



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Phytochemische Aufarbeitung von Öl gewonnen aus
den reifen Früchten von *Sambucus racemosa*“

verfasst von / submitted by

Michaela Stojanovic, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2023 / Vienna, 2023

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meiner Betreuerin ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die Möglichkeit, meine Masterarbeit in ihrer Arbeitsgruppe zu absolvieren und an diesem interessanten Projekt beteiligt sein zu dürfen. Ihre Begeisterung für die Pharmakognosie hat bei mir nicht nur während des Studiums einen bleibenden Eindruck hinterlassen, sondern mir auch während der Masterarbeit viel Motivation geschenkt. Auch möchte ich mich für ihre Expertise und die vielen hilfreichen Tipps bedanken, die mir das Leben oft erleichtert haben. Ein sehr großer Dank gilt auch meiner Mitbetreuerin Mag. Elisabeth Eichenauer, die mir während der gesamten Zeit immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und sich immer die Zeit genommen hat, für jedes Problem die passende Lösung zu finden. Ich hätte mir kein besseres Betreuer-Team wünschen können!

Vielen Dank an Franziska Höller, BSc für die Vorversuche bei der Extraktion des Öls und die hilfreichen Tipps. Weiters möchte ich mich auch bei Mag. Andreas Wasilewicz für seine Unterstützung während der HPCCC-Experimente bedanken. Danke auch an PD Dr. Ulrike Grienke und Mag. Sigrid Adelsberger für die große Hilfe beim „UHPSFC-Troubleshooten“.

Ein riesen Danke geht an das gesamte Team der Division of Pharmacognosy. Ihr habt die Zeit zu einer der schönsten, lustigsten und lehrreichsten meines Studiums gemacht.

Mein Dank gilt auch Mag. pharm. Dr. Stefan Brenner MSc und seinem Team für die GC-Untersuchung des Gesamtextraktes.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei all meinen Freunden, meiner Familie und meinem Freund Walter bedanken, die mich während der gesamten Studienzeit unterstützt haben und immer ein offenes Ohr und einen guten Ratschlag parat hatten.

Es war mir eine Riesenehre, an diesem Projekt beteiligt zu sein. DANKE!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	3
3. Material und Methoden	4
3.1. Pflanzenmaterial	4
3.2. Extraktion	4
3.3. Chromatographische Methoden	5
3.3.1. Dünnschichtchromatographie (DC)	6
3.3.2. High Performance Counter Current Chromatography (HPCCC)	8
3.3.3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	12
3.3.4. Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography (UHPSFC)	14
3.3.5. Gaschromatographie (GC)	19
3.4. Lösungsmittel und Chemikalien	22
4. Ergebnisse	23
4.1. Extraktion des Öls	23
4.2. Fraktionierung mittels HPCCC	25
4.2.1. Auswahl der geeigneten HEMWat Systeme	25
4.2.2. Fraktionierung	26
4.3. Analyse von Fraktion 7	29
4.3.1. HPLC	29
4.3.2. UHPSFC	30
4.4. GC-Untersuchung des Petrolether-Extrakts B	37
5. Diskussion und Conclusio	40
Zusammenfassung	44
Abstract	45
Literaturverzeichnis	46
Abkürzungsverzeichnis	48
Anhang	49

1. Einleitung

Sambucus racemosa L., auf Deutsch auch roter Holunder oder Traubenholunder genannt, ist ein sommergrüner Strauch aus der Gattung *Sambucus* (Greger J., 1921). Früher zu der Familie der Caprifoliaceae gezählt, haben DNA-Sequenzierungen gezeigt, dass *Sambucus* L., *Viburnum* L. und *Adoxa* L. eine monophyletische Gruppe bilden, die sich deutlich von der der Caprifoliaceae unterscheidet, weshalb alle drei Gattungen heute zur Familie Viburnaceae gehören (Applequist W. L., 2013, International Plant Names Index and World Checklist of Vascular Plants). Das Hauptverbreitungsgebiet des roten Holunders umfasst weite Teile Europas, Asiens und Nordamerikas, wobei der 2 bis 4 Meter hohe Strauch besonders in höheren Lagen in Fichtenwäldern, entlang von Forststraßen und Waldrändern anzutreffen ist (Cano I et al., 2007; Machatschek M., 2015). Der Traubenholunder trägt von April bis Mai gelblichgrüne Blüten, die sich, je nach Höhenlage und Witterungsverhältnissen, von Juni bis September zu scharlachroten Früchten entwickeln, die in einer dichten Traube angeordnet sind (siehe Abbildung 1, Seite 1) (Greger J., 1921). Das Fruchtfleisch enthält fettes Öl, ist reich an Vitamin C, einer Reihe an B-Vitaminen, Natrium, Calcium, Phosphor und Spurenelementen (Machatschek M., 2015). Jede Steinfrucht enthält 3 bis 5 große Samen und wird besonders von Vögeln und kleinen Nagetieren gerne verspeist. Bei Menschen kann ein übermäßiger Verzehr der Früchte und vor allem der Samen zu Übelkeit, Erbrechen oder Durchfall führen, was auf die cyanogenen Glykoside zurückzuführen ist, die sich vor allem im Samen, aber in geringeren Mengen auch im Fruchtfleisch der rohen Früchte finden. Die hitzelabilen Glykoside können beim Kochen jedoch zerstört werden, weshalb die Früchte traditionell vor dem Verzehr gekocht werden (Losey R. J., 2003).



Quelle: Sabine Glasl-Tazreiter

Abbildung 1: Ein gelblichgrüner Blütenstand von *Sambucus racemosa* L. (links) und scharlachrote Früchte in scheinbaren Trauben angeordnet (rechts)

Die Frucht als Volksheilmittel

Zubereitungen aus den reifen Früchten von *Sambucus racemosa* L. werden aufgrund der harn- und schweißtreibenden Eigenschaften, ähnlich wie die des schwarzen Holunders, traditionell gerne als Volksheilmittel bei Erkältungen und grippalen Infekten angewendet. Der gekochte und mit Honig verfeinerte Saft wird in Südtirol auch gerne zur Schmerzlinderung und Entzündungshemmung bei Magen-Darm-Erkrankungen eingesetzt (Machatschek M., 2015). Das fette Öl aus dem Fruchtfleisch dient in manchen Gegenden auch als Volksheilmittel zur innerlichen und äußerlichen Anwendung und wird bei verschiedenen Hautkrankheiten angewendet (Gerlach S., 2007; Gerlach S., Saukel J., Kubelka W., 2006; Machatschek M., 2015; Zellner J., 1902).

Traditionelle Gewinnung des Öls

Traditionell wird das Öl des roten Holunders gewonnen, indem man die reifen Früchte zuerst mit der Hand und anschließend mit einer Spindelpresse ausquetscht, um den Saft ohne die Samen zu gewinnen. Der Saft wird anschließend so lange gekocht, bis sich eine gelbe Schaumschicht absetzt, welche abgeschöpft wird. Sobald genug Schaum gewonnen worden ist, wird dieser eingedickt, bis sich größere Öltropfen auf der Oberfläche bilden, welche schließlich abgetrennt werden (Zellner J., 1902).

Eigenschaften des Öls

Man erhält ein gelbes bis rotgelbes Öl, das bei längerer Aufbewahrung nachdunkelt. Es ist geruchlos und mild schmeckend. Beim Erwärmen zeigt das sonst geruchlose Öl jedoch einen typischen Holundergeruch. Wird es länger bei kühleren Temperaturen um die 15°C aufbewahrt, scheiden sich weiße Kristalle ab. Der rotgelbe Farbstoff des Öls ist lichtempfindlich und wird, wenn es in einer dünnen Schicht aufgetragen und direktem Sonnenlicht ausgesetzt ist, nach 3 bis 4 Tagen komplett zerstört (Matthes H. & Rossié W., 1918; Zellner. J, 1902, 1918). Trotz mehrfacher Untersuchung finden sich in der Literatur nur Erkenntnisse über physikalische und chemische Konstanten des Öls, jedoch ist die chemische Zusammensetzung bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Byers H. G. & Hopkins P., 1902; Matthes H. & Rossié W., 1918; Zellner. J, 1902, 1918).

2. Zielsetzung

Aufgrund der Lücken hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung, war das Ziel dieser Masterarbeit in erster Linie die Entschlüsselung des phytochemischen Profils des Öls aus den Früchten von *Sambucus racemosa* L. Im Zuge dessen sollten auch Wege gefunden werden, die Extraktions- und Analysemethoden zu optimieren. Hierfür wurde das Öl auf zwei verschiedene Weisen extrahiert und anschließend fraktioniert. Die Fraktionen wurden mit verschiedenen chromatographischen Methoden untersucht, wobei der Hauptfokus im zweiten Teil der Arbeit auf der Fraktion 7 und der Optimierung ihrer Analyse lag. Die Arbeit soll als Grundlage für die weitere Erforschung der phytochemischen Zusammensetzung des Öls dienen, dessen Fraktionen in der Zukunft auf vorhandene Bioaktivität im Rahmen der Wundheilung getestet werden können.

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel geht es um die verwendeten Materialien und ihren Ursprung, weiters werden die analytischen und präparativen Methoden beschrieben, die zur Fraktionierung und Untersuchung des Öls zum Einsatz gekommen sind.

3.1. Pflanzenmaterial

Die in dieser Masterarbeit verwendeten Früchte wurden im Juli 2022 auf der Forsteralm, Gaflenz, Oberösterreich geerntet. Die reifen und entstielen Früchte wurden zunächst per Hand und Löffel durch ein Metallsieb gepresst, um den Saft ohne Samen zu gewinnen. In der Folge wurde dazu eine „Flotte Lotte“ mit feinem Siebeinsatz verwendet. Der so gewonnene Rohsaft wurde portioniert und in Glasgefäße gefüllt, ehe er eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut wurde.

3.2. Extraktion

Traditionell wird das Öl durch Auskochen der Früchte oder des Rohsaftes gewonnen. Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden zur Gewinnung des Öls zwei verschiedene Methoden gewählt, eine mit und eine ohne Auskochen. Für beide Ansätze wurde der eingefrorene Rohsaft aufgetaut und auf Zimmertemperatur gebracht.

Ansatz A (ohne Hitzebehandlung)

200 ml Rohsaft wurden auf Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und für 15 min bei 30.000 U/min (Umdrehungen/min) zentrifugiert. Dabei bildeten sich 3 Phasen (siehe Abbildung 2, Seite 4).

Die oberste Phase stellt die halb feste Öl-Saft-Emulsion dar, während die wässrige Phase und der feste Bodensatz darunter liegen. Die Öl-Saft-Emulsion wurde mit einem Löffel vorsichtig abgehoben und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Die Öl-Saft-Emulsion wurde anschließend 11-mal mit je 30 ml Petrolether (PE) versetzt und mittels Magnetrührer für jeweils 5 min bei 1000 (U/min) gerührt, ehe die PE-Phase mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein Becherglas überführt wurde. Die vereinigten, intensiv gelb gefärbten



Abbildung 2: Rohsaft nach 15-minütiger Zentrifugation (30.000 U/min) zeigt deutliche Phasentrennung

PE-Phasen wurden filtriert und der Petrolether abgedampft. Über diesen Ansatz wurden insgesamt 0,57 g Petrolether-Extrakt A gewonnen.

Ansatz B (mit Hitzebehandlung)

220 ml des Rohsaftes wurden mit 430 ml Wasser versetzt und auf niedriger Hitze 4 Stunden lang thermisch behandelt. Durch das Erhitzen im offenen Gefäß verdampfte ein Großteil des enthaltenen Wassers, sodass die 650 ml der Emulsion innerhalb der 4h reduziert wurden auf 180 ml Volumen eines mit Hitze behandelten Rohsafts. Diese 180 ml wurden auf Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und für 15 min bei 30.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die oberste Schicht (siehe Abbildung 2, Seite 4) vorsichtig mit einem Löffel abgehoben und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Die restliche Extraktion mit Petrolether wurde analog zu Ansatz A (siehe Seite 4) durchgeführt. Über diesen Ansatz wurden insgesamt 1,06 g Petrolether-Extrakt B gewonnen.

Tabelle 1: Überblick über die bei der Extraktion verwendeten Instrumente sowie die resultierenden Petrolether-Extrakte

Zentrifuge	Heraeus Labofuge 400
Magnetrührer	Heidolph MR 3001 K
Ansatz A (Rohsaft zentrifugiert)	0,57 g Petrolether-Extrakt A
Ansatz B (Rohsaft hitzebehandelt und zentrifugiert)	1,06 g Petrolether-Extrakt B

3.3. Chromatographische Methoden

Alle chromatographischen Methoden beruhen auf der Wechselwirkung eines Analyten mit einer ruhenden stationären und einer vorbeiströmenden mobilen Phase. Das zugrunde liegende Trennverfahren kann sowohl analytisch als auch semipräparativ genutzt werden (Gey M., 2021). In diesem Unterkapitel werden die verwendeten chromatographischen Methoden, wie die Dünnschichtchromatographie (DC), High Performance Counter Current Chromatography (HPCCC), High Performance Liquid Chromatographie (HPLC), Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography (UHPSFC) und Gaschromatographie (GC) näher erläutert.

3.3.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Anders als die säulenchromatographischen Methoden ist die DC ein Flachbettverfahren, bei dem sich die stationäre Phase auf einer dünnen Folie aus Aluminium oder einer Glasplatte befindet. Meist kommen polare Silicagele als stationäre Phase zum Einsatz, doch werden auch modifizierte Silicagele, Cellulose, Polyamid und Aluminiumoxid verwendet. Je nach Polarität der stationären Phase stehen verschiedene mobile Phasen zur Verfügung. Beim Einsatz einer polaren Silicagel Platte werden in der Regel apolare Fließmittel wie Petrolether, Hexan oder Toluol eingesetzt. Polare Zusätze wie Ethanol, Aceton oder Ethylacetat können ebenfalls eingesetzt werden, um die Trennleistung an den Analyten anzupassen. Das zu trennende Gemisch wird in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, ehe es mittels einer Glaskapillare, die meist 5 µl fasst, punkt- oder bandenförmig auf die markierte Startzone der Silicagel Platte appliziert wird. In einem gesättigten DC-Trog wird die Platte anschließend entwickelt. Die mobile Phase steigt getrieben durch Kapillarkräfte nach oben und nimmt dabei die Analyten mit. Je nach Affinität der Analyten zur stationären Phase werden diese unterschiedlich weit getragen. Es entstehen Banden, die im Idealfall nicht überlappen und scharf begrenzt sind. Nach der Entwicklung wird die Platte aus dem Trog genommen und visualisiert. Gefärbte Banden können bei Tageslicht ausgewertet werden, jedoch sind oft Derivatisierungen notwendig, um die Banden sichtbar zu machen. Nach der Derivatisierung können die Banden anschließend bei verschiedenen Wellenlängen (254 nm oder 366 nm) ausgewertet werden (Gey M., 2021).

Im Zuge dieser Masterarbeit wurde die DC vor allem für analytischen Untersuchungen herangezogen. Einerseits wurde der chromatographische Fingerprint der Petrolether-Extrakte nach der Extraktion untersucht, um einen möglichen Einfluss der Extraktionsmethode auf die Zusammensetzung des PE-Extrakts zu untersuchen. Andererseits diente die DC der Analyse der mittels HPCCC gesammelten Fraktionen. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die Fraktionierung des PE-Extrakts funktioniert hat und welche Fraktionen aufgrund einer ähnlichen Zusammensetzung vereint werden können. Auch sollte die Reproduzierbarkeit der einzelnen HPCCC Läufe untersucht werden. Als stationäre Phase wurden von MERCK hergestellte Aluminium Silica 60 F₂₅₄ Platten mit einer durchschnittlichen Teilchengröße von 9,5 bis 11,5 µm und Zinksilicat als Fluoreszenzindikator eingesetzt. Als mobile Phase diente

eine Mischung aus Hexan und Aceton im Verhältnis 25+4 (siehe Tabelle 2, Seite 7). Die Proben wurden in PE gelöst und mittels einer 5 µl Glaskapillare banden- oder punktförmig aufgetragen, ehe die Platte 2-mal entwickelt wurde. Die Visualisierung erfolgte mittels CAMAG TLC Visualizer (siehe Tabelle 3, Seite 7). Die entwickelten und getrockneten Platten wurden bei weißem Licht und den Wellenlängen 254 nm und 366 nm fotografiert. Vor der Derivatisierung waren Substanzen, die eine Fluoreszenz Löschung zeigen, bei 254 nm und Substanzen mit Eigenfluoreszenz bei 366 nm sichtbar. Anschließend wurden die Platten mit Hilfe des CAMAG Chromatogram Immersion Device in das Derivatisierungsreagenz getaucht und für ungefähr 2 min auf 108°C erhitzt. Danach wurden die Platten wieder bei weißem Licht und 366 nm fotografiert. Die Fotos wurden anschließend ausgewertet, wobei die derivatisierten Platten bei 366 nm die beste Interpretation ermöglichten.

Tabelle 2: Chromatographische Parameter für die analytische DC

Stationäre Phase	Aluminium Silica 60 F ₂₅₄ Platten (durchschnittliche Teilchengröße 9,5 bis 11,5 µm)
Mobile Phase	Hexan – Aceton (25 + 4)
Detektion	weißes Licht und 366 nm
Derivatisierungsreagenz	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (bestehend aus 5 ml Anisaldehyd, 100 ml konz. Essigsäure, 845 ml Methanol, 50 ml konz. Schwefelsäure)

Tabelle 3: HPTLC Instrumente

Instrument	CAMAG TLC Visualizer
	CAMAG Chromatogram Immersion Device (III)
Software	CAMAG Vision Cats

3.3.2. High Performance Counter Current Chromatography (HPCCC)

Die HPCCC ist eine chromatographische Methode, die auf der Verteilung von Analyten zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten beruht. Anders als bei herkömmlichen säulenchromatographischen Methoden kommt keine feste stationäre Phase zum Einsatz, was einige Vorteile mit sich bringt. Da es zu keiner irreversiblen Adsorption des Probenmaterials an die stationäre Phase kommen kann, hat man wenig bis gar keinen Verlust an Analyten (Ito Y., 2005; Langeder J. et al., 2021). Durch die effiziente Auftrennung der Probe in wenigen Stunden und das mögliche Upscaling eignet sich die Methode sowohl für analytische als auch präparative Zwecke (Skalicka-Woźniak K. et al., 2012). Als stationäre beziehungsweise mobile Phase dienen bei der HPCCC sogenannte HEMWat (Hexan-Ethylacetat-Methanol-Wasser) Systeme. Die Auswahl des geeigneten Systems spielt eine große Rolle bei der Effizienz der Auftrennung. Dabei beschreibt der K-Wert das Verhältnis der Konzentrationen der Analyten in der mobilen und stationären Phase. Wünschenswert ist eine gleichmäßige Verteilung zwischen Ober- und Unterphase (Liu Y. et al., 2015).

Im Zuge dieser Masterarbeit diente die HPCCC in erster Linie der Auftrennung des PE-Extrakts und der Gewinnung von Fraktionen, um eine bessere Analyse der Zusammensetzung zu ermöglichen. 200 µl Probe wurden mit 4 ml n-Hexan verdünnt. Hiervon wurde 1 ml entnommen und in Eppendorf Gefäße mit HEMWat Systemen unterschiedlicher Polarität überführt (siehe Tabelle 4, Seite 9). Die Verteilung der Substanzen wurde nach kräftigem Ausschütteln mittels DC untersucht (siehe Kapitel 3.3.1., Seite 6). Anschließend wurde ein analytischer Lauf durchgeführt, ehe vier präparative Läufe vorgenommen wurden. Für die Experimente wurde ein Spectrum Instrument von Dynamic Extractions in Kombination mit einer Interchim puriFlash (Lösungsmittelpumpe, PDA-Detektor, ELSD und Fraktionen-Sammler) verwendet (siehe Tabelle 5, Seite 9). Es wurde eine Umkehrphasen-Gradienten-Elution mit den in Tabelle 6 (Seite 9) ersichtlichen stationären und mobilen Phasen durchgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der getesteten HEMWat Systeme

HEMWat System	Verhältnis (Hexan - Ethylacetat - Methanol - Wasser)
15	2 + 3 + 2 + 3
17	1 + 1 + 1 + 1
19	3 + 2 + 3 + 2
20	2 + 1 + 2 + 1
24	5 + 1 + 5 + 1
25	6 + 1 + 6 + 1
26	9 + 1 + 9 + 1
27	19 + 1 + 19 + 1
28	1 + 0 + 1 + 0

Tabelle 5: Für die HPCCC Fraktionengewinnung verwendete Instrumente

Instrument	Dynamic Extractions Spectrum
	Accel 500 LC Kühler
	Interchim puriFlash® 4250
	GeneVac Standard (EZ-2 Serie)
Software	Interchim Software

Tabelle 6: Verwendete stationäre und mobile Phasen

	HEMWat System
Stationäre Phase	Oberphase 26
1. Mobile Phase	Unterphase 26
2. Mobile Phase	Unterphase 27
3. Mobile Phase	Unterphase 28

Die verwendeten Lösungsmittel Mischungen wurden am Vortag des jeweiligen Laufes separat in Messzylindern mit Schliff bzw. Laborflaschen hergestellt und an einem kühlen, dunklen Ort gelagert.

Analytische HPCCC

Es wurde eine analytische Säule mit einem Volumen von 22 ml im Umkehrphasen-Modus verwendet. Zunächst wurde die Säule mit der stationären Phase (Flussrate 2 ml/min, Oberphase (OP) 26) befüllt bei einer Umdrehungszahl von 200 U/min. Dann wurde die 1. mobile Phase (Unterphase (UP) 26) mit einer Flussrate von 1 ml/min bei 1600 U/min eingepumpt. 42,03 mg der Probe (PE-Extrakt B) wurden in 700 µl einer 1:1 Mischung aus Oberphase (OP) 26 und Unterphase (UP) 26 gelöst und mittels Glasspritze in eine 1 ml Probenschleife eingespritzt, sobald das hydrodynamische Äquilibrium erreicht war. Fraktionen wurden ab dem Zeitpunkt der Einspritzung gesammelt. Die restlichen mobilen Phasen wurden ebenfalls mit 1 ml/min eingepumpt. Gegen Ende des Laufes wurde die stationäre Phase mittels MeOH+H₂O (1:1) extrudiert (siehe Tabelle 7, Seite 10). Die gesammelten Fraktionen wurden mittels GeneVac Standard (siehe Tabelle 5, Seite 9) im „aqueous“ Modus zur Trockene gebracht.

Tabelle 7: Parameter für analytische HPCCC

HEMWat Nr. (siehe Tab. 6, Seite 9)	Flussrate [ml/min]	Volumen [ml]	Phase
26	2	60	OP
26	1	95	UP
27	1	40	UP
28	1	40	UP
Extrusion	2	56	MeOH+H ₂ O (1:1)

Präparative HPCCC

Eine präparative Säule mit einem Volumen von 136 ml wurde im Umkehrphasen-Modus verwendet. Die Säule wurde zunächst mit der stationären Phase OP 26 mit 10 ml/min bei 200 U/min befüllt. Anschließend wurde die 1. mobile Phase (UP 26) mit 6 ml/min bei 1600 U/min in das System gepumpt. Sobald das hydrodynamische Äquilibrium erreicht war, wurden in vier Läufen jeweils 392,01 mg, 396,89 mg, 389,76 mg und 394,30 mg PE-Extrakt B in 8 ml einer 1:1 Mischung aus OP 26 und UP 26 gelöst und mittels Glasspritze in eine 12 ml Probenschleife eingespritzt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Fraktionen nach Volumen

gesammelt. Alle weiteren mobilen Phasen wurden ebenfalls mit 6 ml/min eingepumpt. Gegen Ende der Methode wurde eine Extrusion der stationären Phase mit MeOH+H₂O (1:1) vorgenommen (siehe Tabelle 8, Seite 11). Die gesammelten Fraktionen wurden mittels GeneVac Standard im „aqueous“ Modus zur Trockene gebracht.

Tabelle 8: Parameter für die präparative HPCCC

HEMWat Nr.	Flussrate [ml/min]	Volumen [ml]	Phase
26	10	300	OP
26	6	470	UP
27	6	240	UP
28	6	240	UP
Extrusion	10	280	MeOH+H ₂ O (1:1)

Alle gesammelten Fraktionen wurden in 100 µl (analytisch) bzw. 200 µl (präparativ) PE gelöst und mittels DC untersucht.

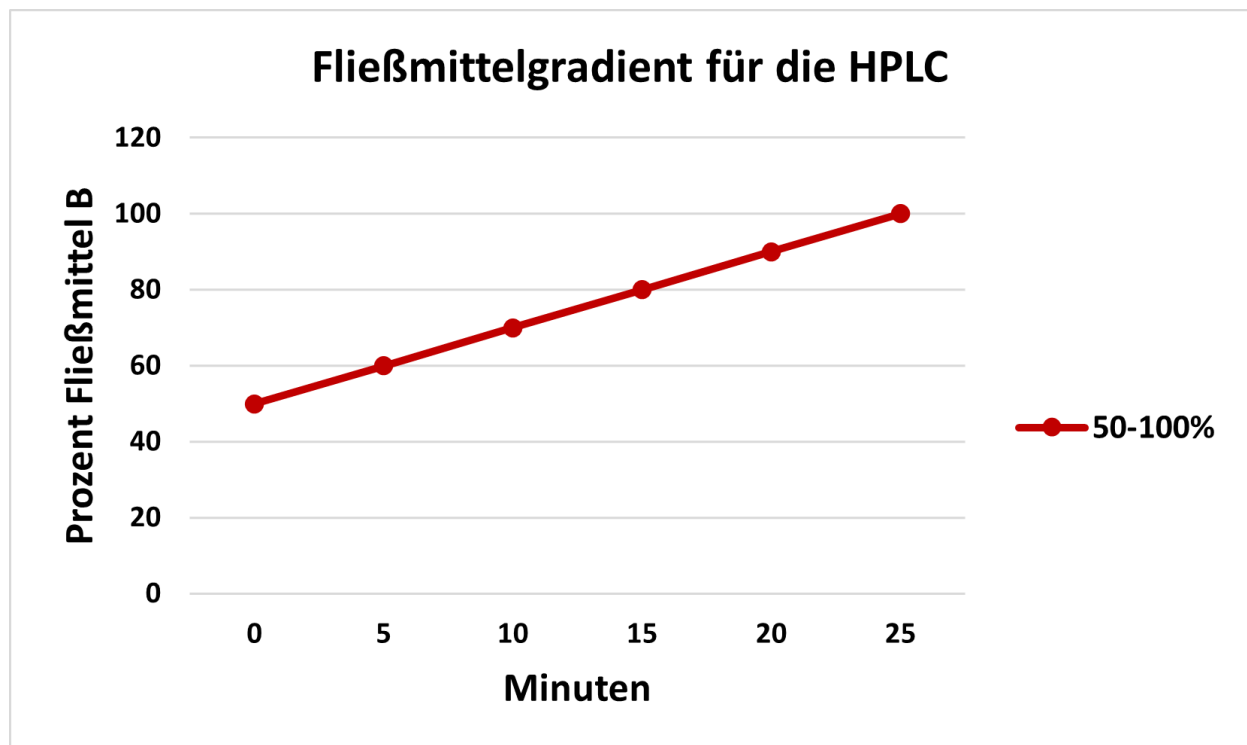
3.3.3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC – auf Deutsch Hochleistungsflüssigchromatographie – stellt, wie der Name schon verrät, eine verbesserte Version der herkömmlichen Säulenflüssigchromatographie dar. Der im Unterschied zur klassischen Säulenchromatographie erheblich kleinere Teilchendurchmesser (LC: 100-200 μm , HPLC: 3-10 μm) erlaubt die Verwendung kürzerer Säulen. In Kombination mit einer Hochdruckpumpe, welche die Fließmittel mit einem gleichmäßig bleibenden Druck (2-20 MPa) durch die Säule pumpt, werden so hohe Trennleistungen in kurzer Zeit erreicht. Oft werden „reversed phase“ (RP) Säulen verwendet, was bedeutet, dass die Oberflächengruppen des Silicagels so modifiziert sind, dass diese einen hydrophoben Charakter bekommen. Üblich sind vor allem C18-Säulen, bei denen ein Teil der Silanolgruppen mit einer C18-Alkylkette modifiziert ist. Um die restlichen Silanolgruppen zu besetzen, wird oft ein sogenanntes „endcapping“ mit Trimethylchlorsilan durchgeführt. Die mobile Phase besteht aus einem polaren Gemisch aus Methanol + Wasser oder Acetonitril + Wasser. Nach der Elution der Analyten von der Säule werden diese von einem oder mehreren hintereinander geschalteten Detektoren erfasst (Gey M., 2021). Meist werden PDA-Detektoren verwendet, welche auf UV-Absorption chromophorer Gruppen bei bestimmten Wellenlängen basieren. Das heißt wiederum, dass die Analyten ein oder mehrere Chromophore besitzen müssen, um von dem Detektor erfasst zu werden. Der ELSD stellt eine universellere Option dar, die nicht-flüchtige Substanzen unabhängig von chromophoren Systemen erfassen kann (Vervoort N. et al., 2008).

