untersuchten Polyphenolgruppen zum Gesamtpolyphenolgehalt.



**Abb.E29:** Polyphenolgehalt der vier Extrakte von *Phaseolus vulg.* var. *vulgaris* (jeweils n=1) und durchschnittlicher Polyphenolgehalt (n=4) innerhalb der untersuchten Proben. Quantifizierung der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Flavonole als Catechin bei 280 nm, der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm und der Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm

Polyphenole im Kochwasser von *Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*

Die detektierten Flavonole stimmten für das zurückbleibende gekochte Samenmaterial mit den bereits oben beschriebenen Komponenten überein. Für das Kochwasser hingegen konnten in allen untersuchten Proben nur zwei Flavonole (26.47 min und Astragalin) gefunden werden. Das Flavonol bei 29.06 min und Kämpferol konnten nur in einem von drei Fällen bzw. zwei von drei Fällen detektiert werden.

In der Gruppe der Flavanole wurden neben Catechin vier weitere Flavanole im Samenmaterial sowie drei weitere Flavanole im Kochwasser beobachtet. Ebenso waren jeweils drei Zimtsäure-Derivate zu finden.

Die enthaltenen Anthocyanidine hingegen gingen beim Kochvorgang vollständig verloren, da sie nicht hitzebeständig sind, wie dies allgemein für diese Substanzklasse bekannt ist.

Insgesamt konnte ein Übergang der Polyphenole von 32.2 % in das Kochwasser beobachtet werden. Dies entsprach 35.0 mg ( $\pm$  13.71 mg)/ 100 g FG bei einem ermittelten Gesamtpolyphenolgehalt von 108.9 mg/ 100 g FG. Der ermittelte Gesamtgehalt liegt in diesem Fall höher als der für den Extrakt Oktober 2003 ermittelte Gehalt von 49.8 mg ( $\pm$  9.10 mg) /100 g FG. Dies ist hauptsächlich auf einen doppelt so hohen Flavanolgehalt zurückzuführen, aber auch auf eine Zunahme des Zimtsäuregehaltes. Der höhere Gehalt könnte auf Veränderungen während des Kochvorgangs unter Abbau von polymeren Strukturen oder Matrixeffekten zurückgeführt werden.

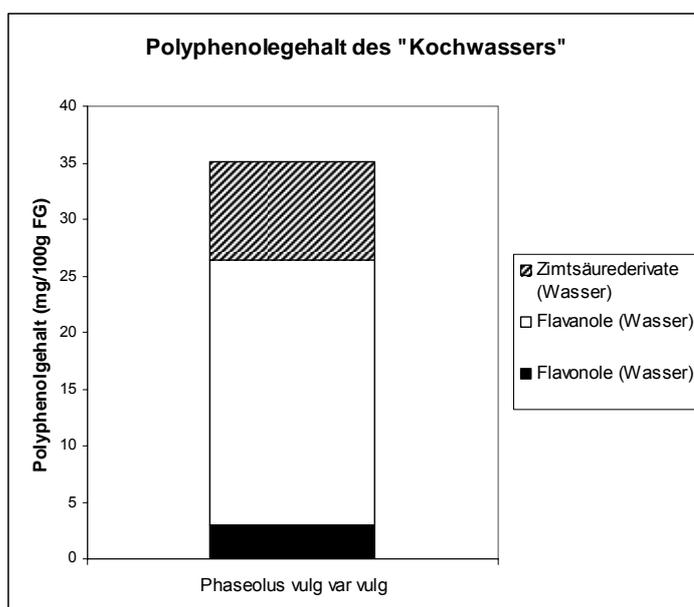


Abb.E30: *Phaseolus vulg.* var. *vulgaris*: Polyphenolgehalt der Wasserfraktion nach dem Kochvorgang (n=3)

Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

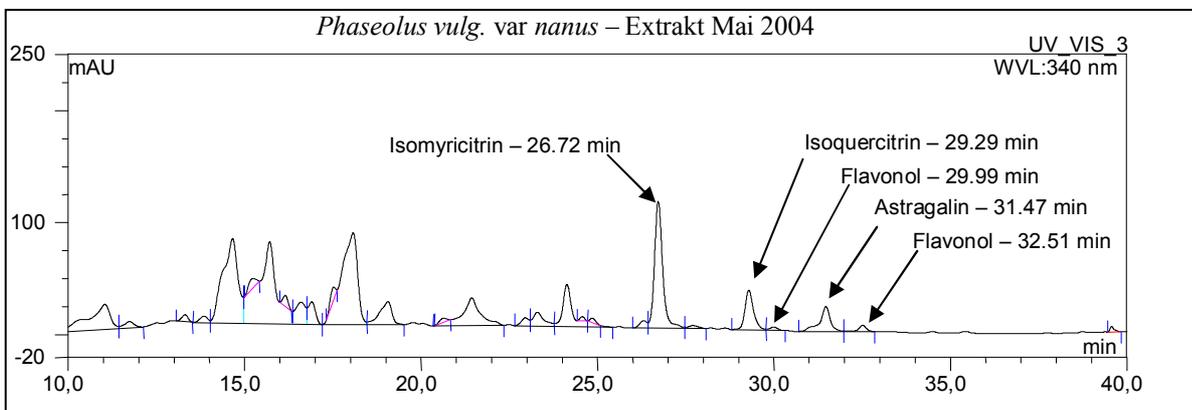
Im Extrakt Mai 2004 von *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris* konnten vor Hydrolyse 346.1 mg ( $\pm$  8.63 mg) FP/10 g FG nachgewiesen werden. Nach Hydrolyse stieg dieser Wert auf 426.8 mg ( $\pm$  18.03 mg) GP/100 g FG. Die Methode nach Folin-Ciocalteu lieferte den 5-7-fachen Wert für den Gehalt an Polyphenolen gegenüber der HPLC-Methode.

**3.2.8. Extrakte von *Phaseolus vulgaris* L. var. *nanus* (Jusl.) Aschers.**

Qualitative Zusammensetzung

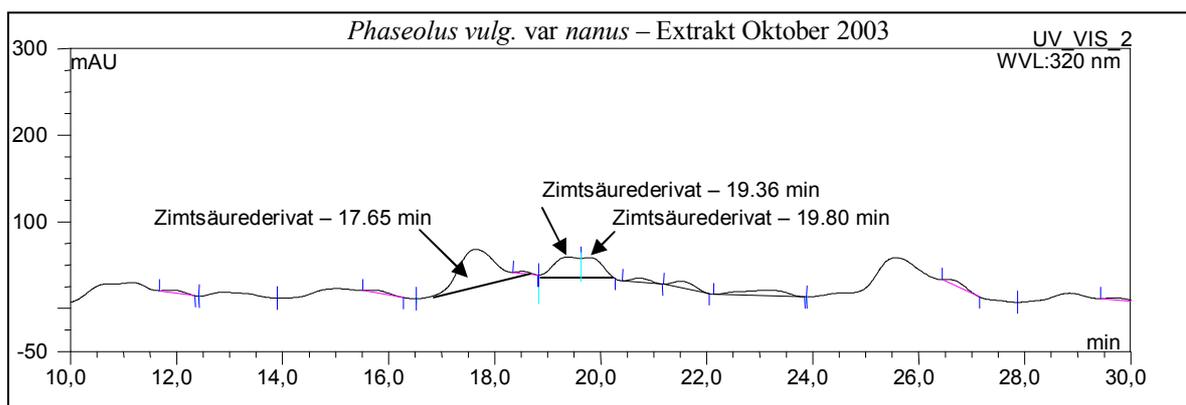
In den Extrakten von *Phaseolus vulgaris* var. *nanus* waren neben Flavonolen auch Zimtsäure-Derivate sowie Anthocyanidine nachzuweisen, zusätzlich hierzu konnten im Extrakt Mai 2004 auch Isoflavonoide detektiert werden.

In der Gruppe der Flavonole lagen Isomyricitrin (26.72 min), Isoquercitrin (29.29 min) und Astragalin (31.47 min) als Hauptkomponenten vor, neben zwei weiteren Flavonolen (29.99 min und 32.51min), die in geringerer Konzentration in allen Extrakten vorhanden waren. Zusätzlich konnten noch zwei weitere Flavonole detektiert werden, die jedoch nicht in allen Extrakten nachzuweisen waren. So wurde im Extrakt Gewächshaus noch ein Peak bei 27.29 min detektiert und in allen Extrakten außer dem Extrakt Mai 2004 eluierte ein Flavonol bei 31.04 min.



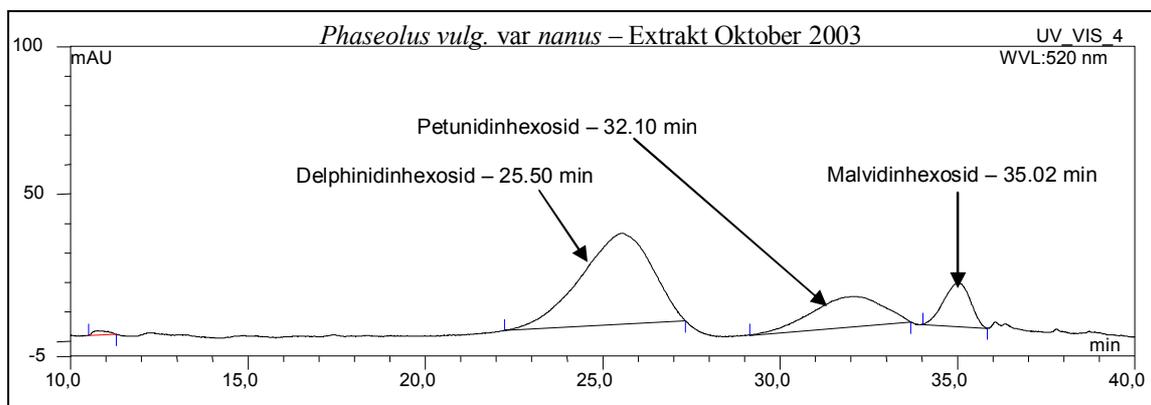
**Abb.E31:** HPLC-Chromatogramm des *Phaseolus vulg.* var. *nanus* Extraktes Mai 2004 (Wellenlänge: 340 nm, HPLC-Programm Nr.2)

Anhand ihrer UV-Spektren konnten drei Zimtsäure-Derivate beobachtet werden, die in allen Extrakten nachweisbar waren.



**Abb.E32:** HPLC-Chromatogramm des *Phaseolus vulg.* var. *nanus* Extraktes Oktober 2003 (Wellenlänge: 320 nm, HPLC-Programm Nr.5)

Im Falle der Anthocyanidine konnten drei Vertreter identifiziert werden (25.5 min, 32.10 min und 35.02 min). Alle wiesen UV-Maxima bei 270 – 275 nm und 520 – 530 nm auf, außerdem konnten im Massenspektrum Massen von 465, 479 und 493 amu beobachtet werden, die jeweils ein Fragment von 162 amu abspalteten. Damit könnte es sich um Glycoside von Delphinidin, Petunidin und Malvidin handeln, die bereits für *Phaseolus vulgaris* („Jamapa bean“) beschrieben sind (Aparicio-Fernandez et al. 2005).



**Abb.E33:** HPLC-Chromatogramm des *Phaseolus vulg.* var. *nanus* Extraktes Oktober 2003 (Wellenlänge: 520 nm, HPLC-Programm Nr.4)

Im Falle des Extraktes Mai 2004 konnten zusätzlich auch Isoflavonoide nachgewiesen werden. Sie eluierten bei 26.31 min und 31. 25 min (HPLC-Chromatogramm nicht abgebildet).

Abbildung Abb.E34 zeigt die UV-Spektren der beiden Isoflavonoide.

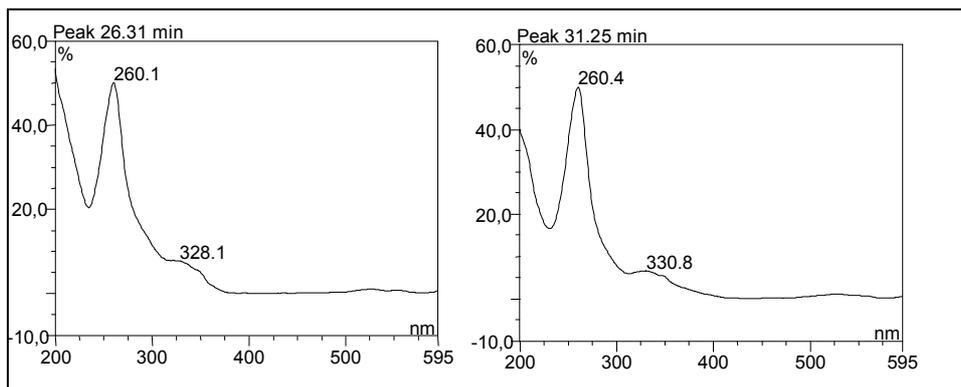


Abb.E34: UV-Spektren der Isoflavonoide des *Phaseolus vulg.* var. *nanus* Extraktes Mai 2004

Quantitative Untersuchung mittels HPLC - DAD

Die vier untersuchten Extrakte zeigten einen unterschiedlichen Gesamtpolyphenolgehalt. Der Extrakt Oktober 2003 wies zusammen mit dem Extrakt Botanischen Garten die geringere Polyphenolkonzentrationen auf (31.4 mg  $\pm$  2.13/100 g FG, 37.1 mg  $\pm$  2.34/100 g FG), wohingegen die Extrakte Mai 2004 und Gewächshaus mit 50.7 mg ( $\pm$  5.97 mg)/ 100g FG bzw. 67.0 mg ( $\pm$  5.48 mg)/ 100 g FG fast doppelt so hohe Gehalte zeigten. Hauptsächlich war dies auf die höheren Flavonol- und Anthocyanidingehalte zurückzuführen.

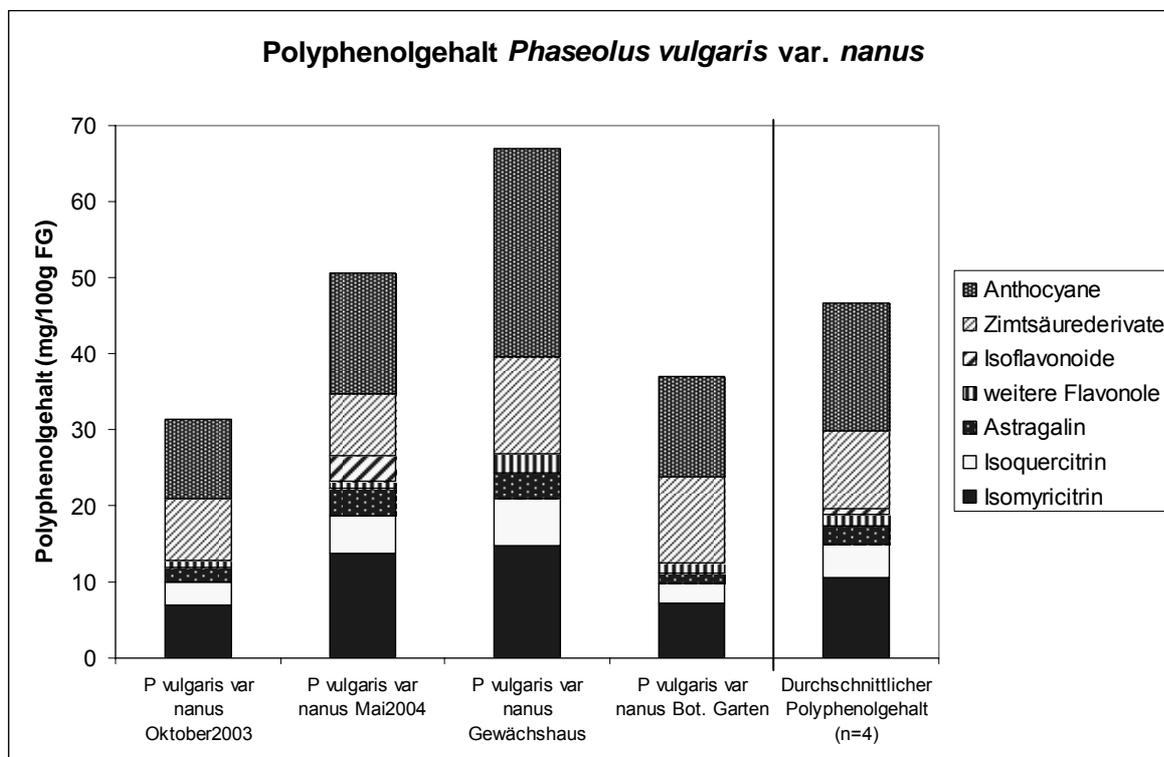


Abb.E35: Polyphenolgehalt der vier Extrakte von *Phaseolus vulg.* var. *nanus* (jeweils n=1) und durchschnittlicher Polyphenolgehalt (n=4) innerhalb der untersuchten Proben. Quantifizierung der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Isoflavonoide als Genistein bei 280 nm, der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm und der Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm

**Tab.E9:** Absolutwerte der Polyphenolgehalte von *Phaseolus vulg.* var. *nanus*. Bestimmung der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Isoflavonoide als Genistein bei 280 nm, der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm und der Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm ermittelt aus drei Messungen.

Extrakt Komponente (mg(±SD)/100g FG)	Oktober 2003	Mai 2004	Gewächs- haus	Bot. Garten	Durchschnitt- licher Gehalt
Isomyricitrin	7.0± 0.32	13.8± 0.54	14.7± 0.67	7.2± 0.34	10.6± 3.60
Isoquercitrin	3.1± 1.14	4.8± 0.07	6.3± 0.17	2.7± 0.11	4.2± 1.45
Astragalin	1.9± 0.68	3.6± 0.12	3.5± 0.09	1.2± 0.13	2.5± 1.01
weitere Flavonole	0.9± 0.28	1.0± 0.08	2.4± 0.39	1.4± 0.16	1.4± 0.60
Isoflavonoide	-	3.4± 0.10	-	-	0.8± 1.45
Zimtsäure- Derivate	8.1± 0.93	8.2± 2.02	12.7± 0.95	11.3± 1.02	10.1± 2.00
Anthocyanidine	10.5± 0.60	15.9± 4.40	27.4± 4.30	13.3± 1.56	16.8± 6.43
Gesamtgehalt	31.4± 2.18	50.7± 5.97	67.0± 5.48	37.1± 2.34	46.5± 9.23

#### Polyphenole im Kochwasser von *Phaseolus vulgaris* var. *nanus*

Nach dem Kochvorgang waren sowohl Isomyricitrin und Isoquercitrin als auch Astragalin im Samenmaterial nachweisbar. Daneben waren auch alle bereits beschriebenen Minoritätskomponenten zu finden, außerdem kamen noch zwei Flavonolpeaks bei späteren Retentionszeiten hinzu. In der Wasserfraktion hingegen waren nur die ersten drei der beschriebenen Flavonole vorhanden.

In der Gruppe der Zimtsäure-Derivate konnte der Peak bei 17.65 min ebenfalls wieder detektiert werden, jedoch konnten die beiden vorher bei 19 min eluierenden Peaks nicht beobachtet werden. Es war allerdings ein Peak bei 35 min hinzugekommen, der auch in den Wasserfraktionen zu finden war.

Die Anthocyanidine waren nach dem Kochvorgang wie bereits vorher bei *Glycine max* und *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris* nicht mehr zu detektieren.

Damit waren 62.8 % der Flavonole im Kochwasser nachweisbar, wobei dies 10.5 mg (± 0.55 mg)/100 g FG entsprach. Insgesamt waren 16.6 mg Polyphenole (n=1) in Samenmaterial und Kochwasser zu finden.

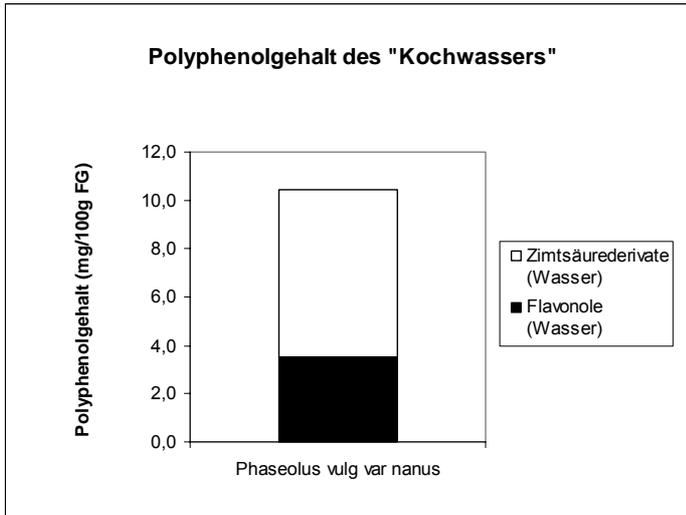


Abb.E36: *Phaseolus vulg.* var. *nanus*: Polyphenolgehalt der Wasserfraktion nach dem Kochvorgang (n=3)

### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

Für den Extrakt von *Phaseolus vulgaris* var. *nanus* konnte nach Folin-Ciocalteu ein Gehalt an freien Polyphenolen von 303.8 mg ( $\pm$  9.85 mg) FP/100 g FG erhalten werden, der nach Hydrolyse auf 474.7 mg ( $\pm$  11.34 mg) GP/100 g FG anstieg. Diese Werte lagen ebenfalls 5–7-fach höher als die Werte nach der HPLC – Methode.

### 3.3. Qualitative und quantitative Zusammensetzung weiterer Gemüseextrakte

Um einen Vergleich der Inhaltsstoffmuster und Gehalte der Polyphenole auch mit Nicht-Leguminosen zu erhalten, wurden vier weitere chinesische und vier aus in Deutschland erworbene Gemüsesorten untersucht. Alle Gemüsesorten haben sowohl in China als auch in Deutschland einen festen Platz im täglichen Speiseplan und können somit hier wie dort als natürliche Quelle von Polyphenolen dienen. Die in Deutschland erworbenen Gemüse wurden in äußere (Schalengewebe) und innere (Markgewebe) Gewebe getrennt, um die Lokalisation der Polyphenole genauer zu bestimmen. Die Besprechung der Proben erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

#### 3.3.1. Extrakte von *Allium sativum* L.

##### Qualitative und quantitative Untersuchung mittels HPLC – DAD

Von *Allium sativum* wurden aus China stammende frische, nicht getrocknete Zwiebeln untersucht. Es konnten keine Komponenten der untersuchten Polyphenolgruppen mit Hilfe ihrer charakteristischen UV-Spektren in den HPLC-Chromatogrammen gefunden werden. Diese Komponenten waren somit nicht enthalten bzw. lagen unterhalb der Detektionsgrenze.

##### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

Mit der Methode nach Folin-Ciocalteu konnten Polyphenole in dem Extrakt von *Allium sativum* nachgewiesen werden.

Ohne den Einsatz von Säure zur Hydrolyse der gebundenen OH-Gruppen konnte ein Polyphenolgehalt von 24.1 mg ( $\pm$  2.35 mg)/100 g FG bestimmt werden. Nach Hydrolyse stieg dieser Wert sogar um mehr als 30-fache auf 776.4 mg ( $\pm$  14.75 mg)/100 g FG an.

#### 3.3.2. Extrakte von *Cucumis sativus* L.

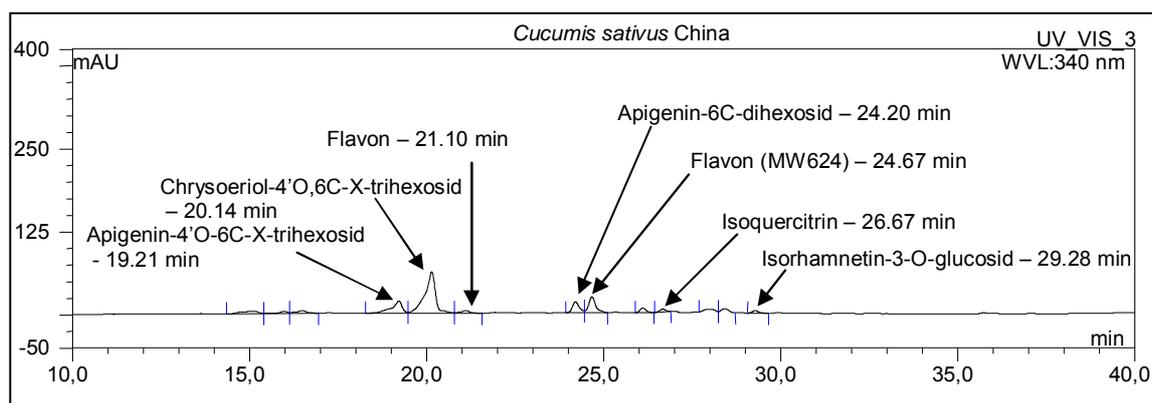
Von der Gurke lagen insgesamt drei Proben vor. Zum einen eine Probe aus China, die sowohl aus Mark- als auch aus Schalengewebe bestand, zum anderen die in Deutschland erworbene Gurke, die in Schale und Mark getrennt und einzeln untersucht wurde.

##### Qualitative Zusammensetzung

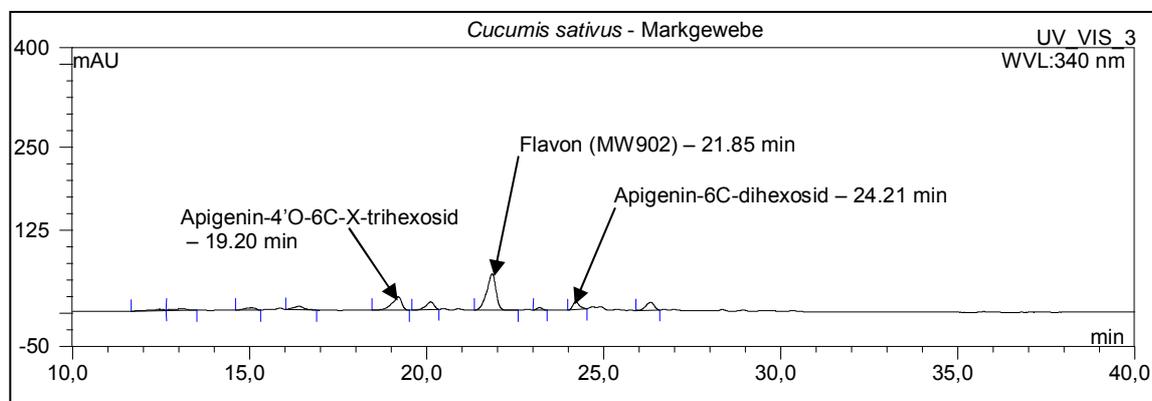
In dem Extrakt von *Cucumis sativus* der chinesischen Frucht konnten sowohl Flavone als auch Flavonole detektiert werden, während in dem Extrakt der Schale nur Flavonole sowie im Extrakt des Marks nur Flavone nachzuweisen waren.

Alle isolierten Komponenten konnten im Extrakt der chinesischen Frucht identifiziert werden, d.h. sowohl zwei Apigenin- sowie Luteolin-Derivate als auch zwei Quercetin-Derivate wurden detektiert (Abb.E37). Die Frucht aus Deutschland, die in Schalen – und Markgewebe differenziert wurde, wies im inneren Gewebe drei Flavone auf, wohingegen im Schalengewebe lediglich zwei Flavonole beobachtet werden konnten. Die beiden Flavone mit einer Retentionszeit von 19.20 min und 24.21 min zeigten die gleichen Charakteristika in Bezug auf UV-Spektrum, Retentionszeit und Massenspektrum wie die aus dem chinesischen Extrakt bereits bekannten Substanzen. Das dritte Flavon bei 21.85 min jedoch wies andere Eigenschaften auf. Das Molekulargewicht betrug 902 amu; es konnte die Abspaltung dreier Hexosen und einer Desoxyhexose beobachtet werden, wobei eine Hexose als C-Glycosyl vorlag.

Die beiden Flavonole, welche in der Schale zu beobachten waren, wiesen zwar die gleichen Retentionszeiten wie die auch aus dem Extrakt der chinesischen Frucht bekannten Flavonole Isoquercitrin und Isorhamnetin-3-O-glucosid auf, jedoch konnte ihr Vorhandensein nicht mittels Massenspektrum bestätigt werden.



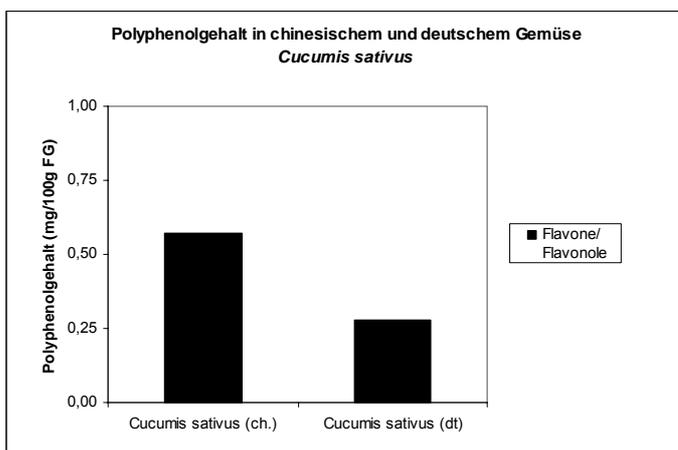
**Abb.E37:** HPLC-Chromatogramm des *Cucumis sativus* – Extraktes der chinesischen Frucht (Wellenlänge 340 nm, HPLC-Programm Nr.1)



**Abb.E38:** HPLC-Chromatogramm des *Cucumis sativus*-Extraktes der deutschen Frucht (Markgewebe) (Wellenlänge 340 nm, HPLC-Programm Nr.1)

### Quantitative Untersuchung mittels HPLC-DAD

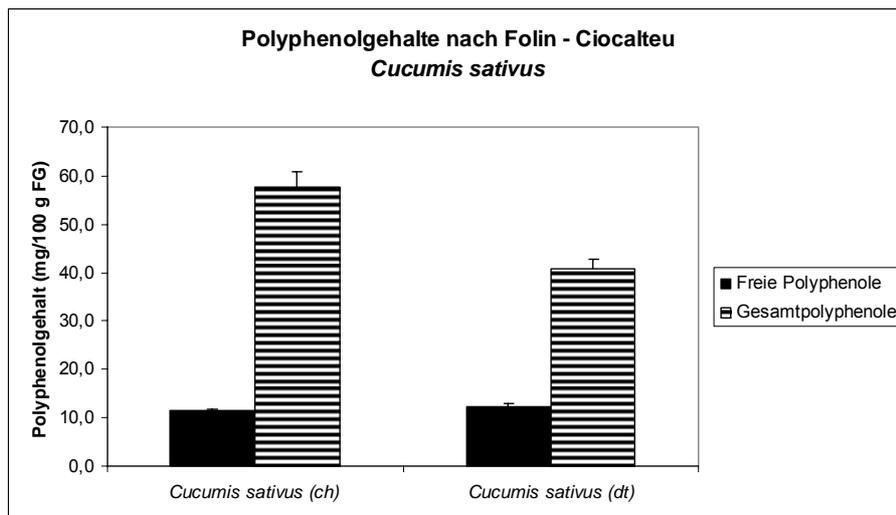
Der Flavon/Flavonolgehalt der verschiedenen *Cucumis sativus*-Arten wurde mittels HPLC-DAD bestimmt, dabei ergab sich für die „chinesische Gurke“ ein Gesamtpolyphenolgehalt von 0.6 mg ( $\pm$  0.09 mg)/100 g FG, wohingegen die „deutsche Gurke“ nur 0.3 mg ( $\pm$  0.05 mg)/100 g FG enthielt.



**Abb.E39:** Gesamtpolyphenolgehalte der *Cucumis sativus* – Extrakte der chinesischen (ch.) und deutschen (dt.) Frucht, mg/100 g Frischgewicht (Flavone bestimmt als Apigenin bei 340 nm, Flavonole bestimmt als Quercetin bei 340 nm)

### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

Die Extrakte aus den beiden Gurken wurden ebenfalls mit Hilfe der Methode nach Folin-Ciocalteu untersucht. Es wurden sowohl die freien Polyphenole bestimmt als auch die nach Hydrolyse vorliegenden Gesamtpolyphenole. Es konnten so 11.6 mg ( $\pm$  0.37 mg)/100 g FG freie Polyphenole und 57.8 mg ( $\pm$  3.02 mg)/100 g FG Gesamtpolyphenole für die chinesische Gurke bestimmt werden. Während die deutsche Gurke mit dieser Methode etwa die gleiche Menge freie Polyphenole aufwies, nämlich 12.3 mg ( $\pm$  0.50 mg)/100 g FG, blieb sie im Gesamtpolyphenolgehalt mit 40.7 mg ( $\pm$  1.97 mg)/100 g FG hinter der chinesischen Gurke zurück. Insgesamt lagen auch diese Werte höher als die der jeweiligen Werte, die mittels HPLC-DAD bestimmt wurden.



**Abb.E40:** Freie Polyphenole und Gesamtpolyphenole der *Cucumis sativus* - Extrakte der chinesischen (ch.) und deutschen (dt.) Frucht berechnet als Catechin

### 3.3.3. Extrakte von *Cucurbita pepo*-Arten zum Vergleich

Von den Kürbisgewächsen (Cucurbitaceen) wurden zusätzlich noch eine Zucchini – und eine Zierkürbis-Art zum Vergleich der Polyphenolmuster untersucht. Diese wurden jeweils in Schale und Mark getrennt. In beiden Fällen konnten die Polyphenole hauptsächlich oder ausschließlich in den äußeren Geweben detektiert werden.

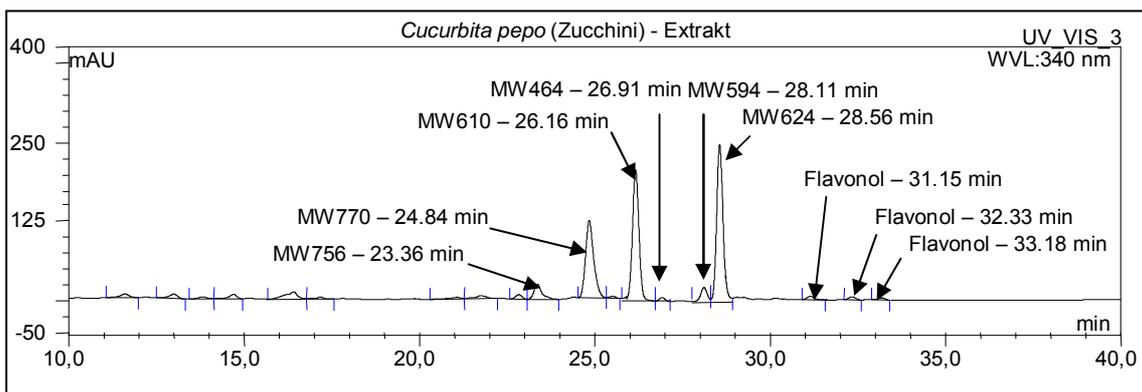
#### Qualitative und quantitative Untersuchung mittels HPLC-DAD

Als Polyphenole der Zucchini wurden Flavonole beobachtet, sowie im Markgewebe ein Flavon. Insgesamt waren neun Flavonole im Schalengewebe vorhanden, sechs davon konnten weiter charakterisiert werden (siehe Abb.E45). Die Flavonole mit dem Molekulargewicht von 756, 610 und 464 amu zeigten Quercetin als Aglykon, wohingegen die Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 770 und 624 amu ein methyliertes Quercetin als Aglykon aufwiesen. Die Komponente bei 28.11 min erwies sich sowohl auf Grund des UV-Spektrums als auch wegen des ermittelten Massenspektrums als Kämpferol-Derivat. Alle sechs Verbindungen zeigten Abspaltungen von ein, zwei oder drei Zuckereinheiten. Während die beiden im Chromatogramm zuerst eluierenden Komponenten zweimal die Abspaltung einer Desoxyhexose und schließlich das Fragment einer Hexose aufwiesen, zeigten die beiden Hauptverbindungen bei 26.16 und 28.56 min und die Minoritätskomponente bei 28.11 min lediglich die Abspaltung einer Desoxyhexose und einer Hexose. Die Minoritätskomponente bei 26.91 min spaltete als einziges Fragment eine Hexose ab.

Im Markgewebe hingegen waren drei Flavonole und ein Flavon zu detektieren. Es konnte sowohl das Quercetin-Derivat mit einem Molekulargewicht von 610 amu als auch das Kämpferol-Derivat mit einem Molekulargewicht von 594 amu beobachtet werden. Bei 24.8

min eluierte im Gegensatz zum Schalengewebe jedoch kein Methylquercetin-Derivat mit einem Molekulargewicht von 770 amu, sondern ein Kämpferol-Derivat mit einem Molekulargewicht von 740 amu. Das Flavon, das im Markgewebe detektiert wurde, eluierte bei 23.6 min, konnte aber nicht genauer charakterisiert werden.

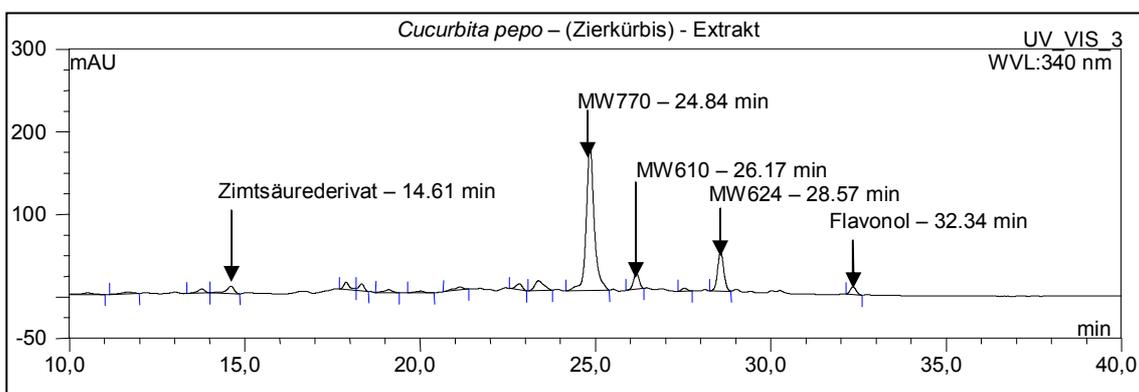
Es konnten für die Zucchini 1.1 mg ( $\pm$  0.00 mg) Polyphenole pro 100 g FG mittels HPLC-DAD ermittelt werden.



**Abb.E41:** HPLC - Chromatogramm des *Cucurbita pepo* var. Extraktes (Zucchini) (Wellenlänge 340 nm, HPLC-Programm Nr.1)

Die Polyphenole des Zierkürbis konnten nur im Schalengewebe nachgewiesen werden, wobei es sich um Flavonoide des Flavonoltyps handelte. Bei 24.84 min eluierte eine Hauptkomponente, die ein identisches Massenspektrogramm besaß wie das bereits oben erwähnte methylierte Quercetin-Derivat mit einem Molekulargewicht von 770 amu. Auch die beiden Komponenten mit einem Molekulargewicht von 610 und 624 waren nachweisbar, neben einer Minoritätskomponente bei 32.34 min. Im Zierkürbis konnte zusätzlich auch ein Zimtsäure-Derivat nachgewiesen werden. Das HPLC-Chromatogramm des Markgewebes wies keine Peaks mit charakteristischen UV-Spektren auf.

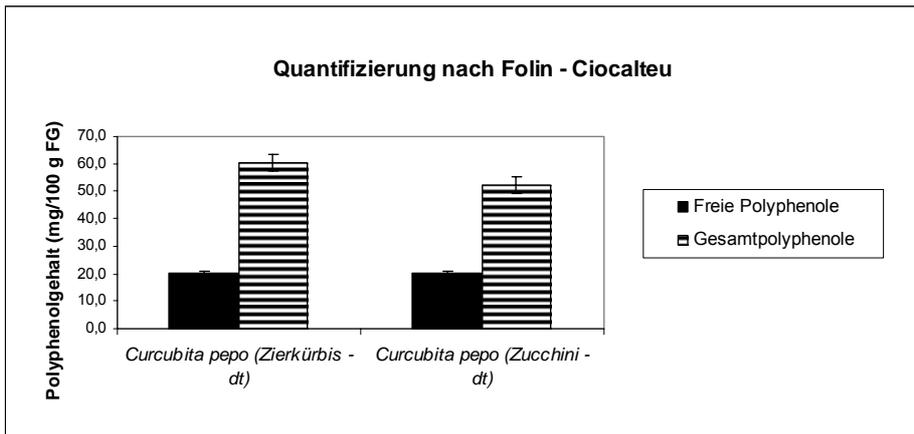
Insgesamt waren im Zierkürbis 0.9 mg ( $\pm$  0.01 mg)/ 100 g FG Polyphenole enthalten, wovon 0.9 mg ( $\pm$  0.01 mg)/ 100 g FG auf die Gruppe der Flavonole entfielen.



**Abb.E42:** HPLC - Chromatogramm des *Cucurbita pepo* var. Extraktes (Zierkürbis) (Wellenlänge 340 nm, HPLC-Programm Nr.1)

Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

Die beiden Kürbisgewächse wiesen nach Folin-Ciocalteu ähnliche Gehalte auf. Die Zucchini enthielt 20.1 mg ( $\pm 0.87$  mg)/100 g FG freie Polyphenole, während der Zierkürbis 20.2 mg ( $\pm 0.40$  mg)/100 g FG enthielt. Die Hydrolyse ergab für die Zucchini einen 2.6 – fachen Anstieg der Polyphenole auf 52.2 mg ( $\pm 3.03$  mg)/100 g FG und für den Zierkürbis einen fast dreifachen Anstieg auf 60.4 mg ( $\pm 3.19$  mg)/100 g FG Gesamtpolyphenole.



**Abb.E43:** Freie Polyphenole und Gesamtpolyphenolgehalte der *Cucurbita pepo* – Extrakte der deutschen (dt.) Kürbisarten berechnet als Catechin

### **3.3.4. Extrakte von *Raphanus sativus* L.**

#### Qualitative und quantitative Untersuchung mittels HPLC – DAD

Im Falle von *Raphanus sativus* wurde eine Sorte gewählt, die in der Umgebung von Hangzhou angebaut wurde, jedoch keine Zuchtsorte darstellte, da sie nur kleine etwa handgroße Knollen aufwies. In den HPLC-Chromatogrammen konnten auch in diesem Extrakt keine Polyphenole der untersuchten Gruppen detektiert werden.

#### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

Für *Raphanus sativus* konnte nach Folin-Ciocalteu ein Polyphenolgehalt ermittelt werden. So lagen 28.4 mg ( $\pm$  2.11 mg)/100 g FG als freie Polyphenole vor, während der Gesamtpolyphenolgehalt in diesem Fall mit 72.3 mg ( $\pm$  2.47 mg)/100 g FG lediglich 2-3 Mal so hoch ausfiel.

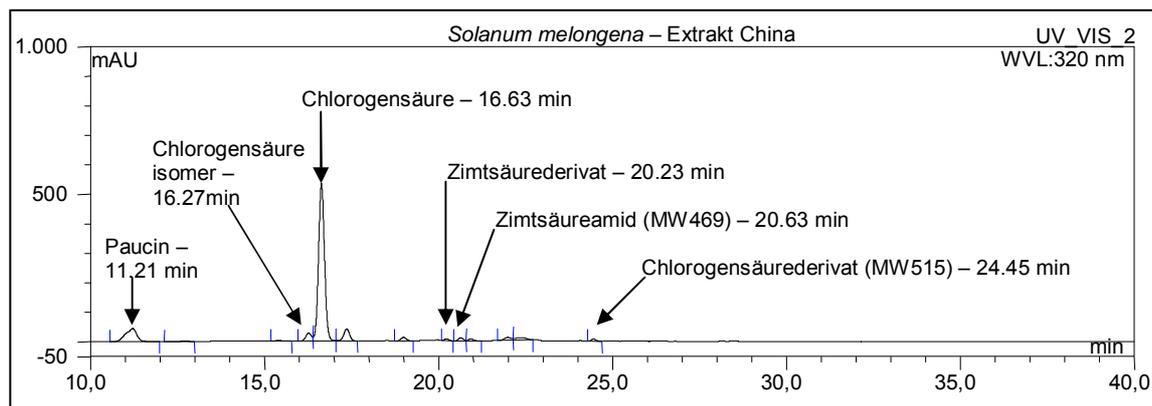
### **3.3.5. Extrakte von *Solanum melongena* L.**

Von *Solanum melongena* lagen insgesamt wieder drei verschiedenen Proben vor. Zum einen der Extrakt aus chinesischen Pflanzen, zum anderen zwei Proben von in Deutschland erworbenen Früchten, die wiederum in Schale und Mark getrennt wurden.

#### Qualitative Zusammensetzung

In den untersuchten Proben konnten Dihydroxyzimtsäure-Derivate als Hauptinhaltsstoffe der Aubergine beobachtet werden, daneben lagen auch Anthocyanidine und Flavonole vor. Während die Flavonole und Anthocyanidine nur in der Schale detektiert werden konnten, waren die Dihydroxyzimtsäure-Derivate sowohl in Schale als auch im Markgewebe nachzuweisen.

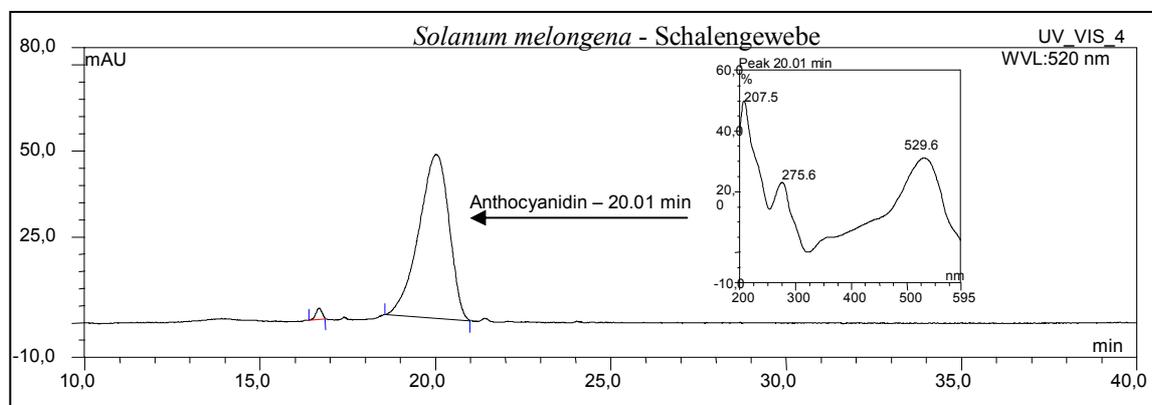
Insgesamt konnten sechs verschiedene Zimtsäure-Derivate an Hand ihrer charakteristischen UV-Spektren beobachtet werden. Solche Derivate wurden zusammen mit Zimtsäureamiden bereits als charakteristische Inhaltsstoffe der Früchte von *Solanum melongena* beschrieben (Whitaker et al. 2003). Paucin und Chlorogensäure, die beide aus der chinesischen Pflanze isoliert wurden, konnten bei 11.21 min bzw. 16.63 min detektiert werden. Zusätzlich neben Chlorogensäure war auch eine weitere Komponente mit einem Molekulargewicht von 354 amu zu beobachten, die bei 16.27 min eluierte. Dabei handelte es sich um ein Chlorogensäureisomer, welches nicht weiter charakterisiert wurde.



**Abb.E44:** HPLC-Chromatogramm des *Solanum melongena* – Extraktes der chinesischen Frucht (Wellenlänge 320 nm, HPLC-Programm Nr.1)

Zusätzlich konnten drei weitere Komponenten beobachtet werden, wobei die Verbindung bei 20.23 min ein nicht weiter identifiziertes Dihydroxymzimtsäure-Derivat darstellte. Die Komponenten bei 20.63 min bzw. 24.45 min konnten auf Grund ihrer UV- und Massenspektren als N,N-Dicaffeoylspermidin und eine Dicaffeoylchinasäure identifiziert werden. Letztere wurde nur in der chinesischen Probe und im Schalengewebe der deutschen Frucht detektiert.

Im Schalengewebe konnte außerdem ein Anthocyanidin nachgewiesen werden, das UV-Maxima bei 275.6 nm und 529.6 nm aufwies, dessen Molekulargewicht jedoch nicht bestimmbar war. Auch das Anthocyanidin der chinesischen Probe konnte nicht näher charakterisiert werden, weil hier Schalen- und Markgewebe zusammen untersucht wurden, jedoch der Markanteil wesentlich höher als der Schalenanteil war und somit die Konzentration des Anthocyanidins zu gering ausfiel. Die UV-Maxima lagen auch hier bei 282 nm und 537.8 nm. Auf Grund der unterschiedlichen Retentionszeiten (20.01 min vs. 22.23 min) handelte es sich aber eindeutig um verschiedene Anthocyanidine.



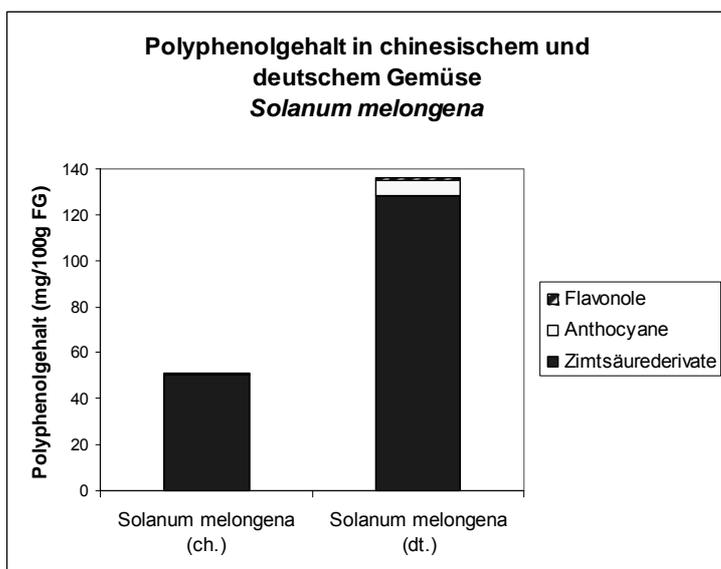
**Abb.E45:** HPLC-Chromatogramm des *Solanum melongena* Extraktes der deutschen Frucht (Wellenlänge 520 nm, HPLC-Programm Nr.1)

Das Flavonol wurde in der Schale der deutschen Aubergine bei 24.06 min detektiert. Das UV-Spektrum war dem eines Quercetin- bzw. Myricetin-3*O*-Derivates sehr ähnlich, jedoch konnte auch hier das Molekulargewicht nicht näher bestimmt werden.

#### Qualitative und quantitative Untersuchung mittels HPLC-DAD

In der chinesischen Aubergine konnten 50.3 mg ( $\pm$  2.17 mg)/100 g FG Zimtsäure-Derivate neben 0.7 mg ( $\pm$  0.31 mg)/100 g FG Anthocyanidinen gefunden werden. Im Gegensatz dazu konnten in der deutschen Aubergine 128.1 mg ( $\pm$ 7.34 mg) Zimtsäure-Derivate/100 g FG neben 7.1 mg ( $\pm$  2.38 mg)/100 g FG Anthocyanidinen bzw. 0.9 mg ( $\pm$  0.18 mg)/100 g FG Flavonolen beobachtet werden.

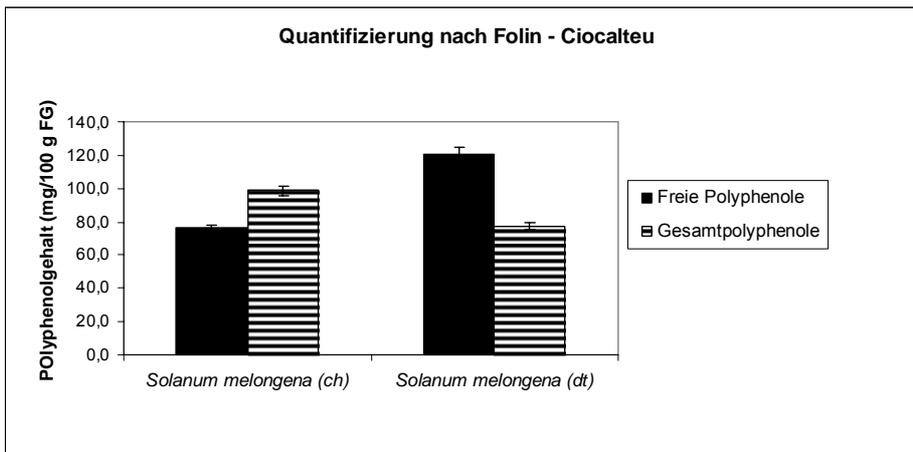
Somit ergab sich für die chinesische Aubergine ein Gesamtgehalt von 51.0 mg ( $\pm$  2.68 mg)/100 g FG. Die deutsche Aubergine wies demgegenüber einen Gehalt von 136.1 mg ( $\pm$  9.45 mg)/ 100 g FG auf, der damit mehr als zweimal so hoch ausfiel.



**Abb.E46:** Polyphenolgehalt der *Solanum melongena* Extrakte der chinesischen (ch.) und deutschen (dt.) Frucht, mg/100 g Frischgewicht, Flavonole bestimmt als Quercetin bei 340 nm, Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm und Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm

#### Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu

Der Gehalt an freien Polyphenolen in dem Extrakt der chinesischen Frucht bestimmt nach Folin-Ciocalteu betrug 76.0 mg ( $\pm$  1.77 mg)/100 g FG und der Gesamtpolyphenolgehalt belief sich auf 98.7 mg ( $\pm$  2.77 mg)/100 g FG. Die deutsche Aubergine wies einen höheren Gehalt an freien Polyphenolen auf. Jedoch war der Gesamtpolyphenolgehalt mit 77.5 mg ( $\pm$ 2.18 mg)/100 g FG geringer als der Gehalt an freien Polyphenolen mit 120.6 mg ( $\pm$ 4.56 mg)/100 g FG. Der abnehmende Gehalt könnte auf den Zerfall der Anthocyanidine zurückzuführen sein.

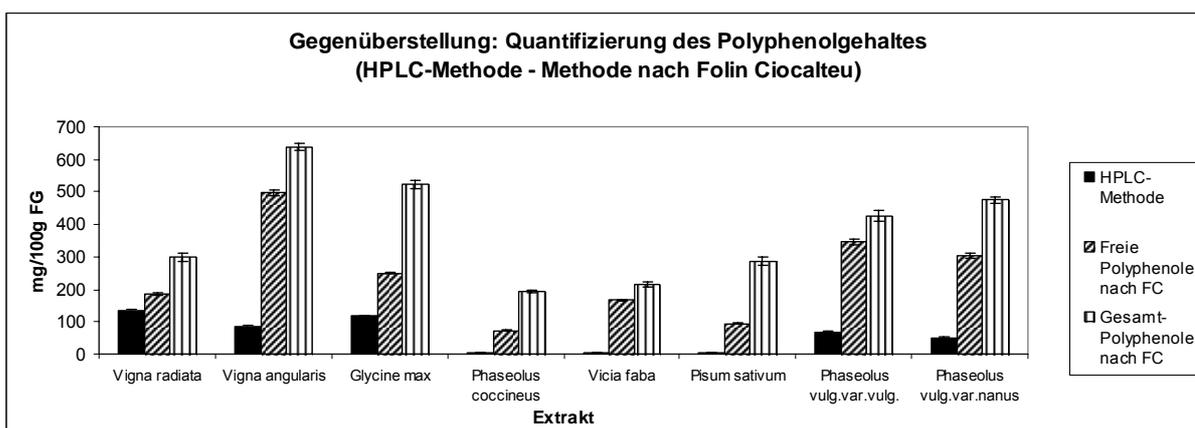


**Abb.E47:** Freie Polyphenole und Gesamtpolyphenolgehalte der *Solanum melongena* – Extrakte der chinesischen (ch.) und deutschen(dt.) Frucht berechnet als Catechin

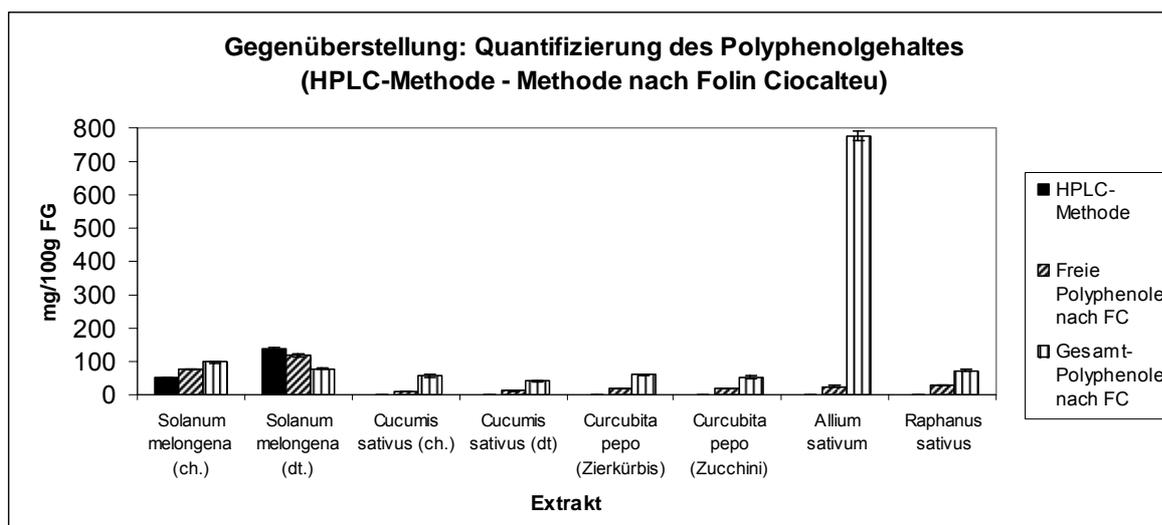
### 3.4. Gegenüberstellung der erhaltenen Quantifizierungsergebnisse

Die Extrakte wurden sowohl mit HPLC-DAD als auch nach Folin-Ciocalteu quantitativ untersucht. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse nochmals gegenübergestellt und miteinander verglichen.

Die Abbildungen Abb.E48 und E49 zeigen deutlich, dass die Ergebnisse, die mittels HPLC gewonnen wurden, jeweils niedriger ausfallen als die, die nach Folin-Ciocalteu bestimmt wurden. Innerhalb der letztgenannten ergaben die Gesamtpolyphenole nach Hydrolyse ebenfalls jeweils höhere Ergebnisse. Ausnahme bildet lediglich der Extrakt der deutschen Aubergine. Hier liegt der Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu unterhalb dem der Freien Polyphenole. Dies ist zum Teil auf den Abbau der Anthocyanidine während des Erhitzens zurückzuführen. Ebenso ergab sich ein höherer Gehalt nach der HPLC-Methode, der durch den Zerfall der Anthocyanidine in alkalischer Lösung sowie durch die unterschiedliche Reaktion der Inhaltsstoffe mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz zustande kommt.



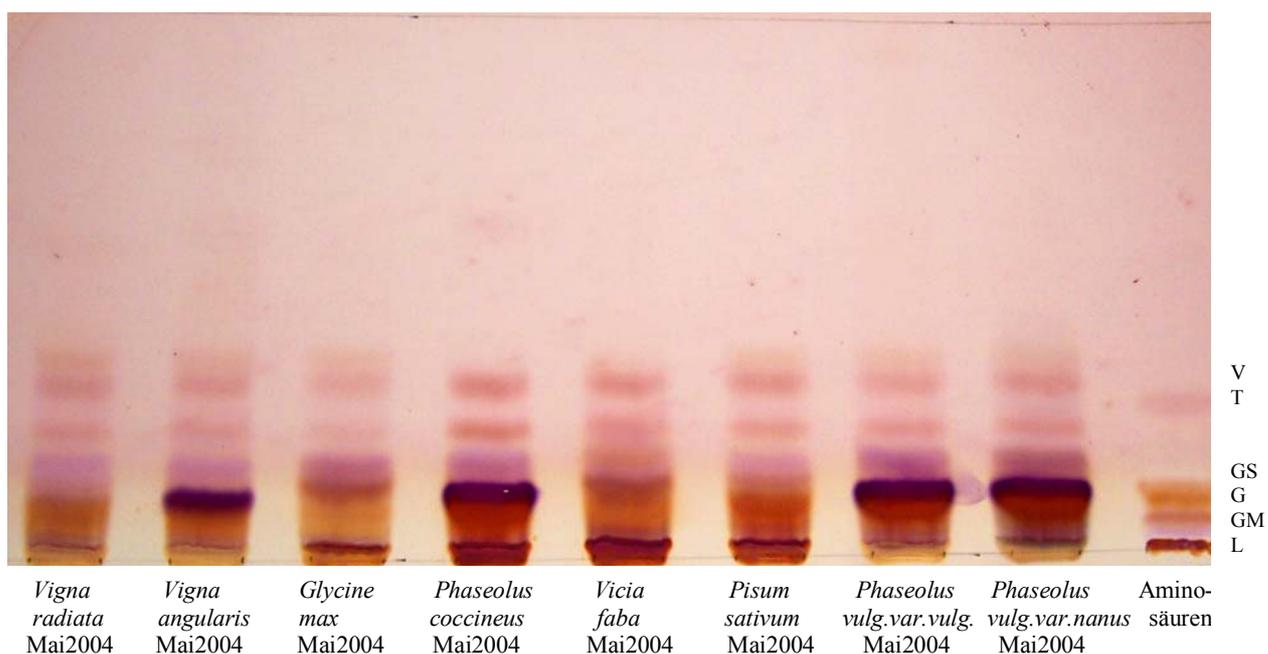
**Abb.E48:** Polyphenolgehalt der Mai 2004-Extrakte (jeweils n=1). HPLC-Methode: Quantifizierung der Flavonole als Catechin bei 280 nm, der Flavone als Apigenin bei 340 nm, der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Isoflavonoide als Genistein bei 280 nm, der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm und der Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm. Nach Folin-Ciocalteu: Freie- und Gesamtpolyphenolgehalte berechnet als Catechin, vor und nach Hydrolyse mit 1.2 M HCl. FC=Folin-Ciocalteu



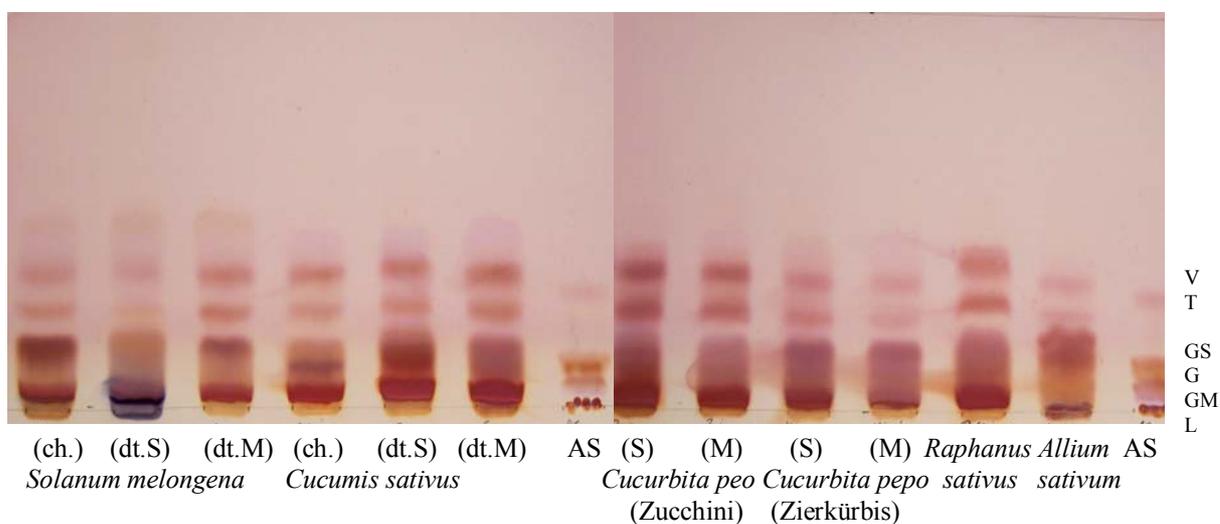
**Abb.E49:** Polyphenolgehalt der weiteren Gemüse-Extrakte (jeweils n=1). HPLC-Methode: Quantifizierung der Flavanole als Catechin bei 280 nm, der Flavone als Apigenin bei 340 nm, der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Isoflavonoide als Genistein bei 280 nm, der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm und der Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm. Nach Folin-Ciocalteu: Freie- und Gesamtpolyphenolgehalte berechnet als Catechin, vor und nach Hydrolyse mit 1.2 M HCl. ch=chinesische Pflanze, dt=deutsche Pflanze, FC=Folin-Ciocalteu

Da die Bestimmung mit Folin-Ciocalteu-Reagenz nicht nur für Polyphenole, sondern auch zur Quantifizierung von Proteingehalten herangezogen wird, wurden die Extrakte Mai 2004, ebenso die Gemüse-Extrakte, per Dünnschichtchromatographie untersucht. Unter anderem wurde Ninhydrin als Sprühreagenz für Aminosäuren eingesetzt, um diese in den jeweiligen Extrakten nachzuweisen. Die Rohproteingehalte der Leguminosensamen liegen recht hoch und werden mit 39.0% (*Glycine max*), 25.7% (*Pisum sativum*), 24.1% (*Phaseolus vulgaris*), 23.1% (*Phaseolus coccineus*), 26.7% (*Vigna radiata*), 26.7% (*Vicia faba*) und 21.0% (*Vigna angularis*) angegeben (Schuster et al. 1998).

Der Proteinanteil der weiteren Gemüsesorten wird für *Solanum melongena* mit 1-2%, für *Cucumis sativus* mit 0.5-1%, für *Curcubita pepo*-Arten mit 1% angegeben. Auch für die Familie der Brassicaceen sind Werte von ca. 1% Protein (Radieschen-*Raphanus sativus* L. var. *sativus*), sowie für die Küchenzwiebel (*Allium cepa*) von ca. 2% Protein zu finden (Schuchert 2007). Diese Proteingehalte liegen damit wesentlich niedriger als diejenigen der Leguminosen. In allen Extrakten konnten Aminosäuren mittels Ninhydrin nachgewiesen werden.



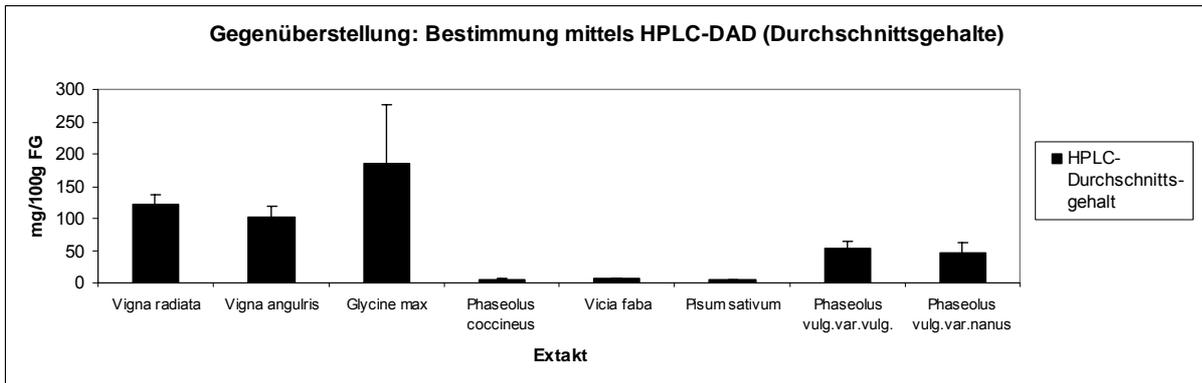
**Abb.E50:** Extrakte vom Mai 2004, DC:0.8 mg Extrakt, Fließmittel: Ethylacetat/Ameisensäure/Wasser (85:10:5), Laufstrecke: 8 cm, Sprühreagenz: Ninhydrin, Aminosäurestandard: D,L-Valin (V), D,L-Tyrosin (T), L-Glutaminsäure (GS), D,L-Glycin (G), L-Glutamin (GM), D,L- Lysin (L)



**Abb.E51:** Extrakte der weiteren Gemüse, DC:0.8 mg Extrakt, Fließmittel: Ethylacetat/Ameisensäure/Wasser (85:10:5), Laufstrecke: 8 cm, Sprühreagenz: Ninhydrin, Aminosäurestandard: D,L-Valin (V), D,L-Tyrosin (T), L-Glutaminsäure (GS), D,L-Glycin (G), L-Glutamin (GM), D,L- Lysin (L), ch=chinesisch, dt=deutsch, S=Schalengewebe, M=Markgewebe

Wenn man die Durchschnittsgehalte der Polyphenole in den untersuchten Extrakte betrachtet, ist zu erkennen, dass die vier Ernten von *Vigna radiata*, *Vigna angularis* und *Glycine max* einen höheren Gehalt aufwiesen als die der übrigen Leguminosen. Ein mittlerer Gehalt war hingegen bei den beiden *Phaseolus vulgaris*-Arten zu finden. Sehr geringe Konzentrationen

der untersuchten Polyphenole konnten bei *Phaseolus coccineus*, *Vicia faba* und *Pisum sativum* gefunden werden. Dies ist in Abb.E52 wiedergegeben.



**Abb.E52:** Polyphenolgehalt der Leguminosen, Quantifizierung der Flavanole als Catechin bei 280 nm, der Flavone als Apigenin bei 340 nm, der Flavonole als Quercetin bei 340 nm, der Isoflavonoide als Genistein bei 280 nm, der Zimtsäure-Derivate als Chlorogensäure bei 320 nm und der Anthocyanidine als Cyanidinchlorid bei 520 nm, n=4 außer *P.coccineus* n=3, *Vicia faba* n=2, *Pisum sativum* n=3

### 3.5. Identifizierung der isolierten Inhaltsstoffe

Von den Leguminosen und dem weiteren chinesischen Gemüse wurden Extrakte in größerem Umfang hergestellt, um die im vorangegangenen Kapitel beobachteten Flavonoide zu isolieren sowie deren Strukturen aufzuklären.

Mit Hilfe der erhaltenen HPLC-Chromatogramme konnten die in den Extrakten enthaltenen Polyphenole detektiert werden. Durch die in Abschnitt Material und Methoden genannten chromatographischen Verfahren wurden die Extrakte aufgetrennt. Dabei war es Ziel jeweils möglichst die Hauptkomponenten zu erhalten, um einen Überblick und Vergleich der Aktivität zwischen Einzelsubstanz und Extrakt zu erhalten. Im Hinblick auf starke Aktivitätsänderungen je nach Art der Aglyka und Derivatisierung der enthaltenen Flavonoide wurde auch dann eine Identifizierung vorgenommen, wenn dies nur zur partiellen Aufklärung der Struktur führte.

#### 3.5.1. Flavonoide und Isoflavonoide

Flavonoide und Isoflavonoide sind eine Substanzklasse, deren Grundkörper aus drei Ringsystemen besteht (Phenylchromangerüst). Die Benennung der Ringe und die Nummerierung des Grundkörpers sind in Abb.E53 dargestellt. Nach der Art des C-Ringes können die Flavonoide in mehrere Unterklassen aufgegliedert werden. (Einteilung nach Teuscher (Teuscher et al. 2004)).

- Flavane (2-Phenyl-chroman)
  - Flavanole (3-Hydroxy-flavane, Catechine)
  - Flavandiole (3,4-Dihydroxy-flavane, Leucoanthocyanidine)
  - Flavanone (4-Oxo-flavane)
  - Flavanonole (3-Hydroxy-4-oxo-flavane)
  - Flavone (4-Oxo-flav-2-ene)
  - Flavonole (3-Hydroxy-4-oxo-flav-2-ene)
  - Flavylumsalze (Anthocyanidine)
- Isoflavane (3-Phenyl-chroman)
- Neoflavane (4-Phenyl-chroman)

Zusätzlich bieten Substituenten wie unter anderem Hydroxy- /Methoxy-gruppen oder die Derivatisierung durch Verknüpfungen mit Zuckern sowohl durch C-C-Bindungen als auch durch C-O-Bindungen weitere Variationsmöglichkeiten, so dass eine Vielzahl an Verbindungen existiert. Nach oben aufgeführter Einteilung werden in den nächsten Kapiteln die isolierten Verbindungen besprochen. Isoliert werden konnten Flavanole, Flavone, Flavonole, Flavanonole und Isoflavanone.

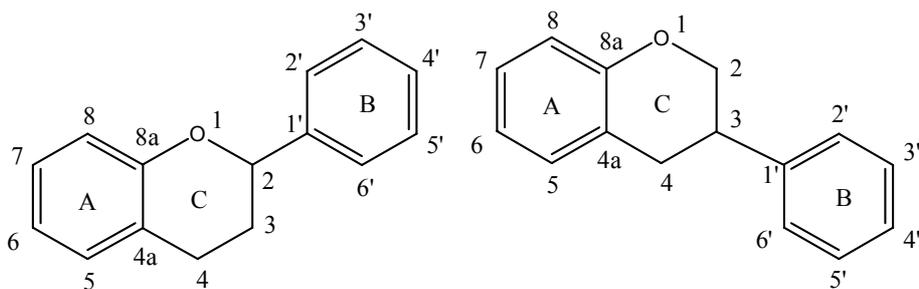


Abb.E53: Flavan- und Isoflavan-Grundkörper (Nummerierung, Kennzeichnung)

### 3.5.1.1. Flavanole

#### Catechin, Galocatechin und Epicatechin

Diese drei Substanzen sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut. Catechin und Epicatechin unterscheiden sich lediglich in ihrer Stereochemie an Position 3. Im Catechinmolekül sind die beiden Substituenten trans-ständig, während im Epicatechin die Hydroxy- und die Phenylgruppe auf einer Seite der Ebene, die durch den A-Ring gebildet wird, stehen. Galocatechin trägt im B-Ring zusätzlich eine weitere OH-Gruppe.

Im Massenspektrum konnte für Catechin und Epicatechin ein Molekulargewicht von 290 amu gefunden werden, während Galocatechin ein Molekulargewicht von 306 amu aufwies. Im Massenspektrum sind zusätzlich bei diesen Verbindungen häufig die Pseudomolekülonen ihrer Di-  $[2M+H]^+$  oder Trimere  $[3M+H]^+$  zu erkennen, außerdem eine Abspaltung von 18 amu, die einem Ammoniumion entspricht, das aber nicht aus der Verbindung, sondern aus dem Fliessmittel stammte.

Allen gemeinsam war das UV-Spektrum, das bei 270 bzw. 279 nm ein Maximum aufwies, und im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die Signale für die meta-koppelnden Protonen des A-Rings. Dabei handelte es sich um Dubletts bei 5.69 ppm – 5.94 ppm, die eine Kopplungskonstante von 2.2 Hz – 2.5 Hz aufwiesen.

Bei der Betrachtung der NMR-Daten von Flavonoiden im Allgemeinen und Catechin im Besonderen ergeben sich oft Diskrepanzen für die Zuordnung von H-6 und H-8. Diese ließ sich im vorliegenden Fall durch Analyse des HMBC-Spektrums eindeutig ableiten. Das Proton bei  $\delta$  5.67 (H-8) zeigte eine Korrelation zu einem Signal bei  $\delta$  155.2 (C-8a), das auf Grund seiner Tieffeldverschiebung einem phenolischen C-Atom zuzuordnen war. Da dieses Korrelationen zu H-2 und H-4<sub>A</sub>/4<sub>B</sub> aufwies, konnte es sich nur um C-8a handeln und bei dem Proton im aromatischen Bereich nur um H-8, wodurch sich im Umkehrschluss die Zuordnung von H-8 ergab.

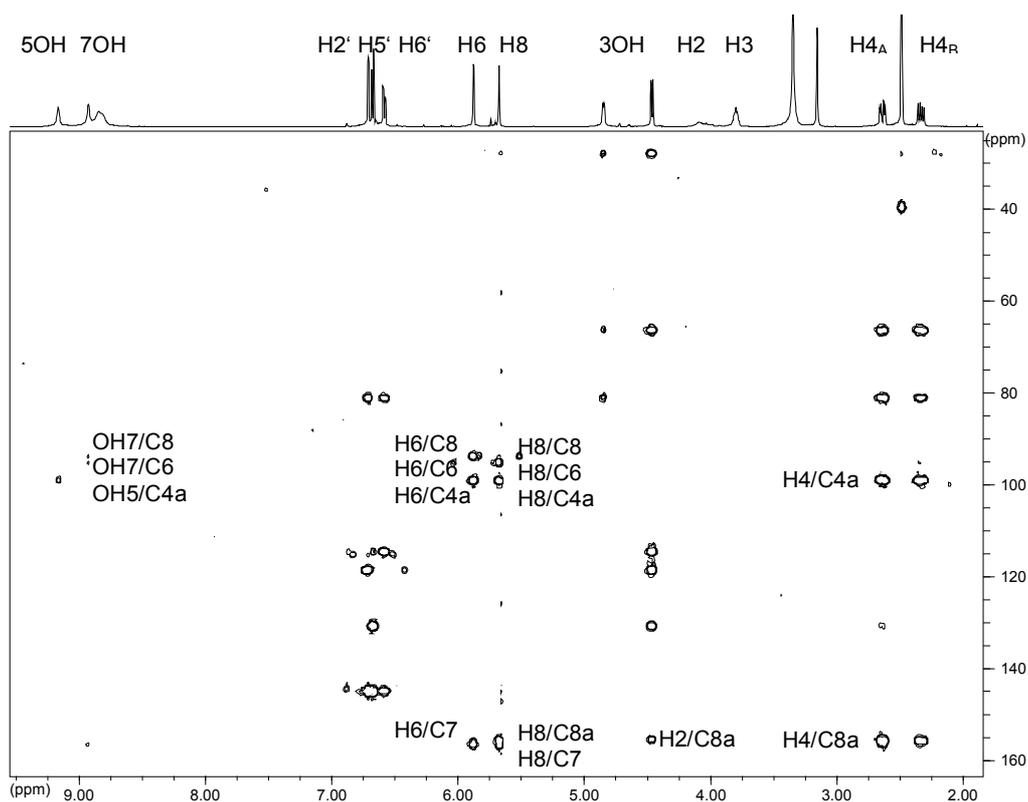


Abb.E54: HMBC-Spektrum von Catechin (in DMSO- $d_6$ )

Die Signale für einen 3',4'-disubstituierten Phenylring lagen ebenso vor und konnten im COSY-Spektrum als Spin-System beobachtet werden. Während H-2' auf Grund der meta-Stellung zu H-6' eine kleine Kopplungskonstante (1.9 Hz) aufwies, zeigte das Signal für H-5' eine große Kopplungskonstante von 8.2 Hz wegen der ortho-Stellung zu H-6'. H-6' selbst ergab demnach ein Dublett vom Dublett mit den jeweiligen Kopplungskonstanten zu H-2' und H-5'. Dieses ABC-System des B-Rings ist für Catechin und Epicatechin sehr charakteristisch. Das Spektrum veränderte sich, wenn wie im Gallocatechin eine zusätzliche OH-Gruppe in Position 5' hinzukam. Die beiden Protonen H-2' und H-6' erschienen dann als ein Singulett bei 6.39 ppm, da sie chemisch äquivalent sind.

Die Signale im C-Ring boten die Möglichkeit der Unterscheidung der Stereochemie an Position 3. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erschien H-3 selbst als Multipllett, jedoch konnten zu H-2 bzw. H-4 unterschiedliche Kopplungskonstanten gefunden werden. Im Falle von Catechin zeigte H-2 bei 4.48 ppm eine große Kopplungskonstante von 7.9 Hz, ebenso H-4<sub>B</sub>, das daneben auch die geminale Kopplung von 16.6 Hz besaß. Dies ist zurückzuführen auf die axial-axiale-Stellung dieser beiden Protonen zu H-3. Steht H-3 im Falle des Epicatechins nun in äquatorial-axialer Stellung zu H-2 und H-4<sub>B</sub> so werden beide Kopplungskonstanten kleiner, so dass im vorliegenden Fall H-2 im Epicatechin nur noch als breites Singulett zu erkennen war.

Die Drehwerte von 0 zeigten, dass es sich um ein quasi-racemisches Gemisch der Enantiomere der jeweiligen Verbindungen handelte. Zusätzlich waren ihre NMR-Daten in

Übereinstimmung mit der Literatur (Davis et al. 1996). Catechin wurde sowohl aus *Vigna angularis* und *Vicia faba* als auch aus den beiden *Phaseolus vulgaris* Arten (var. *nanus* und var. *vulgaris*) isoliert und durch Vergleich mit einem authentischen Standard eindeutig identifiziert.

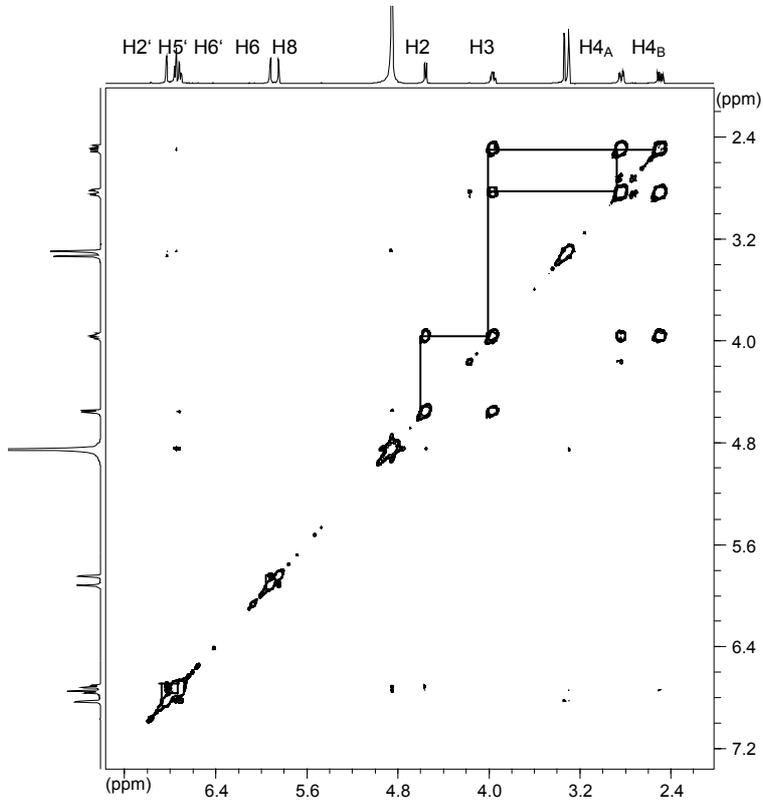


Abb.E55: COSY-Spektrum von Catechin (in CD<sub>3</sub>OD)

**(±) – Catechin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavan)**

Systematischer Name: (2R,3S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3,5,7-triol

Molekulargewicht: 290 g/mol

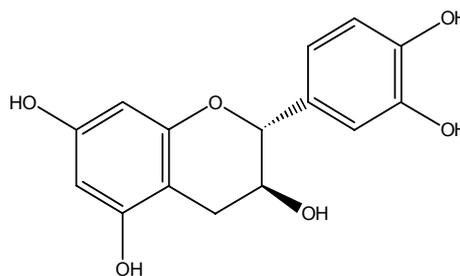
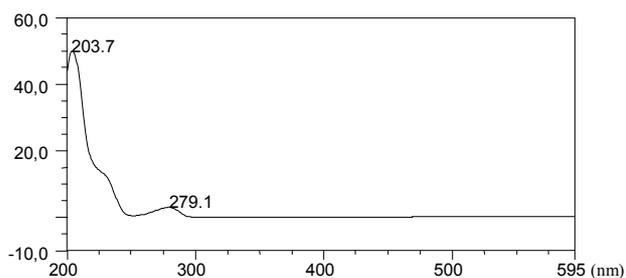
Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P2Eg2RP1 (15.8 mg), P8EgRP30Pr3 (2.5 mg), P8EfPr4 (3.4 mg), P7EfRP2 (33.6 mg), P7EgRP2 (9.5 mg), P5EfPr1 (1mg)

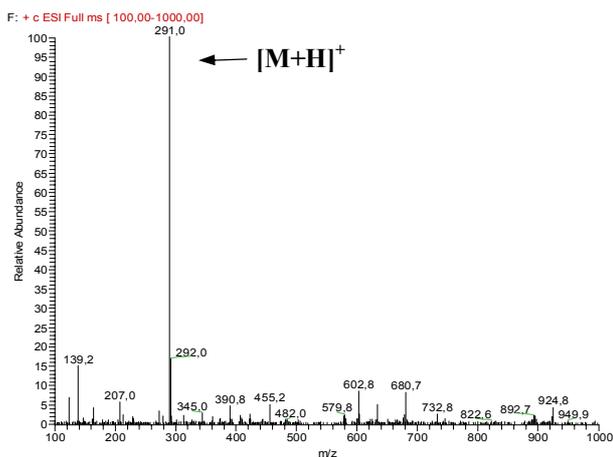
Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : ~ 0

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 13.44 min

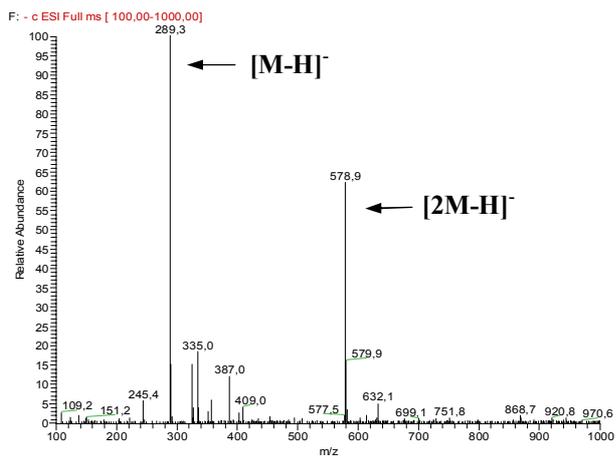
UV – Spektrum



ESI-MS+



ESI-MS-



**(±) – Gallocatechin (3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavan)**

Systematischer Name: (2*RS*,3*SR*)-3,4-Dihydro-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-2*H*-1-benzopyran-3,5,7-triol

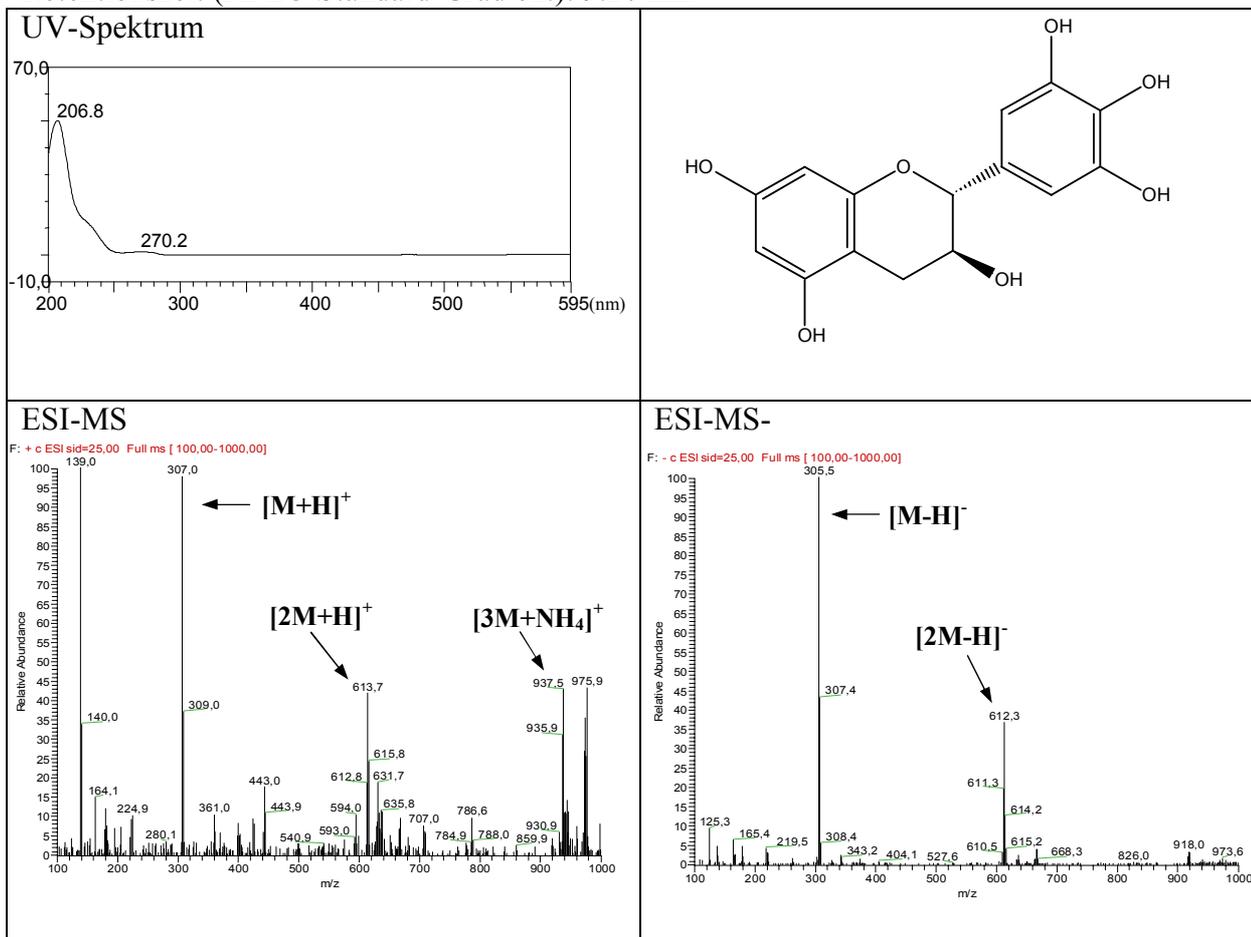
Molekulargewicht: 306 g/mol

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P8EgRP30Pr2 (1.1 mg)

Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: ~ 0

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 9.20 min



**(±) – Epicatechin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavan)**

Systematischer Name: (2R,3R)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3,5,7-triol

Molekulargewicht: 290 g/mol

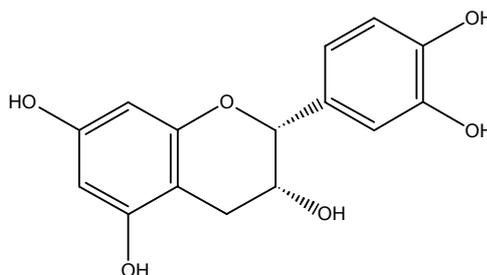
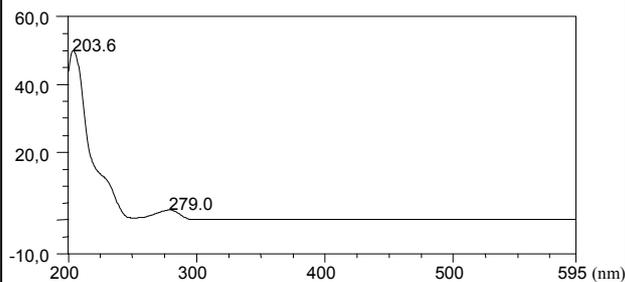
Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5EfPr2 (0.9 mg)

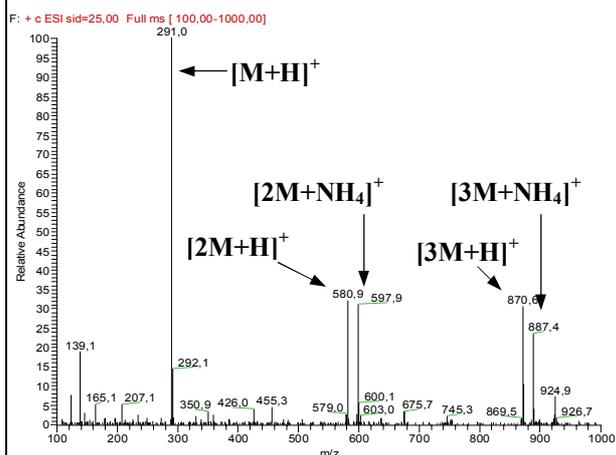
Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: ~ 0

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 15.85 min

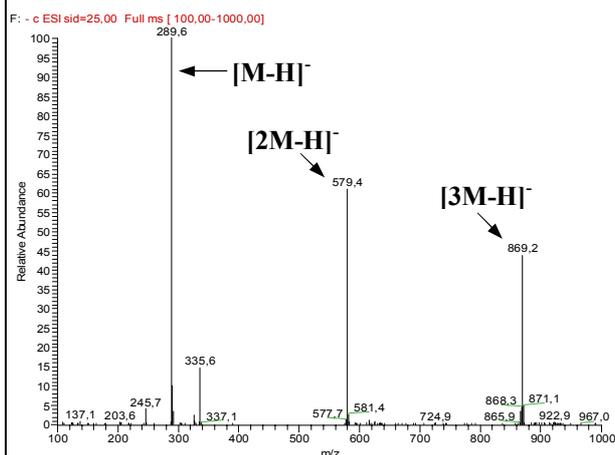
UV – Spektrum



ESI-MS+



ESI-MS-



Tab.E10: NMR-Daten von Catechin, Gallocatechin und Epicatechin

	Catechin			Gallocatechin			Epicatechin		
	$\delta_H^a$ (/Hz)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^b$ (/Hz)	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^b$ (/Hz)	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_C$ HMBC (H→C)
<b>2</b>	4.48 d (7.9)	80.9	3, 4, 8a, 1', 2', 6'	4.52 d (7.6)	82.2	3, 4, 1', 2', 6'	4.81 br s	82.2	3, 4, 1', 2', 6'
<b>3</b>	3.80 m	66.2		3.96 m	68.1	4a	4.17 m	68.1	4a
<b>3-OH</b>	4.85 d (5.1)		2, 3, 4						
<b>4<sub>A/B</sub></b>	2.64 dd (16.1, 5.1)	27.7	2, 3, 4a, 5, 8a	2.80 dd (16.1, 5.0)	27.4	2, 3, 4a, 8a	2.85 dd (16.7, 4.4)	27.4	2, 3, 4a, 8a
	2.34 dd (16.1, 7.9)			2.49 dd (16.1, 7.6)			2.73 dd (16.7, 2.8)		
<b>4a</b>		98.9			100.0			100.0	
<b>5</b>	9.16 br s	155.6			156.6			156.6	
<b>6</b>	5.88 d (2.5)	95.0	4a, 6, 7, 8	5.94 d (2.5)	95.5	4a, 6, 7, 8	5.90 d (2.2)	95.5	4a, 6, 7, 8
<b>7</b>	8.92 br s	156.2			157.1			157.1	
<b>8</b>	5.67 d (2.5)	93.7	4a, 6, 7, 8, 8a	5.87 d (2.5)	94.7	4a, 6, 8, 8a	5.83 d (2.2)	94.7	4a, 6, 8, 8a
<b>8a</b>		155.2			156.0			156.0	
<b>1'</b>		130.5			130.8			130.8	
<b>2'</b>	6.71 d (1.9)	114.4	2, 2', 3', 4', 6'	6.39 s	106.5	2, 1', 2', 3', 4', 6'	6.96 d (1.9)	106.5	2, 1', 2', 3', 4', 6'
<b>3'</b>		144.8			146.0			146.0	
<b>4'</b>		144.8			133.0			133.0	
<b>5'</b>	6.67 d (8.2)	114.7	2, 1', 3', 4', 5'		146.0		6.74 d (8.2)	146.0	
<b>6'</b>	6.58 dd (8.2, 1.9)	118.3	2, 2', 4'	6.39 s	106.5	2, 1', 2', 3', 4', 6'	6.79 dd (8.2, 1.9)	106.5	2, 1', 2', 3', 4', 6'

<sup>a</sup>aufgenommen in DMSO-d<sub>6</sub> <sup>b</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD <sup>c</sup>erhalten aus HMBC Spektrum <sup>d</sup>fett (direkt Korrelation)

**Procyanidin B3/B6**

Bei dieser Verbindung handelt es sich um eine dimere Verbindung des Catechins. Gemäß der Konvention zur Benennung von Catechin-Polymeren werden die Atome der „oberen Einheit“ (upper unit) mit „u“ gekennzeichnet, während die „untere Einheit“ (terminal unit) mit „t“ gekennzeichnet wird. Die Nummerierung der Atome erfolgt analog der des Monomers mit dem jeweiligen Zusatz. Die dimere Struktur wurde in Erwägung gezogen, da im Massenspektrum ein Molekulargewicht von 578 amu ermittelt wurde, das formal dem Zweifachen der Monomere unter Verlust von zwei Protonen entsprach. Es sind mehrere oligomere Strukturen bekannt, die aus zwei Catechin- oder Epicatechineinheiten oder aus je einer Catechin und Epicatechineinheit bestehen, die über eine C-C-Bindung miteinander verknüpft sind. Die Position der Verknüpfung kann ebenfalls variieren.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung erwies sich als sehr komplex, damit konnte es sich nicht um eine symmetrische Verbindung dieses Typs handeln.

