

Isolierung und Charakterisierung von Flavan-3-olen aus *Bassia longifolia* und deren pharmakologische Charakterisierung *in vitro*



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

vorgelegt von

Peter Bürkel

aus Großhaslach

2023

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von März 2019 bis April 2023 unter der Leitung von PD Dr. Guido Jürgenliemk am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 08.05.2023

Datum der mündlichen Prüfung: 23.06.2023

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Sigurd Elz	(Vorsitzender)
	PD Dr. Guido Jürgenliemk	(Erstgutachter)
	Prof. Dr. Jörg Heilmann	(Zweitgutachter)
	PD Dr. Markus Reichold	(dritter Prüfer)

Danksagung

Zuallererst gilt mein größtes Dankeschön PD Dr. Guido Jürgenliemk, für die stets nicht nur fachlich höchst kompetente, sondern auch menschlich bestmögliche Betreuung. Lieber Guido, ich habe mich stets wohl gefühlt unter deiner Regie. Du hattest jederzeit ein offenes Ohr und ich habe mich immer willkommen gefühlt. Vielen Dank auch für die vielen angenehmen Gespräche über Urlaube, Essen und Praktikumserlebnisse.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Heilmann dafür bedanken die Möglichkeit bekommen zu haben, hier promovieren zu dürfen. Vielen Dank für deine stete Bereitschaft, mich fachlich bestmöglich zu unterstützen. Vielen Dank für die stets ungezwungenen Unterhaltungen und die Möglichkeit, sich kompetent über alle möglichen Fußballthemen austauschen zu können.

Vielen Dank an PD Dr. Markus Reichold für das Übernehmen des Amtes des Drittprüfers und die fachlichen Anregungen über den pharmazeutisch-chemischen Arbeitsalltag hinaus.

Besten Dank auch an Prof. Dr. Sigurd Elz, der mich ab Tag 1 meines Studiums über begleitet hat und durch das Übernehmen des Vorsitzes des Prüfungsausschusses mir einen schönen und runden Abschluss gewährt.

Ein herzlicher Dank gilt an Prof. Dr. Antje Bäumner für die Möglichkeit, das Bakterienlabor nutzen zu dürfen.

Vanessa Tomanek danke ich recht herzlich für die Unterstützung und Einführung in das Arbeiten mit Bakterien und CD-Spektrometer sowie ihre super sympathische und hilfsbereite Art.

Fritz Kastner und Tuan-Anh Nguyen sei ganz herzlich für die Aufnahme der NMR-Spektren gedankt, die für diese Arbeit unerlässlich waren und immer zuverlässig und schnell gemessen wurden sowie Josef Kiermaier und Wolfgang Söllner für die Messung der Massenspektren und PD Dr. Dürkop für die Möglichkeit zur Vermessung der CD-Spektren.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Joachim Wegener für die unkomplizierte Möglichkeit und kurzfristige Bereitschaft, einen weiteren Assay durchführen zu können.

Danke auch an Prof. Dr. Dejan Orčić für die Durchführung der LC-MS/MS Experimente an der Universität in Novi Sad und die hervorragende Erklärung des theoretischen Hintergrunds.

Saphia Azzam danke ich für die Durchführung des Wundheilungsassays und der sehr netten Beantwortung der fachlichen Fragen.

Meinen Wahlpflichtpraktikanten Ariane Preuß, Theresa Bartke, Maja Prautzsch, Lea Rohr, Alfons Grad und Wolfgang Weber danke ich für ihre Unterstützung der (manchmal undankbaren) Arbeiten im Labor.

Anne Grashuber, ohne die ein reibungsloser Ablauf der Praktika nicht möglich gewesen wäre, danke ich ganz besonders.

Bei Gabriele Brunner möchte ich mich für die Bereitschaft, mich immer bestmöglich und geduldig bei allen Themen aus dem Labor-Einmaleins zu beraten, bedanken.

Vielen Dank an meine serbischen Freunde Marijana Janić, Ema Svirčev und Tanja Majkić. Ihr habt uns mit eurer wahnsinnigen Gastfreundschaft den Aufenthalt in Novi Sad zu einer unvergesslichen Zeit gemacht.

Vielen Dank an die Pharmazeut:innen im Praktikum, die ich miterleben durfte: Martin Hartmann, Alexander Ernst, Liza Dreibusch, Anna Weinzierl und Gloria Kössel.

Liebe Gloria, vielen Dank für deine herzliche und liebe Art. Du hast unser Labor und die Abende immer sehr bereichert und ich danke dir auch für die Erweiterung meines Brauereihorizontes.

Des Weiteren danke ich meinem ersten PB1-Team mit Martina Tremmel und Sebastian Schwindl. Liebe Bämmli, ich habe dein Händchen für Zeichentalente immer bewundert. Vielen Dank, dass ich zum Ausgleich immer Rücksprache halten durfte. Nicht nur die Zeit im Praktikum war stets unterhaltsam, auch die mit dir als Laborkollegin. Die täglichen Gespräche über den schlimmsten Muskelkater aller Zeiten werde ich wohl am meisten vermissen. Und Sebi: „Ich hab's“.

Julia Brunner danke ich vielmals für die Einarbeitung in das Bakterienlabor und dem Sojageschnetzeltorn.

Mirjam Abu-Salah/Salat/Salsa/Sarah danke ich für ihren grenzenlosen Optimismus und gute Laune. In dir hat man immer einen gleichgesinnten Gesprächspartner gefunden, wenn die Dinge besonders gut gelaufen sind. Deine unnachahmliche Art und Weise Geschichten zu erzählen haben die Pausen immer verbessert.

Katrin Kuck möchte ich dafür danken, dass sie ihr schier unendliches Fachwissen immer bereitwillig geteilt hat und für die Einführung in die präp. HPLC und die Strukturaufklärung.

Nicole Herl danke ich für ihre unglaublich hilfsbereite Art und ihr Engagement als Workgroupmanagerin, die nach ein paar Wochen schon mehr konnte als ich in vier Jahren.

Leonie Kayser danke ich zum einen für das wiederholte Durchführen meiner UPLC®-Experimente und zum anderen für ihre super sympathische Art. Liebe Leonie, ich wünsche dir noch viel Kraft für deine Zeit als Doktorandin und die damit verbundenen Tage nach dem Feierabendgetränk.

Ein großes Dankeschön geht an Anna Unterholzner. Anna, vielen Dank für deine liebe und direkte Art. Du hast es oft geschafft Dinge anzusprechen, die sonst keiner angesprochen hat und dafür bin ich dir dankbar. Vielen Dank auch für dein Fachwissen, dein gründliches Korrekturlesen dieser Arbeit und dafür, dass du uns allen gezeigt hast, mit wie wenig Flüssigkeit der menschliche Körper doch auskommen kann.

Michael Schaffer möchte ich für seine unkomplizierte, entspannte Art und seine riesige Hilfsbereitschaft danken.

Bernhard Kram als Urgestein von 13.1.41 danke ich herzlich für seine lustige, erwachsene Art und sämtliche Hausmeistertätigkeiten. Danke, dass du mich immer hast teilhaben lassen an deinen neuesten Bauprojekten und an deinem breiten Fundus an intellektuell wertvollen Bewegtbildern.

Herzlichen Dank auch an Sabrina Zölch. Liebe Sabrina, ich danke dir für deine lustigen Erzählungen, die es stets geschafft haben, meinen Horizont zu erweitern und gleichzeitig sowohl Kopfschütteln als auch Bewunderung hervorzurufen. Serbien mit dir und Tom war wirklich einmalig und dadurch viel mehr Urlaub als Arbeit. PB1 mit dir war immer entspannt und unkompliziert und für das leibliche Wohl war immer bestens gesorgt.

Thomas Gruber, meinem alten Flavan-3-brol danke ich ebenfalls ganz herzlich. Lieber Gschafftgruber, ob Serbien, Griechenland oder sogar langweilige Messebesuche: mit dir war alles immer ein bisschen lustiger. Deine Outfits und Urlaubserlebnisse haben mich immer inspiriert. Deine Expertise und Erfahrungen in sämtlichen Lebensbereichen habe ich stets bewundert und versucht so gut aufzusaugen, wie es nur geht.

Ein besonderer Dank geht an Carola Aumer. Liebe Carola, wir haben uns in deinem PJ kennenlernt und haben nicht lange gebraucht, bis wir uns bestens verstanden haben. Deine unerschütterlich sympathische und herzliche Art haben die Arbeitstage immer schöner gemacht. Bitte lass dir das niemals austreiben, bleib so wie du bist und: Helm tragen nicht vergessen!

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Paper

Bürkel P, Rajbhandari M, Jürgenliemk, G. *Bassia longifolia*: Isolation of flavan-3-ols and their contribution to the antibacterial and antidiabetic activity *in vitro*.

Eingereicht am 17.04.2023 bei Heliyon (Elsevier)

Konferenzbeiträge

Posterbeiträge

XXX International Conference on Polyphenols (ICP 2020), 13.-15. Juli 2021, Turku, Finnland (online)

Bürkel. P., Rajbhandari M., Jürgenliemk G. Flavan-3-ols isolated from the bark of *Bassia longifolia*.

70th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 28.-31. August 2022, Thessaloniki, Griechenland

Bürkel. P., Rajbhandari M., Jürgenliemk G. Characterization of Proanthocyanidins from the Bark of *Bassia longifolia*.

71th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 02.06 Juli 2023, Dublin, Irland

Bürkel. P., Rajbhandari M., Jürgenliemk G. Antibacterial and α -glucosidase inhibitory activity *in vitro* of *Bassia longifolia*, a traditional medicinal plant from Nepal.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Einleitung.....	5
2.1. Traditionelle Medizin aus Nepal und dem Himalaya.....	5
2.2. <i>Bassia longifolia</i> KOENIG	6
2.2.1. Beschreibung, kommerzielle und traditionelle medizinische Nutzung.....	6
2.2.2. Pharmakologische Untersuchungen zu <i>B. longifolia</i>	7
2.2.3. Bekannte Inhaltsstoffe	8
2.3. Gerbstoffe	9
2.3.1. Hydrolysierbare Gerbstoffe.....	9
2.3.2. Proanthocyanidine	11
2.3.2.1. Einteilung und Vorkommen	11
2.3.2.2. Biosynthese	12
2.3.2.3. Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik	13
2.3.2.4. Pharmakologie und Evidenz von Proanthocyanidinen	14
2.4. Pflanzliche Arzneimittel bei Diabetes mellitus	15
2.4.1. α -Glucosidasen als Target	16
2.4.2. Die Anwendung gerbstoffhaltiger Arzneipflanzen bei Diabetes.....	17
2.5. Traditionelle Arzneimittel zur Wundheilung	18
2.5.1. Wundheilungsfördernde Arzneipflanzen	19
2.5.2. Antibakterielle Wirkung von Proanthocyanidinen.....	20
2.6. Zielsetzung	21
3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus <i>B. longifolia</i>	22
3.1. Hintergrund und Zielsetzung	22
3.2. Isolierung von Inhaltsstoffen aus dem EtOAc-Extrakt	22
3.2.1. Isolierungsstrategie	22
3.2.2. Extraktion	23
3.2.3. Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20.....	24
3.2.4. Flash-Chromatographie mit Kieselgel	25
3.2.5. Isolierung mit analytischer HPLC.....	25
3.2.6. Präparative HPLC.....	25
3.3. Isolierung oligomerer Proanthocyanidine aus dem MeOH-Extrakt.....	26
3.3.1. Isolierungsstrategie	26
3.3.2. Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20.....	28
3.3.3. Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® CHP20P.....	28
3.3.4. Präparative HPLC.....	29
3.3.5. Strukturaufklärung	30
3.3.5.1. (+)-Catechin.....	30
3.3.5.2. (-)-Epicatechin	32
3.3.5.3. Procyanidin B1	34
3.3.5.4. Procyanidin B2	37
3.3.5.5. Procyanidin B3	40
3.3.5.6. Procyanidin B4	42

3.3.5.7.	Procyanidin B5	44
3.3.5.8.	Procyanidin B8	46
3.3.5.9.	Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin	49
3.3.5.10.	Procyanidin C1	51
3.3.5.11.	Epicatechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin	54
3.3.5.12.	Catechin-(4 α →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin	57
3.3.5.13.	Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin	60
3.3.5.14.	Epicatechin-(4 β →8)-Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin	63
3.3.5.15.	Epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin	66
3.3.5.16.	Cinnamtannin A2	69
3.4.	¹³C-NMR-Untersuchungen zur Polymerfraktion	72
3.4.1.	Hintergrund	72
3.4.2.	Ergebnisse	72
3.5.	Zusammenfassung und Diskussion	74
3.6.	Material und Methoden	77
3.6.1.	Geräte, Gefäße, Materialien und Software	77
3.6.2.	Chemikalien	79
3.6.3.	Pflanzenmaterial und Extraktion	80
3.6.4.	Dünnschichtchromatographie	81
3.6.5.	Sprühreagenzien	81
3.6.5.1.	AA/H ₂ SO ₄ -Sprühreagenzeagenz	81
3.6.5.2.	Vanillin/HCl-Sprühreagenz	82
3.6.6.	Fraktionierung und Isolierung	82
3.6.6.1.	Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20	82
3.6.6.2.	Flash-Chromatographie an MCI-Gel® CHP20P für PA3-PA5	84
3.6.6.3.	Flash-Chromatographie mit Kieselgel für F3	86
3.6.6.4.	Methodenentwicklung für die präp. HPLC	87
3.6.6.5.	Isolierung an der präp. HPLC	87
3.6.6.6.	Aufreinigung an der analytischen HPLC	90
3.6.7.	Strukturaufklärung und Substanzcharakterisierung	91
3.6.7.1.	Bestimmung der chromatographischen Reinheit	91
3.6.7.2.	LC-HR-ESI-MS	91
3.6.7.3.	NMR-Spektroskopie	91
3.6.7.4.	Polarimetrie	92
3.6.7.5.	Circulardichroismus	92
4.	Analytische Untersuchungen zum Gerbstoffprofil von <i>B. longifolia</i>	94
4.1.	Hintergrund	94
4.2.	Untersuchungen zum Gerbstoffgehalt	94
4.2.1.	Bestimmung des Gerbstoffgehaltes nach der Methode 2.8.14 nach Ph. Eur.	94
4.2.2.	UPLC®-Methode zur Quantifizierung von PA-Clustern	95
4.3.	Screening nach (Epi)afzelechin mittels LC-MS/MS	98
4.4.	Zusammenfassung und Diskussion	99
4.5.	Material und Methoden	100
4.5.1.	Geräte, Gefäße und Materialien	101
4.5.2.	Chemikalien und Reagenzien	102
4.5.3.	Quantifizierung des Gerbstoffgehalts mit der modifizierten Methode 2.8.14 nach Ph. Eur.	102

4.5.4.	UPLC®-Methode zur Quantifizierung von PA-Clustern	103
4.5.5.	LC-MS/MS Untersuchungen zur Detektion von (Epi)afzelechin	104
5.	Untersuchungen zur Hemmung der α-Glucosidase.....	106
5.1.	Hintergrund.....	106
5.2.	α -Glucosidaseassay.....	106
5.3.	Zusammenfassung und Diskussion	111
5.4.	Material und Methoden.....	113
5.4.1.	Geräte, Gefäße und Materialien	113
5.4.2.	Chemikalien und Reagenzien	114
5.4.3.	α -Glucosidaseassay	114
6.	Antibakterielle Untersuchungen	117
6.1.	Hintergrund.....	117
6.2.	MTT-Assay zur Bestimmung der MHK.....	117
6.3.	Serial microdilution broth assay mit Agarplatten	119
6.4.	Zusammenfassung und Diskussion	120
6.5.	Material und Methoden.....	121
6.5.1.	Geräte, Gefäße und Materialien	121
6.5.2.	Chemikalien, Medien und Bakterien.....	122
6.5.3.	Herstellung der Nährmedien.....	122
6.5.4.	Bestimmung der Keimbildenden Einheiten/ml.....	122
6.5.5.	Serial microdilution broth assay mit Agarplatten	122
6.5.6.	MTT-Assay zur Bestimmung der MHK.....	123
7.	Untersuchungen zur Wundheilung	125
7.1.	Hintergrund.....	125
7.2.	ECIS-Wundheilungsassay mit NRK-52E Zellen	125
7.3.	Zusammenfassung und Diskussion	127
7.4.	Material und Methoden.....	128
7.4.1.	Geräte, Gefäße und Materialien	128
7.4.2.	Kulturmedien, Chemikalien und Zellen	129
7.4.3.	ECIS-Wundheilungsassay.....	129
8.	Zusammenfassung	131
9.	Summary	133
10.	Erklärung zur Eigenständigkeit.....	135
11.	Literaturverzeichnis.....	136

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$[\alpha]_D^{25}$	spezifischer Drehwert
%	Prozent
1D	eindimensional
^1H	Wasserstoff-Isotop mit einem Proton und keinem Neutron
^{13}C	Kohlenstoff-Isotop mit sechs Protonen und sieben Neutronen
2D	zweidimensional
δ	chemische Verschiebung
ϵ	molarer Absorptionskoeffizient
λ_{max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
A.	<i>Achillea</i>
AA	Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz
ACN	Acetonitril
Anal.	analytisch
B.	<i>Bassia</i> oder <i>Bacillus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
br	breites Signal
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
c	Konzentration
ca.	Circa
Caco-2	Cancer coli-2 Zellen
CD	Circular dichroism, Zirkulardichroismus
CDCl_3	deutertes Chloroform
CHI	Chalkonflavanonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym-A
COSY	Correlated spectroscopy
d	Dublett
D.	Diabetes
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie/Dünnschichtchromatogramm
DCM	Dichlormethan
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
dd	Dublett vom Dublett
DFR	Dihydroflavanolreduktase

1. Abkürzungsverzeichnis

d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECIS	Electric cell-substrate impedance sensing
ESI	Electrospray-Ionisation
etc.	et cetera
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
F	Farad
F3H	Flavanon-3-hydroxylase
FA	Formic acid, Ameisensäure
FAM	Fertigarzneimittel
FM	Fließmittel
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GLP1	Glucagon-like Peptide 1
GPL	Gesamtphenollösung
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy
HMEC-1	Human Microvascular Endothelial Cells-1
HOAc	Essigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	High Resolution, hochauflösend
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy
Hz	Hertz
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
iNOS	induzierbare NO-Synthase
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
KBE	Keimbildende Einheiten
Konz.	Konzentration
l	Liter
LAR	Leukoanthocyanidinreduktase
LC	liquid Chromatography, Flüssigchromatographie
LIFDI	Liquid Injection Field Desorption Ionization
LM	Lösemittelkontrolle
log	dekadischer Logarithmus
M	molar
m	Multipllett
m/V	Masse/Volumen
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis

1. Abkürzungsverzeichnis

mAU	Milli-Absorptionseinheit
MeOD	Methanol- <i>d</i> ₄
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MGAM	Maltase-Glucoamylase
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
n	Nano oder Anzahl an Experimenten
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernresonanzspektroskopie
NK	Negativkontrolle
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Nr.	Nummer
NRK	Normal rat kidney
PA	Proanthocyanidin
PA-F	Proanthocyanidin-Fraktion
PC	Procyanidin
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Petrolether
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PK	Positivkontrolle
pNPG	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucoopyranosid
Poly-F	Polymer-Fraktion
Pos.	Position
ppm	parts per million
Präp.	präparativ
rel.	relativ
R_f	Retentionsfaktor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP-18	reversed Phase 18
RPL	Restphenollösung
s	Singulett
s	Sekunde
S.	<i>Staphylococcus</i>
SCoA	S-Acetyl-Coenzym A
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat, Natriumdodecylsulfat
SSC	Side-Scattered Light, Seitenstreulicht
SD	Standard deviation; Standardabweichung
SGLT2	Sodium glucose linked transporter 2
SEM	Standard error of the mean; Standardfehler

1. Abkürzungsverzeichnis

SI	Sucrose-Isomaltase
sog.	sogenannt
t	Triplett
T	Temperatur
TGF-β	Transforming growth factor β
TM	Traditionelle Medizin
U	Units
UPLC®	Ultra performance liquid chromatography
UV/Vis	Ultravioletter/sichtbarer Bereich
V	Volt
v. Chr.	vor Christus
V/V	Volumen/Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z.B	zum Beispiel

2. Einleitung

2.1. Traditionelle Medizin aus Nepal und dem Himalaya

Die immer höher werdenden Kosten, die durch das Gesundheitssystem verursacht werden, stellen für viele Länder eine zunehmende Belastung dar. Daher fällt dem Bereich der traditionellen und komplementären Medizin eine immer höhere Relevanz zu, da sie gut verfügbar und günstig ist. Traditionelle Medizin (TM) umfasst die Therapie von Krankheiten mit Pflanzen, durch Teile von Tieren, Mineralien sowie den Einsatz von manuellen Methoden, Akkupunktur und spirituellen Techniken. In Afrika kommt bei 80% der Bevölkerung die TM zum Einsatz während in vielen Industrieländern der Gebrauch stark steigt [1]. Umso wichtiger ist es, die TM in die nationalen Gesundheitssysteme zu implementieren und zu regulieren. Die Zahl der Länder, die hierzu eine Strategie entwickelt haben, stieg von 25 im Jahr 1999 auf 98 Länder 2018. Um die Sicherheit der Anwendung zu gewährleisten, ist es unerlässlich, die bisher oft wenig erforschten Pflanzen eingehend zu untersuchen. Dabei stieg auch die Anzahl der Länder mit einem nationalen Forschungsinstitut für TM von 19 im Jahr 1999 auf 75 im Jahr 2018. Gleichzeitig beklagten 90% der Länder in der Region von Südostasien, zu denen auch Nepal und andere Länder des Himalaya gehören, dass es an Forschungsdaten und Geldern dafür fehle [2]. Somit stellt die Ethnopharmazie ein Fachgebiet mit hohem Forschungsbedarf dar. Der Großteil der TM in der Himalaya-Region kann zur Ayurveda gezählt werden, einer traditionellen indischen Heilkunst, die seit ca. 1500 v. Chr. praktiziert wird und tausende verschiedene pflanzliche Formulierungen beinhaltet [3, 4]. Andere traditionelle Heilformen, die praktiziert werden, sind die traditionelle chinesische Medizin, Amchi, welches oft als traditionelle tibetische Medizin bezeichnet wird oder Unani als klassische arabische Medizin [5, 6]. Der Himalaya stellt einen sehr artenreichen Lebensraum mit über 10 000 bekannten Pflanzenarten dar [7]. In Nepal sind über 6000 Gefäßpflanzen bekannt, von denen schätzungsweise 1600-1900 Arten als traditionelle Heilmittel verwendet werden [5, 8]. Im Vergleich dazu sind in ganz Europa ca. 11 000 Arten heimisch, von denen über 4000 in Deutschland vorkommen [9, 10]. Viele verschiedene Pflanzen des Himalayas und zahlreiche verschiedene Zubereitungsformen decken einen großen medizinischen Bereich ab. Den Großteil der Indikationen in der TM des Himalayas machen äußerliche Erkrankungsbilder wie Verbrennungen, Wunden oder Hauterkrankungen aus. Die verwendeten Pflanzenorgane sind meist die Blätter oder Wurzeln, die oft zu Pasten oder Säften weiterverarbeitet werden. Beispiele hierfür sind der Einsatz des ätherischen Öls von *Cedrus deodara* G.DON (Pinaceae) bei Wunden oder das Rhizom von *Valeriana jatamansi* G.DON (Caprifoliaceae), einer Baldrianart gegen verschiedene entzündliche Hauterkrankungen [11]. Doch auch für innerliche Erkrankungen gibt es eine Vielzahl von verwendeten Pflanzen und Darreichungsformen. So werden bspw. die Nadelblätter von *Abies spectabilis* (D. Don) MIRB. (Pinaceae) bei Husten und Erkältungen geschnupft, die gepulverten Samen von *Mucuna macrocarpa* WALL. (Fabaceae) bei Bandwürmern eingesetzt oder das Rhizom von *Costus speciosus* (J.Koenig) SM. (Costaceae) mit Zucker gemischt und bei Venenerkrankungen getrunken [6].

2.2. *Bassia longifolia* KOENIG

2.2.1. Beschreibung, kommerzielle und traditionelle medizinische Nutzung

Der indische Butterbaum wird in dieser Arbeit als *Bassia longifolia* KOENIG bezeichnet und gehört zur Familie der Sapotaceae. Es sind jedoch verschiedene Synonyme bekannt, die ebenfalls in der Literatur verwendet werden. Das meistverwendete ist *Madhuca longifolia* J.F.MACBR. Weitere zulässige Synonyme sind *Bassia villosa* WALL. EX G.DON, *Illipe malabrorum subsp. alphonsae* DUBARD und *Vidoricum longifolium* KUNTZE [12]. Es handelt sich dabei um einen immergrünen Baum, der bis zu 20 m hoch wird und in Nepal, Indien, Sri Lanka und Pakistan verbreitet ist [13]. Der Stamm ist kahl und weist eine rötlich-bräunliche Rinde auf (**Abbildung 1**).



Abbildung 1. Der Habitus von *B. longifolia* (links) und die getrocknete und zerkleinerte Rinde (rechts). Quellen: Meena Rhajbhandari (links); Peter Bürkel (rechts).

Die Blätter liegen verstreut oder in Gruppen am Zweigende. Sie sind kahl, im jungen Zustand aber behaart, breit elliptisch-lanzettlich und 12-15 nervig. Der Blütenstiel ist filzig behaart und 2,5-5 cm lang. Die Kelchblätter sind eiförmig, spitz zulaufend und behaart. Die Kronblätter sind weiß, fleischig und verlaufen eiförmig-zuspitzend. Die Blüte besitzt 20 oder mehr Fruchtblätter und die Frucht ist eine fleischige, braun behaarte Beere (**Abbildung 2**, [12]).



Abbildung 2. Die fleischigen Blüten (links), die Früchte (Mitte) und die Samen (rechts) von *B. longifolia* [14–16].

Die Blüten und Samen sind in der Lebensmittelindustrie Asiens von großer Bedeutung. So werden die Blüten gesammelt, um aus diesen Essig oder Likör herzustellen [17]. Die Samen enthalten ungefähr 50% Fett und werden deswegen zu Mahua- oder Mowrahbutter weiterverarbeitet, die in der Kosmetikindustrie oder als Lebensmittel verwendet werden [17, 18]. Nach der Extraktion des Öls bleibt

der sog. „seed cake“ übrig. Dieser ist reich an Proteinen, Zuckern und Stickstoff und wird als Dünger, als Zusatz zu Futtermittel und aufgrund der enthaltenen Saponine auch als Pestizid genutzt. [19, 20]. Alle Teile der Pflanze finden Anwendung als traditionelles Arzneimittel. Die Wurzel wird in Form einer Paste bei Bandwurminfektionen eingesetzt [21]. Wickel der Blätter werden auf Ekzeme gelegt. Die Asche der Blätter vermischt mit Ghee Butter kann auf Wunden und Verbrennungen appliziert werden [22]. Bei den Blüten herrscht die größte therapeutische Vielfalt. Diese werden zur Kühlung, als Aphrodisiakum, Expektorans und bei Flatulenz eingesetzt [23, 24]. Außerdem sollen sie die Produktion von Muttermilch erhöhen [25]. Auch die Rinde kann auf verschiedene Weisen verwendet werden: Äußerlich aufgrund der postulierten antiinflammatorischen Eigenschaften als Paste bei der Behandlung von Schnitten und Wunden oder innerlich als Dekokt bei Diabetes mellitus [13, 26].

2.2.2. Pharmakologische Untersuchungen zu *B. longifolia*

Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben gibt es eine enorme Vielfalt in den traditionellen medizinischen Anwendungen von *B. longifolia*. Von diesen sind jedoch nur sehr wenige auch wissenschaftlich untersucht. Dabei soll noch erwähnt werden, dass die Bezeichnung der untersuchten Pflanze bei der Sichtung der Literatur zu Unklarheiten geführt hat, da die Namen *Madhuca latifolia*, *M. indica* oder weitere Variationen dieser synonym zu *B. longifolia* verwendet wurden, laut aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen aber nicht korrekt ist. Dadurch ist es in vielen Studien nicht ersichtlich, welche Pflanze untersucht worden ist. Ein Überblick über die aktuelle Studienlage, bei denen es sich eindeutig um *B. longifolia* handelt, soll im Folgenden geschaffen werden. Die antioxidativen Eigenschaften eines methanolischen Extraktes aus der Rinde wurden in einem ferric-reducing antioxidant power assay untersucht. Bei diesem wird die Kapazität einer Substanz überprüft Fe^{3+} zu Fe^{2+} zu reduzieren. Dabei zeigte der Extrakt eine stärkere antioxidative Wirkung als Ascorbinsäure [27]. Die einzige qualitativ hochwertige *in vitro* Studie zur Rinde, die auch gleichzeitig die Grundlage für diese Arbeit darstellt, stammt von Zimmermann-Klemd et al., die drei verschiedene Extrakte unterschiedlicher Polarität von *B. longifolia* anfertigten. In einem scratch-Assay konnte für die Extrakte keine beschleunigte Wundheilung festgestellt werden, jedoch ein Effekt in verschiedenen immunologischen Experimenten. Der EtOAc-Extrakt inhibierte die Proliferation von T-Zellen, ohne dabei zu erhöhter Apoptose und Nekrose zu führen. Außerdem reduzierte der Extrakt die Ausschüttung von Interleukin-2 und beeinflusste die Degranulation von aktivierten T-Zellen. So konnte in verschiedenen Assays eine insgesamt antiinflammatorische Wirkung des EtOAc-Extraktes der Rinde von *B. longifolia* gezeigt werden [28]. Nach Literaturrecherche konnten zwei *in vivo* Studien gefunden werden. Sharma et al. untersuchten einen ethanolisch-wässrigen Extrakt aus den Samen bezüglich der Wundheilung in einem Mausmodell. Dabei wurde auf die verletzte Haut der Tiere eine Salbe appliziert, die den Extrakt beinhalten oder mit Flavonoiden angereicherte Fraktionen aus diesem Extrakt. Zusätzlich wurden in manche Salben noch Gold- und Silbernanopartikel hinzugefügt. Dabei zeigten allen Salben mit dem Extrakt und der mit Flavonoiden angereicherten Fraktion sowohl mit als auch ohne Zusatz von Nanopartikel eine Verbesserung der Wundheilung [29]. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2009 untersuchte die antiinflammatorischen Eigenschaften eines Ethanolextraktes der Samen. In einem Carageen-induziertem Entzündungsmodell an Ratten führte der Einsatz des Extraktes zu einer signifikanten Reduktion der Ödeme. Diese Wirkung wurde in einem Formaldehyd-induzierten Schmerzmodell und in einem Baumwollpellet-Granulom-Modell bestätigt. Die Wirkung, die von den Autoren auf die enthaltenen Saponine zurückgeführt wird, ist in der Studie teilweise stärker als die von

Diclofenac [30]. Zusammenfassend ist die Studienlage zu *B. longifolia* trotz des weiten kommerziellen sowie medizinischen Gebrauchs als unzureichend zu bewerten. Die Qualität vieler Studien ist mangelhaft und die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich. Einzig eine antiinflammatorische Wirkung der Rinde und der Samen scheint nach aktuellem Stand als wahrscheinlich.

2.2.3. Bekannte Inhaltsstoffe

Eine weitere Herausforderung bei der Recherche zu Untersuchungen betreffend der Inhaltsstoffe, betraf die Qualität der Arbeiten zur Pflanze. Generell konnten nur wenige phytochemische Studien zu *B. longifolia* gefunden werden. Zur eindeutigen Identifizierung von Inhaltsstoffen sind verschiedene spektroskopische Studien wie MS und vor allem ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie notwendig. Diese fehlen jedoch in den meisten der gefundenen Studien, die sich mit Strukturen aus *B. longifolia* befassen. In einer Arbeit aus dem Jahr 2020 wurden verschiedene traditionelle Arzneipflanzen auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Es erfolgte auch eine LC-MS/MS Untersuchung zu den Inhaltsstoffen. Dabei wurde für *B. longifolia* das Vorkommen der Flavonoidglykoside Hirsutrin und Isoorientin postuliert. Das untersuchte Pflanzenorgan ist nicht genauer spezifiziert [31]. In einer anderen Studie wird ein „phytochemisches Screening“ durchgeführt, nachdem die Autoren postulieren, dass Terpene, Anthrachinone, herzwirksame Glykoside, Saponine und Gerbstoffe enthalten seien. Es wird explizit erwähnt, dass keine Flavonoide in der Pflanze enthalten sind. Jedoch wird weder auf das Pflanzenorgan noch auf die Methoden, mit denen dieses Screening durchgeführt wurde eingegangen [32]. Insgesamt konnten nur drei Arbeiten gefunden werden, welche die Strukturen der isolierten Substanzen über NMR-spektroskopische Methoden bestätigten. Studien aus dem Jahr 1975 und 2000 konnten in den Samen die Strukturen von acht verschiedenen Saponinen nachweisen [33, 34]. Dabei handelte es sich um die Verbindungen Mi-Saponin A, B sowie um Madlongisid A-D. Außerdem konnten Mimusopsid A und 3-O- β -D-Glucopyranosyl Protobassic Acid isoliert werden. Alle Verbindungen gehören zur Gruppe der Oleanantyp-Saponine. Weiterhin konnte in einer Arbeit Myricitrin aus den Blättern isoliert werden [35]. Ein Überblick über die bekannten Verbindungen ist in **Abbildung 3** dargestellt.

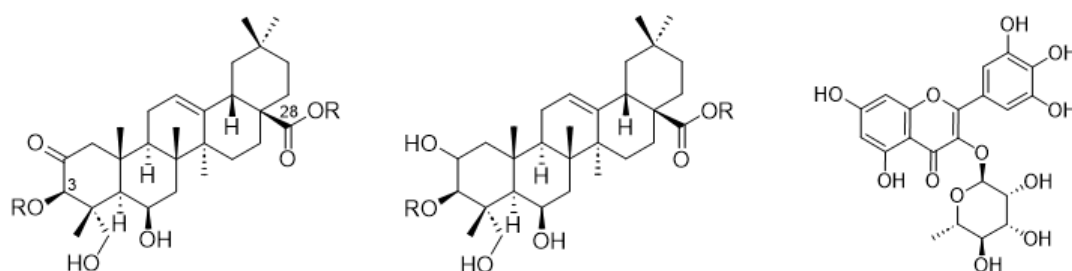


Abbildung 3. Links und in der Mitte sind die Grundstrukturen der isolierten Saponine abgebildet [33, 34]. An Position 3 und 28 sind verschiedene Zucker verknüpft. Rechts Myricitrin [35].

Somit sind nur einige Verbindungen aus den Samen und eine einzige aus den Blättern nachgewiesen. Es gibt keine Arbeit, in der Inhaltsstoffe aus der Rinde isoliert wurden. Insgesamt ist die Zahl an chemischen sowie pharmakologischen Arbeiten zu *B. longifolia* sehr gering.

2.3. Gerbstoffe

Pflanzliche Gerbstoffe sind wasserlösliche, phenolische Verbindungen, mit einem Molekulargewicht von 500-3000 Dalton. Sie besitzen adstringierende bzw. gerbende Eigenschaften. Dies liegt an den phenolischen Partialstrukturen, durch die sie in der Lage sind, intermolekulare Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zu Proteinen auszubilden. Sind diese reversibel, so spricht man von einer adstringierenden Wirkung. Es sind auch irreversible kovalente Bindungen möglich, welche bei der Gerbung gebildet werden [36]. Gerbstoffe kommen in fast allen Pflanzen vor und somit auch in der menschlichen Ernährung als pflanzlichen Lebensmittel [37]. Dabei wird von einer täglichen Gerbstoffaufnahme von 0,1-0,5 g/Tag ausgegangen [38]. Deshalb ist es umso wichtiger, die Gerbstoffzusammensetzung der verschiedenen Pflanzen sowie deren Bioverfügbarkeit, Pharmakologie und Toxikologie zu untersuchen. Strukturell unterteilen diese sich in hydrolysierbare (Gallo- und Ellagitannine) und kondensierte Gerbstoffe (Catechingerbstoffe bzw. Proanthocyanidine (PA)). Es existieren auch Gerbstoffe, die Strukturmerkmale beider Klassen aufweisen, welche dann als komplexe Gerbstoffe bezeichnet werden [39].

2.3.1. Hydrolysierbare Gerbstoffe

Diese Gruppe ist deshalb hydrolysierbar, weil sie Ester darstellen. Sie bestehen in der Regel aus einem Zucker, der als Alkoholkomponente fungiert, und einer Säurekomponente, die oft eine Gallussäure oder Derivate davon darstellt. Dabei können auch jeweils zwei Gallussäuren zu Digallussäuren untereinander verestert und mit einer unterschiedlichen Anzahl von Hydroxygruppen des Zuckers verknüpft sein. Diese Verbindungen stellen die Substanzklasse der Gallotannine dar. Das einfachste Beispiel hierfür ist die 1-O-Galloylglucose, die in den Wurzeln des Rhabarbers vorkommt, aber aufgrund des zu geringen Molekulargewichts noch nicht zu Gerbstoffen gezählt werden kann. Eine beispielhafte Verbindung, bei der alle Hydroxygruppen verestert sind, ist die 1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose, die bspw. aus Brombeerblättern isoliert wurde (**Abbildung 4**, [40]).

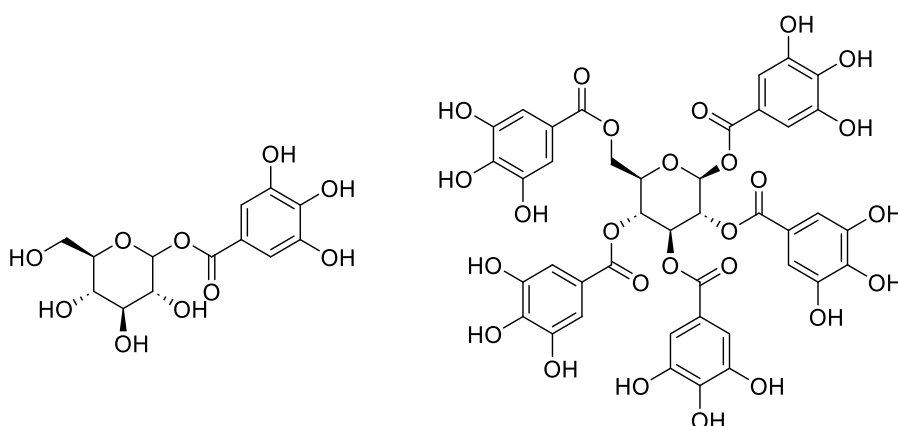


Abbildung 4. 1-O-Galloylglucose (links) aus Rhabarberwurzel und 1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose (rechts) aus Brombeerblättern [40].

2. Einleitung

Gallotannine unterscheiden sich strukturell von den Ellagitanninen. Diese sind ebenfalls aus einem Zucker und Gallussäuren aufgebaut, können aber noch zusätzlich mit Hexahydroxydiphensäure verestert sein. Diese ergeben dann nach Hydrolyse nicht nur Zucker und Gallussäure, sondern zusätzlich auch Ellagsäure, welche aus der Hexahydroxydiphensäure entsteht [39, 41]. Ein Beispiel hierfür wäre Tellimagrandin II, das für Gewürznelken beschrieben ist (**Abbildung 5**, [42]).

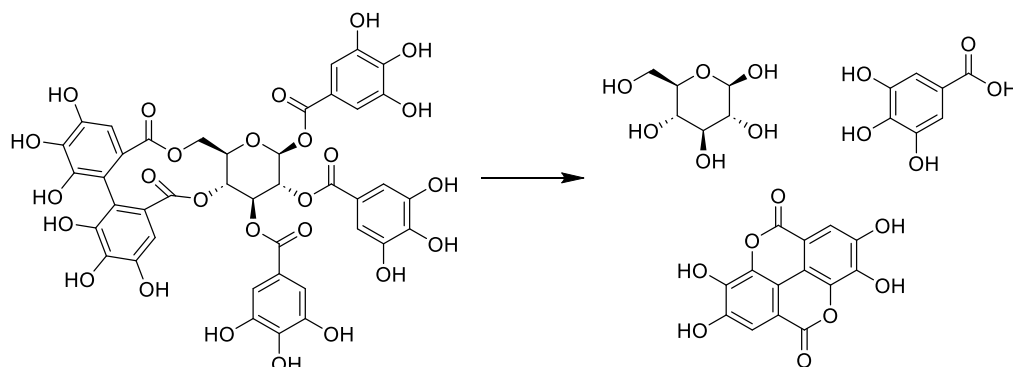


Abbildung 5. Die Struktur von Tellimagrandin II (links). Bei der Hydrolyse von Ellagitanninen kommt es zur Freisetzung der einzelnen Komponenten: β -D-Glucose, Gallussäure und zur Bildung von Ellagsäure [42].

Einfache Gallotannine kommen in der Natur nur selten vor [43]. Gallotannin-reiche Früchte sind z.B. Mangos oder Mandeln. Ellagitannine sind wesentlich weiter verbreitet, wobei bisher fast 500 verschiedene Moleküle identifiziert werden konnten. In besonders hohen Konzentrationen kommen sie in Brombeeren, Himbeeren oder in Granatäpfeln vor [41]. Die Bioverfügbarkeit wurde bisher kaum untersucht. Es gibt Studien aus den 50er Jahren, bei denen Ratten eine Mischung aus verschiedenen Gallotanninen verabreicht wurde. Dabei konnten im Urin noch einige intakte Verbindung nachgewiesen werden, sowie 4-O-Methylgallussäure, welches auch den Hauptmetaboliten darstellt, der nach der alleinigen Gabe von Gallussäure detektiert wurde [44]. Studien zu einzelnen hydrolysierbaren Gerbstoffen konnten nach intensiver Literaturrecherche nicht gefunden werden. In einer Arbeit zur Bioverfügbarkeit von Ellagsäure im Tiermodell konnte der Metabolit 3,8-Dihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on nachgewiesen werden [45]. Nach Verabreichung von Blättern von *Terminalia oblongata* an Schafe konnte dieser Metabolit ebenfalls sowie dessen 3-O-Glucuronid detektiert werden (**Abbildung 6**, [46]). In einer Humanstudie wurde nach der Gabe von Granatapfelsaft geringe Plasmakonzentrationen von Ellagsäure nach 0,5-3 h detektiert. Intakte Ellagitannine konnten nicht nachgewiesen werden [47].

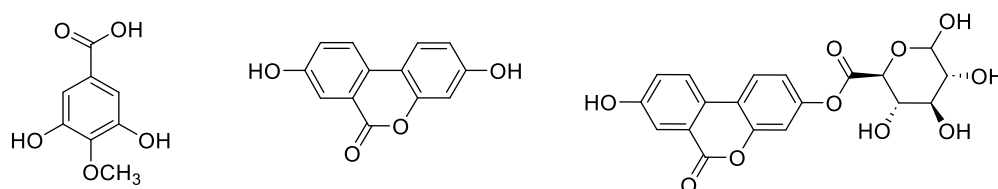


Abbildung 6. Detektierte Metaboliten nach Gabe einer Mischung aus verschiedenen Gallotanninen bzw. Gallussäure und Ellagsäure im Tiermodell: 4-O-Methylgallussäure (links), 3,8-Dihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on (Mitte) und dessen 3-O-Glucuronid (rechts) [46, 47].

Die Pharmakologie der hydrolysierbaren Gerbstoffe ist ebenfalls wenig untersucht. Die antioxidativen Eigenschaften sind dafür vielfach dokumentiert, wie auch aufgrund der phenolischen Struktur zu erwarten ist. So wurde der inhibitorische Effekt auf die Autooxidation von Ascorbinsäure untersucht, die Hemmung der Lipidperoxidation und der Effekt in verschiedenen Radikalfängerassays.

Dies gilt sowohl für Gemische als auch für Einzelsubstanzen, die dabei oftmals auch eine stärkere Aktivität als die kondensierbaren Gerbstoffe zeigten. Außerdem konnten antitumorale Eigenschaften *in vivo* nachgewiesen werden [46]. Einige Studien zeigten zudem eine antimikrobielle Aktivität. Dies gilt sowohl für Bakterien z.B. gegen *Helicobacter pylori*, *S. aureus*, *Campylobacter jejuni* als auch für Pilze (*Candida albicans*). Weiterhin konnte eine antivirale Aktivität gegen verschiedene Viren wie dem HI-Virus und gegen Herpesviren erfasst werden. [48–51]. Die Relevanz dieser pharmakologischen Erkenntnisse darf jedoch aufgrund der nichtvorhandenen Daten zum Metabolismus und der Bioverfügbarkeit mit Vorsicht beurteilt werden, da nicht bekannt ist, ob und in welcher Menge die untersuchten Substanzen nach peroraler Aufnahme im Blut des Menschen noch nachweisbar sind.

2.3.2. Proanthocyanidine

2.3.2.1. Einteilung und Vorkommen

Die Proanthocyanidine (PA) bzw. Catechingerbstoffe sind Oligo- oder Polymere von Flavan-3-olen. Dabei sind die Monomere in den meisten Fällen 4→8- oder seltener 4→6-verknüpft. Dimere bilden die sog. B-Typ PA. Eine Besonderheit stellen die A-Typ PA dar, die zusätzlich zur 4→8 noch eine 2→7-Bindung aufweisen. Die am weitesten verbreiteten Monomere sind Catechin und Epicatechin mit zwei Hydroxygruppen im B-Ring, gefolgt von Galocatechin und Epigallocatechin mit drei. Afzelechin und Epiafzelechin mit einer Hydroxygruppe an Position 4' im B-Ring kommen in der Natur am seltensten vor. Die jeweils genannten Monomerenpaare mit gleichem Hydroxylierungsgrad unterschieden sich jeweils in ihrer 2,3-Konfiguration, wobei das Präfix „Epi-“ für eine 2,3-*cis*- und die Verbindung ohne dieses Präfix für eine 2,3-*trans*-Konfiguration steht (**Abbildung 7**). Sie stellen Diastereomere (Epimere) dar.

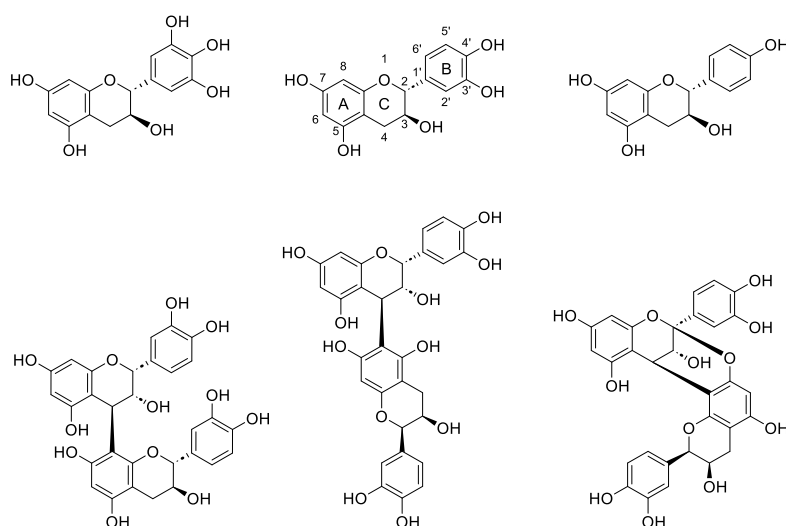


Abbildung 7. Oben die Monomere von links nach rechts: Galocatechin, Catechin und Afzelechin. Unten links und in der Mitte die beiden B-Typ PA PC B1 und PC B5 sowie rechts das A-Typ Dimer PC A2.

Die PA unterscheiden sich somit in Polymerisierungsgrad, Zusammensetzung, Verknüpfung und Stereochemie innerhalb der Monomere bzw. zwischen diesen. Von polymeren PA spricht man ab einem Molekulargewicht von etwa 3000 Dalton, was einem Polymerisierungsgrad (dP) von etwa 8-10 entspricht. Weiterhin unterscheidet die Nomenklatur Procyanidine (PC), Prodelphinidine und

Propelargonidine. Diese Klassifizierung hängt von den oberen Einheiten ab. Bei der Proanthocyanidinbestimmung, einem quantitativen Analyseverfahren für oligomere und polymere PA, werden diese mit Säure versetzt. Dabei werden die oberen Einheiten zu den entsprechenden Anthocyanidinen oxidiert. So ergeben Verbindungen mit (Epi)catechin als oberster Einheit das rotgefärbte Cyanidin, (Epi)gallocatechin violette Delphinidin und (Epi)afzelechin orange-rotes Pelargonidin. Catechingerbstoffe kommen sowohl in Arzneidrogen als auch in pflanzlichen Lebensmitteln vor. Klassische Phytopharmaka mit hohen Gerbstoffgehalten sind z.B. Eichenrinde, Tormentillwurzelstock oder getrocknete Heidelbeeren. Alle drei Drogen sind im europäischen Arzneibuch beschrieben (Ph. Eur) und werden traditionell bei unspezifischen Durchfallerkrankungen eingesetzt, was auf die adstringierende Wirkung der Gerbstoffe zurückzuführen ist [40]. Die höchsten Gehalte an PA in Lebensmitteln finden sich in den Traubenkernen von *Vitis vinifera* L., Aronia und Kakao. Bei letzterem wurden extrem hohe Gehalte von bis zu 8,1 g/100 g an kondensierten Gerbstoffen ermittelt [41].

2.3.2.2. Biosynthese

Biosynthetisch gesehen sind Flavan-3-ole $C_6-C_3-C_6$ -Körper. Dabei unterteilen sie sich in zwei Untereinheiten. Eine C_6-C_3 -Einheit, die den B-Ring bildet, sowie eine weitere C_6 -Einheit, die den A-Ring bildet. Durch Verknüpfung der beiden Ringe entsteht dann der C-Ring. Die Biosynthese ist beispielhaft für Afzelechin in **Abbildung 8** dargestellt.

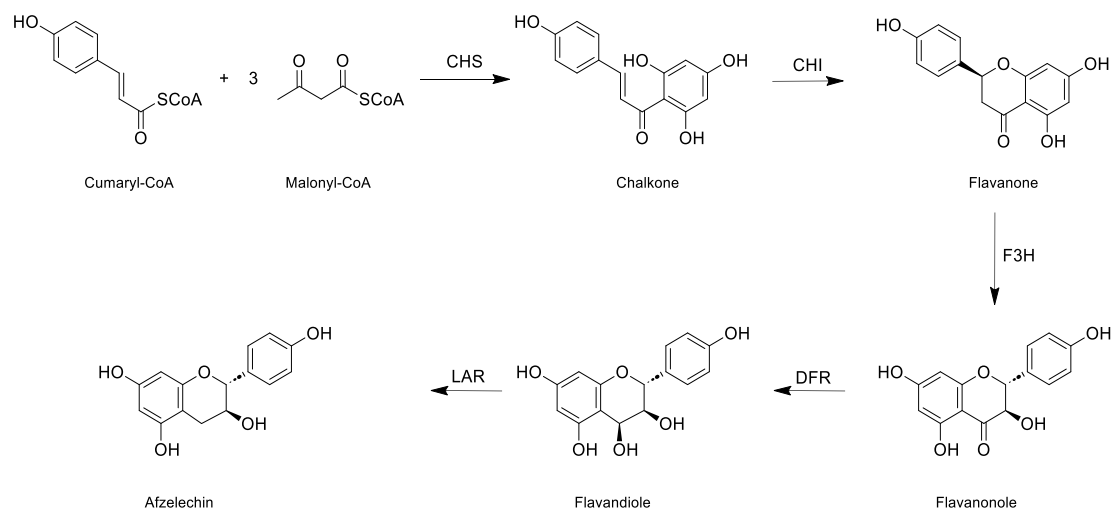


Abbildung 8. Die Biosynthese von Flavan-3-olen am Beispiel von Afzelechin. CHS = Chalkonsynthase; CHI = Chalkonflavanonisomerase; F3H = Flavan-3-hydroxylase; DFR = Dihydroflavanolreduktase; LAR = Leukoanthocyanidinreduktase [39].

Ausgangsverbindungen sind Cumaryl-CoA, welches aus dem Shikimatweg stammt und drei Einheiten Malonyl-CoA. Daraus entstehen, katalysiert durch die Chalkonsynthase (CHS) schrittweise Chalkone, bei denen der C-Ring noch nicht ausgebildet ist. Im zweiten Schritt erfolgt der Ringschluss über die Chalkonflavanonisomerase (CHI) und es entsteht ein Flavanon-Grundgerüst. Über die Flavan-3-hydroxylase (F3H) wird an Position 3 eine Hydroxygruppe eingefügt, was zur Inhaltsstoffklasse der Flavanonole führt. Vermittelt durch das Enzym Dihydroflavanolreduktase (DFR) wird das Keton an Position 4 zum Alkohol reduziert und es entstehen die Flavandiole (Leukoanthocyanidine). Über eine letzte Reduktion der Hydroxygruppe an Position 4 durch die Leukoanthocyanidinreduktase (LAR) kommt es zur Bildung der Flavan-3-ole [39]. Im Gegensatz zur Biosynthese der Monomere ist die

Oligomerisierung bzw. Polymerisierung ein vieldiskutiertes Thema und nicht zweifellos geklärt. Dabei scheinen als Intermediate Chinonmethide und Carbokationen eine Rolle zu spielen. Auch der Einfluss von Enzymen ist nicht genauer untersucht. Eine Arbeit von Xie et al. gibt zu den verschiedenen vorgeschlagenen Mechanismen eine Übersicht [52].

2.3.2.3. Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik

Wie bereits erwähnt ist die Grundvoraussetzung pharmakologischer Wirkungen die lokale Verfügbarkeit. Dies gilt für die meisten innerlichen Anwendungen, wenn die entsprechenden Verbindungen oder Arzneidrogen z.B. eine antioxidative, antiinflammatorische, antivirale, kardioprotektive oder anticancerogene Wirkung entfalten sollen. Deshalb müssen die Resorption, die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus sorgfältig bewertet und miteinbezogen werden. Während die Pharmakokinetik von Flavonoiden und einfacheren phenolischen Verbindungen besser untersucht sind, ist dies für Gerbstoffe weniger der Fall [53]. Eine eindeutige Antwort auf die Frage nach Resorption und Metabolismus kann nach heutigem Stand nicht gegeben werden. In *in vitro* Modellen konnten verschiedene Beobachtungen für den Magen gemacht werden. So wird beschrieben, dass die Oligomere in ihre Monomere gespalten werden wohingegen in anderen Studien keine signifikante Depolymerisation erfolgt [54, 55]. In einem Versuch mit Caco-2 Zellen, bei dem die Darmbarriere simuliert wird, konnte beobachtet werden, dass A-Typ PCs bis zu Tetrameren, sowie B-Typ Dimere, Trimere und Catechin in einem Größenbereich von <1% resorbiert werden. Für höher oligomere Flavan-3-ole war die Resorptionsrate ca. 10 mal geringer [56]. Studien zur Metabolisierung wurden *in vivo* meist an Tieren durchgeführt. Nachdem ein PC-reicher Extrakt aus Litschi Ratten oral verabreicht wurde, konnten Spuren von A-Typ PA sowie von Catechin und Epicatechin im Urin nachgewiesen werden [57]. Eine weitere Studie von Bittner et al. untersuchte den Urin von Schweinen nach oraler Verabreichung von PC B4, eines dimeren Flavan-3-ols. Dabei konnte eine maximale Plasmakonzentration von 4 nM des intakten Moleküls, sowie geringe Mengen der Monomere Catechin und Epicatechin detektiert werden. Weiterhin konnten methylierte und glucuronidierte Monomere als Hauptverbindungen im Blut erfasst werden [58]. Nachdem der Großteil der aufgenommenen Gerbstoffe nicht ins Blut aufgenommen werden, gelangen sie zum Colon und werden dort vermutlich durch das Mikrobiom metabolisiert. Entsprechend konnten im Tiermodell Metabolite wie Phenylvalerolactone, Phenylessig-, Phenylpropan- und Phenylbuttersäuren im Blut nachgewiesen werden [59]. Vergleichbare Verbindungen konnten auch von Deprez et al. im Rattenurin nach der Gabe einer Fraktion, angereichert mit polymeren PA aus *Salix caprea*, gefunden werden [60]. Nach Untersuchung des Blutplasmas von Menschen nach Einnahme eines Weidenrindentrockenextraktes konnte sulfatiertes und glucuronidiertes Catechin nachgewiesen werden [61]. Grimm et al. konnten geringe Catechin-Konzentrationen und ein Phenylvalerolacton ebenfalls in menschlichem Plasma nach Gabe eines Kiefernindenextraktes detektieren [62]. In **Abbildung 9** sind einige Beispiele für gefundene Metabolite dargestellt.

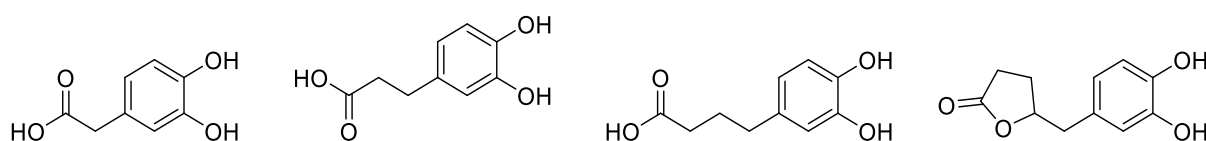


Abbildung 9. Beispiele für Abbauprodukte von Catechingerbstoffen, die *in vivo* nachgewiesen werden konnten.

