



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Aktivitätsgeleitete Fraktionierung ausgewählter österreichischer
Rotweine – Einfluss auf die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Elisabeth Hager
Matrikel-Nummer:	0305308
Studienrichtung (lt. Studien- blatt):	Pharmazie (A 449)
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Gottfried Reznicek

Wien, am 02.07.2009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen herzlich danken, die zum Gelingen der Diplomarbeit beigetragen haben.

Frau Univ. Prof. Dr. V. M. Dirsch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie.

Herrn ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek und Mag. Oliver Donath für die exzellente Betreuung während der praktischen Arbeit und das Vertrauen beim Verfassen der Diplomarbeit.

Herrn Univ. Prof. Dr. Dr. h. c. Johann Jurenitsch für die fachlich wertvollen Diskussionen.

Alle Kolleginnen und Kollegen des Departments für Pharmakognosie für das angenehme und freundliche Arbeitsklima.

Meiner Familie, die mich das ganze Studium hindurch unterstützte und mir immer hilfreich zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	3
2	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	Probenmaterial	7
2.1.1	Ausgewählte österreichische Rotweine	7
2.1.2	Weinlaub	8
2.2	Extrakte und Fraktionen	8
2.2.1	Fraktionierte Extraktion des Weinlaubs	8
2.2.2	Aktivitätsgeleitete Fraktionierung der Rotweine	12
2.2.3	Herstellung der Ether- und Ethylacetatfraktionen	18
2.3	Chromatographische und spektrometrische Methoden	22
2.3.1	Säulenchromatographie	22
2.3.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	22
2.3.3	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	24
2.3.4	Festphasenextraktion (SPE)	26
2.4	Bioassay (Arginin-Citrullin-Konversions-Assay)	27
3	EXPERIMENTELLER TEIL	28
3.1	Analyse der fünf ausgewählten österreichische Rotweine	29
3.1.1	Fraktionierung der fünf Rotweine	29
3.1.2	HPLC-Vergleich der apolaren Fraktionen („AF“)	29
3.1.3	HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit den Subfraktionen	30
3.1.4	Ergebnisse der Bioassay-Untersuchungen der „AF“ und der Subfraktionen	34
3.1.5	Analyse der Ether- und Ethylacetatfraktionen	35
3.1.5.1	HPLC-Vergleich der Etherfraktionen der fünf Rotweine	36
3.1.5.2	HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen	37
3.1.5.3	HPLC-Vergleich der „AF“, Ether- und Ethylacetatfraktionen	38
3.1.5.4	HPLC-Vergleich der Etherfraktionen mit den Ether-Subfraktionen	42
3.1.5.5	HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen mit den Ethylacetat-Subfraktionen	45

3.2	Analyse des Weinlaubs	49
3.2.1	Dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Weinlaubextrakte	49
3.2.2	Analyse des MeOH-Extraktes	51
3.2.3	Wiederholung der Extraktion von grünem Weinlaub („GWL“) und rotem Weinlaub („RWL“)	53
4	DISKUSSION	55
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	LITERATURVERZEICHNIS	60
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	61
8	ANHANG	64
8.1	Gesammelte Chromatogramme mittels Lichtstreuendetektor	64
8.2	Gesammelte Chromatogramme bei 280 nm	87
8.3	Gesammelte Chromatogramme bei 310 nm	105
9	LEBENS LAUF	110

1 Einleitung und Problemstellung

Anfang der 90er Jahre haben epidemiologische Untersuchungen mit dem Ziel, die Mortalität durch Herz-Kreislauferkrankungen mit den Ernährungsgewohnheiten in den europäischen Ländern in Verbindung zu bringen, ergeben, dass in Frankreich trotz überdurchschnittlich fettreicher Ernährung ein signifikant reduziertes Risiko besteht, kardiovaskuläre Erkrankungen zu erleiden. Bei näherer Betrachtung konnte festgestellt werden, dass der Zusammenhang zwischen dem regelmäßigen und moderaten Konsum von Rotwein der französischen Bevölkerung und der verringerten Inzidenz für Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems existiert¹.

Die Herz-Kreislauferkrankungen mit ihren Spätfolgen Herzinfarkt und Schlaganfall stellen in den westlichen Industrieländern die häufigste Todesursache dar². Auch in Österreich ist, sowohl bei Männern als auch bei Frauen, der Großteil der Sterbefälle auf Herzkreislauferkrankungen zurückzuführen. Abb. 1 zeigt den prozentuellen Anteil der Todesursachen in Österreich im Jahr 2006 getrennt nach Geschlecht.

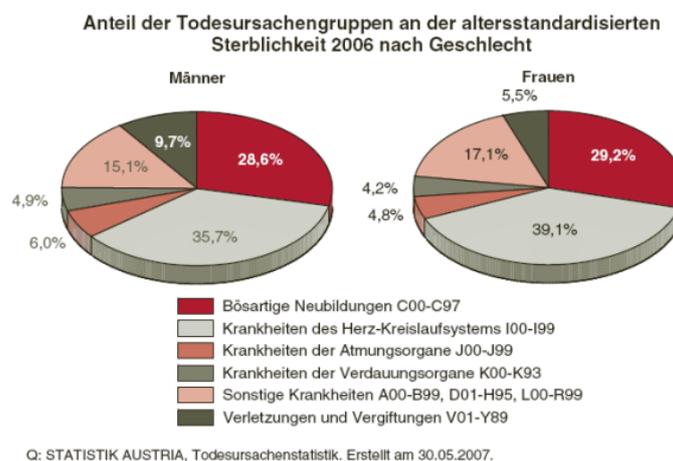


Abb. 1: Todesursachen der Männer und Frauen in Österreich im Jahr 2006³

¹ Renaud S., de Logeril M. (1992)

² Räthel T.R. (2005)

³ www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/todesursachen, 12.5.2009

Zur Entstehung von Herz-Kreislaferkrankungen trägt sehr wesentlich die Atherosklerose bei, die zu einer Verringerung des Durchmessers bzw. zu einem Verschluss der Blutgefäße führen kann. Eine einwandfrei funktionierende Endothelschicht, welche die Gefäße als innerste Zellschicht auskleidet, ist für gesunde Gefäße von entscheidender Bedeutung. In den Endothelzellen katalysiert die endotheliale NO-Synthase die Oxidation von Arginin zu Stickstoffmonoxid. Als Nebenprodukt dieser Reaktion wird L-Citrullin gebildet (s. Abb. 2). Die physiologische Endothelfunktion beruht wesentlich auf der ausreichenden Synthese von NO und kann demzufolge nach heutigem Wissen als ein Schlüsselmolekül für die Aufrechterhaltung der Endothelfunktion angesehen werden⁴. Die kardioprotektive Wirkung von NO beinhaltet die Regulierung des Blutdrucks und des Gefäßtonus, eine Hemmung der Plättchenaggregation, Thrombozyten- und Leukozyten-Adhäsion und einer Proliferation von glatten Muskelzellen⁵.

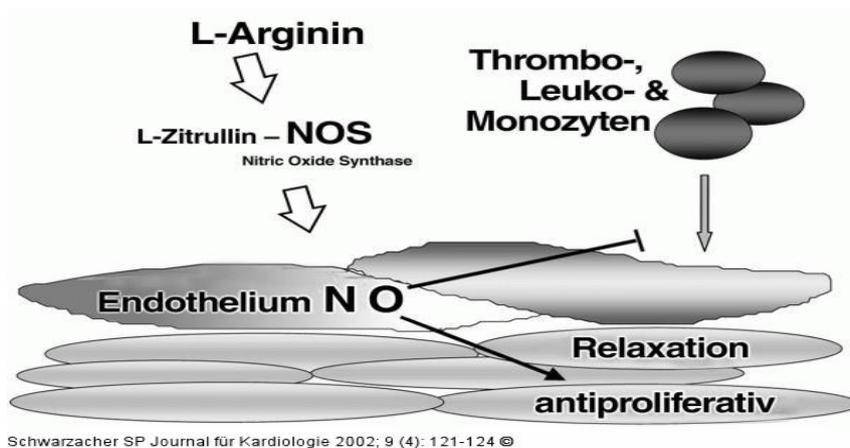


Abb. 2: Schematische Darstellung der NO-Biosynthese⁶

⁴ Schwarzacher S.P. Journal für Kardiologie (2002)

⁵ Naseem K.M. et al. (2005)

⁶ Schwarzacher S.P. Journal für Kardiologie (2002)

Steht für eine reibungslose Gefäßfunktion nicht mehr genug NO zur Verfügung spricht man von einer endothelialen Dysfunktion. Die Folgen können Erkrankungen des Gefäßsystems wie Atherosklerose, Thrombose, und Angina Pectoris sein⁷. Somit kann dem NO eine gefäßprotective Wirkung und eine entscheidende Rolle bei der Prävention der Atherosklerose zugeschrieben werden.

Der Rotwein wurde schon Anfang des 19. Jahrhunderts für eine positive kardiovaskuläre Wirkung verantwortlich gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass der Rotwein polyphenolische Inhaltsstoffe enthält, die die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) erhöhen und somit einer endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose entgegen wirken können⁸. Zu den Polyphenolen im Rotwein zählen z.B. die Anthocyane, Proanthocyanidine, Flavonoide, phenolische Säuren und Stilbenderivate. Zu letzteren gehört auch Resveratrol, dem bezüglich der Wirkung des Rotweines auf die Gefäße eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Effekt von Resveratrol auf die endotheliale NO-Synthase nicht alleine verantwortlich sein kann. Daher kommen auch andere Polyphenole im Rotwein für eine Wirkung auf die Aktivität der eNOS in Frage⁹.

In dieser Arbeit sollten insgesamt fünf österreichische Rotweine untersucht werden. Vier davon haben sich schon in einer laufenden Dissertation¹⁰ als sehr effektiv auf die gesteigerte Aktivität der eNOS erwiesen. Ein Rotwein hatte kaum eine Aktivität im Bioassay („ACCA“) (s. Kap 2.4). Ein Ziel war es, die Inhaltsstoffe der Rotweine mit Hilfe eines bereits etablierten Fraktionierungsschemas aufzutrennen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Fraktionen gelegt, die auch eine Wirkung im entsprechenden Zellassay zeigten. Nach Herstellung der Fraktionen sollte mit Hilfe der HPLC das Inhaltsstoffmuster der Rotweine miteinander verglichen und die Inhaltsstoffe näher charakterisiert werden. Der

⁷ Räthel T.R. (2005)

⁸ Räthel T.R. (2005)

⁹ Leikert et al. (2002)

¹⁰ Donath O. (in Vorbereitung)

Versuch, Unterschiede im Inhaltsstoffmuster aufzuzeigen und diese mit der Wirkung im „ACCA“ in Verbindung zu bringen, stand dabei im Vordergrund. Weiters sollten durch den Vergleich des Fingerprints der aktiven Weine mit dem des inaktiven Weines Rückschlüsse auf die wirksamkeitsbestimmenden Substanzen gezogen werden.

Anschließend sollte untersucht werden, ob die sehr zeitaufwändige Abtrennung von Begleitstoffen mit einer Polystyrolsäule (s. Kap. 2.3.1) durch Ausschütteln der Rotweine mit Ether und Ethylacetat ersetzt werden kann. Danach sollten unter Zuhilfenahme der HPLC die Ether- und Ethylacetatfraktionen mit den Fraktionen, die durch die Säulenchromatographie mit Polystyrol gewonnen wurden, qualitativ und quantitativ verglichen werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, das rote und grüne Weinlaub der Sorte Blaufränkisch zu untersuchen. Zuerst wurden die Inhaltsstoffe durch eine fraktionierte Extraktion nach ihrer Polarität aufgetrennt. Die gewonnenen Extrakte sollten mittels „ACCA“ (s. Kap. 2.4) auf deren Aktivität auf die eNOS überprüft werden. Weiters sollte ein direkter Vergleich der Extrakte vom roten und grünen Weinlaub mittels DC und HPLC aufgestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

2.1.1 Ausgewählte österreichische Rotweine

In dieser Arbeit wurden fünf österreichische Rotweine (s. Tab. 1) fraktioniert und untersucht. Diese fünf Rotweine wurden im Rahmen einer laufenden Dissertation¹¹, die sich mit dem Einfluss von polyphenolischen Inhaltsstoffen aus österreichischen Rotweinen auf die Aktivität der endothelialen NO-Synthase beschäftigt, aus ursprünglich acht getesteten Rotweinen ausgewählt. Darunter sind vier Rotweine, die sich als sehr effektiv auf die gesteigerte Freisetzung von NO herausstellten, und ein Rotwein, der beinahe keine Aktivität zeigte.

Blaifränkisch 2005 - „BK“ (Thermenregion, Tattendorf - Weingut Stift Klosterneuburg)
Merlot 2005 - „MC“ (Carnuntum, Göttlesbrunn - Winzerin Birgit Wiederstein)
Pinot Noir 2004 Grand Select - „PW“ (Wien - Weingut Weininger)
Rubin Carnuntum Zweigelt 2005 - „ZC“ (Carnuntum, Göttlesbrunn - Weingut Böheim)
St. Laurent 2004 - „SW“ (Wachau, Spitz/Donau - Hof zu Mühlgraben, Franz Mayer)

Tab. 1: Ausgewählte österreichische Rotweine

Der St. Laurent zeigte im Zellassay kaum eine Aktivität und wurde in dieser Arbeit sozusagen als „Negativprobe“ verwendet. Es sollte versucht werden, durch den Vergleich des Inhaltsstoffmusters der aktiven Weine mit dem des St. Laurent, Rückschlüsse auf die wirksamkeitsbestimmenden Substanzen zu ziehen.

¹¹ Donath O. Dissertation

2.1.2 Weinlaub

Zur Untersuchung der Wirkung von Weinblättern auf die endotheliale NO-Synthese, wurden Blätter der Sorte Blaufränkisch aus dem Burgenland (Region Neusiedlersee – Hügelland, Rust – E. Triebaumer) in unterschiedlichen Entwicklungsstadien herangezogen. Die grünen Weinblätter („GWL“) wurden zum Zeitpunkt der Traubenernte Ende September 2008 und die roten Weinblätter („RWL“) Ende Oktober 2008, nachdem sie sich schon gänzlich rot verfärbt hatten, gesammelt (s. Abb. 3) und bei Raumtemperatur in Dunkelheit getrocknet.



Abb. 3: Grünes und rotes Weinlaub der Sorte Blaufränkisch (Neusiedlersee – Hügelland)

2.2 Extrakte und Fraktionen

2.2.1 Fraktionierte Extraktion des Weinlaubs

Die roten Weinblätter („RWL“) und grünen Weinblätter („GWL“) wurden mit der ASE 200 - Accelerated Solvent Extractor (Dionex) - extrahiert. Die verwendete Methode ist der Tab. 2 zu entnehmen. Die ASE stellt eine Alternative zu anderen Extraktionsmethoden dar und hat den Vorteil, dass die Extraktion sehr schnell durchführbar ist, der Lösungsmittelverbrauch geringer ist und Temperatur und Druck voreinstellbar sind. Daher besteht eine sehr gute qualitative und quantitative Reproduzierbarkeit der Extrakte. Vor der Extraktion musste das Weinlaub mit einer

Drogenmühle gerieben werden. Dabei wurde eine Siebgröße von 0,75 mm verwendet.

Heat	5 min
Static	2 min
Flush (%)	10
Purge	60
Cycles	3
Pressure (bar)	150
Temperature (°C)	40
Solvents	Dichlormethan Ethylacetat Methanol Wasser

Tab. 2: Methode der ASE (Accelerated Solvent Extractor)

Die pulverisierte Droge wurde beginnend mit dem apolaren Dichlormethan, weiters dem mittelpolaren Ethylacetat, dann dem polaren Methanol und schließlich mit dem äußerst polaren Wasser extrahiert. Die vier gewonnenen Extrakte konnten mit vermindertem Druck zur Trockene gebracht werden. Die Extraktion wurde in drei Parallel-Ansätzen durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten abgekürzten Bezeichnungen der Extrakte sind in Tab. 3 aufgelistet. Die erhaltenen Ausbeuten der Extrakte sind der Tab. 4 zu entnehmen. Das Wasser-Extrakt wurde bei der dritten Extraktion ausgelassen, da dieses im Zellassay keine Wirkung zeigte. Die Bereiche der Droge-Extrakt Verhältnisse (DEV) nach drei Ansätzen sind in Tab. 5 angegeben.

Extrakt	Abkürzung
Dichlormethanextrakt	DCM
Ethylacetatextrakt	EA
MeOH-Extrakt	MeOH
Wasser-Extrakt	H ₂ O

Tab. 3: Verwendete Abkürzungen für die Weinlaubextrakte

Grünes Weinlaub	DCM	EA	MeOH	H ₂ O
1. Extraktion	22,75%	3,01%	61,51%	12,73%
2. Extraktion	16,87%	51,81%	2,45%	28,87%
3. Extraktion	30,39%	2,78%	66,84%	
Rotes Weinlaub				
1. Extraktion	13,16%	1,62%	50,80%	34,42%
2. Extraktion	13,9%	0,86%	45,26%	39,98%
3. Extraktion	20,44%	1,52%	78,04%	

Tab. 4: Ausbeuten der Extrakte von rotem und grünem Weinlaub bezogen auf die Gesamtmenge an Extrakt in Prozent

Grünes Weinlaub	DEV	Rotes Weinlaub	DEV
DCM	12-13 : 1	DCM	12-17 : 1
EA	82-138 : 1	EA	135-244 : 1
MeOH	4-6 : 1	MeOH	4-5 : 1
H ₂ O	11-22 : 1	H ₂ O	5-7 : 1

Tab. 5: Bereiche der Droge-Extrakt Verhältnisse (DEV) von drei Ansätzen

Die Ausbeuten der ersten fraktionierten Extraktion sind in Abb. 4 und Abb. 5 als Beispiel graphisch dargestellt. Dabei ist der Anteil des MeOH-Extraktes von rotem und grünem Weinlaub am höchsten. Die Ausbeute an EA-Extrakt ist bei beiden sehr gering. Die Menge an DCM-Extrakt ist bei grünem Weinlaub tendenziell höher, was auf den höheren Gehalt an Chlorophyll im grünen Weinlaub zurückzuführen ist. Der Anteil des H₂O-Extraktes ist bei rotem Weinlaub dreimal höher als bei grünem Weinlaub.

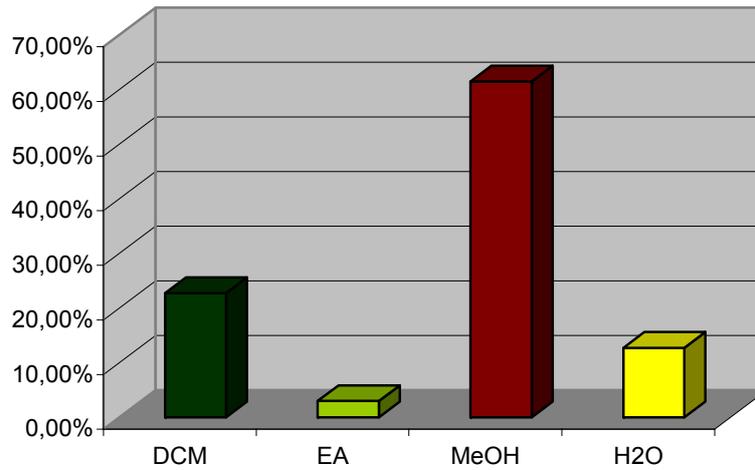


Abb. 4: Ausbeuten der ersten Extrakte des grünen Weinlaubs bezogen auf die Gesamtmenge des Extraktes in Prozent

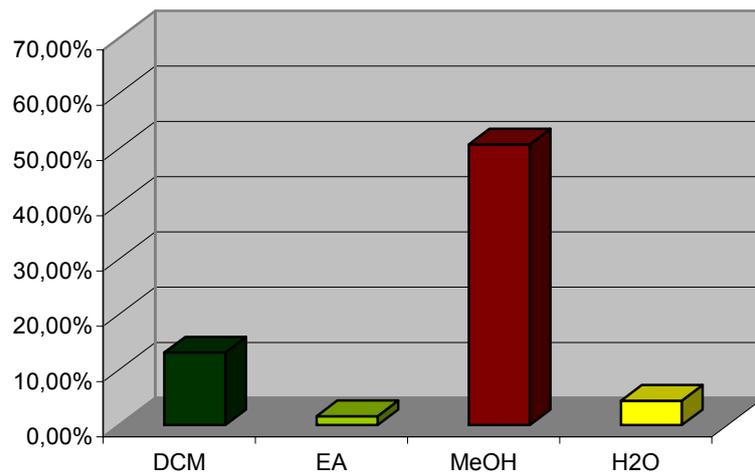


Abb. 5: Ausbeuten der ersten Extrakte des roten Weinlaubs bezogen auf die Gesamtmenge des Extraktes in Prozent

2.2.2 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung der Rotweine

Die Fraktionierung der Rotweine erfolgte nach einem bereits in einer laufenden Dissertation¹² etabliertem Schema (siehe Abb. 6). Jeder Fraktionierungsschritt wurde vom entsprechenden Zellassay (s. Kap. 2.4) begleitet, um die Aktivität der einzelnen Fraktionen hinsichtlich der gesteigerten Bildung von NO zu ermitteln.

Zur genaueren Analyse der Inhaltsstoffe der Rotweine musste zuerst der Alkohol abgetrennt werden. Durch Einengen des Rotweines auf ein Zehntel, ließ sich der Großteil des Alkohols entfernen. 20 ml dieses Konzentrats wurden zuerst zentrifugiert, um Schwebstoffe abzutrennen, und dann auf eine Polystyrolsäule (s. Kap. 2.3.1) aufgebracht. Durch Elution mit 10%igem EtOH konnte der Vorlauf („VL“), der vor allem Glycerin, Fruchtsäuren und Zucker enthält, abgetrennt werden. Durch eine anschließende Elution mit 90%igem EtOH wurden die polyphenolischen Inhaltsstoffe – diese Polyphenolfraktion wird als „PPF“ bezeichnet – von der Säule gelöst. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Lyophilisation für weitere Versuche haltbar gemacht.

Die eNOS-aktivierende Polyphenolfraktion wurde weiters in eine polare, wasserlösliche Fraktion, die oligomere Procyanidine, Anthocyane und Gerbstoffe enthält und eine apolare, in Ethylacetat lösliche Fraktion, in der sich Flavonoidaglyka und -glucoside, Resveratrol und dessen Glycosid Piceid und Tyrosol, Benzoessäurederivate und Phenylpropansäurederivate befinden, aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die apolare Fraktion gerichtet, da sich diese schon in vorangegangener Arbeit¹³ als die wirksame herausstellte. Die apolare Fraktion wurde mit Hilfe der Festphasenextraktion weiter fraktioniert (s. Kap. 2.3.4).

¹² Donath O. (in Vorbereitung)

¹³ Neckam M. (2008)

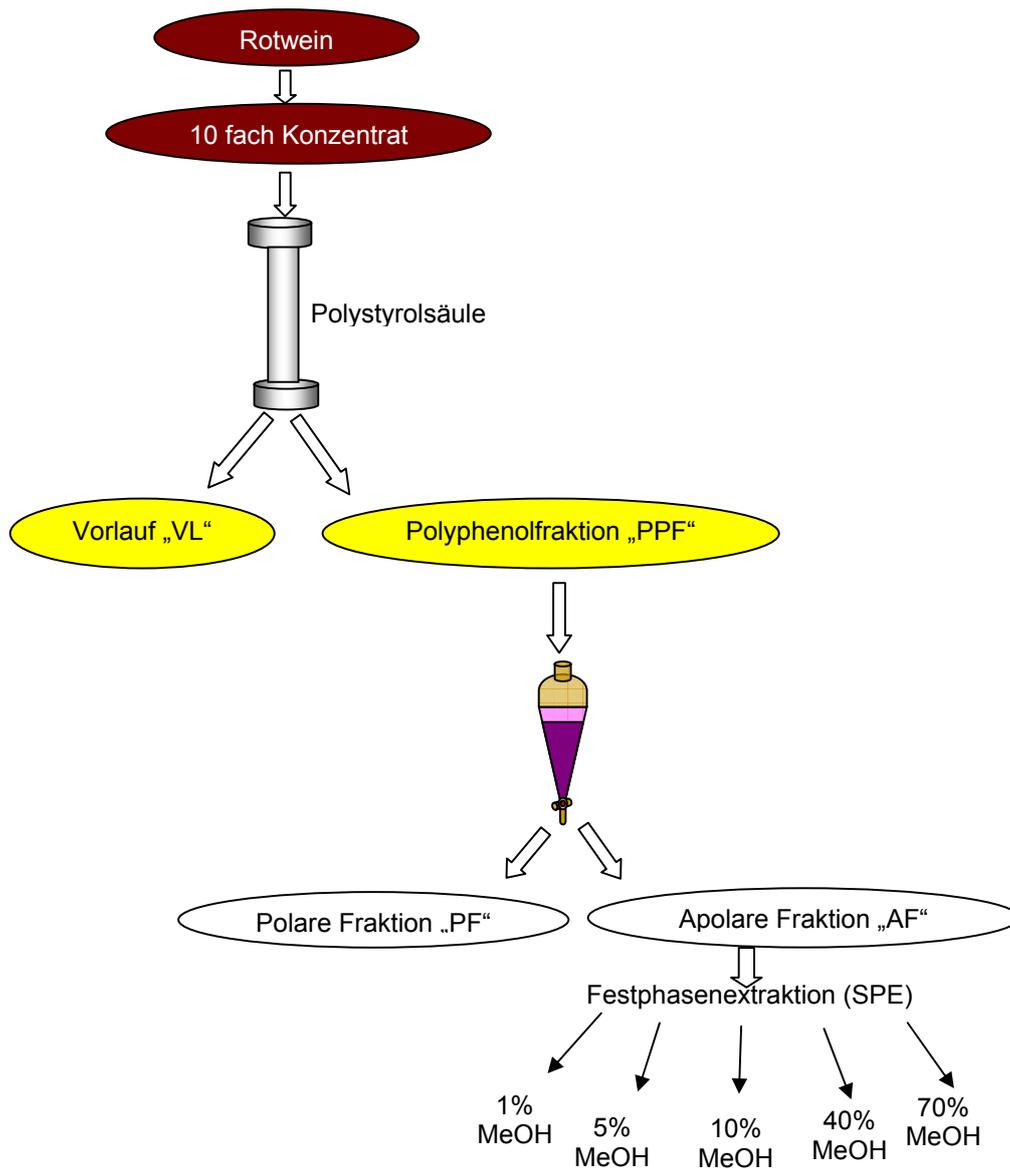


Abb. 6: Fraktionierungsschema für Rotwein

Die Ausbeuten von „VL“ und „PPF“ aller fünf Rotweine sind in Abb. 7 dargestellt. Die Werte in Tab. 6 zeigen, dass die Polyphenolfractionen der Rotweine Blaufränkisch, Pinot, Zweigelt und Merlot jeweils ca. 10% der Gesamtausbeute ausmachen, der St. Laurent jedoch mit knapp 5% einen deutlich geringeren Gehalt an Polyphenolen aufweist.

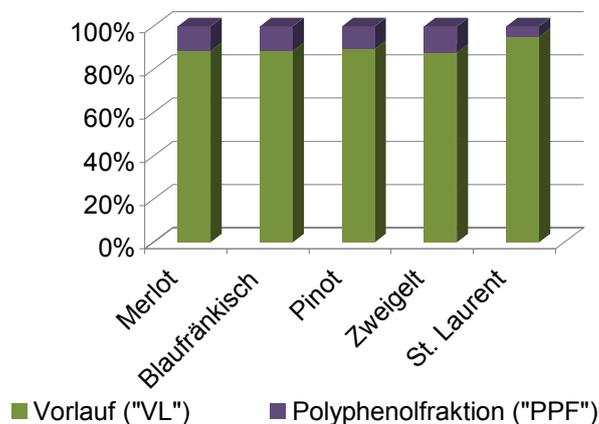


Abb. 7: Ausbeuten der Vorläufe („VL“) und der Polyphenolfractionen („PPF“) der fünf Rotweine in Prozent

	Vorlauf „VL“	Polyphenolfraktion „PPF“
Merlot	88,58%	11,42%
Blaufränkisch	88,53%	11,47%
Pinot	89,61%	10,39%
Zweigelt	87,86%	12,14%
St. Laurent	95,18%	4,82%

Tab. 6: Ausbeuten der Vorläufe („VL“) und der Polyphenolfractionen („PPF“) der fünf Rotweine in Prozent

Bei der Auftrennung der „PPF“ in eine apolare Fraktion („AF“) und eine polare Fraktion („PF“) wurden jeweils 450 mg der „PPF“ des Merlot, Blaufränkisch, Pinot und Zweigelt und 200 mg der „PPF“ des St. Laurent verwendet. Auf Grund der geringen Ausbeute beim St. Laurent (s. Abb. 7) konnte bei diesem Rotwein nicht mit der gleichen Menge gearbeitet werden. Nach dem Lösen und Verdünnen der Fraktionen mit 200 ml bzw. 100 ml Wasser (St. Laurent), ergab das anschließende Ausschütteln mit Ethylacetat (4 x 200 ml bzw. 4 x 100 ml) folgende in Tab. 7 angegebene prozentuelle Gewichtsverteilung der „AF“ und „PF“. Diese Verteilung ist in Abb. 8 graphisch dargestellt.

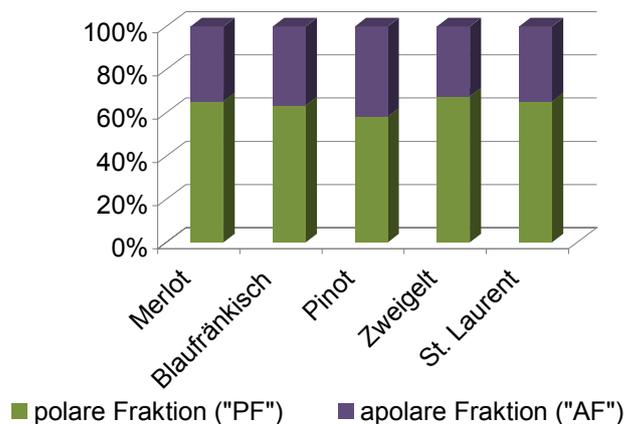


Abb. 8: Ausbeuten der apolaren Fraktion („AF“) und polaren Fraktion („PF“) der fünf Rotweine in Prozent

	Apolare Fraktion „AF“	Polare Fraktion „PF“
Merlot	34,65%	65,35%
Blaufränkisch	36,51%	63,48%
Pinot	41,77%	58,23%
Zweigelt	32,44%	67,56%
St. Laurent	35,99%	64,01%

Tab. 7: Ausbeuten der apolaren Fraktion („AF“) und polaren Fraktion („PF“) der fünf Rotweine in Prozent

Die „AF“ wurde mittels Festphasenextraktion (SPE) mit einer C18 Kartusche (s. Kap. 2.3.4) weiter in eine 1%-, 5%-, 10%-, 40%-, und 70%-MeOH Fraktion aufgetrennt. Die Fraktionen werden in dieser Arbeit als Subfraktionen bezeichnet. Es wurden von den Weinen Merlot, Blaufränkisch, Zweigelt und Pinot jeweils zwei Chargen hergestellt, vom St. Laurent auf Grund der nur geringen Ausbeute der „AF“ nur eine Charge. Die Auftragemenge auf die Kartusche betrug jeweils 50 mg. Die Ausbeuten der erhaltenen Subfraktionen sind der Tab. 8 zu entnehmen.

1. Charge	1%- MeOH	5%- MeOH	10%- MeOH	40%- MeOH	70%- MeOH
Pinot:	15,5%	17,23%	17,89%	40,75%	8,69%
Merlot	17,54%	11,12%	11,84%	47,52%	11,92%
Blaufränkisch	10,44%	13,74%	9,25%	52,92%	13,92%
Zweigelt	6,47%	9,61%	13,46%	68,79%	10,13%
2. Charge					
Pinot	9,85%	14,29%	18,77%	49,25%	7,84%
Merlot	8,42%	8,97%	12,68%	56,00%	13,93%
Blaufränkisch	4,91%	7,23%	15,97%	60,78%	11,11%
Zweigelt	7,67%	12,88%	14,44%	54,07%	10,94%
St. Laurent	9,08%	7,18%	12,90%	51,82%	19,02%

Tab. 8: Ausbeuten der Subfraktionen der apolaren Fraktion („AF“) nach der Festphasenextraktion

Die „AF“ der fünf Rotweine und die Subfraktionen (s. Tab. 8) wurden mit der HPLC (s. Kap. 2.3.3) qualitativ und quantitativ verglichen. Um einen quantitativen Vergleich mit der HPLC durchführen zu können, wurden die absoluten Auftragemengen der Fraktionen auf die HPLC-Säule in Relation zu den jeweiligen Ausbeuten gesetzt. Nach einigen Vorversuchen wurde die absolute Auftragemenge von 200 µg bei einer Ausbeute von 40% der „AF“ (s. Tab. 7) festgelegt. Die berechneten absoluten Auftragemengen sind in Tab. 9 angegeben.

	Ausbeute „AF“	Auftragemenge (absolut)
Pinot	41,77%	208,85 µg
Merlot	34,65%	173,25 µg
Zweigelt	32,44%	162,20 µg
Blaufränkisch	36,51%	182,55 µg
St. Laurent	35,99%	179,95 µg

Tab. 9: Absolute Auftragemengen der apolaren Fraktion („AF“) auf die HPLC-Säule

Die Subfraktionen der „AF“ wurden in gleicher Weise mit Hilfe der HPLC (s. Kap. 2.3.3) qualitativ und quantitativ verglichen. Die absoluten Auftragemengen wurde auch hier in Relation zu den Ausbeute der einzelnen Subfraktionen (s. Tab. 8)

gesetzt. Dabei wurde die absolute Auftragemenge der „AF“ je nach Ausbeute auf die entsprechenden Subfraktionen aufgeteilt (s. Tab. 10).

Pinot	Absolute Auftragemenge	Merlot	Absolute Auftragemenge
1%-MeOH	20,57 µg	1%-MeOH	14,59 µg
5%-MeOH	29,84 µg	5%-MeOH	15,54 µg
10%-MeOH	39,20 µg	10%-MeOH	21,97 µg
40%-MeOH	102,4 µg	40%-MeOH	97,02 µg
70%-MeOH	16,37 µg	70%-MeOH	24,13 µg
Zweigelt		Blaufränkisch	
1%-MeOH	12,44 µg	1%-MeOH	8,96 µg
5%-MeOH	20,88 µg	5%-MeOH	13,2 µg
10%-MeOH	23,42 µg	10%-MeOH	29,15 µg
40%-MeOH	87,70 µg	40%-MeOH	110,95 µg
70%-MeOH	17,74 µg	70%-MeOH	20,28 µg
St. Laurent			
1%-MeOH	306 µg		
5%-MeOH	242 µg		
10%-MeOH	435 µg		
40%-MeOH	1747 µg		
70%-MeOH	641 µg		

Tab. 10: Absolute Auftragemengen der Subfraktionen der „AF“ auf die HPLC-Säule

2.2.3 Herstellung der Ether- und Ethylacetatfraktionen

Die Säulenchromatographie, die zur Auftrennung des Rotweinkonzentrates in einen Vorlauf und in eine Polyphenolfraktion eingesetzt wurde, stellt ein sehr gutes, jedoch zeitaufwändiges Verfahren für die Fraktionierung des Rotweines dar. In dieser Arbeit sollte nun durch eine andere Vorgangsweise versucht werden, diesen Schritt der Fraktionierung zu ersetzen. 200 ml des Rotweins wurden mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und mit 4 x 200 ml Ether ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde gesammelt und anschließend zur Trockene gebracht. Anschließend wurde der verdünnte Rotwein noch einmal mit 4 x 200 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Auch diese Fraktionen wurden zur Trockene gebracht und anschließend alle Fraktionen durch Lyophilisation haltbar gemacht. Die Etherfraktionen („ETHF“) und die Ethylacetatfraktionen („EAF“) sollten anschließend untereinander und mit den „AF“, die durch die Säulenchromatographie gewonnen wurden, qualitativ und quantitativ verglichen werden. Die Ausbeuten sind in Tab. 11 angegeben.

Pinot: Gesamte Ausbeute: 4986,44 mg Etherfraktion: 4,99% Ethylacetatfraktion: 5,68% H ₂ O-Fraktion: 89,32%	Merlot: Gesamte Ausbeute: 5571,78 mg Etherfraktion: 3,18% Ethylacetatfraktion: 5,08% H ₂ O-Fraktion: 91,74%
Blafränkisch Gesamte Ausbeute: 5379,37 mg Etherfraktion: 3,82% Ethylacetatfraktion: 3,47% H ₂ O-Fraktion: 92,71%	Zweigelt Gesamte Ausbeute: 5854,95 mg Etherfraktion: 4,03% Ethylacetatfraktion: 5,25% H ₂ O-Fraktion: 91,85%
St. Laurent Gesamte Ausbeute: 5168,43 mg Etherfraktion: 2,51% Ethylacetatfraktion: 4,25% H ₂ O-Fraktion: 93,25%	

Tab. 11: Ausbeuten der Ether-, Ethylacetat- und H₂O-Fractionen

Eine weitere Auftrennung der „ETHF“ und „EAF“ in eine 1%-, 5%-, 10%-, 40%- und 70%-MeOH Fraktion gelang unter Zuhilfenahme der Festphasenextraktion mit einer C18 Kartusche (s. Kap. 2.3.4). Diese Fraktionen werden als Ether- bzw. Ethylacetat-Subfraktionen bezeichnet. Die erhaltenen Ausbeuten sind der Tab. 12 und der Tab. 13 zu entnehmen.

	1%- MeOH	5%- MeOH	10%- MeOH	40%- MeOH	70%- MeOH
Pinot:	47,58%	17,23%	17,89%	40,75%	8,69%
Merlot	72,25%	11,12%	11,84%	47,52%	11,92%
Blaufränkisch	75,34%	13,74%	9,25%	52,92%	13,92%
Zweigelt	44,44%	9,61%	13,46%	68,79%	10,13%
St. Laurent	72,15%	3,31%	6,42%	13,79%	4,33%

Tab. 12: Ausbeuten der Ether-Subfraktionen

	1%- MeOH	5%- MeOH	10%- MeOH	40%- MeOH	70%- MeOH
Pinot:	46,7%	4,83%	8,8%	34,67%	5,0%
Merlot	49,55%	3,79%	7,09%	30,49%	9,08%
Blaufränkisch	48,2%	3,21%	7,34%	35,12%	6,13%
Zweigelt	51,35%	4,5%	6,39%	31,52%	6,23%
St. Laurent	79,87%	1,86%	2,49%	13,01%	2,76%

Tab. 13: Ausbeuten der Ethylacetat-Subfraktionen

Die „ETHF“ und „EAF“ und die dazugehörigen Subfraktionen wurden mittels HPLC qualitativ und quantitativ verglichen. Um einen quantitativen Vergleich der verschiedenen Fraktionen zu ermöglichen, wurden auch hier in gleicher Weise wie bei den „AF“ (s. Tab. 9) die absoluten Auftragemengen auf die HPLC-Säule in Relation zu den Ausbeuten gesetzt. Von den „ETHF“ und „EAF“ wurde jeweils 200 µg auf die Säule aufgebracht, von ihren Subfraktionen entsprechend weniger. Die absoluten Auftragemengen der Ether- und Ethylacetat-Subfraktionen sind der Tab. 14 und der Tab. 15 zu entnehmen.

Pinot	Absolute Auftragemenge	Merlot	Absolute Auftragemenge
1%-MeOH	95,16 µg	1%-MeOH	144,5 µg
5%-MeOH	10,52 µg	5%-MeOH	12,72 µg
10%-MeOH	31,84 µg	10%-MeOH	7,98 µg
40%-MeOH	47,12 µg	40%-MeOH	28,12 µg
70%-MeOH	15,38 µg	70%-MeOH	6,68 µg
Zweigelt		Blafränkisch	
1%-MeOH	88,88 µg	1%-MeOH	150,68 µg
5%-MeOH	10,64 µg	5%-MeOH	13,0 µg
10%-MeOH	31,54 µg	10%-MeOH	8,4 µg
40%-MeOH	51,7 µg	40%-MeOH	22,58 µg
70%-MeOH	17,24 µg	70%-MeOH	5,4 µg
St. Laurent			
1%-MeOH	144,3 µg		
5%-MeOH	6,62 µg		
10%-MeOH	12,84 µg		
40%-MeOH	27,58 µg		
70%-MeOH	8,66 µg		

Tab. 14: Absolute Auftragemengen der Ether-Subfraktionen

Pinot	Absolute Auftragemenge	Merlot	Absolute Auftragemenge
1%-MeOH	93,4 µg	1%-MeOH	99,1 µg
5%-MeOH	9,66 µg	5%-MeOH	7,58 µg
10%-MeOH	17,6 µg	10%-MeOH	14,18 µg
40%-MeOH	69,34 µg	40%-MeOH	60,98 µg
70%-MeOH	10,0 µg	70%-MeOH	18,16 µg
Zweigelt		Blaufränkisch	
1%-MeOH	102,7 µg	1%-MeOH	96,4 µg
5%-MeOH	9,0 µg	5%-MeOH	6,42 µg
10%-MeOH	12,78 µg	10%-MeOH	14,68 µg
40%-MeOH	63,04 µg	40%-MeOH	70,24 µg
70%-MeOH	12,46 µg	70%-MeOH	12,26 µg
St. Laurent			
1%-MeOH	159,74 µg		
5%-MeOH	3,72 µg		
10%-MeOH	4,98 µg		
40%-MeOH	26,02 µg		
70%-MeOH	5,52 µg		

Tab. 15: Absolute Auftragemengen der Ethylacetat-Subfraktionen

2.3 Chromatographische und spektrometrische Methoden

2.3.1 Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie diente zur Auftrennung des Rotweinkonzentrates. Es wurde dabei eine Polystyrolsäule verwendet, aus der zuerst der Vorlauf, mit den unerwünschten Begleitstoffen wie Glycerin, Zucker und Fruchtsäuren, durch Elution mit 10%igem Ethanol (Eluens 1) ausgewaschen werden konnte. Anschließend wurden mit 90%igem Ethanol (Eluens 2) die polyphenolischen Inhaltsstoffe eluiert.