Im aromatischen Bereich waren die Signale für das ABC-System des B-Ringes zweifach zu beobachten, so dass eine Verknüpfung an dieser Position ausgeschlossen werden konnte. Unterschiede konnten hingegen bei den Signalen des A-Ringes festgestellt werden. Während für die eine Einheit das Spin-System der beiden meta-koppelnden Protonen des A-Ringes im

**Tab.E11** : NMR-Daten-Vergleich der Probe mit Procyanidin B3

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (P7EfPr1) (JHz)	$\delta_{\text{H}}$ (Literatur*) (JHz)
<b>2u</b>	4.24 d (9.45)	4.30 d (9.2)
<b>2t</b>	4.53 d (7.2)	4.59 d (7.2)
<b>3u</b>	4.34 m	4.42 m
<b>3t</b>	3.78 m	3.82 m
<b>4u</b>	4.40 d (7.9)	4.47 d (7.6)
<b>4t<sub>A/B</sub></b>	2.75 dd (16.4, 5.7) 2.47 dd (16.4, 8.2)	2.79 dd (16.4, 5.6) 2.54 dd (16.4, 8.0)
<b>6u</b>	5.87 d (2.2)	5.93 d (2.4)
<b>6t</b>	6.06 s	6.16 s
<b>8u</b>	5.77 d (2.5)	5.83 d (2.4)
<b>8t</b>		
<b>2'u</b>	6.73 d (1.9)	6.78 d (2.0)
<b>2't</b>	6.57 d (1.9)	6.64 d (2.0)
<b>5'u</b>	6.66 d (8.2)	6.689 d (8.0)
<b>5't</b>	6.66 d (8.2)	6.683 d (8.0)
<b>6'u</b>	6.45 dd (8.2, 1.9)	6.84 dd (8.2, 2.0)
<b>6't</b>	6.24 dd (8.2, 1.9)	6.28 dd (8.2, 2.0)

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD \*(De Bruyne et al. 1996)

mit H-3. Somit lag eine Verknüpfung der beiden Einheiten über C-4 und ein C-Atom des A-Ringes (C-6 oder C-8) vor. Es konnte sich somit um Procyanidin B6 oder B3 handeln.

COSY-Spektrum zu sehen war, konnte für die zweite Einheit nur ein einzelnes Singulett gefunden werden. Die Signale für die Protonen H-2 und H-3 erschienen ebenfalls zweifach, wohingegen bei H-4<sub>A</sub>/4<sub>B</sub> ein Unterschied festzustellen war. Eine Einheit zeigte das gleiche Aufspaltungsmuster, wie es für Catechin bereits oben beschrieben wurde. Für die zweite Einheit bestand das Signal lediglich aus einem einzelnen Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 7.9 Hz. Dabei handelte es sich um die Kopplung des axial-axial-ständigen Protons

In der Literatur (De Bruyne et al. 1996) werden für Procyanidin B3 zwei Rotamere beschrieben, die auf Grund der Drehung um die Interflavan-Bindung zustande kommen. Diese

Signale konnten in unterschiedlichem Verhältnis im NMR-Spektrum neben weiteren Signalen einer Nebenkompente beobachtet werden, so dass die Spektren sehr komplex waren. Bei dem Versuch die Verbindung aufzureinigen, zeigte sich jedoch ein Zerfall, der durch eine Vermehrung der jeweiligen Signalgruppen und weiteren Überlappungen gekennzeichnet war. Ein Vergleich mit Literaturdaten für Procyanidin B3 (De Bruyne et al. 1996) zeigte eine gute Übereinstimmung der chemischen Verschiebung, allerdings konnte keine abschließende Bestätigung der Verknüpfung ( $4\alpha \rightarrow 8$  für Procyanidin B3;  $4\alpha \rightarrow 6$  für Procyanidin B6) mehr vorgenommen werden, da die Substanz nicht mehr zur Verfügung stand.

**Procyanidin B3 (oder B6) (Catechin ( $4\alpha \rightarrow 8$ ) catechin (oder Catechin ( $4\alpha \rightarrow 6$ ) catechin))**

Systematischer Name: 2R,2'R,3S,3'S,4S-3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavan-( $4\alpha \rightarrow 8$  oder  $6$ )-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan

Molekulargewicht: 578 g/mol

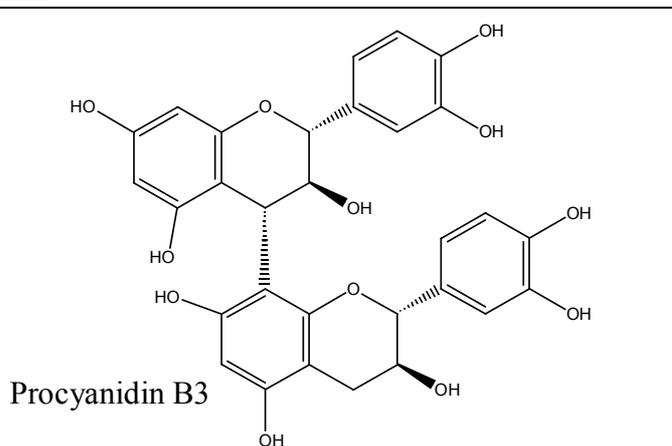
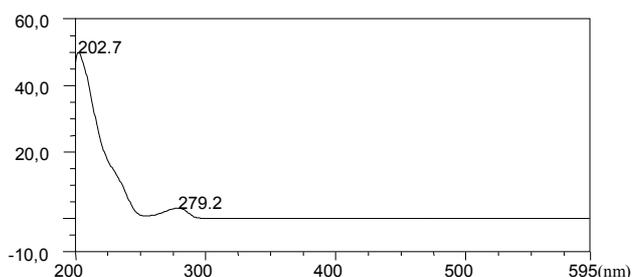
Summenformel:  $C_{30}H_{26}O_{12}$

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P7EfrP1 (4.1 mg), P7EgRP1 (8.0 mg)

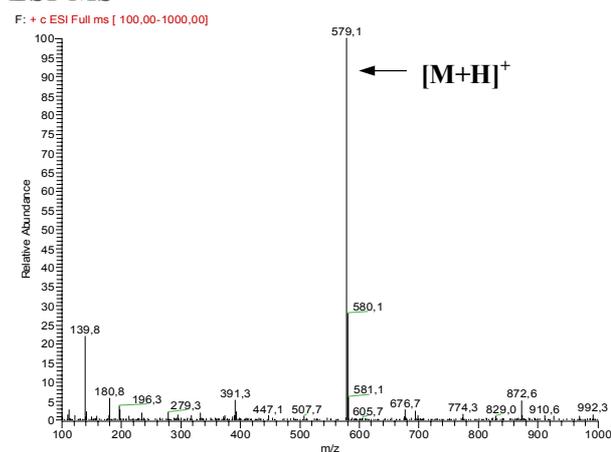
Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : nicht mehr ermittelbar wegen des Zerfalls der Substanz

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 12.06 min

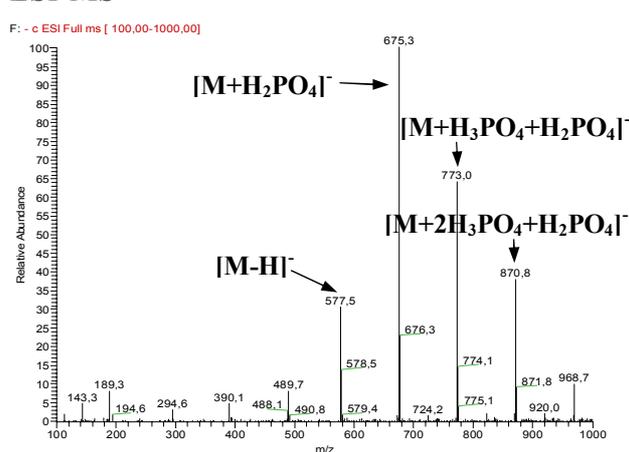
UV – Spektrum



ESI-MS+



ESI-MS-



### 3.5.1.2. Flavone

Die folgenden Verbindungen sind hauptsächlich Derivate des Apigenins, seltener solche des Luteolins. Für einige Verbindungen konnte auf Grund der geringen Ausbeute in den Fraktionen nur ein Strukturvorschlag gemacht werden, da die Aufnahme von zweidimensionalen Spektren eingeschränkt war und eine Auswertung allein der Protonenspektren keinen exakten Nachweis der Struktur zuließ. Eine Zuordnung zu einem Strukturtyp und damit eine Qualifizierung sind jedoch eindeutig möglich.

#### Monoglycoside

##### Vitexin und Isovitexin

Die Flavonoid-Strukturen der Fraktionen, die Vitexin und Isovitexin enthielten, konnten eindeutig mit Hilfe ihrer NMR-Spektren aufgeklärt werden. Beide Verbindungen wiesen UV-Maxima bei 269 nm und 337 nm und ein Molekulargewicht von 432 amu auf. Jedoch war sowohl bei den Retentionszeiten als auch bei der MS-MS-Fragmentierung bei positiver Ionisierung ein Unterschied festzustellen, so dass es sich um zwei unterschiedliche Verbindungen handeln musste.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte in beiden Verbindungen das AA'BB'-System des 1,4-disubstituierten B-Rings beobachtet werden. Dabei erschienen jeweils H-2'/H-6' und H-3'/H-5' als ein komplexes Dublett mit Feinstruktur mit einer Kopplungskonstante von 8.8 Hz, da sie chemisch, jedoch nicht magnetisch äquivalent waren. Diese Kopplungskonstante spiegelte eine ortho-Kopplung von H-2' zu H-3' bzw. H-5' zu H-6' wieder. Ersteres Signal war bei Vitexin schlecht aufgelöst und erschien als breites Singulett.

H-3 konnte ebenso wie H-6 bzw. H-8 jeweils als Singulett detektiert werden, wovon letzteres Signal jeweils eine deutliche Hochfeldverschiebung aufwies. Das anomere Proton bei 4.57 ppm zeigte eine große Kopplungskonstante von 9.8 Hz und wies somit eine axial-axiale Stellung zu H-2'' auf. Die Tatsache, dass sowohl H-2'' (4.03 ppm), H-3'' (3.18 ppm) und H-4'' (3.11 ppm) als Triplets mit großen Kopplungskonstanten (8.8 Hz, 8.5 Hz bzw. 9.1 Hz) erschienen, bewies, dass diese Protonen jeweils axial-axial zueinander standen. H-5'' erschien als Multiplett, während die Protonen H-6<sub>A/B</sub>'' eine große geminale Kopplung und eine kleinere Kopplung zu H-5'' zeigten. Das so beschriebene Aufspaltungsmuster beweist das Vorliegen einer  $\beta$ -D-Glucose.

Eine eindeutige Unterscheidung von Vitexin und Isovitexin war mit Hilfe des HMBC-Spektrums von Isovitexin möglich. Entscheidend für die Zuordnung des Isovitexins zu den beiden vorliegenden Spektrensätzen erwies sich die Korrelation von H-8 (6.49 ppm) zu C-8a (156.2 ppm), wobei selbstverständlich die genaue Zuordnung der C-Atome mit phenolischen Substituenten unabdingbar war. C-5 war eindeutig festgelegt durch Korrelation zur chelatisierten OH-Funktion 5-OH, die im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum als das am weitesten

tieffeldverschobene Signal ( $\delta$  13.54 ppm) erschien. Das anomere Proton der Glucose ( $\delta$  4.57 ppm) zeigte Kreuzsignale zu C-5, C-6 ( $\delta$  108.9 ppm) sowie C-7 ( $\delta$  163.5 ppm), wodurch für das verbleibende phenolische C-Atom 8a nur die bereits erwähnte Zuordnung übrig blieb. Die erhaltenen Daten waren zudem in Übereinstimmung mit der Literatur (Davoust et al. 1980; Hostettmann et al. 1976; Siciliano et al. 2004). Vitexin und Isovitexin wurden im Rahmen dieser Arbeit aus *Vigna radiata* und *Vicia faba* isoliert und erstere zusätzlich durch Vergleich mit einem authentischen Standard identifiziert.

Für die Analyse unbekannter Flavonoide war wichtig, dass im Falle von Vitexin bzw. Isovitexin mit Hilfe von ESI-MS/MS das Vorliegen von C-Glycosylen eindeutig nachgewiesen werden konnte. Als diagnostisch erwiesen sich hierbei Massenverluste von 90 und 120 amu, die aus einer Fragmentierung von C-C- und C-O-Bindungen innerhalb der glycosylisch gebundenen Hexose resultieren. Konventionell werden solche Fragmente als sog. X-Fragmente bezeichnet, speziell im vorliegenden Fall  $^{0,1}X_i$  (Verlust von 120 amu) sowie  $^{0,2}X_i$  (Verlust von 90 amu) (Cavaliere et al. 2005). Die entsprechenden Fragmentierungsmuster sind in Abb.E56 dargestellt.

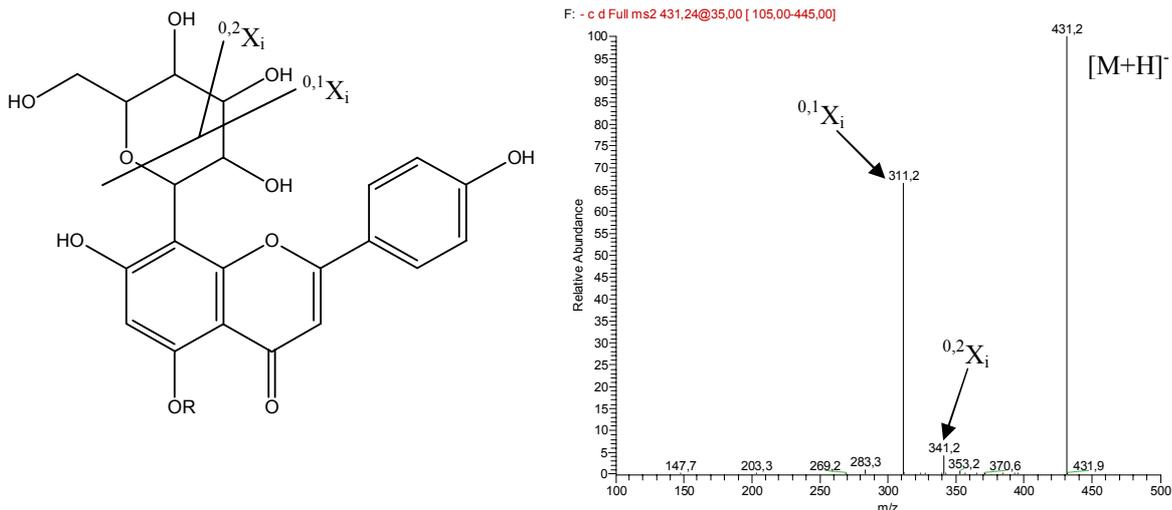


Abb.E56: MS-Fragmentierung der C-Glycosyle

Im weiteren Verlauf der Arbeit erwies sich außerdem die genaue Zuordnung der Position eines C-glycosylisch gebundenen Zuckers an Position 6 bzw. 8 als essentiell. Da für Vitexin und Isovitexin ein entsprechendes Isomerenpaar vorlag, konnten anhand dieses Beispiels zwei wichtige Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden. Einerseits zeigte H-8 (6.49 ppm im Falle von Isovitexin) im Vergleich zu H-6 (6.25 ppm im Falle von Vitexin) jeweils eine deutliche Tieffeldverschiebung, wenn sich an der jeweils anderen Position ein C-glycosylisch gebundener Zuckerrest befindet. Zum anderen zeigte auch das anomere Proton eines an C-8 gebundenen Zuckers jeweils eine merkbare Tieffeldverschiebung (H-1'' Vitexin 5.03 ppm) im Vergleich zum entsprechenden 6 substituierten Isomer (H-1'' Isovitexin 4.57 ppm). Eine entsprechende Tendenz konnte auch für Schaftosid /Isoschaftosid beobachtet werden.

**Vitexin (Apigenin-8C-glucosid)**

Systematischer Name: 8-β-D-Glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 432 g/mol

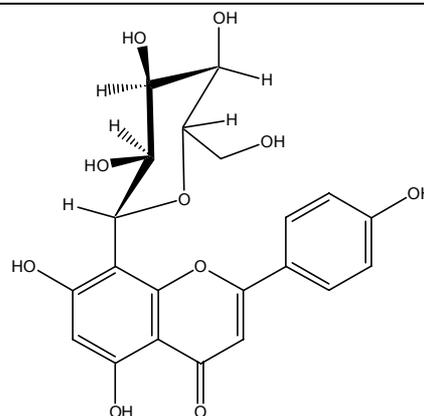
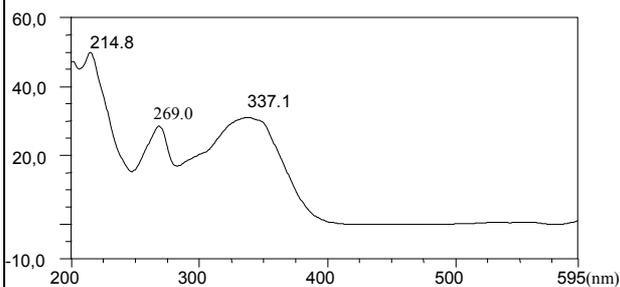
Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5EePr3 (1.1 mg), (P1G, Nebenverbindung)

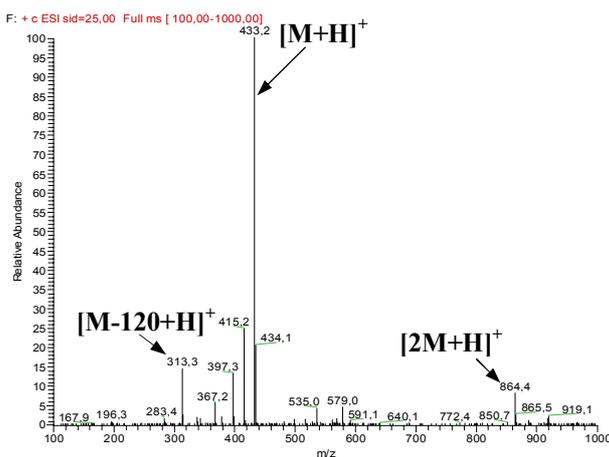
Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: 7.7 (c= 0.15 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 19.15 min

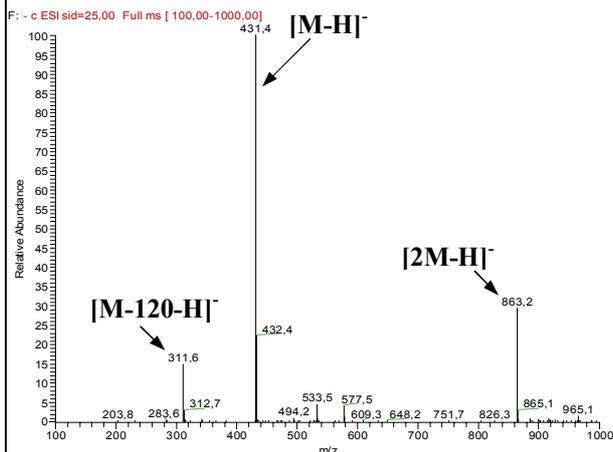
UV-Spektrum



ESI-MS+



ESI-MS-



**Isovitexin (Apigenin-6C-glucosid)**

Systematischer Name: 6-β-D-Glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 432 g/mol

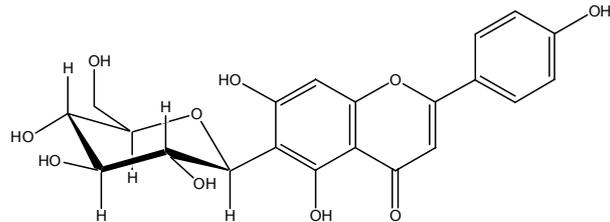
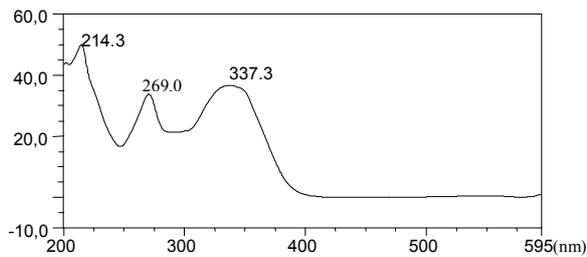
Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5EePr4 (1.6 mg), P1G (148 mg)

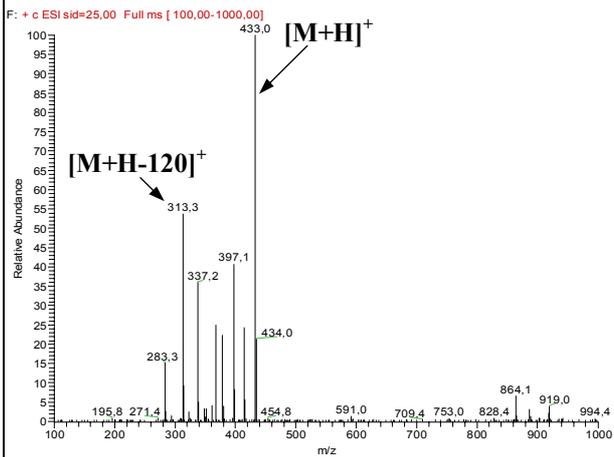
Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: 13 (c= 0.61 EtOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 20.35 min

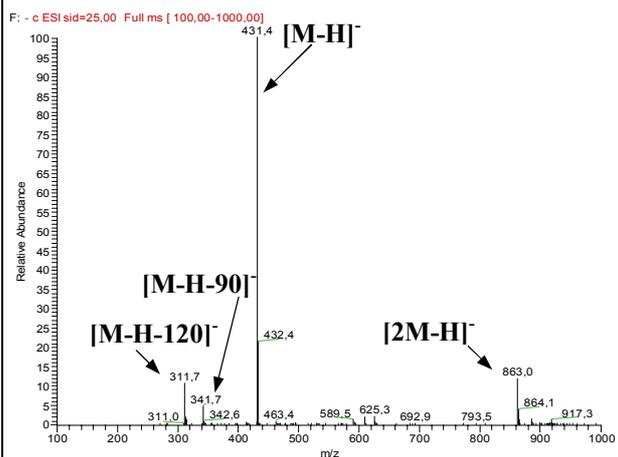
UV – Spektrum



ESI-MS+



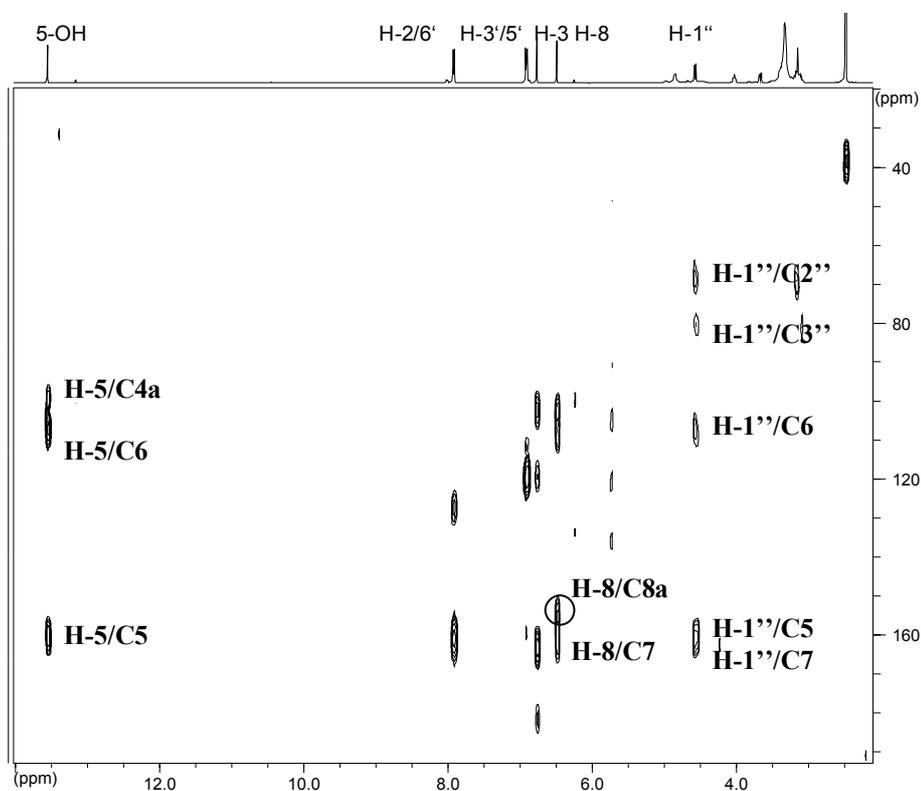
ESI-MS-



Tab.E12: NMR-Daten Vitexin und Isovitexin

	Isovitexin			Vitexin
	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^b$ (JHz)
<b>2</b>		163.5		
<b>3</b>	6.77 s	102.8	2, 4, 4a, 1'	6.5 s
<b>4</b>		182.0		
<b>4a</b>		103.4		
<b>5-OH</b>	13.54 s	160.7	4a, 5, 6	
<b>6</b>		108.9		6.25 s
<b>7-OH</b>		163.5		
<b>8</b>	6.49 s	93.7	4a, 6, 7, 8a	
<b>8a</b>		156.2		
<b>1'</b>		121.1		
<b>2'/6'</b>	7.92 d (8.8)	128.5	<b>2', 4', 6'</b>	7.92 br s
<b>3'/5'</b>	6.92 d (8.8)	116.0	<b>1', 3', 4', 5'</b>	6.90 d (8.8)
<b>4'</b>		161.2		
<b>1''</b>	4.57 d (9.8)	73.1	5, 6, 7, 2'', 3''	5.03 d (9.5)
<b>2''</b>	4.03 t (8.8)	70.2		n.d.
<b>3''</b>	3.18 t (8.5)	81.6		3.62 t (9.8)
<b>4''</b>	3.11 t (9.1)	70.6	3''	3.50 t (9.1)
<b>5''</b>	3.15 m	78.0	4''	3.47 m
<b>6''<sub>A/B</sub></b>	3.67 br d (11.1) 3.40 dd (11.1,6.0)	61.5		3.91 br d (11.1) 3.77 dd (11.1,5.7)

<sup>a</sup>aufgenommen in DMSO-d<sub>6</sub> <sup>b</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD <sup>c</sup>erhalten aus HMBC-Spektrum  
fett (Direktkorrelation) n.d. nicht detektiert

Abb.E57: HMBC-Spektrum von Isovitexin (in DMSO-d<sub>6</sub>)

## Diglycoside

Die nachfolgenden Verbindungen konnten aus *Vicia faba* und *Cucumis sativus* isoliert werden. Das Aglykon Apigenin ist in diesen Verbindungen mit Hexosen und Pentosen über C-C-Bindungen derivatisiert. Die Stellung und die Art der Zucker konnte nicht immer vollständig aufgeklärt werden.

### **Apigenindiglycoside aus *Vicia faba***

Aus dem ethanolischen Extrakt konnten über semipräparative HPLC vier Peaks mit unterschiedlichen Retentionszeiten isoliert werden. Die Untersuchung per LC-MS ergab in drei Fällen 564 und einmal 594 amu als Molekulargewicht. Anhand des Vergleichs der UV-Spektren ( $\lambda_{\max}$  =270-274 nm und 334-337 nm) konnte geschlossen werden, dass es sich bei allen Verbindungen um Apigenin-Derivate handelte.

### **Apigenin-6C-glucosyl-8C-arabinosid**

Für die Verbindung P5BdPr4 konnte per LC-MS ein Molekulargewicht von 564 amu ermittelt werden. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum war das AA'BB'-System des B-Ringes sowie ein Singulett

**Tab.E13:** NMR-Daten Vergleich der Probe mit Neoschaftosid

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (P5BdPr4) (JHz)	$\delta_{\text{H}}$ (Literatur*) (JHz)
<b>3</b>	6.61 s	6.77 s
<b>2'/6'</b>	7.94 d (8.8)	7.97 d (8.8)
<b>3'/5'</b>	6.91 d (8.8)	6.90 d (8.8)
<b>1''</b>	5.69 br s	5.51 br s
<b>2''</b>	3.94 br d (3.8)	3.78 m
<b>3''</b>	4.06 dd (4.4, 3.2)	3.88 m
<b>4''</b>	4.17 m	4.01 m
<b>5''<sub>A/B</sub></b>	3.88 dd (12.0, 5.7) 3.70 dd (12.0, 5.0)	3.74 m 3.64 m
<b>1'''</b>	4.85 d (9.5)	4.61 d (9.8)
<b>2'''</b>	4.39 t (9.5)	4.12 m
<b>3'''</b>	3.47 t (8.8)	3.20 m
<b>4'''</b>	3.38 m	3.11 m
<b>5'''</b>	3.44 m	3.15 m
<b>6'''<sub>A/B</sub></b>	4.08 m 3.83 dd (12.0, 2.5)	3.68 m 3.40 m

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD \* (Xie et al. 2003)

bei 6.61 ppm (H-3) zu beobachten, woraus sich das Aglykon als Apigenin-Derivat ableiten ließ.

Bei negativer Ionisierung konnte eine Abspaltung von 90 bzw. 120 amu beobachtet werden, woraus sich gemäß den für Vitexin und Isovitexin erläuterten massenspektrometrischen Fragmentierungsmustern schlussfolgern ließ, dass die vorliegende Verbindung eine C-glycosylisch gebundene Hexose enthalten musste.

Der Vergleich mit dem Molekulargewicht ergäbe für den zweiten Zucker formal die Notwendigkeit einer Desoxypentose. Da Verbindungen mit einem solchen Zucker bisher in der Natur so gut wie gar nicht beschrieben wurden, wäre eine C-glycosylisch gebundene Pentose wesentlich wahrscheinlicher. Als mögliche Verknüpfungspunkte für beide erschienen C-6 bzw. C-8 als die mit Abstand

wahrscheinlichste Alternative. Mit diesen Informationen -Molekulargewicht, Apigenin als Aglykon sowie zwei C-glycosylische Zucker- wurde eine Datenbanksuche, die als mögliche

Treffer Schaftosid, Neoschaftosid und Isoschaftosid sowie weitere Isomere lieferte, durchgeführt.

Die Interpretation des COSY-Spektrums ermöglichte, ausgehend von den beiden anomeren Protonen, eine komplette Zuordnung aller Signale für beide Zucker. Die Analyse der Kopplungskonstanten (H-1''' als Dublett, H-2''' und H-3''' jeweils als Triplet, *J* jeweils 8-9 Hz) ergab, dass es sich bei dem an C-6 gebundenen Zucker um Glucose handeln musste, da die entsprechenden Protonen jeweils eine axial-axiale Stellung zueinander aufweisen. Für den zweiten C-glycosylisch gebundenen Zucker ergab ein Vergleich mit den zu erwartenden Kopplungsmustern für Ribose, Xylose, Lyxose und Arabinose, dass es sich um letztere, in der Furanoseform, handelte. In der Literatur wurde eine analoge Verbindung als Neoschaftosid beschrieben (Xie et al. 2003), während in diesem Fall die Arabinose in der Pyranoseform vorlag. Die erarbeiteten Daten erlauben jedoch keine abschließende Strukturaufklärung der Verbindung. Anhand der ausführlich diskutierten Gesichtspunkte ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der Verbindung P5BdPr4 um Apigenin-6C-β-D-glucopyranosyl-8C-β-L-arabinofuranosid handelt.

### Apigenin-6C-glucosyl-8C-arabinosid

Systematischer Name: 8-β-L-Arabinofuranosyl-6-β-D-glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 564 g/mol

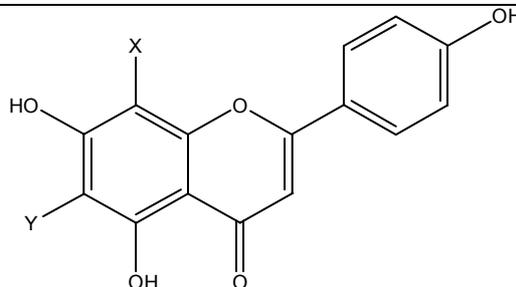
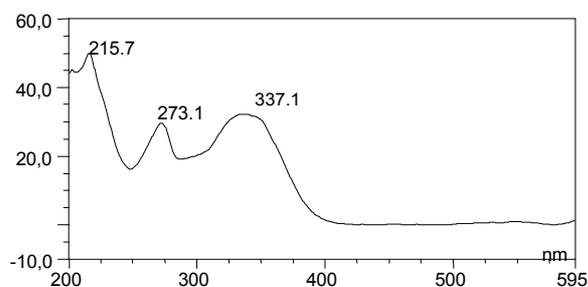
Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5BdPr4 (0.5 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : -20.5 (c=0.04 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 19.9 min

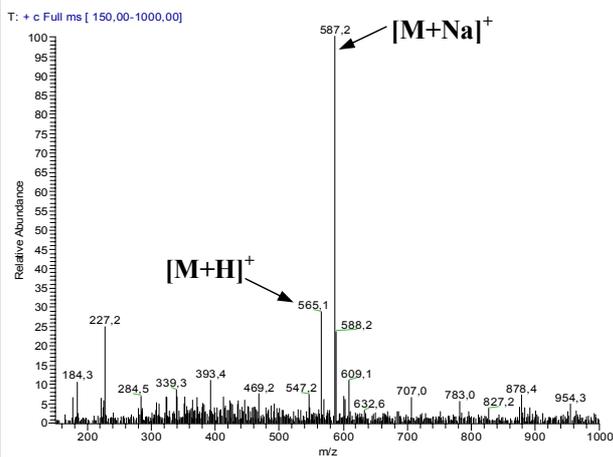
#### UV – Spektrum (nm)



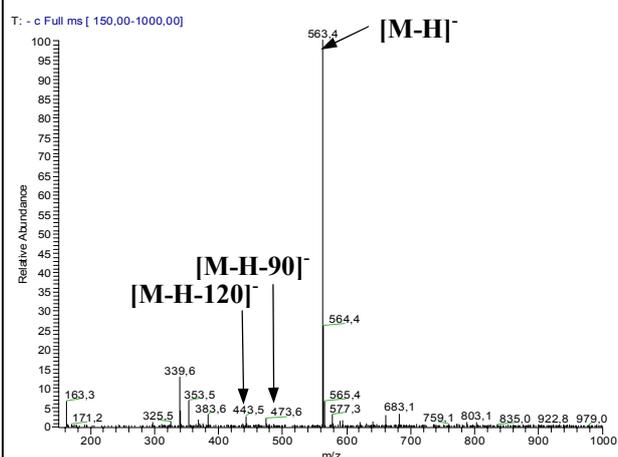
X=X' = β-L-arabinose

Y=Y'' = β-D-glucopyranose

#### ESI-MS+



#### ESI-MS-



## Isoschaftosid

Für die zweite Verbindung P5MW564A konnte ebenfalls ein Molekulargewicht von 564 amu ermittelt werden. In diesem Fall waren auch Ionen zu beobachten, die jeweils ein Vielfaches von 98 größer als das eigentliche Molekulargewicht ausfielen. Diese Fragmente bei negativer Ionisierung stellten Addukte des Moleküliions mit Phosphorsäure dar, wobei letztere als Verunreinigung im Lösungsmittelgemisch zu finden war.

Die Verbindung selbst zeigte im Massenspektrum ebenfalls eine Abspaltung von 120 bzw. 90 amu. Auf Grund der großen Ähnlichkeit in den spektralen Daten wurde geschlossen, dass

**Tab.E14:** NMR-Daten-Vergleich der Probe mit auch diese Verbindung zwei glycosylisch Isoschaftosid

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (P5MW564A) (JHz)	$\delta_{\text{H}}$ (Literatur) (JHz)
	PP5MW564A	Isoschaftosid
<b>3</b>	6.59 s	6.66 br s
<b>5OH</b>	-	13.64 s
<b>2'/6'</b>	7.99 d (7.3)	7.97 d (8.4)
<b>3'/5'</b>	6.92 d (8.8)	6.89 d (9.4)
<b>Gluc1''</b>	5.05 d (10.1)	4.81 d (9.9)
<b>2''</b>	4.08 br t (9.5)	3.89 m
<b>3''</b>	3.53 t (8.5)	3.30 m
<b>4''</b>	3.63 m	3.36 m
<b>5''</b>	3.47 m	3.27 m
<b>6''<sub>A/B</sub></b>	3.94 br d (12.5) 3.77 dd (12.5, 5.4)	3.74 m 3.52 m
<b>Arab1'''</b>	4.85 d (9.8)	4.62 d (9.4)
<b>2'''</b>	4.08 br t (9.5)	4.00 m
<b>3'''</b>	3.63 d (7.6)	3.42 m
<b>4'''</b>	3.93 m	3.77 m
<b>5'''<sub>A/B</sub></b>	4.02 br d (12.8) 3.73 br d (12.8)	3.79 m 3.57 m

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD

gebundene Zucker enthielt, bei denen es sich wieder um ein Pentose und eine Hexose handelte.

Zusammen mit dem COSY-Spektrum und der Analyse der Kopplungskonstanten konnte einer der Zucker wie oben beschrieben als  $\beta$ -D-Glucose identifiziert werden. Auf Grund der im Falle von Vitexin und Isovitexin ermittelten Gesetzmäßigkeit für anomere Protonen an den Positionen 6 bzw. 8 ergab sich, dass die Glucose an Position 8 mit dem Flavonoid verknüpft war. Die Identifizierung des zweiten Zuckers erwies sich zunächst als schwierig, da sich das entsprechende anomere Proton unter dem Wassersignal verbarg. Eine Aufnahme des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums bei einer Temperatur von 60° C

ermöglichte es, beide Signale zu trennen. Die nun zu erkennende große Kopplungskonstante von ~10 Hz sowie die Analyse der Kopplungsmuster für die übrigen Protonen sprach für das Vorliegen einer  $\alpha$ -L-Arabinopyranose, so dass es sich bei der Verbindung um Isoschaftosid handelte. Die angegebenen chemischen Verschiebungen waren außerdem in Übereinstimmung mit der Literatur (Xie et al. 2003).

**Isoschaftosid (Apigenin-6C-arabinosyl-8C-glucosid)**

Systematischer Name: 6- $\alpha$ -L-Arabinopyranosyl-8- $\beta$ -D-glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 564 g/mol

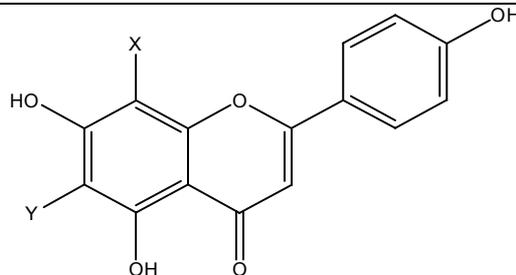
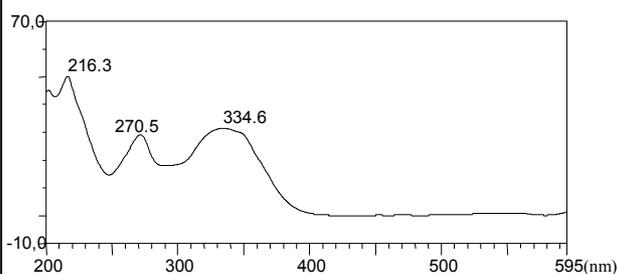
Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5MW564A (4.4 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : 18.05 (c=0,36 MeOH)

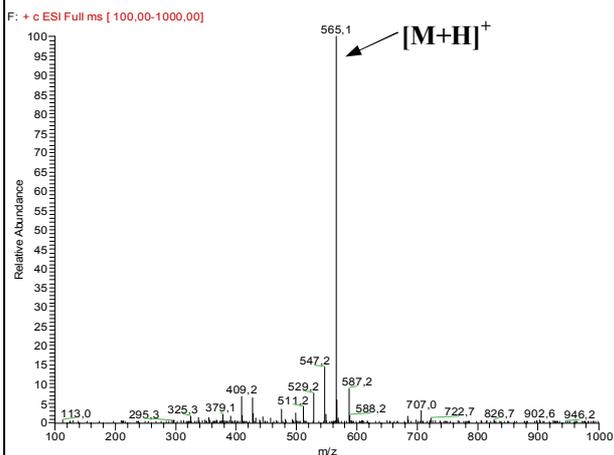
Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 18.1 min

UV-Spektrum

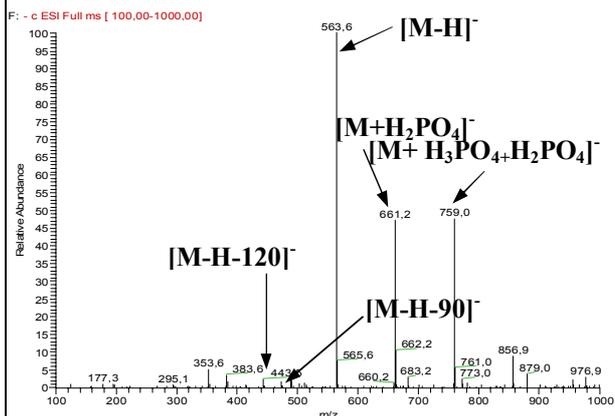


X=  $\beta$ -D-Glucopyranose,  
Y=  $\alpha$ -L-Arabinopyranose

ESI-MS+



ESI-MS-



**P5MW564B (Apigenin-6C-xylosyl-8C-galactosid)**

Das dritte Molekül P5MW564B mit einer Molekülmasse von 564 amu zeigte wiederum bei negativer Ionisierung Fragmentabspaltungen von 90 und 120 amu. Daher musste auch diese Verbindung eine C-glycosylisch gebundene Hexose enthalten, so dass auch in diesem Fall in analoger Weise zu den bereits vorher diskutierten Verbindungen nur eine C-glycosylisch gebundene Pentose als zweiter Zucker in Frage kam.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte erneut das AA'BB'-System und ein einzelnes Singulett bei 6.52 ppm (H-3) beobachtet werden, das auf ein Apigenin-Derivat als Aglykon hindeutete.

**Tab.E15:** NMR-Daten für P5MW564B

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)
<b>3</b>	6.55 s
<b>2'/6'</b>	8.02 d (br s)
<b>3'/5'</b>	6.90 d (8.5)
<b>1''</b>	4.97 d (9.8)
<b>2''</b>	4.40 br s
<b>3''</b>	3.66 dd (9.2, 3.0)
<b>4''</b>	4.00 br s
<b>5''</b>	3.74 m
<b>6''<sub>A/B</sub></b>	3.84 m 3.76 m
<b>1'''</b>	4.90 d (7.6)
<b>2'''</b>	4.22 br s
<b>3'''</b>	3.53 t (9.3)
<b>4'''</b>	3.38 m
<b>5'''<sub>A/B</sub></b>	3.76 m 4.05 br d (12.3)

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD

Die Signale für die Hexose zeigten allerdings ein von den bisherigen Verbindungen abweichendes Aufspaltungsmuster. Anstelle von Triplets für H-3'' bzw. für H-4'' mit Kopplungskonstanten von jeweils 8 - 9 Hz erschien ein Dublett vom Dublett (9.2, 3.0 Hz) bzw. ein breites Singulett. Dies wies darauf hin, dass H-3'' axial und H-4'' äquatorial standen und es sich somit um eine Galactose handeln musste. Für den zweiten Zucker war wegen Signalüberlappungen eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, wobei die Analyse der Kopplungsmuster der detektierbaren Signale Xylose als die wahrscheinlichste Alternative erscheinen ließ. Allerdings ergab auch ein Vergleich mit Literaturdaten für Flavonoidxyloside keinen weiteren Aufschluss, da es sich durchweg um Publikationen handelte, bei denen die Signale für Protonen H-2 - H-5 wenn überhaupt lediglich als Multipletts berichtet wurden. Das anomere Proton der Galactose war im Vergleich zu dem der Pentose tieffeldverschoben, so dass erstere sich an Position 8 befinden musste. Die Verbindung P5MW564B wurde mit großer Wahrscheinlichkeit als Apigenin-6C-xylosyl-8C-galactosid identifiziert.

**P5MW564B (Apigenin-6C-xylosyl-8C-galactosid)**

Molekulargewicht: 564 g/mol

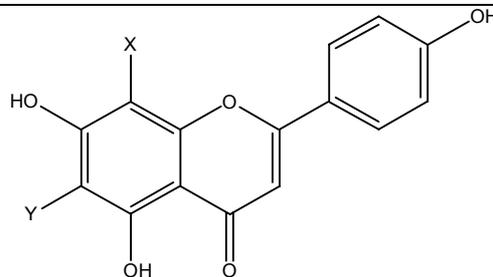
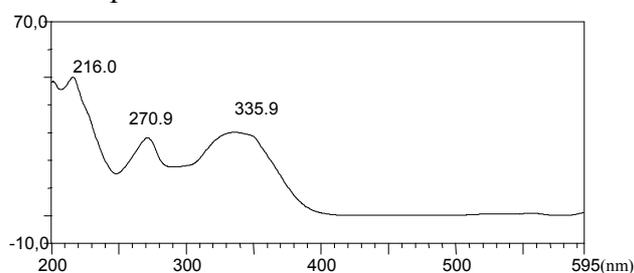
Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5MW564B (2.3 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : 15.0 (c=0,26 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 18.6 min

UV – Spektrum

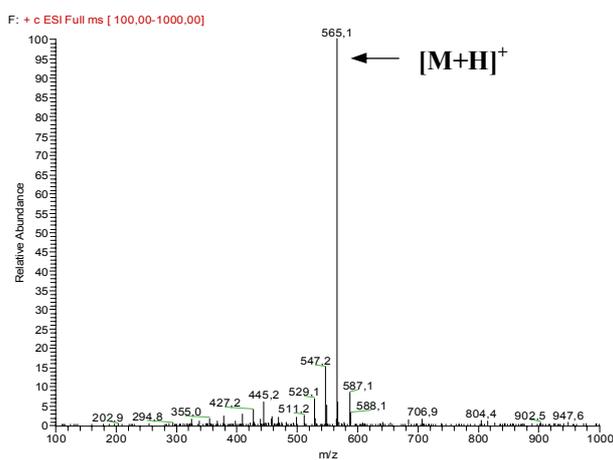


X=X'' =  $\beta$ -D-Galactopyranose

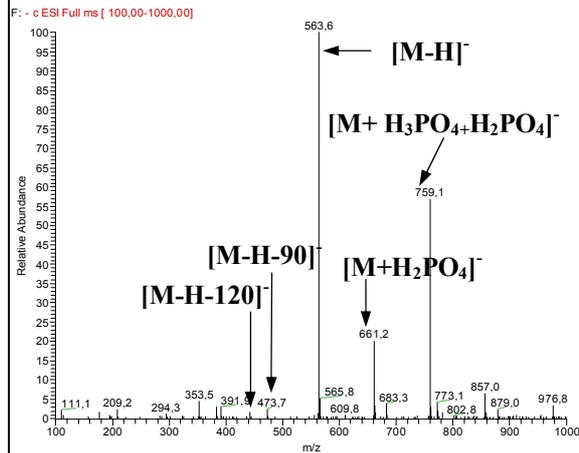
Y=Y''' = Xylose

(Strukturvorschlag)

ESI-MS+



ESI-MS-



**P5MW594 (Apigenin-6,8 C -dihexosid)**

Das letzte Diglycosid P5MW594, das aus *Vicia faba* isoliert werden konnte, zeigte im Massenspektrum eine sukzessive Abspaltung von zwei Fragmenten der Masse 120 amu, so dass in diesem Fall zwei Hexosen C-glycosylisch gebunden sein mussten. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum konnten lediglich die Signale des Aglykons (H-3, 5-OH, H-2'/6' und H-3'/5') zugeordnet werden, wohingegen beide anomeren Protonen nicht beobachtet werden konnten. Dies könnte darin begründet liegen, dass beide vom Wassersignal verdeckt wurden. Das ESI-Fragmentmuster des Moleküls entsprach jedoch dem eines Apigenin-6,8-di-C-hexosids, beispielsweise dem in der Literatur beschriebenen Vicenin-2 (=6,8-Di-C-β-D-glucopyranosyl-apigenin) (Caristi et al. 2003).

**Tab.E16:** NMR-Daten-Vergleich der Probe mit Vicenin-2

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (P5MW594) (JHz)	$\delta_{\text{H}}$ (Literatur) (JHz)
	P5MW594	Vicenin-2
<b>3</b>	6.50 s	6,41 s
<b>5-OH</b>	13.69 s	13,68 s
<b>2'/6'</b>	7.85 d (8.2)	7,90 d (8.7)
<b>3'/5'</b>	6.85 d (8.5)	6,85 d (8.7)
<b>1''</b>	n.d.	4,82 d (9.6)
<b>1'''</b>	n.d.	4,62 d (9.8)

<sup>a</sup>aufgenommen in DMSO-d<sub>6</sub>, n.d.nicht detektierbar  
Literatur: Caristi et al. 2003

**P5MW594 (Apigenin-6,8C-dihexosid)**

Molekulargewicht: 594 g/mol

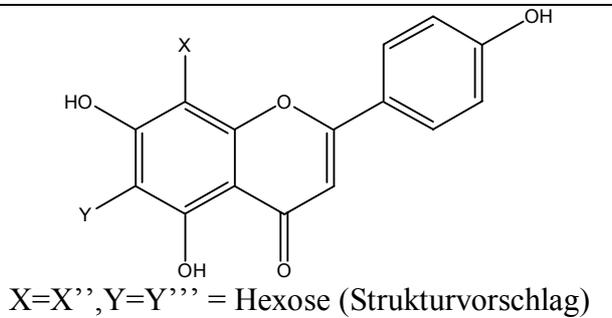
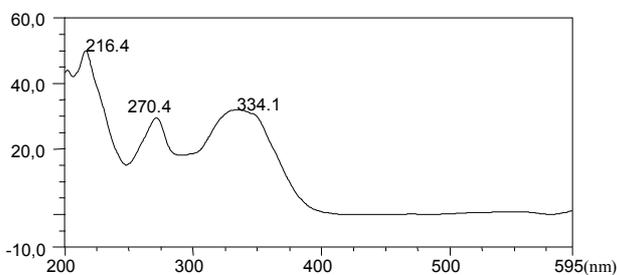
Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5MW594 (2.3 mg)

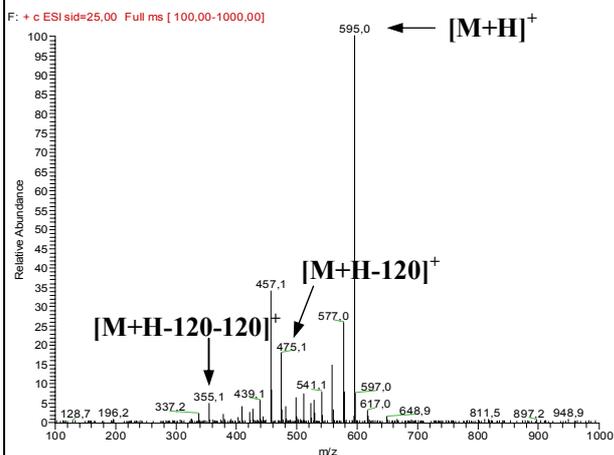
Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : 1.7 (c=0.25 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 17.1 min

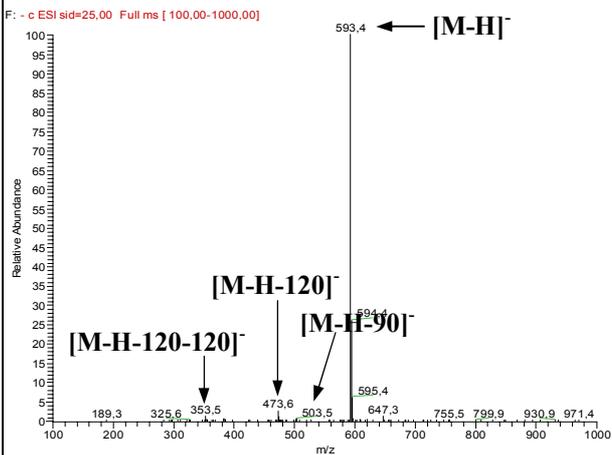
UV – Spektrum



ESI-MS+



ESI-MS-



Apigenindiglycoside aus *Cucumis sativus***GD2WHLPr1 (Apigenin-6C-dihexosid)**

Aus *Cucumis sativus* konnte ein Diglycosid des Apigenins isoliert werden. Das Massenspektrum lieferte ein Molekulargewicht von 594 amu, von dem ausgehend die Abspaltung von 162 amu und 120 amu zu beobachten war. Dies wies auf das Vorhandensein von zwei Hexosen hin, von denen die eine O-glycosidisch und die andere C-glycosylisch gebunden war. Diese Interpretation wurde dadurch bestätigt, dass im aromatischen Bereich des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums insgesamt zwei Singulets für die drei möglichen Positionen H-3, H-6 und H-8 beobachtet wurden, deren genaue Zuordnung jedoch nicht möglich war.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten die Signale für das AA'BB'-System des B-Ringes beobachtet werden, deren chemische Verschiebung im Vergleich mit Isovitexin/Vitexin und nachfolgenden 4'-glycosylierten Verbindungen den ersteren entsprach, so dass beide Zucker am A-Ring verknüpft waren.

Eine Substitution der O-glycosidischen Hexose an Position 5-OH bzw. 7-OH konnte jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden, da in diesem Fall eine chemische Verschiebung für das zugehörige anomere Proton im Bereich von 5.0 ppm zu erwarten wäre. Somit blieb als letzte Möglichkeit eine direkte Verknüpfung des O-glycosidischen mit dem C-glycosylischen Zucker. Diese Überlegung wiederum erlaubte die Zuordnung des Signals bei 4.41 ppm zu H-3, da nur im Falle einer 7-O-Glycosidierung H-6 bzw. H-8 tieffeld von H-3 erscheinen würden. Leider ließ die zur Verfügung stehende Substanzmenge keine weitergehenden, d.h. 2D-NMR Untersuchungen zu. Jedoch erlauben die bereits vorliegenden Daten den Schluss, dass es sich bei Verbindung GD2WHLPr1 um ein Apigenin-6 oder -8C-glycosid handelt, das an der C-glycosylisch gebundenen Hexose eine weitere O-glycosidische trägt. Auch ein Vergleich mit den Literaturdaten von Flavosativasid, einem Vitexin-2''-O- $\beta$ -D-Glucopyranosid, ließ keine eindeutige Zuordnung für H-6 bzw. H-8 zu (Tomczyk et al. 2002).

**Tab.E17:** NMR-Daten für GD2WHLPr1

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)
<b>3</b>	6.41 s
<b>8</b>	6.20 br s
<b>2'/6'</b>	7.78 d (8.8)
<b>3'/5'</b>	6.87 d (8.8)
<b>1''</b>	4.89
<b>1'''</b>	4.39 d (7.6)

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD

**GD2WHLPr1 (Apigenin-6C-dihexosid)**

Molekulargewicht: 594 g/mol

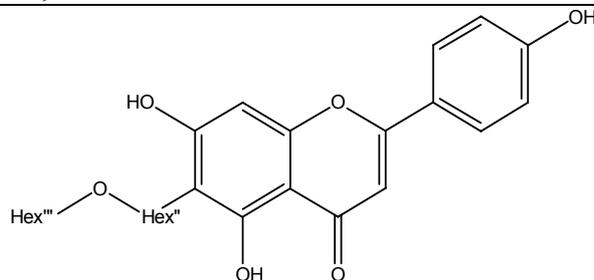
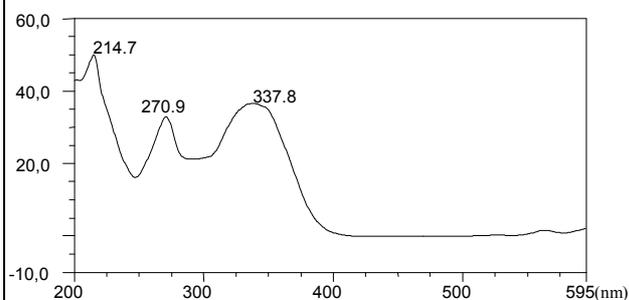
Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): GD2WHLPr1 (1 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : -10.6 (c= 0.04 MeOH)

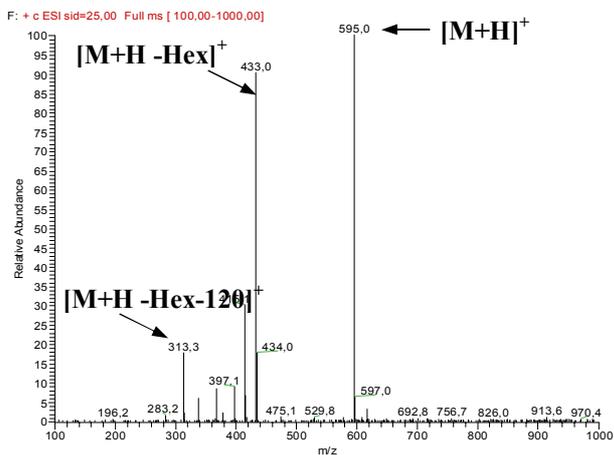
Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient-semi): 12,08min

UV – Spektrum

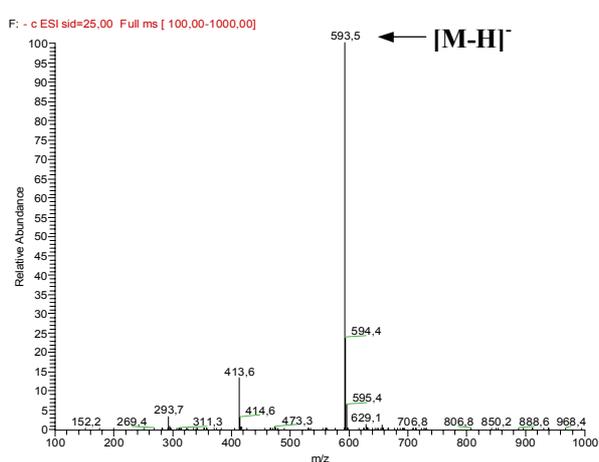


Hex=Hexose (Strukturvorschlag)

ESI-MS+



ESI-MS-



## Triglycoside

### Apigenintriglycoside aus *Cucumis sativus*

#### GD2WHHPr1 und -Pr2 (Apigenin- und Chrysoeriol-4'-O-6C-X-trihexosid)

Aus *Cucumis sativus* konnten neben dem eben beschriebenen Diglycosid auch Triglycoside isoliert werden. Die beiden letzteren unterschieden sich von GD2WHLPr1 durch einen Unterschied von 162 und 192 (162+30) im Molekulargewicht. Die beiden Verbindungen konnten in geringer Menge als Reinsubstanzen erhalten werden, zur Analyse mittels NMR stand jedoch nur ein Substanzgemisch zur Verfügung.

Da in den NMR-Spektren für die insgesamt sechs anomeren Protonen der beiden Triglycoside lediglich drei getrennte Signale zu beobachten waren, muss angenommen werden, dass es auf Grund der starken strukturellen Übereinstimmung zu Überlagerungen der Signale kam. Die genaue Analyse beider erhaltenen NMR-Spektren ergab, dass sich beide Verbindungen offensichtlich lediglich im Substitutionsmuster des B-Ringes unterschieden. In einem Fall lag eine 4'-Hydroxy-, im anderen Fall eine 4'-Hydroxy-3'-Methoxy-Substitution vor. Letztere konnte durch ein nOe zwischen der Methoxyfunktion und H-2' festgelegt werden.

Die UV-Spektren beider Verbindungen wiesen jeweils hypsochrome Verschiebungen der 1. Bande gegenüber der des Apigenins bzw. des Luteolins auf. Dies kann dadurch zustande kommen, dass Position 4' derivatisiert vorliegt (Mabry et al. 1970). Für beide Verbindungen konnte im ROESY-Spektrum jeweils eine Korrelation zwischen dem anomeren Proton einer O-glycosidisch gebundenen Hexose und H-3'/5' bzw. H-5' gefunden werden.

Eine zweite C-glycosylisch gebundene Hexose konnte für beide Verbindungen an Position 6 lokalisiert werden. Dies ergibt sich einerseits aus den charakteristischen chemischen Verschiebungen für H-1''' und H-2''' wie sie bereits mehrfach diskutiert wurden. Zudem waren HMBC-Korrelationen zu zwei phenolische Sauerstofffunktionen tragenden C-Atomen im Bereich von 160 ppm zu beobachten. Die Positionierung des C-Glycosyls an C-6 bzw. C-8 konnte jedoch nur mit Hilfe eines Vergleichs mit Literaturdaten bewerkstelligt werden. Für Vitexin- bzw. Orientin-Derivate wurden chemische Verschiebungen von 98-99 ppm für C-6 und 103-104 ppm für C-8 berichtet, während die entsprechenden Werte für Isovitexin- bzw. Isoorientin-Derivate bei 107-109 ppm und 93-94 ppm lagen (Kim, Jin Hwa et al. 2005; Kumarasamy et al. 2004; Ohkawa et al. 1998; Zou et al. 2005). Für die vorliegenden Verbindungen wurde ein Wert von 106 bzw. 109.0 ppm beobachtet, so dass es sich um C-6-Glycosyle handeln sollte. Die Positionierung des dritten Zucker ließ sich nicht eindeutig ermitteln, da die entsprechenden anomeren Protonen keine HMBC-Korrelationen zeigten. Jedoch spricht die Analyse der Massenspektren (Verlust von 162, gefolgt von 120 amu, sowie Verlust von 162 gefolgt von 162 und 120 amu) dafür, dass sich die dritte O-glycosidisch gebundene Hexose an dem C-Glycosyl befinden muss. Eine eindeutige Festlegung der Strukturen war anhand der vorliegenden NMR-Daten jedoch nicht möglich, da zum einen auf

Grund der geringen Substanzmengen wichtige Korrelationen nicht beobachtet wurden und da zum anderen auf Grund der vielfältigen Signalüberlappung die genaue Zuordnung der Kreuzsignale zu einer der beiden Verbindungen im Gemisch zum Teil nicht möglich war.

**GD2WHHPr1 (Apigenin-4'-O,6C-X-trihexosid)**

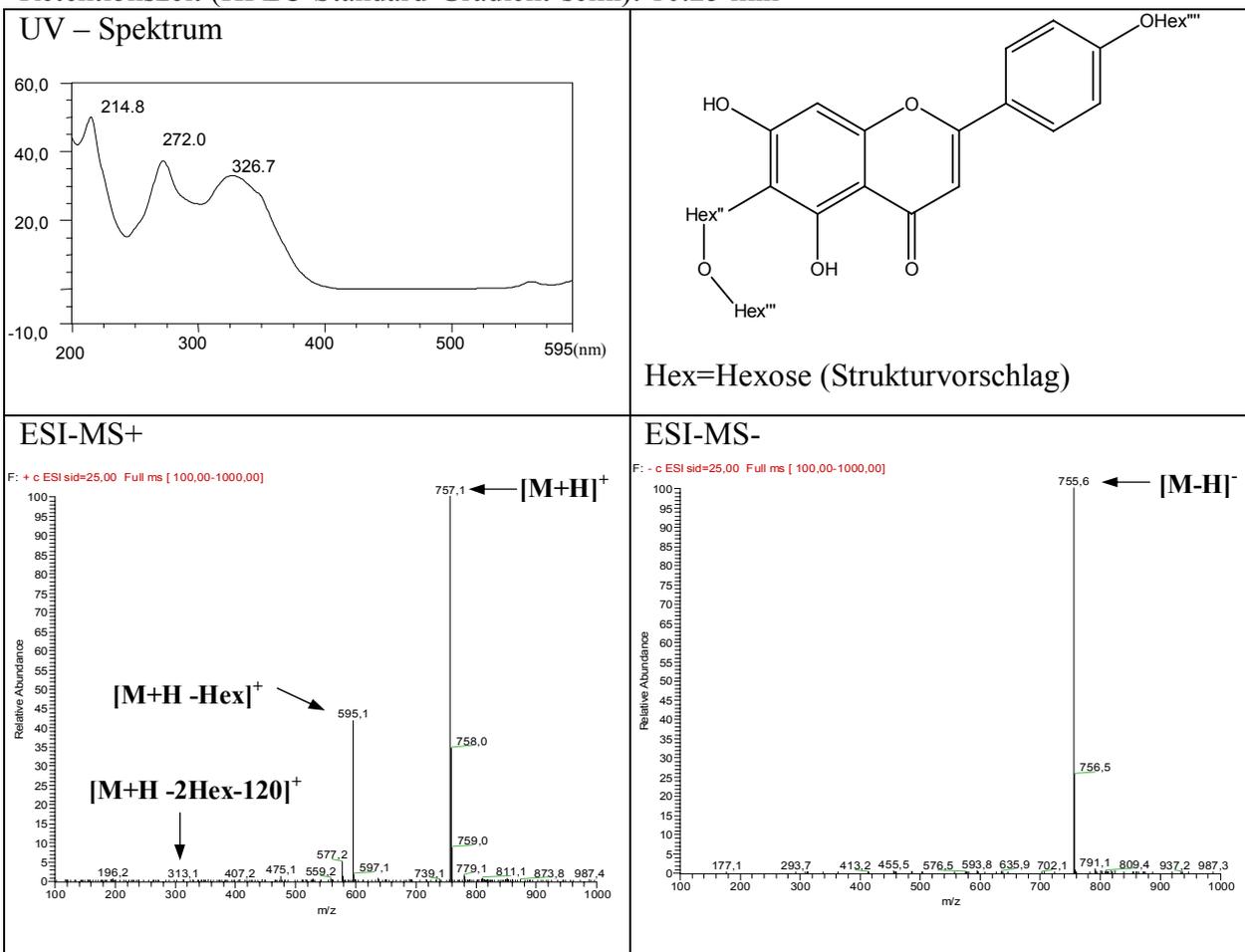
Molekulargewicht: 756 g/mol

Summenformel: C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>O<sub>20</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): GD2WHHPr1 (1.2 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : -17.86 (c=0.1 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient-semi): 10.25 min



**GD2WHHPr2 (Chrysoeriol-4'O,6C-X-trihexosid)**

Molekulargewicht: 786 g/mol

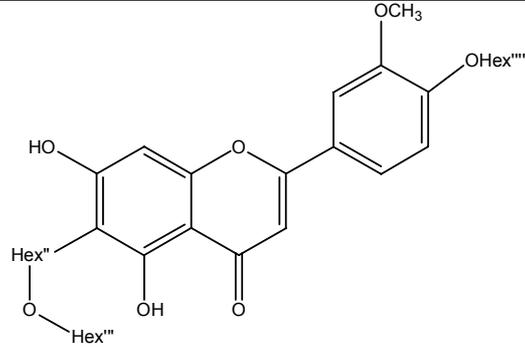
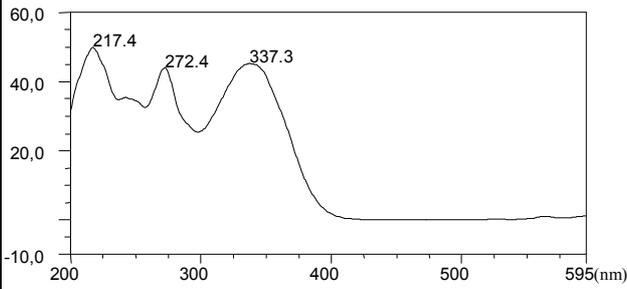
Summenformel: C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>O<sub>21</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): GD2WHHPr2 (3.5 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : -39.29 (c=0.03 MeOH)

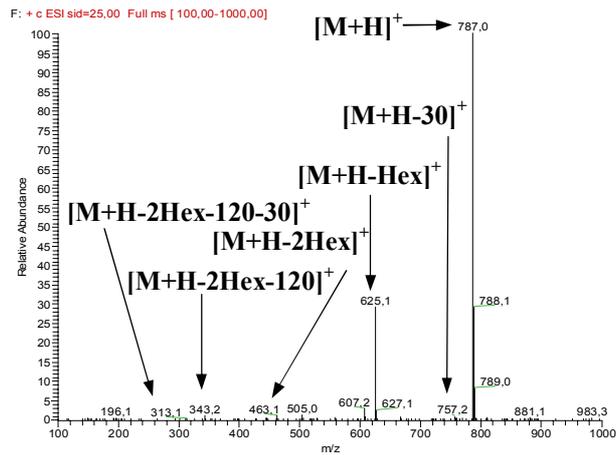
Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient-semi): 10.53 min

UV – Spektrum

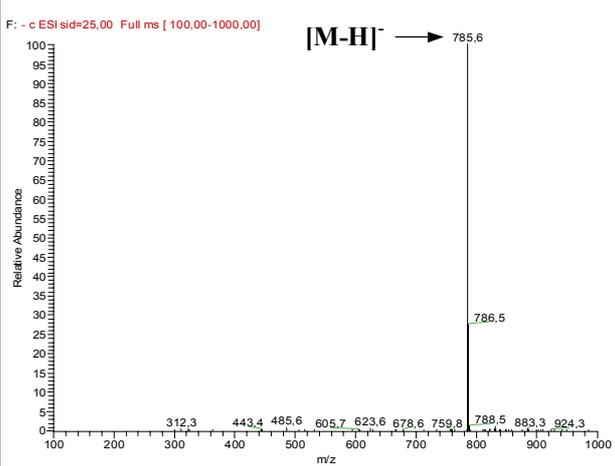


Hex=Hexose (Strukturvorschlag)

ESI-MS+



ESI-MS-



Tab.E18: NMR-Daten der Triglycoside

Apigenin-trihexosid			Chrysoeriol-trihexosid			
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C)
<b>2</b>		164.9				
<b>3</b>	6.66 s		2, 4, 4a, 6, 1'	6.69 s		2, 4a, 1',
<b>4</b>					184.1	
<b>4a</b>		104.6			104.6	
<b>5-OH</b>						
<b>6</b>		106.4			109.1	
<b>7-OH</b>		164.0				
<b>8</b>	6.47 s		4a, 6, 8a	6.47 s		4a, 6, 8a
<b>8a</b>		158.7			158.7	
<b>3'OCH<sub>3</sub></b>				3.95 s (3H)		3'
<b>1'</b>		125.9			126.8	
<b>2'</b>	7.94 d (8.8)	129.1	2, 2', 4', 6'	7.52 d (1.6)	111.8	2, 2', 4', 6'
<b>3'</b>	7.23 d (8.8)	117.8	1', 3', 4', 5'		151.4	
<b>4'</b>		161.8			151.8	
<b>5'</b>	7.23 d (8.8)	117.8		7.30 d (8.8)		1', 4'
<b>6'</b>	7.94 d (8.8)	129.1		7.59 br d (8.5)	121.4	2, 2', 4'
<b>1''</b>	5.03 d (7.3)		6	4.94 d (9.1)		6
<b>1'''</b>	4.39 d (7.3)			4.39 d (7.3)		
<b>1''''</b>	4.94 d (9.1)		4'	5.03 d (7.3)		4'

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD <sup>b</sup>erhalten aus HMBC-Spektrum fett (Direktkorrelationen)

### 3.5.1.3. Flavonole und Derivate

Als Verbindungen vom Flavonoltyp konnten Derivate des Kämpferols, Quercetins und Myricetins isoliert werden. Im Folgenden werden die Strukturen nach der Anzahl ihrer OH-Gruppen im B-Ring besprochen.

#### Kämpferol-Derivate

##### Kämpferol

Kämpferol konnte als gelblicher Niederschlag in 30% wässrigem Methanol erhalten werden. Das UV-Spektrum wies zwei Maxima bei 265 nm und 366 nm auf, welche für Flavonole charakteristisch sind. Zudem konnte ein Molekulargewicht von 286 amu bestimmt werden.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung war das AA'BB'-System des B-Rings, wie es bereits für die Apigenin-Derivate beschrieben wurde, zu beobachten. H-6 bzw. H-8 konnten jeweils als Dubletts bei 6.17 ppm bzw. 6.39 ppm detektiert werden, wobei beide eine Kopplungskonstante von 1.9 Hz aufwiesen, welche ihre meta-Stellung bestätigte. Zudem waren die erhaltenen Daten in Übereinstimmung mit der Literatur (Budzianowski 1990).

##### Kämpferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavon)

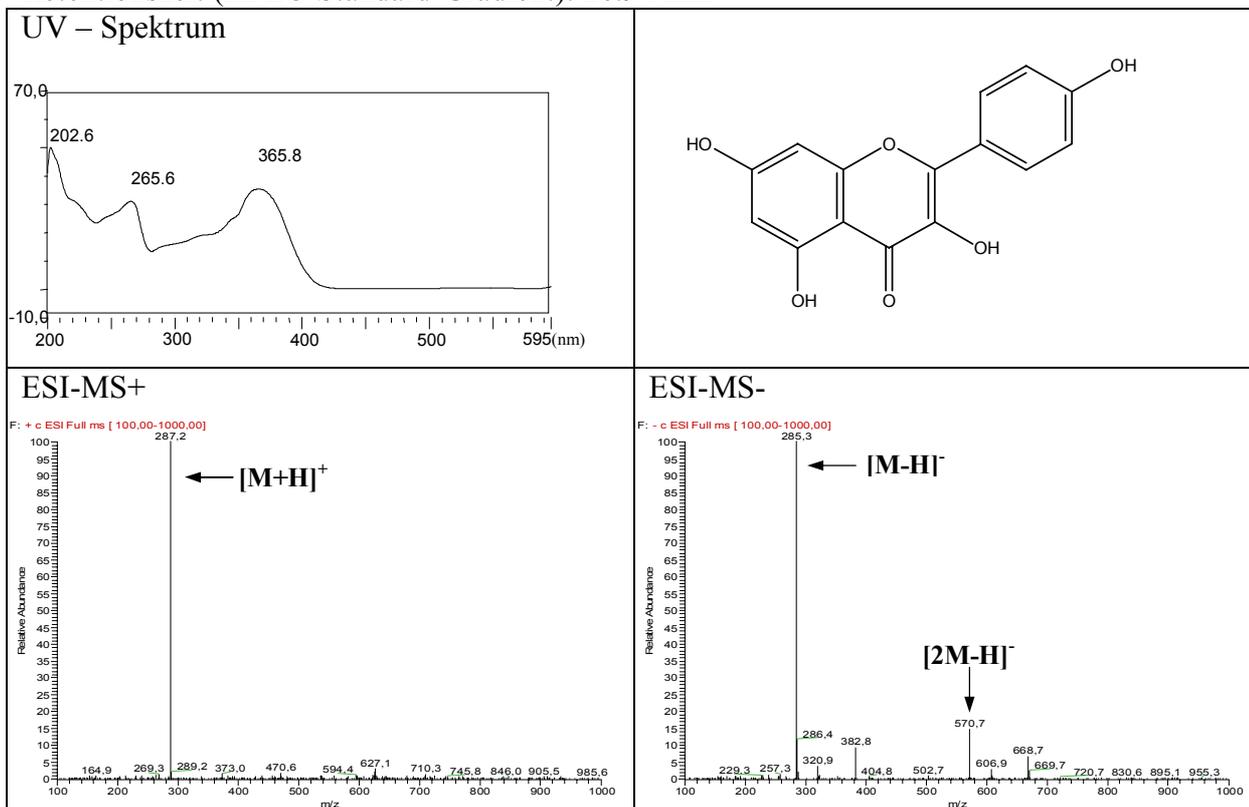
Systematischer Name: 3,5,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 286 g/mol

Summenformel:  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P7EhR (3.5 mg)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 26.94 min



### Astragalin

Die folgende Verbindung zeigte im UV-Spektrum Maxima bei 265.6 nm und 348.2 nm und somit gegenüber dem UV-Spektrum des Kämpferols (265.6 nm, 365.8 nm) eine hypsochrome Verschiebung der ersten Bande um 17.6 nm. Eine derartige Verschiebung wurde in der Literatur für Flavonol-3-*O*-glycoside beschrieben (Mabry et al. 1970).

Die Verbindung wies ein Molekulargewicht von 448 amu auf. Außerdem konnte im Massenspektrum sowohl bei positiver als auch bei negativer Ionisierung die Abspaltung einer *O*-glycosidisch gebundenen Hexose beobachtet werden.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte die gleichen Signalgruppen wie das bereits beschriebene Kämpferol, jedoch war zusätzlich ein anomeres Proton bei 5.25 ppm mit einer Kopplungskonstanten von 7.6 Hz, die eine axial-axiale Stellung zu H-2'' bestätigte, zu detektieren. Auf Grund der Tatsache, dass H-2'' und H-3'' als Triplets mit jeweils einer großen Kopplungskonstanten (9.5 bzw. 8.8 Hz) zu beobachten waren, standen auch H-2'' und H-3'' bzw. H-3'' und H-4'' axial-axial zueinander. H-4'' selbst befand sich unter dem Lösungsmittelsignal, daher konnte für dieses Proton kein Aufspaltungsmuster detektiert werden. H-5'' und H-6<sub>A/B</sub>'' erschienen als Multiplett bzw. als Dublett vom Dublett mit einer großen geminalen Kopplung und einer kleineren Kopplung zu H-5'', so dass es sich bei der Hexose um ein β-D-Glucose handelte. Somit konnte die Verbindung als Astragalin identifiziert werden.

Astragalin konnte im Rahmen dieser Arbeit aus *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris* und var. *nanus* isoliert werden.

**Astragalin (Kämpferol-3O-glucosid)**

Systematischer Name: 3-O-β-D-Glucopyranosyl- 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

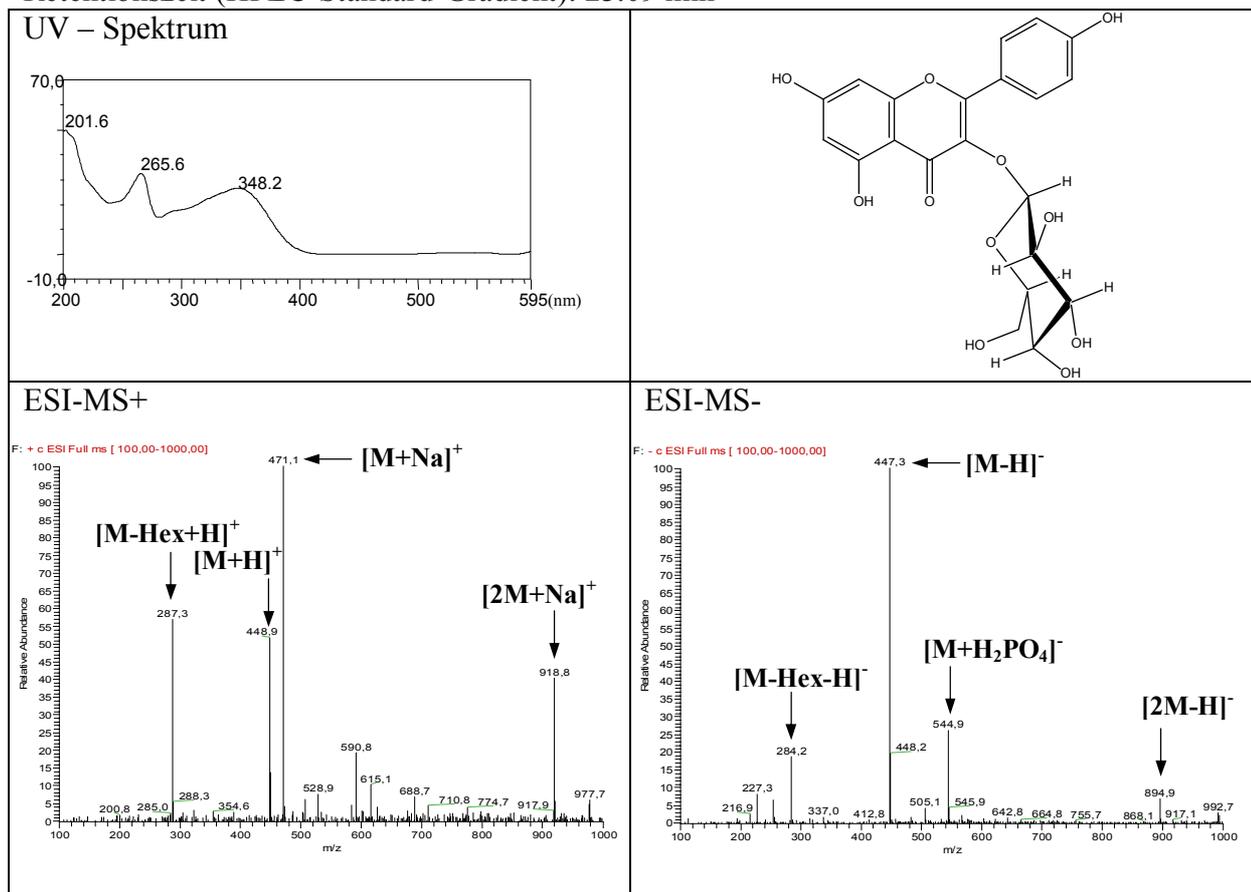
Molekulargewicht: 448 g/mol

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P7EeRP55 (1.4 mg), P8EePr3 (1.7 mg), P8EePr8 (0.3 mg)

Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -9.9 (c = 0.16 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 23.09 min



**Nicotiflorin**

Diese Verbindung aus dem *Vicia faba* -Extrakt wies ein dem Astragalin ähnliches UV-Spektrum auf. Im Massenspektrum konnte ein Molekulargewicht von 594 amu ermittelt werden, wobei das Fragmentmuster eine schrittweise Abspaltung von 146 und 162 amu aufwies, d.h. an der Struktur sowohl eine Desoxyhexose als auch eine Hexose beteiligt waren. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte die charakteristischen Signale für das AA'BB'-System des B-Ringes wie auch für die beiden meta-koppelnden Protonen H-6 und H-8. Daneben waren zwei weitere Dubletts bei 5.12 ppm und 4.51 ppm zu beobachten, die beide jeweils Signale anomerer Protonen darstellten. Während das erste Signal eine große Kopplungskonstante von 6.9 Hz aufwies und bei Auswertung des COSY- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums zudem das bereits mehrfach beschriebene Aufspaltungsmuster einer β-D-Glucose nachgewiesen werden konnte,

besaß das zweite anomere Proton eine kleine Kopplungskonstante von 1.3 Hz, die eine axial-äquatoriale Stellung zu H-2''' anzeigte. H-2''' ( $\delta$  3.62) und H-3''' ( $\delta$  3.52) erschienen jeweils als Dublett vom Dublett mit zwei kleinen Kopplungskonstanten (3.2 und 1.9 Hz) bzw. mit einer großen und einer kleinen Kopplungskonstanten (9.5 und 3.2 Hz), die zeigten, dass auch H-2''' und H-3''' nicht axial-axial zueinander standen. Eine axial-axiale Stellung von H-4''' sowohl zu H-3''' als auch zu H-5''' wurde dagegen durch das Triplett bei 3.27 ppm mit einer Kopplungskonstanten von 6.3 Hz bestätigt. Während H-5''' als Multipllett bei 3.44 ppm zu beobachten war, konnte die Methylgruppe als Dublett bei 1.12 ppm detektiert werden. Das so beschriebene Aufspaltungsmuster ist charakteristisch für eine  $\alpha$ -L-Rhamnose. Durch Vergleich mit einem authentischen Standard konnte die Verbindung eindeutig als Kämpferol-3-O-rutinosid (Nicotiflorin) identifiziert werden, zudem waren die Ergebnisse in Übereinstimmung mit der Literatur (Kazuma et al. 2003).

### Nicotiflorin (Kämpferol-3O-rutinosid)

Systematischer Name: 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

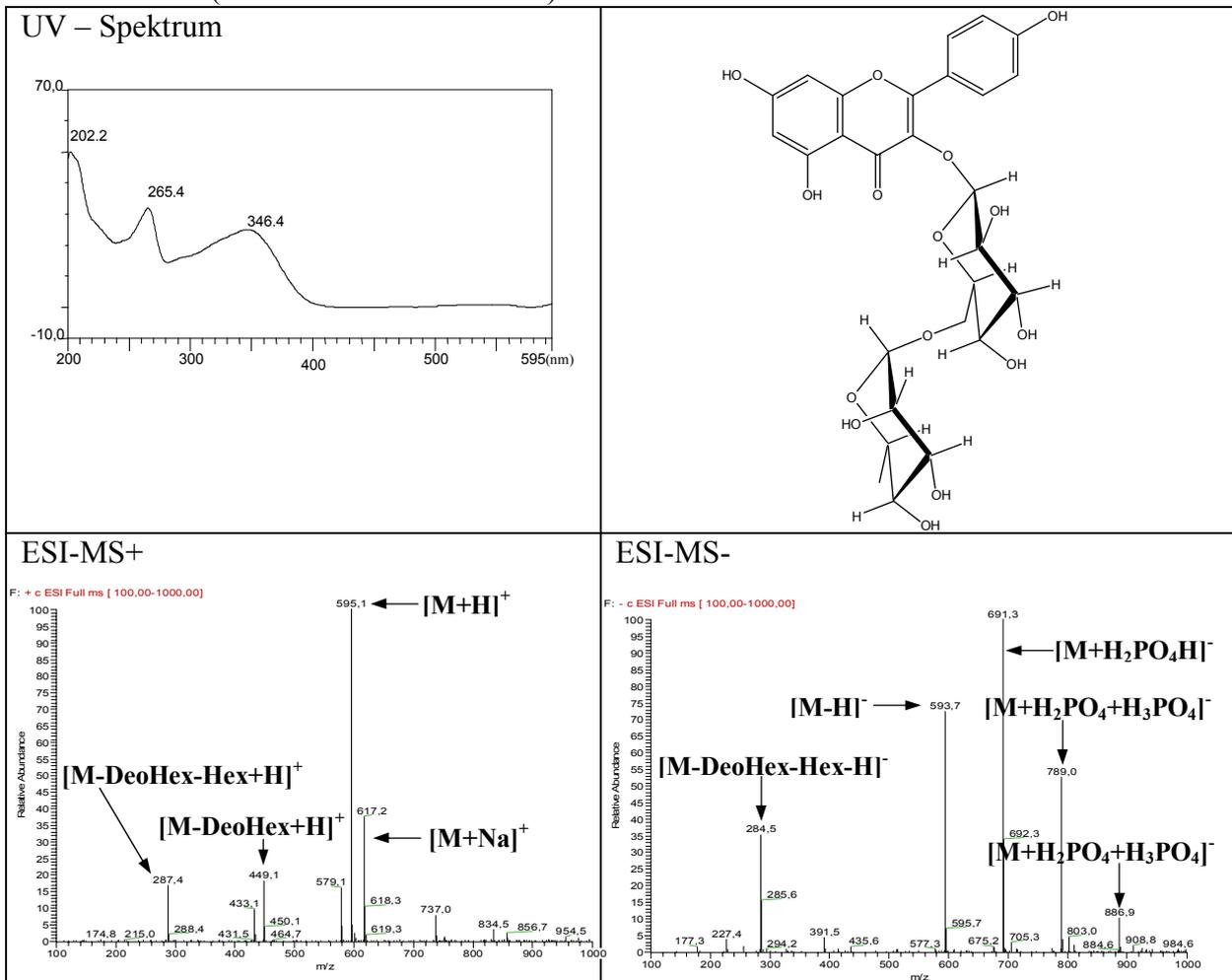
Molekulargewicht: 594 g/mol

Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5EdPr5 (0.6 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : 15.75 (c = 0.1 MeOH)

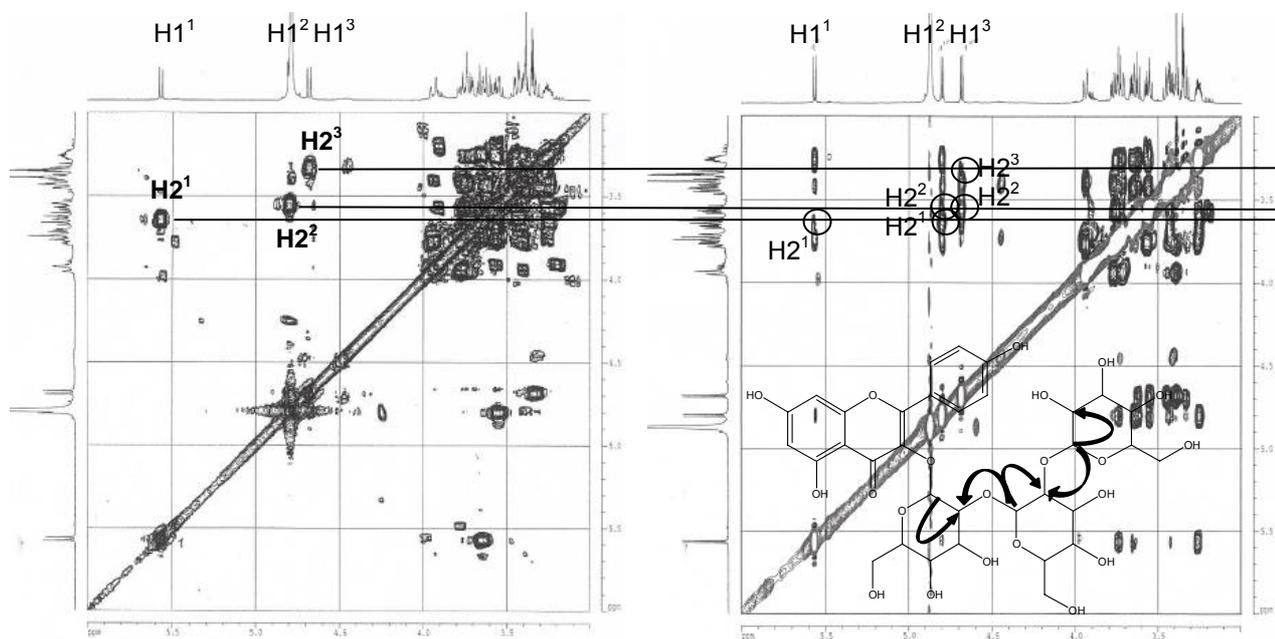
Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 22.41 min



### Kämpferol-3O-sophorotriosid

Ein weiteres Kämpferol-Derivat konnte aus dem Extrakt von *Pisum sativum* isoliert werden. Die Verbindung wies ein UV-Spektrum auf, das große Ähnlichkeit zu denen von Astragalin und Nicotiflorin zeigte. Das Molekulargewicht von 772 amu sowie das Fragmentierungsmuster bei positiver Ionisierung zeigten an, dass die Verbindung insgesamt drei Hexosen enthalten musste.

Im  $^1\text{H-NMR}$  waren das AA'BB'-System des B-Ringes und die meta-koppelnden Protonen des A-Ringes zu beobachten. Zusätzlich konnten drei Dubletts bei 5.55 ppm, 4.78 ppm bzw. 4.67 ppm für anomere Protonen mit einer Kopplungskonstanten von jeweils 7-8 Hz gefunden werden. Im Bereich zwischen 3.0 und 4.0 ppm kamen überlappende Signalgruppen hinzu. Eine Literaturrecherche ergab, dass für *Pisum sativum* unter anderem ein Kämpferol-3O-sophorotriosid, ein Kämpferol-3O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosid, bereits beschrieben wurde (Ferrerres et al. 1995). Auf Grund der starken Signalüberlappung erwies sich die genaue Zuordnung aller Protonen der drei Zucker als äußerst schwierig, jedoch konnte mit Hilfe des COSY-Spektrums für jeden Zucker zumindest die Lage des jeweiligen H-2 ermittelt werden (H-2'',  $\delta$  3.13; H-2''',  $\delta$  3.06; H-2''''',  $\delta$  2.84).



**Abb.E58:** 1H-1H-COSY- und ROESY-Spektrum (mit Korrelationen) von Kämpferol-3O-sophorotriosid

Das HMBC – Spektrum ermöglichte es die Verknüpfung der Zucker untereinander abzuleiten. H-1''' ( $\delta$  5.55) zeigte ein Kreuzsignal zu C-3 ( $\delta$  134.9), während über Direktkorrelationen die chemische Verschiebung der beiden übrigen anomeren Protonen C-1'' (104.2 ppm) und C-1'''' (106.2 ppm) ermittelt werden konnten. Von H-2'' bzw. H-2''' konnten jeweils Kreuzsignale zu C-1'' bzw. C-1'''' beobachtet werden, die belegten, dass die restlichen

beiden Hexosen jeweils O-glycosidisch gebunden sein mussten. Die Identität der einzelnen Zucker ließ sich anhand der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten bestätigen, ohne dass eine genaue Zuordnung der einzelnen Signale notwendig war. Literaturangaben für  $\beta$ -D-Glucopyranoside umfassen Signale bei 77.3 (2x C-3, C-5), 74.6 (C-2), 71.2 (C-4) sowie 62.4 ppm (C-6) (Kalinowski et al. 1984). Die vorliegende Verbindung zeigte die Signalcluster (herrührend von 3 identischen Zuckern), so dass das Vorliegen anderer Zucker mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte.

