



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Charakterisierung von Heidelbeertrestern
und deren phenolischen Inhaltsstoffen

verfasst von

Job Simon

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreut von: Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr.h.c. Brigitte Kopp

Danksagung:

In den einleitenden Zeilen dieser Diplomarbeit möchte ich mich bei einigen Personen bedanken:

Frau Professor Kopp gab mir die Möglichkeit, mich an dem spannenden Tresterprojekt zu beteiligen. Für die Möglichkeiten, die sie mir geboten hat, und die Unterstützung zu jedem Zeitpunkt meiner Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich auch an Katharina Waldbauer richten. Mit viel Geduld, Humor und einem stets wachsamen Auge hat sie mich durch diese Arbeit begleitet. Ich habe in ihr eine wunderbare Arbeitskollegin und Freundin gefunden, wofür ich sehr dankbar bin.

Generell empfand ich das Arbeitsklima bei der praktischen Arbeit stets als sehr angenehm und ich verstand mich mit meinen Arbeitskollegen wunderbar. Auch ihnen will ich für Hilfe und tolle Gespräche danken.

Meine Familie unterstützte mich zu jedem Zeitpunkt meines Studiums. Die kompromisslose Hingabe, mit der meine Eltern ihre Kinder unterstützen, bewundere ich. Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung.....	6
1.1	Potenzial der Trester	6
1.2	Die Heidelbeere	8
1.2.1	Traditionelle Anwendung	8
1.2.2	Inhaltsstoffe der Heidelbeere	8
1.3	Ziele der Diplomarbeit.....	16
2.	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien.....	18
2.2	Probenvorbereitung und Extraktion	19
2.3	Dünnschichtchromatographie (DC).....	20
2.4	Säulenchromatographie (SC).....	22
2.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	24
2.6	Sonstige Geräte	26
3.	Ergebnisse	27
3.1	Herstellung von Extrakten verschiedener Polaritäten	27
3.2	HPLC-Trennung der im Heidelbeertrester vorhandenen Anthocyane	29
3.2.1	Methodenentwicklung	30
3.3	Fraktionierung des Heidelbeertresters mittels Säulenchromatographie	43
3.3.1	Extraktion des Heidelbeertresters.....	43
3.3.2	Durchführung der Auftrennung des Heidelbeertresters mittels SC.....	43
3.3.3	Untersuchungen der Sammelfractionen.....	49
3.4	Identifizierung und Quantifizierung der Anthocyane in Heidelbeertresterextrakt und Sammelfractionen	52
3.4.1	Zuordnung der Anthocyane im Heidelbeertrester.....	53
3.4.2	Eichgerade	55

3.4.3	Qualitative und quantitative Analyse der Sammelfractionen.....	60
3.5	Metabolismus phenolischer Inhaltsstoffe in der Heidelbeere.....	63
3.5.1	Resorption und Metabolismus im Menschen	63
3.5.2	Resorption und Elimination von phenolischen Strukturen	64
3.5.3	Metabolite phenolischer Substanzgruppen in Heidelbeeren	66
4.	Diskussion.....	71
5.	Zusammenfassung.....	76
6.	Summary	78
7.	Literaturverzeichnis.....	80

Abkürzungen:

AA-Reagenz	Anisaldehyd-Reagenz
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACN	Acetonitril
ASE	Accelerated Solvent Extraction
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
cGMP	cyclisches Guanosylmonophosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEV	Droge-Extrakt Verhältnis
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
EtOH	Ethanol
FM	Fließmittel
HbTr	Heidelbeertrester
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
LC	Flüssig-Chromatographie
LM	Lösungsmittel
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
n.d.	Nicht detektierbar
NO	Stickstoffmonoxid
NP-Reagenz	Naturstoffreagenz
ÖAB	österreichisches Arzneibuch
RP Chromatographie	Umkehr-Phasen-Chromatographie
spp.	<i>species pluralis</i>
UV	ultraviolett
VMA	<i>Vaccinium myrtillus</i> (L.) Anthocyane

1. Einleitung

1.1 Potenzial der Trester

Fruchttrester sind Pressrückstände von Früchten, die im Zuge der Saftpressung anfallen. Diese Rohstoffe sind billige Naturstoffquellen für die Industrie. Beispielsweise wird Apfeltrester von der Herbstreith & Fox AG als Rohstoff zur Gewinnung von Pektin verwendet. Dieses wird in der Lebensmittelindustrie als Geliermittel und in der pharmazeutischen Industrie als billiger Klebstoff mit guten Klebeeigenschaften eingesetzt (Teuscher *et al.*, 2012).

Dennoch sind Trester für die Saftindustrie meist Abfall, der jedoch möglicherweise in Zukunft gewinnbringend verwertet werden könnte. Die Weiterverwendung von Abfallprodukten schützt die Umwelt und eröffnet der Industrie vor allem auch wirtschaftlich sehr vielversprechende Perspektiven. Man generiert einen Mehrwert aus einem im Überfluss vorhandenen Produkt. Um jedoch tatsächlich Nutzen aus den Vorteilen von Trestern zu ziehen, muss man geeignete Methoden zur Aufarbeitung und Bewertung von Tresterabfällen entwickeln. Die Wirkungen der verbliebenen Inhaltsstoffe in Trestern müssen besser erforscht und getestet werden, um ihr wahres Potenzial bewerten zu können.

Diese Diplomarbeit wurde im Rahmen eines Subprojekts des Initiativkollegs BioPromotion der Universität Wien durchgeführt. Ziel des Projekts ist die Untersuchung des möglicherweise eNOS-aktivitätsfördernden Einflusses von Fruchttresterextrakten und deren Fraktionen, um potentielle neue pharmakologische Anwendungen zu identifizieren.

Die eNOS reguliert den Gefäßwiderstand und damit die Blutzirkulation. Von L-Arginin, einer basischen Aminosäure, wird die Guanidingruppe oxidiert, wodurch NO und die Aminosäure L-Citrullin entstehen. Aus den Endothelzellen diffundiert NO anschließend in die glatte Gefäßmuskulatur, wo es an die lösliche Guanylylcyclase bindet. Durch anschließende Phosphorylierung wird die Guanylylcyclase aktiviert und stimuliert die Bildung von cyclischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) aus Guanosin-Triphosphat. cGMP aktiviert in Folge die Proteinkinase G, welche den intrazellulären Calciumspiegel senkt. NO ist äußerst kurzlebig. Es reagiert innerhalb von 20 Sekunden mit Sauerstoff zu Nitrat oder Nitrit. Noch schneller erfolgt die Oxidation durch ein Sauerstoffradikal zu Peroxynitrit (Forth *et al.*, 2001).

Die Folge der Aktivierung der Guanylylcyclase ist eine Vasodilatation und die Senkung des peripheren Gefäßwiderstandes. Ebenfalls hemmt NO die Thrombocytenaggregation und verhindert die Leukocytenadhäsion an Gefäßwänden sowie die Proliferation glatter Muskelzellen. Durch diese vasoprotektiven und cardioprotektiven Mechanismen wird die Bildung sklerotischer Gefäßveränderungen gehemmt.

Deswegen sind die NO-Donatoren bereits seit langer Zeit bedeutende Arzneistoffe in der Behandlung von Bluthochdruck und Angina pectoris-Anfällen. Auch die häufig verschriebenen ACE-Hemmer wirken teilweise über eine indirekte Induktion der eNOS (Forth *et al.*, 2001).

Für die Testung der eNOS induzierenden Wirkung von Tresterextrakten wird ein *in vitro* Assay (EA.hy926-Zellen) verwendet. EA.hy926-Zellen exprimieren die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Durch eine Erhöhung der intrazellulären Stickstoffmonoxidkonzentration durch starke Induktion der eNOS könnte es möglich werden, hochwirksame Extrakte oder Inhaltsstoffe aus Trestern gegen kardiovaskuläre Krankheiten einzusetzen. Um besonders aktive Tresterextrakte oder deren Fraktionen zu finden, sollten Tresterextrakte verschiedener Polarität aus Fruchtrestern gewonnen werden. Diese sollten anschließend im Zuge einer Bioassay-geleiteten Fraktionierung, welche einer möglichst weitgehenden Isolierung aktiver Komponenten dient, weiter untersucht werden. Diese Arbeit beschreibt die Extraktion, Auftrennung und Analyse eines Heidelbeertresters.

1.2 Die Heidelbeere

Vaccinium myrtillus (L.) ist eine altbekannte Heilpflanze aus der Pflanzenfamilie der Ericaceae. Verwendet werden ihre Früchte und Blätter.

1.2.1 Traditionelle Anwendung

Aufgrund des hohen Gerbstoffgehalts wird die Heidelbeere als Einzelteedroge bei leichten Durchfallerkrankungen beschrieben.

Weiters wird „Ein eingestellter, gereinigter Trockenextrakt aus frischen Heidelbeeren innerlich bei Netzhauterkrankungen diabetischer und vaskulärer Genese, bei Störungen der Kapillarpermeabilität, zur Förderung der Epithelregeneration bei Magen- und Darmgeschwüren und äußerlich zur Förderung der Vernarbung von Wunden, z. B. nach Verbrennungen, angewendet“ (Teuscher *et al.*, 2012, Biogene Arzneimittel, S. 320).

Zusätzlich wirken Heidelbeeren durch Hemmung des Kollagen- und Elastinabbaus einer pathologisch erhöhten Kapillarpermeabilität und -fragilität entgegen (Teuscher *et al.*, 2012). Darüber hinaus werden „Extrakte aus getrockneten Heidelbeeren in Form eines Aufgusses, eines Mazerats oder einer Abkochung eingenommen oder bei leichten Schleimhautentzündungen im Mund- oder Rachenraum zum Spülen oder Gurgeln verwendet“ (Teuscher *et al.*, 2012, Biogene Arzneimittel, S. 353).

1.2.2 Inhaltsstoffe der Heidelbeere

Mengenmäßig bedeutsame Inhaltsstoffgruppen in Heidelbeeren sind unter anderem Kohlenhydrate. Monosaccharide in Heidelbeeren sind Hexosen wie Glucose, Galactose und Fructose sowie die Pentosen Xylose und Arabinose (Viljakainen *et al.*, 2002).

Für die Industrie wichtige Polysaccharide sind Pektine, die ebenfalls in Heidelbeeren enthalten sind. Pektine sind 1 → 4 glykosidisch verknüpfte Galacturonsäuren, deren Carboxylgruppen teilweise mit Methanol verestert sind oder mit divalenten Kationen Salze bilden (Teuscher *et al.*, 2012). Von Laaksonen *et al.* (2010) wird in Heidelbeeren weiters die Zuckeralkoholverbindung Myo-Inositol beschrieben.

Eine weitere wichtige Inhaltsstoffgruppe in Heidelbeeren sind Phenylacrylsäuren und deren Derivate. Sie liegen vor allem verestert vor und werden in freier Form arzneilich aufgrund ihrer sekretionsfördernden Wirkung geschätzt.

Der Grundbaustein der Phenylacrylsäuren ist die 3-Phenylpropansäure (Wagner *et al.* 1999). Phenylacrylsäuren unterscheiden sich untereinander hinsichtlich Hydroxylierungsgrad, Doppelbindungen und Veresterung. Es liegen oft mehrere Phenylacrylsäuren miteinander verestert vor. Sie können jedoch auch mit Hexosen oder Pentosen konjugiert sein (Teuscher *et al.*, 2012). Laut Laaksonen *et al.* (2010), Moze *et al.* (2011) und Viljakainen *et al.* (2002) sind Kaffeesäure, Ferulasäure, Cumarinsäure, Zimtsäure, Chlorogensäure, 5-O-Caffeoylchinasäure und 3,5-O-Dicaffeoylchinasäure in Heidelbeeren enthalten.

Pharmazeutisch relevante Inhaltsstoffe in Heidelbeeren sind weiters Gerbstoffe, das sind wasserlösliche Oligomere von Polyphenolen. Sie sind gelöst in der Lage tierische Proteine zu vernetzen. Man spricht dann vom Gerben. Es werden Gallotannine von Catechingerbstoffen unterschieden. Auch Kaffeesäureester mit gerbstoffähnlichen Eigenschaften werden zu den Gerbstoffen gezählt. Aufgrund ihres hohen Gerbstoffgehalts werden viele Ericaceen traditionell als Mittel gegen Durchfall eingesetzt. Auch äußerlich wird eine adstringierende und antimikrobielle Wirkung der Gerbstoffe beschrieben. Deshalb werden gerbstoffhaltige Drogen zur Wundbehandlung eingesetzt (Teuscher *et al.*, 2012). In Heidelbeeren sind Gallotannine und Catechingerbstoffe enthalten, wobei die Catechingerbstoffe überwiegen (Moze *et al.*, 2011).

Neben Gerbstoffen sind in Heidelbeeren laut Viljakainen *et al.* (2002) auch Apfelsäure, Weinsäure und Zitronensäure enthalten. Aufgrund ihrer schlechten Resorbierbarkeit und ihrer hohen osmotischen Wirksamkeit wird für diese drei Säuren eine abführende Wirkung beschrieben (Teuscher *et al.*, 2012). Auch die Ascorbinsäure ist eine laut Viljakainen *et al.* (2002) in Heidelbeeren vorkommende Säure. In der pharmazeutischen Industrie wird Ascorbinsäure (Vitamin C) als eigenständiger Arzneistoff zur Stärkung der Abwehrkräfte oder als Antioxidans in der Galenik verwendet. Ascorbinsäure ist sehr oxidationsempfindlich (Wagner *et al.* 1999), weswegen der Ascorbinsäure-Gehalt von Pflanzen bei unsachgemäßer Lagerung schnell abnimmt (Teuscher *et al.*, 2012).

Wichtige Naturstoffgruppen in Heidelbeeren sind Flavanderivate und Anthocyane. Flavanderivate werden je nach Oxidationszustand der C-Atome an den Positionen 3 und 4 in Flavanole, Flavanone, Flavanonole, Flavandiole, Flavonole, Flavone und Flavylumsalze eingeteilt. Biosynthetisch entstehen Flavanderivate durch Kondensation von Phenylacryloyl-Coenzym A-Derivaten und drei Molekülen Malonyl-Coenzym A (Rimpler *et al.*, 1999). Primär werden Chalkone gebildet, aus denen dann die Flavanderivate entstehen. Flavanderivate werden im weit gefassten Sinne auch als Flavonoide bezeichnet und kommen in allen höheren Pflanzen vor. Flavonoide liegen meist C- oder O-glykosidisch gebunden vor. Anthocyane sind Oxoniumsalze von Flavanonolen (Teuscher *et al.*, 2012). Eine Besonderheit der Anthocyane ist ihre pH-abhängige Färbung:

pH	Farbe
2-3	Rot
4-7	Purpur
7-8	Blau
8-10	Blaugrün

Tabelle 1: pH-abhängige Färbung der Anthocyane

Die Bedeutung der Flavonoide und Anthocyane für die Pflanzenwelt ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Sie dienen sicherlich als Lockstoffe in Blüten (Teuscher *et al.*, 2012, Wagner *et al.* 1999) und sind starke Radikalfänger.

Teuscher *et al.* (2012) beschreiben für Flavonoide antiarteriosklerotische, elastasehemmende, diuretische, entzündungshemmende, vasoprotektive, muskelrelaxierende, durchblutungsfördernde und blutdrucksenkende Wirkungen.

Die Anthocyanoglykoside hemmen den Collagen- und Elastinabbau. Sie wirken so kapillarabdichtend und vasoprotektiv (Teuscher *et al.*, 2012, Domitrovic *et al.*, 2011).

Die Mechanismen der beschriebenen Wirkungen von Flavanderivaten sind teilweise noch unklar (Baron-Menguy *et al.*, 2007, Lazze *et al.*, 2006, Ojeda D. *et al.*, 2010, Teuscher *et al.*,

2012). Einige dürften direkt über Bindung an Enzyme wirken, andere scheinen wiederum Effekte aufgrund eines veränderten Elektrolythaushaltes in den Zellen, z.B. auf Grund von Ca-Komplexierung, auszulösen (Teuscher *et al.*, 2012).

Mueller *et al.* (2012) und Jovancevic *et al.* (2011) beschreiben folgende Anthocyane in Heidelbeeren:

Delphinidin-3-O-galactosid
Delphinidin-3-O-glucosid
Delphinidin-3-O-arabinosid
Cyanidin-3-O-galactosid
Cyanidin-3-O-glucosid
Cyanidin-3-O-arabinosid
Cyanidin
Petunidin-3-O-galactosid
Petunidin-3-O-glucosid
Petunidin-3-O-arabinosid
Peonidin-3-O-galactosid
Peonidin-3-O-glucosid
Peonidin-3-O-arabinosid
Malvidin-3-O-galactosid
Malvidin-3-O-glucosid
Malvidin-3-O-arabinosid

Tabelle 2: Liste der Anthocyane in der Heidelbeere

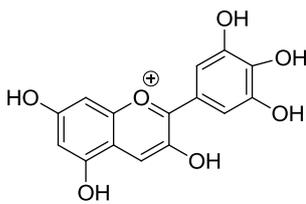


Abbildung 1: Delphinidin

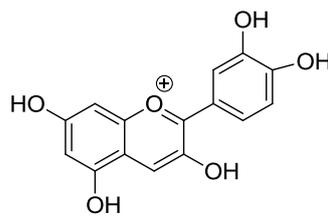


Abbildung 2: Cyanidin

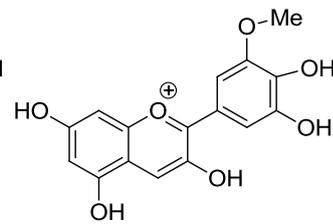


Abbildung 3: Petunidin

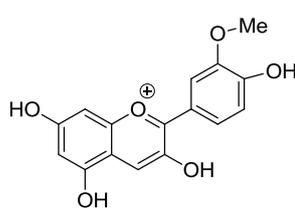


Abbildung 4: Peonidin

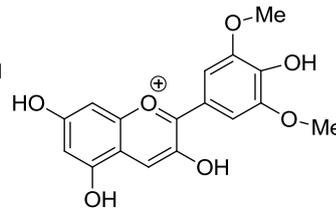


Abbildung 5: Malvidin

Hokkanen *et al.* (2009), Laaksonen *et al.* (2010), Moze *et al.* (2011), Mikulic-Petkovsek *et al.* (2012) und Rieger *et al.* (2008) beschreiben folgende Flavon-3-ole in Heidelbeeren:

Quercetinderivate:
Quercetin
Quercetin 3-O-galactosid
Quercetin 3-O-glucosid
Quercetin 3-O-glucuronid
Quercetin 3-O-xylosid
Quercetin 3-O-arabinopyranosid
Quercetin 3-O-arabinofuranosid
Quercetin-3-O-rhamnosid
Quercetin-3-O-arabinosid
Quercetin-3-O-rutinosid

Syringetinderivate:
Syringetin
Syringetin-3-O-galactosid
Syringetin-3-O-glucosid
Syringetin-3-O-glucuronid

Kämpferolderivate:
Kämpferol:
Kaempferol-O-(hexose-deoxyhexosid)
Kaempferol-3-O-rhamnosid
Kaempferol 3-O-rutinosid
Kaempferol 3-O-robinobiosid

Isorhamnetinderivate:
Isorhamnetin
Isorhamnetin 3-O-galactosid
Isorhamnetin 3-O-glucosid
Isorhamnetin-3-O-xylosid
Isorhamnetin-3-O-glucuronid

Myricetinderivate:
Myricetin
Myricetin 3-O-galactosid
Myricetin 3-O-glucosid
Myricetin 3-O-glucuronid
Myricetin-3-O-xylosid
Myricetin-3-O-arabinosid

Laricitrinderivate
Laricitrin
Laricitrin-3-O-galactosid
Laricitrin-3-O-glucosid
Laricitrin-3-O-glucuronid
Laricitrin-3-O-xylosid

Tabelle 3: Flavon-3-ole in Heidelbeeren (in 2 Spalten)

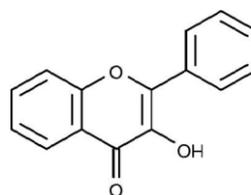


Abbildung 6: Flavon-3-ol

Catechin sowie dessen Isomer Epicatechin sind Flavan-3-ole in Heidelbeeren:

Catechin
Epicatechin

Tabelle 4: Flavanole in Heidelbeeren

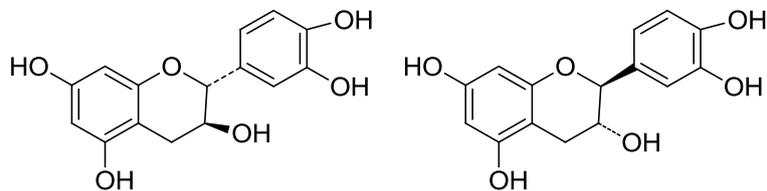


Abbildung 7: (+)-Catechin (2R, 3S)

(-)-Catechin (2S, 3R)

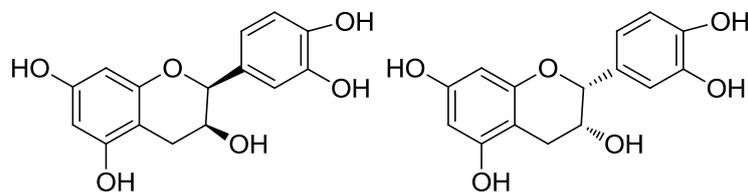


Abbildung 8: (-)-Epicatechin (2R, 3R)

(+)-Epicatechin (2S, 3S)

Taxifolin und dessen 3-O-Glucosid sind Flavanonole in Heidelbeeren:

Taxifolin
Taxifolin-3-O-glucosid

Tabelle 5: Flavanonole in Heidelbeeren

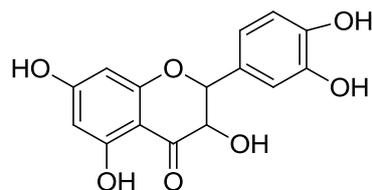


Abbildung 9: Taxifolin

Weitere wichtige Inhaltsstoffe in Heidelbeeren sind Terpene. Heidelbeeren enthalten Carotine, das sind Tetraterpene (Rimpler *et al.*, 1999). Diese tragen zahlreiche Methylgruppen, sind meist mehrfach ungesättigt und stark lipophil. Carotine werden in Gegenwart von Licht sehr schnell abgebaut. Aufgrund ihrer starken antioxidativen Eigenschaften sind diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe wichtige Radikalfänger. In

Pflanzen kommen sie vorwiegend in Chromoplasten vor, wo sie als "Lichtspender" der Photosynthese dienen. Pharmazeutisch werden Carotine vorwiegend aufgrund ihrer starken Radikalfängereigenschaften und als natürliches Bräunungsmittel eingesetzt (Teuscher *et al.*, 2012, Rimpler *et al.*, 1999).

