

Isolierung, Strukturaufklärung und Eigenschaften
von polyphenolischen Verbindungen aus
Aspalathus linearis* und *Rheum rhaponticum

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
DOCTOR RERUM NATURALIUM
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II – Chemie und Physik
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Diplom-Lebensmittelchemikerin
Nicole Krafczyk
geboren am 30. November 1981 in Köthen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Marcus A. Glomb
 2. Prof. Dr. Lothar W. Kroh

Halle (Saale), 30.10.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014607

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014607>]

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Marcus Glomb möchte ich mich an dieser Stelle für die ausgezeichnete Betreuung recht herzlich bedanken. Sie haben mir ein sehr interessantes, anspruchsvolles Thema zur Bearbeitung überlassen, immer Zeit für Diskussionen gehabt und Sie sind stets am Fortgang der Arbeit interessiert gewesen.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei Herrn Prof. Dr. Eder, Frau Dr. Brandsch und dem gesamten Team des Institutes für Ernährungswissenschaften für die Möglichkeit die Tierexperimentellen Studien durchführen zu können, sowie für die Bereitstellung der Ultrazentrifuge.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter des Arbeitskreises Lebensmittelchemie und Umweltchemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die stetige Hilfsbereitschaft und die vielen schönen Stunden neben der Laborarbeit. Hierbei möchte ich insbesondere Frau Dr. Antje Klöpfer erwähnen: Danke für die zahlreichen anregenden Diskussionen und die Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dr. Ströhl und seinem Team sei für die Aufnahmen der NMR-Spektren gedankt. Ebenfalls möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Schmidt vom Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie für die Aufnahmen der hochauflösenden Massenspektren danken.

Bei meinen ehemaligen Diplomanden Franziska, Nicole, Ulrike und Matthias bedanke ich mich ebenfalls. Eure fleißigen Hände haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen lieben Mann Stefan bedanken. Du hast mir so viel Verständnis und moralische Unterstützung entgegengebracht, aus der ich immer wieder Kraft für neuen Tatendrang schöpfen konnte. Dieser Dank geht ebenfalls an meine ganze Familie! Euer Interesse am Gelingen dieser Arbeit hat mich stets motiviert.

Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	iii
Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	5
3 Zusammenfassung der Wissenschaftlichen Arbeit.....	6
3.1 Sekundäre Inhaltsstoffe von Rhabarber.....	6
3.2 Polyphenolen aus <i>Aspalathus linearis</i>	18
3.2.1 Isolation und Strukturaufklärung	18
3.2.2 Reaktionen der Flavonoide	22
3.2.3 Struktur-Aktivitätsbeziehungen ausgewählter Polyphenole	29
4 Originalarbeiten.....	43
4.1 Phenolic Composition of Rhabarb	43
4.2 Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea	54
4.3 Structure-Antioxidant-Relationship of Flavonoids from Fermented Rooibos	64
5 Zusammenfassung der Dissertation	93
6 Abstract	95
7 Literaturverzeichnis.....	97
8 Abbildungsverzeichnis.....	v
9 Tabellenverzeichnis.....	vii
10 Anhang	viii
11 Publikationsliste	xii
12 Lebenslauf	xiv
13 Eidesstattliche Erklärung	xv

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2005 bis März 2008 am Institut für Chemie, im Arbeitskreis Lebensmittelchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, wo ich als Wissenschaftliche Mitarbeiterin tätig war.

Die vorliegende Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt. Die ausgewählten Publikationen sind beigefügt. Sie enthalten die experimentellen Daten, sowie die ausführlichen Diskussionen der jeweiligen Ergebnisse.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Zusammenfassung der einzelnen wissenschaftlichen Veröffentlichungen. Entsprechend der inhaltlichen Abfolge in der Zusammenfassung sind diese in die Dissertation integriert.

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen der Deutschen Rechtschreibung laut Duden und den Internationalen Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz
ACC	Acetyl-CoenzymA-Carboxylase
AMVN	2,2'-Azobis-(2,4-dimethylvaleronitril)
ANR	Anthocyanidin-Reductase
ANS	Anthocyanidin-Synthase
AUS	Auron-Synthase
APT	<i>Attached Proton Test</i>
C4H	Cinnamat-4-Hydrolase
CHI	Chalcon-Isomerase
CHS	Chalcon-Synthase
4-CL	4-Coumarat-CoA-Ligase
CoA	Coenzym A
δ	chemische Verschiebung
d	Duplett
dd	Duplett von Duplett
DAD	<i>Dioden Array Detector</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DFR	Dihydroflavonol-4-reductase
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolidin-N-oxid
DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid-d ₆
DPPH	2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl
ESI	Elektronenspray-Ionisation
ESR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
F3GT	Flavonoid-3-glycosyltransferase
F3H	Flavanon-3- β -hydroxylase
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FLS	Flavonol-Synthase

Abkürzungsverzeichnis (Fortsetzung)

FNS	Flavon-Synthase
FRAP	<i>Ferric-Reducing Antioxidant Power</i>
Fremy's-Salz	Kaliumnitrosodisulfonat
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
Glu	Glucose
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR-MS	Hochauflösendes Massenspektrometer
J	Kopplungskonstante
LAR	Leucoanthocyanidin-Reductase
LC-MS	Flüssigchromatograph-Massenspektrometer
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LOO·	Lipidhydroperoxyradikal
LOOH	Lipidhydroperoxid
m	Multipllett
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight</i>
MDA	Malondialdehyd
MLCCC	<i>Multilayer Countercurrent Chromatography</i>
NADH	Nicotinamidadenosindinucleotid
NBT	<i>Nitroblue-Tetrazolium</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PAL	<i>Phenylalanin Ammonia Lyase</i>
PC	Phosphatidylcholin
β-PE	β-Physcoerythrin
PBN	<i>N-tert-Butyl-α-phenylnitron</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PKR	Polyketid-Reduktase
PPO	Polyphenoloxidase
pt	<i>pseudo-Triplett</i>

Abkürzungsverzeichnis (Fortsetzung)

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s	Singulett
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
STS	<i>Soluble Sulfotransferase</i>
TBA	Thiobarbitursäure
TCA	Tricarbonsäurezyklus
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Activity</i>
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive-Spezies
TBTZ	Tripyridyltriazin
TRAP	<i>Total Radical-Trapping Parameter</i>
Trolox [®]	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
RT	Retentionszeit

1 Einleitung

Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und stellen einen wichtigen Bestandteil aller Pflanzen und Früchte dar. Zu den Polyphenolen gehören die Flavonoide, Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren. Die Flavonoide können wiederum unterteilt werden in Flavonole, Flavanole, Flavone, Flavanone, Flavanonole, Dihydrochalcone und Anthocyane. Proanthocyanidine und höhere Kondensationsprodukte (Theaflavine, Bisflavanole, Thearubigene, u.a.) werden den Flavanolen zugeordnet. Weitere Substanzen, welche zu den sekundären Inhaltsstoffen der Pflanze gezählt werden, sind u.a. Naphtalenderivate, Anthrachinone, Stilbene, Lignane, Lignine, Xanthone, Anthracenderivate und Tannine.

Flavonoide werden innerhalb des Phenylpropanoidweges gebildet. Der Phenylpropanoidweg bildet neben den Flavonoiden noch weitere Naturstoffe, wie z. B. Phenolsäuren, Lignine und Stilbene. Die Schlüsselsubstanz für diesen Bildungsweg ist einerseits Phenylalanin, dieses wird innerhalb des Shikimisäurebildungsweges erhalten. Andererseits wird Malonyl-CoA, welches aus dem TCA (Tricarbonsäurezyklus) stammt, benötigt. Ein Teil des Phenylpropanoidweges, welche die Biosynthese der wichtigsten Flavonoide enthält, ist in Abb. 1 dargestellt. Bei dieser Synthese der Flavonoide kann die am Coenzym A gebundene 4-Coumarsäure (4-Coumaryl-CoA) durch eine von der Chalconsynthase (CHS) katalysierten Reaktion mit Malonyl-CoA zum Naringenin-chalcon weiterreagieren. Dies stellt nun das C₆-C₃-C₆-Grundgerüst dar, wovon sich alle Flavonoide ableiten. Durch Ringschluss bildet sich aus dieser Substanz mittels der Chalcon-Isomerase (CHI) Naringenin, welches wiederum die Vorstufe für Flavone, Dihydroflavanole, Flavonole, Leukoanthocyanidine und Anthocyanidine darstellt. Die Leukoanthocyanidine können durch das Enzym LAR (Leukoanthocyanidinreduktase) zu Flavan-3-olen abgebaut werden. Diese sind zusammen mit den *epi*-Flavan-3-olen (werden durch Anthocyanidinreduktase (ANR) aus Anthocyanidinen gebildet) die Vorstufen für höhermolekulare Flavonoide. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit können Zuckermoleküle C-O-glycosidisch oder C-C-glycosidisch durch Enzyme (Transferasen) in der fortgeschrittenen Phase der Biosynthese an das Aglycon gebunden werden. Die Bildung von Flavonoidglycosiden kann z. B. durch das Enzym F3GT (Flavonoid-3-glycosyltransferase) erfolgen (Abb. 1) (Davies *et al.*, 2005, Winkel *et al.*, 2008). Hydroxybenzoesäuren werden in den Pflanzen aus Hydroxyzimtsäuren gebildet, indem Acetatreste oxidativ aus den Seitenketten der Hydroxyzimtsäuren entfernt werden (Moriguchi *et al.*, 2003).

Stilbene sind aus einem C₆-C₂-C₆-Grundkörper aufgebaut und entstehen durch Reaktion von 4-Coumaryl-CoA mit Malonyl-CoA in Gegenwart des Enzyms STS (Stilbensynthase) (Abb.1).

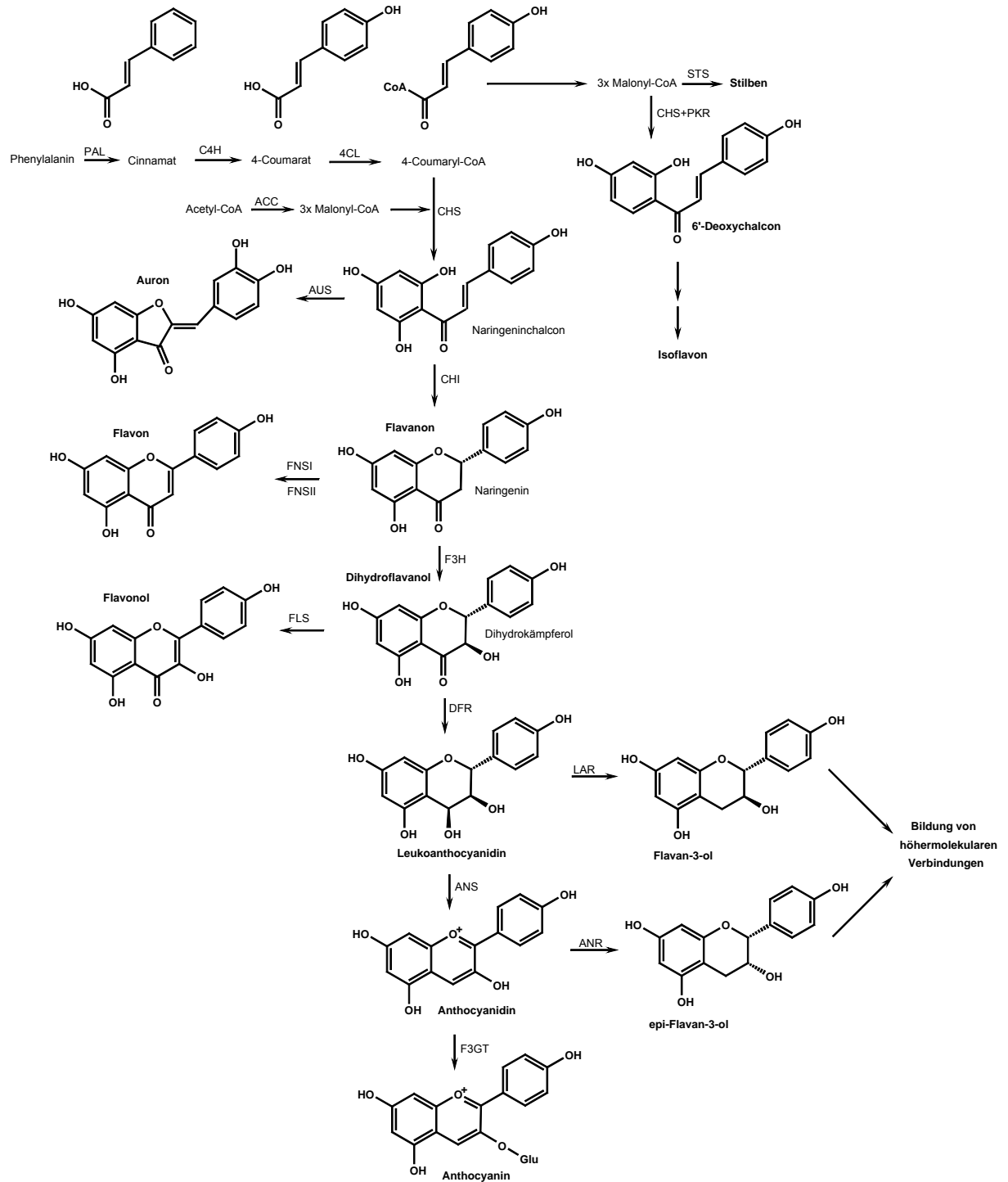


Abb. 1 Biosyntheseweg von Flavonoiden innerhalb des Phenylpropanoidweges (Davies *et al.*, 2005).

In der Pflanze selbst übernehmen die Polyphenole viele wichtige Funktionen. Zum einen dienen sie als Schutz der Pflanze vor UV-Strahlung und schädlichen Sauerstoffspezies. Andererseits haben sie einen Einfluss auf die Regulierung von Enzymaktivitäten und sind

Anlockmittel für Insekten. Gleichzeitig fungieren sie aber auch als Abwehrsubstanzen der Pflanze vor Schädlingen und haben eine antivirale, fungizide und antibakterielle Wirkung (Gould *et al.*, 2005).

Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass Flavonoide nach Aufnahme durch die Nahrung einen ebenfalls positiven Effekt auf die menschliche Gesundheit haben. Hertog *et al.* hatte in der „Zutphen Elderly Studie“ erste stichhaltige Zusammenhänge zwischen einer hohen Flavonidaufnahme durch die Nahrung und einem geringeren Risiko an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, festgestellt (Hertog *et al.*, 1993). Bestimmt wurden innerhalb dieses Experiments die Gehalte der verschiedenen Lebensmittel an Quercetin, Kämpferol, Myricetin, Apigenin und Luteolin. Anhand dieser Studie wurde dann eine Empfehlung für eine durchschnittliche Aufnahme an Flavonoiden mit der Nahrung von 23 mg/d herausgegeben, um eine positive Wirkung der Flavonoide im Organismus zu erzielen. Lebensmittel mit einem sehr hohen Flavonidgehalt sind u.a. Tee (32 mg/100 g), Äpfel (23 mg/100 g) und rote Zwiebeln (141 mg/100g) (Kyle *et al.*, 2005). Die einzelnen Lebensmittel wiederum weisen sehr verschiedene Flavonoidtypen auf. Grüner Tee besitzt z. B. einen sehr hohen Gehalt an Catechinderivaten, welche zu den Flavan-3-olen gezählt werden (Graham *et al.*, 1992). Dagegen enthalten Zitrusfrüchte vor allem Flavanone und Dihydrochalcone, z. B. Neohesperidin oder Phloretin (Tomás-Baberán *et al.*, 2000; Moriguchi *et al.*, 2003).

Die positive Wirkung der Flavonoide auf die Gesundheit beruht auf der antioxidativen Kapazität dieser Substanzen, welche wiederum von der Struktur abhängig ist (Rice-Evans *et al.*, 1996). Aus diesem Grund nimmt die Analytik der Flavonoide einen besonders hohen Stellenwert ein, um Substanzen mit einer relativ hohen antioxidativen Kapazität ausfindig zu machen.

Begonnen wurde mit der Polyphenolanalytik Ende der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts. Hierbei wurden die ersten Erkenntnisse zu den Strukturen der Flavonoide anhand der ¹H-NMR-Spektroskopie gewonnen. Weitere Hinweise zu den Strukturen wurden durch die Verschiebung der Absorptionsmaxima der Flavonoide nach Zugabe von sogenannten „Shift-Reagenzien“ erhalten, wobei sich die einzelnen Flavonoidklassen voneinander unterscheiden lassen (Sherif *et al.*, 1980; Fossen *et al.*, 2005). Die absolute Reinheit der Flavonoide war jedoch eine grundlegende Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode. Einen großen Fortschritt brachte die ¹³C-NMR-Spektroskopie, allerdings wurden in der Anfangsphase sehr hohe Substanzmengen (bis zu 100 mg) benötigt.

Die moderne Analytik von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen besteht heute zum einen aus der NMR-Spektroskopie, wobei vor allem die zweidimensionalen NMR-Experimente, wie HMBC und HMQC zur eindeutigen Strukturaufklärung herangezogen werden. Andererseits haben die verschiedenen Techniken der Massenspektrometrie (FAB, MALDI-TOF, ESI) eine herausragende Bedeutung für die Naturstoffanalytik. Substanzgemische können durch moderne Kopplungstechniken wie LC-MS oder GC-MS aufgetrennt und anhand von Standards identifiziert werden.

Die analytische Erfassung trägt zum Verständnis der systematischen Einordnung der verschiedenen Pflanzenarten in ihre entsprechenden Gattungen bei. Im Zuge des Fortschrittes der Polyphenolanalytik wurde erkannt, dass ähnliche Flavonoidmuster in den verschiedenen Pflanzen gleicher Gattung auftreten. Dennoch gibt es immer wieder herausragende Beispiele, dass bestimmte Flavonoide nur typisch für eine ganz bestimmte Art einer Gattung sind. Außerdem sind auch unterschiedliche Naturstoffe in den verschiedenen Pflanzenteilen zu finden (Friedrich *et al.*, 1966).

Doch nicht nur die Fortschritte in der Strukturaufklärung allein sind wichtig für die Analytik der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Auch die Substanzisolierung stellt einen wichtigen Aspekt in der Naturstoffanalytik dar. Komplexe Extrakte von Naturstoffen werden hierbei anhand von chromatographischen Methoden aufgetrennt, um Einzelkomponenten zu isolieren. Hierfür können z. B. die verschiedenen Arten der Säulenchromatographie angewandt werden. Allerdings sind dabei, insbesondere bei sehr komplexer Matrix, oft nur unzureichende Ergebnisse in vergangener Zeit erzielt worden. Vor allem die irreversible Adsorption der Extrakte am Säulenmaterial stellte ein Problem dar. Die letztendliche Revolution in der Analytik sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe wurde mit der Multilayer Countercurrent Chromatographie (MLCCC) erreicht. Dies ist eine spezielle Form der Verteilungschromatographie, bei der auch größere Substanzmengen (bis zu 1 g Naturstoffextrakt) in einem einzigen Trennungsgang separiert werden können. Vorteil dieser Methode ist weiterhin, dass die stationäre Phase wieder vollständig von der Trennsäule erhalten werden kann. Die nach einem Trennungsgang nicht eluierten Verbindungen können somit nach Wechsel des Fließmittelsystems erneut auf die Säule aufgetragen werden.

Damit können sämtliche sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe eines Extraktes isoliert und gleichzeitig eine ausreichende Substanzmenge für die verschiedenen Methoden der Strukturaufklärung erhalten werden.

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, aus ausgewählten Pflanzen, welche bezüglich der Naturstoffe nur ungenügend in der Literatur beschrieben sind, neuartige Substanzen zu isolieren. Als Untersuchungsmaterial wird hierbei der Rooibostee (*Aspalathus linearis*) und der Rhabarber (*Rheum rhaponticum*) verwendet.

Nach der Extraktion des Pflanzenmaterials wird zur Isolierung der Polyphenole die Multilayer Countercurrent Chromatographie (MLCCC) und die präparative HPLC genutzt. Hierbei soll eine analytische Methode entwickelt werden, welche in der Lage ist, die verschiedenen Polyphenolklassen der beiden Pflanzen vollständig und simultan zu erfassen. Die Strukturaufklärung der isolierten Reinstsubstanzen erfolgt durch die hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS) und den verschiedenen Techniken der NMR (^1H , ^{13}C , APT, HMQC und HMBC).

Während der Fermentation wird die Farbgebung und die Polyphenolzusammensetzung vom Rooibostee verändert. Die hierbei ablaufenden Reaktionen sollen durch Modellinkubationen der isolierten Reinstsubstanzen, insbesondere der Dihydrochalcone, näher charakterisiert werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, das antioxidative Potenzial der im Rooibostee enthaltenen Flavonoide zu ermitteln. In vergangenen Arbeiten haben bereits Untersuchungen zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität vom Rooibostee stattgefunden, allerdings wurden hierbei nur die Extrakte vom fermentierten und unfermentierten Tee berücksichtigt, wobei aber stets hohe antioxidative Potenziale ermittelt wurden (Marnewick *et al.*, 2003; Joubert *et al.*, 2005). Welche Substanzen aber diese hohe Aktivität verursachen, soll innerhalb dieser Arbeit geklärt werden. Die antioxidative Kapazität der isolierten Polyphenole aus dem Rooibostee wird hierbei durch verschiedene antioxidative Testsysteme (TEAC, Fremy`s-Salz, LDL-Oxidation) bestimmt, um eventuelle Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Flavonoide aus den einzelnen Testsystemen ableiten zu können.

Weiterhin soll ein Screening-Schnelltestverfahren entwickelt werden, damit von Naturstoffextrakten mit unbekanntem Inhaltsstoffen zunächst das antioxidative Potenzial vor der gezielten Substanzisolierung ermittelt werden kann. Hierzu werden die verschiedenen Extrakte von Rooibos durch HPLC-DAD aufgetrennt und fraktioniert. Gekoppelt wird das analytische HPLC-System dabei offline an die drei oben beschriebenen Testsysteme.

3 Zusammenfassung der Wissenschaftlichen Arbeit

3.1 Sekundäre Inhaltsstoffe von Rhabarber

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

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

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

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

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

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

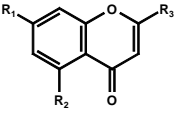
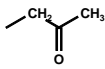
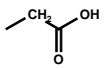
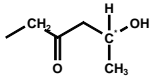
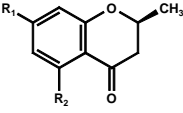
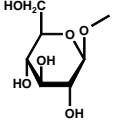
Phenolcarbonsäuren

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

Chromon- und Chromanonderivate

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

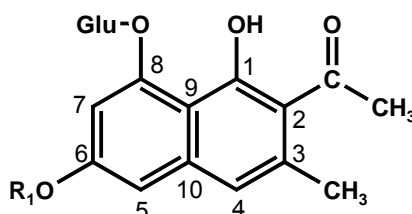
Tab. 2 Chromon- und Chromanonderivate isoliert aus der Wurzel des Medizinalrhabarbers

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

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

Naphthalenglycoside

Aus der Wurzel des Medizinalrhabarbers wurden auch Naphthalenglycoside gewonnen (Tsuboi *et al.*, 1977). Das Grundgerüst dieser Substanzen ist in Abb. 2 dargestellt. Ermittelt wurden die Strukturen von 6-Hydroxymusizin-8-*O*-β-D-glucopyranosid (R₁, R₂ = H), Torachryson-8-*C*-β-D-glucopyranosid (R₁ = CH₃, R₂ = H) und Torachryson-8-*C*-β-D-(6'-*O*-oxalyl)-glucopyranosid (R₁ = CH₃, R₂ = CO-COOH).

**Abb. 2** Grundstruktur der Naphthalenderivate

Anthracenderivate

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

pyranosid, Physcion und Physcion-8-*O*- β -D-glucopyranosid (Matsuda *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2005, Komatsu *et al.*, 2006). Smolarz *et al.* (2005) hat Emodin ebenfalls in *R. rhaponticum* und *R. undulatum* nachgewiesen. Physcion wurde neben Emodin und Chrysophanol von Tuson *et al.* (2003) im Türkischen Rhabarber (*Rheum ribes*) identifiziert. Danthron wurde neben Emodin, Aloe-emodin, Chrysophanol, Rhein und Physcion in der Wurzel von *R. palmatum* aufgefunden (Huang *et al.*, 2006). Auch die Rheinoside A bis D lassen sich in der Wurzel des Medizinalrhabarbers nachweisen (Yamagishi *et al.*, 1987). Die Rheinoside A und B ($R_1 = OH$) unterschieden sich wie die Rheinoside C und D ($R_1 = H$) am C₁₀-Kohlenstoff hinsichtlich der absoluten Konfiguration. In der Wurzel von *R. emodi* konnten zusätzlich folgende Substanzen nachgewiesen werden: Emodin-8-*O*- β -D-gentiobiosid, Chrysophanol-8-*O*- β -D-gentiobiosid, Physcion-8-*O*- β -D-gentiobiosid, Sulfemodin-8-*O*- β -D-glucosid, Rhein-11-*O*- β -D-glucosid, Cascaroside A-D und Cassialoin (Krenn *et al.*, 2003, 2004). Die Grundstrukturen der bis hierher aufgezählten Anthracenderivate sind in Abb. 3 dargelegt.

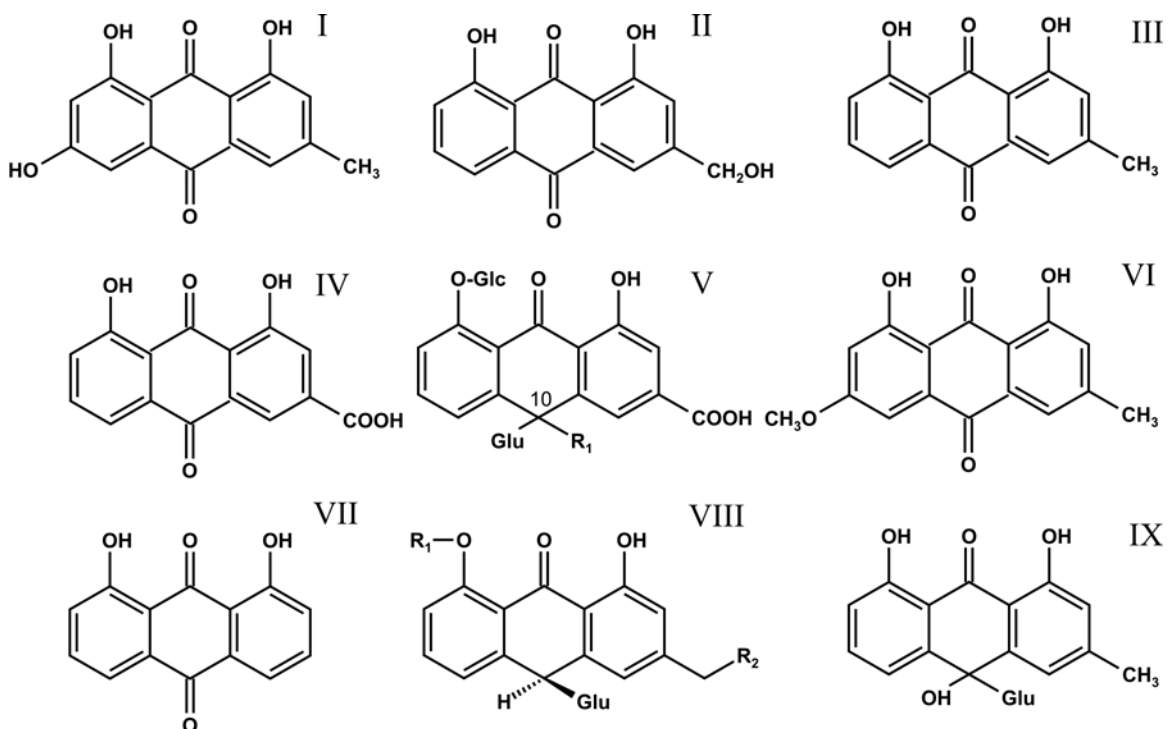


Abb. 3 Grundstrukturen der Anthracenderivate (I – Emodin; II – Aloe-Emodin; III – Chrysophanol; IV – Rhein; V – Rheinosid; VI – Physcion; VII – Danthron; VIII – Cascarosid A-D, A & B: $R_1 = Glu$, $R_2 = OH$, C & D: $R_1 = Glu$, $R_2 = H$; IX - Cassialoin)

Dianthrone, zu denen die Sennoside gehören, wurden in ganz unterschiedlichen Rhabarberpflanzen hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt. Die Sennoside A bis F wurden in der Wurzel von *R. officinale* nachgewiesen (Oshio *et al.*, 1974; Komatsu *et al.*, 2006). In *Rheum palmatum* konnten wiederum nur die Sennoside A bis C identifiziert werden (Zwaving *et al.*, 1965). Dianthrone entstehen durch C₁₀-C₁₀-Bindungsknüpfung von zwei Anthrachinonen. Die Grundstruktur der Sennoside A und B ist in Abb. 4 dargestellt.

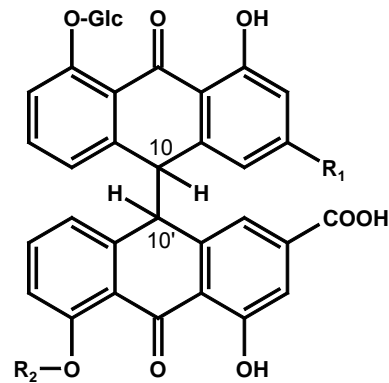


Abb. 4 Sennoside A (10, 10'-*erythro*) und Sennoside B (10, 10'-*threo*), R₁ = COOH, R₂=Glu (Komatsu *et al.*, 2006)

Die Sennoside C und D unterscheiden sich von der A- und B-Form durch eine CH₂OH-Funktion an Position R₁. Im Unterschied zum Sennosid A und B zeigen die Sennoside E und F an Position R₂ anstelle der Glucose die Glucuronsäure auf. Kuo *et al.* hatte 2003 auch die nichtglycosilierte Formen der Sennoside, welche als Sennidine bezeichnet werden, im Medizinalrhabarber nachgewiesen.

Stilbene

Die bisher bekannten Stilbene des Rhabarbers sind hauptsächlich aus der Wurzel der Pflanze isoliert worden. Die identifizierten Substanzen bestehen alle aus einem C₆-C₂-C₆-Grundkörper, dem Stilben. Aus diesem Grund sind stets 2 mögliche Isomere zu erwarten. Grundsätzlich wurden die meisten Stilbenderivate aus der Wurzel des Chinesischen Rhabarbers (*Rheum officinale*) von Kashiwada *et. al.* (1986, 1988, 1989) und Nonaka *et al.* (1977) charakterisiert. Hierzu zählen die folgenden Verbindungen: 3,4',5-Trihydroxystilbene (Resveratrol), 3,4',5-Trihydroxystilben-4'-O-β-D-(6''-O-galloyl)-glucopyranosid, *cis*-3,3',5-Trihydroxy-4'-methoxystilben-3-O-β-D-glucopyranosid (Rhaponticin), *cis*-3,3',5-Trihydroxy-4'-methoxystilben-3-O-β-D-(6''-O-galloyl)-glucopyranosid, *cis*-3,5-Dihydroxy-4'-methoxystilben-3-O-β-D-glucopyranosid (Desoxyrhaponticin), *cis*-3,3',5-Trihydroxy-4'-methoxystilben (Rhapontigenin), Resveratrol-4'-O-β-D-glucopyranosid, Resveratrol-4'-O-β-D-(6''-O-

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

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

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

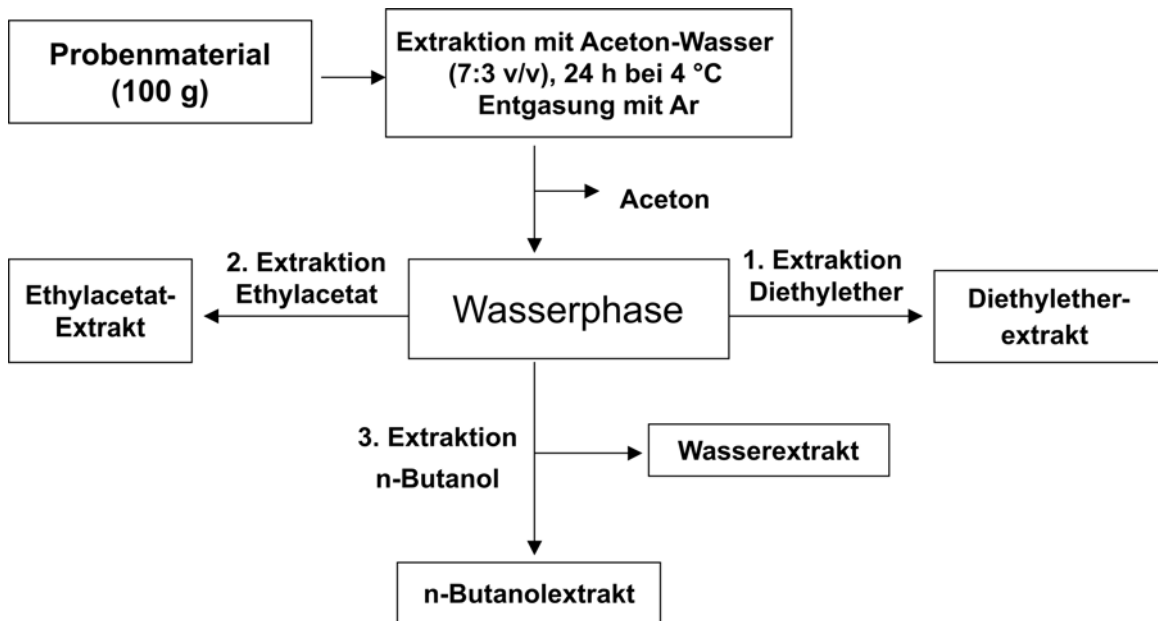


Abb. 5 Aufarbeitungsschema des Pflanzenmaterials

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

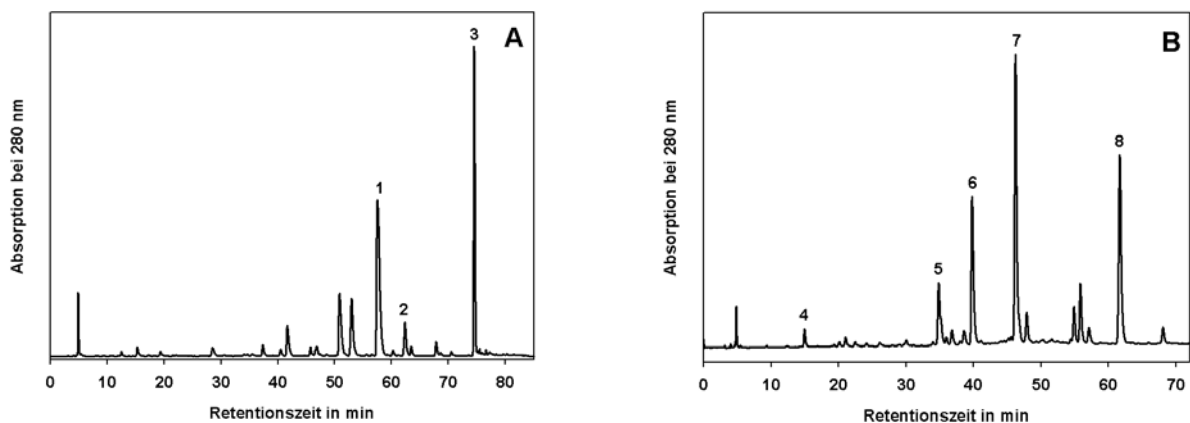


Abb. 6 HPLC-DAD-Chromatogramm vom Diethyletherextrakt (A) und Ethylacetatextrakt (B) der Rhabarberwurzel. (1 – *trans*-Rhapontigenin (57,5 min); 2 – *cis*-Desoxyrhaponticin (62,4 min); 3 – *trans*-Desoxyrhapontigenin (74,5 min); 4 – (+)-Catechin (15,3 min); 5 – *trans*-Resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranosid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

