



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Aufreinigung von Apfeltrestern und  
begleitende Analytik“

Verfasserin

Maria Häusler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

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



## **Danksagung**

Ich danke Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. Univ.-Prof. Brigitte Kopp für die freundliche Unterstützung bei der praktischen Arbeit und beim Verfassen der Diplomarbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Mag. Katharina Waldbauer, die jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mich immer unterstützt hat. Vielen Dank für die Freundschaft, das ausgezeichnete Arbeitsklima, die vielen Hilfestellungen und Ratschläge!

Michael Blaschke, Florian Gössnitzer und Andreas Schinkowitz möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre motivierenden Worte danken.

Danke an Daniel Schimani für die Hilfe bei graphischen Fragen und Christian Häusler für die Erstellung der Arbeit.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die Ermöglichung des Studiums und die freundliche Unterstützung zu jeder Zeit!

Außerdem möchte ich mich bei Elmar bedanken, der mir während meines Studiums immer hilfreich zur Seite gestanden ist.



## Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung .....	1
1.1. Allgemeines über Apfeltrester .....	2
1.1.1. Bisherige Verwendung und Verwertungsmöglichkeiten von Apfeltrester	3
1.2. Inhaltsstoffe.....	4
1.2.1. Pektin.....	4
1.2.2. Gesamtpolyphenole .....	4
1.2.2.1. Struktur von Polyphenolen .....	10
1.2.2.2. Phenolische Strukturen im Apfel.....	10
1.2.2.3. Pharmakologische Wirkungen .....	12
1.2.2.4. <i>in vitro</i> -Wirkungen .....	14
1.2.2.5. Tierversuche .....	15
1.2.2.6. Humanstudien .....	16
2. Material und Methoden .....	18
2.1. Trester .....	18
2.1.1. Apfeltrester von „Stift Klosterneuburg“.....	18
2.1.2. Apfeltrester der Firma „Rauch Fruchtsäfte GmbH & Co OG“ .....	18
2.1.3. Chemikalien .....	19
2.1.4. Reinsubstanzen .....	19
2.2. Geräte .....	20
2.2.1. Gefriertrocknungsanlage.....	20
2.2.2. Ultra-Zentrifugalmühle.....	20
2.2.3. Accelerated Solvent Extractor (ASE 200).....	20
2.2.4. Säulenchromatographie .....	200
2.2.5. Dünnschichtchromatographie (DC) .....	21
2.2.6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	22
2.2.7. Spektrophotometer.....	23
2.3. Methoden .....	24
2.3.1. Probenvorbereitung.....	24

2.3.2. Extraktion der Proben mittels Accelerated Solvent Extractor (ASE) .....	24
2.3.3. Fraktionierung mittels Säulenchromatographie .....	25
2.3.4. Analyse mittels Dünnschichtchromatographie (DC) .....	25
2.3.5. Analyse der Sammelfraktionen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	26
2.3.6. Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu .....	28
2.3.7. Restfeuchtegehalt der ofengetrockneten/lyophilisierten Apfeltresterproben .....	31
3. Ergebnisse .....	32
3.1. Herstellung und Charakterisierung der Rohextrakte.....	32
3.1.1. Extraktausbeute.....	32
3.1.2. Restfeuchtegehalt.....	33
3.1.3. Gesamtpolyphenolgehalt .....	33
3.2. Fraktionierung der Rohextrakte.....	34
3.2.1. Säulenchromatographie – Analyse mittels DC .....	34
3.2.2. Gesamtpolyphenolgehalt der Sammelfraktionen.....	38
3.2.3. Analyse und Quantifizierung der Fraktionen mittels HPLC.....	40
4. Diskussion .....	49
5. Zusammenfassung .....	52
6. Summary .....	54
7. Literaturverzeichnis.....	56
Curriculum vitae.....	65

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
DC	Dünnschichtchromatographie
d.w.	Trockengewicht, dry weight
et al.	und andere (et alii)
EW	Einwaage
e.V.	eingetragener Verein
ed.	Edition
GAE	Gallussäure-Äquivalent
GC	Gaschromatographie
f.w.	Frischgewicht, fresh weight
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kf	Korrekturfaktor
µl	Mikroliter
MS	Massenspektrometrie
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
n.d.	not detectable, nicht detektierbar
o.J.	ohne Jahresangabe
PO	Probe „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet, gepresst in Putzing)
PL	Probe „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, gepresst in Putzing)
Rf-Wert	Retentionsfaktor
RO	Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)
RL	Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert)
SD	standard deviation, Standardabweichung
Tab.	Tabelle
UV/VIS	Ultraviolettes/Sichtbares Licht
vgl.	vergleiche
w/w %	Massenprozent
z.B.	zum Beispiel





## 1. Einleitung

Die Nutzung von Wertstoffen aus pflanzlichen Reststoffen der Lebensmittelindustrie gewinnt zunehmend sowohl wirtschaftlich als auch ernährungsphysiologisch an Bedeutung (Sánchez-Rabaneda F. et al. 2004). Pflanzliche Reststoffe fallen jährlich in großen Mengen an, in der EU sind es etwa 30 Millionen Tonnen (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. 2011). Eine effektive Abfallverwertung ist bei dieser Menge eine Herausforderung und schafft die Überlegung, auch aus den Rückständen noch vorhandene Wertstoffe zu gewinnen und durch geeignete Extraktionsverfahren weiterzuverarbeiten (Wijngaard H.H. et al. 2010).

Apfeltrester fällt in der Fruchtsaftindustrie tonnenweise an und stellt eine natürliche Quelle wertvoller Inhaltsstoffe dar (Wijngaard H.H. et al. 2010; Vendruscolo F. et al. 2008). Dazu gehören Polyphenole, welche eine bedeutende Rolle in der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen spielen dürften (Pfannhauser W. et al. 2001). Aus epidemiologischen Studien ist zu entnehmen, dass eine an Obst und Gemüse reiche Ernährung, somit eine polyphenolreiche Kost, das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse senkt (Vita J.A. 2005; Manach C. et al. 2005; Goldberg G. ed. 2003; Stanner S. ed. 2005). Polyphenole neutralisieren u.a. freie Radikale, wirken entzündungshemmend und sind krebsvorbeugend (Sesso H. et al. 2003).

Die vorliegende Arbeit entstand zur Unterstützung eines Projekts des Initiativkollegs BioProMoTION der Universität Wien. Dabei werden Wirkungen von Extrakten auf eNOS-Aktivität aus verschiedenen Fruchttrestern mit Hilfe eines etablierten Zellassays *in vitro* getestet (Waldbauer K. 2014).

Das Ziel der Arbeit besteht darin, Extrakte aus verschiedenen Apfeltrestern zu gewinnen, um daraus Fraktionen zu erhalten, die der Zellassay-basierten Isolierung wirksamer Substanzen dienen. Zur Charakterisierung der Fraktionen wurden der Gesamtphenolgehalt bestimmt und die für Apfeltrester charakteristischen Flavonoide mittels Hochleistungsflüssigkeits- und Dünnschichtchromatographie analysiert.

## 1.1. Allgemeines über Apfeltrester

Apfeltrester ist jener Rückstand, der bei der Apfelsaft- und Apfelweinerzeugung anfällt. Er enthält Schale, Kerne, Kerngehäuse, Blütenkelche, Stängel und weiches Zellgewebe des Apfels (Cao X. et al. 2009). Jährlich entstehen mehrere Millionen Tonnen Apfeltrester weltweit (Bhushan S. et al. 2008, vgl. Tab. 1).

Land	Menge (in Tonnen)	Literatur
Spanien	200 000	Gullón B. et al. (2007)
Deutschland	250 000	Endreß H.-U. (2000)
Neuseeland	20 000	Lu Y. und Foo L.Y. (1998)
Brasilien	14 000	Villas-Bôas S.G. et al. (2003)
Iran	97 000	Pirmohammadi R. et al. (2006)
Japan	160 000	Takahashi J. und Mori T. (2006)
USA	27 000	Roberts J.S. et al. (2004)

Tabelle 1: Übersicht über die Menge an entstehendem Apfeltrester bei der Apfelsaft- und Apfelweinerstellung weltweit (Bhushan S. et al. 2008)

In Deutschland beispielsweise werden zwischen 400 und 750 Mio. Liter Apfelsaft pro Jahr hergestellt, wobei bis zu 250 000 Tonnen Apfeltrester entstehen (Endreß H.-U. 2000; Cao X. et al 2009; Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e.V. 2009). Bei einer üblichen Apfelsaftherstellung fallen 75% des Apfel-Frischgewichtes als Saft und 25% als Trester an (Shah G.H. und Masoodi F.A. 1994). Aufgrund der großen Menge dieses Reststoffs werden vielfach Überlegungen angestellt, um die Trester sinnvoll zu verwerten (Schalow S. 2009).

Durch den hohen Feuchtigkeitsgehalt (70 – 75%) sind die Apfeltrester voluminös, anfällig für den Befall von Mikroorganismen und deshalb schwierig zu lagern (Bhushan S. et al 2008). Aus diesem Grund wird immer noch ein Großteil des Apfeltresters direkt entsorgt, wobei gesundheitsfördernde Moleküle wie die erwähnten Polyphenole verlorengehen. Folglich erscheint es sinnvoll, die Rückstände einer Weiterbehandlung zu unterziehen, um so deren wertvolle Stoffe zu gewinnen und für protektive Effekte im Bereich der Gesundheit zu nutzen (Wijngaard H.H. et al. 2010).

Folgende Stoffgruppen wurden in Apfeltrestern nachgewiesen  
(Bhushan S. et al. 2008):

- Pektin
- Mineralien [P, K, Mn, Ca, Mg, Fe], (Kennedy M.J. et al. 1994)
- Vitamine [A und C], (Kennedy M.J. et al. 1994)
- Proteine (Kennedy M.J. et al. 1994)
- ubiquitäre Zucker [v.a. Arabinose, Galaktose, Glucose, Rhamnose, Xylose], (Mehrländer K. et al. 2002)
- Triterpene [Ursolsäure u.a.], (Bhushan S. et al 2008)
- Polyphenole (Schieber A. et al. 2002; Guyot S. et al. 2007)

### **1.1.1. Bisherige Verwendung und Verwertungsmöglichkeiten von Apfeltrester**

Allgemein werden Apfeltrester verwendet

- zur Pektinengewinnung (Schieber A. et al. 2003)
- als Beimischung in Tierfuttermittel (Sehm J. et al. 2007; Joshi V.K. et al. 2000)
- zur Enzymherstellung [Polygalacturonase], (Berovic M. und Ostroversnik H. 1997; Favela-Torres E. et al. 2006)
- als Substrat für mikrobiologisches Wachstum und somit für die Herstellung wertvoller Produkte wie organische Säuren (z.B. Zitronensäure), Biogas, Ethanol, Farbstoff und Bäckerhefe (Hang Y.D. et al. 1981; Hang Y.D. und Woodams E.E. 1984; Hang Y.D. 1987; Kalia V.C. et al. 1992; Wiacek-Zychliniska A. 1994; Shojaosadati S.A. 2002; Bhushan S. und Joshi V.K. 2006; Attri D. und Joshi V.K. 2006; Gullón B. et al. 2007)
- und, wichtig für die vorliegende Arbeit, für die Rückgewinnung von Polyphenolen aus Pflanzenextrakten (Bhushan S. et al 2008; Djilas S. et al. 2009)

## **1.2. Inhaltsstoffe**

### **1.2.1. Pektin**

Pektin ist ein natürlicher Bestandteil der Zellwände und der Mittellamellen von Pflanzen. Dort sorgt es für den Zusammenhalt und die Stabilisierung der Gewebe und Zellen. Es ist ein Heteropolysaccharid und besteht aus einer Hauptkette, die Galakturonsäure enthält, und Seitenketten mit Neutralzuckern wie Arabinose und Galaktose. Die Bausteine der Hauptkette können mit Methanol verestert sein, wodurch Pektine mit unterschiedlichen Veresterungsgraden entstehen. Durch Veränderung verschiedener Parameter entsteht eine Palette an Produkten für eine vielseitige Anwendung (Herbstreith & Fox KG).

Aus industrieller Sicht hat Pektin als Inhaltsstoff die größte Bedeutung im Apfeltrester (Endreß H.-U. 2000; Muralikrishna G. und Taranathan R.N. 1994). In der Nahrungsmittelindustrie wird es vor allem als Verdickungsmittel (Geliermittel) eingesetzt (Thakur B.R. et al. 1997). Pharmazeutisch wird es unter anderem verwendet, um den Blutcholesterinspiegel zu senken (Delbarre F. et al. 1977; Cedra J.J. et al. 1988). Intravenös verabreicht verkürzt Pektin die Koagulationszeit des Blutes bei Hämorrhagie und lokalen Blutverlusten (Joseph G.H. 1956). Außerdem zeigte Kohn R. (1982), dass Pektin bei Vergiftungen mit toxischen Kationen wie Blei diese durch Komplexbildung aus dem Blut entfernen kann. Aufgrund der großen Wasserbindungskapazität vermittelt Pektin ein Sättigungsgefühl, welches zu verringertem Nahrungskonsum und zur Gewichtsabnahme führt (Schwartz S.E. et al. 1983). Schieber A. et al. (2003) beschreiben ein Verfahren, wie die Gewinnung von Polyphenolen ohne großen Aufwand in die bereits bekannte Pektinproduktion integriert werden kann. Es sind aber weitere Studien hinsichtlich Stabilität und Verwendung der so gewonnenen Polyphenole nötig.

### **1.2.2. Gesamtpolyphenole**

Ihre pharmazeutische Bedeutung haben Polyphenole in Zusammenhang mit der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen (Van der Sluis A.A. et al 2001). Sie zeigen antioxidative Aktivität *in vitro* (Lu Y. und Foo L.Y. 2000) und protektive Effekte bei Erkrankungen assoziiert mit oxidativem Stress wie Herz-Kreislauf-

Erkrankungen, Krebs und Entzündungen (Hollman P.C.H. et al. 2001; Scalbert A. et al. 2005; Cody V. et al. 1986) sowie bei koronaren Herzerkrankungen (Joshiyura K. et al. 2001). Eine gesunde Lebensweise und polyphenolhaltige Ernährung können z.B. 30% aller Krebsarten vorbeugen (Willet W. 1995; Vanden Berghe W. 2012).

Polyphenole sind in Obst und Gemüse enthalten und können in über 8000 verschiedenen Komponenten auftreten, um die Pflanzen vor UV-Strahlung, pathogenen oder organischen Schäden zu schützen (Middleton E.Jr. et al. 2000). Reiche Quellen für Polyphenole sind neben Gemüse und Obst auch Getreide, Kakao, Rotwein, Tee, Kaffee und viele Gewürze (Michalska M. et al 2010; Weichselbaum E. und Buttriss J.L. 2010).

Abhängig von Sorte, Lagerung und klimatischen Bedingungen variieren Zusammensetzung und Menge der phenolischen Komponenten zwischen den verschiedenen Arten und den unterschiedlichen Teilen der Äpfel (Kahle K. et al. 2007; Guyot S. et al. 2003; Golding J. 2001). Nicht nur die Intensität und Art der Lichteinstrahlung ist wichtig bei der Entwicklung der Äpfel, sondern auch Kultur, Temperatur, Reifegrad, Bodenbeschaffenheit und Lagerungsbedingungen (Van der Sluis A.A. et al. 2001; Escarpa A. und Gonzalez M.C. 1998; Lancaster J.E. 2000). Aufgrund der verschiedenen Arten und Anbaubedingungen sind die Werte über den Gehalt an Polyphenolen in der Literatur recht unterschiedlich und dadurch schwierig zu vergleichen (Stracke B.A. et al. 2009; Tsao R. et al 2005). Außerdem enthalten z.B. Schale und Kerne höhere Konzentrationen als das Fruchtfleisch (Vrhovsek U. et al. 2004; Awad M. et al. 2000; Dick A.J. et al. 1987; Lamperi L. et al. 2008).

In den Tabellen 2 – 5 (vgl. Seiten 6 – 9) sind Gesamtphenolgehalte von Äpfeln zusammengefasst, ermittelt mithilfe der Methode nach Folin-Ciocalteu bzw. mithilfe von Hochleistungsflüssigchromatographie-Methoden (HPLC-Methoden).

Dabei wurden bei Verwendung der Methode nach Folin-Ciocalteu zur Bestimmung der Gesamtphenole als Referenzen Gallussäure, Chlorogensäure, Catechin und Epicatechin verwendet. Bei der Berechnung auf das Trockengewicht untersuchten Rössle C. et al. (2010) in zwei aufeinanderfolgenden Jahren Apfelspalten von fünf Sorten und erhielten bei vier von diesen im Jahr 2008 höhere Gesamtphenolge-

halte als das Jahr zuvor. Bei Huber G.M. und Rupasinghe H.P.V. (2009) enthielten Apfelspalten größere Polyphenolkonzentrationen als Apfelschalen. Suárez B. et al. (2010) untersuchten Apfeltrester und fanden mit verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedliche Gesamtphenolgehalte (6,5 mg/g im Aceton-extrakt; 3,6 mg/g im Methanolextrakt). Höhere Gehalte an Polyphenolen zeigten sich bei García Y. et al. (2009) mit 3,9 – 13,9 mg/g in Apfeltrestern der Cider-Industrie und 5,5 – 10,9 mg/g in Einzelkultur-Apfeltrestern (vgl. Tab. 2).

Material	Gesamtphenole in mg/g	Methode	Literatur
Apfeltrester (Acetonextrakt)	6,5	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Suarez B. et al. (2010)
Apfeltrester (Methanolextrakt)	3,6	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Suarez B. et al. (2010)
Apfeltrester industriell 5 Sorten	3,9 - 13,9	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	García Y. et al. (2009)
Apfeltrester Einzelkultur 6 Sorten	5,5 - 10,9	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	García Y. et al. (2009)
Apfeltrester	6,5	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Savatović S.M. et al. (2009)
Apfeltrester (Jonagold)	8,5	Folin-Ciocalteu (Chlorogensäure)	Četković G. et al. (2008)
Apfeltrester (Pinova)	8	Folin-Ciocalteu (Chlorogensäure)	Četković G. et al. (2008)
Apfeltrester (Reinders)	8,7	Folin-Ciocalteu (Chlorogensäure)	Četković G. et al. (2008)
Apfeltrester (Iduna)	6,5	Folin-Ciocalteu (Chlorogensäure)	Četković G. et al. (2008)
Apfeltrester (Braeburn)	5,6	Folin-Ciocalteu (Chlorogensäure)	Četković G. et al. (2008)
Apfeltrester 11 Kulturen	2,3 - 8,6	Folin-Ciocalteu (Catechin)	Sato et al. (2010)
Apfelschale (Dolgo)	0,3	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelschale (Red Delicious)	0,3	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelschale (Northern Spy)	0,2	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelschale (Cortland)	0,2	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelschale (Royal Gala)	0,2	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelspalten Braeburn (2007)	11,8	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Braeburn (2008)	12,4	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Cortland (2007)	11,6	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Cortland (2008)	12,5	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Gloster (2007)	13,3	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Gloster (2008)	16	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Idared (2007)	18,5	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Idared (2008)	14,9	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Jonica (2007)	14,6	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Jonica (2008)	15,8	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Rössle C. et al. (2010)

Tabelle 2: Gesamtphenolgehalte bestimmt mittels Methode nach Folin-Ciocalteu im Apfel, berechnet auf das Trockengewicht (d.w.)