Zu den Carotinen in Heidelbeeren zählen α -Carotin, β -Carotin, γ -Carotin und Lycopin. α -, β - und γ - Carotine sind Vorstufen des lebensnotwendigen Vitamin A. Laut Laaksonen *et al.* (2010) enthalten Heidelbeeren als weitere terpenoide Strukturen auch Cumaroyliridoide.

Weiters enthalten Heidelbeeren laut Hokkanen *et al.* (2009) und Wagner *et al.* (1999) Arbutin. Heidelbeerblätter haben einen Gesamtarbutingehalt von 0,5% (Wagner *et al.*, 1999). Arbutin zählt zu den Hydroxybenzenen (Hydrochinon- β -D-glucopyranosid). Es wird großteils intakt resorbiert. Auf dem Weg in die systemische Zirkulation wird es in der Leber glucuronidiert und sulfatiert. Die entstandenen Konjugate werden in der Harnröhre von eventuell vorhandenen E.coli wieder zu Hydrochinon, welches antimikrobiell wirkt, gespalten.

Auf Grund dieser Wirkung werden arbutinreiche Pflanzen oder Pflanzenteile, wie z.B. die Blätter von Preiselbeeren zur Behandlung von Harnwegsinfektionen eingesetzt (Teuscher *et al.*, 2012). Preiselbeerblätter haben einen sehr hohen Arbutingehalt (mindestens 3% laut ÖAB, 2013).

Das zur Gruppe der Stilbene gehörende trans-Resveratrol ist laut Moze *et al.* (2011) ebenfalls in Heidelbeeren enthalten. Trans-Resveratrol ist das 3, 5, 4` Trihydroxystilben. Es wirkt kardioprotektiv, antiphlogistisch, neuroprotektiv, antikarzinogen und Thrombocytenaggregationshemmend. Resveratrol ist auch in Rotwein enthalten, der eine vasoprotektive Wirkung besitzt (Teuscher *et al.*, 2012).

Heidelbeerinhaltsstoffe von pharmazeutisch geringerer Bedeutung sind Macro- und Microelemente, die in den Tabellen 6 und 7 (S. 16) aufgelistet werden.

Macroelemente:

Calcium	140 ± 21.4 mg/100 g
Kalium	572.5 ± 81.2 mg/100 g
Phosphor	117.2 ± 15.5 mg/100 g
Magnesium	59.7 ± 6.8 mg/100 g

Tabelle 6: Macroelemente in Heidelbeeren (Elisabetta *et al.*, 2013)

Microelemente:

Mangan	11.8 ± 10.8 mg/100g
Aluminium	2.2 ± 0.3 mg/100 g
Eisen	1.8 ± 0.5 mg/100 g
Barium	1.7 ± 0.5 mg/100 g
Natrium	1.6 ± 0.7 mg/100 g
Lithium	0.03 ± 0.03 mg/100 g
Bor	0.8 ± 0.2 mg/100 g
Kupfer	0.4 ± 0.1 mg/100 g
Strontium	0.1 ± 0.06 mg/100 g
Zink	0.9 ± 0.1 mg/100 g

Tabelle 7: Microelemente in Heidelbeeren (Elisabetta *et al.*, 2013)

Von pharmazeutisch geringerer Bedeutung sind weiters Stärke, Cellulose, Aminosäuren und Fettsäuren, die in allen Pflanzen vorkommen (Campbell *et al.*, 2009).

1.3 Ziele der Diplomarbeit

Aufgrund der zahlreichen beschriebenen Heidelbeerwirkungen in der Pharmazie wäre die Untersuchung und pharmazeutische Verwendung von Heidelbeertrestern von ökonomischen und umweltbewussten Interesse. Für das bessere Verständnis der Wirkungen von Heidelbeertrestern untersucht Waldbauer (2014, Dissertation in Vorbereitung) in ihrer

Dissertation potentiell eNOS aktivitätsfördernde Einflüsse von Heidelbeertresterextrakten (siehe Kapitel 1.1, Seite 6).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten durch Extraktion des Heidelbeertresters mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität Extrakte hergestellt werden, um diese anschließend für die Testung ihres eNOS aktivierenden Potentials zur Verfügung zu stellen. Aktive Extrakte sollten für eine bioassay-geleitete Fraktionierung herangezogen werden (siehe Kapitel 3.1, Seite 27ff).

Von methanolisch-wässrigen Tresterextrakten könnte aufgrund des hohen Zuckergehaltes die eNOS-Aktivität zahlreicher Inhaltsstoffe verschleiert werden. Daher sollte der mit Methanol (MeOH) 70% gewonnene Extrakt mittels Säulenchromatographie (SC) aufgetrennt werden, um den Zucker abzutrennen und Sammelfractionen unterschiedlicher Polarität zu gewinnen (siehe Kapitel 3.3, Seite 43ff).

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Wirkungen der Anthocyane in Heidelbeeren (siehe Kapitel 1.2.2, Seite 10) wurde bei den phytochemischen Untersuchungen besonderes Augenmerk auf die in Heidelbeeren enthaltenen Anthocyane gelegt (siehe auch Kapitel 1.2.2, Seite 12). Die bei der Auftrennung erhaltenen Sammelfractionen sollten hinsichtlich ihrer Anthocyanzusammensetzung und ihres Anthocyangehalts phytochemisch untersucht werden (siehe Kapitel 3.4, Seite 52ff). Für die Auftrennung der in den Sammelfractionen enthaltenen Anthocyane sollte eine geeignete HPLC-Methode herangezogen werden (siehe Kapitel 3.2, Seite 29ff).

Da noch wenig über den Metabolismus der Heidelbeer-Inhaltsstoffe bekannt ist, wurde in Kapitel 3.5, Seite 63ff, eine Übersicht mit zu diesem Thema relevanter Literatur erstellt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

verwendete Chemikalien:	Hersteller:
MeOH p.a.	VWR BDH Prolabo
Aqua Purificata	Hergestellt durch Destillation
Ethanol 96%	Brenntag CEE Group
Acetonitril (HiPerSolvChromanorm)	VWR BDH Prolabo
Ameisensäure 98%	Carl Roth GmbH & Co KG
Essigsäure 96%	Carl Roth GmbH & Co KG
Trifluoressigsäure 99%	Sigma-Aldrich
Anisaldehyd	Merck
Chloroform p.a.	VWR BDH Prolabo
Diatominerde	Dionex
Dichlormethan p.a.	VWR BDH Prolabo
Naturstoffreagenz	Carl Roth GmbH & Co KG
Ethylacetat p.a.	Carl Roth GmbH & Co KG
Hexan p.a.	J.T. Baker
Polyethylenglykol-400	Carl Roth GmbH & Co KG
Seesand	Carl Roth GmbH & Co KG
Schwefelsäure 93-95%	Glatt Koller

Tabelle 8: verwendete Chemikalien

Referenzsubstanzen:	Chargennummer:
Glucose	Lab M Nr. MC013-A
Fructose	Merck Nr. 1053230250
Saccharose	Fluka AG Nr. 57-50-1
Cyanidin-3-O-glucosid	Phytolab Nr.89616

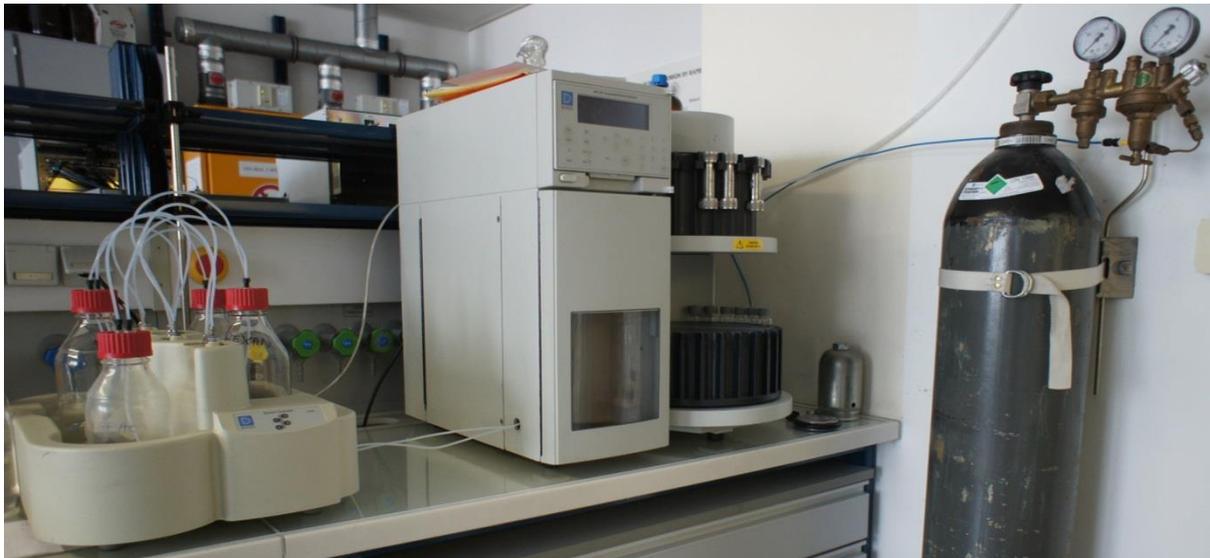
Tabelle 9: verwendete Referenzsubstanzen

2.2 Probenvorbereitung und Extraktion

Gegenstand der Analyse war Heidelbeertrester, der dem Department für Pharmakognosie Wien von der Firma Rauch Fruchtsäfte GmbH & Co OG mit Sitz in Rankweil in Vorarlberg zur Verfügung gestellt wurde. Der Trester war tiefrot gefärbt und bestand aus gepressten Heidelbeeren, wenigen Heidelbeerblättern und einigen Stängeln.

Bis zur Verarbeitung wurde der Heidelbeertrester bei -20 °C gelagert. Da der gelagerte Trester noch große Mengen Wasser enthielt, wurde er zur Trocknung lyophilisiert. Das erhaltene trockene Trestermaterial wurde mit einer Retsch Ultra-Zentrifugalmühle ZM 100 (Partikelsieb 0,75 mm) pulverisiert und im Exsiccator bis zur Extraktion aufbewahrt.

Alle Extraktionen, die im Zuge der Arbeit anfielen, wurden mit einem Accelerated Solvent Extractor von Dionex (ASE 200) durchgeführt. Bei einer ASE wird durch einen mit Probenmaterial gefüllten Zylinder unter definiertem Druck und bei definierter Temperatur Lösungsmittel durchgepumpt. Das erhaltene Extrakt fließt anschließend in ein Auffanggefäß, welches durch Schläuche mit der Extraktionszelle verbunden ist. Jeder Schritt der Extraktion geschieht vollautomatisch und unter definierten Bedingungen, wodurch eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet wird.



**Abbildung 10: ASE 200-Gerät (Firma Dionex)
Vorratsbehältnis für Lösungsmittel (links); Extraktionszellen und Probenauffanggefäße (Mitte);
Stickstoffflaschen für Druckaufbau (rechts)**

Als Extraktionsmittel für die Extraktion des Heidelbeertresters mittels ASE wurden Hexan, Ethylacetat, Dichlormethan und MeOH 70% verwendet (siehe Kapitel 3.1, Seite 27ff).

Bei der Extraktion des Heidelbeertresters wurde mit folgenden ASE-Einstellungen gearbeitet:

Vorheizen	1 min
Heizen	5 min
statisch	5 min
Flush	60 Vol%
Spülen	60 sec
Zyklen	1
Druck	1700 p.s.i
Temperatur	40 °C

Tabelle 10: ASE-Einstellungen

2.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Bei der Dünnschichtchromatographie (DC) werden die Inhaltsstoffe des Probenmaterials, hier ein Heidelbeertresterextrakt bzw. eine Heidelbeertresterextrakt-Fraktion, von der stationären Phase, je nach Wechselwirkung mit der mobilen Phase, stärker, schwächer oder gar nicht abgelöst und wandern mit der mobilen Phase an einem geeigneten Trägermaterial aufwärts. Durch unterschiedliches Wanderungsverhalten kommt es zu einer Auftrennung der einzelnen Inhaltsstoffe. Die verschiedenen, aufgetrennten Komponenten sind nun bei Tageslicht, als Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder bei 366 nm als fluoreszierende Stoffe zu erkennen. Gegebenenfalls können die Komponenten auch mit einem geeigneten Sprühreagenz derivatisiert werden, um sie bei Tageslicht oder bei 366 nm besser sichtbar zu machen (Jork *et al.*, 1989).

Für die DC (siehe auch Kapitel 3.3, Seite 43ff) wurden zwei unterschiedliche stationäre Phasen verwendet:

- Stationäre Phase 1:
 Kieselgel 60 F₂₅₄
 auf Glas oder Alufolie
 20 x 10 cm
 Partikelgröße: 10-12 µm
 Merck, Darmstadt, Deutschland

- Stationäre Phase 2:
 Kieselgel 60 F₂₅₄
 auf Glas
 10 x 10 cm
 Partikelgröße: 5-6 µm
 Merck, Darmstadt, Deutschland

Weiters wurden für die DC vier unterschiedliche mobile Phasen verwendet (siehe auch Kapitel 3.3, Seite 43ff):

FM 1:	Ethylacetat/Ameisensäure 98 %/Essigsäure 96 %/H ₂ O	100/11/11/26
FM 2:	Chloroform/MeOH/H ₂ O	60/40/10
FM 3:	Ethylacetat/Ameisensäure 98 %/Essigsäure 96 %	100/11/11
FM 4:	Chloroform/MeOH/H ₂ O	85/8/0,5

Tabelle 11: Zusammensetzungen der verwendeten DC-Fließmittelsysteme

Für die Detektion der Inhaltsstoffe wurden zwei Sprühreagenzien verwendet:

- Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz:
 0,5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig, 85 ml MeOH und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure in angegebener Reihenfolge gemischt. Die DC-Platte wird mit der Lösung besprüht und für 5-10 Minuten bei 100°C im Trockenschrank getrocknet. Die Auswertung erfolgt bei Tageslicht und unter der UV-Lampe bei 366 nm. Das Reagenz

hat nur eine begrenzte Haltbarkeit, die sich durch gekühlte Lagerung bei 4 °C deutlich verlängert. Zeigt sich eine Verfärbung von farblos nach rot-violett, muss die Lösung verworfen werden (Wagner H. *et al.*, 2009).

- **Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagenz:**
Naturstoffreagenz: 1 % Lösung von Diphenylboryloxyethylamin in MeOH
Polyethylenglykol-Reagenz: 5% Polyethylenglykol-4000-Lösung in Ethanol
Die Platte wird zuerst mit Naturstoffreagenz besprüht. Nach kurzem Warten wird dieselbe Platte mit Polyethylenglykol-Reagenz besprüht (Wagner H *et al.*, 2009).

Vor und nach dem Besprühen wurden die Platten unter Tageslicht und unter UV-Licht (254 nm und 366 nm) detektiert und mit einer Sony NEX-3 fotografiert (siehe auch Kapitel 3.3, Seite 43ff).

2.4 Säulenchromatographie (SC)

Die Auftrennung mittels Säulenchromatographie beruht auf einer Verteilung der Stoffe einer Probe zwischen einer festen stationären Phase und einer flüssigen mobilen Phase (Böcker, 1997).

Die Fraktionierung des methanolisch-wässrigen Heidelbeertrestereextrakts mittels Säulenchromatographie (siehe auch Kapitel 3.3, Seite 43ff) wurde mit einer Säule der folgenden Abmessungen durchgeführt:

Füllhöhe der Säule: 50 cm; Durchmesser: 7,5 cm

Die für die Säulenchromatographie verwendete stationäre Phase war Polystyrol. Dieses ist ein preiswertes und oft verwendetes Polymer aus Styroluntereinheiten. Aufgrund der aromatischen Struktur eignet es sich zur Adsorption phenolischer Substanzen, da es zu π - π -Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und den phenolhaltigen Komponenten kommt. Polystyrol darf auf bis zu 75 °C erhitzt werden (Voigt, 2010). Es wurde mit Diaion® HP-20 (CAS Nummer: 9003-53, Partikelgröße: 250-850 μ m) gearbeitet.

Die Elutionsmittel waren H₂O, Ethanol, MeOH und Ethylacetat. Im Zuge der Elution wurde die Apolarität des Lösungsmittels kontinuierlich gesteigert (siehe auch Kapitel 3.3, Seite 43ff). Es wurde mit H₂O und anschließend mit einem Gemisch aus H₂O und Ethanol in steigender Ethanolkonzentration eluiert. Nach Elution mit Ethanol 96% wurden mit MeOH und Ethylacetat die apolarsten Substanzen eluiert.

Elutionsmittel:	Liter (l)
H ₂ O	10,05 l
Ethanol 10% (EtOH 10%)	13,90 l
Ethanol 30% (EtOH 30%)	12,80 l
Ethanol 50% (EtOH 50%)	6,60 l
Ethanol 70% (EtOH 70%)	8,60 l
Ethanol 96% (EtOH 96%)	6,00 l
MeOH	4,40 l
Ethylacetat (EtOAc)	6,80 l

Tabelle 12: Volumina der für die SC verwendeten Elutionsmittel

Für die in Kapitel 3.3, Seite 43ff, beschriebene Säulenchromatographie wurden 1200 g Polystyrol in einem Becherglas eingewogen, mit MeOH bedeckt, für 15 min im Ultraschallbad behandelt und das Lösungsmittel abdekantiert. Dieser Vorgang wurde mit EtOH 96% und mit EtOH 50% wiederholt. Zur Befüllung der Säule wurde der Abfluss mit einem Wattestück dicht und polystyrolundurchlässig verschlossen und die Glassäule mit dem mit EtOH 50% konditioniertem Polystyrol befüllt.

Normalerweise wird für die Aufschwemmung und Befüllung der Säule das erste Elutionsmittel der Säulenchromatographie verwendet. Hätte man jedoch statt EtOH 50% Wasser für die Befüllung verwendet, wären die leichten Polystyrolkörner in der Säule aufgeschwommen und hätten Lufteinschlüsse begünstigt.

Deshalb wurde nach der Befüllung die stationäre Phase mit 4 l Wasser, dem ersten Elutionsmittel, gespült. Nach dem Spülen wurde der in MeOH 70% gelöste methanolisch-wässrige Heidelbeertresterextrakt auf die stationäre Polystyrolphase aufgebracht. Zum

Beschweren wurde eine dünne Schicht Seesand aufgetragen. Die anschließende Fraktionierung wurde in einem auf 20–25 °C temperierten, fensterlosen Raum durchgeführt.

2.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC diente in dieser Arbeit der Betrachtung der in verschiedenen Extrakten enthaltenen phenolischen Inhaltsstoffe (Detektion bei 280 nm) und der Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung sowie des Anthocyangehalts der aus der Säulenchromatographie gewonnenen Sammelfractionen (Detektion bei 520 nm).

HPLC-Gerät:

Pumpe:	LC-10AD
Entgaser:	DGU-14A
Controller:	SCL-10A
Autosampler:	SIL-10AD
Detektor:	SPD-M10A-VP
Säulenofen:	CTO-20AC
Software:	Shimadzu LC Solution Version 1.03 SP5
Hersteller:	Shimadzu

Tabelle 13: HPLC-Gerätekomponenten



Abbildung 11: HPLC-Gerät (siehe Tabelle 13, Seite 24)

Es wurden folgende 3 HPLC-Säulen eingesetzt:

- Säule 1 (siehe Kapitel 3.1, Seite 27):
Agilent
Hypersil BDS C-18
Säulenmaße: 250 x 4,6 mm
Partikelgröße: 5 μ m
Seriennummer: 002700
- Säule 2 (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 32):
Phenomenex
Luna Phenyl-Hexyl
Säulenmaße: 250 x 2 mm
Partikelgröße: 5 μ m
Seriennummer: 159488-1
- Säule 3 (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 30):
Dionex
C-18 Acclaim 120 Silica-Based
Säulenmaße: 150 x 2,1 mm
Partikelgröße: 3 μ m
Seriennummer: 002546

Für die Auftrennung der Heidelbeertresterextrakte verschiedener Polarität wurden folgende HPLC-Parameter und folgender Elutionsgradient festgesetzt (siehe Kapitel 3.1, Seite 27):

Säule	Agilent Hypersil BDS C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Mobile Phase	A: Wasser pH 2,8 (Ameisensäure) B: Acetonitril (der Phase A äquivalente Menge Ameisensäure)
Durchflussrate	1 ml/min
Säulenofen	40 °C
Injektionsvolumen	5 µl

Tabelle 14: Bedingungen der HPLC

Minute	Mobile Phase B (%)
0-120	0-95 %

Tabelle 15: Elutionsgradient

Für die Auftrennung der Anthocyane in Sammelfractionen musste eine geeignete HPLC-Methode entwickelt werden. Die HPLC-Parameter und Elutionsgradienten der entwickelten Methoden werden in Kapitel 3.2, Seite 30, beschrieben.

2.6 Sonstige Geräte

Magnetrührer	Heidolph MR 3001 K
Ultraschallbad	Elma Transsonic 460H
pH-Elektrode	WTW pH-Elektrode Sen Tix 81
Gefriertrocknungsanlage	Zirbus VaCo 5-II
Destillationsapparatur	IKA-dest M3000
Waage 1	Analysewaage Sartorius BP 210 59008
Waage 2	Sartorius LC4801P
Zentrifuge	Eppendorf miniSpin Zentrifuge
Kamera:	Sony NEX-3

Tabelle 16: sonstige verwendete Geräte

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung von Extrakten verschiedener Polaritäten

Der Heidelbeertrester wurde durch Lyophilisation getrocknet. Dabei ergab sich ein Gewichtsverlust von 53 % (siehe Kapitel 2.2, Seite 19). Der pulverisierte Heidelbeertrester wurde mit Hexan, Dichlormethan, Ethylacetat und MeOH 70% extrahiert. Die erhaltenen Extrakte dienten in weiterer Folge der biologischen Testung an EA.hy926-Zellen (Waldbauer, 2014, Dissertation in Vorbereitung).

