

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Versuche zur Isolierung von Oleocanthal aus
Olivenöl“

verfasst von

Dominic Dorfmeister

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreut von: a. o. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Bei Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch möchte ich mich vielmals für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Vor allem möchte ich mich bei a. o. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die Betreuung und die Bereitstellung des Themas meiner Diplomarbeit bedanken. Sie stand mir während der gesamten Arbeitszeit mit Rat und Tat zur Seite und war auch stets für spontane Zwischenfragen bereit und ermöglichte es mir auf diese Weise, viele Arbeitstechniken zu erlernen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei a. o. Univ. Prof. Dr. Ernst Urban für die NMR-Analysen.

Außerdem gilt mein Dank Dr. Martin Zehl und a. o. Univ. Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek, die mir bei den Arbeiten an der präparativen HPLC und an der LC-MS erklärend und helfend zur Seite gestanden sind.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Karl und Annegret Dorfmeister, bedanken, die mir diese Ausbildung möglich gemacht haben und mich zu allen Zeiten unterstützt haben.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Freundin Natascha, die mir immer eine große Stütze war.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Material und Methoden	11
2.1. Öle	11
2.2. Analytische HPLC	12
2.3. Semipräparative HPLC	13
2.4. Massenspektrometrie	14
2.5. NMR-Spektroskopie	15
3. Ergebnisse	16
3.1. Methodenoptimierung zur Isolierung von Oleocanthal	16
3.1.1. Optimierung der Extraktionsmethode	16
3.1.2. Optimierung der HPLC-Methode	21
3.1.3. Umsetzung auf semi-präparative HPLC	22
3.1.4. Umsetzung auf die präparative HPLC	23
3.2. Aufreinigung des Extraktes	24
3.2.1. Isolierung beider Oleocanthal-Isomeren	24
3.2.2. Versuch der Trennung der Isomeren	26
3.2.2.1. Trennung mittels semipräparativer HPLC.....	26
3.2.2.2. Trennung ohne UV/Vis-Detektor	29
3.2.2.3. Einengen ohne Lyophilisation	31

3.3. Quantifizierung des Oleocanthalgehaltes in Olivenöl unterschiedlicher Herkunft	34
3.3.1. Kalibrierung des Systems	34
3.3.2. Vergleich der Öle	36
3.4. Strukturklärung des Gemisches	40
3.4.1. Strukturklärung mittels LC-MS	40
3.4.2. Vergleich der UV-Spektren	43
3.4.3. Strukturklärung mittels NMR-Spektroskopie	46
4. Diskussion	49
5. Zusammenfassung	51
6. Abbildungs –und Tabellenverzeichnis	52
7. Anhang	55
8. Literaturverzeichnis	67
9. Lebenslauf	70

Abkürzungsverzeichnis

AcCN	Acetonitril
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EW	Einwaage
FL	Peakfläche
HPLC	High Performance Liquid Chromatography = Hochleistungsflüssigchromatographie
LLE	Liquid-Liquid-Extraction, Flüssig-Flüssig-Extraktion
LPS	Lipopolysaccharid
MeOH	Methanol
NL	Nachlauf
NSAID	Non Steroidal Anti Inflammatory Drug
OBP	Olive Oil Biophenol
OLC	Oleocanthal
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
VL	Vorlauf
EVOO	Extra Natives Olivenöl (Extra Virgin Olive Oil)
3,5-DMP	3,5-Dimethylpyrazol (verwendet als interner Standard zur Quantifizierung von Oleocanthal)

1. Einleitung

Seit mehreren tausend Jahren ist Olivenöl ein wichtiger Bestandteil der mediterranen Küche. Belegt ist die Verwendung von Olivenöl bereits in Werken von Homer, der seine Verwendung bei der Diät der Athleten erwähnt.

Das „Native Olivenöl“ wird durch ausschließlich mechanische Verfahren aus der ganzen Frucht (Olive) von *Olea europea* L. [1] gewonnen. Damit das Produkt den Zusatz „Extra“ tragen darf, muss, laut EU-Verordnung, der Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, bei höchstens 0,8g je 100g liegen [2]. Kaltgepresste Öle, die diesen Grenzwert nicht einhalten, dürfen nur unter den Namen „Natives Olivenöl“ bzw. „Lampantöl“ verkauft werden.

Niedrigere Qualitätsstufen von Olivenöl sind „Raffiniertes Olivenöl“, „Olivenöl – bestehend aus raffiniertem Olivenöl und nativem Olivenöl“, „Rohes Oliventresteröl“, „Raffiniertes Oliventresteröl“ oder „Oliventresteröl“ [2]. Diese minderen Qualitätsstufen sind nicht ausschließlich durch mechanische Extraktionsverfahren gewonnen, sondern raffiniert oder unter Einsatz von Lösungsmitteln hergestellt.

Dem Endverbraucher dürfen nur die Güteklassen „Natives Olivenöl extra“, „Natives Olivenöl“, „Olivenöl – bestehend aus raffinierten Olivenölen und nativen Olivenölen“ und „Oliventresteröl“ verkauft werden.

Mit den größten Anbauländern Spanien, Italien und Griechenland, deckt die EU nicht nur 80% des Weltbedarfs an Olivenöl, sondern hat mit rund 70% Anteil am Weltkonsum auch die größte Menge an Verbrauchern [3].

Als essentieller Bestandteil der mediterranen Küche wird in den Mittelmeerländern mit 10-20 Litern pro Person im Jahr das meiste Olivenöl verwendet.

Wissenschaftlich sind deshalb auch potentielle, gesundheitsfördernde Wirkungen seit längerer Zeit von Interesse.

Neben der günstigen Fettsäurezusammensetzung (55-83% Ölsäure, 3,5-21% Linolsäure, 7,5-20% Palmitinsäure, 0,3-3,5% Palmitoleinsäure, 0,5-

5,0% Stearinsäure) [4] enthält Olivenöl Tocopherole, Karotinoide und diverse Phenole und Phenolcarbonsäuren. Zusätzlich zu bekannten Substanzen wie Vanillinsäure, Kaffeesäure, Gallussäure und Elenolsäure fand man bei einer Charakterisierung der hydrolysierbaren Phenole vier bisher unbekannte Komponenten [5]. Bei der spektroskopischen Charakterisierung der Substanzen mittels H^1 -NMR- und C^{13} -NMR-, IR- und UV-Spektroskopie konnte ihre Struktur als Elenolsäurederivate vollständig aufgeklärt werden [6].

Von besonderem wissenschaftlichen Interesse ist jene Substanz, die später den Namen Oleocanthal (= 2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoat bzw. (3S,4E)-4-Formyl-3-(2-oxoethyl)-4-hexenoic acid 2-(4-hydroxyphenyl)ethylester) erhielt (Oleo-Öl, canth-Stich, al-Aldehyd) [5] und für den kratzenden Geschmack mancher Olivenöle verantwortlich gemacht wird. Dieses kratzende Gefühl im Rachen wurde von Verkostern ähnlich wie nach der Einnahme von Ibuprofen empfunden [7]. Andere Bezeichnungen für Oleocanthal sind z.B. HPEA-EDA (HydroxyPhenyl-EthylAlkohol-ElenolsäureDiAldehyd) [8] oder Deacetoxy-Ligstroside-Aglycon.

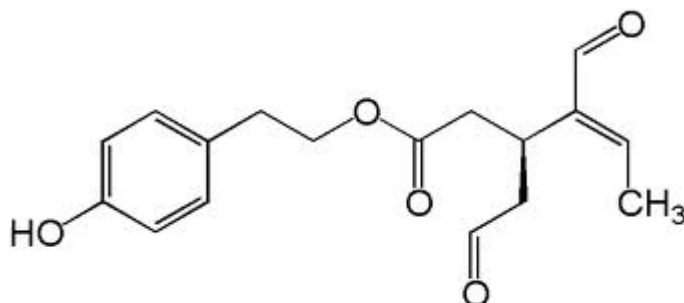


Abb.1: Strukturformel von (-)-Oleocanthal

Eine Versuchsreihe sollte den Reiz, der von Oleocanthal ausgelöst wird, genauer lokalisieren. Dabei wurde festgestellt, dass Oleocanthal nur in der Oropharyngalregion ein kratzendes Empfinden auslöst, während die meisten anderen irritierenden Stoffe die nociceptiven Neuronen in der gesamten Mundhöhle anregen [9][10].

Oleocanthal bindet nicht nur an denselben Rezeptor wie Ibuprofen, sondern wirkt, trotz der deutlichen, strukturellen Unterschiede, ebenfalls inhibierend auf COX-1 und COX-2, jedoch nicht auf Lipoxxygenase. Deshalb wurde die

Substanz auch mit den positiven Wirkungen einer „mediterranen Diät“, mit niedrigen Raten an Herz-, bestimmten Krebs- und degenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht [11][12].

Für weitere pharmakologische Testungen wurde eine „12-Schritte de-novo-Synthese“ [13] entwickelt, um die erforderlichen Mengen an Testsubstanz bereitstellen zu können.

Eine verbesserte Synthesemethode, mit D-(-)-Lyxose anstatt D-(-)-Ribose als Ausgangsprodukt, einer Reduktion auf 10 Schritte und doppelter Ausbeute (von 7% auf 14%) wurde entwickelt [14].

Infolge wurde Oleocanthal auf verschiedene pharmakologische Wirkungen getestet.

Durch Oleocanthal und strukturell ähnliche Derivate wird die iNOS-Proteinexpression in LPS-stimulierten Chondrozyten gesenkt, was zu einer geringeren NO-Produktion führt. Eine überschießende NO-Produktion wird mit degenerativen Knorpelerkrankungen in Verbindung gebracht. Daher deuteten die Resultate dieser Studie auf knorpelschonende Wirkungen von OLC [11].

Weiter konnte gezeigt werden, dass Oleocanthal die Fibrillisation von Amyloid- β -Peptid und τ -Protein hemmte, die als Hauptursachen für die Alzheimer-Erkrankung interpretiert werden. Für die Wirkung verantwortlich schien die Bindung der beiden Aldehydgruppen des OLC an Lysin. Dadurch verblieb τ -Protein in seiner ursprünglichen, ungefalteten Form, in der es in seiner Funktion durch Oleocanthal nicht beeinträchtigt wurde. Im Übrigen ist dies eine Wirkung, die Oleocanthal nicht mit Ibuprofen und anderen NSAIDs teilt [12] [15].

