

Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio

Charakterisierung der Inhaltsstoffe von Pflanzenextrakten, deren  
Untersuchung auf ihre ER-Stress-lindernde Aktivität

und

Anwendung der Sublimation auf Fruchtpulver zur Identifizierung von  
Marker-Substanzen und Isolierung von Naturstoffen

**Dissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

*(Dr. rer. nat.)*

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Manuel Gronbach

Rostock, 07. Dezember 2020

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00003127](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003127)



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine  
Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. Udo Kragl, Universität Rostock, Institut für Chemie
2. Prof. Dr. Michael Lalk, Universität Greifswald, Institut für Biochemie

**Jahr der Einreichung:** 2020

**Jahr der Verteidigung:** 2021

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2017 bis Dezember 2020 am Institut für Chemie der Universität Rostock im Arbeitskreis von Prof. Dr. Udo Kragl erstellt.

Die Promotion wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Proteinfehlfaltung, ER-Stress und Proteindegradation – Entwicklung einer systematischen Pipeline für individualisierte Therapien bei erblichen Leber- und Pankreaserkrankungen“ angefertigt und durch Mittel des Europäischen Sozialfonds (ESF) finanziert (ESF/14-BM-A55-0048/16). Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil des Qualifikationsprogrammes „Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbänden - Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern“.



**EUROPÄISCHE UNION**  
Europäischer Sozialfonds



Europäische Fonds EFRE, ESF und ELER  
in Mecklenburg-Vorpommern 2014-2020

## Abstract

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Extrakte verschiedener Pflanzenorgane hergestellt und ihre Zusammensetzung analysiert. Dabei konnten einige Inhaltsstoffe der Sanddornbeere isoliert und charakterisiert werden. Neben bereits bekannten Inhaltsstoffen wurden dabei auch bisher noch nicht für den Sanddorn in der Literatur beschriebene Substanzen erhalten. Die Vollextrakte der untersuchten Pflanzenorgane sowie Fraktionen und isolierte Verbindungen der Sanddornbeere wurden zudem in zellbiologischen Untersuchungen auf ihre ER-Stress-reduzierende Aktivität getestet.

Zusätzlich wurde die direkte Sublimation von Substanzen aus Fruchtpulvern und Trockenextrakten untersucht. Durch die Analyse der Sublimate unterschiedlicher Sanddornsorten konnten Marker-Substanzen für Sanddornbeeren ermittelt werden. Ein Vergleich mit weiteren Fruchtpulversublimaten ermöglichte zudem die Bestimmung spezifischer Marker-Substanzen des Sanddorns. Die Sublimate der Trockenextrakte der Sanddornbeere wurden auch auf Unterschiede in ihrer Zusammensetzung überprüft. Je nach verwendetem Extraktionsmittel waren dabei spezifische Marker-Substanzen in den Sublimaten der Trockenextrakte zu finden. In einem letzten Schritt wurde das Sublimat eines Sanddornbeerenpulvers chromatographisch aufgetrennt. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden mittels HPLC-ESI-MS und NMR-Spektroskopie untersucht und einige Inhaltsstoffe charakterisiert. Eine für den Sanddorn bisher nicht beschriebene Substanz konnte auf diese Weise das erste Mal isoliert werden.

In the course of this work, extracts of various plant organs were prepared and their composition was analyzed. Thereby some ingredients of the sea buckthorn berry could be isolated and characterized. In addition to already known ingredients, substances not yet described for sea buckthorn in the literature were obtained. The whole extracts of the investigated plant organs as well as fractions and isolated compounds of the sea buckthorn berry were also tested in cell biological studies for their ER-stress reducing activity.

Additionally, the direct sublimation of substances from fruit powders and dry extracts was investigated. By analyzing the sublimates of different sea buckthorn varieties, marker substances for sea buckthorn berries could be determined. A comparison with other fruit powder sublimates also enabled the determination of specific marker substances of sea buckthorn. The sublimates of the dry extracts of the sea buckthorn berry were also checked for differences in their composition. Depending on the extraction agent used, specific marker substances were found in the sublimates of the dry extracts. In a last step the sublimat of a sea buckthorn berry powder was separated chromatographically. The resulting fractions were analyzed by HPLC-ESI-MS and NMR spectroscopy and some of the ingredients were characterized. In this way, a substance not previously described for sea buckthorn could be isolated for the first time.

# Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Udo Kragl dafür danken, dass er mich in seinen Arbeitskreis aufnahm und mir ein interessantes Thema zur Anfertigung meiner Dissertation überließ. Ich bedanke mich auch für die Unterstützung und Förderung über die Jahre sowie interessante Gespräche und gute Hinweise.

Natürlich gilt mein Dank auch der Europäischen Union für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Forschungsprojektes „Proteinfehlfaltung, ER-Stress und Proteindegradation – Entwicklung einer systematischen Pipeline für individualisierte Therapien bei erblichen Leber- und Pankreaserkrankungen“ durch Mittel des Europäischen Sozialfonds (ESF).

Meiner Betreuerin Dr. Christina Oppermann möchte ich für die Einarbeitung in das Themengebiet, die ständige Unterstützung, viele motivierende Worte und eine gute Zusammenarbeit über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit hinweg danken.

Mein Dank gilt ebenso allen Projektpartnern innerhalb des PePPP-Projektes für eine gute Zusammenarbeit und ein kollegiales Miteinander. Ein besonderer Dank geht dabei an M. Sc. Jana Marielle Modenbach für die Durchführung zahlreicher medizinischer Untersuchungen für meine Arbeit. Frau Modenbach und ich haben über die Jahre hinweg immer gut zusammengearbeitet, hatten sehr gute Gespräche und bis zum Ende interessante Ergebnisse und dafür bin ich sehr dankbar.

Die analytische Abteilung des Instituts für Chemie und des Leibniz-Instituts für Katalyse hat mir sehr dabei geholfen, diese Arbeit erfolgreich abschließen zu können und dafür möchte ich mir bedanken. Hervorheben möchte ich dabei besonders Dr. Dirk Michalik, der mir wirklich immer mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn es nötig war und mit seiner freundlichen Art stets zu motivieren wusste.

Es gibt wahrscheinlich fast nichts wichtigeres als gute Kollegen, wenn eine solche Arbeit gelingen soll. Deshalb sage ich ein ganz großes Danke an die Arbeitsgrupper der Technischen Chemie! Es war über die Jahre hinweg wirklich schön mit euch zu arbeiten und es gab viele spaßige Momente. Lars, Arend, ihr wart extrem gute Büropartner und den Reggae-Freitag werde ich wohl nie vergessen. Sandra, danke für deine Unterstützung im Labor und das ruhige Beantworten von circa einer Million Fragen. Du hast mir wirklich sehr geholfen, vielen Dank dafür! Natürlich möchte ich auch meinen Bachelor-Studentinnen Tanja, Alina und Laura für ihre Mühe und ihre guten Ergebnisse danken.

Es war ein langer Weg bis hierhin und ohne gute Freunde hätte ich es wahrscheinlich nicht hierher geschafft. Deswegen danke an euch alle, dass ihr über die letzten neun Jahre für mich da wart, mich unterstützt habt, mit mir gelernt, gefeiert und durchgehalten habt! Danke Benni, Stephan und Jonas, für die gute Zeit in Rostock, danke Torben, Kuddi, Martin für immer währenden Rückhalt, danke Lars und Johanna für das gemeinsame Durchhalten und viel Unterstützung!

Meine Familie hat mich immer unterstützt und ich bin sehr dankbar für alles, was sie mir ermöglicht hat. Danke, dass ihr mich immer wieder motiviert habt, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mir geholfen habt, wenn ich es brauchte. Danke an meine Eltern, an die besten Bros der Welt: Tobi, Daniel, Simon und Dicki und an meine Schwiegereltern!

Mein größter Dank geht an meine Frau Lisa. Danke, dass du mich immer unterstützt und stärkst und dass du immer für mich da bist!

# Inhalt

|  |     |
|--|-----|
| Abkürzungsverzeichnis .....  | I   |
| Abbildungsverzeichnis .....  | III |
| Tabellenverzeichnis .....  | VI  |
| 1 Einleitung.....  | 1   |
| 2 Zielsetzung.....   | 3   |
| 3 Stand der Technik .....  | 5   |
| 3.1 Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen.....   | 5   |
| 3.1.1 Konventionelle Extraktionstechniken.....   | 5   |
| 3.1.2 Moderne Extraktionsverfahren .....   | 6   |
| 3.2 Sublimation.....   | 9   |
| 3.3 Trennverfahren für Naturstoffe.....  | 10  |
| 3.3.1 Flüssig-Fest Isolationstechniken.....  | 10  |
| 3.3.2 Flüssig-Flüssig Isolationstechniken.....   | 12  |
| 3.4 Stress im Endoplasmatischen Retikulum.....   | 13  |
| 4 Experimenteller Teil .....   | 17  |
| 4.1 Materialien und Methoden.....  | 17  |
| 4.1.1 Chemikalien.....   | 17  |
| 4.1.2 Probenmaterial .....   | 17  |
| 4.1.3 Probenvorbereitung.....  | 17  |
| 4.1.4 Extraktion .....   | 18  |
| 4.1.5 Sublimationsversuche .....   | 18  |
| 4.1.6 Säulenchromatographische Trennung.....   | 19  |
| 4.1.7 HPLC-ESI-MS Analyse.....   | 20  |
| 4.1.8 NMR Analyse .....  | 21  |
| 4.1.9 Evaluierung ER-Stress reduzierender Substanzen.....  | 21  |
| 5 Ergebnisse und Diskussion.....   | 23  |
| 5.1 Extraktions-Untersuchungen .....   | 23  |
| 5.1.1 Optimierung der Probenvorbereitung für Extraktionsuntersuchungen.....  | 23  |
| 5.1.2 Zusammensetzung und biologische Aktivität der Sanddornbeerenextrakte .....   | 23  |
| 5.1.3 Zusammensetzung und biologische Aktivität weiterer Pflanzenextrakte .....  | 55  |
| 5.2 Sublimation als Technik zur Anreicherung, Identifizierung und Isolierung der Inhaltsstoffen von Früchten .....         | 63  |
| 5.2.1 Anwendung der Sublimation zur Anreicherung und Identifizierung von Marker-Substanzen in Früchten und Extrakten ..... | 63  |
| 5.2.2 Isolierung und Charakterisierung von durch Sublimation angereicherten Naturstoffen .....                             | 73  |
| 6 Zusammenfassung und Ausblick .....   | 87  |
| 7 Literaturverzeichnis .....   | 91  |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 8     | Anhang.....   | 102 |
| 8.1   | Methodenparameter .....                                       | 102 |
| 8.1.1 | Joint Component Detection Wizard Einstellungen.....           | 102 |
| 8.2   | Tauchlösungen zum Anfärben der Dünnschichtchromatogramme..... | 103 |
| 8.3   | NMR-Daten der isolierten Verbindungen.....                    | 103 |
| 8.3.1 | Äpfelsäure.....   | 103 |
| 8.3.2 | Äpfelsäuremethylester .....                                   | 104 |
| 8.3.3 | Äpfelsäurebutylester .....                                    | 104 |
| 8.3.4 | Bernsteinsäure .....  | 104 |
| 8.3.5 | Ethyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid .....                        | 104 |
| 8.3.6 | 5-(Hydroxymethyl)furfural.....                                | 104 |
| 8.3.7 | Quino-1,5-lacton.....   | 104 |
| 8.3.8 | Ursolsäure.....   | 104 |
| 8.4   | Kristallographische Daten .....                               | 105 |
| 8.4.1 | Bernsteinsäure .....  | 105 |
| 8.5   | Abbildungen .....   | 106 |
| 8.6   | Tabellen .....  | 117 |

## Abkürzungsverzeichnis

|            |   |
|------------|---|
| (+)        | positiver Scan-Modus                        |
| (-)        | negativer Scan-Modus                        |
| ALP        | Sanddornsorte mit Ursprung in den Alpen     |
| ASE        | Beschleunigte Lösemittelextraktion          |
| COSY       | correlated spectroscopy                     |
| CID        | Kollisionsinduzierte Dissoziation           |
| DC         | Dünnschichtchromatographie                  |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid                            |
| EI         | Elektronen Ionisation                       |
| ER         | Endoplasmatisches Retikulum                 |
| ESF        | Europäischer Sozialfond                     |
| ESI        | Elektrospray Ionisation                     |
| GC         | Gaschromatographie                          |
| HPLC       | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie    |
| HBG-I      | Sanddornsorte Habego, geerntet 2017         |
| HBG-II     | Sanddornsorte Habego, geerntet 2018         |
| HMBC       | heteronuclear multiple bond correlation     |
| HSQC       | heteronuclear single quantum coherence      |
| LC         | Flüssigchromatographie                      |
| NMR        | Kernspinresonanzspektroskopie               |
| M          | molare Masse                                |
| MPa        | Megapascal                                  |
| ME         | Mikrowellenextraktion                       |
| NOESY      | nuclear Overhauser enhancement spectroscopy |
| MS         | Massenspektrometrie                         |
| <i>m/z</i> | Masse-zu-Ladungsverhältnis                  |
| NL         | Normalization Level                         |
| OTR        | Sanddornsorte Otradnaja                     |
| RT         | Retentionszeit                              |

|     |   |
|-----|---|
| SC  | Säulenchromatographie                       |
| SFE | Extraktion mit überkritischen Flüssigkeiten |
| TIC | total ion current chromatogram              |
| TM  | Tunicamycin                                 |
| TRO | Sanddornsorte Trofimovskaja                 |
| UE  | Ultraschallextraktion                       |
| UME | Ultraschall-Mikrowellen-Extraktion          |
| XIC | Extracted-ion Chromatogramm                 |

# Abbildungsverzeichnis

|                       |   |    |
|-----------------------|---|----|
| <b>Abbildung 1.1</b>  | Pflanzliche und pflanzenbasierte (Aspirin) Wirkstoffe .....   | 1  |
| <b>Abbildung 1.2</b>  | Prozentualer Anteil von Naturstoffen, deren Derivate und pflanzlichen Arzneimitteln an den jährlichen Medikamentenzulassungen zwischen 1981 und 2014 <sup>13</sup> .....              | 2  |
| <b>Abbildung 2.1</b>  | Schematische Erläuterung der Vorgehensweise in dieser Arbeit .....  | 4  |
| <b>Abbildung 3.1</b>  | Bevorzugte moderne Extraktionstechniken und Pflanzenorgane für die Extraktion bestimmter Stoffklassen (Nach Belwal et al., 2018). <sup>27</sup> .....                                 | 8  |
| <b>Abbildung 3.2</b>  | Schema einer Flüssig-flüssig Extraktion zur Herstellung erster Fraktionen aus Pflanzenextrakten (nach Xiao et al., 2013) <sup>83</sup> .....  | 12 |
| <b>Abbildung 3.3</b>  | Die drei Hauptwege, die ER-Stress erkennen und die UPR durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren XBP-1, ATF4 und ATF6 induzieren (nach Lukas et al., 2019) <sup>14</sup> ..... | 14 |
| <b>Abbildung 3.4</b>  | Verschiedene ER-Stress-reduzierende Substanzen und der ER-Stress Auslöser Tunicamycin .....   | 15 |
| <b>Abbildung 4.1</b>  | Mechanismus, der das Erkennen von ER-Stress ermöglicht .....  | 21 |
| <b>Abbildung 5.1</b>  | Total Ion Current (TIC) Chromatogramme des wässrigen HBG-I Extraktes.....   | 24 |
| <b>Abbildung 5.2</b>  | Vergleich der Ergebnisse eines MS/MS Experimentes. Die Substanz mit dem m/z 191 wurde mit einer Fragmentierungsenergie von 25% fragmentiert. ....                                     | 25 |
| <b>Abbildung 5.3</b>  | Reaktion der Ascorbinsäure in wässrigen Lösungen zur 2,3-Diketogulonsäure .....   | 25 |
| <b>Abbildung 5.4</b>  | Extracted-ion Chromatogram (XIC) des Reinstwasser HBG-I Extraktes. Das m/z 625 wurde als Filter angewandt und nur Peaks, die diese m/z aufweisen, werden angezeigt. ....              | 26 |
| <b>Abbildung 5.5</b>  | TIC Chromatogramme des HBG-I Ethanolextraktes (80%).....  | 28 |
| <b>Abbildung 5.6</b>  | TIC Chromatogramme des HBG-I DMSO-Extraktes .....   | 30 |
| <b>Abbildung 5.7</b>  | TIC Chromatogramme des HBG-I 1-Butanolextraktes .....   | 31 |
| <b>Abbildung 5.8</b>  | Ergebnisse der therapeutischen Behandlung der HEK-293T Zellen mit den HBG-I Extrakten.....  | 33 |
| <b>Abbildung 5.9</b>  | Vergleich der Fluoreszenz zwischen mit TM und zusätzlich mit den Extrakten behandelten Zellen nach 48 h Versuchsdauer bei therapeutischer Behandlung. ....                            | 34 |
| <b>Abbildung 5.10</b> | Vergleich der Fluoreszenz 2, 6, 24 und 48 h nach Behandlung der Zellen mit TM und dem HBG-I 1-Butanolextrakt mit der Fluoreszenz der Zellen, die nur mit TM behandelt wurden. ....    | 35 |
| <b>Abbildung 5.11</b> | TIC Chromatogramme der wässrigen (aq.) und der Heptan (org.) Phase des HBG-I 1-Butanolextraktes.....  | 36 |
| <b>Abbildung 5.12</b> | (-) Base Peak Chromatogramme einiger Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes.....   | 39 |
| <b>Abbildung 5.13</b> | (-) XIC (m/z 461) der F15 des HBG-I 1-Butanolextraktes mit dazugehörigem Massenspektrum .....   | 40 |
| <b>Abbildung 5.14</b> | (-) Base Peak Chromatogramme (oben) der F10 und F10.1 des HBG-I 1-Butanolextraktes. (-) XIC (m/z 617.5) der F10.1 (unten).....  | 41 |
| <b>Abbildung 5.15</b> | <sup>1</sup> H-NMR-Spektren in DMSO-d <sub>6</sub> der F13.3 und F13.4 im Bereich von 0–6 ppm....   | 42 |
| <b>Abbildung 5.16</b> | <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der F18.1 in DMSO-d <sub>6</sub> .....  | 43 |

|                       |   |    |
|-----------------------|---|----|
| <b>Abbildung 5.17</b> | Einfluss der organischen (org.) und wässrigen (aq.) Phase auf TM induzierten ER-Stress während der therapeutischen Behandlung der Zellen.....   | 45 |
| <b>Abbildung 5.18</b> | Ergebnisse der protektiven Behandlung der Zellen mit einigen Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes.....   | 46 |
| <b>Abbildung 5.19</b> | (-) Base Peak Chromatogramme der 1-Butanolextrakte der HBG-I, OTR, TRO und ALP.....   | 47 |
| <b>Abbildung 5.20</b> | (+) Base Peak Chromatogramme der 1-Butanolextrakte der HBG-I, OTR, TRO und ALP.....   | 48 |
| <b>Abbildung 5.21</b> | Massenspektrum des MS/MS Experimentes (Fragmentierungsenergie 30%) auf die Masse 295 aus dem OTR 1-Butanolextrakt.....  | 49 |
| <b>Abbildung 5.22</b> | Einfluss der unterschiedlichen 1-Butanolsanddornbeerenextrakte auf TM-induzierten ER-Stress während der therapeutischen Behandlung der Zellen.....                                    | 51 |
| <b>Abbildung 5.23</b> | Base Peak Chromatogramme des Butanol Apoldas und des HPLC Grade Butanols (reines 1-BuOH).....   | 52 |
| <b>Abbildung 5.24</b> | Base Peak GC-MS Chromatogramm des BuOH Apolda und des HPLC Grade Butanols.....  | 53 |
| <b>Abbildung 5.25</b> | Ergebnisse der therapeutischen Behandlung (oben) der Zellen mit dem Destillat oder Rückstand des BuOH Apolda und Ergebnisse der protektiven Behandlung (unten) mit dem Destillat..... | 54 |
| <b>Abbildung 5.26</b> | Base Peak Chromatogramme der Extrakte der Sanddornblätter .....   | 56 |
| <b>Abbildung 5.27</b> | Base Peak Chromatogramme der Extrakte der Sanddornrinde .....   | 57 |
| <b>Abbildung 5.28</b> | Ergebnisse der therapeutischen und protektiven Behandlung der Zellkultren mit Extrakten der Sanddornrinde und -blätter nach 48 h.....   | 58 |
| <b>Abbildung 5.29</b> | Base Peak Chromatogramme der Apfelbeeren Extrakte .....   | 59 |
| <b>Abbildung 5.30</b> | Base Peak Chromatogramme der Kornelkirschen Extrakte .....  | 60 |
| <b>Abbildung 5.31</b> | Zwei Iridoide, die als Inhaltsstoffe in der Kornelkirsche vorkommen .....   | 61 |
| <b>Abbildung 5.32</b> | Ergebnisse der therapeutischen Behandlung der Zellen mit dem ethanolischen Apfelbeeren- und wässrigen Kornelkirschenextrakt.....  | 62 |
| <b>Abbildung 5.33</b> | Base Peak Chromatogramme der Sanddornpulver-Sublimate. Die vier untersuchten Sorten zeigen ein ähnliches Peak-Muster.....   | 64 |
| <b>Abbildung 5.34</b> | Base Peak Chromatogramme der verschiedenen Früchtepulver-Sublimate.....   | 67 |
| <b>Abbildung 5.35</b> | Base Peak Chromatogramme der unterschiedlichen HBG-II Extrakte.....   | 69 |
| <b>Abbildung 5.36</b> | Base Peak Chromatogramme der Sublimate der Sanddornbeerentrockenextrakte .....  | 70 |
| <b>Abbildung 5.37</b> | XIC (m/z 147 für Methanol, m/z 189 für 1-Butanol) und entsprechende MS-Spektren der gebildeten Äpfelsäureester .....  | 71 |
| <b>Abbildung 5.38</b> | Base Peak Chromatogramme des HBG-II Sublimats .....   | 74 |
| <b>Abbildung 5.39</b> | Dünnschichtchromatogramme der Fraktionen des HBG-II Sublimates (S). .....   | 75 |
| <b>Abbildung 5.40</b> | Base Peak Chromatogramme der Fraktionen des HBG-II Sublimats.....   | 76 |
| <b>Abbildung 5.41</b> | DEPT- und <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der F1 des HBG-II Sublimats.....  | 77 |
| <b>Abbildung 5.42</b> | <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der F2 des HBG-II Sublimates. ....  | 78 |
| <b>Abbildung 5.43</b> | Ausschnitt des HMBC-Spektrums der F4 des HBG-II Sublimats, in dem die Signale des 5-(Hydroxymethyl)furfurals zu sehen sind .....  | 79 |

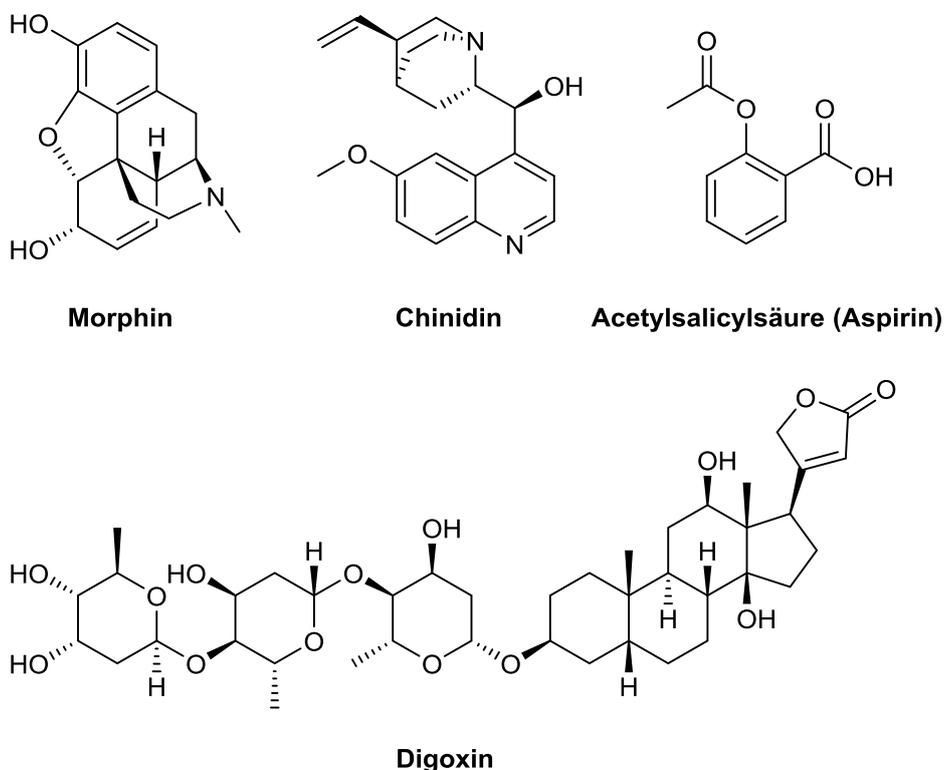
|                       |  |     |
|-----------------------|--|-----|
| <b>Abbildung 5.44</b> | Reaktionsweg der „Maillard-Reaktion“, der zur Entstehung des HMFs führt (nach Baltes und Matissek, 2009) <sup>169</sup> .....                                      | 80  |
| <b>Abbildung 5.45</b> | Kristallstruktur von Bernsteinsäure aus F4 isoliert. ....  | 81  |
| <b>Abbildung 5.46</b> | <sup>1</sup> H-NMR-Spektren der F5 und F6 des HBG-II Sanddornbeerensublimates .....  | 82  |
| <b>Abbildung 5.47</b> | <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeerensublimates.....   | 83  |
| <b>Abbildung 5.48</b> | Base Peak (-) Chromatogramme der Chinasäure und des Chinasäure-Sublimates mit den dazugehörigen Massenspektren .....   | 85  |
| <b>Abbildung 8.1</b>  | Einstellung der JCD bei Messungen von Proben mit einem Feststoffgehalt von 1.0–9.9 mg/ml.....  | 102 |
| <b>Abbildung 8.2</b>  | Einstellung der JCD bei Messungen von Proben mit einem Feststoffgehalt von ≥ 10 mg/ml.....   | 103 |
| <b>Abbildung 8.3</b>  | <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY-Spektrum der F13.3 des HBG-I 1-Butanolextraktes .....  | 106 |
| <b>Abbildung 8.4</b>  | <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der F18.1 des HBG-I 1-Butanolextraktes.....  | 106 |
| <b>Abbildung 8.5</b>  | Beispiel für den Unterschied zwischen dem positiven (rot) und negativen (blau) Scan-Modus Chromatogrammen des Trofimovskaja-Sublimates.....                        | 107 |
| <b>Abbildung 8.6</b>  | Beispiel für eine Substanz, die nur im Chromatogramm des Habego-Sublimates mit einem m/z von 165 zur RT 5.5 min detektiert wurde.....                              | 107 |
| <b>Abbildung 8.7</b>  | Beispiel für eine Substanz, die nur im Chromatogramm des Otradnaja-Sublimates (orange) mit einem m/z von 368 zur RT 15.2 min detektiert wurde...                   | 108 |
| <b>Abbildung 8.8</b>  | Beispiel für eine Substanz, die nur im Chromatogramm des Alpensorte-Sublimates (lila) mit einem m/z von 223 zur RT 16.6 min detektiert wurde .....                 | 108 |
| <b>Abbildung 8.9</b>  | Beispiel für eine Substanz, die nur in den Chromatogrammen des Trofimovskaja-Sublimates (grün) nicht vorkam, mit einem m/z von 423 zur RT 25.7 min.....            | 109 |
| <b>Abbildung 8.10</b> | Vergleich der Chromatogramme verschiedener Sanddornbeerensublimata im Bereich von 12-16 Minuten. ....  | 109 |
| <b>Abbildung 8.11</b> | Vergleich der Massenspektren des Toluenextraktes (unten) der HBG-II Sanddornbeere und des Sublimates der Toluenextraktes (oben) im Bereich von 17-19 Minuten. .... | 110 |
| <b>Abbildung 8.12</b> | HSQC-Spektrum der F1 des HBG-II Sanddornbeerensublimates.....  | 110 |
| <b>Abbildung 8.13</b> | <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY-Spektrum der F1 des HBG-II Sanddornbeerensublimates .....  | 111 |
| <b>Abbildung 8.14</b> | <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeerensublimates.....  | 111 |
| <b>Abbildung 8.15</b> | <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeerensublimates .....  | 112 |
| <b>Abbildung 8.16</b> | HSQC-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeerensublimates.....  | 112 |
| <b>Abbildung 8.17</b> | DEPT-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeerensublimates .....   | 113 |
| <b>Abbildung 8.18</b> | <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeerensublimates.....   | 113 |
| <b>Abbildung 8.19</b> | <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeerensublimates.....  | 114 |
| <b>Abbildung 8.20</b> | DEPT-Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeerensublimates .....   | 114 |
| <b>Abbildung 8.21</b> | HSQC-Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeerensublimates.....  | 115 |
| <b>Abbildung 8.22</b> | <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeerensublimates.....   | 115 |
| <b>Abbildung 8.23</b> | HMBC-Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeerensublimates.....  | 116 |

## Tabellenverzeichnis

|                     |  |     |
|---------------------|--|-----|
| <b>Tabelle 5.1</b>  | $\alpha$ -Feststoffgehalt (FG) der Ethanolextrakte (80%) .....   | 23  |
| <b>Tabelle 5.2</b>  | Liste der identifizierten Strukturen des HBG-I Reinstwasserextraktes. ....   | 27  |
| <b>Tabelle 5.3</b>  | Liste der identifizierten Strukturen des HBG-I Ethanolextraktes (80%).....   | 29  |
| <b>Tabelle 5.4</b>  | Liste der identifizierten Strukturen des HBG-I DMSO-Extraktes.....   | 30  |
| <b>Tabelle 5.5</b>  | Liste der identifizierten Strukturen des HBG-I 1-Butanolextraktes .....  | 32  |
| <b>Tabelle 5.6</b>  | Masse der einzelnen Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes.....   | 37  |
| <b>Tabelle 5.7</b>  | m/z Werte der Phytosterine aus den Fraktionen 5–9 des HBG-I 1-Butano<br>Extraktes .....                                      | 38  |
| <b>Tabelle 5.8</b>  | Liste identifizierter Flavonoid Glycoside in Fraktionen des HBG-I 1-<br>Butanolextraktes .....                               | 41  |
| <b>Tabelle 5.9</b>  | Identifizierte Substanzen aus den 1-Butanolextrakten der HBG-I, OTR, TRO<br>und ALP.....                                     | 50  |
| <b>Tabelle 5.10</b> | Substanzen, die nach Datenbankabgleich im BuOH Apolda Destillat enthalten<br>sein könnten. ....                              | 55  |
| <b>Tabelle 5.11</b> | Identifizierte Substanzen aus den Extrakten der Sanddornblätter .....  | 57  |
| <b>Tabelle 5.12</b> | Identifizierte Substanzen aus den Extrakten der Apfelbeeren (x = im Extrakt<br>enthalten) .....                              | 60  |
| <b>Tabelle 5.13</b> | Identifizierte Substanzen aus den Extrakten der Kornelkirschen .....   | 61  |
| <b>Tabelle 5.14</b> | Spezifische m/z, die in den Chromatogrammen der Sanddornsublimaten von<br>HBG, OTR und ALP gefunden wurden. ....             | 65  |
| <b>Tabelle 5.15</b> | Marker-Substanzen, die in jedem Sublimat der untersuchten Sanddornpulver<br>gefunden wurden. ....                            | 65  |
| <b>Tabelle 5.16</b> | Marker-Substanzen des Sanddorns, die in der Apfelbeere, der Bocksdornbeere<br>und der Kornelkirsche vorhanden (x) sind ..... | 68  |
| <b>Tabelle 5.17</b> | Extraktionsmittel, -temperatur und Trockengewicht der Sanddornextrakte.....  | 69  |
| <b>Tabelle 5.18</b> | Marker-Substanzen der Trockenextrakte und ihrer Sublimaten .....   | 72  |
| <b>Tabelle 5.19</b> | Marker-Substanzen der Trockenextrakt-Sublimaten, die in den Extrakten nicht<br>vorkamen .....                                | 72  |
| <b>Tabelle 5.20</b> | Masse der einzelnen Fraktionen des HBG-II Sublimates .....   | 75  |
| <b>Tabelle 6.1</b>  | Substanzen, die aus dem 1-Butanolextrakt der HBG-I Sanddornbeeren isoliert<br>wurden .....                                   | 87  |
| <b>Tabelle 6.2</b>  | Substanzen, die aus dem Sublimat des HBG-II Fruchtpulvers isoliert wurden.....   | 89  |
| <b>Tabelle 8.1</b>  | Ergebnisse der Gefriertrocknung der Sanddornbeeren (HBG-I). Nach 32h<br>wurde Gewichtskonstanz erreicht .....                | 117 |
| <b>Tabelle 8.2</b>  | Feststoffgehalte der Ethanolextrakte (80%) bei unterschiedlicher<br>Probenvorbereitung .....                                 | 117 |
| <b>Tabelle 8.3</b>  | Marker Substanzen, die in den Sanddornbeerensublimaten gefunden wurden. ....   | 117 |

# 1 Einleitung

Die pflanzliche Heilkunde stellt den Ursprung für die Behandlung menschlicher Krankheiten in vielen Kulturen auf der ganzen Welt dar.<sup>1</sup> Die ersten Aufzeichnungen über die medizinische Verwendung von Pflanzen datieren über 5000 Jahre zurück zum Volk der Sumerer. Über die Jahrtausende entwickelten sich getrennt voneinander verschiedene Arten traditioneller Medizin. Bekannte Vertreter sind neben der Traditionellen Chinesischen Medizin, das Ayurveda und das Unani. Typischerweise wurden bei diesen traditionellen Methoden Extrakte oder Teile von Pflanzen verwendet. Diese Heilpflanzen sind der Ursprung einer Vielzahl von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die in der modernen Medizin ihre Anwendung finden. Der erste Wirkstoff, der Anfang des 19. Jahrhunderts in reiner Form aus einer Pflanze (Schlafmohn, *Papaver somniferum*) isoliert werden konnte, war das Alkaloid Morphin.<sup>2</sup> Es folgten weitere pflanzenbasierte Medikamente wie Aspirin, Chinidin und Digoxin (Abbildung 1.1).<sup>3</sup>



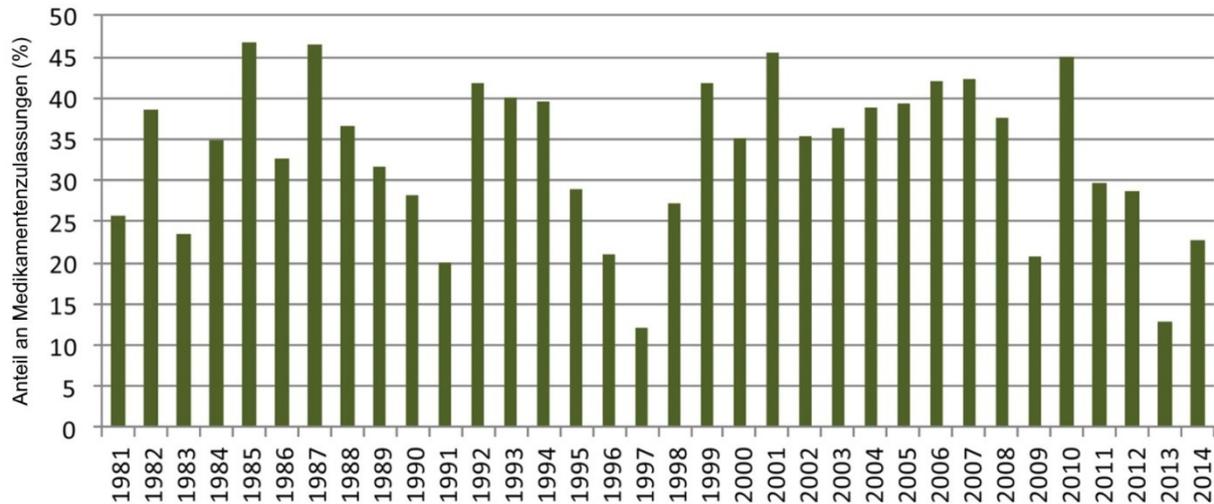
**Abbildung 1.1** Pflanzliche und pflanzenbasierte (Aspirin) Wirkstoffe

Heutzutage werden sowohl Teile von Pflanzen, Pflanzenextrakte und isolierte Naturstoffe in medizinischen Studien untersucht. In verschiedenen Testreihen an Menschen zeigten zum Beispiel Ingwer (*Zingiber officinale*), Mutterkraut (*Tanacetum parthenium*), Ginkgo (*Ginkgo biloba*) und Echtes Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) positive therapeutische Effekte.<sup>4,5</sup> Die positiven Eigenschaften verschiedener Heilpflanzen werden dabei oft mit ihren hohen Anteilen an Polyphenolen, Phytosterinen oder Alkaloiden in Verbindung gebracht. Diese werden sowohl in ihrer reinen Form als auch in Kombination untersucht, um vermutete synergistische Effekte beizubehalten.<sup>6-</sup>

11

Die intensive Forschung im Bereich der naturstoffbasierten Pharmazie spiegelt sich auch in den aktuellen Arzneimittelzulassungen wider. So wurden 2019 insgesamt 48 neue Medikamente von der US Food and Drug Administration (FDA) zugelassen wovon neun auf Naturstoffen basieren.<sup>12</sup> Auch

Newman und Cragg zeigen in ihrer Analyse der jährlichen Medikamentenzulassungen, dass der Einfluss von Naturstoffen zwischen 1981 und 2014 sehr hoch war.<sup>13</sup> Naturstoffe, deren Derivate und pflanzliche Arzneimittel machten in diesem Zeitraum im Mittel 33% ( $\pm 9\%$ ) aus (**Abbildung 1.2**). Es wird angenommen, dass etwa 35.000-70.000 Pflanzenarten für medizinische Zwecke weltweit verwendet werden.<sup>1</sup> Dabei handelt es sich nur um einen geringen Teil der weltweiten Flora (~20%). Dieser geringe Anteil ist jedoch die Grundlage für mehr als die Hälfte der Medikamente (~60%) der modernen Medizin.



**Abbildung 1.2** Prozentualer Anteil von Naturstoffen, deren Derivate und pflanzlichen Arzneimitteln an den jährlichen Medikamentenzulassungen zwischen 1981 und 2014<sup>13</sup>

Die Nachfrage nach pflanzenbasierten Medikamenten ist auch heutzutage noch sehr hoch. Die Natur bietet nach wie vor eine Vielzahl unentdeckter Möglichkeiten, um neue Wirkstoffe zur Bekämpfung von Krankheiten zu entdecken. Es liegt an uns, diese Möglichkeiten zu nutzen. Dabei ist es wichtig, neben den aktuellen Trends, auch immer wieder einen Blick zurück zu den Wurzeln der modernen Medizin zu werfen. Das Wissen, welches die verschiedenen Kulturen über tausende von Jahre gesammelt haben, kann uns auch heute noch helfen, verschiedene Krankheitsbilder zu behandeln.

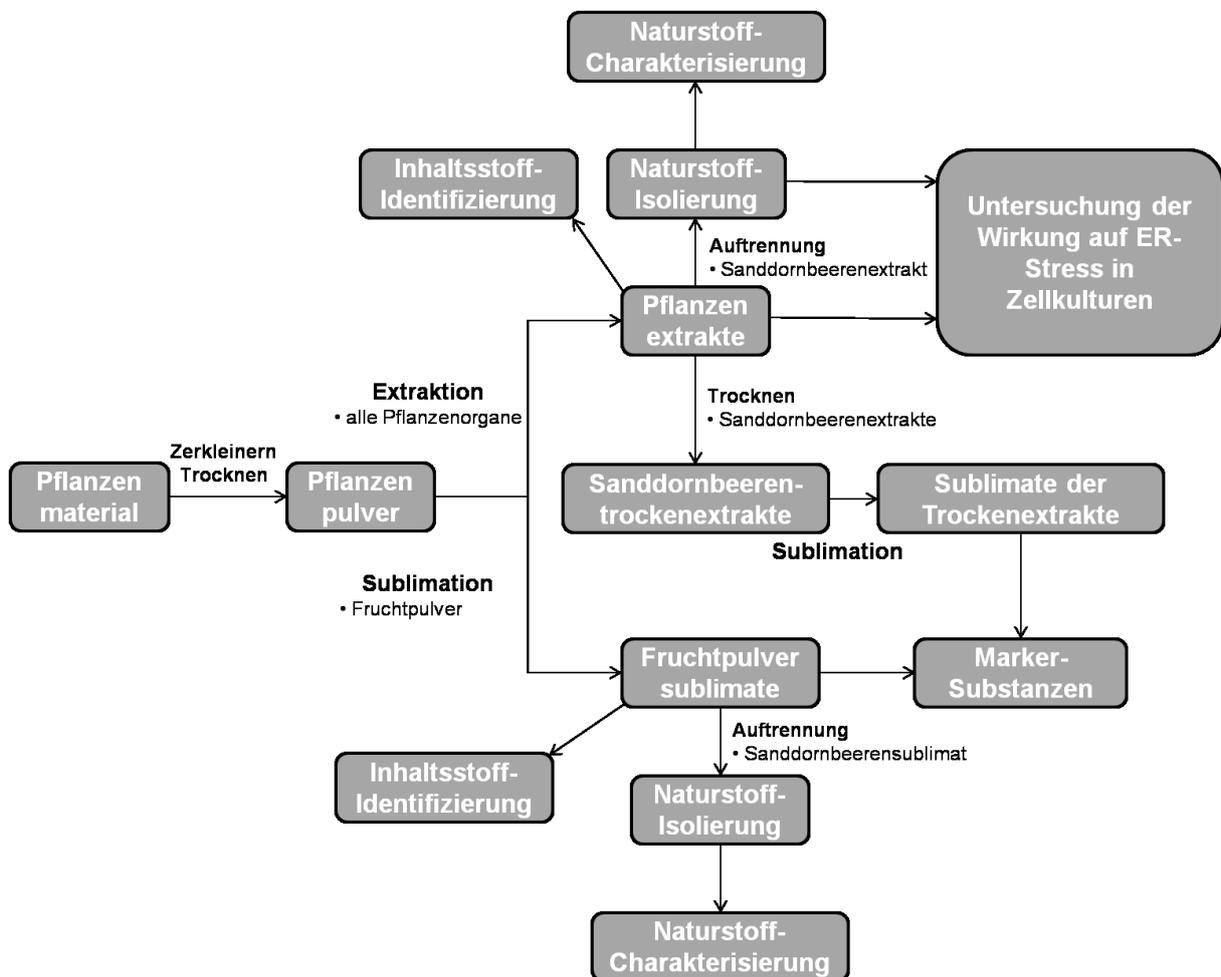
## 2 Zielsetzung

Trotz aller Fortschritte im Bereich der Medikamentenforschung können noch lange nicht alle Krankheiten auf der Welt erfolgreich behandelt werden. Um das zu verändern, wird intensiv im Bereich der Naturstoffe geforscht, da diese ein hohes Potential in medizinischen Untersuchungen aufweisen. Es kommen dabei viele unterschiedliche Extraktionsmethoden zum Einsatz, um potentielle Wirkstoffe aus Pflanzen zu extrahieren. Die Naturstoffgemische, die dabei entstehen, müssen im Nachhinein sehr aufwendig aufgetrennt werden, um positive Ergebnisse bei Aktivitätsuntersuchungen auf einen oder mehrere Inhaltsstoffe zurückführen zu können. Diese Trennungen werden mit Hilfe unterschiedlicher Isolationstechniken ermöglicht. Extraktionen und weiterführende Trennverfahren verbrauchen oft große Mengen an Lösungsmitteln, was auch ökologische Probleme mit sich bringt. Es besteht demnach auch heute noch Bedarf nach Extraktionsmethoden, die den Zeit- und Arbeitsaufwand sowie den Einsatz von Chemikalien minimieren.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Proteinfehlfaltung, ER-Stress und Proteindegradation – Entwicklung einer systematischen Pipeline für individualisierte Therapien bei erblichen Leber- und Pankreaserkrankungen“ (PePPP) angefertigt. Das von der europäischen Union (ESF) und im Rahmen der Landesexzellenzinitiative Mecklenburg-Vorpommern geförderte interdisziplinäre Projekt hat sich zum Ziel gesetzt, erbliche bedingte Krankheiten der Pankreas (Johanson-Blizzard Syndrom) und der Leber (Morbus Wilson) zu bekämpfen. Diese Erbkrankheiten werden beide durch Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER) hervorgerufen.<sup>14</sup> Verschiedene natürliche Substanzen wurden bereits auf ihre Wirkung gegen ER-Stress untersucht und konnten positive Wirkungen in Zelltests erzielen (Kapitel 3.4).<sup>15</sup> Darunter finden sich auch verschiedene Polyphenole wie das Flavonoid Quercetin.<sup>16</sup> Es wurde aufgrund dieser Tatsache entschieden, die Beeren des Sanddorns (*Hippophae rhamnoides*) in dieser Arbeit auf ihre Wirkung in Bezug auf ER-Stress zu untersuchen. Sanddornbeeren sind bekannt für ihren hohen Gehalt an Polyphenolen wie Flavonoiden oder Catechinen.<sup>17,18</sup> Der Sanddorn ist zudem in Mecklenburg-Vorpommern beheimatet, was ihn als potentiellen Wirkstoffträger noch interessanter macht. Neben modernen Extraktionsmethoden wie der Mikrowellenextraktion und der Ultraschallextraktion wird die Sublimation erstmals auf getrocknetes Pflanzenmaterial und Sanddornbeerenextrakte angewendet werden. Der Einfluss der Lösungsmittel in der Mikrowellen- und Ultraschallextraktion wird untersucht und die verschiedenen Extrakte in Zellaktivitätstests auf ihre Wirksamkeit überprüft. Die Extrakte werden mit Hilfe chromatographischer Trennverfahren in Fraktionen und Reinstoffe getrennt. Auch diese werden auf ihre ER-Stress lindernde Wirkung getestet. Die Zusammensetzung der verschiedenen Erzeugnisse wird mittels Kombinationen der Flüssigchromatographie (LC) und der Gaschromatographie (GC) mit der Massenspektrometrie (MS) untersucht. Zur Strukturaufklärung wird außerdem die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) verwendet.

Die Sublimation wird zur Anreicherung von Marker-Substanzen aus Fruchtpulvern genutzt. Es wird dabei überprüft, ob unterschiedliche Substanzen aus den Früchten gewonnen werden können und somit eine Identifizierung der Früchte durch ihre Sublimate möglich ist. Dazu werden die Inhaltsstoffe der Sublimate verschiedener Sanddornarten miteinander verglichen, um den chemischen Fingerabdruck der Sanddornbeere unabhängig von der jeweiligen Sorte zu bestimmen. Die so bestimmten Marker-Substanzen werden daraufhin mit den Sublimaten weiterer Früchte verglichen, um spezifische Marker-Substanzen der Sanddornbeeren zu erkennen. Zudem wird die Anwendung der Sublimation auf Trockenextrakte der Sanddornbeeren untersucht. Es wird überprüft, ob die Inhaltsstoffe der Sublimate der Trockenextrakte einen Rückschluss auf die verwendeten

Extraktionsmittel zur Herstellung der Trockenextrakte zulassen. Die Analyse der Sublimate wird mittels LC/MS durchgeführt. Abschließend wird das Sublimat eines Sanddornbeerenpulvers durch die Säulenchromatographie aufgetrennt, um dessen Zusammensetzung auf bisher noch nicht für die Sanddornbeere beschriebene Naturstoffe zu untersuchen. Hierzu wird neben der LC/MS vor allem die NMR-Spektroskopie verwendet. Die verschiedenen Arbeitsschritte sind in **Abbildung 2.1** schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.1** Schematische Erläuterung der Vorgehensweise in dieser Arbeit

Alle Ergebnisse werden nach ihrer Auswertung miteinander verglichen. Hieraus sollten sich Rückschlüsse auf den Nutzen der Sublimation in der Naturstoffchemie ziehen lassen. Auch die Wirksamkeit von Extrakten, Fraktionen und Reinstoffen des Sanddorns in Bezug auf die Linderung des ER-Stresses im Zellmodell wird ermittelt werden. Die so erhaltenen Daten sollen mit als Grundlage für die Bekämpfung der Erbkrankheiten Johanson-Blizzard-Syndrom und Morbus Wilson genutzt werden.

## 3 Stand der Technik

### 3.1 Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen

Die Extraktion bildet die erste Stufe bei Trennung von gewünschten Naturstoffen aus dem Pflanzenmaterial. Dabei werden verschiedene Lösungsmittel verwendet, die unterschiedliche Substanzklassen aus den Probenmatrizes lösen können. Eine weitere Möglichkeit ist das Auspressen des Rohstoffes, wie es zum Beispiel für Kernöle oder Fruchtsäfte üblich ist.<sup>19</sup>

Der Extraktionsprozess kann durch verschiedene Parameter gesteuert werden. Diese Parameter beeinflussen die Diffusion der Naturstoffe aus dem Pflanzenmaterial und ihre Löslichkeit in den Lösungsmitteln. Je nach Priorität lassen sich so besonders schnelle, milde, ergiebige oder nachhaltige Verfahren gestalten. Neben den Eigenschaften des verwendeten Lösungsmittels spielen vor allem die Temperatur, die Extraktionsdauer, das Lösungsmittel-zu-Feststoff Verhältnis, die Partikelgröße des Pflanzenmaterials und der pH-Wert eine Rolle.<sup>20-23</sup> Je nach angewandter Methode bieten sich noch eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten, die Extraktion zu beeinflussen.<sup>24-27</sup>

Für die Extraktion mit Lösungsmitteln besteht eine große Bandbreite verschiedener Methoden, die alle heute noch verwendet werden. Das liegt an den verschiedenen Vor- und Nachteilen, die jede Methode mit sich bringt. Die Extraktionstechniken können dabei grob in konventionelle und moderne Extraktionsverfahren unterteilt werden. Erstere benötigen meist keine teuren technischen Geräte und werden zum Teil schon seit Jahrtausenden verwendet. Die Methoden besitzen meist eine lange Extraktionsdauer und sind weniger effektiv als die modernen Extraktionstechniken. Diese werden meist durch teure technische Geräte gesteuert, benötigen jedoch deutlich weniger Zeit und können auch bei geringerer Extraktionstemperatur gute Ausbeuten erzielen.

#### 3.1.1 Konventionelle Extraktionstechniken

Die Mazeration beschreibt die einfachste Art der Extraktion. Das Pflanzenmaterial wird hierbei in dem gewünschten Lösungsmittel ohne zu Erhitzen eingelegt. Dies kann mit und ohne Rühren der Mischung erfolgen. Das Lösungsmittel wird nicht gewechselt. Der Nachteil dieser Methode besteht in ihrer langen Extraktionszeit und geringen Effektivität. Die niedrige Prozesstemperatur bringt den Vorteil mit sich, dass auch thermolabile Verbindungen extrahiert werden können. Hinzu kommt, dass keine teuren Geräte benötigt werden.<sup>19,28</sup> Ein Spezialfall der Mazeration ist die Digestion, hierbei wird der Extraktionsprozess durch leichtes Erhitzen (40-60°C) unterstützt.<sup>29</sup> Ćujić et al. (2016) konnten mit der Mazeration hohe Ausbeuten an Phenolen und Anthocyanen aus der Apfelbeere gewinnen.<sup>30</sup> Ji et al. (2018) nutzen sie zur Extraktion von Phenolen aus Öl-Mischungen.<sup>31</sup>

Die Perkolation beschreibt in der Naturstoffchemie eine kontinuierliche Extraktion von Substanzen aus dem Extraktionsgut. Anders als bei der Mazeration wird das gesättigte Lösungsmittel nach einer Zeit durch frisches Lösungsmittel ersetzt.<sup>19</sup> Hierzu wird nach dem Erreichen einer Sättigung das Extraktionsgut durch eine Filtration vom Lösungsmittel getrennt und anschließend erneut Flüssigkeit hinzugegeben. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt. Alternativ wird auch ein kontinuierlicher Prozess angewandt, wobei frisches Lösungsmittel von oben durch das Pflanzenmaterial geleitet wird und unterhalb wieder austritt.<sup>29</sup> Ein einfaches Beispiel ist die Zubereitung von Kaffee mit Hilfe eines Filterpapiers. Bei einer Perkolation kann auch mit erhöhten Temperaturen gearbeitet werden. Subba et al. (2019) verwendeten die kalte Perkolation mit Methanol in ihrer Analyse von nepalesischen Heilpflanzen und konnten medizinisches Potential bei einigen Extrakten nachweisen.<sup>32</sup> Diese

Extraktionsmethode bietet zwar eine höhere Effektivität im Vergleich zur Mazeration, der Lösungsmittelverbrauch ist jedoch sehr hoch.

Die Abkochung (eng. decoction) ist eine traditionelle Zubereitungsform pflanzlicher Arzneidrogen. Sie ist besonders bekannt aus der traditionellen chinesischen Medizin (TCM). Per Definition ist das einzig verwendete Lösungsmittel Wasser. Die Pflanzenteile werden meist zweimal ausgekocht und danach vereinigt. Die Extraktionszeit liegt im Normalfall unter einer Stunde und wird beim zweiten Auskochen kürzer gewählt. Aufgrund der hohen Temperatur werden Naturstoffe besser aus dem Extraktionsgut gelöst. Sie führt jedoch auch zu einer Reihe von Reaktionen im Dekokt und ist für thermolabile Substanzen ungeeignet. Enzymatische Reaktionen werden durch die hohe Temperatur wiederum verhindert, wodurch einige Substanzen in höheren Mengen vorkommen im Vergleich zu Extraktionen mit niedrigerer Temperatur.<sup>33,19</sup> Auch heute findet diese bereits sehr lange bekannte Extraktionsmethode noch Verwendung. Khatib et al. (2017) untersuchten zwei Sorten von Granatäpfeln und nutzen die Abkochung zur Extraktion von Polysacchariden.<sup>34</sup> Aufgrund der antithrombotischen Wirkung des BuyangHuanwu Dekokts entwickelten Liao et al. (2018) eine Methode, um aktive Substanzen des Dekoktes zu identifizieren.<sup>35</sup>

Eine der wohl bekanntesten und meist verwendeten Extraktionsmethoden ist die nach ihrem Entdecker benannte Soxhlet Extraktion. Das Extraktionsgut befindet sich oberhalb eines mit Lösungsmittel gefüllten Kolbens in einer Extraktionshülse im sogenannten Soxhlet Aufsatz. Durch Erhitzen des Lösungsmittels gelingt dieses in einen Kühler, welcher oberhalb des Soxhlet Aufsatzes angebracht wird. Das heiße Lösungsmittel fließt zurück durch das Pflanzenmaterial und anschließend wieder in den Kolben darunter. Dieser Kreisprozess läuft kontinuierlich ab und das Extraktionsgut wird immer wieder durch reines Lösungsmittel extrahiert. Dies erhöht verglichen mit den traditionelleren Methoden die Effektivität des Verfahrens. Es wird deutlich weniger Lösungsmittel verbraucht und aufgrund der hohen Temperatur die Extraktionsdauer gesenkt. Letztere wird jedoch zwingend benötigt. Die Methode erhöht demnach die Gefahr einer thermischen Zersetzung labiler Substanzen.<sup>19,28</sup> Aufgrund ihrer geringen Kosten und relativ hohen Effektivität findet die Methode auch heutzutage noch viel Verwendung. Sunitha et al. (2015) extrahierten mit der Soxhlet Apparatur aktive Inhaltsstoffe der *Ixora chinensis* und isolierten einige Substanzen aus dieser Pflanze zum ersten Mal.<sup>36</sup> In einer Studie von Padhi und Panda (2016) wurde der positive Einfluss von ethanolischen Soxhlet Extrakten der *Bix orellana* festgestellt und die traditionelle Verwendung der Pflanze wurde somit validiert.<sup>37</sup>

### 3.1.2 Moderne Extraktionsverfahren

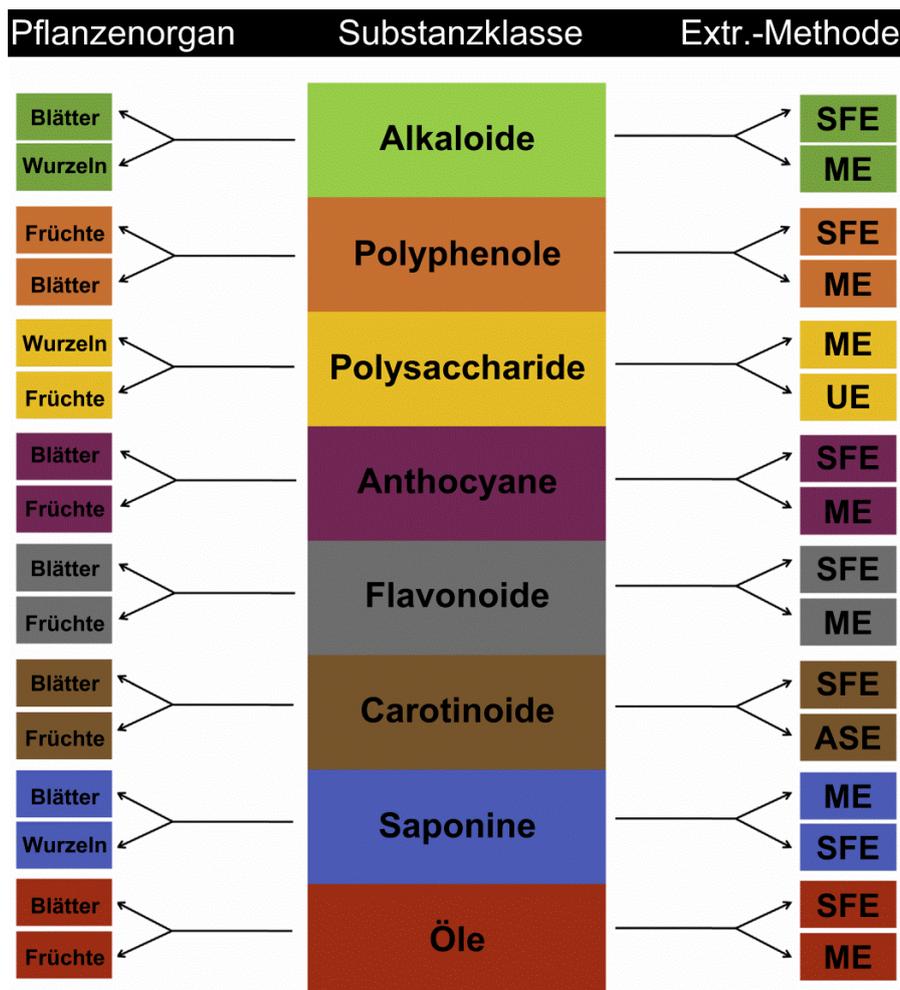
Die beschleunigte Lösemittlextraktion (eng. Accelerated Solvent Extraction (ASE)) ist ein Hochdruckprozess und wird bei Drücken von 10-15 MPa betrieben. Hoher Druck ermöglicht es, Lösungsmittel über ihrem Siedepunkt in flüssiger Form zu halten. Daraus resultieren eine höhere Löslichkeit und Diffusionsrate für Naturstoffe während der Extraktion. Das Lösungsmittel kann außerdem schneller in die Poren des Extraktionsgutes eindringen. Dies führt zu kürzeren Extraktionszeiten und macht es möglich, thermolabile Substanzen zu extrahieren, da ihre Degradationsprozesse langsamer verlaufen.<sup>19,38</sup> So gelang es Gizir, Turker und Artuvan (2008) mit Hilfe der ASE Anthocyane aus schwarzen Karotten (*Daucus carota ssp. sativus*) zu extrahieren.<sup>39</sup> Zengin et al. (2020) zeigten bei ihren Untersuchungen der *Helichrysum stoechas*, dass die ASE im Vergleich zu vier weiteren Extraktionsmethoden die höchste Effektivität bezüglich der Extraktion von Phenolen und Flavonoiden aufweist. Dies spiegelte sich indirekt in der Fähigkeit des ASE-Extraktes als Radikalfänger und Inhibitor der  $\alpha$ -Glucosidase wieder.<sup>40</sup>

Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) befindet sich oberhalb einer Temperatur von 31 °C und einem Druck von 7,38 MPa in einem überkritischen Zustand und wird als überkritisches Fluid bezeichnet. Überkritisches CO<sub>2</sub> wird mit Abstand am häufigsten bei Extraktionen mit überkritischen Flüssigkeiten (eng. Supercritical fluid extraction (SFE)) verwendet. Das liegt vorwiegend an den vielen Vorteilen, die CO<sub>2</sub> mit sich bringt. Es ist in großen Mengen verfügbar, kostet daher wenig, weist eine geringe Toxizität auf und kann vergleichsweise einfach in seinen überkritischen Zustand versetzt werden. Aufgrund der geringen benötigten Temperatur eignet sich überkritisches CO<sub>2</sub> zur Extraktion thermolabiler Substanzen. Es wird vorwiegend zur Extraktion von Lipiden verwendet, da CO<sub>2</sub> eine sehr geringe Polarität besitzt.<sup>19,38</sup> Santos et al. (2020) gelang es mit Hilfe von überkritischem CO<sub>2</sub>, 41% der Masse von Favela Samen (*Cnidocolus quercifolius*) in Form von Öl zu extrahieren.<sup>41</sup> Die Extraktionseigenschaften dieser Methode lassen sich durch die Zugabe von Modifikatoren stark beeinflussen. Ein Modifikator ist ein organisches Lösungsmittel, das dem überkritischen Fluid zugesetzt wird. Coelho et al. (2020) untersuchten den Einfluss von Isopropanol, Ethanol und Ethylacetat bei der CO<sub>2</sub> Extraktion von verbrauchtem Kaffeesatz. Die maximale Öl-Ausbeute konnte durch die Zugabe von nur 10% der organischen Lösungsmittel in der Hälfte der Zeit erreicht werden. Es konnte außerdem eine erhöhte antioxidative Eigenschaft in den Extrakten nachgewiesen werden, die mit Modifikatoren hergestellt wurden.<sup>42</sup>

Die Frequenz von Ultraschallwellen liegt zwischen 20 kHz und 10 MHz. In der Lebensmittelindustrie wird zwischen diagnostischem Ultraschall (2–10 MHz) und Leistungultraschall (20–100 kHz) unterschieden. Letzterer wird neben anderen Anwendungsfeldern auch zur Extraktion von biologisch aktiven Substanzen verwendet.<sup>28</sup> Der Ultraschallextraktion (UE) liegt der Mechanismus der akustischen Kavitation zugrunde. Trifft Ultraschall auf eine Flüssigkeit, induziert er eine Reihe von Komprimierungen und Dekomprimierungen in den Molekülen des Medium. Diese führen zu Bildung, Ausdehnung und Implosion von Mikrobläschen in mit Ultraschall behandelten Flüssigkeiten.<sup>43</sup> Diese sogenannten Kavitationsblasen können in zwei Typen unterteilt werden. Stabile Kavitationsblasen sind relativ langlebige Gasblasen und existieren über mehrere Zyklen von Komprimierungen und Dekomprimierung. Transiente Kavitationsblasen kollabieren bereits nach sehr kurzer Zeit unter starker Energieentwicklung. Während einer Ultraschallextraktion existieren tausende solcher Bläschen, von denen einige nach Erreichen einer instabilen Größe kollabieren und dabei punktuell Temperaturen bis zu 5000 K und Drücke im Bereich von 50 MPa hervorrufen.<sup>44</sup> Temperatur- und Druckänderungen, die bei diesen Implosionen auftreten, führen zu Verdünnung von Zellmembranen und Zerstörung von Zellen. Dies erleichtert das Eindringen des Lösungsmittels in die Probenmatrix und verstärkt den Massentransfer der Zielverbindungen in das Lösungsmittel. Die Implosion der Kavitationsblasen erzeugt außerdem Turbulenzen auf mikroskopischer Ebene, Hochgeschwindigkeits-Kollisionen zwischen den Partikeln und Agitation in mikroporösen Partikeln der Matrix, was die Diffusion beschleunigt.<sup>45</sup> Zu den wichtigsten Prozessparametern zählen die Ultraschall Leistung und Amplitude. So zeigten Goldsmith et al. (2018) bei der Extraktion von phenolischen Verbindungen aus Oliventrester, dass eine Erhöhung der Ultraschall Leistung von 150 W auf 250 W die Extraktionsausbeute erhöhte.<sup>46</sup> Đurović et al. (2018) untersuchten die Extraktion von phenolischen Säuren aus Sojabohnen (*Glycine max*). Sie stellen dabei fest, dass die Erhöhung der Amplitude von 15 auf 30% die Menge an extrahierten Substanzen um über 100% steigerte.<sup>47</sup>

Mikrowellen sind nicht ionisierende elektromagnetische Wellen, welche eine Frequenz im Bereich von 300 MHz bis 300 GHz aufweisen.<sup>24,38</sup> Sie interagieren mit Proben und Lösungsmitteln, die ein Dipolmoment aufweisen. Hierdurch findet bei einer Mikrowellenextraktion (ME) die Erhitzung unmittelbar und innerhalb der Probe statt. Es entstehen demnach keine Temperaturgradienten, wie es für die meisten anderen Verfahren der Fall ist. Dies führt zu sehr schnellen Extraktionen, da Wasser

innerhalb von Zellen sofort erhitzt wird und die Zellen zerstört. Die enthaltenen Naturstoffe gelangen also noch schneller in das Extraktionsmedium. Generell ist eine hohe Permittivität und dielektrische Absorption des Lösungsmittels wünschenswert, da es die Kapazität zur Absorption von Mikrowellenenergie erhöht und somit zum schnelleren Erhitzen führt. Zur Extraktion thermolabiler Substanzen können auch Lösungsmittelgemische mit geringen dielektrischen Eigenschaften verwendet werden. Der Einsatz unpolarer Lösungsmittel ist genauso möglich wie der von polaren Lösungsmitteln. Die Mikrowellenextraktion ist heutzutage aufgrund ihrer hohen Effektivität und geringen Extraktionsdauer eine der meistgenutzten Extraktionsmethoden. Belwal et al. (2018) zeigten in ihren Untersuchungen zu Extraktionsmethoden, dass die Mikrowellenextraktion für die viele Stoffgruppen und Pflanzenteile die bevorzugte Extraktionsmethode darstellt (Abbildung 3.1).<sup>27</sup> Vallejo-Castillo et al. (2020) untersuchten die Rückgewinnung von Antioxidantien aus Papaya (*Carica papaya*) Schalen und Fruchtfleisch mittels Mikrowellenextraktion und konnten größere Mengen extrahieren als zuvor in der Literatur beschrieben wurde.<sup>48</sup> Fan et al. (2020) verwendeten in ihrer Studie Vitamin B<sub>3</sub> basierte protische ionische Flüssigkeiten zur Extraktion von Astilbin aus Stechwindenwurzelstock (*Rhizoma Smilacis glabrae*). Ionische Flüssigkeiten eignen sich aufgrund ihrer hohen Ionenleitfähigkeit besonders für die Mikrowellenextraktion.<sup>49</sup> Ayouaz et al. konnten mit ihrer optimierten Methode innerhalb von 60 Sekunden eine maximale Ausbeute von phenolischen Substanzen aus den Blättern des Oleanders (*Nerium oleander*) gewinnen. Das Extrakt zeigte in Zelltest eine Wirkung gegen das Wachstum eines Darmkarzinoms ohne zytotoxisch zu wirken.<sup>50</sup>



**Abbildung 3.1** Bevorzugte moderne Extraktionstechniken und Pflanzenorgane für die Extraktion bestimmter Stoffklassen (Nach Belwal et al., 2018).<sup>27</sup> SFE = Extraktion mit superkritischen Flüssigkeiten, ME = Mikrowellenextraktion, UE = Ultraschallextraktion, ASE = Beschleunigte Lösemittelextraktion

Die Extraktion mit Hilfe von gepulsten elektrischen Feldern (eng. pulsed electric fields (PEF)) ist eines der neuesten Extraktionsverfahren. Es handelt sich um keinen thermalen Prozess, wodurch thermolabile Substanzen ohne eine Gefahr der Degradation extrahiert werden können. Wird die elektrische Feldstärke jedoch zu hoch gewählt, kann es durch die hohe Konzentration an Hydroxyl-Radikalen zu Abbaureaktionen kommen. Durch das angelegte elektrische Feld werden Zellmembranen durchlässig, wodurch in der Zelle enthaltenen Naturstoffe besser ins Lösungsmittel diffundieren können.<sup>51</sup> Im Vergleich zu anderen Methoden ermöglicht es eine schnellere, effektivere und ökologischere Extraktion von Substanzen aus biologischen Proben. Hou et al. (2010) zeigten in ihren Untersuchungen, dass die PEF Extraktion im Vergleich zur Mikrowellen-, Ultraschall- und beschleunigten Lösungsmittelextraktion die höchste Ausbeute an Ginsenosiden aus Ginseng (*Panax ginseng*) aufweist und dabei gleichzeitig eine geringe Extraktionsdauer benötigt.<sup>52</sup> Neuere Studien befassen sich mit dem Einsatz der PEF Extraktion zur Verwertung von Abfallprodukten. Gharibi-Tehrani et al. (2019) extrahierten mittels PFE Nebenprodukte der Zwiebelverarbeitung und konnten erfolgreich hohe Mengen an phenolischen Substanzen gewinnen.<sup>53</sup> Franco et al. (2020) nutzten die PFE Methode um Fischabfälle zu extrahieren und es gelang ihnen Antioxidantien in guter Ausbeute zu erhalten.<sup>54</sup>

Die Wasserdampfdestillation ist auch heute noch die meistverwendete Methode zur Gewinnung von ätherischen Ölen.<sup>55</sup> Es gibt verschiedene Arten der Wasserdampfdestillation.<sup>56</sup> Die einfachste Methode wird durch Einlegen des Pflanzenmaterials in Wasser und anschließende Destillation durchgeführt. Es besteht auch die Möglichkeit, Wasserdampf in Extrakte von organischen Lösungsmitteln einzuleiten, um die wasserdampflichten Substanzen aus diesen zu gewinnen. Eine dritte Variante ist das Durchströmen einer mit Pflanzenmaterial gefüllten Kolonne mit Wasserdampf. In allen Fällen findet eine Phasentrennung im Destillat statt, wodurch die lipophilen ätherischen Öle einfach von der wässrigen Phase getrennt werden können. Da sich die Dampfdrücke der Komponenten in einem Gemisch addieren, ist sowohl die Destillation von leicht als auch schwerflüchtigen Verbindungen mit dieser Methode möglich. Da ätherische Öle oft Geschmacks- oder Duftstoffe enthalten, ist die Wasserdampfdestillation besonders für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie bedeutsam. Avalos-Martínez et al. (2020) untersuchten erst kürzlich die Zusammensetzung flüchtiger Substanzen des mexikanischen Hibiskus (*Hibiscus sabdariffa* L.), welche sie mittels Wasserdampfdestillation gewonnen hatten, um ihren Einfluss auf das Aroma heißer Hibiskus Getränke zu ermitteln.<sup>57</sup> Park et al. (2018) verwendeten die Wasserdampfdestillation zur Extraktion volatiler Verbindungen aus dem Chinesischen Spaltkörbchen (*Schisandra chinensis*) und konnten in einigen Fraktionen eine starke antioxidative Wirkung nachweisen.<sup>58</sup>

## 3.2 Sublimation

Ein weiteres thermisches Trennverfahren, das zur Gewinnung von Naturstoffen aus Pflanzenmaterial genutzt werden kann, ist die Sublimation. Bereits vor über 100 Jahren wurde die Sublimation zum Nachweis von Benzoesäure, Ferulasäure, Umbelliferon und Zimtsäure in einigen Beerenarten oder Harzen genutzt.<sup>59</sup> Die Bedeutung der Sublimation in der Naturstoffchemie hat über die Jahre jedoch stark abgenommen, da durch die Extraktion eine größere Anzahl an Substanzen mit einer höheren Ausbeute in kürzerer Zeit gewonnen werden konnte. Die Mehrzahl der Publikationen aus den letzten 50 Jahren beschreibt die Sublimation lediglich als letzten Aufreinigungsschritt, um Inhaltsstoffe aus Pflanzenextrakten zu isolieren.<sup>60-65</sup> Die direkte Sublimation von Substanzen aus natürlichen Quellen wie Pflanzen oder Steinen wurde in der Literatur deutlich weniger untersucht.<sup>66,67</sup> Dabei bietet die Sublimation die Möglichkeit, Stoffe und Stoffgemische in höherer Reinheit direkt aus dem zu untersuchenden Material zu erhalten. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass nur wenige

Verbindungen zur Sublimation neigen. Das Anlegen eines Vakuums und das Erhitzen des Probenmaterials kann dazu genutzt werden, die Anzahl der Substanzen, die sublimieren, zu erhöhen. Ähnlich wie bei einer Destillation kann die Reinheit des Endproduktes durch die Variation der Sublimationsparameter beeinflusst werden.<sup>68</sup> Im Rahmen der Nachhaltigkeit ist zudem von Vorteil, dass die Sublimation ohne die Verwendung von Lösungsmitteln auskommt. Die Akkumulation von Naturstoffen im Sublimat stellt einen recht spezifischen Vorgang dar, weshalb die Sublimation bei der Untersuchung von natürlichen Materialien neue Erkenntnisse liefern könnte. Die Methode sollte jedoch nicht als Konkurrenz zur Extraktion, sondern mehr als Ergänzung im Repertoire der Naturstoffchemie angesehen werden.