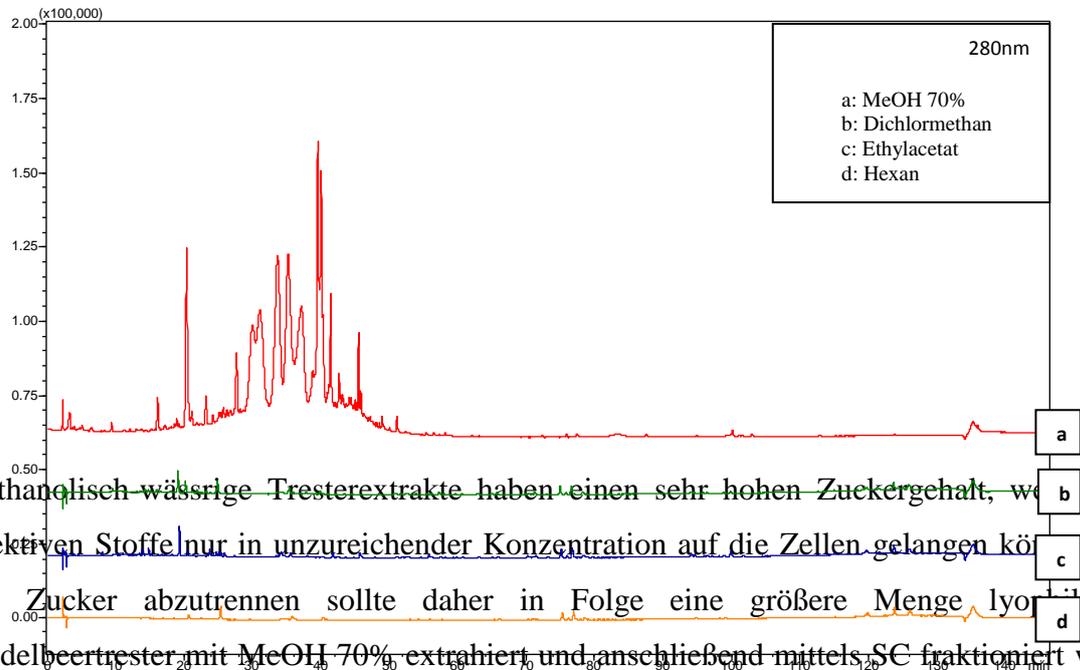
Für die Herstellung der Rohextrakte wurden jeweils 8,0 g mit der Retsch-Mühle pulverisierter Heidelbeertrester ohne Zusatz von Diatomeenerde mit einem der vier Lösungsmittel (Hexan, Dichlormethan, Ethylacetat und MeOH 70 %) extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden in einen tarierten Rundkolben überführt, eingedampft und gewogen. Aus den erhaltenen Extraktmengen wurde das Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) berechnet. Dieses Verhältnis gibt die Anzahl der Drogeteile, die notwendig sind, um ein Teil Extrakt zu erhalten, an.

Lösungsmittel	Drogeneinwaage	Extraktmenge	DEV
Hexan	8,3 g	0,6 g	13,1:1
Dichlormethan	8,1 g	0,7 g	11,3:1
Ethylacetat	8,0 g	0,7 g	12,2:1
MeOH 70%	8,1 g	0,9 g	8,7:1

Tabelle 17: DEV der vier Extrakte

Anschließend wurden die 4 Extrakte in einer Konzentration von 3 mg/ml mittels HPLC mit den in den Tabellen 14 und 15 (Seite 26) beschriebenen Parametern bei der Detektionswellenlänge 280 nm vermessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die meisten phenolischen Substanzen.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass der methanolisch wässrige Extrakt das größte Spektrum phenolischer Substanzen aufweist. In den mit Hexan, Ethylacetat und Dichlormethan extrahierten Extrakten wurden kaum phenolische Verbindungen detektiert.



Methanolisch wässrige Tresterextrakte haben einen sehr hohen Zuckergehalt, weshalb die effektiven Stoffe nur in unzureichender Konzentration auf die Zellen gelangen können. Um den Zucker abzutrennen sollte daher in Folge eine größere Menge lyophilisierter Heidelbeertrester mit MeOH 70% extrahiert und anschließend mittels SC fraktioniert werden (siehe Kapitel 3.3 Seite 13ff). Die erhaltenen Sammelfractionen sollten anschließend phytochemisch analysiert werden (Bauer (2014, Dissertation in Vorbereitung) zur Verfügung gestellt werden).

Abbildung 12: HPLC-Chromatogramme der Extrakte verschiedener Polarität

3.2 HPLC-Trennung der im Heidelbeertrester vorhandenen Anthocyane

Es sollte eine geeignete HPLC-Trennmethode für die im Heidelbeertrester enthaltenen Anthocyane entwickelt werden, mit welcher die Tresteranthocyane anschließend identifiziert und quantifiziert werden sollten.

Für die Identifizierung unbekannter Komponenten einer Probe mittels HPLC ist es möglich der Probe eine Referenzsubstanz definierter Konzentration zuzusetzen. Handelt es sich bei der unbekannt Komponente um die Referenzsubstanz, tritt eine Peakflächenerhöhung im Chromatogramm auf (Becker, 2000). Dadurch wird die unbekannte Komponente eindeutig identifiziert.

Weitere Hinweise auf die Struktur unbekannter Komponenten liefern UV-Chromatogramme und LC-MS-Chromatogramme durch deren Vergleiche mit Daten aus der Literatur (Becker, 2000).

Die Kopplung an ein Massenspektrometer stellt aber auch besondere Anforderungen an das für die Auftrennung verwendete Fließmittel (Kromidas, 2006). Vor allem für die Elektronen-Spray-Ionisation (ESI) sollten alle Bestandteile der mobilen Phase rückstandslos flüchtig sein (Kromidas, 2006).

Für die Quantifizierung der Anthocyane wurde ein externer Standard eingesetzt. Ein externer Standard ist eine in der Probe enthaltene Komponente, die als Reinsubstanz in verschiedenen bekannten Konzentrationen vermessen wird (Kromidas, 2006). In einem bestimmten Konzentrationsbereich kann das Verhältnis zwischen Konzentration und Peakfläche mit einer linearen Funktion der Form $f(x)=k \cdot x+d$ beschrieben werden (Meyer, 2009). Das Detektorsignal ist jedoch sehr stark von Stoffeigenschaften abhängig. Deswegen muss bei der externen Standardisierung für jeden Analyten eine eigene Kalibrationsgerade erstellt werden, sofern nicht mehrere Analyten dasselbe chromophore System besitzen und sich nur durch das Molekulargewicht unterscheiden (Meyer, 2009).

3.2.1 Methodenentwicklung

Es sollte eine HPLC-Methode für die Auftrennung der Anthocyane im methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakt sowie in den in Kapitel 3.3.3, Seite 49, beschriebenen Sammelfractionen entwickelt werden. Für die Entwicklung dieser HPLC-Methode wurde der methanolisch-wässrige Heidelbeertresterextrakt (siehe Kapitel 3.1, Seite 27) verwendet.

Stefanut *et al.* (2011) beschreiben eine HPLC-Methode zur Auftrennung von Heidelbeeranthocyanen (siehe Tabelle 18). Sie verwenden eine Dionex Acclaim-C18-Säule mit den Dimensionen 150 x 4,6 mm und einer Partikelgröße von 5 µm. Da diese Säule nicht mit denselben Dimensionen verfügbar war, wurde mit Hilfe eines Umrechnungsprogrammes der Firma Dionex (Programm U3000-RSLC) die Flussrate der mobilen Phase auf die in dieser Arbeit verwendete Säule 3 (Dionex Acclaim C-18, 150 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 3 µm) umgerechnet (siehe Kapitel 2.5, Seite 25). Die Flussrate wurde daher von 1,5 ml/min auf 0,3 ml/min gesenkt. Der Heidelbeertresterextrakt wurde in 0,5 % Trifluoressigsäure gelöst und in einer Konzentration von 9 mg/ml mit dem HPLC-Gerät vermessen. Die Anthocyane haben ihre Absorptionsmaxima zwischen 465 und 560 nm (siehe Kapitel 3.4.2, Seite 55), weshalb bei 520 nm detektiert wurde. Für die HPLC wurden folgende Parameter festgesetzt:

Säule	Dionex Acclaim C-18, 150 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 3µm
Mobile Phase	A: H ₂ O/MeOH/Trifluoressigsäure (79,5/20/0,5) B: MeOH
Durchflussrate	0,3 ml/min
Säulenofen	40 °C
Injektionsvolumen	5 µl

Tabelle 18: HPLC-Parameter der Methode nach Stefanut *et al.* (2011), modifiziert

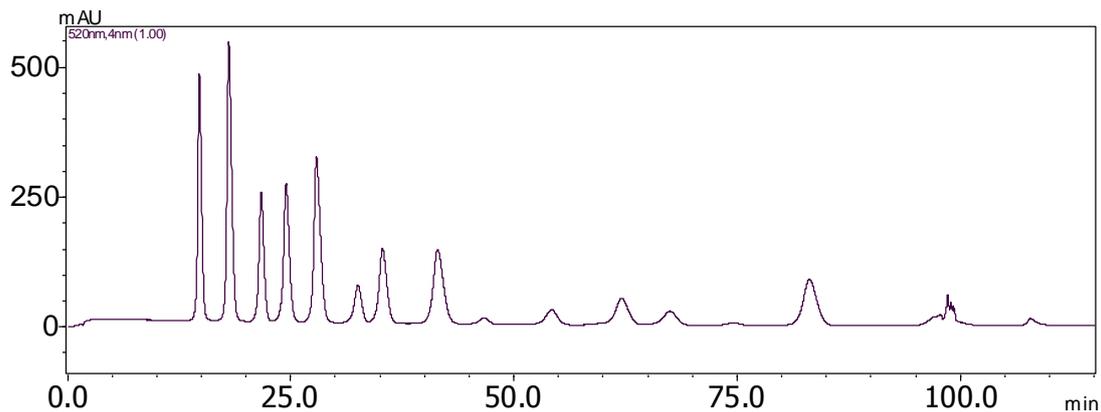


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm des methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakts; Detektion: 520 nm

Die von Stefanut *et al.* (2011) weiters publizierten LC-MS Daten können ebenso für die Identifizierung der Anthocyanaglyka im Heidelbeertresterextrakt herangezogen werden. Stefanut *et al.* (2011) identifizierten die Anthocyane durch den Vergleich mit authentischen Referenzsubstanzen (siehe Kapitel 3.4.1, Seite 53). Die von Stefanut *et al.* (2011) publizierte Abfolge der Anthocyane und deren relative Retentionszeiten kann für die Zuordnung der Anthocyane im methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakt und in den Sammelfractionen herangezogen werden.

Allerdings enthält die von Stefanut *et al.* (2011) verwendete mobile Phase Trifluoressigsäure, welche nur mangelnde MS-Kompatibilität besitzt (Niessen, 1999). Deshalb wurde versucht eine alternative HPLC-Methode zu entwickeln, welche mit einer mobilen Phase bestehend aus den LC-MS kompatiblen Substanzen H₂O, Ameisensäure und Acetonitril auskommt.

Für die Entwicklung der HPLC-Methode wurde Säule 2 (siehe Kapitel 2.5, Seite 25) verwendet. Bei Säule 2 besteht die stationäre Phase aus mit Phenyl-Hexylgruppen derivatisiertem Kieselgel. Diese stationäre Phase eignet sich laut Herstellerangaben besonders für die Auftrennung von aromatischen Strukturen. Für jede Methode wurden 2 µl einer 9 mg/ml Lösung Heidelbeertresterextrakt, gelöst in MeOH 70%, in das HPLC-Gerät injiziert. Aufgrund der charakteristischen Absorptionsmaxima der Anthocyane (siehe Kapitel 3.4.2, Seite 55ff) wurde bei 520 nm detektiert.

Mit der gesuchten HPLC-Methode sollte es, wie in der Publikation von Stefanut *et al.* (2011), möglich sein 16 Anthocyane sowie Cyanidin in der Heidelbeere zu detektieren. Um das Elutionsverhalten der Anthocyane zu bestimmen, wurden für die erste Methode (Methode 1; siehe Abbildung 14) folgende Parameter festgesetzt:

Säule	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 250 mm x 2 mm; Partikelgröße: 5 µm
Mobile Phase	A: Wasser pH 2,5 (Ameisensäure) B: Acetonitril (H ₂ O äquivalente Menge Ameisensäure)
Durchflussrate	0,2 ml/min
Säulenofen	40 °C
Injektionsvolumen	2 µl

Tabelle 19: Parameter Methode 1

Minute	Mobile Phase B (%)
0-107	5-70

Tabelle 20: Elutionsgradient Methode 1

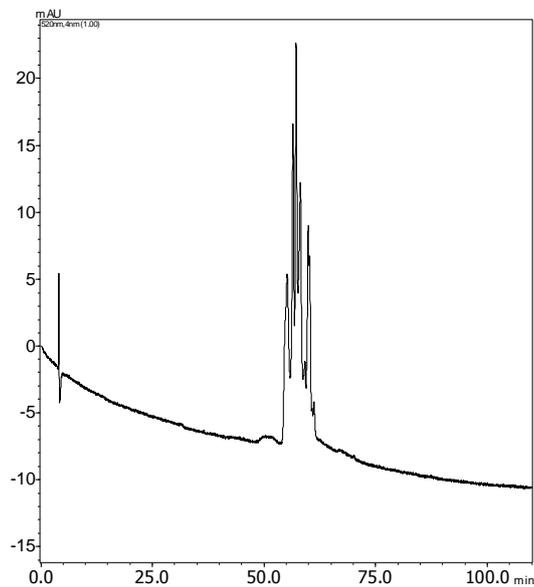


Abbildung 14: Chromatogramm Methode 1; Detektion: 520 nm

Durch Modifikation der Zusammensetzung der mobilen Phase (siehe Tabelle 21) konnte eine Verbesserung der Auftrennung erreicht werden (Methode 2; siehe Abbildung 15).

Minute	Mobile Phase B (%)
0-60	18-30

Tabelle 21 Elutionsgradient Methode 2

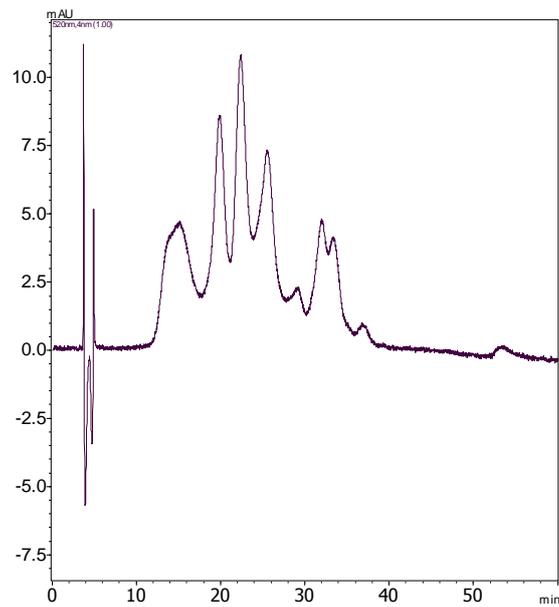


Abbildung 15: Chromatogramm Methode 2; Detektion 520 nm

Aufgrund der unzureichenden Peakschärfe wurde die Flussrate von 0,2 ml/min auf 0,25 ml/min erhöht (Methode 3; siehe Abbildung 16).

Säule	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 250 mm x 2 mm; Partikelgröße: 5 µm
Mobile Phase	A: Wasser pH 2,5 (Ameisensäure) B: Acetonitril (H ₂ O äquivalente Menge Ameisensäure)
Durchflussrate	0,25 ml/min
Säulenofen	40 °C
Injektionsvolumen	2 µl

Tabelle 22: Parameter Methode 3

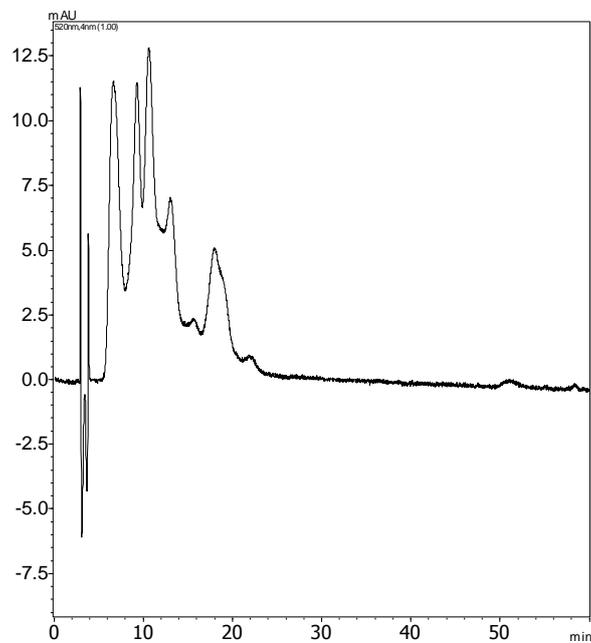


Abbildung 16: Chromatogramm Methode 3; Detektion 520 nm

Dadurch wurde die Elution der Anthocyane beschleunigt, weshalb der Gradient ebenfalls angepasst wurde (Methode 4; siehe Abbildung 17).

Minute	Mobile Phase B (%)
0-60	15-25

Tabelle 23: Elutionsgradient Methode 4

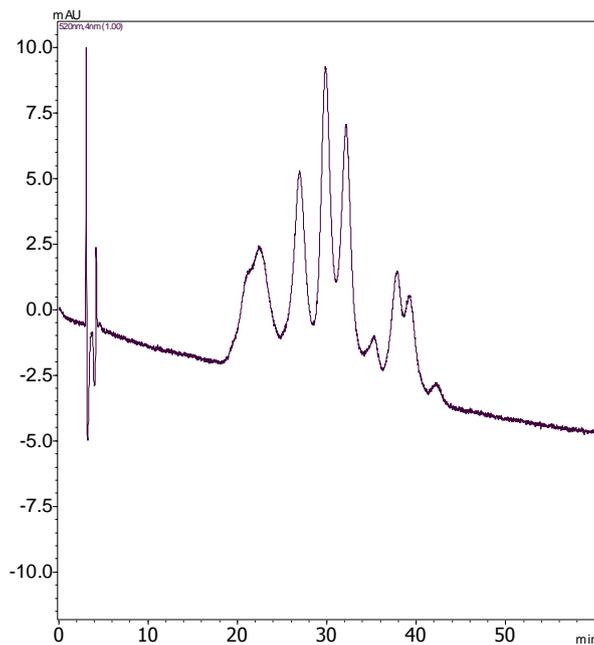


Abbildung 17: Chromatogramm Methode 4; Detektion 520 nm

Durch Senkung des pHs von 2,5 auf 2,3 wurde eine Verbesserung der Peakschärfe erreicht (Methode 5; siehe Abbildung 18, S. 36).

Säule	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 250 mm x 2 mm; Partikelgröße: 5 µm
Mobile Phase	A: Wasser pH 2,3 (Ameisensäure) B: Acetonitril (H ₂ O äquivalente Menge Ameisensäure)
Durchflussrate	0,25 ml/min
Säulenofen	40 °C
Injektionsvolumen	2 µl

Tabelle 24: Parameter Methode 5

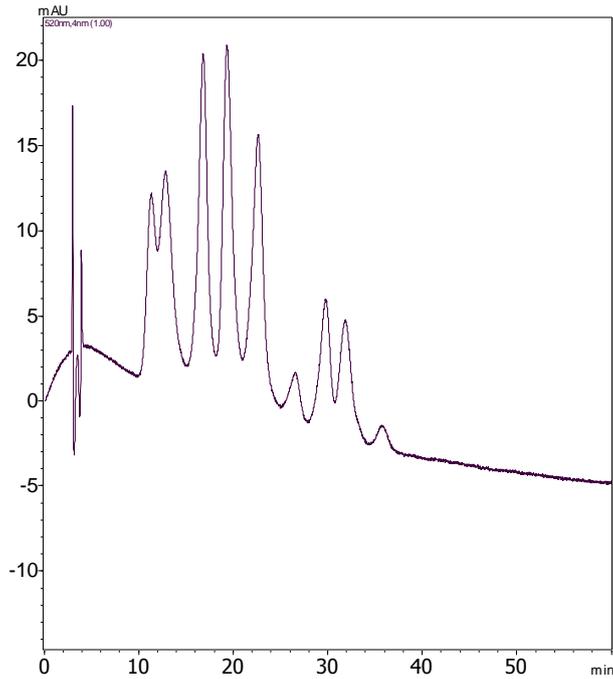


Abbildung 18: Chromatogramm Methode 5; Detektion 520 nm

Da durch die Senkung des pHs auch die Elutionsgeschwindigkeit von der Säule erhöht wurde, musste im nächsten Schritt die Startkonzentration des Gradienten gesenkt werden, wobei der Anstieg des Gradienten unverändert blieb (Methode 6; siehe Abbildung 19, S. 37).