2.3.2.4. Pharmakologie und Evidenz von Proanthocyanidinen

Zur Untersuchung von pharmakologischen Effekten und zur klinischer Evidenz von PA existieren zahlreiche Studien und Reviews, weswegen hier auf einen großen Datensatz zurückgegriffen werden kann [63–65]. Dabei muss aber erwähnt werden, dass viele Studien zu potenziellen Wirkmechanismen, insbesondere *in vitro* durchgeführte Zellkulturstudien, nur eine begrenzte Aussagekraft besitzen. Dies liegt wie im vorherigen Kapitel bereits ausgeführt an der geringen Bioverfügbarkeit und starken Metabolisierung der Catechingerbstoffe. Für diese Wirkungen, für die eine bestimmte Konzentration der Testsubstanzen bzw. des Extraktes ins Blut gelangen muss, besitzen nur *in vivo* und idealerweise an Menschen durchgeführte Studien eine Aussagekraft. Im Folgenden soll eine Übersicht an relevanten klinischen Studien zur Einnahme von PA gegeben sowie deren pharmakologische Mechanismen diskutiert werden. Eine Meta-Analyse von Wang et al. untersuchte den Zusammenhang von Flavonoideinnahme und kardiovaskulären Erkrankungen. Dabei wurden Unterkategorien für verschiedene Substanzklassen gebildet, sodass Anthocyanidine, Flavanone, Flavone, Proanthocyanidine etc. einzeln betrachtet werden konnten. In den einzelnen Studien wurden die Studienteilnehmer regelmäßig nach dem Konsum bestimmter Lebensmittel befragt, deren Gehalt an den betreffenden Substanzklassen bekannt ist. So konnte dann die Aufnahme dieser abgeschätzt und danach eingeteilt werden. Für PA flossen zwei Studien in die Metaanalyse mit ein, die insgesamt über 100 000 Teilnehmer umfasste. Dabei zeigte eine Studie, die knapp 100 000 Frauen und Männer umfasste eine leichte Risikoreduktion für kardiovaskuläre Erkrankungen [66]. Eine andere Studie mit über 30 000 postmenopausalen Frauen konnte ebenfalls eine Risikoreduktion zeigen, diese war jedoch nicht signifikant [67]. In der Metaanalyse kommen die Autoren zu dem Schluss, dass in der Gesamtbetrachtung das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse durch PA leicht gesenkt werden kann [68]. In Tierexperimenten konnten verschiedene Mechanismen aufgedeckt werden, wie PA das kardiovaskuläre System beeinflussen. So konnte in Mäusen, denen ein PA-reicher Extrakt oral verabreicht wurde eine verstärkte Endothel-abhängige Vasorelaxation festgestellt werden [69]. In einer anderen Studie an Ratten konnte eine Senkung der Endothelin-1 Konzentration sowie eine Hochregulierung der Produktion der endothelialen NO-Synthase beobachtet werden. Beides führt ebenfalls zur Gefäßerweiterung. Weiterhin konnte eine Senkung des Blutdrucks gemessen werden [70]. Somit scheinen verschiedene Mechanismen für die in klinischen Studien beobachteten kardioprotektiven Effekte verantwortlich zu sein. Eine andere Metaanalyse untersuchte den Zusammenhang zwischen Krebsrisiko und Frucht-/Gemüsekonsum sowie deren verschiedene phenolische Inhaltsstoffklassen. Dabei wurden verschiedene Fall-Kontroll-Studien aus der Schweiz und Italien mit über 10 000 Teilnehmern untersucht. Auch hier wurden die Patienten nach ihren Essgewohnheiten befragt und die Ernährung über einen Katalog an Lebensmitteln mit z.B. bekannten PA-Gehalt analysiert. Dabei konnte eine signifikante Risikoreduktion bei einer hohen PA-Aufnahme für die Entwicklung von Magen-, Endometrium-, Pankreas und Prostatakrebs sowie die Bildung eines kolorektalen Karzinoms festgestellt werden [71]. Auch hier kommt es zu einem Zusammenspiel verschiedener Mechanismen. So konnte gezeigt werden, dass verschiedene Apoptose-hemmende Proteine die Bildung von Enzymen oder Entzündungsmediatoren wie COX-2, die iNOS sowie verschiedene durch NF-κB induzierte Proteine gehemmt werden und das Immunsystem stimuliert wird [72]. Eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Studie aus Japan untersuchte den Einfluss der Einnahme von Tabletten mit „konzentrierten PA“ aus Traubenkernen bei menopausalen Symptomen bei knapp 100 Frauen. Dabei konnte eine Verbesserung verschiedener Symptome wie Hitzewallungen, Schlaf- oder Angststörungen festgestellt werden. Auch eine Senkung des Blutdruckes

sowie eine Zunahme der Muskelmasse wurde nach 4 und nach 8 Wochen beobachtet. Diese Studie wurde allerdings vom Hersteller des Produkts finanziert, was bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden sollte [73]. Die neurologischen Symptome betreffend schlagen die Autoren als möglichen Mechanismus die Beeinflussung von GABA_A-Rezeptoren durch PA vor, die im Mausmodell beobachtet werden konnte [74]. In einer weiteren randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie wurde der Einsatz eines Fertigarzneimittels (FAM) aus *Croton lechleri*, MÜLL.ARG. (Euphorbiaceae), des Drachenblutbaums, bei Reizdarmsyndrom mit Durchfallsymptomatik untersucht. Als Hauptbestandteil des FAM wurden oligomere PA identifiziert. In der Studie wurden 250 Patienten in einem Zeitraum von 12 Wochen untersucht. Dabei zeigte das Medikament eine signifikante Verringerung der Stuhlfrequenz sowie eine Verlängerung von aufeinanderfolgenden schmerzfreien Tagen bei betroffenen Frauen. Auch diese Studie wurde vom Hersteller finanziert [75]. Aufgrund der adstringierenden Wirkung ist Durchfall eine typische Indikation für gerbstoffhaltige Drogen (siehe Kapitel **2.3.2.1**). Diese wirken lokal auf der Oberfläche von Schleimhäuten und bilden dabei eine Koagulationsmembran. Die Gerbstoffe bilden mit den Proteinen in der obersten Hautschicht wasserunlösliche Assoziate und verschließen somit oberflächlich das Gewebe. Dies soll reizmildernd, entzündungshemmend und antisekretorisch wirken [76]. Zusammenfassend betrachtet ist die Evidenz bezüglich der Verringerung von kardiovaskulären Erkrankungen und des Risikos, an bestimmten Krebsarten zu erkranken, klinisch belegt. Einige kleinere Studien zum Einsatz gegen Symptome bei menopausalen Frauen sowie beim Reizdarmsyndrom deuten auch für diese Indikationen einen positiven Effekt von PA an. Dabei gibt es für die einzelnen Anwendungsgebiete jeweils keinen klar untersuchten pharmakologischen Mechanismus, sondern eine Vielzahl davon durch deren Zusammenspiel der Effekt verursacht wird. Weiterhin zu beachten gilt, dass in den erwähnten Untersuchungen nie eine Einzelsubstanz verabreicht wurde. Es handelte sich stets entweder um Vielstoffgemische in Form von Nahrungsmitteln, in denen auch noch viele andere Substanzklassen enthalten sind oder in Form von Zubereitungen, angereichert mit PA verschiedener Struktur. Dies gilt sowohl für die klinischen Studien als auch für die Arbeiten zur Pharmakologie dahinter.

2.4. Pflanzliche Arzneimittel bei Diabetes mellitus

Unter Diabetes mellitus versteht man eine Stoffwechselerkrankung, die durch absoluten oder relativen Insulinmangel gekennzeichnet ist und mit chronischer Hyperglykämie einhergeht. Insulin wird von den β -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas gebildet und führt zu einer Abnahme des Blutzuckerspiegels durch Aufnahme von Glucose in fast alle Körperzellen. Dabei unterscheidet man in zwei Arten: bei Typ-I-Diabetes kann der Körper infolge der Zerstörung von Pankreasgewebe (z.B. durch Autoimmunreaktionen) kein Insulin mehr bilden. Typ-II Diabetes beruht hingegen sowohl auf einer Insulinsekretionsstörung als auch auf einer Insulinresistenz, welche sich häufig durch eine ungesunde Lebensweise entwickelt. Unbehandelt können beide Typen zu schwerwiegenden Folgeerkrankungen wie diabetische Mikro- oder Makroangiopathien, Retinopathien oder Neuropathien bis hin zum lebensbedrohlichen diabetischen Koma führen [77, 78]. Im Folgenden soll ein Überblick über die traditionelle Behandlung mit Arzneipflanzen und ihre Wirkmechanismen gegeben werden.

2.4.1. α -Glucosidasen als Target

Patienten, die unter Typ-I Diabetes leiden erhalten als Therapie immer eine Form der Insulingabe. Bei Patienten mit Typ-II Diabetes ist dies hingegen die letzte Therapieoption. Hier werden Wirkstoffe eingesetzt, die indirekt die Insulinsekretion erhöhen wie bspw. GLP1-Rezeptoragonisten, Sulfonylharnstoffe oder die sog. Glinide. Eine andere Möglichkeit ist, insulinunabhängig eine Senkung des Blutzuckerspiegels zu bewirken. Dies funktioniert z.B. durch eine verminderte Rückresorption von Glucose in der Niere durch SGLT2-Inhibitoren, eine verminderte Gluconeogenese in der Leber durch Metformin oder indem die Aufnahme von Zuckern ins Blut durch Hemmung der Spaltung von Polysacchariden im Darm verringert wird. [79, 80]. Letzteres erfolgt bspw. durch die Hemmung sog α -Glucosidasen. Der erste Schritt bei der Verdauung von Polysacchariden zu Di- oder Trisacchariden erfolgt durch α -Amylasen. Diese können die Darmwand aber noch nicht passieren und werden deshalb von α -Glucosidasen zu Monosacchariden weiter abgebaut. Diese sind auf den Mikrovilli in den oberen Dünndarmabschnitten lokalisiert. Das hat den Vorteil, dass auch *in vitro* Untersuchungen eine hohe Aussagekraft besitzen, da hier die Verfügbarkeit am Wirkort gesichert ist und die Metabolisierung, die z. B. erst im Colon stattfindet, auch vernachlässigt werden kann. Beim Menschen kommen zwei verschiedenen Isoformen des Enzyms vor. Die Maltase-Glucoamylase (MGAM) spaltet ausschließlich α -1,4-Verknüpfungen, die Sucrase-Isomaltase (SI) zusätzlich noch α -1,6-Bindungen (**Abbildung 10**).

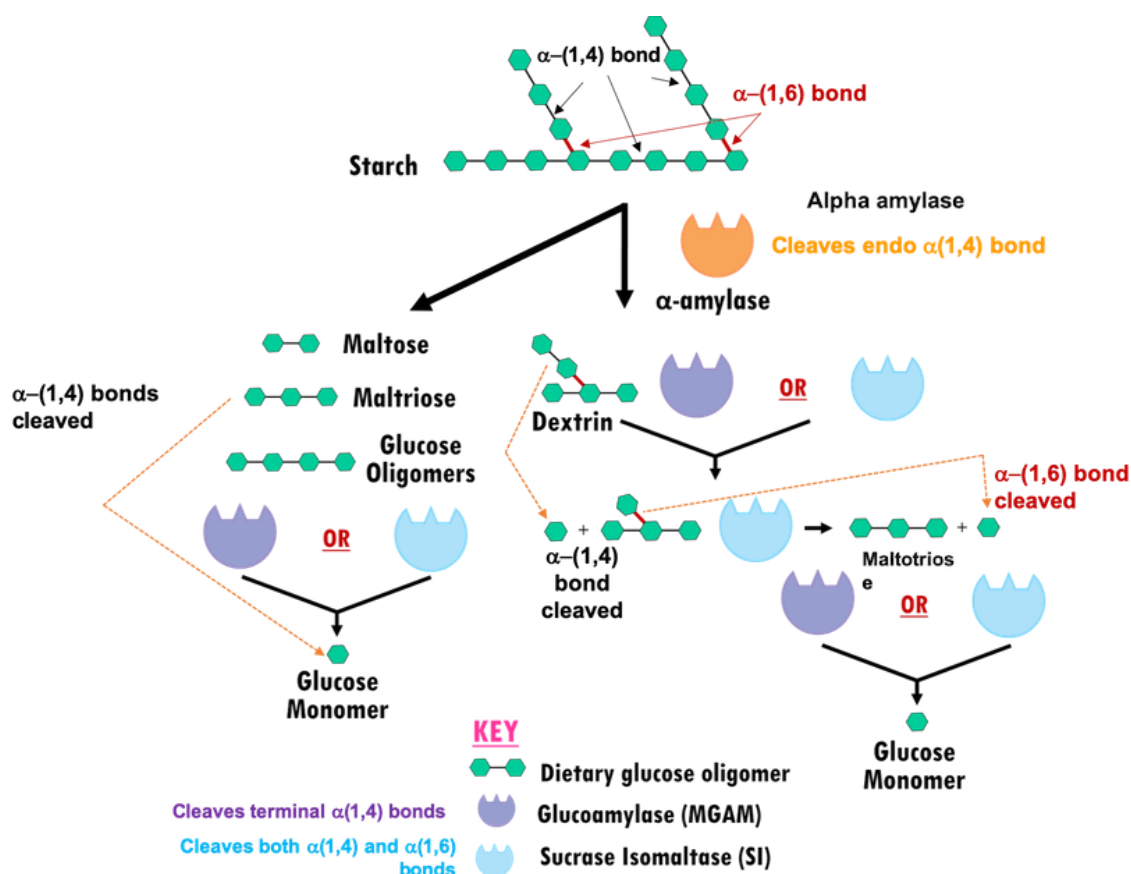


Abbildung 10. Abbau von Stärke. Die α -Amylase spaltet Amylopectin und Amylose in Oligosaccharide, die dann durch die zwei verschiedenen α -Glucosidasen (MGAM und SI) zu α -Glucose abgebaut werden [81].

Das Endprodukt des Stärkeabbaus ist α -Glucose, welches dann ins Blut aufgenommen wird und zu einem Anstieg des Blutglucosespiegels führt [81, 82]. Demnach können Inhibitoren dieser Enzyme bei D. mellitus eingesetzt werden. In der europäischen Union sind dazu die Arzneistoffe Acarbose und

Miglitol zugelassen, werden aber in den deutschen Leitlinien zur medikamentösen Therapie von D. mellitus Typ-II nicht mehr erwähnt [80, 83]. In den meisten Arbeiten zur Untersuchung von Naturstoffen auf α -Glucosidasehemmung finden die zwei Formen der α -Glucosidase keine Berücksichtigung. Die Enzyme unterscheiden sich neben unterschiedlichen Substratspezifitäten auch dadurch, dass die SI eine höhere Hydrolyserate als die MGAM aufweist, letztere dafür stärker exprimiert wird [80]. Für *in vitro* Testungen sind verschiedene α -Glucosidasen zum Kauf erhältlich. Es konnte gezeigt werden, dass die α -Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bierhefe) isoliert der SI entspricht und die aus *Geobacillus stearothermophilus* isoliert der MGAM. [84]. Letztere wurde für den in dieser Arbeit durchgeführten Assay verwendet.

2.4.2. Die Anwendung gerbstoffhaltiger Arzneipflanzen bei Diabetes

Eine Vielzahl von Forschungsarbeiten beschäftigt sich mit der Untersuchung von Pflanzen, die traditionell bei D. mellitus eingesetzt werden. In Zentralasien werden die Blüten der Gattung *Artemisia* (Asteraceae) volksmedizinisch eingesetzt. Dabei konnte die Hemmung der α -Glucosidase festgestellt werden sowie des Proteins Tyrosin Phosphatase 1B, einem Schlüsselprotein in der Insulinrezeptoraktivität [85, 86]. Viele weitere Pflanzen, bei denen Gerbstoffe bzw. Polyphenole nachgewiesen werden konnten, werden ebenfalls bei Diabetes angewendet. Für *Lysiphyllum strychnifolium* (Craib) A.SCHMITZ (Fabaceae), einer in Thailand heimischen Pflanze, konnte u.a. eine α -Glucosidasehemmung festgestellt werden. Eine Reduzierung des Blutzuckerspiegels *in vivo* an Mäusen konnte ebenfalls gemessen werden [87]. Für die Gattung *Cinnamomum* (Zimt), welche seit Jahrtausenden nicht nur als Gewürz, sondern auch als Arzneimittel in der traditionellen Medizin angewendet wird [88], konnte ebenfalls eine α -Glucosidasehemmung ermittelt werden, was die Autoren auf die phenolischen Inhaltsstoffe zurückführen [89]. Der gemeine Odermennig, *Agrimonia eupatoria* KITAM. (Rosaceae), der auch in Europa eine traditionelle Anwendung als Arzneimittel findet, zeigte bei Ratten mit Streptozotocin-induziertem D. mellitus antidiabetische Aktivität [90]. Bei den genannten Studien wurden stets Pflanzenextrakte getestet. Es existieren auch kleinere klinische Studien, die den Blutzuckerspiegel von Patienten bei der gleichzeitigen Gabe von gerbstoffhaltigen Extrakten untersuchten. Dabei konnte dieser durch die regelmäßige Gabe von Traubensaft, Rotwein oder Seekiefer-Rindenextrakt signifikant über mehrere Wochen gesenkt werden [91, 92]. Für PA im speziellen konnten zahlreiche Mechanismen, die zu einer Senkung des Blutzuckerspiegels führen, gefunden werden. So konnte gezeigt werden, dass die Glucoseaufnahme in die Leber gesteigert, die Expression von Glucosetransportern hochreguliert, die Apoptose von β -Zellen im Pankreas inhibiert und die Regulierung verschiedener glykolytischer Enzyme beeinflusst wird. Eine Übersicht über diese und andere erforschte Mechanismen findet sich bei Gonzalez-Abuin et al. [93]. Um die inhibitorische Wirkung der Flavan-3-ole auf die α -Glucosidase besser zu verstehen, wurde die Interaktion mit PC B2 in einem Modell von Dai et al. simuliert (**Abbildung 11**). Da für die menschlichen α -Glucosidasen keine Kristallstruktur zur Verfügung steht, wurden über den sog. BLAST-Algorithmus ähnliche Sequenzen in einer Datenbank gesucht, für die Kristallstrukturen vorhanden sind und so das Enzym zusammengesetzt. Als aktives Zentrum wurde dasselbe wie bei der Isomaltase aus *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt, wobei die Sequenzidentität bei 93% lag und somit deutlich über den 60%, die in der Literatur als Grenze für derartige Simulationen angesehen werden. Über Fluoreszenzspektroskopie, Circular dichroismus und thermodynamische Berechnungen konnte auch experimentell die Bindung von PC B2 an α -Glucosidase bestätigt werden. Dabei wurden als

Hauptwechselwirkungen hydrophile Wasserstoffbrückenbindungen identifiziert. Hydrophobe π - π -, π -Alkyl- und π -Amid-Wechselwirkungen konnten ebenfalls detektiert werden. Somit konnte bewiesen werden, dass PC B2, ein dimeres PA, an das aktive Zentrum der α -Glucosidase bindet und somit zur kompetitiven Hemmung führen könnte [94]. Diese Experimente könnten dabei helfen, Struktur-Wirkungsbeziehungen speziell für PA zu ermitteln. Ob mit steigendem dP auch die Hemmung steigt, ist in der Literatur nicht eindeutig belegt und die Erkenntnisse zum Teil widersprüchlich [95–98]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dies daher experimentell weiter untersucht werden.

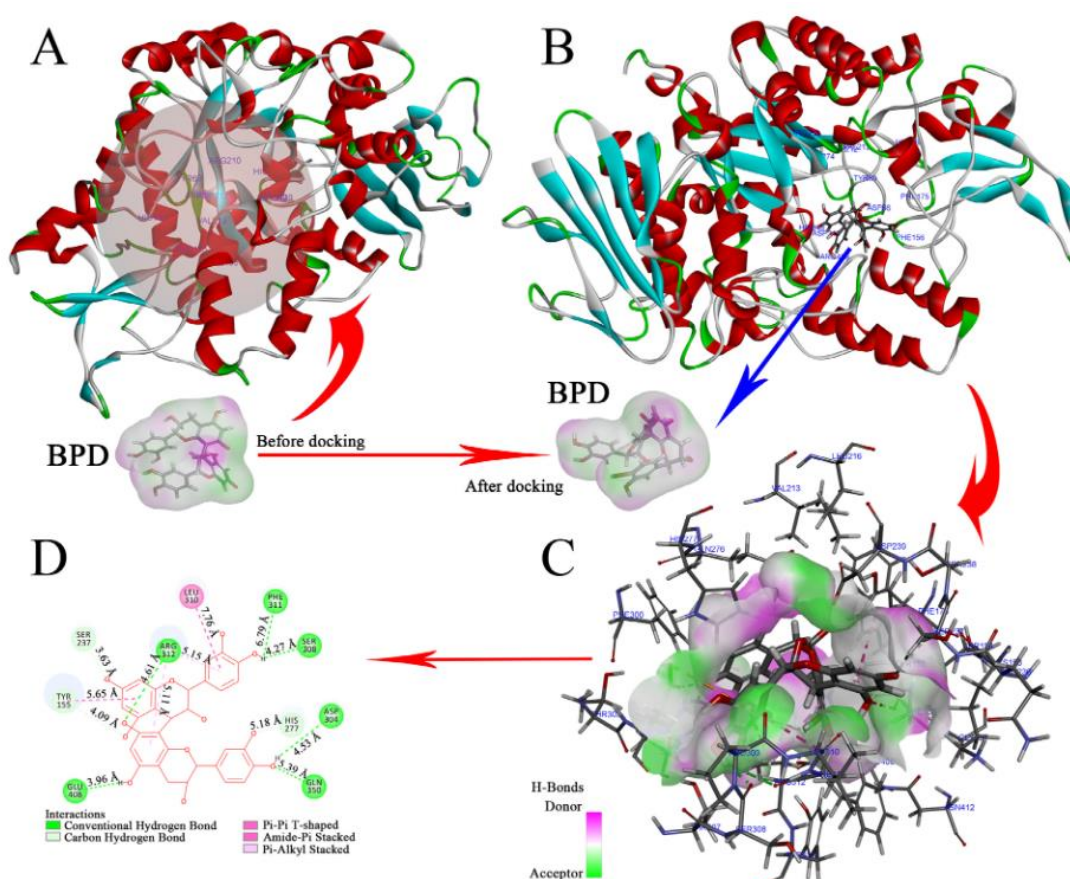


Abbildung 11. Dockingmechanismus von PC B2 mit α -Glucosidase. Die 3D-Struktur des Enzyms (A). Konformationsänderung des Enzyms nach Bindung von PC B2 (B). Die Art der Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym im 3D-Modell (C). 2D-Darstellung der Wechselwirkungen mit den beteiligten Aminosäuren (D) [94].

2.5. Traditionelle Arzneimittel zur Wundheilung

Kommt es zur Verletzung von Blutgefäßen beginnt die Wundheilung, die in drei Phasen eingeteilt wird. In der inflammatorischen Phase kommt es initial, vermittelt durch Thromboxan A₂, zu einer Vasokonstriktion. Außerdem starten die Thrombozytenaggregation und die Bildung eines Fibrinnetzwerkes, um die Wunde zu verschließen. Dabei kommt es zur Migration zahlreicher Immunzellen wie Monozyten, Granulozyten und Makrophagen in das Läsionsgebiet. Diese setzen viele verschiedene Stoffe wie lysosomale Enzyme, Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine frei, welche die Wunde säubern und Viren oder Bakterien abtöten sollen. Hier werden auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert, die zum einen als second messenger für viele weitere Prozesse fungieren und zum anderen über ihre Reaktivität ebenfalls zur Zerstörung von Pathogenen

führen [99]. In der Proliferationsphase wird dann neues Gewebe aufgebaut. Fibroblasten bilden Kollagen und ersetzen dadurch das Fibrinnetzwerk, Keratinozyten bilden die neuen Epithelzellen und durch Myofibroblasten kommt es zur Wundkontraktion. In dieser zweiten Phase spielen wiederum zahlreiche Wachstumsfaktoren eine Rolle wie VEGF, PDGF oder TGF- β . In der Remodellierungsphase kommt es dann zum Umbau des neuen Gewebes, bspw. indem das neugebildete Kollagen durch einen anderen Kollagentyp ersetzt wird. Außerdem findet die Angiogenese, also die Gefäßneubildung hauptsächlich in dieser Phase statt. Sie ist ebenso wie die vorherigen über viele Wachstumsfaktoren und zusätzlich Hypoxie-gesteuert. Somit gibt es aufgrund der Beteiligung vieler verschiedener Zelltypen, Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren, Enzymen etc. zahlreiche Angriffspunkte, um die Wundheilung zu beeinflussen bzw. zu beschleunigen [100–102].

2.5.1. Wundheilungsfördernde Arzneipflanzen

In der Literatur sind zahlreiche Pflanzen beschrieben, die weltweit traditionell zur Wundheilung angewendet werden [103–105]. Bei der Recherche fiel auf, dass sich unter diesen besonders viele in der Familie der Asteraceae befinden. Einige ausgewählte Beispiele sollen im Folgenden gegeben werden. Die Blüten von *Calendula officinalis* L. (Ringelblume) gelten als wundheilungsfördernd, werden traditionell in Europa angewendet und kommen auch in verschiedenen FAM zur Anwendung. Dabei konnte die antiinflammatorische Wirkung der Extrakte *in vivo* nachgewiesen werden. Die Wirkung wird hier den Triterpenalkoholen und ihren Estern zugeschrieben [106]. Ein wässrig-ethanolischer Extrakt aus der Pflanze zeigte im Tiermodell eine direkte Wundheilungsförderung. Hierfür wurde eine Verkürzung der Epithelisierungsphase und positive Einflüsse auf die Kollagenreifung beobachtet [107, 108]. Eine im Jahr 2016 durchgeführte klinische Studie konnte dies auch am Menschen bestätigen. Bei 60 Studienteilnehmenden mit einem schlecht verheilenden Venenulkus am Bein wurde 30 Wochen lang ein Extrakt der Pflanze oder Placebo auf die Wunde gegeben. Dabei konnte eine vierfach schnellere Wundheilung als in der Kontrollgruppe beobachtet werden [109]. Verschiedene Arten der Gattung *Achillea* (Schafgarbe) konnten ebenfalls als wundheilungsfördernd identifiziert werden. In *in vitro* Untersuchungen zu *A. millefolium* var. *manshurica* KITAM. wurde gezeigt, dass Extrakte daraus die Kollagensynthese und die Ausdifferenzierung von Keratinozyten beschleunigen sowie TGF- β hochregulieren. Dafür werden von den Autoren phenolische Verbindungen wie Chlorogensäure, Apigenin-7-O-glukosid und Schaftosid verantwortlich gemacht [110]. Eine weitere in Europa heimische Art, für die wundheilungsfördernde Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, ist *Silybum marianum* (L) GAERTN., die Mariendistel. Dies wurde nicht nur für den Extrakt nachgewiesen, sondern auch für dessen Inhaltsstoffe. Der Silymarinkomplex, ein Gemisch der Flavonoide Silibinin, Isosilibinin, Silicristin und Silidianin erhöhte die Epithelisierungsrate und schützt Fibroblasten vor oxidativem Stress [111, 112]. Silibinin konnte den Wundverschluss in Ratten beschleunigen [113]. Die Anwendung eines Silibinin-Gels konnte ebenfalls die Gewebe-Reepithelisierung und die Kollagenproduktion im Tiermodell erhöhen [114]. Eine weitere Pflanze aus der Familie der Asteraceae, die zur Behandlung von Wunden eingesetzt wird, ist die v.a. in Mexiko verbreitete Pflanze *Ageratina pichinchensis* (Kunth) R. M. KING & H. ROB. In einer kleinen klinischen Studie zur Behandlung von Venenulcera am Bein konnte die Zeit zur Heilung dieser durch die Behandlung mit einem standardisierten Extrakt verkürzt werden [115]. In einer bioaktivitätsgeleiteten Untersuchung, in der systematisch die Fraktionen ausgewählt wurden, welche die proliferative Kapazität von Hautzellen am meisten erhöhen, konnte Galaktin-7-O-glukosid als

2. Einleitung

Substanz mit der höchsten Aktivität identifiziert werden [116]. In **Abbildung 12** ist eine Übersicht über Verbindungen gegeben, für die eine wundheilungsfördernde Wirkung postuliert wird.

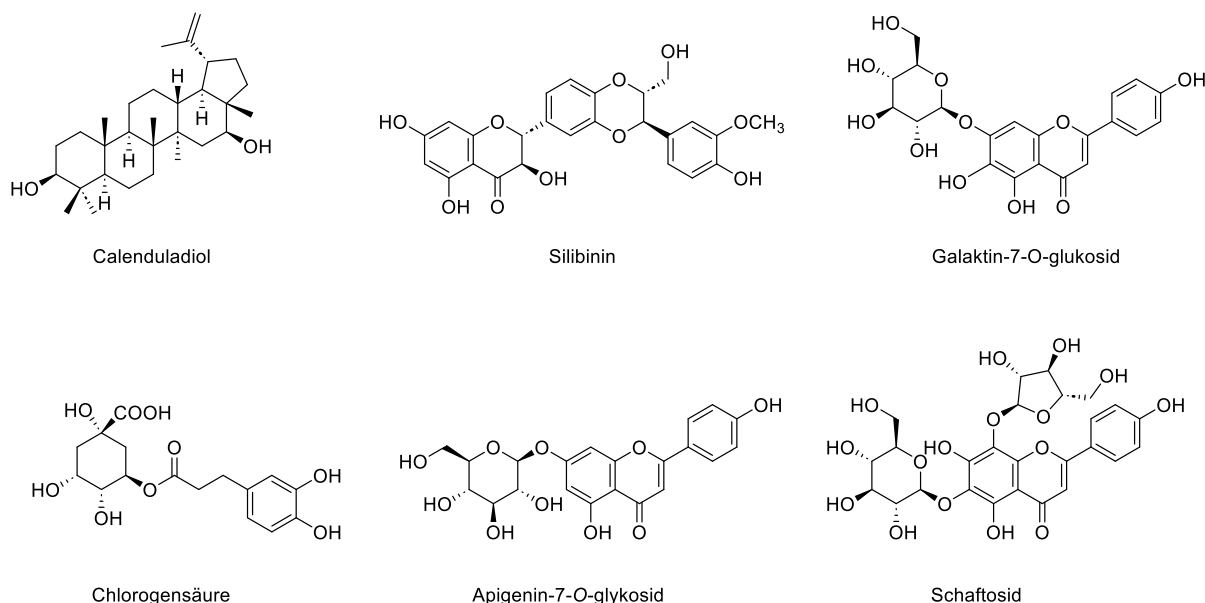


Abbildung 12. Übersicht über Verbindungen, für die eine wundheilungsfördernde Wirkung postuliert wird.

2.5.2. Antibakterielle Wirkung von Proanthocyanidinen

Bei schlecht heilenden Wunden kommt es oft zum bakteriellen Befall. Deshalb ist es wichtig diesem vorzubeugen bzw. ihn zu bekämpfen [117]. In der Literatur finden sich zahlreiche Studien zu antibakteriellen Untersuchungen zu Gerbstoffen. Hierbei wurde der Effekt auf verschiedene Bakterienstämme sowohl von gerbstoffhaltigen Extrakten als auch von Einzelsubstanzen nachgewiesen [118–121]. Dennoch stellt sich die Studienlage zu antibakteriellen Effekten einzelner PA sehr heterogen dar. Nur für A-Typ PA konnte eine gesicherte antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden. Diese werden für die Wirkung in Cranberry-Extrakten oder -Säften (*Vaccinium macrocarpon* AITON, Ericaceae) verantwortlich gemacht, wobei es sich dabei aber nicht um Studien handelt, welche Wundheilung untersuchten. So können A-Typ PA u.a. die Adhärenz von *Escherichia coli* an Epithelzellen inhibieren und dadurch das Risiko eines Harnwegsinfektes erniedrigen [122]. Diese Wirkung wurde in verschiedenen klinischen Studien untersucht, wobei sich für Frauen ein unterschiedliches Bild zeigte. Meist konnte dabei eine signifikante Reduktion bei der Häufigkeit von Harnwegsinfekten festgestellt werden, bei anderen war dieser Effekt nicht signifikant oder es konnte kein Unterschied zur Placebogruppe ermittelt werden. In einer Cochrane Meta-Analyse kommen die Autoren daher zu dem Schluss, dass eine generelle Empfehlung zur Einnahme von Cranberrysaft zur Prävention von Harnwegsinfekten bei Frauen aufgrund der vielen nicht signifikanten Ergebnisse, nicht gegeben werden kann [123]. Bei Kindern ist die Studienlage zugunsten der Einnahme eines Cranberrysaftes zur Prävention etwas besser. Hier konnten drei unabhängige Studien einen positiven Effekt nachweisen [124]. Weiterhin konnte die antibakterielle Wirkung gegen *Helicobacter pylori* und äußerlich bei *Streptococcus aureus*, eine häufige Ursache für Karies, nachgewiesen werden [125, 126]. Arbeiten zu anderen einzelnen Flavan-3-olen fallen sehr unterschiedlich aus. So konnte Wang et al. eine MHK für PC B3 gegen *S. aureus* von 111 μM ermitteln [120], Karioti et al. jedoch eine MHK von 0,43 μM für die selbe Substanz gegen den selben Keim [121]. Dem entgegen steht eine Arbeit von de Bruyne et al., die

ein breiteres Spektrum von Monomeren, Dimeren und Trimeren gegen verschiedene Bakterienstämme untersuchten und für kein Flavan-3-ol einen antibakteriellen Effekt gegen *S. aureus* nachweisen konnten. Dies könnte auch an der großen Vielfalt der verwendeten Methoden zur MHK-Bestimmung liegen. Zudem finden sich in vielen Veröffentlichungen keine genauen Angaben zur Methodik oder der Hinweis, dass die MHK lediglich visuell ermittelt wurde [120, 121]. Diese wird meist auch mittels Agardiffusionsmethode oder durch Ausmessen der Hemmhöfe bestimmt [127, 128].

2.6. Zielsetzung

Für *B. longifolia* sind zahlreiche traditionelle medizinische Anwendungen überliefert. Für diese existieren aber kaum Studien, welche diese pharmakologisch untersucht haben. Bezüglich der Inhaltsstoffe gibt es nur valide Arbeiten zur Isolierung von Saponinen aus den Samen und einem einzigen Flavonoid aus den Blättern. Für alle anderen Pflanzenteile gibt es keine Studien zur Isolierung und Strukturaufklärung mittels NMR-spektroskopischer Methoden (Stand: 20.03.2023; SciFinder®, PubMed®). Deswegen sollte in der vorliegenden Arbeit das Inhaltsstoffspektrum eines methanolischen Extrakts aus der Rinde untersucht werden. Dabei wurde sich auf die Isolierung oligomerer Flavan-3-ole fokussiert sowie auf die Charakterisierung der polymeren PA und die Bestimmung des Gerbstoffgehaltes. Aus den vielfältigen pharmazeutischen Anwendungen für die Rinde der Pflanze wurden äußerlich der Einsatz zur Wundheilung und innerlich gegen Diabetes mellitus thematisch aufgegriffen. Für diese sollte mittels geeigneter Assays eine pharmakologische Grundlage geschaffen werden. Um die Bedeutung der Gerbstoffe hier zu ermitteln, sollte deren antibakterielle Aktivität sowie ihre Fähigkeit getestet werden, das Enzym α -Glucosidase zu hemmen.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

3.1. Hintergrund und Zielsetzung

Hintergrund dieser Dissertation sind Arbeiten, die im Zeitraum von 2017-2019 an der Universität Regensburg und Freiburg durchgeführt wurden. Hierbei wurden von Zimmermann-Klemd et al. neun verschiedene Arzneipflanzen untersucht. Diese bei Wundheilung traditionell angewandten Pflanzen wurden in Nepal gesammelt und getrocknet. In Regensburg wurden aus allen Pflanzen jeweils drei verschiedene Extrakte (PE, EtOAc und MeOH) hergestellt und an der Universität Freiburg in einem Wundheilungsassay auf verschiedene immunologische Eigenschaften hin weiter untersucht. Dabei zeigte der EtOAc-Extrakt von *B. longifolia* vielversprechende Effekte [28], weshalb mit einer größeren Menge und einem größeren Extraktansatz daraus eine bioaktivitätsgeleitete Isolierung von Inhaltsstoffen durchgeführt werden sollte. Dies stellte sich allerdings im Laufe des Aufarbeitungsprozesses als schwierig heraus. Obwohl zur Extraktion über ein Kilogramm getrocknete Rinde zur Verfügung stand, konnten nur 13,4 g EtOAc-Extrakt gewonnen werden. Im Laufe der weiteren Fraktionierung konnte festgestellt werden, dass Gerbstoffe eine dominante Inhaltsstoffklasse des EtOAc-Extrakts darstellen. Um die Isolierung dieser zu erleichtern, wurde auf den MeOH-Extrakt gewechselt, da hier aufgrund der höheren Polarität der erwartete Gerbstoffgehalt wesentlich höher war. Nach umfassender Literaturrecherche konnten keine Arbeiten gefunden werden, die sich mit der Charakterisierung von Inhaltsstoffen der Rinde von *B. longifolia* auseinandersetzten. Daraufhin wurde beschlossen, endgültig den Extrakt zu wechseln, um ein umfassendes Gerbstoffprofil der Rinde von *B. longifolia* zu erstellen. Dieses sollte die Isolierung einzelner Gerbstoffe, die Charakterisierung der enthaltenen polymeren Proanthocyanidine und den Gesamtgerbstoff- bzw. Phenolgehalt umfassen. Um bei der traditionellen Anwendung von Wunden zu bleiben, sollten die isolierten Substanzen und Fraktionen anschließend auf beschleunigte Wundheilung und auf antibakterielle Effekte getestet werden. Aufgrund der weiteren traditionellen Indikation Diabetes mellitus und wegen der generell positiven Studienlage bezüglich der antidiabetischen Eigenschaften von Gerbstoffen [41] wurde außerdem beschlossen, auf die Hemmung von α -Glucosidase zu testen.

3.2. Isolierung von Inhaltsstoffen aus dem EtOAc-Extrakt

3.2.1. Isolierungsstrategie

Zu Beginn der Arbeit stand aufgrund der beobachteten Effekte von Zimmermann-Klemd et al. der EtOAc-Extrakt im Fokus. Hier stand keine besondere Inhaltsstoffklasse im Vordergrund, da es bisher keine Daten in der Literatur zum Inhaltsstoffspektrum der Droge gab. Um das gesamte Extraktmaterial möglichst effizient aufzuarbeiten, wurde mit einer Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20 begonnen, da hier im Vergleich zu anderen zur Verfügung stehenden Methoden die größte Menge an Extrakt aufgeben werden konnte. Anschließend erfolgten verschiedene Fraktionierungsschritte wie

eine Flash-Chromatographie auf Kieselgel oder Methoden basierend auf der präp. und anal. HPLC. Das Isolierungsschema ist in **Abbildung 13** dargestellt.

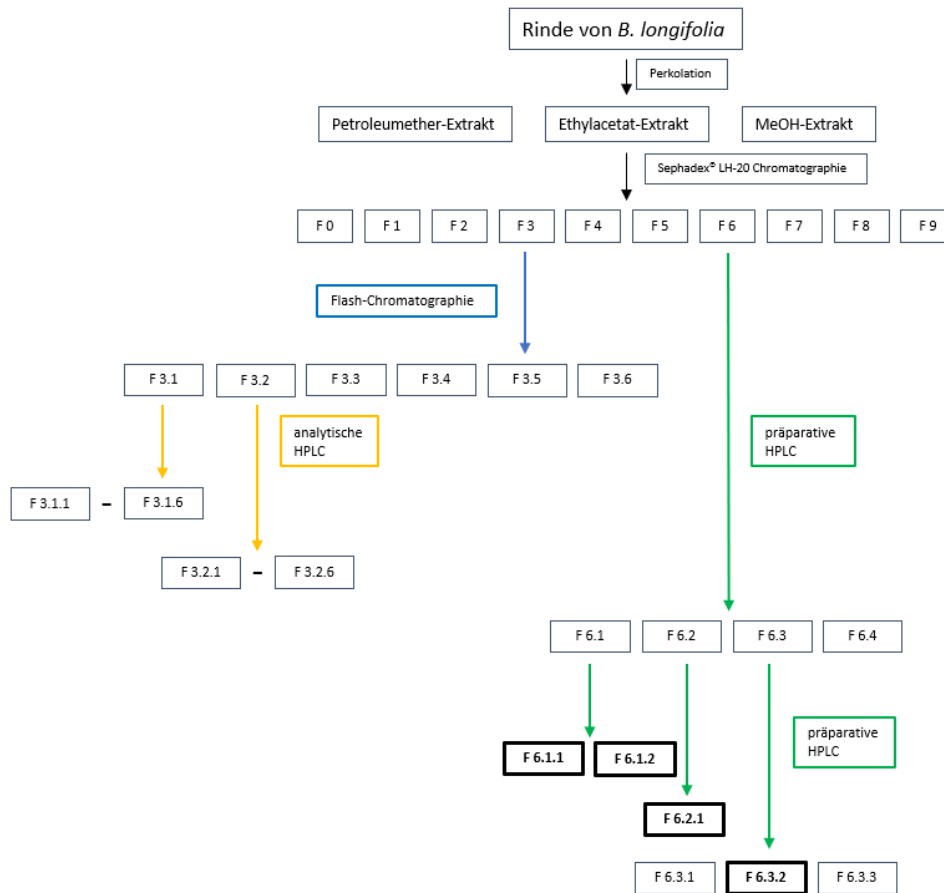


Abbildung 13. Isolierungsschema mit allen Fraktionen, die aus dem EtOAc-Extrakt gewonnen wurden. Nach der Extraktion erfolgte eine erste Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20. Danach folgte ein Flash-Chromatographie mit F3 bzw. direkt präp. HPLC mit F6. F 3.1-F 3.6 wurden anschließend mit der anal. HPLC weiter fraktioniert, wohingegen F6 mit einer anderen Methode auf der präp. HPLC zu Reinsubstanzen weiterfraktioniert wurde, sodass insgesamt vier mit fettem Rahmen gekennzeichnete Isolate gewonnen wurden (F 6.1.1, F 6.1.2, F 6.2.1, F 6.3.2).

3.2.2. Extraktion

Bei der Extraktion war es wichtig, diese schonend und erschöpfend durchzuführen, weshalb eine Perkolation in Glassäulen bei Raumtemperatur erfolgte. Da zunächst noch keine Inhaltsstoffgruppe im Fokus stand, wurden alle Polaritätsbereiche abgedeckt. Deshalb wurde zuerst mit dem unpolaren PE, danach mit mittelpolarem EtOAc und zum Schluss mit polarem MeOH extrahiert. So konnten die in Kapitel 3.6.3 beschriebenen Extrakte gewonnen werden. Eine Darstellung der ersten Übersichts-DCs ist in **Abbildung 14** zu finden.

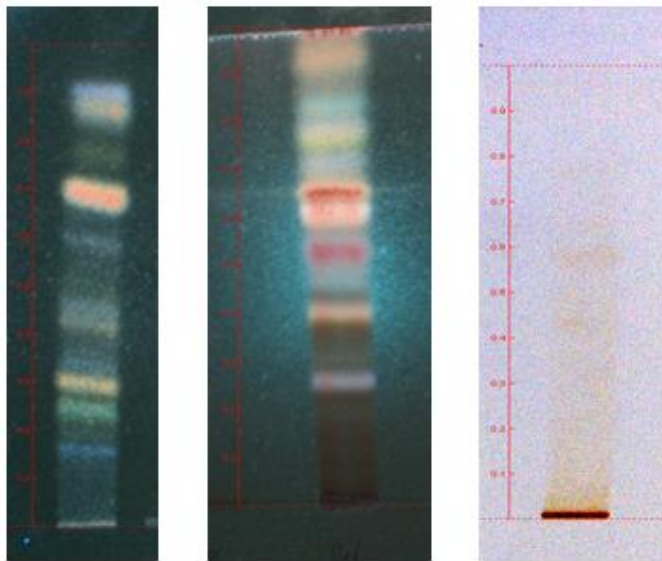


Abbildung 14. DCs des PE-Extrakts (links) mit DC-System 3, des EtOAc-Extrakts (Mitte) mit DC-System 2 jeweils bei 366 nm und derivatisiert mit AA/H₂SO₄. Das DC des MeOH-Extrakts (rechts) mit DC-System 1, derivatisiert mit Vanillin/HCl bei Tageslicht.

Für eine erste Analyse erfolgte das Besprühen mit unterschiedlichen, für verschiedene Inhaltsstoffklassen typischen Sprühreagenzien. So sollte ein erster Hinweis auf die Art der Inhaltsstoffe erhalten werden. Jedoch zeigte nur das unspezifische AA/H₂SO₄-Sprühreagenz eine intensive Färbung beim PE- und EtOAc-Extrakt. Lediglich mit Vanillin/HCl trat beim MeOH-Extrakt im Tageslicht eine starke Rotfärbung auf, die auf Gerbstoffe hindeutete.

3.2.3. Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20

Die Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20 wurde mit EtOH 70% durchgeführt. Es wurde so lange eluiert, bis keine Banden mehr mit DC-System 2 (Kapitel 3.6.4) zu erkennen waren (F1-F8), und anschließend der Rest mit Aceton 70% von der Säule gespült (F9). Somit konnten 9 Fraktionen gesammelt werden, die in **Abbildung 15** dargestellt sind.

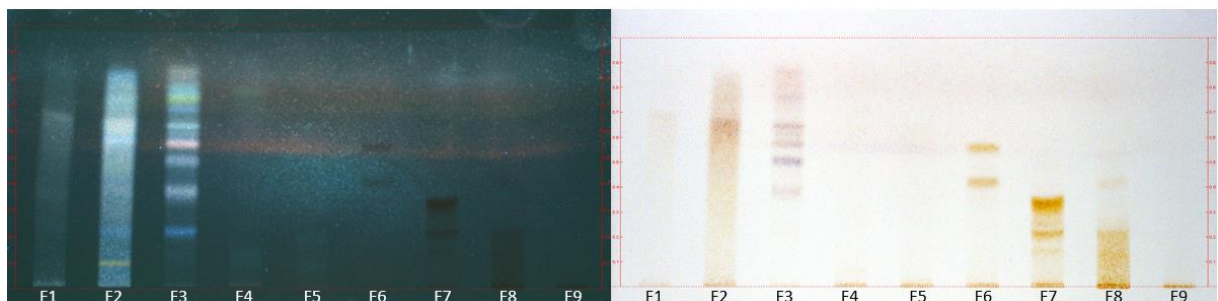


Abbildung 15. Übersichts-DC über alle nach der Sephadex®-Chromatographie mit dem EtOAc-Extrakt erhaltenen Fraktionen mit DC-System 2 nach Besprühen mit AA/H₂SO₄ bei 366 nm (links) und bei Tageslicht (rechts).

Wie aus der Übersichts-DC hervorgeht, finden sich spätestens ab F6 Flavan-3-ole, die in etwa in der Reihenfolge ihres dP eluieren. In F9 befinden sich nur noch polymere PA (siehe Kapitel 3.3.2). Die PA-haltigen Fraktionen (F6-F9) machen mit 41% somit fast die Hälfte der Gesamtmasse des EtOAc-

Extrakts aus. Die verschiedenfarbigen Banden der Fraktionen F1-F3 konnten keiner Substanzklasse zugeordnet werden.

3.2.4. Flash-Chromatographie mit Kieselgel

Als nächster Schritt sollten Unterfraktionen von F3 gebildet werden, da bei dieser mit 1820 mg die größte Menge zur Verfügung stand. Aufgrund des regelmäßigen Bandenmusters auf der DC-Platte wurde beschlossen, die stationäre Phase nicht zu ändern und eine Flash-Chromatographie auf Kieselgel mit F3 durchzuführen. Es konnten sieben weitere Fraktionen gebildet werden, die in **Abbildung 16** wiedergegeben sind.

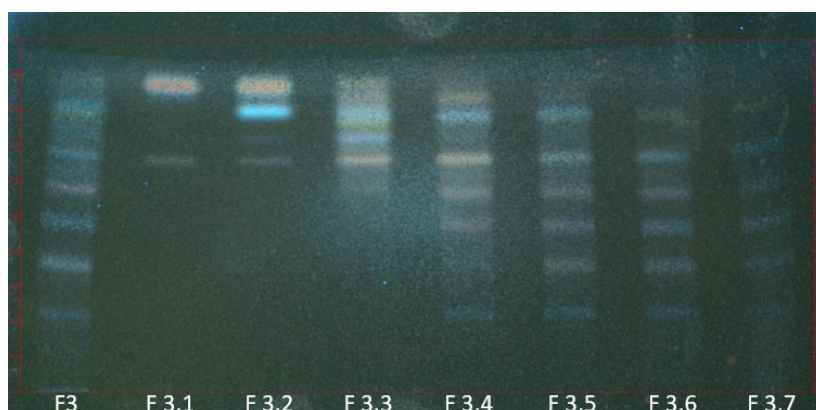


Abbildung 16. Übersicht-DC über die nach Flash-Chromatographie mit Kieselgel aus F3 erhaltenen Fraktionen. Die Entwicklung erfolgte mit DC-System 2, detektiert wurde bei 366 nm nach Derivatisierung mit AA/H₂SO₄.

3.2.5. Isolierung mit analytischer HPLC

Da gemäß der DC und der Untersuchung der Fraktionen mit der anal. HPLC F 3.1 und F 3.2 nur noch wenige Bestandteile enthielten, wurden diese zur weiteren finalen Aufreinigung ausgewählt. Dies wurde zuerst an der präp. HPLC versucht. Hier war mit den zu diesem Zeitpunkt vorhandenen stationären Phasen die Auftrennung in einzelne Peaks nicht möglich. Aufgrund dessen und der sehr geringen Substanzmengen mit 6,4 bzw. 14,6 mg, wurde beschlossen die Peaks an der anal. HPLC zu isolieren (HPLC-System 10, Kapitel 3.6.6.6), wo eine Trennung erreicht werden konnte. Letztlich konnten drei Verbindungen mit messbaren Auswaagen isoliert werden, wovon aber zwei nach LC-MS Analyse als nicht näher spezifizierte Weichmacher identifiziert werden konnten (F 3.2.4, F 3.2.5). Für F 3.2.6 mit lediglich 0,86 mg war es zwar möglich ein NMR-Spektrum aufzunehmen, jedoch zeigte sowohl das HPLC-Chromatogramm zur Reinheitsbestimmung als auch das erhaltene Chromatogramm der LC-MS starke Verunreinigungen an, weswegen keine Auswertung erfolgen konnte.

3.2.6. Präparative HPLC

Im HPLC-Chromatogramm von F6 waren mit einer Diol-Säule drei basisliniengetrennte Peaks zu erkennen, die es ermöglichte, diese voneinander zu trennen. Allerdings konnte in der Untersuchung an der anal. HPLC mit einer Biphenyl-Säule gezeigt werden, dass diese Fraktionen (F 6.1-F 6.3) nicht rein waren. Es handelte sich wahrscheinlich um ein Gemisch von Stereoisomeren, die mit dieser

stationären Phase nicht weiter voneinander getrennt werden konnten. Nach der Anschaffung einer neuen Säule mit einer quervernetzten C18-Phase (Nucleodur C18 Isis) konnte aber schließlich eine Trennung der Stereoisomeren erreicht und vier Verbindungen isoliert werden. Beispielhaft ist dies in **Abbildung 17** dargestellt. Bei diesen vier Verbindungen handelt es sich um (+)-Catechin (F 6.1.1, Kapitel 3.3.5.1), (-)-Epicatechin (F 6.1.2, Kapitel 3.3.5.2), Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (F6.2.1, Kapitel 3.3.5.9) sowie um PC B2 (F 6.3.2, Kapitel 3.3.5.4), welche zusammen mit den aus dem MeOH-Extrakt nochmals isolierten Verbindungen in Kapitel 3.3.5 vorgestellt werden.

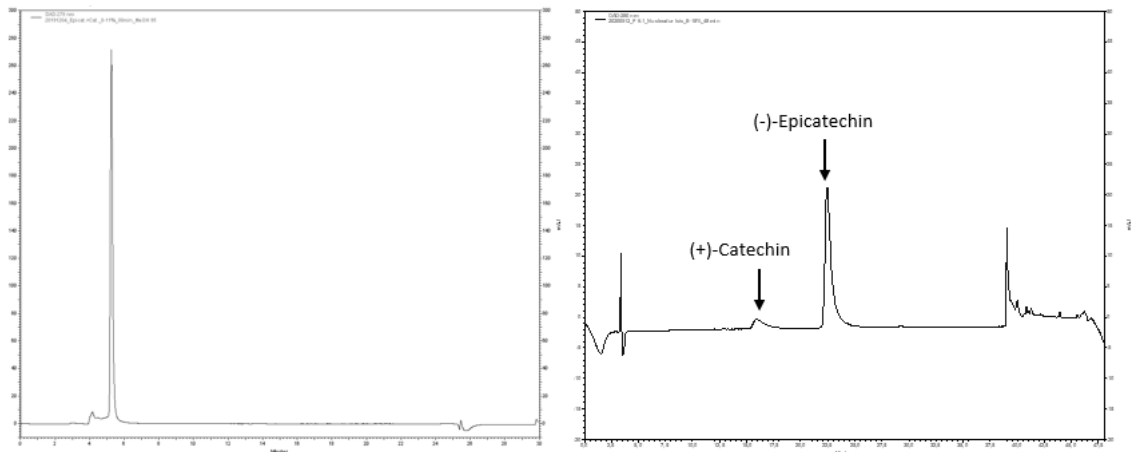


Abbildung 17. HPLC-Chromatogramme bei 280 nm von F6.1 an einer Diol-Säule (links), bei der keine Auftrennung der beiden enthaltenen Verbindungen stattfindet und das HPLC-Chromatogramm von F 6.1 mit der quervernetzten C18 (rechts), die eine saubere Trennung der beiden Verbindungen an der präp. HPLC mit HPLC-System 11 ermöglichte.

3.3. Isolierung oligomerer Proanthocyanidine aus dem MeOH-Extrakt

3.3.1. Isolierungsstrategie

Um eine möglichst effiziente Isolierung von PA aus dem MeOH-Extrakt zu gewährleisten, wurden verschiedene chromatographische Verfahren mit unterschiedlichen Trennprinzipien kombiniert. Diese sollten einen hohen Durchsatz ermöglichen, da eine große Menge Extrakt zur Verfügung stand und auch benötigt wurde, da zur Strukturaufklärung von Flavan-3-olen eine dem erhöhten Molekulargewicht der Oligomere angepasste Substanzmenge für einen auswertbaren NMR-Spektrensatz erforderlich ist. Deshalb wurden die untersuchten Extrakte zuerst mit einer offenen Säulenchromatographie mit Sephadex[®] LH-20 vorfraktioniert, anschließend mittels Flash-Chromatographie an MCI-Gel[®] weiter aufgearbeitet und schließlich an der präp. HPLC die Isolate gewonnen. Die entstandenen Fraktionen und Isolate wurden nach folgendem Schema benannt (**Abbildung 18**).

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

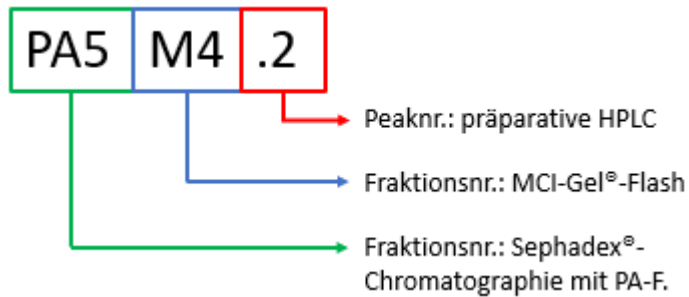


Abbildung 18. Schematische Benennung der Fraktionen und Isolate am Beispiel von PA5 M4.2.

Die so gewonnenen Isolate wurden anschließend an der anal. HPLC auf ihre Reinheit überprüft, dann mittels LC-MS die Summenformel bestimmt und anschließend verschiedene NMR-Spektren aufgenommen, um die Struktur aufzuklären. Von allen Isolaten wurde zusätzlich noch der spezifische Drehwert gemessen und ein CD-Spektrum aufgenommen. Das genaue Vorgehen bei der Fraktionierung ist im Isolierungsschema in **Abbildung 19** wiedergegeben.

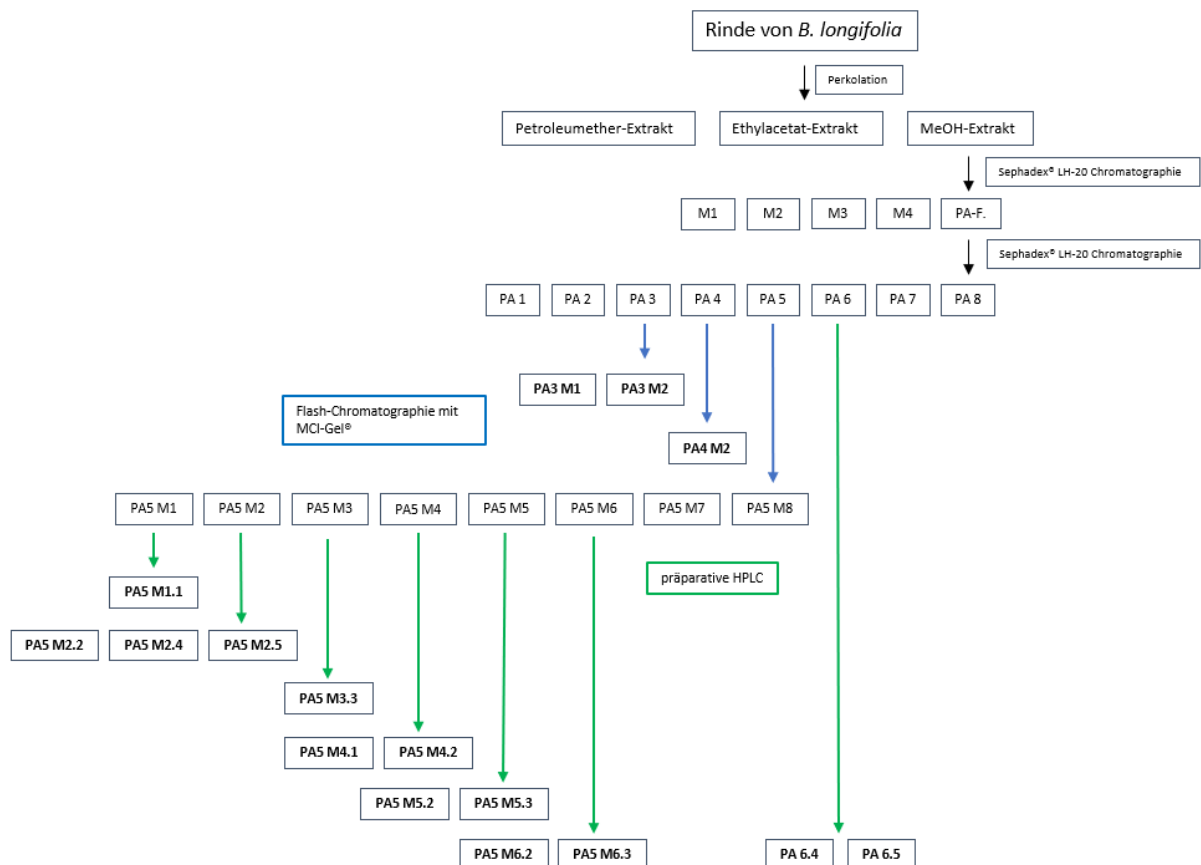


Abbildung 19. Isolierungsschema mit allen Fraktionen, die aus dem MeOH-Extrakt gewonnen wurden. Nach der Extraktion erfolgte eine erste Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20, um eine mit PA angereicherte Fraktion (PA-F) zu erhalten. Diese wurde in einer zweiten Sephadex®-Chromatographie weiter fraktioniert. Danach konnten entweder direkt durch präparative HPLC (aus PA6) Isolate gewonnen werden oder mit einer Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® weitere Fraktionen (PA5) oder direkt Reinsubstanzen (aus PA3 und PA4). PA5 M1-M6 konnten durch präp. HPLC final aufgereinigt werden. Insgesamt wurden so 16 verschiedene PA isoliert.

3.3.2. Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20

Bei der Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20 konnten zwei Dinge miteinander verbunden werden: Zum einen konnte damit eine große Menge Extrakt verarbeitet werden (bis zu 25 g pro Lauf), zum anderen ist das Trennprinzip durch Größenausschluss und Adsorption bestens geeignet für die Fraktionierung von Gerbstoffen. Somit ist durch dieses Verfahren bereits eine ungefähre Trennung der oligomeren PA nach ihrem Polymerisierungsgrad (dP) möglich. Bei einem ersten Durchlauf sollten die enthaltenen Flavan-3-ole aufkonzentriert werden. Deshalb wurde so lange mit EtOH 70% eluiert (Fraktionen M1-M4), bis die erste Gerbstoffbande auf der DC-Kontrolle auftauchte. Sobald dies der Fall war, wurde mit Aceton 70% alles von der Säule gespült und als eine mit Gerbstoffen angereicherte Fraktion gesammelt („Proanthocyanidin-Fraktion“ = PA-F). Dies wurde mehrmals wiederholt und anschließend mit PA-F die Chromatographie erneut durchgeführt. In diesen Läufen konnten Fraktionen gewonnen werden (PA1-PA7), die ausschließlich PA enthielten, wobei zuerst die mit niedrigem und dann die mit höherem dP eluierten. Hier wurde wieder mit EtOH 70% als Eluent gearbeitet und erst auf Aceton 70% umgespült, als bei der DC-Kontrolle nur noch an der Grundlinie eine Gerbstoffbande detektiert werden konnte. Eine Übersichts-DC aller gesammelten Fraktionen ist in **Abbildung 20** dargestellt.