### 3.3 Trennverfahren für Naturstoffe

Naturstoffextrakte werden in den meisten Fällen durch verschiedene Trennverfahren in Fraktionen aus kleineren Stoffgemischen und Einzelsubstanzen unterteilt. Im Idealfall kann so eine Wirkung, die zum Beispiel ein traditionelles Heilmittel über viele Jahrhunderte hinweg erzielen konnte, durch eine gezielte Auftrennung auf einen Inhaltsstoff zurückgeführt werden. Die verschiedenen Techniken, die dabei verwendet werden, können in zwei Kategorien unterteilt werden. Die Flüssig-Fest- und die Flüssig-Flüssig Isolationstechniken werden heutzutage beide regelmäßig genutzt, um Vielstoffgemische aufzutrennen. Ihre Namen sind auf die Aggregatzustände der Trennphasen zurückzuführen. In den meisten Fällen reicht die Anwendung eines einzigen Trennverfahrens nicht aus und eine Kombination der hier diskutierten Techniken muss verwendet werden.

#### 3.3.1 Flüssig-Fest Isolationstechniken

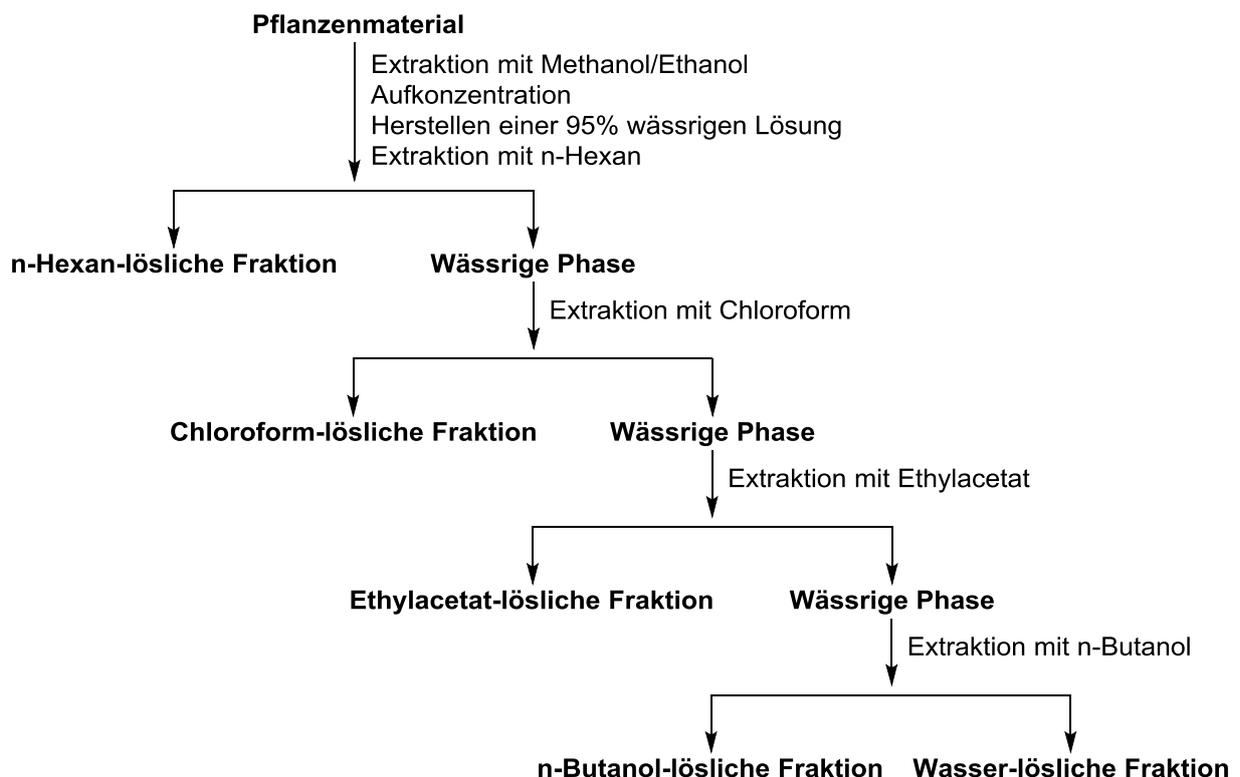
Alle Flüssig-Fest Isolationstechniken gehören zu den chromatographischen Trennverfahren. Diese Verfahren beruhen auf Wechselwirkungen der Analyten mit einer festen (stationären) Phase und einer flüssigen (mobile) Phase. Substanzen werden je nach Material der stationären Phase entweder anhand ihrer Polarität, Größe oder Ladung aufgetrennt. Dementsprechend wird zwischen Adsorptions-, Größenausschluss- und Ionenchromatographie unterschieden. Die Wahl der mobilen Phase hat einen großen Einfluss, da sie die Wechselwirkung der Naturstoffe mit der festen Phase schwächen oder begünstigen kann. Die wohl am meisten verwendete Technik bei der Auftrennung von Naturstoffgemischen ist die Säulenchromatographie (SC). Für eine Säulenchromatographie wird eine Säule, im Laboralltag meist aus Glas, mit einer stationären Phase beladen. Diese wird daraufhin mit der gewünschten mobilen Phase gesättigt. Ein zu trennendes Stoffgemisch wird oben auf die Säule gegeben und kontinuierlich mit der mobilen Phase durch die feste Phase geleitet. Die Analyten gelangen abhängig von ihrer Affinität zur stationären Phase und ihrer Löslichkeit im Lösungsmittel unterschiedlich schnell durch die Säule und können so getrennt voneinander gesammelt werden. Die meist verwendete stationäre Phase ist Silikagel. Es gehört zu den polaren stationären Phasen der Adsorptionschromatographie, die auch als Normalphasen (NP) bezeichnet werden. Schätzungen zufolge werden fast 90% der präparativen Trennungen von Naturstoffen mit Kieselgel durchgeführt. Es wechselwirkt aufgrund seiner polaren Hydroxygruppen vorwiegend mit polaren Naturstoffen, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol Wechselwirkungen mit dem Silikagel interagieren.<sup>19</sup> So fraktionierten Rather et al. (2013) die Methanol-, Methanol-Wasser- (1:1) und Wasserextrakte des Arznei-Engelwurz (*Angelica archangelica*) unter Verwendung von Kieselgel als stationärer Phase ihrer Flash Chromatographie.<sup>69</sup> Die Flash Chromatographie (FC) ist eine sehr häufig verwendete Abwandlung der SC. Dabei wird die mobile Phase samt Analyten mit Gasdruck durch die Säule gedrückt, was eine schnellere Trennung und bessere Auflösung mit sich bringt.<sup>38</sup> So gelang es Yu et al. (2013), mit einer Silikagel basierten FC Heteroclitin D aus *Kadsurae Caulis* zu isolieren.<sup>70</sup>

Die FC ist aufgrund ihrer einfachen Handhabung, günstigen Anschaffung und großer Verfügbarkeit eine sehr beliebte Methode zur ersten Fraktionierung von Extrakten und simplen Isolierung von Einzelsubstanzen. Es finden jedoch noch weitere Variationen der klassischen SC Anwendung. Die Niederdruckflüssigkeitschromatographie (eng. low pressure liquid chromatography (LPLC)) wird ohne oder mit geringem Überdruck verwendet. Zheleva-Dimitrova et al. (2016) verwendeten die LPLC zur Auftrennung von Methanolextrakten von Blättern und Wurzeln der *Geigeria alata* und konnten acht Fraktionen aus 1 g Trockenextrakt generieren.<sup>71</sup> Sie wählten dazu eine unpolare Octadecyl-Phase (C18-Phase), die in der Adsorptionschromatographie als Umkehrphase (eng. reversed phase (RV)) bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um ein funktionalisiertes Silikagel, dessen Hydroxygruppen mit C-18 Resten modifiziert wurden. Neben der FC und LPLC ist die Vakuumflüssigkeitschromatographie (eng. Vacuum Liquid Chromatography (VLC)) eine Technik der Wahl, wenn große Probenmengen mit geringem Kostenaufwand getrennt werden sollen.<sup>72</sup> So trennten Erhirhie et al. (2019) 6.5 g einer Ethylacetat Fraktion eines Ethanol-Wasser (1:5) Extraktes des Echten Wurmfarns (*Dryopteris filix-mas*) mit der VLC in 17 weitere Fraktionen und konnten so die entzündungshemmende Wirkung genauer zurückverfolgen.<sup>73</sup> Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie, auch Hochleistungschromatographie (HPLC) genannt, ist aufgrund der benötigten technischen Ausrüstung deutlich teurer in der Anschaffung und kann im Vergleich mit FC, LPLC und VLC weniger Probenmaterial in einem Durchlauf auftrennen. Sie wird aufgrund ihrer sehr guten Trennleistung und hohen Reproduzierbarkeit jedoch immer häufiger zur Auftrennung von Naturstoffgemischen und zur Isolation reiner Substanzen verwendet. Atlabachew et al. (2017) nutzen die hohe Trennleistung der präparativen Hochdruckflüssigkeitschromatographie, um Cathin, Cathinon und (-)-Norephedrin aus einem Gemisch von Oxalat Salzen, die aus einem Extrakt des Kathstrauchs (*Catha edulis Forsk*) gefällt wurden, zu gewinnen.<sup>74</sup> Shi et al. (2019) gelang mittels HPLC die Isolation von acht Verbindungen aus dem Schwarzen Nachtschatten (*Solanum nigrum L.*), wovon fünf Substanzen das erste Mal entdeckt wurden. Für die erste Trennung verwendeten sie eine C18-Säule, zur weiteren Auftrennung eine Toyopearl® HW-40F Säule.<sup>75</sup> Diese polymerbasierte stationäre Phase funktioniert nach dem Prinzip des Größenausschlusses, einem häufig verwendeten Mechanismus der fest-flüssig Isolationstechnik. Die Größenausschlusschromatographie (eng. size exclusion chromatography (SEC)) wird dabei wesentlich öfter verwendet als die Membranfiltration (MF). In der MF können kleinere Moleküle eine semipermeable Membran durchdringen, während größere Verbindungen zurückgehalten werden. Je nach Porengröße der Membran wird von Mikro- Ultra- oder Nanofiltration gesprochen. Sitanggang et al. (2020) verwendeten Ultrafiltrationsmembranen um bioaktive Proteine aus Fermentationsbrühen von Sojabohnen (*Glycine max*) abzutrennen.<sup>76</sup> Mit der Verwendung von neun Nanofiltrationsmembranen gelang es Yammine et al. (2019) Anthocyane von größeren und kleineren Verunreinigungen aus Traubentrestereextrakten zu trennen.<sup>77</sup> Je nach Anzahl und Typ der verwendeten Membranen können also unterschiedliche Substanzklassen gewonnen werden. Die SEC wird aufgrund ihrer Anwendbarkeit in allen fest-flüssig Chromatographietechniken wie erwähnt häufiger benutzt. Ovchinnikov et al. (2020) gelang es mit einer Sephadex® LH-20 Säule die Polyphenol Fraktion eines Blasentang (*Fucus vesiculosus*) Extraktes in sechs Fraktionen zu unterteilen. Dazu verwendeten sie einen einfachen SC Aufbau.<sup>78</sup> Auch Wang et al. (2020) nutzten zwei SC mit zwei unterschiedlichen SEC Phasen bei ihrer Isolation von Polysacchariden aus einem Seitling (*Pleurotus ferulae*) Extrakt.<sup>79</sup> They et al. (2020) verwendeten in ihrer Studie zu Brokkoli (*Brassica oleracea var. italica*) Samen eine Kombination aus Ionenaustauschchromatographie (IC) und HPLC-SEC, um ein Protein mit starker antimykotischer Wirkung zu isolieren.<sup>80</sup> Die IC trennt Analyten anhand ihrer Ladung. Ihr Einsatz ist deshalb auf geladene oder ionisierbare Naturstoffe beschränkt. Damotharan et al. (2015) nutzen den schwach basischen Anionentauscher Diethylaminoethylcellulose zur Isolation eines Giftproteins der Schnabelköpfigen Seeschlange

(*Enhydrina schistosa*).<sup>81</sup> Eine der neuesten Techniken zur Auftrennung von Naturstoffgemischen ist die Simulated Moving Bed (SMB) Chromatographie. Sie verwendet mehrere Säulen mit stationären Phasen. Es wird dabei ein Gegenstrom der Festphase durch das Umschalten von Ventilen, die periodisch den Einlass und Auslass umschalten, simuliert. Der SMB Prozess ist ein kontinuierliches leistungsfähiges Trennverfahren, um im großen Maßstab Naturstoffe zu trennen.<sup>19</sup> Li et al. (2020) verwendeten die SMB Chromatographie, um Flavonoide aus dem ethanolischen Extrakt (70%) von Abfällen des Tatarischen Buchweizens (*Fagopyrum tataricum*) abzutrennen. Ihr Prozess lieferte sehr gute Ergebnisse und könnte auch auf andere Abfallprodukte angewandt werden.<sup>82</sup>

### 3.3.2 Flüssig-Flüssig Isolationstechniken

Flüssig-flüssig Isolationstechniken arbeiten mit zwei flüssigen Phasen. Die Triebkraft sind Konzentrationsunterschiede der Analyten in den zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten. Substanzen werden entsprechend ihrer Verteilungskoeffizienten aufgetrennt. Die einfachste, aber immer noch sehr häufig angewandte Methode ist dabei die Flüssig-Flüssig Extraktion. Dabei werden wässrige Extrakte oder mit Wasser mischbare Extrakte organischer Lösungsmittel mit Lösungsmitteln extrahiert, welche nicht mischbar mit Wasser sind (**Abbildung 3.2**). Die mit Wasser mischbaren Extrakte werden dabei vor der Extraktion mit Wasser verdünnt bis sie zu circa 95% wässrig sind. Die Extraktionen werden meist durch schütteln der zwei unmischbaren Lösungsmittel in einem Schütteltrichter durchgeführt. Die Polarität der Extraktionsmittel wird mit jedem Extraktionsschritt höher gewählt. Diese Methode steht oft am Anfang von Isolationsversuchen um Stoffgruppen grob voneinander zu trennen.<sup>83</sup>



**Abbildung 3.2** Schema einer Flüssig-flüssig Extraktion zur Herstellung erster Fraktionen aus Pflanzenextrakten (nach Xiao et al., 2013)<sup>83</sup>

Hung et al. (2018) nutzen das Verfahren, um ein Ethanolextrakt des Zitroneneukalyptus (*Corymbia citriodora*) in drei grobe Fraktionen zu unterteilen. Es gelang ihnen dadurch, Flavonoide in ihrer Ethylacetatfraktion anzureichern und von anderen Stoffen zu trennen.<sup>84</sup> Ugorji et al. (2019) stellten

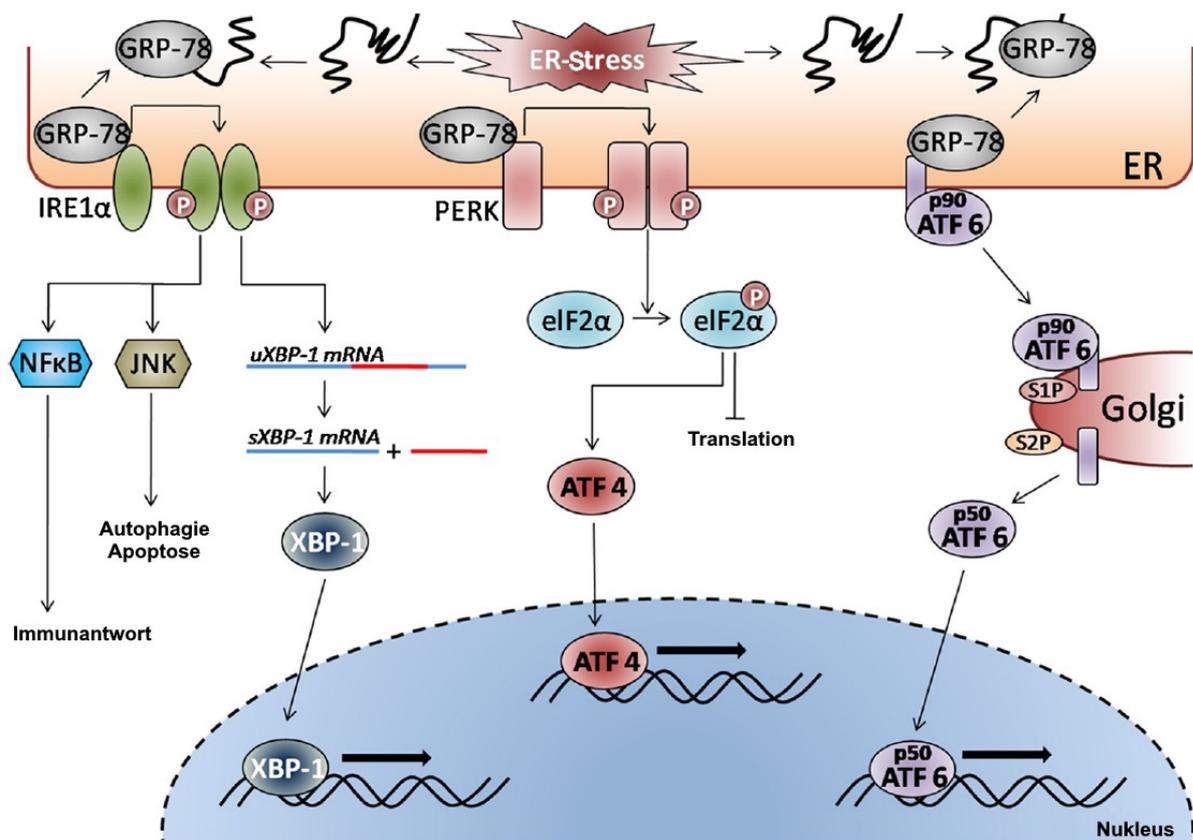
durch eine einfache Flüssig-flüssig Extraktion drei Fraktionen eines Methanolextraktes des *Sabicea brevipes Wernham* her und untersuchten diese auf ihre antioxidativen Eigenschaften.<sup>85</sup> Teixeira et al. (2020) konzentrierten ihre Untersuchungen auf die Butanolfraction eines wässrigen Extraktes des *Cecropia hololeuca*, da die dort angereicherten Flavonoide eine gute schmerzlindernde und antivirale Wirkung zeigten.<sup>86</sup> Die Verteilungschromatographie bietet im Vergleich zur einfachen Flüssig-Flüssig Extraktion eine wesentlich höhere Trennleistung. Der Trennmechanismus ist der gleiche und beruht auf der relativen Löslichkeit in zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln. Die am häufigsten verwendeten Techniken sind heutzutage die zentrifugale Verteilungschromatographie (eng. centrifugal partition chromatography (CPC)), die Hochgeschwindigkeits-Gegenstromchromatographie (eng. high speed counter current chromatography (HSCCC)) und die Hochleistungs-Gegenstromchromatographie (eng. high performance counter current chromatography (HPCCC)). Alle diese Methoden werden zur Gegenstromchromatographie (eng. counter current chromatography (CCC)) gezählt und werden in hydrodynamische (HSCCC, HPCCC) und hydrostatische (CPC) Verfahren unterteilt. Im Vergleich zur chromatographischen Trennung mit festen stationären Phasen bieten diese Techniken mehrere Vorteile. So stellen irreversible Adsorptionen, Peak Tailing und Proben Denaturierung keine Probleme mehr dar. Weiter Vorteile sind hohe Ladekapazitäten, hohe Proben Rückgewinnung und geringer Lösungsmittelverbrauch.<sup>19,83</sup> Die Effizienz einer HPLC wird von den CCC Techniken zwar nicht erreicht, dies wird jedoch durch ihre hohe Selektivität und dem hohem Verhältnis von stationärer zu mobiler Phase (bis zu 80% stationäre Phase) ausgeglichen.<sup>38</sup> Dies spiegelt sich auch in der häufigen aktuellen Anwendung wieder. So verwendeten Shrestha et al. (2020) und Dias et al. (2020) erst kürzlich die CPC, um Extrakte zweier Braunalgen (*Phaeophyceae*) aufzutrennen. Es gelang ihnen, die biologisch aktiven Substanzen (-)-Loliolide (Dias) und Eckol (Shrestha) zu isolieren.<sup>87,88</sup> Auch die HSCCC findet häufig Anwendung in der Literatur. Zhu et al. (2020) isolierten fünf Flavonoid Glycoside, darunter zwei Epimer Paare, aus dem Ethanolextrakt von Blättern des Zimtapfels (*Annona squamosa*) mittels HSCCC.<sup>89</sup> Auch Abdin et al. (2020) konnten diese Technik nutzen, um gezielt drei Anthocyan-Diglucoside aus dem Ethanolextrakt von Schalen der Jambolanapflaume (*Syzygium cumini*) zu separieren.<sup>90</sup> Die neueste und schnellste CCC Methode, die HPCCC, konnte in jüngster Vergangenheit auch in einigen Studien überzeugen. Ochsenberger et al. (2019) entdeckten bei ihren Untersuchungen zur *Iris adriatica* eine antibakterielle Wirkung einer hergestellten Extrakt-Fraktion. Mittels HPCCC konnten sie mehrere Substanzen isolieren und die Wirkung auf 2,4,6-trihydroxy-4-methoxy-benzophenon zurückführen.<sup>91</sup> Grabarska et al. (2020) nutzen die HPCCC zur Isolierung von Imperatorin aus Arznei-Engelwurz (*Angelica archangelica*) und Xanthotoxin aus Pastinaken (*Pastinaca sativa*). Es gelang ihnen, Imperatorin in hoher Reinheit (98%) und guter Ausbeute (16%) in unter 25 Minuten aus dem Methanolrohextrakt zu gewinnen.<sup>92</sup>

### 3.4 Stress im Endoplasmatischen Retikulum

In fast allen tierischen Zellen findet sich ein komplexes Membransystem im Zytoplasma, welches eine Vielzahl an Aufgaben in den Zellen übernimmt. Dieses wird als endoplasmatisches Retikulum (ER) bezeichnet.<sup>93</sup> Übermäßige Proteinfehlfaltung oder die Anhäufung von defekten oder überflüssigen Proteinen ist für die Entstehung von Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) und die Aktivierung der ungefalteten Protein-Antwort (eng. unfolded protein response (UPR)) verantwortlich.<sup>94</sup> Übermäßiger ER-Stress kann zum Zelltod der betroffenen Zellen führen.<sup>95</sup> Um diesen zu vermeiden, besitzt die Zelle eine Reihe von Mechanismen, welche dem ER-Stress entgegenwirken. Drei Hauptwege sind dabei in die UPR involviert, welche die Expression von UPR-zugehörigen Genen regulieren und zelluläre Protein-Degradationswege aktivieren. Es handelt sich um das Inositol benötigende Enzym 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), die Protein Kinase RNA-ähnliche endoplasmatische

Retikulum Kinase (PERK) und den aktivierenden Transkriptionsfaktor 6 (ATF6). Diese Proteine teilen einige Funktionen, induzieren jedoch zusätzlich verschiedene Vorgänge in der Zelle, wie in **Abbildung 3.3** gezeigt ist.<sup>14</sup>

Die Freisetzung des ER-Chaperons GRP-78 von IRE1 $\alpha$  ist eine Folge der Akkumulation von nicht oder fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen. Chaperone sind Proteine, die neu synthetisierte Proteine bei der Faltung in ihre richtige Form unterstützen.<sup>96</sup> Die Freisetzung des GRP-78 aktiviert die Kinaseaktivität der IRE1 $\alpha$  bevor es zur Autophosphorylierung und Oligomerisierung des Proteins kommt.<sup>97</sup> Das aktivierte IRE1 $\alpha$  besitzt eine Endoribonuklease Aktivität, die für das alternative Spleißen der X-Box-Bindungsprotein 1 (XBP-1) mRNA verantwortlich ist.<sup>98</sup> XBP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher durch das alternative Spleißen der XBP-1 mRNA als 40 kDa XBP-1 s synthetisiert wird, anstatt in der 33 kDa XBP-1 u Isoform. Dieses Umschalten der XBP-1 Form reguliert die Transkription der ER Chaperone wie GRP-78 und anderer Proteine, die mit dem ER-assoziierten Proteinabbau (eng. ER-associated degradation (ERAD)) zusammenhängen.<sup>99</sup>



**Abbildung 3.3** Die drei Hauptwege, die ER-Stress erkennen und die UPR durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren XBP-1, ATF4 und ATF6 induzieren (nach Lukas et al., 2019)<sup>14</sup>

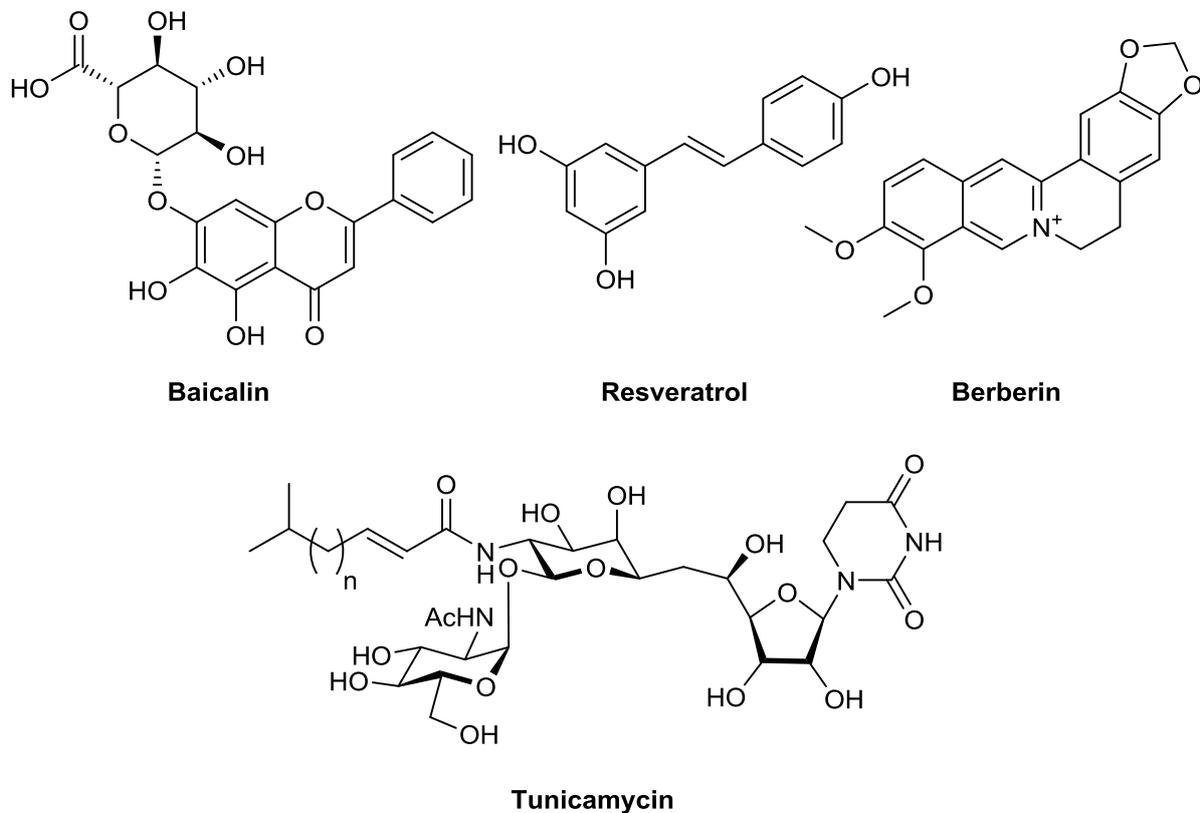
Durch die Interaktion des IRE1 $\alpha$  mit der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird zudem eine Autophagie bzw. eine pro-inflammatorische Immunantwort hervorgerufen.<sup>100,101</sup>

PERK ist eine Proteinkinase, die sich an der ER-Membran befindetet. Die Akkumulation fehl- oder entfalteter Proteine führt zur Freisetzung von ER-Chaperonen wie GRP-78 von PERK und verursacht die Autophosphorylierung des Proteins.<sup>102</sup> Durch die Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) deaktiviert PERK diesen und hemmt somit die Proteinsynthese der Zelle. Dies führt zu einer Verminderung des ER-Stresses, da weniger ungefaltete

Proteine vorliegen.<sup>103</sup> Nicht alle Proteinsynthesen werden durch die Deaktivierung des eIF2 $\alpha$  beeinflusst. Der Transkriptionsfaktor 4 (ATF4) wird kontinuierlich exprimiert und aktiviert die Transkription weiterer Proteine, welche unter anderem die Phosphorylierung des eIF2 $\alpha$  aufheben können. ATF4 kontrolliert zusätzlich die Transkription von Genen, die ER-Stress verhindern oder für die Resistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich sind. Der Transkriptionsfaktor C/EBP homologous protein (CHOP), dessen Produktion auch durch ATF4 reguliert wird, ist zudem in die Regulierung der Apoptose involviert.<sup>104-106</sup>

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors 6 (ATF6) ist direkt gekoppelt an die ER-Membran durch eine Transmembrandomäne. Durch die ER-Stress-induzierte Dissoziation des GRP-78 vom ATF6 (p90) wird der Transkriptionsfaktor zum Golgi Apparat transportiert. Hier findet die Abspaltung des Transmembran-Abschnittes durch die Proteasen S1P und S2P statt und ATF6 (p50) wird in das Cytosol abgegeben. Von dort transloziert es in den Zellkern und agiert als Transkriptionsfaktor für UPR und ERAD Mechanismen ähnlich zu XBP-1 und CHOP.<sup>107,108</sup>

ER-Stress ist die Ursache für verschiedene Arten von Herz- und Gefäßkrankheiten sowie Krankheiten des Magen-Darm-Trakts.<sup>15,14</sup> Einige Naturstoffe wurden bereits in medizinischen Untersuchungen auf ihre Wirkung bezüglich ER-Stress getestet und zeigten positive Effekte in den verwendeten Zellkulturen, indem sie auf die beschriebenen Zellfunktionen Einfluss nahmen. So hemmte das Triterpen Elatosid C aus *Aralia elata* ER-Stress assoziierte Apoptose Marker wie GRP-78, CHOP und JNK. Dies führte zu einer starken Reduzierung des ER-Stresslevels bei Hypoxie/Reoxygenations-induzierter Apoptose in H9c2-Kardiomyozyten.<sup>109</sup>



**Abbildung 3.4** Verschiedene ER-Stress-reduzierende Substanzen und der ER-Stress Auslöser Tunicamycin

Auch Polyphenole wie Resveratrol und das Flavonoid Baicalin (**Abbildung 3.4**) zeigten in verschiedenen Zellkulturen eine ER-Stress lindernde Wirkung.<sup>110,111</sup> Baicalin reduzierte die ER-Stress-induzierte Apoptose, welche durch Tunicamycin in kultivierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

hervorgerufen wurde. Tunicamycin (**Abbildung 3.4**) ist eine Mischung homologer Nukleosid-Antibiotika, die in Zellkulturtests dazu genutzt wird, ER-Stress zu erzeugen.<sup>111</sup> Resveratrol verhinderte die Apoptose und Hypertropie in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten durch eine Reduzierung der Translation verschiedener ER-Stress Proteine.<sup>110</sup> Auch Alkaloide wie das Isochinolinalkaloid Berberin (**Abbildung 3.4**) zeigten vielversprechende Ergebnisse in einigen ER-Stress bezogenen Untersuchungen.<sup>112</sup> Berberin verhinderte die Phosphorylierung der PERK und des eIF2 $\alpha$  und die Expression des ATF4 und CHOP in Herzgewebe. Dies führte sowohl bei *in vivo* als auch *in vitro* Experimenten zu einem reduzierten ER-Stresslevel, dass sich unter anderem in einer verringerten Apoptose und verringertem oxidativem Schaden darstellte.

Die Suche nach weiteren Naturstoffen, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu den aufgezeigten Substanzen aufweisen, könnte vielversprechende Ergebnisse bei der Bekämpfung von ER-Stress liefern.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Materialien und Methoden

#### 4.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Lösungsmittel waren von LC/MS, HPLC oder GC Qualität und wurden bei Fisher Chemical (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gekauft. Die Standards von *Cis*-7-hexadecenoic acid ( $\geq 98\%$ ) und Palmitoleinsäureethylester ( $\geq 95\%$ ) wurden von VWR (VWR International, Vienna, Österreich) erhalten. Weitere Standardsubstanzen wie (+)-Catechin, *trans*-p-Cumarsäure, (-)-Epicatechin, Myristinsäureethylester, 2-Äpfelsäuremethylester, Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure, Palmitoleinsäure, Phenethyl hexanoate ( $\geq 97\%$ ), Ölsäure ( $\geq 99\%$ ), Tetradecan und *cis*-Vaccensäure wurden bei Sigma-Aldrich gekauft. Ethyl *trans*-4-decenoate ( $> 98\%$ ) und *cis*-3-hexen-1-yl hexanoate ( $> 98\%$ ) wurden von TCI (TCI Germany, Eschborn, Deutschland) erhalten. Alle weiteren Standardsubstanzen wie Äpfelsäure (99%/Supelco), Ascorbinsäure (99%/Supelco), (+)-Catechin (99%/Sigma-Aldrich), (-)-Chinasäure (98%/Merck), Fumarsäure (99%/Supelco), Isorhamnetin ( $\geq 99\%$ /Fluka), Kaffeesäure ( $\geq 98\%$ /Sigma-Aldrich), Quercetin ( $\geq 95\%$ /Sigma-Aldrich), Quercetin 3-O-Glucosid ( $\geq 90\%$ /Sigma-Aldrich), Quercetin 3-O-Rutinosid ( $\geq 94\%$ /Sigma-Aldrich) und Zitronensäure (99.5%/Sigma-Aldrich) waren schon im Arbeitskreis vorhanden und wurden nach einer Reinheitskontrolle für diese Arbeit verwendet. Kieselgel wurde von Sigma-Aldrich gekauft (technical grade, pore size 60 Å, 230–400 mesh part. Size, 40–63  $\mu\text{m}$  particle size).

#### 4.1.2 Probenmaterial

Der Großteil des Probenmaterials wurde vom Landesforschungsinstitut für Fischerei und Landwirtschaft Mecklenburg-Vorpommern (LFA MV) durch Herrn Dr. Frank Hippauf bereitgestellt und auf dessen Versuchsfeldern in Gülzow-Prüzen angebaut und geerntet. Im Einzelnen handelte es sich dabei um die reifen Früchte des Sanddorns (*Hippophae Rhamnoides*), der Apfelbeere (*Aronia melanocarpa*), des Gemeinen Bocksdorns (*Lycium barbarum*) und der Kornelkirsche (*Cornus Mas*). Es wurden vier unterschiedliche Sorten von Sanddornbeeren zur Verfügung gestellt. Diese waren die Habego (HBG), Otradnaja (OTR), Trofimovskaja (TRO) und eine unbekannte Sorte, die ursprünglich aus den Alpen stammt (ALP). Die Beeren wurden in den Jahren 2016 (HBG-I), 2017 (ALP, OTR, TRO) und 2018 (HBG-II) geerntet. Die Apfelbeeren zählten zur Sorte Viking, die Kornelkirsche zur Albrechts Frühe und die Sorte des Gemeinen Bocksdorns war unbekannt. Die Kirschen und Bocksdornbeeren wurden 2015 geerntet, die Apfelbeeren 2017. Neben den Früchten dieser Pflanzen wurden außerdem die Blätter und Rinde des Sanddorns von der LFA MV bereitgestellt. Beides wurde 2017 bei der Ernte der Sanddornbeeren zusätzlich erhalten und gehörte zur Sorte Rori. Das Pflanzenmaterial wurde nach der Ernte sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und die Kühlung wurde bis zur weiteren Verarbeitung aufrecht erhalten.

#### 4.1.3 Probenvorbereitung

##### *Pflanzenmaterial*

Feuchtes Pflanzenmaterial wurde zunächst einer Gefriertrocknung unterzogen. Dazu wurden die Pflanzenteile mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und an der Gefriertrocknungsanlage VaCo 2 (ZIRBUS technology, Bad Grund, Deutschland) für mindestens 48 h bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Probenmaterial mit der Mikrofeinmühle MF 10 von

IKA (IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland) oder mit einer handelsüblichen Kaffeemühle (ANMER CG 8120) zerkleinert. Die Früchte der erhaltenen Pflanzen wurden dabei mit der Kaffeemühle zerkleinert. Für die restlichen Pflanzenorgane wurde die Mikrofeinmühle verwendet. Der Durchmesser des Probenmaterials betrug somit maximal 1 mm. Die getrockneten und zerkleinerten Früchte wurden vor der Extraktion durch zweistündiges Kochen unter Rückfluss mit Heptan im Verhältnis 25:1 (ml/g) entfettet. Das entfettete Material wurde nach Beendigung des Vorgangs abfiltriert und mit einer geringen Menge kalten Heptans gewaschen. Die Trocknung der entfetteten Beeren erfolgte anschließend am Rotationsverdampfer (40 °C, <10 mbar, 1 h). Alle Weiteren untersuchten Pflanzenorgane wurden vor ihrer Extraktion nicht entfettet.

#### 4.1.4 Extraktion

Von den vorbereiteten Pflanzenorganen wurden folgende extrahiert: Die Sanddornbeeren HBG-I, OTR, TRO und ALP, die Apfelbeere, die Kornelkirsche, die Sanddornblätter und -rinde. Dabei wurde eine zwei-Stufen-Methode verwendet. Im ersten Schritt wurde das Probenmaterial mit dem Extraktionsmittel in Teflonbehälter gefüllt und über 25 Minuten im Ultraschallbad Typ RK52 (Bandelin, SONOREX, Berlin, Deutschland) einer Ultraschallextraktion unterzogen. Daraufhin erfolgte eine Mikrowellenextraktion über zehn Minuten (fünf Minuten Aufwärmphase) unter Verwendung der Labormikrowelle CEM Mars 240/50 (CEM Corporation, Matthews, USA). Das Lösungsmittel-zu-Feststoff-Verhältnis belief sich, soweit nicht anders beschrieben, für jede Extraktion auf 25:1 (ml/g). Die Extraktionstemperatur betrug 60°C. Die Bestimmung des Feststoffgehaltes von 1 ml Extrakt erfolgte mit Hilfe eines Abdampfblockes. Das Lösungsmittel wurde dabei unter Argon bei 40-60°C bis zur Gewichtskonstanz entfernt. Der Feststoffgehalt wurde für jedes Extrakt fünfmal bestimmt.

#### *Extrakte für Sublimationsversuche*

Für die Extrakte, die in den Sublimationsversuchen untersucht wurden, sind je 10 g des getrockneten und zerkleinerten Pflanzenmaterials der Habego Sanddornbeeren (HBG-II) extrahiert worden. Auf eine 15-minütige Ultraschallextraktion folgten drei 15-minütige (fünf Minuten Aufwärmphase) Mikrowellenextraktionen. Hierbei erfolgte nach jeder Mikrowellenextraktion der Austausch des Lösungsmittels. Das Lösungsmittel-zu-Feststoffverhältnis blieb über die Extraktionen hinweg konstant bei 25:1 (ml/g). Die Extraktionstemperatur variierte je nach verwendetem Lösungsmittel (Tab. 5.17). Im Anschluss sind die erhaltenen Extrakte kombiniert und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bis zur Trockene eingengt worden. Die Lagerung der Trockenextrakte erfolgte bei -18 °C.

#### 4.1.5 Sublimationsversuche

##### *Direkte Sublimation aus Fruchtpulvern*

In einem 250-ml Rundhalskolben wurden je 2 g eines der hergestellten Fruchtpulver der Sanddornbeeren HBG-II, OTR, TRO und ALP und der Apfelbeere, der Bocksdornbeere und Kornelkirsche auf 90 °C erhitzt. Dazu wurde ein Öl-Bad mit Heizplatte verwendet. Der Rundhalskolben war mit einem Kühlfinger ausgestattet, der permanent auf 5 °C gekühlt wurde. Der Druck wurde während der Sublimation unter 0.1 mbar gehalten. Nach sechs Stunden wurde die Sublimation gestoppt. Der Niederschlag auf dem Kühlfinger wurde mit 3 ml Methanol abgespült. Die Lösungen wurden mittels HPLC-ESI-MS vermessen und bei 4 °C gelagert. Alle Fruchtpulver wurden in dreifacher Ausführung auf diese Weise mittels Sublimation untersucht.

### *Sublimation aus HBG-II Trockenextrakten*

Die Trockenextrakte wurden vor ihrer Verwendung für die Sublimationsversuche unter Hochvakuum ( $10^{-3}$  mbar) bei 60 °C für 1 h erneut getrocknet, um die Kontamination des Kühlfingers durch Blasenbildung zu vermeiden.

Die Sublimation wurde mit den Trockenextrakten auf die gleiche Weise wie mit den Fruchtpulvern durchgeführt. Es wurde lediglich die Sublimationsdauer auf 24 h erhöht und die Temperatur auf 60 °C gesenkt, um einer Dekomposition des Materials vorzubeugen. Die Sublimate der Trockenextrakte wurden außerdem mit 3 ml des Lösungsmittels vom Kühlfinger gelöst, welches zur Herstellung des Trockenextraktes verwendet wurde.

### *Direkte Sublimation aus HBG-II Sandornbeerenpulver*

In einem 250-ml Rundhalskolben wurden je 7 g des HBG-II Sanddornbeerenpulvers auf 80 °C erhitzt. Dazu wurde ein Öl-Bad mit Heizplatte verwendet. Der Rundhalskolben war mit einem Kühlfinger ausgestattet, der permanent auf 5 °C gekühlt wurde. Der Druck wurde während der Sublimation unter 0.1 mbar gehalten. Die Sublimation wurde nach vier Tagen gestoppt. Das entstandene Sublimat wurde mit 10 ml Methanol vom Kühlfinger gelöst und bei 4 °C gelagert. Dieser Vorgang ist zwölfmal in vier Wochen wiederholt worden, wobei jedes Mal frisches Beerenpulver verwendet wurde. Die Sublimat-Lösungen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingengt und das Trockensublimat bis zur Trennung mittels Säulenchromatographie bei 4 °C gelagert.

#### 4.1.6 Säulenchromatographische Trennung

Zur Auftrennung der erhaltenen Vielstoffgemische wurde die Säulenchromatographie verwendet. Als stationäre Phase diente in jedem Fall Kieselgel. Die Menge an verwendeter stationärer Phase hing von der Masse des zu trennenden Gemisches und der Schwere des Trennproblems ab. Als mobile Phase dienten die Lösungsmittel Heptan, Ethylacetat, Toluol, Methanol, Dichlormethan und Essigsäure. Die Zusammensetzung der mobilen Phase wurde durch das Anfertigen mehrerer Dünnschichtchromatographien (DC) vor Beginn der Säule ermittelt. Die Säulenchromatographie wurde als sogenannte Flash-Chromatographie durchgeführt. Das bedeutet, dass bei ihrer Durchführung die mobile Phase mit Überdruck durch die stationäre Phase geleitet wurde. Jede der Flash-Chromatographien wurde mit einem Argon Druck von 2–4 psi durchgeführt. Fraktionen wurden durch das Anfertigen von mehreren DC eingeteilt und anschließend am Rotationsverdampfer eingengt. Die Verbindungen auf den DC wurden mit Hilfe verschiedener Färbereagenzien sichtbar gemacht (Anhang, Kapitel 8.2).

### *Trennung des HBG-I 1-Butanolextraktes*

2.27 g des HBG-I 1-Butanolextraktes wurden in Methanol gelöst und 8 g Kieselgel hinzugegeben. Nach Abdampfen des Methanols wurde der trockene Slurry auf die vorbereitete Säule gegeben. Diese wurde zuvor mit einer Mischung aus 80 g Kieselgel und 10:1 Heptan/Ethylacetat gepackt. Das Extrakt wurde anschließend mit acht verschiedenen Lösungsmittelgemischen zu je 600 ml durch die Säule gespült. Diese bestanden zu verschiedenen Teilen aus Heptan (A), Ethylacetat (B) und Methanol (C). Die Reihenfolge war (A:B:C): 1. 10:1:0, 2. 2:1:0, 3. 20:10:1, 4. 5:5:1, 5. 5:5:3, 6. 4:5:5, 7. 1:5:5, 8. 0:0:1.

#### *Trennung Fraktion 10 des HBG-I 1-Butanolextraktes*

Fraktion 10 des HBG-I 1-Butanolextraktes entsprach einem 60 mg Substanzgemisch. Dieses wurde auf einer 12 g Kieselgel Säule mit einer mobilen Phase von 2:1 Heptan/Ethylacetat getrennt. Dazu wurden 210 ml der mobilen Phase verwendet.

#### *Trennung Fraktion 13 des HBG-I 1-Butanolextraktes*

Fraktion 13 des HBG-I 1-Butanolextraktes entsprach einem 239 mg Substanzgemisch. Dieses wurde auf einer 8 g Kieselgel Säule mit zwei Lösungsmittelsystemen aus Toluol (A) und Ethylacetat (B) getrennt. Das erste Eluentengemisch bestand aus 120 ml 5:1 A/B. Das Zweite aus 80 ml 1:3 A/B mit 0.5% Essigsäure.

#### *Trennung Fraktion 18 des HBG-I 1-Butanolextraktes*

Fraktion 18 des HBG-I 1-Butanolextraktes entsprach einem 261 mg Substanzgemisch. Dieses wurde auf einer 26 g Kieselgel Säule mit zwei Lösungsmittelsystemen aus Dichlormethan (A) und Methanol (B) getrennt. Dazu wurden 240 ml des ersten (5:1) und 225 ml des zweiten (2:1) Eluentengemisches verwendet.

#### *Trennung des HBG-II Direktsublimates*

400 mg Sublimat des HBG-II Sanddornbeerenpulvers wurden an 13 g Kieselgel unter Verwendung von vier Lösungsmittelgemischen aufgetrennt. Die Gemische bestanden aus Heptan (A), Ethylacetat (B) und Methanol (C) in den Verhältnissen A:B:C 1. 10:1:0, 2. 1:1:0, 3. 1:5:0 und 4. 0:1:1 mit jeweils 1% Essigsäure. Dabei wurden 300 ml von den Lösungsmittelgemischen eins und vier und 200 ml der Gemische zwei und drei verwendet.

#### 4.1.7 HPLC-ESI-MS Analyse

Die Analyse der hergestellten Proben erfolgte mit zwei HPLC-ESI-MS Systemen (Ultimate 3000™, LTQ XL™ /Finnigan Surveyor, LTQ) der Firma Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland), da die anfänglich genutzte LTQ aufgrund eines Defektes ausgemustert werden musste. Die Auswertung der Daten wurde mit der Software Xcalibur™ (Version 3.0.63) und Mass Frontier™ (Version 8.0.577.177) durchgeführt. Die ausgewerteten Daten wurden mit OriginPro® 2020 visualisiert. Zur Auftrennung der Substanzgemische wurde die Kinetex Phenyl-Hexyl Säule (150 x 2.1 mm, 2.6 µm, Phenomenex®) im HPLC System verwendet. Die Säule wurde auf 35 °C temperiert. Die mobile Phase bestand aus Methanol mit 0.1% (v/v) Ameisensäure (Eluent A) und Wasser mit 0.1% Ameisensäure (Eluent B) und wurde in einem Gradientensystem wie folgt verwendet: 0 min 60% B; 10 min 5% B; 20 min 5% B; 30 min 20% B; 35 min 60% B; 40 min 60% B. Die Flussrate betrug 150 µl/min und das Injektionsvolumen betrug 5 µl.

Der Massenspektrometer (MS) wurde sowohl im negativen als auch im positiven Scan-Modus betrieben. Der Bereich, in dem die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse ( $m/z$ ) detektiert wurden, erstreckte sich von 50–2000. Die weiteren Angaben können je nach verwendetem MS variieren, befinden sich aber in ähnlichen Bereichen: sweep gas flow: 10 arb. unit; auxiliary gas flow: 5 arb. unit; sheath gas flow: 35 arb. unit; capillary temperature: 275 °C; capillary voltage: -30.0 V; H-ESI source heater: 300 °C.

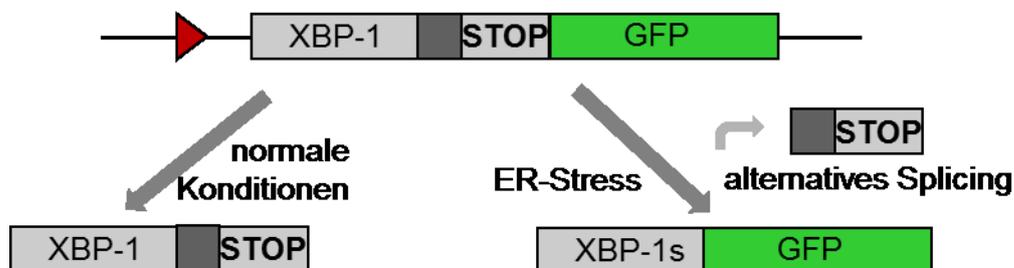
#### 4.1.8 NMR Analyse

Die  $^1\text{H}$ -Spektren (300.13 und 500.13 MHz) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (75.5 und 125.8 MHz) der analysierten Verbindungen wurden mit den Spektrometern AVANCE 300 und AVANCE 500 der Firma Bruker (Bruker Corporation, Billerica, USA) aufgenommen. Als Referenzsignale zur Bestimmung der chemischen Verschiebungen dienen die Signale der verwendeten Lösungsmittel (Aceton- $d_6$ :  $\delta^1\text{H} = 2.05$  ppm,  $\delta^{13}\text{C} = 29.8$  ppm; Acetonitril- $d_3$ :  $\delta^1\text{H} = 1.94$  ppm,  $\delta^{13}\text{C} = 118.3$  ppm;  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta^1\text{H} = 7.26$  ppm,  $\delta^{13}\text{C} = 77.0$  ppm; DMSO- $d_6$ :  $\delta^1\text{H} = 2.50$  ppm,  $\delta^{13}\text{C} = 39.7$  ppm). Die Zuordnung der NMR Signale wurde durch DEPT- und zwei-dimensionale (2D)  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY sowie  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC und  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektren unterstützt. Es wurden dabei die Standard Pulssequenzen verwendet.

#### 4.1.9 Evaluierung ER-Stress reduzierender Substanzen

Die Zellaktivitätstests, bezogen auf die Evaluierung des ER-Stresses, wurden durch M. Sc. Jana Marielle Modenbach durchgeführt. Frau Modenbach forschte in der Arbeitsgruppe von Dr. Matthias Sandler und arbeitete im Forschungslabor/Forschungscluster 3 der Universitätsmedizin Greifswald. Die Kooperation fand im Rahmen des PePPP Projektes statt.

Die ER-Stress-reduzierende Wirkung der Extrakte, Fraktionen oder Einzelsubstanzen wurde in einem speziell dafür entwickelten Zellsystem untersucht. Der ER-Stress wurde dabei durch die Zugabe von Tunicamycin induziert. Um das Stresslevel einschätzen zu können, wurde ein XBP-1s GFP (grün fluoreszierendes Protein) Fusionsprotein verwendet. Dazu wurden die mRNA der Zellen so verändert, dass diese unter ER-Stress das GFP herstellen, wodurch eine Fluoreszenz messbar wird. Unter normalen Bedingungen wird das GFP nicht gebildet, da dazu ein alternatives Spleißen der mRNA stattfinden muss, was nur unter ER-Stress der Fall ist (**Abbildung 4.1**). Die Intensität der Fluoreszenz gibt demnach an, wie sehr die Zellen unter Stress stehen.



**Abbildung 4.1** Mechanismus, der das Erkennen von ER-Stress ermöglicht (modifiziert und zur Verfügung gestellt von Dr. Matthias Sandler, Universität Greifswald, nach Iwawaki et al., 2013)<sup>113</sup>

Die Evaluierung der Substanzen im Zellsystem wurde immer auf die gleiche Weise durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden HEK-293T Zellen in einer 96-Well Platte ausgesät, wo diese über 24 h anwuchsen. Es folgte eine Transfektion mit Liposomen (Lipofektion), um die GFP kodierende mRNA in die Zellen einzuschleusen. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Tunicamycin behandelt. Die Extrakte, Fraktionen oder Einzelsubstanzen wurden zum gleichen Zeitpunkt (protektiver Versuchsaufbau) oder 24 h nach dem Tunicamycin (therapeutischer Versuchsaufbau) hinzugegeben. Die Intensität der Fluoreszenz der Zellen wurde bei der therapeutischen Behandlung der Zellen 2, 6, 24, 26, 30 und 48 h nach Zugabe des Tunicamycins gemessen. Bei der protektiven Behandlung wurde nach 2, 6, 24 und 48 h die Fluoreszenz der Zellen bestimmt. Die Proben wurden zwei- bis viermal getestet. In Kontrollversuchen wurden die Zellen zudem nur mit den Testsubstanzen oder Tunicamycin behandelt, um falsche Rückschlüsse zu vermeiden. Unbehandelte Zellen dienten als

Positivkontrolle, die Negativkontrolle wurde mit nicht transfizierten Zellen, welche mit Proben behandelt wurden durchgeführt. Die Fluoreszenz der Negativkontrollen nach zwei Stunden wurde als 100% festgelegt und stellt die Eigenfluoreszenz der Proben dar. Die Positivkontrolle (Ctr.) ist für jeden Versuch mit aufgeführt.

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit OriginPro® 2020. Alle Versuche mit mindestens drei Stichproben ( $n \geq 3$ ) wurde mittels Shapiro-Wilk-Test auf eine Normalverteilung der Daten überprüft. Die Signifikanzermittlung für Daten, für die somit eine Normalverteilung angenommen werden konnte, wurden daraufhin mittels ungepaarten t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0.05$  festgelegt. Daten für die keine Normalverteilung angenommen werden konnte, dazu gehören alle Versuche mit weniger als drei Stichproben ( $n < 3$ ), wurden mittels Mann-Whitney Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auch hier auf  $\alpha = 0.05$  festgelegt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Extraktions-Untersuchungen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Extraktionsversuche dargestellt und miteinander verglichen.

#### 5.1.1 Optimierung der Probenvorbereitung für Extraktionsuntersuchungen

Zu Beginn wurde der Einfluss der Gefriertrocknung und Zerkleinerung der Sanddornbeeren auf die Extraktion ermittelt. Dazu wurden Beeren der Sorte Habego aus dem Jahr 2017 (HBG-I) verwendet. Eine Menge von insgesamt 90.48 g frischer Sanddornbeeren verlor durch die Lyophilisierung über 32 h im Durchschnitt 83% ihres Gewichtes ( $n = 3$ , Anhang, Tab. 8.1). Das erhaltene Pulver kann in gleicher Weise wie die ungetrockneten Beeren in einer Zwei-Stufen-Extraktion verwendet werden, jedoch werden nur 17% des Nassgewichtes in Trockenform verwendet. Das Pflanzenmaterial wird zuerst für 25 Minuten einer Ultraschallextraktion unterzogen und anschließend fünf Minuten bei 60 °C in der Mikrowelle extrahiert. Als Extraktionsmittel wurde 80%iges Ethanol verwendet. Das Lösungsmittel-zu-Feststoff-Verhältnis betrug 25:1 (ml/g). Bei einem Vergleich der Feststoffgehalte (FG) der Extrakte von zerkleinerten und nicht zerkleinerten Sanddornbeeren zeigt sich, dass die Zerkleinerung der Beeren die Extraktionseffizienz um den Faktor 3.2 von 5.0 mg/ml auf 16.0 mg/ml erhöht (Tab. 5.1). Die Gefriertrocknung erhöht die Ausbeute der Extraktion weiter um 36% auf 21.8 mg/ml. Durch eine Entfettung des Pflanzenmaterials wurden die Zellwände der Beeren angegriffen, wodurch mehr Substanzen aus dem Innern der Zellen in das Lösungsmittel diffundieren konnten. Dies erhöhte die Ausbeute um weitere 25% auf 27.2 mg/ml. Die Bestimmung der FG wurde jeweils fünfmal durchgeführt (Anhang, Tab. 8.2)

**Tabelle 5.1**  $\phi$ -Feststoffgehalt (FG) der Ethanolextrakte (80%) der ganzen, zerkleinerten (zerkl.), zerkl. und getrockneten (tr.) und der zerkl. tr. entfetteten (entf.) Sanddornbeeren (HBG-I,  $n = 5$ )

|                    | Beeren, ganz | Beeren, zerkl. | Beeren, zerkl. tr. | Beeren, zerkl. tr. entf. |
|--------------------|--------------|----------------|--------------------|--------------------------|
| $\phi$ -FG (mg/ml) | 5.0          | 16.0           | 21.8               | 27.2                     |

Alle weiteren Extraktionen wurden, soweit nicht anders dargestellt, unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse mit gefriergetrocknetem zerkleinertem entfettetem Pflanzenmaterial durchgeführt.

#### 5.1.2 Zusammensetzung und biologische Aktivität der Sanddornbeerenextrakte

##### *HBG-I Extrakte*

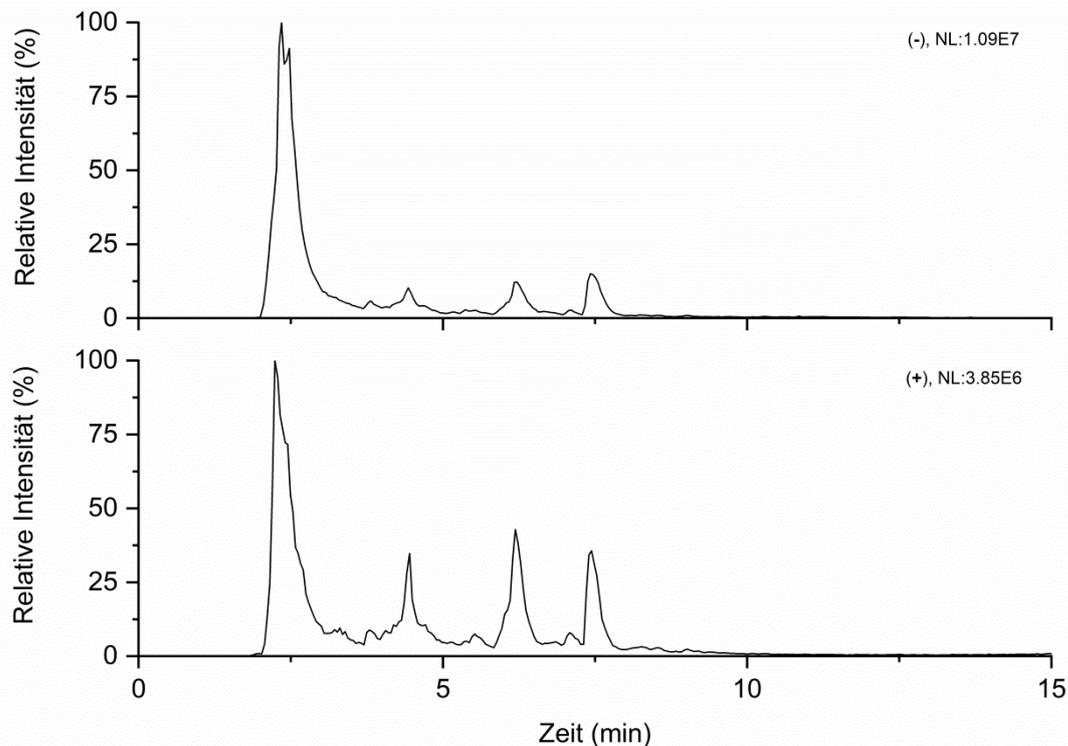
Da die Wahl des Lösungsmittels unmittelbaren Einfluss auf die Zusammensetzung eines Extraktes hat, wurden verschiedene Lösungsmittel verwendet, um HBG-I zu extrahieren. Der Fokus lag dabei auf polaren bis leicht unpolaren Flüssigkeiten wie Wasser, Ethanol, DMSO und Butanol. Lediglich für die Herstellung dieser Extrakte wurde nicht entfettetes Pflanzenmaterial verwendet, um potentielle unpolare Wirkstoffe nicht zu verlieren.

##### *Reinstwasserextrakt HBG-I*

Die Extraktion mit Wasser ist eine sehr häufig verwendete Methode zur Gewinnung von polaren Substanzen wie Zuckerderivaten, kleinen organischen Säuren oder geladenen Naturstoffen.<sup>114-116</sup> Der Vorteil von Wasser als Extraktionsmittel sind die einfache Verfügbarkeit und die nicht vorhandene Umwelt- und Gesundheitsschädlichkeit. Nachteile sind vor allem die hohe Verdampfungsenthalpie

(2257 kJ, 1 kg bei 100 °C)<sup>117</sup> und die Anfälligkeit gegenüber Mikroorganismen. Die Extrakte sollten daher schnell verarbeitet und bei sehr niedrigen Temperaturen (<-18 °C) gelagert werden.

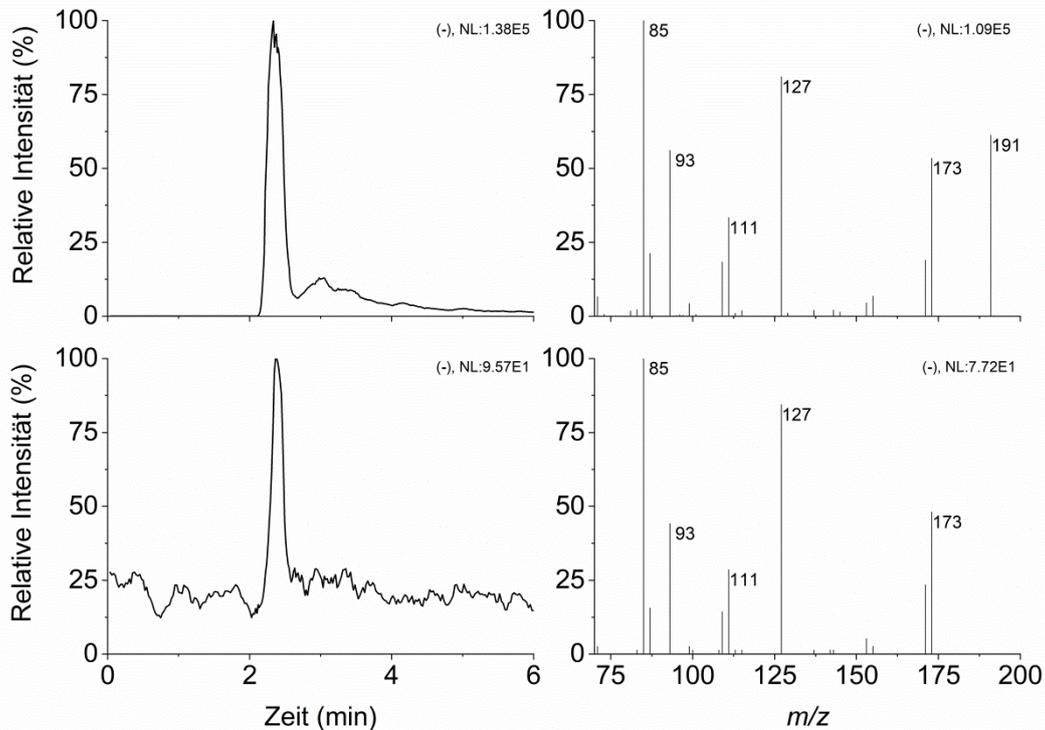
Die Extraktion des angefertigten Sanddornpulvers mittels Zwei-Stufen-Extraktion lieferte ein Extrakt mit einem Feststoffgehalt von 17.9 mg/ml. Eine automatische Peak Erkennung mittels Joint Components Detection (JCD) (Mass Froniter 8) (Anhang, Kapitel 8.1.1) ermittelte das Vorhandensein von 37 (neg. Scan-Modus = (-)) bzw. 43 Substanzen (pos. Scan-Modus = (+)) im wässrigen Auszug. In den (-) bzw. (+) Chromatogrammen werden Anionen bzw. Kationen detektiert. Dieses Ergebnis spiegelt zwar nicht die wirkliche Zusammensetzung des Extraktes wieder, gibt aber eine grobe Vorstellung davon, welche Substanzen hauptsächlich im Extrakt vorhanden sind. Hinzu kommt, dass durch die Anwendung der JCD auf weitere Extrakte ein Vergleich zwischen diesen möglich wurde. Das Chromatogramm des Reinstwasserextraktes weist einige sehr große Signale und viele kleine Signale auf, die meisten davon im Bereich der Retentionszeit (RT) 2–8 min (**Abbildung 5.1**).



**Abbildung 5.1** Total Ion Current (TIC) Chromatogramme des wässrigen HBG-I Extraktes. Der negative (-) und der positive (+) Scan-Modus werden gezeigt. Das Normalization Level (NL) gibt die Intensität des höchsten Peaks an

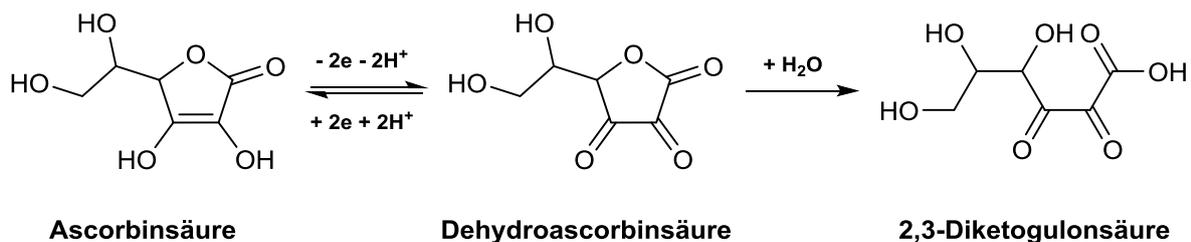
Die Polarität einer Verbindung hat den größten Einfluss auf ihr Retentionsverhalten auf der Trennsäule einer HPLC. Da die Untersuchungen mit einer unpolaren Säule, einer Umkehrphase (eng. reversed phase (RV)), durchgeführt wurden, finden sich im vorderen Bereich des Chromatogramms polare Substanzen wieder. Die Wechselwirkung zwischen polaren Verbindungen und unpolarem Säulenmaterial sind schwach und die polare mobile Phase, bestehend aus Wasser und Methanol mit 0.1% Ameisensäure, leitet die hydrophilen Substanzen schnell durch die Säule. Die Größe der Verbindungen spielt ebenfalls eine Rolle, da die Van-der-Waals Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und Analyt mit steigender Molekülgröße auch zunimmt, verlängert sich der Aufenthalt auf der Säule. Größere polare Moleküle eluieren demnach später als kleine polare Substanzen. Diese

Verhaltensweisen lassen sich im Chromatogramm (-) des HBG-I Reinstwasserextraktes gut erkennen. So finden sich unter dem größten Peak bei RT 2.4 min vor allem kleine organische Säuren wie Ascorbinsäure, Äpfelsäure, Chinasäure und Fumarsäure.



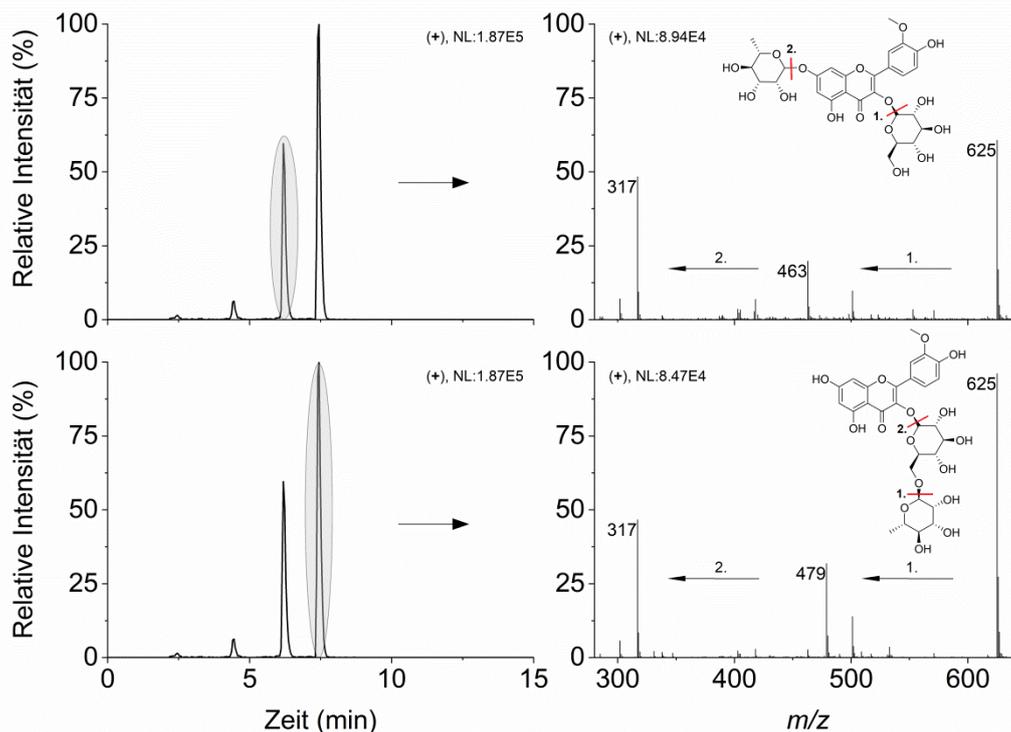
**Abbildung 5.2** Vergleich der Ergebnisse eines MS/MS Experimentes. Die Substanz mit dem  $m/z$  191 wurde mit einer Fragmentierungsenergie von 25% fragmentiert. Base Peak Chromatogramme des HBG-I Reinstwasserextraktes (oben) und der Ascorbinsäure (2 mmol/l) in Wasser (unten) und die dazugehörigen Massenspektren

Die Ascorbinsäure wurde durch Vergleich des Chromatogrammes und Massenspektrums des Extraktes mit denen der reinen Ascorbinsäure in wässriger Lösung als 2,3-Diketogulonsäure nachgewiesen (**Abbildung 5.2**). Das Fragmentierungsmuster der Substanz stimmt mit dem des Ascorbinsäurestandards fast komplett überein. Im Reinstwasserextrakt sind noch weitere Verbindungen mit dem  $m/z$  191 enthalten, welche bei der verwendeten Fragmentierungsenergie stabil sind, weshalb die 191 im Massenspektrum detektiert wurde. Die 2,3-Diketogulonsäure entsteht in wässrigen Lösungen durch die Oxidation der Ascorbinsäure und anschließende Hydrolyse der entstandenen Dehydroascorbinsäure (**Abbildung 5.3**).<sup>118</sup>



**Abbildung 5.3** Reaktion der Ascorbinsäure in wässrigen Lösungen zur 2,3-Diketogulonsäure

Bei RT 4.4 min konnte die Substanz Isorhamnetin-3-O-Sophorosid-7-O-Rhamnosid entdeckt werden. Sophorose besteht aus zwei Glucose Einheiten, die über eine  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 2 Bindung miteinander verknüpft sind. Das Isorhamnetin Derivat ist durch die drei Zucker im Molekül sehr polar, eluiert aufgrund seiner Größe jedoch etwas später als die kleineren organischen Säuren. Den Einfluss der Struktur auf das Elutionsverhalten wird besonders an den beiden Substanzen deutlich, die zu RT 6.2 min und 7.4 min detektiert wurden. Beide Verbindungen sind Derivate des Isorhamnetins und haben eine Molare Masse von 624.56 g/mol. Der Unterschied besteht in der Verknüpfung der Zuckereinheiten. Isorhamnetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid besteht aus Isorhamnetin verknüpft mit den Monosacchariden Glucose und Rhamnose. Isorhamnetin 3-O-Rutinosid besteht aus Isorhamnetin verknüpft mit dem Disaccharid, das aus Glucose und Rhamnose aufgebaut ist. Anhand der Fragmentierung im Massenspektrum lässt sich erkennen, dass das Rutinosid später eluiert. Die Abspaltung der Glucose, welches ein Fragment mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) von 463 erzeugt, ist nur für das Isorhamnetin mit den beiden Monosacchariden möglich. Dieses findet sich im (+) Chromatogramm bei RT 6.2 min (**Abbildung 5.4**). Die Konstitutionsisomere weisen also einen deutlichen Unterschied in ihrem Elutionsverhalten auf. Die Monosaccharide schirmen das unpolare Aglycon Isorhamnetin dabei anscheinend besser ab, als das Disaccharid, wodurch es schneller durch die Säule gelangt.