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

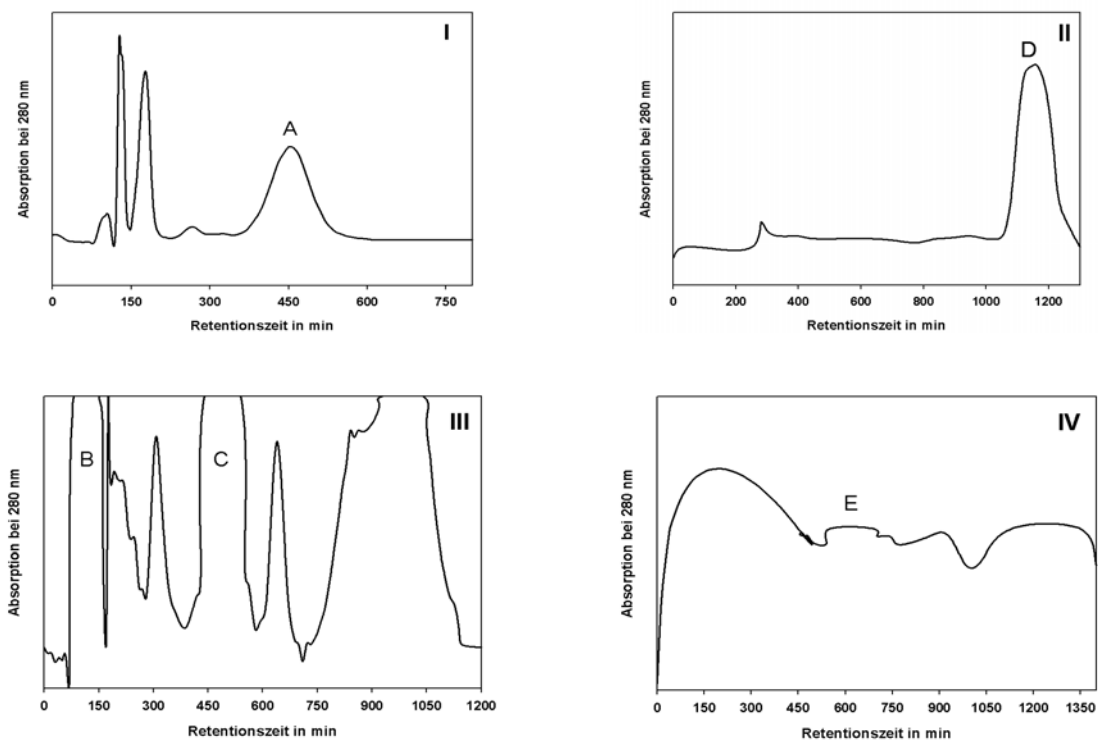


Abb. 7 MLCCC-Chromatogramme nach Auftrennung des Diethyletherextraktes I&III und des Ethylacetatextraktes II&IV (III&IV stellt jeweils die Auftrennung der stationären Phase von I & II dar). **A** – *cis*-Desoxyrhaponticin, **B** – *trans*-Desoxyrhapontigenin, **C** – *trans*-Rhapontigenin, **D** – *trans*-Rhaponticin,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

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

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

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

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

Flavonoide

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

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

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

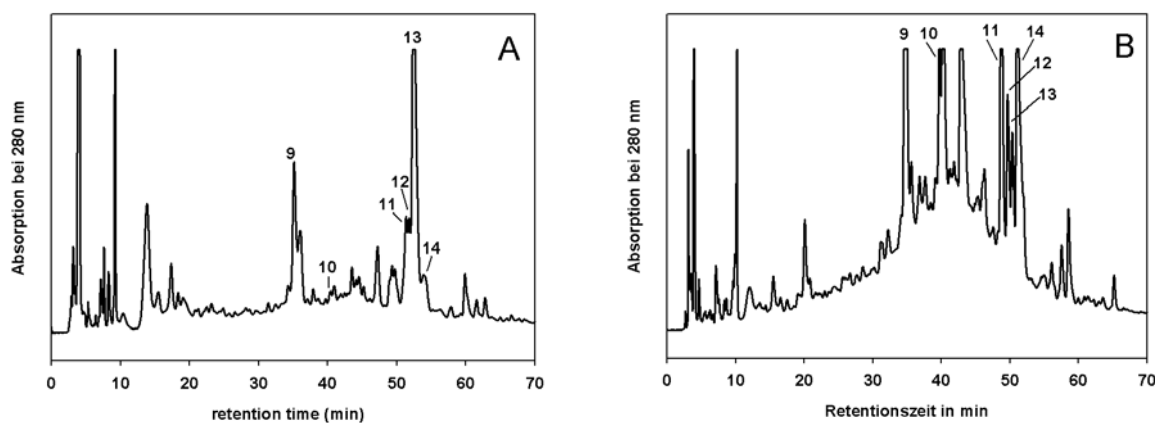


Abb. 8 HPLC-DAD-Chromatogramm des *n*-Butanolextraktes der Stängel (A) und Blätter (B) bei $\lambda = 280$ nm. (**9** – 6,8-Di-*C*- β -D-glucosylapigenin (34,9 min); **10** – 6-*C*- β -D-Glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin (40,9 min); **11** – Isovitexin (48,9 min); **12** – 6-*C*- β -D-Arabinosyl-8-*C*-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

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

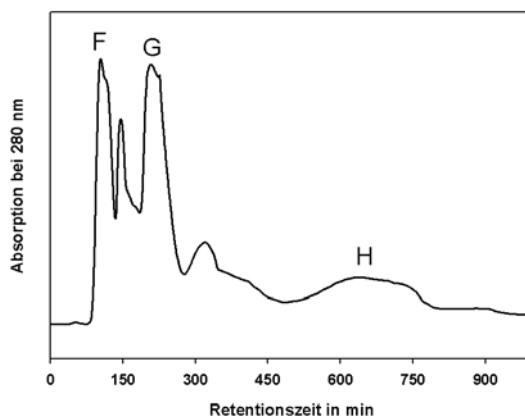


Abb. 9 MLCCC-Chromatogramm vom *n*-Butanolextrakt der Blätter (**F** – 6,8-Di-*C*- β -D-glucosylapigenin, 6-*C*- β -D-Glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin, 6-*C*- β -D-Arabinosyl-8-*C*- β -D-glucosylapigenin; **G** – Rutin; **H** – Isovitexin, Quercetin-3-*O*- β -D-glucuronid).

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

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

Krenn *et al.* (2003) hatte in *Rheum emodi* das Carpusin (R = CH₃) und Maesopsin (R = H) entdeckt. Die Grundstruktur dieser beiden Auronole ist in Abb. 10 dargestellt.

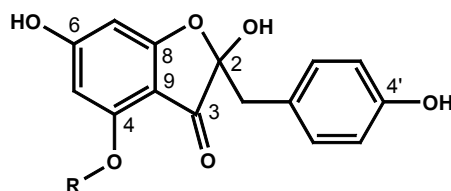


Abb. 10 Grundstruktur der Auronole

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

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

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

3.2 Polyphenole aus *Aspalathus linearis*

3.2.1 Isolation und Strukturaufklärung

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

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

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

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

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

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

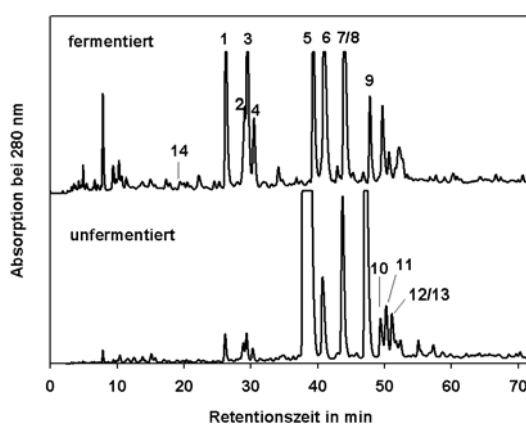


Abb. 11 HPLC-DAD-Chromatogramm des fermentierten und unfermentierten Ethylacetatextraktes bei $\lambda = 280$ nm. **1** – (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid (26,3 min); **2** – (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranosid (29,1 min); **3** – (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid (29,5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

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

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

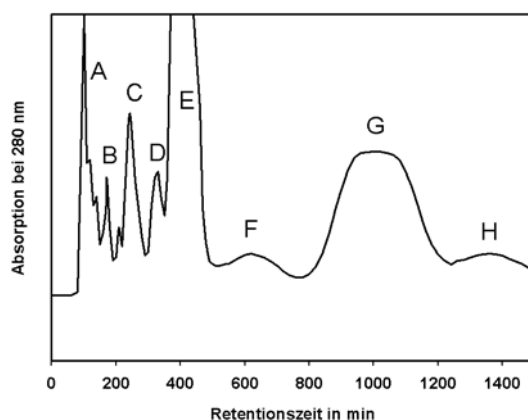


Abb. 12 MLCCC-Chromatogramm nach Auftrennung des Ethylacetatextraktes von unfermentiertem Rooibostee. (A – Flavonoidgemisch; B - (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- β -D-glycopyranosid **2**; C – Chlorogensäure **14**, (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glycopyranosid **1**, (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glycopyranosid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

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

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

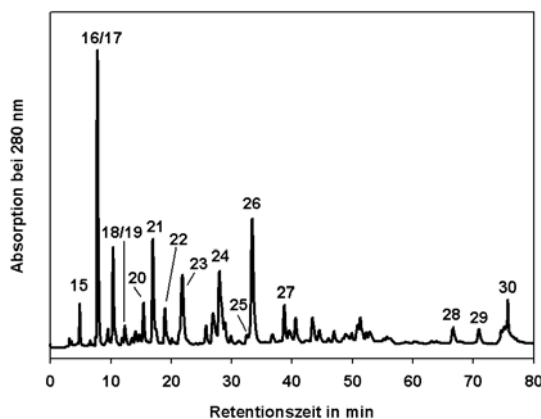


Abb. 13 HPLC-DAD-Chromatogramm des Diethyletherextraktes von unfermentierten Rooibos bei $\lambda = 280$ nm. **15** - Gallussäure (4,9 min); **16** - Protocatechussäure (7,8 min); **17** - 3,5-Dihydroxybenzoesäure (7,8 min); **18** - Gentsinsäure (12,3 min); **19** - *p*-Hydroxybenzoesäure (12,3 min);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

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

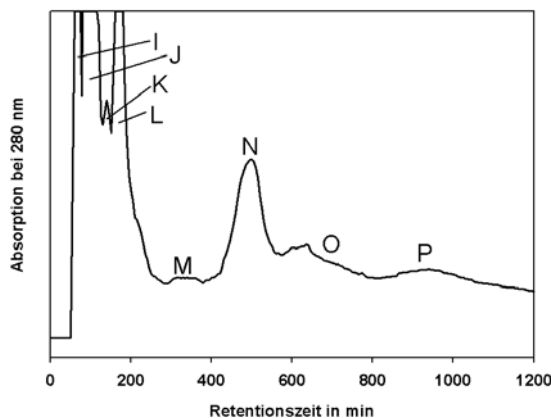


Abb. 14 MLCCC-Chromatogramm vom Diethyletherextrakt ($\lambda = 280$ nm). **I/J/K** - Substanzgemisch; **L** - Gallussäure **15**; **M** - Gentsinsäure **18**; **N** - Protocatechussäure **16**; **O** - Syringasäure **23**; **P** - Vanillinsäure **21**, Kaffeesäure **22**.

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

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

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

3.2.2 Reaktionen der Flavonoide

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

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

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

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

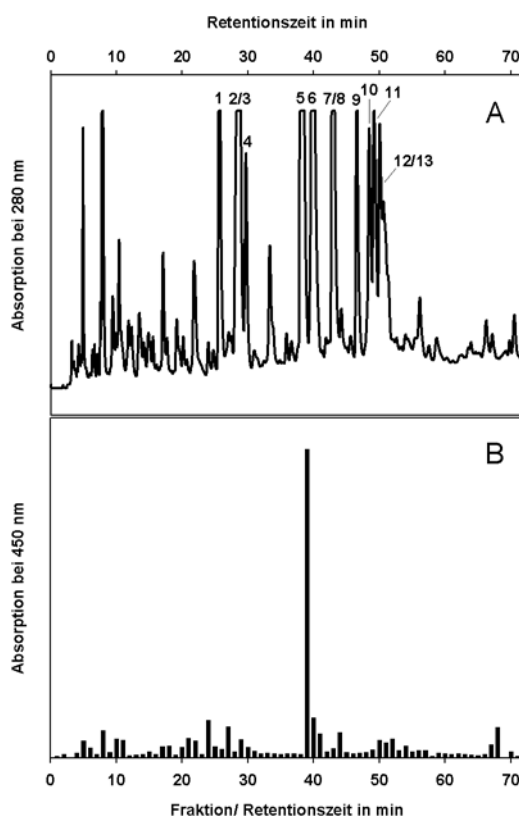


Abb. 15 A: HPLC-DAD Chromatogramm des Ethylacetatextraktes vom fermentierten Rooibostee bei $\lambda = 280$ nm. **1** - (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid (26,3 min); **2** - (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranosid (29,1 min); **3** - (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid (29,5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

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

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

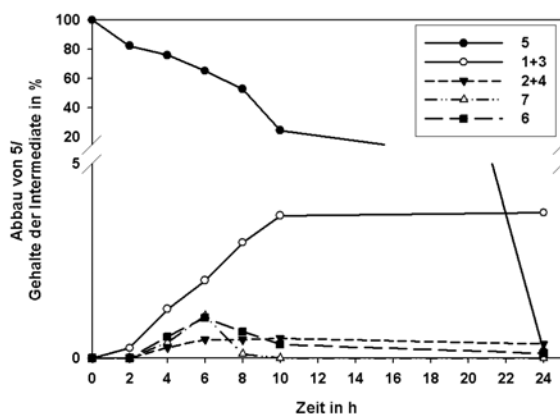


Abb. 16 Abbau des Aspalathins **5** zu (*R*)/(*S*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid **1+3**, (*R*)/(*S*)-Eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranosid **2+4**, Orientin **6** und Isoorientin **7**. (Die Gehalte der Folgeprodukte wurden prozentual auf die Ausgangskonzentration des Aspalathins umgerechnet).

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

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

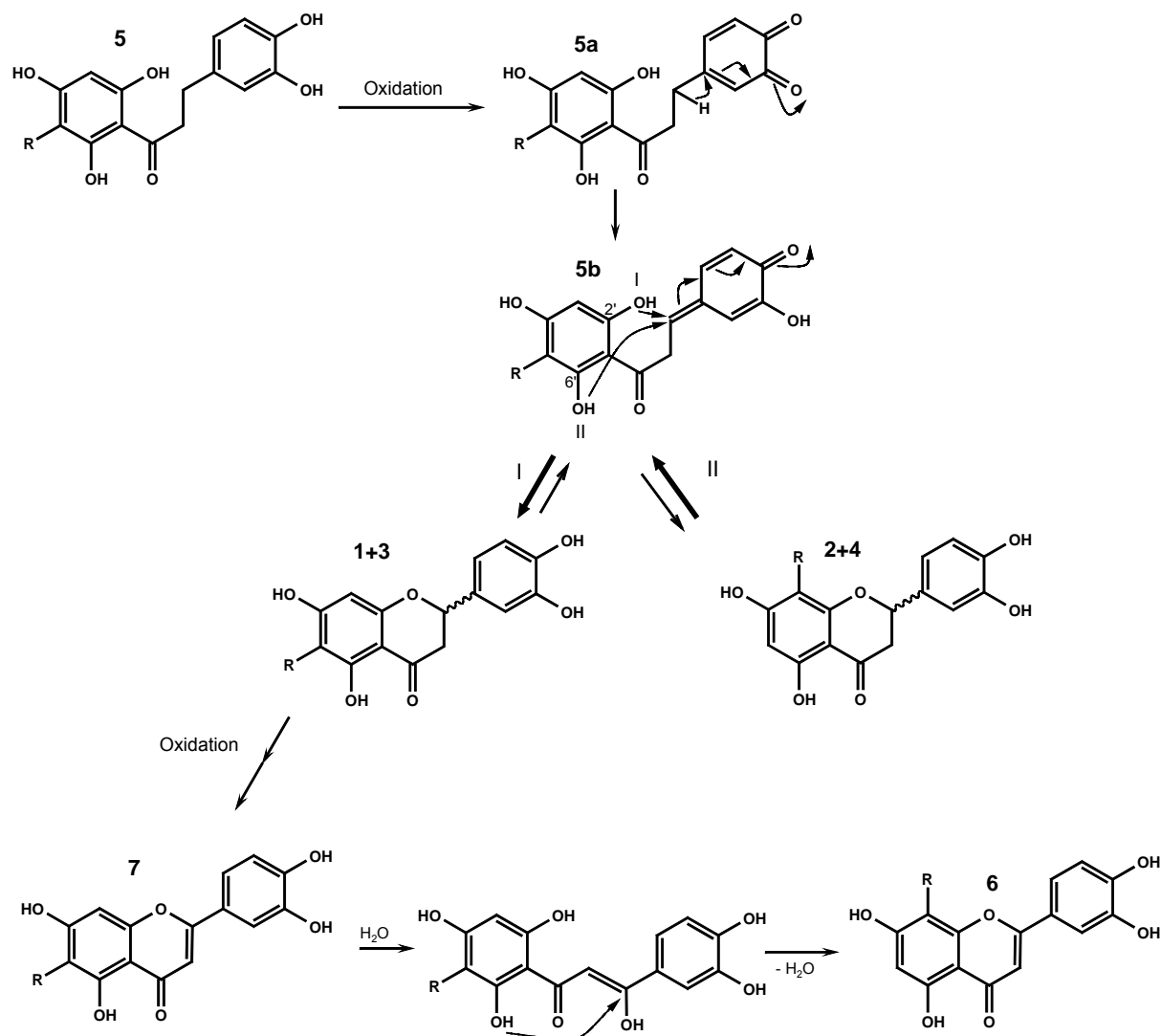


Abb. 17 Oxidativer Abbau des Aspalathins **5** zu Orientin **6** und Isoorientin **7**. Die Eriodictyole **1-4** (**1**-(*S*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid, **2**-(*S*)-Eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranosid, **3**-(*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid, **4**-(*R*)-Eriodictyol-8-*C*-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

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

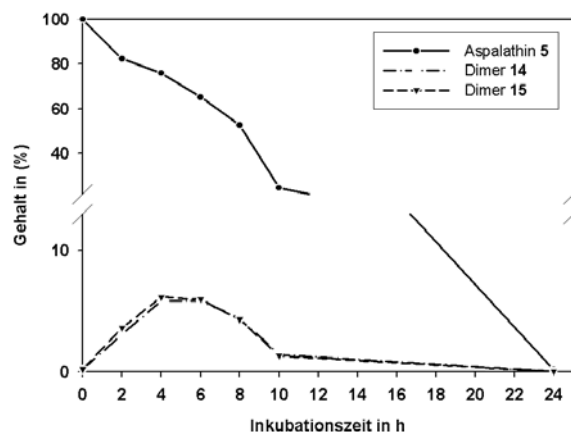


Abb.18 Inkubation von Aspalathin über einem Zeitraum von 24 h. Die prozentualen Gehalte der Folgeprodukte wurden bezogen auf die Ausgangskonzentration des Aspalathins berechnet.

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

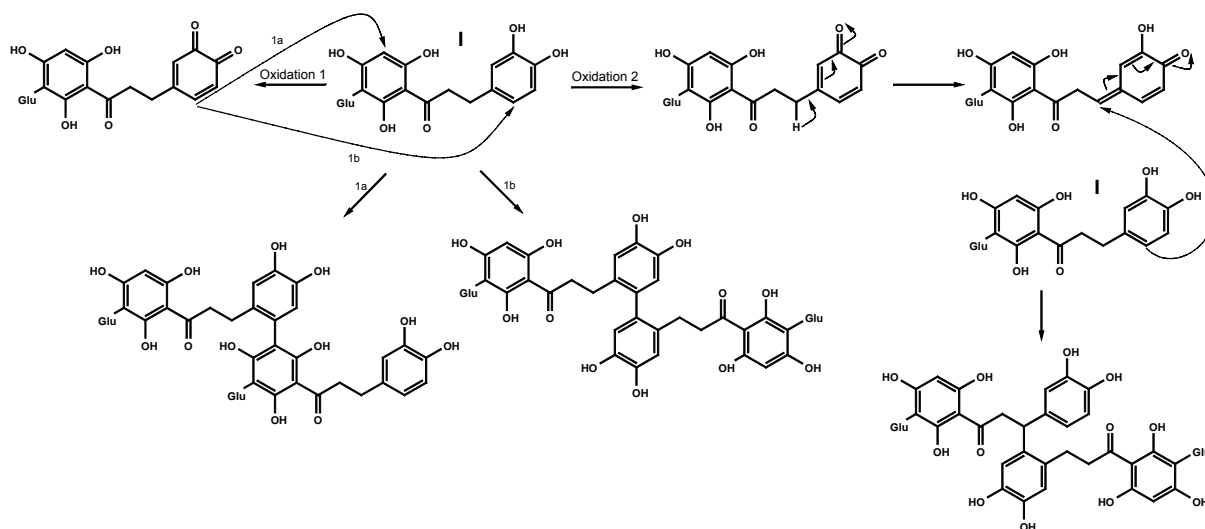


Abb. 19 Mögliche Reaktionsmechanismen zur Dimerbildung von Aspalathin (I).

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

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

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

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

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

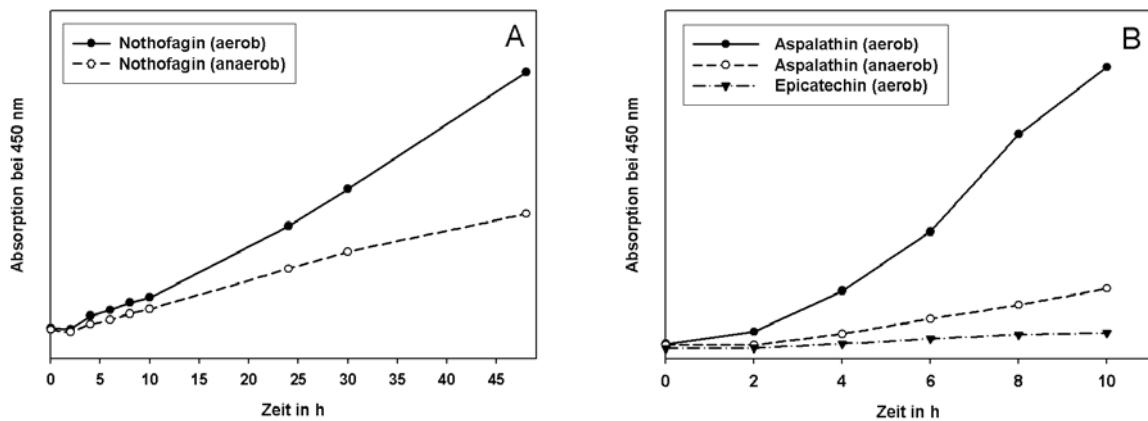


Abb. 20 Anaerobe und aerobe Bräunung von Nothofagin (A), Aspalathin und Epicatechin (B).

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

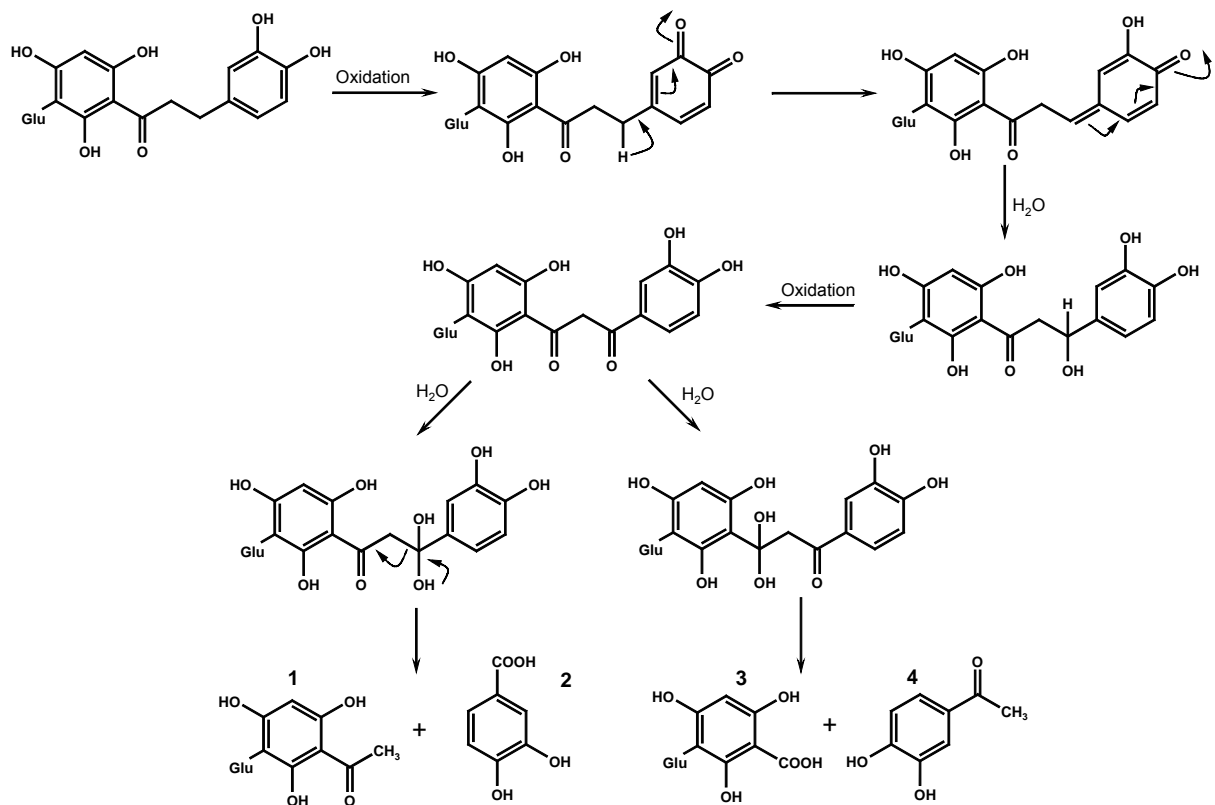


Abb. 21 Oxidativer Abbau des Aspalathins durch β -Carbonylsplaltung.

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

3.2.3 Struktur-Aktivitätsbeziehungen ausgewählter Polyphenole

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

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

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

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

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

Hydrophile Testsysteme

Das wohl am häufigsten angewandte Testsystem ist der TEAC-Assay. Beim diesem Testverfahren wird nach Inkubation von ABTS ein $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikalkation erzeugt, welches in einer bestimmten Menge vorgelegt und mit den entsprechenden Flavonoiden für eine definierte Zeit in Wechselwirkung tritt. Die Detektion des noch vorhandenen Radikals erfolgt photometrisch bei 734 nm. Die Erzeugung des Radikals kann auf 2 unterschiedlichen Wegen erfolgen. Einerseits wird Kaliumperoxodisulfonat eingesetzt, zum anderen Methmyoglobin und H_2O_2 . Standardisiert wird diese Methode mit dem wasserlöslichen Vitamin-E-derivat Trolox[®]. Das Ergebnis wird demzufolge in Trolox-Equivalenten (bezogen auf 1 mM Standardsubstanz) angegeben. Dieses antioxidative Testsystem kann auch online an ein HPLC-DAD-System gekoppelt werden (Koleva *et al.*, 2001). Hierbei werden die einzelnen Fraktionen von Substanzen nach Auftrennung mittels HPLC-DAD mit der radikalischen $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Lösung in Kontakt gebracht. Danach wird der Abbau des Radikals über einen 2. photometrischen Detektor quantifiziert. Zur elektrochemischen Erzeugung von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ aus einer ABTS-Lösung wurde ein Verfahren von Ivekovic *et al.* (2005) etabliert. Somit kann die Inkubationszeit zur Erzeugung der Radikalkationen umgangen werden.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Hydrophobe Testsysteme

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

Beim TRAP-Assay wird AAPH mit Plasma oder Serum in Kontakt gebracht, wobei nach bestimmten Zeitabständen die O_2 -Aufnahme elektrochemisch detektiert wird. Allerdings ist diese Methode zur Bestimmung eher ungeeignet, vor allem hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Ergebnissen, da das Plasma oder Serum als zu oxidierende Matrix verwendet wird. In diesen Probenmaterialien befinden sich jeweils unterschiedliche Konzentrationen an weiteren antioxidativ wirksamen Substanzen, wie Vitamin C, β -Carotin, Bilirubin, Albumin und Tocopherole, die letztendlich bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt werden (Cao *et al.*, 1993). Der ORAC-Assay stellt eine Weiterentwicklung des TRAP-Assays dar, wobei Serum oder Plasma gegen β -PE ausgetauscht werden. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von β -PE wird in diesem Assay auch gleichzeitig ein spezifischeres Detektionssystem verwendet. Marnewick *et al.* hat verschiedene Teegetränke, u.a. auch fermentierten und unfermentierten Rooibostee für 10 Wochen an Ratten verabreicht (Marnewick *et al.*, 2003). Die Extrakte der Leber wurden nach diesem Versuch anhand des ORAC-Tests hinsichtlich ihres antioxidativen Potenzials untersucht. Allerdings konnten keine Unterschiede zwischen dem Kontrollexperiment und den Versuchsreihen festgestellt werden.

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

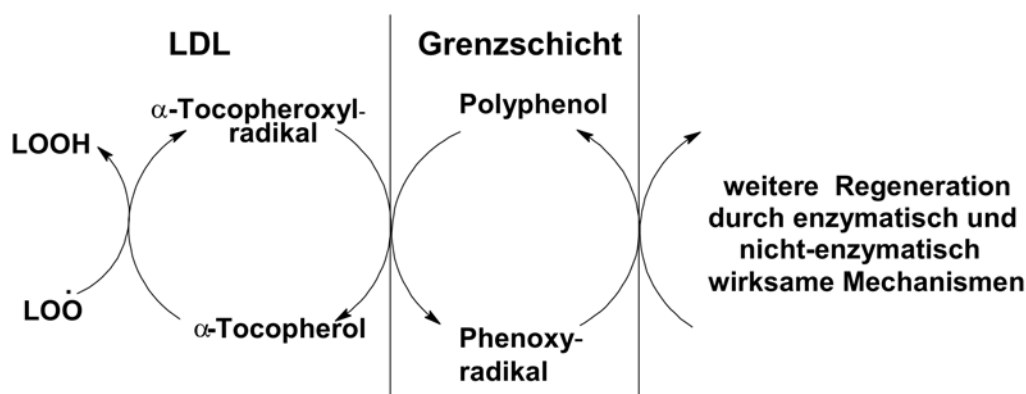


Abb. 22 Mögliche Wechselwirkung von α -Tocopherol und Polyphenolen an der Phasengrenzfläche der LDL

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

Unter definierten Bedingungen kann im Rancimatstest die Lipidperoxidation ausgelöst werden. In einer abgeschlossenen Apparatur werden hier definierte Bedingungen (O_2 -Einstrom und Temperatur) eingestellt, um dann die Bildung von Oxidationsprodukten konduktometrisch zu erfassen. Der Einfluss von verschiedenen wässrigen Rooibosteeextrakten, die sich hinsichtlich

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

Anwendung ausgewählter in-vitro-Testsysteme

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

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

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

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

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

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

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

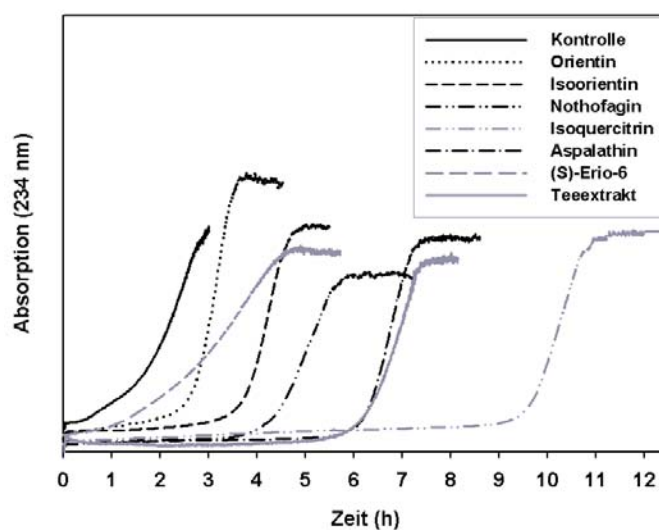


Abb. 23 LDL-Oxidationstest, induziert durch Cu^{2+} . Die *lag*-Phasenverschiebung wurde erzielt durch 1 nmol folgender Substanzen: (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid (2,1 h); Aspalathin (6,2 h); Orientin (2,7 h); Isoorientin (3,8 h); Nothofagin (4,3 h); Isoquercitrin (9,6 h); Teeextrakt (eingestellt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

An den Ergebnissen dieses Testsystems war die *lag*-Phasenverschiebung, induziert durch Isoquercitrin (9,6 h) besonders auffällig. Die antioxidative Kapazität von Isoquercitrin war in diesem hydrophoben Assay höher als das Potenzial von Aspalathin und Aspalathin im Teeextrakt. Die identischen *lag*-Phasenverschiebungen von Aspalathin und Teeextrakt können durch die Bräunungsreaktion des Aspalathins im Teeextrakt erklärt werden. Befindet sich Aspalathin in einer neutralen Lösung und in Gegenwart von weiteren, an der Bräunungsreaktion beteiligten Substanzen, so findet die Bräunungsreaktion des noch vorhandenen Aspalathins beschleunigt statt. Ist das Dihydrochalcon als Reinsubstanz in neutraler Lösung vorhanden, so ist der erste Schritt der Bräunungsreaktion der zeitlich limitierende Faktor für alle weiteren Folgereaktionen. Somit waren beim reinen Aspalathinversuch weniger Bräunungsprodukte während der Inkubationszeit zu erwarten, als beim Einsatz des Teeextraktes. Für beide Versuche wurden demzufolge ähnliche *lag*-Phasenverschiebungen erreicht, da mit der Oxidation von Aspalathin das antioxidative Potenzial der Folgeprodukte abnimmt. Im Teeextrakt waren neben dem Aspalathin aber noch weitere wasserlösliche, antioxidativ wirksame Bestandteile enthalten, welche die LDLs zusätzlich vor Oxidation geschützt haben. Beim TEAC-Test und Fremy's-Salz-Test ist dieses Phänomen nicht beobachtet worden, da die Versuchszeit nur 2,5 min bzw. 20 min betrug. Die intensive *lag*-Phasenverschiebung des Isoquercitrins kann durch die metallkomplexierenden Eigenschaften der Flavonole beschrieben werden (Gonzalez-Alvarez *et al.*, 2005). Die möglichen Bindungsstellen des Isoquercitrins sind in Abb. 24 dargestellt.

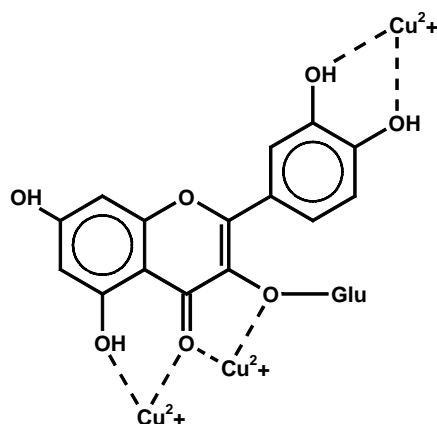


Abb. 24 Bindungsstellen von Cu^{2+} an Isoquercitrin (Gonzalez-Alvarez *et al.*, 2005).