Stationäre Phase: Polystyrol Diaion HP20

Säule: Gesamtlänge: 100 cm

Durchmesser: 2 cm

Volumen: 314 cm²

Füllhöhe: 90 cm

Eluens 1: Ethanol 10% (100 ml / ml Rotweinkonzentrat)

Eluens 2: Ethanol 90% (50 ml / ml Rotweinkonzentrat)

2.3.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie kam in dieser Arbeit ausschließlich für analytische Zwecke zum Einsatz und wurde zum Vergleich der verschiedenen Extrakte von rotem und grünem Weinlaub herangezogen. Um ein optimales DC-System zu finden, mussten verschiedene mobile Phasen getestet werden. Die Zusammensetzungen der verwendeten Fließmittel sind in Tab. 16 angegeben.

Stationäre Phase	HPTLC Fertigplatte Kieselgel 60 F ₂₅₄
Trennstrecke	8 cm
Mobile Phase	<ul style="list-style-type: none"> • Chloroform – Methanol – Eisessig - H₂O (60 + 12 + 32 + 8) = „CMEW“ • Dichlormethan – Cyclohexan – Ameisensäure konz. – Ethylformiat (30 + 35 + 5 + 30) = „Apoflav“ • Ethylacetat – Ameisensäure konz. – Eisessig – Wasser (100 + 11 + 11 + 26) = „111-26“ • Ethylacetat – Eisessig - H₂O (100 + 20 + 30) Oberphase = „CAT“ - FM

Tab. 16: Zusammensetzung der Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie

Die Standarddetektion erfolgte unter UV-Licht bei der Wellenlänge von 366 nm nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz A und Polyethylenglycol (PEG). Die verwendeten Sprühreagentien sind in Tab. 17 beschrieben.

Reagenz	Zusammensetzung	Detektion	Nachzuweisende Substanzklasse
Naturstoff Reagenz A	1%ige Lösung von Diphenylborsäure-2-aminoethylester in Methanol; 5%iges Polyethylenglykol 400 in Ethanol zum Nachbesprühen	UV 366 nm, färbige Fluoreszenzen	Flavonoide und andere phenolische Inhaltsstoffe
Echtblausalzreagenz	100 mg Echtblausalz in 20 ml Wasser; 0,1N NaOH zum Nachbesprühen	Bei Tageslicht	Polyphenole, Catechin, Epicatechin und Polymere davon

Tab. 17: Sprühreagentien zur Detektion in der Dünnschichtchromatographie

2.3.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde in dieser Arbeit zum qualitativen und quantitativen Vergleich der „AF“ und Subfraktionen (s. Kap. 2.3.4) der fünf Rotweine, der „ETHF“, „EAF“ und der Ether- und Ethylacetat-Subfraktionen (s. Kap. 2.2.3), sowie der MeOH-Extrakte des Weinlaubs (s. Kap. 2.2.1) und zur weiteren Charakterisierung der phenolischen Inhaltsstoffe herangezogen.

Die Detektion erfolgte mit einem Diode Array Detektor bei 280 nm und 310 nm und einem Lichtstreuendetektor. Diese Arbeit konzentriert sich vor allem auf die Chromatogramme mittels Lichtstreuendetektor. Dieser hat den Vorteil, dass nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Vergleiche der Fraktionen möglich sind. Die Chromatogramme bei 280 nm und 310 nm sind im Anhang (s. Kap. 8) abgebildet. Die Gerätekonfiguration, sowie die eingesetzten HPLC - Systeme werden in Tab. 18 und Tab. 19 erläutert.

Gerätekonfiguration	
Pumpe	Shimadzu LC-20AD
Autosampler	Shimadzu SIL-10AD
Detektion	Diode Array Detektor: Shimadzu SPP-M20A bei 280 nm, 310 nm
	Lichtstreuendetektor: Shimadzu ELSD-LT
Software	LC-Solution Version 1.21SP1

Tab. 18: Gerätekonfiguration für die HPLC

System 1	
Säule	Thermo Fisher Scientific Aquasil C18 (5 µm) Säulendurchmesser 4,6 mm, Länge 250 mm
Temperatur	30 °C
Mobile Phase	Laufmittel A: Acetonitril Laufmittel B: Essigsäures H ₂ O (pH 2,65)
Fluss	1ml/min
Gradient	Steigung von Laufmittel A von 1% → 11% in 60 min 11% → 43% in 40 min 43% → 100% in 5 min 100% für 3 min 100% → 1% in 5 min 1% für 17 min
System 2	
Säule	Thermo Fisher Scientific Aquasil C18 (3 µm) Säulendurchmesser 2,1 mm, Länge 150 mm
Temperatur	30 °C
Flussrate	0,35 ml/min
Mobile Phase	Laufmittel A: Acetonitril Laufmittel B: Essigsäures H ₂ O (pH 2,65)
Gradient	Steigung von Laufmittel A von 4% → 11% in 28 min 11% → 31% in 20 min 31% → 47% in 4 min 47% → 100% in 2 min 100% für 4 min 100% → 4% in 1 min 4% für 11 min

Tab. 19: Verwendete HPLC - Systeme

Um einen quantitativen Vergleich mit Hilfe der HPLC durchführen zu können, mussten die absoluten Auftragemengen auf die HPLC-Säule in Relation zu den jeweiligen Ausbeuten der Fraktionen gesetzt werden (s. Kap. 2.2.2). Die absoluten Auftragemengen der „AF“ und der Subfraktionen sind in Tab. 9 und Tab. 10, jene der Ether- und Ethylacetat-Subfraktionen sind in Tab. 14 und Tab. 15 aufgelistet.

2.3.4 Festphasenextraktion (SPE)

Mit Hilfe der Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) wurden die apolaren Fraktionen der fünf Rotweine, die Ether- und Ethylacetatfraktionen und das MeOH-Extrakt des grünen Weinlaubs weiter aufgetrennt. Die Festphasenextraktion stellt eine Form der Säulenchromatographie dar. Es handelt sich um einen physikalischen Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase, dem Sorbens stattfindet¹⁴.

Sorbens:	C18 Kartusche Varian Mega Bond Elut Größe 20CC/5GM Durchmesser: 2 cm, Höhe: 8,5 cm Das Volumen beträgt bei dieser Kartusche 26,7 ml
Konditionierung:	Zum Reinigen bzw. Waschen der Kartusche wurde 100% MeOH p.a. verwendet. Die Kartusche wurde mit vier Reservoirvolumen H ₂ O konditioniert.
Elutionsmittel:	1% MeOH 5% MeOH 10% MeOH 40% MeOH 70% MeOH Es wurde jede Fraktion mit jeweils 4 Reservoirvolumen eluiert, beginnend mit 1% MeOH

¹⁴ Analytik biogener Arzneimittel, Pharmazeutische Biologie; Band 4, S.8

2.4 Bioassay (Arginin-Citrullin-Konversions-Assay)

Die in dieser Arbeit hergestellten Fraktionen wurden in einem Bioassay auf deren Wirksamkeit auf die endotheliale NO-Synthase überprüft.

Der Assay beruht auf der Tatsache, dass die endotheliale NO-Synthase L-Arginin in einer 5-Elektronen-Oxidationsreaktion unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff in L-Citrullin und NO umsetzt¹⁵. Somit kann eine gesteigerte Freisetzung von NO aus dem Endothel nachgewiesen werden.

Für die Versuche wurden Zellen der menschlichen Endothelzelllinie EA.hy926 verwendet. Die Zellen werden in 6-Well Zellkulturplatten in definierter Konzentration ausgesät. Nach drei Tagen werden sie mit den zu untersuchenden Substanzen 24 Stunden lang inkubiert und anschließend mit einem Puffer gewaschen. Danach werden die Zellen mit [¹⁴C] markiertem L-Arginin und dem Ca²⁺-Ionophor A23187 gefüttert¹⁶. Das radioaktive L-Arginin wird schließlich in L-Citrullin und NO umgesetzt. Nach 25 Minuten Reaktionszeit werden die Zellen lysiert und die Aminosäuren aus dem Lysat extrahiert. Diese werden im Anschluss auf Kieselgel Dünnschichtchromatographieplatten aufgetrennt und die radioaktiven Aminosäuren per Autoradiographie sichtbar gemacht und quantifiziert. Der prozentuale Umsatz von L-Arginin zu L-Citrullin ist ein Maß für die Aktivität der eNOS¹⁷.

¹⁵ Räthel T.R. (2005)

¹⁶ Leikert et al.(2002)

¹⁷ Räthel T.R. (2005)

3 Experimenteller Teil

In diesem Kapitel werden die Untersuchungen und Resultate der praktischen Arbeit behandelt.

Es wurde mit der Analyse der fünf österreichischen Rotweine Merlot 2005, Blaufränkisch 2005, Pinot Noir 2004, Zweigelt 2005 und St. Laurent 2004 begonnen. Am Anfang stand die bioassay-kontrollierte Fraktionierung der Rotweine. Zuerst wurden Begleitsubstanzen mit einer Polystyrolsäule abgetrennt (s. Abb. 6). Die so erhaltene wirksame „PPF“ wurde weiters durch Ausschütteln mit Ethylacetat in eine „AF“ und eine „PF“ getrennt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag bei der Analyse der „AF“, da diese einen Effekt im Zellassay zeigte. Die „AF“ konnte mittels Festphasenextraktion (s. Kap. 2.3.4) weiter aufgetrennt und anschließend unter Zuhilfenahme der HPLC charakterisiert werden.

Weiters wurde versucht, die sehr zeitaufwändige Abtrennung von Begleitstoffen mit Hilfe einer Polystyrolsäule durch Ausschütteln des Rotweines mit Ether und anschließend mit Ethylacetat zu ersetzen (s. Kap. 2.2.3). Die so erhaltenen „ETHF“ und „EAF“ wurden ebenfalls mittels Festphasenextraktion weiter aufgetrennt. Unter Zuhilfenahme der HPLC wurden die „ETHF“ und „EAF“ mit den „AF“ der fünf Rotweine qualitativ und quantitativ verglichen. Der Vergleich sollte zeigen, ob diese Methode der Fraktionierung zu ähnlichen Ergebnissen führt.

Im Anschluss an diese Analysen stand der dünnschichtchromatographische Vergleich der Dichlormethan-, MeOH-, Ethylacetat- und H₂O-Extrakte von grünem und rotem Weinlaub. Es wurden auch hier Zellassays durchgeführt, um die Wirkung der Weinlaubextrakte auf die eNOS zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass das MeOH-Extrakt zu einer gesteigerten Aktivität der endotheliale NO-Synthase führt (s. Abb. 35). Daher wurde dieses Extrakt mit Hilfe der Festphasenextraktion (SPE) weiter fraktioniert und analysiert.

3.1 Analyse der fünf ausgewählten österreichische Rotweine

3.1.1 Fraktionierung der fünf Rotweine

Die Rotweine Merlot 2005, Blaufränkisch 2005, Zweigelt 2005, Pinot Noir 2004 und St. Laurent 2004 wurden für die Untersuchung mittels Säulenchromatographie, mit Polystyrol als stationäre Phase, zuerst in eine „PPF“ und in einen „VL“ aufgetrennt. Anschließend folgte die Fraktionierung der „PPF“ in eine „PF“ und eine „AF“ (s. Abb. 6). Von den Weinen Merlot, Blaufränkisch, Zweigelt und Pinot Noir konnte bereits ein signifikanter Effekt der „PPF“ und der „AF“ auf die eNOS nachgewiesen werden. Der St. Laurent zeigte jedoch keine Wirkung und wurde in dieser Arbeit sozusagen als „Negativprobe“ verwendet. Durch den Vergleich des Inhaltsstoffmusters des St. Laurents mit dem der aktiven Weine, sollten Rückschlüsse auf die wirksamkeitsbestimmenden Substanzen gezogen werden.

3.1.2 HPLC-Vergleich der apolaren Fraktionen („AF“)

Für diese Analyse wurde die HPLC im System 2 (siehe Tab. 19) mit einem Diode Array Detektor und einem Lichtstredetektor verwendet. In der vorliegenden Arbeit wird der Schwerpunkt auf die Chromatogramme des Lichtstredetektors gelegt. Dieser hat den Vorteil, dass die Peaks nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ verglichen werden können. In Abb. 9 sind einige Beispiele für qualitative (roter Pfeil) und quantitative Unterschiede (grüner Pfeil) markiert.

Bei Zweigelt und Merlot ist der Peak bei min 17,5 auffällig. Dieser ist bei den anderen kaum vorhanden. Der Merlot weist außerdem bei min 39 und 50 Substanzen auf, die bei den anderen Rotweinen in diesem Chromatogramm nicht sichtbar sind. Die Substanz bei min 41 ist beim Pinot in viel höherer Konzentration enthalten. Weiters zeigen die Peaks bei min 20, 23 und 24 quantitative Unterschiede zwischen den verschiedenen apolaren Fraktionen. Alle fünf Rotweine weisen eine Vielzahl von Substanzen zwischen 40 und 50 min auf. Hier sind sowohl quantitative, als auch qualitative Unterschiede erkennbar. Das Chromatogramm der apolaren Fraktion des St. Laurent zeigt als einziges noch einige

deutliche Peaks bei einer Retentionszeit von über 50 min. Auch qualitative Unterschiede wie zum Beispiel die Peaks bei 8 und 52 min sind hier ersichtlich.

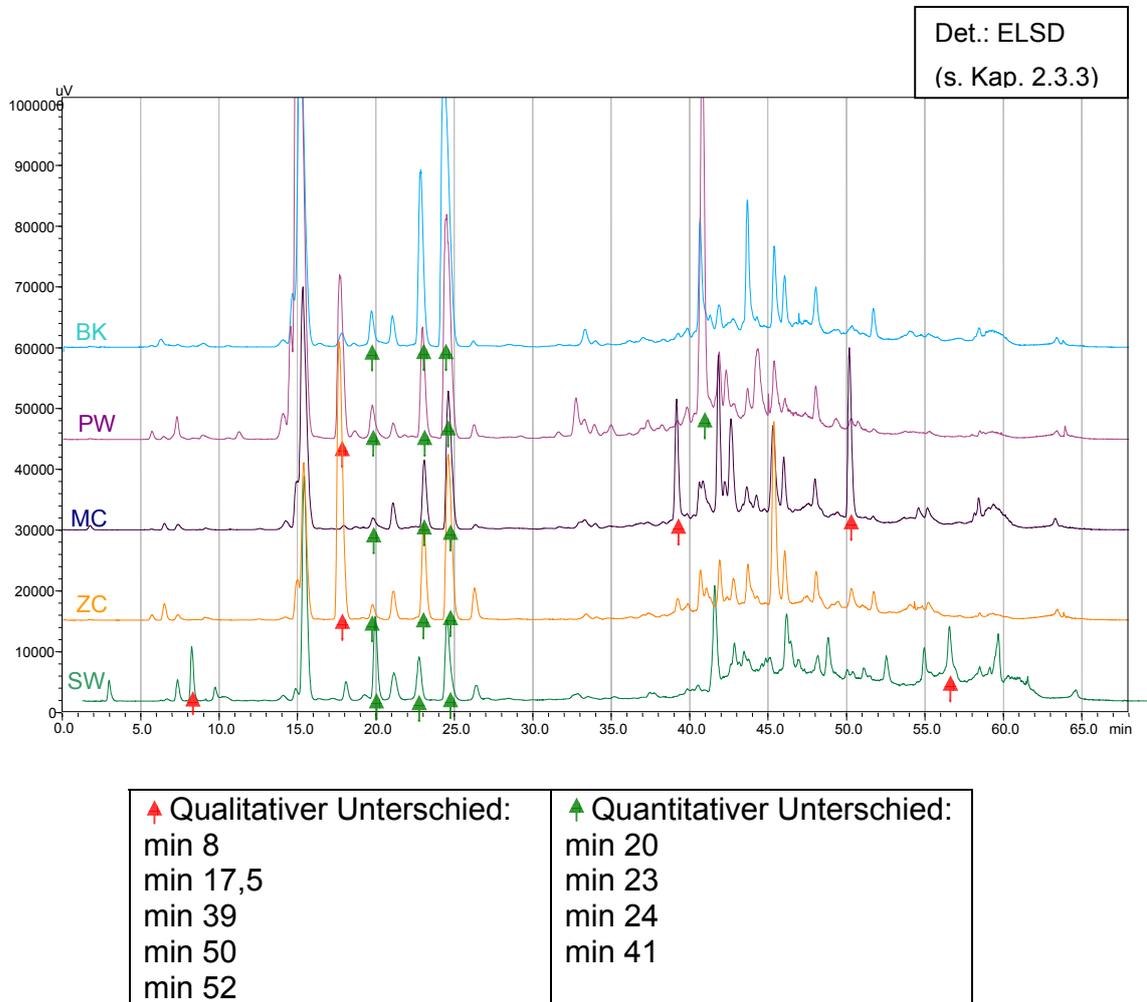


Abb. 9: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktionen („AF“) der 5 Rotweine

3.1.3 HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit den Subfraktionen

Nach der Herstellung „AF“, gelang eine weitere Auftrennung mittels Festphasenextraktion. Hierbei wurden 50 mg der „AF“ beginnend mit 1%-MeOH, 5%-MeOH, 10%-MeOH, 40%-MeOH und schließlich mit 70%-MeOH eluiert. Diese Subfraktionen wurden mit den „AF“ der Rotweine mit Hilfe der HPLC im System 2 (s. Tab. 19) verglichen. Die folgenden Chromatogramme der Subfraktionen sind

mit den entsprechenden Prozentzahlen gekennzeichnet, die die Konzentration des zur Elution verwendeten Methanols angeben. Jede dieser Fraktionen wurde mit Hilfe des Arginin-Citrullin Konversionsassays („ACCA“) (s. Kap. 2.4) auf deren Wirkung auf die endotheliale NO-Synthase untersucht.

Nach der Fraktionierung mittels SPE kann man den Großteil der Peaks aller fünf Rotweine in der 40%-Fraktion wiederfinden. Die meisten dieser Substanzen erscheinen ab einer Retentionszeit von 40 min im Chromatogramm. Drei markante Peaks sind jedoch auch bei 21, 23 und 24 min in dieser Fraktion zu sehen. In der 10%-Fraktion ist bei allen Rotweinen ein großer Peak bei 15 min sichtbar. Die Substanz bei min 17,5 in der „AF“ des Zweigelt und des Pinot ist nach der Extraktion an der Festphase in der 5%- und der 10%-Fraktion zu sehen. In der 70%-Fraktion weist der Merlot eine einzige Substanz bei 50 min auf. Weiters zeigt dieselbe Fraktion des St. Laurent eine Vielzahl von Substanzen nach einer Retentionszeit von 50 min.

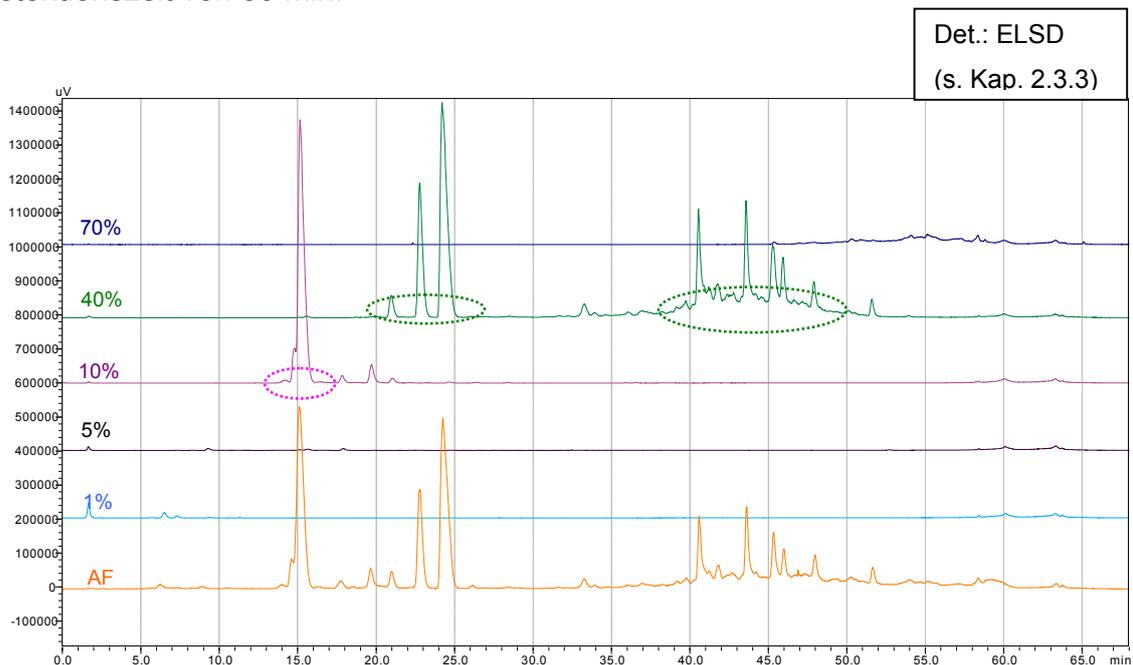


Abb. 10: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) des Blaufränkisch 2005 mit den Subfraktionen

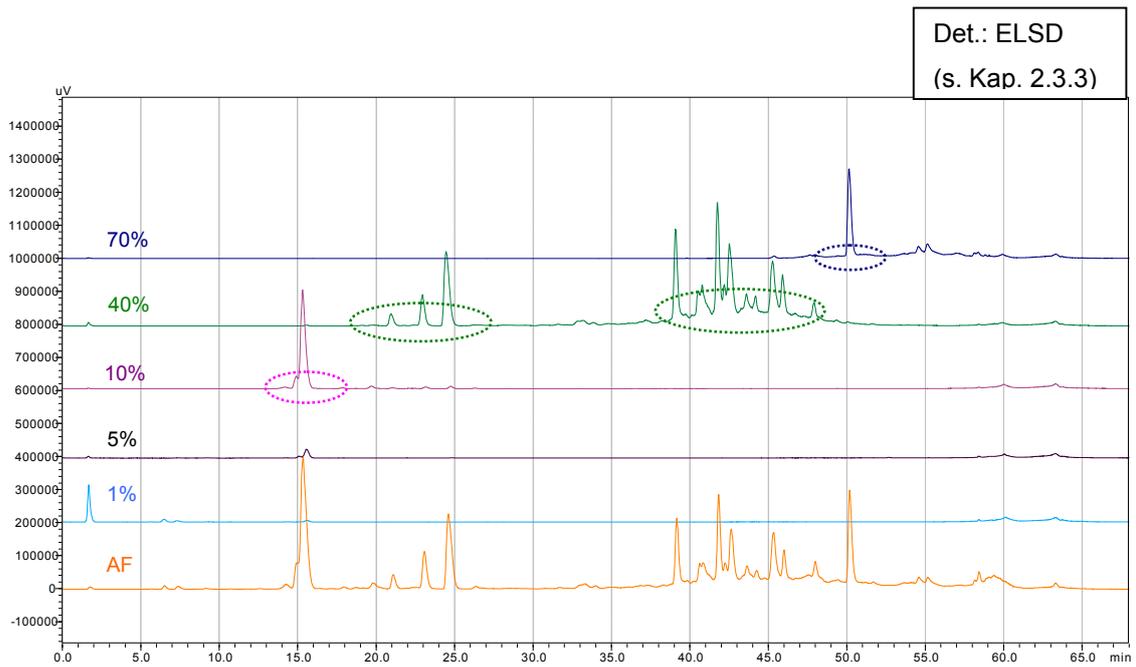


Abb. 11: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) des Merlot 2005 mit den Subfraktionen

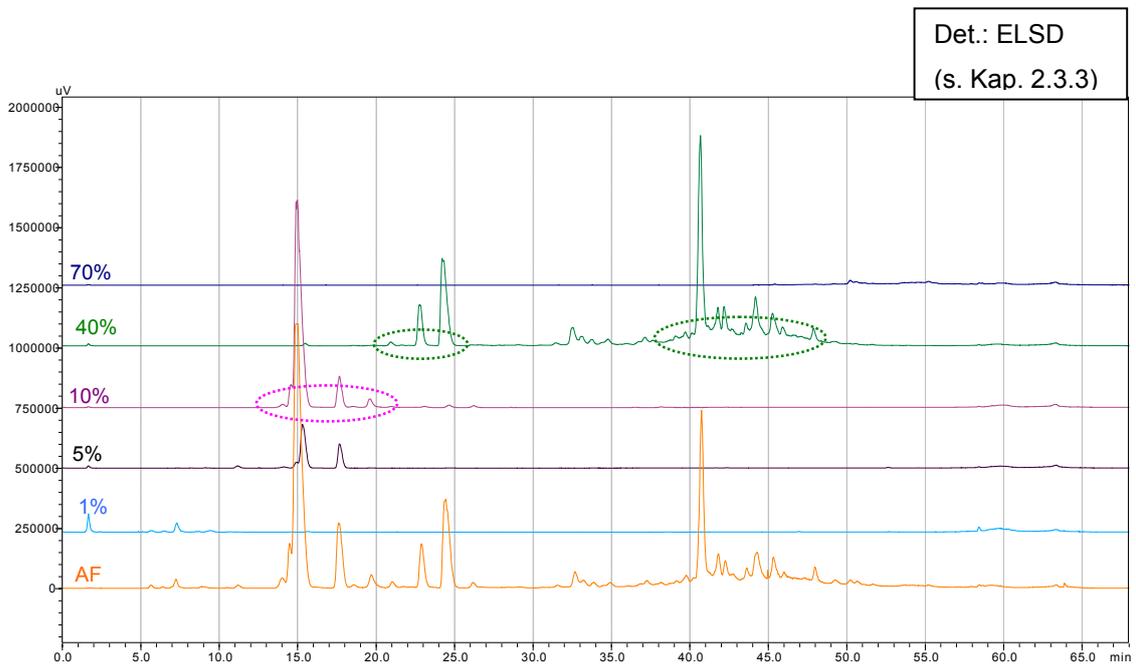


Abb. 12: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktionen („AF“) des Pinot 2004 mit den Subfraktionen

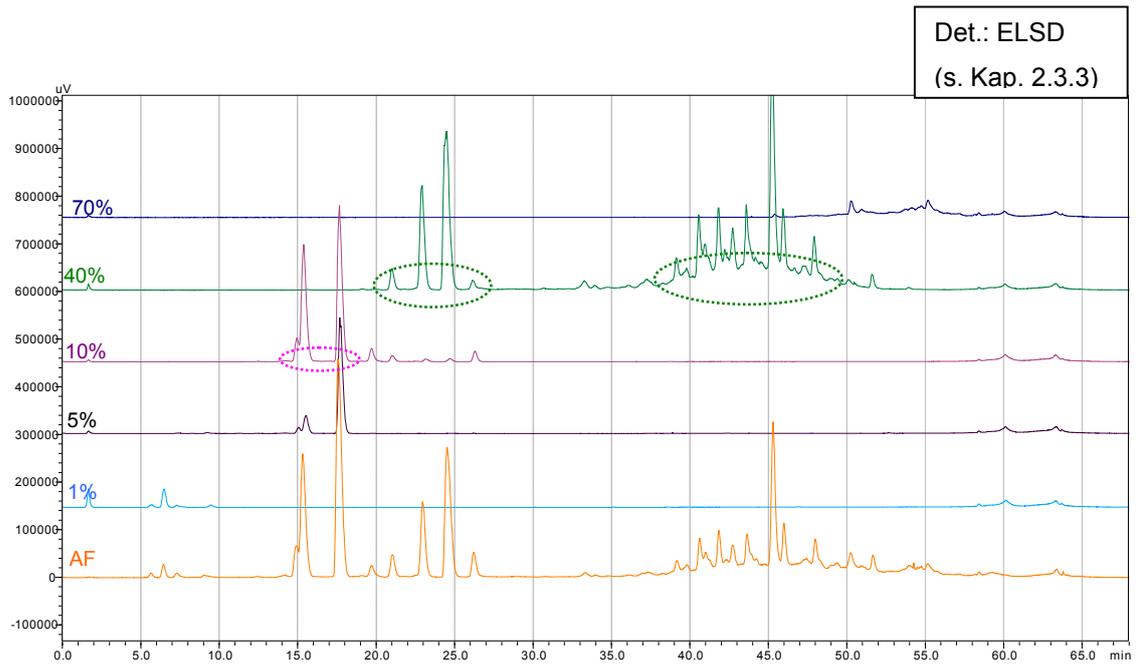


Abb. 13: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion „AF“ des Zweigelt 2004 mit den Subfraktionen

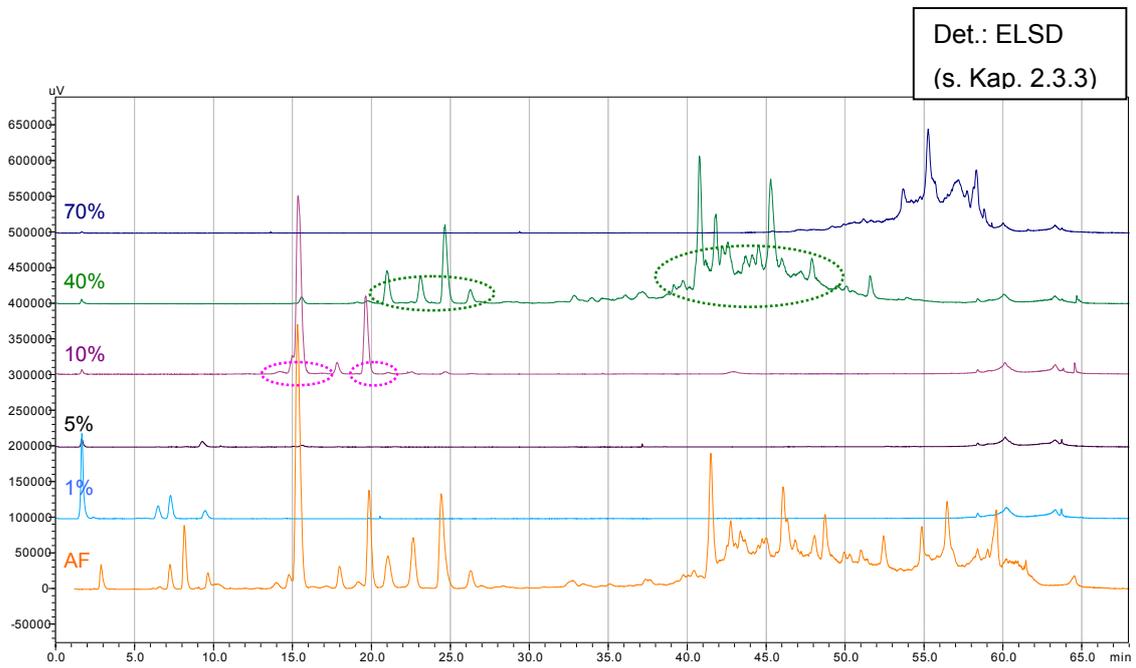


Abb. 14: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion „AF“ des St. Laurent 2004 mit den Subfraktionen

3.1.4 Ergebnisse der Bioassay-Untersuchungen der „AF“ und der Subfraktionen

Die in Abb. 15 dargestellten Diagramme zeigen die Aktivität der „AF“ der Rotweine Merlot, Zweigelt, Blaufränkisch, Pinot und St. Laurent hinsichtlich der gesteigerten Freisetzung von NO im Vergleich zum Kontrollwert und der mittels Festphasenextraktion hergestellten Subfraktionen.

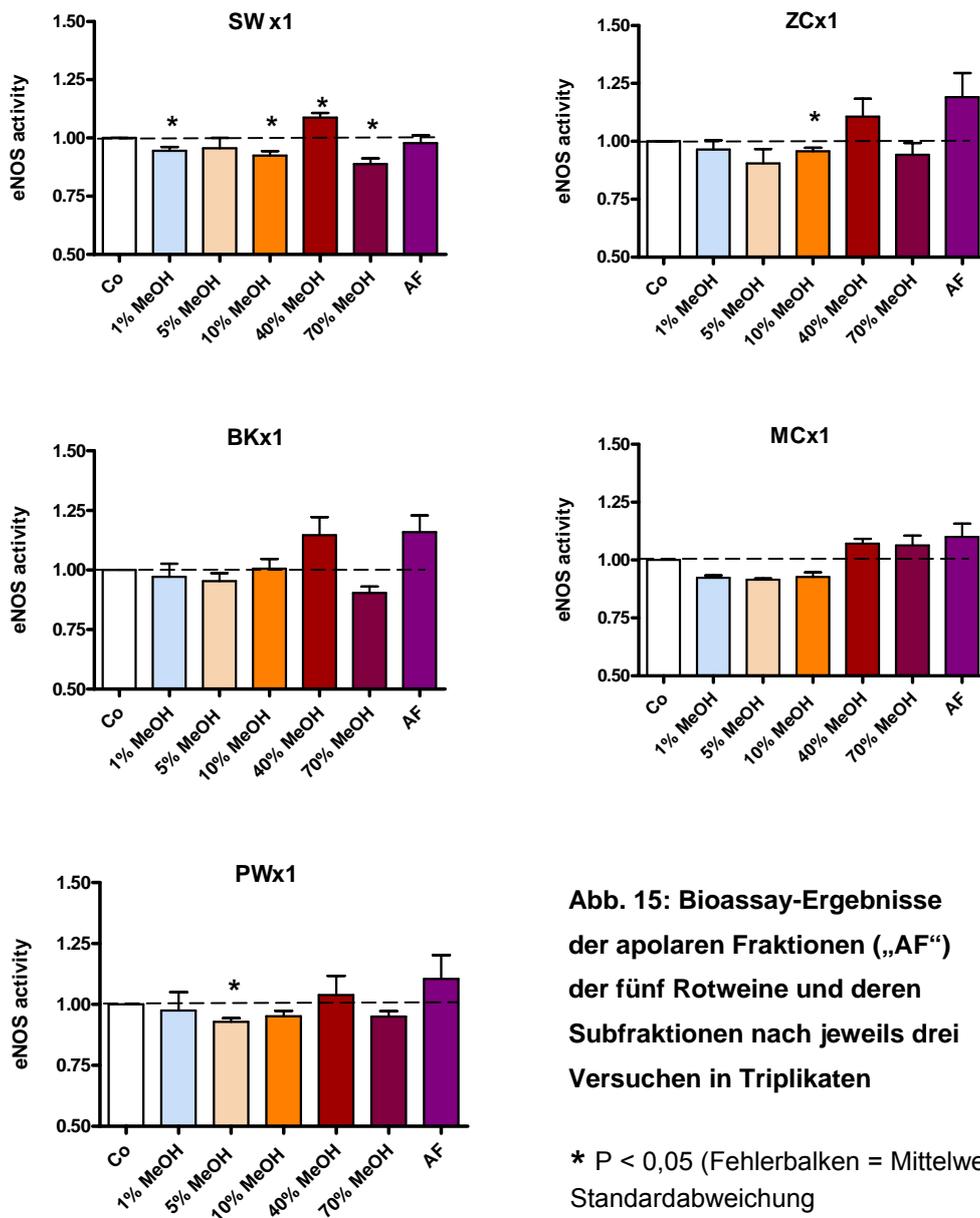


Abb. 15: Bioassay-Ergebnisse der apolaren Fraktionen („AF“) der fünf Rotweine und deren Subfraktionen nach jeweils drei Versuchen in Triplikaten

* P < 0,05 (Fehlerbalken = Mittelwert ± Standardabweichung)

Die Diagramme zeigen, dass die „AF“ des Merlot, Blaufränkisch, Zweigelt und Pinot eine Wirkung auf die gesteigerte NO-Bildung haben. Die „AF“ des St. Laurent zeigt als einzige keinen Effekt. Durch die Fraktionierung der „AF“ in eine 1%-, 5%-, 10%-, 40%- und 70%-Methanolfraktion konnten die Substanzen noch weiter aufgetrennt werden. Die wirksamkeitsbestimmenden Substanzen befinden sich nach der Festphasenextraktion hauptsächlich in der 40%-Fraktion. Diese zeigt bei allen fünf Rotweinen eine gute Aktivität im Zelltest. Auffällig ist, dass trotz fehlender Wirkung der „AF“ des St. Laurent, die 40%-Fraktion einen signifikanten Effekt aufweist. Möglicherweise liegen in der „AF“ Substanzen vor, die eine negative Wirkung bezüglich der gesteigerten Aktivität der eNOS haben. Im Zuge der Festphasenfraktion konnten sie vermutlich in die 70%-Fraktion abgetrennt werden. Diese zeigte im Zelltest verglichen mit dem Kontrollwert eine relativ starke Hemmung auf die Freisetzung von NO. Die 70%-Fraktion des Merlot hat bezüglich der Wirkung auf die endotheliale NO-Synthase einen gleich starken Effekt wie die 40%-Fraktion. Das Chromatogramm der 70%-Fraktion weist nur einen einzigen signifikanten Peak bei 50 min auf. Diese Substanz wird für die Wirkung auf die gesteigerte Freisetzung von NO verantwortlich sein und muss in weiterer Folge identifiziert werden.

3.1.5 Analyse der Ether- und Ethylacetatfraktionen

Weiters sollte in dieser Arbeit versucht werden, den zeitaufwändigen Fraktionierungsschritt mittels Polystyrolsäule zu ersetzen. Es wurden daher Fraktionen, durch Ausschütteln des verdünnten Rotweines (s. Kap. 2.2.3) mit Ether und Ethylacetat hergestellt. Diese Fraktionen werden schließlich untereinander und mit der „AF“ verglichen. Dafür wurde die HPLC im System 2 (s. Tab. 19) mit einem Diode Array Detektor und einem Lichtstreuendetektor verwendet. Die Vergleiche der Fraktionen sind als Multiview-Chromatogramm dargestellt.

3.1.5.1 HPLC-Vergleich der Etherfraktionen der fünf Rotweine

Der Vergleich der ELSD-Chromatogramme zeigt qualitative und quantitative Unterschiede der Substanzen in den „ETHF“ der Rotweine (s. Abb. 16). Die Substanzen bei 15, 24 und 45 min sind in den fünf Rotweinen in unterschiedlicher Konzentration enthalten. Merlot und Zweigelt weisen bei min 17,5 einen markanten Peak auf, der bei den anderen Weinen nur in Spuren vorhanden ist. Weiters fällt der Peak bei min 50 im Chromatogramm des Merlot auf, der schon in der 70%-MeOH Subfraktion der „AF“ isoliert vorliegt. Das Chromatogramm der „ETHF“ des St. Laurent zeigt nur wenige Peaks in geringer Konzentration im Bereich ab 15 min. Dafür befinden sich höhere Peaks im relativen Vergleich zu den vier anderen Weinen in den ersten fünf Minuten des Chromatogramms. Einige Beispiele für qualitative und quantitative Unterschiede sind in Abb. 16 markiert.

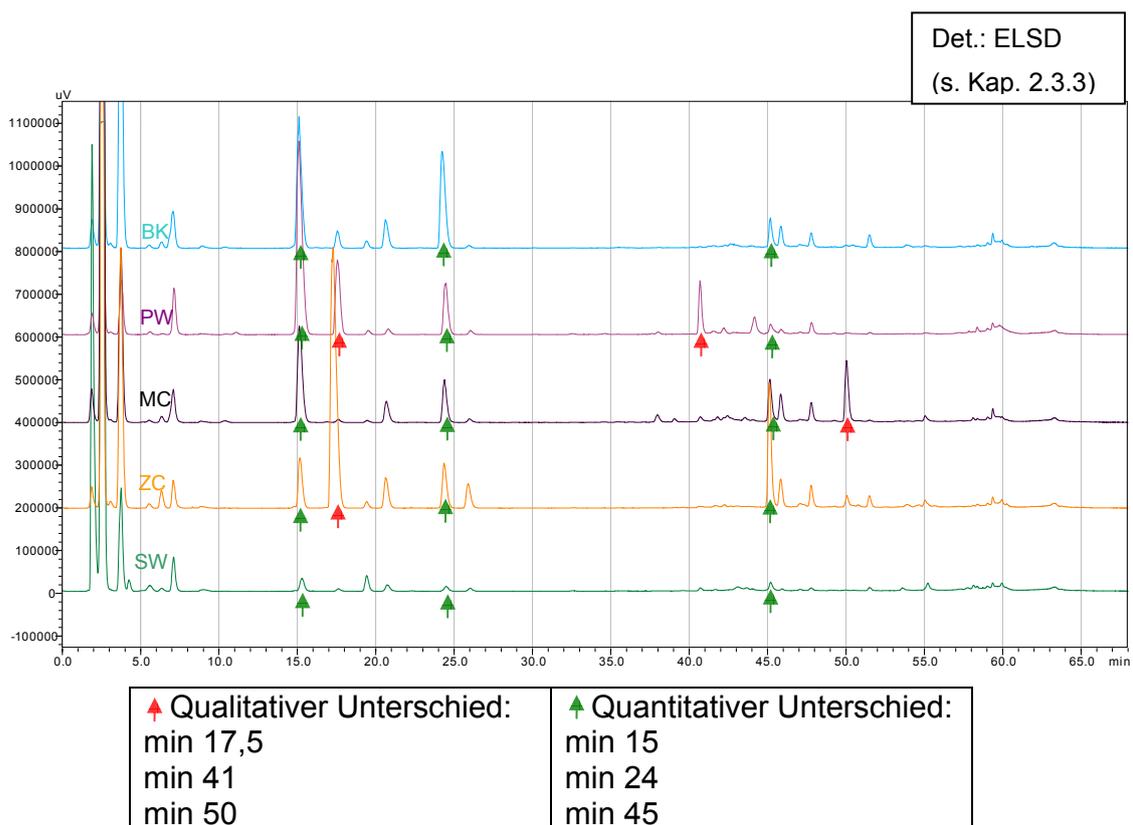


Abb. 16: HPLC-Vergleich der Etherfraktionen („ETHF“) der fünf Rotweine

3.1.5.2 HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen

In Abb. 17 sind die ELSD-Chromatogramme der „EAF“ aller fünf Rotweine dargestellt. Das Chromatogramm des St. Laurent weist vergleichbar mit der „ETHF“ nur sehr wenige Peaks auf. Die Peaks bei min 15 und 24 zeigen quantitative Unterschiede. Bei min 22 ist bei den Weinen Blaufränkisch, Zweigelt, Merlot und Pinot ein Peak erkennbar, der im St. Laurent nicht vorhanden ist. Ein Beispiel für einen qualitativen Unterschied ist weiters der Peak bei min 39, der nur im Merlot vorkommt.