Minute	Mobile Phase B (%)
0-60	12-22

Tabelle 25: Elutionsgradient Methode 6

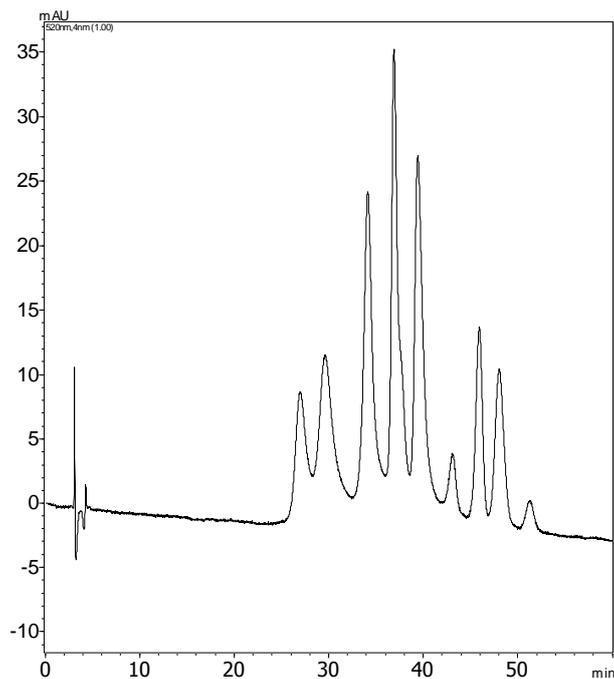


Abbildung 19: Chromatogramm Methode 6; Detektion 520 nm

Durch eine Erhöhung der Temperatur von 40 °C auf 50 °C wurde die Peakschärfe geringfügig verbessert (Methode 7; siehe Abbildung 20, S. 38).

Säule	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 250 mm x 2 mm; Partikelgröße: 5 µm
Mobile Phase	A: Wasser pH 2,3 (Ameisensäure) B: Acetonitril (H ₂ O äquivalente Menge Ameisensäure)
Durchflussrate	0,25 ml/min
Säulenofen	50 °C
Injektionsvolumen	2 µl

Tabelle 26: Parameter Methode 7

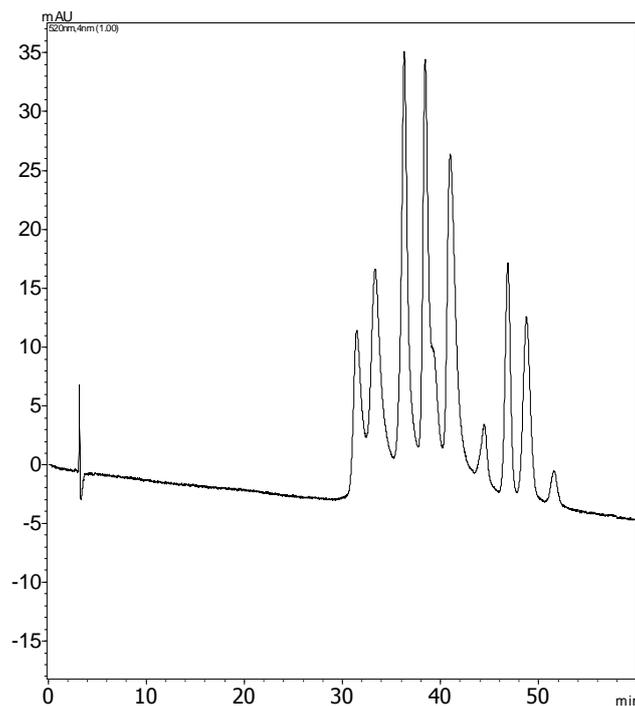


Abbildung 20: Chromatogramm Methode 7; Detektion 520 nm

Da 16 Anthocyanpeaks und ein Cyanidinpeak zu erwarten wären, war die in Abbildung 20 beschriebene Auftrennung noch immer unzureichend. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Flussrate von 0,25 ml/min auf 0,3 ml/min weiter erhöht (Methode 8; siehe Abbildung 21, Seite 39).

Säule	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 250 mm x 2 mm; Partikelgröße: 5 µm
Mobile Phase	A: Wasser pH 2,3 (Ameisensäure) B: Acetonitril (H ₂ O äquivalente Menge Ameisensäure)
Durchflussrate	0,3 ml/min
Säulenofen	50 °C
Injektionsvolumen	2 µl

Tabelle 27: Parameter Methode 8

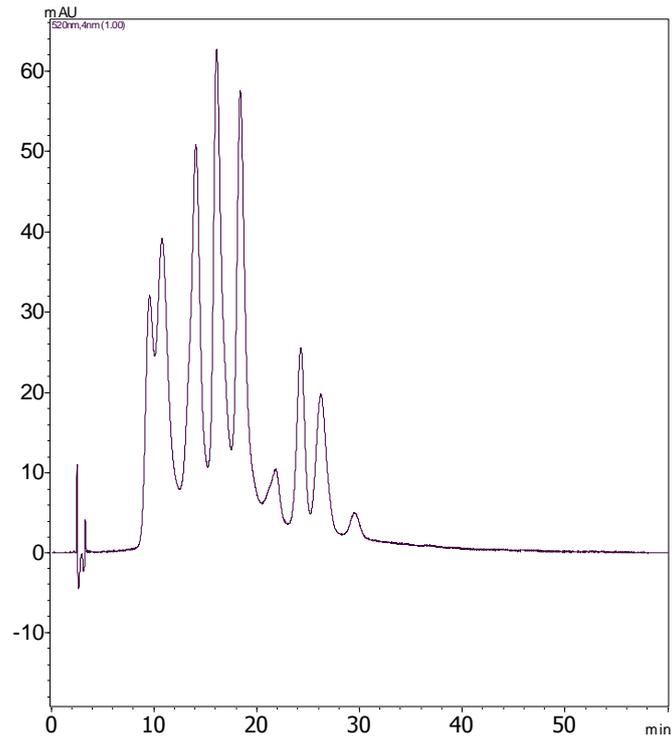


Abbildung 21: Chromatogramm Methode 8; Detektion 520 nm

Die Elution der Anthocyane beschleunigte sich wieder. Durch eine Senkung des Gradientenanstiegs wurde in Folge eine weitere Auftrennung der Anthocyanpeaks erwartet (Methode 9; siehe Abbildung 22, Seite 40).

Minute	Mobile Phase B (%)
0-60	12-18

Tabelle 28: Elutionsgradient Methode 9

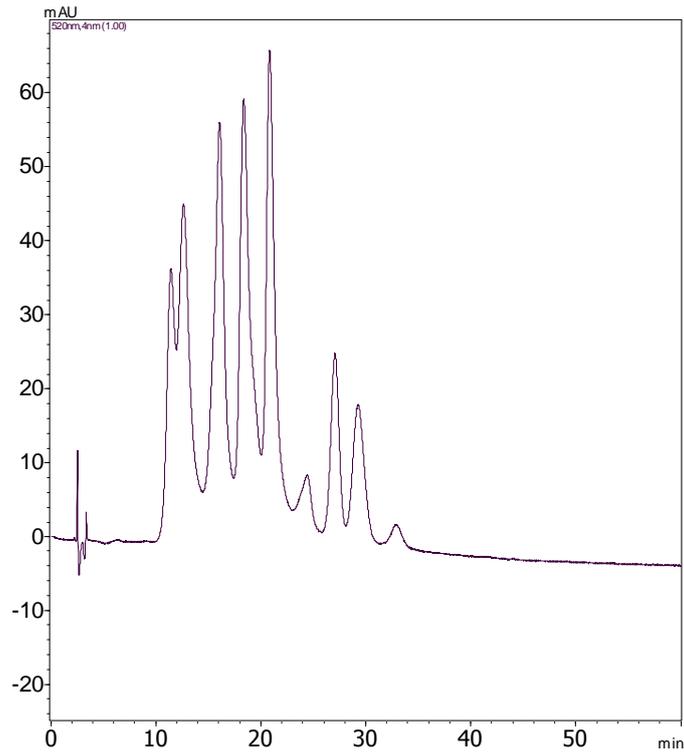


Abbildung 22: Chromatogramm Methode 9; Detektion 520 nm

Durch die Senkung des Anstiegs des Gradienten konnte keine Verbesserung der Auftrennung erreicht werden (siehe Abbildung 22). Im nächsten Schritt wurde die Temperatur von 50 °C auf 55 °C erhöht (Methode 10; siehe Abbildung 23, Seite 41).

Säule	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl, 250 mm x 2 mm; Partikelgröße: 5 µm
Mobile Phase	A: Wasser pH 2,3 (Ameisensäure) B: Acetonitril (H ₂ O äquivalente Menge Ameisensäure)
Durchflussrate	0,3 ml/min
Säulenofen	55 °C
Injektionsvolumen	2 µl

Tabelle 29: Parameter Methode 10

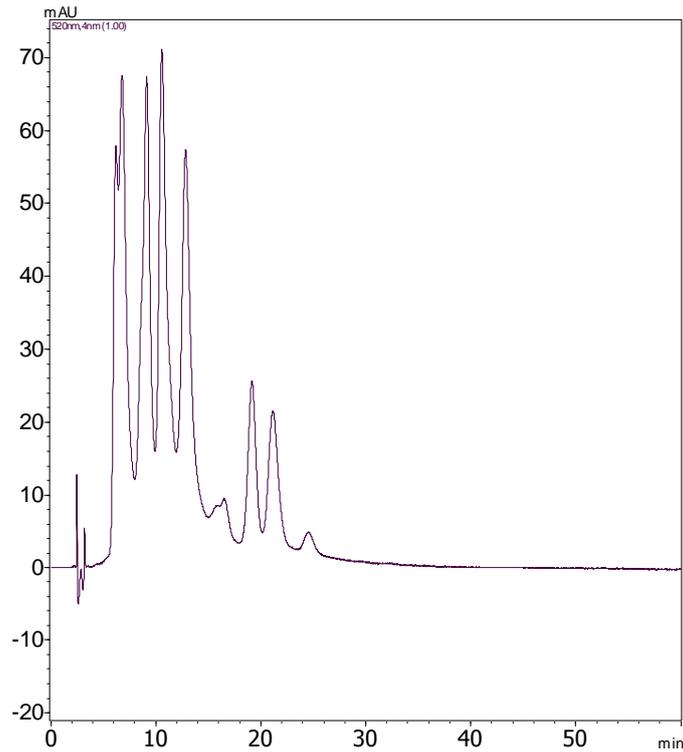


Abbildung 23: Chromatogramm Methode 10; Detektion 520 nm

Da die Temperaturerhöhung ausschließlich die Elutionsgeschwindigkeit erhöhte, aber sich die Peakschärfe nicht verbesserte, wurde der Gradient wieder angepasst (Methode 11; siehe Abbildung 24, Seite 42).

Minute	Mobile Phase B (%)
0-60	8-13
60-90	13-32

Tabelle 30: Elutionsgradient Methode 11

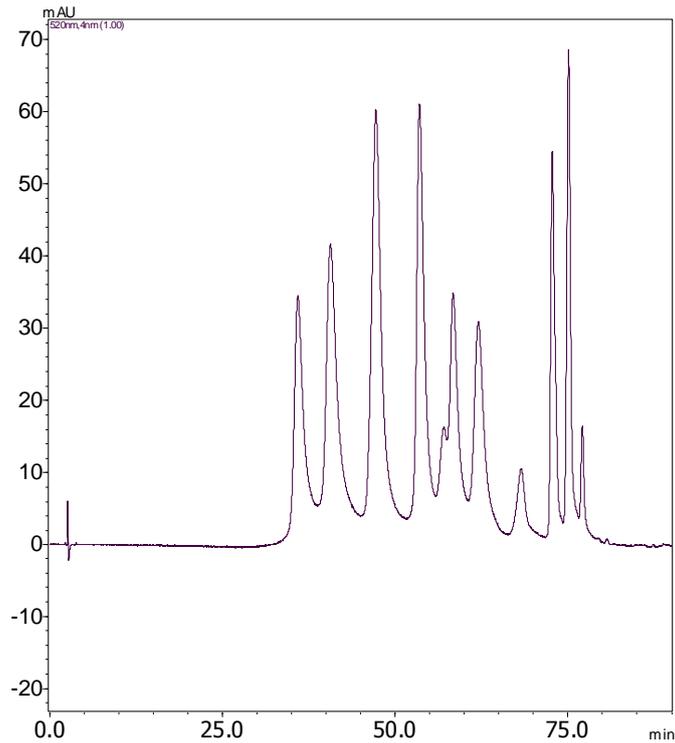


Abbildung 24: Chromatogramm Methode 11; Detektion 520 nm

Mit Methode 11 können bei 520 nm nur 11 Anthocyanpeaks detektiert werden. Nur mit der Methode nach Stefanut *et al.* (2011) konnten bei 520 nm alle 17 Anthocyanpeaks detektiert werden. Es konnte daher keine ohne Trifluoressigsäure auskommende Methode zur Auftrennung der Anthocyane entwickelt werden, deren Auftrennqualitäten an die zu Beginn des Kapitels beschriebene Methode nach Stefanut *et al.* (2011) (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 30) heranreichte.

Bei Verwendung von Trifluoressigsäure für die LC/MS gilt es also die durch Trifluoressigsäure verursachten Störungen (siehe auch Kapitel 4, Seite 73) gegen die bessere Auftrennung von Anthocyanen abzuwägen. Für eine analytische HPLC, gekoppelt an ein UV/VIS- oder Photodioden-Array Spektrophotometer, empfiehlt sich die Verwendung der Methode nach Stefanut *et al.* (2011) zur Auftrennung des in Heidelbeeren vorhandenen Anthocyanenspektrums (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 30). Außerdem kann die Zuordnung der Anthocyane mittels der von Stefanut *et al.* (2011) publizierten relativen Retentionszeiten erfolgen (siehe Kapitel 3.4.1, Seite 53).

3.3 Fraktionierung des Heidelbeertresters mittels Säulenchromatographie

Da, wie bereits in Kapitel 3.1, Seite 28, beschrieben, methanolisch-wässrige Tresterextrakte einen sehr hohen Zuckergehalt aufweisen, weshalb die möglicherweise effektiven Stoffe nur in unzureichender Konzentration auf die eNOS-Zellen gelangen könnten, sollten ungefähr 30 g methanolisch-wässrigen Tresterextrakts mittels SC fraktioniert werden. Die Ziele dieser Auftrennung waren die Abtrennung des Zuckers sowie die Auftrennung des Extraktes in Sammelfractionen unterschiedlicher Polarität.

3.3.1 Extraktion des Heidelbeertresters

Für die Extraktion wurden 418 g Heidelbeertresterpulver (siehe Kapitel 2.2, Seite 19) mit 220 g Diatomeenerde vermischt. Diatomeenerde (=Kieselgur) ist ein hochporöses Material. Es wurde dem Tresterpulver zugesetzt, um in der Extraktionszelle eine Verstopfung durch das quellende Drogenmaterial zu verhindern. Als Extraktionsmittel wurde MeOH 70 % verwendet.

Mit der ASE (siehe Kapitel 2.2, Seite 19) wurden 25 Extraktionszellen, die jeweils 10 g der Verreibung aus Diatomeenerde- und Heidelbeertresterpulver enthielten (Mischverhältnis: Heidelbeertresterpulver/Diatomeenerde = 1,9/1), extrahiert. Die Extraktlösungen wurden in einen tarierten Rundkolben überführt, eingedampft und der jeweilige Rückstand gewogen. Anschließend wurden die Rückstände in einem Vakuumexsiccator aufbewahrt. Aus 25 Extraktionszellen wurden 32,45 g Extrakt gewonnen. Davon wurden 30,90 g für die säulenchromatographische Auftrennung verwendet.

3.3.2 Durchführung der Auftrennung des Heidelbeertresters mittels SC

Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 3 ml/min wurden Fractionen zu je 200 ml gesammelt. Die Fractionen wurden in einen Rundkolben überführt, am Rotavapor auf circa 8 ml eingengt und anschließend in ein 10 ml fassendes Schnappdeckelgefäß überführt. Dieses wurde bei einer Temperatur von 6 °C bis zur DC-Analyse gelagert.

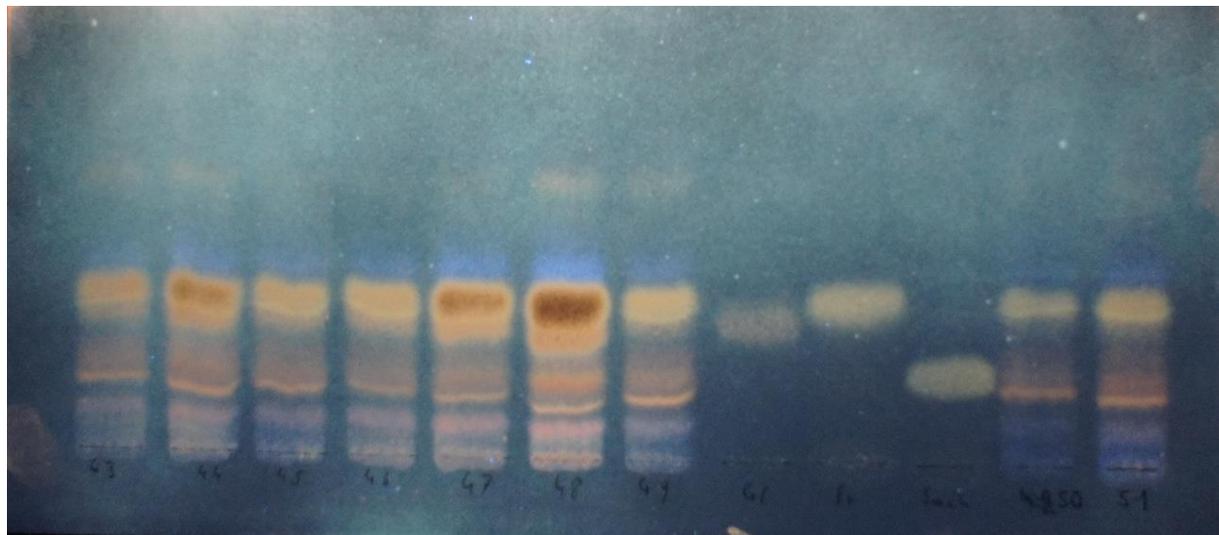
Jede Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch überprüft, um das in der Fraktion enthaltene Inhaltsstoffspektrum zu ermitteln. Für die Analyse der Fraktionen, gelöst im jeweiligen Elutionsmittel, wurde stationäre Phase 1 verwendet (siehe Kapitel 2.3, Seite 21). Die Probenkonzentration auf der stationären Phase betrug 1 mg/ml. Als Sprühreagenzien für die DC wurden Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz und Naturstoff-Polyethylenglykol Reagenz verwendet (siehe Kapitel 2.3, Seite 21). Detektiert wurde anschließend unter UV-Licht bei 254 und 366 nm.

War die Ausbeute pro Fraktion sehr gering und die Zonen auf der entwickelten DC bei konstanter Auftragemenge nur schwach bzw. gar nicht erkennbar, ging man davon aus, dass das Lösungsmittel für die in der Säule verbliebenen Substanzen zu polar war und es wurde auf ein apolareres Lösungsmittel gewechselt. Als eine geringe Ausbeute wurde eine Ausbeute kleiner als 3 mg/ 200 ml Extraktlösung definiert. Für die Auftrennung des Heidelbeertresterextrakts wurden acht Elutionsmittel unterschiedlicher Polarität verwendet (siehe Tabelle 31).

Fraktion	Elutionsmittel	Volumen pro Fraktion
1-3	Wasser	100 ml
4-16	Wasser	50 ml
17-43	Wasser	200 ml
44-75	Wasser	200 ml
76-107	EtOH 10%	100 ml
108-159	EtOH 10%	200 ml
160-223	EtOH 30%	200 ml
224-256	EtOH 50%	200 ml
257-289	EtOH 70%	200 ml
290-319	EtOH 96%	200 ml
320-341	MeOH	200 ml
342-376	EtOAc	200 ml

Tabelle 31: Fraktionsvolumen und Elutionsmittel jeder Fraktion

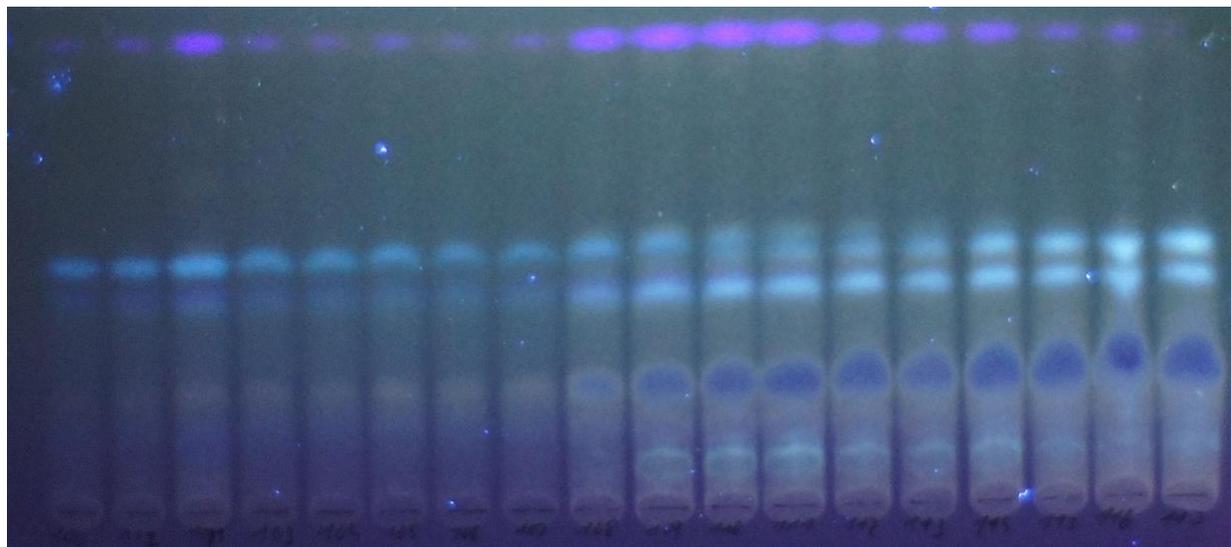
Die ersten 75 Fraktionen wurden mit Wasser eluiert (siehe Tabelle 31, Seite 44). Dieses sehr polare Lösungsmittel eignet sich vor allem zur Abtrennung der im Extrakt enthaltenen Zucker. In Abbildung 25 sieht man einige stark zuckerhaltige Fraktionen.



43 44 45 46 47 48 49 Glucose Fructose Saccharose 50 51

Abbildung 25: DC der Fraktionen 43-51.
Referenzsubstanzen: Glucose, Fructose und Saccharose; Fließmittel 2;
Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz; UV 366

Ab Fraktion 76 wurde EtOH 10% für die Elution verwendet (siehe Abbildung 26).