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

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

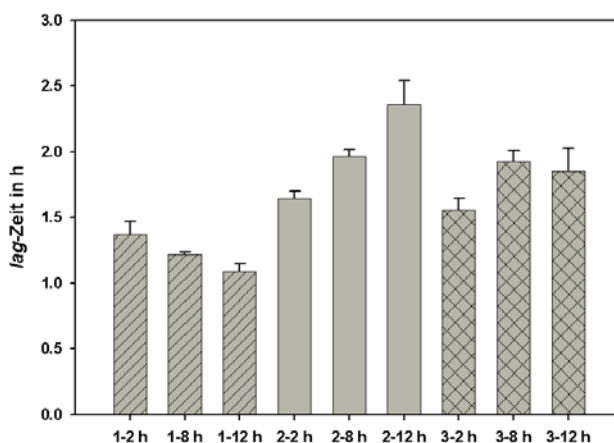


Abb. 25 Entkoppelter LDL-Oxidationstest. (1: Kontrolle, 2: Aspalathin, 3: Isoquercitrin)

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

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

Entwicklung eines Screening-Testsystems

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

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

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

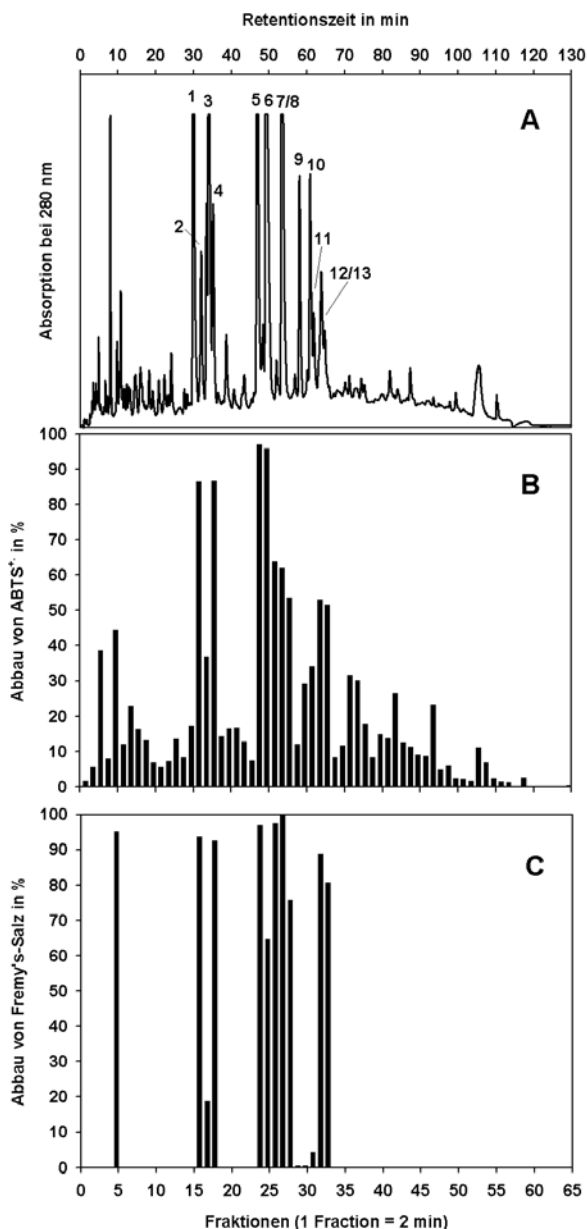


Abb. 26 Screening-Testverfahren bezogen auf den Ethylacetatextrakt des fermentierten Rooibostees. A: HPLC-DAD-Chromatogramm bei $\lambda = 280$ nm. 1: (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid (29,9 min); 2: (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranosid (33,3 min); 3: (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid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

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

Tab. 6 Verhältniszahlen (ABTS^{•+}-Abbau) /HPLC-DAD-Peakfläche^a von Flavonoiden aus dem Ethylacetatextrakt des Rooibosteess.

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

*Fraktionen, welche mit weiteren Verbindungen coeluieren.

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

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

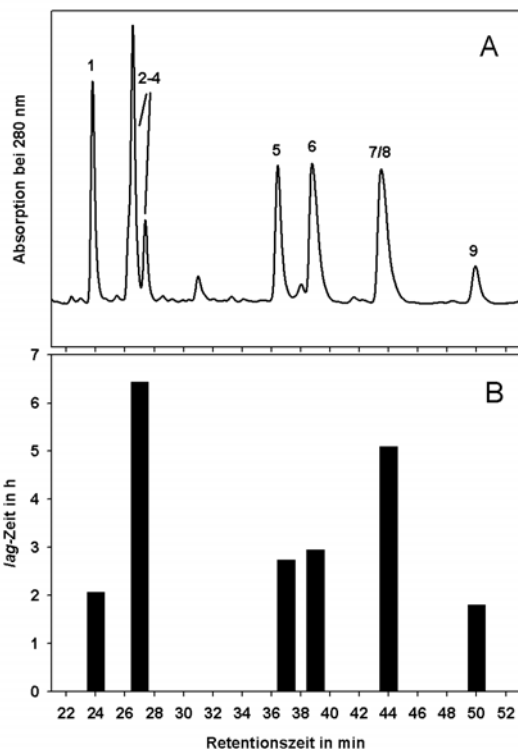


Abb. 27 LDL-Oxidations-Screeningtestsystem, angewandt auf den Ethylacetatextrakt von fermentierten Rooibostee. (A: HPLC-DAD-Chromatogramm. 1: (*S*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glycopyranosid (24,1 min), 2: (*S*)-Eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranosid (26,9 min); 3: (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid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

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

4 Originalarbeiten

4.1 Phenolic Composition of Rhubarb

Krafczyk, N.; Kötke, M.; Lehnert, N. and Glomb, M.A. Phenolic Composition of Rhubarb.
European Food Research and Technology **2008**, angenommen am 01.07.2008.

Phenolic composition of rhubarb

Nicole Krafczyk · Matthias Kötke · Nicole Lehnert ·
Marcus A. Glomb

Received: 29 April 2008 / Revised: 25 June 2008 / Accepted: 1 July 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Extracts of different parts (leaves, petioles and rhizomes) of domestic garden rhubarb (hybrids of *Rheum rhabarbarum* L. and *Rheum rhaponticum* L.) were investigated for their content of phenolic ingredients. Two stilbenes (*trans*-rhapontigenin, *trans*-desoxyrhapontigenin), five stilbene glycosides (*trans*-rhaponticin, *cis*- and *trans*-desoxyrhaponticin, *trans*-resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside, *trans*-piceatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranoside) and seven flavonoids [rutin, quercetin-3-*O*-glucuronide, isovitexin, 6,8-di-*C*- β -D-glucosylapigenin, 6-*C*- β -D-glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin (schaftoside), 6-*C*- β -D-arabosyl-8-*C*- β -D-glycosylapigenin (isoschaftoside), (+)-catechin] were unequivocally established. Separation was done in two steps. Multilayer countercurrent chromatography was applied to separate different extracts of plant material. Preparative HPLC was then used to obtain pure substances. The purity and identity of isolated compounds was confirmed by different NMR experiments, HR-MS and HPLC-DAD analysis.

Keywords Rhubarb · Multilayer countercurrent chromatography (MLCCC) · Phenolic compounds · NMR · HPLC-DAD · HR-MS

Introduction

Rhubarb belongs to the family of Polygonaceae. It is widely used as a traditional Chinese medicinal herb. There are approximately 50 various kinds of rhubarb (*Rheum* species), e.g., *R. palmatum* L., *R. rhaponticum* L., *R. officinale* L., *R. undulatum* L. (syn. *R. rhabarbarum* L.), *R. emodi* L. and *R. ribesformicum* L. [1]. Botanically, it is difficult to distinguish between the various *Rheum* species. Recent studies on the constituents of rhubarb (leaves and rhizoms) have revealed the occurrence of a variety of phenolic compounds, i.e., anthracene derivatives (which are the active principles of the purgative effect) [2, 3], naphthalene derivatives [4], stilbene glycosides [5, 6], tannin-related compounds such as galloyl esters of glucose [7], flavonols [8], catechine derivatives [5, 9] and anthocyanins [10]. The various kinds of rhubarb contain different types of phenolic ingredients. *R. palmatum* L. and *R. officinale* L. have anthraquinones and anthraquinone-glycosides. *R. rhaponticum* L. and *R. ribesformicum* L. possess stilbenes, such as rhaponticosides, which induce phytoestrogenic effects [11]. Most botanical gardens in Europe cultivate species of the section *rhaponticum*. The species of this section hybridize with great ease, thus, nowadays there are no pure species of this section in cultivation in Europe [12]. The commercial garden rhubarb is a crossbreed between *R. rhabarbarum* L. and *R. rhaponticum* L. [13].

Ingredients of traditional Chinese rhubarb (*R. officinale*) were studied in-depth. In contrast, the polyphenolic ingredients of garden rhubarb, cultivated in Europe, were characterized very scarcely. Therefore, the aim of this study was to isolate polyphenols from the rhizome, petioles and leaves of garden rhubarb by MLCCC and preparative HPLC. MLCCC has been successfully applied to analysis and separation of various natural products [14].

N. Krafczyk · M. Kötke · N. Lehnert · M. A. Glomb (✉)
Institute of Chemistry, Food Chemistry,
Martin Luther University Halle-Wittenberg,
Kurt-Mothes-Str. 2, 06120 Halle, Germany
e-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de

Materials and methods

Chemicals

Chemicals of highest quality available were obtained from Roth (Karlsruhe, Germany) unless otherwise indicated. Methanol was HPLC-grade from Merck (Darmstadt, Germany). Heptafluorobutyric acid and (+)-catechin were purchased from Fluka (Taufkirchen, Germany). Dimethylsulfoxide (DMSO- d_6) was obtained from Chemotrade (Leipzig, Germany).

Extraction of plant material

Rhubarb rhizomes, leaves and petioles were obtained from local gardens in Germany (Sachsen-Anhalt and Brandenburg). Hundred grams of freeze-dried material was extracted with acetone/water (7:3 v/v) at 5 °C for 24 h under argon atmosphere, and decanted. Acetone was removed under reduced pressure. The residual H₂O phase was successively extracted with diethyl ether (2 × 200 mL), ethyl acetate (2 × 200 mL) and *n*-butanol (2 × 200 mL). From the individual extracts solvents were removed under reduced pressure.

Multilayer countercurrent chromatography

The Multilayer countercurrent chromatography (MLCCC) system (Ito, Multilayer Separator–Extractor Modell, P.C. Inc., Potomac) was equipped with a Waters constant flow pump (model 6000 A), a Zeiss Spectralphotometer PM2D operating at 280 nm, a sample injection valve with a 10-mL sample loop. Eluted liquids were collected in fractions of 8 mL with a fraction collector (LKB Ultrac 7000). Chromatograms were recorded on a plotter (Servogor 200). The multilayer coil was prepared from 1.6 mm ID PTFE tubing. The total capacity was 300 mL. The MLCCC was run at a revolution speed of 800 rpm and a flow rate of 2 mL min⁻¹ in head to tail modus.

Samples of 1 g were dissolved in a 1:1 mixture (10 mL) of light and heavy phase and injected into the system. Solvent system A for separation of diethyl ether extract consisted of water/ethyl acetate (2:1 v/v). Ethyl acetate extracts were separated by using ethyl acetate/*n*-butanol/water (2:1:4 v/v) (solvent system C). Then, structures of the residual stationary phase of both mentioned extracts were isolated by chloroform/methanol/water (4:3:2 v/v) (solvent system B). *n*-Butanol extracts were separated by using ethyl acetate/*n*-butanol/water (3:1:4 v/v) (solvent system D).

Analytical HPLC-DAD

A Jasco (Gross-Umstadt, Germany) quaternary gradient unit PU 2080, with degasser DG 2080-54, autosampler AS 2055, column oven (Jasco Jetstream II) and multiwavelength detector MD 2015 was used. Chromatographic separations were performed on stainless steel columns (VYDAC CRT. #218TP54, 250 × 4.0 mm, RP 18, 5 μm, Hesperia, CA) using a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The mobile phase used was water (solvent A) and MeOH/water (7:3 v/v, solvent B). To both solvents (A and B), 0.6 mL L⁻¹ heptafluorobutyric acid (HFBA) was added. Samples were injected at 10% B, the gradient then changed linear to 30% B in 30 min, to 65% B in 40 min, to 100% B in 2 min, and held at 100% B for 8 min. The column temperature was 25 °C. The effluent was monitored at 280 nm, and 350 nm.

Preparative HPLC-UV

A Besta HD 2–200 pump (Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 8 mL min⁻¹. Elution of material was monitored by a UV-detector (Jasco UV-2075, Gross-Umstadt, Germany). Chromatographic separations were performed on stainless steel columns (VYDAC CRT. #218TP1022, 250 × 23 mm, RP18, 10 μm, Hesperia, CA). The mobile phase used was solvent A and B identical to the analytical HPLC-DAD system. From the individual chromatographic fractions solvents were removed under reduced pressure. After addition of water solutions of polyphenols were freeze-dried.

Accurate mass determination (HR-MS)

The high resolution positive and negative ion ESI mass spectra were obtained from a Bruker Apex III Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, USA) equipped with an Infinity™ cell, a 7.0 Tesla superconducting magnet (Bruker, Karlsruhe, Germany), an RF-only hexapole ion guide and an external electrospray ion source (APOLLO; Agilent, off axis spray). Nitrogen was used as drying gas at 150 °C. The samples were dissolved in methanol and the solutions were introduced continuously via a syringe pump at a flow rate of 120 μL h⁻¹. The data were acquired with 256 k data points and zero filled to 1,024 k by averaging 32 scans.

Magnetic resonance spectroscopy (NMR)

NMR spectra were recorded on a Varian Unity Inova 500 instrument (Darmstadt, Germany). Chemical shifts are given relative to external Me₄Si.

Results and discussion

Isolation and elucidation of phenolic ingredients from rhizome

Diethyl ether, ethyl acetate and *n*-butanol extract from rhizome (*Rhei radix*) were screened for flavonoids by analytical HPLC-DAD. Basically, the ethyl acetate and *n*-butanol extracts revealed the same ingredients. Therefore, diethyl ether and ethyl acetate extract were used for isolation of substances. Final structural evidence was achieved by ^1H - and ^{13}C -nuclear magnetic resonance (NMR), as well as heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) NMR experiments.

Diethyl ether extract

HPLC-DAD chromatogram of diethyl ether extract is shown in Fig. 1. First step of purification was separation by MLCCC (system A) (Fig. 2a). Stationary phase retention was between 65–70%. The residual stationary phase was further processed by a second MLCCC-step (system B, retention: 80%) (Fig. 2b). Afterwards, fractions A–C were separated by preparative HPLC to isolate pure substances. The following structures were verified: *trans*-rhapontigenin **1** (C) ($\lambda_{\text{max}} = 318 \text{ nm}$), *cis*-desoxyrhaponticin **2** (A) ($\lambda_{\text{max}} = 314 \text{ nm}$) and *trans*-desoxyrhapontigenin **3** (B) ($\lambda_{\text{max}} = 311 \text{ nm}$) (Figs. 2, 3). **1** and **3** have been isolated from rhubarb rhizome before (*R. undulatum*, *R. officinale*). NMR-data of **1** was in line with Kashiwada et al. [15], NMR-data of **3** in good agreement with Choi et al. [16]. HR-MS gave a pseudo-molecular mass of m/z 257.1 for

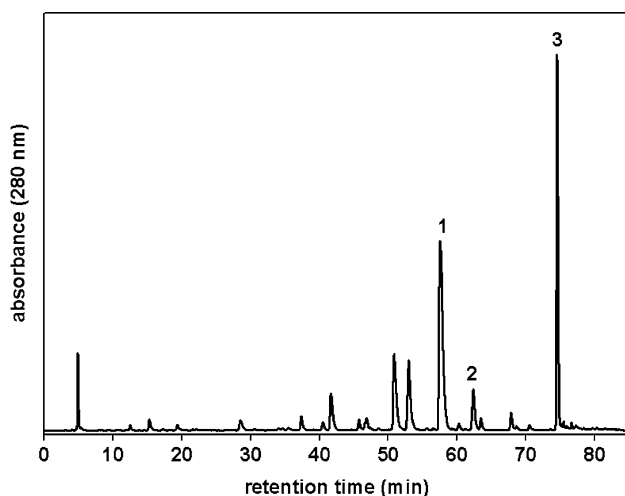


Fig. 1 HPLC-DAD chromatogram of diethyl ether extract from rhubarb rhizome. Retention times are given in brackets. **1**, *trans*-rhapontigenin (57.5 min); **2**, *cis*-desoxyrhaponticin (62.4 min); **3**, *trans*-desoxyrhapontigenin (74.5 min)

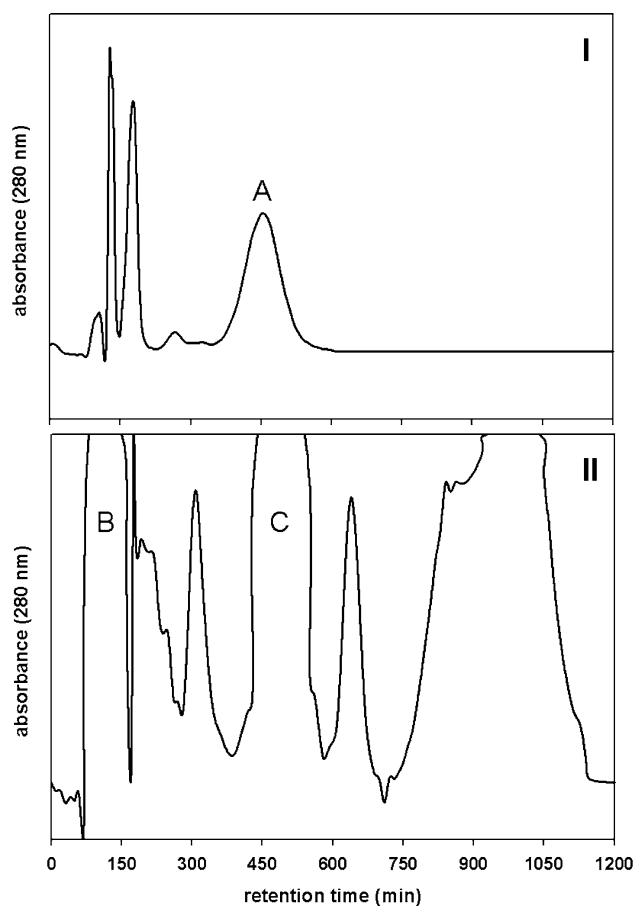


Fig. 2 Separation of diethyl ether extract (I, solvent system A) and the residual stationary phase (II, solvent system B) from rhubarb rhizome by MLCCC. A, *cis*-desoxyrhaponticin **2**; B, *trans*-desoxyrhapontigenin **3**; C, *trans*-rhapontigenin **1**

trans-rhapontigenin **1** [m/z 257.0821 (found); m/z 257.0819 calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_4$ [M–H] $^-$] and a pseudo-molecular mass of m/z 241.1 for *trans*-desoxyrhapontigenin **3** [m/z 241.0873 (found); m/z 241.0870 calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_3$ [M–H] $^-$].

NMR-data of *cis*-desoxyrhaponticin **2** are presented in Table 1. The presence of the stilbene skeleton was evident from ^{13}C NMR: δ 126.22 ppm (C- α), δ 129.89 ppm (C- β), the HMBC correlation from H- α (δ 6.91 ppm) to C-1 (δ 138.74 ppm) and from H- β (δ 7.15 ppm) to C-1' (δ 128.98 ppm) and was further supported by NMR-data of **1** and **3** (not shown). In **2** the glucose is fixed in the *O*- β -glycoside position, because the H-atom at position 1'' had a chemical shift of 4.77 ppm coupling to H-2'' at $^3J = 7.6 \text{ Hz}$. The coupling constant of $^3J = 8.5 \text{ Hz}$ and $^3J = 8.4 \text{ Hz}$ (H- α , H- β) are characteristic for *cis*-stilbenes, while for the corresponding *trans*-stilbene, which is discussed below, a coupling constant of $^3J = 16.4 \text{ Hz}$ and $^3J = 16.6 \text{ Hz}$ (H- α , H- β) was recorded [17]. HR-MS delivered a pseudo-molecular mass of m/z 427.1 for **2** [m/z 427.1366 (found); m/z 427.1363 calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{Na}$ [M + Na] $^+$]. Further

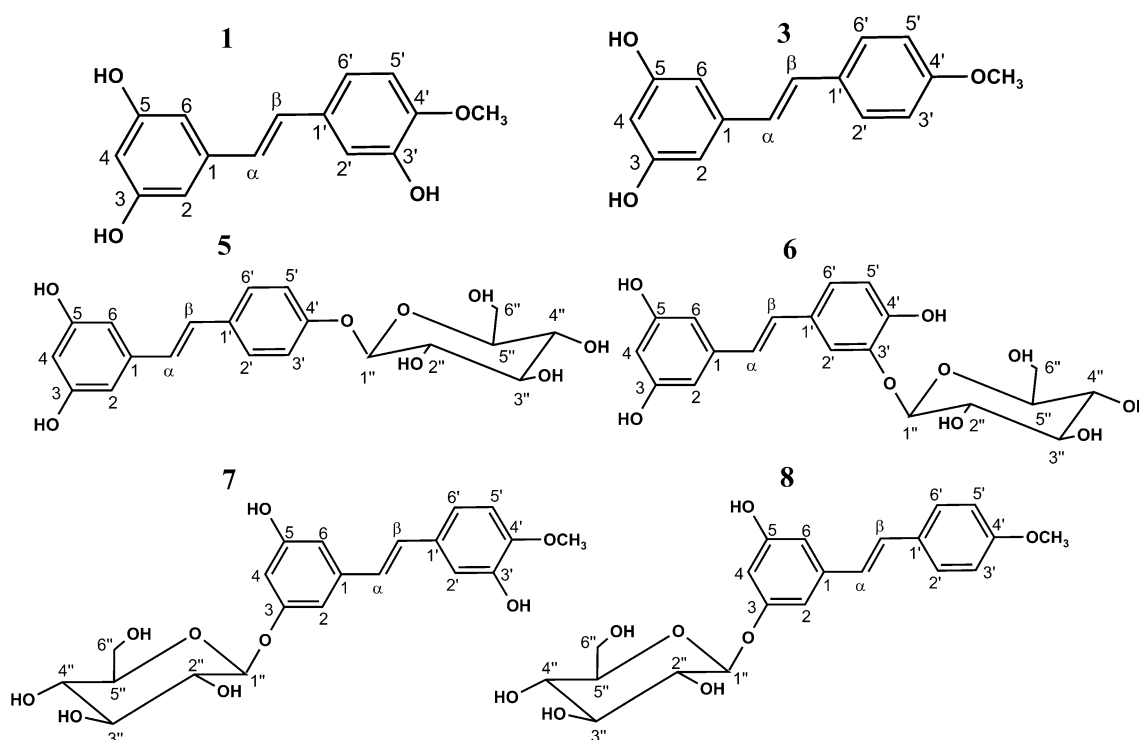


Fig. 3 Structures of stilbenes isolated from rhubarb rhizome. **1**, *trans*-rhapontigenin; **3**, *trans*-desoxyrhapontigenin; **5**, *trans*-resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside; **6**, *trans*-piceatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranoside; **7**, *trans*-rhaponticin; **8**, *trans*-desoxyrhaponticin

determination between *cis*- and *trans*-desoxyrhaponticin could be established by disparate UV absorption maxima; *cis*-desoxyrhaponticin ($\lambda_{\max} = 282$ nm); *trans*-desoxyrhaponticin ($\lambda_{\max} = 311$ nm).

Ethyl acetate extract

The ethyl acetate extract was screened for phenolic compounds by analytical HPLC-DAD (Fig. 4). Then, the extract was separated by MLCCC (system C, retention: 50%) (Fig. 5I). As for the diethyl ether extract, the residual stationary phase contained further compounds. Therefore, material was again separated by MLCCC (system B, retention 80%) (Fig. 5II). MLCCC signals D and E were further separated by preparative HPLC to obtain pure substances. MLCCC signal D gave four substances: (+)-catechin **4** ($\lambda_{\max} = 275$ nm), *trans*-resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside **5** ($\lambda_{\max} = 311$ nm), *trans*-piceatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranoside **6** ($\lambda_{\max} = 314$ nm) and *trans*-rhaponticin **7** ($\lambda_{\max} = 314$ nm).

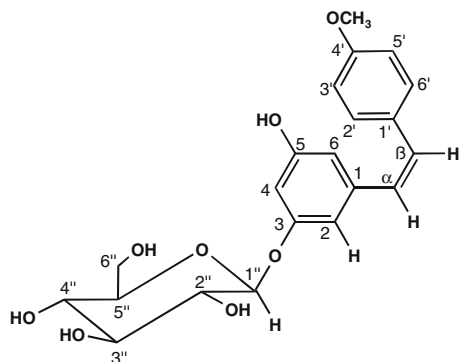
NMR-data of (+)-catechin **4** was in line with Nonaka et al. [5]. HR-MS gave a pseudo-molecular mass of $m/z = 289.1$ for (+)-catechin **4** [m/z 289.0723 (found); m/z 289.0718 calculated for $C_{15}H_{13}O_6$ [M-H]⁻].

Compounds **5** and **6** were isolated in previous work from rhizomes of *R. officinale* [5, 18]. The structure of these compounds are shown in Fig. 3. NMR-data of **5** were in line

with Nonaka et al. [5]. ¹³C-NMR-data of C1–C6 and ¹H-NMR-data of H-2, H-4 and H-6 verified the symmetry of the resorcinol ring A. The symmetry of ring B was ensured by ¹³C-NMR-data of C1'–C6' and ¹H-NMR-data of H-2', H-3', H-5' and H-6'. H-1'' gave HMBC correlation to C-4'. Thus, the sugar is bound to the C-4' hydroxyl group in β -glycoside position (³*J*(H_{2''}) = 7.4 Hz (H-1'')). Compound **5** delivered a pseudo-molecular mass of $m/z = 413.1$ [m/z 413.1211 (found); m/z 413.1207 calculated for $C_{20}H_{22}O_8Na$ [M + Na]⁺].

NMR-data of *trans*-piceatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranoside **6** were in line with Kashiwada et al. [18] and similar to that of *trans*-resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside **5**, except that the β -glucose was bound to an additional hydroxyl group at C-3'. Consequently, the symmetry of the B-ring was abrogated. HR-MS of **6** gave a pseudo-molecular mass of $m/z = 429.1$ [m/z 429.1165 (found); m/z 429.1156 calculated for $C_{20}H_{22}O_9Na$ [M + Na]⁺].

Trans-rhaponticin **7** is a typical compound of *R. rhaponticum* L. [15]. NMR-data of compound **7** suggested the presence of a glucose moiety (Fig. 3). In contrast to **5** and **6**, the glucose is fixed to the A-ring, via the hydroxyl-group of C-3. The olefinic protons H- α and H- β delivered the characteristic coupling constant for *trans*-stilbenes of ³*J*(H _{α}) = 16.4 Hz and ³*J*(H _{β}) = 16.1 Hz. *Trans*-rhaponticin **7** verified a molecular mass of $m/z = 443.1$ [m/z 443.1319 (found); m/z 443.1312 calculated for $C_{21}H_{24}O_9Na$

Table 1 ^1H (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) spectroscopic data of *cis*-desoxyrhaponticin 2 (in $\text{DMSO-}d_6$)*cis*-Desoxyrhaponticin

C/H	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1		138.74
2	6.55 (s, 1H)	107.12
3		158.10
4	6.32 (s, 1H)	102.67
5		158.37
6	6.72 (s, 1H)	104.84
α	6.91 [d, 1H, $^3J(\text{H}_\beta) = 8.5$ Hz]	126.22
β	7.15 [d, 1H, $^3J(\text{H}_\alpha) = 8.4$ Hz]	129.89
1'		128.98
2'	7.49 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{3'}) = 8.5$ Hz]	129.89
3'	6.90 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{2'}) = 8.5$ Hz]	113.65
4'		158.56
5'	6.90 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{6'}) = 8.5$ Hz]	113.65
6'	7.49 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{5'}) = 8.5$ Hz]	129.89
1''	4.77 [d, 1H, $^3J(\text{H}_{2''}) = 7.6$ Hz]	100.66
2''	3.16–3.74 (m, 6H)	73.09
3''		76.75
4''		69.31
5''		76.75
6''		60.38
$-\text{OCH}_3$	3.74 (s, 3H)	54.99

Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HMQC and ^{13}C -DEPT measurements

δ chemical shift, J coupling constant

$[\text{M} + \text{Na}]^+$. MS and NMR-data were in good agreement with Matsuda et al. [19].

Trans-desoxyrhaponticin **8** was isolated from MLCCC signal E (Figs. 3, 5b). NMR-data (Table 1) verified the structure of this *trans*-stilbene. Signal in NMR spectra were similar to that of **7**. In contrast to *trans*-rhaponticin **7** symmetry of the B-ring was given by loss of a hydroxyl group at position 3'. *Trans*-desoxyrhaponticin **8** delivered a pseudo-molecular mass of $m/z = 427.1$ [m/z 427.1366

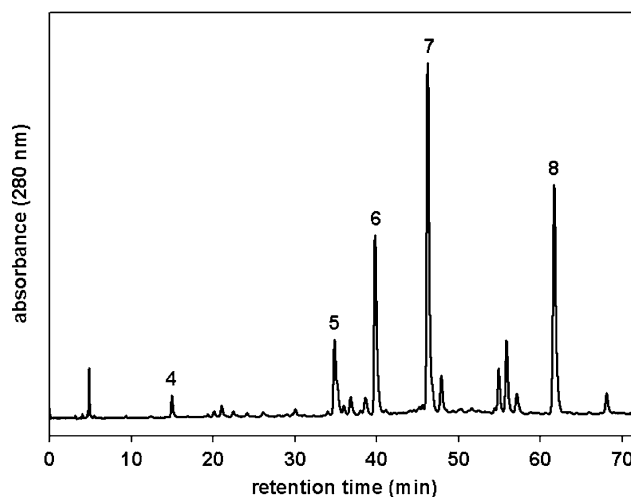


Fig. 4 HPLC-DAD chromatogram of ethyl acetate extract from rhubarb rhizome. Retention times are given in brackets. **4**, (+)-catechin (15.3 min); **5**, *trans*-resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside (34.4 min); **6**, *trans*-piceatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranoside (38.8 min); **7**, *trans*-rhaponticin (46.2 min); **8**, *trans*-desoxyrhaponticin (62.4 min)

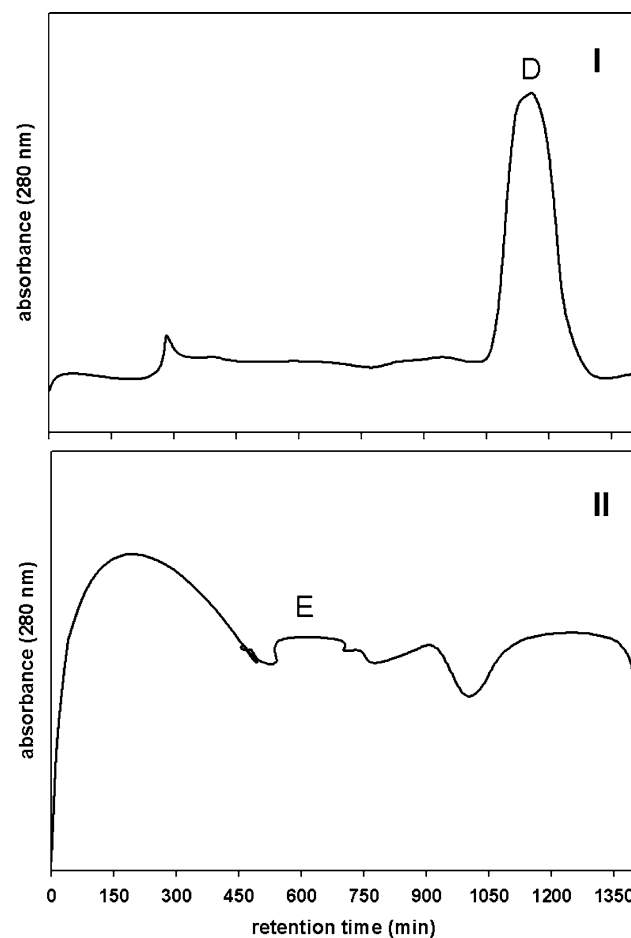


Fig. 5 Separation of ethyl acetate extract (**I**, solvent system C) and the residual stationary phase (**II**, solvent system B) from rhubarb rhizome by MLCCC. **D**: *trans*-rhaponticin **7**; *trans*-resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside **5**; *trans*-piceatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranoside **6**; (+)-catechin **4**; **E**: *trans*-desoxyrhaponticin **8**

(found); m/z 427.1363 calculated for $C_{21}H_{24}O_8Na$ $[M + Na]^+$].

Isolation and elucidation of phenolic ingredients from *n*-butanol extract of petioles and leaves

The diethyl ether, ethyl acetate and *n*-butanol extracts of petioles and leaves were screened for polyphenols by HPLC-DAD. The majority of substances were contained in *n*-butanol extract of the petioles and leaves of rhubarb. Therefore this extract was used for isolation of compounds. HPLC-DAD chromatogram of the petioles and leaves of rhubarb is shown in Fig. 6. First, the *n*-butanol extract was separated by MLCCC (system D, retention 50–55%) (Fig. 7). All substances were obtained from this separation step. Therefore, the residual stationary phase was not further investigated. MLCCC fractions F–H were purified by preparative

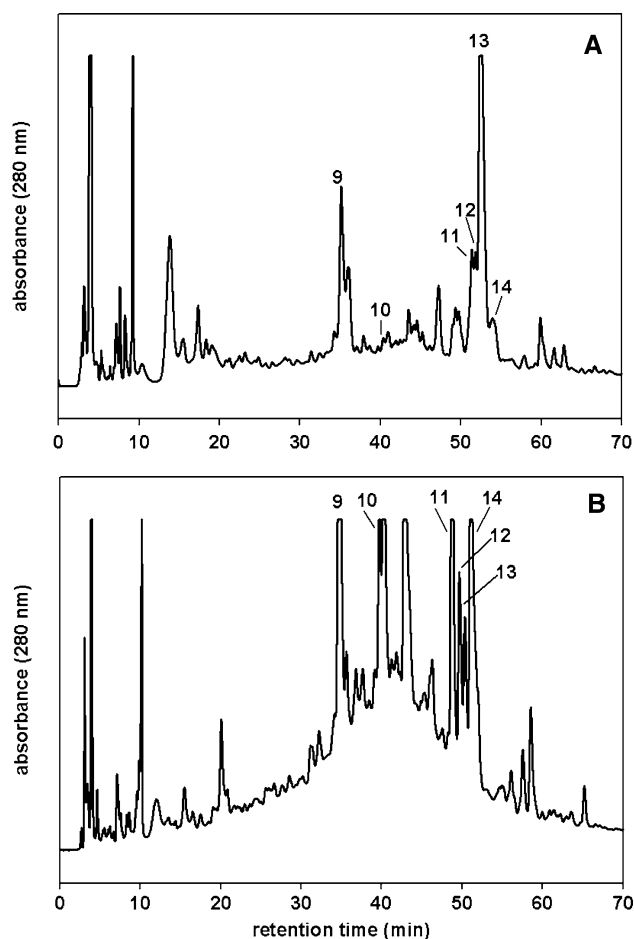


Fig. 6 HPLC-DAD chromatogram of *n*-butanol extract from rhubarb petioles (a) and leaves (b) at $\lambda = 280$ nm. Retention times are given in brackets. **9**, 6,8-di-*C*- β -D-glucosylapigenin (34.9 min); **10**, 6-*C*- β -D-glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin (40.9 min); **11**, isovitexin (48.9 min); **12**, 6-*C*- β -D-arabinosyl-8-*C*- β -D-glucosylapigenin (49.1 min); **13**, quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide (50.3 min); **14**, rutin (51.4 min)

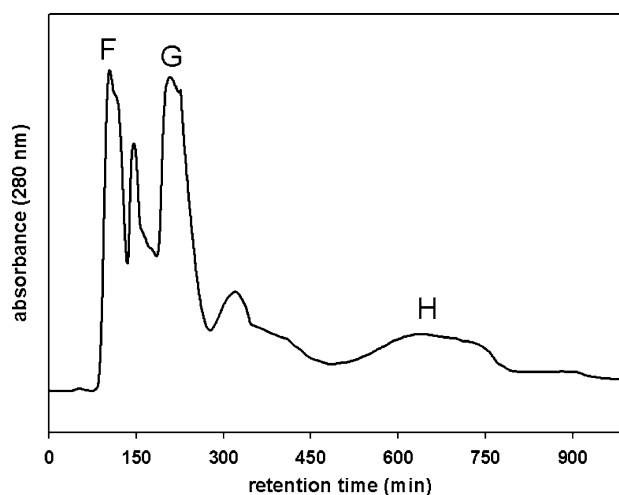
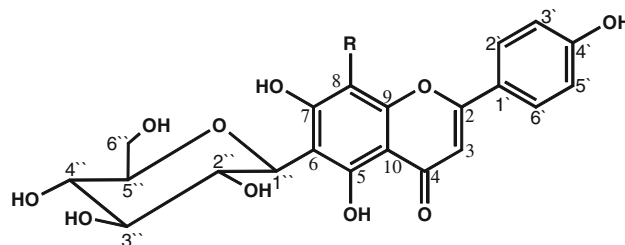


Fig. 7 Separation of *n*-butanol extract from rhubarb leaves and petioles by MLCCC (solvent system D). **F**: 6,8-di-*C*- β -D-glucosylapigenin **9**, 6-*C*- β -D-glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin **10**, 6-*C*- β -D-arabinosyl-8-*C*- β -D-glucosylapigenin **12**; **G**: rutin **14**; **H**: isovitexin **11**, quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide **13**

HPLC. The following compounds were isolated: 6,8-di-*C*- β -D-glucosylapigenin **9**; 6-*C*- β -D-glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin **10** ($\lambda_{\max} = 266, 346$ nm); isovitexin **11** ($\lambda_{\max} = 252, 352$ nm); 6-*C*- β -D-arabinosyl-8-*C*- β -D-glucosylapigenin **12** ($\lambda_{\max} = 267, 338$ nm); quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide **13** ($\lambda_{\max} = 261, 341$ nm); rutin **14** ($\lambda_{\max} = 255, 353$ nm). 6,8-di-*C*- β -D-glucosylapigenin **9** was isolated from MLCCC peak F. NMR-data is presented in Table 2. The presence of the flavone skeleton was evident from the UV ($\lambda_{\max} = 264, 348$ nm), ^{13}C NMR [δ 182.20 ppm (C-4), 164.24 ppm (C-2), 102.75 ppm (C-3)] and the HMBC correlations from H-3 [δ 6.80 ppm (s)] to C-1, C-4, C-2, C-10. The positions of the sugars were ensured by HMBC correlation of H-1'' to C-5, C-6 and C-7 and by HMBC correlation of H-1''' to C-7, C-8 and C-9. The β -glycoside configuration of the glucoses was verified by coupling constant of H-1''/H-1''' [$^3J(H_{2''}/H_{2'''}) = 9.9$ Hz]. HR-MS gave the following pseudo-molecular mass: $m/z = 617.1$ [m/z 617.1471 (found); m/z 617.1477 calculated for $C_{27}H_{30}O_{15}Na$ $[M + Na]^+$]. Isovitexin **11** was isolated from MLCCC peak H and the NMR-data are shown in Table 2 for comparison. The NMR spectra were similar to that of 6,8-di-*C*- β -D-glucosylapigenin **9**, with the difference that C-8 (δ 94.17 ppm) gave a negative signal in the APT-experiment. Furthermore, C-8 showed in HMQC spectra a correlation to H-8 at δ 6.50 ppm (s, 1H), which correlated to C-7 and C-9 in HMBC. Data of HR-MS delivered a pseudo-molecular mass of $m/z = 455.1$ [m/z 455.0949 (found); m/z 455.0949 calculated for $C_{21}H_{20}O_{10}Na$ $[M + Na]^+$].