Tests zur Stabilität von Oleocanthal im Öl zeigten, dass es nach 10 Monaten Lagerung zu einem Rückgang der OLC-Konzentration um 15% gekommen war. Ein Öl wurde sowohl Licht als auch Sauerstoff für 10 Monate ausgesetzt. Obwohl es unter diesen Lagerungsbedingungen zu einer Abnahme von bis zu 37% des Oleocanthalgehaltes kam, zeigten sensorische Tests die immer noch vorhandene biologische Aktivität an. Es wurde auch gezeigt, dass unter Licht- und Sauerstoffschutz die Abnahme des

Oleocanthalgehaltes deutlich niedriger war [16].

Eine Untersuchung zur Hitzestabilität stellte fest, dass es nach 90 Minuten Erhitzen bei 240°C zwar nur zu einer geringen Abnahme des Oleocanthalgehaltes, allerdings zu einer deutlichen Abnahme der biologischen Aktivität kam. Deshalb wurde vermutet, dass auch die gesundheitsfördernde Wirkung des Olivenöls mit übermäßigem Erhitzen nachlässt [17].

Oleocanthal liegt in Extra Nativem Olivenöl mit einer Konzentration von bis zu knapp 200µg/g vor, wie z.B. in der italienischen Sorte Falconero [18].

Als problematisch erweist sich bei Experimenten mit Oleocanthal die Oxidationsanfälligkeit der Substanz, weshalb sie nur sehr bedingt lagerfähig und nicht im Handel erhältlich ist. Daher besteht neben der aufwendigen Synthese mit geringer Ausbeute [14] nur die Möglichkeit, Oleocanthal direkt aus Extra Nativem Olivenöl zu extrahieren.

Aus diesem Grund beschäftigte sich die vorliegende Diplomarbeit damit, eine geeignete Methode zu etablieren, um möglichst effektiv, ausreichende Mengen Oleocanthal aus Olivenöl zu gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1. Öle

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Extra Natives Olivenöl verschiedener Hersteller verwendet.

Markenname	Herkunft
Sitia, Kreta D.O.P.	Griechenland
Laudemio, Toskana	Italien
Caelo, Oleum Olivae Extra Vergine	Spanien
Kloster Toplou, Bio- Olivenöl	Griechenland
Punta Legnu d'Oro, Folelli	Italien
Nicolas Alziari, Nizza	Frankreich

Tab.1: verwendete Olivenöle, Herkunft



Abb.2: verwendete Olivenöle in handelsüblicher Verpackung und zum Farbvergleich in Erlenmeyerkolben

2.2. Analytische HPLC

Pumpe: Shimadzu LC-20AD

Kontroller: CBM-20A

Detektor: Shimadzu SPD-M20A Diode Array Detektor

Säule: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm, (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)

Mobile Phase: Aqua dest./Acetonitril (3+1, isokratisch)

Durchflussrate: 1ml/min

Injektionsvolumen: 20µl

Temperatur: 25°C

Detektion: 278nm



Abb.3: analytische HPLC

2.3. Semipräparative HPLC

Pumpe: Shimadzu LC-20AD

Kontroller: CBM-20A

Detektor: Shimadzu SPD-M20A Diode Array Detektor

Säule: LiChroCART® 250-10 PUROSPHER® STAR RP-18e 5µm (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)

Mobile Phase: Aqua dest./Acetonitril (3+1, isokratisch)

Durchflussrate: 5ml/min

Injektionsvolumen: 200µl-1500µl

Detektion: 278nm



Abb.4: präparative HPLC

2.4. LC-MS

Die LC/MS Analysen wurden auf einem UltiMate 3000 RSLC-Series System (Firma Dionex), gekoppelt an ein, mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT, Bruker Daltonics) ausgestattetem 3D-Quadrupol-Ionenfallen Massenspektrometer durchgeführt.

Angaben zur HPLC

Gerät:	Dionex UltiMate 3000 RSLC-Series System
stationäre Phase:	Acclaim [®] 120 C ₁₈ , 2,1 mm x 150 mm x 3 µm (Dionex, Germering, Deutschland)
mobile Phase:	Eluent A: 1 %ige wässrige Ameisensäure Eluent B: Acetonitril
Gradient:	10 % B (0 min), 10 % B (2 min) und 23 % B (15 min)
Temperatur:	25 °C
Flussrate:	0,5 ml/min
UV-Detektion:	190-400 nm

Angaben zum Massenspektrometer

Gerät:	Bruker Daltonics ESI-IT-MS
Ionisation:	Elektrospray
Kapillarenspannung:	± 3-7 kV
Vernebler:	26 psi (N ₂)
Trocknungsgasfluss:	9 l/min (N ₂)
Trocknungstemperatur:	340 °C
Kollisionsgas:	Helium
Modus:	DDA-Modus
Messbereich MS:	m/z 80-1000
Messbereich MS ^(n= 2,3,4) :	m/z 40-1000
Anzahl Spektren/Scan:	durchschnittlich 3 Spektren

2.5. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen wurden auf einem Bruker Avance DRX 600 NMR-Spektrometer mit einem 5 mm QNP Probenkopf (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P) mit z-Gradientenspule und automatischer Tuning- und Matching-Einheit durchgeführt.

Messfrequenz: 600,13 MHz für ^1H -NMR bzw. 150,92 MHz für ^{13}C -NMR

Messtemperatur: 298 K

Lösungsmittel: MeOH-d_4

Es wurden 1D- (^1H -NMR, ^{13}C -NMR) und gradient enhanced 2D-Experimente (COSY, NOESY, HMBC, HSQC) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Methodenoptimierung zur Isolierung von Oleocanthal

In der Literatur wurden mehrere Extraktionsmethoden [15][18] beschrieben, die sich sowohl in der Wahl der Lösungsmittel, als auch in den verwendeten Mengen unterschieden. Daher war es notwendig, die beschriebenen Methoden auf ihre Effizienz, OLC anzureichern, zu erproben und anschließend zu optimieren.

3.1.1. Optimierung der Extraktionsmethode

Zu Beginn der Arbeit standen zwei Extraktionsmethoden zur Wahl:

1. Methode A [18]

45 ml Extra Natives Olivenöl mit 3x 8ml Methanol ausschütteln, abzentrifugieren und die Methanolphase eindampfen. Den Rückstand in 1ml Methanol/Wasser (1:1) aufnehmen und durch Verteilung mit 3ml Hexan Ölreste entfernen.

2. Methode B [17]

1g Extra Natives Olivenöl mit 2ml Hexan mischen, mit 5ml Acetonitril ausschütteln und zentrifugieren. Die Acetonitrilphase eindampfen und den Rückstand in 1ml Methanol/Wasser (1:1) aufnehmen und mit 5ml Hexan Ölreste durch Ausschütteln entfernen.

Beide Methoden wurden auf eine Olivenölmenge von 45ml berechnet, um die Ergebnisse vergleichen zu können.

Daraus resultierten folgende Vorgangsweisen:

Methode A:

45ml EVOO wurden 3x mit je 8ml MeOH 1min geschüttelt und anschließend 5min am Ultraschallbad behandelt.

Nach jedem Extraktionsdurchgang wurde die MeOH – Phase im Scheidetrichter abgetrennt.

Die vereinigten MeOH – Phasen wurden bei 3500 U/min für 10min

zentrifugiert, die MeOH – Phase entnommen und am Rotavapor bei 39°C und 200mbar zur Trockenen gebracht. Es resultierte ein öliger Rückstand, der mit 1ml MeOH/Wasser (1:1) 1min geschüttelt und anschließend 5min am Ultraschallbad behandelt wurde.

Diese Mischung wurde nochmals mit 5ml Hexan 1min geschüttelt, in Eppendorffgefäße übergeführt, bei 13.000 U/min für 10min zentrifugiert und die MeOH/Wasser – Phase für die Analyse entnommen.

Methode B:

45ml EVOO wurden mit 45ml Hexan 1min geschüttelt. Die Mischung wurde mit 225ml Acetonitril 1min geschüttelt und anschließend 5min im Ultraschallbad behandelt.

Das Gemisch wurde bei 3500 U/min für 10min zentrifugiert, die Acetonitril – Phase entnommen und am Rotavapor bei 39°C und 200mbar zur Trockenen gebracht. Es resultierte ein öliger Rückstand, der mit 1ml MeOH/Wasser (1:1) 1min geschüttelt und anschließend 5min am Ultraschallbad behandelt wurde.

Diese Mischung wurde nochmals mit 5ml Hexan 1min geschüttelt, in Eppendorffgefäße überführt, bei 13.000 U/min für 10min zentrifugiert und die MeOH/Wasser – Phase für die Analyse entnommen.

Phasenverteilung:

Olivenöl ist mit Hexan homogen mischbar. Dagegen ergeben Olivenöl und Methanol bzw. Acetonitril ein 2-Phasensystem, das sich langsam trennt, wobei das Olivenöl die Unterphase bildet. Die Oberphase enthält die in Methanol bzw. Acetonitril gelösten Phenole.

Das zweiphasige Gemisch, das sich beim Ausschütteln von Olivenöl/Hexan (1:1) und Methanol bzw. Acetonitril ergibt, trennt sich dagegen sehr rasch, wobei die Olivenöl/Hexan (1:1)-Mischung die Unterphase und Methanol bzw. Acetonitril die Oberphase bildet.

Methanol/Wasser (1:1) und Olivenöl/Hexan (1:1) ergeben ein 2-Phasensystem, das sich ebenfalls schnell trennt, wobei die Methanol/Wasser

- Phase die Unterphase und die Olivenöl/Hexan – Mischung die Oberphase bildet.

Flüssigkeit	Relative Dichte
Olivenöl	0,91 g/cm ³
Hexan	0,66 g/cm ³
Methanol	0,79 g/cm ³
Acetonitril	0,78 g/cm ³
Wasser	1,00 g/cm ³

Tab.2: Relative Dichte der verwendeten Flüssigkeiten

Die Versuche zeigten, dass Methode B eine deutlich bessere Ausbeute an Phenolen brachte als Methode A.