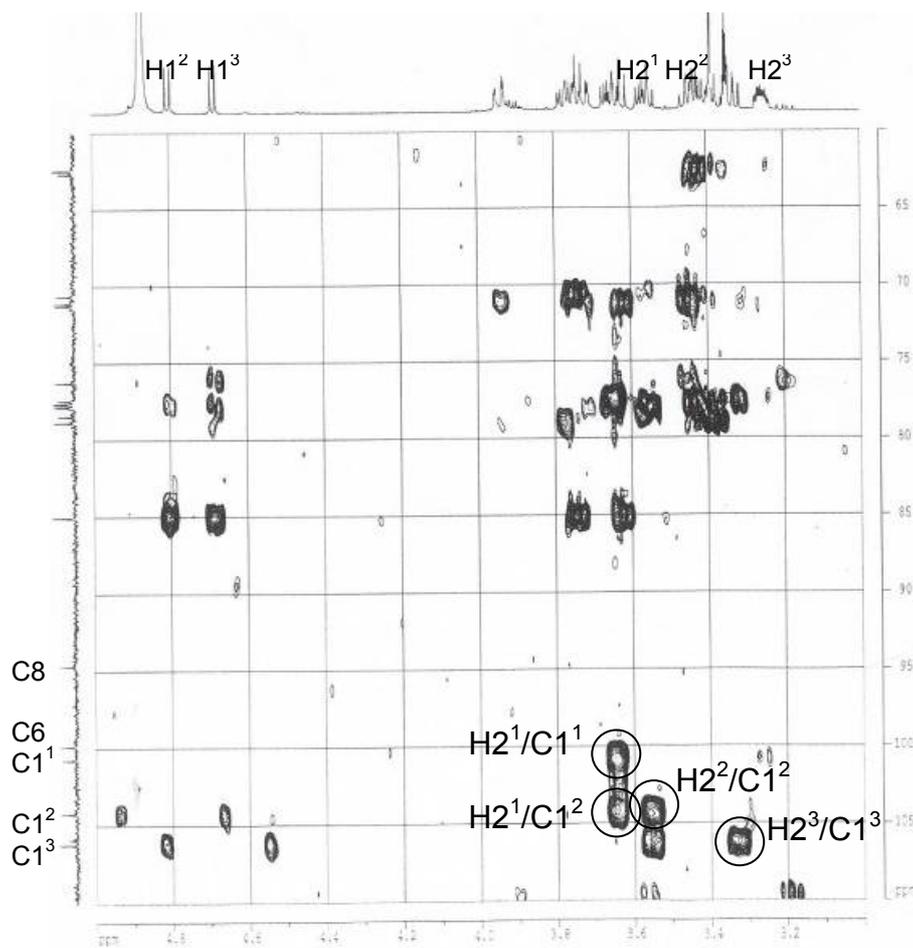


Abb.E59: HMBC-Spektrum von Kämpferol-3-O-sophorotriosid

**Kämpferol-3O-sophorotriosid**

Systematischer Name: 3O-[ $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 772 g/mol

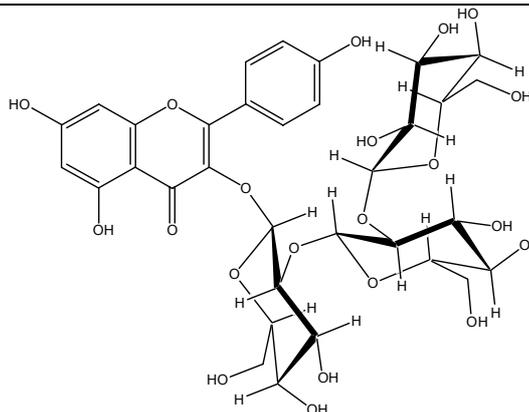
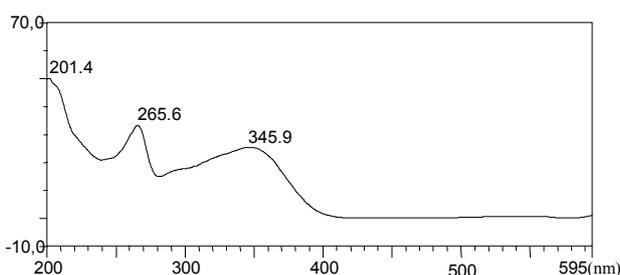
Summenformel: C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>O<sub>21</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P6BdPr3 (6.4 mg)

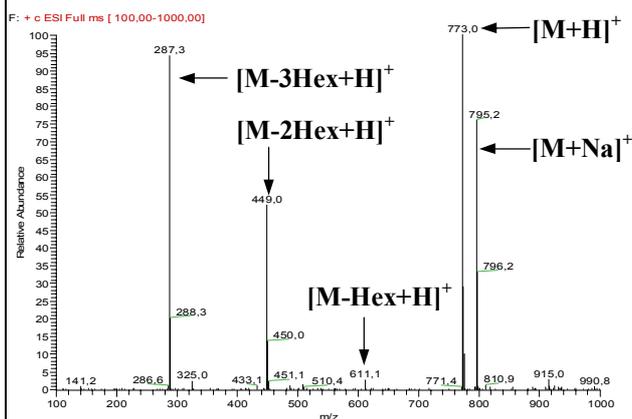
Spezifische Drehung [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -20.7 (c = 0.37 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 19.63 min

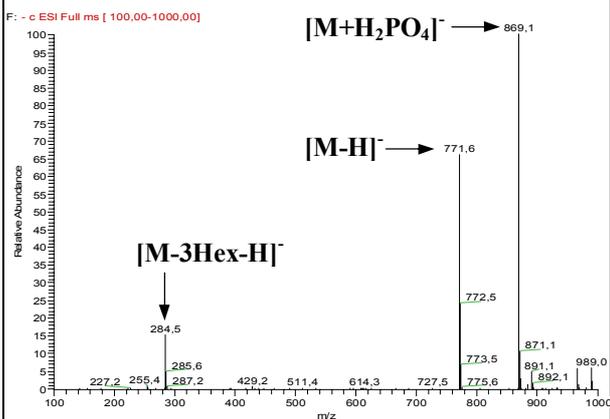
## UV – Spektrum



## ESI-MS+



## ESI-MS-


**Kämpferol-3O-glucosyl-7O-rhamnosid**

Die nachfolgende Verbindung wurde ebenfalls aus *Vicia faba* isoliert. Genau wie Kämpferol-3O-rutinosid wies sie ein Molekulargewicht von 594 amu und ein UV-Maximum bei ca. 345 - 350 nm auf. Jedoch unterschieden sich beide Verbindungen in ihrer Retentionszeit sowie der Intensität der Fragmente bei positiver Ionisierung in der Massenspektrometrie.

Durch Interpretation der <sup>1</sup>H-NMR- und COSY-Spektren konnte zum einen eine  $\alpha$ -L-Rhamnose und eine  $\beta$ -D-Glucose nachgewiesen werden. Die Position der beiden Zucker konnte mit Hilfe des ROESY-Experimentes festgestellt werden. Entscheidend hierfür waren die Kreuzsignale zwischen dem anomeren Proton der Rhamnose bei 5.56 ppm und H-8 sowie zwischen dem anomeren Proton der Glucose und H-2'/6'. Damit handelte es sich um ein

Kämpferol-3*O*-glucosyl-7*O*-rhamnosid. Die experimentell ermittelten Daten waren zudem in Übereinstimmung mit der Literatur (Inigo et al. 1988).

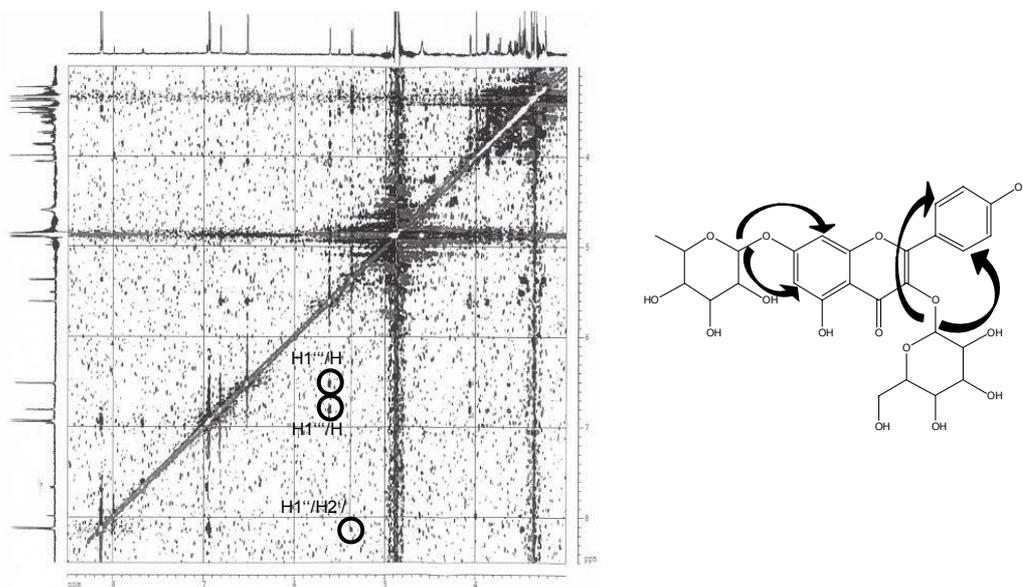


Abb.E60: Roesy-Spektrum von Kämpferol-3*O*-glucosyl-7*O*-rhamnosid

### Kämpferol-3*O*-glucosyl-7*O*-rhamnosid

Systematischer Name: 3*O*- $\beta$ -D-Glucopyranosyl, 7*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

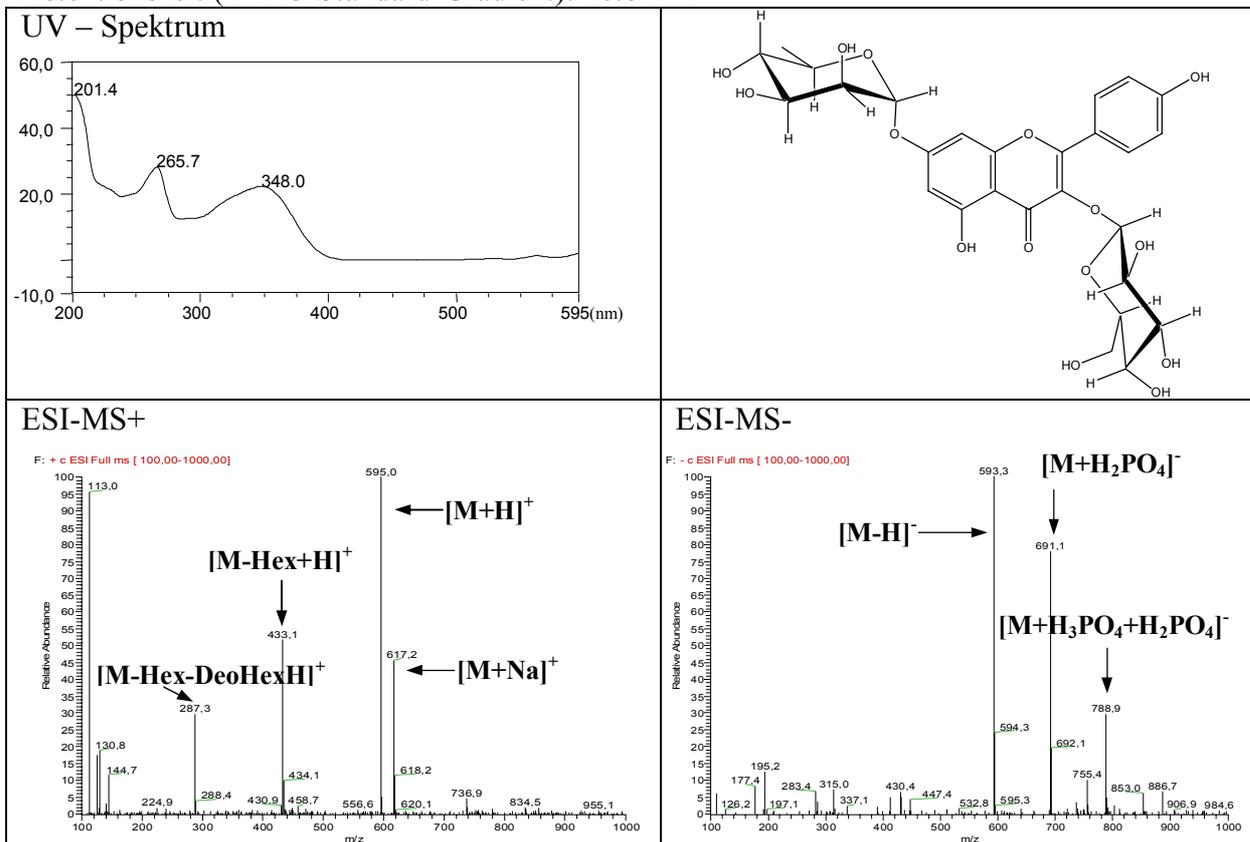
Molekulargewicht: 594 g/mol

Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5EcPr4 (0.2 mg), P5EdPr4 (1.5 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : -11.8 (c = 0.19 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 20.8 min



Tab.E19a: NMR-Daten der Kämpferolderivate

	Kämpferol		Astragalin		Nicotiflorin		Kämpferol-3O-sophorotriosid			K-3oglucosyl-7O-rhamnosid	
	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^b$ (JHz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^a$ (JHz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^a$ (JHz)	
<b>2</b>				159.3				158.5			
<b>3</b>				135.5				134.9			
<b>4</b>				n.d.				179.7			
<b>4a</b>				105.8				104.2			
<b>5-OH</b>				163.1				163.2			
<b>6</b>	6.17 d (1.9)	6.20 d (2.2)		100.1	4a, 5, 8	6.18 d (2.2)	6.19 d (1.9)	99.9	4a, 5, 6, 7, 8	6.47 d (2.2)	
<b>7-OH</b>				165.9				165.9			
<b>8</b>	6.39 d (1.9)	6.39 d (2.2)		94.8	4a, 6, 7, 8a	6.37 d (2.2)	6.39 d (1.9)	94.7	4a, 6, 7, 8, 8a	6.77 d (2.2)	
<b>8a</b>				158.2				158.2			
<b>1'</b>				123.0				122.9			
<b>2'/6'</b>	8.08 d (8.8, 2H)	8.05 d (8.8, 2H)		132.3	2, 2', 4', 6'	8.06 d (8.8, 2H)	8.03 d (8.8, 2H)	132.3	2, 2', 3', 4', 5', 6'	8.08 d (9.2, 2H)	
<b>3'/5'</b>	6.90 d (8.8, 2H)	6.88 d (9.5, 2H)		116.4	1', 3', 4', 5'	6.88 d (8.8, 2H)	6.90 d (8.8, 2H)	116.3	1', 3', 4', 5'	6.89 d (8.8, 2H)	
<b>4'</b>				161.4				161.5			

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD n.d. nicht detektierbar, fett<sup>(Direktkorrelationen)</sup>

Tab.E19b. NMR-Daten der Kämpferolderivate

	Kämpferol		Astragalin			Nicotiflorin			Kämpferol-3O-sophorotriosid				K-3oglucoosyl-7O-rhamnosid
	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^b$ (JHz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^a$ (JHz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^a$ (JHz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_H^a$ (JHz)
1''		5.25 d (7.6)	n.d.	3	5.12 d (6.9)	5.55 d (7.6)	100.8	3	5.33 d (7.6)				
2''		3.43 t (9.5)	76.7	3''	3.43 t (9.5)	3.13 m		1'', 1''''	3.43 t (7.9)				
3''		3.40 t (8.8)	77.1	4''	3.42 t (7.6)				3.42 t (8.2)				
4''		3.30 n.d.	74.6	2''	3.24 t (8.8)				3.30 m				
5''		3.19 m	77.5		3.32 m				3.21 m				
6'' <sup>A/B</sup>		3.68 dd (11.7, 1.9) 3.52 dd (11.7, 5.7)	70.3	5''	3.79 dd (11.1, 1.3) 3.51 dd (11.1, 5.7)				3.58 dd (13.1, 6.9) 3.69 dd (13.1, 2.2)				
1'''					4.51 d (1.3)	4.78 d (8.2)	104.2	1'''	5.56 d (1.9)				
2'''					3.62 dd (3.2, 1.9)	3.06 m		1''', 1''''	4.01 dd (3.5, 1.9)				
3'''					3.52 dd (9.5, 3.2)				3.82 dd (9.5, 3.5)				
4'''					3.27 t (6.3)				3.48 m				
5'''					3.44 m				6.57 m				
6'''					1.12 d (6.3, 3H)				1.23 d (6.0, 3H)				
H-Zucker						3.2-4.0							
1''''						4.67 d (7.6)	106.2	1''''					
2''''						2.84 m		1''''					

<sup>a</sup> aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD n.d. nicht detektierbar, **fett** (Direktkorrelationen)

**P5MW772 (Kämpferol-/Quercetin-3,4'-O-triglycosid)**

In dieser Fraktion konnten aus dem *Vicia faba* – Extrakt zwei weitere Flavonole erhalten werden, wobei beide unter Standardbedingungen koeluierten und mit den zur Verfügung stehenden chromatographischen Methoden nicht aufgetrennt werden konnten. Das Massenspektrum lieferte ein Molekulargewicht von jeweils 772 amu, zudem zeigten die Fragmentierungsmuster einerseits die schrittweise Abspaltung dreier O-glycosidisch gebundener Hexosen und somit Kämpferol als Aglykon, sowie für die zweite Verbindung die Abspaltung zweier O-glycosidisch gebundener Hexosen und einer O-glycosidisch gebundenen Desoxyhexose und somit Quercetin als Aglykon. Das UV-Spektrum zeigte ein UV-Maximum bei 345 nm, so dass zumindest eine der beiden Verbindungen eine Glycosidierung an 3 – Position aufweisen musste.

Im <sup>1</sup>H-NMR - Spektrum wurde bestätigt, dass es sich um ein Gemisch zweier Verbindungen handelte. Es konnte sowohl das AA'BB'-System eines Kämpferols als auch das ABC-System eines Quercetins identifiziert werden. Die meta-koppelnden Protonen H-8 und H-6 wurden sowohl für das Kämpferol-Derivat als auch für das Quercetin-Derivat bei jeweils 6.27 ppm und 6.11 ppm beobachtet.

Tab.E20:NMR-Daten für Probe P5MW772

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)
	Kämpferol-Deriv.	Quercetin-Deriv.
<b>6</b>	6.11 d (2.2)	6.11 d (2.2)
<b>8</b>	6.27 d (1.9)	6.27 d (1.9)
<b>2'</b>	8.11 d (9.2)	7.78 d (1.9)
<b>3'</b>	7.19 d (9.1)	
<b>5'</b>	7.19 d (9.1)	7.26 d (8.8)
<b>6'</b>	8.11 d (9.2)	7.63 dd (8.5, 2.2)
<b>1<sup>x</sup></b>	5.17 d (7.6)*	5.10 d (7.3)*
<b>1<sup>y</sup></b>	5.08 d (7.9)*	5.06 d (7.6)*
<b>1<sup>z</sup></b>	5.00 d (7.3)*	4.55 d (1.6)
<b>6<sup>z</sup></b>		1.11 d (6.3, 3H)

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD \* austauschbar

Im Falle des Kämpferol-Derivates zeigte ein Vergleich der chemischen Verschiebungen mit denen des Aglykons, dass lediglich das Signal für H-3'/5' ( $\delta$  7.19) im tieferen Feld detektiert wurde. Auf Grund dieser Informationen - UV-Spektrum und chemische Verschiebung der Signale - musste es sich um ein Kämpferol handeln, das an 3- und 4'- Position O-glycosidisch derivatisiert vorlag. Die Position des Diglycosids blieb jedoch offen.

Ein analoger Vergleich des Quercetin-Derivates mit Quercetin-4'-*O*-glucosid (Fossen et al. 1998) zeigte, dass auch in diesem Fall eine Glycosidierung an 4'- Position vorliegen musste. Auf Grund der chemischen Verschiebung eines anomeren Protons von 4.55 ppm mit einer kleinen Kopplungskonstanten (1.5 Hz) und einem Methyldublett bei 1.11 ppm handelte es sich bei der Desoxyhexose sehr wahrscheinlich um eine  $\alpha$ -L-Rhamnose, die über eine Hexose mit dem Flavonoid verbunden war. Auch in diesem Fall konnte die Position des Diglycosids nicht näher bestimmt werden.

Somit handelte es sich bei den beiden vorliegenden Verbindungen um ein Kämpferol- bzw. Quercetin-3,4'-*O*-dihexosid, das zusätzlich eine weitere Hexose bzw. Desoxyhexose *O*-glycosidisch an einem der beiden Zucker trug.

**P5MW772**

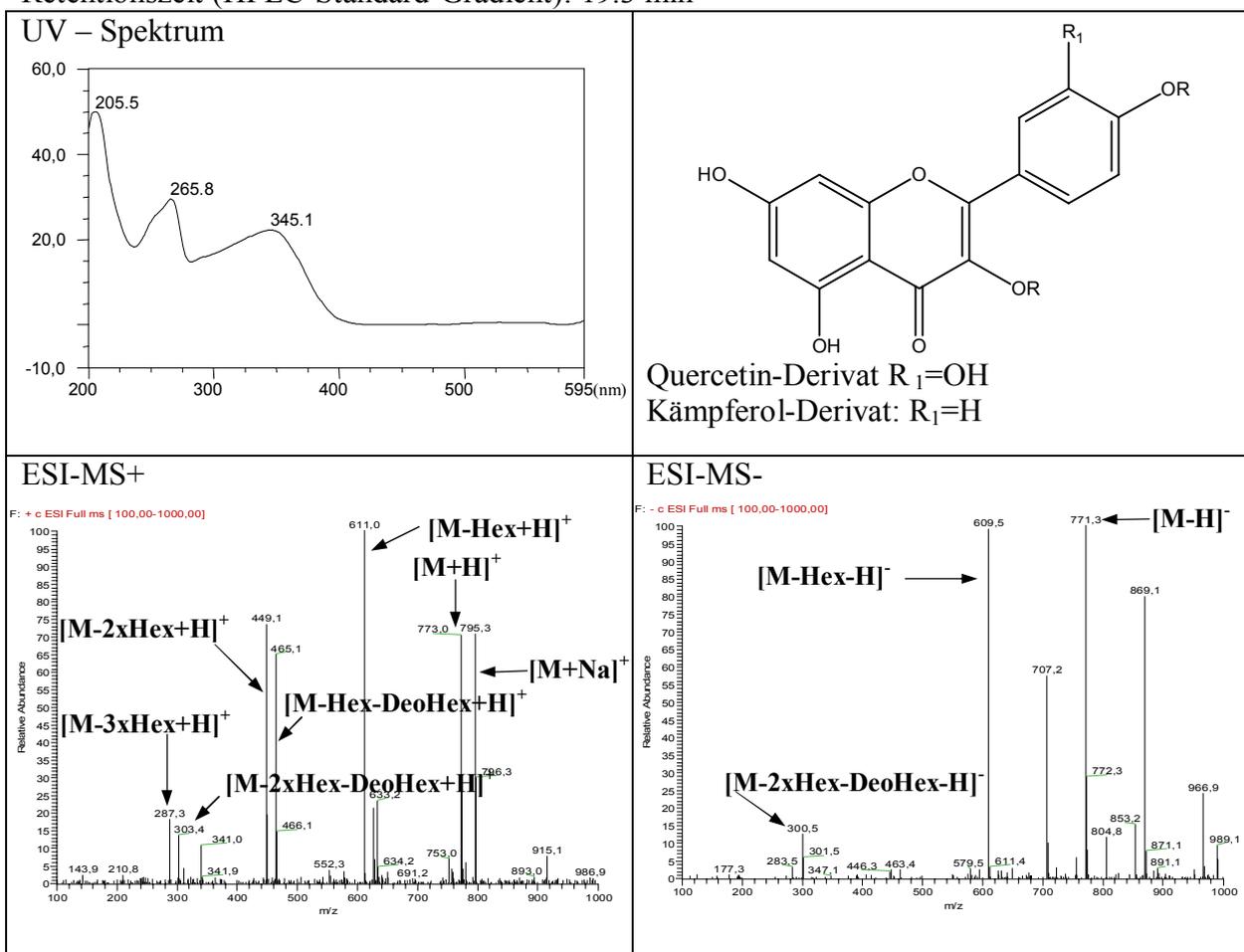
Molekulargewicht: 772 g/mol

Summenformel: C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>O<sub>21</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5MW772 (1.1 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : -15.0 (c=0.11 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 19.3 min



## Quercetin-Derivate

Insgesamt konnten 5 Verbindungen vom Quercetintyp aus verschiedenen Quellen isoliert werden.

### Quercetin

Quercetin als Aglykon wurde aus *Vigna angularis* isoliert. Das UV- Spektrum wies ein Maximum bei 370 nm auf, welches eindeutig einem Flavonol entsprach. Das Molekulargewicht wurde mit 302 amu bestimmt und die  $^1\text{H-NMR}$  – Daten zeigten sowohl die meta-koppelnden Protonen des A-Ringes als auch das ABC-System des B-Ringes. Die erhaltenen NMR-Daten zeigten eine gute Übereinstimmung mit einem authentischen Standard sowie mit Literaturdaten (Shen et al. 1993).

#### Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon)

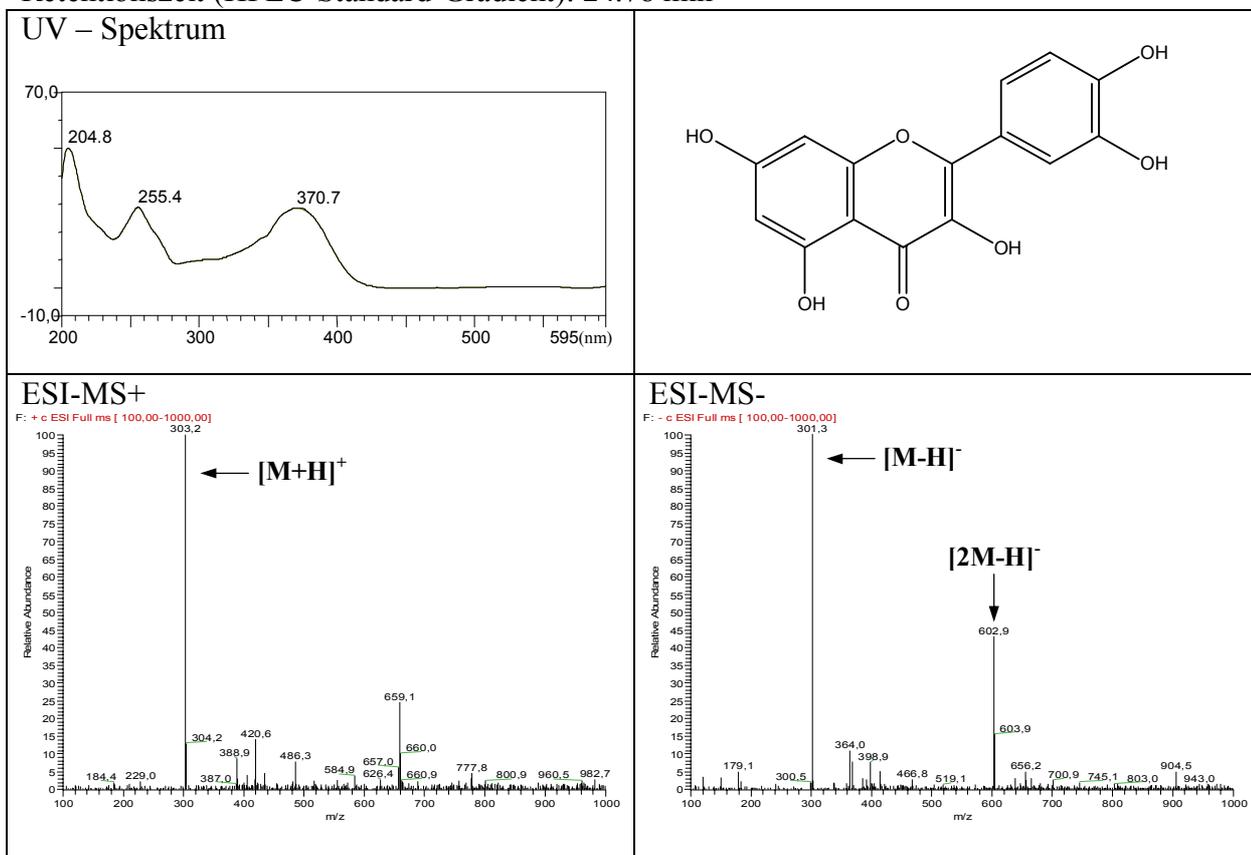
Systematischer Name: 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 302 g/mol

Summenformel:  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P2Ei6 (3.6 mg)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 24.78 min



**Isoquercitrin**

Die Verbindung besaß ein UV-Spektrum mit einem UV-Maximum bei 356.7 nm, was eine hypsochrome Verschiebung der 1. Bande gegenüber dem Aglykon Quercetin bedeutete. Diese Verschiebung wird, wie bereits für die Kämpferol-Derivate diskutiert, für 3-OH substituierte Verbindungen beschrieben (Mabry et al. 1970). Im Massenspektrum waren die Abspaltung einer Hexose sowie das Aglykon mit 303 amu bei positiver Ionisierung zu verzeichnen. Im aromatischen Bereich des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums wurde das ABC-System des B-Ringes beobachtet, daneben waren die meta-koppelnden Protonen des A-Ringes zu sehen. Das anomere Proton des Zuckers (5.25 ppm) wies eine Kopplungskonstante von 7.6 Hz auf. Die Interpretation der COSY-Spektren zeigte das typische Aufspaltungsmuster einer  $\beta$ -D-Glucose, wie es bereits mehrfach beschrieben wurde. Die Verknüpfung des Zuckers an Position 3 wurde durch das HMBC-Spektrum bestätigt. Das anomere Proton wies eine Korrelation mit einem Signal bei 135.7 ppm auf, welches C-3 zuzuordnen war. Es handelte sich daher bei dieser Verbindung um Quercetin-3-O-glucosid (Isoquercitrin).

**Isoquercitrin (Quercetin-3-O-glucosid)**

Systematischer Name: 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on

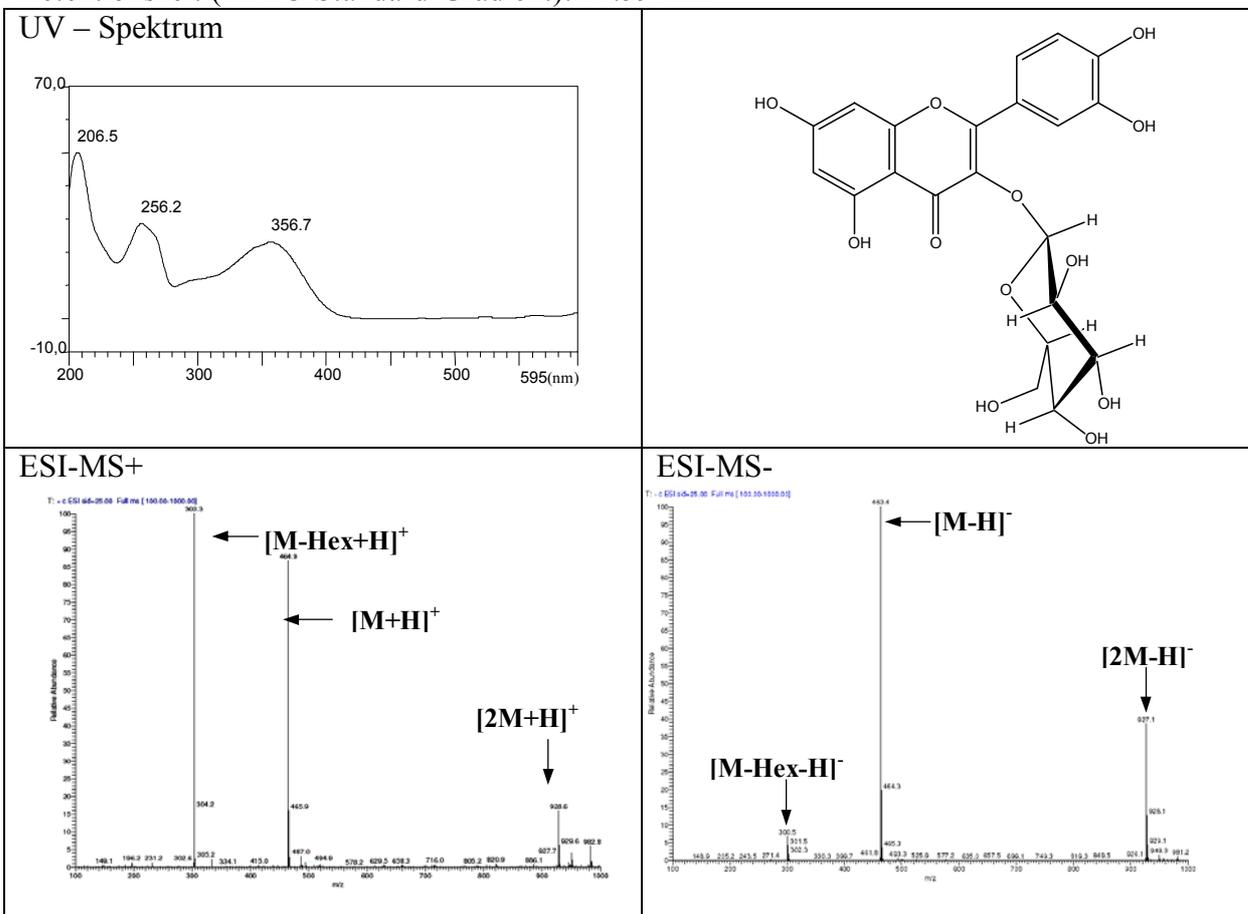
Molekulargewicht: 464 g/mol

Summenformel:  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P8EfPr7 (1.2 mg), GD2Wk (2.2 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : -20 (c = 0.05 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 21.59 min



### Isorhamnetin-3O-glucosid

Die Verbindung wies ein dem Isoquercitrin ähnliches UV-Spektrum mit einem Maximum bei 355 nm auf. Sie besaß jedoch ein Molekulargewicht von 478 amu, wobei im Massenspektrum zum einen die Abspaltung einer Hexose, zum anderen der Verlust von 30 amu beobachtet wurde, welcher für eine Methoxygruppe charakteristisch ist.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum traten das ABC-System des B-Ringes und die meta-koppelnden Protonen des A-Ringes sowie ein anomeres Proton bei 5.30 ppm auf. Letzteres konnte mit Hilfe des COSY-Spektrums einer  $\beta$ -D-Glucose zugeordnet werden. Das Vorliegen einer Methoxyfunktion wurde durch ein Singulett bei 3.93 ppm bestätigt, während ihre Position an C-3' sowohl durch die Tieffeldverschiebung von H-2' als auch durch ein nOe-Experiment bestimmt wurde. Zudem lieferte ein Vergleich mit Literaturdaten (Lu et al. 2000) gute Übereinstimmungen. Es handelte sich somit um Isorhamnetin-3O-glucosid.

#### Isorhamnetin-3O-glucosid (3O-glucosyl-3,4',5,7-tetrahydroxy-3'-methoxyflavon)

Systematischer Name: 3-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

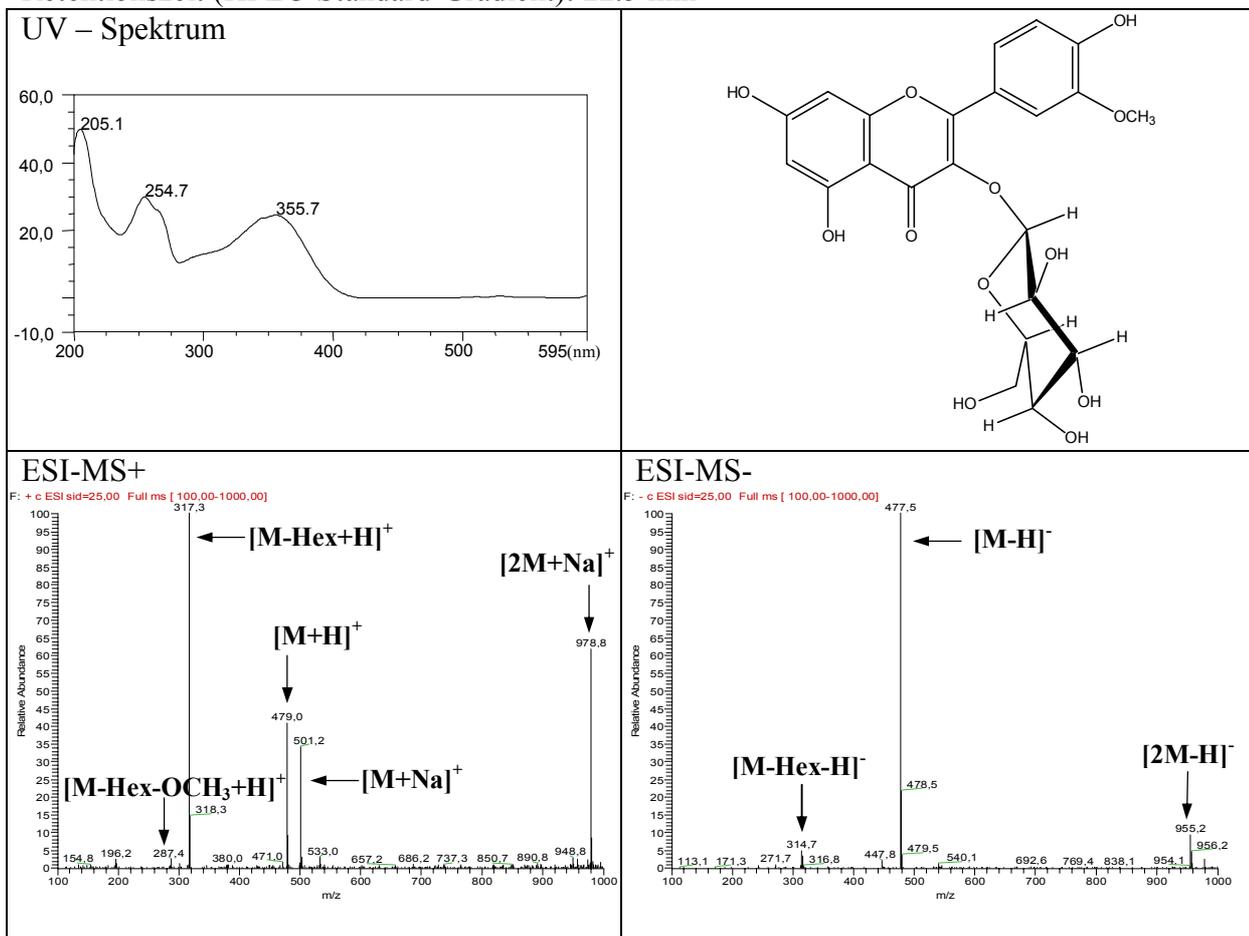
Molekulargewicht: 478 g/mol

Summenformel:  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$

Probenbezeichnung (Substanzmenge): GD2WIPr2 (1 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : -14.5 (c = 0.03 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 22.5 min



## Rutin

Das UV-Spektrum der Verbindung wies die bereits aus den beiden vorherigen Substanzen bekannten Maxima eines Flavonol-Derivates auf. Im Massenspektrum war bei positiver Ionisierung die Abspaltung einer Desoxyhexose, gefolgt von einer Hexose zu beobachten.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte neben dem ABC-System des B-Ringes und den meta-koppelnden Protonen des A-Ringes zwei anomere Protonen bei 5.10 ppm und 4.51 ppm, wobei erstere als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 7.6 Hz erschien, während das zweite Signal ein breites Singulett darstellte. Die Identität der Zucker konnte durch Interpretation der COSY-Spektren bestimmt werden und lieferte ein wie bereits im Falle des Kämpferol-3-O-rutinosids bzw. Kämpferol-3-O-glucosyl-7-O-rhamnosids beschriebenes Aufspaltungsmuster. Die Verknüpfung der beiden Zucker wurde mit Hilfe des HMBC-Spektrums bestimmt, wobei Kreuzsignale zwischen H-1'' (5.10 ppm) und C-3 (135.6 ppm) sowie zwischen H-6''<sub>A/B</sub> (3.80 bzw. 3.38 ppm) und C-1''' (102.0 ppm) und umgekehrt zwischen H-1''' (4.51 ppm) und H-6'' (68.6 ppm) beobachtet wurden, so dass es sich bei der Verbindung um Quercetin-3-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosid (Rutin) handelte.

Die Identität konnten außerdem durch Vergleich mit einem Standard sowie durch Übereinstimmung der Daten mit der Literatur (Kazuma et al. 2003) nachgewiesen werden.

**Rutin (Quercetin-3O-rutinoside)**

Systematischer Name: 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon

Molekulargewicht: 610 g/mol

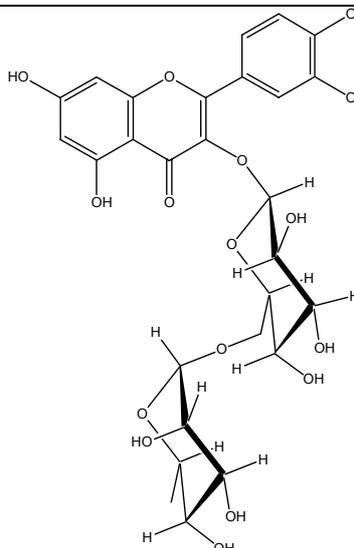
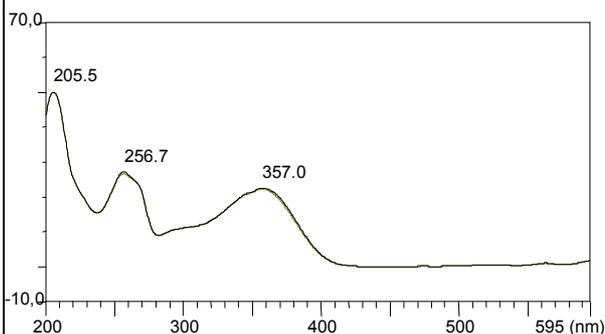
Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P2BgRP5 (6.5 mg)

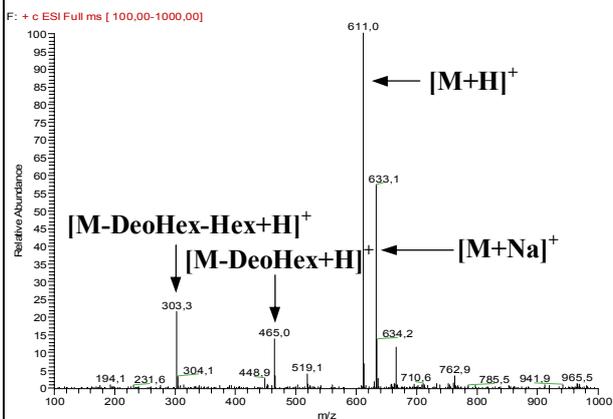
Spezifische Drehung [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: 12 (c = 0.10 EtOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 21.55 min

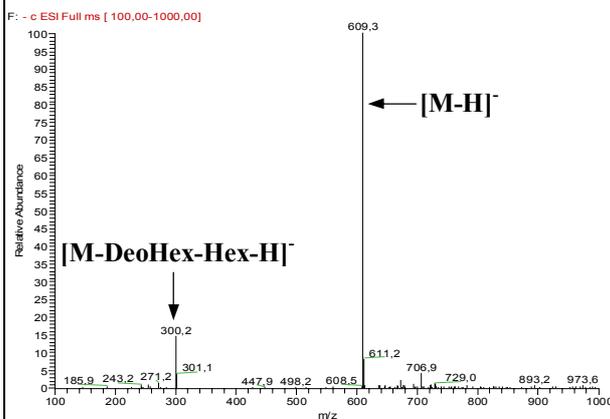
UV-Spektrum



ESI-MS+



ESI-MS-



**P5EcPr3 (Isorhamnetin-3O-diglycosid)**

Die Verbindung P5EcPr3 unterschied sich von der vorangegangenen Fraktion nur durch 30 amu in der Molekülmasse. Im Massenspektrum waren die charakteristischen Fragmente für eine Desoxyhexose und Hexose zu beobachten, wobei jeweils daneben Fragmente der Abspaltungen einer Methoxygruppe zu finden waren (595, 449 und 287 amu). Beim Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren dieser Verbindung mit Rutin (H-2', 7.66 ppm) und Isorhamnetin (H-2', 7.90 ppm) konnte festgestellt werden, dass H-2' (7.96 ppm) eine ähnliche Tieffeldverschiebung aufwies wie letzteres. Die Signale für H-6 und H-8 zeigten im Vergleich

mit Rutin keine weiteren Abweichungen, so dass sich die Methoxygruppe, die bei 3.96 ppm als Singulett erschien, an 3'-Position befinden musste und der Zucker an 3-OH O-glycosidisch gebunden vorlag. Die Verknüpfung oder Art des Zuckers war wegen starker Signalüberlappungen nicht eindeutig bestimmbar. Die Verbindung konnte somit als Isorhamnetin-3-O-diglycosid identifiziert werden.

**P5EcPr3 (Isorhamnetin-diglycosid)**

Systematischer Name :Diglycosyl-3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 624 g/mol

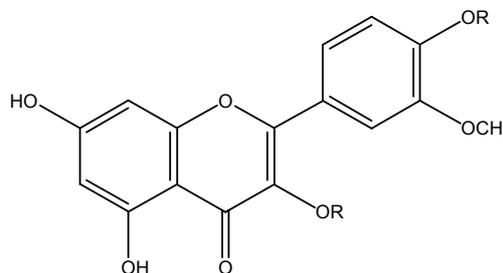
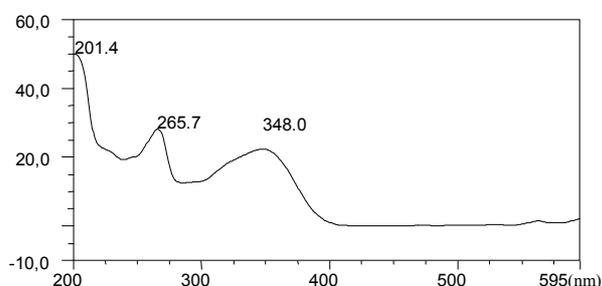
Summenformel: C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>16</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P5EcPr3 (2.1 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{26}$ : -23.5 (c = 0.06 MeOH)

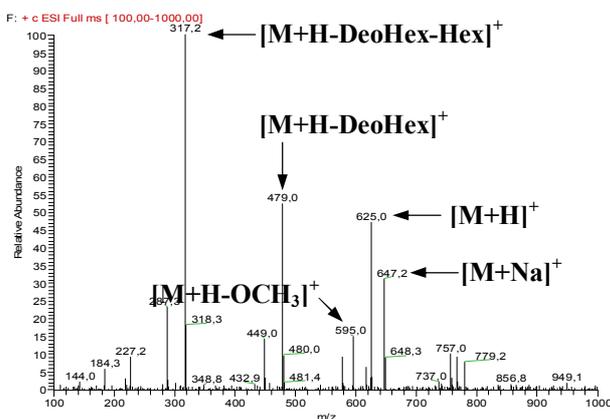
Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 20.3 min

UV – Spektrum

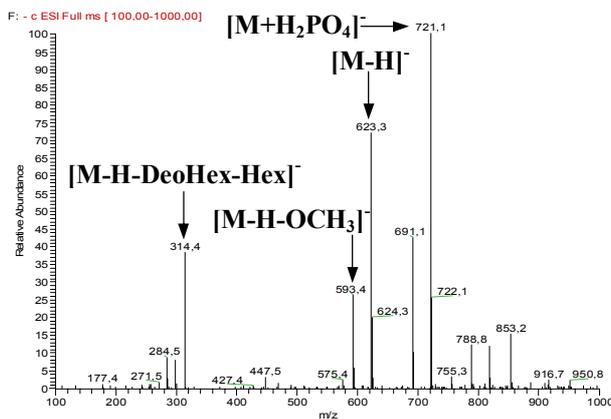


R=Glycosid  
(Strukturvorschlag)

ESI-MS+



ESI-MS-



Tab.E21a:NMR-Daten der Quercetin-Derivate

	Quercetin		Isoquercitrin			Isorhamnetin-3O-glucosid		Rutin			Isorhamnetin-3O-diglycosid	
	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^b$ (JHz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C$ NOE (CH3→H)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^b$ (JHz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^a$ (JHz)		
<b>2</b>			158.8					159.3				
<b>3</b>			135.7					135.6				
<b>4</b>			n.d.					179.4				
<b>4a</b>			105.4					104.8				
<b>5-OH</b>	12.44 s		162.9					163.0				
<b>6</b>	6.17 d (1.9)	6.20 d (1.6)	100.2	4a, 5, 7, 8	6.09 d (1.9)		6.20 d (1.6)	100.1	4a, 5, 6, 7, 8	6.17 d (2.2)		
<b>7</b>			165.9					166.3				
<b>8</b>	6.39 d (1.9)	6.39 d (1.6)	94.7	4a, 6, 7, 8a	6.25 d (1.9)		6.39 d (1.6)	94.9	4a, 6, 7, 8, 8a	6.36 d (2.2)		
<b>8a</b>			158.4					158.6				
<b>OCH<sub>3</sub></b>					3.93 s (3H)	2'				3.96 s (3H)		
<b>1'</b>			123.1					123.2				
<b>2'</b>	7.66 d (1.9)	7.70 d (2.5)	118.0	3	7.90 d (1.9)		7.66 d (1.9)	116.1	2, 3', 4', 6'	7.96 d (1.9)		
<b>3'</b>			145.7	2, 3', 4', 6'				145.9				
<b>4'</b>			149.8					149.8				
<b>5'</b>	6.87 d (8.2)	6.86 d (8.8)	n.d.	1', 3', 4'	6.89 d (8.5)		6.87 d (8.2)	117.7	1', 3', 4', 5'	6.90 d (8.5)		
<b>6'</b>	7.52 dd (8.2, 1.9)	7.58 dd (8.8, 2.5)	123.2	2', 4'	7.58 dd (8.5, 2.2)		7.63 dd (8.2, 1.9)	123.6	2, 2', 3', 4', 6'	7.54 dd (8.5, 1.9)		

 aufgenommen in <sup>a</sup>DMSO-d<sub>6</sub>, <sup>b</sup>CD<sub>3</sub>OD, n.d.=nicht detektiert, fett<sup>(Direktkorrelation)</sup>

Tab.E21b:NMR-Daten der Quercetin-Derivate

	Quercetin			Isoquercitrin			Isorhamnetin-3-O-glucosid			Rutin			Isorhamnetin-3-O-diglycosid		
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (JHz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ HMBC (H→C)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ NOE (CH <sub>3</sub> →H)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ HMBC (H→C)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ HMBC (H→C)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	
1''		5.25 d (7.6)	n.d.		5.30 d (7.6)			5.10 d (7.6)	102.4	3; 1''			5.88 d (7.6)		
2''		3.47 t (9.5)	n.d.		3.44 t (7.6)			3.48 t (8.8)	75.8	1'', 3''			3.67		
3''		3.41 t (8.8)	n.d.		3.42 t (9.1)			3.36 t (8.8)	78.2	5''			3.2-4.2		
4''		3.35 t (8.1)	n.d.		3.30 m			3.24 m	71.4	6''			3.2-4.2		
5''		3.21 m	n.d.		3.22 m			3.32 m	77.3	1'', 4'', 6''			3.2-4.2		
6''		3.71 dd (12.0, 2.5) 3.56 dd (12.0, 5.1)	n.d.		3.71 dd (12.0, 2.5) 3.55 dd (12.0, 5.4)			3.80 br d (10.4) 3.38 br d (10.4)	68.6	4'', 1'', 3'', 1''			3.2-4.2		
1'''								4.51 br s	102.0	6'', 3'', 5''			5.17 d (1.3)		
2'''								3.62 br s	72.1	3'''			3.2-4.2		
3'''								3.55 dd (9.5; 3.2)	72.3	4'', 5''			3.2-4.2		
4'''								3.28 m	74.0	3'', 5'', 6''			3.2-4.2		
5'''								3.43 m	69.7	4'', 5'', 6''			4.01		
6'''								1.11 d (5.7, 3H)	17.9				0.86 d (6.3, 3H)		

aufgenommen in <sup>4</sup>DMSO-d<sub>6</sub>, <sup>13</sup>CD<sub>3</sub>OD, n.d.=nicht detektiert, fett<sup>(Direktkorrelation)</sup>

## **Myricetin-Derivate**

Aus den verschiedenen Extrakten wurden drei Myricetin-Derivate isoliert. Die glycosidierten Verbindungen sind dabei analog den Quercetin-Verbindungen aufgebaut und unterscheiden sich von diesen nur durch die Addition einer OH-Gruppe im B-Ring an Position 5'.

Das Dihydromyricetin wurde ebenfalls in dieses Kapitel aufgenommen, obwohl es sich dabei um ein Flavanonol handelt, da große strukturelle Übereinstimmung zu den beiden Myricetin-Derivaten besteht.

### **Dihydromyricetin**

Aus Fraktion P8EgRP45 wurde eine Verbindung isoliert, die ein den Flavanolen ähnliches UV-Spektrum aufwies. Das Massenspektrum der Verbindung zeigte ein Molekulargewicht von 320 amu, jedoch waren im  $^1\text{H-NMR}$  lediglich fünf Signale zu beobachten. Zum einen waren die beiden meta-koppelnde Protonen H-6 bzw. H-8 (5.90 ppm bzw. 5.87 ppm) zu sehen, zum anderen ein im tiefen Feld erscheinendes Singulett für H-2'/6' (6.51 ppm). Zusätzlich zu diesen Signalen erschienen zwei weitere Dubletts für H-2 und H-3 (4.82 ppm und 4.45 ppm), die beide eine Kopplungskonstante von 11.4 Hz aufwiesen, welche die trans-Stellung von H-2 und H-3 belegte. Der gemessene Drehwert stimmte zudem mit dem der Literatur (Onda et al. 1989) für das (+)-2R,3R-Epimer überein. Ein Literaturvergleich der spektralen Daten (Shen et al. 1993) lieferte eine gute Übereinstimmung, somit handelte es sich bei der Verbindung um (+)-2R,3R-Dihydromyricetin.

**Dihydromyricetin (3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavanon)**

Systematischer Name: (2R,3R)-2,3-Dihydro-3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

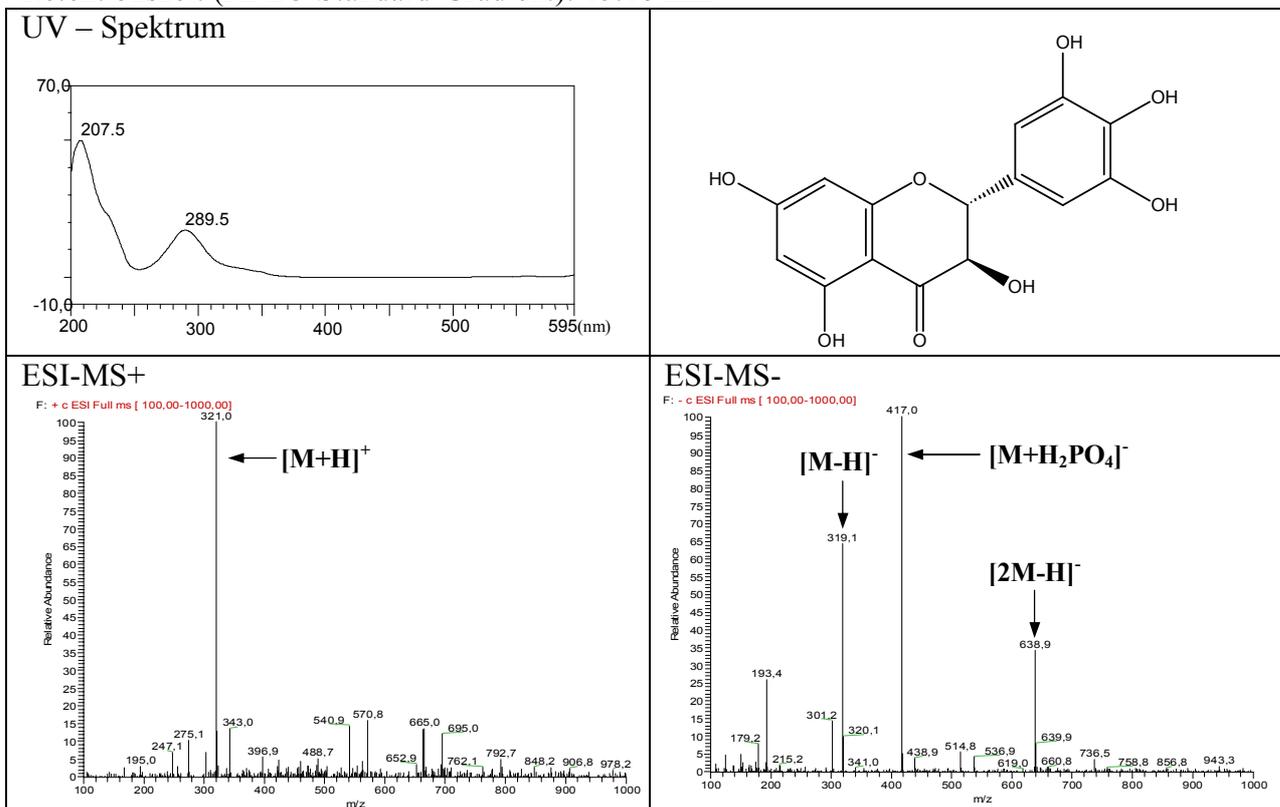
Molekulargewicht: 320 g/mol

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P8EgRP45 (4 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : +17.8 (c = 0.08 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 15.18 min

**Isomyricitrin**

Das UV-Spektrum dieser Verbindung zeigte die charakteristischen Maxima für ein Flavonol-Derivat. Das Massenspektrum lieferte ein Molekulargewicht von 480 amu, ebenso zeigte es die Abspaltung einer Hexose und damit ein Aglykon mit der Masse von 318 amu. Ein entsprechendes Flavonol, welches den oben aufgeführten Daten entspricht, ist Isomyricitrin. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung waren H-2' und H-6', die chemisch äquivalent sind, als Singulett (7.34 ppm) zu beobachten, daneben lagen die charakteristischen Signale der meta-koppelnden Protonen H-6 und H-8 (6.20 und 6.38 ppm) vor. Die Position der Hexose konnte durch ein Kreuzsignal des anomeren Protons (5.25 ppm) zu einem Signal bei 135.6 ppm, welches durch Literaturvergleich C-3 zuzuordnen war, belegt werden. Die Identifizierung des Zuckers als β-D-Glucose wurde durch Interpretation der Aufspaltungsmuster und Korrelationen im <sup>1</sup>H-NMR- und COSY-Spektrum bestätigt. Somit

wurde die Verbindung als Isomyricitrin identifiziert, was im Einklang mit Literaturdaten war (Kazuma et al. 2003).

**Isomyricitrin (3O-Glucosyl-3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon)**

Systematischer Name: 3-O-β-D-Glucopyranosyl-3,5,7-Trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

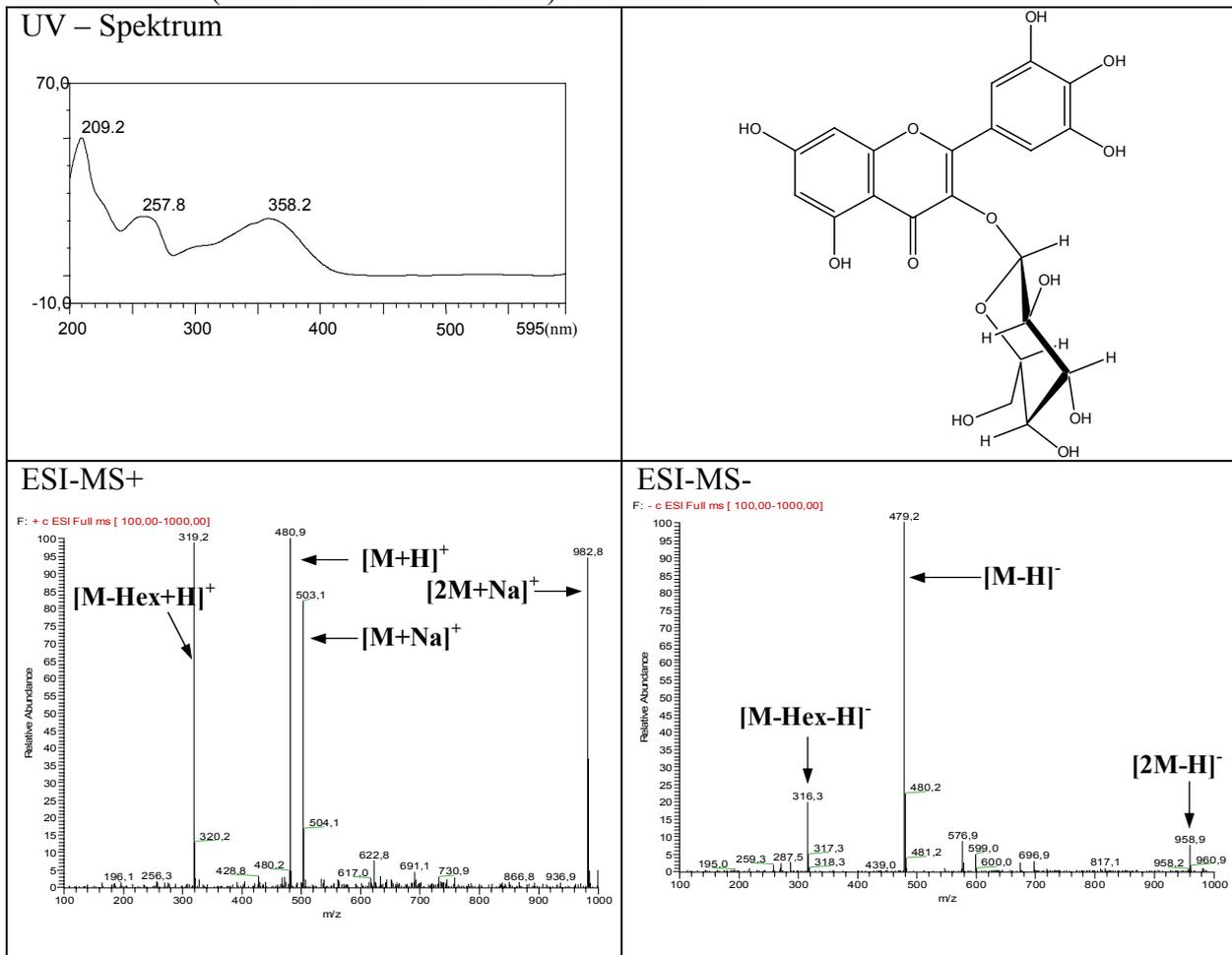
Molekulargewicht: 480 g/mol

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>13</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P8EgRP55 (1.2 mg), P8Bi (4.8 mg)

Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -23.2 (c = 0.022 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 19.78 min



**Myricetin-3O-rutinosid**

Diese Verbindung wies ein dem Isomyricitrin ähnliches UV-Spektrum auf. Das Massenspektrum zeigte jedoch zusätzlich zur Abspaltung einer Hexose auch das Fragment einer Desoxyhexose, also eine Molekülmasse von 626 amu. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum wies die beiden Dubletts der Protonen H-6 und H-8 (6.23 und 6.41 ppm), ein Singulett bei 7.30 ppm für H-2'/6' und außerdem die Protonen der Zucker auf. Die Kopplungsmuster der Signale ermöglichten die Identifizierung der Desoxyhexose als α-L-Rhamnopyranose, wohingegen die Hexose mit Hilfe der <sup>13</sup>C-Daten eindeutig als β-D-Glucose (Kalinowski et al. 1984)

zugeordnet werden konnte. Ein Vergleich mit der Literatur (Kazuma et al. 2003) zeigte gute Übereinstimmung und somit handelte es sich bei dieser Verbindung um Myricetin-3-O-rutinosid.

### Myricetin-3-O-rutinosid

Systematischer Name: 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 626 g/mol

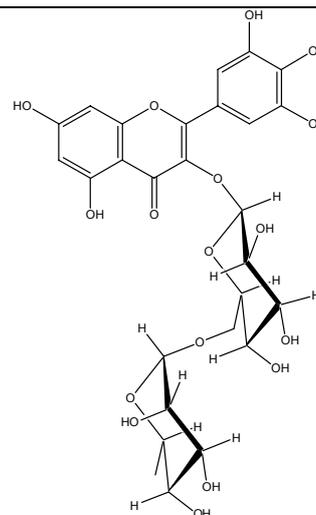
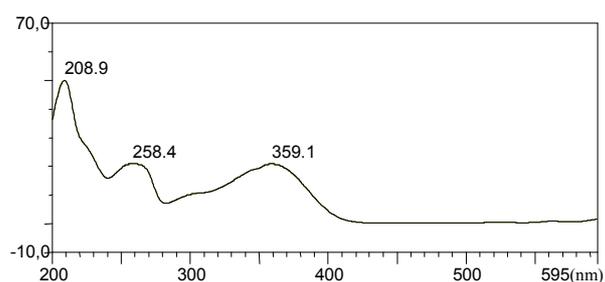
Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P2BgRP3 (4.7 mg)

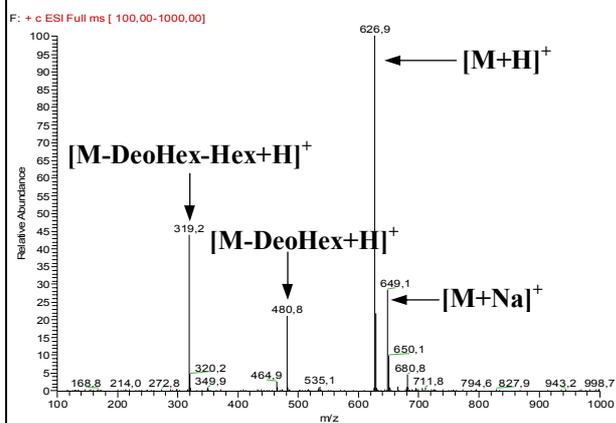
Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : 2.5 (c = 0.48 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 20.09 min

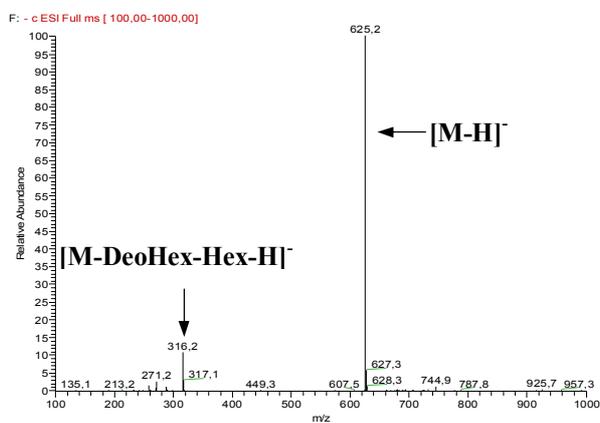
#### UV – Spektrum



#### ESI-MS+



#### ESI-MS-



Tab.E22a: NMR-Daten der Myricetin-Derivate

	Dihydromyricetin			Isomyricitrin			Myricetin-3O-rutinosid		
	$\delta_H^a$ (J/Hz)	$\delta_H^a$ (J/Hz)	$\delta_C^b$ (J/Hz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^a$ (J/Hz)	$\delta_H^a$ (J/Hz)	$\delta_C^b$ (J/Hz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	
<b>2</b>	4.82 d (11.4)		159.1				159.4		
<b>3</b>	4.45 d (11.4)		135.6				135.8		
<b>4</b>			n.d.				179.4		
<b>4a</b>			n.d.				105.6		
<b>5</b>			n.d.				163.0		
<b>6</b>	5.90 d (1.9)	6.20 d (1.9)	n.d.			6.23 d (2.0)	100.0	4a, 5, 7, 8	
<b>7</b>			n.d.				166.2		
<b>8</b>	5.87 d (1.9)	6.38 d (1.9)	n.d.			6.41 d (2.0)	94.8	4a, 6, 7, 8a	
<b>8a</b>			n.d.				158.5		
<b>1'</b>			121.9				122.1		
<b>2'/6'</b>	6.51 s (2H)	7.34 s (2H)	110.0	2, 1', 2', 3', 4', 5', 6'	7.30 s (2H)	7.30 s (2H)	110.3	2, 1', 2', 3', 4', 5', 6'	
<b>3'/5'</b>			146.0				146.3		
<b>4'</b>			137.8				138.1		

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD fett (Direktkorrelation)

Tab.E22b: NMR-Daten der Myricetin-Derivate

	Dihydromyricetin		Isomyricitrin		Myricetin-3-O-rutinosid			
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C)	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C)
1''		5.25 d (7.6)	n.d.	3	5.11 d (7.6)	104.8	3	
2''		3.50 t (8.8)	n.d.		3.52 dd (7.8, 9.1)	75.7	1'', 3''	
3''		3.43 t (8.8)	n.d.		3.45 m	78.2	2''	
4''		3.37 t (9.5)	n.d.		3.35 m	71.4	6''	
5''		3.22 m	n.d.		3.32 m	77.2	6''	
6'' <sub>A/B</sub>		3.72 dd (14.2, 7.5)	n.d.		3.83 dd (10.9, 1.3)	68.6	5'', 1''', 3'', 4''	
		3.61 dd (14.2, 5.04)			3.42 dd (10.9, 5.7)			
1'''					4.55 d (1.3)	102.2	3''', 5'''	
2'''					3.65 dd (3.5, 1.6)	72.1	3''', 4'''	
3'''					3.57 dd (9.5, 3.5)	72.2	4'''	
4'''					3.30 t (9.5)	74.0	2''', 3''', 5'''	
5'''					3.46 dd (9.5, 6.0)	69.7	4'''	
6'''					1.18 d (1.3, 3H)	17.9	4''', 5''', 6'''	

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD fett<sup>(Direktkorrelation)</sup>

### 3.5.1.4. Isoflavonoide und ihre Derivate

Substanzen aus der Klasse der Isoflavonoide konnten aus *Glycine max* und *Phaseolus coccineus* isoliert werden. Sie unterscheiden sich von den vorher beschriebenen Flavonoiden durch die Stellung des B-Ringes, der an 3-Position des C-Ringes sitzt. Sie wiesen alle ein einzelnes UV-Maximum zwischen 240-270 nm auf.

#### Genistein

Die erste Verbindung wurde aus beiden der oben genannten Pflanzen isoliert und wies ein UV-Maximum bei 260 nm und eine Molekülmasse von 270 amu auf. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte sowohl das AA'BB'-System des B-Ringes als auch die beiden meta-koppelnden Protonen des A-Ringes gefunden werden. Ein einzelnes Singulett bei 8.05 ppm erschien für H-2. Die Verbindung wurde durch Vergleich mit einem authentischen Standard überprüft und eindeutig als Genistein identifiziert.

#### Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon)

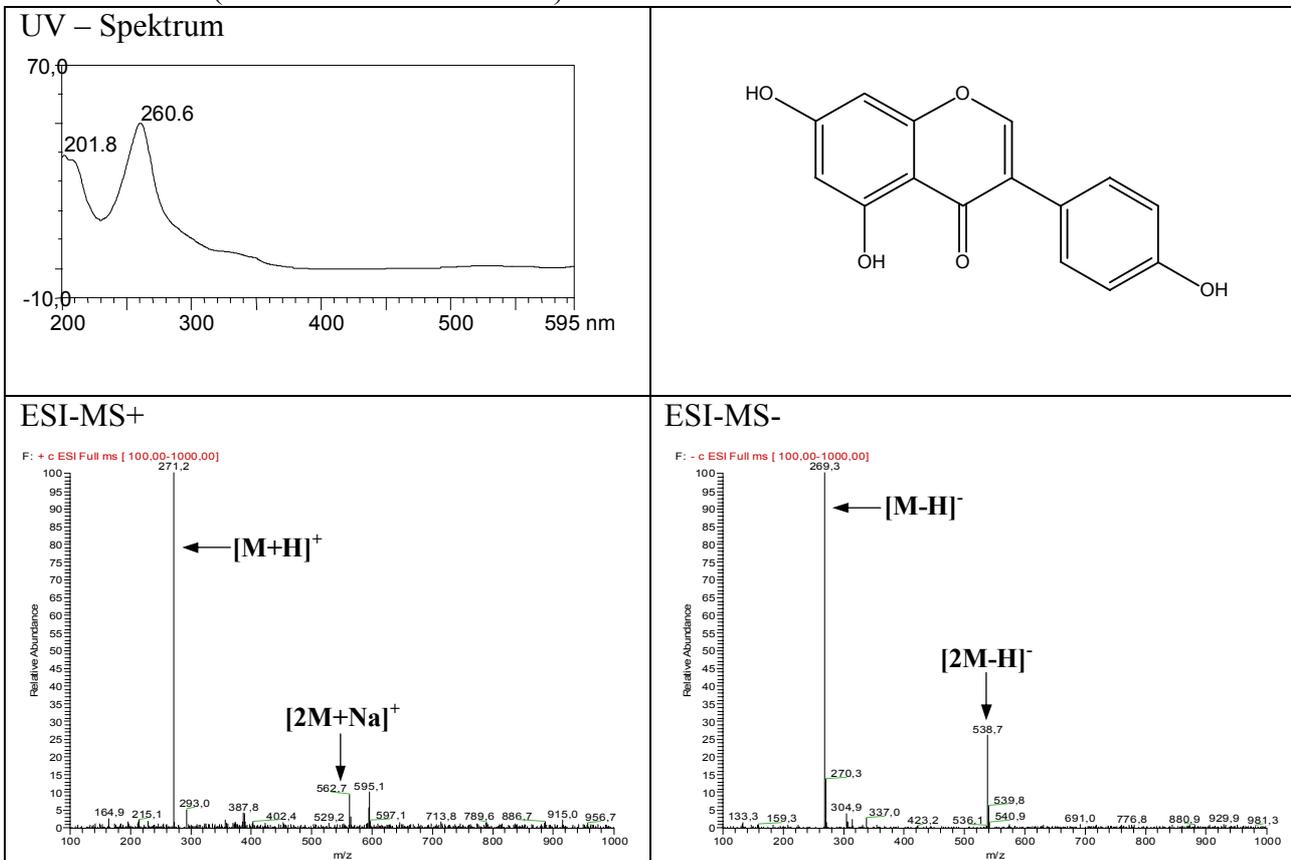
Systematischer Name: 5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 270 g/mol

Summenformel:  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P3Ef (3.7 mg), P4EdPr3 (0.9 mg)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 24.82 min



**Genistin**

Eine Verbindung, die ebenfalls ein UV-Maximum bei 260 nm besaß, jedoch viel polarer war und damit unter Standardbedingungen früher von der HPLC-Säule eluierte, wies eine Molekülmasse von 432 amu auf. Im Massenspektrum konnte bei positiver Ionisierung die Abspaltung einer Hexose sowie ein Aglykon von 271 amu beobachtet werden. Es lag in diesem Fall wieder eine Verunreinigung der Lösungsmittel mit Phosphat vor, so dass entsprechende Fragmente bei negativer Ionisierung zu sehen waren. Im  $^1\text{H-NMR}$  konnte ein Singulett und ein AA'BB'-System beobachtet werden, deren chemische Verschiebungen denen des Genisteins entsprachen. Die Signale für zwei meta-koppelnde Protonen waren ebenfalls zu sehen, jedoch lag eine Verschiebung der Signale ins tiefere Feld vor. Diese wies auf eine Glycosidierung an 7-OH hin, welche im HMBC-Spektrum bestätigt wurde. Hier war ein Kreuzsignal von dem anomeren Proton bei 5.03 und einem Signal bei 165.1 ppm (C-7) zu sehen. Auf Grund der Tieffeldverschiebung musste es sich bei diesem Signal um ein sauerstofftragendes C-Atom handeln. Da ebenfalls Kreuzsignale von H-6 und H-8 zu diesem Signal existierten, blieb lediglich die genannte Position als Verknüpfungspunkt übrig. Der Zucker wurde durch Auswertung der  $^1\text{H-NMR}$ - und COSY-Spektren als  $\beta$ -D-Glucose bestimmt. Somit wurde die Verbindung als Genistin identifiziert, was durch Vergleich mit einem authentischen Standard und Literaturdaten bestätigt wurde (Lewis et al. 1998).

**Genistin (Genistein-7O-glucosid)**

Systematischer Name: 7O-β-D-Glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 432 g/mol

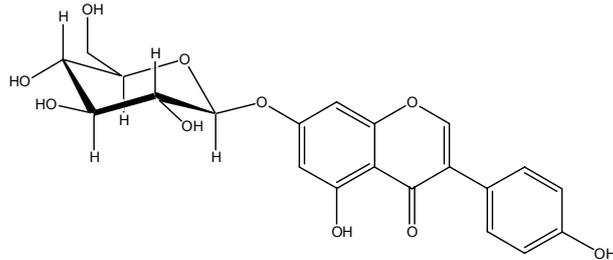
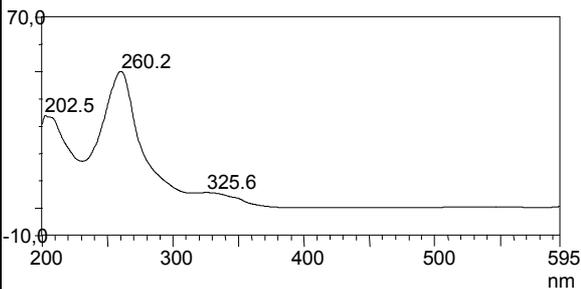
Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P3BD30D+ERP55 (1.2 mg), P4EdPr1 (1.5 mg), P3EeDCU (10.2 mg), P3BD80DRP50 (6.5 mg)

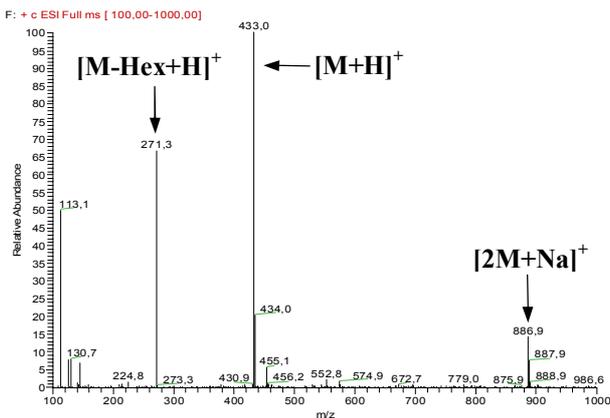
Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -31.6 (c = 0.48 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 19.48 min

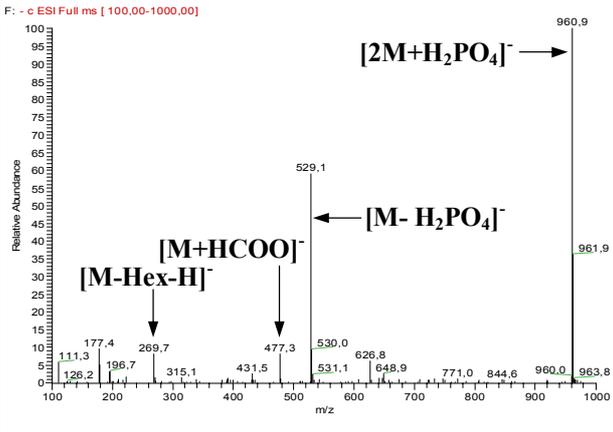
UV – Spektrum



ESI-MS+



ESI-MS-



**Daidzein**

Eine weitere Fraktion enthielt eine Verbindung, deren Retentionszeit wieder der des Genisteins ähnlich war, jedoch ein unterschiedliches UV-Spektrum und eine Masse von 255 amu bei positiver Ionisierung aufwies. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung konnte neben einem AA'BB'-System bei 7.33 und 6.82 ppm (H-2'/6' und H-3'/5') und einem Singulett bei 7.96 ppm (H-2) auch ein ABC-System beobachtet werden. Die Signale des ABC-Systems waren den Protonen des A-Ringes zuzuordnen. Das Proton des ortho-koppelnden Signals (7.86 ppm) konnte im HMBC als H-5 bestimmt werden, da es ein Kreuzsignal mit C-4 und C-8a zeigte, welche ebenso von H-2 zu beobachten waren. Entsprechend wurden die Signale bei 6.70 ppm bzw. 6.50 ppm H-6 bzw. H-8 zugeordnet, was es ermöglichte die Verbindung als

Daidzein zu identifizieren. Außerdem waren die spektralen Daten in Übereinstimmung mit der Literatur (Balasubramanian et al. 2000; Murthy et al. 1986).

### Daidzein (4',7-Dihydroxyisoflavon)

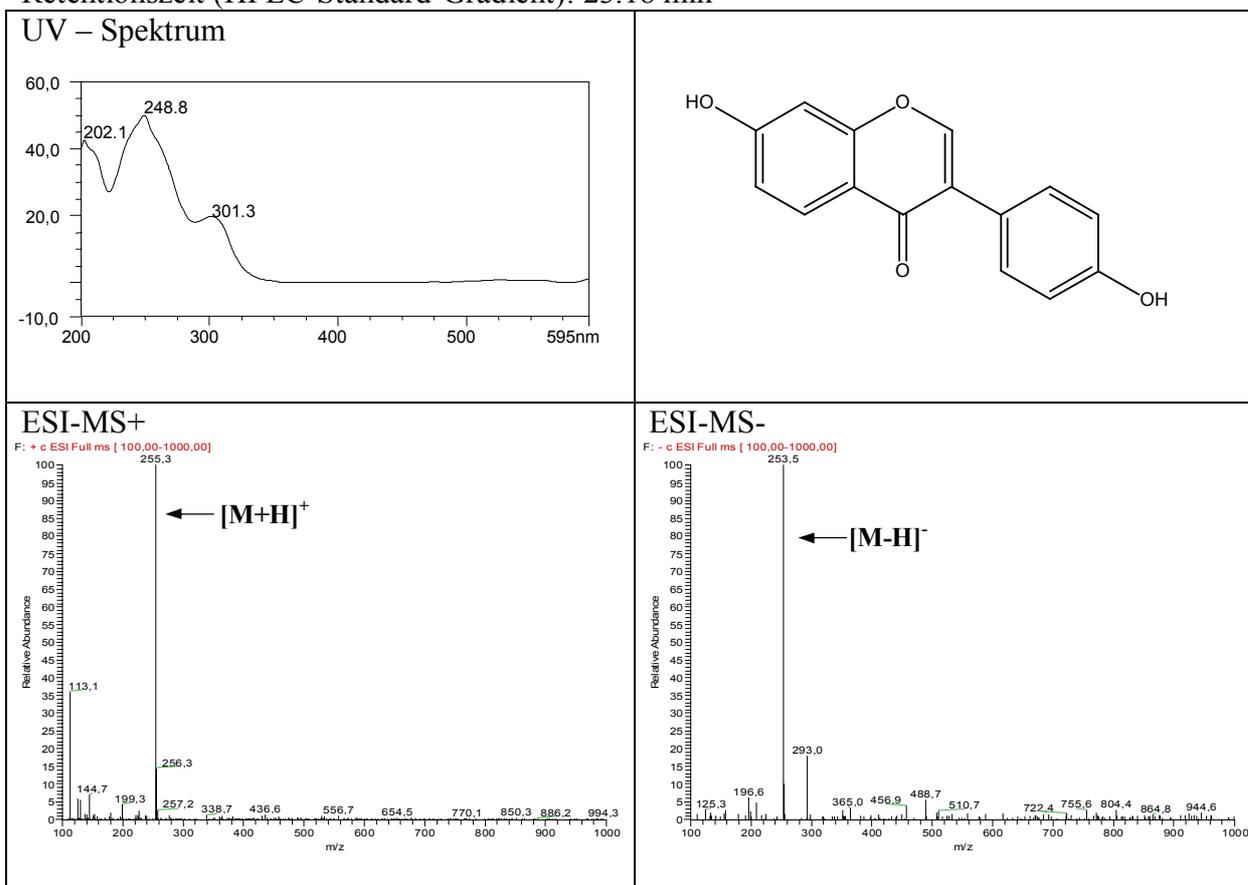
Systematischer Name: 7-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 254 g/mol

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P3EeDCO (5.1 mg)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 23.18 min



### Daidzin

Das UV-Spektrum dieser Verbindung ähnelte dem des Daidzeins. Gleichzeitig verkürzte sich die Retentionszeit, d.h. die Substanz war damit also wieder wesentlich polarer als Daidzein. Im Massenspektrum wurde ein Molekülion von 417 amu bei positiver Ionisierung beobachtet, zudem die Abspaltung einer Hexose, die das Aglykon mit einer Masse von 254 amu lieferte. Im <sup>1</sup>H-NMR wurde ein AA'BB'-System für die Signale des B-Rings und ein Singulett bei 8.2 ppm für H-2 detektiert. Das bereits bei Daidzein beschriebene ABC-System des A-Ringes war in diesem Fall ins tiefe Feld verschoben, so dass eine Substitution an 7-OH vorliegen musste. Das Aufspaltungsmuster und die Kopplungskonstanten des Zuckers waren in Übereinstimmung mit dem einer β-D-Glucose. Ein Vergleich der NMR-Daten mit der Literatur (Lewis et al. 1998) identifizierte die Verbindung eindeutig als Daidzin.

**Daidzin (Daidzein-7O-glucosid)**

Systematischer Name: 7O-β-D-Glucopyranosyl-7-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

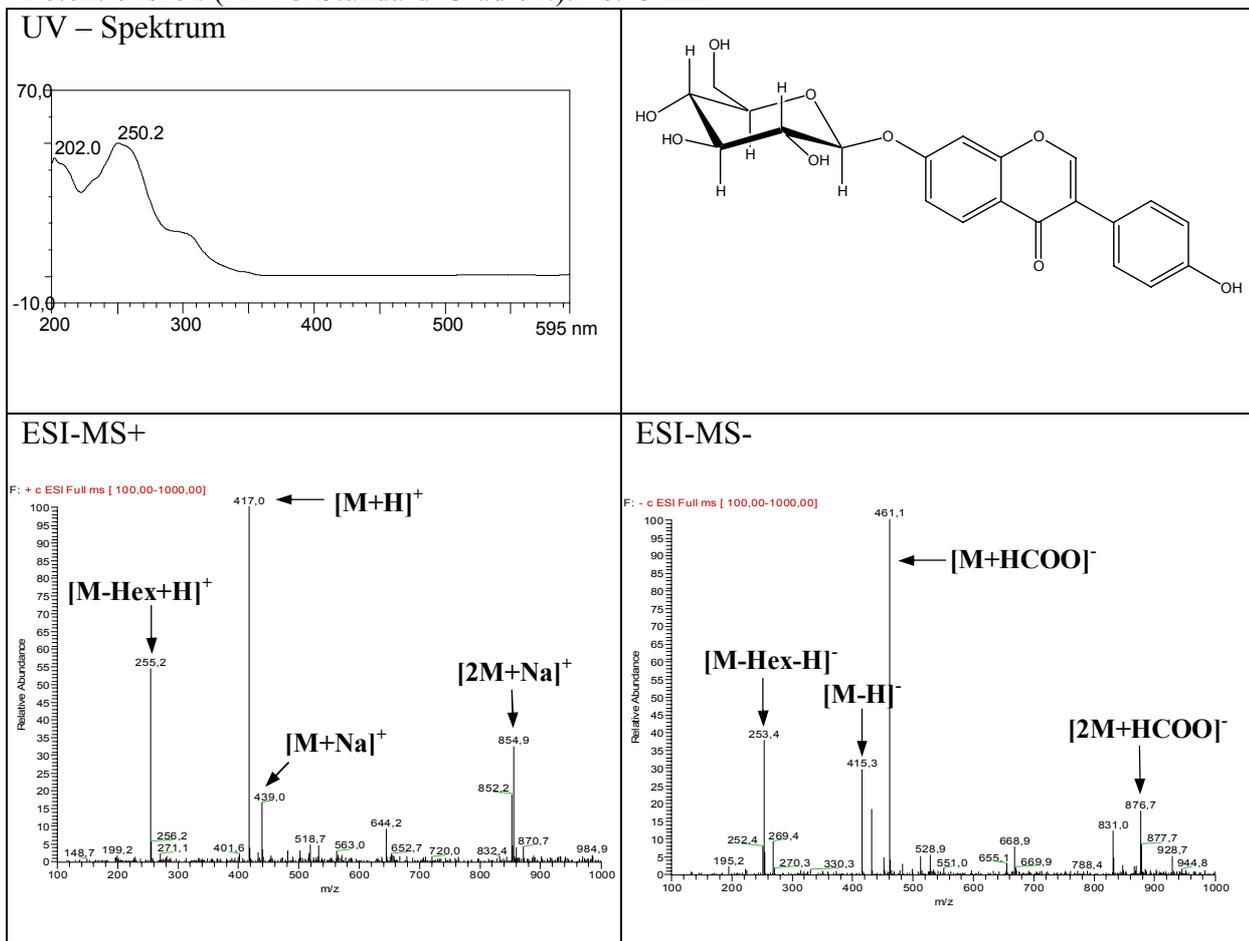
Molekulargewicht: 416 g/mol

 Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P3D30BRP35 (4.9 mg), P4EcPr1 (1.1 mg)

 Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -32.5 (c = 0.034 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 18.13 min


**Glycitin**

Die letzte der Verbindungen vom Isoflavonoidtyp zeigte ein dem Daidzein vergleichbares UV-Spektrum. Das Massenspektrum lieferte eine Molekülmasse von 446 amu, wobei die Abspaltung einer Hexose zu beobachten war, welche nachfolgend ein Aglykon lieferte, das um 30 amu schwerer als Daidzein war. Somit lag eine Methoxylierung dieses Aglykons vor. Im Unterschied zu Daidzin war im <sup>1</sup>H-NMR neben dem AA'BB'-System und dem Singulett für H-2 kein ABC-System zu erkennen, sondern lediglich zwei weitere Singulets bei 7.63 ppm (H-5) und 7.34 ppm (H-8). Zusätzlich war ein Signal für eine Methoxygruppe bei 3.95 ppm vorhanden. Auf Grund der beiden Singulets mussten sich die beiden Protonen des A-Ringes in para-Stellung zueinander befinden. Dies war nur in 5 und 8 Stellung möglich und

somit lag eine Substitution im A-Ring an Position 6 und 7 vor. In einem ROESY-Experiment konnten Kreuzsignale von dem anomeren Proton (5.10 ppm) des Zuckers zu dem Singulett bei 7.34 ppm und von der Methoxygruppe zu dem Signal bei 7.63 ppm beobachtet werden.

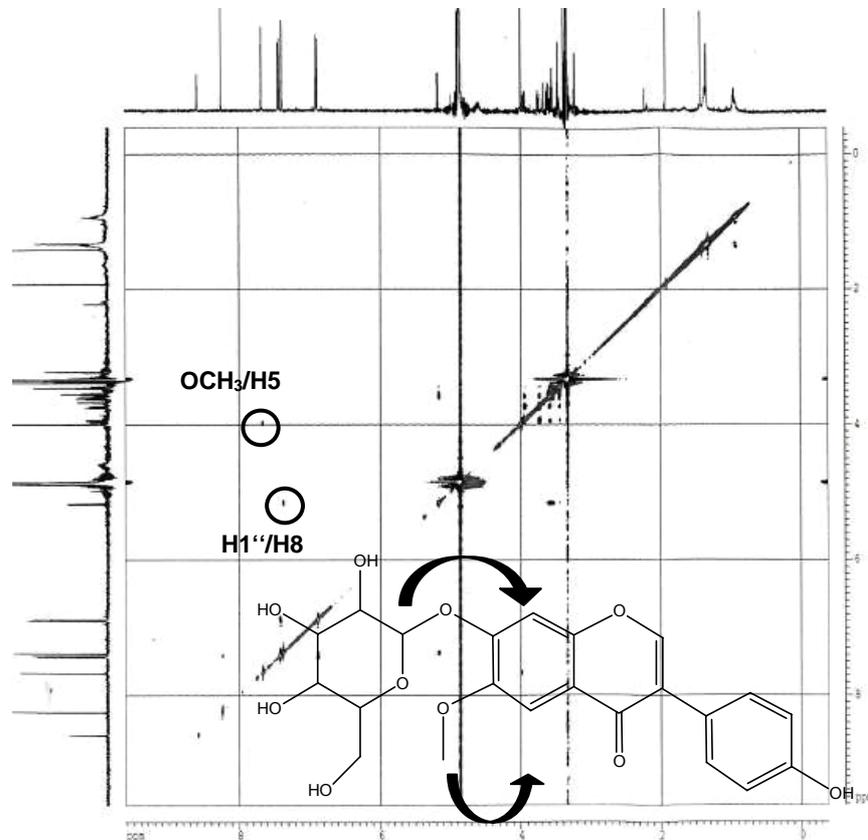


Abb.E61: ROESY-Spektrum von Glycitin

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe der durch Daidzein und Daidzin erhaltenen Daten und durch Vergleich mit Literaturwerten (Park et al. 1999). Somit handelt es sich bei der vorliegenden Verbindung um Glycitin.