Bei Nutzung der HPLC als Bestimmungsmethode für die Gesamtpolyphenole wurde vorwiegend ein Diodenarray-Detektor für die Detektion verwendet. Als mobile Phase A diente meist Essigsäure (2% - 2,5%) oder Ameisensäure (0,1%) in Wasser und als mobile Phase B Acetonitril oder Methanol. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte meist anhand der Retentionszeiten oder durch einen Vergleich der UV/Vis-Spektren von Referenzstandards. Unbekannte Komponenten wurden durch andere spektrale Eigenschaften bzw. Literaturdaten identifiziert. Einige Hauptkomponenten sind Phloridzin, Chlorogensäure, Procyanidin B2, Epicatechin und Quercetin. Zur Quantifizierung wurden Kalibrationskurven mit externen Standards verwendet: Phloridzin für Dihydrochalkone (bei 280 nm beobachtet), Chlo-

rogensäure für Hydroxyzimtsäuren (bei 320 nm beobachtet), Quercetin für Flavonole (bei 350 nm beobachtet), Cyanidin-Glykoside für Anthocyanine (bei 520 nm beobachtet).

Huber G.M. und Rupasinghe H.P.V. (2009) untersuchten Apfelschalen verschiedener Sorten und erhielten mithilfe der HPLC-Methoden größere Gesamtpolyphenolkonzentrationen (z.B. Dolgo 6,4 mg/g) als mithilfe der Methoden nach Folin-Ciocalteu (z.B. Dolgo 0,3 mg/g). Bei Schieber A. et al. (2003) enthielten Apfeltrester mit 2,4 mg/g etwas größere Mengen an Polyphenolen als Apfelsamen mit 2,2 mg/g. Rössle C. et al. 2010 untersuchten Apfelspalten verschiedener Sorten von zwei aufeinanderfolgenden Jahren (2007 und 2008) und ermittelten mithilfe der HPLC geringfügige Unterschiede im Gesamtphenolgehalt (vgl. Tab. 3).

Material	Gesamtphenole in mg/g	Literatur
Apfelsamen	2,2	Schieber A. et al. (2003)
Apfeltrester	2,4	Schieber A. et al. (2003)
Apfeltrester	7,2	Lu Y. & Foo L.Y. (1997)
Apfeltrester industriell 5 Sorten	1,1 - 4,4	García Y. et al. (2009)
Apfeltrester Einzelkultur 6 Sorten	4,7 - 5,9	García Y. et al. (2009)
Apfelschale (Dolgo)	6,4	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelschale (Red Delicious)	3,8	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelschale (Northern Spy)	4,1	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelschale (Cortland)	3,2	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelschale (Royal Gala)	4,8	Huber G.M. & Rupasinghe H.P.V. (2009)
Apfelspalten Braeburn (2007)	9,6	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Braeburn (2008)	10,8	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Cortland (2007)	10,5	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Cortland (2008)	10,9	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Gloster (2007)	14,3	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Gloster (2008)	17,1	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Idared (2007)	18	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Idared (2008)	12,4	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Jonica (2007)	13,3	Rössle C. et al. (2010)
Apfelspalten Jonica (2008)	14,5	Rössle C. et al. (2010)

Tabelle 3: Gesamtphenolgehalte bestimmt mittels HPLC im Apfel, berechnet auf das Trockengewicht (d.w.)

Einen Gesamtphenolgehalt von 12 mg/g berechnet auf das Frischgewicht fanden Leontowicz H. et al. (2002) in Apfelschalen, bestimmt mittels der Folin-Ciocalteu Methode. Verglichen mit diesem Wert waren bei Wolfe K. et al. (2003) die Konzentrationen mit 3,1 – 5,9 mg/g und bei Tsao R. et al. (2003) mit 1,3 – 2,0 mg/g deutlich geringer. Tsao R. et al. (2003) konnten feststellen, dass der Gesamtphenolgehalt im Fruchtfleisch von Äpfeln unter dem in Apfelschalen lag.

Vieira F.G.K. et al. (2009) untersuchten Schale, Fruchtfleisch und Gesamthaut und ermittelten, dass die Konzentrationen in der Schale mit 5,7 – 6,4 mg/g deutlich höher waren als im Fruchtfleisch mit 1,4 – 2,2 mg/g und in der gesamten Frucht mit 1,7 – 2,3 mg/g. Lamperi L. et al. (2008) fanden in Apfelschalen vergleichbare

Werte (4,0 – 7,4 mg/g) und konnten geringfügige Unterschiede der Konzentrationen von ausgewählten Sorten in verschiedenen Regionen feststellen. Der Polyphenolgehalt in der gesamten Frucht war bei Scalbert A. und Williamson G. (2000), Boyer J. und Liu R.H. (2004) und bei Hamauzu Y. et al. (2005) geringer als in Apfelschalen (vgl. Tab. 4).

Material	Gesamtphenole in mg/g	Methode	Literatur
Apfelschalen	12	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Leontowicz H. et al. (2002)
Apfelschalen (Idared)	5,9	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Wolfe K. et al. (2003)
Apfelschalen (Rome Beauty)	5	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Wolfe K. et al. (2003)
Apfelschalen (Cortland)	3,9	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Wolfe K. et al. (2003)
Apfelschalen (Golden Delicious)	3,1	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Wolfe K. et al. (2003)
Apfelschalen (Cortland)	1,3	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Tsao R. et al. (2003)
Apfelschalen (Red Delicious)	2	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Tsao R. et al. (2003)
Apfelschalen (Northern Spy)	1,6	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Tsao R. et al. (2003)
Schale (Fuji)	5,8	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Vieira F.G.K. et al. (2009)
Schale (Epagri COOP24)	5,7	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Vieira F.G.K. et al. (2009)
Schale (Epagri F5P283)	6,4	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Vieira F.G.K. et al. (2009)
Schale (Golden Delicious, 3 verschiedene Regionen)	4 5,3	Folin-Ciocalteu (Catechin) Folin-Ciocalteu (Catechin)	Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008)
Schale (Annurca, 3 verschiedene Regionen)	4,5 5,7 6,1	Folin-Ciocalteu (Catechin) Folin-Ciocalteu (Catechin) Folin-Ciocalteu (Catechin)	Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008)
Schale (Red Chief, 2 verschiedene Regionen)	7,4 6,4 5,7	Folin-Ciocalteu (Catechin) Folin-Ciocalteu (Catechin) Folin-Ciocalteu (Catechin)	Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008)
Schale (Stayman Neepling, 2 verschiedene Regionen)	5,8 5,5	Folin-Ciocalteu (Catechin) Folin-Ciocalteu (Catechin)	Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008)
Schale (Jeanne Renard)	6	Folin-Ciocalteu (Epicatechin)	Sanoner P. et al. (1999)
Schale (Chevalier Janne)	3,8	Folin-Ciocalteu (Epicatechin)	Sanoner P. et al. (1999)
Schale (Kermerrien)	3,6	Folin-Ciocalteu (Epicatechin)	Sanoner P. et al. (1999)
Äpfel ohne Schale	6,8	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Leontowicz H. et al. (2002)
Fruchtfleisch (Cortland)	0,5	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Tsao R. et al. (2003)
Fruchtfleisch (Red Delicious)	0,5	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Tsao R. et al. (2003)
Fruchtfleisch (Northern Spy)	0,8	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Tsao R. et al. (2003)
Fruchtfleisch (Fuji)	1,4	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Vieira F.G.K. et al. (2009)
Fruchtfleisch (Epagri COOP24)	1,7	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Vieira F.G.K. et al. (2009)
Fruchtfleisch (Epagri F5P283)	2,2	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Vieira F.G.K. et al. (2009)
Gesamte Frucht (Fuji)	1,7	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Vieira F.G.K. et al. (2009)
Gesamte Frucht (Epagri COOP24)	1,8	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Vieira F.G.K. et al. (2009)
Gesamte Frucht (Epagri F5P283)	2,3	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Vieira F.G.K. et al. (2009)
Gesamte Frucht	2,2	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Scalbert A. & Williamson G. (2000)
Gesamte Frucht (10 Sorten)	1,1 - 2,3	Folin-Ciocalteu (Gallussäure)	Boyer J. & Liu R.H. (2004)
Gesamte Frucht (Fuji)	0,6	Folin-Ciocalteu (Epicatechin)	Hamauzu Y. et al. (2005)

Tabelle 4: Gesamtphenolgehalte bestimmt mittels Methode nach Folin-Ciocalteu im Apfel, berechnet auf das Frischgewicht (f.w.)

Lamperi L. et al. (2008) untersuchten die Schalen von Äpfeln und erhielten mithilfe der HPLC (2,3 – 5,8 mg/g) geringere Werte als mittels der Methode nach Folin-Ciocalteu (4,0 – 7,4 mg/g). Bei Sanoner P. et al. (1999) lieferten beide Methoden nur geringfügig unterschiedliche Ergebnisse (Folin-Ciocalteu: 3,8 – 6,0 mg/g und HPLC: 3,8 – 7,0 mg/g). Tsao R. et al. (2003) fanden mithilfe der HPLC größere Konzentrationen in Apfelschalen (1,7 – 2,4 mg/g) als im Fruchtfleisch (0,5 – 1,0 mg/g). Auch bei Scalbert A. und Williamson G. (2000) betrug der



Polyphenolgehalt, ermittelt mithilfe der HPLC, in der gesamten Frucht weniger als in Apfelschalen (vgl. Tab. 5).

Material	Gesamtphenole in mg/g	Literatur
Schale (Golden Delicious, 3 verschiedene Regionen)	2,3 4	Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008)
	2,6	Lamperi L. et al. (2008)
Schale (Annrca, 3 verschiedene Regionen)	4,1 4,9	Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008)
	5,8	Lamperi L. et al. (2008)
Schale (Red Chief, 2 verschiedene Regionen)	5,3 3,3	Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008)
Schale (Stayman Neepling, 2 verschiedene Regionen)	4,3 3,5	Lamperi L. et al. (2008) Lamperi L. et al. (2008)
Schale (Jeanne Renard)	7	Sanoner P. et al. (1999)
Schale (Chevalier Janne)	3,8	Sanoner P. et al. (1999)
Schale (Kermerrien)	4,5	Sanoner P. et al. (1999)
Apfelschalen (Cortland)	1,7	Tsao R. et al. (2003)
Apfelschalen (Red Delicious)	2,4	Tsao R. et al. (2003)
Apfelschalen (Northern Spy)	2,1	Tsao R. et al. (2003)
Fruchtfleisch (Cortland)	0,5	Tsao R. et al. (2003)
Fruchtfleisch (Red Delicious)	0,5	Tsao R. et al. (2003)
Fruchtfleisch (Northern Spy)	0,9	Tsao R. et al. (2003)
Gesamte Frucht (Jonagold)	0,5	Van der Sluis A.A. et al. (2001)
Gesamte Frucht (Golden Delicious)	0,4	Van der Sluis A.A. et al. (2001)
Gesamte Frucht (Elstar)	0,3	Van der Sluis A.A. et al. (2001)
Gesamte Frucht	1,2	Scalbert A. & Williamson G. (2000)

Tabelle 5: Gesamtphenolgehalte bestimmt mittels HPLC im Apfel, berechnet auf das Frischgewicht (f.w.)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in Apfeltrester größere Gesamtpolyphenolgehalte pro Gramm vorkommen als in Apfelschalen oder in der gesamten Frucht. Die Methoden zur Ermittlung der Gehalte bergen Unterschiede, wobei mit der Methode nach Folin-Ciocalteu tendenziell höhere Werte gefunden wurden als mithilfe der HPLC. Der Vergleich der Gehalte bei Berechnung auf das Frischgewicht bzw. auf das Trockengewicht beider Methoden zeigt, dass bei Ermittlung der Gehalte auf das Frischgewicht teilweise höhere Werte als erwartet auftraten. Eine Erklärung dafür wäre möglicherweise die geringere Zersetzung der Polyphenole im frischen Obst oder die gleichzeitige Erfassung weiterer Substanzen.

Im Apfelsaft sind meist nur 3 – 10% der Polyphenole der gesamten Frucht enthalten. Die Vielzahl der Inhaltsstoffe verbleibt im Apfeltrester, weshalb dieser zu einer interessanten natürlichen Quelle für die Gewinnung und Nutzung phenolischer Komponenten wird (Van der Sluis A.A. 2002). Beim Apfelsaft entscheidet auch die Art der Herstellung über die Menge an Pflanzeninhaltsstoffen. Bei klaren Apfelsäften gehen während der Klärung viele Polyphenole verloren, während in naturtrüben Säften mehr erhalten bleiben (Stiftung Warentest, Stand 18.09.2009; Kahle K. et al. 2005).

### **1.2.2.1. Struktur von Polyphenolen**

Polyphenole haben zwei oder mehr direkt an einen aromatischen Ring gebundene Hydroxygruppen (Stevenson D.E. und Hurst R.D. 2007; D'Archivio M. et al. 2007). Die Wirkung der Polyphenole ist abhängig von diesem aromatischen Ringsystem und von der Anwesenheit und Position funktioneller Gruppen, vor allem der Hydroxygruppen (Middleton E.Jr. et al. 2000; Pannala A.S. et al. 1997). Polyphenole liegen in Pflanzen selten frei vor, meist sind sie an Zucker, organische Säuren oder Alkohole gebunden, die in dieser Form nicht resorbierbar sind (Manach C. et al. 2004; D'Archivio M. et al. 2007). Als Glykoside im phenolischen Apfel kommt Galaktose vor, aber auch Glucose, Rhamnose, Xylose, Arabinose und das Disaccharid Rutinose (Mazza G. und Velioglu Y.S. 1992).

Verdauungsenzyme (z.B.  $\beta$ -Glucosidase) und die Dickdarm-Mikroflora hydrolysieren die Polyphenole, um ihre Aufnahme zu ermöglichen. Bis diese Blut und Gewebe erreichen, werden sie vielfältigen Modifikationen unterzogen (Manach C. et al. 2004; D'Archivio M. et al. 2007). Die Struktur der Polyphenole bestimmt Geschwindigkeit und Menge der Aufnahme und die Beschaffenheit der Metabolite im Plasma stärker als ihre Konzentration (D'Archivio M. et al. 2007).

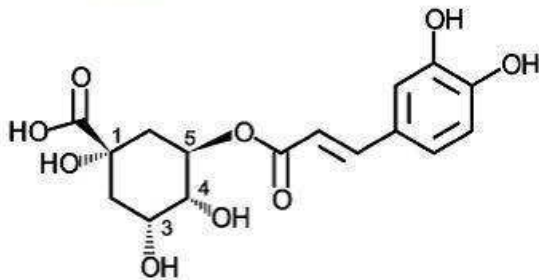
### **1.2.2.2. Phenolische Strukturen im Apfel**

Die am häufigsten vorkommenden Einzelphenole im Apfel, welche auch aus Apfeltrester isoliert wurden (Lu Y. und Foo L.Y. 2000), sind Chlorogensäure, Quercetin-3-glykoside, Catechin, Epicatechin, Phloridzin und Cyanidin-3-glykoside (Tsao R. et al. 2003; Mazza G. und Velioglu Y.S. 1992; Awad M. et al. 2000).

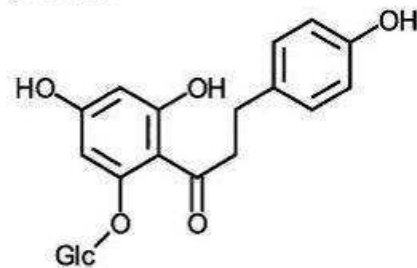
Abbildung 1 (vgl. Seite 11) zeigt diese Strukturen, eingeteilt in fünf Hauptgruppen (Tsao R. et al 2003; Mazza G. und Velioglu Y.S. 1992; Pérez-Illarbe J. et al. 1991; Guyot S. et al. 1998; Kennedy M.J. et al. 1994; Lamperi L. et al. 2008; Neveu V. et al. 2010 <http://www.phenol-explorer.eu>; Wojdylo A. et al. 2008; Tsao R. et al. 2005):

- Hydroxyzimtsäure und Hydroxyzimtsäure-Derivate (z.B. Chlorogensäure)
- Flavan-3-ole/ Procyanidine (z. B. Epicatechin/ Procyanidin B2)
- Anthocyanidine (z. B. Cyanidin-3-glykosid)
- Flavonole (z. B. Quercetin)
- Dihydrochalkone (z. B. Phloridzin)

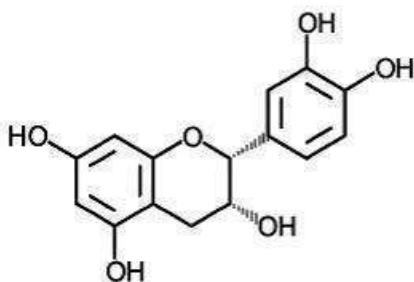
Chlorogensäure



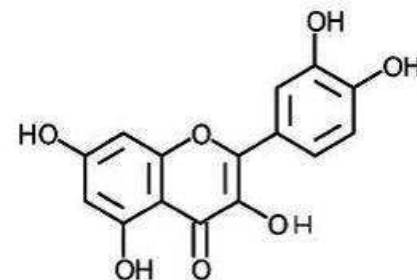
Phloridzin



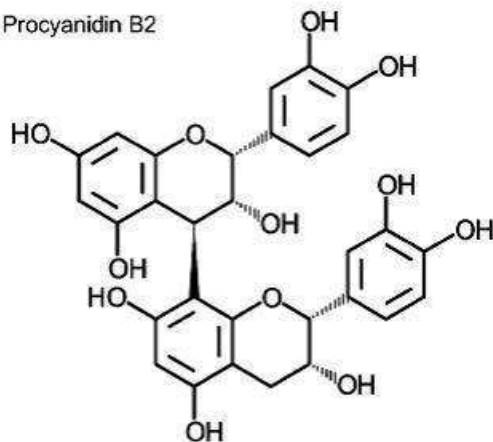
(-)-Epicatechin



Quercetin



Procyanidin B2



Cyanidin-3-glykosid

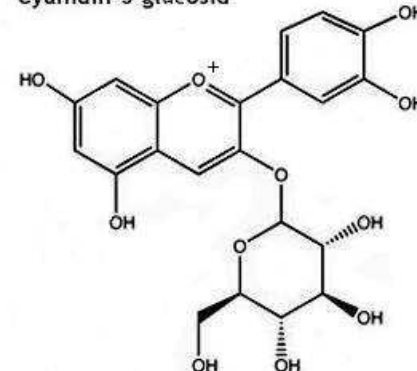


Abbildung 1: Die am häufigsten vorkommenden Polyphenole in Äpfeln und Apfelprodukten (Gerhäuser C. 2008; Chemische Fabrik Marktredwitz AG Oskar Tropitzsch URL: <http://www.cfmot.de/en/phytochemicals/cyanidin-3-glucoside.html>)

Phloridzin ist seit langem als Inhaltsstoff des Apfels bekannt und ist von Wilson E.L. (1981) als solcher charakterisiert worden. Es kommt im Apfel und auch im Apfelsaft als ein Hauptbestandteil vor und kann als Merkmal für die Echtheit von Apfelprodukten herangezogen werden (Spanos G.A. und Wrolstad R.E. 1992).

Die Gesamtaufnahme von Flavonoiden aus der Nahrung beträgt 100 mg bis 1 g pro Tag, davon fällt ein bedeutender Teil auf Quercetin-Derivate (vor allem Glykoside). Quercetin ist eines der häufigsten Flavonoide in der Nahrung und kommt in Obst und Gemüse meist als Glykosid vor. Es gehört zu den Polyphenolen mit den stärksten antioxidativen Wirkungen (Formica J.F. und Regelson W. 1995).

### **1.2.2.3. Pharmakologische Wirkungen**

Forschungen der letzten 30 Jahre haben gezeigt, dass vermehrter Konsum von Obst und Gemüse und ein angemessener Lebensstil das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen, verschiedener Krebserkrankungen und anderer chronischer Erkrankungen (z.B. Diabetes, Osteoporose, Alzheimer, Parkinson) reduzieren (Vita J. A. 2005; Kahle K. et al. 2011; Tsao R. et al. 2003; Peters U. et al. 2001; Di Castelnuovo A. et al. 2002; Stanner S. ed. 2005). Vor allem den Polyphenolen, die in Obst und Gemüse vorkommen, wird protektive Wirkung zugeschrieben.