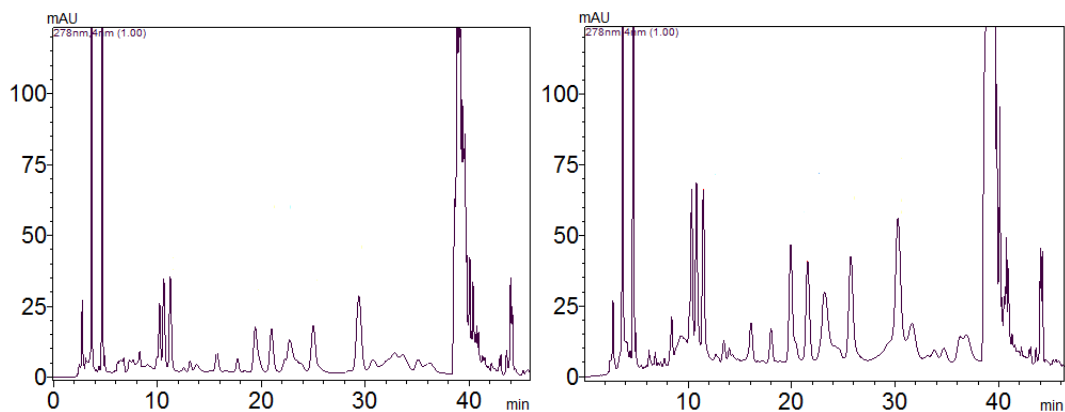


Abb.5: Analysen der Extrakte von Methode A (links) und Methode B (rechts); stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

Variationen der beiden Methoden

Da mit Methode B eine wesentlich bessere Ausbeute erhalten wurde, aber auch ein sehr viel größerer Lösungsmiteinsatz notwendig war, sollte überprüft werden, ob Acetonitril durch das preisgünstigere und weniger toxische Methanol ersetzt werden könnte.

Die Ausbeute wurde anhand der Peakflächen der Phenolpeaks verglichen.

Es zeigte sich, dass mit Methanol ein ähnlich gutes Ergebnis wie mit Acetonitril erzielt werden konnte, weshalb aufgrund der geringeren Toxizität und Kosten in weiterer Folge ausschließlich Methanol als Lösungs- und Extraktionsmittel eingesetzt wurde.

Weiters wurden die 45ml Olivenöl nicht einmal mit 225ml Methanol ausgeschüttelt, sondern dreimal mit je 75ml. Durch die mehrmalige Gewichtseinstellung bei der Verteilung von Oleocanthal zwischen den beiden Phasen sollte eine größere Ausbeute erzielt werden.

Bei der Analyse mittels HPLC stellte sich jedoch heraus, dass lediglich in den ersten beiden Extraktionszyklen eine relevante Menge an Oleocanthal extrahiert wurde, weshalb in der Folge nur noch zweimal mit Methanol ausgeschüttelt wurde.

Mit der optimierten Methode erfolgte die Aufreinigung des Olivenöls wie folgt:

45ml EVOO wurden mit 45ml Hexan 1min geschüttelt. Die Mischung wurde mit 75ml Methanol 1min geschüttelt und anschließend 5min am Ultraschallbad behandelt.

Die MeOH – Phase wurde im Scheidetrichter abgetrennt.

Um verbliebene Ölrreste abzutrennen, wurde die MeOH-Phase bei 3500 U/min für 10min zentrifugiert und die MeOH-Phase entnommen. Die Olivenöl/Hexan-Phase wurde wiederum mit 75ml MeOH versetzt und der beschriebene Vorgang wiederholt. Die vereinigten MeOH-Phasen wurden am Rotavapor bei 39°C und 200mbar zur Trockenen gebracht. Es resultierte ein

öliger Rückstand, der mit 1ml MeOH/Wasser (1:1) 1min geschüttelt und anschließend 5min am Ultraschallbad behandelt wurde.

Diese Mischung wurde nochmals mit 5ml Hexan 1min geschüttelt, in Eppendorffgefäße überführt, bei 13.000 U/min für 10min zentrifugiert und die MeOH/Wasser – Phase für die Analyse entnommen.

Zur Bereitung von Extrakten für die Auftrennung mittels präparativer HPLC wurden jeweils 500ml Olivenöl eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden aliquot aufgerechnet. Nur das Volumen an Methanol/Wasser (1:1) – Mischung zur Aufnahme des öligen Rückstandes wurde niedrig gehalten, um eine möglichst konzentrierte Injektionslösung zu erhalten. Auch die Menge zugefügten Hexans, um Ölreste aus dem Extrakt zu entfernen, zeigte sich als ausreichend und wurde nicht erhöht.

500ml EVOO wurden mit 500ml Hexan 1min geschüttelt. Die Mischung wurde mit 850ml Methanol 1min geschüttelt und anschließend 5min am Ultraschallbad behandelt.

Die MeOH – Phase wurde im Scheidetrichter abgetrennt.

Um Ölreste abzutrennen, wurde die MeOH-Phase bei 3500 U/min für 10min zentrifugiert und die MeOH-Phase entnommen. Die Olivenöl/Hexan-Phase wurde wiederum mit 850ml MeOH versetzt und der beschriebene Vorgang wiederholt. Die vereinigten MeOH-Phasen wurden am Rotavapor bei 39°C und 200mBar zur Trockenen gebracht. Es resultierte ein öliger Rückstand, der mit 3ml MeOH/Wasser (1:1) 1min geschüttelt und anschließend 5min am Ultraschallbad behandelt wurde.

Diese Mischung wurde nochmals mit 5ml Hexan 1min geschüttelt, in Eppendorffgefäße überführt, bei 13.000 U/min für 10min zentrifugiert und die MeOH/Wasser-Phase für die Analyse entnommen.

3.1.2. Optimierung der analytischen HPLC-Methode

Die analytischen HPLC – Läufe wurden an einer RP-Phase (Phenomenex Luna C18) durchgeführt.

Dabei wurden 2 Methoden verwendet:

Für genaue Analysen des Biophenolprofils der Olivenöle wurde ein langsamerer Anstieg des Elutionsgradienten angewandt [17]. Die zweite Methode diente ausschließlich der Analyse von aufgereinigtem Oleocanthal.

Durchflussrate: 1ml/min

Minuten	Mobile Phase
0 - 35	Acetonitril + Wasser (25 + 75)
35 - 36	auf Acetonitril + Wasser (80 + 20)
36 - 45	Acetonitril + Wasser (80 + 20)
45 - 46	auf Acetonitril + Wasser (25 + 75)
46 - 55	Acetonitril + Wasser (25 + 75)

Tab.3: Elutionsgradient der Methode A

Methode B wurde entwickelt, um bei Analysen von Fraktionen, bei denen ausschließlich Oleocanthalmengen abgeschätzt werden sollten, Zeit und Fließmittel zu sparen.

Durchflussrate: 1ml/min

Minuten	Mobile Phase
0 - 24	Acetonitril + Wasser (25 + 75)
24 - 25	auf Acetonitril + Wasser (90 + 10)
25 - 34	Acetonitril + Wasser (90 + 10)
34 - 35	auf Acetonitril + Wasser (25 + 75)
35 - 39	Acetonitril + Wasser (25 + 75)

Tab.4: Elutionsgradient der Methode

3.1.3. Umsetzung auf die semipräparative HPLC

Semipräparative Läufe zur Anreicherung von Oleocanthal wurden auf einer LiChro CART® 250-10, Purospher® STAR, RP – 18e, 5µm durchgeführt.

Es wurde Methode B übernommen, wobei der Fluss mit 5 ml/min an den größeren Säulendurchmesser angepasst wurde.

Berechnung „Scale-up“:

$$\text{Faktor} = (\text{Radius}_{\text{semipräparative Säule}})^2 / (\text{Radius}_{\text{analytische Säule}})^2$$

$$5^2 / 2,3^2 = 4,725 \sim 5 \text{ ml/min}$$

Die Umsetzung dieser Methode auf die semi-präparative Säule zeigte hervorragende Ergebnisse bei annähernd gleichen Retentionszeiten der Oleocanthalpeaks.

Minuten	Mobile Phase
0 - 24	Acetonitril + Wasser (25 + 75)
24 - 25	auf Acetonitril + Wasser (90 + 10)
25 - 34	Acetonitril + Wasser (90 + 10)
34 - 35	auf Acetonitril + Wasser (25 + 75)
35 - 39	Acetonitril + Wasser (25 + 75)

Tab.5: Elutionsgradient bei semipräparativer HPLC

Die Injektionsvolumina wurden schrittweise von 100µl bis auf 1500µl gesteigert, wobei die Trennleistung erwartungsgemäß mit ansteigendem Injektionsvolumen abnahm.

3.1.4. Umsetzung auf die präparative HPLC

Diese Methode wurde ebenfalls auf eine präparative Säule umgesetzt. Hierbei wurde eine Hibar® 250-25, LiChrospher® 100 RP-18, 5µm verwendet.

Berechnung „Scale-up“

$$\text{Faktor} = (\text{Radius}_{\text{präparative Säule}})^2 / (\text{Radius}_{\text{semipräparative Säule}})^2$$

$$1,25^2 / 0,5^2 = 6,25 \quad 6,25 \times 5 = 31,25$$

Die Umsetzung von Methode B, bei einer Flussrate von 31,25 ml/min, auf eine präparative Säule erbrachte nicht die gewünschten Ergebnisse bezüglich der Trennleistung, weshalb für alle Anreicherungsschritte die semi-präparative Säule verwendet wurde.

3.2. Aufreinigung des Extraktes

3.2.1. Isolierung der Oleocanthal-Isomeren

Aus dem gewonnenen Extrakt aus dem Olivenöl sollten beide Isomere des Oleocanthals gemeinsam abgetrennt werden.