**Glycitin (7O-glucosyl-6-Methoxy-4',7-dihydroxyisoflavin)**

Systematischer Name: 6-Methoxy, 7-O-β-D-glucopyranosyl,-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Molekulargewicht: 446 g/mol

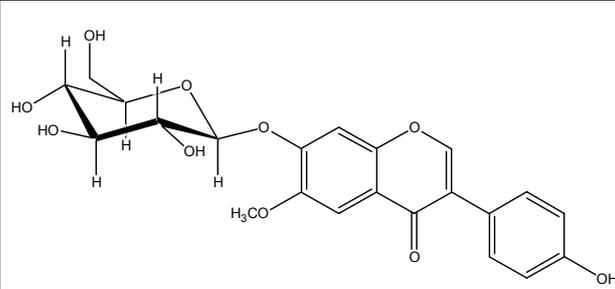
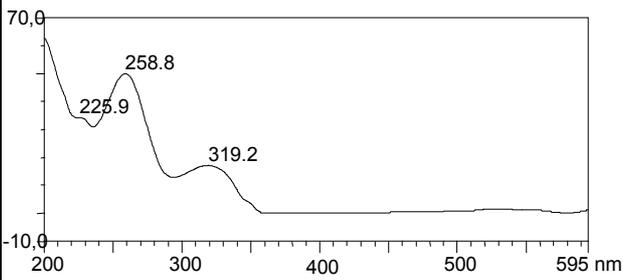
Summenformel: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): P4EcPr2 (1.6 mg)

Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: 11.75 (c = 0.05 MeOH)

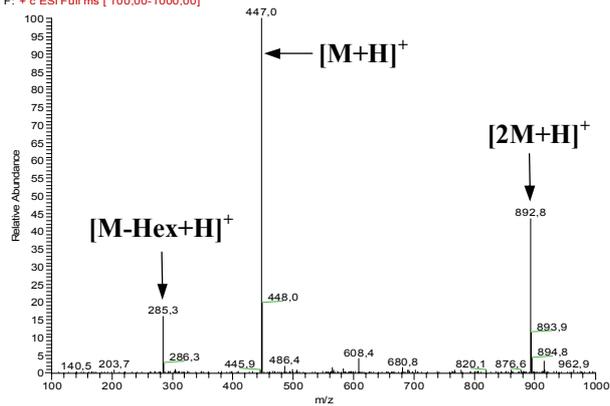
Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 18.27 min

UV – Spektrum



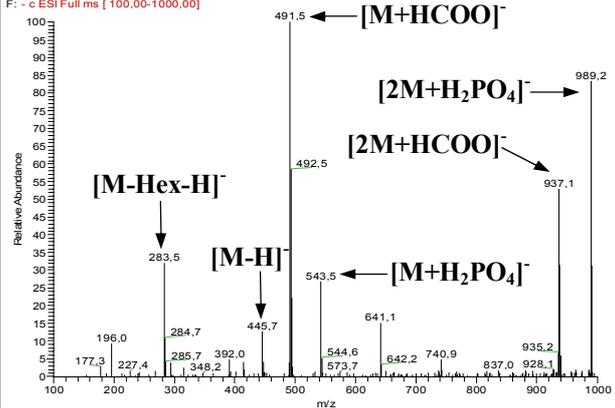
ESI-MS+

F: + c ESI Full ms [ 100.00-1000.00]



ESI-MS-

F: - c ESI Full ms [ 100.00-1000.00]



Tab.E23a: NMR-Daten der Isoflavonoide

	Genistein		Genistin		Daidzein		Daidzin		Glycitin	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (JHz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	ROESY (H→H)
<b>2</b>	8.05 s	8.1 s	155.4	3,4,8a, 1'	7.96 s	153.4	2, 4, 8a, 1'	8.2 s	8.21 s	
<b>3</b>			125.8			n.d.				
<b>4</b>			183.0			178.1				
<b>4a</b>			108.5			113.3				
<b>5</b>			n.d.		7.86 d (8.8)	n.d.	4, 7, 8a	8.15 d (8.8)	7.63 s	
<b>6</b>	6.21 d (2.2)	6.49 d (1.9)	101.6	4a, 7, 8	6.70 dd (8.8, 2.5)	121.5	4a, 8	7.21 dd (8.8, 2.5)		
<b>7</b>			165.1			176.2				
<b>8</b>	6.33 d (2.2)	6.67 d (1.9)	96.0	4a, 6, 7, 8a	6.50 d (1.9)	104.0	4a, 6	7.25 d (1.9)	7.34 s	
<b>8a</b>			159.6			161.1				
<b>OCH<sub>3</sub></b>									3.95 s (3H)	H5

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD <sup>b</sup>erhalten aus HMBC Spektrum n. d. nicht detektiert, fett (Direktkorrelationen)

Tab.E23b: NMR-Daten der Isoflavonoide

	Genistein		Daidzein		Daidzin		Glycitin		
	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^b$ (JHz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_C^b$ (JHz)	$\delta_C$ HMBC (H→C)	$\delta_C^b$ (JHz)	$\delta_H^a$ (JHz)	ROESY (H→H)
<b>1'</b>		121.7			125.0				
<b>2'/6'</b>	7.36 d (8.5, 2H)	131.7	3, 2', 4', 6'	7.33 d (8.2)	131.3	1', 2', 4', 6'	7.37 d (8.8)	7.38 d (8.2)	
<b>3'/5'</b>	6.83 d (8.8, 2H)	117.7	1', 3', 4', 5'	6.82 d (8.8)	115.9	1', 3', 4', 5'	6.84 d (8.8)	6.85 d (8.8)	
<b>4'</b>		161.9			158.6				
<b>1''</b>		n.d.	7				5.10 d (7.6)	5.13 d (7.6)	H8
<b>2''</b>		n.d.					3.51 t (3.2)	3.57 t (8.8)	
<b>3''</b>		n.d.					3.51 t (3.2)	3.51 t (8.8)	
<b>4''</b>		n.d.					3.41 t (9.5)	3.41 t (9.5)	
<b>5''</b>		n.d.					3.54 m	3.54 m	
<b>6''<sup>A/B</sup></b>		n.d.					3.92 dd (12.3, 1.9) 3.71 dd (12.3, 6.3)	3.91 dd (12.6, 2.5) 3.70 dd (12.6, 6.3)	

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD <sup>b</sup>erhalten aus HMBC Spektrum n.d. nicht detektiert, fett (<sup>D</sup>Direktkorrelationen)

### 3.5.2. Einfache Phenylpropan-Derivate und ähnliche Verbindungen

Die Phenylpropan-Derivate sind eine Gruppe von Naturstoffen, deren Grundkörper (1-Phenylpropan) ebenfalls aus dem Shikimisäurestoffwechsel entsteht. Dabei werden die unterschiedlichen Strukturen nach der Art ihrer Seitenkette eingeteilt (Einteilung nach (Teuscher et al. 2004):

- Phenylaminopropionsäuren
- Phenylacrylsäuren (Zimtsäuren)
- Cumarine
- Phenylacrylaldehyde
- Phenylallylalkohole (Zimtalkohole)
- Phenyl-prop-1-ene/Phenyl-prop-2-ene
- Lignane
- Lignine

Ausgehend von den Phenylaminopropionsäuren werden die Phenylacrylsäuren durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) gebildet. Weitere Modifizierungen in der Seitenkette liefern dann die oben genannten Derivate. Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen werden der oben stehenden Einteilung nach besprochen. Es handelt sich dabei um Phenylacrylsäuren und deren Derivat, aber auch um Phenylallylalkohole.

#### Phenylacrylsäuren (Zimtsäuren)

##### (E)-Ferulasäure

Diese Verbindung aus *Phaseolus vulgaris* var. *nanus* wies ein UV-Maximum bei 322 nm auf sowie Schultern bei ca. 300 nm und 350 nm. Das Molekulargewicht wurde per EI-MS zu 194 amu bestimmt.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum dieser Verbindung zeigte insgesamt sechs Signale. Es wurde unter anderem das ABC-System eines 3,4 disubstituierten Phenyls beobachtet, wie es auch bei den Flavanolen und anderen Verbindungen bereits beschrieben wurde. Zusätzlich waren zwei Dubletts mit einer großen Kopplungskonstante von 16.1 Hz zu beobachten, die den beiden Protonen der Doppelbindung zuzuordnen waren und die trans-Stellung der Substituenten belegten. Daneben war das Singulett einer Methoxygruppe bei 3.90 ppm zu sehen. Somit handelte es sich bei dieser Verbindung um Ferulasäure, was durch Vergleich mit Literaturdaten (Nomura et al. 2003) und einem authentischen Standard bestätigt wurde.

**(E)-Ferulasäure (Kaffeesäure-3-methylether)**

Systematischer Name: 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(E)-propensäure

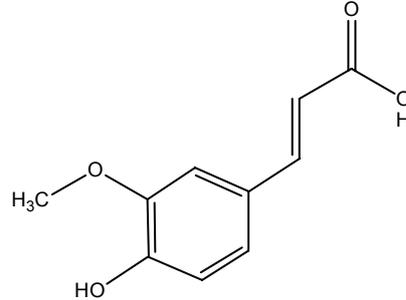
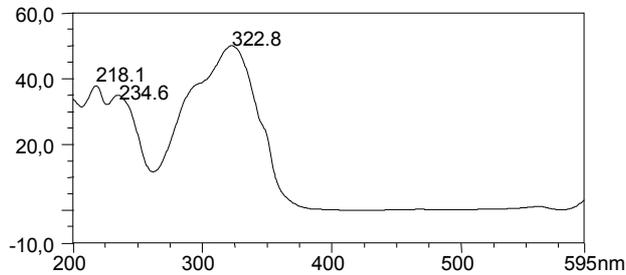
Molekulargewicht: 194 g/mol

Summenformel: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>

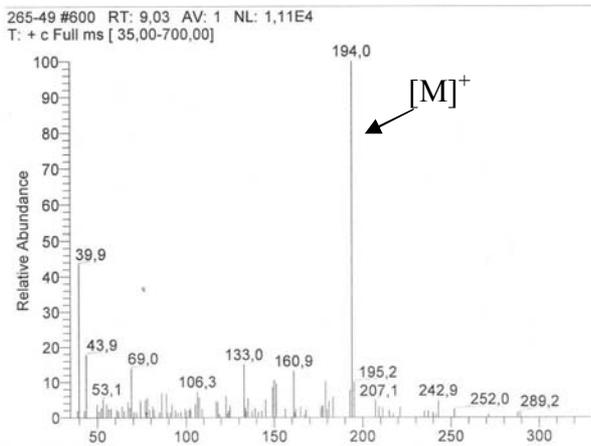
Probenbezeichnung (Substanzmenge): P8EcPr4 (2 mg)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 18.62 min

UV – Spektrum



GC-EI



**Tab.E24:** NMR-Daten Vergleich der Probe mit Ferulasäure (Literatur)

	$\delta_H^a$ (JHz)	$\delta_H$ (Literatur*) (JHz)
<b>2</b>	7.17 d (2.2)	7.11 d (1.6)
<b>5</b>	6.80 d (8.2)	6.77 d (8.0)
<b>6</b>	7.05 dd (8.2, 1.9)	6.97 dd (8.0, 1.6)
<b>7</b>	7.58 d (16.1)	7.30 d (15.6)
<b>8</b>	6.29 d (16.1)	6.41 d (15.6)
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3.90 s (3H)	3.79 s

<sup>a</sup> aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD \*(Nomura et al. 2003)

### (E)-Chlorogensäure

Die Verbindung AD2gRP3 zeigte ein UV-Spektrum, welches durch die im Arbeitskreis vorhandene Spektrenbibliothek als Chlorogensäure identifiziert wurde. Bei Betrachtung des Massenspektrums war bei positiver Ionisierung ein Molekülionenpeak von 355 amu zu sehen, außerdem ein Fragment von 162 amu, welches durch Abspaltung der Chinasäure zustande kommt. Bei negativer Ionisierung hingegen war ein Fragment von 192 amu zu beobachten, das nach Abspaltung des Caffeoylrestes erhalten wird.

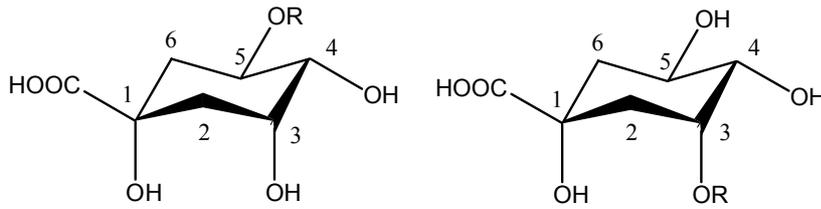
Die Signale dieser beiden Teilstrukturen waren ebenso im  $^1\text{H-NMR}$  zu erkennen. Neben dem ABC-System der Kaffeesäure waren zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstanten von 16.0 Hz zu beobachten, die die trans-Stellung der Doppelbindung belegten. Für die Chinasäure wurden insgesamt sieben Signale beobachtet, deren Zugehörigkeit zu einem gemeinsamen Spinsystem im COSY-Spektrum belegt wurde.

Als nicht trivial erwies sich die Zuordnung der Verbindung zu den beiden Stereoisomeren Chlorogensäure und Neochlorogensäure. Chlorogensäure und Neochlorogensäure sind Diastereomere, die sich in der absoluten Konfiguration an C1 und C4 unterscheiden. Die in der pharmazeutischen Literatur gebräuchliche Inversion der Stereochemie an C3 und C5 der Chlorogensäure liefert jedoch das Enantiomer der Neochlorogensäure (Pauli et al. 1999). Bei der Chlorogensäure ist die estersubstituierte OH-Gruppe an Position 5 äquatorial angeordnet, während sich bei der Neochlorogensäure derselbe Substituent an der axial-ständigen OH-Funktion an Position 3 befindet (siehe Abb.E62). Definitionsgemäß wird die zur Carboxylfunktion an C1 cis-ständige Hydroxyfunktion als C5 bezeichnet.

Beide Verbindungen weisen einen ähnlichen Satz an Kopplungskonstanten auf, der allerdings in Verbindung mit den chemischen Verschiebungen eine sichere Unterscheidungsmöglichkeit bietet (Pauli et al. 1999). Im Falle der Chlorogensäure weist das auf Grund der Esterbindung am meisten tieffeldverschobene Proton zwei große axial-axiale Kopplungen (8-12 Hz) auf, während bei der Neochlorogensäure das entsprechende Proton an dem estersubstituierten Kohlenstoffatom äquatorial steht und deshalb erheblich kleinere Kopplungen aufweist.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung konnte bei 5.37 ppm ein Signal gefunden werden, das als Dublett vom Triplet mit einer großen Kopplungskonstanten von 11.4 Hz erschien. Diese ist auf die beiden axial-axialen Wechselwirkungen zu  $\text{H-6}_{\text{ax}}$  und H-4 zurückzuführen. Entscheidend ist die Tatsache, dass dieses Signal auf Grund der Esterbindung eine deutliche Tieffeldverschiebung aufweist. Es handelt sich bei der vorliegenden Verbindung somit um Chlorogensäure.

## Strukturaufklärung-einfache Phenylpropan-Derivate



Chlorogensäure  
(R=trans-Kaffeesäure)

Neochlorogensäure  
(R=trans-Kaffeesäure)

Abb.E62: Stereochemie der Caffeoylchinasäure

### (E) - Chlorogensäure (5O-Caffeoyl-chinasäure)

Systematischer Name: 5-((E)-3,4-Dihydroxycinnamoyl)-chinasäure

Molekulargewicht: 354 g/mol

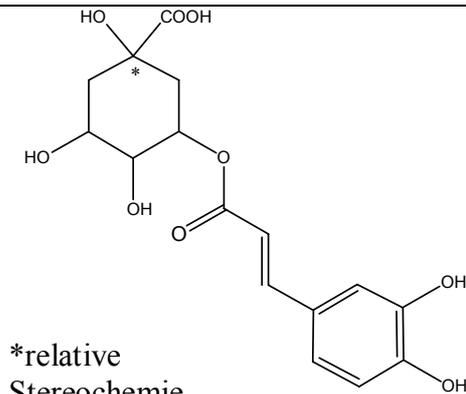
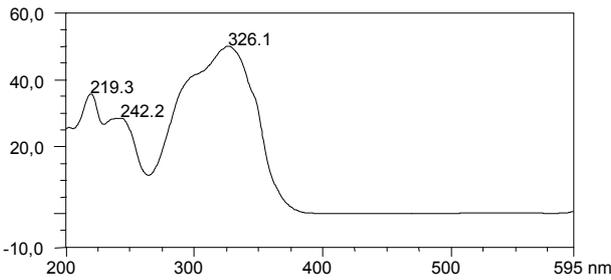
Summenformel: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): AD2gRP3 (4.8 mg)

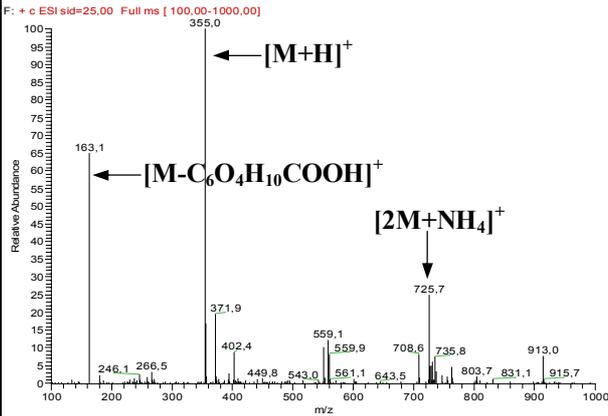
Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : -7.7 (c=0.48 MeOH), -14.4 (c=0.23 H<sub>2</sub>O)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 14.92 Min.

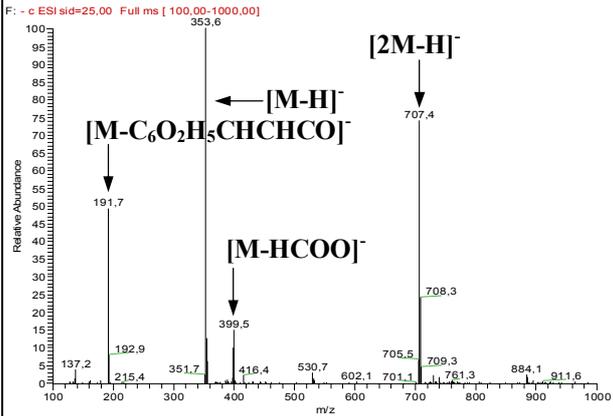
#### UV – Spektrum



#### ESI-MS+



#### ESI-MS-



Tab.E:25: NMR-Daten für Chlorogensäure und Literaturdaten

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{H}}$ (Literatur*) (JHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$ (JHz)	$\delta_{\text{C}}$ (Literatur*) (JHz)	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C)
<b>1</b>			n.d.	76.2	
<b>2 <math>\beta</math></b>	2.14 dd (14.8, 2.5)	2.18 dd (14.2, 3.4)	n.d.	38.1	
<b>2 <math>\alpha</math></b>	1.93 n.r.	2.05 ddd (14.2, 5.4, 2.2)			
<b>6 <math>\beta</math></b>	1.98 n.r.	2.08 dd (13.5, 9.3)	n.d.	38.9	5
<b>6 <math>\alpha</math></b>	2.11 n.r.	2.23 ddd (13.5, 4.4, 2.2)			
<b>3<math>\beta</math></b>	4.11 br s	4.17 ddd (5.4, 3.4, 3.3)	n.d.	71.4	
<b>4<math>\beta</math></b>	3.67 dd (10.1, 3.2)	3.73 dd (8.6, 3.3)	n.d.	73.6	
<b>5<math>\alpha</math></b>	5.37 dt (11.4, 5.0)	5.33 ddd (9.3, 8.6, 4.4)	72.4	71.9	<b>5</b>
<b>7</b>			n.d.	177.0	
<b>1'</b>			127.7	127.8	
<b>2'</b>	7.04 d (1.9)	7.05 d (1.9)	114.8	115.3	2', 3', 4', 6', 7'
<b>3'</b>			148.0	146.6	
<b>4'</b>			149.3	149.4	
<b>5'</b>	6.76 d (8.2)	6.78 d (8.0)	116.2	116.5	1', 4', 5', 6', 7'
<b>6'</b>	6.93 dd (8.2, 1.3)	6.95 dd (8.0, 1.9)	122.7	122.9	1', 2', 4', 6', 7'
<b>7'</b>	7.55 d (16.0)	7.56 d (16.1)	146.6	147.0	1', 2', 6', 7', 8', 9'
<b>8'</b>	6.28 d (16.0)	6.26 d (16.1)	115.8	115.3	1', 8', 9'
<b>9'</b>			168.9	168.7	

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>erhalten aus HMBC Spektrum, fett (Direktkorrelation) n.d. nicht detektierbar, n.r. not resolved Signale überlappend, #Signale austauschbar, Lit.: \*(Pauli et al. 1999)

### E/Z-Paucin

Aus der chinesischen Aubergine wurde Verbindung AD2dRP2/1 isoliert, die ein UV-Spektrum zeigte, das Ähnlichkeit mit dem eines Kaffeesäure-Derivates aufwies. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum waren ein ABC-System und die charakteristischen Signale der trans-Doppelbindung zu finden. Zusätzlich gab es vier weitere Signale, die auf Grund ihrer chemischen Verschiebung den Signalen der Methylenkette des Putrescins (1.5-3.5 ppm) zugeordnet wurden, was durch Interpretation des COSY- bzw. des HMBC-Spektrums bestätigt wurde. Bei Betrachtung des Massenspektrums bei positiver Ionisierung war die Abspaltung des Putrescins sowie der Kaffeesäure zu beobachten. Die NMR-Daten zeigten eine gute Übereinstimmung mit E-Caffeoylputrescin, das bereits aus Solanaceen beschrieben wurde (Keller et al. 1996). Neben den Hauptsignalen der trans-Verbindung konnten im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum auch Signale für eine zweite Verbindung identifiziert werden, die sich nur dadurch unterschieden, dass die Kopplungskonstante der Signale für die Doppelbindung kleiner war (12.6 Hz). Somit lag als Nebenverbindung das Z-Isomer des Caffeoylputrescins vor.

**Tab.E26:** <sup>1</sup>H-NMR-Daten für die E/Z-Enantiomere des Paucins und Literaturdaten

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz) E-Enantiomer	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz) Z-Enantiomer	$\delta_{\text{H}}$ (Literatur*) (JHz) E-Enantiomer
<b>1</b>	3.30 (n.d.)	3.25 t (6.6)	3.38 t (6.7)
<b>2</b>	1.56-1.76 (m, 2H)	1.56-1.76 m	1.65-1.78 m
<b>3</b>	1.56-1.76 (m, 2H)	1.56-1.76 m	1.65-1.78 m
<b>4</b>	2.95 t (7.2, 2H)	2.93 t (7.6)	3.01 t (7.2)
<b>2'</b>	6.99 d (1.9)	7.04 d (2.2)	7.05 d (2.0)
<b>5'</b>	6.75 d (8.1)	6.71 d (8.2)	k.A.
<b>6'</b>	6.88 dd (8.1, 1.9)	6.84 dd (8.2, 2.2)	6.94 dd (8.2, 2.0)
<b>7'</b>	7.38 d (15.8)	6.58 d (12.6)	7.44 d (15.7)
<b>8'</b>	6.34 d (15.8)	5.79 d (12.6)	6.40 d (15.7)

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD k.A. keine Angaben n.d. nicht detektiert, da unter Wassersignal \*(Keller et al. 1996)

**Tab.E27:** <sup>13</sup>C-NMR-Daten für die E/Z-Enantiomere des Paucins und Literaturdaten

	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (JHz) E-Enantiomer	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (JHz) Z-Enantiomer	$\delta_{\text{C}}$ (Literatur*) (JHz) E-Enantiomer	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C) E-Enantiomer
<b>1</b>	39.4	39.3	40.4**	<b>1, 2, 3</b>
<b>2</b>	25.9	25.9	25.9	3
<b>3</b>	27.4	27.1	27.6	1, 2,
<b>4</b>	40.3	n.d.	39.6**	<b>2, 3, 4</b>
<b>1'</b>	128.1	128.5	128.2	
<b>2'</b>	114.9	117.3	115.0	<b>2', 3', 4', 6', 7',</b>
<b>3'</b>	146.7	145.9	148.9	
<b>4'</b>	148.8	147.5	146.8	
<b>5'</b>	117.3	n.d.	118.2	1', 3', 4'
<b>6'</b>	122.1	123.2	122.1	2', 4', 5', 7'
<b>7'</b>	142.4	138.2	142.4	1', 2', 6', 7', 8', 9'
<b>8'</b>	117.9	n.d.	116.5	1', <b>8', 9'</b>
<b>9'</b>	169.2	169.5	169.5	

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD n.d. nicht detektierbar <sup>b</sup>erhalten aus HMBC Spektrum  
fett(Direktkorrelation) \*\*austauschbar \*(Keller et al. 1996)

**(E,Z)-Paucin ((E/Z)-Caffeoylputrescin)**

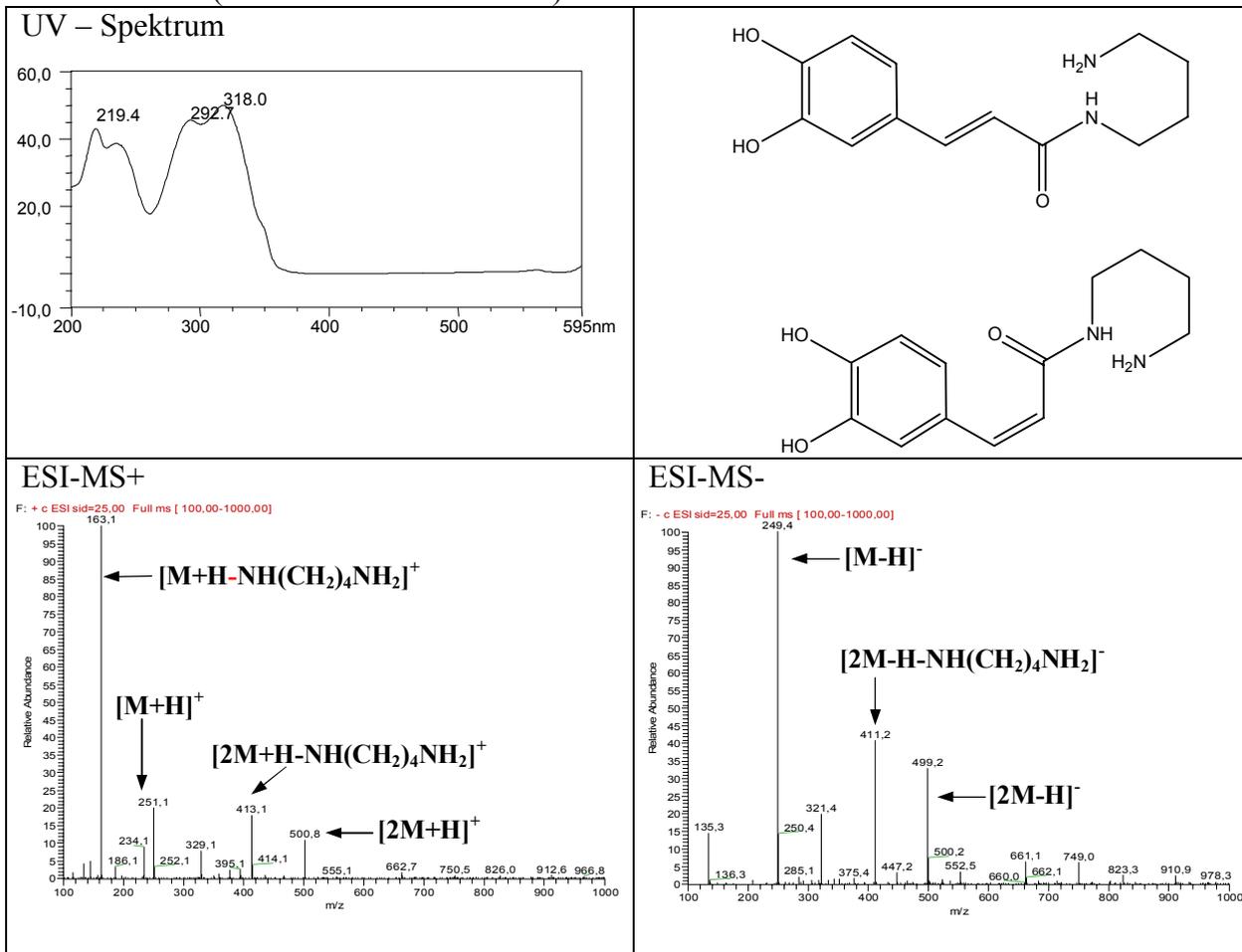
Systematischer Name: N-(4-Aminobutyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propanamid

Molekulargewicht: 250 g/mol

Summenformel: C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): AD2dRP2/1 (8.3 mg)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 10.9 min

**Phenylallylalkohole (Zimtalkohole)****(E)-Isoconiferin**

Verbindung KD2ePr2 wies ein UV-Spektrum mit einem einzelnen Maximum bei 264.8 nm auf. Das Massenspektrum lieferte ein Molekulargewicht von 342 amu, wobei die Abspaltung von Fragmenten mit 180 amu und 162 amu zu beobachten war, letztere entsprach dabei einer Hexose.

Im <sup>1</sup>H-NMR konnte ein ABC-System für einen 3,4-disubstituierten Phenylrest beobachtet werden, ebenso das Signal zweier Protonen an einer trans-ständigen Doppelbindung. Allerdings erschien das zweite Signal bei 6.17 ppm nicht mehr als Dublett, sondern als Dublett vom Triplet, so dass hier eine weitere Kopplung vorlag. Dies konnte auch im COSY-Spektrum bestätigt werden, das weitere Kreuzsignale zu zwei Dubletts vom Dublett (4.38 und 4.15 ppm) zeigte. Diese Signale für eine diastereotope Methylengruppe zeigten eine große

geminale Kopplung von 13.4 Hz und eine kleinere Kopplung zu dem Signal bei 6.17 ppm. Des weiteren waren die bereits mehrfach diskutierten Signale einer  $\beta$ -D-Glucose zu erkennen, was die Aufspaltung der Protonen der Methylengruppe in zwei Signale erklärte, da auf Grund der Chiralität der Verbindung die beiden Protonen weder chemisch noch magnetisch äquivalent waren und somit als getrennte Signale erschienen. Abschließend war auch das Signal einer Methoxygruppe bei 3.77 ppm zu erkennen, welches mit dem Phenylrest verknüpft war.

Beim Vergleich der chemischen Verschiebung mit denen des Isoconiferins der Literatur (Della Greca et al. 1998) konnte eine gute Übereinstimmung gefunden werden.

**(E)-Isoconiferin (Coniferylalkohol-9O-glucosid)**

Systematischer Name: (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propen-1 O- $\beta$ -D-glucopyranosid

Molekulargewicht: 342 g/mol

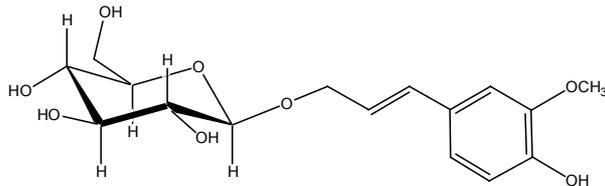
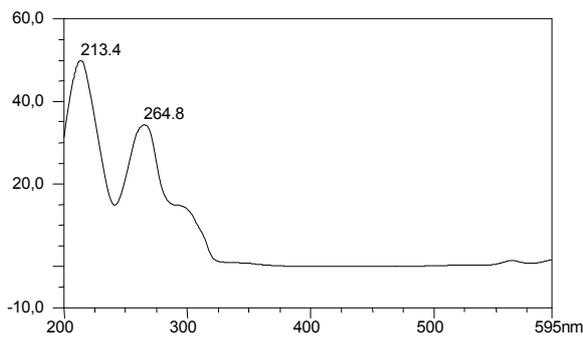
Summenformel: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>

Probenbezeichnungen (Substanzmenge): KD2ePr2 (1 mg)

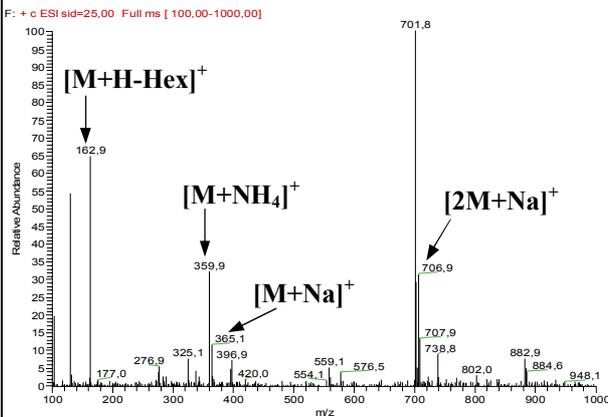
Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : -22 (c = 0.02 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient-semi): 9.72 min

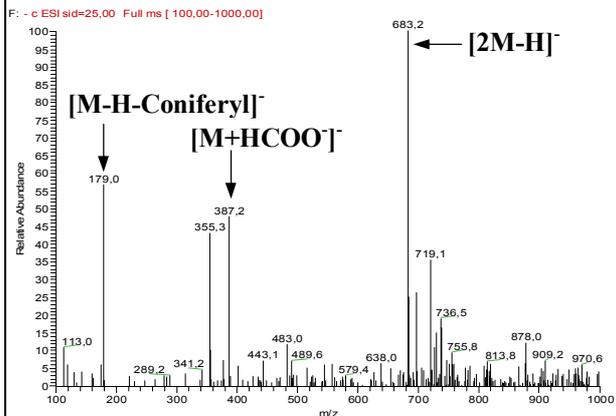
UV – Spektrum



ESI-MS+



ESI-MS-



**Triandrin**

Die Verbindung GD2HfRP2/1 wies ein ähnliches UV-Spektrum auf wie Isoconiferin. Im Massenspektrum waren analog die Fragmente einer Hexose und in diesem Fall ein Verlust von 150 amu zu beobachten.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum lag ein AA'BB'-System vor, das bereits mehrfach bei den Flavonen und Flavonolen beschrieben wurde. Es handelte sich somit um einen monosubstituierten Phenylrest. Die weiteren Signale entsprachen denen des Isoconiferins. Somit wurde die Verbindung als Triandrin identifiziert, was durch Vergleich mit Literaturangaben bestätigt wurde (Naidoo et al. 1992).

**(E)-Triandrin (p-Coumarylalkohol-9O-glucosid)**

Systematischer Name: (E)-3-(4-Hydroxyphenyl)-2-propen-1O- $\beta$ -D-Glucopyranosid

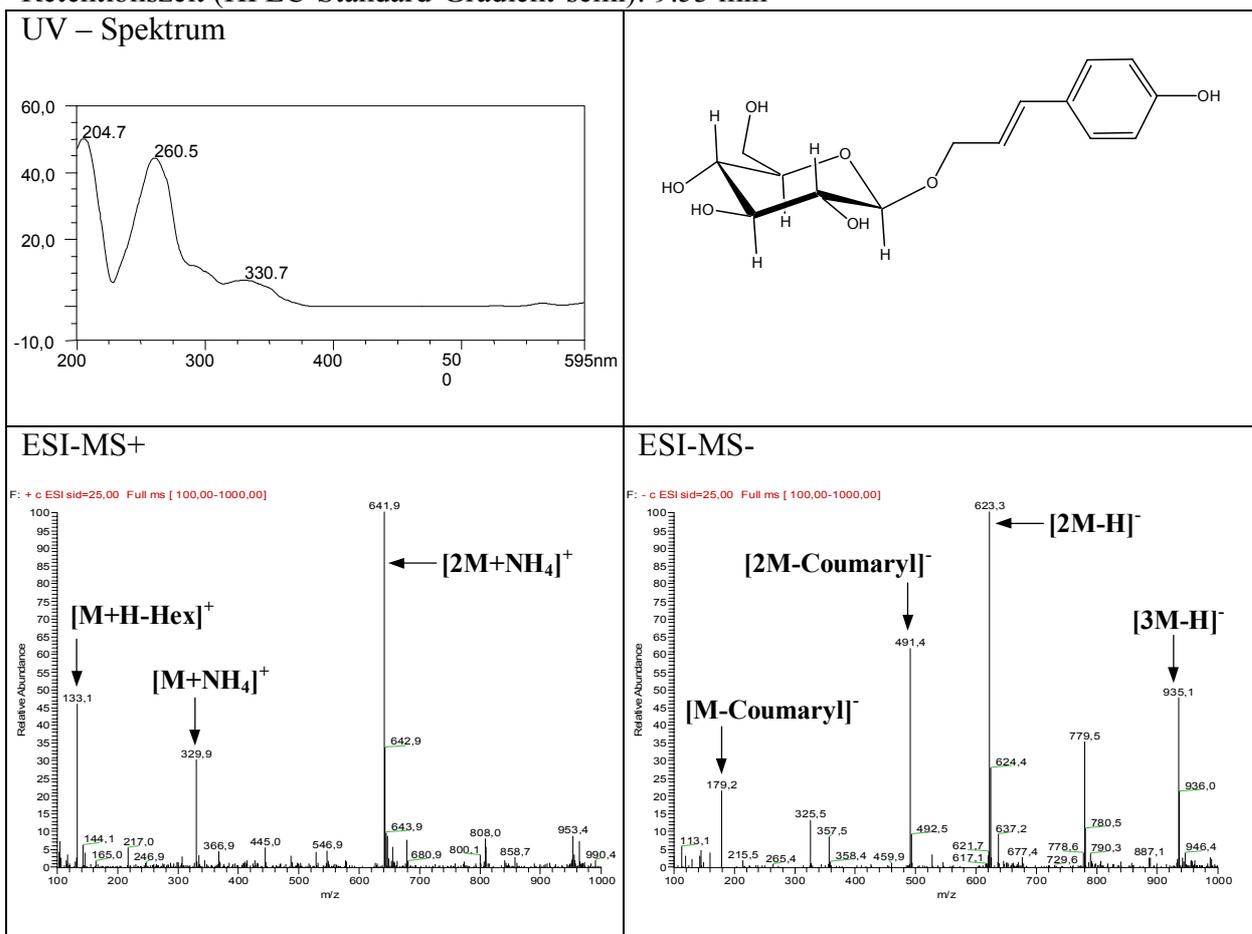
Molekulargewicht: 312 g/mol

Summenformel:  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$

Probenbezeichnung (Substanzmenge): GD2HfRP2/1 (10.7 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : -35.9 (c = 0.53 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient-semi): 9.53 min



Tab. E28: NMR-Daten für (E)-Isoconiferin und (E)-Triandrin und Literaturdaten

	(E)-Isoconiferin		(E)-Triandrin				$\delta_C$ (Literatur**)	$\delta_C$ HMBC (H→C)
	$\delta_H^a$ (/Hz)	$\delta_H$ (Literatur*) (/Hz)	$\delta_H^b$ (/Hz)	$\delta_H$ (Literatur**) (/Hz)	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_C$ (Literatur**)		
<b>1</b>	4.19 d (7.9)	4.97 d (7.7)	4.45 d (7.9)	4.4 d (7.6)	103.1	103.4	2, 3, 5, 9'	
<b>2</b>	2.97 t (8.2)	3.35 t (7.5)	3.21 dd (8.8, 7.9)	3.33 m	75.0	75.3	1, 3,	
<b>3</b>	3.13 (n.a.)	3.49 m	3.35 t (8.5)	3.33 m	77.8	78.3	1, 2, 4, 5	
<b>4</b>	3.04 t (8.8)	3.48 m	3.28 t (8.2)	3.33 m	71.5	71.8	2, 3, 5, 6	
<b>5</b>	3.42 m	3.17 m	3.26 m	3.33 m	77.8	78.2	3, 4, 6	
<b>6</b>	3.55 – 3.70 m	3.68 m 3.79 m	3.87 dd (12.2, 2.2) 3.67 dd (2.2, 5.4)	3.75 dd (12.3, 4.5)	62.7	62.9	4, 5, 6	
<b>1'</b>					129.6	130.0		
<b>2'</b>	7.01 d (1.6)	7.03 d (1.8)	7.25 d (8.5)	7.35 d (8.6)	128.7	129.2	2', 3', 4', 5', 6', 7'	
<b>3'</b>			6.71 d (8.5)	6.80 d (8.7)	116.2	116.7	1', 3', 4', 5', 7'	
<b>4'</b>					158.2	158.7		
<b>5'</b>	6.71 d (8.2)	6.75 d (8.2)	6.71 d (8.5)	6.80 d (8.7)	116.2	116.7	1', 3', 4', 5', 7'	
<b>6'</b>	6.80 dd (8.2, 1.6)	6.97 dd (8.2, 1.8)	7.25 d (8.5)	7.35 d (8.6)	128.7	129.2	2', 3', 4', 5', 6', 7',	
<b>7'</b>	6.52 d (16.0)	6.40 dd (16.0, 1.5)	6.57 d (16.0)	6.60 d (15.9)	134.0	134.5	2', 6', 9'	
<b>8'</b>	6.17 dt (16.0, 6.0)	6.18 dt (16.0, 5.8)	6.15 dt (16.0, 6.6)	6.20 ddd (15.9, 6.8, 5.9)	123.3	123.7	1', 9'	
<b>9'</b>	4.38 dd (13.4, 4.7) 4.15 dd (13.4, 7.25)	4.30 dd (5.8, 1.5)	4.48 ddd (12.3, 6.0) 4.28 ddd (2.3, 6.9)	4.50 ddd (12.3, 6.8, 6.0, 1.5, 1.2)	71.0	71.3	1, 7', 8', 9'	
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3.77 s (3H)	3.88 s (3H)						

<sup>a</sup>aufgenommen in DMSO-d<sub>6</sub>, n.a. nicht auflösbar, <sup>b</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD, <sup>c</sup>erhalten aus HMBC Spektrum, fett (Direktkorrelation)  
\*(Della Greca et al. 1998), \*\* (Naidoo et al. 1992)

**Phyllemblin**

Diese Verbindung wurde aus *Phaseolus vulg.* var *nanus* isoliert und zeigte ein UV-Spektrum mit einem Maximum bei 273.5 nm. Im ESI-Massenspektrum konnte bei negativer Ionisierung ein Pseudomolekülion von 197 amu detektiert werden. Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe eines TOF-MS bestätigt, welches ebenfalls die Abspaltung der Ethylgruppe aufwies.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung wies insgesamt nur drei Signale auf. Das Singulett der chemisch äquivalenten aromatischen Protonen bei 7.03 ppm (H-2'/6') war ein Indiz für die Symmetrie des aromatischen Teils der Verbindung, der durch Vergleich mit dem Molekulargewicht als Gallussäure identifiziert wurde. Anhand der charakteristischen chemischen Verschiebungen, Kopplungsmuster sowie Integrale konnte im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ein Ethoxysubstituent nachgewiesen werden, so dass es sich bei der Verbindung um Gallussäureethylester handelte. Die spektralen Daten wurden verglichen mit einem 4'-Methylderivat des Gallussäureethylesters (Ali et al. 1998) und zeigten gute Übereinstimmung.

**Tab.E29:** NMR-Daten für Ethylgallat mit Literaturdaten

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{H}}$ (Literatur*) (JHz)
<b>2/6</b>	7.03 s	7.09 s
<b>CH<sub>2</sub></b>	4.26 q (7.3; 2H)	4.24 q (7.1; 2H)
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.32 t (7.3; 3H)	1.30 t (7.1; 3H)
<b>OCH<sub>3</sub></b>		3.86 s (3H)

<sup>a</sup>aufgenommen in CD<sub>3</sub>OD \* (Ali et al. 1998)

**Phyllemblin (Gallussäureethylester)**

Systematischer Name: Ethyl-3,4,5-trihydroxybenzoat

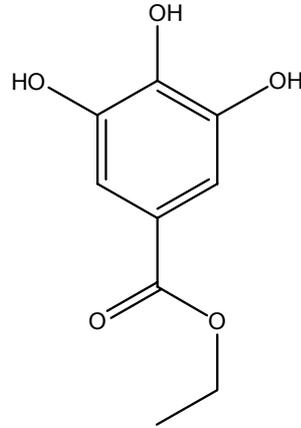
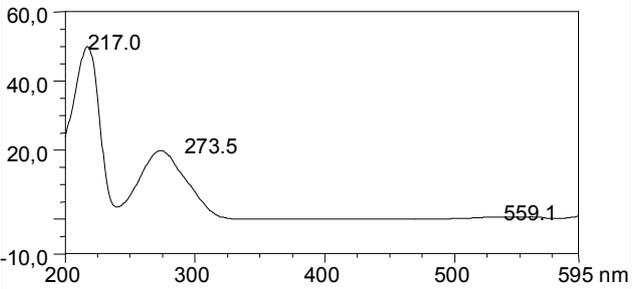
Molekulargewicht: 198 g/mol

Summenformel: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

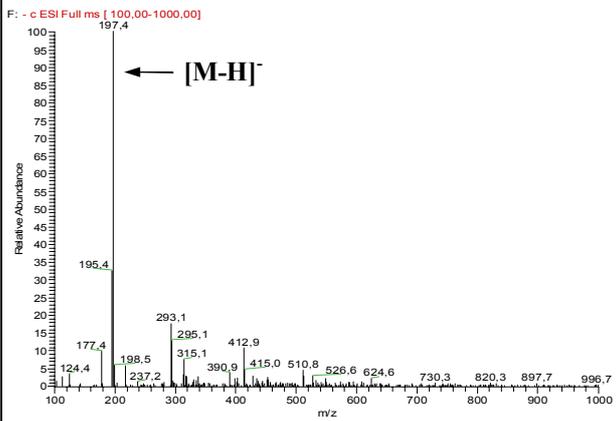
Probenbezeichnung (Substanzmenge): P8EcPr2 (1.9 mg)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient): 15.94 min

UV – Spektrum



ESI-MS-



### 3.5.3. Indol-Derivate

Indol-Derivate leiten sich biogenetisch von der Aminosäure L-Tryptophan ab. Aus diesem Grund tragen sie auch an Position 3 des Indolringsystems einen 2-Amino-ethylrest, der entweder zusätzlich derivatisiert oder auch in ein weiteres an den Indolrest anneliertes Ringsystem mit eingebunden sein kann.

#### Glucosinolate

Die Verbindungen der Glucosinolate sind hauptsächlich anzutreffen in der Familie der Brassicaceae, die in diesem Fall auch untersucht wurde (*Raphanus sativus*). Die Glucosinolate besitzen die in Abb.E63 dargestellte allgemeine Struktur.

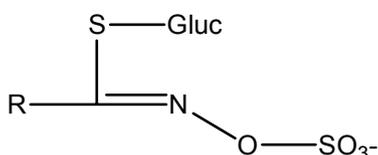


Abb.E63: Allgemeine Struktur der Glucosinolate

#### Glucobrassicin

Diese Verbindung aus *Raphanus sativus* erwies sich als sehr polar und besaß zudem ein für tryptophanhaltige Naturstoffe charakteristisches UV-Spektrum (Spektrenvergleich mit Spektrenbibliothek). Das Molekulargewicht konnte mit 448 amu angegeben werden. Durch die NMR-Daten wurde eine Summenformel von  $C_{16}H_{20}N_2O_9S_2$  bestimmt, die durch Aufnahme eines HR-Massenspektrums bestätigt wurde.

Im  $^1H$ -NMR-Spektrum konnte das ABCD-System des Indols im aromatischen Bereich beobachtet werden, ebenso wie H-2 bei 7.24 ppm als Singulett. In DMSO- $d_6$  war außerdem ein weiteres Singulett bei 10.98 ppm für das Proton der N-H-Funktion zu detektieren. Des Weiteren waren zwei Dubletts zu beobachten, die beide eine große Kopplungskonstante von 16.1 Hz aufwiesen, welche für die geminale Kopplung der Protonen einer diastereotropen Methylengruppe charakteristisch ist. Zusätzlich waren Signale eines Zuckers bei 3.00 ppm – 3.81 ppm zu beobachten, wobei das anomere Proton bei 4.65 ppm als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 9.8 Hz erschien. Auch in diesem Fall war das Aufspaltungsmuster einer  $\beta$ -D-Glucose zu finden. Die nachgewiesenen Fragmente wiesen auf das Vorhandensein des Glucosinolats Glucobrassicin hin. Diese Vermutung wurde durch Vergleich mit Literaturangaben bestätigt (Belkhiri et al. 1990).

Abb.E30: NMR-Daten Glucobrassicin und Literaturdaten

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz) DMSO-d <sub>6</sub>	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz) CD <sub>3</sub> OD	$\delta_{\text{H}}$ (Literatur*) (JHz)
<b>1</b>	10.98 s		11.1 s
<b>2</b>	7.19 s	7.24 s	7.30 s
<b>3</b>			
<b>4</b>	7.67 d (7.6)	7.71 d (7.9)	7.8 d (8.0)
<b>5</b>	6.95 t	7.03 t (8.2)	7.1 t (7.5)
<b>6</b>	7.07 t	7.10 t (6.9)	7.2 t (7.5)
<b>7</b>	7.34 d (7.9)	7.34 d (9.8)	7.5 d (8.0)
<b>8</b>			
<b>9</b>			
<b>10</b>	4.25 3.85	4.38 d (16.1) 4.04 d (16.1)	4.40 d (16.0) 3.90 d (16.0)
<b>11</b>			
<b>1'</b>	4.52 d (9.8)	4.65 d (9.8)	4.6 d (9.0)
<b>2'</b>	2.89 t (8.9)	3.11 t (8.8)	3.1 – 3.8
<b>3'</b>	2.96 t (8.2)	3.00 t (8.8)	3.1 – 3.8
<b>4'</b>	3.02 t (8.8)	3.21 t (9.1)	3.1 – 3.8
<b>5'</b>	3.13 m	3.07 m	3.1 – 3.8
<b>6'<sub>A/B</sub></b>	3.74 d (12.0, n.a.) n.d.	3.81 dd (12.3, 2.2) 3.59 dd (12.3, 6.3)	3.1 – 3.8

<sup>a</sup>aufgenommen in DMSO-d<sub>6</sub> und CD<sub>3</sub>OD n.d. nicht detektiert unter Wassersignal  
n.a. nicht aufgelöst \*(Belkhiri et al. 1990)

**Glucobrassicin**

Systematischer Name: 3-Indolylmethylglucosinolat

Molekulargewicht: 448 g/mol

HR-MS<sup>+</sup>=449,06884, HR-MS<sup>-</sup>=447,05319

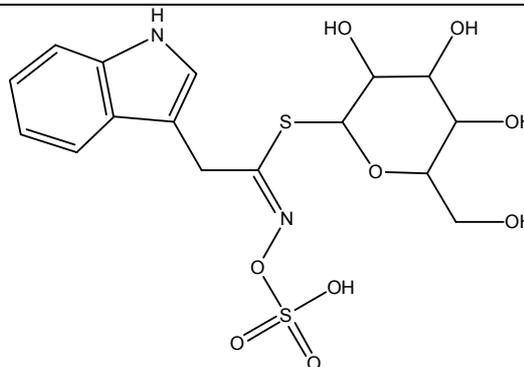
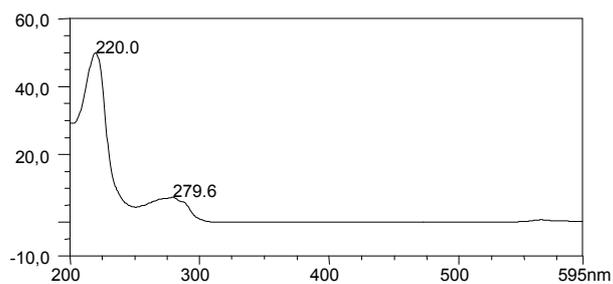
Summenformel: C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): RD2gRP1 (22.8 mg)

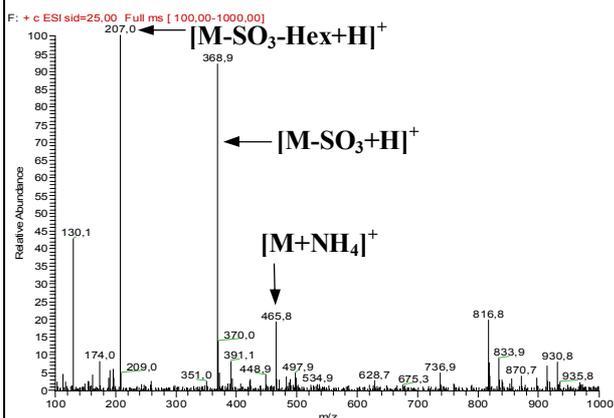
Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: 1.7 (c = 1.14 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient-semi): 6.77 min

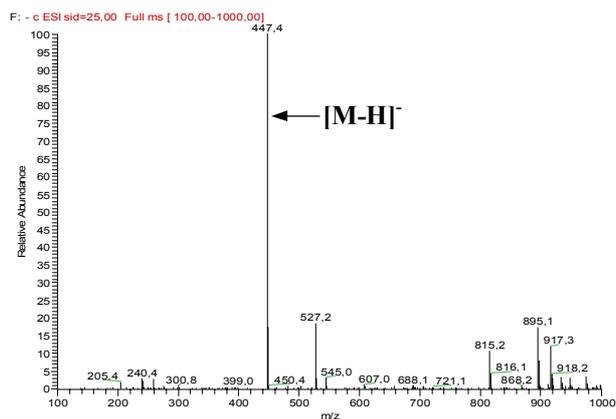
UV – Spektrum



ESI-MS+



ESI-MS-



**6-Methoxy-Glucobrassicin**

Die Verbindung zeigte ein ähnliches UV-Spektrum wie das bereits beschriebene Glucobrassicin. Das Molekulargewicht konnte mit 478 amu bestimmt werden, wobei auch hier die Abspaltung von 80 und 162 amu zu beobachten war. Die Informationen des Massenspektrums legten eine Derivatisierung des Indolrestes nahe, welche im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bestätigt wurde. Es konnte von den bereits im Glucobrassicin beobachteten Signalen kein ABCD-System mehr gefunden werden, stattdessen lag ein ABC-System vor, das dem eines disubstituierten Phenylrings entsprach. Wegen des Aufspaltungsmusters der aromatischen Signale musste eine Substitution an Position 5 oder 6 vorliegen. Im HMBC-Spektrum konnten von der N-H- und der Methylengruppe aus drei gemeinsame Kreuzsignale zu Kohlenstoffen bei 121.3 ppm, 116.1 ppm und 109.3 ppm gefunden werden. Das Signal bei 121.3 ppm konnte auf Grund einer Direktkorrelation als C-2 eindeutig identifiziert werden, so dass für die beiden verbleibenden Signale bei 109.9 ppm bzw. 116.1 ppm nur die Positionen C-3 bzw. C-9 möglich waren. Da auch das ortho-meta-koppelnde Proton des ABC-Systems ein Kreuzsignal bei 116.1 ppm aufwies, wurde die oben getroffene Zuordnung bestätigt und die Substitution des Indolringes eindeutig auf C-6 festgelegt. Die Möglichkeit einer Substitution an Position 5 konnte somit ausgeschlossen werden, da das beschriebene Kreuzsignal nur durch eine Korrelation über vier Bindungen zustande gekommen wäre und daher als die unwahrscheinlichere Variante anzusehen war.

**Tab.E31:** NMR-Daten 6- Methoxy-Glucobrassicin und Literaturdaten für 5-Methoxyglucobrassicin

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz) DMSO-d <sub>6</sub>	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz) CD <sub>3</sub> OD	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ Lit.5-OCH <sub>3</sub>	$\delta_{\text{C}}$ HMBC (H→C)
<b>1 N-H</b>	10.93 s				2, 3, 8, 9
<b>2</b>	7.07 s	7.06	121.3	125.4	2, 3, 8
<b>3</b>			109.9	112.9	
<b>4</b>	6.45 d (7.3)	6.93 d (0.6)	n.d.	101.7	
<b>5</b>	6.95 dd (7.3, 4.1)	6.98 dd (7.9, 2.2)	98.8	155.2	5, 7, 3
<b>6OCH<sub>3</sub></b>	3.82 s (3H)	3.91 s (3H)	153.9	112.9	6
<b>7</b>	6.30 d (4.4)	6.45 d (7.6)	105.0	116.1	6, 7, 8
<b>8</b>			137.7	128.5	
<b>9</b>			116.1	133.5	
<b>10</b>	4.41 d (16.7) 3.90 d (16.1)	4.71 d (9.8) 4.17 d (16.4)	n.d.	n.a.	2, 3, 9, 11
<b>11</b>			155.8	n.a.	
<b>1'</b>	4.47 d (6.9)	4.71 d (9.8)	n.d.	n.a.	
<b>2'</b>	2.96 t (8.8)	3.12 t (8.8)	n.d.	n.a.	
<b>3'</b>	2.84 t (8.8)	3.00 t (8.8)	n.d.	n.a.	
<b>4'</b>	3.12 t (9.5)	3.30 n.d.	n.d.	n.a.	
<b>5'</b>	3.14 m	2.94 m	n.d.	n.a.	
<b>6'<sub>A/B</sub></b>	3.42 dd (11.7, 5.3) 3.65 dd (12.0, 1.6)	3.67 dd (10.4, 2.2) 3.61 dd (12.3, 4.4)	n.d.	n.a.	

<sup>a</sup>aufgenommen in DMSO-d<sub>6</sub> und CD<sub>3</sub>OD <sup>b</sup>erhalten aus HMBC Spektrum n.d. nicht detektiert, fett <sup>Direktkorrelation</sup>, n.a. nicht angegeben; Lit. (Belkhiri et al. 1990; Hanley et al. 1985)

**6-Methoxyglucobrassicin**

Systematischer Name: 3-[6-Methoxy-indolyl]-methyl-glucosinolat

Molekulargewicht: 478 g/mol

HR-MS<sup>+</sup>=479,07941, HR-MS<sup>-</sup>=477,06376

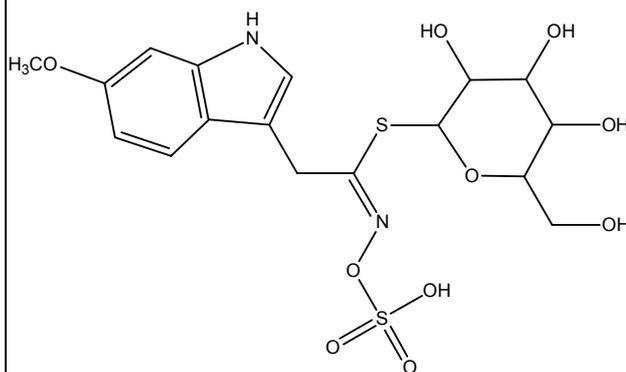
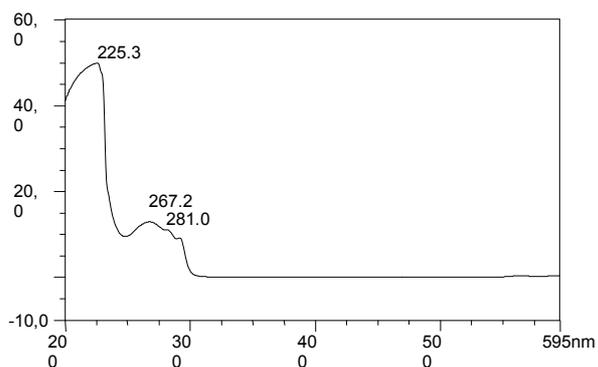
Summenformel: C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): RD2gRP2 (7 mg)

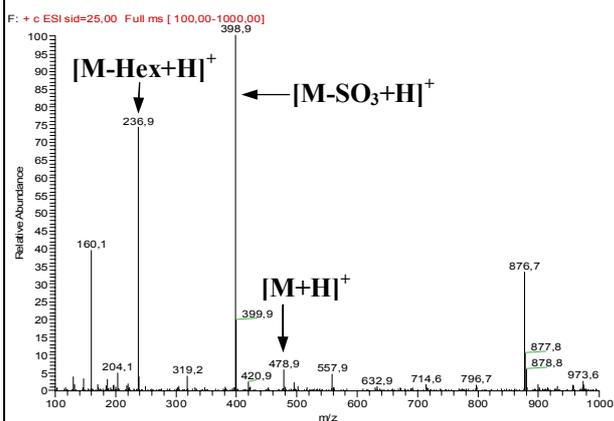
Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -102.7 (c = 0.035 MeOH)

Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient-semi): 8.32 min

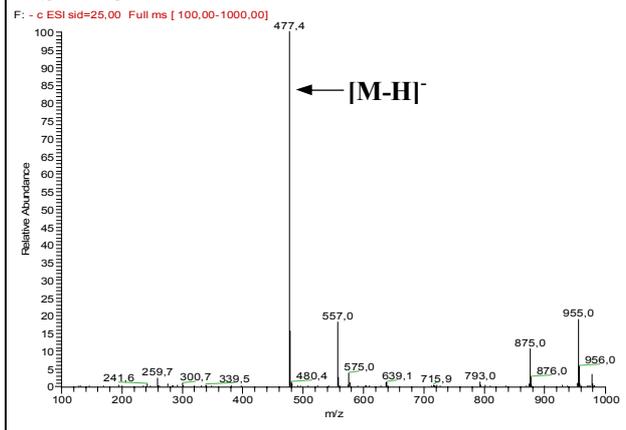
UV – Spektrum



ESI-MS<sup>+</sup>



ESI-MS<sup>-</sup>



**Lycoperodin 1**

Auch in dieser Fraktion lag wieder ein typisches UV-Spektrum vor, wie es für Tryptophanderivate charakteristisch ist. Anhand des Massenspektrums konnte das Molekulargewicht mit 216 amu bestimmt werden. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte das ABCD-System des Indols sowie das Singulett für die N-H-Funktion beobachtet werden. Die Methylengruppe in direkter Nachbarschaft zu den beiden N-Atomen erschien als zwei Dubletts mit jeweils einer großen geminalen Kopplungskonstante von 15.1 Hz. In diesem Fall waren die beiden Protonen magnetisch nicht äquivalent, da es sich um ein chirales Molekül handelte. Das Proton H-3, das am chiralen Zentrum sitzt, erschien ebenfalls im tiefen Feld bei 3.59 ppm. Im COSY-Spektrum konnten Korrelationen zu den beiden Signalen bei 3.12 ppm und 2.80 ppm (H-4<sub>A</sub> und H-4<sub>B</sub>) gefunden werden. Hier war jeweils eine große Kopplungskonstante mit mehr als 15 Hz zu finden, die für die geminale Kopplung der beiden Protonen an H-4 steht. Die gemessenen chemischen Verschiebungen waren zudem in Übereinstimmung mit der Literatur (Tilstra et al. 1990). Diese Verbindung wird beschrieben als Kondensationsprodukt von Formaldehyd mit L-Tryptophan. Dies kann sowohl in der Natur als auch während der Verarbeitung von Nahrungsmitteln gebildet werden.

**Tab.E32:** NMR-Daten Lycoperodin 1 und Literaturdaten

	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (JHz)	$\delta_{\text{H}}$ (Literatur*) (JHz)
<b>1<sub>A/B</sub></b>	4.21 d (15.6) 4.14 d (15.6)	4.0 dd (16.1)
<b>3</b>	3.59 dd (10.3, 5.1)	3.47 dd
<b>4<sub>A/B</sub></b>	3.12 dd (16.1, 5.1) 2.80 dd (16.1, 10.3)	3.06 dd 2.72 dd
<b>5</b>	7.31 d (8.2)	7.6 – 7.1 d;d;m
<b>6</b>	7.06 t (6.9)	7.6 – 7.1 d;d;m
<b>7</b>	6.98 t (7.3)	7.6 – 7.1 d;d;m
<b>8</b>	7.43 d (7.9)	7.6 – 7.1 d;d;m

<sup>a</sup>aufgenommen in DMSO- $d_6$  \*(Tilstra et al. 1990)

**Lycoperodin 1**

Systematischer Name: 2,3,4,9-Tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-3-carbonsäure

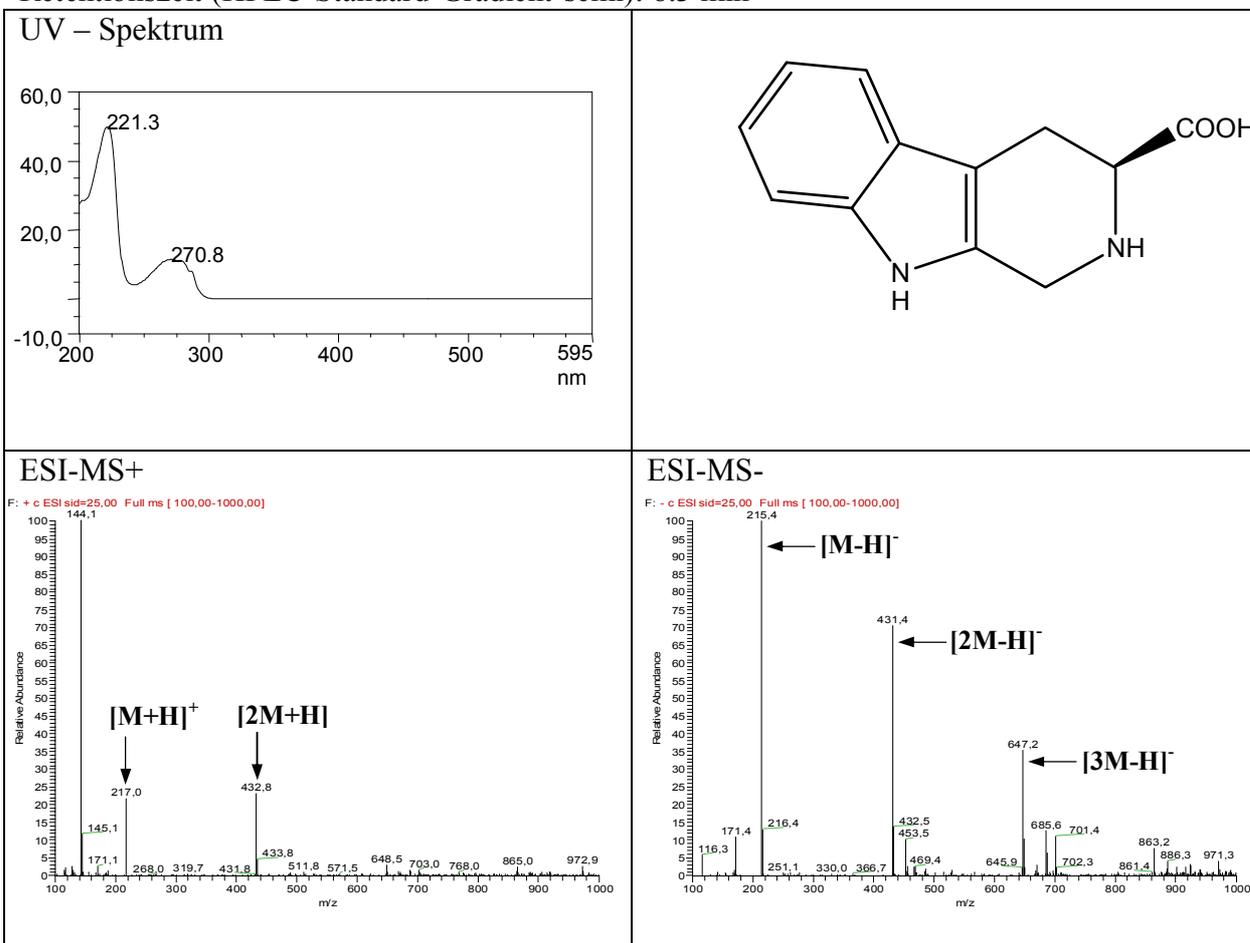
Molekulargewicht: 216 g/mol

Summenformel: C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Probenbezeichnung (Substanzmenge): GD2WHgDC1 (1.8 mg)

Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : -8.3 (c=0.08 MeOH)

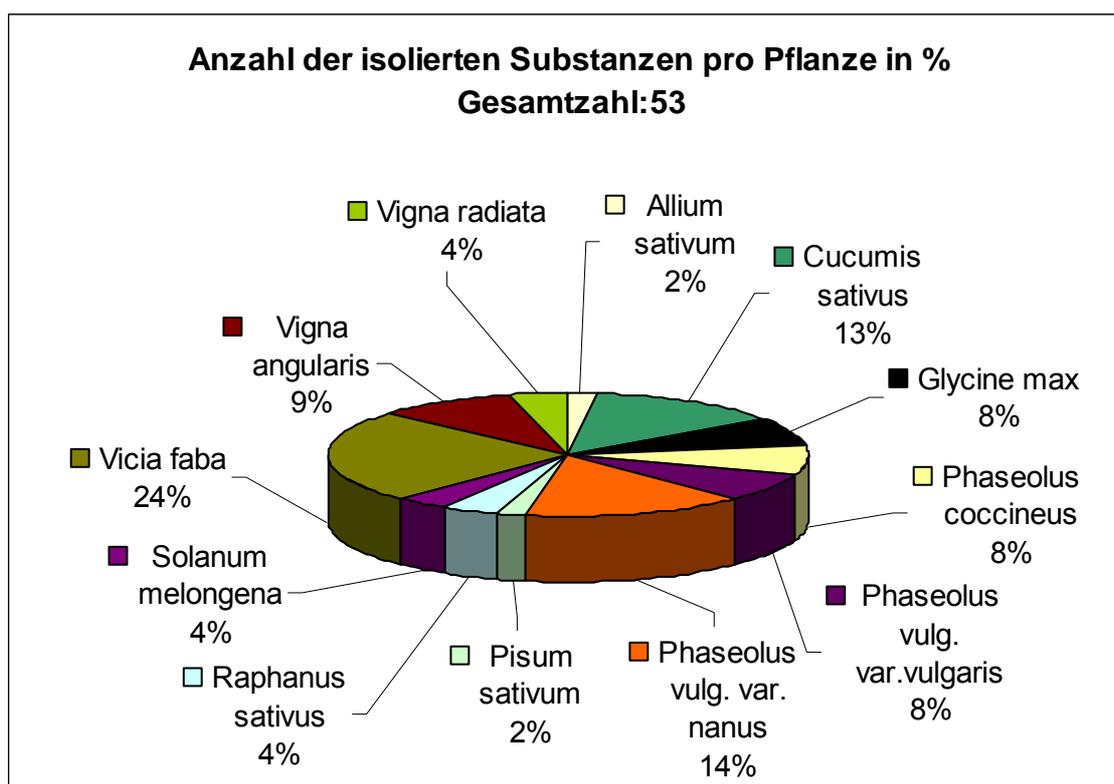
Retentionszeit (HPLC-Standard-Gradient-semi): 8.3 min



### 3.5.4. Zuordnung der isolierten Inhaltsstoffe zu ihren Extrakten

Es wurden zwölf verschiedene Extrakte zur Isolierung bearbeitet, wobei es Ziel der Arbeit war, die Hauptverbindungen der jeweiligen Extrakte zu isolieren und somit eine Übersicht über das Polyphenolmuster innerhalb der Pflanze zu erhalten. Insgesamt wurden 53 Fraktionen mit Reinsubstanzen, entsprechend 41 verschiedenen Verbindungen, isoliert und die Strukturen der Verbindungen zum größten Teil vollständig aufgeklärt. Die meisten Substanzen stammten dabei aus den Extrakten von *Vicia faba* (24 %), *Phaseolus vulg.* var. *nanus* (14 %) und *Cucumis sativus* (13 %) gefolgt von *Vigna angularis* (9 %). Aus den restlichen Extrakten konnte jeweils mindestens eine Verbindung isoliert werden. Es handelte sich dabei nicht ausschließlich um polyphenolische Strukturen, sondern auch um Indol-Derivate.

Abbildungen Abb.E64/65 und Tabelle Tab.E32 geben die Zugehörigkeit der Substanzen zu den jeweiligen Pflanzen wieder, ebenso wie die Zuordnung der Substanzen zu den Verbindungsklassen.



**Abb.E64:** Verteilung der isolierten Verbindungen auf den jeweiligen Extrakt in % (Gesamtzahl=Anzahl der erhaltenen Fraktionen)

Tab.E33: Zuordnung der isolierten Verbindungen zu den Extrakten

Pflanze	Isolierte Inhaltsstoffe	
	identifizierte Strukturen	Partielle Identifizierung (Strukturvorschläge)
<i>Allium sativum</i>	Isoconiferin (PD)	
<i>Cucumis sativus</i>	Isoquercitrin (Flavonol), Isorhamnetin-3 <i>O</i> -glucosid (Flavonol), Triandrin (PD), Lycoperodin 1 (ID)	Apigenin-6 <i>C</i> -dihexosid Apigenin-trihexosid Chrysoeriol-trihexosid
<i>Glycine max</i>	Genistein (Isoflavon), Genistin (Isoflavon), Daidzein (Isoflavon), Daidzin (Isoflavon)	
<i>Phaseolus coccineus</i>	Genistein (Isoflavon), Genistin (Isoflavon), Daidzin (Isoflavon), Glycitin (Isoflavon)	
<i>Phaseolus vulg. var. vulgaris</i>	Catechin (Flavanol), Kämpferol (Flavonol), Astragalin (Flavonol)	Procyanidin B3/B6 (Flavanol)
<i>Phaseolus vulg. var. nanus</i>	Catechin (Flavanol), Gallocatechin (Flavanol), Astragalin (Flavonol), Isoquercitrin (Flavonol), Dihydromyricetin (Flavanonol), Isomyricitrin (Flavonol), Ferulasäure (PD), Gallussäureethylester (PD)	
<i>Pisum sativum</i>	Kämpferol-3 <i>O</i> -sophorotriosid (Flavonol)	
<i>Raphanus sativus</i>	Glucobrassicin (ID), 6- Methoxyglucobrassicin (ID)	
<i>Solanum melongena</i>	Chlorogensäure (PD), Paucin (PD)	
<i>Vicia faba</i>	Catechin (Flavanol), Epicatechin (Flavanol), Vitexin (Flavon), Isovitexin (Flavon), Nicotiflorin (Flavonol), Kämpferol-3 <i>O</i> -glucosyl- 7 <i>O</i> -rhamnosid (Flavonol), Isoschaftosid (Flavon)	Isorhamnetin-3 <i>O</i> -glycosid Apigenin-6,8- <i>C</i> -dihexosid (Vicenin-2) Kämpferol-triglycosid Quercetin-triglycosid Apigenin-6 <i>C</i> -glucosyl-8 <i>C</i> - arabinosid Apigenin-6 <i>C</i> -xylosyl-8 <i>C</i> - galactosid
<i>Vigna angularis</i>	Catechin (Flavanol), Quercetin (Flavonol), Rutin (Flavonol), Myricetin-3 <i>O</i> -rutosid (Flavonol), Daidzein (Isoflavon)	
<i>Vigna radiata</i>	Vitexin (Flavon), Isovitexin (Flavon)	
	PD: einfache Phenylpropan-Derivate ID: Indol-Derivate	

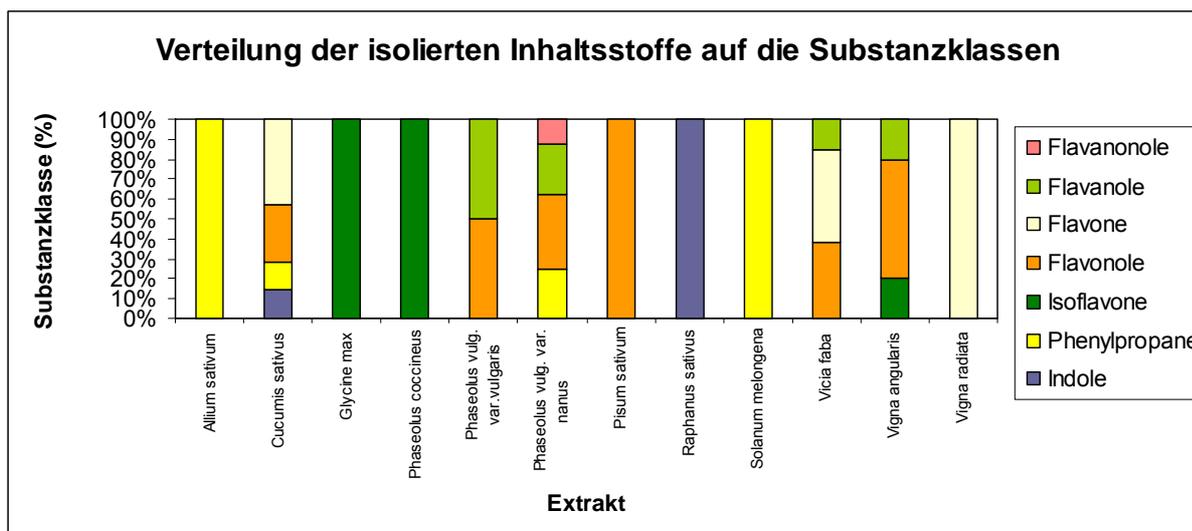


Abb.E65: Verteilung der isolierten Verbindungen auf die Extrakte der Pflanzen

Die Art der Strukturen ist im Hinblick auf Aktivitäten und Struktur-Wirkungs-Beziehungen in verschiedenen Assays von Bedeutung. Aus diesem Grund wurde auch auf die Strukturen eingegangen, die nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, deren Zugehörigkeit zu einer Substanzklasse aber eindeutig möglich war.

Aus dem Extrakt von *Allium sativum* konnte Isoconiferin isoliert werden. Als 9*O*-Glucosid des Coniferylalkohols kommt diese Verbindung in den Zellwänden sowohl der monocotylen als auch dicotylen Pflanzen vor. Für *Asparagus officinalis*, welcher zur gleichen Familie der Liliaceae gehört, wurde bereits Coniferin (Coniferylalkohol-4*O*-Glucosid) identifiziert (Rademaker et al. 2000).

Der Extrakt von *Cucumis sativus* enthielt Isoquercitrin, Isorhamnetin-3*O*-glucosid, Triandrin und Lycoperodin 1, außerdem war die teilweise Identifizierung eines Apigenin-6*C*-dihexosids, Apigenin-trihexosids und Chrysoeriol-trihexosids möglich. Für die Blätter und Blüten von *Cucumis sativus* wurden bereits die 3*O*-Glucoside des Quercetins und des Isorhamnetins beschrieben, ebenso wie ein Isovitexin-2''*O*-glucosid und Iovitexin-4'*XO*-diglucoside (Krauze-Baranowska et al. 2001). Die Flavone waren bei diesen Untersuchungen vermehrt in den Blättern zu finden, wohingegen die Flavonole für die Blüten beschrieben wurden. Derivate des Isoscoparins wurden ebenfalls bereits in *Cucumis sativus* nachgewiesen (Abou-Zaid et al. 2001), zusätzlich handelte es sich in der vorliegenden Literatur um Coumaryl- und Feruloylglucosidderivate. Das Triandrin ist ein Glucosid des p-Hydroxyzimtalkohols. Dieser ist als Zellwandbaustein anzutreffen, wird jedoch vermehrt in

Gymnospermen und monocotylen Pflanzen gefunden. Triandrin selbst wird für *Salix*-Arten beschrieben (DNP 2006; Frohne et al. 1998). Lycoperodin 1 wird als Kondensationsprodukt von L-Tryptophan und Formaldehyd sowohl in der Natur als auch bei der Zubereitung von Gemüse beschrieben (DNP 2006).

Aus dem *Glycine max*-Extrakt konnten Genistein, Genistin, Daidzein und Daidzin isoliert werden. Diese werden für Sojabohnen vielfach in der Literatur aufgeführt (Nakamura et al. 2001).

Auch der *Phaseolus coccineus*-Extrakt enthielt Genistein, Genistin, Daidzin und Glycitin, gleichzeitig wurden Isoflavonoide für diese Pflanze bereits erwähnt (Lindig-Crisneros et al. 1997). Jedoch konnte Nakamura (Nakamura et al. 2001) in dem von ihm untersuchten Extrakt weder Genistein oder Daidzein noch deren Derivate nachweisen.

Aus *Phaseolus vulg.* var. *vulgaris* wurden Catechin, Kämpferol, Astragalin isoliert, außerdem war es möglich ein Procyanidin B3 oder B6 teilweise zu identifizieren. Der *Phaseolus vulg.* var. *nanus*-Extrakt enthielt Catechin, Gallocatechin, Astragalin, Isoquercitrin, Dihydromyricetin, Isomyricitrin, Ferulasäure und Gallussäureethylester. Bereits beschrieben wurden für *Phaseolus vulgaris*-Arten die Glucoside des Kämpferols, des Quercetins und des Myricetins, ebenso ist das Vorkommen von Catechin und Gallocatechin zu finden, welches im Zusammenhang mit Monomeren der Procyanidine erwähnt wird (Aparicio-Fernandez et al. 2005; Beninger et al. 1999). Ferulasäure wird ebenfalls in der Literatur als Inhaltsstoff für *Phaseolus vulgaris* genannt (Diaz-Batalla et al. 2006), wohingegen Gallussäureethylester (Phyllembin) aus *Acacia*-Arten bekannt ist (DNP 2006).

Dihydromyricetin hingegen wurde hier erstmals für *Phaseolus vulgaris* beschrieben.

In *Pisum sativum* konnte Kämpferol-3*O*-sophorotriosid nachgewiesen und isoliert werden. Diese Verbindung ist bereits als Inhaltsstoff für diese Leguminose beschrieben worden (Ferrerres et al. 1995).

Der *Raphanus sativus*-Extrakt enthielt unter anderem Glucobrassicin und 6-Methoxyglucobrassicin. Beide Verbindungen sind typische Inhaltsstoffe der Brassicaceen und bereits für diese allgemein, aber auch speziell für *Raphanus sativus* beschrieben. (Carlson et al. 1985). Das 6-Methoxyderivat wurde mehrfach erwähnt, jedoch liegen bisher keine Veröffentlichungen über NMR-Daten vor.

Aus der Aubergine (*Solanum melongena*) konnten die beiden Verbindungen (E)-Chlorogensäure und Caffeoylputrescin (sowohl das Z- als auch das E-Enantiomer) erhalten werden. Sowohl die Chlorogensäure als auch das Putrescin-Derivat sind bereits aus *Solanum melongena* bekannt (Whitaker et al. 2003).

Der *Vicia faba*-Extrakt lieferte die meisten Verbindungen, wobei Catechin, Epicatechin, Vitexin, Isovitexin, Nicotiflorin, Kämpferol-3*O*-glucosyl-7*O*-rhamnosid und Isoschaftosid eindeutig identifiziert werden konnten. Als weitere mögliche Strukturen sind Isorhamnetin-3*O*-glycosid, Apigenin-6,8*C*-dihexosid (Vicenin-2), Apigenin-6*C*-glucosyl-8*C*-arabinosid, Apigenin-6*C*-xylosyl-8*C*-galactosid sowie ein Kämpferol-triglycosid und ein Quercetin-triglycosid enthalten.

Catechin und Epicatechin sind eindeutig bereits aus *Vicia faba* identifiziert. Apigenin-*C*-glycoside und Kämpferol-Derivate wurden dabei ohne weitere Charakterisierung aus Samenschalen beschrieben (Nozzolillo et al. 1989). Als Hauptflavonol wird Kämpferol-3*O*-galactosid-7*O*-rhamnosid für die epidermalen Zellschichten junger Blätter beschrieben (Vierstra et al. 1982), jedoch konnte im vorliegenden Fall eindeutig das 3*O*-Glucosid isoliert werden, das ebenfalls bereits aus den Blättern von *Vicia faba* bekannt ist (Arisawa et al. 1971). Aus den Hülsen von *Vicia faba* konnte Vicenin-2 isoliert werden (Micheal et al. 1998), jedoch finden sich für *Vicia faba* keine eindeutigen Hinweise auf das Vorkommen von Vitexin, Isovitexin oder eines der weiteren Apigenin-Derivate. Obwohl eine große Vielzahl an Kämpferol- und Quercetin-Derivaten beschrieben wurden, gibt es auch keine Daten zu Nicotiflorin und den Triglycosiden der beiden Flavonole. Auch wurde bisher kein Isorhamnetin-Derivat für die Pflanze beschrieben.

*Vigna angularis* enthielt Catechin, Quercetin, Rutin, Myricetin-3*O*-rutinosid und Daidzein. Bereits für diese Pflanze beschrieben wurden (+)-Catechin, Catechin-7*O*-glucosid und Rutin (Yoshida et al. 2005). Das Vorhandensein von Quercetin als Aglykon könnte teilweise auf die Bearbeitung d.h. die Hydrolyse des Zuckers, zurückzuführen sein, ebenso wie das Vorliegen von (±)-Catechin. Das Vorkommen von Daidzein in *Vigna angularis*-Extrakten wurde bereits in der Literatur beschrieben (Nakamura et al. 2001).

Myricetin-3*O*-rutinosid wurde innerhalb der Kooperation zum ersten Mal aus *Vigna angularis* beschrieben.

In *Vigna radiata* konnten Vitexin und Isovitexin nachgewiesen und isoliert werden. Beide Verbindungen sind für diese Pflanze bereits mehrfach beschrieben (Ahn et al. 2003; Jeong et al. 1998; Kim et al. 2005).

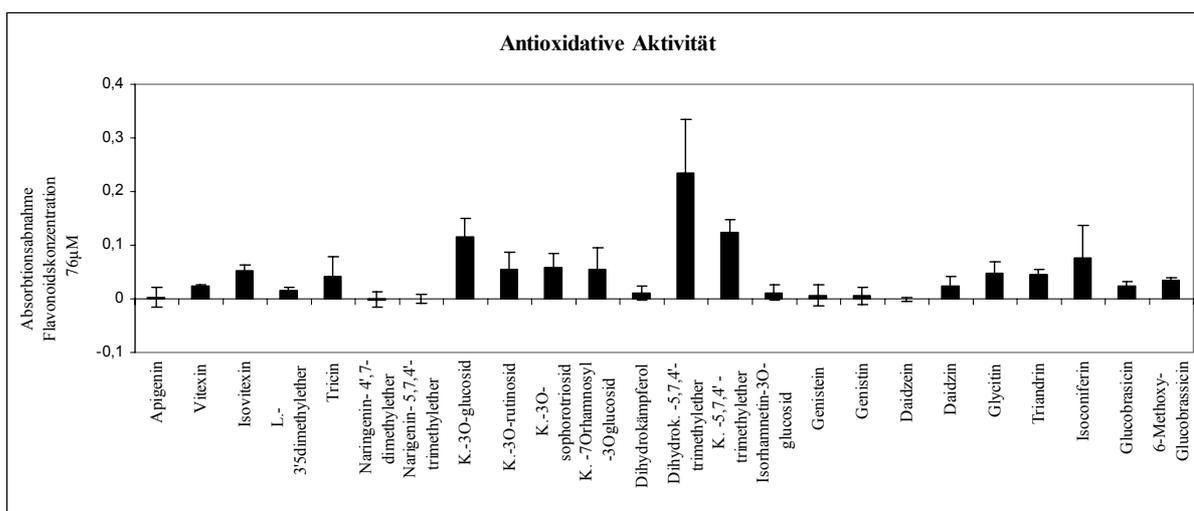
### 3.6. Aktivität der Reinsubstanzen und Extrakte in *in vitro* Testassays

In den vorangegangenen Kapiteln wurde sowohl auf das Polyphenolmuster als auch auf quantitative Aspekte der enthaltenen Substanzen eingegangen. Ebenso wurde eine Vielzahl an Reinsubstanzen aus den Extrakten gewonnen, die nachfolgend in verschiedenen Assays getestet wurden, um ihre antioxidativen, zytotoxischen und proliferationsstimulierenden Eigenschaften zu untersuchen.

#### 3.6.1. Aktivität der Reinsubstanzen im quantitativen DPPH-Küvetten-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 46 verschiedene Substanzen auf ihre antioxidativen Eigenschaften im DPPH-Assay untersucht. Dabei wurde der Test sowohl mit isolierten Verbindungen als auch mit käuflich erworbenen, ebenso wie mit weiteren institutseigenen Substanzen durchgeführt. Der  $EC_{50}$ -Wert gibt dabei die Konzentration der Substanz an, die in der Lage ist die Absorption einer DPPH-Lösung (siehe Material und Methoden 2.6.) nach zwei Minuten auf die Hälfte zu reduzieren. Es wurde zuerst eine Konzentration von  $76 \mu\text{M}$  vermessen; zeigte sich hier bereits eine Absorptionsabnahme um mehr als 0.3 Einheiten, wurde der  $EC_{50}$ -Wert bestimmt.

Abb.E66 gibt die Absorptionsabnahme der Verbindungen wieder, die auf Grund der fehlenden oder geringen Aktivität nicht weiter vermessen wurden. Die Trimethylether des Dihydrokämpferols und Kämpferols sowie Kämpferol-3*O*-glucosid zeigten eine moderate antioxidative Aktivität. Jedoch war mit einer höheren Konzentration der Verbindung keine wesentliche Zunahme der Aktivität verbunden, so dass die  $EC_{50}$ -Werte über  $200 \mu\text{M}$  liegen mussten. Daher wurde auf eine genauere Bestimmung verzichtet.



**Abb.E66:** Absorptionsabnahme der DPPH-Lösung bei Zugabe von  $76 \mu\text{M}$  Flavonoid nach 2 min. Wellenlänge: 517 nm,  $n=3$ , K./-k.=Kämpferol, L.=Luteolin

### 3.6.1.1. Antioxidative Aktivität der Flavanole

Aus der Gruppe der Flavanole standen insgesamt drei Verbindungen zur Verfügung: Catechin, Epicatechin und Gallocatechin. Bei allen drei Substanzen handelte es sich um ein Gemisch der Enantiomere. Zusätzlich wurde (-)-Epicatechin vermessen, das von Frau Dr. B. Steffan am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie aus *Guazuma ulmifolia* isoliert wurde. Alle Flavanole waren in der Lage das stabile DPPH-Radikal zu reduzieren und damit zu einer Abnahme der Absorption zu führen. Die höchste Aktivität zeigte dabei das (-)- Epicatechin mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $24.6 \mu\text{M} \pm 4.69$ . (±)-Catechin, (±)-Epicatechin und (±)-Gallocatechin wiesen gleiche  $EC_{50}$ -Werte von  $42.3 \mu\text{M} \pm 15.08$ ,  $49.7 \mu\text{M} \pm 20.19$  und  $44.0 \mu\text{M} \pm 15.86$  auf.

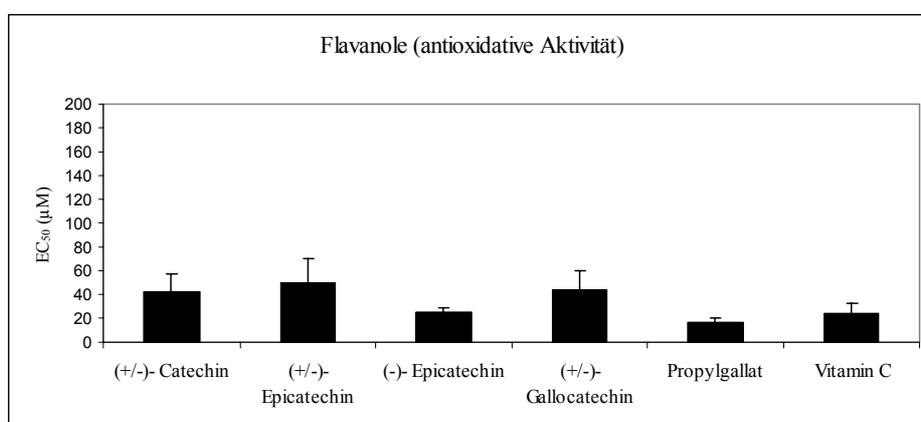
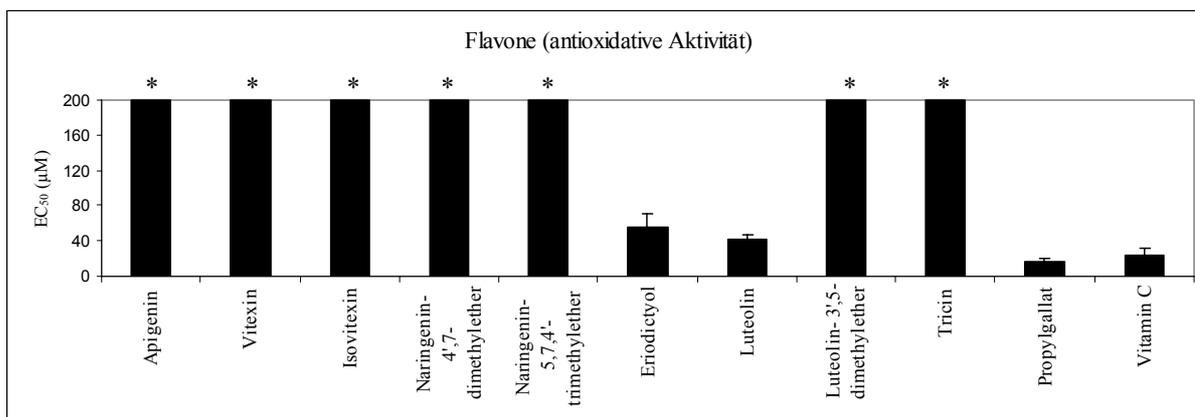


Abb.E67: Antioxidative Aktivität der Flavanole, Wellenlänge:517 nm, n=3, Mittelwert  $\pm$  SD

### 3.6.1.2. Antioxidative Aktivität der Flavone und Flavon-Derivate

In der Reihe der Flavon-Derivate zeigten im Assay das Apigenin und seine Derivate keine Aktivität bis  $76 \mu\text{M}$ . Im Falle des Eriodictyols und des Luteolins war hingegen eine Abnahme der Absorption zu verzeichnen. Der  $EC_{50}$ -Werte des Luteolins lag mit  $42.6 \mu\text{M} \pm 4.25$  im Bereich der  $EC_{50}$ -Werte der Enantiomergemische der Flavanole, während das Eriodictyol mit  $55.5 \mu\text{M} \pm 14.50$  eine etwas geringere Aktivität zeigte. Die 3',5-Dimethylether des Luteolins wies im Assay bei einer Konzentration von  $76 \mu\text{M}$  keine Aktivität auf, ebenso wie Tricin mit drei OH-Gruppen im B-Ring, von denen sowohl 3' als auch 5'-Position methyliert vorliegen. Die Naringenin-Derivate, die von Dr. T. Duong aus *Aglaia oligophylla* isoliert wurden, erwiesen sich ebenso als inaktiv im vermessenen Konzentrationsbereich. Luteolin und seine Derivate wurden von Gamal A. Mohamed aus *Cyperus alopecuroides* isoliert. Beide Arbeiten wurden am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie durchgeführt. Eriodictyol wurde von Herrn Prof. Dr.P. Proksch aus *Encelia* -Arten isoliert.



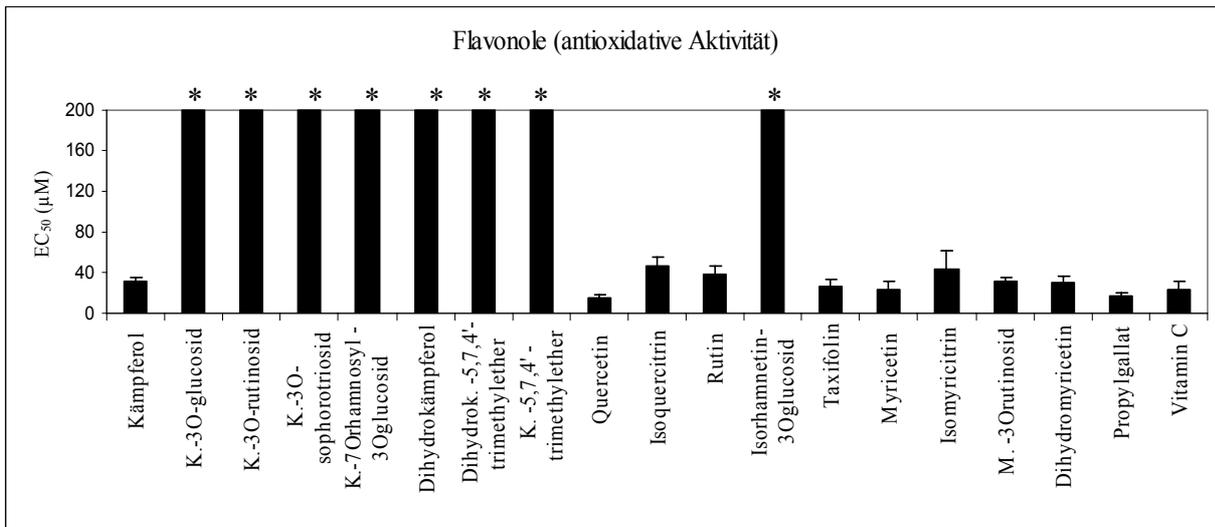
**Abb.E68:** Antioxidative Aktivität der Flavone und Flavon-Derivate (\*keine Aktivität im vermessenen Konzentrationsbereich); Wellenlänge:517nm, n=3, Mittelwert  $\pm$  SD

### 3.6.1.3. Antioxidative Aktivität der Flavonole und Flavonol-Derivate

Unter den Flavonolen zeigten alle untersuchten Aglyka, d.h. Kämpferol ( $31.3 \mu\text{M} \pm 2.48$ ), Quercetin ( $14.8 \mu\text{M} \pm 2.34$ ) und Myricetin ( $23.1 \mu\text{M} \pm 7.97$ ) radikalfangende Eigenschaften. Während weder eine Glycosidierung an der 3-OH Funktion noch eine Hydrierung an 2,3-Position im Quercetin oder im Myricetin zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führten, zeigten die untersuchten Kämpferol-Derivate keine Aktivität bzw. nur eine geringe Absorptionsänderung bei einer Konzentration von  $76 \mu\text{M}$  ( $\Delta A < 0.3$ ). Unter den Quercetin-Derivaten führte eine zusätzlich Methylierung der 3'-OH Funktion im Isorhamnetin-3-O-glucosid zum Verlust der antioxidativen Aktivität.

