



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Chromatographische Aufarbeitung und Analyse von Frucht-Trester-Extrakten

verfasst von

Christiane Brenner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei jenen Personen bedanken, durch deren Unterstützung die Entstehung dieser Arbeit möglich war.

Frau Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp danke ich für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Diplomarbeitsthemas, sowie für die freundliche Betreuung bei der praktischen Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Frau Mag. Katharina Waldbauer, die während der ganzen Zeit der praktischen Arbeit ein offenes Ohr für meine labortechnischen und wissenschaftlichen Fragen hatte und mir stets wertvolle Tipps gab. Ohne diese Ratschläge wäre die Aufarbeitung des Themas nicht in diesem Umfang möglich gewesen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Freunden und Kollegen für die vielen lustigen und schönen Momente sowie die interessanten fachlichen Diskussionen bedanken, durch die ich stets die Freude am Studium behalten habe.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium nicht nur finanziell ermöglichte, sondern mich auch stets auf meinem Weg unterstützte und hinter mir stand.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Dank an meinen Freund Benjamin richten, der mir stets neue Motivation schenkte und auf dessen Rückhalt ich mich in jeder Lebenslage verlassen konnte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Material.....	4
2.1	Frucht-Trester.....	4
2.1.1	Apfel-Trester.....	4
2.1.2	Holunder-Trester.....	5
2.2	Referenzsubstanzen.....	6
2.3	Chemikalien.....	6
3	Geräte und Methoden.....	7
3.1	Geräte.....	7
3.2	Extraktionsmethoden.....	8
3.3	Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu.....	10
3.4	Säulenchromatographie.....	11
3.4.1	Stationäre Phasen.....	12
3.4.2	Herstellung einer Säule.....	13
3.5	Dünnschichtchromatographie (DC).....	14
3.5.1	DC-Platten:.....	15
3.5.2	Fließmittelsysteme:.....	15
3.5.3	Sprühreagenzien und Detektion:.....	16
3.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	17
4	Fraktionierung eines Apfel-Tresters.....	19
4.1	Einleitung.....	19
4.1.1	Apfel-Trester: Allgemeines und Inhaltsstoffe.....	19
4.1.2	Bisherige Verwendungsmöglichkeiten von Apfel-Trester.....	26
4.1.3	Zielsetzung und Allgemeiner Versuchsaufbau.....	27
4.2	Ergebnisse.....	28
4.2.1	Herstellung und Charakterisierung des Apfel-Trester-Extraktes.....	28
4.2.2	Fraktionierung und Analyse.....	30
4.2.2.1	Fraktionierung mittels Polystyrolsäule.....	30
4.2.2.2	Analyse mittels Dünnschichtchromatographie.....	31
4.2.2.3	Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	35

5	Fraktionierung eines Extraktes aus Holunder-Trester mittels Säulenchromatographie	42
5.1	Einleitung.....	42
5.1.1	Holunder-Trester: Allgemeines und Inhaltsstoffe.....	42
5.1.2	Bisherige Verwendungsmöglichkeiten von Holunder-Trester:.....	47
5.1.3	Zielsetzung und allgemeiner Versuchsaufbau.....	48
5.2	Ergebnisse	48
5.2.1	Herstellung und Charakterisierung von Holunder-Trester-Extrakten	49
5.2.2	Fraktionierung und Analyse der Fraktionen.....	50
5.2.2.1	Fraktionierung an Sephadex-LH-20-Material.....	51
5.2.2.2	Fraktionierung an Polystyrol-Material.....	52
5.2.2.3	Up-Scaling der Fraktionierung an Polystyrol-Material.....	55
6	Diskussion.....	60
7	Zusammenfassung	66
8	Summary.....	68
9	Literaturverzeichnis	70
	Abbildungsverzeichnis.....	i
	Tabellenverzeichnis.....	iii
	Curriculum Vitae	iv

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
ASE	Accelerated Solvent Extractor
AW	Auswaage
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
et al.	und andere (et alii)
etc.	und so weiter (et cetera)
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethylacetat
EW	Einwaage
fw	Frischgewicht (fresh weight)
GAE	Gallussäure-Äquivalent (gallic acid equivalent)
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
Konz.	konzentriert
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NMR	Kernspinresonanz
n.d.	keine Daten (no data)
p.a.	für die Analyse (pro analysi)

Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
Rf	Relation zur Front (retention factor)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
UV/VIS	Ultraviolettes/ Sichtbares Licht
v.a.	vor allem
VarK	Variationskoeffizient
VF	Vereinigte Fraktionen
z.B.	zum Beispiel
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/w)	Massenprozent

1 Einleitung

Den Früchten von *Malus domestica* (Borkh.) und *Sambucus nigra* (L.) werden in der traditionellen Medizin zahlreiche pharmakologische Wirkungen zugeschrieben. Die reife Holunderbeere sowie der daraus gewonnene Saft werden in der volkstümlichen Medizin bei Verstopfung, zur Anregung der Harnausscheidung und als Diaphoretikum bei Erkältungskrankheiten eingenommen (*Hiermann A., 2010*). Die Behandlung von Ischias, Kopf-, Zahn-, Herz- und Nervenschmerzen, insbesondere bei Schmerzen des Trigeminusnerves stellt ebenfalls eine Indikation für die Verwendung der Holunderbeere dar (*Wichtl M., 2009*). Die Wirksamkeit der Droge bei den genannten Anwendungsgebieten ist derzeit nicht belegt (*Hiermann A., 2010*). Es gibt jedoch bereits zahlreiche Studien, die die antivirale, bakteriostatische und antioxidative Wirkung der Holunderbeere bestätigen. Mehrere humanpharmakologische Studien belegen, dass in der Beere enthaltene Polyphenole, insbesondere Anthocyane, bei der Passage des Gastrointestinaltraktes in geringen Mengen resorbiert werden und dass offensichtlich ein Zusammenhang zwischen resorbierten Inhaltsstoffen und antioxidativer Wirkung besteht (*Chrubasik C., Chrubasik S. et al., 2008*). Dazu zählen insbesondere diverse Polyphenole, die durch ihre antioxidative und Radikal abfangende Wirkung zur Prävention verschiedener Erkrankungen, die mit oxidativem Stress einhergehen, eingesetzt werden könnten.

Auch in den Früchten von *Malus domestica* (Borkh.), die in der traditionellen Medizin aufgrund ihres hohen Pektingehaltes insbesondere zur Behandlung verschiedener Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes wie Diarrhöen und Dyspepsien eingesetzt werden (*Diether E., 2010*), sind diverse Polyphenole enthalten. Zahlreiche Studien bestätigen bereits die antioxidative Wirkung der in der Apfelfrucht enthaltenen Polyphenole (*Hertog M. G. et al, 1993; Agourram A. et al, 2013; Lu Y., Foo L. Y., 1999; Bell D. R. und Gochenaur K., 2005*).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Extraktion, Auftrennung und Aufreinigung von Frucht-Trestern der Pflanzen *Malus domestica* (Borkh.) und *Sambucus nigra* (L.).

Bei der Herstellung von Apfel- als auch Holundersaft fallen jährlich Millionen Tonnen Holunder- und Apfeltrester als Abfallprodukt an (*Bhushan S. et al., 2008*). Bei der Pressung geht aber nur ungefähr ein Zehntel der enthaltenen Polyphenole in den Saft über (*März L., 2011*), der Rest verbleibt im Trester. Trester stellen somit eine Quelle wertvoller Pflanzenstoffe dar, die kosmetisch, ernährungsphysiologisch, biotechnologisch und medizinisch vielseitig eingesetzt werden könnten. Auch wirtschaftlich gesehen sind die, bei der Saftproduktion als Abfallprodukte anfallenden Trester, von großem Interesse. Betrachtet man den Einkaufspreis von wenigen Cent bis Euro pro Kilogramm Trester (<http://www.apfeltrester-roding.de/produkte.html>, Juni 2013) und den potenziellen Marktwert von daraus hergestellten medizinischen, kosmetischen und nahrungsergänzenden Präparaten, wird deutlich, welche hohen Gewinne sich aus eigentlichen Abfallprodukten erwirtschaften lassen könnten (*Gullón B. et al., 2006*).

Auch im Rahmen eines Projektes des Initiativkollegs BioProMoTION der Universität Wien werden verschiedene Frucht-Trester fraktioniert und auf pharmakologische (kardiovaskuläre) Wirkungen untersucht. Die Testung erfolgt mithilfe eines Zellsays, bei dem die Änderung von eNOS-Aktivität der Zellen bei Zugabe verschiedener Frucht-Trester-Extrakte gemessen wird (*Waldbauer K., 2013*). Ziel ist es, die aktiven Extrakte so zu fraktionieren, dass Substanzen abgetrennt werden, die keine eNOS-Aktivität besitzen, um die eNOS-Aktivität erhöhenden Inhaltsstoffe anzureichern und diese identifizieren zu können.

Die Aufarbeitung verschiedener Apfel-Trester wurde bereits im Zuge einer vorangehenden Diplomarbeit (*Häusler M., 2013*) untersucht. Dabei stellte sich die Extraktion mit MeOH 70% sowie die Fraktionierung mittels Säulenchromatographie an Polystyrol-Material als geeignet heraus.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit gilt es zu analysieren, ob die angewendete Methodik für die Aufarbeitung von Apfel-Trester-Extrakt reproduzierbar wiederholt werden kann sowie die optimale Beladungskapazität für die Fraktionierung an Polystyrol-Material zu ermitteln.

Für die Analytik von Holunder-Trester sollen im Zuge dieser Arbeit verschiedene Extraktionsversuche durchgeführt werden, um einen Extrakt zu erhalten, der

optimale Aktivität am Zellaassay zeigt. Die Fraktionierung des ausgewählten Holunder-Trester-Extraktes mittels Säulenchromatographie an verschiedenen Säulenmaterialien stellt ein weiteres Ziel dar, um anschließend ein up-scaling durchzuführen und Fraktionen zu erhalten, die am Zellaassay auf eNOS-Aktivität getestet werden und für phytochemische Charakterisierung eingesetzt werden können.

2 Material

2.1 Frucht-Trester

2.1.1 Apfel-Trester



Abbildung 1: Apfel-Trester

Der verwendete Apfel-Trester, welcher aus verschiedenen Apfelsorten besteht, wurde von der AGRANA Juice Holding GmbH zur Verfügung gestellt, die auch die Trocknung des nach der Pressung sehr feuchten Tresters durchführte.

Durch diesen Trocknungsvorgang wird eine Haltbarkeit über Jahre hinweg ermöglicht.

Der im Mai 2011 erhaltene Trester (stammend aus der Presssaison 2010) wurde bis zur Aufarbeitung im Sommer 2012 unter Lichtausschluss bei einer Raumtemperatur von etwa 20°C gelagert.

Der Trester bestand vorwiegend aus Kernen, Kerngehäusen, Zellgewebe, Schalen, Blütenkelchen und Stängeln.

2.1.2 Holunder-Trester



Abbildung 2: Holunder-Trester

Bei dem verwendeten Probenmaterial handelt es sich um einen Holunder-Trester der Firma RAUCH Fruchtsäfte GmbH & Co OG.

Der feuchte Trester wurde unmittelbar nach der Pressung tiefgefroren und in gefrorenem Zustand verschickt.

Vom Zeitpunkt der Lieferung im Oktober 2011 bis zur Aufarbeitung im Sommer 2012 wurde der Holunder-Trester bei -20°C gelagert. Zum Zweck der Weiterverarbeitung wurde die Probe durch Lyophilisation gefriergetrocknet und anschließend gewogen. Durch Abzug der Ausbeute von der ursprünglichen Einwaage konnte auf den Wassergehalt der Probe und somit auf den Trocknungsverlust rückgeschlossen werden (vgl. *Österreichisches Arzneibuch, 2012*).

Der Trester bestand vorwiegend aus Beerenhäuten, Stielgerüst und Kernen.

2.2 Referenzsubstanzen

Ascorbinsäure	Aldrich	Nr. EC 200-066-2
Chlorogensäure	Roth	Nr. 3689398
Cyanidin	Phytolab	Nr. 80022
Cyanidin-3-glucosid	Phytolab	Nr. 89616
Cyanidin-3,5-diglucosid	Phytolab	Nr. 89615
Cyanidin-3-sambubiosid	Phytolab	Nr. 89617
Delphinidin	Phytolab	Nr. 89625
D(-)-Fructose	Merck	Nr. 1053230250
Glucose (Dextrose)	Lab M	Nr. MC013-A
Hyperosid	Extrasynthese	Nr. 11101724
Kaffeesäure	Sigma	Nr. 051M1205V
Pelargonidin	Phytolab	Nr. 80084
Pelargonidin-3-glucosid	Phytolab	Nr. 89753
Pelargonidin-3,5-diglucosid	Phytolab	Nr. 80334
Rutin	Extrasynthese	Nr. 11101722
D(+)-Saccharose	Fluka AG.	Nr. 57-50-1
Sitosterol	Merck	Nr. 83-46-5
Ursolsäure	Sigma	Nr. 77-52-1
Quercetin	Phytolab	Nr. 89262

2.3 Chemikalien

Anisaldehyd	Merck
Acetonitril (HiPerSolv Chromanorm)	VWR BDH Prolabo
Ameisensäure 98%	Carl Roth GmbH & Co KG
Chloroform p.a.	VWR BDH Prolabo
Diatomeenerde	Dionex
Dichlormethan (GPR Rectapur)	VWR BDH Prolabo
Naturstoff-Reagenz	Carl Roth GmbH & Co KG
Essigsäure 99%	Carl Roth GmbH & Co KG

Ethanol p.a.	Brenntag CEE Group
Ethylacetat p.a.	VWR BDH Prolabo
Folin-Reagens	Merck
Hexan p.a.	J.T. Baker
Methanol p.a.	VWR BDH Prolabo
n-Butanol p.a.	J.T. Baker
Polyethylenglycol-400	Carl Roth GmbH & Co KG
Seesand	Carl Roth GmbH & Co KG
Schwefelsäure 95-97%	Gatt Koller
Wasser p.a.	Entionisiertes, destilliertes Wasser entspricht Wasser <i>R</i> des Ph. Eur. 7

3 Geräte und Methoden

3.1 Geräte

Ultra-Zentrifugalmühle	Retsch Ultra-Zentrifugalmühle ZM 100 Partikelsieb 0,75mm
Magnetrührer	Heidolph MR 3001 K
Ultraschallbad	Elma Transsonic 460H
Accelerated Solvent Extractor (ASE)	Dionex ASE 200
pH-Elektrode	WTW pH-Elektrode Sen Tix 81
Gefriertrocknungsanlage	Zirbus VaCo 5-II

3.2 Extraktionsmethoden

Probenvorbereitung

Apfel-Trester:

Der getrocknete Apfel-Trester wurde mittels Ultra-Zentrifugalmühle zerkleinert. Da das entstandene Trester-Pulver bei Extraktion mittels Accelerated Solvent Extractor (ASE) eine hohe Tendenz zu verklumpen zeigte, wurde es in einer Reibschale mit Diatomeenerde vermischt, um diesem Effekt entgegenzuwirken. Dabei stellte sich ein Anteil von etwa 23% Diatomeenerde als geeignet heraus.

Holunder-Trester:

Der lyophilisierte Holunder-Trester wurde schonend in einer Reibschale zerkleinert, um die enthaltenen Kerne nicht zu stark zu beschädigen. Da der Trester eine grobe Struktur aufwies, konnte er ohne Beigabe von Diatomeenerde extrahiert werden.

Extraktion:

Extraktion im Ultraschallbad:

Erste Extraktionsversuche des Holunder-Tresters dienten dazu ein geeignetes Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch für die Extraktion zu finden und erfolgten mittels Ultraschallbad. Für die Extraktion von 10g Holundertrester kamen 20ml Extraktionsmittel zum Einsatz. Der Extraktionsvorgang geschah in drei Schritten. Zuerst wurde das Trester-Extraktionsmittel-Gemisch für 15 Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Anschließend rührte das Gemisch für fünf Minuten am Magnetrührer, um eine erneute Durchmischung von Trester und Extraktionsmittel zu erzielen. Zuletzt wurde wieder 15 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Alle drei Schritte erfolgten unter Raumtemperatur.

Es wurden Extrakte mit den Lösungsmitteln Dichlormethan, Ethanol 50%, Ethylacetat, Methanol und Methanol 70% hergestellt. Die erhaltenen Extraktlösungen wurden mittels Rotavapor und Gefriertrocknungsanlage zur Trockene gebracht und die Ausbeute sowie das Droge-Extrakt-Verhältnis bestimmt. Weiters wurden die Extrakte in vitro auf eNOS-Aktivität getestet (Waldbauer K., 2013).

Accelerated Solvent Extractor (ASE)

Die „Accelerated Solvent Extraction“ ist eine Extraktionsmethode, die automatisiert abläuft. Durch Füllung des Systems mit flüssigem Stickstoff baut sich ein hoher Druck auf; auch die Temperatur kann geregelt werden. Durch den erhöhten Druck und die erhöhte Temperatur wird eine gegenüber herkömmlichen Extraktionsmethoden (wie beispielsweise Soxhlet-Extraktion und Extraktion mittels Ultraschall) beschleunigte Reaktion ermöglicht. Auch die Extraktausbeute kann verglichen mit oben genannten Methoden gesteigert werden (*Richter et al., 1996*).

Für die Extraktion des Apfel-Tresters mittels ASE wurden folgende Einstellungen, benannt als Programm 1, gewählt:

Programm 1:	Vorheizen (min)	5
	Heizen (min)	5
	Statisch (min)	5
	Flush (%)	60
	Spülen	60
	Zyklen	3
	Druck (bar)	1000-1700
	Temperatur (°C)	40
	Lösungsmittel A (%)	Methanol 70
	Lösungsmittel B (%)	Wasser 30

Nach den vorangehenden Extraktionsversuchen des Holunder-Tresters mittels Ultraschallbad und Rühren am Magnetrührer wurde aus Gründen der Eignung und Vergleichbarkeit die Extraktion des Holunder-Tresters ebenfalls mit Methanol 70% fortgeführt, wobei hier, wie beim Apfel-Trester, nun die ASE zum Einsatz kam, da diese eine schnellere und ergiebigere Extraktion ermöglichte.

Die Einstellungen von Programm 1 wurden für die Extraktion des Holunder-Tresters geringfügig verändert und als Programm 2 benannt.

Programm 2:	Vorheizen (min)	1
	Heizen (min)	5
	Statisch (min)	5
	Flush (%)	60
	Spülen	60
	Zyklen	3
	Druck (bar)	1000-1700
	Temperatur (°C)	40
	Lösungsmittel A (%)	Methanol 70
	Lösungsmittel B (%)	Wasser 30

Das im Extraktionsmittel enthaltene Methanol wurde nach erfolgter Extraktion unter Zuhilfenahme eines Rotavapors entfernt. Das im Extrakt verbliebene Wasser konnte durch Gefriertrocknung entfernt werden.

3.3 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu

Die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes wurde – basierend auf der Methode von *Gridling M. et al. (2009)* – durchgeführt. Das Prinzip der Gehaltsbestimmung beruht auf einer Redoxreaktion der Phenole im alkalischen Milieu mit den Wolframat- und Molybdat-Ionen des Folin-Ciocalteu-Reagenzes. Dabei entsteht ein blauer Farbkomplex, dessen Extinktion bei 750nm gemessen werden kann (*Netzel G., 2011*).

Jeweils 1mg der Apfel-Trester-Extrakte wurde zur Erstellung einer Probelösung in je 1,00ml Methanol gelöst. Von der Lösung wurden 200µl entnommen und mit 200µl des wässrigen Folin-Ciocalteu-Reagenzes (50% Folin-Ciocalteu-Reagenz, 50% Wasser p.a.) versetzt. Nach drei Minuten erfolgte die Zugabe von 4,00ml einer 2%igen Na₂CO₃-Lösung. Nach 30 Minuten wurde die Extinktion bei 750nm bestimmt. Durch Einsetzen der spektrophotometrisch bestimmten Extinktion der Probelösung in die in Abbildung 3 (Seite 11) dargestellte Kalibrationskurve

konnte der Gesamtphenolgehalt der Extrakte ermittelt werden. Die Angabe des Gehaltes erfolgt in mg Gallussäure-Äquivalente (GAE)/g Extrakt.

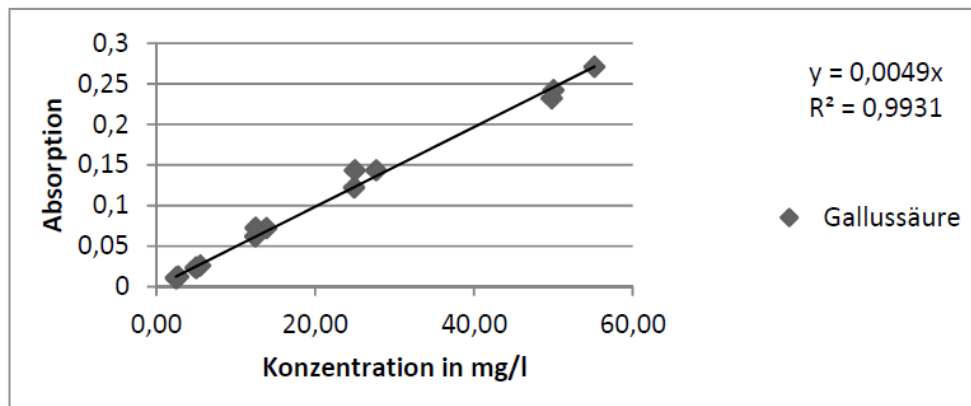


Abbildung 3: Kalibrationskurve der Gallussäure in Wasser, Konzentrationsbereich 2,5 mg/l – 50 mg/l
(Waldbauer K., 2013)

$$y = 0,0049x \quad x \text{ (mg/l)} = \frac{y}{0,0049}$$

Durch Einsetzen der gemessenen Absorption für die Variable y wurde der Gesamtphenolgehalt der Extrakte (x) als mg/l erhalten. Der so errechnete Wert wurde unter Berücksichtigung der anfänglichen Einwaage von 1mg/ml Methanol in mg/g umgerechnet.