**Abbildung 5.4** Extracted-ion Chromatogram (XIC) des Reinstwasser HBG-I Extraktes. Das  $m/z$  625 wurde als Filter angewandt und nur Peaks, die diese  $m/z$  aufweisen, werden angezeigt. Die dazugehörigen Massenspektren von Isorhamnetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid (oben) und Isorhamnetin 3-O-Rutinosid (unten) zeigen die unterschiedliche Fragmentierung

Es konnten noch weitere Substanzen im Reinstwasserextrakt nachgewiesen werden. Dazu gehören noch weitere Glycoside des Isorhamnetins, Quercetins und Kaempferols. Es wurden außerdem auch einige  $m/z$  detektiert, die bisher noch nicht für Sanddornbeeren in der Literatur beschrieben wurden. Eine vollständige Liste der identifizierten Strukturen ist in Tabelle 5.2 zu sehen. Die Identifikation erfolgte

durch einen Vergleich mit bereits in der Literatur beschriebenen Inhaltsstoffen der Sanddornbeeren. Zudem wurden einige Standardsubstanzen vermessen und deren Retentionszeiten sowie Massenspektren mit Substanzen aus den Extrakten verglichen. Zusätzlich wurden MS<sup>n</sup>-Experimente durchgeführt und Fragmentierungsmuster zur Strukturanalyse ausgewertet.

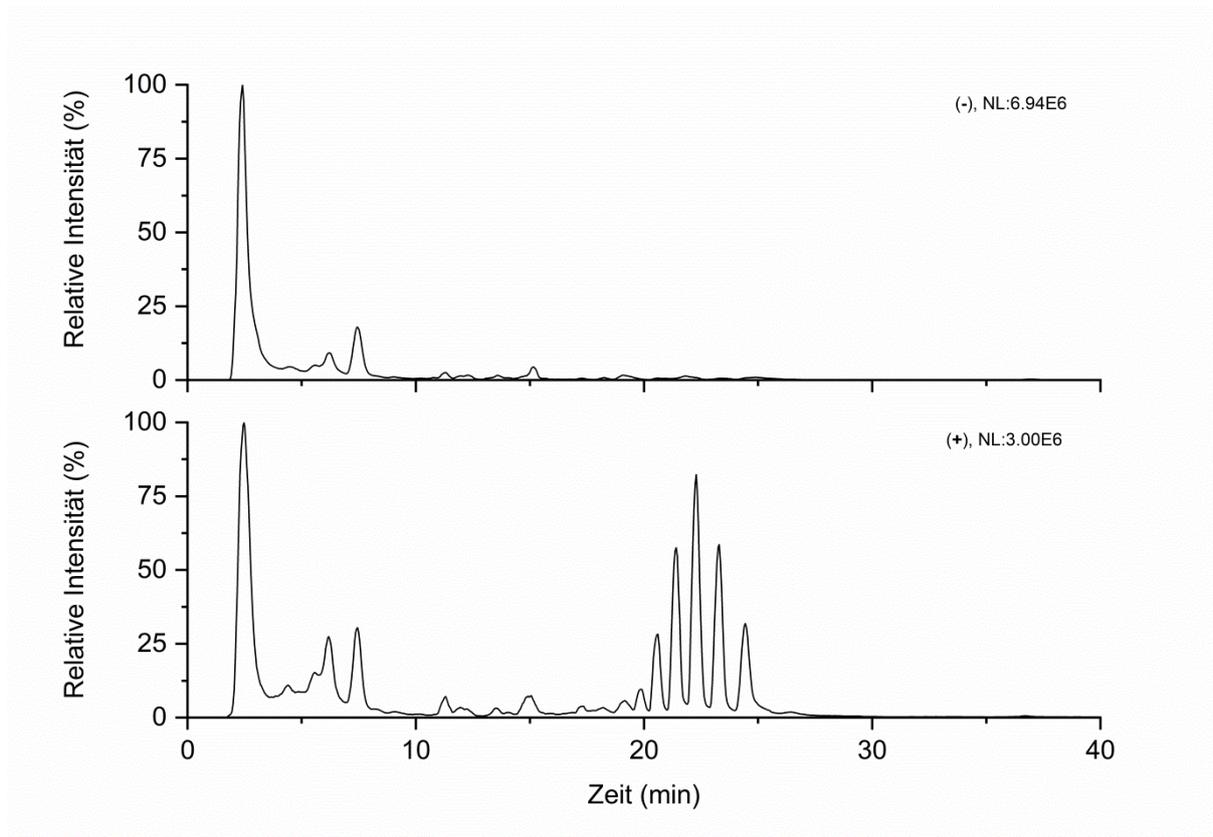
**Tabelle 5.2** Liste der identifizierten Strukturen des HBG-I Reinstwasserextraktes. (X<sup>S</sup> = durch Vermessung des Standards bestätigt; X<sup>M</sup> = durch MS<sup>n</sup>-Experimente untersucht)

| Bestimmte Struktur                                       | RT (min) | m/z <sup>+</sup> | m/z <sup>-</sup> | M (g/mol)    | Referenz               |
|--|----------|------------------|------------------|--------------|------------------------|
| Catechin (+)/(-)   | 2.2      | 291              |                  | 290.3        | 119-122                |
| Chinasäure <sup>S</sup>                                  | 2.3      |                  | 191              | 192.1        | 123,124                |
| Ascorbinsäure <sup>S, M</sup> (als 2,3-Diketogulonsäure) | 2.4      |                  | 191              | 176.1(192.1) | 123,125                |
| Äpfelsäure <sup>S</sup>                                  | 2.5      |                  | 133              | 134.1        | 123                    |
| Zitronensäure <sup>S</sup>                               | 2.8      |                  | 191              | 192.1        | 123,124                |
| Quercetin 3-O-Sophorosid-7-O-Rhamnosid                   | 3.9      | 795              |                  | 772.7        | 120,18,126,127,124     |
| Kaempferol   | 4.3      | 287              |                  | 286.2        | 128,124                |
| Kaempferol 3-O-Sophorosid-7-O-Rhamnosid                  | 4.3      | 779              | 755              | 756.7        | 120                    |
| Isorhamnetin 3-O-Sophorosid-7-O-Rhamnosid                | 4.5      | 809              | 785              | 786.7        | 120,18,126,127,124     |
| Quercetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid                     | 5.4      | 633              |                  | 610.5        | 120,18,126             |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid-7-O-Rhamnosid                 | 6.0      | 793              | 769              | 770.7        | 120,127                |
| Isorhamnetin 3-O-Sinapoylglucose-Glucosid-7-O-Rhamnosid  | 6.1      | 1015             | 991              | 992.9        | 18                     |
| Isorhamnetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid <sup>M</sup>     | 6.2      | 647              | 623              | 624.6        | 120,18,127,122,124,129 |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid-7-O-Rhamnosid                 | 6.3      | 793              | 769              | 770.7        | 120,127                |
| Quercetin 3-O-Rutinosid <sup>S</sup>                     | 6.5      | 633              | 609              | 610.5        | 120,18,126,124,122     |
| Quercetin 3-O-Glucosid <sup>S</sup>                      | 6.7      | 487              | 463              | 462.4        | 120,18                 |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid <sup>M</sup>                  | 7.5      | 625              | 623              | 624.6        | 120,18,126,127,122,124 |

### **Ethanolextrakt (80%) HBG-I**

Gemische von Wasser und Ethanol werden häufig verwendet, um Rohstoffe zu extrahieren. Mit steigendem Ethanolanteil werden vermehrt auch weniger polare Stoffe aus dem natürlichen Material gewonnen. Auf diese Weise werden Extrakte mit einem breiten Substanzvorkommen generiert, auch wenn die Ausbeute einzelner Substanzen mit reinem Wasser oder Ethanol höher liegen kann. Ein weiterer Vorteil des Ethanols ist die wesentlich längere Haltbarkeit der Extrakte, eine geringer Verdampfungsenthalpie und leichtere Handhabbarkeit aufgrund der geringen Viskosität im Vergleich zu Wasser.

Die Extraktion des angefertigten Sanddornpulvers mittels Zwei-Stufen-Extraktion mit Ethanol (80%) ergab ein Extrakt mit einem Feststoffgehalt von 27.2 mg/ml. Die JCD entdeckte 52 (-) bzw. 81 (+) Substanzen in den Chromatogrammen des Extraktes. In **Abbildung 5.5** sind die Chromatogramme dargestellt. Auffällig ist besonders der mittlere Bereich um die RT 10–30 min. Hier finden sich viele Peaks, die im wässrigen Extrakt nicht vorhanden waren. Das zeigt den starken Einfluss des Lösungsmittels. Das Ethanol löst viele Substanzen mit einer geringen Polarität, welche aufgrund der stärkeren Wechselwirkung mit der stationären Phase deutlich später eluieren als es bei den polaren Inhaltsstoffen des Reinstwasserextraktes der Fall war.



**Abbildung 5.5** TIC Chromatogramme des HBG-I Ethanolextrakt (80%)

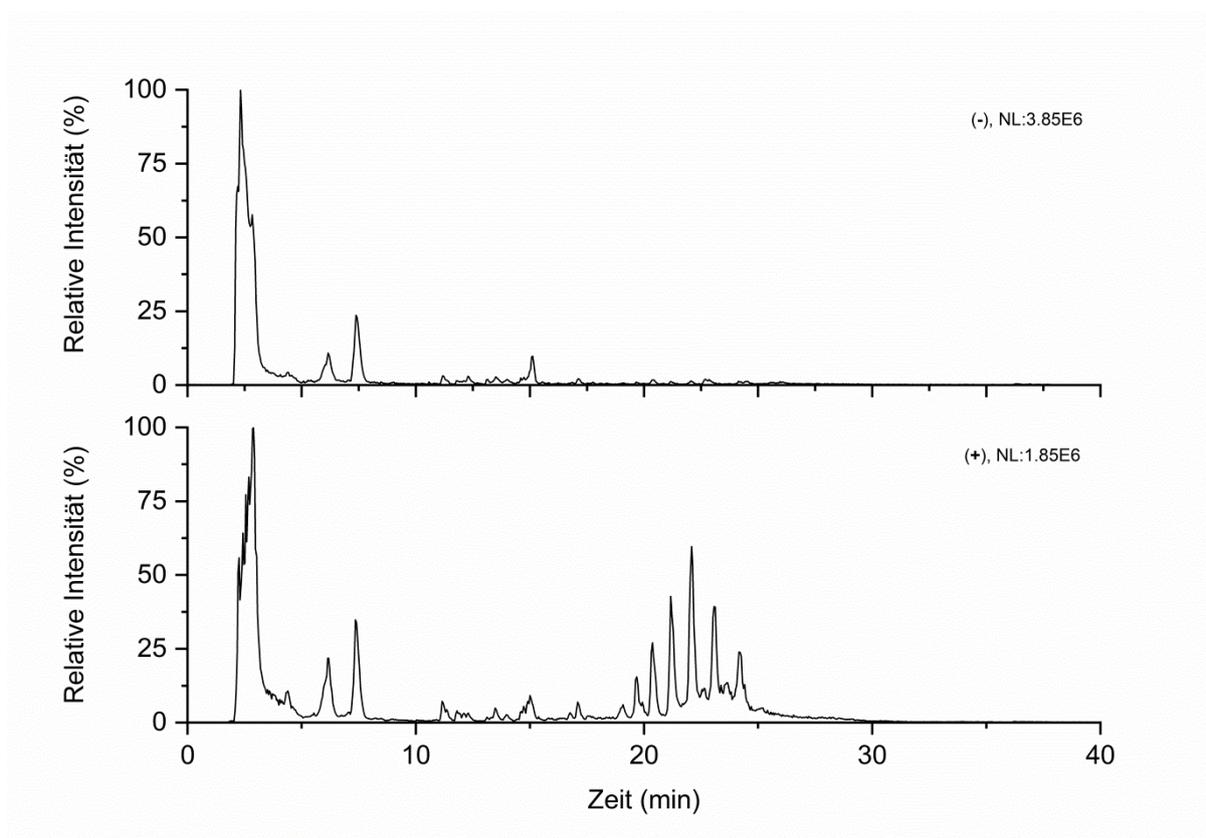
Die großen Peaks zu Beginn der Chromatogramme ähneln denen des wässrigen Extrakt und es wurden nur wenige Unterschiede in den zugehörigen Massenspektren gefunden. Auffällig ist im (-) Chromatogramm die neue Substanz mit dem  $m/z$  175, welche bei RT 2.45 min ihr Maximum aufweist. Dabei handelt es sich um Ascorbinsäure. Diese reagiert im ethanolischen Extrakt wesentlich langsamer und wurde nicht wie im wässrigen Extrakt zur 2,3-Diketogulonsäure umgesetzt. Im (+) Chromatogramm finden sich bei genauerem Hinsehen etwas mehr neue  $m/z$  Werte im Bereich von 2.0–2.8 min. Darunter die  $m/z$  147, 317, 364, 462 641 und 787. Die Fragment-Massen 317, 462, 641 und 787 gehören zu Isorhamnetin 3-O-Rutinosid-7-O-Glucosid. Die meisten neuen Substanzen im Vergleich zum wässrigen Extrakt wurden im mittleren Bereich der Chromatogramme detektiert. Die  $m/z$  Werte in diesem Bereich reichen von circa 500 bis um die 1500. Ein Abgleich mit Literaturwerten und Standardsubstanzen lieferte keine Ergebnisse für die entdeckten Massen. Diese hohen Werte sind typisch für Tannine. Diese oft großen Polyphenole wären durchaus in einem Ethanol-Wasser-Gemisch löslich, ein Beweis für diese Vermutung konnte jedoch nicht gefunden werden.

**Tabelle 5.3** Liste der identifizierten Strukturen des HBG-I Ethanolextraktes (80%)

| Bestimmte Struktur  | RT (min) | $m/z$ <sup>+</sup> | $m/z$ <sup>-</sup> | M (g/mol) | Referenz               |
|---|----------|--------------------|--------------------|-----------|------------------------|
| Catechin (+)/(-)  | 2.1      | 291                |                    | 290.3     | 120,121,119,122        |
| Fumarsäuremonomethylester                                       | 2.2      |                    | 129                | 130.1     | 124                    |
| Ethyl Glucopyranosid  | 2.2      | 209                |                    | 208.2     | 123,124                |
| Ascorbinsäure <sup>S</sup>                                      | 2.4      |                    | 175                | 176.1     | 123,125                |
| Isorhamnetin 3-O-Sophorosid-7-O-Rhamnosid                       | 4.4      | 809                |                    | 786.7     | 120,18,126,127,124     |
| Quercetin-dimethyl-3-O-Hydroxyferuloyl-Diglucosid-7-O-Rhamnosid | 5.0      | 1015               |                    | 992.9     | 120                    |
| Isorhamnetin Pyranosid Furanosid                                | 5.5      | 647                | 623                |           |                        |
| Isorhamnetin 3-O-Sinapoylglucose-Glucosid-7-O-Rhamnosid         | 6.1      | 1015               |                    | 992.9     | 18                     |
| Quercetin-dimethyl-3-O-Caffeoyl-Diglucosid-7-O-Rhamnosid        | 6.1      | 985                |                    | 962.9     | 120                    |
| Isorhamnetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid <sup>M</sup>            | 6.2      | 317                | 623                | 624.6     | 120,18,127,129,124,122 |
| isorhamnetin-3-O-hydroxyferuloyl-diglucoside-7-O-rhamnoside     | 6.2      | 979                |                    | 978.9     | 120                    |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid-7-O-Rhamnosid                        | 6.3      | 793                |                    | 770.7     | 120,127                |
| Kaempferol-3-O-Rutinoside-7-O-Rhamnosid                         | 6.3      | 763                |                    | 740.7     | 120,129                |
| Quercetin 3-O-Rutinosid <sup>S</sup>                            | 6.4      | 633                | 609                | 610.5     | 120,18,126,124,122     |
| Quercetin 3-O-Glucosid <sup>S</sup>                             | 6.6      | 487                | 463                | 462.4     | 120,18                 |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid <sup>M</sup>                         | 7.4      |                    | 623                | 624.6     | 120,18,126,127,122,124 |

**DMSO-Extrakt HBG-I** DMSO löst sowohl unpolare als auch polare Verbindungen. Dies ist auf der einen Seite auf das Vorhandensein zweier lipophiler CH<sub>3</sub>-Gruppen und des großen Schwefelatoms zurückzuführen. Es besitzt außerdem ein starkes Dipolmoment und kann als Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen fungieren. Das Spektrum an gelösten Substanzen in DMSO-Extrakten ist demnach recht groß. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Toxizität, die es in Zellkulturen zu einem beliebigen Lösungsmittel macht. Die meisten anderen Lösungsmittel müssen vor der Zugabe zu den Zellen mit DMSO verdünnt werden, wodurch die Wirkstoff-Konzentrationen gesenkt werden. Der größte Nachteil des DMSO ist dessen hohe Verdampfungsenthalpie, was eine weitere Verarbeitung erschwert.

Die Extraktion des angefertigten Sanddornpulvers mittels Zwei-Stufen-Extraktion mit DMSO ergab ein Extrakt mit einem Feststoffgehalt von 28.2 mg/ml. Die JCD entdeckte 53 (-) bzw. 62 (+) Substanzen in den Chromatogrammen des DMSO-Extraktes. Bereits ein kurzer Blick auf die Chromatogramme aus **Abbildung 5.6** und die Chromatogramme des Ethanolextraktes (80%) lässt eine große Übereinstimmung in deren Zusammensetzung erahnen. Diese Annahme wird durch eine genauere Betrachtung der Chromatogramme und dazugehörigen Massenspektren bestätigt. Im (-) Chromatogramm sind bis auf kleinere Intensitätsunterschiede nur zwei deutliche Abweichungen vom DMSO- zum Ethanolextrakt (80%) zu erkennen. Die Verbindung mit dem  $m/z$  175 bei RT 2.45 min ist im DMSO-Extrakt nicht vorhanden. Es tritt jedoch eine neue Substanz mit dem  $m/z$  330 bei RT 2.86 min auf. Auch im positiven Scan-Modus sind überwiegend Übereinstimmungen zu finden. Der große Unterschied von 81 (Ethanol (80%)) zu 62 (DMSO) mit der JCD ermittelten Verbindungen ist hierbei auf das Fehlen einzelner Substanzen und ihrer Fragmente zurückzuführen. Das Quercetin-dimethyl-3-O-Hydroxyferuloyl-Diglucosid-7-O-Rhamnosid, das Isorhamnetin Pyranosid Furanosid und das Kaempferol 3-O-Rutinoside-7-O-Rhamnoside werden im Chromatogramm des DMSO-Extraktes zum Beispiel vergeblich gesucht.



**Abbildung 5.6** TIC Chromatogramme des HBG-I DMSO-Extraktes

Weitere kleinere Unterschiede treten im Bereich von 2.0–2.8 min auf. Das Isorhamnetin 3-O-Rutinosid-7-O-Glucosid fehlt im DMSO-Extrakt in diesem Bereich genauso wie die Verbindung mit der  $m/z$  175. Zwei Verbindungen mit den  $m/z$  295 und 427 wurden jedoch ausschließlich im DMSO-Extrakt in diesem Retentionsbereich gefunden. Im weiteren Verlauf lassen sich nur noch zwei Unterschiede zwischen dem Ethanol- (80%) und dem DMSO-Extrakt entdecken. Die  $m/z$  825 und 826 zu den RT 22.6 und 23.6 min treten im DMSO-Extrakt zusätzlich zu den bereits im Ethanolextrakt (80%) gefundenen Peaks auf.

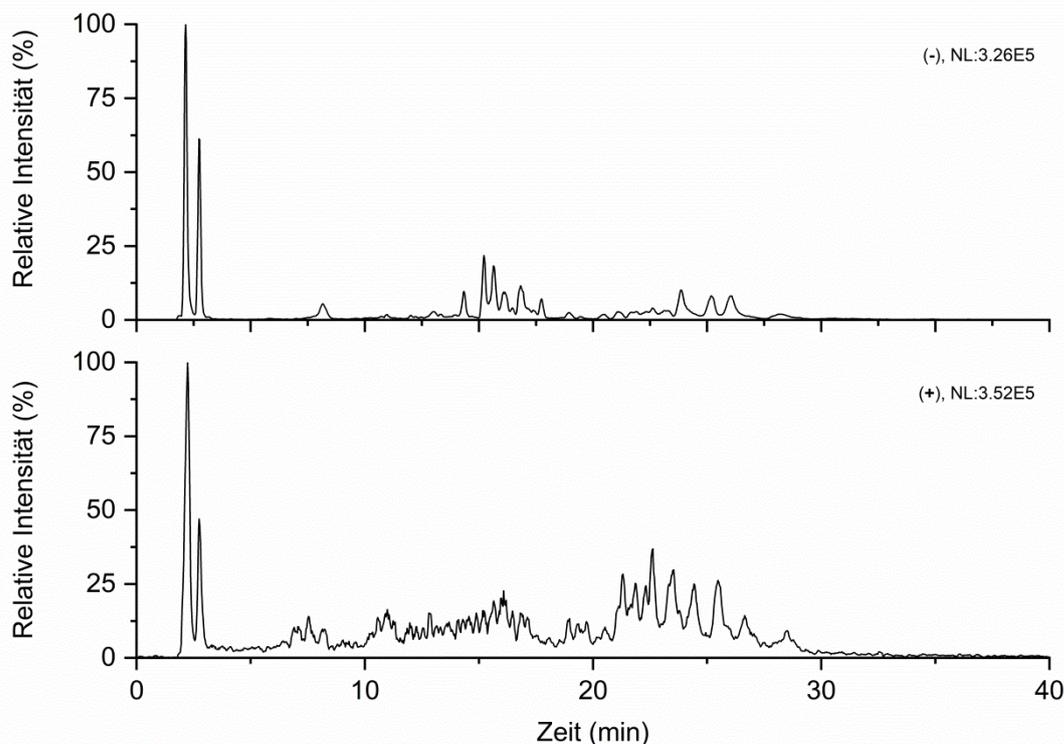
**Tabelle 5.4** Liste der identifizierten Strukturen des HBG-I DMSO-Extraktes

| Bestimmte Struktur                                      | RT (min) | $m/z$ <sup>+</sup> | $m/z$ <sup>-</sup> | M (g/mol) | Referenz               |
|---|----------|--------------------|--------------------|-----------|------------------------|
| Catechin (+)/(-)  | 2.1      | 291                |                    | 290.3     | 120,121,119,122        |
| Fumarsäuremonomethylester                               | 2.2      |                    | 129                | 130.1     | 124                    |
| Ethyl Glucopyranosid                                    | 2.2      | 209                |                    | 208.2     | 123,124 <sup>T</sup>   |
| Chinasäure <sup>S</sup>                                 | 2.4      |                    | 191                | 192.1     | 124,123                |
| Äpfelsäure <sup>S</sup>                                 | 2.6      |                    | 133                | 134.1     | 123                    |
| Isorhamnetin 3-O-Sophorosid-7-O-Rhamnosid               | 4.4      | 809                | 785                | 786.7     | 120,18,126,127,124     |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid-7-O-Rhamnosid                | 5.9      |                    | 769                | 770.7     | 120,127                |
| Isorhamnetin 3-O-Sinapoylglucose-Glucosid-7-O-Rhamnosid | 6.0      | 1015               | 991                | 992.9     | 18                     |
| Isorhamnetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid <sup>M</sup>    | 6.2      | 647                | 623                | 624.6     | 120,18,127,129,122,124 |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid-7-O-Rhamnosid                | 6.2      |                    | 769                | 770.7     | 120,127                |
| Quercetin 3-O-Rutinosid <sup>S</sup>                    | 6.4      |                    | 609                | 610.5     | 120,18,126,124,122     |
| Quercetin 3-O-Glucosid <sup>S</sup>                     | 6.6      | 487                | 463                | 462.4     | 120,18                 |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid <sup>M</sup>                 | 7.4      | 647                | 623                | 624.6     | 18,120,126,127,122,124 |

### 1-Butanolextrakt HBG-I

1-Butanol weist eine geringe Polarität als Ethanol und DMSO auf. Extraktionen mit diesem Lösungsmittel ermöglichen demnach auch das Herauslösen deutlich unpolarerer Substanzen aus dem Pflanzenmaterial. Aufgrund der Hydroxy-Gruppe sind jedoch weiterhin Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol Kräfte mit den Analyten möglich. Butanol hat gegenüber kleineren Alkoholen zudem den Vorteil, dass es nur begrenzt mit Wasser mischbar ist und mit diesem in einer Flüssig-Flüssig Extraktion extrahiert werden kann.

Die Extraktion des angefertigten Sanddornpulvers mittels Zwei-Stufen-Extraktion mit 1-Butanol ergab ein Extrakt mit einem Feststoffgehalt von 19.5 mg/ml. Die JCD entdeckte 52 (-) bzw. 70 (+) Substanzen in den Chromatogrammen des 1-Butanolextraktes. Die mit dem Butanol extrahierten Verbindungen scheinen im Ganzen eine geringere Konzentration aufzuweisen, als es in den vorherigen Extraktionen der Fall war. Dies liegt an dem hohen Anteil an polaren Substanzen in den Sanddornbeeren, welche im Butanol weniger löslich sind als zuvor in Wasser, Ethanol und DMSO.



**Abbildung 5.7** TIC Chromatogramme des HBG-I 1-Butanolextraktes

So sind im Butanolextrakt nur Glycoside des Isorhamnetins zu finden während Derivate des Quercetins und des Kaempferols nicht extrahiert wurden. Interessanterweise wurden durch 1-Butanol auch zwei Triglycoside des Isorhamnetins aus den Sanddornbeeren extrahiert, welche zuvor in keinem der anderen Extrakte gefunden wurden. Die  $m/z$  Werte 785 (-) bzw. 787 (+) und 769 (-) bzw. 771 (+) lassen darauf schließen, dass es sich um ein Derivat mit einer Desoxy Hexose- und zwei Hexose Einheiten handelt und ein weiteres mit zwei Desoxy Hexose- und einer Hexose Einheit. In **Abbildung 5.7** sind die Chromatogramme des 1-Butanolextraktes abgebildet. Die RT einiger Verbindungen weichen aufgrund der Verwendung eines neuen HPLC Systems von den RT der vorherigen Extrakte ab. Es ist zu erkennen, dass die Verbindungen über den ganzen Zeitraum von 2–30 min verteilt

detektiert werden. Die  $m/z$  der detektierten Moleküle unterscheiden sich in großen Teilen von denen der anderen HBG-I Extrakte. Im (-) Chromatogramm liegen die meisten  $m/z$  im Bereich von 10–30 min zwischen 400 und 700. Dies deutet auf das Vorhandensein von Phytosterinen hin, da deren molare Massen in diesem Bereich liegen. Zwei dieser für den Sanddorn bekannten Verbindungen konnten in dem Extrakt identifiziert werden. Dabei handelte es sich um die Korosolsäure mit dem  $m/z$  471 (-) bzw. 473 (+) bei der RT 15.2 min sowie die Ursolsäure mit dem  $m/z$  455 (-) bei RT 17.3 min. Auch unpolare Substanzen wie Fettsäuren konnten durch Butanol extrahiert werden. So wurde die Palmitoleinsäure mit dem  $m/z$  253 (-) bei RT 16.7 min detektiert.

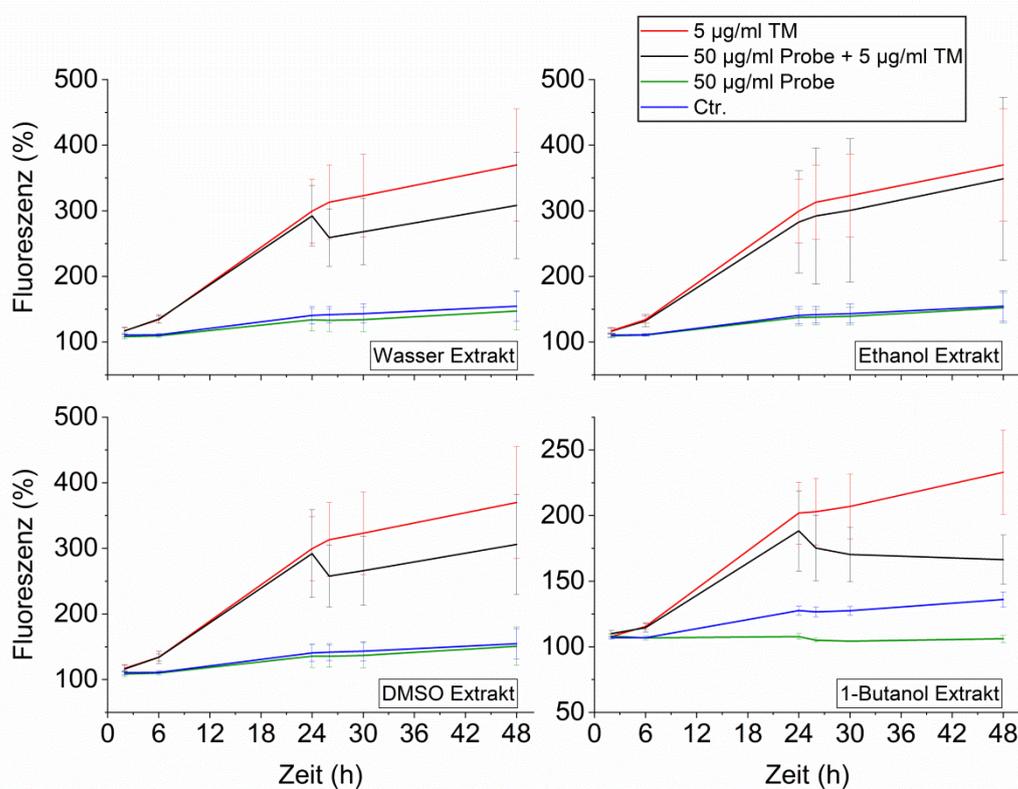
**Tabelle 5.5** Liste der identifizierten Strukturen des HBG-I 1-Butanolextraktes

| Bestimmte Struktur                      | RT (min) | $m/z$ <sup>+</sup> | $m/z$ <sup>-</sup> | M (g/mol) | Referenz               |
|---|----------|--------------------|--------------------|-----------|------------------------|
| Chinasäure <sup>S</sup>                 | 2.1      | 193                | 191                | 192.1     | 123,124                |
| Fumarsäure <sup>S</sup>                 | 2.2      |                    | 115                | 116.1     |                        |
| Äpfelsäure <sup>S</sup>                 | 2.2      |                    | 133                | 134.1     | 123                    |
| Isorhamnetin Triglycosid                | 2.7      | 787                | 785                | 786.7     | 120,18,126,127,124     |
| Isorhamnetin Triglycosid                | 2.8      | 771                | 769                | 770.7     | 120,127                |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid <sup>M</sup> | 8.1      | 625                | 623                | 624.6     | 120,18,126,127,124,122 |
| Isorhamnetin 3-O-Glucosid <sup>M</sup>  | 8.3      |                    | 477                | 478.4     | 120,127,126,122,124    |
| Korosolsäure                            | 15.2     | 473                | 471                | 472.7     | 130                    |
| Palmitoleinsäure <sup>S</sup>           | 16.7     |                    | 253                | 254.4     | 126,131-133,125        |
| Ursolsäure                              | 17.3     |                    | 455                |           | 134,135,130,136        |

### *Untersuchung der HBG-I Extrakte auf ihre Wirkung bezüglich ER-Stresses*

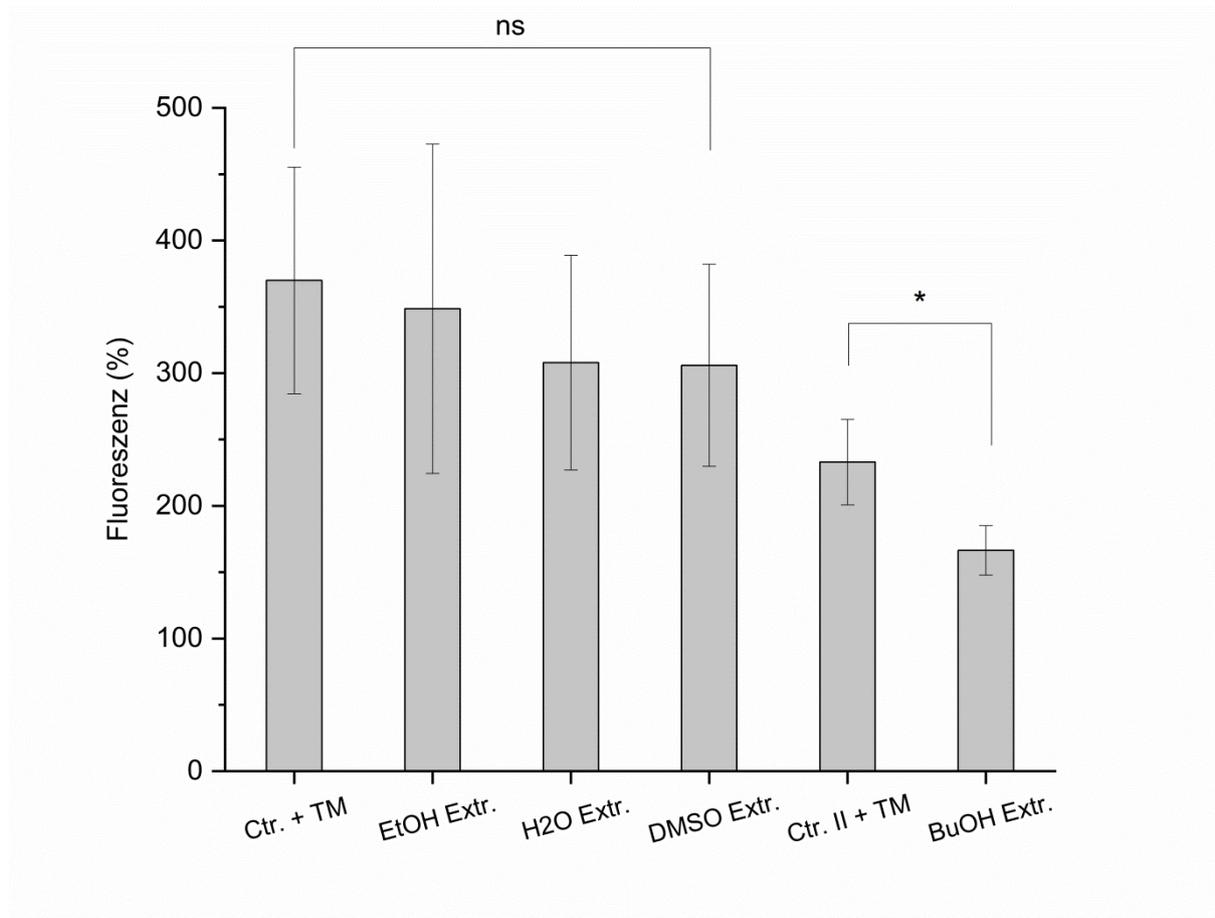
Die angefertigten Extrakte der HBG-I wurden im bereits erläuterten Zellsystem auf ihre Wirksamkeit zur Reduzierung von ER-Stress getestet. Dabei wurden in Vergleichsversuchen reine Lösungsmittelproben untersucht, um ihre Wirkung auf das Zellsystem zu untersuchen. Keines der verwendeten Lösungsmittel zeigte in den Untersuchungen eine ER-Stress reduzierende Wirkung. Die Extrakte der HBG-I Sanddornbeeren mit Wasser, Ethanol (80%) und DMSO wiesen auch keine ER-Stress reduzierende Wirkung auf. Das einzige Extrakt, das eine signifikante Verringerung des ER-Stress Levels verursachte, war das HBG-I 1-Butanolextrakt. Die Verläufe der Intensitäten der Fluoreszenz über die Untersuchungsdauer sind in **Abbildung 5.8** dargestellt. Der 100% Wert beschreibt die Eigenfluoreszenz der Probe auf nicht transferzierten Zellen und wurde immer zwei Stunden nach einer Behandlung der Zellen mit der Probe bestimmt. In der Abbildung sind vier Diagramme mit je vier Graphen zu sehen. Die rote Kurve zeigt die Zunahme der Fluoreszenz der Zellen, was gleichbedeutend mit einer Zunahme des ER-Stresses ist, bei der Zugabe von 5  $\mu\text{g/ml}$  Tunicamycin (TM) an. Wie zu erkennen ist, steigt der ER-Stress in den mit TM behandelten Zellen über die 48 h Versuchsdauer stetig an. Der blaue Graph zeigt die Fluoreszenz der sogenannten „positiv Kontrolle“ an. Es handelt sich dabei um transferzierte Zellen, welche weder mit TM noch mit der untersuchten Probe behandelt wurden. In diesen Zellen ist über die gesamte Versuchsdauer nur ein sehr geringer Anstieg der Fluoreszenz zu betrachten. Da es sich bei den Zellen um lebendige Systeme handelt, ist ein leichter Anstieg des ER-Stresses über 48 h zu erwarten, liegt dieser doch deutlich unter dem Stresslevel der mit TM behandelten Zellen. Die grüne Kurve zeigt den Einfluss der Probenzugabe (50  $\mu\text{g/ml}$ ) auf unbehandelte transferzierte Zellen an. Proben, die von sich aus den ER-Stress Level der Zellen erhöhen, sind als Therapeutikum ungeeignet. Unter den untersuchten Extrakten erzeugt keines einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz. Es ist jedoch zu erkennen, dass das 1-Butanolextrakt die

Fluoreszenz der Zellen verringert, das Stresslevel somit also sehr gering hält. Die Fluoreszenz liegt nach 48 h Behandlung nahe der 100%, welche der Eigenfluoreszenz der Probe entsprechen.



**Abbildung 5.8** Ergebnisse der therapeutischen Behandlung der HEK-293T Zellen mit den HBG-I Extrakten. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (n=4). Kontrollversuche (Ctr.) wurden mit unbehandelten, transferzierten Zellen durchgeführt

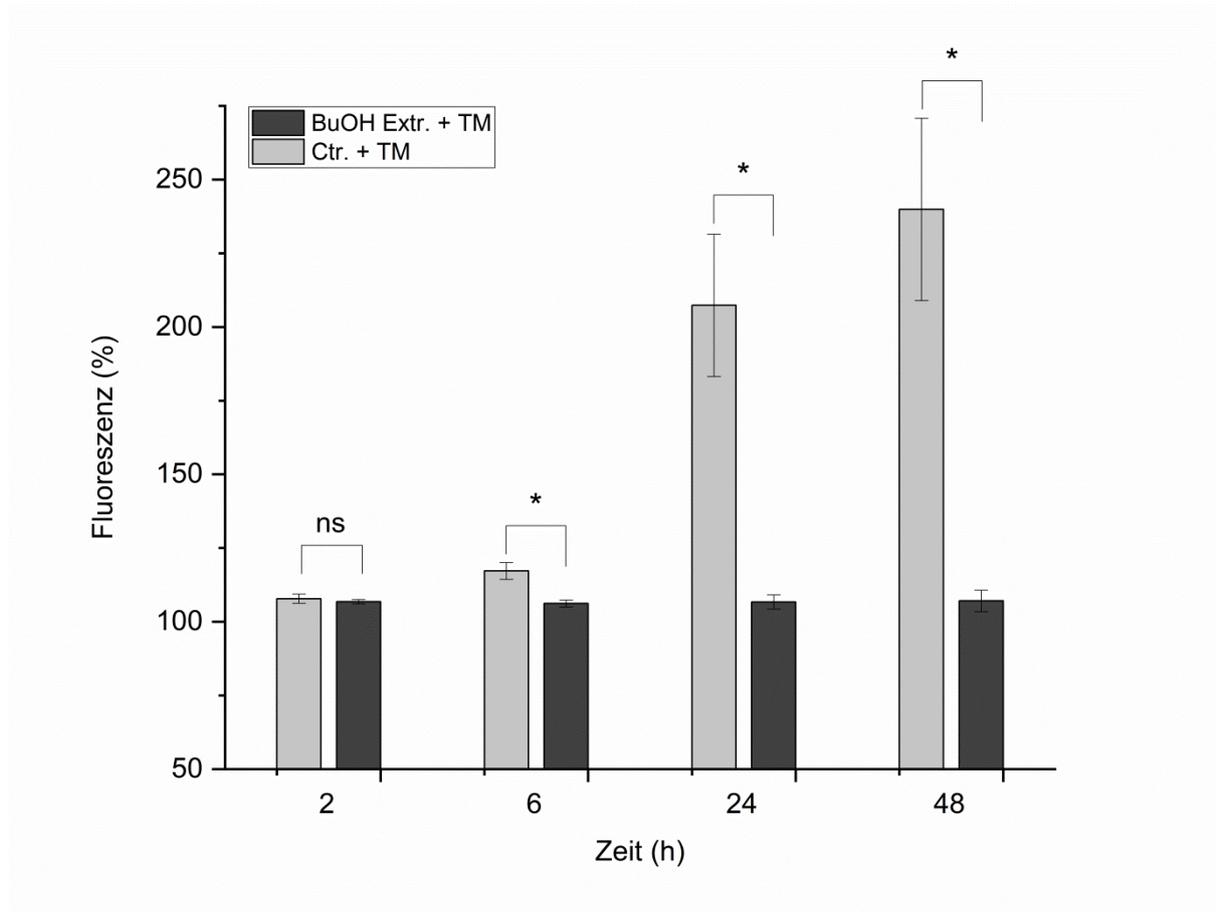
Der interessanteste Graph in den Diagrammen ist jeweils der schwarze, welcher den Verlauf der Fluoreszenzintensität über 48 h bei der Zugabe von TM (5  $\mu\text{g/ml}$ ) und der Probe (50  $\mu\text{g/ml}$ ) darstellt. Hier dargestellt ist der therapeutische Ansatz, welcher die Auswirkung der Zugabe der Probe nach 24 h auf zuvor mit TM behandelte Zellen untersucht. Für das wässrige, ethanolische und DMSO-Extrakt sind keine signifikanten Verringerungen nach der Zugabe zu den Zellen zu beobachten. Die kurzzeitige Abnahme der Fluoreszenz nach Zugabe des Wasser- bzw. DMSO-Extraktes lässt sich durch ein gestörtes Gleichgewicht in den Zellen begründen, was kurzzeitig zu einem vermehrten Absterben dieser geführt haben könnte. Danach folgt ein nahezu gleich steiler Anstieg der Kurven, wie es bei den Zellen, die nur mit TM behandelt wurden, zu sehen ist. Die Kurve der mit dem Ethanolextrakt behandelten Zellen verläuft fast parallel zu den mit TM behandelten Zellen, der ER-Stress nimmt nach der Behandlung mit dem Extrakt zu keinem Zeitpunkt ab. Das 1-Butanolextrakt zeigt als einziges eine Reduzierung des ER-Stresses in Form einer Abnahme der Fluoreszenz der Zellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenz auch über die kurzzeitige relativ steile Abnahme zwei Stunden nach der Behandlung mit dem Extrakt hinweg stetig abnimmt. In **Abbildung 5.9** sind die Ergebnisse der therapeutischen Behandlung nach 48 h noch einmal im Vergleich dargestellt. Diese wurden mit den Werten der mit TM behandelten Zellen verglichen. Die statistische Auswertung bestätigt die bereits geschilderten Beobachtungen und weist nur für die Behandlung mit dem HBG-I 1-Butanolextrakt eine signifikante (\*) Reduzierung des ER-Stresses aus. Die Messwerte der Zellen, die mit den anderen Extrakten behandelt wurden, weichen nicht signifikant (ns) von denen ab, die nur mit TM versetzt wurden.



**Abbildung 5.9** Vergleich der Fluoreszenz zwischen mit TM und zusätzlich mit den Extrakten behandelten Zellen nach 48 h Versuchsdauer bei therapeutischer Behandlung. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=4). Signifikanzermittlung mit ungepaartem t-Test: \* =  $p < 0.05$

Das 1-Butanolextrakt verursachte auch in der protektiven Versuchsdurchführung als einziges einen signifikant geringeren Stresslevel in den Zellkulturen. Die protektive Behandlung untersucht die Auswirkung der Zugabe des Extraktes zum gleichen Zeitpunkt, zu dem auch das TM hinzugegeben wird. Dadurch wird ersichtlich, ob das Extrakt die Entstehung des ER-Stresses von vornherein verhindern kann. In **Abbildung 5.10** sind die Werte der Fluoreszenz der mit TM und der zusätzlich mit dem Butanolextrakt behandelten Zellen zu den verschiedenen Messzeitpunkten gegenübergestellt. Zu Beginn der Untersuchung liegen keine signifikanten Abweichungen zwischen den Werten vor. Der Stresslevel ist in beiden Fällen noch sehr gering. Bereits nach sechs Stunden entsteht jedoch eine signifikante Abweichung zwischen den Fluoreszenzen der beiden Versuchsreihen. Während der ER-Stress in den mit TM behandelten Zellen über 48 h stets ansteigt, scheint das Butanolextrakt der HBG-I Sanddornbeere die Entstehung des ER-Stresses durch TM erfolgreich zu verhindern.

Diese vielversprechenden Ergebnisse dienen als Grundlage für weitergehende Untersuchungen des HBG-I 1-Butanolextraktes. Die restlichen Extrakte der HBG-I Sanddornbeere wurden daraufhin nicht weiter untersucht.



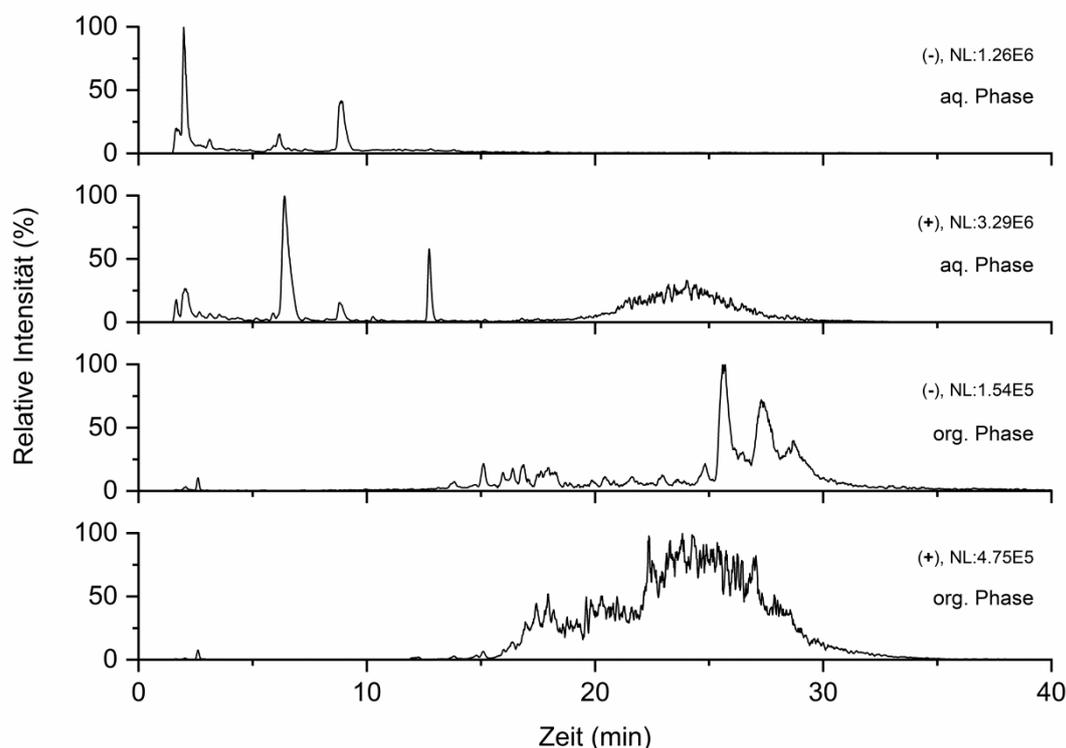
**Abbildung 5.10** Vergleich der Fluoreszenz 2, 6, 24 und 48 h nach Behandlung der Zellen mit TM und dem HBG-I 1-Butanolextrakt mit der Fluoreszenz der Zellen, die nur mit TM behandelt wurden. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=4). Signifikanzermittlung mit ungepaartem t-Test: \* =  $p < 0.05$

#### *Fraktionierung des HBG-I 1-Butanolextrakts*

Aufgrund der guten Ergebnisse des HBG-I 1-Butanolextraktes in den Zelltests wurden mit unterschiedlichen Methoden Fraktionen des Extraktes hergestellt.

#### *Fraktionierung mittels Extraktion*

Um die Anzahl der Verbindungen im Butanolextrakt zu minimieren, wurde das Pflanzenmaterial im ersten Schritt zweifach mit Reinstwasser extrahiert. Daraufhin folgten je zwei Extraktionen mit Ethanol und 1-Butanol. Da das Reinstwasser und Ethanolextrakt (80%) keine Wirkung in den Zellkulturen aufwiesen, wurde davon ausgegangen, dass auf diese Weise nur störende Verbindungen aus dem Pflanzenmaterial entfernt werden. Aus 10.38 g getrockneten zerkleinerten Habego Beeren wurden auf diese Weise 4.65 g an Reinstwasser-, 1.52 g an Ethanol- und 0.44 g an Butanol Trockenextrakt hergestellt. Das Trockenextrakt des Butanols wurde anschließend mit Wasser versetzt und mit Heptan extrahiert. Auf diese Weise wurde eine Fraktion hergestellt, die nur die unpolaren Inhaltsstoffe des Butanolextraktes enthält, während die zweite Fraktion nur die polaren Inhaltsstoffe löst. Eventuelle synergistische Effekte verschiedener Verbindungen in den Zelluntersuchungen könnten bei dieser groben Auftrennung erhalten werden. Bei der Betrachtung der Chromatogramme der beiden Fraktionen in **Abbildung 5.11** werden die Unterschiede in ihrer Zusammensetzung sofort ersichtlich.



**Abbildung 5.11** TIC Chromatogramme der wässrigen (aq.) und der Heptan (org.) Phase des HBG-I 1-Butanolextraktes

Die wässrige Phase weist ihre größten Peaks im RT Bereich von 1.5–13 min auf. Da in diesem Zeitraum vermehrt polare Substanzen eluieren, war dies zu erwarten. Das (+) Chromatogramm der wässrigen Phase zeigt zudem einen sehr breiten Peak zwischen RT 20–30 min. Die  $m/z$  Werte in diesem Bereich überschneiden sich nicht mit denen der organischen Phase. Sie liegen zwischen 570 und 1750. Im einfachen Reinstwasser- und 1-Butanolextrakt der HBG-I kommen diese Substanzen nicht vor. Es liegt demnach die Vermutung nahe, dass diese Verbindungen während der Extraktionsschritte entstanden sind. Eventuell kam es zur Polymerisation oder Oxidation einiger Moleküle beim Extraktionsprozess. Auch die großen Peaks zu den RT 6.4 min und 12.7 min im (+) Chromatogramm der wässrigen Phase gehören zu Verbindungen mit bisher unbekanntem  $m/z$  Werten von 242 und 279. Es lassen sich jedoch auch bereits bekannte Substanzen in der wässrigen Phase nachweisen. Darunter befinden sich mehrere Di- und Triglycoside des Isorhamnetins als auch die China- und Zitronensäure. In den Chromatogrammen der organischen Phase sind viele der Verbindungen wieder zu finden, die im ursprünglichen 1-Butanolextrakt der HBG-I auch vorhanden waren. Interessanterweise gehören dazu auch die bereits erwähnten unbekanntem Triglycoside des Isorhamnetins die zur RT 2.6 min detektiert wurden. Die meisten Verbindungen treten jedoch im Bereich von 12–30 min auf. Dies war zu erwarten, da in diesem Zeitraum vermehrt unpolare Substanzen eluieren. Die  $m/z$  Werte der Verbindungen in diesem Bereich überschneiden sich in großen Teilen mit denen aus dem 1-Butanolextrakt.

### Fraktionierung mittels Flash-Chromatographie

Um die Wirksamkeit des 1-Butanolextraktes weiter einzugrenzen wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt. Als stationäre Phase diente das polare Adsorbens Kieselgel. Die mobile Phase bestand aus Heptan, Ethylacetat und Methanol und wurde mit einem Gradienten über die Säule gegeben. Auf diese Weise wurden 24 Fraktionen hergestellt. Von den ursprünglichen 2.27 g des 1-Butanol-trockenextraktes wurde insgesamt 1.79 g (79%) in aufgetrennter Form wiedererhalten. Die restlichen Substanzen sind auf der Säule verblieben da ihre Bindung an das Kieselgel zu stark ausfiel.

**Tabelle 5.6** Masse der einzelnen Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes

|            |       |       |       |       |      |       |
|------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Fraktion   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5    | 6     |
| Masse (mg) | 4.6   | 5.0   | 80.5  | 13.0  | 1.6  | 10.2  |
| Fraktion   | 7     | 8     | 9     | 10    | 11   | 12    |
| Masse (mg) | 15.0  | 2.9   | 2.0   | 60.0  | 82.0 | 35.6  |
| Fraktion   | 13    | 14    | 15    | 16    | 17   | 18    |
| Masse (mg) | 238.8 | 176.9 | 123.8 | 117.6 | 42.5 | 260.9 |
| Fraktion   | 19    | 20    | 21    | 22    | 23   | 24    |
| Masse (mg) | 74.8  | 108.4 | 177.9 | 52.0  | 77.2 | 43.6  |

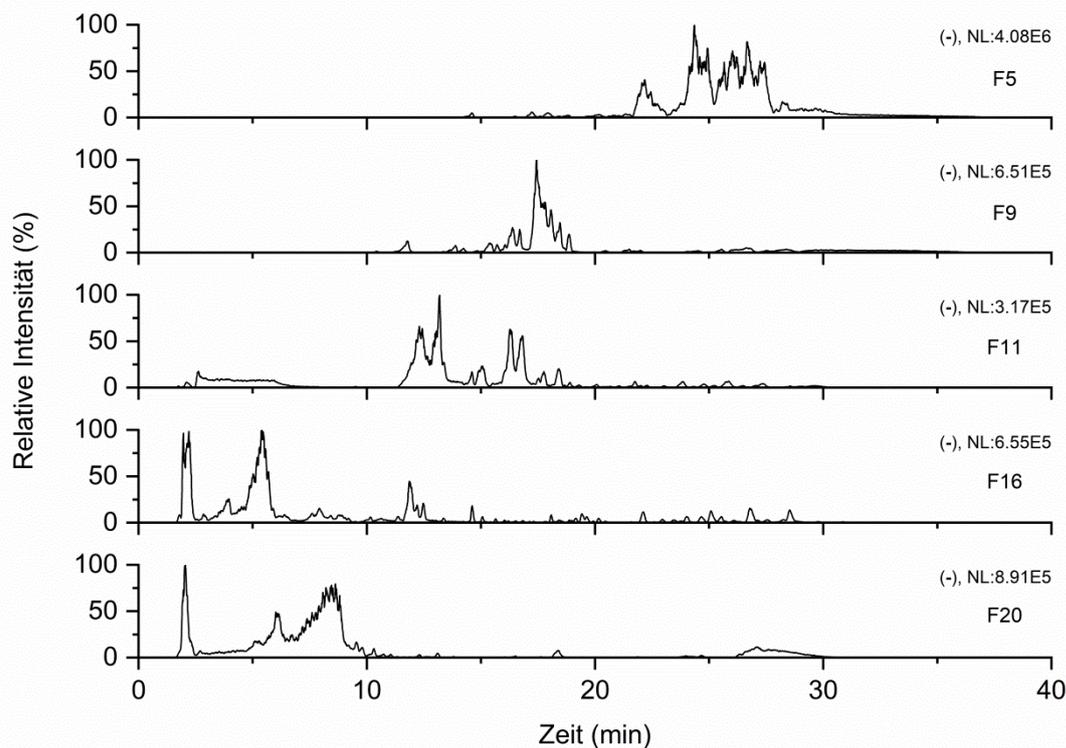
Aufgrund der hohen Polarität der stationären Phase werden lipophile Verbindungen wesentlich weniger stark auf der Säule zurückgehalten als polare Substanzen. Kieselgel wechselwirkt durch Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol Wechselwirkungen mit den Analyten, Van-der-Waals Kräfte spielen eine untergeordnete Rolle. Demnach steigt die Polarität der Substanzen in den Fraktionen bis zum Ende immer weiter an. Dies lässt sich schon beim Vergleich einiger Chromatogramme erkennen. In **Abbildung 5.12** sind die (-) Chromatogramme der Fraktionen 5, 9, 11, 16 und 20 sehen. Die Peaks wandern mit steigender Fraktionsnummer im Chromatogramm nach links, was für einen Anstieg der Polarität der Verbindungen spricht. Im HPLC System wurde eine Säule mit einer unpolaren Phenyl Hexyl Phase verwendet, weshalb polare Verbindungen zu früheren RT eluierten. Dies lässt sich auch anhand der Substanzen, die in den Fraktionen gefunden wurden nachvollziehen. In den (-) Chromatogrammen der Fraktion 5–9 können einige *m/z* Werte Verbindungen aus der Klasse der Phytosterine zugeordnet werden, die bereits in der Literatur für den Sanddorn beschrieben wurden (Tab. 5.7). Dabei handelt es sich zum Beispiel um pentacyclische Triterpen-Carbonsäuren wie Korosolsäure oder das Triterpen Amyrin. Aufgrund ihres unpolaren Grundgerüsts ist die Wechselwirkung dieser Phytosterine mit dem Kieselgel nicht besonders groß. Die Carboxy- und Hydroxy-Funktionen dieser Moleküle sorgen jedoch dafür, dass ihre Verweilzeit auf der Säule etwas höher ausfällt, als es für die Substanzen früherer Fraktionen der Fall ist. Die Vermutung, dass es sich hierbei um Phytosterine handelt, wird mit der in Fraktion 7 isolierten Reinsubstanz zusätzlich untermauert. Nach Auswerten der 1D- und 2D-NMR-Spektren (Anhang, Kapitel 8.3) sowie des Massenspektrums und anschließendem Vergleich mit Literaturdaten konnte diese Verbindung als Ursolsäure identifiziert werden. Die Ausbeute betrug 15 mg, was bezogen auf die Trockenmasse von 4.89 g der extrahierten Sanddornbeeren einem Anteil von 0.3% oder 3.1 mg/g (Ursolsäure/Trockenmasse Beere) entspricht. Im Vergleich zu einer bereits bekannten Methoden zur Gewinnung von Ursolsäure aus getrockneten Sanddornbeeren zeigt die hier verwendete Methode eine deutlich höhere Ausbeute bei weniger Arbeitsschritten ohne einen Reinheitsverlust. So konnten Zheng et al (2009) 300 mg Ursolsäure aus 2.9 kg getrockneten Früchten des *Hippophae rhamnoides* isolieren, was lediglich einer Ausbeute von 0.1 mg/g entspricht. Dazu verwendeten sie eine Kombination aus Flüssig-Flüssig Extraktion, Adsorptions- und Größenausschlusschromatographie.<sup>135</sup> Weitere Quellen,

die isolierte Ausbeuten für Ursolsäure aus Sanddornbeeren beschreiben sind in der Literatur nicht zu finden.

**Tabelle 5.7**  $m/z$  Werte der Phytosterine aus den Fraktionen 5–9 des HBG-I 1-Butano Extraktes

| Mögliche Strukturen   | Fraktion | RT (min) | $m/z$ | M (g/mol) | Referenz        |
|---|----------|----------|-------|-----------|-----------------|
| Melilotigenin c/6 $\beta$ ,19-dihydroxy-3-oxours-12-en-28-oic acid                        | F8       | 15       | 485.5 | 486.7     | 136             |
| Korosolsäure/23-hydroxybetulinic acid/Maslinic acid/3,22-dihydroxyolean-12-en-29-oic acid | F8/F9    | 16       | 471.4 | 472.7     | 136,130         |
| $\alpha$ -Amyrin/ $\beta$ -Amyrim/Cycloartenol/Lanosterol/Cycloeucaleanol/Obtusifoliol    | F5       | 16.8     | 425.4 | 426.7     | 126,137-139     |
| Betulonic acid  | F8       | 17.3     | 453.4 | 454.7     | 130,136         |
| Ursolsäure  | F6/F7/F8 | 17.8     | 455.4 | 456.7     | 134-136,130     |
| Sitostanol  | F5       | 18       | 415.4 | 416.7     | 126,137-139     |
| Stigmasterol/Stigmastadienol  | F9       | 19.5     | 411.5 | 412.7     | 126,137,138     |
| Arjunoic acid   | F6       | 20.2     | 487.5 | 488.7     | 136             |
| $\beta$ -Sitosterol   | F5       | 20.3     | 413.4 | 414.7     | 126,138,139,137 |
| Erythrodiol/Uvaol/Betulin   | F5/F6    | 20.3     | 441.4 | 442.7     | 126,136,138     |
| 1,2,3,19-tetrahydroxy-12-ursen-28-oic acid  | F5       | 20.4     | 503.5 | 504.7     | 136             |
| 28-methylobtusifoliol/24-methylenecycloaratanol/Oleanol aldehyde                          | F9       | 20.5     | 439.5 | 440.7     | 126,138         |
| Melilotigenin c/6 $\beta$ ,19-dihydroxy-3-oxours-12-en-28-oic acid                        | F6       | 20.6     | 485.5 | 486.7     | 136             |
| Erythrodiol/Uvaol/Betulin   | F6       | 21.4     | 441.4 | 442.7     | 126,138,136     |
| Korosolsäure/23-hydroxybetulinic acid/Maslinic acid/3,22-dihydroxyolean-12-en-29-oic acid | F5/F6    | 23.9     | 471.4 | 472.7     | 130,136         |
| Melilotigenin c/6 $\beta$ ,19-dihydroxy-3-oxours-12-en-28-oic acid                        | F5       | 25.2     | 485.5 | 486.7     | 136             |

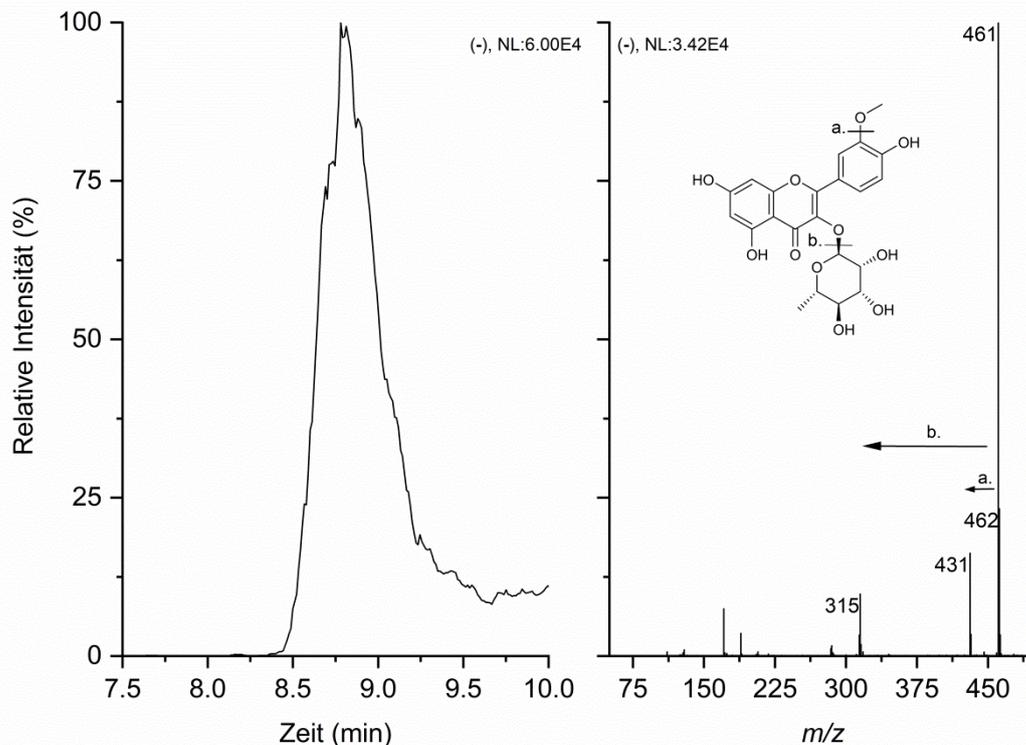
Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit vieler Phytosterine kann davon ausgegangen werden, dass diese ein ähnliches Elutionsverhalten zeigen. In den Fraktionen 5, 6, 8 und 9 sind weitere Substanzen enthalten, welche aufgrund ihrer  $m/z$  Werte zur Stoffklasse der Phytosterine gehören könnten. Diese konnten jedoch nicht bereits bekannten Verbindungen zugeordnet werden.



**Abbildung 5.12** (-) Base Peak Chromatogramme einiger Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes

In Fraktion 10, 11 und 12 wurde zur RT 12.3 min das Flavonoid Isorhamnetin in den Chromatogrammen gefunden. Aufgrund der Hydroxy-Gruppen des Isorhamnetins fällt die Wechselwirkung mit dem Kieselgel etwas stärker aus als es für die Phytosterine der Fall war. In den Chromatogrammen der Fraktionen 10–13 wurden außerdem einige Substanzen mit  $m/z$  Werten zwischen 600 und 650 detektiert. Diese lagen alle im RT Bereich zwischen 15 und 18 min. So wurde in F10 das  $m/z$  617.5 bei RT 17.8 min, in F11 das  $m/z$  633.5 bei RT 16.3 min, in F12 das  $m/z$  635.5 bei RT 16.7 min und in F13 das  $m/z$  649.5 bei RT 15.0 min gefunden. Diese Werte konnten keinen für den Sanddorn bekannten Substanzen zugeordnet werden. Ab Fraktion 12 wurden zusätzlich wieder vermehrt Verbindungen im vorderen Retentionszeitraum entdeckt. Besonders auffällig war dabei eine Verbindung mit dem  $m/z$  189 und einem Fragment mit dem  $m/z$  171, das wahrscheinlich durch die Abspaltung von Wasser entstanden ist. Dieses Molekül zeigt ein sehr breiten Peak von RT 2.5 min–6.4 min im (-) Base Peak Chromatogramm der Fraktionen 12 und 13. Die Breite des Peaks deutet auf einen hohen Gehalt der Verbindung in der Fraktion und auf das Vorhandensein von Carboxy-Gruppen hin. Der  $pK_S$ -Wert der Struktur scheint im selben Bereich zu liegen, wie der pH-Wert der mobilen Phase. Der Analyt liegt demnach wahrscheinlich in seiner protonierten und deprotonierten Form vor, welche unterschiedlich stark mit der stationären Phase interagieren. Dies führt im Endeffekt zu einer Peakverbreiterung. In den Fraktionen 14 und 15 gehört der größte Peak in den (-) Chromatogrammen zu China- und Zitronensäure bei RT 2.0 min. Es treten jedoch in diesem Bereich auch kleinere Unterschiede zwischen den Fraktionen auf. Die  $m/z$  289, 295 und 495 wurden nur in F15 entdeckt. Interessant sind auch die  $m/z$  Werte 147 und 173 zu den RT 2.4 und 2.2 min. Diese sind in beiden Fraktionen zu finden und wurden im ursprünglichen 1-Butanolextrakt nicht nachgewiesen, was an ihrer geringen Konzentration liegen könnte. Das  $m/z$  173 ist in noch höherem Anteil auch in F16 zu finden. Hier treten in diesem frühen Retentionsbereich von 2.0–2.5 min außerdem verstärkt die  $m/z$  271 und 289 auf. Die Fraktion enthält demnach wahrscheinlich vermehrt Catechin, das eine molare

Masse von 290.3 g/mol besitzt. In F15 wurde zudem zur RT 8.8 min das Isorhamnetin 3-O-Rhamnosid mit den  $m/z$  Werten 461, 431 und 315 nachgewiesen. In **Abbildung 5.13** sind die Abspaltungen dargestellt, welche zur Entstehung der Fragmente 431 und 315 führen.



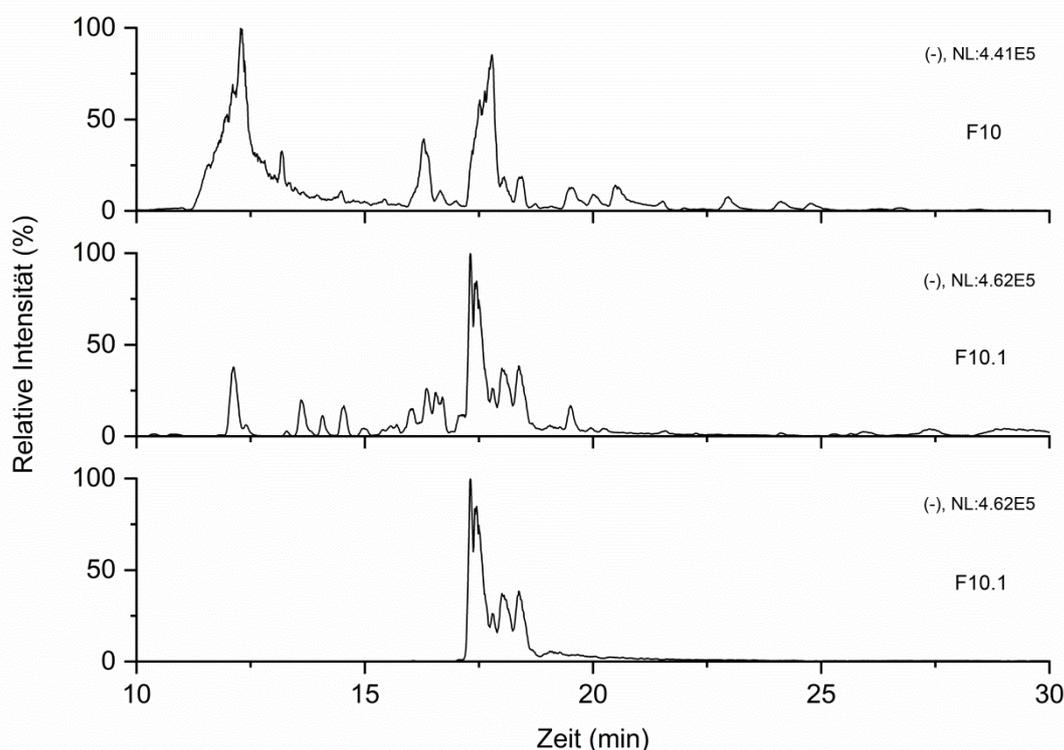
**Abbildung 5.13** (-) XIC ( $m/z$  461) der F15 des HBG-I 1-Butanolextraktes mit dazugehörigem Massenspektrum

In den Fraktionen kommen nun vermehrt polare Substanzen vor. So ist auch die Äpfelsäure bereits ab F13 in den Chromatogrammen vorhanden und wurde genau wie die China- und Zitronensäure bis in die letzte Fraktion durchgehend detektiert. In F16 wurden je zwei Substanzen mit den  $m/z$  Werten 351 und 363 zu den RT 4.0 und 5.9 min bzw. 4.3 und 5.4 min nachgewiesen. Die Verbindungen mit dem  $m/z$  363 ziehen sich auch durch die nächsten Fraktionen bis zur F21, die Substanz mit dem  $m/z$  551 bei RT 4.0 min bis zur F19. In F17 wurde Ascorbinsäure mit der  $m/z$  175 im (-) Chromatogramm zur RT 2.0 min gefunden. Die Chromatogramme der F18 weisen nur noch Spuren der Ascorbinsäure auf, jedoch wurden die neuen  $m/z$  Werte 207 und 323 zur RT 2.3 min entdeckt. Ein weiteres Isorhamnetin Derivat wurde in F18 von ähnlichen Strukturen getrennt erhalten. Das Isorhamnetin 3-O-Glucosid mit dem  $m/z$  477 im (-) Chromatogramm zur RT 8.8 min wurde dort nachgewiesen. In den Chromatogrammen der F19 treten um den gleichen Retentionszeitraum weitere Flavonoid Glycoside auf (Tab. 5.8). Dort wurde das Kaempferol 3-O-Rutinoside-7-O-Rhamnosid mit dem  $m/z$  739 und das Isorhamnetin 3-O-Rutinosid mit dem  $m/z$  623 detektiert. In F20 wurden mit dem Quercetin 3-O-Rutinosid mit dem  $m/z$  609 bei RT 6.7 min und dem Isorhamnetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid mit dem  $m/z$  623 zwei weitere Flavonoid Diglucoside in den Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes nachgewiesen. Die letzte Struktur, die in den Fraktionen 22 und 23 nachgewiesen wurde, war das Isorhamnetin 3-O-Sophorosid-7-O-Rhamnosid. Dem folgten in Fraktion 24 zwischen RT 1.8 und 2.3 min im (-) Chromatogramm noch die Verbindungen mit den  $m/z$  159, 273, 307 und 387.