6-*C*- β -D-glycosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin **10** and 6-*C*- β -D-arabinosyl-8-*C*- β -D-glucosyl-apigenin **12** were

Table 2 ^1H (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) spectroscopic data of flavones 6,8-Di-*C*- β -*D*-glucosylapigenin **9** and isovitexin **11** (in $\text{DMSO-}d_6$)

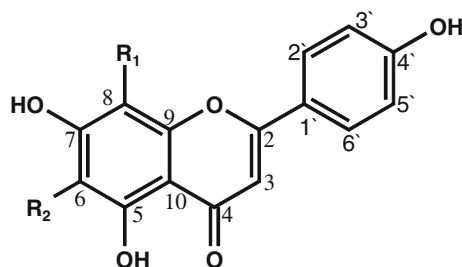
6,8-Di- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucosylapigenin, R = β - <i>D</i> -glc			isovitexin, R = H	
C/H	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
2		164.24		163.48
3	6.80 (s, 1H)	102.75	6.77 (s, 1H)	102.80
4		182.20		181.92
5		158.72		161.14
6		107.64		108.85
7		161.37		163.20
8		104.05	6.50 (s, 1H)	94.17
9		155.21		156.17
10		105.45		103.20
1'		121.65		121.07
2'	8.02 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{3',5'}) = 8.7$ Hz]	129.18	7.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{3',5'}) = 7.6$ Hz]	128.43
3'	6.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{2',6'}) = 8.7$ Hz]	115.97	6.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{2',6'}) = 7.8$ Hz]	115.94
4'		160.94		160.45
5'	6.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{6',2'}) = 8.7$ Hz]	115.97	6.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{6',2'}) = 7.8$ Hz]	115.94
6'	8.02 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{5',3'}) = 8.7$ Hz]	129.18	7.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{5',3'}) = 7.6$ Hz]	128.90
1''/1'''	4.66 (d, 2H, $J = 9.9$ Hz)	73.49/74.26	4.58 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz)	73.32
2''/2'''	3.88 (pt, 2H, $J = 9.5$ Hz)	70.71/69.19	4.02 (pt, 1H, $J = 9.8$ Hz)	70.83
3''/3'''	3.21 (pt, 2H, $J = 8.8$ Hz)	79.00/77.97	3.19 (pt, 1H, $J = 8.7$ Hz)	79.40
4''/4'''	3.15 (m, 2H)	71.06/72.10	3.13 (pt, 1H, $J = 8.5$ Hz)	70.91
5''/5'''	3.28 (m, 2H)	81.03/82.07	3.28 (m, 1H)	81.19
6a''/6a'''	3.63 (m, 2H)	61.43/59.94	3.67 (dd, 1H, $J = 11.2$, $J = 2.1$)	62.69
6b''/6b'''	3.40 (m, 2H)		3.40 (dd, 1H, $J = 11.7$; $J = 6.3$)	

Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HMQC and ^{13}C -DEPT measurements
 δ chemical shift, J coupling constant

isolated from MLCCC peak F (Fig. 7). NMR-data are shown in Table 3. The NMR spectra were very similar to each other. The existence of **10** and **12** were verified by the following distinguishing marks. In HMBC experiment of **10** the H-1'' of β -glucose [δ 4.74 ppm, d, $^3J(\text{H}_{2'',\text{Glu}} = 9.9$ Hz)] correlated to C-6 (δ 108.24 ppm) and C-6 gave a positive APT signal. Further H-1'' showed HMBC correlations to C-5 and C-7 but not to C-8. Additionally H-1'' of β -arabinose [δ 4.70 ppm, d, $^3J(\text{H}_{2'',\text{Ara}} = 9.6$ Hz)] correlated in HMBC to C-8, C-7 and C-9. Selected HMBC correlations of substance **10** are depicted in Fig. 8. The reverse was observed with compound **12**. Here, H-1'' of arabinose correlated to C-5, C-6 and C-7 in HMBC, and H-1'' of glucose gave HMBC correlations to C-7, C-8 and C-9. HR-MS gave the following pseudo-molecular mass for

compound **10**: $m/z = 587.1$ [m/z 587.1382 (found); m/z 587.1371 calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$] and for compound **12**: $m/z = 587.1$ [m/z 587.1384 (found); m/z 587.1371 calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$].

Quercetin-3-*O*- β -*D*-glucuronide **13** was isolated from MLCCC peak H (Fig. 7). NMR-data are given in Table 4. HMBC showed a correlation from H-1'' [δ 5.48 ppm, d, $^3J(\text{H}_{2'',\text{Glu}} = 7.5$ Hz)] to C-3 (δ 133.85 ppm)]. Thus, the sugar is bound to the C-3 hydroxyl group of the aglycon as a β -glycoside. A resonance at δ 169.2 ppm in the sugar skeleton verified the presence of the glucuronic acid moiety. **13** delivered the following HR-MS data: $m/z = 477.1$ [m/z 477.0678 (found); m/z 477.0674 calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_{13}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$]. Rutin **14** was isolated from MLCCC signal G (Fig. 7). This

Table 3 ^1H (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) spectroscopic data of flavones 6-*C*- β -D-glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin (schaftoside) **10** and 6-*C*- β -D-arabinosyl-8-*C*- β -D-glucosyl-apigenin (isoschaftoside) **12** (in DMSO-*d*₆)

6- <i>C</i> - β -D-Glucosyl-8- <i>C</i> - β -D-arabinosylapigenin			6- <i>C</i> - β -D-arabinosyl-8- <i>C</i> - β -D-glucosylapigenin	
C/H	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2		164.28		164.34
3	6.80 (s, 1H)	102.75	6.77 (s, 1H)	103.16
4		182.46		182.76
5		158.36		161.71
6		108.24		109.20
7		161.36		158.26
8		105.27		104.62
9		155.24		156.32
10		104.00		104.59
1'		121.69		121.88
2'	8.00 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{3',5'}) = 8.7$ Hz]	129.19	7.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{3',5'}) = 7.6$ Hz]	129.10
3'	6.90 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{2',6'}) = 8.9$ Hz]	115.97	6.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{2',6'}) = 7.8$ Hz]	116.39
4'		161.06		161.83
5'	6.90 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{6',2'}) = 8.9$ Hz]	115.97	6.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{6',2'}) = 7.8$ Hz]	116.39
6'	8.00 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{5',3'}) = 8.7$ Hz]	129.19	7.92 [d, 2H, $^3J(\text{H}_{5',3'}) = 7.6$ Hz]	129.10
Glc-1''	4.74 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz)	73.41	4.75 [d, 1H, $J = 9.3$ Hz]	73.95
Glc-2''	3.25–3.91 (m, 11H)	70.71	3.15–4.00 (m, 11H)	75.70
Glc-3''		79.03		79.31
Glc-4''		71.05		69.34
Glc-5''		82.06		82.33
Glc-6''		61.37		59.85
Ara-1''	4.70 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz)	74.33	4.71 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz)	74.38
Ara-2''	3.25–3.91 (m, 11H)	69.75	3.15–4.00 (m, 11H)	71.50
Ara-3''		73.96		73.91
Ara-4''		68.56		69.60
Ara-5''		70.26		71.03

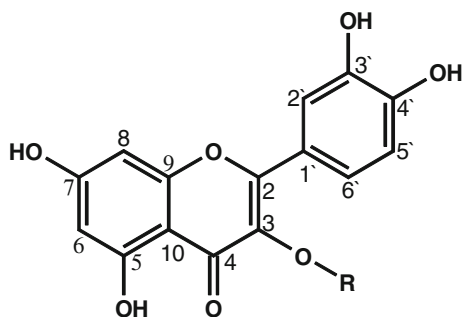
Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HMQC and ^{13}C -DEPT measurements

δ chemical shift, J coupling constant

compound was isolated in previous work by Blundstone et al. [20]. HR-MS data gave $m/z = 633.1$ [m/z 633.1427 (found); m/z 633.1426 calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$].

In conclusion the following substances from domestic garden rhubarb were isolated and identified: *trans*-rhapontigenin **1**, *cis*-desoxyrhapontigenin **2**, *trans*-desoxyrhapon-

tigenin **3**, *trans*-rhaponticin **7**, *trans*-desoxyrhaponticin **8**, (+)-catechin **4**, *trans*-resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside **5**, *trans*-piceatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranoside **6**, 6,8-di-*C*- β -D-glucosylapigenin **9**, 6-*C*- β -D-glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin **10**, isovitexin **11**, 6-*C*- β -D-arabinosyl-8-*C*- β -D-glucosylapigenin **12**, quercetin-3-*O*-glucuronide **13** and rutin **14**. Within this context, the NMR-data of **2**, **9**,

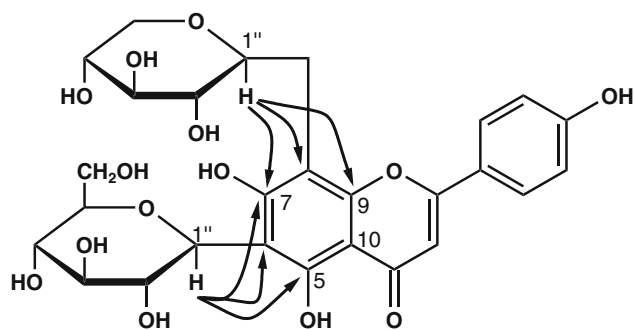
Table 4 ^1H (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) spectroscopic data of quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide **13** (in $\text{DMSO-}d_6$)Quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide, R = β -D-Glu

C/H	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
2		155.82
3		133.85
4		176.78
5		160.84
6	6.20 [d, 1H, $^4J(\text{H}_8) = 1.9$ Hz]	98.49
7		163.83
8	6.40 [d, 1H, $^4J(\text{H}_6) = 1.9$ Hz]	93.30
9		156.92
10		103.65
1'		120.63
2'	7.59 [d, 1H, $^4J(\text{H}_{6'}) = 2.3$ Hz]	114.93
3'		144.57
4'		148.25
5'	6.82 [d, 1H, $^3J(\text{H}_{6'}) = 8.5$ Hz]	115.76
6'	7.51 [dd, 1H, $^4J(\text{H}_{2'}) = 2.2$ Hz, $^3J(\text{H}_{5'}) = 9.0$ Hz]	121.40
1''	5.48 [d, 1H, $^3J(\text{H}_{2''}) = 7.5$ Hz]	100.91
2''	3.21–3.64 (m, 4H)	75.79
3''		75.74
4''		71.12
5''		73.60
6''		169.17

Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HMQC and ^{13}C -DEPT measurements

δ chemical shift, J coupling constant

10, **11**, **12** and **13** were presented for the first-time in rhubarb. Yields of flavonoids (**9–14**) were approximately 10-fold higher in leaves than in petioles of garden rhubarb (Fig. 6). Flavonoids were negligible in rhizomes, where stilbenes were identified exclusively.

**Fig. 8** Structures of compounds **10**, selected HMBC correlations are marked by arrows

Acknowledgments We thank D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle (Germany), for recording NMR spectra, and J. Schmidt from the Leibnitz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Germany), for performing accurate mass analysis.

References

- Chin TC, Youngken HW (1947) The cytotoxicity of rheum. *Am J Bot* 34:401–407
- Oshio H, Imai S, Fujioka S, Sugawara T, Miyamoto M, Tsukui M (1974) *Chem Pharm Bull* 22:823–831
- Okabe H, Matsuo K, Nishioka I (1973) *Chem Pharm Bull* 21:1254–1260
- Tsuboi M, Minami M, Nonaka GI, Nishioka I (1977) *Chem Pharm Bull* 25:2708–2712
- Nonaka GI, Minami M, Nishioka I (1977) *Chem Pharm Bull* 25:2300–2305
- Csupor L (1971) *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* 304:32–35
- Tutin F, Cleweer HBW (1911) *J Chem Soc* 99:946–967
- Blundstone HAW (1967) *Phytochemistry* 6:1449–1452
- Kashiwada Y, Nonaka GI, Nishioka I (1986) *Chem Pharm Bull* 34:3208–3222
- Wrolstad RE, Heatherbell DA (1968) *J Food Sci* 33:592–594
- Frohne D, Jensen U (1992) *Arznei- und Nutzpflanzen der Caryophyllales*, In: *Systematik des Pflanzenreiches unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen*, 4th edn. Gustav Fischer, Stuttgart, pp 129–131
- Schratz E (1960) *Plant Med* 3:299–316
- Bickel-Sandkötter S (2001) *Rheum rhabarbarum*, *Rheum rhabarbarum*, In: *Nutzpflanzen und ihre Inhaltsstoffe*, 1st edn. Quelle und Meyer, Wiebelsheim, pp 232–233
- Maillard M, Marston A, Hostettmann K (1996) High-speed countercurrent chromatography of natural Products. In: Ito Y, Conway WD (eds) *High-speed countercurrent chromatography*, 1st edn. Wiley, New York, pp 179–218
- Kashiwada Y, Nonaka GI, Nishioka I (1984) *Chem Pharm Bull* 32:3501–3517
- Choi SZ, Lee SO, Jang KU, Chung SH, Park SH, Kang HC, Yang EY, Cho HJ, Lee KR (2005) *Arch Pharm Res* 28:1027–1030

17. Meier H (2002) Kernresonanzspektren. In: Hesse M, Meier H, Zeeh B (eds) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 1st edn. Thieme, Stuttgart, pp 102–124
18. Kashiwada Y, Nonaka GI, Nishioka I, Nishizawa M, Yamagishi T (1988) *Chem Pharm Bull* 36:1545–1549
19. Matsuda H, Morikawa T, Toguchida I, Park JY, Harima S, Yoshikawa M (2001) *Bioorg Med Chem* 9:41–50
20. Blundstone HAW (1967) *Phytochemistry* 6:1449–1452

4.2 Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea

Krafczyk, N. and Glomb, M.A. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea.
Journal of Agricultural and Food Chemistry **2008**, 56, 3368-3376.

Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea

NICOLE KRAFczyk AND MARCUS A. GLOMB*

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin Luther University Halle-Wittenberg,
Kurt-Mothes-Strasse 2, 06120 Halle, Germany

Polyphenols present in rooibos, a popular herbal tea from *Aspalathus linearis*, were isolated in two steps. First, phenolic ingredients were separated by multilayer countercurrent chromatography (MLCCC). Preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) was then applied to obtain pure flavonoids. The purity and identity of isolated compounds was confirmed by different NMR experiments, HPLC-diode array detector (DAD), or gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis. This strategy proved to be valid to isolate material in up to gram quantities and to verify known and previously not published polyphenol structures. In addition the chemistry of dihydrochalcones and related intermediates was studied. The dihydrochalcone aspalathin was oxidized to the corresponding flavanone-*C*-glycosides ((*R*)/(*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside and (*R*)/(*S*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside). Flavanone-6-*C*- β -D-glucopyranosides were further degraded to flavones isoorientin and orientin.

KEYWORDS: Rooibos tea; multilayer countercurrent chromatography (MLCCC); reactions of dihydrochalcones; NMR; HPLC-DAD; HR-(GC)-MS

INTRODUCTION

Rooibos is a shrubby legume that is indigenous to the mountains of South African's Western Cape. The genus *Aspalathus* includes more than 200 species native to South Africa, but only *Aspalathus linearis* (*A. linearis*) is edible (1). Its leaves and stems are used for the production of rooibos tea, a beverage with acclaimed beneficial health effects. Rooibos tea boasts high yields of flavonoids with exceptional high contents in *C*-glycosides. Furthermore, this tea is rich in minerals, is caffeine-free, and has low tannin contents (2). Usually, two types of rooibos are available, unfermented and fermented rooibos tea. The fermentation process is an oxidation process brought about for the formation of the characteristic red-brown color and sweetish flavor of the infusion.

First determination of phenolic ingredients of *A. linearis* was established by Koeppen et al. (3–5). The presence of aspalathin, orientin, isoorientin, isoquercitrin, and rutin was described after separation by paper chromatography. Other flavonoids like quercetin and luteolin have been isolated from processed rooibos tea by special extraction methods (6). Furthermore, vitexin, isovitexin, chrysoeriol, and some phenolic acids such as *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, and ferulic acid were identified in processed rooibos (7). The occurrence of nothofagin, (*S*)- and (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside, syringic acid, and (+)-catechin was established (8, 9). The content of the dihydroch-

alcones aspalathin and nothofagin, the major *C*-glycosylflavonoids in unfermented rooibos, decreased significantly with processing (10). Marais et al. reported on the degradation of aspalathin during fermentation to the flavanones (*S*)- and (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (9).

Separation and purification of rooibos using conventional methods such as column chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC) requires several steps resulting in low amounts of products. Multilayer countercurrent chromatography (MLCCC) is a unique liquid–liquid partition chromatography, which uses no solid matrix. Therefore, it eliminates irreversible adsorptive loss of samples onto the solid support used in conventional chromatographic setups. This method has been successfully applied to analysis and separation of various natural products (11). The aim of this work was to comprehensively isolate phenolic compounds from rooibos by MLCCC and preparative HPLC. In addition, the oxidative degradation mechanism of dihydrochalcones was studied in-depth.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Chemicals of the highest quality available were obtained from Roth (Karlsruhe, Germany) unless otherwise indicated. Methanol was HPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany). Caffeic acid, ferulic acid, heptafluorobutyric acid, *p*-hydroxybenzoic acid, (+)-catechin, and pyridine were purchased from Fluka (Taufkirchen, Germany). Dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆) was obtained from Chemotrade (Leipzig, Germany). Gallic acid was ordered from Serva (Heidelberg, Germany). Vanillic acid, sinapinic acid, *p*-coumaric acid,

* To whom correspondence should be addressed. Fax: +49-345-5527341. E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de.

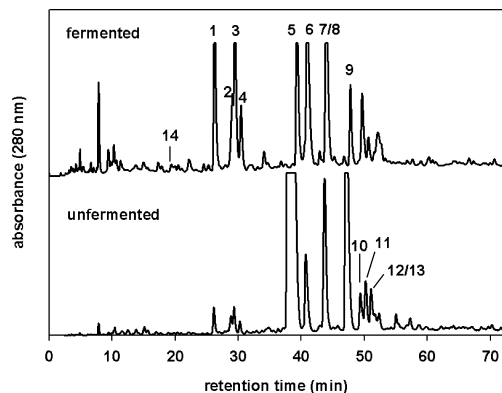


Figure 1. HPLC-DAD chromatogram of ethyl acetate extract from fermented and unfermented rooibos tea at $\lambda = 280$ nm. Retention times are given in parentheses: **1**, (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (26.3 min); **2**, (*S*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside (29.1 min); **3**, (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (29.5 min); **4**, (*R*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside (30.4 min); **5**, aspalathin (39.4 min); **6**, orientin (40.9 min); **7/8**, isoorientin/vitexin (44.1 min); **9**, nothofagin (47.8 min); **10**, isovitexin (49.7 min); **11**, rutin (50.6 min); **12**, hyperoside (51.6 min); **13**, isoquercitrin, (52.1 min) **14**, chlorogenic acid (19.3 min).

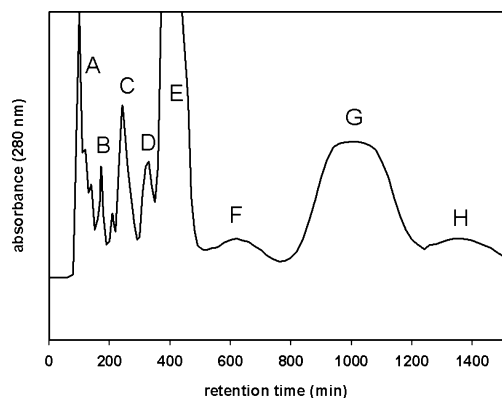


Figure 2. Separation of ethyl acetate extract from unfermented rooibos tea by MLCCC: A, mixture of flavonoids; B, (*S*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside (**2**); C, chlorogenic acid (**14**), (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (**1**), (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (**3**), (*R*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside (**4**), and rutin (**11**); D, isoorientin (**7**); E, aspalathin (**5**); F, orientin (**6**) and vitexin (**8**); G, nothofagin (**9**) and isovitexin (**10**); H, hyperoside (**12**) and isoquercitrin (**13**).

and *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Salicylic acid was ordered from Kosmos (Stuttgart, Germany).

Extraction of Rooibos Tea. Rooibos tea from the Biedouw Valley of South Africa was obtained from Ronnefeldt (Worpswede, Germany). A 100 g amount of fermented (red-brownish) or unfermented (green) rooibos was extracted with acetone/water (7:3 (v/v)) at 5 °C for 24 h under argon atmosphere and decanted. Acetone was removed under reduced pressure. The residual H₂O phase was successively extracted with diethyl ether (2 × 200 mL), ethyl acetate (2 × 200 mL), and *n*-butanol (2 × 200 mL). From the individual extracts, solvents were removed under reduced pressure.

Multilayer Countercurrent Chromatography. The MLCCC system (Ito, Multilayer Separator-Extractor Model, P.C. Inc., Potomac) was equipped with a Waters constant-flow pump (model 6000 A), a Zeiss spectrophotometer PM2D operating at 280 nm, and a sample injection valve with a 10 mL sample loop. Eluted liquids were collected in fractions of 8 mL with a fraction collector (LKB Ultrarac 7000). Chromatograms were recorded on a plotter (Servogor 200). The multilayer coil was prepared from 1.6 mm i.d. poly(tetrafluoroethylene)

(PTFE) tubing. The total capacity was 300 mL. The MLCCC was run at a revolution speed of 800 rpm and a flow rate of 2 mL/min in head to tail modus.

Samples of 1 g were dissolved in a 1:1 mixture (10 mL) of light and heavy phase and injected into the system. The solvent system for separation of ethyl acetate extract or *n*-butanol extract consisted of ethyl acetate/*n*-butanol/water (3:1:4 (v/v)). Diethyl ether extracts were separated by using water/ethyl acetate (2:1 (v/v)).

Analytical HPLC-DAD. A Jasco (Gross-Umstadt, Germany) quaternary gradient unit PU 2080, with degasser DG 2080-54, autosampler AS 2055, column oven (Jasco Jetstream II), and multiwavelength detector MD 2015 was used. Chromatographic separations were performed on stainless steel columns (VYDAC CRT, no. 218TP54, 250 × 4.0 mm, RP 18, 5 μ m, Hesperia, CA) using a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The mobile phase used was water (solvent A) and MeOH/water (7:3 (v/v), solvent B). To both solvents (A and B), 0.6 mL/L heptafluorobutyric acid (HFBA) was added. Samples were injected at 10% B; the gradient then changed linear to 30% B in 30 min, to 65% B in 40 min, and to 100% B in 2 min and were held at 100% B for 8 min. The column temperature was 25 °C. The effluent was monitored at 280 and 350 nm.

Preparative HPLC-UV. A Besta HD 2-200 pump (Wilhelmsfeld, Germany) was used at a flow rate of 8 mL min⁻¹. Elution of materials was monitored by a UV detector (Jasco UV-2075, Gross-Umstadt). Chromatographic separations were performed on stainless steel columns (VYDAC CRT, no. 218TP1022, 250 × 23 mm, RP18, 10 μ m, Hesperia, CA). The mobile phase used was solvents A and B, identical to the analytical HPLC-DAD system. From the individual chromatographic fractions, solvents were removed under reduced pressure. After addition of water, solutions of polyphenols were freeze-dried.

Preparative Thin-Layer Chromatography (TLC). Separation was performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates, 2 mm (Merck), with ethyl acetate/hexane (1:1 (v/v)) as the mobile phase. For isolation of substances, spots were scratched off. Then, target material was eluted from silica gel with methanol.

Accurate Mass Determination. The high-resolution positive and negative ion ESI mass spectra (HR-MS) were obtained from a Bruker Apex III Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, USA) equipped with an Infinity cell, a 7.0 T superconducting magnet (Bruker, Karlsruhe, Germany), a radio frequency (RF)-only hexapole ion guide and an external electrospray ion source (APOLLO; Agilent, off-axis spray). Nitrogen was used as the drying gas at 150 °C. The samples were dissolved in methanol, and the solutions were introduced continuously via a syringe pump at a flow rate of 120 μ L h⁻¹. The data were acquired with 256k data points and zero filled to 1024k by averaging 32 scans.

Magnetic Resonance Spectroscopy. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian Unity Inova 500 instrument (Darmstadt, Germany). Chemical shifts are given relative to external Me₄Si.

NMR Data of Vitexin (8). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 6.76 (1 H, s, H3), 6.26 (1 H, s, H6), 8.01 (2 H, d, *J* = 8.7 Hz, H2', H6'), 6.87 (2 H, d, *J* = 8.7 Hz, H3', H5'), 4.67 (1 H, d, *J* = 9.8 Hz, H1''), 3.81 (1 H, t, *J* = 9.7 Hz, H2''), 3.29 (1 H, m, H3''), 3.37 (1 H, t, *J* = 9.2 Hz, H4''), 3.23 (1 H, m, H5''), 3.75 (1 H, dd, *J* = 11.9 Hz, 2.2 Hz, H6a''), 3.51 (1 H, dd, *J* = 6.0 Hz, 11.7 Hz, H6b'') ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 163.91 (C2), 102.41 (C3), 182.06 (C4), 155.96 (C5), 98.10 (C6), 162.51 (C7), 104.01 (C8), 160.35 (C9), 104.58 (C10), 121.57 (C1'), 128.92 (C2', C6'), 115.77 (C3', C5'), 161.10 (C4'), 73.34 (C1''), 70.80 (C2''), 78.63 (C3''), 70.51 (C4''), 81.81 (C5''), 61.26 (C6'') ppm.

NMR Data of Isovitexin (10). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 6.77 (1 H, s, H3), 6.51 (1 H, s, H8), 7.91 (2 H, d, *J* = 8.8 Hz, H2', H6'), 6.91 (2 H, d, *J* = 8.8 Hz, H3', H5'), 4.57 (1 H, d, *J* = 9.9 Hz, H1''), 4.02 (1 H, t, *J* = 8.9 Hz, H2''), 3.19 (1 H, t, *J* = 8.5 Hz, H3''), 3.11 (1 H, t, *J* = 9.2 Hz, H4''), 3.15 (1 H, m, H5''), 3.68 (1 H, dd, *J* = 10.4 Hz, H6a''), 3.40 (1 H, dd, *J* = 5.9 Hz, 10.4 Hz, H6b'') ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 163.96 (C2), 103.22 (C3), 182.39 (C4), 161.60 (C5), 109.31 (C6), 163.67 (C7), 94.20 (C8), 156.64 (C9), 103.85 (C10),

Table 1. ^1H (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) Spectroscopic Data of Dihydrochalcones Aspalathin (**5**) and Nothofagin (**9**) (in $\text{DMSO-}d_6$)^a

aspalathin			nothofagin	
C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]
1		132.35		131.58
2	6.60 (s, 1H)	115.69	7.00 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz)	129.11
3		144.96	6.63 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz)	115.03
4		143.23		155.35
5	6.60 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz)	115.43	6.63 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz)	115.03
6	6.46 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz)	118.82	7.00 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz)	129.11
α	3.20 (t, 2H, $J = 8.2$ Hz)	45.45	3.20 (t, 2H, $J = 8.2$ Hz)	45.55
β	2.70 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz)	29.67	2.74 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz)	29.53
1''		104.02		104.02
2''		161.59		161.58
3''	5.93 (s, 1H)	94.55	5.91 (s, 1H)	94.54
4''		164.75		164.73
5''		103.58		103.57
6''		164.61		163.62
1''	4.50 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz)	73.54	4.49 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz)	73.54
2''	3.86 (pt, 1H, $J = 8.6$ Hz)	70.43	3.85 (pt, 1H, $J = 8.3$ Hz)	70.41
3''	3.18 (pt, 1H, $J = 8.2$ Hz)	78.86	3.20 (pt, 1H, $J = 8.3$ Hz)	78.88
4''	3.09 (pt, 1H, $J = 9.2$ Hz)	70.63	3.12 (pt, 1H, $J = 8.8$ Hz)	70.64
5''	3.15 (m, 1H)	81.29	3.14 (m, 1H)	81.28
6''	3.40 (dd, 1H, $J = 11.5$ Hz, 6.4 Hz)	61.26	3.39 (dd, 1H, $J = 11.5$, 6.6 Hz)	61.25
	3.64 (dd, 1H, $J = 11.3$ Hz, 1.4 Hz)		3.62 (dd, 1H, $J = 11.6$, 2.2 Hz)	

^a δ , chemical shift; J , coupling constant. Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HMQC, and ^{13}C -DEPT measurements.

121.53 (C1'), 128.90 (C2', C6'), 116.41 (C3', C5'), 161.08 (C4'), 73.48 (C1''), 70.64 (C2''), 79.37 (C3''), 71.04 (C4''), 82.00 (C5''), 61.57 (C6'') ppm.

Gas Chromatography. High-resolution GC-MS (HRGC-MS) was performed on a Finnigan Trace GC Ultra (Thermo Finnigan, Bremen, Germany): quartz capillary column (30 m, 0.32 I.D., HP-5, 0.25 μm ; J&W Scientific, Cologne, Germany); injection port, 220 $^\circ\text{C}$; He, 27.5 cm/s; split ratio, 1:10; detector, 270 $^\circ\text{C}$. After injection of samples at 100 $^\circ\text{C}$, the oven temperature was raised at 5 $^\circ\text{C min}^{-1}$ to 200 $^\circ\text{C}$, then raised at 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$ to 270 $^\circ\text{C}$, and held for 25 min (temperature program 1). For temperature program 2 samples were injected at 200 $^\circ\text{C}$, the oven temperature was then raised at 2.3 $^\circ\text{C min}^{-1}$ to 270 $^\circ\text{C}$ and held for 30 min. The gas chromatograph was connected to a Trace DSQ (Thermo Finnigan, Bremen, Germany): transfer line, 220 $^\circ\text{C}$; EI at 70 eV; full scan, 50–650 m/z .

Derivatization of Samples. Isolated material from MLCCC separation of diethyl ether extracts was dissolved in 100 μL of pyridine, and 100 μL of *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide was added. After a reaction time of 1 h at room temperature, the solution was injected into the GC-MS system.

Incubations. Isolated substances (4.5 mM) were dissolved in phosphate buffer (0.2 M, pH = 7.4) and incubated (37 $^\circ\text{C}$) for 48 h in a shaker incubator (New Brunswick Scientific, New Jersey). After evaporation, the final residue was separated by HPLC-DAD.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and Elucidation of Polyphenolic Ingredients.

Ethyl Acetate and *n*-Butanol Extracts. Ethyl acetate and *n*-butanol extract were screened for polyphenols by analytical HPLC-DAD. Basically both extracts revealed the same ingredients. The HPLC-DAD chromatogram of ethyl acetate extract is shown in **Figure 1**. The first step of purification was separation of these extracts by MLCCC (**Figure 2**) into eight fractions (A–H). Stationary-phase retention was between 50 and 55%. Afterward, fractions A–H were separated by preparative HPLC to isolate pure substances. Final structural evidence was achieved by ^1H and ^{13}C NMR, as well as heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) NMR experiments. In most

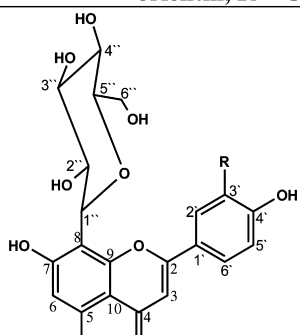
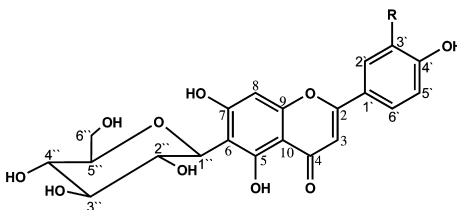
cases, only very rudimentary previous NMR data of rooibos ingredients has been published. Therefore, it was necessary to reinvestigate some structures, present in *A. linearis*.

Two dihydrochalcone structures, aspalathin (**5**) and nothofagin (**9**), were isolated and identified from MLCCC peak E and G. NMR data of both substances are demonstrated in **Table 1**. The presence of the dihydrochalcone skeleton was evident from ^{13}C NMR (δ 45.45 ppm (C- α), 29.67 ppm (C- β), the HMBC correlation from H- β to C-1 (δ 132.35 ppm) and from H- α to C-1'. HR-MS verified a molecular mass of m/z 452.1 for **5** (m/z 451.1248 (found); m/z 451.1246 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_{11}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$) and a molecular mass of m/z 436.1 for **9** (m/z 435.1295 (found); m/z 435.1297 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$). In both dihydrochalcones glucose is fixed in the β -glycoside position, because the H-atom at position 1'' had a chemical shift of 4.50 ppm coupling to H 2'' at $^3J = 9.8$ Hz. ^1H NMR data from **5** were in line with Koeppen and Roux (5, 12) and Rabe et al. (7). Results from **9** were corresponding to Bramati et al. (13) and Hillis and Inoue (14).

Flavone-*C*-glycosides were isolated from MLCCC peak D (isorientin (**7**)), peak F (orientin (**6**), vitexin (**8**)), and peak G (isovitexin (**10**)). NMR data of the flavone-8-*C*- β -D-glucopyranoside orientin and flavone-6-*C*- β -D-glucopyranoside isorientin are specified in **Table 2**. In both structures glucose is bound in the β -glycoside position (δ $^1\text{H} = 4.66$ ppm, $^3J = 10.0$ Hz and δ $^1\text{H} = 4.58$ ppm, $^3J = 9.8$ Hz, respectively). HR-MS delivered a molecular mass of m/z 448.1 for **6** (m/z 447.0930 (found); m/z 447.0933 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$) and a molecular mass of m/z 448.1 for **7** (m/z 447.0929 (found); m/z 447.0933 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$). The ^1H NMR data of flavone-*C*-glycosides were in line with Koeppen (4) and Rabe et al. (7).