Die HPLC wurde im Rahmen dieser Masterarbeit zur Analyse der Fraktion 7 eingesetzt (siehe Tab. 9, Seite 13). Verwendet wurde eine RP-18e Säule als stationäre Phase. Die mobile Phase bestand aus zwei verschiedenen Fließmitteln (A: Wasser + 0,1% Ameisensäure; B: Acetonitril + 0,1% Ameisensäure). Zur Detektion wurden sowohl der PDA-Detektor als auch der ELSD verwendet. Fraktion 7 wurde mit Aceton auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt und mittels SHIMADZU Auto Sampler wurden 5 μl der Probe eingespritzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die verwendeten Instrumente sind in Tabelle 9 (Seite 13) aufgeführt und der verwendete Fließmittel-Gradient ist in Diagramm 1 (Seite 13) ersichtlich.

Tabelle 9: Verwendete HPLC Instrumente

Instrumente	SHIMADZU Auto Sampler SIL-20AC HAT
	SHIMADZU Communications Bus Module CBM-20A
	SHIMADZU Column Oven CTO-20AC
	SHIMADZU Degasser DGU-20A ₅
	SHIMADZU Diode Array Detector SPD-M20A
	SHIMADZU Liquid Chromatograph LC-20AD
	SHIMADZU Low temperature-evaporative light scattering detector ELSD-LT
Software	SHIMADZU Lab solutions
Stationäre Phase	Licrosphere 100 RP 18e 5µm (interne Seriennummer 098), 250x4mm
Mobile Phase	A - Wasser + 0,1% Ameisensäure
	B - Acetonitril + 0,1% Ameisensäure
Gradient	50-100% in 25 min

**Diagramm 1:** Fließmittelgradient der mobilen Phase, der für die HPLC-Analyse verwendet wurde

3.3.4. Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography (UHPSFC)

Die Besonderheit bei der überkritischen Fluidchromatographie (SFC, supercritical fluid chromatography) gegenüber der herkömmlichen LC liegt in erster Linie bei der mobilen Phase. Wie der Name schon sagt, besteht diese bei der SFC aus einem überkritischen Fluid. Überkritische Fluide entstehen, wenn der Druck und die Temperatur jenseits der stoffspezifischen kritischen Werte liegen. In diesem Zustand besitzt das Fluid sowohl Eigenschaften eines Gases (hoher Diffusionskoeffizient, niedrige Viskosität) als auch einer Flüssigkeit (hohe Lösungskraft, Dichte). Überkritisches CO₂ findet heutzutage am meisten Verwendung, da es eine Reihe von Vorteilen bietet:

- Die kritischen Parameter (31°C und 74 bar) sind mit gebräuchlichen Apparaturen leicht zu erreichen
- Es ist inert und nicht toxisch
- Es ist günstig und leicht verfügbar
- Es ist umweltfreundlicher als andere organische Lösungsmittel

Der stark lipophile Charakter von CO₂ eignet sich gut zur Elution apolarer Analyten. Für die Analyse polarer Substanzen können sogenannte Modifier (z.B. MeOH, EtOH, IPA, ACN) zugesetzt werden, durch welche die Polarität der mobilen Phase erhöht wird. Auch können mittels isokratischer Pumpe bei der Detektion durch ein Massenspektrometer (MS) dem CO₂-Strom Substanzen wie Ammoniumformiat oder -acetat beigemengt werden, die die Ionisation in der Elektrospray-Ionenquelle verbessern (Eisath N. G. et al., 2018; Gey M., 2021). Die UHPSFC stellt eine technologische Weiterentwicklung der herkömmlichen SFC dar. Die große Zahl an verfügbaren stationären Phasen – es können sowohl die für die HPLC entwickelten Trennsäulen verwendet werden als auch speziell für die SFC entwickelte – ermöglicht die Analyse einer großen Breite verschiedener Verbindungen. Die SFC und die UHPSFC sind kompatibel mit einer Vielzahl an Detektoren, wie z.B. PDA, ELSD und MS (Eisath N. G. et al., 2018; Goels T. et al., 2022). Vorteile der UHPSFC gegenüber einer herkömmlichen HPLC wären die höhere Trennleistung, kurze Analysenzeiten und ein geringerer Lösungsmittelverbrauch. Auch gegenüber der GC weist die UHPSFC Vorteile auf, da keine aufwendige

Probenaufbereitung notwendig ist, was zusätzliche mögliche Fehlerquellen vermeidet (Goels T. et al., 2022; Langeder J. & Grienke U., 2021).

Die UHPSFC wurde im Rahmen dieser Masterarbeit zur Analyse der Fraktion 7 eingesetzt. Hierfür wurde das Instrument ACQUITY UPC² (ultraperformance convergence chromatography) von WATERS verwendet, welches aus einem Sample Manager, Binary Solvent Manager (BSM), Isocratic Solvent-Manager (ISM), Column Manager, Convergence Manager und verschiedenen Detektoren besteht. Verwendet wurden ein PDA-Detektor, ELSD und QDa (Quadrupole Dalton) Massenspektrometer. Die Probe wurde in Hexan:Isopropanol (70:30) gelöst und mit einer Torus 2-Picolylamin (2-PIC) Säule analysiert (Dimensionen: 3,0 mm x 100 mm, 1,7 µm Partikelgröße). Es wurde 1 µl Probe mittels Sample Manager injiziert. Die mobile Phase bestand aus CO₂ und Methanol als Modifier (1 – 7 % Modifier in 10 min, dann 1-minütiges Plateau bei 7 %, anschließendes Äquilibrieren auf 1% in 1 min) mit einer Flussrate von 1 ml/min. Zur Bestimmung der Masse wurde der QDa mit MeOH:H₂O (95:5) + 10 mM Ammoniumacetat (AA) als ISM Modifier verwendet (Flussrate 0,6 ml/min) (siehe Tabelle 11, Seite 16). Sämtliche Chromatogramme wurden mit der Software Empower 3 ausgewertet.

Tabelle 10: Verwendete UHPSFC Instrumente

Instrument	WATERS ACQUITY UPC ² PDA Detector
	WATERS ACQUITY UPC ² Column Manager
	WATERS ACQUITY UPC ² Convergence Manager
	WATERS ACQUITY UPC ² Sample Manager
	WATERS ACQUITY UPC ² Binary Solvent Manager
	WATERS ACQUITY UPC ² QDa Detector
	WATERS ACQUITY UPLC ELSD
	WATERS ACQUITY UPC ² Isocratic Solvent Manager
Software	Empower 3

In Tabelle 13 auf Seite 17 sind die untersuchten Modifier und der verwendete Gradient ersichtlich, während man in Tabelle 12 auf Seite 17 die, für die Methodenoptimierung untersuchten stationären Phasen sehen kann. Die Methoden zur Gradienten Optimierung findet man in Tabelle 14 auf Seite 18.

Tabelle 11: Optimierte Methode zur Analyse von Fraktion 7

Säule	Dimension (mm)	Modifizier	Gradient (% Modifizier)	ISM Modifizier	Dauer
2-Picolylamin (2-PIC)	3,0 x 100	MeOH	1 – 7 %	MeOH + H ₂ O (95+5) + 10 mM AA	11 min (10 min Anstieg + 1 min Plateau)

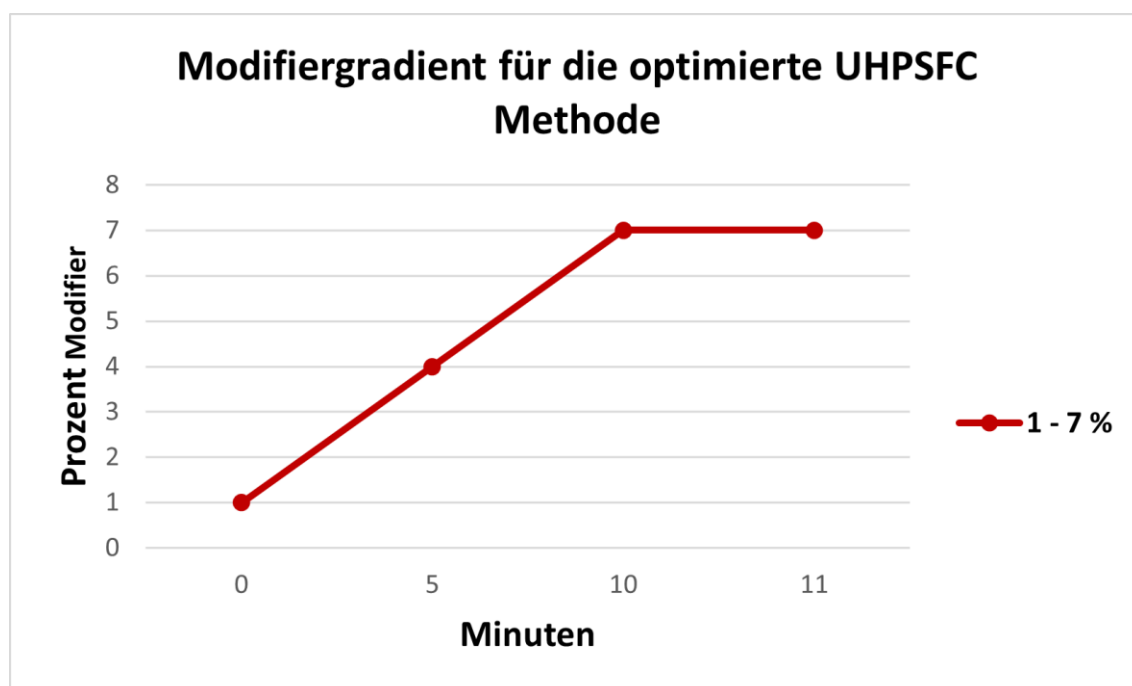


Diagramm 2: Modifiziergradient für die optimierte UHPSFC Methode zur Analyse von Fraktion 7 mit MeOH als Modifizier

Tabelle 12: Stationäre Phasen und die entsprechenden Lösungsmittelgradienten für den Säulen-Check

Säule	Dimension (mm)	Modifizier	Gradient (% Modifizier)	Dauer
Charged-Surface-Hybrid-Fluoro- Phenyl (CSH Fluoro-Phenyl)	3,0 x 100	MeOH	0 – 50 %	10 min
1-Aminoanthracene (1-AA)				
Silica 2-Ethylpyridine (Silica 2-EP)				
Bridged-Ethylene-Hybrid-2- Ethylpyridine (BEH 2-EP)				
2-Picolylamine (2-PIC)				
Bridged-Ethylene-Hybrid (BEH)				

Tabelle 13: Überprüfte Modifizier und Gradientensysteme für UHPSFC Methodenoptimierung

Säule	B1	B2	B3	B4	Gradient (% Modifizier)	Dauer
2-PIC	MeOH	IPA	EtOH	ACN	1 – 15 %	11 min (10 min Anstieg + 1 min Plateau)

Tabelle 14: Gradientenoptimierung UHPSFC

Säule	Modifizier	Gradient (% Modifizier)	Dauer
2-PIC	MeOH	3 – 15 %	11 min (10 min Anstieg + 1 min Plateau)
		2 – 15 %	
		1 – 15 %	
		1 – 10 %	
		1 – 7 %	

3.3.5. Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie stellt ein hocheffizientes chromatographisches Trennverfahren dar, das vor allem in der analytischen Chemie zur Analyse flüchtiger, organischer Verbindungen herangezogen wird. Die mobile Phase bei der GC besteht aus einem inerten Trägergas wie z.B. Stickstoff, Wasserstoff, Argon, Helium oder Kohlenstoffdioxid. Die flüchtigen Analyten werden im Strom des Trägergases an der stationären Phase vorbeigetragen. Die stationäre Phase besteht, je nach GC-Typ aus unterschiedlichen Substanzen. Bei der GC mit gepackter Säule dienen feste und poröse Kieselgur Teilchen mit kleinem Durchmesser (150-250 µm) als stationäre Phase, während bei der Kapillar-GC die Innenwand der Quarzglas Kapillaren mit einem dünnen immobilen Flüssigkeitsfilm versehen ist. Je nach gewünschter Polarität der stationären Phase kann dieser aus Verbindungen mit CN-, C=O- und OH-Gruppen (für polare Analyten) oder aus Silikonölen und Kohlenwasserstoffen (für unpolare Analyten) bestehen. Zu den Vorteilen der GC zählen unter anderem die sehr hohe Trennleistung und die niedrige Nachweisgrenze. Zudem können durch die Kopplung mit einem Massenspektrometer wertvolle Strukturinformationen gewonnen werden. Der größte Nachteil besteht darin, dass die zu analysierenden Verbindungen leicht flüchtig oder verdampfbar sein müssen und sich bei der Verdampfung nicht zersetzen dürfen. Dies bedeutet, dass nur etwa ein Fünftel aller organischen Verbindungen sich für die Analyse mittels GC eignet. Für die Analyse nicht flüchtiger Verbindungen, bedarf es einer aufwendigen Probenaufbereitung, um die Analyten mittels Derivatisierung in flüchtige Substanzen zu überführen, sofern dies möglich ist. Die GC kann mit einer Vielzahl an Detektoren gekoppelt werden, wovon das Massenspektrometer und der Flammenionisationsdetektor (FID) die gängigsten sind. Durch den geringen Trägergasfluss kann die GC auch direkt mit einem MS gekoppelt werden, da der geringe Fluss das Hochvakuum im MS nicht beeinträchtigt (Gey M., 2021).

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde der PE-Extrakt B (Ansatz B, siehe Seite 5) dankenswerterweise von Mag. pharm. Dr. Stefan Brenner MSc, Kontrollleiter des chemisch pharmazeutischen Laboratoriums der Österreichischen Apothekerkammer, mittels GC-MS und GC-FID analysiert. Dieses Labor besitzt eine Reihe von Fettsäuren als Vergleichssubstanzen bzw. kann auf eine selbst etablierte Datenbank zurückgreifen, mit Hilfe derer die gängigsten Fettsäuren identifiziert werden können.

Die Probenvorbereitung für beide Experimente verlief analog. Es wurden 75 mg des PE-Extrakts in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen mit Glasstopfen überführt und unter Schütteln und Erhitzen (50°C – 60°C) in 2 ml TBME (Butylmethylether, tertiär) gelöst. Anschließend wurde der noch warmen Mischung 1 ml Natriummethylatlösung (0,54 g Natriummethylat gelöst in 20,0 ml Methanol) zugesetzt. Die Mischung wurde warm gehalten und mindestens 5 min lang geschüttelt, ehe sie mit 5 ml destilliertem Wasser versetzt, 30 s kräftig geschüttelt und 15 min zentrifugiert wurde. Ein Teil der organischen Phase wurde mit drei Teilen einer Mischung aus TBME + Heptan (2+1) versetzt und gut gemischt. Ein Teil der fertigen Mischung wurde in ein Vial abgefüllt und der GC zugeführt.

Tabellen 15 und 16 (Seite 20) stellen die verwendeten Parameter und Temperaturgradienten für die GC-MS Messung des PE-Extrakts B (siehe Seite 5) dar, während die Parameter der GC-FID Messung in den Tabellen 17 und 18 (Seite 21) ersichtlich sind.

Tabelle 15: Chromatographische Parameter für die GC-MS-Analyse des Petrolether-Extrakts B (Ansatz B, Seite 5)

Säule	TG-5MSSil 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm
Flussrate und mobile Phase	1 ml/min Helium (Qualität 5.0)
Injektionsvolumen	1,0 µl
Injektortemperatur	250°C
Split-Ratio	1:150
Ionen-Quelle Temperatur	250°C
Ionisations-Modus	EI (Elektronen-Ionisation)
Auflösung	30.000
Scan Bereich	40-400 m/z
Polarität	Positiv

Tabelle 16: Temperaturprogramm für die GC-MS Analyse des Petrolether-Extrakts B (Ansatz B, Seite 5)

Retentionszeit [min]	Rate [°C/min]	Zielwert [°C]	Haltezeit [min]
0,000			
1,000	0,00	50,0	1,00
5,000	25,00	150,0	0,00
50,000	2,67	270,0	5,00

Tabelle 17: Chromatographische Parameter für die GC-FID-Analyse des Petrolether-Extrakts B (Ansatz B, Seite 5)

Säule	ZB-WAX 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm ArtNr.7KG-G007-11
Flussrate und mobile Phase	30 cm/s Constant Linear Velocity He (Qualität 5.0)
Injektionsvolumen	1,0 µl
Injektortemperatur	250°C
Split-Ratio	1:50
Detektor-Temperatur	270,0°C
Constant Linear Velocity	30,0 cm/s
Standard	FAME Mix (FAME-37) ANr. CRM47885

Tabelle 18: Temperaturprogramm für die GC-FID Analyse des Petrolether-Extrakts B (Ansatz B, Seite 5)

Retentionszeit [min]	Rate [°C/min]	Zielwert [°C]	Haltezeit [min]
0,000			
1,000	0,00	50,0	1,00
3,500	40,00	150,0	0,00
38,500	2,86	250,0	15,00

3.4. Lösungsmittel und Chemikalien

In den Tabellen 19 und 20 (Seite 22) sind die in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien aufgelistet.

Tabelle 19: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Spezifikation	Hersteller	Standort
Aceton	Aceton Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Acetonitril	Acetonitril HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Ameisensäure	Ameisensäure Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe
Ethanol	Ethanol HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Ethylacetat	Ethylacetat Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
n-Hexan	Hexane (mixture of isomers) HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Isopropanol	2-Propanol HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Methanol	Methanol HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Petrolether	Petrolether ÖAB	destilliert	Wien
Wasser	doppelt destilliertes Wasser	Deionisiertes Wasser, destilliert mit GFL 2004	Wien

Tabelle 20: Verwendete Festsubstanzen

Substanz	Hersteller	Standort
Ammoniumacetat	Merck	Darmstadt
Ammoniumformiat	VWR BDH Prolabo	Wien

4. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Masterarbeit dargestellt. Der erste Teil befasst sich mit der Extraktion und Fraktionierung des PE-Extrakts. Im zweiten Teil stehen die unterschiedlichen analytischen Methoden zur Untersuchung der Fraktion 7 sowie eine GC-Analyse des Petrolether-Extrakts B im Mittelpunkt.

4.1. Extraktion des Öls

Um das fette Öl aus den Früchten von *Sambucus racemosa* L. zu gewinnen, wurden diese, wie in Kapitel 3.1. (siehe Seite 4) beschrieben, gepresst und von den Samen befreit, ehe der Rohsaft weiterverarbeitet wurde. Es wurden zwei Ansätze durchgeführt (siehe Kapitel 3.2., Seite 4), welche sich nur darin unterschieden, dass der Rohsaft in Ansatz B vor der Extraktion mit Hitze behandelt und in Ansatz A ohne thermische Behandlung weiterverarbeitet wurde. Die eigentliche Extraktion der Öl-Saft-Emulsionen (nicht-hitzebehandelt bzw. hitzebehandelt) erfolgte mittels PE am Magnetrührer, wobei zuerst eine gelbgefärbte PE-Phase erhalten wurde (siehe Abbildung 3, Seite 23). Der PE wurde nach dem Filtrieren mittels Druckluft über Nacht abgeblasen und die gewonnenen Extrakte (Petrolether-Extrakt A und Petrolether-Extrakt B) in tarierte Probengläschen überführt. Beide Extrakte zeigten eine tiefgelbe bis orange Farbe (siehe Abbildung 3, Seite 23) und hatten einen milden Geruch. Bei Lagerung im Kühlschrank kommt es zur Bildung von Kristallen, die sich bei Raumtemperatur schnell wieder auflösen. Die Ansätze A und B zeigten unterschiedliche Ausbeuten, wobei Ansatz B (mit thermischer Behandlung) eine höhere erzielte. Die entsprechenden Ausbeuten sind in Tabelle 21 (Seite 24) aufgeführt, während Diagramm 3 (Seite 24) eine grafische Gegenüberstellung der Ausbeuten der beiden Ansätze zeigt.

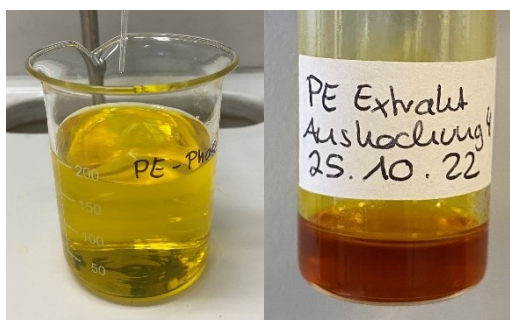


Abbildung 3: Petrolether-Extrakt B: Gelbgefärbte PE-Phase, gewonnen bei der Extraktion der Öl-Saft-Emulsion mit PE am Magnetrührer (links) und orangefarbener PE-Extrakt (rechts) nach dem Entfernen des PE

Tabelle 21: Gewinnung der Petrolether-Extrakte A und B, Ausbeuten der jeweiligen Ansätze (siehe Kapitel 3.2., Seite 4 und 5) bei der Extraktion der Öl-Saft-Emulsion mit Petrolether

Ansatz	Ausbeute [g]	Rohsaft [ml]
A (direkte Extraktion der Öl-Saft-Emulsion ohne Hitzebehandlung)	0,57	200
B (Hitzebehandlung der Öl-Saft-Emulsion vor der Extraktion)	1,06	220

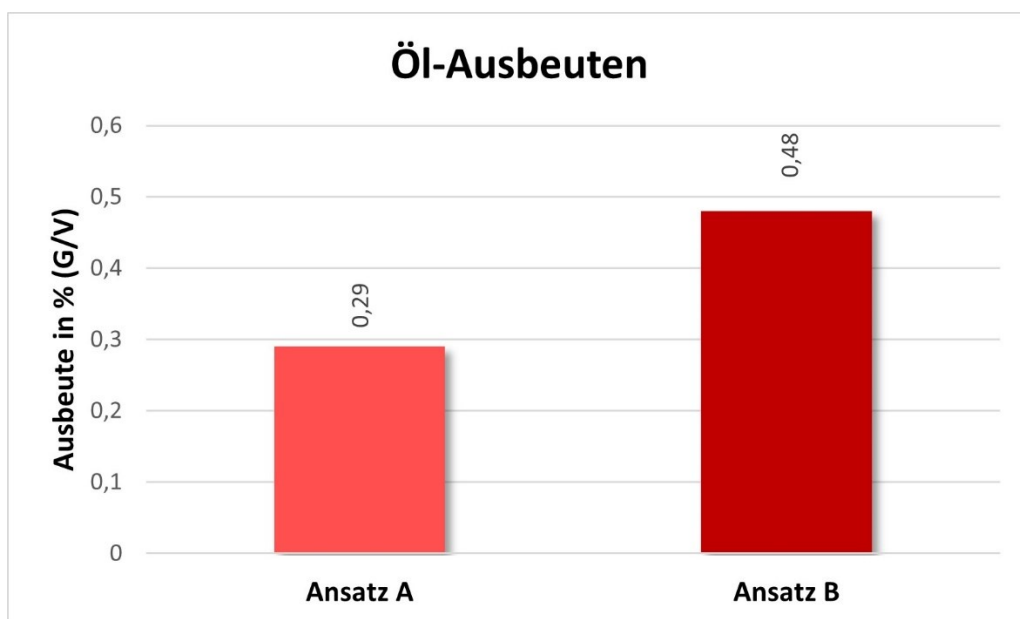
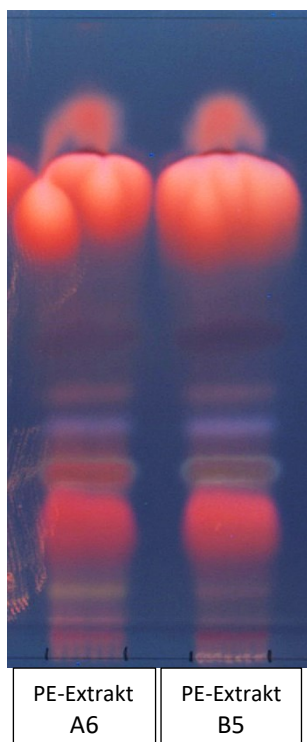


Diagramm 3: Grafische Gegenüberstellung der Ausbeuten der Ansätze A und B (siehe Tab. 21), Ausbeute angegeben in % (G/V) bezogen auf die eingesetzte Menge an Rohsaft



Wie in Diagramm 3 ersichtlich ist, scheint eine thermische Behandlung des Rohsaftes vor der Extraktion eine höhere Ausbeute an PE-Extrakt zu erzielen. Da der DC-Vergleich (siehe Abbildung 4, Seite 24) keine signifikanten Unterschiede im Fingerprint der beiden PE-Extrakte A und B erkennen lässt, ist davon auszugehen, dass die thermische Belastung die Zusammensetzung des PE-Extrakts nicht beeinflusst.

Abbildung 4: DC-Untersuchung der gewonnenen PE-Extrakte A und B (siehe Tab. 21 und Diagramm 3, Seite 24)

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7

Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)

Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

4.2. Fraktionierung mittels HPLCC

Um eine genauere Analyse der Zusammensetzung des PE-Extrakts zu ermöglichen, wurde eine Fraktionierung durchgeführt. Aufgrund der in Kapitel 3.3.2. (Seite 8) erwähnten Vorteile der High Performance Counter Current Chromatography wurde diese zur Durchführung der Fraktionierung gewählt.

4.2.1. Auswahl der geeigneten HEMWat Systeme

Um eine optimale Auftrennung zu erreichen, bestand der erste Schritt in der Auswahl eines geeigneten HEMWat Systems. Hierfür wurden neun verschiedene Systeme, bestehend aus unterschiedlichen Mischungen von n-Hexan, EtOAc, MeOH und Wasser, getestet (siehe Tabelle 4, Seite 9), indem Ausschüttelversuche im Kleinmaßstab durchgeführt wurden (siehe Kapitel 3.3.2., Seite 8). HEMWat System 28 zeigte die beste Verteilung der Analyten zwischen Ober- und Unterphase (siehe Abbildung 5, Seite 26). Da HEMWat Systeme 26 und 27 ebenfalls eine Verteilung der Analyten in die polare Unterphase zeigten, wurden schließlich Systeme 28, 27 und 26 für eine Gradientenelution gewählt.

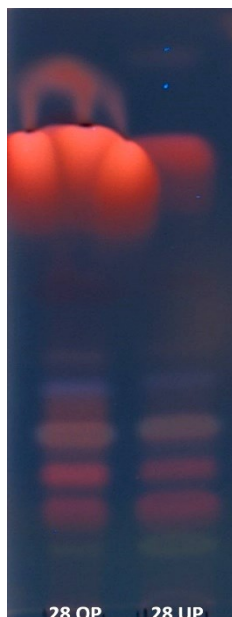


Abbildung 7: DC-Untersuchung der Ober- und Unterphasen (OP, UP) von HEMWat System 28 (siehe Tab. 8, Seite 11)

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

4.2.2. Fraktionierung

Nach der Auswahl der geeigneten HEMWat Systeme wurde zunächst eine analytische HPCCC mit den in Tabelle 7 (Seite 10) beschriebenen Parametern durchgeführt. Dabei wurden 124 Fraktionen gesammelt, die mittels GeneVac eingedampft wurden, ehe sie zum Zwecke der DC Untersuchung in PE aufgenommen wurden. Alle 124 Fraktionen wurden mittels DC untersucht (siehe Tabelle 2, Seite 7), wobei sich eine gute Verteilung der Analyten auf die einzelnen Fraktionen zeigte. Anschließend wurden vier weitere HPCCC Läufe im präparativen Modus (siehe Tab. 8, Seite 11) durchgeführt, bei denen insgesamt 528 Fraktionen gesammelt wurden. Diese wurden ebenfalls mittels GeneVac eingedampft, in PE aufgenommen und mittels DC auf ihre Zusammensetzung überprüft. In Abbildung 6, Seite 27, ist exemplarisch das Dünnschichtchromatogramm des 3. präparativen Laufs dargestellt, die Chromatogramme der anderen Läufe im Appendix, Abbildungen A1 bis A20, Seite 48 bis 57, zu finden. Hierbei zeigten die Fraktionen aller HPCCC Läufe eine sehr ähnliche Zusammensetzung, was für eine hohe Reproduzierbarkeit spricht.