In der Reihe der Quercetin- und Myricetin-Derivate wiesen die Dihydroverbindungen Taxifolin und Dihydromyricetin  $EC_{50}$ -Werte von  $27.3 \mu\text{M} \pm 4.72$  und  $29.3 \mu\text{M} \pm 5.74$  auf, während die  $EC_{50}$ -Werte der Rutinoside mit  $38.3 \mu\text{M} \pm 6.16$  (Rutin) und  $31.0 \mu\text{M} \pm 3.03$  (Myricetin-3-O-rutinosid) geringfügig höher lagen. Die 3-O-Glucoside hatten hier mit  $46.4 \mu\text{M} \pm 7.18$  (Isoquercitrin) und  $42.8 \mu\text{M} \pm 15.31$  (Isomyricitrin) die höchsten  $EC_{50}$ -Werte.

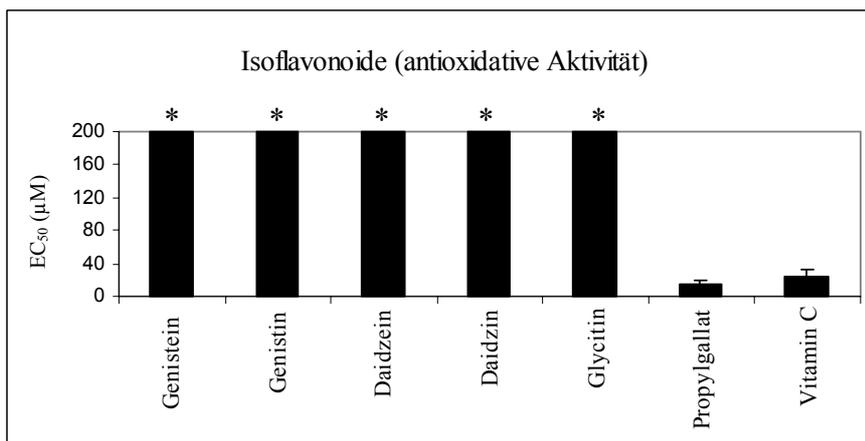
Die Trimethylether des Dihydrokämpferols und des Kämpferols wurden in diesem Fall aus *Aglaia oligophylla* (Dr. T. Duong) isoliert.



**Abb.E69:** Antioxidative Aktivität der Flavonole und Flavonol-Derivate (\*keine oder geringe Aktivität im vermessenen Konzentrationsbereich); Wellenlänge:517nm, n=3, Mittelwert ± SD, K./k.=Kämpferol, M.=Myricetin

#### 3.6.1.4. Antioxidative Aktivität der Isoflavonoide

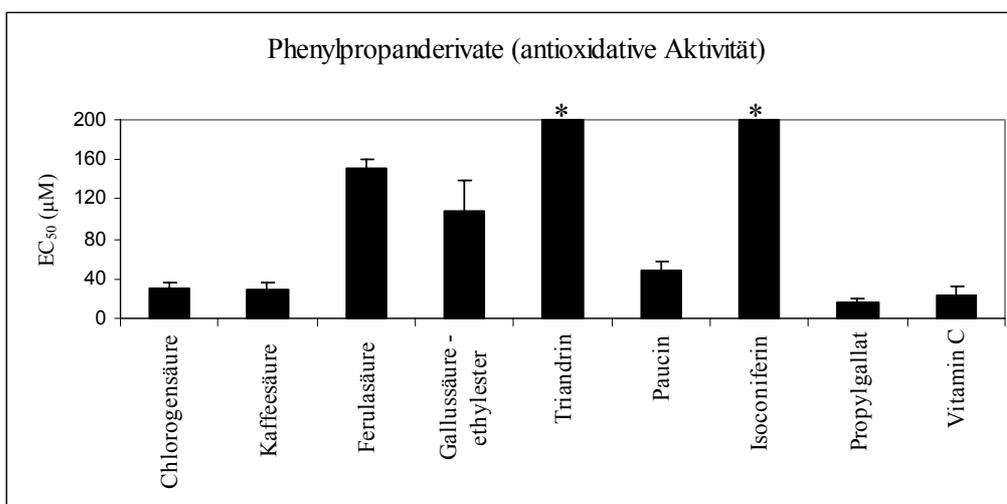
Die Reihe der Isoflavonoide zeigte die gleichen Ergebnisse wie die bereits vorgestellten Apigenin-Derivate. Bis auf die Tatsache, dass sich hier der B-Ring nicht an Position 2 sondern an Position 3 befindet, unterscheiden sich die Strukturen des Genisteins und des Apigenins nicht. Ebenso konnten keine radikalfangenden Eigenschaften bei den Glycosiden beobachtet werden.



**Abb.E70:** Antioxidative Aktivität der Isoflavonoide (\*keine Aktivität im vermessenen Konzentrationsbereich) Wellenlänge:517nm, n=3, Mittelwert ± SD

### 3.6.1.5. Antioxidative Aktivität der einfachen Phenylpropan-Derivate

In der Reihe der einfachen Phenylpropan-Derivate zeigte die Kaffeesäure ( $28.2 \pm 7.11 \mu\text{M}$ ) und ihre Derivate Chlorogensäure ( $31.1 \pm 4.91 \mu\text{M}$ ) und Paucin ( $49.4 \pm 8.90 \mu\text{M}$ , N-Caffeoylputrescin) die niedrigsten  $\text{EC}_{50}$ -Werte. Ferulasäure ( $150.9 \pm 9.91 \mu\text{M}$ ) und Gallussäureethylester ( $109.7 \pm 29.64 \mu\text{M}$ ) wiesen nur eine geringere Fähigkeit auf, das stabile Radikal zu reduzieren, während Triandrin und Isoconiferin im vermessenen Bereich inaktiv waren.



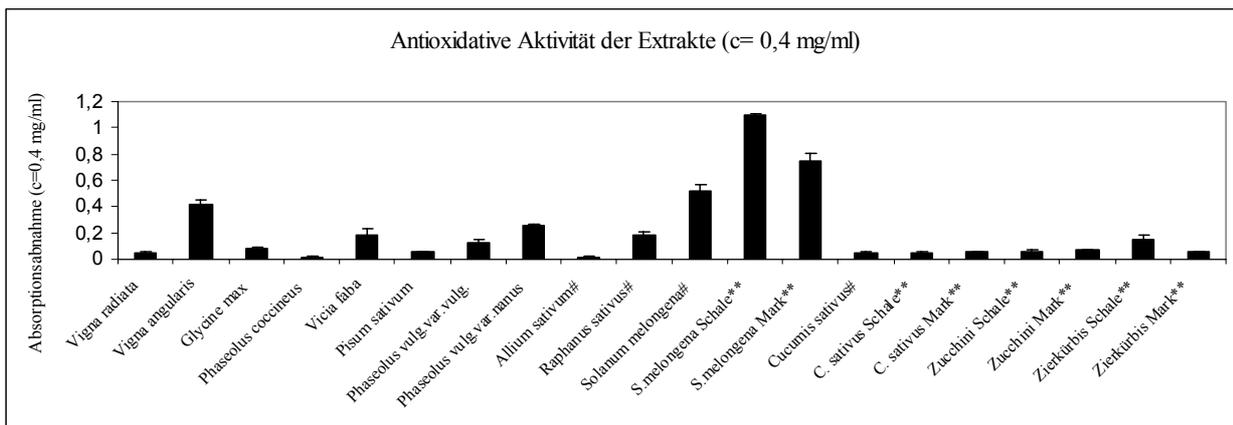
**Abb.E71:** Antioxidative Aktivität der einfachen Phenylpropan-Derivate (\*keine Aktivität im vermessenen Konzentrationsbereich); Wellenlänge: 517nm, n=3, Mittelwert  $\pm$  SD

### 3.6.1.6. Antioxidative Aktivität der Indol-Derivate

Für die beiden aus *Raphanus sativus* isolierten Indol-Derivate konnte im vorliegenden Fall keine Aktivität im DPPH-Assay beobachtet werden. Beide verursachten eine Absorptionsabnahme um weniger als 0.05 Einheiten, so dass auch keine weiteren Messungen durchgeführt wurden.

### 3.6.1.7. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften der Extrakte

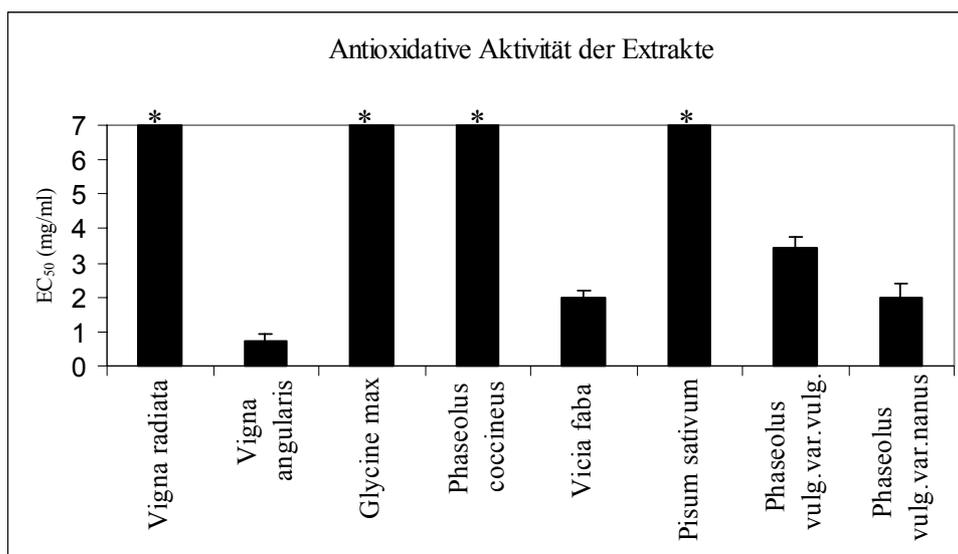
Die Extrakte der verschiedenen Leguminosen (jeweils Extrakt Mai 2004) und der weiteren Gemüsesorten wurden ebenfalls im DPPH-Assay untersucht, um abzuschätzen ob das Inhaltsstoffmuster der Flavonoide mit der antioxidativen Aktivität im vorliegenden Assay korreliert. Dazu wurde zuerst eine Konzentration von 0.4 mg/ml vermessen. Die Absorptionsdifferenzen bei dieser Konzentration sind in Abb.E72 wiedergegeben.



**Abb.E72:** Absorptionsänderung der DPPH-Lösung, Extraktkonzentration 0.4 mg/ml, Wellenlänge 517 nm, n=3, Mittelwert  $\pm$  SD, #Extrakte der chinesischen Pflanzen, \*\*Extrakte der deutschen Pflanzen

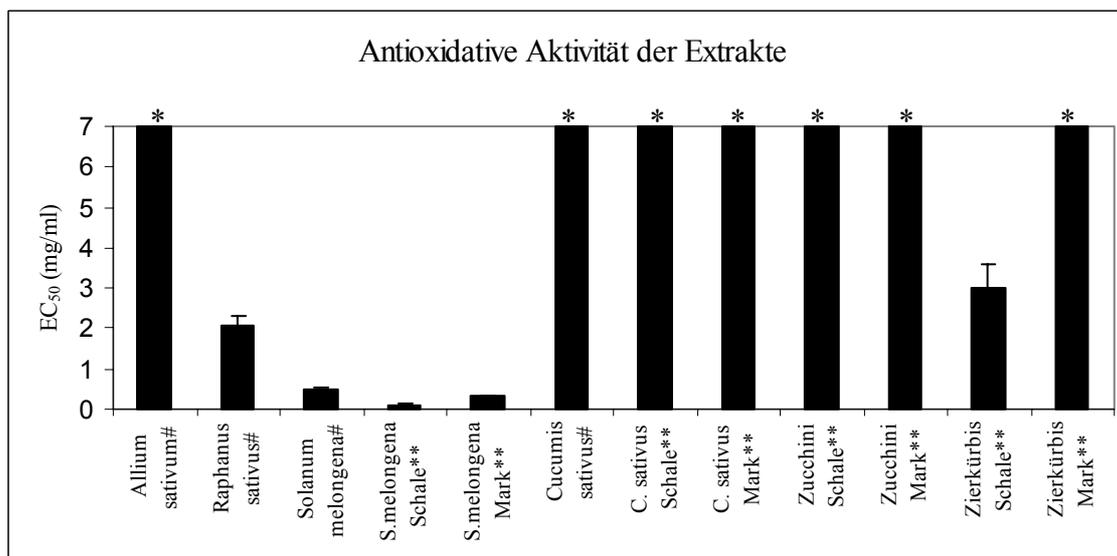
Ausgehend von diesem Ergebnis wurden von den Leguminosen die Extrakte von *Vigna angularis*, *Vicia faba* und den beiden *Phaseolus* - Arten genauer untersucht. Bei den weiteren Gemüsesorten wurde von allen Extrakten der Aubergine (*Solanum melongena*) sowie von den Extrakten von *Raphanus sativus* und dem Schalengewebe des Zierkürbis der  $EC_{50}$ -Wert bestimmt.

Bei den Leguminosen erwies sich der Extrakt von *Vigna angularis* als derjenige Extrakt, der die stärkste antioxidative Aktivität ( $c=0.7$  mg/ml  $\pm$  0.21) aufwies, wie es bereits durch das Screening zu vermuten gewesen war. Die drei anderen Leguminosen zeigten demgegenüber eine schwächere Aktivität (*Vicia faba*:  $2.0 \pm 0.23$  mg/ml; *P. vulg. var. vulg.*:  $3.4 \pm 0.32$  mg/ml; *P. vulg. var. nanus*:  $2.0 \pm 0.44$  mg/ml).



**Abb.E73:** Antioxidative Aktivität der Leguminosenextrakte, (\*keine antioxidative Aktivität im vermessenen Konzentrationsbereich), Wellenlänge 517 nm, n=3, Mittelwert ± SD

Bei den untersuchten weiteren Gemüsesorten ergaben die Extrakte der Aubergine (*Solanum melongena*) die niedrigsten EC<sub>50</sub>-Werte gefolgt von den Extrakten von *Raphanus sativus* und dem Extrakt der Zierkürbisschale. Die EC<sub>50</sub>-Werte lagen bei 0.1 mg/ml ± 0.03 (*S. melongena* „Schale“), 0.3 mg/ml ± 0.04 (*S. melongena* „Mark“), 0.5 mg/ml ± 0.05 (*S. melongena* „China“), die der beiden anderen Extrakte bei 2.1 mg/ml ± 0.26 (*Raphanus sativus*) und 3.0 mg/ml ± 0.57 (*Cucurbita pepo* var. - „Zierkürbis Schale“)



**Abb.E74:** Antioxidative Aktivität der weiteren Gemüsesorten, (\* keine Aktivität im vermessenen Konzentrationsbereich), Wellenlänge 517nm, n=3, Mittelwert ± SD, #Extrakte der chinesischen Pflanzen, \*\*Extrakte der deutschen Pflanzen

### **3.6.2. Charakterisierung der zellulären Eigenschaften der Reinsubstanzen an H4IIE-Hepatom-Zellen**

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Toxikologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Prof. Dr. R. Kahl, Priv. Doz. Dr. W. Wätjen und Mitarbeiter) wurden die zellulären Eigenschaften der Reinsubstanzen an H4IIE Hepatom-Zellen untersucht. Die Zytotoxizität der untersuchten Substanzen wurde mit Hilfe von Neutralrot bzw. MTT nach 24 h Inkubationszeit bestimmt. In Einzelfällen wurde die Fähigkeit der Flavonoide, in geringen Konzentrationen die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen, untersucht.

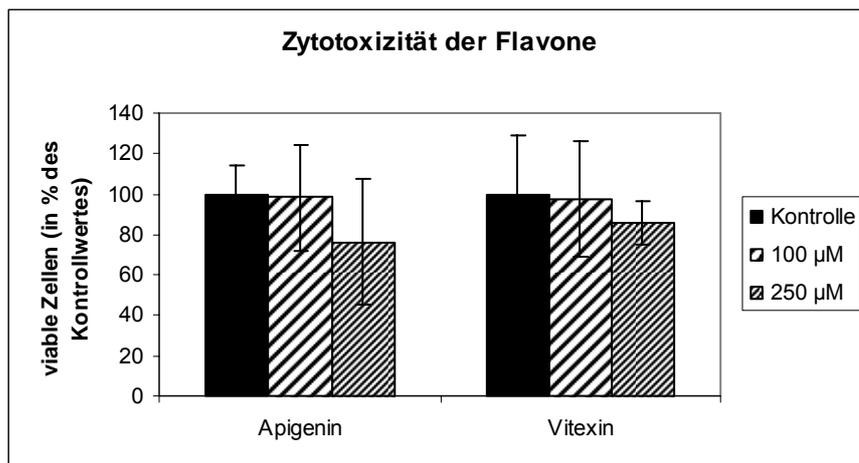
Im Kapitel 3.5. (Aktivität der Reinsubstanzen im quantitativen DPPH Küvetten-Assay) wurden zusätzlich Substanzen getestet, die nicht aus den Leguminosen oder weiterem chinesischem Gemüse, sondern innerhalb des Arbeitskreises in anderen Projekten isoliert wurden. Zum großen Teil wurden diese Substanzen auch innerhalb der Kooperation in Einzelprojekten bearbeitet. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden hier ohne Abbildung erwähnt.

Die Flavanole Catechin und Epicatechin wurden im Rahmen der Kooperation nicht mehr getestet, da eine Untersuchung dieser Substanzen bereits in vorangegangenen Arbeiten erfolgte (Steffan 2005). Gallocatechin stand in diesem Zusammenhang nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung.

#### **3.6.2.1. Eigenschaften von Flavon-Derivaten im Zellkultursystem**

##### **Apigenin und Vitexin**

Im Rahmen eines Projektes mit prenylierten Verbindungen (Wätjen et al. 2007) wurden das Aglykon Apigenin und sein Derivat Vitexin auf ihre Zytotoxizität hin untersucht. Da in H4IIE-Zellen nur eine geringe Aktivität zu beobachten war, wurde auf eine Testung weiterer Apigenin-Derivate verzichtet, zumal viele nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen.



**Abb.E75:** Überlebensrate der Zellen in % des Kontrollwertes nach Inkubation mit jeweils 100 bzw. 250 µM des Flavonoids in H4IIE-Zellen nach 24h, Anfärbung mit Neutralrot (Absorption der Kontrolle beispielhaft für Apigenin=  $0.727 \pm 0.08$ ,  $x \pm SD$ ,  $n=3$ )

### Luteolin und Luteolin-3',5-dimethylether

Das unter Kapitel 3.5.2. (Antioxidative Aktivität der Flavon-Derivate) beschriebene Luteolindimethyl-Derivat (aus *Cyperus alopecuroides*) wurde zusätzlich auf seine zellulären Eigenschaften hin untersucht. Es konnte dabei festgestellt werden, dass Luteolin und Luteolin-3',5-dimethylether in einer Konzentration von 250 µM die Viabilität von H4IIE-Zellen beeinflussten und nach 24 h zu einer Abnahme der Neutralrotakkumulation auf 28.5 % und 33.9 % führten. Luteolin- 5,7,3',4'-tetramethylether zeigte als Vergleich keine Beeinflussung der Zellen unter gleichen Bedingungen. Die oben aufgeführte Zytotoxizität wurde im Falle des Luteolins durch einen apoptotischen Zelltod ausgelöst, welcher in einem Apo-ONE-Assay (Nachweis der Caspase-3-Aktivität) belegt werden konnte. Für die Methylderivate konnte keine Aktivierung der Caspase-3 beobachtet werden. (Michels 2005; Michels et al. 2006)

### Naringenin-4',7-dimethylether und Naringenin-4',5,7-trimethylether

Obwohl für die beiden im Kapitel 3.5.2. (Antioxidative Aktivität der Flavon-Derivate) beschriebenen Naringenin-Derivate (Naringenin-4',7-dimethylether und Naringenin-4',5,7-trimethylether aus *Aglaia oligophylla*) im DPPH-Assay keine Aktivität gefunden wurde, erfolgte eine Testung an H4IIE-Zellen im Hinblick auf ihre Toxizität. Hierzu wurden H4IIE-Zellen mit der zu testenden Substanz versetzt, wobei nach 24 h mit Hilfe des MTT-Assays eine Auswertung erfolgte.

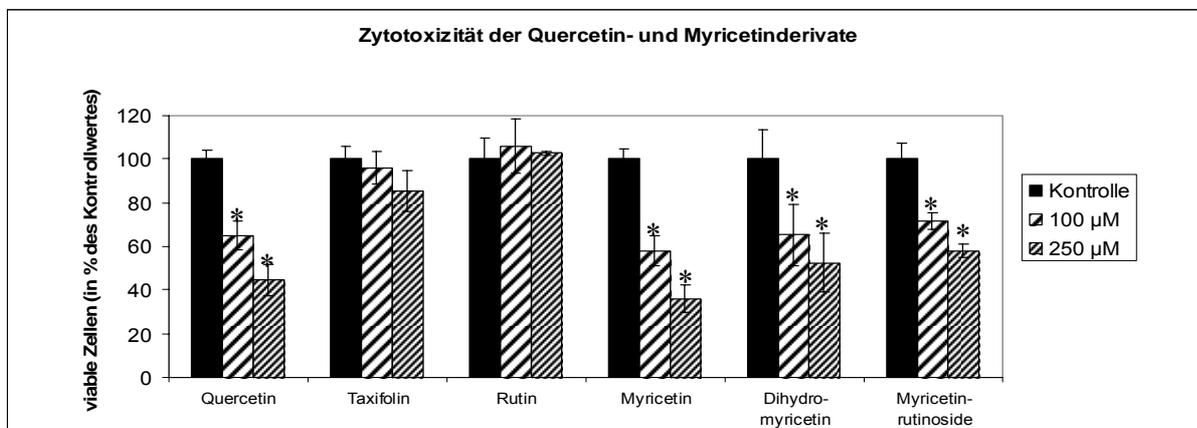
Es konnte gezeigt werden, dass das Dimethylderivat keinen Einfluss auf die Zellviabilität hatte, das Trimethylderivat jedoch eine Abnahme der MTT-Akkumulation auf 22.67% des Kontrollwertes in einer Konzentration von 100 µM hervorrief, welche im Apo-ONE-Assay als apoptotischer Zelltod nachgewiesen werden konnte (unveröffentlichte Daten).

### 3.6.2.2. Eigenschaften von ausgesuchten Quercetin- und Myricetin-Derivaten im Zellkultursystem

#### Zytotoxizität der ausgesuchten Quercetin- und Myricetin-Derivate

Im Folgenden wurden Quercetin und Myricetin, ihre Dihydroverbindungen Taxifolin und Dihydromyricetin, sowie die jeweiligen Rutinoside untersucht. Dabei wurde die Toxizität der Substanzen in H4IIE- Zellen bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt und nach 24h die Überlebensrate mit Hilfe der Neutralrotakkumulation bestimmt. Abb.E76 verdeutlicht die gewonnenen Ergebnisse.

Es konnte festgestellt werden, dass beide Aglyka in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  die Neutralrotakkumulation auf 44.7% (Quercetin) bzw. 35.9% (Myricetin) des Ausgangswertes verringerten. In der Reihe der Quercetin-Derivate (Taxifolin und Rutin) konnte kein Einfluss auf die Zellaktivität gefunden werden, wohingegen die Neutralrotakkumulation bei den Myricetin-Derivaten (Dihydromyricetin und Myricetin-3O-rutinosid) auf 52.5% und 58.0% des Kontrollwertes abnahm und somit die Toxizität trotz Derivatisierung erhalten blieb. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für Quercitrin und Myricitrin gefunden werden (Gollembeck et al. 2006).



**Abb.E76:** Überlebensrate der Zellen in % des Kontrollwertes nach Inkubation mit jeweils 100 bzw. 250  $\mu\text{M}$  des Flavonoids in H4IIE-Zellen nach 24h, Anfärbung mit Neutralrot (\*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle=100%, Absorption der Kontrolle beispielhaft für Quercetin=  $0.319 \pm 0.01$ ,  $x \pm \text{SD}$ ,  $n=4$ )

## Protektive Effekte der ausgesuchten Quercetin- und Myricetin-Derivate gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelte Apoptose

### Caspase-3-Aktivität

Um die protektiven Effekte der untersuchten Substanzen gegenüber der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Apoptose zu untersuchen, wurden H4IIE-Zellen mit 50 µM Flavonoid eine Stunde lang präinkubiert und anschließend für 14h mit 500µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt. Danach wurde die Caspase-3-Aktivität ermittelt und gegen die Blindwerte mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in Abb.E77 dargestellt und zeigen, dass lediglich Quercetin in der Lage war, die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermittelte Caspase-3-Aktivität und damit die Apoptose der Zellen zu reduzieren.

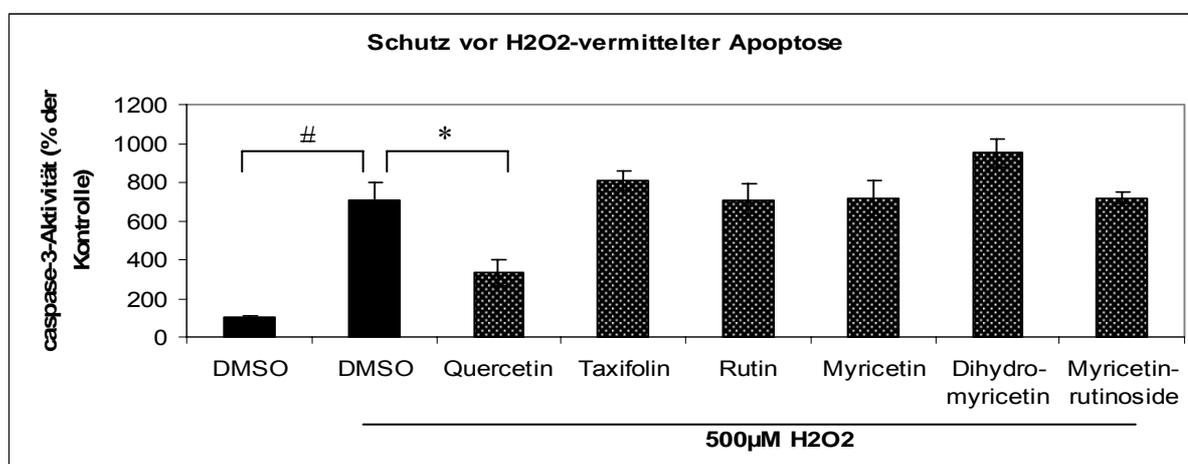
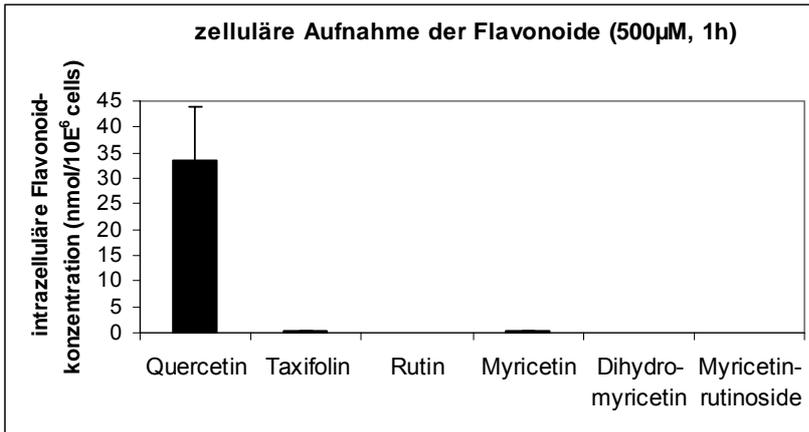


Abb.E77: Caspase-3-Aktivität (in % der Kontrolle) nach 1h Präinkubation mit dem jeweiligen Flavonoid und 14h Inkubation der Zellen mit 500µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=3, \* p<0.05 vs DMSO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Kontrolle, # p<0.05 vs. DMSO-Kontrolle)

## Zelluläre Aufnahme der ausgesuchten Quercetin- und Myricetin-Derivate

Um festzustellen, in welchem Ausmaß die zelluläre Aufnahme an den oben erhaltenen Daten beteiligt ist, wurden H4IIE-Zellen für 1h mit 500µM der jeweiligen Flavonoide inkubiert und die Proben wie unter Material und Methoden (2.7.1.3.Aufnahmestudien) beschrieben, bearbeitet. Zum größten Teil wurden diese Aufnahmestudien bereits in vorangegangenen Arbeiten (Steffan 2005) im Rahmen der Kooperation durchgeführt, während Dihydromyricetin und Myricetin-3O-rutinosid hier hinzugefügt wurden.

Die zelluläre Aufnahme wird in Abb.E78 verdeutlicht und zeigt, dass von den untersuchten Substanzen nur Quercetin in größeren Mengen ( $33.4 \pm 10.7$  nmol/10<sup>6</sup> Zellen) in den Zellen vorhanden war. Taxifolin und Myricetin wurden nur in Spuren wieder gefunden, während Rutin, Dihydromyricetin und Myricetin-3O-rutinosid nicht in den Zellen nachzuweisen waren.



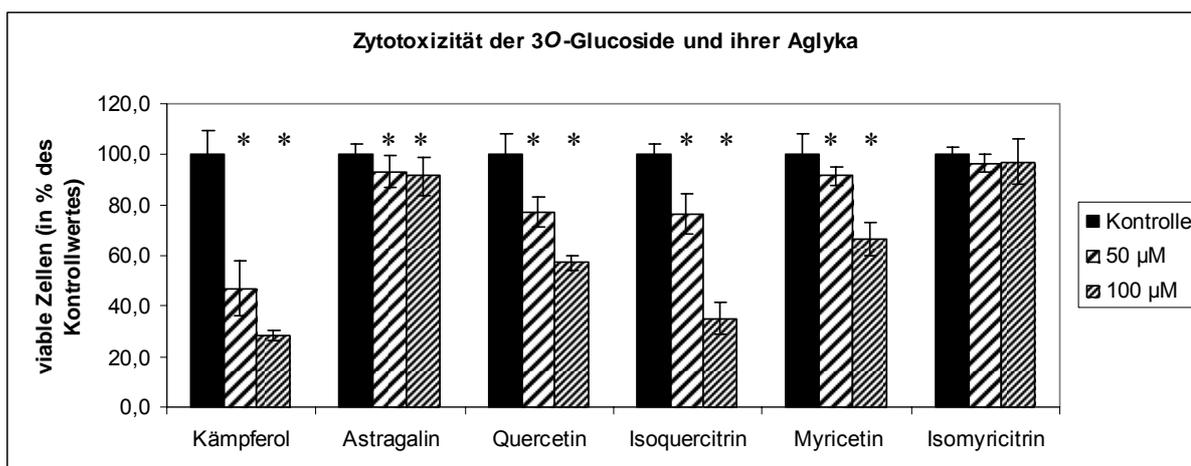
**Abb.E78:** Zelluläre Aufnahme der jeweiligen Flavonoide in H4IIE-Zellen nach Inkubation mit 500µM Flavonoid für 1h

### 3.6.2.3. Eigenschaften von weiteren Flavonol-Derivaten im Zellkultursystem

#### Kämpferol, Quercetin, Myricetin und ihre Glucoside

Die 3*O*-Glucoside von Kämpferol, Quercetin und Myricetin wurden jeweils auf ihre Zytotoxizität an H4IIE-Zellen untersucht. Zum Vergleich wurden die zugehörigen Aglyka Kämpferol, Quercetin und Myricetin ebenfalls vermessen. Die zu testenden Substanzen wurden 24h mit H4IIE-Zellen in Kontakt gebracht. Danach erfolgte die Auswertung der Viabilität mit Hilfe von MTT.

Die Inkubation mit den drei Aglyka führte zu einer Abnahme der MTT-Akkumulation in den Zellen, wobei der Wert bei einer Konzentration von 100µM auf 28.3% (Kämpferol), 57.0% (Quercetin) und 66.7% (Myricetin) des Kontrollwertes zurückging. Im Falle der Glucoside konnte bei 100µM eine geringere Toxizität beobachtet werden; während Isoquercitrin noch eine Reduktion der MTT-Akkumulation auf 35.2% aufwies, zeigten die beiden anderen Glucoside nur eine geringe Aktivität (Astragalin, Isomyricitrin, >90%)

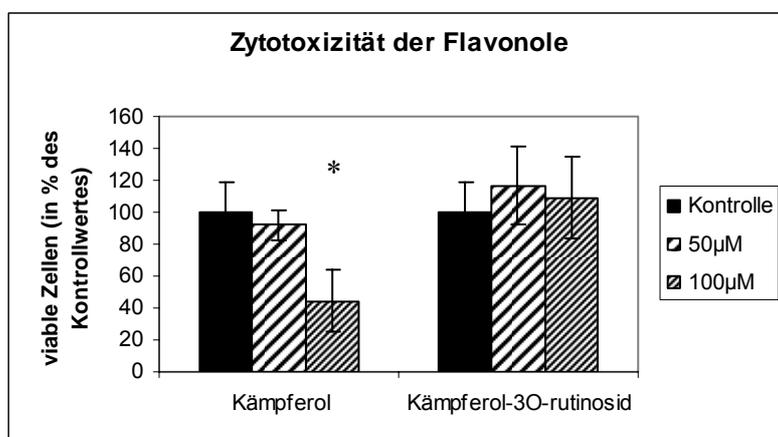


**Abb.E79:** Überlebensrate der Zellen in % des Kontrollwertes nach Inkubation mit jeweils 50 bzw. 100 µM des Flavonoids in H4IIE-Zellen nach 24h, Anfärbung mit MTT (\*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle=100%, Absorption der Kontrolle beispielhaft für Kämpferol=  $0.232 \pm 0.02$ ,  $x \pm SD$ ,  $n=3$ )

### Weitere Kämpferol-Derivate

Als weiteres Glycosid wurde Kämpferol-3O-rutinosid (*Aglaia oligophylla*) untersucht. Da im gestesteten Konzentrationsbereich bis 100µM kein Einfluss auf die Viabilität der H4IIE-Zellen beobachtet werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Testung weiterer Kämpferolglycoside verzichtet.

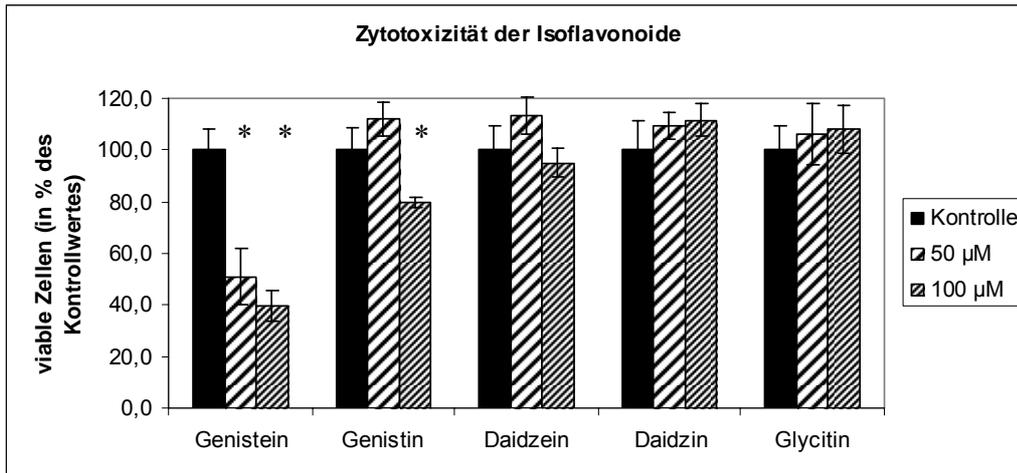
Zusätzlich wurden auch in diesem Fall die beiden aus *Aglaia oligophylla* isolierten methylierten Verbindungen Kämpferol-5,7,4'-O-trimethylether und Dihydrokämpferol-5,7,4'-O-trimethylether an H4IIE-Zellen auf ihre Toxizität getestet, obwohl im DPPH-Assay kein antioxidatives Potential zu verzeichnen war. Allerdings konnte auch in diesem Assay keine Aktivität festgestellt werden.



**Abb.E80:** Überlebensrate der Zellen in % des Kontrollwertes nach Inkubation mit jeweils 50 bzw. 100 µM des Flavonoids in H4IIE-Zellen nach 24h, Anfärbung mit MTT (\*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle=100%, Absorption der Kontrolle beispielhaft für Kämpferol=  $0.362 \pm 0.07$ ,  $x \pm SD$ ,  $n=5$ )

### 3.6.2.4. Eigenschaften der Isoflavonoid-Derivaten im Zellkultursystem

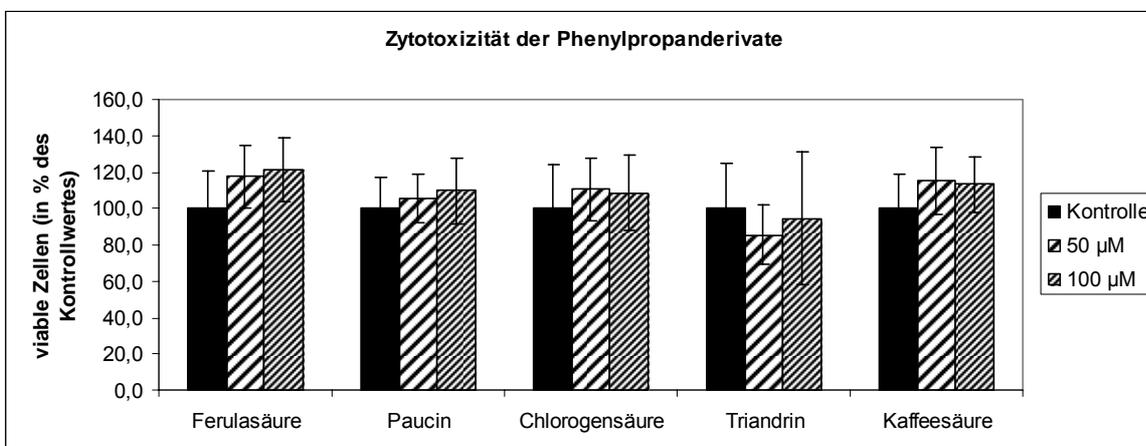
In der Reihe der Isoflavonoide konnte im Falle des Genisteins und Genistins ein Einfluss auf die Viabilität der H4IIE-Zellen festgestellt werden. Eine Konzentration von 100µM verursachte einen Rückgang der MTT-Akkumulation auf 39.7 % bzw. 79.6% des Ausgangswertes. Die weiteren Isoflavonoide erwiesen sich als nicht zytotoxisch im vermessenen Konzentrationsbereich. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb.E81 dargestellt.



**Abb.E81:** Überlebensrate der Zellen in % des Kontrollwertes nach Inkubation mit jeweils 50 bzw. 100 µM des Flavonoids in H4IIE-Zellen nach 24h, Anfärbung mit MTT (\* p<0.05 vs. Kontrolle=100%, Absorption der Kontrolle beispielhaft für Genistein= 0.201 ± 0.02, x±SD, n=3)

### 3.6.2.5. Eigenschaften von einfachen Phenylpropan-Derivaten im Zellkultursystem

Die isolierten bzw. käuflich erworbenen Phenylpropan-Derivate zeigten im vermessenen Bereich bis 100 µM keinen zytotoxischen Einfluss auf H4IIE-Zellen. Isoconiferin konnte auf Grund zu geringer Mengen nicht getestet werden.



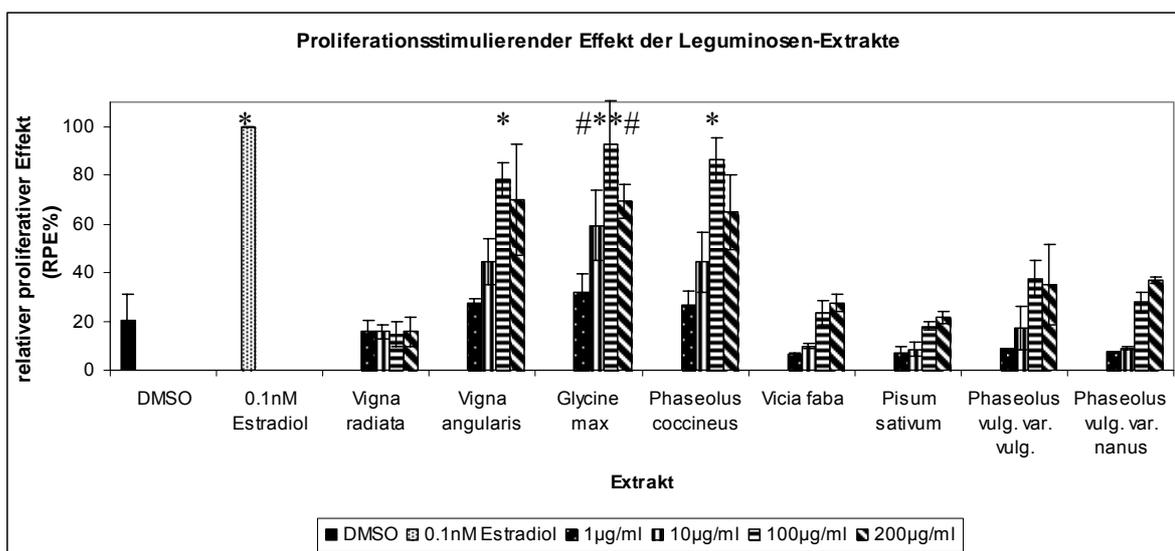
**Abb.E82:** Überlebensrate der Zellen in % des Kontrollwertes nach Inkubation mit jeweils 50 bzw. 100 µM des Flavonoids in H4IIE-Zellen nach 24h, Anfärbung mit MTT (Absorption der Kontrolle beispielhaft für Ferulasäure= 0.211 ± 0.04, x±SD, n=3)

### 3.6.3. Charakterisierung der zellproliferationsstimulierenden Eigenschaften der Reinsubstanzen und Extrakte der Leguminosen und weiterer Gemüsesorten an MCF7-BUS Zellen

#### 3.6.3.1. Bestimmung der zellproliferationsstimulierenden Eigenschaften der Extrakte

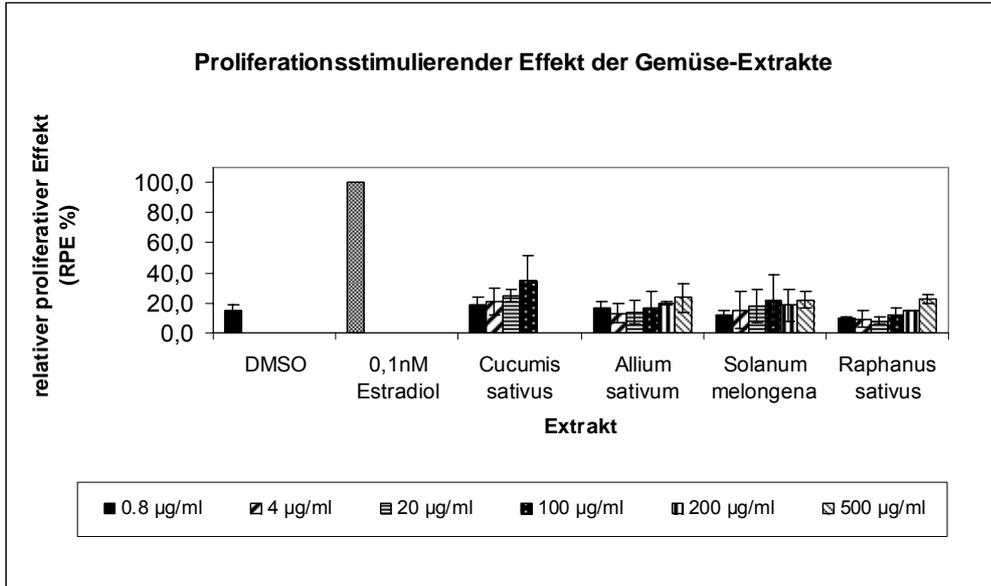
Die proliferationsstimulierenden Eigenschaften sowohl der Leguminosenextrakte als auch der weiteren Gemüse aus China erfolgte an estrogensensitiven MCF7-Zellen. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Extrakt versetzt, wobei der proliferationsstimulierende Effekt gegenüber einer 1 nM Estradiollösung ermittelt wurde.

Unter den Leguminosen erwiesen sich drei der ethanolischen Extrakte als aktiv. *Glycine max* und *Phaseolus coccineus* zeigten bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine Aktivität von 92.6 % und 86.2 % im Vergleich mit 0.1 nM Estradiol. Daneben zeigte nur noch *Vigna angularis* eine vergleichbare Aktivität, die bei 100 µg/ml 78.1 % erreichte (Zhao et al. 2005).

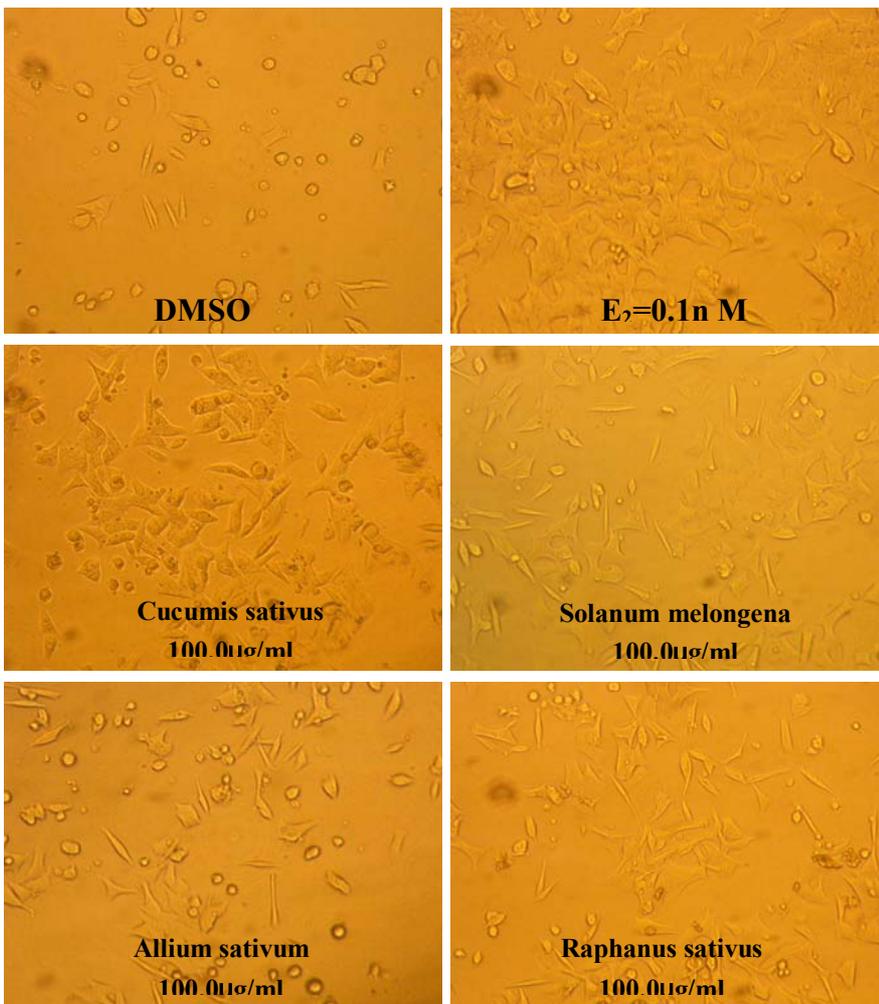


**Abb.E83:** Relativer proliferativer Effekt (RPE) der Leguminosenextrakte an MCF-7-Zellen gemessen gegen 0.1 nM 17 $\beta$ -Estradiol= 100%, Inkubationszeit 6 Tage, Anfärbung mit MTT, n=3, # p< 0.05, \* p< 0.01

Unter dem weiteren chinesischen Gemüse zeigte keiner der Extrakte eine signifikante Aktivität. Es lies sich jedoch eine Tendenz erkennen, die darauf hindeutete, dass in höheren Konzentrationen eine steigende Proliferation zu erwarten wäre, welche besonders bei dem Extrakt von *Cucumis sativus* zu erkennen war. Allerdings wurde das Experiment in dieser Richtung durch die fehlende Löslichkeit der Extrakte im Medium limitiert.



**Abb.E84:** Relativer Proliferativer Effekt (RPE) der weiteren chinesischen Gemüse an MCF-7-Zellen gemessen gegen 0.1 nM 17 $\beta$ -Estradiol =100%, Inkubationszeit 6Tage, Anfärbung mit MTT,  $x \pm SD$ , n=3



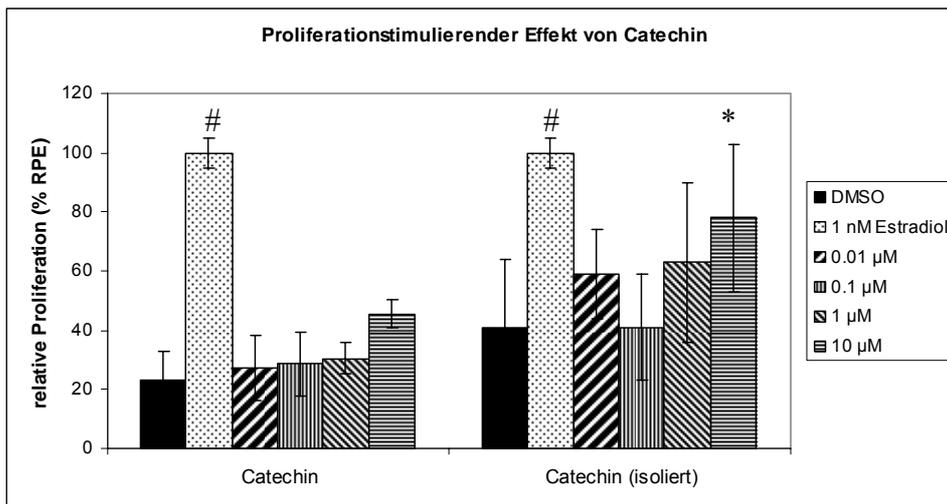
**Abb.E85:** MCF7/BUS-Zellen-Zellproliferationsstimulierende Effekt der chinesischen Gemüse (*Cucumis sativus*, *Solanum melongena*, *Allium sativum*, *Raphanus sativus*) an MCF7/BUS-Zellen in einer Konzentration von 100 µg/ml. Kontrollwert 0.1 nM 17 $\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) =100%, Inkubationszeit 6 Tage, DMSO als negativ Kontrolle.

### 3.6.3.2. Bestimmung der zellproliferationsstimulierenden Eigenschaften der Reinsubstanzen

Von den isolierten Reinsubstanzen wurden Catechin, Rutin, Myricetin-3*O*-rutosid und Genistein auf ihre proliferationsstimulierenden Eigenschaften hin untersucht. Die übrigen stellten käuflich erworbene Substanzen dar, während Catechin und Rutin sowohl aus der einen als auch aus der anderen Quelle getestet wurden.

#### Flavanole

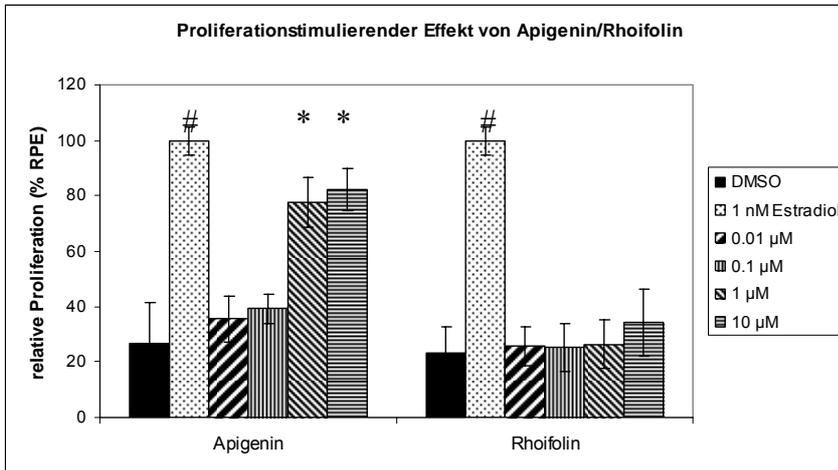
Das Flavanol ( $\pm$ )-Catechin wurde an MCF-7-Zellen auf seine proliferationsstimulierenden Eigenschaften hin untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass das Zellwachstum nur für die isolierte Substanz (*Vigna angularis*) in einer Konzentration von 10  $\mu$ M leicht gegenüber der Kontrolle erhöht war. Die käuflich erworbene Substanz zeigte keinen Einfluss auf das Zellwachstum.



**Abb.E86:** Relative Zellproliferation (RPE) in % des Kontrollwertes (1 nM 17 $\beta$ -Estradiol=100%), Anfärbung mit MTT, Inkubationszeit 7 Tage,  $x \pm$  SD,  $n=3$  ( $n=5$  für Catechin isoliert), \* $p<0.05$ , #  $p<0.01$  (Student t-test vs. DMSO)

## Flavone

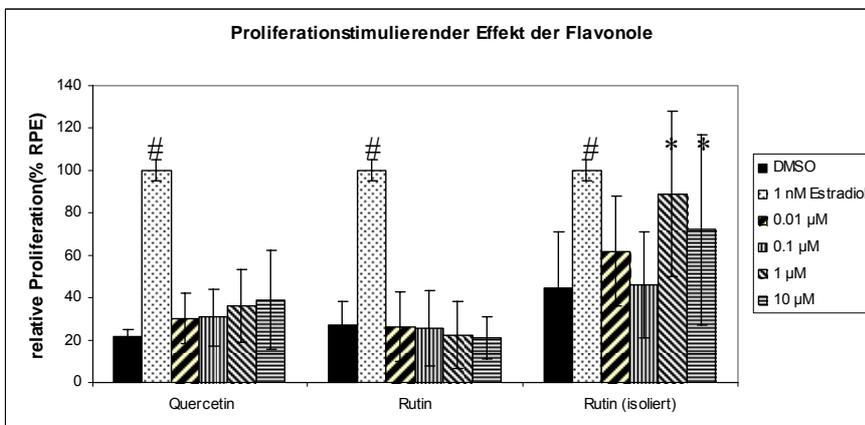
Von den Flavonen wurden Apigenin und Rhoifolin (Apigenin-7*O*-neohesperidosid) untersucht. Dabei zeigte Rhoifolin keine Aktivität im vermessenen Konzentrationsbereich, während das Aglykon Apigenin einen Anstieg der Zellproliferation auf 82.3 % (10 µM) bezogen auf die Positivkontrolle erreichte.



**Abb.E87:** Relative Zellproliferation (RPE) in % des Kontrollwertes (1 nM 17β-Estradiol=100%), Anfärbung mit MTT, Inkubationszeit 7 Tage, x± SD, n=3, \*p<0.05,# p<0.01 (Student t-test vs. DMSO)

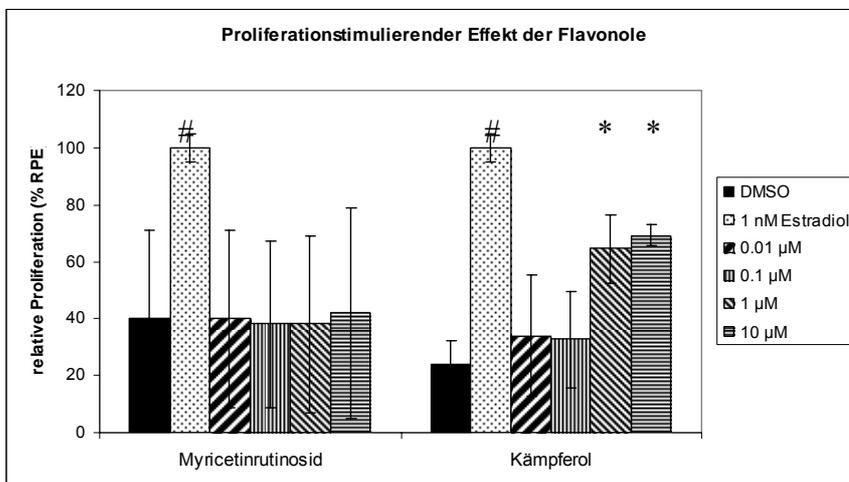
## Flavonole

Quercetin konnte in diesem Modell das Wachstum der MCF-7-Zellen nur leicht, aber nicht signifikant erhöhen, während das käuflich erworbene Rutin keine Aktivität aufwies. Das isolierte Rutin (*Vigna angularis*) jedoch war in der Lage eine Proliferationsstimulation zu bewirken, die 89% (1 µM) bzw. 72% (10 µM) der Proliferation einer 1 nM Estradiollösung entspricht. Die Ergebnisse der Tests sind in Abb.E88 graphisch dargestellt.



**Abb.E88:** Relative Zellproliferation (RPE) in % des Kontrollwertes (1 nM 17β-Estradiol=100%), Anfärbung mit MTT, Inkubationszeit 7 Tage, x± SD, n=3 (n=5 für Rutin isoliert), \*p<0.05,# p<0.01 (Student t-test vs. DMSO)

Es wurden außerdem das isolierte Myricetin-3*O*-rutinosid (*Vigna angularis*) und sowie Kämpferol getestet, wobei letzteres ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eine signifikante Erhöhung der Zellproliferation gegenüber DMSO aufwies, d.h. die MTT-Akkumulation auf 69.3% (10  $\mu\text{M}$ ) des Kontrollwertes anstieg.

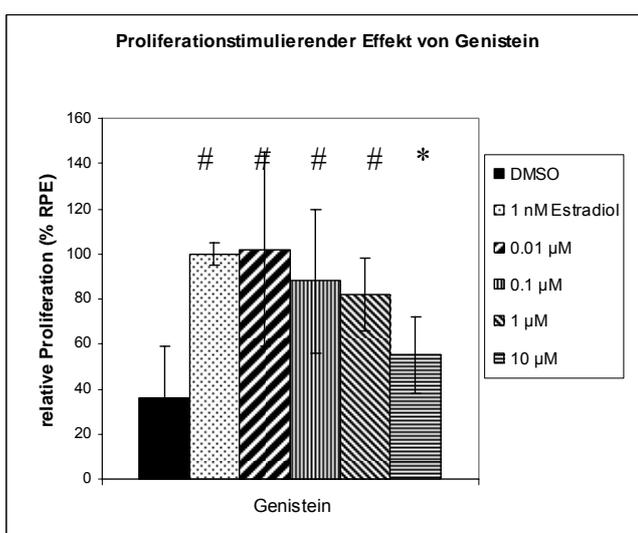


**Abb.E89:** Relative Zellproliferation (RPE) in % in % des Kontrollwertes (1 nM 17 $\beta$ -Estradiol=100%), Anfärbung mit MTT, Inkubationszeit 7 Tage,  $x \pm$  SD,  $n=3$  ( $n=5$  für Myricetin-3*O*-rutinosid), \* $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$  (Student t-test vs. DMSO)

### Isoflavonoide

Von den Isoflavonoiden wurde lediglich Genistein auf seine Aktivität im Testsystem untersucht. Da jedoch für Isoflavonoide eine derartige Eigenschaft mehrfach beschrieben ist, wurde auf eine Testung weiterer Isoflavonoide verzichtet (Cos et al. 2003; Dixon et al. 2002; Morito et al. 2001).

Genistein erwies sich erwartungsgemäß als aktiv in allen untersuchten Konzentrationen.



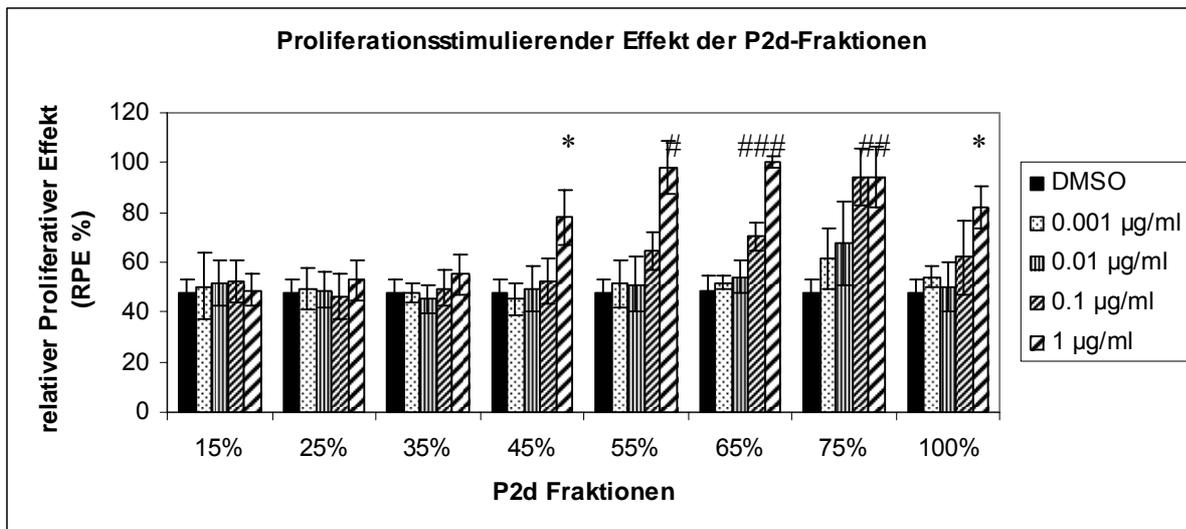
**Abb.E90:** Relative Zellproliferation (RPE) in % des Kontrollwertes (1 nM 17 $\beta$ -Estradiol=100%), Anfärbung mit MTT, Inkubationszeit 7 Tage,  $x \pm$  SD,  $n=3$ , \* $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$  (Student t-test vs. DMSO)

### 3.6.3.3. Bestimmung der aktiven Komponente aus *Vigna angularis*

In Kapitel 3.6.3.1. wurde gezeigt, dass der Extrakt von *Vigna angularis* in der Lage war, das Zellwachstum von MCF7-Zellen zu stimulieren. Auf Grund dieser Eigenschaft und der Tatsache, dass im Extrakt hauptsächlich Flavonoide vom Flavanol- und Flavonoltyp zu detektieren waren, die jedoch als Reinsubstanzen keine bzw. nur eine geringe Aktivität im selben Assay aufwiesen, wurde eine assaybasierte Isolierung durchgeführt, um die aktive Komponente zu ermitteln. Die schrittweise Auftrennung des Extraktes ist in Kapitel 2.7.2.2. beschrieben.

Die nach der ersten Chromatographie erhaltenen Fraktionen (P2a-g) wurden zusammen mit dem Rohextrakt und dem in Methanol unlöslichen Rückstand auf ihre zellproliferierenden Eigenschaften hin untersucht. Hierzu wurden die zu testenden Fraktionen in 96-Well-Platten zu MCF7-Zellen gegeben und nach 5 Tagen die Proliferation mit Hilfe der MTT-Methode bestimmt. Als aktive Fraktion konnten der Rohextrakt und P2d, identifiziert werden, die im Vergleich zu einer 1 nM Estradiollösung in einer Konzentration von 0.001 mg/ml eine Proliferation von 94.26 ( $\pm 5.7$ )% bzw. 103.28 ( $\pm 12.3$ )% hervorriefen ( $n=5$ ,  $x \pm SD$ , Anfärbung mit MTT).

P2d wurde daher einer weiteren Fraktionierung unterworfen, wobei 8 Fraktionen (P2d 15%, -25%, -35%, -45%, -55%, -65%, -75%, -100%) erhalten wurden. Es konnte im Assay eine Aktivität in den Fraktionen P2d45% - 100% festgestellt werden, in deren aktivster Fraktion, P2d65%, eine Komponente erhalten wurde, die durch Vergleich mit einem Standard eindeutig als Daidzein identifiziert werden konnte. Fraktion P2d55% enthielt neben Myricetin-3-O-rutinosid, Rutin und Isoquercitrin auch Daidzein als Nebenkomponente. Die Aktivität der 45%- bzw. der 75%-Fraktion konnte nicht eindeutig auf eine Komponente festgelegt werden, so dass unter Umständen noch weitere aktive Komponenten enthalten sind (Chromatogramme im Anhang, Abb.A64-A69).



**Abb.E91:** Relative Zellproliferation (RPE) in % des Kontrollwertes (1 nM 17 $\beta$ -Estradiol=100%), Anfärbung mit MTT, Inkubationszeit 7 Tage,  $x \pm SD$ ,  $n=4$ , \* $p < 0.05$ , # $p < 0.01$  (Student t-test vs. DMSO)

## 4. Diskussion

In den letzten Jahrzehnten hat das Interesse an Polyphenolen im speziellen den Flavonoiden nicht nachgelassen, da man allgemein von einem protektiven Effekt dieser Verbindungen auf die menschliche Gesundheit ausgeht (Arts et al. 2005).

Vielfach sind in diesem Zusammenhang nicht nur Gehalte bestimmter Verbindungen von Interesse, sondern es werden vermehrt auch qualitative Aspekte gefordert. Ein Vortrag auf dem 54. Kongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung mit dem Thema „Plant metabolomics: Small molecules take center stage“ (Trethewey 2006) verdeutlichte das Interesse der Industrie und Wissenschaft an der Kenntnis der Inhaltsstoffmuster und Gehalte von Pflanzen und Pflanzenteilen („metabolic profiling“). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Analyse des Flavonoidprofils verschiedener Gemüse erarbeitet, die dem Interesse auf diesem Gebiet nachkommt.

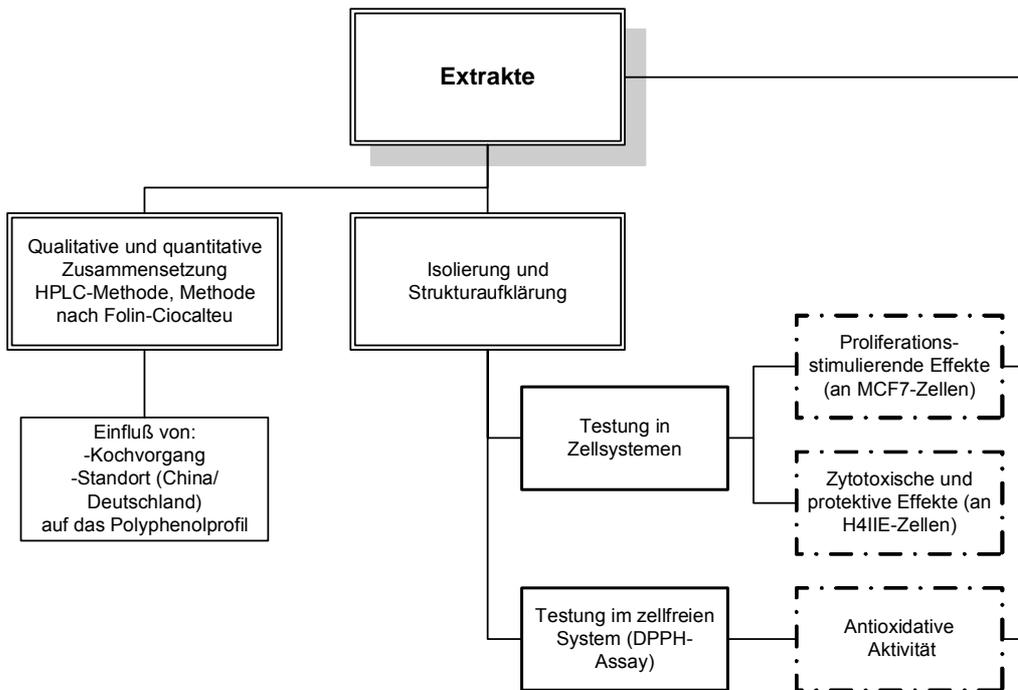


Abb.D1: Veranschaulichung der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen

Das Flavonoidmuster sowie der -gehalt von acht Leguminosensamen wurden untersucht, im Einzelnen wurde die Beeinflussung des Polyphenolmusters durch den Kochvorgang und den Standortwechsel –China/Deutschland- beobachtet. Außerdem wurde das Polyphenolmuster von jeweils vier weiteren Gemüsen aus China und Deutschland als Beispiel für „Nicht-Leguminosen“ erarbeitet. Die jeweiligen Hauptinhaltsstoffe der weiteren Gemüse sowie der Leguminosen wurden isoliert, um eine detaillierte Strukturanalyse durchzuführen sowie die Reinsubstanzen in Testsystemen (Abb.D1) zu untersuchen. Die Aktivität der Extrakte im DPPH-Assay wurde ebenfalls detektiert, um Korrelationen aufzuzeigen. Daneben wurden die

Extrakte auch auf ihre proliferationsstimulierenden Eigenschaften untersucht, um aktive Komponenten zu identifizieren.

Das Flavonoidmuster von 19 verarbeiteten Lebensmittelprodukten, die für die chinesische Küche typisch sind, wurde mittels HPLC-DAD gescreent. Die Untersuchungen beschränkten sich hier nur auf den qualitativen Aspekt und sollten die Anwesenheit von Flavonoiden sowie evt. Besonderheiten bzw. Unterschiede im Flavonoidmuster aufdecken.

In der Literatur finden sich Angaben über die Aufnahme von Polyphenolen, die jedoch von der täglich zugeführten Menge an Flavonoiden unterschieden werden müssen. Polyphenole werden mit der Methode nach Folin-Ciocalteu bestimmt. Hierbei werden neben den phenolischen OH-Gruppen der Flavonoide auch alle weiteren phenolischen OH-Gruppen sowie verschiedene reduzierende Substanzen mitbestimmt (z.B. Tyrosin, Vitamin E und C), weshalb die Methode nach Folin-Ciocalteu jeweils höhere Werte liefert (Singleton et al. 1965). Tabelle D1 (Tab.D1) fasst die Literaturwerte für Protein-, Vitamin C und E-Gehalte der untersuchten Gemüse zusammen, die zu einem höheren Polyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu beitragen könnten.

Mit dieser kolorimetrischen Methode lassen sich jedoch keine differenzierteren Aussagen zu den konsumierten Flavonoidklassen machen.

Dabei variiert die postulierte aufgenommene Menge an Flavonoiden stark. So sind Angaben von weniger als 0.5-1.0 g/d (Hollman et al. 2000; Prior 2003) bis weit mehr als 1 g/d (Scalbert et al. 2000) zu finden, wobei die tatsächlich aufgenommenen Mengen sehr von den individuellen Essgewohnheiten der jeweiligen Person abhängen, da je nach Nahrungsmittel die Aufnahme einzelner Flavonoidklassen unterschiedlich stark ausfällt. Die vorliegende Arbeit ermöglicht diesbezüglich eine Einschätzung der Flavonoidaufnahme aus den untersuchten Gemüsen.

Es wird zuerst auf die Ergebnisse der Leguminosenextrakte und weiteren Gemüseextrakte jeweils getrennt eingegangen. Sodann werden die Resultate des Screenings der verschiedenen Lebensmittel diskutiert, während die biologischen Wirkungen im zweiten Teil (ab Abschnitt 4.2.) besprochen werden.

**Tab.D1:** Protein-, Vitamin C und E-Gehalte der untersuchten Gemüse, Quelle:NDL 2006,\*Schuster et al. 1998, k.A.= keine Angaben, FG=Frishgewicht

Leguminose	Proteingehalt in %	Vitamin C-Gehalt	Vitamin E-Gehalt
<i>Vigna radiata</i>	26.7*	4.8 mg/100 g FG	0.5 mg/100 g FG
<i>Vigna angularis</i>	21*	-	-
<i>Glycine max</i>	39*	6.0 mg/100 g FG	0.85 mg/100 g FG
<i>Phaseolus coccineus</i>	23.1*	k.A.	k.A.
<i>Vicia faba</i>	26.7*	1.4 mg/100 g FG	0.05 mg/100 g FG
<i>Pisum sativum</i>	25.7*	1.8 mg/100 g FG	0.09 mg/100 g FG
<i>Phaseolus vulg. var. vulgaris</i>	24.1*	4.6 mg/100 g FG	k.A.
<i>Phaseolus vulg. var. nanus</i>	24.1*	k.A.	k.A.
<i>Allium sativum</i>	6.4	31.2 mg/100 g FG	0.1 mg/100 g FG
<i>Cucumis sativus</i>	0.7	2.8 mg/100 g FG	0.03 mg/100 g FG
<i>Raphanus sativus</i>	0.6	22 mg/100 g FG	-
<i>Solanum melongena</i>	1.0	2.2 mg/100 g FG	0.3 mg/100 g FG
<i>Cucurbita pepo</i> (Zucchini)	1.2	17 mg/100 g FG	0.12 mg/100 g FG
<i>Cucurbita pepo</i> (Zierkürbis)	1.0	9 mg/100 g FG	1.1 mg/100 g FG

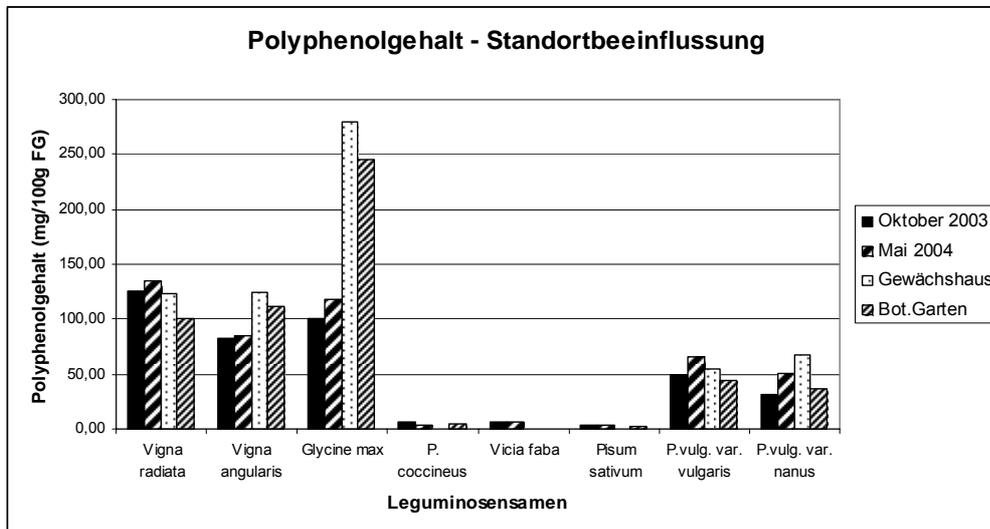
#### 4.1. Qualitative und quantitative Untersuchungen der Leguminosenextrakte und Gemüse

##### 4.1.1. Untersuchung der Extrakte aus Leguminosen

##### Beeinflussung des Polyphenolmusters und -gehaltes durch den Standort

Es konnten von jedem der Leguminosensamen zwei Extrakte aus aus China stammenden Samen erhalten werden (Extrakt Oktober 2003 und Mai 2004). Auf Grund der Ergebnisse die Steffan (Steffan 2005) mit *Guazuma ulmifolia* erhalten hatte – die Pflanze produzierte unter Gewächshausbedingungen keine Flavonoide und zeigte nach Transfer in das Freiland eine vermehrte Produktion von Flavonoidglycosiden, -glucuroniden sowie –galactosiden – wurde dieses Experiment mit den Leguminosen ebenfalls durchgeführt. Hier wurden die Pflanzen jedoch parallel sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland (Bot.Garten) kultiviert. Nicht alle Leguminosen lieferten unter diesen Bedingungen Früchte, jedoch konnten von *Vigna radiata*, *Vigna angularis*, *Glycine max* und den beiden *Phaseolus vulgaris*-Arten jeweils vier Ernten erhalten werden, während *Phaseolus coccineus* und *Pisum sativum* nur im Freiland Früchte bildeten. Erstaunlicherweise konnte kein Unterschied der Hauptkomponenten in den Samen festgestellt werden. Lediglich *Glycine max* wies in den in Deutschland gewonnenen Samen vermehrt Malonylderivate und Flavanole auf, auf die auch die starke Zunahme des Gehaltes zurückzuführen war. Allerdings war dieser Effekt unabhängig von Gewächshaus oder Freiland. Eine mögliche Erklärung könnte hier der Reifezustand der Samen darstellen. Da *Glycine max* sehr spät zur Blüte und Fruchtbildung gelangte, könnte sich dies auch im

Inhaltstoffmuster der Samen bemerkbar gemacht haben. Unterschiede waren vielfach in den Minoritätskomponenten zu verzeichnen, jedoch könnte dies auch daran liegen, dass die Komponenten sich lediglich unterhalb des Detektionslimits befanden.



**Abb.D2:** Durchschnittliche Flavonidgehalte bestimmt mittels HPLC, jeweils n=1, Extrakte vom Oktober 2003 und Mai 2004 aus aus China stammenden Samen, Extrakte Gewächshaus und Bot.Garten aus aus Deutschland stammenden Samen

### Beeinflussung des Polyphenolmusters und des Gehaltes durch den Kochvorgang

Extrakte vom Oktober 2003 der Leguminosen wurden nach dem Kochvorgang betrachtet. Dabei konnte meist ein ähnliches Flavonoidmuster wie in der ungekochten Form beobachtet werden. Es war allerdings auch eine Spaltung von Verbindungen (Catechin-XO-glucosid zu Catechin/*Vigna angularis*) oder ein Abbau (Malonylderivate/*Glycine max*) zu verzeichnen. Häufig kam es auch zu einer Zunahme der detektierbaren Komponenten (z.B. Flavanole/*Vicia faba*, *Glycine max*). Die erhaltenen Daten für *Vicia faba* deuten darauf hin, dass es möglicherweise zu einem Abbau der Proanthocyanidine zu den jeweiligen Monomeren durch den Kochprozess kam.

In jedem Fall war jedoch ein Übergang der untersuchten Polyphenole in das Kochwasser zu beobachten. Der Wert variierte von 35% (*Pisum sativum*, *P.vulg. var. vulg*), über ca. 50-60% (*Vigna radiata/angularis*, *Glycine max*, *P.coccineus*, *P.vulg. var. nanus*) bis ca. 80% (*Vicia faba*). Demnach kommt es bei Zubereitung der Leguminosen zu einem Verlust dieser Substanzen, sofern das verwendete Kochwasser nicht mitverarbeitet wird oder ebenfalls als Nahrungsbestandteil in Form von Eintöpfen oder Suppen dient.

Daneben spielt für die Leguminosen auch die Inaktivierung von Enzyminhibitoren und zum Teil toxischen Lectinen während des Kochens eine Rolle. Link et al. zählen zusätzlich auch die Reduktion von Mikroorganismen und Pestiziden als positiven Effekt des Kochprozesses auf. Die Autoren kommen in ihrer Betrachtung von Vor- und Nachteilen gekochten Gemüses zu dem Schluss, dass der Verzehr sowohl von rohem als auch von gekochtem Gemüse in

einem inversen Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen steht, währenddessen die Daten für rohes Gemüse jedoch eindeutiger ausfallen (Link et al. 2004). Zum Teil könnte dies auch mit dem Verlust der oben beschriebenen Verbindungen in Zusammenhang stehen.

### Polyphenolmuster und –gehalte in den Leguminosenextrakten

Insgesamt konnte für die Leguminosen festgestellt werden, dass die aus dem asiatischen Raum stammenden *Vigna*-Arten und *Glycine max* einen höheren Gehalt der mit HPLC untersuchten Polyphenole enthielten als die aus Amerika stammenden *Phaseolus vulgaris*-Arten, während *Vicia faba*, *Pisum sativum* und *Phaseolus coccineus* wesentlich geringere Gehalte als die übrigen Leguminosen aufwiesen (siehe Durchschnittsgehalte Tab.D2).

Die Polyphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu wiesen eine andere Reihenfolge auf als sie mit Hilfe der HPLC-Methode erhalten wurde. Im Gegensatz zur HPLC-Methode zeigt die Methode nach Folin-Ciocalteu sowohl für die Extrakte von *Vigna angularis* als auch für die Extrakte der *Phaseolus vulgaris*-Arten eine größere Menge an freien Polyphenolen als für die übrigen untersuchten Leguminosen, ebenso konnten die höchsten Gesamtpolyphenolgehalte in den genannten Extrakten sowie in *Glycine max* beobachtet werden. Eine Vergleichsmessung mit Apigenin bzw. Quercetin im Folin-Ciocalteu-Assay ergab für Apigenin bei gleicher Menge geringere Absorptionen, wohingegen Quercetin höhere Werte als der verwendete Standard Catechin lieferte. Somit lässt sich zum Teil der geringer ausfallende Gehalt des *Vigna radiata*-Extraktes im Vergleich zu dem höheren Gehalt des *Vigna angularis*-Extraktes erklären, da ersterer hauptsächlich Apigenin-Derivate und letzterer Myricetin- und Quercetin-Derivate enthält.

Besonders im Falle der *Vicia faba*-Extrakte schienen zusätzlich Proanthocyanidine für den Gehalt der Probe nach Folin-Ciocalteu ausschlaggebend zu sein, da hier die Probe einen mehr als 25-fach höheren Gehalt als mittels HPLC zeigte. Dieser Effekt könnte auch bei anderen Arten Bedeutung besitzen (Abb.E48). Dieser Sachverhalt wird jeweils innerhalb der Diskussion der jeweiligen Leguminose diskutiert.

Die größten Unterschiede zwischen Gesamtpolyphenolgehalten und freien Polyphenolen konnten für *Glycine max*, *Phaseolus coccineus* und *Pisum sativum* beobachtet werden. Während sich der Unterschied im ersten Fall durch die Hydrolyse der in größeren Mengen enthaltenen Isoflavonoidglycoside erklären lässt, können für die *Phaseolus coccineus*- und *Pisum sativum*-Extrakte nur reduzierende Verbindungen unbestimmter Art verantwortlich sein. Das Kämpferol-Derivat des *Pisum sativum*-Extraktes dürfte lediglich zu einem kleinen Teil für den Unterschied heranzuziehen sein.

**Tab.D2:** Übersicht der Gehalte der Leguminosensamen bestimmt mittels HPLC-DAD (Durchschnittsgehalte aus 2-4 Proben, Angabe in mg/100 g FG), Hauptinhaltsstoffe nach Flavonoidklassen

Leguminosae	Durchschnittlicher Polyphenolgehalt	Hauptinhaltsstoffe
<i>Vigna radiata</i>	121.1± 10.0	Flavone
<i>Vigna angularis</i>	101.2± 13.33	Flavonole, Flavanole
<i>Glycine max</i>	186.0± 65.84	Isoflavonoide
<i>Phaseolus coccineus</i>	5.2 ± 1.13	einfache Phenylpropanderivate
<i>Vicia faba</i>	5.9	Flavonole, Flavanole
<i>Pisum sativum</i>	3.3± 0.95	Flavonole, einfache Phenylpropan-derivate
<i>Phaseolus vulg.</i> var. <i>vulgaris</i>	53.7± 4.94	Flavonole (Kämpferol), Flavanole
<i>Phaseolus vulg.</i> var. <i>nanus</i>	46.5± 9.23	Flavonole, Flavanole

Nachfolgend werden die Ergebnisse detailliert unter Einbeziehung von Literaturdaten diskutiert.

### *Vigna radiata*

In den Extrakten von *Vigna radiata* konnten zwei Hauptkomponenten (Vitexin/Isovitexin) identifiziert werden. Diese sind bereits mehrfach aus der Pflanze beschrieben, zudem liegt zu ihrer Isolierung aus *Vigna radiata* ein koreanisches Patent vor (Kim, Dong Kwan et al. 2005), das zeitgleich mit der vorliegenden Arbeit entstand. Die durchgeführte Isolierung ist der in dieser Arbeit verwendeten sehr ähnlich.

In allen vier untersuchten Extrakten konnte ein ähnliches Inhaltsstoffmuster beobachtet werden, d.h. in allen Extrakten sowohl aus in China als auch aus in Deutschland erhaltenen Samen wurden Vitexin und Isovitexin detektiert, wobei jeweils vermehrt Isovitexin vorlag (Abb.E3). Der Gehalt an Flavonoiden bzw. Polyphenolen von durchschnittlich 121.1 (± 10.0) mg/ 100 g FG lag im Vergleich mit den Gehalten der anderen Leguminosen recht hoch, so dass die Samen der Mungbohne ein gutes Ausgangsmaterial für die Isolierung der beiden Flavone darstellen (Tab.E3).

Das Kochwasser von *Vigna radiata* wies ebenfalls beide Komponenten als Hauptbestandteile auf, wobei das Verhältnis dieser beiden Substanzen sich zu Gunsten von Vitexin verschob. Der im Vergleich mit dem Quantifizierungsergebnis mittels HPLC geringere Gesamtpolyphenolgehalt, der aus Wasserfraktion und Samenmaterial resultierte, könnte auf Grund der Extraktionsmethode (Extraktion ohne Säure) hervorgerufen worden sein, jedoch war ein deutlicher Übergang der Flavone in das Kochwasser zu beobachten (Abb.E6).

Des Weiteren konnte ein Luteolin-C-hexosid (Orientin/Isorientin) neben zusätzlichen Flavonen beobachtet werden, das in der Literatur bisher nicht erwähnt wurde.

Der Polyphenolgehalt, der nach Folin-Ciocalteu für *Vigna radiata* bestimmt wurde, lag höher als der mittels HPLC-DAD ermittelte Wert. Die erhaltenen Werte liegen allerdings unterhalb von Angaben, die in der Literatur für den Polyphenolgehalt von Mungbohnen gemacht

werden, jedoch wurden die Gehalte von 808 mg/100 g sowohl auf das Trockengewicht als auch auf Tannin als Referenzsubstanz bezogen (Kataria et al. 1989; Sarla et al. 1988), während in der vorliegenden Arbeit der Gehalt sowohl auf das Frischgewicht als auch Catechin als Standard bezogen wurde.

### *Vigna angularis*

In den Extrakten von *Vigna angularis* konnten sowohl Flavanole als auch Flavonole beobachtet werden. Als Hauptkomponenten aller vier untersuchten Extrakte wurden Catechin-*XO*-glycosid (siehe Literatur), Rutin und Myricetin-3*O*-rutinosid detektiert. Catechin-7*O*-glucosid sowie Rutin wurden bereits für *Vigna angularis* in der Literatur erwähnt (Yoshida et al. 2005), im Gegensatz dazu wurde das Myricetin-Derivat im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal für diese Pflanze beschrieben. Innerhalb der Extrakte zur Quantifizierung waren keine Isoflavonoide nachzuweisen, allerdings konnte Daidzein aus einem weiteren Extrakt (Extrakt zur Isolierung) erhalten werden. Isoflavonoide werden für *Vigna angularis* Samen in sehr geringen Mengen (ca. 1-2 mg/100 g Frischgewicht) in der Literatur erwähnt (Nakamura et al. 2001). Vielfach wird ihr Vorkommen nach Behandlung der Pflanze mit Stressfaktoren (UV-Bestrahlung, Mikroorganismen) beschrieben (Lal et al. 2003; Senevirante et al. 1992; Tsukaho et al. 1985).

Der Gehalt der beiden Extrakte der in China gewonnenen Samen vom Oktober 2003 und Mai 2004 fiel mit rund 80–85 mg /100 g FG geringer aus als der Gehalt der Extrakte der in Deutschland gewonnenen Samen (Bot. Garten und Gewächshaus) mit 110–125 mg/100 g (Tab.E4). Der höhere Gehalt in den letztgenannten Extrakten war auf höhere Flavanol- und Catechingehalte zurückzuführen. Nur im Falle des Extraktes aus dem Gewächshaus war zusätzlich eine Verdopplung des Rutingehaltes zu verzeichnen. Im Vergleich mit den anderen Leguminosen enthielt *Vigna angularis* einen höheren Gehalt an Polyphenolen. In der Literatur ist für *Vigna angularis* ein Flavonoidgehalt von ca. 200–250 mg/ 100g zu finden, der zum einen auf eine unterschiedliche Bestimmungsmethode zurückgeht und zum anderen auf das Trockengewicht bezogen wurde, somit also durchaus höhere Werte liefern kann (Lin et al. 2006).

Während des Kochvorgangs blieben die Komponenten weitestgehend erhalten, es war aber eine partielle Hydrolyse des Catechin-*XO*-glycosids zu Catechin zu verzeichnen. Allgemein war festzustellen, dass die untersuchten Polyphenole in das Kochwasser übergingen und auch dort der Anteil der Flavanole gegenüber dem der Flavonole überwog.

Die Bestimmung nach Folin-Ciocalteu lieferte auch hier wesentlich höhere Werte (freie Polyphenole 499 mg FP/100 g FG, sowie Gesamtpolyphenole 638 mg/100 g FG) als die HPLC-Methode. In der Literatur sind entsprechende Gehalte nach Folin-Ciocalteu von 600–700 mg/100 g TG bestimmt als Gallussäure zu finden.

*Glycine max*

Die Extrakte der *Glycine max* Samen enthielten Isoflavonoide, Anthocyanidine, Flavanole und Flavonole/Flavone.

Während Isoflavonoide (u.a. die hier isolierten Verbindungen Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin sowie Glycitin) und Anthocyanidine (Cyanidin-3*O*-glycosid) bereits für die schwarzen Samen der Sojabohne beschrieben wurden, liegen für die übrigen Flavonoide bisher keine Hinweise in der Literatur vor (Katsuzaki et al. 2003; Lin et al. 2006; Nakamura et al. 2001; Romani et al. 2003). Genistin, Daidzin sowie die malonylierten Derivate dieser beiden Verbindungen waren in allen Extrakten als Hauptinhaltsstoffe anzutreffen. Ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen 7*O*-Glucosiden und Malonylderivaten konnte in den in China gewonnenen Extrakten (Extrakt Oktober 2003 und Extrakt Mai 2004) (Abb.E11) beobachtet werden, demgegenüber überwogen die malonylierten Substanzen in den in Deutschland gewonnenen Extrakten (Extrakt Bot. Garten und Extrakt Gewächshaus). Beide Verhältnisse wurden von den oben genannten Autoren beobachtet.

Die mittels HPLC-DAD ermittelten Polyphenolgehalte schwankten stärker als bei den übrigen Leguminosen (Durchschnittsgehalt  $186 \pm 65.8$  mg/100 g Frischgewicht) (Tab.E5). Die Literatur gibt hier ebenfalls Werte von 98 bis 189 mg Isoflavonoide/ 100 g Frischgewicht an, die in guter Übereinstimmung mit den gefundenen Daten sind (Nakamura et al. 2001).

Während des Kochvorgangs war ein Übergang von rund der Hälfte der Flavonoide in das überstehende Wasser zu verzeichnen. Auch in der Wasserphase überwogen die Isoflavonoide gegenüber den Flavanolen (Abb.E14). Auf Grund der Instabilität der Anthocyanidine konnte nach dem Kochvorgang kein Derivat dieses Typs mehr im Kochwasser nachgewiesen werden. Der Gehalt an Flavanolen hingegen hatte zugenommen, wobei evt. Proanthocyanidine, die durch den Kochvorgang sowohl zu den Monomeren abgebaut wurden als auch ihre Wechselwirkungen mit Proteinen verloren hatten, zu einem derartigen Anstieg nach dem Kochprozess beigetragen haben könnten (Santos-Buelga et al. 2000).

Obwohl malonylierte Genistin- und Daidzin-Derivate als instabil gelten (Dixon et al. 2002), konnten sie nach dem Kochvorgang im Samenmaterial nachgewiesen werden, wohingegen sie in der Wasserfraktion nur noch in geringen Mengen detektiert werden konnten.

Der Gehalt der nach Folin-Ciocalteu bestimmten freien Polyphenole bzw. Gesamtpolyphenole fiel etwa doppelt bzw. fünffach so hoch aus wie der mit der HPLC-Methode ermittelte Wert. In der Literatur konnte ein Verhältnis von Gesamtpolyphenolen zu Flavonoiden von 2-3:1 gefunden werden (Lin et al. 2006). Unter Umständen könnte der Anstieg auch auf Proanthocyanidine zurückgeführt werden (Todd et al. 1993). Der doppelt so hohe Gesamtpolyphenolgehalt gegenüber den freien Polyphenolen lässt sich zum Teil durch die Hydrolyse der Daidzein und Genistein-Derivate erklären, da somit weitere OH-Gruppen aus den Glucosiden freigesetzt werden, die schließlich zur Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz zur Verfügung stehen (Hertog et al. 1992; Singleton et al. 1965).

*Phaseolus coccineus*

Die Extrakte von *Phaseolus coccineus* enthielten lediglich im Extrakt zur Isolierung Isoflavonoide (Genistein, Genistin, Daidzin, Glycitin). In den zur Quantifizierung herangezogenen Extrakten waren dagegen ausschließlich Zimtsäure-Derivate zu beobachten (Abb.E15). Während Nakamura et al. keine Isoflavonoide für *Phaseolus coccineus*-Samen beobachtete (Nakamura et al. 2001), beschrieben sowohl Adesanya et al. als auch Lindig-Crisneros et al. Isoflavonoide für Keimlinge von *Phaseolus coccineus* nach Stressbehandlung (Adesanya et al. 1985; Lindig-Crisneros et al. 1997). Zimtsäure-Derivate hingegen sind weit verbreitet; ihr Vorkommen im Extrakt kann auf Zellwandbestandteile zurückgeführt werden. Die HPLC-Bestimmung lieferte einen sehr geringen Polyphenolgehalt. Die Polyphenole wurden während des Kochvorgangs in größerem Umfang in das Kochwasser abgegeben (Abb.E18). Der Gehalt nach Folin-Ciocalteu betrug für die freien Polyphenole mehr als das zehnfache bzw. für die Gesamtpolyphenole das 30-fache der HPLC-Methode. Der Proteingehalt (Tab.D1) kann nur zum Teil für diesen Unterschied verantwortlich sein, so dass weitere Komponenten mit reduzierenden Eigenschaften gegenüber dem Folin-Ciocalteu-Reagenz enthalten sein müssen. In der Literatur lassen sich jedoch keine genauen Angaben über weitere Inhaltsstoffe finden.