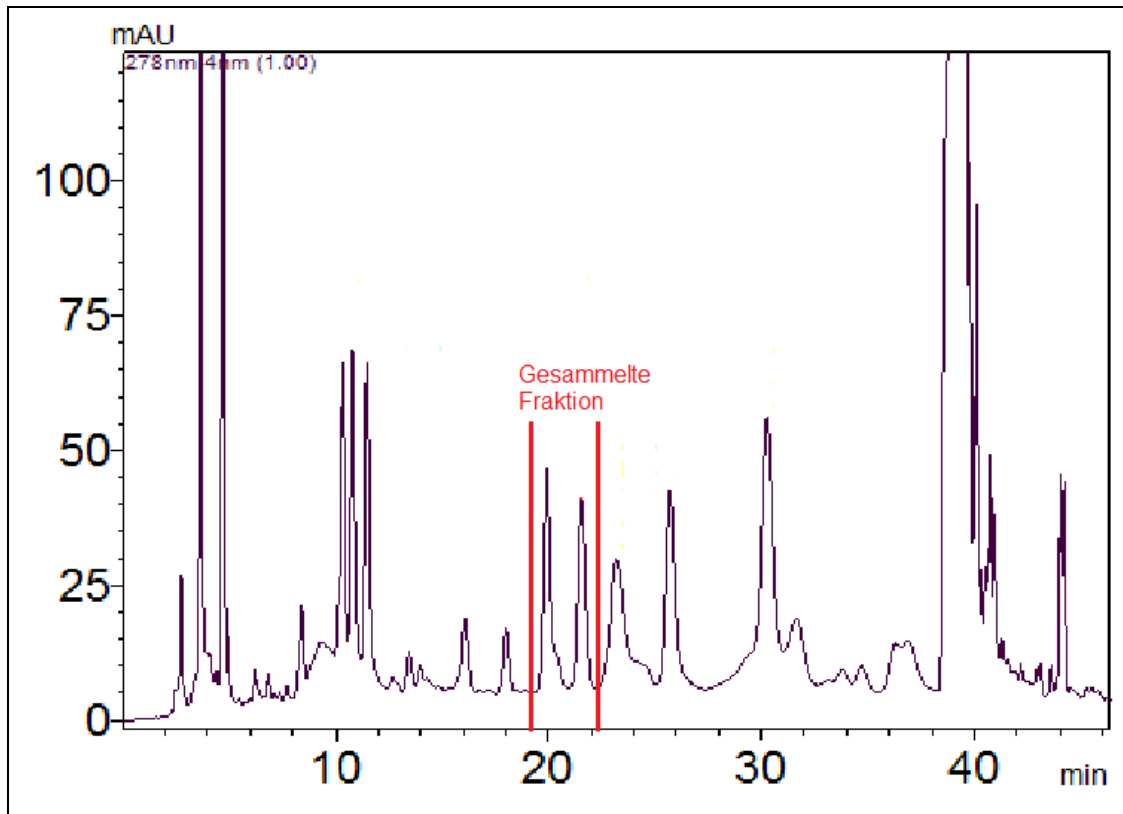


Abb.6: HPLC des Extraktes aus Olivenöl; stationäre Phase: LiChro CART® 250-10, Purospher® STAR, RP – 18e, 5µm mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

Mittels semipräparativer HPLC wurden die beiden OLC-Peaks bei t_R 19 – 22min (siehe Abb.6) gesammelt und anschließend lyophilisiert.

Die Lyophilisate wurden in 200µl Methanol aufgenommen und umgehend analysiert.

Es zeigte sich jedoch bei der Analyse (siehe Abb.7, S.24), dass außer den beiden OLC-Peaks noch weitere Signale bei ca.10 Minuten Retentionszeit sichtbar waren.

Auffällig war dabei, dass es sich bei den Signalen bei 10 Minuten um zwei Peaks handelte, die bereits im Extrakt detektiert worden waren und stets paarweise auftraten wie auch Oleocanthal.

Da sie aufgrund der Retentionszeit kaum in dieser Menge aus der Fraktionierung stammen konnten, lag die Vermutung nahe, dass es sich um Oxidations- oder Abbauprodukte des Oleocanthals handeln könnte.

Eine Untersuchung mittels LC-MS ergab, dass die beiden Substanzen sich im Molekulargewicht ($[M-H]^-$ m/z 319) um m/z 16 von OLC ($[M-H]^-$ m/z 303) unterschieden, was einem Sauerstoffatom entspricht.

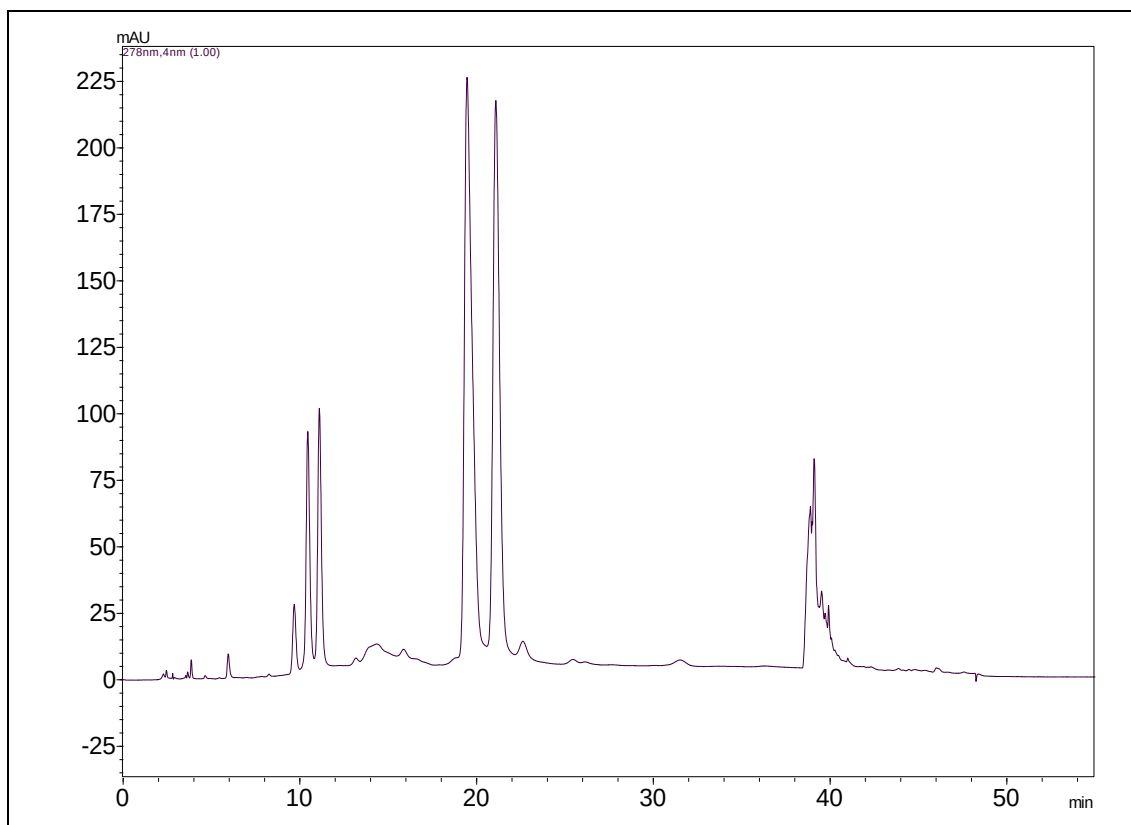


Abb.7: HPLC der OLC-Fraktion nach semipräparativer HPLC
stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5 μ m; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

Offensichtlich war es durch Sauerstoff- und/oder Lichteinfluss zu einer teilweisen Oxidation oder Umlagerung von Oleocanthal gekommen.

Trotzdem war mit dieser Methode eine rasche Anreicherung der OLC-Isomeren möglich.

Insgesamt wurde auf diese Weise aus 2 Litern Olivenöl der Marke Sitia (s.Kap. 2.1. S.10) eine Ausbeute von ca. 17mg Oleocanthal-Gemisch mit einer Reinheit von ca. 60% gewonnen. Bei der Aufarbeitung von 1 Liter Olivenöl der Marke Laudemio (s.Kap. 2.1. S.11) betrug die Ausbeute 20,8mg Oleocanthal-Isomeren, ebenfalls mit einer Reinheit von ca. 60%.

3.2.2. Versuche zur Trennung der Isomeren

Aus diesen angereicherten Fraktionen, die die OLC-Isomeren zu ca. 60% enthielten, sollten Einzelsubstanzen gewonnen werden.

3.2.2.1. Trennung mittels semipräparativer HPLC

Um die beiden Komponenten rein darzustellen, wurde die hergestellte Fraktion nach folgendem Schema aufgetrennt:

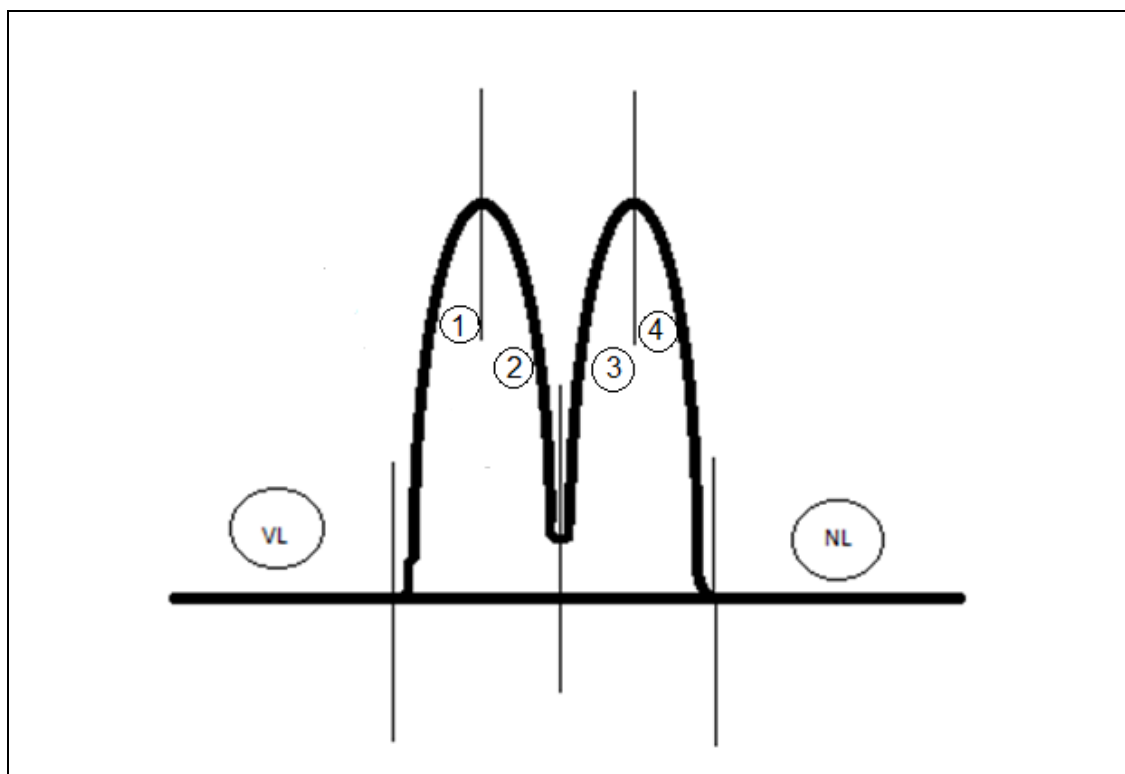


Abb.8: Trennschema der Fraktionierung der Oleocanthal-Isomeren mittels semipräparativer HPLC

Mit Vorlauf und Nachlauf wurden insgesamt 6 Fraktionen gesammelt. Auf diese Weise sollten die übrigen Bestandteile des Extrakts abgetrennt werden und die beiden Isomere separiert werden.