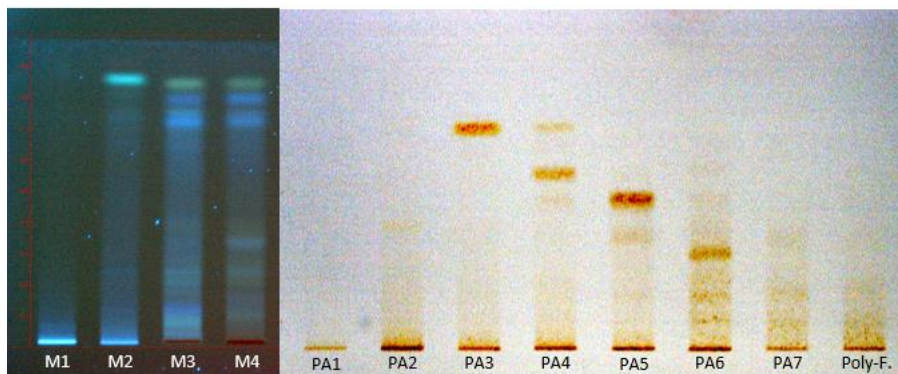


Abbildung 20. Übersichts-DC über alle nach der Sephadex®-Chromatographie mit dem MeOH-Extrakt erhaltenen Fraktionen mit DC-System 1 unbehandelt bei 366 nm (links) und nach Derivatisierung mit Vanillin/HCl bei Tageslicht (rechts). M1-M4 stellt die vor den ersten Gerbstoffen eluierten Fraktionen dar. Der PA-haltige Anteil wurde durch einen weiteren Durchgang in die Fraktionen PA1 bis Poly-F aufgetrennt.

3.3.3. Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® CHP20P

Aus der Übersichts-DC nach Sephadex®-Chromatographie (**Abbildung 20**) geht hervor, dass ab PA3 auch dimere Gerbstoffe enthalten sind. Deswegen wurde ab hier begonnen mit einer Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® CHP20P weiter zu fraktionieren. Das Styrol-Divinylbenzol-Copolymer als stationäre Phase ermöglichte die Trennung von Stereoisomeren, die auf Kieselgel denselben R_f -Wert besitzen. Deutlich wird die Effizienz dieses Verfahrens dadurch, dass aus den Fraktionen PA3-PA5, die zusammen fünf unterschiedliche Banden auf Kieselgel aufwiesen, am Ende 14 verschiedene Substanzen isoliert werden konnten. Aus PA3 konnten zudem direkt die Monomere (+)-Catechin (PA3 M1) und (-)-Epicatechin (PA3 M2) sowie aus PA4 das Dimer Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (PA4

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

M2) isoliert werden (**Abbildung 19**). In **Abbildung 21** ist eine Übersichts-DC nach Flash-Chromatographie mit PA5 dargestellt.

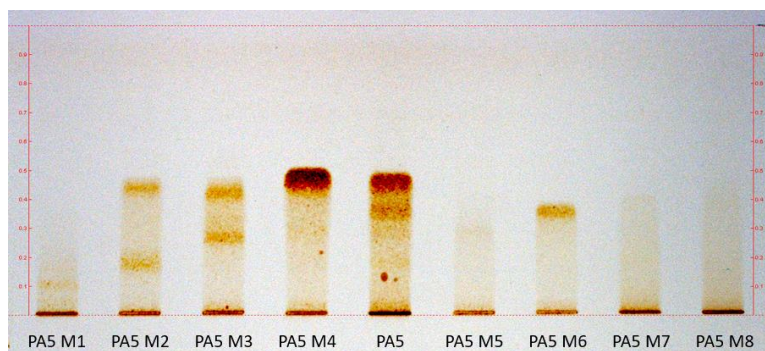


Abbildung 21. Übersichts-DC über die nach Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® CHP20P mit PA5 erhaltenen Fraktionen. Die Entwicklung erfolgte mit DC-System 1, detektiert wurde bei Tageslicht nach Derivatisierung mit Vanillin/HCl.

3.3.4. Präparative HPLC

Zur finalen Isolierung von PA aus den Fraktionen PA5 M1-PA5 M6 und PA6 kamen die in Kapitel 3.6.6.5 genannten Methoden zum Einsatz. Als Säule wurde mit einer speziellen quervernetzten RP18-Phase (Nucleodur C18 Isis) gearbeitet, die es zusätzlich ermöglichte, die Diastereomere zu trennen. In **Abbildung 22**, wird dies für PA5 M6 beispielhaft dargestellt.

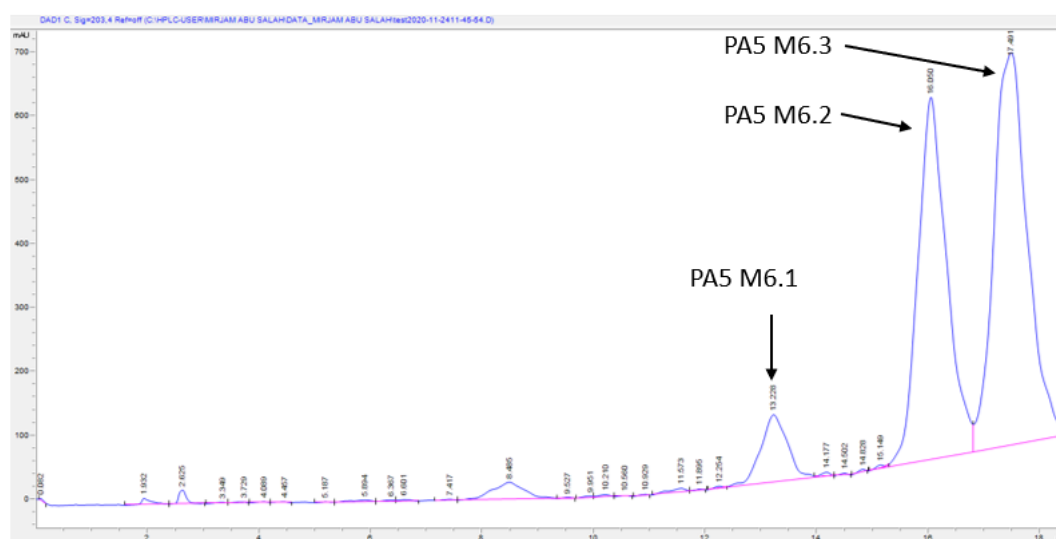
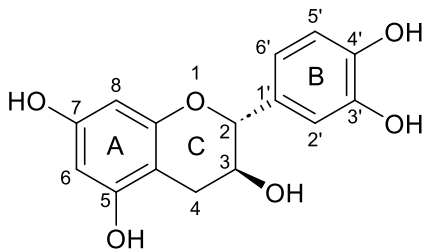


Abbildung 22. Das Chromatogramm mit der präparativen HPLC (HPLC-System 2) bei 205 nm zeigt, dass die eine Bande auf der DC von PA5 M6 (siehe **Abbildung 21**) eine Mischung aus drei Stereoisomeren darstellt.

Insgesamt konnten somit zusätzlich zu den drei PA, welche direkt mit der Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® CHP20P isoliert wurden, noch weitere 13 PA nach finaler Aufreinigung mit präp. HPLC isoliert werden.

3.3.5. Strukturaufklärung

3.3.5.1. (+)-Catechin



(+)-Catechin (PA3 M1) konnte direkt nach der Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® gewonnen werden (Kapitel 3.6.6.2) und stellt ein monomeres Flavan-3-ol dar. Die chromatographische Reinheit betrug 97% (Kapitel 3.6.7.1) und die Ausbeute nach Gefriertrocknung 11,0 mg. Über eine HR-ESI-MS Messung wurde ein Pseudomolekülion mit m/z 291,0872 $[M+H]^+$ detektiert. Die ^{13}C - und ^1H -NMR-

Signale sind in **Tabelle 1** den jeweiligen Positionen im Molekül zugeordnet. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein [129, 130]. Die Konfigurationsisomerie an C-2 und C-3 im C-Ring kann über die Kopplungskonstanten im ^1H -NMR-Spektrum ermittelt werden. Bei *trans*-konfigurierten Einheiten ist das Signal für H-2 typischerweise ein Dublett (d) mit einer Kopplungskonstante von 7,5-10,0 Hz (hier 7,5 Hz), wohingegen das Signal für H-3 ein Multipllett (m) mit sehr kleinen, nicht mehr bestimmbareren Kopplungskonstanten darstellt (**Abbildung 23**). So konnte mit dem d bei 4,60 ppm mit einer Kopplungskonstante von 7,5 Hz und mit dem m bei 3,96 die 2,3-*trans*-Konfiguration der Verbindung bestätigt werden. Des Weiteren gibt die entsprechende ^{13}C -Verschiebung für C-2 einen weiteren Hinweis auf die Konfiguration. So ist eine Verschiebung über 80 ppm für 2,3-*trans*-konfigurierte Einheiten charakteristisch, was hier mit 81,5 ppm für C-2 gegeben ist. Diese Beobachtungen beruhen auf den Vergleichsdaten, die beim Aufklären der in den folgenden Kapiteln vorgestellten Substanzen ermittelt worden sind und konnten durch Abgleich mit Literaturdaten bestätigt werden. Diese Prinzipien gelten somit auch für die oligomeren PA und werden in den folgenden Kapiteln angewandt und beispielhaft ausgeführt. Darüber hinaus wurde bei allen isolierten Verbindungen der spezifische Drehwert bestimmt, auch um ihn mit evtl. vorhandenen Literaturdaten zu vergleichen und die Struktur zu bestätigen. Dabei zeigte (+)-Catechin einen $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ von +26,7 (0,2 g/100 ml in MeOH), was in einem vergleichbaren Bereich mit der Literatur liegt [131]. Somit konnte die Identität der isolierten Verbindung als (+)-Catechin bestätigt werden.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 1. NMR-Tabelle zu (+)-Catechin. Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H -NMR: 600,25 MHz, ^{13}C -NMR: 150,95 MHz, in MeOD) durchgeführt.

Pos.	δ_{C} , Typ	δ_{H} (J in Hz)
2	81.5, CH	4.60, d (7.5)
3	67.4, CH	3.96, m
4	27.1, CH ₂	2.84, dd (16.1, 5.5) 2.49, dd (16.1, 8.0)
4a	99.4, C	
5	156.5, C	
6	94.9, CH	5.92, d (2.3)
7	156.2, C	
8	94.1, CH	5.84, d (2.3)
8a	155.5, C	
1'	130.8, C	
2'	113.9, CH	6.83, d (1.9)
3'	144.9, C	
4'	144.8, C	
5'	114.7, CH	6.75, d (8.1)
6'	118.6, CH	6.71, dd (8.1, 1.9)

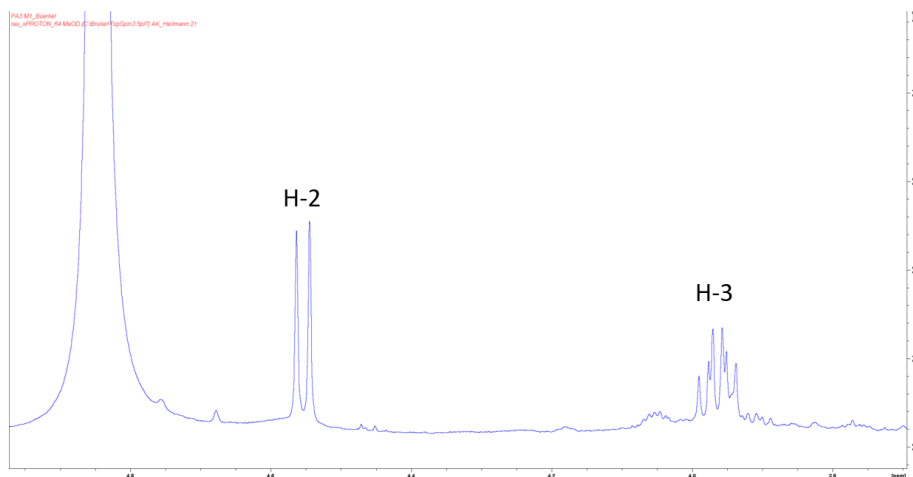
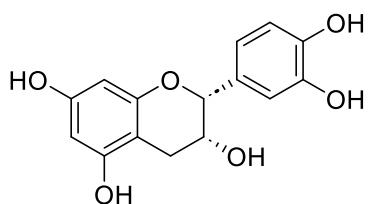


Abbildung 23. Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum (600,25 MHz in MeOD bei RT) von (+)-Catechin. Dargestellt sind das typische Dublett für H-2 ($J = 7,5$ Hz) bei und das Multiplett für H-3.

3.3.5.2. (-)-Epicatechin



Neben (+)-Catechin konnte mit (-)-Epicatechin (PA3 M2) ein weiteres monomeres Flavan-3-ol aus der Rinde von *B. longifolia* isoliert werden. Auch dies gelang direkt nach Aufreinigung von PA3 mittels MCI-Gel®-Flashchromatographie (Kapitel 3.6.6.2). So gelang es, Fraktion 3 komplett mittels Flashchromatographie aufzureinigen, die nach HPLC-Analyse (abgesehen von höher oligomeren PA) ausschließlich aus (+)-Catechin und (-)-Epicatechin bestand. Die chromatographische Reinheit nach HPLC nach Isolierung betrug 97%. Insgesamt konnten nach Lyophilisation 26,1 mg gewonnen werden. Die LC-MS-Analyse konnte ein Pseudomolekülion mit m/z 291,0872 $[M+H]^+$ erfassen. Die ^{13}C - und ^1H -NMR-Signale sind in **Tabelle 2** wiedergegeben. Die ermittelten NMR-Daten stimmen mit den Daten aus der Literatur überein [129, 130]. Auch hier kann die 2,3-*cis*-Konfiguration wieder über die Multiplizität der Signale im ^1H -Spektrum bestimmt werden. Trotz der gleichen chemischen Umgebung wie bei 2,3-*trans*-Konfiguration ist die Aufspaltung der Signale der entsprechenden Protonen unterschiedlich. So werden die Kopplungskonstanten sehr klein. Das d für H-2 (wie in der *trans*-Konfiguration) wird zu einem s und das m für H-3 fällt zu einem breiten Singulett ($br\ s$) zusammen (**Abbildung 24**). So konnte mit dem s bei 4,81 für H-2 und mit dem $br\ s$ bei 4,17 die relative Stereochemie der Verbindung bestätigt werden. Außerdem liefert die Verschiebung des C-2 wieder einen Hinweis. Liegt hier der Wert unterhalb von 80 ppm, deutet dies ebenfalls auf eine 2,3-*cis*-Verknüpfung hin. Auch dies ist hier mit 79.3 ppm gegeben. Die Messung des spezifischen Drehwerts ergab einen $[\alpha]_D^{24}$ von -7,8 (0,23 g/100 ml in MeOH) und lag somit im Bereich früher ermittelter Werte [132].

Tabelle 2. NMR-Tabelle zu (-)-Epicatechin. Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H -NMR: 600,25 MHz, ^{13}C -NMR: 150,95 MHz, in MeOD) durchgeführt.

Pos.	δ_C , Typ	δ_H (J in Hz)
2	79.3, CH	4.81, s
3	66.7, CH	4.17, br s
4	28.8, CH ₂	2.72, dd (16.8, 3.0) 2.85, dd (16.8, 4.6)
4a	99.6, C	
5	157.4, C	
6	95.9, CH	5.93, d (2.0)
7	157.4, C	
8	95.5, CH	5.90, d (2.0)
8a	157.0, C	
1'	132.1, C	
2'	115.1, CH	6.96, d (1.8)
3'	145.2, C	
4'	145.1, C	
5'	115.3, CH	6.75, d (8.1)
6'	119.2, CH	6.79, dd (8.2, 1.8)

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

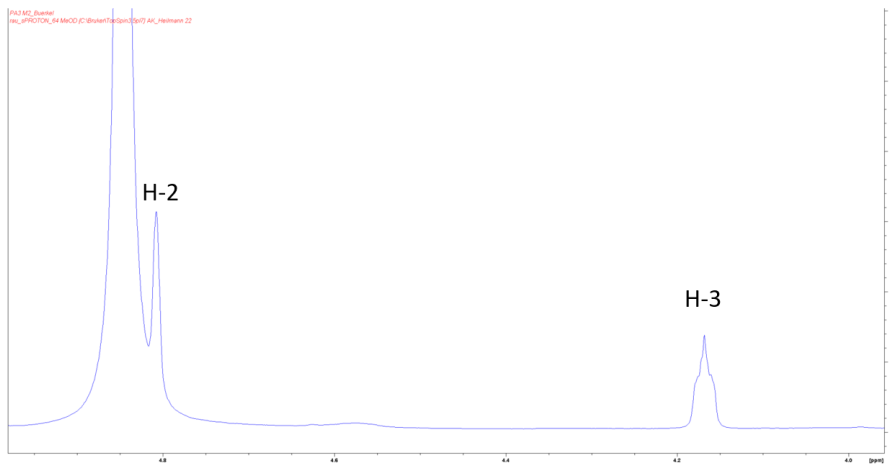
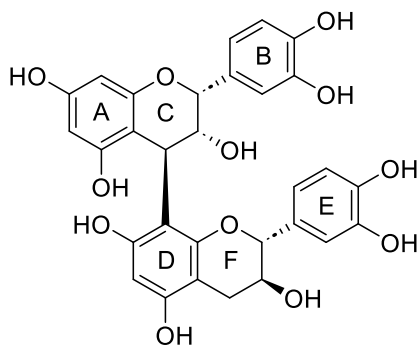


Abbildung 24. Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum von (-)-Epicatechin (600,25 MHz in MeOD bei RT). Dargestellt sind das typische *s* für H-2 und das *br s* für H-3.

3.3.5.3. Procyanidin B1



PC B1 (PA5 M2.2) eluierte zunächst in Fraktion PA 5 von der Sephadex®-Chromatographie und konnte nach dem nächsten Fraktionierungsschritt mit der MCI-Gel®-Flashchromatographie in Fraktion PA5 M2 gefunden werden. Aus dieser wurde es endgültig mit der präp. HPLC mit HPLC-System 1 isoliert, wo es bei 9,1 min eluierte (Kapitel 3.6.6.5). Die Gesamtausbeute betrug 27,6 mg und die chromatographische Reinheit lag bei 98%. Die HR-ESI-MS Messung im positiven Modus lieferte ein Pseudomolekülion mit m/z 579,1504 $[M+H]^+$, welches ein

einfach verknüpftes dimeres PA mit dihydroxyliertem B- und E-Ring vermuten ließ. Wie bei allen isolierten Verbindungen wurde zuerst ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei RT aufgenommen, was allerdings zu breiten und verschwommen Signalen führte, die nicht auswertbar waren. Dies deutete daraufhin, dass eine Rotationsachse im Molekül vorliegt, um die sich das Molekül bei RT dreht, was typischerweise zu solchen NMR-Spektren führt. Eine Möglichkeit, diese Rotation zu verlangsamen, ist die Aufnahme der NMR-Spektren bei Tieftemperatur. Somit konnte bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ ein auswertbares Spektrum generiert werden (**Abbildung 25**). Die ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen sind in **Tabelle 3** wiedergegeben und stimmen mit den Literaturwerten überein [133, 134]. Angegeben sind major- und minor-Signale, die für zwei verschiedene Rotationsisomere stehen. Die Signale mit den kleineren Integralen entsprechen den minor-Signalen. Die 2,3-*cis*-Konfiguration in der oberen Einheit konnte über ein br s für H-2 bei 5,11 ppm und über ein d bei 3,93 ppm ($J = 1,5$) für H-3 bestätigt werden. In der unteren Einheit wurde ein d bei 4,97 ppm ($J = 5,0$) und ein m bei 4,17 ppm für H-3 ermittelt, was für eine Catechin-Einheit spricht. Die β -Verknüpfung der beiden Einheiten konnte über CD-Spektroskopie bestätigt werden. Dabei lässt der positive Cotton-Effekt zwischen 210 und 250 nm nach Barrett et al. auf eine β -Konfiguration schließen [135, 136]. Das ermittelte CD-Spektrum ist in **Abbildung 26** zu sehen. Zusätzlich konnte ein spezifischer Drehwert $[\alpha]_D^{22}$ von +51,4 (0,1 g/100 ml in MeOH) bestimmt werden, der somit in der Nähe früher ermittelter Werte liegt [134].

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 3. NMR-Tabelle zu PC B1 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (^1H -NMR: 400,13 MHz, ^{13}C -NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	$\delta_{\text{C, major}} + \delta_{\text{C, minor}}$, Typ	$\delta_{\text{H, major}} + \delta_{\text{H, minor}}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	77.0 + 76.5, CH	5.11, br s + 5.17, s
	3	72.9 + 73.4, CH	3.93, d (1.5) + 3.83, d (1.4)
	4	36.7 + 37.2, CH	4.65, bs + 4.46 bs
	4a	102.1, C	
	5	157.8, C	
	6	95.1 + 95.2, CH	5.92, d (2.2) + 5.67, d (2.2)
	7	158.6, C	
	8	95.6, CH	5.90, d (2.2)
	8a	155.3, C	
	1'	132.7, C	
	2'	114.9, CH	6.86, d (1.2)
	3'	145.4, C	
	4'	145.7, C	
	5'	115.5, CH	6.71, m
	6'	119.0, CH	6.68, m
untere Einheit	2	81.5 + 82.9, CH	4.97, d (5.0) + 3.90, s
	3	68.1 + 69.0, CH	4.17, m + 3.75, m
	4	26.3 + 29.8, CH ₂	2.54, dd (16.8, 5.0) + 2.40, dd (16.2, 9.0) 2.60, dd (16.6, 5.2) + 2.93, dd (16.0, 6.0)
	4a	99.9, C	
	5	155.7, C	
	6	96.5, CH	5.83, s
	7	156.4, C	
	8	107.6, C	
	8a	153.7, C	
	1'	132.2, C	
	2'	113.7, CH	6.83, d (1.5)
	3'	146.0, C	
	4'	145.7, C	
	5'	115.8, CH	6.68, m
	6'	119.2, CH	6.88, dd (8.0, 1.5)

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

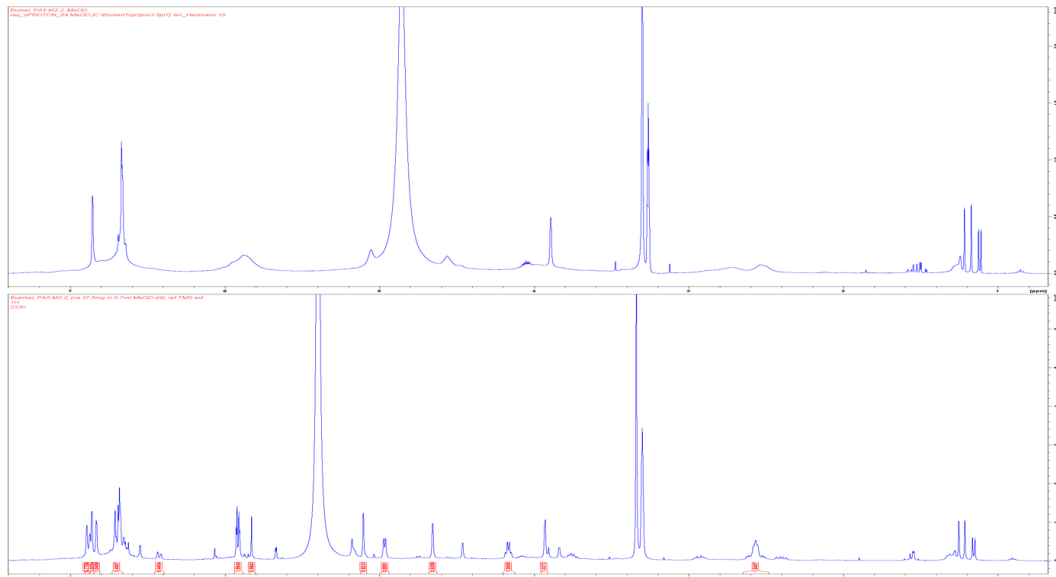


Abbildung 25. ^1H -Spektren von PC B1 gelöst in MeOD (400,13 MHz in MeOD bei RT). Bei RT verschwimmen die Signale zu einem nicht-auswertbaren Spektrum (oben), wohingegen das Spektrum aufgenommen bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ scharfe Signale ergibt (unten).

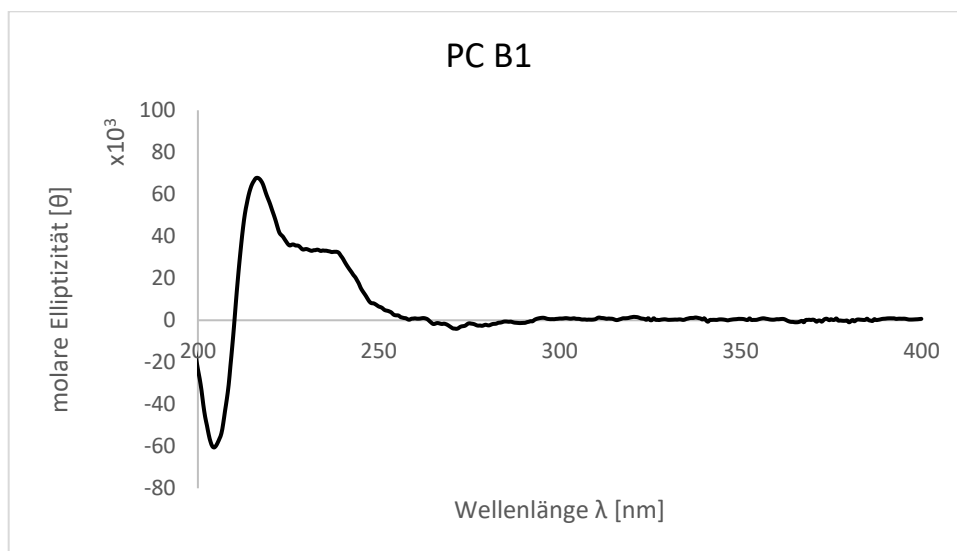
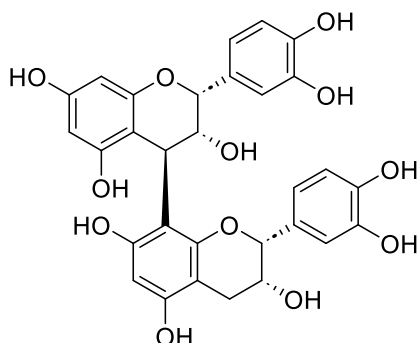


Abbildung 26. CD-Spektrum zu PC B1. CD (MeOH bei RT, θ) 204.5 (-60542.4), 216.5 (+67810.1), 233 (+33642.2), 278.5 (-2630.9).

3.3.5.4. Procyanidin B2



PC B2 (PA5 M4.1) eluierte bei der Sephadex®-Chromatographie mit dem MeOH-Extrakt mit PA 4, 5 und 6 von der Säule. Nach Flash-Chromatographie mit MCI®-Gel konnte PC B2 in mehreren Unterfraktionen detektiert werden. So konnte es über präp. HPLC final aus vier verschiedenen Unterfraktionen isoliert werden (PA 4 M1.1, PA5 M5.1, PA5 M4.2, PA 6). Der größte Anteil eluierte nach 10,7 min mit HPLC-System 11 aus PA5 M4 als PA5 M4.2 (Kapitel 3.6.6.5), weshalb alle anderen Isolate dann dazu vereinigt wurden. PC B2 konnte ebenfalls im EtOAc-

Extrakt nachgewiesen werden. So konnte es nach Sephadex®-Chromatographie und zweier unterschiedlicher präp. HPLC-Methoden (HPLC-System 12 und 5) als F 6.3.2 aus diesem isoliert werden. Die Ausbeute betrug insgesamt nach Vereinigungen aller Fraktionen 82,8 mg. Die chromatographische Reinheit lag bei 97%. Die LC-MS Analyse im positiven Modus lieferte ein Pseudomolekülion mit m/z 579,1504 $[M+H]^+$, welches wiederum ein einfach verknüpftes dimeres PA mit dihydroxyliertem B- und E-Ring vermuten ließ. Die NMR-Daten sind in **Tabelle 4** wiedergegeben und stimmen mit der Literatur für PC B2 überein [133, 134]. Die relative Stereochemie der oberen und unteren Einheit konnte auch hier wieder über die typischen Signale für 2,3-*cis*-konfigurierte Epicatechin-Einheiten ermittelt werden. Stereochemisch gesehen handelt es sich um ein Diastereomer zu PC B1, da es sich nur in der Konfiguration an C-3F unterscheidet. Dadurch, dass ein auswertbares Spektrum bei RT nicht ermittelt werden konnte, lag aufgrund der vorher aufgeführten Beobachtungen eine 4 β -Verknüpfung nahe und konnte dann im CD-Spektrum über einen positiven Cotton-Effekt bestätigt werden (**Abbildung 27**). Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{22}$ lag bei +31,8 (0,1 g/100 ml in MeOH) und stimmte damit mit Literaturwerten überein [134].

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 4. NMR-Tabelle zu PC B2 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	$\delta_{C, \text{major}} + \delta_{C, \text{minor}}$, Typ	$\delta_{H, \text{major}} + \delta_{H, \text{minor}}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	76.9, CH	5.05, s
	3	73.5, CH	3.78, d (2.0) + 3.87, d (2.1)
	4	36.6, CH	4.61, s + 4.50, s
	4a	102.0, C	
	5	157.9, C	
	6	95.6, CH	5.94, d (2.3) + 6.03, d (2.3)
	7	157.8, C	
	8	95.6, CH	5.91, d (2.3) + 5.99, d (2.3)
	8a	157.7, C	
	1'	132.4, C	
	2'	114.9, CH	6.83, d (1.8)
	3'	145.7, C	
	4'	145.4, C	
	5'	115.6, CH	6.67, d (8.2)
	6'	118.9, CH	6.60, dd (8.2, 1.7) + 6.50 (8.2, 1.8)
	untere Einheit	2	79.4, CH
3		67.0 + 67.3, CH	4.24, br s + 3.91, br s
4		29.9 + 29.4, CH ₂	2.93, dd (16.4, 4.2) 2.79, d (16.4)
4a		99.6, C	
5		156.6, C	
6		96.7, CH	5.87, s + 5.62, s
7		156.6, C	
8		107.1, C	
8a		154.5, C	
1'		132.1, C	
2'		114.8, CH	7.09, d (1.7) + 7.06, d (2.0)
3'		145.8, C	
4'		145.4, C	
5'		115.6, CH	6.72, d (8.2)
6'		118.7, CH	6.85, dd (8.3, 1.7)

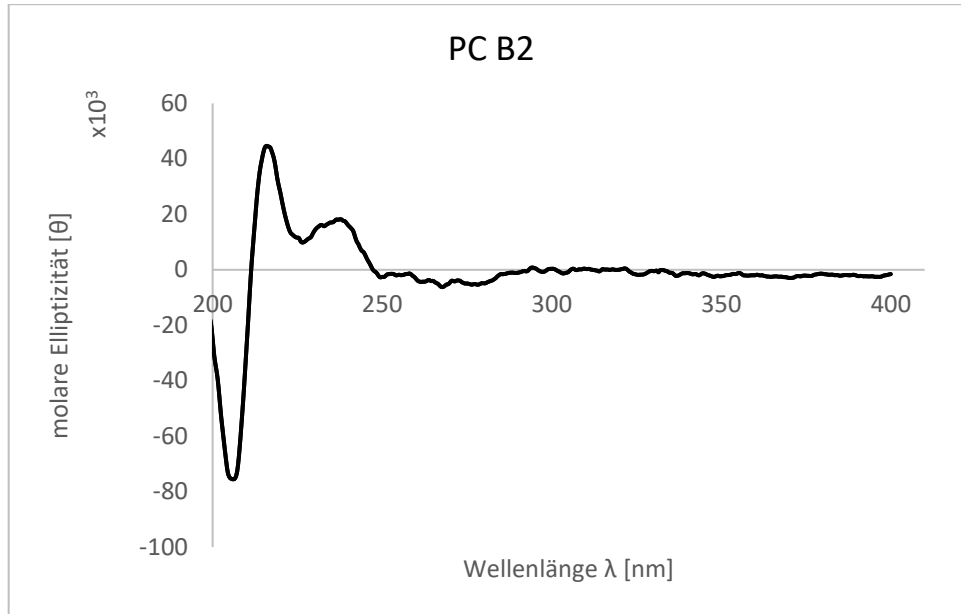
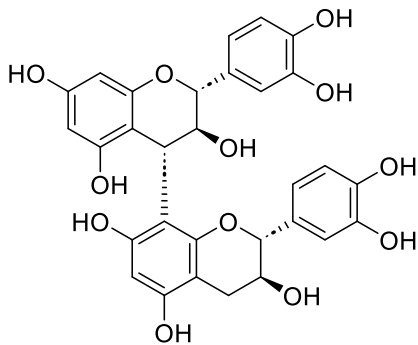


Abbildung 27. CD-Spektrum zu PC B2. CD (MeOH bei RT, Θ) 206.5 (-75378.1), 217.5 (+42470.6), 239 (+17521.3), 268 (-6158.0).

3.3.5.5. Procyanidin B3



PC B3 (PA5 M2.4) befand sich nach Sephadex®-Chromatographie in Fraktion PA 5 und eluierte anschließend in Fraktion PA5 M2 nach Flash-Chromatographie mit MCI-Gel®. Mittels präp. HPLC konnte nach 11,2 min die Verbindung mit HPLC-System 1 (Kapitel 3.6.6.5) isoliert werden. Die Gesamtausbeute nach Gefriertrocknung betrug 15,0 mg. Mittels LC-MS Analyse im positiven Modus konnte ein Pseudomolekülion mit m/z 579,1504 $[M+H]^+$ detektiert werden. Nach HPLC konnte eine chromatographische Reinheit von 81%

ermittelt werden. Für diese Substanz konnte bereits bei RT ein auswertbares NMR-Spektrum generiert werden. Nachdem die Summenformel für ein einfach verknüpftes Dimer mit dihydroxylierten B-Ringen sprach, gab es zwei Möglichkeiten: entweder es handelte sich um ein $4\alpha\rightarrow 8$ oder um ein $4\rightarrow 6$ -verknüpftes PA. Bei beiden Konfigurationen wäre die sterische Hinderung um die Verknüpfungsstelle so groß, dass eine Rotation um diese Bindung so stark eingeschränkt ist, dass bei RT auswertbare Spektren erhalten werden können. Nach Ermittlung und Auswertung der 1D- und 2D-NMR Daten konnte die Verbindung als PC B3 identifiziert werden. Die erhaltenen NMR-Daten sind in **Tabelle 5** abgebildet. Die jeweiligen Signale für H-2 und H-3 lassen auf zwei Catechin-Einheiten schließen und ebenso die ^{13}C -Verschiebungen für C-2, die bei 83,9 ppm für die obere bzw. 82,4 ppm für die untere Einheit liegen, was wiederum typisch für eine *2,3-trans*-Konfiguration ist. Somit konnten zwei Catechin-Einheiten für die Verbindung ermittelt werden. Nach Auswertung der 2D-Spektren konnte eine $4\rightarrow 6$ -Verknüpfung ausgeschlossen werden. Die $4\alpha\rightarrow 8$ Verknüpfung konnte dann über den Vergleich mit Literaturwerten zweifelsfrei bewiesen werden [137–139]. Die Bestätigung der α -Konfiguration konnte leider nicht durch das CD-Spektrum gezeigt werden. Hierfür müsste ein negativer Cotton-Effekt vorliegen. Im ermittelten CD-Spektrum liegt allerdings ein positiver Cotton-Effekt vor (**Abbildung 28**), der aber durch die wesentlich geringere Reinheit im Vergleich zu anderen Isolaten erklärt werden kann. Dennoch kann die Struktur durch die ausgezeichnete Übereinstimmung mit mehreren Literaturquellen als gesichert gelten. Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ lag bei +13,9 (0,1 g/100 ml in MeOH). Es ist naheliegend, dass durch die Verunreinigungen im Isolat, deren Einfluss im CD-Spektrum sichtbar wurde, diese ebenfalls den spezifischen Drehwert verfälschen. Der Vergleich mit Literaturdaten kann in diesem Fall nicht gezogen werden, da die ermittelten Werte stark voneinander abweichen. So geben Dennis et al. einen $[\alpha]_D^{25}$ von +218 (=0,36 g/100 ml) und Mohri et al. einen $[\alpha]_D^{25}$ von -180,5 (0,29 g/100 ml) an [134, 140] .

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 5. NMR-Tabelle zu PC B3 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektroskop mit 5 mm TCI CryoProbe ($^1\text{H-NMR}$: 600,25 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150,95 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	$\delta_{\text{C, major}} + \delta_{\text{C, minor}}$, Typ	$\delta_{\text{H, major}} + \delta_{\text{H, minor}}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	83.9 + 84.1, CH	4.25, d (9.7) + 4.34, d (9.4)
	3	73.6 + 73.7, CH	4.36, d (9.7)
	4	38.6 + 38.5, CH	4.41, d (7.8)
	4a	107.2 + 107.1, C	
	5	157.1, C	
	6	97.3 + 97.5, CH	5.88, d (1.6) + 5.80, d (1.6)
	7	157.1 + 157.3, C	
	8	96.8 + 96.2, CH	5.78, d (2.2) + 5.83, d (2.5)
	8a	158.6, C	
	1'	132.6 + 132.4, C	
	2'	116.4 + 116.1, CH	6.73, d (1.8) + 6.95, d (1.7)
	3'	145.6 + 146.1, C	
	4'	146.1 + 146.3, C	
	5'	116.2 + 115.9, CH	6.67, d (8.0) + 6.75, d (8.0)
6'	120.6, 121.0, CH	6.47, dd (8.1, 1.8)	
untere Einheit	2	82.4 + 82.9, CH	4.53, d (7.0) + 4.74, d (7.7)
	3	68.9 + 68.5, CH	3.79, m + 4.07, m
	4	28.7 + 28.4, CH ₂	2.48, dd (16.3, 8.1) + 2.58, dd (16.0, 7.6) 2.75, dd (16.2, 5.5) + 2.81, dd (16.2, 5.3)
	4a	100.2 + 100.5, C	
	5	155.8 + 155.9, C	
	6	96.5 + 97.1, CH	6.07, s + 5.94, s
	7	155.6	
	8	108.2 + 108.3	
	8a	154.8 + 154.9, C	
	1'	131.8 + 132.1, C	
	2'	115.5 + 115.2, CH	6.58, d (1.6)
	3'	145.5, CH	
	4'	145.8 + 146.1, CH	
	5'	116.1, CH	6.67, d (8.2)
6'	119.9 + 120.1, CH	6.25, dd (8.1, 1.7)	

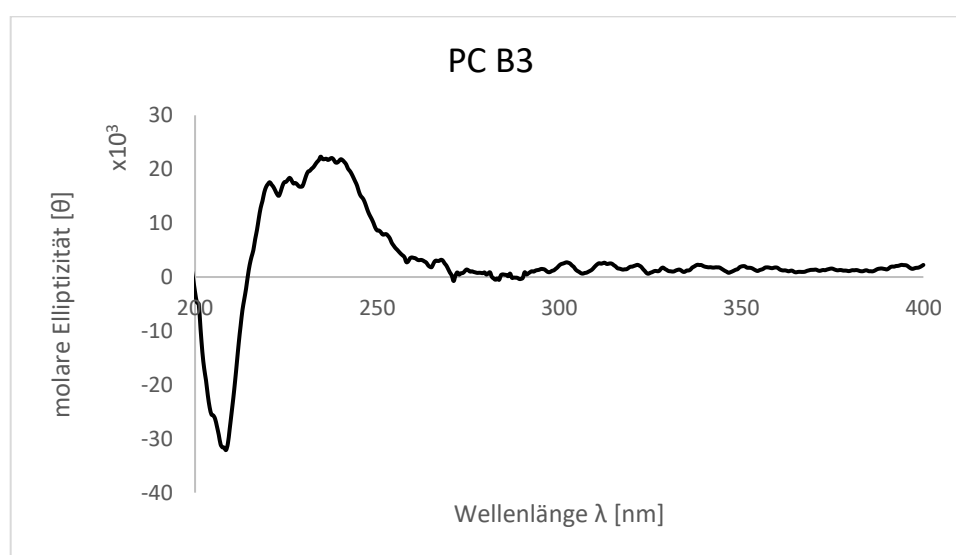
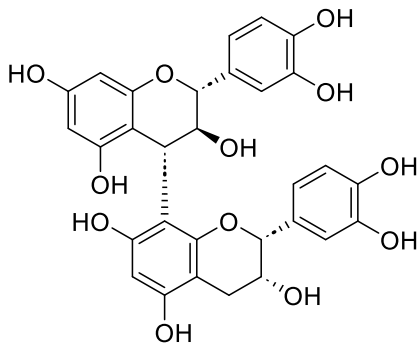


Abbildung 28. CD-Spektrum zu PC B3. CD (MeOH bei RT, θ) 208.5 (-32093,3), 234 (+21707,0), 271 (-749,0).

3.3.5.6. Procyanidin B4



PC B4 (PA5 M4.1) eluierte in Fraktion PA5 der Auftrennung mit Sephadex®. Nach dem nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® wurde sie in Fraktion PA5 M4 detektiert. Die finale Aufreinigung fand an der präp. HPLC mit HPLC-System 11 statt (Kapitel 3.6.6.5). Dabei eluierte die Substanz nach 8,5 min. Die Ausbeute betrug nach Gefriertrocknung 26,6 mg und die chromatographische Reinheit lag bei 88%. Nach erster Strukturanalyse mittels HR-ESI-MS konnte ein Pseudomolekülion mit m/z 579,1504 $[M+H]^+$ detektiert werden, welches ebenfalls

ein einfach verknüpftes dimeres PA mit dihydroxyliertem B- und E-Ring vermuten ließ. Für die obere Einheit lag für ein H-2 ein d bei 4,41 ppm und einer Kopplungskonstante von 9,7 Hz und für H-3 ein typisches m bei 4,56 ppm, was auf eine *trans*-Konfiguration schließen lässt. Bei der unteren Einheit konnten ein s bei 4,93 ppm für H-2 und ein charakteristisches br s für H-3 ermittelt werden, was auf eine *cis*-Konfiguration hindeutet. Als endgültige Struktur wurde durch Auswertung des kompletten NMR-Spektren-Satzes Catechin-(4 α →8)-Epicatechin bestimmt, was mit Hilfe spektroskopischer Daten aus der Literatur bestätigt werden konnte [134, 141]. Die ermittelten ^1H und ^{13}C -Verschiebungen sind in **Tabelle 6** dargestellt. Die α -Konfiguration konnte diesmal über CD-Spektroskopie aufgrund der höheren Reinheit bestätigt werden. Hier tritt der typische negative Cotton-Effekt zwischen 205 und 240 nm auf (**Abbildung 29**). Es konnte ein spezifischer Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ von -72,2 (0,1 g/100 ml in MeOH) ermittelt werden. Mohri et al. [134] konnten für PC B4 einen spezifischen Drehwert von -176,9 (0,01 g/100ml) bestimmen. Diese Abweichung kann dadurch erklärt werden, dass der spezifische Drehwert sehr anfällig für Verunreinigungen ist. Aufgrund der sehr guten Übereinstimmung der NMR-Daten mit der Literatur, kann die Struktur dennoch als bewiesen betrachtet werden.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 6. NMR-Tabelle zu PC B4 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektroskop mit 5 mm TCI CryoProbe ($^1\text{H-NMR}$: 600,25 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150,95 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	$\delta_{\text{C, major}} + \delta_{\text{C, minor}}$, Typ	$\delta_{\text{H, major}} + \delta_{\text{H, minor}}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	83.9 + 84.0, CH	4.41, d (9.7) + 4.31, m
	3	73.8 + 73.8, CH	4.56, m + 4.31, m
	4	38.9 + 38.7, CH	4.62, d (7.9) + 4.46, d (7.1)
	4a	107.2 + 107.4, C	
	5	157.5 + 157.2, C	
	6	97.6 + 97.7, CH	5.79, d (2.2) + 5.89, d (2.2)
	7	157.3 + 157.3, C	
	8	96.1 + 97.1, CH	5.83, d (2.3) + 5.93, d (2.3)
	8a	158.7 + 158.6, C	
	1'	132.2 + 132.6, C	
	2'	116.3 + 116.4, CH	6.98, d (1.9) + 6.69, d (2.0)
	3'	146.5 + 145.6, C	
	4'	146.0 + 146.1, C	
	5'	116.0 + 116.0, C	6.79, d (8.0) + 6.60, d (8.2)
6'	121.2 + 120.5, CH	6.86, dd (8.2, 1.7) + 6.40, dd (8.2, 1.8)	
untere Einheit	2	80.0 + 79.9, CH	4.93, s + 4.80, s
	3	67.4 + 67.8, CH	4.23, br s + 4.05, br s
	4	30.1 + 29.4, CH ₂	2.82, dd (16.9, 1.6) + 2.70 (17.0, 2.2) 2.92, dd (16.7, 4.4) + 2.86 (17.0, 5.0)
	4a	99.3 + 101.4, C	
	5	156.3 + 156.3, C	
	6	97.5 + 96.4, CH	5.95, s
	7	155.8 + 155.9, C	
	8	108.7 + 108.3, C	
	8a	155.4 + 155.4, C	
	1'	132.5 + 131.7, C	
	2'	115.2 + 114.8, CH	7.09, d (1.7) + 6.67, d (1.7)
	3'	46.2 + 145.6, C	
	4'	145.6 + 145.6, C	
	5'	116.0 + 115.9, CH	6.77, d (8.1) + 6.71, d (8.3)
6'	119.1 + 120.3, CH	6.86, dd (8.2, 1.6) + 6.44, dd (8.3, 1.6)	

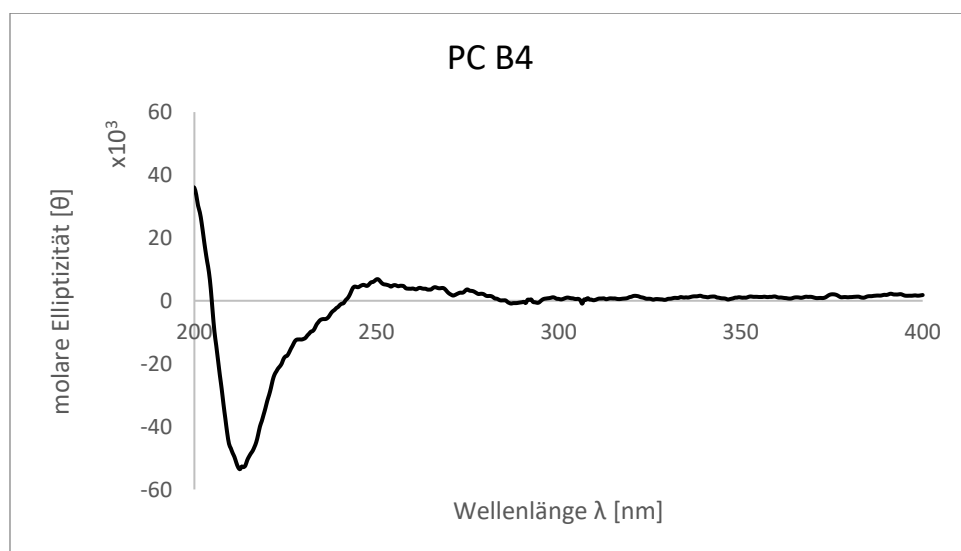
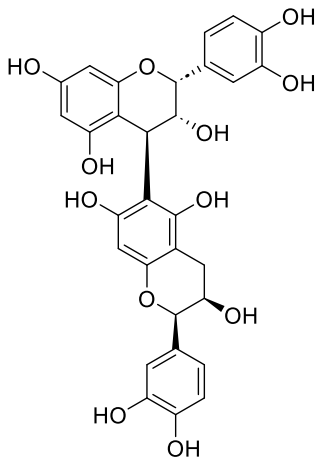


Abbildung 29. CD-Spektrum zu PC B4. CD (MeOH bei RT, θ) 236 (-5812,8), 250.5 (+6810.7), 239 (+17521.3), 275 (-3611,4).

3.3.5.7. Procyanidin B5



PC B5 (PA 6.5) eluierte in Fraktion PA6 bei der Sephadex®-Chromatographie. Bei PA6 wurde auf Unterfraktionierung mit MCI-Gel® verzichtet und so konnte die Verbindung direkt mittels präp. HPLC nach 15,0 min mit HPLC-System 4 (Kapitel 3.6.6.5) isoliert werden. Die Gesamtausbeute betrug 16,3 mg und die chromatographische Reinheit lag bei 89%. Die HR-ESI-MS Analyse im positiven Modus lieferte ein Pseudomolekülion mit m/z 579,1504 $[M+H]^+$. Dies lässt auf ein einfach verknüpftes dimeres Procyanidin mit Catechin- bzw. Epicatechin-Einheiten schließen. Da zum Zeitpunkt der Isolierung von PC B5 bereits alle soweit bekannten 4→8 verknüpften Verbindungen mit diesen Untereinheiten isoliert und aufgeklärt werden konnten, erschien ein 4→6 verknüpftes Procyanidin am wahrscheinlichsten. Hierfür sprach auch,

dass bereits bei RT auswertbare NMR-Spektren generiert werden konnten. Aus den NMR-Signalen konnte die obere Einheit aufgrund des br s bei 4,01 ppm für H-3 und des s bei 4,92 ppm für H-2 als 2,3-*cis*-konfiguriert und somit als Epicatechin identifiziert werden. Das gleiche gilt für die untere Einheit, die ebenfalls eine Epicatechin-Einheit darstellt, wobei die 2,3-*cis*-Konfiguration auch durch ein br s bei 4,15 ppm für H-3 und ein s bei 4,80 ppm für H-2 bestimmt werden konnte. Die ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen sind in **Tabelle 7** wiedergegeben. Für die Positionen C-7_A, C-8_D, C-8_{a_D} und H-8_D konnten die NMR-Signale nicht zugeordnet werden. Die 4→6-Verknüpfung konnte zum einen über das ROESY-Spektrum durch das Fehlen der Kreuzpeaks zwischen H-3 und H-4 des C-Rings der oberen Einheit mit H-2' und H-6' der unteren Einheit bestätigt werden, welche dagegen für das 4→8-konfigurierte PC B2 detektiert werden konnte. Zum anderen konnte durch Literaturwerte die Verbindung als PC B5 ebenfalls abgesichert werden [142, 143]. Die genaue Vorgehensweise, um eine 4→6 oder 4→8-Konfiguration zu identifizieren, soll später anhand von PC B8 (Kapitel 3.3.5.8) vorgestellt werden. Die β -Konfiguration konnte weiterhin über das CD-Spektrum bestätigt werden, da ein positiver Cotton-Effekt zwischen 210 und 270 nm auftritt (**Abbildung 30**). Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ lag bei +63,9 (0,1 g/100 ml in MeOH). Hierfür konnten allerdings nach Literaturrecherche keine Vergleichswerte gefunden werden.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 7. NMR-Tabelle zu PC B5 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektroskop mit 5 mm TCI CryoProbe ($^1\text{H-NMR}$: 600,25 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150,95 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	δ_{C} , Typ	δ_{H} (J in Hz)
obere Einheit	2	77.3, CH	4.92, s
	3	72.7, CH	4.01, br s
	4	37.7, CH	4.56, br s
	4a	99.5, C	
	5	159.5, C	
	6	96.7, CH	5.98, d (1.7)
	7	?	
	8	96.1, CH	6.05, d (1.7)
	8a	158.0, C	
	1'	132.2, C	
	2'	115.3, CH	6.89, d (2.2)
	3'	145.7 ^a , C	
	4'	145.8 ^a , C	
	5'	116.0, CH	6.70 - 6.76 ^c , m
6'	119.2, CH	6.67, dd (8.3, 2.2)	
untere Einheit	2	79.8, CH	4.80, s
	3	67.5, CH	4.15, br s
	4	29.6, CH ₂	2.80, d (16.7) 2.68, d (16.7)
	4a	100.6, C	
	5	156.2, C	
	6	108.4, C	
	7	156.2, C	
	8	?	?
	8a	?	
	1'	132.3, C	
	2'	115.3, CH	6.98, d (1.7)
	3'	145.7 ^b , C	
	4'	145.8 ^b , C	
	5'	116.0, CH	6.70 - 6.76 ^c , m
6'	119.4, CH	6.80, dd (8.3, 2.2)	

^{a-b} Signale mit gleichem Buchstaben sind austauschbar

^c Signale mit gleichem Buchstaben überlappen

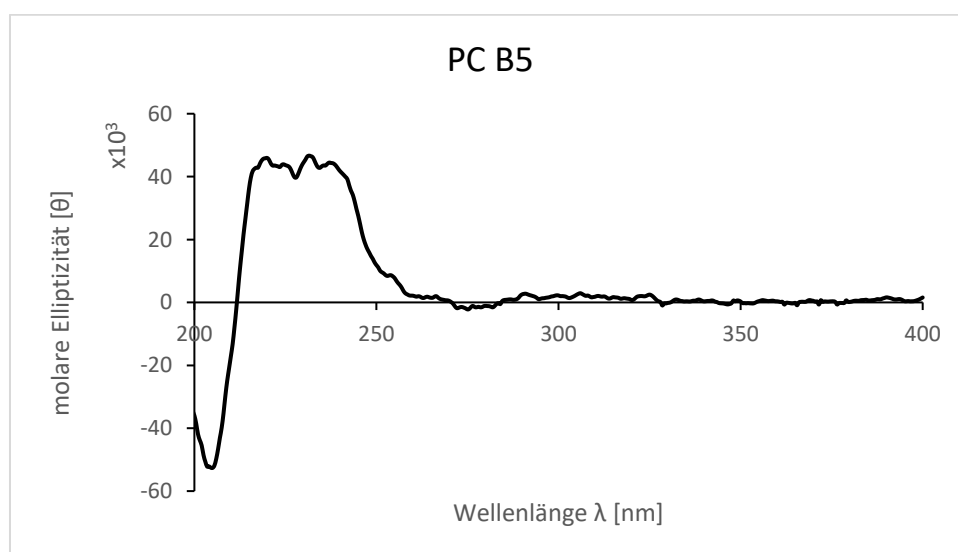
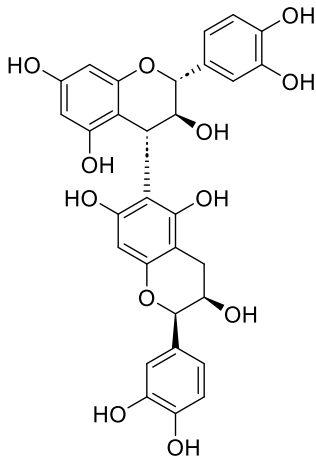


Abbildung 30. CD-Spektrum zu PC B5. CD (MeOH bei RT, θ) 205 (-43542,8), 222 (+6810,7), 231.5 (+46667,8), 275 (-2228,9).

3.3.5.8. Procyanidin B8



PC B8 (PA5 M5.3) eluierte in Fraktion PA 5 bei der Sephadex®-Chromatographie. Nach weiterer Aufarbeitung mittels Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® konnte die Substanz in Fraktion PA5 M5 detektiert werden. Aus dieser konnte sie dann über präp. HPLC nach 15,0 min mit HPLC-System 2 (Kapitel 3.6.6.5) endgültig isoliert werden. Die Ausbeute betrug nach Gefriertrocknung 5,5 mg. Über eine HR-ESI-MS Messung wurde ein Pseudomolekülion mit m/z 579,1504 $[M+H]^+$ detektiert. Dies spricht wieder für ein einfach verknüpftes dimeres PA mit dihydroxyliertem B- und E-Ring. Das δ bei 4,04 ppm in der unteren Einheit lässt auf eine 2,3-*cis*- und das typische δ bei 4,17 ppm auf eine 2,3-*trans*-konfigurierte obere Einheit schließen. Somit konnte das obere Monomer als Catechin und das untere als Epicatechin jeweils eindeutig identifiziert werden. Aufgrund dessen, dass PC B4 als 4 α →8-Analogon schon isoliert und zweifelsfrei identifiziert worden war, lag nahe, dass es sich bei der isolierten Substanz um ein 4→6-verknüpftes Dimer handelt. Um die Struktur zu verifizieren, wurde nach NMR-Daten für das vermutete Catechin-(4 α →6)-Epicatechin-Dimer gesucht. Nach intensiver Literaturrecherche konnten zwar zwei Arbeiten mit NMR-Datensätzen gefunden werden. Diese unterschieden sich jedoch selbst deutlich voneinander und somit konnte für beide nur eine teilweise Übereinstimmung mit den hier ermittelten NMR-Werten gefunden werden [144, 145]. Die Identifizierung der intermolekularen Verknüpfung bei PA ist schon länger ein viel diskutiertes Thema, da dies nicht immer zweifelsfrei möglich ist [146], was hier jedoch durch das 2D-NMR Experiment ROESY letztendlich gelang. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit isolierten Substanzen mit 4→8-Konfiguration konnte aufgrund der räumlichen Nähe ein Kreuzsignal zwischen H-3 und H-4 des C-Rings der oberen Einheit mit H-2' und H-6' der unteren Einheit detektiert werden. Diese Kreuzsignale treten bei 4→6 verknüpften Flavan-3-olen nicht auf (**Abbildung 31**), was in der räumlichen Entfernung begründet liegt und durch den Vergleich der Spektren mit dem vorher isolierten PC B5 bestätigt werden konnte (Kapitel 3.3.5.7). Zur Bestätigung der 4 α -Konfiguration, sollte wie bei vorher isolierten Substanzen ein CD-Spektrum aufgenommen werden. Nach Bestimmung der chromatographischen Reinheit lag diese bei 75%, weswegen die 4 α -Konfiguration über das CD-Spektrum leider nicht ermittelt werden konnte. Da aber keine brauchbaren Literaturdaten zum Abgleich und Ausräumen letzter Zweifel zur Verfügung standen, wurde das Isolat mit HPLC-System 9 (Kapitel 3.6.6.6) noch einmal aufgereinigt. So konnten nach Aufreinigung von 5,5 mg Isolat lediglich 0,7 mg aufgereinigte Substanz erhalten werden, womit es schließlich gelang, ein CD-Spektrum zu ermitteln. Der negative Cotton Effekt, der für die α -Konfiguration charakteristisch ist, konnte damit bestätigt und die Struktur als Catechin-(4 α →6)-Epicatechin nachgewiesen werden. Es wurde ein spezifischer Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ von -52,8 (0,1 g/100 ml in MeOH) ermittelt. Eine strukturbasierte Literaturrecherche ergab keinen bereits beschriebenen spezifischen Drehwert für diese Verbindung.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

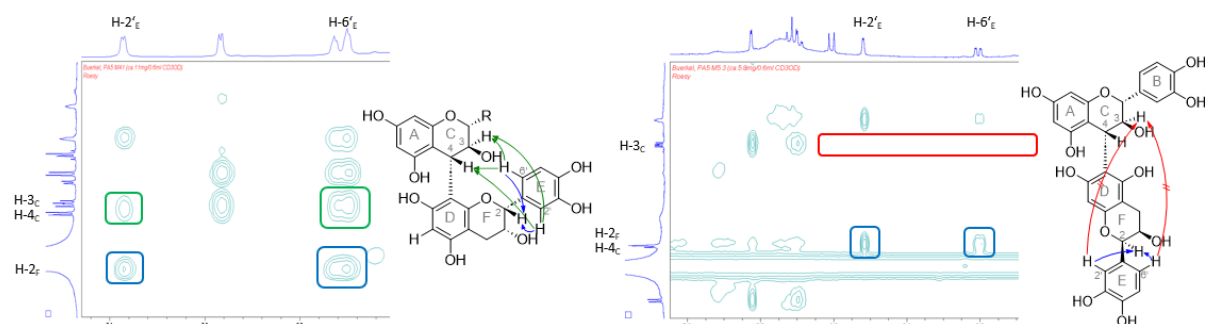


Abbildung 31. Ausschnitte aus den ROESY-Spektren (600,25 MHz) von PC B4 (links) und PC B8 (rechts). Links sind die Kreuzsignale von H-3_c/H-4_c mit H-2'_e/H-6'_e in grün markiert dargestellt. Die Kreuzsignale von H-2'_e/H-6'_e mit H-2_f sind blau markiert. Bei PC B8 (rechts) können lediglich die Kreuzsignale von H-2'_e/H-6'_e mit H-2_f (blau markiert) detektiert werden. Aufgrund der Entfernung von H-3_c/H-4_c und H-2'_e/H-6'_e treten bei 4→6 verknüpften PA keine Kreuzsignale auf (rot markiert).