The NMR data and HR-MS data verified the structure of **8** and **10**. These are isomers of **6** and **7** lacking the hydroxyl group at position 3' (**Table 2**, R = H, orientin \rightarrow vitexin, isorientin \rightarrow isovitexin). Therefore, 3' and 5' like 2' and 6' have the same chemical shift in ^1H and ^{13}C NMR experiments.

Table 2. ^1H (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) Spectroscopic Data of Flavone-C-glycosides Orientin (**6**) and Isoorientin (**7**) (in DMSO- d_6)^a

flavone-8-C- β -D-glucopyranoside, orientin, R = OH			flavone-6-C- β -D-glucopyranoside, isoorientin, R = OH		
					
C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	
2		164.05		163.63	
3	6.63 (s, 1H)	102.36	6.66 (s, 1H)	102.79	
4		181.98		181.86	
5		162.50		160.67	
6	6.26 (s, 1H)	98.06		108.85	
7		160.34		163.22	
8		104.51	6.47 (s, 1H)	93.48	
9		156.95		156.18	
10		103.99		103.40	
1'		122.98		121.42	
2'	7.41 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz)	114.04	7.40 (d, 1H, $J = 4.6$)	113.30	
3'		145.77		145.73	
4'		149.77		149.68	
5'	6.85 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz)	115.61	6.88 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz)	116.04	
6'	7.52 (dd, 1H, $^3J = 6.2$ Hz, $^4J = 2.2$)	119.32	7.41 (dd, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 2.2$)	118.96	
1''	4.66 (d, 0.9H, $J = 10.0$ Hz)	73.35	4.57 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz)	73.03	
	4.82 (d, 0.1H, $J = 9.2$ Hz)*				
2''	3.84 (pt, 1H, $J = 8.9$ Hz)	70.73	4.02 (pt, 1H, $J = 9.5$ Hz)	70.60	
3''	3.24 (pt, 1H, $J = 8.9$ Hz)	78.73	3.19 (pt, 1H, $J = 8.7$ Hz)	78.93	
4''	3.36 (pt, 1H, $J = 9.2$ Hz)	70.66	3.13 (pt, 1H, $J = 8.4$ Hz)	70.19	
5''	3.24 (m, 1H)	81.96	3.26 (m, 1H)	81.55	
6''	3.68 (dd, 1H, $J = 11.4$ Hz, $J = 1.2$ Hz)	61.60	3.67 (dd, 1H, $J = 10.0$ Hz, $J = 2.1$ Hz)	61.48	
	3.52 (dd, 1H, $J = 11.7$ Hz, $J = 6.3$ Hz)		3.40 (dd, 1H, $J = 10.0$ Hz, $J = 6.3$ Hz)		

^a δ , chemical shift; J , coupling constant. Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HMQC, and ^{13}C -DEPT measurements. The asterisk (*) indicates rotamers (21, 22).

In both flavones the glucose was fixed in the β -glycoside position, too. HR-MS data from **8** delivered a molecular mass of m/z 432.1 (m/z 431.0986 (found); m/z 431.0984 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$) and a molecular mass of m/z 432.1 for **10** (m/z 431.0983 (found); m/z 431.0984 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$). UV and MS data of vitexin and isovitexin were corresponding to Rabe et al. (7) and Bramati et al. (13).

Four flavanone-C-glycosides (**1–4**) were isolated from ML-CCC peaks B and C (Figure 2). **2** + **4** and **1** + **3** are diastereoisomeres, respectively, and gave different retention times in HPLC analysis. Although the absolute stereochemistry was not determined, the peak eluting first was tentatively assigned the S-isomer on the basis of Philbin and Schwartz (15). However, NMR results for each group were basically identical (Table 3). This must be due to the almost planar A and C ring system of the flavanone isomers resulting in an almost identical electronic environment for H-3 and H-2. Additionally, both pairs of diastereoisomeres are in equilibrium via ring opening to a quinine methide configuration. Incubations of isolated **1** in phosphate buffer resulted in immediate conversion to a 1:1 mixture of **1** + **3** (Figure 3). The NMR results are in line with the data from a diastereomeric mixture of (R)- and (S)-eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranoside by Marais et al. (9). The data for the 8-C-glycosides are presented for the first time herein. HR-MS delivered a molecular mass of m/z 450.1 for **1** (m/z

449.10870 (found); m/z 449.1089 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$) and a molecular mass of m/z 449.1092 for **3** (m/z 449.1092 (found); m/z 449.1089 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$). Compound **2** gave a molecular mass of m/z 450.1 in HR-MS (m/z 449.1083 (found); m/z 449.1089 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$) and **4** gave a molecular mass of m/z 450.1 in HR-MS (m/z 449.1090 (found); m/z 449.1089 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$).

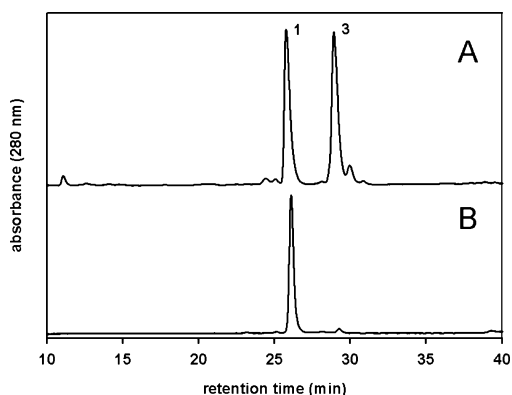
Flavonol-O-glycosides were isolated from MLCCC peak C (rutin **11**) and peak H (hyperoside (**12**) and isoquercitrin (**13**)). NMR data of these substances are shown in Table 4. The sugar of these three flavonol-O-glycosides is fixed in the β -glycoside position. Compound **11** gave the molecular mass m/z 610.1 (m/z 609.1465 (found); m/z 609.1461 (calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{16}$) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$), HR-MS delivered a molecular mass m/z 464.1 for **12** (m/z 503.0587 (found); m/z 503.0586 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{K}$) [$\text{M} + \text{K}$] $^+$), and a molecular mass m/z 464.1 for **13** (m/z 487.0859 (found); m/z 487.0847 (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{Na}$) [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$). All data for rutin were in line with Sawabe et al. (16).

Hyperoside was isolated from *A. linearis*, and the NMR data unequivocally were established for the first time in comparison to **13** and **11**. The detailed structure and selected HMBC correlations are shown in Figure 4. The presence of the flavone skeleton was evident from the UV ($\lambda_{\text{max}} = 256$ and 350 nm), ^{13}C NMR (δ 177 (C-4), 156 (C-2), and 133 ppm (C-3)), and

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopic Data of Flavanone-*C*-glycosides (*R*)/(*S*)-Eriodictyol-6-*C*- β -*D*-glucopyranoside (**1** + **3**) and (*R*)/(*S*)-Eriodictyol-8-*C*- β -*D*-glucopyranoside (**2** + **4**) (in $\text{DMSO-}d_6$)^a

	<i>(R)</i> / <i>(S)</i> -eriodictyol-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside		<i>(R)</i> / <i>(S)</i> -eriodictyol-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	
	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]
2	5.34 (dd, 1H, $J = 2.9$ Hz, 9.0 Hz)	78.65	5.34 (dd, 1H, $J = 3.1$ Hz, 9.0 Hz)	78.26
3 _{cis}	2.70 (dd, 1H, $J = 2.9$ Hz, 14.2 Hz)	42.45	2.70 (dd, 1H, $J = 3.1$ Hz, 14.0 Hz)	42.05
3 _{trans}	3.15 (dd, 1H, $J = 9.0$ Hz, 14.2 Hz)		3.15 (m, 1H)	
4		196.89		196.45
5		166.19		162.68
6	5.93 (s, 1H)	94.90		105.75
7		163.12		165.72
8		106.22	5.92 (s, 1H)	94.70
9		162.01		161.58
10		101.98		101.52
1'		129.87		129.41
2'	6.73 (s, 1H)	115.76	6.73 (s, 1H)	115.32
3'		145.64		145.18
4'		146.13		146.66
5'	6.86 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz)	114.71	6.86 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz)	114.24
6'	6.80 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz)	118.30	6.75 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz)	117.84
1''	4.46 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz)	73.35	4.46 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz)	72.93
2''	3.84 (pt, 1H, $J = 9.8$ Hz)	70.67	3.95 (pt, 1H, $J = 9.1$ Hz)	70.27
3''	3.16 (m, 1H)	79.49	3.15 (m, 1H)	79.03
4''	3.16 (m, 1H)	71.08	3.15 (m, 1H)	70.62
5''	3.16 (m, 1H)	81.93	3.15 (m, 1H)	81.47
6''	3.37 (dd, 1H, $J = 5.7$ Hz, 11.8 Hz)	61.96	3.38 (dd, 1H, $J = 5.9$ Hz, 11.9 Hz)	61.50
	3.65 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, 11.8 Hz)		3.65 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, 11.8 Hz)	

^a δ , chemical shift; J , coupling constant. Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HMQC, and ^{13}C -DEPT measurements.

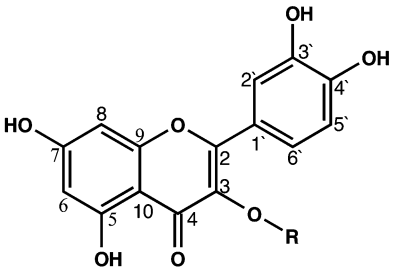
**Figure 3.** HPLC-DAD chromatogram of the incubation of **1** in phosphate buffer: (A) 24 and (B) 0 h.

the HMBC correlation from H-6 (δ 6.18 ppm, d, 1H, $^4J = 2$ Hz) to C-5, C-7, C-8, and C-10. H-8 correlated to C-9, C-7, C-10, and C-6. The ^1H NMR spectrum displayed the anticipated systems for the A and B ring, the protons for 7-OH, 3'-OH, and 4'-OH (δ 9.1–12.6 ppm) and the chelated proton at 5-OH. The β -glycoside configuration was verified by H-1'' at δ 5.35 ppm coupling with $^3J = 7.7$ Hz, which correlated to C-3 at 133.46 ppm. NMR data of **12** and **13** were identical to work published by Krasnov et al. (17).

From MLCCC peak B chlorogenic acid (5-*O*-caffeoyl-quinic acid (**14**)) was identified by comparing the retention time (RT

= 19.3 min) and absorption spectrum ($\lambda_{\text{max}} = 320$ nm) to commercial reference material (Figure 5). Additionally, HR-MS gave a pseudo-molecular mass m/z 353.1 for **14** (m/z 353.0873 (found); m/z 353.0878 (calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9$) [$\text{M} - \text{H}]^-$).

Diethyl Ether Extract. The diethyl ether extract was screened for polyphenols by analytical HPLC-DAD (Figure 6). In contrast to ethyl acetate and *n*-butanol extracts benzoic and cinnamic acids were found in high yields. In addition diethyl ether extract contained hydrophobic flavonoid aglycons. The extract was separated into eight signals (I–P) by MLCCC (Figure 7). Stationary-phase retention was between 60 and 65%. After workup, material was derivatized and subjected to coupled gas chromatography–mass spectrometry (temperature program 1). From the various MLCCC fractions the following polyphenolic structures were unequivocally identified by comparison with authentic material: syringic acid (**23**; m/z), 342 (M^+ , 2 \times silylated, 62%), 327 (70%), 312 (64%), 297 (27%), 283 (25%), 253 (28%), 223 (25%), 141 (19%), 89 (9%), and 73 (100%); gallic acid (**15**; m/z), 458 (M^+ , 4 \times silylated, 35%), 443 (16%), 281 (71%), 179 (11%), and 73 (100%); gentisic acid (**18**; m/z), 355 ($\text{M}^+ - 15$, 3 \times silylated, 50%), 193 (10%), 147 (9%), and 73 (100%); protocatechuic acid (**16**; m/z), 370 (M^+ , 2 \times silylated, 32%), 355 (18%), 311 (9%), 223 (5%), 193 (100%), 165 (8%), 137 (5%), and 73 (53%); vanillic acid (**21**; m/z), 312 (M^+ , 2 \times silylated, 67%), 297 (100%), 282 (26%), 267 (69%), 253 (55%), 223 (29%), 193 (24%), and 73 (90%); caffeic acid

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopic Data of Flavonol-*O*-glycosides Rutin (11), Hyperoside (12), and Isoquercitrin (13) (in $\text{DMSO-}d_6$)^a


isoquercitrin R = β -D-Glc		hyperoside R = β -D-Gal		rutin R = α -L-Rha-1 \rightarrow 6- β -D-Glc	
δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
2	156.60		156.20		156.77
3	133.75		133.46		133.93
4	177.88		177.46		177.84
5	161.68		161.20		161.64
6	6.19 (d, 1H, J = 2.1 Hz)	6.18 (d, 1H, J = 2.0 Hz)	98.63	6.19 (d, 1H, J = 2.0 Hz)	99.11
7	164.53		164.09		164.54
8	6.39 (d, 1H, J = 2.0 Hz)	6.38 (d, 1H, J = 2.1 Hz)	93.46	6.39 (d, 1H, J = 2.0 Hz)	93.96
9	156.75		156.27		156.85
10	104.41		103.89		104.34
1'	121.60		121.07		121.50
2'	7.56 (d, 1H, J = 2.2 Hz)	7.50 (d, 1H, J = 2.3 Hz)	115.91	7.51 (d, 1H, J = 2.3 Hz)	116.42
3'	145.23		144.80		145.24
4'	148.88		148.43		148.91
5'	6.83 (d, 1H, J = 9.0 Hz)	6.79 (d, 1H, J = 8.5 Hz)	115.15	6.81 (d, 1H, J = 8.5 Hz)	115.61
6'	7.57 (dd, 1H, J = 2.2 Hz, 6.8 Hz)	7.64 (dd, 1H, J = 2.2 Hz, 8.5 Hz)	121.97	7.64 (dd, 1H, J = 2.3 Hz, 8.5 Hz)	122.35
1''	5.45 (d, 1H, J = 7.4 Hz)	5.35 (d, 1H, J = 7.7 Hz)	101.77	5.31 (d, 1H, J = 7.7 Hz)	102.44
2''	3.23 (m, 2H)	3.55 (dd, 1H, J = 9.4 Hz, 7.7 Hz)	75.81	3.04-3.31 (m, 8H)	74.50
3''	3.23 (m, 2H)	3.35 (m, 1H)	73.16		76.87
4''	3.07 (m, 2H)	3.63 (d, 1H, J = 3.2 Hz)	67.89		70.86
5''	3.07 (m, 2H)	3.29 (dd, 1H, J = 6.1 Hz, 5.9 Hz)	71.17		76.34
6a''	3.30 (m)	3.35 (m)	60.10	3.35 (dd, 1H, J = 6.1 Hz, 12.3 Hz)	67.41
6b''	3.57 (dd, 1H, J = 3.5 Hz, 11.5 Hz)	3.43 (dd, 1H, J = 5.5 Hz, 10.0 Hz)		3.69 (dd, 1H, J = 3.2 Hz, 10.0 Hz)	
1'''				4.40 (dd, 1H, J = 15.6 Hz, 1.3 Hz)	101.2
2'''				3.04-3.31 (m, 8H)	70.79
3'''					70.43
4'''					72.27
5'''					68.47
6'''				1.03 (d, 3H, J = 6.2 Hz)	18.34

^a δ , chemical shift; J , coupling constant. Hydrogen/carbon assignments were verified by HMBC, HMQC, and ^{13}C -DEPT measurements.

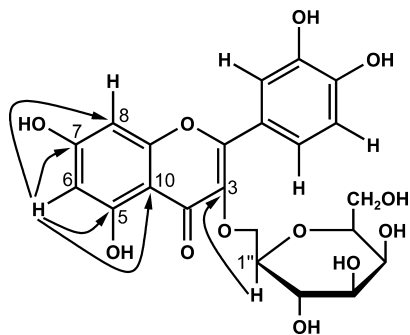


Figure 4. Structure of hyperoside 12. Selected HMBC correlations are marked by arrows.

(22; m/z), 396 (M^{++} , 3 \times silylated, 17%), 219 (16%), 207 (11%), 147 (21%), and 75 (100%). As an example the identification of 23 is shown in Figure 8. Results from protocatechuic acid, caffeic acid, and vanillic acid were corresponding to Lin and Harnly (18). Data from 23 were in line with Ferreira et al. (8).

After MLCCC separation the retarded stationary phase was also silylated and separated by HRGC-MS (temperature program 1), leading to the identification of the following structures: 3,5-

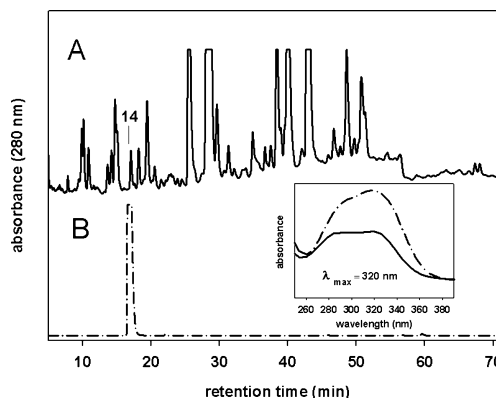


Figure 5. HPLC-DAD chromatograms of *n*-butanol extract (A) and chlorogenic acid (B). Both gave a peak at 19.3 min with identical absorption spectra, $\lambda = 320$ nm.

dihydroxybenzoic acid (16; RT = 18.3 min) m/z 370 (M^{++} , 3 \times silylated, 35%), 355 (10%), 281 (6%), 193 (100%), 147 (16%), and 73 (84%); *p*-hydroxybenzoic acid (19; RT = 14.2 min), m/z 282 (M^{++} , 2 \times silylated, 12%), 267 (86%), 223 (78%), 193 (41%), 147 (29%), and 75 (100%); *p*-coumaric acid (24; RT >

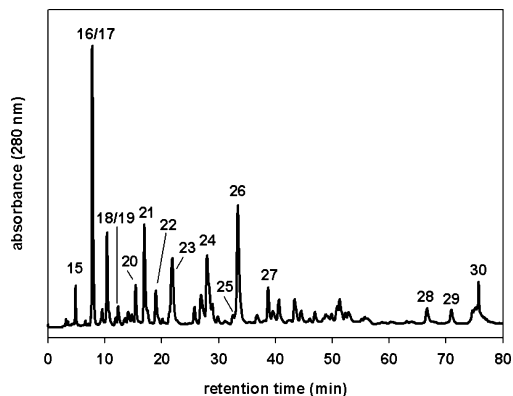


Figure 6. HPLC-DAD chromatogram of diethyl ether extract from unfermented rooibos tea at $\lambda = 280$ nm. Retention times are given in parentheses: **15**, gallic acid (4.9 min); **16**, protocatechuic acid (7.8 min); **17**, 3,5-dihydroxybenzoic acid (7.8 min); **18**, gentisic acid (12.3 min); **19**, *p*-hydroxybenzoic acid (12.3 min); **20**, (+)-catechin (15.9 min); **21**, vanillic acid (17.0 min); **22**, caffeic acid (19.0 min); **23**, syringic acid (21.9 min); **24**, *p*-coumaric acid (28.0 min); **25**, salicylic acid (32.7 min); **26**, ferulic acid (33.4 min); **27**, sinapinic acid (38.7 min); **28**, quercetin (66.7 min); **29**, luteolin (70.9 min); **30**, chrysoeriol (75.7 min).

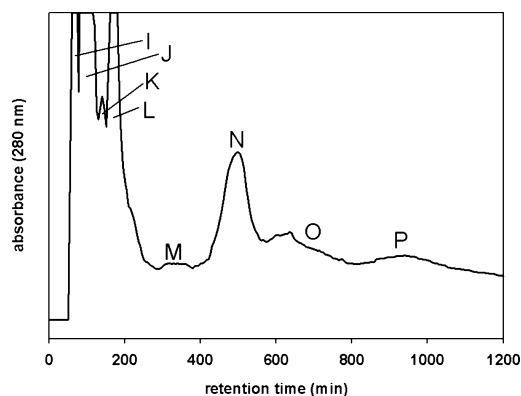


Figure 7. Separation of diethyl ether extract from rooibos tea by MLCCC: I–K, Mixture of flavonoids; L, gallic acid (**15**); M, gentisic acid (**18**); N, protocatechuic acid (**16**); O, syringic acid (**23**); P, vanillic acid (**21**) and caffeic acid (**22**).

= 20.5 min) m/z 308 (M^{+} , 2 \times silylated, 24%), 293 (53%), 249 (22%), 219 (35%), 179 (10%), 147 (15%), and 73 (100%); salicylic acid (**25**; RT = 11.8 min) m/z 267 (M^{+} , 2 \times silylated, 100%), 193 (7%), 149 (10%), 135 (12%), 91 (7%), and 73 (68%); ferulic acid (**26**; RT = 23.2 min) m/z 338 (M^{+} , 2 \times silylated, 38%), 323 (32%), 308 (27%), 293 (16%), 249 (19%), 219 (14%), 147 (26%), 117 (13%), and 73 (100%); sinapinic acid (**27**; RT = 25.2 min) m/z 368 (M^{+} , 2 \times silylated, 25%), 353 (23%), 338 (30%), 323 (11%), 129 (15%), 117 (26%), 73 (100%).

Data from *p*-coumaric acid (**24**) and ferulic acid (**26**) correspond to Lin et al. (18).

The residual stationary phase contained nonpolar aglycons such as (+)-catechin (**20**), quercetin (**28**), luteolin (**29**), and chrysoeriol (**30**) (**Figure 9**). For isolation of **29** + **30** the solventless residuum was separated by preparative thin-layer chromatography. After elution, target material was derivatized and injected into the HRGC-MS system (temperature program 2). The following polyphenolic structures were unequivocally identified by comparison with authentic material: chrysoeriol (**30**; RT = 18.5 min) m/z 486 ($M^{+} - 15$, 5 \times silylated, 1%), 371 (69%), 313 (7%), 281 (10%), 239 (28%), 207 (29%), 203 (35%), 147 (85%), 129 (51%), 117 (37%), 103 (27%), 75

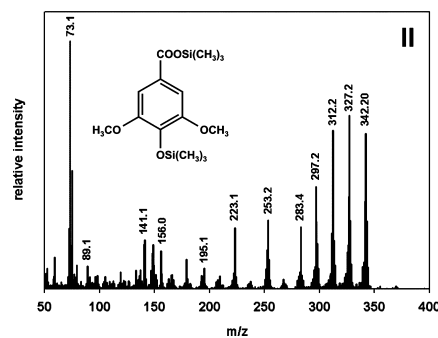
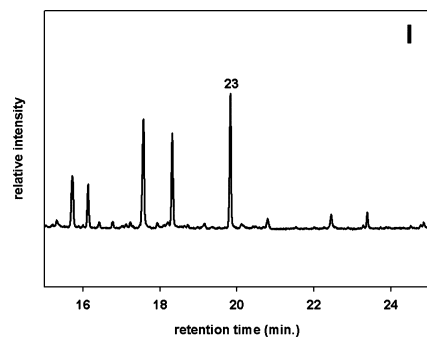


Figure 8. Signal O (**Figure 4**) of MLCCC separation of diethyl ether extract was derivatized by silylation: (I) HRGC-MS chromatogram, syringic acid (**23**) eluted at 19.8 min; (II) corresponding EI-mass spectrum.

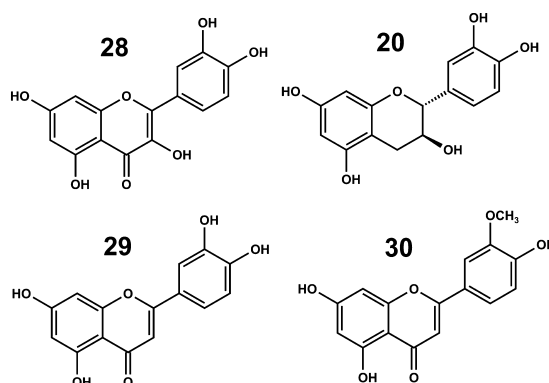


Figure 9. Aglycons isolated from the stationary phase of diethyl ether extract after MLCCC separation: **28**, quercetin; **20**, (+)-catechin; **29**, luteolin; **30**, chrysoeriol.

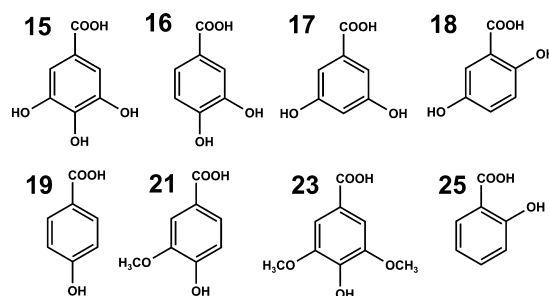


Figure 10. Hydroxybenzoic acids isolated from diethyl ether extract: **15**, gallic acid; **16**, protocatechuic acid; **17**, 3,5-dihydroxybenzoic acid; **18**, gentisic acid; **19**, *p*-hydroxybenzoic acid; **21**, vanillic acid; **23**, syringic acid; **25**, salicylic acid.

(100%), and 73 (96); luteolin (**29**; RT = 23.7 min) m/z 574 (M^{+} , 4 \times silylated, 1%), 488 (2%), 429 (2%), 399 (27%), 281 (10%), 207 (38%), 147 (77%), 129 (30%), 75 (100%), and 73 (62%). Quercetin (**28**) and (+)-catechin (**20**) could be unambiguously identified direct from the stationary phase by HRGC-MS (temperature program 2) after silylation: quercetin (**30**; RT

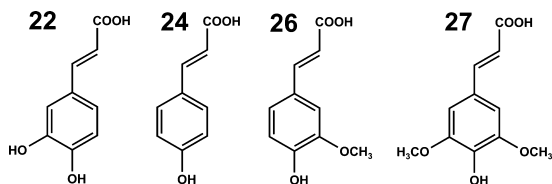


Figure 11. Hydroxycinnamic acids isolated from diethyl ether extract: **22**, caffeic acid; **24**, *p*-coumaric acid; **26**, ferulic acid; **27**, sinapinic acid.

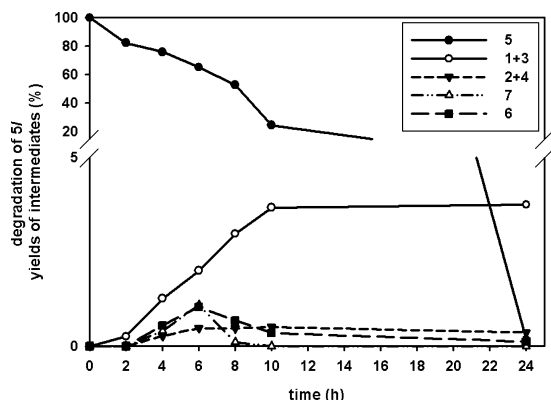


Figure 12. Degradation of aspalathin **5** to (*R*)/(*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (**1** + **3**), (*R*)/(*S*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside (**2** + **4**), orientin (**6**), and isoorientin (**7**). Yields of intermediates are calculated on the basis of the initial concentration of aspalathin.

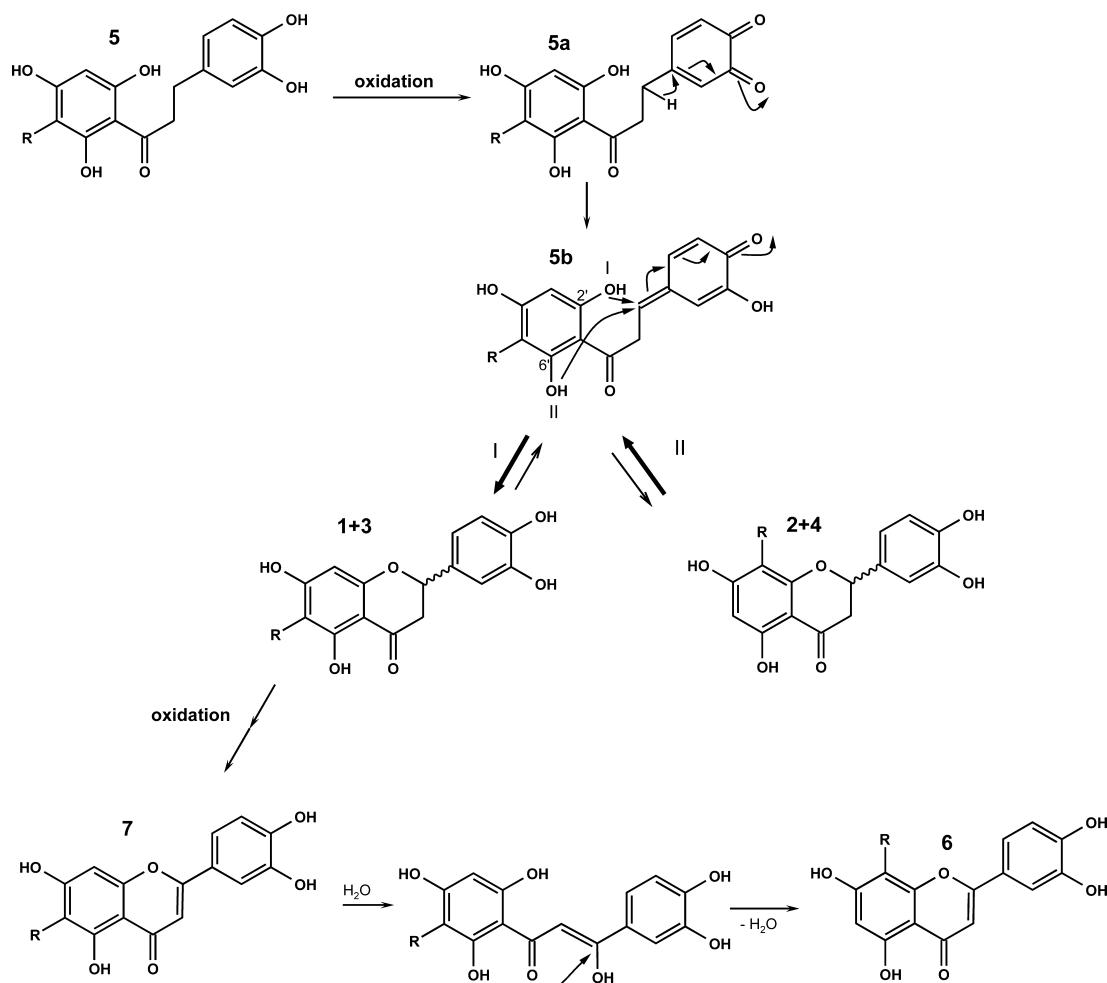


Figure 13. Oxidative degradation of aspalathin (**5**) to orientin (**6**) and isoorientin (**7**). Eriodictyols **1**–**4** (1-*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside, 2-*S*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside, 3-*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside, 4-*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside) are key intermediates. R = glucose.

= 34.7 min) m/z 486 ($M^+ - 15$, 5 \times silylated, 1%), 371 (69%), 313 (7%), 281 (10%), 239 (28%), 207 (29%), 203 (35%), 147 (85%), 129 (51%), 117 (37%), 103 (27%), 75 (100%), and 73 (96); (+)-catechin (**20**; RT = 26.40 min) m/z 650 (M^+ , 5 \times silylated, 7%), 578 (8%), 488 (3%), 383 (16%), 368 (100%), 296 (70%), 280 (66%), 179 (44%), 73 (89%), and 75 (10%). Data were in line with Ferreira et al. (8), Fischer et al. (19), and Amani et al. (20).

In conclusion the following substances from *A. linearis* were isolated and identified: (*S*)/(*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (**1** + **3**), (*S*)/(*R*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside (**2** + **4**), aspalathin (**5**), orientin (**6**), isoorientin (**7**), vitexin (**8**), nothofagin (**9**), isovitexin (**10**), rutin (**11**), hyperoside (**12**), isoquercitrin (**13**), chlorogenic acid (5-CQA, **14**), gallic acid (**15**), protocatechuic acid (**16**), 3,5-dihydroxybenzoic acid (**17**), gentisic acid (**18**), *p*-hydroxybenzoic acid (**19**), (+)-catechin (**20**), vanillic acid (**21**), caffeic acid (**22**), syringic acid (**23**), *p*-coumaric acid (**24**), salicylic acid (**25**), ferulic acid (**26**), sinapinic acid (**27**), quercetin (**28**), luteolin (**29**), and chrysoeriol (**30**). Within this context **2** + **4**, **12**, **14**, **15**, **17**, **18**, **25**, and **27** were isolated from rooibos for the first time. Identified benzoic and cinnamic acids are shown in **Figure 10** and **Figure 11**. The established method is able to isolate multiple and minor polyphenolic substances and applicable to further natural products.

Degradation of Dihydrochalcones. Prolonged incubation of flavanone-*C*-glycosides resulted in several distinct structures.

Thus, the mechanisms of **5** degradation were studied in-depth. Compound **5** was incubated in phosphate buffer for 48 h (Figure 12). The half-life of **5** was calculated as 8 h. After 48 h, all structures were degraded to high molecular uncharacterized material and no discrete signals were detectable in HPLC-DAD. During the process eriodictyols **1** + **3** were the major products coinciding with minor concentrations of **2** + **4** in a stable ratio. Compounds **6** and **7** were also found with a maximum at 6 h. In contrast to a relative slow degradation of **6**, **7** was no longer detectable after 10 h.

The degradation of **5** to eriodictyols **1–4** must be explained by oxidation via *o*-quinone (**5a**; Figure 13). This structure then rearranges to quinone methide (**5b**), which allows fast conversion of isolated single eriodictyols into a stable equilibrium. Reaction step from **5b** to **1** + **3** was reversible, because incubations of (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -*D*-glucopyranoside immediately changed to a 1:1 mixture of **1** + **3** (Figure 3) and, more slowly and to a much lower extent, to the eriodictyol-8-*C*- β -*D*-glucopyranosides **2** + **4**. In equilibrium the ratio of **1** + **3** to **2** + **4** was about 10 to 1. Reactions of authentic **4** yielded **1** + **3**, while **4** was readily decomposed. Reactions of **1** + **3** also produced **7** and, unexpectedly, even higher amounts of **6**. In contrast, **2** + **4** never resulted in any **6**. This excludes direct oxidation of **2** + **4** to **6**. Compounds **6** and **7** were also incubated separately. Isoorientin was converted to orientin, although it was only a minor product among uncharacterized brown material. This is an irreversible reaction step, because **6** was not converted to **7**. Conversion must be initiated by opening of the vinyl ester structure of **7** followed by bond rotation and recyclization, also known as Wessely–Moser rearrangement. Conversion including reductive steps could be excluded as no eriodictyols were formed. During separate incubations of isolated **6** and **7**, degradation of **7** (half-life, 135 h) to brown products was considerably faster than degradation of **6** (half-life, 208 h). This also undermines the notion that degradation from **2** + **4** to **6** was not detectable because of a relative instability of **6**. The understanding of these complex reaction mechanisms is prerequisite to gain further insights into the chemical pathways during the fermentation process of rooibos.

ACKNOWLEDGMENT

We thank D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle, Germany, for recording NMR spectra, and J. Schmidt from the Leibnitz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany, for performing LC-MS/accurate mass analysis.