Durch die Aufteilung der 2 Peaks in 4 Fraktionen wurde eine größere Reinheit Komponenten in Fraktion 1 und 4 erwartet, da es wahrscheinlich war, dass sich die Peaks in den Fraktionen 2 und 3 entsprechend überlagern könnten.

Die 6 Fraktionen wurden in Rundkolben gesammelt, sofort mit Stickstoff überlagert und lyophilisiert.

Die Lyophilisate wurden am Folgetag in je 100µl Methanol gelöst und analysiert.



Abb.9: Ethanolbad (links) und Lyophilisator (rechts)

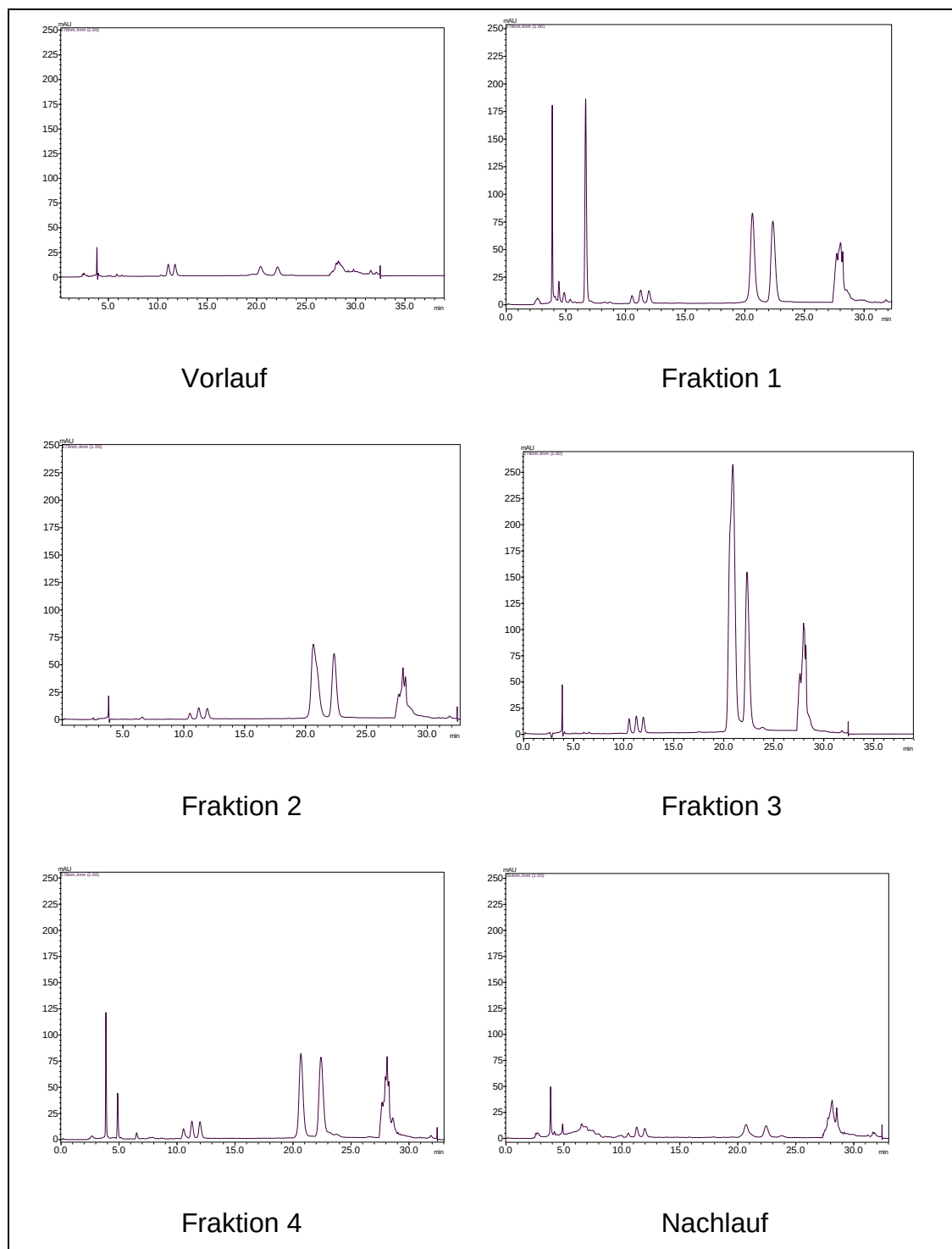


Abb.10: Analyse der 6 Fraktionen nach semipräparativer Trennung der OLC-Isomeren; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

In allen Fraktionen wurden beide Isomere bei t_R 20-22 min detektiert. Bei t_R 10-12 min wurden außerdem wieder jene Peaks sichtbar, die bereits vor der Fraktionierung detektiert worden waren und stets paarweise auftraten.

3.2.2.2. Trennung ohne UV/Vis-Detektor

Die Analysen ließen darauf schließen, dass sich die Isomere wiederum ineinander umgelagert hatten. Aufgrund dieser Resultate wurde versucht, systematisch Gründe für die Umlagerung auszuschließen.

Deshalb wurde zuerst versucht, unter UV-Ausschluss zu arbeiten, was bedeutete, dass auch keine UV/Vis-Detektion erfolgte.

Hierfür wurde vor jedem Fraktionierungslauf ein Lauf mit geringer Einspritzmenge gemacht, um die Retentionszeit der Isomeren zu bestimmen. Danach wurden die Fraktionen nach der Retentionszeit gesammelt. Als Auffanggefäße wurden entsprechende Braunglasgefäße verwendet, welche zusätzlich mit Alufolie umwickelt waren.

Wiederum wurde das Lösungsmittel aus allen Fraktionen durch Lyophilisation entfernt und die Fraktionen am Folgetag in je 100µl Methanol gelöst und analysiert. Parallel dazu wurde Fraktion 3 unter Stickstoff eingeeengt und 100µl sofort analysiert, wobei sich zeigte, dass nur unter diesen Bedingungen ein einzelner OLC-Peak detektiert wurde (s.Abb.12 S.30).

Bei der Analyse der lyophilisierten Fraktionen war kaum eine Veränderung zu den vorherigen Trennversuchen zu erkennen. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die Umlagerung der Substanz nicht ausschließlich mit Lichteinstrahlung oder Oxidationsprozessen, sondern auch damit zusammenhängt, ob die Substanz zur Trockenen gebracht wurde oder nicht.

Aus diesem Grund wurde versucht, die Substanz lediglich einzuengen und noch in Lösung zu analysieren.

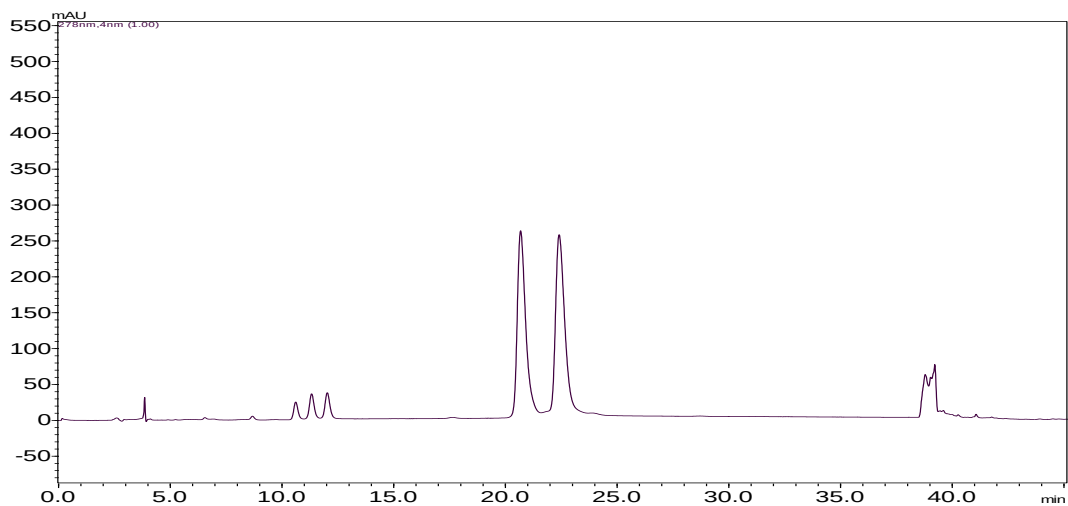


Abb.11: Chromatogramm von Fraktion 3 nach Lyophilisation; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

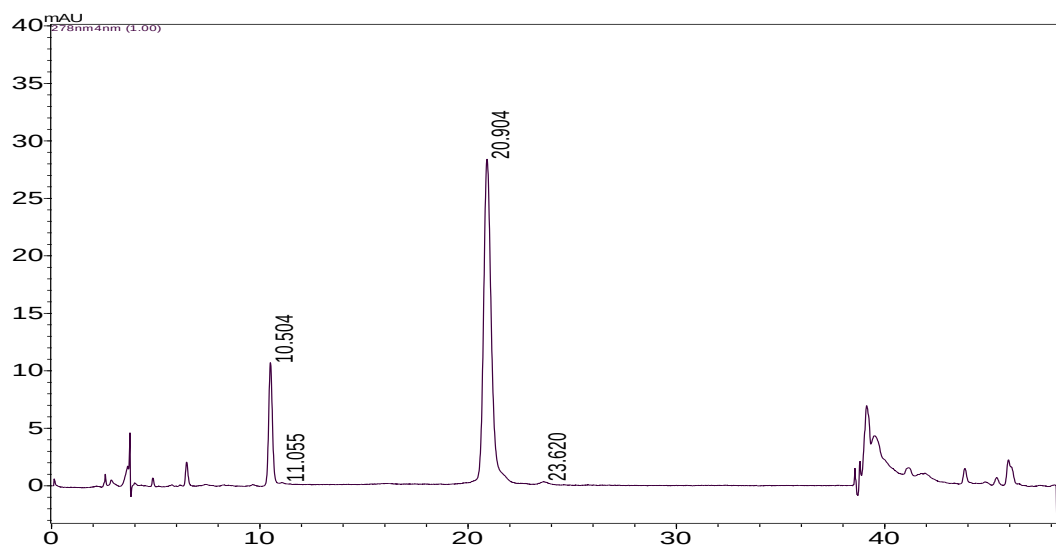


Abb.12: Chromatogramm von Fraktion 3 nach dem Einengen unter Stickstoffstrom; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