Tabelle 8. NMR-Tabelle zu PC B8 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektroskop mit 5 mm TCI CryoProbe (¹H-NMR: 600,25 MHz, ¹³C-NMR: 150,95 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	δ _c , Typ	δ _H (J in Hz)
obere Einheit	2	79.8, CH	5.03, d (7.7)
	3	73.4, CH	4.17, m
	4	33.1, CH	4.73, d (6.1)
	4a	108.0, C	
	5	156.6, C	
	6	97.4 ^a , CH	5.93 ^a , m
	7	156.6, C	
	8	97.4 ^a , CH	5.93 ^a , m
	8a	155.0, C	
	1'	132.5, C	
2'	115.4, CH	6.82, d (1.7)	
3'	146.0 ^b , C		
4'	146.1 ^b , C		
5'	116.0, CH	6.72, d (8.3)	
6'	120.1, CH	6.69, dd (8.3, 1.7)	
untere Einheit	2	79.6, CH	4.73, s
	3	67.8, CH	4.04, br s
	4	29.4, CH ₂	2.87, dd (17.1, 5.0) 2.75, dd (17.1, 2.2)
	4a	100.3, C	
	5	156.2, C ^c	
	6	104.0, CH	
	7	156.2, C ^c	
	8	95.9, CH	6.02, m
	8a	?	
	1'	132.0, C	
2'	114.2, CH	6.52, d (1.9)	
3'	145.3 ^d , C		
4'	145.4 ^d , C		
5'	115.9, CH	6.60, d (8.3)	
6'	119.7, CH	6.20, dd (8.3, 1.7)	

^{a-d} Signale mit gleichem Buchstaben sind austauschbar

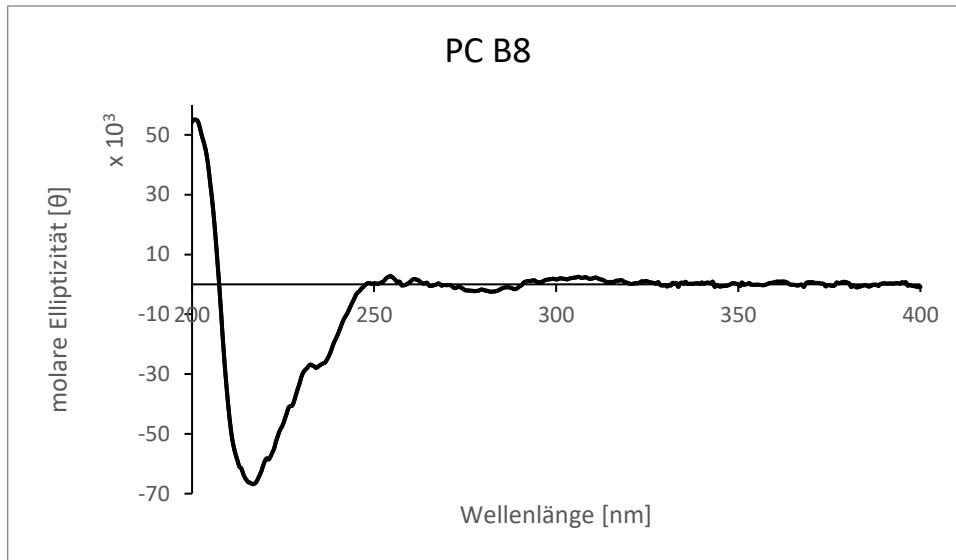
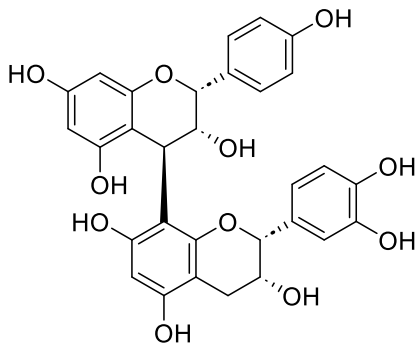


Abbildung 32. CD-Spektrum zu PC B8. CD (MeOH bei RT, θ) 217 (-66725,8), 234.5 (-27662.4), 256 (+1229.1), 282 (-2486,6).

3.3.5.9. Epiäfzelechin-(4 β →8)-Epicatechin

Epiäfzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (PA4 M2) eluierte beim Fraktionierungsschritt mit Sephadex®-Chromatographie in Fraktion PA 4. In der anschließenden Aufarbeitung mit Flash-Chromatographie an MCI-Gel® konnte die Verbindung direkt isoliert werden (Kapitel 3.6.6.2). Die gleiche Verbindung konnte außerdem aus dem EtOAc-Extrakt isoliert werden. Diese eluierte in Fraktion F6 nach Sephadex®-Säulenchromatographie und konnte anschließend über zwei Methoden der präp. HPLC gewonnen werden. Zuerst erfolgte die Aufreinigung der Fraktion

F6 mit HPLC-System 12, bei der F 6.2 nach 4,8 min eluierte und anschließend die finale Isolierung als F 6.2.1 (2,1 mg) mit HPLC-System 6 nach 26,0 min (Kapitel 3.6.6.5). Nach Zusammenführung der Isolate und Gefriertrocknung konnte eine Gesamtausbeute von 306,4 mg gewonnen werden. Die chromatographische Reinheit betrug 99%. Die LC-MS-Analyse im negativen Modus konnte ein Pseudomolekülion mit m/z 561,1409 $[M-H]^-$ erfassen. Dies spricht für ein einfach verknüpftes dimeres PA, wobei eine Einheit einen monohydroxylierten A- oder B-Ring aufweisen muss. Das entsprechende Monomer mit monohydroxyliertem B-Ring entspricht (Epi-)äfzelechin, konnte jedoch aus Fraktion PA 3, die Monomere enthielt, nicht isoliert werden. Die NMR-Daten sind in **Tabelle 9** wiedergegeben. Da schon bei RT ein auswertbares Spektrum generiert werden konnte, liegt wieder eine β -Konfiguration vor. Anhand der typischen Signale für 2,3-*cis*-konfigurierte Monomere, konnten diese schnell identifiziert werden. In der oberen Einheit ergaben sich für den B-Ring ein d bei 7,17 ppm ($J = 8,7$) und ein weiteres bei 6,70 ppm ($J = 8,7$) und so nur zwei verschiedene Signale für vier Protonen (H-2, H-3, H-5 und H-6). Jedes Signal integrierte jedoch für zwei Protonen, was für ein AA'BB'-Spinsystem und eine Symmetrie im B-Ring sprach. Aufgrund der Kreuzsignale im COSY und HMBC konnten das d bei 7,17 ppm H-2' und H-6' und das d bei 6,70 ppm H-3' und H-5' zugeordnet werden. Des Weiteren zeigt das Signal für C-2' / C-6' eine Verschiebung von 129,1 ppm, die typisch für diese Position in einem monohydroxylierten B-Ring ist. So konnte die obere Einheit als Epiäfzelechin identifiziert werden und die gesamte Verbindung als Epiäfzelechin-(4 β →8)-Epicatechin, was durch den Abgleich mit der Literatur bestätigt werden konnte [146]. Über das CD-Spektrum konnte weiterhin die β -Verknüpfung abgesichert werden (**Abbildung 33**). Es wurde ein spezifischer Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ von +46,0 (0,2 g/100 ml in MeOH) ermittelt, wofür jedoch keine Literaturwert zum Vergleich gefunden werden konnte.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 9. NMR-Tabelle zu Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	$\delta_{C, \text{major}} + \delta_{C, \text{minor}}$, Typ	$\delta_{H, \text{major}} + \delta_{H, \text{minor}}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	77.0 + 76.3, CH	5.12, s
	3	73.6, CH	3.78, d (1.8) + 3.86, d (1.8)
	4	36.7, CH	4.62, d (0.9) + 4.52, s
	4a	102.0, C	
	5	157.8, C	
	6	95.6, CH	5.92, d (2.3)
	7	157.8, C	
	8	95.7, CH	5.95, d (2.3)
	8a	154.5, C	
	1'	131.8, C	
	2'	129.1 ^a + 129.8 ^a , CH	7.17 ^c , d (8.7) + 7.31 ^c , d (8.6)
	3'	115.5 ^b , CH	6.70 ^d , d (8.7)
	4'	156.7, C	
	5'	115.5 ^b , CH	6.70 ^d , d (8.7)
6'	129.1 ^a + 129.8 ^a , CH	7.17 ^c , d (8.7) + 7.31 ^c , d (8.6)	
untere Einheit	2	79.4 + 79.5, CH	4.95, s + 4.40, s
	3	67.1 + 67.3, CH	4.23, br s + 3.92, br s
	4	30.0, CH ₂	2.79, d (16.4) 2.93, dd (16.4, 4.2)
	4a	99.6, C	
	5	157.7, C	
	6	96.8, CH	5.87, s
	7	157.9, C	
	8	107.2, C	
	8a	156.6, C	
	1'	132.1, C	
	2'	114.8, CH	7.09, d (1.8)
	3'	145.9, C	
	4'	145.5, C	
	5'	115.7, CH	6.71, d (8.3)
6'	118.7, CH	6.85, dd (8.3, 1.8)	

^{a-d} gleiche Signale aufgrund der Symmetrie im B-Ring

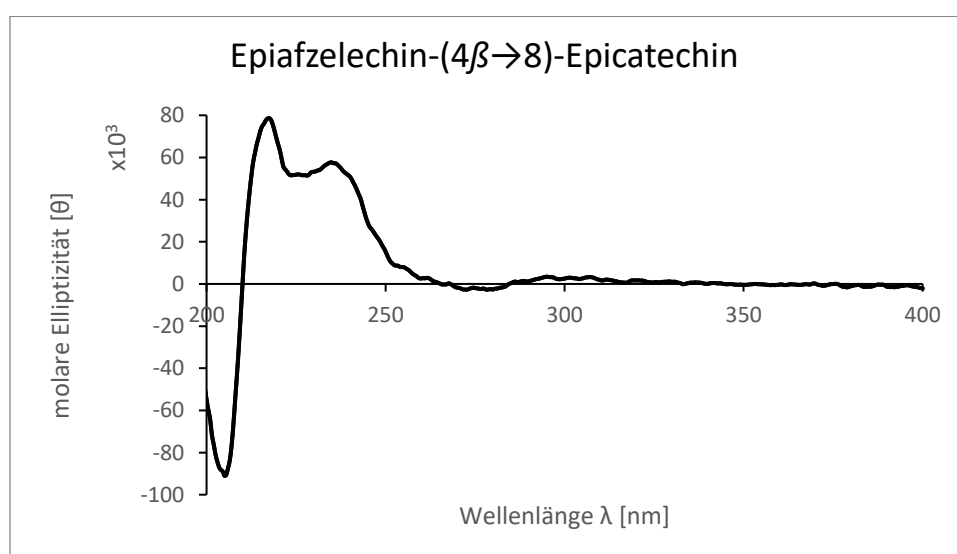
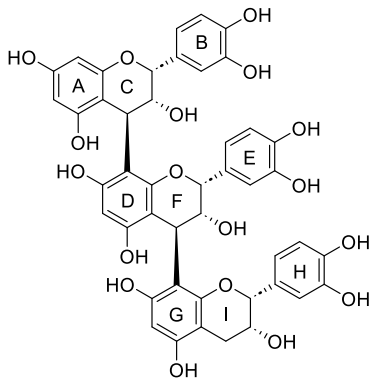


Abbildung 33. CD-Spektrum zu Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin. CD (MeOH bei RT, θ) 205 (-91013.2), 217.5 (+78643.4), 235 (+57635.9), 272.5 (-2713.7).

3.3.5.10. Procyanidin C1



PC C1 (PA5 M5.2) eluierte bei der Chromatographie mit Sephadex® LH-20 in Fraktion PA5 und PA6. Im nächsten Fraktionierungsschritt bei der Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® konnte die Verbindung in Fraktion PA5 M5 detektiert werden. Anschließend konnte sie aus dieser final mittels präp. HPLC mit HPLC-System 2 als PA5 M5.2 isoliert werden. PC C1 konnte zudem direkt aus PA 6 über präp. HPLC mit HPLC-System 4 isoliert werden und eluierte dabei nach 12,1 min. (Kapitel 3.6.6.5). Die Ausbeute nach Zusammenführen der Isolate betrug 55,6 mg bei einer chromatographischen Reinheit von 97%. Die HR-ESI-MS Analyse im

negativen Modus lieferte ein Pseudomolekülion mit m/z 865,2005 $[M-H]^-$, welches ein trimeres Flavan-3-ol mit jeweils einfach verknüpften Monomeren und dihydroxyliertem B-, E- und H-Ring nahelegt. **Tabelle 10** zeigt die zugeordneten NMR-Signale für die isolierte Verbindung. Das in Kapitel 3.3.5.2 diskutierte charakteristische br s für H-3 für 2,3-*cis*-konfigurierte Monomere bei oligomeren PA bleibt hier nur in der terminalen Einheit erhalten und ändert sich in den oberen Einheiten zu einem d. Diese Beobachtungen decken sich auch mit den Daten aus der Literatur für weitere Flavan-3-ole, in denen alle Monomere eine 2,3-*cis*-Konfiguration aufweisen [147–149]. So konnten für H-3 im I-Ring der unteren Einheit ein br s bei 4,31 ppm, ein d bei 3,92 ($J = 2,0$ Hz) für das H-3 des F-Rings in der mittleren Einheit und ein weiteres d bei 3,97 ppm ($J = 2,0$ Hz) für das H-3 des C-Rings in der oberen Einheit ermittelt werden. Dadurch konnte bei den Monomeren jeweils eine 2,3-*cis*-Konfiguration bestimmt und somit drei Epicatechin-Einheiten ermittelt werden. Durch die Aufnahme des CD-Spektrums konnte die Vermutung der 4 β -Konfiguration bestätigt werden (**Abbildung 34**). Die ermittelte Struktur von Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin konnte durch den Abgleich mit dem NMR-Datensatz von Shoji et al. bestätigt werden [147]. Zusätzlich wurde ein spezifischer Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ von +56,0 (0,1 g/100 ml in MeOH) ermittelt, der in guter Übereinstimmung mit der Literatur liegt [150].

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 10. NMR-Tabelle zu PC C1 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	δ _c , Typ	δ _H (J in Hz)
obere Einheit	2	76.8, CH	5.09, s
	3	73.5, CH	3.97, d (2.0)
	4	36.9, CH	4.69, br s
	4a	102.0, C	
	5	157.8 ^a , C	
	6	95.8 ^b , CH	5.97 ^c , d (2.0)
	7	157.9 ^a , C	
	8	95.9 ^b , CH	6.00 ^c , d (2.0)
	8a	157.9 ^a , C	
	1'	132.6, C	
	2'	114.9, CH	6.90, s
	3'	145.6, C	
	4'	145.2, C	
	5'	115.8, CH	6.67 - 6.76 ^d , m
6'	119.0, CH	6.69, m	
mittlere Einheit	2	76.7, CH	5.27, s
	3	73.2, CH	3.92, d (2.0)
	4	37.1, CH	4.69, br s
	4a	102.2	
	5	156.6, C	
	6	96.7, CH	5.90, s
	7	156.2, C	
	8	106.8, C	
	8a	154.6, C	
	1'	132.6, C	
	2'	114.8, CH	7.03, s
	3'	145.3, C	
	4'	145.7, C	
	5'	115.7, CH	6.67 - 6.76 ^d , m
6'	118.5, CH	6.69, m	
untere Einheit	2	79.4, CH	5.00, s
	3	66.7, CH	4.31, br s
	4	30.1, CH ₂	2.81, d (16.3) 2.96, d (16.4)
	4a	99.8, C	
	5	156.6, C	
	6	97.1, CH	5.95, s
	7	157.8, C	
	8	107.5, C	
	8a	154.9, C	
	1'	132.0, C	
	2'	115.0, CH	7.12, s
	3'	145.6, C	
	4'	145.3, C	
	5'	115.7, CH	6.67 - 6.76 ^d , m
6'	118.6, CH	6.89, d (9.5)	

^{a-c} Signale mit gleichem Buchstaben sind austauschbar

^d Signale mit gleichem Buchstaben überlappen

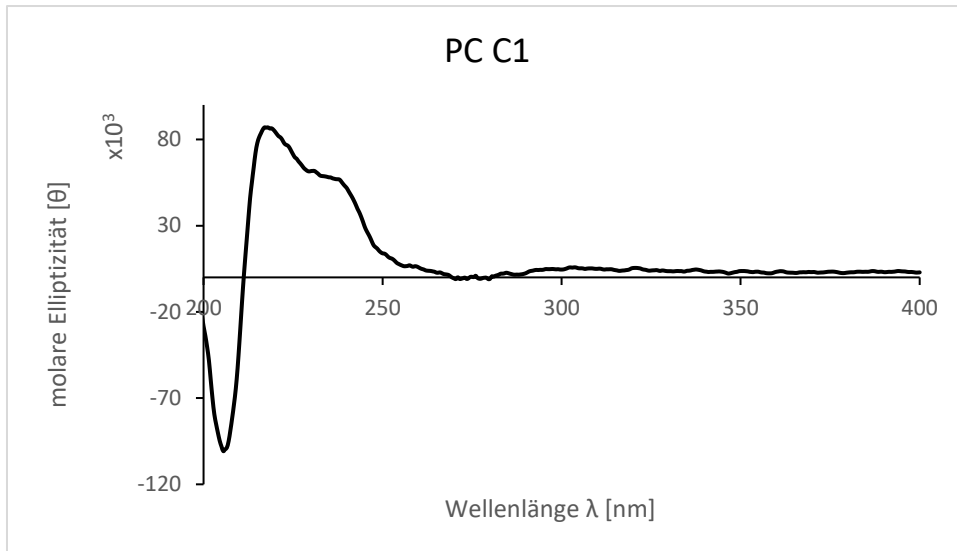
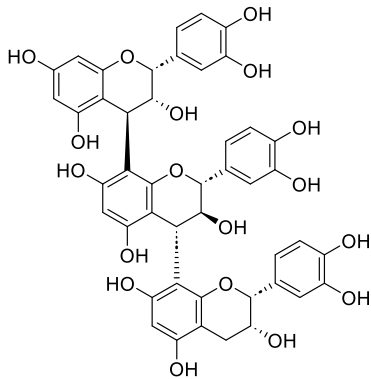


Abbildung 34. CD-Spektrum zu PC C1. CD (MeOH bei RT, θ) 205.5 (-100758.0), 218 (+86999.1), 237 (+56958.4), 271 (-1130.6).

3.3.5.11. Epicatechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin

Epicatechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin (PA5 M2.5, PA 6.1) eluierte bei der Sephadex[®]-Chromatographie in Fraktion PA5 und PA6. Nach Flash Chromatographie an MCI-Gel[®] konnte die Verbindung in Fraktion PA5 M2 detektiert und aus dieser über präp. HPLC mit HPLC-System 1 als PA5 M2.5 isoliert werden (R_t 14,1 min). Außerdem konnte sie ein weiteres Mal direkt aus PA 6 mit der präp. HPLC mit HPLC-System 4 als PA 6.1 gewonnen werden und nach 11,0 min eluierte (Kapitel 3.6.6.5). Die beiden Isolate wurden zusammengeführt und ergaben 32,5 mg, wobei die chromatographische Reinheit bei 94% lag. Die HR-ESI-MS Analyse im positiven Modus lieferte ein Pseudomolekülion mit m/z 867,2139 $[M+H]^+$. Damit lag die Vermutung nahe, dass es sich um ein einfach verknüpftes, trimeres Flavan-3-ol mit Catechin- bzw Epicatechin-Monomeren handelt. Die ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen sind in **Tabelle 11** dargestellt. Für die obere und untere Einheit konnten für H-3 jeweils ein br s bei 3,76 ppm und ein br s bei 4,21 ppm detektiert werden, was für eine 2,3-*cis*-Verknüpfung spricht. In der mittleren Einheit konnte im ^1H -Spektrum ein m bei 4,33 ppm für H-3 und im ^{13}C -Spektrum ein Signal bei 83.5 ppm für C-2 detektiert werden. Beides ist charakteristisch für eine 2,3-*trans*-Verknüpfung. Somit konnten das obere und untere Monomer als Epicatechin und das mittlere als Catechin identifiziert werden. Die spektroskopischen Daten liegen in guter Übereinstimmung mit Daten von Lokvam et al. für Epicatechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin [151]. Das ermittelte CD-Spektrum ergab einen negativen Cotton-Effekt zwischen 203 und 230 nm, der typisch für eine α -Konfiguration ist, der dann übergeht in einen positiven Cotton-Effekt von 230 bis 271 nm, was wiederum typisch für β -konfigurierte PA ist (**Abbildung 35**). Vergleicht man die Werte der molaren Elliptizität im Maximum im positiven Bereich (242 nm; 19805,2), so liegt er bei PC B4, welches α -konfiguriert ist, deutlich niedriger (250,5 nm; 6810,72). Dies könnte dafürsprechen, dass sich in diesem höheren Wellenlängenbereich die β -Konfiguration zwischen der mittleren und der unteren Einheit bemerkbar macht. Da bei den hier isolierten und dem überwiegenden Teil in der Literatur vorgestellten Substanzen auf ein Catechin als obere Einheit immer eine α -Konfiguration bzw. bei Epicatechin als obere Einheit eine β -Konfiguration folgt, wird dies auch in dieser Arbeit für diese und folgende Verbindungen postuliert. Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ von -21,3 (0,1 g/100 ml in MeOH) lag in einer Größenordnung mit vorher veröffentlichten Werten [150].

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 11. NMR-Tabelle zu Epicatechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	δ_C , Typ	δ_H (J in Hz)
obere Einheit	2	76.6, CH	5.36, s
	3	73.8, CH	3.76, br s
	4	37.1, CH	4.45, s
	4a	103.7, C	
	5	156.2 ^a , C	
	6	95.1, CH	5.62, d (2.0)
	7	156.0 ^a , C	
	8	95.2, CH	5.30, d (2.2)
	8a	157.3, C	
	1'	133.5, C	
	2'	115.2, CH	6.63, m
	3'	145.1, C	
	4'	145.8, C	
	5'	115.5, CH	6.73 - 6.85 ^c , m
	6'	119.7, CH	6.73 - 6.85 ^c , m
mittlere Einheit	2	83.5, CH	3.85, d (9.8)
	3	75.2, CH	4.33, m
	4	39.1, CH	4.55, d (7.5)
	4a	107.8, C	
	5	154.9, C	
	6	97.0, CH	5.92, s
	7	157.6, C	
	8	109.3, C	
	8a	154.9, C	
	1'	132.0, C	
	2'	115.0, CH	6.95, s
	3'	145.6, C	
	4'	146.0, C	
	5'	115.1, CH	6.73 - 6.85 ^c , m
	6'	121.4, CH	6.41, dd (8.4, 1.2)
untere Einheit	2	79.5, CH	4.93, s
	3	67.3, CH	4.21, br s
	4	30.1, CH ₂	2.80, d (16.4) 2.91, d (16.3)
	4a	98.6, C	
	5	155.8, C	
	6	97.1, CH	6.00, s
	7	157.6, C	
	8	109.8, C	
	8a	155.2, C	
	1'	132.5, C	
	2'	114.8, CH	7.05, d (1.0)
	3'	145.3 ^b , C	
	4'	145.4 ^b , C	
	5'	115.5, CH	6.73 - 6.85 ^c , m
	6'	118.6, CH	6.81, d (8.4)

^{a-b} Signale mit gleichem Buchstaben sind austauschbar

^c Signale mit gleichem Buchstaben überlappen

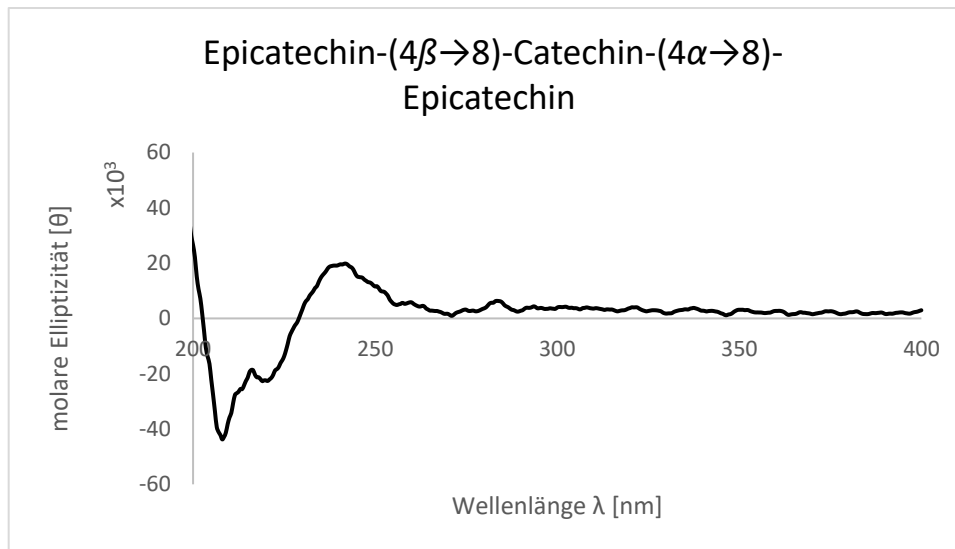
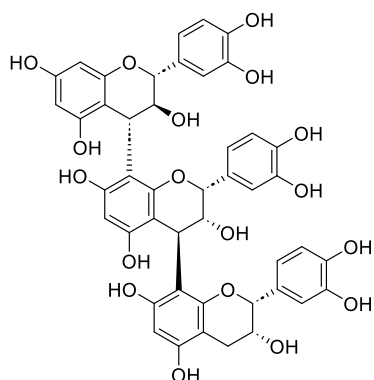


Abbildung 35. CD-Spektrum zu Epicatechin-(4β→8)-Catechin-(4α→8)-Epicatechin. CD (MeOH, Θ) 208 (-43752.7), 219 (-22686.9), 242 (+19805.2), 271 (+922.0).

3.3.5.12. Catechin-(4 α →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin

Catechin-(4 α →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin (PA5 M1.1) eluierte bei der Chromatographie mit Sephadex® LH-20 in Fraktion PA5. Nach dem Fraktionierungsschritt mittels MCI-Gel® Flash-Chromatographie konnte es in Fraktion PA5 M5 detektiert und schließlich mit präp. HPLC mit HPLC-System 3 final aufgereinigt werden. PA5 M1.1 eluierte dabei nach 7,3 min (Kapitel 3.6.6.5). Die Gesamtausbeute betrug 10,8 mg bei einer chromatographischen Reinheit von 93%. Die HR-ESI-MS Analyse im negativen Modus lieferte ein Pseudomolekülion mit m/z 865,1994 $[M+H]^+$. Für die obere Einheit konnte ein m bei 4,56 ppm mit der typischen

Aufspaltung für das H-3 eines 2,3-*trans*-konfigurierten Monomers detektiert werden. Des Weiteren konnten für die unteren Einheiten zwei β s detektiert werden, die auf 2,3-*cis*-Konfiguration schließen lassen. Somit wurde auf Basis der 2D-Spektren, über welche die 4→8-Konfiguration bewiesen werden konnte, als Struktur Catechin-(4 α →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin postuliert. Die Verbindung konnte bereits von Kolodziej et al. isoliert werden, jedoch liegen die NMR-Daten nur für das Peracetat vor [152]. Nach intensiver Literaturrecherche konnten keine NMR-Daten für die freiphenolische Verbindung gefunden werden, womit diese mit dieser Arbeit zum ersten Mal präsentiert werden können (Tabelle 12). Die Aufnahme des CD-Spektrums zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Verbindung Epicatechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin (Kapitel 3.3.5.11). Auch hier tritt ein negativer Cotton-Effekt zwischen 202 und 232 nm und ein positiver Cotton-Effekt zwischen 232 und 269 nm auf, der auf die beiden unterschiedlichen intramolekularen Verknüpfungen der Monomere zurückzuführen ist (Abbildung 36). Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ lag bei -59,1 (0,1 g/100 ml in MeOH) und ist hiermit auch zum ersten Mal beschrieben.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 12. NMR-Tabelle zu Catechin-(4 α →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	δ_C , Typ	δ_H (J in Hz)
obere Einheit	2	84.1, CH	3.74, d (9.9)
	3	74.2, CH	4.56, m
	4	38.3, CH	4.35, d (9.8)
	4a	107.2, C	
	5	155.6 ^a , C	
	6	94.6 ^b , CH	5.64 ^c , d (1.9)
	7	155.2 ^a , C	
	8	95.2 ^b , CH	5.19 ^c , d (2.0)
	8a	157.7, C	
	1'	133.2 ^d , C	
	2'	115.6, CH	6.69 - 6.74 ^{e, f} , m
	3'	145.3, C	
	4'	144.5, C	
	5'	118.4, CH	6.61 ^g , m
	6'	121.4, CH	6.39, d (6.5)
mittlere Einheit	2	75.3, CH	5.16, s
	3	72.3, CH	3.61, br s
	4	36.7, CH	4.42, s
	4a	103.7, C	
	5	156.5, C	
	6	96.9, CH	6.00, s
	7	154.0, C	
	8	109.3, C	
	8a	158.1, C	
	1'	132.6 ^d , C	
	2'	115.0, CH	6.95, d (1.1)
	3'	144.5, C	
	4'	145.8, C	
	5'	115.5, CH	6.69 - 6.74 ^{e, f} , m
	6'	115.5, CH	6.76, m
untere Einheit	2	79.0, CH	5.06, s
	3	65.6, CH	4.43, br s
	4	22.9, CH ₂	2.15, d (16.5) 2.55, d (16.4)
	4a	99.0, C	
	5	156.6, C	
	6	96.9, CH	6.00, s
	7	157.8, C	
	8	110.3, C	
	8a	155.3, C	
	1'	131.9 ^d , C	
	2'	114.9, CH	6.67, d (1.1)
	3'	145.6, C	
	4'	146.0, C	
	5'	118.5, CH	6.61 ^g , m
	6'	116.3, CH	6.39, m

^{a-e} Signale mit gleichem Buchstaben sind austauschbar

^{f-g} Signale mit gleichem Buchstaben überlappen

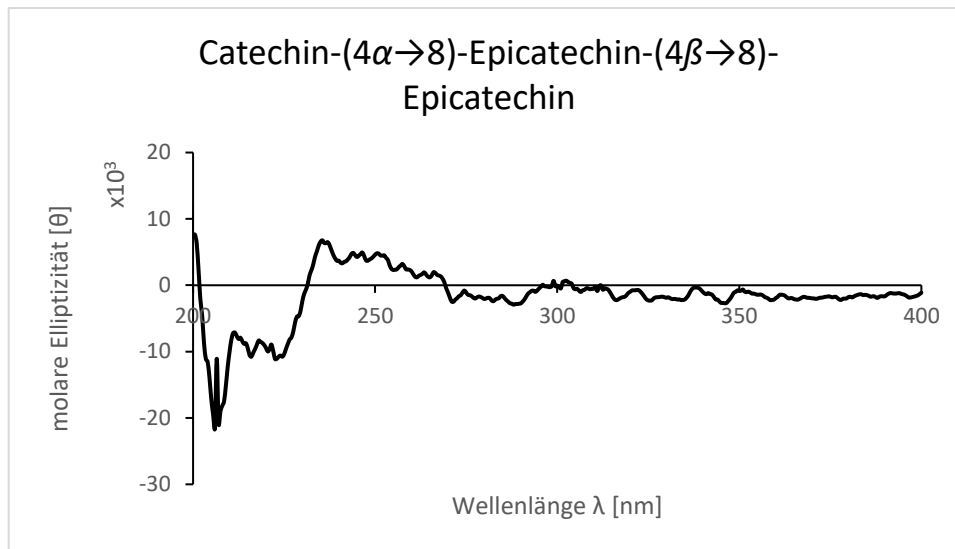
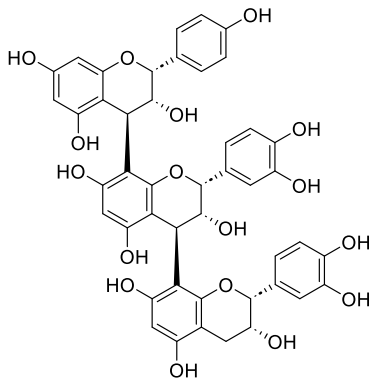


Abbildung 36. CD-Spektrum zu Catechin-(4 α →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin. CD (MeOH bei RT, Θ) 206.5 (-22485.3), 223 (-11073.9), 237 (+6494.9), 271 (-2454.8).

3.3.5.13. Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin

Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin (PA5 M6.2) eluierte bei der Sephadex®-Chromatographie in Fraktion PA5. Nach weiterer Auftrennung über Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® konnte die Verbindung in Fraktion PA5 M6 detektiert werden. Bei der präp. HPLC mit HPLC-System 2 eluierte die Substanz nach 16,1 min und konnte final isoliert werden (Kapitel 3.6.6.5). Die Gesamtauswaage betrug 35,4 mg und die chromatographische Reinheit lag bei 97%. Über eine HR-ESI-MS Messung wurde ein Pseudomolekülion mit m/z 849,2044 [M-H]⁻ detektiert. Dies legt nahe, dass es sich um ein trimeres Flavan-3-ol handelt, welches

jeweils einfach verknüpft ist und eine Einheit einen monohydroxylierten B-Ring besitzt. Ein erster Blick auf das ¹³C-Spektrum bestätigte dies, da ein Signal bei 128,9 ppm detektiert werden konnte, der charakteristisch für C-2' bzw. C-6' bei monohydroxylierten B-Ringen ist. Dieser konnte durch Auswertung aller NMR-Daten der oberen Einheit zugeschrieben werden. Außerdem konnten für die oberen beiden Einheiten die typischen d bei 3,92 ppm ($J = 1,4$ Hz) für H-3_F und bei 3,96 ppm für H-3_C ($J = 1,5$ Hz) ermittelt werden, die wie in Kapitel 3.3.5.10 diskutiert durch 2,3-*cis*-konfigurierte Einheiten verursacht werden, wenn es sich dabei nicht um die terminale Einheit handelt. Für diese wiederum konnte ein brs bei 4,31 ppm für H-3 ermittelt werden, was ebenfalls auf eine *cis*-Konfiguration hindeutet. In **Tabelle 13** sind die NMR-Daten wiedergegeben. Durch die Kreuzsignale im ROESY zwischen H-3 / H-4 der oberen Einheiten mit H-2' / H-6' der darunter liegenden Einheiten konnte wie in Kapitel 3.3.5.8 die Verknüfungsposition bestimmt werden. Das CD-Spektrum zeigt einen starken positiven Cotton-Effekt zwischen 211 und 254 nm, welches die β -Konfiguration bestätigt (**Abbildung 37**). Somit konnte die Verbindung als Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin identifiziert werden. Nach eingehender Literaturrecherche konnten auch für diese Verbindung lediglich die Daten für das Peracetat gefunden werden, womit hiermit die freiphenolischen Daten zum ersten Mal beschrieben sind [148]. Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{23}$ von +64,6 (0,1 g/100 ml in MeOH) ist ebenfalls zum ersten Mal beschrieben.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 13. NMR-Tabelle zu Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	δ_C , Typ	$\delta_{H, \text{major}} + \delta_{H, \text{minor}}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	76.8, CH	5.14, s
	3	73.5, CH	3.96, d (1.5)
	4	36.9, CH	4.69, s
	4a	102.0, C	
	5	157.9 ^a , C	
	6	95.8 ^b , CH	5.97 ^c , d (2.8)
	7	157.9 ^a , C	
	8	95.8 ^b , CH	5.99 ^c , d (2.8)
	8a	157.5, C	
	1'	131.8, C	
	2'	128.9 ^g , CH	7.24 ^h , d (8.6)
	3'	115.6 ⁱ , CH	6.65-6.77 ^{f, j} , m
	4'	157.5, C	
	5'	115.6 ⁱ , CH	6.65-6.77 ^{f, j} , m
6'	128.9 ^g , CH	7.24 ^h , d (8.6)	
mittlere Einheit	2	76.7, CH	5.26, s
	3	73.2, CH	3.92, d (1.4)
	4	37.1, CH	4.68, s
	4a	102.3, C	
	5	156.2, C	
	6	96.6, CH	5.90, s
	7	157.8, C	
	8	106.8, C	
	8a	154.9, C	
	1'	132.6, C	
	2'	114.7, CH	7.03, d (1.0)
	3'	145.2, C	
	4'	145.8, C	
	5'	115.6, CH	6.65-6.77 ^f , m
6'	118.4, CH	6.65-6.77 ^f , m	
untere Einheit	2	79.4, CH	4.99, s
	3	66.7, CH	4.31, br s + 4.24, br s
	4	30.1, CH ₂	2.81, d (16.0) 2.96, d (16.0)
	4a	99.8, CH	
	5	156.6 ^d , C	
	6	97.1, CH	5.93, s + 5.81, s
	7	156.7 ^d , C	
	8	107.6, C	
	8a	154.6, C	
	1'	132.0, C	
	2'	115.0, CH	7.11, d (1.3)
	3'	145.6 ^e , C	
	4'	145.9 ^e , C	
	5'	115.7, CH	6.65-6.77 ^f , m
6'	118.7, CH	6.89, dd (8.2, 1.0)	

^{a-e} Signale mit gleichem Buchstaben sind austauschbar

^f Signale überlappen

^{g-j} gleiche Signale aufgrund der Symmetrie im B-Ring

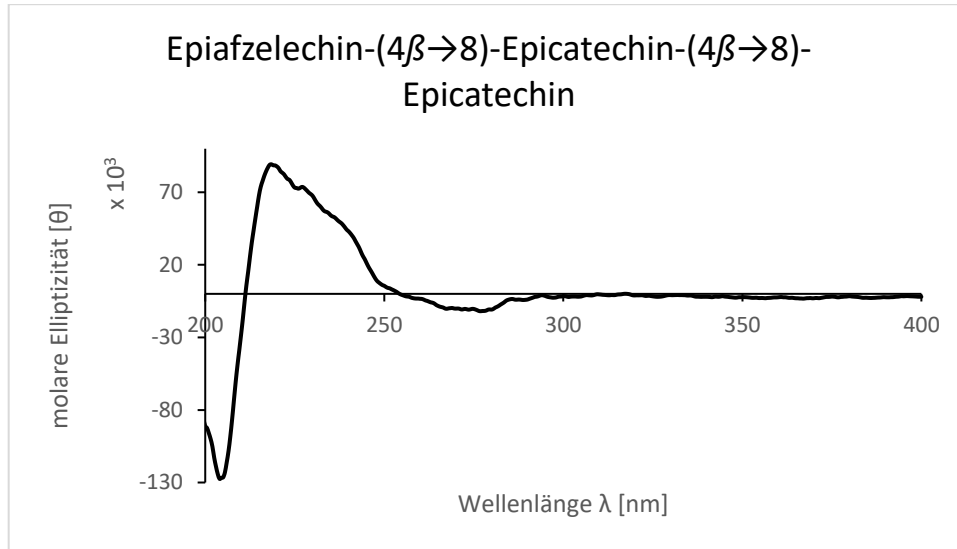
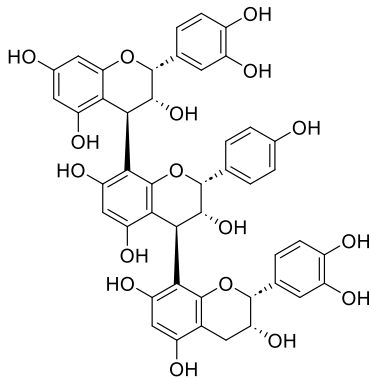


Abbildung 37. CD-Spektrum zu Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin. CD (MeOH bei RT, Θ) 204 (-127484.0), 218.5 (+89258.3), 227 (+73704.1), 277 (-11931.5).

3.3.5.14. Epicatechin-(4 β →8)-Epiäpfzelechin-(4 β →8)-Epicatechin

Epicatechin-(4 β →8)-Epiäpfzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (PA5 M6.3) eluierte bei der Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 in Fraktion PA 5. Nach Flash-Chromatographie an MCI-Gel® konnte die Verbindung in Fraktion PA5 M6 detektiert und schließlich mittels präp. HPLC mit HPLC-System 2 als PA 5 M6.3 isoliert werden. Dabei eluierte die Verbindung nach 17,5 min. (Kapitel 3.6.6.5). Die Gesamtausbeute betrug 39,1 mg bei einer chromatographischen Reinheit von 93%. Die HR-ESI-MS Messung im negativen Modus zeigte ein Pseudomolekülion mit m/z 849,2047 [M-H]⁻, welches ein

trimeres Flavan-3-ol mit jeweils einfach verknüpften Monomeren nahelegt, von denen zwei einen dihydroxylierten und eins einen monohydroxylierten B-Ring aufweisen. Die gemessenen ¹H- und ¹³C-Verschiebungen sind in **Tabelle 14** aufgeführt. In der unteren Einheit konnte für H-3 ein br s bei 4,30 ppm und in der oberen und mittleren Einheit jeweils ein d bei 3,92 ppm und 3,85 ppm mit einer Kopplungskonstante von jeweils 1,5 Hz detektiert werden. Diese drei Signale sprechen für eine 2,3-*cis*-Konfiguration in allen drei Einheiten. Im mittleren Monomer konnte im ¹³C-Spektrum ein Peak bei 128,8 ppm erfasst werden, der C-2' und C-6' des monohydroxylierten B-Rings zugeordnet werden kann. Somit konnte die mittlere Einheit als Epiäpfzelechin identifiziert werden. Das aufgenommene CD-Spektrum zeigt einen starken positiven Cotton-Effekt zwischen 213 und 258 nm. Dieser untermauert die Annahme der für *cis*-konfigurierte Flavan-3-ole typischen β -Konfiguration zwischen den Einheiten. Die 4→8-Konfigurationen können über die Kreuzsignale im ROESY zwischen H-3_C und H-2'_E / H-6'_E für die oberen Einheiten und zwischen H-3_F und H-2'_H zwischen der mittleren und der unteren Einheit bestätigt werden. Die Ermittlung des spezifischen Drehwerts ergab einen $[\alpha]_D^{22}$ von +69,4 (0,1 g/100 ml in MeOH). Nach intensiver Literaturrecherche über SciFinder® (Stand: 20.03.2023) konnte keine Arbeit gefunden werden, in der dieses Molekül bereits isoliert wurde. Die Substanz ist lediglich in einer Arbeit von Alejo-Armijo et al. beschrieben, allerdings wurde sie in dieser nur über HPLC-ESI-MS nachgewiesen, womit keinerlei Information über die Verknüpfung und Stereochemie gegeben ist [149]. Somit sind in dieser Arbeit zum ersten Mal ein kompletter NMR-Satz und chiroptische Daten für die Verbindung Epicatechin-(4 β →8)-Epiäpfzelechin-(4 β →8)-Epicatechin beschrieben.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 14. NMR-Tabelle zu Epicatechin-(4 β →8)-Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	δ_C , Typ	$\delta_{H, major} + \delta_{H, minor}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	76.8, CH	5.10, s
	3	73.4, CH	3.92, d (1.5)
	4	36.8, CH	4.68, s
	4a	102.1, C	
	5	157.7 ^a , C	
	6	95.8 ^b , CH	5.97 ^c , d (2.8)
	7	157.9 ^a , C	
	8	95.8 ^b , CH	5.99 ^c , d (2.8)
	8a	157.5, C	
	1'	132.6, C	
	2'	115.0, CH	6.89, d (1.4)
	3'	145.3, C	
	4'	145.4, C	
	5'	115.4, CH	6.66-6.75 ^f , m
6'	119.0, CH	6.66-6.75 ^f , m	
mittlere Einheit	2	77.0, CH	5.33, s
	3	73.4, CH	3.85, d (1.5)
	4	36.9, CH	4.70, s
	4a	102.0, C	
	5	156.2, C	
	6	96.7, CH	5.90, s
	7	157.9, C	
	8	106.9, C	
	8a	155.0, C	
	1'	131.9, C	
	2'	128.8 ^g , CH	7.30 ^h , d (8.6)
	3'	115.6 ⁱ , CH	6.66-6.75 ^{f,j} , m
	4'	157.5, C	
	5'	115.6 ⁱ , CH	6.66-6.75 ^{f,j} , m
6'	128.8 ^g , CH	7.30 ^h , d (8.6)	
untere Einheit	2	79.4, CH	4.98, s + 4.92, s
	3	66.7, CH	4.30, br s + 4.23, br s
	4	30.1, CH ₂	2.81, d (16.0) 2.95, d (16.2)
	4a	99.7, CH	
	5	156.6 ^d , C	
	6	97.1, CH	5.95, s
	7	156.2 ^d , C	
	8	107.5, C	
	8a	154.6, C	
	1'	131.9, C	
	2'	114.9, CH	7.10, d (1.4)
	3'	145.6 ^e , C	
	4'	145.6 ^e , C	
	5'	115.7, CH	6.66-6.75 ^f , m
6'	118.7, CH	6.89, dd (8.1, 1.2)	

^{a-e} Signale mit gleichem Buchstaben sind austauschbar

^f Signale mit gleichem Buchstaben überlappen

^{g-j} gleiche Signale aufgrund der Symmetrie im B-Ring

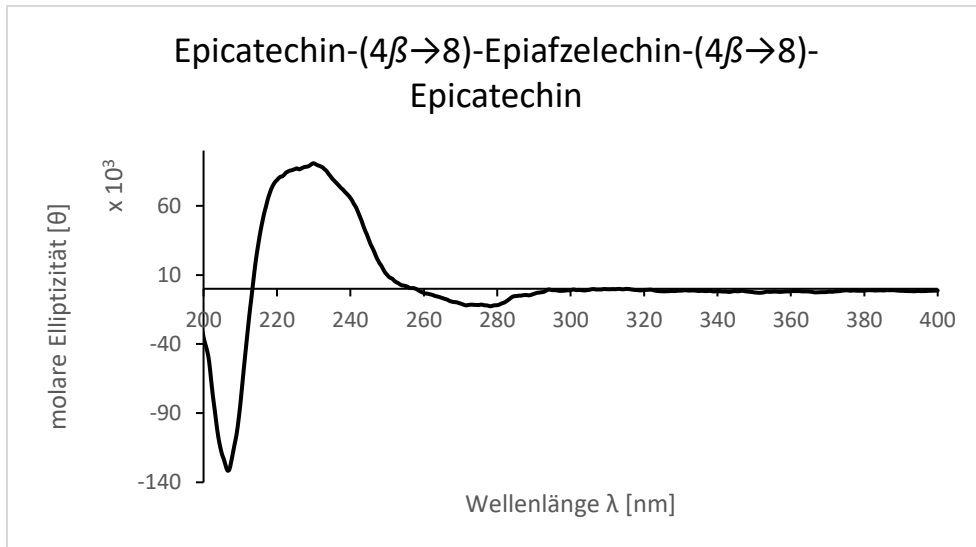
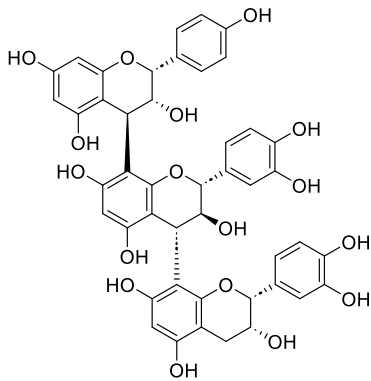


Abbildung 38. CD-Spektrum zu Epicatechin-(4 β →8)-Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin. CD (MeOH bei RT, Θ)
206 (-127711.0), 230 (+9078.,5), 278 (-12599.0).

3.3.5.15. Epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin

Epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin (PA5 M3.3) eluierte bei der Sephadex[®]-Chromatographie in Fraktion PA5. Im Aufarbeitungsschritt mit Flash-Chromatographie an MCI-Gel[®] konnte die Verbindung in Fraktion PA5 M3 detektiert und durch präp. HPLC mit HPLC-System 1 nach 17,1 min als PA5 M3.3 isoliert werden (Kapitel 3.6.6.5). Die Gesamtausbeute betrug 15,1 mg bei einer chromatographischen Reinheit von 92%. Die HR-ESI-MS Messung im negativen Modus lieferte ein Pseudomolekülion mit m/z 849,2039 [M-H]⁻. Dies spricht erneut für ein trimeres Flavan-3-ol, bestehend aus einer (Epi)afzelechin-Einheit und zwei Einheiten mit

dihydroxyliertem B-Ring. Die ermittelten NMR-Signale sind in **Tabelle 15** angegeben. In der unteren Einheit konnte ein br s bei 4,21 ppm für H-3 detektiert werden. In der oberen Einheit konnte ein d bei 3,75 ppm und einer Kopplungskonstante von 1,4 Hz H-3 zugeordnet werden. Beides spricht jeweils für 2,3-*cis*-konfigurierte Monomere als oberste und unterste Einheit. Außerdem konnte ein m bei 4,34 ppm für H-3 der mittleren Einheit detektiert werden, womit für diese eine 2,3-*trans*-Konfiguration ermittelt werden konnte. Im ¹³C-Spektrum konnte das Signal bei 129,7 ppm C-2' und C-6' des monohydroxylierten B-Rings zugewiesen werden, die sich typischerweise in diesem Verschiebungsbereich wiederfinden. Weiterhin konnte ein d bei 7,30 ppm ermittelt werden, welches für zwei Protonen integrierte. Diese für PA starke Tieffeldverschiebung ist charakteristisch für H-2' / H-6' von monohydroxylierten B-Ringen. Somit konnte die obere Einheit als Epiafzelechin identifiziert werden. Das ROESY-Spektrum zeigt Kreuzsignale zwischen H-3 und H-4 im C- und F-Ring mit den H-2' und H-6' der darunter liegenden E- und H-Ringe, wie sie nur bei 4→8-konfigurierten Flavan-3-olen vorkommen. Das CD-Spektrum zeigt einen negativen Cotton-Effekt zwischen 205 und 233 nm, welches durch eine α -Konfiguration hervorgerufen wird (**Abbildung 39**). Der Einfluss einer β -Konfiguration auf das Spektrum kann bei dieser Verbindung nicht festgestellt werden. Dennoch werden die in Kapitel 3.3.5.11 dargestellten Überlegungen auch auf dieses Molekül übertragen und so wird als finale Struktur Epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin postuliert. Die Ermittlung des spezifischen Drehwerts ergab einen $[\alpha]_D^{23}$ von -44,6 (0,1 g/100 ml in MeOH). Nach ausgedehnter strukturbasierter Literaturrecherche über SciFinder[®] (Stand: 20.03.2023) konnten für diese Verbindung keine Vergleichsdaten gefunden werden. Wie bei Epicatechin-(4 β →8)-Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (Kapitel 3.3.5.14) konnte auch diese Substanz nur über HPLC-ESI-MS nachgewiesen werden, wodurch aber keinerlei Information über die Stereochemie gegeben ist [149]. Somit ist auch diese Substanz zum ersten Mal isoliert und vollständig beschrieben worden.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 15. NMR-Tabelle zu Epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	δ_C , Typ	δ_H (J in Hz)
obere Einheit	2	76.6, CH	5.41, s
	3	73.8, CH	3.75, d (1.4)
	4	37.1, CH	4.47, s
	4a	103.7, C	
	5	156.0 ^a , C	
	6	95.1, CH	5.64, d (1.0)
	7	156.2 ^a , C	
	8	95.4, CH	5.29, d (1.2)
	8a	157.3, C	
	1'	132.8, C	
	2'	129.7 ^h , CH	7.30 ⁱ , d (8.3)
	3'	115.5 ^f , CH	6.70 - 6.70 ^{d, g} , m
	4'	157.6, C	
	5'	115.5 ^f , CH	6.70 - 6.79 ^{d, g} , m
	6'	129.7 ^h , CH	7.30 ⁱ , d (8.3)
mittlere Einheit	2	83.5, CH	3.85, d (9.8)
	3	75.2, CH	4.34, m
	4	39.1, CH	4.55, d (7.8)
	4a	107.9, C	
	5	155.1, C	
	6	96.7, C	5.91, s
	7	157.6, C	
	8	109.3, C	
	8a	154.8, C	
	1'	132.0, C	
	2'	115.0, CH	6.58 - 6.65 ^e , m
	3'	145.4 ^b , C	
	4'	145.1 ^b , C	
	5'	115.0, CH	6.58 - 6.65 ^e , m
	6'	121.4, CH	6.41, d (8.8)
untere Einheit	2	79.5, CH	4.93, s
	3	67.4, CH	4.21, br s
	4	30.1, CH ₂	2.78, d (15.7) 2.88, dd (16.7, 4.0)
	4a	98.5, C	
	5	155.7, C	
	6	97.0, CH	6.01, s
	7	158.0, C	
	8	109.8, C	
	8a	155.7, C	
	1'	132.5, C	
	2'	114.8, CH	7.05, s
	3'	145.4 ^c , C	
	4'	145.1 ^c , C	
	5'	115.4, CH	6.70 - 6.79 ^d , m
	6'	118.6, CH	6.82, d (8.0)

^{a-c} Signale mit gleichem Buchstaben sind austauschbar

^{d-e} Signale mit gleichem Buchstaben überlappen

^{f-i} gleiche Signale aufgrund der Symmetrie im B-Ring

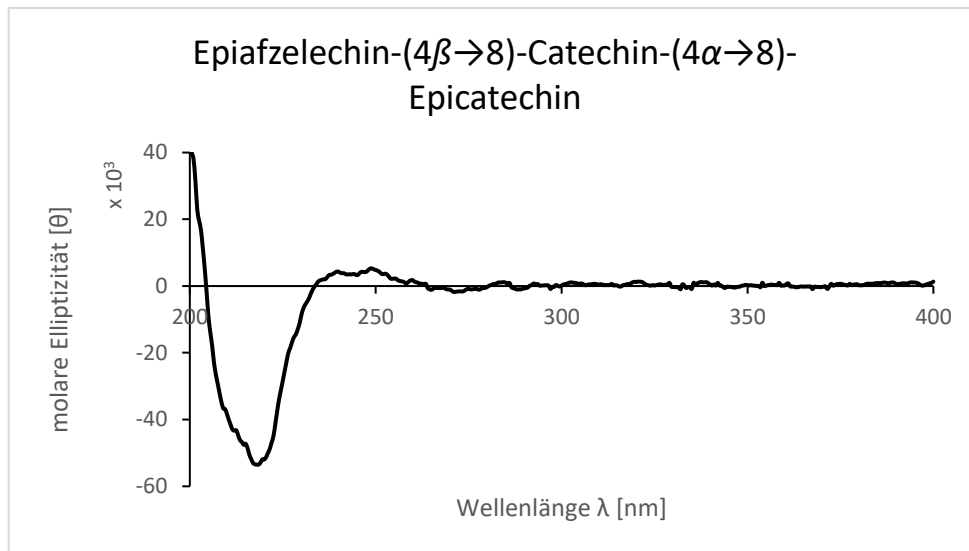
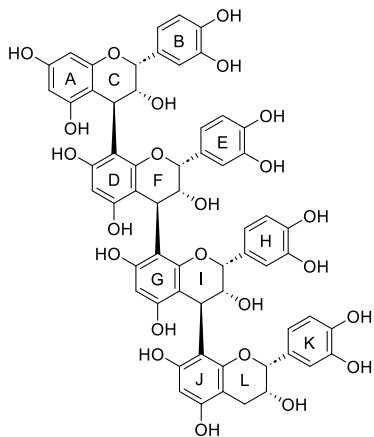


Abbildung 39. CD-Spektrum zu Epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin. CD (MeOH bei RT, Θ) 218 (-53498.1), 239.5 (+4303.9), 249 (+5249.4).

3.3.5.16. Cinnamtannin A2



Cinnamtannin A2 (PA 6.4) eluierte nach SC an Sephadex® LH-20 in Fraktion PA6. Aus dieser konnte es direkt mittels präp. HPLC mit HPLC-System 4 nach 19,2 min als PA 6.4 isoliert werden (Kapitel 3.6.6.5). Die Gesamtausbeute betrug 21,2 mg bei einer chromatographischen Reinheit von 93%. Eine erste Strukturanalyse mittels HR-ESI-MS Messung im positiven Modus lieferte ein Pseudomolekülion mit m/z 1155,2762 $[M+H]^+$. Dies lässt auf ein jeweils einfach verknüpftes tetrameres Flavan-3-ol schließen, dessen vier Einheiten jeweils dihydroxylierte B-, E-, H- und K-Ringe aufweisen. Die ermittelten ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen sind in **Tabelle 16** wiedergegeben. Für das H-3 in der untersten Einheit konnte ein br s bei 4,32 ppm detektiert werden. Außerdem konnten drei weitere d mit sehr kleiner Kopplungskonstante für die drei darüber liegenden Einheiten gefunden werden, die den jeweiligen H-3 zugeordnet werden konnten. Diese charakteristischen Signale sprechen für eine 2,3-*cis*-Konfiguration in allen vier Einheiten des Tetramers. Durch die Auswertung der HMBC- und COSY-Spektren konnten alle vier Monomere als Epicatechin identifiziert werden. Die angegebenen ^{13}C -Verschiebungen konnten aufgrund der geringen Substanzmenge nicht allesamt aus dem ^{13}C -Spektrum ermittelt werden, sondern zusätzlich aus den HSQC- und HMBC-Spektren. Das CD-Spektrum zeigt einen sehr ausgeprägten positiven Cotton-Effekt, der für 4 β -konfigurierte Flavan-3-ole typisch ist (**Abbildung 40**). Durch Abgleich mit NMR-Daten aus der Literatur konnte die Struktur letztendlich als Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin identifiziert werden [133]. Die Ermittlung des spezifischen Drehwerts ergab ein $[\alpha]_D^{22}$ von +87.8 (0,1 g/100 ml in MeOH) und steht damit in guter Übereinstimmung mit zuvor ermittelten Werten [153].

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 16. NMR-Tabelle zu Cinnamtannin A2 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOD) durchgeführt.