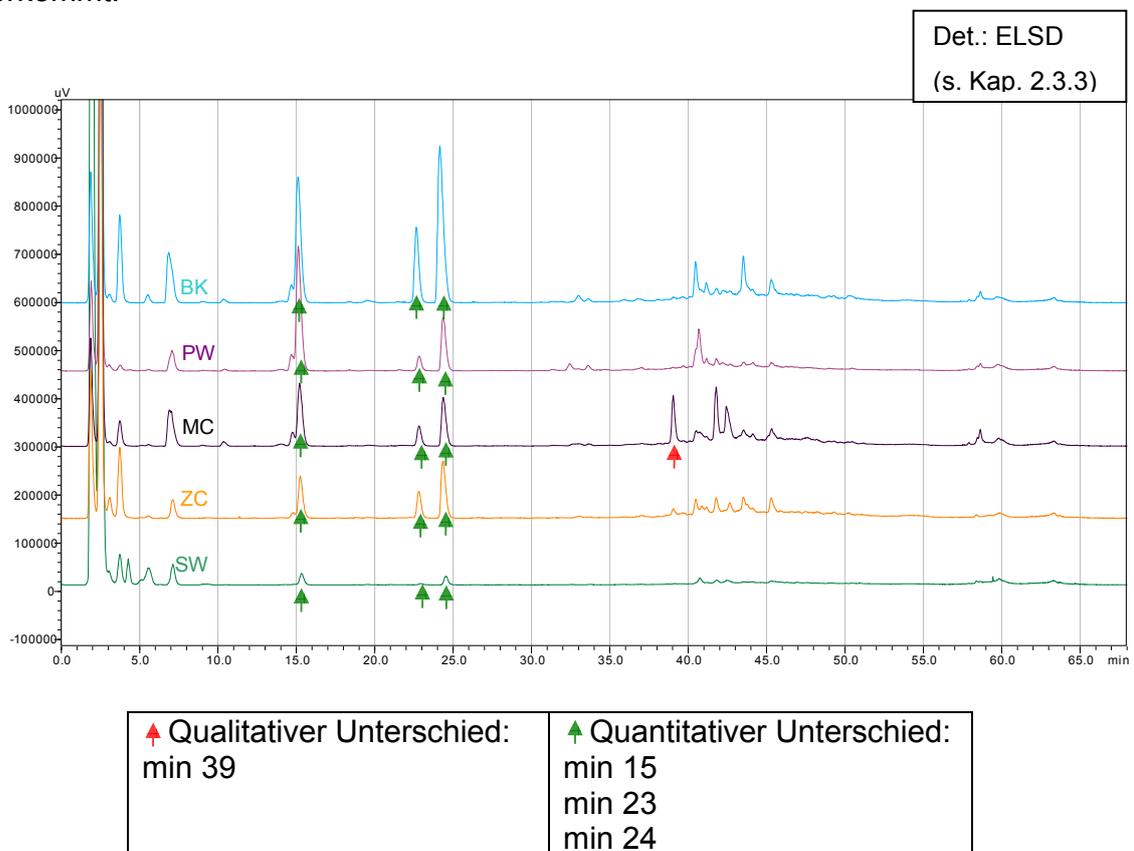


Abb. 17: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) der fünf Rotweine

3.1.5.3 HPLC-Vergleich der „AF“, Ether- und Ethylacetatfraktionen

Der Vergleich der Chromatogramme der „AF“ mit jenen der „ETHF“ und „EAF“ soll zeigen, ob der Fraktionierungsschritt durch Ausschütteln der Rotweine mit Ether und Ethylacetat funktioniert hat. Abb. 18 bis Abb. 22 zeigen, dass die meisten Substanzen, die in den Chromatogrammen der „AF“ ersichtlich sind, auch in einer der beiden anderen Fraktionen enthalten sind. In den „ETHF“ und „EAF“ sind sehr markante Peaks innerhalb der ersten fünf min zu erkennen. Bei dieser Art der Fraktionierung wurden daher noch polarere Substanzen abgetrennt.

Die Substanzen mit den Retentionszeiten von 15 und 24 min finden sich in der „ETHF“ und „EAF“ wieder. Der Peak bei 23 min ist bei den Rotweinen Blaufränkisch, Merlot, Pinot und Zweigelt nur in der „EAF“ enthalten. Im Chromatogramm des St. Laurent ist dieser Peak in keiner der beiden Fraktionen zu sehen. Die Substanzen mit einer Retentionszeit von 40 bis 50 min weisen vor allem quantitative Unterschiede zur „AF“ auf. Einige davon sind nur noch in der „ETHF“, vor allem jene mit einer Retentionszeit bis 45 min, zu finden, andere liegen nur noch in der „EAF“ vor. Die Fraktionierung des St. Laurent mit der Polystyrolsäule lieferte bessere Ergebnisse. In der „ETHF“ und „EAF“ sind nur wenige Substanzen, die in der „AF“ vorhanden sind, zu finden und diese auch nur in minimalen Konzentrationen.

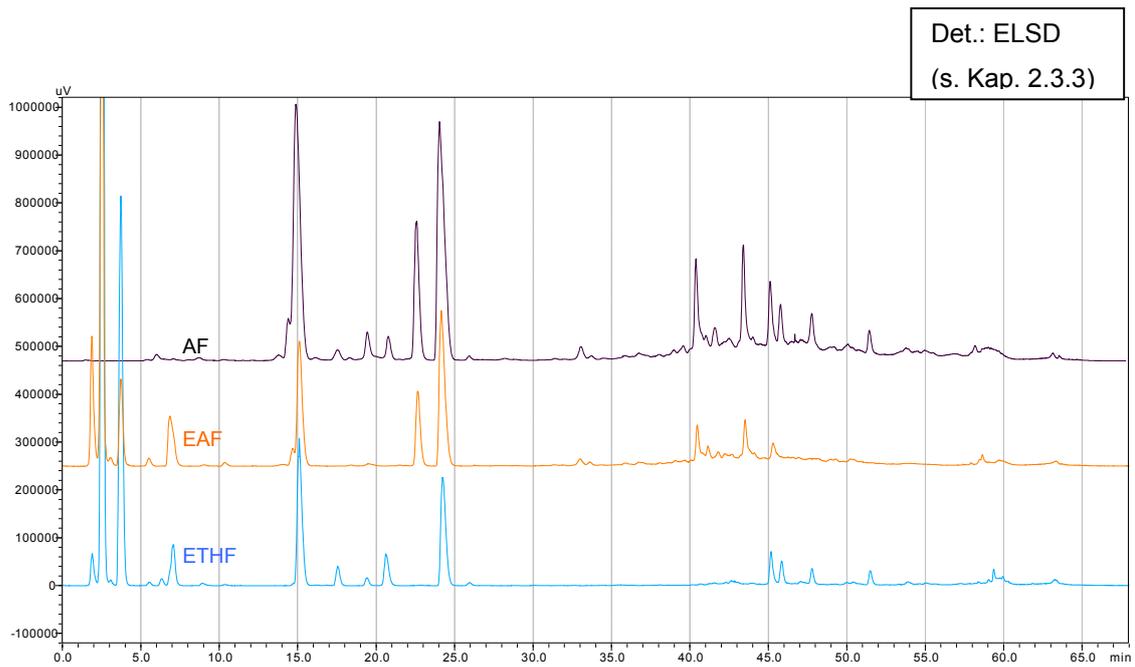


Abb. 18: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des Blaifränkisch 2005

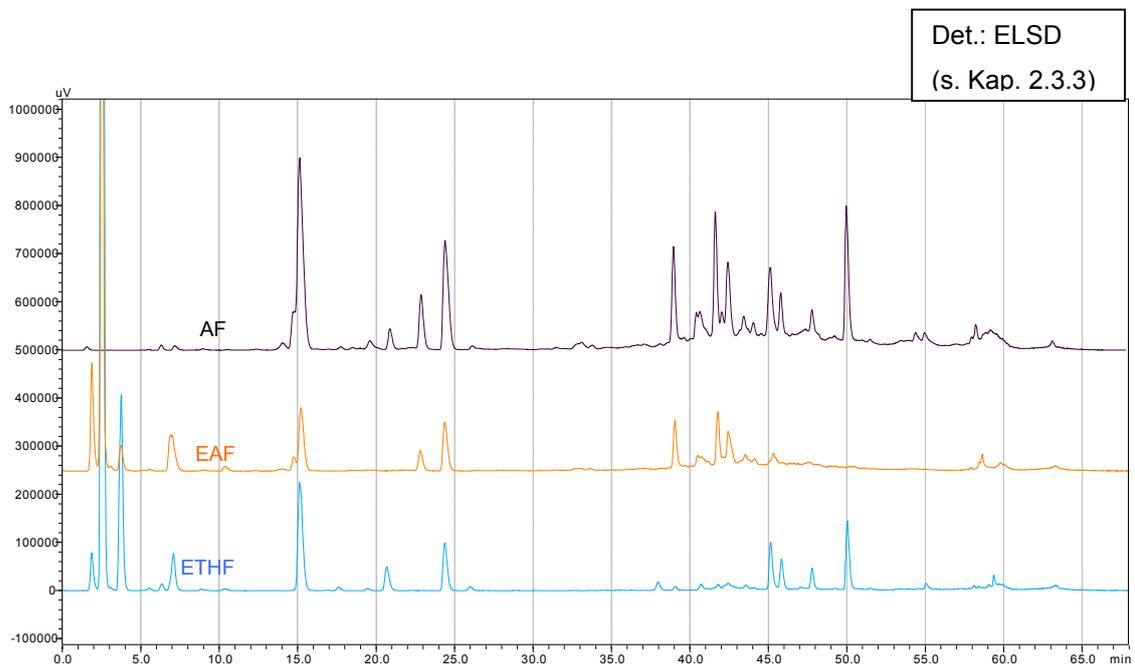


Abb. 19: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des Merlot 2005

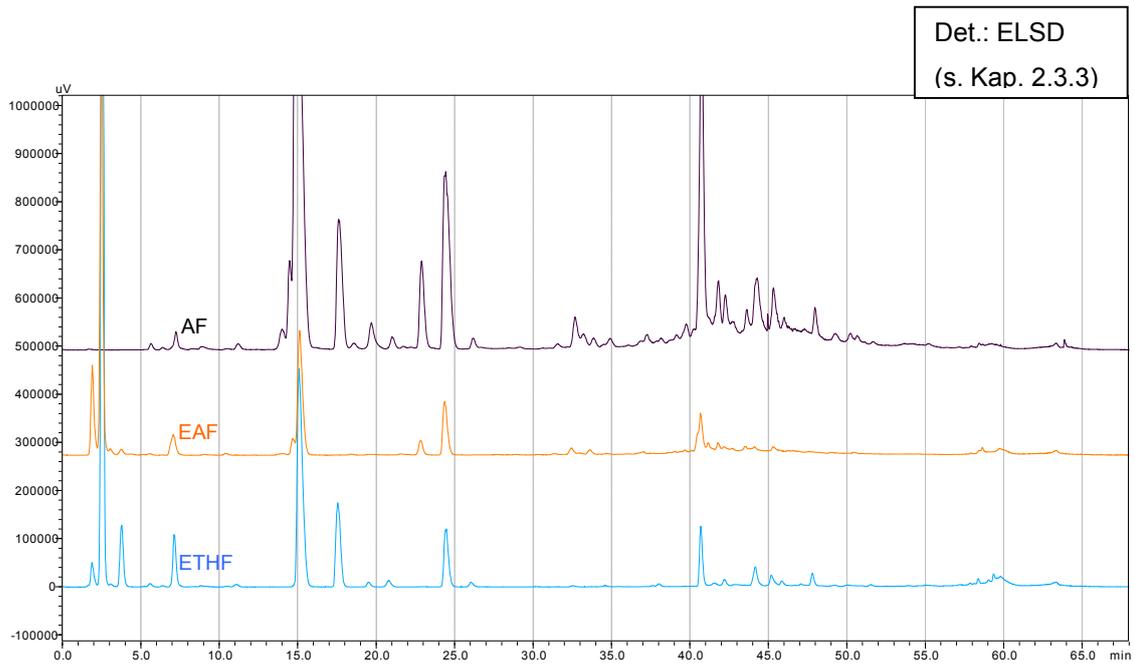


Abb. 20: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des Pinot 2004

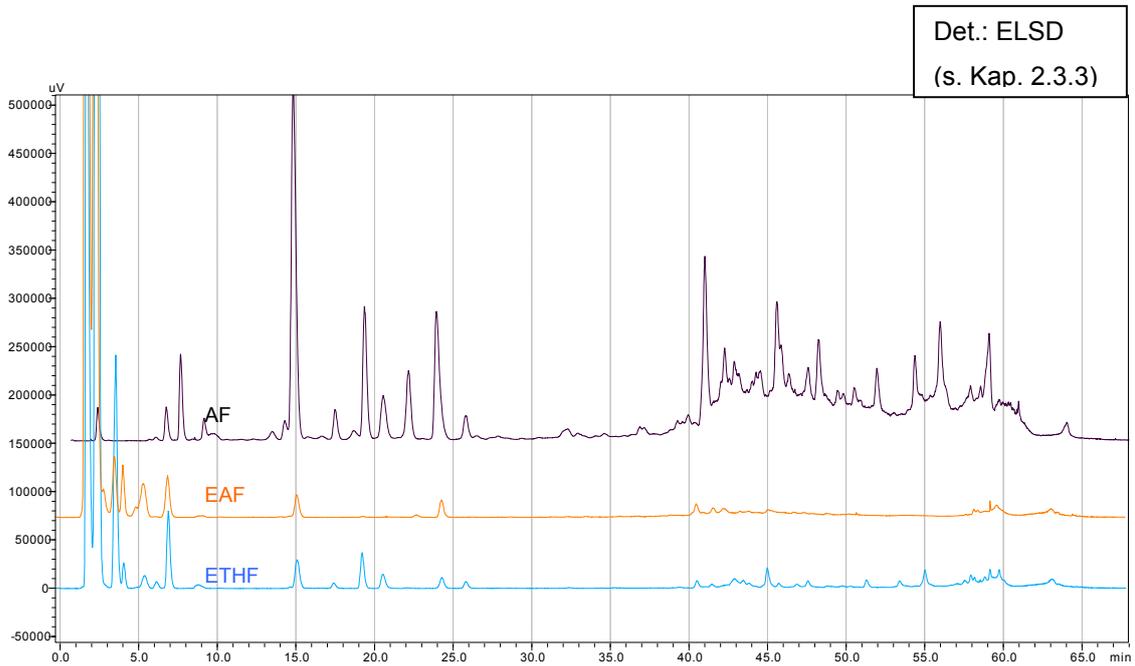


Abb. 21: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des St. Laurent 2005

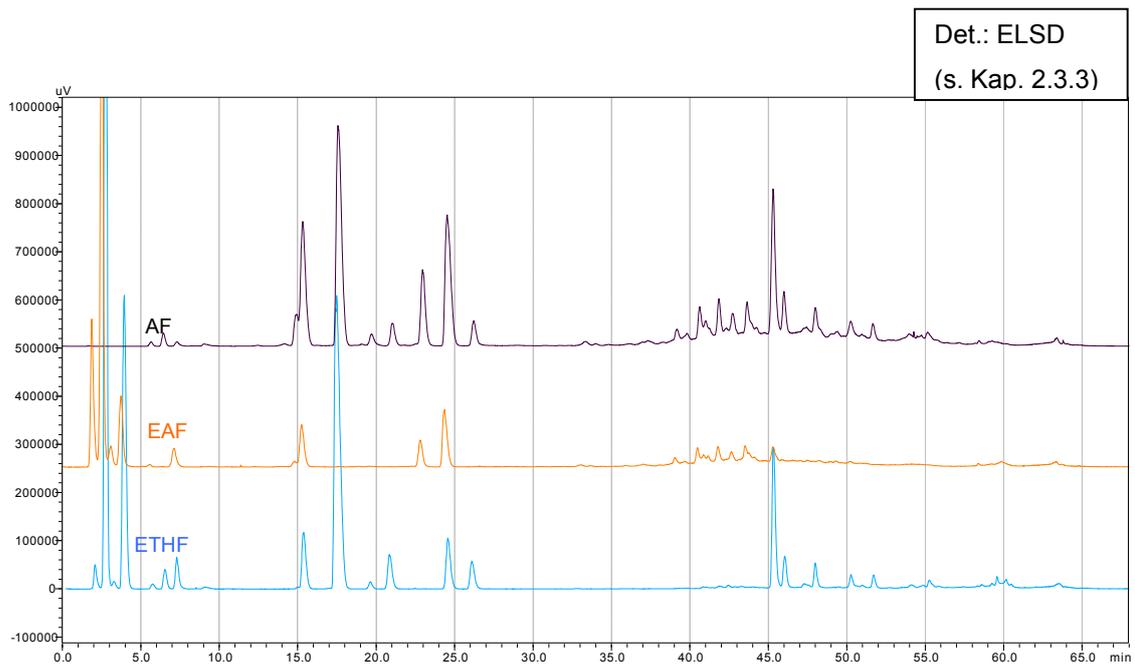


Abb. 22: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des Zweigelt 2005

3.1.5.4 HPLC-Vergleich der Etherfraktionen mit den Ether-Subfraktionen

Die „ETHF“ wurden mittels SPE weiter in eine 1%-, 5%-, 10%-, 40%- und 70%-Methanol Fraktion aufgetrennt. Es wurden 2 x 50 mg der „ETHF“ auf die Kartusche aufgebracht und mit den entsprechenden Lösungsmitteln an der Festphase extrahiert. Die SPE-Fraktionen wurden unter Zuhilfenahme der HPLC im System 2 (s. Tab. 19) charakterisiert und in einem Multiviewchromatogramm der „ETHF“ gegenübergestellt (s. Abb. 23 bis Abb. 27).

Die polaren Substanzen zwischen 1 und 10 min sind nach der Fraktionierung in der 1%-Fraktion zu finden. Die Peaks mit einer Retentionszeit von 40 bis 50 min liegen in der 40%-Fraktion vor. Der Blaufränkisch und der Merlot weisen in den anderen Fraktionen, mit Ausnahme des Peaks bei min 25 in der 5%-Fraktion, keine Substanzen auf. Die Festphasenextraktion zeigte bei diesen Weinen wenig Erfolg. Eine Vielzahl von Substanzen wurde bereits mit dem 1%igen MeOH von der Kartusche eluiert. In den Subfraktionen des St. Laurent sind ebenfalls nur wenige Substanzen zu finden. Beim Pinot und Zweigelt hat die Auftrennung der Substanzen besser funktioniert. Hier sind auch in der 10%-Fraktion sehr markante Peaks bei 15 und 17,5 min zu erkennen. Die 5%- und 10%-Fraktion enthält jedoch auch hier nur wenige Substanzen.

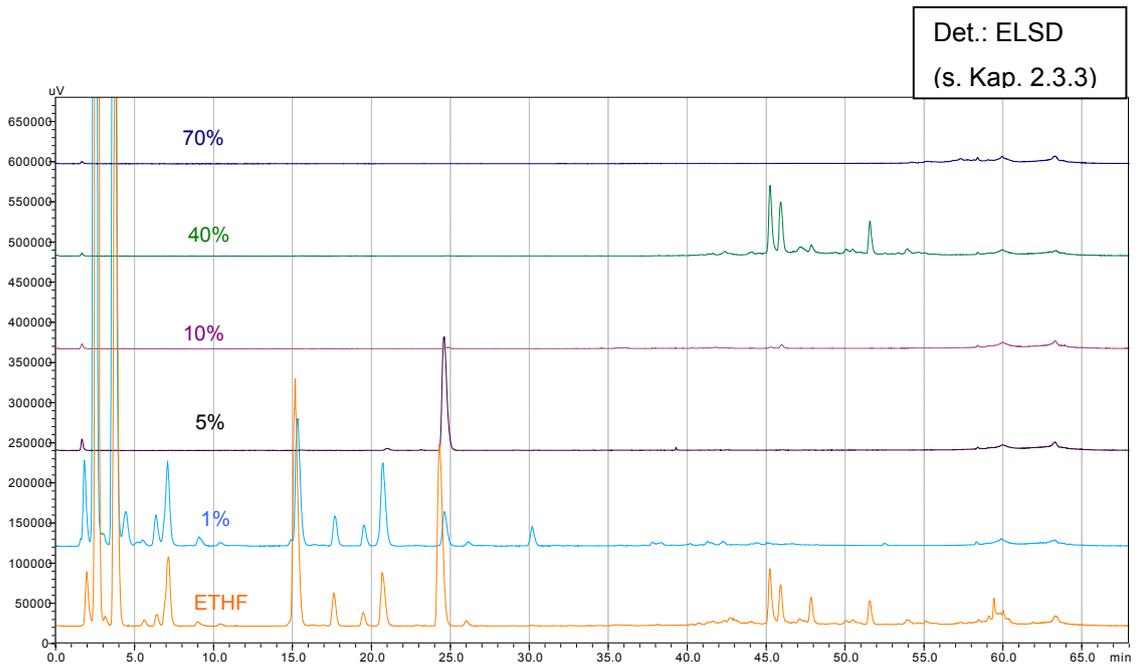


Abb. 23: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des Blaifränkisch

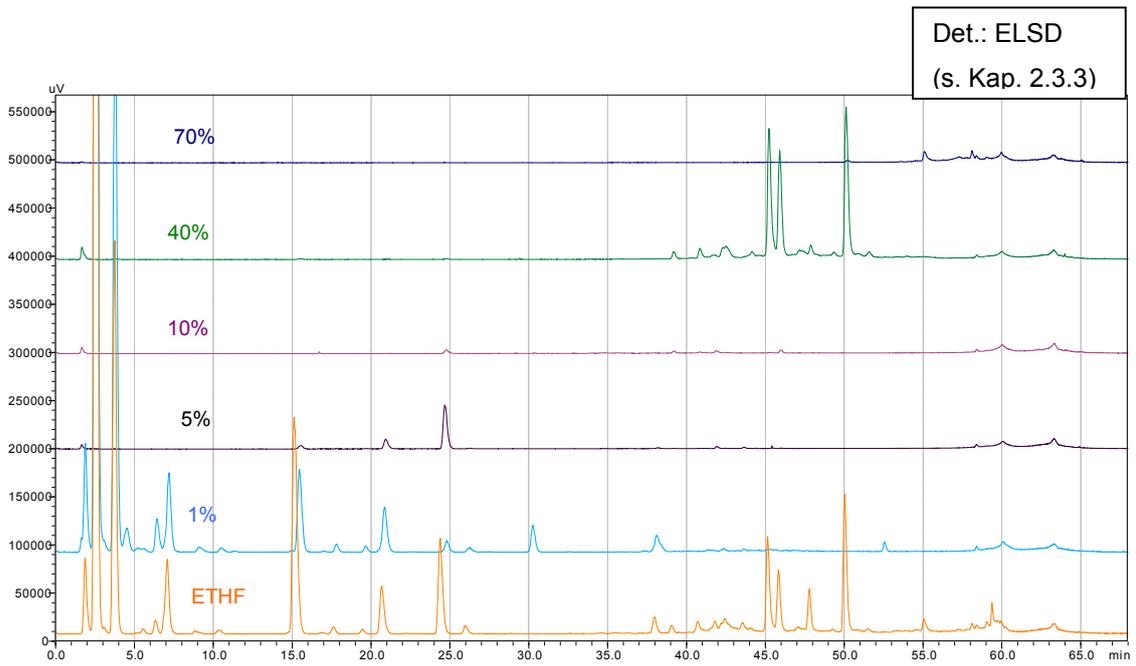


Abb. 24: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des Merlot

Experimenteller Teil

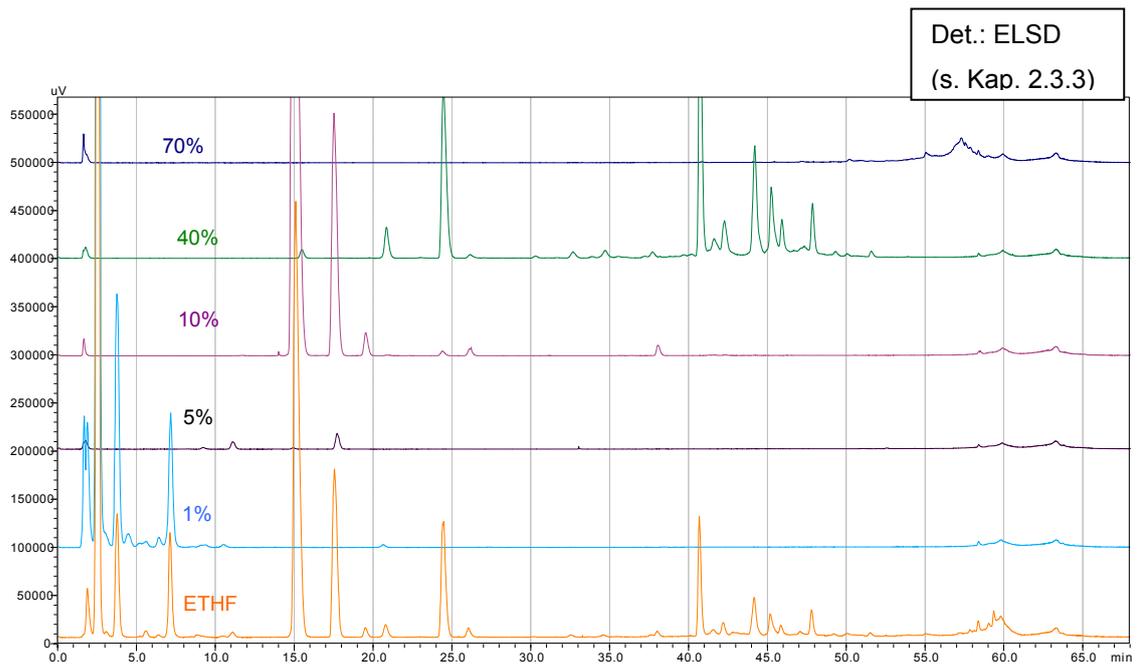


Abb. 25: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des Pinot

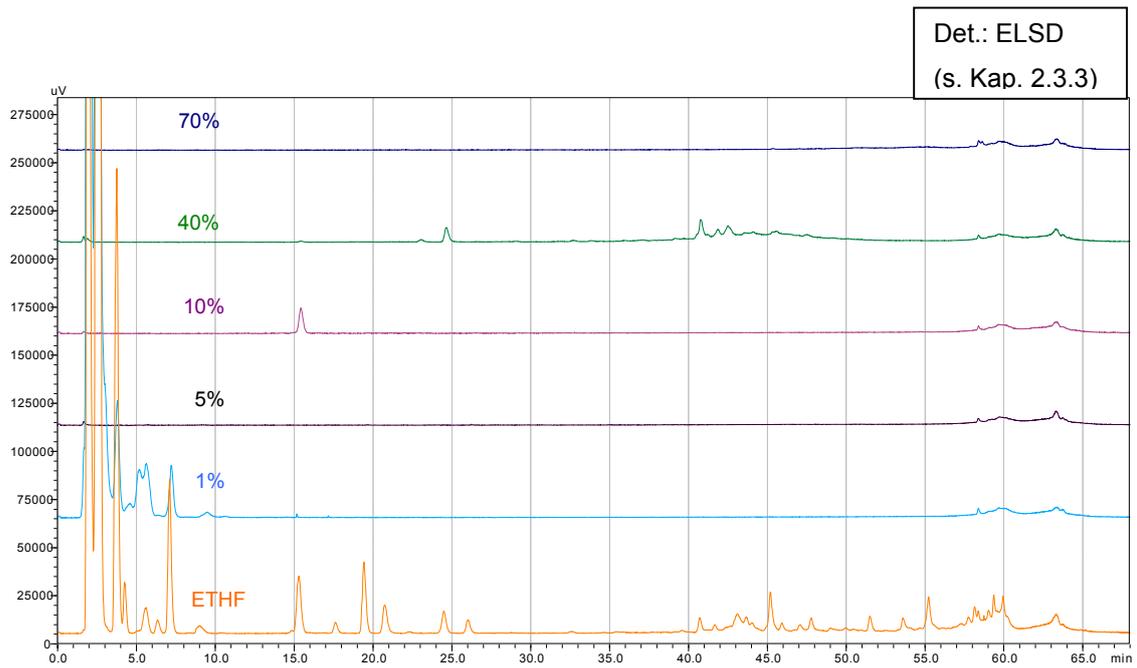


Abb. 26: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des St. Laurent

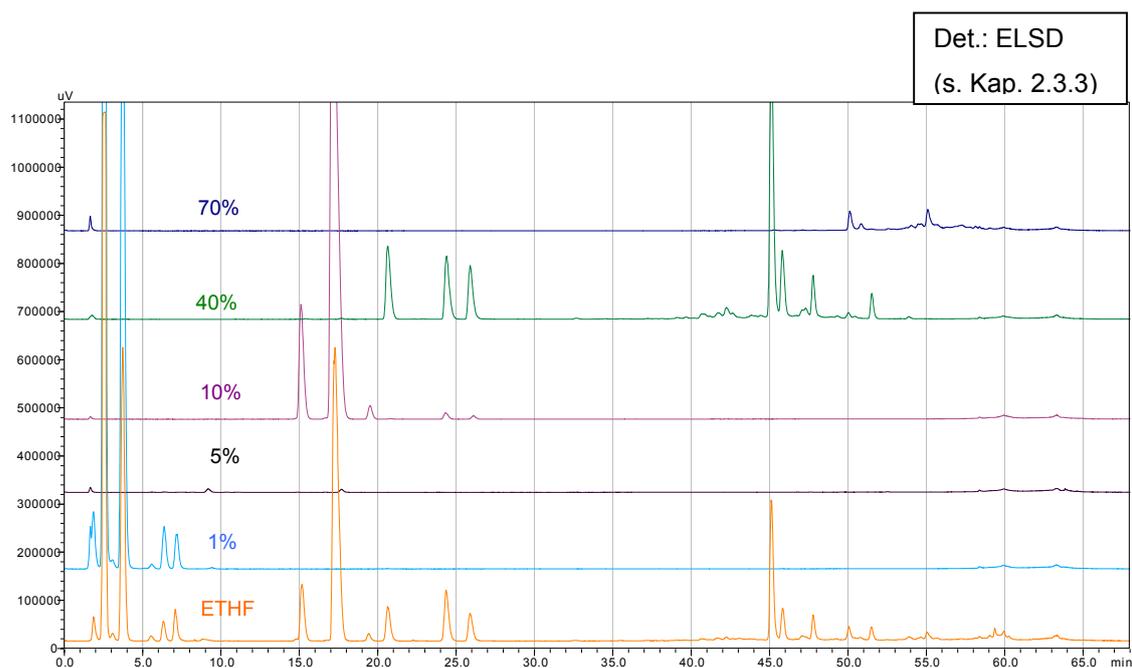


Abb. 27: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des Zweigelt

3.1.5.5 HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen mit den Ethylacetat-Subfraktionen

Weiters wurden die „EAF“ genauso wie zuvor die „ETHF“ mittels SPE in eine 1%-, 5%-, 10%-, 40%- und 70%-MeOH-Fraktion aufgetrennt. Auch diese Fraktionen wurden mit der HPLC im System 2 (s. Tab. 19) analysiert und mit der „EAF“ verglichen. Die Chromatogramme des Lichtstreuendetektors sind in Abb. 28 bis Abb. 32 dargestellt.

Die Festphasenextraktion hat zu einer guten Auftrennung der Substanzen in die einzelnen Subfraktionen geführt. In der 5%-Fraktion sind bei allen fünf Rotweinen keine deutlichen Peaks erkennbar. Die 1%-Fraktion beinhaltet die Substanzen mit einer Retentionszeit zwischen 1 min und 10 min. Der Peak mit einer Retentionszeit von 15 min kommt bei allen Weinen in der 10%-Fraktion vor. Es sind jedoch deutliche quantitative Unterschiede erkennbar. Mit dem 40%igen MeOH konnten

die meisten Substanzen eluiert werden. Diese sind in den Chromatogrammen bei min 23 und min 24 und zwischen 39 und 50 min zu finden.

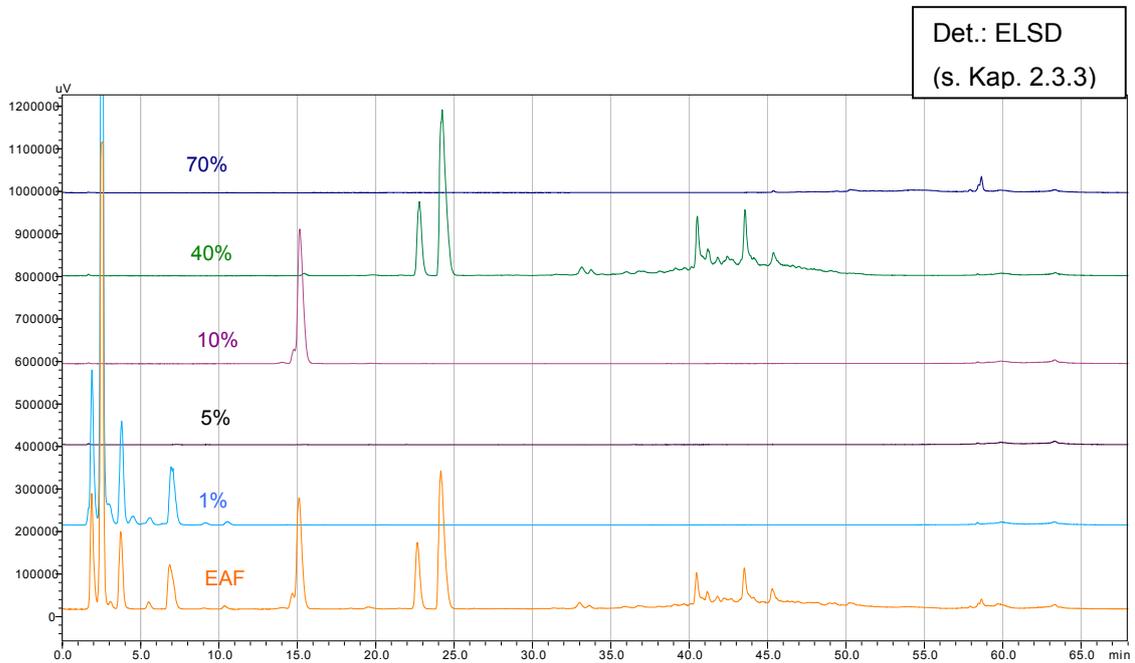


Abb. 28: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des Blaufränkisch

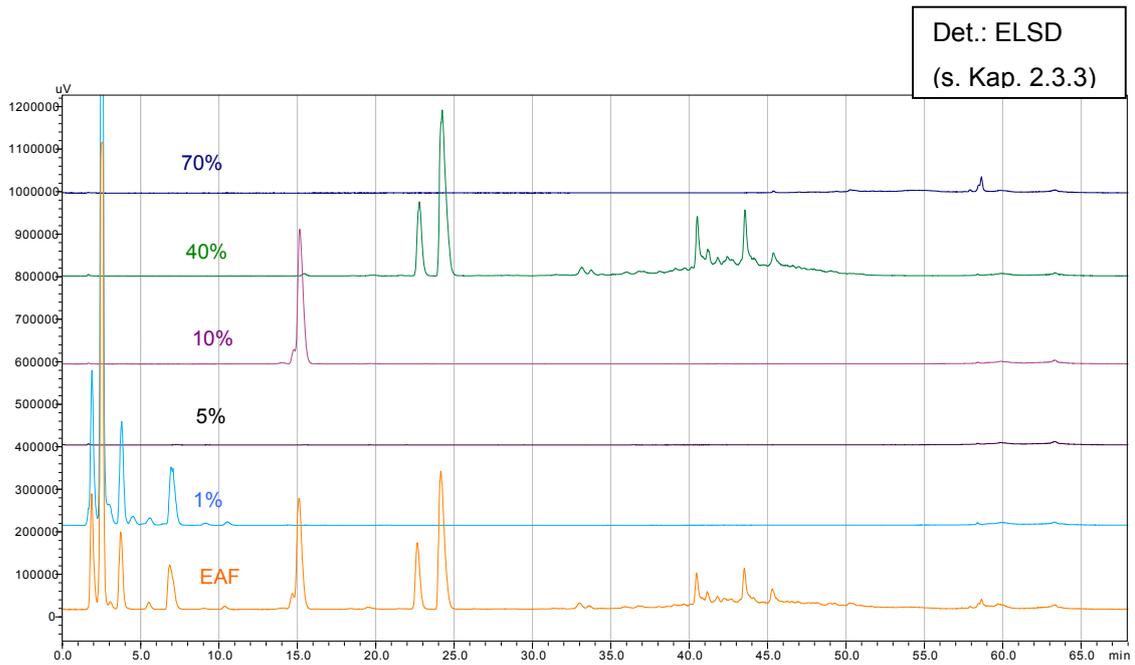


Abb. 29: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des Merlot

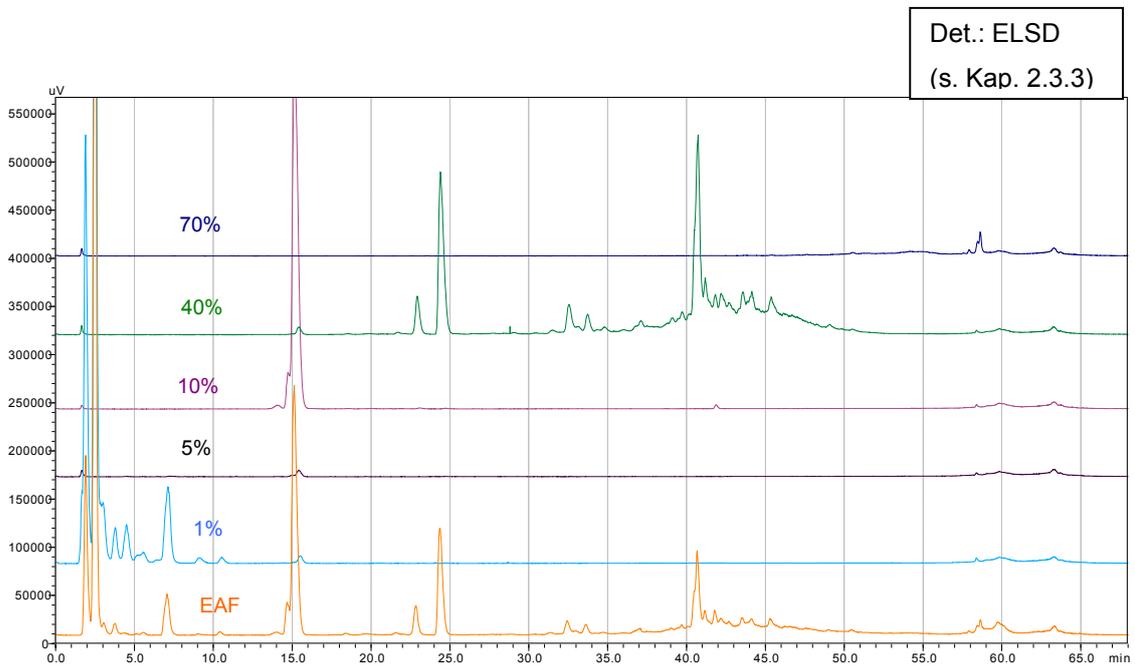


Abb. 30: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des Pinot

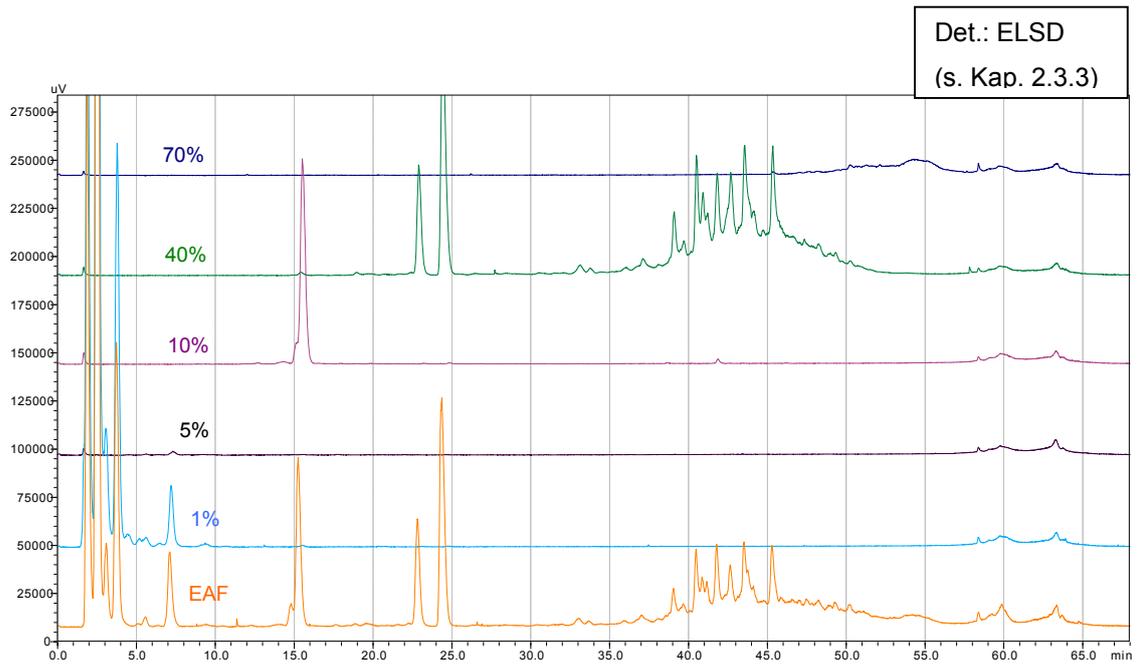


Abb. 31: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des Zweigelt

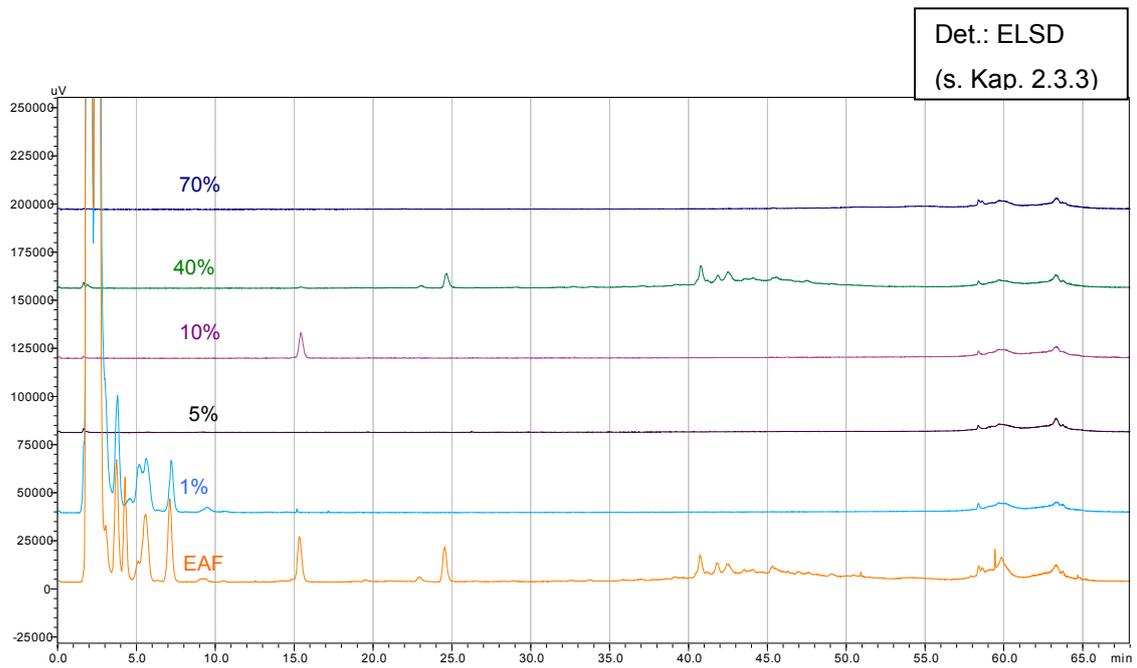


Abb. 32: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des St. Laurent

3.2 Analyse des Weinlaubs

Am Beginn dieser Analyse stand eine fraktionierte Extraktion des roten und grünen Weinlaubs („RWL“ und „GWL“) (s. Kap. 2.1.2). Dabei wurde mittels ASE (s. Kap. 2.2.1) jeweils ein Dichlormethan („DCM“)-, Ethylacetat („EA“)-, Methanol („MeOH“)- und Wasserextrakt („H₂O“) hergestellt. Zur Charakterisierung der Weinlaubextrakte wurde zuerst ein geeignetes DC-System entwickelt. Ein direkter Vergleich von rotem und grünem Weinlaub sollte Unterschiede im Inhaltsstoffmuster aufzeigen. Überdies wurden die Extrakte im Bioassay („ACCA“) (s. Kap. 2.4) auf deren Wirkung auf die endotheliale NO-Synthase überprüft und das wirksame MeOH-Extrakt weiter analysiert.