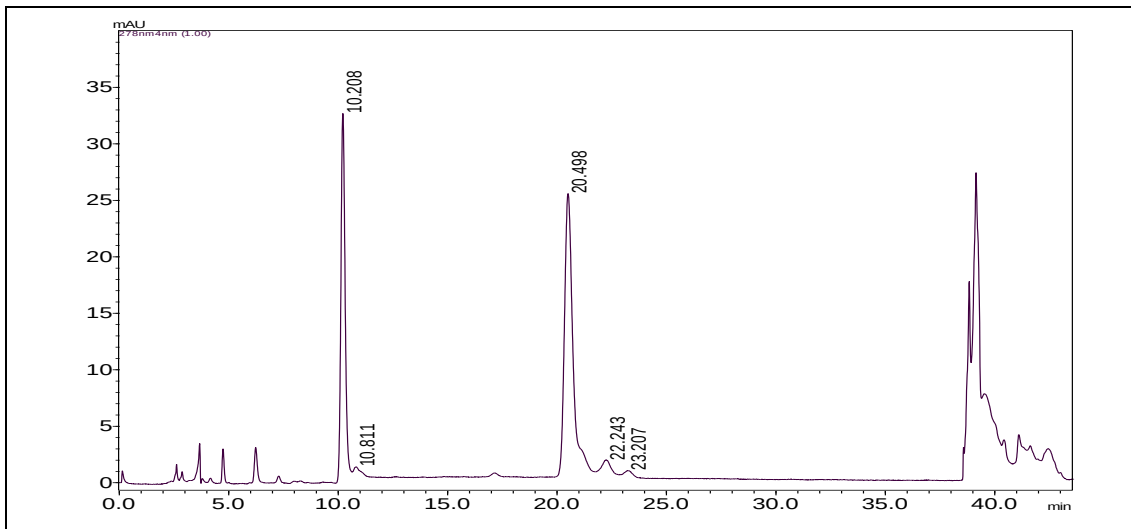


Abb.13: Chromatogramm von Fraktion 2 nach dem Einengen unter Stickstoffstrom stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

Nach dem Einengen unter einem Stickstoffstrom wurde bei Fraktion 2 und 3, sowohl bei t_R 20-22 min, als auch bei t_R 10-12 min nur eine einzelne Substanz detektiert. Diese Resultate deuteten darauf hin, dass es beim Lösen der eingedampften Fraktionen zu der Umlagerung gekommen war.

3.2.2.3. Einengen ohne Lyophilisation

Da diese Trocknungsmethode aufgrund des hohen N_2 -Verbrauchs für das Einengen für größere Mengen nicht in Frage kam, wurden die gesammelten Fraktionen mit je 1ml DMSO unterschichtet. DMSO wird durch Lyophilisation nur sehr langsam entfernt und ist somit nach Entfernung von Acetonitril und Wasser noch vorhanden, um die Substanz in Lösung zu halten. Damit war es möglich, eine entsprechende Aufkonzentrierung zu erreichen.

Die Fraktionen wurden umgehend analysiert.

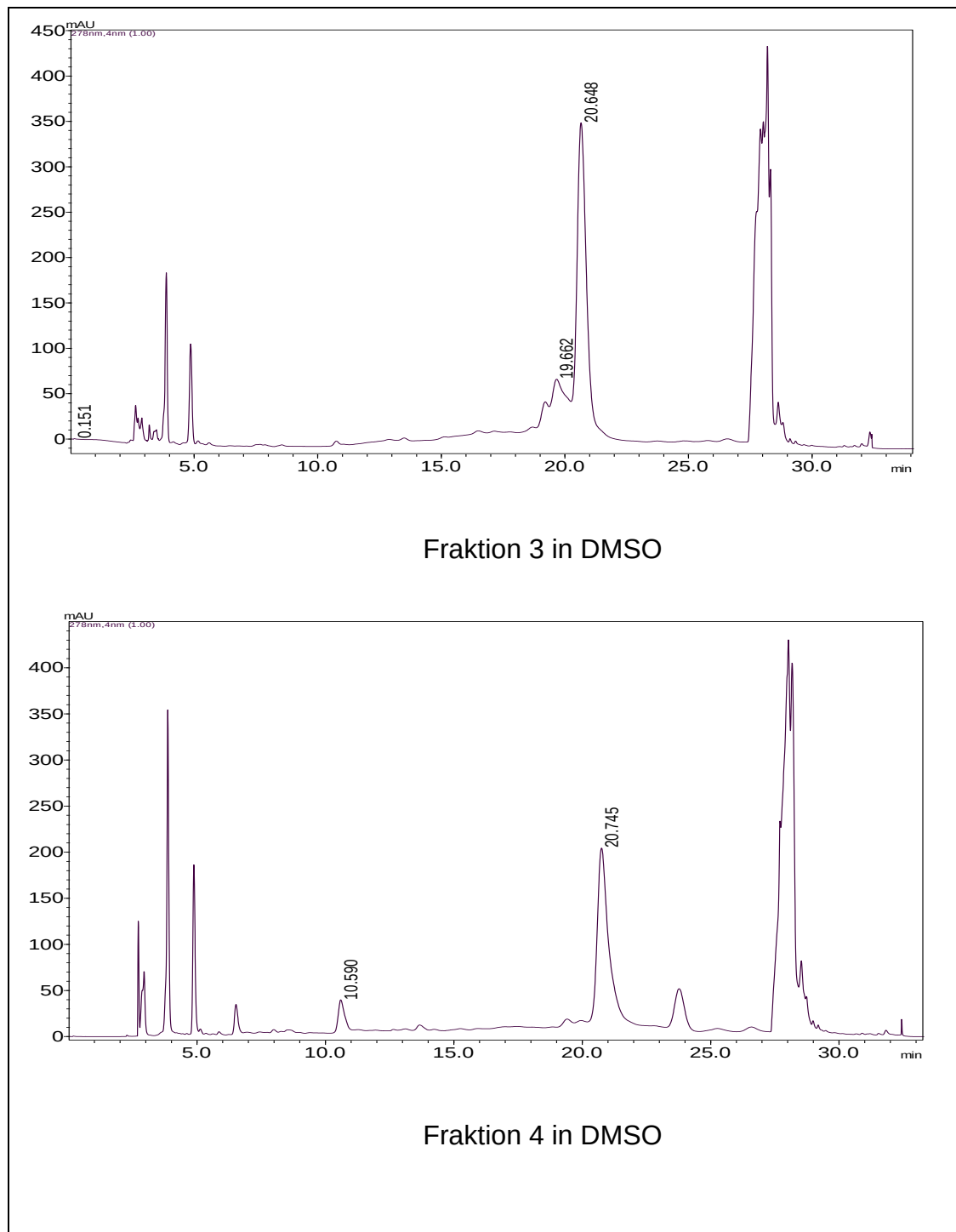


Abb.14: Chromatogramme der Fraktionen 3 und 4 in DMSO stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

Wie in den Abbildung 13 zu erkennen, lag in beiden Fraktionen nur ein Oleocanthalpeak bei t_R 20,7 vor und auch beim Abbauprodukt (t_R 10,6) zeigte sich nur ein Peak.

Eine weitere Möglichkeit bestand darin, die Fraktionen nicht zu lyophilisieren, sondern durch Vakuumzentrifugation im GeneVac einzuengen. Dazu wurde bei einem semi-präparativen HPLC-Lauf wieder ohne UV/Vis-Detektion fraktioniert und je die Hälfte der Fraktionen im GeneVac eingeengt, der Rest unter Stickstoffstrom. Anschließend wurden beide Proben analysiert. Dabei ergab sich, dass es beim Einengen im GeneVac, aufgrund der geringen Flüssigkeitsmenge, schwer war, den Abdampfvorgang rechtzeitig zu stoppen, bevor die Substanz vollständig zur Trockenen gebracht wurde. Das Abblasen des Lösungsmittels unter einem Stickstoffstrom konnte aufgrund der hohen Verbrauchsmenge an Stickstoff nicht durchgeführt werden.

3.3. Quantifizierung des Oleocanthalgehaltes in Olivenöl unterschiedlicher Herkunft

Als Basis für weitere Versuche wurden hochwertige Olivenöle mit hohem Oleocanthalgehalt benötigt. Aus diesem Grund wurden Olivenöle verschiedener Herkunft (s.Tab.1, S.11) mittels HPLC quantitativ untersucht und der Oleocanthalgehalt bestimmt.

Extrahiert wurde nach der in Kapitel 3.1.1. (s.S.19) beschriebenen Methode und auch die HPLC-Bedingungen von Methode B aus Kapitel 3.1.2. (s.S.21) wurden beibehalten.

3.3.1. Kalibrierung des Systems

Zur Gehaltsbestimmung wurde 3,5-Dimethoxyphenol (Merck Schubardt OHG, Germany) als interner Standard verwendet, da dieses bereits zur Quantifizierung von Biophenolen im Olivenöl verwendet worden war [15,16,17]. Aufgrund seiner Retentionszeit in der HPLC-Analyse wurde die Analysenzeit nicht verlängert, es ist günstig im Handel erhältlich und zeigt ausreichende Absorption bei der verwendeten Wellenlänge von 278nm. Die Reinheit wurde vom Hersteller mit 97% angegeben.

Es wurde eine Stammlösung des internen Standards mit einer Konzentration von 19,64 mg/ml in Methanol hergestellt sowie eine Stammlösung von Oleocanthal, wobei die beiden Isomere mit je 23%iger Reinheit vorlagen. Die Konzentration dieser Lösung betrug 5,46 mg/ml.

Mit den beiden vorliegenden Lösungen wurden 5 Eichlösungen mit absteigenden Oleocanthalkonzentrationen hergestellt.