100 102 101 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117

Abbildung 26: DC der Fraktionen 100-117

Fließmittel 1; Detektion: Naturstoff-Polyethylenglykol Reagenz; UV 366

Ab Fraktion 160 wurde mit EtOH 30% eluiert (siehe Abbildung 27; Tabelle 31, Seite 44).

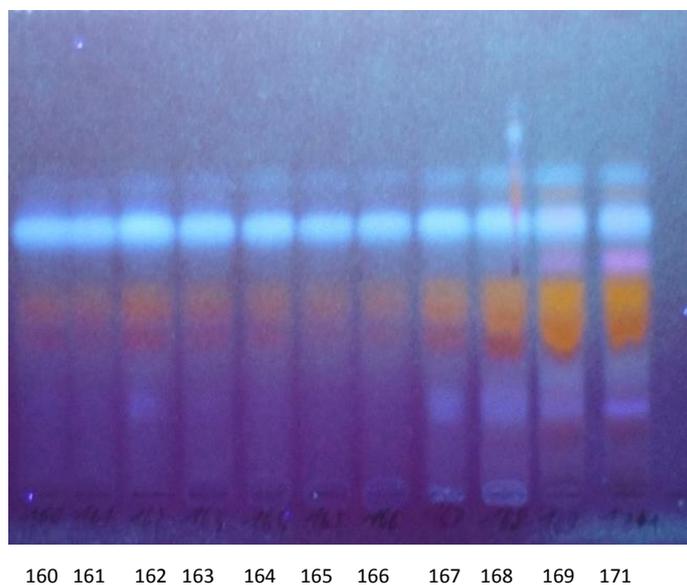


Abbildung 27: DC der Fraktionen 160-171
Fließmittel 1; Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz; UV 366

Ab Fraktion 224 wurde mit EtOH 50% eluiert (siehe Abbildung 28; Tabelle 31, Seite 44).

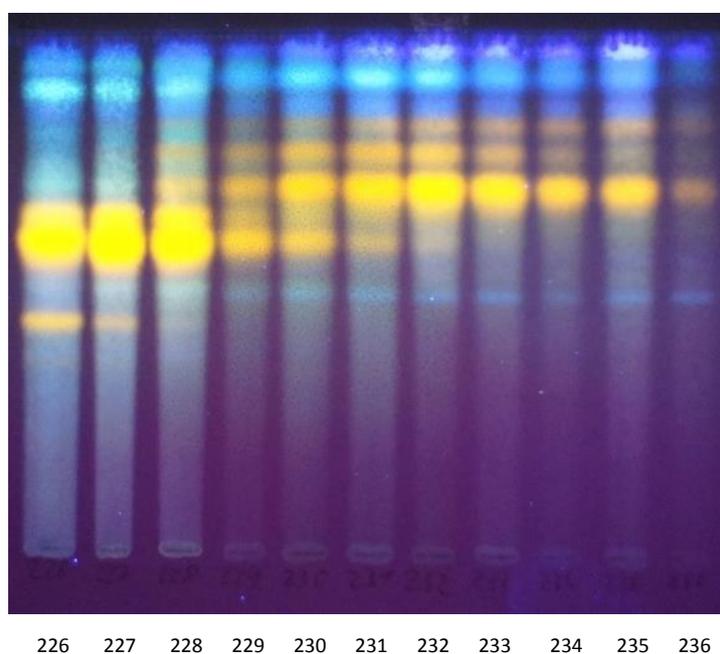


Abbildung 28: DC der Fraktionen 226-236
Fließmittel 1; Detektion: Naturstoff-Polyethylenglykol Reagenz; UV366

Ab Fraktion 257 wurde EtOH 70% verwendet (siehe Tabelle 31, Seite 44). Bei diesem Wechsel kam es zu keiner Veränderung der Fraktionszusammensetzung (siehe Abbildung 29).

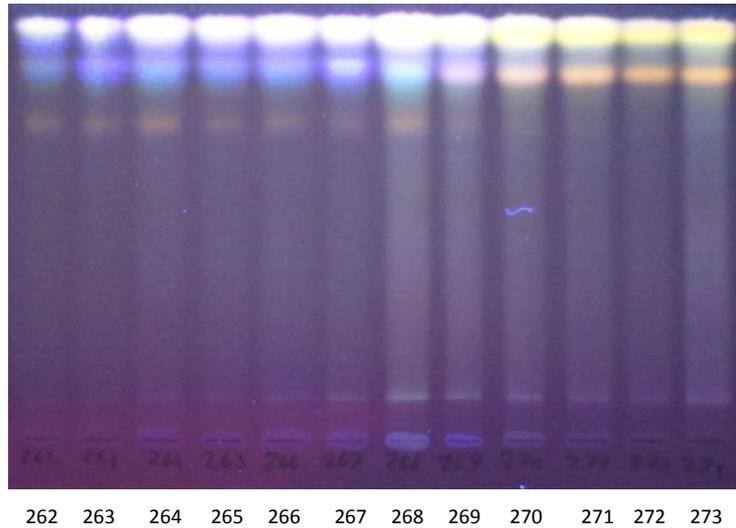


Abbildung 29: DC der Fraktionen 262-273
Fließmittel 1; Detektion: Naturstoff-Polyethylenglykol Reagenz; UV 366

Ab Fraktion 290 wurde EtOH 96% verwendet (siehe Tabelle 31, Seite 44). Die apolaren Fraktionen, eluiert mit EtOH 96%, MeOH und Ethylacetat, waren grün gefärbt und fluoreszierten gelb und rot unter UV 366 (siehe Abbildung 30, Seite 47).

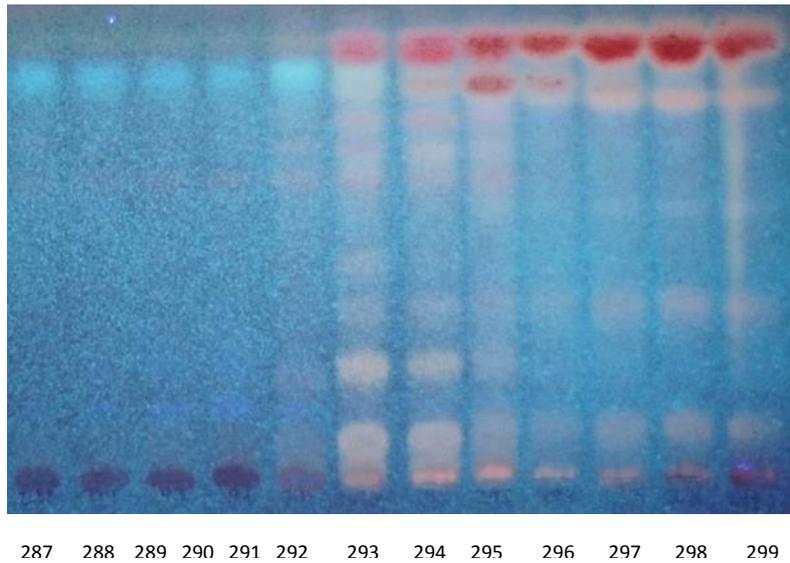


Abbildung 30: DC der Fraktionen 287-299
Fließmittel 3; Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz; UV 366

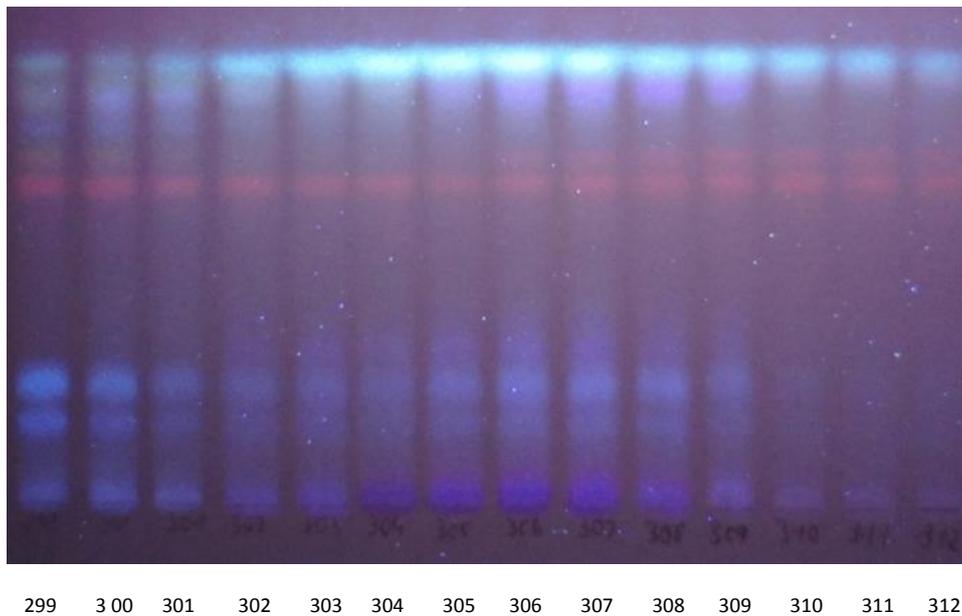


Abbildung 31: DC der Fraktionen 299-312
Fließmittel 3; Detektion: Naturstoff-Polyethylenglykol Reagenz; UV 366

Ab Fraktion 320 wurde MeOH verwendet (siehe Tabelle 31, Seite 44). Die Methanolfractionen zeigen dasselbe Bandenmuster wie die Fraktionen 310, 311 und 312, die in Abbildung 31 angeführt werden. Beim Wechsel von EtOH 96% auf MeOH wurden keine neuen Banden detektiert, weswegen bereits nach 22 eluierten Fraktionen von MeOH auf

Ethylacetat gewechselt wurde (siehe Tabelle 31, Seite 44). Ab Fraktion 342 wurde Ethylacetat verwendet (siehe Abbildung 32, Seite 49).

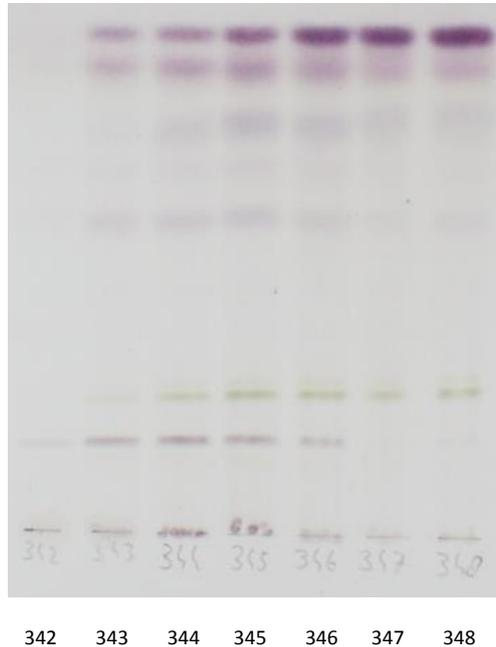


Abbildung 32: DC der Fraktionen 338-348
Fließmittel 4; Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz; Tageslicht

3.3.3 Untersuchungen der Sammelfractionen

Fraktionen, die bei der DC-Analyse dasselbe Bandenmuster aufwiesen, wurden zu Sammelfractionen vereinigt. Sammelfractionen wurden am Rotavapor eingeeengt und anschließend lyophilisiert. Nach der Lyophilisation wurden die getrockneten Sammelfractionen gewogen und anschließend in einem Exsiccator über Blaugel gelagert.

Sammelfraktion	Fraktionen	Gewicht (g)
1	1-3	n.d.
2	4-5	0,04 g
3	6-21	7,39 g
4	22-26	2,10 g
5	27-32	2,43 g
6	33-51	2,04 g
7	52-60	0,30 g
8	61-69	0,05 g
9	70-85	0,01 g
10	86-92	0,12 g
11	93-101	0,15 g
12	102-107	0,02 g
13	108-116	0,18 g
14	117-127	0,08 g
15	128-134	0,18 g
16	135-159	0,22 g
17	160-167	0,10 g
18	168-172	0,69 g
19	173-183	1,36 g
20	184-192	0,46 g
21	193-224	0,80 g
22	225-228	2,63 g
23	229-232	0,36 g
24	233-239	0,23 g
25	240-258	0,26 g
26	259-268	0,14 g
27	269	0,05 g
28	270-273	0,05 g
29	274-288	0,17 g
30	289-292	0,08 g
31	293-295	0,29 g
32	296-300	0,50 g
33	301-307	0,47 g
34	308-318	0,16 g
35	319-342	0,14 g
36	343-376	0,41 g

Tabelle 32: Sammelfraktionen und deren Gewichte

Von den 36 Sammelfractionen wurden DC-Bilder angefertigt. Die Abbildungen 33 und 34 (Seite 52) zeigen diese DC-Bilder. Es wurde mit stationärer Phase 1 gearbeitet (siehe Kapitel 2.3, Seite 21). Die Probenkonzentration auf der stationären Phase betrug ungefähr 1 mg/ml. Als Sprühreagenzien für die DC wurden Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz und Naturstoff-Polyethylenglykol Reagenz verwendet (siehe Kapitel 2.3, Seite 23). Detektiert wurde anschließend unter UV-Licht bei 254 und 366 nm.

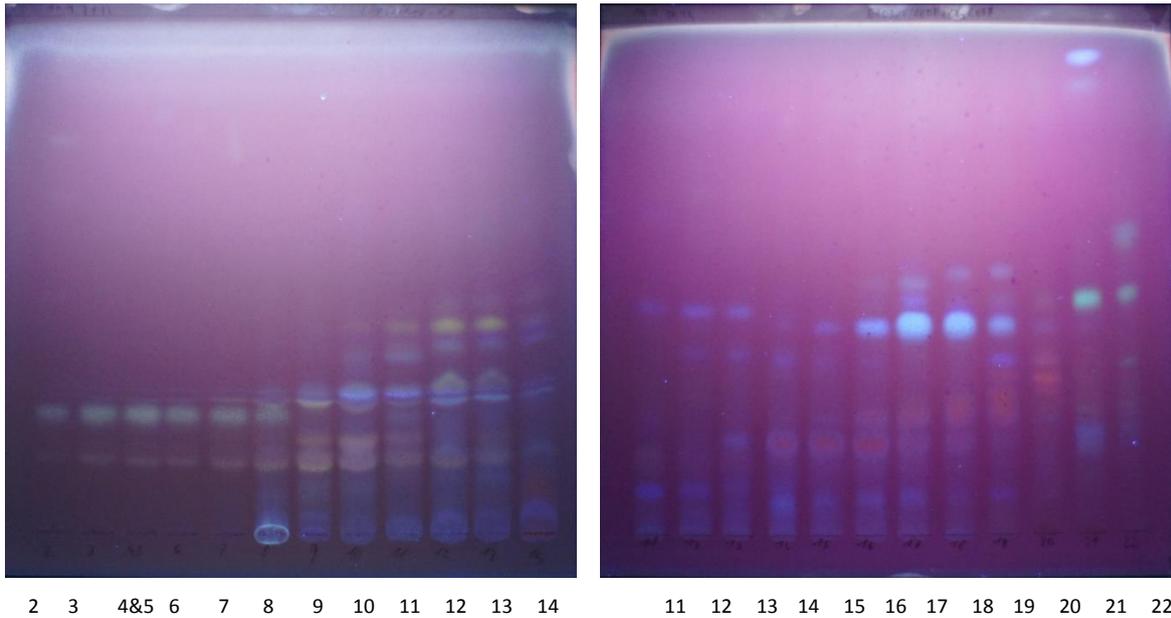


Abbildung 33: Sammelfractionen 2-14 (Fließmittel 1; Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz; UV 366) und Sammelfractionen 11-22 (Fließmittel 2; Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz; UV 366)

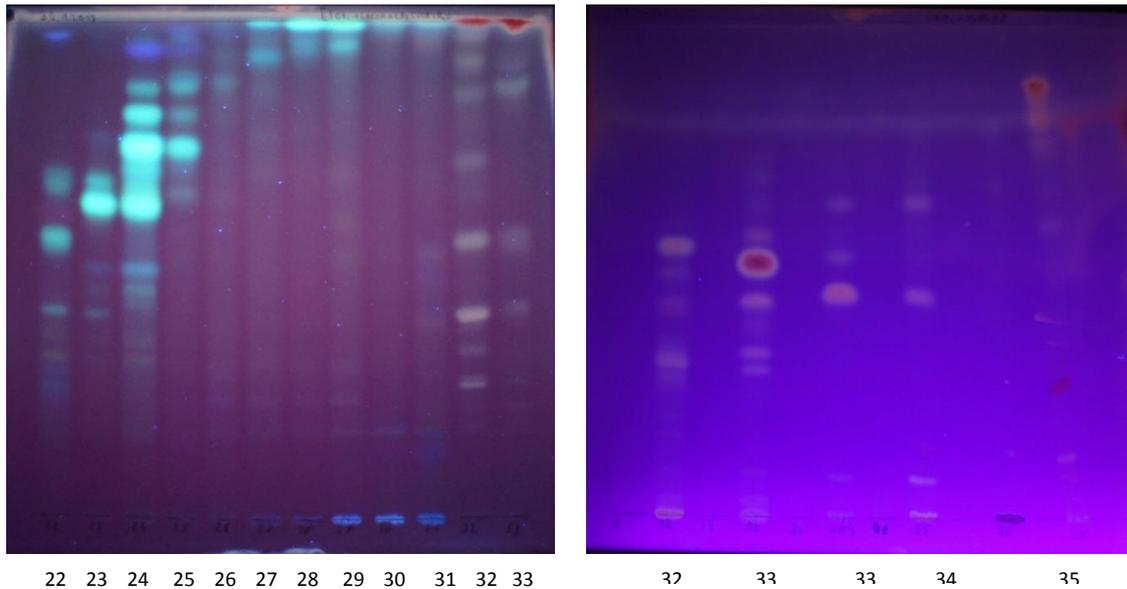


Abbildung 34: Sammelfractionen 22-33 (Fließmittel 2; Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz; UV 366) und Sammelfractionen 32-36 (Fließmittel 4; Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz; UV 366)

In den einzelnen Sammelfractionen sollten in Folge die Anthocyanzusammensetzung und der Anthocyangehalt bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen werden in Kapitel 3.4 beschrieben.

Weiters sollte mit den Sammelfractionen die Steigerung der Aktivität der eNOS nach Stimulation der EA.hy926-Zellen mit Sammelfractionen gemessen werden. Die Messungen werden im Rahmen des Initiativkollegs BioPromotion von Katharina Waldbauer an der Universität Wien durchgeführt (Waldbauer *et al.*, 2014, Dissertation in Vorbereitung).

3.4 Identifizierung und Quantifizierung der Anthocyane in Heidelbeertresterextrakt und Sammelfractionen

Die aus der Fraktionierung des Heidelbeertresters erhaltenen Sammelfractionen (siehe Kapitel 3.3.3, Seite 49) sollten mittels HPLC hinsichtlich ihrer Anthocyanzusammensetzung und ihres Anthocyangehalts untersucht werden.

3.4.1 Zuordnung der Anthocyane im Heidelbeertrester

Stefanut *et al.* (2011) entwickelten eine HPLC-Methode zur Auftrennung der Anthocyane im Heidelbeertrester und identifizierten 16 Anthocyane sowie das Aglykon Cyanidin (siehe Abbildung 35; Tabelle 33).

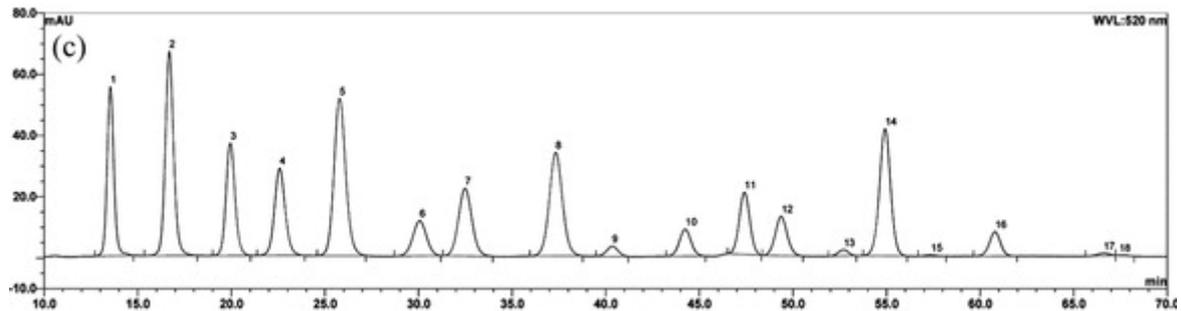


Abbildung 35: Chromatogramm der Methode von Stefanut *et al.* (2011). Detektion: 520 nm

Anthocyan	Peaknummer
Delphinidin-3-O-galactosid	1
Delphinidin-3-O-glucosid	2
Cyanidin-3-O-galactosid	3
Delphinidin-3-O-arabinosid	4
Cyanidin-3-O-glucosid	5
Petunidin-3-O-galactosid	6
Cyanidin-3-O-arabinosid	7
Petunidin-3-O-glucosid	8
Peonidin-3-O-galactosid	9
Petunidin-3-O-arabinosid	10
Peonidin-3-O-glucosid	11
Malvidin-3-O-galactosid	12
Peonidin-3-O-arabinosid	13
Malvidin-3-O-glucosid	14
Malvidin-3-O-arabinosid	16
Cyanidin	17

Tabelle 33: Zuordnung der Anthocyane in Abb. 35 (Stefanut *et al.*, 2011)

Mit Säule 3 (siehe Kapitel 2.5, Seite 25) und den für die Säule adaptierten HPLC-Parametern von Stefanut *et al.* (2011) konnten bei Auftrennung des methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakts 17 Peaks bei der Wellenlänge 520 nm detektiert werden.