Eine der häufigsten Todesursachen in den Industrieländern sind kardiovaskuläre Erkrankungen. Antioxidantien können die dabei im Vordergrund stehende zelluläre durch freie Radikale ausgelöste Stresssituation verhindern und somit das Risiko einer Erkrankung senken. Polyphenole zeigen *in vitro* stärkere antioxidative Wirkung als Vitamine und Carotinoide (Saura-Calixto F. et al. 2007). Polyphenole wirken auf zwei Arten antioxidativ: einerseits neutralisieren sie ROS (Reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies) wie Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hypochlorid (HOCl) direkt, andererseits hemmen sie verschiedene Enzyme, die ROS bilden, beispielsweise Nicotinamidadeninucleotidphosphatoxidase oder Xanthinoxidase (Nijveldt R.J. et al. 2001).

Atherosklerose ist eines der häufigsten Risiken für kardiovaskuläre Erkrankungen. Blutfette und Leukozyten reichern sich an der Gefäßwand an und bilden Ablagerungen, sogenannte Plaques (Giovannini C. et al. 2007). Dadurch verlieren die Gefäßwände ihre Elastizität und der Gefäßdurchmesser verengt sich. Risikofaktoren für die Plaquebildung sind Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen, höheres Alter, männliches Geschlecht und eine genetische Prädisposition (Silbernagl St. und Lang F. 2005). Polyphenole greifen an verschiedenen Stellen in die komplexen Abläufe der Atherosklerose ein und üben protektive Wirkungen aus, welche vielfach in Studien behandelt wurden (Cordova A.C. et al. 2005; Fuhrmann B. et al. 2001; Curin Y. et al. 2005). Polyphenole wirken antiatherosklerotisch auf Grund ihrer antioxidativen Eigenschaften und durch Hemmung der Plättchenaggregation an betroffenen Gefäßwänden, wodurch das Risiko einer Gefäßverstopfung vermindert wird (Curin Y. et al. 2005).

Blutfette spielen eine bedeutende Rolle in der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, v.a. hohe Werte von LDL-Cholesterin (Low Density Lipoprotein) und niedrige Werte von HDL-Cholesterin (High Density Lipoprotein, Silbernagl St. und Lang F. 2005). Polyphenole können diese Parameter begünstigend beeinflussen. Sie reduzieren das Risiko einer LDL-Oxidation wobei ihre Wirkung abhängig ist von der Struktur, der Quelle aus der sie stammen und der Dosis, in der sie vorkommen (Curin Y. et al. 2005; Da Silva Porto P. et al. 2003).

Störungen der Gefäßfunktion, vor allem des Endothels, sind ein sehr frühes Ereignis in der Pathogenese der Atherosklerose bzw. von kardiovaskulären Erkrankungen (Hang Y.D. 1987). Im Normalzustand versuchen Endothelfaktoren physiologischen Blutdruck und Blutfluss beizubehalten und Entzündungsvorgänge zu verhindern. Treten pathogene Faktoren auf, verändert sich der Zustand des Endothels und fördert dadurch Entzündung, Thrombose, Vasokonstriktion und atherosklerotische Vorgänge (Levine G.N. et al. 1995). Endotheliale Dysfunktion lässt sich durch eine Störung der endothelabhängigen Gefäßrelaxation charakterisieren und stellt damit ein Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen dar (Stanner S. ed. 2005). Um dieses Risiko zu reduzieren, wird versucht, die Endothelfunktion zu stärken z.B. durch körperliche Aktivität, Reduzierung der Fettaufnahme und Vermeidung von Rauchen (Suwaidi J.A. et al. 2000; Widlansky M.E. et al. 2003). Nicht nur in frühen Stadien der Atherosklerose ist endotheliale Dysfunktion von

Bedeutung, auch bei später auftretenden Ereignissen, bei denen klinische Symptome an Patienten auftreten, fällt dem Endothel eine mitwirkende Rolle zu. Das Enzym eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) und Stickstoffmonoxid (NO) spielen bei der Regulation des Blutdruckes und für die Funktion von Blutgefäßen eine zentrale Rolle. Endothelzellen produzieren Faktoren, unter anderem NO, die die vaskuläre Homöostase regulieren (Ignarro L.J. et al. 1987). In den Endothelzellen der Blutgefäße wird durch Abspaltung von der Aminosäure L-Arginin mittels des Enzyms NO-Synthase Stickstoffmonoxid gebildet. NO kann dann zu den Gefäßmuskelschichten diffundieren und die Guanylat-cyclase aktivieren, welche den Botenstoff cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) bildet und über Aktivierung der Proteinkinase G eine Vasorelaxation bewirkt (Curin Y. et al. 2005). NO verhindert das Anhaften von Leukozyten und die Entstehung von Adhäsionsmolekülen am Endothel und beugt auf diese Weise atherosklerotischen Veränderungen vor (Gokce N. und Vita J.A. 2002).

Quercetin stimuliert die Bildung von NO im Endothel. Damit bewirkt es eine Normalisierung von Bluthochdruck (Edwards R.L. et al. 2007) und verhindert Thrombusbildung durch die Hemmung der Plättchenadhäsion und der Plättchenaggregation (Gokce N. und Vita J.A. 2000).

In verschiedenen *in vitro*-Assays, Experimenten mit Tieren und epidemiologischen Studien wurden gesundheitsfördernde Effekte von Polyphenolen beobachtet und dokumentiert. In den folgenden Kapiteln 1.2.2.4. bis 1.2.2.6. (vgl. Seite 14 – 17) ist eine Auswahl dieser Studien aufgelistet.

#### **1.2.2.4. *in vitro*-Wirkungen**

Wolfe K. et al. (2003) untersuchten Äpfel und vor allem Apfelschalen mithilfe eines total oxyradical scavenging assays (TOSC), wobei die antioxidative Aktivität durch die Hemmung des entstehenden Ethylens mittels Headspace-Gaschromatographie gemessen wurde. Die untersuchten Äpfel zeigten starke antioxidative Aktivität *in vitro*, welche in den Schalen höher als im Fruchtfleisch war.

Die antioxidative Stärke der Polyphenole wurde auch von Rice-Evans C.A. et al. (1996) mithilfe des TEAC-assays (Trolox equivalent antioxidant capacity) bestimmt. Quercetin und Myricetin zeigten vor Kämpferol die größte Wirkung, während Catechin die geringsten Effekte aufwies.

Pearson D. et al. (1999) beurteilten die antioxidative Aktivität von kommerziellem Apfelsaft und Apfelextrakten mithilfe einer statischen Dampfraum-Gaschromatographie, wobei Hexanal von Kupfer-katalysierter LDL-Oxidation *in vitro* produziert wurde, welche Apfelsaft und Apfelextrakte deutlich inhibierte.

Eine Studie von Rechner A.R. und Kroner C. (2005) zeigte, dass Anthocyane und *in vivo* Metabolite von Polyphenolen antithrombotische Eigenschaften aufweisen, welche mithilfe eines Plättchenaggregationstest nach Born festgestellt wurden.

#### **1.2.2.5. Tierversuche**

Aprikian O. et al. (2001) fanden in 40 Ratten, deren Nahrung mit lyophilisierten Äpfeln ergänzt wurde, eine signifikante Senkung der Cholesterin- und Lebercholesterinspiegel und eine Zunahme des HDL-Wertes.

Im Vergleich zu Birnen und Pfirsichen zeigten Äpfel eine stärkere Senkung des Cholesterinspiegels in Ratten und besaßen ein größeres antioxidatives Potential, was vermutlich auf den höheren Anteil an phenolischen Inhaltsstoffen zurückzuführen ist (Leontowicz H. et al. 2002).

Werden Apfelpektin und Apfelphenole kombiniert aufgenommen, weisen sie eine größere Reduktion von Plasmacholesterin, Lebercholesterin und Triglyceriden auf als jeweils alleine. Diese Zusammenwirkung von Pektin und Phenolen zeigt, dass der Konsum von ganzen Früchten bessere Effekte erzielt als die Aufnahme selektiver Wirkstoffgruppen (Aprikian O. et al. 2003).

Demrow et al. (1995) untersuchten die Wirkung von Polyphenolen an 47 Mischlingshunden und stellten fest, dass Konsum von Rotwein und Traubensaft eine Hemmung der Plättchenaggregation bewirkt.

### 1.2.2.6. Humanstudien

Obwohl Polyphenole starke antioxidative Wirkungen *in vitro* zeigen, gibt es Zweifel, ob auch *in vivo* dieselben Effekte zu erwarten sind. Studien haben gezeigt, dass die Polyphenolspiegel im Blut zu gering waren, um ausreichend zur antioxidativen Kapazität beizutragen (Stevenson D. E. und Hurst R. D. 2007; D'Archivio M. et al. 2007). Polyphenole sind nach der Aufnahme in den Körper zu 90 – 95% molekularen Veränderungen unterworfen. Aufgrund dieser Umwandlungen kann die Wirkung der Polyphenole von ihren biologischen Aktivitäten aus *in vitro* Studien abweichen (Stevenson D. E. und Hurst R. D. 2007; Lotito S.B., Frei B. 2006; Hollman P.C.H. 2010). Es wird angenommen, dass Effekte im menschlichen Körper eher von phenolischen Metaboliten ausgehen als von den ursprünglich aufgenommenen Polyphenolen (Visioli F. et al. 2009). Es gibt limitierte Nachweise aus *in vivo* Studien bezüglich der Wirkung von polyphenolreichen Produkten. Dabei wird beschrieben, dass die Endothelfunktion verbessert und Plättchenaggregation reduziert wird (Hooper L. et al. 2008; Hollman P.C.H. 2010; Kar P. et al. 2006; Ghosh D. und Scheepens A. 2009). Weiters wird Bluthochdruck auf Normalwerte gesenkt (Ghosh D. und Scheepens A. 2009; Taubert D. et al. 2007) und der LDL-Cholesterinspiegel vermindert (Basu A. und Penugonda K. 2009).

Gesundheitsfördernde Effekte *in vivo* sind abhängig von der Absorption, dem Metabolismus, der Verteilung und der Elimination der Polyphenole nach ihrer Aufnahme in den Körper. Kahle K. et al. (2011) führten verschiedene Experimente durch, um Informationen dazu sowie zur systemischen Verfügbarkeit von Polyphenolen *in vivo* zu erhalten. Die Ergebnisse zeigten, dass die Mengen an unkonjugiertem Quercetin im Blutserum sehr gering waren. Nach Aufnahme von einem Liter Apfelsaft (fünf Probanden) konnten nur 0,4 % der enthaltenen Quercetin-Glykoside als körpereigene Konjugate im Harn nachgewiesen werden. Nach Enzymeinwirkung von  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase nach der Aufnahme von naturtrübem Apfelsaft konnten Metabolite der Polyphenole mithilfe GC-MS, HPLC-MS und HPLC-MS/MS im Harn nachgewiesen werden, unter anderem Hippursäure, 3-Hydroxy-hippursäure, 4-Hydroxy-hippursäure, Dihydro-kaffeensäure, 3-Hydroxyphenol-propionsäure und 3,4-Dihydroxy-benzoesäure usw. Die Resultate von Kahle K. et al. (2011) können zu einem besseren Verständnis der Wirkung



der Polyphenole beitragen und weitere Studien unterstützen, die zusätzliche Darlegungen im Bereich der *in vivo* Forschung anstreben.

Eine Studie aus den Niederlanden mit 13 000 teilnehmenden Erwachsenen kam zu dem Ergebnis, dass aufgenommene Inhaltsstoffe aus Äpfeln die Lungenfunktion positiv beeinflussen und das Risiko einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) verringern (Tabak C. et al. 2001).

Knekt P. et al. (2000) beschrieben in einer Kohortenstudie mit 9208 Teilnehmern unter anderem die Verminderung des Risikos eines thrombotischen Schlaganfalls durch Konsum von Äpfeln.

Stein J.H. et al. (1999) verabreichten an 15 Studienteilnehmer mit dokumentierter koronarer Herzerkrankung 14 Tage (Kurzzeitverabreichung) zweimal täglich 4 ml/kg Traubensaft. Die flussmedierte-Dilatation (FMD) wurde mit hochauflösendem Ultraschall gemessen. Es wurde festgestellt, dass Konsum von Traubensaft die FMD verbessert und die Oxidation von Lipiden, die im Zusammenhang mit der atherosklerotischen Plaquebildung an den Gefäßwänden stehen, vermindert wird.

Baba S. et al. (2007) untersuchten die Wirkung einer langfristigen Einnahme (12 Wochen) von Kakaopulver auf die Plasmalipidspiegel von 25 männlichen Studienteilnehmern mit normalem Cholesterinspiegel oder leicht erhöhtem Cholesterinspiegel. Dabei wurden Plasma VLDL-, LDL- und HDL-Cholesterin-Spiegel mithilfe einer automatisierten Agarose-Gelelektrophorese ermittelt. Die Aufnahme von Kakaopulver trägt zum Anstieg des HDL-Cholesterinspiegels bei und begünstigt damit die Hemmung der LDL-Oxidation.

Matsuo S. et al. (2001) beschrieben beim Menschen 30 min nach Konsum von Rotwein oder Polyphenolen (1 g/kg Körpergewicht) einen Anstieg der Stickstoffmonoxid-Konzentration im Blut und als Folge eine Senkung des Blutdrucks und Vergrößerung der Herzrate.

Obwohl es *in vivo* Studien mit positiven Effekten von phenolreichen Produkten bei kardiovaskulären Risiken gibt, ist es nötig weiter Forschung zu betreiben, um ausreichende Nachweise zu erhalten und Schlussfolgerungen ziehen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Trester

Die Trester wurden in der Presssaison 2011 gesammelt und bis zur Trocknung bei minus 20 °C gelagert. Die Trocknung erfolgte zum einen durch Lyophilisation und zum anderen durch Trocknung im Trockenschrank bei 60 °C.

#### 2.1.1. Apfeltrester von „Stift Klosterneuburg“



Abbildung 2: Apfeltrester von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, gepresst in Putzing, PL)



Abbildung 3: Apfeltrester von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet, gepresst in Putzing, PO)

#### 2.1.2. Apfeltrester der Firma „Rauch Fruchtsäfte GmbH & Co OG“



Abbildung 4: Apfeltrester der Firma „Rauch“ (lyophilisiert, RL)



Abbildung 5: Apfeltrester der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, RO)

### 2.1.3. Chemikalien

Methanol p.a.	VWR Prolabo
Ethanol p.a.	Brenntag CEE Group
Ethylacetat p.a.	VWR Prolabo
Ameisensäure 98 %	Carl Roth GmbH & Co KG
Essigsäure 99 %	Carl Roth GmbH & Co KG
Schwefelsäure 95-97 %	Glatt Koller
Chloroform p.a.	VWR Prolabo
Acetonitril p.a.	VWR Prolabo
Anisaldehyd	Merck
Wasser p.a.	entionisiertes, destilliertes Wasser entspricht Wasser R des Ph. Eur. 7

### 2.1.4. Reinsubstanzen

Isoquercetin	Ch. Nr. 1399 Phytolab
Hyperosid	Lot 11101724 Extrasynthese
Phloridzin	Ch. Nr. 3920 Phytolab
Avicularin	Ch. Nr. 2970 Phytolab
Phloretin	Ch. Nr. 5139 Phytolab
Quercetin	Ch. Nr. 2926 Phytolab
Gallussäure	Ch. Nr. 1371 Phytolab
Natriumcarbonat	Ch. Nr. 0053106 Merck
Diatomeenerde	Lot 081223 Dionex
Polystyrol	Lot 184422H u. Lot 33467 Supelco Analytical
Seesand	Charge 440164202 Carl Roth GmbH & Co KG
Folin-Reagens	Charge HC 807325 Merck
Naturstoff-Reagens	Charge 454176232 Carl Roth GmbH & Co KG

## 2.2. Geräte

### 2.2.1. Gefriertrocknungsanlage

Gerät:	Zirbus VaCo 5-II
Volumen:	16 Liter
Kondensatortemperatur:	< -80 °C

### 2.2.2. Ultra-Zentrifugalmühle

Gerät:	Retsch ZM 100
System:	Rotor-Ringsieb
Siebgröße:	0,75 mm

### 2.2.3. Accelerated Solvent Extractor (ASE 200)

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

### 2.2.4. Säulenchromatographie

Stationäre Phase:	Diaion ® HP-20
Mobile Phase 1:	Ethanol 10%
Mobile Phase 2:	Ethanol 96%

### **Säule 1**

Säulendurchmesser: 5,5 cm  
Säulenlänge: 37,5 cm  
Stationäre Phase: 484 g

### **Säule 2**

Säulendurchmesser: 7,5 cm  
Säulenlänge: 30 cm  
Stationäre Phase: 642 g

### **Säule 3**

Säulendurchmesser: 5,5 cm  
Säulenlänge: 49 cm  
Stationäre Phase: 560 g

### **Säule 4**

Säulendurchmesser: 5,5 cm  
Säulenlänge: 47 cm  
Stationäre Phase: 496 g

## **2.2.5. Dünnschichtchromatographie (DC)**

Kieselgel 60 F<sub>254</sub> auf Glas oder auf Alufolie

20 x 20 cm, Korngröße 5 – 40 µm

Merck, Darmstadt, Deutschland

Laufmittel 1: Ethylacetat/Ameisensäure/Essigsäure/Wasser [25/2/2,7/5],  
(Waldbauer K. 2014)

Laufmittel 2: Chloroform/Methanol/Wasser (60/40/10)

### **Detektion und Reagenzien:**

#### AAS – Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz

0,5 ml Anisaldehyd, 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure werden gemischt. Die DC-Platte wird mit dieser Lösung besprüht und 5-10 min bei 100 °C im Trockenschrank erhitzt. Die Auswertung erfolgt im VIS bzw. UV-Spektrometer bei 366 nm. Das Reagenz kann bei 5 °C aufbewahrt werden, aber seine Haltbarkeit ist begrenzt. Bei einer Verfärbung von farblos nach rotviolett ist es nicht mehr zu verwenden (Wagner H. und Blatt S. 1996).

### NAT-PEG = Naturstoff-Polyethylenglycol

Die DC-Platte wird erst mit einer 1 %igen methanolischen Lösung von Diphenylborsäure- $\beta$ -ethylaminoester und direkt danach mit einer 5 %igen ethanolischen Polyethylenglykol-400-Lösung besprüht. Es entsteht unter UV-Licht bei 366 nm eine intensive Verstärkung der Fluoreszenzfarben.

## 2.2.6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-Säule:

Hypersil BDS C18, Thermo Hypersil-Keystone

Länge: 250 mm

Durchmesser: 4,6 mm

Partikelgröße: 5  $\mu$ m

HPLC-Gradient:

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

Fließmittel A: Wasser pH 2,9 (mit Ameisensäure 98% eingestellt)

Fließmittel B: Acetonitril

Flussrate: 1,2 ml/min

Injektionsvolumen: 5  $\mu$ l

HPLC 1:

### **Perkin Elmer 200**

Autosampler: Series 200

Entgaser: Series 200

Pumpe: Series 200

Detektor: Series 200 UV/VIS Detektor

Schnittstelle: Series 200

Software: Total Chrom <sup>TM</sup>

## HPLC 2:

### **Shimadzu 20A**

Autosampler:	SIL-20AC HT
Entgaser:	DGU-20A5
Pumpe:	LC-20AD
Ofen:	CTO-20AC
Detektor:	SPD-M20A Photodiode Array Detektor, gekoppelt mit ELSD-LT Detektor
Controller:	CBM-20A
Software:	LC-Solution, Version 1.2

### **2.2.7. Spektrophotometer**

Gerät:	Beckman DU-600
Wellenlänge:	750 nm
Durchflussküvette	

## 2.3. Methoden

### 2.3.1. Probenvorbereitung

Ein Teil der jeweiligen Tresterproben wurde für 12 Stunden bei 60 °C im Herbartrockenschrank auf Horden getrocknet. Die Lyophilisation von etwa 1600 g gefrorenem Apfeltrester des zweiten Teils erfolgte bis zur vollständigen Trocknung mindestens 48 Stunden.