**Tabelle 5.8** Liste identifizierter Flavonoid Glycoside in Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes

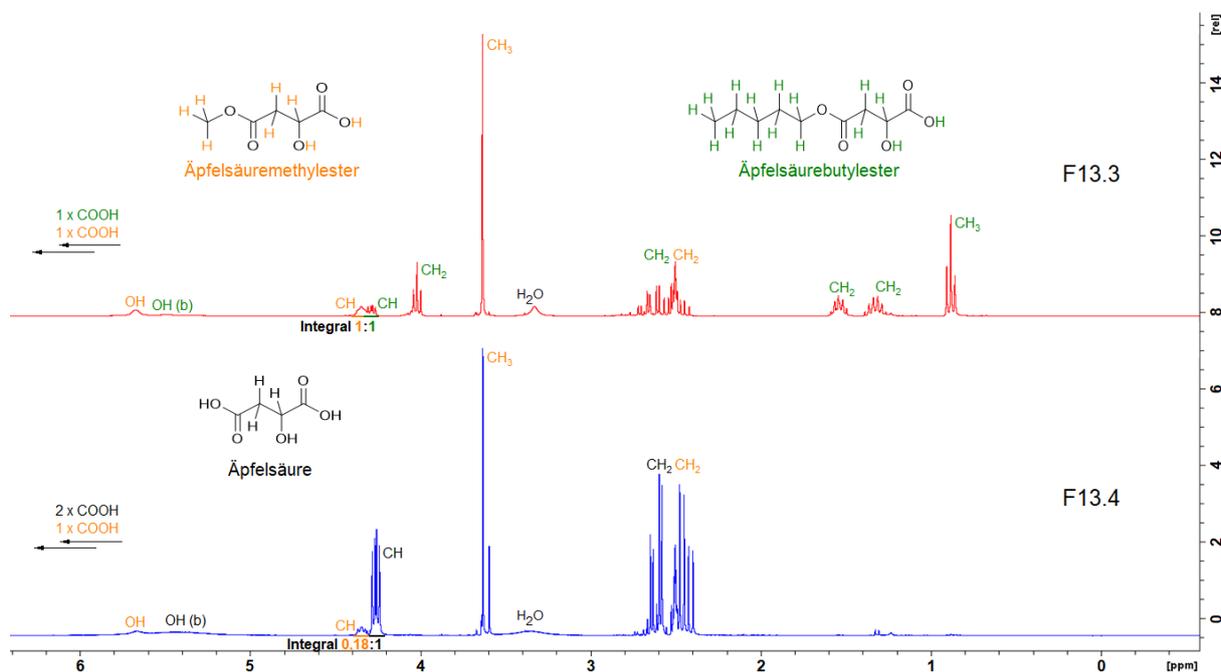
| Bestimmte Struktur                                   | Fraktion | RT (min) | $m/z$ | M (g/mol) | Referenz               |
|--|----------|----------|-------|-----------|------------------------|
| Isorhamnetin 3-O-Sophorosid-7-O-Rhamnosid            | F22, F23 | 3.2      | 785   | 786.7     | 120,18,126,127,124     |
| Isorhamnetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid <sup>M</sup> | F20, F21 | 6.1      | 623   | 624.6     | 120,18,127,129,122,124 |
| Quercetin 3-O-Rutinosid <sup>S</sup>                 | F20      | 6.7      | 609   | 610.5     | 120,18,126,124,122     |
| Kaempferol 3-O-Rutinoside-7-O-Rhamnosid              | F19      | 8.8      | 739   | 740.7     | 120,129                |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid <sup>M</sup>              | F19      | 8.8      | 623   | 624.6     | 120,18,126,127,124,122 |
| Isorhamnetin 3-O-Glucosid                            | F17, F18 | 8.8      | 477   | 478.4     | 120,126,127,124,122    |
| Isorhamnetin 3-O-Rhamnosid <sup>M</sup>              | F15, F16 | 8.8      | 461   | 462.4     | 120,18                 |

Die einzige Verbindung, die in reiner Form durch die Anwendung der Säulenchromatographie direkt aus dem HBG-I 1-Butanolextrakt gewonnen wurde, war die Ursolsäure. Um weitere Verbindungen in hoher Reinheit zu erhalten, wurden einige Fraktionen weiter aufgetrennt. Dazu wurde erneut die Säulenchromatographie mittels Kieselgel verwendet. Auf diese Weise konnten vier weitere Verbindungen in ausreichender Ausbeute isoliert werden, um ihre Struktur aufzuklären. Es wurden außerdem noch weiter Substanzen in reiner Form erhalten, jedoch reichten die erhaltenen Mengen nicht für eine Strukturaufklärung.

**Abbildung 5.14** (-) Base Peak Chromatogramme (oben) der F10 und F10.1 des HBG-I 1-Butanolextraktes. (-) XIC ( $m/z$  617.5) der F10.1 (unten)

In einem ersten Versuch, wurde Fraktion 10 zur weiteren Auftrennung ausgewählt. Ziel war es hier, die unbekannte Verbindung mit dem  $m/z$  617.5 bei RT 17.8 min zu isolieren. In **Abbildung 5.14** ist ein Vergleich der (-) Chromatogramme von F10 und der ersten Fraktion der Säule von F10, F10.1, zu sehen. Es ist gut zu erkennen, dass der Peak des Isorhamnetins bei RT 12.3 min nicht mehr vorhanden

ist. Tatsächlich ist das  $m/z$  617.5 in dieser Fraktion am stärksten vertreten. Das Mass Range (617.5) Chromatogramm zeigt deutlich, dass diese Verbindung die größte Intensität im Massenspektrum aufweist. Die Fraktion wiegt jedoch nur 1.5 mg und zeigt im NMR Spektrum keine auswertbaren Signale. Alle weiteren Fraktionen beinhalten Isorhamnetin und wurden nicht weiter untersucht.

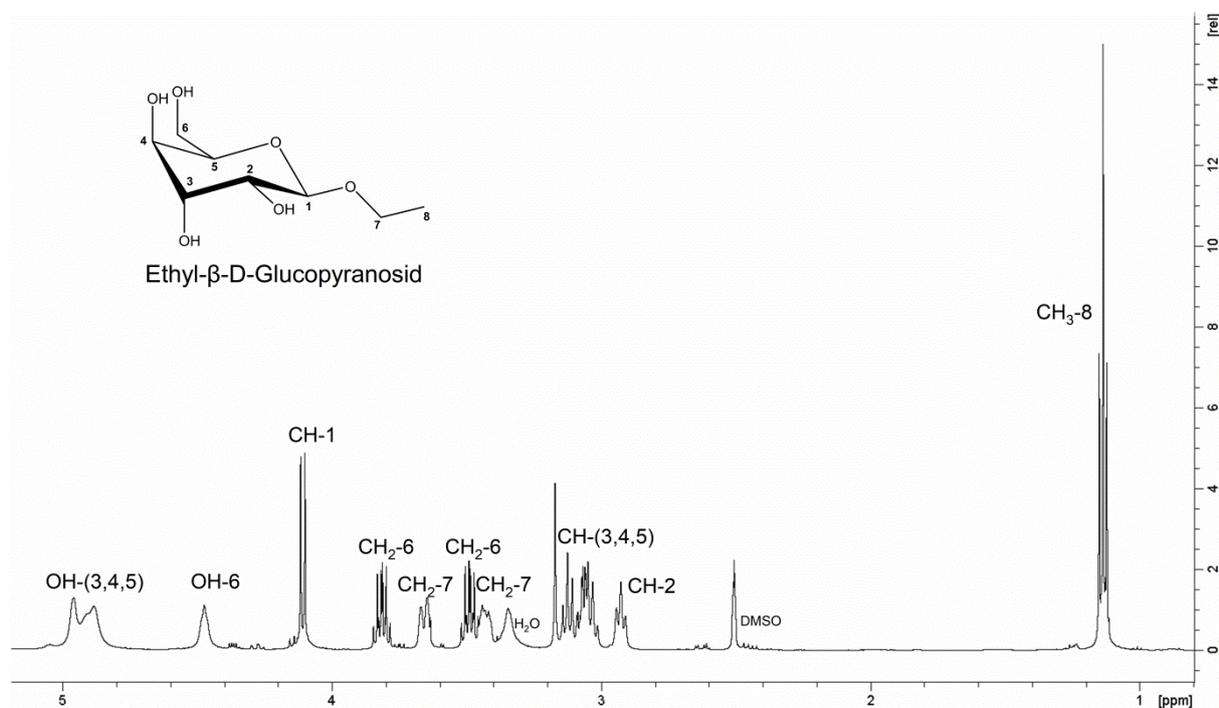


**Abbildung 5.15** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren in DMSO-d<sub>6</sub> der F13.3 und F13.4 im Bereich von 0–6 ppm

Die Auftrennung der Fraktion 13 lieferte bessere Ergebnisse. So gelang es die Struktur von drei Substanzen aus der Fraktion aufzuklären (Anhang, Kapitel 8.3). Dabei handelte es sich um die bereits bekannte Äpfelsäure, welche mittels NMR und MS Spektrum nachgewiesen werden konnte und zwei zuvor nicht für den Sanddorn beschriebene Substanzen. Eine dieser Substanzen trat sowohl in Fraktion 13.4 zusammen mit der Äpfelsäure als auch in F13.3 auf. In F13.3 war zudem die bereits beschriebene Verbindung mit den  $m/z$  189 und 171 im RT Bereich 2.5–6.4 min enthalten. In **Abbildung 5.15** sind die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der F13.3 und F13.4 in DMSO-d<sub>6</sub> gegenüber gestellt. In F13.4 sind um die 4.3 ppm zwei Signale unterschiedlicher Intensität zu erkennen. Das größere der beiden Signale gehört zur CH-Gruppe der Äpfelsäure. Das Verhältnis der beiden Signale zueinander ist 0.18:1. Die chemische Verschiebung des kleineren Signals liegt bei 4.35 ppm. Genau bei dieser Verschiebung ist auch in F13.3 ein Signal zu sehen. In beiden Spektren findet sich zudem ein Singulett bei 3.63 ppm. Das Integral des Singuletts im Vergleich zu den Signalen bei 4.35 ppm ist drei Mal so groß. Es handelt sich wahrscheinlich um eine CH<sub>3</sub>-Gruppe. Da diese keine Aufspaltung aufweist, ist es naheliegend, dass in direkter Nachbarschaft keine weiteren Wasserstoffatome vorliegen. In beiden <sup>1</sup>H-NMR-Spektren finden sich zudem mehrere Signale im Bereich von 2.74–2.37 ppm. Hier liegen die Signale der CH<sub>2</sub>-Gruppe der Äpfelsäure. Die Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppe der Äpfelsäure sind chemisch nicht äquivalent, weshalb sie miteinander koppeln. Durch die zusätzliche Kopplung mit der CH-Gruppe in direkter Nachbarschaft, entstehen zwei Dupletts von Dupletts für jedes Proton der CH<sub>2</sub>-Gruppe im Spektrum. Da mitten in diesem Bereich das Lösungsmittelsignal des DMSO-d<sub>6</sub> liegt, wurden Vergleichsspektren in CD<sub>3</sub>CN angefertigt. Dort zeigt sich, dass das Integral der CH<sub>2</sub>-Gruppen der Äpfelsäure um etwa den Betrag größer ist, der für eine CH<sub>2</sub>-Gruppe im Verhältnis 0.18:1 stehen könnte. Da nun die CH<sub>2</sub>- und CH-Gruppe der unbekanntes Verbindung fast identische chemische Verschiebungen in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der F13.4 aufweisen wie die Äpfelsäure, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Äpfelsäure Derivat. Das Singulett Signal der CH<sub>3</sub>-Gruppe legt nah,

dass es sich um einen Methylester der Äpfelsäure handelt. Die  $^{13}\text{C}$ - und 2D-Spektren sowie das Massenspektrum der F13.3 bestätigen diese Vermutung (Anhang, Kapitel 8.3). In F13.3 sind im Vergleich zur F13.4 jedoch noch weitere Signale zu sehen. Eine  $\text{CH}_3$ -Gruppe bei 0.88 ppm und drei  $\text{CH}_2$ -Gruppen bei den chemischen Verschiebungen von 1.32 ppm, 1.54 ppm und 4.02 ppm. Das COSY-Spektrum der F13.3 zeigt, dass es sich dabei um einen n-Butyl-Rest handelt (Anhang, **Abbildung 8.3**). Die  $\text{CH}_2$ -Gruppe mit einer chemischen Verschiebung von 4.02 ppm ist durch die Kopplung zu lediglich einer weiteren  $\text{CH}_2$ -Gruppe zum Triplet aufgespalten. Durch die Nachbarschaft eines elektronegativen Kerns ist die Elektronendichte an der  $\text{CH}_2$ -Gruppe zudem verringert, was zu einer Entschirmung und somit einer höheren Resonanzfrequenz führt. Dieser Effekt wird auch Tieffeldverschiebung genannt und ist der Grund dafür, dass die  $\text{CH}_2$ -Gruppe bei einer relativ hohen chemischen Verschiebung von 4.02 ppm auftritt. Alle weiteren Signale ähneln stark denen der Äpfelsäure und des Äpfelsäuremethylesters. Das Massenspektrum legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Verbindung um den Äpfelsäurebutylester handelt. Dessen molare Masse beträgt 190.2 g/mol und würde demnach im (-) Chromatogramm als  $m/z$  189 detektiert werden. Beide Verbindungen wurden das erste Mal in Sanddornbeeren nachgewiesen. Die Wahrscheinlichkeit ist jedoch hoch, dass der Butylester während des Extraktionsprozesses entstanden ist. Da der Methyl- und der Butylester in etwa gleichen Anteilen im NMR Spektrum vorhanden sind, macht jede Verbindung circa 20 mg der insgesamt 40 mg der F13.3 aus. Der Methylester ist zudem noch zu etwa 15% in F13.4 enthalten, was einer Menge von 6.7 mg entspricht. Der Anteil an Äpfelsäure in F13 ist somit 37.46 mg. Die Struktur des Äpfelsäuremethylesters konnte durch einen Vergleich mit den NMR Spektren einer Standardsubstanz zusätzlich bewiesen werden.

Fraktion 18 des HBG-I 1-Butanolextraktes wurde erfolgreich aufgetrennt und eine reine Substanz wurde mit einer Ausbeute von 100 mg gewonnen. In **Abbildung 5.16** ist das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der F18.1 in  $\text{DMSO-d}_6$  zu sehen. Auffällig sind hier die drei breiten Signale im Bereich von 4.4–5.0 ppm.



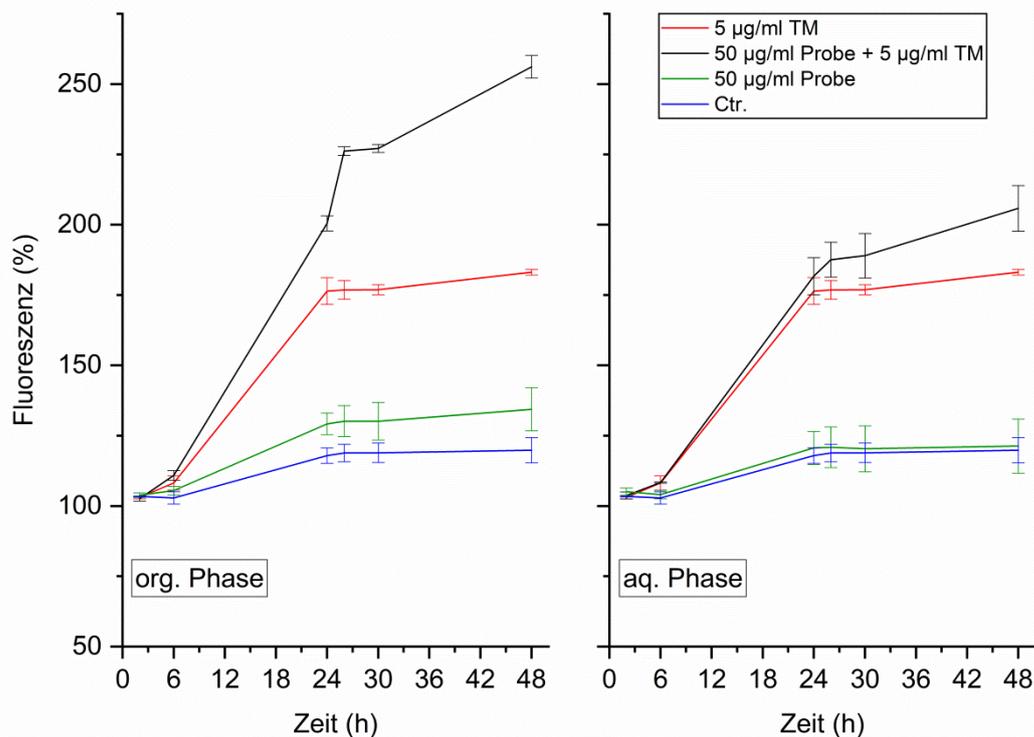
**Abbildung 5.16**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der F18.1 in  $\text{DMSO-d}_6$

Die chemische Verschiebung spricht dafür, dass die Wasserstoffkerne durch Heteroatome wie Sauerstoff in ihrer Umgebung stark entschirmt werden. Die Verbreiterung der Signale ist

wahrscheinlich auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Analyt-Molekülen untereinander und mit dem Lösungsmittel zurückzuführen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich um Protonen handelt, die an Heteroatomen gebunden sind. Die zum Duplett aufgespaltene CH-Gruppe bei einer chemischen Verschiebung von 4.11 ppm liegt in einem Bereich, der typisch für ein Anomeres Zentrum von Zuckern ist. Die Kupplungskonstante über drei Bindungen liegt bei 7.7 Hz, was für eine  $\beta$ -D-Glucose oder Galactose sprechen würde. Aufgrund des Diederwinkels von circa  $180^\circ$  ist die Kopplungskonstante in der  $\beta$ -Form deutlich größer als in der  $\alpha$ -Form, in welcher der Diederwinkel bei circa  $60^\circ$  liegt. Nach Auswertung der 2D-Spektren, kann die Vermutung, dass es sich um eine  $\beta$ -D-Glucose handelt bestätigt werden. Die Hydroxy-Gruppe am anomeren Zentrum ist jedoch mit einem Ethyl-Rest besetzt. Es ist demnach das Ethyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Anhang, Kapitel 8.3). Dies wurde auch durch den Abgleich der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren mit Literaturdaten bestätigt.<sup>140</sup> Tiitinen et al (2006) gelang es zuvor als ersten und einzigen, diese Verbindung aus frisch hergestelltem Sanddornsaft zu isolieren.<sup>123</sup> Dazu verwendeten sie ein HPLC System mit einer Luna NH<sub>2</sub> Säule, das mit Acetonitril und Wasser im Verhältnis 8:2 genutzt wurde. Die Ausbeute der isolierten Verbindung wurde nicht genannt, lediglich ein mittels GC/MS ermittelter Gehalt für verschieden Sorten des Sanddorns, der mit 0.3 – 1.0 g/100 ml angegeben wurde. Sanddornbeeren haben einen Feuchtigkeitsgehalt von circa 82%.<sup>141</sup> Um 100 ml Saft zu erhalten müssten demnach circa 122 g Sanddornbeeren entsaftet werden. Dies würde einem Trockengewicht von 22.0 g der Sanddornbeeren entsprechen. Der Gehalt würde somit zwischen 14 und 45 mg/g (Ethyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid/Trockenmasse Beere) liegen. Die isolierte Ausbeute aus den HBG-I Sanddornbeeren liegt mit 21 mg/g in diesem Bereich.

#### *Untersuchung einzelner Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes auf ihre Wirkung bezüglich ER-Stresses*

Einige der hergestellten Fraktionen wurden in den Zelluntersuchungen auf ihre Wirkung bezüglich ER-Stress getestet. Zuerst wurden die durch Extraktionsschritte hergestellte wässrige und organische Phase des HBG-I 1-Butanols untersucht. Es sollte dadurch festgestellt werden, ob die Wirkung durch die polaren oder unpolaren Bestandteile des Butanolextraktes hervorgerufen wird. Wie in **Abbildung 5.17** zu sehen ist, konnte keine der beiden Phasen die ER-Stress lindernde Wirkung des Vollextraktes in den Zellen hervorrufen. Auch die protektive Behandlung der Zellen, die nicht abgebildet wurde, zeigte keine signifikante Reduktion des ER-Stresses. Im Gegenteil zu dem Vollextrakt sorgten die beiden Phasen dafür, dass die Zellen in den Untersuchungen einen deutlich erhöhten ER-Stresslevel erreichten. Diese Umkehr der Wirkung kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Die bereits Erläuterte chemische Veränderung, die in den beiden Phasen detektiert wurde, könnte einen Wirkstoff so verändert haben, dass dieser keine Wirkung mehr in den Zellen verursacht. Zudem könnte eine zuvor wirkungslose Verbindung nun negative Effekte auf die Zelle ausüben. Es wäre außerdem möglich, dass synergistische Effekte, welche durch das Vollextrakt in den Zellen hervorgerufen werden, bei der Auftrennung der Substanzen in zwei Phasen unterschiedlicher Polaritäten verloren gegangen sind.

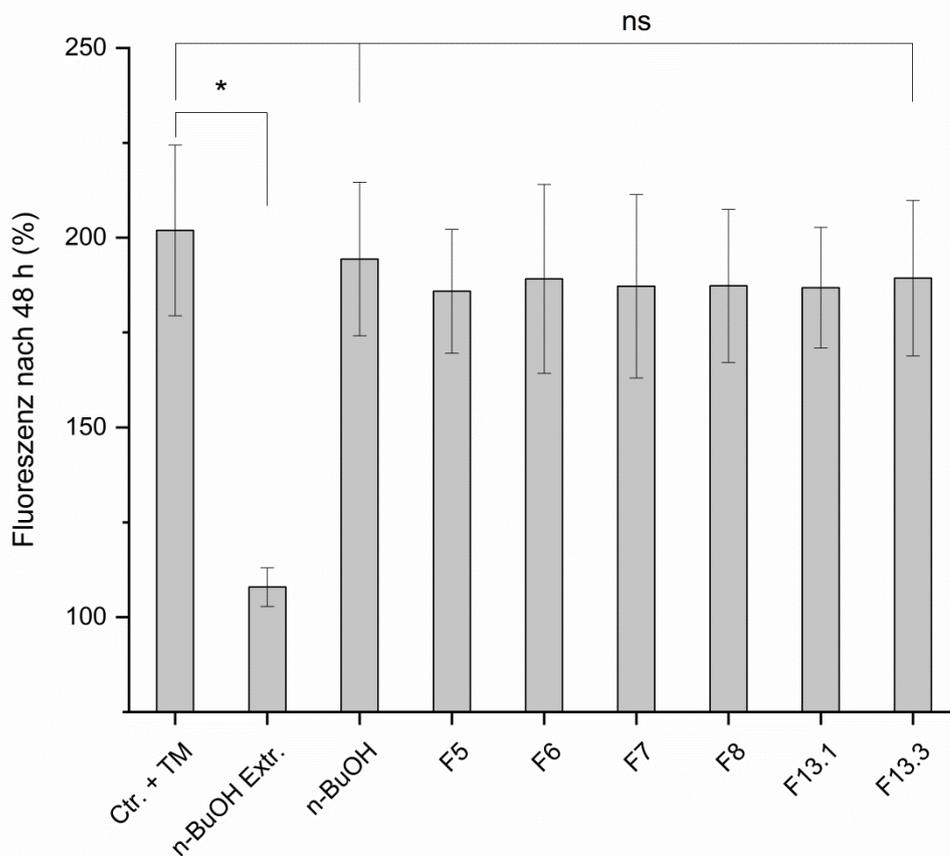


**Abbildung 5.17** Einfluss der organischen (org.) und wässrigen (aq.) Phase auf TM induzierten ER-Stress während der therapeutischen Behandlung der Zellen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=2)

Trotz der schlechten Ergebnisse der beiden extraktiv gewonnenen Fraktionen, wurden auch Fraktionen, die durch die Säulenchromatographie erhalten wurden, untersucht. Die Wirkung kann aus der **Abbildung 5.18** entnommen werden. In diesem Balkendiagramm sind die Fluoreszenz-Werte 48 h nach der Zugabe der Proben während der protektiven Behandlung dargestellt. Als Kontrolle dienten in diesem Fall die nur mit TM behandelten Zellen. Es ist sofort ersichtlich, dass keine der Fraktionen eine signifikante Abweichung der Fluoreszenz in den Zellen im Vergleich zu den nur mit TM versetzten Zellen bewirken kann. Somit ist das TM ungehindert in der Lage, ER-Stress in den Zellen zu induzieren. Auch das reine 1-BuOH zeigt keinen Einfluss auf die Entstehung des ER-Stresses in den Zellen. In diesem Vergleich fällt die gute Wirkung des HBG-I 1-Butanolextraktes besonders auf, da es als einzige Probe den ER-Stress signifikant reduziert.

Auch im therapeutischen Ansatz ist für die Fraktionen der Säulenchromatographie keine signifikante Reduzierung des ER-Stresses zu beobachten gewesen, weshalb auf eine Darstellung der Ergebnisse verzichtet wird.

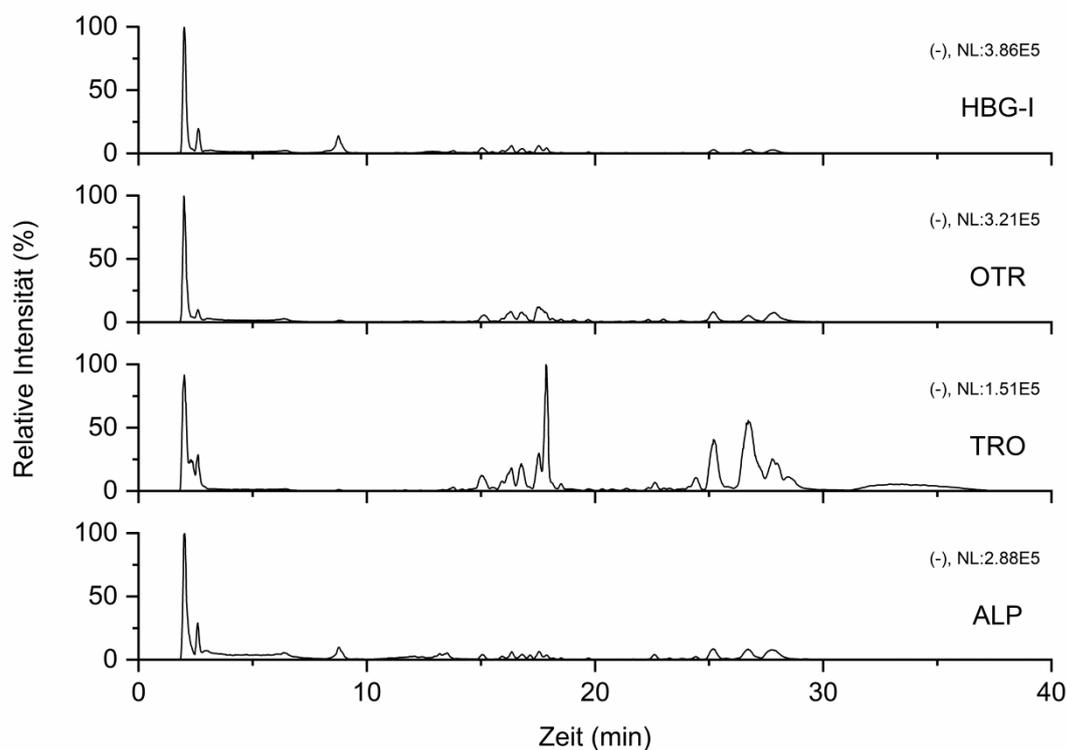
Aufgrund der schlechten Ergebnisse der Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes lag die Vermutung nahe, dass im Vollextrakt mehrere Substanzen vorlagen, die gemeinsam eine Wirkung in den Zellen verursachten. Um die synergistischen Effekte zu reproduzieren und genauere Erkenntnisse über diese zu erhalten, wurden erneut 1-Butanolextrakte der Sanddornbeeren hergestellt. Neben der Sorte Habego (HBG-I) wurden zusätzlich die Sorten Otradnaja (OTR), Trofimovskaja (TRO) und eine Sorte mit Ursprung aus den Alpen (ALP) untersucht.



**Abbildung 5.18** Ergebnisse der protektiven Behandlung der Zellen mit einigen Fraktionen des HBG-I 1-Butanolextraktes. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Signifikanzermittlung mit ungepaartem t-Test: \* =  $p < 0.05$

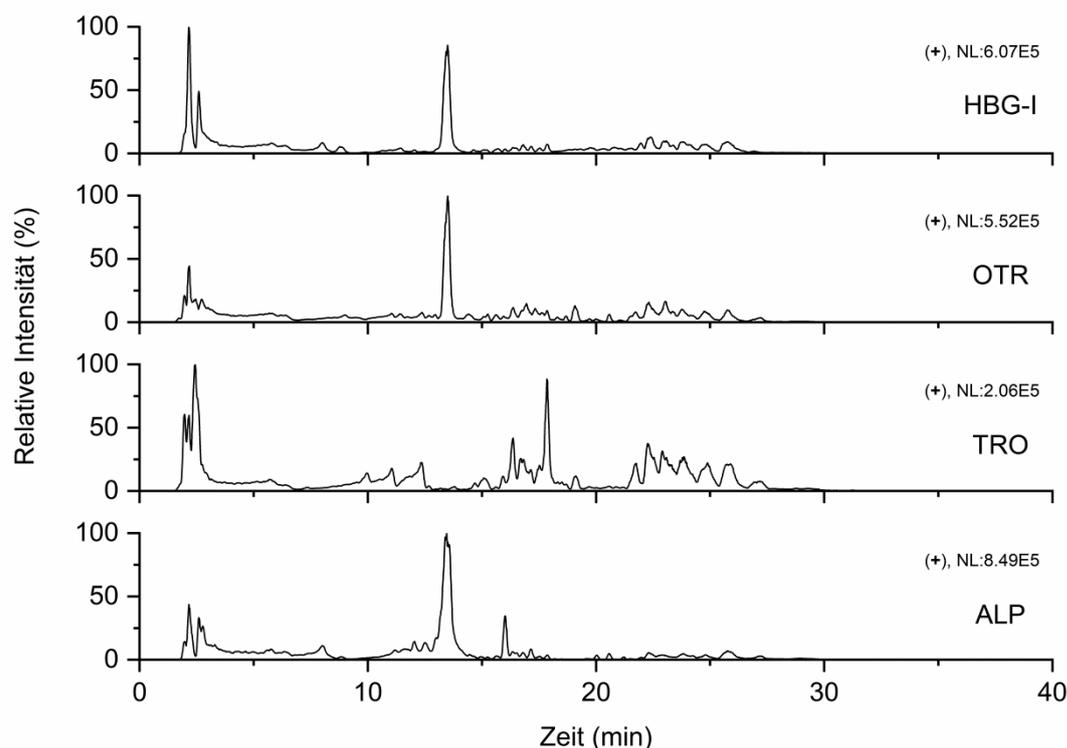
#### *Vergleich der 1-Butanolextrakte verschiedener Sanddornsorten*

Da die ER-Stress lindernde Wirkung für das 1-Butanolvollextrakt der HBG-I entdeckt wurde, kam die Frage auf, ob auch andere Sorten des Sanddorns diese Wirkung hervorbringen würden. Hierfür wurden zusätzlich drei weitere Sorten Sanddornbeeren mit 1-Butanol extrahiert. Die neuen Sanddornarten waren Otradnaja (OTR), Trofimovskaja (TRO) und eine nicht genau definierte Sorte mit Ursprung in den Alpen (ALP). Die Sanddornpflanzen wurden alle in Gülzow-Prüzen angebaut und zu etwa gleichen Zeitpunkten geerntet. Lediglich die HBG-I wurde ein Jahr vor den anderen Beeren geerntet. Die Feststoffgehalte der Extrakte variieren recht stark. Den höchsten Gehalt weist die HBG-I mit 12.3 mg/ml auf. Darauf folgen die ALP mit 8.0 mg/ml, die OTR mit 6.43 mg/ml und die TRO mit 2.78 mg/ml. Für den Vergleich der MS Spektren wurden alle Proben auf 10 mg/ml eingestellt.



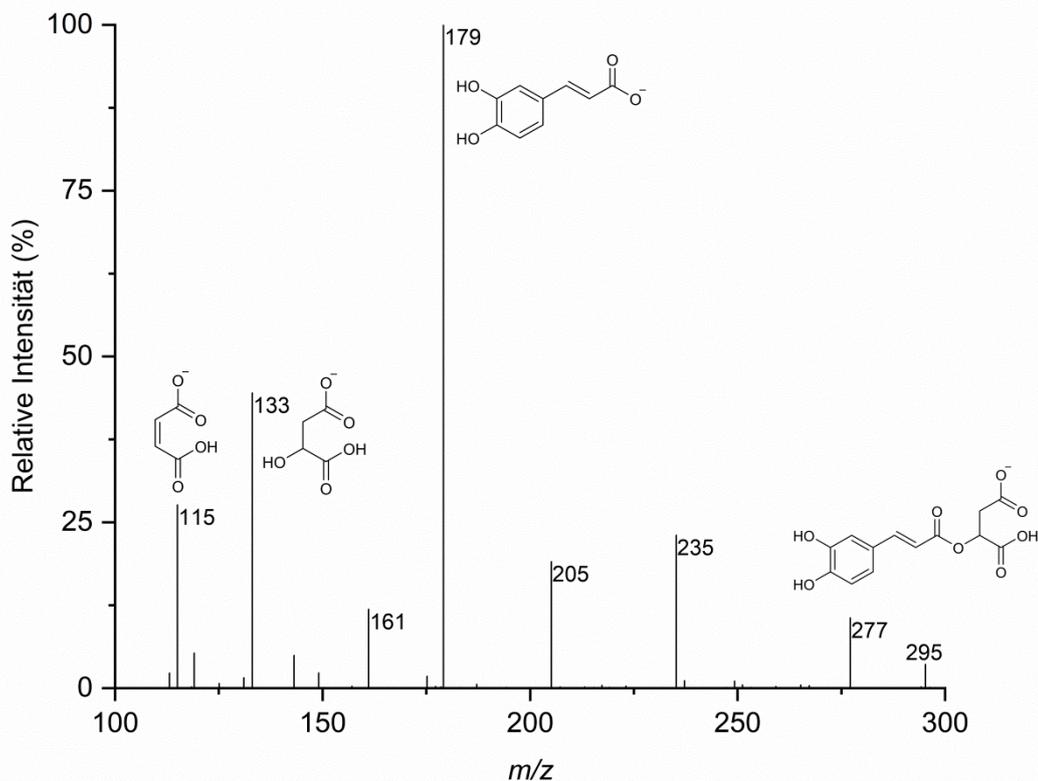
**Abbildung 5.19** (-) Base Peak Chromatogramme der 1-Butanolextrakte der HBG-I, OTR, TRO und ALP

Die JCD ermittelte in den Extrakten unterschiedlich viele Inhaltsstoffe. Im negativen Scan-Modus wurde für die TRO mit 110 Verbindungen die höchste Anzahl bestimmt. Darauf folgten die ALP mit 84, die OTR mit 73 und die HBG-I mit 63 Substanzen. Im positiven Scan-Modus wurden mit 73 die meisten Inhaltsstoffe in der ALP gefunden. Darauf folgten die HBG-I mit 60, die OTR mit 59 und die TRO mit 54 Verbindungen. Im Durchschnitt weisen alle Sorten, die 2017 geerntet wurden, mehr Signale auf als die HBG-I von 2016. Ein Grund dafür könnten unterschiedliche Umweltbedingungen in den beiden Jahren sein, die das Wachstum der Beeren beeinflusst haben. Es könnte sich jedoch auch um sortenspezifische Unterschiede handeln. Die Ergebnisse der TRO sind besonders auffällig, da ihre Werte stark auseinander liegen. Dies könnte als Indiz dafür gesehen werden, dass im Extrakt der TRO vor allem Substanzen vorkommen, die leicht zu deprotonieren sind und somit als Anion detektiert werden. Um genauere Informationen zu erhalten, wurden die Chromatogramme und dazugehörigen Massenspektren visuell ausgewertet. In **Abbildung 5.19** und **Abbildung 5.20** sind die (-) bzw. (+) Chromatogramme der Extrakte dargestellt. In beiden Abbildungen fällt trotz ihres unterschiedlichen Aussehens sofort auf, dass die Chromatogramme des TRO Extraktes sich in ihrer Zusammensetzung von den restlichen Sorten stark unterscheiden.



**Abbildung 5.20** (+) Base Peak Chromatogramme der 1-Butanolextrakte der HBG-I, OTR, TRO und ALP

Im (-) Chromatogramm treten vor allem die Signale im hinteren Bereich des Chromatogramms viel stärker hervor, als es bei den anderen Sorten der Fall ist. Auffällig ist hier besonders der Peak zur RT 17.8 min. Hier findet sich die schon aus den vorherigen Betrachtungen bekannte Verbindung Ursolsäure mit einem  $m/z$  von 455.5 wieder. Sie zeigt die höchste Intensität im gesamten Chromatogramm der TRO und der Peak ist im Vergleich mit den anderen Sorten um circa eine Zehnerpotenz größer. Weitere Phytosterinen wurden in alle untersuchten Butanolextrakten entdeckt. Die Intensitäten variieren hier jedoch zwischen den Sorten, liegen aber nicht weiter als eine Zehnerpotenz auseinander. Die TRO zeigt zusätzlich besonders zwischen RT 25–30 min erhöhte Intensitäten im Vergleich zu den anderen Sanddornarten. Die verhältnismäßig hohe Menge an Phytosterinen im Chromatogramm der TRO könnte eine Erklärung für den geringen Feststoffgehalt des Extraktes sein. Polare Verbindungen wie organische Säuren und Zuckerderivate sind in den anderen Extrakten in höherem Maße vorhanden. Diese machen vor allem im Extrakt der HBG-I einen großen Anteil aus, welches auch den höchsten Feststoffgehalt besitzt. Die Isorhamnetin Derivate wie das Isorhamnetin 3-O-Rutinosid bei RT 8.8 min sind im HBG-I und ALP Extrakt über eine Zehnerpotenz stärker in ihrer Intensität als es für die TRO der Fall ist und auch die OTR zeigt deutlich schwächere Peaks für Verbindungen dieser Art. Auch im vordersten Bereich des (-) Chromatogramms sind Unterschiede zwischen den Sanddornsorten auszumachen. Eine Verbindung mit dem  $m/z$  295 zur RT 2.0 min wurde in den Sorten TRO und OTR mit einer hohen Intensität detektiert. Im Chromatogramm der ALP ist diese Substanz deutlich schwächer vorhanden und im HBG-I Chromatogramm zeigt sie sich nur in Spuren. Das Fragmentierungsmuster dieses Stoffes wurde über einen MS/MS Versuch mit dem OTR Extrakt ermittelt und gibt Aufschluss über die Struktur dieser Verbindung. Wie in **Abbildung 5.21** zu sehen ist, sind die beiden größten Fragmente, die bei einer Fragmentierungsenergie von 35% entstehen, die 179 und die 133.



**Abbildung 5.21** Massenspektrum des MS/MS Experimentes (Fragmentierungsenergie 30%) auf die Masse 295 aus dem OTR 1-Butanolextrakt

Zusammengerechnet würde sich eine Masse von 312 ergeben. Diese liegt 17 u über dem Molekülpeak der Verbindung. Eine Differenz von 17 steht in der ESI-MS typischerweise für die Abspaltung eines Hydroxidions. Angenommen die  $m/z$  133 und 179 würden für die Äpfelsäure und die Kaffeesäure als Fragmente des unbekanntes Moleküls stehen, könnte es sich um einen Ester aus den beiden Säuren handeln, welcher eine um genau 17 u geringere Masse hätte, als die Kombination aus beidem. Auch die weiteren Fragmente würden zu solch einer Verbindung passen. Die Abspaltung eines Wassermoleküls aus dem Anion des Esters würde zum Fragment 277 führen, welches durch die Abgabe von  $\text{CO}_2$  auf ein  $m/z$  von 235 gelangen würde. Durch das Abspalten von Formaldehyd und Ethin würden daraufhin die Fragmente 205 und 179 gebildet. Auch das  $m/z$  von 115 würde als bekanntes Fragment der Äpfelsäure gut ins Bild passen. Es handelt sich dabei um Fumarat. Die stabilsten Fragmente besitzen bei MS/MS Versuchen die stärkste Intensität, was auch für die drei Säuren sprechen würde.

Das  $m/z$  179 ist auch in den (-)  $\text{MS}^1$  Spektren zur RT 2.0 min der TRO und OTR am stärksten vertreten. Die HBG-I zeigt hier erneut die geringste Intensität im Chromatogramm. Ein erhöhter Gehalt an Kaffeesäure würde natürlich auch die Bildung eines Esters mit der Äpfelsäure begünstigen. Umgekehrt verhält es sich für die Ethyl- $\beta$ -D-Glucopyranose, welche in den ALP und HBG-I (-) Chromatogrammen in einer deutlich höheren Intensität vorkommt, als es für die beiden anderen Sorten der Fall ist. Kombiniert mit der Tatsache, dass der Feststoffgehalt dieser Sanddornarten am höchsten ausfiel, spricht dies erneut dafür, dass Zuckerderivate einen Großteil der Trockenextraktmasse ausmachen. Auch in den (+) Chromatogrammen lassen sich einige Unterschiede

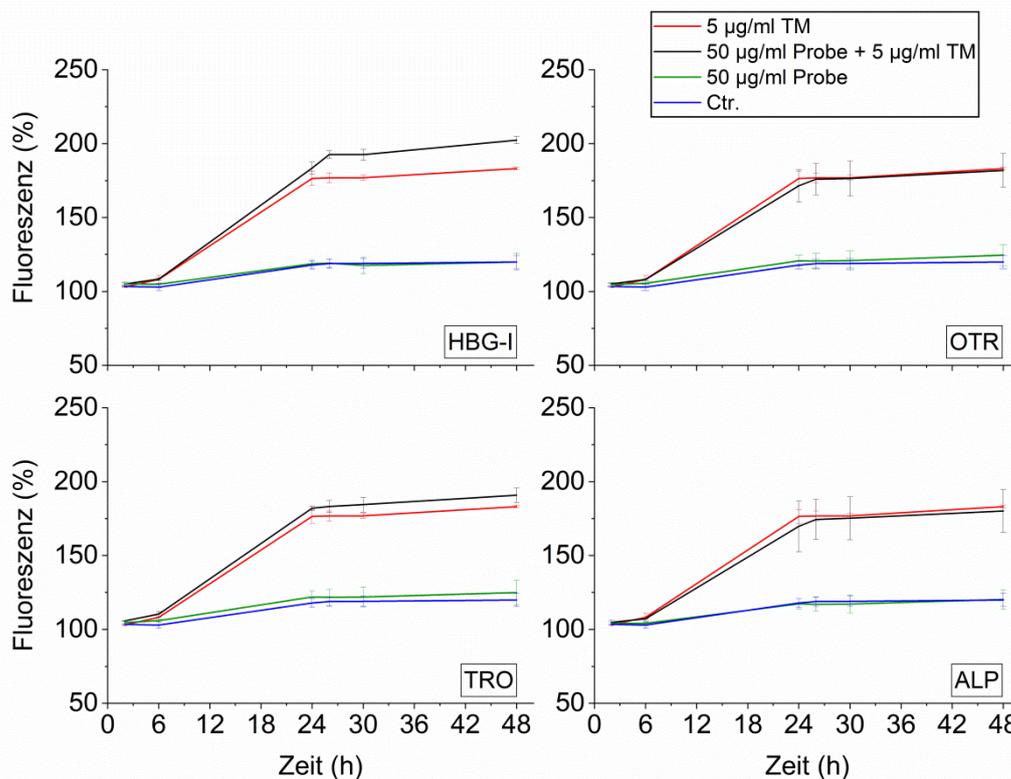
zwischen den Extrakten der Sanddornbeeren erkennen. Die Arten OTR und TRO weisen beispielsweise beide deutlich höhere Intensitäten für die  $m/z$  Werte 427 und 483 zu den RT 2.4 bzw. 2.8 min auf. Der größte Unterschied ist jedoch mit einem Blick auf die Chromatogramme in **Abbildung 5.20** ersichtlich. Der Peak zur RT 13.5 min, welcher in allen Chromatogrammen außer dem der TRO der größte oder zweitgrößte im gesamten Chromatogramm ist. Es handelt sich dabei um eine Verbindung mit dem  $m/z$  269 und ist in den Chromatogrammen der ALP, OTR und HBG-I über zwei Zehnerpotenzen stärker vorhanden als in der TRO. Diese weist, wie auch im (-) Chromatogramm, ihren größten Peak bei einer RT von 17.8 min auf. Die Ursolsäure wird hier als Natrium-Addukt mit einem  $m/z$  von 479 detektiert. Im RT Bereich von 20–30 min überwiegen die TRO und OTR die ALP und HBG-I in der Intensität der Peaks. Aufgrund der geringeren Feststoffgehalte sind die Gehälter in den Extrakten jedoch wahrscheinlich ähnlich hoch. Auffällig sind bei genauerer Betrachtung einige  $m/z$  Werte, die nur in der HBG-I oder der ALP vorkommen. Dazu gehören die 688.5 und 716.5 zu den RT 22.0 und 23.4 min für die HBG-I und die 826 über den RT Bereich von 25.0–30 min in der OTR. Wie zu erwarten war, sind viele Substanzen in jeder der untersuchten Sorten des Sanddorns zu finden (Tab. 5.9). Die Gehälter variieren jedoch in manchen Fällen stark und es gibt einige Verbindungen, die nur in einzelnen Sorten auftreten oder fehlen. Die einzigartige Zusammensetzung der Extrakte könnte einen Unterschied in den medizinischen Untersuchungen hervorrufen, da synergistische Effekte nach den bisherigen Erkenntnissen eine entscheidende Rolle spielen sollten.

**Tabelle 5.9** Identifizierte Substanzen aus den 1-Butanolextrakten der HBG-I, OTR, TRO und ALP (x = im Extrakt enthalten)

| Bestimmte Struktur  | RT   | $m/z$ <sup>+</sup> | $m/z$ <sup>-</sup> | HBG-I | OTR | TRO | ALP | Referenzen             |
|---|------|--------------------|--------------------|-------|-----|-----|-----|------------------------|
| Fumarsäure Methyl ester   | 1.7  |                    | 129.1              | x     | x   | x   | x   | 124                    |
| Ascorbinsäure   | 2.0  |                    | 175.0              | x     |     |     | x   | 123,125                |
| Kaffeensäure  | 2.0  |                    | 179.1              | x     | x   | x   | x   | 142,119,143,144,128    |
| Chinasäure <sup>S</sup>   | 2.0  |                    | 191.1              | x     | x   | x   | x   | 123,124                |
| Ferulasäure   | 2.0  |                    | 193.1              | x     | x   | x   | x   | 145,142,119,128,143    |
| Caffeoylmalic acid <sup>M</sup>   | 2.0  |                    | 295.2              | x     | x   | x   | x   |                        |
| Myricetin   | 2.0  | 319.2              |                    | x     | x   | x   | x   | 121,128                |
| Catechin <sup>S</sup>   | 2.1  |                    | 289.1              | x     | x   | x   | x   | 120,121,119,122        |
| Fumarsäure <sup>S</sup>   | 2.2  |                    | 115.0              | x     | x   | x   | x   |                        |
| Äpfelsäure <sup>S</sup>   | 2.2  |                    | 133.0              | x     | x   | x   | x   | 123                    |
| Ethyl-β-D-Glucopyranosid  | 2.3  |                    | 207.1              | x     | x   | x   | x   | 123,135,146            |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid <sup>M</sup>   | 8.8  | 647.4              | 623.3              | x     | x   | x   | x   | 120,18,126,127,122,124 |
| Isorhamnetin 3-O-Glucosid   | 8.9  | 501.3              | 477.2              | x     | x   | x   | x   | 120,126,127,124,122    |
| Isorhamnetin <sup>S</sup>   | 12.8 |                    | 315.2              | x     | x   |     | x   | 120,121,18,128,143,124 |
| Korosolsäure/23-hydroxybetulinic acid (hba)/Maslinic acid/3,22-dihydroxyolean-12-en-29-oic acid (doa) | 15.9 |                    | 471.5              | x     | x   | x   | x   | 130,136                |
| Korosolsäure/hba/Maslinic acid/doa  | 16.8 |                    | 471.5              | x     | x   | x   | x   | 136,130                |
| Palmitoleinsäure <sup>S</sup>   | 17.3 |                    | 253.4              | x     | x   | x   | x   | 126,131-133,125        |
| Linolsäure <sup>S</sup>   | 17.8 |                    | 279.4              |       | x   | x   | x   | 126,131-133,147,125    |
| Palmitinsäure <sup>S</sup>  | 17.8 |                    | 255.4              |       |     | x   |     | 126,131-133,125        |
| Ursolsäure  | 17.9 |                    | 455.6              | x     | x   | x   | x   | 134,135,130,136        |
| Vaccensäure <sup>S</sup>  | 18.2 |                    | 281.4              | x     | x   | x   | x   | 126,133                |
| Korosolsäure/hba/Maslinic acid/doa  | 24.4 |                    | 471.6              | x     | x   | x   | x   | 130,136                |
| Melilotigenin c/6β,19-dihydroxy-3-oxours-12-en-28-oic acid  | 25.5 |                    | 485.6              | x     | x   | x   | x   | 136                    |

## Untersuchung der 1-Butanolextrakte verschiedener Sanddornsorten auf ihre Wirkung bezüglich ER-Stresses

Die 1-Butanolextrakte der Sanddornbeeren wurden wie die zuvor untersuchten Proben in einem therapeutischen und protektiven Versuchsaufbau untersucht. Dabei zeigten weder die Extrakte der OTR, TRO und ALP Sanddornbeeren noch die der HBG-I eine ER-Stress reduzierende Wirkung in den Zellkulturen. Da das HBG-I 1-Butanolextrakt in den vorherigen Untersuchungen eine signifikante Reduzierung des ER-Stresslevels in den Zellen bewirkte, war dieses Ergebnis unerwartet. Wie in **Abbildung 5.22** zu sehen ist, zeigte das HBG-I Extrakt in diesem Fall nicht einmal eine leichte Stress-reduzierende Tendenz, die Messwerte lagen im Vergleich sogar über denen der mit TM behandelten Zellen. Gleiches war auch für die protektive Behandlung der Zellen zu beobachten.



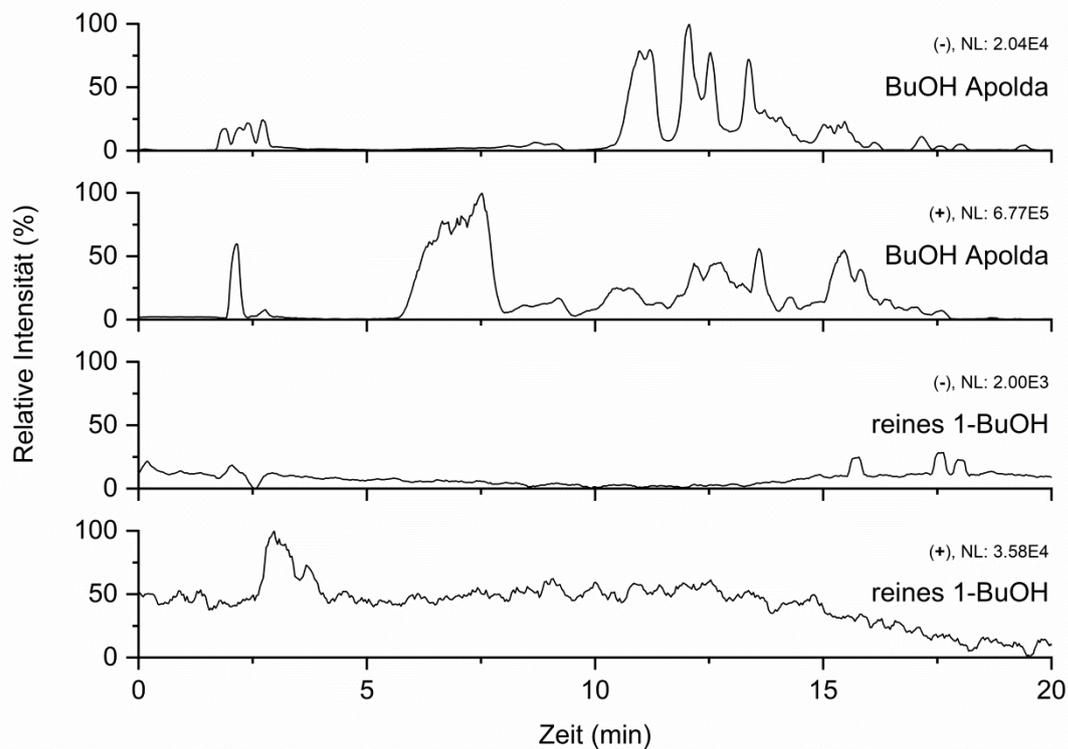
**Abbildung 5.22** Einfluss der unterschiedlichen 1-Butanolsanddornbeerenextrakte auf TM-induzierten ER-Stress während der therapeutischen Behandlung der Zellen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3)

Da die Wirkung des HBG-I 1-Butanolextraktes bei der zweiten hergestellten Charge nicht wieder beobachtet werden konnte, wurde die erste Charge im Vergleich dazu erneut vermessen. Das erste HBG-I 1-Butanolextrakt zeigte jedoch in jedem weiteren Test eine sehr gute Wirkung im Zellsystem. Weiterführende Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass nicht die Inhaltsstoffe des Sanddorns, sondern Verunreinigungen im verwendeten 1-Butanol die Wirkung verursachten. Die Reste des ursprünglich verwendeten Butanols wiesen die gleiche Wirkung in den medizinischen Untersuchungen auf, wie zuvor das 1-Butanolextrakt. Die Sanddornbeeren wurden nach dieser Erkenntnis nicht weiter auf eine eventuelle ER-Stress reduzierende Wirkung untersucht.

## Untersuchung der Begleitstoffe des wirksamen 1-Butanols

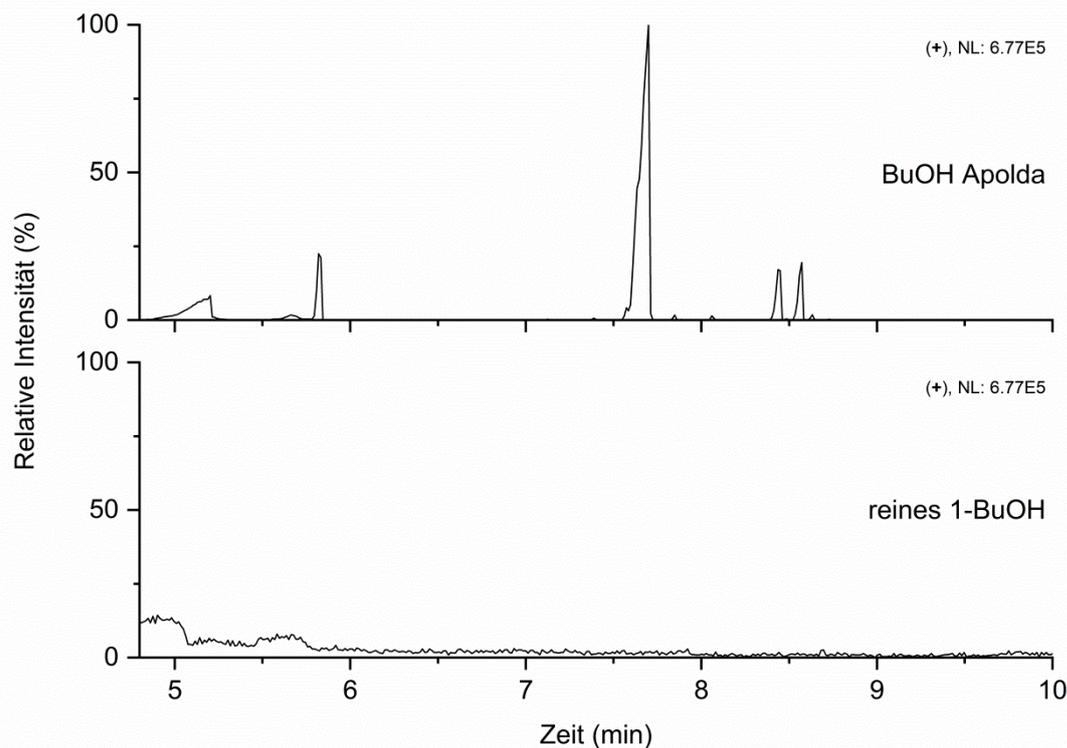
Die Wirksamkeit des 1-Butanols, welches zur Herstellung des ersten HBG-I 1-Butanolextraktes verwendet wurde, konnte nicht durch 1-Butanol hervorgerufen werden. Alle weiteren 1-

Butanolextrakte wiesen keine Wirkung in den Zelltests auf und auch die vermessenen Referenzproben aus reinem Butanol zeigten keine Wirkung. Dementsprechend mussten Begleitstoffe in diesem Butanol die Verminderung des ER-Stresses verursachen. Die zur ersten Extraktion verwendete Charge des Lösungsmittels war bereits über 30 Jahre alt, weshalb für weitere Extraktionen auch neue Bestände angeschafft wurden. Da es von der Firma Apolda Chemie hergestellt wurde, wird es im Folgenden als Butanol (BuOH) Apolda bezeichnet. Über die Jahre könnten natürlich Verunreinigungen in das Lösungsmittel gelangt sein. Auch Oxidationsprozesse könnten einige Lösungsmittelmoleküle verändert haben. Ein Vergleich der LC/MS und GC/MS Spektren zeigte, dass die Reinheit des BuOH Apolda wesentlich geringer ausfiel, als es für eine frische Charge HPLC Grade 1-Butanol der Fall war.



**Abbildung 5.23** Base Peak Chromatogramme des Butanol Apoldas und des HPLC Grade Butanols (reines 1-BuOH)

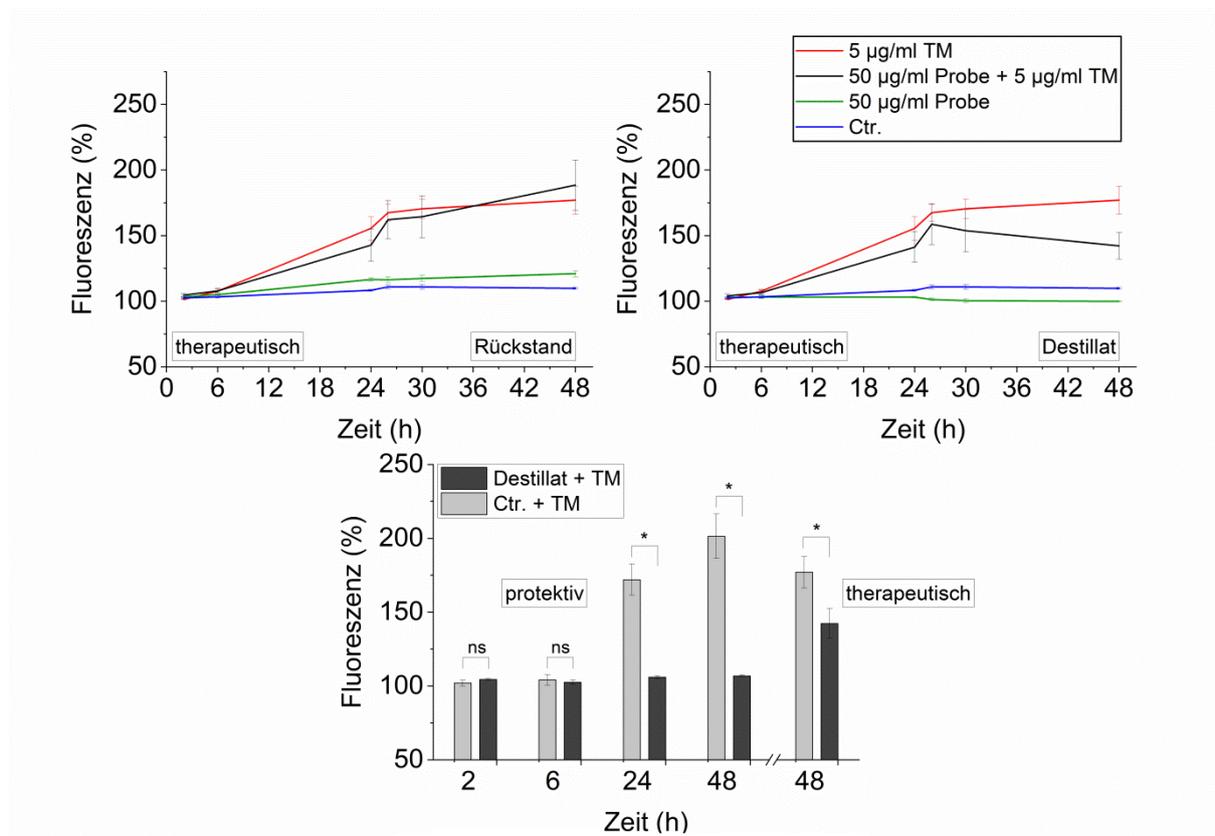
Während das HPLC Grade 1-Butanol in beiden LC/MS-Chromatogrammen lediglich Untergrundsignale aufweist, sind in den Chromatogrammen des BuOH Apolda einige Peaks zu sehen (**Abbildung 5.23**). Die  $m/z$  Werte der detektierten Verbindungen liegen dabei im Bereich von 100 bis maximal 300. Auch in den GC/MS-Chromatogrammen sind deutliche Unterschiede zwischen dem BuOH Apolda und dem HPLC Grade 1-Butanol auszumachen (**Abbildung 5.24**). Während im reinen Butanol neben dem Lösungsmittelsignal nur Untergrundsignale im Intensitätsbereich von  $10^3$  auszumachen sind, zeigen sich im Chromatogramm des BuOH Apolda deutliche Peaks mit einer Intensität von bis zu  $10^7$ . Neben mehreren kleineren Peaks, sind fünf weitere deutlich zu erkennen, wobei der größte Peak bei RT 7.7 min erscheint.



**Abbildung 5.24** Base Peak GC-MS Chromatogramm des BuOH Apolda und des HPLC Grade Butanols

Eine Aussage darüber, welche Substanz/en die Wirkung in den medizinischen Untersuchungen hervorruft, konnte an dieser Stelle jedoch noch nicht gemacht werden. In einem nächsten Schritt wurde das BuOH Apolda bei 40 °C und einem Druck von 80 mbar destilliert. Sowohl das Destillat als auch der flüssige Rückstand wurden daraufhin mittels DC, LC/MS und GC/MS untersucht. Dabei wies der Rückstand deutlich stärkere Verunreinigungen auf als das Destillat. Es wurde daher entschieden, den Rückstand mittels Säulenchromatographie aufzutrennen. Diese ergab neun Fraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung und Reinheit. Bevor weitere Analysen durchgeführt wurden, wurde die Wirksamkeit des Rückstands und seiner Fraktionen in den medizinischen Untersuchungen getestet. Es stellte sich heraus, dass weder der Rückstand noch eine der Fraktionen eine Wirkung aufwies. Dadurch geriet das Destillat in den Fokus der Untersuchung und wurde in der Zellkultur untersucht. Die positive ER-Stress-lindernde Wirkung konnte hier wieder beobachtet werden. In **Abbildung 5.25** sind die Ergebnisse der therapeutischen Behandlung der Zellkulturen mit dem Rückstand und dem Destillat dargestellt. Für das Destillat ist zudem der Verlauf der protektiven Behandlung abgebildet. In beiden Fällen ist eine signifikante Reduzierung des ER-Stresses durch das Destillat des BuOH Apolda in den Zellen zu beobachten. Aufgrund der guten Resultate in den Zelltest wurde das Destillat genauer analysiert. Anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums konnte nachgewiesen werden, dass die Reinheit des Destillats bei  $\geq 99\%$  lag. Die Substanz, die die positive Wirkung verursachte, war demnach nur in Spuren im Destillat enthalten. Da verschiedene DC Experimente unter Verwendung unterschiedlicher Färbereagenzien keine Verunreinigungen im Destillat nachweisen konnten, fiel die Säulenchromatographie als Trennmethode aus. Im GC/MS-Chromatogramm waren im Destillat erneute einige Peaks zu erkennen. Da die Substanz zudem bei der Destillation des Butanols nicht im Rückstand verblieb, wurde versucht, das Destillat über eine weitere Destillation zu trennen. Mehrere Versuche, sowohl unter Atmosphärendruck als auch unter

vermindertem Druck, blieben jedoch erfolglos. Die Ähnlichkeit der Substanz mit dem Butanol ist zu groß, als das eine Trennung über diesen Weg möglich wäre.



**Abbildung 5.25** Ergebnisse der therapeutischen Behandlung (oben) der Zellen mit dem Destillat oder Rückstand des BuOH Apolda und Ergebnisse der protektiven Behandlung (unten) mit dem Destillat. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Signifikanzermittlung mit ungepaartem t-Test: \* = p<0.05

So blieb letzten Endes nur die Möglichkeit, die Verbindungen im Destillat über einen Datenbankabgleich (MassLib V9.40) der EI-MS-Spektren der GC/MS zu ermitteln. Die GC/MS-Messung und der Datenbankabgleich wurden durch Dr. Christine Fischer von Leibniz-Institut für Katalyse durchgeführt. Einen Überblick über die Substanzen, die von der Datenbank vorgeschlagen wurden, ist in Tabelle 5.10 zu sehen. Einige Substanz aus dieser Liste schienen mit größerer Wahrscheinlichkeit im Butanol-Destillat vorhanden zu sein. Die Derivate der oxidierten Form des 1-Butanols, der 1-Buttersäure, und alle Derivate mit n-Butyl-Resten kamen aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum 1-Butanol wahrscheinlicher in dessen Destillat vor, als Acetate oder *iso*- und *sec*-Butyl-Verbindungen. Die Ergebnisse der medizinischen Untersuchung dieser Verbindungen stehen jedoch noch aus.

**Tabelle 5.10** Substanzen, die nach Datenbankabgleich im BuOH Apolda Destillat enthalten sein könnten. Übereinstimmung der Datenbank-Massenspektren mit denen der Probe in Prozent

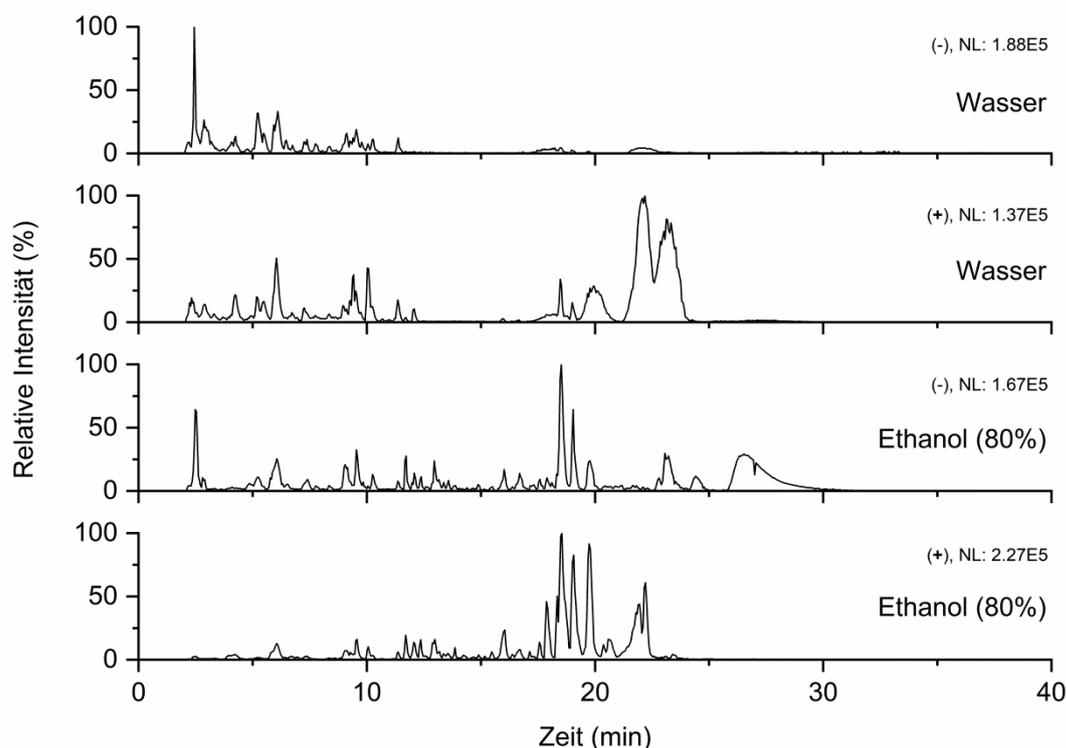
| Substanz (Übereinstimmung)                              | RT    | M (g/mol) | $m/z^+$ Probe                          | $m/z^+$ Datenbank                       |
|---|-------|-----------|--|---|
| Paraldehyd (97)   | 6.37  | 132.16    | 131, 117, 101, 89, 87, 55, 45, 43, 29  | 131, 117, 89, 87, 45, 43, 29, 15        |
| Essigsäure-n-butylester (99)                            | 8.03  | 116.16    | 115, 101, 87, 73, 61, 56, 43, 41, 29   | 87, 73, 61, 56, 43, 41, 29, 15          |
| Essigsäureisobutylester (90)                            | 8.03  | 116.16    |  | 86, 73, 56, 43, 29                      |
| Di-n-butylether (99)                                    | 12.28 | 130.23    | 130, 101, 87, 57, 41, 29               | 130, 115, 101, 87, 73, 57, 41, 29       |
| Di- <i>iso</i> -butylether (92)                         | 12.28 | 130.23    |  | 130, 101, 87, 73, 57, 41, 29            |
| <i>n</i> -Butyl- <i>iso</i> -butylether (95)            | 12.28 | 130.23    |  | 130, 87, 57, 41, 29                     |
| Propionsäure-n-butylester (98)                          | 13.42 | 130.19    | 101, 87, 75, 57, 56, 41, 29            | 101, 87, 75, 57, 56, 41, 29             |
| 2,2,4,6-tetramethyltetrahydro-2H-pyran (64)             | 13.48 | 142.24    | 128, 113, 95, 69, 56, 55, 43, 41, 29   | 142, 127, 113, 95, 83, 69, 56, 41, 29   |
| 2,5-dipropyltetrahydrofuran (65)                        | 13.48 | 156.27    |  | 113, 95, 84, 69, 57, 56, 55, 43, 41, 29 |
| 5,5-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-ol (75)               | 13.48 | 130.19    |  | 129, 113, 95, 84, 69, 56                |
| 2,3-dimethyl-6-(phenylsulfonyl)tetrahydro-2H-pyran (64) | 13.48 | 254.34    |  | 113, 95, 69, 41                         |
| Buttersäure-n-butylester (99)                           | 16.36 | 144.21    | 143, 116, 101, 89, 71, 56, 43, 41, 27  | 116, 101, 89, 71, 56, 43, 41, 29, 27    |
| Isobuttersäurebutylester (89)                           | 16.36 | 144.21    |  | 115, 101, 89, 71, 57, 56, 43, 41        |
| Buttersäure- <i>sec</i> -butylester (98)                | 16.36 | 144.21    |  | 116, 101, 89, 71, 56, 43, 41, 29, 27    |
| Butyraldehyd Dibutyl Acetal (97)                        | 22.20 | 202.3     | 159, 145, 129, 103, 73, 57, 55, 41, 29 | 159, 129, 103, 73, 57, 55, 41, 29       |

### 5.1.3 Zusammensetzung und biologische Aktivität weiterer Pflanzenextrakte

Die Extrakte der Sanddornbeeren wiesen leider keine nennenswerte Wirkung in den medizinischen Untersuchungen auf. Daher wurden Vollextrakte anderer Pflanzenteile des Sanddorns und verschiedener anderer Pflanzen hergestellt. Diese wurden anschließend auf ihre Inhaltsstoffe analysiert und auf ihre Wirkung im Zellsystem getestet.