LITERATURE CITED

- Erickson, L. Rooibos tea: Research in antioxidant and antimutagenic properties. *HerbalGram* **2003**, *59*, 34–45.
- Morton, J. F. Rooibos tea, *Aspalathus linearis*, a caffeineless, low tannine beverage. *Econ. Bot.* **1983**, *37*, 164–173.
- Koeppen, B. H.; Smith, J. B.; Roux, D. G. The flavone C-glycosides and flavonol O-glycosides of *Aspalathus accuminatus* (rooibos tea). *Biochem. J.* **1962**, *83*, 507–511.
- Koeppen, B. H. C-Glycosylflavonoids—The chemistry of orientin and isoorientin. *Biochem. J.* **1965**, *97*, 444–448.
- Koeppen, B. H.; Roux, D. G. Aspalathin, a novel C-glycosylflavonoid from *Aspalathus linearis*. *Tetrahedron Lett.* **1965**, *39*, 3497–3503.
- Snyckers, F. O.; Salemi, G. Studies of the South African medicinal plants (isolation and identification of Quercetin and luteolin). *J. S. Afr. Chem. Inst.* **1974**, *27*, 5–7.
- Rabe, C.; Steenkamp, J. A.; Joubert, E. Phenolic metabolites from rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1559–1565.
- Ferreira, D.; Marais, C.; Steenkamp, J. A.; Joubert, E. Rooibos Tea a Likely Health Food Supplement. *Proceedings of Recent Developments of Technologies on Fundamental Foods for Health*; Korean Society of Food Science and Technology: Seoul, Korea, 1995, pp73–88.
- Marais, C.; van Rensburg, W. J.; Ferreira, D.; Steenkamp, J. A. (*S*)- and (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -*D*-glucopyranoside, novel keys to the fermentation of rooibos (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* **2000**, *55*, 43–49.
- Joubert, E. HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and Nnothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing. *Food Chem.* **1996**, *55*, 403–411.
- Maillard, M.; Marston, A.; Hostettmann, K. High-Speed Countercurrent Chromatography of Natural Products. In *High-Speed Countercurrent Chromatography*, 1st ed.; Ito, Y.; Conway, W. D.; Wiley: New York, 1996; Vol. 132.
- Koeppen, B. H.; Roux, D. G. C-Glycosylflavonoids. The chemistry of aspalathin. *Biochem. J.* **1966**, *99*, 604–609.
- Bramati, L.; Minoggio, M.; Gardana, C.; Simonetti, P.; Mauri, P.; Pietta, P. Quantitative characterization of flavonoid compounds in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5513–5519.
- Hillis, W. E.; Inoue, T. The polyphenols of nothofagus species-II. The heartwood of *Nothofagus fusca*. *Phytochemistry* **1967**, *6*, 59–67.
- Philbin, C. S.; Schwartz, S. J. Resolution of diastereomeric flavonoid (1*S*)-(–)-camphanic acid esters via reversed-phase HPLC. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1206–1211.
- Sawabe, A.; Nesumi, C.; Morita, M.; Matsumoto, S.; Matsubara, Y.; Komemushi, S. Glycosides in African dietary leaves, *Hibiscus sabdariffa*. *J. Oleo Sci.* **2005**, *54*, 185–191.
- Krasnov, E. A.; Raldugin, V. A.; Shilova, I. V.; Avdeeva, E. Yu. Phenolic compounds from *Filipendula ulmaria*. *Chem. Nat. Compd.* **2006**, *42*, 148–151.
- Lin, L. Z.; Harnly, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1084–1096.
- Fischer, C. H.; Bischof, M.; Rabe, J. G. Identification of natural and early synthetic textile dyes with HPLC and UV/VIS-spectroscopy by diode array detection. *J. Liquid Chromatogr.* **1990**, *13*, 319–331.
- Amani, S. A.; Maitland, D. J.; Soliman, G. A. Hepatoprotective activity of *Schouwia thebica* webb. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4642–4628.
- Fossen, T.; Andersen, O. M. Spectroscopic techniques applied to flavonoids. In *Flavonoids—Chemistry, Biochemistry and Applications*, 1st ed.; Andersen, O. M., Markham K. R.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Ratan, Florida, 2006.
- Rayyan, S.; Fossen, T.; Nateland, H. S.; Andersen, O. M. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug ‘*Crataegi Folium Cum Flore*’ (Hawthorn). *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 334–341.

Received for review December 19, 2007. Revised manuscript received February 22, 2008. Accepted February 24, 2008.

JF703701N

4.3 Structure-Antioxidant Relationship of Flavonoids from Fermented Rooibos

Krafczyk, N.; Woyand, F. and Glomb, M.A. Structure-Antioxidant Relationship of Flavonoids from Fermented Rooibos. *Molecular Nutrition and Food Research* **2008**, angenommen am 02.07.2008

Structure-Antioxidant Relationship of Flavonoids from Fermented Rooibos

Nicole Krafczyk¹, Franziska Woyand¹ and Marcus A. Glomb¹

¹Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Str. 2, 06120 Halle, Germany

Correspondence: Prof. Dr. Marcus Glomb, Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Str. 2, 06120 Halle;

E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de

Fax: ++49-345-5527341)

Abbreviations: TAA, Total antioxidant activity; TEAC, Trolox equivalent antioxidant activity

Keywords: Fremy's salt/ LDL-oxidation/ Rooibos tea/ structure-antioxidant relationship/ TEAC

1 Abstract

2 Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) contains different **bioactive** phenolic compounds such as
3 dihydrochalcones, flavonols, flavanones, flavones and flavanols. Flavonoids isolated from
4 rooibos were subjected to different *in vitro* assays: Trolox equivalent antioxidant activity,
5 LDL-oxidation and Fremy's salt assays to determine the total antioxidant activity (TAA).
6 Assay results were compared, and the structure-antioxidant relationship was investigated. A
7 decoupled LDL oxidation test was established with the objective of having an assay adapted
8 more to an *in vivo* situation. The different *in vitro* methods were coupled offline to HPLC-
9 DAD. Results from these coupled offline methods were compared to the TAA to assess the
10 usefulness of the coupling setup.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27 1 Introduction

28 Rooibos tea is made from the leaves and fine stems of *Aspalathus linearis*. Fermented rooibos
29 tea is reported to have different biological properties, such as calming various storage
30 problems, reducing nervous tensions and alleviating allergies [1]. Polyphenols were isolated
31 and identified from fermented and unfermented rooibos by multilayer countercurrent
32 chromatography, e.g. flavanone-*C*-glycosides ((*S*)- and (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -*D*-
33 glycopyranoside, (*S*)- and (*R*)-eriodictyol-8-*C*- β -*D*-glycopyranoside); dihydrochalcones
34 (aspalathin, nothofagin); flavone-*C*-glycosides (orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin);
35 flavonol-*O*-glycosides (isoquercitrin, hyperoside, rutin); flavonol (quercetin) and flavones
36 (luteolin, chrysoeriol) [2]. The structures of these polyphenols are shown in Figure 1.

37 The structure of a phenolic compound affects its antioxidant capacity. More specifically, the
38 antioxidant activity is influenced by the position and degree of hydroxylation of the ring
39 structure. An *ortho*-dihydroxyl-functional group at the B-ring of flavonoids is highly effective
40 for scavenging free radicals. After interception of radicals flavonoids are oxidized to
41 quinones. The antioxidant potential is increased by a 3-hydroxyl functional group and a 2,3-
42 double bond conjugated to a 4-keto function at the flavonoid *C*-ring [3]. Flavanones and
43 flavones are less active than their corresponding dihydrochalcones [4].

44 These differences in activities of flavonoids and phenolic acids were gathered from tests done
45 in hydrophilic phases. In addition to this, the antioxidant activity against lipid radicals should
46 also be addressed. In this case, three modes of inhibition need to be discussed: scavenging
47 lipid alkoxyl and peroxy radicals by acting as hydrogen donors, chelating metal ions via the
48 *ortho*-dihydroxyl or α/β -hydroxycarbonyl structures, and the ability to regenerate tocopherol
49 radicals [3]. It has been hypothesized that flavonoids might be localized near membrane
50 surfaces, e.g. the LDL membrane, scavenging aqueous radicals and thus preventing the
51 consumption of tocopherols, whereas α -tocopherol mainly acts as a chain-breaking lipid
52 peroxy radical scavenger within the LDL [5].

1
2
3 53 Previous work concerning the antioxidant capacity of rooibos extracts showed that
4
5 54 unfermented or fermented rooibos tea had a high antioxidant capacity relative to Trolox[®] in
6
7 55 the DPPH-assay and the β -carotene bleaching method [6]. Additionally, von Gandow et al.
8
9 56 researched the antioxidant capacity of aspalathin, the major flavonoid compound of
10
11 57 unfermented rooibos, and other phenolic compounds of rooibos with the result that aspalathin
12
13 58 inhibited the DPPH radical by 91.4% [7]. Joubert et al. [8] investigated the antioxidant and
14
15 59 pro-oxidant activity of aqueous extracts and crude phenolic fractions of rooibos, using a
16
17 60 **linoleic** acid-Tween buffer emulsion for lipid peroxidation and the deoxyribose degradation
18
19 61 assay based on a Fenton reaction system. Contrary to expectations, the inhibitory effect of the
20
21 62 ethyl acetate soluble fraction of fermented rooibos was significantly higher than that of
22
23 63 unfermented rooibos.

24
25 64 Because of these conflicting results, the antioxidant potential of polyphenolic ingredients of
26
27 65 rooibos in hydrophilic and lipophilic phases was reinvestigated using different *in vitro*
28
29 66 methods: TEAC assay, Fremy's salt assay and LDL-oxidation assay. An offline-HPLC
30
31 67 screening method was developed to couple with the assay methods described. Similar to the
32
33 68 method of Koleva et al. [9], this HPLC method was useful to evaluate the antioxidant activity
34
35 69 of the ethyl acetate extract of rooibos.
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 71 2 Materials and Methods

46 72 2.1 Chemicals

47
48 73 Chemicals of highest quality available were obtained from Roth (Karlsruhe, Germany) unless
49
50 74 otherwise indicated. HPLC-grade methanol was from Merck (Darmstadt, Germany). 6-
51
52 75 Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) was obtained from Aldrich
53
54 76 (Steinheim, Germany). Potassium nitrosodisulfonate (Fremy's salt) was purchased from
55
56 77 Sigma (Taufkirchen, Germany).
57
58
59
60

1
2
3 78 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), quercetin
4
5 79 dihydrate, potassium peroxodisulfate, copper(II) sulfate anhydrous, heptafluorobutyric acid,
6
7
8 80 were purchased from Fluka (Taufkirchen, Germany). Natrium bromide was obtained from
9
10 81 Riedel de Häen (Seelze, Germany).
11

12
13 82

15 83 **2.2 Methods**

17 84 All data are expressed as averages of triplicate experiments.
18
19
20 85

22 86 **2.2.1 Extraction of rooibos tea**

24 87 Fermented rooibos tea from Bieduow Valley of South Africa was obtained from Ronnefeldt
25
26 88 (Worpswede, Germany). Three g of fermented rooibos were extracted with 30 mL
27
28
29 89 acetone/water (7:3, v/v) at 5 °C for 24 h under argon atmosphere, and decanted. Acetone was
30
31
32 90 removed under reduced pressure. The residual H₂O phase was successively extracted with
33
34 91 diethyl ether (10 mL) and ethyl acetate (10 mL). From the extracts solvents were removed
35
36 92 under reduced pressure.
37

38 93 *Production of tea extract.* 100 g of unfermented rooibos from Ronnefeldt (Worpswede,
39
40 94 Germany) was extracted with 1 L of water. After filtration the solution was freeze-dried.
41
42 95 Yield of aspalathin in tea extract was 53 mg/g.
43
44
45 96

48 97 **2.2.2 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay**

50 98 This assay was performed on a Jasco UV-visible spectrophotometer (Gross-Umstadt,
51
52 99 Germany), based on the method of Re et al. [10]. ABTS^{•+} radical cation was produced by
53
54
55 100 reacting 7 mM ABTS and 140 mM potassium peroxodisulfate at 8 °C in the dark for 16 h.
56
57
58 101 The ABTS^{•+} solution was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm after
59
60 102 2.5 min. Individual fractions collected from analytical HPLC separation were evaporated by
103 103 vacuum centrifugation, redissolved in 100 µL of ethanol, then subjected to the TEAC assay.

1
2
3 104 For determination of the TEAC value Trolox standards of final concentration 20-140 μM in
4
5 105 ethanol were prepared and assayed under the same conditions. TEAC values of samples were
6
7
8 106 calculated based on the inhibition exerted by standard Trolox[®] solutions.
9

10
11 107

108 **2.2.3 Fremy's salt assay**

109 The Fremy's salt assay was carried out according to Rösch et al. [11]. Isolated substances or
110 fractions of polyphenols were dissolved in methanol. The solutions of the compounds were
111 allowed to react with an equal volume of a solution of Fremy's salt (1 mM in phosphate
112 buffer 0.2 M, pH = 7.4). ESR spectrum of Fremy's radical was obtained after 20 min, after
113 which the reaction was complete. Signal intensity was obtained by integration, and the
114 antioxidant capacity was calculated by comparison with a control reaction with methanol.
115 Spectra were obtained on a Miniscope MS 100 spectrometer (Magnettech, Berlin, Germany)
116 in a 50 μL micropipet. The microwave power and modulation amplitude were set at 10 dB
117 and 1500 mG, respectively.

118

119 **2.2.4 Isolation of LDL and oxidation**

120 Human LDL ($d = 1.006\text{-}1.063 \text{ g/mL}$) was isolated from fasting plasma collected in EDTA
121 according to the method of Tiedink et al. [12], using a Sorvall ultracentrifuge RC M 150 GX
122 (rotor S 150-AT) (Kendo Laboratory Products, Hanau, Germany). Then subjected to dialysis
123 for 24 h at 4°C three times against 1 L of 0.01 M PBS, 0.0027 M KCl, and 0.138 M NaCl, pH
124 = 7.4. LDL solution was flushed with N_2 , stored at 4 °C. Protein content was measured
125 according to the method of Bradford et al. [13], using bovine serum albumin as standard.

126 *LDL oxidation.* LDL obtained from dialysis (0.05 mg protein/mL) was oxidized in TRIS
127 buffer (1 mM, 0.9 % NaCl, pH = 7.4) in the presence of 70 μM CuSO_4 . Absorption was
128 measured at 234 nm according to Esterbauer et al. [14]. Solutions of isolated substances and

1
2
3 129 of individual fractions from HPLC-DAD separation were added to LDL solution before
4
5 130 addition of CuSO₄.

7
8 131

10 132 **2.2.5 Decoupled LDL-oxidation assay**

11
12 133 200 µL of LDL (0.05 mg/mL), diluted with PBS buffer (pH = 7.4), were added to antioxidant
13
14 134 solutions of aspalathin and isoquercitrin (20 µM) and incubated at 37 °C for 2 h, 8 h and 12 h.
15
16 135 After dialysis against PBS buffer the LDL-oxidation was observed as described above.
17
18
19

20 136

22 137 **2.2.6 HPLC-DAD screening assay**

23
24 138 A Jasco (Gross-Umstadt, Germany) quaternary gradient unit PU 2080, with degasser DG
25
26 139 2080-54, autosampler AS 2055, column oven (Jasco Jetstream II) and multiwavelength
27
28 140 detector MD 2015 coupled to an Advantec fraction collector CHF122SB (Tokyo, Japan) was
29
30 141 used. Chromatographic separations were performed on stainless steel columns (VYDAC
31
32 142 CRT. #218TP54, 250 x 4.0 mm, RP 18, 5 µm, Hesperia, CA) using a flow rate of
33
34 143 1.0 ml min⁻¹. The mobile phase used was water (solvent A) and MeOH/water (7:3, v/v,
35
36 144 solvent B). To both solvents (A and B), 0.6 mL/L heptafluorobutyric acid (HFBA) was added.
37
38 145 The column temperature was 25 °C. The effluent was monitored at 280 nm and 350 nm.
39
40 146 *Method A:* Sample (ethyl acetate extract: 2.1 mg/50 µL) was injected at 10 % B, the gradient
41
42 147 then changed linear to 30 % B in 40 min, to 70 % B in 60 min, to 100 % B in 2 min, and held
43
44 148 at 100 % B for 8 min. 65 fractions of 2 mL were collected in 130 min. *Method B:* Ethyl
45
46 149 acetate extract (420 µg/10 µL) was injected at 10 % B, the gradient then changed to 30 % B in
47
48 150 25 min, to 70 % B in 40 min, to 100 % B in 5 min, and held at 100 % B for 15 min. Fractions
49
50 151 with eluted material (substances **1-9**, Figure 6) were collected and evaporated. Residues were
51
52 152 redissolved in 500 µl of TRIS buffer. One-fifth was used for subsequent LDL oxidation.
53
54
55
56
57
58
59
60

153

154 3 Results and Discussion

155 3.1 Structure antioxidant relationship

156 3.1.1 TEAC and Fremy's salt assay

157 Authentic polyphenol compounds were previously isolated from rooibos by multilayer
158 countercurrent chromatography and preparative HPLC [2]. Quercetin, isoquercitrin,
159 hyperoside and rutin have the necessary prerequisites for a compound with high antioxidant
160 capacity: a 2,3-double bond and a 4-oxo-functional group at the C-ring conjugating the A and
161 B aromatic ring system. The TEAC value of quercetin was 2.70 ± 0.13 mM (Figure 1, Table
162 1). Isoquercitrin, rutin and hyperoside showed only half of the antioxidant activity of
163 quercetin. These results clearly demonstrate the importance of a free hydroxyl group at
164 position 3 on the C-ring. The TEAC value of quercetin was similar to that obtained by Re et
165 al. [10]. The Fremy's salt assay gave an Antioxidant Capacity (AC) (mol Fremy's salt/mol
166 antioxidant) of 4.48 ± 0.03 for quercetin (Table 1). Theoretically, quercetin has 5 possible
167 scavenging groups, two hydroxyl groups at the A-ring, two hydroxyl groups at the B-ring and
168 one hydroxyl group at position 3 of the C-ring. However, the *meta*-configuration of the A-ring
169 hydroxyl substituents does not favor efficient quenching of radicals. Accordingly, quercetin
170 was able to reduce at least 4 radicals, based on the AC-value of Fremy's salt assay. Values of
171 isoquercitrin and hyperoside are in the same range, but slightly less active than quercetin
172 (Table 1). AC of rutin (3.70 ± 0.07) was lower than the AC of isoquercitrin and hyperoside
173 (Table 1). Thus, a sugar unit greater than a monosaccharide at position 3 of the aglycon
174 significantly reduced the antioxidant capacity.

175 Removal of the 3-OH group at the C-ring, as in flavones, decreased the antioxidant activity
176 (TEAC) to a value of 1.47 ± 0.04 mM (orientin) and 1.54 ± 0.05 mM (isoorientin) (Table 1).
177 The antioxidant effect of these two flavone-C-glycosides is based on the 3',4'-dihydroxy
178 substituents at the B-ring, and the 2,3-double bond adjacent to the 4-oxo-function at the

179 C-ring. Orientin and isoorientin gave a degradation of Fremy's salt in the same range (orientin
180 AC 3.48 ± 0.03 ; isoorientin 3.00 ± 0.03).

181 Vitexin and isovitexin contain only one hydroxyl substituent (position 4' at the B-ring) in
182 comparison to orientin/isoorientin. The absence of an *ortho*-diphenolic structure further
183 reduced the ability to scavenge free radicals to 0.86 ± 0.03 mM (vitexin) and 0.81 ± 0.04 mM
184 (isovitexin) in TEAC assay (Table 1). Consequently, this also resulted in lower AC values
185 (1.57 ± 0.10 for vitexin and 1.58 ± 0.14 for isovitexin).

186 The (*R*)- and (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glycopyranosides lack the 2,3-double bond at the C-ring
187 resulting in reduced TEAC-value of 0.88 ± 0.08 mM and 1.04 ± 0.02 mM, respectively (Table
188 1). The low antioxidant activity of these flavanones was paralleled by significantly reduced
189 AC values in comparison to orientin and isoorientin.

190 The highest potency to scavenge free radicals (ABTS^{•+} or Fremy's salt) were found for the
191 dihydrochalcone aspalathin and especially for the tea extract, which was standardized to the
192 same amount of aspalathin (1 nmol) but of course the tea extract contained many further
193 antioxidants. According to previous work, dihydrochalcones are more active against free
194 radicals than their corresponding flavones, chalcones and flavanones [4]. In the TEAC assay,
195 nothofagin, which has only one hydroxyl group at the B-ring gave less activity in comparison
196 to aspalathin, as expected. In the Fremy's salt assay the scavenging activity of nothofagin was
197 completely lost.

198

199 3.1.2 LDL-oxidation-assay

200 The oxidation of LDL can be used as a model to investigate the efficacy of flavonoids as
201 chain breaking antioxidants. Radicals are formed during oxidation of lipids in the presence of
202 Cu²⁺. Flavonoids quench these radicals to give phenoxyl radicals, which are stabilized by
203 delocalization of unpaired electrons within the aromatic ring structure.

1
2
3 204 Isolated pure substances (1 nmol) of rooibos ((*R*)- and (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-
4
5 205 glucopyranoside; aspalathin; nothofagin; orientin; isoorientin; isoquercitrin) and tea extract
6
7 206 (standardized to 1 nmol aspalathin) were introduced into the LDL-oxidation system. *Lag*-time
8
9 207 shifts were obtained in the following order: isoquercitrin (9.6 h) > aspalathin (6.2 h), tea
10
11 208 extract (6.2 h) > nothofagin (4.3 h) > isoorientin (3.8 h) > orientin (2.7 h) > (*S*)-eriodictyol-6-
12
13 209 *C*- β -D-glucopyranoside (2.1 h) > control (1.7 h) (Figure 2). **The higher the lag-time shift**
14
15 210 **relative to the control the more potent the structure is as an antioxidant in this experiment.**
16
17 211 Due to the fact that quercetin was not soluble in the media used for the LDL oxidation test,
18
19 212 the *lag*-time shift of this aglycone could not be determined. The *lag*-time shift of the tea
20
21 213 extract (6.2 h) was identical to *lag*-time shift of aspalathin (6.2 h). The tea extract contained 1
22
23 214 nmol aspalathin and other antioxidant compounds from rooibos. Therefore, in theory the *lag*-
24
25 215 time shift of the tea extract experiment should be considerably higher than that of aspalathin
26
27 216 as anticipated from the TEAC system. On the other hand, possible reactions of aspalathin with
28
29 217 other ingredients during the very long time of oxidation should be taken into consideration.
30
31 218 The tea extract from rooibos consisted of high molecular weight brown products. These
32
33 219 browning substances are able to accelerate the oxidation of aspalathin to further brown
34
35 220 products under neutral and aerated conditions [15]. Therefore, the antioxidant potential of the
36
37 221 tea extract during the oxidation process might be reduced. The *lag*-time shift of aspalathin
38
39 222 was longer than *lag*-time shift of nothofagin. The same difference in antioxidant activity was
40
41 223 recorded in the TEAC/ Fremy's salt assay for the two dihydrochalcones (Table 1). *Lag*-time
42
43 224 of orientin and isoorientin was higher than that of (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glycopyranoside,
44
45 225 which was also anticipated. However, in contrast to TEAC/ Fremy's salt assay there was a
46
47 226 significant difference in the antioxidant potential of isoorientin (3.8 h) compared to orientin
48
49 227 (2.7 h) (Figure 2). This suggests that the position of the sugar attachment had an influence on
50
51 228 the efficacy of these flavones.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 229 Contrary to expectations, isoquercitrin gave a *lag*-time shift of 9.6 h. The antioxidant potential
4
5 230 of isoquercitrin was only increased in this copper-induced assay. Recent studies have shown
6
7
8 231 that flavonoids are able to complex metal ions [16, 17]. Isoquercitrin has three possible
9
10 232 binding sites for copper ions: one at the 3', 4'-dihydroxyl functional groups at the B-ring, and
11
12 233 two because of the 3 and 5 *O*-substituents next to the 4-carbonyl group (Figure 3) [18].
13
14 234 Obviously, the response of isoquercitrin is mainly due to its chelating activity. The LDL-
15
16 235 oxidation assay has frequently been used to assess the antioxidant capacity of potent
17
18 236 compounds *in vivo*. However, the living system can be described as almost depleted from free
19
20 237 metal ions. Therefore, to overcome the disadvantages of an *in vitro* system that uses high
21
22 238 metal concentrations, a modified LDL-oxidation assay was developed.
23
24
25
26
27
28

29 240 **3.1.3 Decoupled LDL-oxidation assay**

30
31 241 To adapt the established *in vitro* LDL-oxidation assay more closely to *in vivo* situation a
32
33 242 decoupled LDL-oxidation experiment was designed. The LDL-solutions were pre-incubated
34
35 243 with isoquercitrin and aspalathin, because these were the two most effective antioxidants in
36
37 244 the *in vitro* LDL-oxidation assay (Figure 2). After different incubation times (2 h, 8 h, 12 h)
38
39 245 dialysis of LDL was performed against PBS-buffer and the LDLs were subsequently
40
41 246 introduced into the Cu²⁺-induced LDL-oxidation. Thus, copper ions do not get in contact with
42
43 247 the flavonoids, and possible chelating effects are excluded. Antioxidative chelating effects are
44
45 248 strictly decoupled from antioxidative radical scavenging effects. On the other hand, during
46
47 249 pre-incubation the antioxidants aspalathin and isoquercitrin enhance the antioxidant status of
48
49 250 the LDL and thereby positively influence the *lag*-time during Cu²⁺ induced oxidation. Figure
50
51 251 4 presents the results from the decoupled LDL-oxidation experiment. The control experiment
52
53 252 gave a decrease in lag time during the period of incubation, as expected. Autoxidation during
54
55 253 pre-incubation proceeded with time and decreased the antioxidant status of LDLs.
56
57
58
59
60

1
2
3 254 The lag-time shift of LDLs that were in contact with aspalathin was prolonged with pre-
4
5 255 incubation time in comparison to the control experiments. The highest *lag*-time was reached
6
7
8 256 with 12 h pre-incubation. A time dependent *lag*-time shift was not observed with
9
10 257 isoquercitrin. In the case of isoquercitrin a maximum LDL-lag-time was reached with 8 h pre-
11
12 258 incubation at levels lower than that of aspalathin. Thus, the antioxidative property of
13
14 259 aspalathin appears to be based mainly on excellent radical scavenging. Isoquercitrin shows a
15
16 260 mixed action of weaker radical scavenging and excellent metal chelating activity.
17
18
19
20 261

21 22 262 **3.2 Screening-assays**

23
24 263 Results from the TEAC, Fremy's salt, and LDL-oxidation assays for the isolated polyphenols
25
26 264 were used to explore the validity of an offline HPLC screening method. Rooibos extract was
27
28 265 first separated by HPLC-DAD. After removal of solvent by vacuum centrifugation, fractions
29
30 266 collected were subjected to the described antioxidant assays.
31
32
33

34 267 35 36 268 **3.2.1 TEAC and Fremy's salt assay of the ethyl acetate extract**

37
38 269 HPLC-DAD chromatogram (absorbance 280 nm, method A) and degradation of radicals
39
40 270 (ABTS^{•+}, Fremy's salt) are shown in Figure 5 for the ethyl acetate extract.

41
42 271 The highest degradation of ABTS^{•+} was obtained with fraction 24 (46-48 min), which
43
44 272 contained aspalathin, followed by fraction 25 (which contained orientin, 48-50 min) and
45
46 273 fraction 16 and 18 (containing the (*S*)- and (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucoopyranosides, 30-32
47
48 274 min and 34-36 min, respectively) (85-97 %). The fractions containing hyperoside (fraction 32,
49
50 275 62-64 min) and isoquercitrin (fraction 33, 64-66 min) also induced a relatively high
51
52 276 degradation of ABTS^{•+} (50 %). The absorbance maxima of (*S*)- and (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-
53
54 277 glucoopyranosides and aspalathin are 280 nm, whereas for orientin, isoquercitrin and
55
56 278 hyperoside it is located at 350 nm.
57
58
59
60

1
2
3 279 Because of high variation in peak intensities the molar extinction coefficient of the substances
4
5 280 in a mixture needs be considered in order to relate UV-absorbance with the absolute
6
7
8 281 antioxidant capacity of single compounds. However, in screening-assay of plant extracts with
9
10 282 unknown constituents, it is complex or impossible to calculate the extinction coefficients for
11
12 283 each substance. Thus, the offline HPLC analysis can only give information on potential
13
14 284 antioxidative material eluting within specific time frames in the chromatographic run, which
15
16 285 can then be subjected to further structural elucidation. For further characterization of eluting
17
18 286 material, the ABTS^{•+} degradation/ HPLC-DAD peak area ratios were calculated for each peak
19
20 287 (Table 2).

21
22
23
24 288 Based on their structure and the results from TEAC-assay, the antioxidant capacities for the
25
26 289 compounds monitored at 280 nm were expected to be in following order: aspalathin >
27
28 290 nothofagin > (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-gluco-pyranoside, (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-gluco-
29
30 291 pyranoside. Fractions containing only a single substance provided the anticipated results
31
32 292 (aspalathin ratio: $9.53 \cdot 10^{-5}$ > nothofagin ratio: $5.52 \cdot 10^{-5}$) (Table 2). However, this approach is
33
34 293 limited. The (*S*)- and (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glycopyranosides coeluted with (*S*)- and (*R*)-
35
36 294 eriodictyol-8-*C*- β -D-glycopyranosides in fractions 16-18. While the ABTS^{•+} UV-absorbance
37
38 295 ratio ($9.36 \cdot 10^{-5}$ (1+3) and $10.22 \cdot 10^{-5}$ (2+4) suggested the compounds are as effective as
39
40 296 aspalathin, the assays for the isolated structures verified significant differences (Table 2).

41
42
43 297 On the basis of results from the TEAC-assay antioxidant capacities for the compounds
44
45 298 monitored at 350 nm were expected to be in the following order: hyperoside, isoquercitrin >
46
47 299 orientin, isoorientin > vitexin, isovitexin. The expectation was achieved with fractions having
48
49 300 only one major compound (hyperoside ratio: $7.94 \cdot 10^{-5}$, isoquercitrin ratio: $7.74 \cdot 10^{-5}$ > orientin
50
51 301 ratio: $6.13 \cdot 10^{-5}$). For fractions with further coeluting major compounds, the ratios were not
52
53 302 directly comparable with the fractions of hyperoside, isoquercitrin and orientin, and should be
54
55 303 considered only in part. For example, fraction 27 (52-54 min), containing isoorientin and
56
57 304 vitexin, gave a ratio ABTS^{•+}-degradation/ HPLC-peak area of $4.93 \cdot 10^{-5}$. Isovitexin and rutin

1
2
3 305 were in fraction 31 (60-62 min) and gave a lower ratio ($3.50 \cdot 10^{-5}$) compared to fraction 27
4
5 306 (Figure 5, Table 2).
6

7
8 307 Fractions of the ethyl acetate extract that induced an ABTS^{•+} degradation over 40 % also
9
10 308 showed a Fremy's salt degradation in the range of 65-100 % (Figure 5B and C). In relating
11
12 309 the offline HPLC screening with Fremy's salt assay it was not possible to see differences
13
14 310 between the various flavonoid types. Nothofagin (fraction 60) gave a very low degradation of
15
16 311 Fremy's salt (4 %), much lower than in ABTS^{•+}-assay (29 %). This was not unexpected. The
17
18 312 same phenomenon was observed in the TEAC and Fremy's salt assays for the isolated
19
20 313 nothofagin, as described above.
21
22
23
24
25

26 314

27 315 **3.2.2 LDL-oxidation screening assay of the ethyl acetate extract**

28
29 316 The ethyl acetate extract was separated by HPLC-DAD (method B). Selected fractions
30
31 317 containing substances **1-9** were subjected to the LDL oxidation assay (Figure 6). The highest
32
33 318 response was shown by fractions which included more than one antioxidant (**2-4; 8/9**), as
34
35 319 expected. **Lag-time shift of the aspalathin fraction was higher (3.0 h) than that of the**
36
37 320 **nothofagin fraction (1.8 h)**. Orientin and aspalathin both facilitated a similar response, which
38
39 321 was higher than that of (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glycopyranoside.
40
41
42
43
44

45 322

46 323 **3.3 Concluding Remarks**

47
48 324 All assays performed in this study showed that fermented rooibos tea contains highly
49
50 325 effective antioxidant compounds. The TEAC assay provides antioxidant capacity data relative
51
52 326 to Trolox[®] while the Fremy's salt assay relates to the absolute number of reduced radicals.
53
54 327 The decoupled LDL oxidation experiment is very useful to dissect the various mechanistic
55
56 328 pathways of antioxidative action, i.e. it differentiates between the radical scavenging and the
57
58 329 metal chelating properties of a compound. The decoupled assay therefore may be a more
59
60 330 appropriate estimate of the efficiency of an antioxidant *in vivo*. Isoquercitrin preferentially

1
2
3 331 protects the LDLs by complexing metal ions. On the other hand, the antioxidant mechanism
4
5 332 of aspalathin is based on scavenging of radicals. As protection against radicals as e.g. reactive
6
7
8 333 oxygen species is a key issue *in vivo*, the determination of the TAA of flavonoids *in vitro*
9
10 334 should therefore separate between these two modes of action during the oxidation process.
11
12 335 The results obtained emphasize the dihydrochalcone aspalathin as a structure more effective
13
14 336 than the flavonol isoquercitrin. However, studies on the bioavailability of chalcones from
15
16 337 food sources are limited.

17
18
19 338 The ABTS^{•+} degradation and the LDL-oxidation assays can be used to screen for antioxidants
20
21 339 in plant extracts in an HPLC-offline mode. Both are more sensitive than the Fremy's salt
22
23 340 assay (Figure 5 and 6). Even based on classification of compounds only by their UV-maxima,
24
25 341 the calculation of the ABTS^{•+}-degradation/peak area ratio in the HPLC-DAD-offline
26
27 342 screening method was useful to estimate the relative antioxidant capacity of eluting material.
28
29 343 However for screening extracts of plant material, the ABTS^{•+} assay should be preferred. The
30
31 344 LDL-oxidation is a far more time-consuming test in comparison to the ABTS^{•+} assay.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354 Legends

355 **Figure 1.** Polyphenols isolated from Rooibos tea [2] (Rut – rutinose, Gal – Galactose, Glu –
356 glucose).

357 **Figure 2.** LDL oxidation assay in presence of Cu^{2+} . Lag-time shift was induced by 1 nmol of
358 the following substances. (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (2.1 h); aspalathin (6.2 h);
359 orientin (2.7 h); isoorientin (3.8 h); nothofagin (4.3 h); isoquercitrin (9.6 h); tea extract
360 (standardized to 1 nmol aspalathin) (6.2 h). Lag-phase of control was 1.4 h.

361 **Figure 3.** Binding sites of Cu^{2+} on isoquercitrin [18].

362 **Figure 4.** Decoupled LDL oxidation assay: LDL was incubated with antioxidants for 2 h, 8 h
363 and 12 h in absence of Cu^{2+} : 1: control; 2: aspalathin; 3: isoquercitrin. After dialysis LDL-
364 oxidation was induced by Cu^{2+} .

365 **Figure 5. A:** HPLC-DAD chromatogram of ethyl acetate extract from fermented rooibos tea
366 at $\lambda = 280$ nm. Retention times are given in brackets. **1:** (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-
367 glucopyranoside (29.9 min); **3:** (*S*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside (33.3 min); **2:**
368 (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (34.1 min); **4:** (*R*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-
369 glucopyranoside (35.1 min); **5:** aspalathin (46.8 min); **7:** orientin (49.2 min); **8/9:** isoorientin/
370 vitexin (53.2 min); **6:** nothofagin (58.0 min); **10:** isovitexin (60.8 min); **13:** rutin (61.7 min);
371 **12:** hyperoside (63.7 min); **11:** isoquercitrin, (64.7 min); **B:** Degradation of ABTS^{*+} by
372 collected fractions. **C:** Degradation of Fremy's salt.