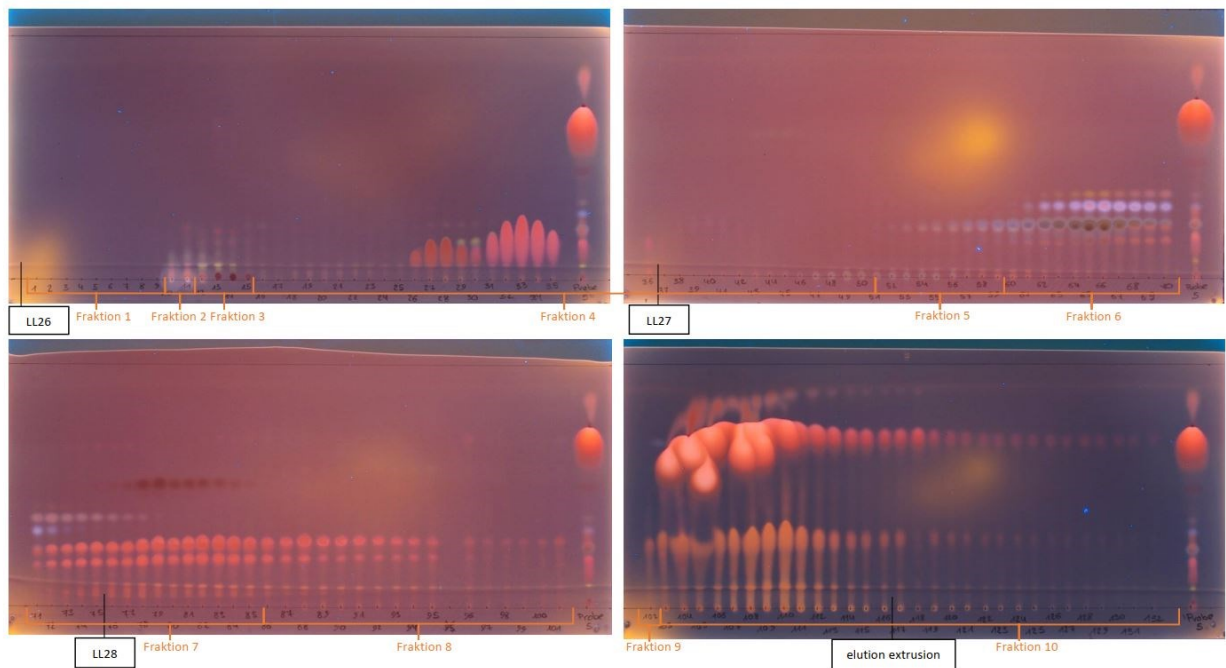


Abbildung 8: DC-Untersuchung der gesammelten Fraktionen des 3. präparativen HPLC Laufs (siehe Tab. 8, Seite 11)

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7

Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)

Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

LL = lower layer, Unterphase (beschreibt die Zusammensetzung der mobilen Phase zu dem entsprechenden Zeitpunkt während des HPLC Laufs)

Wie Abbildung 6 (Seite 27) zeigt, erreicht der gewählte Gradient eine gute Auftrennung der Analyten auf die einzelnen Fraktionen. Die in PE gelösten Fraktionen mit einem ähnlichen Fingerprint wurden vereinigt und in ein tariertes Probengefäß übergeführt, ehe der PE abgeblasen wurde. So wurden schlussendlich 10 Fraktionen erhalten.

Die einzelnen Ausbeuten sowie das Chromatogramm der gesammelten Fraktionen sind in Abbildung 7 auf Seite 28 ersichtlich. Wie in Abbildung 7 gut zu sehen ist, bildet Fraktion 10 den mit Abstand größten Teil des PE-Extrakts B. Wegen der hohen Lipophilie und der öligen Konsistenz der Fraktion, wird davon ausgegangen, dass sie zu großen Teilen aus Triglyceriden besteht. Es bestand die Vermutung, dass die Triglyceride gegen Ende der Fraktionierung eluierten bei geringster Polarität der mobilen Phase. Fraktion 7 hingegen befindet sich im Mittelfeld der Fraktionen und lieferte eine respektable Ausbeute, weshalb der Fokus weiterer Analysen auf Fraktion 7 gelegt wurde.

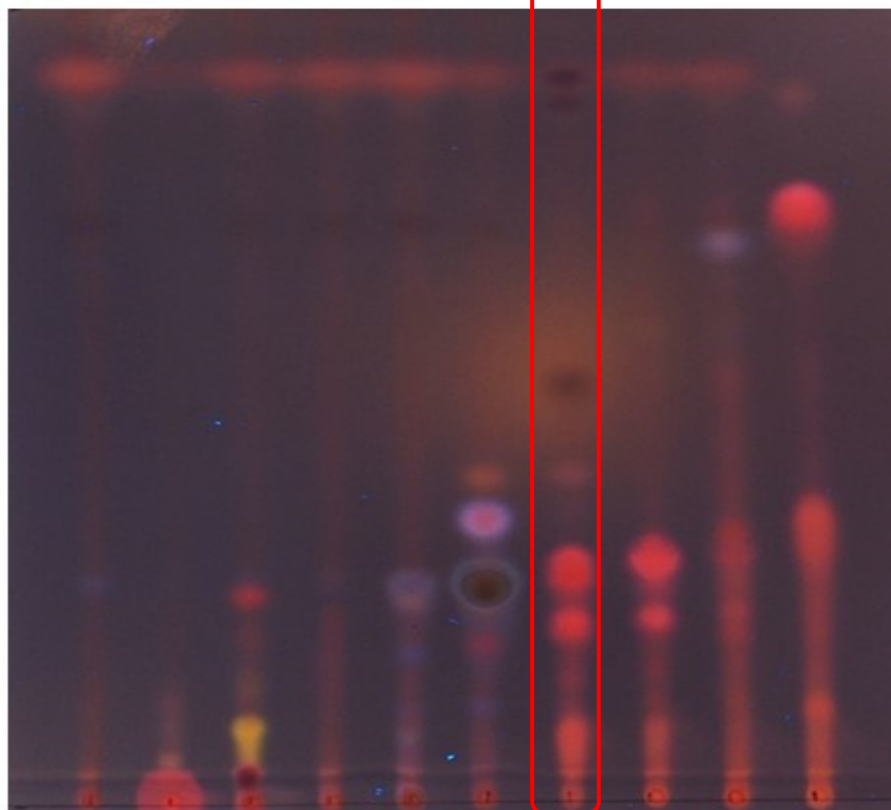
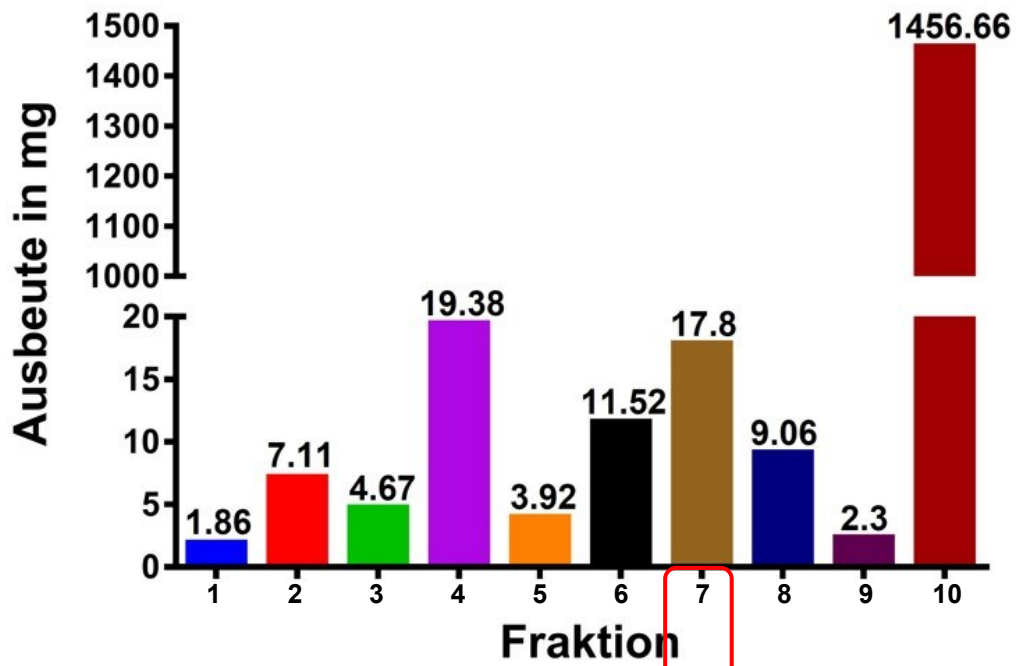


Abbildung 9: DC-Untersuchung der vereinigten Fraktionen resultierend aus der präparativen HPLC (siehe Abb. 6, Seite 27) inklusive entsprechender Ausbeute in mg

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7

Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)

Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

4.3. Analyse von Fraktion 7

Dieses Kapitel bietet einen Überblick über die Analyse von Fraktion 7 (siehe Abb. 7, Seite 28) mittels HPLC, UHPSFC und GC. Zudem wird die Methodenoptimierung der UHPSFC-Analyse erläutert.

4.3.1. HPLC

Da die HPLC eine etablierte und unkomplizierte Analysenmethode mit einfacher Probenvorbereitung darstellt, wurde sie für erste Versuche zur Analyse von Fraktion 7 herangezogen. Die Probe wurde, wie in Kapitel 3.3.3. (Seite 12) beschrieben, vorbereitet und mittels HPLC untersucht. Der Fließmittelgradient der mobilen Phase kann Diagramm 1 auf Seite 13 entnommen werden. Die Detektion mittels PDA-Detektor und ELSD zeigte jedoch, dass diese Methode nicht zu einer Auftrennung der Inhaltsstoffe führte, sondern alle Analyten als ein großer Peak gegen Ende der Analyse eluierten (siehe Abbildung 8, Seite 29). Das legte nahe, dass der apolare Charakter der Probe keine zufriedenstellende Analyse auf einer RP-18e Säule zulässt und eine besser geeignete Analysenmethode gefunden werden musste.

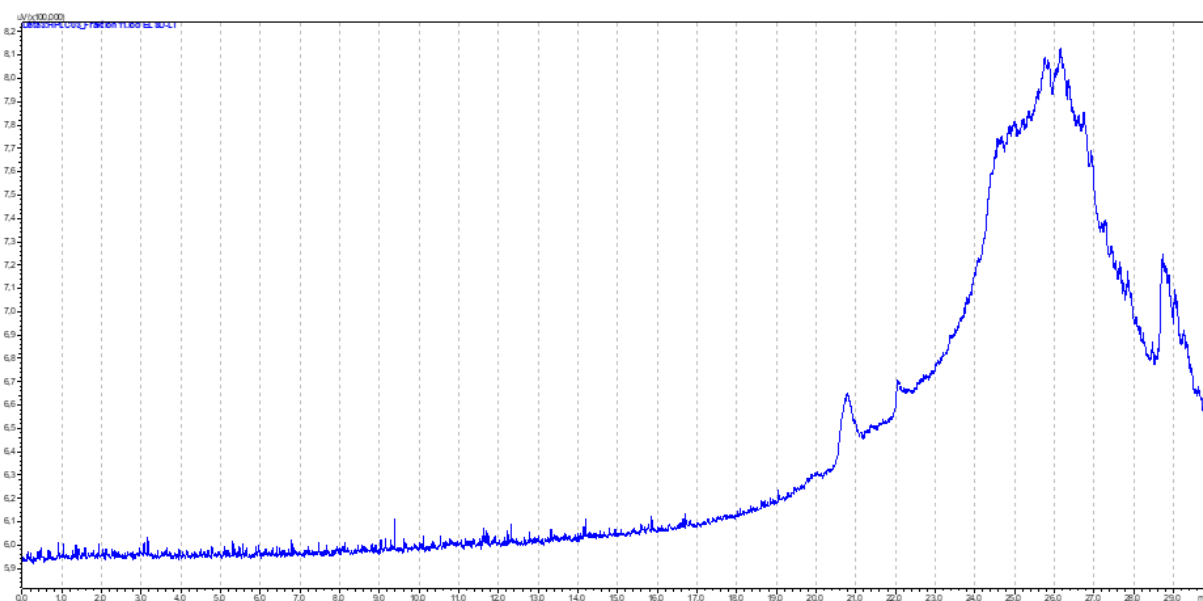


Abbildung 10: Analyse von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) mittels HPLC, Detektion: ELSD, HPLC-Methode siehe Tab. 9 und Diagramm 1, Seite 13

4.3.2. UHPSFC

Aufgrund der in Kapitel 3.3.4. (Seite 14) bereits erwähnten Vorteile der UHPSFC und der apolaren Eigenschaften der Probe, wurden weitere Analysen der Fraktion 7 mittels AQUITY UPC² durchgeführt. Der erste Schritt zur Erarbeitung einer geeigneten Methode war es, die verfügbaren stationären Phasen auf ihre Trennleistung zu überprüfen. Hierfür wurde Fraktion 7 in Hex:IPA (70:30) gelöst und mit sechs verschiedenen stationären Phasen (CSH-Fluoro-Phenyl, 1-AA, Silica-2-EP, BEH-2-EP, 2-PIC, BEH) analysiert (siehe Tabelle 12, Seite 17). Es wurde ein steiler Modifier-Gradient von 0-50% MeOH gewählt (siehe Tabelle 12, Seite 17). Die Detektion erfolgte mittels PDA bei einer Wellenlänge von 220 nm (siehe Abbildung 9, Seite 30).

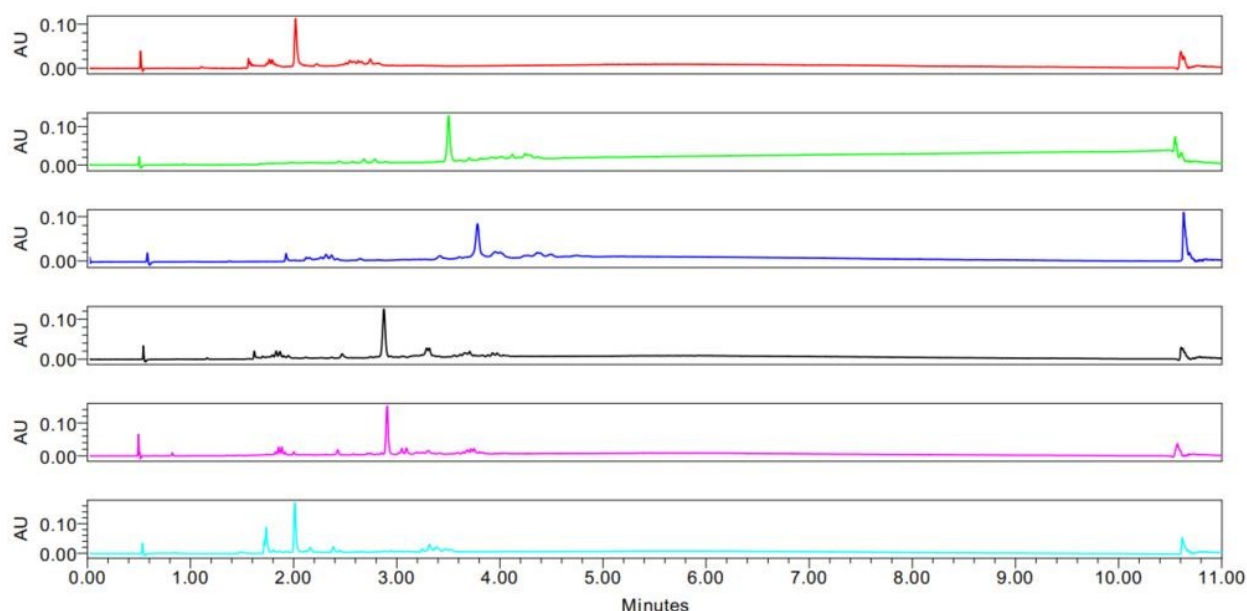


Abbildung 11: Analyse von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) mittels UHPSFC auf verschiedenen stationären Phasen (von oben nach unten: CSH-Fluoro-Phenyl, 1-AA, Silica-2-EP, BEH-2-EP, 2-PIC, BEH), mobile Phase: CO₂ und Methanol, Detektion: PDA 220 nm
UHPSFC Methode: siehe Tabelle 12, Seite 17

Die beste Trennung zeigte die 2-Picolylamin (2-PIC) Säule (siehe Abbildung 10, Seite 31), weshalb die weitere Methodenoptimierung auf dieser stationären Phase durchgeführt wurde.

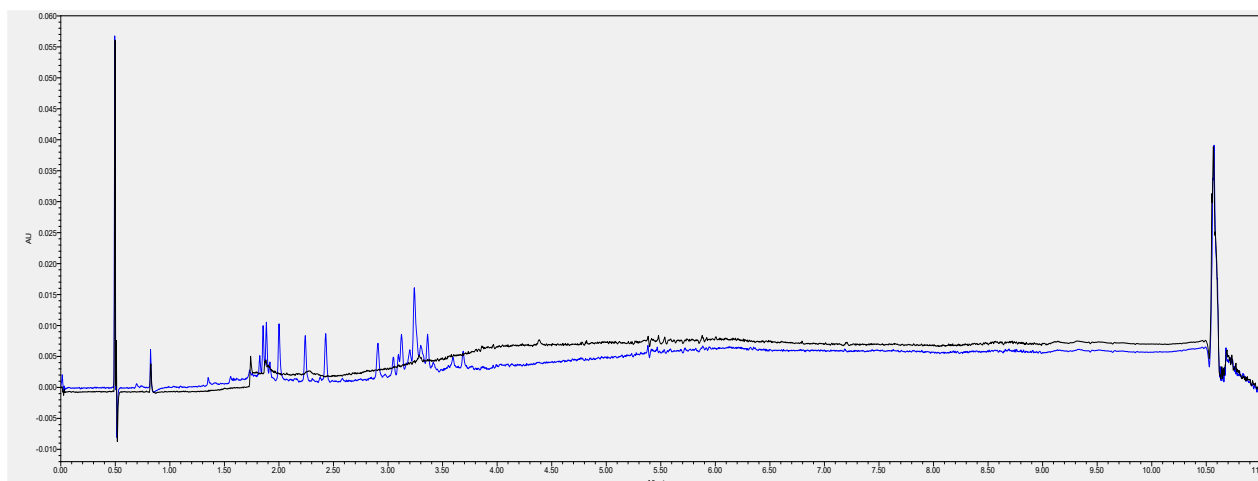


Abbildung 12: Analyse von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) mittels UHPSFC, blaue Linie: Fraktion 7, schwarze Linie: Blank HEX:IPA (70:30), stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und Methanol, Detektion: PDA 220 nm
UHPSFC Methode: siehe Tabelle 12, Seite 17

Der nächste Schritt in der Methodenoptimierung war die Auswahl eines geeigneten Modifiers, um eine optimale Auftrennung der Analyten zu ermöglichen. Da der steile Gradient in den Vorversuchen zur Auswahl der stationären Phase dazu geführt hat, dass sämtliche Analyten sehr früh während der Analyse eluierten, wurde für die weitere Methodenoptimierung ein flacherer Gradient gewählt (siehe Tabelle 13, Seite 17). Es wurden vier verschiedene Modifier überprüft (MeOH, IPA, EtOH, ACN), wobei Methanol und Acetonitril die beste Trennleistung zeigten (siehe Abbildung 11, Seite 32). Für die Detektion wurde der ELSD verwendet, da dieser, wie in Kapitel 3.3.3. (Seite 12) erwähnt, den Vorteil hat, dass er in der Lage ist, auch Analyten ohne ein chromophores System zu detektieren und somit eine größere Breite an Substanzen erfassen kann. Da Acetonitril bei der weiteren Gradientenoptimierung keine reproduzierbaren Ergebnisse zeigte (siehe Abbildung A 21 im Anhang), wurde Methanol als Modifier gewählt.

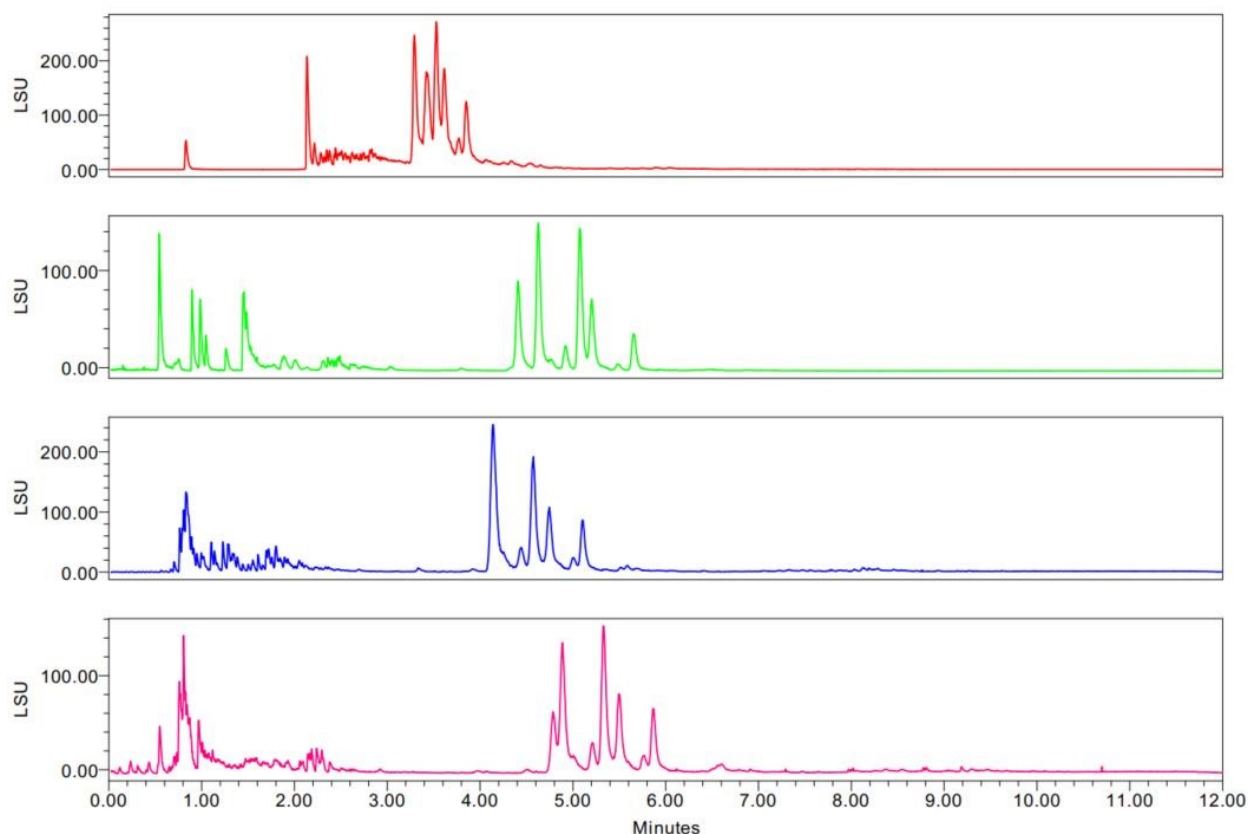


Abbildung 13: Analyse von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) mit UHPSFC, stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und (von oben nach unten) Methanol, Acetonitril, Ethanol, Isopropanol, Detektion: ELSD
UHPSFC-Methode: siehe Tab. 13, Seite 17

Nach der Auswahl des geeigneten Modifiers war der nächste Schritt die Optimierung des Gradienten, um die bestmögliche Auftrennung der Peaks zu erreichen. Hierfür wurde Fraktion 7 in HEX:IPA (70:30) gelöst und mit sechs unterschiedlichen Gradienten (mobile Phase: CO₂ + MeOH, stationäre Phase: 2-PIC) analysiert. Die verwendeten Gradienten sind in Tabelle 14 (Seite 18) angeführt. Die Detektion erfolgte mittels ELSD. Dabei erzielte ein Anstieg der Modifier-Konzentration (MeOH) von 1% auf 7% in 10 min mit einem 1-minütigen Plateau auf 7% die beste Auftrennung der Peaks (siehe Abbildung 12, Seite 33; Methode siehe Tabelle 11 und Diagramm 2, Seite 16).

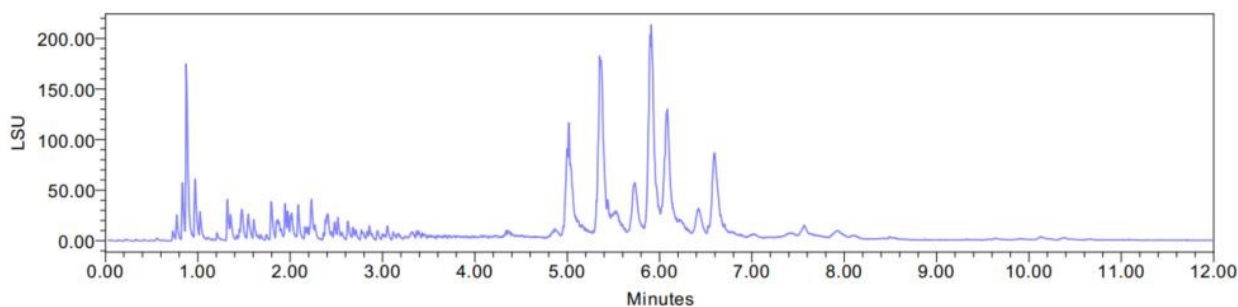


Abbildung 14: Analyse von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) mittels UHPSFC mit optimiertem Modifier-Gradienten, stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und Methanol, Detektion: ELSD
UHPSFC-Methode: siehe Tab. 11 und Diagramm 2, Seite 16

Der nächste und letzte Schritt in der Methodenoptimierung bestand darin, einen geeigneten ISM Zusatz zu finden. Dieser dient, wie in Kapitel 3.3.4. (Seite 14) beschrieben, dazu, dass bei der Detektion mittels MS (WATERS ACQUITY UPC² QDa Detector) die Ionisation der zu erfassenden Substanzen im Elektronenspray verbessert wird. Hierfür wurden vier verschiedene Zusätze getestet:

- MeOH:H₂O (95:5)
- MeOH:H₂O (95:5) + 10 mM Ammoniumformiat (AF)
- MeOH:H₂O (95:5) + 10 mM Ameisensäure (FA)
- MeOH:H₂O (95:5) + 10 mM Ammoniumacetat (AA)

Dabei erzielte MeOH:H₂O (95:5) + 10 mM Ammoniumacetat die beste Auflösung der Peaks im MS (siehe Abbildung 13, Seite 34).

Die optimierte Methode zur Analyse von Fraktion 7 ist in Tabelle 11 auf Seite 16 ersichtlich.