3.4 Säulenchromatographie

Säulenchromatographie beruht auf der Verteilung von Substanzen zwischen einer festen stationären und einer flüssigen mobilen Phase. Je nach Eigenschaften der Substanzen werden diese unterschiedlich stark von der stationären Phase retiniert beziehungsweise von der mobilen Phase transportiert und somit in weiterer Folge unterschiedlich schnell eluiert. Durch kontinuierliche Zugabe mobiler Phase und Wechsel des Auffanggefäßes werden Fraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung erhalten (Skoog D.A., Leary J.J., 2010).

3.4.1 Stationäre Phasen

Im Zuge dieser Arbeit kamen zwei verschiedene stationäre Phasen zum Einsatz.

Polystyrol: Diaion® HP-20
Partikelgröße 250-850µm
Sigma-Aldrich

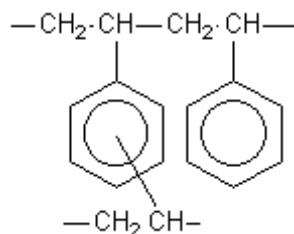


Abbildung 4: Partialstruktur von Diaion® HP-20
(http://www.diaion.com/en/products/chromato_synthesis_02.html, Mai 2013)

Diaion® HP-20 ist ein amorphes Polymer aus Diethenylphenyl- und Ethenylphenyl-Molekülen. Es besitzt eine aromatische apolare Oberfläche, wodurch selektiv hydrophobe Strukturen über Van-der-Waals-Interaktionen adsorbiert werden.

Das Polystyrol-Material sollte vor Durchführung einer Säulenchromatographie gereinigt werden, um eine Verunreinigung mit Fremdstoffen auszuschließen. Dazu eignet sich eine aufeinanderfolgende Elution mit Methanol (MeOH), Ethanol 96% (EtOH 96%), Ethanol 50% (EtOH 50%) und Ethanol 10% (EtOH 10%).

Für die Fraktionierung des Apfel-Tresters stellt der letzte Aufreinigungsschritt mit EtOH 10% auch gleichzeitig die Konditionierung der stationären Phase für die chromatographische Auftrennung dar, da hier EtOH 10% als erstes Fließmittel eingesetzt wird.

Da bei der Fraktionierung des Holunder-Tresters Wasser (H₂O) die erste mobile Phase darstellt, muss nach der Reinigung des Polystyrol-Materials mit MeOH, EtOH 96%, EtOH 50% und EtOH 10% noch ein zusätzlicher Konditionierungsschritt mit Wasser erfolgen, um die richtigen Bedingungen für die Fraktionierung zu gewährleisten.

Als weitere stationäre Phase kam Sephadex® LH-20 zum Einsatz.

Sephadex: Sephadex® LH-20
Partikelgröße: 25-100µm
Sigma-Aldrich

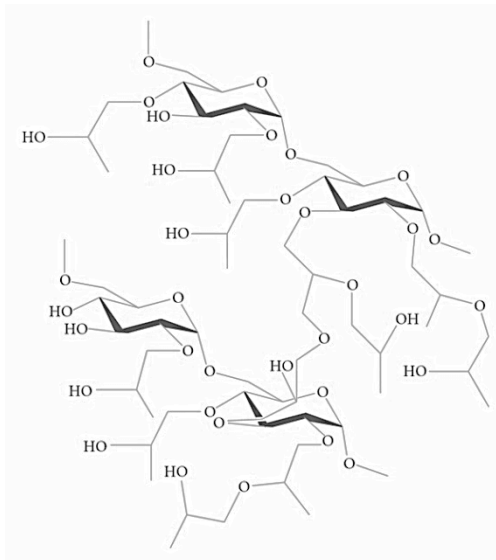


Abbildung 5: Partialstruktur von Sephadex® LH-20
(<http://www.hindawi.com/isrn/pharmaceutics/2012/216068/fig1/>, Mai 2013)

Bei Sephadex® LH-20 handelt es sich um ein quer-verzweigtes Dextran, das Hydroxypropylgruppen trägt, wodurch sich sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften ergeben.

Sephadex ist ein trockenes Pulver, das vor Verwendung für mindestens drei Stunden in einem Lösungsmittel gequollen werden muss. Aufgrund der amphiphilen Beschaffenheit können dazu sowohl Wasser als auch organische Lösungsmittel zum Einsatz kommen (https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314735988470/litdoc56119097AD_20110830235244.pdf, Juni 2013). In dieser Arbeit wurde mit Wasser gequollen, da die spätere Säulenchromatographie mit steigender Apolarität (beginnend mit Wasser) durchgeführt wurde.

3.4.2 Herstellung einer Säule

In der vorliegenden Arbeit kamen als Trennsäulen senkrecht aufgehängte, sich nach unten verjüngende Glasrohre zum Einsatz, die mit einem Hahn zur Regulierung des Lösungsmitteldurchflusses versehen waren. Zum Abdichten der Säule wurde ein Stück Watte an das untere Ende eingebracht. Im Anschluss erfolgte die Befüllung mit der stationären Phase. Dazu musste diese mit dem

ersten für die Fraktionierung verwendeten Fließmittel in Suspension gebracht werden. Die Suspension wurde vorsichtig in das Rohr gefüllt, wobei das Fließmittel langsam abgetropft wurde, um das Absetzen des Adsorbens zu beschleunigen. Dabei muss auf die Vermeidung der Bildung von Luftblasen und Rissen geachtet werden, da diese die Trennleistung der Säulenchromatographie verschlechtern (*Latscha H.P. et al., 2003*). Auf die stationäre Phase wurde ein Filterpapier gelegt und mit Seesand beschwert, um ein Aufschwemmen der stationären Phase bei Einbringen der mobilen Phase zu unterbinden.

Auf die Säule wurde der in EtOH 10% (Apfel-Trester) beziehungsweise in Wasser (Holunder-Trester) suspendierte Trester-Extrakt aufgebracht. Für die Suspension waren pro 1g Extrakt 15ml Lösungsmittel erforderlich.

Säule 1: Durchmesser: 2cm
 Füllhöhe: 27cm

Säule 2: Durchmesser: 5,5cm
 Füllhöhe: 60cm

Die Tropfgeschwindigkeit der Säulen wurde auf 3ml pro Minute eingestellt.

3.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Das Prinzip der Dünnschichtchromatographie ist ähnlich dem der Säulenchromatographie, die Verteilung von Substanzen erfolgt zwischen einer festen stationären Phase und einer flüssigen mobilen Phase. Die stationäre Phase befindet sich bei der DC hingegen auf einem planaren Trägermaterial, meist Glas oder Aluminium. Die mobile Phase wandert mithilfe von Kapillarkräften entlang der stationären Phase. Die Trennung der Substanzen erfolgt meist durch eine Kombination von Verteilung und Adsorption (*Hallbach J., 2001*).

Für die DC-Analyse der mittels Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen von Holunder- und Apfel-Trester kamen zwei verschiedene DC-Platten zum Einsatz. Platte 1 stellt eine „klassische“ Kieselgel-Platte dar. Platte 2 ist eine HPTLC-Platte, die durch ihre geringe Partikelgröße eine höhere Trennleistung als

„klassische“ Kieselgel-Platten besitzt, wodurch eine raschere und präzisere Auftrennung der Proben ermöglicht wird (*Merck Millipore, August 2013*).

3.5.1 DC-Platten:

Platte 1: Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Glas oder Alufolie
20 x 20 cm
Partikelgröße: 10-12µm
Merck

Platte 2: Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Glas
10 x 10 cm
Partikelgröße: 5-6µm
Merck

3.5.2 Fließmittelsysteme:

Phenole neigen aufgrund ihrer chemischen Beschaffenheit in vielen Fließmittelgemischen zur Dissoziation, was auf den Platten als Tailing zu erkennen ist (*Hänsel R., 2010*). Für die chromatographische Auftrennung der Fraktionen mit hohem Anteil an Polyphenolen wurden daher Fließmittelsysteme gewählt, die Säuren enthalten, da diese der Dissoziation der Phenole und somit dem unerwünschten Tailing-Effekt entgegenwirken. Fließmittelsystem 1 entstammt *Wagner H., Bladt S., 2009*. Die Fließmittelsysteme 2 und 3 stellen experimentell ermittelte Abwandlungen von System 1 dar. Die Fließmittelsysteme 4 und 5 sind ebenfalls abgeleitet von Laufmitteln aus *Wagner H., Bladt S. (2009)* sowie *Sherma J., Fried B. (2003)*, wobei die prozentuelle Zusammensetzung geringfügig verändert wurde. Chloroform/Methanol/Wasser-Gemische wie Fließmittel 4 ermöglichen auf Kieselgel-Platten eine Auftrennung verschiedener Disaccharide. Durch Verringerung des Methanol-Anteils entsteht eine mobile Phase die gute Eigenschaften für die Auftrennung lipophiler Bestandteile, wie beispielsweise Triterpene, zeigt (*Sherma J., Fried B., 2003*).

Fließmittelsystem 1: Ethylacetat/Ameisensäure konz./Essigsäure konz./Wasser
(100/11/11/26)

Fließmittelsystem 2: Ethylacetat/Ameisensäure konz./Essigsäure konz./Wasser
(100/8/10,8/20)

Fließmittelsystem 3: Ethylacetat/Ameisensäure konz./Essigsäure konz.
(100/11/11)

Fließmittelsystem 4: Chloroform/Methanol/Wasser
(60/40/10)

Fließmittelsystem 5: Chloroform/Methanol/Wasser
(80/10/1)

3.5.3 Sprühreagenzien und Detektion:

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (ASS-Reagenz):

Das Reagenz weist pro 100ml als inhaltliche Komponenten 0,5ml Anisaldehyd, 10ml Essigsäure konz., 85ml Methanol und 5ml Schwefelsäure konz. auf. Das Reagenz hat nur eine begrenzte Haltbarkeit und muss daher im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden. Zeigt sich eine Verfärbung von farblos nach rot-violett, muss die Lösung verworfen werden.

Die DC-Platte wird mit der Lösung besprüht und für 5-10 Minuten bei 100°C im Trockenschrank erhitzt. Die Auswertung erfolgt bei Tageslicht und unter dem UV-Licht bei 366nm.

Naturstoff-Polyethylenglycol-Reagenz:

Das Naturstoff-Reagenz stellt eine 1%ige methanolische Lösung von Diphenylboryloxyethylamin (Naturstoff) dar.

Die DC-Platte wird mit der Lösung besprüht. Durch Reaktion von in der Probe enthaltenen phenolischen Phenylpropanderivaten mit dem Naturstoffreagenz entsteht eine Fluoreszenz, die unter UV-Licht bei 366nm wahrnehmbar ist. Im Anschluss wird die Platte weiters mit einer 5 %igen ethanolischen PEG 4000-Lösung besprüht, wodurch die entstandene Fluoreszenz deutlich intensiviert wird (*Wagner H., Blatt S., 2009*).

3.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC beruht auf dem Trennprinzip einer Säulenchromatographie, wobei erhöhter Druck zum Einsatz kommt. Dadurch wird die Trennleistung und Empfindlichkeit der Methode deutlich gesteigert und die Analysendauer verkürzt (*Smollich M., 2007*). Die Durchführung der HPLC diente in dieser Arbeit dazu, die durch Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen miteinander zu vergleichen, die Inhaltsstoffe zu identifizieren und teilweise zu quantifizieren.

HPLC-Geräte:

Gerät 1: Shimadzu
Pumpe: LC-10AD
Entgaser: DGU-14A
Controller: SCL-10A
Autosampler: SIL-10AD
Detektor: Photodiode Array Detector (SPD-M10A)
Säulenofen: CTO-20AC
Software: Shimadzu LC Solution Version 1.03 SP5

Gerät 2: Shimadzu
Pumpe: LC-20AD
Entgaser: DGU-20A5
Controller: CBM-20A
Autosampler: SIL-20AC HT
Detektor: Photodiode Array Detector (SPD-M20A)
Säulenofen: CTO-20AC
Software: Shimadzu LC Solution Version 1.2

Gerät 3: entspricht Gerät 2 mit einem zusätzlichen Detektor.
Detektoren: Photodiode Array Detector (SPD-M20A) und
ELSD-LT-Detektor

Säule: Hypersil BDS C18
Säulenmaße: 250x4,6mm
Partikelgröße: 5 µm
Thermo Hypersil-Keystone Inc.

Programm: Fließmittel A: Wasser, mit Ameisensäure konz. auf pH 2,8
eingestellt

Fließmittel B: Acetonitril

Flussrate: 1,2ml/min

Injektionsvolumen: 5µl

Gradient:

Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	85	15
8	81	19
18	81	19
48	10	90
53	10	90

4 Fraktionierung eines Apfel-Tresters

4.1 Einleitung

4.1.1 Apfel-Trester: Allgemeines und Inhaltsstoffe

Äpfel stellen in Österreich mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von über 29 Kilogramm pro Jahr das meist konsumierte Obst dar. Das entspricht hochgerechnet auf die österreichische Bevölkerung etwa 63.000 Tonnen. Mit einem durchschnittlichen jährlichen Verbrauch von acht Litern pro Kopf stellt Apfelsaft in Österreich den zweit meist konsumierten Saft dar (hinter Orangensaft). Der Ertrag des Apfelanbaus in Österreich beträgt jährlich rund 220.000 Tonnen Äpfel, wovon auch ein erheblicher Anteil für die Produktion von Saft verwendet wird (http://www.ama-marketing.at/index.php?id=28&tx_ttnews%5Btt_news%5D=348&cHash=feb00ca171, Mai 2013). Weltweit beträgt die Ernte von Äpfeln 64 Millionen Tonnen pro Jahr (März L., 2011).

Bei der Produktion von Apfelsaft fallen 65% bis 75% des Apfel-Frischgewichtes als Saft und 25% bis 35% als Trester an (Gullón, B et al., 2006). Der Apfeltrester stellt den Rückstand aus Kernen, Kerngehäusen, Zellgewebe, Schale, Blütenkelchen und Stängeln dar (Cao X. et al., 2009).

Angesichts dieser Zahlen wird deutlich, in welcher großer Menge auch Apfel-Trester anfällt. Jährlich entstehen so weltweit gesehen Millionen Tonnen Apfel-Trester (Bhushan S. et al., 2008).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich damit, Verwendungsmöglichkeiten für Trester zu finden (Kapitel 4.1.2), da die Apfel-Rückstände nach Auspressung nach wie vor noch eine Vielzahl verschiedenster Inhaltsstoffe besitzen, die durch Extraktions- und Aufreinigungsverfahren zumindest teilweise gewonnen werden können. Dennoch wird ein Großteil der Trester direkt nach der Pressung entsorgt. Einer der Hauptgründe dafür ist wohl die schwierige Lagerung der voluminösen Trester, die neben einem enormen Platzbedarf auch stark anfällig für mikrobiellen Befall sind. Ursache dafür ist der hohe Feuchtigkeits- und Zuckergehalt, den die Trester nach der Pressung nach wie vor aufweisen. Für Apfel-Trester liegt der Anteil an wässrigen Bestandteilen bei etwa 70% (Bhushan S. et al., 2008).

Ein Teil der im Apfel und demnach auch im Trester enthaltenen Stoffe ist auch von medizinischer Bedeutung, wie schon das Sprichwort „An apple a day keeps the doctor away“, übersetzt: „Ein Apfel pro Tag hält den Doktor fern“ vermuten lässt (Lu Y., Foo L. Y., 2000).

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben über die genaue Zusammensetzung der Inhaltsstoffe von Äpfeln. Grund für diese unterschiedlichen Ausführungen ist die Abweichung der Inhaltsstoffe je nach Apfelsorte, Standort, Reifegrad sowie klimatischen Bedingungen. Auch die Dauer der Lagerung vor Bestimmung der Inhaltsstoffe ist ein entscheidendes Kriterium, da sich viele Inhaltsstoffe durch Einfluss von Licht, Temperatur etc. verändern können (Fießinger A., Höhne F, 2012a).

Tabelle 1 (Seite 20ff) gibt einen Überblick über die in der Literatur angegebenen Werte der inhaltlichen Zusammensetzung der Apfelfrucht.

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der Apfelfrucht

Bestandteile	Gehalt (pro 100g Frischgewicht)	Quelle
Wasser	85,3g	März L., 2011
Kohlenhydrate und Ballaststoffe		
Fructose	5,7g	März L., 2011
Glucose	2,0g	
Saccharose	2,5g	
Stärke	594mg	
Sorbit	514mg	
Pektin	400-1000mg	
Cellulose	900-1000mg	Kertesz Z. I. et al., 2006
Hemicellulose	n.d.	
Vitamine		
Vit. A (Retinol)	8µg	März L.,2011
Vit. B1 (Thiamin)	30µg	
Vit. B2 (Riboflavin)	30µg	
Vit. B6 (Pyridoxin)	50µg	
Vit. C (Ascorbinsäure)	2-25mg	
Vit. E (Tocopherol)	200µg	
Vit. K (Phyllochinon)	0-5µg	
Nicotinamid	300µg	
Panhotensäure	100µg	

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der Apfelfrucht

Biotin	1-8µg	
Folsäure	7µg	
Proteine		
Gesamtprotein	0,34g	März L., 2011
Essenzielle Aminosäuren	81mg	
Nicht essenzielle Aminosäuren	186mg	
Organische Säuren		
Apfelsäure	1,0-1,5g	März L., 2011
Zitronensäure	5mg	
Chinasäure	1000mg (unreife Früchte) 50mg (reife Früchte)	Belitz H.D., 2001
Shikimisäure, Bernsteinsäure, α- Ketoglutarsäure, etc.	In Spuren	März L., 2011
Fettsäuren		
Palmitinsäure	77mg	März L., 2011
Stearinsäure	12mg	
Myristinsäure	3mg	
Laurinsäure	2mg	
Linolsäure	167mg	
Linolensäure	35mg	
Ölsäure	22mg	
Palmitoleinsäure	2mg	
Polyphenole		
Gesamtpolyphenole	130-1000mg	Belitz H.D. et al., 2001
Epicatechin	6,7-10,3mg	März L., 2011
Quercetin und -glykoside	3,6mg	
Anthocyane	450mg	
Procyanidine	9,35mg	Fießinger A., Höhne F, 2012 ^a
Dihydrochalkone (gemessen als Phloridzin)	0,1-15,8mg	
Phenolsäuren (z.B. Chlorogensäure)	3-34mg	Podszędek A., 2010
Aromastoffe		
Gesamtaromastoffe (starke Variation der Komponenten je nach Sorte)	10-100mg	März L., 2011

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der Apfelfrucht

Mineralstoffe		
Natrium	3mg	Senser F. et al.,2009
Kalium	145mg	
Magnesium	6mg	
Calcium	7mg	
Phosphor	12mg	
Chlorid	2mg	
Eisen	480µg	
Kupfer	100µg	
Zink	120µg	
Fluorid	7µg	
Iodid	2µg	
Selen	1µg	
Mangan	65µg	

Ein Großteil der Inhaltsstoffe des Apfels findet sich nach der Pressung auch im Trester wieder. Daher können die in Tabelle 1 (Seite 20ff) angegebenen Bestandteile des unbearbeiteten Apfels auch für den Apfel-Trester übernommen werden. Die Mengenverhältnisse der Inhaltsstoffe unterscheiden sich allerdings zwischen Apfel-Trester und ungepresstem Apfel. Besonders der Anteil an Kohlenhydraten pro 100g getrocknetem Apfel-Trester ist deutlich höher als jener pro 100g Apfel-Frischgewicht (vgl. Tabelle 2, Seite 23).

Tabelle 2: Inhaltsstoffe des Apfel-Tresters

Bestandteile	Gehalt (pro 100g getrocknetem Trester- Material)	Quelle	
<i>Kohlenhydrate und Ballaststoffe</i>	48,8-58,8g	Carson K. et al., 2006	
Saccharose	5,2g	Voget C.E. et al., 1985	
Fructose	35g		
Glucose	12g		
Stärke	17,9g	Singhal K.K. et al., 1991	
Pektin	14,5g	Voget C.E. et al., 1985	
Cellulose	22,9g	Linskens H.F. und Jackson J.F., 1999	
Hemicellulose	6,2g		
<i>Vitamine</i>	n.d.		
Vit. C (Ascorbinsäure)	43-64mg		
<i>Proteine</i>	6,11g		
<i>Organische Säuren</i>	n.d.		
<i>Fettsäuren</i>	3,5g		
<i>Polyphenole</i>	720-990mg		
Epicatechin	54,7mg		Lavelli V. und Corti S., 2011
Quercetin und -glykoside	67,7mg		
Anthocyane (Cyanidin-galaktosid)	9,8mg		
Procyanidine (Procyanidin B2)	22,1mg		
Dihydrochalkone (Phloridzin)	116,7mg		
Phenolsäuren (Chlorogensäure)	69,6mg		
<i>Mineralstoffe</i>		Linskens H.F. und Jackson J.F., 1999	
Natrium	20mg		
Kalium	610mg		
Magnesium	70mg		
Calcium	140mg		
Phosphor	90mg		
Chlorid	1002mg		
Eisen	5mg		
Kupfer	0,4mg		
Zink	0,7mg		
Mangan	0,1mg		

Neben den zahlreichen Vitaminen, die im Apfel beziehungsweise Apfel-Trester enthalten sind, sind für die vielseitigen gesundheitsrelevanten Wirkungen im Speziellen Polyphenole verantwortlich. Verschiedene Studien belegen die hohe antioxidative Kapazität von Apfel-Trestern, die deutlich über der von Apfelsaft liegt. *Van der Sluis A. A. et al. (2002)* messen im Apfel-Trester eine fast zehnmal höhere antioxidative Aktivität als im Apfelsaft (1000/IC₅₀, 203,9l/mg fw gegenüber 21,2l/mg fw). Die antioxidative Aktivität im Trester entspricht etwa jener des unverarbeiteten Apfels (202,3l/mg of fw). Auch der Anteil sämtlicher gemessener Polyphenole ist im Trester deutlich höher als im Saft (vgl. Tabelle 3) dafür spricht, dass die Polyphenole mitverantwortlich für die antioxidative Aktivität sind (*Price K. R. et al., 1999; Lu Y., Foo L. Y., 1999; Van der Sluis A. A. et al., 2002*).