	Pos.	δ _c , Typ	δ _H (J in Hz)
Obere Einheit	2	76.7, CH	5.09, s
	3	73.5, CH	3.99, d (1.5)
	4	37.2, CH	4.70, s
	4a	102.0, C	
	5	157.7 ^a , C	
	6	95.7 ^b , CH	5.97 ^c , d (1.3)
	7	157.8 ^a , C	
	8	95.7 ^b , CH	6.00 ^c , d (1.3)
	8a	157.8 ^a , C	
	1'	132.7, C	
	2'	114.9, CH	6.91, d (1.1)
	3'	145.8 ^d , C	
	4'	145.4 ^d , C	
	5'	115.9, CH	6.66-6.77 ⁱ , m
	6'	119.0, CH	6.69, m
Obere mittlere Einheit	2	76.6, CH	5.28, s
	3	72.9, CH	4.07, d (1.7)
	4	37.4, CH	4.74, s
	4a	102.3, C	
	5	156.5, C	
	6	95.8, CH	5.93, s
	7	156.9, C	
	8	107.1, C	
	8a	154.8, C	
	1'	132.5, C	
	2'	114.9, CH	7.11 ^h , m
	3'	145.6 ^e , C	
	4'	145.2 ^e , C	
	5'	116.0, CH	6.66-6.77 ⁱ , m
	6'	118.8, CH	6.76, m
untere mittlere Einheit	Pos.	δ _c , Typ	δ _H (J in Hz)
	2	76.6, CH	5.31, s
	3	73.1, CH	3.95, d (1.6)
	4	37.3, CH	4.71, s
	4a	102.4, C	
	5	156.2, C	
	6	96.8, CH	5.95, s
	7	156.7, C	
	8	107.2, C	
	8a	155.0, C	
	1'	132.5, C	
	2'	115.0, CH	7.03, m
	3'	145.9 ^f , C	
	4'	145.5 ^f , C	
	5'	115.8, CH	6.66-6.77 ⁱ , m
6'	118.5, CH	6.74, dd (5.7, 2.0)	

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Fortsetzung zu Tabelle 16

	Pos.	δ_c , Typ	δ_H (J in Hz)
Untere Einheit	2	79.4, CH	5.00, s
	3	66.7, CH	4.32, br s
	4	30.1, CH ₂	2.81, d (14.5) 2.96, d (14.4)
	4a	99.8, CH	
	5	156.7, C	
	6	97.2, CH	5.95, s
	7	156.7, C	
	8	107.6, C	
	8a	154.6, C	
	1'	132.0, C	
	2'	114.7, CH	7.11 ^h , m
	3'	145.9 ^g , C	
	4'	145.9 ^g , C	
	5'	115.5, CH	6.66-6.77 ⁱ , m
	6'	118.7, CH	6.90, dd (8.3, 1.2)

^{a-g} Signale mit gleichem Buchstaben sind austauschbar

^{h-i} Signale mit gleichem Buchstaben überlappen

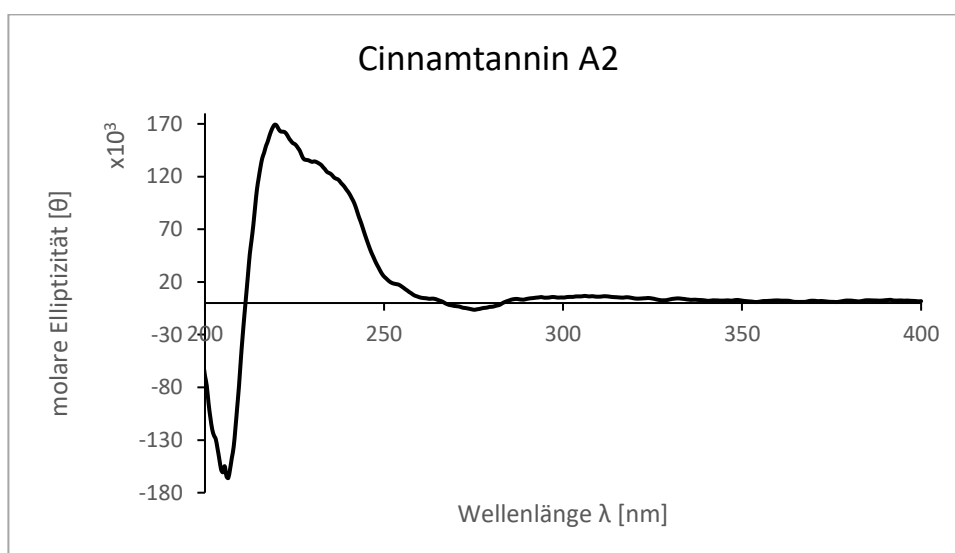


Abbildung 40. CD-Spektrum zu Cinnamtannin A2. CD (MeOH bei RT, Θ) 206 (-164428.0), 219.5 (+169261.0), 232.5 (+130852.0), 275.5 (-6337.5).

3.4. ¹³C-NMR-Untersuchungen zur Polymerfraktion

3.4.1. Hintergrund

Zur Isolierung von Flavan-3-olen aus dem MeOH-Extrakt wurde eine Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20 durchgeführt, wobei acht verschiedene Fraktionen gewonnen werden (PA 1-PA 7, sowie Poly-F; siehe Kapitel 3.3.2). PA1-PA7 wurden mit Ethanol 70% eluiert und enthalten monomere (PA 3, PA 4), dimere (PA 4, PA 5, PA 6), trimere (PA 5), tetramere (PA 6) und höhere oligomere PA (PA 6, PA 7). Nach dem Eluieren dieser oligomeren Verbindungen, wurde das System auf 70% Aceton als Fließmittel umgestellt, um die polymeren Flavan-3-ole (Poly-F) zu erhalten. Die Isolierung und Strukturaufklärung von PA die höher oligomerisiert sind als tetramere Flavan-3-ole, stellt den Analytiker hinsichtlich ihrer vollständigen Stereochemie vor besondere Herausforderungen. Zum einen fällt die Trennung von höher oligomerisierten PA untereinander auf den gängigen chromatographischen Systemen bei steigendem dP immer schwerer, da sich die Substanzen in den chemischen Eigenschaften ähnlicher werden, wenn beispielsweise der dP gleich und nur die 2,3-Konfiguration der Monomere unterschiedlich ist. Diese geringfügigen strukturellen Unterschiede reichen dann nicht mehr aus, um eine vollständige Trennung zu gewährleisten. Zum anderen werden in Pflanzen normalerweise Gerbstoffe mit niedrigerem Molekulargewicht in wesentlich höheren Konzentrationen gebildet, als höher molekulare [154], was das Gewinnen dieser Substanzen in den für die NMR-Spektroskopie notwendigen Mengen nochmals aufwendiger macht. Dazu kommt weiterhin, dass mit steigendem Molekulargewicht mehr Menge für die NMR-Spektroskopie benötigt wird, um ein auswertbares Spektrum zu erhalten. Dennoch ist es möglich, viele strukturelle Informationen über die Flavan-3-ol-Zusammensetzung von Fraktionen mit polymeren Gerbstoffen durch ¹³C-NMR-Spektroskopie zu erhalten. So können u.a. Aussagen getroffen werden zum mittleren dP, zum Verhältnis von 2,3-*cis*- und 2,3-*trans*-konfigurierten Einheiten oder zur Zusammensetzung der einzelnen Monomeren bzgl. ihres Hydroxylierungsgrades im B-Ring, ob also Afzelechin-, Catechin- oder Gallocatechin-Einheiten vorliegen [154, 155]. So wurden in der vorliegenden Arbeit 206 mg der Poly-F Fraktion in MeOD gelöst und von dieser ein ¹³C-Spektrum aufgenommen. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel dargestellt.

3.4.2. Ergebnisse

In **Abbildung 41** ist das erhaltene ¹³C-Spektrum dargestellt. Wenn von verlängernden Einheiten gesprochen wird, sind die mittleren und oberen Einheiten gemeint und bei terminalen Einheiten die unterste.

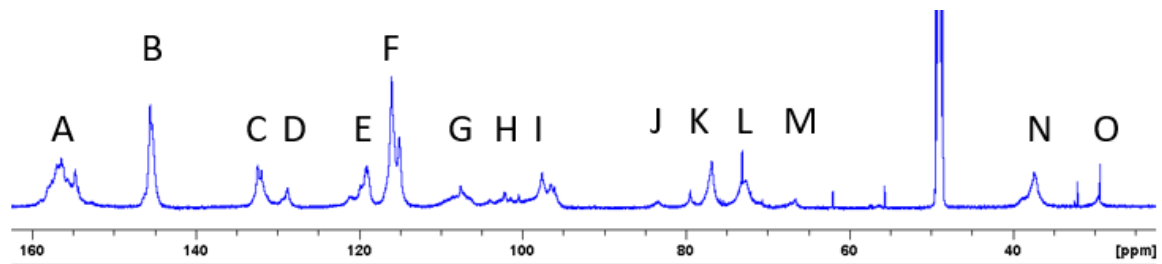


Abbildung 41. ^{13}C NMR Spektrum von Poly-F (150 MHz, MeOD, 293 K, 206 mg). (A) C-5 / C-7 / C-8a im A-Ring; (B) C-3' / C-4' von (Epi)catechin-Einheiten; (C) C-1' im B-Ring; (D) C-2' / C-6' von monohydroxylierten B-Ringen; (E-F) C-2' / C-5' / C-6' von (Epi)catechin-Einheiten; (G) Verknüpfungs-C im A-Ring; (H) C-4a im A-Ring (I) C-6 / C-8 im A-Ring; (J) C-2 von 2,3-*trans*-Einheiten; (K) C-2 von 2,3-*cis*-Einheiten; (L) C-3 von verlängernden Einheiten; (M) C-3 von terminalen Einheiten; (N) C-4 von verlängernden Einheiten; (O) C-4 von terminalen Einheiten.

Der durchschnittliche oder mittlere dP kann durch das Verhältnis der Integration der C-4-Signale der verlängernden Einheiten (N, $\delta_c = 36\text{-}39$ ppm) und der Integration der C-4-Signale der terminalen Einheiten (O, $\delta_c = 29\text{-}31$ ppm) geschätzt werden [139]. Eine zweite Möglichkeit zur Berechnung des dP ist die Integration der C-3-Resonanzen der verlängernden (L, $\delta_c = 71\text{-}74$ ppm) und terminalen Einheiten (M, $\delta_c = 66\text{-}68$ ppm) [156]. Nach der ersten Methode kann ein dP von 8 errechnet werden und nach der zweiten ein dP von 9. Somit kann insgesamt ein mittlerer dP von 8-9 angegeben werden. Das Spektrum ermöglicht es auch, stereochemische Informationen über die relative Konfiguration der Flavan-3-ol-Einheiten an C-2 und C-3 zu erhalten. Das Signal von 76-78 ppm (K_2) kann dem *cis*-

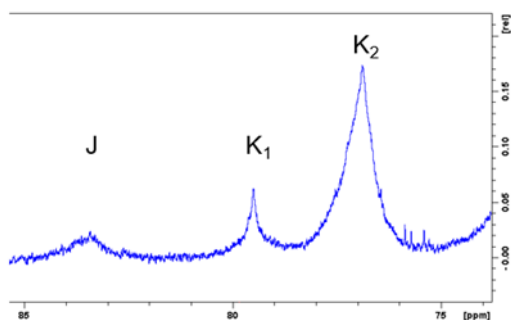


Abbildung 42. Signale des C-2 der *cis*- und *trans*-konfigurierten Flavan-3-ole.

konfigurierten C-2 der verlängernden Einheiten und das Signal von 79-80 ppm (K_1) kann dem *cis*-konfigurierten C-2 der terminalen Einheiten zugeordnet werden. Das Signalcluster bei 82-85 ppm (J) kann dem *trans*-konfigurierten C-2 sowohl der terminalen als auch den verlängernden Einheiten zugeordnet werden (**Abbildung 42**). So machen die *cis*-konfigurierten Einheiten ca. 91% der Polymerfraktion aus. Dies war bereits nach der Isolierung von oligomeren PA zu vermuten, da hier auch der Großteil der isolierten Verbindungen entweder aus Epicatechin-

oder Epiafzelechin-Monomeren zusammengesetzt waren. Darüber hinaus finden sich auch bei den polymeren PA einzelne Einheiten mit monohydroxylierten B-Ringen, da die charakteristischen Signale bei 128-130 ppm (D, **Abbildung 41**) von C-2' und C-6' im ^{13}C -NMR-Spektrum detektiert werden konnten, wie sie bspw. bei (Epi)afzelechin vorkommen. Signale bei 108-109 ppm werden durch C-2' und C-6' von trihydroxylierten B-Ringen wie in (Epi)Gallocatechin-Einheiten verursacht, konnten aber in der polymeren Fraktion von *B. longifolia* sowie im Isolierungsprozess nicht nachgewiesen werden. Zudem könnten Signale im Bereich von 62-76 ppm auf mögliche Zuckerverknüpfungen hinweisen. Diese konnten allerdings hier nicht nachgewiesen werden. Signale im Bereich von 170 oder 200 ppm würden auf Kohlenstoffe, die als Carbonyl- oder Carboxylfunktionen vorliegen, verursacht werden. Auch diese konnten hier nicht detektiert werden, womit Acylsubstitution bei den polymeren PAs höchstens in sehr geringem Anteil vorliegt. Die Ergebnisse der ^{13}C -Untersuchungen decken sich weitgehend mit den Beobachtungen aus der Isolierung von oligomeren PA. So konnte der Anteil von über 90% *cis*-konfigurierten Monomeren in der Polymerfraktion im Isolierungsprozess bestätigt werden, da auch der überwiegende Teil der in den oligomeren PA verbauten Einheiten 2,3-*cis*-konfiguriert sind. Weiterhin konnten acylsubstituierte, glykolysierte oder Flavan-3-ole mit (Epi)gallocatechin-Einheiten weder bei der Isolierung noch in Poly-F nachgewiesen werden. Auch die

in der Polymerfraktion vorhandenen Einheiten mit monohydroxylierten B-Ringen konnte durch die Isolierung von Verbindungen mit Epiafzelechin-Einheiten bestätigt werden.

3.5. Zusammenfassung und Diskussion

Zu Beginn der Forschung stand aufgrund der Arbeit von Zimmermann-Klemd et al. der EtOAc-Extrakt im Vordergrund, um aus diesem immunologisch-aktive Verbindungen zu isolieren. Nach der Extraktion deutete sich bereits an, dass dies nur begrenzt möglich sein würde, da aus über einem Kilogramm Drogenmaterial nur 13,4 g EtOAc-Extrakt gewonnen werden konnten. Nach der Säulenchromatographie an Sephadex[®] zeigte sich, dass der Extrakt aus einem gerbstoffhaltigen (F6-F9) und einem nicht-gerbstoffhaltigen Teil (F1-F5) besteht. Daraufhin wurde erst der nicht-gerbstoffhaltige Teil untersucht und mit einer Kieselgel-Flash-Chromatographie weiter aufgearbeitet. Die Auswaagen wurden noch geringer und die weitere Aufarbeitung war nur noch über die anal. HPLC möglich. Aus der vielversprechendsten Fraktion konnten aber nur zwei Weichmacher und eine nicht-identifizierbare Substanz isoliert werden, weswegen beschlossen wurde, sich auf die Gerbstoffe zu konzentrieren. So konnten über die präp. HPLC vier Verbindungen isoliert werden. Diese stellten sich als die Monomere (+)-Catechin (1,0 mg), (-)-Epicatechin (3,5 mg) und die Dimere PC B2 (4,1 mg) und Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (2,1 mg) heraus. Aufgrund der geringen Substanzmengen konnten von diesen vier Verbindungen die Strukturen allerdings nur von (+)-Catechin, (-)-Epicatechin eigenständig nachgewiesen werden. Die Struktur von PC B2 konnte nur mit Hilfe von Referenzwerten aus der Literatur über das ¹H-Spektrum ermittelt werden, da bei dieser Substanzmenge kein auswertbares ¹³C-Spektrum aufgenommen werden konnte. Die Identifizierung von Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin gelang mit dieser geringen Substanzmenge auch noch nicht. Diese konnte erst später ermittelt werden, nachdem die Verbindung aus dem MeOH-Extrakt nachisoliert werden konnte. Deswegen wurden dann erstens aufgrund der ergebnislosen Analyse des nicht-gerbstoffhaltigen Teils des EtOAc-Extrakts und zweitens wegen der vergleichsweise großen Substanzmengen, die für die Identifizierung von (höher oligomerisierten) PA notwendig sind, beschlossen, gänzlich auf den MeOH-Extrakt umzusteigen, um ein umfassendes Gerbstoffprofil der Pflanze zu erstellen. Aus diesem konnten dann mit einer Kombination aus Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20, Flash-Chromatographie an MCI-Gel[®] CHP20P und präparativer HPLC 16 verschiedene Flavan-3-ole isoliert werden. Da bis zu 25 g pro Lauf auf die Säule mit Sephadex[®]-Material aufgebracht werden konnte, gelang es effizient, eine große Menge des MeOH-Extrakts zu verarbeiten. So wurden insgesamt 129 g Extrakt verwendet und aufgearbeitet. Dies geschah nicht am Stück, sondern es musste mehrmals nachisoliert werden, um die erforderlichen Auswaagen für die NMR-Spektroskopie zu gewinnen. So waren oft die ersten Strukturaufklärungsversuche einer Substanz daran gescheitert, dass keine auswertbaren ¹³C-Signale sowohl im 1D- als auch im HSQC- oder HMBC-Spektrum erhalten werden konnten, da die Auswaage zu gering war. Schließlich gelang es aber zwei monomere, sieben dimere, sechs trimere PA und ein tetrameres Flavan-3-ol zu isolieren. Dabei konnten für die Substanzen Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin und Catechin-(4 α →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin zum ersten Mal die NMR-Daten für die freiphenolischen Verbindungen ermittelt werden, da für diese nur die Daten für die peracetylierten Verbindungen in der Literatur zu finden waren. Die beiden Trimere Epicatechin-(4 β →8)-Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin und Epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal isoliert und die dazugehörigen NMR- und chiroptischen Daten zur Verfügung gestellt werden. Bemerkenswert ist weiterhin die extrem hohe Ausbeute der Substanz Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin, von der über 300 mg sehr einfach in nur

zwei Isolierungsschritten (Sephadex®-Chromatographie und MCI-Gel® Flash-Chromatographie) gewonnen werden konnten. Außerdem konnten bei der Strukturaufklärung von PC B8 weitere NMR-Daten für zukünftige Isolierungsarbeiten geliefert werden, da von dieser Substanz bisher nur heterogene Daten veröffentlicht wurden, die untereinander nicht vergleichbar sind. Des Weiteren konnten mit der genauen Beschreibung zur Identifizierung der 4→6 oder 4→8-Konfiguration mittels ROESY wichtige Hilfestellungen für die Konfigurationserkennung der Verknüpfung geliefert werden. Eine Übersicht über alle isolierten Substanzen findet sich in **Abbildung 43**. Die Analyse der Polymerfraktion des MeOH-Extrakts mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie ergab einen mittleren dP von 8-9. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass über 90% der darin enthaltenen Gerbstoffe aus 2,3-*cis*-konfigurierten Einheiten bestehen. Das Vorkommen von polymeren PA mit monohydroxyliertem B-Ring, die vermutlich Epiafzelechin-Einheiten darstellen, konnte ebenfalls ermittelt werden. Diese Erkenntnisse decken sich mit den isolierten Substanzen mit einem dP von 1-4. Somit entsteht aufgrund des Fehlens acylierter oder mit Gallussäure veresterter Verbindungen der Eindruck eines relativ homogenen Gerbstoffprofils, mit der Besonderheit des Vorkommens von Flavan-3-olen mit Epiafzelechin-Einheiten. Sucht man in einschlägigen Datenbanken wie SciFinder® oder PubMed® nach Arbeiten zur Isolierung von PA mit (Epi)afzelechin-Einheiten so erhält man dafür mit großem Abstand weniger Ergebnisse im Vergleich zu Arbeiten mit di- oder trihydroxylierten Flavan-3-olen. Dies deutet daraufhin, dass diese PA im Pflanzenreich weitaus weniger verbreitet sind, wodurch sich *B. longifolia* von anderen gerbstoffhaltigen Pflanzen abhebt. Obwohl *B. longifolia* einen breiten traditionellen und kommerziellen Anwendungsbereich besitzt, ist diese Arbeit nach heutigem Stand die Erste, die sich mit dem Inhaltsstoffspektrum der Rinde von *B. longifolia* und dem phenolischen Profil insgesamt auseinandersetzt und kann somit einen Beitrag zur Sicherheit der Anwendung dieser leisten.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

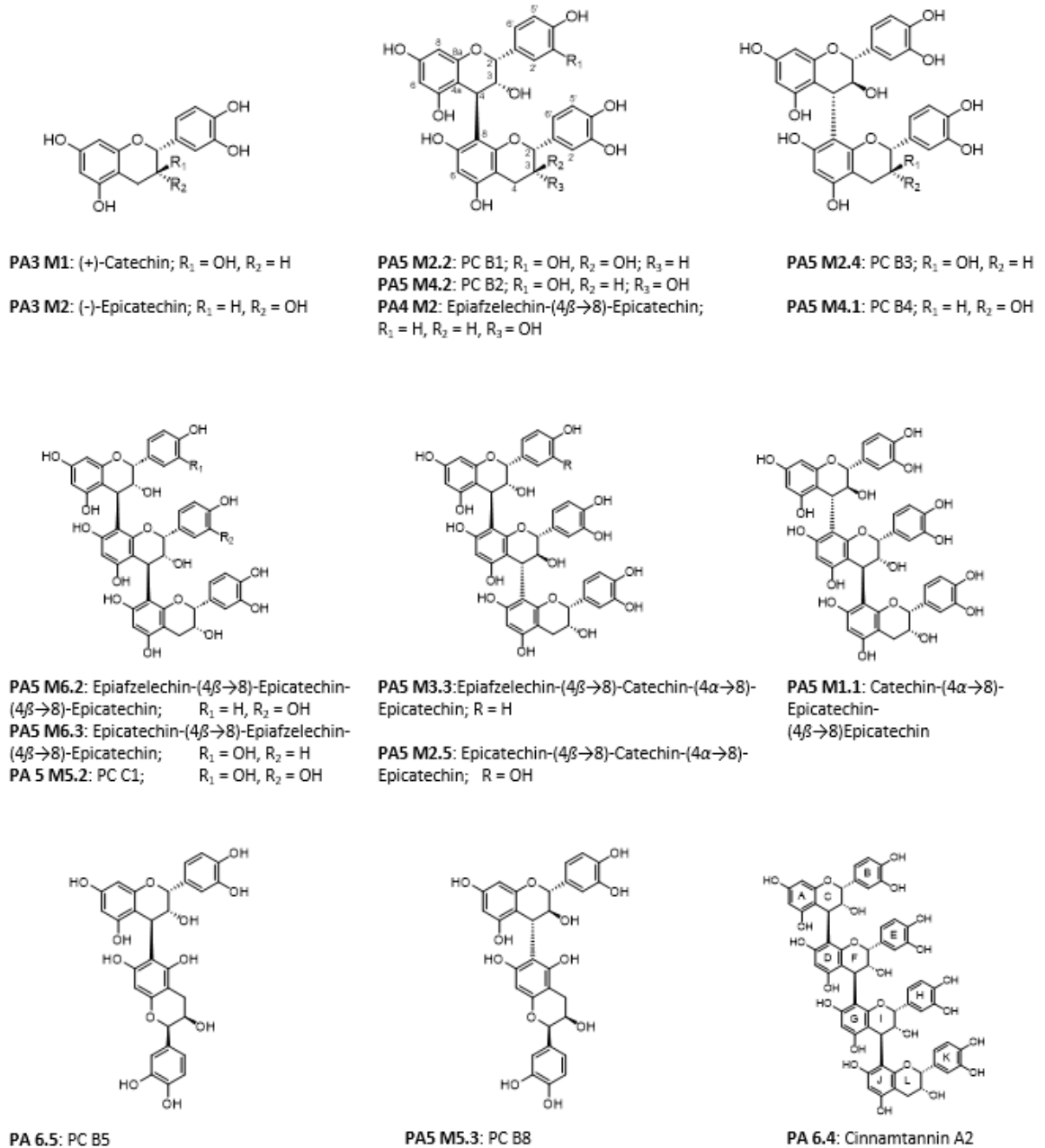


Abbildung 43. Übersicht über die isolierten Verbindungen aus dem MeOH-Extrakt der Rinde von *B. longifolia*.

3.6. Material und Methoden

Für die in dieser Arbeit beschriebene Extraktion, Fraktionierung, Strukturaufklärung und Charakterisierung wurden verschiedene Geräte, Gefäße, Materialien und Software verwendet. Ebenso kamen bei den verschiedenen Arbeitsschritten eine Reihe von Chemikalien und Reagenzien zum Einsatz. Eine Übersicht über alle Materialien findet sich in **Tabelle 17** und **Tabelle 18**.

3.6.1. Geräte, Gefäße, Materialien und Software

Tabelle 17. *Verwendete Geräte, Gefäße, Materialien und Software.*

Bezeichnung	Spezifikation / Modell	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
DC-Auftragung	Linomat 5 WinCats 1.4.2 (Software)	Camag, Muttenz, Schweiz
DC-Kammer	Flachbodenkammer (20 cm x 20 cm)	Desaga Sarstedt-Gruppe, Nümbrecht, Deutschland
DC-Platten	TLC Silica gel 60 F254, 20 cm x 20 cm	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Einmalspritzen	Henke-Ject, Tuberculin, 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland
Flash-Chromatographie Anlage	Spot Flash System Armen Glider Flash V2.3 (Software)	Armen Instrument, Paris, Frankreich
Flash-Kartusche	SVF D26 (9x2,8 cm, SI60 15-40 µm, 30 g)	Götec Labortechnik, Bickenbach, Deutschland
Fraktionskollektor	2211 Superrac	LKB, Bromma, Stockholm; Schweden
Gefriertrocknung	P10-85	Dieter Piatkowski- Forschungsgeräte, München, Deutschland
Glasgeräte, diverse	Mess- und Vollpipetten (vers. Volumina) Messkolben (5, 10 und 25 ml) Messzylinder (10 bis 1000 ml) Rundkolben (25 bis 2000 ml)	Brand, Wertheim, Deutschland oder Schott, Mainz, Deutschland
Glassäulen zur Flüssigchromatographie	60 x 2.5 cm 95 x 3 cm	BESTA-Technik für Chromatographie GmbH, Wilhelmsfeld, Deutschland
Glassäulen zur Extraktion	verschiedene Größen	Glasbläser der Universität Regensburg
Heizplatte	Thermoplate S	Desaga Sarstedt-Gruppe, Nümbrecht, Deutschland

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Fortsetzung Tabelle 17

Bezeichnung	Spezifikation / Modell	Hersteller
HPLC - analytisch	LaChrom Elite L-2200 (Autosampler)	Hitachi, Tokio, Japan Vertrieb: VWR, Darmstadt, Deutschland
	LaChrom Elite L-2130 (Pumpe)	
	LaChrom Elite L-2455 (DAD)	
	LaChrom Elite L-2350 (Säulenofen)	
	EZChrom Elite 3.1.7 (Software)	
HPLC - präparativ	1260 Infinity (binäre Pumpe)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
	1260 Infinity (manueller Injektor)	
	1260 Infinity (DAD)	
	1260 Infinity (Fraktionskollektor)	
	OpenLab CDS (Software)	
HPLC-Säulen	EC 250/4.6 NUCLEODUR C18 Isis, 5 µm (analytisch)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
	VP 250/21 NUCLEODUR C18 Isis, 5 µm 250 x 21 mm (präparativ)	
	VP 250/21 NUCLEODUR C18 Isis, 5 µm 250 x 10 mm (präparativ)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
	Kinetex® Biphenyl, 100 Å, 5 µm, 4,6 x 250 mm (analytisch)	
	Uptisphere DIOL 6 µm 250 x 21,2 mm (präparativ)	
ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland	
HPLC-Vial	11 mm CrimpSnap-Vial, braun, 2 ml	Wicom, Heppenheim, Deutschland
HPLC-Vial Insert	Micro Insert, 300 µl, l = 30 mm, Ø = 6 mm	Wicom, Heppenheim, Deutschland
LC-MS	1290 Infinity UHPLC	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
	G4220A (Binäre Pumpe)	
	G4226A (Autosampler)	
	G1316C (Säulenofen)	
	G4212A (DAD)	
Mikropipetten	Q-TOF 6540 UHD	Brand, Wertheim, Deutschland
	Ionenquelle Dual-ESI	
NMR-Röhrchen	Blaubrand® intraMARK, 10 µl	Norell, Landsville, USA
NMR-Software	507-HP-8	Bruker Corporation, Billerica, USA
NMR-Spektrometer	Topspin 3.2	Bruker Corporation, Billerica, USA
	AVANCE III HD NMR mit 5 mm TCI CryoProbe (¹ H NMR 600,25 MHz, ¹³ C NMR 150,95 MHz)	
	AVANCE III HD NMR (¹ H NMR 600,25 MHz, ¹³ C NMR 100,63 MHz)	
Oberschalenwaage	MC 1, Laboratory LC 6200 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Pipetten	100 Research (10-100 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	1000 Research (100-1000 µl)	
Pipettenspitzen	200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland
	100 - 1250 µl	

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Fortsetzung Tabelle 17.

Bezeichnung	Spezifikation / Modell	Hersteller
Polarimeter	UniPol L 1000 Polarimeter	Schmidt + Haensch, Berlin, Deutschland
Probendosierspritze (manuelle Injektion, preparative HPLC)	5 ml	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Probendosierspritze (DC-Auftragung)	100 µl	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Quarzküvette	QS: 10,00 mm	Hellma, Müllheim, Deutschland
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Berlin, Deutschland
Rotationsverdampfer	Laborota 4003 control	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Schnappdeckelgläser	5 und 20 ml	VWR, Darmstadt, Deutschland
Spektropolarimeter	J-715	JASCO Deutschland, Gross-Umstadt, Deutschland
Spektrophotometer	Cary 50 Scan Cary WinUV 3.00(182) (Software)	Varian Deutschland, Darmstadt, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ultrazentrifugalmühle	ZM1 Ultra-Zentrifugalmühle	Retsch GmbH, Haan Germany
Zeichenprogramm	ChemBioDraw Ultra 18.0.0.231	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

3.6.2. Chemikalien

Tabelle 18. Verwendete Chemikalien und Referenzsubstanzen.

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Aceton	technisch, HSL	CSC Jäcklechemie, Nürnberg, Deutschland
Acetonitril (ACN)	HPLC-grade, LiChrosolv®	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure (FA)	p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Anisaldehyd (AA)	4-Methoxybenzaldehyd zur Synthese	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
(+)-Catechin	≥ 95%	Phytolab GmbH & CO. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland
(-)-Epicatechin	≥ 95%	Phytolab GmbH & CO. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Essigsäure (HOAc)	100 %, wasserfrei	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol (EtOH)	technisch, HSL (wurde vor Gebrauch am Rotationsverdampfer aufgereinigt (120 mbar))	CSC Jäcklechemie, Nürnberg, Deutschland
Ethylacetat (EtOAc)	p.a.	Fisher Scientific, Hampton, USA
MCI-Gel®	CHP20P	Mitsubishi Chemical Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Fortsetzung zu Tabelle 18.

Methanol (MeOH)	p.a.	Fisher Scientific, Hampton, USA
Methanol (für optische und spektroskopische Methoden)	HPLC-grade, LiChrosolv®	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Methanol- <i>d</i> ₄ (MeOD)	Methylalcohol- <i>d</i> ₄	Deutero, Kastellaun, Deutschland
n-Hexan	p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Petrolether (PE)	technisch, HSL	CSC Jäcklechemie, Nürnberg, Deutschland
Salzsäure (HCl), rauchend	~37%, analytical reagent grade	Fisher Scientific, Hampton, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	95-97%, p.a.	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Seesand	p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sephadex®	LH-20	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Toluol	p.a.	Fisher Scientific, Hampton, USA
Vanillin	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.6.3. Pflanzenmaterial und Extraktion

Das Sammeln von insgesamt 1190,4 g der Rinde von *B. longifolia* erfolgte im Kailali Distrikt im Westen Nepals unter der Leitung von Meena Rajbhandari (Tribhuvan-Universität Kathmandu, Nepal). Die Sammlungen erfolgten im Februar 2016 und im Dezember 2018. Die Bestimmung erfolgte durch Prof. Dr. Sangeeta Rajbhandari (Central Department of Botany, Tribhuvan-Universität Kathmandu, Nepal). Die Rinde wurde anschließend zerkleinert und bis zur Massenkonstanz getrocknet. Ein Rückstellmuster unter dem Kennzeichen BL-16-DPP befindet sich im Research Centre for Applied Science and Technology (RECAST, Tribhuvan-Universität Kathmandu, Nepal). Nach Erhalt der Droge wurde diese mit einer ZM1 Ultrazentrifugalmühle (Retsch GmbH, Haan Germany) mit einer Porengröße von 0,25 mm pulverisiert. Die Menge nach Zerkleinerung betrug 1100,1 g. Davon wurden 19,0 g abgenommen und als Rückstellmuster an der Universität Regensburg eingelagert. Die restlichen 1081,1 g Drogenmaterial wurden dann mit Seesand im Verhältnis 1:4 vermischt und dieses dann in mehrere große, verschleißbare Glassäulen gefüllt. Die Extraktion erfolgte dann als Perkolation über mehrere Wochen aufeinanderfolgend mit PE, EtOAc und zum Schluss mit MeOH. Die erhaltenen Extrakte wurden anschließend an einem Laborota 4003 control Rotationsverdampfer (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) getrocknet und danach mit einem P10-85 Gefriertrockner (Dieter Piatkowski-Forschungsgeräte, München, Deutschland) lyophilisiert. Eine Übersicht zur Extraktion ist in **Tabelle 19** wiedergegeben.

Table 19. Kennzahlen des Extraktionsprozesses.

Lösemittel/Fraktion	Lösemittelverbrauch [l]	Auswaage [g]	Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) [%]
Petrolether	6,3	16,7	64,7
Ethylacetat	17,4	13,4	80,7:1
Methanol	17,6	161,0	6,7:1
Gesamt		191,1	5,7:1

3.6.4. Dünnschichtchromatographie

Im Laufe des Isolierungsprozesses wurden zahlreiche DCs angefertigt. Diese entstanden sowohl bei der Fraktionskontrolle der Flash- und Sephadex®-Chromatographien als auch als Übersichts-DC am Ende jedes Fraktionierungsschritts. Im Falle der Fraktionskontrolle wurde von jedem zweiten Glas je nach Konzentration 20-50 µl mit einer Mikropipette (10 µl) manuell aufgetragen, während für Übersichts-DCs eine maschinelle Auftragung von 5-15 µl mit einem Linomat 5 (Camag, Muttenz, Schweiz) erfolgte. Zwei verschiedene DC-Kontrollsysteme kamen zum Einsatz, eines für MCI-Gel®- und Sephadex®-Chromatographie mit dem MeOH-Extrakt (DC-System 1), ein weiteres für Flash- und Sephadex®-Chromatographie mit dem EtOAc-Extrakt (DC-System 2). DC-System 3 wurde für Übersichts-DCs des PE-Extraktes verwendet:

DC-System 1: Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus EtOAc/FA/H₂O im Verhältnis 90/5/5 [V/V/V] verwendet. Außerdem wurde bei der Fraktionskontrolle bei der Sephadex®-Chromatographie zusätzlich (+)-Catechin oder (-)-Epicatechin (Phytolab GmbH & CO. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland) als Referenz aufgetragen. Nach Entnehmen der Platte aus der Kammer, wurde diese an der Luft getrocknet. Im Anschluss erfolgte eine Derivatisierung mit dem AA/H₂SO₄- oder dem Vanillin/HCl- Sprühreagenz.

DC-System 2: Hier wurde mit einem Fließmittelgemisch aus EtOAc/Toluol/FA (80/15/5) gearbeitet. Die Platten wurden nach Entwicklung an der Luft getrocknet und mit dem AA/H₂SO₄-Sprühreagenz behandelt.

DC-System 3: Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Toluol und EtOAc (95/5) verwendet. Die Platten wurden anschließend getrocknet und mit AA/H₂SO₄ besprüht.

Es wurden jeweils TLC Silica gel 60 Platten (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Laufhöhe betrug 10 cm. Fotografisch wurde dies mit einem TLC Visualizer (Camag, Muttenz, Schweiz) im underivatisierten und derivatisierten Zustand bei 254 sowie 366 nm und Tageslicht dokumentiert.

3.6.5. Sprühreagenzien

3.6.5.1. AA/H₂SO₄-Sprühreagenzeagenz

Es wurden 0,50 ml AA in 10,0 ml HOAc gelöst. Anschließend wurden 85 ml MeOH und unter Eiskühlung 5,0 ml H₂SO₄ zugegeben. Die besprühten DC-Platten wurden bei 80°C ca. 2 min erhitzt.

3.6.5.2. Vanillin/HCl-Sprühreagenz

Es wurden 3 g Vanillin in 100 ml EtOH gelöst. Anschließend wurde die DC-Platte mit rauchender HCl besprüht und bei 100°C ca. 1 min erhitzt.

3.6.6. Fraktionierung und Isolierung

3.6.6.1. Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20

Als erster Fraktionierungsschritt für den MeOH- und EtOAc-Extrakt wurde eine Säulenchromatographie an Sephadex® LH20 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gewählt. Insgesamt wurden von dem nach der Extraktion gewonnenen 13,4 g EtOAc-Extrakt 12,9 g verwendet. Er wurde in EtOH 70% gelöst und flüssig auf das Säulenbett aufgetragen. Der Rückstand, der beim Lösen zurückblieb (F0) wurde abzentrifugiert und der klare Überstand in zwei Durchläufen auf die Säule gegeben (Beladungsmengen: Lauf 1 = 5,0 g; Lauf 2 = 7,9 g). Hierbei wurde so lange mit EtOH 70% eluiert und Fraktionen gesammelt (Fraktionen F1-F8) bis bei der Fraktionskontrolle mit dem DC-System 2 keine Banden mehr detektiert werden konnten. Danach wurde auf Aceton 70% umgestellt, um den Rest von der Säule zu spülen (F9). Alle Fraktionen wurden anschließend zusammengeführt, einrotiert und gefriergetrocknet. Eine Zusammenfassung der erhaltenen Fraktionen findet sich in **Tabelle 20**.

Tabelle 20. Erhaltene Fraktionen nach Säulenchromatographie mit Sephadex®-LH-20 mit dem EtOAc-Extrakt.

Fraktion	Elutionsbereich Lauf 1 [ml]	Elutionsbereich Lauf 2 [ml]	Auswaage [mg]
F0			1730,8
F1	0-180	0-756	427,5
F2	180-255	756-900	321,8
F3	255-585	900-1674	1820,2
F4	585-765	1674-2016	101,5
F5	765-1185	2016-2430	74,9
F6	1185-1545	2430-3987	308,1
F7	1545-2475	3987-5220	541,1
F8	2475-5880	5220-7128	861,8
F9	5880-Ende	7128-Ende	1364,5

Der Fraktionierungsschritt an Sephadex® LH-20 wurde ebenfalls mit dem MeOH-Extrakt durchgeführt. Insgesamt wurden von dem nach der Extraktion gewonnenen 161,03 g MeOH-Extrakt 129,0 g verwendet. Es wurde eine Glassäule (95×3 cm) verwendet, in der sich ca. 260-270 g Sephadex®-Material befanden, das in EtOH 70% aufgeschlämmt war. Vor Probenaufgabe wurde ein Flow von 0,8-1,2 ml/min eingestellt. Der MeOH-Extrakt wurde in maximal 200 ml EtOH 70% gelöst und in sechs Durchläufen auf die Säule gegeben (Beladungsmengen: Lauf 1 = 17,5 g; Lauf 2 = 23,07 g; Lauf 3 = 23,8 g; Lauf 4 = 24,9 g; Lauf 5 = 20,0 g; Lauf 6 = 20,0 g). Dann wurde so lange mit EtOH 70% eluiert und Fraktionen gesammelt (Fraktionen M1-4), bis auf der DC der Fraktionskontrolle mit DC-System 1 das erste Mal eine Bande auf der Höhe von (+)-Catechin bzw. (-)-Epicatechin erschien. Dann wurde auf Aceton 70% als Fließmittel umgestellt und das weitere Eluat in einer Fraktion gesammelt (Proanthocyanidin-angereicherte Fraktion = PA-F). Eine Zusammenfassung der Sephadex®-Chromatographie mit dem MeOH-Extrakt findet sich in **Tabelle 21**.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 21. Säulenchromatographie mit Sephadex®-LH-20 mit dem MeOH-Extrakt.

	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Lauf 4	Lauf 5	Lauf 6	gesamt
Fraktion	Auswaagen [g]						
M1	5,00	1,79	2,33	1,45	1,61		10,05
M2	3,22	2,60	2,51	2,93	2,88		5,64
M3	0,48	0,75	0,56	0,33	0,64		2,50
M4	4,64	0,26	0,41	0,61	0,28		6,81
PA-F	28,57	21,25	20,16	18,03	16,63		104,64
Fraktion	Elutionsbereich [ml]						
M1	0-620	0-420	0-480	0-460	0-360		
M2	620-860	420-680	480-820	460-940	360-680		
M3	860-1100	680-1060	820-1140	940-1200	680-1040		
M4	1100-1460	1060-1180	1140-1540	1200-1720	1040-1200		
PA-F	1460-Ende	1180-Ende	1540-Ende	1720-Ende	1200-Ende		

Die ersten beiden Läufe wurden direkt zusammengeführt. Die so gewonnenen Fraktionen wurden im Anschluss einrotiert und gefriergetrocknet. Es konnten insgesamt 104,6 g PA-F gewonnen werden. Davon wurden im Anschluss 89,1 g in weiteren Sephadex®-Säulenchromatographie Durchgängen verarbeitet. PA-F wurde in 5 Durchläufen in EtOH 70% gelöst und auf das Säulenbett aufgetragen (Beladungsmengen: Lauf 1 = 75,0 g; Lauf 2 = 18,0 g; Lauf 3 = 17,8 g; Lauf 4 = 19,0 g; Lauf 5 = 19,2 g). Hierbei wurde so lange mit EtOH 70% eluiert, bis bei der Fraktionskontrolle nur noch eine Bande an der Grundlinie zu sehen war (PA 1-7). Dann wurde wieder auf Aceton 70% als Fließmittel umgestellt und alles Nachfolgende in einer Fraktion gesammelt (Polymer-Fraktion = Poly-F). Ab Lauf 2 wurde PA 1 nicht mehr gesammelt, da dies alle Reagenzgläser umfasste, die nach DC-Kontrolle vor dem ersten Auftreten einer Bande gesammelt wurden. Eine Übersicht ist in **Tabelle 22** zu sehen.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 22. Erhaltene Fraktionen mit Elutionsbereichen nach Säulenchromatographie mit Sephadex®-LH-20 mit PA-F.

	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Lauf 4	Lauf 5	gesamt
Fraktion	Auswaagen [g]					
PA 1	0,29					0,29
PA 2	0,25	0,25	0,25	0,49		1,24
PA 3	0,25	0,62	0,31	0,43	0,40	2,01
PA 4	0,36		0,25	0,30	0,35	1,26
PA 5	0,62	0,46	0,59	0,78	1,01	3,46
PA 6	1,99	2,16	1,27	0,48	0,79	6,69
PA 7	2,11		1,09	0,63	3,35	7,18
Poly-F	11,22	11,21	9,49	12,62	9,5	54,04
Fraktion	Elutionsbereich [ml]					
PA 1	0-1440					
PA 2	1440-1940	0-1580	400-1260	0-1700	0 - 1900	
PA 3	1940-2172	1580-2240	1260-1560	1700-2240	1900 - 2200	
PA 4	2172-2440		1560-1800	2240-2480	2200 - 2400	
PA 5	2440-2752	2240-2680	1800-2240	2480-2980	2400 - 2780	
PA 6	2752-3792	2820-5340	2240-3440	2980-4320	2780 - 3240	
PA 7	3792-4192		3340-5160	4320-4860	3240 - 3840	
Poly-F	4129-Ende	5340-Ende	5160-Ende	4860-Ende	3840 - Ende	

Das Sammeln der Fraktionen für alle Durchläufe erfolgte in Reagenzgläsern aus Glas (16,0x1,5 cm) mit einem LKB Bromma 2211 Superrac Fraktionskollektor (LKB, Stockholm, Schweden).

3.6.6.2. Flash-Chromatographie an MCI-Gel® CHP20P für PA3-PA5

Im Anschluss an die erste Fraktionierung mit Sephadex®-Material erfolgte als zweiter Schritt eine weitere Auftrennung der Fraktionen mithilfe einer Flash-Chromatographie an MCI-Gel® CHP20P (Mitsubishi Chemical Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) auf einem Spot Flash System (Armen Instrument, Paris, Frankreich). Dazu wurden 170 g der stationären Phase in eine von beiden Seiten verschließbare Glassäule zur Flüssigchromatographie (Länge: 600 mm; Durchmesser: 25 mm) der Firma BESTA-Technik für Chromatographie GmbH (Wilhelmsfeld, Deutschland) gefüllt. In zwei verschiedenen Methoden konnten die Fraktionen PA3-5 weiter unterteilt werden. Die Auftrennung der Fraktionen PA3 und PA 4 erfolgte mit Methode A bei einem Fluss von 15 ml/min und von PA 5 mit Methode B und einer Flussrate von 7,5 ml/min (siehe **Tabelle 23**). Die Fraktionskontrolle erfolgte wie bei der Sephadex®-Chromatographie mit dem oben beschriebenen DC-System 1. Die Probenaufgabe erfolgte flüssig nach vollständigem Lösen unter Startbedingungen in MeOH 20%.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 23. Methoden für die Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® CHP20P.

A		B			
t [min]	t [min]	MeOH 20% [%]	MeOH 50% [%]	MeOH 75% [%]	MeOH [%]
0	0	100	0	0	0
5	10	100	0	0	0
240	360	0	100	0	0
240	360	0	0	100	0
285	450	0	0	100	0
285	450	0	0	0	100
330	540	0	0	0	100

Die Aufreinigung von PA 3 erfolgte in einem Lauf (237,6 mg), von PA 4 in zwei Läufen (Lauf 1 = 337,7 mg; Lauf 2 = 880,0 mg) und von PA 5 in vier Läufen (Lauf 1 = 587,9 mg; Lauf 2 = 1050,0 mg; Lauf 3 = 780,0 mg; Lauf 4 = 1010,0 mg). So konnten weitere Unterfraktionen gebildet werden, die entweder mit der präparativen HPLC zur Isolierung von angereicherten Fraktionen oder im Falle von PA3 M1, PA3 M2 und PA4 M2 direkt zu Reinsubstanzen führte (**Tabelle 24**). Bei der Chromatographie mit PA 4 wurde die PA4 M1 als erste Fraktion gebildet, sobald die ersten Banden auf der DC detektiert werden konnten. Alles vorher Eluierte wurde verworfen (**Tabelle 25**).

Tabelle 24. Erhaltene Fraktionen nach der Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® CHP20P.

PA 3		PA 4		PA 5	
Fraktion	Auswaage [mg]	Fraktion	Auswaage [mg]	Fraktion	Auswaage [mg]
PA3 M1	14,6	PA4 M1	172,6	PA5 M1	193,2
PA3 M1.5	32,6	PA4 M2	291,4	PA5 M2	292,6
PA3 M2	20,5	PA4 M3	21,1	PA5 M3	195,9
PA3 M3	41,6	PA4 M4	139,3	PA5 M4	1012,0
PA3 M4	20,5			PA5 M5	188,2
				PA5 M6	346,1
				PA5 M7	432,9
				PA5 M8	613,6

In **Tabelle 25** sind die Elutionsbereiche der einzelnen Fraktionen in den jeweiligen Läufen abgebildet.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 25. Elutionsbereiche der erhaltenen Fraktionen nach der Flash-Chromatographie mit MCI-Gel® CHP20P.

PA3		PA4		
Fraktion	Lauf 1 [ml]	Fraktion	Lauf 1 [ml]	Lauf 2 [ml]
PA3 M1	1480-1600	PA4 M1	2300-2580	2700-3180
PA3 M1.5	1600-1860	PA4 M2	2680-3020	3180-3760
PA3 M2	1860-2000	PA4 M3	3840-4360	3760-Ende
PA3 M3	2000-2880	PA4 M4	4360-Ende	
PA3 M4	2880-Ende			
PA 5				
Fraktion	Lauf 1 [ml]	Lauf 2 [ml]	Lauf 3 [ml]	Lauf 4 [ml]
PA5 M1	0-2200	0-1200	0 - 1160	0 - 1180
PA5 M2	2200-2620	1200-1460	1160 - 1400	1180-1440
PA5 M3	2620-2860	1460-1600	1400 - 1560	1440-1600
PA5 M4	2860-3740	1600-2060	1560 - 1840	1600-2000
PA5 M5	3740-4000	2060-2240	1840 - 2040	2000-2240
PA5 M6	4000-4400	2240-2580	2040 - 2340	2240-2520
PA5 M7	4400-Ende	2580-3140	2340 - 2820	2520-2860
PA5 M8		3140-Ende	2820 - Ende	2860-Ende

3.6.6.3. Flash-Chromatographie mit Kieselgel für F3

Nach erster Fraktionierung des EtOAc-Extraktes mit Sephadex®-Chromatographie erfolgte eine weitere Auftrennung mittels Flash-Chromatographie. Es wurde eine Flash-Chromatographie Anlage (Armen Instrument, Paris, Frankreich) mit einer SVF D26 Kieselgel Kartusche (30 g, Götec Labortechnik, Bickenbach, Deutschland) verwendet. Die Fraktion F3 wurde in fester Form zwischen zwei Glasfritten auf die Säule gegeben und zwei Durchläufe durchgeführt (Lauf 1 = 353,8 mg; Lauf 2 = 388,4 mg). Die Probe wurde anschließend mit dem in **Tabelle 26** angegebenen Gradienten chromatographiert.

Tabelle 26. Gradient zur Flash-Chromatographie mit F3. Fließmittel A = Hexan/EtOAc (90/10); B = EtOH, C = MeOH.

t [min]	A	B	C
0	100	0	0
180	0	100	0
240	0	0	100

Mithilfe des DC-Systems 2 konnte F3 in sieben Unterfraktionen aufgeteilt werden, deren Auswaagen in **Tabelle 27** abgebildet sind.

Tabelle 27. Erhaltene Fraktionen mit den Elutionsbereichen nach Flash-Chromatographie mit Kieselgel mit F3.

Fraktion	Auswaage [mg]	Lauf 1 [ml]	Lauf 2 [ml]
F 3.1	6,4	0-60	0-20
F 3.2	14,6	60-120	20-60
F 3.3	70,2	120-160	60-100
F 3.4	26,1	160-280	
F 3.5	229,5	280-1360	100-1260
F 3.6	60,2	1360-1860	1260-1660
F 3.7	262,2	1860-Ende	1660-Ende

3.6.6.4. Methodenentwicklung für die präp. HPLC

Die Methodenentwicklung für die präparative Auftrennung der Fraktionen erfolgte an der analytischen HPLC (Hitachi, Tokio, Japan). Dazu wurde die jeweilige Probe in einer Konzentration von ca. 1 mg/ml in ACN gelöst und durch einen Spritzenvorsatzfilter in HPLC-Vials filtriert (0,2 µm). So konnten im analytischen Maßstab Gradienten für die jeweiligen Fraktionen optimiert und die Methode anschließend auf die präparative HPLC übertragen werden. Dabei wurde der Fluss proportional zum Säulenquerschnitt erhöht.

3.6.6.5. Isolierung an der präp. HPLC

Die finale Aufreinigung mittels präp. HPLC erfolgte mit einer Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), ausgestattet mit einer binären Pumpe, einem manuellen Injektor, einem DAD und einem Fraktionssammler. Die verwendeten HPLC-Gradienten für die präparative aber auch für die analytische Anwendung sind in **Tabelle 28** dargestellt. Die verwendeten Fließmittel waren Wasser in Kombination mit ACN, MeOH oder MeOH 95%. Für die HPLC-Systeme 1-4 und 10 wurde eine Nucleodur C18 Isis 5 µm 21.2 × 250 mm (Macherey-Nagel, Düren, Germany) verwendet. Für die HPLC-Systeme 5 und 6 wurde die kleinere Version der Nucleodur C18 Isis 5 µm mit einer Größe von 250 x 10 mm verwendet. Die Aufreinigung mit HPLC-System 11 erfolgte an einer Uptisphere DIOL 6 µm 250 x 21,2 (Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich). Die Proben wurden entweder in ACN, MeOH oder MeOH 50% in höchstmöglicher Konzentration gelöst und manuell injiziert.

Nach dem „Spülschritt“ mit 100% des organischen Eluenten, erfolgte jeweils noch eine zweiminütige Rekalibrierung auf den Anfangsgradienten. Dieser wird der Übersichtlichkeit halber in **Tabelle 28** nicht dargestellt. Bei der präparativen HPLC wurden die Peaks bei 205 nm detektiert und manuell mit dem Fraktionskollektor gesammelt. Die Läufe wurden in der Regel mehrmals wiederholt, äquivalente Fraktionen in einem Rundkolben vereinigt und am Rotationsverdampfer getrocknet.

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Tabelle 28. Übersicht über die verwendeten HPLC-Gradienten für die präp. HPLC bestehend aus Wasser und als organische Komponente entweder ACN, MeOH oder MeOH 95%.

#	Verwendung	Flussrate	Gradient	
			t [min]	ACN [%]
HPLC-System 1	PA5 M2, PA5 M3	21 ml/min	0	10
			2	10
			35	18
			36	100
			40	100
HPLC-System 2	PA5 M5, PA5 M6	21 ml/min	0	13
			2	13
			20	18
			21	100
			25	100
HPLC-System 3	PA5 M1	21 ml/min	0	6
			2	6
			15	11
			16	100
			21	100
HPLC-System 4	PA 6	21 ml/min	0	12
			2	12
			35	20
			36	100
			42	100
HPLC-System 5	F 6.1, F 6.3	5 ml/min	0	11
			2	11
			20	17
			21	100
			25	100
HPLC-System 6	F 6.2	5 ml/min	0	8
			2	8
			35	18
			36	100
			40	100
HPLC-System 7	Reinheitsbestimmung	1 ml/min	0	8
			2	8
			35	18
			36	100
			42	100
HPLC-System 8	PA4 M1	21 ml/min	0	11
			2	11
			25	15
			26	100
			30	100

3. Isolierung phenolischer Verbindungen aus *B. longifolia*

Fortsetzung zu Tabelle 28.

#	Verwendung	Flussrate	Gradient	
			t [min]	MeOH [%]
HPLC-System 11	PA5 M4	21 ml/min	0	20
			2	20
			20	35
			21	100
			25	100
HPLC-System 12	F6	21 ml/min	MeOH 95% [%]	
			0	3
			8	3
			9	100
			13	100

Viele Verbindungen konnten in mehreren Fraktionen detektiert werden. In **Tabelle 29** sind die isolierten Verbindungen und ihre jeweiligen Kurzbezeichnungen inklusive der Retentionszeiten in den entsprechenden HPLC-Systemen dargestellt.

Tabelle 29. Übersicht über die mittels präp. HPLC isolierten Verbindungen, in welchen Isolaten sie detektiert werden konnten und die Retentionszeiten mit dem jeweiligen HPLC-System.

Verbindung	Isolat	HPLC-System	R _t [min]
PC B1	PA5 M2.2	1	9,1
PC B2	F 6.3.2	5	20,0
	PA5 M5.1	2	8,0
	PA5 M4.2	10	10,7
	PA 6.2	4	16,8
PC B3	PA5 M2.4	1	11,2
PC B4	PA5 M4.1	10	8,5
PC B5	PA 6.5	4	28,6
PC B8	PA5 M5.3	2	15,0
Epiäfzelechin-(4 β →8)-Epicatechin	PA5 M6.1	2	12,2
	F 6.2.1	6	25,8
PC C1	PA5 M5.2	2	12,1
	PA 6.3	4	19,5
Epicatechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin	PA5 M2.5	1	14,1
	PA 6.1	4	11,1
Catechin-(4 α →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin	PA5 M1.1	3	7,3
Epiäfzelechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin	PA5 M6.2	2	16,1
Epicatechin-(4 β →8)-Epiäfzelechin-(4 β →8)-Epicatechin	PA5 M6.3	2	17,5
Epiäfzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin	PA5 M3.3	1	17,1
Cinnamtannin A2	PA 6.4	4	19,2

3.6.6.6. Aufreinigung an der analytischen HPLC

Zur finalen Aufreinigung von Fraktion PA5 M5.3 fiel aufgrund der geringen Substanzmenge die Wahl auf die analytische HPLC. Die verwendete Säule war eine Kinetex® 5 µm Biphenyl 100 Å, 5 µm, 4,6 x 250 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Dies erfolgte mit HPLC-System 8 wie in **Tabelle 30** abgebildet.

Tabelle 30. Übersicht über die verwendeten HPLC-Gradienten für die anal. HPLC bestehend aus Wasser und als organische Komponente ACN.

#	Verwendung	Flussrate	Gradient	
			t [min]	ACN [%]
HPLC-System 9	PA5 M5.3	1 ml/min	0	15
			2	15
			15	26
			16	100
			20	100
HPLC-System 10	F 3.1, F 3.2	1 ml/min	0	60
			30	100
			34	100

Die Peaks wurden manuell in Rundkolben gesammelt. Aus 5,5 mg PA5 M5.3 konnten somit 0,7 mg reines Isolat gewonnen werden. Für F 3.1 und F 3.2 erfolgte die finale Aufreinigung ebenfalls mit derselben Anlage und HPLC-System 9 mit einer ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland). Da das HPLC-Chromatogramm von F 3.1 mit dem von F 3.2 fast identisch war, wurde die gesammelten Peaks zusammengeführt. Die Auswaagen der gewonnenen Fraktionen sind in **Tabelle 31** dargestellt.

Tabelle 31. Erhaltene Fraktionen nach der Aufreinigung von F 3.1 und F 3.2 mit der anal. HPLC.

Fraktion	Auswaage [mg]
F 3.2.1	0,12
F 3.2.2	0,09
F 3.2.3	0,12
F 3.2.4	2,44
F 3.2.5	0,64
F 3.2.6	0,86

3.6.7. Strukturaufklärung und Substanzcharakterisierung

3.6.7.1. Bestimmung der chromatographischen Reinheit

Die Reinheit der Isolate wurde per HPLC-DAD bestimmt, wobei ein System bestehend aus einem Autosampler L-2200, einer Pumpe L-2130, einem Säulenofen L-2350, einem DAD L-2455 (Hitachi, Tokio, Japan) und als Säule eine Nucleodur C18 Isis 5 μm 21.2 \times 250 mm (Macherey-Nagel, Düren, Germany) verwendet wurde. Der analysierte Wellenlängenbereich betrug dabei 190-400 nm und es wurde zusätzlich zu jedem Gradienten ein Blank mit 10 μl MeOH aufgezeichnet. Die erhaltenen Chromatogramme wurden als Maxplot (190-400 nm) mit EZChrom Elite 3.1.7 (Hitachi) ausgewertet. Dabei wurde zuerst der Blank subtrahiert und eine Normalisierung vorgenommen, bei der die Reinheit als Anteil der Fläche des Hauptpeaks an der Fläche aller Peaks berechnet wurde. Die HPLC-Systeme 4 (für PA 6) und 5 wurden mit einem Fluss von 1 ml/min und einer Ofentemperatur von 25 °C verwendet, um die gewonnenen Isolate (gelöst in MeOH) zu chromatographieren. Für alle restlichen Fraktionen wurde HPLC-System 7 verwendet, wie in **Tabelle 28** dargestellt.