### 2.3.2. Extraktion der Proben mittels Accelerated Solvent Extractor (ASE)

Die getrockneten Proben wurden bei einer Siebgröße von 0,75 mm gemahlen und anschließend mit Diatomeenerde vermischt und der Extraktion durch Accelerated Solvent Extraction zugeführt. Die ASE ist eine automatisierte, beschleunigte Extraktion mit Lösungsmitteln. Sie findet unter Druck durch Füllung des Systems mit Stickstoff und unter erhöhter Temperatur statt. Dadurch erfolgt eine starke Beschleunigung der Reaktionskinetik im Vergleich zu konventionellen Methoden (Ultraschallbad, Soxhlet-Extraktion) und es kann eine Steigerung der Ausbeute erzielt werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Geräteparameter aus einer Publikation von Alonso-Salces R.M. et al. (2001) übernommen und modifiziert. Als Extraktionsmittel wurde Methanol 70% verwendet, und es wurden drei Extraktionszyklen pro gefüllte Zelle durchgeführt. Druck und Anteil an Diatomeenerde wurden an die Korngröße angepasst. Lyophilisierte Trester zeigten eine größere Tendenz zu verklumpen, weshalb der Anteil an Diatomeenerde und der Druck erhöht wurden (vgl. Tab. 6).

Anschließend wurde das Methanol mithilfe eines Rotavapors abgedampft und der wässrige Anteil durch Lyophilisation zur Trockene gebracht.

Probe	Lösungsmittel	Temperatur	Druck (PSI)
„Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet)	Methanol 70%	40 °C	1500
„Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert)	Methanol 70%	40 °C	1700
Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)	Methanol 70%	40 °C	1700
Firma „Rauch“ (lyophilisiert)	Methanol 70%	40 °C	1700

Tabelle 6: Geräteparameter der ASE bei der Extraktion der Proben von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet) und „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) sowie der Proben der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet) und „Rauch“ (lyophilisiert)



### **2.3.3. Fraktionierung mittels Säulenchromatographie**

In dieser Arbeit wurde als stationäre Phase Diaion® HP-20 für die Säulenchromatographie verwendet. Vor der Durchführung der Auftrennung wurde das Material mit Methanol bedeckt, 5 min mit Ultraschall behandelt und anschließend abdekantiert, und in weiterer Folge mit Ethanol 96% (EtOH 96%) und mit Ethanol 10% (EtOH 10%) in gleicher Weise behandelt. Dabei diente EtOH 10% gleichzeitig als Konditionierung für die nachfolgende Auftrennung. Die stationäre Phase wurde in eine Glassäule übergeführt, welche am unteren Ende mit einem Hahn zur Regulierung des Lösungsmitteldurchflusses ausgestattet ist. Das getrocknete Probenmaterial wurde in EtOH 10% gelöst (1g Extrakt/1,5ml Lösungsmittel) und 10 min bei 10 000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Anschließend wurde das gelöste Probenmaterial auf die Säule getropft und mit einem Filterpapier und Seesand bedeckt, um ein Aufschwemmen der stationären Phase beim Einbringen der mobilen Phase zu verhindern. Es wurden Fraktionen von 200 ml – 500 ml gesammelt, deren ethanolischer Anteil mittels Evaporation entfernt wurde. Anschließend wurden die Fraktionen durch Lyophilisation zur Trockene gebracht. Als mobile Phasen wurden

EtOH 10% und EtOH 96% verwendet (Bedingungen vgl. 2.2.4 Seite 20 f.). Die Tropfgeschwindigkeit betrug 3 ml pro Minute. Der Zeitpunkt des Wechsels der mobilen Phase wurde aufgrund der gleichzeitig durchgeführten Analyse mittels Dünnschichtchromatographie und der Größe der Fraktions-Ausbeuten gewählt. Die erste mobile Phase EtOH 10% diente zur Abtrennung der polaren Bestandteile des Rohextraktes. Apolarere Bestandteile wurden anschließend mit der zweiten mobilen Phase EtOH 96% eluiert.

### **2.3.4. Analyse mittels Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die gesammelten Fraktionen wurden mittels DC unter Verwendung der Laufmittel 1 bzw. Laufmittel 2 (vgl. 2.2.5. Seite 21 f.) analysiert. Die Platten wurden mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens bzw. Naturstoffreagens + 0,5 % ethanol. Polyethylenglykol-Lösung besprüht und bei Tageslicht und unter UV-Licht 254 nm bzw. 366 nm ausgewertet. Aufgrund der Sichtbarkeit von Banden bzw. des Feh-

lens der Banden konnten der Wechsel des Elutionsmittels festgelegt und die Fraktionen zu Sammelfractionen vereinigt werden (vgl. Tab. 14 – 17, Seite 35 f.).

### **2.3.5. Analyse der Sammelfractionen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Die Sammelfractionen (vgl. Tab. 14 – 17, Seite 35 f.) wurden in Methanol 80% gelöst (HPLC 1: 3 mg/ml; HPLC 2: 1 mg/ml) und 5 min bei 13 000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in HPLC-Fläschchen übergeführt und mithilfe eines Autosamplers injiziert. Als Fließmittel wurden Wasser *R* mit pH 2,9 und Acetonitril mit äquivalenter Beigabe des Säureanteils des wässrigen Fließmittels verwendet und mittels Gradientenelution vermessen. (Bedingungen vgl. 2.2.6. Seite 22 f.). Zur Detektion flavonoidartiger Inhaltsstoffe wurde ein UV/VIS Detektor eingesetzt. Für die Detektion nicht UV/VIS absorbierender Verbindungen wurde ein Niedrig-Temperatur-Lichtstreuendetektor (ELSD) verwendet.

Die Identifizierung von Hyperosid, Isoquercetin, Quercetin-pentosid 1, Avicularin, Quercetin-desoxy-hexosid 1, Methyl-quercetin-hexosid, Phloridzin und Quercetin erfolgte mithilfe von Massenspektrometrie anhand des Molekulargewichtes und spektralen Eigenschaften sowie zum Teil authentischen Vergleichssubstanzen (Waldbauer K. 2014). Anschließend wurden die Quercetin-Derivate und Phloridzin mittels externer Standardisierung quantifiziert (vgl. Tab. 22, Seite 41).

Zur Berechnung des Gehaltes wurden die Geradengleichungen der Eichgeraden mit den Referenzsubstanzen Quercetin bzw. Phloridzin herangezogen (vgl. Abb. 6 – 7, Seite 27).

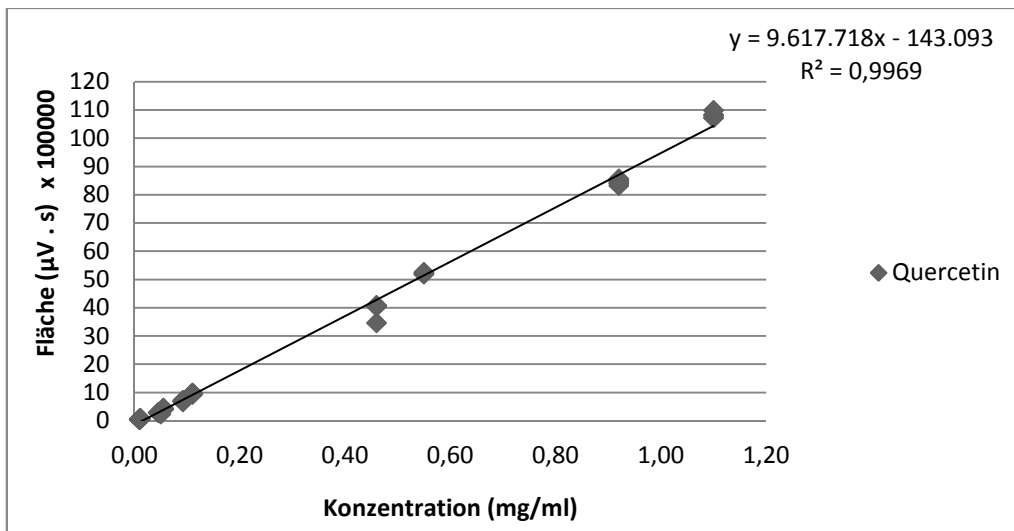


Abbildung 6: Eichgerade zur Berechnung des Gehaltes mit der Referenzsubstanz Quercetin

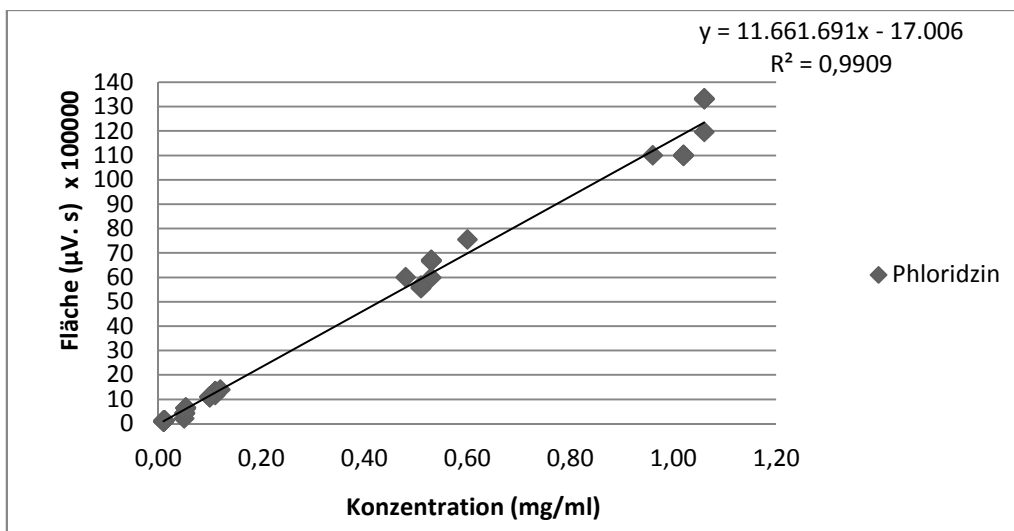


Abbildung 7: Eichgerade zur Berechnung des Gehaltes mit der Referenzsubstanz Phloridzin

Zur Veranschaulichung wird die Berechnung anhand der Quantifizierung von Hyperosid der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Fraktion 16) aufgezeigt.

Geradengleichung (Quercetin):  $y = 9617718x - 143093$

Berechnung in mg/ml:

$$\text{Hyperosid (mg/ml)} = \frac{(\text{Fläche} + 143093)}{9617718} \times \text{Korrekturfaktor (Kf)}$$

$$\text{Hyperosid (mg/ml)} = \frac{(833210 + 143093)}{9617718 \times 1,54} = \mathbf{0,16 \text{ mg/ml}}$$

Berechnung in mg/g:

$$\frac{0,16}{EW} \times 1000 = \mathbf{38,32 \text{ mg/g}}$$

	<b>Molekulargewicht</b>	<b>Korrekturfaktor (Kf)</b>
Hyperosid	464	1,54
Isoquercetin	464	1,54
Quercetin-pentosid 1	434	1,44
Avicularin	434	1,44
Quercetin-desoxy-hexosid 1	447	1,48
Methyl-quercetin-hexosid	477	1,58

Tabelle 7: Korrekturfaktoren zur Quantifizierung mittels HPLC, berechnet anhand des Molekulargewichts von Quercetin

### 2.3.6. Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu

Für die Gehaltsbestimmung der Gesamtpolyphenole wurde die Methode laut Gridling M. et al. (2010) verwendet. Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Reduktionskraft phenolischer Verbindungen. Polyphenole können Molybdat- und Wolframat-Ionen des Folin-Ciocalteu-Reagenzes reduzieren, wobei ein Farbumschlag von gelb nach blau stattfindet. Die entstehende Blaufärbung wird bei 750 nm gemessen und zur quantitativen Bestimmung der Konzentration mittels externer Standardisierung verwendet.

Für die Gehaltsbestimmung der Gesamtpolyphenole wurden die vereinigten EtOH 10% Fraktionen in Wasser *R* und die vereinigten EtOH96 % Fraktionen in Methanol *R* gelöst (1 mg/ml). Davon wurden 200 µl mit 200 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz versetzt und nach drei Minuten 4,0 ml 2%ige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben. Die Extinktion wurde nach 30 Minuten bei 750 nm gemessen und der Polyphenolgehalt als Gallussäure-Äquivalente unter Verwendung der jeweiligen Proben-Lösungsmittel als Kompensationsflüssigkeit berechnet (vgl. Tab. 18 – 21,

Seite 38 f.). Folgende Eichgeraden wurden für die externe Standardisierung verwendet (vgl. Abb. 8 – 11, Seite 29 f.; Waldbauer K. 2014).

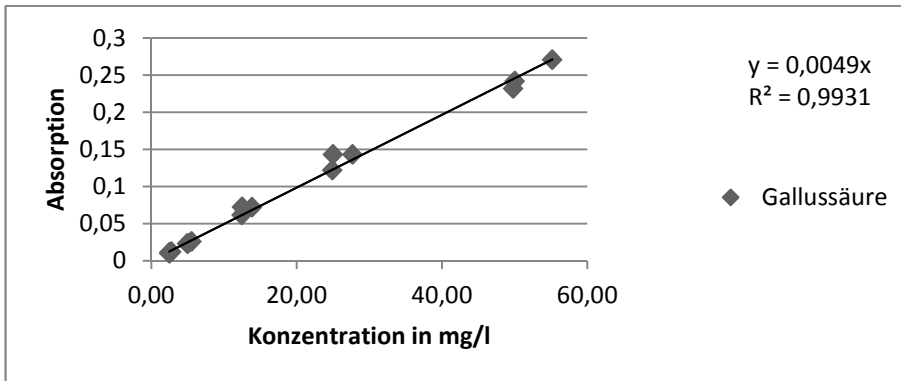


Abbildung 8: Eichgerade Gallussäure in Wasser, Konzentrationsbereich 2,5 mg/l – 50 mg/l

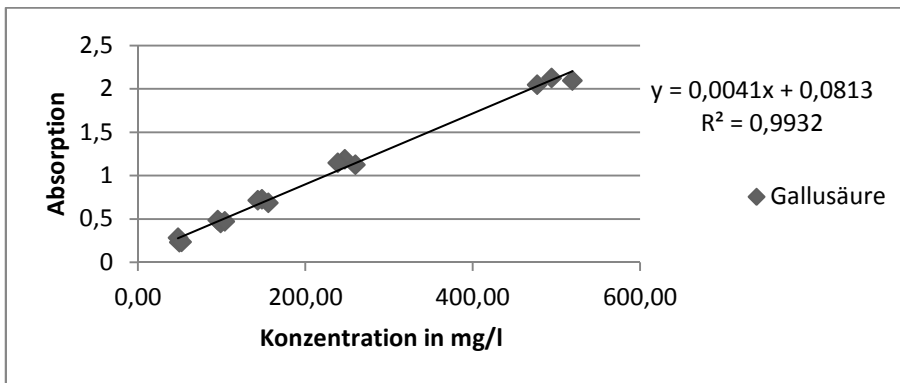


Abbildung 9: Eichgerade Gallussäure in Wasser, Konzentrationsbereich 50 mg/l – 500 mg/l

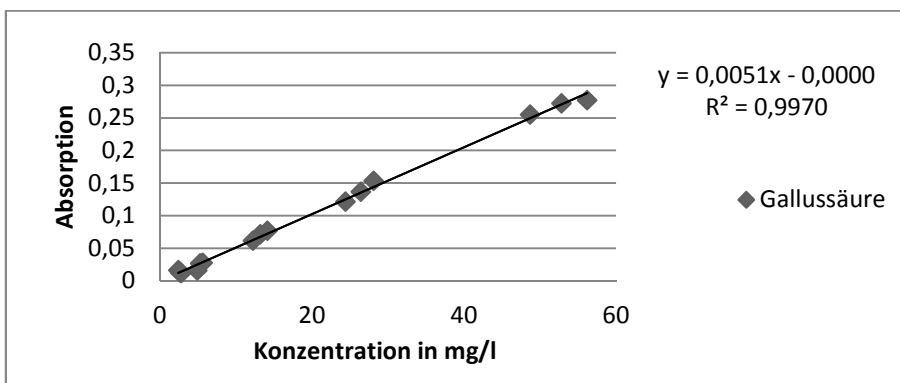


Abbildung 10: Eichgerade Gallussäure in Methanol, Konzentrationsbereich 2,5 mg/l – 50,0 mg/l

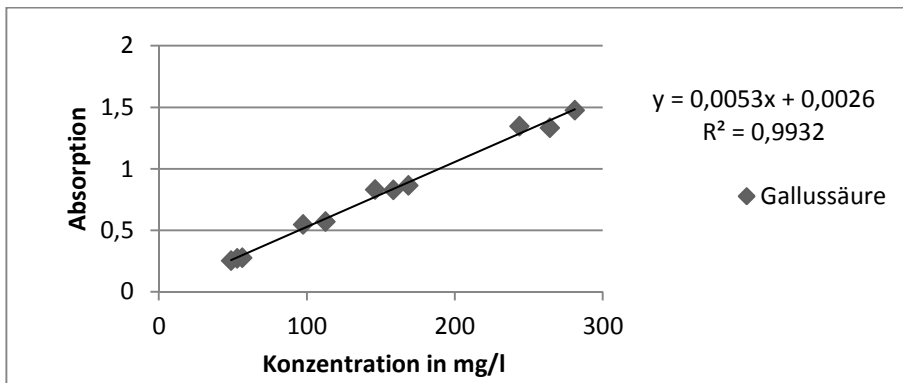


Abbildung 11: Eichgerade Gallussäure in Methanol, Konzentrationsbereich 50 mg/l – 250 mg/l

Ein Beispiel für die Berechnung des Gehaltes an Gesamtpolyphenolen wird nachfolgend dargestellt. Es wurde die Geradengleichung der Eichgerade herangezogen:

Geradengleichung (vgl. Abb. 8, Seite 29):  $y = 0,0049x \rightarrow x = \frac{y}{0,0049}$

	Einwaage in mg	Absorption bei 750 nm Messung 1	Absorption bei 750 nm Messung 2
<b>EW 1</b>	5,07	0,1248	0,1255
<b>EW 2</b>	5,11	0,1270	0,1259

Tabelle 8: Einwaagen und Absorption der Sammelfraktion 6 der Probe „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) zur Bestimmung der Gesamtpolyphenole

Berechnung Gesamtpolyphenolgehalt in mg GAE/l:

$$\frac{0,1248}{0,0049} = 25,47$$

$$\frac{0,1255}{0,0049} = 25,61$$

$$\frac{0,1270}{0,0049} = 25,92$$

$$\frac{0,1259}{0,0049} = 25,69$$

$$\text{Mittelwert: } \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = 25,7 \text{ mg GAE/l}$$

$$\text{Standardabweichung: } s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} = 0,19$$

Berechnung Gesamtpolyphenolgehalt in mg/g:

$$25,47 \text{ mg/l} = 0,02547 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{c}{EW} \times 1000 = \frac{0,02547}{EW} \times 1000 = 25,12$$

$$\frac{0,02561}{EW} \times 1000 = 25,26$$

$$\frac{0,02592}{EW} \times 1000 = 25,36$$

$$\frac{0,02569}{EW} \times 1000 = 25,14$$

$$\text{Mittelwert: } \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \mathbf{25,2 \text{ mg/g}}$$

$$\text{Standardabweichung: } s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} = 0,11$$

### **2.3.7. Restfeuchtegehalt der ofengetrockneten/lyophilisierten Apfeltresterproben**

Als Restfeuchtegehalt bzw. Trocknungsverlust wird im Arzneibuch der Gewichtsverlust einer Substanz beim Trocknen unter den jeweils vorgeschriebenen Bedingungen bezeichnet.