#### *Zusammensetzung der Sanddornrinde und -blätter Extrakte*

Die Blätter und Rinde des Sanddorns wurden vor ihrer Extraktion im Trockenofen bei 60 °C getrocknet. Die Extraktion erfolgte mit Wasser und Ethanol (80%). Die Feststoffgehalte fielen für beide Pflanzenteile geringer aus, als es für die Beeren der Fall war. So wurden aus den Blättern 10.2 mg/ml mit Wasser und 3.9 mg/ml mit Ethanol (80%) extrahiert. Die Wurzeln wiesen im wässrigen Extrakt ein FG von 12.8 mg/ml und im ethanolischen Auszug ein FG von 6.0 mg/ml auf. Auffällig ist hierbei, dass die FG der Wasserextrakte höher sind als die der Ethanolextrakte. Dies war für die Sanddornbeeren genau umgekehrt der Fall. Der FG des wässrigen Extraktes lag bei 17.9 mg/ml und der des Ethanolextraktes bei 27.2 mg/ml. Der Anteil an unpolaren Substanzen war in den Blättern und der Rinde demnach geringer als in den Beeren.



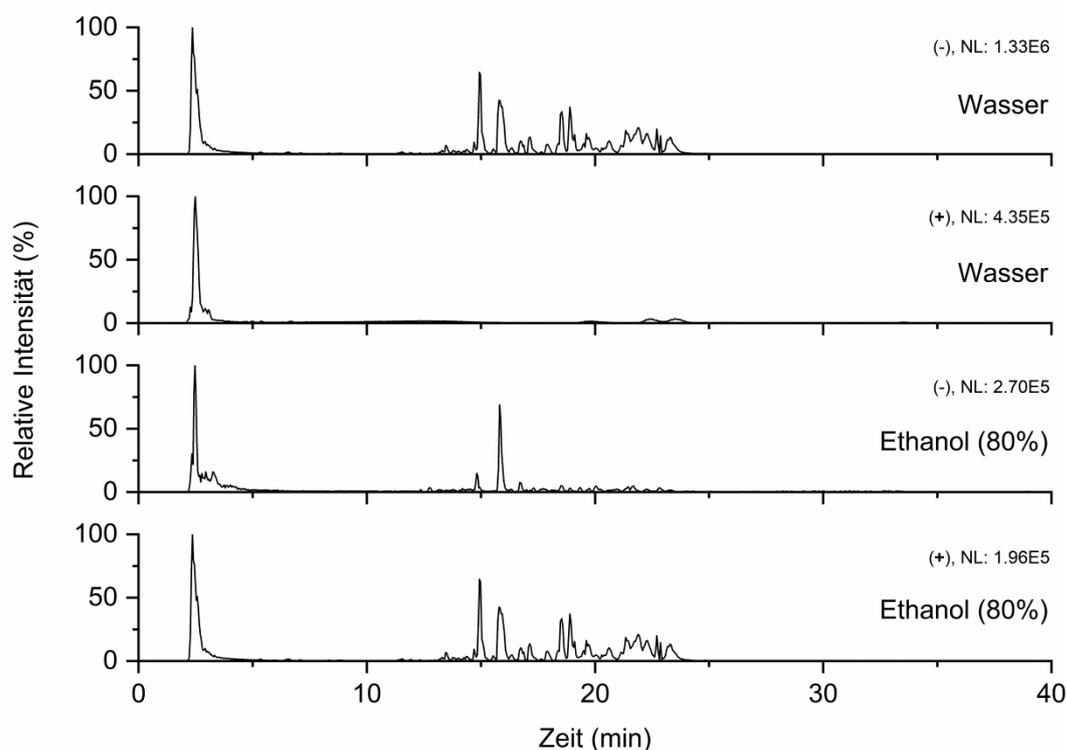
**Abbildung 5.26** Base Peak Chromatogramme der Extrakte der Sanddornblätter

Die JCD ermittelte im wässrigen Extrakt der Sanddornblätter weniger Substanzen als im ethanolischen Extrakt. So wurden nur (-) 80 bzw. (+) 36 Verbindungen in den Chromatogrammen des Wasserextraktes entdeckt, während im Ethanolextrakt (-) 112 bzw. (+) 63 Substanzen detektiert wurden. Es wurden jedoch in beiden Extrakten einige Derivate des Isorhamnetins und des Quercetins nachgewiesen. Die Glycoside dieser Flavonoide lösen sich jedoch besser im wässrigen und treten dort verstärkt auf. In den Chromatogrammen sind viele kleine Signale zu erkennen (**Abbildung 5.26**). Im wässrigen Extrakt treten diese vermehrt zwischen RT 2.0–12.0 min auf. Die starken Peaks organischer Säuren, wie sie in den Sanddornbeeren vor allem im (-) Chromatogramm zu Beginn auftraten, sind in den Blättern nicht mehr vorhanden. Dagegen sind im (+) Chromatogramm des wässrigen Extrakts starke Peaks zu späteren RT zu finden. Im Ethanolextrakt (80%) ist das Bild ähnlich, jedoch wurden hier noch mehr Verbindungen zwischen RT 15.0–30 min gefunden. Die  $m/z$  Werte in diesen Bereichen der Chromatogramme lieferten keine Übereinstimmungen mit in der Literatur für Sanddornblätter beschriebenen Substanzen. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich um gut in Wasser und Ethanol lösliche Tannine handeln könnte, da die gefundenen  $m/z$  Werte im Bereich der Molekülmassen dieser Substanzen bei 500 – 1500 liegen. Michel et al. (2012) konnten in den Blättern, Samen, Wurzel und Ästen des Sanddorns bereits Tannine nachweisen.<sup>148</sup> Die Strukturen der Tannine wurden dabei jedoch nicht aufgeklärt. Die in Tabelle 5.11 aufgelisteten Substanzen wurden in beiden Extrakten der Sanddornblätter entdeckt.

**Tabelle 5.11** Identifizierte Substanzen aus den Extrakten der Sanddornblätter

| Bestimmte Struktur                                   | RT  | $m/z^+$ | $m/z^-$ | M (g/mol) | Referenzen     |
|--|-----|---------|---------|-----------|----------------|
| trans p-coumaric acid                                | 2.9 |         | 163     | 164.2     | <sup>149</sup> |
| Isorhamnetin 3-O-Dihexosid                           | 4.0 | 663     | 640     | 640.6     | 18             |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid-7-O-Glucosid              | 4.1 |         | 785     | 786.7     | 18             |
| Kaempferol 3-O-Glucosid                              | 4.2 |         | 448     | 448.5     | <sup>150</sup> |
| Quercetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid                 | 5.2 | 633     | 610     | 610.5     | 18,150         |
| Isorhamnetin 3-O-Glucosid-7-O-Rhamnosid <sup>M</sup> | 6.1 | 647     | 624     | 624.5     | 18,150         |
| Quercetin 3-O-Rutinosid <sup>S</sup>                 | 6.3 | 633     | 610     | 610.5     | 18,150,149     |
| Quercetin 3-O-Galactosid                             | 6.5 | 487     | 464     | 464.4     | 149,18,150     |
| Isorhamnetin 3-O-Rutinosid <sup>M</sup>              | 7.3 | 647     | 624     | 624.5     | 18,150         |

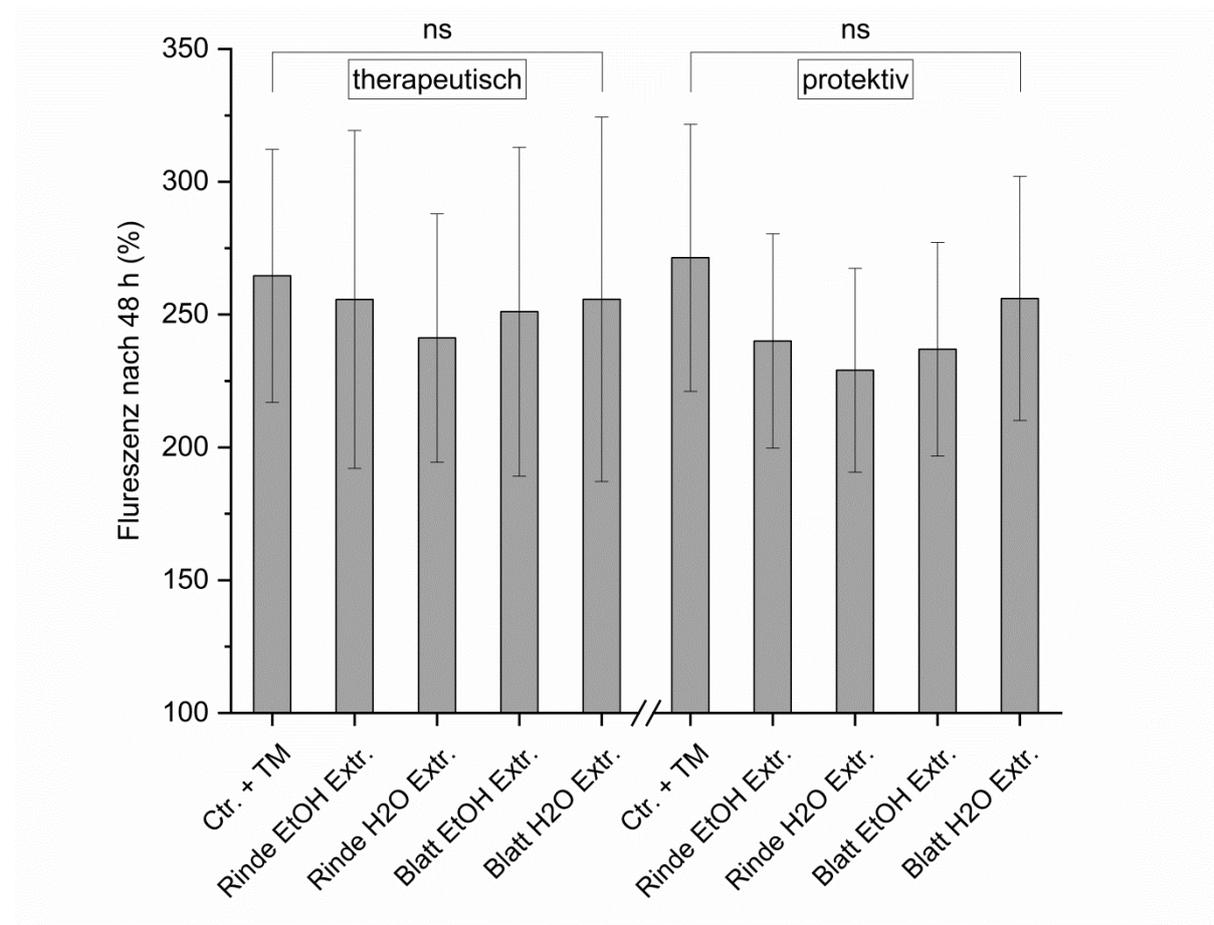
Die Extrakte der Sanddornrinde weisen deutlich weniger Verbindungen auf als die Extrakte der Sanddornblätter. Die JCD ermittelte hier nur (-) 36 bzw. (+) 34 im wässrigen und (-) 30 bzw. (+) 81 Substanzen im ethanolischen Extrakt. Auffällig ist die relativ hohe Zahl an detektierten Verbindungen im (+) Chromatogramm des Ethanolextraktes (**Abbildung 5.27**). Hier zeigen sich vor allem im Bereich von RT 13.0–24.0 min viele Peaks. Die  $m/z$  liegen, genau wie in den Chromatogrammen der Blätter, vermehrt im Bereich zwischen 500 und 1500. Es könnte sich demnach auch hier um Tannine handeln. Zu früheren RT sind nur wenige Substanzen zu finden und es wurden in allen Chromatogrammen der beiden Extrakte keine Übereinstimmungen mit Literaturdaten gefunden. Die Rinde des Sanddorns ist zwar wesentlich weniger untersucht worden als Beeren und Blätter, jedoch gibt es einige Quellen, die Alkaloide, Phytosterine und Proanthocyanidine in der Rinde nachweisen konnten.<sup>151-153</sup>



**Abbildung 5.27** Base Peak Chromatogramme der Extrakte der Sanddornrinde

## Untersuchung der Extrakte der Sanddornblätter und -rinde auf ihre Wirkung bezüglich ER-Stresses

Die Extrakte der Sanddornrinde und der Sanddornblätter wiesen in den chemischen Untersuchungen deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung auf. Die Inhaltsstoffe unterschieden sich auch von denen der Sanddornbeeren. In den medizinischen Untersuchungen wurde jedoch erneut keine ER-Stress reduzierende Wirkung festgestellt. In **Abbildung 5.28** sind die Fluoreszenzwerte der Zellen nach 48 h Versuchsdauer sowohl für die therapeutischen als auch protektiven Behandlungen dargestellt.



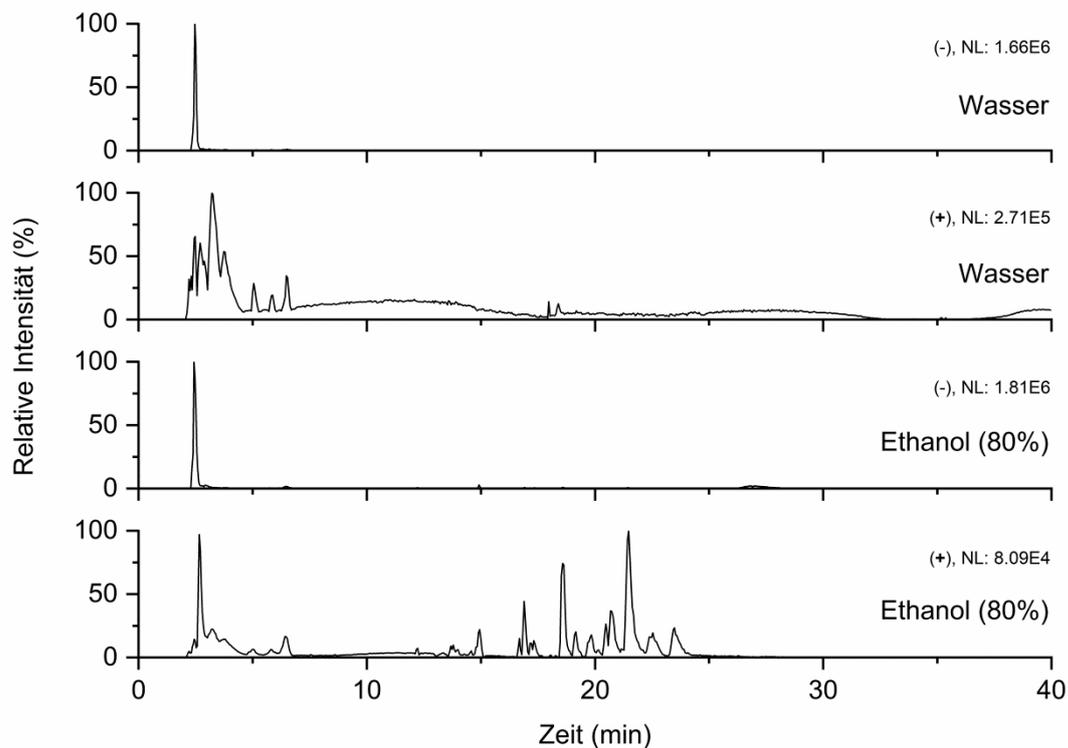
**Abbildung 5.28** Ergebnisse der therapeutischen und protektiven Behandlung der Zellkulturen mit Extrakten der Sanddornrinde und -blätter nach 48 h. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Signifikanzermittlung mit ungepaartem t-Test: \* =  $p < 0.05$

Es ist gut zu erkennen, dass keines der Extrakte in den Experimenten eine signifikante Reduzierung des ER-Stresses bewirken konnte.

Einige Substanzklassen, die in vorherigen Studien vielversprechende Resultate in Bezug auf die Linderung von ER-Stress zeigten, wurden in den verschiedenen Teilen des Sanddorn nachgewiesen und teilweise isoliert. Eine positive Wirkung wurde in den Zellkulturtests jedoch nicht beobachtet. Eventuell verhindern einige Inhaltsstoffe des Sanddorns den lindernden Einfluss anderer Substanzen, wodurch die Extrakte als Ganzes keine positive Wirkung erzielen konnten. Es ist demnach nicht gänzlich auszuschließen, dass einer der Inhaltsstoffe eine ER-Stress reduzierende Wirkung besitzt, jedoch wurde für weitere Untersuchungen auf Bestandteile des Sanddorns verzichtet.

## Zusammensetzung der Apfelbeeren Extrakte

Die Apfelbeeren wiesen eine dunkel lila bis schwarze Farbe auf. Die kleinen apfelförmigen Beeren weisen aber nicht nur äußerlich starke Unterschiede zu den Sanddornbeeren auf, ihre chemische Zusammensetzung weicht recht deutlich von der des Sanddorns ab. Während im Sanddorn vermehrt das Flavonoid Isorhamnetin und dessen Glykoside vorkamen, finden sich in den Früchten der Apfelbeere vor allem Derivate des Quercetins. Die dunkel lila Färbung ist auf das Vorhandensein von Anthocyanen zurückzuführen. Insbesondere das Cyanidin und dessen Glykoside spielen hier eine große Rolle. Einige Verbindungen wie zum Beispiel Zucker und organische Säuren lassen sich in den Extrakten beider Früchte nachweisen.



**Abbildung 5.29** Base Peak Chromatogramme der Apfelbeeren Extrakte

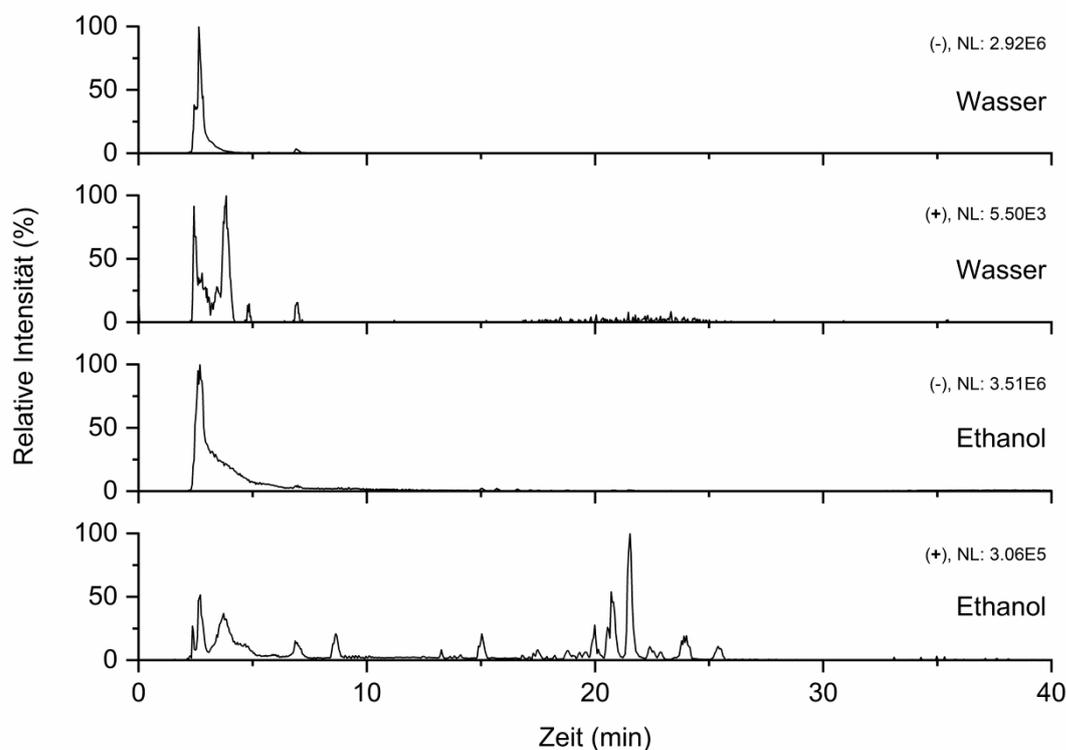
Es wurden zwei Extrakte aus den getrockneten Apfelbeeren hergestellt. Das wässrige Extrakt wies dabei einen etwas geringen Feststoffgehalt von 7.7 mg/ml auf als das Ethanolextrakt (80%) mit 13.7 mg/ml. Es ist somit auch wenig überraschend, dass die JCD deutlich weniger Substanzen für das Wasserextrakt ermittelte als für das Ethanolextrakt (80%). Es wurden (-) 19 bzw. (+) 26 Substanzen im wässrigen und (-) 55 bzw. (+) 48 im ethanologischen Extrakt detektiert. Im vorderen Bereich der Chromatogramme beider Extrakte sind nur wenige Unterschiede auszumachen und diese liegen vor allem in der Intensität einzelner Verbindungen (**Abbildung 5.29**). Im RT Bereich von 15–20 min ist der Unterschied zwischen den beiden Extrakten im (+) Chromatogramm deutlich zu erkennen. Die hier vorkommenden Substanzen sind nur im ethanologischen Extrakt zu finden. Ihre  $m/z$  Werte liegen zum größten Teil zwischen 700 und 1600. Ein Vergleich mit in der Literatur bekannten Inhaltsstoffen ergab in diesem Bereich keine Übereinstimmungen. Eine Übersicht über die identifizierten Verbindungen in den Extrakten ist in Tabelle 5.12 zu sehen.

**Tabelle 5.12** Identifizierte Substanzen aus den Extrakten der Apfelbeeren (x = im Extrakt enthalten)

| Bestimmte Struktur   | RT  | $m/z^+$ | $m/z^-$ | M (g/mol) | Wasser | Ethanol | Referenzen  |
|--|-----|---------|---------|-----------|--------|---------|-------------|
| Äpfelsäure <sup>S</sup>  | 2.3 |         | 133     | 134.1     |        | x       | 154         |
| Sorbitol   | 2.4 |         | 181     | 182.2     | x      |         | 154         |
| Äpfelsäuremethylester  | 2.5 | 149     |         | 148.1     |        | x       | 155         |
| Zitronensäure <sup>S</sup>                                     | 2.5 |         | 191     | 192.1     | x      | x       | 154         |
| Ethyl 2-[(3,4-dihydroxybenzoyloxy)-4,6-dihydroxyphenyl] Acetat | 2.6 | 349     |         | 348.3     | x      | x       | 155         |
| Cyanidin   | 2.9 | 287     |         | 287.3     | x      | x       | 156         |
| Cyanidin 3-O-Arabinosid/Xylosid                                | 2.9 | 419     |         | 419.4     |        | x       | 156-158     |
| Cyanidin 3-O-Glucoside/Galactosid                              | 3.3 | 449     |         | 449.4     | x      | x       | 156-158     |
| Cyanidin 3-O-Arabinosid/Xylosid                                | 3.7 | 419     |         | 419.4     | x      | x       | 158,157,156 |
| Quercetin 3-O-Rutinosid <sup>S</sup>                           | 6.4 | 633     |         | 610.5     | x      | x       | 159,155     |

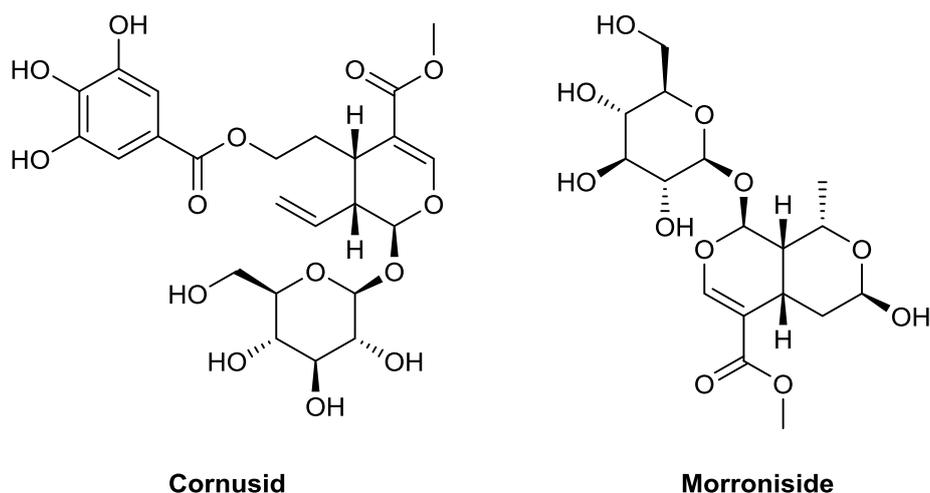
### Zusammensetzung der Kornelkirschen Extrakte

Die getrockneten Kornelkirschen wurden mit Wasser und Ethanol extrahiert. Der FG des wässrigen Extraktes betrug 4.9 mg/ml, der FG des Ethanolextraktes 9.9 mg/ml. Der höhere FG des ethanolschen Extraktes spiegelt sich auch in den durch die JCD ermittelten Substanzen wider. Während im Wasserextrakt (-) 21 bzw. nur (+) 4 Verbindungen erkannt wurden, waren es im Ethanolextrakt (-) 57 bzw. (+) 48 Stoffe. In der Kornelkirsche scheinen demnach vermehrt unpolare Substanzen enthalten zu sein.



**Abbildung 5.30** Base Peak Chromatogramme der Kornelkirschen Extrakte

Auf den Chromatogrammen in **Abbildung 5.30** ist gut zu sehen, dass im wässrigen Extrakt die Signale nicht über die RT 7.0 min hinausgehen. Auffällig ist auch die geringe Intensität der Signale im (+) Chromatogramm. Der Anteil der hier detektierten Substanzen am gesamten Extrakt scheint sehr gering auszufallen. Ganz anders ist das Bild für das Ethanolextrakt. Die Intensitäten liegen für beide Scan Modi in einem ähnlichen Bereich und besonders im (+) Chromatogramm sind Signale bis zur RT 26.0 min zu erkennen. Der größte Peak in den (-) Chromatogrammen beider Extrakte zur RT 2.7 min konnte der Äpfelsäure zugeordnet werden. Zudem wurde in beiden Extrakten die Weinsäure und Zitronensäure nachgewiesen. Die dunkelroten Kornelkirschen weisen genau wie die Apfelbeeren einige Anthocyane in ihrer Zusammensetzung auf. Neben Glycosiden des Cyanidins wurden in den Kornelextrakten auch Derivate des Pelargonidins entdeckt.



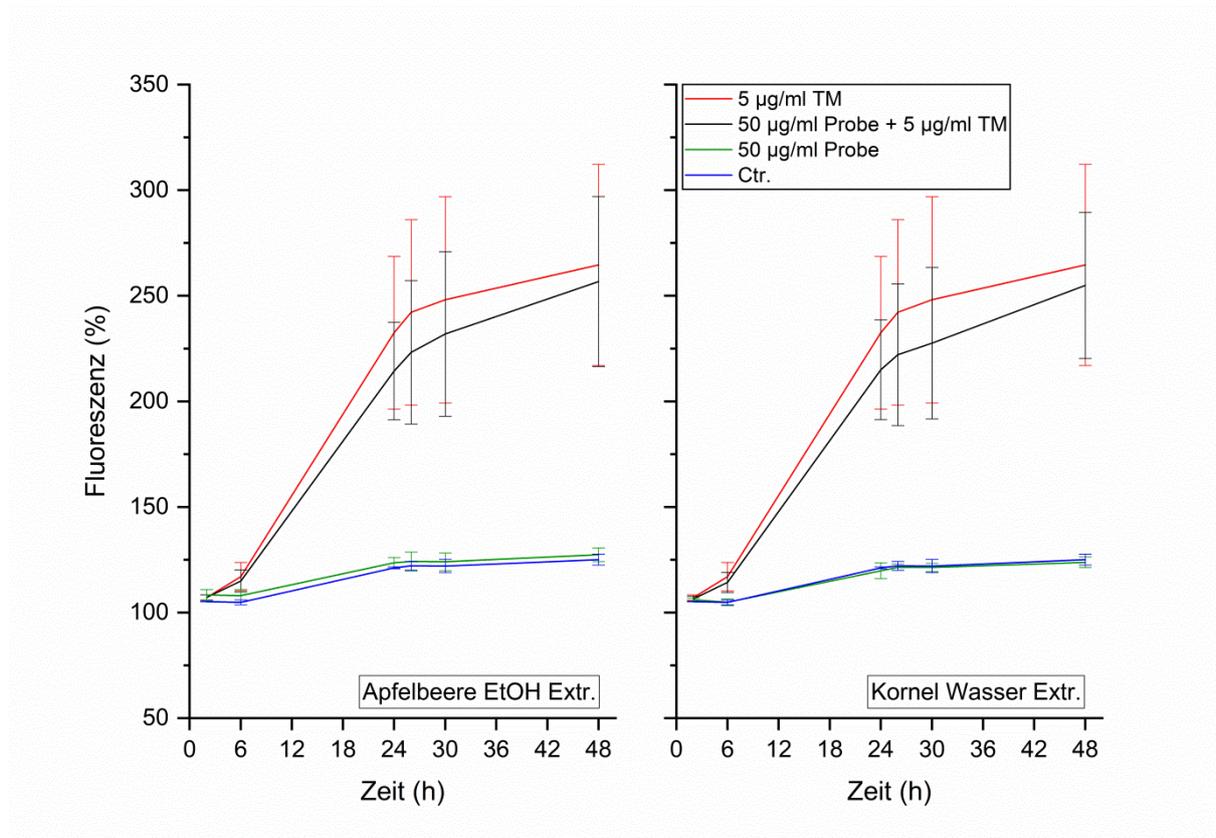
**Abbildung 5.31** Zwei Iridoide, die als Inhaltsstoffe in der Kornelkirsche vorkommen

Besonders interessant ist jedoch das Vorkommen der Iridoide Morronisid und Cornusid (**Abbildung 5.31**) in den Kornelkirschen. Diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe kommen in keinem der anderen Pflanzenextrakte vor. Für Pflanzen der Gattung Hartriegel (*Cornus*) ist das Auftreten dieser Substanzklasse bekannt.<sup>160</sup> Iridoide dienen in der Natur zur Abwehr von Fressfeinden und die Aglycone besitzen eine starke biologische Wirkung. In Tabelle 5.13 sind alle Substanzen aufgelistet, welche in den Extrakten der Kornelkirsche detektiert wurden.

**Tabelle 5.13** Identifizierte Substanzen aus den Extrakten der Kornelkirschen

| Bestimmte Struktur   | RT  | $m/z^+$ | $m/z^-$ | M (g/mol) | Wasser | Ethanol | Referenzen |
|--|-----|---------|---------|-----------|--------|---------|------------|
| Morronisid   | 2.3 |         | 405.5   | 406.4     | x      | x       | 161        |
| D-Glucose  | 2.4 |         | 179.1   | 180.2     | x      |         | 162        |
| 4-Acetoxy-5, 2', 4', 6', $\beta$ -pentahydroxy-3-methoxychalcone | 2.4 | 398.6   |         | 376.1     | x      | x       | 162        |
| Weinsäure  | 2.6 |         | 149.3   | 150.1     | x      | x       | 163        |
| Cyanidin 3-O-Hexosid   | 2.6 | 449.1   |         | 449.4     |        | x       | 164,160    |
| Zitronensäure <sup>S</sup>                                       | 2.6 |         | 191.0   | 192.1     | x      | x       | 163        |
| Äpfelsäure   | 2.7 |         | 133.3   | 134.1     | x      | x       | 163        |
| Cyanidin 3-O-Hexosid   | 3.3 | 449.1   |         | 449.4     | x      | x       | 164,160    |
| Pelargonidin 3-O-Hexosid   | 3.7 | 433.1   |         | 433.4     | x      | x       | 160,164    |
| Aromadendrin 7-O-Glucosid  | 5.7 |         | 449.5   | 450.4     | x      |         | 164        |
| Quercetin 3-O-rutinoside <sup>S</sup>                            | 6.9 |         | 609.2   | 610.5     | x      | x       | 164        |
| Cornusid   | 7.0 |         | 541.8   | 542.5     | x      | x       | 160,163    |

## Untersuchung der Extrakte der Apfelbeere und Kornelkirsche auf ihre Wirkung bezüglich ER-Stresses



**Abbildung 5.32** Ergebnisse der therapeutischen Behandlung der Zellen mit dem ethanolischen Apfelbeeren- und wässrigen Kornelkirschenextrakt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=2)

Die Inhaltsstoffe der Apfelbeere und der Kornelkirsche bewirkten leider auch nicht die erhoffte Reduzierung des ER-Stresses in den Zelluntersuchungen. In **Abbildung 5.32** sind die Verläufe der therapeutischen Behandlung der Zellen mit dem ethanolischen Aronia- und dem wässrigen Kornelkirschenextrakt dargestellt. Wie schon zuvor beobachtet, verläuft die Kurve nach der Behandlung in ähnlicher Weise, wie die der nur mit TM behandelten Zellen. Eine Reduktion des ER-Stresses ist nicht zu erkennen. Eventuell würde eine Fraktionierung der Extrakte ein wirksames Stoffgemisch ergeben, dessen Wirkung im Vollextrakt durch andere Inhaltsstoffe unterdrückt werden könnte.

## 5.2 Sublimation als Technik zur Anreicherung, Identifizierung und Isolierung der Inhaltsstoffen von Früchten

Zu Beginn der Untersuchungen wurden zunächst die Sublimate der getrockneten Beeren verschiedener Sanddornsorten miteinander verglichen und einige relevante Marker-Verbindungen identifiziert. Marker-Substanzen sind Inhaltsstoffe, die in jeder der Sorten vorkommen und die somit den chemischen Fingerabdruck der Sanddornbeere bilden. Danach wurden die Sublimate der Früchte der Apfelbeere, des Gemeinen Bocksdorns und der Kornelkirsche hergestellt und das Vorkommen der zuvor bestimmten Marker überprüft. Schließlich wurden die Inhaltsstoffe verschiedener Extrakte der Habego-Sanddornbeeren und deren Sublimate miteinander verglichen und zusätzliche Marker-Substanzen nachgewiesen.

Im zweiten Teil wurden die Beeren der Sanddornsorte Habego aus dem Jahr 2018 (HBG-II) mehrfach einer Sublimation unterzogen und die vereinten Sublimate im Anschluss durch eine Säulenchromatographie aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mittels verschiedener analytischer Methoden untersucht und die Strukturen einiger Inhaltsstoffe wurden aufgeklärt.

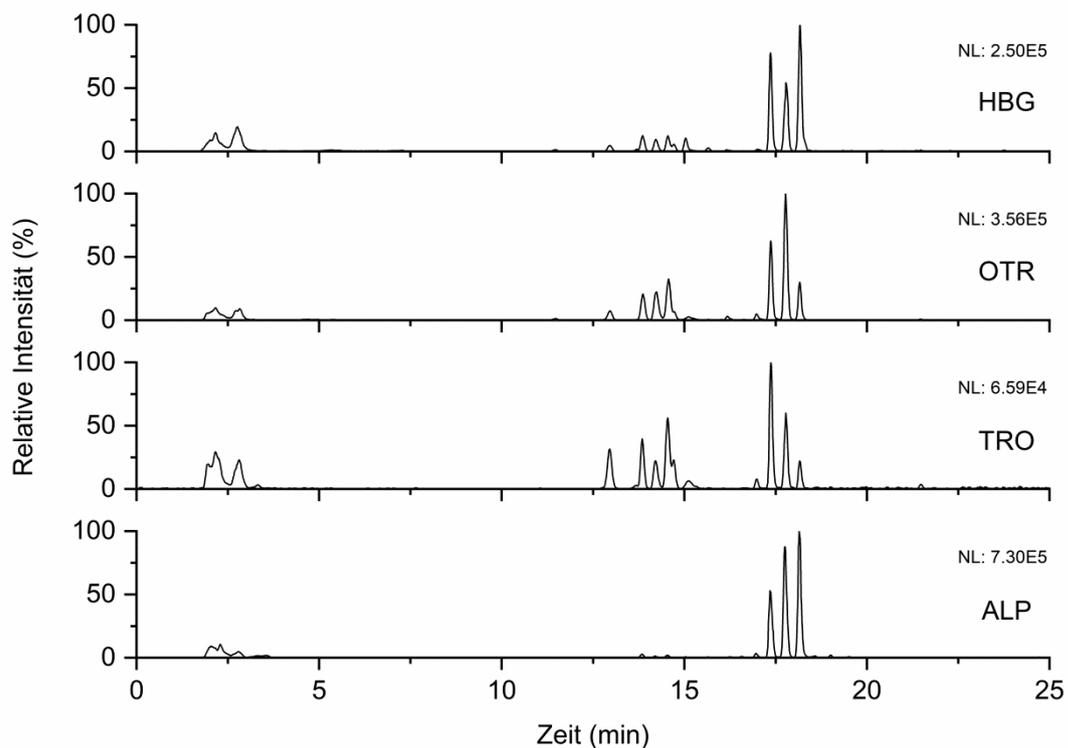
### 5.2.1 Anwendung der Sublimation zur Anreicherung und Identifizierung von Marker-Substanzen in Früchten und Extrakten

Dieser Teil der Arbeit wurde zur Veröffentlichung bei „Food Analytical Methods“ eingereicht und befindet sich derzeit unter Revision.

Im Folgenden werden die MS-Ergebnisse der Pflanzen nur für den negativen Scan-Modus diskutiert. Der positive Scan-Modus zeigt ähnliche, aber weniger Peaks, die zur Auswertung genutzt werden können (Anhang, **Abbildung 8.5**). Er wird daher nicht weiter diskutiert. Alle Chromatogramme werden im Base Peak Modus dargestellt.

#### *Sublimation von Substanzen aus Sanddornbeerpulver*

Vier verschiedene Arten von Sanddornbeeren wurden zunächst einer Sublimation unterzogen und anschließend die Zusammensetzung der Sublimate miteinander verglichen. Es handelte sich um die Sorten Habego (HBG-II), die 2018 geerntet wurde, Otradnaja (OTR), Trofimovskaja (TRO) und eine Sorte aus den Alpen (ALP). Die Chromatogramme sind in **Abbildung 5.33** zu sehen.



**Abbildung 5.33** Base Peak Chromatogramme der Sanddornpulver-Sublimat. Die vier untersuchten Sorten zeigen ein ähnliches Peak-Muster

Bei jeder verwendeten Sorten konnten Besonderheiten in ihrer Zusammensetzung entdecken werden, die sie von den anderen unterschied. So wurden in den Sorten HBG, OTR und ALP spezifische Massen entdeckt, die ausschließlich in ihren Sublimaten zu finden waren (Anhang, **Abbildung 8.6**, **Abbildung 8.7**, **Abbildung 8.8**, **Abbildung 8.9**). Die Sorte TRO unterschied sich von den anderen Sorten hauptsächlich dadurch, dass  $m/z$  Werte, die in jeder der anderen Sorten vorkam, in der TRO nicht nachgewiesen wurden (Anhang, **Abbildung 8.9**). Die Auswertung der Chromatogramme ergab schließlich für jede Sorte eine spezifische Zusammensetzung. In Tabelle 5.14 sind alle Massen aufgeführt, die eine qualitative Unterscheidung zwischen den vier Sanddornarten ermöglichen. Natürlich gibt es auch Überschneidungen zwischen den Arten, aber die Anteile bestimmter Substanzen in den Pflanzen variieren. Beispielsweise erscheinen in jedem Chromatogramm drei Hauptpeaks im Zeitbereich von 17–19 min, die sich jedoch in der Intensität unterscheiden. Gründe für diese Variationen können neben dem Unterschied in der Sorte auch unterschiedliche Reifegrade, Wetter- und andere Umwelteinflüsse sein. Es wurden auch einige kleine Intensitätsunterschiede bei den früh im Chromatogramm auftretenden Substanzen zu einer RT von zwei bis drei Minuten festgestellt. Peaks zwischen den RT 12–16 min zeigen ebenfalls Unterschiede in ihren Intensitäten, jedoch unterscheidet sich die ALP nicht so sehr von den anderen Sorten, wie es auf den ersten Blick erscheinen mag (Anhang, **Abbildung 8.10**).

**Tabelle 5.14** Spezifische  $m/z$ , die in den Chromatogrammen der Sanddornsublimaten von HBG, OTR und ALP gefunden wurden. Einige Massen, die bei all diesen Sorten auftraten, wurden im Chromatogramm des Sublimats der TRO nicht nachgewiesen (n.d.)

| HBG |       |     | TRO  |       |     |
|-----|-------|-----|------|-------|-----|
| RT  | $m/z$ |     | RT   | $m/z$ |     |
|     | 2.8   | 413 | 2.8  | n.d.  | 577 |
|     | 5.5   | 119 | 4.6  | n.d.  | 232 |
|     | 5.5   | 165 | 4.6  | n.d.  | 300 |
| OTR |       |     | 4.6  | n.d.  | 362 |
| RT  | $m/z$ |     | 7.2  | n.d.  | 203 |
|     | 15.2  | 368 | 16.2 | n.d.  | 297 |
|     | 15.2  | 383 | 16.2 | n.d.  | 333 |
|     | 15.2  | 384 | 17.0 | n.d.  | 225 |
| ALP |       |     | 17.0 | n.d.  | 227 |
| RT  | $m/z$ |     | 25.7 | n.d.  | 423 |
|     | 16.6  | 223 |      |       |     |
|     | 16.6  | 337 |      |       |     |
|     | 19.5  | 311 |      |       |     |

Abgesehen von den Unterschieden waren besonders die Ähnlichkeiten zwischen den Sublimaten von Interesse. Ist es möglich, durch die Sublimation bestimmte Marker-Substanzen einer Pflanze zu erhalten, um ihre Identität unabhängig von ihrer genauen Sorte zu bestimmen? Tabelle 5.15 zeigt eine Liste von Verbindungen, die in den Sublimaten aller in dieser Studie untersuchten Sanddornbeeren gefunden werden konnten. Nach qualitativer Analyse der Chromatogramme und der zugehörigen Massenspektren wurden diese Substanzen als Marker-Verbindungen definiert, die standardmäßig in den Sublimaten von Sanddornbeeren vorkommen. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass vier Sanddornbeersorten untersucht wurden, die in den Jahren 2017 und 2018 geerntet wurden. Voraussetzung für die Aufnahme der Substanzen in Tabelle 5.15 war die Überschreitung der Nachweisgrenze in jedem der zwölf Sublimate (drei Sublimationen pro Sorte), die aus den Fruchtpulvern gewonnen wurden. Nach den Richtlinien der ICH (International Conference on Harmonisation) wurde dies durch visuelle Auswertung überprüft.<sup>165</sup>

**Tabelle 5.15** Marker-Substanzen, die in jedem Sublimat der untersuchten Sanddornpulver gefunden wurden. Die meisten der Substanzen konnten nach Vergleich der  $m/z$  Werte mit Literaturdaten und Standardmessungen nicht identifiziert (n.i.) werden. 27 (\*) dieser Marker erwiesen sich nach Vergleich mit anderen Fruchtsublimaten als spezifisch für den Sanddorn

| ID | RT  | Strukturzuweisung | M (g/mol) | $m/z$ | References |
|----|-----|-------------------|-----------|-------|------------|
| 1  | 2.0 | Fumarsäure        | 116.07    | 115   |            |
| 2  | 2.0 | Äpfelsäure        | 134.09    | 133   | 123        |
| 3  | 2.0 | (+)-Catechin      | 290.27    | 289   | 120-122    |
| 4  | 2.0 | n.i.              |           | 333   |            |
| 5  | 2.1 | n.i.              |           | 158   |            |
| 6  | 2.1 | n.i.              |           | 159   |            |
| 7* | 2.1 | n.i.              |           | 175   |            |
| 8  | 2.1 | n.i.              |           | 186   |            |
| 9  | 2.1 | n.i.              |           | 245   |            |
| 10 | 2.1 | n.i.              |           | 291   |            |

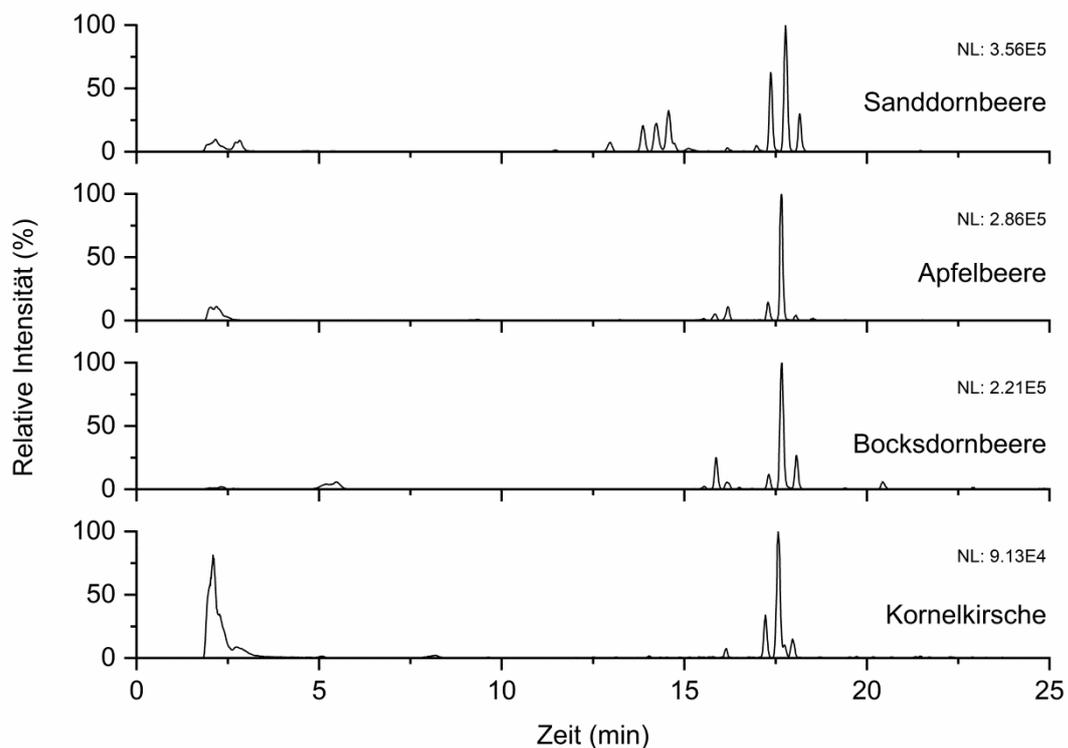
| ID  | RT   | Strukturzuweisung       | M (g/mol) | m/z | References                  |
|-----|------|-------------------------|-----------|-----|-----------------------------|
| 11  | 2.2  | n.i.                    |           | 231 |                             |
| 12  | 2.2  | n.i.                    |           | 298 |                             |
| 13  | 2.2  | n.i.                    |           | 327 |                             |
| 14  | 2.3  | n.i.                    |           | 163 |                             |
| 15  | 2.3  | n.i.                    |           | 203 |                             |
| 16  | 2.3  | n.i.                    |           | 289 |                             |
| 17  | 2.4  | n.i.                    |           | 129 |                             |
| 18* | 2.8  | n.i.                    |           | 179 |                             |
| 19  | 2.8  | n.i.                    |           | 381 |                             |
| 20* | 3.3  | n.i.                    |           | 171 |                             |
| 21* | 12.9 | n.i.                    |           | 218 |                             |
| 22* | 12.9 | n.i.                    |           | 246 |                             |
| 23* | 13.8 | n.i.                    |           | 218 |                             |
| 24* | 13.8 | n.i.                    |           | 233 |                             |
| 25* | 14.2 | n.i.                    |           | 188 |                             |
| 26* | 14.2 | n.i.                    |           | 217 |                             |
| 27* | 14.2 | n.i.                    |           | 232 |                             |
| 28* | 14.2 | n.i.                    |           | 260 |                             |
| 29* | 14.2 | n.i.                    |           | 275 |                             |
| 30* | 14.5 | n.i.                    |           | 216 |                             |
| 31* | 14.5 | n.i.                    |           | 244 |                             |
| 32* | 14.5 | n.i.                    |           | 259 |                             |
| 33* | 14.7 | n.i.                    |           | 246 |                             |
| 34* | 14.7 | n.i.                    |           | 274 |                             |
| 35* | 14.7 | n.i.                    |           | 289 |                             |
| 36* | 15.0 | n.i.                    |           | 219 |                             |
| 37* | 15.0 | n.i.                    |           | 230 |                             |
| 38* | 15.0 | n.i.                    |           | 245 |                             |
| 39* | 15.7 | n.i.                    |           | 197 |                             |
| 40* | 15.7 | n.i.                    |           | 265 |                             |
| 41* | 15.7 | n.i.                    |           | 327 |                             |
| 42* | 16.9 | n.i.                    |           | 381 |                             |
| 43  | 17.0 | Hexadecadiensäure       | 252.39    | 251 | 126                         |
| 44* | 17.0 | n.i.                    |           | 271 |                             |
| 45* | 17.0 | n.i.                    |           | 319 |                             |
| 46  | 17.4 | Linolensäure            | 278.43    | 277 | 133,126                     |
| 47  | 17.4 | Palmitoleinsäure        | 254.41    | 253 | 126,166,131,133,132         |
| 48  | 17.8 | Palmitinsäure           | 256.43    | 255 | 126,166,133,131,132,<br>167 |
| 49  | 17.8 | Linolsäure              | 280.45    | 279 | 126,131,133,132             |
| 50  | 18.2 | <i>cis</i> -Vaccensäure | 282.46    | 281 | 133,131,132,166,126         |
| 51  | 18.2 | n.i.                    |           | 349 |                             |
| 52  | 18.2 | n.i.                    |           | 586 |                             |

Einige der Naturstoffe, die in den Sublimaten des Sanddorns gefunden wurden, sind durch einen Vergleich der MS-Fragmente mit Literaturdaten und anschließend durch Standardmessungen identifiziert worden. Dabei handelt es sich um primäre Metaboliten, die in den meisten Pflanzen gefunden werden können. Dazu gehören sowohl kleine organische Säuren wie die Äpfelsäure als auch Fettsäuren wie die Palmitinsäure. Die meisten Massen, die in den Sublimaten der Sanddornsorten

gefunden wurden, sind jedoch bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um bisher unbekannte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe des Sanddorns handelt. Diese Entdeckung ist aus mehreren Gründen interessant. Zum einen konnte hiermit gezeigt werden, dass durch die Sublimation bisher unbekannte Naturstoffe aus Pflanzenmaterial gewonnen werden können. Zum anderen könnte es sich um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe handeln, welche spezifisch in Sanddornbeeren vorkommen und damit eine eindeutige Identifizierung der Beeren ermöglichen.

*Sublimation von Substanzen aus Fruchtepulvern der Apfelbeere, des Gemeinen Bocksdorns und der Kornelkirsche*

Um festzustellen, ob die vorher bestimmten Marker-Substanzen lediglich in den Sanddornbeeren vorhanden sind, wurden Sublimate aus den Früchten der Apfelbeere, des Gemeinen Bocksdorns und der Kornelkirsche hergestellt. Die Zusammensetzung der Sublimate wurde daraufhin mit den Marker-Verbindungen verglichen. Schon ein kurzer Blick auf die Chromatogramme in **Abbildung 5.34** zeigt, dass es einige Unterschiede in der Zusammensetzung der verschiedenen Sublimate gibt.



**Abbildung 5.34** Base Peak Chromatogramme der verschiedenen Fruchtepulver-Sublimate

Auffällig ist, dass im Chromatogramm des Bocksdornbeerensublimats nur ein sehr kleiner Peak im Bereich von 2–4 min zu sehen ist. Die anderen Früchte besitzen ähnliche Peaks in diesem Bereich, nur der Sanddorn zeigt einen zusätzlichen Peak bei RT 2.8 min. Ein Vergleich der Massenspektren in diesem schlecht aufgelösten Teil des Chromatogramms verstärkt den ersten Eindruck beim Betrachten der Diagramme. Die Kornelkirsche, die die größte Peakfläche mit dem Sanddorn gemeinsam hat, weist in diesem Retentionszeitraum ebenfalls viele der gleichen Massen auf. Auch die Apfelbeere weist eine große Ähnlichkeit mit dem Sanddorn auf. Nur die Bocksdornbeeren unterscheiden sich bereits in diesem Bereich recht stark von letzterer (Tab. 5.16). Die größte Ähnlichkeit mit dem

Sanddorn zeigt die Kornelkirsche, welche 20 der 52 Marker des Sanddorns aufweist. Es folgen die Apfelbeere mit 18 und der Bocksdorn mit 16 Übereinstimmungen. Insgesamt verbleiben 27 spezifische Marker für den Sanddorn. Jede der sublimierten Pflanzen hat in ihrem Chromatogramm spezifische Peaks, die in den anderen nicht vorkommen. Im Chromatogramm der Bocksdornbeere finden sich diese circa bei den RT 5 und 20 min, im Falle der Kornelkirsche bei 8 min, im Falle der Apfelbeere bei 9 min und im Falle des Sanddorns zwischen 10–15 min. Der Vergleich der MS-Spektren zeigt bis zur 17. Minute keine weiteren Übereinstimmungen zwischen den Sanddornbeeren und den anderen Früchten. Die Hauptbestandteile aller Sublimate sind verschiedene Fettsäuren, die im Bereich von RT 17 - 19 min nachgewiesen wurden. Die Menge unterscheidet sich je nach Pflanze, so konnte z. B. Palmitoleinsäure nur im Sanddorn und Bocksdorn nachgewiesen werden.

**Tabelle 5.16** Marker-Substanzen des Sanddorns, die in der Apfelbeere, der Bocksdornbeere und der Kornelkirsche vorhanden (x) sind

| RT   | m/z | Apfelbeere | Bocksdornbeere | Kornelkirsche |
|------|-----|------------|----------------|---------------|
| 2.0  | 115 | x          |                | x             |
| 2.0  | 133 | x          | x              | x             |
| 2.0  | 289 | x          |                | x             |
| 2.0  | 333 | x          |                | x             |
| 2.1  | 291 |            |                | x             |
| 2.1  | 158 | x          |                | x             |
| 2.1  | 159 | x          |                | x             |
| 2.1  | 186 | x          | x              | x             |
| 2.1  | 245 | x          | x              | x             |
| 2.2  | 231 | x          | x              | x             |
| 2.2  | 298 | x          |                | x             |
| 2.2  | 327 | x          |                | x             |
| 2.3  | 163 |            | x              | x             |
| 2.3  | 203 |            | x              |               |
| 2.3  | 289 | x          |                | x             |
| 2.4  | 129 |            | x              | x             |
| 2.8  | 381 |            | x              |               |
| 17.0 | 251 |            | x              |               |
| 17.4 | 277 | x          | x              | x             |
| 17.4 | 253 |            | x              |               |
| 17.8 | 255 | x          | x              | x             |
| 17.8 | 279 | x          | x              | x             |
| 18.2 | 281 | x          | x              | x             |
| 18.2 | 349 | x          | x              | x             |
| 18.2 | 586 | x          | x              |               |

Nachdem die Chromatogramme und MS-Spektren der Sublimate miteinander verglichen wurden, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die direkte Sublimation von Substanzen aus getrocknetem Pflanzenmaterial es ermöglicht, spezifische Marker-Verbindungen zur Bestimmung der Identität einer Pflanze zu erhalten.

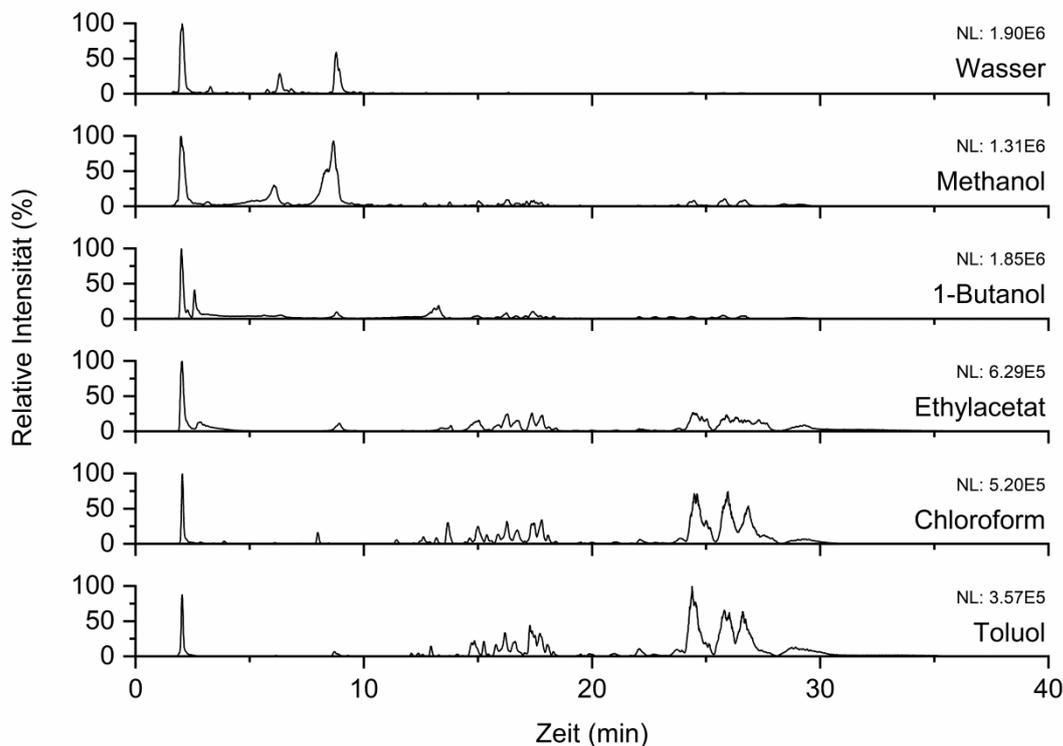
### Sublimation von Substanzen aus Sanddornbeerenextrakten

Pflanzenbestandteile werden vor der Weiterverarbeitung oft extrahiert. Sanddorn findet sich zum Beispiel in vielen Cremes, Salben und anderen kosmetischen Artikeln wieder, die zu ihrer Herstellung verschiedene Arten von Pflanzenextrakten benötigen.<sup>168</sup> Aus diesem Grund wurden verschiedene Extrakte aus Sanddornbeeren (HBG-II) einer Sublimation unterzogen. Für die Extraktion wurden Lösungsmittel verschiedener Polaritäten, nämlich Wasser, Methanol, 1-Butanol, Ethylacetat, Chloroform und Toluol, gewählt. Die Extraktionstemperaturen variierten aufgrund unterschiedlicher Siedepunkte. Je 10 g Sanddornbeerenpulver wurden pro Extraktion verwendet.

**Tabelle 5.17** Extraktionsmittel, -temperatur und Trockengewicht der Sanddornextrakte, die durch Ultraschall- und Mikrowellenextraktion hergestellt wurden

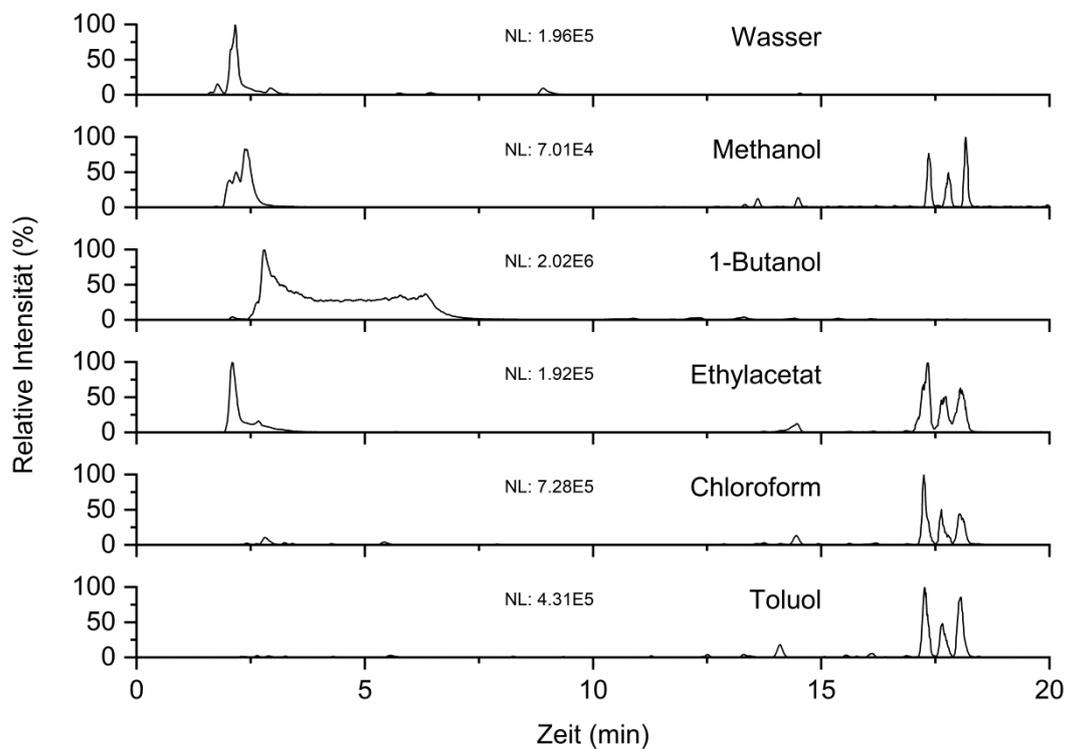
| Extraktionsmittel | Extrakt Trockengewicht (g) | Extraktionstemperatur (°C) |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|
| Wasser            | 5.1                        | 80                         |
| Methanol          | 5.1                        | 60                         |
| 1-Butanol         | 4.6                        | 80                         |
| Ethylacetat       | 2.9                        | 60                         |
| Chloroform        | 2.8                        | 60                         |
| Toluol            | 2.8                        | 80                         |

Wie erwartet, waren die Zusammensetzungen der Extrakte unterschiedlich. Dies ist sowohl aus den Trockengewichten als auch aus den Chromatogrammen der Extrakte in **Abbildung 5.35** ersichtlich.



**Abbildung 5.35** Base Peak Chromatogramme der unterschiedlichen HBG-II Extrakte

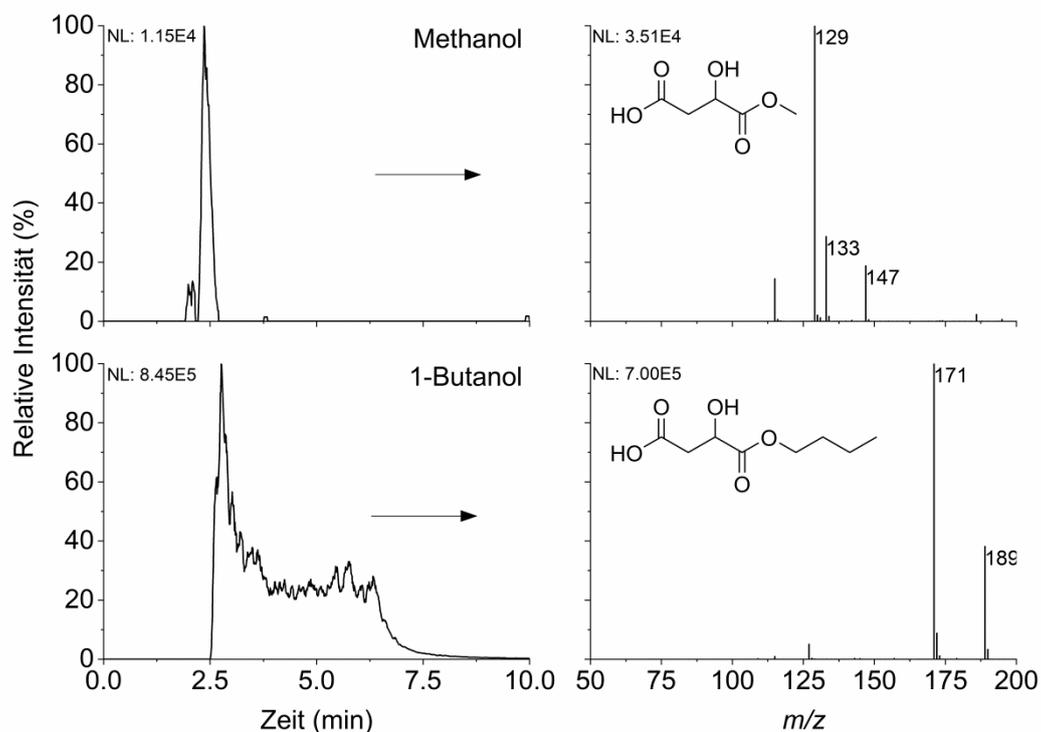
Polare Lösungsmittel wie Wasser oder Methanol lösen Substanzen wie kleine organische Säuren, Flavonoide, Zucker und deren Kombinationen viel besser als unpolare Lösungsmittel wie Chloroform oder Toluol. Da diese Verbindungen im Sanddorn in hohem Maße vorhanden sind, haben diese Extrakte damit die höchsten Trockengewichte. Die Chromatogramme der unpolaren Extrakte zeigen stärkere Peaks im Bereich zwischen RT 10–30 min. In diesem Bereich liegen hauptsächlich Peaks von Phytosterinen, Fettsäuren und Carotinoiden. Neben den offensichtlichen Unterschieden zwischen polaren und unpolaren Extrakten gibt es in jedem Extrakt Peaks, die in den anderen nicht auftreten. Diese, in Kombination mit allen anderen in den Extrakten gefundenen Substanzen, liefern einen einzigartigen Fingerabdruck für die Pflanzenextrakte. Mit diesem Aspekt im Hinterkopf wurden die Trockenextrakte zur Sublimation verwendet. Das die Wahl des Lösungsmittels die Zusammensetzung der Extrakte bestimmt, ist auch in den Chromatogrammen der Sublimate in **Abbildung 5.36** deutlich zu sehen.



**Abbildung 5.36** Base Peak Chromatogramme der Sublimate der Sanddornbeerentrockenextrakte

Jedes Sublimat enthält in seinem Chromatogramm weniger Peaks im Vergleich zum verwendeten Trockenextrakt (**Abbildung 5.35**). Da viele Substanzen aufgrund ihrer niedrigen Dampfdrücke nicht sublimiert werden können, war dies zu erwarten. So fehlen in den Sublimaten z. B. jegliche Zuckerverbindungen und ein hoher Anteil an unpolaren Substanzen, die in den Chromatogrammen der weniger polaren Extrakte im Bereich zwischen RT 10–30 min auftreten. Fettsäuren hingegen sind Hauptbestandteile in den Sublimaten der organischen Lösungsmittlextrakte und zeigen die größten Peaks im Bereich zwischen RT 17–19 min. In den Extrakten sind sie neben den größeren Signalen anderer Verbindungen kaum wahrnehmbar und machen nur einen geringen Teil der Zusammensetzung aus (Anhang, **Abbildung 8.11**). Die höhere Reinheit ist besonders nützlich, wenn Substanzen aus den Sublimaten isoliert werden sollen. Die vergleichsweise geringe Anzahl von Verbindungen erleichtert die chromatographische Trennung der Inhaltsstoffe. Gleichzeitig ist es immer noch möglich, jedes der

Sublimate zu unterscheiden. Die Massenspektren der jeweiligen Chromatogramme wurden untersucht, so dass für jedes Extrakt-Sublimat eigene Marker-Substanzen definiert werden konnten (Anhang, Tab. 8.3). Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Verbindungen, die nur in einem der Sublimate vorkommen. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe besteht aus Verbindungen, die auch in den Trockenextrakten nachgewiesen werden können. Dementsprechend dienen diese als Marker-Verbindungen sowohl für die Sublimate der Extrakte als auch für die Extrakte selbst. Bei der Extraktion von Sanddorn mit Alkoholen entstehen z. B. Äpfelsäureester. Diese Ester sind sowohl im Sublimat der Extrakte (**Abbildung 5.37**) als auch im Extrakt selbst vorhanden. Diese Esterbildung ist zum einen hilfreich, weil sie zur Identifizierung dieser Extrakte beiträgt. Zum anderen ist in ihr ein genereller Nachteil der Extraktion zu erkennen, da die Reaktion mit Lösungsmitteln die Inhaltsstoffe verändert.



**Abbildung 5.37** XIC ( $m/z$  147 für Methanol,  $m/z$  189 für 1-Butanol) und entsprechende MS-Spektren der gebildeten Äpfelsäureester

Marker-Substanzen, die sowohl in den Extrakten als auch in den Sublimaten der Extrakte vorkommen, wurden für alle Lösungsmittel mit Ausnahme von Wasser gefunden (Tabelle 5.18).

Die meisten der Marker-Substanzen, die in den Sublimaten der Trockenextrakte gefunden wurden, konnten jedoch in den Extrakten nicht nachgewiesen werden (Tabelle 5.19). Dies kann mehrere Gründe haben. Erstens ist die Konzentration einiger Verbindungen in den Extrakten so gering, dass sie mittels MS nicht nachgewiesen werden können. Bei der Sublimation hingegen können diese Verbindungen am Kühlfinger angereichert werden, während viele andere Substanzen im Extrakt verbleiben. Da der Kühlfinger nur mit einer geringen Menge Lösungsmittel gespült wird, ist die Konzentration der sublimierten Substanzen im Vergleich zum Extrakt relativ hoch und ihr Nachweis möglich.

**Tabelle 5.18** Marker-Substanzen der Trockenextrakte und ihrer Sublimate

| Methanol  |     | Ethylacetat |     | Toluol |      |     |
|-----------|-----|-------------|-----|--------|------|-----|
| RT        | m/z | RT          | m/z | RT     | m/z  |     |
| 2.4       | 147 | 2.2         | 271 | 2.3    | 173  |     |
|           |     | 2.6         | 289 | 2.4    | 259  |     |
| 1-Butanol |     | Chloroform  |     | 9.3    | 204  |     |
| RT        | m/z | RT          | m/z | 9.3    | 219  |     |
| 2.6       | 186 |             | 2.4 | 195    | 9.3  | 331 |
| 2.8       | 127 |             | 3.5 | 161    | 11.2 | 231 |
|           |     |             | 5.4 | 385    | 11.2 | 249 |
|           |     |             | 8.5 | 219    | 11.8 | 248 |
|           |     |             |     |        | 12.3 | 287 |
|           |     |             |     |        | 15.6 | 271 |
|           |     |             |     |        | 15.8 | 295 |
|           |     |             |     |        | 16.2 | 365 |
|           |     |             |     |        | 16.9 | 269 |

Ein weiterer Grund könnte auf die geringe thermodynamische Stabilität einiger Inhaltsstoffe des Sanddorns zurückzuführen sein. Durch die zugeführte Wärme und das Hochvakuum konnten diese Substanzen zersetzt und die Produkte dieser Prozesse auf dem Kühlfinger abgelagert werden. Unabhängig davon, welcher Fall zutrifft, sind diese und die meisten anderen Verbindungen, die durch Sublimation aus den Trockenextrakten gewonnen werden, von großem Interesse.