*Vicia faba*

Für *Vicia faba* konnten vielfältige Derivate vom Flavanol- und Flavon-/Flavonoltyp isoliert und auch in den Extrakten detektiert werden. Während Catechin sowie Epicatechin in den Samen, Vicenin 2\* in den Hülsen und Kämpferol-3*O*-glucosyl-7*O*-rhamnosid in den Blättern der Pflanzen in der Literatur bekannt sind (Arisawa et al. 1971; Micheal et al. 1998; Nozzolillo et al. 1989), wurden die beiden letztgenannten sowie Vitexin, Isovitexin, Nicotiflorin, Isoschaftosid, ebenso wie Isorhamnetin-3*O*-glycosid\*, Kämpferol-triglycosid, Quercetin-triglycosid, Apigenin-6*C*-glucosyl-8*C*-arabinosid\* und Apigenin-6*C*-xylosyl-8*C*-galactosid\* (\*=partielle Strukturidentifizierung, siehe Identifizierung der isolierten Inhaltsstoffe/3.5.1.2.Flavone/3.5.1.3.Flavonole) zum ersten Mal für *Vicia faba*-Samen beschrieben.

In den Extrakten zur Quantifizierung wurden Vicenin 2\*, Kämpferol-3*O*-glucosyl-7*O*-rhamnosid, Nicotiflorin und zwei weitere Flavone/Flavonole ebenso wie Epicatechin detektiert. Jedoch war der durchschnittliche Gehalt mit 5.88 mg/100 g (Tab.E6/Abb.E20) im Vergleich zu den *Vigna*-Arten und *Glycine max* sehr gering, entsprach aber dem von Hertog et al. angegebenen Bereich, die in *Vicia faba* ca. 2 mg/100 g FG Quercetin/Kämpferol sowie 2.6 mg/100 g FG Myricetin fanden (Hertog et al. 1992).

Nach dem Kochvorgang konnten vermehrt Flavanoole neben Flavonen/Flavonolen im Wasser detektiert werden (Abb.E21), womit es insgesamt zu einem höheren Polyphenolgehalt kam (8.1 mg gegenüber 5.9 mg/100 g FG). Dies könnte auf vielfach für *Vicia faba* beschriebene

Proanthocyanidine zurückzuführen sein, die bei der Bestimmung mittels HPLC evt. wegen des unspezifischen UV-Spektrums nicht detektiert wurden (Merghem et al. 2004; Santos-Buelga et al. 2000). Das zusätzliche Auftreten eines Catechinpeaks im Kochwasser, der als Abbauprodukt der Proanthocyanidine entstehen könnte, bestätigt zudem diese Vermutung.

Arts et al. konnten außerdem in *Vicia faba* einen Catechingehalt von 49.4 mg/ 100 g FG, der sich aus (+)-Catechin, (-)-Epicatechin sowie Epigallocatechin zusammensetzte, beobachten (Arts et al. 2000).

Die Gehaltsbestimmung nach Folin-Ciocalteu lieferte zum Teil wegen des Proteingehaltes, der Vitamingehalte, aber auch auf Grund der vermutlich enthaltenen Proanthocyanidine Polyphenolgehalte, die um das 29-fache bzw. 36-fache höher ausfielen als die mittels HPLC ermittelten Werte.

### *Pisum sativum*

In den Extrakten der *Pisum sativum*-Samen waren lediglich ein Flavonol (Kämpferol-3-O-sophorotriosid) sowie ein Zimtsäure-Derivat zu detektieren (Abb.E22). Das Flavonol wurde in der Literatur bereits für Keimlinge von *Pisum sativum* beschrieben (Ferrerres et al. 1995). Insgesamt ergab sich auch für *Pisum sativum* ein im Vergleich mit den *Vigna*-Arten niedrigerer Polyphenolgehalt, der ebenfalls im Bereich des von Hertog et al. gefundenen Flavonolgehaltes von weniger als 2 mg Kämpferol/100 g FG lag (Hertog et al. 1992).

Der Kochprozess führte zu einer größeren Anzahl an Flavonolpeaks, die jedoch lediglich als Minoritätskomponenten vorlagen. Sowohl Flavonole als auch Zimtsäure-Derivat gingen in das Kochwasser über (Abb.E24).

Die Bestimmung nach Folin-Ciocalteu ergab Werte von 94.3 mg FP/100 g FG berechnet als Catechin für die freien Polyphenole. Kaur et al. finden bei gleicher Standardsubstanz einen Wert von 39.8 mg/100 g FG, jedoch gelöst in 100% Wasser, so dass sich auf Grund unterschiedlicher Löslichkeit der Komponenten eine Abweichung ergeben kann. Vergleichsweise zu diesen Werten geben Kähkönen et al. für *Pisum sativum* den Gehalt an freien Polyphenolen von 40 mg bzw. 160 mg/100 g TG bestimmt als Gallussäure an (Kähkönen et al. 1999).

### *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris*

Aus *Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris* konnten Kämpferol und Astragalin als Flavonole, ebenso Catechin und ein teilweise identifiziertes Procyanidin isoliert werden. Diese Verbindungen sind bereits aus *Phaseolus vulgaris*-Arten beschrieben (Dinelli et al. 2006). In allen vier Extrakten zur Quantifizierung konnten die ersten drei dieser Verbindungen neben weiteren Flavonolen/Flavanolen detektiert werden (Abb.E25/26). Außerdem waren auch Anthocyanidine sowie Zimtsäure-Derivate vorhanden, die auf Grund der rötlichviolett-gesprenkelten Samenschale bzw. als Zellwandbestandteile enthalten waren (Beninger et al.

1999; Frohne et al. 1998). Es lag ein relativ gleich bleibender Gehalt von durchschnittlich 53.7 mg ( $\pm 4.94$ ) /100 g FG vor, wobei allerdings ein stark variierender Gehalt an freiem Kämpferol auffiel (Tab.E8/Abb.E29).

Nach dem Kochvorgang konnte eine Zunahme des Gesamtgehaltes festgestellt werden, der hauptsächlich auf einen höheren Gehalt an Flavanolen und Zimtsäure-Derivaten zurückzuführen war. Flavanole waren im Kochwasser ebenfalls nachzuweisen, wobei im speziellen Proanthocyanidine bereits in der Literatur für *Phaseolus vulgaris* beschrieben wurden (Beninger et al. 1999; Todd et al. 1993). Daher liegt für diesen Extrakt ebenfalls nahe, dass es zum Abbau von Proanthocyanidinen kam, die dann mitbestimmt wurden.

Der nach Folin-Ciocalteu bestimmte Wert für freie Polyphenole liegt wiederum über dem mittels HPLC bestimmten Wert, jedoch fallen die Ergebnisse lediglich ca. 5-mal so hoch aus, so dass der enthaltene Proanthocyanidingehalt geringer sein müsste als bei dem *Vicia faba*-Extrakt. Während Kaur et al. den Wert für freie Polyphenole mit 97.0 mg/100 g FG angeben, also niedrigere Werte finden als in dieser Arbeit berichtet, enthielten Proben von *Phaseolus vulgaris* bei Vinson et al. nach Hydrolyse einen Gesamtpolyphenolgehalt von umgerechnet 916 mg/100 g FG, welcher fast doppelt so hoch liegt wie der hier gefundene (Kaur et al. 2002; Vinson et al. 1998). Hertog et al. geben für Quercetin und Kämpferol Durchschnittswerte von 3.9 mg bzw. weniger als 1.2 mg/100 g FG an. Diese Daten liegen in einem Bereich, der dem der gefundenen Werte entspricht (Hertog et al. 1992).

#### *Phaseolus vulgaris* var. *nanus*

Aus dieser *Phaseolus*-Art konnten sowohl die Flavanole Catechin und Gallocatechin als auch die 3O-Glucoside von Kämpferol, Quercetin und Myricetin isoliert werden. Diese sind für *Phaseolus vulgaris* bereits beschrieben (Aparicio-Fernandez et al. 2005). Daneben konnten Ferulasäure, die ebenfalls aus *Phaseolus vulgaris* bekannt ist (Diaz-Batalla et al. 2006), und Gallussäureethylester, welcher in der Familie der Leguminosen (*Acacia*) beschrieben wurde (DNP 2006), als Reinsubstanzen erhalten werden. Dihydromyricetin wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal für *Phaseolus vulgaris* beschrieben.

In allen vier Extrakten zur Quantifizierung wurden die bereits oben genannten Flavonole detektiert (Abb.E31). Außerdem konnten als Farbstoffe der schwarzen Samenschale Delphinidin-, Petunidin- und Malvidinhexosid nachgewiesen werden (Abb.E33), die bereits aus der Literatur bekannt sind (Aparicio-Fernandez et al. 2005). Daneben waren zusätzlich auch Zimtsäure-Derivate zu beobachten.

Nur für den Extrakt vom Mai 2004 konnten Isoflavonoide nachgewiesen werden. Isoflavonoide aus *Phaseolus vulgaris* wurden in der Literatur nach Infektion mit Mikroorganismen beschrieben (Harborne et al. 1982).

Catechin und Gallocatechin wurden zwar isoliert, aber in keinem der Extrakte beobachtet, so dass diese Komponenten evt. unterhalb des Detektionslimits lagen oder als Bestandteil von

Proanthocyanidinen vorlagen, die jedoch wegen eines unspezifischen UV-Spektrums nicht mitbestimmt wurden.

Im Gegensatz zu den Kochwasser-Extrakten von *Glycine max*, *Vicia faba* oder *Phaseolus vulg.* var. *vulgaris* wurden für *Phaseolus vulgaris* var. *nanus* im Kochwasser keine Flavanole detektiert, sondern es konnten lediglich geringere Mengen der enthaltenen Flavonole und äquivalente Mengen an Zimtsäure-Derivaten beobachtet werden (Abb.E36).

Die gefundenen Gehalte entsprechen in etwa denen der Varietät *vulgaris*, fallen jedoch ein wenig niedriger aus. Espinosa-Alonso et al. fanden für *Phaseolus vulgaris* mit schwarzer Samenschale, dass diese einen höheren Gehalt an Anthocyanidinen, gleichzeitig aber einen geringeren Gehalt an Procyanidinen aufwiesen (Espinosa-Alonso et al. 2006). Dies könnte zu den leicht niedrigeren Werten beitragen.

#### 4.1.2. Untersuchung der Extrakte der weiteren Gemüse

##### Polyphenolmuster und –gehalte in den weiteren Gemüse

Die Daten, die mittels HPLC ermittelt wurden, zeigten, dass die Aubergine (*Solanum melongena*) den höchsten Gehalt unter dem weiteren Gemüse aufwies, der dem Gehalt der *Vigna radiata*-Extrakte bzw. der *Phaseolus*-Extrakte vergleichbar war (Tab.D3). Die in Deutschland erworbene Aubergine enthielt mehr als den doppelten Gehalt an Polyphenolen gegenüber der chinesischen Frucht. Die Früchte der Kürbisgewächse (*Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*) enthielten nur 0.3 – 1.1 mg/100 g FG, was sogar noch unterhalb der Gehalte lag, die für *Phaseolus coccineus*, *Vicia faba* und *Pisum sativum* bestimmt wurden. In diesem Fall enthielt die in Deutschland erworbene Gurke lediglich die Hälfte des Gehalts der in China erworbenen Frucht. Besonders zu beachten ist, dass die untersuchten Gemüse meist einen wesentlich höheren Wassergehalt aufweisen (>85%) als die Leguminosen (5-10%).

Die Aubergine (*Solanum melongena*) enthielt auch bei Bestimmung der freien Polyphenole den höchsten Gehalt, gefolgt von Rettich, Knoblauch, Kürbisgewächsen und Gurke (Abb.E49). Brat et al. beobachteten den höchsten Gehalt ebenfalls in Auberginen, gefolgt von Rettich und Kürbis (Brat et al. 2006). Kaur et al. dagegen finden in Knoblauch den höchsten Polyphenolgehalt, während Gurke und Rettich einen geringeren Gehalt aufwiesen. Die Unterschiede der in dieser Arbeit ermittelten Werten zu denen der Literatur können bei Brat et al. auf Grund der dort zusätzlichen Aufarbeitung der Probe zustande kommen, wohingegen die rein wässrige Aufarbeitung bei Kaur et al. ebenfalls abweichende Ergebnisse ermöglicht (Brat et al. 2006; Kaur et al. 2002).

Ein Anstieg der Gesamtpolyphenole gegenüber den freien Polyphenolen um das 32-fache war bei dem Extrakt des Knoblauchs zu beobachten. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur für „Aged garlic extract“ (AGE) eine höhere antioxidative Aktivität beobachtet, die in frischen oder gekochten Knoblauchextrakten nicht auftritt (Borek 2001; Sato et al. 2006).

Analog könnten durch die saure Hydrolyse stark reduzierende Verbindungen entstanden sein, auf die dieser hohe Gesamtpolyphenolgehalt zurückgeführt werden kann. Es wurden jedoch keine weiteren Untersuchungen zur Art der reduzierenden Komponenten des Knoblauch-Extraktes durchgeführt.

**Tab.D3:** Übersicht der Gehalte der weiteren Gemüse bestimmt mittels HPLC-DAD (Angabe in mg/100 g FG), Hauptinhaltsstoffe nach Flavonoidklassen, ch. chinesische Frucht/dt. deutsche Frucht

Gemüse	Polyphenolgehalt	Hauptinhaltsstoffe
<i>Allium sativum</i>	-	Phenylpropanderivat
<i>Cucumis sativus</i>	0.6 ± 0.09 (ch.)/ 0.3 ± 0.05 (dt.)	Flavonole, Phenylproanderivat, Flavone
<i>Raphanus sativus</i>	-	Indolderivate
<i>Solanum melongena</i>	51.0 ± 2.68 (ch.)/ 136.1 ± 9.45 (dt.)	Phenylpropanderivate
<i>Cucurbita pepo</i> (Zucchini)	1.1 ± 0.00	Flavonole
<i>Cucurbita pepo</i> (Zierkürbis)	0.9 ± 0.01	Flavonole

### *Allium sativum*

Aus dem Extrakt von *Allium sativum* konnte lediglich Isoconiferin isoliert werden. Coniferin ist bereits aus der Familie der Liliaceae (*Asparagus officinalis*) bekannt (Rademaker et al. 2000). Allerdings konnte weder diese Verbindung noch eine andere der untersuchten Komponenten in den HPLC-Chromatogrammen nachgewiesen werden. Starke et al. konnte für Knoblauchzwiebeln einen maximalen Gehalt an Quercetin bzw. Kämpferol von jeweils 0.2 mg/100 g FG bestimmen, so dass die hier untersuchten Mengen vermutlich nicht zum Nachweis der Flavonoide ausreichen (Starke et al. 1976).

Die Bestimmung nach Folin-Ciocalteu lieferte einen Gehalt an freien Polyphenolen von 24.1 mg/100 g FG sowie 776.4 mg/100 g FG Gesamtpolyphenole. Dies entspricht zum einen der Hälfte des von Vinson et al. ermittelten Wertes für freie Polyphenole, zum anderen liegt der Gesamtpolyphenolgehalt doppelt so hoch wie der Literaturwert (Vinson et al. 1998). Der höhere Gesamtpolyphenolgehalt könnte mit einem unterschiedlichen Gehalt an reduzierenden Inhaltsstoffen zusammenhängen, wie Allixin, S-Allylcystein und S-Allylmercaptocystein (Borek 2001), die nach Hydrolyse freigesetzt werden.

### *Cucumis sativus*

Der Extrakt von *Cucumis sativus* zur Isolierung enthielt Isoquercitrin, Isorhamnetin-3-O-glucosid, Triandrin und Lycoperodin 1, außerdem war die teilweise Identifizierung eines Apigenin-6C-dihexosids, Apigenin-trihexosids und Chrysoeriol-trihexosids möglich. Die Flavone und Flavonole wurden dabei in den Blüten und Blättern von *Cucumis sativus* bereits nachgewiesen (Krauze-Baranowska et al. 2001), ebenso wie Coumaryl- und

Feruloylglucosidderivate des Isoscoparins (Abou-Zaid et al. 2001). Triandrin hingegen wurde für *Salix*-Arten beschrieben (DNP 2006; Frohne et al. 1998), aber noch nicht im Zusammenhang mit *Cucumis sativus* in der Literatur erwähnt. Lycoperodin 1 wird als Kondensationsprodukt von L-Tryptophan und Formaldehyd sowohl in der Natur als auch bei der Zubereitung von Gemüse gefunden (DNP 2006).

Die isolierten Flavon- und Flavonol-Derivate waren auch in dem zur Quantifizierung herangezogenen Extrakt nachzuweisen (Abb.E37). Vergleichsweise wurde hier auch ein Extrakt einer in Deutschland erworbenen Gurke untersucht, der sowohl das bereits beschriebene Apigenin-dihexosid als auch das Apigenin-trihexosid enthielt (Abb.E38). Daneben konnte als Hauptkomponente ein weiteres Flavon detektiert werden. Durch Differenzierung der in Deutschland erworbenen Frucht in Schalen- und Markgewebe wurde deutlich, dass die Flavonole im Schalengewebe zu finden waren, während die Flavone im Markgewebe lokalisiert vorlagen.

Auf Grund des hohen Wassergehaltes von fast 95% fiel der Polyphenolgehalt, der mittels HPLC bestimmt wurde, sehr gering aus. Er betrug lediglich 0.57 mg/100 g FG (chinesische Varietät) bzw. 0.28 mg/100 g FG (deutsche Varietät), wobei die in der Literatur gefundenen Flavonolgehalte mit weniger als 0.1-0.2 mg/100 g FG diesen Werten entsprachen (Hertog et al. 1992).

Kaur et al. geben für *Cucumis sativus* nach Folin-Ciocalteu einen Wert von 48.0 mg/100 g FG berechnet als Catechin an, jedoch ermittelt in einem wässrigen Medium, so dass die hier gefundenen Werte von 11.6 mg/100 g FG für die chinesische Gurke bzw. 12.3 mg/100 g FG für die deutsche Gurke davon abweichen (Kaur et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Gesamtpolyphenolgehalt von 57.8 mg bzw. 40.7 mg/100 g FG für die chinesische bzw. deutsche *Cucumis sativus*-Art ermittelt werden, im Gegensatz hierzu gibt Vinson et al. 11.6 mg/100 g FG berechnet als Catechin an, jedoch kann allein ein unterschiedlicher Wassergehalt diesen Wert beeinflussen (Vinson et al. 1998).

### *Cucurbita pepo*

Zum Vergleich wurden zusätzlich zwei Früchte von *Cucurbita pepo*-Arten untersucht. Es wurde festgestellt, dass beide hauptsächlich bzw. ausschließlich Flavonoide im Schalengewebe enthielten. Die Zucchini enthielt dabei mit 9 Flavonoiden eine größere Vielfalt an Inhaltsstoffen als der Zierkürbis mit lediglich vier Inhaltsstoffen, jedoch konnten alle Flavon/Flavonol-Derivate, die in der Zucchini detektiert wurden, auch im Kürbis beobachtet werden (Abb.E41/42).

Ebenso waren die Gehalte der beiden *Cucurbita pepo* -Arten sowohl nach Bestimmung mittels HPLC als auch nach Folin-Ciocalteu vergleichbar. Der Gehalt an freien Polyphenolen lag mit ca. 20 mg/100 g FG 20 Mal höher als der mittels HPLC bestimmte Wert und der Gesamtpolyphenolgehalt stieg nochmals um das 2-3-fache (Abb.E43). Für die Zucchini stellten Brat et al. einen Gehalt an freien Polyphenolen von 18.8 mg/100 g FG bestimmt als

Gallussäure fest. Es erfolgte jedoch eine Aufarbeitung der Probe unter Entfernung der wasserlöslichen reduzierenden Substanzen (Brat et al. 2006).

### *Raphanus sativus*

Aus diesem Extrakt wurden lediglich für die Familie typische Glucosinolate isoliert, ebenso konnten keine Polyphenole in den HPLC-Chromatogrammen identifiziert werden. Auch die Literatur gibt für Rettich keine Flavonoide an. Im Gegensatz dazu lassen sich aber freie Polyphenolgehalte von 54.5 mg/100 g FG berechnet als Catechin finden (Kaur et al. 2002). Es konnten im vorliegenden Fall 28.4 mg/100 g FG ermittelt werden. Dieser Wert stieg nach Hydrolyse (Gesamtpolyphenole) auf 72.3 mg/100 g FG. Zum Teil kann ein hoher Vitamin C-Gehalt von ca. 22 mg/100 g FG (NDL 2006) für den Nachweis von freien Polyphenolen verantwortlich sein.

### *Solanum melongena*

Aus den Extrakten der Aubergine (*Solanum melongena*) konnten Chlorogensäure und Paucin isoliert werden. Beide sind für die Früchte dieser Pflanze bereits beschrieben (Whitaker et al. 2003). Die Autoren identifizierten ebenfalls weitere Zimtsäure-Derivate (Zimtsäureamide sowie DicaFFEoylchinasäuren), die in den Extrakten zur Quantifizierung teilweise nachzuweisen waren. Außerdem untersuchten sie verschiedene Varietäten der Aubergine und stellten einen stark schwankenden Gehalt von 0.45 g – 1.22 g/100 g Trockengewicht fest. Auf Grund des hohen Wassergehaltes von über 90 % fielen die ermittelten Werte von 51.0 mg/100 g FG für die chinesische Aubergine bzw. 136.1 mg/100 g Frischgewicht für die deutsche Aubergine dementsprechend geringer aus (Abb.E46). In diesen Daten sind auch Anthocyanidine sowie die in der deutschen Varietät ermittelte Flavonole enthalten. Der Gehalt an Anthocyanidinen, der im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurde, fiel auf Grund der Extraktionsmethode und den genutzten Aufarbeitungen geringer aus als in der Literatur angegeben (750 mg/100 g FG) (Clifford 2000), da Anthocyanidine sehr instabil gegenüber Temperatur und höheren pH-Werten sind. Da allerdings auch bei der normalen Verarbeitung der Gemüse keine besondere Rücksicht auf thermolabile Substanzen genommen wird, gibt dieser Wert wahrscheinlich einen guten Einblick in die noch vorhandene Menge an Anthocyanidinen nach dem Kochen.

Die in Deutschland erworbene Aubergine enthielt 1.5 Mal so viele freie Polyphenole wie ihre chinesische Verwandte. Nach Hydrolyse stieg der Polyphenolgehalt bei der chinesischen Varietät von 76.0 mg auf 98.7 mg/100 g FG berechnet als Catechin, demgegenüber fiel dieser Wert bei der deutschen Varietät von 120.6 mg auf 77.5 mg/100 g FG, wobei dies zum Teil auf den Zerfall der Anthocyanidine und des Vitamin Cs während des Hydrolysevorgangs zurückzuführen sein könnte (Abb.E47). Der Einfluss des Erhitzens ist für den chinesischen Extrakt vermutlich nicht so ausschlaggebend, da Anthocyanidine nur in sehr geringem Maße

nachzuweisen waren. In Übereinstimmung mit den hier erhaltenen Daten beobachteten Brat et al. einen Gehalt an freien Polyphenolen von 65.5 mg/100g FG berechnet als Gallussäure, jedoch nach Entfernung wasserlöslicher Substanzen wie Vitamin C (Brat et al. 2006).

#### 4.1.3. Untersuchung der eingelegten und getrockneten Gemüse

Die Fertigprodukte, zu denen sowohl in Essig eingelegte, sog. „pickled vegetables“, als auch getrocknete Gemüse gehörten, wurden auf Polyphenole hin untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass in den essigsauren Zubereitungen auf Grund saurer Hydrolyse lediglich Aglyka, deren Methylderivate sowie C-Glycosyle zu detektieren waren, während die getrockneten Lebensmittel zusätzlich auch O-Glycoside enthielten. Da die meisten Flavonoide genuin in der Pflanze als Glycoside vorkommen, stellen essigsaure Zubereitungen somit im Gegensatz zu getrocknetem oder frischem Gemüse eine Quelle für bereits freie Aglyka dar.

Die Menge der Aufnahme an Flavonoiden über diese Quelle wurde nicht genauer untersucht, jedoch ist anzunehmen, dass sie niedriger ausfällt als in frischem Gemüse, da es meist zu einem quantitativen Verlust der Flavonoide während der Verarbeitung kommt (Hollman et al. 2000).

Flavonoidvorkommen in Lotussamen (*Nelumbo*) und Daylily-Blüten (*Heimerocallis*) scheinen bisher wenig untersucht zu sein, obwohl die Pflanzen ein breites Spektrum dieser Verbindungen enthalten. Eine Datenbanksuche ergab erstaunlicherweise nur wenige Quellen, die über Flavonoide oder Polyphenole aus diesen Pflanzenteilen berichten (Que et al. 2007; Sujay et al. 2006).

Weiterhin konnten hauptsächlich in den oberirdischen Teilen der untersuchten Gemüse Flavonoide detektiert werden (Tab.E1 und Tab.E2).

So zeigten die unterirdischen Teile von *Brassica juncea* kein Vorkommen an Flavonoiden, während in den Blättern des essigsauren Lebensmittels Quercetin, Methylquercetin und Kämpferol enthalten waren. Zusätzlich konnten in den getrockneten Blättern jeweils ein weiteres Flavon bzw. Flavonol beobachtet werden. Aus den Blättern von *Brassica juncea* sind Kämpferol- und Isorhamnetinglycoside bereits beschrieben (Choi et al. 2002; Kim et al. 2002; Yokozawa et al. 2002) (Abb.A9-11; A15).

In den unterirdischen Teilen von *Raphanus sativus*, *Lilium spec.* und *Dioscorea opposita* konnten keine Flavonoide nachgewiesen werden, wohingegen die Knoblauchzwiebel (*Allium sativum*) als essigsaures Gemüse Kämpferol und Methylquercetin enthielt, daneben war in *Astragalus membranaceus* im getrockneten Zustand ein Flavonol zu finden. Flavonoide sind für *Allium sativum* bereits identifiziert worden (Borek 2001), ebenso werden für *A. membranaceus* sowohl Flavonoide als auch Isoflavonoide beschrieben (Matkowski et al. 2003) (Abb.E1; Abb.A16).

In den Bambussprossen (*Phyllostachys spec.*) konnten weder im essigsauren noch im getrockneten Zustand Flavonoide detektiert werden, während für die Blätter dieser Pflanze Flavonoide bereits beschrieben wurden (Zhang et al. 2002).

Flavan-Derivate sind aus Pilzen bisher nicht bekannt (Teuscher et al. 2004), dementsprechend waren im Zitterling (*Tremella spec.*) keine Derivate vom Flavantyp zu finden, ebenso wurden auch keine Isoflavane detektiert.

In den Extrakten der eingelegten *Cucumis sativus*-Produkte waren in der Mehrheit Flavone zu beobachten. Es lagen sowohl C-Glycosyle als auch deren Methylderivate vor, die unter den gegebenen Bedingungen stabil blieben (Abb.A12/13). Derartige Flavonoid-Derivate sind für *Cucumis sativus*-Früchte bereits beschrieben (Krauze-Baranowska et al. 2001; McNally et al. 2003).

Für die Lotussamen (*Nelumbo nucifera*) wurden 5 Flavonoide nachgewiesen (Abb.A14). Da es sich um getrocknetes Material handelte, waren auch Derivate wie z.B. Kämpferol-di-O-glycosid (MW594) zu beobachten. Bisher wurden für *Nelumbo nucifera* in der Literatur lediglich Polyphenolgehalte des 50% alkoholischen Extraktes beschrieben (Sujay et al. 2006). Die meisten Flavonoide wurden in den Blüten von *Hemerocallis spec.* gefunden (Abb.E2). Dabei handelte es sich ausschließlich um Flavonole, die in drei Fällen als Quercetin- und in einem Fall als Kämpferol-Derivat identifiziert werden konnten. In Datenbanken konnte sehr wenig über Polyphenole, im speziellen Flavonoide, aus dieser Quelle gefunden werden, obwohl *Hemerocallis*-Arten offensichtlich ein breites Spektrum an Flavonoiden besitzen. Eine neue Veröffentlichung berichtet lediglich von Rutin, Catechin und Gallocatechin (Que et al. 2007), jedoch zeigte das in dieser Arbeit untersuchte Produkt von Daylily-Blüten eine weitaus größere Vielfalt an Flavonolen.

## 4.2. Biologische Wirkungen

Allgemein wird der tägliche Verzehr von 5 Obst- und Gemüseportionen pro Tag empfohlen. Ein Grund, aus dem diese Verzehrempfehlung ausgesprochen wird, ist die Aufnahme antioxidativ wirksamer Substanzen, zu denen neben Vitamin C und E sowie Carotinoiden auch die Klasse der Flavonoide zu zählen ist. Es wird hier ein Zusammenhang zwischen antioxidativer Aktivität und Krankheitsprävention gesehen, der für kardiovaskuläre Erkrankungen von Bedeutung sein könnte, aber auch als Schutz gegen Krebsentstehung diskutiert wird. Zu derartigen Aussagen gelangt man auf Grund epidemiologischer Studien, die eine Korrelation zwischen der Aufnahme antioxidativ wirksamer Substanzen und Erkrankungshäufigkeiten finden. Jedoch sind auf diese Weise keine kausalen Verknüpfungen nachweisbar, da zahlreiche Störgrößen das Ergebnis beeinflussen können, wie z.B. Lifestylefaktoren oder andere Ernährungsparameter.

Während Link et al. einen protektiven Effekt von rohem Gemüse bei der Entstehung von Krebserkrankungen finden (Link et al 2004), legt eine kürzlich veröffentlichte Studie des National Cancer Instituts und der American Association of Retired Persons einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Multivitaminpräparaten und der Entstehung von Prostatakrebs nahe (Lawson et al. 2007). Dass in der letztgenannten Studie die Multivitaminpräparate an der Entstehung von Prostatakrebs beteiligt sind, kann allerdings nicht eindeutig gesagt werden, da eine erhöhte Einnahme unter anderem auch mit einer häufigeren Untersuchung hinsichtlich einer Prostataerkrankung korrelierte.

Auch andere neuere Studien und Analysen kommen zu dem Ergebnis, dass die Einnahme hoher Dosen einzelner Verbindungen unter Umständen zu einer vermehrten Sterblichkeit führen kann ( $\beta$ -Carotin/CARET-Studie, Vitamin E (Goodmann et al. 2004; Miller et al. 2005)). So stellt sich auch für Polyphenole die Frage, ob die Aufnahme einzelner hochdosierter Substanzen schädlich ist, oder ob sich die Kombination verschiedener Polyphenole bzw. Flavonoide (analog einem natürlichen Polyphenol-/Flavonoidmuster) gesundheitsfördernder auswirken könnte.

In diesem Zusammenhang sind auch die zytotoxischen Eigenschaften der Polyphenole zu betrachten, die ihren Einsatz in der Krebstherapie ermöglichen könnten. Estrogenabhängige Tumore werden hier außerdem durch die phytoestrogenen Eigenschaften verschiedener Polyphenole beeinflusst, wie dies für die Isoflavonoide bei Brustkrebs diskutiert wird (Scalbert et al.2005).

Im Folgenden werden daher neben den antioxidative Eigenschaften der isolierten Reinsubstanzen auch deren zytotoxische und proliferationsstimulierende Eigenschaften untersucht. Außerdem wird zusätzlich auf die antioxidative Aktivität sowie den proliferationsfördernden Effekt der Extrakte eingegangen.

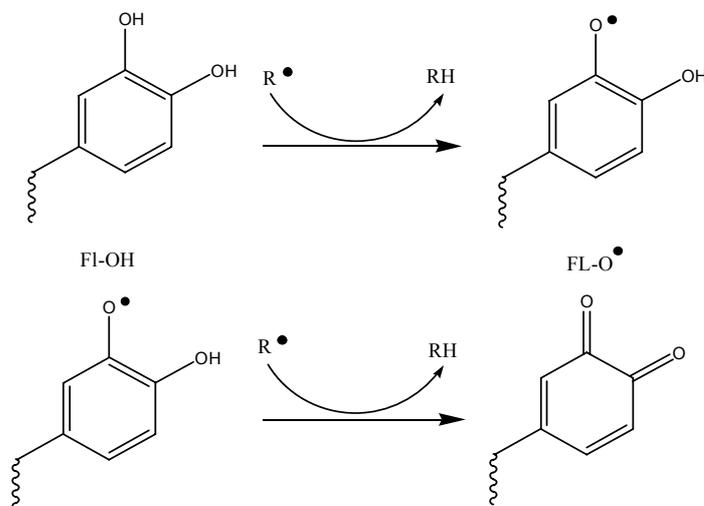
#### 4.2.1. Aktivität im quantitativen DPPH-Küvetten-Assay

Die antioxidative Kapazität der Substanzen wurde im DPPH-Assay (DPPH=2,2-Diphenyl-1-picrylhydracyl) ermittelt. Dieser Assay stellt eine Methode von vielen dar, um eine Aussage über die antioxidative Aktivität von Verbindungen *in vitro* machen zu können. Da jedoch bisher kein Standard-Assay etabliert wurde, bleibt es schwierig, die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen, die in unterschiedlichen Testsystemen (DPPH-, TEAC-, Xanthinoxidase-Assay, ect.) gewonnen wurden, zu vergleichen (Huang et al. 2005).

##### 4.2.1.1. Antioxidative Aktivität der Reinsubstanzen

###### Flavanole

Aus der Gruppe der Flavanole wurden insgesamt vier Verbindungen vermessen: Catechin, Epicatechin und Gallocatechin, die jeweils als Gemisch der Enantiomere vorlagen, sowie zusätzlich (-)-Epicatechin. Alle Flavanole führten zu einer Abnahme der Absorption und waren in der Lage das stabile DPPH-Radikal zu reduzieren (Abb.E67). Diese Eigenschaft beruht hauptsächlich auf dem Vorhandensein der vicinalen OH-Gruppen im B-Ring der Verbindungen, was bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen dokumentiert wurde (Cotelle et al. 1996; Okawa et al. 2001; Pietta 2000; Rice-Evans et al. 1996). Dabei reagiert das Flavonoidmolekül (Fl-OH) wie unten dargestellt (Abb.D3) mit zwei Radikalen zu einem stabilen ortho-Chinon (Pietta 2000). Nach Rice-Evans et al. und Pannala et al. soll die zusätzliche dritte OH-Gruppe im Gallocatechin zu einer weiteren Steigerung der antioxidativen Aktivität gegenüber (±)-Catechin führen (Pannala et al. 2001; Rice-Evans et al. 1996). Für das (-)-Epicatechin ist gegenüber Superoxidationen im Xanthinoxidase-Assay eine leicht stärkere radikalfangende Aktivität als für (+)-Catechin beschrieben (Saint-Cricq de Gaulejac et al. 1999). Die Steigerung der antioxidativen Aktivität im Falle des Gallocatechins konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, allerdings war zu beobachten, dass das (-)-Enantiomer des Epicatechins einen niedrigeren EC<sub>50</sub>-Wert aufwies als die anderen getesteten Flavanole. Die Enantiomeregemische von Epicatechin und Gallocatechin zeigten, obwohl es weder im HPLC-Chromatogramm noch im NMR-Spektrum Hinweise auf eine Verunreinigung gab, eine geringere Aktivität.



**Abb.D3:** Reaktion der Flavonoide beim Abfangen von Radikalen nach Pietta (Pietta 2000)

### Flavone und Flavon-Derivate

Nach Van Acker et al. ist die Substitution bzw. antioxidative Aktivität des B-Rings ausschlaggebend für die Gesamtaktivität des Moleküls. Nimmt die Aktivität des B-Rings ab, so kann unter Umständen die restliche Struktur diesen Verlust kompensieren (Van Acker et al. 1996).

Im Falle des Eriodictyols sowie des Luteolins sind analog zu Catechin und Epicatechin zwei vicinale OH-Gruppen an 3',4'-Position des B-Rings vorhanden. Dementsprechend konnte eine antioxidative Aktivität beobachtet werden, die auch in der Literatur für Luteolin bestätigt wird (Dapkevicius et al. 2002; Schlupper et al. 2006). Eriodictyol besitzt im Gegensatz zu Luteolin keine Doppelbindung an 2,3-Position des C-Ringes, gleichzeitig steigt auch der EC<sub>50</sub>-Wert im Vergleich zu Luteolin (Abb.E68). Hierfür dürfte die fehlende Planarität des Moleküls verantwortlich sein, die Pannala et al. als wesentliche Voraussetzung für die antioxidative Aktivität ansehen (Pannala et al. 2001).

Ist eine der beiden freien OH-Gruppen des B-Rings im Luteolin methyliert wie im Falle des Luteolin- 3',5-dimethylethers, so konnte im Assay bei einer Konzentration von 76 µM lediglich eine sehr geringe Aktivität beobachtet werden (Abb.E66/68). Auch das Tricin zeigte keine Aktivität, obwohl es drei OH-Gruppen im B-Ring aufweist. Jedoch lagen sowohl die OH-Gruppe an Position 3' als auch die an 5' methyliert vor.

Rice-Evans (Rice-Evans et al. 1996) beschreiben für Apigenin, Luteolin-4'-O-glucosid und Naringenin eine geringe antioxidative Aktivität im TEAC-Assay, welche sie auf die Aktivität der meta-ständigen OH-Gruppen an 5 und 7 Position des A-Ringes zurückführen. Diese scheinen nach den erhaltenen Ergebnissen für die Aktivität im durchgeführten DPPH-Assay

nicht von Bedeutung zu sein. Apigenin und seine Derivate zeigten in einer Konzentration von 76  $\mu\text{M}$  eine Absorptionsdifferenz von max. 0,05 Einheiten und somit eine sehr geringe Aktivität (Abb.E66). Die geringe Aktivität für Apigenin im DPPH-Assay wird mehrfach in der Literatur bestätigt (Cotelle et al. 1996; Murota et al. 2002; Okawa et al. 2001). Apigenin, Vitexin und Isovitexin gemeinsam ist eine einzelne OH-Gruppe im B-Ring und auch die Naringenin-Derivate weisen diese strukturelle Eigenschaft auf. Somit ist die strukturelle Voraussetzung für die Bildung eines ortho-Chinons, wie sie oben beschrieben wurde, nicht gegeben. Dies erklärt die fehlende Aktivität der Flavone vom Apigenin-Typ. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen finden Kim et al. für Vitexin eine Aktivität auch im DPPH-Assay, allerdings mit einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 245  $\mu\text{M}$  (Kim, Jin Hwa et al. 2005). Das Ergebnis innerhalb der Flavone zeigt, dass die vicinalen OH-Gruppen an den Positionen 3' und 4' des B-Rings auch hier von entscheidender Bedeutung für die antioxidative Aktivität gegenüber dem DPPH-Radikal sind.

#### Flavonole und Flavonol-Derivate

Im Flavonol ist gegenüber dem Flavon eine zusätzlich OH-Gruppe an Position 3 enthalten. Nach Pannala et al. führt diese zusammen mit der Doppelbindung an 2,3-Position zu einer verstärkten Planarität des Moleküls (über Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen 3OH und H2' bzw. H6' (Abb.D2-(c)), so dass eine höhere antioxidative Aktivität vorliegt (Pannala et al. 2001).

Dementsprechend wiesen die untersuchten Aglyka Kämpferol, Quercetin und Myricetin alle eine antioxidative Aktivität auf mit  $\text{EC}_{50}$ -Werte von  $31 \pm 3 \mu\text{M}$ ,  $15 \pm 3 \mu\text{M}$  bzw.  $23 \pm 9 \mu\text{M}$ , die niedriger ausfielen als die der entsprechenden Flavone und Flavonole.

Im Quercetin- und Myricetinmolekül liegen jeweils mindestens zwei vicinale OH-Gruppen im B-Ring vor, die für die antioxidative Aktivität verantwortlich sind. Weder eine Glycosidierung an 3 Position (Isoquercitrin, Isomyricitrin) noch eine Hydrierung der Doppelbindung (Taxifolin, Dihydromyricetin) im C-Ring führten zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Es war allerdings ein Anstieg der  $\text{EC}_{50}$ -Werte in der Reihe Aglykon < Dihydroverbindung < 3O-Rutinosid < 3O-Glucosid zu verzeichnen. Eine Abnahme der Aktivität im Falle der Derivate ist auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Arora et al. 1998; Potapovich et al. 2003; Rice-Evans et al. 1996; Van Acker et al. 1996). Der Verlust der Doppelbindung sowie die Glycoside an 3 Position verringern die Planarität des Moleküls, damit aber auch die Möglichkeit der Delokalisation des Elektrons sowie die Stabilität des gebildeten Radikals und damit verbunden die antioxidative Aktivität der Verbindungen.

Wie wichtig die freie OH-Gruppe an Position 3 für die beobachtete Aktivität ist, wird im Falle des Isorhamnetin-3O-glucosids deutlich, in dem sowohl die 3OH-Position als auch die 3'OH-Position derivatisiert vorliegen. In diesem Fall ging die antioxidative Aktivität verloren. Dieses Ergebnis wird durch Yokozawa et al. bestätigt (Yokozawa et al. 2002), die ebenfalls Isorhamnetin-Derivate untersuchten und im Falle von Isorhamnetin-3,7O-diglucosid keine

Aktivität beobachteten. Choi et al. fanden im Gegensatz dazu für Isorhamnetin-7*O*-glucosid eine Aktivität, die mit der von Ascorbinsäure vergleichbar war (Choi et al. 2002).

Demzufolge sind zwei vicinale OH-Gruppen im B-Ring für die Aktivität von Bedeutung, aber eine Doppelbindung an 2,3-Position in Verbindung mit einer freien OH-Gruppe an Position 3 verstärken diese Aktivität zusätzlich bzw. gewinnen bei Verlust einer der beiden OH-Gruppen des B-Ringes an Bedeutung.

Dieses Resultat wird durch die Ergebnisse in der Reihe der Kämpferol-Derivate gestützt. Im Falle des Kämpferols liegt eine der oben beschriebenen Strukturen vor, so dass eine antioxidative Aktivität beobachtet werden konnte. Substanzen, denen die freie OH-Gruppe an Position 3 fehlte oder die eine Hydrierung der Doppelbindung aufwiesen, zeigten keine dem Kämpferol vergleichbare Aktivität. Eine Konzentrationsreihe des Kämpferol-3*O*-glucosids, das eine moderate Absorptionsabnahme zeigte, erbrachte zwar einen Anstieg der Absorptionsabnahme, jedoch lag der extrapolierte EC<sub>50</sub>-Wert bei über 300 µM. Beninger et al. konnte in einem fluoreszenz-basierten Liposomenassay keine antioxidative Aktivität für Kämpferol-3*O*-glucosid finden (Beninger et al. 2003), obwohl auch sie in der Literatur auf Hinweise für die Aktivität von Kämpferol-Derivaten im DPPH-Assay gestoßen waren (Gamez et al. 1998). Jedoch wurde hier die Aktivität nach Inkubation bei 37°C und 30 Minuten in einer ethanolischen Lösung bestimmt. Die veränderten Testbedingungen dürften den Unterschied zu den hier gefundenen Ergebnissen zum Teil erklären. Es kann jedoch gesagt werden, dass die Derivatisierung der freien OH-Gruppe an Position 3 oder die Hydrierung der Doppelbindung zu einer starken Abnahme der Aktivität im Kämpferol führt. Pietta et al. gibt im Gegensatz hierzu eine vergleichbare Aktivität von Kämpferol und Dihydrokämpferol im TEAC-Assay an (1.34 bzw. 1.3 mM), wohingegen im in dieser Arbeit durchgeführten DPPH-Assay keine Aktivität der Dihydroverbindung beobachtet werden konnte (Pietta 2000). Auch der 5,7,4'-Trimethylether des Dihydrokämpferols zeigte lediglich eine geringe antioxidative Aktivität.

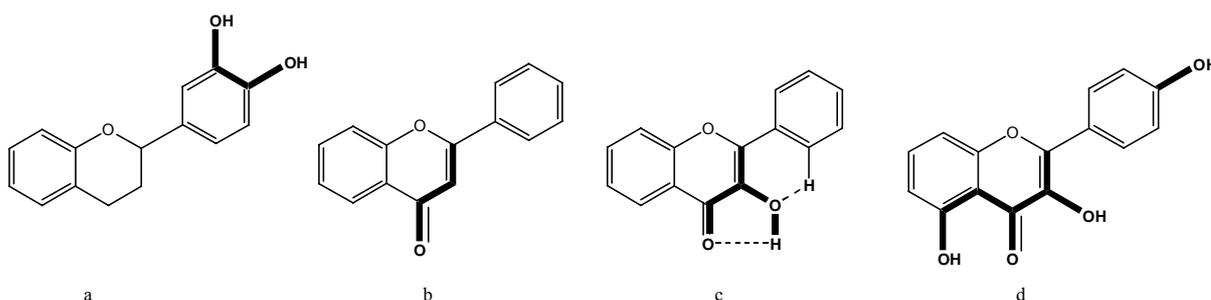
Dass die Aktivität der Kämpferole und damit auch zum Beispiel die der Isorhamnetin-Derivate nicht nur von der freien OH-Gruppe an Position 3 beeinflusst wird, verdeutlicht die geringe Aktivität des 5,7,4'-Trimethylethers des Kämpferols. Van Acker et al. gehen im Kämpferol von einer Oxidation der OH-Gruppe an Position 4' aus, die in diesem Fall derivatisiert ist (Van Acker et al. 1996). In der Literatur werden aber auch freie OH-Gruppen an Position 3 und 5 als wichtiges Strukturmerkmal für die antioxidative Aktivität genannt (Rice-Evans et al. 1996), wofür die Aktivität des Galangins (OH-Gruppen an Position 3, 5 und 7) im TEAC-Assay sprechen würde (Michels 2005). Eine Beteiligung einer oder beider Strukturmerkmale muss für die beobachtete Aktivität im DPPH-Assay verantwortlich sein.

### Isoflavonoide

Die Reihe der Isoflavonoide zeigt die gleiche geringe antioxidative Aktivität wie die bereits vorgestellten Apigenin-Derivate. Im Einklang mit den erhaltenen Daten finden Murota et al.

keinen antioxidativen Effekt von Genistein im DPPH-Assay (Murota et al. 2002). Pietta beschreibt für Genistein eine antioxidative Aktivität, die vergleichbar ist mit der des Luteolins gemessen im TEAC-Assay (Pietta 2000). Jedoch werden auch hier die radikalfangenden Eigenschaften zum Teil auf die OH-Gruppen an 5 und 7 Position zurückgeführt. Auch Okawa et al. (Okawa et al. 2001) weisen für Isoflavonoide eine Aktivität im DPPH-Assay nach, allerdings liegen die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte bis auf den für Genistin (265 µM) zum Teil über 500 µM und sogar 1000 µM.

Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Ergebnisse innerhalb der Flavonoide, dass zwei vicinale OH-Gruppen im B-Ring (Positionen 3' und 4') ausschlaggebend für eine gute antioxidative Aktivität im DPPH-Assay sind (a). Eine Doppelbindung an 2,3-Position in Konjugation mit einer 4-Oxo-Gruppe sowie eine zusätzliche OH-Gruppe an Position 3 verstärken diese Aktivität (b, c). Jedoch auch eine freie OH-Gruppe sowohl an Position 3 als auch an den Positionen 5 bzw. 4' in Verbindung mit einer Doppelbindung an 2,3-Position vermitteln innerhalb der Flavonole eine antioxidative Aktivität (d) (Abb.D4).



**Abb.D4:** Für die antioxidative Aktivität wichtige Strukturmerkmale

### Phenylpropan-Derivate

In der Reihe der Phenylpropan-Derivate zeigten analog zu den bereits beschriebenen Resultaten solche Verbindungen die stärkste antioxidative Aktivität, die zwei vicinale OH-Gruppen beinhalteten. Von den Verbindungen Kaffeesäure, Chlorogensäure und Paucin (Caffeoylputrescin) weist das Säureamid die geringere Aktivität auf (Abb.E71).

Wird eine der OH-Gruppen derivatisiert, so lässt sich ebenfalls eine Aktivitätsabnahme verzeichnen, wie im Falle von Ferulasäure. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten von Li et al. und Brand Williams et al., die ebenfalls für Ferulasäure eine geringere Aktivität im Vergleich zu Kaffeesäure oder Chlorogensäure beobachteten (Brand Williams et al. 1995; Li et al. 1999). Gallussäure selbst zeigt nach Li et al. und Brand Williams et al. eine höhere Aktivität als Kaffeesäure, jedoch wies in den hier durchgeführten Untersuchungen der Ethylester eine wesentlich geringere antioxidative Aktivität auf. Dieses Ergebnis ist in

Übereinstimmung mit Daten von Rice-Evans et al., die eine geringere Aktivität der Ester gegenüber Gallussäure beschreiben (Rice-Evans et al. 1996).

Isoconiferin und Triandrin wiesen lediglich eine geringe Aktivität im Assay auf, wofür zum einen die fehlende Säurefunktion, zum anderen die einzelne OH-Gruppe bzw. im Isoconiferin die zusätzliche Methoxylierung verantwortlich sein dürfte.

### Indol-Derivate

Für die isolierten Indol-Derivate aus *Raphanus sativus* konnte im DPPH-Assay keine antioxidative Aktivität gefunden werden. Barillari et al. beschreiben eine Aktivität (0.13 mM) dieser Verbindungen im TEAC-Assay, jedoch fällt diese um mindestens das zehnfache geringer aus als dies für Polyphenole der Fall ist (Barillari et al. 2005; Rice-Evans et al. 1996).

#### **4.2.1.2. Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften der Extrakte**

##### Leguminosen und weitere Gemüse

Im DPPH-Assay konnte für *Vigna angularis*, *Vicia faba* und die beiden *Phaseolus vulgaris*-Arten eine antioxidative Aktivität gefunden werden, während die übrigen Leguminosenextrakte lediglich eine sehr geringe Absorptionsabnahme bewirkten. Von dem weiteren Gemüse zeigten die Auberginen-Extrakte (*Solanum melongena*), der Rettichextrakt (*Raphanus sativus*) und der Extrakt der Zierkürbisschale (*Cucurbita pepo*) antioxidative Eigenschaften. Die Extrakte von *Vigna angularis* und *Solanum melongena* waren in einer Konzentration <1 mg/ml aktiv, während der *Vicia faba*- und der *Raphanus sativus*-Extrakt einen EC<sub>50</sub>-Wert von 2 mg/ml aufwiesen. Die beiden *Phaseolus*-Extrakte sowie der Zierkürbisschalenextrakt (*Cucurbita pepo*) zeigten zwischen 2-3 mg/ml eine vergleichbare Aktivität. Katsube et al. finden zwischen Polyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Aktivität im DPPH-Assay eine Korrelation von 0.969 (Katsube et al. 2004). Korreliert man im vorliegenden Fall die prozentualen Gehalte der Extrakte ermittelt mittels HPLC bzw. nach Folin-Ciocalteu (freie Polyphenole) mit den Absorptionsabnahmen im DPPH-Assay bei 0.4 mg/ml, so ergibt sich für beide ein Koeffizient  $r > 0.9$  ( $r^2 > 0.8$ ).

Die beobachtete Korrelation der HPLC-Methode sowie der Aktivität im DPPH-Assay deuten somit auf eine teilweise, jedoch nicht ausschließliche Beteiligung der untersuchten Polyphenole an der antioxidativen Wirkung der Extrakte hin. Die untersuchten Konzentrationen der Polyphenole entsprechen der Konzentration im menschlichen Körper bei der Aufnahme von 70 g Gemüse (unter der vereinfachten Annahme eines durchschnittlichen Verteilungsvolumens von 70 L) oder liegen darüber.

Betrachtet man die in den Extrakten enthaltenen Polyphenole, so lässt sich die antioxidative Aktivität mit der Anwesenheit DPPH-aktiver Verbindungen meist gut erklären. Während *Vigna radiata* und *Glycine max* zwar einen hohen Gehalt an Flavonoiden aufweisen, enthalten sie jedoch hauptsächlich Flavone vom Apigenintyp bzw. Isoflavonoide, die im DPPH-Assay als Reinsubstanzen inaktiv waren. Demgegenüber enthalten *Vigna angularis* und die *Phaseolus vulgaris*-Arten sowohl einen höheren Polyphenolgehalt als auch Myricetin- und Quercetin-Derivate oder freies Kämpferol, ebenso wie Catechine, die jeweils eine gute antioxidative Aktivität als Reinsubstanzen gezeigt hatten. Die gemessene antioxidative Aktivität des *Vicia faba*-Extraktes spricht zusätzlich für das Vorliegen von Proanthocyanidinen, da die enthaltenen Flavone und Flavonole im DPPH-Assay inaktiv waren; dimere Procyanidine weisen jedoch gute antioxidative Eigenschaften auf (Saint-Cricq de Gaulejac et al. 1999). *Phaseolus coccineus* und *Pisum sativum* enthalten beide die geringsten Gehalte sowohl nach Folin-Ciocalteu (freie Polyphenole) als auch mit der HPLC-Methode. Beide beinhalten in geringem Maße Zimtsäure-Derivate, während *Pisum sativum* zusätzlich Kämpferol-3*O*-sophorotriosid enthält, welches jedoch auch als Reinsubstanz nur geringe antioxidative Eigenschaften besaß. In den Extrakten der Aubergine sind hauptsächlich Chlorogensäure-Derivate sowie Anthocyanidine zu detektieren, von denen erstere auch als Reinsubstanzen im DPPH-Assay gute antioxidative Eigenschaften bewiesen.

Lediglich die Aktivität der Extrakte vom Rettich (*Raphanus sativus*) sowie von der Zierkürbisschale (*Cucurbita pepo*) bildete bei dieser Interpretation eine Ausnahme. Im Rettich konnten keine Flavonoide nachgewiesen werden, wohingegen der Zierkürbisschalen-Extrakt zwar Flavonoide enthält, aber nur solche, die auch im inaktiven Zucchini-schalen-Extrakt enthalten sind. Daher müssen in diesen Extrakten andere Inhaltsstoffe mit guten radikal-fangenden Eigenschaften enthalten sein. Das Nutrient Data Laboratory weist für Kürbisarten einen Vitamin C-Gehalt von 9 mg sowie einen Vitamin E-Gehalt von 1.1 mg/100 g FG nach. Zusätzlich wird ein Gehalt an  $\beta$ -Carotin (3100  $\mu$ g/100 g) und Lutein/Zeaxanthin (1500  $\mu$ g/ 100 g) angegeben, die ebenfalls antioxidative Eigenschaften besitzen (Granado et al. 2003). Rettich enthält sogar 22 mg/100 g Vitamin C (NDL 2006). Diese Substanzen könnten im Falle der letzten beiden Extrakte maßgeblich für die antioxidative Wirkung verantwortlich sein. In jedem Fall ist auch in den vorher besprochenen Extrakten eine Beteiligung weiterer Inhaltsstoffe nicht auszuschließen.

Die antioxidative Wirkung von Pflanzen, speziell Gemüseextrakten wird in der Literatur in unterschiedlichen Assays untersucht. Lin et al. beschreibt für den Wasser-Extrakt von *Vigna angularis* einen protektiven Effekt gegen die durch  $\text{FeCl}_2$  induzierte Lipidperoxidation, ebenso war der Extrakt in der Lage Superoxidationen abzufangen (Lin et al. 2001). Im gleichen Assay erwiesen sich jedoch auch die Extrakte von *Glycine max* und *Vigna radiata* als aktiv.

Itoh et al. bringen den Befund, dass der Kochwasserextrakt von Adzukibohnen (*Vigna angularis*) die Adhäsion, Invasion und Metastasenbildung von B16 Melanomzellen der Maus

vermindert, mit seiner antioxidativen Wirkung in Zusammenhang. Den Autoren ist jedoch die genaue Zusammensetzung des Extraktes unbekannt, so dass sie lediglich Polyphenole, speziell Catechin als aktive Komponente diskutieren, das eventuell durch seine radikalfangenden Eigenschaften die Metastasenbildung reduziert (Itoh et al. 2005). Nach den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen kommen in diesem Extrakt neben Catechin auch Myricetin-3-O-rutinosid und Rutin (siehe Kapitel 3.2.2.) als antioxidativ aktive Substanzen vor, deren Einflüsse somit besonders im Hinblick auf Zytotoxizität, Metabolisierung und Aufnahme noch genauerer Untersuchungen bedürfen.

Für *Phaseolus vulgaris* konnten Kaur et al. sowie Vinson et al. eine antioxidative Aktivität der Extrakte im  $\beta$ -Carotin-Bleichungs-Test bzw. LDL-Oxidations-Test beobachten. Allerdings konnte hier auch bei Extrakten von Knoblauch, Gurke, Rettich sowie Erbsen Aktivität gezeigt werden. So wiesen bei Kaur et al. die Ethanolextrakte in der Reihe Rettich<Gurke<Gartenbohne<Erbsen<Knoblauch steigende Aktivitäten auf (Kaur et al. 2002), wohingegen Vinson et al. für die untersuchten Pflanzen eine Reihenfolge von Gurke<Knoblauch<Gartenbohne angeben (Vinson et al. 1998). Cao et al. beobachteten im ORAC-Assay, dass die Aubergine (*Solanum melongena*) gegenüber Gurke (*Cucumis sativus*) sowie Knoblauch (*Allium sativum*) bezogen auf das Trockengewicht eine höhere Aktivität gegenüber OH-Radikalen besitzt (Cao et al. 1996).

#### 4.2.2. Zelluläre Eigenschaften der Reinsubstanzen und Extrakte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Eigenschaften strukturanaloger Substanzen auf Zellen untersucht. Hierbei wurden folgende Parameter miteinbezogen:

- proliferationsfördernde Wirkungen in MCF7-Zellen
- toxische Effekte in H4IIE-Zellen
- protektive Effekte gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H4IIE-Zellen

Die auffälligsten zellulären Effekte wurden erwartungsgemäß mit den Isoflavonoiden beobachtet, für die in der Literatur vielfach estrogenartige Wirkungen beschrieben wurden. Genistein, Genistin, Daidzein und Daidzin sowie Glycitin stimulierten das Wachstum von MCF-7-Zellen in der Reihenfolge 17- $\beta$ -Estradiol> Genistin> Daidzein> Genistein> Daidzin> Glycitin> Glycitin, wobei Konzentrationen von 10<sup>-6</sup>-10<sup>-14</sup> M getestet wurden (Morito et al. 2001). Isoflavonoide binden verstärkt, aber nicht ausschließlich an den Estrogenrezeptorsubtyp  $\beta$  (ER- $\beta$ ), der unter anderem im ZNS, im kardiovaskulären System und in Knochen anzutreffen ist. Der ER- $\beta$  vermittelt vermehrt antientzündliche und antiproliferative Effekte, wohingegen der Estrogenrezeptorsubtyp  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) Proliferation und Wachstum stimuliert und somit zur Entwicklung hormonabhängiger Tumore beiträgt. Da ER- $\beta$  nur bei höheren Konzentrationen von Estradiol aktiviert wird, kommt es bei sinkenden

Estrogenspiegeln zu einer vermehrten Aktivität von ER- $\alpha$  (Rohr 2006). Die Tatsache, dass in asiatischen Ländern der Konsum an Sojaprodukten bzw. Isoflavonoiden gegenüber den westlichen Industrieländern deutlich höher ist (30 mg/d versus 1 mg/d; (Cos et al. 2003)), könnte im Hinblick auf die ER- $\beta$  Affinität der Isoflavonoide mitverantwortlich sein für das geringere Auftreten von Brustkrebs in den asiatischen Ländern (Cos et al. 2003; Harris et al. 2005; Rohr 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung auf proliferationsstimulierende Eigenschaften estrogensensitive humane MCF-7-Zellen verwendet. Genistein zeigte als Reinsubstanz einen zellproliferierenden Effekt ab Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M, der mit steigender Konzentration jedoch abnahm. Dies ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen aus der Literatur, die für geringe Genisteinkonzentrationen einen proliferationsfördernden Effekt beschreiben, während in höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte zu überwiegen scheinen (Kuntz et al. 1999; Reinwald et al. 2006). Im Zytotoxizitätstest zeigte Genistein einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität bei Konzentrationen, die weit über den proliferationsfördernden Konzentrationen lagen ( $EC_{50} < 100 \mu$ M). Genistin besaß lediglich einen  $EC_{50}$ -Wert  $> 100 \mu$ M, Daidzein war im getesteten Konzentrationsbereich nicht toxisch für H4IIE-Zellen. Auch von Kuntz et al. wurde eine Zytotoxizität von Genistein in HAT-29 Zellen beobachtet. Bei diesen Autoren zeigten allerdings auch Daidzein und Genistin in HAT 29 Zellen  $EC_{50}$ -Werte von 73 und 84  $\mu$ M (Kuntz et al. 1999).

Angeichts ihrer hohen Isoflavonoidgehalte wurden auch die ethanolischen bzw. methanolischen Extrakte der verschiedenen Leguminosen auf ihre proliferationsstimulierenden Eigenschaften hin untersucht. Für die Extrakte von *Vigna angularis*, *Glycine max* und *Phaseolus coccineus* konnte ein signifikanter Anstieg der Zellproliferation gegenüber DMSO beobachtet werden, während die Extrakte von *Vicia faba* und von den beiden *Phaseolus*-Arten lediglich einen leichten Anstieg der Zellproliferation hervorriefen. Die Extrakte von *Pisum sativum* und *Vigna radiata* erwiesen sich in diesem Assay als inaktiv (Zhao et al. 2005). Auch der Extrakt von *Vigna angularis* wies proliferationsfördernde Eigenschaften auf, jedoch konnte erst eine Assay-basierte Isolierung einen Hinweis auf die aktive Komponente aufzeigen. In der aktivsten Fraktion konnte Daidzein identifiziert werden. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass weitere aktive Inhaltsstoffe vorliegen, da Daidzein in nur sehr geringen Mengen nachzuweisen war und daneben weitere aktive Fraktionen ohne Daidzein gefunden wurden. Von den getesteten weiteren Gemüsesorten zeigte lediglich der Extrakt von *Cucumis sativus* einen leichten Anstieg der Proliferation, jedoch konnten höhere Konzentrationen wegen zu geringer Löslichkeit nicht mehr getestet werden.

Unter den Flavonen wies nur Apigenin ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine proliferationsfördernde Wirkung in MCF-7-Zellen auf. Rhoifolin (Apigenin-7O-

neohesperidosid) war inaktiv. Harris et al. und Kuiper et al. beschreiben in diesem Zusammenhang ebenfalls für Apigenin eine Aktivierung des ER- $\beta$  (Harris et al. 2005; Kuiper et al. 1998). Im Zytotoxizitätsassay in H4IIE-Zellen war Apigenin bis zu einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  inaktiv, ebenso Vitexin. Vergleichbare Ergebnisse zur Zytotoxizität von Apigenin in H4IIE-Zellen wurden bereits in früheren Arbeiten erhalten (Steffan 2005). Ujiki et al. beobachteten ebenfalls für die ersten 24 h in vier verschiedenen humanen Pankreaszelllinien keinen Effekt von Apigenin auf die Viabilität der Zellen (Ujiki et al. 2006). In der Literatur hatte sich für Apigenin in H4IIE-Zellen kein protektives Potential gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  feststellen lassen (DCF-Assay) (Wätjen et al. 2007). Ebenso wenig wurde in der vorliegenden Arbeit im DPPH-Assay eine antioxidative Wirksamkeit für Apigenin gefunden. Die traditionelle Nutzung der Mungbohnenextrakte (*Vigna radiata*) mit den Hauptinhaltsstoffen Vitexin und Isovitexin bei Fieber bzw. Hitze muss wohl auf andere Wirkmechanismen als antioxidative zurückgeführt werden. Mehrfach wurde ein antihistaminischer Effekt ähnlich dem Effekt der Chromoglicinsäure festgestellt, der den Einsatz dieses Extraktes in Kosmetika zur Reduktion von Irritationen der Haut erklären würde (Jo et al. 2003; Middleton et al. 1982; Prabhakar et al. 1981). Ebenso wird die Gurke wie in Kapitel 1.2. erwähnt bei Hitzeausschlägen und Sonnenbrand eingesetzt. Sie beinhaltet ebenfalls Apigenin-Derivate, die die Freisetzung von Histamin verringern könnten.

Unter den Flavonolverbindungen wurden die Aglyka Quercetin und Kämpferol auf proliferationsfördernde Wirkungen in MCF-7-Zellen hin untersucht. Während Quercetin bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keinen Effekt aufwies, zeigte Kämpferol schon bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eine signifikant gesteigerte Zellproliferation gegenüber DMSO. Auch Harris et al. und Kuiper et al. beschreiben für Kämpferol eine Aktivierung des ER- $\beta$  (Harris et al. 2005; Kuiper et al. 1998). Rutin wies als isolierte Reinsubstanz (1-10  $\mu\text{M}$ ) im Gegensatz zur käuflich erworbenen Verbindungen eine proliferationsfördernde Wirkung auf. Dies könnte auf weitere aktive Komponenten im Extrakt hinweisen. Ein ähnlicher Effekt wurde im Übrigen auch für das isolierte Catechin im Gegensatz zur käuflich erworbenen Substanz beobachtet. Die glycosidische Verbindungen Myricetin-3O-rutinosid wies im Assay keine Effekte auf. Die schwache proliferationsfördernde Wirkung der Extrakte von *Vicia faba*, *Cucumis sativus* und der beiden *Phaseolus*-Arten ist wahrscheinlich auf die synergistischen Effekte von Quercetin-, Kämpferol- und Apigenin-Derivaten zurückzuführen, gleichzeitig sind auch hier Isoflavonoide in sehr geringen Dosen nicht auszuschließen.

Im Zytotoxizitätsassay in H4IIE-Zellen wurde festgestellt, dass Quercetin und Myricetin ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  toxische Effekte aufwiesen mit  $\text{EC}_{50}$ -Werten von 211  $\mu\text{M}$  bzw. 154  $\mu\text{M}$  (Neutralrotassay). Kuntz et al. beobachteten in HAT-29 Zellen etwas niedrigere  $\text{EC}_{50}$ -Werte (85 bzw. 47  $\mu\text{M}$ ) (Kuntz et al. 1999). Die niedrige oder fehlende Toxizität der Quercetin-Derivate Taxifolin und Rutin bestätigt frühere Studien (Wätjen et al. 2005). Es

konnte in diesem Zusammenhang jedoch eine Zytotoxizität der Myricetin-Derivate Dihydromyricetin und Myricetin-3O-rutinosid festgestellt werden, die jeweils ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität besaßen. Während die Zytotoxizität in der Reihe der Quercetin-Derivate gut mit der Aufnahme in die Zelle korrelierte, konnte dies bei den Myricetin-Derivaten nicht festgestellt werden. So war von Quercetin nach 1stündiger Inkubation eine Konzentration von 33.4 nmol/ $10^6$  Zellen intrazellulär zu finden, wohingegen Taxifolin nur in Spuren (0.2 nmol/ $10^6$  Zellen) und Rutin nicht nachzuweisen waren. Im Gegensatz dazu waren Myricetin (0.2 nmol/ $10^6$  Zellen) sowie die Derivate Dihydromyricetin und Myricetin-3O-rutinosid nur in geringen Mengen oder überhaupt nicht in den Zellen zu beobachten, dennoch war ein zytotoxischer Effekt vorhanden. Daher muss angenommen werden, dass die zusätzliche OH-Gruppe, die den einzigen Unterschied zwischen diesen Substanzgruppen darstellt, einen entscheidenden Einfluss auf die beobachtete Zytotoxizität besitzt. Es ist möglich, dass diese Substanzen ihre Toxizität über eine verstärkte extrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung vermitteln. Nakagawa et al. beobachteten für Epigallocatechin (EGC) sowie Epigallocatechingallat (EGCG), nicht jedoch für Epicatechingallat (ECG) eine Zunahme der extrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung sowie die Reduktion von Fe(III), welche in der Fenton-Reaktion mit der Bildung von Hydroxylradikalen einhergeht. Dies führte in Jurkat-Zellen zur Apoptose. Da EGC und EGCG, nicht jedoch ECG zytotoxisch wirkten, muss auch im vorliegenden Fall der B-Ring als Auslöser der Zytotoxizität in Betracht gezogen werden (Nakagawa et al. 2004).

Dass Quercetin in geringeren als zytotoxischen Konzentrationen Schutzwirkungen gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufweist, ist aus der Literatur bekannt (Wätjen et al. 2006) und zeigte sich auch in den hier vorgelegten Untersuchungen, bei denen H4IIE Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Flavonoids präinkubiert wurden; anschließend wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Apoptose ausgelöst. Allerdings war unter den untersuchten Flavonolen lediglich Quercetin in der Lage die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte Apoptose zu reduzieren. Dies korrelierte mit den Ergebnissen, die wie bereits oben beschrieben für die Aufnahme der Flavonoide gefunden wurden.

Somit stellt sich zur Beurteilung der Ergebnisse der Experimente mit Zelllinien in jedem Fall die Frage, inwieweit die getesteten Verbindungen überhaupt durch Zellen aufgenommen werden. Aglyka gelten dabei als aktive Wirkform, so dass ihrer Freisetzung aus den jeweiligen Glycosiden wesentliche Bedeutung zukommt. Walle et al. beschreiben eine von Mensch zu Mensch unterschiedlich ausgeprägte Spaltung von Flavonoidglucosiden bereits in der Mundhöhle (Walle et al. 2005). Ebenso stellt das saure Milieu des Magens neben den Enzymen des Darmlumens eine weitere Möglichkeit zur Spaltung von Glycosiden oder oligo- bzw. polymeren Verbindungen dar. Demgegenüber konnte für einige Glucoside wie z.B. Isoquercitrin oder Quercetin-4'O- $\beta$ -glucosid gezeigt werden, dass sie über einen Natrium-abhängigen Glucosetransporter (SGLT1) in die Zelle aufgenommen werden (Walgren et al.

2000; Wolffram et al. 2002). Allerdings wird dieser Einstrom durch MRP1 (multidrug resistance –associated Protein 1) limitiert, das für den gleichzeitigen Efflux der Verbindungen verantwortlich gemacht wird (Walle et al. 2003).

Für H4IIE-Zellen konnte gezeigt werden, dass glykosidierte Verbindungen wie Rutin, Myricetin-3*O*-rutinosid und Kämpferol-3*O*-glycosid nicht intrazellulär nachzuweisen sind (Steffan et al. 2005; Wätjen et al. 2005). In diesem Zusammenhang sind besonders die Ergebnisse zu den Glucosiden der Flavonole zu betrachten. Während die Aglyka jeweils zytotoxische Effekte aufwiesen und die Zellviabilität in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  signifikant reduzierten, konnte ein vergleichbarer Effekt unter den Glucosiden lediglich für das Isoquercitrin festgestellt werden. Für Isoquercitrin ist eine Beteiligung des SGTL1 möglicherweise mitverantwortlich für die gemessene Toxizität, jedoch bleibt offen, ob die beiden anderen Glucoside nicht in die Zelle aufgenommen werden oder ob ein schneller Efflux zu ihrer geringen Toxizität beiträgt.

Mehrere strukturanaloge Phenylpropan-Derivate (Kaffeensäure, Ferulasäure, Chlorogensäure sowie Triandrin) wurden in H4IIE-Zellen auf zytotoxische Wirkungen hin untersucht, von denen jedoch lediglich CAPE (Kaffeensäurephenethylester) eine signifikante Toxizität bewirkte. Hydroxyzimtsäuren sind in der Natur weit verbreitet; Kaffeensäure und in einem geringeren Maße auch Ferulasäure sind die häufigsten Vertreter. Es werden daneben aber auch Säureamide wie das Paucin und Ester wie die Chlorogensäure beschrieben. Letztere wird nach Aufnahme im Darm durch Esterasen zu Kaffeensäure und Chinasäure abgebaut (Plumb et al. 1999). Kurata et al. fanden für Chinasäure nach 72 Stunden keinen Effekt an HL-60 Zellen, wohingegen 1000 $\mu\text{M}$  Chlorogensäure die Zellviabilität auf 20% verringerten und Kaffeensäure bereits in Dosierungen über 10 $\mu\text{M}$  einen stärkeren Effekt hervorrief. In DLD-1 Zellen hingegen konnte lediglich für beide eine Reduktion der Zellviabilität um 10% (1000  $\mu\text{M}$ ) beobachtet werden (Kurata et al. 2007). An MC-IXC Zellen konnten Kim et al. nach 24 Stunden keine toxischen Effekte von Ferulasäure bis zu einer Konzentration von 4 mM beobachten (Kim et al. 2007).

Da man davon ausgeht, dass auch Flavonoide im Körper zu Phenolsäuren abgebaut werden (Karlsson et al. 2005), sowie dass die tägliche Aufnahme von Phenolsäuren recht hoch liegt (eine Tasse Kaffee enthält ca 50-150 mg Chlorogensäure, in Weizen können 500 mg/100 g Ferulasäure nachgewiesen werden (Scalbert et al. 2000)), ist eine geringe Toxizität dieser Verbindung wünschenswert. In der Wasserfraktion von humanen Faeces konnten Konzentrationen von Ferulasäure von 0.7 – 44  $\mu\text{M}$  gemessen werden, während sich der Gesamtgehalt an phenolischen Verbindungen durchschnittlich auf 789  $\mu\text{M}$  belief (Karlsson et al. 2005). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Aubergine neben dem Kaffee beträchtlich zur Chlorogensäureaufnahme beiträgt, welche besonders bei Nahrungsergänzungsmitteln aus diesem Gemüse zu beachten ist, da über Nahrungsergänzungsmittel Inhaltsstoffe dem Körper

in hohen Konzentrationen über einen längeren Zeitraum angeboten werden. Besonders die unterschiedlichen Ergebnisse für die Kaffeesäure in den verschiedenen Modellen schließen einen negativen Einfluss der Substanz nicht aus. So konnte bei chronische Einnahme von Chlorogensäure ein erhöhter Homocysteinspiegel beobachtet werden, der mit einem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen in Verbindung gebracht wird (Olthof et al. 2001).

#### **4.3. Schlussbetrachtung**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Leguminosen wie weitere Gemüse ein unterschiedliches Polyphenolmuster sowie unterschiedliche Konzentrationen der untersuchten Polyphenole beinhalten.

Die verschiedenen antioxidativen, zytotoxischen und proliferationsfördernden Eigenschaften der aus diesen Pflanzen gewonnenen Reinsubstanzen verdeutlichen, dass eine gesonderte Betrachtung der einzelnen Strukturtypen, wenn auch aufwendig, jedoch im Hinblick auf eine ausgeglichene sowie eine therapie-begleitende Ernährung sinnvoll und notwendig sind.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben über die tägliche Zufuhr an Flavonoiden. Während Prior und Hollmann et al. annehmen, dass vermutlich weniger als 0.5 g – 1.0 g/d in den westlichen Ländern aufgenommen werden (Hollman et al. 2000; Prior 2003), gehen Scalbert et al. von wesentlich mehr als 1 g/d aus. Sie weisen jedoch ausdrücklich darauf hin, dass dies stark von den individuellen Essgewohnheiten der jeweiligen Personen abhängt (Scalbert et al. 2000). Hiervon zu unterscheiden sind Angaben der aufgenommenen Menge als Polyphenole. Eine Einteilung oder Unterscheidung, ob nun vermehrt Flavonoide oder andere reduzierende Substanzen wie Vitamin C/E oder  $\beta$ -Carotin bzw. Proteine aufgenommen wurden, ist in den meisten Fällen nicht möglich, allenfalls wenn diese Substanzen zusätzlich bestimmt oder vor der Messung entfernt wurden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nach Folin-Ciocalteu verdeutlichen diesen Sachverhalt.

Je nach konsumiertem Nahrungsmittel kann die Aufnahme einzelner Flavonoidklassen unterschiedlich stark ausfallen. So führt ein hoher Konsum an Kaffee oder Auberginen zu einer vermehrten Zufuhr an Phenylpropansäuren, während der Konsum von rotem Wein und roten Früchten zu einer vermehrten Aufnahme von Anthocyanidinen beiträgt. Der tägliche Teekonsum hingegen fördert die Flavanolaufnahme (Clifford 2000; Santos-Buelga et al. 2000; Scalbert et al. 2000).

Die Art der aufgenommenen Verbindungen sowie die vorliegende Konzentration sind nicht unerheblich, da unterschiedliche Plasmaspiegel erreicht werden und somit unterschiedliche Effekte von den einzelnen Verbindungen ausgehen können.

Flavonoide kommen im Pflanzenreich hauptsächlich an Zucker gebunden vor. Dabei spielt die Art des Zuckers eine nicht unerhebliche Rolle bei der Aufnahme und individuellen

Verarbeitung im Körper. In kontrollierten Aufnahmestudien von Quercetin und Quercetin-Derivaten konnten Unterschiede der maximalen Plasmaspiegel und der Zeit bis zum Erreichen der maximalen Konzentration beobachtet werden. Bei Gabe von 50 mg Quercetin bzw. 100 mg Rutin wurden maximale Plasmaspiegel von 0.28  $\mu\text{M}$  sowie 0.3  $\mu\text{M}$  erhalten (Erlund et al. 2000). Graefe et al. beobachteten für Quercetin-4'-*O*-glucosid (entsprechend 100 mg Quercetin) und Rutin (entsprechend 200 mg Quercetin) sogar Plasmaspiegel von 7.0  $\mu\text{M}$  bzw. 1.1  $\mu\text{M}$  (Graefe et al. 2001). Der maximale Plasmaspiegel wurde bei Rutin erst später erreicht, da für die Aufnahme eine Spaltung des Zuckers im Darm notwendig ist.

Nach der Einnahme von Sojaprodukten über die normale tägliche Ernährung konnte bei japanischen Männern Plasmaspiegel von 0.28  $\mu\text{M}$  Genistein und 0.11  $\mu\text{M}$  Daidzein beobachtet werden. Wurde jedoch ein angereichertes Sojaprotein konsumiert, stieg dieser Wert um das 3-5-fache auf 0.9  $\mu\text{M}$  Genistein und 0.5  $\mu\text{M}$  Daidzein an (Gooderham et al. 1996). Isoflavonoide werden hierbei vermutlich als Aglyka aufgenommen.

Nach der Aufnahme von 10.9 mg/kg Holunderfrüchten konnten Anthocyanidine im Plasma in einer Konzentration von 97.4 nM nachgewiesen werden, während die Einnahme von 3.58 mg/kg Konzentrat aus schwarzer Johannisbeere zu Plasmaspiegeln von 115 nM führte (Prior 2003).

Geht man davon aus, dass Nahrungsergänzungsmittel mit einem einzelnen Inhaltsstoff wie Quercetin oder mit konzentrierten Frucht- und Gemüseextrakten häufiger in hohen Mengen (ca. 500 mg-pro Kapsel) und über einen längeren Zeitraum eingenommen werden (meist wird die Einnahme von mehreren Kapseln oder mehreren Portionen pro Tag von den Anbietern empfohlen), so sind weit höhere Konzentrationen der Flavonoide im Plasma denkbar.

Somit könnten die in den *in vitro*-Assays verwendeten Konzentrationen erreicht werden und pharmakologische Wirkungen entfalten. So wird bei Einnahme von Genistein- oder Vitexin-reicher Ernährung ein Zusammenhang mit Jodmangelkrankungen gesehen (Gaitan et al. 1995; Scalbert et al. 2005). Wie bereits erwähnt vermutet man einen Einfluss von hohen Dosen Chlorogensäure (1 g/d) auf den Homocysteinspiegel, der ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zu verursachen scheint (Olthof et al. 2001). Dagegen erwiesen sich Polyphenole wie Epigallocatechin und Quercetin in der Chemotherapie als gute Adjuvantien, um die Wirkung der verwendeten Therapeutika zu verbessern (Scalbert et al. 2005).

Nicht alle Polyphenolkonzentrationen und –zusammensetzungen müssen daher für jedes Individuum einen positiven Effekt besitzen. Eine Supplementierung sollte immer sorgfältig abgewogen und eine ungewollte Supplementierung über angereicherte Nahrungsmittel eher skeptisch betrachtet werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abou-Zaid, M.M., D.A. Lombardo, G.C. Kite, R.J. Grayer and N.C. Veitch (2001). "Acylated flavone C-glycosides from *Cucumis sativus*" Phytochemistry **58**(1): 167-172.
- ADA (1999). "Position of the American Dietetic Association: functional foods." J. Am. Diet. Assoc. **99**(10): 1278-1285.
- Adesanya, S.A., M.J. O'Neill and M.F. Roberts (1985). "Isoflavonoids from *Phaseolus coccineus*." Phytochemistry **24**(11): 2699 - 2702.
- Ahn, G.U., B.G. Cho, C.S. Ryu and Y.G. Yoo (2003). Skin whitening cosmetics composition containing extract of mung-bean hull. Republic Korean Kongkae Taeho - Coreana Cosmetics Co. Ltd. South Korea. **KR 2003030327**.
- Ali, Z., V.U. Ahmad, M. Zahid and R.B. Tareen (1998). "Benzoic acid derivatives from *Stocksia Brahuica*." Phytochemistry **48**(7): 1271 - 1273.
- Aparicio-Fernandez, X., G.G. Yousef, G. Loarca-Pina, E. deMejia and M.A. Lila (2005). "Characterization of Polyphenolics in the Seed Coat of Black Jamapa Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." J. Agric. Food Chem. **53**(11): 4615-4622.
- Arisawa, M., T. Takakuwa and K. Handa (1971). "Unutilized resouces VI. components of flavonoids in *Vicia faba* genus plants. 1. Flavonoids of *Vicia faba* and *V. unijuga* (Leguminosae)." Yakugaku Zasshi **91**(5): 587-589.
- Arora, A., M. Nair and G.M. Strasburg (1998). "Strukture-Activity reationship for antioxidant acitivities of series of Flavonoids in a liposomal system." Free Radic. Biol. Med. **24**(9): 1355-1363.
- Arts, I.C. and P.C. Hollman (2005). "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies." Am J Clin Nutr **81**(1 Suppl.): 317S-325S.
- Arts, I.C., B. van de Putte and P.C. Hollman (2000). "Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods." J. Agric. Food Chem. **48**(5): 1746-1751.
- Bailey, L. H. (1923). Gentes Herbarium.
- Balasubramanian, S. and M. Nair (2000). "An efficient "one pot" synthesis of isoflavones." Synthetic Communications **30**(3): 469 - 484.
- Barillari, J., R. Cervellati, M. Paolini, A. Tatibouet, P. Rollin and R. Iori (2005). "Isolation of 4-Methylthio-3-butenyl Glucosinolate from *Raphanus sativus* sprouts (Kaiware Daikon) and its redox properties." J Agric Food Chem **53**: 9890 - 9896.
- Belkhiri, A. and G. B. Lockwood (1990). "An indole derivative and glucosinolates from *Moricandia arvensis*" Phytochemistry **29**(4): 1315-1316.
- Beninger, C.W. and G.L. Hosfield (1999). "Flavonol glycosides from Montcalm Dark Red Kidney Bean: implications for the genetics of seed coat color in *Phaseolus vulgaris* L." J. Agric. Food Chem. **47**(10): 4079-4082.
- Beninger, C.W. and G.L. Hosfield (2003). "Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes." J. Agric. Food Chem. **51**(27): 7879-7883.
- Bjelakovic, G., D. Nikolova, L.L. Gluud, R.G. Simonetti and C. Gluud (2007). "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention. Systematic review and metaanalysis." J. Am. Med. Assoc. **297**(8): 842 - 857.
- Borek, C. (2001). "Antioxidant health effects of aged garlic extract." J. Nutr. **131**(3s): 1010S-1015S.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical. Biochem. **72**: 248-254.
- Brand Williams, W., M.E. Cuvelier and C. Berset (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidative activity." Lebensm. Wiss. Technol. **28**: 25-30.
- Brat, P., S. Georgé, A. Bellamy, L. Du Chauffaut, A. Scalbert, L. Mennen, N. Arnault and M.J. Amiot (2006). "Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables." J. Nutr. **136**: 2368 - 2373.
- Brown, D. (2005). The Royal Horticultural Society Dorling Kindersley.

- Budzianowski, J. (1990). "Kaempferol glycosides from *Hosta ventricosa*." Phytochemistry **29**(11): 3643-3647.
- Cao, G., E. Sofic and R.L. Prior (1996). "Antioxidant capacity of tea and common vegetables." J. Agric. Food Chem. **44**(11): 3426-3431.
- Caristi, C., E. Bellocco, V. Panzera, G. Toscano, R. Vadala and U. Leuzzi (2003). "Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from Sicilian cultivars." J. Agric. Food Chem. **51**(12): 3528-3534.
- Carlson, D. G., M. E. Daxenbichler and C. H. Van Etten (1985). "Glucosinolates in Radish cultivars." J. Amer. Soc. Hort. Sci. **110**(5): 634-638.
- Cavaliere, C., P. Foglia, E. Pastorini, R. Samperi and A. Laganà (2005). "Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry." Rapid communications in mass spectrometry **19**: 3143-3158.
- Choi, J.S., M.J. Jung, H.J. Park, H.Y. Chung and S.S. Kaug (2002). "Further isolation of peroxy nitrile and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging isorhamnetin-7-O-glucoside from leaves of *Brassica juncea* L." Arch. Pharm. Res. **25**(5): 625 - 627.
- Clifford, M.N. (2000). "Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden." J.Sci. Food Agric. **80**: 1063 - 1072.
- Cos, P., T. De Bruyne, S. Apers, D. Vanden Berghe, L. Pieters and A.J. Vlietinck (2003). "Phytoestrogens: recent developments." Planta Med. **69**(7): 589-599.
- Cotelle, N., J.L. Bernier, J.P. Catteau, J. Pommery, J.C. Wallet and E.M. Gaydou (1996). "Antioxidant properties of hydroxy-flavones." Free Radic. Biol. Med. **20**(1): 35-43.
- Dapkevicius, A., T.A. van Beek, G.P. Lelyveld, A. van Veldhuizen, A. de Groot, J.P. Linssen and V. R. (2002). "Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves." J Nat Prod **65**(6): 892 - 896.
- Davis, A.L., Y. Cai, A.P. Davies and J.R. Lewis (1996). "<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Assignments of some green tea polyphenols." Magn. Reson. Chem. **34**(11): 887-890.
- Davoust, D., M. Massias and D. Molho (1980). "<sup>13</sup>C NMR investigation of flavonoid C-β -D-glucosides. Detection of a conformational equilibrium." Organic Magnetic Resonance **13**(3): 218-219.
- De Bruyne, T., L. A. C. Pieters, R. A. Dommissie, H. Kolodziej, V. Wray, T. Domke and A. J. Vlietinck (1996). "Unambiguous assignments for free dimeric proanthocyanidin phenols from 2D NMR." Phytochemistry **43**(1): 265-272.
- Della Greca, M., M. Ferrera, A. Fiorentino, P. Monaco and L. Previtera (1998). "Antialgal compounds from *Zantedeschia Aethiopica*." Phytochemistry **49**(5): 1299 - 1304.
- Diaz-Batalla, L., J.M. Widholm, G.C. Fahey, E. Castano-Tostado and O. Paredes-Lopez (2006). "Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds *Phaseolus vulgaris*." J. Agric. Food Chem. **54**(6): 2045-2052.
- Dinelli, G., A. Bonetti, M. Minelli, I. Marotti, P. Catizone and A. Mazzanti (2006). "Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes." Food Chem. **99**: 105-114.
- Dixon, R.A. and D. Ferreira (2002). "Genistein." Phytochemistry **60**(3): 205-211.
- DNP. (2006). "Dictionary of natural products." 14.1.
- Dominik, A. and D. Steinhilber (1996). Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten, Jungjohann Verlag/Gustav Fischer Verlag.
- Erlund, I., T. Kosonen, G. Alftan, J. Maenpaa, K. Perttunen, J. Kenraali, J. Parantainen and A. Aro (2000). "Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers." Eur. J. Clin. Pharmacol. **56**(8): 545-553.
- Espinosa-Alonso, L.G., A. Lygin, J.M. Widholm, M.E. Valverde and O. Paredes-Lopez (2006). "Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans *Phaseolus vulgaris* L." J. Agric. Food Chem. **54**(12): 4436-4444.
- EuAB 5.5 Europäisches Arzneibuch Kapitel 2.8.14.
- FAO (2004). FAO-Statistical Yearbook, www.faostat.fao.org.
- Ferreres, F., E. Esteban, R. Carpena-Ruiz, M.A. Jimenez and F.A. Tomas-Barberan (1995). "Acylated flavonol sophorotriosides from pea shoots." Phytochemistry **39**(6): 1443-1446.
- Fossen, T., A.T. Pedersen and O.M. Andersen (1998). "Flavonoids from red onion (*Allium cepa*)." Phytochemistry **47**(2): 281-285.

- Frohne, D. and U. Jensen (1998). Systematik des Pflanzenreichs, Gustav Fischer Verlag.
- Füllung, O. (2000). Chinas Osten mit Beijing und Shanghai. Bielefeld, Reise Know-How Verlag Peter Rump GmbH.
- Gaitan, E., R.C. Cooksey, J. Legan and R.H. Lindsay (1995). "Anthithyroid effects *in vivo* and *in vitro* of Vitexin: a C-glucosylflavone in Millet." J. Clin. Endocrinol. Metab. **80**: 1144-1147.
- Gamez, E.J.C., L. Luyengi, S.K. Lee, L.-F. Zhu, B.-N. Zhou, H.H.S. Fong, J.M. Pezzuto and D.A. Konghorn (1998). "Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*." J. Nat. Prod. **61**: 706-708.
- Gollembeck, D., W. Wätjen, N. Weber, S. Ohler, Y. Chovolou, A. Kampkotter, P. Proksch and R. Kahl (2006). Different effects of glycosylated flavonoids in H4IIE hepatoma cells. Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.
- Gooderham, M.H., H. Adlercreutz, S.T. Ojala, K. Wahala and B.J. Holub (1996). "A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effects on plasma isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men." J. Nutr. **126**(8): 2000-2006.
- Goodmann, G.E., M.D. Thornquist, J. Balmes, M.R. Cullen, F.L. Meyskens, G.S. Omenn, B. Valanis and J.H.J. Williams (2004). "The beta-carotene and retinol efficacy trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-years follow-up after stopping  $\beta$ -carotene and retinol supplements." J. Nat. Cancer Inst. **96**: 1743 - 1750.
- Gordon, M. (1996). "Dietary antioxidants in disease prevention." Nat. Prod. Rep. **13**(4): 265-273.
- Graefe, E.U., J. Wittig, S. Mueller, A.K. Riethling, B. Uehleke, B. Drewelow, H. Pforte, G. Jacobasch, H. Derendorf and M. Veit (2001). "Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans." J. Clin. Pharmacol. **41**(5): 492-499.
- Granado, F., B. Olmedilla and I. Blanco (2003). "Nutritional and clinical relevance of lutein in human health." Brit. J. Nutr. **90**(3): 487-503.
- Hanelt, P. (2001). Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Plants, Springer.
- Hanley, A. B., P. S. Belton, G. R. Fenwick and N. F. Janes (1985). "Ring oxygenated indole glucosinolates of *Brassica* species " Phytochemistry **24**(3): 598-600.
- Harborne, J.B. and T.J. Mabry (1982). The Flavonoids: Advances in research. London, Chapman and Hall.
- Harris, D.M., E. Besselink, S.M. Henning, V.L.W. Go and D. Heber (2005). "Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or beta-mediated response in transfected breast cancer cells." Exp. Biol. Med. **230**: 558-568.
- Hayashi, T., K. Sawa, M. Kawasaki, M. Arisawa, M. Shimizu and N. Morita (1988). "Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids." J Nat Prod **51**(2): 345-348.
- Hertog, M.G., P.C. Hollman and M.B. Katan (1992). "Content of potentially anticarcinogenic Flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands." J Agric Food Chem **40**: 2379 - 2383.
- Hertog, M.G., P.C. Hollman and D.P. Venema (1992). "Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits." J. Agric. Food Chem. **40**(9): 1591-1598.
- Hollman, P.C. and I.C. Arts (2000). "Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden." J Agric Food Chem **80**: 1081-1093.
- Hostettmann, K. and A. Jacot-Guillarmod (1976). "Identification of xanthenes and new arabinosides of flavone C-glucosides from *Swertia perennis* L." Helv. Chim. Acta **59**(5): 1584-91.
- Huang, D., B. Ou and R.L. Prior (2005). "The Chemistry behind antioxidant capacity assays." J. Agric. Food Chem. **53**(6): 1841-1856.
- Inigo, R.P.A., D.I.A. De Iglesias and C.A.N. Catalan (1988). "Kaempferol 3 $\alpha$ -D-Glucopyranoside-7- $\alpha$ -L-Rhamnopyranoside from *Erythroxylon cuneifolium*." Phytochemistry **27**(4): 1230-1231.
- Itoh, T., U. Hayato and F. Yukio (2005). "Potential ability of hot water Adzuki (*Vigna angularis*) extracts to inhibit the adhesion, invasion and metastasis of murine B16 Melanoma cells." Biosci. Biotechnol. Biochem. **69**(3): 448 - 454.
- Jeong, S. J., T. H. Kang, E. B. Ko and Y. C. Kim (1998). "Flavonoids from seeds of *Phaseolus radiatus*." Saengyak Hakhoechi **29**(4): 357-359.