	1	2	3	4	5
3,5-DMP	50	50	50	50	50
OLC	200	100	50	25	13
MeOH	0	100	150	175	187
Gesamt	250	250	250	250	250

Tab.6: Eichlösungen in μl

	1	2	3	4	5
3,5-DMP	3,81	3,81	3,81	3,81	3,81
OLC	4,37	2,18	1,09	0,55	0,27
OLC_1	1,01	0,50	0,25	0,13	0,06
OLC_2	1,01	0,50	0,25	0,13	0,06

Tab.7: Eichlösungen in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Für jede OLC-Konzentration wurden 2 Eichlösungen hergestellt und vermessen. Aus den vorliegenden Chromatogrammen wurden Korrekturfaktoren für Oleocanthal berechnet und eine Eichgerade erstellt.

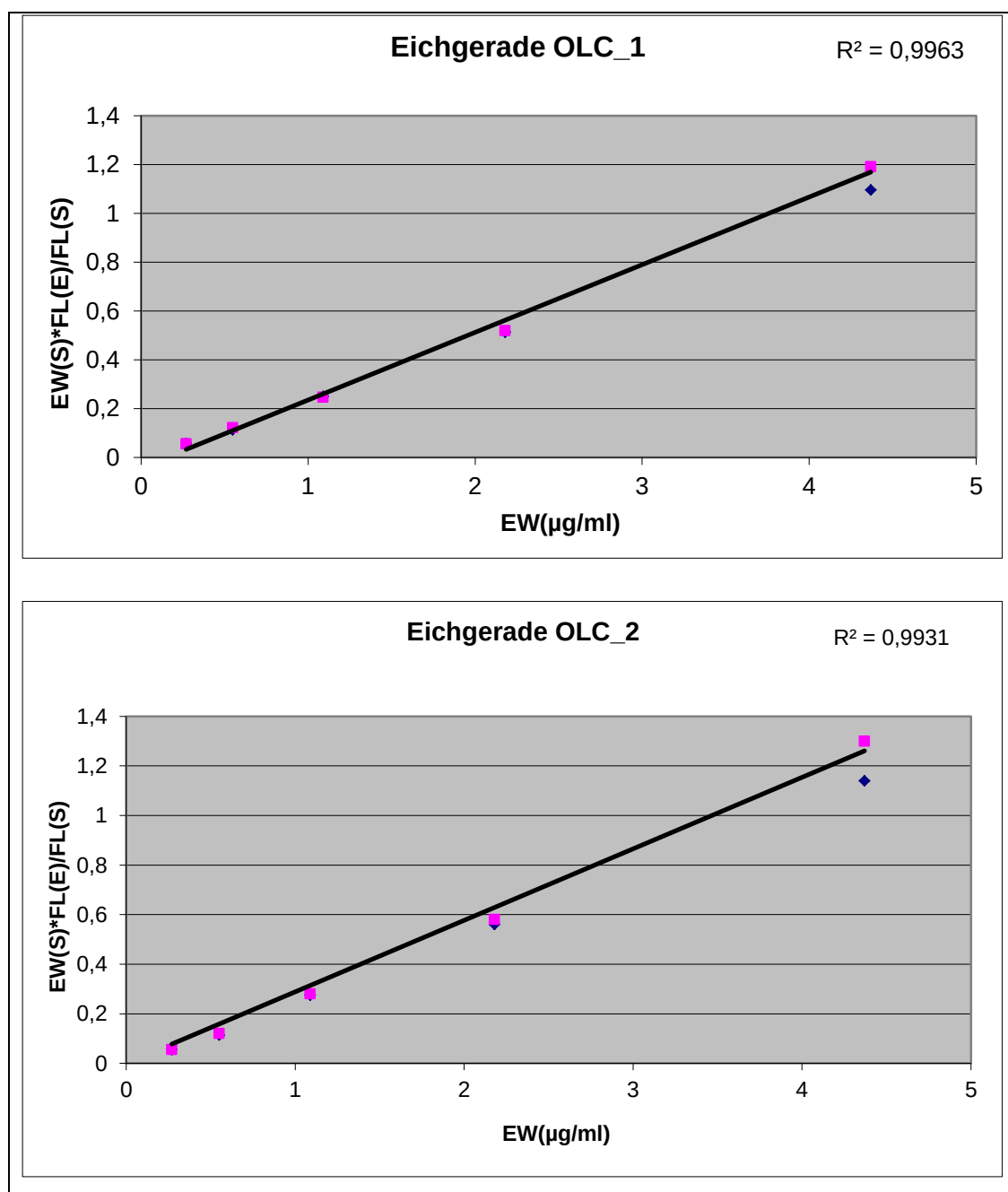


Abb.15: Eichgeraden der OLC-Isomeren OLC_1 und OLC_2

3.3.2. Vergleich der Öle

Zur Bestimmung des Oleocanthalgehaltes wurden von jedem Öl 2 Proben zu je 10g aufgearbeitet, wobei je 500µl Extrakt erhalten wurden. Von jedem der 12 Extrakte wurden 2 Mal je 100µl entnommen, die einmal mit 50µl Methanol und einmal mit 50µl Stammlösung des Internen Standards (4,72 mg/ml) versetzt wurden.

Die 24 Analysenlösungen wurden vermessen.

Es wurden die Peakflächen der beiden Oleocanthalpeaks sowie die Peakfläche des Internen Standards ermittelt.

Außerdem wurden die minimalen Peakflächen jener Peaks bestimmt, welche in der Probe nach Methanolzusatz zur selben Retentionszeit wie der interne Standard detektiert wurden. Dieser Wert wurde von der Peakfläche des internen Standards subtrahiert, um geringfügige Störungen durch Begleitstoffe zu korrigieren.

Der Oleocanthalgehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\%_{\text{OLC}} = \frac{A_{\text{OLC}} \times EW_{\text{ISTD}} \times F_k \times 100}{EW_{\text{ÖL}} \times A_{\text{ISTD}}}$$

A_{OLC} Peakfläche Oleocanthal

EW_{ISTD} Einwaage Interner Standard (0,236 mg)

F_k Korrekturfaktor

OLC_11,004

OLC_21,023

$EW_{\text{ÖL}}$ Einwaage Olivenöl (2000 mg)

A_{ISTD} Peakfläche Interner Standard

	Sitia	Laudemio	Aliziari	Punta Legnu	Kloster Toplou	Caelo
OLC_1	10,5	10,4	3,5	9,9	7,9	2,1
OLC_2	9,1	10,2	2,5	9,5	7,2	1,4
OLC_Gesamt	19,6	20,6	6,0	19,4	15,1	3,5

Tab.8: Oleocanthalgehalt verschiedener Olivenöle in mg/l

Der OLC-Gehalt der Olivenöle lag zwischen 3,5mg/l und 20,6mg/l. Zwar konnte bei dem italienischen Olivenöl Laudemio der höchste Gehalt an OLC nachgewiesen werden, der in der Literatur angegebene Gehalt von 154,2µg/g (entspricht 140mg/l) [18] wurde aber nicht erreicht.

Bezüglich der Herkunft der Öle konnte festgestellt werden, dass die beiden italienischen Öle (Laudemio und Punta Legnu) sowie die beiden griechischen Öle (Sitia und Kloster Toplou) gegenüber dem französischen (Aliziari) und dem spanischen Öl (Caelo) einen höheren OLC-Gehalt aufwiesen.

Das Verhältnis zwischen OLC_1 und OLC_2 lag immer bei ca. 1:1 ,außer bei dem Muster von Caelo.

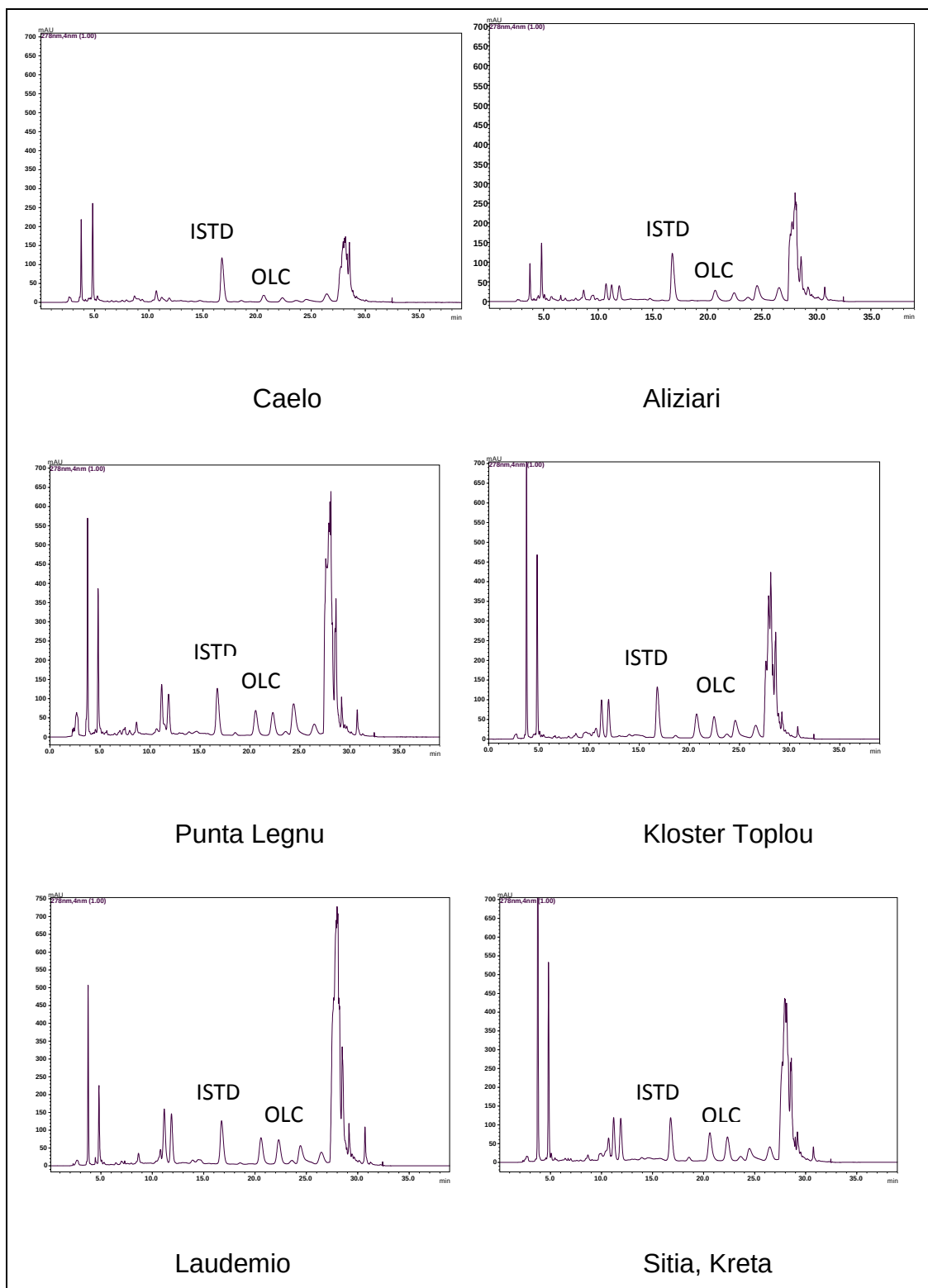


Abb.16: Chromatogramme der Olivenölextrakte mit 3,5-DMP bei t_R 16,8 min als internem Standard; OLC_1 bei t_R 20,6 min und OLC_2 t_R 22,4 min; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5 μ m; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

Das Phenolmuster ist bei allen sechs untersuchten Ölen sehr ähnlich, lediglich die Konzentration unterscheidet sich deutlich. Auch die Retentionszeiten der jeweiligen Komponenten sind erwartungsgemäß gleich. So lassen sich bei allen sechs Ölen die gleichen markanten Peaks erkennen, jeweils paarweise auftretend, bei t_R 3,8 min und t_R 5,0 min, bei t_R 11,2 min und t_R 12,0 min, sowie bei t_R 20,6 min und t_R 22,4 min.