373 **Figure 6. A:** Separation of ethyl acetate extract by HPLC; **1:** (*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-
374 glycopyranoside (24.1 min), **3:** (*S*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside (26.9 min); **2:** (*R*-
375 eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside (26.9 min); **4:** (*R*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside
376 (27.8 min); **5:** aspalathin (37.2 min); **7:** orientin (39.6 min); **8/9:** isoorientin/vitexin
377 (44.4 min); **6:** nothofagin (51.1 min); Collected fractions were introduced into the LDL

1
2
3 378 oxidation system. *Lag*-time shift of each fraction is presented in picture **B**. *Lag*-time shift of
4
5 379 control reaction without the addition of polyphenols was 1.6 h.
6
7
8 380
9
10
11 381
12
13
14 382
15
16
17 383
18 384
19 385
20 386
21 387
22 388
23 389
24 390
25 391
26 392
27 393
28 394
29 395
30 396
31 397
32 398
33 399
34 400
35 401
36 402
37 403
38 404
39 405
40 406
41 407
42 408
43 409
44 410
45 411
46 412
47 413
48 414
49 415
50 416
51 417
52 418
53 419
54 420

For Peer Review

421 Tables

422 **Table 1. Trolox Equivalent Antioxidant Activity (TEAC) and Antioxidant capacity (AC)**
 423 **(mol Fremy's salt/ mol antioxidant) of isolated compounds from rooibos**

424

Compounds	Free OH-Substituents	Glycosylated Position	TEAC [mM] (n=3)	AC (mol Fremy's salt/mol) (n=3)
<i>Dihydrochalcones</i>				
aspalathin	3, 4, 2', 4', 6'	5'-glu	2.62 ± 0.07	4.81 ± 0.03
nothofagin	4, 2', 4', 6'	5'-glu	2.06 ± 0.14	0.02 ± 0.01
<i>Flavanones</i>				
(S)-eriodictyol-6-C-β-D-glucopyranoside	5, 7, 3', 4'	6-glu	0.88 ± 0.08	2.67 ± 0.19
(R)-eriodictyol-6-C-β-D-glucopyranoside	5, 7, 3', 4'	6-glu	1.04 ± 0.02	3.13 ± 0.22
<i>Flavones</i>				
orientin	5, 7, 3', 4'	8-glu	1.47 ± 0.04	3.48 ± 0.03
isoorientin	5, 7, 3', 4'	6-glu	1.54 ± 0.05	3.00 ± 0.03
vitexin	5, 7, 4'	8-glu	0.86 ± 0.03	1.57 ± 0.10
isovitexin	5, 7, 4'	6-glu	0.81 ± 0.04	1.58 ± 0.14
<i>Flavonols</i>				
rutin	5, 7, 3', 4'	3-α-L-Rha-1→6-β-D-glu	1.20 ± 0.07	3.70 ± 0.07
isoquercitrin	5, 7, 3', 4'	3-glu	1.23 ± 0.05	4.08 ± 0.11
hyperoside	5, 7, 3', 4'	3-gal	1.33 ± 0.08	4.21 ± 0.02
quercetin	3, 5, 7, 3', 4'		2.70 ± 0.13	4.48 ± 0.03
tea extract*			3.20 ± 0.01	17.65 ± 1.12

*relative to aspalathin; glu – glucose; rha – rhamnose; gal – galactose

425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451

452 **Table 2. Ratio of ABTS^{•+} degradation/HPLC-DAD peak area^a of flavonoids included in**
 453 **ethyl acetate extract.**

454

Flavonoids			
<i>Compound (280 nm)</i>	<i>ratio^a</i>	<i>Compound (350 nm)</i>	<i>ratio^a</i>
aspalathin	9.53·10 ⁻⁵	orientin	6.13·10 ⁻⁵
nothofagin	5.52·10 ⁻⁵	isoorientin/vitexin	4.93·10 ⁻⁵
(<i>S</i>)-eriodictyol-6- <i>C</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside ^{a)}	9.36·10 ⁻⁵	isovitexin/rutin	3.50·10 ⁻⁵
		hyperoside ^{a)}	7.94·10 ⁻⁵
(<i>R</i>)-eriodictyol-6- <i>C</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside ^{a)}	10.22·10 ⁻⁵	isoquercitrin ^{a)}	7.74·10 ⁻⁵

^{a)} fraction coeluted with further components

For Peer Review

1
2
3 497 *We thank C. Brandsch and K. Eder from the Institute of agriculture and nutritional science,*

4
5 498 *Halle (Germany), for providing the ultracentrifuge facilities.*

6
7
8 499 *The authors have declared no conflict of interest.*

9
10 500

11
12 501

13
14 502

15
16 503

17
18 504

19
20 505

21
22 506

23
24 507

25
26 508

27
28 509

29
30 510

31
32 511

33
34 512

35
36 513

37
38 514

39
40 515

41
42 516

43
44 517

45
46 518

47
48 519

49
50 520

51
52 521

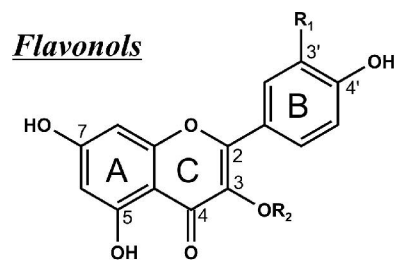
53
54 522

For Peer Review

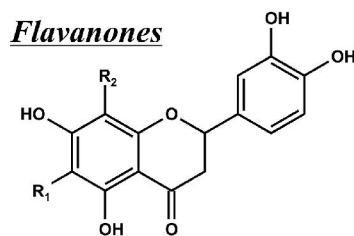
523 References

- 524 [1] Morton, J.F.; Rooibos Tea, *Aspalathus linearis*, a Caffeineless, Low-Tannin Beverage.
525 *Economic Botany* 1983, 37(2), 164-173.
- 526 [2] Krafczyk, N.; Glomb, M.A. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea. *J.*
527 *Agric. Food Chem.* 2008, 56 (9), 3368-3376.
- 528 [3] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships
529 of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 1996, 20, 933-956.
- 530 [4] Dzedzic, S.Z.; Hudson, B.J.F. Polyhydroxy Chalcones and Flavanones as Antioxidants
531 for Edible Oils, *Food Chem.* 1983, 12, 205-212.
- 532 [5] Terao, J.; Piskuli, M.; Yao, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and
533 quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994,
534 308, 278-284.
- 535 [6] von Gandow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C.F. Comparison of the antioxidant activity of
536 rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chem.* 1997,
537 60, 73-77.
- 538 [7] von Gandow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C.F. Comparison of the antioxidant activity of
539 aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), alpha-
540 tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 632-638.
- 541 [8] Joubert, E.; Winterton, P.; Britz, T.J.; Gelderblom, W.C.A. Antioxidant and Pro-oxidant
542 Activities of Aqueous Extracts and Crude Polyphenolic Fractions of Rooibos
543 (*Aspalathus linearis*). *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 10260-10267.
- 544 [9] Koleva, I.I.; Niederländer, H.A.G.; van Beek, T.A. Application of ABTS Radical
545 Cation for Selective On-Line Detection of Radical Scavengers in HPLC Eluates. *Anal.*
546 *Chem.* 2001, 73, 3373-3381.

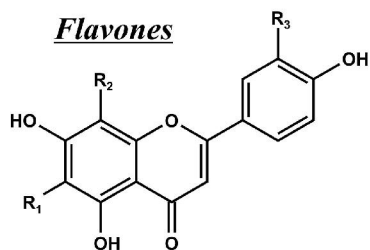
- 1
2
3 547 [10] Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.
4
5 548 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.
6
7 549 *Free Radical Biology & Medicine* 1999, 26, 1231-1237.
- 8
9
10 550 [11] Rösch, D.; Bergmann, M.; Knorr, D.; Kroh, L.W. Structure-Antioxidant Efficiency
11
12 551 Relationships of Phenolic Compounds and Their Contribution to the Antioxidant
13
14 552 Activity of Sea Buckthorn Juice. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4233-4239.
- 15
16
17 553 [12] Tiedink, HG.M.; Katan, M.B. Variability in lipoprotein concentrations in serum after
18
19 554 prolonged storage at -20°C. *Clin. Chim. Acta* 1989, 180, 147-156.
- 20
21
22 555 [13] Bradford, M.M. A Rapid Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities
23
24 556 of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-
25
26 557 254.
- 27
28
29 558 [14] Esterbauer, H.; Striegl, G.; Puhl, H.; Rotheneder, M. Continuous Monitoring of in vitro
30
31 559 Oxidation of Human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Comms.* 1989, 6, 67-75.
- 32
33
34 560 [15] Joubert, E. HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in
35
36 561 rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing. *Food Chemistry*, 1996, 55,
37
38 562 403-411.
- 39
40
41 563 [16] Yeomans, V.C.; Linseisen, J.; Wolfram, G. Interactive effects of polyphenols, tocopherol
42
43 564 and ascorbic acid on the Cu²⁺-mediated oxidative modification of human low density
44
45 565 lipoproteins. *Eur. J. Nutr.* 2005, 44, 422-428.
- 46
47
48 566 [17] Brown, J.E.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C.A. Structural dependence of
49
50 567 flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties.
51
52 568 *Biochem. J.* 1998, 330, 1173-1178.
- 53
54
55 569 [18] Gonzalez-Alvarez, M.; Alzuet, G.; Garcia-Gimenez, J.L.; Macias, B.; Borrás, J.
56
57 570 Biological Activity of Flavonoids Copper Complexes. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 2005, 631,
58
59 571 2181-2187.
- 60
572



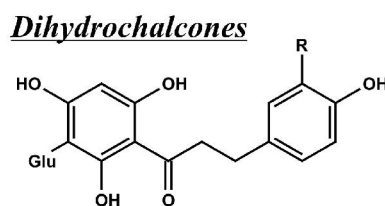
rutin, R₁ = OH, R₂ = Rut
 hyperoside, R₁ = OH, R₂ = Gal
 isoquercitrin, R₁ = OH, R₂ = Glu
 quercetin, R₁ = OH, R₂ = H



(*S*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside, R₁ = Glu, R₂ = H
 (*S*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside, R₁ = H, R₂ = Glu
 (*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside, R₁ = Glu, R₂ = H
 (*R*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside, R₁ = H, R₂ = Glu



orientin, R₁ = H, R₂ = Glu, R₃ = OH
 isoorientin, R₁ = Glu, R₂ = H, R₃ = OH
 vitexin, R₁ = H, R₂ = Glu, R₃ = H
 isovitexin, R₁ = Glu, R₂ = H, R₃ = H
 luteolin, R₁ = H, R₂ = H, R₃ = OH
 chrysoeriol: R₁ = H, R₂ = H, R₃ = OCH₃



aspalathin, R = OH
 nothofagin: R = H

Polyphenols isolated from Rooibos tea [2] (Rut \square rutinose, Gal \square Galactose, Glu \square glucose).

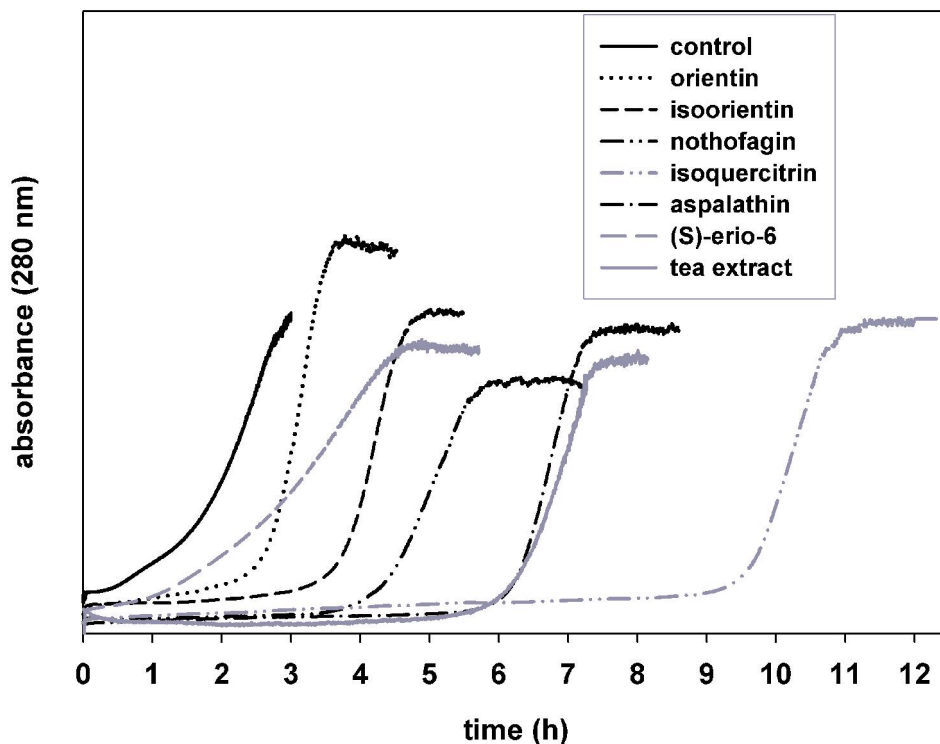


Figure 2. LDL oxidation assay in presence of Cu^{2+} . Lag-time shift was induced by 1 nmol of the following substances. (S)-eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranoside 1 (2.1 h); aspalathin 5 (6.2 h); orientin 7 (2.7 h); 7: isoorientin 8 (3.8 h); nothofagin 6 (4.3 h); isoquercitrin 11 (9.6 h); tea extract (standardized to 1 nmol aspalathin) (6.2 h). Lag phase of control was 1.4 h.
578x483mm (150 x 150 DPI)

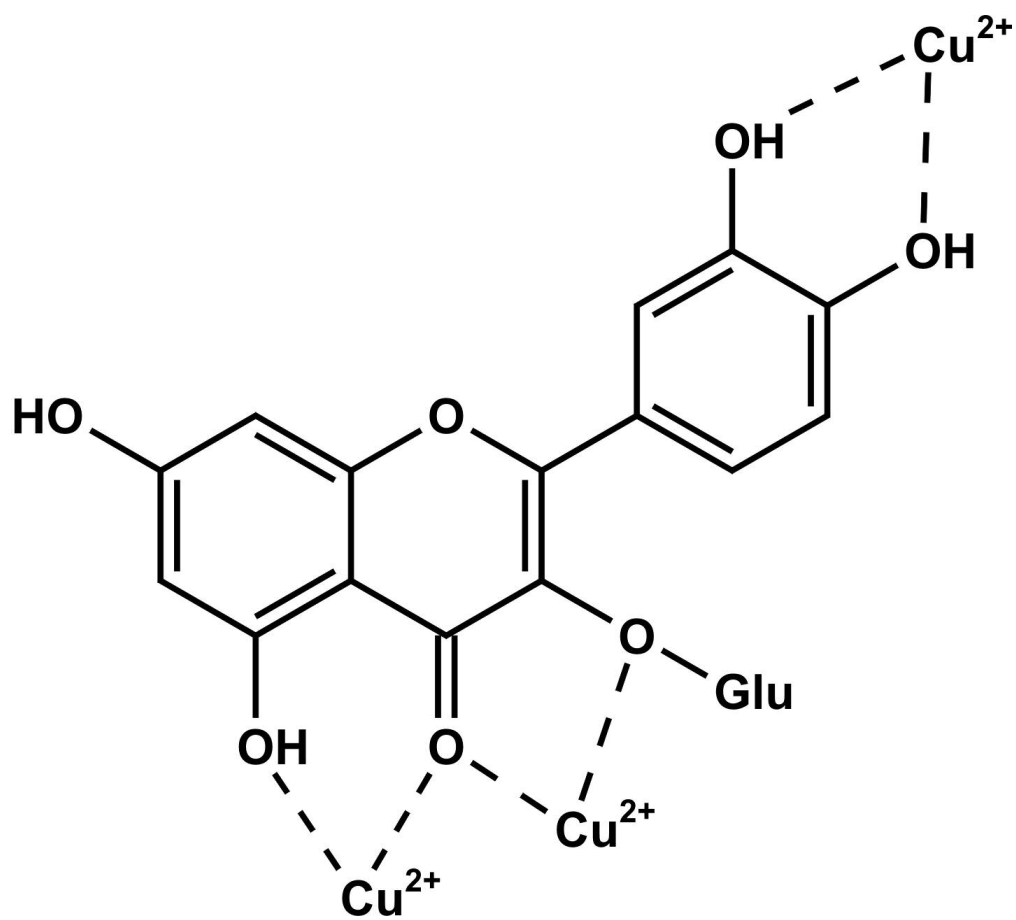


Figure 3. Binding sites of Cu^{2+} on isoquercitrin 11 [19].

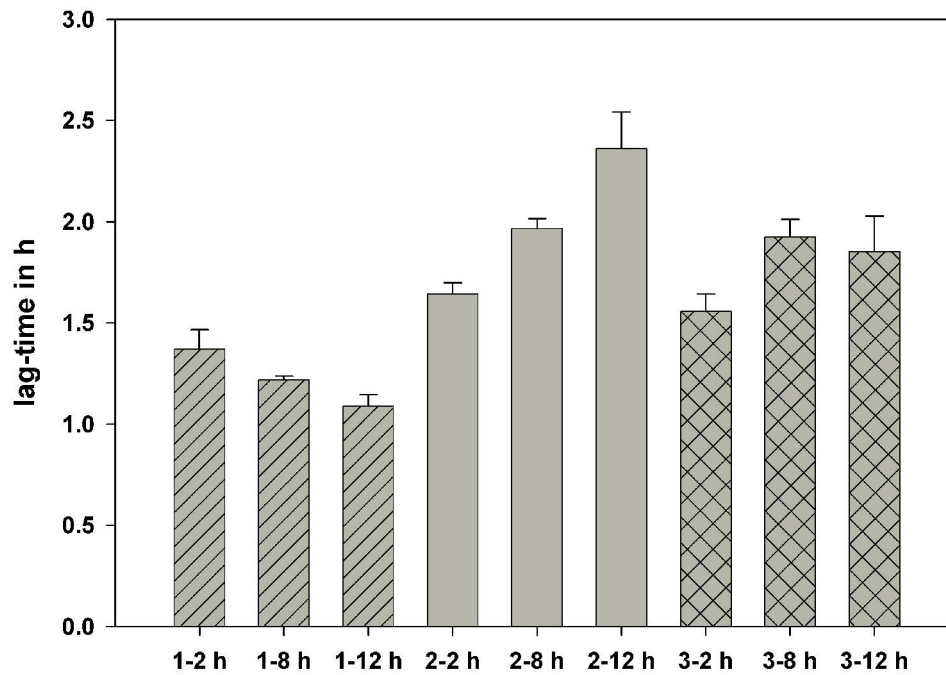


Figure 4. Decoupled LDL oxidation assay: LDL was incubated with antioxidants for 2 h, 8 h and 12 h in absence of Cu^{2+} : 1: control; 2: aspalathin 5; 3: isoquercitrin 11. After dialysis the LDL-oxidation was induced by Cu^{2+} .

593x455mm (150 x 150 DPI)

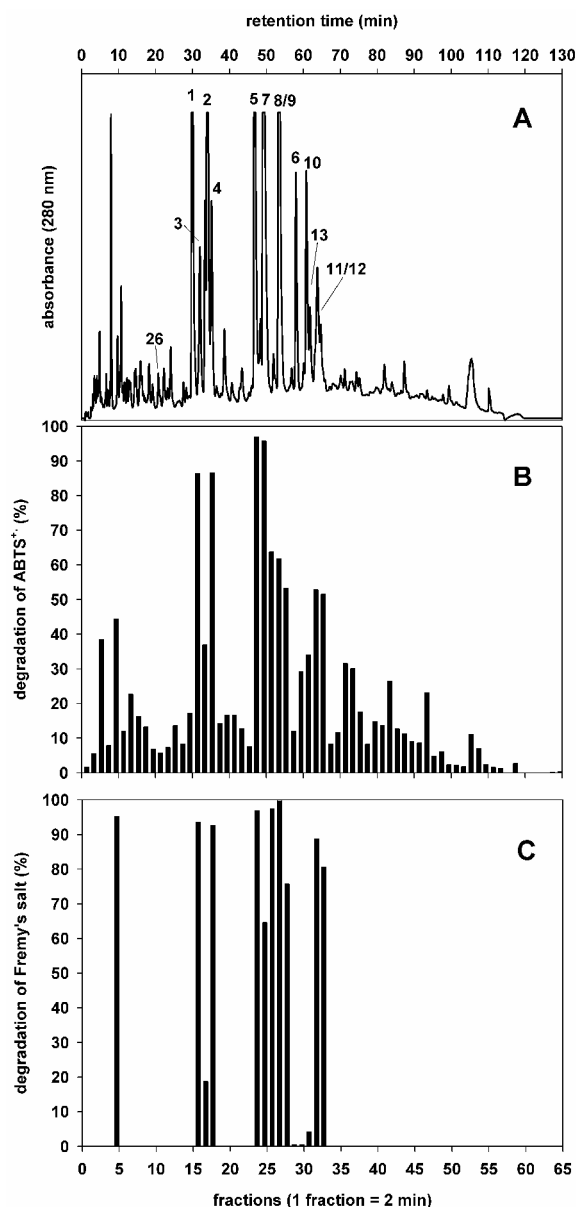


Figure 5. A: HPLC-DAD chromatogram of ethyl acetate extract from fermented rooibos tea at $\lambda = 280$ nm. Retention times are given in brackets. 1: (S)-eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranoside (29.9 min); 3: (S)-eriodictyol-8-C- β -D-glucopyranoside (33.3 min); 2: (R) eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranoside (34.1 min); 4: (R)-eriodictyol-8-C- β -D-glucopyranoside (35.1 min); 5: aspalathin (46.8 min); 7: orientin (49.2 min); 8/9: isoorientin/ vitexin (53.2 min); 6: nothofagin (58.0 min); 10: isovitexin (60.8 min); 13: rutin (61.7 min); 12: hyperoside (63.7 min); 11: isoquercitrin, (64.7 min); B: Degradation of ABTS^{•+} by collected fractions. C: Degradation of Fremy's salt.

606x1248mm (150 x 150 DPI)

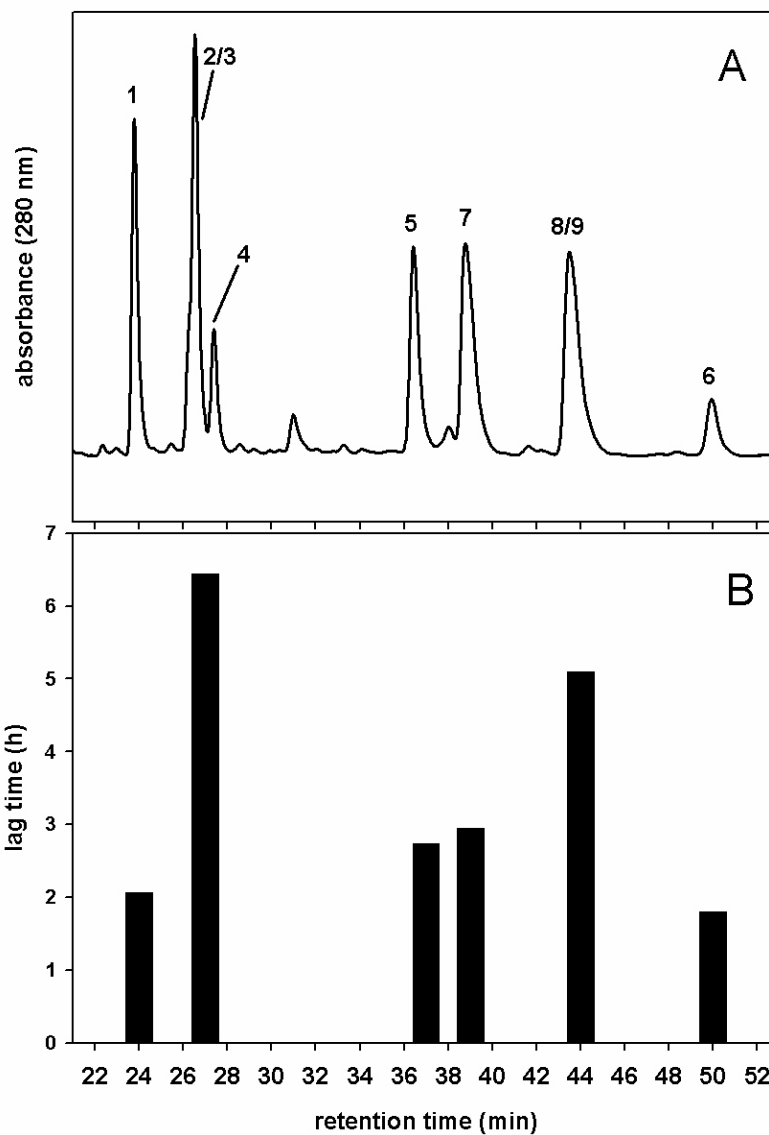


Figure 6. A: Separation of ethyl acetate extract by HPLC; 1: (S)-eriodictyol-6-C- β -D-glycopyranoside (24.1 min), 3: (S)-eriodictyol-8-C- β -D-glycopyranoside (26.9 min); 2: (R)-eriodictyol-6-C- β -D-glycopyranoside (26.9 min); 4: (R)-eriodictyol-8-C- β -D-glycopyranoside (27.8 min); 5: aspalathin (37.2 min); 7: orientin (39.6 min); 8/9: isoorientin/vitexin (44.4 min); 6: nothofagin (51.1 min); Collected fractions were introduced into the LDL oxidation system. Lag-time shift of each fraction is presented in picture B. Lag-time shift of control reaction without the addition of polyphenols was 1.6 h.

145x211mm (150 x 150 DPI)

5 Zusammenfassung der Dissertation

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Pflanzenteile (Blatt, Blattstiel, Wurzel) vom Gartenrhabarber (*Rheum rhabonticum*) sowie der Rooibostee (*Aspalathus linearis*) auf Polyphenole untersucht. Nach Extraktion des Pflanzenmaterials wurde die MLCCC als erstes Aufreinigungsverfahren genutzt. Nach weiterer Auftrennung durch die präparative HPLC wurden Reinstsubstanzen erhalten, welche hinsichtlich ihrer Struktur durch verschiedene NMR-Techniken (^1H , ^{13}C , HMBC, HMQC) und der HR-MS eindeutig verifiziert wurden. Aus der Wurzel des Gartenrhabarbers konnten hierbei Stilbene (*trans*-Rhapontigenin, *trans*-Desoxyrhapontigenin) und Stilbenglycoside (*trans*-Rhaponticin, *cis/trans*-Desoxyrhaponticin, *trans*-Resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranosid, *trans*-Piceatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranosid) eindeutig verifiziert werden. Aus den Blättern bzw. Blattstielen wurden die Flavonoide (Rutin, Quercetin-3-*O*-glucuronid, Isovitexin, 6,8-Di-*C*- β -D-glycosylapigenin, 6-*C*- β -D-Glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin, 6-*C*- β -D-Arabinosyl-8-*C*- β -D-glycosylapigenin, (+)-Catechin) isoliert und identifiziert.

Im Ethylacetat- und *n*-Butanolextrakt vom fermentierten und unfermentierten Rooibostee konnten die Flavanon-*C*-glycoside ((*S*)/(*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid, (*S*)/(*R*)-Eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranosid), Dihydrochalcone (Aspalathin, Nothofagin), Flavon-*C*-glycoside (Orientin, Isoorientin, Vitexin, Isovitexin) und Flavonol-*O*-glycoside (Isoquercitrin, Hyperoside, Rutin) hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt werden. Nach der MLCCC-Auftrennung des Diethyletherextraktes vom Rooibos wurden die einzelnen Signale durch *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid derivatisiert und durch GC-MS weiter aufgetrennt. Hierbei wurden durch den Vergleich mit authentischen Standardsubstanzen folgende Substanzen eindeutig identifiziert: Hydroxybenzoesäuren (Gallussäure, Protocatechussäure, 3,5-Dihydroxybenzoesäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Gentisinsäure, Vanillinsäure, Syringasäure, Salicylsäure), Hydroxyzimtsäuren (Ferulasäure, *p*-Coumarsäure, Sinapinsäure, Kaffeesäure, Chlorogensäure), Flavone (Luteolin, Chrysoeriol), Flavonol (Quercetin) und ein Flavanol ((+)-Catechin).

Die Zusammensetzung der Polyphenole des unfermentierten Tees wird während der Fermentation durch den Einfluss von Licht und Sauerstoff verändert. Hierbei kommt es zu einer Änderung der Farbgebung, welche insbesondere durch die Folgereaktionen der Dihydrochalcone verursacht wird. Das Aspalathin bildet unter aeroben Bedingungen Bräunungsprodukte, welche ein Absorptionsmaximum bei 450 nm besitzen. Durch Modellinkubationen konnte die Reaktion von Aspalathin zu den korrespondierenden

Flavanon-C-glycosiden ((*S*)/(*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosid, (*S*)/(*R*)-Eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranosid) nachgewiesen werden. Die Flavanon-C-glycoside wurden allesamt zum Orientin umgelagert, wobei das Isoorientin ein wichtiges Intermediat dieser Reaktion vor der Wessely-Moser-Umlagerung darstellt. Die bis hierher erwähnten Folgeverbindungen vom Aspalathin sind allerdings keine braun gefärbten Strukturen, da ihr Absorptionsmaximum zwischen 280 nm und 350 nm liegt. Eine erste wichtige Stufe auf dem Bildungsweg zu den wahrscheinlich höhermolekularen Bräunungsprodukten stellen die Dimere des Aspalathins dar. Diese werden ebenfalls unter oxidativen Bedingungen durch C-C-Bindungsknüpfung gebildet.

Erstmalig wurden die aus dem Rooibostee isolierten Flavonoide hinsichtlich ihres antioxidativen Potenzials untersucht. Hierzu wurden drei verschiedene Testsysteme (TEAC-Assay, Fremy's-Salz-Test, LDL-Oxidationstest) verwendet. Generell weisen die Flavonoide des Rooibostees ein relativ hohes antioxidatives Potenzial auf. Vor allem das Dihydrochalcon Aspalathin, welches in relativ hoher Konzentration im unfermentierten Tee vorkommt (53 mg/g wässriger Teeextrakt), konnte als das *in vitro* wirksamste Antioxidans anhand des TEAC- bzw. Fremy's-Salz-Test bestimmt werden. Durch die Entkopplung des LDL-Oxidationstests wurde dieser *ex vivo*-Assay weiter an die Situation *in vivo* angenähert, auch hierbei hat sich das Aspalathin als wirksamstes Antioxidans herausgestellt.

Die verschiedenen Testsysteme (TEAC-Assay, Fremy's-Salz-Test, LDL-Oxidationstest) wurden zur Entwicklung eines Screening-Verfahrens zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Naturstoffextrakten genutzt. Hierzu wurden verschiedene Extrakte des Rooibostees durch HPLC-DAD aufgetrennt und anschließend fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden in das jeweilige Testsystem eingebracht. Der TEAC-Test stellte sich hierbei als das für ein Screening-Verfahren geeignete System heraus. Bei einer hohen Empfindlichkeit wurde eine exakte Korrelation zu den HPLC-Signale erhalten. Durch die Berechnung der Verhältniszahlen (Peakfläche des HPLC-Signals/ ABTS^{•+}-Abbau in %) unter Berücksichtigung der Absorptionsmaxima der Substanzen, kann ein erster Hinweis zum tatsächlichen antioxidativen Potenzial einer Substanz erhalten werden. Diese Methode kann vor allem dann genutzt werden, wenn das antioxidative Potenzial vor einer gezielten Substanzisolierung abgeschätzt werden soll.

6 Abstract

In the present dissertation individual parts (leaves, petioles and root) of garden rhubarb (*Rheum rhaponticum*) as well as rooibos tea (*Aspalathus linearis*) were reinvestigated for polyphenols. After extraction of plant materials, MLCCC was used for the first purification step. After further separations by preparative HPLC pure polyphenols were obtained. The structures of these substances were unequivocally verified by different NMR-experiments (^1H , ^{13}C , HMBC, HMQC) and HR-MS. From the root of garden rhubarb the following stilbenes and stilbene-glycosides were isolated: *trans*-rhapontigenin, *trans*-desoxyrhapontigenin, *trans*-rhaponticin, *cis/trans*-desoxyrhaponticin, *trans*-resveratrol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside and *trans*-piceatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranoside. 7 Flavonoids were verified from the leaves and petioles of garden rhubarb: rutin, quercetin-3-*O*-glucuronide, isovitexin, 6,8-di-*C*- β -D-glycosylapigenin, 6-*C*- β -D-glucosyl-8-*C*- β -D-arabinosylapigenin, 6-*C*- β -D-arabinosyl-8-*C*- β -D-glycosylapigenin and (+)-catechin.

In ethyl acetate and n-butanol extract of fermented and unfermented rooibos the following polyphenols were identified: flavanone-*C*-glycosides ((*S*)/(*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside, (*S*)/(*R*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranoside), dihydrochalcones (aspalathin, nothofagin), flavone-*C*-glycosides (orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin) and flavonole-*O*-glycosides (isoquercitrin, hyperoside, rutin).

The diethyl ether extract of rooibos was separated by MLCCC. Eluting material was derivatized with *N,O*-bistrimethylsilylacetamid and then subjected to GC-MS. The following polyphenols were identified by comparison with reference substances: hydroxy benzoic acids (gallic acid, protocatechuic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, vanillic acid, syringic acid, salicylic acid), hydroxycinnamic acids (ferulic acid, *p*-coumaric acid, sinapinic acid, caffeic acid, chlorogenic acid), flavones (luteolin, chrysoeriol), flavonole (quercetin) and flavanole ((+)-catechin).

During the exposure to light and oxygen the composition of polyphenols from unfermented rooibos tea is significantly altered. This process is called fermentation. At this point the unfermented rooibos tea changes color mainly caused by consecutive reactions of the dihydrochalcones. The dihydrochalcone aspalathin produces browning products under aerated conditions, which possess of absorbance maxima at 450 nm. The conversion of aspalathin to corresponding flavanone-*C*-glycosides ((*S*)/(*R*)-eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranosides, (*S*)/(*R*)-eriodictyol-8-*C*- β -D-glucopyranosides) was verified by model incubations. All of the flavanone-*C*-glycosides were degraded to isoorientin. The isoorientin underwent a wesselymoser rearrangement resulting in the formation of orientin. All mentioned polyphenols

generated by aspalathin possess of an absorbance maximum between 280 nm and 350 nm. Therefore the eriodictyols, orientin and isoorientin are colorless substances.

The first important step during the formation of higher molecular browning products is the formation of aspalathin dimers. These dimers were formed under aerated conditions by oxidative C-C-bond coupling.

The antioxidant potential of isolated flavonoids from rooibos tea was determined for the first time. Herein, three different assays were used (TEAC-assay, fremy's salt assay and LDL-oxidation). In general the flavonoids of rooibos gave a relative high antioxidant potential. Particularly the dihydrochalcone aspalathin, which occurs in high concentrations in unfermented rooibos (53 mg/g aqueous tea extract), is *in-vitro* the most effective species (determined by TEAC- and fremy's salt assay). The decoupled LDL-oxidation assay was used to approach the LDL-oxidation assay more related to the situation *in vivo*. Here aspalathin was determined as the most effective antioxidant, too.

The different assays (TEAC-assay, fremy's salt assay and LDL-oxidation) were further used for the development of a screening assay to determine the antioxidant capacity of compounds from unknown plant extracts. Here, the different extracts of rooibos were separated by HPLC-DAD and fractionated. Each collected fraction was introduced into the different assays.

The TEAC-assay was proven as the appropriate system for a screening assay. This test system gave a high sensitivity and an exact correlation to the individual HPLC-DAD signals. The ratios of peak area/degradation of $ABTS^{\bullet+}$ were calculated based on absorbance maxima of substances. These ratios gave first insights to the antioxidant capacity of eluting material and allowed direct comparison of individual compounds.

7 Literaturverzeichnis

Aaviksaar, A.; Haga, M.; Kuzina, K.; Puessa, T.; Raal, A.; Tsoupras, G. Hydroxystilbenes in the roots of *Rheum rhaponticum*. *Proceedings of the Estonian Academy of Science Chemistry* **2003**, *52*, 99-107.

Alyukina, L.S.; Baigozina, V.P.; Ramazanova, Z. *Rheum wittrockii* flavonoids. *Akademiya Nauk Kazakhskoi* **1970**, *28*, 170-178.

Andersen, M.L.; Outtrup, H.; Skibsted, L.H. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3106-3111.

Aruoma, O.I.; Murcia, A.; Butler, J.; Halliwell, B. Evaluation of the Antioxidant and Proantioxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1880-1885.

Aziz, A.B.; Grossman, S.; Ascarelli, I.; Budowski, P. Carotene-Bleaching Activities of Lipoxygenase and Heme Proteins as Studied by a direct Spectrometric Method. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 1445-1452.

Banks, H.; Cameron, D.W. New natural stilbene glucoside from *Rheum rhaponticum* (Polygonaceae). *Australian Journal of Chemistry* **1971**, *24*, 2427-30.

Blundstone, H.A.W. Polyphenols of *Rheum rhaponticum* –1. Flavonol Glycosides. *Phytochemistry* **1967**, *6*, 1449-1452.

Blundstone, H.A.W. Hydroxycinnamic acid derivatives of *Rheum Rhaponticum*. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 1677-1679.

Bramati, L.; Minoggio, M.; Gardana, C.; Simonetti, P.; Mauri, P.; Pietta, P. Quantitative Characterization of Flavonoid Compounds in Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5513-5519.