Tabelle 3: Massen, Konzentrationen von Flavonoiden und Chlorogensäure (mg/kg fw) sowie antioxidative Aktivität von Äpfeln, Apfel-Trester und Apfelsaft (*Van der Sluis A. A. et al, 2002*)

	apples (n = 5)		pulp (3 × 3 × 10 mm) (n = 4)		straight pressing			
	mean	SD	mean	SD	pomace (n = 3)		standardized raw juice (n = 3)	
					mean	SD	mean	SD
standardized mass balance (kg)	25.0	± 0	24.7	± 0.0	14.2	± 0.2	11.4	± 1.3
included added water (kg)							1.3	± 1.1
concentrations (mg/kg of fw)								
Cy-Ga	10	± 3	8	± 2	14	± 2	3	± 0
phloridzin	46	± 17	36	± 7	63	± 11	4	± 1
chlorogenic acid	202	± 33	178	± 16	170	± 20	133	± 15
total O-glycosides	109	± 25	103	± 17	179	± 30	13	± 1
total catechins	186	± 26	176	± 13	173	± 19	16	± 1
measured activity: 1000/IC ₅₀ (L/mg of fw)	202.3	± 67.6 ^a	195.0 ^b		203.9 ^b		21.2	± 18.4 ^a
calculated activity: Σ(C/IC ₅₀)	72.7	± 11.3	68.4	± 5.8	78.0	± 9.7	9.5	± 1.2
explained activity: calculated/measured		36%		35%		38%		45%

^a n = 2. ^b n = 1.

Die im Apfel enthaltenen Polyphenole wirken antioxidativ und besitzen Radikalfängereigenschaften. Durch diese Eigenschaften können sie eine Rolle in der Prävention von Erkrankungen spielen, die mit oxidativem Stress assoziiert sind, besonders Entzündungsprozesse, Krebserkrankungen sowie kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen. Diese positiven Wirkungen wurden bereits in zahlreichen Studien untersucht und belegt (*Hertog M. G. et al, 1993; Agourram A. et al, 2013; Lu Y., Foo L. Y., 1999; Bell D. R. und Gochenaur K., 2005*).

Betrachtet man das hohe antioxidative und Radikal abfangende Potenzial der im Trester enthaltenen Polyphenole, stellt sich die Frage, ob sich für Trester außer den bisherigen Verwendungsmöglichkeiten (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 26) auch ein Einsatz im medizinischen Bereich ergeben könnte. Notwendig ist es dazu festzustellen, inwieweit die im Trester enthaltenen unwirksamen Komponenten wie Kohlenhydrate und Ballaststoffe abgetrennt und die medizinisch interessanten Polyphenole aufkonzentriert werden können.

Abbildung 6 (Seite 26) zeigt die Strukturen der häufigsten im Apfel-Trester vorkommenden Polyphenole:

- Flavanole (v.a. Epicatechin)
- Flavonole (v.a. Quercetin-glykoside)
- Anthocyane (v.a. Cyanidin-galaktosid)
- Procyanidine (Oligomere und Polymere des Catechins, v.a. Procyanidin B2)
- Dihydrochalkone (v.a. Phloridzin)
- Phenolsäuren (z.B. Chlorogensäure)

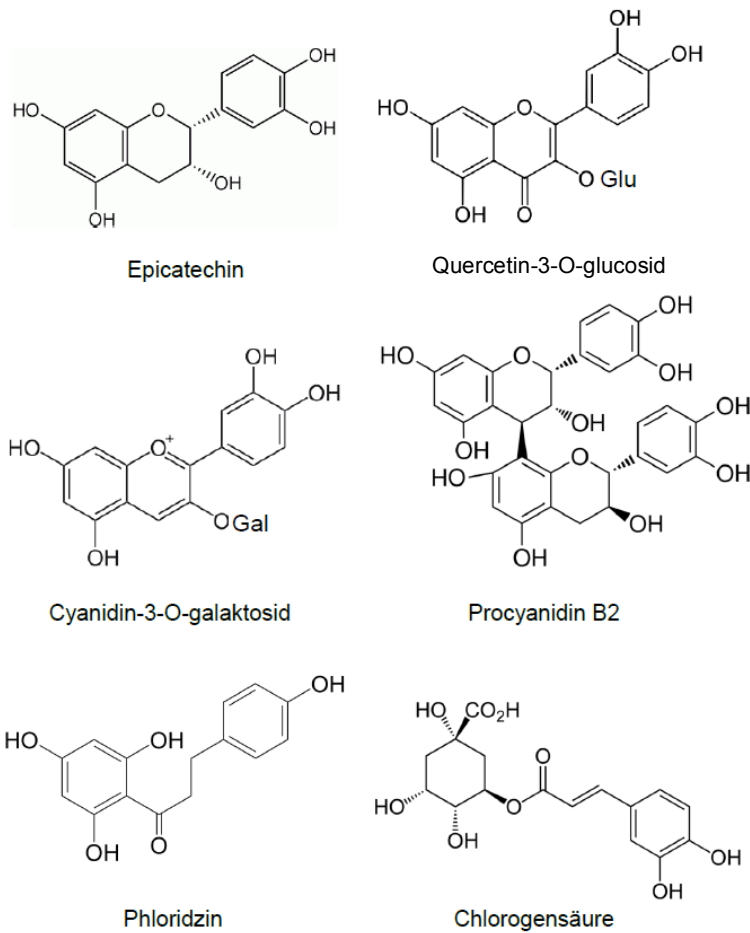


Abbildung 6: Häufigste Polyphenole im Apfel-Trester (<http://www.commonswikimedia.org>, Juni 2013; Strukturen zu einer Abbildung zusammengefügt)

4.1.2 Bisherige Verwendungsmöglichkeiten von Apfel-Trester

Apfel-Trester werden meist direkt nach der Pressung entsorgt, da sie aufgrund ihres hohen Wassergehaltes leicht anfällig für mikrobiellen Befall sind. Dennoch gibt es auch zahlreiche Verwendungsmöglichkeiten für dieses eigentliche Abfallprodukt.

Die häufigste Anwendung ist der Einsatz als Futtermittel für verschiedene Nutztiere und Wild (*Gullón B. et al., 2006*). Einen weiteren Verwendungszweck des Apfel-Tresters in der Landwirtschaft stellt der Einsatz als Düngemittel dar (*Linskens H.F. und Jackson J.F., 1999*). Da Apfel-Trester einen hohen Gehalt an Pektin aufweisen (14,5% des getrockneten Tresters) finden sie auch Verwendung in der Lebensmittelindustrie, und zwar zur Darstellung von Pektin für die Marmeladeherstellung (*Gullón B. et al., 2006*). Zur Gewinnung von

Aromastoffen werden Apfel-Trester ebenfalls herangezogen (*Vendruscolo F. et al, 2008*).

Trester dient auch als Substrat für biotechnologische Reaktionen zur Herstellung anderer Produkte. Dazu zählen insbesondere die Gewinnung verschiedener Enzyme (*Vendruscolo F. et al, 2008*), die Herstellung von Zitronensäure mittels *Aspergillus niger* (*Hang Y.D., Woodams E.E., 1984*) und die Produktion von Bioethanol (*Chatanta D.K. et al, 2008*), Milchsäure (*Gullón B. et al., 2006*) und Butanol (*Linskens H.F. und Jackson J.F., 1999*).

4.1.3 Zielsetzung und Allgemeiner Versuchsaufbau

Im Rahmen eines Projekts des Initiativkollegs BioProMoTION der Universität Wien werden die kardiovaskulären Wirkungen von verschiedenen Frucht-Trester-Extrakten mit Hilfe eines etablierten Zellassays *in vitro* getestet (*Waldbauer K., 2013*).

Aufgrund der bekannten antioxidativen und somit kardioprotektiven Wirkung der im Apfel enthaltenen Polyphenole werden im Zuge dieses Projektes auch verschiedene Apfel-Trester-Extrakte fraktioniert und auf Aktivität am Zellassay getestet.

Die Eignung von Diaion[®] HP-20 als stationäre Phase für die Auftrennung von Apfel-Trester-Extrakten mittels Säulenchromatographie wurde bereits im Zuge einer vorangehenden Diplomarbeit untersucht (*Häusler M., 2013*).

Im folgenden Teil dieser Arbeit galt es herauszufinden, inwieweit sich die Fraktionierung an Diaion[®] HP-20-Material reproduzierbar wiederholen lässt und wo die optimale Beladungskapazität einer solchen Polystyrolsäule liegt.

Hierzu wurden jeweils zwei Säulen der Größe 1 (Kapitel 3.4.2, Seite 13) mit 15g Polystyrol als Trägermaterial befüllt und mit der gleichen Menge an Apfel-Trester-Extrakt beladen (Kapitel 3.4.2, Seite 13). Die bei der Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) analysiert. Als Referenzsubstanz wurde bei der HPLC-Analyse Phloridzin gewählt, da es im Apfel-Trester das mengenmäßig am stärksten vertretene Polyphenol darstellt.

4.2 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die durch Anwendung der in Kapitel 3 (Seite 7) gelisteten Methoden für die Herstellung, Fraktionierung und Charakterisierung des Apfel-Trester-Extraktes erhaltenen Ergebnisse dargestellt, diskutiert und mit in der Literatur gegebenen Werten verglichen.

4.2.1 Herstellung und Charakterisierung des Apfel-Trester-Extraktes

Die Herstellung des Apfel-Trester-Extraktes erfolgte wie in Kapitel 3.2 (Seite 9) beschrieben durch Extraktion mittels ASE.

Da es sich bei Apfel-Trestern um Produkte natürlicher Rohstoffe handelt, deren Zusammensetzung variiert, müssen vor dem eigentlichen Versuchsaufbau, der Fraktionierung, Extrakte hergestellt und miteinander verglichen werden, um sicherzustellen, dass Extrakte, die aus einer Trester-Charge entstammen untereinander identisch sind. Andernfalls wären die Daten der späteren Säulenchromatographie nicht korrekt auswertbar, da sie durch uneinheitliches Ausgangsmaterial verfälscht sein könnten.

Um Verfälschungen, bedingt durch nicht idente Trester-Extrakte ausschließen zu können, wurden fünf separate Extraktionen durchgeführt und die erhaltenen Produkte analysiert und miteinander verglichen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die Zusammensetzung der auf die Säule aufgetragenen Extrakte ident ist und somit gleiche Bedingungen, soweit dies im Rahmen manueller Säulenherstellung möglich ist, für die Fraktionierung herrschen.

Es wurden fünf ASE-Zellen mit je 12,0 g der Apfel-Trester-Diatomeenerde-Mischung befüllt und mit dem in Kapitel 3.2 (Seite 8) dargestellten Programm extrahiert (vgl. Seite 9).

Die erhaltenen Extrakte wurden zur Trockene gebracht und jeweils das Droge-Extrakt-Verhältnis berechnet, sowie der Gesamtphenolgehalt bestimmt. Dies erfolgte nach Folin-Ciocalteu, wie in Kapitel 3.3 (Seite 10) beschrieben, wobei eine Kalibrationskurve für die Berechnung des Gehaltes zu Hilfe genommen wurde (Abbildung 3, Seite 11).

Bei der Berechnung ergab sich ein Mittelwert von 18,1 mg GAE/g Extrakt mit einem Variationskoeffizienten von 0,02 (Tabelle 4, Seite 29).

Tabelle 4: Gesamtphenolgehalt (mg GAE/g Extrakt) in fünf mittels ASE hergestellten Extrakten

Extrakt	Gesamtphenolgehalt (in mg GAE/g)
Extrakt 1	18,29 (SD 0,24, VarK 0,01)
Extrakt 2	18,33 (SD 0,17, VarK 0,01)
Extrakt 3	18,07 (SD 0,04, VarK 0,002)
Extrakt 4	18,53 (SD 0,54, VarK 0,03)
Extrakt 5	17,43 (SD 0,36, VarK 0,02)
	MW=18,13

Das Droge-Extrakt-Verhältnis lässt sich durch Division der Einwaage (unter Abzug des Anteils an Diatomeenerde) durch die Auswaage errechnen und wird als Verhältnis x:1 angegeben.

$$\text{DEV} = [\text{EW (in g)} - \text{Anteil an Diatomeenerde (in g)}] / \text{AW (in g)}$$

$$\text{DEV} = x:1$$

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5 veranschaulicht.

Tabelle 5: Droge-Extrakt-Verhältnisse der 5 Apfel-Trester-Extrakte

Extrakt	Einwaage (in g)	Anteil an Diatomeenerde (in g)	Einwaage exkl. Diatomeen (in g)	Auswaage Extrakt (in g)	Droge-Extrakt-Verhältnis
Extrakt 1	12,04	2,78	9,26	2,59	3,6:1
Extrakt 2	12,00	2,77	9,23	2,59	3,6:1
Extrakt 3	12,03	2,78	9,25	2,64	3,5:1
Extrakt 4	12,01	2,77	9,24	2,65	3,5:1
Extrakt 5	12,02	2,77	9,25	2,50	3,7:1
					MW=3,6:1

Das mittlere Droge-Extrakt-Verhältnis hat einen Wert von 3,6:1 und weist einen Variationskoeffizienten von 0,02 auf.

Nach erfolgter Überprüfung der Einheitlichkeit der Extraktionsmethode konnte mit der Extraktion in größerem Maßstab fortgesetzt werden.

4.2.2 Fraktionierung und Analyse

4.2.2.1 Fraktionierung mittels Polystyrolsäule

Das Trägermaterial Diaion[®] HP-20 (Polystyrol) wurde nacheinander mit Methanol (MeOH), Ethanol 96% (EtOH 96%), Ethanol 50% (EtOH 50%) und Ethanol 10% (EtOH 10%) gereinigt, wobei der letzte Schritt auch gleichzeitig die Konditionierung des Säulenmaterials für die folgende Säulenchromatographie darstellte.

Der Apfel-Trester-Extrakt wurde mittels Ultraschallbad in EtOH 10% gelöst, wobei pro 1g Extrakt 15ml des Lösungsmittelgemisches notwendig waren.

Insgesamt acht Glassäulen (Säule 1, vgl. Seite 14) wurden mit je 15g des zuvor konditionierten Polystyrols befüllt und immer jeweils zwei davon mit der gleichen definierten Menge an Apfel-Trester-Extrakt beladen. Dabei wurden als Quantitäten 1g, 2,5g, 5g und 7,5g gewählt. So wurden zwei Säulen mit 1g, zwei Säulen mit 2,5g, zwei Säulen mit 5g und zwei Säulen mit 7,5g Extrakt beladen.

Als Fließmittel dienten EtOH 10% und EtOH 96%, wobei fünf Fraktionen zu je 50ml mit dem Elutionsmittel EtOH 10% gesammelt wurden, bevor auf EtOH 96% gewechselt und erneut fünf Fraktionen zu je 50ml eluiert wurden. Als Tropfgeschwindigkeit wurden 3ml/min eingestellt.

Die erste mobile Phase (EtOH 10%) diene zur Abtrennung der polaren Bestandteile, besonders Zucker, die in einer großen Menge vorkommen, am Zellassay aber keine Aktivität zeigen. Zudem erschwert der hohe Zuckeranteil die Analyse der Flavonoide, welche zur Validierung bei der HPLC herangezogen werden. Im Anschluss wurde EtOH 96% als Fließmittel verwendet, wodurch die weniger polaren Komponenten des Extraktes, wie beispielsweise Flavonoide, eluiert wurden.

Die erhaltenen Fraktionen wurden am Rotavapor eingeeengt und der wässrige Anteil mittels Lyophilisation entfernt. Im Anschluss wurde die Masse der zur Trockene gebrachten Fraktionen bestimmt. Dies ermöglichte es, die beiden Säulen anhand der Massen der jeweiligen Fraktionen miteinander zu vergleichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 (Seite 31) veranschaulicht. Aus Gründen besserer Übersichtlichkeit werden hier nicht die Massen jeder einzelnen Fraktion dargestellt, sondern jeweils die Gesamtausbeute der fünf polaren

(Elutionsmittel EtOH 10%) sowie der fünf apolaren (Elutionsmittel EtOH 96%) Fraktionen.

Tabelle 6: Massen der polaren und apolaren Fraktionen nach säulenchromatographischer Auftrennung verschiedener Extraktmengen

Extraktmenge (in g)	Säule 1 EtOH 10% (AW in g)	Säule 2 EtOH 10% (AW in g)	Säule 1 EtOH 96% (AW in g)	Säule 2 EtOH 96% (AW in g)
1,00	0,8503	0,8195	0,0855	0,0777
	SD=0,0154 VarK=0,0184		SD=0,0039 VarK=0,0478	
2,50	2,1113	1,9008	0,1661	0,3142
	SD=0,1053 VarK=0,0525		SD=0,0741 VarK=0,3086	
5,00	4,4895	4,3731	0,3028	0,3293
	SD=0,0582 VarK=0,0131		SD=0,0133 VarK=0,0105	
7,50	6,7881	6,6136	0,4185	0,7064
	SD=0,0873 VarK=0,0130		SD=0,1728 VarK=0,3072	

4.2.2.2 Analyse mittels Dünnschichtchromatographie

Die durch Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen des Apfel-Trester-Extraktes wurden im weiteren Schritt mittels Dünnschichtchromatographie analysiert.

Die aufzutragenden Probelösungen wurden durch Lösen von 3mg der Fraktion in je 500µl Elutionsmittel (EtOH 10% beziehungsweise EtOH 96%) erhalten. Je 10µl der entstandenen Probelösung wurden auf DC-Platten (Platte 1, vgl. Seite 15) aufgetragen und mit den Fließmittelsystemen 2 und 4 (vgl. Seite 15) entwickelt. Die Auswertung erfolgte durch Besprühen mit Anisaldehyd-Sprühreagenz bzw. Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz unter Betrachtung im Tageslicht sowie im UV-Licht bei 366nm.

Durch Vergleich der vorhandenen Banden sowie deren Farb- und Fluoreszenzintensität konnte festgestellt werden, ob die Säulen, die mit der gleichen Menge an Extrakt beladen wurden, auch die gleiche Fraktionierung aufweisen. Des Weiteren konnte analysiert werden, inwieweit es Unterschiede in

der Fraktionierung der Säulen gibt, die mit verschiedenen Quantitäten beladen wurden.

In den Abbildungen 7 (Seite 32) und 8 (Seite 33) sind die durch Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen der zwei Säulen, die mit 2,5g Extrakt beladen wurden, zu sehen. Abbildung 7 zeigt dabei die Fraktionen, die durch EtOH 10% eluiert wurden, Abbildung 8 die Fraktionen, die mit EtOH 96% eluiert wurden. Es wurden auf den DC-Platten jeweils abwechselnd die Fraktionen der einen und der anderen Säule aufgetragen, sodass jeweils die gleichen Fraktionen gepaart abgebildet sind. Die ersten beiden aufgetragenen Banden der Abbildung entsprechen demnach der Fraktion 1 der beiden Säulen, die nächsten 2 aufgetragenen Banden entsprechen der Fraktion 2 der beiden Säulen usw. Dasselbe gilt für die EtOH 96%igen Fraktionen in Abbildung 8 (Seite 32).

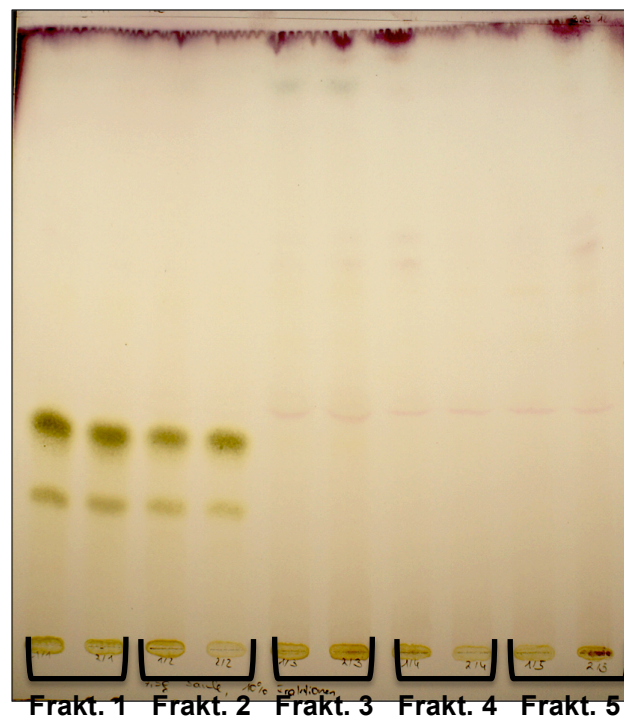


Abbildung 7: Vergleich der EtOH 10%igen Fraktionen (Frakt. 1-5) zweier Säulen mit gleicher Extraktbeladung (2,5g). Die gleichen Fraktionen sind jeweils paarweise angeführt. DC entwickelt mit FM 4, besprüht mit ASS (vgl. Seite 15).