3.2.1 Dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Weinlaubextrakte

Zur Charakterisierung der Extrakte von rotem und grünem Weinlaub wurde zuerst eine dünnschichtchromatographische Überprüfung auf das Vorliegen von Flavonoiden mit NSRA durchgeführt (s. Abb. 33). Es wurden dabei mehrere Fließmittel getestet, wobei sich das Fließmittel „111-26“ (s. Tab. 16) als das geeignetste herausstellte. Mit dem Fließmittel „Apoflav“ (s. Tab. 16) werden die meisten Substanzen am Start zurückgehalten. Das Fließmittel „CMEW“ bewirkt eine gute Verteilung auf der Laufstrecke, die Trennqualität ist aber mit „111-26“ deutlich besser.

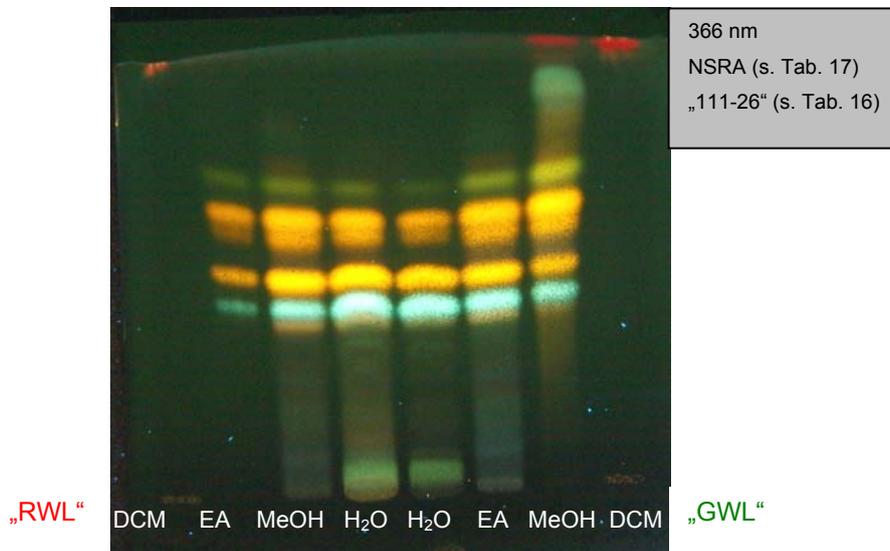


Abb. 33: DC-Vergleich der Extrakte des Weinlaubs („RWL“ und „GWL“) nach Besprühen mit NSRA bei 366 nm

Die Extrakte weisen mit Ausnahme der beiden Dichlormethanextrakte ein ähnliches Zonierungsmuster auf. Die gelb bis orange fluoreszierenden Banden stellen vermutlich Flavonoide dar. Weiters ist bei $R_f=0,4$ eine bläulich fluoreszierende Bande zu erkennen. Auffällig ist die grüne Bande beim MeOH Extrakt des grünen Weinlaubs nahe der Fließmittelfront, die bei den anderen Extrakten nicht zu finden ist.

Weiters wurde eine DC allgemein auf Polyphenole im roten und grünen Weinlaub durchgeführt. Als Fließmittel wurde „CAT“-FM (s. Tab. 16) verwendet und es wurde mit Echtblausalzreagenz (s. Tab. 17) besprüht. Die Detektion erfolgte bei Tageslicht. Auf der DC (s. Abb. 34) kann man erkennen, dass der Polyphenolgehalt im MeOH-Extrakt höher als bei den übrigen Extrakten ist.

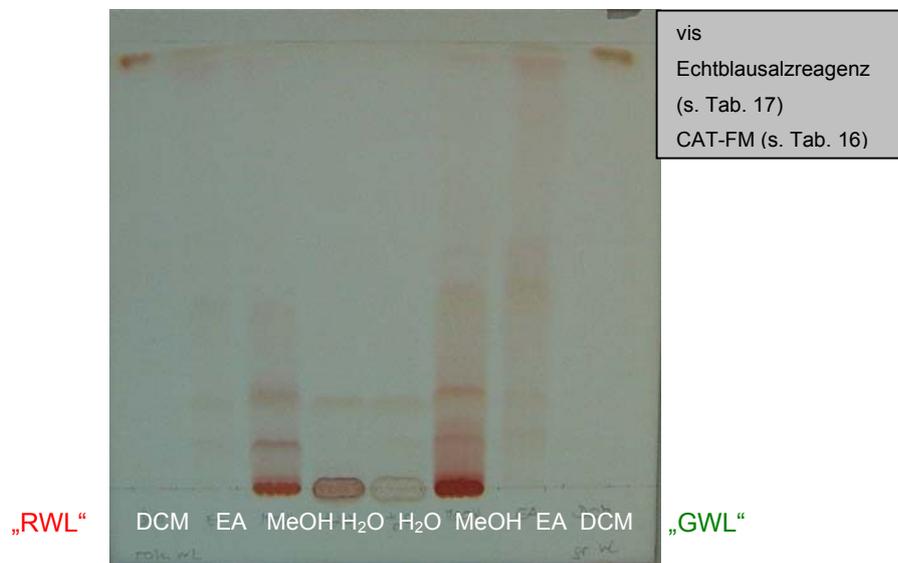


Abb. 34: DC-Vergleich der Rotweinextrakte nach Besprühen mit Echtblausalzreagenz

3.2.2 Analyse des MeOH-Extraktes

Im Zellsay haben sich die MeOH-Extrakte hinsichtlich der gesteigerten Freisetzung von NO als wirksam herausgestellt und wurden daher für weitere Analysen verwendet. Die Abb. 35 zeigt die Bioassayergebnisse von rotem und grünem Weinlaub nach insgesamt je vier Versuchen mit den drei parallel hergestellten Extrakten (s. Kap. 2.2.1). Das erste und dritte Extrakt wurden einmal getestet und mit dem zweiten Extrakt wurden zwei Versuche durchgeführt.

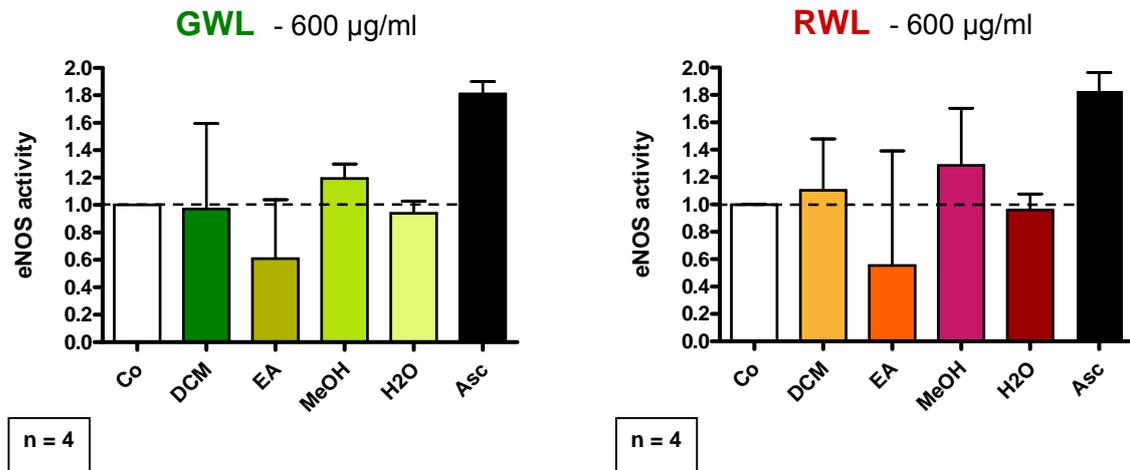


Abb. 35: Bioassay-Ergebnisse der Weinlaubextrakte

Um Unterschiede zwischen den MeOH-Extrakten von rotem und grünem Weinlaub aufzudecken, wurde ein direkter Vergleich mit Hilfe der HPLC aufgestellt (s. Abb. 36). Hier kam das System 1, das der Tab. 19 zu entnehmen ist, zum Einsatz.

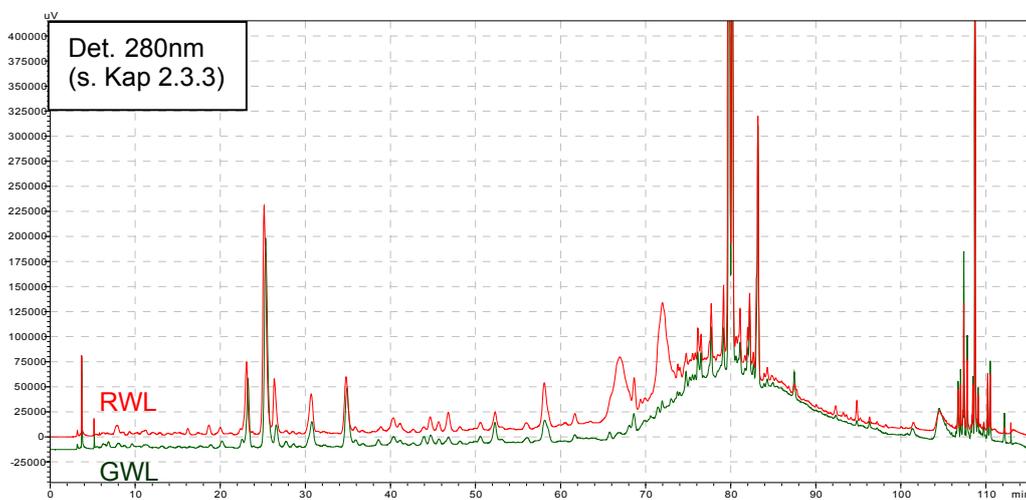


Abb. 36: Vergleich der MeOH-Extrakte von rotem und grünem Weinlaub bei 280nm

Bei der Gegenüberstellung der beiden Chromatogramme wird ersichtlich, dass sich das Inhaltsstoffmuster von rotem und grünem Weinlaub im MeOH-Extrakt nicht stark unterscheidet. Die größte Auffälligkeit sind die Peaks bei min 67 und 72 im

Chromatogramm des roten Weinlaubs. Diese haben ein Maximum im sichtbaren Bereich bei 520 nm und entsprechen den roten Farbstoffen, den Anthocyanen.

Als nächster Schritt wurde das MeOH-Extrakt des grünen Weinlaubs mittels SPE analog zu den Rotweinfractionen in eine 1%-, 5%-, 10%-, 40%- und 70%-MeOH-Fraktion aufgetrennt. Es konnte, wie in Abb. 37 ersichtlich, eine gute Auftrennung erzielt werden. Die Subfraktionen konnten auf Grund der nur geringen Mengen noch nicht auf deren Wirksamkeit im Bioassay überprüft werden.

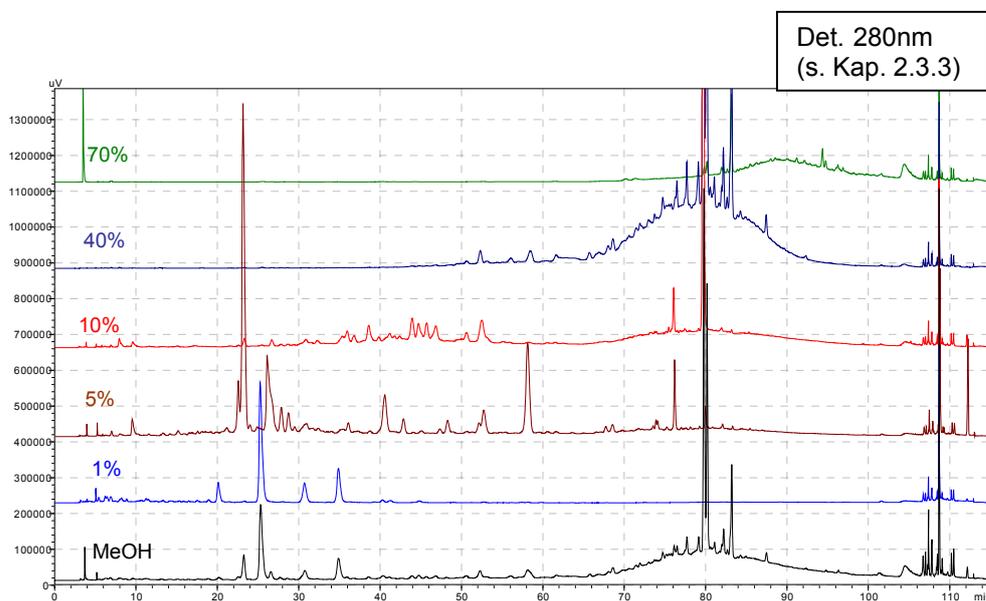


Abb. 37: HPLC-Vergleich des MeOH-Extraktes mit den Subfraktionen

3.2.3 Wiederholung der Extraktion von grünem Weinlaub („GWL“) und rotem Weinlaub („RWL“)

Die Extrakte des Weinlaubs lieferten im Zelltest unterschiedliche Ergebnisse. Daher wurde die Extraktion mit der ASE wiederholt. Es wäre möglich, dass die verschiedenen Qualitäten der verwendeten Lösungsmittel einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Bei dieser Extraktion wurden daher nur Lösungsmittel in HPLC-Qualität verwendet. Das Wasser- und EA-Extrakt wurde nicht mehr hergestellt.

Das Wasserextrakt zeigte im Bioassay keine Wirkung (s. Abb. 35). Die Extraktion mit Ethylacetat wurde wegen der nur geringen Ausbeute nicht wiederholt. Die erhaltenen Ausbeuten sind in Tab. 20 angegeben.

Grünes Weinlaub	DCM	MeOH
1. Extraktion	8,5%	16,34%
2. Extraktion	8,9%	16,6%
3. Extraktion	8,4%	15,7%
Rotes Weinlaub		
1. Extraktion	6,5%	15,7%
2. Extraktion	6,5%	18,56
3. Extraktion	6,5%	19,24%

Tab. 20: Ausbeuten der DCM- und MeOH-Extrakte nach der fraktionierten Extraktion

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die wirksamen Substanzen nach der Fraktionierung (s. Kap. 2.2) hauptsächlich in der 40%-MeOH-Fraktion zu finden sind. Diese zeigte bei allen fünf Rotweinen einen guten Effekt auf die gesteigerte Freisetzung von NO durch die endotheliale NO-Synthase. Auffällig ist, dass auch die 40%-Fraktion des St. Laurent eine signifikante Wirkung zeigte, obwohl die apolare Fraktion unwirksam war. Die Festphasenextraktion könnte eventuell eine Abtrennung von Substanzen, die einen negativen Effekt auf die Freisetzung von NO ausüben, bewirkt haben. Diese Substanzen befinden sich möglicherweise nach der Fraktionierung in der 70%-Fraktion, da diese im Zelltest eine relativ starke Hemmung auf die Freisetzung von NO zeigte. Ein Ziel der Arbeit war es, durch den Vergleich des Inhaltsstoffmusters des inaktiven Weines mit dem der aktiven Weine Rückschlüsse auf die wirksamkeitsbestimmenden Substanzen zu ziehen. Da der St. Laurent nach der Fraktionierung mittels SPE ebenfalls einen vergleichbar guten Effekt im Zellassay zeigte, war dies leider nicht mehr möglich. Die 40%-Fraktion weist bei allen Rotweinen Peaks bei einer Retentionszeit von 21 min, 23 min und 24 min und eine Vielzahl von Peaks zwischen 40 und 50 min auf. Diese Substanzen könnten für den gefäßerweiternden Effekt des Rotweines verantwortlich sein. Der markante Peak in der 10%-Fraktion bei einer Retentionszeit von 15 min dürfte für die Wirkung nicht verantwortlich sein, da diese Fraktion gegenüber dem Kontrollwert im Assay keine Aktivitätssteigerung aufweist. Die 70%-Fraktion des Merlot zeigte im Bioassay eine gleich starke Aktivität wie die 40%-Fraktion. Das Chromatogramm der 70%-Fraktion weist nur einen einzigen signifikanten Peak bei einer Retentionszeit von 50 min auf. Diese Substanz wird wahrscheinlich eine Wirkung auf die gesteigerte Freisetzung von Stickstoffmonoxid haben und muss in weiterer Folge identifiziert werden.

Der Versuch, die Fraktionierung des Rotweines zur Abtrennung von Begleitstoffen mit einer Polystyrolsäule durch Ausschütteln des verdünnten Rotweines mit Ether und Ethylacetat zu ersetzen, lieferte beim Merlot, Blaufränkisch, Zweigelt und

Pinot gute Ergebnisse. Die Chromatogramme der „ETHF“ und „EAF“ sind mit jenen der „AF“ vergleichbar. Der markanteste Unterschied sind einige Peaks mit einer Retentionszeit zwischen min 1 und min 10. Es wurden daher bei dieser Art der Fraktionierung noch polarere Substanzen abgetrennt. Einige Substanzen sind nach der flüssig-flüssig Verteilung nur noch in der „ETHF“ oder in der „EAF“, andere jedoch auch in beiden Fraktionen zu finden. Die dadurch resultierende stärkere Auftrennung der Substanzen könnte bei der Charakterisierung der wirksamkeitsbestimmenden Substanzen nützlich sein. Die „ETHF“ und „EAF“ des St. Laurent zeigten im Chromatogramm sehr große Peaks in den ersten 7 min. Die apolareren Substanzen, die bei einer späteren Retentionszeit im Chromatogramm zu sehen sind, sind in diesen Fraktionen daher in geringerer Konzentration enthalten. Grundsätzlich ist jedoch diese Methode eine zeitsparende und gute Variante den Rotwein von Verbindungen ohne aromatischen Ring wie Fruchtsäuren, Zucker und Glycerin abzutrennen.

Weiters wurde in dieser Arbeit das Weinlaub der Sorte Blaufränkisch analysiert. Durch eine fraktionierte Extraktion konnten von rotem und grünem Weinlaub je ein Dichlormethan-, Ethylacetat-, Methanol- und Wasserextrakt gewonnen werden, die sich hinsichtlich ihrer Wirkung im Zelltest unterschieden. Das MeOH-Extrakt stellte sich als das Wirksamste heraus und wurde weiter untersucht. Mit Hilfe der HPLC sollten die MeOH-Extrakte von rotem und grünem Weinlaub miteinander verglichen werden. Die Chromatogramme bei 280 nm (s. Abb. 36) zeigen ein sehr ähnliches Inhaltsstoffmuster beider MeOH-Extrakte. Der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Chromatogrammen sind die Substanzen im roten Weinlaub mit einer Retentionszeit von 63 min und 71 min. Diese zeigen ihr Maximum im sichtbaren Bereich und entsprechen den roten Farbstoffen des Weinlaubs, den Anthocyanen. Beide MeOH-Extrakte hatten im Bioassay eine ähnlich gute Wirkung. Daher ist es auszuschließen, dass die Anthocyane an dem gefäßerweiternden Effekt beteiligt sind. Das MeOH-Extrakt des grünen Weinlaubs wurde in gleicher Weise wie beim Rotwein mittels SPE fraktioniert und die Fraktionen miteinander verglichen. Da die Auftrennung (s. Abb. 37) gut funktioniert hat, wäre es sinnvoll, diese Fraktionierung

des MeOH-Extraktes in einem größeren Ansatz zu wiederholen, um genügend Substanz für die Überprüfung der Wirkung der SPE-Fractionen im Bioassay zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung und Charakterisierung der polyphenolischen Inhaltsstoffe von fünf ausgewählten österreichischen Rotweinen. Dem Rotwein wird bei regelmäßigem Konsum in moderaten Mengen eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben. In einem Zellmodell konnte bereits gezeigt werden, dass Rotweinpolyphenolextrakte die Aktivität der eNOS und somit die Bildung von NO erhöhen¹⁸. NO ist ein Schlüssel-molekül für die Endothelfunktion, wirkt gefäßprotektiv und ist daher ein wichtiger Faktor für die Prävention von Atherosklerose. Da die Atherosklerose eine der häufigsten Ursachen für Herz-Kreislauferkrankungen darstellt und diese in den industrialisierten Ländern als Todesursache an erster Stelle stehen, ist es von besonderer Bedeutung, die für den kardioprotektiven Effekt verantwortlichen Substanzen, zu identifizieren.

Am Beginn der Arbeit stand die bioassay-kontrollierte Fraktionierung der ausgewählten österreichischen Rotweine mittels Polystyrolsäule. Der Schwerpunkt der Analysentätigkeit lag bei den apolaren Fraktionen, da diese die höchste Aktivität auf die gesteigerte Freisetzung von NO durch die endotheliale NO-Synthase zeigten. Diese wurden mittels Festphasenextraktion mit einer C18 Kartusche weiter aufgetrennt und anschließend unter Zuhilfenahme der HPLC miteinander verglichen. Es sollen dabei Unterschiede im Inhaltstoffmuster aufgezeigt werden und diese mit der Wirkung im Bioassay in Verbindung gebracht werden.

Weiters wurde versucht, die sehr zeitaufwändige Fraktionierung der Weine unter Zuhilfenahme einer Polystyrolsäule durch Ausschütteln des verdünnten Rotweines mit Ether und Ethylacetat zu ersetzen. Die erhaltenen Fraktionen wurden ebenfalls an der Festphase mit einer C18 Kartusche extrahiert. Eine Gegenüberstellung der HPLC-Chromatogramme der Ether- und Ethylacetatfraktionen mit jenen der apolaren Fraktionen ließ erkennen, dass auch diese Methode der Fraktionierung eine gute und zeitsparende Variante darstellt.

¹⁸ Räthel T.R. (2005)

Am Schluss stand die Analyse des roten und grünen Weinlaubs der Sorte Blaufränkisch aus der Region Neusiedlersee. Die verwendeten Blätter wurden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (s. Kap. 2.1.2) gesammelt und Extrakte mit verschiedener Polarität hergestellt. Anschließend wurden sie im Bioassay auf deren Wirksamkeit überprüft. Das MeOH-Extrakt zeigte den besten Effekt im Zelltest und wurde daher weiter analysiert und mittels SPE analog zum Rotwein fraktioniert.

6 Literaturverzeichnis

Adam KP. Analytik biogener Arzneistoffe Pharmazeutische Biologie, Band 4, 1.Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2000

Donath Oliver. Dissertation Universität Wien, in Vorbereitung

Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells. *Circulation*. 2002; 106 (13): 1614 - 7.

Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*. 2005; 26 (1 - 2): 33 - 65

Neckam M. Charakterisierung und Wirkung phenolischer Inhaltsstoffe ausgewählter österreichischer Rotweine. Diplomarbeit, Universität Wien, 2008

Räthel T.R. Untersuchungen zum Einfluss von Sojaisoflavonen und Rotweinpolyphenolextrakten auf die Expression und Aktivität der endothelialen NO-Synthase. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005

Renaud S; de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992; 339: 1523 - 6.

Schwarzacher SP Das Endothel: parakrine und endokrine Funktionen. *Journal für Kardiologie*. 2002; 9 (4): 121 - 124

www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/todesursachen, 12.05.2009

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Todesursachen der Männer und Frauen in Österreich im Jahr 2006	3
Abb. 2: Schematische Darstellung der NO-Biosynthese	4
Abb. 3: Grünes und rotes Weinlaub der Sorte Blaufränkisch (Neusiedlersee – Hügelland)	8
Abb. 4: Ausbeuten der ersten Extrakte des grünen Weinlaubs bezogen auf die Gesamtmenge des Extraktes in Prozent	11
Abb. 5: Ausbeuten der ersten Extrakte des roten Weinlaubs bezogen auf die Gesamtmenge des Extraktes in Prozent	11
Abb. 6: Fraktionierungsschema für Rotwein	13
Abb. 7: Ausbeuten der Vorläufe („VL“) und der Polyphenolfractionen („PPF“) der fünf Rotweine in Prozent	14
Abb. 8: Ausbeuten der apolaren Fraktion („AF“) und polaren Fraktion („PF“) der fünf Rotweine in Prozent	15
Abb. 9: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktionen („AF“) der 5 Rotweine	30
Abb. 10: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) des Blaufränkisch 2005 mit den Subfraktionen	31
Abb. 11: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) des Merlot 2005 mit den Subfraktionen	32
Abb. 12: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktionen („AF“) des Pinot 2004 mit den Subfraktionen	32
Abb. 13: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion „AF“ des Zweigelt 2004 mit den Subfraktionen	33
Abb. 14: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion „AF“ des St. Laurent 2004 mit den Subfraktionen	33
Abb. 15: Bioassay-Ergebnisse der apolaren Fraktionen („AF“) der fünf Rotweinen und deren Subfraktionen nach jeweils drei Versuchen in Triplikaten	34
Abb. 16: HPLC-Vergleich der Etherfraktionen („ETHF“) der fünf Rotweine	36
Abb. 17: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) der fünf Rotweine	37
Abb. 18: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des Blaufränkisch 2005	39
Abb. 19: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des Merlot 2005	39
Abb. 20: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des Pinot 2004	40
Abb. 21: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des St. Laurent 2005	40
Abb. 22: HPLC-Vergleich der apolaren Fraktion („AF“) mit der Etherfraktion („ETHF“) und Ethylacetatfraktion („EAF“) des Zweigelt 2005	41
Abb. 23: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des Blaufränkisch	43

Abbildungsverzeichnis

Abb. 24: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des Merlot	43
Abb. 25: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des Pinot	44
Abb. 26: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des St. Laurent	44
Abb. 27: HPLC-Vergleich der Etherfraktion („ETHF“) mit den Ether-Subfraktionen des Zweigelt	45
Abb. 28: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des Blaufränkisch	46
Abb. 29: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des Merlot	47
Abb. 30: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des Pinot	47
Abb. 31: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des Zweigelt	48
Abb. 32: HPLC-Vergleich der Ethylacetatfraktionen („EAF“) mit den Ethylacetat-Subfraktionen des St. Laurent	48
Abb. 33: DC-Vergleich der Extrakte des Weinlaubs („RWL“ und „GWL“) nach Besprühen mit NSRA bei 366 nm	50
Abb. 34: DC-Vergleich der Rotweineextrakte nach Besprühen mit Echtblausalzreagenz	51
Abb. 35: Bioassay-Ergebnisse der Weinlaubextrakte	52
Abb. 36: Vergleich der MeOH-Extrakte von rotem und grünem Weinlaub bei 280nm	52
Abb. 37: HPLC-Vergleich des MeOH-Extraktes mit den Subfraktionen	53
Abb. 38: HPLC-Vergleich der „AF“ der fünf Rotweine (ELSD)	64
Abb. 39: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Blaufränkisch (ELSD)	65
Abb. 40: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Merlot (ELSD)	66
Abb. 41: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Pinot (ELSD)	67
Abb. 42: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Zweigelt (ELSD)	68
Abb. 43: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des St. Laurent (ELSD)	69
Abb. 44: HPLC-Vergleich der „ETHF“ der fünf Rotweine (ELSD)	70
Abb. 45: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Blaufränkisch (ELSD)	71
Abb. 46: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Merlot (ELSD)	72
Abb. 47: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Pinot (ELSD)	73
Abb. 48: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Zweigelt (ELSD)	74
Abb. 49: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des St. Laurent (ELSD)	75
Abb. 50: HPLC-Vergleich der „EAF“ der fünf Rotweine (ELSD)	76
Abb. 51: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Blaufränkisch (ELSD)	77
Abb. 52: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Merlot (ELSD)	78
Abb. 53: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Pinot (ELSD)	79
Abb. 54: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Zweigelt (ELSD)	80

Abbildungsverzeichnis

Abb. 55: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des St. Laurent (ELSD)	81
Abb. 56: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des Blaufränkisch (ELSD)	82
Abb. 57: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des Merlot (ELSD)	83
Abb. 58: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des Pinot (ELSD)	84
Abb. 59: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des Zweigelt (ELSD)	85
Abb. 60: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des St. Laurent (ELSD)	86
Abb. 61: HPLC-Vergleich der „AF“ der fünf Rotweine bei 280 nm	87
Abb. 62: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Blaufränkisch bei 280 nm	88
Abb. 63: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Merlot bei 280 nm	89
Abb. 64: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Pinot bei 280 nm	90
Abb. 65: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Zweigelt bei 280 nm	91
Abb. 66: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des St. Laurent bei 280 nm	92
Abb. 67: HPLC-Vergleich der „ETHF“ der fünf Rotweine bei 280 nm	93
Abb. 68: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Blaufränkisch bei 280 nm	94
Abb. 69: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Merlot bei 280 nm	95
Abb. 70: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Pinot bei 280 nm	96
Abb. 71: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Zweigelt bei 280 nm	97
Abb. 72: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des St. Laurent bei 280 nm	98
Abb. 73: HPLC-Vergleich der „EAF“ der fünf Rotweine bei 280 nm	99
Abb. 74: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Blaufränkisch bei 280 nm	100
Abb. 75: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Merlot bei 280 nm	101
Abb. 76: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Pinot bei 280 nm	102
Abb. 77: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Zweigelt bei 280 nm	103
Abb. 78: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des St. Laurent bei 280 nm	104
Abb. 79: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Blaufränkisch bei 310 nm	105
Abb. 80: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Merlot bei 310 nm	106
Abb. 81: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Pinot bei 310 nm	107
Abb. 82: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Zweigelt bei 310 nm	108
Abb. 83: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des St. Laurent bei 310 nm	109

8 Anhang

8.1 Gesammelte Chromatogramme mittels Lichtstreuendetektor

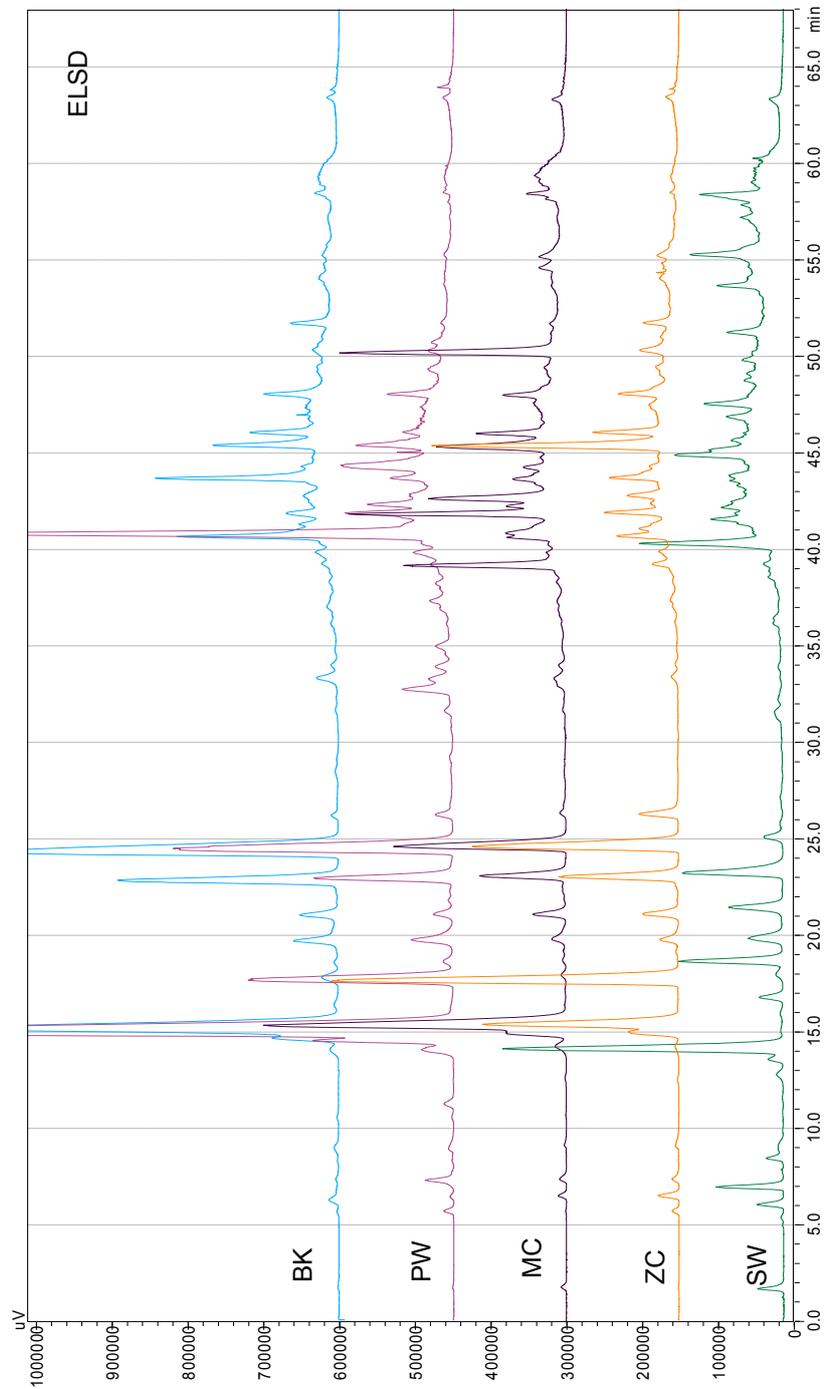


Abb. 38: HPLC-Vergleich der „AF“ der fünf Rotweine (ELSD)

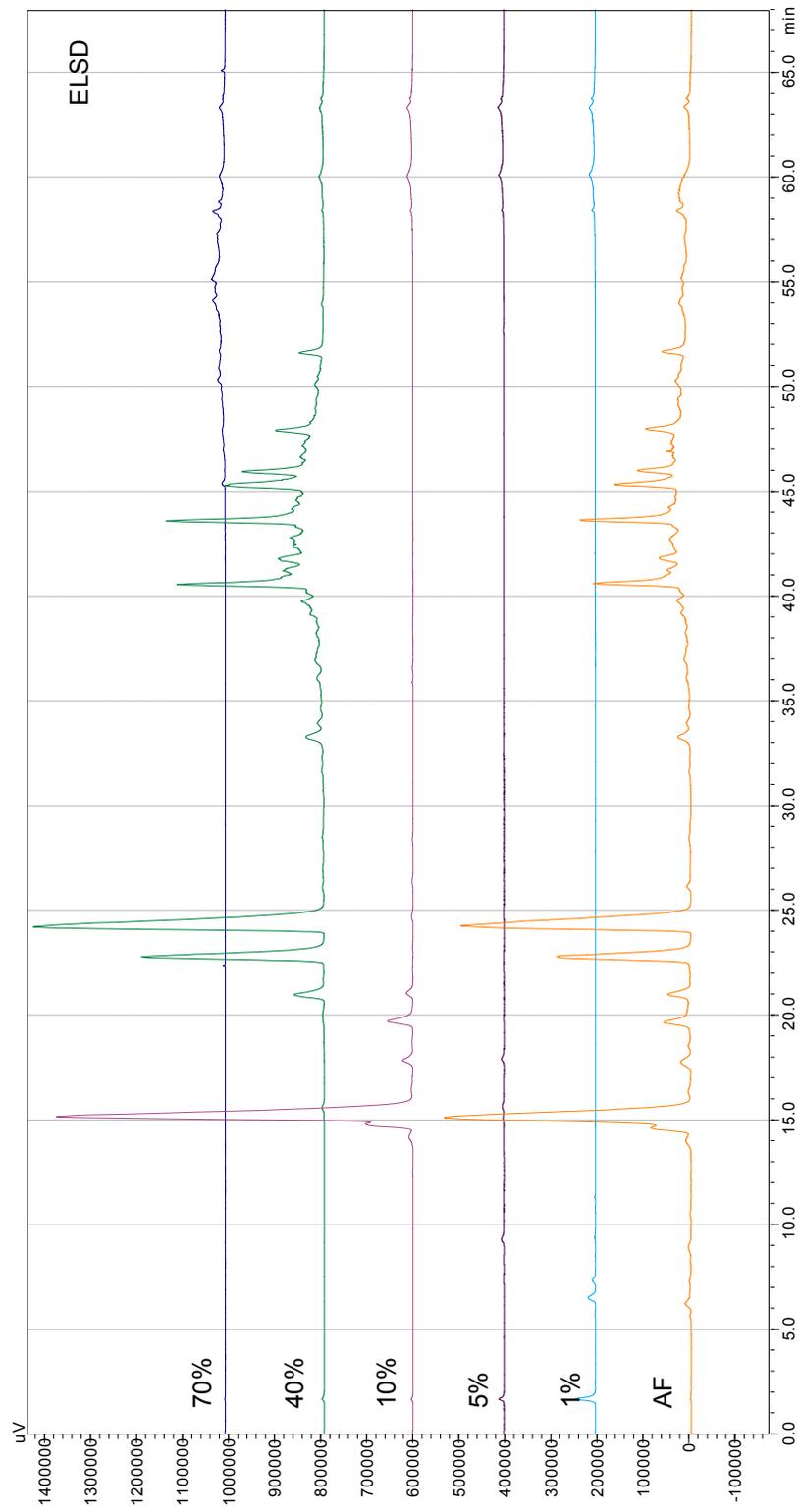


Abb. 39: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Blaufränkisch (ELSD)

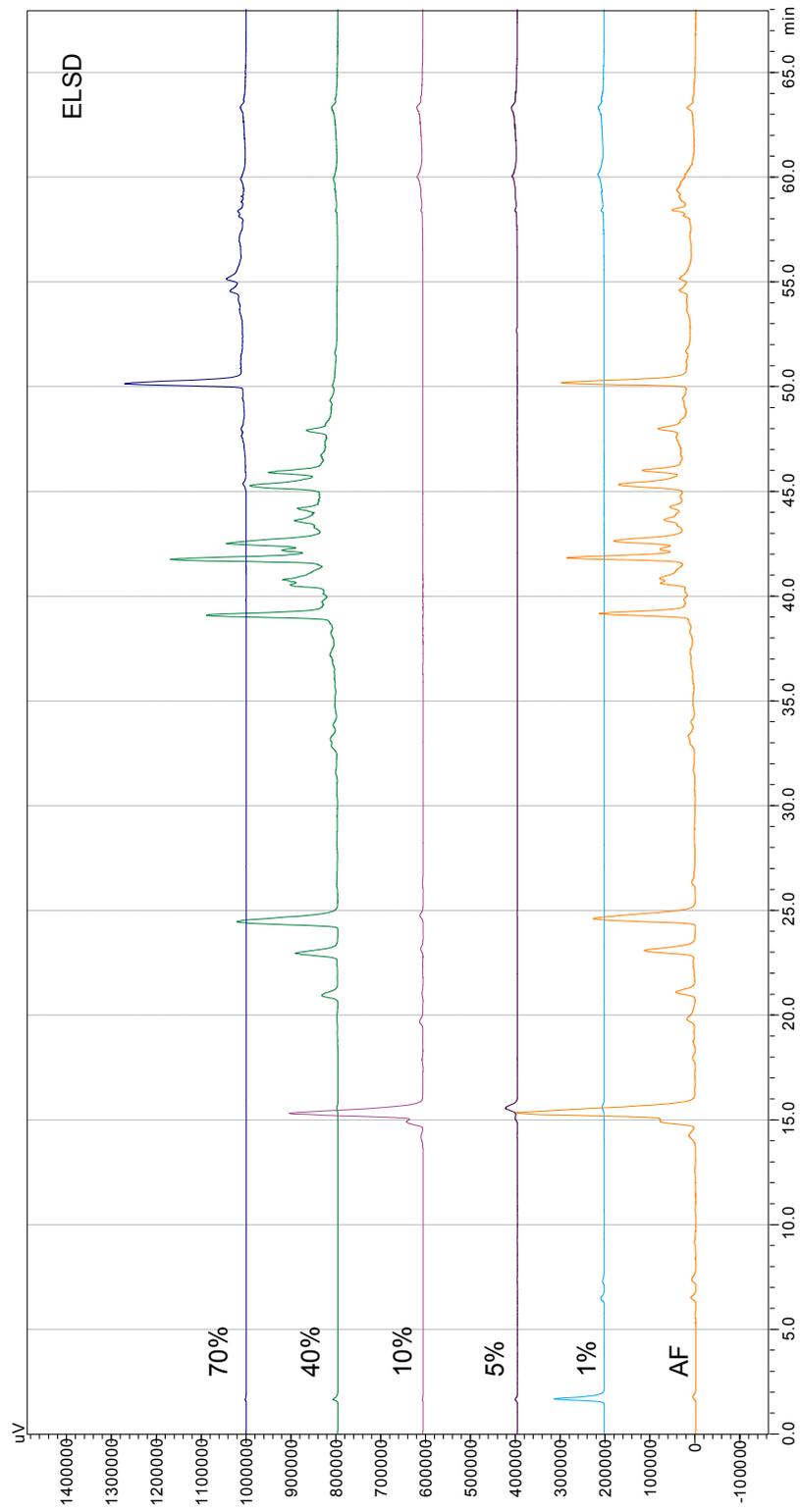


Abb. 40: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Merlot (ELSD)