- Jo, B.K., G.W. Ahn, J.-H. Jeong and Y.-I. Hwang (2006). "Clinical studies on the anti-irritation effect of mung bean (*Phaseolus aureus*) extracts in cosmetics." SÖFW-Journal **132**(1/2): 8-10. 12-14, 16.
- Kahkonen, M.P., A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala and M. Heinonen (1999). "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds." J. Agric. Food Chem. **47**(10): 3954-3962.
- Kalinoswski, H.-O., S. Berger and S. Braun (1984). <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Karlsson, P.C., U. Huss, A. Jenner, B. Halliwell, L. Bohlin and J.J. Rafter (2005). "Human fecal water inhibits COX-2 in colonic HT-29 cells: role of phenolic compounds." J. Nutr. **135**(10): 2343-2349.
- Kataria, A., B.M. Chauhan and D. Punia (1989). "Antinutrients in amphidiploids (black gram x Mung bean): varietal differences and effect of domestic processing and cooking." Plant Food. Hum. Nutr. **39**: 257 - 266.
- Katsube, T., H. Tabata, Y. Ohta, Y. Yamasaki, E. Anuurad, K. Shiwaku and Y. Yamane (2004). "Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay." J. Agric. Food Chem. **52**(8): 2391-2396.
- Katsuzaki, H., H. Hibasami, S. Ohwaki, K. Ishikawa, K. Imai, K. Date, Y. Kimura and T. Komiya (2003). "Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside isolated from skin of black *Glycine max* and other anthocyanins isolated from skin of red grape induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells." Oncol. Rep. **10**(2): 297-300.
- Katzer, G. (2005). Gewürzseiten, Universität Graz - [www.uni-graz.at/~katzer/germ/index.html](http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/index.html)
- Kaur, C. and H.C. Kapoor (2002). "Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables." Int. J. Food Sci. Tech. **37**(2): 153-161.
- Kazuma, K., N. Noda and M. Suzuki (2003). "Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*." Phytochemistry **62**(1): 229 - 237.
- Keller, H., H. Hohlfeld, V. Wray, K. Hahlbrock, D. Scheel and D. Strack (1996). "Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum* " Phytochemistry **42**(2): 389-396.
- Kim, D.K., J.B. Kim, Y.S. Lee, Y.H. Kim, G.C. Park, S.W. Kim, D.M. Son and I.J. Park (2005). Methods for extracting vitexin and isovitexin from *vigna radiata* (L.) wich allows of extraction of large quantity of vitexin and isovitexin without expensive machine and extract thereof. R. k. K. T. Kongbo. South Korea. **KR 2005078386**.
- Kim, J.E., M.J. Jung, H.A. Jung, J.J. Woo, H.Y. Cheigh and J.S. Choi (2002). "A new Kaempferol-7-O-triglucoside from leaves of *Brassica juncea* L." Arch. Pharm. Res. **25**(5): 621 - 624.
- Kim, J.H., B.C. Lee, J.H. Kim, G.S. Sim, D.H. Lee, K.E. Lee, Y.P. Yun and H.B. Pyo (2005). "The isolation and antioxidant effect of vitexin from *Acer palmatum*." Arch. Pharm. Res. **28**(2): 195 - 202.
- Kim, M.J., S.J. Choi, K. H.K., C.-J. Kim, B. Hong, Y.J. Kim and D.-H. DShin (2007). "Activation effects of *Allium Tuberosum* Rottl. on choline acetyltransferase " Biosci. Biotechnol. Biochem. **71**(1): 226-230.
- Krauze-Baranowska, M. and W. Cisowski (2001). "Flavonoids from some species of the genus *Cucumis*." Biochem. Syst.Ecol. **29**(3): 321-324.
- Kris-Etherton, P.M., K.D. Hecker, A. Bonanome, S.M. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel and T.D. Etherton (2002). "Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer." Am. J. Med. **113 Suppl 9B**: 71S-88S.
- Kuiper, G.G.J.M., J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. Van der Saag, B. Van der Burg and J. Gustafsson (1998). "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ ." Endocrinology **139**(10): 4252-4263.
- Kulturpflanze, D. (1972).
- Kumarasamy, Y., M. Byres, P. J. Cox, A. Delazar, M. Jaspars, L. Nahar, M. Shoeb and S. D. Sarker (2004). "Isolation, structure elucidation, and biological activity of flavone 6-C-glycosides from *Alliaria petiolata*." Chemistry of Natural Compounds **40**(2): 122-128.

- Kuntz, S., U. Wenzel and H. Daniel (1999). "Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines." Eur. J. Nutr. **38**: 133-142.
- Kurata, R., A. Masaru, O. Yamakawa and M. Yoshimoto (2007). "Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*ipomoea batatas* L.) leaves." J Agric Food Chem **55**: 185 -190.
- Lal, A., S. Warber, A. Kirakosyan, P. Kaufmann and J. Duke (2003). "Upregulation of isoflavonoids and soluble proteins in edible legumes by light and fungal elicitor treatments." J. Altern. Complement.Med. **9**(3): 371 - 378.
- Lawson, K.A., M.F. Wright, A. Subar, T. Mouw, A. Hollenbeck, A. Schatzkin and M.F. Leitzmann (2007). "Multivitamin Use and Risk of Prostate Cancer in the National Institutes of Health – AARP Diet and Health Study." J Natl Cancer Inst **99**: 754 - 764.
- Lehmann, C. O. (1954). "Das morphologische System der Saaterbsen *Pisum sativum* L. sens. lat.Gov. ssp.*sativum*." Der Züchter - Zeitschrift für theoretische und angewandte Genetik **24**(11-12): 316-337.
- Lehmann, C. O. (1962). "Ein Beitrag zur Systematik der Sojabohnen (*Glycine max* (L.) Merr.)." Der Züchter - Zeitschrift für theoretische und angewandte Genetik **32**(5): 229-249.
- Lewis, P., S. Kaltia and K. Wähälä (1998). "The phase transfer catalysed synthesis of isoflavone-O-glucosides." J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 **16**: 2481-2484.
- Li, P., H. Anu, S. Jari, Y. Teijo and V. Heikki (1999). "TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of repaseed meal by video scanning technology." Proceedings of the 10th International rapeseed congress (Canberra/Australia)  
[www.regional.org.au/au/gc/1/551.htm](http://www.regional.org.au/au/gc/1/551.htm).
- Lin, C.-C., S.-J. Wu, J.-S. Wang, J.-J. Yang and C.-H. Chang (2001). "Evaluation of the antioxidant activity of legumes." Pharmaceutical Biology **39**(4): 300-304.
- Lin, P.-Y. and H.-M. Lai (2006). "Bioactive compounds in Legumes and their germinated products." J Agric Food Chem **54**: 3807 - 3814.
- Lindig-Crisneros, R., B. Benrey and F.J. Espinosa-Garcia (1997). "Phytoalexins, resistance trains, and domestication status in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus lunatus*." J. Chem. Ecol. **23**(8): 1997-2011.
- Link, L.B. and J.D. Potter (2004). "Raw versus cooked vegetables and cancer risk." Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **13**(9): 1422 - 1435.
- Lu, Y., Y. Sun, L.Y. Foo, W.C. McNabb and A.L. Molan (2000). "Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*." Phytochemistry **55**(1): 67-75.
- Mabry, T.J., K.R. Markham and M.B. Thomas (1970). The systematic identification of flavonoids, Springer Verlag.
- Maréchal, Mascherpa and Stainier (1978). Etude taxonomique des genres *Phaseolus* et *Vigna* Papilionaceae, Publications des conservatoire et Jardin Botaniques de la ville de Genève - Boissiera.
- Matkowski, A., D. Wozniak, E. Lamer-Zarawska, J. Oszmianski and L. A. (2003). "Flavonoids and phenol carboic acids in the oriental medical plant *Astragalus membranaceus* acclimated in Poland." Z. Naturforsch. C **58**(7-8): 602-604.
- McNally, D.J., K.V. Wurms, C. Labbe, S. Quideau and R.R. Belanger (2003). "Complex C-glycosyl flavonoid phytoalexins from *Cucumis sativus*." J. Nat. Prod. **66**(9): 1280-1283.
- Mergheim, R., M. Jay, N. Brun and B. Voirin (2004). "Qualitative analysis and HPLC isolation and identification of procyanidins from *Vicia faba*." Phytochem. Anal. **15**(2): 95-99.
- Micheal, N., S.N. Guergues and R.N. Sandak (1998). "Studies on some phenolic and flavonoid content of *Vicia faba* hulls and their antibacterial activity." Egyptian journal of pharmaceutical sciences **38**(4-6): 435-450.
- Michels, G., G.R.M.M. Haenen, W. Wätjen, S. Rietjens and A. Bast (2004). "The thiol reactivity of the oxidation product of 3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one containing flavonoids." Toxicology Letters **151**: 105-111.
- Michels, G. (2005). Vergleichende Untersuchungen protektiver und zytotoxischer Effekte von Polyphenolen in kultivierten Säugerzellen. Institut für Pharmakologie und Toxikologie. Düsseldorf, Heinrich - Heine Universität.

- Michels, G., W. Wätjen, P. Niering, B. Steffan, Q.-H. Tran-Thi, Y. Chovolou, A. Kampkotter, A. Bast, P. Proksch and R. Kahl (2005). "Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells." Toxicology **206**: 337-348.
- Michels, G., G.A. Mohamed, N. Weber, Y. Chovolou, A. Kampkotter, W. Wätjen and P. Proksch (2006). "Effects of Methylated Derivatives of Luteolin Isolated from *Cyperus alopecuroides* in Rat H4IIE Hepatoma Cells." Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol. **98**(2): 168-172.
- Middleton, E.J. and G. Drzewiecki (1982). "Effects of flavonoids and transitional metal cations on antigen-induced histamine release from human basophils." Biochem. Pharmacol. **31**(7): 1449-1453.
- Miller, E., R. Pastor-Barriuso, D. Dalal, R.A. Riemersma, L.J. Appel and E. Guallar (2005). "Meta-Analysis: High dosage vitamin E supplementation may increase all cause mortality." Ann. Intern. Med. **142**: 37 - 46.
- Morito, K., T. Hirose, J. Kinjo, T. Hirakawa, M.M. Okawa, T. Nohara, S. Ogawa, S. Inoue, M. Muramatsu and Y. Masamune (2001). "Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ ." Biol. Pharm. Bull. **24**(4): 351 - 356.
- Murota, K., S. Shimizu, S. Miyamoto, T. Izumi, A. Obata, M. Kikuchi and J. Terao (2002). "Unique uptake and transport of Isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: Comparison of Isoflavonoids and Flavonoids." J. Nutr. **132**: 1956-1961.
- Murthy, M. S. R., E. V. Rao and R. S. Ward (1986). "Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of isoflavones." Magn. Reson. Chem. **24**(3): 225-230.
- Naidoo, L.A.C., S.E. Drewesa, J. Van Staden and A. Hutchingsb (1992). "Exocarpic acid and other compounds from tubers and inflorescences of *Sarcophyte sanguinea* " Phytochemistry **31**(11): 3929-3931.
- Nakagawa, H., K. Hasumi, J.-T. Woo, K. Nagai and M. Wachi (2004). "Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate." Carcinogenesis **25**(9): 1567-1574.
- Nakamura, Y., A. Kaihara, K. Yoshii, Y. Tsumura, S. Ishimitsu and Y. Tonogai (2001). "Content and Composition of Isoflavonoids in Mature or Immature Beans and Bean Sprouts Consumed in Japan." Journal of Health Science **47**(4): 294.
- NDL (2006). USDA's National Nutrient Database for Standard Reference/Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center/Agricultural Research Service/United States Department of Agriculture ([www.ars.usda.gov/nutrientdata](http://www.ars.usda.gov/nutrientdata)).
- Nomura, E., A. Kashiwada, A. Hosoda, K. Nakamura, H. Morishita, T. Tsuno and H. Taniguchi (2003). "Synthesis of amide compounds of ferulic acid, and their stimulatory effects on insulin secretion in vitro." Bioorg. Med. Chem. **11**(17): 3807-3813.
- Nozzolillo, C., L. Ricciardi and V. Lattanzio (1989). "Flavonoid constituents of seed coats of *Vicia faba* (Fabaceae) in relation to genetic control of their color." Can. J. Bot. **67**(5): 1600-1604.
- Ohkawa, M., J. Kinjo, Y. Hagiwara, H. Hagiwara, H. Ueyama, K. Nakamura, R. Ishikawa, M. Ono and T. Nohara (1998). "Three new anti-oxidative saponarin analogs from young green Barley leaves." Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **46**(12): 1887 - 1890.
- Okawa, M., J. Kinjo, T. Nohara and M. Ono (2001). "DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants." Biol. Pharm. Bull. **24**(10): 1202-1205.
- Olthof, M.R., P.C. Hollman, P.L. Zock and M.B. Katan (2001). "Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans." Am. J. Clin. Nutr. **73**: 532-538.
- Onda, M., S. Li, X. Li, Y. Harigaya, H. Takahashi, H. Kawase and H. Kagawa (1989). "Heterocycles, XXIV. Synthesis of Optically Pure 2,3-trans-5,7,3,4,5-Pentahydroxyflavan-3,4-diols and comparison with naturally occurring Leucodelphinidins." J. Nat. Prod. **52**(5): 1100-1106.
- Pahlow, M. (2001). Das grosse Buch der Heilpflanzen. München, Gräfe und Unzer Verlag GmbH.
- Park, H.-J., J.-H. Park, J.-O. Moon, K.-T. Lee, W.-T. Jung, S.-R. Oh and H.-K. Lee (1999). "Isoflavone glycosides from the flowers of *Pueraria thunbergiana* " Phytochemistry **51**(1): 147-51.
- Pauli, G.F., U. Kuczkowiak and A. Nahrstedt (1999). "Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids." Magn. Reson. Chem. **37**(11): 827-836.

- Pannala, A.S., T.S. Chan, P.J. O'Brien and C. Rice-Evans (2001). "Flavonoid B-Ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics." Biochem. Biophys. Res. Commun. **282**: 1161 - 1168.
- Pietta, P.G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." J. Nat. Prod. **63**(7): 1035-1042.
- Pitot, H. C., C. Pareino, P. A. Morse and V. A. Potter (1964). "Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver *in vivo*." Natl. Cancer Inst. Monogr. **13**: 229-242.
- Plumb, G.W., M.T. Garcia-Conesa, K.P. A., M. Rhodes, S. Ridley and G. Williamson (1999). "Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora." J. Sci. Food Agric. **79**(3): 390-392.
- Potapovich, A.I. and V.A. Kostyuk (2003). "Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids." Biochemistry (Mosc) **68**(5): 514-519.
- Prabhakar, M.C., H. Bano, I. Kumar, M.A. Shamsi and M.S. Khan (1981). "Pharmacological investigations on vitexin." Planta Med **43**(4): 396-403.
- Prior, R.L. (2003). "Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage." Am. J. Clin. Nutr. **78**(Suppl.): 570S-578S.
- Que, F., L. Mao and X. Zheng (2007). "*In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of Daylily flowers and the involvement of phenolic compounds." Asia. Pac. J. Clin. Nutr. **16**(Suppl.1): 196-203.
- Rademaker, M. and A. Young (2000). "Contact dermatitis to *Asparagus officinalis*." Aust. J. Dermatol. **41**(4): 262-263.
- Reinwald, S. and C.M. Weaver (2006). "Soy isoflavones and bone health: a double-edged sword?" J. Nat. Prod. **69**(3): 450-459.
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller and G. Paganga (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." Free Radic. Biol. Med. **20**(7): 933-956.
- Rimpler, H. (1999). Biogene Arzneistoffe. Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag.
- Rohr, U. (2006). "Die Bedeutung des Estrogen-Rezeptors beta." DAZ **146**(45): 68 - 74.
- Romani, A., P. Vignolini, C. Galardi, C. Aroldi, C. Vazzana and D. Heimler (2003). "Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions." J. Agric. Food Chem. **51**(18): 5301-5306.
- Rozema, J., L.O. Björn, J.F. Bornman, A. Gaberscik, D.-P. Häder, T. Trost, M. Germ, M. Klisch, A. Gröniger, R.P. Sinha, M. Lebert, Y.-Y. He, R. Buffoni-Hall, N.V.J. de Bakker, J. van de Staaij and B.B. Meijkamp (2002). "The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems - an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds." J. Photochem. Photobiol. B: Biology **66**: 2-12.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., C. Provost and N. Vivas (1999). "Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods." J. Agric. Food Chem. **47**(2): 425-431.
- Santos-Buelga, C. and A. Scalbert (2000). "Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health." J. Sci. Food Agric. **80**(7): 1094-1117.
- Sarla, M., M. Darshan and S.D. Kuldip (1988). "Proximate composition and antinutritional factors in rice bean (*Vigna umbellata*)." Plant Food. Hum. Nutr. **38**: 75 - 81.
- Sato, E., M. Kohno, H. Hamano and Y. Nivano (2006). "Increased anti-oxidative potency of Garlic by spontaneous short-term fermentation." Plant Food. Hum. Nutr. **61**: 157 - 160.
- Scalbert, A., C. Manach, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **45**(4): 287-306.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." J. Nutr. **130**(8S Suppl): 2073S-2085S.
- Schlupper, D., S. Giesa and R. Gebhardt (2006). "Influence of Biotransformation of Luteolin, Luteolin 7-O-Glucoside, 3',4'-Dihydroxyflavone and Apigenin by Cultured Rat Hepatocytes on Antioxidative Capacity and Inhibition of EGF Receptor Tyrosine Kinase Activity." Planta Med. **72**: 596-603.
- Schuchert, W. (2007). Kulturpflanzenausstellung, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln - [www.mpiz-koeln.mpg.de](http://www.mpiz-koeln.mpg.de)
- Schuster, W. and J. Alkämper (1998). Leguminosen zur Kornnutzung - Kornleguminosen der Welt. Gießen, Förderverein Tropeninstitut Gießen.
- Scientific Committee on Food/ Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2006). Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals European Food Safety Authority.

- Senevirante, G.I. and J.B. Harborne (1992). "Constitutive Flavonoids and induced Isoflavonoids as taxonomic markers in the genus *Vigna*." Biochem. Syst. Ecol. **20**(5): 459 - 467.
- Shen, C.-C., Y.-S. Changa and L.-K. Hottb (1993). "Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids." Phytochemistry **34**(3): 843-845.
- Siciliano, T., N. DeTommasi, I. Morelli and A. Braca (2004). "Study of Flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) Different Edible Organs by Liquid Chromatography Photodiode Array Mass Spectrometry." J. Agric. Food Chem. **52**(21): 6510-6515.
- Singleton, V.L. and J.J.A. Rossi (1965). "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents." Am. J. Enol. Vitic. **16**(3): 144-158.
- Starke, H. and K. Herrmann (1976). "Flavonols und Flavones of vegetables." Z. Lebenm. Unters.-Forsch. **161**: 25 - 30.
- Steffan, B. (2005). Inhaltsstoffe aus Pflanzen der indonesischen Volksmedizin (Jamu): Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften. Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Steffan, B., W. Wätjen, G. Michels, P. Niering, V. Wray, R. Ebel, R. Edrada, R. Kahl and P. Proksch (2005). "Polyphenols from plants used in traditional Indonesian medicine (Jamu): uptake and antioxidative effects in rat H4IIE hepatoma cells." J. Pharm. Pharmacol. **57**: 233- 240.
- Steinberg, D. and J.L. Witztum (2002). "Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?" Circulation **105**(17): 2107-2111.
- Sujay, R., W. Atul, M. Kakali, P.S. Bishnu and K.M. Pulok (2006). "Antioxidant aktivty of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds." J. Ethnopharm. **104**(3): 322 - 327.
- Teuscher, E., M. Melzig and U. Lindequist (2004). Biogene Arzneimittel, Wissenschaftliche Verlagsgessellschaft mbH Stuttgart.
- Tilstra, L., M. C. Sattler, W. R. Cherry and M. D. Barkley (1990). "Fluorescence of a rotationally constrained tryptophan derivative, 3-carboxy-1,2,3,4-tetrahydro-2-carboline." J. Am. Chem. Soc. **112**: 9176 - 9182.
- Todd, J.J. and L.O. Vodkin (1993). "Pigmented soybean (*Glycine max*) seed coats accumulate proanthocyanidins during development." Plant Physiol **102**: 663 - 670.
- Tomczyk, M., J. Gudej and M. Saohacki (2002). "Flavonoids from *Ficaria verna* Huds." Z. Naturforsch. C **57**: 440-444.
- Trethewey, R. (2006). "Plant metabolomics: Small molecules take center stage." Planta Medica **72**: 961.
- Tsao, R. and R. Yang (2003). "Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography." J Chromatogr A **1018**(1): 29-40.
- Tsukaho, H. and O. Yoshimoto (1985). "Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate, and elevation of medium pH." Plant Cell Physiol. **26**(6): 1101 - 1110.
- Ujiki, M.B., X.-Z. Ding, M.R. Salabat, D.J. Bentrem, L. Golkar, B. Milam, M.S. Talamonti, R.H.J. Bell, T. Iwamura and T.E. Adrian (2006). "Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest." Mol. Cancer **5**: 76.
- Van Acker, S.A.B.E., M.J. de Groot, D.-J. van den Berg, M.N.J.L. Tromp, G. Donné-Op den Kelder, W.J.F. van der Vijgh and A. Bast (1996). "A quantum chemical explanantion of the antioxidant activity of Flavonoids." Chem. Res. Toxicol. **9**(1305-1312).
- Vierstra, R. D., T. R. John and K. L. Poff (1982). "Kaempferol 3-O-Galactoside, 7-O-Rhamnoside is the Major Green Fluorescing Compound in the Epidermis of *Vicia faba*." Plant Physiol. **69**(2): 522-525.
- Vinson, J.A., Y. Hao, X. Su and L. Zubik (1998). "Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Vegetables." J. Agric. Food Chem. **46**(9): 3630-3634.
- Vinson, J. A., X. Su, L. Zubik and P. Bose (2001). "Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits." J Agric Food Chem **49**(11): 5315-21.
- Walgren, R.A., J.-T. Lin, R.K.H. Kinne and T. Walle (2000). "Cellular uptake of dietary flavonoid Quercetin-4'- $\beta$ -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1." J. Pharmacol. Exp. Ther. **294**: 837-843.

- Walle, T., A.M. Browning, L.L. Steed, S.G. Reed and U.K. Walle (2005). "Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans." *J. Nutr.* **135**: 48 - 52.
- Walle, T. and U.K. Walle (2003). "The  $\beta$ -D-Glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1)-inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins 1/2." *Drug Metab. Dispos.* **31**(11): 1288-1291.
- Wang, Z.-q., N. Weber, Y.-j. Lou and P. Proksch (2006). "Prenylflavonoids as Nonsteroidal phytoestrogens and related structure-activity relationship." *ChemMedChem* **1**(4): 482 - 488.
- Wätjen, W., G. Michels, B. Steffan, P. Niering, Y. Chovolou, A. Kampkotter, T.-T. Quynh-Hoa, P. Proksch and R. Kahl (2005). "Low concentration of Flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis." *J. Nutr.* **135**: 525-531.
- Wätjen, W., N. Weber, Y.-j. Lou, Z.-q. Wang, Y. Chovolou, A. Kampkotter, R. Kahl and P. Proksch (2007). "Prenylation enhances Flavonoid Cytotoxicity in Rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells." *Food Chem. Toxicol.* **45**(1): 119-124.
- Wen, D., C. Li, H. Di, Y. Liao and H. Liu (2005). "A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines." *J Agric Food Chem* **53**(17): 6624-9.
- Whitaker, B.D. and J.R. Stommel (2003). "Distribution of hydroxycinnamic acid conjugates in fruit of commercial eggplant (*Solanum melongena L.*) cultivars." *J. Agric. Food Chem.* **51**(11): 3448-3454.
- Wolffram, S., M. Blöck and P. Ader (2002). "Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine." *J. Nutr.* **132**: 630-635.
- Xie, C., N. C. Veitch, P. J. Houghton and M. S. Simmonds (2003). "Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* MAKINO." *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **51**(10): 1204-7.
- Yaginuma, S., T. Shiraishi, H. Ohya and K. Igarashi (2002). "Polyphenol increases in safflower and cucumber seedlings exposed to strong visible light with limited water." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**(1): 65-72.
- Yokozawa, T., H.Y. Kim, E.J. Cho, J.S. Choi and H.Y. Chung (2002). "Antioxidant Effects of Isorhamnetin-3,7-di- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated from Mustard leaf (*Brassica juncea*) in rats with Streptozotocin-induced Diabetes." *J Agric Food Chem* **50**: 5490 - 5495.
- Yoshida, K., T. Kondo, M. Ito and T. Kondo (2005). "Analysis of Polyphenols in Water Extracts of Red Adzuki Bean, *Vigna angularis*." *ITE Letters on Batteries, New Technologies & Medicine* **6**(3): 226 - 231.
- Zhang, Y., X.Z. Wu and Z.Y. Yu (2002). "Comparison study on total flavonoid content and anti-free radical activity of leaves of bamboo, *phyllostachys nigra*, and *Ginkgo biloba*." *Zhong guo Zhong yao za zhi* **27**(4): 320.
- Zhao, Q.-w., B. Li, N. Weber, Y.-j. Lou and P. Proksch (2005). "Estrogen-like effects of ethanol extracts from several Chinese legumes on MCF-7 cell." *Eur. Food Res. Technol.* **211**(6): 828-833.
- Zou, J.-H., J.-S. Yang, Y.-S. Dong, L. Zhuou and G. Lin (2005). "Flavone C-glycosides from flowers of *Trollius ledebouri*." *Phytochemistry* **66**: 1121-1125.

## 6. Abkürzungen

$[\alpha]_D$	spezifische Rotation bei der D-Linie des Natriums
Abb	Abbildung
ACN	Acetonitril
amu	Atomic Mass Unit
aq.	aquosum
ANOVA	Analysis of variance
b	breites NMR-Signal
$\text{CHCl}_3$	Chloroform
Ch.	chinesisch
cm	Zentimeter
COSY	Correlation Spectroscopy (meist H-H-COSY)
$\delta$	chemische Verschiebung
d	Dublett
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	deutscher Arzneimittel Codex
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distorsionsless Enhancement by Polarisation Transfer
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- $d_6$	deutertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNP	dictionary of natural products
DPPH	diphenylpicrylhydrazyl
Dt.	deutsch
EAB	Europäisches Arzneibuch
EC	effectiv concentration
ESI	Electrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
EtOAc	Ethylacetat
FPLC	Flüssig/Flüssigverteilungschromatographie
FC	Folin-Ciocalteu
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FG	Frischgewicht

FP	Freie Polyphenole
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HHU	Heinrich-Heine-Universität
g	Gramm
GP	Gesamtpolyphenole
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
HMBC	Hetero Multinuclear Bond Coherence
HMQC	Hetero Multinuclear Quantum Coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC-DAD	HPLC mit Diodenarray-Detektor
HPLC-UV	HPLC mit UV-Detektor
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
Hz	Hertz
L	Liter
LC	Lethal Concentration
LC-MS	HPLC mit Massendetektor
m	Multiplett
M	Molar
(M)	Markgewebe
MeOH	Methanol
MeOD	deuteriertes Methanol
MHz	Mega Hertz
mg	Milligramm
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl- Tetrazoliumbromid
m/z	Masse pro Ladung
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ml	Milliliter

NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
pH	Wasserstoffionen-Exponent
ppm	parts per million
q	Quartett
ROESY	rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy
ROS	reactive oxygen species, reactive Sauerstoffspezies
RP	reversed phase
RPE	relativer proliferativer Effekt
Rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
s	Singulett
(S)	Schalengewebe
SC	Säulenchromatographie
SD	standard deviation, Standardabweichung
t	Triplet
Tab	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
TMS	Tetramethylsilan
UV	Ultraviolett
Vgl	Vergleich
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol

## 7. Anhang

### 7.1. Herbar – Bildmaterial

#### *Vigna radiata*



Abb.A1: *Vigna radiata* – Abbildung von Samen, Blatt und Blüte

#### *Vigna angularis*



Abb.A2: *Vigna angularis* – Abbildung von Samen, Blatt und Blütenstand

*Glycine max*



**Abb.A3:** *Glycine max* – Abbildung von Samen, Blatt und Blütenstand

*Phaseolus coccineus*



**Abb.A4:** *Phaseolus coccineus* – Abbildung von Samen, Blüte, Blatt und Blütenstand

*Vicia faba*



**Abb.A5:** *Vicia faba* – Abbildung von Blatt, Blüte und Blütenstand

*Pisum sativum*



**Abb.A6:** *Pisum sativum* – Abbildung von Samen, Blatt, Blüte und Blütenstand

***Phaseolus vulg. var. vulgaris***



**Abb.A7:** *Phaseolus vulg. var. vulgaris* – Abbildung von Samen, Blatt und Blüte

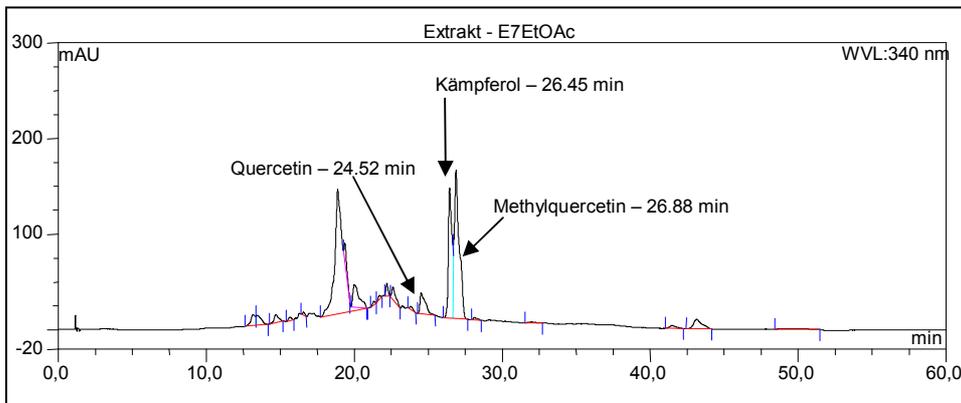
***Phaseolus vulg. var. nanus***



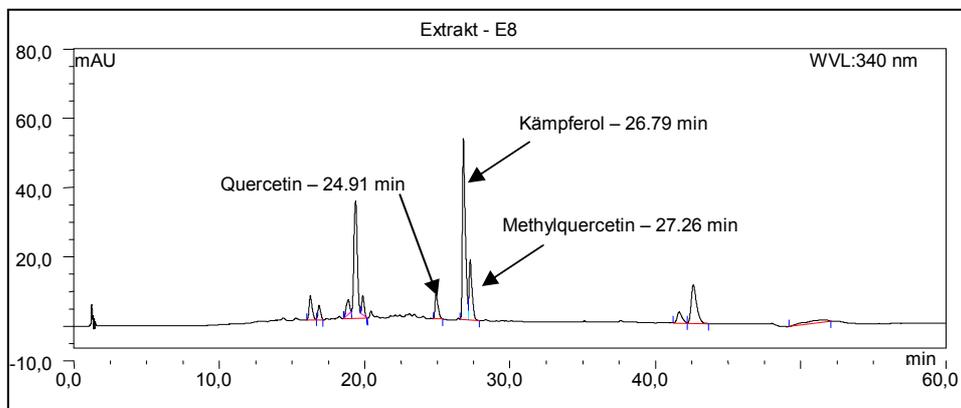
**Abb.A8:** *Phaseolus vulg. var. nanus* – Abbildung von Samen, Blatt und Blütenstand

## 7.2. HPLC-Chromatogramme der eingelegten und getrockneten Gemüse

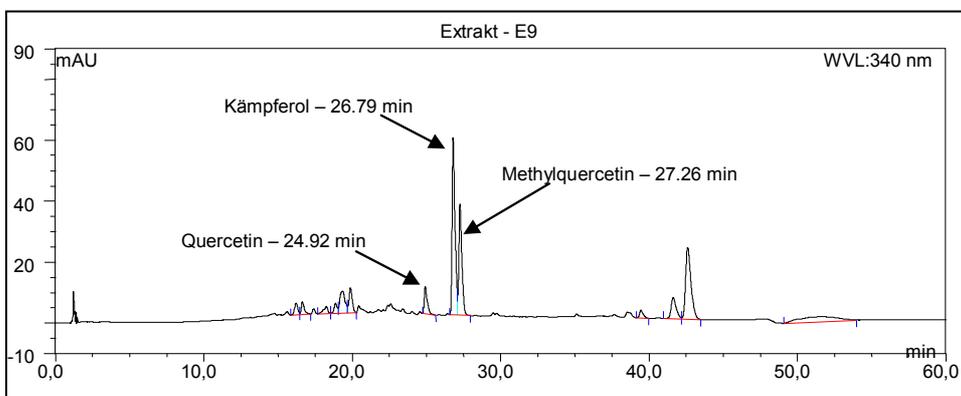
### 7.2.1. HPLC-Chromatogramme der eingelegten Gemüse



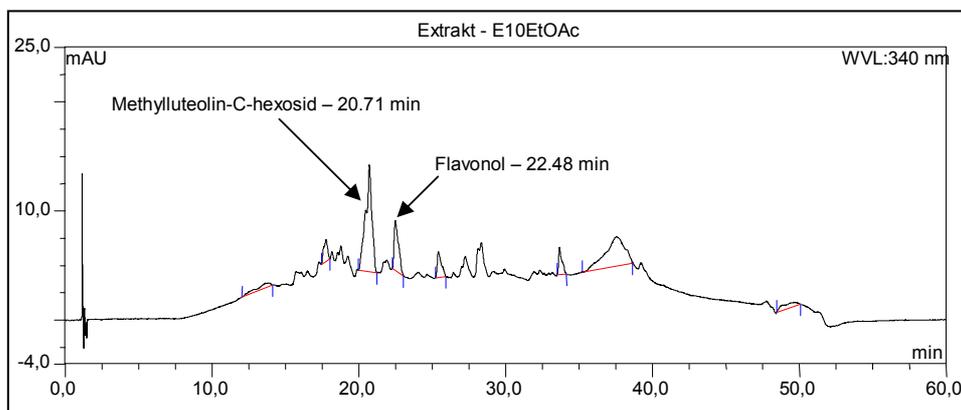
**Abb.A9:** HPLC-Chromatogramm Extrakt-E7 (Ethylacetataufreinigung, *Brassica juncea* var. (Blätter)), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm



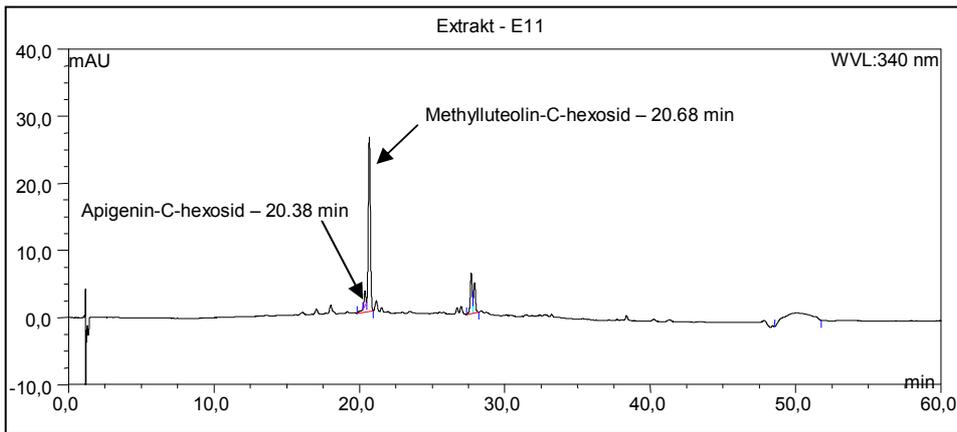
**Abb.A10:** HPLC-Chromatogramm Extrakt-E8 (100%MeOH, *Brassica juncea* var. (Blätter)), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm



**Abb.A11:** HPLC-Chromatogramm Extrakt-E9 (100%MeOH, *Brassica juncea* var. (Blätter)/ *Phyllostachys spec.*), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm

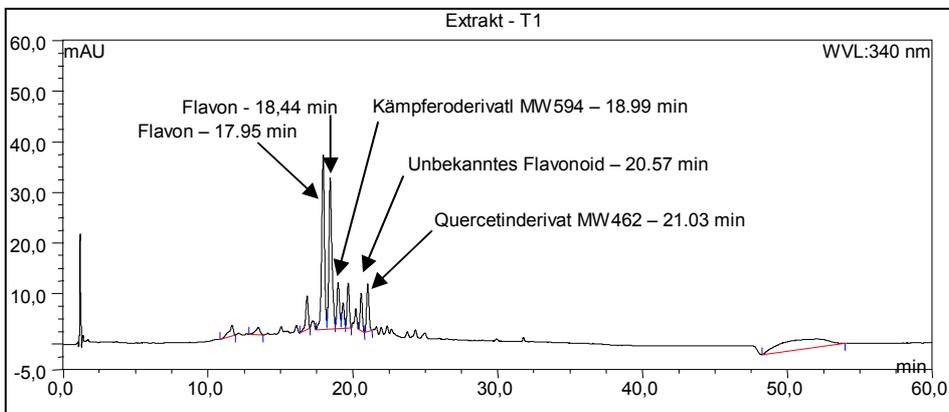


**Abb.A12:** HPLC-Chromatogramm Extrakt-E10 (Ethylacetataufreinigung, *Cucumis sativus* var.), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm

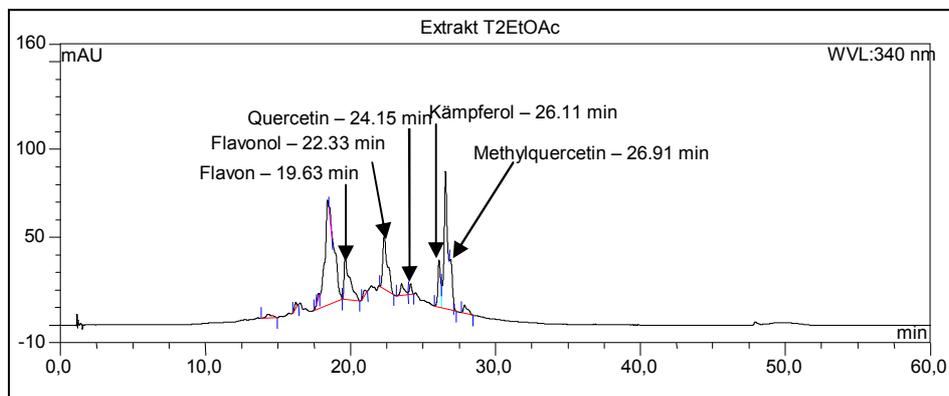


**Abb.13:** HPLC-Chromatogramm Extrakt-E11 (100% MeOH, *Cucumis sativus* var.), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm

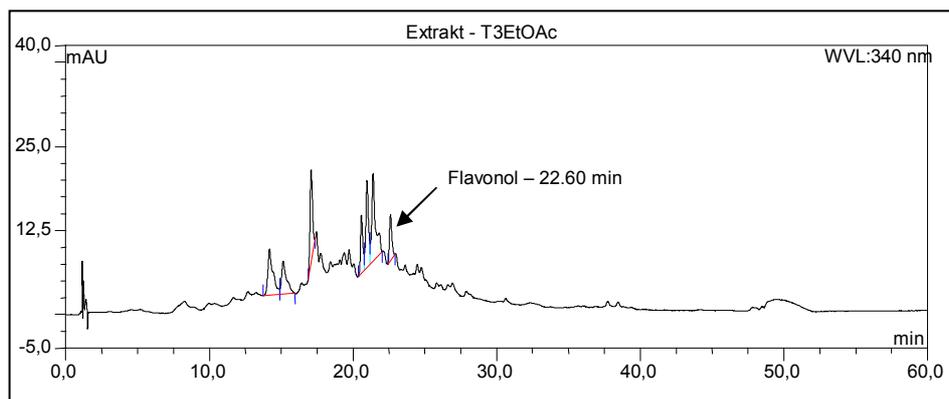
### 7.2.2. HPLC-Chromatogramme der getrockneten Gemüse



**Abb.A14:** HPLC-Chromatogramm Extrakt-T1 (100% MeOH, *Nelumbo nucifera* (Semen nelumbinis)), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm



**Abb.A15:** HPLC-Chromatogramm Extrakt-T2 (Ethylacetataufreinigung, *Brassica juncea* var.(Blätter)), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm



**Abb.A16:** HPLC-Chromatogramm Extrakt-T3 (Ethylacetataufreinigung, *Astragalus membranaceus*), Standardgradient, Wellenlänge 340 nm

### 7.3. NMR-Spektren

#### 7.3.1. NMR-Spektren der Flavanole

##### Catechin

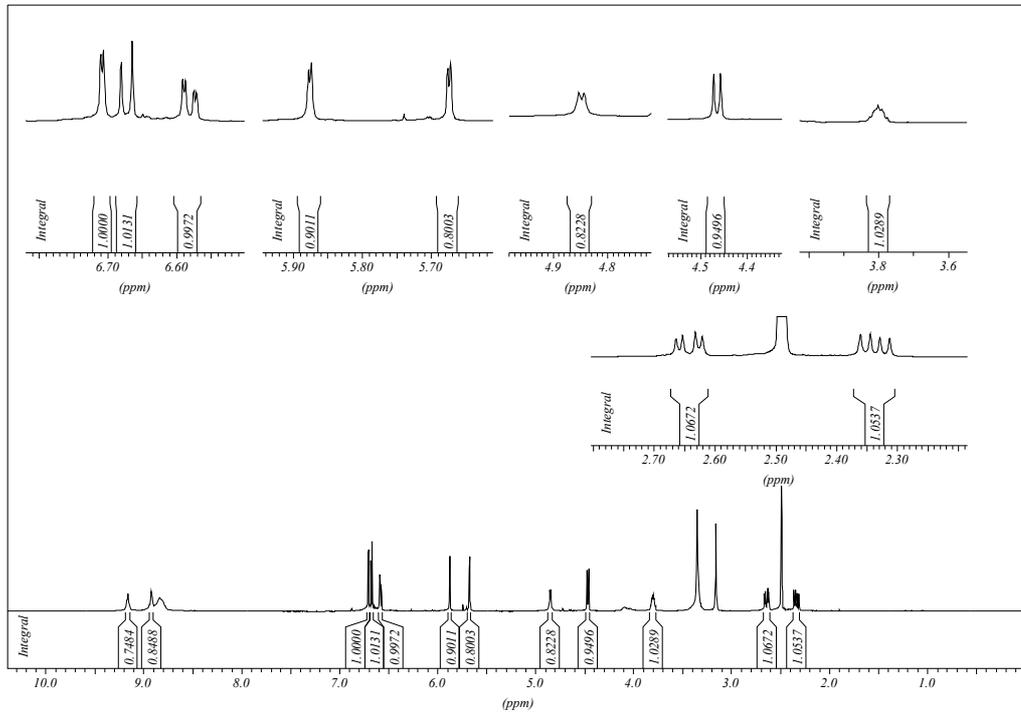


Abb.A17:  $^1\text{H-NMR}$  Catechin in  $\text{DMSO-d}_6$

##### Epicatechin

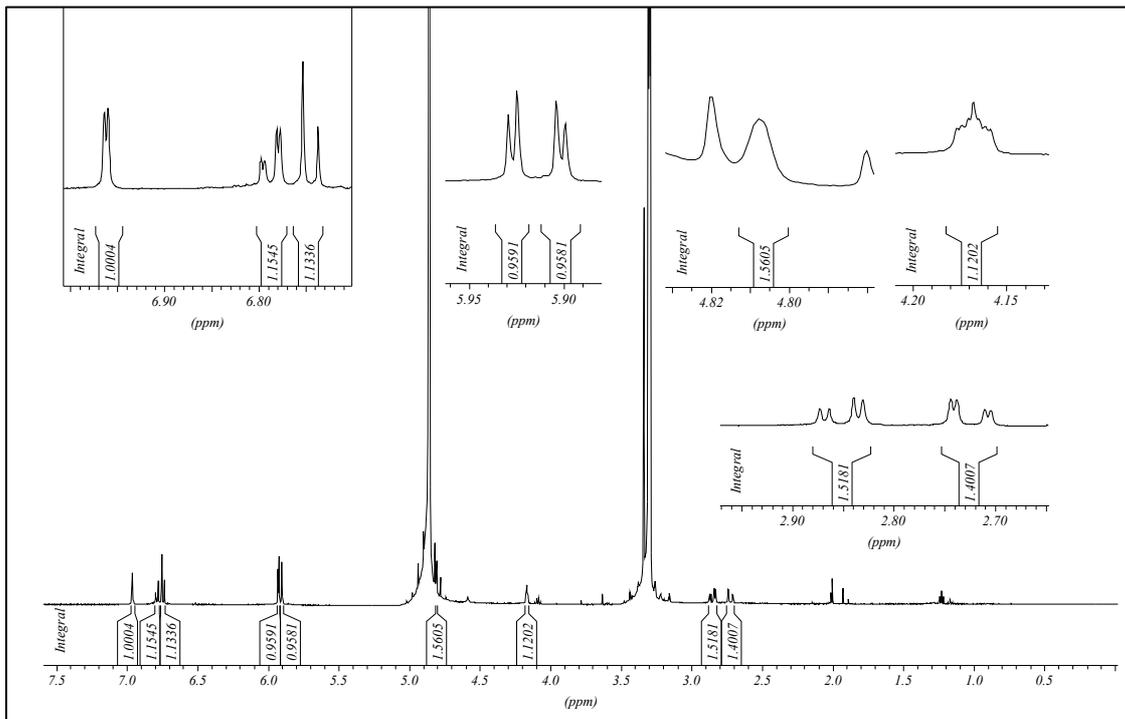
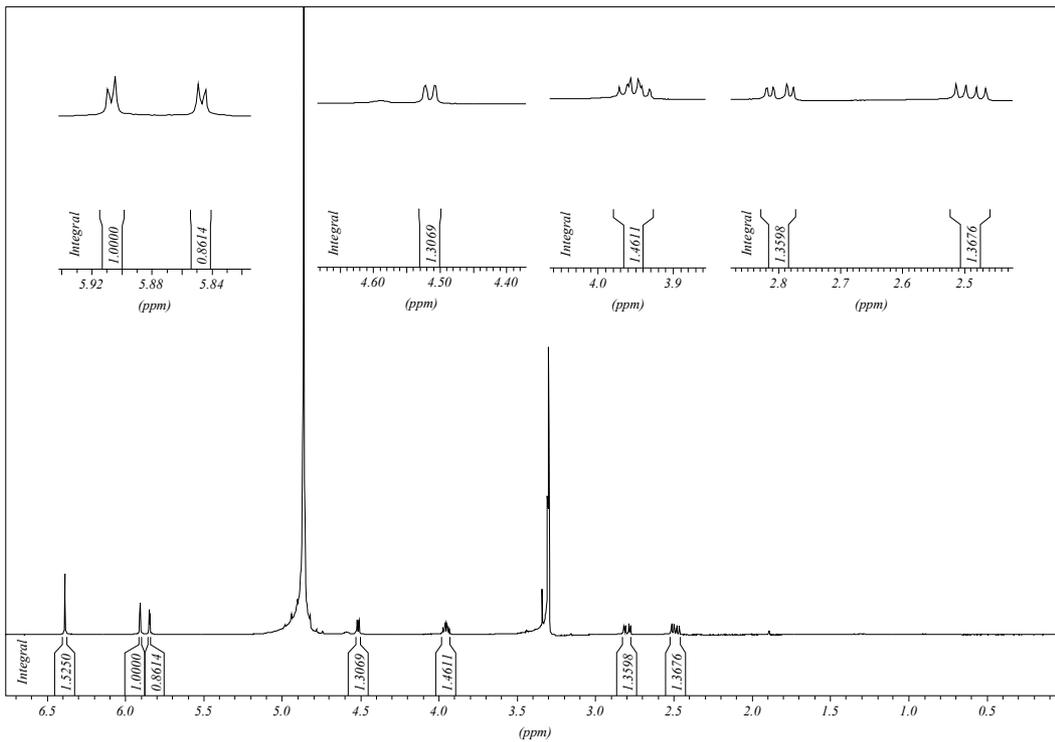
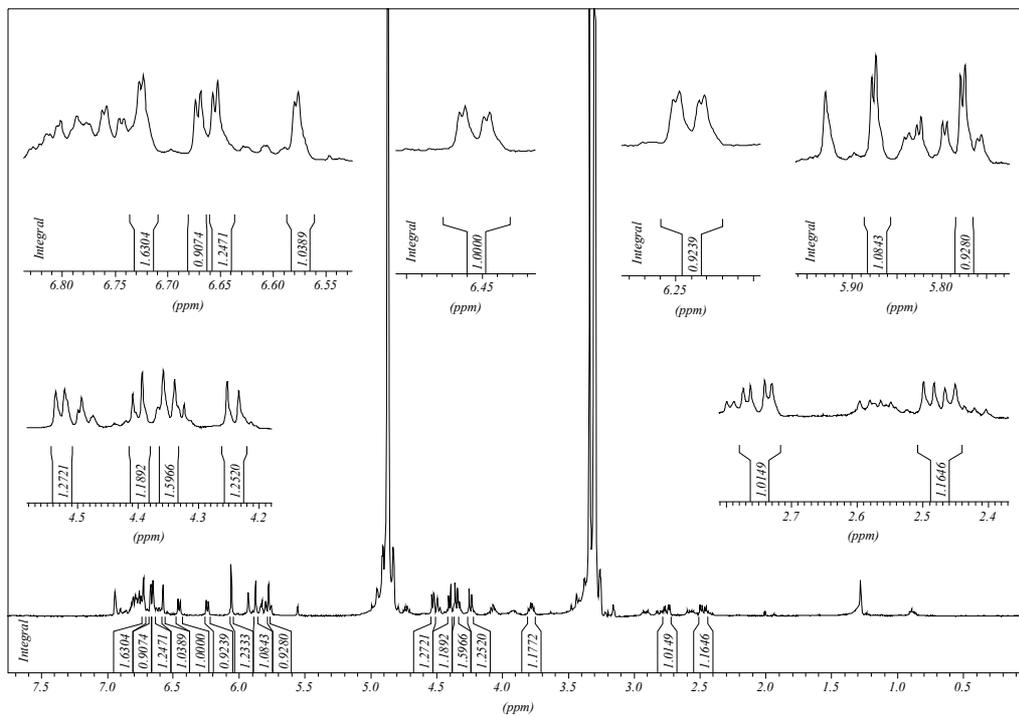


Abb.A18:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Epicatechin in  $\text{CD}_3\text{OD}$

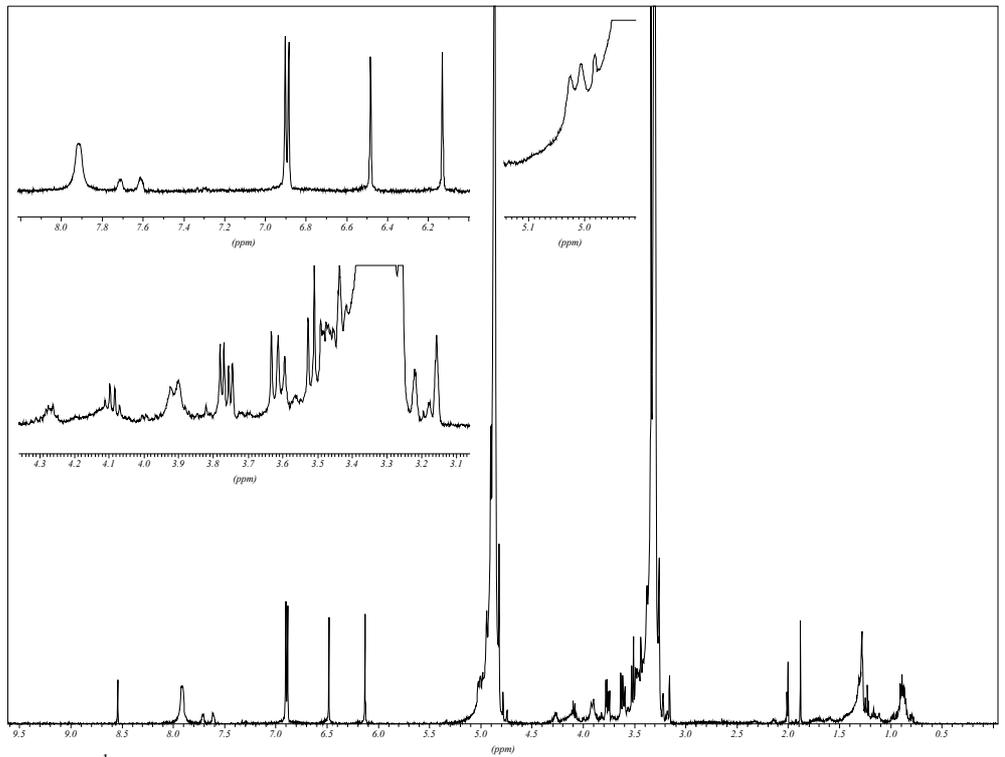
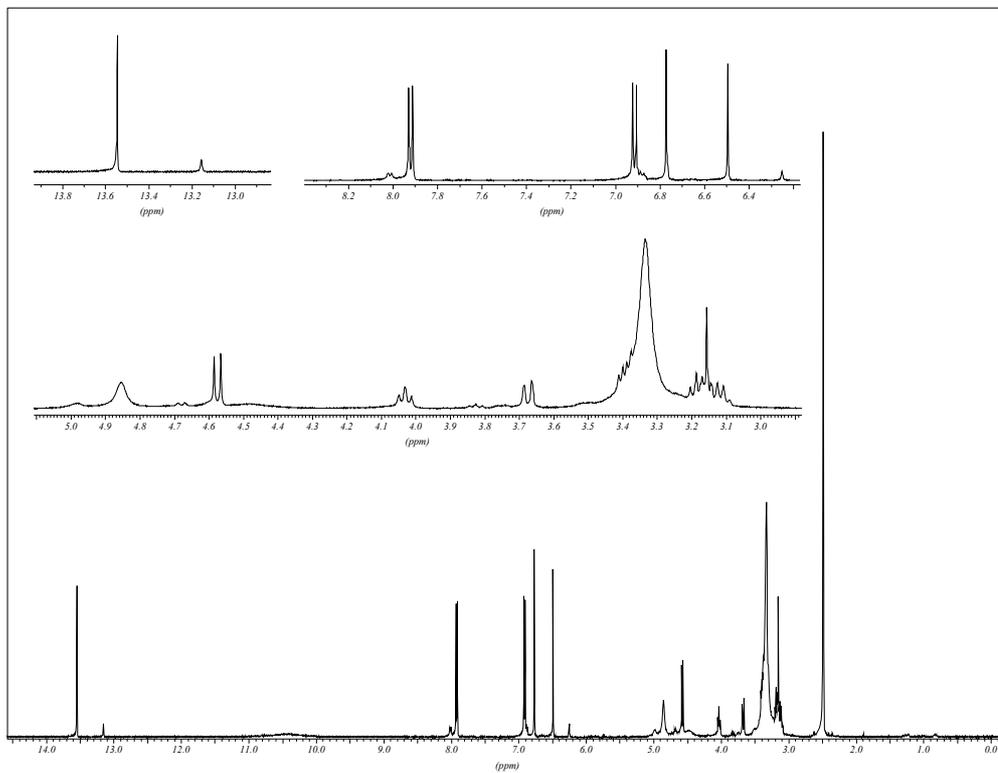
## Gallocatechin

Abb.A19:  $^1\text{H}$ -NMR Gallocatechin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

## Procyanidin B3 oder B6

Abb.A20:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum Procyanidin B3/B6 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

## 7.3.2. NMR-Spektren der Flavone

VitexinAbb.A21:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Vitexin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ IsovitexinAbb.A22:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum Isovitexin in  $\text{DMSO-d}_6$

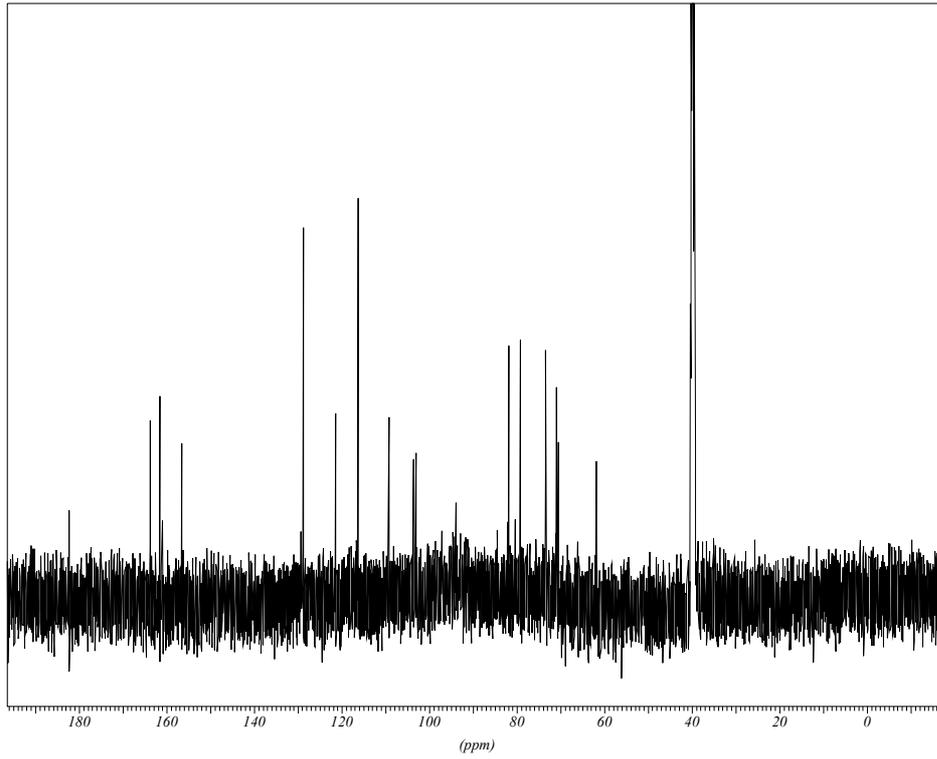


Abb.A23:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Isovitecin in  $\text{DMSO-d}_6$

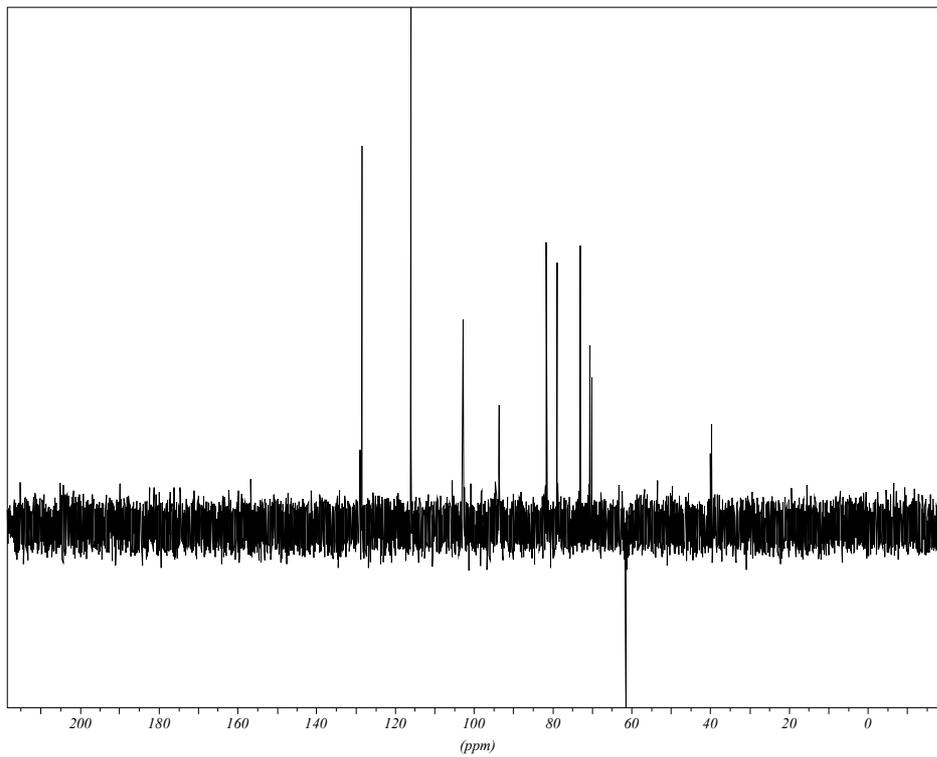
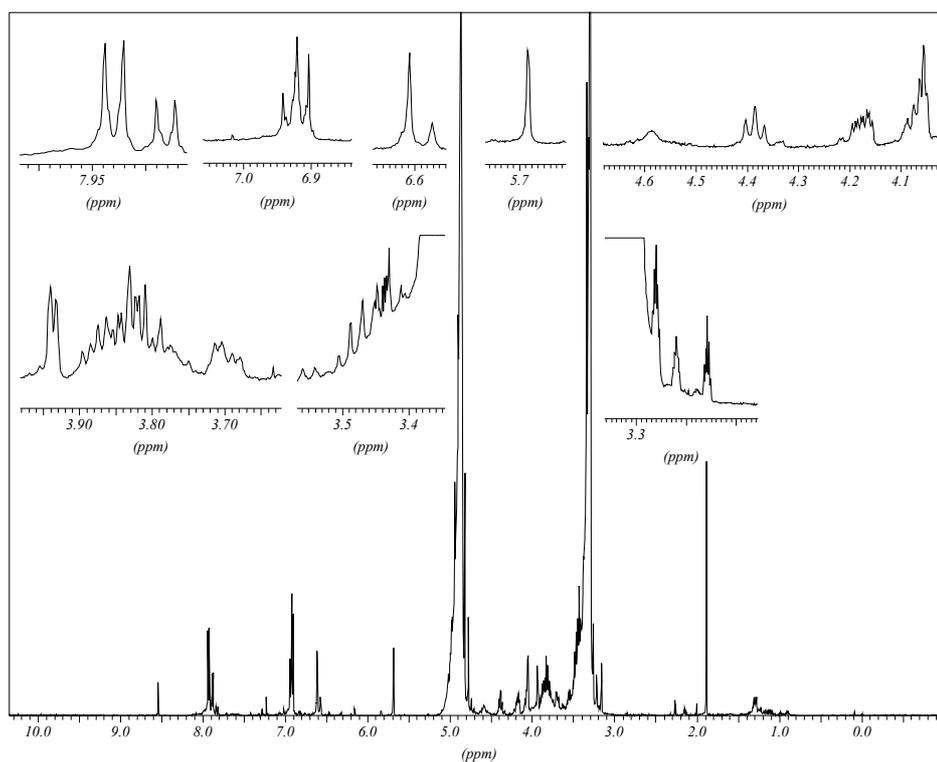
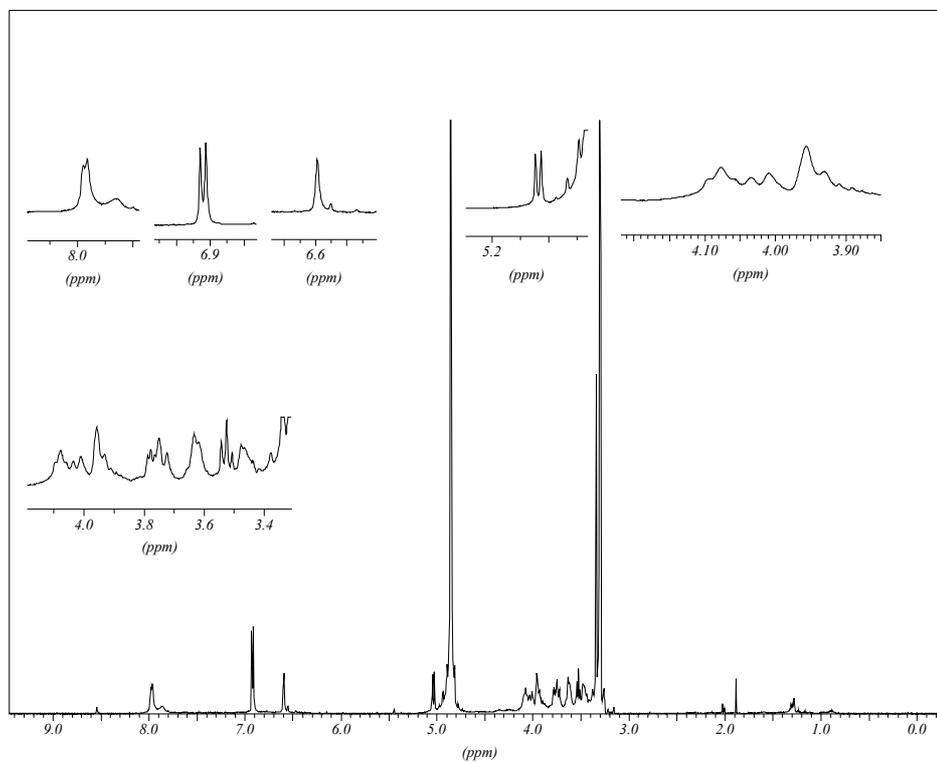


Abb.A24: DEPT-Spektrum von Isovitecin in  $\text{DMSO-d}_6$

P5BdPr4 (Apigenin-6C-glucosyl-8C-arabinosid)Abb.A25:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum P5BdPr4 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ IsoschaftosidAbb.A26:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Isoschaftosid in  $\text{CD}_3\text{OD}$

P5MW564B (Apigenin-6C-xylosyl-8C-galactosid)

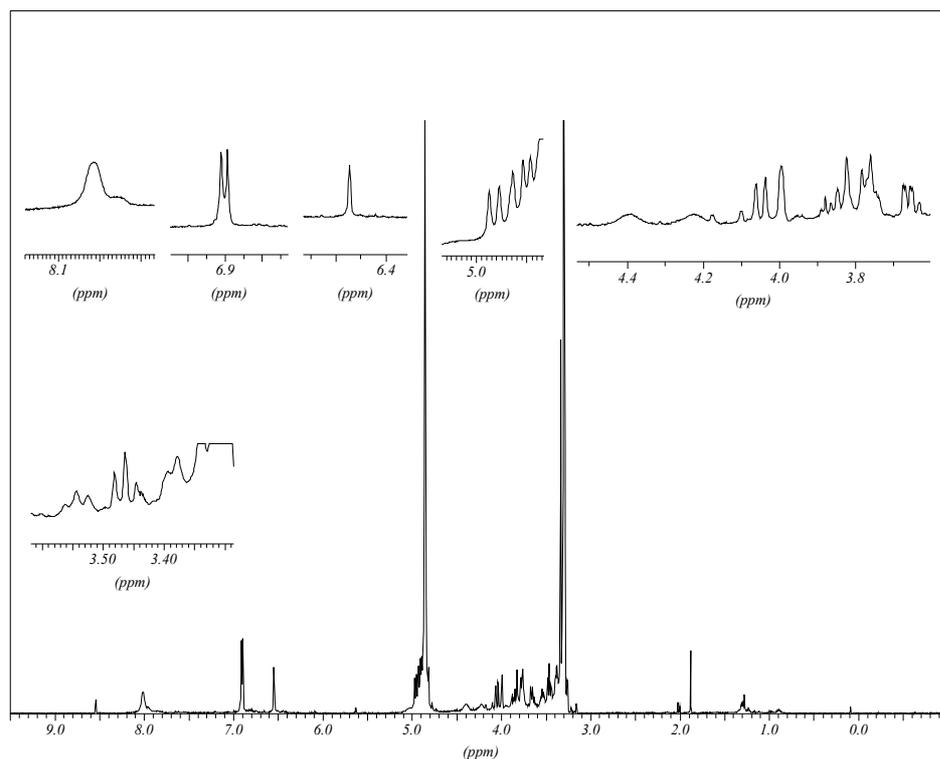


Abb.A27: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum P5MW564B in CD<sub>3</sub>OD

P5MW594 (Apigenin-6,8 C -dihexosid)

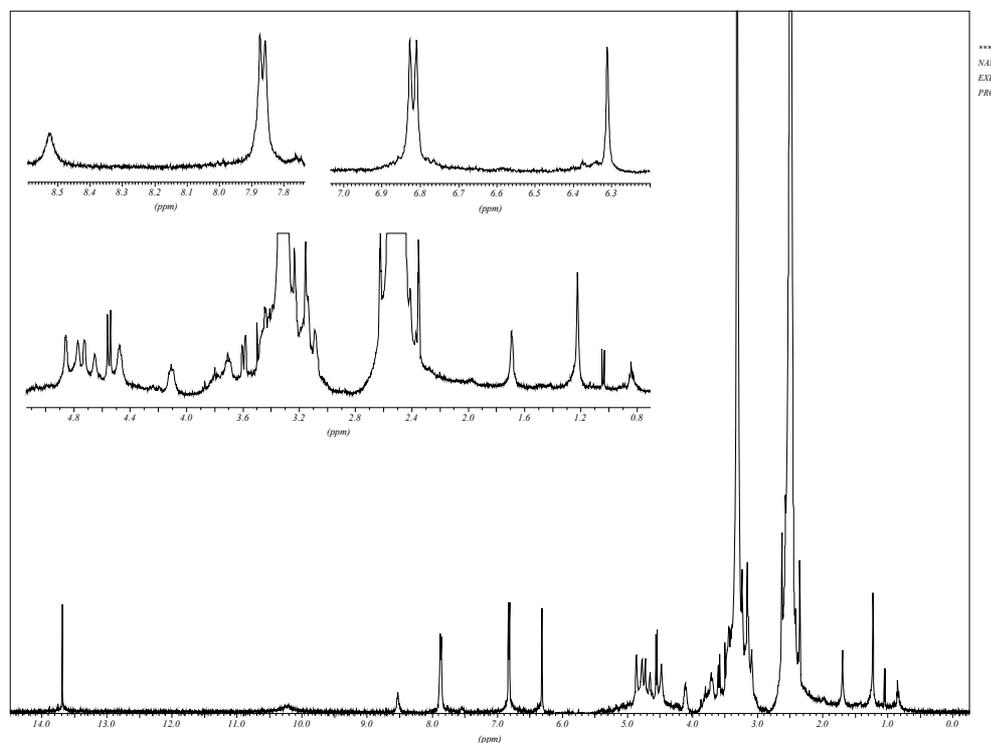
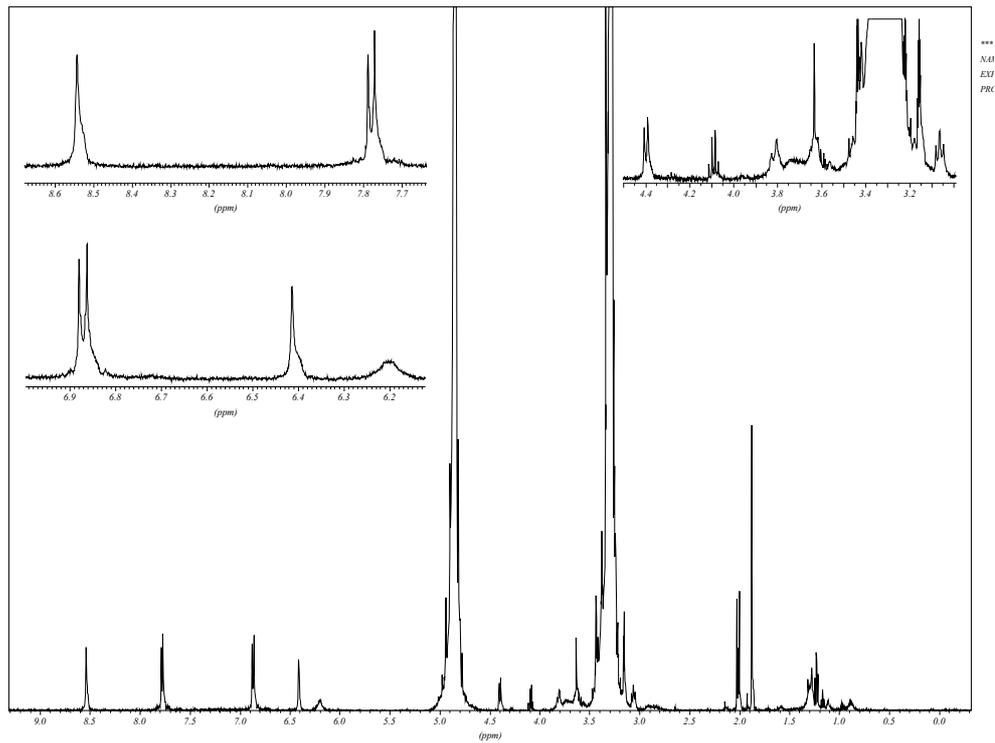
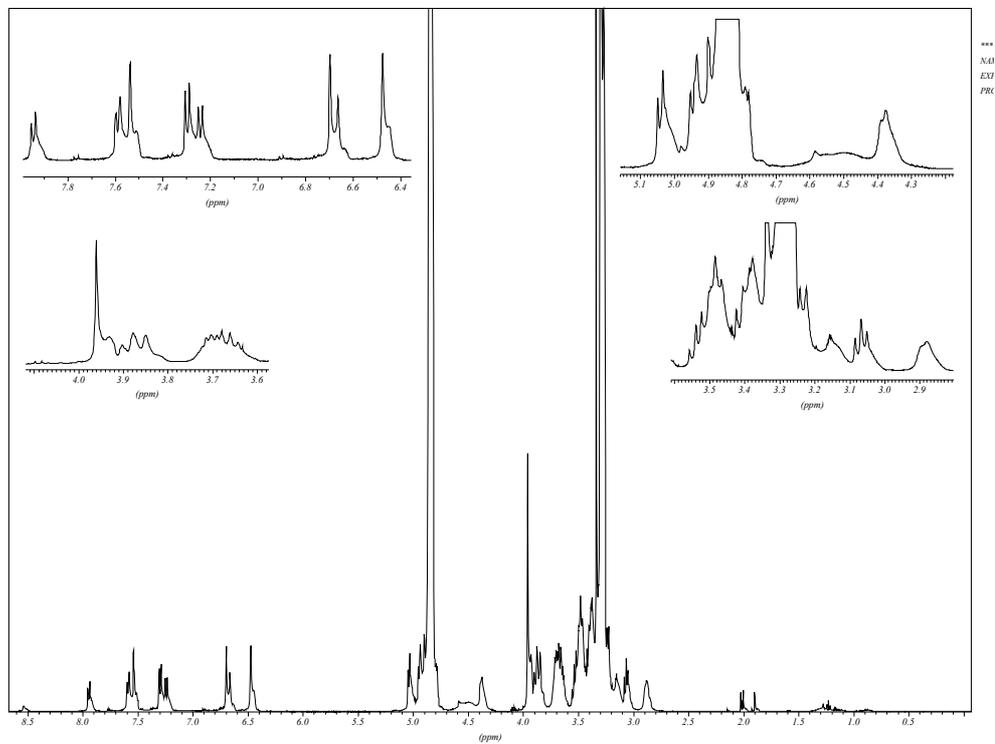
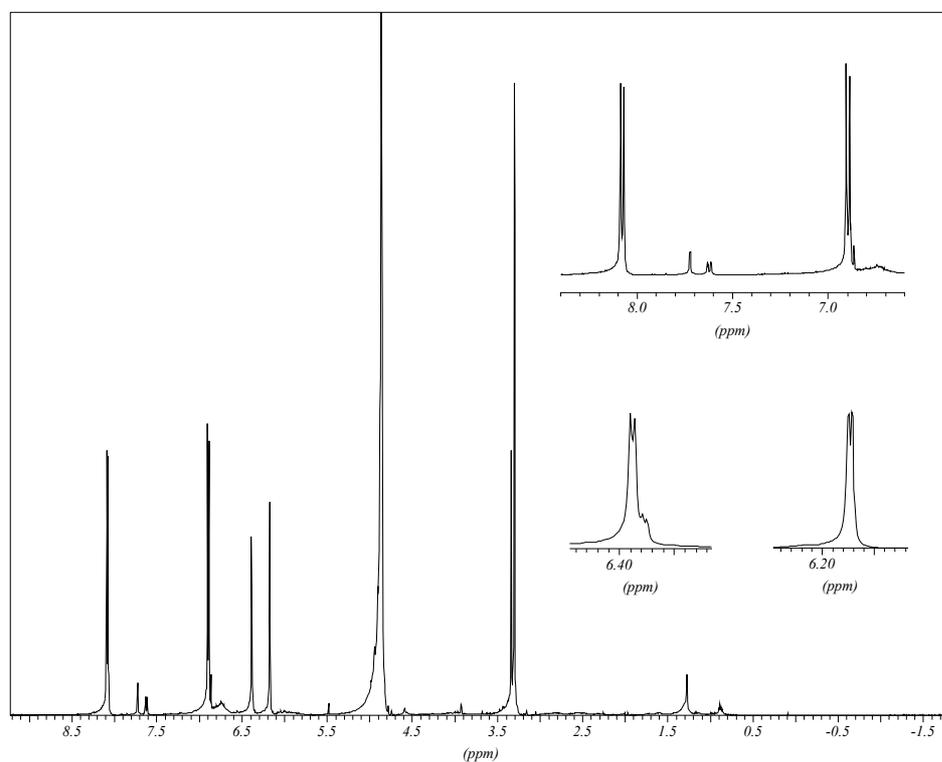
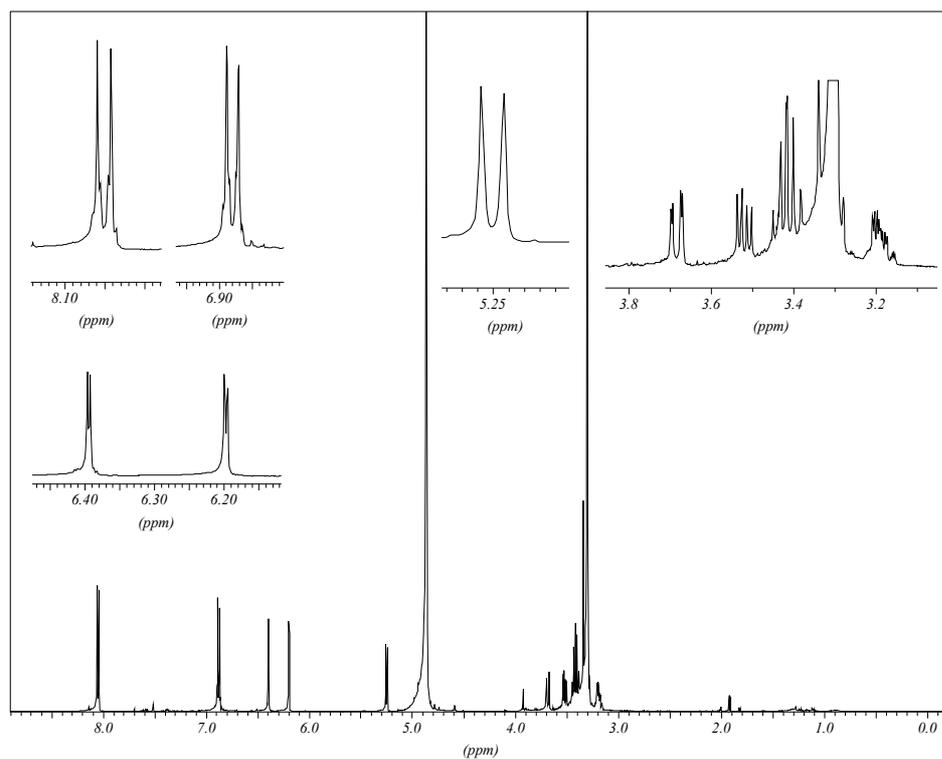
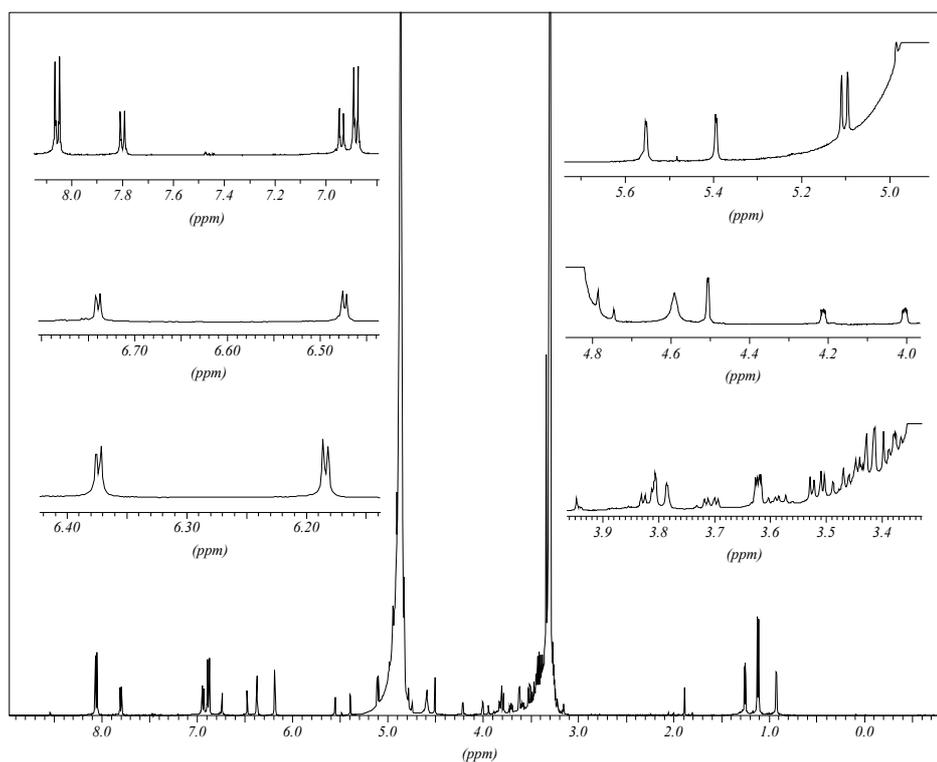
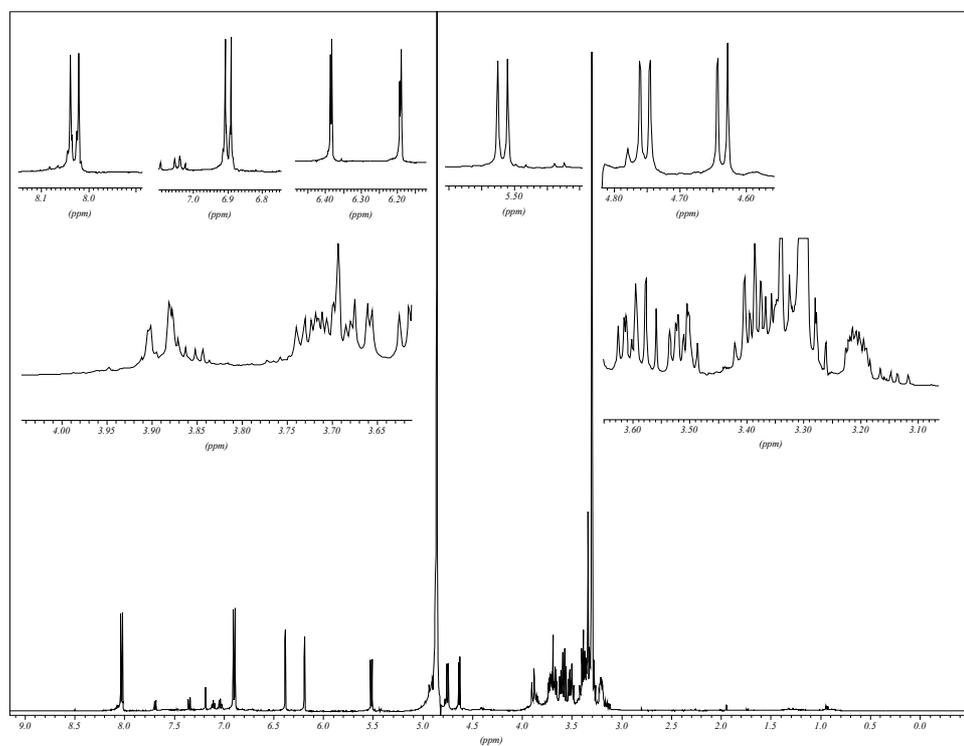


Abb.A28: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum P5MW594 in DMSO-d<sub>6</sub>

GD2WHLPr1 (Apigenin-6C-diglycosid)Abb.A29: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum GD2WHLPr1 in CD<sub>3</sub>ODGD2WHHPr1 und -Pr2 (Apigenin- und Chrysoeriol-4'-O-6C-X-trihexosid)Abb.A30: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum GD2WHHPr1 /-Pr2 in CD<sub>3</sub>OD

## 7.3.3. NMR-Spektren der Flavonole

KämpferolAbb.A31:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Kämpferol in  $\text{CD}_3\text{OD}$ AstragalinAbb.A32:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Astragalin in  $\text{CD}_3\text{OD}$

NicotiflorinAbb.A33:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum Nicotiflorin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ Kämpferol-3O-sophorotriosidAbb.A34:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Kämpferol-3O-sophorotriosid in  $\text{CD}_3\text{OD}$

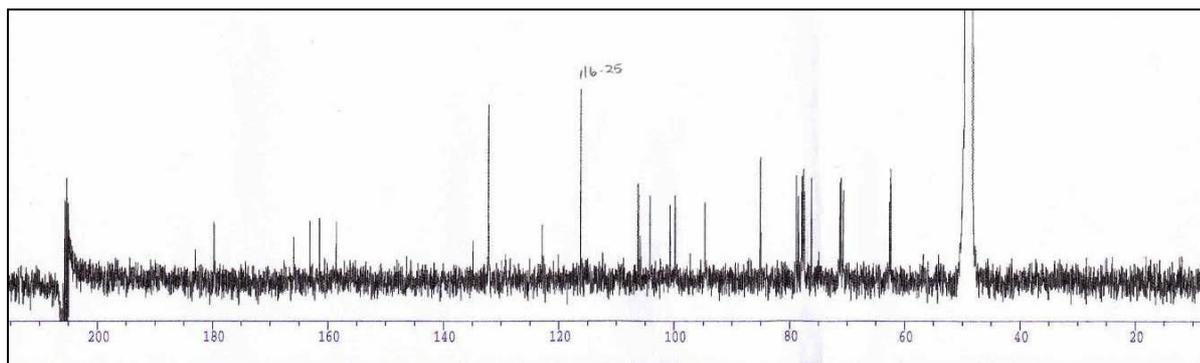


Abb.A35:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Kämpferol-3O-sophorotriosid in  $\text{CD}_3\text{OD}$

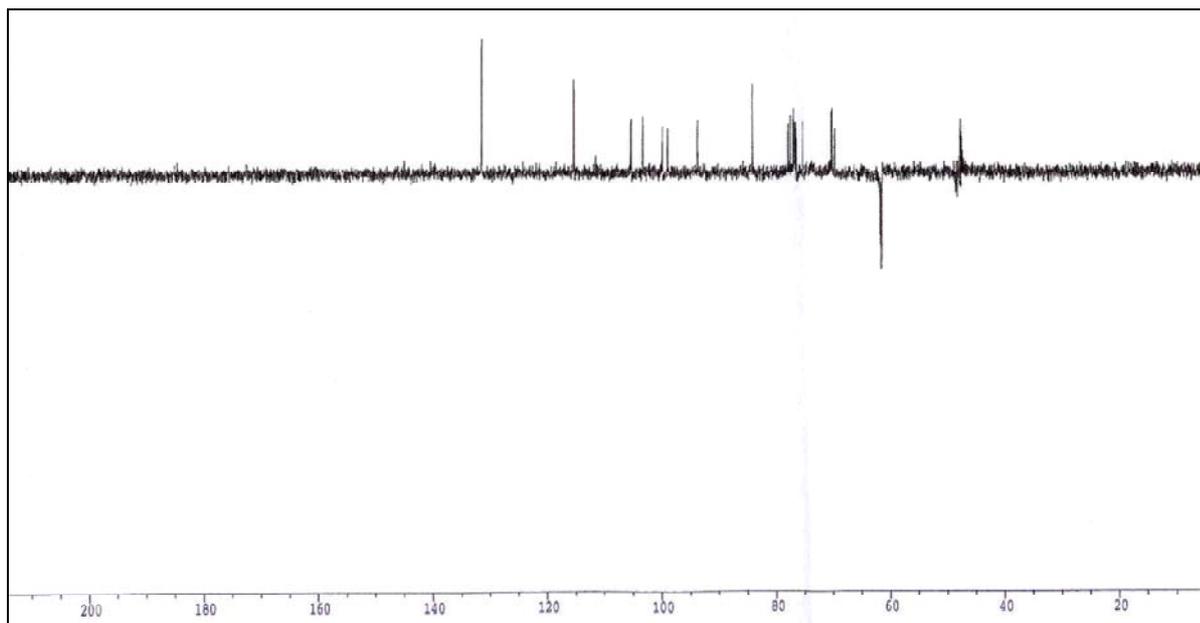


Abb.A36: DEPT-Spektrum von Kämpferol-3O-sophorotriosid in  $\text{CD}_3\text{OD}$