Die verwendeten Wägegläschen wurden vor der Bestimmung des Restfeuchtegehaltes bei gleichen Bedingungen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ein Teil der getrockneten bzw. lyophilisierten Proben wurde mit Ringsiebstärke 0,2 mm gemahlen und durch Sieb (355) auf eine einheitliche Größe gebracht. Die Trocknungszeit betrug bei einer Trocknungstemperatur von 103 – 105 °C zwei Stunden. Danach wurden die Gläschen eine Stunde im Exsiccator abgekühlt und gewogen. Die Werte wurden in Doppelbestimmung ermittelt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Herstellung und Charakterisierung der Rohextrakte

Die Geräteparameter der Extraktion der Trester, welche mithilfe des Accelerated Solvent Extractors durchgeführt wurde, zeigt Tabelle 6 auf Seite 24. Druck und Anteil an Diatomeenerde wurden an die Beschaffenheit der gemahlene Trester angepasst, vor allem bei den lyophilisierten Trestern mussten beide Parameter erhöht werden, weil diese eher zu Verklumpung neigten (vgl. Tabelle 9).

Probe	Druck (PSI)	Trester Trocken- gewicht (g)	Diatomeenerde g (%)
„Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet)	1500	200	20 (10)
„Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert)	1700	200	84 (42)
Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)	1700	185	86 (30)
Firma „Rauch“ (lyophilisiert)	1700	185	92 (50)

Tabelle 9: Übersicht über die Anpassung der Parameter Druck und Anteil an Diatomeenerde bei der Herstellung der Rohextrakte der Proben von „Stift Klosterneuburg“ und der Firma „Rauch“ mittels ASE

##### 3.1.1. Extraktausbeute

Die eingesetzten Drogenmengen und die resultierenden Rohextraktausbeuten sind in Tabelle 10 (vgl. Seite 33) angeführt. Die Ausbeuten der lyophilisierten Trester waren geringfügig höher als die der ofengetrockneten. Das Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) besagt, dass von den Proben von „Stift Klosterneuburg“ geringere Ausgangsmengen an Droge gebraucht werden als von den Proben der Firma „Rauch“, um eine bestimmte Menge Extrakt zu erhalten. Die Proben von „Stift Klosterneuburg“ lieferten 51,4 % und 52,2 % Extrakt, also rund 10 % mehr als die Proben der Firma „Rauch“ mit 41,2 % und 41,2 %.



Rohextrakte	Trester Trockengewicht in g	Extrakt- Ausbeute in g	Extrakt (w/w %)	DEV
Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet)	200	102,8	51,4	1,94:1
Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert)	200	104,4	52,2	1,92:1
Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)	185	76,2	41,2	2,43:1
Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert)	185	76,3	41,2	2,42:1

Tabelle 10: Menge an Extrakten der Proben von „Stift Klosterneuburg“ und der Firma „Rauch“, die nach ASE erhalten wurden

### 3.1.2. Restfeuchtegehalt

Der Restfeuchtegehalt der gemahlene Trester in Prozent ist in Tabelle 11 abzu-  
lesen. Die Proben von „Stift Klosterneuburg“ wiesen mit 2,7 % und 4,2 % im Mittel  
einen höheren Restfeuchtegehalt auf als die Proben der Firma „Rauch“ mit 2,3 %  
und 3,5 %. Die ofengetrockneten Proben beider Trester zeigten niedrigere Rest-  
feuchten als die lyophilisierten Proben.

Rohextrakte	Restfeuchtegehalt in %	Restfeuchtegehalt Mittelwert in %
Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet)	2,6 2,8	2,7
Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert)	4,3 4,1	4,2
Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)	2,2 2,4	2,3
Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert)	3,4 3,6	3,5

Tabelle 11: Restfeuchtegehalte der Rohextrakte der Proben von „Stift Klosterneuburg“ und der  
Firma „Rauch“

### 3.1.3. Gesamtpolyphenolgehalt

Tabelle 12 (vgl. Seite 34) zeigt den Gesamtpolyphenolgehalt der methanol-  
wässrigen Extrakte, welcher mit der Methode nach Folin-Ciocalteu bestimmt wur-  
de. Der Gehalt der Proben der Firma „Rauch“ war mit 14,1 mg/g und 21,2 mg/g  
deutlich größer als der von den Proben von „Stift Klosterneuburg“ mit 5,3 mg/g  
und 8,8 mg/g. Die lyophilisierten Proben enthielten größere Mengen an Poly-

phenolen als die ofengetrockneten Proben, was darauf hinweisen könnte, dass durch Temperaturanwendung die enthaltenen Inhaltsstoffe verändert werden.

Rohextrakte	Gesamtpolyphenolgehalt in mg GAE/l	Gesamtpolyphenolgehalt in mg/g
Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet)	5,4 (SD 0,06)	5,3 (SD 0,12)
Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert)	8,8 (SD 0,15)	8,8 (SD 0,17)
Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)	14,2 (SD 0,17)	14,1 (SD 0,17)
Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert)	21,4 (SD 0,68)	21,2 (SD 0,70)

Tabelle 12: Gesamtpolyphenolgehalt der Rohextrakte der Proben von „Stift Klosterneuburg“ und der Proben der Firma „Rauch“

### 3.2. Fraktionierung der Rohextrakte

#### 3.2.1. Säulenchromatographie – Analyse mittels DC

Die Ausbeuten der Sammelfractionen (vgl. Tab. 14 – 17, Seite 35 f.), welche mithilfe der Säulenchromatographie erhalten wurden (Bedingungen vgl. 2.2.4. Seite 20 f.), sind in Tabelle 16 (vgl. Seite 36) zu sehen. Die Proben der Firma „Rauch“ hatten mit 2,3 g bzw. 2,8 g größere Ausbeuten bei jenen Fraktionen in denen vor allem Polyphenole vorkamen als die Proben von „Stift Klosterneuburg“ mit 1,2 g bzw. 1,8 g.

Probe	Sammelfraktion	eingesetzter Rohextrakt	Ausbeute	
			in g	in %
„St. Klosterneuburg“ (ofengetrocknet)	1 – 3	67 g	61,1	91,2
	4		1,2	1,8
„St. Klosterneuburg“ (lyophilisiert)	5 – 8	99 g	93,0	93,9
	9 – 10		1,8	1,8
Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)	11 – 14	70 g	60,9	87,0
	15 – 18		2,3	3,3
Firma „Rauch“ (lyophilisiert)	19 – 22	70 g	63,2	90,2
	23 – 27		2,8	4,0

Tabelle 13: Ausbeuten der Sammel fraktionen der Proben von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet und lyophilisiert) und von der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet und lyophilisiert)

Abbildung 12 (vgl. Seite 35) zeigt die Dünnschichtchromatogramme der einzelnen Fraktionen der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert), welche durch Säulenchromatographie erhalten wurden. Für die Dünnschichtchromatogramme der

Fraktionen 0 – 6 wurde Laufmittel 2 verwendet, für die Fraktionen 7 – 23 Laufmittel 1 (Bedingungen vgl. 2.2.5 Seite 21 f.). Die DC-Platte wurde mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens besprüht und unter UV-Licht mit 366 nm detektiert. Die Fraktionen 0 – 6 enthielten große Mengen verschiedener Zucker, die auf dem Chromatogramm als dunkle Banden zu sehen waren. Bis zum Wechsel des Elutionsmittels erschienen vor allem blau fluoreszierende Banden, danach waren Polyphenole als weitere, hell fluoreszierende Banden zu sehen. Fraktion 16 zeigte eine höhere Anzahl an Banden als die anderen Fraktionen und enthielt auch die größte Menge an Polyphenolen. Aufgrund des Bandenmusters erfolgte die Vereinigung der Fraktionen zu Sammelfraktionen (vgl. Tab. 14 – 17, Seite 35 f.).

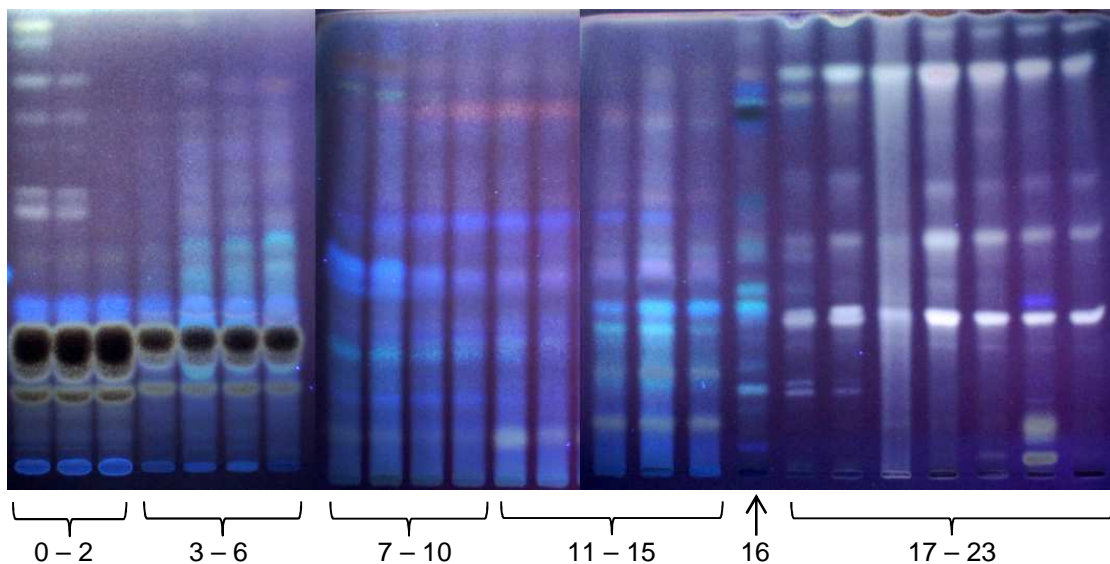


Abbildung 12: Dünnschichtchromatogramme der Fraktionen 0 – 23 der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert), Laufmittel 2 bei Fraktionen 0 – 6 und Laufmittel 1 bei Fraktionen 7– 23 verwendet, detektiert unter UV-Licht bei 366 nm (Bedingungen vgl. 2.2.5. Seite 21 f.)

Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet)	
Sammelfraktion 1	EtOH 10 % (Fraktion 1 – 7)
Sammelfraktion 2	EtOH 10 % (Fraktion 8 – 13)
Sammelfraktion 3	EtOH 10 % (Fraktion 14 – 25)
Sammelfraktion 4	EtOH 96 % (Fraktion 26 – 34)

Tabelle 14: Fraktionen der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet), erhalten durch Säulenchromatographie, vereinigt zu Sammelfraktionen

Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert)	
Sammelfraktion 5	EtOH 10 % (Fraktion 0 – 2)
Sammelfraktion 6	EtOH 10 % (Fraktion 3 – 6)
Sammelfraktion 7	EtOH 10 % (Fraktion 7 – 10)
Sammelfraktion 8	EtOH 10 % (Fraktion 11 – 15)
Sammelfraktion 9	EtOH 96 % (Fraktion 16)
Sammelfraktion 10	EtOH 96 % (Fraktion 17 – 24)

Tabelle 15: Fraktionen der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert), erhalten durch Säulenchromatographie, zusammengefasst zu Sammelfraktionen

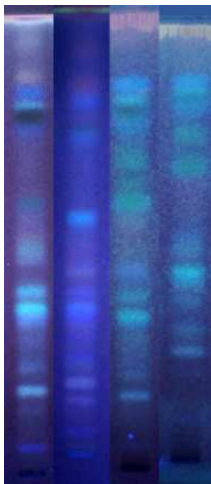
Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)	
Sammelfraktion 11	EtOH 10 % (Fraktion 0 – 5)
Sammelfraktion 12	EtOH 10 % (Fraktion 6 – 7)
Sammelfraktion 13	EtOH 10 % (Fraktion 8 – 13)
Sammelfraktion 14	EtOH 10 % (Fraktion 14 – 21)
Sammelfraktion 15	EtOH 96 % (Fraktion 22)
Sammelfraktion 16	EtOH 96 % (Fraktion 23)
Sammelfraktion 17	EtOH 96 % (Fraktion 24 – 35)
Sammelfraktion 18	EtOH 96 % (Fraktion 36 – 43)

Tabelle 16: Fraktionen der Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet), erhalten durch Säulenchromatographie, zusammengefasst zu Sammelfraktionen

Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert)	
Sammelfraktion 19	EtOH 10 % (Fraktion 0 – 6)
Sammelfraktion 20	EtOH 10 % (Fraktion 7 – 8)
Sammelfraktion 21	EtOH 10 % (Fraktion 9 – 12)
Sammelfraktion 22	EtOH 10 % (Fraktion 13 – 20)
Sammelfraktion 23	EtOH 96 % (Fraktion 21)
Sammelfraktion 24	EtOH 96 % (Fraktion 22 – 25)
Sammelfraktion 25	EtOH 96 % (Fraktion 26 – 32)
Sammelfraktion 26	EtOH 96 % (Fraktion 33 – 36)
Sammelfraktion 27	MeOH 96 % (Fraktion 37 – 38)

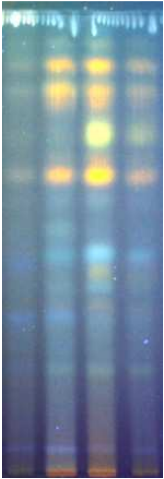
Tabelle 17: Fraktionen der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert), erhalten durch Säulenchromatographie, zusammengefasst zu Sammelfraktionen

Die Abbildungen 13 und 14 (vgl. Seite 37 f.) zeigen einen Vergleich der Chromatogramme der Fraktionen, welche jeweils die größte Menge an Polyphenolen der Proben von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet), „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) sowie von den Proben der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet), „Rauch“ (lyophilisiert) enthielten. Die Platten wurden mit Laufmittel 1 entwickelt (Bedingungen vgl. 2.2.5 Seite 21 f.) und mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (Abbildung 13) bzw. mit Naturstoff-Polyethylenglycol (Abb. 14, vgl. Seite 38) besprüht und unter UV-Licht mit 366 nm detektiert. Dabei war kein signifikanter Unterschied bezüglich der verschiedenen Trocknungsweise der Tresterproben zwischen den Proben von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 4), „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 9) und den Proben der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 23) und „Rauch“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 15) erkennbar (vgl. Tab. 14 – 17, Seite 35 f. und Abb. 14, Seite 38).



SF4 SF9 SF23 SF15

Abbildung 13: Dünnschichtchromatogramme der Proben von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 4 = SF4), von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 9 = SF9), von der Firma „Rauch“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 23 = SF23) und von der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 15 = SF15), entwickelt mit Laufmittel 1, besprüht mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens, detektiert unter UV-Licht bei 366 nm (Bedingungen vgl. 2.2.5. Seite 21 f.)



SF4 SF9 SF23 SF15

Abbildung 14: Dünnschichtchromatogramme der Proben von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 4 = SF4), von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 9 = SF9), von der Firma „Rauch“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 23 = SF23) und von der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 15 = SF15), entwickelt mit Laufmittel 1, besprüht mit Naturstoff-Polyethylenglykol, detektiert unter UV-Licht bei 366 nm (Bedingungen vgl. 2.2.5. Seite 21 f.)

### 3.2.2. Gesamtpolyphenolgehalt der Sammelfractionen

Die Tabellen 18 bis 21 (vgl. Seite 38 f.) zeigen die Gesamtpolyphenolgehalte der Sammelfractionen der Proben von „Stift Klosterneuburg“ und der Proben der Firma „Rauch“ (vgl. Tab. 14 – 17, Seite 35 f.) berechnet als Gallussäure-Äquivalente (GAE). Die Proben der Firma „Rauch“ enthielten die größten Mengen an Gesamtpolyphenolen (725,7 mg/g bzw. 1194,8 mg/g), während bei den Proben von „Stift Klosterneuburg“ die Zahlen deutlich niedriger waren (231,6 mg/g bzw. 525,1 mg/g). Der Gehalt an Gesamtpolyphenolen stieg mit der Zahl der Fraktionen, bevor er kurz vor Wechsel des Elutionsmittels absank, um danach den größten Wert zu erreichen.

Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet)	Gesamtpolyphenolgehalt in mg GAE/l	Gesamtpolyphenolgehalt in mg/g Fraktionsgewicht
Sammelfraktion 1	2,5 (SD 0,27)	2,5 (SD 0,27)
Sammelfraktion 2	77,2 (SD 1,46)	76,6 (SD 1,43)
Sammelfraktion 3	67,6 (SD 1,19)	66,4 (SD 1,17)
Sammelfraktion 4	87,3 (SD 0,61)	86,2 (SD 0,71)
<b>Summe</b>	<b>234,5</b>	<b>231,6</b>

Tabelle 18: Gesamtpolyphenolgehalte der Sammelfractionen der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet)

Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert)	Gesamtpolyphenolgehalt in mg GAE/l	Gesamtpolyphenolgehalt in mg/g Fraktionsgewicht
Sammelfraktion 5	1,1 (SD 0,06)	1,1 (SD 0,07)
Sammelfraktion 6	25,7 (SD 0,19)	25,2 (SD 0,11)
Sammelfraktion 7	132,7 (SD 2,47)	131,7 (SD 2,52)
Sammelfraktion 8	67,6 (SD 2,53)	66,4 (SD 2,41)
Sammelfraktion 9	252,9 (SD 5,18)	247,7 (SD 4,73)
Sammelfraktion 10	54,4 (SD 3,62)	53,1 (SD 3,37)
<b>Summe</b>	<b>534,4</b>	<b>525,1</b>

Tabelle 19: Gesamtpolyphenolgehalte der Sammelfraktionen der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert)

Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)	Gesamtpolyphenolgehalt in mg GAE/l	Gesamtpolyphenolgehalt in mg/g Fraktionsgewicht
Sammelfraktion 11	1,6 (SD 0,40)	1,6 (SD 0,38)
Sammelfraktion 12	58,2 (SD 3,98)	57,0 (SD 3,13)
Sammelfraktion 13	114,3 (SD 2,52)	112,5 (SD 2,48)
Sammelfraktion 14	115,9 (SD 0,86)	114,1 (SD 0,85)
Sammelfraktion 15	279,6 (SD 7,84)	276,0 (SD 6,59)
Sammelfraktion 16	100,5 (SD 3,74)	98,5 (SD 3,63)
Sammelfraktion 17	41,1 (SD 2,50)	41,1 (SD 2,69)
Sammelfraktion 18	26,3 (SD 2,72)	25,1 (SD 2,43)
<b>Summe</b>	<b>737,4</b>	<b>725,7</b>

Tabelle 20: Gesamtpolyphenolgehalte der Sammelfraktionen der Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet)

Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert)	Gesamtpolyphenolgehalt in mg GAE/l	Gesamtpolyphenolgehalt in mg/g Fraktionsgewicht
Sammelfraktion 19	2,0 (SD 0,08)	2,0 (SD 0,08)
Sammelfraktion 20	61,7 (SD 0,93)	60,7 (SD 0,80)
Sammelfraktion 21	120,7 (SD 4,59)	119,3 (SD 3,12)
Sammelfraktion 22	117,8 (SD 5,57)	117,0 (SD 5,00)
Sammelfraktion 23	384,1 (SD 0,56)	382,2 (SD 4,32)
Sammelfraktion 24	95,0 (SD 1,07)	94,2 (SD 1,64)
Sammelfraktion 25	70,6 (SD 1,20)	69,8 (SD 1,48)
Sammelfraktion 26	91,6 (SD 1,77)	91,6 (SD 1,77)
Sammelfraktion 27	261,5 (SD 1,73)	257,9 (SD 0,27)
<b>Summe</b>	<b>1205,0</b>	<b>1194,8</b>

Tabelle 21: Gesamtpolyphenolgehalt der Sammelfraktionen der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert)

### **3.2.3. Analyse und Quantifizierung der Fraktionen mittels HPLC**

Tabelle 22 (vgl. Seite 41) zeigt die Gehalte an Hyperosid, Isoquercetin, Avicularin, Quercetin-desoxy-hexosid 1, Methyl-quercetin-hexosid, Phloridzin und Quercetin der Sammelfraktionen der Proben von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet) und von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) sowie der Proben der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet) und „Rauch“ (lyophilisiert), ermittelt mittels Hochleistungsflüssigchromatographie. Die größten Gehalte weisen Sammelfraktion 15, Sammelfraktion 23 und Sammelfraktion 9 auf. Quercetin konnte nur in Sammelfraktion 16 detektiert werden (vgl. Tab. 14 – 17, Seite 35 f.).