**Tabelle 5.19** Marker-Substanzen der Trockenextrakt-Sublimate, die in den Extrakten nicht vorkamen

| Wasser    |     | Ethylacetat |     | Toluol |     |      |     |
|-----------|-----|-------------|-----|--------|-----|------|-----|
| RT        | m/z | RT          | m/z | RT     | m/z | RT   | m/z |
| 2.3       | 163 | 2.7         | 367 | 2.4    | 197 | 7.9  | 313 |
| 2.8       | 247 | 5.7         | 401 | 2.6    | 111 | 10.5 | 120 |
| Methanol  |     | Chloroform  |     | 2.6    | 161 | 10.5 | 164 |
| RT        | m/z | RT          | m/z | 2.6    | 523 | 10.5 | 192 |
| 13.3      | 221 | 2.3         | 273 | 2.8    | 225 | 10.8 | 219 |
| 13.3      | 236 | 2.8         | 289 | 3.0    | 225 | 10.8 | 262 |
| 13.3      | 293 | 2.8         | 413 | 3.3    | 239 | 10.8 | 277 |
| 13.3      | 361 | 3.3         | 275 | 3.3    | 301 | 11.2 | 216 |
| 1-Butanol |     | 5.2         | 271 | 3.3    | 316 | 12.2 | 202 |
| RT        | m/z | 8.8         | 192 | 3.7    | 235 | 12.2 | 230 |
| 16.1      | 331 | 12.5        | 189 | 3.7    | 297 | 12.2 | 258 |
| 16.1      | 399 | 12.5        | 259 | 3.9    | 267 | 12.2 | 273 |
|           |     | 12.5        | 351 | 5.0    | 119 | 12.3 | 232 |
|           |     | 13.9        | 189 | 5.4    | 221 | 12.9 | 202 |
|           |     | 13.9        | 259 | 5.4    | 233 | 12.9 | 230 |
|           |     | 13.9        | 351 | 5.4    | 295 | 12.9 | 258 |
|           |     | 15.6        | 245 | 6.5    | 132 | 12.9 | 273 |
|           |     |             |     | 6.6    | 144 | 15.6 | 285 |
|           |     |             |     | 7.9    | 251 |      |     |

Zum einen ist es aufgrund der einzigartigen Zusammensetzung der Sublimate möglich, auf das Extraktionsmittel zu schließen, mit dem sie ursprünglich extrahiert wurden. Damit könnten bestimmte Produkte in der Lebensmittelindustrie auf ihre Echtheit überprüft werden. Zum anderen sind viele der Substanzen, die in den Sublimaten der Trockenextrakte gefunden wurden, in der Literatur nicht bekannt. Die Sublimation bietet also die Möglichkeit, auch aus Extrakten noch unbekannte Verbindungen anzureichern und zu entdecken. Dabei weisen unpolare Lösungsmitteln wie Toluol und Chloroform die höchste Anzahl von möglicherweise noch nicht beschriebenen Inhaltsstoffen der Sanddornbeeren auf.

Nach Durchführung der Sublimation sowohl mit Fruchtpulver als auch mit Trockenextrakten der Sanddornbeeren liegen die Vorteile der beiden Ansätze auf der Hand. Die Sublimation aus dem Pulver erfordert eine einfache Probenvorbereitung, verwendet außer zum Spülen der Kühlfinger kein Lösungsmittel und erzeugt daher kaum Abfall. Die Sublimate weisen zudem eine höhere Reinheit auf, was es einfacher macht, neue Substanzen daraus zu isolieren. Im Gegensatz dazu hat die Sublimation aus den Extrakten den Vorteil, dass die Inhaltsstoffe im Extrakt angereichert werden und somit eine größere Menge an Substanzen für die Sublimation zur Verfügung steht. Infolgedessen enthalten die Sublimate der Extrakte mehr Substanzen. Die Wahl des Extraktionsmittels kann zudem genutzt werden, um im Vorhinein zu kontrollieren, welche Art von Verbindungen das Sublimat enthalten wird.

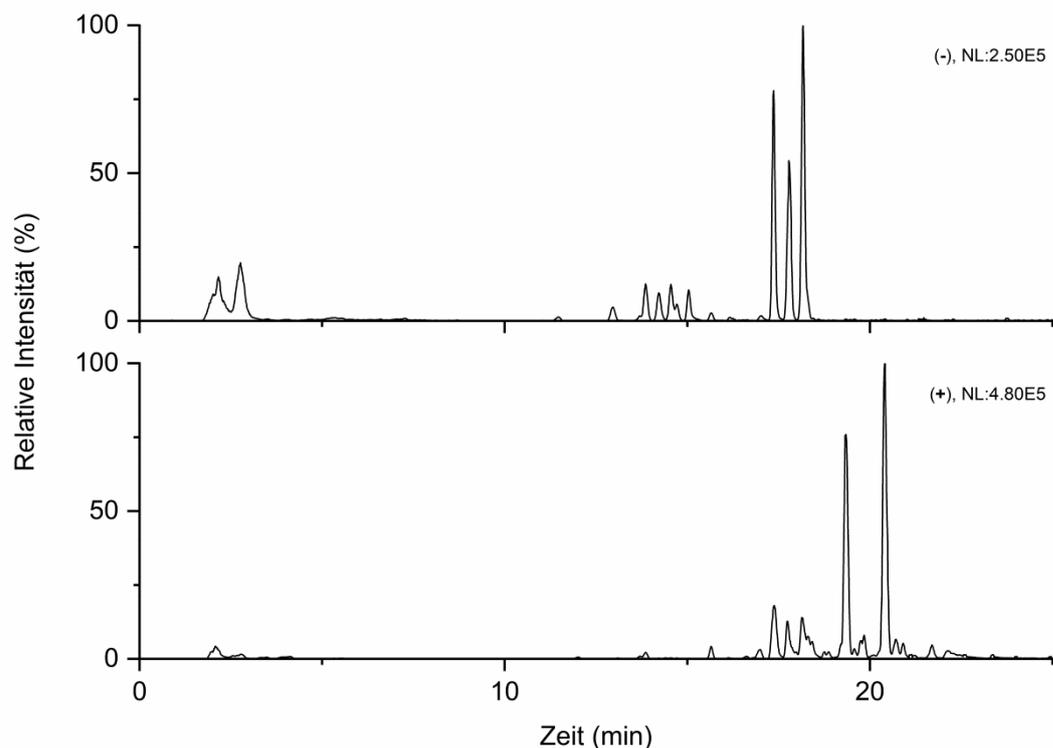
### 5.2.2 Isolierung und Charakterisierung von durch Sublimation angereicherten Naturstoffen

Die Anwendung der Sublimation auf Pflanzenmaterial führt zu einer Anreicherung von sublimierbaren Naturstoffen an den verwendeten Kühlflächen. Da nur wenige Substanzen sublimieren, sind die Substanzgemische, die dabei erhalten werden, weniger komplex in ihrer Zusammensetzung als z. B. Extrakte. Es ist zudem möglich, dass Verbindungen, welche in einem Extrakt aufgrund der hohen Anteile anderer Stoffe im Hintergrund untergehen, im Sublimat hervortreten. Die Anreicherung solcher Substanzen in Kombination mit der höheren Reinheit eines Sublimates sorgt dafür, dass neue Naturstoffe in diesen nachgewiesen werden können.

#### *Auftrennung des HBG-II Sanddornbeerensublimates*

Das Gewicht des gesamten Sublimates des HBG-II Sanddornbeerenpulvers betrug 0.41 g. Im Durchschnitt wurde demnach je Sublimation bei insgesamt zwölf Sublimationen über vier Tage eine Ausbeute von 34 mg erzielt. Vor der Auftrennung des Sublimats wurde dieses erneut mit der LC/MS vermessen. Die Chromatogramme sind in **Abbildung 5.38** abgebildet. Diese können grob in drei Bereiche eingeteilt werden. Im vorderen Retentionsbereich von RT 1.5–7.5 min sind vor allem kleine polare Substanzen zu finden. Dazu gehören vor allem kleinere Fruchtsäuren, aber auch einige unbekanntere kleinere Moleküle. Es ist davon auszugehen, dass Verbindungen, die zu diesen RT eluieren, mehrere Hydroxy- oder Carboxy-Gruppen aufweisen, wodurch ihre Wechselwirkung mit der unpolaren stationären Phase gering ausfallen. Der zweite Bereich umfasst die RT 10.0–17.0 min und 18.4–25.0 min. Die Verbindungen, die in diesen Bereichen auftauchen, sind in der Literatur noch nicht beschriebene Inhaltsstoffe des Sanddorns. Einige von ihnen gehören zu den bereits in Kapitel 5.2.1 beschriebenen Marker-Substanzen der Sanddornbeeren. Diese Substanzen sind von besonderem Interesse bei der Auftrennung des Sublimats. Der dritte und letzte Bereich beschreibt die Substanzen zwischen den RT 17.0–18.4 min. Es handelt sich dabei um literaturbekannte Fettsäuren, die in Sanddornbeeren vorkommen (Tab. 5.15). Diese Substanzen sind von geringerem Interesse, lediglich ihre isolierte Ausbeute in Bezug auf die Menge an Sublimat und ihr relatives Vorkommen zueinander sind interessante Informationen.

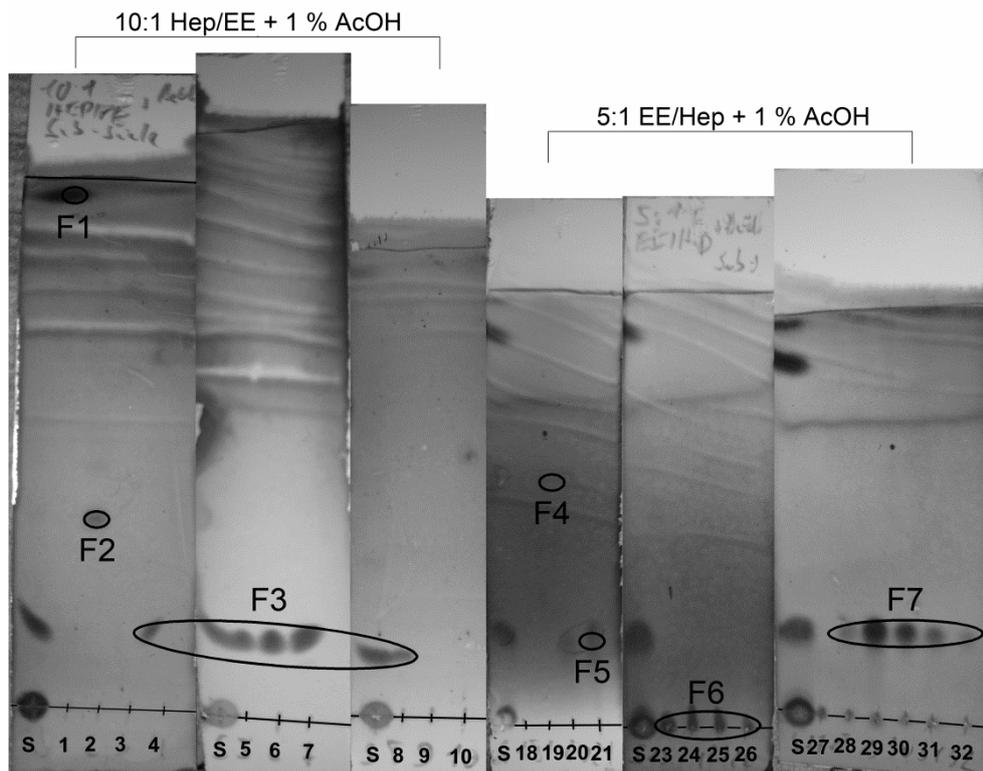
Bevor das Sublimat weiter aufgetrennt werden konnte, wurden mehrere Dünnschichtchromatographien angefertigt. Auf diese Weise wurde im Vorhinein ermittelt, welche Lösungsmittel in welchem Verhältnis für die anschließende Säulenchromatographie verwendet werden müssen. Aufgrund der großen Bandbreite an Verbindungen mit unterschiedlicher Polarität im Sublimat, wurden als Startbedingungen die unpolaren Lösungsmittel Heptan und Ethylacetat im Verhältnis 10:1 verwendet.



**Abbildung 5.38** Base Peak Chromatogramme des HBG-II Sublimats

Da neben den unpolaren Fettsäuren auch sehr polare Fruchtsäuren im Sublimat vorkamen, wurde außerdem zu jedem Eluentengemisch 1% Essigsäure hinzugegeben. Das Gleichgewicht zwischen protonierter und deprotonierter Form der im Sublimat vorhandenen Verbindungen ist somit stark in Richtung protonierter Form verschoben und es kommt zu einer einheitlichen Wechselwirkung mit der stationären Phase. Die Säulenchromatographie wurde mit einem vierten und letzten Eluentengemisch aus Methanol und Ethylacetat im Verhältnis 1:1 beendet. Es wurden dabei sieben Fraktionen erhalten. Die Einteilung der Fraktionen (F) anhand der DC ist in **Abbildung 5.39** zu erkennen. F1 und F2 sind bereits in den ersten beiden Reagenzgläsern (RG) enthalten. Diese Verbindungen liefen selbst im unpolaren Eluentengemisch aus Heptan und Ethylacetat im Verhältnis 10:1 sehr schnell durch die Säule. Für die F1 ist dies auch auf der DC zu erkennen. Sie läuft ganz oben auf der DC, was für keine bzw. sehr schwache Wechselwirkungen mit der Silicaphase spricht. Die F2 scheint deutlich stärker mit der DC-Platte zu wechselwirken, eluiert jedoch bereits kurz nach der F1 von der Säule. Beide Fraktionen scheinen zudem sehr klein zu sein, da sie nur in einem RG vorkommen. F3 ist im Gegensatz dazu wesentlich größer. Sie erstreckt sich über die RG 4–8 und zeigt einen recht guten Rückhalt auf der stationären Phase. Die F4 und F5 sind wesentlich polarer als die vorherigen Fraktionen. Um diese zu erhalten, war ein Eluentengemisch aus Ethylacetat und Heptan im Verhältnis von 5:1 nötig. In RG 19 wurden F4 ohne weitere auf der DC erkennbare Verunreinigungen sauber erhalten. F5 konnte in gleicher Reinheit in RG 21 erhalten werden, während in RG 20 noch eine

Mischung aus beiden Fraktionen vorlag. Eine Besonderheit lag bei F6 vor. Obwohl diese laut DC im verwendeten Lösungsmittelgemisch so gut wie überhaupt nicht durch die stationäre Phase bewegt wurde, eluierte sie noch vor F7, welche auf der DC wesentlich höher lief. Dies lässt sich mit zwei Ansätzen erklären. Zum einen bilden die DC nicht genau die Begebenheiten einer Säulenchromatographie ab. Poren- und Partikelgrößen sind unterschiedlich, welche einen großen Einfluss auf die Trennung haben. Zum anderen ist F6 in recht großen Mengen vorhanden und es könnte aufgrund von Diffusionseffekten zu einem sogenannten Fronting gekommen sein. In F7 sind noch Spuren der Substanz aus F6 zu erkennen (Abbildung 5.39).



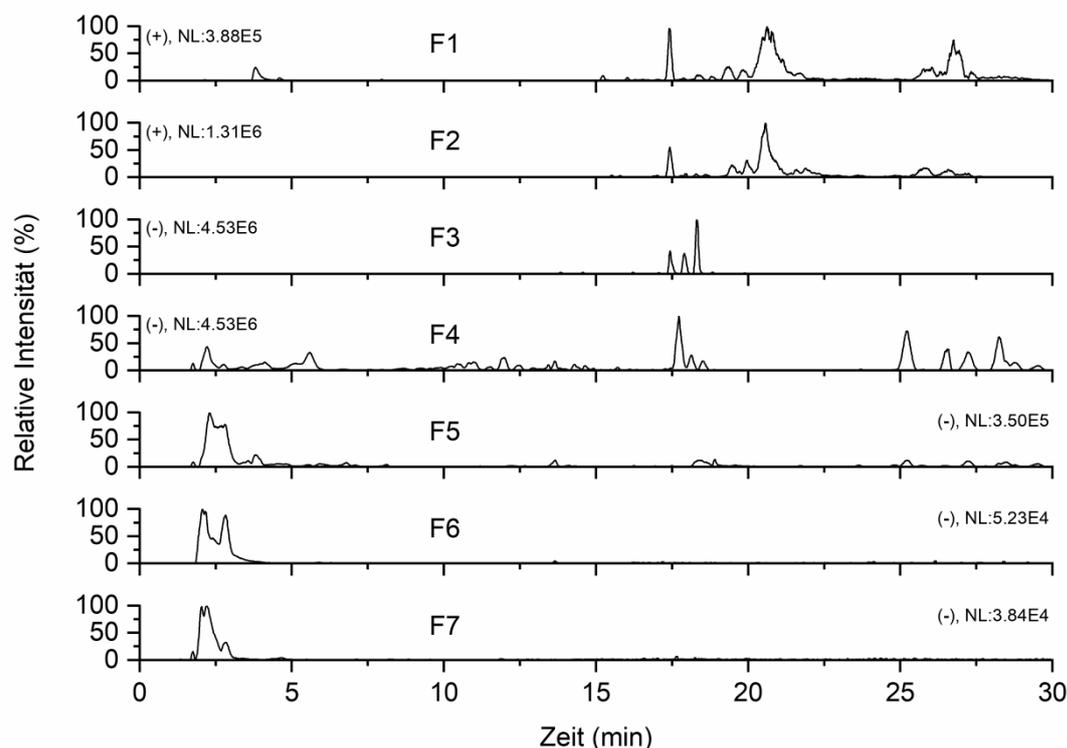
**Abbildung 5.39** Dünnschichtchromatogramme der Fraktionen des HBG-II Sublimates (S). Die Laufmittelzusammensetzungen sind oben abgebildet

Die Masse der Fraktionen betrug insgesamt 0.27 g, was 65% des eingesetzten Sublimates entspricht. Alle weiteren RG, die keiner Fraktion angehörten, wurden für die Massenbilanz nicht berücksichtigt. Da ein Färbereagens zur Entwicklung der DC benötigt wurde, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass alle Substanzen, die in den RG vorhanden waren, mit der DC auch detektiert wurden. Neben den nicht detektierten Substanzen war wahrscheinlich auch der Verbleib einiger Verbindungen auf dem Kieselgel der Säule ein Grund für die moderate Rückgewinnung. Die Auswaagen der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 5.20 aufgelistet. Es fällt bei einem Blick auf die Zahlen sofort auf, dass F6 etwas mehr als 50% der Gesamtmasse aller Fraktionen ausmacht. Darauf folgen F3 und F7, beide mit einem Gewicht von 46 mg, wobei aus der DC Analyse bereits bekannt ist, dass noch etwas F6 in F7 vorhanden ist. F1 und F5 enthielten 15 bzw. 10 mg. Die geringsten Massen wiesen F2 und F4 mit 8 bzw. 4 mg auf.

**Tabelle 5.20** Masse der einzelnen Fraktionen des HBG-II Sublimates

| Fraktion   | 1  | 2 | 3  | 4 | 5  | 6   | 7  |
|------------|----|---|----|---|----|-----|----|
| Masse (mg) | 15 | 8 | 46 | 4 | 10 | 139 | 46 |

Um zu beurteilen, welche Fraktionen für weitere Untersuchungen den Vorrang haben sollten, wurde im nächsten Schritt eine LC/MS Analyse der aufgetrennten Substanzen in Methanol durchgeführt. Bei einem kurzen Blick auf **Abbildung 5.40** wirkt es dabei so, als wären die F1 und F2 nahezu identisch in ihrer Zusammensetzung. Hinter den ähnlichen Peaks der (+) Chromatogramme verbergen sich jedoch in einigen Fällen unterschiedliche Massenspektren. Zur RT 20.6 min ist im Spektrum der F1 das Massenfragment 441 hauptsächlich vorhanden, während in der F2 das  $m/z$  407 zu dieser Zeit das Spektrum dominiert. Die Verbindung mit dem  $m/z$  407 besaß im Sublimat die höchste Intensität im (+) Chromatogramm (**Abbildung 5.38**) und ist nur in der F2 detektiert worden. Die erste Fraktion weist jedoch zur frühen RT von 3.8 min einen kleineren Peak mit dem dazugehörigen  $m/z$  186 auf, welcher in F2 nicht auftrat. Die zusätzlich dazu auftretenden gemeinsamen Peaks mit gleichem Massenspektrum, wie sie zu den RT 17.4 min oder 19.3 min vorkommen, deuten darauf hin, dass Überschneidungen zwischen den Fraktionen vorliegen, welche mit der DC nicht entdeckt wurden. Beide Fraktionen sind aufgrund der nicht literaturbekannten Substanzen in ihren Chromatogrammen für weitere Untersuchungen von großem Interesse und wurden deshalb in NMR Experimenten weiter untersucht.



**Abbildung 5.40** Base Peak Chromatogramme der Fraktionen des HBG-II Sublimats

Während für die F1 und F2 vor allem Peaks im (+) Chromatogramm detektiert wurden, sind in F3–F7 vorwiegend Peaks im (-) Chromatogramm vorgekommen. Die dritte Fraktion zeigt drei große Peaks (**Abbildung 5.40**), welche auch im (-) Chromatogramm des Sublimats am stärksten auftraten (**Abbildung 5.38**). In dieser Fraktion sind demnach hauptsächlich die Fettsäuren Hexadecadien-, Palmitolein-, Palmitin-, *cis*-Vaccen-, Linol- und Linolensäure enthalten. Für weitere Untersuchungen ist diese Fraktion von geringerem Interesse, da die Inhaltsstoffe bereits in der Literatur für den Sanddorn beschrieben wurden. Anders verhält es sich für F4. Hier ist eine Reihe Peaks im (-) Chromatogramm zu erkennen. Auch hier scheint das Färbereagenz nur einen Bruchteil der

Substanzen detektiert zu haben. In den Fraktionen fünf, sechs und sieben sind vor allem die großen Peaks zu Beginn der (-) Chromatogramme auffällig. Die Zusammensetzung unterscheidet sich bei Betrachtung der MS Spektren jedoch. In F5 ist das  $m/z$  179 im RT Bereich von 1.5–3.0 min am stärksten vertreten. Hinzu kommen einige kleine  $m/z$  Werte wie die 143, 147 und 175, welche in den weiteren Fraktionen nicht auftauchen. In F6 und F7 ist die Verbindung mit dem  $m/z$  179 auch vorhanden, jedoch sind die  $m/z$  Werte 115 und 133 in beiden noch stärker enthalten. Die F7 fällt zudem durch das Auftreten einer Verbindung mit dem  $m/z$  173 auf, das in beiden vorherigen Fraktionen nicht detektiert wurde. Auch die drei letzten Fraktionen sind für eine genauere Untersuchung ausgewählt worden. Ihre unterschiedlichen Dünnschichtchromatogramme deuten auf stärkere Unterschiede hin, als es die Massenspektren vermuten lassen.

Die Fraktionen eins und zwei wurden in deuteriertem Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) gelöst und sind anschließend mittels  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, DEPT- und 2D-NMR-Spektroskopie untersucht worden. Die Auswertung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der F1 zeigt, dass es sich zum größten Teil um nur eine Verbindung handelt (Abbildung 5.40). Der Vergleich der Intensitäten eines CH-Signals mit einem unbekanntem Signal der größten Verunreinigung im Spektrum zeigt, dass diese höchstens zu 12% der Teilchenanzahl der Hauptverbindung entspricht. Die Auswertung des Protonen Spektrums zeigt fünf Signale mit einem Intensitätsverhältnis von 1:2:37:6:3 bei den chemischen Verschiebungen 5.35 ppm, 2.01 ppm, 1.26 ppm, 0.88 ppm und 0.07 ppm. Das DEPT-Verfahren (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) ermöglicht es, zwischen  $\text{CH}_2$ -,  $\text{CH}$ - und  $\text{CH}_3$ - sowie quartären Kohlenstoffatomen im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zu unterscheiden. Während  $\text{CH}$ - und  $\text{CH}_3$ -Signale wie gewohnt angezeigt werden, werden  $\text{CH}_2$ -Signale um  $180^\circ$  gedreht dargestellt und zeigen somit im Spektrum nach unten. Quartäre Kohlenstoffatome sind im DEPT-Spektrum überhaupt nicht vorhanden, da bei diesem Verfahren Protonen am Kohlenstoff benötigt werden, um die  $^{13}\text{C}$ -Signale abzubilden. Im DEPT-Spektrum der F1 sind drei  $\text{CH}$ - bzw.  $\text{CH}_3$ -Signale zu erkennen und mehrere  $\text{CH}_2$ -Signale (Abbildung 5.41). Sechs dieser Signale sind gut von den restlichen zu unterscheiden, jedoch überlagern einige zu einem sehr großen Signal. Bei einem Vergleich der Intensitäten der  $\text{CH}_2$ -Signale im DEPT-Spektrum ergibt sich am Ende eine Anzahl von 14  $\text{CH}_2$ -Gruppen im Spektrum.

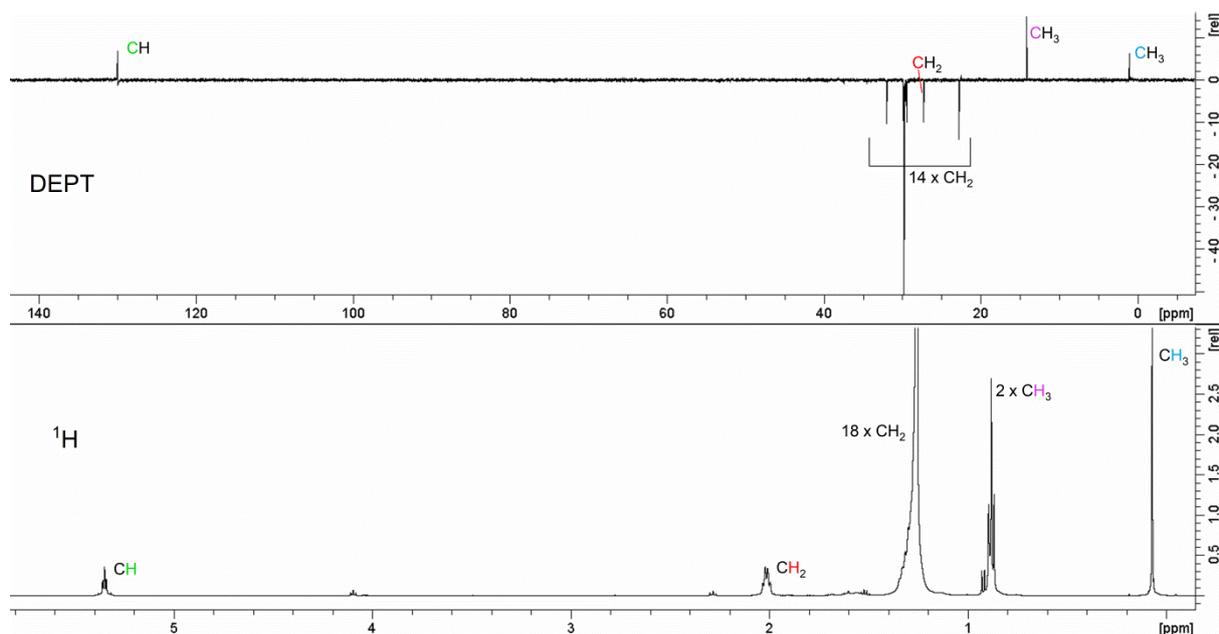
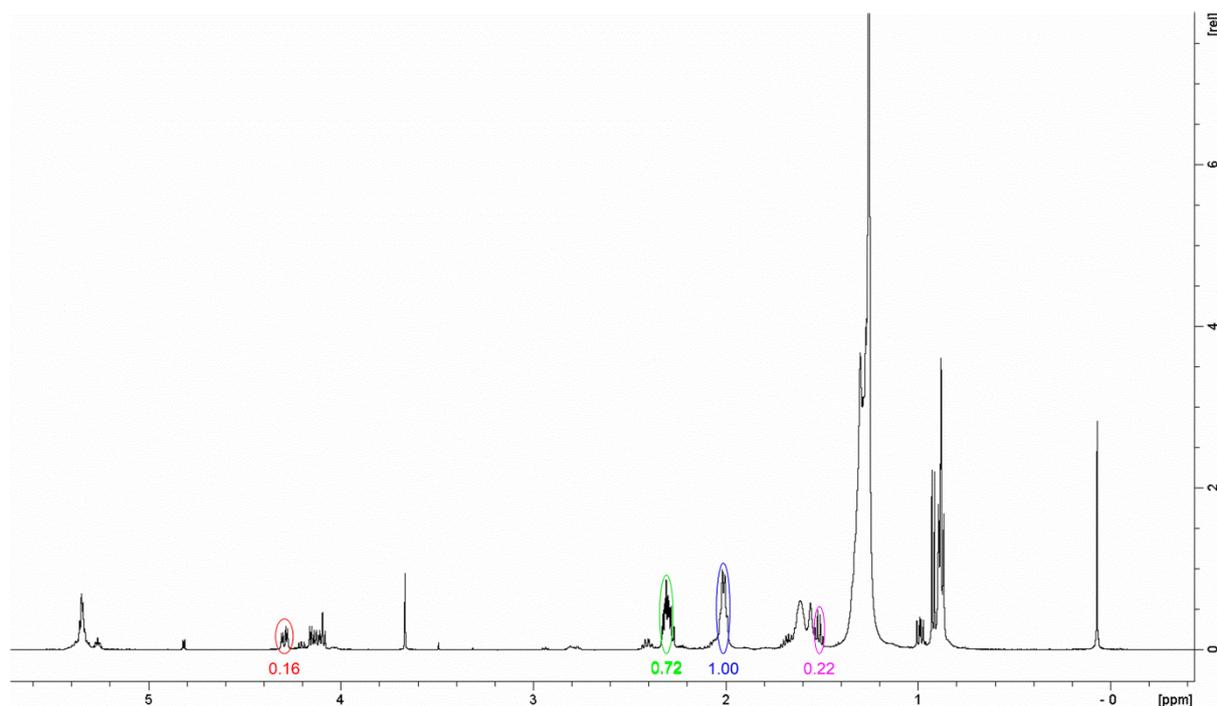


Abbildung 5.41 DEPT- und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der F1 des HBG-II Sublimats

Diese Anzahl deckt sich nicht ganz mit der Menge an Protonen, die unter dem breiten Signal bei 1.26 ppm im  $^1\text{H}$ -Spektrum liegen. 37 Protonen entsprächen maximal 18  $\text{CH}_2$ -Gruppen, jedoch sind Intensitäten im DEPT-Spektrum nicht so genau, wie es im Protonen Spektrum der Fall ist. Die genaue Anzahl der  $\text{CH}_2$ -Gruppen bleibt ungewiss, da unter dem breiten Signal unterschiedliche Verbindungen liegen könnten. Im HSQC-Spektrum (Heteronuclear Single Quantum Coherence) werden Kopplungen zwischen Protonen und Kohlenstoffatomen über eine Bindung sichtbar gemacht und somit wird eine Zuordnung der  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Signale zueinander möglich. Daraus ergibt sich, dass es sich bei den Signalen im  $^1\text{H}$ -Spektrum um eine CH- (5.35 ppm), eine  $\text{CH}_2$ - (2.01 ppm), mehrere  $\text{CH}_2$ - (1.26 ppm), zwei  $\text{CH}_3$ - (0.88 ppm) und eine  $\text{CH}_3$ - (0.07 ppm) Gruppe handelt (Anhang, **Abbildung 8.12**). Da die CH-Gruppe zum Triplet aufgespalten ist, liegt die Vermutung nahe, dass in ihrer direkten Nachbarschaft eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe liegt. Diese Annahme wird durch die Auswertung des COSY-Spektrums (Correlated Spectroscopy) bestätigt (Anhang, **Abbildung 8.13**). In diesem Spektrum werden Kopplungen zwischen Protonen über drei Bindungen erkenntlich, also Kopplungen, welche zwischen benachbarten Protonen entstehen. Die  $\text{CH}_2$ -Gruppe zur chemischen Verschiebung 2.01 ppm koppelt demnach mit der CH-Gruppe und einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe, deren Signal mit weiteren  $\text{CH}_2$ -Gruppen bei 1.26 ppm liegt. Aus diesem Bereich findet auch eine Kopplung zu den  $\text{CH}_3$ -Gruppen bei 0.88 ppm statt. Es ist jedoch nicht möglich, eine genaue Aussage darüber zu treffen, welche  $\text{CH}_2$ -Gruppe aus diesem Bereich die Kopplungen eingeht. Aufgrund der starken Abschirmung der CH-Gruppe ist zudem davon auszugehen, dass diese außer der  $\text{CH}_2$ -Gruppe ein oder zwei elektronegative Atome in direkter Nachbarschaft aufweist. Die Struktur der Verbindung aus F1 konnte nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass es sich um einen langkettigen Alkohol handelt.

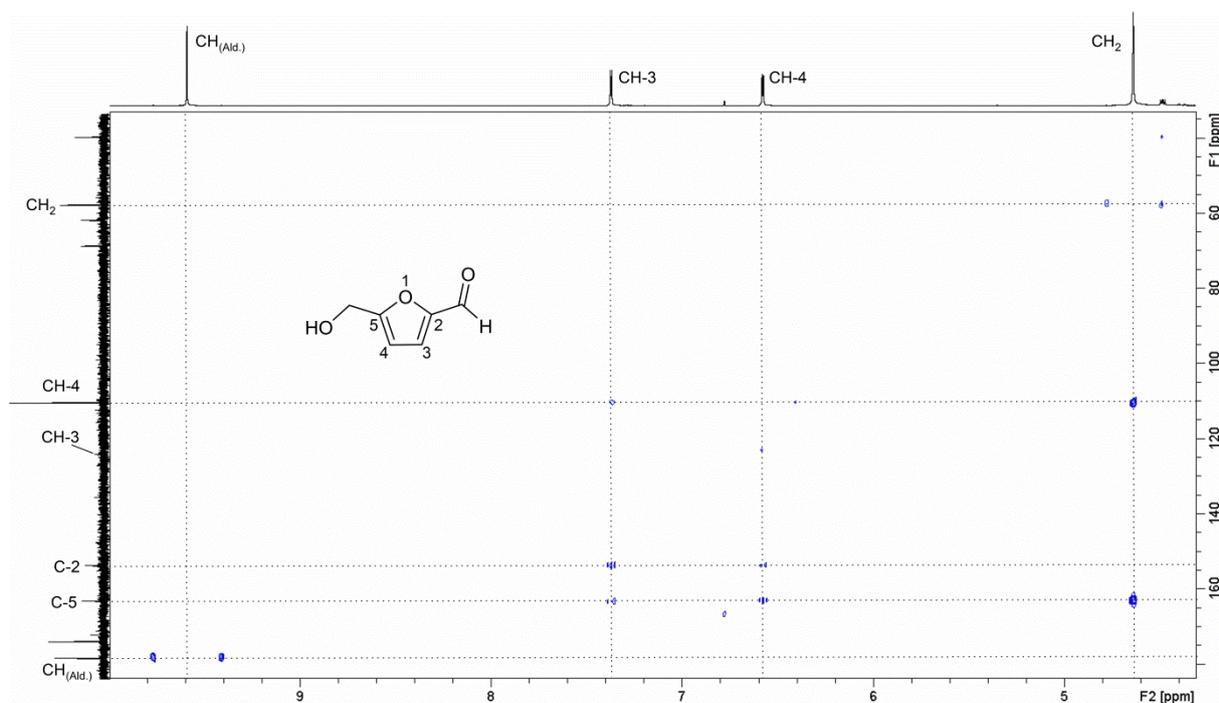


**Abbildung 5.42**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der F2 des HBG-II Sublimates. Die Intensitäten der  $\text{CH}_2$ -Gruppen verschiedener Inhaltsstoffe der Fraktion sind unter den dazugehörigen Signalen angegeben

Die zweite Fraktion des HBG-II Sublimats enthält mehr Substanzen als die erste Fraktion. Dies ist anhand der NMR-Spektren klar zu erkennen. Dabei ist die Substanz, welche in F1 den Großteil der Zusammensetzung ausmacht, auch in F2 am stärksten vertreten. Es sind jedoch mehrere zusätzliche Verbindungen enthalten, wobei deren genaue Anzahl nicht ermittelt werden konnte. In **Abbildung 5.42**

sind die Intensitäten von vier CH<sub>2</sub>-Gruppen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der F2 angegeben. Diese wurden zuvor mittels DEPT- und HSQC-Spektrum bestimmt, um die Anteile der verschiedenen Verbindungen an F2 des HBG-II Sublimats abschätzen zu können. Die in F1 beschriebene Substanz macht im Vergleich mit drei weiteren Verbindungen etwas weniger als 50% der F2 aus (Abbildung 5.42, blau). Mit circa 70% der Intensität ist eine weitere Verbindung in stärkerem Maße vorhanden (Abbildung 5.42, grün). Zwei zusätzliche Inhaltsstoffe folgen mit um die 20% der Intensität (Abbildung 5.42, rot/rosa). Es sind noch weitere Moleküle mit geringerer Intensität vorhanden, wodurch eine Auswertung zusätzlich erschwert wurde. Um eine Aussage über die Strukturen der gefundenen Substanzen tätigen zu können, muss eine weitere Auftrennung erfolgen, welche aufgrund der geringen Menge an F2 jedoch nicht durchgeführt werden konnte.

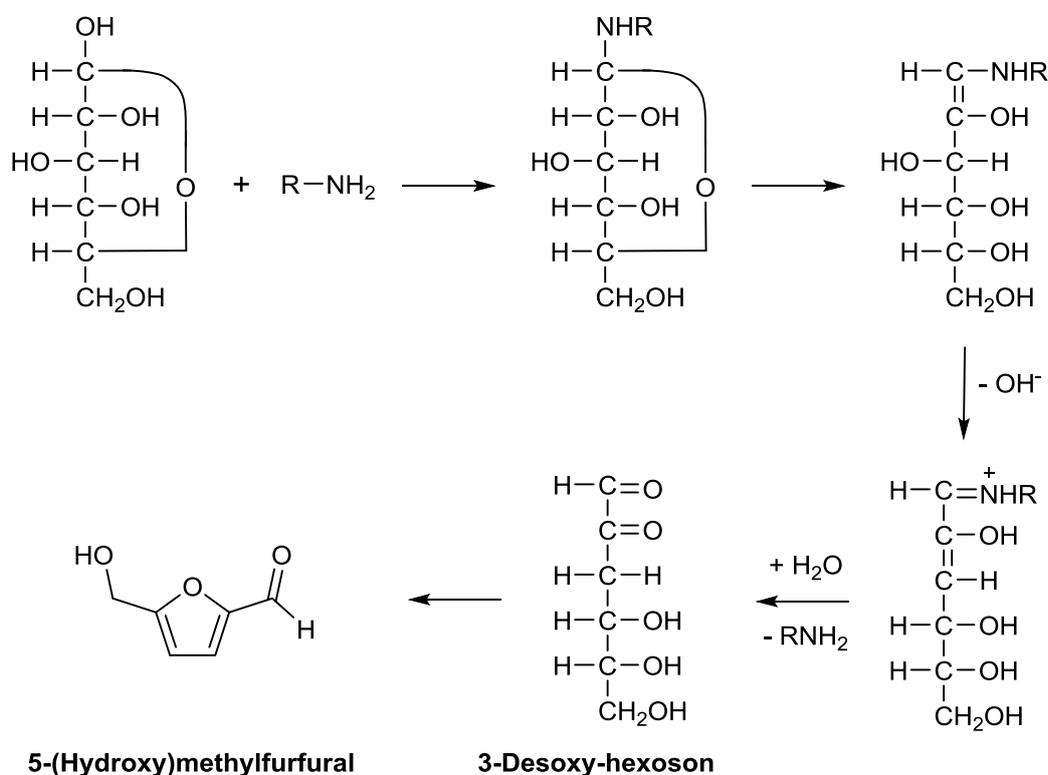
Da F3 von geringerem Interesse war, als die restlichen Fraktionen, wurde als nächstes die vierte Fraktion mittels NMR analysiert. Es war auch hier sofort zu erkennen, dass mehrere Substanzen in der Fraktion vorlagen. Durch die Auswertung des <sup>1</sup>H- und COSY-Spektrums (Anhang, Abbildung 8.14, Abbildung 8.15) konnte festgestellt werden, dass es sich dabei um vier Verbindungen im Verhältnis von 1:0.75:0.39:0.35 handelte.



**Abbildung 5.43** Ausschnitt des HMBC-Spektrums der F4 des HBG-II Sublimats, in dem die Signale des 5-(Hydroxymethyl)furfurals zu sehen sind

Die am stärksten vertretende Substanz zeigt ein scharfes Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 9.6 ppm. Dies spricht für ein sehr stark entschirmtes Proton ohne Protonen-Kopplungspartner. Da im HMBC-Spektrum (heteronuclear multiple bond correlation) eine Kopplung zwischen einem Kohlenstoffatom mit einer chemischen Verschiebung von 178.1 ppm und dem Singulett über eine Bindung klar zu erkennen ist, handelt es sich um ein CH-Signal (Abbildung 5.43). Die starke Entschirmung der beiden Signale spricht dafür, dass es sich um ein Aldehyd handelt, da der doppelt gebundene Sauerstoff die Elektronendichte an beiden Kernen stark verringert. Da keine weiteren Kopplungen des Protons und des Carbonyl-Kohlenstoffs in den NMR-Spektren erkennbar sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Aldehydgruppe an ein quartäres Kohlenstoffatom gebunden ist. Zwei weitere CH- und ein CH<sub>2</sub>-Signal im <sup>1</sup>H-Spektrum können aufgrund ihrer Intensitäten der Aldehyd-Verbindung zugeordnet werden. Die zwei CH-Signale, welche zu Dupletts aufgespalten sind, koppeln

miteinander und sind demnach direkt miteinander verbunden. Sie liegen in dem Bereich des Spektrums, im dem olefinische oder aromatische CH Gruppen zu finden sind (5–8 ppm), daher ist es wahrscheinlich, dass sie an Doppelbindungen beteiligt sind. Im HMBC-Spektrum sind für diese CH-Gruppen zusätzliche Kopplungen zu den quartären Kohlenstoffatomen mit den chemischen Verschiebung 153.4 ppm und 162.9 ppm zu erkennen (**Abbildung 5.43**). Dies spricht dafür, dass jeweils eines der beiden quartären Kohlenstoffatome in direkter Nachbarschaft zu einer der CH-Gruppen vorliegt. Es sind somit die Kopplungen über zwei und drei Bindungen der Protonen zu den Kohlenstoffatomen zu sehen. Die Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppe zeigen im HMBC-Spektrum ebenfalls eine Kopplung zum Kohlenstoff der CH-Gruppe mit der chemischen Verschiebung von 110.2 ppm. Das zugehörige Proton liegt im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bei 6.6 ppm. Die CH<sub>2</sub>-Gruppe koppelt im HMBC außerdem mit dem quartären Kohlenstoff der bei einer chemischen Verschiebung von 162.9 ppm im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zu sehen ist. Es ist daher anzunehmen, dass die CH<sub>2</sub>-Gruppe in direkter Nachbarschaft zu diesem Kohlenstoff vorliegt, welcher seinerseits direkter Nachbar der CH-Gruppe mit der chemischen Verschiebung von 110.2 ppm im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum ist. Aufgrund der chemischen Verschiebung von 4.6 ppm der Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppe, befindet sich in direkter Nachbarschaft zudem ein elektronegatives Atom wie Sauerstoff. Auch die beiden quartären Kohlenstoffatome, welche wahrscheinlich eine Doppelbindung zu den CH-Gruppen aufweisen und in ihrer Nachbarschaft zudem eine Aldehyd- bzw. CH<sub>2</sub>-Gruppe besitzen, müssen aufgrund der hohen chemischen Verschiebungen von 153.4 ppm und 162.9 ppm noch ein elektronegatives Atom in ihrer direkten Umgebung haben. Alle Erkenntnisse aus den NMR-Spektren weisen stark darauf hin, dass es sich bei der Verbindung um das 5-(Hydroxymethyl)furfural (HMF) handelt (Anhang, Kapitel 8.3).

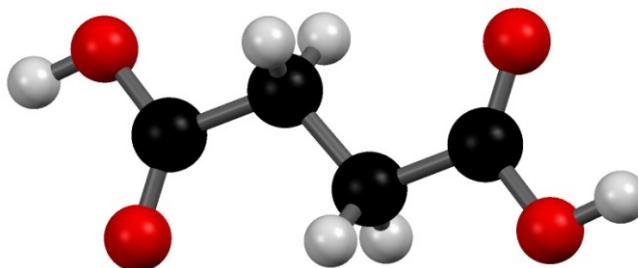


**Abbildung 5.44** Reaktionsweg der „Maillard-Reaktion“, der zur Entstehung des HMFs führt (nach Baltés und Matissek, 2009)<sup>169</sup>

Diese Analyse wurde anschließend durch den Vergleich mit Literaturdaten bestätigt.<sup>170</sup> Die Isolierung von HMF aus Sanddornbeeren wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben.<sup>135</sup> Dabei muss erwähnt werden, dass Zheng et al. (2009) ihre spektroskopischen Daten dazu nicht veröffentlicht

haben und die dort angegebene Referenz das HMF nicht erwähnt. Constantin et al. (2019) und Xu et al. (2014) untersuchten die HMF Entstehung während der thermischen Behandlung von Sanddornpüree bzw. Sanddornsaft.<sup>171,172</sup> Diese ist auf die sogenannte Maillard Reaktion zurückzuführen. Dabei reagieren reduzierende Zucker mit Aminosäuren, wobei eines der Zwischenprodukte das 3-Desoxyhexoson ist, welches dann weiter zu HMF reagiert (**Abbildung 5.44**).<sup>169</sup> Da das Sanddornbeerenpulver während der Sublimation auf 90 °C erhitzt wurde, ist es möglich, dass das HMF während der Sublimation aus Glucose oder Fructose, welche mit Aminosäuren reagierten, entstand.

Eine weitere Verbindung der F4 ist mit nur einem Signal im <sup>1</sup>H- und zwei Signalen im <sup>13</sup>C-Spektrum vorhanden. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ist ein Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 2.58 ppm die einzige Information, die zu dieser Substanz vorhanden ist. Durch das HSQC und DEPT Spektrum kann diesem Singulett eine CH<sub>2</sub>-Gruppe zugeordnet werden (**Anhang, Abbildung 8.16, Abbildung 8.17**). Die einzige Kopplung, die in diesem Molekül auftritt, ist die der Protonen der CH<sub>2</sub> Gruppe mit einem sehr stark abgeschirmten quartären Kohlenstoffatom. Dessen chemische Verschiebung von 173.3 ppm lässt darauf schließen, dass es sich dabei um einen Carboxyl-Kohlenstoff handelt (**Anhang, Abbildung 8.18**). Die geringe chemische Verschiebung der CH<sub>2</sub>-Gruppe ist ein Anzeichen dafür, dass diese nicht an ein elektronegatives Element wie Sauerstoff oder Stickstoff gebunden ist. Da im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum jedoch keine Aufspaltung des Signals zu sehen ist, müssten Protonen, die in direkter Nachbarschaft zur CH<sub>2</sub>-Gruppe auftreten, chemisch äquivalent zu dieser sein. Dies wäre aber nur der Fall, wenn die gefundene Substanz symmetrisch aufgebaut ist. Demnach würde es sich bei der Substanz um Bernsteinsäure handeln (**Anhang, Kapitel 8.3**). Ein Vergleich mit den Literaturwerten bestätigte diese Annahme.<sup>173</sup> Die Verbindung konnte außerdem auskristallisiert werden und die Kristallstruktur mittels Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden (**Abbildung 5.45, Anhang, Kapitel 8.4**). Bernsteinsäure konnte schon zuvor in Sanddornbeeren nachgewiesen werden.<sup>174</sup> Die Isolierung der Verbindung aus den Sanddornbeeren wurde bis jetzt jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben.

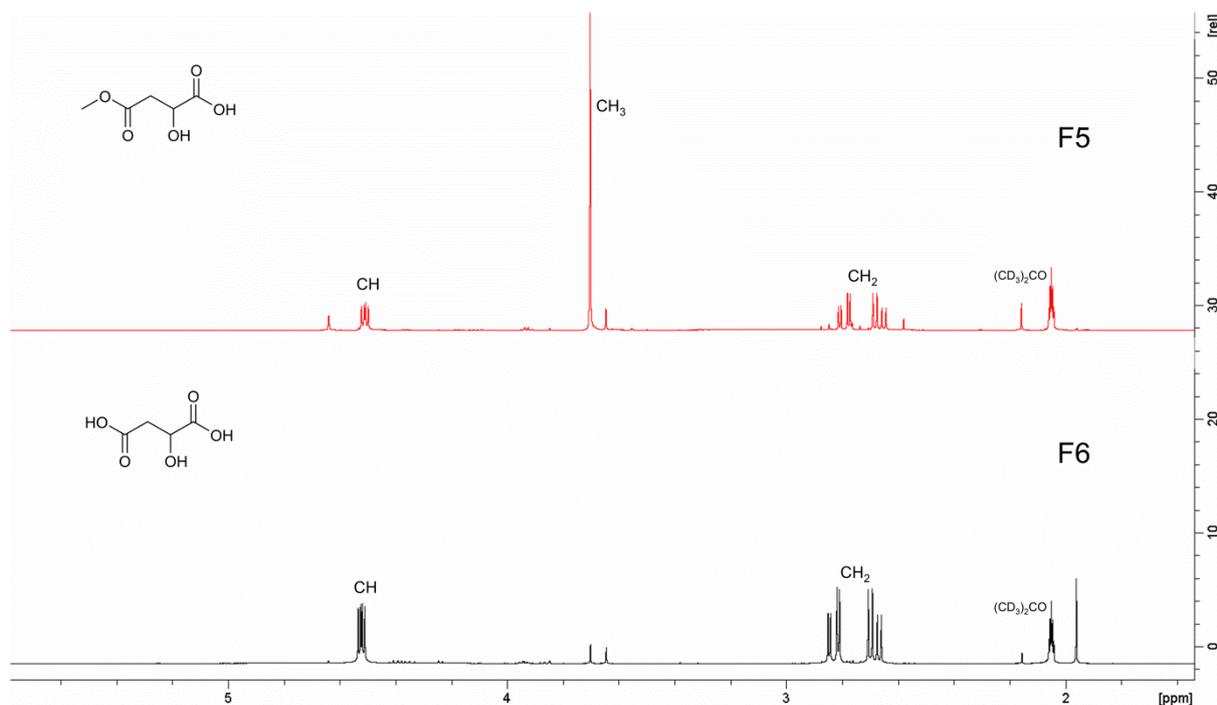


**Abbildung 5.45** Kristallstruktur von Bernsteinsäure aus F4 isoliert. Folgende Atome sind sichtbar: Wasserstoff (weiß), Kohlenstoff (schwarz) und Sauerstoff (rot)

Die Strukturen der restlichen Verbindungen, welche in der vierten Fraktion des HBG-II Sublimats enthalten waren, konnten aufgrund ihres geringen Anteils nicht aufgeklärt werden.

Auch die fünfte Fraktion des HBG-II Sublimats bestand aus mehreren Verbindungen. Einen kleinen Anteil machte auch hier das HMF aus, wobei noch zwei weitere Substanzen in geringeren Mengen im Protonen-Spektrum zu erkennen sind. Die F5 setzte sich jedoch zum Großteil aus nur einer Verbindung zusammen (**Abbildung 5.46**). Dabei handelte es sich um den Äpfelsäuremethylester, welcher zuvor bereits aus dem 1-Butanolextrakt der HBG-I isoliert werden konnte (**Kapitel 5.1.2.3**).

Dieser konnte nun zusätzlich durch die Anwendung der Sublimation gewonnen werden. Die Reinheit des Esters betrug laut  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dabei circa 75%, was 7.5 mg entsprach. Es wurden insgesamt 84 g des Sanddornbeerenpulvers in der Sublimation eingesetzt. Für die Extraktion der HBG-I Beeren mit 1-Butanol wurden lediglich 4.89 g des Pulvers verwendet und am Ende konnten 26.7 mg Äpfelsäuremethylester isoliert werden. Der Methylester konnte dabei jedoch nur als Gemisch mit dem Butylester der Äpfelsäure mit einer Reinheit von 50% erhalten werden. Die Ausbeute lag für den Extraktionsprozess mit 5.4 mg/g (Äpfelsäuremethylester/Sanddornbeerenpulver) deutlich über der Ausbeute der Sublimation mit 0.09 mg/g. Dabei muss berücksichtigt werden, dass das Pflanzenmaterial dreimal extrahiert wurde, das Extraktionsmittel (0.36 l) entfernt und anschließend mit einer großen Menge an Lösungsmitteln (2.6 l) die Säulenchromatographie durchgeführt wurde. Die Sublimation kommt komplett ohne Lösungsmittel aus und die einfache chromatographische Trennung verwendete vergleichsweise wenig an Eluent (0.7 l). Die Sublimationsdauer (96 h) liegt natürlich weit über der Extraktionsdauer (25 min). Der Arbeitsaufwand ist jedoch sehr gering, da der Sublimationsvorgang automatisch abläuft. Es sind keine Filtrationsschritte oder Verdampfungsprozesse notwendig. Des Weiteren variiert der Anteil an Äpfelsäure in den Sanddornbeeren in Abhängigkeit von den Erntezeitpunkten. Für die Extraktion sind Sanddornbeeren der Sorte Habego aus dem Jahre 2017 (HBG-I) und für die Sublimation aus dem Jahre 2018 (HBG-II) verwendet worden.

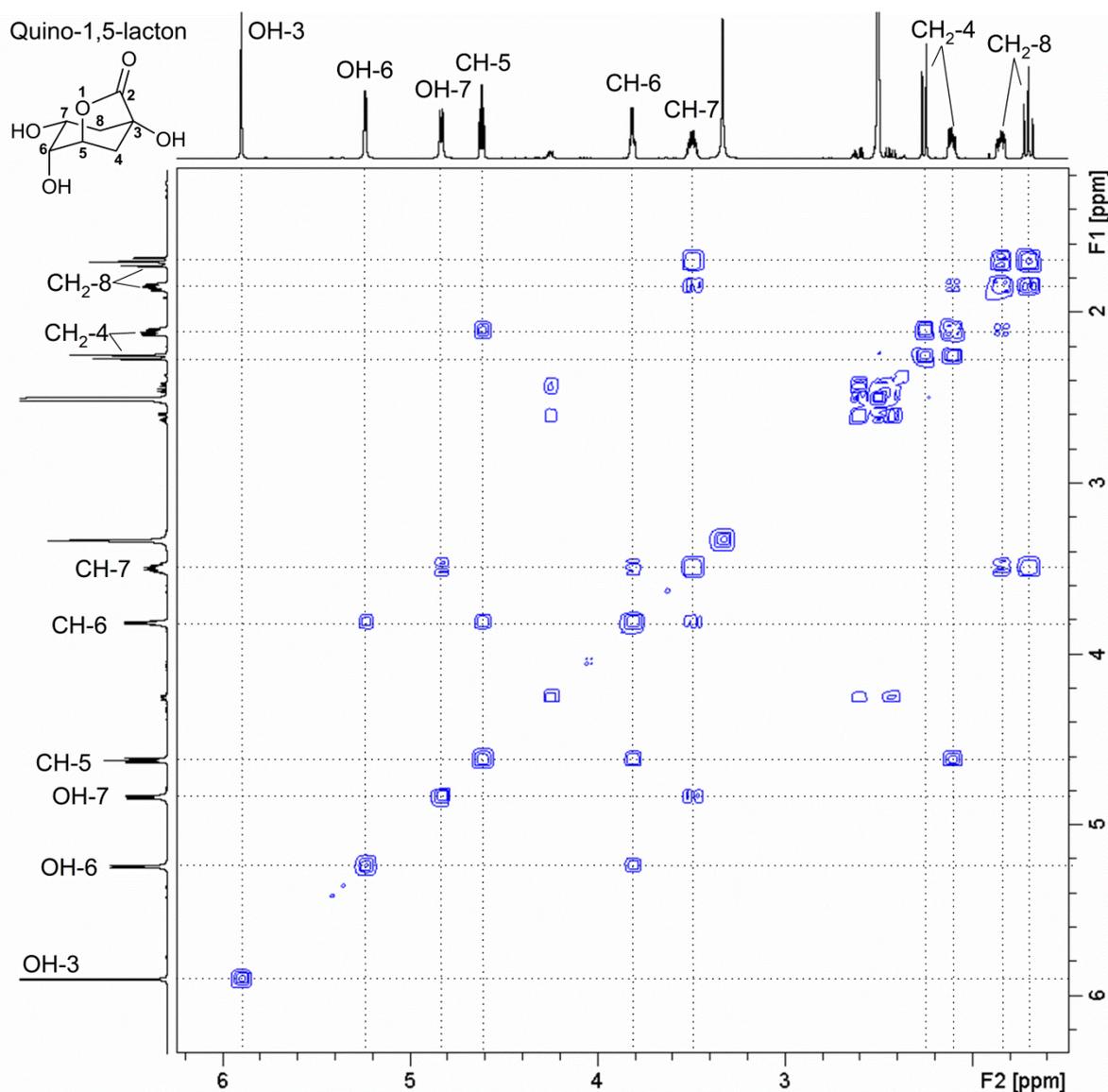


**Abbildung 5.46**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der F5 und F6 des HBG-II Sanddornbeeren-sublimates

Die sechste Fraktion war mit 139 mg die mit Abstand größte Fraktion des HBG-II Sublimates. Laut dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wies sie eine hohe Reinheit auf und bestand zu circa 90% aus Äpfelsäure (Abbildung 5.46). Die Reinheit der Äpfelsäure aus Fraktion 13.4 des HBG-I 1-Butanolextraktes lag mit 85% etwas darunter. Die Ausbeute betrug dabei 37.5 mg, während aus dem Sublimat 125.1 mg isoliert werden konnten. Im Extrakt war noch wesentlich mehr Äpfelsäure enthalten, diese verteilte sich jedoch über mehrere Fraktionen (F13–F24) hinweg. Der Aufwand für die Isolierung einer größeren Menge wäre deutlich gestiegen und mit höherem Lösungsmittelverbrauch einhergegangen. Hier lässt sich erneut ein wesentlicher Vorteil der Sublimation erkennen. Die Äpfelsäure ist mit einem Anteil von 30% im Sublimat vorhanden. Aufgrund der geringeren Komplexität in der Zusammensetzung des

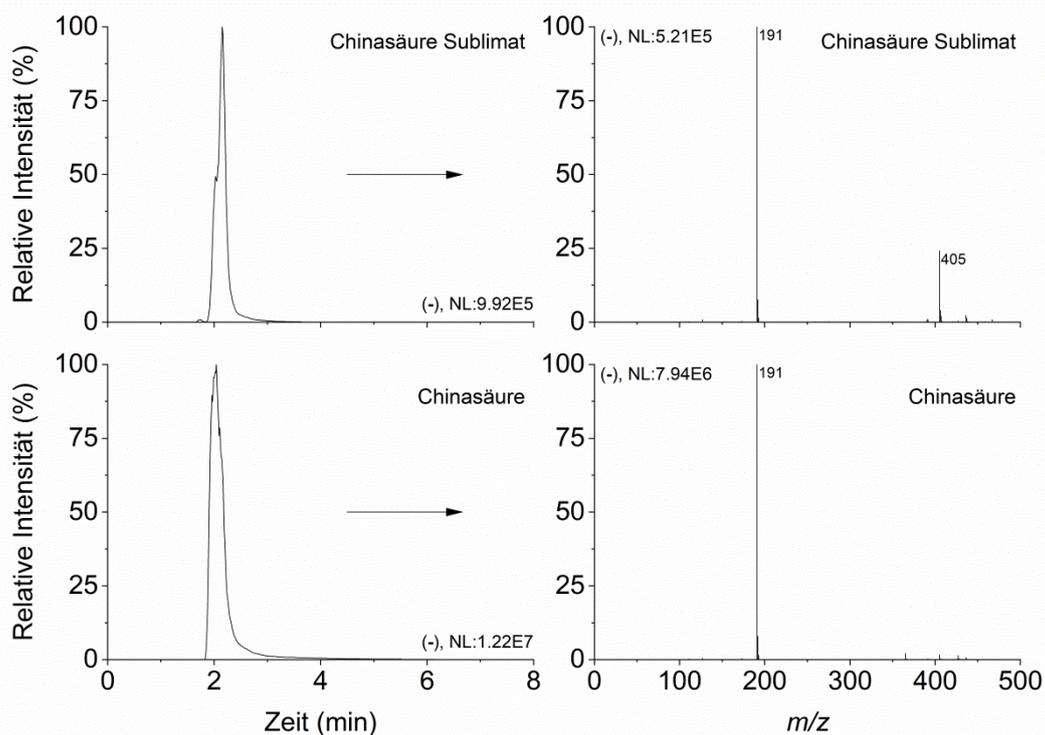
Sublimats im Vergleich zu der des Extraktes gelang es, die Säure in sehr guter Ausbeute und hoher Reinheit zu isolieren. Die relative Ausbeute bezogen auf das Ausgangsmaterial liegt für die Extraktion natürlich höher. Substanzen, die im Extrakt nur in geringen Konzentrationen vorkommen, könnten jedoch durch die geringere Komplexität im Sublimat erstmals entdeckt werden.

In F7 waren, wie schon bei der Analyse der DC zu erkennen war (**Abbildung 5.39**), noch Teile der F6 enthalten. Die Auswertung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums zeigte, dass die siebte Fraktion zu 16% aus Äpfelsäure bestand (Anhang, **Abbildung 8.19**). Die restlichen 84% gehörten zu einem anderen Inhaltsstoff, dessen Struktur noch nicht aufgeklärt ist. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der F7 des HBG-II Sublimats in  $\text{DMSO-d}_6$  sind zehn Signale zu erkennen, die jeweils eine Intensität von eins besitzen (**Abbildung 5.47**). Bis auf ein Signal, besitzt jedes ein Aufspaltungsmuster, es liegen somit Kopplungen für fast jedes Proton mit mindestens einem weiteren Proton vor. Im DEPT-Spektrum sind drei CH-Signale und zwei  $\text{CH}_2$ -Signale zu sehen (**Abbildung 8.20**). Demnach sind vier der Protonensignale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum auf  $\text{CH}_2$ -Gruppen zurückzuführen und drei auf Heteroatom-gebundene Protonen. Die Protonen der  $\text{CH}_2$ -Gruppen sind chemisch nicht äquivalent, wodurch sie miteinander koppeln können. Das wiederum führt zu einer Aufspaltung des  $\text{CH}_2$ -Signals in zwei CH-Signale, welche im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu sehen sind.



**Abbildung 5.47**  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeeren-sublimates

Im HSQC-Spektrum wird ersichtlich, dass die Protonensignale zu den chemischen Verschiebungen von 2.25 ppm und 2.14–2.07 ppm (CH<sub>2</sub>-4) bzw. 1.88–1.80 ppm und 1.7 ppm (CH<sub>2</sub>-8) zu einer CH<sub>2</sub>-Gruppe gehören (Anhang, **Abbildung 8.21**). Die Tatsache, dass diese Protonen nicht die gleiche chemische Umgebung besitzen, spricht dafür, dass eine Ringstruktur vorliegen muss, in der die CH<sub>2</sub>-Gruppen nicht frei rotieren können. Im <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY-Spektrum wird deutlich, welche CH- bzw. CH<sub>2</sub>-Gruppen sich in direkter Nachbarschaft zueinander befinden (**Abbildung 5.47**). So ist zu erkennen, dass beide CH<sub>2</sub>-Gruppen eine CH-Gruppe in direkter Nachbarschaft besitzen. Die CH<sub>2</sub>-4 koppelt mit dem Proton der CH-Gruppe mit einer chemischen Verschiebung von 4.61 ppm, die CH<sub>2</sub>-8 mit dem der CH-Gruppe bei 3.53–3.45 ppm. Des Weiteren koppelt diese zu einem Heteroatom-gebundenen Proton und einer weiteren CH-Gruppe mit den chemischen Verschiebungen von 4.83 bzw. 3.81 ppm. Zwischen den CH-Gruppen bei den chemischen Verschiebungen von 4.61 und 3.81 ppm besteht ebenfalls eine Kopplung, wobei letztere auch zu einem Heteroatom-gebundenen Proton koppelt. Die Verknüpfung ergibt bis hierher die Abfolge CH<sub>2</sub>-CH-CH(XH)-CH(XH)-CH<sub>2</sub>, wobei X für ein Heteroatom steht. Das letzte Protonen-Signal bei einer chemischen Verschiebung von 5.9 ppm ist an ein Heteroatom gebunden. Da es sich dabei um ein Singulett handelt, liegt das Heteroatom mit hoher Wahrscheinlichkeit an einem quartären Kohlenstoffatom. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum sind zwei quartäre Kohlenstoffatome bei den chemischen Verschiebungen von 177.6 und 71.5 ppm zu sehen (Anhang, **Abbildung 8.22**). Aufgrund der starken Tieffeldverschiebung handelt es sich bei ersterem voraussichtlich um einen Carboxyl-Kohlenstoff. Da beide CH<sub>2</sub>-Gruppen aufgrund der Tatsache, dass ein Ring vorliegen muss, mit dem gleichen Kohlenstoffatom verbunden sind, kann nur das zweite genannte Kohlenstoffatom an dieser Stelle liegen. Zusätzlich sind im HMBC-Spektrum starke Kopplungen von diesem Kohlenstoffatom zu den Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppen und der CH-Gruppe mit einer chemischen Verschiebung von 4.61 ppm sowie zum Singulett-Signal im <sup>1</sup>H-Spektrum zu sehen (Anhang, **Abbildung 8.23**). Das Singulett-Proton zeigt zudem Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen der CH<sub>2</sub>-Gruppe und der Carboxy-Gruppe. Das Carboxy-Kohlenstoffatom koppelt zusätzlich mit den Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppen und der CH-Gruppe mit der chemischen Verschiebung von 4.61 ppm. Diese Kopplungen lassen einige Rückschlüsse zu. Das Heteroatom, welches das Proton mit einer chemischen Verschiebung von 5.9 ppm bindet, muss am Kohlenstoff mit der chemischen Verschiebung von 71.5 ppm sitzen. Außerdem liegt die Carboxy-Gruppe in direkter Nachbarschaft zu diesem Kohlenstoffatom, da sowohl die CH<sub>2</sub>-Protonen als auch das Heteroatom-gebundene Proton eine Kopplung zu diesem aufweisen. Da kein weiteres Protonensignal zu erkennen ist, liegt die Vermutung nahe, dass ein intramolekularer Ester vorliegt. Die CH-Gruppe bei einer chemischen Verschiebung von 4.61 ppm ist am stärksten von allen CH-Gruppen ins Tieffeld verschoben. Allerdings zeigt diese keine Kopplung zu einem Heteroatom-gebundenen Proton auf. Auch ein Proton der Carboxy-Gruppe ist nicht vorhanden. Somit muss hier eine Verknüpfung zwischen der CH-Gruppe und dem quartären Kohlenstoff über ein Sauerstoffatom vorliegen. Werden alle Heteroatome als Sauerstoffatome angesehen, ergibt sich als Struktur das Quino-1,5-lacton (**Abbildung 5.47**) (Anhang, Kapitel 8.3). Ein Vergleich mit den NMR Daten von synthetisch hergestelltem Quino-1,5-lacton bestätigt das Ergebnis der NMR Analyse der F7.<sup>175</sup> In der Literatur wurde diese Substanz bisher noch nicht als Inhaltsstoff des Sanddorns beschrieben. Dies ist zum einen natürlich interessant, da dies eine neue Entdeckung in einer schon sehr gut erforschten Pflanze darstellt, zum anderen zeigt es das Potential der Sublimation für die Entdeckung bisher unbekannter Naturstoffe. Die Verwendung unterschiedlichster Extraktionsmethoden in Kombination mit verschiedenen Trennverfahren führte nicht zur Identifizierung, Isolierung oder Charakterisierung dieser Verbindung. Erst der Einsatz der Sublimation vermochte dies zu ermöglichen.



**Abbildung 5.48** Base Peak (-) Chromatogramme der Chinasäure und des Chinasäure-Sublimates mit den dazugehörigen Massenspektren

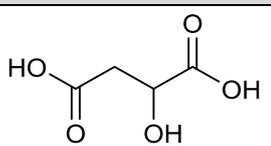
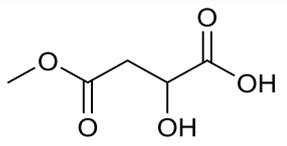
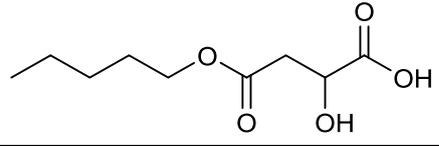
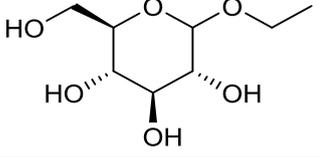
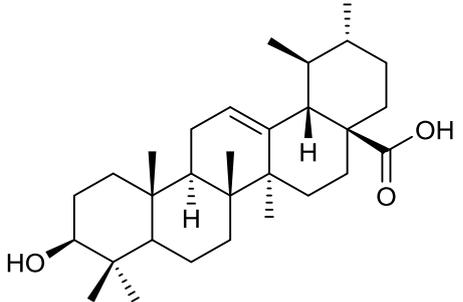
Um auszuschließen, dass das Quino-1,5-lacton als Produkt einer Wasserabspaltung der Chinasäure (Quinic acid) während des Sublimationsprozesses entsteht, wurde die Chinasäure unter den gleichen Bedingungen wie das Sanddornpulver einer Sublimation unterzogen. Es wurden 200 mg reine Chinasäure in der Sublimation eingesetzt. Es ist zu sehen, dass die (-) LC/MS Chromatogramme der Chinasäure und des Sublimates der Chinasäure nur einen Peak zur RT 2.0 min aufweisen (**Abbildung 5.48**). Die zu den Peaks gehörenden Massenspektren weisen nahezu die gleichen Massen auf. Das Molekül-Ion der Chinasäure mit  $m/z$  191 ist in beiden Fällen mit Abstand das größte Signal. Im Sublimat hat sich zudem eine Verbindung mit dem  $m/z$  405 angereichert, welche schon in der reinen Chinasäure vorhanden war. Quino-1,5-lacton besitzt ein Molekül-Ion mit  $m/z$  173. Dieses ist in Spuren in beiden Massenspektren nachweisbar. Des Weiteren ist keine Anreicherung des Lactons im Sublimat zu erkennen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Chinasäure unter den gewählten Sublimationsbedingungen stabil ist. Hinzu kommt noch, dass die Menge an Sublimat, trotz des Einsatzes von 200 mg in reiner Form, sehr gering war, weshalb Chinasäure in den Beerensublimaten auch nicht detektiert werden konnte. Laut Literatur sublimiert das Quino-1,5-lacton auch wesentlich leichter und konnte durch White et al. (1995) bei einer Synthese aus einem Chinasäurederivat mittels Sublimation gereinigt werden.<sup>176</sup> Das Molekül-Ion mit  $m/z$  173, welches im (-) Chromatogramm der F7 detektiert wurde, findet sich auch im (-) Chromatogramm des gesamten HGB-II Sublimats wieder. Zudem kann das Ion auch in den 1-Butanolextrakten der HGB-I sowie den Sublimaten des Methanol- und Reinstwasserextraktes der HGB-II nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen zeugen, dass das Quino-1,5-lacton somit definitiv ein Inhaltsstoff der Sanddornbeere sein muss und nicht wie zuvor vermutet, durch den Sublimationsvorgang entstanden ist.