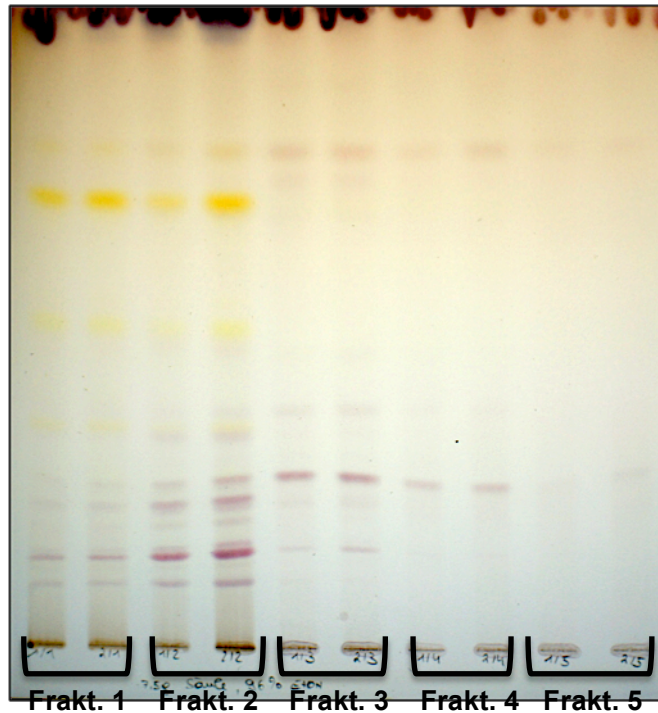


Abbildung 8: Vergleich der EtOH 96%igen Fraktionen (Frakt. 1-5) zweier Säulen mit gleicher Extraktbeladung (2,5g). Die gleichen Fraktionen sind jeweils paarweise angeführt. DC entwickelt mit FM 2, besprüht mit ASS (vgl. Seite 14f).

In den Abbildungen 7 (Seite 31) und 8 (Seite 32) ist deutlich zu erkennen, dass die beiden Säulen mit gleicher Beladungsmenge an Apfel-Trester-Extrakt (2,5g) ein praktisch identes Chromatogramm ergeben. In den jeweils entsprechenden Fraktionen finden sich die gleichen Substanzen wieder. Gut sichtbar ist dies beispielsweise in Abbildung 7, wo beide Säulen die gleichen braungrünen Substanzflecken (Fructose und Glucose) in den Fraktionen 1 und 2 aufweisen. Dies spricht dafür, dass Säulen mit gleicher Extrakt-Beladungsmenge eine idente Fraktionierung aufweisen.

Die Frage, die sich in weiterer Folge stellt, ist, ob auch Säulen anderer Beladungsmenge eine derart einheitliche Fraktionierung aufweisen, wie sie bei der Beladung mit 2,5g Extrakt gegeben ist, beziehungsweise inwieweit die Fraktionierung von Säulen verschiedener Beladungsmenge ident ist.

In Abbildung 9 (Seite 34) sind die DCs der beiden Säulen, die mit 2,5g Extrakt beladen wurden, jenen mit einer Extraktmenge von 7,5g gegenübergestellt. Die Abbildungen 9a und 9b entsprechen dabei den EtOH 10%igen Fraktionen, die Abbildungen 9c und 9d den EtOH 96%igen Fraktionen.

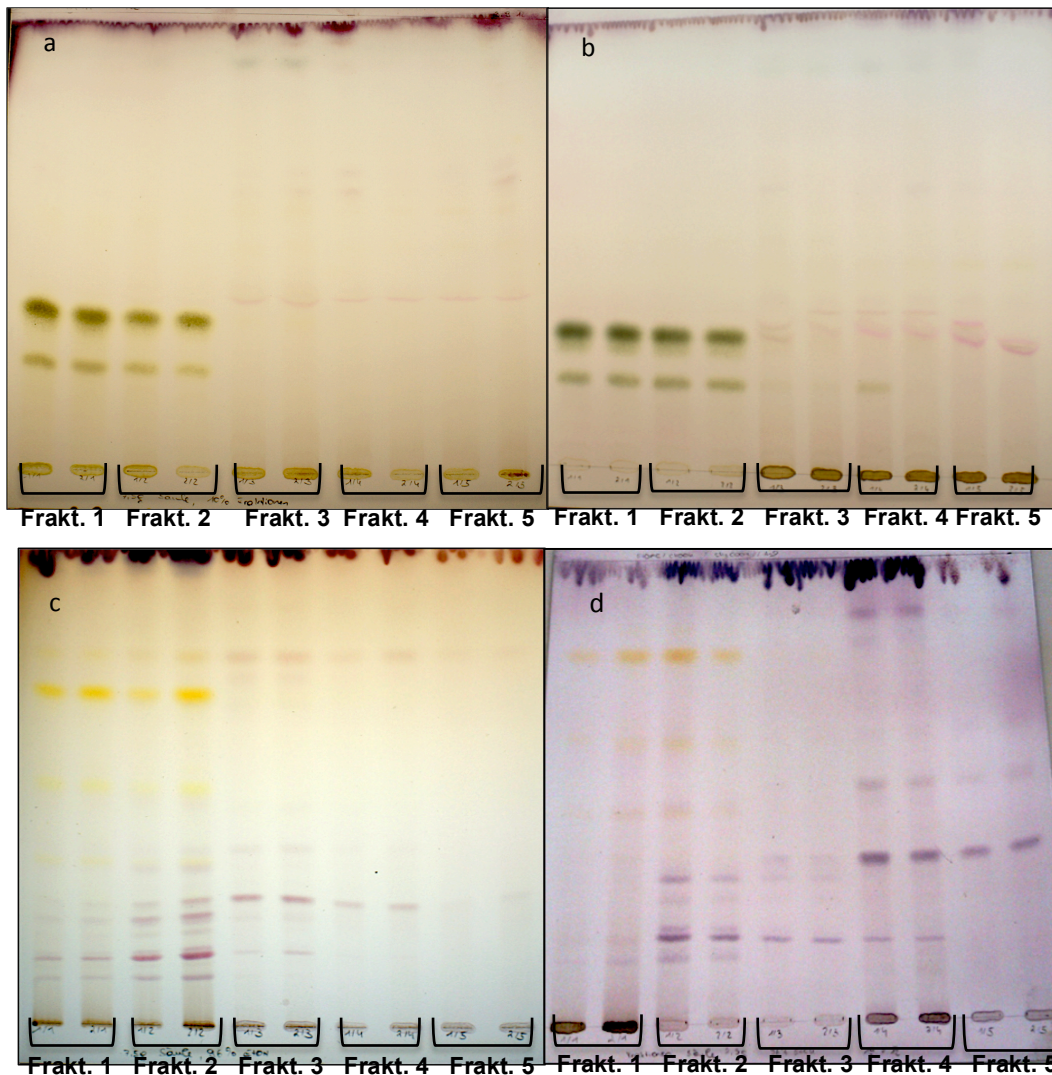


Abbildung 9: Gegenüberstellung der Fraktionierung von Säulen mit unterschiedlicher Beladungsmenge an Apfel-Trester-Extrakt (a) und c): 2,5g Extrakt; b) und d): 7,5g Extrakt).

- a) EtOH 10%ige Fraktionen der beiden Säulen mit 2,5g Beladungsmenge (DC entwickelt mit FM 4, besprüht mit ASS). b) EtOH 10%ige Fraktionen der beiden Säulen mit 7,5g Beladungsmenge (DC entwickelt mit FM 4, besprüht mit ASS). c) EtOH 96%ige Fraktionen der beiden Säulen mit 2,5g Beladungsmenge (DC entwickelt mit FM 2, besprüht mit ASS). d) EtOH 96%ige Fraktionen der beiden Säulen mit 7,5g Beladungsmenge (DC entwickelt mit FM 2, besprüht mit ASS, vgl. Seite 14f)

Auf den DCs in Abbildung 9 ist zu erkennen, dass auch bei einer hohen Extrakt-Beladungsmenge eine recht einheitliche Fraktionierung gegeben ist, erkennbar an den gleichen Banden der entsprechenden Fraktionen. Bei dem Vergleich der Fraktionierungen von Säulen mit unterschiedlicher Beladungsmenge, in Abbildung 9, entsprechend 2,5g gegenüber 7,5g ist erkennbar, dass die ersten beiden polaren Fraktionen praktisch ident sind. Bei den Säulen, die mit 7,5g Extrakt beladen wurden, erscheinen in den EtOH 10%igen Fraktionen 3 bis 5 (vgl. Abbildung 9b) bereits verstärkt Substanzen (rote Banden), die bei 2,5g Extrakt mit EtOH 10% erst in geringem Maße eluiert werden. Das spricht dafür,

dass mit 7,5g eine Überbeladung der stationären Phase stattgefunden hat. Dadurch waren die funktionellen Gruppen des Diaion HP-20 derartig ausgelastet, dass sie keine weiteren Bindungen mehr mit apolaren Bestandteilen des Extraktes eingehen konnten und diese daher ungehindert bereits mit polarem Lösungsmittel eluiert wurden.

4.2.2.3 Analyse mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Im weiteren Schritt sollten die Zusammensetzung sowie die prozentuelle Verteilung der Flavonoide mittels HPLC analysiert werden.

Dazu wurden jeweils die fünf apolaren Fraktionen jeder Säulenchromatographie vereinigt (in weiterer Folge abgekürzt mit VF_EtOH 96%). Zur Erstellung einer Messlösung wurden jeweils 3mg der vereinigten Fraktionen in 1,00ml MeOH 80% gelöst. Die polaren Fraktionen, die mit EtOH 10% eluiert wurden, wurden nicht in die Messungen einbezogen, da sie primär Zucker enthalten, die es von den anderen Substanzen abzutrennen galt.

Die Analyse wurde unter Verwendung einer Hypersil BDS C18-Säule und dem in Kapitel 3.6. dargestellten Gradienten durchgeführt.

Die Abbildung 10 zeigt das mittels UV/VIS-Detektor bei 280nm aufgenommene Chromatogramm der Probe VF_EtOH 96% Säule 1, 5g-Extrakt. Es sind acht charakteristische Peaks zu erkennen, welche Phloridzin sowie verschiedene Quercetin-Derivate darstellen. Durch Vermessung der anderen Proben werden, wie in Abbildung 11 (Seite 36) veranschaulicht, nahezu identische Chromatogramme erhalten.

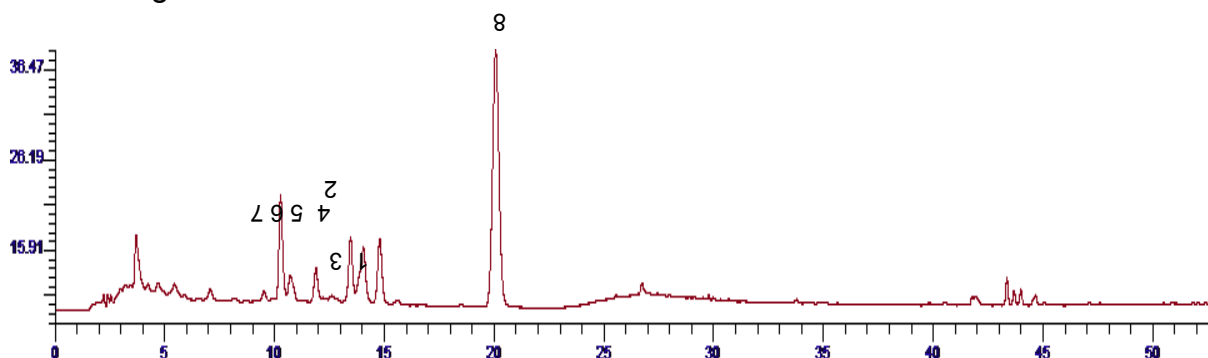


Abbildung 10: HPLC-Chromatogramm der Probe VF_EtOH 96% Säule 1, 5g-Extrakt; detektiert bei 280nm (vgl. Bedingungen Seite 18)

Abbildung 11 zeigt die Chromatogramme sämtlicher VF_EtOH 96%, welche alle die gleichen acht charakteristischen Peaks bei der selben Retentionszeit aufweisen.

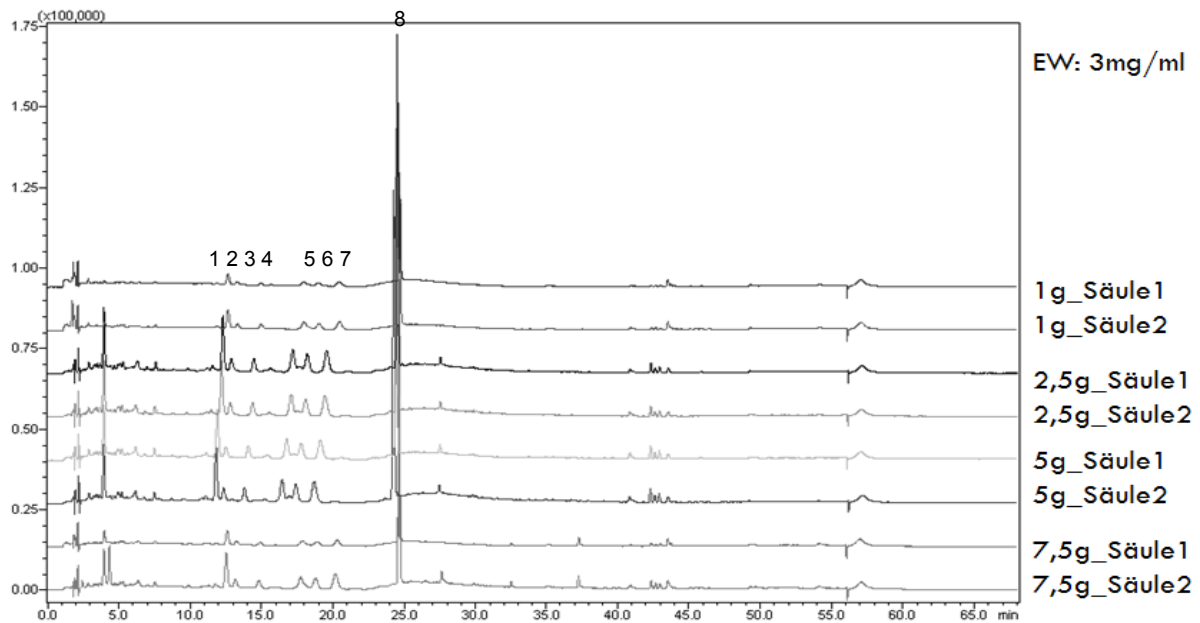


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramme der vereinigten Fraktionen, welche alle die gleichen acht charakteristischen Peaks bei etwa der selben Retentionszeit aufweisen; detektiert bei 280nm (vgl. Bedingungen Seite 18)

Sieben der acht Peaks konnten durch Verwendung der Massenspektrometrie (MS) beziehungsweise durch Spiking-Experimente mit Referenzsubstanzen identifiziert werden (Waldbauer K., 2013). Es handelt sich bei den Substanzen um Hyperosid (Peak 2), Isoquercetin (Peak 3), Quercetin-pentosid (Peak 4), Avicularin (Peak 5), Quercetin-desoxyhexosid (Peak 6), Methyl-Quercetin-hexosid (Peak 7) und Phloridzin (Peak 8). Bei Peak 1 dürfte es sich ebenfalls um ein Flavonoid handeln, das jedoch nicht genauer identifiziert werden konnte.

Das jeweilige Verhältnis der acht Peaks zueinander ist in Tabelle 7 (Seite 37) dargestellt. Dabei werden die acht Peaks als 100% angenommen und die sich dadurch ergebende prozentuelle Verteilung angegeben.

Tabelle 7: Relativer Flächenanteil der acht Peaks in den Chromatogrammen der vereinigten apolaren Fraktionen. Die acht Peaks werden als 100% angenommen und die sich dadurch ergebende prozentuelle Verteilung angegeben.

Vereinigte apolare Fraktionen (Jeweils zwei Fraktionierungen pro Extraktmenge)	Peak 1 (in %)	Peak 2 (in %)	Peak 3 (in %)	Peak 4 (in %)	Peak 5 (in %)	Peak 6 (in %)	Peak 7 (in %)	Peak 8 (in %)
1g Extraktmenge Fraktionierung 1	1,15	12,04	3,12	3,40	9,28	6,32	9,47	55,22
1g Extraktmenge Fraktionierung 2	1,42	11,76	3,32	3,44	9,51	6,72	9,09	54,74
2,5g Extraktmenge Fraktionierung 1	1,97	13,58	4,55	3,70	8,13	7,03	9,16	51,88
2,5g Extraktmenge Fraktionierung 2	1,20	12,85	4,10	3,69	8,26	7,03	9,42	53,54
5g Extraktmenge Fraktionierung 1	1,19	12,21	3,08	3,73	7,06	8,60	8,83	55,30
5g Extraktmenge Fraktionierung 2	1,20	12,36	3,21	3,91	7,04	8,54	9,27	54,46
7,5g Extraktmenge Fraktionierung 1	1,22	12,47	3,67	3,54	9,21	6,31	8,80	54,77
7,5g Extraktmenge Fraktionierung 2	1,17	10,78	3,05	3,26	7,85	5,76	8,72	59,39
MW	1,32	12,26	3,51	3,58	8,29	7,04	9,04	54,91
SD	0,28	0,82	0,55	0,21	0,97	1,03	0,26	2,13
VarK	0,21	0,07	0,18	0,06	0,12	0,15	0,03	0,04

Wie schon die optische Betrachtung der Chromatogramme in Abbildung 11 (Seite 36) vermuten lässt, ist die relative Flächenverteilung der acht Peaks im Chromatogramm bei allen durchgeführten Fraktionierungen, unabhängig von der Extraktbeladung, sehr ähnlich. Die größten Unterschiede weist die Fraktionierung der Säulen mit 7,5g Extrakt auf. Dieses Ergebnis spiegelt sich ebenfalls bei der Quantifizierung des Phloridzins wider (vgl. Tabelle 8, Seite 39) Begründung findet dieses Ergebnis, wie auch schon bei der DC-Auswertung erwähnt (Seite 35), in einer Überbeladung der stationären Phase bei der Säulenchromatographie.

Neben der prozentuellen Verteilung der Peaks ist auch die Quantität, in der die Substanzen in den erhaltenen Fraktionen vorkommen, relevant. Es wird so ermöglicht, Schlüsse zu ziehen, ob Säulen, die mit der gleichen Menge Apfel-Trester-Extrakt beladen wurden, auch eine derart gleichmäßige Fraktionierung aufweisen, dass als Produkt die gleiche Menge an Polyphenolen erscheint. Weiters kann mit dieser Analyse festgestellt werden, ob das Mengenverhältnis der aufgetragenen Extrakte dem Mengenverhältnis der erhaltenen Flavonoide in den apolaren Fraktionen entspricht. Somit können Vergleiche zwischen Säulen mit unterschiedlicher Extrakt-Beladung getätigt werden und die optimale Beladungsmenge pro Gramm Diaion[®] HP-20 eruiert werden.

Eine übermäßige Beladung der Säule kann dazu führen, dass Substanzen, die im polaren Lösungsmittel (EtOH 10%) unzureichende Löslichkeit besitzen, dennoch mit diesem eluiert werden. Begründet wird dies durch ein Ungleichgewicht an Extraktmenge zu stationärer Phase. Die funktionellen Gruppen der stationären Phase Diaion[®] HP-20 sind dann derartig ausgelastet, dass sie keine weiteren Bindungen mehr mit apolaren Bestandteilen des Extraktes eingehen. Diese können dann nicht mehr retiniert werden und werden bereits zu Beginn der Säulenchromatographie gemeinsam mit den polaren Komponenten eluiert.

Um festzustellen, ob eine derartige Überbeladung stattgefunden hat, wurde eine Quantifizierung von Phloridzin durchgeführt. Bei optimaler Trennleistung bei allen gewählten Beladungsmengen müssten die erhaltenen Phloridzinmengen zueinander im gleichen Verhältnis wie die aufgetragenen Extraktmengen stehen. Bei zu hoher Beladungsmenge könnte ein Teil der Polyphenole durch Elution mit EtOH 10% verloren gehen. Somit stünden die bei der Vermessung der vereinigten apolaren Fraktionen erhaltenen Phloridzinmengen nicht im gleichen Verhältnis wie die eingesetzten Apfel-Trester-Extraktmengen.

Zur Berechnung wurde eine Phloridzin-Kalibrationskurve verwendet (Waldbauer K., 2013), die in Abbildung 12 dargestellt ist.

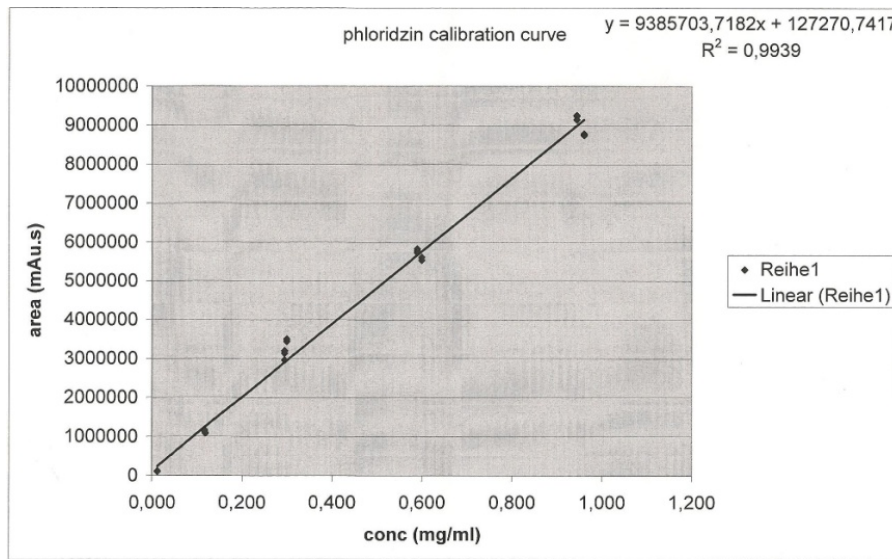


Abbildung 12: Phloridzin-Kalibrationskurve (Fläche/Konzentration) zur Berechnung der Phloridzinkonzentration in den Fraktionen.

Ausgehend von der Gleichung der Kalibrationskurve:

$y = 9385703,7182x + 127270,7417$ wird durch Umformung der nachfolgende Term erhalten:

$$x \text{ (mg/ml)} = \frac{y - 127270,7417}{9385703,7182}$$

Durch Einsetzen der mittels HPLC gemessenen Peakflächen des Phloridzins für die Variable y der Geradengleichung wurde der Phloridzingehalt in mg/ml Fraktion errechnet. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Einwaage wurden die in Tabelle 8 dargestellten Werte erhalten.