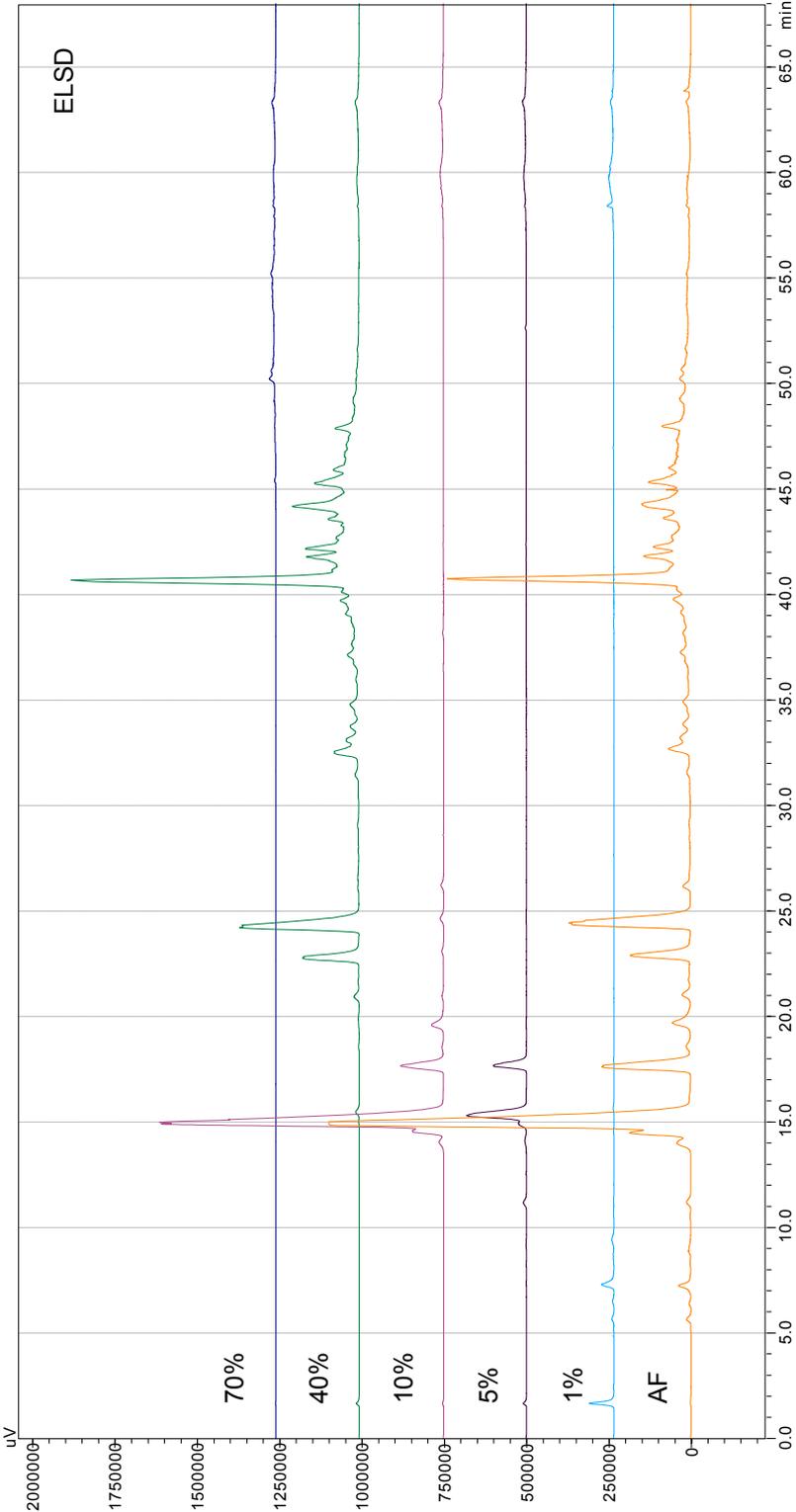


Abb. 41: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Pinot (ELSD)

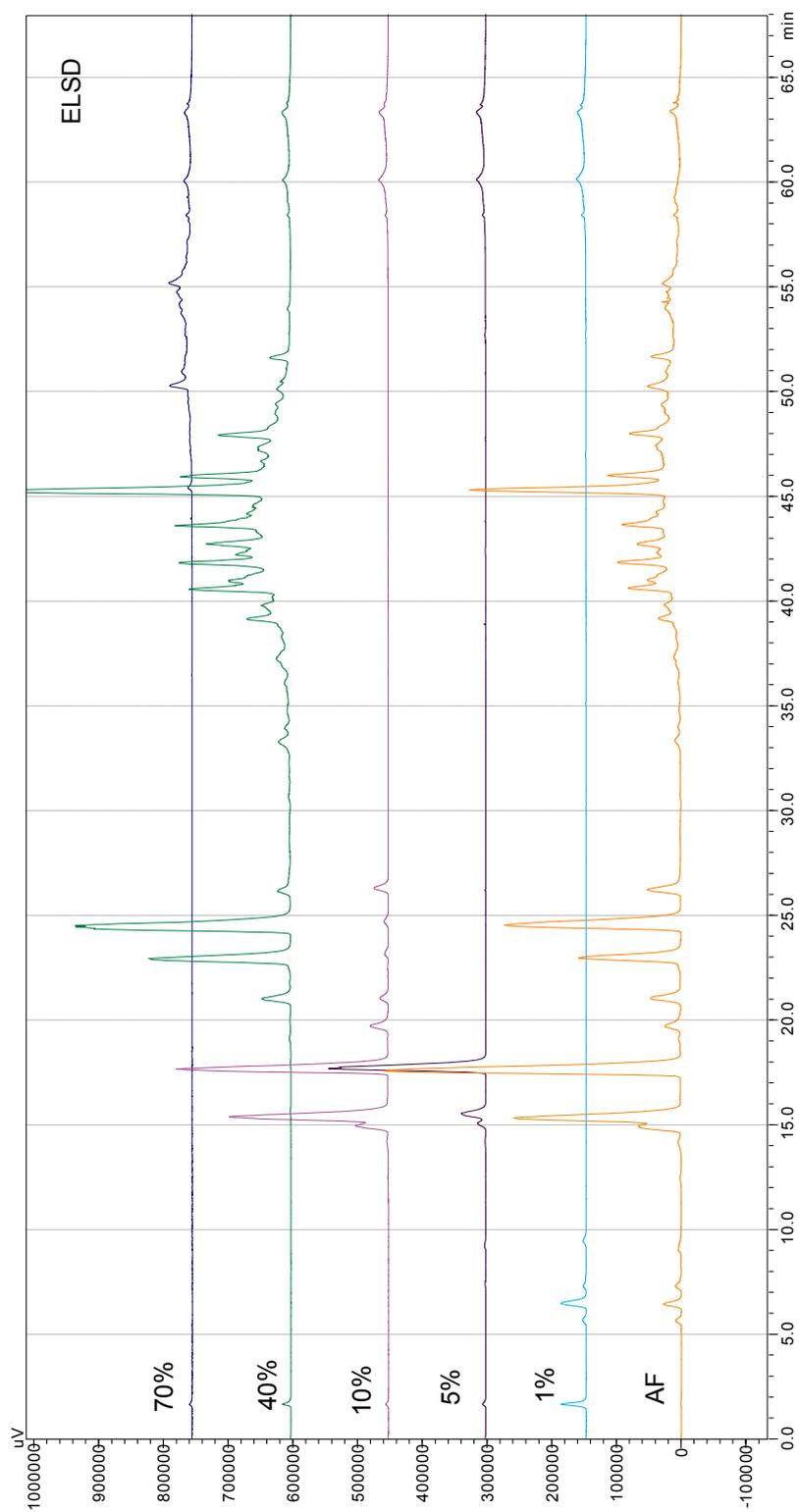


Abb. 42: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Zweigelt (ELSD)

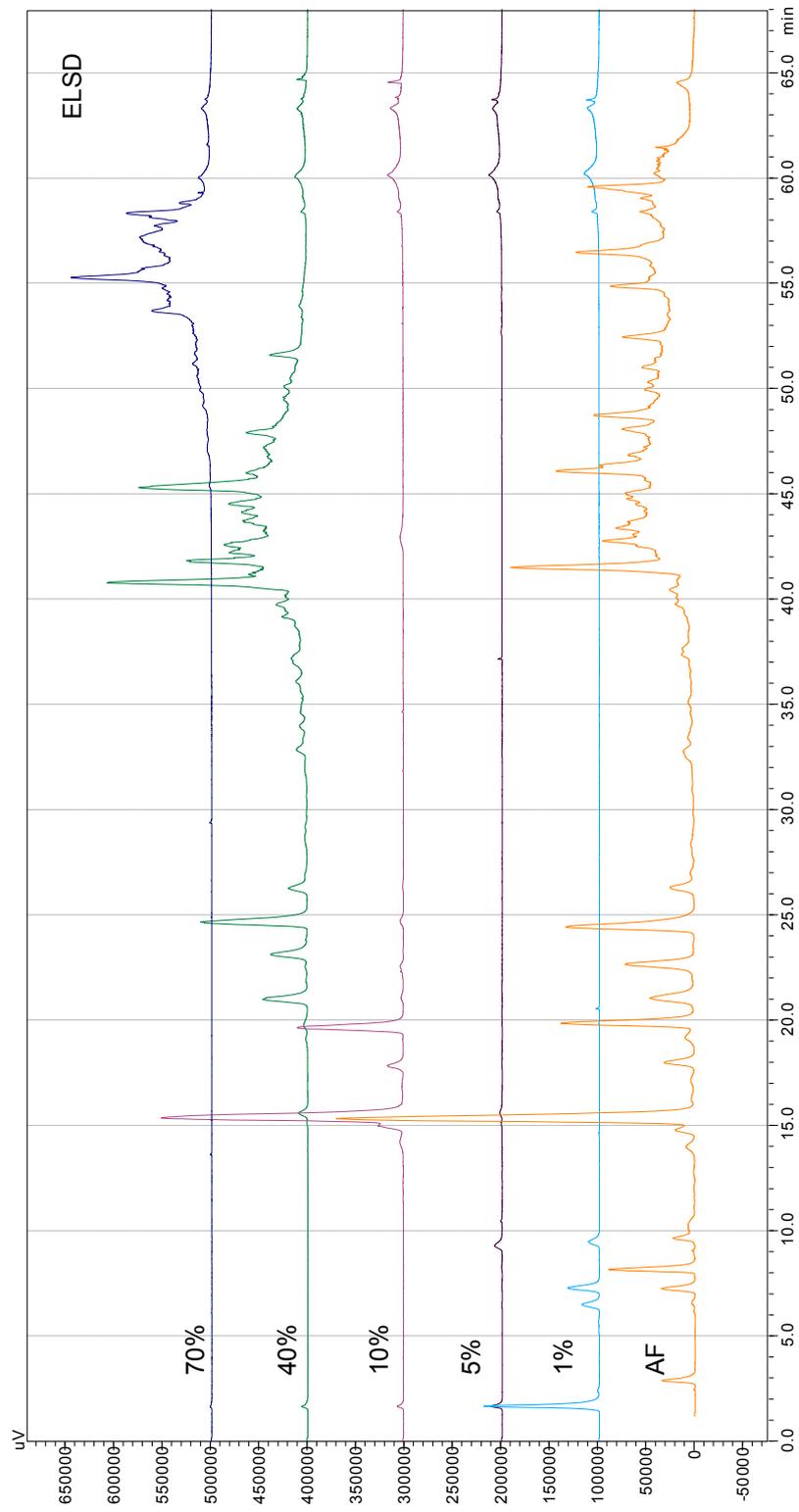


Abb. 43: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des St. Laurent (ELSD)

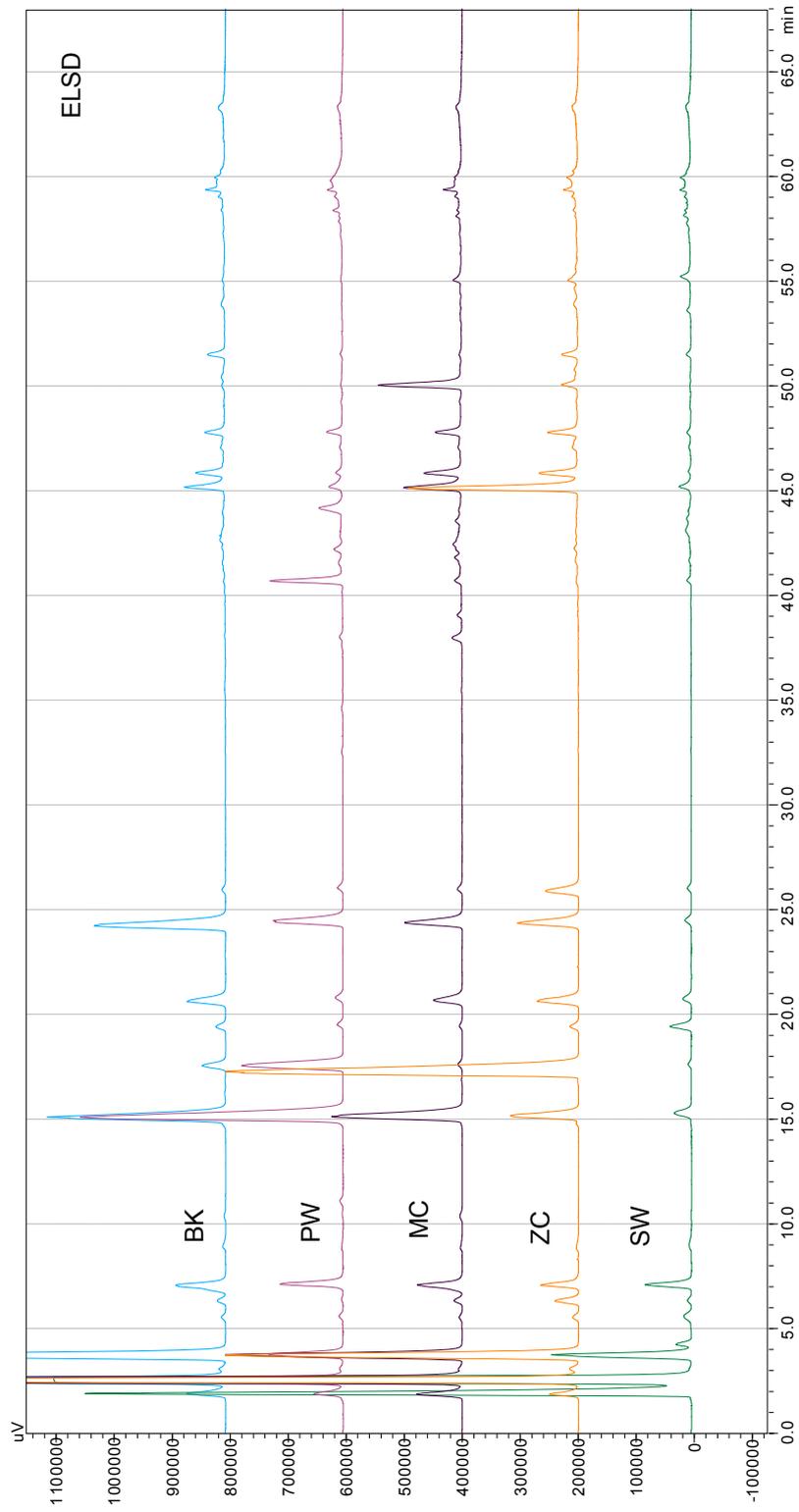


Abb. 44: HPLC-Vergleich der „ETHF“ der fünf Rotweine (ELSD)

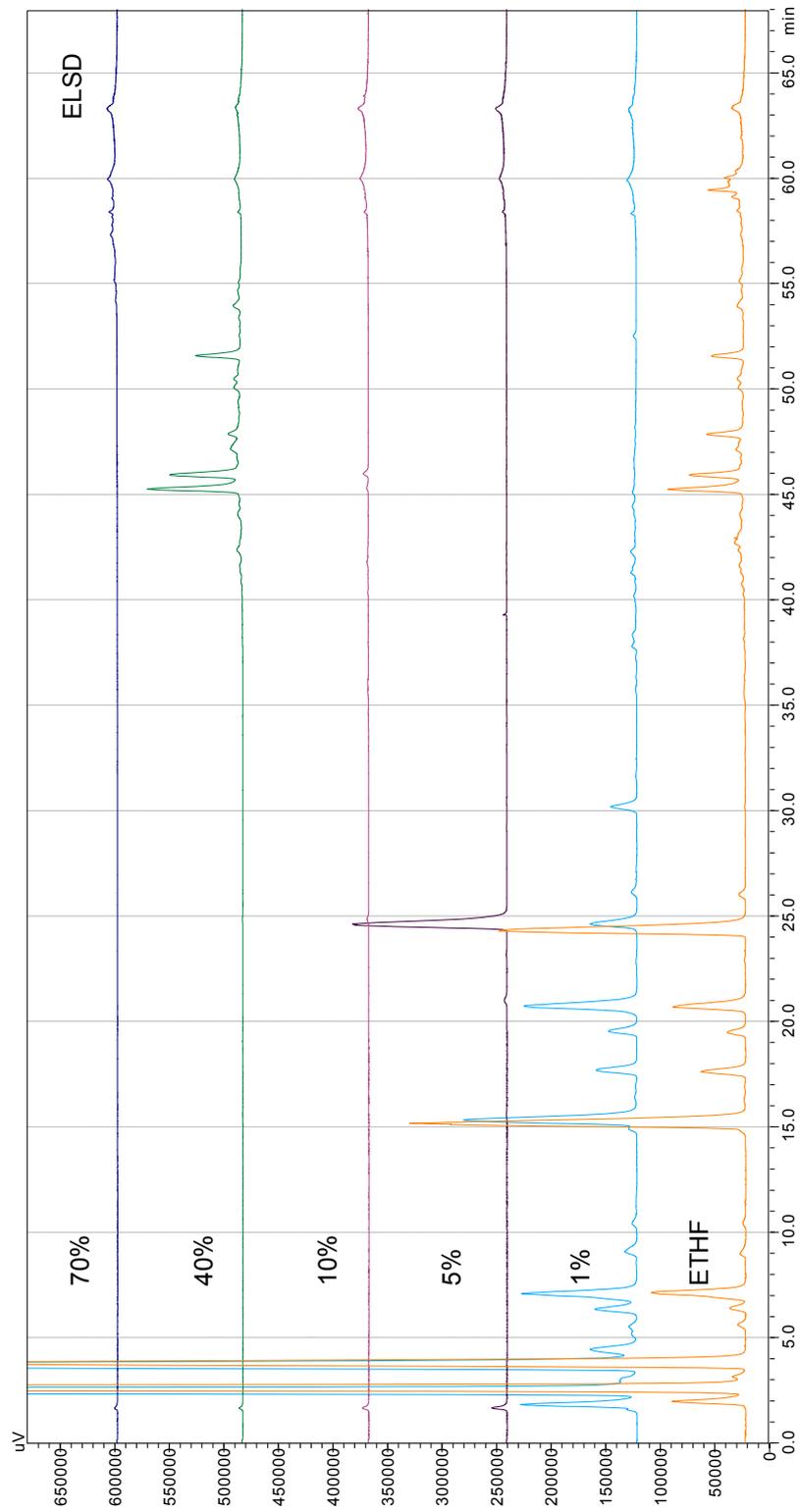


Abb. 45: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Blaufränkisch (ELSD)

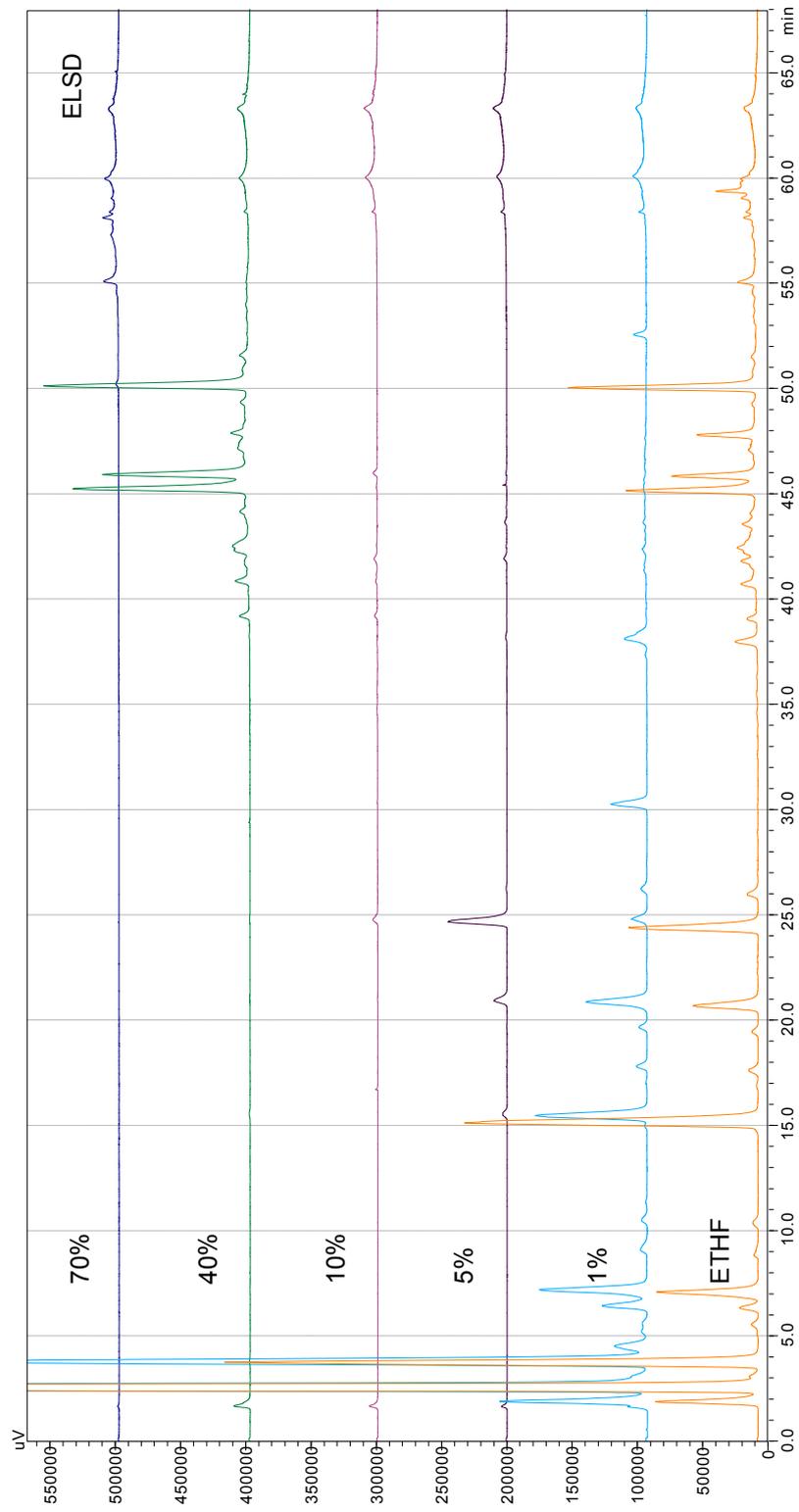


Abb. 46: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Merlot (ELSD)

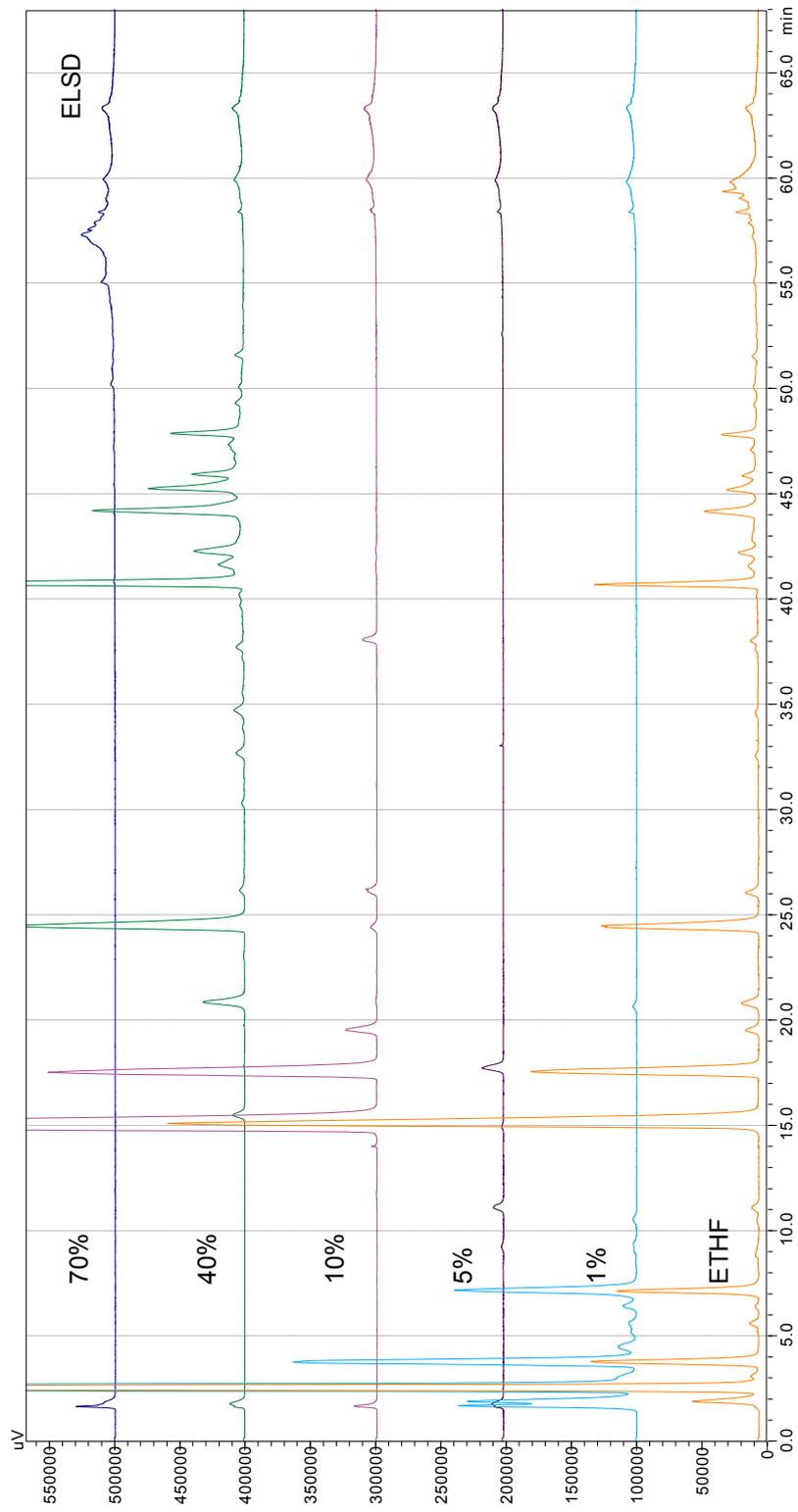


Abb. 47: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Pinot (ELSD)

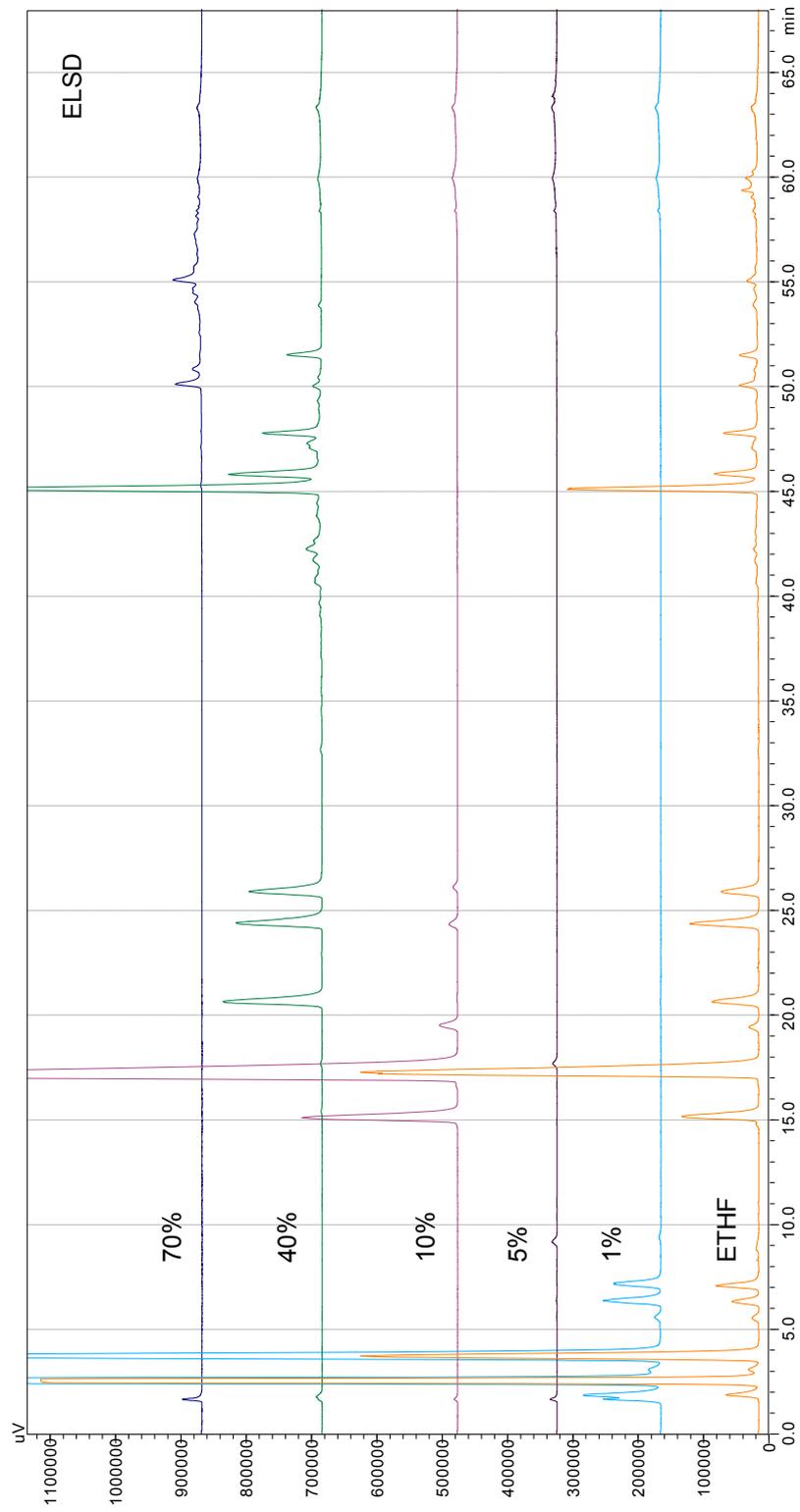


Abb. 48: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Zweigelt (ELSD)

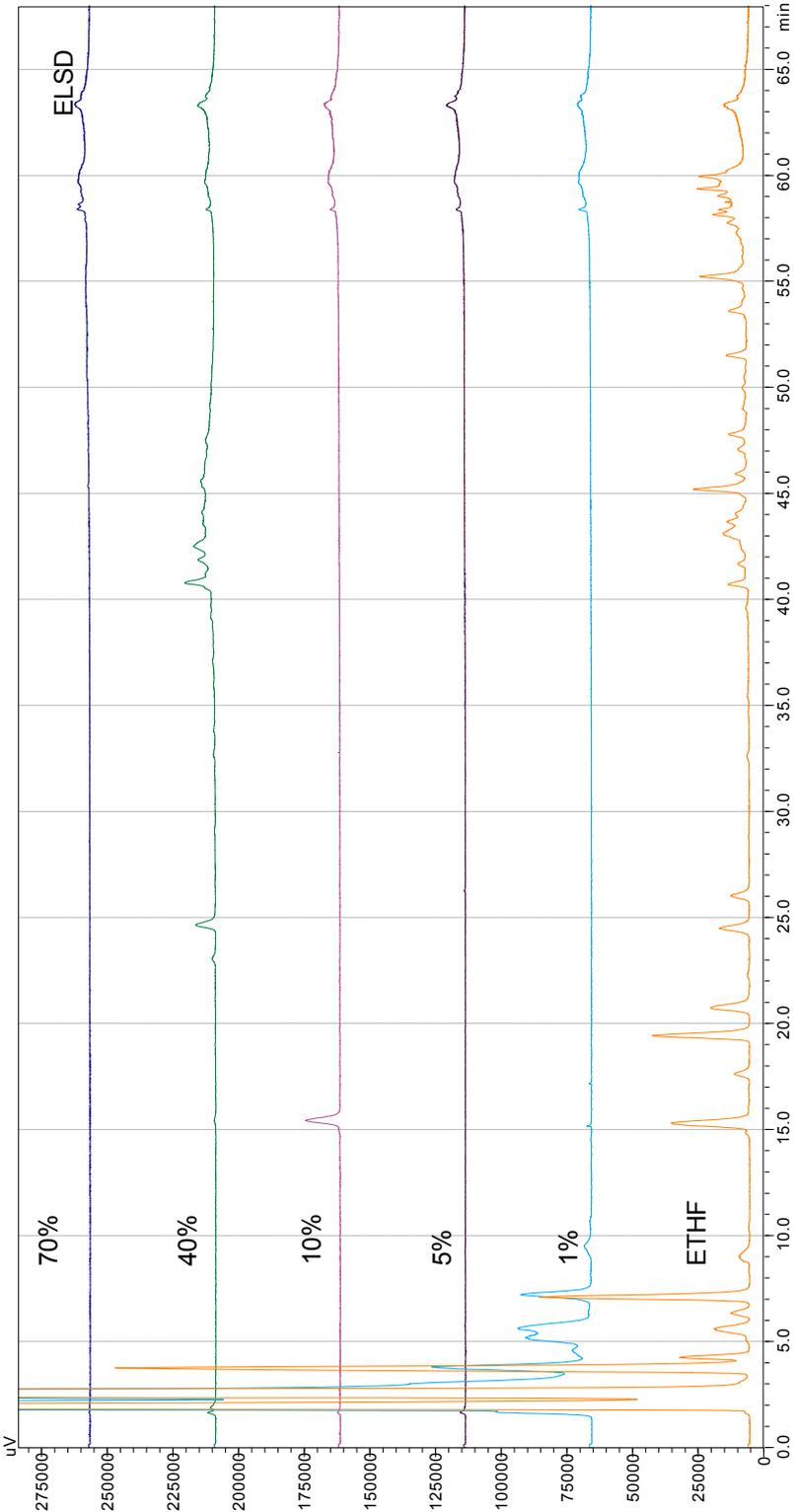


Abb. 49: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des St. Laurent (ELSD)

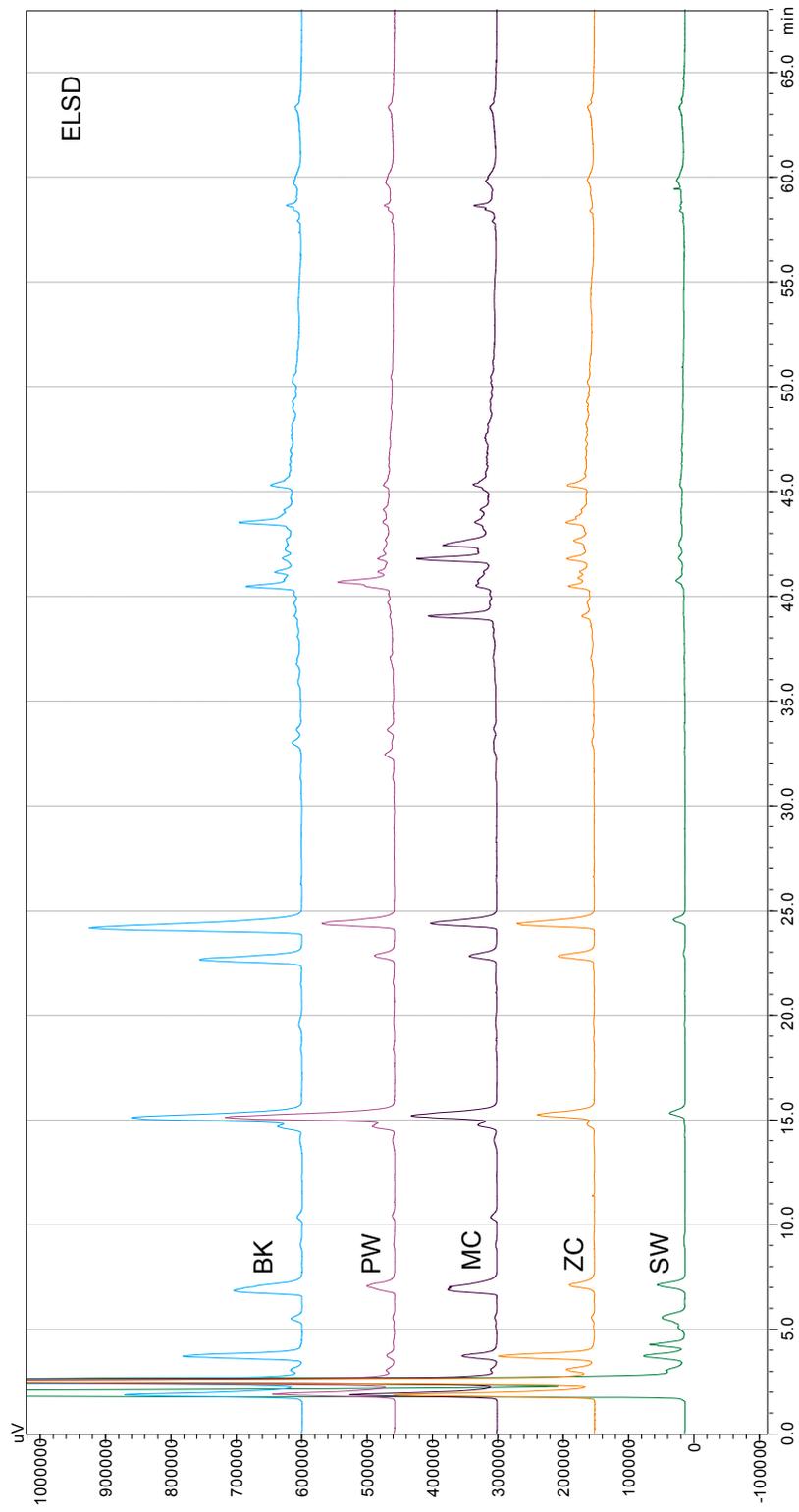


Abb. 50: HPLC-Vergleich der „EAF“ der fünf Rotweine (ELSD)