Im Hinblick auf weitere Untersuchungen von Pflanzenpulvern mittels Sublimation stellt sich die Frage, ob der Prozess vom Labormaßstab auf größere Anlagen möglich ist. Würde dies gelingen, so wäre es vorstellbar, dass einige der hier entdeckten Verbindungen, deren Strukturaufklärung aufgrund der geringen erhaltenen Menge nicht erfolgreich war, charakterisiert werden könnten. Neben der für diese Arbeit genutzten Vakuum-Sublimation ist für den industriellen Gebrauch auch noch die sogenannte Trägergas-Sublimation bekannt.<sup>68</sup> Beides findet jedoch hauptsächlich Anwendung im Bereich der anorganischen Chemie. So wird die Vakuum-Sublimation bei der Reinigung und dem Aufdampfen von Metallen verwendet. Die Trägergas-Sublimation wird von der US-Atomenergie-Kommission genutzt, um Fluor durch die Umsetzung mit Uran-IV-fluorid zu Uran-VI-fluorid zurückzugewinnen. Uran-VI-fluorid wird absublimiert während Nebenprodukte in der Apparatur verbleiben. Die Sublimation wird nach derzeitigem Kenntnisstand nicht zur Anreicherung von Substanzen aus Pflanzenmaterial genutzt. Ein Upscaling dieses Vorgehens sollte jedoch durchführbar sein. Dabei könnten beide Sublimationsvarianten genutzt werden. Für die Vakuum-Sublimation ist eine gleichzeitige Sublimation in mehreren Sublimationsgefäßen vorstellbar. Die Effizienz könnte durch das Rühren des Pflanzenmaterials, eine geringere Partikelgröße und höhere Sublimationstemperatur gesteigert werden. Die Trägergas-Sublimation könnte in Form eines Wirbelschichtreaktors ermöglicht werden, wobei das Pflanzenmaterial durch erwärmtes Inertgas durchströmt wird und somit Substanzen mit sich zieht, bis eine Kühlfläche erreicht wird. Diese Ansätze könnten für weitere Untersuchungen verschiedenster Pflanzenorgane hilfreich sein und die Entdeckung weiterer bisher unbekannter Inhaltsstoffe ermöglichen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sind Sanddornbeeren der Sorte Habego mit vier polaren Lösungsmitteln extrahiert und die Inhaltsstoffe dieser Extrakte analysiert worden. Hierbei konnten vor allem Flavonoidglycoside, organische Säuren, Phytosterine und weitere kleine Moleküle durch Vermessen von Referenzsubstanzen, Auswerten von MS/MS Experimenten und den Abgleich mit Literaturbekannten Substanzen identifiziert werden. Durch die Anwendung der Säulenchromatographie und der flüssig-flüssig Extraktion wurden zudem Fraktionen des 1-Butanolextraktes der HBG-I Sanddornbeeren hergestellt. Dabei gelang es, fünf Inhaltsstoffe zu isolieren und mit NMR und LC/MS zu charakterisieren. In Tabelle 6.1 sind diese Naturstoffe aufgelistet.

**Tabelle 6.1** Substanzen, die aus dem 1-Butanolextrakt der HBG-I Sanddornbeeren isoliert wurden

| Struktur  | Name                     | Isolierte Ausbeute/NMR-Reinheit |
|---|--------------------------|---------------------------------|
|    | Äpfelsäure               | 37.5 mg/85%                     |
|   | Äpfelsäuremethylester    | 26.7 mg/50%                     |
|  | Äpfelsäurebutylester     | 20.0 mg/50%                     |
|  | Ethyl-β-D-Glucopyranosid | 100 mg/>95%                     |
|  | Ursolsäure               | 15 mg/80%                       |

Der Methylester der Äpfelsäure ist dabei zum ersten Mal in Sanddornbeeren nachgewiesen worden. Im Vergleich mit Literaturwerten gelang es zudem, die Ursolsäure in deutlich verbesserter Ausbeute und unter Verwendung weniger Arbeitsschritte zu isolieren. Beide Substanzen konnten auch in den 1-Butanolextrakten der Sanddornbeersorten Otradnaja, Trofimovskaja und der alpinen Sorte nachgewiesen werden. Die Extraktion mit 1-Butanol führte zudem zur Entstehung des Butylesters der Äpfelsäure, welcher ebenfalls isoliert und mittels NMR und MS charakterisiert werden konnte. Das Ethyl-β-D-Glucopyranosid wurde das erste Mal durch die Verwendung der Flashchromatographie mit Kieselgel und das zweite Mal überhaupt nachweislich aus Sanddornbeeren isoliert. Durch MS/MS Experimente gelang es außerdem, die Struktur einer Verbindung aus den 1-Butanolextrakten der

Sanddornbeeren als Ester aus Kaffee- und Äpfelsäure zu bestimmen. Diese Substanz konnte jedoch nicht in reiner Form isoliert werden.

Alle Extrakte und Fraktionen, die in diesem Teil der Arbeit hergestellt wurden, sind zudem in medizinischen Untersuchungen auf ihre ER-Stress reduzierende Wirkung getestet worden. Eine anfängliche Wirkung des 1-Butanolextraktes der HBG-I Sanddornbeere ist letztendlich jedoch auf eine Verunreinigung im verwendeten 1-Butanol zurückzuführen. Diese zeigte als einzige eine signifikante Reduktion des ER-Stresses im Zellsystem. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die nachgewiesene Wirkung dem Destillat des Butanols zuzuschreiben ist. Eine GC/MS-Analyse des Destillats zeigt Verunreinigungen mit z. B. *n*-Buttersäurebutylester und Di-*n*-Butylether auf, welche die Ursache für die ER-Stress Reduktion sein könnten. Die abschließenden Untersuchungen in den Zellkulturen stehen jedoch noch aus.

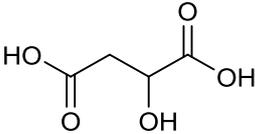
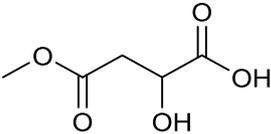
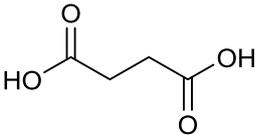
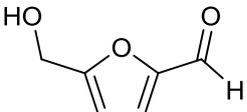
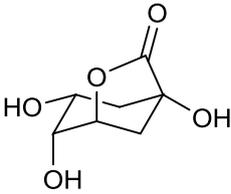
Die Rinde und Blätter des Sanddorns sowie die Früchte der Apfelbeere und Kornelkirsche sind ebenfalls mit Wasser und Ethanol extrahiert worden. Für ihre Extrakte konnte jedoch keine Reduktion des ER-Stresses nachgewiesen werden. Die erhoffte Wirkung durch die Extraktion neuer Stoffgruppen blieb jedoch aus. Allerdings gelang es, 32 Substanzen aus den Extrakten mittels Standard- und Literaturabgleich sowie MS/MS-Messungen zu identifizieren.

Des Weiteren ist in dieser Arbeit das erste Mal die Sublimation zur Bestimmung von typischen Marker-Substanzen der Sanddornbeeren genutzt worden. Deren Bestimmung erfolgte mit vier verschiedenen Sanddornsorten durch die Auswertung der Massenspektren. Neben sorten- bzw. auch umweltspezifischen Unterschieden in der Zusammensetzung der Sublimate, konnten auch 52 Übereinstimmungen zwischen allen Sorten gefunden werden. einigen Unterschieden zwischen den Sublimaten konnten dabei auch 52 Übereinstimmungen zwischen allen Sorten gefunden werden. Der Vergleich mit den Sublimaten der Apfelbeere, des Gemeinen Bocksdorn und der Kornelkirsche zeigte, dass 27 Marker-Substanzen spezifisch dem Sanddorn zuzuordnen sind.

Zusätzlich sind auch verschiedene Sanddornbeerentrockenextrakte der Sorte Habego für die Sublimation verwendet worden. Hierbei konnten je nach verwendetem Extraktionsmittel Unterschiede in den sublimierten Inhaltsstoffen aufgezeigt werden. Dabei wurden auch hier Marker-Substanzen entdeckt, die nur in einem der jeweiligen Sublimate der Extrakte vorkamen. Die Sublimate der Extrakte unterschieden sich zudem stark von den ursprünglichen Extrakten. Die Anzahl der Verbindungen im Sublimat ist wesentlich geringer. Einige Substanzen sind nur in den Sublimaten zu finden. Diese sind in den Extrakten nicht vorhanden oder konnten aufgrund ihrer geringen Konzentration im Extrakt nicht detektiert werden. Die Sublimate der Fruchtpulver zeigten im Vergleich zu den Sublimaten der Trockenextrakte ein breiteres Spektrum an Verbindungen, da im Vorhinein keine Selektion der Inhaltsstoffe durch eine Extraktion stattfand. In den Sublimaten der Trockenextrakte sind jedoch einige Inhaltsstoffe zu finden, die nicht in den Sublimaten der Fruchtpulver detektiert wurden.

Die Sublimation aus dem Fruchtpulver der Habego Sanddornbeeren wurde über mehrere Wochen durchgeführt, bis ausreichend Sublimat vorhanden war, um eine Säulenchromatographie durchzuführen. Auf diese Weise wurden sieben Fraktionen aus dem Sublimat hergestellt. In diesen Fraktionen wurden sechs Substanzen entdeckt, wovon fünf mittels NMR und MS charakterisiert wurden. Die isolierten Verbindungen sind in Tabelle 6.2 aufgeführt.

**Tabelle 6.2** Substanzen, die aus dem Sublimat des HBG-II Fruchtpulvers isoliert wurden

| Struktur   | Name                      | Isolierte Ausbeute/NMR-Reinheit |
|--|---------------------------|---------------------------------|
|   | Äpfelsäure                | 125 mg/90%                      |
|   | Äpfelsäuremethylester     | 7.5 mg/75%                      |
|   | Bernsteinsäure            | 1.2 mg/30%                      |
|   | 5-(Hydroxymethyl)furfural | 1.6 mg/40%                      |
|  | Quino-1,5-lacton          | 38.2 mg/84%                     |

Sowohl der Methylester der Äpfelsäure als auch die freie Säure konnten nicht nur im Extrakt, sondern auch im Sublimat der Sanddornbeeren nachgewiesen werden. Die Äpfelsäure wurde dabei in hoher Reinheit und guter Ausbeute erhalten. Ihr Gesamtanteil am Sublimat beträgt circa 30%. Mit der Bernsteinsäure wurde eine weitere organische Säure aus den Sanddornbeeren sublimiert. Zum derzeitigen Stand der Literaturrecherche konnte die Isolierung dieser Verbindung aus Sanddornbeeren in dieser Arbeit das erste Mal beschrieben werden. Zudem konnte auch 5-(Hydroxymethyl)furfural isoliert werden. Die Isolierung des HMFs aus den Sanddornbeeren ist zwar bereits in der Literatur beschrieben, jedoch durch die Autoren nicht hinreichend belegt worden. Die interessanteste Entdeckung stellte jedoch das Quino-1,5-lacton dar, welches das erste Mal aus Sanddornbeeren gewonnen wurde und welches zuvor noch nicht als Inhaltsstoff des Sanddorns bekannt war. Die Verwendung unterschiedlichster Extraktionsmethoden in Kombination mit verschiedenen Trennverfahren führte zuvor nicht zur Identifizierung, Isolierung oder Charakterisierung dieser Verbindung. Erst der Einsatz der Sublimation vermochte dies zu ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bieten in vielerlei Hinsicht eine Grundlage für zukünftige Arbeiten in diesem Gebiet. Zum einen zeigen die gemessenen Daten, dass der Sanddorn, obwohl bereits gut erforscht, noch immer Geheimnisse birgt, die es mit verschiedenen Mitteln aufzudecken gilt. Dabei kann, wie hier gezeigt, auf Standardmethoden, wie z. B. die Mikrowellenextraktion und Säulenchromatographie, aber auch auf ungewöhnliche Ansätze, wie z. B. die Sublimation, zurückgegriffen werden. Eine Vielzahl der hier diskutierten Inhaltsstoffe der Sanddornbeeren, ist noch unbekannt und somit besteht auch weiterhin das Potential, diese zu isolieren und zu charakterisieren. Zusätzlich können diese als neue potentielle Wirkstoffe in anderen medizinischen Studien z. B. der Krebsforschung untersucht werden.

Des Weiteren gilt es natürlich, den Wirkstoff, der mit dem verunreinigten 1-Butanol in diese Studie getragen wurde, zu identifizieren und dessen Potential in weiterführenden medizinischen Untersuchungen zu ergründen. Auch wenn das Projektziel, einen ER-Stress reduzierenden Naturstoff zu finden, in dieser Arbeit nicht möglich war, ist dieses Ergebnis durchaus positiv zu werten. So zeigen Datenbankanalysen, dass die Strukturen der identifizierten Verbindungen aus dem 1-Butanol der Firma Apolda nicht besonders kompliziert sind. Das kann bei weiteren positiven Ergebnissen letzten Endes für eine Anwendung als Medikament von Vorteil sein, da diese einfach synthetisiert werden könnten.

Von großem Interesse für weitere Arbeiten im Bereich der Naturstoffchemie und eventuell auch der Lebensmittelchemie dürften die guten Ergebnisse der Sublimationsversuche sein. So kann die Methode zur Bestimmung von Marker-Substanzen in den Sublimaten von Früchten für weitere Pflanzenarten verwendet werden. Auch andere Pflanzenorgane wie Blätter, Blüten, Rinden, Samen und Wurzeln könnten mit der Sublimation untersucht werden. Ein Katalog, welche die Chromatogramme der Sublimate der verschiedenen Proben enthält, könnte bei der Identifizierung unbekannter Proben helfen. Somit wäre diese Methode auch zur Bekämpfung von Lebensmittelbetrug geeignet. Hierzu wären natürlich noch weitere Untersuchungen nötig. Da viele Pflanzenprodukte nicht mehr als Rohstoff, sondern in raffinierter Form vorliegen, wird es eine wichtige Rolle spielen, dass es möglich ist, Marker-Substanzen auch in den Sublimaten von Pflanzenextrakten nachzuweisen.

Für Naturstoffchemiker und Analytiker ist vor allem interessant, dass die Sublimation es ermöglicht, vorher unbekannte Substanzen aus Pflanzenmaterial zu gewinnen. Die höhere Reinheit der Sublimate im Vergleich zu den Extrakten ermöglicht eine einfachere Analyse und Auftrennung der Stoffgemische. Diese kann genutzt werden, um vorher unbekannte Verbindungen zu charakterisieren. Auch hier kann die Anwendung der Sublimation auf weitere Pflanzenbestandteile erweitert werden. Auf diese Weise werden in Zukunft bestimmt einige noch unbekannte Inhaltsstoffe verschiedenster Pflanzenarten entdeckt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Alamgir ANM, ed. *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1*. Cham: Springer International Publishing; 2017. Progress in Drug Research.
2. Schmitz R. Friedrich Wilhelm Sertürner and the discovery of morphine. *Pharm Hist*. 1985;27(2):61-74.
3. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*. 2001;109 Suppl 1:69-75. doi:10.1289/ehp.01109s169.
4. Linde K, Ramirez G, Mulrow CD, Pauls A, Weidenhammer W, Melchart D. St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ*. 1996;313(7052):253-258. doi:10.1136/bmj.313.7052.253.
5. Miller LG. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. *Arch Intern Med*. 1998;158(20):2200-2211. doi:10.1001/archinte.158.20.2200.
6. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*. 2008;585(2-3):325-337. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.008.
7. Junio HA, Sy-Cordero AA, Ettefagh KA, et al. Synergy-directed fractionation of botanical medicines: a case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J Nat Prod*. 2011;74(7):1621-1629. doi:10.1021/np200336g.
8. Ras RT, Fuchs D, Koppenol WP, et al. Effect of a plant sterol-enriched spread on biomarkers of endothelial dysfunction and low-grade inflammation in hypercholesterolaemic subjects. *J Nutr Sci*. 2016;5:e44. doi:10.1017/jns.2016.40.
9. Yin Y, Liu X, Liu J, et al. The effect of beta-sitosterol and its derivatives on depression by the modification of 5-HT, DA and GABA-ergic systems in mice. *RSC Adv*. 2018;8(2):671-680. doi:10.1039/C7RA11364A.
10. Mohammed IH. Avinca alkaloid effect on microtubulues of H22 (Hepatic cell line). *Int J Curr Res Aca Rev*. 2016;4(2):9-17. doi:10.20546/ijcrar.2016.402.002.
11. Maurya S, Srivastava JS, Jha RN, Panday VB, Singh UP. Effect of Tetrahydropalmatine, an Alkaloid on Spore Germination of Some Fungi. *Mycobiology*. 2001;29(3):142-144. doi:10.1080/12298093.2001.12015776.
12. La Torre BG de, Albericio F. The Pharmaceutical Industry in 2019. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules*. 2020;25(3). doi:10.3390/molecules25030745.
13. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016;79(3):629-661. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
14. Lukas J, Pospech J, Oppermann C, et al. Role of endoplasmic reticulum stress and protein misfolding in disorders of the liver and pancreas. *Adv Med Sci*. 2019;64(2):315-323. doi:10.1016/j.advms.2019.03.004.
15. Choy KW, Murugan D, Mustafa MR. Natural products targeting ER stress pathway for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*. 2018;132:119-129. doi:10.1016/j.phrs.2018.04.013.
16. Suganya N, Bhakkiyalakshmi E, Suriyanarayanan S, Paulmurugan R, Ramkumar KM. Quercetin ameliorates tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Cell Prolif*. 2014;47(3):231-240. doi:10.1111/cpr.12102.
17. Rösch D, Bergmann M, Knorr D, Kroh LW. Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *J Agric Food Chem*. 2003;51(15):4233-4239. doi:10.1021/jf0300339.

18. Pop RM, Socaciu C, Pintea A, et al. UHPLC/PDA-ESI/MS analysis of the main berry and leaf flavonol glycosides from different Carpathian *Hippophaë rhamnoides* L. varieties. *Phytochem Anal.* 2013;24(5):484-492. doi:10.1002/pca.2460.
19. Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med.* 2018;13:20. doi:10.1186/s13020-018-0177-x.
20. Liang Q, Chen H, Zhou X, et al. Optimized microwave-assistant extraction combined ultrasonic pretreatment of flavonoids from *Periploca forrestii* Schltr. and evaluation of its anti-allergic activity. *Electrophoresis.* 2017;38(8):1113-1121. doi:10.1002/elps.201600515.
21. Patrautanu OA, Lazar L, Popa VI, Volf I. Influence of Particle Size and Size Distribution on Kinetic Mechanism of Spruce Bark Polyphenols Extraction. *Cell Chem Technol.* 2019;53(1-2):71-78. doi:10.35812/CelluloseChemTechnol.2019.53.08.
22. Roselló-Soto E, Martí-Quijal FJ, Cilla A, et al. Influence of Temperature, Solvent and pH on the Selective Extraction of Phenolic Compounds from Tiger Nuts by-Products: Triple-TOF-LC-MS-MS Characterization. *Molecules.* 2019;24(4). doi:10.3390/molecules24040797.
23. Poornima DS, Hanumantharaju KN, Siva Shankar V, Suresh Kurnar K, Ramya HN. Influence of moisture content and temperature on mechanical extraction of oil from watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds. *J Pharmacogn Phytochem.* 2019;8(4):275-279.
24. Routray W, Orsat V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Tech.* 2012;5(2):409-424. doi:10.1007/s11947-011-0573-z.
25. Machado APDF, Sumere BR, Mekarú C, Martínez J, Bezerra RMN, Rostagno MA. Extraction of polyphenols and antioxidants from pomegranate peel using ultrasound: influence of temperature, frequency and operation mode. *Int J Food Sci Technol.* 2019;54(9):2792-2801. doi:10.1111/ijfs.14194.
26. Hu B, Li Y, Song J, et al. Oil extraction from tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) using the combination of microwave-ultrasonic assisted aqueous enzymatic method - design, optimization and quality evaluation. *J Chromatogr A.* 2020;1627:461380. doi:10.1016/j.chroma.2020.461380.
27. Belwal T, Ezzat SM, Rastrelli L, et al. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC-Trend Anal Chem.* 2018;100:82-102. doi:10.1016/j.trac.2017.12.018.
28. Osorio-Tobón JF. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *J Food Sci Technol.* 2020. doi:10.1007/s13197-020-04433-2.
29. Mandal SC, Mandal V, Das AK. Extraction of Botanicals. In: *Essentials of Botanical Extraction.* Elsevier; 2015:63-82.
30. Ćujić N, Šavikin K, Janković T, Pljevljakušić D, Zdunić G, Ibrić S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem.* 2016;194:135-142. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.008.
31. Ji Y, Hou Y, Ren S, Yao C, Wu W. Highly efficient extraction of phenolic compounds from oil mixtures by trimethylamine-based dicationic ionic liquids via forming deep eutectic solvents. *Fuel Process Technol.* 2018;171:183-191. doi:10.1016/j.fuproc.2017.11.015.
32. Subba B, Timilsina MP. Scientific Validation of Some Nepalese Medicinal Plants From Nangle Bhare of Kathmandu, Nepal. *Asian J Pharm Clin Res.* 2019:205-209. doi:10.22159/ajpcr.2019.v12i2.28959.
33. Söger E. Drogen der Traditionellen Chinesischen Medizin in westlichen Ländern. In: Hänsel R, Sticher O, eds. *Pharmakognosie — Phytopharmazie.* Springer Berlin Heidelberg; 2007:431-461.

34. Khatib M, Giuliani C, Rossi F, et al. Polysaccharides from by-products of the Wonderful and Laffan pomegranate varieties: New insight into extraction and characterization. *Food Chem.* 2017;235:58-66. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.041.
35. Liao F, Yu A, Yu J, et al. Identification of active ingredients mediating anti-platelet aggregation effects of BuyangHuanwu decoction using a platelet binding assay, solid phase extraction, and HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B.* 2018;1092:320-327. doi:10.1016/j.jchromb.2018.06.027.
36. Sunitha D, Hemalatha K, Manthrapragada B, Chary N. Extraction and Isolation of active constituents from *Ixora chinensis* Lam leaves. *Der Pharma Chem.* 2015;7(10):434-441.
37. Padhi S, Panda SK. Evaluatuion of Wound Healing Potential of Crude Leave Extracts of Bixa Orellana Linn. in Wistar Rats. *World J Pharm Pharm Sci.* 2016;5(8):1388-1395.
38. Sticher O. Natural product isolation. *Nat Prod Rep.* 2008;25(3):517-554. doi:10.1039/b700306b.
39. Gizir AM, Turker N, Artuvan E. Pressurized acidified water extraction of black carrot [*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.] anthocyanins. *Eur Food Res Technol.* 2008;226(3):363-370. doi:10.1007/s00217-006-0546-z.
40. Zengin G, Cvetanović A, Gašić U, et al. A comparative exploration of the phytochemical profiles and bio-pharmaceutical potential of *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* extracts obtained via five extraction techniques. *Process Biochem.* 2020;91:113-125. doi:10.1016/j.procbio.2019.12.002.
41. Santos KA, da Silva EA, da Silva C. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of favela (*Cnidioscolus quercifolius*) seed oil: Yield, composition, antioxidant activity, and mathematical modeling. *J Supercrit Fluids.* 2020;104981. doi:10.1016/j.supflu.2020.104981.
42. Coelho JP, Filipe RM, Paula Robalo M, Boyadzhieva S, St. Cholakov G, Stateva RP. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of spent coffee grounds. Influence of co-solvents and characterization of the extracts. *J Supercrit Fluids.* 2020;161:104825. doi:10.1016/j.supflu.2020.104825.
43. Tiwari BK. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC-Trend Anal Chem.* 2015;71:100-109. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013.
44. Piyasena P, Mohareb E, McKellar RC. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int J Food Microbiol.* 2003;87(3):207-216. doi:10.1016/S0168-1605(03)00075-8.
45. Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chem Eng Process.* 2012;53:10-23. doi:10.1016/j.cep.2012.01.003.
46. Goldsmith CD, Vuong QV, Stathopoulos CE, Roach PD, Scarlett CJ. Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace. *LWT-Food Sci Technol.* 2018;89:284-290. doi:10.1016/j.lwt.2017.10.065.
47. Đurović S, Nikolić B, Luković N, et al. The impact of high-power ultrasound and microwave on the phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds. *Ind Crop Prod.* 2018;122:223-231. doi:10.1016/j.indcrop.2018.05.078.
48. Vallejo-Castillo V, Muñoz-Mera J, Pérez-Bustos MF, Rodriguez-Stouvenel A. Recovery of Antioxidants from Papaya (*Carica papaya* L.) Peel and Pulp by Microwave-assisted Extraction. *Rev Mex Ing Quim.* 2019;19(1):85-98. doi:10.24275/rmiq/Alim593.
49. Fan Y, Li W, Zhang S, Sun S, Yang L. Vitamin B<sub>3</sub>-based protic ionic liquids as green solvents for the isolation of astilbin from rhizoma *smilacis glabrae*. *Ind Crop Prod.* 2020;152:112563. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112563.

50. Ayouaz S, Oliveira-Alves SC, Lefsih K, et al. Phenolic compounds from Nerium oleander leaves: microwave assisted extraction, characterization, antiproliferative and cytotoxic activities. *Food Funct.* 2020;11(7):6319-6331. doi:10.1039/d0fo01180k.
51. Xi J, Li Z, Fan Y. Recent advances in continuous extraction of bioactive ingredients from food-processing wastes by pulsed electric fields. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020:1-13. doi:10.1080/10408398.2020.1765308.
52. Hou J, He S, Ling M, et al. A method of extracting ginsenosides from Panax ginseng by pulsed electric field. *J Sep Sci.* 2010;33(17-18):2707-2713. doi:10.1002/jssc.201000033.
53. Gharibi-Tehrani M, Elhamirad AH, Azarpazhooh E, Pedramnia A, Sharayi P. Natural valuable compound extraction from onion by-products using a pulsed electric field. *Int J Biol Chem.* 2019;12(1):171-180. doi:10.26577/ijbch-2019-1-i22.
54. Franco D, Munekata PES, Agregán R, et al. Application of Pulsed Electric Fields for Obtaining Antioxidant Extracts from Fish Residues. *Antioxidants.* 2020;9(2). doi:10.3390/antiox9020090.
55. Masango P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J Clean Prod.* 2005;13(8):833-839. doi:10.1016/j.jclepro.2004.02.039.
56. Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Curr Drug Metab.* 2018;19(13):1100-1110. doi:10.2174/1389200219666180723144850.
57. Avalos-Martínez E, Pino JA, Sáyago-Ayerdi S, Sosa-Moguel O, Cuevas-Glory L. Assessment of volatile compounds and sensory characteristics of Mexican hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces hot beverages. *J Food Sci Technol.* 2019;56(1):360-366. doi:10.1007/s13197-018-3496-0.
58. Park M-S, Park M-S, Lee K-G. Antioxidative activities of volatile and non-volatile extracts of Schisandra chinensis Baill fruit. *Flavour Fragr J.* 2020;35(4):435-442. doi:10.1002/ffj.3582.
59. Schneider A. *Pharmazeutische Zentralhalle für Deutschland 54. Jahrgang 1913.* Schneider; 1913.
60. Kosuge T, Kamiya H. Discovery of a pyrazine in a natural product: tetramethylpyrazine from cultures of a strain of *Bacillus subtilis*. *Nature.* 1962;193:776. doi:10.1038/193776a0.
61. Hargreaves KR, Carnduff J, Nechvatal A. Root-bark constituents of *Hypericum elatum* and *H. androsaemum*. *Phytochemistry.* 1968;7(2):331. doi:10.1016/S0031-9422(00)86333-5.
62. Burnett AR, Thomson RH. Naturally occurring quinones. Part X. The quinonoid constituents of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). *J Chem Soc C.* 1967:2100. doi:10.1039/J39670002100.
63. Aoyagi N, Kimura R, Murata T. Studies on *Passiflora incarnata* dry extract. I. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol. *Chem Pharm Bull.* 1974;22(5):1008-1013. doi:10.1248/cpb.22.1008.
64. Kuzma M, Jegorov A, Kacer P, Havlíček V. Sequencing of new beauverolides by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2001;36(10):1108-1115. doi:10.1002/jms.213.
65. Guidoin M-F, Yang J, Pichette A, Roy C. Betulin isolation from birch bark by vacuum and atmospheric sublimation. A thermogravimetric study. *Thermochim Acta.* 2003;398(1-2):153-166. doi:10.1016/S0040-6031(02)00358-1.
66. Glavin DP, Cleaves HJ, Buch A, et al. Sublimation extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry: A new technique for future in situ analyses of purines and pyrimidines on Mars. *Planet Space Sci.* 2006;54(15):1584-1591. doi:10.1016/j.pss.2005.12.023.
67. Arvindkar AU, Pereira GR, Laddha KS. Assessment of conventional and novel extraction techniques on extraction efficiency of five anthraquinones from *Rheum emodi*. *J Food Sci Technol.* 2015;52(10):6574-6582. doi:10.1007/s13197-015-1814-3.

68. Matz G. Die Sublimation im Rahmen der thermischen Trennverfahren. *Chem-Ing-Tech*. 1966;38(3):299-308. doi:10.1002/cite.330380322.
69. Rayees A, Rather RAR. Flash chromatography guided fractionation and antibacterial activity studies of *Angelica archangelica* root extracts. *IOSR-JAC*. 2013;4(3):34-38. doi:10.9790/5736-0433438.
70. Yu X-X, Wang Q-W, Xu X-J, Lv W-J, Zhao M-Q, Liang Z-K. Preparative isolation of Heteroclitin D from *Kadsuræ Caulis* using normal-phase flash chromatography. *J Pharm Anal*. 2013;3(6):456-459. doi:10.1016/j.jpha.2013.07.004.
71. Zheleva-Dimitrova D, Gevrenova R, Zaharieva MM, et al. HPLC-UV and LC-MS Analyses of Acylquinic Acids in *Geigeria alata* (DC) Oliv. & Hiern. and their Contribution to Antioxidant and Antimicrobial Capacity. *Phytochem Anal*. 2017;28(3):176-184. doi:10.1002/pca.2658.
72. Ahmad Dar A, Sangwan PL, Kumar A. Chromatography: An important tool for drug discovery. *J Sep Sci*. 2020;43(1):105-119. doi:10.1002/jssc.201900656.
73. Erhirhie EO, Emeghebo CN, Ilodigwe EE, et al. *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott ethanolic leaf extract and fractions exhibited profound anti-inflammatory activity. *Avicenna J Phytomed*. 2019;9(4):396-409.
74. Atlabachew M, Chandravanshi BS, Redi-Abshiro M. Preparative HPLC for large scale isolation, and salting-out assisted liquid-liquid extraction based method for HPLC-DAD determination of khat (*Catha edulis* Forsk) alkaloids. *Chem Cent J*. 2017;11(1):107. doi:10.1186/s13065-017-0337-6.
75. Shi F, Wang C, Wang L, et al. Preparative isolation and purification of steroidal glycoalkaloid from the ripe berries of *Solanum nigrum* L. by preparative HPLC-MS and UHPLC-TOF-MS/MS and its anti-non-small cell lung tumors effects in vitro and in vivo. *J Sep Sci*. 2019;42(15):2471-2481. doi:10.1002/jssc.201801165.
76. Sitanggang AB, Lesmana M, Budijanto S. Membrane-based preparative methods and bioactivities mapping of tempe-based peptides. *Food Chem*. 2020;329:127193. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127193.
77. Yammine S, Rabagliato R, Vitrac X, Mietton Peuchot M, Ghidossi R. The use of nanofiltration membranes for the fractionation of polyphenols from grape pomace extracts. *OENO One*. 2019;53(1):11-26. doi:10.20870/oeno-one.2019.53.1.2342.
78. Ovchinnikov DV, Bogolitsyn KG, Druzhinina AS, et al. Study of Polyphenol Components in Extracts of Arctic Brown Algae of *Fucus vesiculosus* Type by Liquid Chromatography and Mass-Spectrometry. *J Anal Chem*. 2020;75(5):633-639. doi:10.1134/S1061934820050147.
79. Wang W, Li X, Chen K, Yang H, Jialengbieke B, Hu X. Extraction optimization, characterization and the antioxidant activities in vitro and in vivo of polysaccharide from *Pleurotus ferulae*. *Int J Biol Macromol*. 2020;160:380-389. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.158.
80. Thery T, Lynch KM, Zannini E, Arendt EK. Isolation, characterisation and application of a new antifungal protein from broccoli seeds – New food preservative with great potential. *Food Control*. 2020;117:107356. doi:10.1016/j.foodcont.2020.107356.
81. Damotharan P, Veeruraj A, Arumugam M, Balasubramanian T. Isolation and characterization of biologically active venom protein from sea snake *Enhydrina schistosa*. *J Biochem Mol Toxicol*. 2015;29(3):140-147. doi:10.1002/jbt.21678.
82. Li L, Liu W, Song D, Li C, Jia P, Niu G. Simulated Moving Bed Purification for Flavonoids from Tartary Buckwheat Shell. *J Chromatogr Sci*. 2020;58(4):362-372. doi:10.1093/chromsci/bmz122.

83. Xiao W, Lei F, Hengqiang Z, Xiaojing L. CHAPTER 9. Isolation and Purification of Natural Products. In: Rostagno MA, Prado JM, eds. *Natural Product Extraction*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2013:314-362. *Green Chemistry Series*.
84. Hung WJ, Chen ZT, Lee SW. Antioxidant and Lipoxigenase Inhibitory Activity of the Kino of *Eucalyptus citriodora*. *Indian J Pharm Sci*. 2018;80(5). doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000444.
85. Ugorji CO, Ihedioha JN, Agbo MO, Ekere NR, Nwafor FI, Odoemelam EI. Antimicrobial and Antioxidant Studies of the Leaf Extract and Fractions of *Sabicea brevipes* Wernham (Rubiaceae). *Int J Biochem Res Rev*. 2019;1-11. doi:10.9734/IJBCRR/2019/v27i230119.
86. Teixeira FM, Coelho MN, José-Chagas FdN, et al. Oral treatments with a flavonoid-enriched fraction from *Cecropia hololeuca* and with rutin reduce articular pain and inflammation in murine zymosan-induced arthritis. *J Ethnopharmacol*. 2020;260:112841. doi:10.1016/j.jep.2020.112841.
87. Shrestha S, Zhang W, Begbie AJ, Pukala TL, Smid SD. *Ecklonia radiata* extract containing eckol protects neuronal cells against A $\beta$ 1-42 evoked toxicity and reduces aggregate density. *Food Funct*. 2020;11(7):6509-6516. doi:10.1039/d0fo01438a.
88. Dias MKHM, Madusanka DMD, Han EJ, et al. (-)-Loliolide Isolated from *Sargassum horneri* Protects against Fine Dust-Induced Oxidative Stress in Human Keratinocytes. *Antioxidants*. 2020;9(6). doi:10.3390/antiox9060474.
89. Zhu H, Chen L, Yu J, et al. Flavonoid epimers from custard apple leaves, a rapid screening and separation by HSCCC and their antioxidant and hypoglycaemic activities evaluation. *Sci Rep*. 2020;10(1):8819. doi:10.1038/s41598-020-65769-5.
90. Abdin M, Hamed YS, Akhtar HMS, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of target anthocyanins di-glucosides isolated from *Syzygium cumini* pulp by high speed counter-current chromatography. *J Food Biochem*. 2020;44(6):1050-1062. doi:10.1111/jfbc.13209.
91. Ochensberger S, Alperth F, Mitić B, et al. Phenolic compounds of *Iris adriatica* and their antimycobacterial effects. *Acta Pharm*. 2019;69(4):673-681. doi:10.2478/acph-2019-0037.
92. Grabarska A, Skalicka-Woźniak K, Kiełbus M, et al. Imperatorin as a Promising Chemotherapeutic Agent Against Human Larynx Cancer and Rhabdomyosarcoma Cells. *Molecules*. 2020;25(9). doi:10.3390/molecules25092046.
93. Buselmaier W. *Biologie für Mediziner*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
94. McDuffee AT, Senisterra G, Huntley S, et al. Proteins containing non-native disulfide bonds generated by oxidative stress can act as signals for the induction of the heat shock response. *J Cell Physiol*. 1997;171(2):143-151. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199705)171:2<143:AID-JCP4>3.0.CO;2-O.
95. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000;403(6765):98-103. doi:10.1038/47513.
96. Buchner J. Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(10):1587-1588. doi:10.1007/PL00012484.
97. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*. 1999;13(10):1211-1233. doi:10.1101/gad.13.10.1211.
98. Calton M, Zeng H, Urano F, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002;415(6867):92-96. doi:10.1038/415092a.

99. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7448-7459. doi:10.1128/mcb.23.21.7448-7459.2003.
100. Castillo K, Rojas-Rivera D, Lisbona F, et al. BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1 $\alpha$  branch of the unfolded protein response. *EMBO J.* 2011;30(21):4465-4478. doi:10.1038/emboj.2011.318.
101. Tam AB, Mercado EL, Hoffmann A, Niwa M. ER stress activates NF- $\kappa$ B by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *PLoS One.* 2012;7(10):e45078. doi:10.1371/journal.pone.0045078.
102. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 1999;397(6716):271-274. doi:10.1038/16729.
103. Iwawaki T, Hosoda A, Okuda T, et al. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol.* 2001;3(2):158-164. doi:10.1038/35055065.
104. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 2003;11(3):619-633. doi:10.1016/s1097-2765(03)00105-9.
105. Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol.* 2003;23(4):1292-1303. doi:10.1128/mcb.23.4.1292-1303.2003.
106. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998;12(7):982-995. doi:10.1101/gad.12.7.982.
107. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 1999;10(11):3787-3799. doi:10.1091/mbc.10.11.3787.
108. Yoshida H, Okada T, Haze K, et al. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2000;20(18):6755-6767. doi:10.1128/mcb.20.18.6755-6767.2000.
109. Wang M, Meng X-b, Yu Y-l, et al. Elatostide C protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes through the reduction of endoplasmic reticulum stress partially depending on STAT3 activation. *Apoptosis.* 2014;19(12):1727-1735. doi:10.1007/s10495-014-1039-3.
110. Lin Y, Zhu J, Zhang X, et al. Inhibition of Cardiomyocytes Hypertrophy by Resveratrol Is Associated with Amelioration of Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(2):780-789. doi:10.1159/000447788.
111. Shen M, Wang L, Yang G, et al. Baicalin protects the cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis: inhibition of CHOP through induction of endothelial nitric oxide synthase. *PLoS One.* 2014;9(2):e88389. doi:10.1371/journal.pone.0088389.
112. Zhao G-l, Yu L-m, Gao W-l, et al. Berberine protects rat heart from ischemia/reperfusion injury via activating JAK2/STAT3 signaling and attenuating endoplasmic reticulum stress. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37(3):354-367. doi:10.1038/aps.2015.136.
113. Iwawaki T, Akai R, Kohno K, Miura M. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med.* 2004;10(1):98-102. doi:10.1038/nm970.

114. Deans BJ, Just J, Smith JA, Bissember AC. Development and Applications of Water-based Extraction Methods in Natural Products Isolation Chemistry. *Asian J Org Chem.* 2020;9(8):1144-1153. doi:10.1002/ajoc.202000210.
115. Hussain ZTE, Yagi S, Mahomoodally MF, Mohammed I, Zengin G. A comparative study of different solvents and extraction techniques on the anti-oxidant and enzyme inhibitory activities of *Adansonia digitata* L. (Baobab) fruit pulp. *S Afr J Bot.* 2019;126:207-213. doi:10.1016/j.sajb.2019.01.034.
116. Sushkova S, Minkina T, Chaplygin V, et al. Subcritical water extraction of organic acids from chicken manure. *J Sci Food Agric.* 2020. doi:10.1002/jsfa.10768.
117. Kretzschmar H-J, Wagner W. Tables of the Properties of Water and Steam. In: Kretzschmar H-J, Wagner W, eds. *International Steam Tables*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019:173-344.
118. Mills MB, Damron CM, Roe JH. Ascorbic Acid, Dehydroascorbic Acid, and Diketogulonic Acid in Fresh and Processed Foods. *Anal Chem.* 1949;21(6):707-709. doi:10.1021/ac60030a019.
119. Pop OI, Chiritescu V, Pop M. Biological Compounds with Antioxidant Activity Found in *Hippophae rhamnoides*, *Ribes nigrum* and *Vaccinium myrtillus* Juice. *Bulletin UASVM Agriculture.* 2012;69(2). <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/agriculture/article/view/8785>.
120. Rösch D, Krumbein A, Mügge C, Kroh LW. Structural investigations of flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace by NMR spectroscopy and HPLC-ESI-MS(n). *J Agric Food Chem.* 2004;52(13):4039-4046. doi:10.1021/jf0306791.
121. Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Mattila PH, González-Paramás AM, Törrönen AR. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *J Agric Food Chem.* 2004;52(14):4477-4486. doi:10.1021/jf049595y.
122. Olas B, Żuchowski J, Lis B, et al. Comparative chemical composition, antioxidant and anticoagulant properties of phenolic fraction (a rich in non-acylated and acylated flavonoids and non-polar compounds) and non-polar fraction from *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson fruits. *Food Chem.* 2018;247:39-45. doi:10.1016/j.foodchem.2017.12.010.
123. Tiitinen KM, Yang B, Haraldsson GG, Jonsdottir S, Kallio HP. Fast analysis of sugars, fruit acids, and vitamin C in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) varieties. *J Agric Food Chem.* 2006;54(7):2508-2513. doi:10.1021/jf053177r.
124. Li Y, Yili A, Liu Y, Kawuli A, Aisa HA. Chemical Constituents of *Hippophae rhamnoides* subsp. *turkestanica* Fruits. *Chem Nat Compd.* 2014;50(2):352-354. doi:10.1007/s10600-014-0951-7.
125. Ranjith A, Kumar KS, Venugopalan VV, Arumughan C, Sawhney RC, Singh V. Fatty acids, tocopherols, and carotenoids in pulp oil of three sea buckthorn species (*Hippophae rhamnoides*, *H. salicifolia*, and *H. tibetana*) grown in the Indian Himalayas. *J Amer Oil Chem Soc.* 2006;83(4):359-364. doi:10.1007/s11746-006-1213-z.
126. Teleszko M, Wojdyło A, Rudzińska M, Oszmiański J, Golis T. Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Bioactive Compounds Content in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Berries. *J Agric Food Chem.* 2015;63(16):4120-4129. doi:10.1021/acs.jafc.5b00564.
127. Tian Y, Liimatainen J, Alanne A-L, et al. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chem.* 2017;220:266-281. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.145.
128. Fatima T, Kesari V, Watt I, et al. Metabolite profiling and expression analysis of flavonoid, vitamin C and tocopherol biosynthesis genes in the antioxidant-rich sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Phytochemistry.* 2015;118:181-191. doi:10.1016/j.phytochem.2015.08.008.

129. Zhang J, Gao W, Cao M-S, Kong D-Y. Three new flavonoids from the seeds of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*. *J Asian Nat Prod Res.* 2012;14(12):1122-1129. doi:10.1080/10286020.2012.725726.
130. Hu N, Suo Y, Zhang Q, et al. Rapid, Selective, and Sensitive Analysis of Triterpenic Acids in *Hippophae rhamnoides* L. Using HPLC with Pre-Column Fluorescent Derivatization and Identification with Post-Column APCI-MS. *J Liq Chromatogr R T.* 2015;38(4):451-458. doi:10.1080/10826076.2014.913523.
131. Cakir A. Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochem Syst Ecol.* 2004;32(9):809-816. doi:10.1016/j.bse.2003.11.010.
132. Ercisli S, Orhan E, Ozdemir O, Sengul M. The genotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries grown in Turkey. *Sci Hortic-Amsterdam.* 2007;115(1):27-33. doi:10.1016/j.scienta.2007.07.004.
133. Dulf FV. Fatty acids in berry lipids of six sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L., subspecies *carpatica*) cultivars grown in Romania. *Chem Cent J.* 2012;6(1):106. doi:10.1186/1752-153X-6-106.
134. Tsybikova DT, Zylkyeva DN, Darzhapova GZ. Ursolic acid from *Hippophae rhamnoides*. *Chem Nat Compd.* 1975;11(4):543. doi:10.1007/BF00566815.
135. Zheng R-X, Xu X-D, Tian Z, Yang J-S. Chemical constituents from the fruits of *Hippophae rhamnoides*. *Nat Prod Res.* 2009;23(15):1451-1456. doi:10.1080/14786410903075457.
136. Sun Y, Feng F, Nie B, Cao J, Zhang F. High throughput identification of pentacyclic triterpenes in *Hippophae rhamnoides* using multiple neutral loss markers scanning combined with substructure recognition (MNLSR). *Talanta.* 2019;205:120011. doi:10.1016/j.talanta.2019.06.011.
137. Yang B, Karlsson RM, Oksman PH, Kallio HP. Phytosterols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries: identification and effects of different origins and harvesting times. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5620-5629. doi:10.1021/jf010813m.
138. Li T, Beveridge T, Drover J. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chem.* 2007;101(4):1633-1639. doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.033.
139. Horník S, Sajfrtová M, Karban J, Sýkora J, Březinová A, Wimmer Z. LC-NMR Technique in the Analysis of Phytosterols in Natural Extracts. *J Anal Methods Chem.* 2013;2013:526818. doi:10.1155/2013/526818.
140. Bisht KS, Gross RA, Cholli AL. Enzymatic Polymerization of Poly( $\epsilon$ -CL) Containing an Ethyl Glucopyranoside Head Group: An NMR Study. *Appl Spectrosc.* 1998;52(11):1472-1478. doi:10.1366/0003702981942898.
141. Kyriakopoulou K, Pappa A, Krokida M, Detsi A, Kefalas P. Effects of Drying and Extraction Methods on the Quality and Antioxidant Activity of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Berries and Leaves. *Dry Technol.* 2013;31(9):1063-1076. doi:10.1080/07373937.2013.773907.
142. Arimboor R, Kumar KS, Arumughan C. Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;47(1):31-38. doi:10.1016/j.jpba.2007.11.045.
143. Hajazimi E, Landberg R, Zamaratskaia G. Simultaneous determination of flavonols and phenolic acids by HPLC-CoulArray in berries common in the Nordic diet. *LWT-Food Sci Technol.* 2016;74:128-134. doi:10.1016/j.lwt.2016.07.034.

144. Zadernowski R, Naczek M, Czaplicki S, Rubinskiene M, Szalkiewicz M. Composition of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *J Amer Oil Chem Soc.* 2005;82(3):175-179. doi:10.1007/s11746-005-5169-1.
145. Häkkinen S, Heinonen M, Kärenlampi S, Mykkänen H, Ruuskanen J, Törrönen R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Res Int.* 1999;32(5):345-353. doi:10.1016/S0963-9969(99)00095-2.
146. Ma X, Yang W, Marsol-Vall A, Laaksonen O, Yang B. Analysis of flavour compounds and prediction of sensory properties in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries. *Int J Food Sci Technol.* 2020;55(4):1705-1715. doi:10.1111/ijfs.14442.
147. Kuhkheil A, Naghdi Badi H, Mehrafarin A, Abdossi V. Chemical constituents of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit in populations of central Alborz Mountains in Iran. *RJP.* 2017;4(3):1-12. [http://www.rjpharmacognosy.ir/article\\_47336.html](http://www.rjpharmacognosy.ir/article_47336.html).
148. Michel T, Destandau E, Le Floch G, Lucchesi ME, Elfakir C. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chem.* 2012;131(3):754-760. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.029.
149. Criste A, Urcan AC, Bunea A, et al. Phytochemical Composition and Biological Activity of Berries and Leaves from Four Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Varieties. *Molecules.* 2020;25(5). doi:10.3390/molecules25051170.
150. Radenkova V, Püssa T, Juhneva-Radenkova K, Anton D, Seglina D. Phytochemical characterization and antimicrobial evaluation of young leaf/shoot and press cake extracts from *Hippophae rhamnoides* L. *Food Biosci.* 2018;24:56-66. doi:10.1016/j.fbio.2018.05.010.
151. Xu X, Xie B, Pan S, et al. A new technology for extraction and purification of proanthocyanidins derived from sea buckthorn bark. *J Sci Food Agric.* 2006;86(3):486-492. doi:10.1002/jsfa.2339.
152. Yang Z-G, Li H-R, Wang L-Y, et al. Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. *Chem Pharm Bull.* 2007;55(1):15-18. doi:10.1248/cpb.55.15.
153. Tolkachev ON, Abizov EA, Abizova EV, Mal'tsev SD. Phytochemical study of the bark of some plants of the Elaeagnaceae family as a natural source of  $\beta$ -carboline indole alkaloids. *Pharm Chem J.* 2008;42(11):630-632. doi:10.1007/s11094-009-0196-0.
154. Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *J Food Sci.* 2012;77(10):C1064-70. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02896.x.
155. Li J, Deng Y, Yuan C, et al. Antioxidant and quinone reductase-inducing constituents of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruits. *J Agric Food Chem.* 2012;60(46):11551-11559. doi:10.1021/jf303712e.
156. Chandra A, Rana J, Li Y. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. *J Agric Food Chem.* 2001;49(8):3515-3521. doi:10.1021/jf010389p.
157. Nakajima J-I, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M, Saito K. LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. *J Biomed Biotechnol.* 2004;2004(5):241-247. doi:10.1155/S1110724304404045.
158. Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 2004;52(26):7846-7856. doi:10.1021/jf0486850.

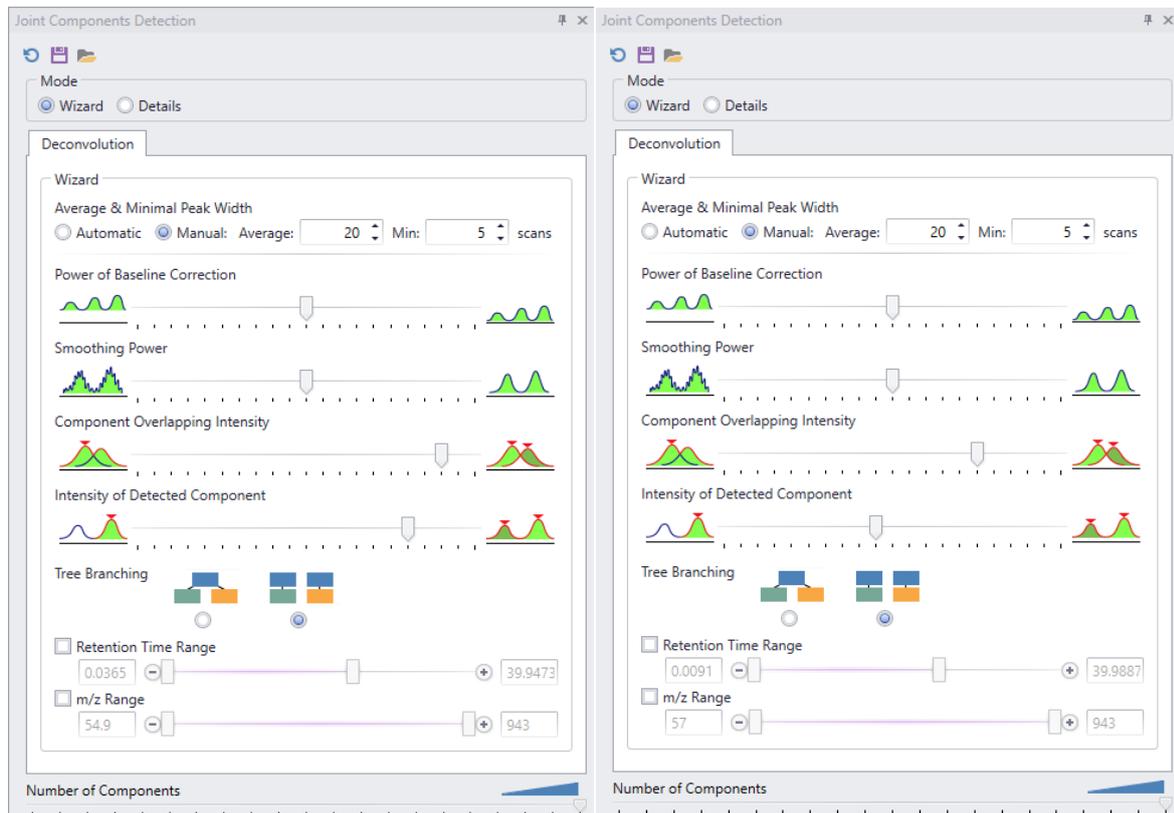
159. Mikulic-Petkovsek M, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. HPLC-MSn identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chem.* 2012;135(4):2138-2146. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.115.
160. Kucharska AZ, Szumny A, Sokół-Łętowska A, Piórecki N, Klymenko SV. Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars. *J Food Compos Anal.* 2015;40:95-102. doi:10.1016/j.jfca.2014.12.016.
161. West BJ, Deng S, Jensen CJ, Palu AK, Berrio LF. Antioxidant, toxicity, and iridoid tests of processed Cornelian cherry fruits. *Int J Food Sci Technol.* 2012;47(7):1392-1397. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.02985.x.
162. Rudrapaul P, Kyriakopoulos AM, De UC, Zoumpourlis V, Dinda B. New flavonoids from the fruits of *Cornus mas*, Cornaceae. *Phytochem Lett.* 2015;11:292-295. doi:10.1016/j.phytol.2015.01.011.
163. Deng S, West BJ, Jensen CJ. UPLC-TOF-MS Characterization and Identification of Bioactive Iridoids in *Cornus mas* Fruit. *J Anal Methods Chem.* 2013;2013:710972. doi:10.1155/2013/710972.
164. Pawlowska AM, Camangi F, Braca A. Quali-quantitative analysis of flavonoids of *Cornus mas* L. (Cornaceae) fruits. *Food Chem.* 2010;119(3):1257-1261. doi:10.1016/j.foodchem.2009.07.063.
165. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci.* 2011;2(1):21. doi:10.4103/2229-5186.79345.
166. Schiller H. Fettbegleitstoffe des Sanddornöls. *Fett Wiss Technol.* 1989;91(2):66-68. doi:10.1002/lipi.19890910205.
167. Hirvi T, Honkanen E. The aroma of the fruit of sea Buckthorn, *Hippophae rhamnoides*, L. *Eur Food Res Technol.* 1984;179(5):387-388. doi:10.1007/BF01043436.
168. Frede W. *Taschenbuch für Lebensmittelchemiker: Lebensmittel - Bedarfsgegenstände - Kosmetika - Futtermittel (German Edition)*. Dordrecht: Springer; 2006.
169. Baltes W, Matissek R. *Lebensmittelchemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011.
170. Ayer WA, Racok JS. The metabolites of *Talaromyces flavus* : Part 1. Metabolites of the organic extracts. *Can J Chem.* 1990;68(11):2085-2094. doi:10.1139/v90-318.
171. Xu H, Hao Q, Yuan F, Gao Y. Nonenzymatic Browning Criteria to Sea Buckthorn Juice during Thermal Processing. *J Food Process Eng.* 2015;38(1):67-75. doi:10.1111/jfpe.12128.
172. Constantin OE, Kukurová K, Daško I, et al. Modelling Contaminant Formation during Thermal Processing of Sea Buckthorn Purée. *Molecules.* 2019;24(8). doi:10.3390/molecules24081571.
173. Sirimungkala A, Försterling H-D, Noszticzius Z. HPLC Studies on the Organic Subset of the Oscillatory BZ Reaction. 2. Two Different Types of Malonyl Radicals in the Ce<sup>4+</sup>-Malonic Acid Reaction. *J Phys Chem.* 1996;100(8):3051-3055. doi:10.1021/jp952492l.
174. Green RC, Low NH. Physicochemical composition of buffaloberry (*Shepherdia argentea*), chokecherry (*Prunus virginiana*) and sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) fruit harvested in Saskatchewan, Canada. *Can J Plant Sci.* 2013;93(6):1143-1153. doi:10.4141/cjps2013-087.
175. Assoah B, Veiros LF, Afonso CAM, Candeias NR. Biomass-Based and Oxidant-Free Preparation of Hydroquinone from Quinic Acid. *Eur J Org Chem.* 2016;2016(22):3856-3861. doi:10.1002/ejoc.201600616.
176. White JD, Cammack JH, Sakuma K, Rewcastle GW, Widener RK. Transformations of Quinic Acid. Asymmetric Synthesis and Absolute Configuration of Mycosporin I and Mycosporin-gly. *J Org Chem.* 1995;60(12):3600-3611. doi:10.1021/jo00117a008.

## 8 Anhang

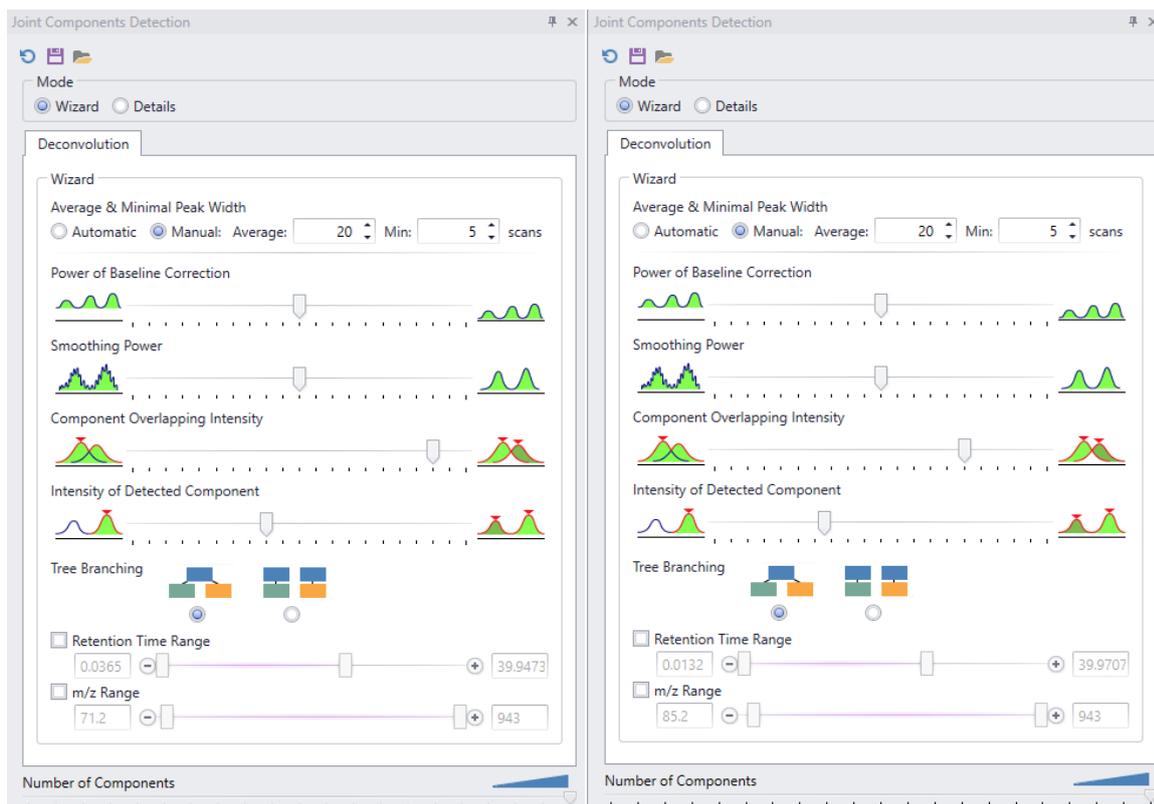
### 8.1 Methodenparameter

#### 8.1.1 Joint Component Detection Wizard Einstellungen

Die automatische Peak Erkennung mittels JCD wurde mit dem Einstellungs-Wizard in MassFrontier 8 für den negativen (links) und positiven (rechts) Scan-Modus folgendermaßen eingestellt:



**Abbildung 8.1** Einstellung der JCD bei Messungen von Proben mit einem Feststoffgehalt von 1.0–9.9 mg/ml



**Abbildung 8.2** Einstellung der JCD bei Messungen von Proben mit einem Feststoffgehalt von  $\geq 10$  mg/ml

## 8.2 Tauchlösungen zum Anfärben der Dünnschichtchromatogramme

Zum Anfärben der Dünnschichtchromatogramme wurden verschiedene Tauchlösungen hergestellt und verwendet. Die Dünnschichtchromatogramme wurden dazu nach der Auftrennung der Substanzen und Abdampfen des Lösungsmittels für 1-3 Sekunden in die Tauchlösungen gehalten. Daraufhin erfolgte das Entwickeln der Chromatogramme durch das Erhitzen der DC-Platte mit einem Heizföhn. Die verwendeten Lösungen waren:

1. Eine Anisaldehyd-Schwefelsäure Lösung aus 100 ml Essigsäure, 2 ml konzentrierter Schwefelsäure und 1 ml Anisaldehyd
2. Eine ethanolische Schwefelsäurelösung aus 90 ml Ethanol und 10 ml konzentrierter Schwefelsäure
3. Eine Cer(IV)-sulfat/Molybdätophosphorsäure Lösung aus 28 g Ammoniummolybdat-Tetrahydrat, 0,5 g Cerammoniumnitrat, 28 ml konzentrierter Schwefelsäure und 160 ml Wasser
4. Eine Kaliumpermanganat Lösung aus 1,5 g Kaliumpermanganat, 10 g Natriumcarbonat, 120 ml Wasser und 2,5 ml 5%iger Natronlauge

## 8.3 NMR-Daten der isolierten Verbindungen

### 8.3.1 Äpfelsäure

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  12.36 (s, 2H, 2 x COOH), 5.44 (s, 1H, OH), 4.26 (m, 1H, CH), 2.66-2.38 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  174.73 (COOH), 172.37 (COOH), 67.69 (CH), 39.00 ( $\text{CH}_2$ ).

### 8.3.2 Äpfelsäuremethylester

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 12.44 (s, 1H, COOH), 5.67 (s, 1H, OH), 4.35 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 6.0 Hz, CH), 3.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.73-2.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 173.33 (COOMe), 171.54 (COOH), 66.99 (CH), 51.61 (CH<sub>3</sub>), 39.12 (CH<sub>2</sub>).

### 8.3.3 Äpfelsäurebutylester

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 12.44 (s, 1H, COOH), 5.50 (s, 1H, OH), 4.28 (m, 1H, CH), 4.02 (q, 2H, <sup>3</sup>*J* = 6.5 Hz, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.73-2.40 (m, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-COO), 1.54 (q, 2H, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.32 (sx, 2H, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.88 (t, 3H, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 174.29 (COOH), 170.22 (COO-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>), 66.87 (CH), 63.68 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 39.09 (CH-CH<sub>2</sub>-COO), 30.12 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 18.53 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 13.53 (CH<sub>3</sub>).

### 8.3.4 Bernsteinsäure

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):** δ 2.58 (s, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):** δ 173.69 (2 x COOH), 29.16 (2 x CH<sub>2</sub>).

### 8.3.5 Ethyl-β-D-Glucopyranosid

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 4.94 (s, 1H, OH-2), 4.88 (s, 1H, OH), 4.46 (s, 1H, OH-6), 4.10 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.7 Hz, CH-1), 3.89-3.73 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-6), 3.71-3.58 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-7), 3.57-3.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6 + CH<sub>2</sub>-7), 3.21-2.98 (m, 3H, CH-3, CH-4, CH-5), 2.92 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.2 Hz, CH-2), 1.13 (t, 3H, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 102.6 (CH-1), 76.83 (CH-5), 76.78 (CH-3), 73.44 (CH-2), 70.09 (CH-4), 63.83 (CH<sub>2</sub>-7), 61.10 (CH<sub>2</sub>-6), 15.18 (CH<sub>3</sub>).

### 8.3.6 5-(Hydroxymethyl)furfural

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):** δ 9.59 (s, 1H, CH<sub>Ald</sub>), 7.37 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 3.5 Hz, CH-3), 6.58 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 3.5 Hz, CH-4), 4.64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):** δ 178.07 (COH), 162.89 (C-5), 153.44 (C-2), 123.79 (CH-3), 110.20 (CH-4), 57.49 (CH<sub>2</sub>).

### 8.3.7 Quino-1,5-lacton

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 5.9 (s, 1H, OH-3), 5.24 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 4.3 Hz, OH-6), 4.83 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, OH-7), 4.61 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 5.3 Hz, CH-5), 3.53-3.45 (m, 1H, CH-6), 3.81 (q, 1H, <sup>3</sup>*J* = 4.4 Hz, CH-7), 2.25 (d, 1H, <sup>4</sup>*J* = 11.3 Hz, 1 x CH<sub>2</sub>-4), 2.14-2.07 (m, 1H, 1 x CH<sub>2</sub>-4), 1.88-1.80 (m, 1H, 1 x CH<sub>2</sub>-8), 1.7 (t, 1H, <sup>4</sup>*J* = 11.52 Hz, 1 x CH<sub>2</sub>-8). **δ C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 177.64 (COO), 75.87 (CH-5), 71.52 (C-OH), 65.55 (CH-6), 65.19 (CH-7), 39.02 (CH<sub>2</sub>-4), 36.71 (CH<sub>2</sub>-8).

### 8.3.8 Ursolsäure

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 11.95 (s, 1H, COOH), 5.13 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 3.5 Hz, C=CH), 4.28 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 5.1 Hz, OH), 3.00 (q, 1H, <sup>3</sup>*J* = 5.2 Hz, CH-CO), 2.10, (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 11.3 Hz, CH=C-CH), 1.97-1.75 (m, 4H, 1 x C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH, C=CH-CH<sub>2</sub>, 1 x C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), 1.69-1.39 (m, 11H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH, OH-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, 1 x C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH, 1x OH-CH-C-CH-CH<sub>2</sub>, C=CH-CH<sub>2</sub>-CH, OH-CH-CH<sub>2</sub>, 1 x CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH, 1 x OH-CH-C-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.39-1.19 (m, 4H, 1x OH-CH-C-CH-CH<sub>2</sub>, CH-CH-C-COOH, 1 x OH-CH-C-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, 1 x CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), 1.05 (s, 3H, CH=C-C-CH<sub>3</sub>), 1.00 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 13.3 Hz, 1 x C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), 0.92 (s, 4H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), .0.90 (s, 3H, OH-CH-C-CH<sub>3</sub>), 0.87 (s, 3H, OH-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 0.82 (d, 3H, <sup>3</sup>*J* = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH-C-COOH), 0.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-C-C-

C=CH), 0.68 (s, 4H, OH-CH-C-CH<sub>3</sub>, OH-CH-C-CH). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 178.27 (COOH), 138.19 (C=CH), 124.58 (C=CH), 76.82 (OH-CH), 52.37 (CH-C-COOH), 54.78 (OH-CH-C-CH), 47.02 (C=CH-CH<sub>2</sub>-CH), 46.82 (C-COOH), 41.64 (C-C-C=CH), 39.10 (C-C=CH), 38.50 (CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), 38.44 (CH-CH-C-COOH), 38.38 (OH-CH-C), 38.23 (OH-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 36.53 (OH-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C), 36.32 (CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), 32.70 (CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), 30.19 (OH-CH-C-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 28.26 (OH-CH-C-CH<sub>3</sub>), 27.54 (C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), 27.00 (OH-CH-CH<sub>2</sub>), 23.80 (C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), 23.27 (CH=C-C-CH<sub>3</sub>), 22.85 (C=CH-CH<sub>2</sub>), 21.08 (CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-COOH), 18.00 (OH-CH-C-CH-CH<sub>2</sub>), 17.01 (CH<sub>3</sub>-CH-CH-C-COOH), 16.91 (CH<sub>3</sub>-C-C-C-C=CH), 16.08 (OH-CH-C-CH<sub>3</sub>), 15.23 (OH-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>3</sub>).