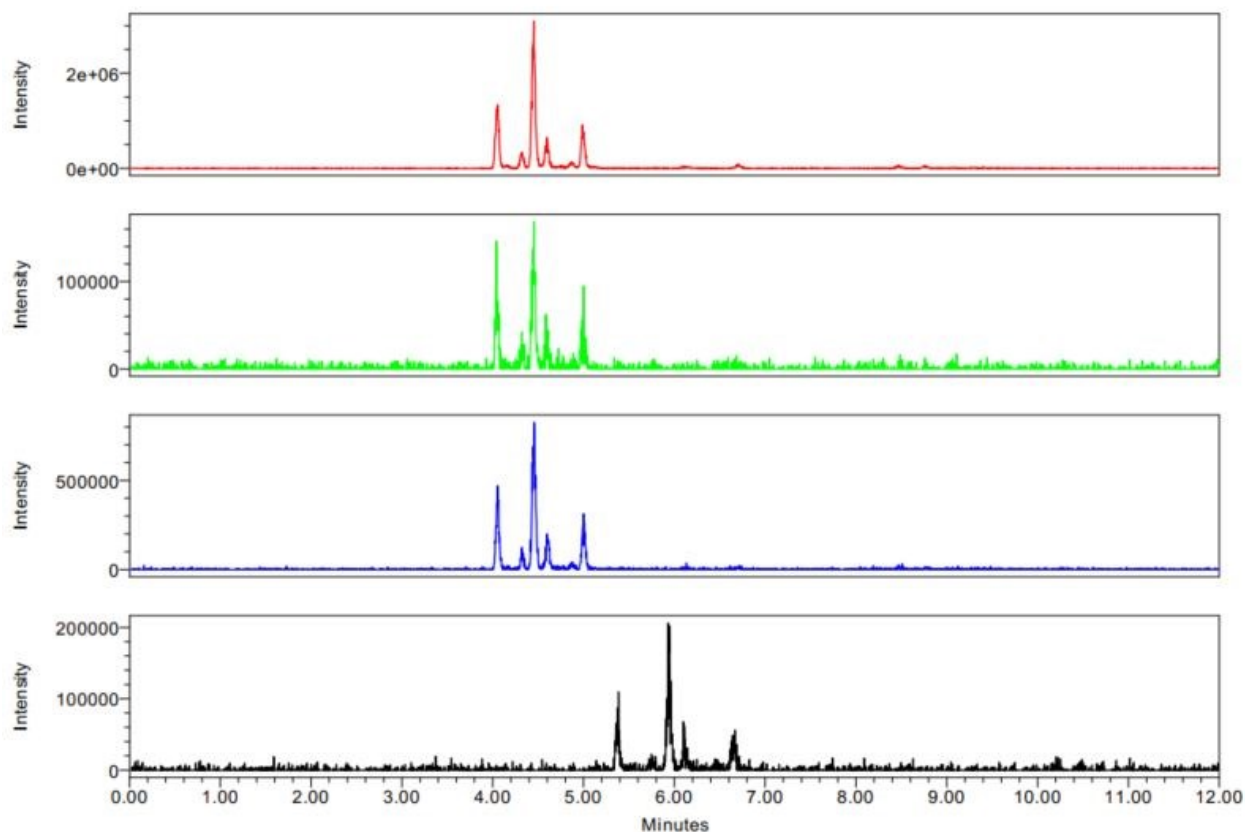


Abbildung 15: Analyse von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) mittels UHPSFC, stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und Methanol, Detektion QDa im Negativ-Modus bei 279,0 Da, ISM-Zusätze von oben nach unten MeOH:H₂O (95:5) + 10 mM AA, MeOH:H₂O (95:5) + 10 mM FA, MeOH:H₂O (95:5) + 10 mM AF, MeOH:H₂O (95:5)

UHPSFC-Methode: siehe Tab. 11 und Diagramm 2, Seite 16

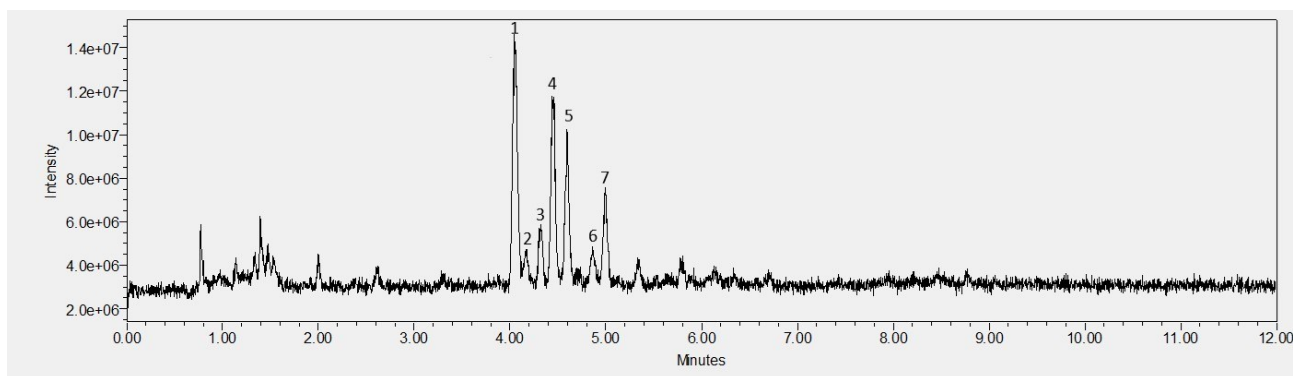


Abbildung 16: Total Ion Current (TIC) Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) aufgenommen mittels QDa im positiven Modus mit AA als ISM-Modifizier
UHPSFC-Methode: siehe Tab. 11 und Diagramm 2, Seite 16

Tabelle 22: Masse/Ladungsverhältnisse der Peaks 1-7 des TIC-Chromatogramms (siehe Abbildung 14) von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) aufgenommen mittels QDa im positiven Modus
UHPSFC-Methode: siehe Tab. 11 und Diagramm 2, Seite 16

Peak	Masse/Ladung Molekülion [m/z]	Masse/Ladung Fragmente [m/z]
1	575,65	-
2	608,67	573,60
3	601,67	-
4	617,71	599,68
5	610,71	575,66
6	636,78	-
7	634,73	-

Die entsprechenden Massenspektren der einzelnen Peaks befinden sich im Anhang (siehe Abbildungen A 22 bis A 28).

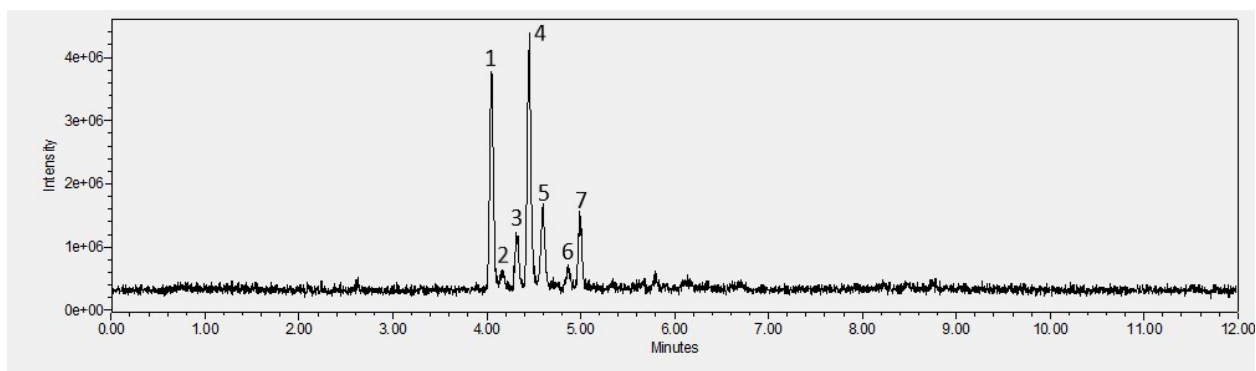


Abbildung 17: Total Ion Current (TIC) Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) aufgenommen mittels QDa im negativen Modus mit AA als ISM-Modifizier
UHPSFC-Methode: siehe Tab. 11 und Diagramm 2, Seite 16

Tabelle 23: Masse/Ladungsverhältnisse der erhaltenen Peaks des TIC-Chromatogramms (siehe Abbildung 15) von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) aufgenommen mittels QDa im negativen Modus
UHPSFC-Methode: siehe Tab. 11 und Diagramm 2, Seite 16

Peak	Masse/Ladung Molekölion [m/z]	Masse/Ladung Fragmente [m/z]
1	279,20	256,24
2	279,24	277,13 256,28
3	281,24	279,20
4	279,20	-
5	279,20	256,21
6	281,21	279,22
7	279,18	-

Die entsprechenden Massenspektren der einzelnen Peaks befinden sich im Anhang (siehe Abbildungen A 29 bis A 35).

4.4. GC-Untersuchung des Petrolether-Extrakts B

Der Petrolether-Extrakt B (siehe Ansatz B, Seite 5) wurde zu weiteren Untersuchungen in das chemisch-pharmazeutische Laboratorium der österreichischen Apothekerkammer geschickt, wo es von Mag. pharm. Dr. Stefan Brenner MSc und seinem Team mittels GC-MS und GC-FID analysiert wurde. Vor der Untersuchung wurde der Petrolether-Extrakt B wie in der Probenvorbereitung in Kapitel 3.3.5. (Seite 19) beschrieben aufgearbeitet, um vorhandene Fettsäuren in ihre jeweiligen Methylester überzuführen und sie so flüchtig zu machen.

Die Ergebnisse des GC-MS Experiments sind in Abbildung 16 und der zugehörigen Tabelle 22 ersichtlich. Wie man sehen kann, wurden sechs verschiedene Fettsäuren mittels GC-MS nachgewiesen:

- Palmitoleinsäure
- Palmitinsäure
- Linolsäure
- Linolensäure
- Ölsäure

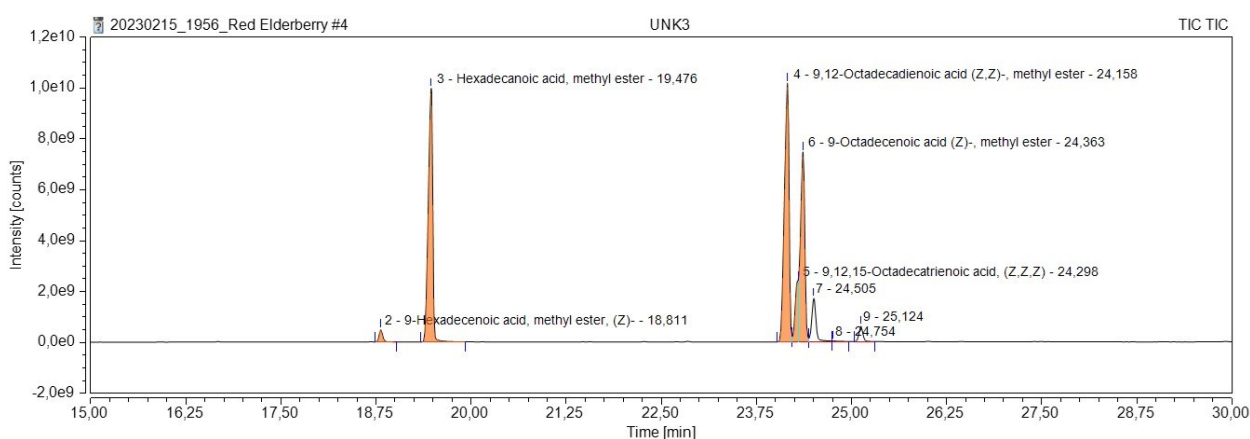


Abbildung 18: GC-MS Chromatogramm vom Petrolether-Extrakt B (siehe Ansatz B, Seite 5)
GC-Methode: siehe Tab. 15, Seite 20

Tabelle 22: Ergebnisse der GC-MS Untersuchung des Petrolether-Extrakts B (siehe Ansatz B, Seite 5),
entsprechendes Chromatogramm in Abbildung 16 (Seite 37) ersichtlich
GC-Methode: siehe Tab. 15, Seite 20

Peak-Name	Substanz	Retentions-Zeit [min]	Rel. Fläche [%]
9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	Palmitoleinsäure, Methylester	18,811	1,21
Hexadecanoic acid, methyl ester	Palmitinsäure, Methylester	19,476	30,24
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	Linolsäure, Methylester	24,158	33,00
9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)	Linolensäure, Methylester	24,298	4,71
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	Ölsäure, Methylester	24,363	23,21

Abbildung 17 und die dazugehörige Tabelle 23 zeigen die bei der GC-FID Untersuchung erhaltenen Ergebnisse.

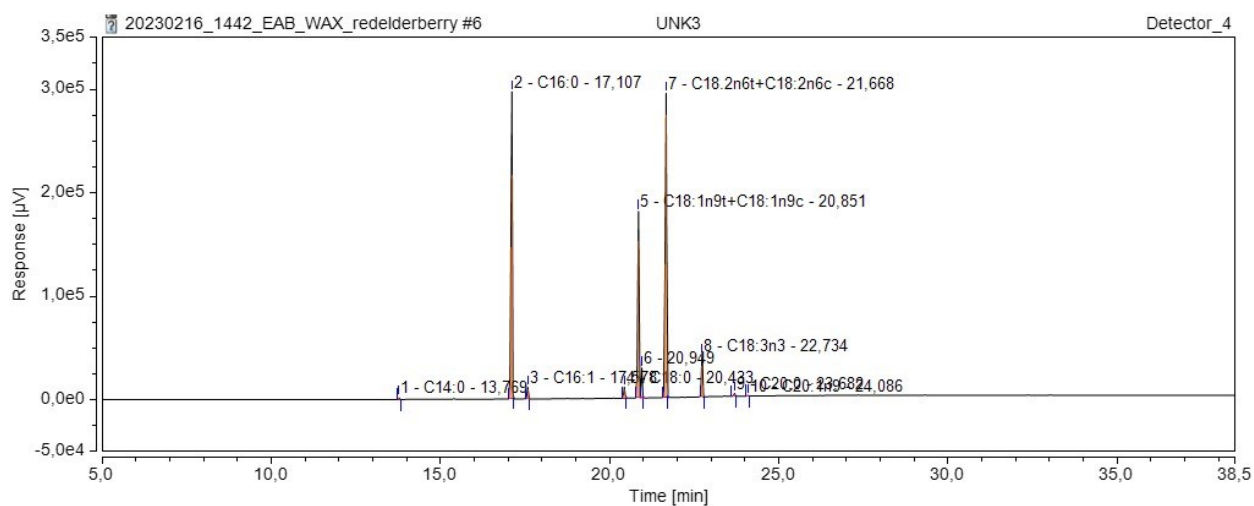


Abbildung 19: GC-FID Chromatogramm des Petrolether-Extrakts B (siehe Ansatz B, Seite 5)
GC-Methode: siehe Tab. 17, Seite 21

Tabelle 23: Ergebnisse der GC-FID Untersuchung des Petrolether-Extrakts B (siehe Ansatz B, Seite 5),
entsprechendes Chromatogramm in Abbildung 17 (Seite 38) ersichtlich
GC-Methode: siehe Tab. 17, Seite 21

Peak-Name	Retentions-Zeit [min]	Rel. Fläche [%]	Zuordnung anhand des Standards FAME Mix (FAME-37) (siehe Tab. 17, Seite 21)
C14:0	13,769	0,18	Myristinsäure
C16:0	17,107	34,87	Palmitinsäure
C16:1	17,578	1,12	Palmitoleinsäure
C18:0	20,433	1,17	Stearinsäure
C18:1n9t+C18:1n9c	20,851	19,53	Ölsäure
C18:2n6t+C18:2n6c	21,668	35,57	Linolsäure
C18:3n3	22,734	4,26	Alpha-Linolensäure
C20:0	23,682	0,36	Arachidonsäure
C20:1n9	24,086	0,09	Gondonsäure

Durch den Vergleich der erhaltenen Retentionszeiten der Analyten aus der Probe mit denen eines bekannten Standards (FAME Mix (FAME-37) ANr. CRM47885), konnten die in Tab. 23 gelisteten Fettsäuren identifiziert werden.

5. Diskussion und Conclusio

Im Zuge dieser Masterarbeit wurde das fette Öl (Petrolether-Extrakt) aus den Früchten von *Sambucus racemosa* L. extrahiert. Traditionell wird das Öl durch Auskochen des gepressten Rohsaftes gewonnen, weshalb zwei verschiedene Ansätze bei der Extraktion verfolgt wurden (Zellner J., 1902). Dabei zeigte sich, dass eine thermische Behandlung des Rohsaftes der Früchte vor der Extraktion mit Petrolether eine deutlich höhere Ausbeute liefert als die Extraktion des unbehandelten Rohsaftes. Dass dies auf eine Aufkonzentrierung des Saftes – durch das Verdampfen des enthaltenen Wassers während des Kochens – zurückzuführen ist, ist ausgeschlossen, da die Ausbeute an Petrolether-Extrakt gerechnet auf aliquote Menge an eingesetztem Rohsaft bei der Methode mit thermischer Behandlung deutlich höher war. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die thermische Behandlung zu einer Beschädigung der Zellwände geführt hat, wodurch vermehrt Öl ausgetreten ist. Die thermische Belastung hat der DC-Untersuchung zufolge keinen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung des Petrolether-Extrakts, was den Schluss zulässt, dass die Hauptinhaltsstoffe thermisch stabil sind. Demnach empfiehlt es sich, diesen zusätzlichen Schritt der thermischen Behandlung bei der Extraktion durchzuführen, um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten. Die HPCCC erwies sich – aufgrund des geringen Verlustes und der einfachen Durchführung – als sehr gut geeignete Methode, um den Extrakt zu fraktionieren, bevor man weitere Analysen durchführt. Der größte Anteil des Petrolether-Extrakts, bei dem angenommen wird, dass er hauptsächlich aus Triglyceriden besteht, konnte mittels dieser Technik abgetrennt werden, was die Analyse der restlichen Fraktionen erleichtert. Zudem zeigte die HPCCC eine hohe Reproduzierbarkeit bei der Gewinnung der Fraktionen (siehe Anhang, Abbildungen A 1 bis A 20), was nicht nur im analytischen sondern auch im semi-präparativen Maßstab ein großer Vorteil ist. Da die fortführende Analyse aller zehn Fraktionen den zeitlichen Rahmen einer Masterarbeit gesprengt hätte, wurden weitere Analysen nur mit Fraktion 7 durchgeführt. Diese Fraktion wurde gewählt, da sie eine hohe Ausbeute zeigte, was ausgiebige Analysen ermöglichte, und sie hinsichtlich ihrer qualitativen Zusammensetzung Ähnlichkeiten mit den nachfolgenden Fraktionen aufwies.

Für die Analyse von Fraktion 7 kam die HPLC zum Einsatz, da das eine sehr universelle Methode ohne aufwendige Probenvorbereitung ist (Gey M., 2021). Hier zeigte sich jedoch

schnell, dass die Auftrennung mittels RP-18e Säule keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefert, da die Analyten mehr oder weniger ungetrennt als großer Peak gegen Ende der Analyse eluierten. Das weist auf eine niedrige Polarität der Analyten hin. Die UHPSFC erwies sich auf Grund der in Kapitel 3.3.4. (Seite 14) erwähnten Vorteile als vielversprechende Alternative, bei der eine größere Auswahl an stationären Phasen zur Verfügung stand. Weitere Analysen wurden daher auf der WATERS ACQUITY UPC² vorgenommen. Bei der Methodenoptimierung zeigte sich, dass der lipophile Charakter der Probe eine sehr apolare Mischung der mobilen Phase mit einem flachen Anstieg des Anteils von Methanol als Modifier benötigt, um eine gute Trennung der Peaks auf einer 2-PIC Säule zu erzielen. Die finale Methode zur Analyse von Fraktion 7 kann als Startpunkt für zukünftige Methodenoptimierungen für Analysen weitere Fraktionen dienen. Weiters wurden mit dieser Methode und der Detektion mittels Massenspektrometer (QDa) die in Tabellen 22 (Seite 35) und 23 (Seite 36) aufgelisteten Massen/Ladungsverhältnisse ermittelt. Bei der Recherche in der SciFinder Datenbank konnten Hinweise gefunden werden, dass einige der im positiven Modus ermittelten Massen möglicherweise auf Anthocyane und Flavonoide zurückzuführen sind. Aufgrund des stark apolaren Charakters des Lösungsmittels Petrolethers, welches zur Extraktion verwendet wurde, ist die Anwesenheit von glykosylierten Anthocyanen und Flavonoiden in Fraktion 7, welche eher im hinteren Mittelfeld der Polarität der Fraktionen liegt, jedoch recht unwahrscheinlich. Peak 3 (Abbildung 14, Tabelle 22, Seite 35) könnte auf ein Xanthin-Derivat hindeuten, was aufgrund der gelblichen Farbe der Fraktion nicht abwegig wäre. Der Massenunterschied von 18 Einheiten zwischen dem Molekülion und dem Fragment von Peak 3 deutet zudem auf die Abspaltung eines Wassermoleküls hin, was ein Hinweis auf das Vorhandensein einer OH-Gruppe ist. Die Differenzen der m/z Werte von Peak 2 und 5 (Abbildung 14, Tabelle 22, Seite 35) zu ihren jeweiligen Fragmenten deuten zudem auf die mögliche Abspaltung eines Chlorid-Ions (35 g/mol) hin. Die im negativen Modus erhaltenen m/z Werte (Tabelle 23, Seite 36) bewegen sich alle von 279 bis 281 und könnten durch die Anwesenheit von Linolsäure (~280 g/mol) in Fraktion 7 erklärt werden. Die Anwesenheit von Linolsäure im Petrolether-Extrakt B konnte durch die GC-Untersuchung des Extraktes nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.4., Seite 37). Um zu untersuchen, ob sich Linolsäure wirklich in Fraktion 7 befindet, wäre eine DC-Untersuchung von Fraktion 7 unter Zunahme von Linolsäure als Referenz erforderlich bzw. die HPLC-Analyse dieser Verbindung. Aufgrund der

kurzen Analysezeiten und simplen Probenvorbereitung, stellt die UHPSFC eine sehr wertvolle Analysenmethode dar.

Vorangegangene Analysen fokussierten sich in erster Linie auf physikalische und chemische Eigenschaften des Öls. So ermittelte Zellner (1902) bei seinen Untersuchungen ein spezifisches Gewicht von 0,9171 und einen Brechungsindex von 1,472. Die Säurezahl liegt laut Zellner (1902) bei 3,15 und die Verseifungszahl bei 196,8. Zudem bestimmte er den Anteil von festen und flüssigen Fettsäuren im Öl. Feste Fettsäuren machen demnach 21% aus und bestehen vor allem aus Palmitinsäure und Arachidonsäure neben einer kleinen Menge einer nicht näher bestimmten Säure mit kleinerem Molekulargewicht. Auf die flüssigen Fettsäuren entfällt ein Anteil von 79%, wobei zwei Drittel davon aus Ölsäure bestehen. Weiters sind Linolsäure und eventuell Oxysäuren enthalten, also Fettsäuren mit mindestens einer Carboxyl- oder Hydroxylgruppe (Zellner, 1902). Matthes H. & Rossié W. (1918) kamen zu vergleichbaren Ergebnissen. Sie bestimmten ein spezifisches Gewicht von 0.9215 und einen Brechungsindex von 1,471. Die Säurezahl beträgt 3,11 und die Verseifungszahl 192,56. Laut Matthes H. & Rossié W. (1918) entfällt auf die flüssigen Fettsäuren ein Anteil von 74%, davon macht Ölsäure den größten Anteil aus mit 55-58% gefolgt von 32% Linolsäure. Zudem konnte, anders als bei Zellner, auch 10% Linolensäure nachgewiesen werden. Die festen Fettsäuren machen einen Anteil von 22% aus (Matthes H. & Rossié W., 1918). Im Zuge dieser Masterarbeit wurde der Petrolether-Extrakt unter Zuhilfenahme der hochsensiblen GC in Kombination mit einem Massenspektrometer und einem Flammenionisationsdetektor untersucht und mittels einer Reihe von bekannten Fettsäuren als Referenzsubstanzen analysiert (siehe Tab. 15 und 16, Seite 20 und Tab. 17 und 18, Seite 21). Dies ermöglichte eine genaue Aufschlüsselung des Fettsäureprofils. So wurden die, schon von Zellner (1902) entdeckten, Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure, Palmitinsäure und Arachidonsäure festgestellt. Weiters wurde die Anwesenheit der von Matthes H. & Rossié W. (1918) gefundenen Linolensäure bestätigt (siehe Tab. 22, Seite 38 und Tab. 23, Seite 39). Den größten Anteil nimmt jedoch die Linolsäure gefolgt von der Palmitinsäure ein (siehe Tab. 22, Seite 38), während die Ölsäure, anders als bei Zellner (1902) und Matthes H. & Rossié W (1918), nur ungefähr ein Viertel ausmacht. Dieser recht große Unterschied lässt sich eventuell durch unterschiedliche Erntezeitpunkte und -orte erklären. Auch der Klimawandel und die steigenden Durchschnittstemperaturen sowie veränderten Witterungsverhältnisse könnten einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Verhältnisse

der Inhaltsstoffe haben. Dennoch empfiehlt es sich aufgrund des großen Unterschieds des Ölsäure-Gehalts, weitere Analysen durchzuführen, um die Ergebnisse zu bestätigen. Weiters wäre eine Bestimmung der physikalischen Eigenschaften angeraten, um zu analysieren, ob sich diese mit den vorangegangenen Ergebnissen von Zellner (1902) und Matthes H. & Rossié W. (1918) decken, oder ob sich Unterschiede aufzeigen. Die effiziente chromatographische Methode und die Verfügbarkeit eines Standards (siehe Tab. 17, Seite 21) ermöglichten zudem die Zuordnung weiterer Fettsäuren, die in kleinerem Ausmaß in dem Petrolether-Extrakt vorhanden sind. So konnten Myristinsäure, Palmitoleinsäure, Stearinsäure und Gondonsäure nachgewiesen werden (siehe Tab. 23, Seite 39).

Im Zuge dieser Arbeit wurden effiziente Methoden zur Extraktion und Fraktionierung des Petrolether-Extrakts erarbeitet. Weiters bietet die Arbeit wichtige Anhaltspunkte für weitere Analysen des phytochemischen Profils. Zur Entschlüsselung der phytochemischen Zusammensetzung des Öls aus den Früchten von *Sambucus racemosa* L. sind dennoch weitere Experimente und die Verwendung zusätzlicher Analysemethoden notwendig. Eine GC-Untersuchung der einzelnen Fraktionen, in erster Linie von Fraktion 10, wäre angeraten, um zu analysieren, ob die im Petrolether-Extrakt B detektierten Fettsäuren sich ebenfalls in dieser Fraktion befinden.

Zusammenfassung

Sambucus racemosa L. ist ein sommergrüner Strauch aus der Familie der Viburnaceae (International Plant Names Index and World Checklist of Vascular Plants). In den Sommermonaten trägt er scharlachrote runde Früchte, die in einer leicht spitz zulaufenden Schirmrispe angeordnet sind, die bei oberflächlicher Betrachtung an eine Traube erinnert, woraus sich die deutsche Bezeichnung Traubenholunder ableitet. Das Fruchtfleisch enthält viel fettes Öl, das volksmedizinisch unter anderem zur Behandlung von grippalen Infekten und verschiedenen Hautkrankheiten eingesetzt wird. Das macht das Öl und die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe besonders interessant für weitere Untersuchungen hinsichtlich wundheilender Wirkung. Die phytochemische Zusammensetzung des Öls ist bis heute jedoch nicht vollständig aufgeklärt, weshalb das Ziel dieser Masterarbeit die Extraktion und Untersuchung der Inhaltsstoffe dieses Öls war.

Hierzu wurden die reifen Früchte ausgepresst und das Öl auf zwei verschiedene Methoden extrahiert. Dabei zeigte sich, dass eine thermische Beeinflussung des Rohsaftes vor der Extraktion zu höheren Ausbeuten führt, ohne die qualitative Zusammensetzung zu verändern. Anschließend folgte die Fraktionierung des Extraktes mittels HPLC, um eine Auftrennung der Analyten zu erreichen. So wurden 10 Fraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung erhalten. Folgende Analysen fokussierten sich auf Fraktion 7, wobei unterschiedliche chromatographische Methoden herangezogen wurden. Im Zuge dieser Arbeit konnte eine optimierte Methode zur Untersuchung von Fraktion 7 mittels UHPSFC entwickelt werden.

Zudem wurde der Petrolether-Extrakt B mittels GC-MS und GC-FID untersucht, was die Anwesenheit verschiedener Fettsäuren (Myristinsäure, Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Alpha-Linolensäure, Arachidonsäure und Gondoensäure) bestätigte.

Zusammenfassend betrachtet lässt sich sagen, dass weitere Untersuchungen hinsichtlich des phytochemischen Profils des Öls vom roten Holunder notwendig sind. Nach der Identifizierung und Isolierung der prominentesten Inhaltsstoffe, können weitere Analysen hinsichtlich der wundheilungsfördernden Eigenschaften vorgenommen werden.

Abstract

Sambucus racemosa L. is a deciduous shrub of the family Viburnaceae (International Plant Names Index and World Checklist of Vascular Plants). During the summer months, the shrub bears bright red fruits, which are arranged in clusters. The pulp contains plenty of fatty oil which has a long history of use in traditional medicine as treatment for respiratory tract infections and various skin diseases. This makes the oil particularly interesting for further investigations of its wound-healing effects and the responsible compounds. However, the phytochemical composition of the oil has not yet been fully elucidated, which is why the aim of this master's thesis was to extract and examine the constituents of this oil.

To achieve this, the ripe fruits were pressed, and the oil was extracted using two different methods. It was shown, that the application of heat to the raw juice before extraction leads to higher yields of the oil. The extract was then fractionated using HPCCC. Ten different fractions were obtained. The following analyses were focused on fraction 7. Various chromatographic methods were applied. In the course of this work an optimized method for investigating fraction 7 using UHPSFC could be developed.

The total extract was also analysed by GC-MS und GC-FID which confirmed the presence of various fatty acids (myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid, arachidonic acid and gondoic acid).

To sum up, further research is needed concerning the phytochemical profile of the red elderberry oil. After identifying the most prominent constituents, further analyses can be done regarding the wound-healing properties.

Literaturverzeichnis

- Applequist, W. L. (2013, June). A brief review of recent controversies in the taxonomy and nomenclature of *Sambucus nigra sensu lato*. In *International Symposium on Elderberry* 1061 (pp. 25-33).
- Byers, H. G., & Hopkins, P. (1902). INVESTIGATION OF THE OIL OF THE RED ELDERBERRY "SAMBUCUS RACEMOSA ARBORESCENS.". *Journal of the American Chemical Society*, 24(8), 771-774.
- Cano, I., Calatayud, V., Cerveró, J., & Sanz, M. J. (2007). Ozone effects on three *Sambucus* species. *Environmental monitoring and assessment*, 128(1-3), 83-91.
- Eisath, N. G., Sturm, S., & Stuppner, H. (2018). Supercritical fluid chromatography in natural product analysis—an update. *Planta medica*, 84(06/07), 361-371.
- Gerlach, S., Saukel, J., Kubelka, W. (2006). Pflanzen in der österreichischen Volksmedizin - die „Volksmed-Datenbank “. *Sci .Pharm.*, 74, S36.
- Gerlach, S. (2007). Wissenschaftliche Reflexionen über traditionelle Arzneimittel in Österreich. PhD thesis, University of Vienna.
- Gey, M. (2021). Instrumentelle Analytik und Bioanalytik : Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen (4th ed. 2021.). Springer Berlin Heidelberg Imprint: Springer Spektrum.
- Goels, T., Eichenauer, E., Langeder, J., Aichner, G. F., Mauser, G., Amtmann, L., ... & Glasl, S. (2022). Ultra high-performance supercritical fluid chromatography for the quantitation of diterpene resin acids in Norway spruce samples. *Frontiers in Pharmacology*, 2172.
- Greger, J. (1921). Über Traubenholunder-Marmelade. *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs-und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände*, 42, 383-384.
- International Plant Names Index and World Checklist of Vascular Plants, <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30056767-2>, abgerufen am 20.06.2023
- Ito, Y. (2005). Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065(2), 145-168.
- Langeder, J., & Grienke, U. (2021). A supercritical fluid workflow for the quality assessment of herbal drugs and commercial preparations from *Rhodiola rosea*. *Phytochemical Analysis*, 32(6), 982-991.