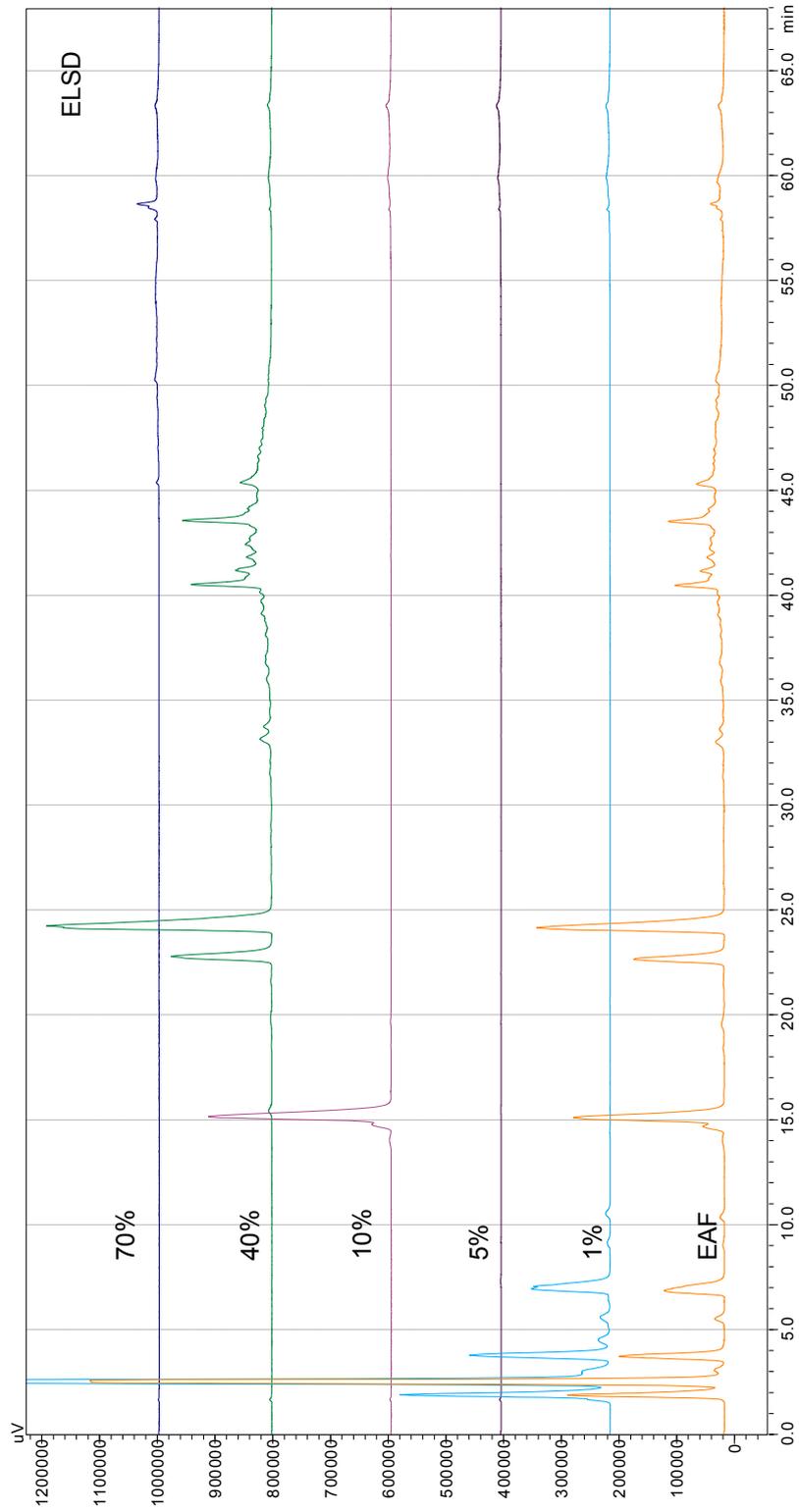


Abb. 51: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Blaifränkisch (ELSD)

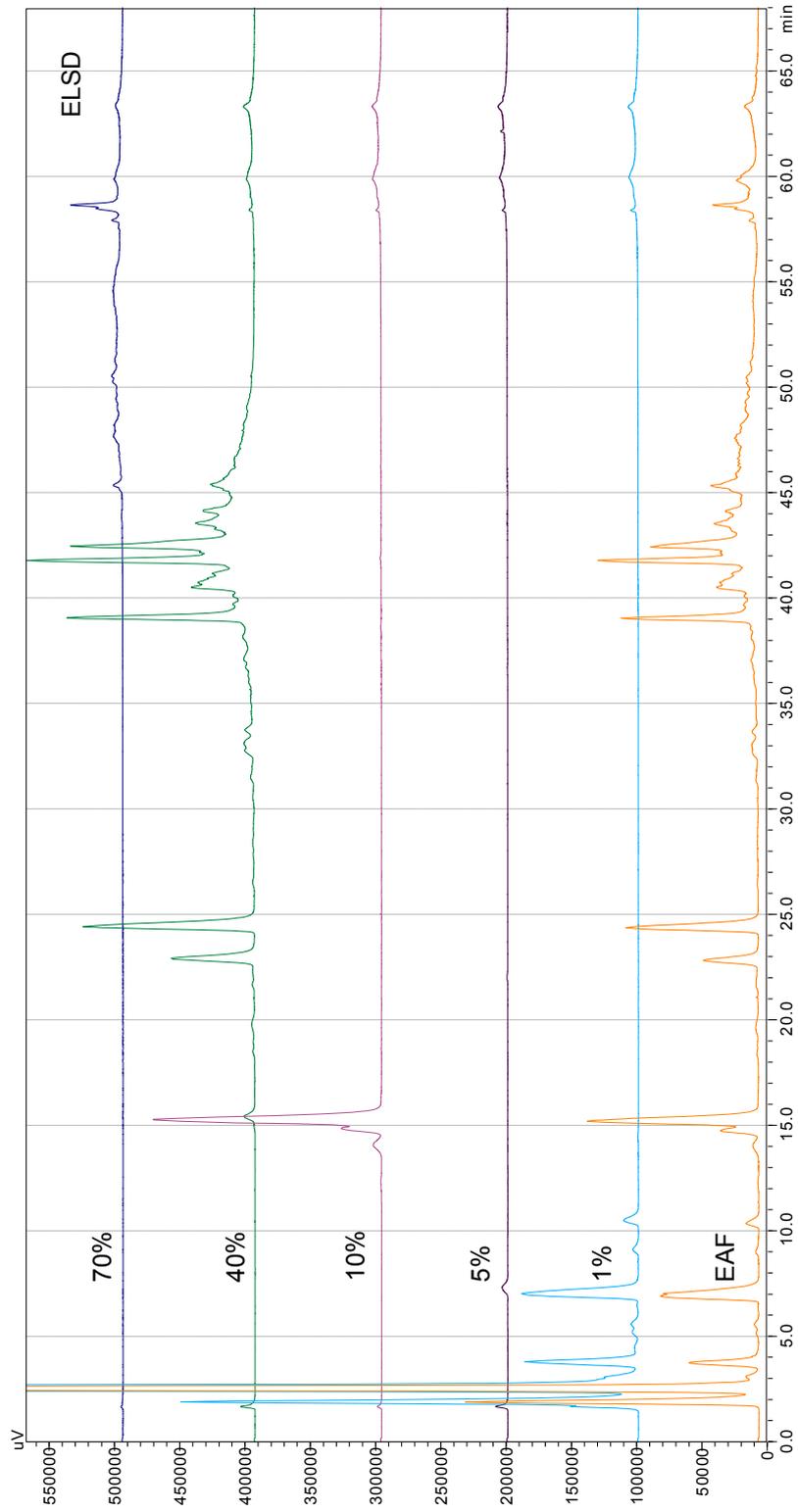


Abb. 52: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Merlot (ELSD)

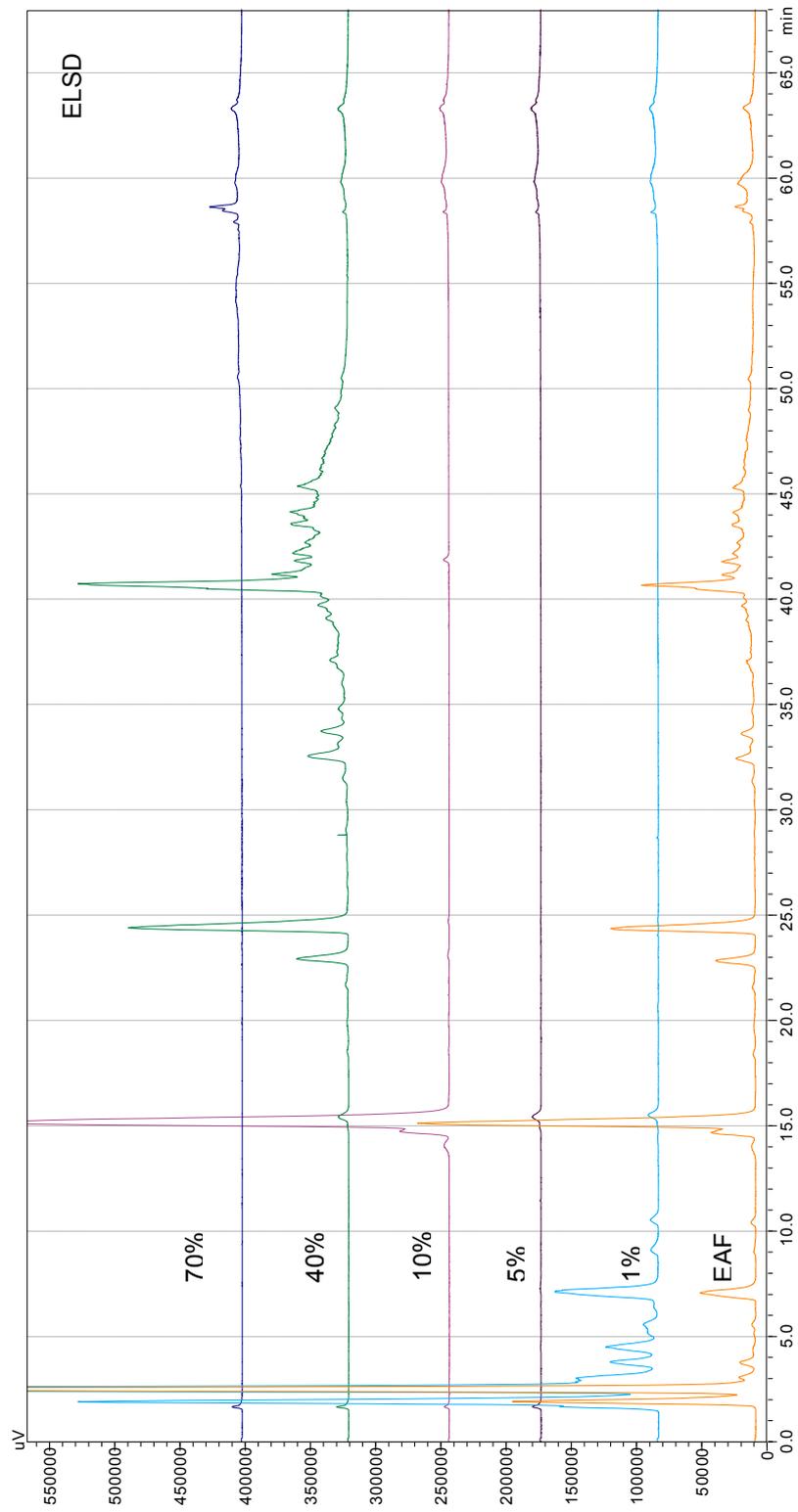


Abb. 53: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Pinot (ELSD)

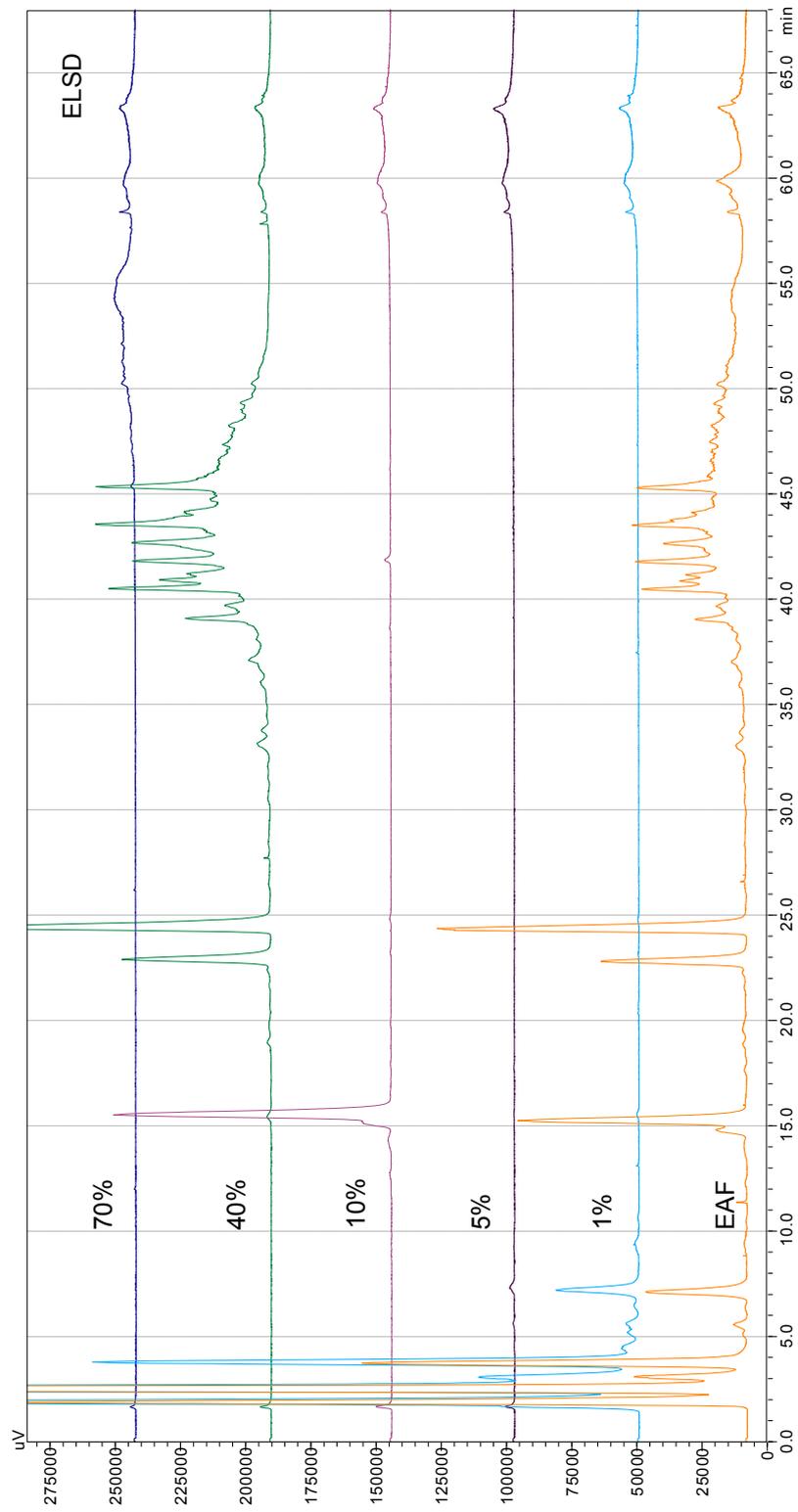


Abb. 54: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Zweigelt (ELSD)

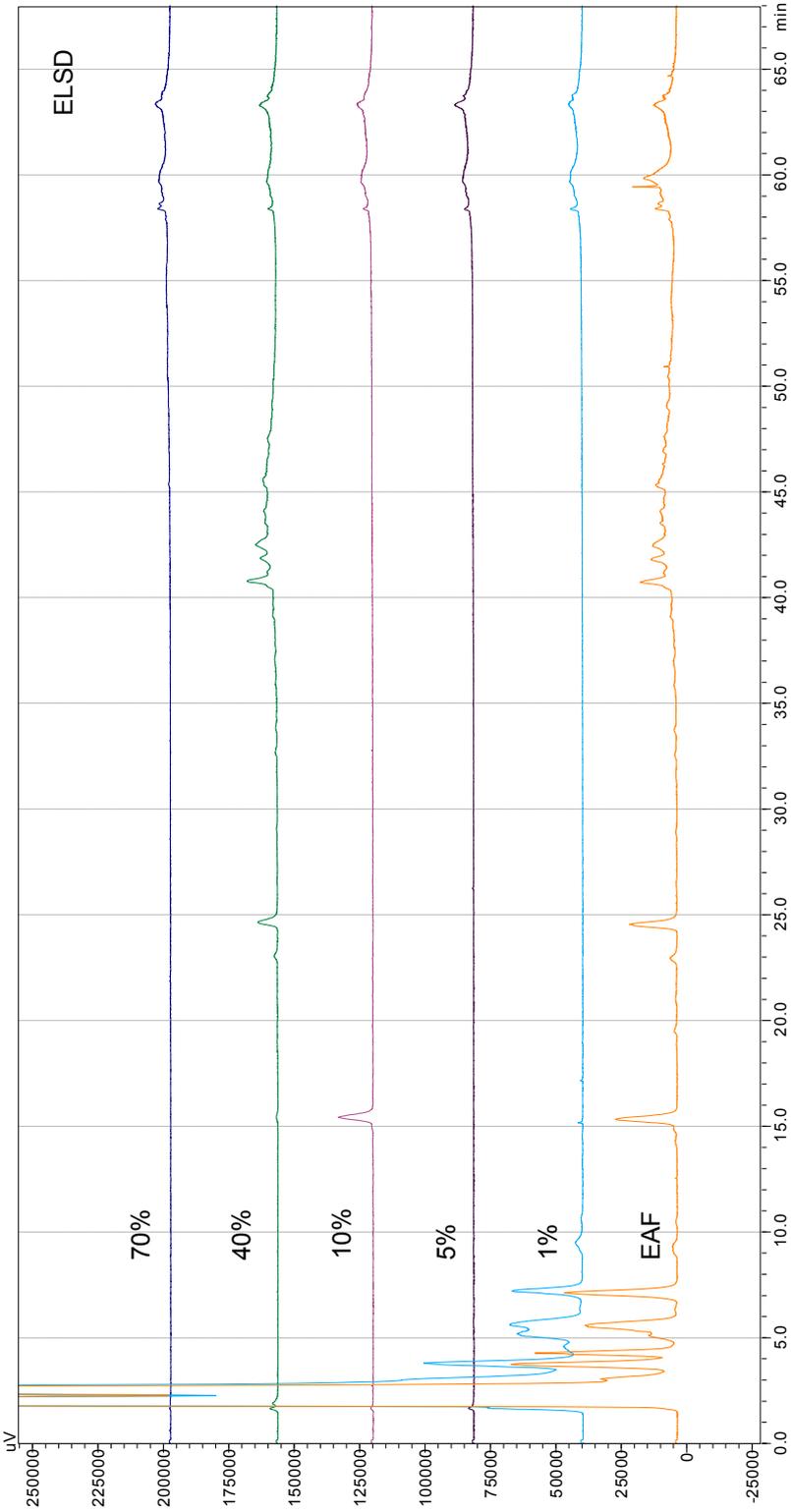


Abb. 55: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des St. Laurent (ELSD)

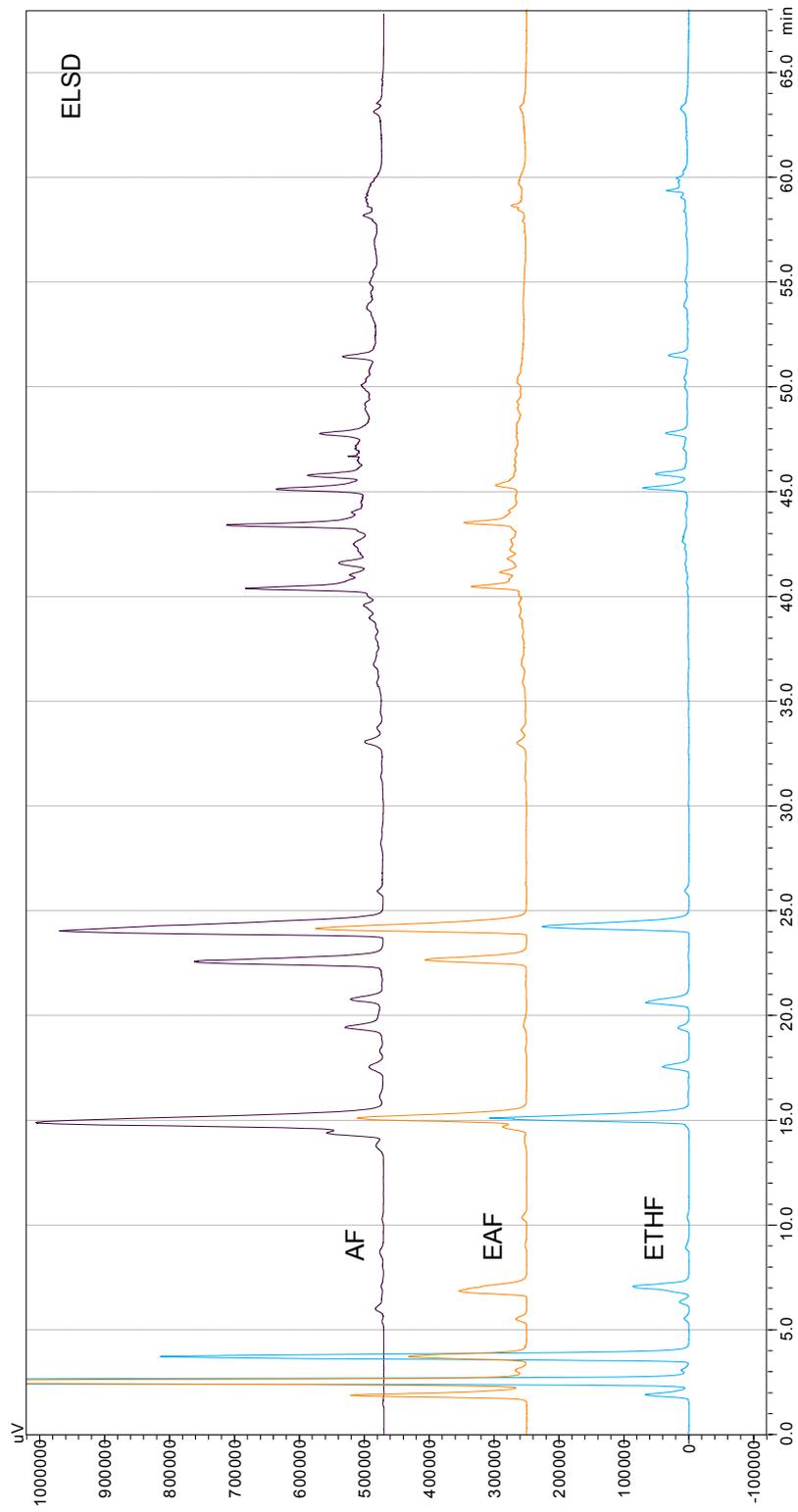


Abb. 56: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des Blaifränkisch (ELSD)

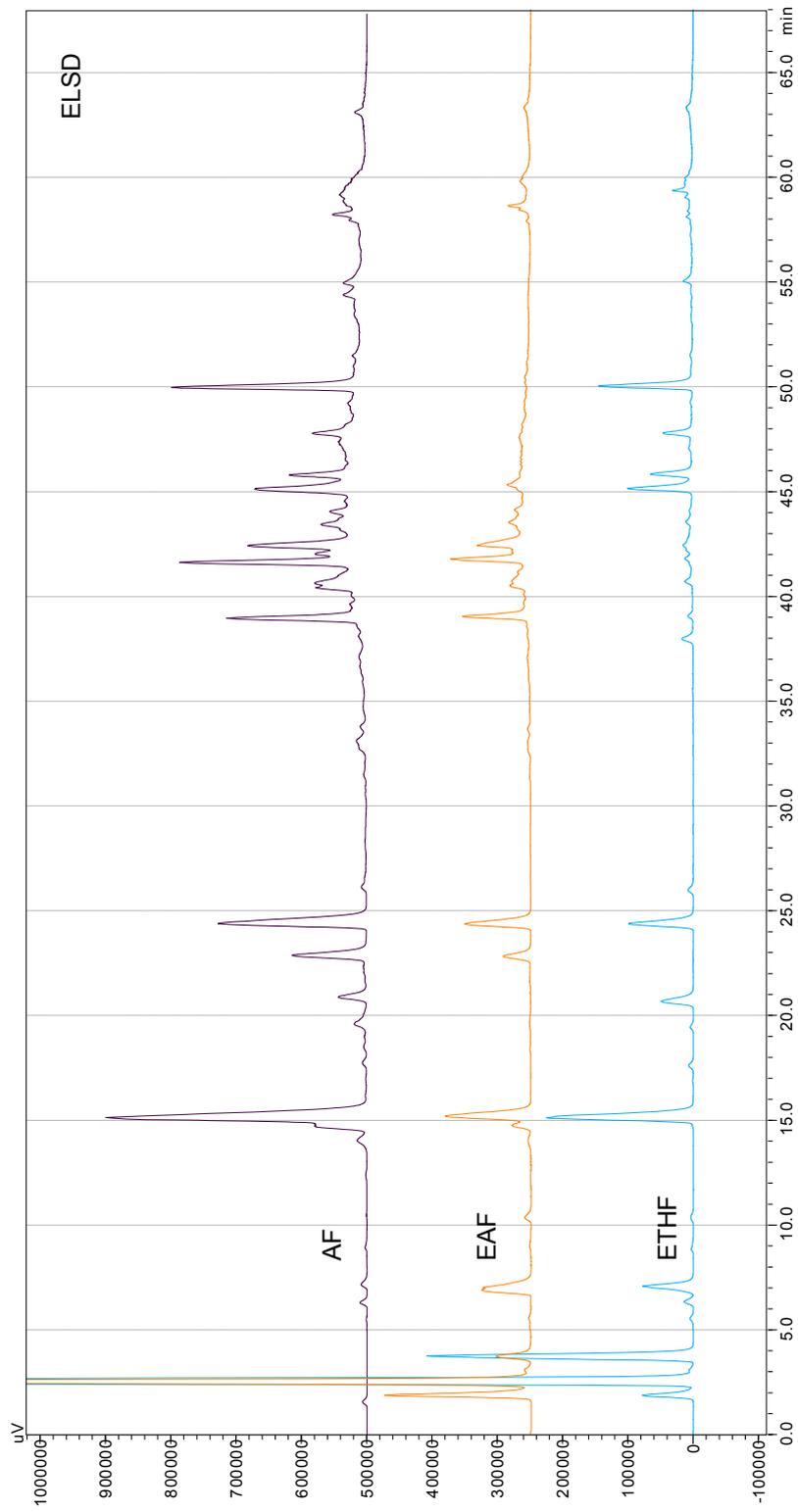


Abb. 57: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des Merlot (ELSD)

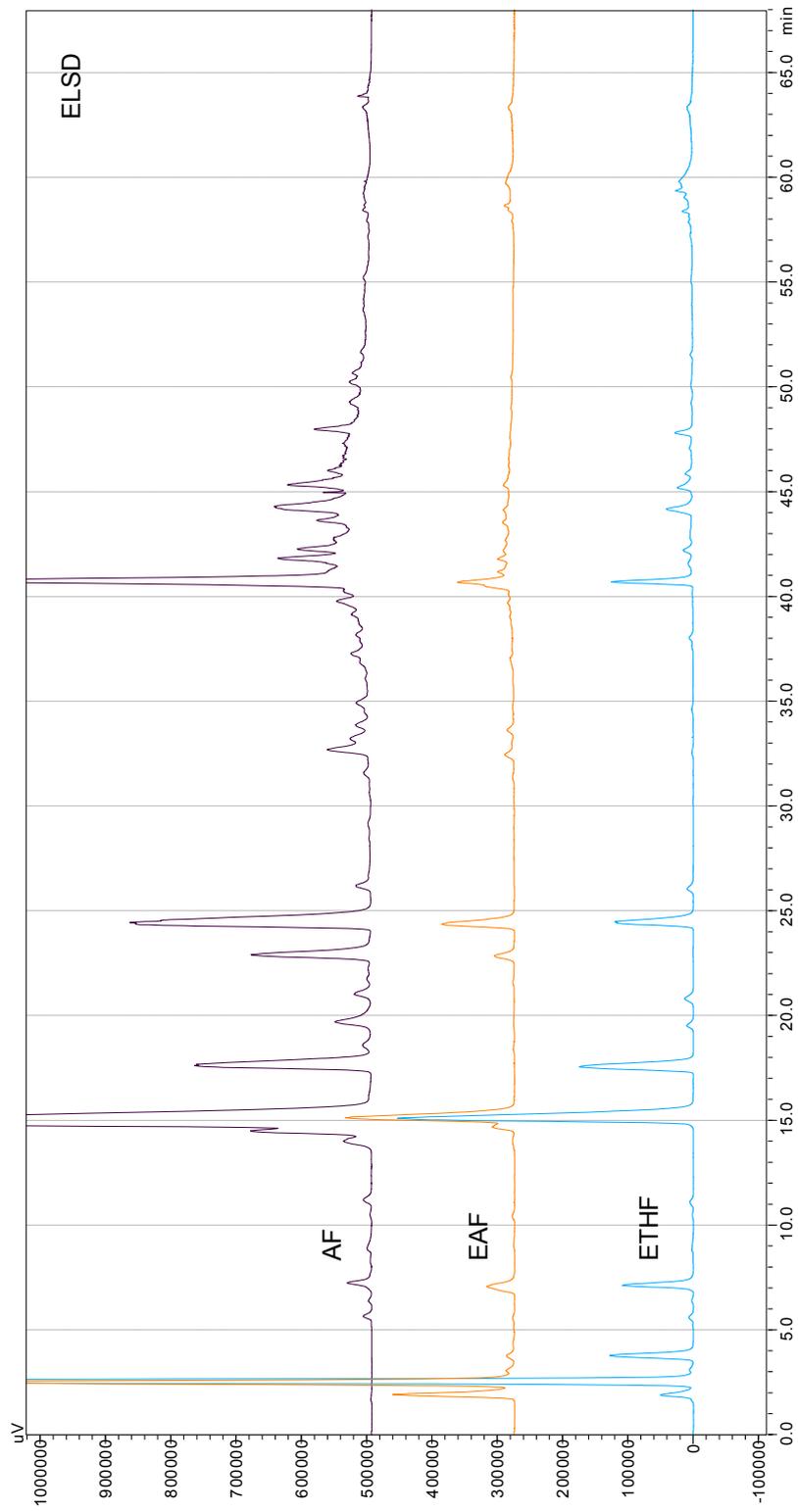


Abb. 58: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des Pinot (ELSD)

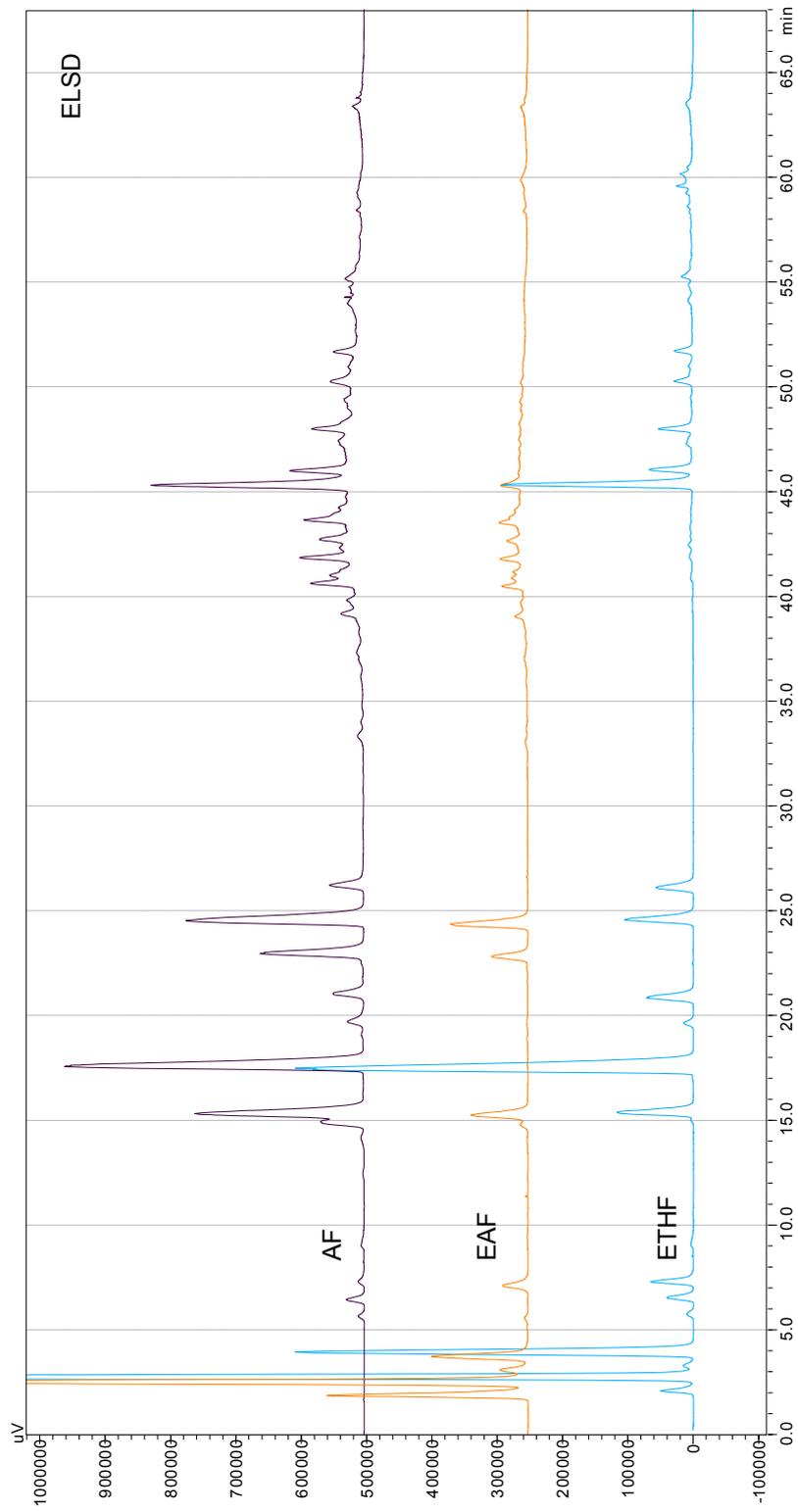


Abb. 59: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des Zweigelt (ELSD)

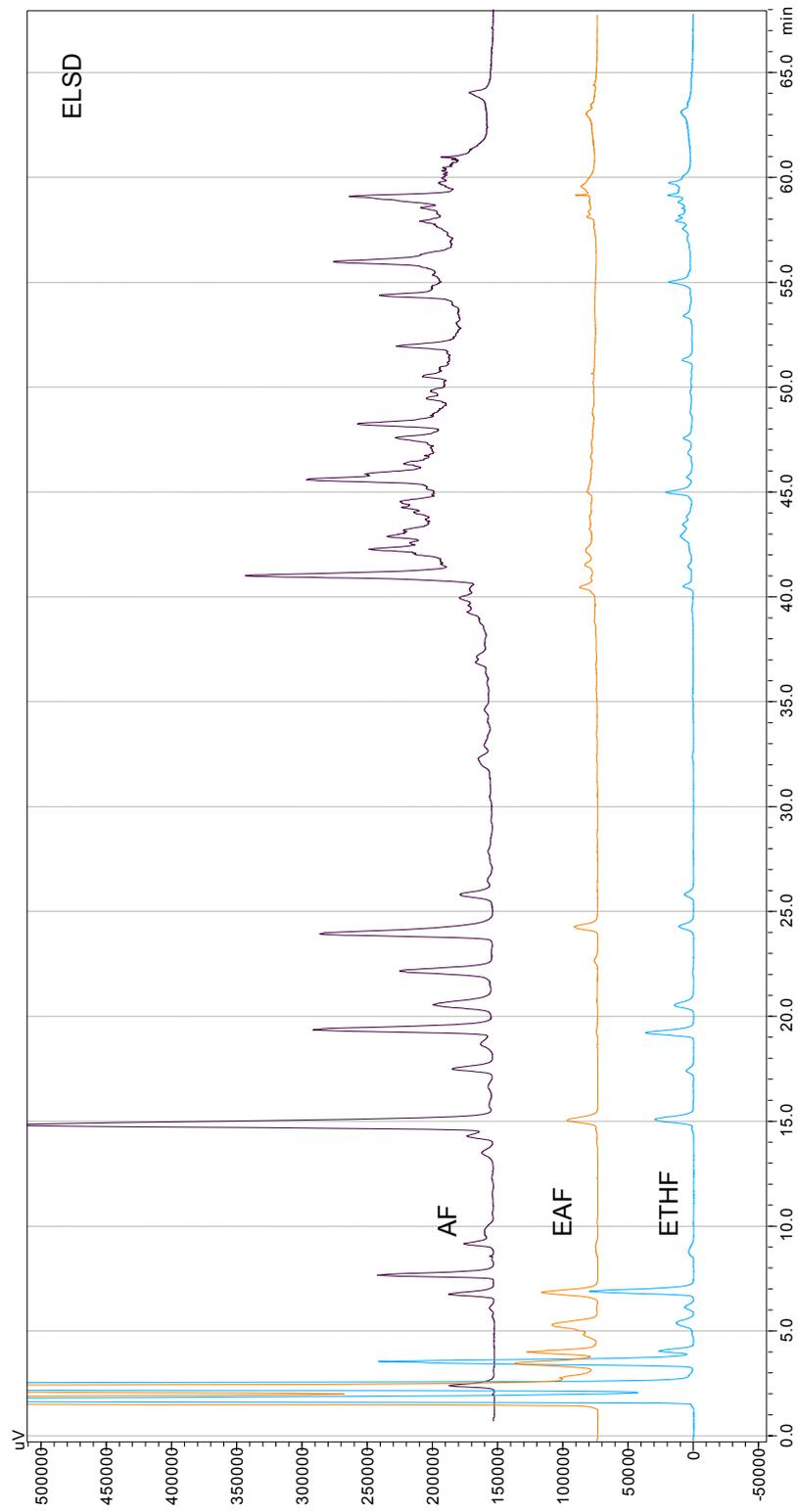


Abb. 60: HPLC-Vergleich der „AF“ mit der „ETHF“ und „EAF“ des St. Laurent (ELSD)

8.2 Gesammelte Chromatogramme bei 280 nm

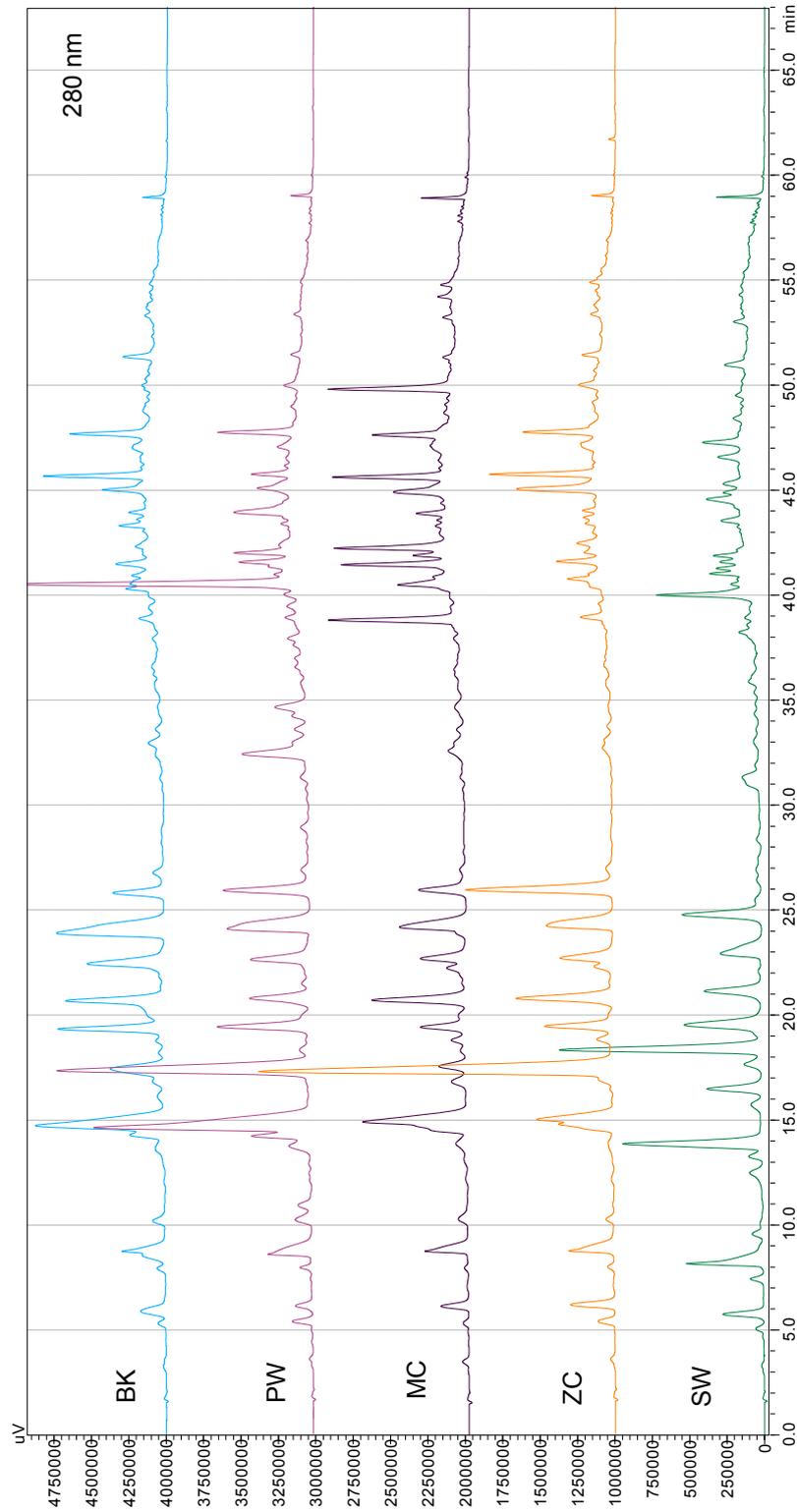


Abb. 61: HPLC-Vergleich der „AF“ der fünf Rotweine bei 280 nm

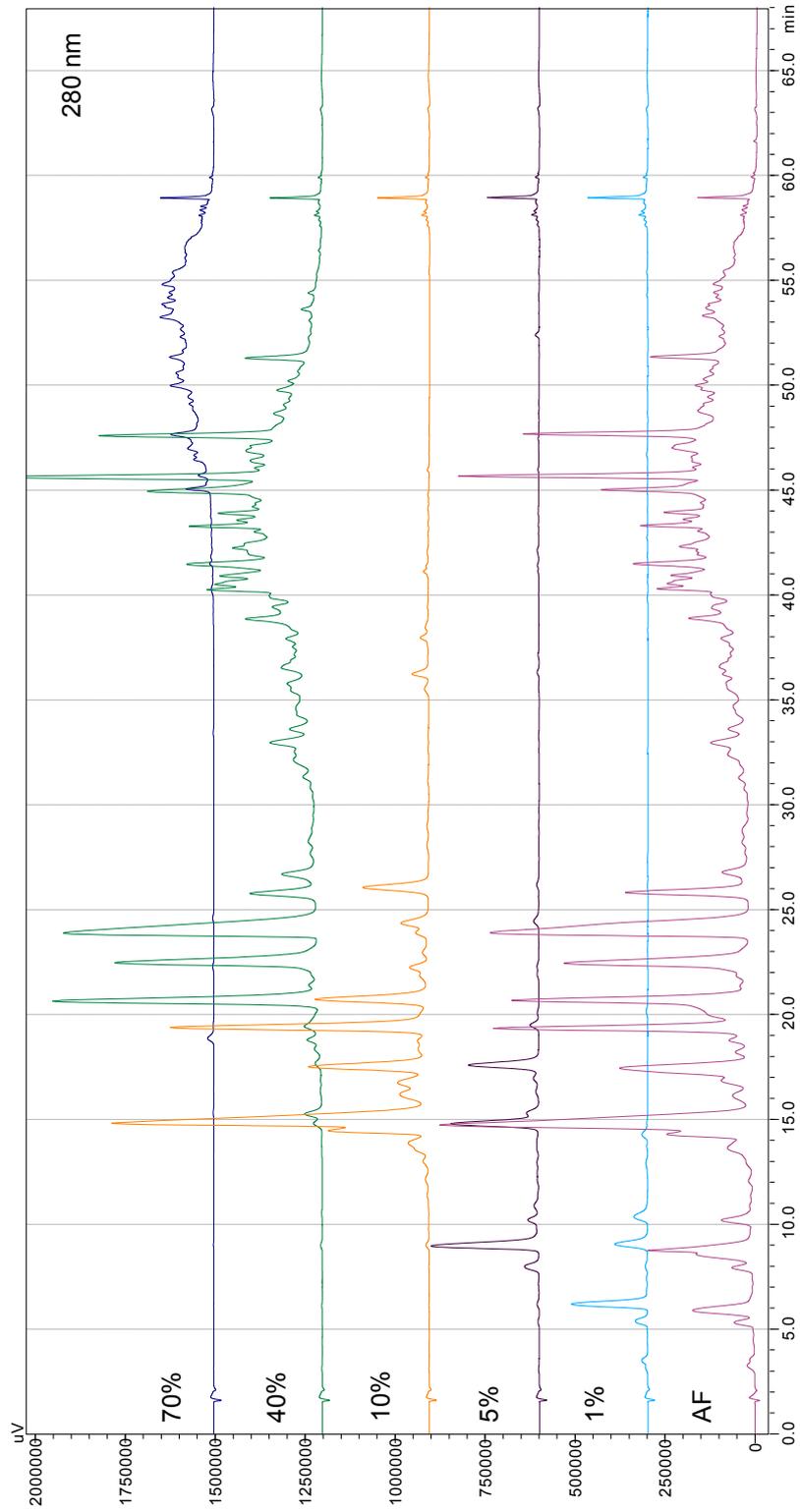


Abb. 62: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Blaifränkisch bei 280 nm