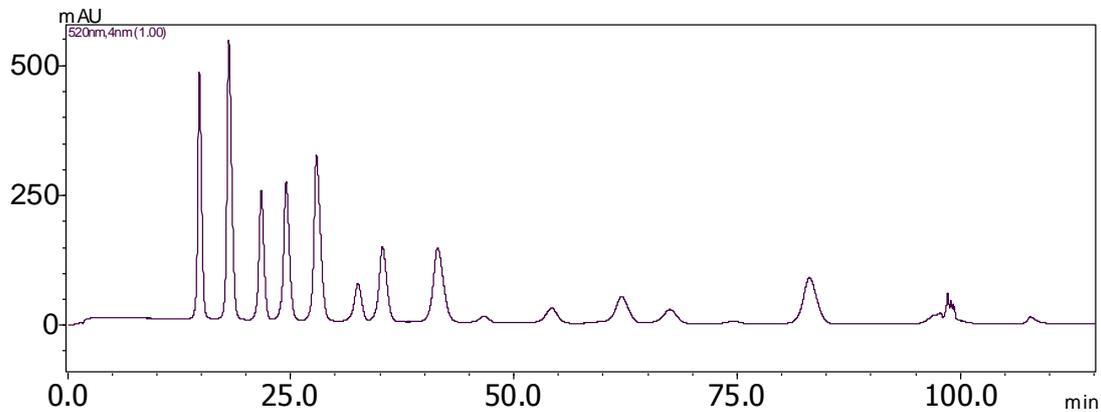


Abbildung 36: HPLC-Chromatogramm nach Auftrennung des methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakts mit der modifizierten Methode von Stefanut *et al.* (2011); Detektion: 520 nm

Ebenso konnten in der Arbeit von Waldbauer (2014, Dissertation in Vorbereitung) die von Stefanut *et al.* (2011) publizierten massenspektrometrischen Daten reproduziert werden.

Massenspektrometrische Daten ermöglichen keine vollständige Identifizierung aller Anthocyane im methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakt, da es nicht möglich ist alle Anthocyanglykoside mittels MS zu unterscheiden. Stefanut *et al.* (2011) identifizierten die Anthocyane daher durch Vergleiche mit authentischen Referenzsubstanzen und publizierten eine Zuordnung aller Anthocyane und Cyanidin in Heidelbeeren (siehe Abbildung 35; Tabelle 33, Seite 53). Anhand dieser Zuordnung und ihrer relativen Retentionszeiten wurde es möglich alle Anthocyane im methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakt zuzuordnen. Anhand der absoluten Retentionszeiten und der UV-Spektren konnte außerdem die Zusammensetzung der Anthocyane in den einzelnen Sammelfractionen vermutet werden (siehe Tabelle 36, Seite 61).

3.4.2 Eichgerade

Neben der Anthocyanzusammensetzung sollte auch der Anthocyangehalt der Sammelfractionen bestimmt werden. Die Ermittlung des Anthocyangehalts der Sammelfractionen wurde mittels externer Standardisierung als Cyanidin-3-O-glucosid näherungsweise durchgeführt.

Cyanidin-3-O-glucosid ist das in Heidelbeeren mengenmäßig vorherrschende sowie preislich günstigste Anthocyan. Deshalb wird es häufig herangezogen um Anthocyane mittels externer Standardisierung zu quantifizieren. Wie in Kapitel 1.2.2, Seite 10, erläutert, besitzen alle Anthocyane der Heidelbeere dasselbe chromophore System und unterscheiden sich durch die Substituenten 3', 4' und 5'. Die Substituenten beeinflussen die Absorptionsmaxima der Anthocyane nur geringfügig, wie in folgendem Experiment gezeigt werden soll:

Cyanidin-3-O-glucosid, Malvidin-3-O-glucosid und Peonidin-3-O-glucosid wurden in einer Konzentration von 0,30 mg/ml in die Photodioden-Array-Detektor-gekoppelte HPLC 5-mal injiziert. Die erhaltenen UV/VIS Chromatogramme (siehe Abbildung 38, 39 und 40, Seite 55) zeigen, dass die Absorptionsmaxima für Cyanidin-3-O-glucosid und Peonidin-3-O-glucosid bei 514 nm liegen und für Malvidin-3-O-glucosid bei 527 nm.

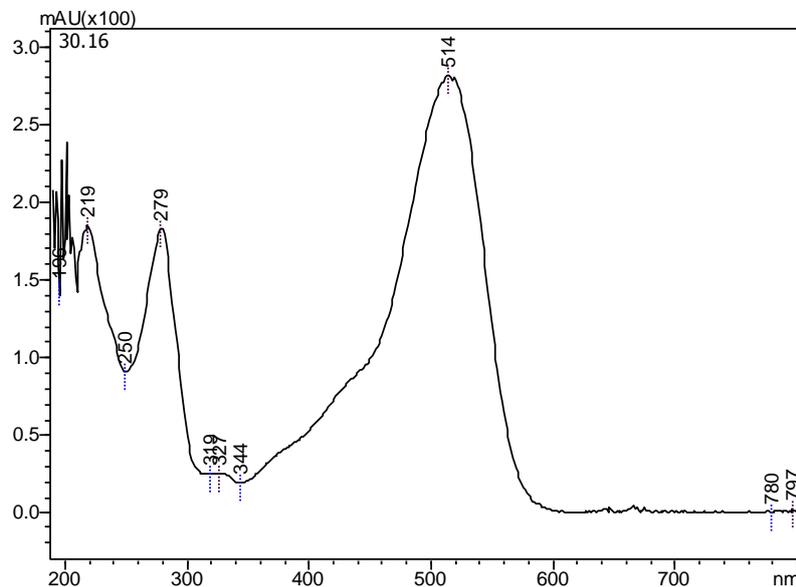


Abbildung 37: UV-Absorptionsspektrum von Cyanidin-3-O-glucosid

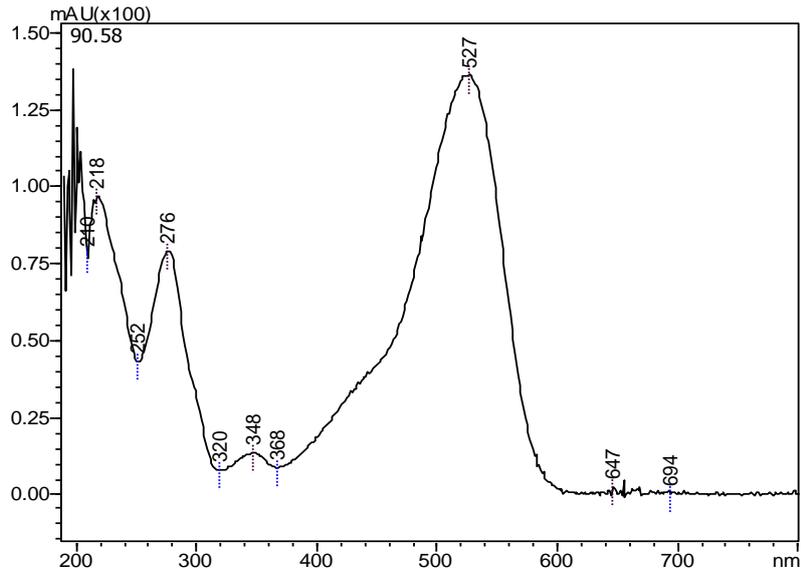


Abbildung 38: UV-Absorptionsspektrum von Malvidin-3-O-glucosid

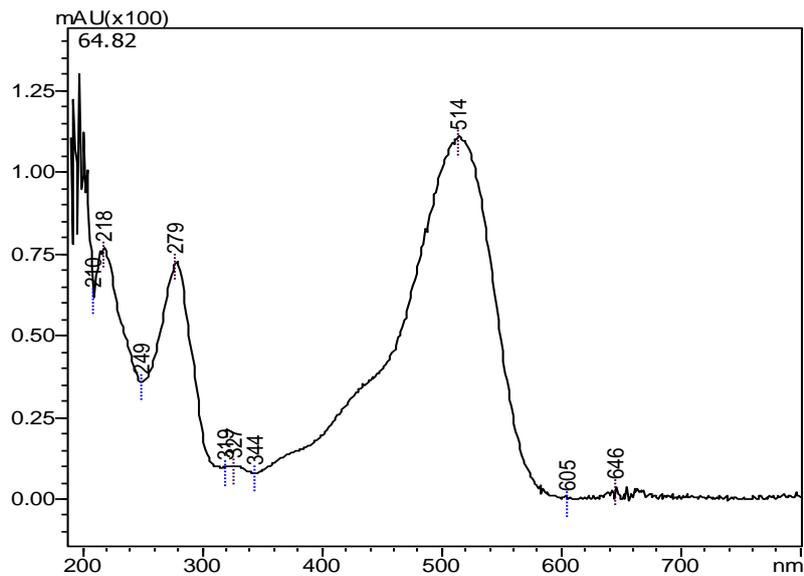


Abbildung 39: UV-Absorptionsspektrum von Peonidin-3-O-glucosid

Die in der Literatur häufig für die Detektion von Anthocyanen verwendete Wellenlänge von 520 nm erscheint somit als guter Kompromiss für die Ermittlung des Anthocyangehalts, berechnet als Cyanidin-3-O-glucosid.

Waldbauer (2014, Dissertation in Vorbereitung) erstellte eine Eichgerade durch Vermessung bekannter Konzentrationen von Cyanidin-3-O-glucosid (siehe Abbildung 37). Cyanidin-3-O-glucosid wurde mit dem HPLC-Gerät unter Verwendung der Methode nach Stefanut *et al.* (2011) in fünf verschiedenen Konzentrationen injiziert und detektiert. Von jeder Konzentration wurden zwei unterschiedliche Einwaagen vermessen. Die Erstellung der Geraden erfolgte anschließend anhand der resultierenden Peakflächen (auf der Ordinate), abhängig von den steigenden Konzentrationen (auf der Abszisse) von Cyanidin-3-O-glucosid.

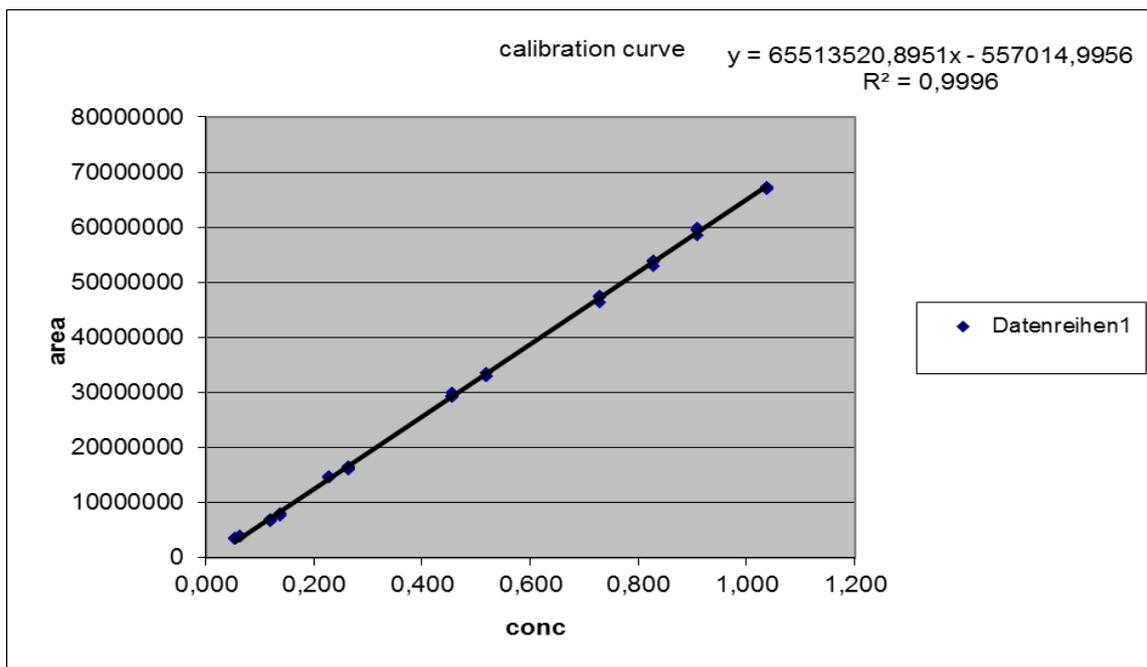


Abbildung 40: Eichgerade von Cyanidin-3-O-glucosid (Waldbauer 2014, Dissertation in Vorbereitung)

Um den Fehler, der bei der Quantifizierung der Heidelbeeranthocyane, berechnet als Cyanidin-3-O-glucosid, entsteht, abschätzen zu können wurden bekannte Konzentrationen der Reinsubstanzen Cyanidin-3-O-glucosid, Malvidin-3-O-glucosid und Peonidin-3-O-glucosid mit den Parametern der Methode nach Stefanut *et al.* (2011) in das HPLC-Gerät injiziert. Anschließend wurden die Peakflächen der bei 520 nm detektierten Anthocyanpeaks ermittelt und anhand der Eichgerade der Anthocyan Gehalt berechnet (siehe Tabelle 37, Seite 62).

Für die Berechnung des Anthocyangehalts müssen die Peakflächen der bei 520 nm detektierten Anthocyanpeaks in den einzelnen Chromatogrammen summiert werden.

Aus der Eichgeraden (siehe Abbildung 37, Seite 57) ergibt sich eine lineare Funktion der Form $f(x)=k \cdot x+d$, wobei k die experimentell ermittelte Steigung ist und d der Schnittpunkt der Ordinate am Nullwert der Abszisse. Die lineare Steigung kann aus der Eichgeraden abgelesen werden. Da die Konzentration von der Ordinate abgelesen wird, müssen wir die lineare Gleichung entsprechend umformen, um die gesuchte Konzentration x berechnen zu können. x entspricht der Konzentration des Analyten in mg/ml. $F(x)$ entspricht der Summe der Peakflächen der Anthocyanpeaks in den einzelnen Chromatogrammen.

$$\frac{\text{Summe der Peakflächen} - d}{\text{lineare Steigung}} = c \text{ (mg/ml)}$$

Die Gesamtanthocyankonzentration, ausgehend von den experimentell ermittelten Peakflächen und der Eichgeraden, wird wie folgt berechnet:

$$\frac{(\text{Summe der Peakflächen} - d) \times 1000}{\text{lineare Steigung} \times c \text{ (mg/ml) der aufgetrennten Sammelfraktion}} = c \text{ (mg/g)}$$

Replikat	Referenzsubstanz	conc mg/ml(Einwaage)	Peakfläche	conc mg/ml (berechnet als Cy-3-O-gluc)	Korrekturfaktor	Fehler (in %)	Mittelwert des Fehlers pro Bestimmung
1	Cyanidin-3-O-glucosid	0,30	20057334	0,31	0,97	3,23 %	
1	Peonidin-3-O-glucosid	0,29	14013226	0,22	0,76	24,14 %	11,28 %
1	Malvidin-3-O-glucosid	0,31	18571420	0,29	1,06	6,46 %	
2	Cyanidin-3-O-glucosid	0,30	19840252	0,31	0,97	3,23 %	
2	Peonidin-3-O-glucosid	0,29	14872064	0,24	1,24	17,25 %	11,16 %
2	Malvidin-3-O-glucosid	0,31	17428401	0,27	1,12	13,01 %	
3	Cyanidin-3-O-glucosid	0,30	20349236	0,32	0,95	6,67 %	
3	Peonidin-3-O-glucosid	0,29	13552179	0,22	1,36	24,14 %	12,42 %
3	Malvidin-3-O-glucosid	0,31	18633361	0,29	1,05	6,46 %	

Tabelle 34: experimentelle Dreifachbestimmung von Korrekturfaktoren und der Fehlerabweichung in %

Wie in der Tabelle 34 zu sehen ist, sprechen die Abweichungen der als Cyanidin-3-O-glucosid berechneten Konzentrationen von den wahren Cyanidin-3-O-glucosid und Malvidin-3-O-glucosid Konzentrationen für eine sehr gute Annäherung an den tatsächlichen Anthocyangehalt. Bei Peonidin-3-O-glucosid ist der entstehende Fehler durch die Quantifizierung bei 520 nm, berechnet als Cyanidin-3-O-glucosid, signifikanter. Aufgrund des, außer bei Peonidin-3-O-glucosid, geringen Fehlers wurde in Folge der Anthocyangehalt der einzelnen Sammelfractionen, berechnet als Cyanidin-3-O-glucosid, ermittelt.

3.4.3 Qualitative und quantitative Analyse der Sammelfractionen

Jeder Sammelfraktion wurde ein Milligramm entnommen und dieses anschließend gelöst. Für die Sammelfractionen 1-21 wurde eine 0,5 % Lösung Trifluoressigsäure in H₂O als Lösungsmittel verwendet. Die apolareren Fractionen 22-36 konnten mit EtOH 96 % im Ultraschallbad gelöst werden.

Da der Anthocyan Gehalt in den einzelnen Sammelfractionen sehr unterschiedlich ist (siehe auch Kapitel 3.3.3, Seite 49), wurden anthocyanarme Sammelfractionen höher konzentriert als anthocyanreiche Sammelfractionen vermessen. Das war notwendig damit die Anthocyane im linearen Bereich der Eichgerade detektiert werden. Aufgrund von Testmessungen wurden folgende Konzentrationen für die qualitative und quantitative Analyse der Sammelfractionen verwendet:

Sammelfractionen	Konzentration
1-8	20 mg/ml
9-19	3 mg/ml
20-28	10 mg/ml
29-36	20 mg/ml

Tabelle 35: gewählte Konzentrationen der Sammelfractionen für die HPLC-Analyse

Für die HPLC-Auftrennung der Anthocyane wurde die Methode nach Stefanut *et al.* (2011) verwendet. Die Anthocyane wurden bei 520 nm detektiert und die Anthocyanzusammensetzung aller Sammelfractionen wurde, wie in Kapitel 3.4.1, Seite 53, beschrieben, ermittelt. Ab Sammelfraktion 11 waren Anthocyane detektierbar (siehe Tabelle 36, Seite 61). Ab Sammelfraktion 27 wurden nur noch Spuren von Anthocyan glykosiden detektiert, jedoch nahm die Konzentration des Aglykons Cyanidin zu.

Sammeffraktion	Delphinidin-3-O-galactosid	Delphinidin-3-O-glucosid	Cyanidin-3-O-galactosid	Delphinidin-3-O-arabinosid	Cyanidin-3-O-glucosid	Petunidin-3-O-galactosid	Cyanidin-3-O-arabinosid	Petunidin-3-O-glucosid	Peonidin-3-O-galactosid	Petunidin-3-O-arabinosid	Peonidin-3-O-glucosid	Malvidin-3-O-galactosid	Peonidin-3-O-arabinosid	Malvidin-3-O-glucosid	Malvidin-3-O-arabinosid	Cyanidin
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11	x	x		x												
12	x	x														
13	x	x		x												
14	x	x		x												
15	x	x	x	x	x	x		x								
16	x	x	x	x	x	x		x								
17	x	x	x	x	x	x	x	x								
18	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x		x		x
19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
20	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
21	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
22																x
23																x
24	x	x			x		x									x
25	x	x	x	x	x		x	x								x
26																x
27																
28	x	x	x	x	x		x	x						x		x
29	x	x	x	x	x		x	x						x		x
30					x									x		x
31																x
32																x
33	x	x	x	x	x						x		x			x
34																x
35	x	x	x	x	x	x				x	x		x			x
36																x

Tabelle 36: Qualitative Analyse der in den SF (siehe Kapitel 3.3.3, Seite 49) enthaltenen Anthocyane

Anschließend wurde, wie in Kapitel 3.4.2, Seite 58, beschrieben, der Anthoyangehalt jeder Sammelfraktion, berechnet als Cyanidin-3-O-glucosid, ermittelt.

Sammelfraktion	Anthocyangehalt (mg/g)
11	12,9
12	33,0
13	188,6
14	271,1
15	275,9
16	147,6
17	141,7
18	195,1
19	129,5
20	100,0
21	53,0
22	12,9
23	13,1
24	19,9
25	44,4
26	13,6
27	n.d.
28	20,6
29	14,9
30	13,7
31	0,6
32	0,5
33	6,9
34	0,5
35	10,4
36	0,5

Tabelle 37: Gesamtanthocyangehalt jeder Sammelfraktion, berechnet als Cyanidin-3-O-glucosid, in der Anthocyane nachweisbar war

3.5 Metabolismus phenolischer Inhaltsstoffe in der Heidelbeere

Baron-Menguy *et al.* (2007), Lazze *et al.* (2006), Ojeda D. *et al.* (2010) und Teuscher *et al.* (2012) heben hervor, dass die vasoprotektiven Wirkmechanismen von Flavonoiden, Anthocyanen und anderen phenolischen Substanzen umstritten sind und es hier bei vielen Stoffen noch einer restlosen Aufklärung bedarf. Laut Kim *et al.* (1998) geht man davon aus, dass nicht nur die Inhaltsstoffe selbst, sondern auch deren Metaboliten, die ebenfalls resorbiert werden, relevante Wirkungen besitzen.

3.5.1 Resorption und Metabolismus im Menschen

Der Metabolismus von peroral verabreichten Stoffen beginnt bereits im Mund, wo es durch Amylasen im Speichel zur Zersetzung von verabreichten Substanzen kommt. Anschließend werden diese durch im Magen sezernierte Verdauungsenzyme, wie zum Beispiel Pepsin, in Magen und Darm weiter zersetzt. An der Darmwand wird die Nahrung von Oxidasen, Reduktasen und Hydrolasen weiter enzymatisch gespalten. Die Enzymkonzentration an der Darmwand ist gering, weswegen bei Spaltung durch Darmwandenzyme schnell Enzymsättigung eintreten kann (Aktories *et al.*, 2009).

Neben den Verdauungsenzymen ist die äußerst komplexe Darmflora, deren Zusammensetzung individuell unterschiedlich ist und die große Unterschiede hinsichtlich ethnischer Herkunft aufweist (Aktories *et al.*, 2009), ebenfalls verantwortlich für den Metabolismus phenolischer Substanzen vor der Resorption. Nach Williamson *et al.* (2010) verfügt unser Verdauungssystem über 10-mal so viele mikrobielle Zellen wie unser Körper. Jeder Abschnitt des Verdauungssystems (Mund, Ösophagus, Magen, Dünndarm und Dickdarm) hat eine eigene mikrobielle Flora, die Bakterien und Archaea beheimatet.