Tabelle 8: Phloridzinmenge der vereinigten apolaren Fraktionen in mg/g Fraktion

	Extraktmenge 1g		Extraktmenge 2,5g		Extraktmenge 5g		Extraktmenge 7,5g	
	Säule 1	Säule 2	Säule 1	Säule 2	Säule 1	Säule 2	Säule 1	Säule 2
Phloridzinmenge (mg Phloridzin/ g Fraktion)	1,2	4,05	25,06	24,93	30,96	25,65	4,87	21,38
	SD=2,02 VarK=0,77		SD=0,09 VarK=0,004		SD=3,75 VarK=0,13		SD=11,67 VarK=0,88	

Graphisch dargestellt (Abbildung 13, Seite 41) ist deutlich zu erkennen, dass die optimale Beladungskapazität bei etwa 2,5g Apfel-Trester-Extrakt pro 15g Diaion® HP-20 liegt, da der Variationskoeffizient von 0,004 beider Fraktionierungen deutlich geringer ist als jener der Fraktionierungen mit anderer Beladungsmenge. Die Beladung mit 2,5g-Extrakt erzielt weiters das beste Verhältnis zwischen Beladung mit Extrakt und Ausbeute an Polyphenolen. So wurde bei Fraktionierung von 2,5g Extrakt ein mittlerer Gehalt von etwa 25,0mg Phloridzin/g Fraktion erhalten. Bei der Auftrennung von 1g Extrakt wurde nur ein durchschnittlicher Gehalt von 2,6mg/g Fraktion erhalten, was statt zwei Fünftel lediglich etwa ein Zehntel des Gehaltes der Fraktionierung von 2,5g Extrakt darstellt. Bei der Auftrennung von 5g Extrakt wird verglichen mit 2,5g ebenfalls ein deutlich schlechteres Verhältnis von Beladungsmenge zu Phloridzinausbeute, erhalten. Erwartungsgemäß müsste die doppelte Menge eingesetzten Extraktes die doppelte Menge an Ausbeute erzielen, doch bei der Fraktionierung von 5g Extrakt wird gegenüber 2,5g nur eine um 13,2% höhere Phloridzinmenge erhalten. Die beiden Auftrennungen von 7,5g Apfel-Trester-Extrakt pro 15g Polystyrol weisen einen derartig hohen Variationskoeffizienten ($VarK=0,88$) auf, dass das Beladungsverhältnis wahrscheinlich als nicht geeignet angesehen werden kann.

Die Messergebnisse zeigen, dass bei höherer Beladung keine optimale Fraktionierungsleistung gegeben ist, da offensichtlich große Teile der im Extrakt enthaltenen Phloridzinmenge bereits durch Elution mit frühen Fraktionen verlorengehen. Besonders deutlich wird dieses Ergebnis bei Beladung mit 7,5g Extrakt. Es kann davon ausgegangen werden, dass große Teile der anderen sieben im HPLC-Chromatogramm ersichtlichen Flavonoide ebenfalls frühzeitig eluiert wurden. Begründet wird diese Vermutung durch die geringe gemessene Phloridzinmenge, jedoch einem gegenüber geringeren Beladungsmengen im Chromatogramm etwa gleichbleibenden Flächenverhältnis der Substanzen zueinander.

Die Beladung des Trägermaterials mit 1g Apfel-Trester-Extrakt scheint bei der Fraktionierung mittels Polystyrol zu gering zu sein, um verlässliche Aussagen bezüglich des Phloridzingehaltes treffen zu können.

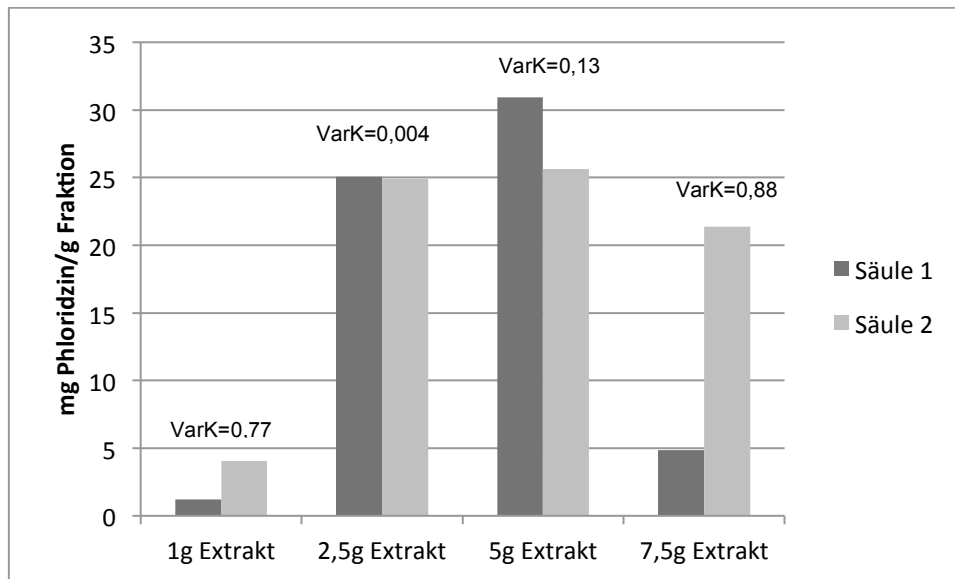


Abbildung 13: Phloridzinmenge der vereinigten apolaren Fraktionen (mg/g Fraktion). Aufgetragene Extraktmengen für die Fraktionierung betragen 1g, 2,5g, 5g und 7,5g Extrakt-Durchführung von jeweils zwei Parallelversuchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fraktionierung von Apfel-Trester-Extrakt an Polystyrol-Material bei einer Beladungsmenge von 0,17g Extrakt pro 1g stationärer Phase – entsprechend 2,5g Extrakt pro 15g stationärer Phase – die optimalsten Ergebnisse erzielt. Wie bei wiederholter Versuchsdurchführung ersichtlich ist, zeigt sich bei dieser Beladungsmenge die größte Übereinstimmung der erhaltenen Ergebnisse. Die in den vereinten apolaren Fraktionen gemessene Phloridzinmenge der beiden Wiederholungen der Fraktionierung zeigt einen Variationskoeffizienten von 0,004, was in Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei den Trennsäulen „nur“ um händisch gefüllte Säulen handelt, eine geringe Abweichung darstellt. Bestätigt wird diese Annahme sowohl bei Auswertung der Fraktionen mittels DC (vgl. Seite 31) als auch bei der Analyse mittels HPLC (vgl. Seite 35).

5 Fraktionierung eines Extraktes aus Holunder-Trester mittels Säulenchromatographie

5.1 Einleitung

5.1.1 Holunder-Trester: Allgemeines und Inhaltsstoffe

Sambucus nigra (L.) wird in Europa bereits seit dem Mittelalter als Arzneipflanze eingesetzt. Bei der Recherche in alten Schriften (beispielsweise *Blochwich M., 1677*) fällt besonders auf, dass Holunder eine der meist genannten medizinisch genutzten Pflanzen darstellt. Fast alle Teile der Pflanze, einschließlich Rinde, Wurzeln, Blätter, Blüten und Früchte finden Verwendung in der Behandlung verschiedener Erkrankungen (*Vallès J et al., 2004*). Aufgrund unzureichender Dokumentationen aus dieser Zeit beschränkt sich die Anwendung heutzutage vor allem auf die Blüten und Früchte der Pflanze (*Chrubasik C., Chrubasik S., 2008*).

Wichtl M. (2009) und *Hiermann A. (2010)* nennen nachfolgende Indikationen für den Einsatz der reifen Früchte von *Sambucus nigra* (L.) beziehungsweise deren Saft in der traditionellen Medizin:

- Bei Erkältungskrankheiten sowie Erkrankungen des Respirationstraktes
- Als Diuretikum
- Als Diaphoretikum
- Als Laxantium
- Als Analgetikum bei Zahn-, Kopf-, rheumatischen und neuralgischen Schmerzen

Betrachtet man diese vielseitigen Einsatzgebiete in der traditionellen Medizin, ist es umso erstaunlicher, dass es in Österreich kein einziges registriertes Arzneimittel mit *Sambuci Fructus* als wirksamer Komponente gibt (*HMPC/EMA, 2013*).

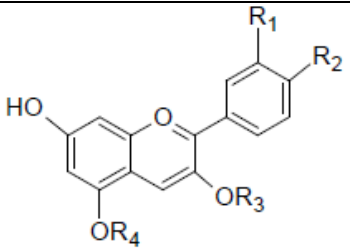
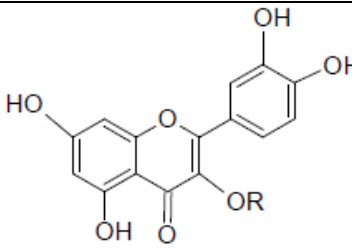
Da die Holunderfrucht aber als traditionelle Arzneidroge bekannt ist, gibt es mittlerweile zahlreiche Studien, die sich mit der Untersuchung pharmakologischer Wirkungen von *Sambuci fructus* beschäftigen. Einige Wirkungen der Droge konnten bereits wissenschaftlich bestätigt werden:

- Immunmodulatorische Aktivität: *Barak et al. (2001)* testeten verschiedene Holunderbeeren-Extrakte in vitro an Monocyten und konnten dabei eine gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Cytokine (TNF α sowie IL-1 β , IL-6, IL-8) feststellen.
- Antivirale Aktivität: *Zakay-Rones et al. (2004)* testeten die antivirale Aktivität von Holunderbeeren-Extrakten an MDCK-Zellen, die mit Influenza A- und B-Viren infiziert waren. Es konnte gezeigt werden, dass Extrakt aus Holunderbeeren die Bindung der Viren an die Zellen verhindert. Eine ähnliche Wirkung konnten *Roschek et al. (2009)* bei H1N1-Viren nachweisen. Hauptverantwortlich für die antivirale Wirkung von Früchten von *Sambucus nigra* (L.) dürften verschiedene Polyphenole, im Besonderen Flavonoide sein.
- Antioxidative Wirkung: Die antioxidative Wirkung von *Sambuci Fructus* konnte bereits in zahlreichen Studien bestätigt werden (*Einbond L.S. et al., 2002; Dawidowicz A.L. et al., 2006; Bagchi D. et al., 2005*). Hauptverantwortlich für diese Eigenschaft sind die in den Holunderbeeren in hoher Konzentration enthaltenen Anthocyane und andere Polyphenole, die als Reduktionsmittel und Radikalfänger fungieren.
- Antibiotische Aktivität: *Hearst et al. (2010)* konnten die Wirkung von lyophilisiertem Holunderbeerenpulver gegen Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) -Keime nachweisen.

Die Früchte von *Sambucus nigra* (L.) enthalten mehrere Komponenten, die für die oben beschriebene „pharmakologische Wirkung“ verantwortlich sind. Wie auch beim Apfel, sind für die antioxidative Radikal abfangende Wirkung insbesondere verschiedene Polyphenole verantwortlich. Hervorzuheben sind dabei vor allem verschiedene Anthocyane und Flavonole, die in der Holunderbeere mengenmäßig den größten Anteil der Polyphenole einnehmen (*Dawidowicz A.L. et al., 2006*) und auch im Holunder-Trester nachweislich vorhanden sind. Tabelle 9 (Seite 44) zeigt die Strukturen der häufigsten im Holunder-Trester vorkommenden Polyphenole:

- Anthocyane (v.a. Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-sambubiosid)
- Flavonole (v.a. Rutin)

Tabelle 9: Häufigste Polyphenole im Holunder-Trester (Seabra, I.J. et al., 2010b)

				
Anthocyane		Flavonole		
Name				
Anthocyane	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Cyanidin 3- glucosid	OH	OH	Glucose	H
Cyanidin 3- sambubiosid	OH	OH	Xylose-Glucose	H
Cyanidin 3-sambubiosid-5-glucosid	OH	OH	Xylose-Glucose	Glucose
Cyanidin-3,5,-diglucosid	OH	OH	Glucose	Glucose
Cyanidin 3-rutinosid	OH	OH	Rutinose	H
Pelargonidin 3-glucosid	H	OH	Glucose	H
Pelargonidin 3-sambubiosid	H	OH	Xylose-glucose	H
Flavonole	R			
Quercetin-3-rutinosid	Rutinose			

Wu et al. (2004a) quantifizierten Anthocyane von über 100 verschiedenen Früchten und stellten dabei fest, dass Holunderbeeren mit 1374mg Anthocyanen/100g Frischgewicht die Früchte mit dem zweithöchsten Gehalt an Anthocyanen darstellen. Nur Früchte der Pflanze *Aronia melanocarpa* (Medic.), der Apfelbeere, weisen mit einem Gehalt von 1480mg Anthocyanen/100g Frischgewicht einen höheren Wert auf. Sämtliche andere getestete Früchte haben einen Gehalt, der weit unter dem des Holunders liegt. Rote Weintrauben beispielsweise, die eine bekannte Quelle anthocyanreicher Extrakte darstellen, wiesen lediglich einen Wert von 27-100mg/100g Frischgewicht auf.

Neben den oben dargestellten Polyphenolen enthalten die Früchte von *Sambucus nigra* (L.) noch eine Vielzahl anderer Komponenten, wobei die genauen Mengen der Inhaltsstoffe je nach Sorte, Anbaugebiet und klimatischen Bedingungen stark variieren (Rieger G. et al., 2008; Lee J. und Finn C. E., 2007).

In der Literatur finden sich daher sehr unterschiedliche Angaben. In Tabelle 10 sind die Inhaltsstoffe der Holunderbeeren sowie deren durchschnittliche Gehalte aufgezählt, wobei die Tabelle auf der Auswertung verschiedener Quellen basiert und somit einen Überblick über in der Literatur angegebene Werte gibt.

Tabelle 10: Inhaltsstoffe der Holunderbeere (Monographie der HMPC/EMA, 2013; ergänzt)

Inhaltsstoffe	Gehalt (pro 100g Frischgewicht)	Referenz
Flavonoide		
Anthocyane	1374mg	Wu et al., 2004a
Cyanidin-3-glucosid	739,8mg	
Cyanidin-3-sambubiosid	545,9mg	
Cyanidin -3,5-diglucosid	80,2mg	Brønnum-Hansen et al., 1985
Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid	82,6mg	Wu et al., 2004a
Cyanidin-3-rutinosid	4,4mg	
Pelargonidin-3-glucosid	1,8mg	
Pelargonidin-3-sambubiosid	In Spuren	
Flavonole		
Quercetin	2,2mg	Mudge M. et al., 2013
Isoquercetin	6,5mg	
Rutin	52,5mg	
Hyperosid	n.d.	
Ätherische Öle		
	100mg	Askar, Treptow, 1985
Phenylacetaldehyd	25,8mg	Mikova et al., 1984
2-Furaldehyd	3,7mg	
Butylacetat	n.d.	
Isopentanol	n.d.	Askar, Treptow, 1985
1-Hexanol		
Acetylfuran		
Benzaldehyd		
Benzylalkohol		
α-Terpineol		
2-Phenylethanol	1,04mg	Mikova et al., 1984
Linalool	0,3mg	
Fettsäureester		
Methylpalmitooleat	1,1mg	Mikova et al., 1984
Ethyloleat	2,9mg	

Tabelle 10: Inhaltsstoffe der Holunderbeere (Monographie der HMPC/EMA, 2013; ergänzt)

Ethyllinolat	7,8mg	
Ethylmyristat	0,4mg	
Methylpalmitat	0,5mg	
Ethylpalmitat	1,1mg	
Ethylpalmitooleat	2,9mg	
Ethylstearat	0,8mg	
Methylinolat	2,9mg	
Methylinolenat	1,1mg	
Ethyllinolenat	5,0mg	
Methyloleat	0,8mg	
Sitosterol	n.d.	
Organische Säuren		
Citronensäure, Apfelsäure, Ursolsäure	n.d.	Souci 1989, zitiert von Wichtl, 2009
Vitamine und Mineralien		
Vitamin B 2	65 mg	Souci 1989; zitiert von Wichtl, 2009; Askarand und Treptow, 1985; Hiermann, 2010
Vitamin C	18-26 mg	
Folsäure	17 mg	
Biotin	1,8 mg	
β-Carotin	0,36 mg	
Vitamin B6	0,25 mg	
Panthothensäure	0,18 mg	
Nicotinamid	1,48 mg	
Kalium	288 mg-305 mg	
Phosphor	49 mg-57 mg	
Kohlenhydrate		
Glucose und Fruktose	7,5g	Souci, 1994
Pektin	160mg	Vulićet et al., 2008

Bei der Herstellung von Holunderbeerensaft bleiben nach der Pressung der Früchte etwa 25-40% der eingesetzten Masse als Trester - bestehend aus Samen, Schale, Stängeln und Fruchtfleisch - zurück (Seabra I.J. et al., 2010a). Da die Gewinnung von Holundersaft lediglich durch Pressung der Beeren erfolgt (<http://www.rauch.cc/at/unternehmen/produktion/>, Juni 2013), kann davon ausgegangen werden, dass sich ein Großteil der Inhaltsstoffe, die in Tabelle 10 (Seite 45f) angeführt sind, zumindest in geringer Menge auch im Trester wiederfindet. Von den pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffen, im speziellen Polyphenole, sind besonders Anthocyane im Holunder-Trester in einer großen

Menge enthalten. Sie gehen lediglich zu 2-25% in den Saft über und bleiben demnach zu 75-98% im Trester zurück (*Brønnum-Hansen K. et al., 2007*). Betrachtet man diese hohen Konzentrationen polyphenolischer Bestandteile im Trester, wird deutlich, von welchem hohem Interesse die Aufreinigung dieses Beiproduktes und Anreicherung von aktiven Substanzen für medizinische Zwecke ist.

Wie in Kapitel 4.1.1 (Seite 25) beschrieben, ist der Einsatz polyphenolhaltiger Präparate im medizinischen Bereich aufgrund ihrer antioxidativen und Radikal abfangenden Wirkung denkbar. Polyphenole könnten demnach ein wirksames Mittel zur Behandlung und Prävention verschiedenster Erkrankungen darstellen, die mit oxidativem Stress assoziiert sind. Zu diesen Erkrankungen zählen, wie schon genannt, primär Entzündungsprozesse, Krebserkrankungen sowie kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen.

5.1.2 Bisherige Verwendungsmöglichkeiten von Holunder-Trester:

Trotz immer strenger werdender Regulierungen der Europäischen Union betreffend Abfallwirtschaft, wird ein großer Anteil der landwirtschaftlich anfallenden Nebenprodukte nach wie vor entsorgt. Auch der Großteil der entstehenden Holunder-Trester wird aufgrund der schwierigen Lagerung direkt nach der Pressung kompostiert (*Seabra I.J. et al., 2010b*).

Neben der direkten Entsorgung gibt es aber auch Möglichkeiten des Recyclings anfallender Nebenprodukte. Für Holunder-Trester sind verschiedene Verwendungszwecke gebräuchlich:

- Als Düngemittel (*Seabra I.J. et al., 2010b*)
- Als Futterzusatz für Nutztiere (*Seabra I.J. et al., 2010b*)
- Zur Gewinnung von Holundersamenöl, welches als Bestandteil verschiedener Kosmetika und Lotionen eingesetzt wird (<http://www.vulcor.com/en/products/dehydrated-elderberry-pomace.html>, Juni 2013)

5.1.3 Zielsetzung und allgemeiner Versuchsaufbau

Im Zuge der Testung verschiedener Frucht-Trester-Extrakte im Rahmen des Projektes BioProMoTION der Universität Wien sollten aufgrund der pharmakologischen Wirkung der Früchte von *Sambucus nigra* (L.), auch dessen Trester extrahiert und fraktioniert und in weiterer Folge auf eNOS-Aktivität am Zellassay getestet werden.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Extraktionssmethoden für Holunder-Trester zu entwickeln, um verschiedene Extrakte und Fraktionen bereitzustellen, die in weiterer Folge von *Waldbauer K.* auf in vitro Aktivität getestet werden konnten. Die Kriterien für die Beurteilung der Eignung der jeweiligen Methode sind in den nachfolgenden Kapiteln angeführt.

Der Arbeitsablauf verlief in folgenden Schritten:

1. Trocknung des gelieferten Tresters
2. Durchführung von Extraktionsversuchen mit verschiedenen Lösungsmitteln beziehungsweise –gemischen und up-scaling der Extraktion mit dem geeignetsten Lösungsmittel/-gemisch
3. Fraktionierung des erhaltenen Trester-Extraktes mittels Säulenchromatographie an Diaion[®] HP-20- und Sephadex[®] LH-20-Material
4. Vergleich der beiden Fraktionierungen mittels Dünnschichtchromatographie
5. Up-scaling der Fraktionierung von Holunder-Trester-Extrakt mittels Säulenchromatographie am geeigneten Material
6. Analyse der erhaltenen Fraktionen mittels Dünnschichtchromatographie und Vereinigung gleicher Fraktionen

5.2 Ergebnisse

Der von der Firma RAUCH Fruchtsäfte GmbH & Co OG (Rankweil, Österreich) gefroren gelieferte Holunder-Trester wies einen hohen Feuchtigkeitsgehalt auf. Die Trocknung erfolgte durch Lyophilisation in der Gefriertrocknungsanlage Zirbus VaCo 5-II. Durch Abwiegen der eingesetzten Probemenge sowie dem nach dem Trocknungsvorgang erhaltenen Produkt konnte ein Feuchtigkeitsverlust von 45,5% nachgewiesen werden.

5.2.1 Herstellung und Charakterisierung von Holunder-Trester-Extrakten

Im weiteren Schritt dieser Arbeit galt es, eine geeignete Methode für die Extraktion von Holunder-Trester zu finden.

In der Literatur sind verschiedene Extraktionsmethoden für anthocyanreiche pflanzliche Materialien angeführt. *Wrolstad E. et al.* beschreibt beispielsweise die Mazeration mit angesäuertem Methanol (0,01% (v/v) HCl in Methanol) als rasche und effiziente Methode. Die Gegenwart von HCl kann jedoch zu einer Hydrolyse säurelabiler Inhaltsstoffe führen und verringert dadurch die Lagerfähigkeit des erhaltenen Extraktes, was einen Nachteil dieser Methode darstellt. Weiters ist die Extraktion mittels wässrigen Acetons (70% (v/v) Aceton in Wasser) mit anschließendem Ausschütteln des erhaltenen Extraktes mit Chloroform angeführt. Hierbei entsteht ein Extrakt, der frei von lipophilen Bestandteilen ist.