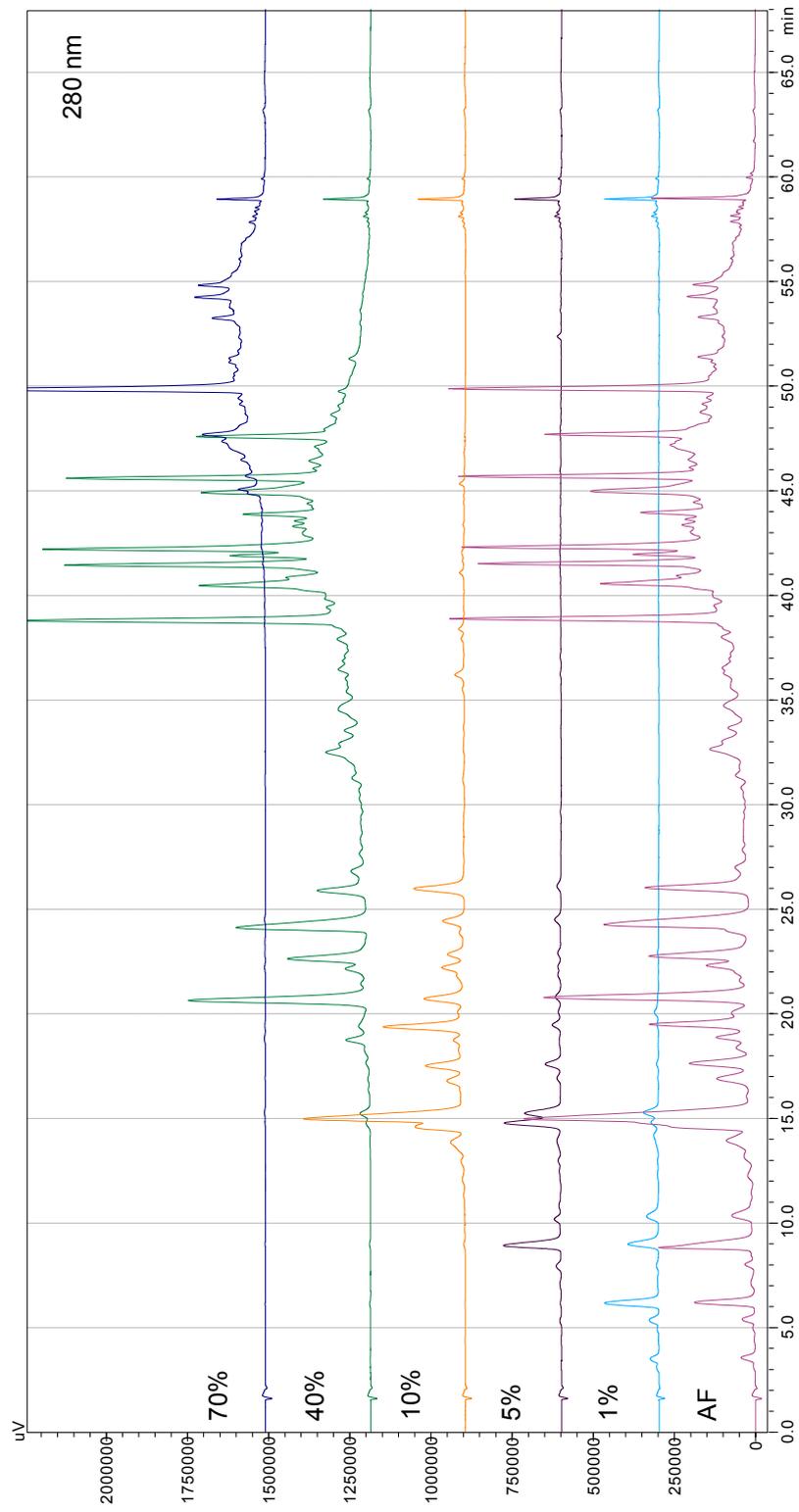


Abb. 63: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Merlot bei 280 nm

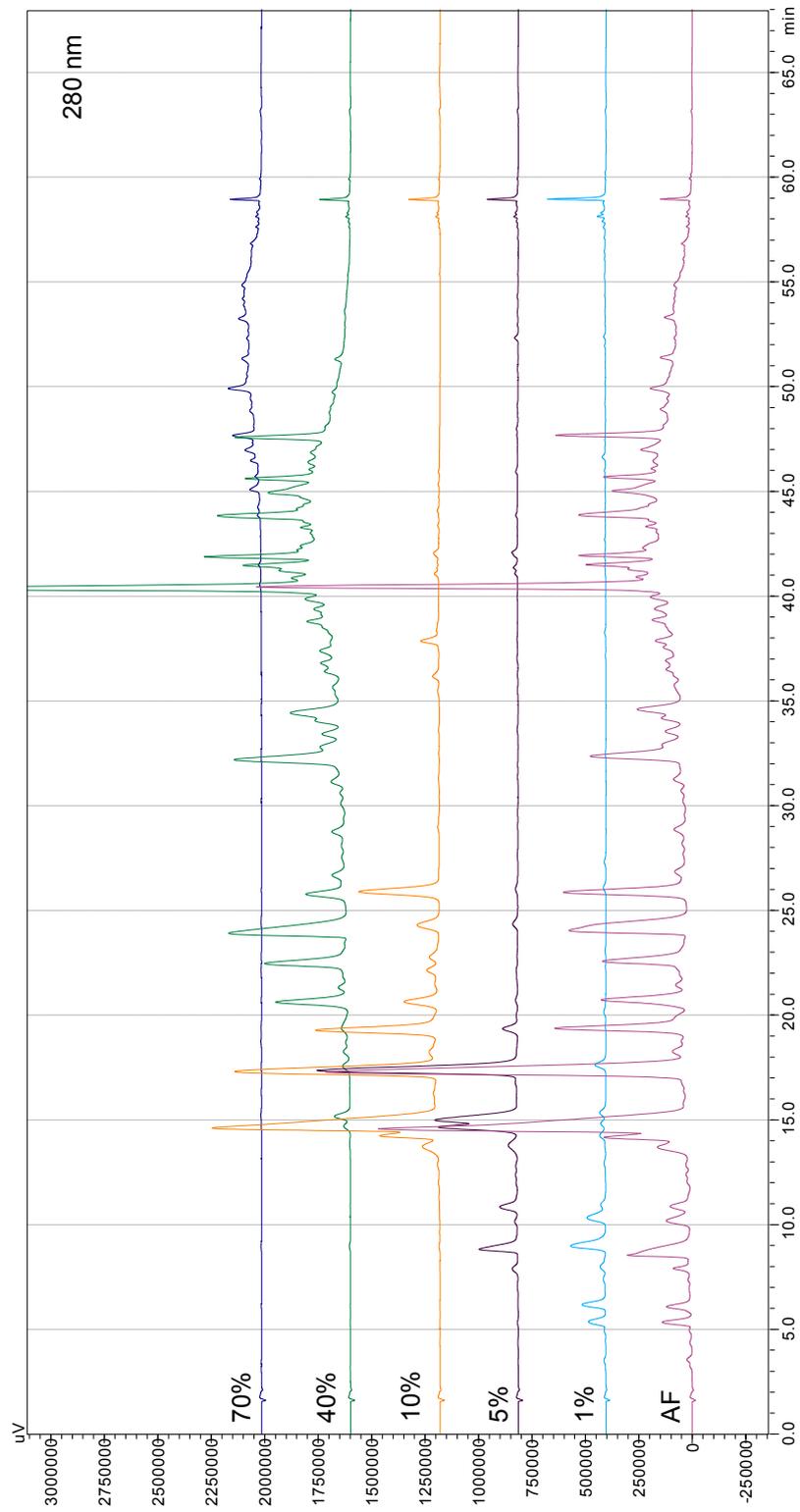


Abb. 64: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Pinot bei 280 nm

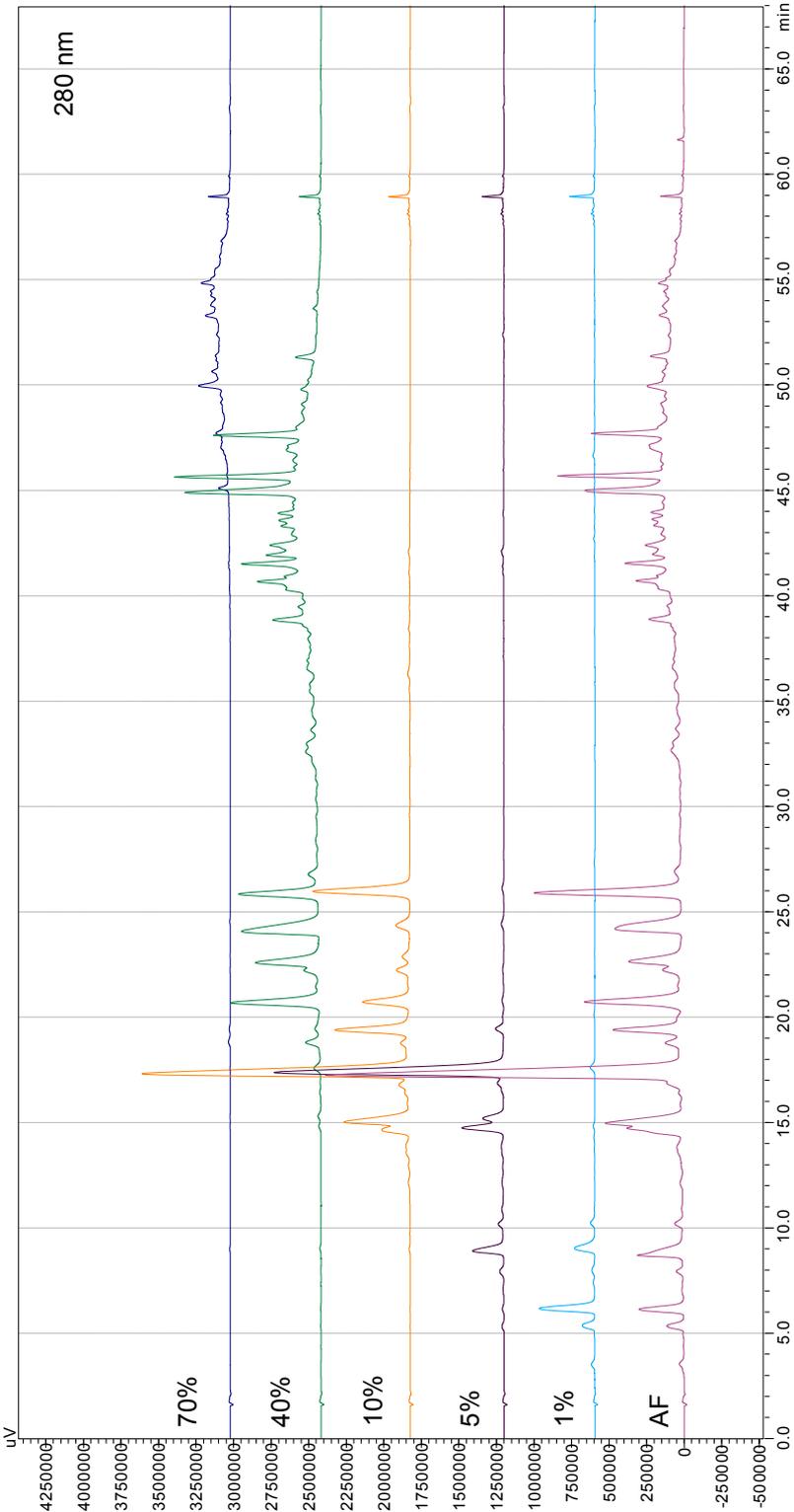


Abb. 65: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Zweigels bei 280 nm

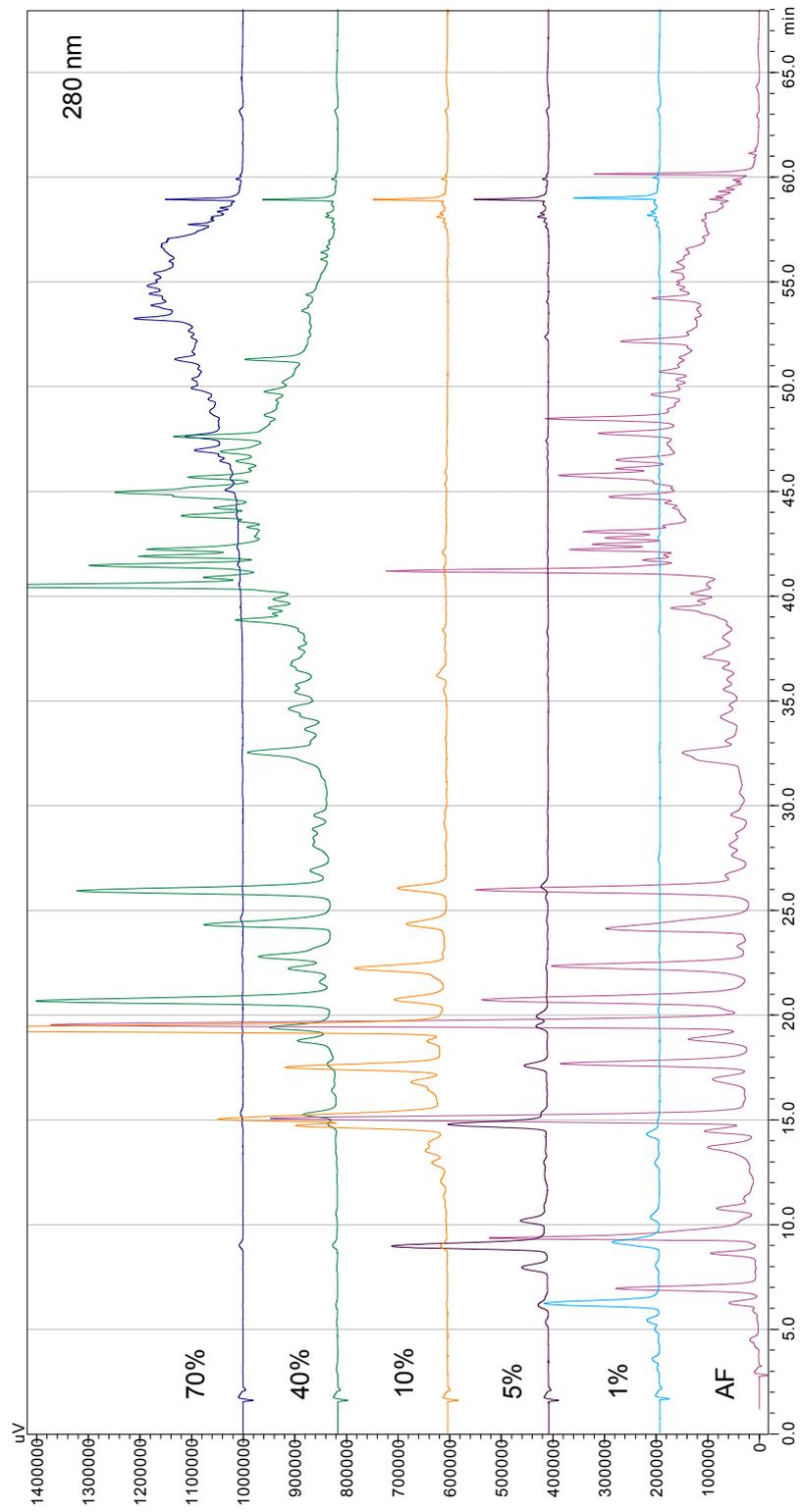


Abb. 66: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des St. Laurent bei 280 nm

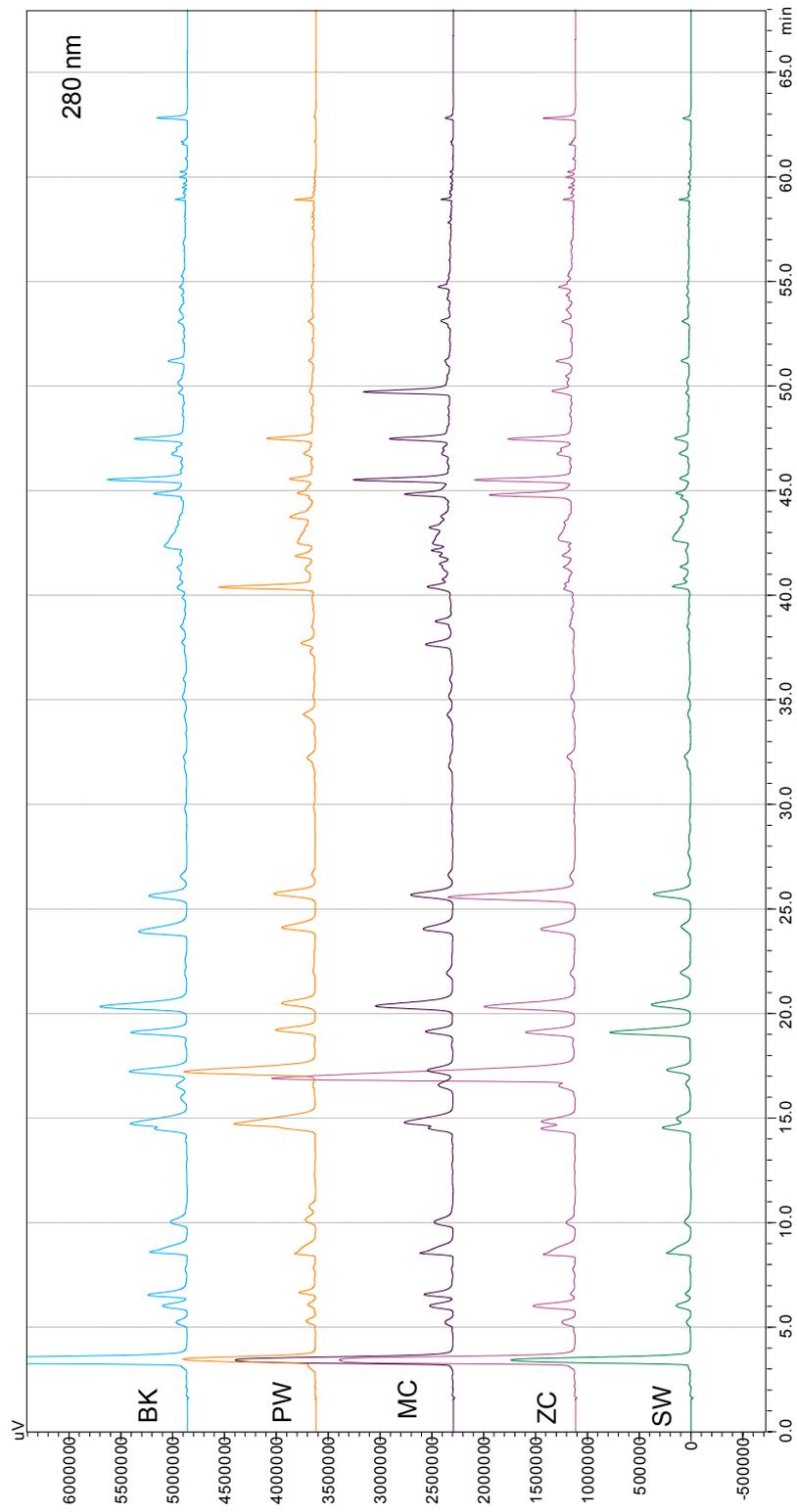


Abb. 67: HPLC-Vergleich der „ETHF“ der fünf Rotweine bei 280 nm

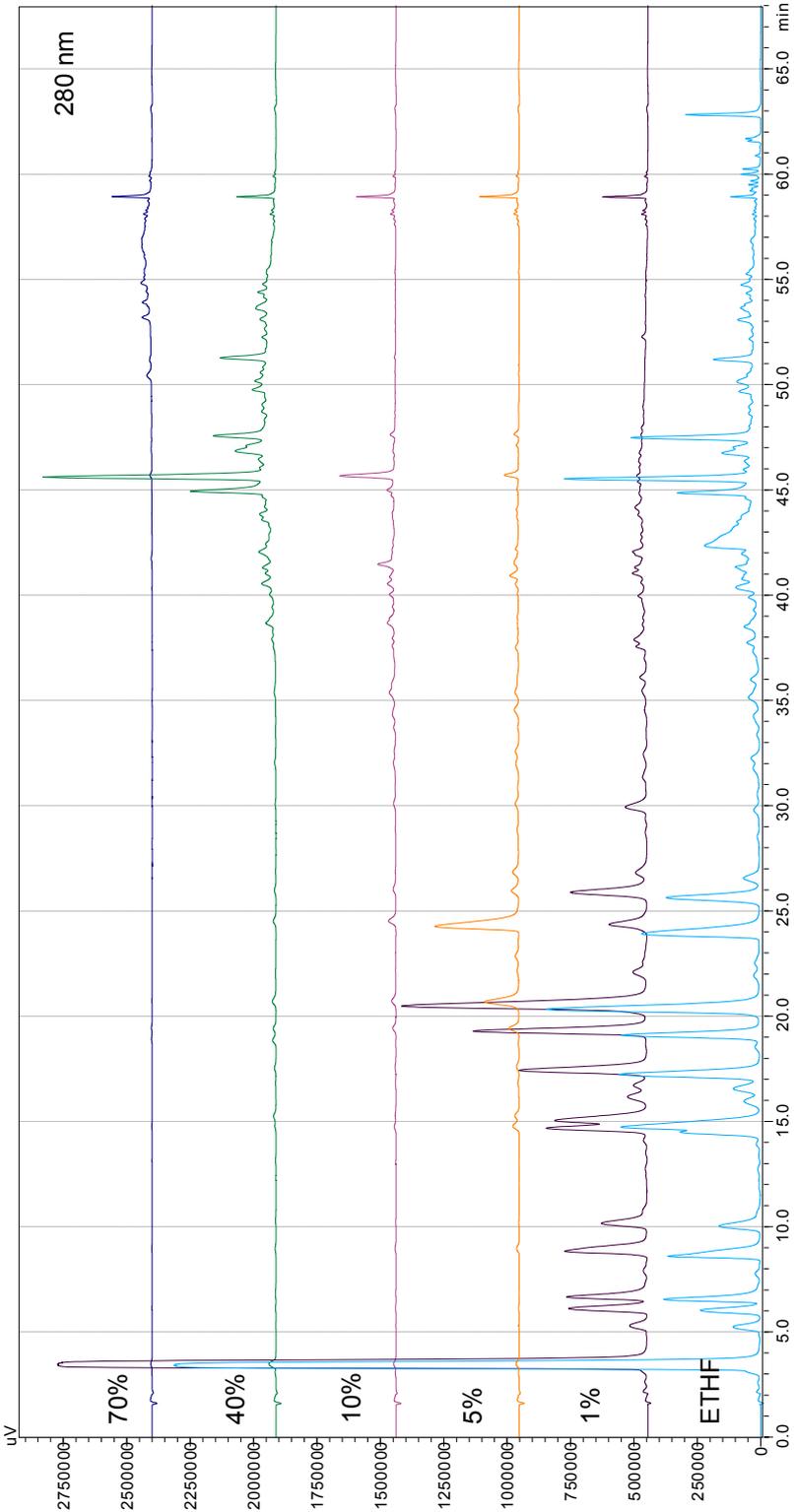


Abb. 68: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Blaufränkisch bei 280 nm

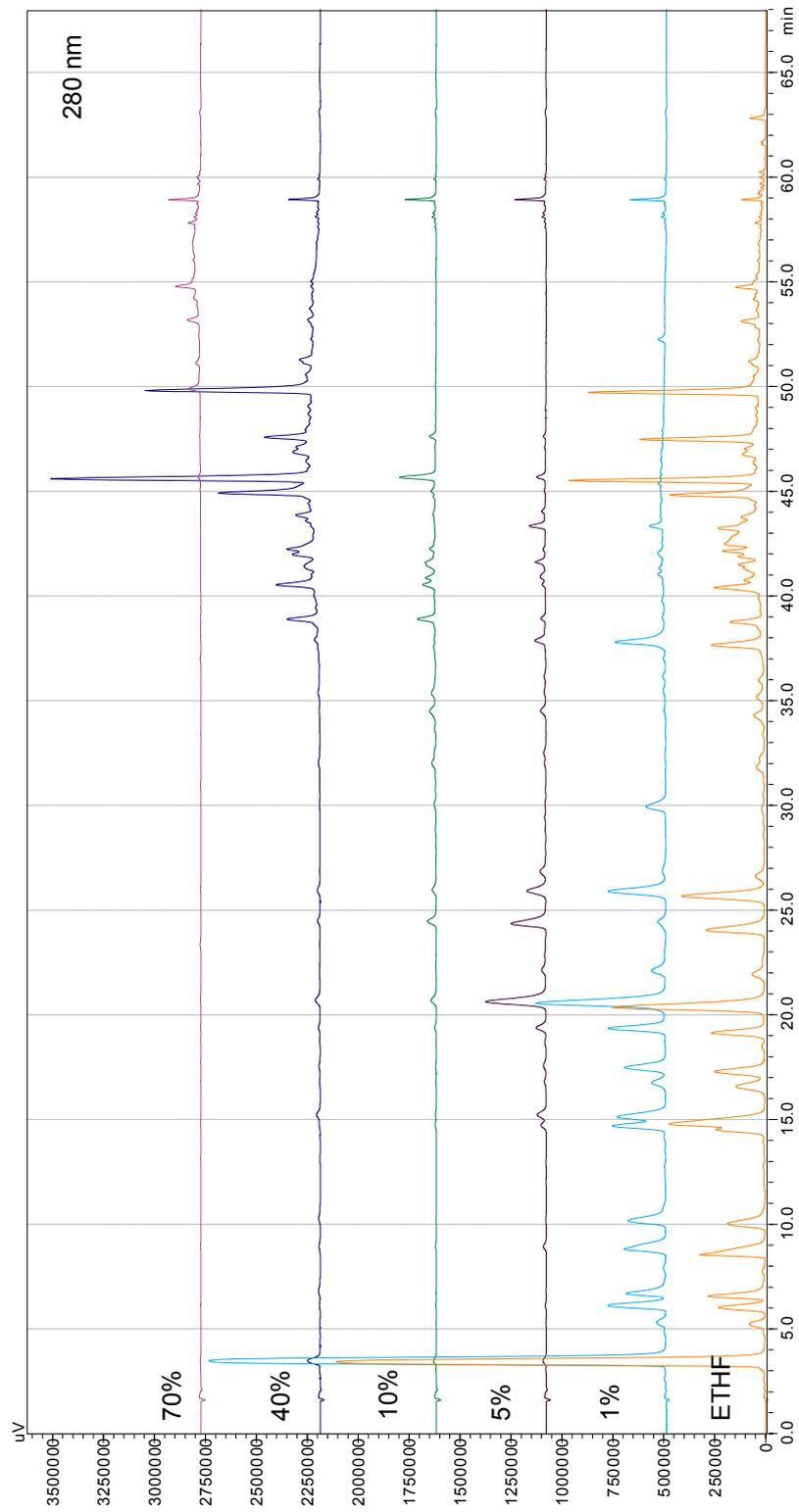


Abb. 69: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Merlot bei 280 nm

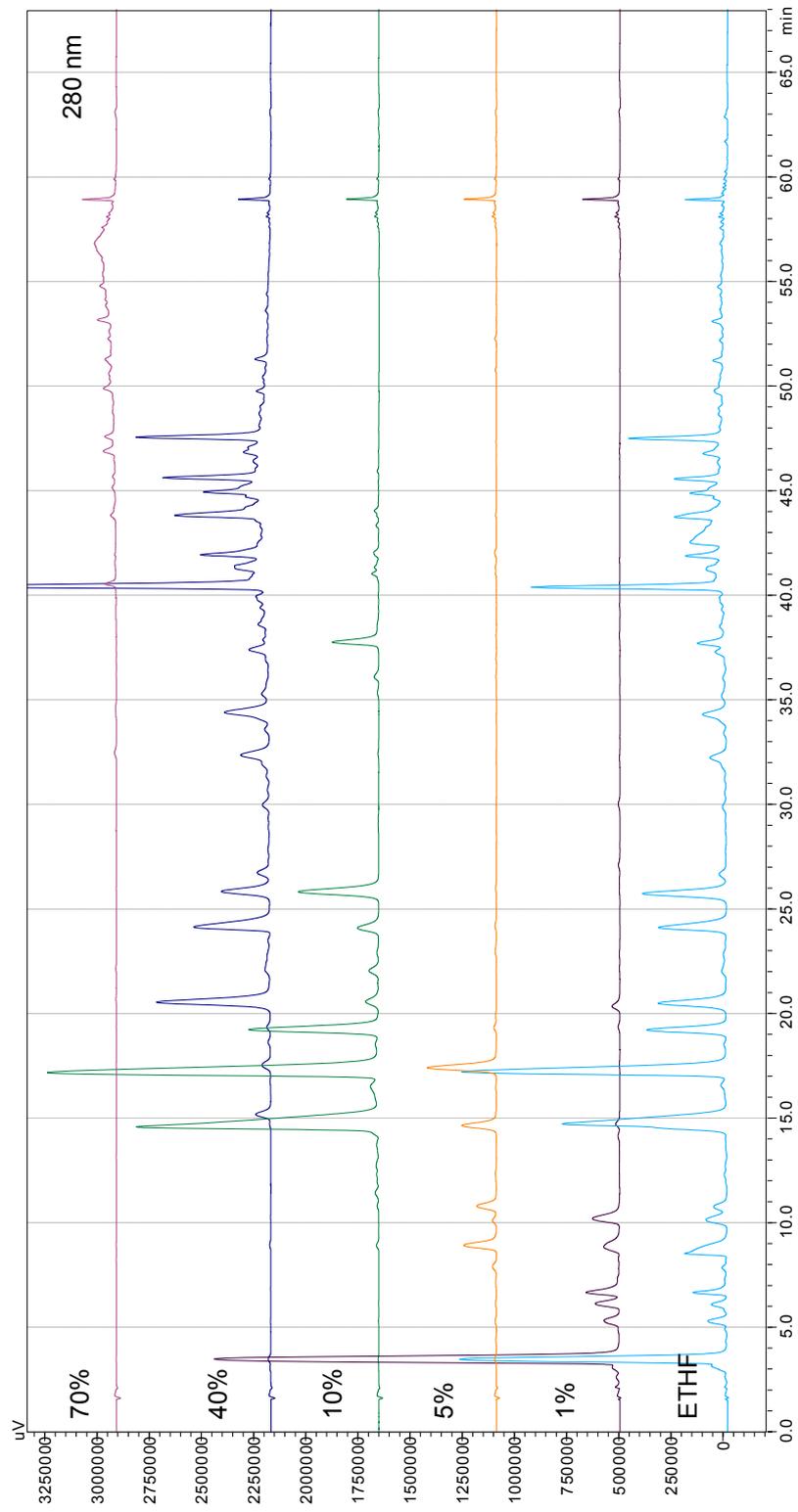


Abb. 70: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Pinot bei 280 nm

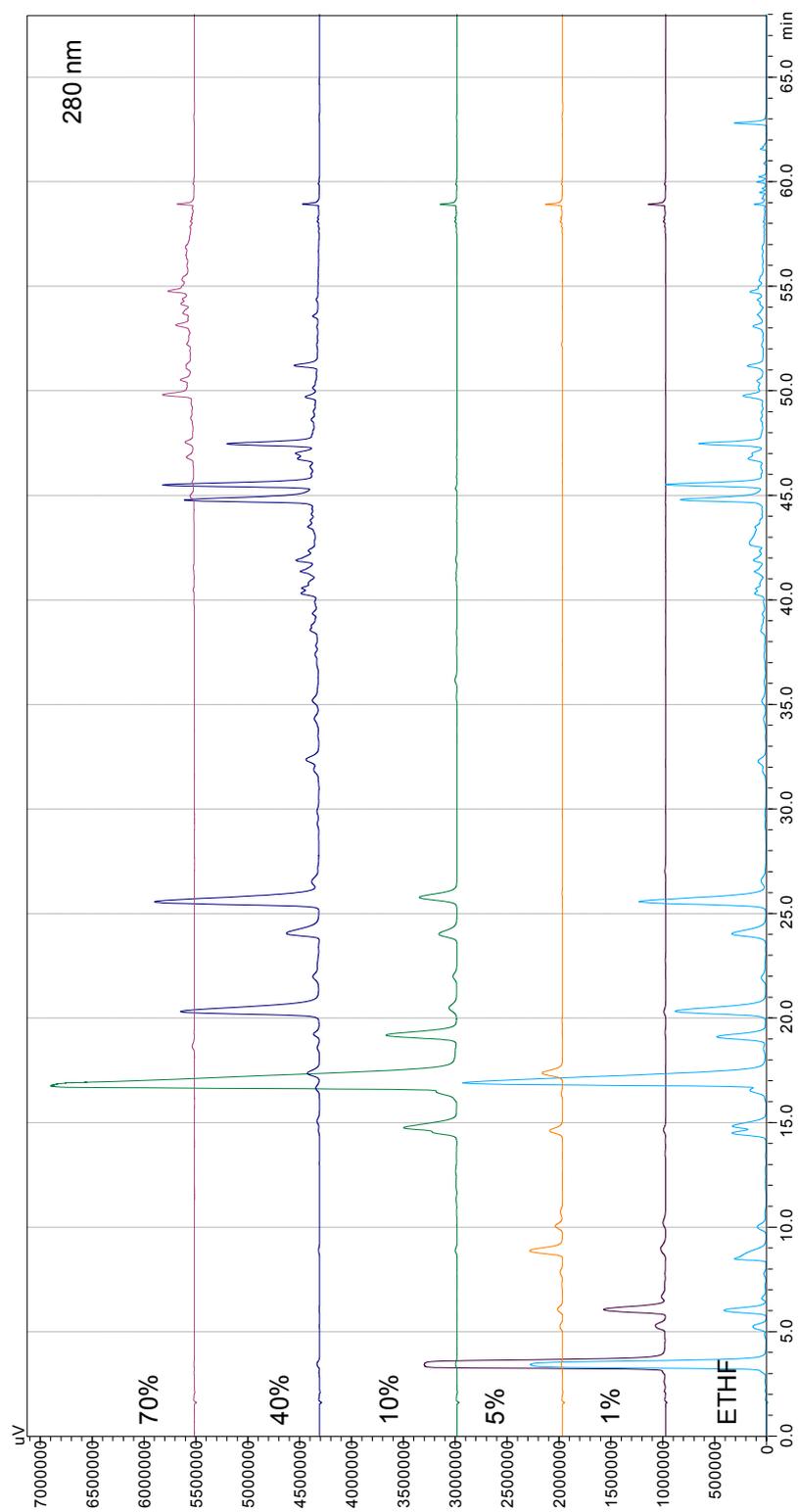


Abb. 71: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des Zweigels bei 280 nm

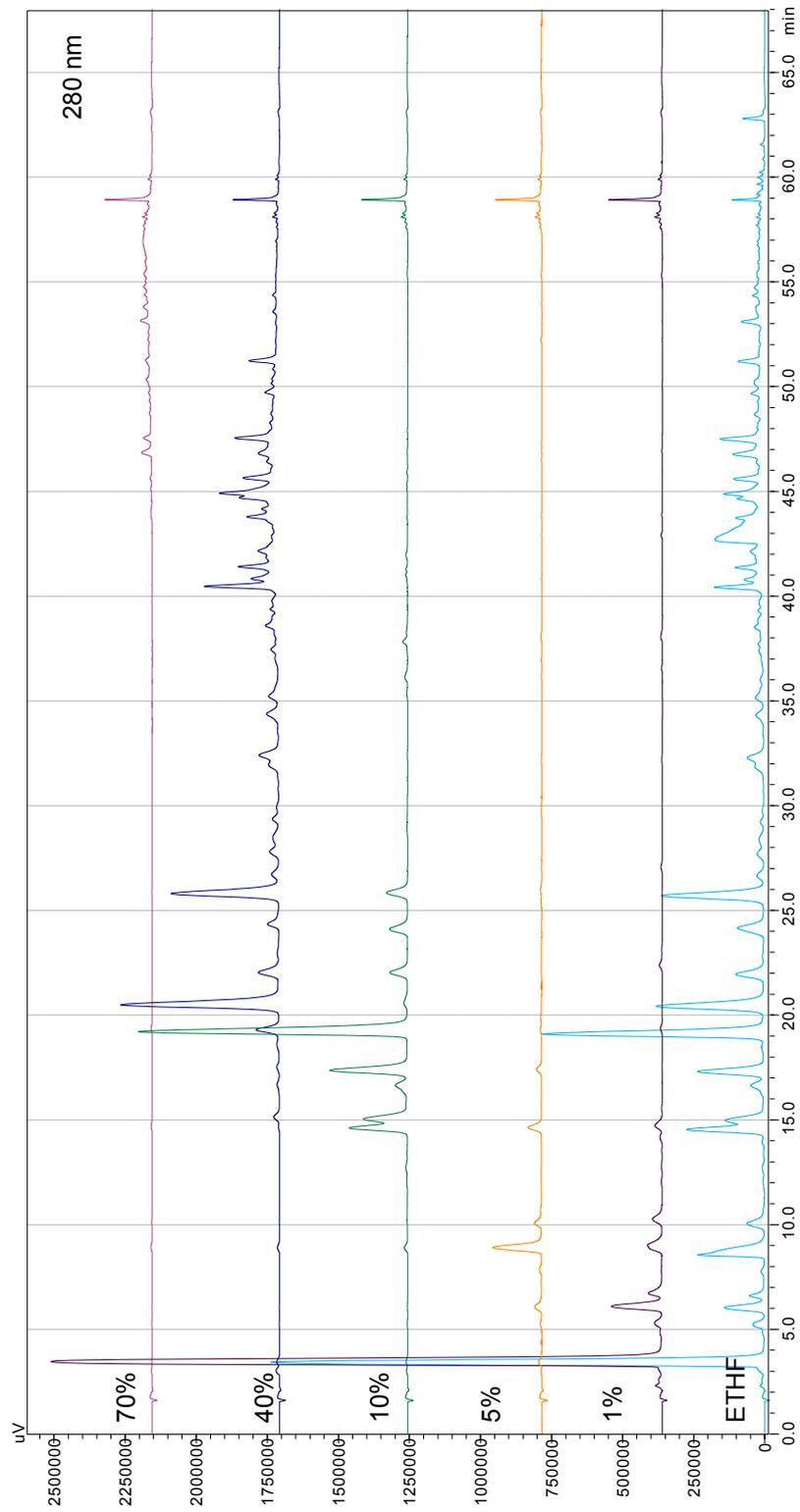


Abb. 72: HPLC-Vergleich der „ETHF“ mit den Ethersubfraktionen des St. Laurent bei 280 nm