Kämpferol-3O-glucosyl-7O-rhamnosid

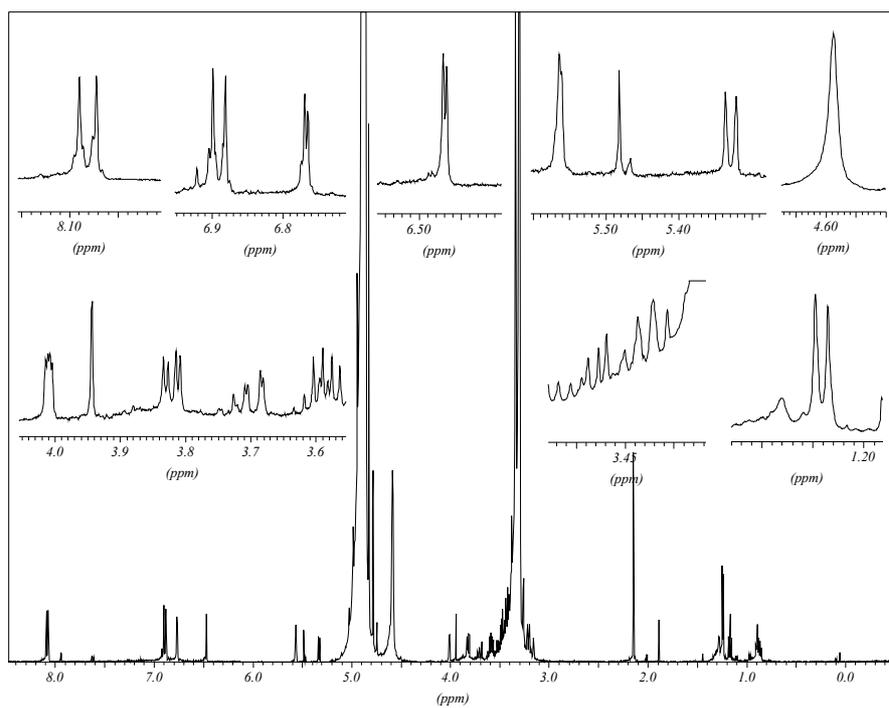
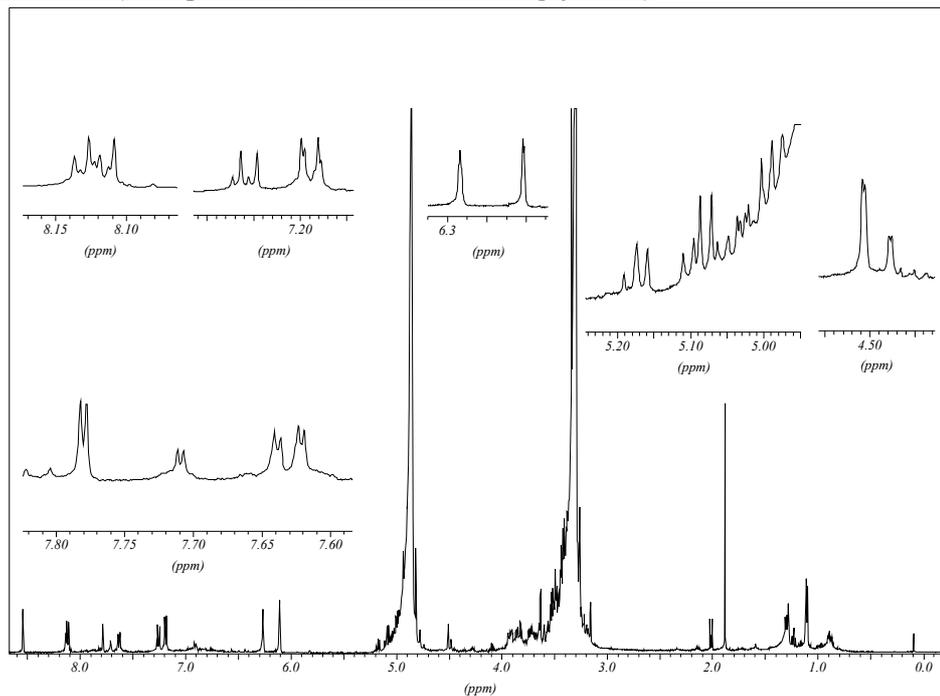
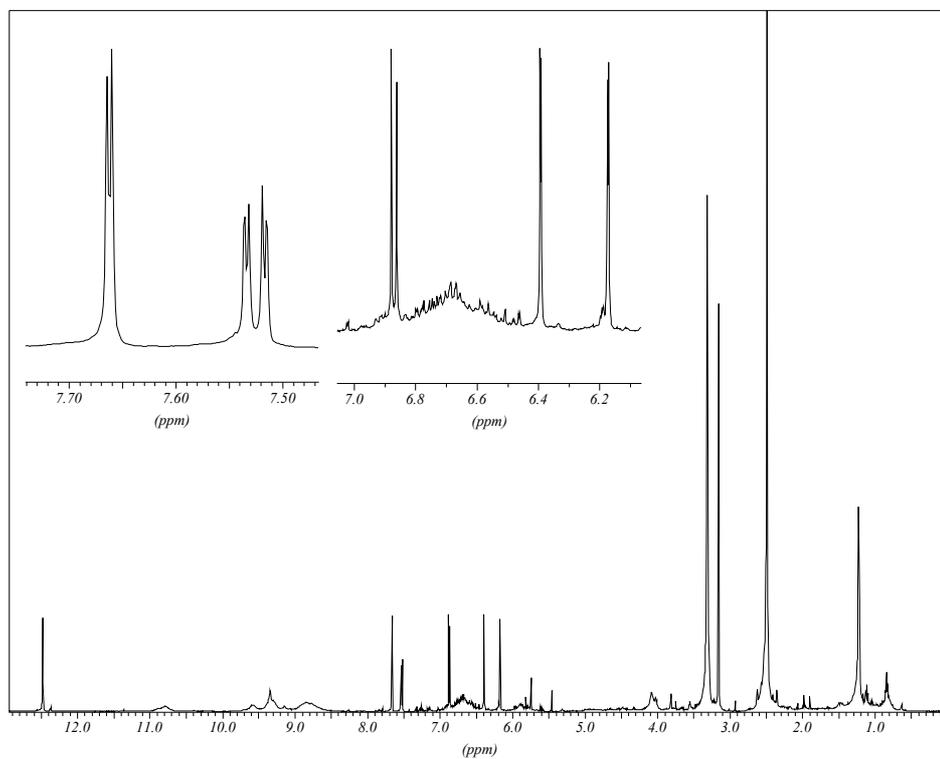
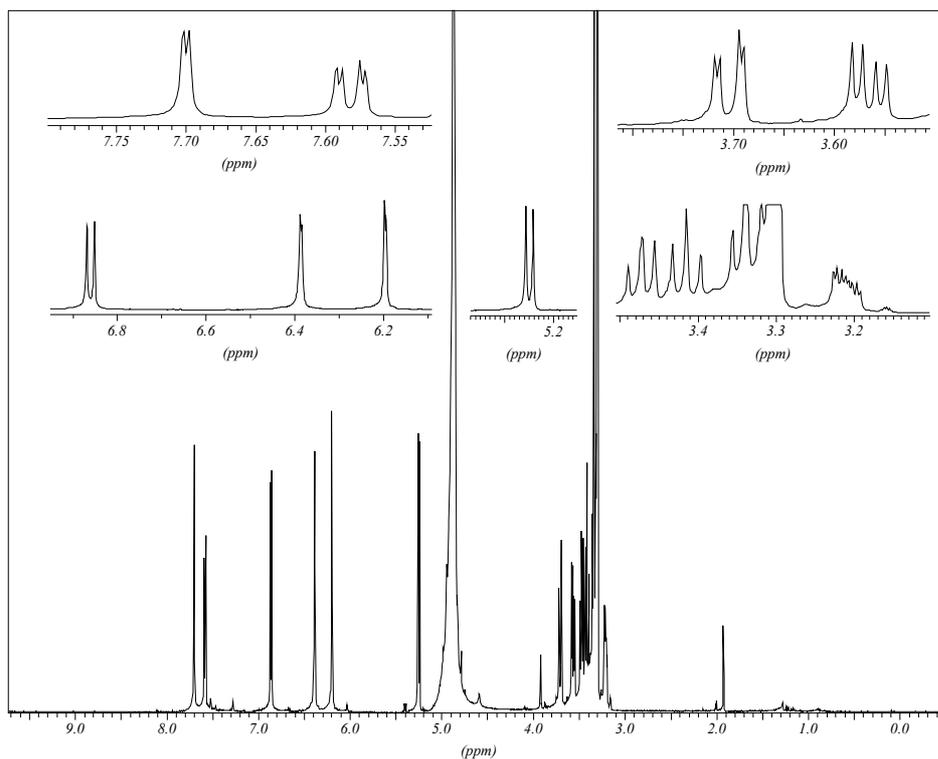
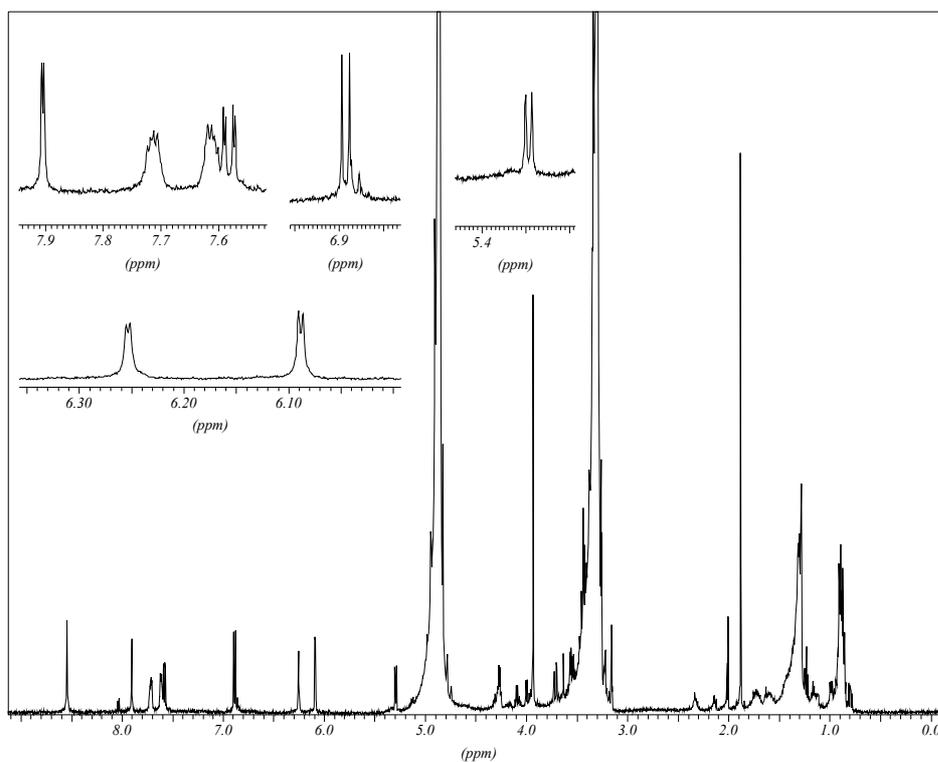
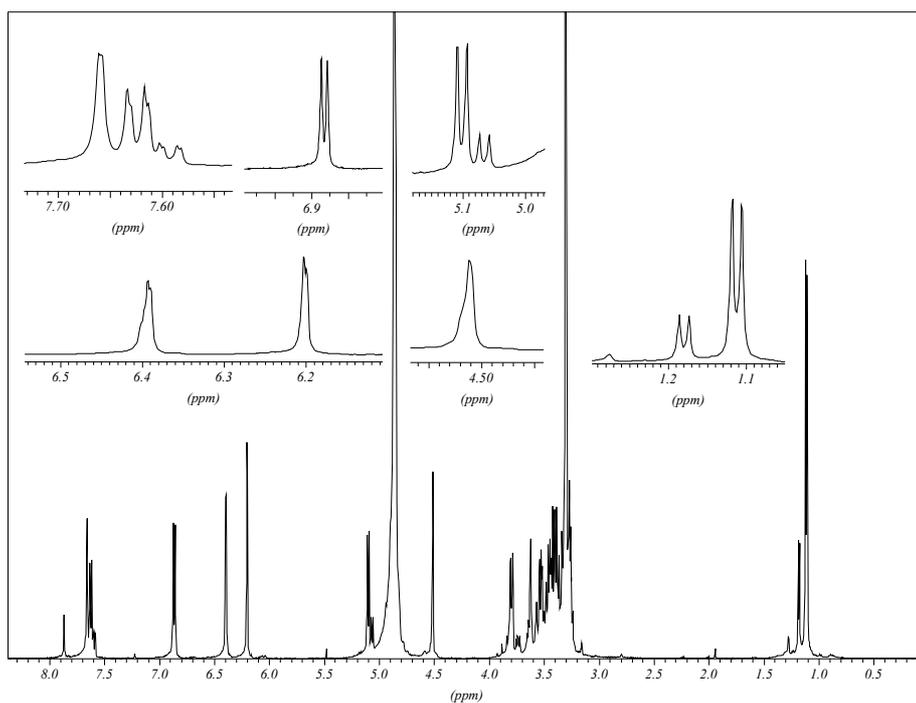
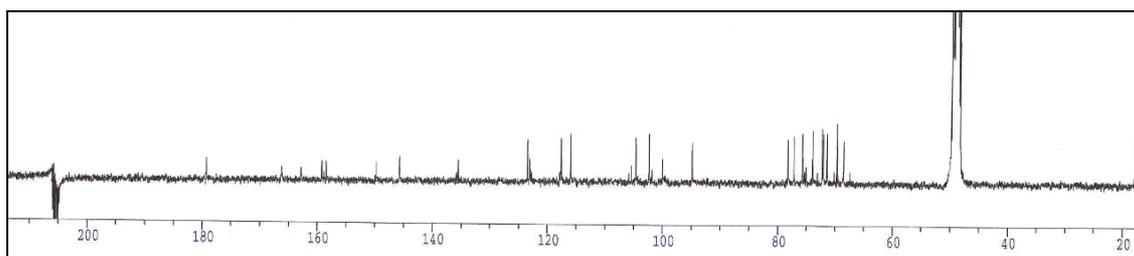
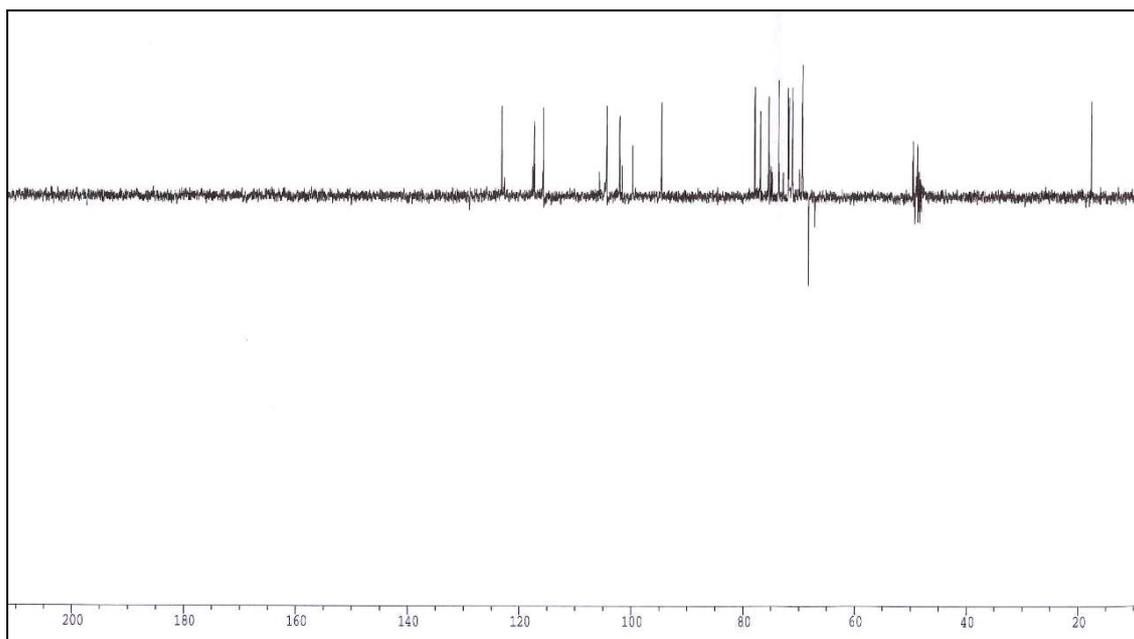
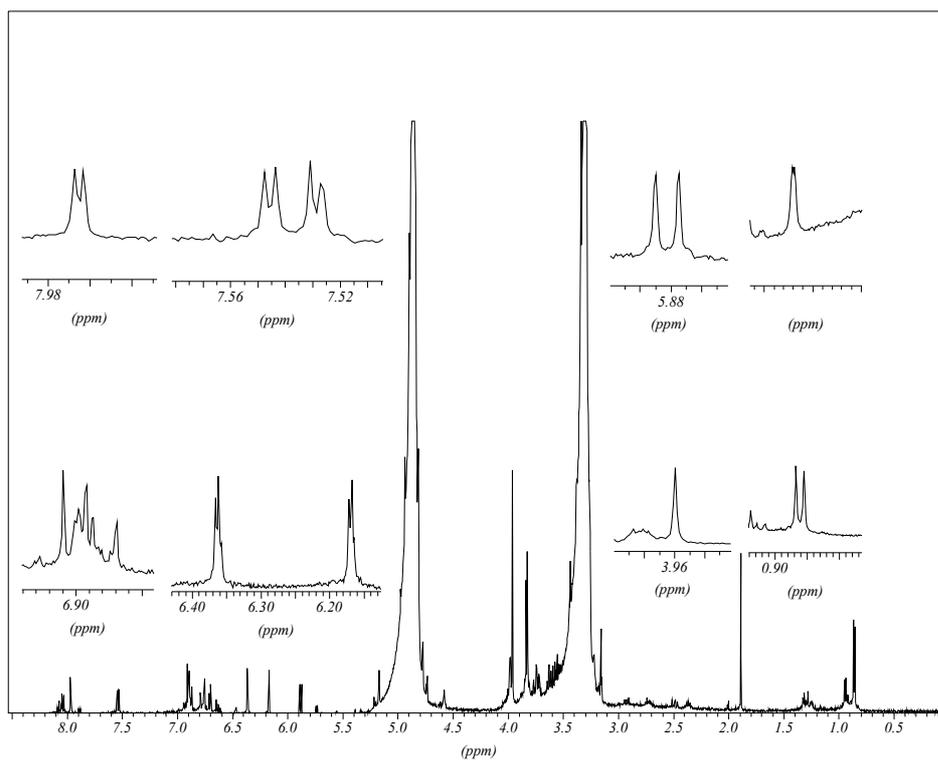
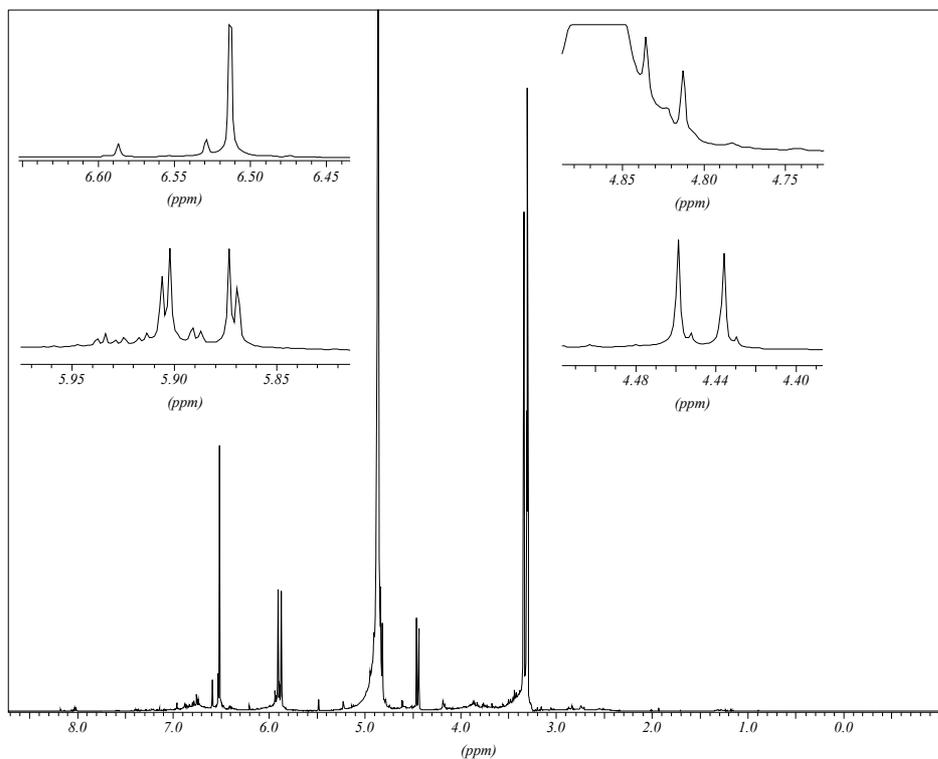


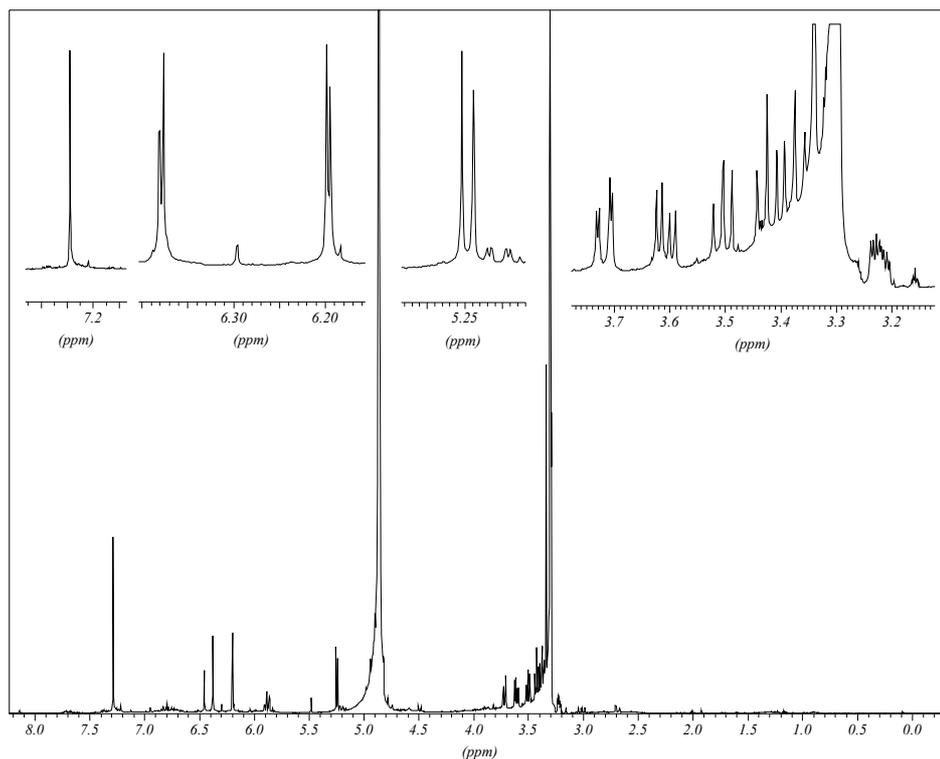
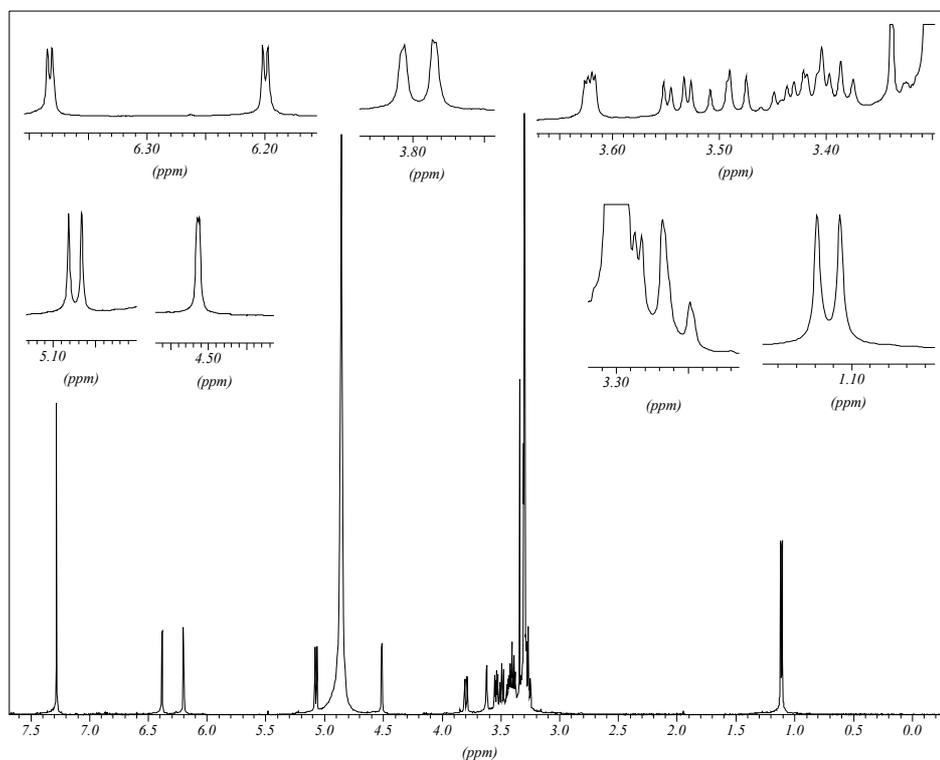
Abb.A37:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Kämpferol-3O-glucosyl-7O-rhamnosid in  $\text{CD}_3\text{OD}$

P5MW772 (Kämpferol-/Quercetin-3,4'-O-triglycosid)Abb.A38:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Kämpferol-/Quercetin-3,4'-O-triglycosid in  $\text{CD}_3\text{OD}$ QuercetinAbb.A.39:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Quercetin in  $\text{CD}_3\text{OD}$

IsoquercitrinAbb.A40:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Isoquercitrin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ Isorhamnetin-3O-glucosidAbb.A41:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Isorhamnetin-3O-glucosid in  $\text{CD}_3\text{OD}$

RutinAbb.A42:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Rutin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ Abb.A43:  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Rutin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ Abb.A44: DEPT-Spektrum von Rutin in  $\text{CD}_3\text{OD}$

P5EcPr3 (Isorhamnetin-3*O*-diglycosid)Abb.A45:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von P5EcPr3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ DihydromyricetinAbb.A46:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Dihydromyricetin in  $\text{CD}_3\text{OD}$

IsomyricitrinAbb.A47:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Isomyricitrin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ Myricetin-3O-rutinosidAbb.A48:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Myricetin-3O-rutinosid in  $\text{CD}_3\text{OD}$

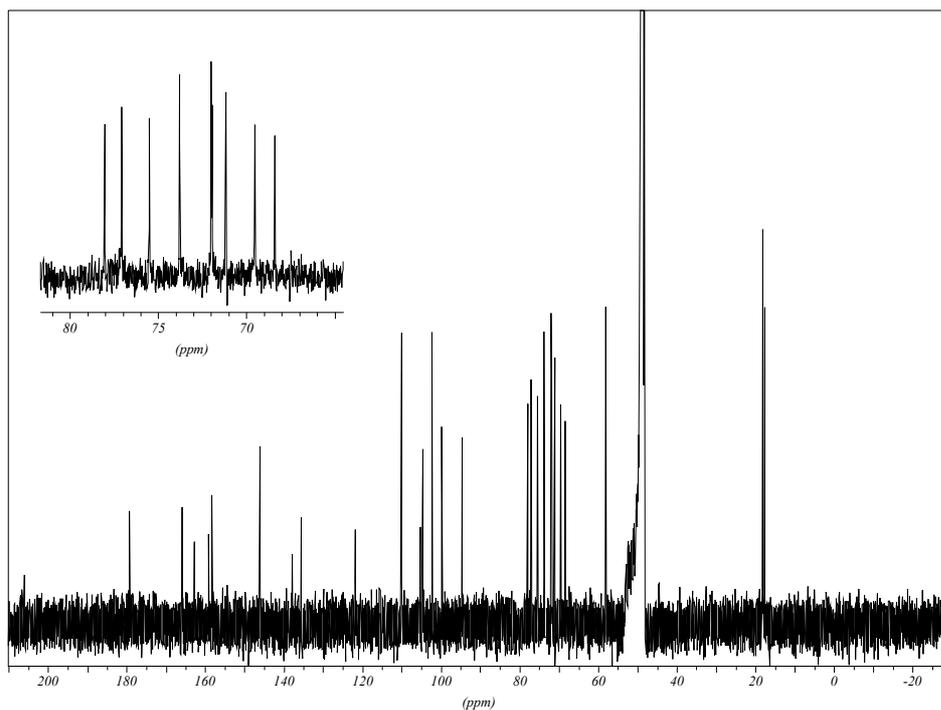


Abb.A49:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Myricetin-3-O-rutinosid in  $\text{CD}_3\text{OD}$

### 7.3.4. NMR-Spektren der Isoflavonoide

#### Genistein

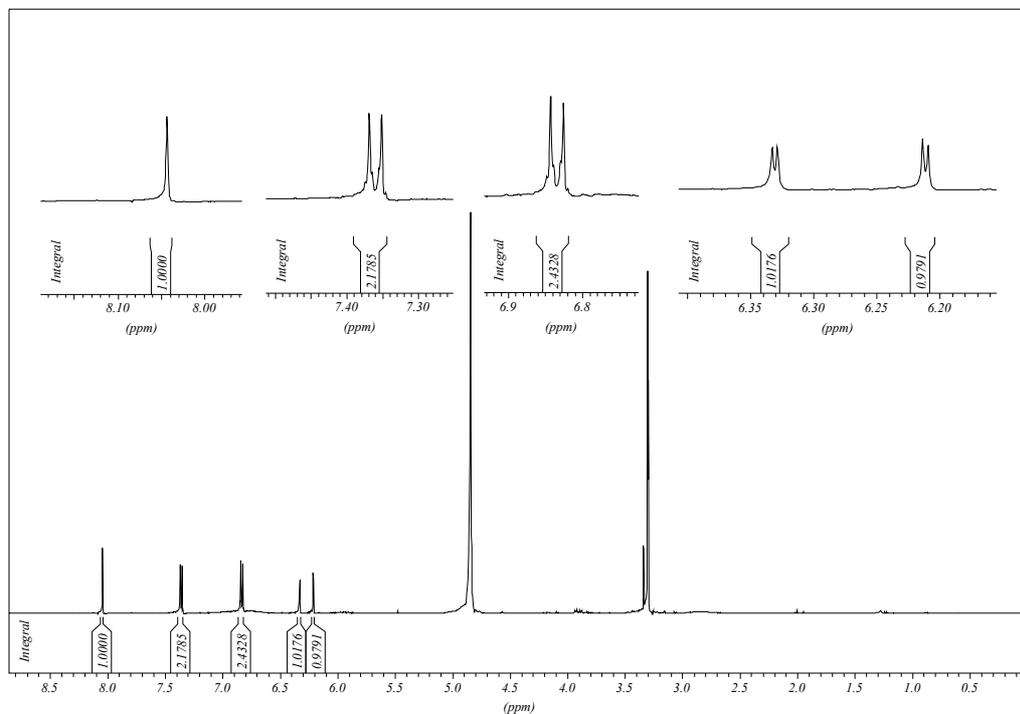
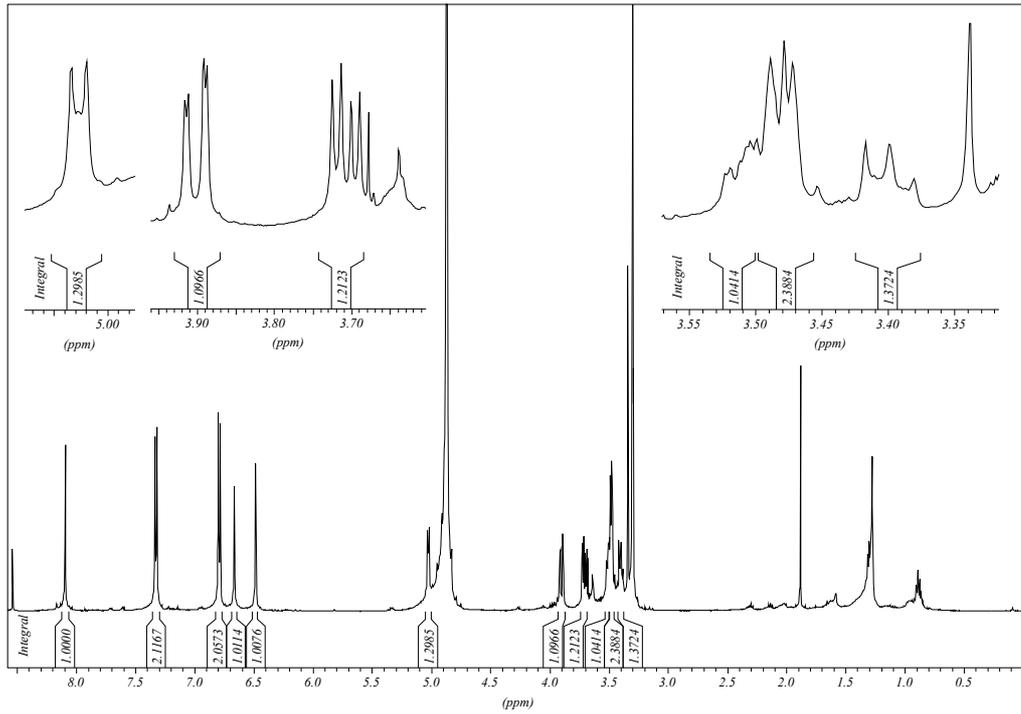
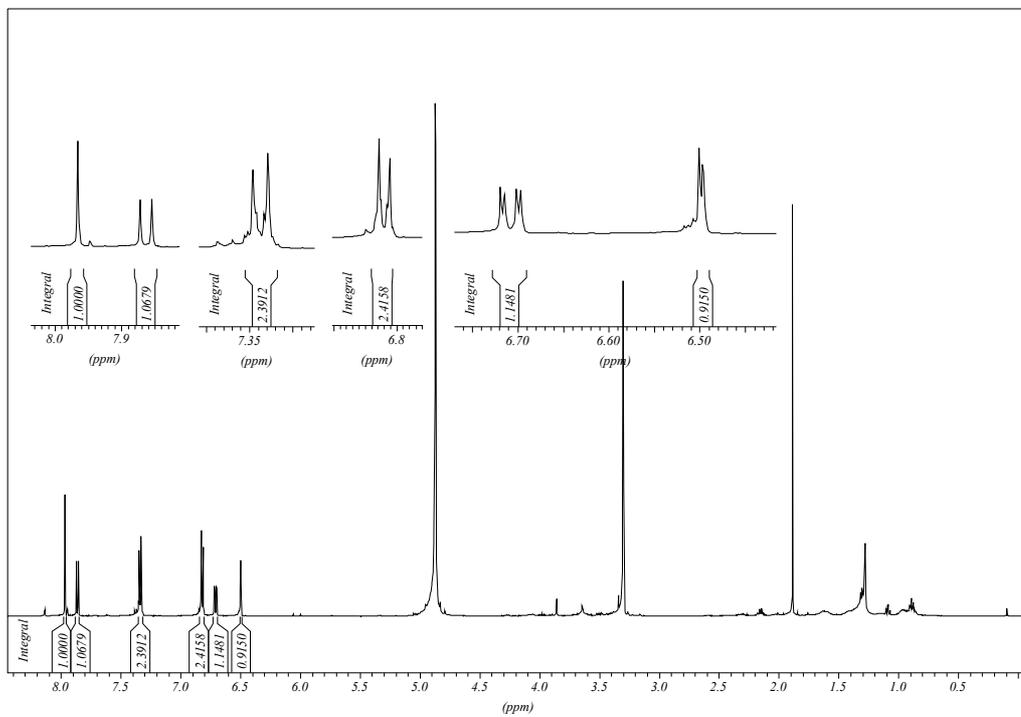
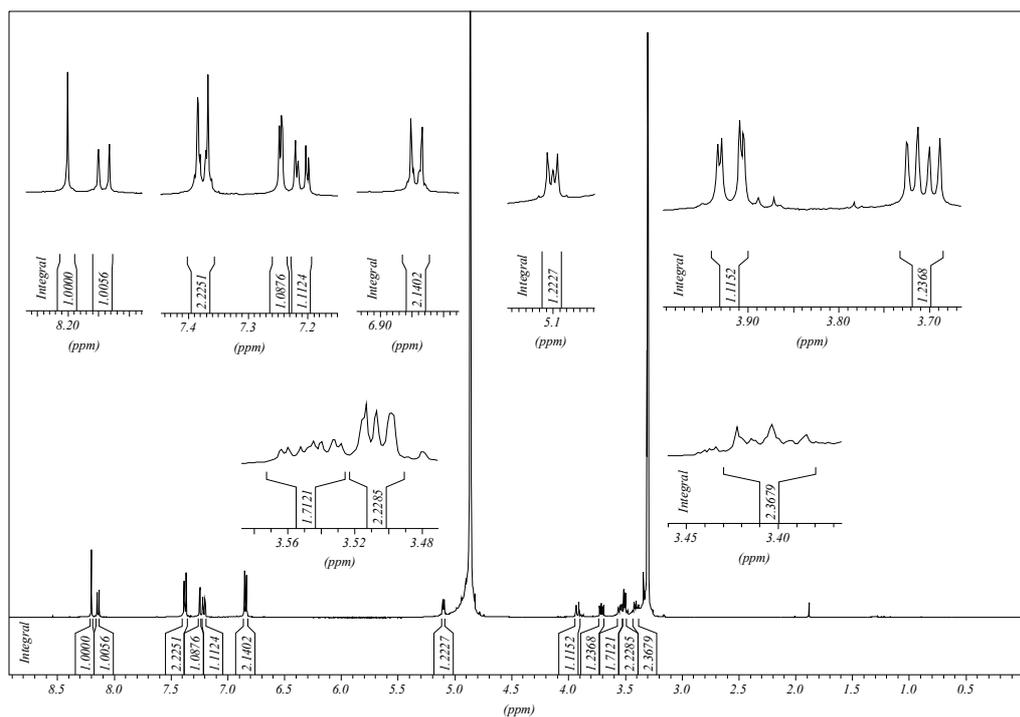
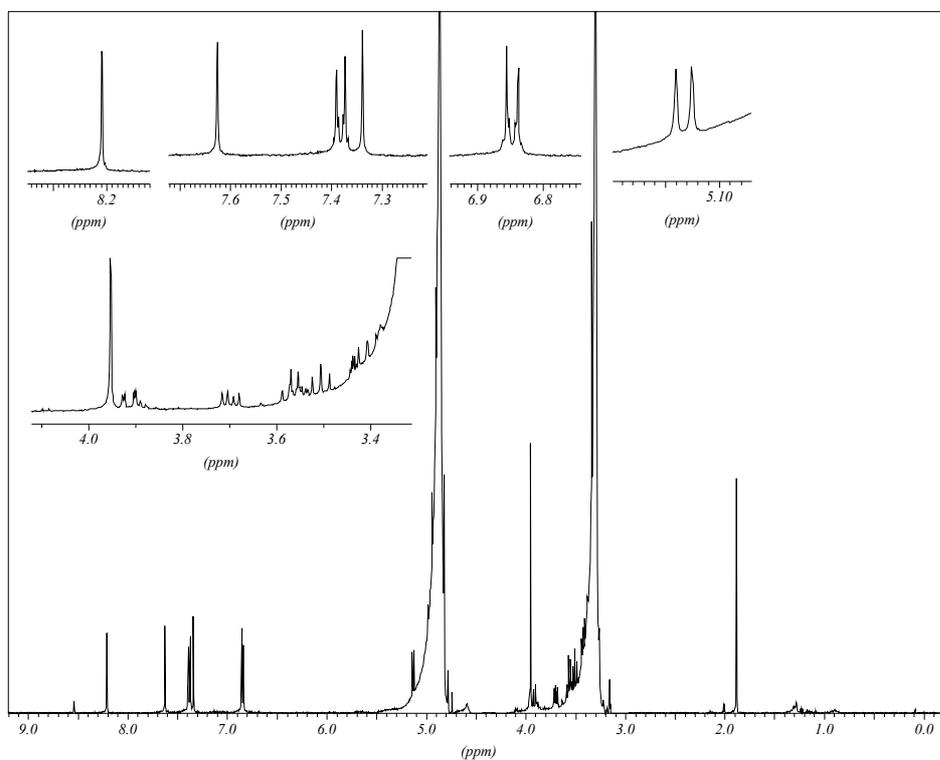
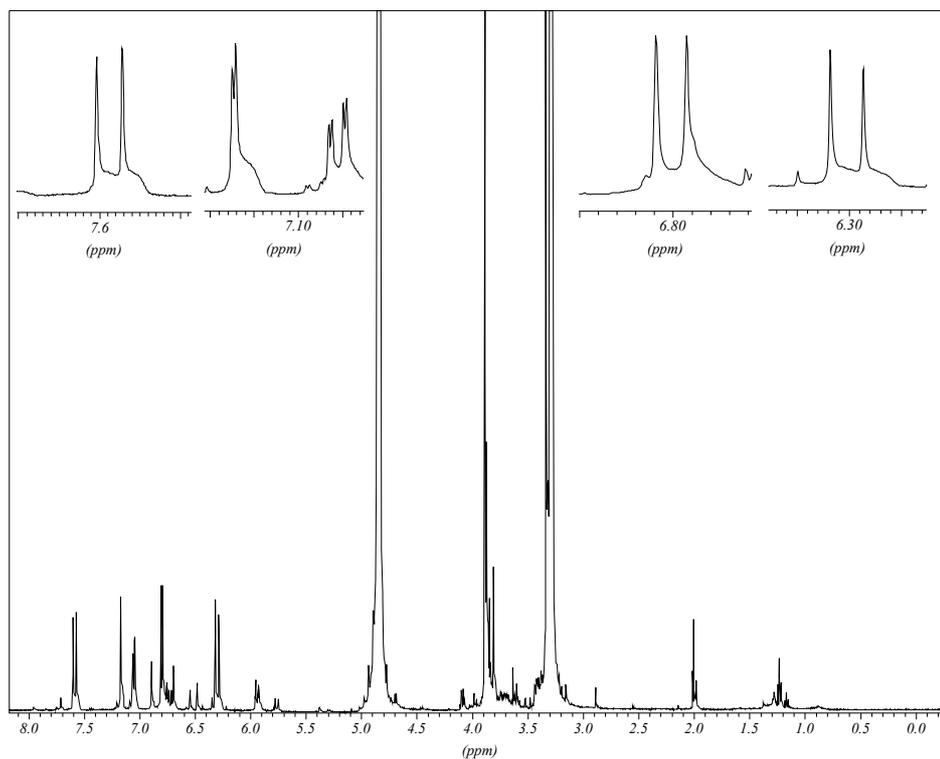
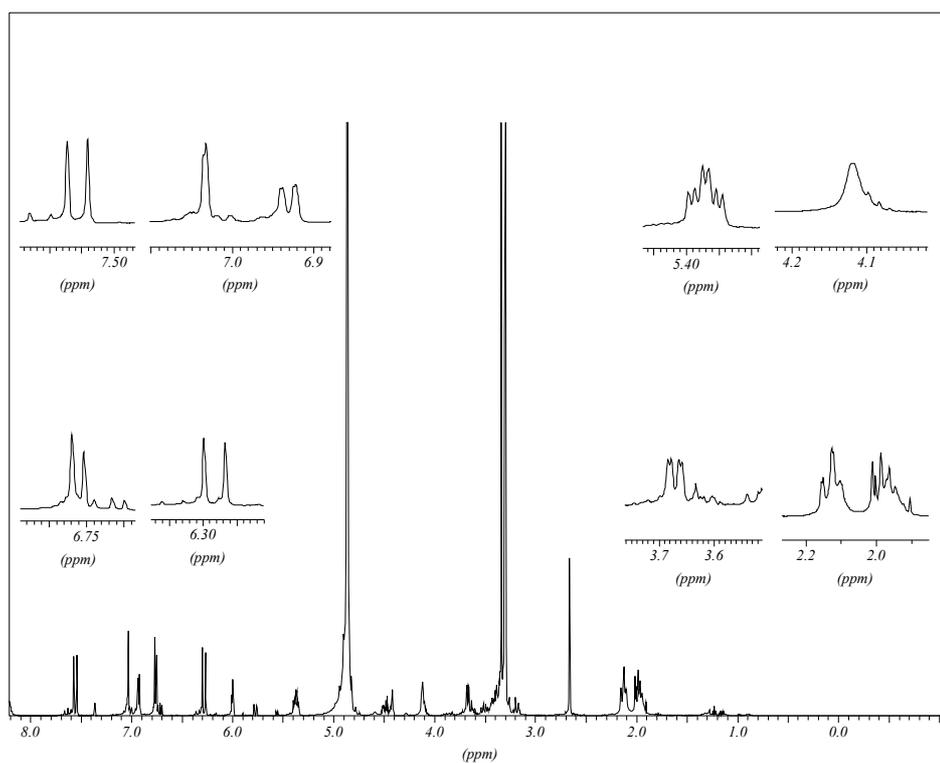


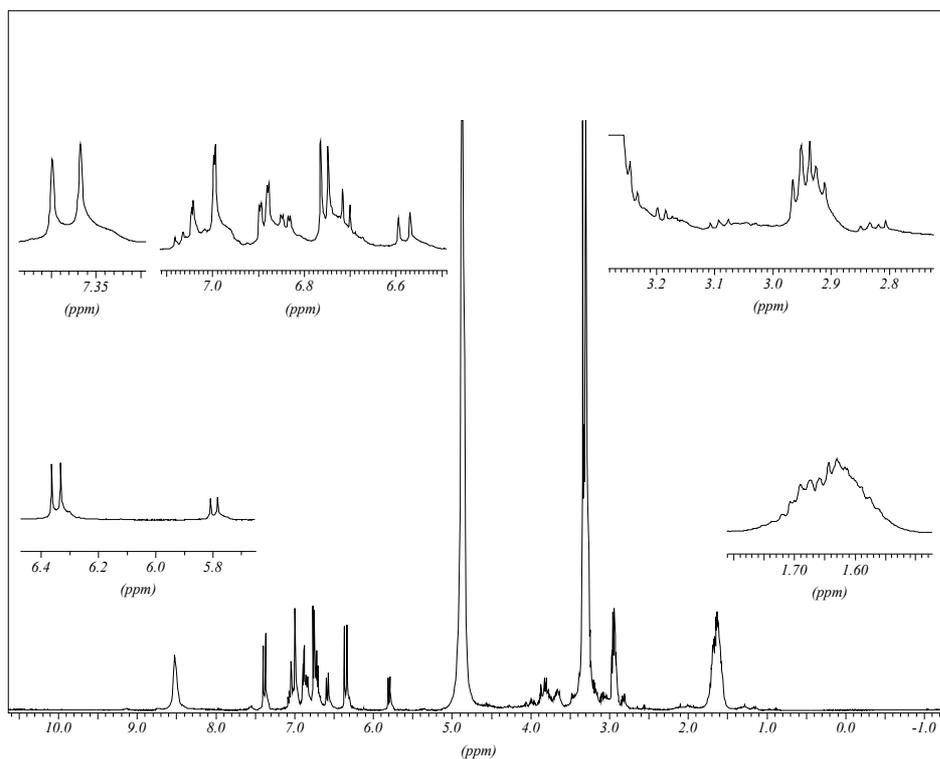
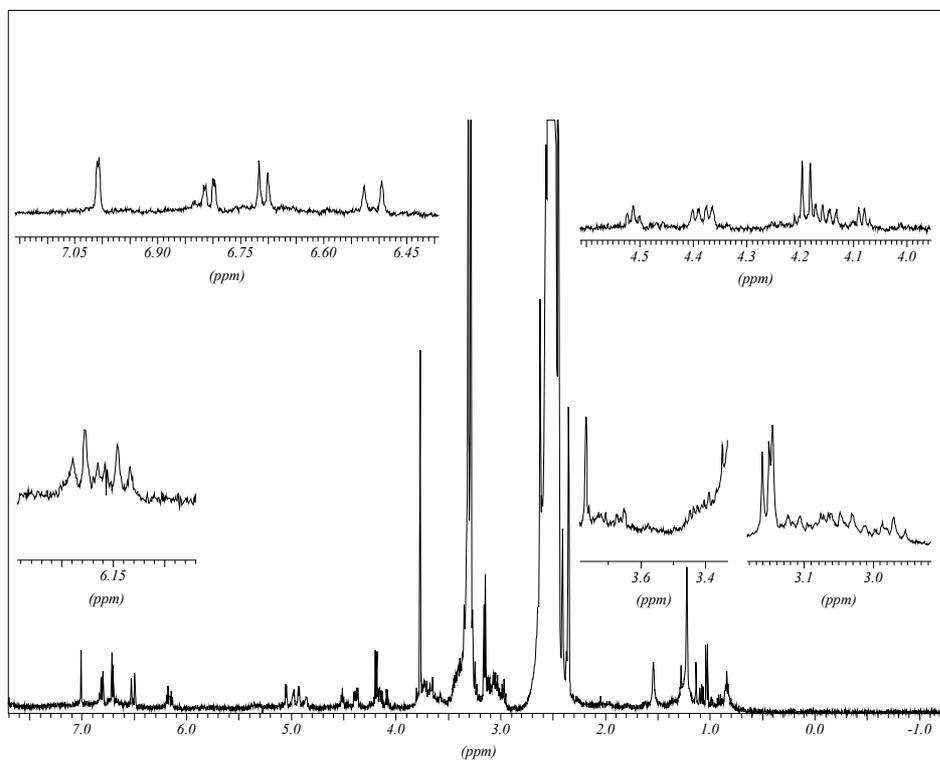
Abb.A50:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Genistein in  $\text{CD}_3\text{OD}$

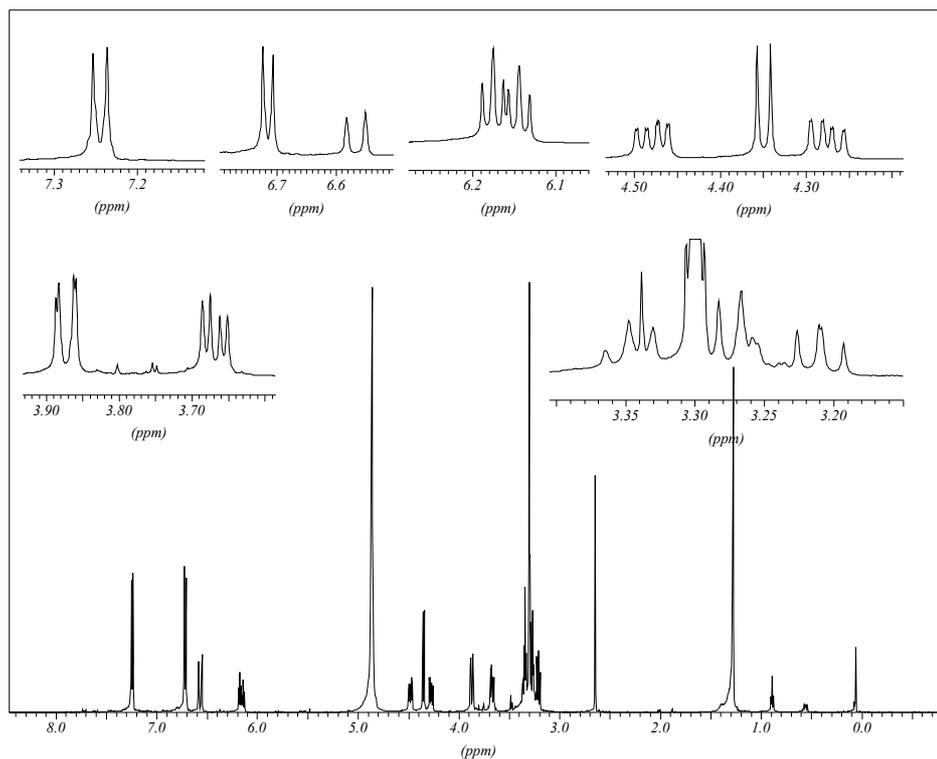
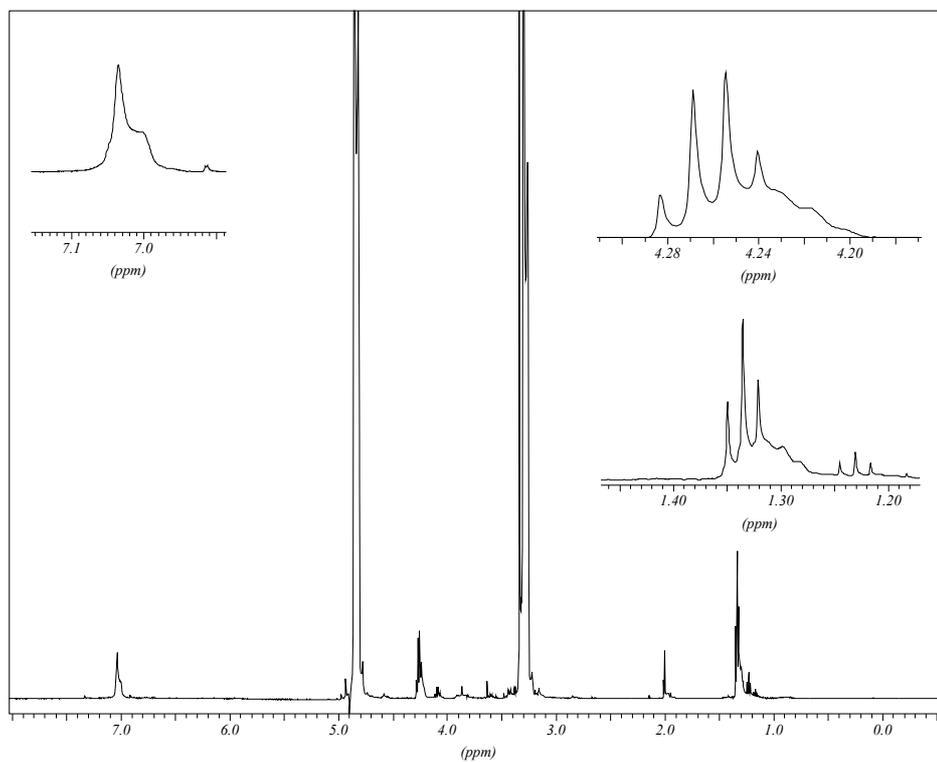
GenistinAbb.A51:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Genistin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ DaidzeinAbb.A52:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Daidzein in  $\text{CD}_3\text{OD}$

DaidzinAbb.A53:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Daidzin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ GlycitinAbb.A54:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Glycitin in  $\text{CD}_3\text{OD}$

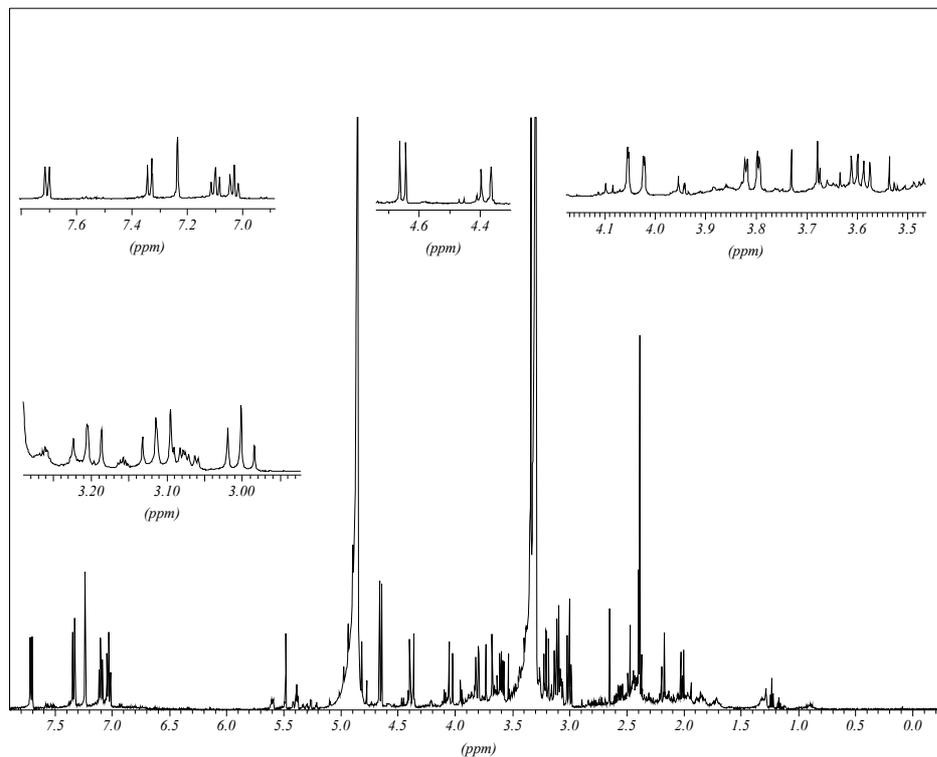
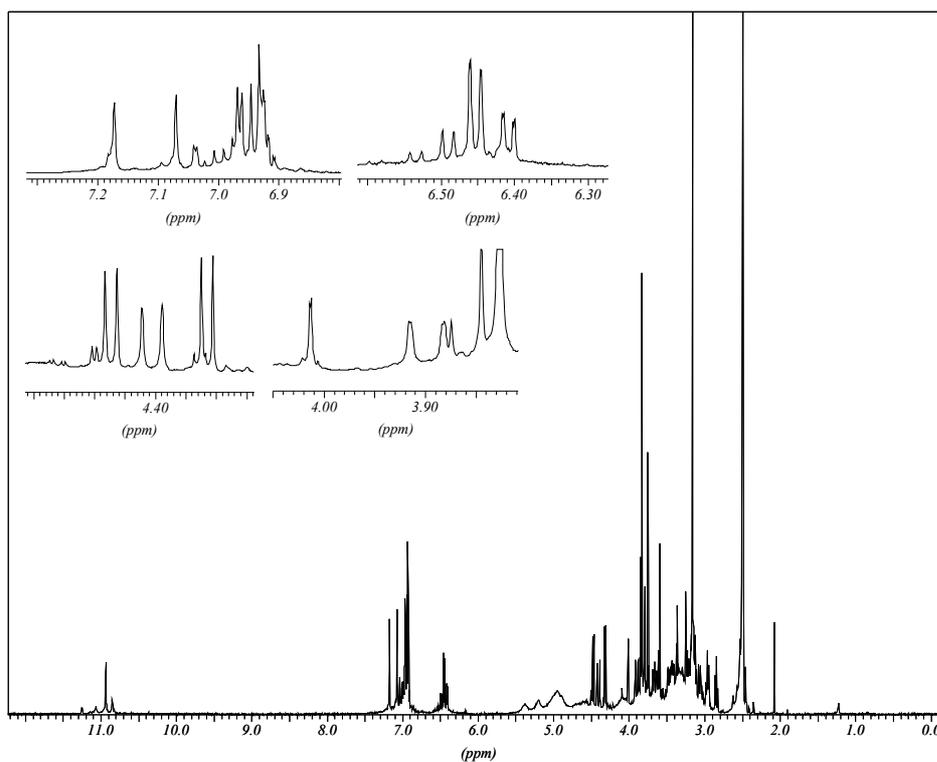
## 7.3.5. NMR-Spektren der Phenylpropanderivate

(E)-FerulasäureAbb.A55:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Ferulasäure in  $\text{CD}_3\text{OD}$ (E)-ChlorogensäureAbb.A56:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Chlorogensäure in  $\text{CD}_3\text{OD}$

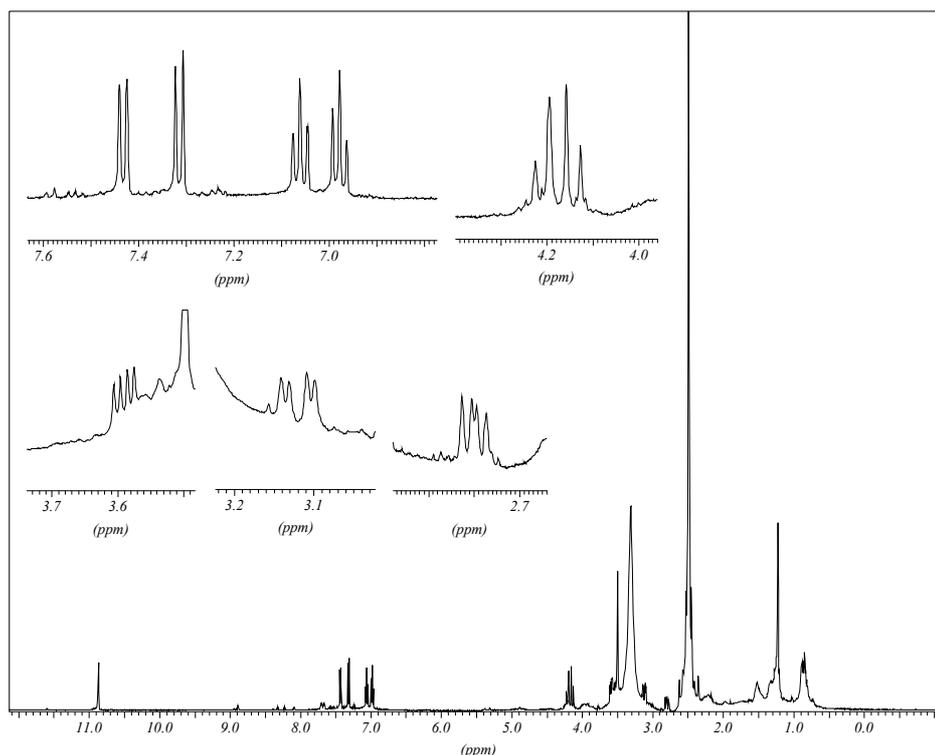
E/Z-PaucinAbb.A57:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Paucin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ IsoconiferinAbb.A58:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Isoconiferin in  $\text{DMSO-d}_6$

TriandrinAbb.A59:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Triandrin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ PhyllemblinAbb.A:60:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Phyllemblin in  $\text{CD}_3\text{OD}$

## 7.3.6. NMR-Spektren der Indolderivate

GlucobrassicinAbb.A61:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Glucobrassicin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ 6-Methoxy-GlucobrassicinAbb.A62:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 6-Methoxyglucobrassicin in  $\text{DMSO-d}_6$

## Lycoperodin 1

Abb.A63:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Lycoperodin-1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

## 7.4. Daten der Kalibriergeraden (HPLC-Methode)

Tab.A1: Menge des Standards und erhaltene Fläche zur Bestimmung der Kalibriergeraden (n=3), Angabe der Wellenlänge bei der die jeweilige Detektion erfolgte, Detektionslimit			
Standard	$\mu\text{g}$ (Fläche [mAU*min])	Wellenlänge der Detektion	Detektionslimit (ng)
Apigenin	3 (218.66), 2 (147.55), 1.5 (123.59), 1 (73.48), 0.5 (37.78), 0.1 (6.81)	340 nm	0.9
Quercetin	9.44 (307.04), 6.29 (211.61), 2 (72.45), 1 (35.94), 0.5 (17.44), 0.1 (3.88)	340 nm	2.1
( $\pm$ )-Catechin	10.62 (129.59), 5.56 (67.30), 2.78 (34.10), 1.39 (15.89), 0.37 (4.54), 0.19 (2.34)	280 nm	18
Genistein	5.0 (218.45), 2.32 (94.70), 1.16 (47.63), 0.58 (20.04), 0.29 (10.69), 0.12 (5.20)	280 nm	5
Chlorogensäure	2.37 (107.19), 1.18 (52.58), 0.59 (26.18), 0.47 (21.09), 0.27 (11.13), 0.12 (5.58)	320 nm	2,6
Cyanidin-chlorid	7.13 (420.74), 2.24 (147.43), 0.89 (51.58), 0.45 (22.76), 0.22 (8.45)	520 nm	0.6

7.5. Rohdaten der EC<sub>50</sub>-Bestimmung des DPPH-Assays

**Tab.A2:** Absorptionsabnahme der DPPH-Lösung nach 2 min bei 517 nm bei Zugabe eines Radikalfängers

Substanz	μM (ΔA=Absorptionsdifferenz, Mittelwert n=3)			
Propylgallat	38.0 (1.09)	25.3 (0.87)	15.2 (0.62)	7.6 (0.31)
(±)-Catechin	76.0 (0.97)	50.7 (0.76)	30.4 (0.46)	15.2 (0.23)
(±)-Epicatechin	76.0 (0.89)	38.0 (0.48)	7.6 (0.11)	3.04 (0.05)
(-)-Epicatechin	38.0 (0.88)	25.3 (0.66)	7.6 (0.17)	3.04 (0.09)
(±)-Galocatechin	76.0 (0.91)	38.0 (0.57)	19.0 (0.34)	15.2 (0.26)
Eriodictyol	76.0 (0.83)	38.0 (0.39)	19.0 (0.19)	9.5 (0.08)/7.6 (0.08)
Luteolin	76.0 (0.94)	38.0 (0.64)	15.2 (0.26)	7.6 (0.15)
Quercetin	25.3 (1.03)	19.0 (0.84)	15.2 (0.67)	7.6 (0.21)
Isoquercitrin	76.0 (0.92)	38.0 (0.51)	25.3 (0.37)	15.2 (0.23)
Rutin	76.0 (1.02)	38.0 (0.68)	15.2 (0.31)	7.6 (0.16)
Taxifolin	38.0 (0.82)	25.3 (0.54)	19.0 (0.44)	7.6 (0.16)
Myricetin	38.0 (0.86)	25.3 (0.68)	15.2 (0.48)	7.6 (0.24)
Isomyricitrin	76.0 (0.91)	38.0 (0.62)	15.2 (0.31)	7.6 (0.18)
Myricetin3Orutinosid	38.0 (0.72)	30.4 (0.56)	15.2 (0.34)	5.04 (0.16)
Dihydromyricetin	-	38.0 (0.75)	15.2 (0.35)	7.6 (0.18)
Kämpferol	38.0 (0.72)	25.3 (0.48)	15.2 (0.29)	7.6 (0.13)
Ferulasäure	152.0 (0.58)	101.3 (0.46)	76.0 (0.41)	38.0 (0.29)/15.2 (0.19)
Gallussäureethylester	228.0 (1.14)	76.0 (0.48)	38.0 (0.28)	15.2 (0.14)/7.6 (0.08)
Kaffeesäure	38.0 (0.80)	25.3 (0.52)	15.2 (0.32)	3.8 (0.14)
Chlorogensäure	38.0 (0.71)	25.3 (0.47)	7.6 (0.29)	3.04 (0.13)
Paucin	76.0 (0.86)	38.0 (0.51)	15.2 (0.24)	12.67 (0.18)
Vitamin C	38.0 (0.95)	30.4 (0.79)	15.2 (0.37)	7.6 (0.18)

**Tab.A3:** Absorptionsabnahme der DPPH-Lösung nach 2 min bei 517 nm bei Zugabe des jeweiligen Extraktes

Extrakt	mg/ml (ΔA=Absorptionsdifferenz, Mittelwert n=3)						
<i>Vigna angularis</i>	0.2 (0.31)	0.25 (0.34)	0.4 (0.46)	0.59 (0.57)	1.0 (0.71)		
<i>Vicia faba</i>	0.2 (0.15)	0.25 (0.18)	0.4 (0.21)	0.59 (0.26)	1.0 (0.37)	2.0 (0.60)	
<i>P. vulg. var. vulgaris</i>	0.2 (0.12)	0.25 (0.13)	0.4 (0.16)	0.59 (0.21)	1.0 (0.26)	3.0 (0.53)	4.0 (0.67)
<i>P. vulg. var. nanus</i>	0.25 (0.18)	0.4 (0.23)	0.59 (0.26)	1.0 (0.34)	3.0 (0.84)		
<i>S. melongena</i> (ch.)	0.1 (0.16)	0.2 (0.30)	0.25 (0.32)	0.4 (0.52)	0.59 (0.70)		
<i>S. melongena</i> (S,dt.)	0.01 (0.09)	0.02 (0.14)	0.05 (0.33)	0.1 (0.57)	0.2 (0.93)		
<i>S. melongena</i> (M,dt.)	0.1 (0.20)	0.2 (0.38)	0.25 (0.50)	0.4 (0.75)	0.59 (1.01)		
<i>Raphanus sativus</i>	0.1 (0.05)	0.2 (0.09)	0.25 (0.11)	0.4 (0.18)	0.59 (0.22)	1.0 (0.37)	4.0 (1.08)
<i>Cucurbita pepo</i> (S,dt.)	0.2 (0.08)	0.25 (0.08)	0.4 (0.15)	0.59 (0.18)	1.0 (0.27)	4.0 (0.76)	

S=Schalengewebe, M= Markgewebe, ch.= chinesisch, dt.= deutsch

## 7.6. Rohdaten der Zelltests

### 7.6.1. Rohdaten der Zelltest an H4IIE-Hepatom Zellen

**Tab.A4:** Absorptionen des Neutralrot-Assays, 560nm, H4IIE-Hepatom Zellen

Apigenin	DMSO	50µM	100µM
1	0,661	0,731	0,573
2	0,704	0,799	0,861
3	0,814	0,786	0,706
Vitexin	DMSO	50µM	100µM
1	0,666	0,671	0,625
2	1,023	1,008	0,980
3	0,791	0,797	0,813

**Tab.A5:** Absorptionen bei 405 nm, Caspase-3-Assay, Werte wurden auf DMSO-Probe ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bezogen

	(-)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Zugabe						
	DMSO	DMSO	Quercetin	Taxifolin	Rutin	Myricetin	Dihydro-Myricetin	Myricetin-Rutinosid
1	0,0104	0,1025	0,0377	0,0883	0,0872	0,0984	0,1118	-
2	0,0148	0,0915	0,0561	0,0777	0,0876	0,0901	0,1083	0,0774
3	0,0093	0,0534	0,0232	-	0,0492	0,0538	-	0,0722
4	0,0101	0,0559	0,0278	-	0,0818	0,0682	-	0,0834
5	0,0094	0,0795	-	0,0962	-	-	0,0877	-

**Tab.A6:** Absorptionen des Neutralrot-Assays, 560nm, H4IIE-Hepatom Zellen

Quercetin	DMSO	100µM	250µM
1	0,305	0,251	0,160
2	0,346	0,174	0,110
3	0,317	0,219	0,144
4	0,342	0,204	0,197
Taxifolin	DMSO	100µM	250µM
1	0,559	0,584	0,603
2	0,567	0,530	0,488
3	0,654	0,559	0,407
4	0,545	0,520	0,473
Rutin	DMSO	100µM	250µM
1	0,532	0,454	0,517
2	0,536	0,584	0,513
3	0,441	0,561	0,522
Myricetin	DMSO	100µM	250µM
1	0,314	0,145	0,113
2	0,284	0,136	0,095
3	0,339	0,266	0,104
4	0,347	0,249	0,171
Dihydromyricetin	DMSO	100µM	250µM
1	0,691	0,398	0,375
2	0,466	0,259	0,203
3	0,592	0,492	0,395
4	0,599	0,384	0,261
Myricetin3O rutinosid	DMSO	100µM	250µM
1	0,542	0,342	-
2	0,551	0,404	0,315
3	0,428	0,344	0,273

**Tab.A7:** Absorptionen des MTT-Assays 560nm, H4IIE-Hepatom Zellen, Daten wurden auf DMSO bezogen

Kämpferol	DMSO	50µM	100µM
1	0,236	0,134	0,069
2	0,226	0,079	0,059
3	0,235	0,115	0,069
Astragalin	DMSO	50µM	100µM
1	0,242	0,197	0,195
2	0,217	0,227	0,223
3	0,231	0,220	0,213
Quercetin	DMSO	50µM	100µM
1	0,236	0,164	0,127
2	0,219	0,188	0,135
3	0,235	0,180	0,131
Isoquercitrin	DMSO	50µM	100µM
1	0,242	0,204	0,101
2	0,233	0,162	0,070
3	0,243	0,183	0,082
Myricetin	DMSO	50µM	100µM
1	0,236	0,222	0,139
2	0,228	0,208	0,172
3	0,238	0,212	0,157
Isomyricitrin	DMSO	50µM	100µM
1	0,242	0,240	0,257
2	0,241	0,226	0,237
3	0,242	0,234	0,212
Kämpferol	DMSO	50µM	100µM
1	0,266	0,322	0,142
2	0,439	0,393	0,212
3	0,371	0,329	0,242
4	0,299	0,230	0,143
5	0,312	0,320	0,061
Kämpferol3O rutinosid	DMSO	50µM	100µM
1	0,266	0,347	0,329
2	0,439	0,470	0,389
3	0,371	0,541	0,538
4	0,299	0,321	0,301
5	0,312	0,433	0,416

**Tab.A8:** Absorptionen des MTT-Assays 560nm, H4IIE-Hepatom Zellen, Daten wurden auf DMSO bezogen

Genistein	DMSO	50µM	100µM
1	0,200	0,127	0,093
2	0,183	0,079	0,069
3	0,221	0,102	0,078
Genistin	DMSO	50µM	100µM
1	0,213	0,236	0,163
2	0,216	0,214	0,156
3	0,237	0,228	0,163
Daidzein	DMSO	50µM	100µM
1	0,211	0,245	0,201
2	0,176	0,215	0,181
3	0,184	0,226	0,193
Daidzin	DMSO	50µM	100µM
1	0,212	0,229	0,236
2	0,225	0,210	0,211
3	0,255	0,220	0,226
Glycitin	DMSO	50µM	100µM
1	0,188	0,239	0,237
2	0,155	0,201	0,215
3	0,182	0,201	0,202

**Tab.A9:** Absorptionen des MTT-Assays 560nm, H4IIE-Hepatom Zellen, Daten wurden auf DMSO bezogen

Ferulasäure	DMSO	50µM	100µM
1	0,245	0,231	0,234
2	0,232	0,247	0,256
3	0,157	0,171	0,178
Paucin	DMSO	50µM	100µM
1	0,230	0,208	0,235
2	0,213	0,211	0,212
3	0,159	0,164	0,157
Chlorogensäure	DMSO	50µM	100µM
1	0,239	0,231	0,230
2	0,179	0,217	0,217
3	0,152	0,162	0,149
Triandrin	DMSO	50µM	100µM
1	0,210	0,155	0,173
2	0,176	0,160	0,184
3	0,131	0,157	0,162
Kaffeesäure	DMSO	50µM	100µM
1	0,178	0,235	0,223
2	0,174	0,233	0,233
3	0,179	0,169	0,167

## 7.6.2. Rohdaten der Zelltest an MCF7/BUS Zellen

**Tab.A10:** Absolutwerte der zellproliferierenden Eigenschaften der Extrakte, Mittelwert  $\pm$  SD, n=3; Daten auf Estradiol bezogen

DMSO	Estradiol 0.1nM	<i>Vigna radiata</i>	<i>Vigna angularis</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Phaseolu s coccineus</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>P.vulga ris var. vulg.</i>	<i>P.vul g. var. nanus</i>	$\mu\text{g}/\text{ml}$
20.53	99.99									
		16.21 $\pm$ 3.83	27.29 $\pm$ 1.70	31.59 $\pm$ 7.80	26.52 $\pm$ 6.09	6.54 $\pm$ 0.64	7.23 $\pm$ 2.46	8.73 $\pm$ 0.35	7.46 $\pm$ 0.16	1
		15.73 $\pm$ 2.86	44.45 $\pm$ 9.59	59.35 $\pm$ 14.43	44.33 $\pm$ 12.39	9.68 $\pm$ 1.09	8.58 $\pm$ 3.05	17.02 $\pm$ 8.82	9.11 $\pm$ 0.66	10
		14.56 $\pm$ 5.03	78.11 $\pm$ 6.92	92.61 $\pm$ 17.84	86.18 $\pm$ 9.02	23.46 $\pm$ 5.26	18.08 $\pm$ 1.36	37.45 $\pm$ 7.61	27.94 $\pm$ 4.13	100
		15.82 $\pm$ 6.00	69.98 $\pm$ 22.91	69.30 $\pm$ 6.96	64.84 $\pm$ 15.42	27.65 $\pm$ 3.74	21.55 $\pm$ 2.32	35.01 $\pm$ 16.62	37.00 $\pm$ 1.44	200

**Tab.A11:** Absolutwerte der zellproliferierenden Eigenschaften der Extrakte, Mittelwert  $\pm$  SD, n=3; Daten auf Estradiol bezogen

$\mu\text{g}/\text{ml}$	DMSO	Estradiol 0.1nM	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Allium sativum</i>	<i>Solanum melongena</i>	<i>Raphanus sativus</i>
	14.68 $\pm$ 4.61	100.00 $\pm$ 0.00				
0.8			18.67 $\pm$ 5.17	16.90 $\pm$ 4.08	12.21 $\pm$ 3.10	10.09 $\pm$ 0.81
4			20.61 $\pm$ 9.01	13.22 $\pm$ 6.25	15.19 $\pm$ 12.10	9.33 $\pm$ 5.16
20			24.70 $\pm$ 3.61	13.92 $\pm$ 7.48	17.58 $\pm$ 10.89	8.19 $\pm$ 2.25
100			34.81 $\pm$ 16.38	16.51 $\pm$ 10.88	21.78 $\pm$ 17.00	11.40 $\pm$ 5.43
200				19.67 $\pm$ 1.28	18.53 $\pm$ 10.60	14.86 $\pm$ 0.09
500				23.42 $\pm$ 9.62	22.16 $\pm$ 5.41	22.78 $\pm$ 2.65

**Tab.A12:** Absolutwerte der Absorptionen (Zellproliferation, Färbung MTT, Daten auf Estradiol bezogen)

Quercetin	RPE	SD	Rutin (syn.)	RPE	SD	Rutin (isoliert)	RPE	SD
DMSO	0,22	0,031	DMSO	0,272	0,112	DMSO	0,45	0,26
Estradiol	1	0,05	Estradiol	1	0,05	Estradiol	1	
10 $\mu\text{M}$	0,391	0,234	10 $\mu\text{M}$	0,212	0,097	10 $\mu\text{M}$	0,72	0,45
1 $\mu\text{M}$	0,361	0,17	1 $\mu\text{M}$	0,224	0,159	1 $\mu\text{M}$	0,89	0,39
0.1 $\mu\text{M}$	0,306	0,132	0.1 $\mu\text{M}$	0,257	0,179	0.1 $\mu\text{M}$	0,46	0,25
0.01 $\mu\text{M}$	0,301	0,12	0.01 $\mu\text{M}$	0,265	0,164	0.01 $\mu\text{M}$	0,62	0,26

**Tab.A13:** Absolutwerte der Absorptionen (Zellproliferation, Färbung MTT, Daten auf Estradiol bezogen)

Catechin (syn)	RPE	SD	Catechin (isoliert)	RPE	SD
DMSO	0,232	0,096	DMSO	0,41	0,23
Estradiol	1	0,05	Estradiol	1	0,05
10 $\mu\text{M}$	0,456	0,05	10 $\mu\text{M}$	0,78	0,25
1 $\mu\text{M}$	0,305	0,052	1 $\mu\text{M}$	0,63	0,27
0.1 $\mu\text{M}$	0,285	0,109	0.1 $\mu\text{M}$	0,41	0,18
0.01 $\mu\text{M}$	0,271	0,111	0.01 $\mu\text{M}$	0,59	0,15

**Tab.A14:** Absolutwerte der Absorptionen (Zellproliferation, Färbung MTT, Daten auf Estradiol bezogen)

Apigenin	RPE	SD	Rhoifolin	RPE	SD
DMSO	0,269	0,146	DMSO	0,232	0,096
Estradiol	1	0,05	Estradiol	1	0,05
10 µM	0,823	0,077	10 µM	0,343	0,121
1 µM	0,777	0,089	1 µM	0,264	0,089
0.1 µM	0,391	0,052	0.1 µM	0,252	0,086
0.01 µM	0,356	0,084	0.01 µM	0,257	0,072

**Tab.A15:** Absolutwerte der Absorptionen (Zellproliferation, Färbung MTT, Daten auf Estradiol bezogen)

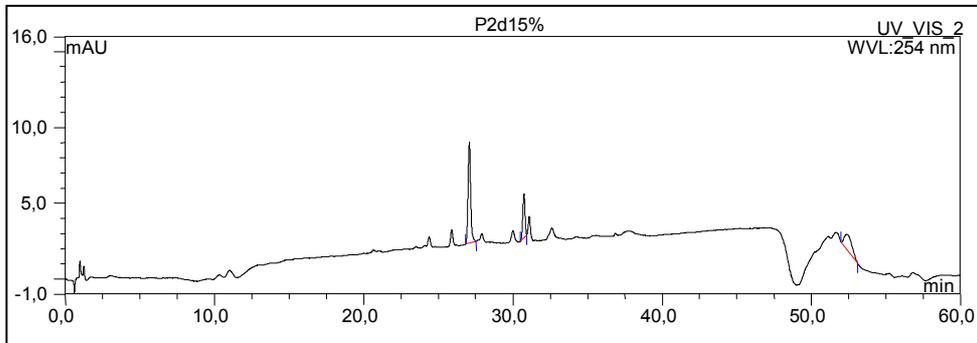
Myricetin3O rutinosid	RPE	SD	Kaempferol	RPE	SD
DMSO	0,4	0,31	DMSO	0,238	0,086
Estradiol	1	0,05	Estradiol	1	0,05
10 µM	0,42	0,37	10 µM	0,693	0,037
1 µM	0,38	0,31	1 µM	0,645	0,119
0.1 µM	0,38	0,29	0.1 µM	0,326	0,167
0.01 µM	0,4	0,31	0.01 µM	0,34	0,212

**Tab.A16:** Absolutwerte der Absorptionen (Zellproliferation, Färbung MTT, Daten auf Estradiol bezogen)

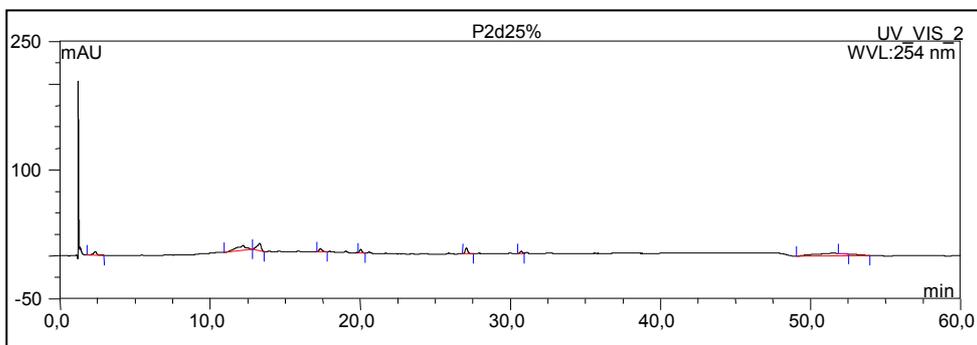
Genistein	RPE	SD
DMSO	0,36	0,23
Estradiol	1	0,05
10 µM	0,55	0,17
1 µM	0,82	0,16
0.1 µM	0,88	0,32
0.01 µM	1,02	0,43

## 7.7. Ermittlung der aktiven Komponente des *Vigna angularis*-Extraktes

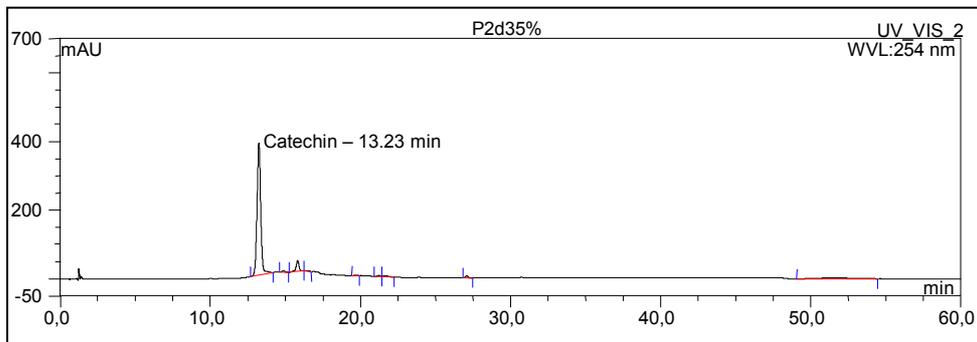
### 7.7.1. HPLC-Chromatogramme der P2d-Auftrennung(*Vigna angularis*)



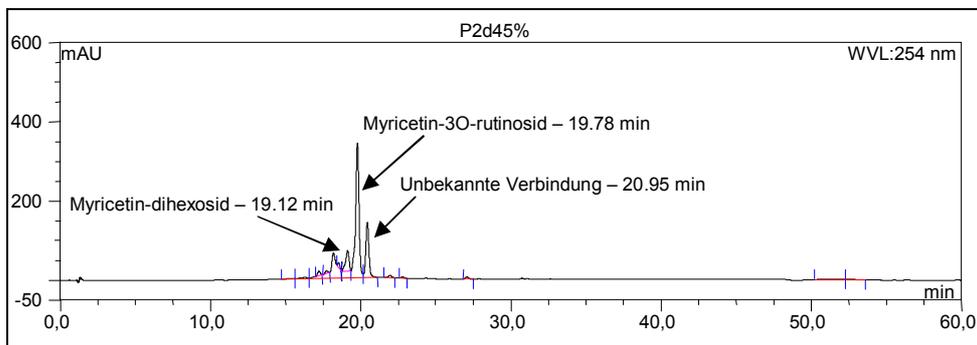
**Abb.A64:** HPLC-Chromatogramm Fraktion P2d15%, Standardgradient, Wellenlänge 254 nm



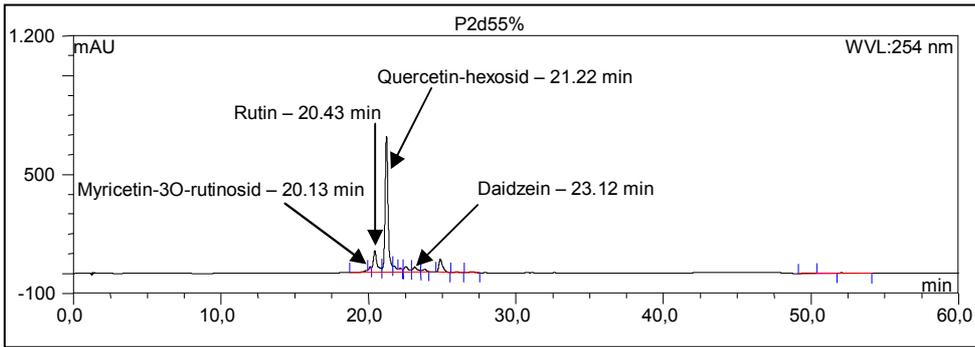
**Abb.A65:** HPLC-Chromatogramm Fraktion P2d25%, Standardgradient, Wellenlänge 254 nm



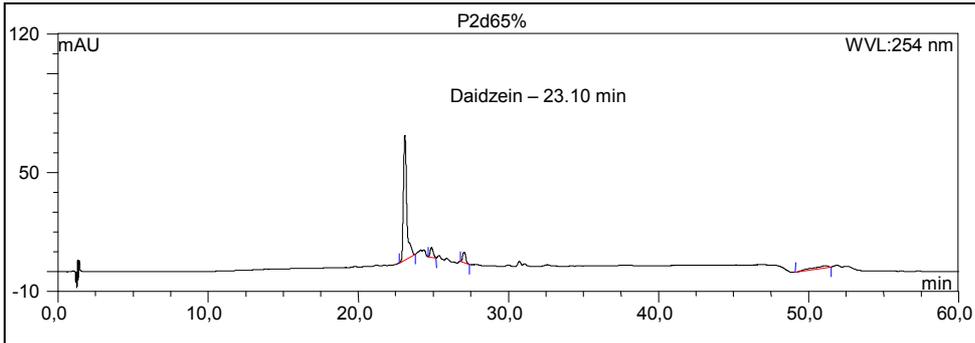
**Abb.A66:** HPLC-Chromatogramm Fraktion P2d35%, Standardgradient, Wellenlänge 254 nm



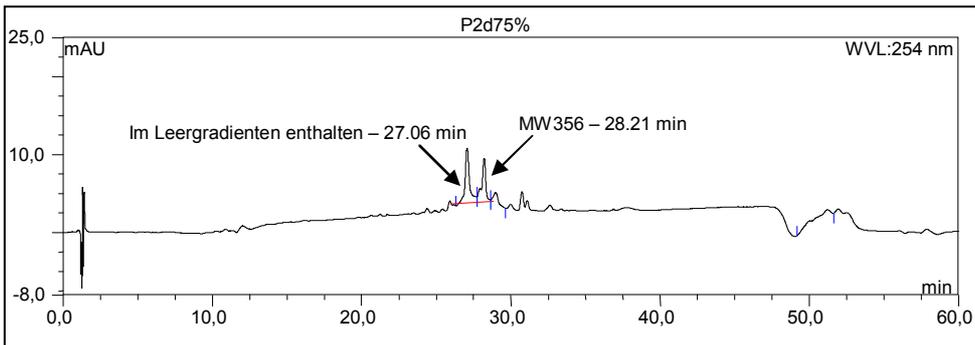
**Abb.A67:** HPLC-Chromatogramm Fraktion P2d45%, Standardgradient, Wellenlänge 254 nm



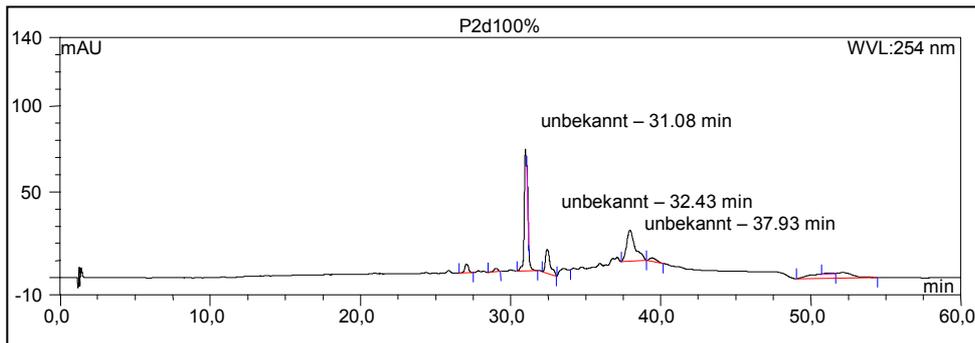
**Abb.A68:** HPLC-Chromatogramm Fraktion P2d55%, Standardgradient, Wellenlänge 254 nm



**Abb.A69:** HPLC-Chromatogramm Fraktion P2d65%, Standardgradient, Wellenlänge 254 nm



**Abb.A70:** HPLC-Chromatogramm Fraktion P2d75%, Standardgradient, Wellenlänge 254 nm



**Abb.A71:** HPLC-Chromatogramm Fraktion P2d100%, Standardgradient, Wellenlänge 254 nm

## 7.7.2. NMR-Spektrum der P2d65%-Fraktion

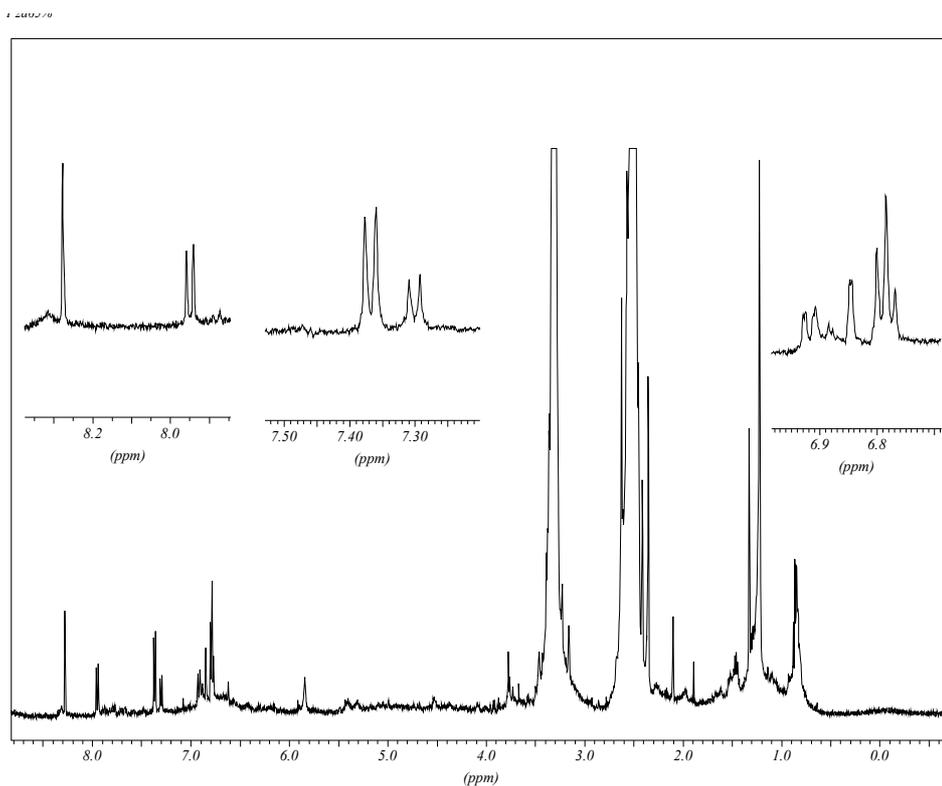


Abb.A72:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Daidzein (P2d65%-Fraktion) in  $\text{DMSO-d}_6$

## 7.8. Lebenslauf und Veröffentlichungen/Präsentationen

<b>Name</b>	Nadine Caroline Weber
<b>Geburtsdatum</b>	15.12.1978
<b>Geburtsort</b>	Saarlouis
<b>Schulische Ausbildung</b>	
<b>1985-89</b>	Grundschule Schaffhausen
<b>1989-98</b>	Marie-Luise-Kaschnitz Gymnasium Völklingen; Abitur
<b>Berufsausbildung</b>	
<b>10.1998-11.2002</b>	Studium der Pharmazie an der Universität des Saarlandes
<b>11.2002-05.2003</b>	Pharmaziepraktikum in der Sonnenapotheke in Zweibrücken
<b>06.2003-12.2003</b>	Pharmaziepraktikum an der Heinrich-Heine Universität am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
<b>Dez. 2003</b>	Approbation als Apothekerin
<b>seit 01.2004</b>	Promotionsstudium am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
<b>seit 10.2006</b>	Elefanten-Apotheke in Meerbusch

Düsseldorf, den

**Veröffentlichungen:**

1. Qing – wei Zhao, Bo Li, Nadine Weber, Yi – jia Lou, Peter Proksch, (2005) „Estrogen like effects of ethanol extracts from several Chinese legumes on MCF – 7 cell.“ *Eur. Food Res. Technol.* 211(6);828 - 833
2. Qing – wei Zhao, Xin Huang, Yi – jia Lou, Nadine Weber, Peter Proksch, (2007) “Effects of ethanol extracts from Adzuki Bean (*Phaseolus angularis* Wight.) and Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) on Estrogen and Progesterone receptor phenotypes of MCF-7/BOS cells.“ *Phytother. Res.* In press
3. Zhi – qiang Wang, Nadine Weber, Yi – jia Lou, Peter Proksch, (2006) “Prenylflavonoids as Nonsteroidal Phytoestrogens and Related Structure – Activity Realtionship.” *ChemMedChem*, Vol 1 (4); 482-488
4. Gudrun Michels, Gamal A. Mohamed, Nadine Weber, Yvonne Chovolou, Andreas Kampkötter, Wim Wätjen, Peter Proksch, (2006) “Effects of Methylated Derivatives of Luteolin Isolated from *Cyperus alopecuroides* in Rat H4IIE Hepatoma Cells.” *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 98; 168 – 172
5. Gudrun Michels, Wim Wätjen, Nadine Weber, Petra Niering, Yvonne Chovolou, Andreas Kampkötter, Peter Proksch, Regine Kahl, (2006) “Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells.” *Toxicology* 225; 173-182
6. Wim Wätjen, Nadine Weber, Yi – jia Lou, Zhi – qiang Wang, Yvonne Chovolou, Andreas Kampkötter, Regine Kahl, Peter Proksch (2006) “Prenylation enhances Flavonoid Cytotoxicity in Rat H4IIE Hepatoma and C6 Glioma cells.” *Food & Chemical Toxicology* 45(1); 119-124

**Poster/Vorträge:**

1. Wätjen, W., Weber, N., Michels, G., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Proksch, P. und Kahl, R (2005) Comparison of uptake, antioxidative effects and cytotoxicity of structurally related flavonoids. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Vol. 371 (Supplement 1), 449, Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz
2. Gollombeck, D., Wätjen, W., Weber, N., Ohler, S., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Proksch, P., Kahl, R. (2006) Different effects of glycosylated flavonoids in H4IIE hepatoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Vol. 372 (Supplement 1), 409, Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz
3. Wätjen, W., Weber, N., Ohler, S., Gollombeck, D., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Proksch, P., Kahl, R. (2006) Effects of polyphenols in mammalian cell lines: Comparison of uptake, apoptosis and necrosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Vol. 372 (Supplement 1), 407, Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

4. Wätjen, W., Gollombeck, D., Kulawik, A., Ohler, S., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Weber, N., Proksch, P., Kahl, R. (2006) Protective and detrimental effects of flavonoids in mammalian cells. 57. Mosbacher Kolloquium der GBM, "Redox Signaling: Mechanisms and Biological Impact", 06.-08.04. Mosbach
5. Nadine Weber, Peter Proksch (2006) Antioxidative Phenole aus chinesischen Gemüsepflanzen. Treffen des Graduiertenkollegs 820 "Natürliche Antioxidantien", Workshop „Analyse von Biowirkstoffen aus chinesischen Pflanzen“, 11.07.06 Kiel
6. N. Weber, W. Wätjen, R. Edrada, V. Wray, Y. Lou, Z.-q. Wang and P. Proksch (2006) Flavonoids from *Vigna angularis* – composition and antioxidative effects. *Planta Medica*, Vol. 72, 976, 54. Kongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, 29.08–02.09.06 Helsinki

## 7.9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei:

Dr. Rainer Ebel für die Hilfe bei auftretenden wissenschaftlichen Fragen und für die jahrelangen grammatikalischen Übungen.

Dr. RuAngelie Edrada-Ebel für ihre geduldige Hilfe bei der Interpretation von unzähligen NMR-Spektren, sowie das sie immer mit ihrer guten Laune für die nötige Motivation gesorgt hat. Außerdem bei beiden auch für ihre private Unterstützung, den Plätzchenabenden und gemeinsamen Unternehmungen.

Dr. Victor Wray für seine qualifizierte Hilfe bei der Strukturaufklärung.

Dr. Wim Wätjen für seine wissenschaftliche Unterstützung und besonders für die Möglichkeit der sehr flexiblen Terminvereinbarungen.

Dr. Franka Teuscher für viele lustige Momente, für die sichere Navigation bei Unternehmungen und für ihre Freundschaft.

Clécia Maria Freitas Richard (geb. de Jesus Freitas) für die Aufmunterungen und vielen lustigen Situationen, die den Arbeitsalltag immer mit ein wenig brasilianischem Sonnenschein versehen haben.

Meiner Laborkollegin Annika Putz dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hatte, für eine lustige Laboratmosphäre ebenso wie für viele nette Unternehmungen.

Dr. Yosi Bayu Murti für seine vielen praktischen Labortips, für seinen Humor und für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Amal Hassan für die vielen Diskussionen nicht nur am Institut, sondern auch privat. Ine Dewi Indriani und Arnulf Diesel ganz besonders für die nette Zusammenarbeit.

Mareike Thiel für die schnelle Hilfe bei allen administrativen Problemen, für die Organisation von „Schnäppchen“ und für gute literarische Empfehlungen.

Sofia Ortlepp, Julia Jacob, Yao Wang für die nette Zusammenarbeit in der unteren Etage.

Katrin Rohde, Waldraut Schlag, Klaus Dieter Jansen und Sabine Borstel für die Organisation von benötigten Materialien und technischen Utensilien.

Anke Schnittker, Triana Hertiani, Edi Wahyu Sri Mulyono und allen weiteren Mitarbeitern für die fröhliche multikulturelle Atmosphäre, die immer für Abwechslung im Laboralltag gesorgt hat.

Dr. Bärbel Steffan, Dr. Gero Eck, Dr. Carsten Thoms, Dr. Gernot Brauers, Dr. Suwigarn Pedpradab, Dr. Tu Ngoc Duong, Dr. Yudi Rusman, Dr. Yasman, Dr. Sabrin Ibrahim, Dr. Mohammed Ashour und allen weiteren ehemaligen Kollegen für das gute Arbeitsklima in den letzten vier Jahren.

Den Mitarbeitern am „Department of Pharmacology and Toxicology der Zhejiang University (Hangzhou/China) für den sehr interessanten Aufenthalt in China.

Herrn H.-W. Knuffmann für die Unterstützung in den letzten Monaten der Promotion und die sehr promotionsfreundlichen Arbeitszeiten in der Elefanten-Apotheke in Meerbusch.

Frau Dr. Ulrike Lohwasser am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Abteilung Genbank, Arbeitsgruppe Ressourcengenetik und Reproduktion in Gatersleben und Frau Dr. Sabine Etges am Botanischen Institut der HHU-Düsseldorf für die taxonomischen Bestimmungen der Leguminosen.

Herrn Rogmann und seinen Mitarbeitern für die Pflege und Ernte der „Bohnen“ im Gewächshaus und Freiland der HHU Düsseldorf.

Den Mitarbeitern des NMR- und MS-Service des Instituts für Anorganische und Strukturchemie der HHU- Düsseldorf für die Aufnahme zahlreicher NMR- und MS-Spektren.

Dem DFG und der GlaxoSmithKline-Stiftung für die finanzielle Unterstützung

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir ermöglicht haben den Weg bis zur Promotion zu gehen und mich stets mit hilfreichen Ratschlägen und finanziellen Mitteln unterstützt haben.

Meinem Bruder für seine Geduld in den letzten Jahren, wenn seine Schwester ständig über Tabellen, Büchern und Dokumenten saß.

Meinem Freund, der Unmengen von Papier, Ordnern und Büchern ertragen musste, für die Unterstützung besonders in Form von kulinarischen Leckerbissen.

Meiner Oma Hedwig für ihre Unterstützung und dass sie bis zum Ende für mich da sein wollte.

### **7.10. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation „Antioxidative Polyphenole chinesischer Leguminosen und weiterer chinesischer Gemüse,, selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Des Weiteren erkläre ich, dass ich früher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht habe.

Düsseldorf 2007

Nadine Weber