Probe	Sammelfraktion	Hyperosid mg/g	Isoquercetin mg/g	Quercetin- pentosid 1 mg/g	Avicularin mg/g	Quercetin-desoxy- hexosid 1 mg/g	Methyl-quercetin- hexosid mg/g	Phloridzin mg/g	Quercetin mg/g
"Stift Klosterneuburg" (ofengetrocknet)									
	4	18,6	7,1	7,5	13,4	12,1	6,0	6,3	n.d.
"Stift Klosterneuburg" (lyophilisiert)									
	9	38,8	15,7	16,1	32,3	45,4	25,0	56,2	n.d.
	10	8,5	5,1	5,7	9,8	8,9	5,7	6,2	n.d.
Firma "Rauch" (ofengetrocknet)									
	15	66,7	27,3	21,4	43,4	50,3	16,2	18,4	n.d.
	16	19,0	9,4	7,7	7,3	13,1	7,8	2,3	10,6
	17	5,1	n.d.	n.d.	4,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Firma "Rauch" (lyophilisiert)									
	23	60,0	26,0	19,6	39,8	36,5	16,9	25,4	n.d.
	24	12,5	6,7	6,0	10,2	9,0	5,2	3,6	n.d.
	25	5,1	5,2	n.d.	4,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 22: Gehalt an Hyperosid, Isoquercetin, Avicularin, Quercetin-desoxy-hexosid 1, Methyl-quercetin-hexosid, Phloridzin und Quercetin in Sammelfractionen der Proben von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet), von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) und der Proben der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet) und „Rauch“ (lyophilisiert)

Nachfolgendes HPLC-Chromatogramm (Abb. 15) zeigt Hyperosid, Isoquercetrin, Quercetin-pentosid, Avicularin, Quercetin-desoxy-hexosid, Methyl-quercetin-hexosid und Phloridzin, welche mithilfe eines UV-Detektors bei 280 nm detektiert wurden (Bedingungen vgl. 2.2.6. Seite 22 f.).

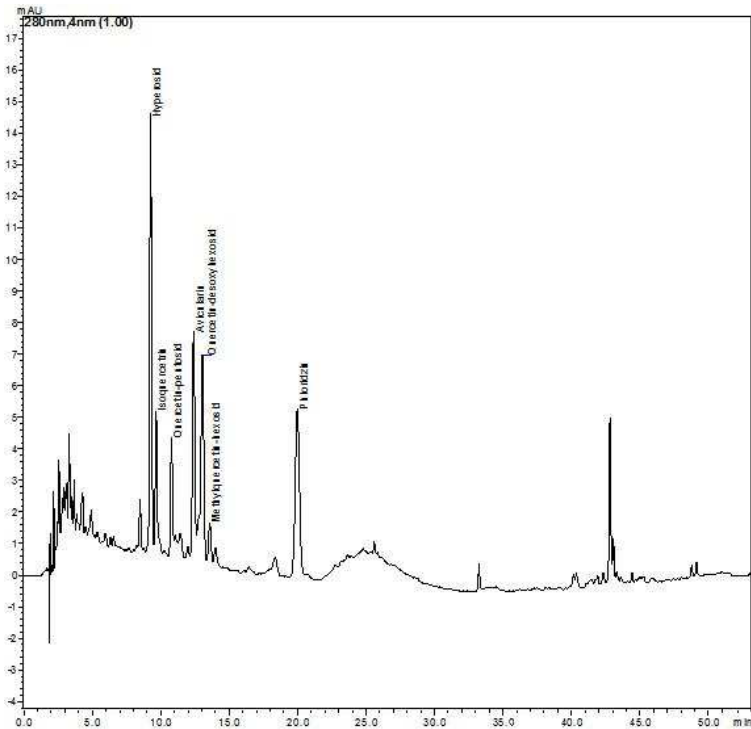


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm der Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 15), UV-Detektion bei 280 nm

In den HPLC-Chromatogrammen der Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet) zeigen sich in der ersten Sammelfraktion vor allem polare Substanzen wie Hyperosid, Isoquercetrin, Quercetin-pentosid, Avicularin, Quercetin-desoxy-hexosid, Methyl-quercetin-hexosid und Phloridzin (vgl. Sammelfraktion 15, Abb. 15). Die darauf folgende Sammelfraktion 16 weist neben den polaren auch apolare Komponenten auf (vgl. Abb. 16, Seite 43). In weiterer Folge kommen verstärkt apolare Substanzen vor (vgl. Abb. 17, Seite 43) bis die Konzentration beider Gruppen absinkt (vgl. Abb. 18, Seite 44).

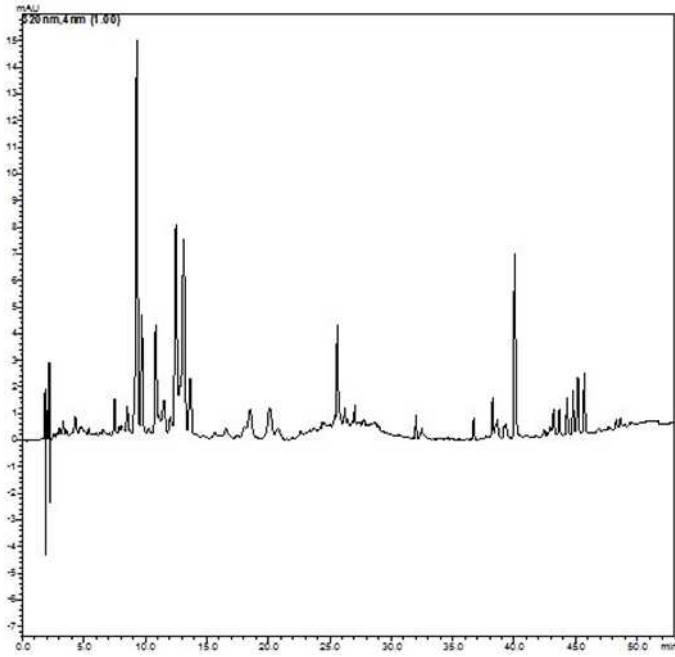


Abbildung 16: HPLC-Chromatogramm der Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 16), UV-Detektion bei 320 nm

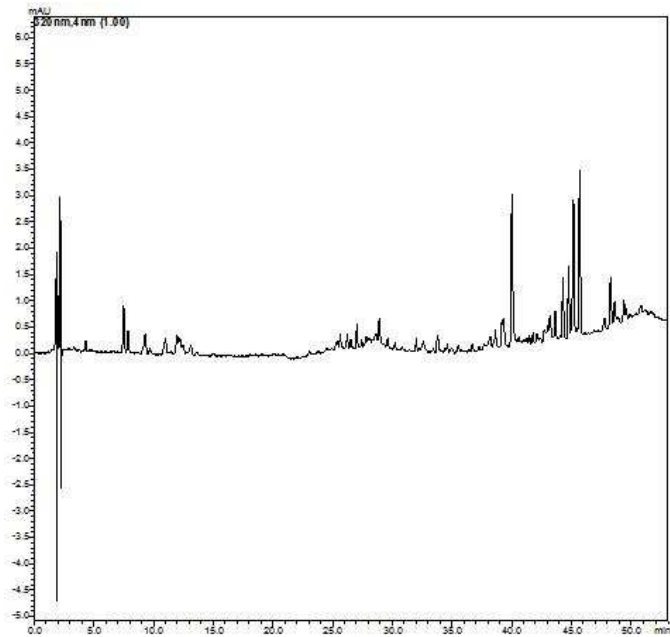


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm der Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 17), UV-Detektion bei 320 nm

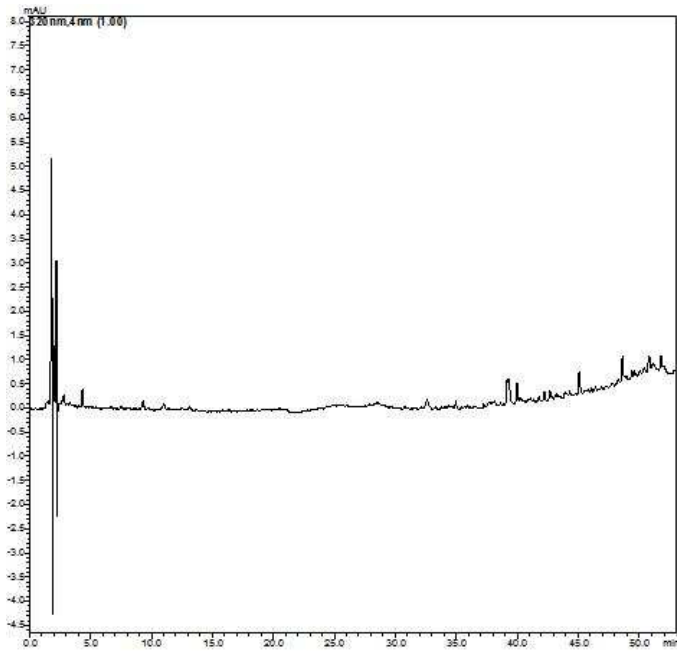


Abbildung 18: HPLC-Chromatogramm der Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 18), UV-Detektion bei 320 nm

Zur Detektion der apolaren Komponenten ohne Chromophor, welche in größerer Anzahl in den Proben von „Stift Klosterneuburg“ und der Firma „Rauch“ vorkamen, wurde ein ELSD-Detektor verwendet (Bedingungen vgl. 2.2.6. Seite 22 f.).

Abbildung 19 zeigt diese Substanzen, welche in der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 10) angereichert waren.

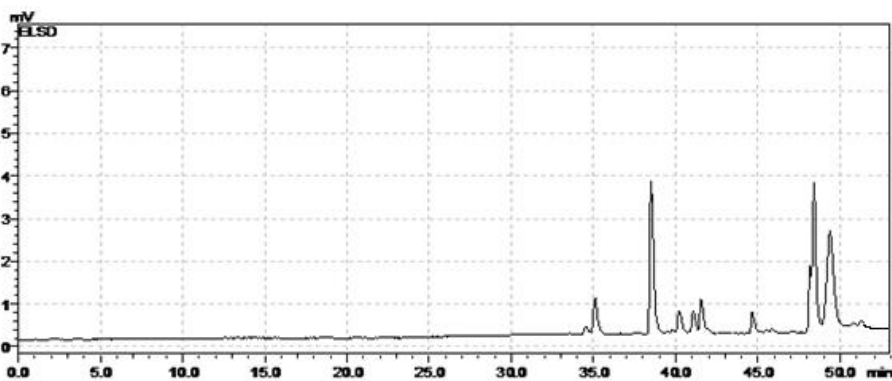


Abbildung 19: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 10)

Im Vergleich zeigen die HPLC-ELSD-Chromatogramme der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert, Sammelfraktionen 23 – 26, vgl. Abb. 20 – 23, Seite 45) und der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktionen 9 – 10, vgl.

Abb. 24 – 25, Seite 46) einige Unterschiede in der Zusammensetzung (Sammel-  
fraktionen vgl. Tab. 14 – 17, Seite 35 f.).

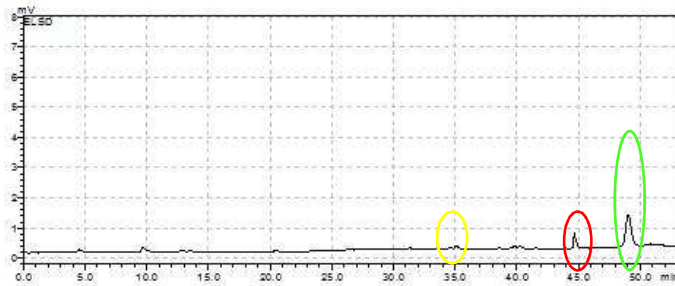


Abbildung 20: HPLC-ELSD-Chromatogramme der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert, Sammel-  
fraktion 23)

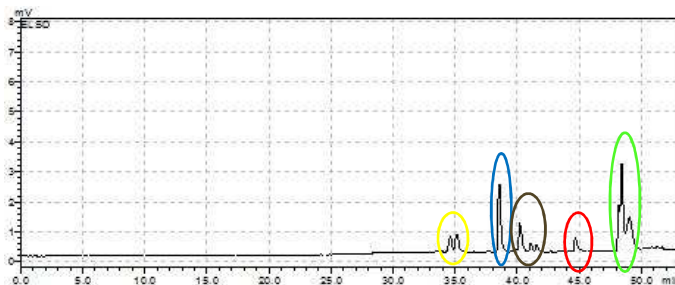


Abbildung 21: HPLC-ELSD-Chromatogramme der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert, Sammel-  
fraktion 24)

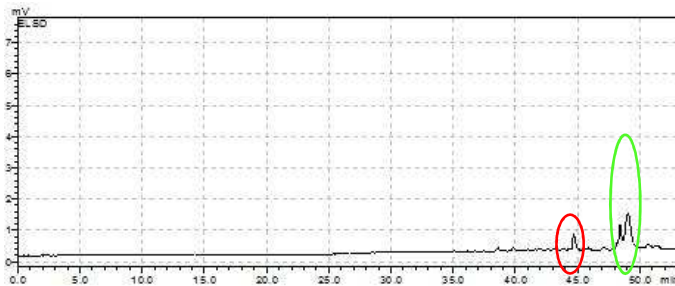


Abbildung 22: HPLC-ELSD-Chromatogramme der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert, Sammel-  
fraktion 25)

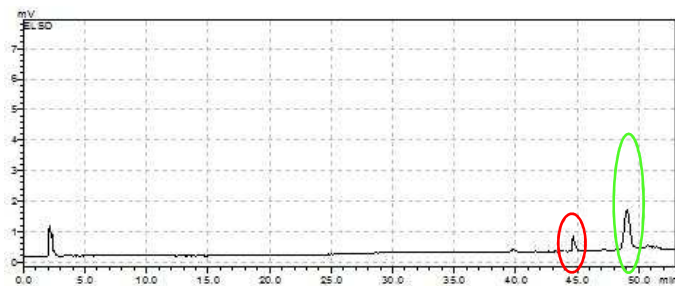


Abbildung 23: HPLC-ELSD-Chromatogramme der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert, Sammel-  
fraktion 26)

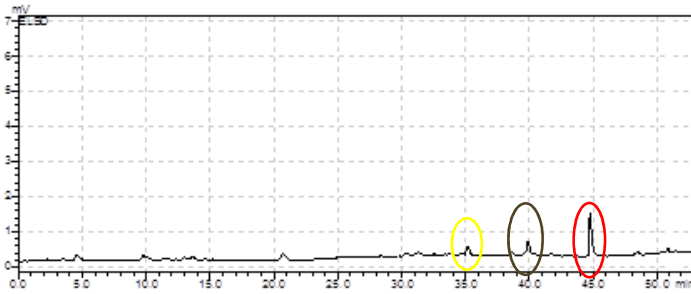


Abbildung 24: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 9)

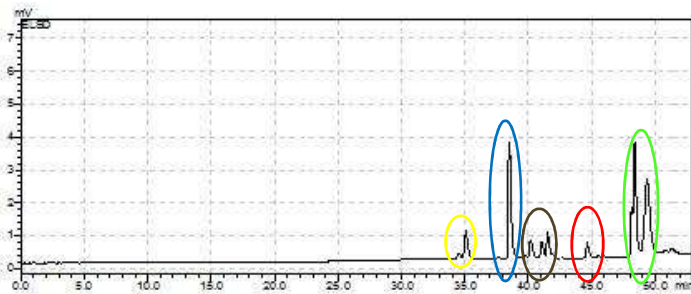


Abbildung 25: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 10)

- In der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert) wurde etwa in Minute 35 eine Substanz eluiert, welche in Sammelfraktion 23 und 24 in geringer Menge auftrat (gelb). Bei der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) zeigte sich diese in Sammelfraktion 9 und in der folgenden Sammelfraktion 10 in sichtbar größerem Ausmaß (vgl. Abb. 20 – 25, Seite 45 f.).
- Der Inhaltsstoff, der etwa in Minute 45 eluiert wurde (rot), kam in allen Sammelfraktionen der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert) in etwa gleicher Menge vor. Bei der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) war die Menge in Sammelfraktion 9 größer als in der folgenden Sammelfraktion 10 (vgl. Abb. 20 – 25, Seite 45 f.).
- Die blau markierten Komponenten, etwa in Minute 38 eluiert, zeigten sich bei der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert) nur in der Sammelfraktion 24 und bei der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) nur in der Sammelfraktion 10 (vgl. Abb. 21, Seite 45 und Abb. 25, Seite 46).
- In Minute 40 bis 41 wurden bei der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert) Komponenten eluiert, welche nur in Sammelfraktion 24 (drei Peaks) zu sehen sind. Bei der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) sind diese

in Sammelfraktion 9 (ein Peak) und 10 (drei Peaks) sichtbar (vgl. Abb. 21, Seite 45 und Abb. 24 – 25, Seite 46).

- In den Chromatogrammen der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert) ist in Sammelfraktion 23 und 26 etwa in Minute 48 je ein Peak zu sehen, in den Sammelfraktionen 24 und 25 je zwei Peaks, wobei diese nicht vollständig aufgetrennt worden sind. (vgl. Abb. 20 – 23, Seite 45). Die Chromatogramme von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) zeigen nur bei Sammelfraktion 10 in Minute 48 zwei getrennte Peaks (vgl. Abb. 25, Seite 46).

Die HPLC-ELSD-Chromatogramme der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet) und der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) wiesen ein recht ähnliches Erscheinungsbild auf. Aber es gab Unterschiede hinsichtlich der Menge der Inhaltsstoffe, denn die Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) zeigte höhere Gehalte, welche sich möglicherweise durch die schonendere Behandlung der Trester durch Lyophilisation erklären lassen (vgl. Abb. 26 – 27).

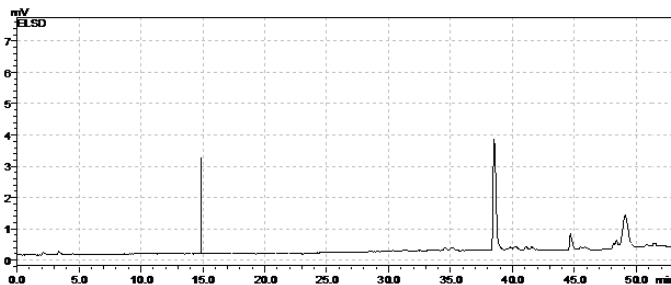


Abbildung 26: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 4)

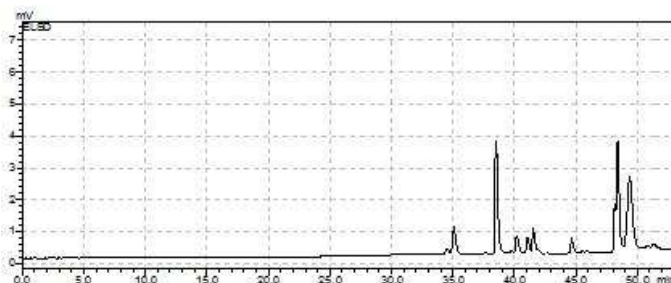


Abbildung 27: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Probe „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 10)

Der Vergleich der HPLC-ELSD-Chromatogramme der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet) und „Rauch“ (lyophilisiert) zeigt nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung und Menge der Inhaltsstoffe. Die schonendere Trocknung der Tresterproben lässt auch hier auf höheren Ertrag der lyophilisierten Probe schließen (Abbildung 28 – 29).