- Langeder, J., Grienke, U., Döring, K., Jafari, M., Ehrhardt, C., Schmidtke, M., & Rollinger, J. M. (2021). High-performance countercurrent chromatography to access *Rhodiola rosea* influenza virus inhibiting constituents. *Planta medica*, 87(10/11), 818-826.
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., & Pauli, G. F. (2015). Solvent system selection strategies in countercurrent separation. *Planta medica*, 81(17), 1582-1591.
- Losey, R. J., Stenholm, N., Whereat-Phillips, P., & Vallianatos, H. (2003). Exploring the use of red elderberry (*Sambucus racemosa*) fruit on the southern Northwest Coast of North America. *Journal of Archaeological Science*, 30(6), 695-707.
- Machatschek, M. (2015) Der Rote oder Trauben-Holunder (*Sambucus racemosa*) liefert ein wertvolles Kernöl und die heilsame Hollersülze. In Machatschek M. (Hrsg.), *Nahrhafte Landschaft 3*, Bohlau Verlag GmbH & Cie, Köln/Wien, S. 189-203.
- Matthes, H. & Rossié, W. (1918). Ueber Holunderbeerenöl. *Archiv der Pharmazie*, 256(1-4), 284-288.
- Motl, O., Stránský, K., Novotný, L., & Ubik, K. (1977). Über die Zusammensetzung des Samenöles aus Traubenholunder (*Sambucus racemosa* L.). *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 79(1), 28-32.
- Skalicka-Woźniak, K., Mroczek, T., Garrard, I., & Głowniak, K. (2012). Isolation of the minor and rare constituents from fruits of *P. eucedanum alsaticum* L. using high-performance counter-current chromatography. *Journal of separation science*, 35(7), 790-797.
- Vervoort, N., Daemen, D., & Török, G. (2008). Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 1189(1-2), 92-100.
- Zellner, J. (1902). Über das fette Öl von *Sambucus racemosa*. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*, 23, 937-941.
- Zellner, J. (1918). Über die fetten Öle von *Sambucus racemosa* L. II. *Mitteilung. Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*, 39, 87-94.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Ammoniumacetat
ACN	Acetonitril
AF	Ammoniumformiat
BSM	Binary Solvent Manager
DC	Dünnschichtchromatographie
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FA	Formic Acid (Ameisensäure)
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HEX	n-Hexan
HEMWat	n-Hexan – Ethylacetat – Methanol – Wasser
HPCCC	High Performance Counter Current Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IPA	Isopropanol
ISM	Isocratic Solvent Manager
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
MeOH	Methanol
MPa	Mega Pascal
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
OP	Oberphase
PDA	Photo Diode Array
PE	Petrolether
QDa	Quadrupol Dalton
TIC	Total Ion Current
U/min	Umdrehungen pro Minute
UHPSFC	Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography
UP	Unterphase

Anhang

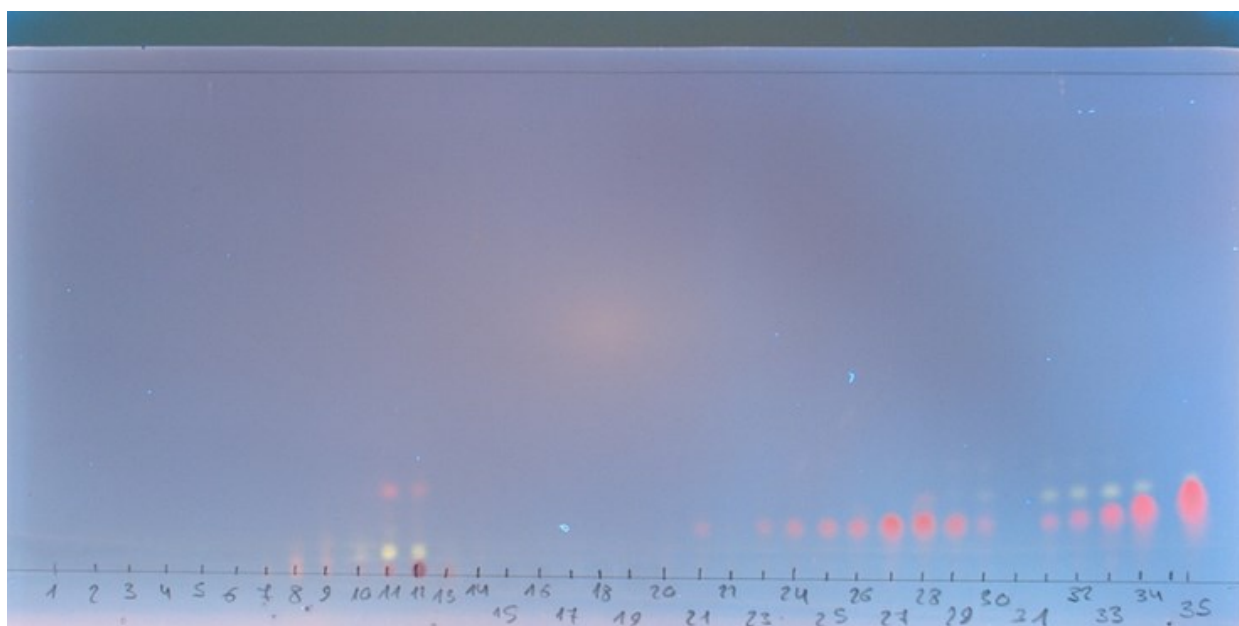


Abbildung A 1: HPCCC Fraktionen 1-35 analytischer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

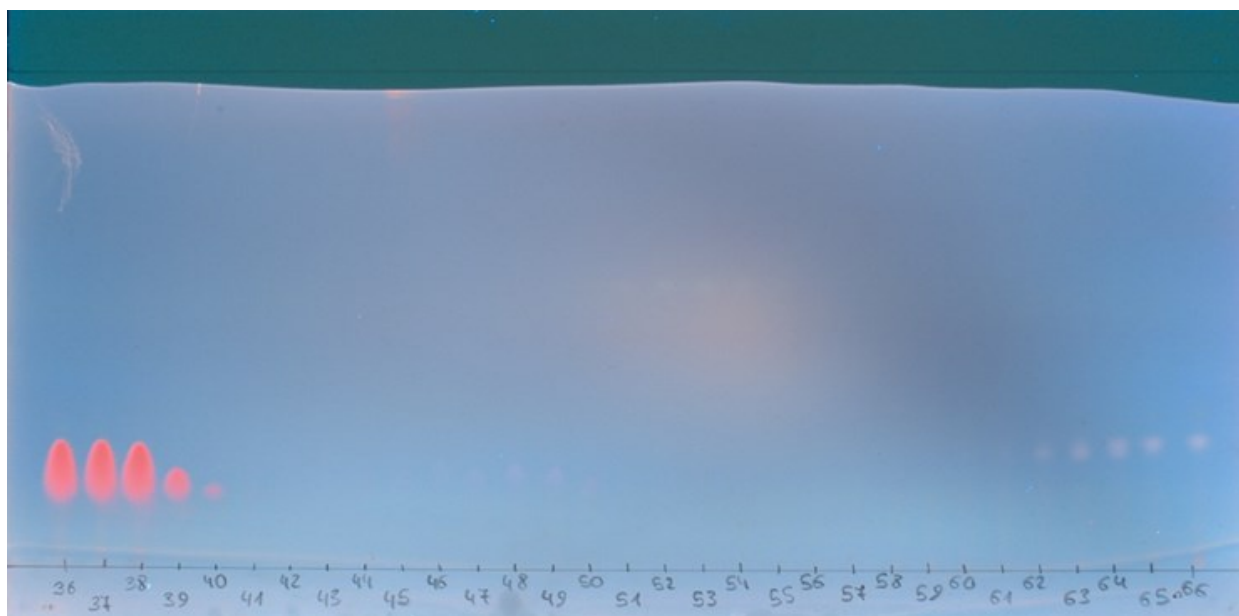


Abbildung A 2: HPCCC Fraktionen 36-66 analytischer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

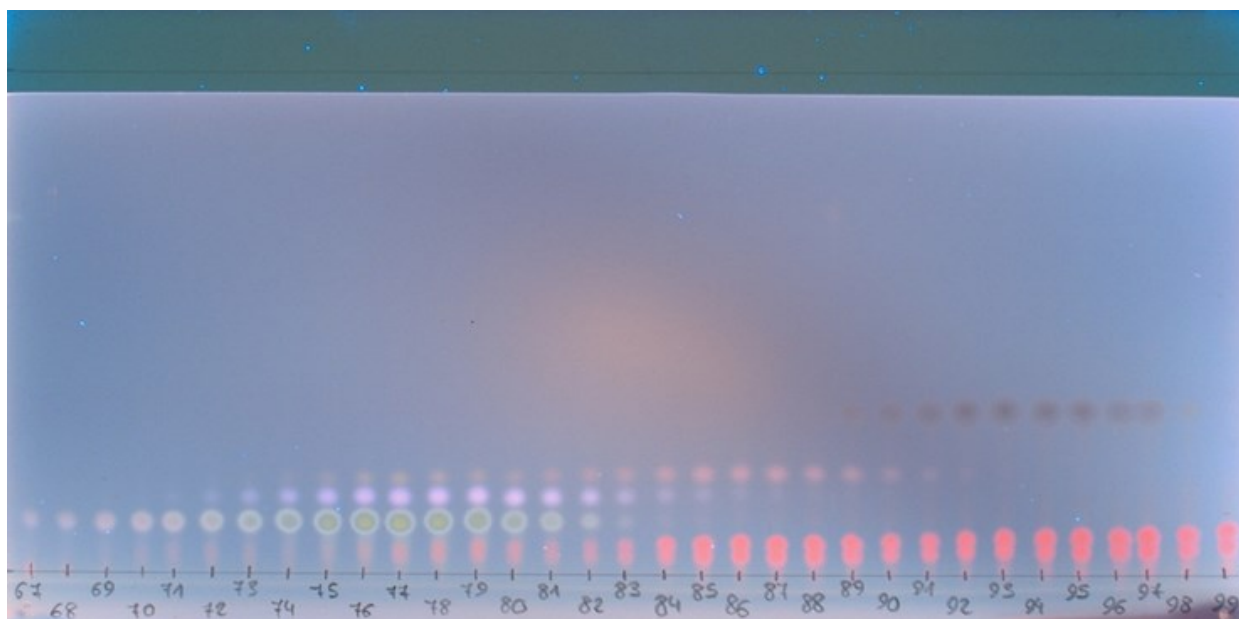


Abbildung A 3: HPCCC Fraktionen 67-99 analytischer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

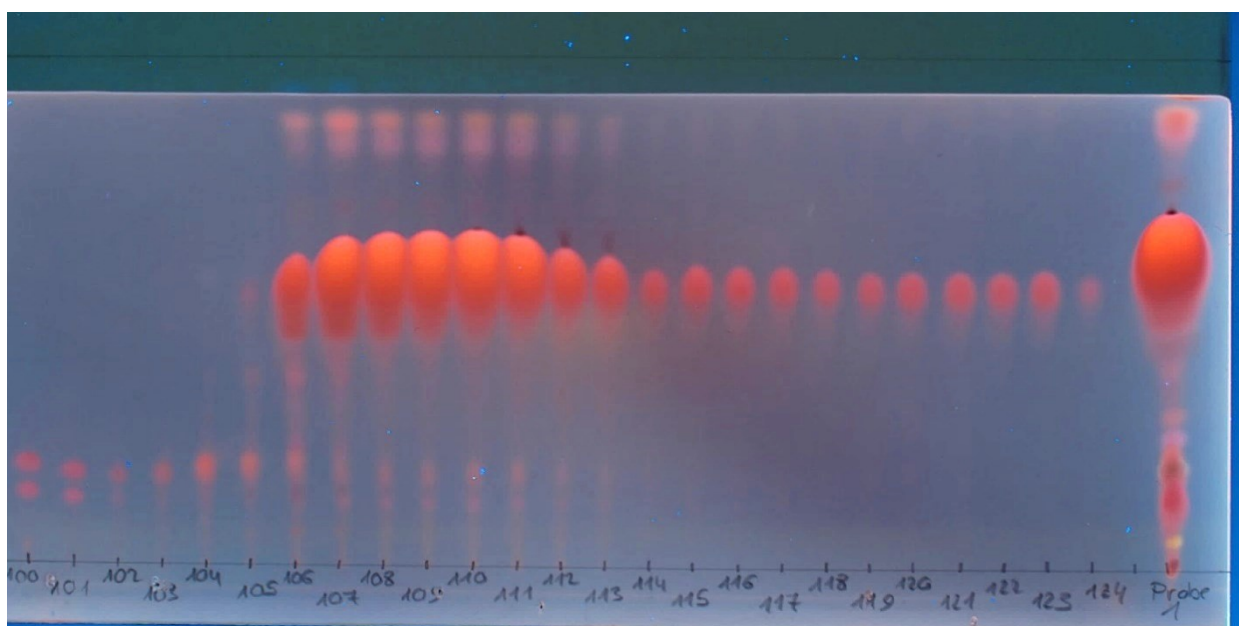


Abbildung A 4: HPCCC Fraktionen 100-124 analytischer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

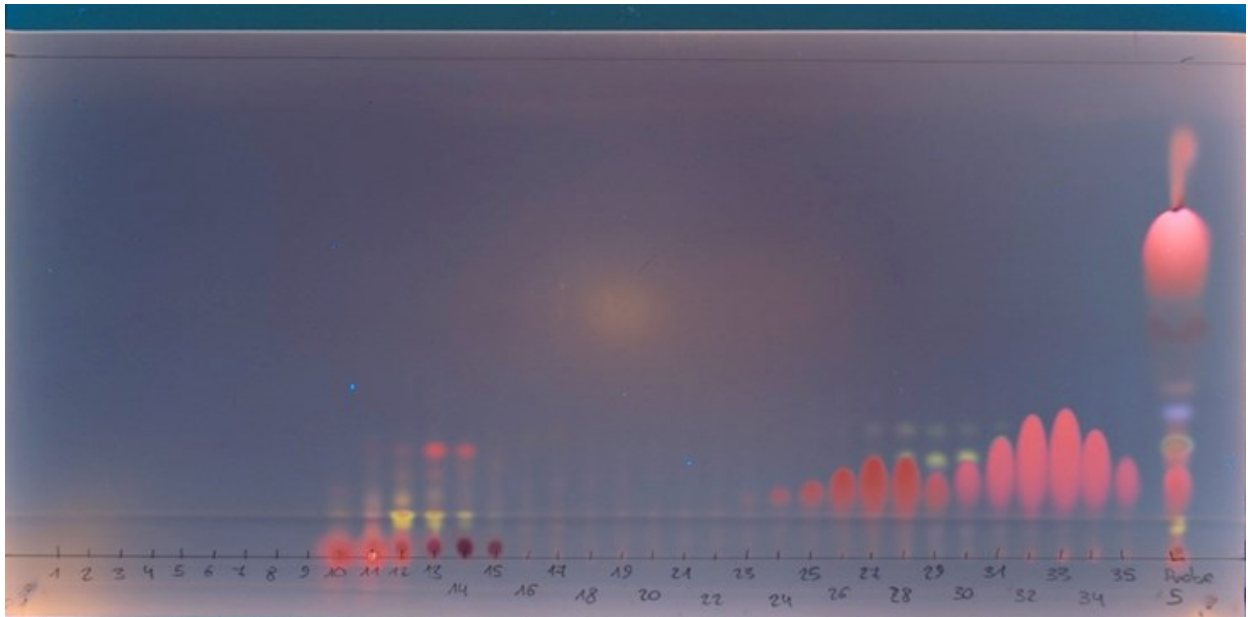


Abbildung A 5: HPCCC Fraktionen 1-35 1. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

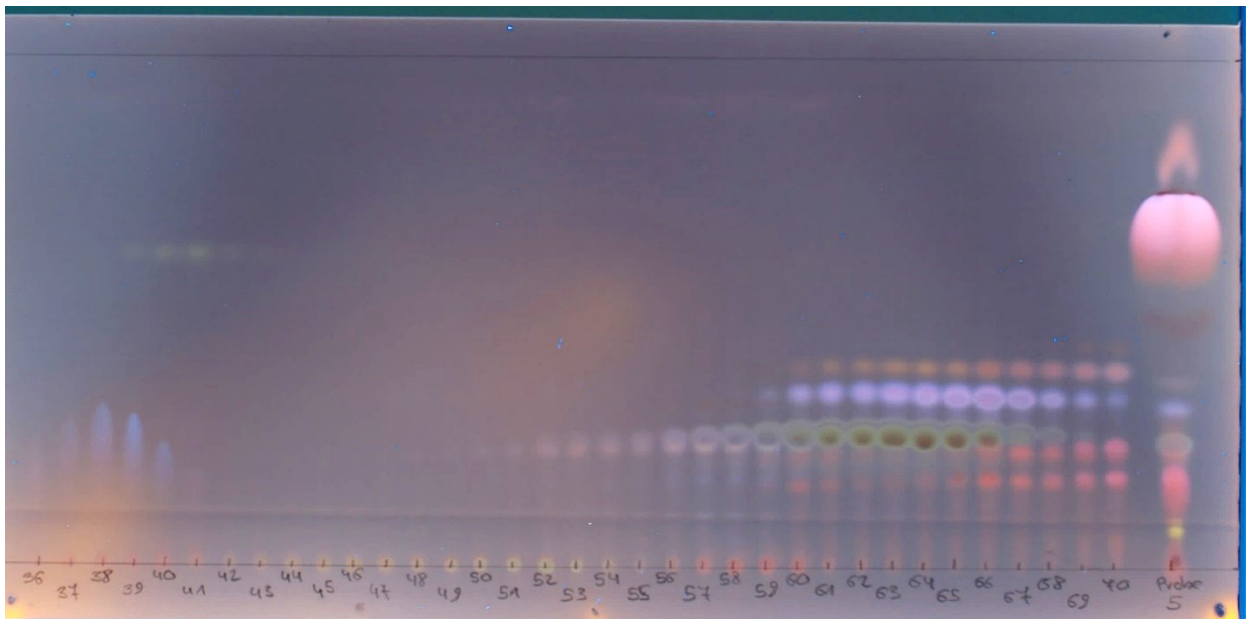


Abbildung A 6: HPCCC Fraktionen 36-70 1. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

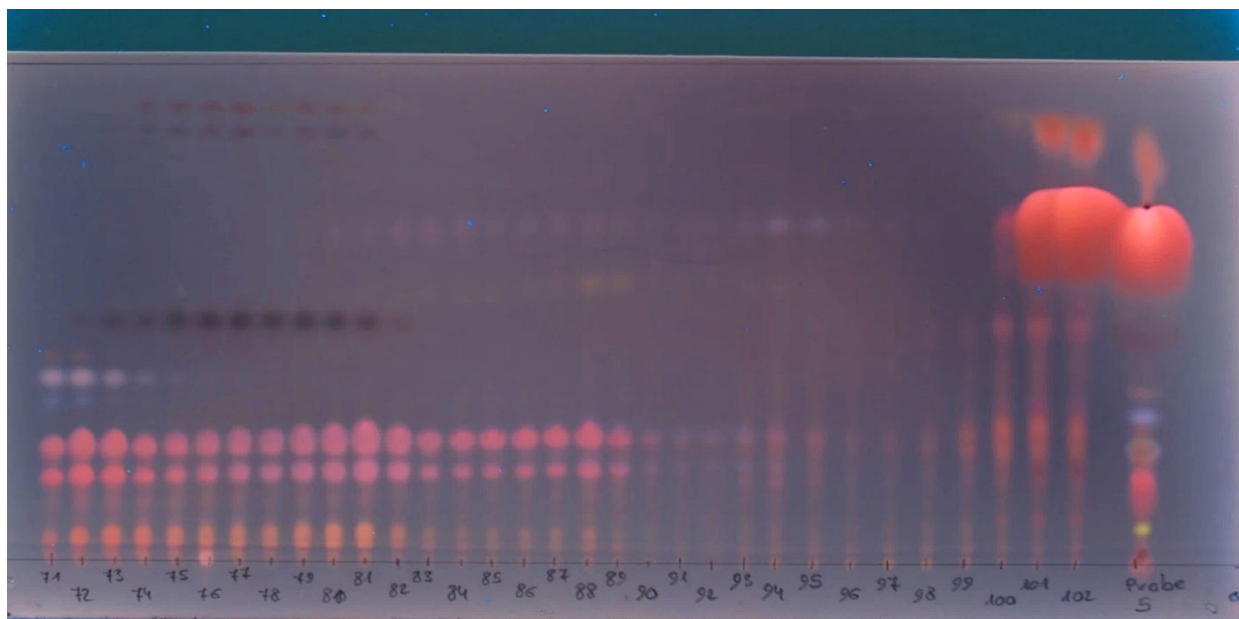


Abbildung A 7: HPCCC Fraktionen 71-102 1. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

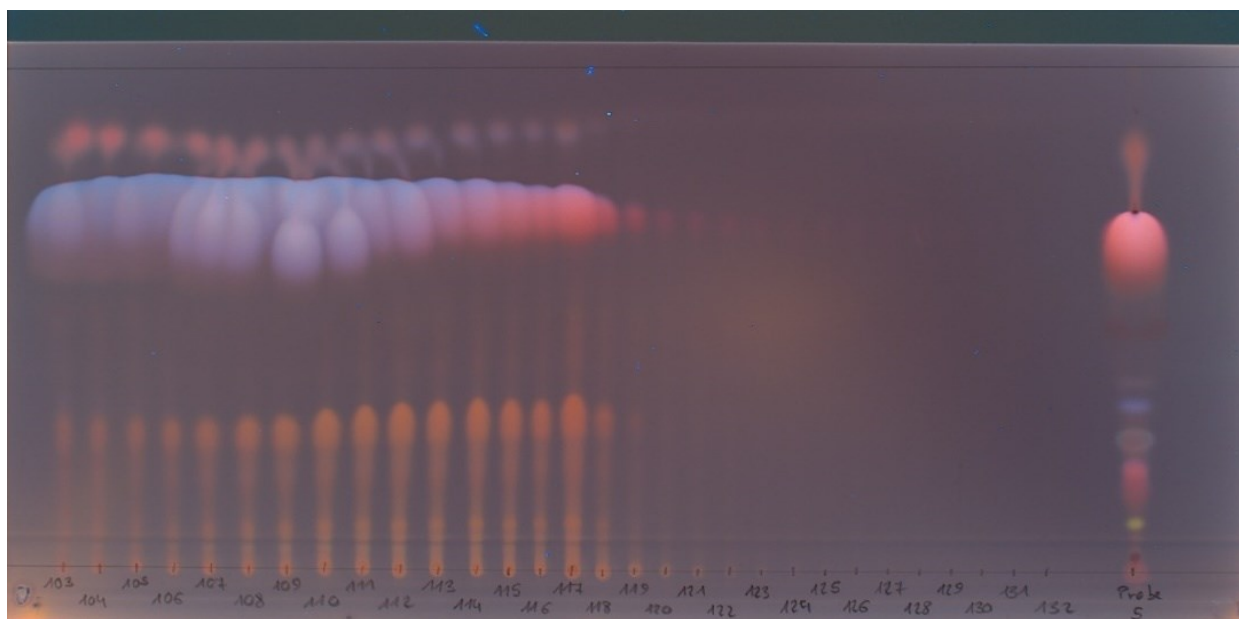


Abbildung A 8: HPCCC Fraktionen 103-132 1. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

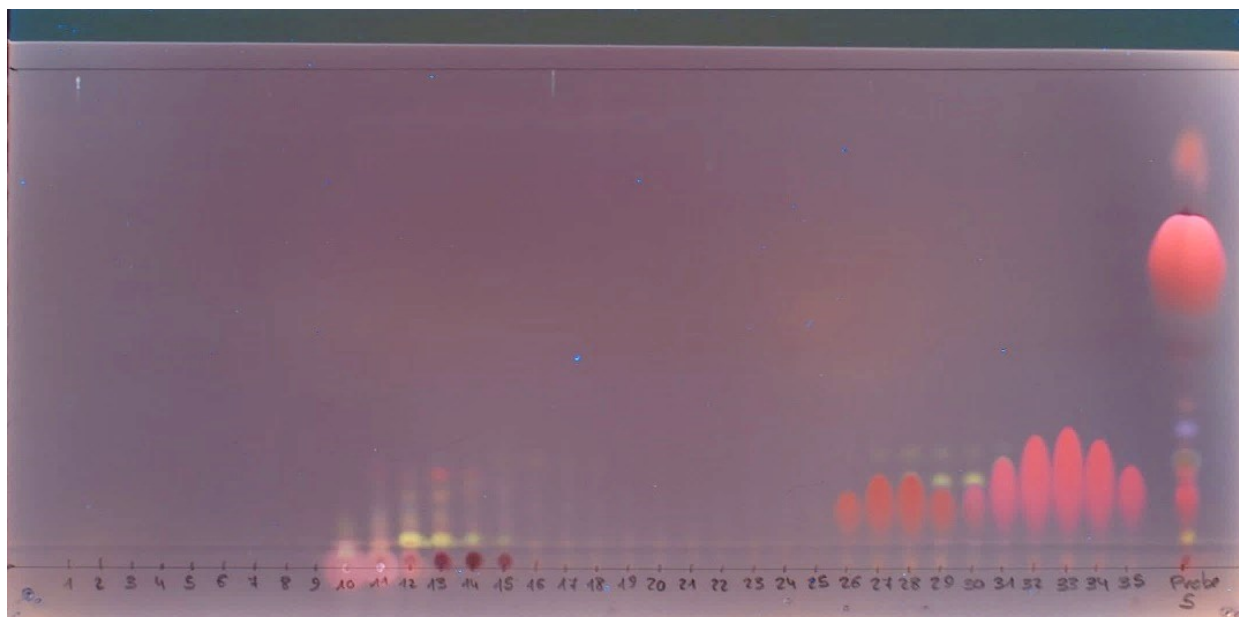


Abbildung A 9: HPCCC Fraktionen 1-35 2. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

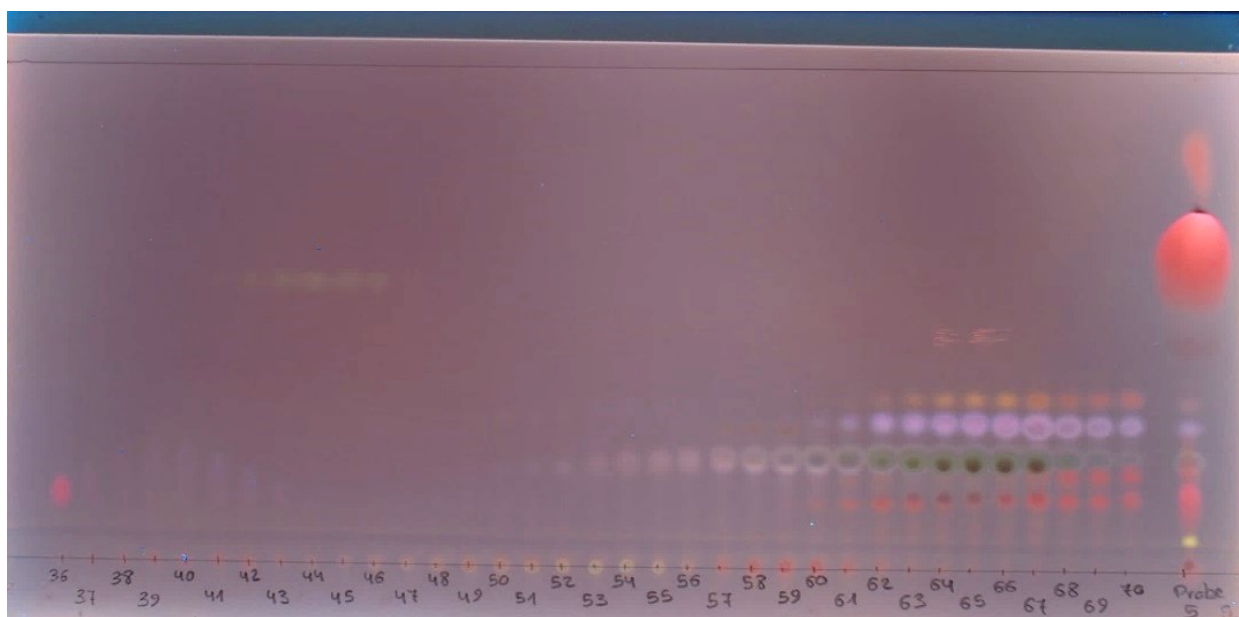


Abbildung A 10: HPCCC Fraktionen 36-70 2. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