Die häufigsten Bakteriengruppen sind *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. und *Eubacterium* spp. Im Dickdarm sind weiters viele *Fusobakterien*, *Peptostreptococce*n und *Bifidobakterien* angesiedelt. *Methanobrevibacter smithii* zählt zu den Archaea und ist vorwiegend im Colon angesiedelt (Williamson *et al.*, 2010). Für die intestinale Metabolisierung und Resorbierbarkeit zahlreicher phenolischer Substanzen wird daher eine intakte Darmflora im Dickdarm benötigt (Jaganath *et al.*, 2006).

Nach der Resorption in Dünn- oder Dickdarm gelangen die Stoffe in den enterohepatischen Kreislauf und anschließend über die Leber in den Blutkreislauf. Je nach Löslichkeit werden sie entweder unverändert ausgeschieden oder vor der Elimination biotransformiert.

Eliminiert werden Metaboliten oder unveränderte Stoffe hauptsächlich über Darm, Galle und Niere. Auch über Haut, Lunge und Speichel können Stoffe eliminiert werden (Aktories *et al.*, 2009), wie zum Beispiel Komponenten eines ätherischen Öls.

3.5.2 Resorption und Elimination von phenolischen Strukturen

Für das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Resorption phenolischer Strukturen sind die Veresterung/Veretherung/Glykosylierung (Scalbert *et al.*, 2002, Ichiyangi *et al.*, 2006) von phenolischen Strukturen, das Molekulargewicht (Scalbert *et al.*, 2002), die individuelle Enzymausstattung des Verdauenden (Ichiyangi *et al.*, 2006) und die Zusammensetzung der Darmflora (Jaganath *et al.*, 2006) von Bedeutung. Da die Zusammensetzung der Darmflora und die Enzymaktivität im Darm individuell durch die genetische Ausstattung geprägt werden, ist auch die Resorption phenolischer Metabolite ein sehr individueller Prozess (Ichiyangi *et al.*, 2006).

Nach Scalbert *et al.* (2002) und Milbury *et al.* (2010) werden phenolische Strukturen nur zu geringen Teilen resorbiert. In Pflanzen liegen Phenole als Glykoside vor (Teuscher *et al.*, 2012). Die peroral eingenommenen Glykoside werden vorwiegend von Glykosidasen des Verdauungstraktes gespalten (Milbury *et al.*, 2010). Dennoch können auch im Plasma unverändert resorbierte Glykoside nachgewiesen werden (Manach *et al.*, 2005).

Auch Ichiyangi *et al.* (2006) beschreiben die Resorption von intakten Heidelbeeranthocyanen. Im Darm entstandene Glucuronide werden laut Ichiyangi *et al.* (2006) nicht resorbiert.

Nach oraler zeitlich versetzter Gabe äquivalenter Mengen von Quercetin und Quercetin-3-O-glucosid hatte es auf die Resorptionsrate des Aglykons Quercetin einen großen Einfluss ob Quercetin oder Quercetin-3-O-glucosid verabreicht worden waren.

Bei Gabe des Quercetin-3-O-glucosids wurde nämlich eine höhere Quercetinkonzentration im Plasma gemessen, als bei Gabe äquimolarer Menge Quercetins (Scalbert *et al.*, 2002).

Hypothetisch kann festgehalten werden, dass möglicherweise die Glucose intestinal kontinuierlich abgespalten wird, dabei kontinuierlich das Aglykon entsteht und dieses resorbiert wird. Die Transportsysteme des Darms sind vermutlich nie gesättigt und daher könnte, nach Gabe von Quercetin-3-O-glucosid, Quercetin insgesamt in größeren Mengen resorbiert werden. Bei Gabe des Aglykons sind die Transportsysteme im Dünndarm schnell übersättigt und das Aglykon gelangt zu einem Großteil unresorbiert in den Dickdarm.

Die Mikroorganismen im Dickdarm sind in der Lage C- und O-Glykoside sowie Ester und Amide zu spalten. Methoxygruppen bzw. Methylgruppen werden teilweise demethoxiliert und/oder demethyliert. Aromatische Hydroxygruppen werden großteils abgespalten und teilweise auch die konjugierten Ringsysteme aufgespalten und geöffnet (Williamson *et al.*, 2010). Neben den später in diesem Kapitel beschriebenen Metaboliten entstehen dabei auch CO₂ und Oxalacetat (Williamson *et al.*, 2010).

Bei der Metabolisierung von Flavonoiden sind das Ausmaß der Hydroxylierung und die Stellung der Hydroxylgruppen im B-Ring von Bedeutung: Die p-Hydroxylgruppe am B-Ring erhöht die Metabolisierungsrate, während diese durch m-Hydroxylgruppe eher vermindert wird (Williamson *et al.*, 2010).

Die Elimination von resorbierten phenolischen Substanzen ist abhängig von der individuellen Enzymausstattung in der Leber und der individuellen Nierenfunktion (Ichiyanagi *et al.*, 2006). Die Elimination erfolgt durch Spaltung oder Konjugation der Phenole über Phase 1 und Phase 2 Enzyme. Gemeinsamer Endmetabolit aller Phenole ist die Hippursäure (Beyoglu *et al.*, 2012). Die Spaltung zur Hippursäure erfolgt großteils in der Leber (siehe Abbildung 42, Seite 70) (Beyoglu *et al.*, 2012). Hippursäure wird anschließend renal ausgeschieden.

Von Carbonsäuren wird ein kleiner Teil unverändert renal eliminiert, der Großteil jedoch ebenfalls als Hippursäure im Urin detektiert (Farah *et al.*, 2008).

Pharmakologische Dosen phenolischer Substanzen können zu einer Sättigung der metabolisierenden Enzyme in Darm und Plasma führen, was zu einem schlagartigen Anstieg

der phenolischen Strukturen im Plasma führt. So werden hohe, wirksame Plasmaspiegel der unveränderten Phenole erreicht (Scalbert *et al.*, 2002).

3.5.3 Metabolite phenolischer Substanzgruppen in Heidelbeeren

Die mengenmäßig bedeutendsten Flavanderivate in Heidelbeeren sind Flavan-3-ole und Flavon-3-ole.

Catechin, ein Flavan-3-ol und oligomere Proanthocyanidine (siehe auch Kapitel 1.2.2, Seiten 9, 14) werden zu einem geringen Teil resorbiert (Manach *et al.*, 2005). Bei in-vivo Testungen von Deprez *et al.* (2000) wurden 11 verschiedene Catechinmetaboliten (Phenylvalerensäure-, Phenyllessigsäure- und Benzoessäure-derivate) im Plasma detektiert.

Neben den Flavan-3-olen sind Flavon-3-ole mengenmäßig bedeutsame Vertreter der Flavanderivate in Heidelbeerfrüchten (siehe auch Kapitel 1.2.2, Seiten 13). Die Flavon-3-olglykoside werden fast vollständig zu den Aglyka gespalten, aber auch teilweise unverändert resorbiert (Manach *et al.*, 2005).

Kämpferol besitzt nur eine p-Hydroxygruppe am B-Ring und wird deswegen stärker metabolisiert als Quercetin, welches zwei Hydroxygruppen an 3' und 4' besitzt. Dieses wiederum wird schneller metabolisiert als Myricetin, da dieses drei Hydroxygruppen am B-Ring aufweist (Williamson *et al.*, 2010).

Syringetin ist zweifach methoxyliert. Bereits im Darm wird ein großer Teil der Methoxygruppen und Hydroxygruppen abgespalten. Als Metaboliten entstehen dabei auch Laricitrin und Myricetin (Williamson *et al.*, 2010).

Isorhamnetin wird teilweise zu Quercetin demethyliert (Williamson *et al.*, 2010).

Quercetin wird nach Aura *et al.* (2002) innerhalb von 2 Stunden zur Dihydroxyessigsäure abgebaut. In weiteren acht Stunden spalten Hydroxylasen anschließend eine oder beide Hydroxylgruppen ab.

Die einzigen Flavanonole in Heidelbeerfrüchten sind Taxifolin und dessen Glucosid (siehe auch Kapitel 1.2.2, Seite 14). Flavanonolglykoside werden großteils zu den entsprechenden Aglyka gespalten, aber teilweise auch unverändert resorbiert. Der B-Ring der Metaboliten

von Taxifolin kann an den Positionen p- und m- hydroxyliert oder dehydroxyliert vorliegen (Williamson *et al.*, 2010).

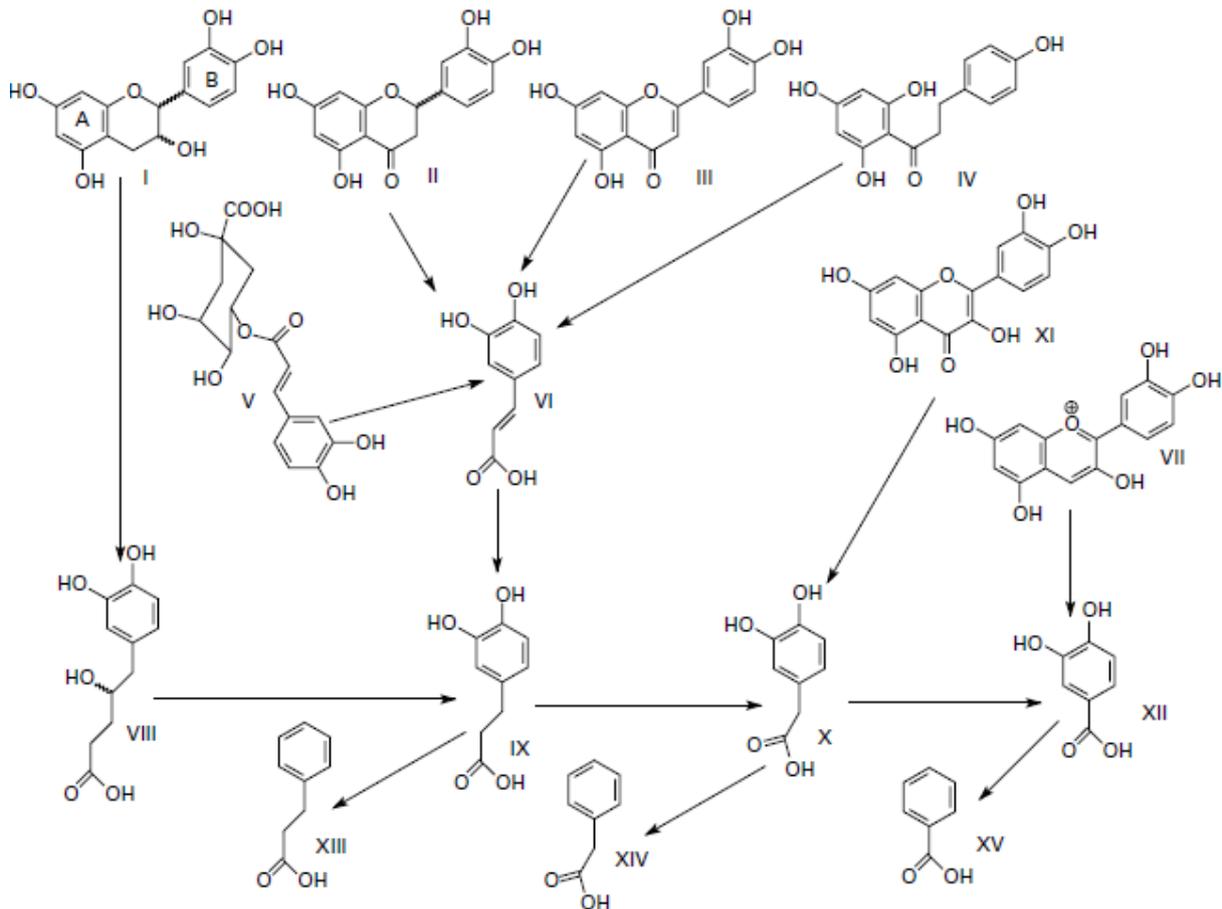


Abbildung 41: Metabolisierung von phenolischen Strukturen im menschlichen Körper (Williamson *et al.* 2010). Sind Colonmetaboliten von Polyphenolen in Beeren die fehlende Verknüpfung für das Verständnis ihrer biologischen Aktivität? British Journal of Nutrition 104: S. 49

Legende der römischen Zahlen in der Abbildung:

**I: Flavanole; II: Flavanone; VII: Anthocyanidine; XI: Flavonole; VI: Zimtsäurederivate;
VIII: Phenylvalerensäure; XIII: Phenylpropionsäure (IX= Hydroxyderivat); XIV: Phenyllessigsäure
(X= Hydroxyderivat); XV: Benzoensäuren (XII= Hydroxyderivat)**

Wie bei den Flavanderivaten geht man auch bei den Anthocyanen (siehe Kapitel 1.2.2, Seite 12) von einer geringen Resorbierbarkeit aus (Matsumoto *et al.*, 2001, Manach *et al.*, 2005). Nach peroraler Gabe werden die Anthocyanglykoside im Darm rasch deglykosyliert. Anschließend werden die Aglyka resorbiert, enzymatisch abgebaut oder mikrobiell verdaut (Keppler *et al.*, 2005).

Von Keppler *et al.* (2005) wurde der Metabolismus verschiedener Anthocyane am isolierten Schweinedarm untersucht. Unter physiologischen Bedingungen wurden Cyanidin-3-O-glucosid, Malvidin-3-O-glucosid, Cyanidin-3,5-O-diglucosid, Malvidin-3,5-O-diglucosid, Cyanidin-3-O-rutinosid und Peonidin-3-O-glucosid sowie die zugehörigen Aglyka Cyanidin, Malvidin und Peonidin getestet.

20 Minuten nach peroraler Verabreichung der Anthocyane waren die Anthocyane im Darm nahezu vollständig deglykosyliert. Die Darmkonzentration an Anthocyanen nahm stetig ab, und stattdessen wurden im Darm die Abbauprodukte Protocatechusäure, Syringasäure, Vanillinsäure, Phloroglucinolaldehyd, Phloroglucinolsäure und Gallussäure nachgewiesen.

Diese Ergebnisse decken sich bei Testungen der Metabolisierung von Anthocyanen an der humanen Mikroflora von Aura *et al.* (2005). Nach Beimpfung der Mikroflora mit Cyanidin-3-O-rutinosid wurden nach einer Stunde nur noch Spuren intakten Cyanidin-3-O-rutinosids detektiert. Jedoch wurden hohe Konzentrationen an Cyanidin, Protocatechusäure, Vanillinsäure, Trihydroxybenzoesäure und Hydroxybenzoesäure gemessen (Aura *et al.*, 2005).

Bei Messungen der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen an Ratten schwankte diese zwischen 0,61 und 1,82 %. Bereits 15 Minuten nach oraler Verabreichung konnte der maximale Plasmaspiegel unverändert resorbierter Anthocyane erreicht werden, jedoch waren die Anthocyane nach 2 Stunden nur noch in Spuren detektierbar (Ichiyanagi *et al.*, 2006). Die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen scheint weiters von der Glykosylierung abhängig zu sein (Ichiyanagi *et al.*, 2006).

Wenn das Aglykon Delphinidin oder Cyanidin ist, haben Galactoside eine höhere Bioverfügbarkeit als Glucoside und Arabinoside. Wenn das Aglykon Petunidin oder Malvidin ist, haben Galactoside und Arabinoside eine höhere Bioverfügbarkeit als Glucoside (Ichiyanagi *et al.*, 2006).

Bei Urinmessungen am Menschen wurde von Milbury *et al.* (2010) festgestellt, dass resorbierte Heidelbeeranthocyane systemisch schnell glucuronidiert werden. Durch Glucuronidierung werden die resorbierten Anthocyane polarer und können renal eliminiert werden. Die Elimination von Anthocyanen ist vom Verweilort der Anthocyane und der Anthocyan-glucuronide abhängig (Milbury *et al.*, 2010). In Schweinen wurde die Dauer der Nachweisbarkeit von Heidelbeeranthocyanen und deren Metaboliten in verschiedenen Kompartimenten gemessen. Bemerkenswert war die lange Nachweisbarkeit von Anthocyanen im Hirn, da diese auch 18 Stunden nach der Gabe noch nachweisbar waren. Das steht im Widerspruch zu der sehr kurzen Nachweisbarkeit von unverändert resorbierten Anthocyanen im Blutplasma von Mäusen (Milbury *et al.*, 2010). Das im Mäuseplasma am längsten nachweisbare Anthocyan war Malvidin (Milbury *et al.*, 2010).

Bezogen auf die 5 Anthocyan-Grundkörper (Aglyka) in der Heidelbeere werden die Halbwertszeiten absteigend wie folgt gereiht (Ichiyanagi *et al.*, 2006):

Malvidin \geq Peonidin = Petunidin \geq Cyanidin \geq Delphinidin.

Weitere mengenmäßig bedeutsame phenolische Verbindungen in Heidelbeeren sind Pyrogallol und nachfolgend beschriebene Phenolcarbonsäuren (siehe Kapitel 1.2.2, Seite 9), die teilweise unverändert resorbiert werden (Manach *et al.*, 2005).

Pyrogallol wird zu Dihydrophloroglucinol und 3-Hydroxy-5-oxo-Caprinsäure metabolisiert (Williamson *et al.*, 2010).

Die in Heidelbeeren enthaltene Zimtsäure wird unter CO₂-Abspaltung zu Phenylelessigsäure und Benzoesäure metabolisiert (Beyoglu *et al.*, 2012). Resorbierte Zimtsäure wird in der Leber über Bildung von Benzoesäure zur Hippursäure abgebaut und anschließend renal eliminiert (Beyoglu *et al.*, 2012).

Bei der ebenfalls enthaltenen Ferulasäure liegt in der m-Position des B-Rings eine Methoxygruppe vor. Diese wird teilweise intestinal demethyliert, wobei Kaffeesäure als Metabolit der Ferulasäure entsteht (Williamson *et al.*, 2010).

Die Cumarinsäure weist nur eine Hydroxygruppe in p-Position auf. Monohydroxyde werden schneller als Dihydroxyde abgebaut. Daher wird Cumarinsäure schneller als Kaffeesäure und Ferulasäure ausgeschieden (Williamson *et al.*, 2010).

Aus Kaffeesäure entsteht intestinal und nach Resorption in der Leber Dihydroxy-phenylpropionsäure, Dihydroxy-phenyllessigsäure und Dihydroxy-benzoessäure (Williamson *et al.*, 2010).

Chinasäure wird im Dickdarm von der Darmflora dehydroxyliert (Beyoglu *et al.*, 2012), resorbiert und nach Aromatisierung und Bildung von Benzoessäure wieder eliminiert (vergleiche auch Abbildung 42) (Beyoglu *et al.*, 2012). Caffeoylchinasäuren werden intestinal zu Kaffeesäure und Chinasäure gespalten, die anschließend wie oben beschrieben metabolisiert werden (Williamson *et al.*, 2010).

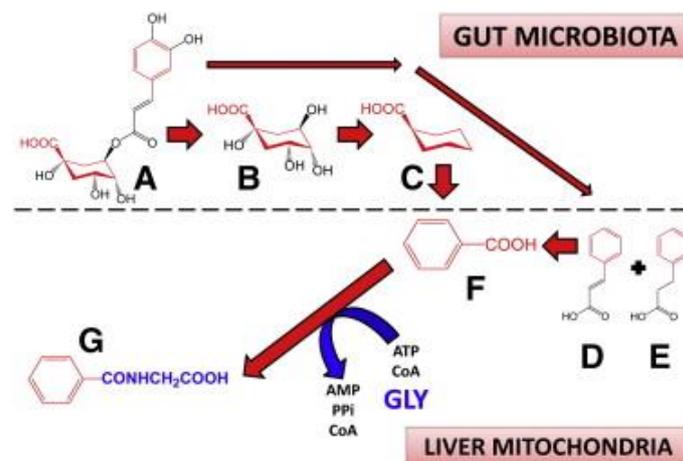


Abbildung 42: Abbau der Chlorogensäure (A). Chlorogensäure wird zu Chinansäure und Zimtsäure gespalten. Chinansäuremoleküle (B) werden dehydroxyliert (C), resorbiert und unter Bildung von Benzoessäure aromatisiert. (F). Dihydroxyzimtsäure wird dehydroxyliert, als Zimtsäure resorbiert (D+E), hepatisch zur Benzoessäure gespalten (F), und als Hippursäure ausgeschieden (Beyoglu *et al.*, 2012).

4. Diskussion

In einer entstehenden Doktorarbeit des Initiativkollegs BioPromotion an der Universität Wien werden Fruchttrester im Rahmen einer „bioassay geleiteten Fraktionierung“ an EA.hy926-Zellen hinsichtlich ihres eNOS aktivierenden Potenzials getestet. Als Analysematerial für die Zelltestung sollten Heidelbeertresterextrakte verschiedener Polarität (siehe Kapitel 3.1, Seite 27) sowie bei der Auftrennung eines methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakts erhaltene Sammelfraktionen, die im Zuge dieser Arbeit hergestellt wurden, verwendet werden (siehe Kapitel 3.3, Seite 43ff).

Heidelbeeren werden vasoprotektive und blutdrucksenkende Wirkungen nachgesagt. Für diese Wirkungen sind laut Teuscher *et al.* (2012) vor allem die in Heidelbeeren enthaltenen Anthocyane verantwortlich, die laut Domitrovic *et al.* (2011) und Teuscher *et al.* (2012) vasoprotektive Eigenschaften besitzen. Domitrovic *et al.* (2011) gehen davon aus, dass Anthocyane eNOS induzierende Eigenschaften besitzen und über Wechselwirkungen mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System vasodilatierend wirken. Jedoch heben andere Quellen hervor, dass die Wirkmechanismen der Flavonoide und Anthocyane nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt sind (Baron-Menguy *et al.*, 2007, Teuscher *et al.*, 2012) und in der Literatur werden zahlreiche unterschiedliche vasodilatierende Wirkmechanismen von Anthocyanen beschrieben (vergleiche auch Baron-Menguy *et al.*, 2007, Lazze *et al.*, 2006, Ojeda *et al.*, 2010).