3.6.7.2. LC-HR-ESI-MS

Die Summenformel von Isolaten wurde mithilfe einer LC-HR-ESI-MS der Zentralen Analytik der Universität Regensburg ermittelt (Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg). Dazu kam ein Quadrupol-Time of Flight Q-TOF 6540 UHD-Massenspektrometer mit einer Dual-ESI-Ionenquelle (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) zum Einsatz. Die Chromatographiebedingungen sind in **Tabelle 32** zusammengefasst.

Tabelle 32. Versuchsbedingungen der LC.

mobile Phase	Gradient		Fluss	Säulenofen- temperatur	Injektions- volumen
	t [min]	B [%]			
A: Wasser + 0,1% FA B: ACN + 0,1% FA	0	20	0,5 ml/min	50 °C	1 μl
	10,0	98			
	12,0	98			
	12,1	20			
	13,5	20			

3.6.7.3. NMR-Spektroskopie

Die Messung der NMR-Spektren erfolgte durch die Zentrale Analytik der Universität Regensburg (Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg). Die Isolate wurden in 0,7 ml Methanol- d_4 gelöst und in NMR-Röhrchen überführt. Für Verbindungen, bei denen bei Raumtemperatur (RT) ein auswertbares Spektrum generiert werden konnte, erfolgten die Messungen auf einem AVANCE III HD NMR mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H NMR 600,25 MHz, ^{13}C NMR 150,95 MHz). Verbindungen, die Rotationsisomerie aufweisen, konnten bei RT jedoch so nicht vermessen werden und wurden deshalb unter Tiefkühlung bei 233 K auf einem AVANCE III HD NMR (^1H NMR 400,13 MHz, ^{13}C NMR 100,63 MHz) (beides Bruker Corporation, Billerica, USA) vermessen. Dabei wurden 1D- ^1H , 1D- ^{13}C sowie 2D- ^1H , ^{13}C -

HSQC, $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC, $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY und $^1\text{H},^1\text{H}$ -ROESY aufgezeichnet. Die Auswertung der Spektren erfolgten mit der Software TopSpin 3.5.b.91 pl 7 (Bruker). Die Messung des ^{13}C -Spektrums zur Charakterisierung der Polymerfraktion (Poly-F) wurde ebenfalls auf einem AVANCE III HD NMR mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H NMR 600,25 MHz, ^{13}C NMR 150,95 MHz) durchgeführt. Dabei wurden 206,0 mg Poly-F in 0,7 ml MeOD gelöst und dann bei RT ein ^{13}C -Spektrum aufgenommen. Zuerst wurde eine Liste aller ^{13}C -Signale erstellt und mithilfe des HSQC-Spektrums zugehörige Protonen identifiziert. Im ^1H Spektrum wurden anschließend das Integral, die Multiplizität und die Kopplungskonstanten ausgelesen. Alle diese Daten trugen dann gemeinsam mit den HMBC- und COSY-Spektren zur Ermittlung der Struktur bei. Mithilfe des ROESY-Spektrums wurde die Verknüpfungsstelle bei oligomeren PA bestimmt.

3.6.7.4. Polarimetrie

Der spezifische Drehwert wurde an einem UniPol L 1000 Polarimeter (Schmidt + Haensch, Berlin, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 589 nm ermittelt. Hierfür wurden die Isolate in Konzentrationen zwischen 0,085 und 0,2 g/100 ml in Methanol gelöst und in ein Mikromessrohr (50 mm, 550 μl) überführt. Der spezifische Drehwert wurde aus dem Mittelwert von zehn Messungen mit folgender Formel berechnet (**Formel 1**).

Formel 1. Berechnung des spezifischen Drehwerts.

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha}{c \cdot d}$$

$[\alpha]_D^{25}$	spezifischer Drehwert $[(^\circ \cdot \text{ml}) \cdot (\text{g} \cdot \text{dm})^{-1}]$
α	Drehwinkel $[\circ]$
c	Konzentration $[\text{g}/\text{ml}]$
d	Schichtdicke $[\text{dm}]$

3.6.7.5. Circulardichroismus

Die CD-Spektren wurden mit einem J-715 Spektropolarimeter (JASCO Deutschland GmbH, Groß-Umstadt, Deutschland) bei 22° C aufgenommen. In 10 Wiederholungen wurde in einem Wellenlängenbereich von 190-400 nm in 0,5 nm Schritten mit 200 nm/min gemessen. Es wurden 1 mm Quarzküvetten (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) verwendet. Alle Proben wurden in MeOH gelöst und zu Konzentration zwischen 90 und 116 $\mu\text{mol}/\text{l}$ verdünnt. Für das Spektrum wurde die molare Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen, welche sich nach **Formel 2** berechnet. Abschließend wurde die Kurve unter Anwendung des Savitzky-Golay Algorithmus mit einer Konvolutionsbreite von 15 geglättet.

Formel 2. Berechnung der molaren Elliptizität.

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot M}{c \cdot l \cdot 10}$$

[θ]	molare Elliptizität [(°·cm ²)·dmol ⁻¹]
θ	Elliptizität [°]
M	molare Masse [g/mol]
c	Konzentration [g/ml]
l	Schichtdicke [cm]

4. Analytische Untersuchungen zum Gerbstoffprofil von *B. longifolia*

4.1. Hintergrund

Zur Erfassung des Gerbstoffprofils der Rinde von *B. longifolia* sollten nicht nur Inhaltsstoffe isoliert werden, sondern auch der Gesamtgerbstoffgehalt untersucht werden. Aufgrund der dunkelrot-bräunlichen Farbe der Rinde, der bemerkenswert hohen Auswaage des MeOH-Extrakts, und des hohen Anteils der PA-angereicherten- bzw. der Polymerfraktion (PA-F und Poly-F) lag die Vermutung nahe, dass der Gerbstoffanteil in der Pflanze sehr hoch ist. Dies wurde mit einer modifizierten Version der Hautpulvermethode nach Ph. Eur. ermittelt. Weiterhin wurde der PA-Gehalt und der Anteil der verschiedenen dP mit einer UPLC-Methode mittels einer Diol-Säule untersucht. Beide Methoden und deren Ergebnisse sollen im Folgenden vorgestellt werden. Weiterhin erfolgte mittels LC-MS/MS ein Screening der Fraktionen nach monomeren Flavan-3-olen mit monohydroxyliertem B-Ring, da diese im Laufe des Isolierungsprozesses nicht isoliert werden konnten aber als Bestandteil eines dimeren und von drei trimeren Flavan-3-olen auftraten. So sollte herausgefunden werden, ob diese in detektierbaren Mengen von der Pflanze auch als Einzelsubstanzen in der Rinde synthetisiert werden.

4.2. Untersuchungen zum Gerbstoffgehalt

4.2.1. Bestimmung des Gerbstoffgehaltes nach der Methode 2.8.14 nach Ph. Eur.

In dieser Methode wird der Gesamtphenol- und der Gerbstoffgehalt einer Probe mit der als „Hautpulvermethode“ bezeichneten Methode 2.8.14 aus dem Europäischen Arzneibuch bestimmt [157], die nach Wiesneth et al. für einen höheren Probendurchsatz modifiziert wurde [158]. Bei dieser handelt es sich um eine Konventionsmethode. Dies sind Methoden, die nach einem genau festgelegten Verfahren durchgeführt werden, um vergleichbare Werte zu erhalten, aber meist nicht dem tatsächlichen Wirkstoffgehalt entsprechen. Hierbei stellt diese Methode eine der meistverwendeten dar. Das Prinzip ist die Reduktion eines Natriumwolframat/Phosphorsäure-Gemisches, des Folin-Ciocalteu-Reagenzes durch phenolische Inhaltsstoffe. Dabei werden blaue Wolframoxide gebildet, die im Bereich von 580-820 nm absorbieren [39]. In Extrakten kann die Reduktion des Reagenzes durch verschiedene Inhaltsstoffe wie z.B. hydrolysierbare und kondensierte Gerbstoffe, Flavonoide, Phenolcarbonsäuren usw. erfolgen. Um nur den Gerbstoffgehalt zu vermessen, werden deshalb zwei Lösungen vermessen: eine Gesamtphenollösung (GPL), in der alle Stoffe des Extraktes vorliegen, und eine Restphenollösung (RPL). Die RPL entsteht, indem der GPL im Überschuss Hautpulver zugesetzt wird. Daran binden Gerbstoffe aufgrund ihrer adsorbierenden Eigenschaften und werden somit der Lösung entzogen. Nach Vermessung der Absorption beider Lösungen kann über die Differenz der Gerbstoffgehalt berechnet werden. Für diese Arbeit wurden jeweils der Phenol- und der Gerbstoffgehalt für den MeOH-Extrakt und für einen wässrigen Rindenextrakt bestimmt (Kapitel 4.5.3). Die Ergebnisse hierzu sind in **Tabelle 33** dargestellt.

4. Analytische Untersuchungen zum Gerbstoffprofil von *B. longifolia*

Tabelle 33. Bestimmung des Gesamtphenol- und Gerbstoffgehalts. Alle Werte wurden als Catechin berechnet und die Ergebnisse sind in % [m/m] \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$).

	MeOH-Extrakt	Rindenextrakt
Gesamtphenolgehalt \pm SD [%]	43.1 \pm 1.4	9.9 \pm 0.9
Gerbstoffgehalt \pm SD [%]	42.2 \pm 2.0	9.9 \pm 1.0

Da in der Literatur viele verschiedene Methoden zur Quantifizierung von Phenolen und Gerbstoffen zu finden sind, können für einen Vergleich des Gehalts mit anderen Arten nur Daten verwendet werden, die mit exakt derselben Methode gewonnen wurden. In früheren Untersuchungen wurde der Gehalt an Phenolen und Gerbstoffen für verschiedene *Salix*-Arten während einer Vegetationsperiode in Blättern und Sprossen bestimmt. Es wurde festgestellt, dass der höchste Gehalt an Phenolen zwischen 4-8 % und der höchste Gehalt an Gerbstoffen zwischen 2-8 % lag [159]. Für die Rinde von *Quercus robur* L. (Fagaceae), die wegen ihres "hohen" Gerbstoffgehalts in der traditionellen europäischen Medizin verwendet wird, wurde ein Gehalt von 5,1% Phenolen und 4,3% Gerbstoffen ermittelt [39, 158]. Der Wert des Rindenextraktes von *B. longifolia* von 9,9% liegt deutlich über den Werten der Weidenarten und der Eichenrinde. Dies deutet auf einen vergleichsweise hohen Gehalt an Phenolen und Gerbstoffen in der Rinde von *B. longifolia* hin. Außerdem ist der Gehalt an Gerbstoffen sowohl im Rinden- als auch im MeOH-Extrakt ebenso hoch wie der an Phenolen, was darauf hindeutet, dass fast alle phenolischen Verbindungen Gerbstoffe darstellen. Diese Ergebnisse werden auch durch die Beobachtungen aus dem Isolierungsprozess untermauert, in dem ausschließlich Flavan-3-ole gewonnen werden konnten. Außerdem konnte in den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen des MeOH- oder EtOAc-Extrakts bspw. keine charakteristischen gefärbten Banden für andere Phenole als Flavan-3-ole detektiert werden (**Abbildung 15**, **Abbildung 20**).

4.2.2. UPLC[®]-Methode zur Quantifizierung von PA-Clustern

Zur weiteren Charakterisierung des MeOH-Extraktes wurde über eine UPLC[®]-Methode an einer Diol-Säule zum einen der Gesamtgehalt der PA quantifiziert und zum anderen deren Zusammensetzung des dP bestimmt. Die Detektion mittels Fluoreszenz hat den Vorteil einer sehr hohen Sensitivität und Selektivität. Letzteres ist mit den Parametern von $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 316$ nm charakteristisch für Flavan-3-ole mit dihydroxyliertem B-Ring, also für Catechin- und Epicatechin-Einheiten. Aufgrund von Quench-, also Störeffekten, die zu Fluoreszenzverminderung führen können, können mit Gallussäure veresterte oder mono- und trihydroxylierte Flavan-3-ole nicht quantifiziert werden. *Trans*-konfigurierte Moleküle besitzen i.d.R. weiterhin eine intensivere Fluoreszenz als *cis*-konfigurierte. Dies bedeutet, dass PA mit Catechin-Einheiten stärker erfasst werden als solche mit Epicatechin-Einheiten [160, 161]. Mit der angewandten Analysemethode sind also nur Flavan-3-ole berücksichtigt, die aus Catechin oder Epicatechin-Einheiten bestehen, deren Anteil dadurch abgeschätzt werden kann. Die prozentuale Verteilung der PA ist in **Abbildung 44** zu sehen. Die Retentionszeiten, die als Grenzen für die einzelnen dPs zur Integration festgelegt wurden, sind in **Abbildung 45** dargestellt und orientieren sich an der Arbeit von Hellenbrand et al. [160]. Dabei macht die Polymerfraktion mit 35,3 \pm 0,4% den mit Abstand größten Teil aus. Die Flavan-3-ole mit einem dP von 2-4 sind ungefähr zu gleichen Anteilen von 9-10% enthalten. Den kleinsten Anteil machen die Monomere mit <1% aus. Insgesamt sind die Anteile von dP 2 bis dP 10 ähnlich, nehmen aber mit steigendem dP leicht ab.

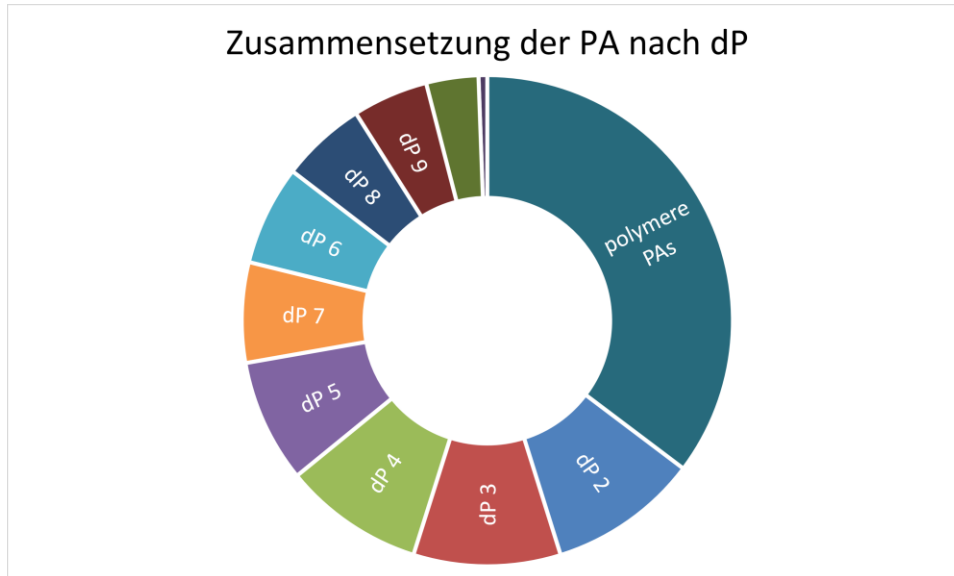


Abbildung 44. Anteil der Flavan-3-ole, aufgeteilt nach dP. Dunkelgrün = dP 10; grau = Monomere.

Die Berechnung des PA-Gehalts erfolgte als Summe der Peakflächen aller dPs als Catechin über eine Kalibriergerade und ergab einen Wert von $0,25 \pm 0,01$ mg/ml. Bei einer MeOH-Extrakt-Konzentration von 3 mg/ml entspricht dies einem Anteil von $8,3 \pm 0,3\%$. Vergleicht man diesen Wert mit dem Gesamtphenol- bzw. Gerbstoffgehalt, ermittelt mit der Hautpulvermethode, der bei 43,1 bzw. 42,2% lag, ist dieser deutlich geringer. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass bei der Hautpulvermethode sämtliche reduzierend wirkende Verbindungen und damit ein viel breiteres Spektrum erfasst werden kann. Wie bereits diskutiert konnten im Isolierungsprozess aber ausschließlich Flavan-3-ole isoliert werden und somit kann der Einfluss anderer solcher reduzierenden Verbindungen somit weitgehend ausgeschlossen werden. Der Grund für den großen Unterschied liegt wahrscheinlich in den gewählten Wellenlängen im Fluoreszenzdetektor. Bei diesen werden wie zuvor beschrieben (Epi)afzelechin-Einheiten nicht erfasst. Außerdem können *cis*-konfigurierte Monomere weniger gut quantifiziert werden. Diese machen jedoch den Hauptteil der Polymerfraktion aus und finden sich überwiegend in den isolierten Verbindungen. Das PA-Spektrum der meisten Pflanzen besteht zum größten Teil aus Catechin oder Epicatechin-Einheiten, weswegen dieses Verfahren als Screening eines großen Probendurchsatzes gut geeignet ist. Aufgrund der eingesetzten Wellenlängen ist es aber teilweise für einzelne Pflanzenarten, wie in diesem Fall, weniger gut geeignet, wenn die *cis*-Konfiguration so dominant ist und auch andere Monomere zu einem gewissen Teil vorkommen.

4. Analytische Untersuchungen zum Gerbstoffprofil von *B. longifolia*

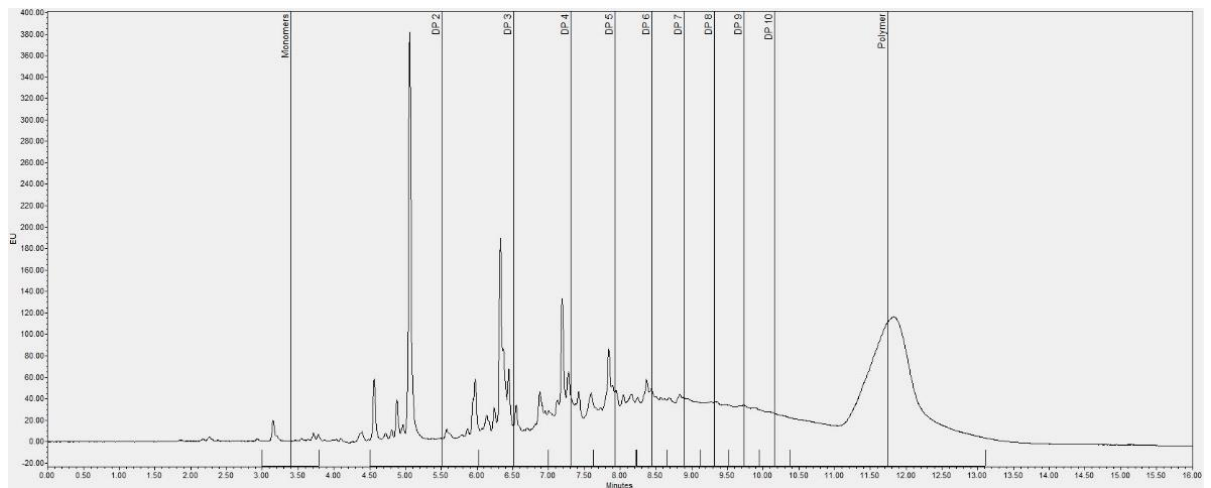


Abbildung 45. UPLC[®]-Chromatogramm des MeOH-Extraktes. Gemessen wurde die Emission bei einer Wellenlänge von 316 nm. Die Chromatographie wurde unter den in Kapitel 4.5.4 aufgeführten Bedingungen.

4.3. Screening nach (Epi)afzelechin mittels LC-MS/MS

Im Laufe der Isolierung konnten vier verschiedenen Substanzen isoliert werden, die eine Epicatechin-Einheit besitzen. Darunter befand sich ein mit Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (PA4 M2) ein Dimer und mit Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin (PA5 M6.2), Epicatechin-(4 β →8)-Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin (PA5 M6.3) und Epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin (PA5 M3.3) drei trimere PA. Als Monomere konnten nur Catechin und Epicatechin isoliert werden, Epiafzelechin jedoch nicht. Mithilfe der Sephadex®-Chromatographie konnten Fraktionen gewonnen werden (PA1-Poly-F; Kapitel 3.6.6.1), in der die Gerbstoffe nach ihrem dP aufgetrennt waren. In den Fraktionen PA1 und PA2 konnten weder auf der DC noch mittels HPLC-UV Flavan-3-ole detektiert werden. Erst in PA3 konnten die ersten Monomere isoliert werden. Dabei handelte es sich aber auch um die einzigen zwei Peaks der gesamten Fraktion, die mit HPLC-UV detektierbar waren. Ein Nachweis von Epiafzelechin gelang mit Hilfe dieser Methoden nicht. Deswegen wurde versucht, über die sensiblere LC-MS/MS Epiafzelechin oder Afzelechin in den Fraktionen nachzuweisen. Dazu wurden im sog. MS2scan-Modus die Fraktionen M1-M4 sowie PA1-PA7 vermessen, um sie nach dem [M-H]⁻- und des [M+H]⁺-Ions zu scannen. Dabei zeigte die Messung im negativen Modus für die Fraktionen PA2 und PA3 ein Fragment m/z 273, welches dem [M-H]⁻ von (Epi)afzelechin entspricht. Zur Verifizierung, ob es sich bei dem gefundenen Ion um eine der gesuchten Verbindungen handelt, erfolgte eine weitere Fragmentierung dessen im sog. Product Ion Scan. Dabei sollte ein Massenspektrum generiert werden, welches mit der Literatur abgeglichen werden kann. Dazu wurden in der MassBank of North America (MoNa) in der Vaniya/Fiehn Natural Products Library Spektren gesucht, welche unter vergleichbaren Bedingungen von Afzelechin aufgenommen wurden. Als Precursor Ion wurde ein m/z von 273 eingestellt, welches im ersten Quadrupol herausgefiltert wurde. Im zweiten Quadrupol erfolgte dann die Fragmentierung des Ions bei vier verschiedenen Kollisionsenergien, um ein möglichst breites Fragmentierungsmuster zu erhalten. Die erhaltenen Massenspektren von PA 2 bei den verschiedenen Spannungen und die Referenzspektren sind in **Abbildung 46** dargestellt.

4. Analytische Untersuchungen zum Gerbstoffprofil von *B. longifolia*

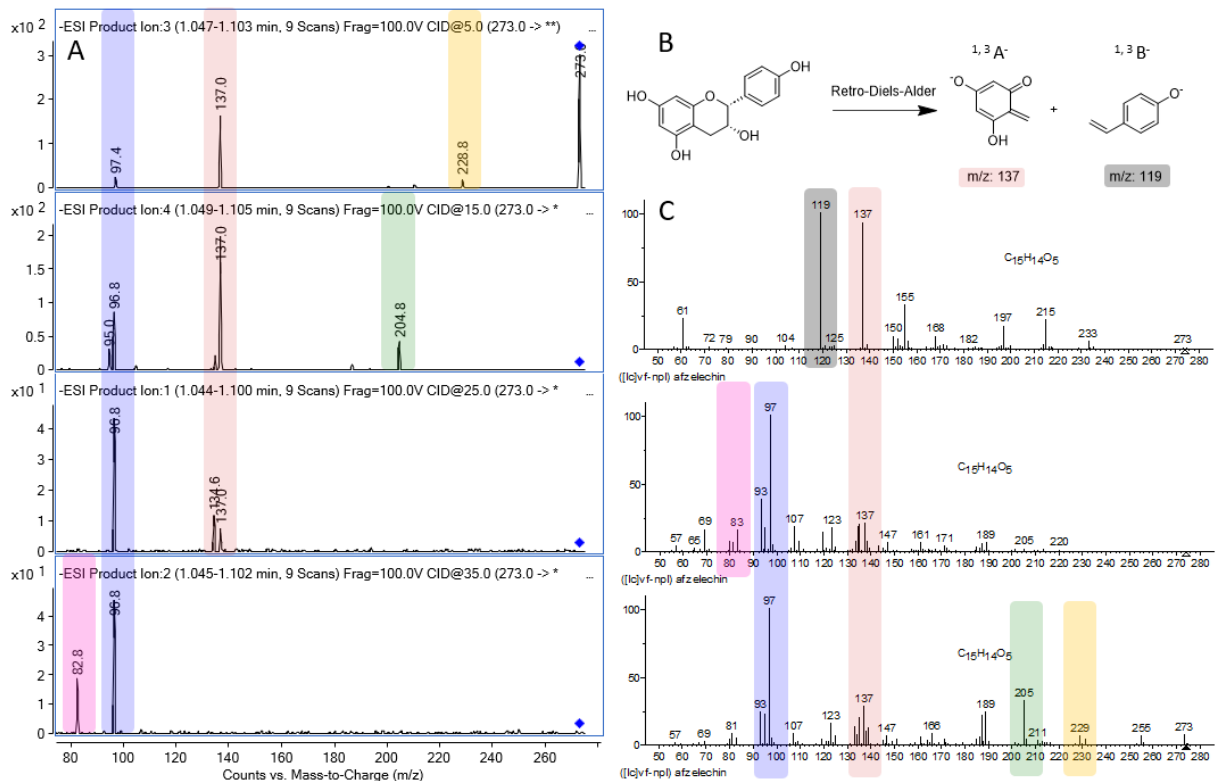


Abbildung 46. In **A** sind die Massenspektren von PA 2, ermittelt bei 5, 15, 25 und 35 V dargestellt. In **B** ist die Retro-Diels-Alder Fragmentierung für (Epi)afzelechin abgebildet. **C** zeigt drei Referenzspektren verschiedener Autoren aus der MassBank of North America (MoNa). Massenfragmente, die sich sowohl in den Referenzspektren als auch in den gemessenen Spektren wiederfinden sind farbig markiert.

Bei allen Referenzspektren konnte ein Fragment bei m/z 137 detektiert werden. Dieses fand sich auch in allen Spektren außer der mit der höchsten Kollisionsenergie wieder. Es entsteht durch eine Retro-Diels-Alder Fragmentierung am Molekül (**B** in **Abbildung 46**). Durch Spaltung nach Position 1 und 3 entstehen die Fragmente $^{1,3}A^-$ und $^{1,3}B^-$. Ersteres ist dabei unspezifisch für den Hydroxylierungsgrad im B-Ring und entsteht bei allen Flavan-3-olen und auch Flavanolen [162]. Dieses Fragment konnte auch in allen Messungen nachgewiesen werden. Das $^{1,3}B^-$ -Fragment hängt damit vom Hydroxylierungsgrad des B-Rings ab, taucht aber bei den Messungen nicht auf, sondern nur in einem Referenzspektrum. Weitere Massenfragmente bei m/z 97, 83, 205 und 229 konnten nachgewiesen werden und untermauern, dass es sich bei dem detektierten Ion von m/z 273 in den Fraktionen PA2 und PA3, um das $[M-H]^-$ von (Epi)afzelechin handelt. Zweifelsfrei könnte dies aber nur durch die Isolierung und Strukturaufklärung mittels NMR nachgewiesen werden, was jedoch aufgrund der fehlenden Detektierbarkeit mit HPLC-UV oder DC nicht realisiert werden konnte. Dies ist durch einen extrem geringen Gehalt von (Epi)afzelechin in den Fraktionen zu erklären. Es kann geschlossen werden, dass keine Kumulation von (Epi)afzelechin im Sekundärstoffwechsel von *B. longifolia* stattfindet, sondern dieses direkt zu den entsprechenden oligomeren PA weiter reagiert.

4.4. Zusammenfassung und Diskussion

Die Bestimmung des Gerbstoffgehaltes mit der modifizierten Variante der Hautpulvermethode nach Ph. Eur. ergab einen Gerbstoffgehalt von 9,9% für die Rinde und von 42,2% für den MeOH-Extrakt. Vergleicht man diesen Wert mit anderen Gehalten, ermittelt mit derselben Methode wie es bspw. für verschiedene Weidenarten oder Eichenrinde durchgeführt wurde, so ist dieser Wert vergleichsweise

hoch. In keiner der 11 beprobten Weidenarten oder der Eichenrinde konnte ein höherer Wert ermittelt werden [159]. Außerdem ist der Gesamtphenolgehalt fast genauso hoch wie der Gerbstoffgehalt, was bedeutet, dass fast alle enthaltenen phenolischen Verbindungen Gerbstoffe darstellen. Dies konnte im Isolierungsprozess auch bestätigt werden, in dem keine andere phenolische Inhaltsstoffklasse isoliert werden konnte als Flavan-3-ole, also kondensierte Gerbstoffe. Diese Ergebnisse sollten in einer UPLC®-Methode zur Quantifizierung des PA-Gehaltes bestätigt werden. Hier konnte für den MeOH-Extrakt ein Wert von 8,3% an Flavan-3-olen bestimmt werden. Bei der Bestimmung des Gerbstoffgehaltes konnte ein Wert von 42,2% ermittelt werden. Bei den beiden durchgeführten Methoden handelt es sich um Konventionenmethoden, die keinen wahren Wert ermitteln und somit auch nur bedingt miteinander verglichen werden können. Die enorm hohe Diskrepanz zwischen Gehalt der UPLC®- und Hauptpulvermethode lässt sich dennoch erklären: bei den eingestellten Wellenlängen im Fluoreszenzdetektor können nur Einheiten mit dihydroxyliertem B-Ring erfasst werden. Das schließt (Epi)gallocatechin- und (Epi)afzelechin-Einheiten aus. Letztere konnten aber isoliert werden und kommen auch nachweislich in der Polymerfraktion vor. Außerdem werden *cis*-konfigurierte Moleküle mit der Fluoreszenzspektroskopie ebenfalls besser erfasst. Diese beiden Effekte könnten zu dem großen Unterschied führen. Die UPLC®-Methode wurde außerdem herangezogen, um die Anteile der Flavan-3-ole nach ihrem dP zu bestimmen. Dabei zeigte die Polymerfraktion den größten Anteil mit 35,3% und die Monomere mit 0,6% den geringsten. In der LC-MS/MS Analyse der PA-Fraktion wurde gezielt nach (Epi)afzelechin gesucht, da dieses in Oligomeren verbaut isoliert werden, jedoch nicht als Monomer erfasst werden konnte. In den Fraktionen PA2 und PA3 konnte eine Masse detektiert werden, welches dem $[M-H]^-$ von (Epi)afzelechin entspricht. Um zu verifizieren, ob es sich um (Epi)afzelechin handelt, konnten mithilfe von Referenzspektren einige Fragmente dieser Moleküle detektiert werden, die auf Epiafzelechin hinweisen. Somit kann es als wahrscheinlich angenommen werden, dass sich Spuren von (Epi)afzelechin in diesen beiden Fraktionen befinden. Zweifelsfrei könnte dies aber nur über Isolierung und Strukturaufklärung nachgewiesen werden, was aber aufgrund des geringen Gehalts der Substanzen nicht möglich war.

4.5. Material und Methoden

Für die in dieser Arbeit beschriebenen analytischen Untersuchungen des Gerbstoffgehaltes, der Charakterisierung der Polymerfraktion sowie dem Screening nach (Epi)afzelechin wurden verschiedene Geräte, Gefäße und Materialien verwendet. Ebenso kamen bei den verschiedenen Arbeitsschritten eine Reihe von Chemikalien und Reagenzien zum Einsatz. Eine Übersicht über alle Materialien und Chemikalien findet sich in **Tabelle 34** und **Tabelle 35**.

4.5.1. Geräte, Gefäße und Materialien

Tabelle 34. Verwendete Geräte, Gefäße und Materialien.

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
HPLC-Vial	11 mm CrimpSnap-Vial, braun, 2 ml	Wicom, Heppenheim, Deutschland
HPLC-Vial Insert	Micro Insert, 300 µl, l = 30 mm, Ø = 6 mm	Wicom, Heppenheim, Deutschland
HPLC	Series 1200 Infinity	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
HPLC-Säule	Zorbax Eclipse XDB-C18; 50 mm x 4,6 mm; 1,8 µm	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
MS	Series 6410 Triple Quad	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Mikrotiterplatten	96-Well Polystyren F-bottom microplate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
NMR-Röhrchen	507-HP-8	Norell, Landsville, USA
NMR-Spektrometer	AVANCE III HD NMR mit 5 mm TCI CryoProbe (1H NMR 600,25 MHz, 13C NMR 150,95 MHz)	Bruker Corporation, Billerica, USA
Pipetten	100 Research (10-100 µl) 1000 Research (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl 100 - 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland
Plattenlesegerät	Spectra FluorPlus Xfluor4 V 4.40 (Software)	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Berlin, Deutschland
Spektrophotometer	Cary 50 Scan Cary WinUV 3.00(182) (Software)	Varian Deutschland, Darmstadt, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt, Deutschland
UPLC®	Acquity UPLC®-Anlage: Acquity H-Class quaternary solvent manager, Acquity FTN autosampler, Acquity eλ PDA detector, Acquity FLR detector	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
UPLC®-Säule	Acquity UPLC® Protein SEC, 200 Å, 1,7 µm, 4,6 x 150 mm	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
Zentrifuge	Mikrozentrifuge 1-14	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland

4.5.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 35. Verwendete Chemikalien und Referenzsubstanzen.

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
(+)-Catechin	≥ 95%	Phytolab GmbH & CO. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Essigsäure	100%, anhydrous	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Hautpulver	Freiberg Hautpulver	Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen GmbH, Freiberg, Deutschland
Methanol	HPLC-grade, LiChrosolv®	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Methanol- <i>d</i> ₄ (MeOD)	Methylalcohol- <i>d</i> ₄	Deutero, Kastellaun, Deutschland
Natriumcarbonat	≥ 99%, wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

4.5.3. Quantifizierung des Gerbstoffgehalts mit der modifizierten Methode 2.8.14 nach Ph. Eur.

Zur Quantifizierung der Phenole und Tannine wurde eine modifizierte Variante der Methode 2.8.14 des Europäischen Arzneibuchs verwendet [157]. 50,0 mg pulverisierte Rinde und 5,0 mg methanolischer Extrakt von *B. longifolia* wurden in 1,0 mL Wasser gegeben, 60 Minuten lang im Ultraschallbad extrahiert und anschließend bei 14000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Vier verschiedene Verdünnungen von 5 ml/ml, 2,5 ml/ml, 1,25 ml/ml und 0,5 ml/ml für den pulverisierten Rindenextrakt bzw. 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml und 0,05 mg/ml für den methanolischen Extrakt wurden hergestellt. Diese Lösungen enthalten die Gesamtphenole. 0,5 mL dieser Gesamtphenollösung (GPL) wurden in Mikrozentrifugenröhrchen (VWR international, Radnor, USA) mit 10 mg Hautpulver (Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen GmbH, Freiberg, Deutschland) versetzt und 60 Minuten lang im Dunkeln geschüttelt. Diese Zubereitung wurde filtriert und als Restphenollösung (RPL) bezeichnet. Entweder 20 µL GPL oder RPL wurden zusammen mit 100 µL Folin-Ciocalteu's Reagenz (Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 80 µL 10,6% Natriumcarbonatlösung in einer 96-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) verdünnt. Nach einer 180-minütigen Inkubation unter Lichtausschluss wurde die Absorption bei 690 nm mit einem SpectraFLUOR PLUS® (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gemessen. Der Gerbstoffgehalt wurde als Catechin berechnet. Zur Ermittlung der Kalibriergeraden wurden sechs verschiedene Verdünnung von Catechin zwischen 0,04 und 0,24 mg/ml hergestellt und jeweils sechs Messwerte erhoben. Die erhaltene Kalibriergerade ist in **Abbildung 47** angegeben. Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt und zur Berechnung des Gerbstoffgehalts mit **Formel 3** als Catechin berechnet.

Formel 3. Berechnung des Gesamtgerbstoffgehaltes.

$$\text{Gesamtgerbstoffgehalt [\%]} = 100 \cdot \frac{(A_{\text{GPL}} - A_{\text{RPL}})_{\text{Probe}} \cdot m_{\text{Catechin}}}{(A_{\text{GPL}} - A_{\text{RPL}})_{\text{Catechin}} \cdot m_{\text{Probe}}}$$

A	Absorption bei 690 nm
m	Einwaage [mg]

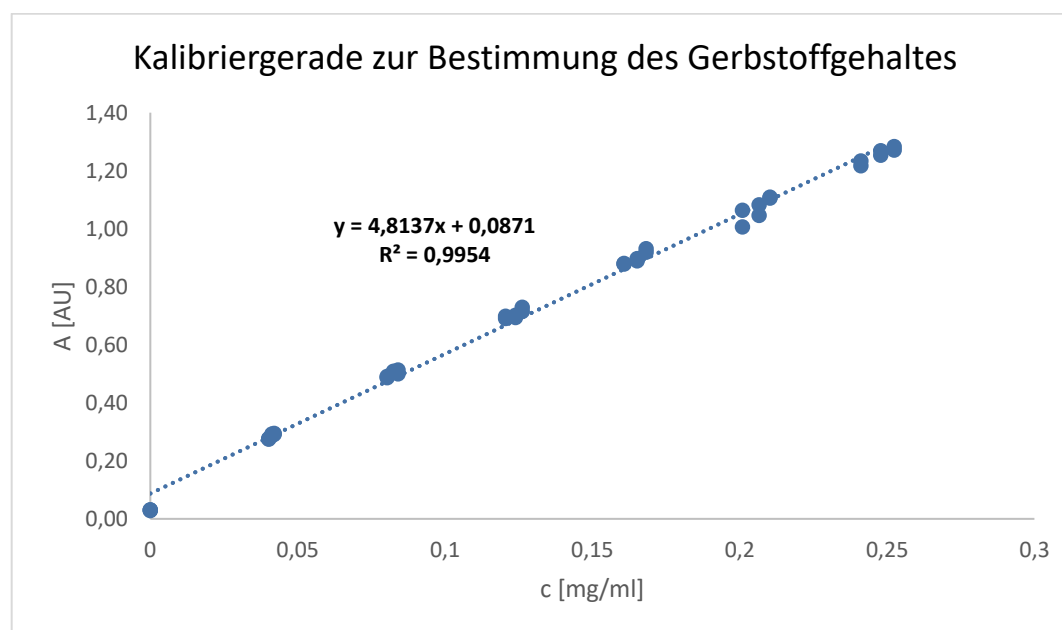


Abbildung 47. Kalibriergerade zur Bestimmung des Gerbstoffgehaltes mit der Hautpulvermethode, berechnet als Catechin. In sechs verschiedenen Verdünnungen von Catechin wurden jeweils sechs Messwerte ermittelt.

4.5.4. UPLC®-Methode zur Quantifizierung von PA-Clustern

Die verwendete Methode wurde von Hellenbrand et al. entwickelt, um die Zusammensetzung von PA des selben dP, sog. PA-Clustern, zu untersuchen [160]. Die Quantifizierung der PA-Gehalts erfolgte als Catechin über eine Kalibriergerade. Dazu wurde Catechin in MeOH gelöst und sechs verschiedene Konzentrationen in einem Bereich von 0,2 bis 0,02 mg/ml vermessen. Die so erhaltene Kalibriergerade ist in **Abbildung 48** dargestellt. Die Berechnung des Anteils des jeweiligen dP erfolgte über das Verhältnis der Fläche der Peaks im Bereich des jeweiligen dP zur Gesamtfläche aller Peaks. Vermessen wurde eine Lösung des MeOH-Extraktes in MeOH bei einer Konzentration von 3 mg/ml und $n = 3$. Das Injektionsvolumen betrug 1 μl . Die T im Säulenofen betrug 50°C und der Preheater wurde aktiviert. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenz-Detektor mit folgenden Parametern: Gain = 1 (Ermittlung der Kalibriergerade); 0,0→4,5 min: Gain = 0,01; 4,5→16 min: Gain = 1 (Vermessen der Proben), $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 316$ nm. Die Trennung erfolgte mit den Eluenten ACN+HOAc (98+2[V/V]) (Eluent A) und MeOH/H₂O/HOAc (86+12+2 [V/V/V]) (Eluent B) bei einem Fluss von 1 ml/min. Das Injektionsvolumen betrug 1 μl . Der verwendete Gradient ist in **Tabelle 36** wiedergegeben.

4. Analytische Untersuchungen zum Gerbstoffprofil von *B. longifolia*

Tabelle 36. Gradient zur UPLC®-Methode zur Quantifizierung von PA-Clustern. Eluent A = MeCN+HOAc (98+2[V/V]); Eluent B = MeOH/H₂O/HOAc (86+12+2 [V/V/V]).

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
1,00	100	0
6,18	65	35
7,75	60	40
9,00	60	40
10,50	0	100
13,00	0	100
14,26	100	0
16,00	100	0

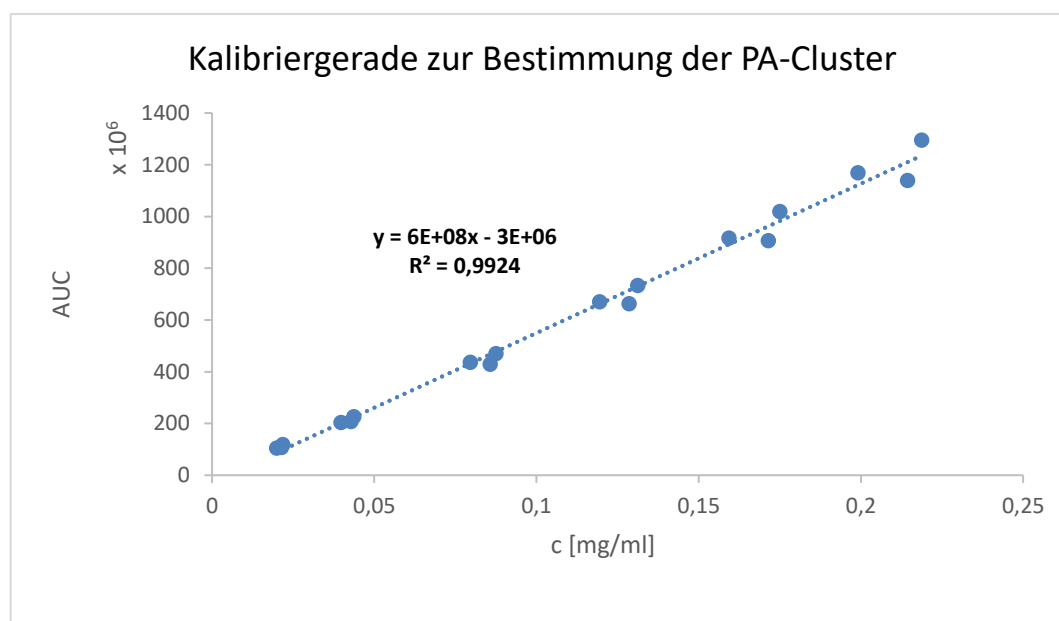


Abbildung 48. Kalibriergerade zur Bestimmung des Flavan-3-ol-Gehalts via UPLC, berechnet als Catechin. In sechs verschiedenen Verdünnungen von Catechin wurden jeweils drei Messwerte ermittelt.

4.5.5. LC-MS/MS Untersuchungen zur Detektion von (Epi)afzelechin

Zur Detektion der Monomere Afzelechin oder Epiafzelechin wurden jeweils eine Lösung von 1 mg/ml in ACN der Fraktionen M1-M4 sowie PA1-PA7 hergestellt. Es wurden je 5 µl in eine HPLC series 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) injiziert. Die verwendete Säule war eine Zorbax Eclipse XDB-C18; 50 mm x 4,6 mm; 1,8 µm (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und die Ofentemperatur lag bei 50°C. Die Trennung erfolgte mit den Eluenten H₂O+0,1% FA (Eluent A) und ACN (Eluent B) bei einem Fluss von 1 ml/min. Die verwendete Methode ist in **Tabelle 37** angegeben. Nach der HPLC gelangte die Probe in das MS. Als Ionenquelle diente eine ESI bei einer Kapillarspannung von 4000 V, der Druck des Verneblers betrug 50 psi, als Trocknungsgas diente N₂ bei 350 °C und einer Flussrate von 10 l/min. Die Vermessung im MS2Scan-Modus erfolgte im positiven und negativen Modus in einem *m/z*-Bereich von 100-1680. Die Fragmentorspannung betrug 135 V. Die Messung im Product Ion Scan erfolgte im negativen Modus. Als precursor ion wurde ein *m/z* von 273 und als product ion eine Bandbreite von 35-275 eingestellt. Die Fragmentorspannung betrug 100 V, und als Kollisionsenergien wurden 5, 15, 25 sowie 35 V gewählt.

4. Analytische Untersuchungen zum Gerbstoffprofil von *B. longifolia*

Tabelle 37. HPLC-Gradient zum LC-MS/MS Screening nach (Epi)afzelechin. Eluent A = H₂O+0,1% FA; Eluent B = ACN.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	80	20
6	40	60
9	40	60
12	0	100
15	0	100

5. Untersuchungen zur Hemmung der α -Glucosidase

5.1. Hintergrund

In der Literatur ist die traditionelle Anwendung eines Dekoktes bei diabetischen Patienten in Nepal beschrieben [13]. Es finden sich zahlreiche Arbeiten, die sich mit Pflanzen beschäftigen, welche traditionell bei Diabetes angewendet werden. Dabei handelt es sich häufig um Pflanzen, die einen hohen Gerbstoffanteil aufweisen oder bei denen hydrophile, polyphenolhaltige Fraktionen den größten antidiabetischen Effekt aufweisen [86, 89, 163–165]. Weiterhin sind auch Studien zu finden, die eine Hemmung der α -Glucosidase von einzelnen Flavan-3-olen oder PA mit vorher charakterisiertem dP nachweisen [95, 166]. Aus den Ergebnissen der Gerbstoffbestimmung geht eine vergleichsweise hohe Konzentration dieser in der Rinde von *B. longifolia* hervor (Kapitel 4.2). Ebenso konnten zahlreiche Flavan-3-ole isoliert werden. Deshalb schien eine Testung auf die Hemmung der α -Glucosidase vielversprechend, worüber sich der traditionelle Einsatz bei diabetischen Patienten begründen ließe. Bei vielen Untersuchungen zur Wirkung von sekundären Pflanzenstoffen wird deren Metabolismus selten berücksichtigt. Flavan-3-ole unterliegen einer ausgeprägten Verstoffwechslung, wodurch nur ein sehr geringer Teil ins Blut übergeht [41]. Da die α -Glucosidase aber auf dem Epithel der Mikrovilli im oberen Dünndarm exprimiert wird, ist der Übergang der Substanzen in das Blut nicht notwendig und kann deshalb durch eine orale Aufnahme, bspw. durch ein traditionelles Dekokt gehemmt werden [81].

5.2. α -Glucosidaseassay

Zuerst wurde der Assay mit dem bekannten α -Glucosidasehemmer Acarbose durchgeführt. Hierbei konnte mit $2,9 \pm 0,4$ nM im Vergleich zu allen isolierten und getesteten Reinsubstanzen der kleinste IC_{50} -Wert ermittelt werden (Abbildung 49).

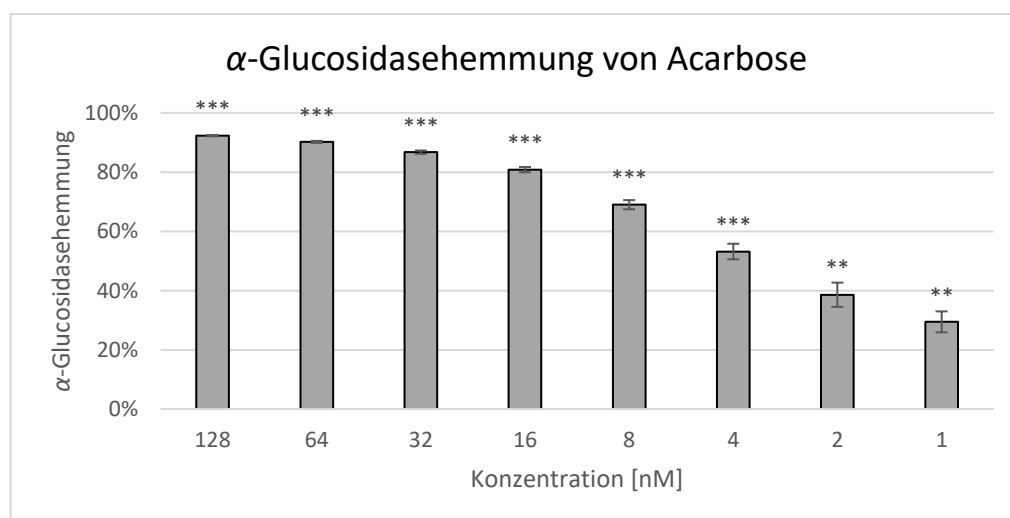


Abbildung 49. α -Glucosidasehemmung von Acarbose. Alle Tests wurden dreimal in Tetraplikaten durchgeführt und sind als $MW \pm SEM$ präsentiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. NK.

Aufgrund der Vermutung, dass ein hoher Anteil an Gerbstoffen zu einer starken Enzymhemmung führt, wurden zuerst drei Fraktionen mit unterschiedlichem Gerbstoffgehalt und dP getestet. Daraufhin wurden der MeOH-Extrakt, die mit Flavan-3-olen angereicherte Fraktion PA-F und die mit polymeren PA angereicherte Fraktion Poly-F ausgewählt und getestet. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 50** dargestellt.

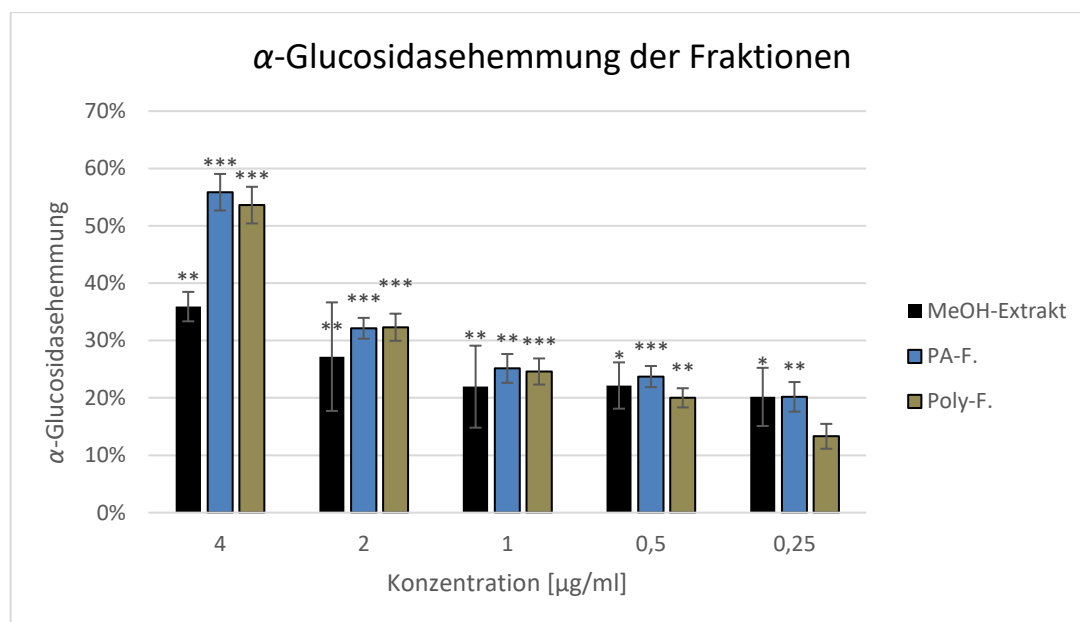


Abbildung 50. α -Glucosidasehemmung des MeOH-Extrakts, PA-F und Poly-F. Alle Tests wurden in Tetraplikaten durchgeführt und sind als $MW \pm SEM$ präsentiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. NK.

Dabei konnte für den MeOH-Extrakt eine IC_{50} von $7,8 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$, für PA-F eine IC_{50} von $4,0 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ und eine IC_{50} für Poly-F von $3,2 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$ ermittelt werden, wobei die Experimente für den MeOH-Extrakt und PA-F dreimal und für Poly-F aufgrund der hohen Schwankungen der Absorptionen, neunmal durchgeführt wurden. Der MeOH-Extrakt weist somit die geringste Hemmung der drei Fraktionen auf, PA-F und Poly-F unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Letzterer weist eine etwas stärkere Hemmung der α -Glucosidase auf. Somit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die α -Glucosidasehemmung mit steigender Gerbstoffkonzentration zunimmt. Dass diese auch mit steigendem Polymerisationsgrad zunimmt, konnte nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Hier ist lediglich eine Tendenz zu erkennen. Im Anschluss darauf wurden die Isolate getestet. Darunter befand sich ein weites Spektrum an Flavan-3-olen, welches Monomere, 4β -, 4α -, $4 \rightarrow 6$ -, $4 \rightarrow 8$ -konfigurierte Dimere, Trimere und ein Tetramer umfasste, weshalb versucht wurde, eine Struktur-Wirkungs-Beziehung herzustellen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Diagramme zur α -Glucosidasehemmung für die einzelnen Substanzen im Anhang abgebildet. Eine Übersicht der getesteten Substanzen und deren IC_{50} -Werte ist in **Tabelle 38** dargestellt.

5. Untersuchungen zur Hemmung der α -Glucosidase

Tabelle 38. $IC_{50} \pm SD$ [μM]-Werte der getesteten Substanzen ($n = 3$). Dabei sind die Werte in der jeweiligen Spalte nach aufsteigendem IC_{50} -Wert geordnet. Zur besseren Lesbarkeit der Tabelle sind bei Substanzen mit Trivialnamen diese angegeben.

Monomere	IC_{50} [μM]	Dimere	IC_{50}	Trimere	IC_{50} [μM]	Tetramere	IC_{50} [μM]
Catechin	8.4 ± 1.1	PC B5	1.6 ± 0.4	PA5 M1.1	2.2 ± 0.1	Cinnamtannin A2	1.7 ± 0.1
Epicatechin	8.5 ± 0.9	PA4 M2	2.3 ± 0.8	PC C1	3.4 ± 1.1		
		PC B3	2.4 ± 0.3	PA5 M3.3	4.5 ± 0.7		
		PC B4	3.0 ± 0.5	PA5 M2.5	5.3 ± 0.5		
		PC B2	8.5 ± 1.5	PA5 M6.3	6.3 ± 0.6		
		PC B1	11.2 ± 1.0	PA5 M6.2	8.6 ± 1.5		

So konnte für alle getesteten Flavan-3-ole eine starke α -Glucosidasehemmung festgestellt werden, wobei sich die IC_{50} für fast alle Substanzen im einstelligen mikromolaren Bereich befindet. Die α -Glucosidasehemmung für die Einzelsubstanzen ist in **Abbildung 51** wiedergegeben.