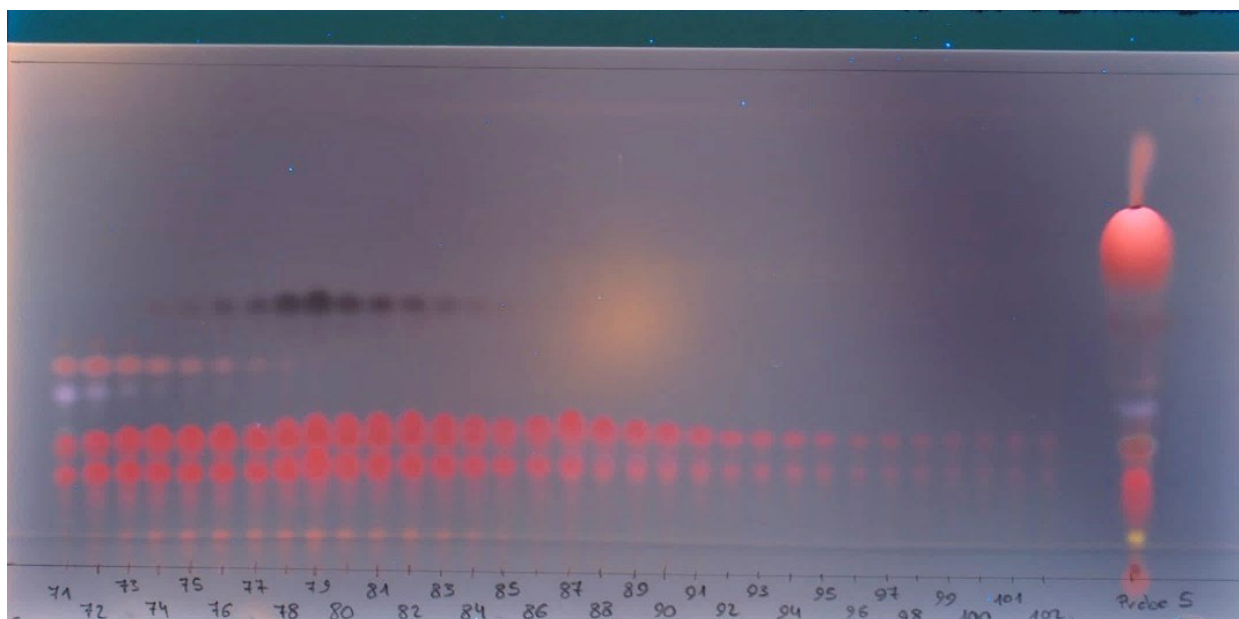


Abbildung A 11: HPCCC Fraktionen 71-102 2. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

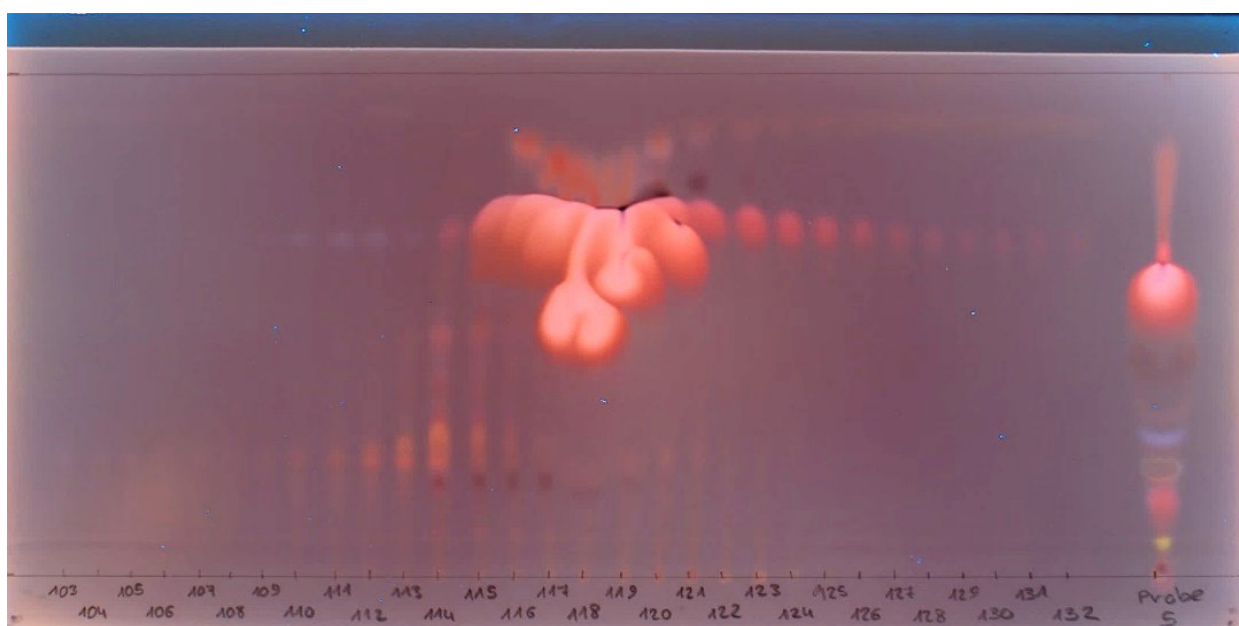


Abbildung A 12: HPCCC Fraktionen 103-132 2. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

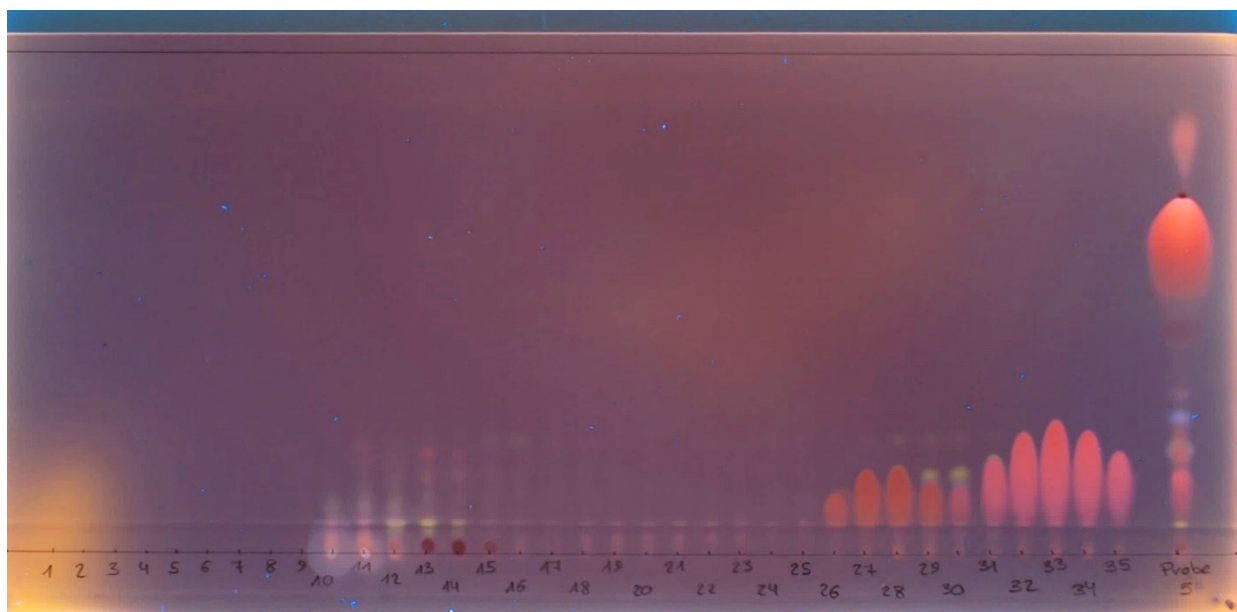


Abbildung A 13: HPCCC Fraktionen 1-35 3. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

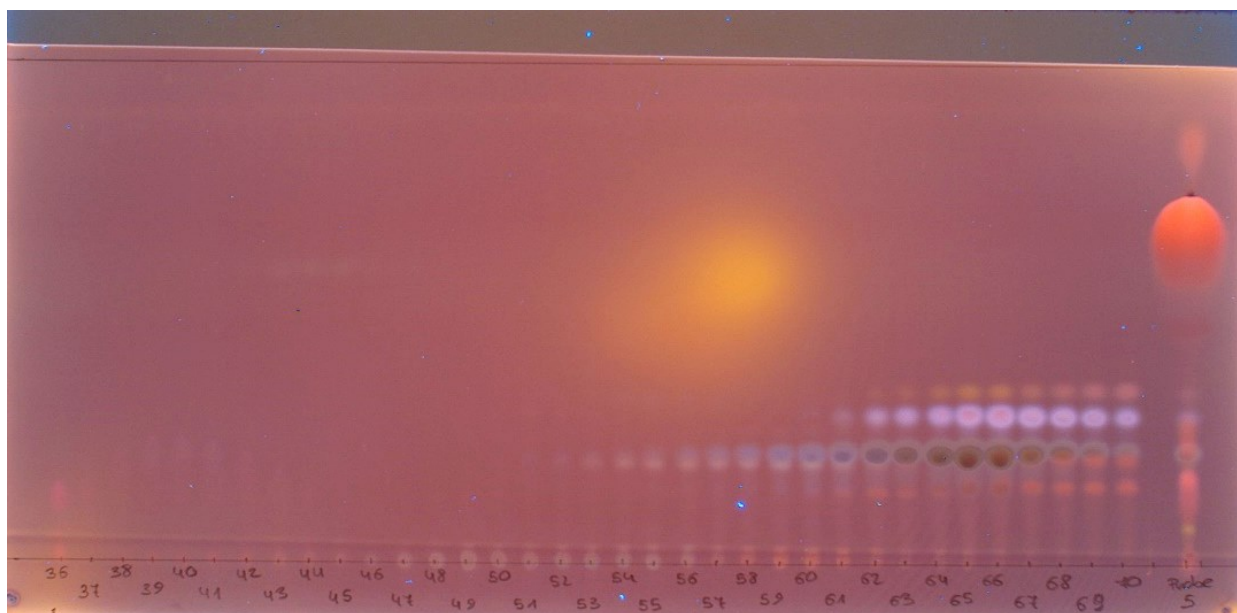


Abbildung A 14: HPCCC Fraktionen 36-70 3. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

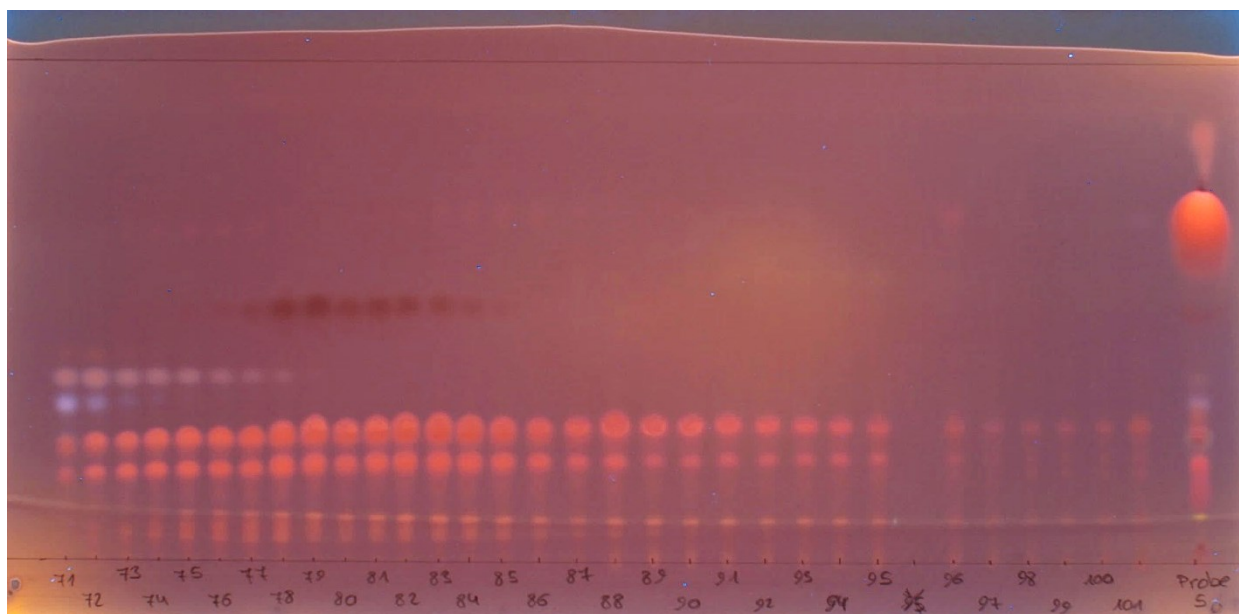


Abbildung A 15: HPCCC Fraktionen 71-101 3. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

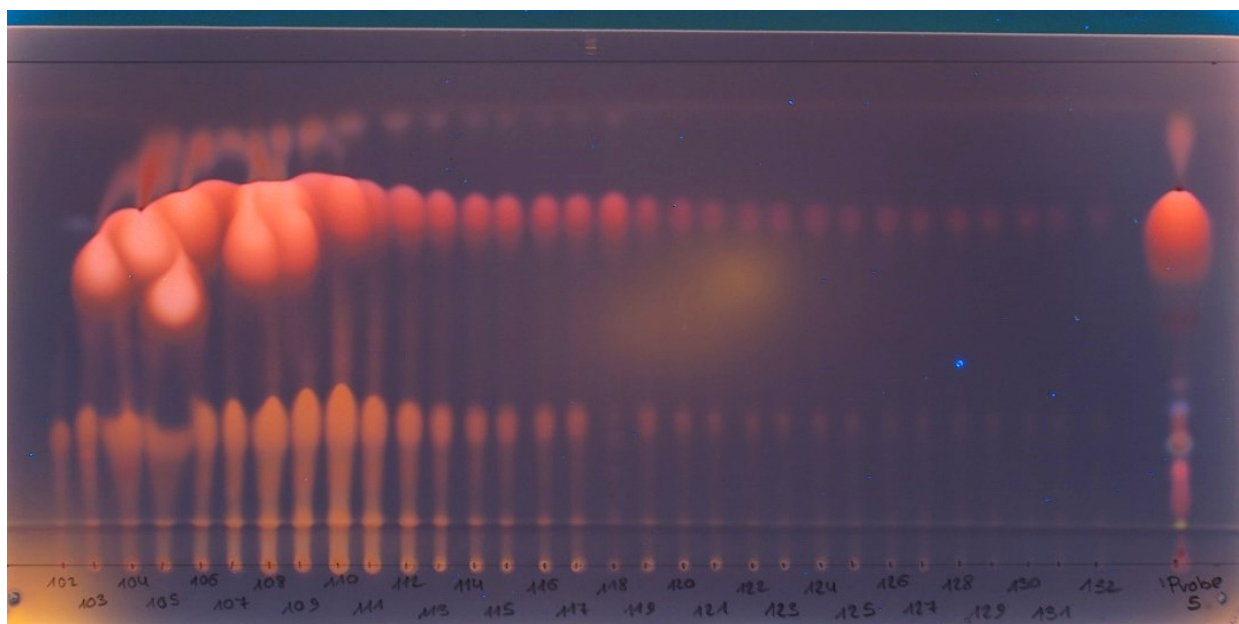


Abbildung A 16: HPCCC Fraktionen 102-132 3. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

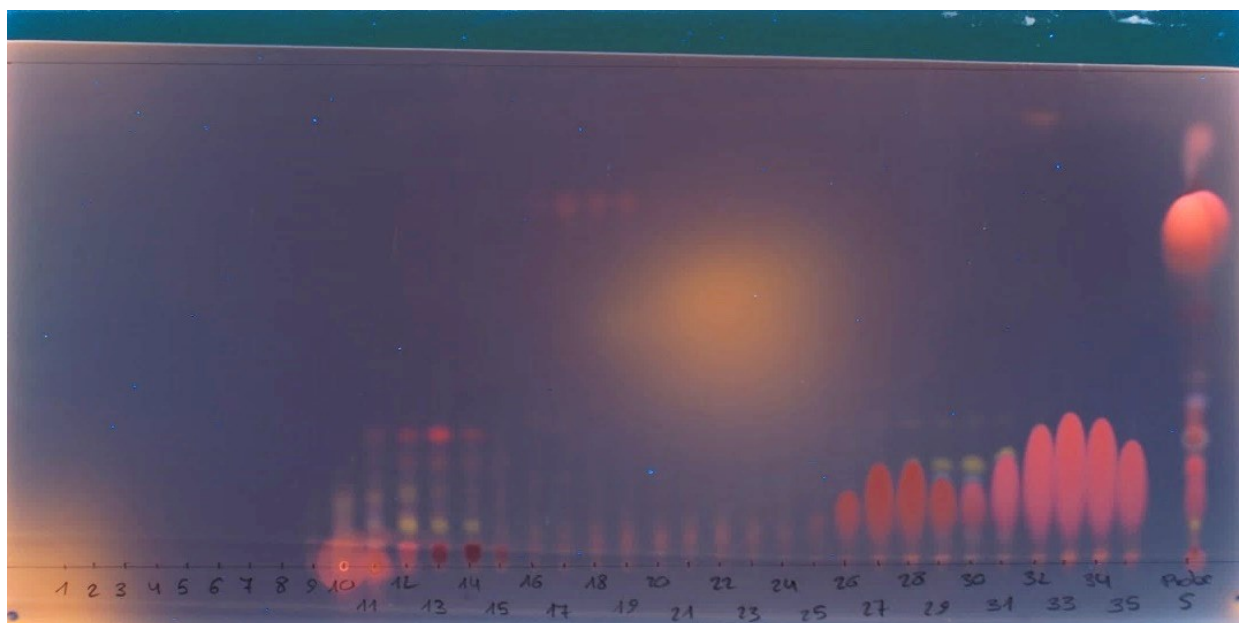


Abbildung A 17: HPCCC Fraktionen 1-35 4. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

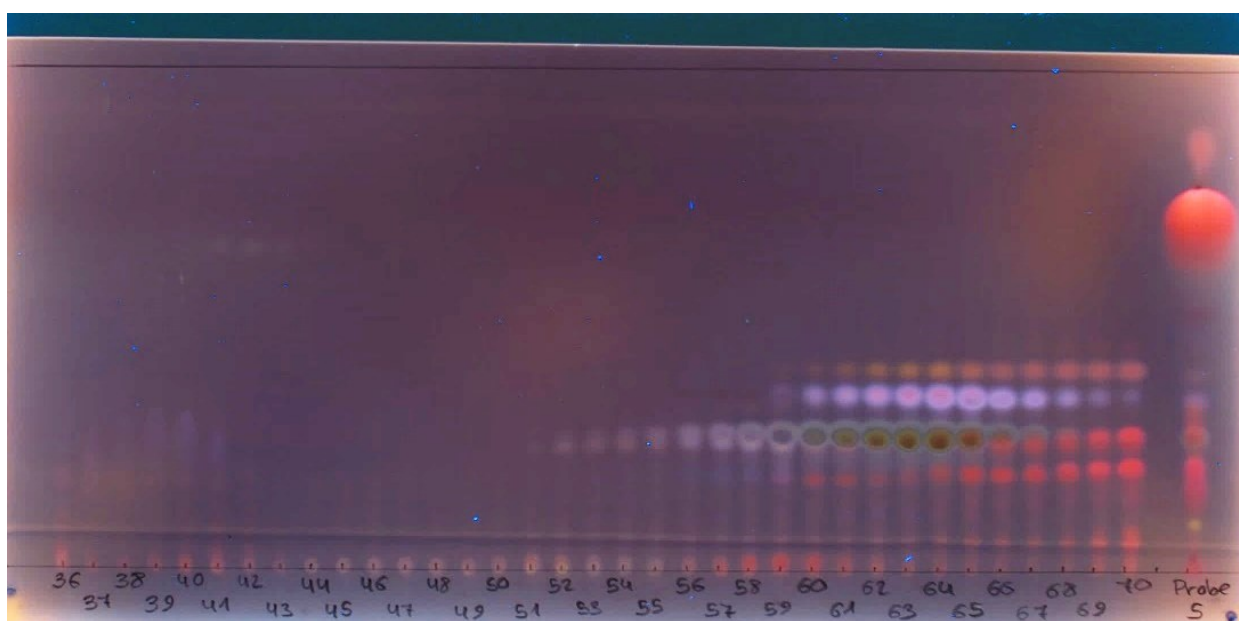


Abbildung A 18: HPCCC Fraktionen 36-70 4. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

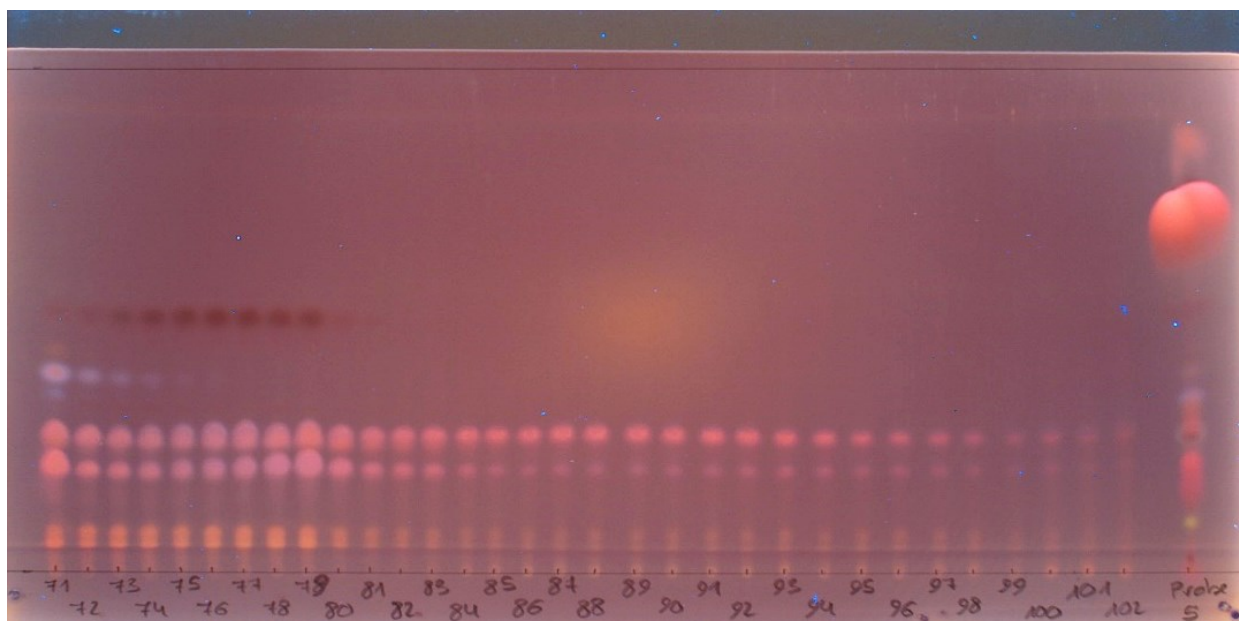


Abbildung A 19: HPCCC Fraktionen 71-102 4. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

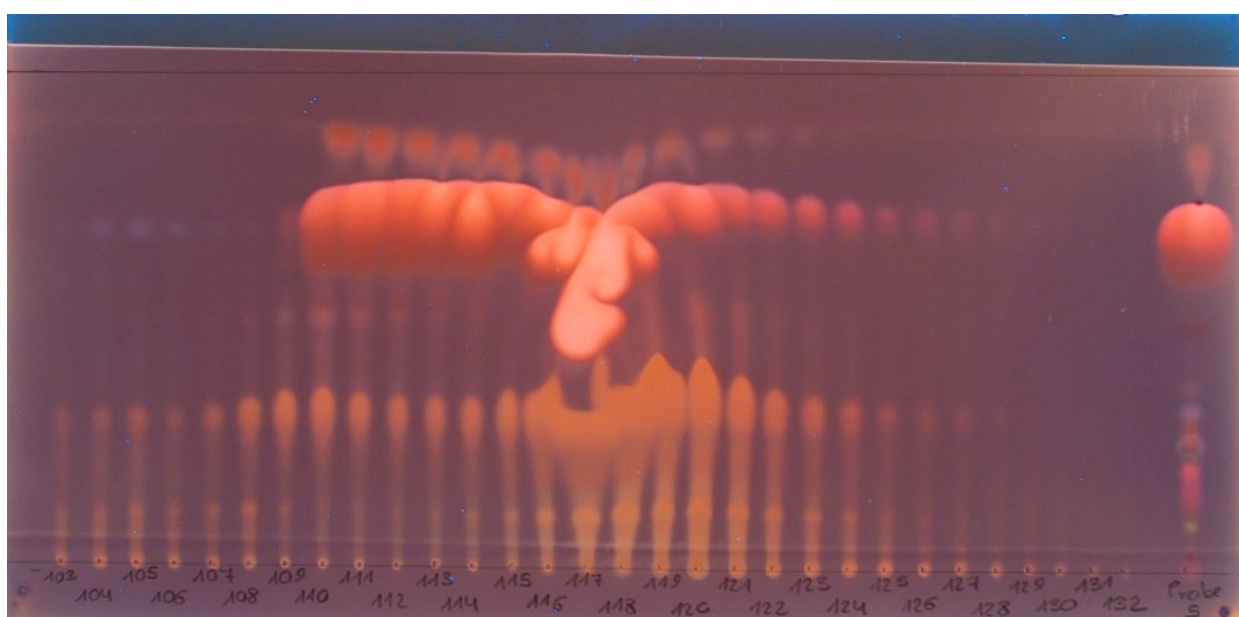


Abbildung A 20: HPCCC Fraktionen 103-132 4. präparativer Lauf

DC-Methode: siehe Tab. 2, Seite 7
 Mobile Phase: Hexan+Aceton (25+4; 2x entwickelt)
 Detektion: Anisaldehyd/Schwefelsäurereagenz: UV₃₆₆

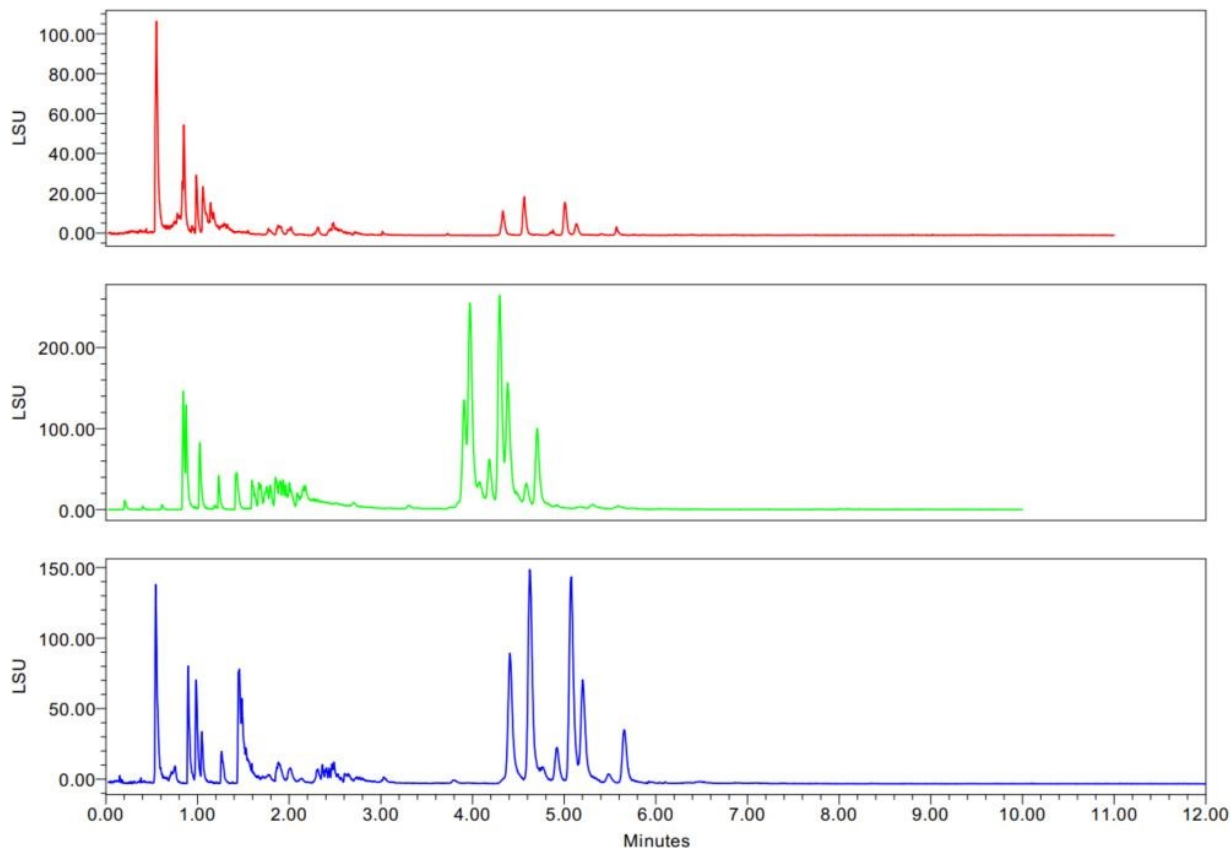


Abbildung A 21: Fehlschlag bei der Methodenoptimierung zur Analyse von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) mit UHPSFC, stationäre Phase: 2-PIC, mobile Phase: CO₂ und Acetonitril, Detektion: ELSD
UHPSFC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 21