Vatai T. et al. benennt die Extraktion von Holunder mit wässrigen organischen Lösungsmittelgemischen wie Methanol-, Ethanol- oder Ethylacetat-Wasser unter erhöhter Temperatur als effizienteste Methode.

Da das primäre Ziel in dieser Arbeit die Findung eines Extraktes mit eNOS Aktivität in vitro beziehungsweise dessen Aufreinigung darstellte, erfolgte die Arbeit bioassay-guided. Es wurden verschiedene Extrakte hergestellt und am Zellassay getestet (*Waldbauer K., 2013*). So konnte festgestellt werden, welche Extrakte am Zellassay Wirkung zeigen und somit für die weitere Arbeit von Interesse sind.

Erste Extraktionen wurden wie in Kapitel 3.2 (Seite 8) beschrieben, mittels Ultraschallbad durchgeführt. Als Extraktionsmittel dienten Dichlormethan, Ethanol 50%, Ethylacetat, Methanol und Methanol 70%.

Es wurden jeweils mehrere Extraktionen pro Lösungsmittel durchgeführt, um Durchschnittswerte zu erhalten. Die Mittelwerte der Droge-Extrakt-Verhältnisse, der zur Trockene gebrachten Holunder-Trester-Extrakte sind in Tabelle 11 (Seite 50) dargestellt. Die mit MeOH hergestellten Extrakte weisen das günstigste Droge-Extrakt-Verhältnis auf.

Tabelle 11: Vergleich der Droge-Extrakt-Verhältnisse von Holunder-Trester-Extrakten, die mit verschiedenen Lösungsmitteln beziehungsweise -gemischen erhalten wurden.

Extraktionsmittel	Einwaage Trester (in g)	Auswaage Extrakt (in g)	Droge-Extrakt- Verhältnis
DCM	10,02 (SD 0,00, VarK 0,00)	0,33 (SD 0,05, VarK 0,15)	31,3:1 (SD 4,6, VarK 0,15)
EtOAc	10,04 (SD 0,01, VarK 0,001)	0,64 (SD 0,04, VarK 0,06)	15,8:1 (SD 0,84, VarK 0,05)
EtOH 50%	10,01 (SD 0,02, VarK 0,002)	0,53 (SD 0,04, VarK 0,08)	18,9:1 (SD 1,32, VarK 0,07)
MeOH	10,03 (SD 0,01, VarK 0,001)	0,74 (SD 0,02, VarK 0,03)	13,5:1 (SD 0,4, VarK 0,03)
MeOH 70%	10,03 (SD 0,03, VarK 0,003)	0,39 (SD 0,00, VarK 0,00)	25,5:1 (SD 0,09, VarK 0,004)

In weiterer Folge wurden die Extrakte in vitro auf eNOS-Aktivität getestet (Waldbauer K., 2013). Bei dieser Testung erzielten der wässrige methanolische sowie der wässrige ethanolische Extrakt die besten Ergebnisse. Aus Gründen der Eignung und auch der Vergleichbarkeit mit früheren Messungen an Apfel-Trester-Extrakten wurde die Extraktion mit Methanol 70% fortgeführt, zumal auch eNOS-Aktivität messbar war. Dabei kam nun die ASE mit dem in Kapitel 3.2 (Seite 9) beschriebenen Programm zum Einsatz, da sie eine schnellere und ergiebigere Extraktion ermöglicht. Die Extrakt-Ausbeute konnte mit dieser Methode deutlich gesteigert werden, sodass ein Droge-Extrakt-Verhältnis von 10,7:1 statt wie bei der Durchführung mit Ultraschallbad von 25,5:1 erreicht wurde.

5.2.2 Fraktionierung und Analyse der Fraktionen

Im nächsten Schritt der Arbeit galt es, die Fraktionierung des am Zellassay positiv auf eNOS-Aktivität getesteten Holunder-Trester-Extraktes an verschiedenen Säulenmaterialien zu vergleichen und in weiterer Folge ein up-scaling der Auftrennung durchzuführen. Als stationäre Phasen der Säulenchromatographie wurden hierzu Sephadex[®] LH-20 sowie Diaion[®] HP-20 für den Vergleich gewählt. Bei einer Fraktionierung im kleinen Maßstab (0,75g Holunder-Trester-Extrakt) sollte herausgefunden werden, welches der beiden Materialien besser für eine Auftrennung des Tresters geeignet ist. In weiterer

Folge sollte das Material, welches sich als geeignet herausstellen sollte, für eine Fraktionierung im größeren Maßstab herangezogen werden.

Bei der Großaufreinigung mittels Säulenchromatographie sollten primär Substanzen abgetrennt werden, die keine eNOS-Aktivität aufweisen beziehungsweise Fraktionen erhalten werden, die am Zellaassay ein positives Testergebnis zeigen.

Die Bewertung der Eignung des Säulenmaterials als stationäre Phase für die Auftrennung von Holunder-Trester-Extrakt wurde nach folgenden Kriterien durchgeführt:

- Separate Abtrennung der Zucker (vor allem Glucose und Fruktose) von den anderen Inhaltsstoffen, da diese ein großes Volumen des Tresters einnehmen, jedoch keine eNOS-Aktivität aufweisen.
- Substanztrennung: Hierbei galt es zu bewerten, inwieweit Substanzen getrennt voneinander eluiert werden. Dazu wurde die Anzahl der verschiedenen Komponenten pro Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Des Weiteren wurde analysiert, inwieweit sich die Substanzzusammensetzung der Fraktionen durch Änderung des Fließmittels beeinflussen lässt und ob die Komponenten Fließmittel spezifisch eluiert werden.
- Dauer der Fraktionierung: Da es bei der folgenden Großaufreinigung mehrere Hundert Fraktionen zu sammeln galt, war eines der entscheidenden Kriterien auch die Dauer für das Sammeln einer Fraktion, wobei sich in Vorversuchen eine Tropfgeschwindigkeit von 3ml/Minute als geeignet herausstellte, da es hier verglichen mit langsamerer Geschwindigkeit gerade noch zu keiner Verschlechterung der Auftrennung kommt.
- Kosten des Säulenmaterials: In Anbetracht der potentiellen Verwendung von aufgereinigtem Holunder-Trester-Extrakt im medizinischen und ernährungsphysiologischen Bereich stellt auch die Kostenintensivität des Säulenmaterials ein entscheidendes Kriterium dar.

5.2.2.1 Fraktionierung an Sephadex-LH-20-Material

15g des in Wasser *R* gequollenen Sephadex®-LH-20-Materials wurden in eine Glassäule übergeführt (vgl. Säule 1, Seite 14) und wie in Kapitel 3.4.2 (Seite 13) mit 0,75g Holunder-Trester-Extrakt beladen. Das optimale Säulenmaterial-Extrakt-Verhältnis wurde in Vorversuchen ermittelt, wobei sich 0,05g Extrakt/1g Säulenmaterial, was 0,75g/15g entspricht, als geeignet herausstellte.

Die Elution erfolgte mit Lösungsmitteln abnehmender Polarität in der vorliegenden Reihenfolge: H₂O, EtOH 10%, EtOH 30%, EtOH 50%, EtOH 70% und EtOH 96%.

Die ersten mit H₂O eluierten Fraktionen dienten dazu, die im Trester-Extrakt enthaltenen Zucker abzutrennen. Hierbei wurden so lange Fraktionen zu je 50ml gesammelt, bis auf der DC-Platte keine Zucker mehr nachgewiesen werden konnten. Bei der Fraktionierung an Sephadex-Material waren dazu zwei Fraktionen notwendig. Nach dem anfänglichen Spülen der Säule mit H₂O, wurden pro Lösungsmittel zwei Fraktionen zu je 50ml gesammelt, zur Trockene gebracht und Probelösungen mit einer Konzentration von 1mg/ml (gelöst im jeweiligen Elutionsmittel) hergestellt. Diese wurden mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung des Fließmittels 2 (vgl. Seite 15) analysiert. Die Detektion der Banden erfolgte durch Besprühung der DC-Platte mit Anisaldehyd-Sprühreagenz und Betrachtung unter Tageslicht und UV-Licht bei 366nm (Abbildung 14a und c, Seite 53)

5.2.2.2 Fraktionierung an Polystyrol-Material

Die Fraktionierung des Holunder-Trester-Extraktes an Polystyrol-Material erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Fraktionierung an Sephadex®-LH-20-Material. 15g des konditionierten Polymeres dienten als stationäre Phase für die Fraktionierung von 0,75g Extrakt. Als Elutionsmittel kamen, wie bei der in Kapitel 5.2.2.1 (Seite 52) beschriebenen Fraktionierung, H₂O, EtOH 10%, EtOH 30%, EtOH 50%, EtOH 70% und EtOH 96% in genannter Reihenfolge zum Einsatz. Für die Abtrennung des Zuckers war bei der Fraktionierung an Diaion-Material die Elution von vier Fraktionen zu je 50ml notwendig. Im Anschluss wurden, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, zwei Fraktionen pro Lösungsmittel gesammelt. Die erhaltenen Fraktionen zu je 50ml wurden zur Trockene gebracht

und in einer Konzentration von 1mg/ml mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung des Fließmittels 2 (vgl. Seite 15) aufgetrennt.

Die Abbildungen 14b und d zeigen die entstandenen Chromatogramme besprüht mit Anisaldehyd-Schwefel-Reagenz, bei Tageslicht und unter UV-Licht bei 366nm.

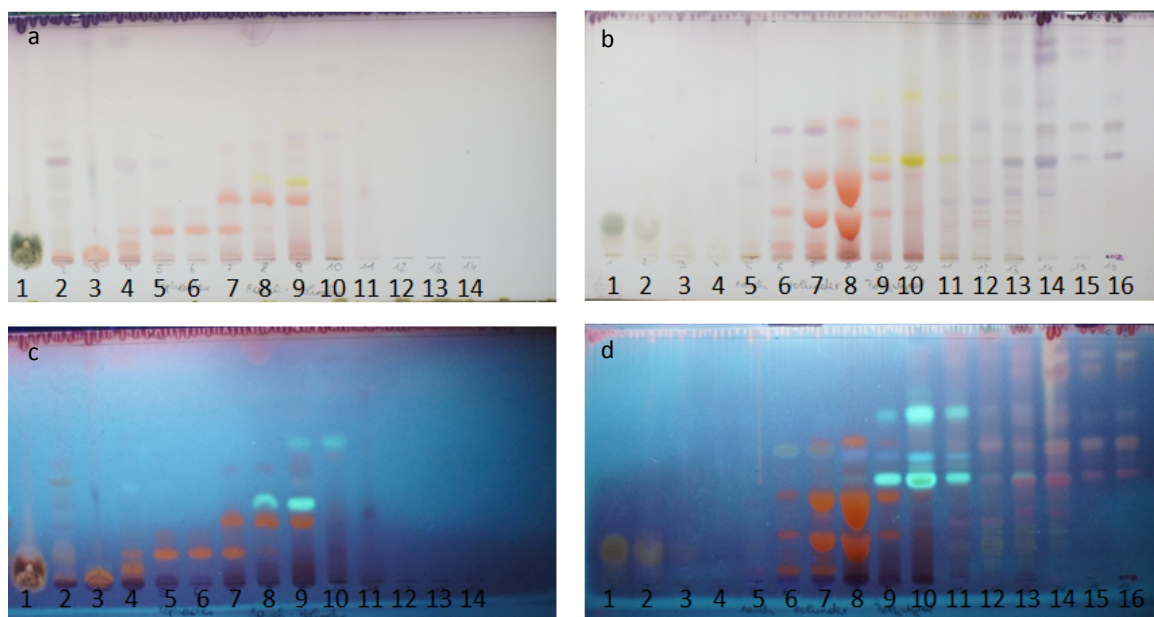


Abbildung 14: Vergleich der Fraktionen von Holunder-Trester-Extrakt, erhalten durch die Auftrennung an den Säulenmaterialien Sephadex LH-20[®] (Abb. a und c) sowie Diaion[®] HP-20 (Abb. b und d). Die Entwicklung der DC erfolgte mit Fließmittel 2 (vgl. Seite 15) und wurde mit ASS-Reagenz (vgl. Seite 16) besprüht. Auswertung der DCs unter Tageslicht (Abb. a und b) und UV-Licht bei 366nm (Abb. c und d).

Bei beiden Fraktionierungen ist zu erkennen, dass der im Trester enthaltene Zucker (braune Bande bei a) und c) deutlich in Fraktion 1 beziehungsweise bei b) und d) deutlich in den Fraktionen 1 und 2 zu erkennen) bereits zu Beginn separat von den restlichen Substanzen eluiert wird. Die folgenden Fraktionen enthalten verschiedene Anthocyan-glykoside, die als rote Banden zu erkennen sind. Hier zeigt sich bei Sephadex[®] LH-20 eine etwas bessere Trennung, erkennbar durch eine geringere Anzahl von roten Banden je Fraktion. Auf die Anthocyan-glykoside folgen, sind bei 366nm türkis-fluoreszierende Substanzflecken zu erkennen, welche verschiedene Flavonole beziehungsweise Flavonol-glykoside darstellen. Auch hier zeigt sich bei Sephadex eine geringfügig bessere Separation. Die apolareren Bestandteile wie verschiedene Triterpene, Lipide etc. werden durch Sephadex offensichtlich gänzlich retiniert und

erscheinen in keiner der gesammelten Fraktionen. Bei Polystyrol hingegen sind diese Substanzen ab Fraktion 13 als deutliche violette Banden wahrnehmbar.

Bei beiden Fraktionierungen ist zu erkennen, dass die Elution von Substanzen fließmittelspezifisch erfolgt. Durch die Änderung des Elutionsmittels kommt es zu einer deutlich anderen Zusammensetzung der Fraktionen. Grund dafür ist die unterschiedliche Löslichkeit der Substanzen im jeweiligen Fließmittel. Durch Wechsel des Fließmittels mit steigender Apolarität lassen sich polare Bestandteile, besonders Zucker, relativ einfach von den für die Untersuchungen deutlich interessanteren und verglichen mit den Zuckern weniger polaren Bestandteilen abtrennen. Zu diesen weniger polaren Bestandteilen zählen insbesondere Flavonoide und Anthocyane.

Vergleicht man den Zeitfaktor, der für die Auftrennung von Holunder-Trester-Extrakt an den beiden Materialien notwendig ist, so wird deutlich, dass eine Fraktionierung an Diaion® HP-20 wesentlich rascher durchgeführt werden kann. Durch die gröbere Körnung des Materials ist eine deutlich höhere Durchflussrate als bei Sephadex® LH-20 möglich. Abbildung 14 (Seite 53) zeigt, dass die Fraktionierungsleistung von Polystyrol für den Zweck der Aufreinigung und Vortrennung des Holunder-Trester-Extraktes dennoch zufriedenstellend ist.

Betrachtet man den potentiellen Nutzen von aufgereinigtem Holunder-Trester-Extrakt als Nahrungsergänzungsmittel oder medizinisches Präparat, sind neben einer geeigneten Fraktionierung auch wirtschaftliche Aspekte, insbesondere die Höhe der Kosten des Säulenmaterials, relevant. Ein finanziell geringerer Aufwand, bedingt durch kostengünstiges Material, könnte dafür sprechen, den Trester entsprechend für gesundheitsrelevante Zwecke aufzuarbeiten, anstatt ihn zu entsorgen.

Der Kostenpunkt für reguläre Verpackungseinheiten von 2x500g Sephadex® LH-20 liegt bei 4950€, während sich der Preis für 1000g Diaion® HP-20 auf 133,50€ beläuft (<http://www.sigmaaldrich.com/austria.html>, Österreich, Mai 2012), entsprechend einem Minus von etwa 97,3%.

Unter Beibehaltung des Beladungsverhältnisses von 0,75g Extrakt/15g Säulenmaterial lassen 1000g Säulenmaterial die Aufreinigung von 50g Holunder-Trester-Extrakt, entsprechend etwa 535g Holunder-Trester (DEV=10,7:1), zu.

Unter Abwägung des Kosten-Nutzen-Verhältnisses wurde in dieser Arbeit für die weitere Fraktionierung mittels Säulenchromatographie Diaion[®] HP-20 als stationäre Phase eingesetzt.

5.2.2.3 Up-Scaling der Fraktionierung an Polystyrol-Material

Im folgenden Teil der Arbeit sind die Ergebnisse des Up-scalings der Fraktionierung von Holunder-Trester-Extrakt an Polystyrol-Material angeführt. Unter Beibehaltung des Beladungsverhältnisses von 0,75g/15g wurde eine Säule, bestehend aus 600g Polystyrol, mit 30g Holunder-Trester-Extrakt beladen.

Die Elution erfolgte wiederum mit steigender Apolarität mit den Lösungsmitteln beziehungsweise –gemischen H₂O, EtOH 10%, EtOH 30%, EtOH 50%, EtOH 70%, EtOH 96%, MeOH und EtOAc. Der Zeitpunkt des Wechsels der mobilen Phase wurde durch Bestimmung der Ausbeuten sowie Analyse der DCs gewählt.

Kriterien für den Wechsel auf das nächst apolarere Elutionsmittel waren:

- Ausbeuten von weniger als 2mg in mehreren (mindestens drei) aufeinanderfolgenden Fraktionen
- Konstante Elution von Fraktionen mit gleicher Zusammensetzung, jedoch immer stärker an Intensität verlierenden Substanzflecken auf der DC-Platte

Es wurden Fraktionen zu 100-200ml gesammelt. Fraktionen, deren Zusammensetzung mittels Dünnschichtchromatographie als gleich identifiziert wurde, wurden miteinander vereinigt. Abbildung 15 (Seite 56) zeigt ein Beispiel für ein solches Vereinigungsschema.

Aufgrund des Vorhandenseins beziehungsweise Fehlens von Banden können 19 Fraktionen zu vier Sammelfraktionen zusammengeführt werden.

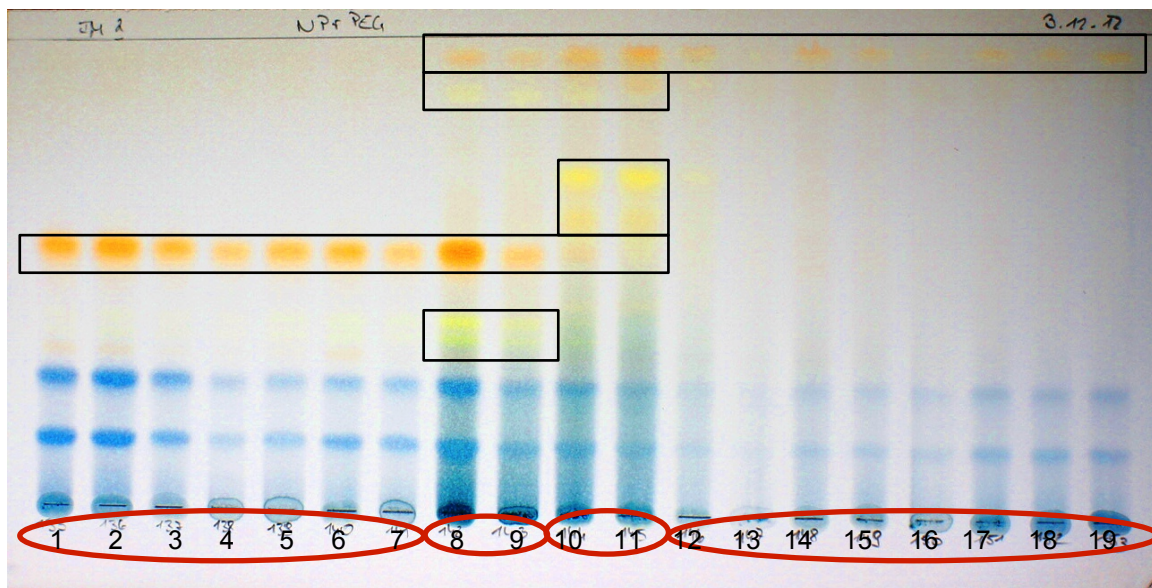


Abbildung 15: Schema der Zusammenfassung von Fraktionen mit identen Inhaltsstoffen; 19 Fraktionen werden zu vier Sammelfractionen vereinigt.

Bei der Fraktionierung mittels Polystyrolsäule wurden unter Beibehaltung des oben dargestellten Vereinigungsschemas insgesamt 294 gesammelte Fraktionen zu 30 Sammelfractionen vereinigt.

Durch Vergleich mit Referenzsubstanzen, die bei der Dünnschichtchromatographie mit aufgetragen wurden, konnten verschiedenste Inhaltsstoffe identifiziert werden. Tabelle 12 (Seite 58) stellt eine Liste identifizierter Inhaltsstoffe dar, wobei kein Anspruch auf Vollständigkeit gestellt wird, sondern ein Überblick über die jeweiligen Hauptinhaltsstoffe der Fraktionen sowie der mobilen Phase, bei der sie eluiert wurden, gegeben wird.

In Abbildung 16 (Seite 57) und Abbildung 17 (Seite 57) sind Beispiele für eine Identifizierung unter Zuhilfenahme verschiedener Referenzsubstanzen dargestellt. In Abbildung 16 können Rutin ($R_f=0,42$) und Isoquercetin ($R_f=0,62$) durch Vergleich verschiedener Flavonoide mit den Banden der Probe als Inhaltsstoffe der Fraktion identifiziert werden. Abbildung 17 zeigt die Bestätigung der Inhaltsstoffe Ursolsäure ($R_f=0,58$) und Sitosterol ($R_f=0,72$) in den Fraktionen 226-228 (Sammelfraction 25).