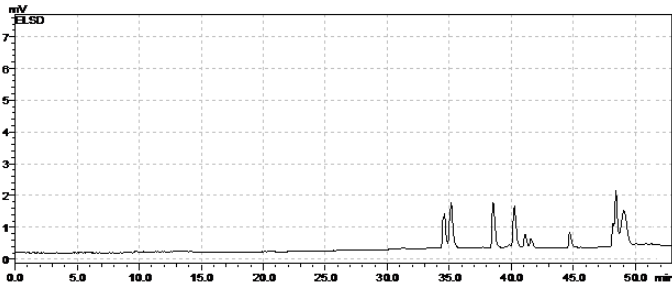


Abbildung 28: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, Sammelfraktion 16)

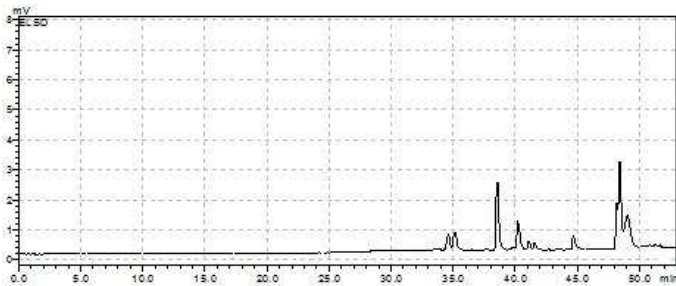


Abbildung 29: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 24)



#### 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Herstellung von Extrakten aus Apfelsaft-Trestern, deren Fraktionierung sowie mit der anschließenden Charakterisierung der Fraktionen durch Bestimmung des Gesamtphenolgehalts und der Analyse mittels Hochleistungsflüssig- und Dünnschichtchromatographie. Dabei wurde besonders auf den Gehalt an Polyphenolen in den Trestern Wert gelegt. Polyphenole zeigen in *in vitro*-Assays, Tierexperimenten, epidemiologischen Studien und in derzeit noch relativ wenigen *in vivo*-Studien gesundheitsfördernde und protektive Effekte im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen (Boyer J. and Liu R.H. 2004).

Aus den Proben von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet) und „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) sowie den Proben der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet) und „Rauch“ (lyophilisiert) wurden Rohextrakte mithilfe des Accelerated Solvent Extractors hergestellt. Dabei konnten beim gemahlenden Trester je nach Art der Trocknung unterschiedliche Eigenschaften festgestellt werden. Die lyophilisierten Proben zeigten größere Tendenzen zu verklumpen als die ofengetrockneten, was auf höhere Wasseranziehung des Materials nach der Lyophilisation schließen lässt. Auch bei der Bestimmung des Restfeuchtegehaltes stellte sich heraus, dass die lyophilisierten Proben höhere Werte erreichten als die ofengetrockneten (vgl. Tab. 11, Seite 33).

Das Ausgangsmaterial der Firma „Rauch“ wurde vollständiger verpresst, wodurch eine geringere Menge Rohextrakt erreicht wurde als bei der Probe von „Stift Klosterneuburg“. Die Extraktmengen der lyophilisierten Trester von „Stift Klosterneuburg“ und der Firma „Rauch“ waren geringfügig höher als die der ofengetrockneten (vgl. Tab. 10, Seite 33).

Der Gesamtpolyphenolgehalt wurde mit der Methode nach Folin-Ciocalteu bestimmt. Die Proben von „Stift Klosterneuburg“ enthielten deutlich weniger Gesamtpolyphenole als die Proben der Firma „Rauch“ (vgl. Tab. 12, Seite 34), obwohl aus dem Ausgangsmaterial eine größere Menge Extrakt gewonnen wurde. Die lyophilisierten Trester von „Stift Klosterneuburg“ und der Firma „Rauch“ enthielten höhere Gehalte an Gesamtpolyphenolen als die ofengetrockneten. Eine mögliche Er-

klärung könnte die Veränderung der Inhaltsstoffe durch die Temperaturanwendung bei der Trocknung im Trockenschrank sein.

Die Ergebnisse der Rohextrakte der vorliegenden Arbeit sind mit den Werten aus der Literatur vergleichbar. So enthielten z.B. die Apfeltrester bei García Y. et al. (2009) 3,9 – 13,9 mg/g Gesamtpolyphenole und die Apfelspalten Idared bei Rössle C. et al. (2010) 18,5 mg/g. Die Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert) erzielte den größten Gehalt mit 21,2 mg/g, die Probe von „Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet) den Geringsten mit 5,3 mg/g (vgl. Tab. 12, Seite 34).

Weiters wird in dieser Arbeit die Anreicherung und Fraktionierung phenolischer Substanzen aus dem Apfeltrester mittels Säulenchromatographie durchgeführt. Dadurch wurde die Herstellung von Fraktionen mit einem Gesamtpolyphenolgehalt von bis zu 382,2 mg/g (Sammelfraktion 23) erreicht (vgl. Tab. 21, Seite 39). Die lyophilisierten Proben von „Stift Klosterneuburg“ und von der Firma „Rauch“ erzielten größere Ausbeuten als die ofengetrockneten (vgl. Tab. 13, Seite 34).

Der Gesamtpolyphenolgehalt der Sammelfraktionen wurde durch die Folin-Ciocalteu-Methode bestimmt. Der Gehalt stieg mit der Zahl der Fraktionen an, sank dann aber ab und erreichte nach Wechsel des Elutionsmittels auf EtOH 96 % den größten Wert. Die Proben der Firma „Rauch“ enthielten höhere Gehalte an Gesamtpolyphenolen als die Proben von „Stift Klosterneuburg“ (vgl. Tab. 18 – 21, Seite 38 f.).

Ein Nachteil der Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehalts mittels Folin-Ciocalteu-Methode ist, dass die Differenzierung der Einzelkomponenten nicht möglich ist und dass neben phenolischen Stoffen auch andere reduzierende Substanzen erfasst werden (Matsuo S. et al. 2001).

Bei der Analyse mittels HPLC konnten folgende phenolische Verbindungen nachgewiesen und detektiert werden: Hyperosid, Isoquercetin, Avicularin, Phloridzin und Quercetin (vgl. Tab. 22, Seite 40). Die Identifizierung dieser Komponenten wurde im Rahmen der Dissertation von Waldbauer K. (2014) mithilfe von Vergleichssubstanzen durchgeführt. Ebenso konnten ein weiteres Quercetin-desoxyhexosid 1 und Methyl-quercetin-hexosid mithilfe der Massenspektrometrie detektiert werden und anhand der spektralen Eigenschaften des Quercetins unter Beachtung des Molekulargewichts quantifiziert werden.

Die Proben der Firma „Rauch“ enthielten größere Mengen dieser Komponenten als die Proben von „Stift Klosterneuburg“. Zwischen lyophilisierten und ofengetrockneten Proben zeigte sich nur ein geringer Unterschied bezüglich Zusammensetzung und Menge.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Proben neben diesen polaren Substanzen in größerer Menge apolare Komponenten enthalten. Zur Detektion der apolaren Inhaltsstoffe wurde ein Niedrig-Temperatur-Lichtstredetektor (ELSD) verwendet. Dabei zeigten die Proben von „Stift Klosterneuburg“ und die Proben der Firma „Rauch“ ähnliche Zusammensetzung, aber geringe Unterschiede hinsichtlich der Menge der Inhaltsstoffe (vgl. Abb. 20 – 25, Seite 45 f.). Die lyophilisierten Proben von „Stift Klosterneuburg“ und der Firma „Rauch“ enthielten größere Gehalte als die ofengetrockneten Proben im Vergleich, was sich möglicherweise durch die schonendere Behandlung der Trester durch Lyophilisation erklären lässt (vgl. Abb. 26 – 29, Seite 47 f.).

Abschließend gesehen wies die Probe der Firma „Rauch“ (lyophilisiert und ofengetrocknet) im Vergleich zur Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert und ofengetrocknet) einen höheren Gehalt an Gesamtpolyphenolen auf.

Auch die Gehalte von Hyperosid, Isoquercetin, Quercetin-pentosid 1, Avicularin und Quercetin-desoxy-hexosid 1 erreichten bei den Proben der Firma „Rauch“ (lyophilisiert und ofengetrocknet) höhere Werte. Die Probe von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert und ofengetrocknet) dagegen enthielt mehr Methyl-quercetin-hexosid und Phloridzin.

## 5. Zusammenfassung

Apfeltrester fällt jährlich in großen Mengen an und enthält wertvolle Inhaltsstoffe wie unter anderem Polyphenole. Diese dürften laut epidemiologischen Studien eine bedeutende Rolle in der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen spielen. Um das Abfallprodukt Apfeltrester einer sinnvollen Verwertung zu unterziehen, wird versucht, die enthaltenen Polyphenole anzureichern bzw. zu gewinnen. Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden zwei Apfeltrester [„Stift Klosterneuburg“ (ofengetrocknet, lyophilisiert) und Firma „Rauch“ (ofengetrocknet, lyophilisiert)] extrahiert, fraktioniert und analysiert. Die erhaltenen Fraktionen können einer weiteren Zellassay basierten Untersuchung zugeführt werden, um die eNOS-Aktivität von Fruchtrestereextrakten *in vitro* zu testen.

Die Apfeltrester wurden einerseits 12 Stunden bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet, andererseits bis zur vollständigen Trocknung mindestens 48 Stunden lyophilisiert, um den Einfluss des Trocknungsvorganges auf die Inhaltsstoffe vergleichen zu können.

Danach wurden aus den gemahlenden Treestern mithilfe der Accelerated Solvent Extraction Rohextrakte erhalten, wobei die Ausbeuten bei den Proben von „Stift Klosterneuburg“ höher waren als bei den Proben der Firma „Rauch“.

Der Restfeuchtegehalt der Rohextrakte war bei den Proben von „Stift Klosterneuburg“ größer als bei den Proben der Firma „Rauch“. Außerdem stellte sich heraus, dass die ofengetrockneten Proben beider Trester niedrigere Restfeuchtegehalte aufwiesen und somit länger gelagert werden könnten.

Der Gehalt an Gesamtpolyphenolen wurde mithilfe der Methode nach Folin-Ciocalteu bestimmt. Die Proben der Firma „Rauch“ enthielten deutlich größere Mengen an Polyphenolen als die Proben von „Stift Klosterneuburg“. Die lyophilisierten Proben beider Trester zeigten jeweils höhere Werte, was sich möglicherweise durch die schonendere Trocknung erklären lässt.

Im Anschluss wurden die Rohextrakte mittels Säulenchromatographie fraktioniert, wobei Diaion® HP-20 als stationäre Phase diente und EtOH 10% und EtOH 96% als mobile Phasen verwendet wurden.

Mithilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) konnten Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt werden. Die Ausbeuten jener

Fraktionen, die Polyphenole enthielten, waren bei den Proben der Firma „Rauch“ größer als bei den Proben von „Stift Klosterneuburg“.

Im Vergleich mit den ofengetrockneten Proben („Stift Klosterneuburg“, Firma „Rauch“) konnten aus den lyophilisierten Proben („Stift Klosterneuburg“, Firma „Rauch“) größere Mengen Polyphenole isoliert werden, was sich möglicherweise auf die schonendere Trocknung zurückführen lässt.

Einige Polyphenole konnten mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) detektiert werden. Sammelfraktion 15 der Probe der Firma „Rauch“ (ofengetrocknet) enthielt die größte Menge an Hyperosid (66,7 mg/g), Isoquercetin (27,3 mg/g), Quercetin-pentosid 1 (21,4 mg/g), Avicularin (43,4 mg/g) und Quercetin-desoxyhexosid 1 (50,3 mg/g). Bei der Probe „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert, Sammelfraktion 9) konnten die höchsten Werte an Methyl-quercetin-hexosid (25,0 mg/g) und Phloridzin (56,2 mg/g) festgestellt werden. Quercetin war nur in Fraktion 23 der Probe „Rauch“ (ofengetrocknet) detektierbar (10,6 mg/g).

Zur Detektion der in größerer Menge vorkommenden apolaren Inhaltsstoffe der Proben „Stift Klosterneuburg“ und der Firma „Rauch“ wurde ein Niedrig-Temperatur-Lichtstredetektor (ELSD) verwendet. Die Proben von „Stift Klosterneuburg“ (lyophilisiert) und der Firma „Rauch“ (lyophilisiert) wiesen größere Gehalte auf als die jeweils ofengetrockneten Proben von „Stift Klosterneuburg“ und der Firma „Rauch“, ein Umstand, der möglicherweise durch die schonendere Behandlung der Trester durch Lyophilisation erklärbar ist.

## 6. Summary

Apple pomace is generated annually in great extent and contains many valuable ingredients such as polyphenols. According to epidemiological studies, they may play a significant role in prevention of cardiovascular diseases. In order to recycle the waste product apple pomace it is tried to enrich and obtain these polyphenols. In this context, two samples of apple pomace [“Stift Klosterneuburg“ (oven-dried, lyophilized) and „Rauch“ (oven-dried, lyophilized)] have been purified and analyzed. This work will be used for further investigation in *in vitro* studies of eNOS activity.

The apple pomace samples were either oven-dried for 12 hours at 60°C or lyophilized for at least 48 hours until complete drying with the intention to compare the influence of the two different drying procedures on the ingredients. After drying, the milled pomaces were extracted with an Accelerated Solvent Extractor. The yields of the extracts of “Stift Klosterneuburg” samples were higher than the yields of the samples “Rauch”. The extracts of the samples “Stift Klosterneuburg” had higher moisture content than the samples of “Rauch”. The oven-dried samples of both pomaces had lower values of moisture content.

The total phenolic content was determined by means of Folin-Ciocalteu reagent. The samples “Rauch” contained more polyphenols than the samples “Stift Klosterneuburg”. The lyophilized pomace of both samples comprised higher values.

The raw extracts were fractionated by column chromatography using Diaion® HP-20 as stationary phase and EtOH 10% and EtOH 96% as mobile phases. Fractions with similar composition on the Thin Layer Chromatography (TLC) plates were united after assessment by means of thin layer chromatography. The samples “Rauch” had higher yields of polyphenol-containing fractions than the samples “Stift Klosterneuburg”. Higher amounts of polyphenols were isolated from the lyophilized samples than from the air dried samples probably because of the milder drying process. Some polyphenols were detected by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The sample “Rauch” (oven-dried, collected fraction 15) contained the largest quantities of Hyperoside (66.7 mg/g), Isoquercetin (27.3 mg/g), Quercetin-pentosid 1 (21.4 mg/g), Avicularin (43.4 mg/g) and Quercetin-desoxy-hexoside 1 (50.3 mg/g).

Whereas the sample “Stift Klosterneuburg” (lyophilized, collected fraction 9) showed the largest values of Methyl-quercetin-hexoside (25.0 mg/g) and Phloridzin (56.2 mg/g). Quercetin was only detectable in fraction 23 of “Rauch” (oven-dried) (10.6 mg/g).

An Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) was used for detection of high amounts of apolar components in samples of “Rauch” and “Stift Klosterneuburg”. The lyophilized samples of “Stift Klosterneuburg” and “Rauch” covered more ingredients than the oven-dried samples of those perhaps because of the milder drying process.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alonso-Salces R.M., Korta E., Barranco A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F. (2001), Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple, *Journal of Chromatography A* 933: 37-43
- Aprikian O., Duclos V., Guyot S., Besson C., Manach C., Bernalier A., Morand C., Remesy C., Demigne C. (2003), Apple pectin and a polyphenol rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats, *Journal of Nutrition* 133: 1860-1865
- Attri D. and Joshi V.K. (2006), Optimization of apple pomace based medium and fermentation conditions for pigment production by *Chromobacter* sp., *Journal of Food Science and Technology* 43: 484-487
- Awad M.A., de Jager A., van Westing L.M. (2000), Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation, *Scientia Horticulturae* 83: 249-263
- Baba S., Osakabe N., Kato Y., Natsume M., Yasuda A., Kido T., Fukuda K., Muto Y., Kondo K. (2007), Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition* 85: 709-17
- Basu A. and Penugonda K. (2009), Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice, *Nutrition Reviews* 67: 49-56
- Berovic M. and Ostroversnik H. (1997), Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace, *Journal of Biotechnology* 53: 47-53
- Bhushan S., Kalia K., Sharma M., Singh B., Ahuja P.S. (2008), Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules, *Critical Reviews in Biotechnology* 28: 285-296
- Bhushan S. and Joshi V.K. (2006), Baker's yeast production under fed-batch culture from apple pomace, *Journal of Scientific & Industrial Research* 65: 72-76
- Bogaty P., Hackett D., Davies G., Maseri A. (1994), Vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina, *Circulation* 90: 5-11
- Boyer J. and Liu R.H. (2004), Apple phytochemicals and their health benefits, *Nutrition Journal* 3: 5-19
- 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: 4268-4274
- Cedra J.J., Robinsons F.L., Burgin C.W., Baumgartner T.G., Rice R.W. (1988), The effects of grapefruit pectin on patients at risk for coronary heart diseases, *Clinical Cardiology* 11: 589
- Ćetković G., Čanadanović-Brunet J., Djilas S., Savatović S., Mandić A., Tumbas V. (2008), Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace, *Food Chemistry* 109: 340-347
- Cfm (Chemische Fabrik Marktredwitz AG) Oskar Tropitzsch, Online im Internet, URL: <http://www.cfmot.de/en/phytochemicals/cyanidin-3-glucoside.html> (o. J.)