## 8.4 Kristallographische Daten

### 8.4.1 Bernsteinsäure

|   |  |
|---|--|
| Dateiname   | is_mgsb18                                    |
| Summenformel  | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> |
| Molekulargewicht  | 118.09 g/mol                                 |
| Kristallsystem; Raumgruppe                                      | Monoklin; P2 <sub>1</sub> /c                 |
| Temperatur (K)  | 123 K  |
| a; b; c (Å)   | 5.4638(3); 8.7721(6); 5.0157(3)              |
| β (°)   | 93.091(2)                                    |
| V (Å <sup>3</sup> )   | 240.048                                      |
| Z   | 2  |
| Strahlungstyp   | Mo Kα  |
| μ (mm <sup>-1</sup> )   | 0.15   |
| Kristallmaße (mm)   | 0.13 × 0.17 × 0.32                           |
| Gerät   | Bruker D8 Quest                              |
| Gemessene Reflexe   | 7883   |
| Unabhängige Reflexe   | 971  |
| Reflexe mit [I > 2σ(I)]   | 866  |
| R <sub>int</sub>  | 0.043  |
| R[F <sup>2</sup> > 2σ(F <sup>2</sup> )]; wR(F <sup>2</sup> ); S | 0.0377; 0.0953; 1.064                        |
| Parameterzahl   | 41   |

## 8.5 Abbildungen

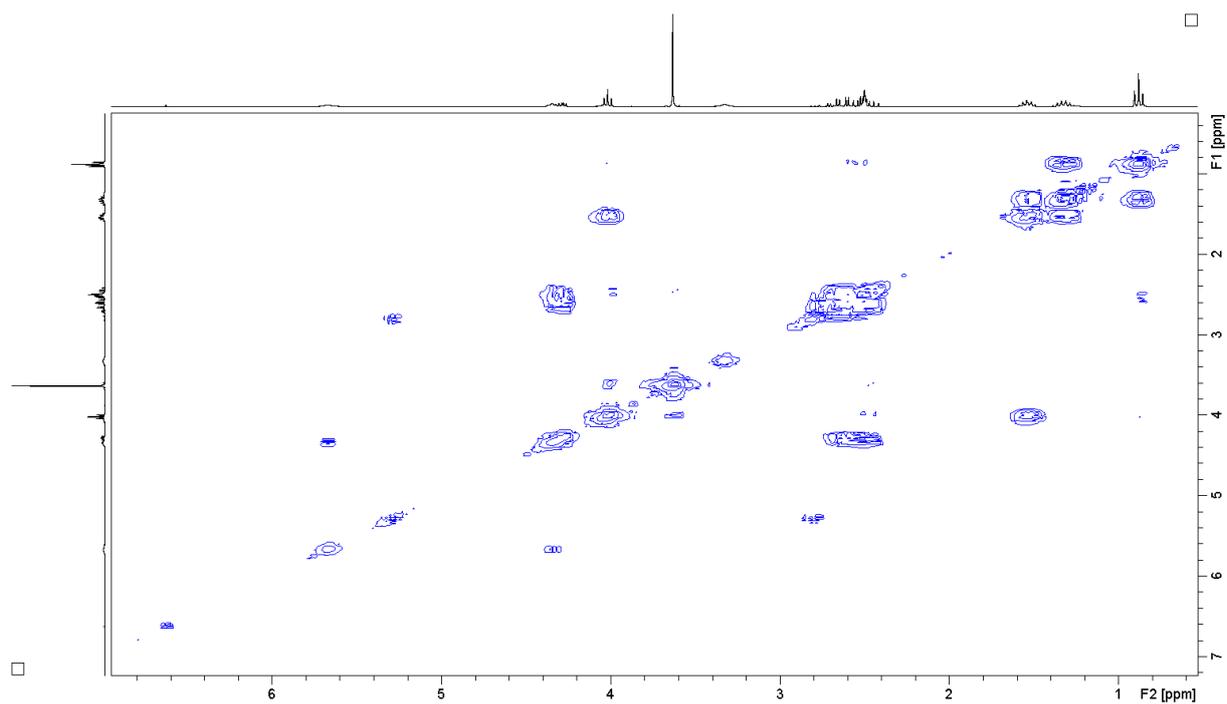


Abbildung 8.3  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der F13.3 des HBG-I 1-Butanolextraktes

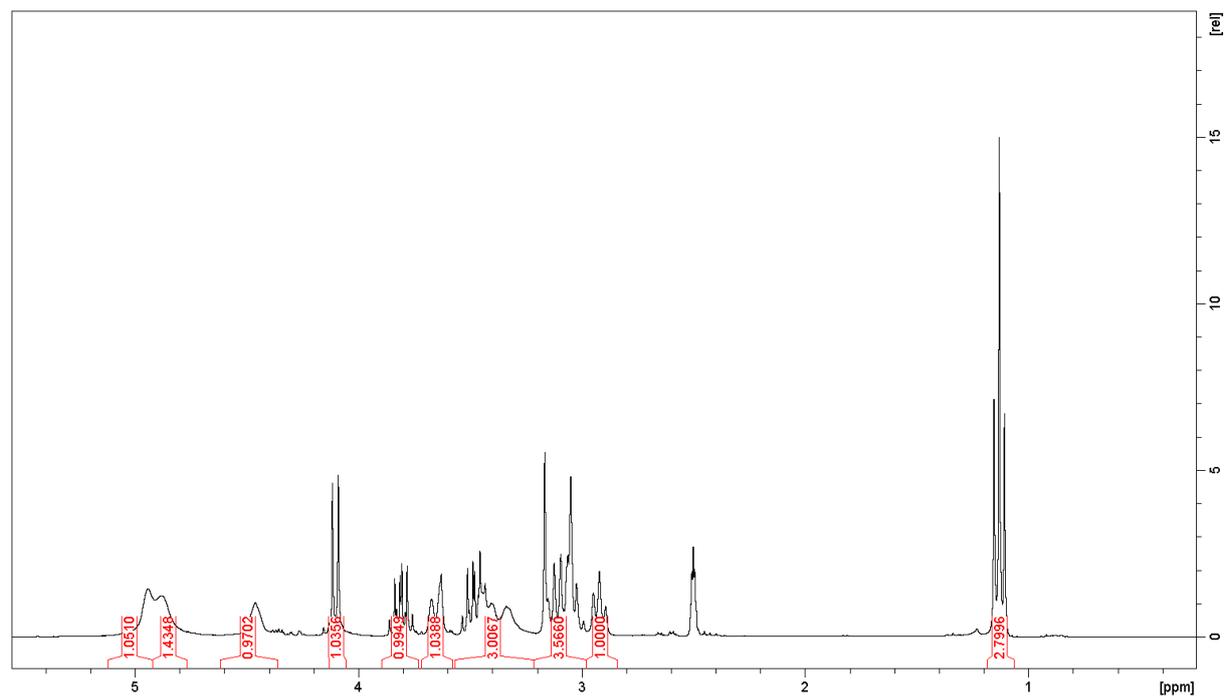
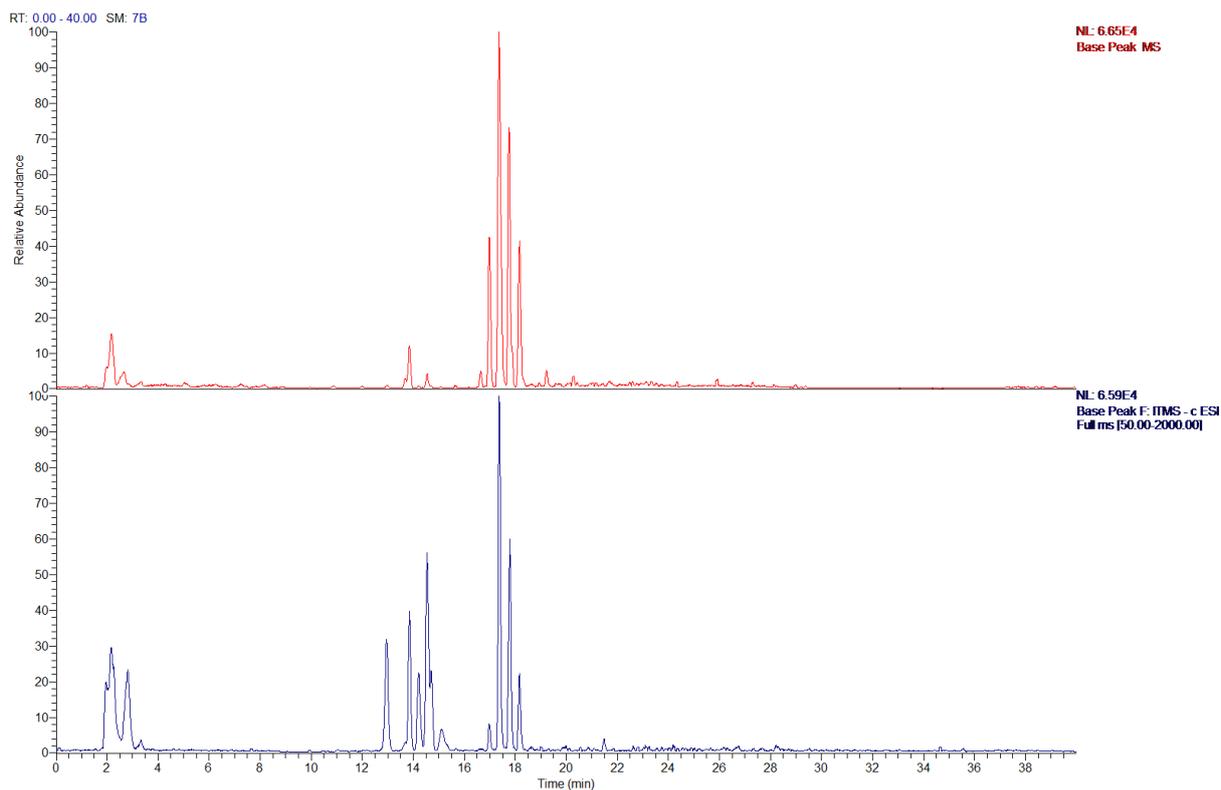
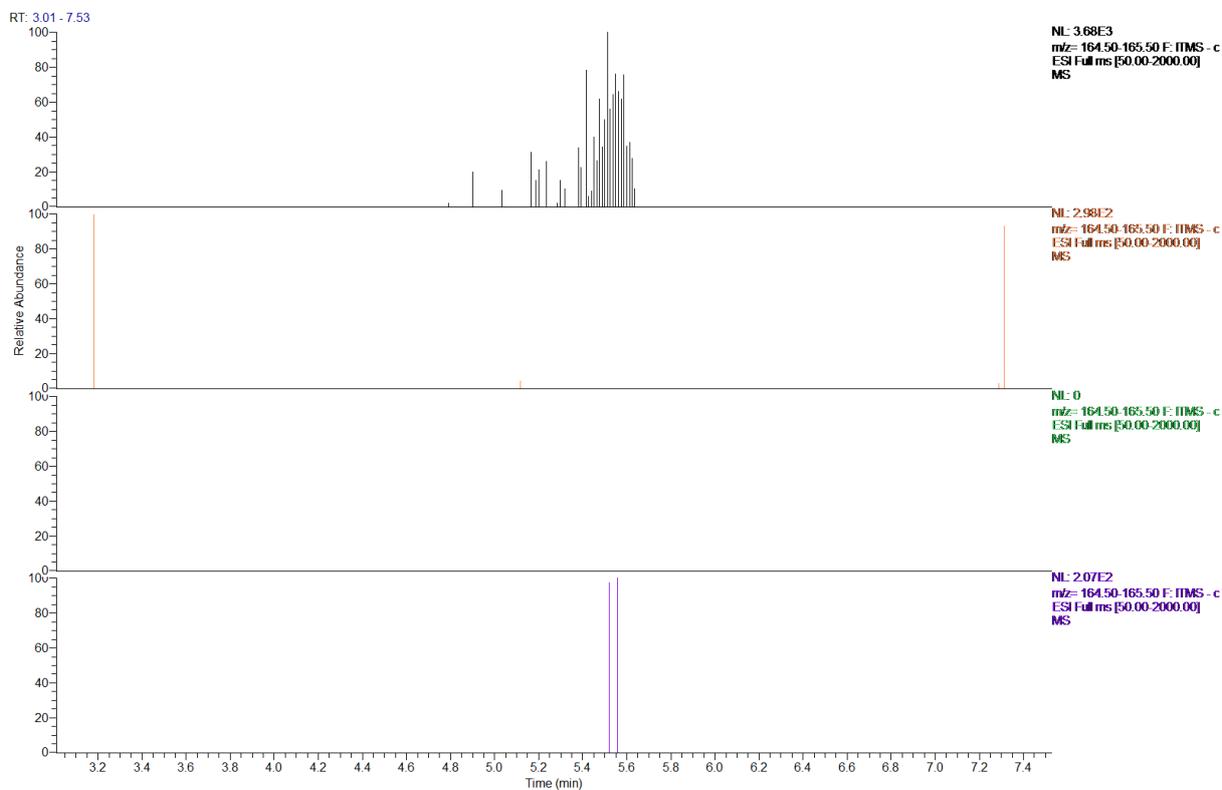


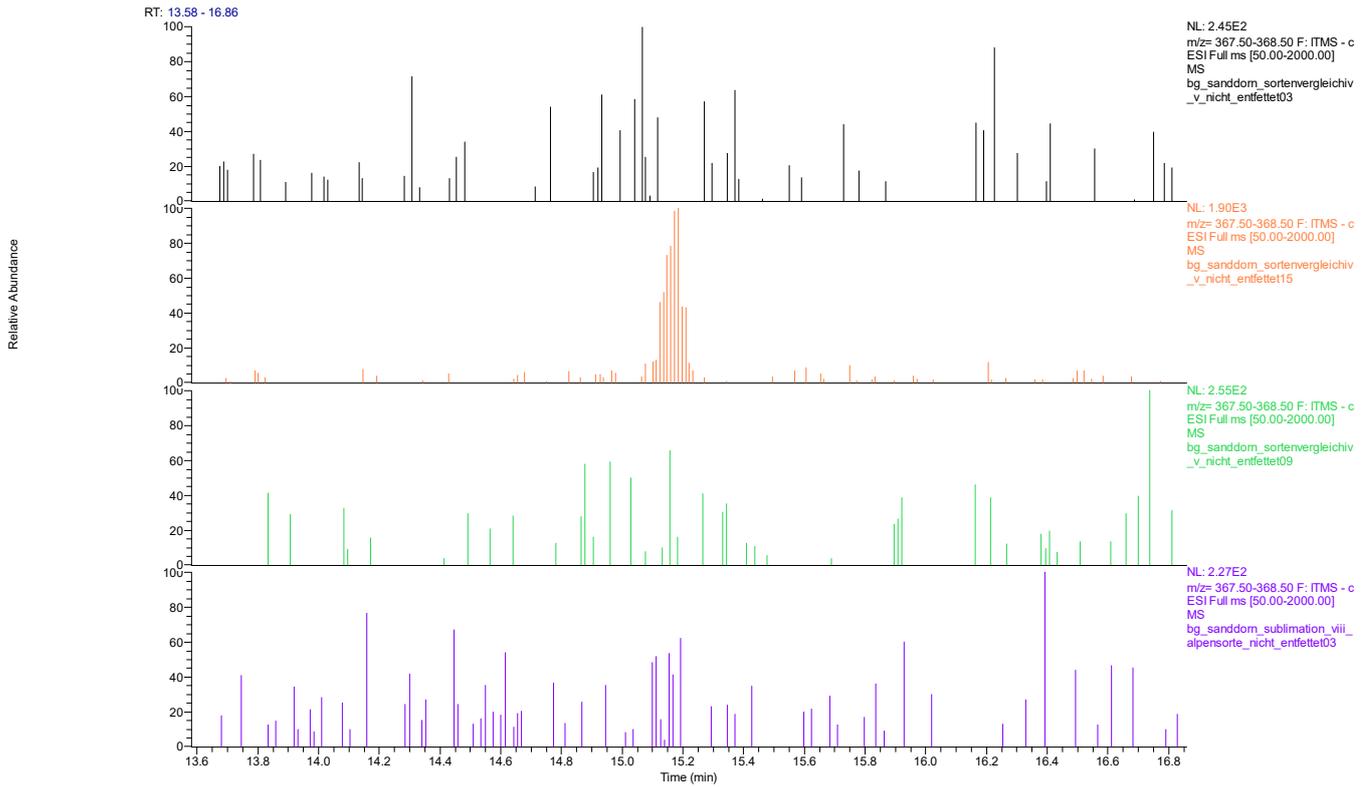
Abbildung 8.4  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der F18.1 des HBG-I 1-Butanolextraktes



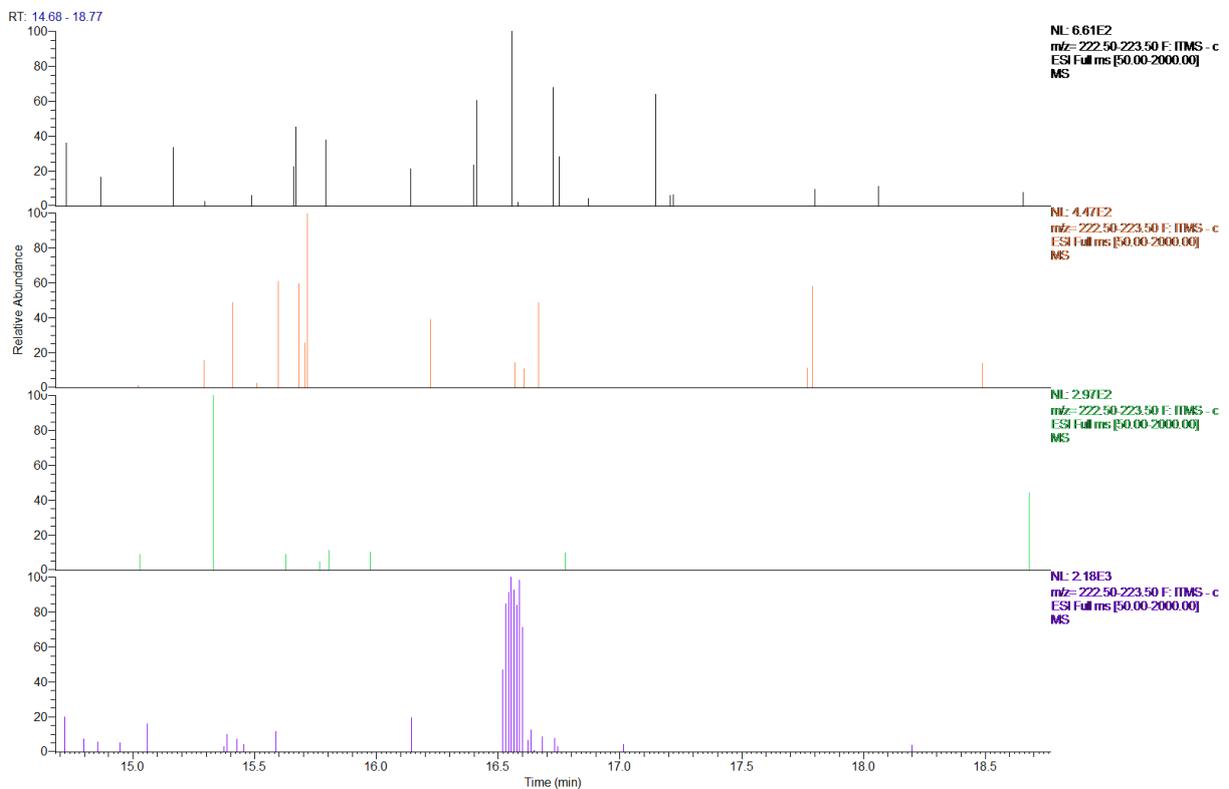
**Abbildung 8.5** Beispiel für den Unterschied zwischen dem positiven (rot) und negativen (blau) Scan-Modus Chromatogrammen des Trofimovskaja-Sublimates. Der positive Scan-Modus weist die gleichen Peaks auf, wie der negative Scan-Modus, jedoch sind im Bereich von 12-16 min weniger Peaks vorhanden



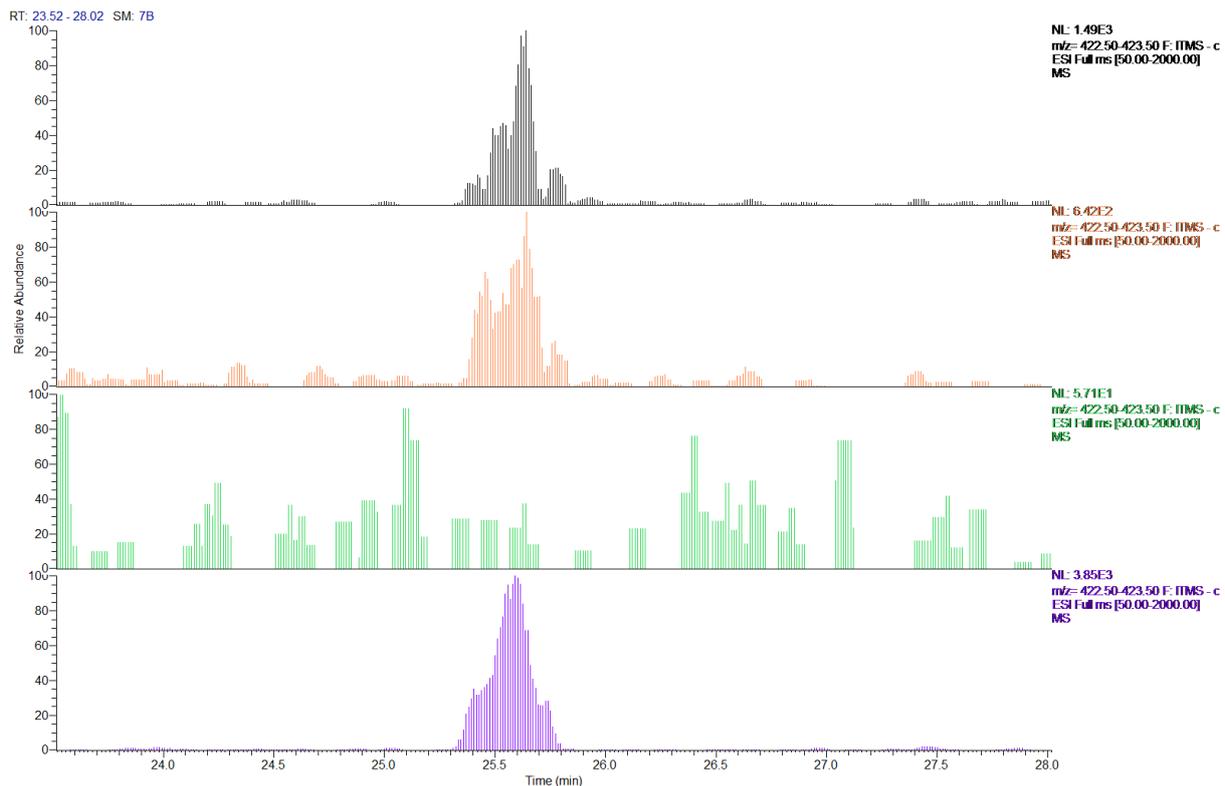
**Abbildung 8.6** Beispiel für eine Substanzm, die nur im Chromatogramm des Habego-Sublimates mit einem  $m/z$  von 165 zur RT 5.5 min detektiert wurde



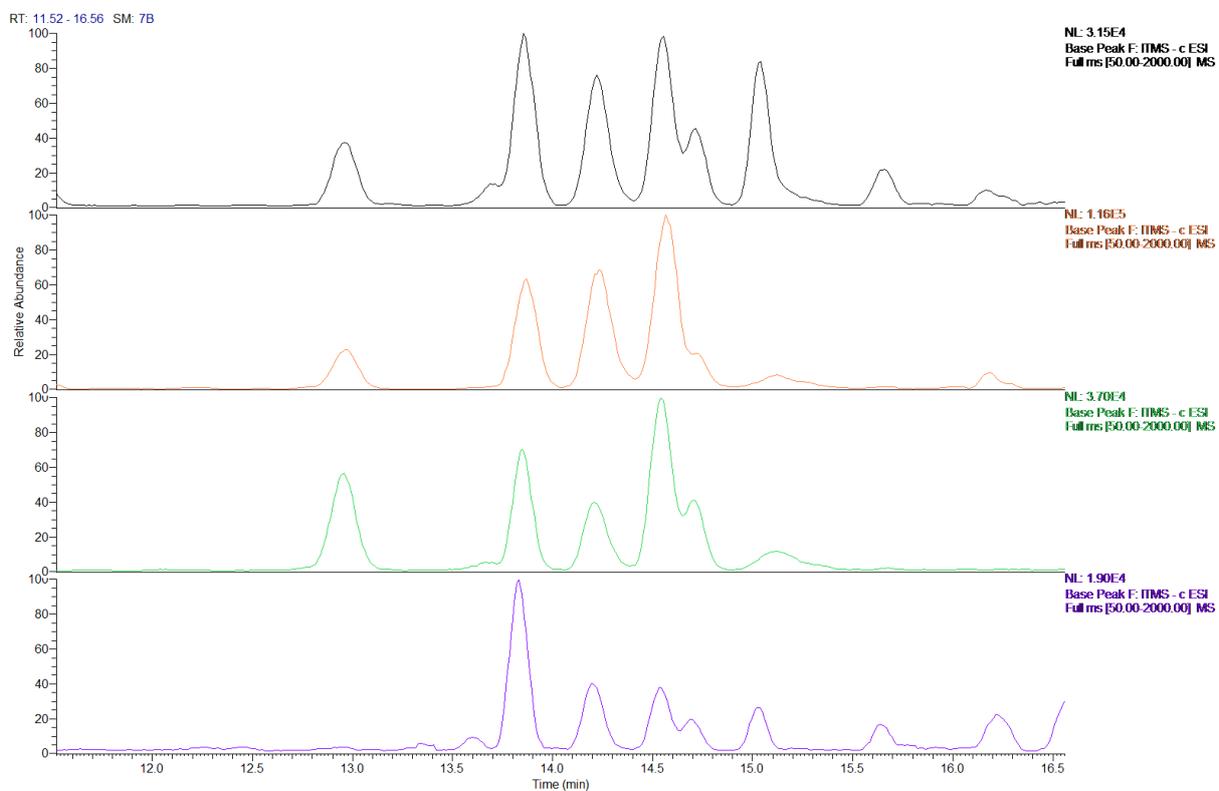
**Abbildung 8.7** Beispiel für eine Substanz, die nur im Chromatogramm des Otradnaja-Sublimates (orange) mit einem  $m/z$  von 368 zur RT 15.2 min detektiert wurde



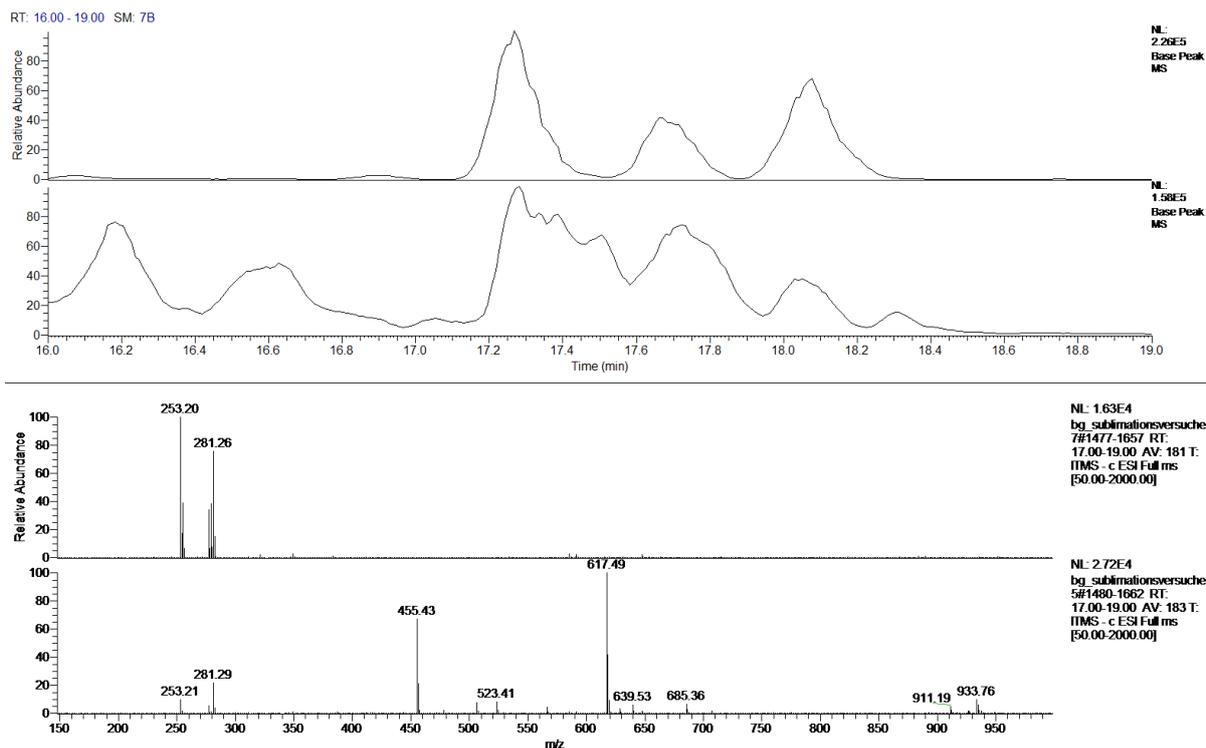
**Abbildung 8.8** Beispiel für eine Substanz, die nur im Chromatogramm des Alpensorte-Sublimates (lila) mit einem  $m/z$  von 223 zur RT 16.6 min detektiert wurde



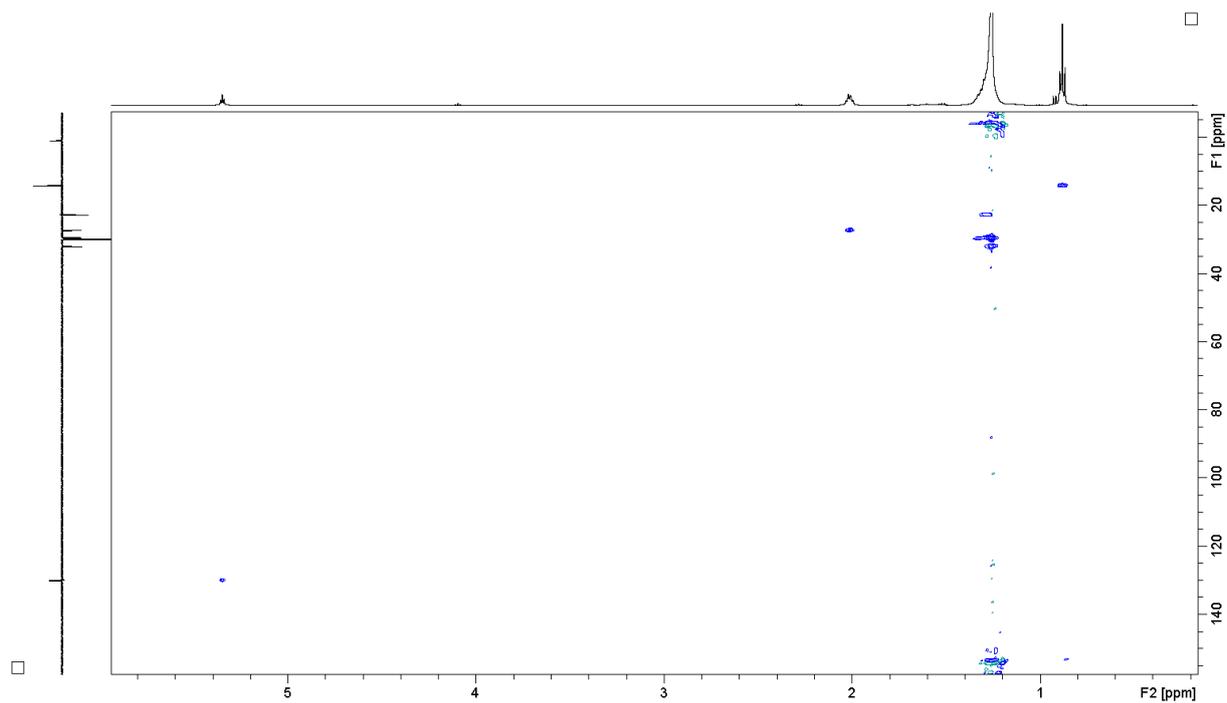
**Abbildung 8.9** Beispiel für eine Substanz, die nur in den Chromatogrammen des Trofimovskaja-Sublimates (**grün**) nicht vorkam, mit einem  $m/z$  von 423 zur RT 25.7 min



**Abbildung 8.10** Vergleich der Chromatogramme verschiedener Sanddornbeerensublimates im Bereich von 12-16 Minuten. Habego (schwarz), Otradnaja (**orange**), Trofimovskaja (**grün**) und eine Sorte aus den Alpen (**lila**) zeigen ähnliche Peakmuster. Die Peakintensitäten sind in allen Sorten unterschiedlich



**Abbildung 8.11** Vergleich der Massenspektren des Toluextraktes (unten) der HBG-II Sanddornbeere und des Sublimates der Toluextraktes (oben) im Bereich von 17-19 Minuten. Es sind deutliche Unterschiede zu erkennen, Substanzen mit einer Masse über 400 amu aus dem Extrakt werden nicht sublimiert



**Abbildung 8.12** HSQC-Spektrum der F1 des HBG-II Sanddornbeerensublimates

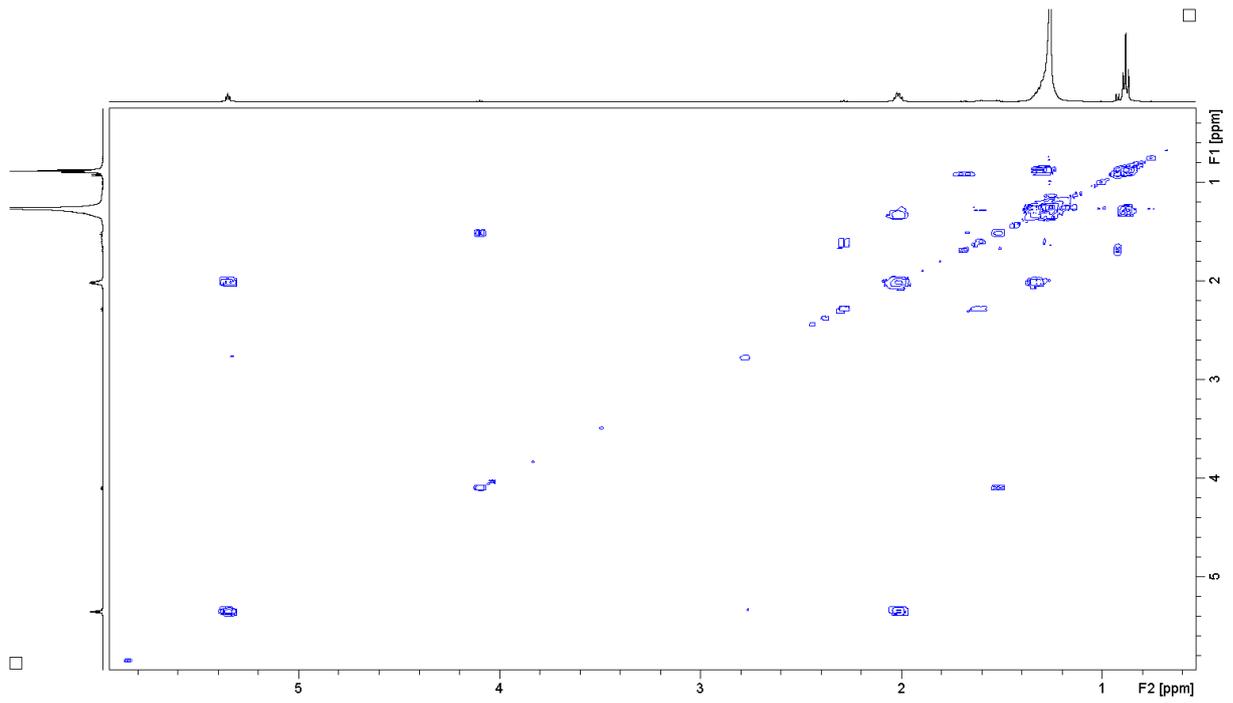


Abbildung 8.13  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der F1 des HBG-II Sanddornbeerensublimates

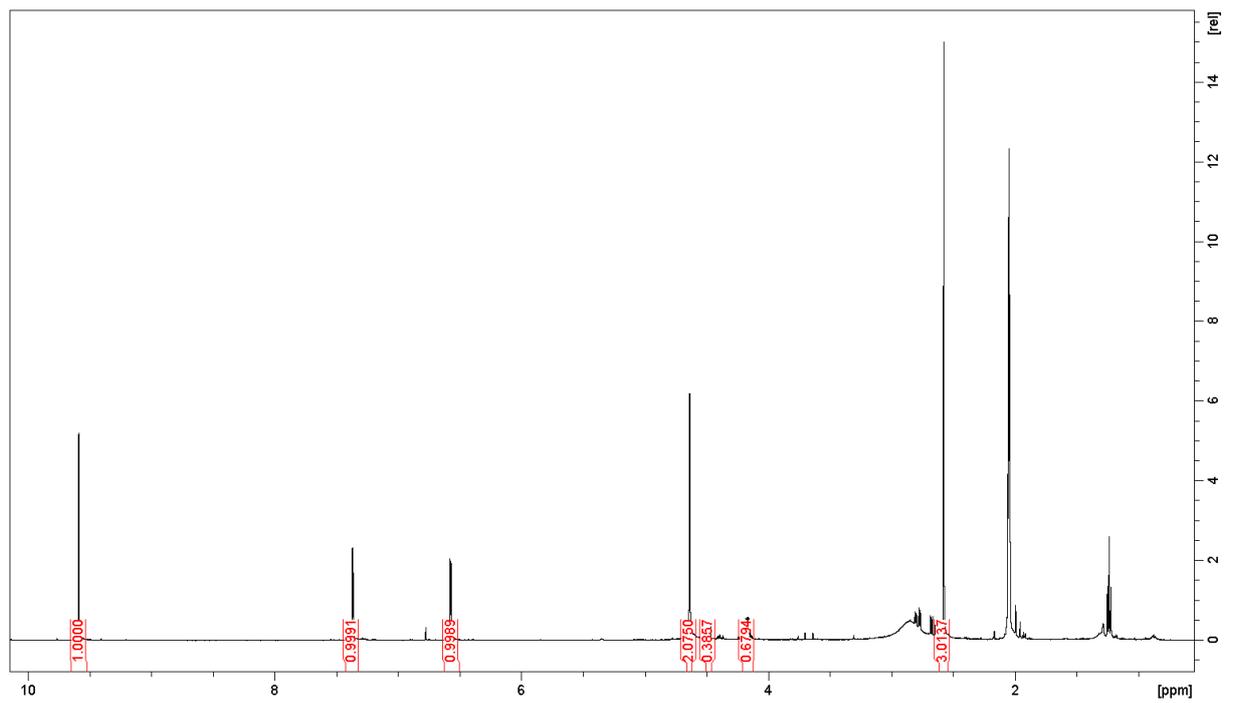


Abbildung 8.14  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeerensublimates

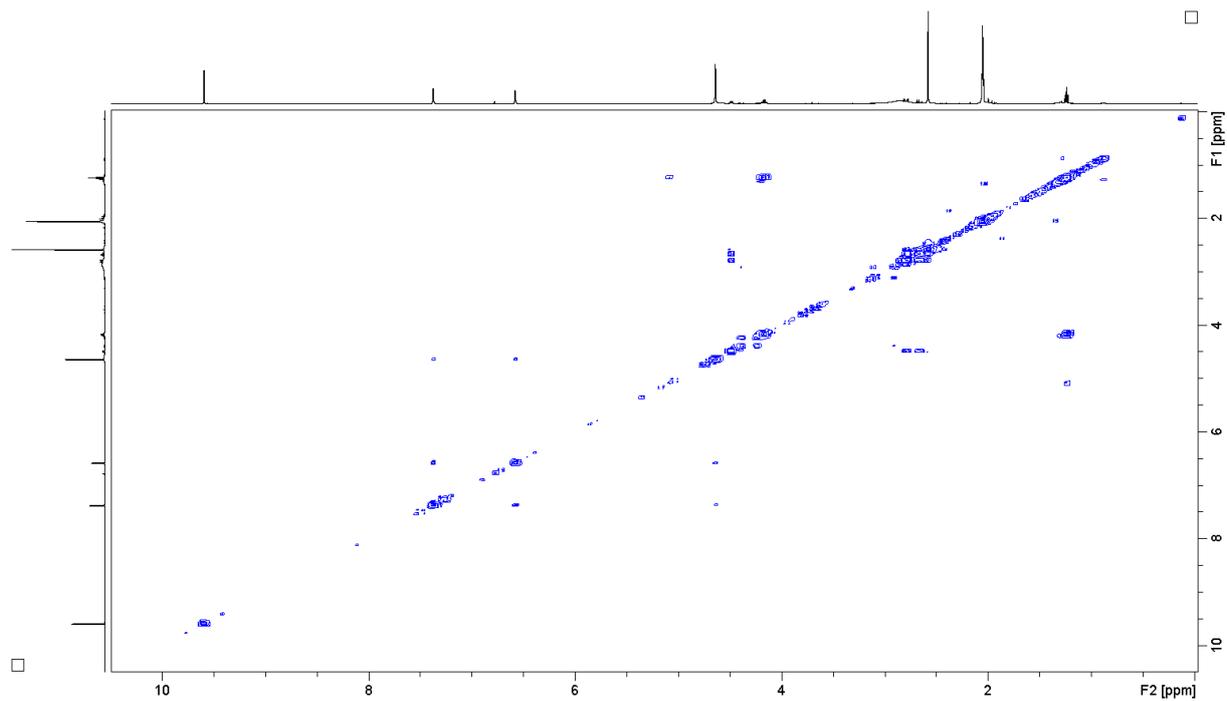


Abbildung 8.15  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeeren sublimates

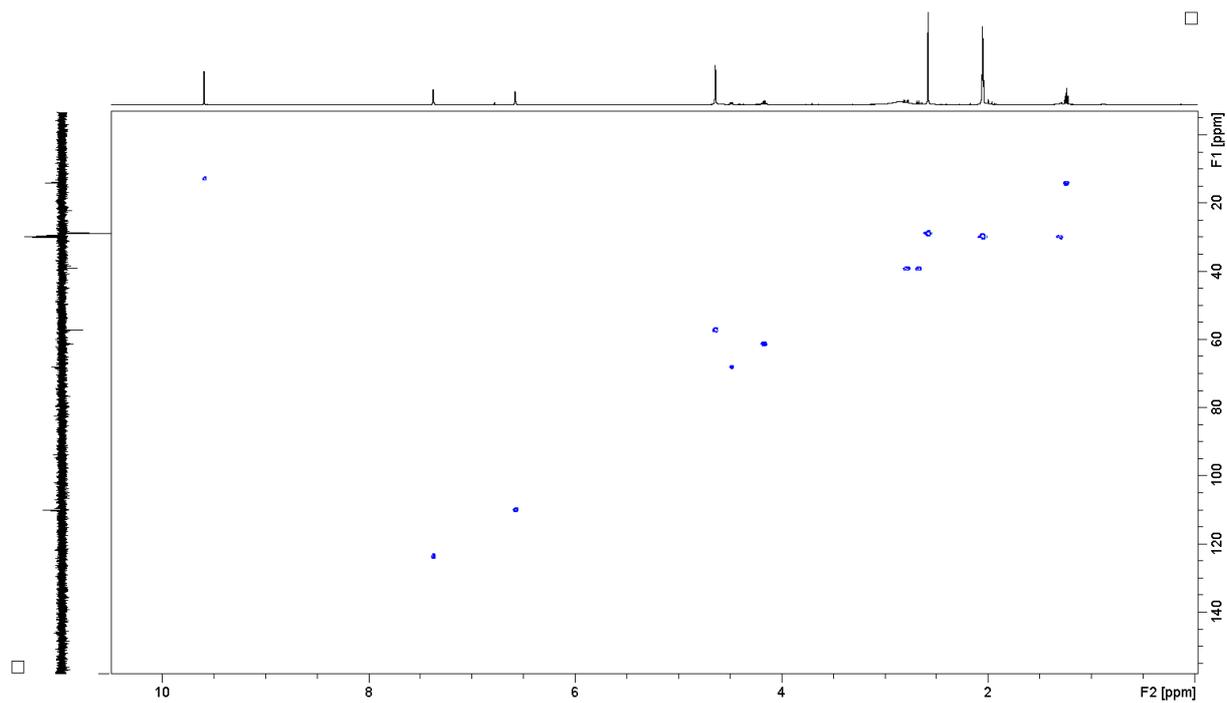


Abbildung 8.16 HSQC-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeeren sublimates

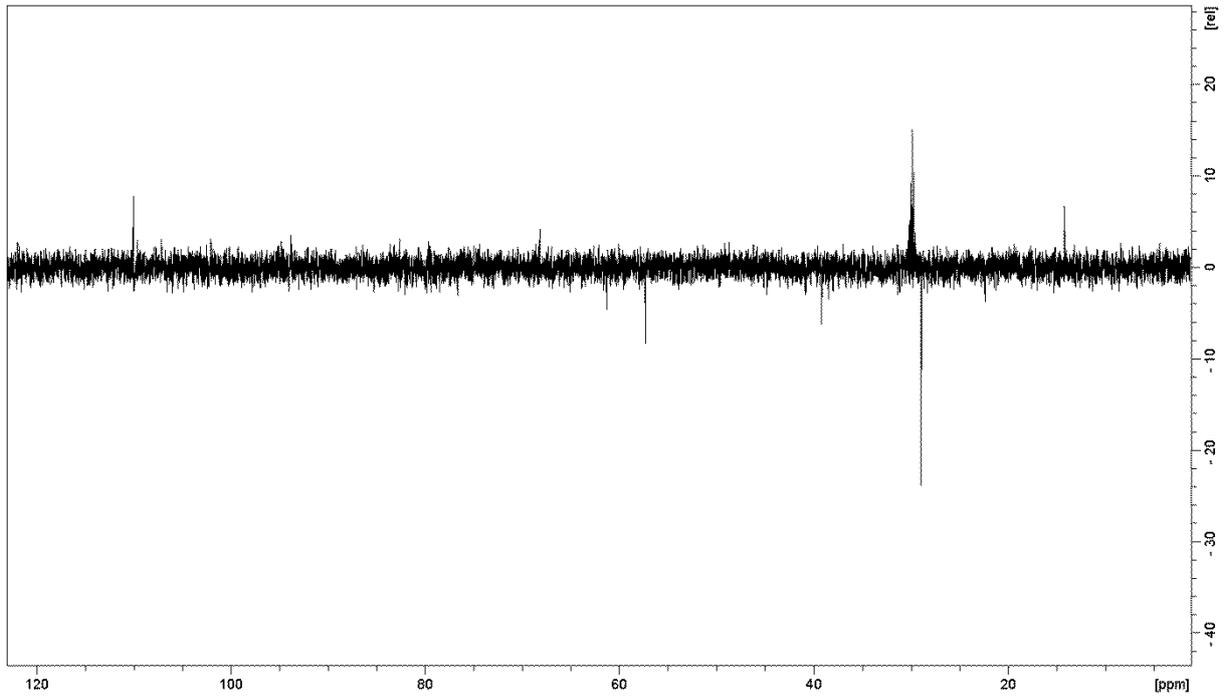


Abbildung 8.17 DEPT-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeerensublimates

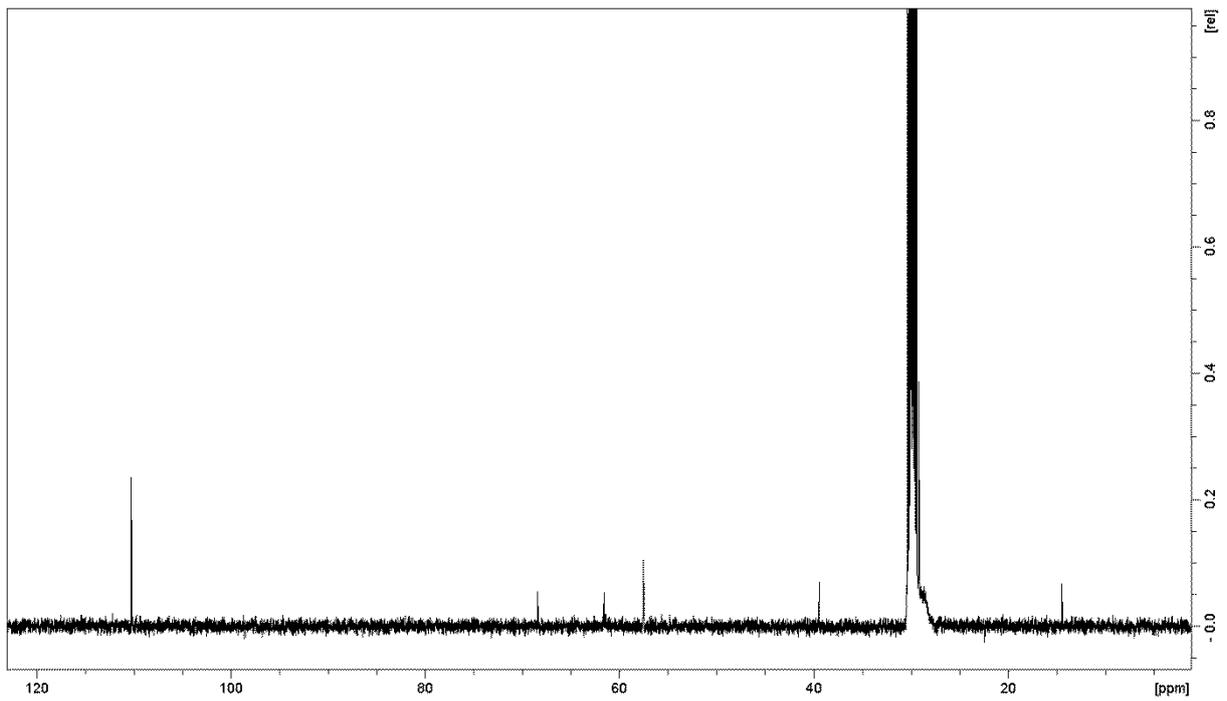


Abbildung 8.18  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der F4 des HBG-II Sanddornbeerensublimates

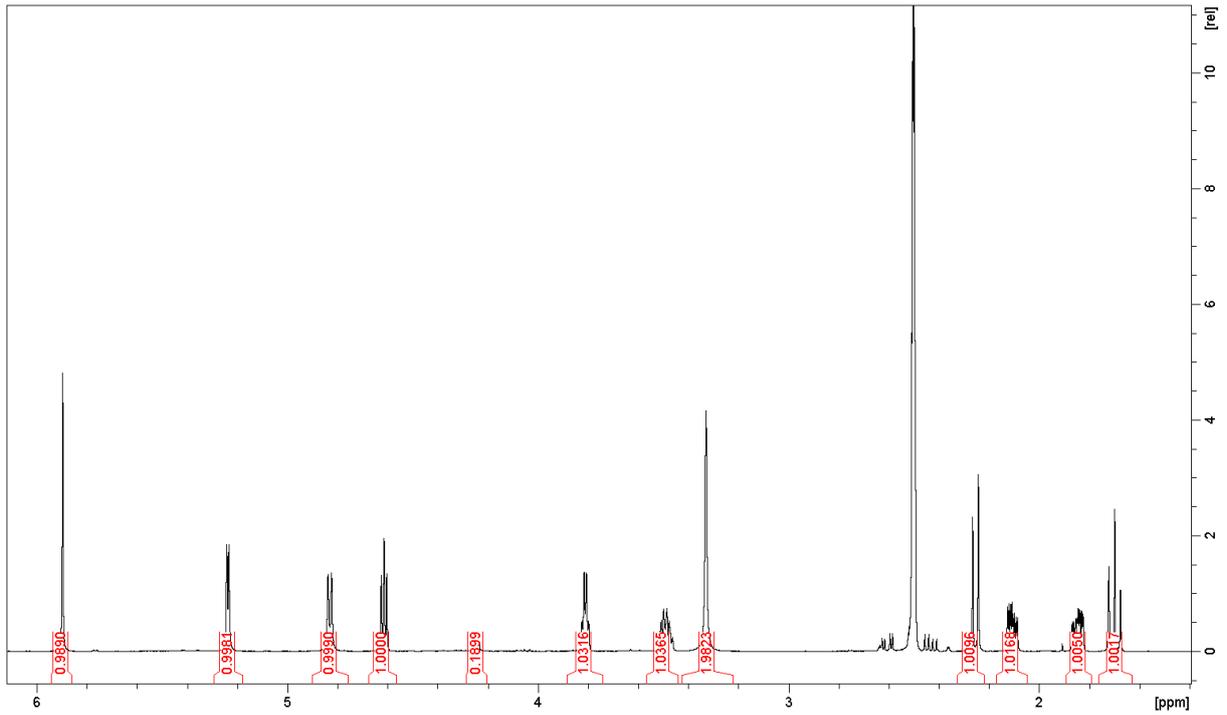


Abbildung 8.19  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeerensublimates

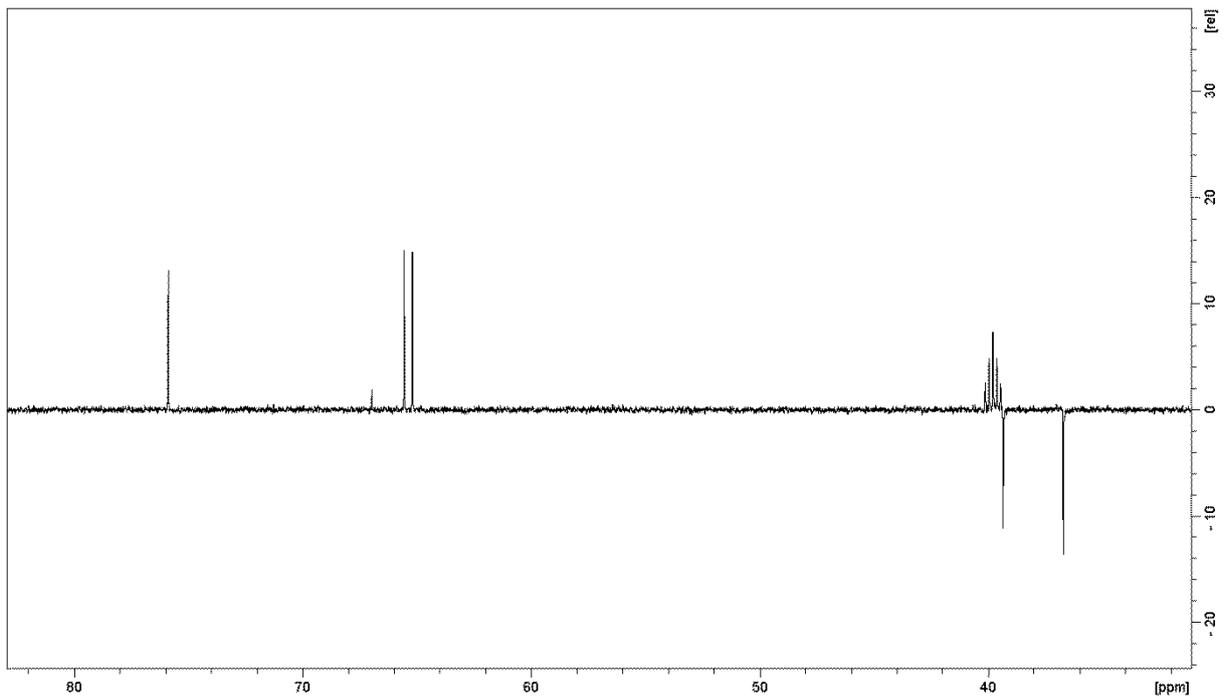


Abbildung 8.20 DEPT-Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeerensublimates

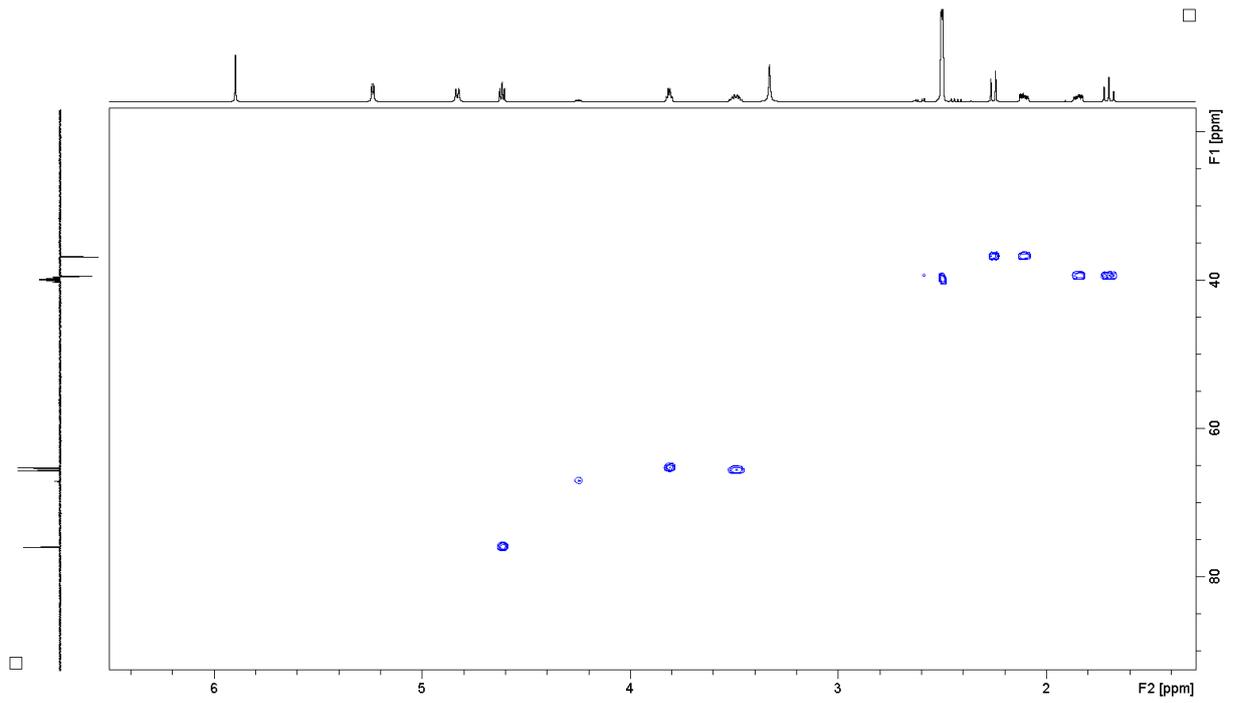


Abbildung 8.21 HSQC-Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeeren sublimates

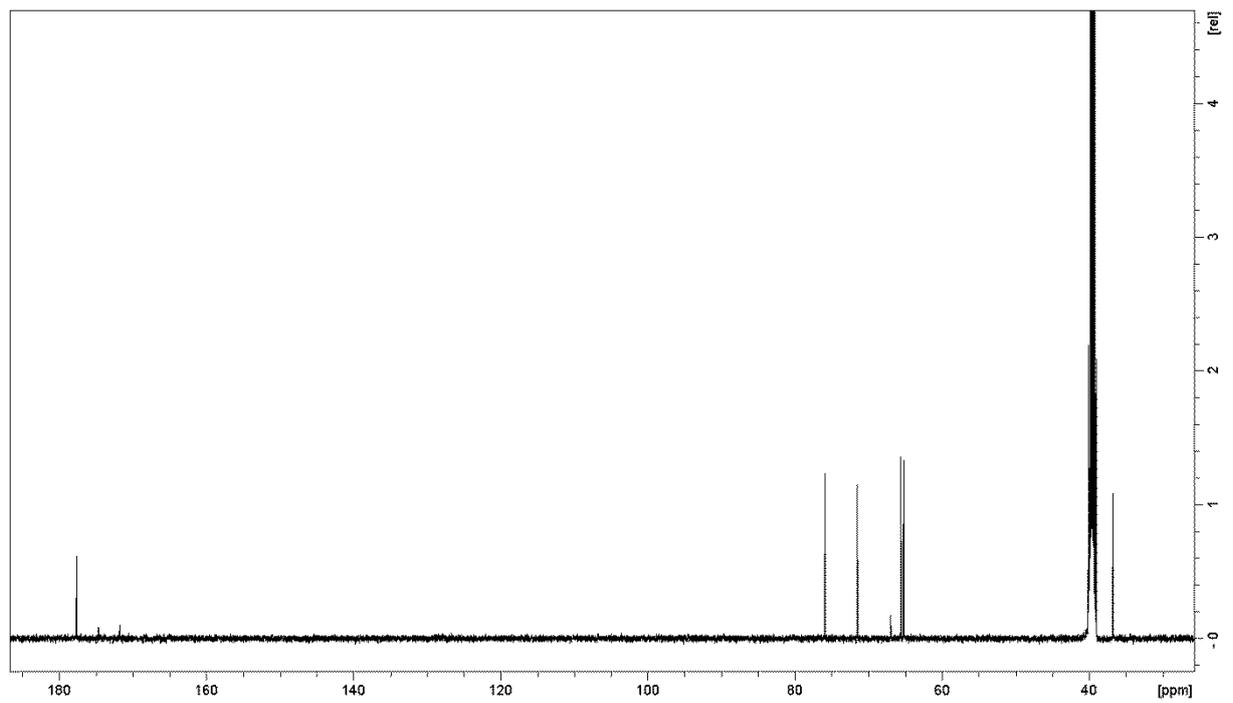


Abbildung 8.22  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeeren sublimates

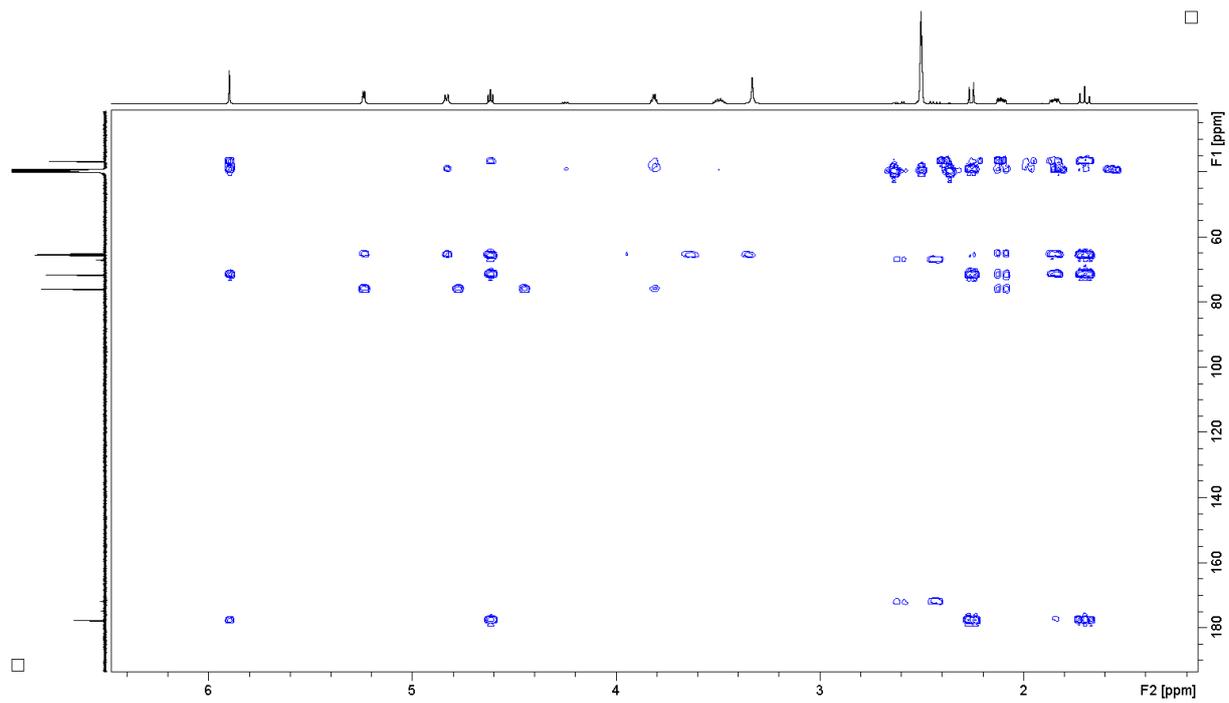


Abbildung 8.23 HMBC-Spektrum der F7 des HBG-II Sanddornbeeren sublimates

## 8.6 Tabellen

**Tabelle 8.1** Ergebnisse der Gefriertrocknung der Sanddornbeeren (HBG-I). Nach 32h wurde Gewichtskonstanz erreicht

| Charge             | 1     | 2     | 3     | ø     |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| Nassgewicht (g)    | 30.08 | 30.24 | 30.16 | 30.16 |
| Trockengewicht (g) | 5.0   | 5.3   | 5.1   | 5.13  |
| Massenverlust (%)  | 83.4  | 82.5  | 83.1  | 83.0  |

**Tabelle 8.2** Feststoffgehälter der Ethanolextrakte (80%) bei unterschiedlicher Probenvorbereitung

| Beeren, ganz |     | Beeren, zerkl. |      | Beeren, zerkl. tr. |      | Beeren, zerkl. tr. entf. |      |
|--------------|-----|----------------|------|--------------------|------|--------------------------|------|
| FG           | ø   | FG             | ø    | FG                 | ø    | FG                       | ø    |
| 5.0          | 5.0 | 15.9           | 16.0 | 20.6               | 21.8 | 25.6                     | 27.2 |
| 5.2          |     | 15.8           |      | 21.8               |      | 27.6                     |      |
| 5.0          |     | 15.7           |      | 21.7               |      | 26.3                     |      |
| 5.0          |     | 16.5           |      | 23.3               |      | 27.1                     |      |
| 4.7          |     | 16.0           |      | 21.5               |      | 29.3                     |      |

**Tabelle 8.3** Marker Substanzen, die in den Sanddornbeeren-sublimaten gefunden wurden. Massen, die nur in einem der Sublimat gefunden wurden, sind grün hervorgehoben

| RT  | m/z | Wasser | Methanol | 1-Butanol | Ethylacetat | Chloroform | Toluol |
|-----|-----|--------|----------|-----------|-------------|------------|--------|
| 2   | 115 | x      | x        | x         | x           |            |        |
| 2   | 133 | x      | x        | x         | x           |            |        |
| 2.0 | 261 |        | x        |           | x           |            |        |
| 2.0 | 289 |        | x        | x         | x           |            |        |
| 2.0 | 333 | x      | x        | x         | x           | x          |        |
| 2.0 | 343 |        | x        | x         | x           |            |        |
| 2.0 | 191 | x      |          | x         |             |            |        |
| 2.1 | 291 | x      | x        | x         | x           |            |        |
| 2.1 | 159 | x      | x        | x         | x           |            |        |
| 2.1 | 158 | x      | x        | x         | x           |            |        |
| 2.1 | 175 |        |          |           | x           |            |        |
| 2.1 | 186 | x      | x        | x         | x           |            |        |
| 2.1 | 195 |        | x        |           | x           |            |        |
| 2.1 | 229 |        | x        |           | x           |            |        |
| 2.1 | 245 | x      | x        | x         | x           |            |        |
| 2.1 | 275 | x      | x        |           | x           |            |        |
| 2.2 | 231 | x      | x        | x         |             |            |        |
| 2.2 | 271 |        |          |           | x           |            |        |
| 2.2 | 298 | x      | x        | x         |             |            |        |
| 2.2 | 327 | x      | x        | x         |             |            |        |
| 2.2 | 343 | x      | x        | x         |             |            |        |
| 2.2 | 483 | x      | x        | x         |             |            |        |
| 2.2 | 505 | x      | x        | x         |             |            |        |
| 2.3 | 117 | x      |          | x         |             | x          | x      |

| RT  | m/z | Wasser | Methanol | 1-Butanol | Ethylacetat | Chloroform | Toluol |
|-----|-----|--------|----------|-----------|-------------|------------|--------|
| 2.3 | 163 | x      |          |           |             |            |        |
| 2.3 | 173 |        |          |           |             |            | x      |
| 2.3 | 253 | x      | x        | x         |             |            |        |
| 2.3 | 273 |        |          |           |             | x          |        |
| 2.3 | 279 |        |          |           |             | x          | x      |
| 2.3 | 289 | x      | x        | x         | x           | x          |        |
| 2.3 | 295 |        |          |           |             | x          | x      |
| 2.3 | 301 |        |          |           |             | x          | x      |
| 2.3 | 311 |        | x        |           |             | x          |        |
| 2.4 | 129 | x      | x        | x         |             | x          | x      |
| 2.4 | 147 |        | x        |           |             |            |        |
| 2.4 | 195 |        |          |           |             | x          |        |
| 2.4 | 197 |        |          |           |             |            | x      |
| 2.4 | 205 |        | x        | x         | x           | x          |        |
| 2.4 | 259 |        |          |           |             |            | x      |
| 2.4 | 281 |        |          |           |             | x          | x      |
| 2.4 | 343 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 2.4 | 345 |        |          |           | x           | x          |        |
| 2.5 | 173 |        |          |           |             | x          | x      |
| 2.6 | 111 |        |          |           |             |            | x      |
| 2.6 | 140 |        |          | x         |             |            | x      |
| 2.6 | 161 |        |          |           |             |            | x      |
| 2.6 | 186 |        |          | x         |             |            |        |
| 2.6 | 261 |        | x        |           |             | x          |        |
| 2.6 | 289 |        |          |           | x           |            |        |
| 2.6 | 345 |        |          |           |             | x          | x      |
| 2.6 | 377 |        |          |           |             | x          | x      |
| 2.6 | 523 |        |          |           |             |            | x      |
| 2.7 | 229 |        |          |           |             | x          | x      |
| 2.7 | 367 |        |          |           | x           |            |        |
| 2.8 | 127 |        |          | x         |             |            |        |
| 2.8 | 143 |        |          | x         | x           | x          | x      |
| 2.8 | 171 |        |          | x         | x           |            |        |
| 2.8 | 179 | x      | x        | x         | x           | x          | x      |
| 2.8 | 189 |        |          | x         | x           |            |        |
| 2.8 | 225 |        |          |           |             |            | x      |
| 2.8 | 247 | x      |          |           |             |            |        |
| 2.8 | 289 |        |          |           |             | x          |        |
| 2.8 | 381 | x      | x        | x         | x           | x          | x      |
| 2.8 | 413 |        |          |           |             | x          |        |
| 3.0 | 225 |        |          |           |             |            | x      |
| 3.2 | 186 |        |          |           |             | x          | x      |
| 3.2 | 254 |        |          |           |             | x          | x      |
| 3.3 | 171 |        |          | x         |             | x          | x      |
| 3.3 | 239 |        |          |           |             |            | x      |
| 3.3 | 275 |        |          |           |             | x          |        |

| RT   | m/z | Wasser | Methanol | 1-Butanol | Ethylacetat | Chloroform | Toluol |
|------|-----|--------|----------|-----------|-------------|------------|--------|
| 3.3  | 301 |        |          |           |             |            | x      |
| 3.3  | 316 |        |          |           |             |            | x      |
| 3.4  | 134 |        |          |           |             | x          | x      |
| 3.4  | 178 |        |          |           |             | x          | x      |
| 3.7  | 235 |        |          |           |             |            | x      |
| 3.7  | 297 |        |          |           |             |            | x      |
| 3.5  | 161 |        |          |           |             | x          |        |
| 3.9  | 205 | x      |          |           |             | x          | x      |
| 3.9  | 267 |        |          |           |             |            | x      |
| 4.0  | 367 |        |          |           |             | x          | x      |
| 4.3  | 121 |        |          |           |             | x          | x      |
| 4.8  | 201 |        |          |           |             | x          | x      |
| 4.8  | 257 |        |          |           |             | x          | x      |
| 4.8  | 401 |        |          |           |             | x          | x      |
| 5.0  | 119 |        |          |           |             |            | x      |
| 5.2  | 271 |        |          |           |             | x          |        |
| 5.4  | 119 |        |          |           |             | x          | x      |
| 5.4  | 147 |        |          |           |             | x          | x      |
| 5.4  | 165 |        |          |           |             | x          | x      |
| 5.4  | 221 |        |          |           |             |            | x      |
| 5.4  | 233 |        |          |           |             |            | x      |
| 5.4  | 295 |        |          |           |             |            | x      |
| 5.4  | 353 |        |          |           |             | x          | x      |
| 5.4  | 385 |        |          |           |             | x          |        |
| 5.4  | 415 |        |          |           |             | x          | x      |
| 5.7  | 201 | x      |          |           | x           |            |        |
| 5.7  | 401 |        |          |           | x           |            |        |
| 5.9  | 134 |        |          |           |             | x          | x      |
| 6.5  | 132 |        |          |           |             |            | x      |
| 6.6  | 144 |        |          |           |             |            | x      |
| 6.5  | 171 |        |          | x         | x           |            |        |
| 7.9  | 251 |        |          |           |             |            | x      |
| 7.9  | 313 |        |          |           |             |            | x      |
| 8.0  | 209 |        |          |           |             | x          | x      |
| 8.0  | 271 |        |          |           |             | x          | x      |
| 8.0  | 303 |        |          |           |             | x          | x      |
| 8.5  | 219 |        |          |           |             | x          |        |
| 8.8  | 192 |        |          |           |             | x          |        |
| 9.3  | 204 |        |          |           |             |            | x      |
| 9.3  | 219 |        |          |           |             |            | x      |
| 9.3  | 331 |        |          |           |             |            | x      |
| 10.5 | 120 |        |          |           |             |            | x      |
| 10.5 | 164 |        |          |           |             |            | x      |
| 10.5 | 192 |        |          |           |             |            | x      |
| 10.8 | 219 |        |          |           |             |            | x      |
| 10.8 | 262 |        |          |           |             |            | x      |

| RT   | m/z | Wasser | Methanol | 1-Butanol | Ethylacetat | Chloroform | Toluol   |
|------|-----|--------|----------|-----------|-------------|------------|----------|
| 10.8 | 277 |        |          |           |             |            | x        |
| 11.2 | 216 |        |          |           |             |            | x        |
| 11.2 | 231 |        |          |           |             |            | x        |
| 11.2 | 249 |        |          |           |             |            | x        |
| 11.8 | 248 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.2 | 202 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.2 | 230 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.2 | 258 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.2 | 273 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.3 | 232 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.3 | 287 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.5 | 189 |        |          |           |             | x          |          |
| 12.5 | 259 |        |          |           |             | x          |          |
| 12.5 | 351 |        |          |           |             | x          |          |
| 12.9 | 202 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.9 | 218 |        |          |           | x           | x          | x        |
| 12.9 | 246 | x      | x        |           | x           | x          | x        |
| 12.9 | 261 |        |          |           |             | x          | x (12.5) |
| 12.9 | 230 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.9 | 258 |        |          |           |             |            | x        |
| 12.9 | 273 |        |          |           |             |            | x        |
| 13.3 | 221 |        | x        |           |             |            |          |
| 13.3 | 236 |        | x        |           |             |            |          |
| 13.3 | 293 |        | x        |           |             |            |          |
| 13.3 | 361 |        | x        |           |             |            |          |
| 13.6 | 179 |        | x        |           |             | x          |          |
| 13.6 | 225 |        | x        |           |             | x          |          |
| 13.6 | 293 |        | x        |           |             | x          |          |
| 13.6 | 355 |        | x        |           |             | x          |          |
| 13.6 | 473 |        | x        |           |             | x          |          |
| 13.6 | 535 |        | x        |           |             | x          |          |
| 13.8 | 218 |        |          |           |             | x          |          |
| 13.8 | 233 |        |          | x         | x           | x          | x        |
| 13.9 | 189 |        |          |           |             | x          |          |
| 13.9 | 259 |        |          |           |             | x          |          |
| 13.9 | 351 |        |          |           |             | x          |          |
| 14.2 | 188 |        | x        |           | x           | x          | x        |
| 14.2 | 217 |        | x        |           | x           | x          | x        |
| 14.2 | 232 |        | x        |           | x           | x          | x        |
| 14.2 | 260 |        | x        |           | x           | x          | x        |
| 14.2 | 275 |        | x        |           | x           | x          | x        |
| 14.5 | 216 | x      | x        | x         | x           | x          | x        |
| 14.5 | 244 | x      | x        | x         | x           | x          | x        |
| 14.5 | 259 | x      | x        | x         | x           | x          | x        |
| 15   | 219 |        |          | x         | x           | x          | x        |
| 15   | 230 |        |          |           |             |            | x        |

| RT   | m/z | Wasser | Methanol | 1-Butanol | Ethylacetat | Chloroform | Toluol |
|------|-----|--------|----------|-----------|-------------|------------|--------|
| 15.6 | 245 |        |          |           |             | x          |        |
| 15.6 | 267 |        |          |           |             | x          | x      |
| 15.6 | 271 |        |          |           |             |            | x      |
| 15.6 | 285 |        |          |           |             |            | x      |
| 15.6 | 307 |        |          |           |             | x          | x      |
| 15.7 | 265 |        |          |           |             | x          |        |
| 15.8 | 295 |        |          |           |             |            | x      |
| 16.1 | 331 |        |          | x         |             |            |        |
| 16.1 | 399 |        |          | x         |             |            |        |
| 16.2 | 245 |        |          |           | x           | x          | x      |
| 16.2 | 293 |        |          |           | x           |            | x      |
| 16.2 | 333 |        | x        |           | x           | x          | x      |
| 16.2 | 365 |        |          |           |             |            | x      |
| 16.9 | 269 |        |          |           |             |            | x      |
| 16.9 | 381 |        | x        |           |             | x          | x      |
| 17   | 251 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 17   | 319 |        | x        |           | x           | x          | x      |
| 17.4 | 277 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 17.4 | 253 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 17.8 | 255 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 17.8 | 279 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 17.8 | 280 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 18.2 | 281 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 18.2 | 282 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 18.2 | 349 |        | x        | x         | x           | x          | x      |
| 18.2 | 586 |        | x        | x         | x           | x          | x      |