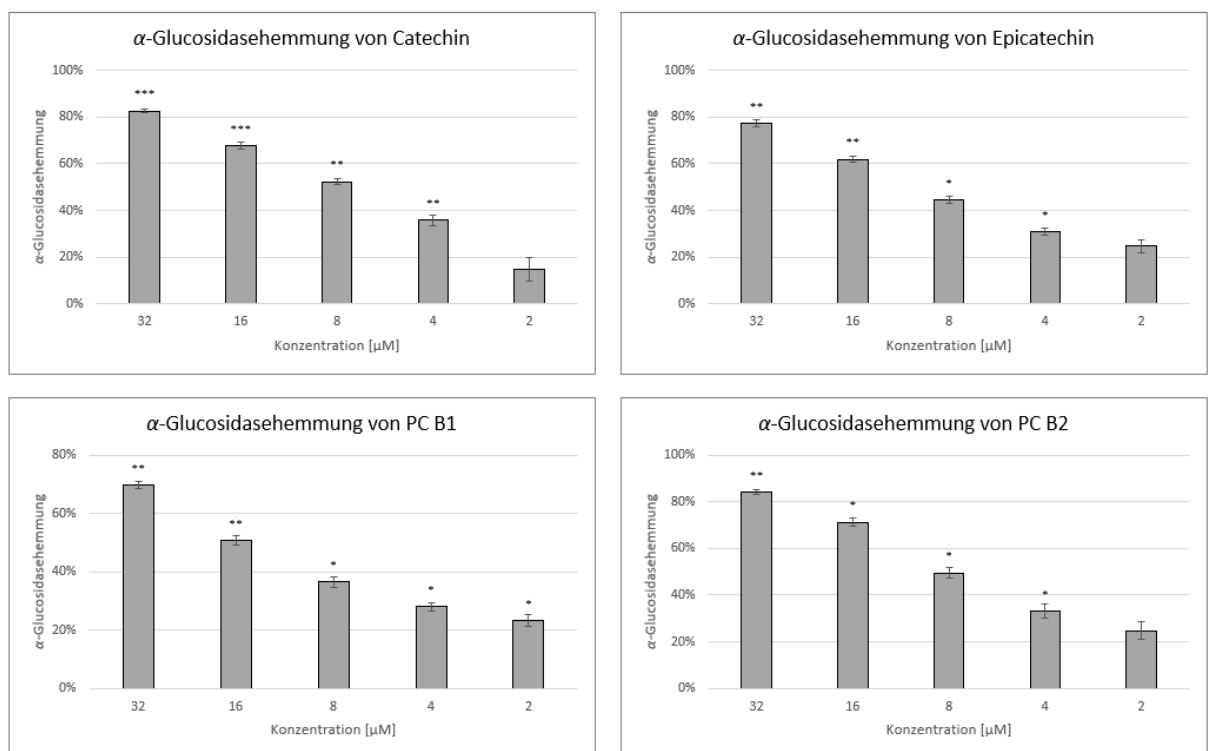
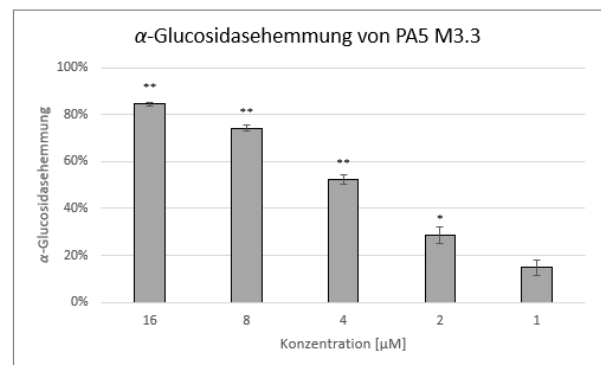
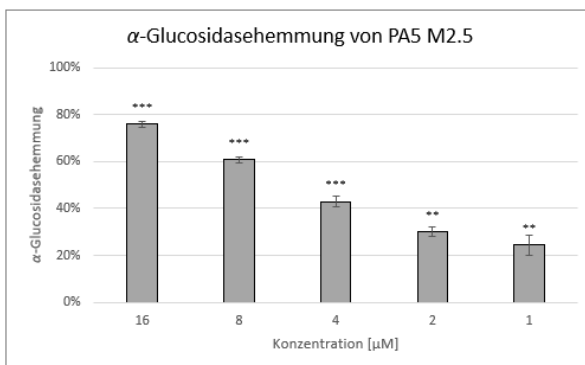
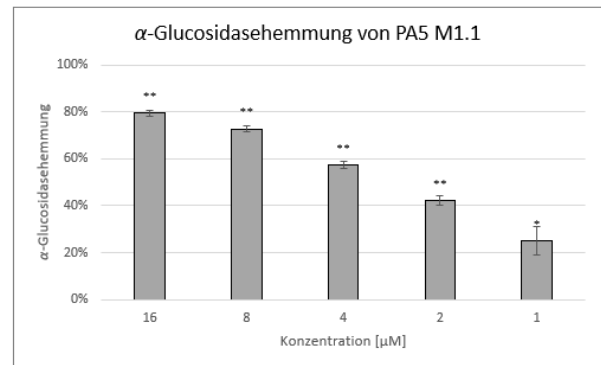
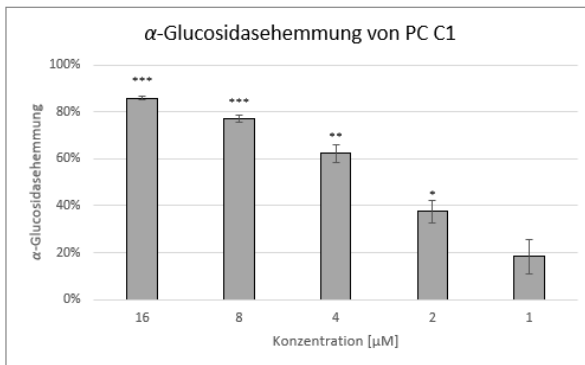
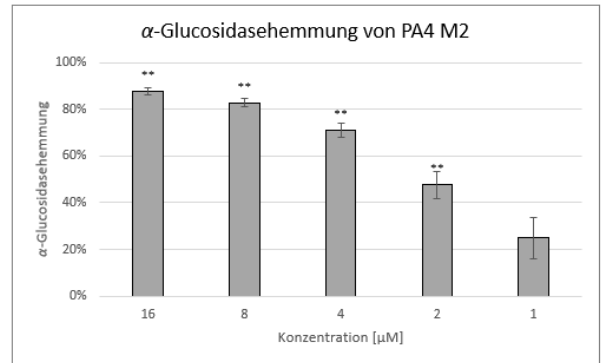
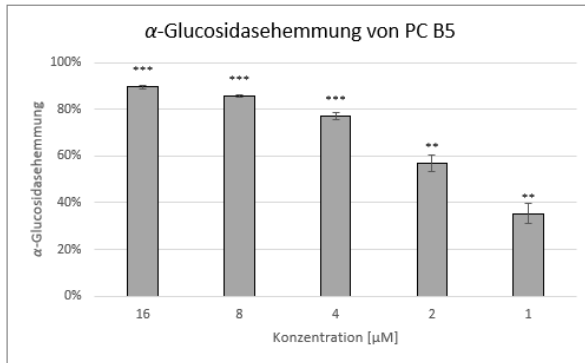
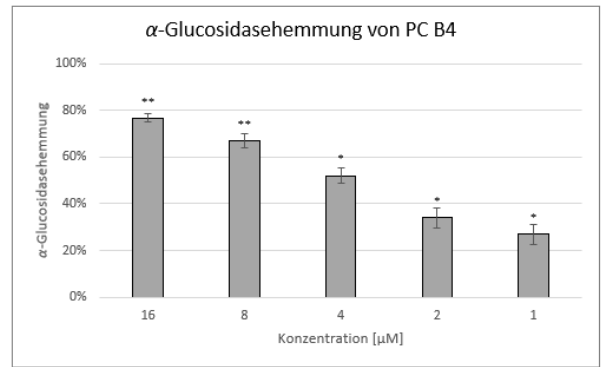
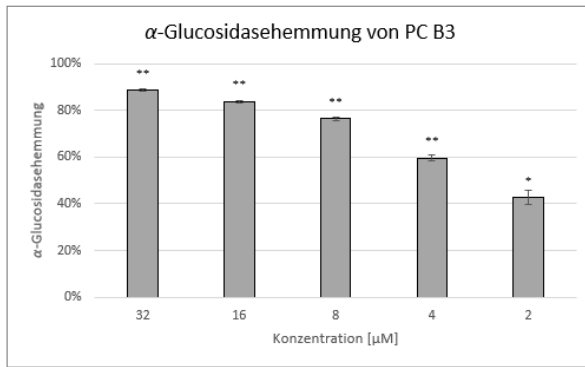


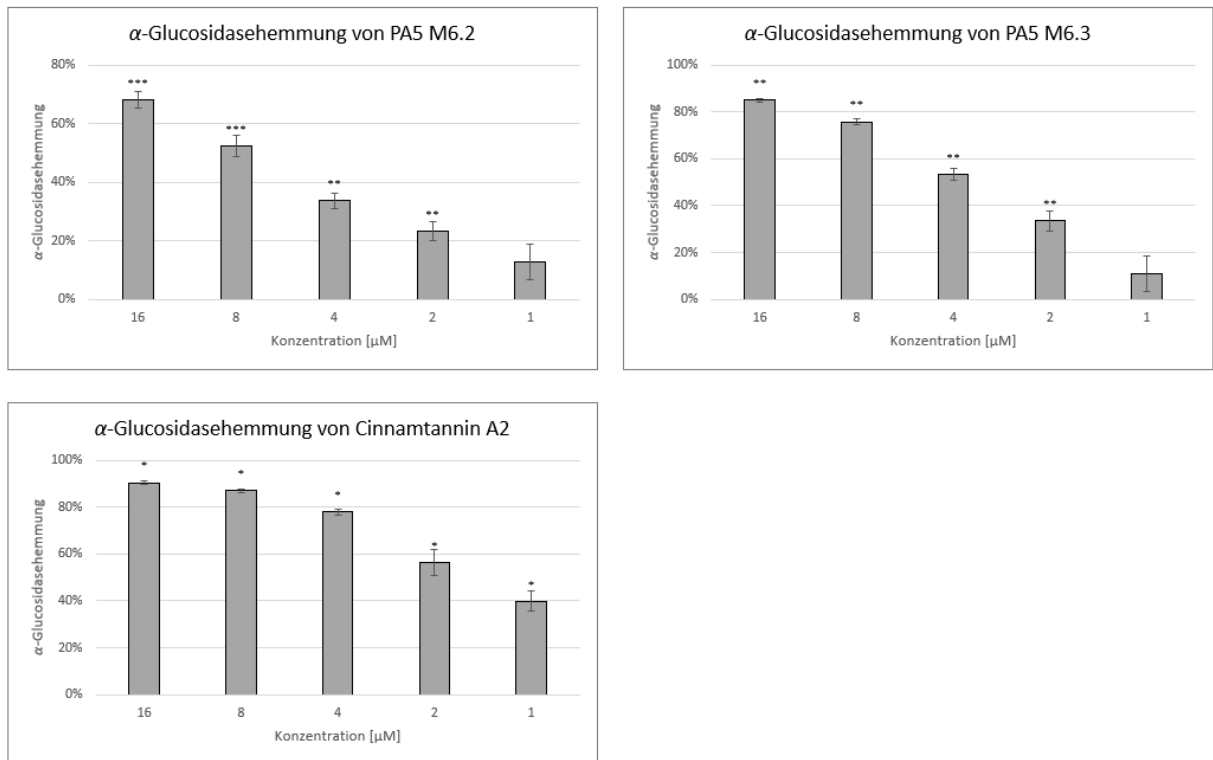
Abbildung 51. α -Glucosidasehemmung der Einzelsubstanzen. Alle Tests wurden dreifach in Tetraplikaten durchgeführt und sind als $MW \pm SEM$ präsentiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. NK.

5. Untersuchungen zur Hemmung der α -Glucosidase



Fortsetzung zu Abbildung 51.

5. Untersuchungen zur Hemmung der α -Glucosidase



Fortsetzung zu Abbildung 51.

Die beiden Monomere Catechin und Epicatechin unterscheiden sich nicht in ihrer Hemmstärke und liegen dabei im Vergleich zu allen anderen Substanzen im hinteren Bereich. Bei den dimeren PA ist eine eindeutige Tendenz erkennbar: das $4\beta\rightarrow 6$ konfigurierte PC B5 weist die stärkste Enzymhemmung auf. PC B5 ist das einzige $4\rightarrow 6$ konfigurierte Flavan-3-ol, welches getestet wurde, da die Auswaage für PC B8 nach Aufreinigung nicht mehr ausreichend hoch war (Kapitel 3.3.5.8). Alle darauffolgenden Substanzen sind jeweils $4\rightarrow 8$ verknüpft. Dabei zeigen die 4α -konfigurierten Dimere PC B3 und PC B4 mit einer IC_{50} von $2,4\pm 0,3 \mu\text{M}$ bzw. $3,0\pm 0,5 \mu\text{M}$ eine wesentlich stärkere Hemmung als die 4β -verknüpften PC B2 und PC B1 mit einer IC_{50} von $8,5\pm 1,5 \mu\text{M}$ bzw. $11,2\pm 1,0 \mu\text{M}$. Für PC B1 konnte sogar der höchste Wert für alle Substanzen ermittelt werden. Diese Reihe wird nur durch Epiafzelechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Epicatechin (PA4 M2) unterbrochen, wobei die Epiafzelechin-Einheit eine Rolle spielen könnte. Die trimeren PA zeigen ein ähnliches Bild. Hier scheint auch die Konfiguration der intramolekularen Verknüpfung eine Rolle zu spielen. Verbindungen mit einer 4α -Konfiguration im Molekül weisen eine höhere Enzymhemmung auf als Substanzen mit einer durchgehenden 4β -Verknüpfung mit Epiafzelechin im Molekül. Die Reihe der 4α -konfigurierten Substanzen PA5 M1.1 (Catechin-($4\alpha\rightarrow 8$)-Epicatechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Epicatechin), PA5 M3.3 (Epiafzelechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Catechin-($4\alpha\rightarrow 8$)-Epicatechin) und PA5 M2.5 (Epicatechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Catechin-($4\alpha\rightarrow 8$)-Epicatechin) mit relativ hohen IC_{50} -Werten wird durch PC C1 (Epicatechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Epicatechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Epicatechin) unterbrochen. Darauf folgen die durchgängig 4β -konfigurierten Trimere PA5 M6.3 (Epicatechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Epiafzelechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Epicatechin) und PA5 M6.2 (Epiafzelechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Epicatechin-($4\beta\rightarrow 8$)-Epicatechin), welche jeweils eine Epiafzelechin-Einheit aufweisen. Dabei weist PA5 M6.3, in dem Epicatechin die oberste Einheit darstellt eine stärkere Hemmung auf als PA5 M6.2, in welchem Epicatechin als mittlere Einheit verbaut ist. So konnte auch bei den dimeren PA für PA4 M2, mit Epiafzelechin wiederum als oberste Einheit, ein stärkerer Effekt als bei den anderen 4β -konfigurierten Substanzen ermittelt werden. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang. Das einzige Tetramer, welches isoliert und getestet werden konnte, war Cinnamtannin A2. Hierbei handelt es sich um

Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin-(4 β →8)-Epicatechin, also um ein homogen 4 β →8 verknüpftes Flavan-3-ol. Für dieses konnte mit einer IC₅₀ von 1,7±0,1 μ M die stärkste Hemmung aller getesteter Verbindungen bestimmt werden. Somit konnten für PC B5, als einzig getestetes 4→6-konfiguriertes Flavan-3-ol und für das tetramere PA Cinnamtannin A2 die höchste α -Glucosidasehemmung festgestellt werden. Die Niedrigste wurde für die beiden Monomere und PC B1 gemessen. Vergleicht man alle 4→8 verknüpften PA untereinander, so konnte festgestellt werden, dass mit steigendem dP auch die Enzymhemmung zunimmt. Außerdem scheint die intramolekulare Verknüpfung eine Rolle zu spielen, da Verbindungen, die mindestens eine 4 α -Verknüpfung besitzen, innerhalb ihres jeweiligen Polymerisierungsgrades eine höhere Enzymhemmung aufweisen als 4 β -konfigurierte PA.

5.3. Zusammenfassung und Diskussion

Insgesamt erfolgte die Testung von drei gerbstoffhaltigen Fraktionen und 15 verschiedenen Flavan-3-olen, die im Laufe des Isolierungsprozesses gewonnen werden konnten. Von den drei gerbstoffhaltigen Fraktionen zeigte der MeOH-Extrakt die geringste α -Glucosidasehemmung. PA-F, ein Extrakt angereichert mit Flavan-3-olen zeigte die zweithöchste und Poly-F, angereichert mit polymeren PA zeigte den stärksten Effekt. Die beiden letztgenannten unterschieden sich jedoch nur marginal voneinander. Somit konnte für die Fraktionen die Vermutung, dass mit steigendem dP die Inhibierung des Enzyms zunimmt, nicht eindeutig bestätigt werden. Möglicherweise steigt die Enzymhemmung nur bis zu einem gewissen dP und nimmt dann bei höher polymerisierten Gerbstoffen wieder ab. Bei der Testung der Einzelsubstanzen jedoch konnte der Zusammenhang zwischen steigendem dP und damit verbundener steigender Enzymhemmung beobachtet werden. So konnte für Cinnamtannin A2, dem einzigen getesteten tetrameren PA, die niedrigste IC₅₀ bestimmt werden und für die monomeren und 4 β -konfigurierten dimeren Flavan-3-ole die höchste. Auch ein Zusammenhang zwischen Verknüpfung und α -Glucosidasehemmung konnte ermittelt werden. PC B5 liegt als einziges 4→6-verknüpftes PA mit seiner IC₅₀ im Bereich von Cinnamtannin A2. Außerdem scheint eine 4 α -Konfiguration die Hemmung ebenfalls zu begünstigen. Für PC B3 und PC B4 (4 α →8-konfiguriert) konnte eine stärkere Hemmung als für PC B1 und PC B2 (4 β →8-konfiguriert) ermittelt werden, die aus den gleichen Monomeren bestehen und sich ausschließlich in der intramolekularen Verknüpfung unterscheiden. Bei den trimeren PA konnte ebenfalls für die Verbindungen, in denen eine 4 α -Verknüpfung vorliegt, eine stärkere Hemmung ermittelt werden. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass ein steigender dP, das Vorhandensein einer 4 α -Konfiguration und einer 4→6-Verknüpfung die Hemmung der α -Glucosidase begünstigen. Eine Übersicht über den Einfluss der Strukturen auf die Enzymhemmung ist in **Abbildung 52** zu sehen. Es konnte für alle getesteten Fraktionen und Substanzen eine hohe Hemmung der α -Glucosidase ermittelt werden. Deswegen erscheint die Aufnahme eines wässrigen Dekoktes, der einen hohen Anteil an Gerbstoffen aufweist, als sinnvoll. Hierbei kann zumindest der über die α -Glucosidase vermittelte Anstieg des Blutzuckerspiegels gesenkt werden. Für den Einsatz als traditionelles Arzneimittel zur Senkung des postprandialen Blutzuckerspiegels konnte somit mit diesen Versuchen eine erste Grundlage geschaffen werden.

5. Untersuchungen zur Hemmung der α -Glucosidase

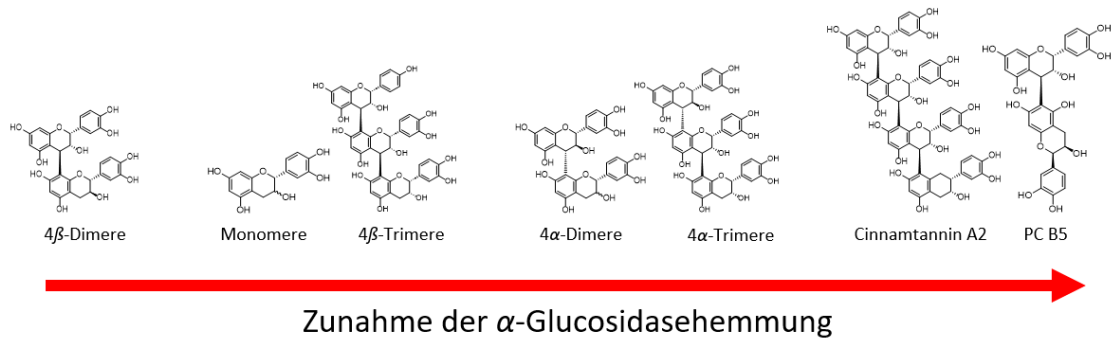


Abbildung 52. Zusammenhang zwischen den Strukturen der Flavan-3-ole und der α -Glucosidasehemmung.

5.4. Material und Methoden

Zur Erhebung und Auswertung der Daten zur α -Glucosidasehemmung kamen eine Reihe von Geräten, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien zum Einsatz. Diese sind in **Tabelle 39** und **Tabelle 40** zusammengefasst.

5.4.1. Geräte, Gefäße und Materialien

Tabelle 39. Geräte, Gefäße und Materialien für den α -Glucosidaseassay.

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Falcon-Tubes	15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Inkubator	AutoFlow IR Direct Heat, NU-5500 E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Mikrotiterplatten	96-Well Polystyren F-bottom microplate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mehrkanalpipetten Reservoir	5 ml	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Pipetten	100 Research (10-100 μ l) 1000 Research (100-1000 μ l) 100 Research, 12-Kanal (10-100 μ l)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 μ l 100-1250 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland
Plattenlesegerät	Spectra FluorPlus Xfluor4 V 4.40 (Software)	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Berlin, Deutschland
Software zur Erhebung	Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
biostatistischer Daten	GraphPad Prism 8.0.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt, Deutschland
Vortexer	VF2 Laborschüttler D 365 DL	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

5.4.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 40. Chemikalien und Reagenzien für den α -Glucosidaseassay.

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
Acarbose	$\geq 95\%$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
α -Glucosidase	α -Glucosidase from <i>Bacillus stearothermophilus</i> , lyophilized powder, ≥ 50 units/mg protein	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
K_2HPO_4	for Analysis EMSURE	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
KH_2PO_4	for Analysis EMSURE	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Na_2CO_3	$\geq 99\%$, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
pNPG	4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside $\geq 99\%$	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

5.4.3. α -Glucosidaseassay

Das Grundprinzip des Assays ist die Spaltung der α -Glucose von *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (pNPG) durch α -Glucosidase (beide Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), wobei *p*-Nitrophenol entsteht, welches im Alkalischen eine gelbe Färbung aufweist (**Abbildung 53**).

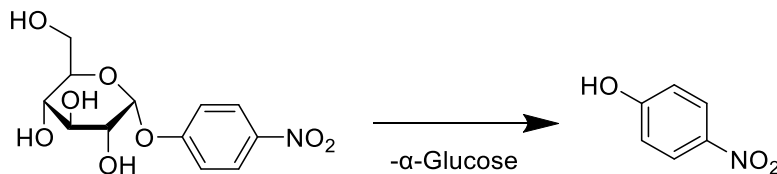


Abbildung 53. Die Abspaltung von α -Glucose von 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranosid zu *p*-Nitrophenol.

Vor Durchführung des Versuchs wurden die in **Tabelle 41** aufgeführten Lösungen und Puffer hergestellt. Für den Test wurde α -Glucosidase aus *Bacillus stearothermophilus* (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Daraus wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer eine Stammlösung von 100U/ml hergestellt und in Aliquots zu 12 μ l bei -20° C weggefroren. Diese wurden dann unmittelbar vor Beginn des Versuchs aufgetaut und mit 0,1 M Phosphatpuffer zu 0,4 U/ml verdünnt, welches dann sofort und als letztes Reagenz in die Wells gegeben wurde. Für den Phosphatpuffer wurden 3,696 g KH_2PO_4 und 3,978 g K_2HPO_4 in einen 500 ml Messkolben gegeben und dieser mit entionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Einstellung des pH-Wertes von 6,8 erfolgte mit HCl oder NaOH. In **Tabelle 41** sind die Lösungen und Puffer mit den jeweiligen Konzentrationen aufgeführt, die für den Assay hergestellt wurden.

5. Untersuchungen zur Hemmung der α -Glucosidase

Tabelle 41. Lösungen und Puffer für den α -Glucosidaseassay.

Lösung	Konzentration in Stammlösung
Acarbose	1,28 mM
α -Glucosidase	0,4 U/ml
Na ₂ CO ₃	2 M
Phosphatpuffer	0,1 M; pH 6,8
pNPG	10 mM

Die Proben wurden zur jeweiligen Konzentration in entionisiertem Wasser, Acarbose und pNPG in Phosphatpuffer gelöst. In jede Vertiefung einer 96-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) wurden 70 μ l 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 6,8), 10 μ l 0,4 U/ml α -Glucosidase und entweder 10 μ l der zu testenden Substanz in zehnfacher Endkonzentration, 10 μ l Wasser (Negativkontrolle) oder 10 μ l 1,28 mM Acarbose (Positivkontrolle) gegeben. Die Konzentration von Acarbose war die geringste bei der noch eine vollständige Hemmung des Enzyms ermittelt werden konnte und wurde deshalb als Positivkontrolle gewählt. Der Konzentrationsbereich in den Wells für die getesteten Isolate lag bei 32-1 μ M, der bei den getesteten Fraktionen bei 4-0,25 μ g/ml. Nach der Zugabe von 10 μ l 10 mM pNPG wurden die 96-Well-Platten sofort für 20 Minuten bei 60° C inkubiert. Nach der Inkubation und der Zugabe von 150 μ l 2 M Na₂CO₃-Lösung zum Stoppen der Enzymaktivität wurde die Absorption bei 405 nm in einem SpectraFLUOR PLUS® (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Proben wurden dreimal in Tetraplikaten auf ihre α -Glucosidasehemmung getestet. Ein Beispiel für die Aufteilung in einer 96-well Platte ist in **Abbildung 54** zu sehen.

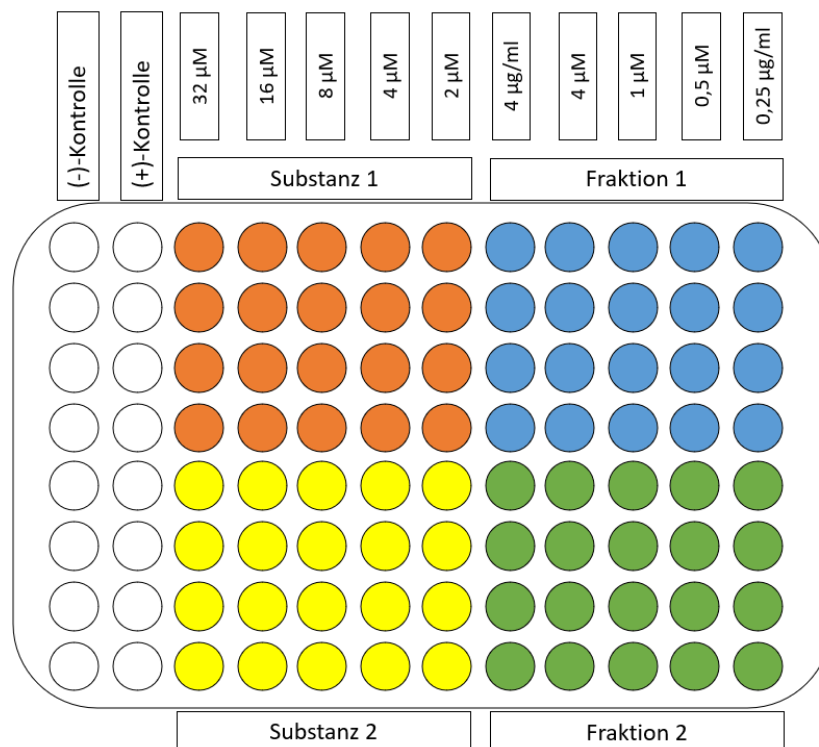


Abbildung 54. Pipettierschema für die Bestimmung der α -Glucosidasehemmung von Substanzen und Fraktionen.

5. Untersuchungen zur Hemmung der α -Glucosidase

Die α -Glucosidasehemmung berechnet sich aus **Formel 4**. Die statistische Analyse für Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus mittel t-Tests zwischen Kontrolle und Testkonzentrationen erfolgte mit Excel für Office 365® (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die Ermittlung der IC₅₀-Werte erfolgte mittels nicht-linearer Regression mit GraphPad Prism 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Formel 4. Berechnung zur α -Glucosidasehemmung.

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 \cdot \frac{A_{\text{Kontrolle}} - A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Kontrolle}}}$$

A Absorption bei 405 nm

6. Antibakterielle Untersuchungen

6.1. Hintergrund

Die Verwendung der Rinde von *B. longifolia* zur Wundheilung könnte auch mit antibakteriellen Eigenschaften des Dekoktes zusammenhängen, die dadurch eine störungsfreie Wundheilung ermöglichen. Wie in den Kapiteln 3 und 4 dargestellt konnte eine Vielzahl an Flavan-3-olen isoliert und ein generell hoher Gerbstoffgehalt in der Droge nachgewiesen werden. Diese werden mit einer antibakteriellen Wirkung in Verbindung gebracht [39], weshalb verschiedene Fraktionen und Einzelsubstanzen daraufhin untersucht werden sollten. Dazu wurden zwei verschiedene Assays durchgeführt, die im Folgenden vorgestellt werden. Es wurden der MeOH-Extrakt, PA-F und Poly-F, die isolierten Verbindungen sowie weitere Flavan-3-ole untersucht, um ein möglichst breites Spektrum für Struktur-Wirkungs Beziehungen zu ermitteln. Als Keim wurde der gram-positive *S. aureus* gewählt, da dieser natürlicherweise auf der menschlichen Haut angesiedelt ist [167].

6.2. MTT-Assay zur Bestimmung der MHK

Die Bestimmung der Mindesthemmkonzentration (MHK) sollte zuerst über einen MTT-basierten Assay bestimmt werden. Dabei wird 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden Zellen oder Bakterien zu einem dunkelblauen Formazan reduziert. Durch die Messung der Absorption bei 560 nm kann durch den Vergleich mit der Normalkontrolle (NK) der Anteil lebender Bakterien ermittelt werden. In **Abbildung 55** ist beispielhaft der Versuch mit Catechin, Epicatechin und PC B2 dargestellt.

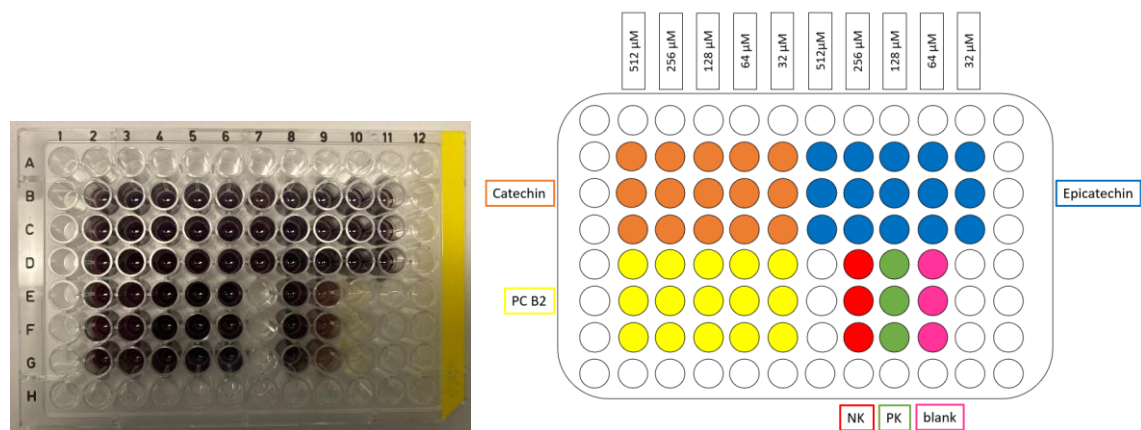


Abbildung 55. Beispiel eines MTT-Assays nach Durchführung und Pipettierschema. Im Blank befanden sich 150 µl Medium und 50 µl DMSO. In den farblosen Wells befand sich 200 µl H₂O.

In allen dunkel gefärbten Wells wurde das gesamte MTT umgesetzt. Dies bedeutet auf den ersten Blick, dass keine Hemmung des Bakterienwachstums stattgefunden hat, da alle Bakterien in den Wells noch leben und das MTT reduzieren konnten. Allerdings lag die Absorption bei diesem Versuch und auch bei den Experimenten mit anderen Substanzen in einem höheren Bereich als in der NK. Lediglich bei den Substanzen PA5 M2.5, PA5 M1.1 und PA5 M3.3 konnte in den höchsten getesteten Konzentrationen optisch eine geringere Violettfärbung, sowie eine etwas geringere Absorption

6. Antibakterielle Untersuchungen

festgestellt werden als in der NK. Dies wurde den antibakteriellen Eigenschaften dieser Substanzen zugeschrieben, konnte jedoch nicht ausgewertet werden, da die Absorption immer noch im Bereich der Negativkontrolle lag. Nachdem bei keiner der getesteten Verbindungen eine MHK bestimmt werden konnte, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem in die Wells ausschließlich 50 µl Substanz, 150 µl Medium und 20 µl MTT ohne Bakterium gegeben wurde. Bei den Substanzen handelte es sich um Epicatechin, PC B2 und PA4 M2. Dies wurde 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 56** zu sehen.

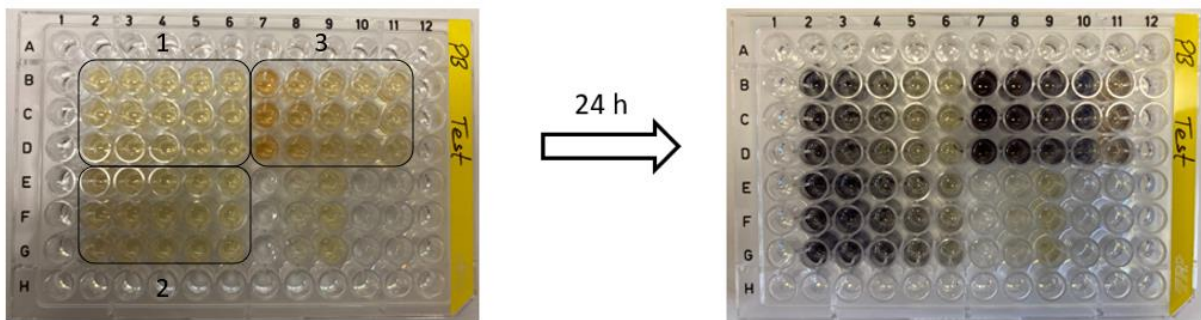


Abbildung 56. Die Substanzen sind von links nach rechts in absteigender Konzentration zugegeben (1: Epicatechin; 2: PC B2; 3: PA4 M2). Links ist die Platte direkt nach Zugabe von MTT abgebildet, rechts nach 24 h Inkubation.

Nach 24 h Inkubation war eine starke Violett-färbung bei allen Substanzen zu beobachten. Die Färbung war umso intensiver, je höher die Konzentration im Well war. Damit konnte bewiesen werden, dass die Umsetzung des MTTs nicht durch die Bakterien verursacht wird, sondern durch die Testsubstanzen selbst. Da es sich bei der Umsetzung von MTT um eine Reduktion handelt, könnte dies mit den antioxidativen Eigenschaften der Flavan-3-ole begründet werden. Ein möglicher Mechanismus ist in **Abbildung 57** dargestellt.

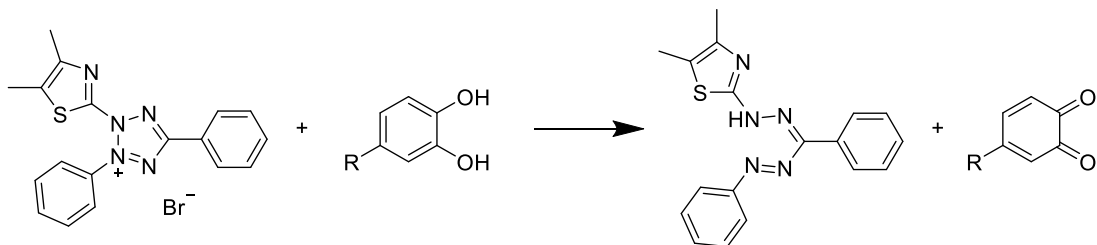


Abbildung 57. Möglicher Mechanismus der Reduktion von MTT durch phenolische Verbindungen.

Bei der Reduktion von MTT werden zwei Elektronen übertragen. Diese könnten von der Catechol-Partialstruktur, wie sie im B-Ring von Flavan-3-olen auftritt, geliefert werden. Dabei entstehen das violette Formazan und ein 1,2-Benzochinon. Somit konnte gezeigt werden, dass ein MTT-basierter Assay ungeeignet für diese phenolischen Verbindungen ist. Dies sollte bei zukünftigen Forschungsvorhaben bedacht und vorher immer kontrolliert werden. Deswegen musste eine andere Möglichkeit gefunden werden, um die antibakteriellen Eigenschaften der Substanzen zu untersuchen.

6.3. Serial microdilution broth assay mit Agarplatten

Zur Entwicklung einer neuen Methode wurde der grundsätzliche Ablauf mit den Verdünnungsreihen in den 96-well Platten beibehalten. Zur Bestimmung der MHK wurde ein Aliquot aus den Wells entnommen, auf eine unterteilte Agarplatte verstrichen und nach 24 h Inkubation visuell ausgewertet (Kapitel 6.5.5). Zuerst wurden PA5 M2.5 und PA5 M3.3 getestet, da diese im MTT-Assay eine etwas geringere Absorption als die NK zeigten und deswegen die Vermutung bestand, dass diese einen antibakteriellen Effekt aufweisen würden (Kapitel 6.2). Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden, da selbst bei höchster Testkonzentration von 512 μM noch volles Bakterienwachstum stattfand. Somit wurde auf die Testung der gerbstoffhaltigen Fraktionen fokussiert. Dabei wurden der MeOH-Extrakt, PA-F und Poly-F getestet, also Fraktionen, die einen unterschiedlichen Anteil an Gerbstoffen und dP aufweisen. Dabei sollte auch untersucht werden, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen diesen Eigenschaften und der Hemmwirkung bestehen. Durch die Untersuchung der Fraktionen konnten die Testkonzentrationen auf 5 mg/ml erhöht werden. Diese Vielstoffgemische liegen näher an der traditionellen Anwendung als Paste als die Einzelsubstanzen, mit denen auf der Haut solche Konzentrationen nicht erreicht werden könnten. In **Abbildung 58** sind die Agarplatten einer Testreihe der drei Fraktionen abgebildet.

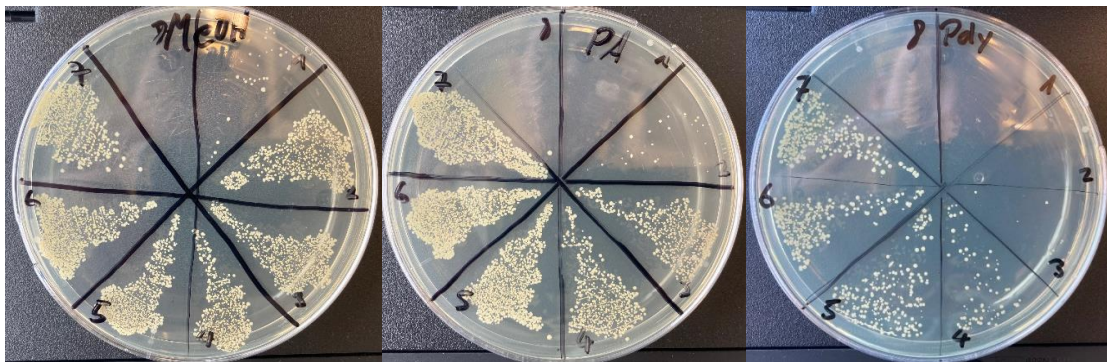


Abbildung 58. Beispiel aus dem Serial microdilution broth assay. Links der MeOH-Extrakt, mittig PA-F und rechts Poly-F. In Felder 1-6 sind die Fraktionen in absteigender Konzentration von 5-0,16 mg/ml aufgebracht. Feld 7 zeigt die NK und Feld 8 die PK mit Chloramphenicol.

Für den MeOH-Extrakt konnte nur einmal eine MHK von 2,5 mg/ml ermittelt werden was jedoch nicht signifikant war, da in den anderen beiden Versuchen dann keine Hemmung des Bakterienwachstums mehr festgestellt wurde. Für PA-F und Poly-F konnte in allen drei Versuchen eine Hemmung beobachtet werden. Für PA-F konnte eine MHK von $4,2 \pm 1,2$ mg/ml und für Poly-F eine MHK von $3,3 \pm 1,2$ mg/ml bestimmt werden. Somit konnte für diese Fraktionen gezeigt werden, dass mit steigendem Gerbstoffanteil und steigendem dP die antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* zunimmt. Für die Einzelsubstanzen konnte in den eingesetzten Konzentrationen keine Wirkung gezeigt werden. Dies steht größtenteils in Kontrast zur Literatur. Hier wiesen einzelne Flavan-3-ole oft eine antibakterielle Wirkung auf. Dies könnte zum einen damit zusammenhängen, dass die Ergebnisse stark vom durchgeführten Assay abhängen und zum anderen, dass sich Bakterien, auch wenn sie vom gleichen Stamm sind, durch Mutationen, die im Laufe des oft jahrelangen Gebrauchs entstanden sind, sich von Labor zu Labor stark voneinander unterscheiden.

6.4. Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Arbeit wurde versucht, für eine mögliche antibakterielle Aktivität, die MHK über zwei unterschiedliche Methoden zu ermitteln. Mit dem MTT-Assay, der für die Einzelsubstanzen verwendet wurde, konnte für keine Substanz eine antibakterielle Wirkung festgestellt werden. Drei Substanzen, die im MTT-Assay einen Effekt zu zeigen schienen, konnten diesen dann im serial microdilution broth assay nicht bestätigen. So liegt die Erkenntnis nach diesem Assay darin, dass dieser für phenolische Substanzen vermutlich nicht geeignet ist, da das MTT durch die antioxidativen Verbindungen selbst zum violetten Farbstoff reduziert wird. Somit sollte bei der zukünftigen Anwendung von MTT stets eine Testreihe mit den relevanten Verbindungen durchgeführt werden, um diesen Effekt auszuschließen. Im serial microdilution broth assay wurde sich dann auf die Untersuchung des MeOH-Extraktes, PA-F und Poly-F beschränkt. Hier konnten vergleichsweise hohe Konzentrationen verwendet werden, da in der traditionellen Anwendung eine Paste der Rinde auch direkt auf die betroffene Stelle appliziert wird. Deshalb spielten Überlegungen zur Resorption und Bioverfügbarkeit der Fraktionen ebenfalls keine Rolle. Dabei zeigten die mit Gerbstoffen angereicherte Fraktion PA-F und die mit polymeren PA angereicherte Poly-F einen signifikanten antibakteriellen Effekt. Somit konnte für diese Fraktionen gezeigt werden, dass mit steigendem Gerbstoffanteil und steigendem dP die antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* zunimmt.

6.5. Material und Methoden

Bei der Bestimmung der antibakteriellen Eigenschaften der isolierten Substanzen und Fraktionen kamen verschiedene Geräte, Bakterien, Verbrauchsmaterialien, Medien und Chemikalien zum Einsatz. Diese sind in **Tabelle 42** und **Tabelle 43** zusammengefasst.

6.5.1. Geräte, Gefäße und Materialien

Tabelle 42. Verwendete Geräte, Software, Gefäße und Materialien für die antibakteriellen Assays.

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	Melag Autoklav 23	Melag Medizintechnik, Berlin, Deutschland
Falcon-Tubes	15+50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Inkubator	Brutschrank IF55plus	Memmert GmbH+Co. KG, Schwabach, Deutschland
Laborschüttler	Incubating orbital shaker	VWR, Darmstadt, Deutschland
Mikrotiterplatten	96-Well Polystyren F-bottom microplate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mehrkanalpipetten Reservoir	5 ml	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Pipetten	100 Research (10-100 µl) 1000 Research (100-1000 µl) 100 Research, 12-Kanal (10-100 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl 100-1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland
Plattenlesegerät	Spectra FluorPlus Xfluor4 V 4.40 (Software)	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Sterilwerkbank	Herasafe™ KS 12	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zellkulturschalen	100 x 20 mm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

6.5.2. Chemikalien, Medien und Bakterien

Tabelle 43. Verwendete Chemikalien, Medien und Bakterien für die antibakteriellen Assays.

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
Agar	bacteriological	VWR, Darmstadt, Deutschland
Chloramphenicol	Kristallines Pulver, Fisher BioReagents	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
DMSO	Getrocknet (max. 0,05% H ₂ O)	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Epigallocatechingallat	≥95%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LB-Medium	Millers modification, H26676	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, ~98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>S. aureus</i>	ATCC 12600	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

6.5.3. Herstellung der Nährmedien

Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 10 g LB-Medium (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) in 500 ml bidestilliertem Wasser aufgelöst und 15 min bei 125 °C autoklaviert. Für den Nährboden in den Zellkulturschalen (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) wurden 10 g LB-Medium und 7,5 g Agar (VWR, Darmstadt, Deutschland) in bidestilliertem Wasser gelöst und wiederum bei 125 °C 15 min autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wurde das noch flüssige Medium in die Zellkulturschalen ausgegossen.

6.5.4. Bestimmung der Keimbildenden Einheiten/ml

Zur Bestimmung der KBE/ml wurde in drei Schritten eine 1:10⁶-Verdünnung aus der Stammsuspension mit LB-Medium hergestellt, davon 50 µl auf eine Agarplatte gegeben, mit einem Drigalskispatel gleichmäßig verstrichen und 24 h in den Inkubator (Mettler GmbH+Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei 37 °C gegeben. Am nächsten Tag konnten dann die Kolonien ausgezählt und auf die Stammsuspension und die Konzentration in den wells rückgerechnet werden.

6.5.5. Serial microdilution broth assay mit Agarplatten

Die MHK wurden mit einem „serial microdilution broth assay“ gemäß den EUCAST-Protokollen mit *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

GmbH, Braunschweig, Deutschland) ermittelt. Die Inkubation der Bakterien mit den Fraktionen erfolgte in einer 96-well Platte und die Auswertung nach Ausstreichen auf einer Agarplatte.

Am ersten Tag erfolgte eine Abnahme von 2-3 Kolonien von *S. aureus* mit einer Impföse von einer Agarplatte auf der der entsprechende Keim vorher bereits gewachsen war. Diese Kolonien wurden in 30-50 ml LB-Medium (Miller-Modifikation; Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) dispergiert. Anschließend wurde diese Stammsuspension auf einen Laborschüttler (VWR, Darmstadt, Deutschland) gestellt und 24 h bei 37 °C bei 125 Umdrehungen/min inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgte zum einen die Verdünnung der Bakteriensuspension zur Bestimmung der KBE/ml und zum anderen zur Durchführung des Assays. In die wells der Mikrotiterplatte wurde dann zuerst 50 µl Probe (in DMSO gelöst) gegeben und diese mit DMSO in den wells jeweils 1:1 verdünnt. Anschließend erfolgte noch die Zugabe von 50 µl LB-Medium sowie 100 µl 1:50-Verdünnung der Bakterienstammsuspension. In die Positivkontrolle wurde anstatt 50 µl Probe 50 µl DMSO sowie 20 µl einer Antibiotikumlösung von 3 mg/ml Chloramphenicol (in 70% wässriger EtOH) gegeben. Bei der Negativkontrolle wurde die Probe durch DMSO ersetzt. Die 96-well Platte wurde anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden dann jeweils 10 µl der unterschiedlichen Probeverdünnungen sowie Positiv- und Negativkontrolle auf eine Agarplatte pipettiert und mit der Pipettenspitze verstrichen (siehe **Abbildung 59**).

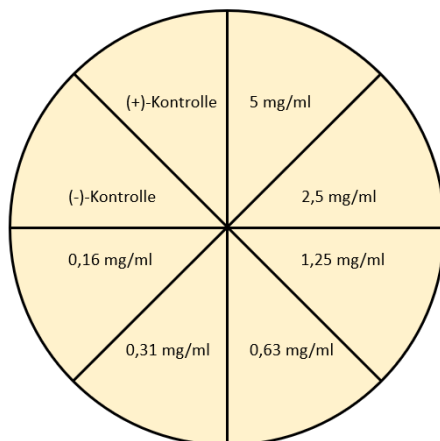


Abbildung 59. Auftragschema für die getesteten Fraktionen auf die Agarplatte.

Für die getesteten Fraktionen wurde ein Konzentrationsbereich von 5,00-0,16 mg/ml und für die Isolate wurde ein Konzentrationsbereich von 512-64 µM gewählt. Nach Aufbringen auf die Agarplatte wurde diese wiederum 24 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert und am darauffolgenden Tag final ausgewertet. Die MHK wurde als die niedrigste Konzentration der Probe definiert, die kein sichtbares Bakterienwachstum zulässt. Der Test wurde für jede Probe dreimal durchgeführt.

6.5.6. MTT-Assay zur Bestimmung der MHK

Der Versuchsablauf erfolgte bis Tag 3 identisch zum Serial microdilution broth assay mit Agarplatten und beruht auf der Methode von Winkelmann et al. [168]. Auch hier wurde mit *S. aureus* gearbeitet. Es wurde jedoch keine Probelösung entnommen und auf eine Agarplatte pipettiert, sondern die Auswertung und Ermittlung der MHK erfolgte photometrisch mittels MTT in der 96-well

6. Antibakterielle Untersuchungen

Platte. Dazu wurde an Tag 3 in die wells jeweils 20 μl 0,25% MTT (gelöst in H_2O) zugegeben. Anschließend wurden die Platten wieder bei 37 $^\circ\text{C}$ 24 h in den Inkubator gestellt. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben an einem Spectra FluorPlus Plattenlesegerät (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 560 nm vermessen. Die Isolate wurden in einem Konzentrationsbereich von 512-32 μM dreimal in Triplikaten getestet. Neben den isolierten Verbindungen aus dem MeOH-Extrakt von *B. longifolia* wurden weitere Flavan-3-ole getestet, um ein möglichst breites Spektrum dieser Substanzklasse zu untersuchen. Von Dr. Frank Peterleit und Prof. Andreas Hensel von der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Corrensstraße 48, 48149 Münster) wurden Epigallocatechin, Gallocatechin-(4 α →8)-Galocatechin (Prodelphinidin B3), Epigallocatechin-(4 β →8)-Catechin und Gallocatechin-(4 α →8)-Galocatechin-(4 α →8)-Catechin zur Verfügung gestellt. Außerdem erfolgte die Testung von Epigallocatechingallat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) sowie von Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexene-1-carboxylicacid)-ester (HCH-Catechin) und Gallocatechin, isoliert von Thomas Gruber aus der Rinde von *Salix cinerea*. Eine Übersicht über die zusätzlich getesteten Substanzen ist in **Abbildung 60** dargestellt.

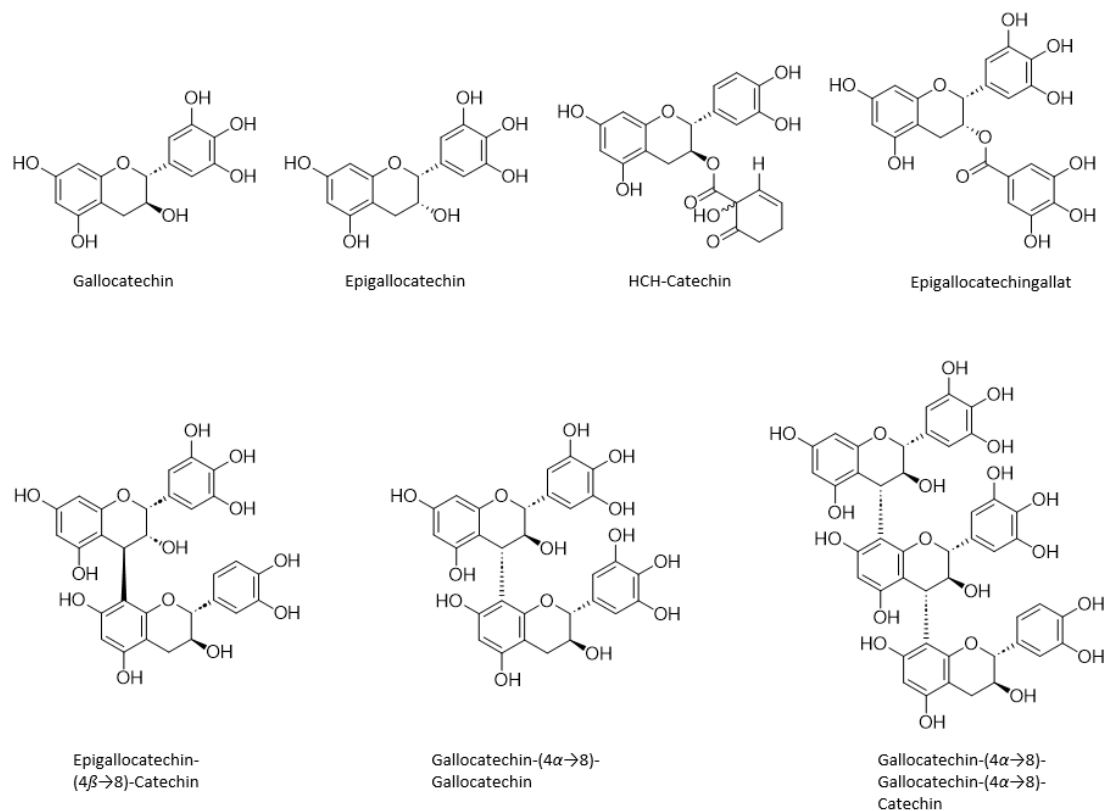


Abbildung 60. Übersicht über die im MTT-Assay zusätzlich getesteten Substanzen, die nicht aus *B. longifolia* stammen.

7. Untersuchungen zur Wundheilung

7.1. Hintergrund

Im Jahr 1993 wurde von I. Giaever und C. R. Keese zum ersten Mal eine Methode vorgestellt mit der Bewegungen und Änderungen in der Morphologie von Zellen über die Messung der Impedanz beobachtet werden konnten. Hierzu werden Zellen in Wells kultiviert, die mit kleinen Goldfilmelektroden ausgestattet sind, auf deren Oberfläche die Zellen wachsen. Kommt es nun zur Migration, Absterben oder sonstigen morphologischen Änderungen, ändert sich auch die gemessene Impedanz. Diese Methodik wird als Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) bezeichnet [169]. Dabei wird in den wells über die Elektroden ein schwacher Wechselstrom ($<1 \mu\text{A}$) angelegt, der keinen Einfluss auf die Zellen hat. Zum Simulieren der Verwundung werden dann höhere Wechselstromstärken im Milliamperebereich bei hoher Frequenz verwendet, welches zum Absterben der Zellen auf der Messelektrode und zu einem damit verbundenem signifikanten Impedanzabfall führen. Über das Messen der Impedanzänderung über die Zeit kann beobachtet werden, wie schnell sich die Wunde wieder verschließt. Erreicht die Impedanz wieder das Anfangsniveau vor der Verwundung, haben die Zellen die Wunde durch Migration wieder verschlossen [170]. Somit ist es möglich, den Einfluss von potenziell wundheilungsfördernden Substanzen zu untersuchen, welche zur Verkürzung dieser Zeitspanne im Vergleich zur Kontrolle führen würden.

7.2. ECIS-Wundheilungsassay mit NRK-52E Zellen

Die traditionelle Anwendung der Rinde von *B. longifolia* umfasst auch die äußerliche Anwendung als Paste bei Wunden [13, 26]. Deshalb wurden verschiedene Isolate auf wundheilungsfördernde Eigenschaften hin untersucht. Dabei wurde versucht die strukturelle Vielfalt der isolierten Flavan-3-ole abzudecken. So wurde (-)-Epicatechin als Monomer, PC B2 als $4\beta \rightarrow 8$ und PC B5 als $4\beta \rightarrow 6$ konfiguriertes Dimer ausgewählt sowie mit PC C1 und Cinnamtannin A2 jeweils ein Vertreter der trimeren und tetrameren PA. Diese wurden mit dem in Kapitel 7.4.3 beschriebenen Assay getestet. Als Zellen wurden normal rat kidney cells gewählt, isoliert aus den Nieren der Wanderratte, da es sich dabei um Epithelzellen handelt. In **Abbildung 61** sind die Ergebnisse dargestellt. Hierbei erfolgte die Messung der Änderung der Kapazität gegen die Zeit. Bei einer Vermessungen in diesem hohen Frequenzbereich (32000 kHz) zeigt sich die Messung der Kapazitätsänderung aufgrund der höheren Sensitivität für Veränderungen auf der Elektrodenoberfläche, als geeigneter als die Impedanz [171].

7. Untersuchungen zur Wundheilung

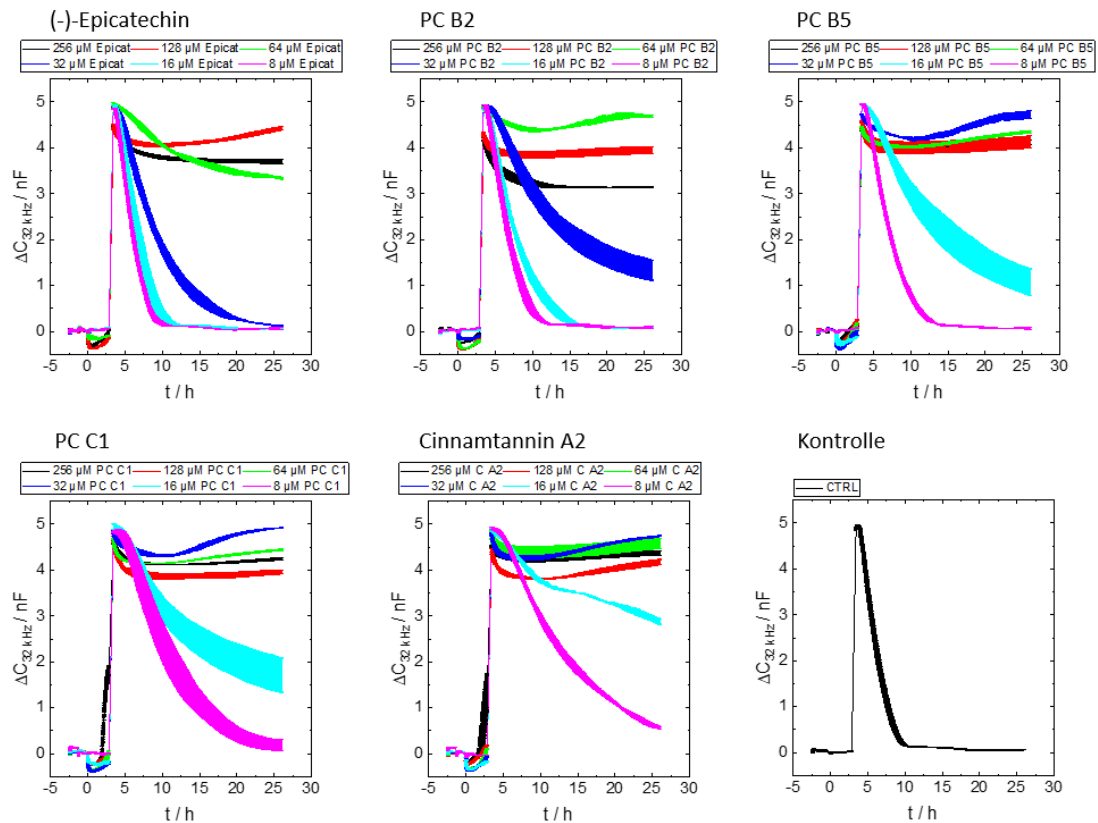


Abbildung 61. Ergebnisse des ECIS-Wundheilungsassays mit NRK-52E Zellen. Aufgetragen ist die Kapazitätsänderung ΔC in nF bei 32 kHz über die Zeit in h. Dabei stellen die unterschiedlichen Farben die unterschiedlichen Konzentrationen dar. Angegeben sind die Mittelwerte aus den Messungen von zwei Replikaten bei den Substanzen und sechs bei der Kontrolle. Die Breite der Graphen kommt durch die Standardabweichung zustande.

Die Messung beginnt mit dem Einbau des Elektrodenarrays in das Messgerät. Nach 1,5 h erfolgte dann das Umstellen auf das serumfreie Medium. Hier bleiben die Kurven stabil. Die Zugabe der Substanzen wurde dann als Zeitpunkt 0 gesetzt. Hier zeigt sich bereits bei allen fünf Substanzen eine Änderung der Kapazität, also ein Reagieren der Zellen auf die Substanzzugabe. Daraufhin wurde 2,8 h gewartet, bis die Verwundung erfolgte. Bei Cinnamtannin A2 und PC C1 ist bei der höchsten Konzentration von 256 μM bereits vor der Verwundung ein Anstieg der Kapazität zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass diese Substanzen eine cytotoxische Wirkung besitzen. Nach der Verwundung kommt es dann zum Kapazitätsanstieg bis ca. 5 nF. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle Zellen, die sich auf der Goldfilmelektrode befanden, abgetötet und die Elektrode ist frei. Der anschließende Verlauf der Kurve zurück zum Anfangswert beschreibt das Migrieren der Zellen auf die Oberfläche, welches dem Wundverschluss entspricht. Nach ca. 12 h ist der vollständige Wundverschluss in der Kontrolle, in der sich ausschließlich Medium befindet, erfolgt. Es konnte für keine Substanz eine Beschleunigung der Wundheilung beobachtet werden. Bei Epicatechin und PC B2 lässt sich jeweils in niedrigster Konzentration (8 μM) kein negativer Einfluss auf die Wundheilung feststellen. Hier liegen die Zeiträume bis zum Erreichen des Ausgangswerts etwa im Bereich der Kontrolle. Bei Epicatechin kann bis 32 μM noch ein Wundverschluss im Messzeitraum (28,5 h) beobachtet werden, bei höheren Konzentrationen findet dieser nicht mehr statt. Bei PC B2 kann nur noch bei 16 μM der Wundverschluss detektiert werden. Bei PC B5 erreicht ausschließlich die niedrigste Konzentration wieder den Anfangswert der Kapazität. Alle höheren Konzentrationen führen entweder zu einer Wundheilung nach 28,5 h oder zur vollständigen Unterdrückung dieser. Das Migrieren der Zellen zurück auf die Elektrodenoberfläche findet nicht mehr statt, die Kapazität bleibt auf hohem Niveau, was vermuten lässt, dass alle Zellen im well abgestorben sind. Beim trimeren PC C1 und dem tetrameren Cinnamtannin A2 findet auch nur bei

der niedrigsten Konzentration die Wundheilung statt, die aber auch außerhalb des beobachteten Zeitraums liegt. Für alle anderen Konzentrationen kommt es entweder zu einer noch stärker verlangsamten Wundheilung oder auch zum kompletten Absterben der Zellen. Somit konnte für keine der getesteten Falvan-3-ole eine wundheilungsfördernde Wirkung festgestellt werden. Die Substanzen führten vielmehr zu einer gestörten Wundheilung oder waren sogar toxisch für die Zellen.