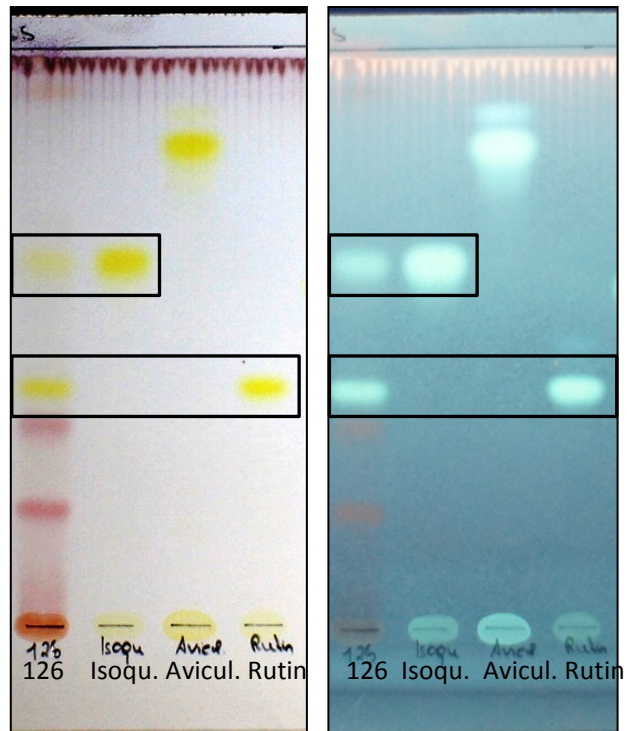


Abbildung 16: Vergleich der Fraktion 126 mit den Referenzsubstanzen Isoquercetin (Isoqu.), Avicularin (Avicul.) und Rutin. Die Entwicklung der DC erfolgte mit Fließmittel 2 (vgl. Seite 15) und wurde mit ASS-Reagenz (vgl. Seite 16) besprüht. Auswertung der DC unter Tageslicht und UV-Licht bei 366 nm.

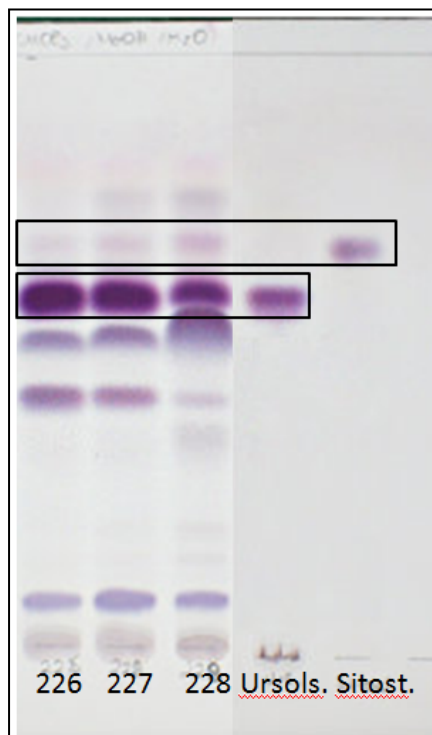


Abbildung 17: Vergleich der Fraktionen 226-228 mit Ursolsäure (Ursols.) und Sitosterin (Sitost.). Die Entwicklung der DC erfolgte mit Fließmittel 3 (vgl. Seite 15) und wurde mit ASS-Reagenz (vgl. Seite 16) besprüht. Auswertung der DC unter Tageslicht.

Tabelle 12 zeigt die Vereinigung der Fraktionen der Säulenchromatographie an Polystyrol-Material und soweit analysierbar, deren Hauptinhaltsstoffe.

Tabelle 12: Fraktionsliste des aufgetrennten Holunder-Trester-Extraktes

Nr.	Fraktionen	Fließmittel	Hauptinhaltsstoffe
1	1-5	H ₂ O	n.d.
2	6-18	H ₂ O	Fruktose, Glucose
3	19-31	H ₂ O	Fruktose, Glucose
4	32-50	H ₂ O (bis 45) + 10% EtOH (ab 46)	n.d.
5	51-56	10% EtOH	n.d.
6	57-66	10% EtOH	n.d.
7	67-76	10% EtOH	Cyanidin-3-sambubiosid
8	77-90	10% EtOH (bis 79) + 30% EtOH (ab 80)	Cyanidin-3-sambubiosid, Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin
9	91-97	30% EtOH	Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-sambubiosid, Rutin
10	98-126	30% EtOH	Rutin, Isoquercetin, Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-sambubiosid
11	127-143	30%EtOH (bis 138) + 50%EtOH (ab 139)	Isoquercetin, Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-sambubiosid
12	144-145	50% EtOH	Isoquercetin, Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-sambubiosid, Flavonoide
13	146-150	50% EtOH	Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-sambubiosid, Flavonoide
14	151-155	50% EtOH	Anthocyan-Aglyka, Triterpene
15	156-173	50% EtOH	Anthocyan-Aglyka, Triterpene
16	174-179	50% EtOH	n.d.
17	180	50% EtOH	n.d.
18	181-187	50%EtOH (bis 181) + 70%EtOH (ab 182)	n.d.
19	188-191	70% EtOH	Triterpene
20	192-210	70% EtOH	Triterpene
21	211-215	70% EtOH	Triterpene
22	216-221	70%EtOH (bis 216) + 96%EtOH (ab 217)	Triterpene
23	222	96% EtOH	Triterpene
24	223-225	96% EtOH	Triterpene
25	226-228	96% EtOH	Triterpene
26	229	96% EtOH	Ursolsäure
27	230-238	96% EtOH	Ursolsäure, Sitosterol
28	239-241	96% EtOH	Sitosterol
29	242-255	MeOH	Sitosterol
30	256-294	EtOAc	„Chlorophyll“

Die Fraktionierung an Polystyrol-Material zeigt - wie bereits bei den Vorversuchen - eine gute Abtrennung der Zucker mit H₂O als mobiler Phase. Nach vollständiger Elution der Zucker wurde das Fließmittel gewechselt. Anhand der Auswertung von Fraktionsausbeuten und Dünnschichtchromatogrammen erfolgte so nach und nach der Wechsel auf immer apolarer werdende Elutionsmittel. Je nach Polarität des Fließmittels änderte sich die Zusammensetzung der erhaltenen Fraktionen. In Tabelle 12 (Seite 58) sieht man deutlich, dass zu Beginn der Auftrennung polare Bestandteile des Trester-Extraktes eluiert werden. Mit geringer werdender Polarität der mobilen Phase wird auch die Zusammensetzung der Fraktionen stetig apolarer.

Durch Vereinigung gleicher Fraktionen wurden insgesamt 30 Sammelfraktionen erhalten, deren Aktivität am Zellassay getestet werden wird.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit erfasste Teilaspekte Unterstützung eines Projektes des Initiativkollegs BioProMoTION der Universität Wien, welches sich mit der Fraktionierung verschiedener Frucht-Trester und deren in vitro Testung auf eNOS-Aktivität beschäftigt (*Waldbauer K., 2013*). Unter anderem werden hierbei auch Trester von *Malus domestica* (Borkh.) und *Sambucus nigra* (L.) analysiert.

Den Früchten beider Pflanzen werden in der traditionellen Medizin eine Vielzahl pharmakologischer Wirkungen zugeschrieben. Bisherige Studien zeigen, dass für diese Wirkungen primär verschiedene Polyphenole verantwortlich sind, wobei sich diese Inhaltsstoffe bei Apfel und Holunder im Vorhandensein und in der Menge unterscheiden.

Der Großteil der in der Apfelfrucht enthaltenen Polyphenole lässt sich von sechs verschiedenen Grundstrukturen ableiten: Flavanole (v.a. Epicatechin), Flavonole (v.a. Quercetin-glykoside), Anthocyane (v.a. Cyanidin-galaktosid), Procyanidine (Oligomere und Polymere des Catechins, v.a. Procyanidin B2), Dihydrochalkone (v.a. Phloridzin) und Phenolsäuren (z.B. Chlorogensäure). Mengenmäßig am stärksten vertreten sind dabei Flavonole, Flavanole und Anthocyane.

Bei *Sambuci fructus* beschränken sich die in einer bedeutsamen Menge enthaltenen Polyphenole auf zwei Strukturklassen: Anthocyane (v.a. Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-sambubiosid) und Flavonole (v.a. Rutin), wobei die Anthocyane mit einer Menge von bis zu 1374mg/100g Frischgewicht die mengenmäßig deutlich am stärksten vertretenen Polyphenole darstellen (*Wu X. et al., 2004b*).

Die Aufarbeitung verschiedener Apfel-Trester wurde bereits im Zuge einer vorangehenden Diplomarbeit (*Häusler M., 2013*) untersucht. Dabei stellte sich die Extraktion mit MeOH 70% sowie die Fraktionierung mittels Säulenchromatographie an Polystyrol-Material als geeignet heraus.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit galt es herauszufinden, ob die angewendete Methodik reproduzierbar wiederholt werden kann und wo die optimale Beladungskapazität für die Fraktionierung an Polystyrol-Material liegt.

Die Überprüfung der Extraktion mithilfe der ASE und MeOH 70% als Extraktionsmittel erfolgte durch separate Extraktion fünf verschiedener ASE-Zellen und Bestimmung der Einheitlichkeit der erhaltenen Extrakte. Als Parameter zur Einheitsprüfung der Extrakte wurden das Droge-Extrakt-Verhältnis sowie der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu herangezogen. Es wurde ein mittleres Droge-Extrakt-Verhältnis von 3,6:1 mit einer Standardabweichung von 0,075 errechnet. Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes der erhaltenen Extrakte ergab einen Mittelwert von 18,13 mg GAE/g Extrakt mit einem Variationskoeffizienten von 0,02.

Betrachtet man den Gesamtphenolgehalt des Apfel-Tresters in verschiedenen Literaturangaben, beispielsweise in *Linskens H.F. und Jackson J.F. (1999)*, wo ein Gesamtphenolgehalt von 720-990mg/100g getrocknetem Apfel-Trester genannt wird, wird deutlich, dass durch die vorgenommene Extraktion mit MeOH 70% eine deutliche Anreicherung der Polyphenole gegenüber dem Trester erzielt wird. So wurde ein Extrakt erhalten, der 18,13mg Gesamtphenole (angegeben als GAE)/g Extrakt, entsprechend 1813mg Gesamtphenole/100g Extrakt enthält. Die im Trester enthaltenen Polyphenole konnten durch ASE-Extraktion somit auf den doppelten Gehalt aufkonzentriert werden. Die Extraktion mittels ASE und MeOH 70% als Extraktionsmittel stellt demnach eine geeignete Methode dar, um Extrakte zu erhalten, die reich an Polyphenolen sind.

Die Feststellung der geeigneten Beladungskapazität von Polystyrol-Material für die Fraktionierung von Apfel-Trester-Extrakt erfolgte durch Beladung von Säulen gleicher Dimension mit unterschiedlichen Mengen Extrakt. Um dabei gleichzeitig die Wiederholbarkeit der Fraktionierung zu überprüfen und Fehler minimieren zu können, wurden jeweils zwei Säulen mit der gleichen Menge an Extrakt beladen. So wurden insgesamt acht Säulen, bestehend aus 15g Polystyrol hergestellt und je zwei davon mit 1g, 2,5g, 5g, und 7,5g Extrakt beladen.

Bei jeder Säule wurden fünf Fraktionen mit EtOH 10% als mobiler Phase eluiert, die primär dazu dienten, Zucker und Polysaccharide von den restlichen, teils pharmakologisch relevanten Substanzen, abzutrennen. Anschließend wurden fünf Fraktionen mit EtOH 96% als mobiler Phase eluiert, die unter anderem verschiedene Flavonoide enthielten.

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels DC und HPLC analysiert.

Bei der DC konnte festgestellt werden, dass alle Säulen, egal mit welcher Menge Extrakt sie beladen wurden, die gleichen Banden auf der DC-Platte aufweisen. Bei höherer Beladung (7,5g Apfel-Trester-Extrakt) jedoch erscheinen einige der Substanzen, die bei geringerer Beladungsmenge erst später eluiert werden, bereits in früheren Fraktionen.

Dieses Bild bestätigt sich auch bei der weiteren Analyse mittels HPLC. Dabei wurden der Gehalt von Phloridzin und die prozentuelle Mengenverteilung verschiedener Quercetin-Derivate in den Fraktionen gemessen, die bei der Säulenchromatographie mit EtOH 96% eluiert wurden.

Anhand der Quantifizierung des in den Fraktionen enthaltenen Phloridzins mittels HPLC konnte festgestellt werden, dass die Beladungsmenge mit 2,5g Apfel-Trester-Extrakt pro 15g Polystyrol am geeignetsten ist. Bei dieser Menge konnte in den EtOH 96%-Fraktionen beider Säulen etwa die gleiche Menge Phloridzin (MW=25,00g/g Fraktion; VarK=0,004) gemessen werden. Dies spricht für eine gute Wiederholgenauigkeit. Bei höherer Beladung, besonders bei 7,5g Extrakt, ergeben sich deutlich höhere Variationskoeffizienten (VarK=0,13 bei 5g Extrakt und VarK=0,88 bei 7,5g Extrakt).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es bei einer höheren Beladung als 2,5g Extrakt pro 15g Säulenmaterial zu Sättigungserscheinungen der funktionellen Gruppen von Polystyrol kommt. Dadurch kann ein Teil der weniger polaren Substanzen (besonders Flavonoide) nicht mehr retiniert werden. Diese Substanzen werden dann mit frühen Fraktionen eluiert. Die frühen Fraktionen enthalten insbesondere Zucker und Polysaccharide, die am Zellassay keine Wirkung zeigen und daher für diese Arbeit nicht von Interesse sind. Sie werden daher verworfen. Polyphenole, die bereits frühzeitig eluiert werden und sich daher in den zuckerhaltigen Fraktionen befinden, werden daher ebenfalls nicht in die weitere Analyse miteinbezogen.

Eine Beladungsmenge von 1g Apfel-Trester-Extrakt pro 15g Polystyrol-Material, entsprechend etwa 0,067g pro 1g Säulenmaterial scheint für die Fraktionierung zu gering zu sein, da offensichtlich ein großer Anteil des Extraktes von dem Säulenmaterial zurückgehalten wird.

Hinsichtlich der Tatsache, dass es sich bei den verwendeten Polystyrolsäulen um manuell hergestellte Trennsäulen handelt, die nicht komplett ident sein können, zeigen die Ergebnisse eine gute Reproduzierbarkeit. Um jedoch

aussagekräftigere Ergebnisse erzielen zu können, wäre es notwendig, den Versuchsaufbau mit einer deutlich größeren Anzahl von Säulen zu wiederholen und die dabei entstehenden Ergebnisse mit den bereits erhaltenen Ergebnissen zu vergleichen.

Es zeigt sich jedoch schon bei den durchgeführten Versuchen mit geringer Stückzahl, dass durch die Fraktionierung mittels Polystyrolsäule eine deutliche Aufkonzentrierung der Polyphenole, hier gemessen am Beispiel des Phloridzins, erzielt wird. Betrachtet man den in der Literatur angegebenen Phloridzingehalt im Apfel-Trester von 116,7mg/100g getrocknetem Trester (*Lavelli V. und Corti S., 2011*), entsprechend 1,167mg/g, und im Vergleich dazu den durch HPLC erhaltenen Wert von 25mg/g in den vereinigten apolaren Fraktionen der Säulen, die mit 2,5g Apfel-Trester-Extrakt beladen wurden, ergibt die durchgeführte Methodik eine Aufkonzentrierung auf etwa die 20fache Menge.

Für die Analyse von Holunder-Trester wurden Extraktionsversuche im Ultraschallbad durchgeführt (vgl. Seite 8), wobei die Extraktionsmittel DCM, EtOH 50%, Ethylacetat, MeOH und MeOH 70% zum Einsatz kamen. Das optimalste Droge-Extrakt-Verhältnis erzielte dabei MeOH (DEV=13,5:1). Die höchste Aktivität am Zellassay wiesen die wässrigen methanolischen und ethanolischen Extrakte auf. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit anderen am Zellassay getesteten Extrakten wurde MeOH 70% als Extraktionsmittel eingesetzt, wobei nun die ASE zum Einsatz kam. Die Extrakt-Ausbeute konnte mit dieser Methode deutlich gesteigert werden, sodass ein Droge-Extrakt-Verhältnis von 10,7:1 (SD 0,5, VarK 0,05) statt wie bei der Ultraschall-Extraktion von 25,5:1 erreicht wurde. Grund für die gesteigerte Ausbeute ist, wie in Kapitel 3.2 (Seite 9) beschrieben, die Möglichkeit, individuell geeignete Druck- und Temperatureinstellungen beim Verfahren der Accelerated Solvent Extraction zu wählen, die zu einer verbesserten Extraktion führen kann.

Bei dem Vergleich der beiden Säulenmaterialien Diaion[®] HP-20 und Sephadex[®] LH-20 galt es, die Vor- und Nachteile der Materialien für die Fraktionierung von Holunder-Trester-Extrakt zu analysieren und abzuwägen, welche der beiden stationären Phasen unter Betrachtung der gegebenen Zielsetzung, nämlich der Vorfraktionierung von Holunder-Trester-Extrakt für die weitere Analytik, besser geeignet ist. Als Kriterien zur Bewertung der Eignung eines Säulenmaterials als

stationäre Phase für die Aufreinigung von Holunder-Trester-Extrakt, wurden folgende Kriterien gewählt:

- Gute Abtrennung der Zucker und Polysaccharide (vor allem Glucose und Fruktose) von den anderen Inhaltsstoffen, da diese ein großes Volumen des Tresters einnehmen, jedoch keine eNOS-Aktivität aufweisen.
- Substanztrennung: Hierbei galt es zu bewerten, inwieweit Substanzen separat voneinander eluiert werden.
- Dauer der Fraktionierung
- Kosten des Säulenmaterials

Anhand der Auswertung der DCs von den bei der Auftrennung erhaltenen Fraktionen der beiden Säulen konnte gezeigt werden, dass beide Säulenmaterialien die Abtrennung der im Holunder-Trester-Extrakt enthaltenen Zucker ermöglichen.

Dabei zeigte sich weiters, dass mit Sephadex eine geringfügig bessere Trennleistung als mit Diaion erzielt werden kann. Ein Teil der apolaren Inhaltsstoffe des Holunder-Trester-Extraktes wurden durch Sephadex jedoch gänzlich retiniert, was einen eindeutigen Nachteil der Fraktionierung an diesem Material darstellt.

Bei beiden Säulenmaterialien ist vor der eigentlichen Fraktionierung eine Konditionierung der Materialien notwendig, um sie für die folgende Fraktionierung aufzubereiten und ein gutes Packungsverhalten der einzelnen Partikel miteinander zu gewährleisten. Die eigentliche Trennung des Holunder-Tresters verläuft bei Sephadex deutlich langsamer als bei Diaion.

Betrachtet man den Kostenfaktor der beiden Säulenmaterialien, ist dies ein eindeutiger Nachteil des Sephadex[®] LH-20-Materials, da es mit einem Preis von 4950€ für eine Packungsgröße von 2x500g um 97% teurer ist als Diaion[®] HP-20-Material.

Das Ziel der Aufreinigung von Holunder-Trester-Extrakt im Zuge dieser Arbeit, nämlich die Aufbereitung des Tresters und Anreicherung medizinisch interessanter Inhaltsstoffe, im Besonderen Polyphenole, verdeutlicht, dass der Kostenfaktor für die Fraktionierung von enormer Bedeutung ist. Eine Nutzung der aufgereinigten Trester, sofern diese Aktivität zeigen, als

Nahrungsergänzungsmittel oder medizinisches Präparat, ist denkbar. Daher sind neben einer geeigneten Fraktionierung auch wirtschaftliche Aspekte, insbesondere die Höhe der Kosten des Säulenmaterials, relevant. Ein finanziell geringerer Aufwand, bedingt durch kostengünstiges Material, könnte dafür sprechen, den Trester entsprechend für gesundheitsrelevante Zwecke aufzuarbeiten, anstatt ihn zu entsorgen.

Unter Abwägung der zuvor definierten Kriterien wurde unter Berücksichtigung des Kosten-Nutzen-Verhältnisses in der vorliegenden Arbeit Diaion als stationäre Phase für die weitere Aufreinigung größerer Mengen (30g) Holunder-Trester-Extrakt herangezogen.

Bei der Fraktionierung von 30g Holunder-Trester-Extrakt mittels Säulenchromatographie wurden 294 Fraktionen zu je 100-200ml gesammelt und nach chromatographischer Überprüfung zu 30 Sammelfraktionen vereinigt, die nun der weiteren Zellassay basierten Untersuchung zugeführt werden, um sie auf eNOS-Aktivität zu prüfen.

Im Anschluss an die zellassaybasierte Analyse der Fraktionen gilt es, eventuell vorhandene eNOS-aktive Fraktionen weiter zu analysieren und die für die Aktivität verantwortlichen Inhaltsstoffe zu definieren. Dies könnte beispielsweise mittels Isolierung und anschließender MS- und NMR-Analyse durchgeführt werden. Hierbei könnte nicht nur die genaue inhaltliche Zusammensetzung der Fraktionen bestimmt werden, sondern auch die Quantitäten, in denen die aktiven Inhaltsstoffe enthalten sind.

7 Zusammenfassung

Als Ziel der vorliegenden Arbeit wurde die chromatographische Aufarbeitung und Analyse von Apfel- und Holunder-Trester-Extrakten definiert.

Die Aufarbeitung von Apfel-Trester-Extrakten wurde bereits von *Maria H. (2013)* im Zuge einer vorhergehenden Diplomarbeit untersucht, wobei für die säulenchromatographische Fraktionierung Diaion[®] HP-20 (Polystyrol) als stationäre Phase sowie EtOH 10% und EtOH 96% als mobile Phasen zum Einsatz kamen.

In der vorliegenden Arbeit galt es herauszufinden, ob die angewendete Methodik reproduzierbar wiederholt werden kann und wo die optimale Beladungskapazität für die Fraktionierung an Diaion[®] HP-20 liegt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die optimale Beladungskapazität bei 2,5g Apfel-Trester-Extrakt pro 15g Polystyrol-Material, entsprechend 0,17g pro 1g, liegt. Dieses Ergebnis wurde durch Analyse mittels Dünnschichtchromatographie und High Performance Liquid Chromatography erzielt.