Bramati, L.; Aquilano, F.; Pietta, P. Unfermented Rooibos Tea: Quantitative Characterization of Flavonoids by HPLC-UV and Determination of the Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7472-7474.

Buchner, N.; Krumbein, A.; Rohn, S.; Kroh, L.W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, *20*, 3229-3225.

Cai, Y.; Sun, M.; Xing, J.; Corke, H. Antioxidant Phenolic Constituents in Roots of *Rheum Officinale* and *Rubia cordifolia*: Structure-Radical Scavenging Activity Relationships. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7884-7890.

Cao, G.; Alessio, H.M.; Cutler, R.G. Oxygen-Radical Absorbance Capacity assay for Antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **1993**, *14*, 303-311.

Chin, T.C.; Youngken, H.W. The Cytotaxonomy of *Rheum*. *American Journal of Botany* **1947**, *34*, 401-407.

Choi, S.Z.; Lee, S.O.; Jang, K.U.; Chung, S.H.; Park, S.H.; Kang, H.C.; Yang, E.Y.; Cho, H.J.; Lee, K.R. Antidiabetic Stilbene and Anthroquinone Derivates from *Rheum undulatum*. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *9*, 1027-1030.

Csupor, L. Desoxyrhaponticin, a new natural stilbene derivate in rhizoma *Rhei rhapontici*. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* **1970**, *303*, 681-687.

Davies, K.M.; Schwinn, K.E. Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis. *Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Application*, 1. Auflage, **2005**, Andersen, O.M.; Markham, K.R. CRC Press, Taylor and Francis group, Broken, USA.

Esterbauer, H.; Striegl, G.; Puhl, H.; Rotheneder, M. Continuous Monitoring of in vitro Oxidation of Human Low Density Lipoprotein. *Free Rad. Res. Comms.* **1989**, *6*, 67-75.

Faustino, R.S.; Clark, T.A.; Sobrattee, S.; Czubryl, M.P.; Pierce, G.N. Differential antioxidant properties of red wine in water soluble and lipid soluble peroxy radical generating systems. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2004**, *263*, 211-215.

Ferreira, D.; Marais, C.; Steenkamp, J.A. and Joubert, E. Rooibos tea a likely Health Food Supplement. In *Processing of Recent Developments of Technologies and Fundamental Foods for Health*. Korean Society of Food Science and Technology **1995**, 73-78.

Frankel, E.N.; German, J.B.; Davis, P.A. Headspace Gas Chromatography to Determine Human Low Density Lipoprotein Oxidation. *Lipids* **1992**, *27*, 1047-1051.

Friedrich, H.; Höhle, J. Vorkommen und Verteilung von Polyphenolen in verschiedenen Arten der Gattung *Rheum*. *Plant Medica – Zeitschrift für Arzneimittelpflanzenforschung* **1966**, *4*, 363-369.

Fossen, T.; Andersen, O.M. Spectroscopic Technique Applied to Flavonoids. *Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Application*, 1. Auflage, **2005**, Andersen, O.M.; Markham, K.R. CRC Press, Taylor and Francis group, Broken, USA.

Foti, M.; Piattelli, M.; Baratta, M.T.; Ruberto, G. Flavonoids, Coumarins and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure-Activity Relationship. *J.Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 497-501.

Frankel, E.N.; Meyer, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1925-1941.

Fujita, M. ; Sankawa, U. Detection and isolation of coloring matter contained in leaves of *rhubarb*. *Shoyakugaku Zasshi* **1958**, *12*, 80-81.

Graczka, L. Stilbene derivates from plants, II. 3,5,3',4'-Tetrahydroxystilbene-3-D-glucoside, a third stilbene glycoside in *Rhei rhapontici Radix*. *Archiv der Pharmazie* **1984**, *317*, 374-377.

Gonzalez-Alvarez, M.; Alzuet, G.; Garcia-Gimenez, J.L.; Marcias, B.; Borrás, J. Biological Activity of Flavonoids Copper Complexes. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2005**, *631*, 2181-2187.

Gould, K. S.; Lister, C. Flavonoid Functions in Plants. Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Application, 1. Auflage, **2005**, Andersen, O.M.; Markham, K.R. CRC Press, Taylor and Francis group, Broken, USA.

Graham, H.N. The polyphenols of tea – Biochemistry and significance – a Review. *Bulletin de liaison* **1992**, *16*, 32-43.

Habu, T.; Flath, R.A. ; Mon, T.R. ; Morton, J.F. Volatile Components of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*). *J.Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 249-254.

Ham, I.H.; Oh, I.S.; Whang, W.K.; Kim, H. Pharmaco-constituents of Korean cultivated rhubarb leaves : the flavonoids from leaves. *Yakhak Hoechi* **1994**, *38*, 469-475.

Harold, N.; Graham, P.D. Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry. *Preventive Medicine* **1992**, *21*, 334-350.

Heinecke, J.W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* **1998**, *141*, 1-15.

Hertog, M.G.L. ; Feskens, E.J.M ; Hollman, P.C.H. ; Katan, M.B., Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* **1993**, *342*, 1007-1011.

Hetmanski, W.; Nybom, N. Anthocyanins of edible rhubarb. *Fruchtsaft-Industrie* **1968**, *12*, 256-260.

Huang, Q.; Lu, G.; Shen, H.M.; Chung, M.C.M.; Ong, C.N. Anti-Cancer Properties of Anthraquinones from Rhubarb. *Medical Research Reviews* **2006** (Published online 2006 in Willey InterScience).

Inoue, K.; Murayama, S.; Seshimo, F. ; Takeba, K. ; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. Identification of phenolic compounds in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 872-878.

Ivekovic, D.; Milardovic, S.; Roboz, M.; Grabaric, B.S. Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. *Analyst* **2005**, *130*, 708-714.

Iwashina, T.; Omori, Y.; Kitajima, J.; Akiyama, S.; Suzuki, T.; Ohba, H. Flavonoids in translucent bracts of the Himalayan *Rheum nobile* (Polygonaceae) as ultraviolet shields. *J. Plant. Res.* **2004**, *117*, 101-107.

Joubert, E.; Winterton, P.; Britz, T.J.; Gelderblom, W.C.A. Antioxidant and Pro-oxidant Activities of Aqueous Extracts and Crude Polyphenolic Fractions of Rooibos (*Aspalathus linearis*). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10260-10267.

Khanbabae, K.; Ree, T. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 641-649.

Karakaya, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **2004**, *44*, 453-464.

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma).V. Isolation and Characterization of Chromone and Chromanone Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3493-3500.

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.I.; Nishioka, I. Studies on Rhubarb. (Rhei Rhizoma). VI. Isolation and Characterization of Stilbenes. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 3237-3243.

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Tannins and related compounds. XLVII. Rhubarb. (6). Isolation and characterization of new p-hydroxyphenylbutanones, stilbenes and gallic acid glucosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 3237-3243.

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.I.; Nishioka, I. Tannins and Related Compounds. XLVIII. Rhubarb. (7). Isolation and Characterization of New Dimeric and Trimeric Procyanidins. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 4083-4091.

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I.; Yamagishi, T. Galloyl and Hydroxycinnamoylglucoses from Rhubarb. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1473-1477.

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Tannins and related compounds. Part 66. Galloylsucroses from rhubarbs. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1469-1472.

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.I.; Nishioka, I. Studies on Rhubarb. (Rhei Rhizoma). XIV. Isolation and Characterization of Stilbene Glycosides from Chinese Rhubarb. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1545-1549.

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.I.; Nishioka, I. Studies on Rhubarb. (Rhei Rhizoma). XV. Simultaneous determination of phenolic compounds by High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 999-1004.

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Chromone glycosides from Rhubarb. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1007-1009.

Kawakami, M.; Kobayashi, A.; Kator, K. Volatile Constituents of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) As affected by Extraction Process. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 633-636.

Ko, S.K. A new stilbene diglycoside from *Rheum undulatum*. *Archives of Pharmacol Research* **2000**, *23*, 159-162.

Koepfen, B.H.; Smit, C.B.J.; Roux, D.G. The Flavone-C-Glycosides and Flavonol-O-glycosides of *Aspalathus acuminatus* (Rooibos Tea). *Biochem. J.* **1962**, *83*, 507-511.

Koepfen, B.H.; Roux, D.G. C-Glycosylflavonoids. The Chemistry of Orientin and Isoorientin. *Biochem. J.* **1965**, *97*, 444-448.

Koeppe, B.H.; Roux, D.G. Aspalathin: A novel C-Glycosylflavonoid from *Aspalathus linearis*. *Tetrahedron Letters* **1965**, *39*, 3497-3503.

Koeppe, B.H.; Roux, D.G. C-Glycosylflavonoids. The Chemistry of Aspalathin. *Biochem. J.* **1966**, *99*, 604-609.

Koleva, I.I.; Niederländer, H.A.G.; van Beek, T.A. Application of ABTS Radical Cation for Selective On-line Detection of Radical Scavengers in HPLC Eluates. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3373-3381.

Komatsu, K.; Nagayama, Y, Tanaka, K.; Ling, Y.; Basnet, P. ; Meselhy, M.R. Development of a High Performance Liquid Chromatographic Method for Systematic Quantitative Analysis of Chemical Constituents in Rhubarb. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 941-947.

Krenn, L.; Presser, A.; Pradhan, R.; Bahr, B.; Paper, D.H.; Mayer, K.K.; Kopp, B. Sulfemodin 8-O- β -D-Glucoside, a New Sulfated Anthochinone Glycoside, and Antioxidant Phenolic Compounds from *Rheum emodi*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1107-1109.

Krenn, L.; Pradhan, R.; Presser, A.; Reznicek, G.; Kopp, B. Anthrone-C-glucosides from *Rheum emodi*. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 391-393.

Kuo, C.H.; Sun, S.W. Analysis of nine rhubarb anthraquinones and bianthrone by micellar electrokinetic chromatography using experimental design. *Analytica Chimica Acta*, **2003**, *482*, 47-58.

Kyle, J.A.M.; Duthie, G.G. Flavonoids in Foods. Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Application, 1. Auflage, **2005**, Andersen, O.M.; Markham, K.R. CRC Press, Taylor and Francis group, Broken, USA.

Marais, C.; van Rensberg, W.J.; Ferreira, D.; Steenkamp, J.A. (S)- and (R)-Eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranoside, novel keys to the fermentation of Rooibos (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* **2000**, *55*, 43-49.

Marnewick, J.L.; Gelderblom, W.C.A; Joubert, E. An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas. *Mutation Research* **2000**, *471*, 157-166.

Marnewick, J.L.; Joubert, E.; Swart, P.; van der Westhuizen, F.; Gelderblom, W.A. Modulation of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes and Oxidative Status by Rooibos (*Aspalathus linearis*) and Honeybush (*Cyclopia intermedia*), Green and Black (*Camellia sinensis*) Teas in Rats. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 8113-8119.

Matsuda, H.; Morikawa, T.; Toguchida, I.; Park, J.Y.; Harima, S.; Yoshikawa, M. Antioxidant Constituents from Rhubarb: Structural Requirements of Stilbenes for the Activity and Structures of Two New Anthrachinone Glucosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9*, 41-50.

McKay, D.L.; Blumberg, J.B. A Review of the Bioactivity of South African Herbal Teas: Rooibos (*Aspalathus linearis*) and Honeybush (*Cyclopia intermedia*). *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 1-16.

Medynska, E.; Smolarz, H.D. Comparative study of phenolic acids from underground parts of *Rheum palmatum* L., *R. rhaponticum* L. and *R. undulatum* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **2005**, *74*, 275-279.

Moriguchi, T.; Kita, M.; Hasegawa, S.; Omura, M. Molecular approach to citrus flavonoids and limonoid biosynthesis. *Food, Agriculture & Environment* **2003**, *1*, 22-25.

Morton, J.F. Rooibos Tea, *Aspalathus linearis*, a Caffeinless, Low-Tannin Beverage. *Economy* **1983**, *37*, 164-173.

Nonaka, G.I., Minami, M., Nishioka, I. Studies on Rhubarb (*Rhei Rhizoma*). III. Stilbene Glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 2300-2305.

Nonaka, G.I., Nishioka, I.; Nagasawa, T.; Oura, H. Tannins and related Compounds. I. Rhubarb (1). *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 2862-2870.

Nonaka, G.I., Ezaki, E. Hayashi, K. ; Nishioka, I. Flavanol glucosides from Rhubarb and *Rhaphiolapis umbellata*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1659-1661.

Oshio, H.; Imai, S.; Fujioka, S.; Sugawara, T.; Miyamoto, M.; Tsukui, M. Investigation of Rhubarbs. III. New Purgative Constituents, Sennosides E and F. *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 823-831.

Pratt, D.E.; Hudson, B.J.F. Natural antioxidants not exploited commercially. In *Food Antioxidants*; Hudson, B.J.F., Elsevier Applied Science: London, U.K., **1990**, 171-192.

Rabe, C.; Steenkamp, J.A.; Joubert, E. Phenolic Metabolites from Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1559-1565.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity applying an improved ABTS Radical Cation Decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **1999**, *26*, 1231-1237.

Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, *20*, 933-956.

Robak, J.; Gryglewski, R.J. Flavonoids are Scavengers of Superoxid Anions. *Biochemical Pharmacology* **1988**, *37*, 837-841.

Rösch, D.; Bergmann, M.; Kroh, L.W. Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution on the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4233-4239.

Rupprich, N.; Hildebrand, H.; Kindl, H. Substrate specificity in vivo and in vitro in the formation of stilbenes. Biosynthesis of rhaponticin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1980**, *200*, 72-78.

Schratz, E. Zur Systematik des Genus *Rheum*. *Planta Medica-Zeitschrift für Arzneimittelforschung* **1960**, *3*, 299-316.

Sherif, E.A.; Gupta, R.K.; Krishnamurti, M. Anomalous AlCl₃ induced U.V. shift of C-alkylated polyphenols. *Tetrahedron Letters* **1980**, *21*, 641-642.

Smet, K.; Raes, K; de Smet, S. Novel approaches in measuring the antioxidative potential of animal feeds : the FRAP and DPPH methods. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 2412-2416.

Smolarz, H.D.; Medynska, E.; Matysik, G. Determination of emodin and phenolic acids in the petioles of *Rheum undulatum* and *Rheum rhaponticum*. *Journal of Planar chromatography-Modern TLC* **2005**, *18*, 319-322.

Snijam, P.W.; Swanevelder, S.; Joubert, E.; Green, I.R.; Gelderblom, W.C.A. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose – response effects on mutagen activation – flavonoid interactions. *Mutation Research* **2007**, *631*, 111-123.

Snyckers, F.O.; Salemi, G. Studies of the South African medicinal plants (Isolation and Identification of Quercetin and Luteolin). *J. of the South African Chem. Inst.* **1974**, *27*, 5-7.

Standley, L.; Winterton, P.; Marnewick, J.L.; Gelderblom, W.C.A.; Joubert, E.; Britz, T.J. Influence of Processing Stages on Antimutagenic and Antioxidant Potentials of Rooibos Tea. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 114-117.

Tamura, H.; Yamagami, A. Antioxidative Activity of Monoacetylated Anthocyanidins Isolated from Muscat Bailey A Grape. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1612-1615.

Tomás-Baberán, F.A.; Clifford, M.N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1073-1080.

Tsuboi, M.; Minami, M.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Studies on Rhubarb (*Rhei Rhizoma*). IV. Naphthalene Glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 2708-2712.

Tuson, F.; Akyuz-Kizilay, A. Anthrachinones and flavonoids from *Rheum ribes*. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi* **2003**, *32*, 31-35.

Unno, T.; Sugimoto, A.; Kakuda, T. Scavenging effect of tea catechins and their epimers on superoxid anion radicals by a hypoxanthine and xanthine oxidase system. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 601-606.

Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C.F. Effect of Extraction time and Additional Heating on the Antioxidant Activity of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1370-1374.

von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C.F. Comparison of the antioxidant activity of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry* **1997**, *60*, 73-77.

Watanabe, M. Catechins as Antioxidants from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 839-845.

Wayner, D.D.M.; Burton, G.W.; Ingold, K.U.; Locke, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett.* **1985**, *187*, 33-37.

Winkel, B.S.J. The Biosynthesis of Flavonoids. In *The Science of Flavonoids.*, 1.Ausgabe, Grotewohl, E., Springer Verlag: New York **2008**.

Yamagishi, T.; Nishizawa, M.; Ikura, M.; Hikichi, K.; Nonaka, G.; Nishioka, I. New laxative Constituents of Rhubarb. Isolation and Characterization of Rheinosides A, B, C and D. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 3132-3138.

Zwaving, J.H., Separation and Isolation of anthraquinone glucosides of *Rheum palmatum*. *Planta Med.* **1965**, *13*, 474-84.

8 Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung</u>	<u>Titel</u>	<u>Seite</u>
Abb. 1	Biosyntheseweg von Flavonoiden innerhalb des Phenylpropanoidweges	2
Abb. 2	Grundstruktur der Naphthalenderivate	8
Abb. 3	Grundstrukturen der Anthracenderivate	9
Abb. 4	Sennoside A (10, 10'- <i>trans</i>) und Sennoside B (10, 10'- <i>meso</i>)	10
Abb. 5	Aufarbeitungsschema des Pflanzenmaterials	12
Abb. 6	HPLC-DAD-Chromatogramm vom Diethyletherextrakt (A) und Ethylacetatextrakt (B) der Rhabarberwurzel	12
Abb. 7	MLCCC-Chromatogramme nach Auftrennung des Diethyletherextraktes I&III und des Ethylacetatextraktes II&IV	13
Abb. 8	HPLC-DAD-Chromatogramm des <i>n</i> -Butanolextraktes der Stängel (A) und Blätter (B) bei $\lambda = 280$ nm	15
Abb. 9	MLCCC-Chromatogramm des <i>n</i> -Butanolextraktes der Blätter	16
Abb. 10	Grundstruktur der Auronole	16
Abb. 11	HPLC-DAD-Chromatogramm des fermentierten und unfermentierten Ethylacetatextraktes bei $\lambda = 280$ nm	19
Abb. 12	MLCCC-Chromatogramm nach Auftrennung des Ethylacetatextraktes von unfermentierten Rooibostee	20
Abb. 13	HPLC-DAD-Chromatogramm des Diethyletherextraktes von unfermentierten Rooibos bei $\lambda = 280$ nm	21
Abb. 14	MLCCC-Chromatogramm des Diethyletherextraktes ($\lambda = 280$ nm)	21
Abb. 15	A: HPLC-DAD Chromatogramm des Ethylacetatextraktes vom fermentierten Rooibostee bei $\lambda = 280$ nm; B: Absorption der Fraktionen bei 450 nm	23
Abb. 16	Abbau des Aspalathins 5 zu (<i>R</i>)/(<i>S</i>)-Eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranosid 1+3 , (<i>R</i>)/(<i>S</i>)-Eriodictyol-8-C- β -D-glucopyranosid 2+4 , Orientin 6 und Isoorientin 7	24
Abb. 17	Oxidativer Abbau des Aspalathins 5 zu Orientin 6 und Isoorientin 7	25

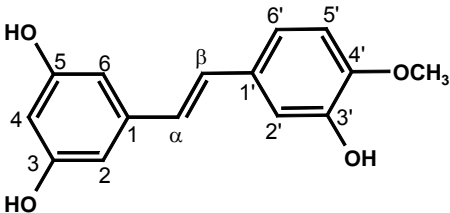
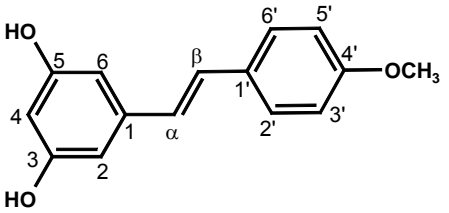
<u>Abbildung</u>	<u>Titel</u>	<u>Seite</u>
Abb. 18	Inkubation von Aspalathin über einem Zeitraum von 24 h	26
Abb. 19	Mögliche Reaktionsmechanismen zur Dimerbildung von Aspalathin (I)	26
Abb. 20	Anaerobe und aerobe Bräunung von Nothofagin (A), Aspalathin und Epicatechin (B)	28
Abb. 21	Oxidativer Abbau des Aspalathins durch β -Carbonylsplaltung	28
Abb. 22	Mögliche Wechselwirkung von α -Tocopherol und Polyphenolen an der Phasengrenzfläche der LDL.	34
Abb. 23	LDL-Oxidationstest, induziert durch Cu^{2+}	37
Abb. 24	Bindungsstellen von Cu^{2+} an Isoquercitrin	38
Abb. 25	Entkoppelter LDL-Oxidationstest. (1: Kontrolle, 2: Aspalathin, 3: Isoquercitrin)	38
Abb. 26	Screening-Testverfahren bezogen auf den Ethylacetatextrakt des fermentierten Rooibostees	40
Abb. 27	LDL-Oxidations-Screeningtestsystem, angewandt auf den Ethylacetatextrakt von fermentierten Rooibostee	42

9 Tabellenverzeichnis

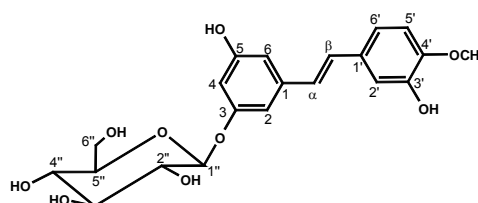
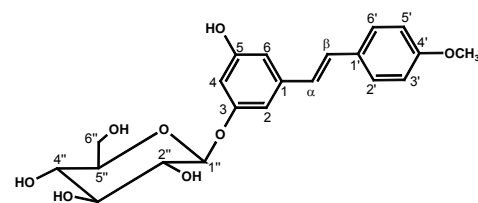
<u>Tabelle</u>	<u>Titel</u>	<u>Seite</u>
Tab. 1	Überblick über ausgewählte Arten der Gattung <i>Rheum</i> und deren Ursprung	6
Tab. 2	Chromon- und Chromanonderivate isoliert aus der Wurzel des Medizinalrhabarbers	8
Tab. 3	Strukturübersicht der Stilbenderivate, isoliert aus der Wurzel von <i>Rheum rhaponticum</i>	14
Tab. 4	Überblick über ausgewählte antioxidative Testverfahren in hydrophilen und lipophilen Medien	31
Tab. 5	Ergebnisse des TEAC- und Fremy's-Salz-Tests von isolierten Substanzen aus den Rooibostee	35
Tab. 6	Verhältniszahlen (ABTS ^{•+} -Abbau) /HPLC-DAD-Peakfläche ^a von Flavonoiden aus dem Ethylacetatextrakt des Rooibostees	41
Tab. A1	¹ H (500 MHz) und ¹³ C NMR (125 MHz) NMR-Daten der <i>trans</i> -Stilbene Rhapontigenin 1 and Desoxyrhapontigenin 3	61
Tab. A2	¹ H (500 MHz) and ¹³ C NMR (125 MHz) NMR-Daten der <i>trans</i> -Stilbenes Rhaponticin 7 and Desoxyrhaponticin 8	62
Tab. A3	¹ H (500 MHz) und ¹³ C NMR (125 MHz) NMR-Daten der <i>trans</i> -Stilbenes Resveratrol-4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid 5 und Piceatannol-3'- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid 6	63
Tab. A4	¹ H (500 MHz) und ¹³ C NMR (125 MHz) NMR-Daten von Rutin	64

10 Anhang

Tab. A1 ^1H (500 MHz) und ^{13}C NMR (125 MHz) NMR-Daten der *trans*-Stilbene Rhapontigenin **1** and Desoxyrhapontigenin **3** (in DMSO- d_6)

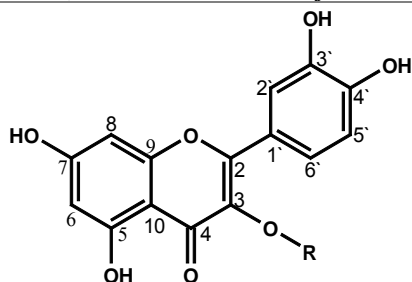
<i>trans</i> -Rhapontigenin			<i>trans</i> -Desoxyrhapontigenin		
					
C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	
1		139.06		139.05	
2	6.39 (s, 1H)	104.40	6.38 (s, 1H)	104.38	
3		158.48		158.48	
4	6.12 (s, 1H)	101.90	6.11 (s, 1H)	101.92	
5		158.48		158.48	
6	6.38 (s, 1H)	104.40	6.37 (s, 1H)	104.38	
α	6.79 (d, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_\beta) = 16.3$ Hz)	126.50	6.89 (d, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_\beta) = 16.3$ Hz)	126.64	
β	6.89 (d, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_\alpha) = 16.3$ Hz)	127.87	6.98 (d, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_\alpha) = 16.3$ Hz)	127.44	
1'		130.08		129.92	
2'	7.01 (d, 1H, $^4\text{J}(\text{H}_{6'}) = 1.8$ Hz)	112.16	7.51 (d, 2H, $^3\text{J}(\text{H}_{3'}) = 8.5$ Hz)	127.72	
3'		146.57	6.92 (d, 2H, $^3\text{J}(\text{H}_{6'}) = 8.5$ Hz)	114.09	
4'		147.62		158.86	
5'	6.89 (d, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_{6'}) = 8.6$ Hz)	112.94	6.92 (d, 2H, $^3\text{J}(\text{H}_{6'}) = 8.5$ Hz)	114.09	
6'	6.95 (dd, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_{5'}) = 8.4$ Hz, $^4\text{J}(\text{H}_2) = 1.8$ Hz)	120.06	7.51 (d, 2H, $^3\text{J}(\text{H}_{3'}) = 8.5$ Hz)	127.72	
-OCH ₃	3.77 (s, 3H)	55.62	3.77 (s, 3H)	55.10	

Tab. A2 ^1H (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) NMR-Daten der *trans*-Stilbenes Rhaponticin **7** and Desoxyrhaponticin **8** (in DMSO- d_6)

<i>trans</i> -Rhaponticin			<i>trans</i> -Desoxyrhaponticin		
					
C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	
1		139.12		139.15	
2	6.56 (s, 1H)	107.22	6.55 (s, 1H)	107.31	
3		158.31		158.34	
4	6.33 (s, 1H)	102.88	6.32 (s, 1H)	102.94	
5		158.84		158.87	
6	6.72 (s, 1H)	104.89	6.72 (s, 1H)	104.86	
α	6.82 (d, 1H, $^3J(\text{H}_\beta) = 16.1$ Hz)	126.06	6.91 (d, 1H, $^3J(\text{H}_\beta) = 16.6$ Hz)	126.23	
β	6.98 (d, 1H, $^3J(\text{H}_\alpha) = 16.4$ Hz)	128.51	7.05 (d, 1H, $^3J(\text{H}_\alpha) = 16.4$ Hz)	128.13	
1'		129.98		129.55	
2'	7.01 (d, 1H, $^4J(\text{H}_{6'}) = 2.0$ Hz)	112.94	7.48 (d, 2H, $^3J(\text{H}_{3'}) = 8.8$ Hz)	127.82	
3'		146.55	6.90 (d, 2H, $^3J(\text{H}_{2'}) = 8.7$ Hz)	114.12	
4'		147.70		158.97	
5'	6.89 (d, 1H, $^3J(\text{H}_{6'}) = 9.3$ Hz)	112.12	6.90 (d, 2H, $^3J(\text{H}_{6'}) = 8.7$ Hz)	114.12	
6'	6.95 (dd, 1H, $^3J(\text{H}_{5'}) = 10.0$ Hz, $^3J(\text{H}_{2'}) = 2.0$ Hz)	118.53	7.48 (d, 2H, $^3J(\text{H}_{5'}) = 8.8$ Hz)	127.82	
1''	4.79 (d, 1H, $^3J(\text{H}_{2''}) = 7.6$ Hz)	100.63	4.77 (d, 1H, $^3J(\text{H}_{2''}) = 7.6$ Hz)	100.67	
2''	3.12 - 3.72 (m, 6H)	73.26	3.16 - 3.74 (m, 4H)	73.27	
3''		76.67		77.11	
4''		69.75		69.76	
5''		76.51		76.69	
6''		60.70	3.70 (dd, 1H, $J = 11.9$, $J = 2.8$)	60.71	
-OCH ₃	3.77 (s, 3H)	55.62	3.46 (dd, 1H, $J = 10.1$; $J = 1.2$)	55.13	
			3.74 (s, 3H)		

Tab. A3 ^1H (500 MHz) und ^{13}C NMR (125 MHz) NMR-Daten der *trans*-Stilbenes Resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranosid **5** und Piceatannol-3'-O- β -D-glucopyranosid **6** (in DMSO- d_6)^a

<i>trans</i> -Resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranosid			<i>trans</i> -Piceatannol-3'-O- β -D-glucopyranosid		
C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	
1		138.70		138.98	
2	6.42 (s, 1H)	104.28	6.38 (s, 1H)	104.21	
3		158.19		158.16	
4	6.12 (s, 1H)	101.96	6.19 (s, 1H)	102.45	
5		158.19		158.16	
6	6.41 (s, 1H)	104.28	6.37 (s, 1H)	104.21	
α	6.91 (d, 1H, $^3J(\text{H}_\beta) = 16.4$ Hz)	126.95	6.83 (d, 1H, $^3J(\text{H}_\beta) = 16.5$ Hz)	126.34	
β	6.98 (d, 1H, $^3J(\text{H}_\alpha) = 16.4$ Hz)	127.49	6.89 (d, 1H, $^3J(\text{H}_\alpha) = 16.5$ Hz)	127.73	
1''		130.58		128.83	
2''	7.50 (d, 2H, $^3J(\text{H}_{3'}) = 8.4$ Hz)	127.29	7.50 (d, 1H, $^4J(\text{H}_{6'}) = 1.9$ Hz)	114.24	
3''	7.01 (d, 2H, $^3J(\text{H}_{2'}) = 8.7$ Hz)	116.21		146.63	
4''		156.91		145.59	
5''	7.01 (d, 2H, $^3J(\text{H}_{6'}) = 8.7$ Hz)	116.21	6.85 (d, 1H, $^3J(\text{H}_{6'}) = 8.3$ Hz)	115.84	
6''	7.50 (d, 2H, $^3J(\text{H}_{5'}) = 8.4$ Hz)	127.29	7.11 (dd, 1H, $^3J(\text{H}_{5'}) = 8.0$ Hz, $^4J(\text{H}_{2'}) = 1.8$ Hz)	122.05	
1''	4.87 (d, 1H, $^3J(\text{H}_{2''}) = 7.4$ Hz)	100.24	4.79 (d, 1H, $^3J(\text{H}_{2''}) = 7.1$ Hz)	101.82	
2''	3.10 - 3.80 (m, 6H)	73.17	3.20 - 3.88 (m, 6H)	73.38	
3''		76.99		77.35	
4''		69.36		70.10	
5''		76.49		75.95	
6''		60.61		60.90	

Tab. A4 ^1H (500 MHz) und ^{13}C NMR (125 MHz) NMR-Daten von Rutin (in DMSO-d_6)^a**Rutin, R = α -L-Rha-1 \rightarrow 6- β -D-Glc**

C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]
2		156.54
3		133.44
4		177.54
5		161.34
6	6.19 (d, 1H, $^4\text{J}(\text{H}_8) = 2.1$ Hz)	98.80
7		164.20
8	6.37 (d, 1H, $^4\text{J}(\text{H}_6) = 2.0$ Hz)	93.70
9		156.73
10		104.09
1'		121.30
2'	7.52 (d, 1 H, $^4\text{J}(\text{H}_{6'}) = 2.3$ Hz)	116.39
3'		145.88
4'		148.54
5'	6.83 (d, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_{6'}) = 8.5$ Hz)	115.35
6'	7.64 (dd, 1H, $^4\text{J}(\text{H}_{2'}) = 2.3$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_{5'}) = 8.1$ Hz)	121.70
1''	5.38 (d, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_{2''}) = 9.6$ Hz)	101.32
2''	3.03-3.31 (m, 8 H)	74.20
3''		76.04
4''		70.69
5''		76.04
6a''	3.35 (dd, 1H, J = 6.3, 9.8 Hz)	67.12
6b''	3.69 (dd, 1H, J = 6.7, 10.3 Hz)	
1'''	4.40 (dd, 1H, $^3\text{J}(\text{H}_{2''''}) = 17.2, 6.1$ Hz)	100.87
2'''	3.04-3.31 (m, 8 H)	70.60
3'''		70.13
4'''		71.94
5'''		68.36
6'''	0.98 (d, 3 H, J = 6.3 Hz)	17.85

11 Publikationsliste

Veröffentlichungen

Krafczyk, N.; Glomb, M.A. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*(9), 3368-3376.

Krafczyk, N.; Woyand, F.; Glomb, M.A. Structure-Antioxidant-Relationship of Flavonoids from fermented Rooibos. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *accepted*.

Krafczyk, N.; Kötke, M.; Lehnert, N.; Glomb, M.A. Phenolic Composition of Rhubarb. *European Food Research and Technology* **2008**, *accepted*.

Vorträge

Haupt, N.; Glomb, M.A. Aufklärung von Strukturen und Reaktionen phenolischer Verbindungen aus *Aspalathus linearis*. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 17. Arbeitstagung Regionalverband Süd-Ost, 29.03.2007, Halle (Saale).

Posterpräsentationen

Haupt, N.; Woyand, F., Glomb, M.A. Charakterisierung der Struktur-Wirkungsbeziehungen *in vitro* und *in vivo* und Isolierung von Flavonoiden aus Rooibostee. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen-Nürnberg.

Woyand, F.; **Haupt, N.;** Glomb, M.A. Untersuchung der antioxidativen Kapazität ausgesuchter Polyphenole des Rooibostees *in vivo*. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen-Nürnberg.

Lehnert, N.; **Haupt, N.;** Glomb, M.A. Isolierung und Strukturaufklärung phenolischer Inhaltsstoffe aus den Stängeln und Blättern von Rhabarber. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen-Nürnberg.

Haupt, N.; Geschwäntner, U.; Glomb, M.A. Untersuchungen zur Antioxidativen Kapazität phenolischer Verbindungen im Rooibostee. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden. U. Abstract: *Lebensmittelchemie* **2007**, *61*, 76.

Kötke, M.; **Haupt, N.;** Glomb, M.A. Isolierung und Strukturaufklärung phenolischer Inhaltsstoffe von Rhabarber. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden. Abstract: *Lebensmittelchemie* **2007**, *61*, 120.

Weitere Publikationen

-Diese stehen nicht im Zusammenhang mit der kumulativen Promotion-

Zhdanov, R.I.; Shmyrina, A.S.; Zarubina, T.V.; Mulyukin, A.L.; El-Registan, G.I.; **Haupt, N.**; Kraus, A.; Lorenz, W. Nature of DNA-bound fatty acids in *Pseudomonas aurantiaca*. *FEMS Letters* **2006**, 265, 151-158.

Zhdanov, R.I.; Shmyrina, A.S.; Mulyukin, A.L.; El-Registan, G.I.; Zarubina, T.V.; Kraus, A.; **Haupt, N.**; Lorenz, W. The Lipid Fraction Tightly Bound to Genomic DNA Is Determined in Prokaryotes. *Biochemistry and Biophysics* **2006**, 410, 320-323.

Haupt, N.; Kraus, A.; Lorenz, W. Examination of DNA-bound lipids by GC-MS and LC-MS. Lebensmittelchemische Gesellschaft, 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Hamburg. Abstract: *Lebensmittelchemie* **2006**, 60, 93.

12 Lebenslauf

Name:	Nicole Krafczyk, geb. Haupt
Geburtsdatum:	30. November 1981
Geburtsort:	Köthen/ Anhalt
September 1988- Juli 1992	Besuch der Frideriken-Grundschule in Ballenstedt
September 1992- Juli 2000	Besuch des Wolterstorff-Gymnasiums in Ballenstedt; Abschluss: Abitur
Oktober 2000- März 2005	Studium der Lebensmittelchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Abschluss: 1. Staatsexamen, Diplom
April 2005- März 2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie, Lebensmittelchemie
seit April 2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Firma Scil Proteins GmbH in Halle

13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation „Isolierung, Strukturaufklärung und Eigenschaften polyphenolischer Verbindungen aus *Aspalathus linearis* und *Rheum rhaponticum*“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Halle (Saale), 02.09.2008

Nicole Krafczyk