Zusatz von Acetonitril zeigte keine reproduzierbaren Intensitäten der Signale bei gleicher Probenkonzentration, Optimierung der Analysenzeit zeigte keine Erfolge, weil die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren

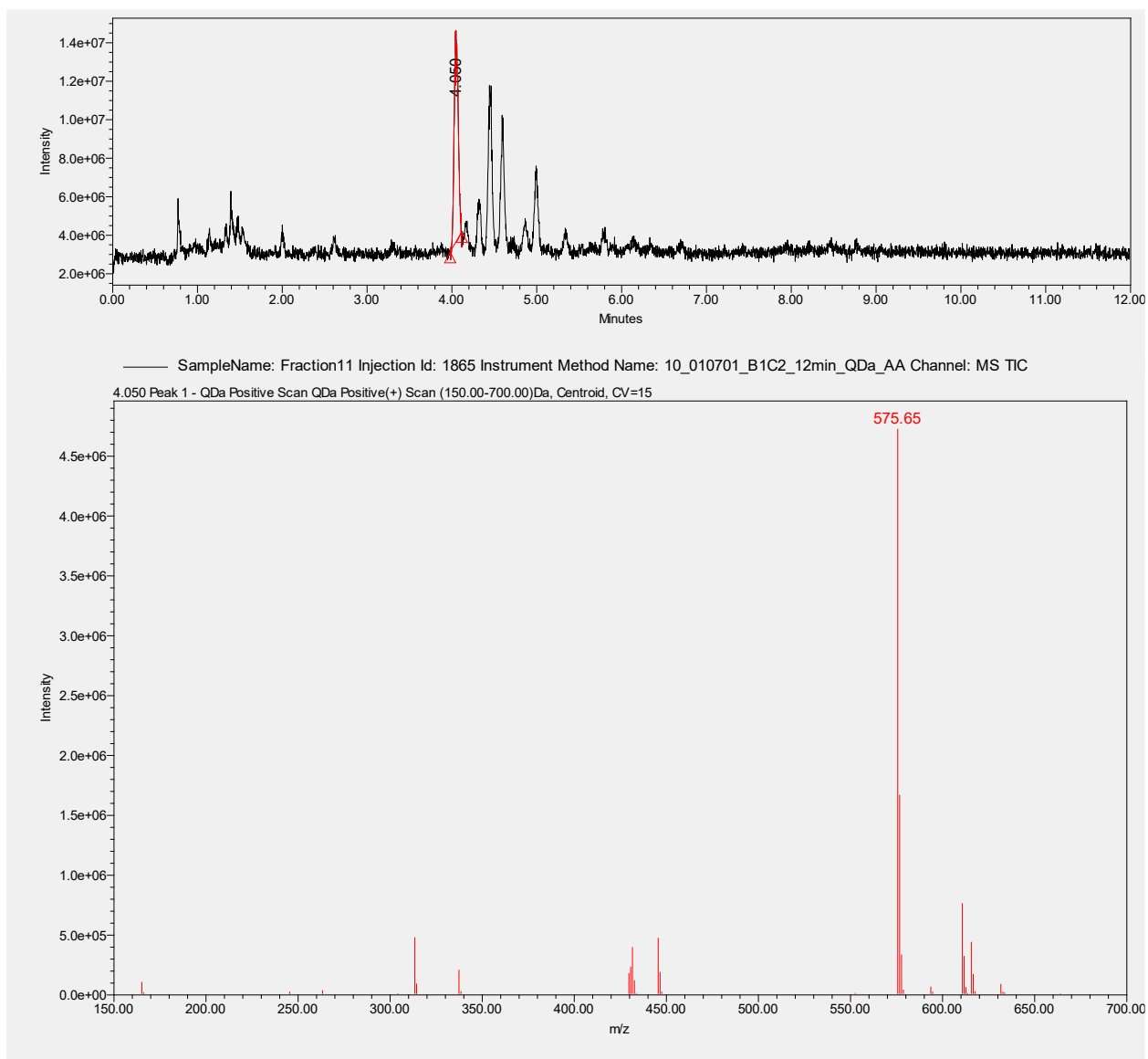


Abbildung A 22: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im positiven Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 1 (siehe Tabelle 22)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

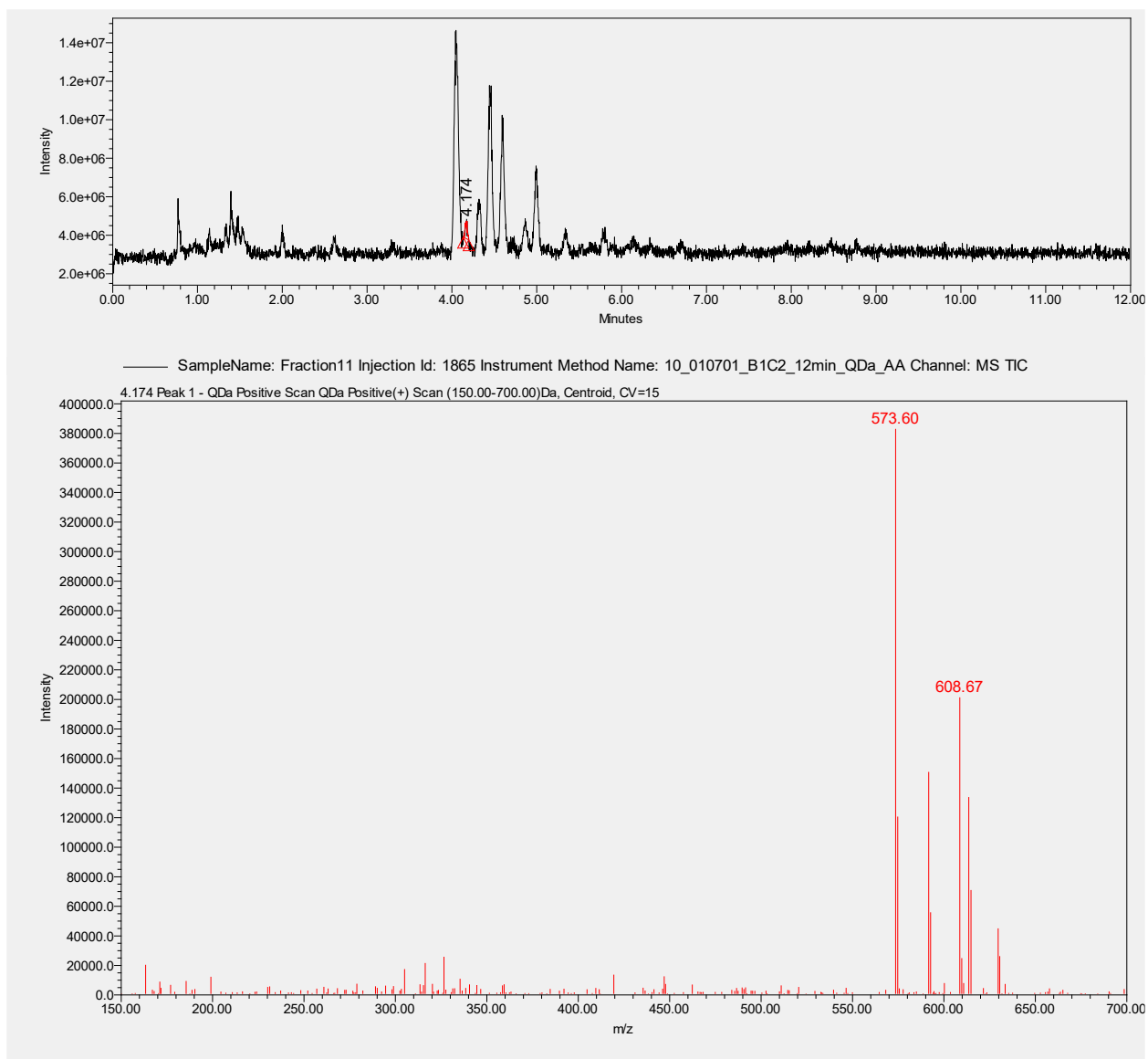


Abbildung A 23: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im positiven Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 2 (siehe Tabelle 22)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

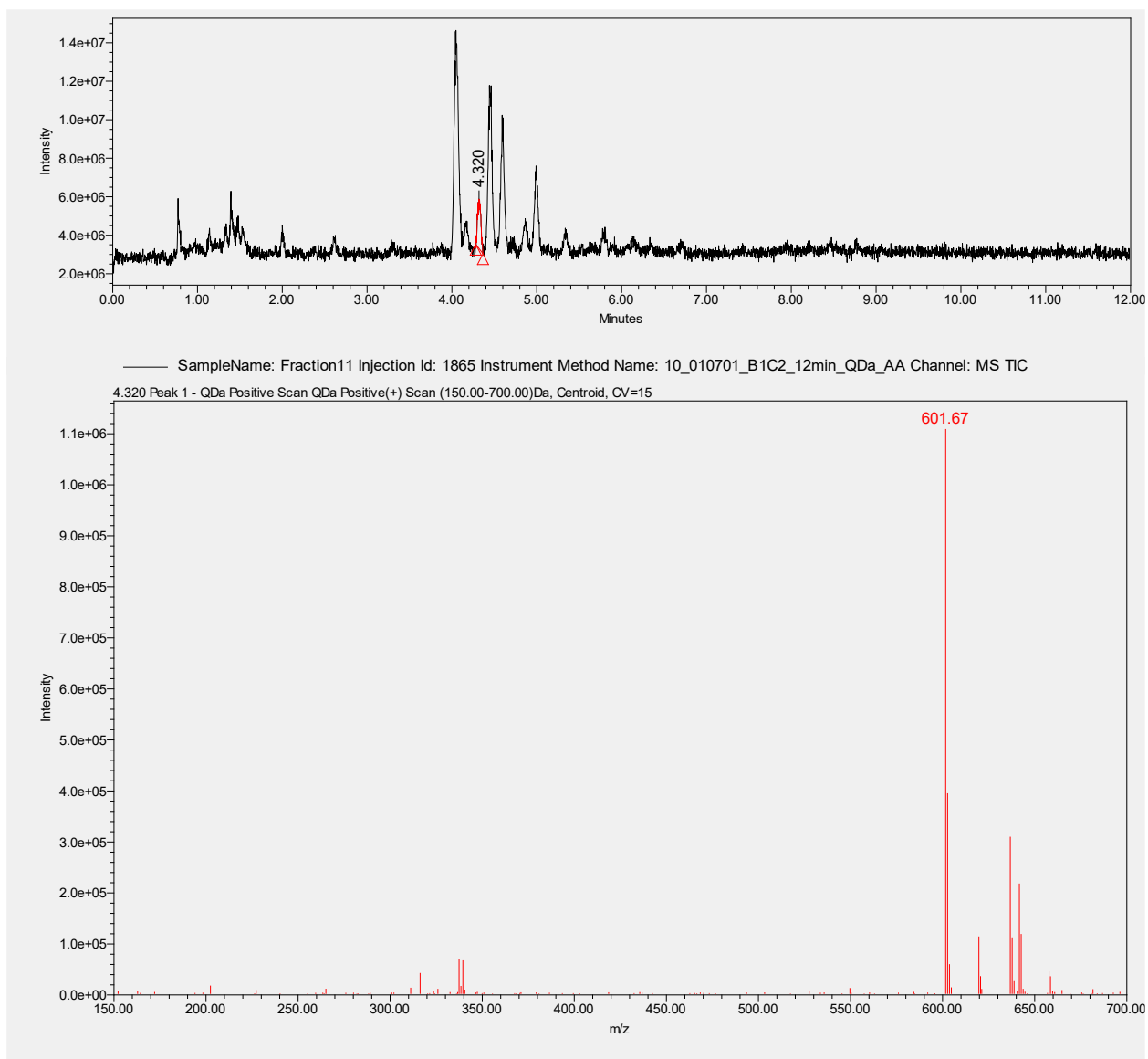


Abbildung A 24: UHPSFC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im positiven Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 3 (siehe Tabelle 22)
UHPSFC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

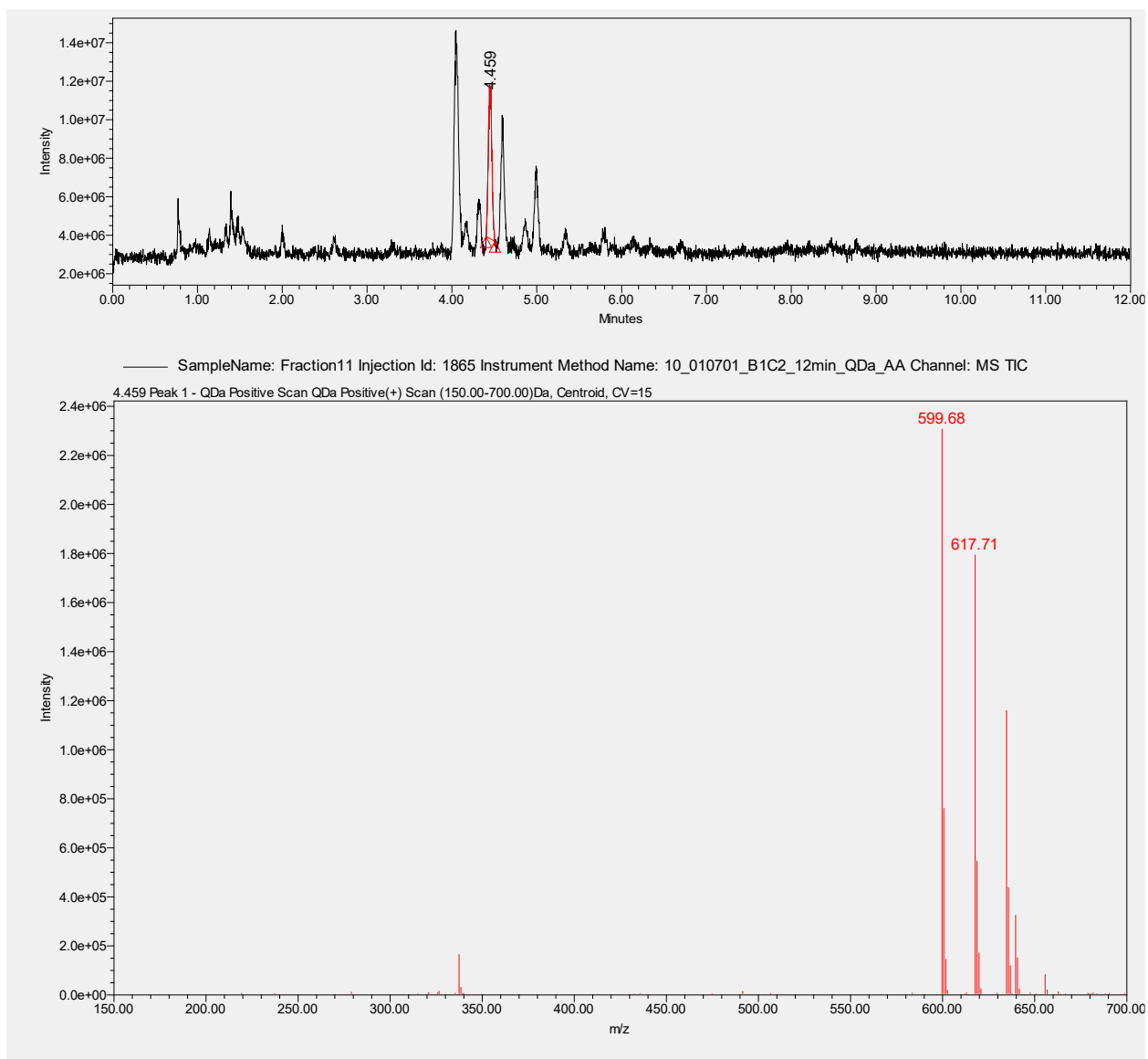


Abbildung A 25: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im positiven Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 4 (siehe Tabelle 22)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

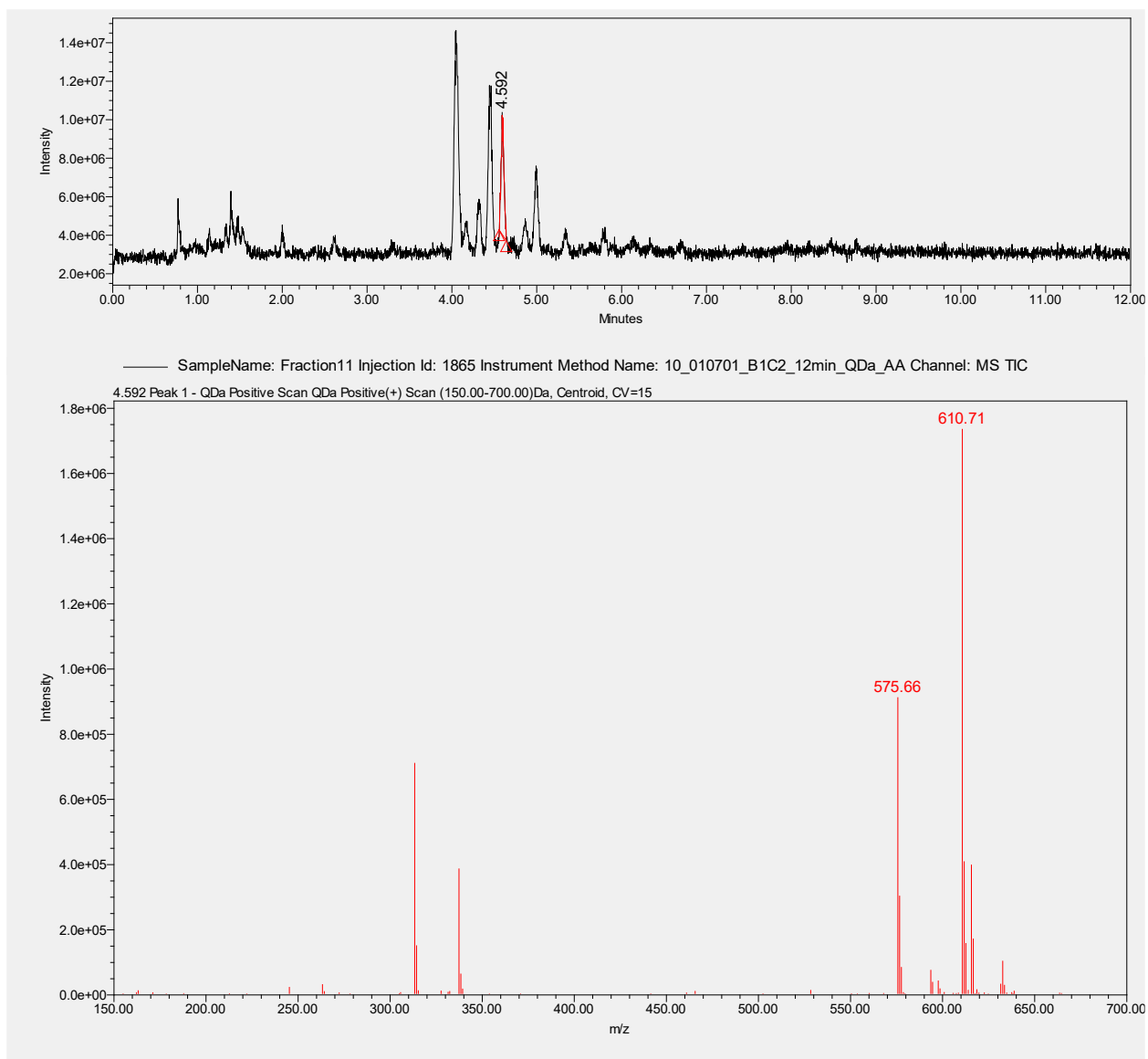


Abbildung A 26: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im positiven Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 5 (siehe Tabelle 22)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

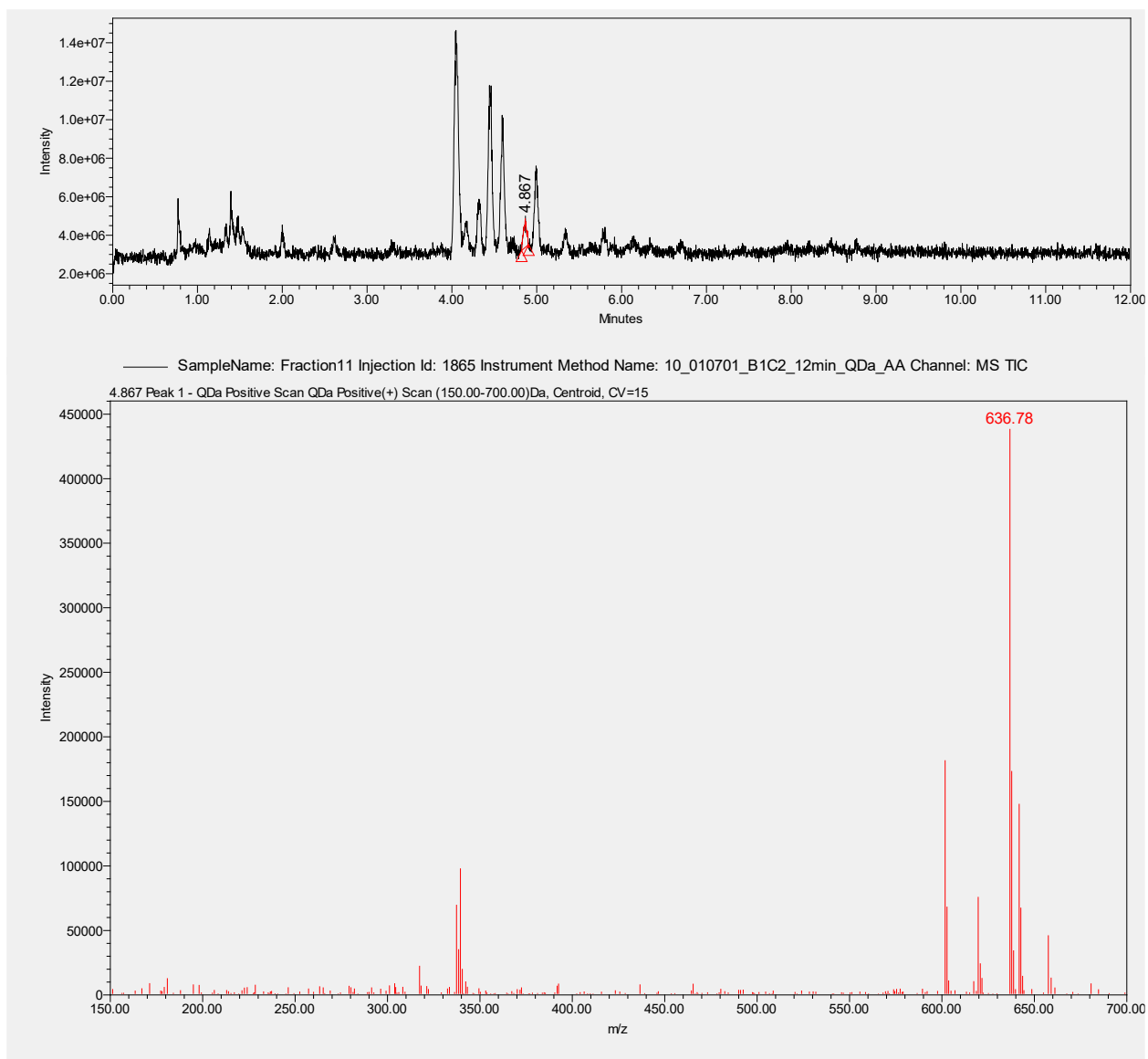


Abbildung A 27: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im positiven Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 6 (siehe Tabelle 22)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

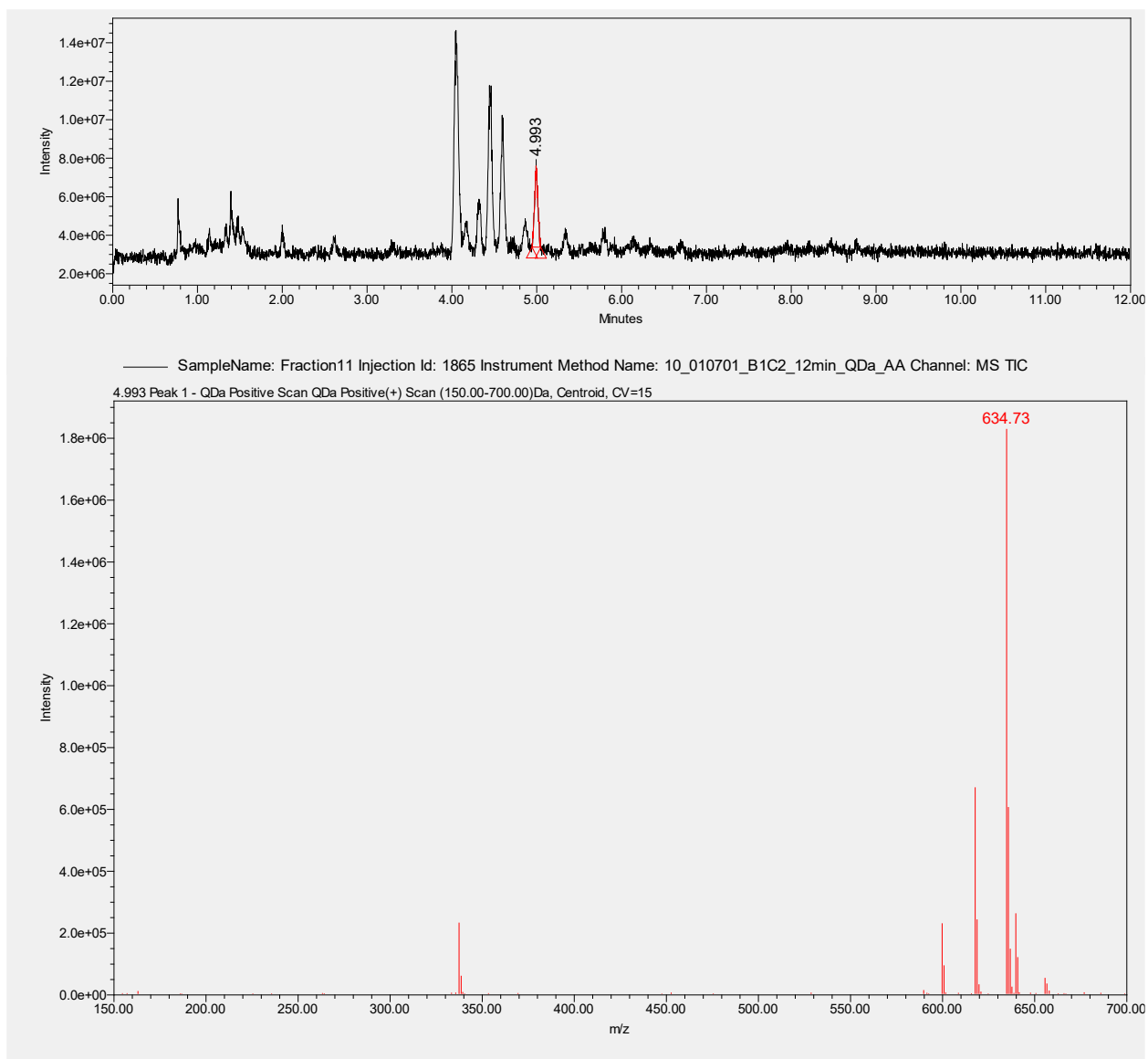


Abbildung A 28: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im positiven Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 7 (siehe Tabelle 22)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