- Cody V., Middleton E., Harborne J.B. (1986), Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological and structure activity relationships: proceedings of a symposium held in Buffalo, New York, July 22-26, 1985, Band 1
- Cordova A.C., Jackson L.S., Berke-Schlessel D.W., Sumpio B.E. (2005), The cardiovascular protective effect of red wine, *Journal of the American College of Surgeons* 200(3): 428-439
- Curin Y. and Andriantsitohaina R. (2005), Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases, *Pharmacological Reports* 57 (suppl.): 97-107
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R., Djilas S., Čanadanović-Brunet J., Četković G. (2007), Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Annali dell'Instituto Superiore Di Sanita* 43: 348-361
- Da Silva Porto P.A., Laranjinha J., de Freitas V. (2003), Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships, *Biochemical Pharmacology* 66: 947-954
- Delbarre F., Roudier J., de Gery A. (1977), Lack of effect of two pectins in idiopathic or gout associated hyperdyslipidemia hypercholesterolemia, *The American Journal of Clinical Nutrition* 30: 463
- Demrow H.S., Slane P.R., Folts J.D. (1995), Administration of wine and grape juice inhibits *in vivo* platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries, *Circulation* 91: 1182-1188
- Di Castelnuovo A., Rotondo S., Iacoviello L., Donati M.B., De Gaetano G. (2002), Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk, *Circulation* 105: 2836-2844
- Dick A.J., Redden P.R., DeMarco A.C., Lidster P.D., Grindley T.B. (1987), Flavonoid glycosides of Spartan apple peel, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 529-531
- Djilas S., Čanadanović-Brunet J., Četković G. (2009), By-Products of fruits processing as a source of phytochemicals, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 15(4): 191-202
- Eberhardt M., Lee C., Liu R.H. (2000), Antioxidant activity of fresh apples, *Nature* 405: 903-904
- Edwards R.L., Lyon T., Litwin S.E., Rabovsky A., Symons J.D., Jalili T. (2007), Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects, *The Journal of Nutrition* 137: 2405-11
- Endreß H.-U. (2000), High quality resulting from product integrated environment protection – PIUS, *Fruit Processing* 10: 273-276
- Escarpa A. and Gonzalez M.C. (1998), High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties, *Journal of Chromatography A* 823: 331-337
- Favela-Torres E., Volke S.T., Viniegra G.G. (2006), Production of hydrolytic depolymerising pectinases, *Food Technology and Biotechnology* 44: 221-227
- Figuerola F., Hurtado M.L., Estevez A.M., Chiffelle I., Asenjo F. (2005), Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential source for food enrichment, *Food Chemistry* 91: 395-401
- Formica J.F. and Regelson W. (1995), Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food and Chemical Toxicology* 33 (12): 1061-80

- Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI) (2011), Entwicklung mikroverkapselter Polyphenolextrakte aus pflanzlichen Reststoffen zur Nutzung als Lebensmitteladditive, Online im Internet: URL: [http://www.fei-bonn.de/download/projekte/projektdatenbank.html/fv\\_16014](http://www.fei-bonn.de/download/projekte/projektdatenbank.html/fv_16014) (02.10.2012)
- Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI) (2010), Bioaktive Inhaltsstoffe mit gesundheitsförderndem Potenzial aus Nebenprodukten der Apfelsaftherstellung und der Apfelpektinengewinnung: In-vitro-Charakterisierung des Wirkprofils und Anreicherung wertgebender Komponenten, Online im Internet: URL:[http://lmc.univie.ac.at/fileadmin/user\\_upload/inst\\_lebensmittelchemie/15617.pdf](http://lmc.univie.ac.at/fileadmin/user_upload/inst_lebensmittelchemie/15617.pdf) (31.05.2013)
- Fuhrmann B. and Aviram M. (2001), Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis, *Current Opinion in Lipidology* 12: 41-48
- García Y.D., Valles B.S., Lobo A.P. (2009), Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple Pomace, *Food Chemistry* 117: 731-738
- Gerhauser C. (2008), Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components, *Planta Medica* 74: 1608-1624
- Ghosh D. and Scheepens A. (2009), Vascular action of polyphenols, *Molecular Nutrition & Food Research* 53: 322-331
- Giovannini C., Scazzocchio B., Vari R., Santangelo C., D'Archivio M., Masella R. (2007), Apoptosis in cancer and atherosclerosis: polyphenol activities, *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43 (4): 406-416
- Gokce N. and Vita J.A. (2002), Clinical manifestations of endothelial dysfunction. In: Loscalzo J, Schafer AI, eds. Thrombosis and hemorrhage, 685-706, *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia
- Goldberg G. ed. (2003), Plants: Diet and Health. *The Report of the British Nutrition Foundation Task Force*, Blackwell Science for the British Nutrition Foundation: Oxford, UK
- Golding J., Mc Glasson B., Wyllie S., Leach D. (2001), Fate of apple peel phenolics during cold storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2283-2289
- 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  $\alpha$ - tubulin, *Oncology Reports* 23:1145-1151
- Gullón B., Garrote G., Alonso J.L., Parajó J.C. (2007), Production of L-lactic acid and oligomeric compounds from apple pomace by simultaneous saccharification and fermentation: a response surface methodology assessment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5580-5587
- Guyot S., Marnet N., Laraba D., Sanoner P., Drilleau J.-F. (1998), Reversed-phased HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* var. *Kermerrien*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1698-1705
- Guyot S., Marnet N., Sanoner P., Drilleau J.-F. (2003), Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6240-6247
- Guyot S., Serrand S., Querre J.M.L., Sanoner P., Renard C.M.G.C. (2007), Enzymatic synthesis and physicochemical characterization of phloridzin oxida-

- tion products, a new water soluble yellow dye deriving from apple, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8: 443-450
- Hamauzu Y., Yasui H., Inno T., Kume C., Omanyuda M. (2005), Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 928-934
- Hang Y.D., Lee C.Y., Woodams E.E., Cooley H.J. (1981), Production of alcohol from apple pomace, *Applied and Environmental Microbiology* 42: 1128-1129
- Hang Y.D. (1987), Production of fuels and chemicals from apple pomace, *Food Technology* 41: 115-117
- Hang Y.D. and Woodams E.E. (1984), Apple pomace. A potential substrate for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 6: 763-764
- Herbstreith & Fox KG, Pektin – Natürlich von H&F, Online im Internet: URL: <http://www.herbstreith-fox.de/de/pektine.html> (19.05.2013)
- Hollman P.C.H. et al. (2001), Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 842-852
- Hollman P.C.H. (2010), The 4<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols and Health, *Nutrition Bulletin* 35: 183-5
- Hooper L., Kroon P.A., Rimm E.B., Cohn J.S., Harvey L., Le Cornu K.A., Ryder J.J., Hall W.L., Cassidy A. (2008), Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials, *The American Journal of Clinical Nutrition* 88: 38-50
- Huber G.M. and Rupasinghe H.P.V. (2009), Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts, *Journal of Food Science* 74(9): 693-700
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. (1987), Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 9265-9
- Joseph G.H. (1956), Pectin Bibliography of Pharmaceutical Literature, *Sunskist Growers*, Ontario, CA
- Joshi V.K., Gupta K., Devrajan A., Lal B.B., Arya S.P. (2000), Production and evaluation of fermented apple pomace in the feed of broilers, *Journal of Food Science and Technology* 37: 609-612
- Joshipura K., Hu F., Manson J., Stampfer M., Rimm E., Speizer F., Colditz G., Ascherio A., Rosner B., Spiegelman D., Willett W. (2001), The effect of fruit and vegetable intake on risk of coronary heart disease, *Annals of Internal Medicine* 134: 1106-1114
- Kahle K., Kraus M., Richling E. (2005), Polyphenol profiles of apple juices, *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 797-806
- Kahle K., Huemmer W., Kempf M., Scheppach W., Erk T., Richling E. (2007), Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10605-10614
- Kahle K., Kempf M., Schreier P., Scheppach W., Schrenk D., Kautenburger T., Hecker D., Huemmer W., Ackermann M., Richling E. (2011), Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols, *The European Journal of Nutrition* 50: 507-522

- Kalia V.C., Kumar A., Jain S.R., Joshi A.P. (1992), Biomethanation of plant materials, *Bioresource Technology* 41: 209-212
- Kar P., Laight D., Shaw K.M., Cummings M.H. (2006), Flavonoid-rich grapeseed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? *International Journal of Clinical Practice* 60: 1484-1492
- Kennedy M.J. et al. (1994), Apple pomace and kiwifruit: processing options, *Australian Biotechnology* 4: 43-49
- Knekt P., Isotupa S., Rissanen H., Heliövaara M., Järvinen R., Hakkinen R., Aromaa A., Reunanen A. (2000), Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease, *European Journal of Clinical Nutrition* 54: 415-417
- Kohn R. (1982), Binding of toxic cations to pectin, its oligomeric fragments and plant tissues, *Carbohydrate Polymers* 2: 273
- Lamperi L., Chiuminatto U., Cincinelli A., Galvan P., Giordani E., Lepri L., Del Bubba M. (2008), Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6536-6546
- Lancaster J. E. (2000), Induction of flavonoids and phenolic acids in apple by UV-B and temperature, *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 75: 142-148
- Leontowicz H., Gorinstein S., Lojek A., Leontowicz M., Číž M., Soliva-Fortuny R., Park Y.-S., Jung S.-T., Trakhtenberg S., Martin-Belloso O. (2002), Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches, and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats, *The Journal of Nutrition Biochemistry* 13: 603-610
- Levine G.N., G.N., Keaney J.F.Jr., Vita J.A. (1995), Cholesterol reduction in cardiovascular disease: clinical benefits and possible mechanisms, *The New England Journal of Medicine* 332: 512-521
- Lotito S.B. and Frei B. (2006), Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence or epiphenomenon, *Free Radical Biology & Medicine* 41: 1727-1746
- Lu Y. and Foo L.Y. (1997), Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace, *Food Chemistry* 59: 187-194
- Lu Y. and Foo L.Y. (1998), Constitution of some chemical components of apple seed, *Food Chemistry* 61: 29-33
- Lu Y. and Foo L.Y. (2000), Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food Chemistry* 68: 81-85
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. (2005), Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 230-242
- Matsuo S., Nakamura Y., Takahashi M., Ouchi Y., Hosoda K., Nozawa M., Kinoshita M. (2001), Effect of red wine and ethanol on production of nitric oxide in healthy subjects, *American Journal of Cardiology* 87: 1029-1031, A6
- Mazza G. and Velioglu Y.S. (1992), Anthocyanins and other phenolic compounds in fruits of red-flesh apples, *Food Chemistry* 43: 113-117
- Mehrländer K., Will F., Dietrich H., Sembries S., Dongowski G. (2002), Structural characterization of oligosaccharides and polysaccharides from apple juices produced by enzymatic pomace liquefaction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1230-1236

- Michalska M., Gluba A., Mikhoulidis D.P., Nowak P., Bielecka-Dabrowa A., Rysz J., Banach M. (2010), The role of polyphenols in cardiovascular disease, *Medical Science Monitor* 16 (5): 110-119
- Middleton E.Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000), The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacological Reviews* 52: 673-751
- Muralikrishna G. and Taranathan R.N. (1994), Characterization of pectin polysaccharides from pulse husks, *Food Chemistry* 50: 87
- Neveu V., Perez-Jiménez J., Vos F. (2010), Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods, Database doi: 10.1093/database/bap024 (Version 1.5.2.), Available at: <http://www.phenol-explorer.eu>
- Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E., Boelens P.G., Van Norren K., Van Leeuwen P.A. (2001), Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *The American Journal of Clinical Nutrition* 74: 418-425
- Pannala A.S., Rice-Evans C.A., Halliwell B., Singh S. (1997), Inhibition of peroxy-nitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 232: 164-168
- Pearson D., Tan C.H., German J.B., Davis P.A., Gershwin M.E., (1999), Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation, *Life Science* 64: 1913-1920
- Pérez-Illarbe J., Hernandez T., Estrella I. (1991), Phenolic compounds in apples: varietal difference, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 192: 551-554
- Peters U. et al. (2001), Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis, *The American Journal of Epidemiology*, 154: 495-503
- Pfannhauser W., Fenwick G.R., Khokhar S. (Eds.), (2001), Biologically-Active Phytochemicals in Food. Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function, *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK*: 271-273
- Pirmohammadi R., Rouzbehan Y., Rezayazadi K., Zahedifar M. (2006), Chemical composition, digestibility and in situ degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage, *Small Ruminant Research* 66: 150-155
- Rechner A.R. and Kroner C. (2005), Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function, *Thrombosis Research* 116: 327-34
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G. (1996), Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (7): 933-956
- Roberts J.S., Gentry T.S., Bates A.W. (2004), Utilization of dried apple pomace as a press aid to improve the quality of strawberry, raspberry and blueberry juices, *Journal of Food Science* 69: SNQ, 181-190
- Rössle C., Wijngaard H.H., Gormley R.T., Butler F., Brunton N. (2010), Effect of storage on the content of polyphenols of minimally processed skin-on apple wedges from ten cultivars and two growing seasons, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 1609-1614
- Sánchez-Rabáneda F., Jáuregui O., Lamuela-Raventós R.M., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (2004), Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 553-563

- Sanoner P., Guyot S., Marnet N., Molle D., Drilleau J.-F. (1999), Polyphenol profiles of french cider apple varieties (*Malus domestica* sp.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4847-4853
- Sato M.F., Vieira R.G., Zardo D.M., Falcão L.D., Nogueira A., Wosiacki G. (2010), Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds, *Acta Scientiarum Agronomy* (Online) 32 (1) <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i1.317610.4025/actasciagron.v32i1.3176> (27.10.2012)
- Saura-Calixto F., Serrano J., Goñi I. (2007), Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet, *Food Chemistry* 101: 492-501
- Savatović S.M., Tepić A.N., Šumić Z.M., Nikolić M.S. (2009), Antioxidant activity of polyphenol-enriched apple juice, <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/1450-7188/2009/1450-71880940095S.pdf> (24.12.2012)
- Scalbert A. and Williamson G. (2000), Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *Journal of Nutrition* 130: 2073-2085
- Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M. (2005), Polyphenols: Antioxidants and beyond, *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 215-217
- Schalow S. (2009), Untersuchungen zum enzymatisch-physikalischen Aufschluss von Apfeltrester, Technische Universität Berlin, *Dissertation*
- Schieber A., Hilt P., Conrad J., Beifuss U., Carle R. (2002), Elution order of quercetin glycosides from apple pomace extracts on a new HPLC stationary phase with hydrophilic endcapping, *Journal of Separation Science* 25: 361-364
- Schieber A., Hilt P., Streker P., Endreß H.-U., Rentschler C., Carle R. (2003), A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4: 99-107
- Schwartz S.E., Levine R.A., Singh A., Scheidecker J.R. (1983), Sustained pectin delays gastric emptying, *Gastroenterology* 83: 812
- Sehm J., Linder Mayer H., Dummer C., Treutter D., Pfaffl M.W. (2007), The influence of polyphenol rich apple pomace or red-wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 91: 289-296
- Sesso H.D., Gaziano J.M., Liu S., Buring J. (2003), Flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in women, *The American Journal of Clinical Nutrition* 77: 1400-1408
- Shah G.H. and Masoodi F.A. (1994), Studies on the utilization of wastes from apple processing plants, *Indian Food Packer* 48 (5): 47-52
- Shojaosadati S.A. and Babaeipour V. (2002), Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor, *Process Biochemistry* 37: 909-914
- Silbernagl St. und Lang F. (2005), Taschenatlas der Pathophysiologie, 236-238, 2. korrigierte Auflage, Thieme, Stuttgart
- Spanos G.A. and Wrolstad R.E. (1992), Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage – a review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1478-1487
- Stanner S. ed. (2005), Cardiovascular disease: Diet, nutrition and emerging risk factors, *The Report of the British Nutrition Foundation Task Force*, Blackwell Science for the British Nutrition Foundation: Oxford, UK,

- Online im Internet: URL:  
<http://medicallibrary90.wikispaces.com/file/view/Cardiovascular+Disease+Diet+Nutrition+and+Emerging+Risk+Factors+The+Report+of+the+British+Nutrition+Foundation+Task+Force.pdf> (06.03.2013)
- Stein J.H., Keevil J.G., Wiebe D.A., Aeschlimann S., Folts J.D. (1999), Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease, *Circulation* 100: 1050-1055
- Stevenson D.E. and Hurst R.D. (2007), Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cellular & Molecular Life Sciences* 64: 2900-2916
- Stiftung Warentest: Apfelsaft: Drei sind durchgefallen, Online im Internet: URL:  
<http://www.test.de/Apfelsaft-Drei-sind-durchgefallen-1801978-0/>  
 (18.09.2009)
- Stracke B.A., Rufer C.E., Weibel F.P., Bub A., Watzl B. (2009), Three-year comparison of the polyphenol contents and antioxidant capacities in organically and conventionally produced apples (*Malus domestica* bork. Cultivar 'Golden Delicious'), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4598-4605
- Suárez B., Álvarez Á.L., García Y.D., del Barrio G., Lobo A.P., Parra F. (2010), Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace, *Food Chemistry* 120: 339-342
- Sudha M.L., Baskaran V., Leelavathi K. (2007), Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making, *Food Chemistry* 104: 686-692
- Suwaidi J.A., Hamasaki S., Higano S.T., Nishimura R.A., Holmes D.R., Lerman A. (2000), Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction, *Circulation* 101: 948-954
- Tabak C., Arts I., Smit H., Heederik D., Kromhout D. (2001), Chronic obstructive pulmonary disease and intake of catechins, flavonols, and flavones, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164: 61-64
- Takahashi J. and Mori T. (2006), Hydrogen production from reaction of apple pomace with water over commercial steam reforming Ni catalysts, *Journal of the Japan Petroleum Institute* 49: 262-267
- Taubert D., Roesen R., Schomig E. (2007), Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis, *Archives of Internal Medicine* 167: 626-634
- Thakur B.R., Singh R.K., Handa A.K. (1997), Chemistry and uses of pectin – A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37: 47-73
- Tsao R., Yang R., Young J.C., Zhu H. (2003), Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6347-6353
- Tsao R., Yang R., Xie S., Sockovie E., Kanizadeh S. (2005), Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4989-4995
- Vanden Berghe W. (2012), Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: Lifelong remodeling of our epigenomes, *Pharmacological Research* 65: 565-576
- Van der Sluis A.A., Dekker M., de Jager A., Jongen W.M.F. (2001), Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3606-3613

- Van der Sluis A.A., Dekker M., Skrede G., Jongen W.M.F. (2002), Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7211-7219
- VDF (2009), Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e. V., Trier/ Bonn, Online im Internet: URL: [http://www.fruchtsaft.net/index.php?menu\\_sel=17&menu\\_sel2=23&menu\\_sel3=&menu\\_sel4=&msg=425](http://www.fruchtsaft.net/index.php?menu_sel=17&menu_sel2=23&menu_sel3=&menu_sel4=&msg=425) (31.05.2013)
- Vendruscolo F., Albuquerque P.M., Streit F., Esposito E., Ninow J.L. (2008), Apple Pomace: A versatile substrate for biotechnological applications, *Critical Reviews in Biotechnology* 28: 1-12
- Vieira F.G.K., da Silva Campelo Borges G., Copetti C., Gonzaga L.V., da Costa Nunes E., Fett R. (2009), Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars, *Archivos Latino-americanos de Nutricion* 59: 101-106
- Villas-Bôas S.G., Esposito E., Matos de Mendonca M. (2003), Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 461-467
- Visioli F., Bernaert H., Corti R., Ferri C., Heptinstall S., Molinari E., Poli A., Serafini M., Smit H.J., Vinson J.A., Violi F., Paoletti R. (2009), *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 49: 299-312
- Vita J.A. (2005), Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function, *American Journal of Clinical Nutrition* 81 (suppl): 292-297
- Vrhovsek U., Rigo A., Tonan D., Mattivi F. (2004), Quantification of polyphenols in different apple varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6532-6538
- Wagner H. and Bladt S. (1996), Plant Drug Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas, 362, 2. Ausgabe, Springer, Berlin
- Waldbauer K. (2013), Dissertation, Universität Wien, in Vorbereitung
- Weichselbaum E. and Buttriss J.L. (2010), Polyphenols in the diet, *Nutrition Bulletin* 35: 157-164
- Wiacek-Zychliniska A. (1994), Xylanase production by fungal strains in solid-state fermentation, *Bioresource Technology* 49: 13-16
- Widlansky M.E., Gokce N., Keaney J.F.Jr., Vita J.A. (2003), The clinical implications of endothelial dysfunction, *Journal of the American College of Cardiology* 42: 1149-60
- Wijngaard H.H. and Brunton N. (2010), The optimisation of solid-liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology, *Journal of Food Engineering* 96: 134-140
- Willet W. (1995), Diet, nutrition and avoidable cancer, *Environ Health Perspect*, 103: 165-170
- Wilson E.L. (1981), High-pressure liquid chromatography of apple juice phenolic compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32: 257-264
- Wojdylo A., Oszmianski J., Laskowski P. (2008), Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6520-6530
- Wolfe K., Wu X., Liu R.H. (2003), Antioxidant activity of apple peels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 609-614



## **Curriculum vitae**

### Persönliche Daten:

Name: Maria Häusler  
Geburtsdatum: 01.09.1985  
Geburtsort: Zwettl, NÖ  
Staatsangehörigkeit: Österreich

### Ausbildung:

seit 2004 Studium der Pharmazie an der Universität Wien  
1996 – 2004 Bundesgymnasium Zwettl  
Abschluss: Matura  
1992 – 1996 Volksschule Rappottenstein

### Berufliche Erfahrung:

09/ 2007 Praktikum Apotheke zum Schwarzen Adler,  
Zwettl, NÖ