Aufgrund dieser beschriebenen vasoprotektiven Eigenschaften der Anthocyane (Domitrovic *et al.*, 2011, Teuscher *et al.*, 2012) wäre es daher möglich, dass aus Heidelbeertrestern Extrakte oder deren Fraktionen mit stark eNOS-induzierenden Eigenschaften isoliert werden könnten. Daher wurden, für die spätere Interpretation der bei der Zelltestung der erhaltenen Sammelfraktionen ermittelten Werte, die Anthocyanzusammensetzung und der Anthocyan Gehalt jeder Sammelfraktion ermittelt (siehe Kapitel 3.4, Seite 52ff).

Für die Findung eines stark eNOS-induzierenden Extrakts wurde der Heidelbeertrester mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität extrahiert. Jedoch wies keines der Extrakte bei der

Testung an den EA.hy926-Zellen signifikante eNOS-Induktion auf (Waldbauer, 2014, Disseration in Vorbereitung).

Aufgrund des hohen Zuckergehalts des methanolisch-wässrigen Extrakts (siehe Abbildung 25, Seite 45) könnte es jedoch sein, dass aktive Komponenten im methanolisch-wässrigen Extrakt in unzureichenden Konzentrationen auf die Zellen gelangen und ihre Wirkung nicht erfasst wird. Daher wurde beschlossen den Zucker mittels Säulenchromatographie abzutrennen und das methanolisch-wässrige Extrakt in Sammelfractionen unterschiedlicher Polarität aufzutrennen.

In Folge wurden daher mit MeOH 70% 418 g Heidelbeertresterpulver extrahiert. Bei der Extraktion erhaltene 30,9 g eines methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakts wurden anschließend säulenchromatographisch in 37 unterschiedlich polare Sammelfractionen aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3, Seite 43ff).

Die Summe der Gewichte der einzelnen Sammelfractionen betrug 23,18 g. 28,6 % der eingesetzten Menge Heidelbeertresterextrakt blieben an dem Säulenmaterial irreversibel absorbiert.

Die bei der säulenchromatographischen Auftrennung verwendete stationäre Phase bestand aus Polystyrol (Diaion® HP-20). Dieses adsorbiert apolare Substanzen durch Van-der-Waals Kräfte und ist für eine RP-chromatographische Auftrennung gut geeignet. Brenner (2013) vergleicht die Eignung von Diaion® HP-20 und Sephadex® für die Auftrennung eines Holundertresters. Nach Brenner (2013) ist die Eignung einer stationären Phase zur Auftrennung eines Holundertresters abhängig von der Dauer, den Kosten, der Fähigkeit, Zucker abzutrennen und der Fähigkeit andere Substanzen aufzutrennen. Mit Sephadex® wird eine geringfügig bessere Trennleistung erreicht. In Anbetracht der Kosten beider Materialien hat jedoch Diaion® HP-20 bei der säulenchromatographischen Extraktion eines methanolisch-wässrigen Fruchtrestereextrakts das bessere Kosten-Nutzen Verhältnis (Brenner, 2013).

Die mobile Phase bestand aus acht Elutionsmitteln. Wasser diente der Abtrennung von Zucker. Ein Gemisch aus Ethanol mit Wasser in unterschiedlichen Konzentrationen eignete sich zur Auftrennung der phenolischen Bestandteile. Mit EtOH 96%, MeOH und EtOAc

wurden apolare Sammelfractionen gebildet. In den apolaren Fraktionen wird aufgrund eines geringen Anteils an Blättern und Stängeln im Heidelbeertrester Chlorophyll vermutet, welches in Folge (vergleiche auch Kapitel 3.3.2, Seite 48) möglicherweise den Zelltest stören könnte.

Nach der SC der methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakts wurde für die Auftrennung der Heidelbeeranthocyane sowie für die anschließende Ermittlung der Anthocyanzusammensetzung und des Anthocyangehalts eine HPLC-Methode benötigt. Eine HPLC-Methode, die eine vollständige Auftrennung der Heidelbeeranthocyane ermöglicht, ist die Methode nach Stefanut *et al.* (2011) (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 30). Jedoch enthält die für die Methode nach Stefanut *et al.* (2011) verwendete mobile Phase Trifluoressigsäure, welche bei der Durchführung einer LC-MS häufig Störungen verursacht (Niessen, 1999). Trifluoressigsäure ist eine hydrophobe Säure, die sich im Massenspektrometer anlagert, die Oberflächenspannung beeinflusst, und sich bei weiteren Messungen störend auswirkt (Apffel A *et al.*, 1995).

Daher sollte in Folge eine für eine Auftrennung geeignete HPLC-Methode mit einer mobilen Phase, die statt Trifluoressigsäure Ameisensäure enthält, gesucht werden. Eine solche Methode wurde jedoch nicht gefunden. Mit keiner der in Kapitel 3.2.1, Seite 32ff, beschriebenen Methoden wird eine Baseline-Trennung der 17 Anthocyanpeaks, detektiert bei 520 nm, erreicht (Böcker, 1997). Trifluoressigsäure bildet mit positiv geladenen Anthocyanen Ionenpaare, die sich aufgrund der Hydrophobizität der Trifluoressigsäure an der stationären Phase anlagern. Daher ermöglicht Trifluoressigsäure eine gute Auftrennung kleiner positiv geladener Ionen (Bin *et al.*, 1999). Ameisensäure bildet ebenfalls Ionenpaare, die jedoch nicht hydrophob sind und eher in der mobilen Phase verbleiben. Daher können Anthocyane mit einer Trifluoressigsäure enthaltenden mobilen Phase chromatographisch besser aufgetrennt werden (vergleiche auch Abbildung 13, Seite 31, und Abbildung 23, Seite 41) als mit einer Ameisensäure enthaltenden mobilen Phase.

Stefanut *et al.* (2011) identifizierten die Anthocyane durch den Vergleich mit authentischen Referenzsubstanzen. Die von Stefanut *et al.* (2011) publizierte Zuordnung der Anthocyane und deren relative Retentionszeiten wurden daher für die vollständige Zuordnung aller

Anthocyane im methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakt und in den Sammelfractionen herangezogen.

Weiters wurde der Gesamtanthocyangehalt jeder Sammelfraction, berechnet als Cyanidin-3-O-glucosid, ermittelt.

Die Anthocyane wurden mit der von Stefanut *et al.* (2011) beschriebenen modifizierten Methode aufgetrennt und die Chromatogramme bei 520 nm für die Ermittlung der Summe der Peakflächen der einzelnen Anthocyane verwendet (siehe Kapitel 3.4.2, Seite 55). Ausgehend von dieser Summe wurde anschließend der Gesamtanthocyangehalt, berechnet als Cyanidin-3-O-glucosid, jeder Sammelfraction ermittelt (siehe Tabelle 37, Seite 62).

Ab Sammelfraction 12 wurden Anthocyane detektiert. Die mit EtOH 10% und EtOH 30 % eluierten Fractionen enthielten die meisten Anthocyane (Sammelfractionen 12-21, siehe auch Tabellen 36, Seite 61, und 37, Seite 62). Die Sammelfractionen 24-35 enthielten Cyanidin und nur mehr Spuren von Anthocyanen.

Für das Verständnis der Wirkungen phenolischer Strukturen, wie Anthocyane in Heidelbeeren, ist auch deren Pharmakokinetik wichtig. Das Ausmaß der Bioverfügbarkeit phenolischer Substanzen und deren Verweildauer im Plasma ist neben der individuellen Enzymausstattung (siehe Kapitel 3.5.2, Seite 64) vor allem von der Polarität einer phenolischen Substanz abhängig.

Polare Substanzen wie Phenolcarbonsäuren besitzen eine niedrige Bioverfügbarkeit. Chlorogensäure wird zum Beispiel intestinal nahezu gänzlich zu Zimtsäurederivaten, Caffeoylchinasäuren und Benzoessäurederivaten abgebaut (Farah *et al.*, 2008). Auch Beyoglu *et al.* (2012) bestätigen dies bei Messungen der Bioverfügbarkeit von Chlorogensäure und deren Metaboliten. Niedermolekulare Säuren wie Zimtsäuren werden teils unverändert renal ausgeschieden, da sie für eine renale Elimination ausreichend polar sind (Farah *et al.*, 2008).

Flavonoide (siehe Kapitel 3.5.3, Seite 66), denen eine im Vergleich zu anderen phenolischen Inhaltsstoffen aufwendigere Biosynthese zugrunde liegt (Teuscher *et al.*, 2012), werden teilweise resorbiert (Manach *et al.*, 2005). Jedoch ist das exakte Ausmaß der Resorption umstritten (Hollman *et al.*, 1997). Sie besitzen jedoch eine höhere Plasmaverweildauer als die in Kapitel 3.5.3, Seite 69, beschriebenen Phenolcarbonsäuren, da sie erst nach

Glucuronidierung und Sulfatierung ausreichend polar für die renale Elimination sind (Hollman *et al.*, 1997).

Molekulargewicht bzw. Biosynthese der Struktur und die Zahl funktioneller Gruppen von phenolischen Substanzen könnten daher nützliche Indikatoren für eine Abschätzung der Bioverfügbarkeit und der Verweildauer im Plasma sein.

Wahrscheinlich haben Metaboliten phenolischer Strukturen ebenfalls Anteil an der in-vivo Wirksamkeit phenolreicher Extrakte (Williamson *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 1998). Von Kim *et al.* (1998) wird eine Hemmung der Plättchenaggregation durch Essigsäurederivate beschrieben, welche Metabolite von Rutin und Quercetin sind (siehe Kapitel 3.5.3, Seite 66). Weiters publizieren Kim *et al.* (1998) eine gewisse antioxidative Kapazität der Metaboliten von phenolischen Inhaltsstoffen, die in Heidelbeeren vorkommen. Laut Milbury *et al.* (2010) dürfte wiederum, aufgrund der kurzen Verweildauer von Metaboliten phenolischer Strukturen im Plasma, das Ausmaß der vasoprotektiven Wirkung aufgrund von Radikalfängereigenschaften sehr niedrig sein. Nach Williamson *et al.* (2010) sind die Wirkungen und Wirkmechanismen von Metaboliten phenolischer Heidelbeerinhaltsstoffe generell noch weitgehend unbekannt.

5. Zusammenfassung

Trester sind Abfallprodukte der Fruchtsaftproduktion, die bei der industriellen Saftpressung anfallen. Sie bieten eine billige und ergiebige Quelle zur Gewinnung von Zuckern, Phenolen und anderen Pflanzenstoffen. In einer entstehenden Doktorarbeit des Initiativkollegs BioPromotion der Universität Wien werden Fruchttrester an EA.hy926-Zellen hinsichtlich ihres eNOS aktivierenden Potenzials getestet. Das Enzym eNOS ist in unseren Gefäßen verantwortlich für die Bildung von Stickstoffmonoxid, das vasodilatierend wirkt. Eine Induktion der eNOS hat in unserem Körper vasoprotektive und blutdrucksenkende Wirkungen. Ausgehend von Testungen der Tresterextrakte an EA.hy926-Zellen (eNOS exprimierende Zellen) könnte daher ein Nahrungsergänzungsmittel oder Arzneimittel, indiziert bei Herz-Kreislauf Erkrankungen, entwickelt werden.

Anthocyane sind Farbpigmente und zählen zu den phenolischen Heidelbeerinhaltsstoffen. Ihnen werden vasoprotektive Wirkungen zugeschrieben (Domitrovic *et al.*, 2011). Es wurde eine geeignete HPLC-Methode entwickelt, um die 16 im methanolisch-wässrigen Heidelbeertresterextrakt vermuteten Anthocyane sowie Cyanidin aufzutrennen. Eine Auftrennung ermöglichte die Methode nach Stefanut *et al.* (2011) die jedoch nur beschränkt MS-kompatibel ist. Bei der Suche einer mobilen Phase ohne Trifluoressigsäure konnte jedoch keine MS-kompatible Methode zur Auftrennung der Anthocyane gefunden werden.

Für die Testung an eNOS exprimierenden Zellen wurden Extrakte unterschiedlicher Polarität herangezogen. Weiters wurden für die Abtrennung des Zuckers und neuerlichen Testung sowie für die qualitative und quantitative Analyse der Anthocyane in Heidelbeertrestern 30,9 g methanolisch-wässriger Heidelbeertresterextrakt mittels Säulenchromatographie in 37 unterschiedlich polare Sammelfractionen aufgetrennt, deren Anthocyane anschließend für die Ermittlung der Anthocyanzusammensetzung sowie des Anthocyangehalts mit einer HPLC-Methode nach Stefanut *et al.* (2011) aufgetrennt wurden.

Eine Betrachtung der Metaboliten von phenolischen Strukturen in Heidelbeeren ist für das Verständnis des in-vivo Verhaltens dieser Heidelbeerkomponenten hilfreich. Daher wird in dieser Arbeit relevante Literatur über die Metabolisierung von phenolischen Substanzen in Heidelbeeren zusammengetragen.

6. Summary

Pomaces are a side product of the fruit juice production, as a result of the juice pressing. They are a cheap and rich source for extraction of sugar, phenols and other plant ingredients.

In a dissertation in progress at the doctoral college "BioProMoTION" at the University of Vienna pomaces, regarding pomace's eNOS activating potential, are tested. In our vessels eNOS is responsible for the induction of NO, which works vasodilating. In-vivo induction of eNOS results vasoprotective and blood pressure reducing. Based on tests of pomace extracts on EA.hy929-cells (eNOS producing cells) it could be possible to develop a food supplement or some new medicine, indicated for cardiovascular diseases.

Anthocyanins are colour pigments. They are phenolic bilberry ingredients, which are described as operating vasoprotective in our body (Domitrovic *et al.*, 2011). A HPLC-method was developed in order to separate and identify 16 different bilberry anthocyanins and cyanidin. During the method finding, the excellent method of Stefanut *et al.* (2011) was tested, which is only limited compatible for detection by the mass spectrometer because of its mobile phase. Though it was not possible to develop a method based on a mass spectrometer compatible mobile phase.

For research proposes by testing extracts and their fractions on eNOS producing cells some extracts of different polarity were tested. In favour of removing the sugar and for qualitative and quantitative analysis of anthocyanins in bilberry pomace 30,9 g of methanolic-aqueous bilberry pomace extract were separated by column chromatography. As a result we got 37 fractions of different polarity. Based on the method after Stefanut *et al.* (2011) the anthocyanins of every fraction got separated, identified and the anthocyanin content of every fraction was determined.

Beside the understanding of in-vivo effects of bilberry ingredients, the indepth knowledge of bilberry metabolites is also of great importance. Because of this we discussed important studies about metabolism of phenolic substances in bilberries.

7. Literaturverzeichnis

Adamson RH, Bridges JW, Evans ME, Williams RT (1970). Species differences in the aromatization of quinic-acid in-vivo and the role of gut bacteria. *Biochemical Journal* 116(3): 437-443.

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2009). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 10.Auflage, Elsevier München

Apffel A, Fischer S, Goldberg G, Goodley PC, Kuhlmann FE (1995). Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases, *J Chromatogr A.*: 712(1):177-90

Aura A-M, Martin-Lopez P, O'Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey K-M, Poutanen K *et al.* (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition* 44(3): 133-142.

Aura AM, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimia R *et al.* (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6): 1725-1730.

Baron-Menguy C., Bocquet A., Guihot A., Chappard D., Amiot M., Andriantsitohaina R., Loufrani L., Henrion D. (2007). Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic, *The FASEB Journal* vol. 21, no. 13: 3511-3521

Bauer K H, Frömmling K H, Führer C (2012). *Pharmazeutische Technologie Einführung in die Biopharmazie*, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Becker A (2000). Analytik biogener Arzneistoffe, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Beyoglu D, Idle JR (2012). The glycine deportation system and its pharmacological consequences. *Pharmacology and Therapeutics* 135(2): 151-167.

Bin C., Jianwei L. (1999). Evaluation of trifluoroacetic acid as an ion-pair reagent in the separation of small ionizable molecules by reversed-phase liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta* Volume 399, Issue 3, Pages 249–258

Böcker J. (1997). Chromatographie-Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese. 1. Auflage, Würzburg

Brenner Christiane (2013). Chromatographische Aufarbeitung und Analyse von Frucht-Trester-Extrakten. Diplomarbeit, Universität Wien

Campell N A, Reece J B (2009), *Biologie*, 8. Auflage, Pearson Education München (deutsche Fassung)

Das N P (1971). Studies on flavonoid metabolism absorption and metabolism of plus catechin in man. *Biochemical Pharmacology* 20(12): 3435-3445.

Deprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapierre C, et al. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *Journal of Nutrition* 130(11): 2733-2738.

Domitrovic R (2011). The Molecular Basis for the Pharmacological Activity of Anthocyanins. *Current Medicinal Chemistry* 18(29): 4454-4469

Elisabetta B, Flavia G, Paolo F, Giorgio L, Attilio SG, Fiorella LS, et al. (2013). Nutritional Profile and Productivity of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Different Habitats of a Protected Area of the Eastern Italian Alps. *Journal of food science* 78(5): C673-678.

Farah A, Monteiro MC, Donangelo CM, Lafay S (2008). Bioavailability of chlorogenic acids from green coffee extract in humans. *FASEB Journal* 22.

Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (2001). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer Verlag München

Herbstreith & Fox (2012). *Informationsbroschüre über Pektine* Ausgabe 3/1. Neuenburg, Deutschland

Hokkanen J, Mattila S, Jaakola L, Pirttila AM, Tolonen A (2009). Identification of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Hybrid Bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(20): 9437-9447.

Hollman P C, Katan M B (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 51(8): 305-310.

Ichiyanagi T, Shida Y, Rahman M, Hatano Y, Konishi T (2006) Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18):6578-6587

Jaganath I B, Mullen W, Edwards CA, Crozier A (2006). The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radical Research* 40(10): 1035-1046.

Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H (1989). Dünnschicht-Chromatographie-Reagenzien und Nachweismethoden-Physikalische und chemische Nachweismethoden: Grundlagen, Reagenzien 1. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim

Jovancevic M, Balijagic J, Menkovic N, Savikin K, Zdunic G, Jankovic T, et al. (2011). Analysis of phenolic compounds in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) from Montenegro. Journal of Medicinal Plants Research 5(6): 910-914.

Keppler K, Humpf H-U (2005). Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. Bioorganic & Medicinal Chemistry 13(17): 5195-5205.

Kim D H, Jung E A, Sohng I S, Han J A, Kim T H, Han M J (1998). Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. Archives of Pharmacal Research 21(1): 17-23.

Kromidas S (2006). HPLC richtig optimiert. Ein Handbuch für Praktiker. 1. Auflage, WILEY-VCH Verlag Weinheim

Laaksonen O, Sandell M, Kallio H (2010). Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fractions. European Food Research and Technology 231(2).

Lazze MC, Pizzala R, Perucca P, et al. (2006) Anthocyanidins decrease endothelin-1 production and increase endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. Mol Nutr Food Res 50, 44–51.

Linskens H. F., Jackson J. F. (1999). Analysis of Plant Waste Materials, Modern Methods of Plant Analysis Vol. 20, 1. Auflage, Springer Heidelberg.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81(1, Suppl. S): 230S-242S.

Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T (2001). Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(3): 1546-1551.

Meyer V (2009). *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 10.Auflage, Wiley-VCH Verlag Weinheim

Mikulic-Petkovsek M, Slatnar A, Stampar F, Veberic R (2012). HPLC-MS(n) identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry* 135(4).

Milbury PE, Kalt W (2010). Xenobiotic Metabolism and Berry Flavonoid Transport across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(7): 3950-3956.

Moze S, Polak T, Gasperlin L, Koron D, Vanzo A, Ulrich NP, *et al.* (2011). Phenolics in Slovenian Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(13).

Mueller D, Schantz M, Richling E (2012). High Performance Liquid Chromatography Analysis of Anthocyanins in Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and Corresponding Juices. *Journal of Food Science* 77(4).

Niessen W.M.A. (1999). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, Second Edition, Revised and Expanded, chromatographic science series 2. Auflage, Marcel Dekker Inc. New York

Ojeda D, Jimenez-Ferrer E, Zamilpa A, *et al.* (2010) Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *J Ethnopharmacol* 127, 7–10.

Österreichisches Arzneibuch, 2012, Verlag Österreich, Wien, S. 421

Rieger G, Muller M, Guttenberger H, Bucar F (2008). Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(19): 9080-9086.

Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56(6): 276-282.

Stefanut M N, Cata A, Pop R, Mosoarca C, Zamfir AD (2011). anthocyanins HPLC-DAD and MS characterization, total phenolics, and antioxidant activity of some berries extracts. *Analytical Letters* 44(18): 2843-2855.

Teuscher E, Melzig M, Lindequist U (2012). *Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*, 7. Auflage, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Viljakainen S, Visti A, Laakso S (2002). Concentrations of organic acids and soluble sugars in juices from Nordic berries. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* 52(2-3): 101-109.

Voigt R (2010). *Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf*, 11. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart

Waldbauer Katharina (2011). Dissertation, Universität Wien, in Vorbereitung

Williamson G, Clifford MN (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing

link to biological activity? *British Journal of Nutrition* 104: S48-S66.

Wulf LW, Nagel CW (1978). High pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *vitis-vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture* 29(1): 42-49.

Curriculum vitae:

Name: *Simon Job*

Geburtstag: *13.3.1991*

Geburtsort: *1090, Wien*

Nationalität: *Österreich*

Ausbildung:

1997-2001: ÜVS der pädagogischen Akademie -Eisenstadt

*2001-2009: Gymnasium Wolfgarten - Privatgymnasium der Diözese Eisenstadt
(humanistisches Gymnasium)*

2009-2014: Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Beruflicher Werdegang:

Juli 2006: Praktikum in Mag Job´s Marien-Apotheke Eisenstadt

Juli 2007: Praktikum in der Rechtsanwaltskanzlei Beck und Dornhöfer

Juli 2008: Praktikum in Mag Job´s Marien-Apotheke Eisenstadt

2009-2014: geringfügige Beschäftigung in Mag Job´s Marien-Apotheke Eisenstadt

Juli 2011: Praktikum in der Bartholomäus Apotheke, 1170 Wien

Sprachen:

Deutsch, Englisch fließend

Italienisch gut