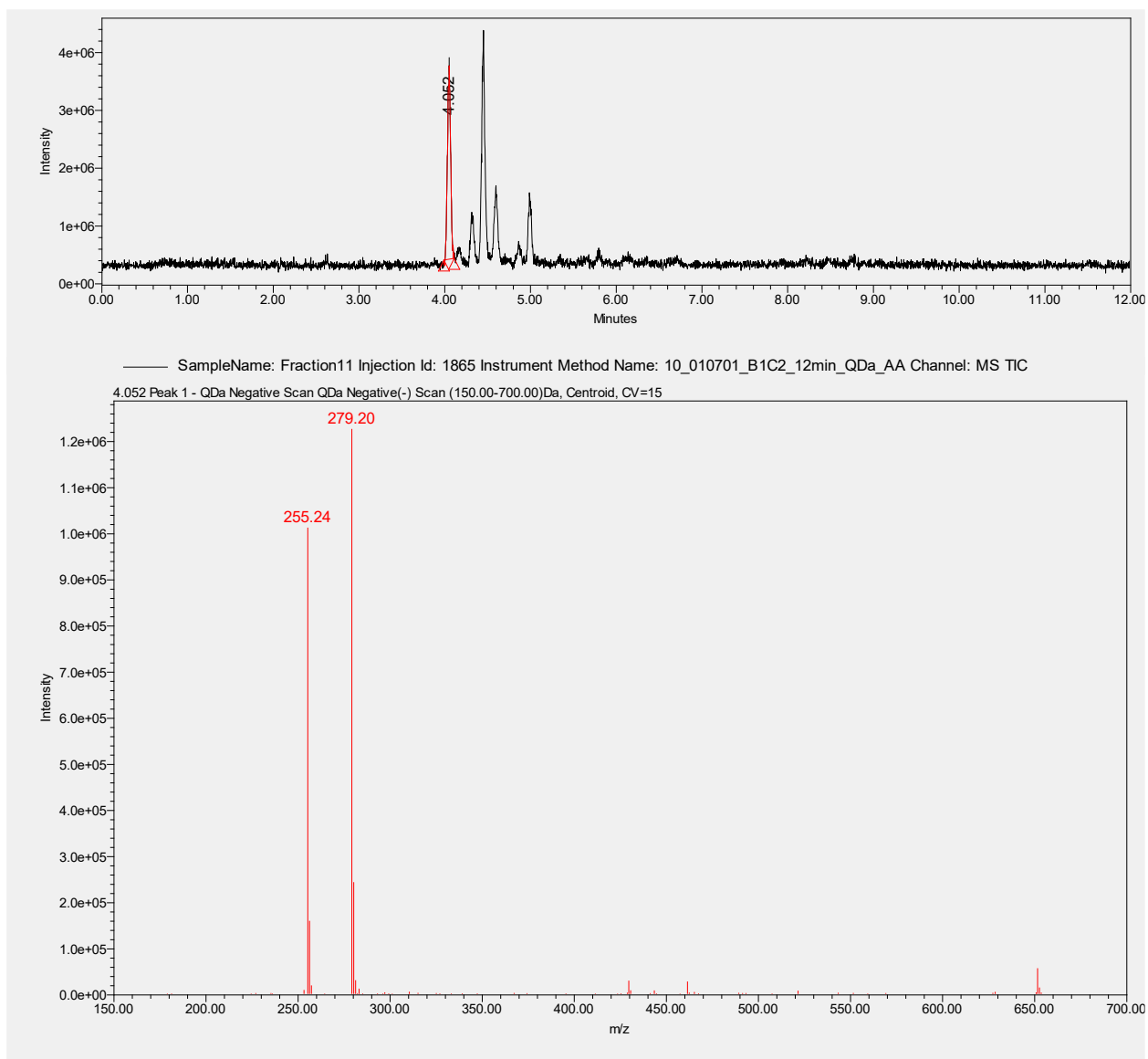


Abbildung A 29: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im negativen Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 1 (siehe Tabelle 23)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

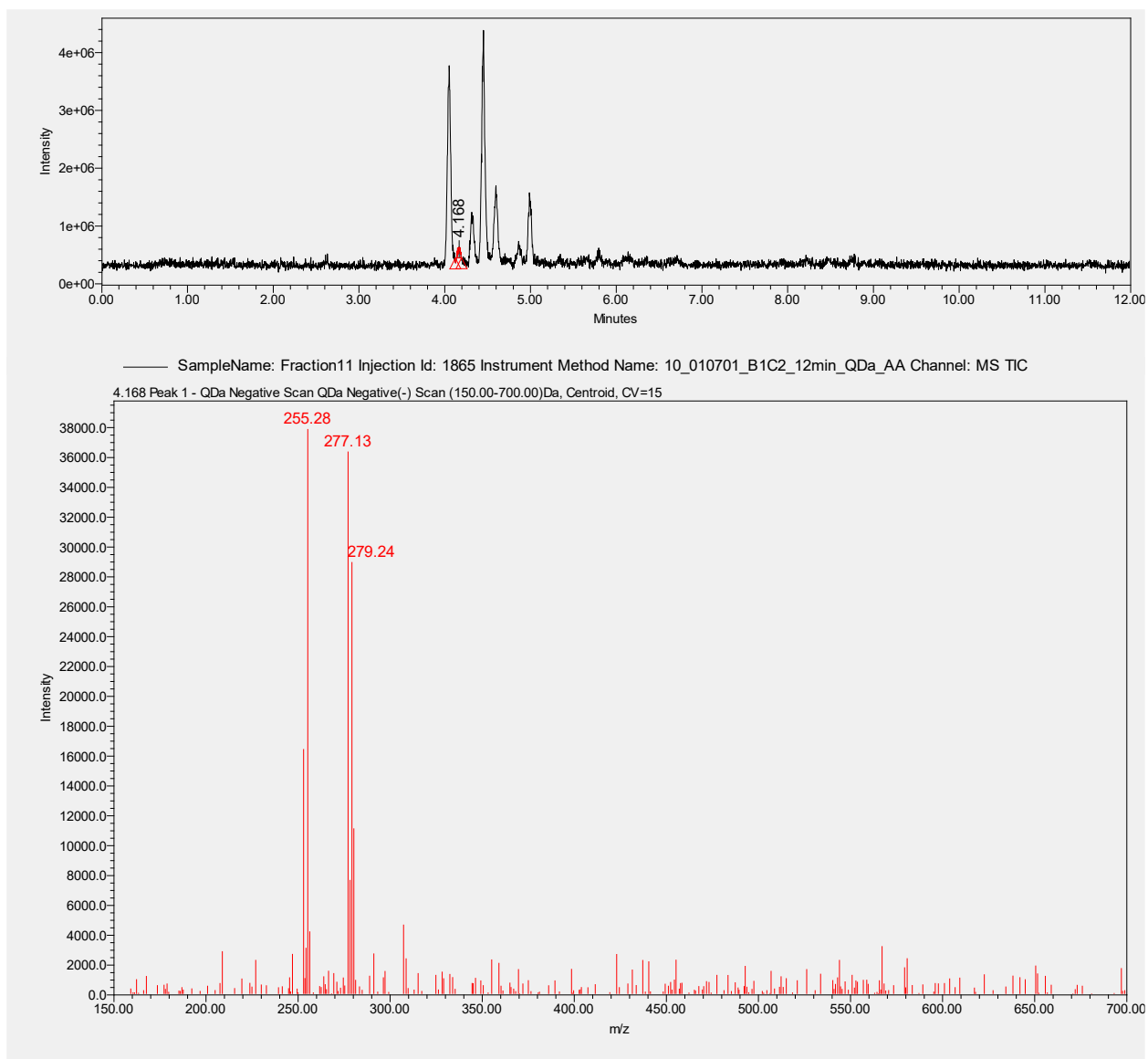


Abbildung A 30: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im negativen Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 2 (siehe Tabelle 23)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

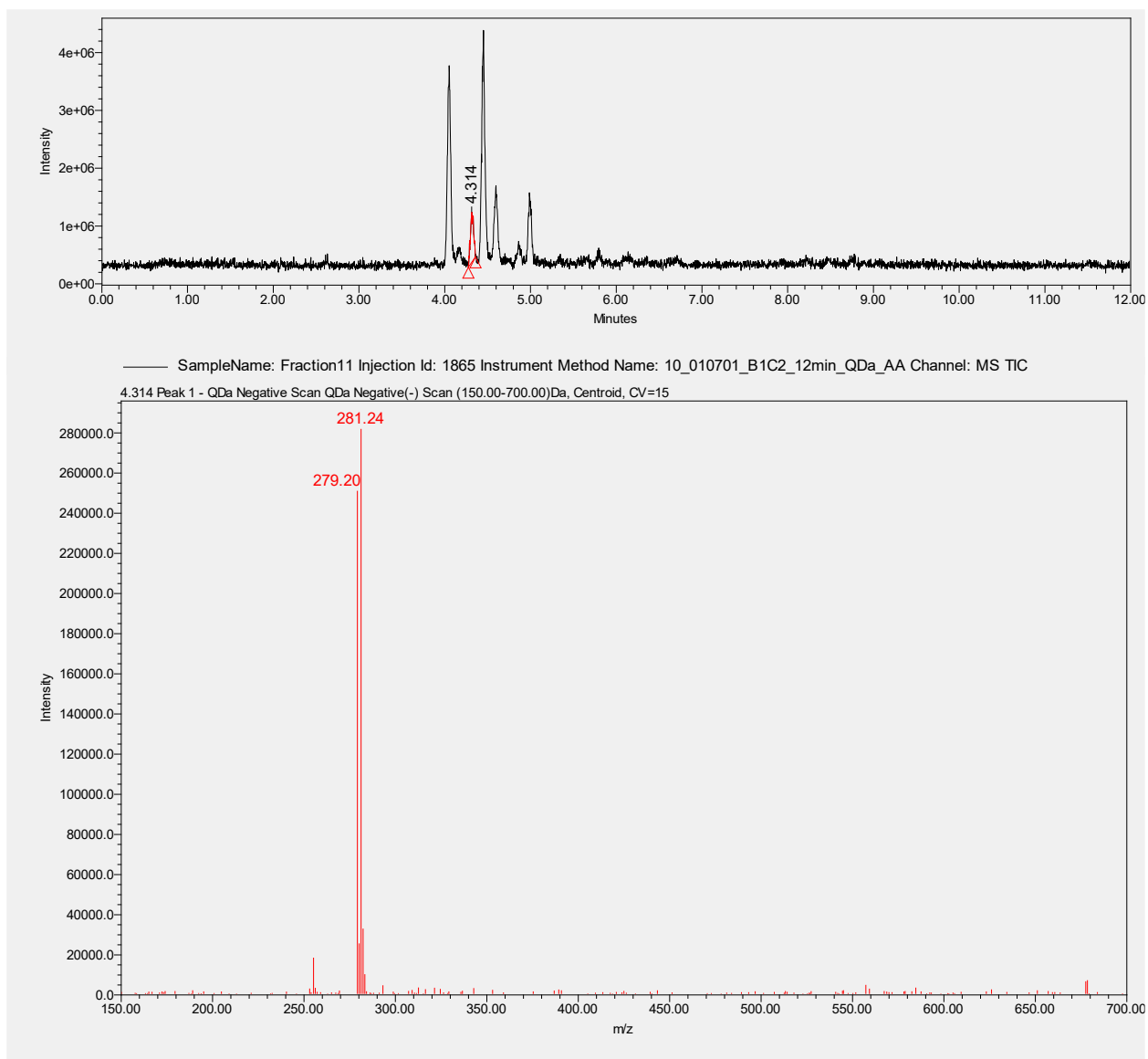


Abbildung A 31: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im negativen Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 3 (siehe Tabelle 23)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

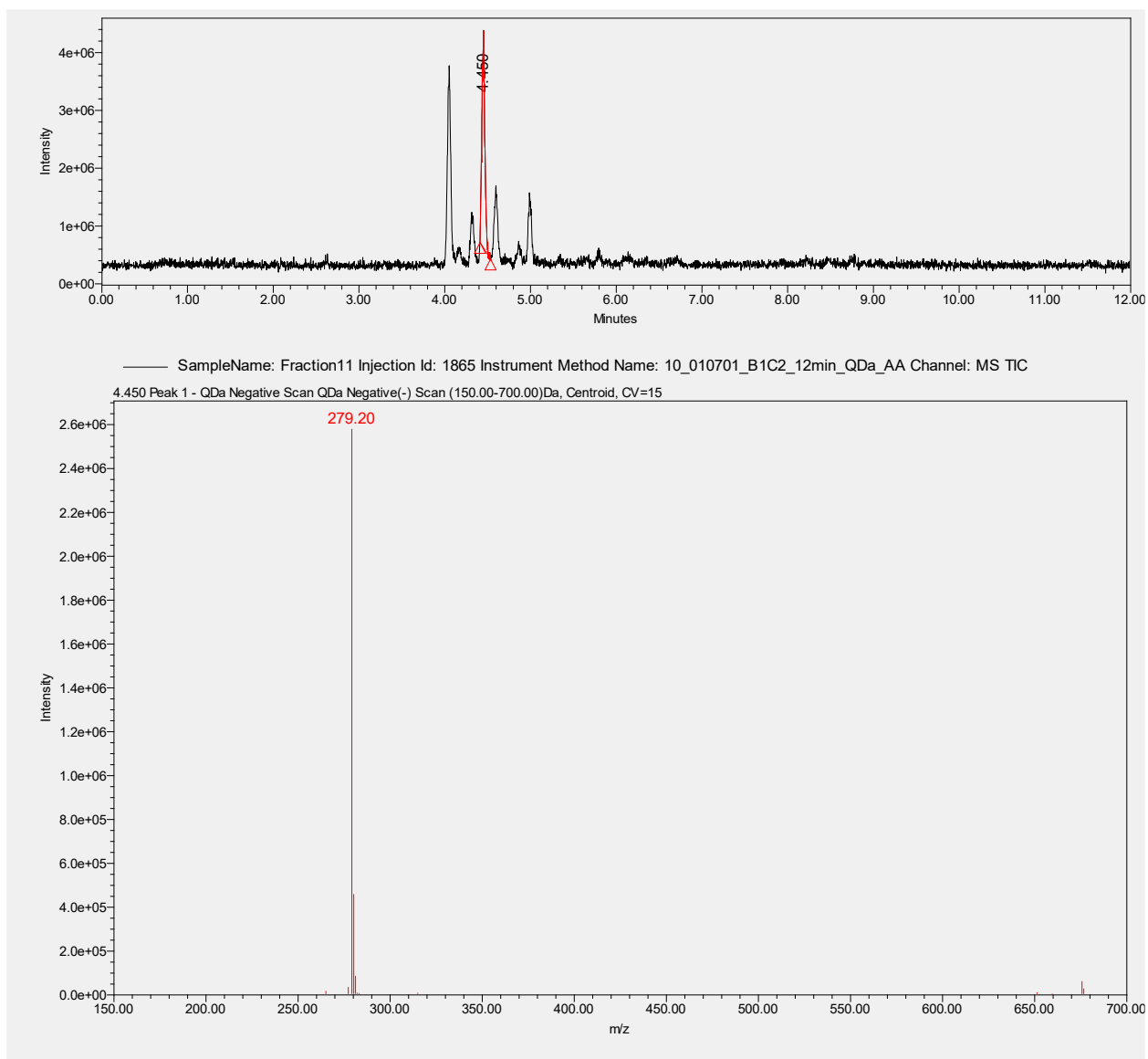


Abbildung A 32: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im negativen Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 4 (siehe Tabelle 23)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

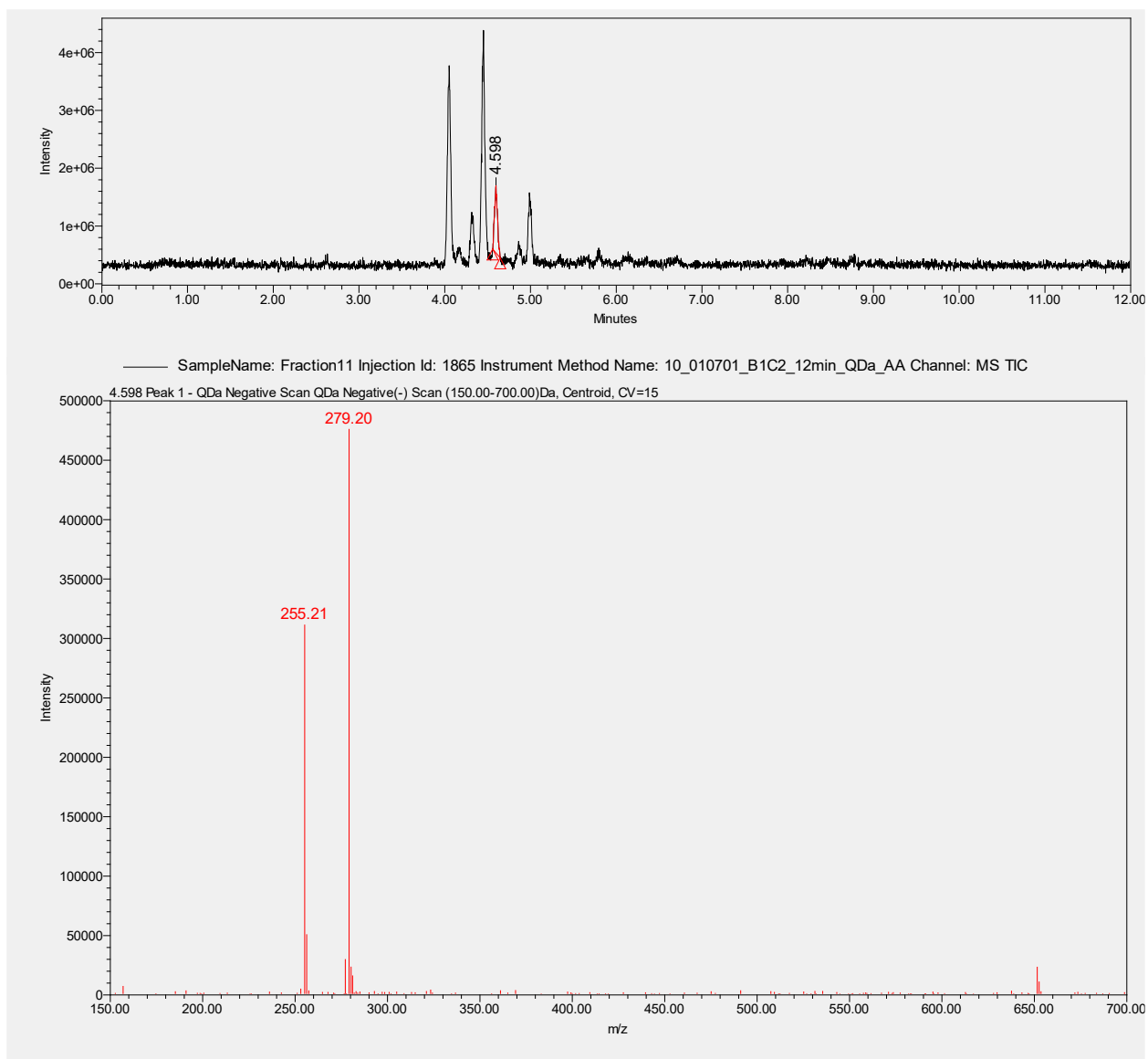


Abbildung A 33: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im negativen Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 5 (siehe Tabelle 23)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

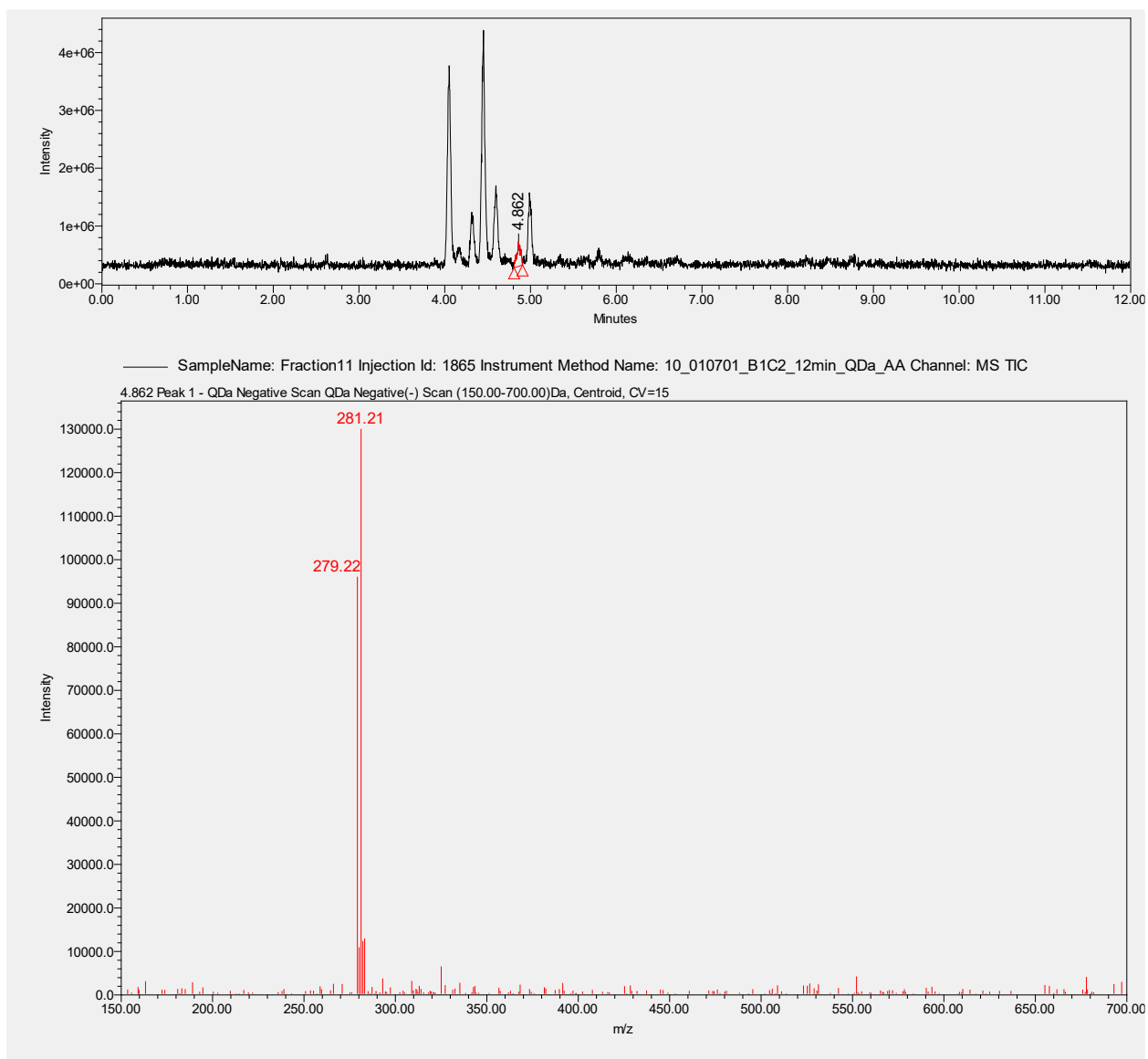


Abbildung A 34: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im negativen Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 6 (siehe Tabelle 23)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16

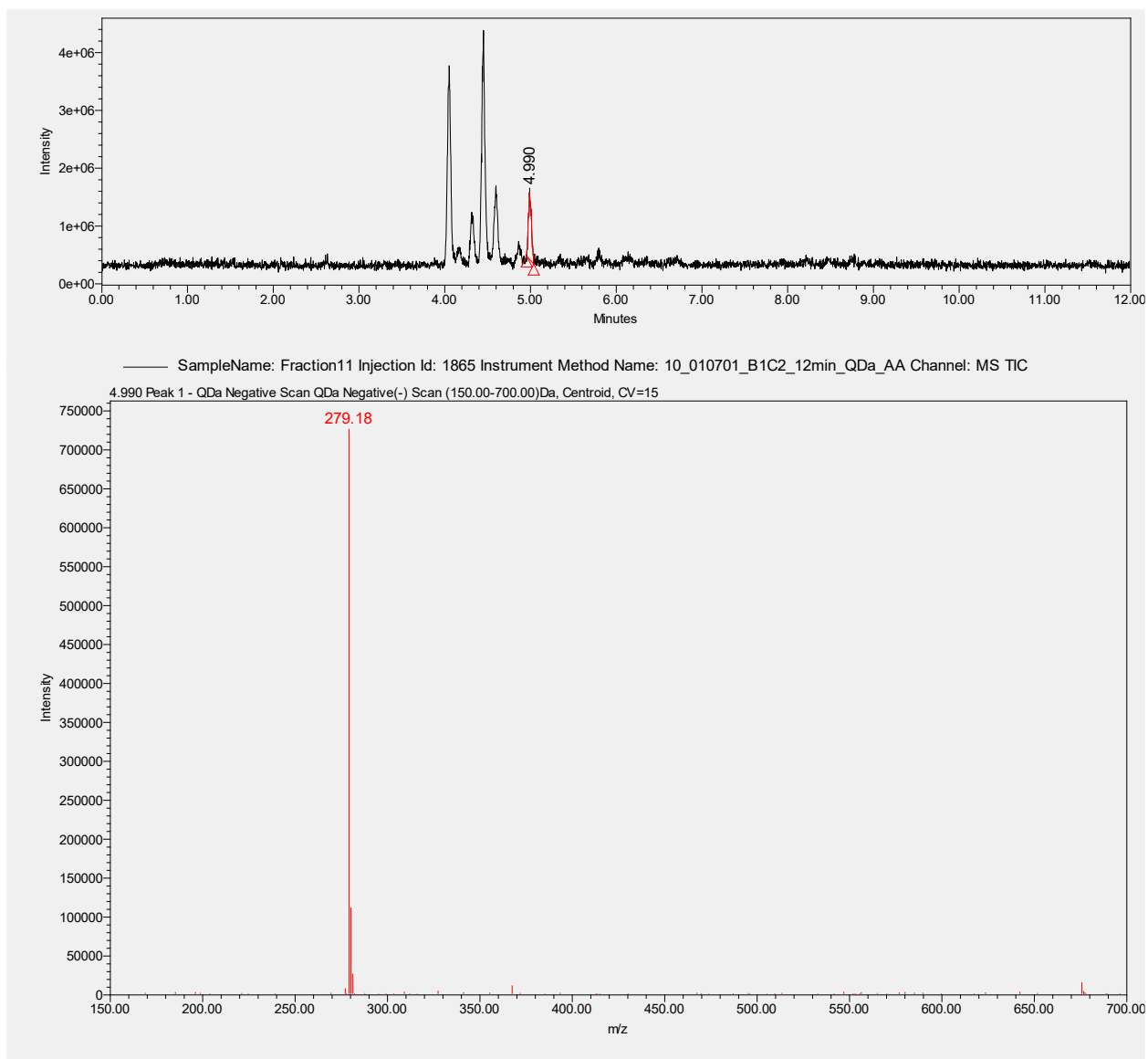
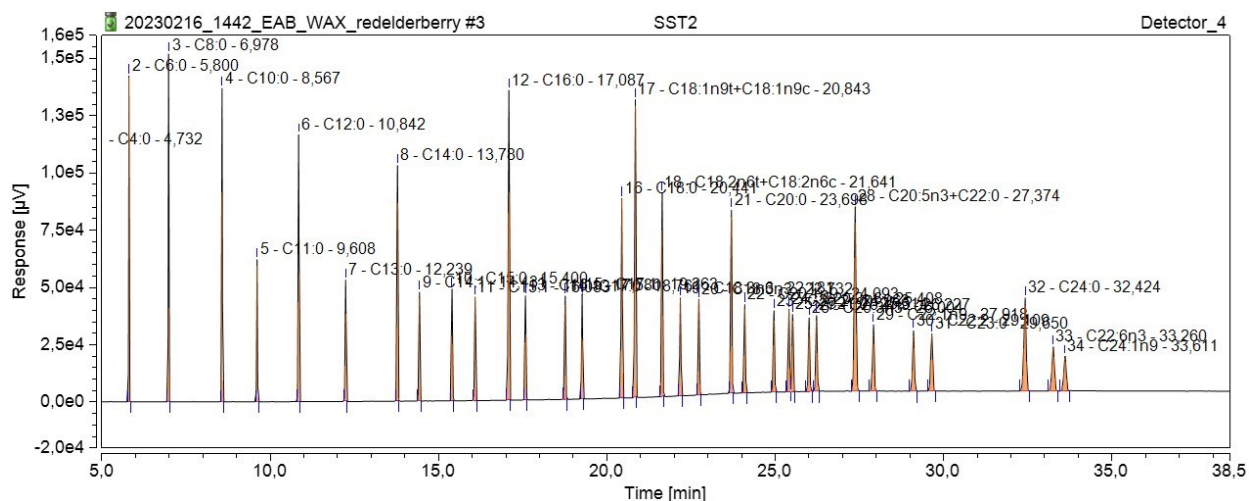


Abbildung A 35: UHPSEC-QDa Chromatogramm von Fraktion 7 (siehe Abb. 6 und 7, Seiten 27 und 28) im negativen Modus mit zugehörigem MS Spektrum von Peak 7 (siehe Tabelle 23)
UHPSEC-Methode: siehe Tab. 11, Seite 16



C18.2n6t+C18:2n6c	21,641	4,25
C18:3n6	22,181	2,03
C18:3n3	22,732	2,04
C20:0	23,698	4,28
C20:1n9	24,093	2,06
C20:2	24,963	2,05
C20:3n6	25,408	2,09
C21:0	25,514	2,04
C20:3n3	26,004	2,02
C20:4n9	26,227	2,02
C20:5n3+C22:0	27,374	6,28
C22:1n9	27,918	2,08
C22:2	29,109	2,05
C23:0	29,650	2,08
C24:0	32,424	4,19
C22:6n3	33,260	2,05
C24:1n9	33,611	1,60