7.3. Zusammenfassung und Diskussion

Wie aus Kapitel 7.2 hervorgeht konnte für keine der getesteten Substanzen eine wundheilungsfördernde Wirkung beobachtet werden. Es konnte der gegenteilige Effekt nachgewiesen werden, nämlich nicht nur eine verzögerte Wundheilung, die nur bei den niedrigsten Konzentrationen stattfindet, sondern auch die Toxizität der Substanzen bei den verwendeten Epithelzellen. Dabei lässt sich auch eine Struktur-Wirkungsbeziehung herstellen. Während Epicatechin und PC B2 in niedrigster Konzentration keinen negativen Einfluss auf die Wundheilung zeigen, lässt sich mit steigendem dP nur noch verzögerte Wundheilung oder das Absterben der Zellen beobachten. Beim trimeren PC C1 und tetrameren Cinnamtannin A2 kann ein vollständiges Migrieren der Zellen zurück auf die Elektrodenoberfläche im Messzeitraum von 28,5 h auch in der niedrigsten Konzentration nicht mehr detektiert werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die adstringierende Wirkung der Gerbstoffe sein. Diese sind in der Lage, an Oberflächenproteine auf der Zellmembran zu binden und so in höheren Konzentrationen die komplette Zelloberfläche zu bedecken, die dann eine hydrophobe Schicht ausbilden können [39]. Dies könnte dazu führen, dass die Zellen zur normalen Migration bzw. zur Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte nicht mehr in der Lage sind. Dieses könnte auch erklären, warum bei steigendem dP der Effekt immer stärker wird. Mit steigendem dP steigt auch die Anzahl der Hydroxygruppen zur Ausbildung der Protein-Polyphenol Wechselwirkungen und die Hydrophobizität der Gerbstoffe. Aufgrund des hohen Gesamtgerbstoffgehaltes der Rinde (siehe Kapitel 4.2) erscheint eine traditionelle Anwendung bei äußerlichen Verletzungen auf den ersten Blick als unplausibel. Jedoch geht aus den Literaturquellen nicht hervor, wie die Herstellung des traditionellen Arzneimittels erfolgt [13, 26]. Deswegen kann lediglich für den polaren methanolischen Extrakt keine wundheilungsfördernde Wirkung aufgrund des hohen Gerbstoffgehaltes hier *in vitro* nachgewiesen werden. Bei lipophileren Extrakten mit anderer Inhaltsstoffzusammensetzung könnten weitere Untersuchungen auch auf andere Zelllinien zu anderen Ergebnissen gelangen.

7.4. Material und Methoden

Beim ECIS-Wundheilungsassay kamen verschiedene Geräte, Gefäße, Verbrauchsmaterialien, Medien, Chemikalien und Zellen zum Einsatz. Diese sind in **Tabelle 44** und **Tabelle 45** zusammengefasst.

7.4.1. Geräte, Gefäße und Materialien

Tabelle 44. Verwendete Geräte, Software, Gefäße und Materialien für den Wundheilungsassay.

Bezeichnung	Spezifikation / Model	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	Melag Autoklav 23	Melag Medizintechnik, Berlin, Deutschland
ECIS-System	ECIS® Z-Theta	Applied Biophysics Inc., Troy, USA
Inkubator	MCO-170AICUVH-PE IncuSafe CO ₂ Inkubator	PHC Europe B.V, Etten-Leur, Niederlande
Mikrotiterplatten	96-Well Polystyren F-bottom microplate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
	96W1E+ PET	Applied Biophysics Inc., Troy, USA
Mehrkanalpipetten Reservoir	5 ml	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Pipetten	1000 Research (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	100 Research, 12-Kanal (10-100 µl)	
Pipettenspitzen	100-1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland
Plasmasterilisator	Expanded Plasma Cleaner PDC-002	Harrick Plasma, Ithaca, USA
Software	Applied BioPhysics-ECIS Software	Applied Biophysics Inc., Troy, NY, USA
	OriginPro® 2020	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Sterilwerkbank	Herasafe™ KS 12	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland

7.4.2. Kulturmedien, Chemikalien und Zellen

Tabelle 45. Verwendete Kulturmedien, Chemikalien und Zellen für den Wundheilungsassay.

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
FKS	Fetales Kälberserum Superior	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gentamicin	Gentamicin-Sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin	(S)-2,5-Diamino-5-oxopentansäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Medium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-hoher Glucoseanteil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Solution stabilized	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Zellen	Normal rat kidney (NRK)-52E, CRL-1571	American Type Culture Collection, Manassas, USA

7.4.3. ECIS-Wundheilungsassay

Der durchgeführte Assay basiert auf den Arbeiten von Keese et al. [170]. Am ersten Tag erfolgt die Aussaat der NRK-52E Zellen (CRL-1571, American Type Culture Collection, Manassas, USA) in das 96W1E+-array (Applied Biophysics Inc., Troy, USA), welches zuvor 30 s im Argon-Plasma in einem Expanded Plasma Cleaner PDC-002 sterilisiert wurde (Harrick Plasma, Ithaca, USA). Es befand sich 100 µl Zellsuspension in den wells, wobei die Zelldichte 425000 Zellen/well betrug. Die Zellen wurden in DMEM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), welches 10% FKS (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 50µg/ml Gentamicin enthält, kultiviert und in einem MCO-170AICUVH-PE IncuSafe CO₂ Inkubator (PHC Europe B.V, Etten-Leur, Niederlande) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte inkubiert. Am dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden erneut 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Experiment gestartet. Die Messung wurde mit einem ECIS® Z-Theta (Applied Biophysics Inc., Troy, USA) im „Single Frequency Time-Series Mode bei einer Frequenz von 32000 kHz durchgeführt. Dabei wurden die Impedanz Z, der Widerstand R und die Kapazität C vom Gerät aufgezeichnet. Die Zeitauflösung betrug ~0,013 h. Zuerst wurde die Baseline vermessen und nach einer Stunde das Medium auf serumfreies umgestellt, welches aus DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin (alle Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) besteht. Anschließend wurde für eine weitere Stunde die Baseline vermessen. Danach wurden 100 µl der zu testenden Substanzen zugegeben. Die Substanzen wurden dazu in einer anderen 96 well Platte in doppelter Konzentration vorgelegt. Es wurden Epicatechin, PC B2, PC B5, PC C1 und Cinnamtannin A2 in einem Endkonzentrationsbereich von 256-8 µM getestet. Das Pipettierschema ist in **Abbildung 62** wiedergegeben. Ca. 3 h danach erfolgte die Verwundung der Zellen über die Elektroden für 30 s bei 32000 kHz und 2800 µA. Die Aufzeichnung erfolgte für weitere 28 h ab der Verwundung mit dem Programm Applied BioPhysics-ECIS Software (Applied Biophysics Inc., Troy, USA). Das Experiment wurde einmal in Duplikaten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit OriginPro® 2020 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

7. Untersuchungen zur Wundheilung

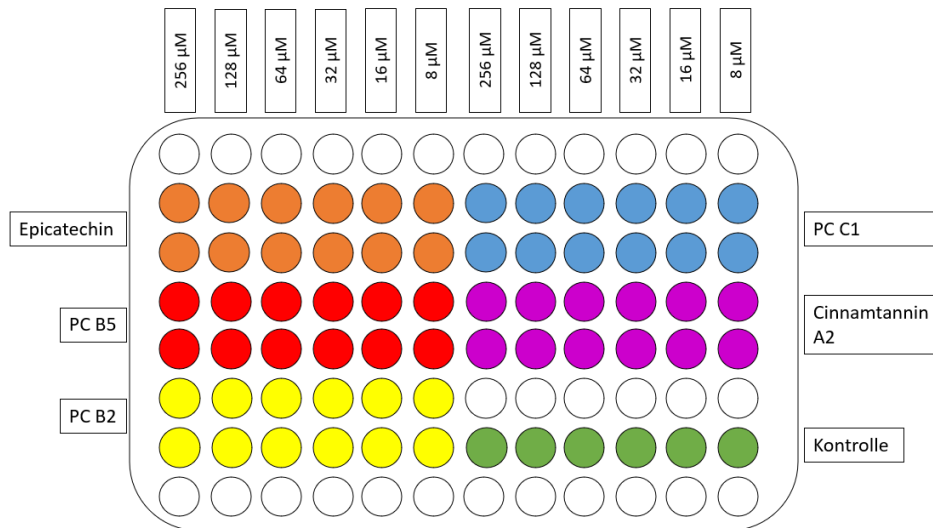


Abbildung 62. Aufteilung der Substanzen im 96W1E+-array für den ECIS-Wundheilungsassay.

8. Zusammenfassung

Bassia longifolia KOENIG ist ein ca. 20 m hoher immergrüner Baum, der in Indien, Nepal und Sri Lanka verbreitet ist. Samen, Blüten und die Rinde werden als Futter-, Lebens- und Arzneimittel genutzt. Pharmazeutisch interessant sind vor allem die Rinde und die Blüten, gegen eine Vielzahl von Indikationen. So werden die Blüten bei Husten, Erkältungen und Bronchitis angewandt. Die Rinde wird u.a. äußerlich bei Wunden angewendet und innerlich als Dekokt gegen Diabetes mellitus. Zu den traditionellen medizinischen Anwendungen sind nur wenige Studien in der Literatur zu finden. Das Inhaltsstoffspektrum ist ebenfalls kaum untersucht. So finden sich nur für die Samen seriöse Untersuchungen, die verschiedene Saponine identifizieren konnten. Für die Rinde finden sich keine Studien, in denen Inhaltsstoffe mittels spektroskopischer Methoden identifiziert werden konnten. Deshalb sollte in dieser Arbeit das Inhaltsstoffspektrum der Rinde von *B. longifolia* erfasst werden in Verbindung mit *in vitro* Untersuchungen zu den traditionellen Anwendungen zur Wundheilung und gegen Diabetes.

Zu diesem Zweck wurden durch Perkolation ein Petrolether-, ein Ethylacetat- und ein Methanol-Extrakt hergestellt. Da in einer früheren Arbeit der Ethylacetat-Extrakt gute Ergebnisse in einigen immunologischen Assays gezeigt hat, wurde begonnen, aus diesem Inhaltsstoffe zu isolieren. In dessen Aufarbeitung zeigte sich bereits ein hoher Gerbstoffanteil. Jedoch konnten aus diesem wegen zu geringen Mengen nur vier Flavan-3-ole isoliert werden. Der Gerbstoffanteil versprach in dem methanolischen Extrakt noch höher zu sein, weswegen daraufhin komplett auf den methanolischen Extrakt gewechselt wurde in der Absicht, ein umfassendes Gerbstoffprofil zu erstellen. Im Zuge des Isolierungsprozesses konnten insgesamt 16 verschiedene Flavan-3-ole isoliert werden, bestehend aus zwei Monomeren, sieben Dimeren, sechs Trimeren und einem Tetrameren. Besonders war das Vorkommen vieler Verbindungen mit Epiafzelechin-Einheiten, die nach Studium der Literatur bisher nur selten isoliert werden konnten. Die beiden Trimere Epicatechin-(4 β →8)-Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin und Epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal isoliert und deren Struktur und Stereochemie zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Zur weiteren Analyse des Gerbstoffprofils wurde eine Fraktion, angereichert mit polymeren Proanthocyanidinen, über ein ¹³C-NMR Verfahren untersucht. Dabei konnte ein mittlerer Polymerisationsgrad von 8-9 ermittelt werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass über 90% der Gerbstoffe der Polymerfraktion aus 2,3-*cis*-konfigurierten Einheiten besteht sowie das Vorkommen von polymeren PA mit monohydroxyliertem B-Ring, die vermutlich Epiafzelechin-Einheiten darstellen.

Nach Bestimmung des Gerbstoffgehaltes über eine modifizierte Variante der „Hautpulvermethode“ nach europäischem Arzneibuch und einer UPLC-Methode konnte ein sehr hoher Phenol- und Gerbstoffgehalt festgestellt werden. Dieser liegt wesentlich höher als der einiger Weidenarten und von Eichenrinde. Außerdem ist der Gesamtphenolgehalt so hoch wie der Gehalt an Gerbstoffen. Das lässt vermuten, dass andere phenolische Inhaltsstoffklassen nur in sehr geringen Mengen vorkommen, was auch bei der Isolierung festgestellt werden konnte. Nachdem verschiedene Verbindungen mit Epiafzelechin-Einheiten isoliert werden konnten, das Monomer jedoch nicht, sollte mittels LC-MS/MS überprüft werden, ob die Verbindung in Spuren dennoch zu finden ist. Zwei Fraktionen konnten daraufhin identifiziert werden, in denen bestimmte Ionen detektiert werden konnte, die typisch für Afzelechin sind. Dennoch scheint im Biosyntheseprozess der Flavan-3-ole in *B. longifolia* Epiafzelechin größtenteils direkt weiter zu den oligomeren Proanthocyanidinen weiterverarbeitet zu werden.

Der zweite große Teil der Arbeit befasste sich mit der pharmakologischen *in vitro* Untersuchung einzelner Fraktionen und der isolierten Substanzen. In einem Electric Cell-substrate Impedance Sensing

(ECIS) basierten Wundheilungsassay konnte keine beschleunigte Wundheilung beobachtet werden. Im Gegenteil konnte sogar mit einem steigenden Polymerisationsgrad der Substanzen eine verzögerte Wundheilung festgestellt werden, die vermutlich auf der Toxizität der Substanzen bei den verwendeten Epithelzellen beruht. Möglicherweise könnte die traditionelle Anwendung bei Wundheilung aber auch in antibakteriellen Effekten begründet sein, wie sie für Gerbstoffe häufig beschrieben sind. Dazu wurden zwei verschiedene Assays mit dem auf der menschlichen Haut angesiedeltem *Staphylococcus aureus* durchgeführt. Ein auf die Umsetzung von MTT basierender Assay konnte aufgrund der antioxidativen Eigenschaften der getesteten Flavan-3-ole nicht ausgewertet werden. Ein Assay, der auf Agarplatten durchgeführt wurde, zeigte antibakterielle Effekte für eine mit PA angereicherte Fraktion und eine Fraktion mit polymeren PA. Dabei war der Effekt umso stärker je höher der Polymerisationsgrad war. Somit könnte die Anwendung als Paste bei Wundheilung zumindest teilweise auf die antibakteriellen Eigenschaften der gerbstoffreichen Fraktionen zurückgeführt werden.

Ein α -Glucosidaseassay wurde durchgeführt, um die Anwendung gegen Diabetes mellitus zu untersuchen. Bei den getesteten Fraktionen zeigte sich ebenfalls eine stärkere Aktivität je höher der Gerbstoffanteil und der Polymerisationsgrad waren. Des Weiteren wurden die 16 isolierten Verbindungen getestet. Alle Substanzen wiesen eine gute Hemmung der α -Glucosidase auf, wobei aber auch eine Struktur-Wirkungsbeziehung hergestellt werden konnte: es konnte beobachtet werden, dass ein steigender dP, das Vorhandensein einer 4α -Konfiguration und einer 4 \rightarrow 6-Verknüpfung die Hemmung der α -Glucosidase begünstigen. Auch wenn der Blutzuckerspiegel durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert wird, kann hier mit der Hemmung der α -Glucosidase der traditionellen Anwendung eine erste Rechtfertigung gegeben werden.

Somit stellt diese Arbeit die erste umfassende Untersuchung zu den Inhaltsstoffen der Rinde von *B. longifolia* generell und des Gerbstoffprofils im Besonderen dar. Weiterhin konnten grundlegende pharmakologische Beiträge zur traditionellen medizinischen Anwendung zur Wundheilung und gegen Diabetes geliefert werden.

9. Summary

Bassia longifolia KOENIG is an evergreen tree, approx. 20 m tall, which is widespread in India, Nepal, and Sri Lanka. Seeds, flowers, and bark are used as fodder, food, and medicines. Of particular pharmaceutical interest are the bark and the flowers, which have a variety of indications. Flowers are used against coughs, colds, and bronchitis. The bark is used externally for wounds and internally as a decoction against diabetes mellitus. Only a few studies on traditional medicinal uses can be found in the literature. The spectrum of ingredients has also hardly been studied. Only for the seeds there are serious studies that could identify various saponins. For the bark, there are no studies in which compounds could be identified using spectroscopic methods. Therefore, the aim of this study was to investigate the spectrum of constituents of the bark of *B. longifolia* in conjunction with *in vitro* studies on its traditional applications in wound healing and diabetes.

For this purpose, a petroleum ether extract, an ethyl acetate extract, and a methanol extract were prepared by percolation. As the ethyl acetate extract had shown good results in some immunological assays in a prior study, the isolation of compounds was started with this extract. A high content of tannins was found in this extract. However, only four flavan-3-ols could be isolated from this extract due to insufficient quantities. The tannin content promised to be higher in the methanolic extract and therefore, further studies to investigate the proanthocyanidin profil were performed with it. In the course of the isolation process, a total of 16 different flavan-3-ols could be isolated, consisting of two monomers, seven dimers, six trimers, and one tetramer. Particularly noteworthy was the occurrence of many compounds with epiafzelechin units, which, according to studies in the literature, have only rarely been found so far. The two trimers epicatechin-(4 β →8)-Epiafzelechin-(4 β →8)-Epicatechin and epiafzelechin-(4 β →8)-Catechin-(4 α →8)-Epicatechin could be isolated for the first time in this work and their structure and stereochemistry could be proven definitely.

A fraction enriched with polymeric proanthocyanidins was examined via a ¹³C-NMR method to further analyze the tannin profile. An average degree of polymerization of 8-9 could be determined. *Cis*-configured flavan-3-ol units predominate with 90% and the further occurrence of monohydroxylated flavan-3-ols was found. After determining the tannin content using a modified variant of the "skin powder method" according to the European Pharmacopoeia and an UPLC method, a very high phenol and tannin content was found which is considerably higher than that of some willow species and oak bark. In addition, the total phenol content is as high as the tannin content, which suggests that other phenolic compounds are only present in very small amounts. After various compounds with epiafzelechin units could be isolated, but not the monomer, LC-MS/MS was to be used to check whether the compound could nevertheless be found in traces. Two fractions could be identified in which certain ions typical of afzelechin could be detected.

The second major part of the work dealt with the pharmacological investigation of individual fractions and isolated substances. In an Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) based wound healing assay, no accelerated wound healing could be observed. On the contrary, delayed wound healing was observed with an increasing degree of polymerization of the substances probably due to their *in vitro* cytotoxicity against the used cell line. However, it is possible, that the traditional application in wound healing could be due to antibacterial effects, as they are frequently described for tanning agents. For this purpose, two different assays were carried out with *Staphylococcus aureus*, that naturally inhabits human skin. An MTT-based assay could not be evaluated due to the antioxidant

properties of the flavan-3-ols tested. An assay performed on agar plates showed an antibacterial effect for a fraction enriched with PA and a fraction with polymeric PA. The higher the degree of polymerization, the stronger was the effect. Thus, the antibacterial properties of the tannin-rich fractions could be at least partly explain the application as a paste in wound healing.

An α -glucosidase assay was performed to investigate the use of *B. longifolia* in diabetes mellitus. As observed in the antibacterial assays, the fractions tested showed greater inhibition the higher the tannin content and degree of polymerization was. Furthermore, the 16 isolated compounds were tested. All substances showed good inhibition of α -glucosidase, but a structure-activity relationship could also be established. It was observed that an increasing dP, the presence of a 4 α -configuration, and a 4 \rightarrow 6 linkage lead to a stronger inhibition of α -glucosidase. Although blood glucose levels are regulated by a variety of mechanisms, the inhibition of α -glucosidase provides a first explanation for the traditional use of *B. longifolia*.

Thus, this work represents the first comprehensive investigation of the constituents from the bark of *B. longifolia* in general and of the tannin profile in particular. Furthermore, elementary pharmacological contributions to the traditional medicinal use in wound healing and diabetes could be provided.

10. Erklärung zur Eigenständigkeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet.

Regensburg, den 03.05.2023

Unterschrift

11. Literaturverzeichnis

- [1] Organization WH. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. Geneva: World Health Organization; 2002
- [2] Organization WH. WHO Global Report on Traditional and Complementary Medicine 2019. Geneva: World Health Organization; 2019
- [3] Mukherjee PK, Harwansh RK, Bahadur S, Banerjee S, Kar A, Chanda J, Biswas S, Ahmmed SM, Katiyar CK. Development of Ayurveda - Tradition to trend. *J Ethnopharmacol* 2017; 197: 10–24; DOI: 10.1016/j.jep.2016.09.024
- [4] Aschoff L, Diepgen P. Kurze Übersichtstabelle zur Geschichte der Medizin. Munich, s.l.: J.F. Bergmann-Verlag; 1936
- [5] Baral SR, Kurmi PP. A compendium of medicinal plants in Nepal. Kathmandu: Sharma; 2006
- [6] Gaire BP, Subedi L. Medicinal Plant Diversity and their Pharmacological Aspects of Nepal Himalayas. *Pharmacognosy Journal* 2011; 3: 6–17; DOI: 10.5530/pj.2011.25.2
- [7] Xu J, Badola R, Chettri N, Chaudhary RP, Zomer R, Pokhrel B, Hussain SA, Pradhan S, Pradhan R. Sustaining Biodiversity and Ecosystem Services in the Hindu Kush Himalaya. In: Wester P, Mishra A, Mukherji A, Shrestha AB, eds. *The Hindu Kush Himalaya Assessment: Mountains Climate Change Sustainability and People*. Cham: Springer International Publishing; 2018: 127–165
- [8] Rus Jacquet A de, Subedi R, Ghimire SK, Rochet J-C. Nepalese traditional medicine and symptoms related to Parkinson's disease and other disorders: Patterns of the usage of plant resources along the Himalayan altitudinal range. *J Ethnopharmacol* 2014; 153: 178–189; DOI: 10.1016/j.jep.2014.02.016
- [9] Winter M, Schweiger O, Klotz S, Nentwig W, Andriopoulos P, Arianoutsou M, Basnou C, Delipetrou P, Didziulis V, Hejda M, Hulme PE, Lambdon PW, Pergl J, Pysek P, Roy DB, Kühn I. Plant extinctions and introductions lead to phylogenetic and taxonomic homogenization of the European flora. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 21721–21725; DOI: 10.1073/pnas.0907088106
- [10] Ludwig G, May R, Otto C. BfN Schriften 220 - Verantwortlichkeit Deutschlands für die weltweite Erhaltung der Farn- und Blütenpflanzen – vorläufige Liste –. Vol. 220. Bundesamt für Naturschutz; 2007
- [11] Heinrich M, Jiang H, Scotti F, Booker A, Walt H, Weckerle C, Maake C. Medicinal plants from the Himalayan region for potential novel antimicrobial and anti-inflammatory skin treatments. *J Pharm Pharmacol* 2021; 73: 956–967; DOI: 10.1093/jpp/rgab039
- [12] WFO (2023): World Flora Online. Online: <http://www.worldfloraonline.org>; cited: March 1, 2023
- [13] Manandhar NP, Manandhar S. *Plants and people of Nepal*. Portland, OR: Timber Press; 2002
- [14] Wikimedia commons. Flowers of Madhuca Indica (Mahua). Online: https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Mahua_Flowers_1.jpg#/media/Datei:Mahua_Flowers_1.jpg; cited: March 2, 2023
- [15] Wikimedia commons. Online: [https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Ippe_\(Kannada-%E0%B2%87%E0%B2%AA%E0%B3%8D%E0%B2%AA%E0%B3%86\)_\(2463481357\).jpg#/media/Datei:Ippe_\(Kannada-%E0%B2%87%E0%B2%AA%E0%B3%8D%E0%B2%AA%E0%B3%86\)_\(2463481357\).jpg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Ippe_(Kannada-%E0%B2%87%E0%B2%AA%E0%B3%8D%E0%B2%AA%E0%B3%86)_(2463481357).jpg#/media/Datei:Ippe_(Kannada-%E0%B2%87%E0%B2%AA%E0%B3%8D%E0%B2%AA%E0%B3%86)_(2463481357).jpg); cited: March 2, 2022
- [16] Wikimedia commons. Seeds of Mahua or seeds of Bassia Latifolia. Online: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Seeds_of_Mahua_or_seeds_of_Bassia_Latifolia.JPG#/media/File:Seeds_of_Mahua_or_seeds_of_Bassia_Latifolia.JPG

- [17] Ramadan MF, Mohdaly AAA, Assiri AMA, Tadros M, Niemeyer B. Functional characteristics, nutritional value and industrial applications of *Madhuca longifolia* seeds: an overview. *J Food Sci Technol* 2016; 53: 2149–2157; DOI: 10.1007/s13197-015-2095-6
- [18] Singh A, Singh IS. Chemical evaluation of mahua (*Madhuca indica*) seed. *Food Chemistry* 1991; 40: 221–228; DOI: 10.1016/0308-8146(91)90106-X
- [19] Gupta A, Chaudhary R, Sharma S. Potential Applications of Mahua (*Madhuca indica*) Biomass. *Waste Biomass Valor* 2012; 3: 175–189; DOI: 10.1007/s12649-012-9107-9
- [20] Saponins in *Madhuca Longifolia* as undesirable substances in animal feed. European Food Safety Authority, February 23, 2009. Online: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/979>; cited: March 2, 2023
- [21] Amit Tomar. Folk medicinal uses of plant roots from Meerut district, Uttar Pradesh; 2009
- [22] Ramadan MF, Sharanabasappa G, Parmjyothi S, Seshagiri M, Moersel J-T. Profile and levels of fatty acids and bioactive constituents in mahua butter from fruit-seeds of buttercup tree [*Madhuca longifolia* (Koenig)]. *Eur Food Res Technol* 2006; 222: 710–718; DOI: 10.1007/s00217-005-0155-2
- [23] Awasthi YC, Bhatnagar SC, Mitra CR. Chemurgy of sapotaceous plants: *Madhuca* species of India. *Econ Bot* 1975; 29: 380–389; DOI: 10.1007/BF02862185
- [24] Madhumita Patel, S. Naik. Flowers of *Madhuca indica* J. F. Gmel.: Present status and future perspectives. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 2010
- [25] M S, RD G, KS J, S R, S P. Anti-inflammatory, anti-ulcer and hypoglycaemic activities of ethanolic and crude alkaloid extracts of *Madhuca indica* (Koenig) Gmelin seed cake. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 2007; 7: 141–149; DOI: 10.3742/OPEM.2007.7.2.141
- [26] Singh AG, Hamal JP. Traditional Phytotherapy of Some Medicinal Plants Used by Tharu and Magar Communities of Western Nepal, Against Dermatological Disorders. *Sci World* 2013; 11: 81–89; DOI: 10.3126/sw.v11i11.8558
- [27] Chakma C, Tripathi AS, Dahake AK, Chakma R. Antioxidant activity of methanolic extract of *Madhuca longifolia* bark. *Journal of Pharmacy Research* 2010; 3
- [28] Zimmermann-Klemd AM, Konradi V, Steinborn C, Ücker A, Falanga CM, Woelfle U, Huber R, Jürgenliemk G, Rajbhandari M, Gründemann C. Influence of traditionally used Nepalese plants on wound healing and immunological properties using primary human cells in vitro. *J Ethnopharmacol* 2019; 235: 415–423; DOI: 10.1016/j.jep.2019.02.034
- [29] Sharma M, Yadav S, Ganesh N, Srivastava MM, Srivastava S. Biofabrication and characterization of flavonoid-loaded Ag, Au, Au–Ag bimetallic nanoparticles using seed extract of the plant *Madhuca longifolia* for the enhancement in wound healing bio-efficacy. *Prog Biomater* 2019; 8: 51–63; DOI: 10.1007/s40204-019-0110-0
- [30] Gaikwad RD, Ahmed ML, Khalid MS, Swamy P. Anti-inflammatory activity of *Madhuca longifolia* seed saponin mixture. *Pharmaceutical Biology* 2009; 47: 592–597; DOI: 10.1080/13880200902902513
- [31] Sarkar MK, Vadivel V, Raja MRC, Kar Mahapatra S. Investigation of phytochemical constituents of anti-leukemic herbal drugs used by the traditional healers of Purulia, Birbhum and Bankura districts of West Bengal. *Nat Prod Res* 2020; 34: 3388–3393; DOI: 10.1080/14786419.2019.1566818
- [32] Gopalkrishnan B, Shimpi SN. Pharmacognostical studies on stem bark of *Madhuca longifolia* (Koen.) Macbr. var. *latifolia* (Roxb.) A. Cheval. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 2012: 232–236

- [33] I. Kitagawa, A. Inada, I. Yosioka. Saponin and Sapogenol. XII. Mi-Saponin A and Mi-Saponin B, Two Major Bidesmosides from the Seed Kernels of *Madhuca longifolia* (L.) MACBRIDE. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1975
- [34] Yoshikawa K, Tanaka M, Arihara S, Pal BC, Roy SK, Matsumura E, Katayama S. New Oleanene Triterpenoid Saponins from *Madhucalongifolia*. *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 1679–1681; DOI: 10.1021/np000351r
- [35] Sarkar MK, Mahapatra SK, Vadivel V. Oxidative stress mediated cytotoxicity in leukemia cells induced by active phyto-constituents isolated from traditional herbal drugs of West Bengal. *J Ethnopharmacol* 2020; 251: 112527; DOI: 10.1016/j.jep.2019.112527
- [36] Bolwell GP. Plant Polyphenols: Vegetable tannins revisited (1989). By E. Haslam. *Chemistry and Pharmacology of Natural Products* (J. D. Phillipson, D. C. Ayres and H. Baxter, Eds). Cambridge University Press: Cambridge, Pp. 230. *Bioessays* 1990; 12: 453; DOI: 10.1002/bies.950120912
- [37] E. Lamy, C. Pinheiro, L. Rodrigues, F. C. E. Silva, Orlando Lopes, Sofia, Tavares, Rui Gaspar. DETERMINANTS OF TANNIN-RICH FOOD AND BEVERAGE CONSUMPTION : ORAL PERCEPTION VS . PSYCHOSOCIAL ASPECTS 2015
- [38] Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53 Suppl 2: S310-29; DOI: 10.1002/mnfr.200900039
- [39] Sticher O, Heilmann J, Zündorf I, Hänsel R. Hänsel/Sticher, *Pharmakognosie Phytopharmazie*. 10th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2015
- [40] Wichtl - *Teedrogen und Phytopharmaka: Ein Handbuch für die Praxis*. 6th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2016
- [41] Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Br J Pharmacol* 2017; 174: 1244–1262; DOI: 10.1111/bph.13630
- [42] Kurokawa M, Hozumi T, Basnet P, Nakano M, Kadota S, Namba T, Kawana T, Shiraki K. Purification and characterization of eugenin as an anti-herpesvirus compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 728–735
- [43] Hagerman AE, Zhao Y, Johnson S. Methods for Determination of Condensed and Hydrolyzable Tannins. In: Shahidi F, ed. *Antinutrients and phytomedicines in food: Developed from a symposium sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry [at the 210th National Meeting of the American Chemical Society, Chicago, Illinois, August 20 - 25, 1995. Vol. 662. ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society; 1997: 209–222*
- [44] Booth AN, Masri MS, Robbins DJ, Emerson OH, Jones FT, DeEds F. The Metabolic Fate of Gallic Acid and Related Compounds. *Journal of Biological Chemistry* 1959; 234: 3014–3016; DOI: 10.1016/S0021-9258(18)69715-7
- [45] Doyle B, Griffiths LA. The metabolism of ellagic acid in the rat. *Xenobiotica* 1980; 10: 247–256; DOI: 10.3109/00498258009033752
- [46] Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Hydrolyzable tannins and related polyphenols. *Fortschr Chem Org Naturst* 1995; 66: 1–117; DOI: 10.1007/978-3-7091-9363-1_1
- [47] Nuñez-Sánchez MA, García-Villalba R, Monedero-Saiz T, García-Talavera NV, Gómez-Sánchez MB, Sánchez-Álvarez C, García-Albert AM, Rodríguez-Gil FJ, Ruiz-Marín M, Pastor-Quirante FA, Martínez-Díaz F, Yáñez-Gascón MJ, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58: 1199–1211; DOI: 10.1002/mnfr.201300931

- [48] Jesus NZT de, Falcão HdS, Gomes IF, Leite Tjda, Lima GRdM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Da Silva MS, Athayde-Filho PF de, Batista LM. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 2012; 13: 3203–3228; DOI: 10.3390/ijms13033203
- [49] Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 905215; DOI: 10.1155/2015/905215
- [50] Nile SH, Park SW. Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* 2014; 30: 134–144; DOI: 10.1016/j.nut.2013.04.007
- [51] Sieniawska E. Activities of Tannins--From In Vitro Studies to Clinical Trials. *Nat Prod Commun* 2015; 10: 1877–1884
- [52] Xie D-Y, Dixon RA. Proanthocyanidin biosynthesis--still more questions than answers? *Phytochemistry* 2005; 66: 2127–2144; DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.01.008
- [53] Velderrain-Rodríguez GR, Palafox-Carlos H, Wall-Medrano A, Ayala-Zavala JF, Chen C-YO, Robles-Sánchez M, Astiazaran-García H, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food Funct* 2014; 5: 189–197; DOI: 10.1039/c3fo60361j
- [54] Ellam S, Williamson G. Cocoa and human health. *Annu Rev Nutr* 2013; 33: 105–128; DOI: 10.1146/annurev-nutr-071811-150642
- [55] Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 7292–7295; DOI: 10.1021/jf0344385
- [56] Ou K, Gu L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. *Journal of Functional Foods* 2014; 7: 43–53; DOI: 10.1016/j.jff.2013.08.004
- [57] Li S, Sui Y, Xiao J, Wu Q, Hu B, Xie B, Sun Z. Absorption and urinary excretion of A-type procyanidin oligomers from *Litchi chinensis* pericarp in rats by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* 2013; 138: 1536–1542; DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.09.120
- [58] Bittner K, Kemme T, Peters K, Kersten S, Dänicke S, Humpf H-U. Systemic absorption and metabolism of dietary procyanidin B4 in pigs. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58: 2261–2273; DOI: 10.1002/mnfr.201400435
- [59] Zhang L, Wang Y, Li D, Ho C-T, Li J, Wan X. The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. *Food Funct* 2016; 7: 1273–1281; DOI: 10.1039/c5fo01244a
- [60] Déprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapierre C, Scalbert A. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr* 2000; 130: 2733–2738; DOI: 10.1093/jn/130.11.2733
- [61] Untergehrer M. Analytische Untersuchungen zu phenolischen Inhaltsstoffen aus *Salicis cortex* unter besonderer Berücksichtigung ihrer Metabolisierung [Dissertation]. Regensburg: Universität Regensburg; 2015
- [62] Grimm T, Skrabala R, Chovanová Z, Muchová J, Sumegová K, Liptáková A, Duracková Z, Högger P. Single and multiple dose pharmacokinetics of maritime pine bark extract (pycnogenol) after oral administration to healthy volunteers. *BMC Clin Pharmacol* 2006; 6: 4; DOI: 10.1186/1472-6904-6-4
- [63] Monjotín N, Amiot MJ, Fleurentin J, Morel JM, Raynal S. Clinical Evidence of the Benefits of Phytonutrients in Human Healthcare. *Nutrients* 2022; 14; DOI: 10.3390/nu14091712
- [64] Salvadó MJ, Casanova E, Fernández-Iglesias A, Arola L, Bladé C. Roles of proanthocyanidin rich extracts in obesity. *Food Funct* 2015; 6: 1053–1071; DOI: 10.1039/c4fo01035c

- [65] Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI. Interactions of flavan-3-ols and procyanidins with membranes: mechanisms and the physiological relevance. *Food Funct* 2015; 6: 32–41; DOI: 10.1039/c4fo00647j
- [66] McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Am J Clin Nutr* 2012; 95: 454–464; DOI: 10.3945/ajcn.111.016634
- [67] Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong C-P, Nettleton JA, Jacobs DR. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 895–909; DOI: 10.1093/ajcn/85.3.895
- [68] Wang X, Ouyang YY, Liu J, Zhao G. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *British Journal of Nutrition* 2014; 111: 1–11; DOI: 10.1017/S000711451300278X
- [69] Hort MA, Straliootto MR, Duz MS, Netto PM, Souza CB, Schulz T, Horst H, Pizzolatti MG, Bem AF de, Ribeiro-do-Valle RM. Cardioprotective effects of a proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill: focus on atherosclerosis. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 3769–3775; DOI: 10.1016/j.fct.2012.07.050
- [70] Pons Z, Margalef M, Bravo FI, Arola-Arnal A, Muguerza B. Grape seed flavanols decrease blood pressure via Sirt-1 and confer a vasoprotective pattern in rats. *Journal of Functional Foods* 2016; 24: 164–172; DOI: 10.1016/j.jff.2016.03.030
- [71] Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *British Journal of Nutrition* 2015; 113 Suppl 2: S102-10; DOI: 10.1017/S0007114515000148
- [72] Nandakumar V, Singh T, Katiyar SK. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett* 2008; 269: 378–387; DOI: 10.1016/j.canlet.2008.03.049
- [73] Terauchi M, Horiguchi N, Kajiyama A, Akiyoshi M, Owa Y, Kato K, Kubota T. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on menopausal symptoms, body composition, and cardiovascular parameters in middle-aged women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Menopause* 2014; 21: 990–996; DOI: 10.1097/GME.0000000000000200
- [74] Moreira ELG, Rial D, Duarte FS, Carvalho CR de, Horst H, Pizzolatti MG, Prediger RDS, Ribeiro-do-Valle RM. Central nervous system activity of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* in rats. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62: 1061–1068; DOI: 10.1111/j.2042-7158.2010.01124.x
- [75] Mangel AW, Chaturvedi P. Evaluation of crofelemer in the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients. *Digestion* 2008; 78: 180–186; DOI: 10.1159/000185719
- [76] Hänsel R, Sticher O, Steinegger E, eds. *Pharmakognosie — Phytopharmazie*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1999
- [77] *Physiologie des Menschen: Mit 100 Tabellen*. Springer-Lehrbuch. 26th ed. Berlin [u.a.]: Springer; 1995
- [78] Thews G, Mutschler E, Vaupel P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen: 135 Tabellen*. 5th ed. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 1999
- [79] Joost H-G, Nauck M. Diabetes mellitus. In: Lemmer B, Brune K, eds. *Pharmakotherapie*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010: 371–379
- [80] Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin. NVL Typ-2-Diabetes – Teilpublikation der Langfassung, 2. Auflage. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2021

- [81] Jiang S, Ghosh J. Alpha glucosidase. RCSB PDB 2019; DOI: 10.2210/rcsb_pdb/GH/DM/drugs/gi/glucosidase
- [82] Jones K, Sim L, Mohan S, Kumarasamy J, Liu H, Avery S, Naim HY, Quezada-Calvillo R, Nichols BL, Pinto BM, Rose DR. Mapping the intestinal alpha-glucogenic enzyme specificities of starch digesting maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase. *Bioorg Med Chem* 2011; 19: 3929–3934; DOI: 10.1016/j.bmc.2011.05.033
- [83] Heads of Medicines Agency. MRI Product Index. Online: <https://mri.cts-mrp.eu/portal/home>
- [84] Rivera-Chávez J, González-Andrade M, Del González MC, Glenn AE, Mata R. Thielavins A, J and K: α -Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 2013; 94: 198–205; DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.05.021
- [85] Nurlybekova A, Kudaibergen A, Kazymbetova A, Amangeldi M, Baiseitova A, Ospanov M, Aisa HA, Ye Y, Ibrahim MA, Jenis J. Traditional Use, Phytochemical Profiles and Pharmacological Properties of *Artemisia* Genus from Central Asia. *Molecules* 2022; 27; DOI: 10.3390/molecules27165128
- [86] Combs AP. Recent advances in the discovery of competitive protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for the treatment of diabetes, obesity, and cancer. *J Med Chem* 2010; 53: 2333–2344; DOI: 10.1021/jm901090b
- [87] Goli AS, Sato VH, Sato H, Chewchinda S, Leanpolchareanchai J, Nontakham J, Yahuafai J, Thilavech T, Meesawatsom P, Maitree M. Antihyperglycemic effects of *Lysiphyllum strychnifolium* leaf extract in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Biology* 2023; 61: 189–200; DOI: 10.1080/13880209.2022.2160771
- [88] Banini AE, Boyd LC, Allen JC, Allen HG, Sauls DL. Muscadine grape products intake, diet and blood constituents of non-diabetic and type 2 diabetic subjects. *Nutrition* 2006; 22: 1137–1145; DOI: 10.1016/j.nut.2006.08.012
- [89] Adisakwattana S, Lerdsuwankij O, Poputtachai U, Minipun A, Suparpprom C. Inhibitory activity of cinnamon bark species and their combination effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *Plant Foods Hum Nutr* 2011; 66: 143–148; DOI: 10.1007/s11130-011-0226-4
- [90] Kuczmánová A, Balažová A, Račanská E, Kameníková M, Fialová S, Majerník J, Nagy M, Gál P, Mučaji P. *Agrimonia eupatoria* L. and *Cynara cardunculus* L. Water Infusions: Comparison of Anti-Diabetic Activities. *Molecules* 2016; 21; DOI: 10.3390/molecules21050564
- [91] Liu X, Zhou H-J, Rohdewald P. French maritime pine bark extract Pycnogenol dose-dependently lowers glucose in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004; 27: 839; DOI: 10.2337/diacare.27.3.839
- [92] Ximing Liu, Ha-Jun Zhou, P. Rohdewald. French maritime pine bark extract Pycnogenol dose-dependently lowers glucose in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004
- [93] Gonzalez-Abuin N, Pinent M, Casanova-Martí A, Arola L, Blay M, Ardevol A. Procyranidins and their healthy protective effects against type 2 diabetes. *Curr Med Chem* 2015; 22: 39–50; DOI: 10.2174/0929867321666140916115519
- [94] Dai T, Chen J, McClements DJ, Li T, Liu C. Investigation the interaction between procyranidin dimer and α -glucosidase: Spectroscopic analyses and molecular docking simulation. *Int J Biol Macromol* 2019; 130: 315–322; DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.105
- [95] Li Q, Chen J, Li T, Liu C, Zhai Y, McClements DJ, Liu J. Separation and characterization of polyphenolics from underutilized byproducts of fruit production (*Choerospondias axillaris* peels): inhibitory activity of proanthocyanidins against glycolysis enzymes. *Food Funct* 2015; 6: 3693–3701; DOI: 10.1039/c5fo00939a

- [96] Ho GTT, Kase ET, Wangenstein H, Barsett H. Phenolic Elderberry Extracts, Anthocyanins, Procyanidins, and Metabolites Influence Glucose and Fatty Acid Uptake in Human Skeletal Muscle Cells. *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65: 2677–2685; DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05582
- [97] Xiao J, Kai G, Yamamoto K, Chen X. Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2013; 53: 818–836; DOI: 10.1080/10408398.2011.561379
- [98] Lee YA, Cho EJ, Tanaka T, Yokozawa T. Inhibitory activities of proanthocyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzymes related to diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2007; 53: 287–292; DOI: 10.3177/jnsv.53.287
- [99] Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, Leaper D, Georgopoulos NT. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J* 2017; 14: 89–96; DOI: 10.1111/iwj.12557
- [100] Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018
- [101] Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg* 1998; 176: 26S-38S; DOI: 10.1016/s0002-9610(98)00183-4
- [102] Gonzalez ACdO, Costa TF, Andrade ZdA, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol* 2016; 91: 614–620; DOI: 10.1590/abd1806-4841.20164741
- [103] Ning S, Zang J, Zhang B, Feng X, Qiu F. Botanical Drugs in Traditional Chinese Medicine With Wound Healing Properties. *Front Pharmacol* 2022; 13; DOI: 10.3389/fphar.2022.885484
- [104] Jarić S, Kostić O, Mataruga Z, Pavlović D, Pavlović M, Mitrović M, Pavlović P. Traditional wound-healing plants used in the Balkan region (Southeast Europe). *J Ethnopharmacol* 2018; 211: 311–328; DOI: 10.1016/j.jep.2017.09.018
- [105] Antonio Pereira I, Judah Cury B, Kaio Silva Nunes R, Da Mota Silva L. Traditional Plants Used in Southern Brazil as a Source to Wound Healing Therapies. *Chem Biodivers* 2023; 20: e202201021; DOI: 10.1002/cbdv.202201021
- [106] Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Isaac O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med* 1994; 60: 516–520; DOI: 10.1055/s-2006-959562
- [107] Klouček-Popova E, Popov A, Pavlova N, Krůsteva S. Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 1982; 8: 63–67
- [108] Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavec M, Della Loggia R, Tubaro A, Bertoldi M, Franz C. Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J Ethnopharmacol* 1997; 57: 139–144; DOI: 10.1016/S0378-8741(97)00061-5
- [109] Buzzi M, Freitas F de, Barros Winter M de. Therapeutic effectiveness of a *Calendula officinalis* extract in venous leg ulcer healing. *J Wound Care* 2016; 25: 732–739; DOI: 10.12968/jowc.2016.25.12.732
- [110] Dorjsembe B, Lee HJ, Kim M, Dulamjav B, Jigjid T, Nho CW. *Achillea asiatica* extract and its active compounds induce cutaneous wound healing. *J Ethnopharmacol* 2017; 206: 306–314; DOI: 10.1016/j.jep.2017.06.006
- [111] Sharifi R, Rastegar H, Kamalinejad M, Dehpour AR, Tavangar SM, Paknejad M, Mehrabani Natanzi M, Ghannadian N, Akbari M, Pasalar P. Effect of topical application of silymarin (*Silybum marianum*) on excision wound healing in albino rats. *Acta Med Iran* 2012; 50: 583–588

- [112] Sharifi R, Pasalar P, Kamalinejad M, Dehpour AR, Tavangar SM, Paknejad M, Mehrabani Natanzi M, Nourbakhsh M, Ahmadi Ashtiani HR, Akbari M, Rastegar H. The effect of silymarin (*Silybum marianum*) on human skin fibroblasts in an in vitro wound healing model. *Pharmaceutical Biology* 2013; 51: 298–303; DOI: 10.3109/13880209.2012.721789
- [113] Tabandeh MR, Oryan A, Mohammad-Alipour A, Tabatabaei-Naieni A. Silibinin regulates matrix metalloproteinase 3 (stromelysin1) gene expression, hexoseamines and collagen production during rat skin wound healing. *Phytother. Res.* 2013; 27: 1149–1153; DOI: 10.1002/ptr.4839
- [114] Samanta R, Pattnaik AK, Pradhan KK, Mehta BK, Pattanayak SP, Banerjee S. Wound Healing Activity of Silibinin in Mice. *Pharmacognosy Res* 2016; 8: 298–302; DOI: 10.4103/0974-8490.188880
- [115] Romero-Cerecero O, Zamilpa-Álvarez A, Jiménez-Ferrer E, Tortoriello J. Exploratory study on the effectiveness of a standardized extract from *Ageratina pichinchensis* in patients with chronic venous leg ulcers. *Planta Med* 2012; 78: 304–310; DOI: 10.1055/s-0031-1280448
- [116] Romero-Cerecero O, Zamilpa A, González-Cortazar M, Alonso-Cortés D, Jiménez-Ferrer E, Nicasio-Torres P, Aguilar-Santamaría L, Tortoriello J. Pharmacological and chemical study to identify wound-healing active compounds in *Ageratina pichinchensis*. *Planta Med* 2013; 79: 622–627; DOI: 10.1055/s-0032-1328462
- [117] Karthik N, Ward MC, Juloori A, Scott J, Mesko N, Shah C. Factors Associated With Acute and Chronic Wound Complications in Patients With Soft Tissue Sarcoma With Long-term Follow-up. *Am J Clin Oncol* 2018; 41: 1019–1023; DOI: 10.1097/COC.0000000000000421
- [118] Jin S, Eerdunbayaer, Doi A, Kuroda T, Zhang G, Hatano T, Chen G. Polyphenolic constituents of *Cynomorium songaricum* Rupr. and antibacterial effect of polymeric proanthocyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 7297–7305; DOI: 10.1021/jf301621e
- [119] Bruyne T de, Pieters L, Witvrouw M, Clercq E de, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols. *J. Nat. Prod.* 1999; 62: 954–958; DOI: 10.1021/np980481o
- [120] Wang C-M, Hsu Y-M, Jhan Y-L, Tsai S-J, Lin S-X, Su C-H, Chou C-H. Structure Elucidation of Procyanidins Isolated from *Rhododendron formosanum* and Their Anti-Oxidative and Anti-Bacterial Activities. *Molecules* 2015; 20: 12787–12803; DOI: 10.3390/molecules200712787
- [121] Karioti A, Sokovic M, Ciric A, Koukoulitsa C, Bilia AR, Skaltsa H. Antimicrobial properties of *Quercus ilex* L. proanthocyanidin dimers and simple phenolics: evaluation of their synergistic activity with conventional antimicrobials and prediction of their pharmacokinetic profile. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 6412–6422; DOI: 10.1021/jf2011535
- [122] Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry* 2000; 54: 173–181; DOI: 10.1016/s0031-9422(99)00573-7
- [123] Jepson RG, Williams G, Craig JC. Cranberries for preventing urinary tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 10: CD001321; DOI: 10.1002/14651858.CD001321.pub5
- [124] Blumberg JB, Camesano TA, Cassidy A, Kris-Etherton P, Howell A, Manach C, Ostertag LM, Sies H, Skulas-Ray A, Vita JA. Cranberries and their bioactive constituents in human health. *Adv Nutr* 2013; 4: 618–632; DOI: 10.3945/an.113.004473
- [125] Shmueli H, Burger O, Neeman I, Yahav J, Samra Z, Niv Y, Sharon N, Weiss E, Athamna A, Tabak M, Ofek I. Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 231–235; DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.08.011

- [126] Steinberg D, Feldman M, Ofek I, Weiss EI. Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 86–89; DOI: 10.1093/jac/dkh254
- [127] Ibrahim TA, El Dib RA, Al-Youssef HM, Amina M. Chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of *Antidesm abunius* L. *Pak J Pharm Sci* 2019; 32: 153–163; DOI: Study
- [128] Huang L, Yang K-P, Zhao Q, Li H-J, Wang J-Y, Wu Y-C. Corrosion resistance and antibacterial activity of procyanidin B2 as a novel environment-friendly inhibitor for Q235 steel in 1 M HCl solution. *Bioelectrochemistry* 2022; 143: 107969; DOI: 10.1016/j.bioelechem.2021.107969
- [129] M.H. Abd El-Razek. NMR assignments of four catechin epimers. *Asian Journal of Chemistry* 2007; 19: 4867–4872
- [130] Davis AL, Cai Y, Davies AP, Lewis JR. ¹H and ¹³C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magn. Reson. Chem.* 1996; 34: 887–890; DOI: 10.1002/(SICI)1097-458X(199611)34:11<887::AID-OMR995>3.0.CO;2-U
- [131] Lin Y-P, Chen T-Y, Tseng H-W, Lee M-H, Chen S-T. Neural cell protective compounds isolated from *Phoenix hanceana* var. *formosana*. *Phytochemistry* 2009; 70: 1173–1181; DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.06.006
- [132] Galotta ALQA, Boaventura MAD, Lima LARS. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açai' (*Euterpe precatoria* Mart.). *Quím. Nova* 2008; 31: 1427–1430; DOI: 10.1590/S0100-40422008000600028
- [133] Shoji T, Mutsuga M, Nakamura T, Kanda T, Akiyama H, Goda Y. Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 3806–3813; DOI: 10.1021/jf0300184
- [134] Mohri Y, Sagehashi M, Yamada T, Hattori Y, Morimura K, Kamo T, Hirota M, Makabe H. An efficient synthesis of procyanidins. Rare earth metal Lewis acid catalyzed equimolar condensation of catechin and epicatechin. *Tetrahedron Letters* 2007; 48: 5891–5894; DOI: 10.1016/j.tetlet.2007.06.047
- [135] Barrett MW, Klyne W, Scopes PM, Fletcher AC, Porter LJ, Haslam E. Plant proanthocyanidins. Part 6. Chiroptical studies. Part 95. Circular dichroism of procyanidins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1979: 2375; DOI: 10.1039/p19790002375
- [136] Botha JJ, Young DA, Ferreira D, Roux DG. Synthesis of condensed tannins. Part 1. Stereoselective and stereospecific syntheses of optically pure 4-arylflavan-3-ols, and assessment of their absolute stereochemistry at C-4 by means of circular dichroism. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1981: 1213; DOI: 10.1039/p19810001213
- [137] Hayes CJ, Whittaker BP, Watson SA, Grabowska AM. Synthesis and preliminary anticancer activity studies of C4 and C8-modified derivatives of catechin gallate (CG) and epicatechin gallate (ECG). *J Org Chem* 2006; 71: 9701–9712; DOI: 10.1021/jo061740e
- [138] Makabe H, Kamo T, Hirota M, Mohri Y, Sagehashi M, Yamada T, Hattori Y, Morimura K. An Efficient Synthesis of Procyanidins Using Equimolar Condensation of Catechin and/or Epicatechin Catalyzed by Ytterbium Triflate. *HETEROCYCLES* 2009; 79: 549; DOI: 10.3987/COM-08-S(D)14
- [139] Wiesneth S, Petereit F, Jürgenliemk G. *Salix daphnoides*: A Screening for Oligomeric and Polymeric Proanthocyanidins. *Molecules* 2015; 20: 13764–13779; DOI: 10.3390/molecules200813764
- [140] Dennis EG, Jeffery DW, Johnston MR, Perkins MV, Smith PA. Procyanidin oligomers. A new method for 4→8 interflavan bond formation using C8-boronic acids and iterative oligomer synthesis through a boron-protection strategy. *Tetrahedron* 2012; 68: 340–348; DOI: 10.1016/j.tet.2011.10.039

- [141] Nakajima N, Saito A, Tanaka A, Ubukata M. Synthetic Studies of Proanthocyanidins. Part 4. The Synthesis of Procyanidin B1 and B4: TMSOTf-catalyzed Cyclization of Catechin and Epicatechin Condensation. *HETEROCYCLES* 2003; 61: 287; DOI: 10.3987/COM-03-S37
- [142] Kolodziej H. Synthesis and characterization of procyanidin dimers as their peracetates and octamethyl ether diacetates. *Phytochemistry* 1986; 25: 1209–1215; DOI: 10.1016/S0031-9422(00)81582-4
- [143] Wiesneth S. Phytochemische Untersuchung des phenolischen Inhaltsstoffspektrums in *Salix* Spezies unter besonderer Berücksichtigung der Flavan-3-ole [Dissertation]. Regensburg: Universität Regensburg; 2017
- [144] Esatbeyoglu T, Wray V, Winterhalter P. Dimeric procyanidins: screening for B1 to B8 and semisynthetic preparation of B3, B4, B6, And B8 from a polymeric procyanidin fraction of white willow bark (*Salix alba*). *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 7820–7830; DOI: 10.1021/jf101023e
- [145] Bruyne T de, Pieters L, Dommissie R, Kolodziej H, Wray V, Vanden Berghe D, Vlietinck A. NMR characterization and biological evaluation of proanthocyanidins: a systematic approach. *Basic Life Sci* 1999; 66: 193–209; DOI: 10.1007/978-1-4615-4139-4_10
- [146] Balas L, Vercauteren J. Extensive high-resolution reverse 2D NMR analysis for the structural elucidation of procyanidin oligomers. *Magn. Reson. Chem.* 1994; 32: 386–393; DOI: 10.1002/mrc.1260320703
- [147] Shoji T, Mutsuga M, Nakamura T, Kanda T, Akiyama H, Goda Y. [Duplikat] Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 3806–3813; DOI: 10.1021/jf0300184
- [148] Bicker J, Petereit F, Hensel A. [Duplikat] Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa* L. *Fitoterapia* 2009; 80: 483–495; DOI: 10.1016/j.fitote.2009.08.015
- [149] Alejo-Armijo A, Tello-Abolafia A, Salido S, Altarejos J. Phenolic compounds in Laurel Wood: A new source of proanthocyanidins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 2019; 39: 436–453; DOI: 10.1080/02773813.2019.1636825
- [150] Saito A, Doi Y, Tanaka A, Matsuura N, Ubukata M, Nakajima N. Systematic synthesis of four epicatechin series procyanidin trimers and their inhibitory activity on the Maillard reaction and antioxidant activity. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 4783–4790; DOI: 10.1016/j.bmc.2004.07.024
- [151] Lokvam J, Kursar TA. Divergence in structure and activity of phenolic defenses in young leaves of two co-occurring *Inga* species. *J Chem Ecol* 2005; 31: 2563–2580; DOI: 10.1007/s10886-005-7614-x
- [152] Kolodziej H. Oligomeric flavan-3-ols from medicinal willow bark. *Phytochemistry* 1990; 29: 955–960; DOI: 10.1016/0031-9422(90)80054-K
- [153] Ichikawa M, Takanashi K, Suda M, Hattori Y, Kawahara S, Fujii H, Makabe H. Concise Synthesis of Cinnamtannin A2 from Dimeric Epicatechin Electrophile and Nucleophile Prepared by Zn(OTf)₂-Mediated Self-Condensation. *Synthesis* 2016; 48: 1525–1532; DOI: 10.1055/s-0035-1561390
- [154] Czochanska Z, Foo LY, Newman RH, Porter LJ. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1980: 2278; DOI: 10.1039/p19800002278
- [155] Newman RH, Porter LJ, Foo LY, Johns SR, Willing RI. High-resolution¹³C NMR studies of proanthocyanidin polymers (condensed tannins). *Magn. Reson. Chem.* 1987; 25: 118–124; DOI: 10.1002/MRC.1260250207
- [156] Jürgenliemk G, Petereit F, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and procyanidins from the bark of *Salix purpurea* L. *Pharmazie* 2007; 62: 231–234

- [157] *Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte*, ed. *Europäisches Arzneibuch 10.0: 2.8.14 Gerbstoffe in pflanzlichen Drogen*. Vol. 10. Stuttgart, Germany: Deutscher Apotheker Verlag; 2020
- [158] Wiesneth S, Jürgenliemk G. Total phenolic and tannins determination: a modification of Ph. Eur. 2.8.14 for higher throughput. *Pharmazie* 2017; 72: 195–196; DOI: 10.1691/ph.2017.6911
- [159] Wiesneth S, Aas G, Heilmann J, Jürgenliemk G. Investigation of the flavan-3-ol patterns in willow species during one growing-season. *Phytochemistry* 2018; 145: 26–39; DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.10.001
- [160] Hellenbrand N, Sendker J, Lechtenberg M, Petereit F, Hensel A. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in leaves and flowers of Hawthorn (*Crataegus* spp.). *Fitoterapia* 2015; 104: 14–22; DOI: 10.1016/j.fitote.2015.04.010
- [161] Schulman SG. *Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: Physicochemical principles and practice*. Vol. 59. International series in analytical chemistry. Oxford [u.a.]: Pergamon Press; 1977
- [162] Rijke E de, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A* 2006; 1112: 31–63; DOI: 10.1016/j.chroma.2006.01.019
- [163] Alarcón M, Vargas P, Sáez L, Molero J, Aldasoro JJ. Genetic diversity of mountain plants: two migration episodes of Mediterranean *Erodium* (Geraniaceae). *Mol Phylogenet Evol* 2012; 63: 866–876; DOI: 10.1016/j.ympev.2012.02.031
- [164] Benrahou K, Naceiri Mrabti H, Bouyahya A, Daoudi NE, Bnouham M, Mezzour H, Mahmud S, Alshahrani MM, Obaidullah AJ, Cherrah Y, Faouzi MEA. Inhibition of α -Amylase, α -Glucosidase, and Lipase, Intestinal Glucose Absorption, and Antidiabetic Properties by Extracts of *Erodium guttatum*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2022; 2022: 5868682; DOI: 10.1155/2022/5868682
- [165] Blaschek W, Hänsel R, Keller K, Reichling J, Rimpler H, Schneider G. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1998
- [166] Wang H, Liu T, Song L, Huang D. Profiles and α -amylase inhibition activity of proanthocyanidins in unripe *Manilkara zapota* (chiku). *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 3098–3104; DOI: 10.1021/jf204715q
- [167] Fritsche O. *Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016
- [168] Winkelmann K, Heilmann J, Zerbe O, Rali T, Sticher O. New phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 104–108; DOI: 10.1021/np990417m
- [169] Giaever I, Keese CR. An electrical impedance method to continuously monitor morphology and motion of cells in culture. In: *Proceedings of 16th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. IEEE; 1994: A75
- [170] Keese CR, Wegener J, Walker SR, Giaever I. Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1554–1559; DOI: 10.1073/pnas.0307588100
- [171] Wegener J, Keese CR, Giaever I. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res* 2000; 259: 158–166; DOI: 10.1006/excr.2000.4919