Das Hauptaugenmerk der praktischen Arbeit lag bei der Ermittlung einer geeigneten Methodik für die Aufarbeitung von Holunder-Trester-Extrakt. Anhand der Durchführung diverser Extraktionsversuche kristallisierte sich die Extraktion mittels Accelerated Solvent Extractor unter Verwendung von wässrigem Methanol als Extraktionsmittel als geeignet heraus. Bei der Fraktionierung mittels Säulenchromatographie an Diaion[®]-HP-20- sowie Sephadex[®]-LH-20-Material konnten die beiden stationären Phasen in Bezug auf ihre Eignung für die Auftrennung von Holunder-Trester-Extrakt verglichen werden. Während bei der Fraktionierungsleistung kaum einem der beiden Materialien gegenüber dem anderen Vorzug gegeben werden konnte, zeigten sich klare zeitliche und preisliche Vorteile beim Einsatz von Diaion[®] HP-20.

Da die aufgearbeiteten Trester für die Anwendung als Nahrungsergänzungsmittel beziehungsweise als medizinische Präparate aufgrund enthaltener Inhaltsstoffe interessant sind, stellen ein geringerer zeitlicher und preislicher Aufwand klare wirtschaftliche Vorteile dar. Für eine anschließende „Großaufreinigung“ von 30g

Holunder-Trester-Extrakt, wurde Polystyrol als Säulenmaterial herangezogen, wobei 294 Fraktionen zu je 100-200ml gesammelt und zu 30 Sammelfraktionen vereinigt wurden.

Da Holunder aufgrund des hohen Gehaltes an Polyphenolen antioxidative, Radikal abfangende Wirkungen zugeschrieben werden, die auch schon in zahlreichen Studien bestätigt werden konnten, gilt es, die erhaltenen Sammelfraktionen anschließend an diese Fraktionierung, Zellassay basiert auf eNOS-Aktivität zu untersuchen. Weiters gilt es, die aktiven Fraktionen unter Anwendung geeigneter Methoden auch phytochemisch zu charakterisieren.

8 Summary

The present diploma thesis had the objective to process and analyse apple- and elderberry-pomace chromatographically.

The processing of apple-pomace-extracts had already been surveyed in the diploma thesis of *Maria H. (2013)*. Diaion[®] HP-20 (polystyrene) was used as stationary phase and EtOH 10% as well as EtOH 96% as mobile phases, came into use.

In the present diploma thesis the reproducibility of this method was studied. Furthermore the optimal load capacity for the fractionation on Diaion[®] HP-20-material was elucidated. The optimal load capacity for the fractionation was 2,5g apple-pomace-extract per 15g polystyrene-material, according 0,17g per 1g. This result was controlled by analysis via thin layer chromatography and high performance liquid chromatography.

The main focus of the practical work was on the development of an appropriate method for the processing of elderberry-pomace. Based on the implementation of several extraction experiments, the extraction via Accelerated Solvent Extractor with MeOH 70% as solvent appeared to be appropriate.

To search for an appropriate column material, the next step was to compare the fractionation of elderberry-pomace-extract on Diaion[®]-HP-20- and Sephadex[®]-LH-20-material. Whereas the fractionation capacity of both materials was similar, the use of Diaion[®] HP-20 was convenient in moneyed and temporal interests.

As the processed pomace is interesting for the use as food supplement or medicinal product, a smaller expenditure has definitely economical advantages.

Consequently, polystyrene was used for the following up-scale of the fractionation of elderberry-pomace-extract. 30g of pomace-extract were fractionated via column chromatography resulting in the elution of 294 fractions, each of 100-200ml, which could be unified to 30 different samples.

As elderberry, due to the high content of polyphenols, is known to have radical scavenging and antioxidant activity, which has already been proved in several

pharmacological studies, the collected fractions will now be analyzed cell assay based on eNOS activity. Moreover, the active fractions have to be characterized phytochemically with appropriate methods.

9 Literaturverzeichnis

Agourram A., Ghirardello D., Rantsiou D., Zeppa G., Belviso S., Romane A., Oufdou K., Giordano M. (2013), Phenolic Content, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activities of Fruit and Vegetable By-Product Extracts. *International Journal of Food Properties*, 16(5), S.1092–1104.

Bagchi D., Roy S., Patel V., He G., Khanna S., Ojha N., Phillips C., Ghosh S., Bagchi M., Sen CK. (2006), Safety and whole-body antioxidant potential of a novel anthocyanin-rich formulation of edible berries. *Molecular and cellular biochemistry*, 281(1-2), S.197–209.

Barak V., Halperin T., Kalickman I. (2001), The effect of Sambucol, a black elderberry-based, natural product, on the production of human cytokines: I. inflammatory cytokines. *European Cytokine Network* (12)2, S. 290-296.

Belitz H.-D. Grosch W., Schieberle P. (2001), Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag, Heidelberg.

Bell D.R. (2005), Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal of Applied Physiology*, 100(4), S.1164–1170.

Bhushan S., Kalia K., Sharma M., Singh B., Ahuja PS. (2008), Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(4), S.285–296.

Blochwich H., The Anatomy of the Elder. Original Edition 1677, Re-Edited 2010, Berry Pharma AG, Lana.

Brønnum-Hansen K., Jacobsen F., Flink J.M. (1985), Anthocyanin colourants from elderberry (*Sambucus nigra* (L.)). 1. Process considerations for production of the liquid extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 20(6), S.703–711.

Brønnum–Hansen K., Hansen S.H. (1983), High performance liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Sambucus nigra* L. *Journal of Chromatography. A.*, 262, S. 385-392.

Cao X., Wang C., Pei H., Sun B. (2009), Separation and identification of polyphenols in apple pomace by high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A.*, 1216(19), S. 4268-4274.

Carson K. J., Collins, J. I., Penfield, M. P. (1994), Unrefined, Dried Apple Pomace as a Potential Food Ingredient. *Journal of Food Science*, 59(6), S.1213–1215.

Chatanta D.K., Attri C., Gopal K., Devi M., Gupta G., Bhalla T.C. (2008), Bioethanol Production from Apple Pomace left after Juice Extraction. *The Internet Journal of Microbiology*, 5(2).

Chrubasik, C., Chrubasik S. (2008), Schwarzer Holunder: Volkstümliche Anwendungen wissenschaftlich belegt. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 29(2), S.71–74.

Dawidowicz A.L., Wianowska D., Baraniak B. (2006), The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT - Food Science and Technology*, 39(3), S.308–315.

Diether E., Mali fructus. Verfügbar in: DrugBase, Hagers Enzyklopädie 2010, http://www.drugbase.de/de/datenbanken/hagers-enzyklopaedie/artikel.html?tx_crondavdbhager_pi%5Buid%5D=52194&cHash=4d5cacd59a14e11008445279531d9e2e, (September, 2013).

Einbond L.S., Reynertson K.A., Luo X.-D., Basile M.J., Kennelly E.J. (2004), Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, 84(1), S.23–28.

Fießinger A., Höhne F. (2012a), Neue Erkenntnisse über die Inhaltsstoffe des Apfels. Teil 1 –Primäre Inhaltsstoffe und Vitamine. Verfügbar auf: http://www.landwirtschaft-mv.de/cms2/LFA_prod/LFA/content/de/Fachinformationen/Obstbau/Kern-_und_Steinobst/Berichte/Inhaltsstoffe_des_Apfels_-_Teil_1/2012_05_Inhaltsstoffe_des_Apfels_-_Teil_1_211212.pdf, (Mai 2013).

Fießinger A., Höhne F. (2012b), Neue Erkenntnisse über die Inhaltsstoffe des Apfels. Teil 2 – Sekundäre Inhaltsstoffe und antioxidatives Potential von Apfelsorten. Verfügbar auf: http://www.landwirtschaft-mv.de/cms2/LFA_

prod/LFA/content/de/Fachinformationen/Obstbau/Kern-_und_Steinobst/Berichte/
Inhaltsstoffe_des_Apfels_-_Teil_2/2013_01_Inhaltsstoffe_des_Apfels_-
_Teil_2_040413.pdf, (Mai 2013).

Gridling M., Popescu R., Kopp B., Wagner K.H., Krenn L., Krupitza G. (2010),
Anti-leukaemic effects of two extract types of *Lactuca sativa* correlate with the
activation of Chk2, induction of p21, downregulation of cyclin D1 and acetylation
of α -tubulin. *Oncology Reports*, 23(4), S. 1145-51.

Gullon B., Falque E., Alonso J.L., Parajo J.C. (2007), Evaluation of apple pomace
as a raw material for alternative applications in food industries. *Food Technology
and Biotechnology*, 45(4), S.426–433.

Hallbach J. (2001), *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*. Thieme
Verlag, Stuttgart.

Hang Y.D., Woodams E.E. (1984), Apple pomace. A potential substrate for citric
acid production by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 6, S. 763-764.

Hänsel R., Sticher O. (2010), *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 9.,
überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Häusler M. (2013), Diplomarbeit, Universität Wien.

Hertog M.L., Kromhout D., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Fidanza F.,
Giampaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S. (1995), Flavonoid intake and
long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries
study. *Archives of Internal Medicine*, 155(4), S.381–386.

Hiermann A., *Sambuci fructus*. Verfügbar in: DrugBase, Hagers Enzyklopädie
2010, [http://www.justscience.de/de/drugbaseAbuja/hagers-enzyklopaedie/
artikel.html?tx_crondavdbhager_pi%5Buid%5D=53728&cHash=fa9a5954c1](http://www.justscience.de/de/drugbaseAbuja/hagers-enzyklopaedie/artikel.html?tx_crondavdbhager_pi%5Buid%5D=53728&cHash=fa9a5954c1), (Mai
2013).

HMPC/EMA (2013), Assessment report on *Sambucus nigra* L., fructus.

- Hong, V., Wrolstad R.E. (1990), Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), S.708–715.
- Kertesz Z.I., Eucare M., Fox G. (1959), A study of apple cellulose. *Journal of Food Science*, 24(1), S.14–19.
- King J.W. Grabel R.D., Wightman J.D. (2003), Subcritical water extraction of anthocyanins from fruit berry substrates. *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*. S. 409–418.
- Latscha H.P., Linti G.W., Klein H.A. (2003), Analytische Chemie: Chemie - Basiswissen III. 4., vollständig überarbeitete Auflage, Springer Verlag, Heidelberg.
- Lavelli V., Corti S. (2011), Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. *Food Chemistry*, 129(4), S. 1578-1583.
- Lee J., Finn C.E. (2007), Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14), S.2665–2675.
- Linskens H.F., Jackson J.F. (1999), Analysis of Plant Waste Materials. Springer Verlag, Heidelberg.
- Lu Y., Yeap Foo L. (2000), Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68(1), S.81–85.
- März L. (2011), Das Apfelhandbuch: Wissenswertes rund um den Apfel. Diplomica Verlag GmbH, Hamburg.
- Merck Millipore (2011), ChromBook-Your guide to a fascinating world of chromatography. Darmstadt.
- Mudge M. (2013), Flavonoid Content of Elderberry Collected in the Eastern United States. Dissertation, University of Missouri, Missouri.

Netzel G. (2011), Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und antioxidativen Kapazität von antioxidativ wirksamen Substanzen aus Rotwein, rotem Traubensaftkonzentrat, sortenreinem Apfelsaft und einem“ Antiox”-Getränk beim Menschen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Österreichisches Arzneibuch (2012), Amtliche Ausgabe 2012. Verlag Österreich, Wien.

Podsędek A., Wilska-Jeszka J., Anders B., Markowski J. (2000), Compositional characterisation of some apple varieties. *European Food Research and Technology*, 210(1), S. 268-272.

Price K.R., Prosser T., Richetin A.M.F., Rhodes M.J.C., (1999), A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chemistry*, 66(4), S.489-494.

Richter B.E, Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L. (1996), Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), S.1033–1039.

Rieger G., Müller M., Guttenberger H., Bucar F. (2008), Influence of Altitudinal Variation on the Content of Phenolic Compounds in Wild Populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), S.9080–9086.

Roschek B.Jr., Fink R.C., McMichael M.D., Li D., Alberte R.S. (2009). Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection *in vitro*. *Phytochemistry*, 70, S. 1255–1261.

Schieber A., Stintzing F.C., Carle R. (2001), By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), S.401–413.

Seabra I.J., Braga M.E.M., Batista M.T., Sousa H.C. (2008), Fractioned High Pressure Extraction of Anthocyanins from Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 3(5), S.674–683.

Seabra I.J., Braga M.E.M., Batista M.T., Sousa H.C. (2010a), Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *The Journal of Supercritical Fluids*, 54(2), S.145–152.

Seabra I.J. (2010b), Extraction of valuable compounds from agro-residues of elder (*Sambus nigra*), pine (*Pinus pinaster*) and tara (*Caesalpinia spinosa*). Dissertation, University of Coimbra, Coimbra.

Senser F., Scherz H., Kirchhoff E. (2009), Der kleine Souci-Fachmann-Kraut Lebensmitteltabelle für die Praxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

Sherma J., Fried B. (2003), Handbook of Thin-Layer Chromatography. Marcel Dekker Inc, New York.

Singhal K.K. Thakur S.S., Sharma D.D. (1991), Nutritive Value of Dried and Stored Apple Pomace and its Further Processing for Improved Utilization. *Indian Journal of Animal Nutrition*, 8(3), S.213–216.

Skoog D.A., Leary J.J. (2010), Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte – Anwendungen. Springer Verlag, Heidelberg.

Smollich M. (2007), Einführung in die pharmazeutische instrumentelle Analytik. Grin Verlag, Norderstedt.

Van der Sluis A.A., Dekker M., Skrede G., Jongen W.M. (2002), Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple Juice. 1. Effect of Existing Production Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), S.7211–7219.

Vallès J., Bonet M.A., Agelet A. (2004), Ethnobotany of *Sambucus nigra* L. in catalonia (Iberian Peninsula): The integral exploitation of a natural resource in mountain regions. *Economic Botany*, 58(3), S.456–469.

Vatai T., Škerget M., Knez Z. (2009), Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90(2), S.246–254.

- Voget C.E., Mignone C.F., Ertola R.J. (1985), Butanol production from apple pomace. *Biotechnology Letters*, 7(1), S.43–46.
- Wagner H., Blatt S. (2009), *Plant Drug Analysis*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Waldbauer K. (2013), Dissertation, Universität Wien, in Vorbereitung.
- Wichtl M. (2009), *Teedrogen und Phytopharmaka*, 5. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Wrolstad E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Sporns P. (2005), *Handbook of Food Analytical Chemistry. Pigments, Colorants, Flavors, Texture and Bioactive Food Components*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Prior R.L. (2004a), Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), S.4026–4037.
- Wu X., Gu L., Prior R.L., McKay S. (2004b), Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), S.7846–7856.
- Zakay-Rones Z., Thom E., Wollan T., Wadstein J. (2004), Randomized study of the efficacy and safety of oral elderberry extract in the treatment of influenza A and B virus infections. *Journal of International Medical Research*, 32, S.132-140.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Apfel-Trester	4
Abbildung 2: Holunder-Trester	5
Abbildung 3: Kalibrationskurve der Gallussäure in Wasser, Konzentrationsbereich 2,5 mg/l – 50 mg/l (<i>Waldbauer K., 2013</i>)	11
Abbildung 4: Partialstruktur von Diaion® HP-20 (http://www.diaion.com/en/products/chromato_synthesis_02.html , Mai 2013)	12
Abbildung 5: Partialstruktur von Sephadex® LH-20 (http://www.hindawi.com/isrn/pharmaceutics/2012/216068/fig1/ , Mai 2013)	13
Abbildung 6: Häufigste Polyphenole im Apfel-Trester (http://www.commons.wikimedia.org , Juni 2013; Strukturen zu einer Abbildung zusammengefügt)	26
Abbildung 7: Vergleich der EtOH 10%igen Fraktionen (Frakt. 1-5) zweier Säulen mit gleicher Extraktbeladung (2,5g). Die gleichen Fraktionen sind jeweils paarweise angeführt. DC entwickelt mit FM 4, besprüht mit ASS.	32
Abbildung 8: Vergleich der EtOH 96%igen Fraktionen (Frakt. 1-5) zweier Säulen mit gleicher Extraktbeladung (2,5g). Die gleichen Fraktionen sind jeweils paarweise angeführt. DC entwickelt mit FM 2, besprüht mit ASS.	33
Abbildung 9: Gegenüberstellung der Fraktionierung von Säulen mit unterschiedlicher Beladungsmenge an Apfel-Trester-Extrakt (a) und c): 2,5g Extrakt; b) und d): 7,5g Extrakt). a) EtOH 10%ige Fraktionen der beiden Säulen mit 2,5g Beladungsmenge (DC entwickelt mit FM 4, besprüht mit ASS). b) EtOH 10%ige Fraktionen der beiden Säulen mit 7,5g Beladungsmenge (DC entwickelt mit FM 4, besprüht mit ASS). c) EtOH 96%ige Fraktionen der beiden Säulen mit 2,5g Beladungsmenge (DC entwickelt mit FM 2, besprüht mit ASS). d) EtOH 96%ige Fraktionen der beiden Säulen mit 7,5g Beladungsmenge (DC entwickelt mit FM 2, besprüht mit ASS).	34
Abbildung 10: HPLC-Chromatogramm der Probe VF_EtOH 96% Säule 1, 5g- Extrakt; detektiert bei 280nm (vgl. Bedingungen Seite 16)	35
Abbildung 11: HPLC-Chromatogramme der vereinigten Fraktionen, welche alle die gleichen acht charakteristischen Peaks bei etwa der selben Retentionszeit aufweisen; detektiert bei 280nm (vgl. Bedingungen Seite 16)	36
Abbildung 12: Phloridzin-Kalibrationskurve (Fläche/Konzentration) zur Berechnung der Phloridzinkonzentration in den Fraktionen.....	39
Abbildung 13: Phloridzinmenge der vereinigten apolaren Fraktionen (mg/g Fraktion). Aufgetragene Extraktmengen für die Fraktionierung betragen 1g, 2,5g, 5g und 7,5g Extrakt-Durchführung von jeweils zwei Parallelversuchen.	41

Abbildung 14: Vergleich der Fraktionen von Holunder-Trester-Extrakt, erhalten durch die Auftrennung an den Säulenmaterialien Sephadex LH-20 [®] (Abb. a und c) sowie Diaion [®] HP-20 (Abb. b und d). Die Entwicklung der DC erfolgte mit Fließmittel 2 (vgl. Seite14) und wurde mit ASS-Reagenz (vgl. Seite 14) besprüht. Auswertung der DCs unter Tageslicht und UV-Licht bei 366nm.	53
Abbildung 16: Schema der Zusammenfassung von Fraktionen mit identen Inhaltsstoffen; 19 Fraktionen werden zu vier Sammelfraktionen vereinigt.	56
Abbildung 17: Vergleich der Fraktion 126 mit den Referenzsubstanzen Isoquercetin (Isoqu.), Avicularin (Avicul.) und Rutin. Die Entwicklung der DC erfolgte mit Fließmittel 2 (vgl. Seite14) und wurde mit ASS-Reagenz (vgl. Seite 14) besprüht. Auswertung der DC unter Tageslicht und UV-Licht bei 366nm.	57
Abbildung 18: Vergleich der Fraktionen 226-228 mit Ursolsäure (Ursols.) und Sitosterin (Sitost.). Die Entwicklung der DC erfolgte mit Fließmittel 3 (vgl. Seite14) und wurde mit ASS-Reagenz (vgl. Seite 14) besprüht. Auswertung der DC unter Tageslicht.	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der Apfelfrucht.....	20
Tabelle 2: Inhaltsstoffe des Apfel-Tresters.....	23
Tabelle 3: Massen, Konzentrationen von Flavonoiden und Chlorogensäure (mg/kg fw) sowie antioxidative Aktivität von Äpfeln, Apfel-Trester und Apfelsaft (<i>Van der Sluis A. A. et al, 2002</i>)	24
Tabelle 4: Gesamtphenolgehalt (mg GAE/g Extrakt) in fünf mittels ASE hergestellten Extrakten	29
Tabelle 5: Droge-Extrakt-Verhältnisse der 5 Apfel-Trester-Extrakte	29
Tabelle 6: Massen der polaren und apolaren Fraktionen nach säulenchromatographischer Auftrennung verschiedener Extraktmengen.	31
Tabelle 7: Relativer Flächenanteil der acht Peaks in den Chromatogrammen der vereinigten apolaren Fraktionen. Die acht Peaks werden als 100% angenommen und die sich dadurch ergebende prozentuelle Verteilung angegeben.....	37
Tabelle 8: Phloridzinmenge der vereinigten apolaren Fraktionen in mg/g Fraktion	39
Tabelle 9: Häufigste Polyphenole im Holunder-Trester (Seabra, I.J. et al., 2010; übersetzt).....	44
Tabelle 10: Inhaltsstoffe der Holunderbeere (HMPC/EMA, 2013; übersetzt und ergänzt)	45
Tabelle 11: Vergleich der Droge-Extrakt-Verhältnisse von Holunder-Trester- Extrakten, die mit verschiedenen Lösungsmitteln beziehungsweise - gemischen erhalten wurden.	50
Tabelle 12: Fraktionsliste des aufgetrennten Holunder-Trester-Extraktes	58

Curriculum Vitae

Angaben zu meiner Person:

Name: Christiane Brenner
Geburtsort: Wien
Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung:

1999 – 2007 BRG 19 Krottenbachstraße 11-13, 1190 Wien
Juni 2007 Matura mit ausgezeichnetem Erfolg
Seit Oktober 2007 Studium der Pharmazie an der Universität Wien
April 2009 1.Diplomprüfung
Juni 2012 – Jänner 2013 Experimenteller Teil der Diplomarbeit, Universität
Wien, Department Pharmakognosie
Juni 2013 2.Diplomprüfung