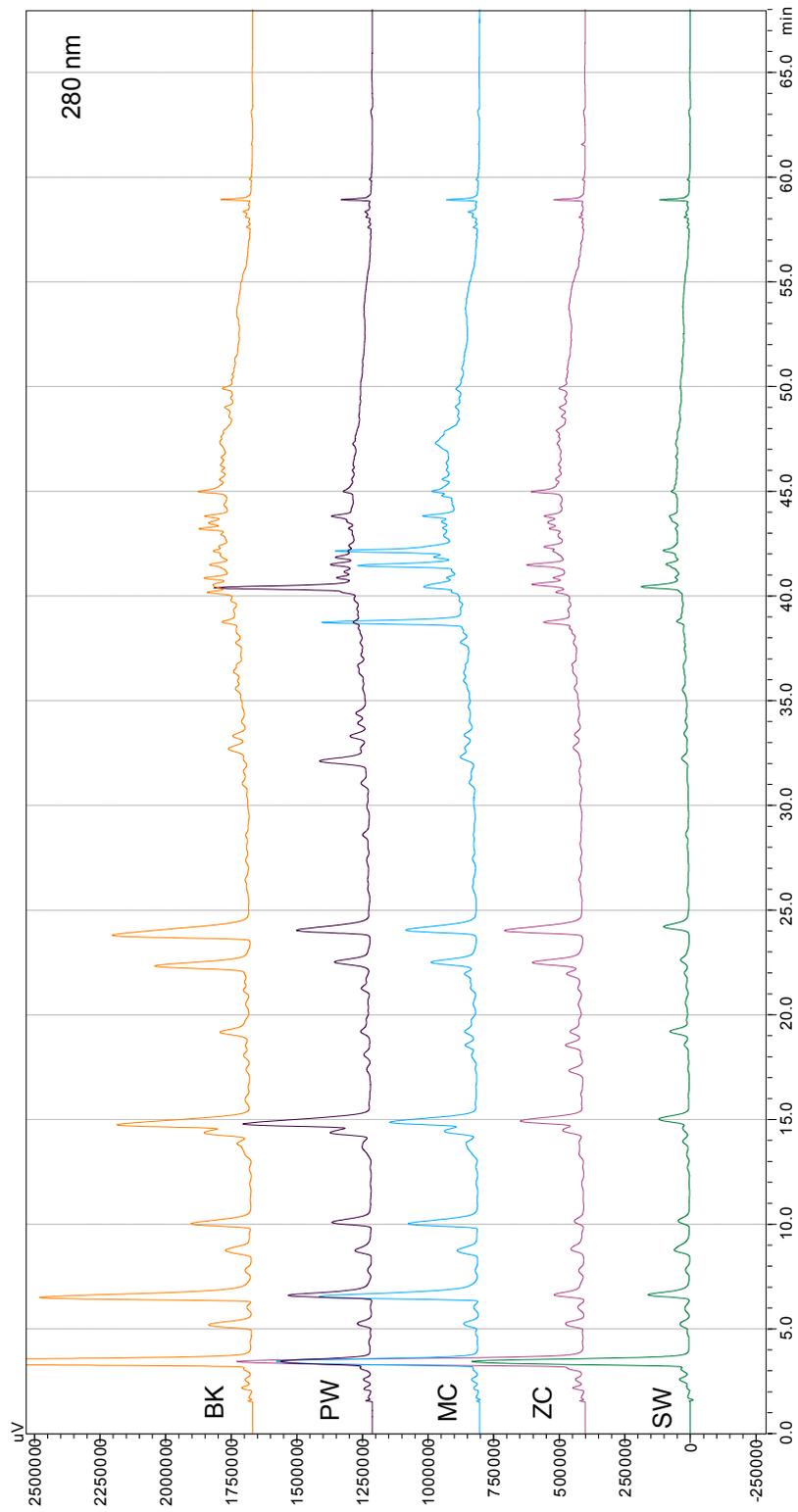


Abb. 73: HPLC-Vergleich der „EAF“ der fünf Rotweine bei 280 nm

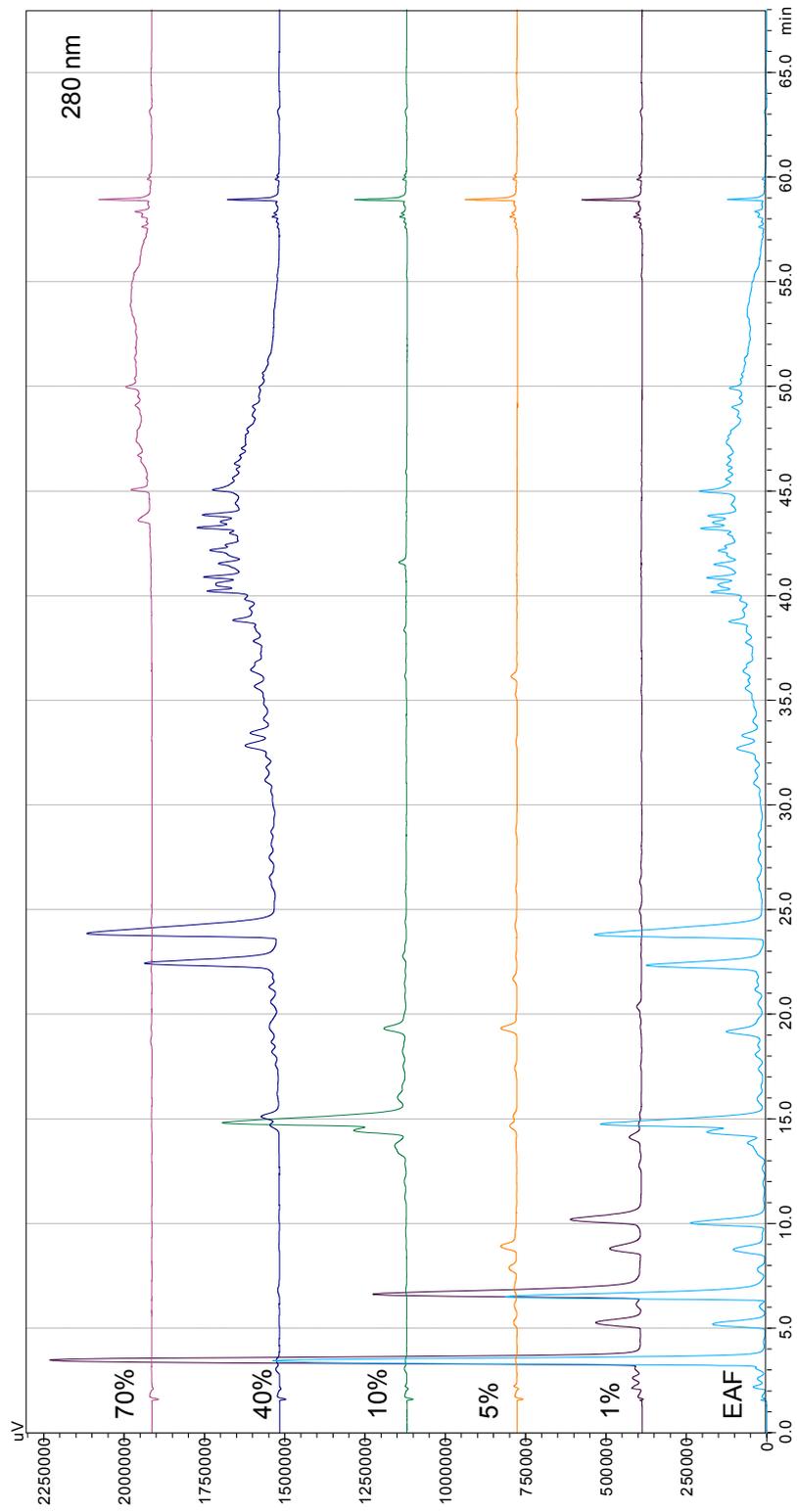


Abb. 74: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Blaufränkisch bei 280 nm

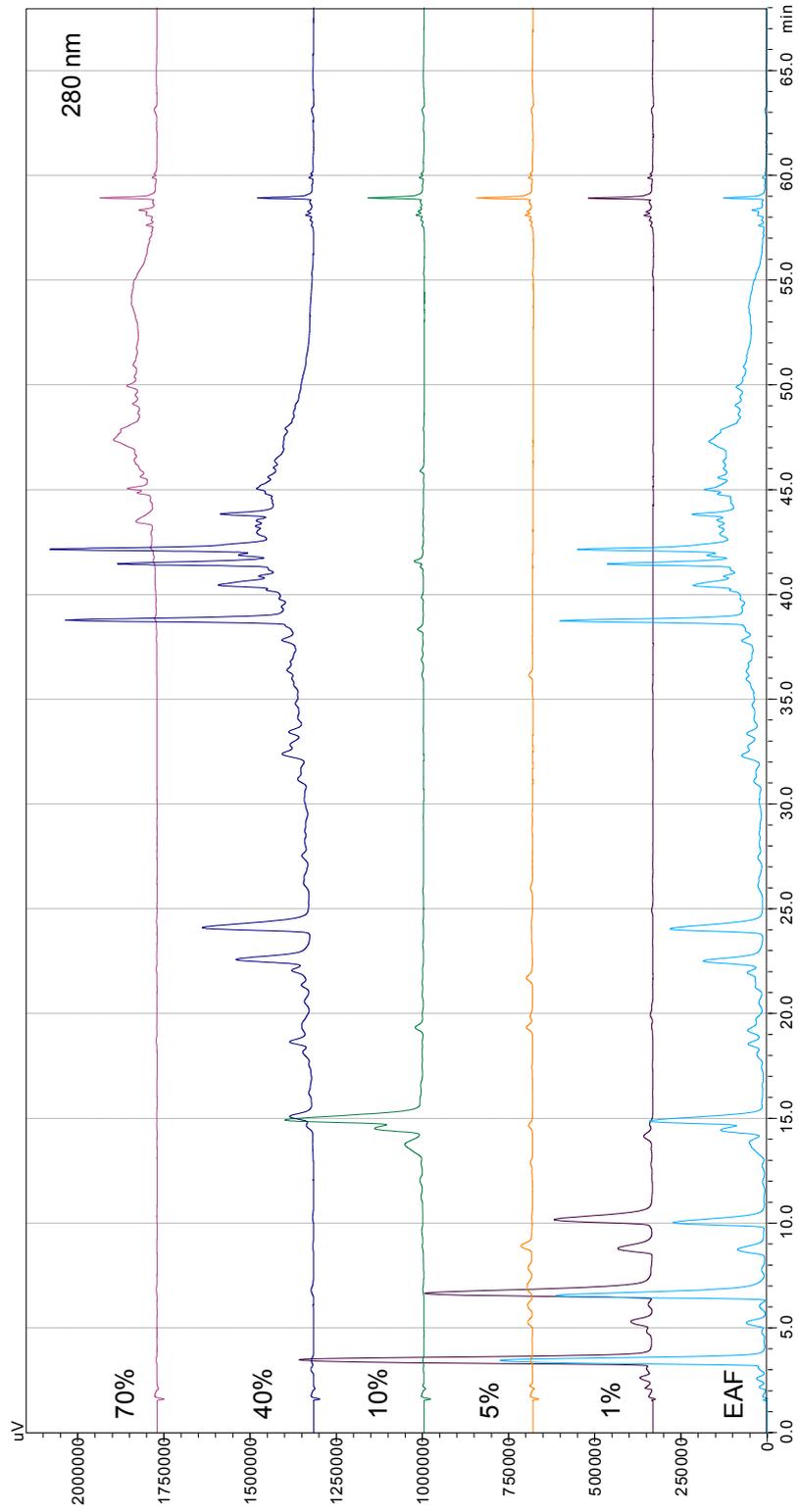


Abb. 75: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Merlot bei 280 nm

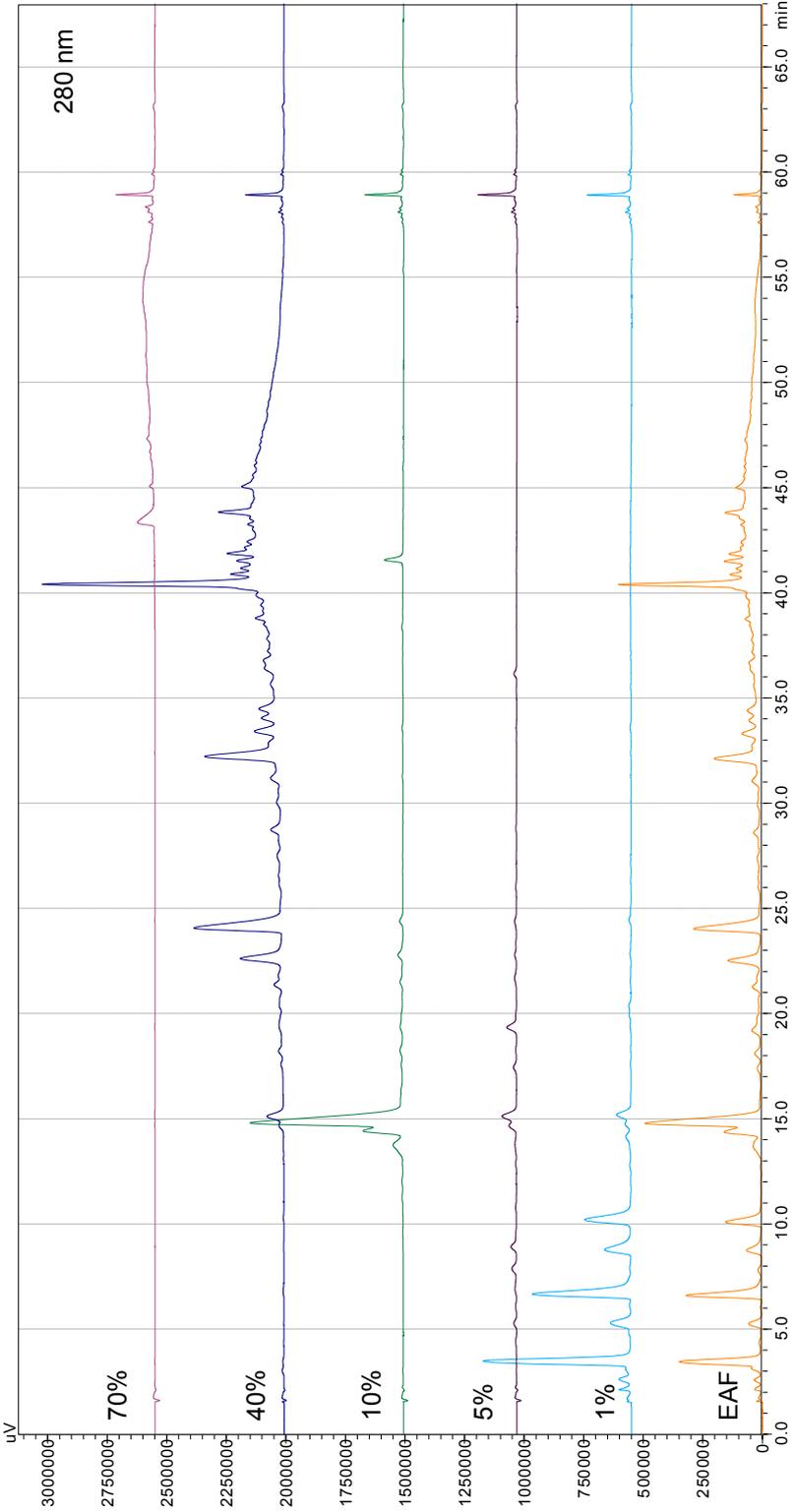


Abb. 76: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Pinot bei 280 nm

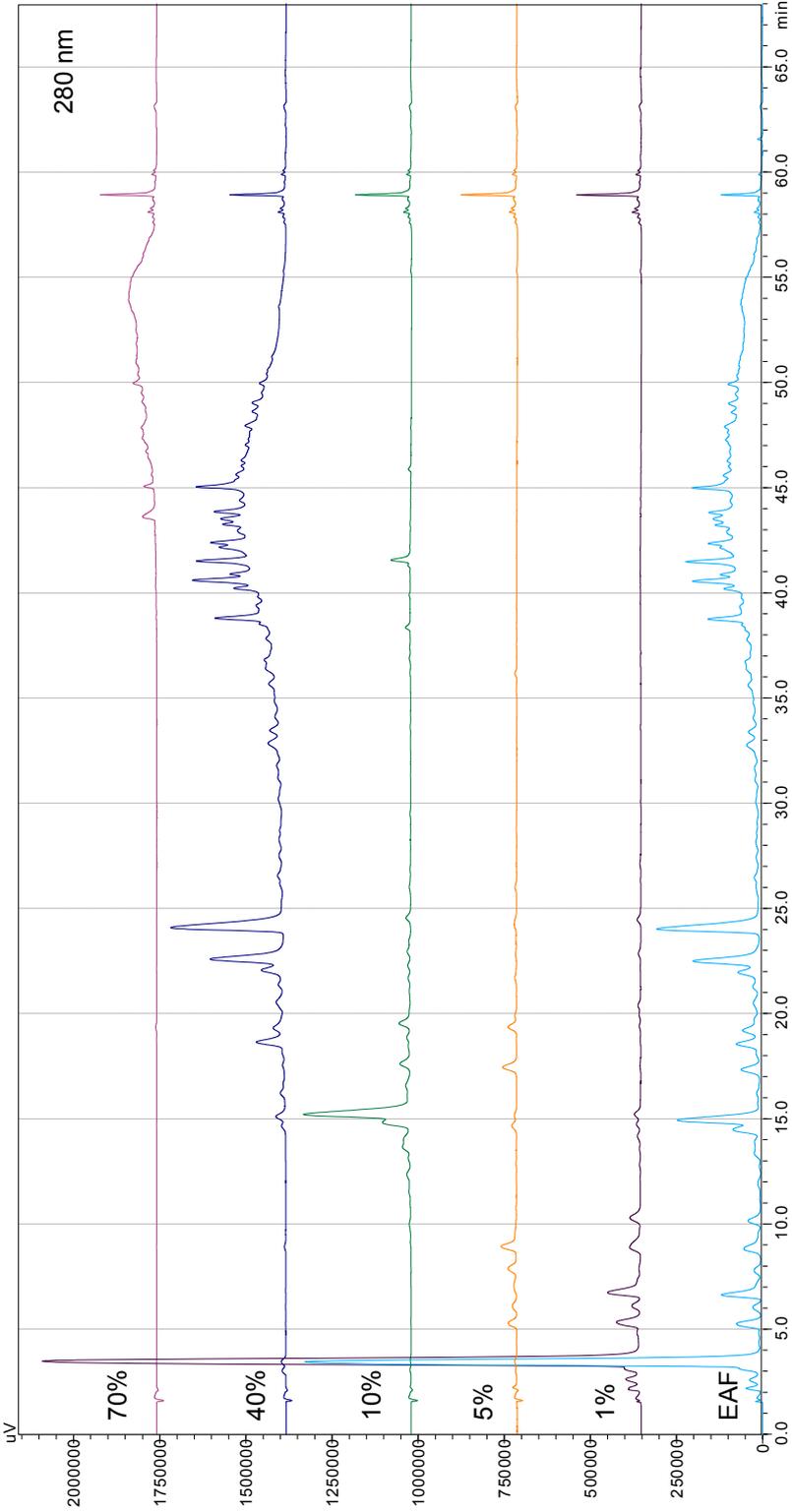


Abb. 77: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des Zweigelt bei 280 nm

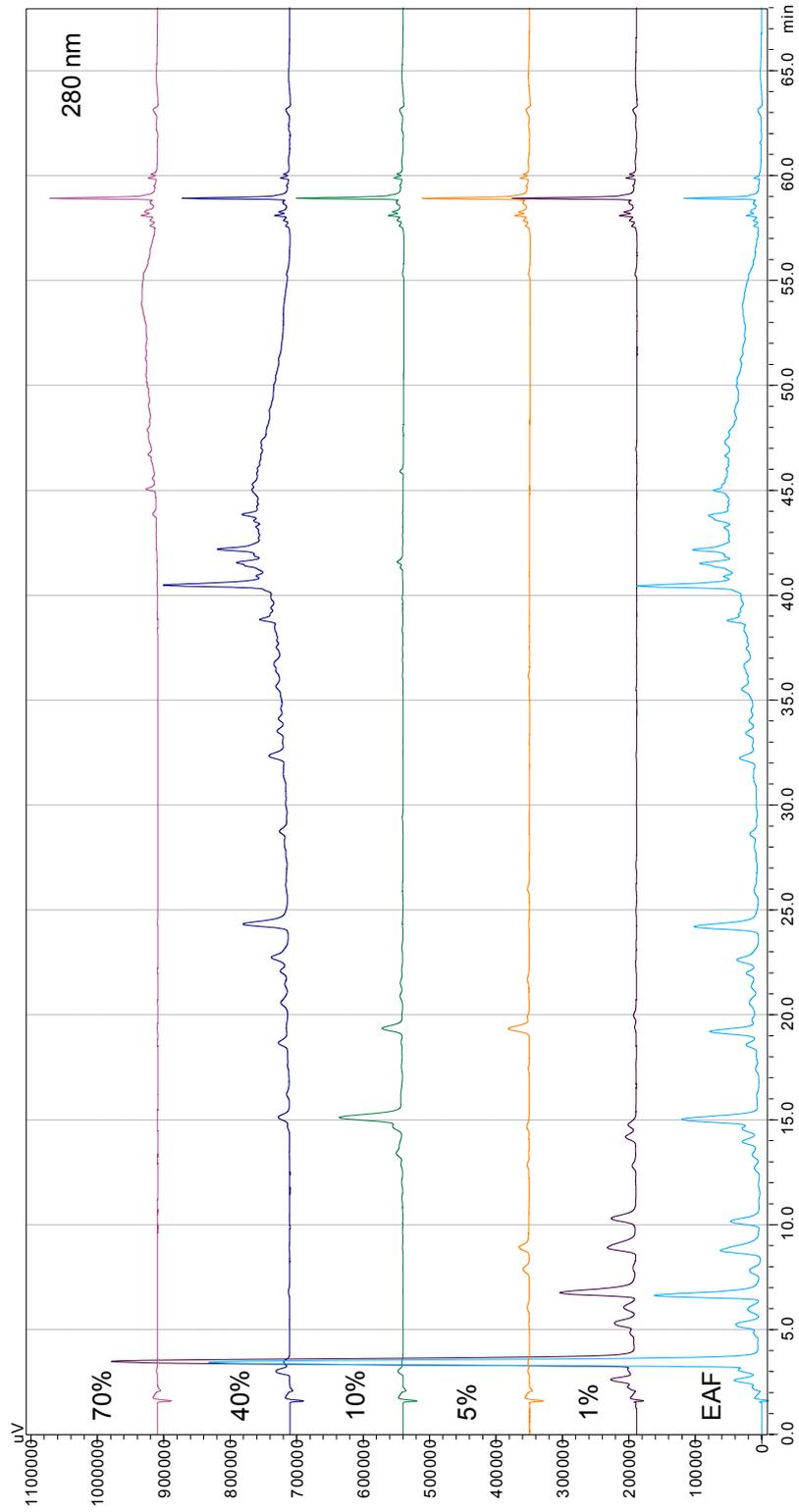


Abb. 78: HPLC-Vergleich der „EAF“ mit den Ethylacetatsubfraktionen des St. Laurent bei 280 nm

8.3 Gesammelte Chromatogramme bei 310 nm

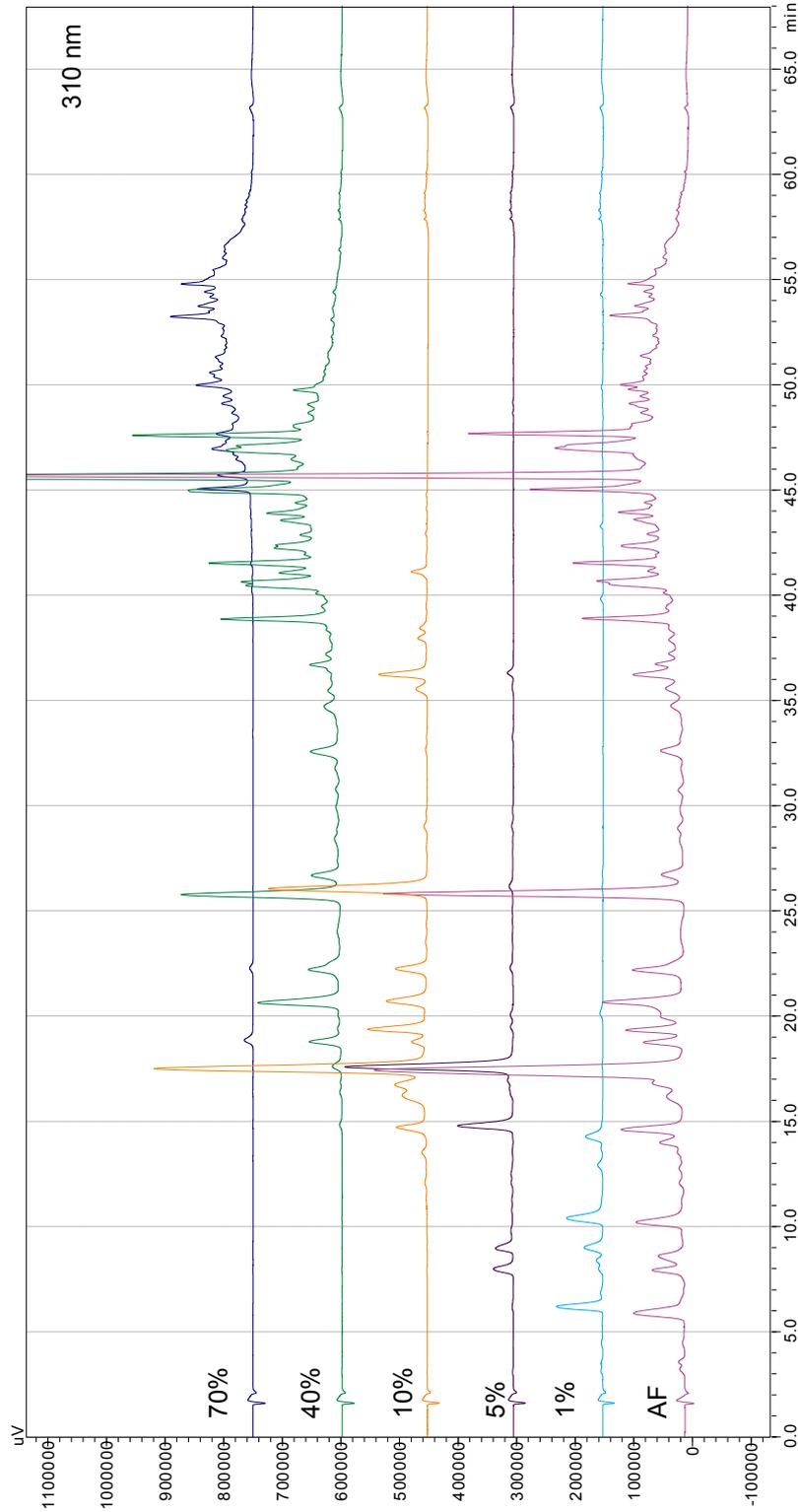


Abb. 79: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Blaifränkisch bei 310 nm

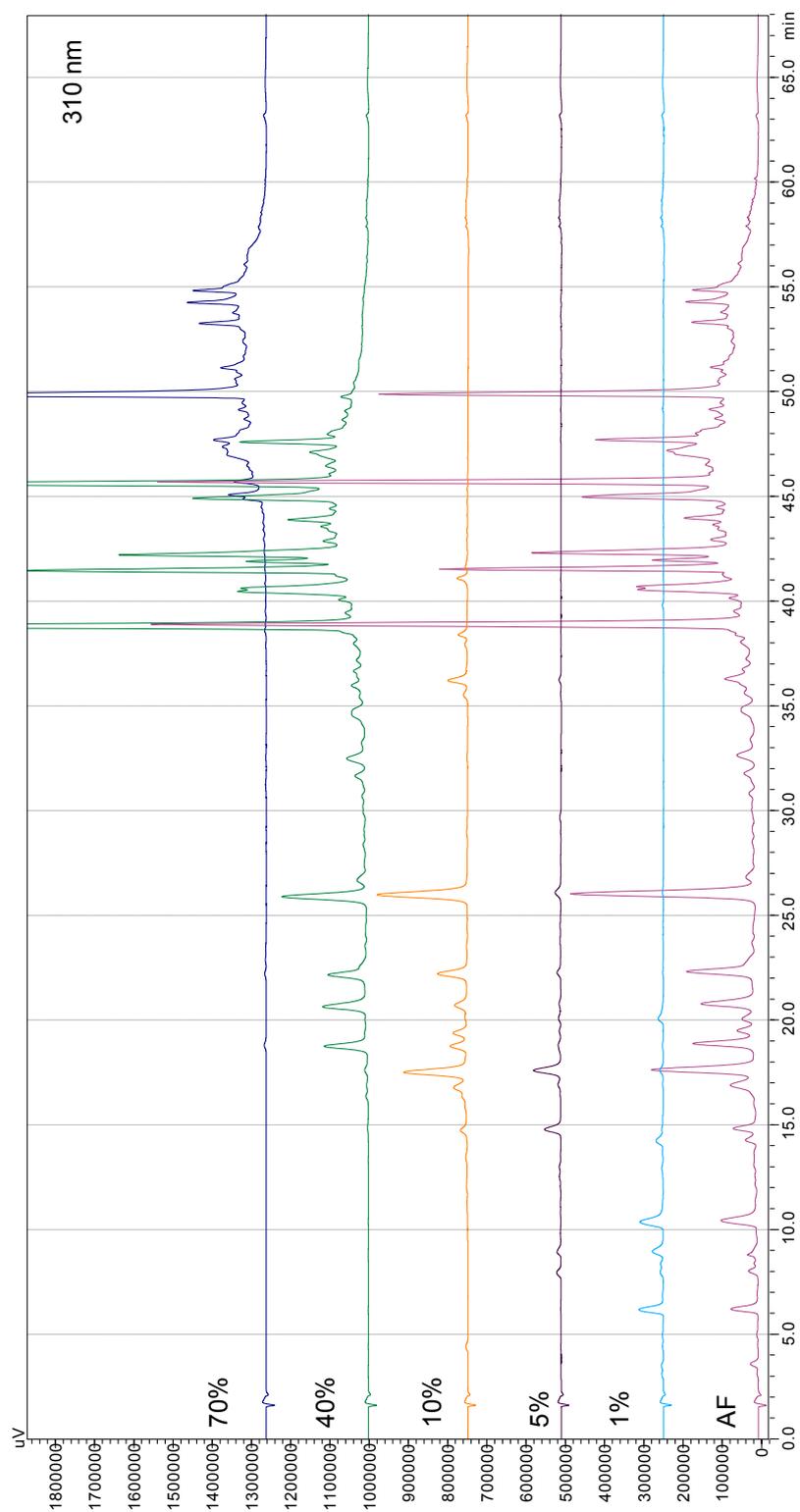


Abb. 80: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Merlot bei 310 nm

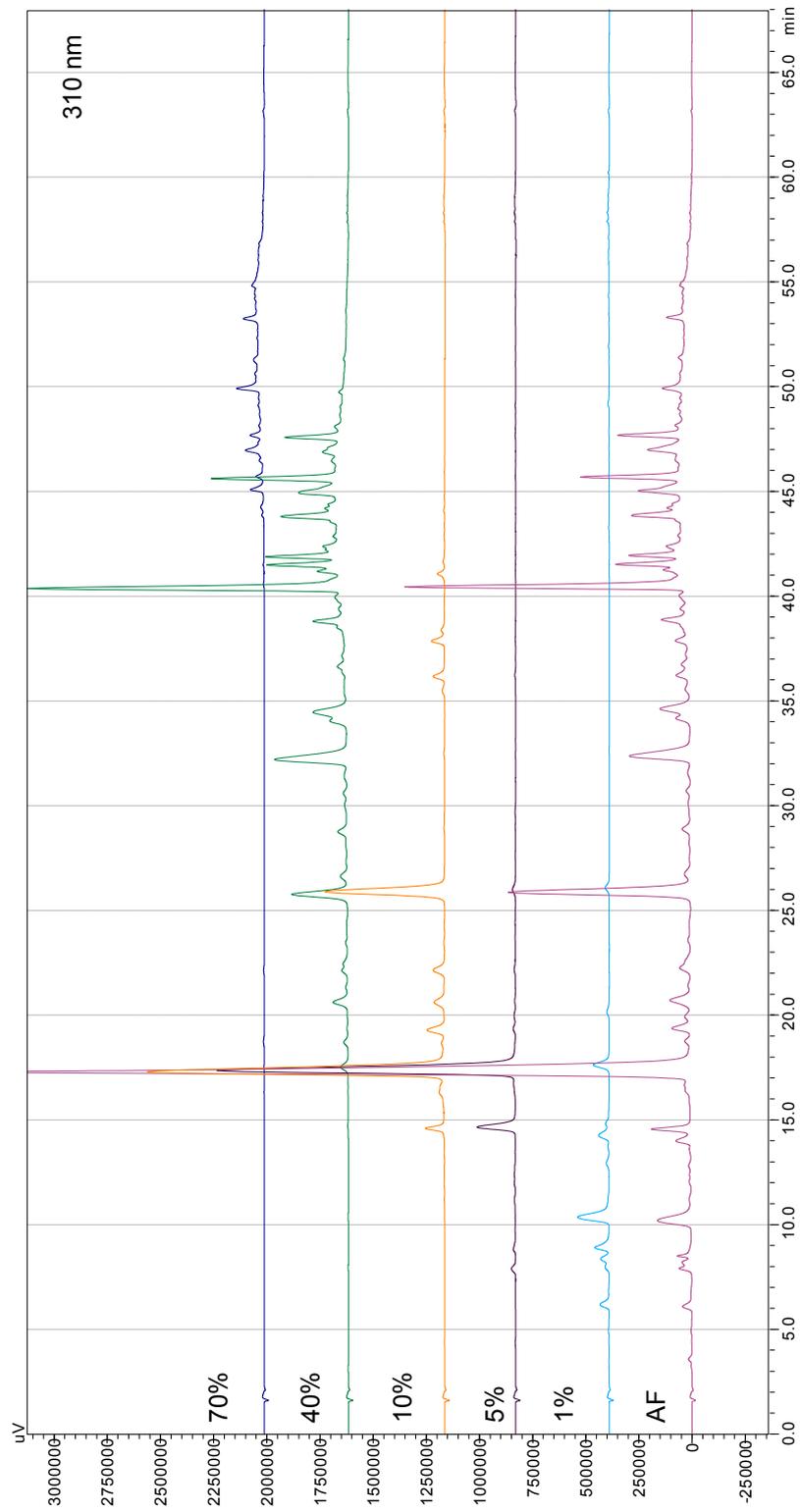


Abb. 81: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Pinot bei 310 nm

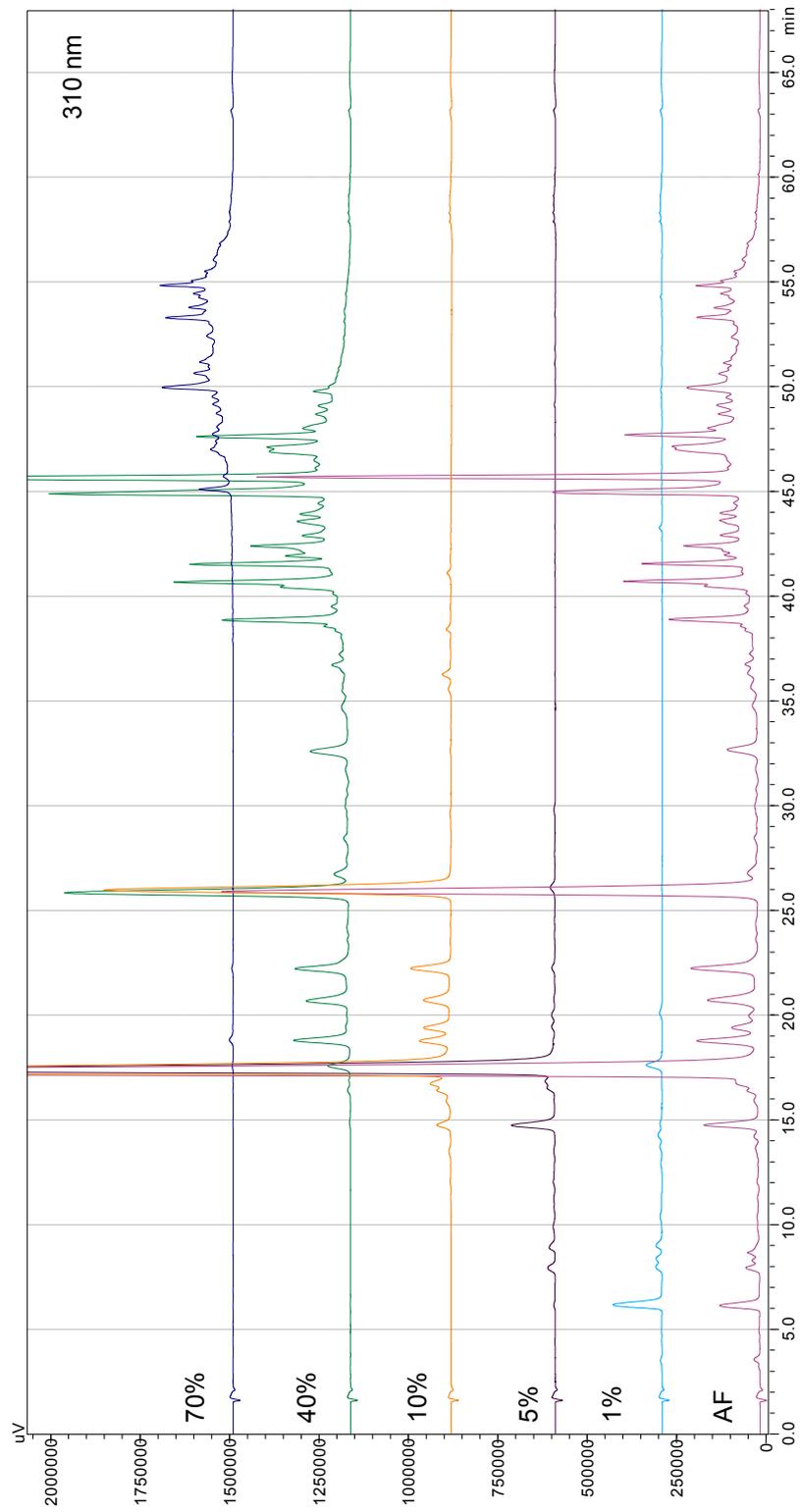


Abb. 82: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des Zweigels bei 310 nm

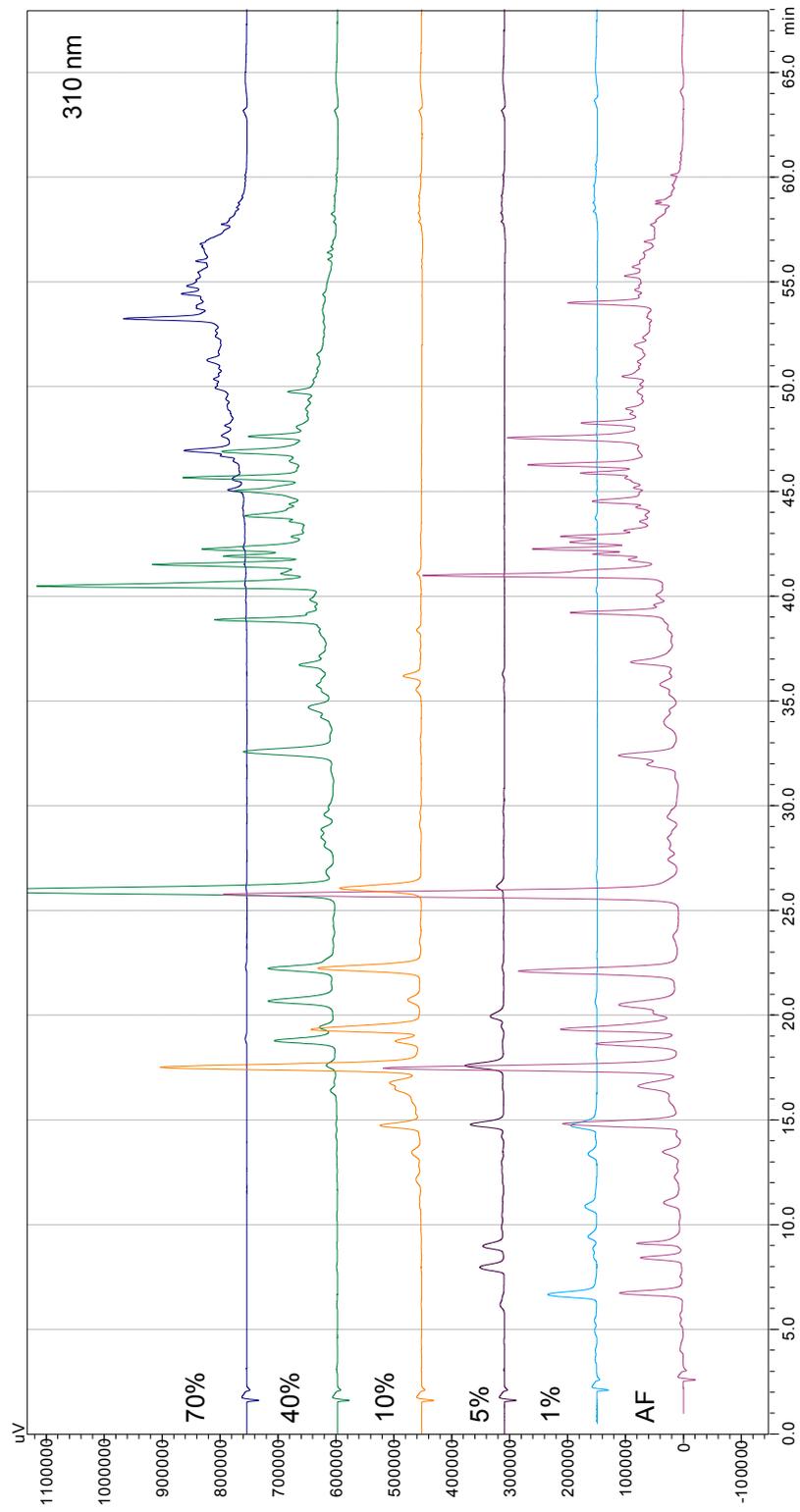


Abb. 83: HPLC-Vergleich der „AF“ mit den Subfraktionen des St. Laurent bei 310 nm

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Elisabeth Hager
Geburtsdatum: 14. Dezember 1984
Geburtsort: Wels, Oberösterreich
Adresse: Sobieskigasse 23/1/13a
1090 Wien
Email: elisabeth_hager@gmx.net
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

1991-1995: Volksschule Schleißheim
1995-2003: BRG Wels Wallererstraße
2003: Reifeprüfung
2003-2009: Studium der Pharmazie an der Universität Wien
10/2008 – 02/2009: Durchführung der praktischen Arbeiten für die Diplomarbeit

Beschäftigungen

07/2006: Adler Apotheke Wels
07/2007: Haid Center Apotheke
seit 05/2009: Brady Apotheke "Zum roten Turm", Wien