3.4. Strukturklärung des Gemisches

3.4.1. Strukturklärung mittels LC-MS

Um die OLC-Isomeren eindeutig zuordnen zu können, wurde im ersten Schritt eine LC-MS durchgeführt.

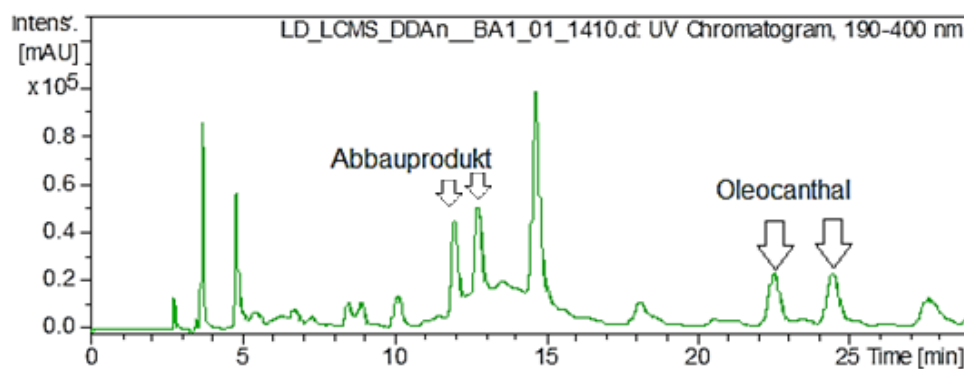


Abb.17: LC-MS Chromatogramm (TIC) von Olivenölextrakt; OLC-Abbauprodukte bei t_R 11,7 min und t_R 12,6 min ; OLC bei t_R 22,1 min und t_R 24,2 min; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5 μ m; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

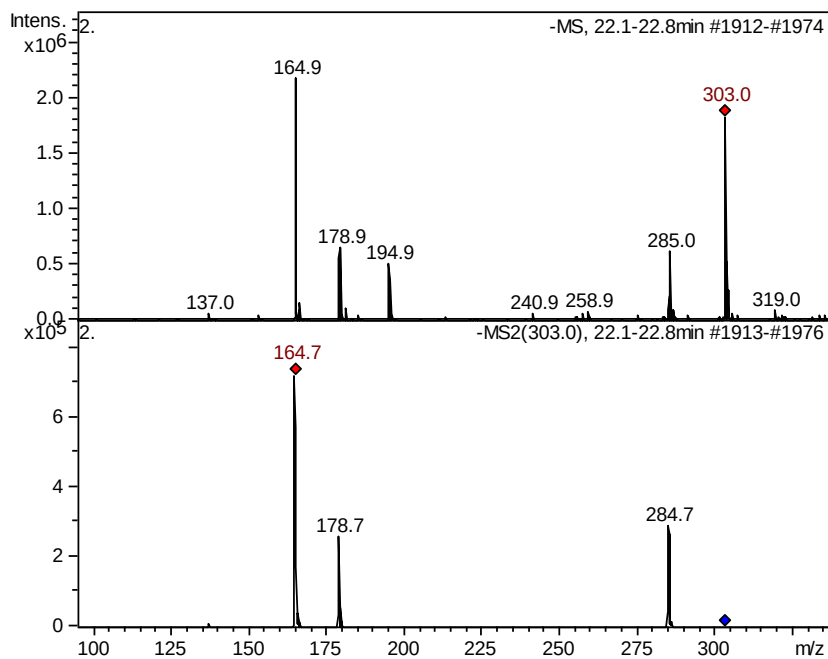


Abb.18: ESI-Massenspektrum eines Oleocanthals-Isomers

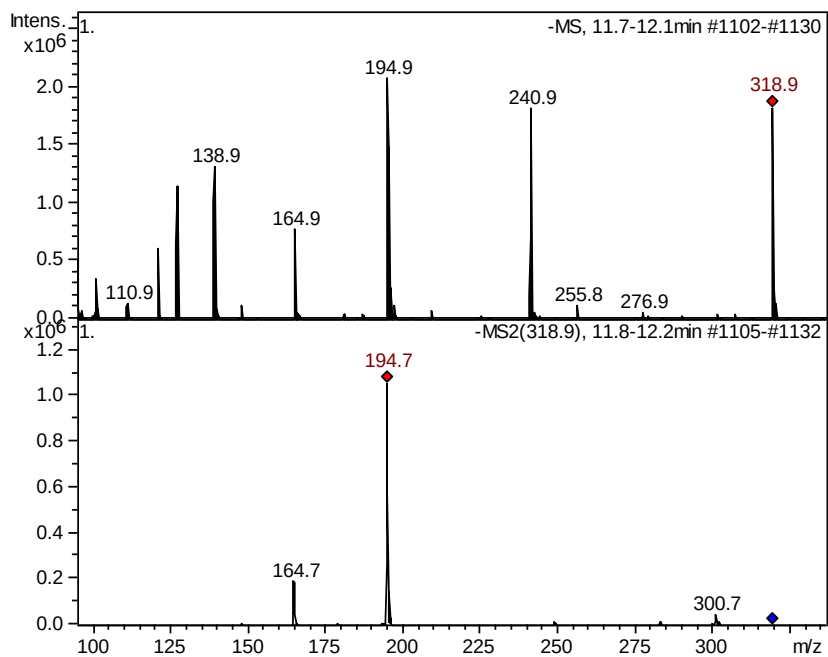


Abb.19: ESI-Massenspektrum eines Oleocanthals-Abbauproduktes

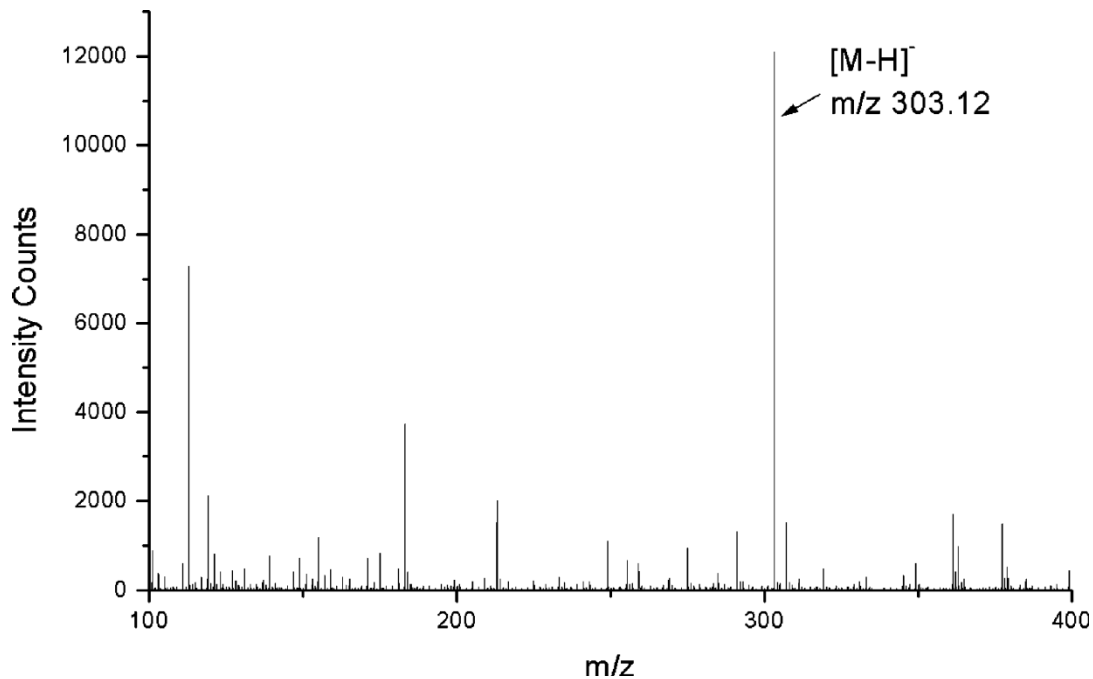


Abb.20: $[M-H]^-$ Massenspektrum von Oleocanthal [17]

Die Messwerte von $[M-H]^-$ m/z 303,0 stimmen mit dem errechneten Molekulargewicht von Oleocanthal von 304,34 g/mol überein. Auch der Vergleich mit der Literatur zeigt eine Übereinstimmung des Massenpeaks bei $[M-H]^-$ m/z 303.

Bei der MS-Analyse des Abbauproduktes zeigte sich, dass sich sowohl der Massenpeak bei $[M-H]^-$ m/z 318,9, als auch der MS^2 Peak bei m/z 194,9 um das Gewicht eines Sauerstoffatoms (16 g/mol) von den entsprechenden Peaks im Spektrum von Oleocanthal $[M-H]^-$ m/z 303,0 bzw. m/z 178,9, unterscheiden.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Peaks bei t_R 11,7 min und t_R 12,6 min um Oxidationsprodukte der OLC-Isomeren mit einer zusätzlichen Sauerstofffunktion handelt.

3.4.2. Vergleich der UV-Spektren

Die UV-Spektren der Komponenten des Gemisches wurden mit den Daten aus UV-Analysen aus der Literatur verglichen [6].

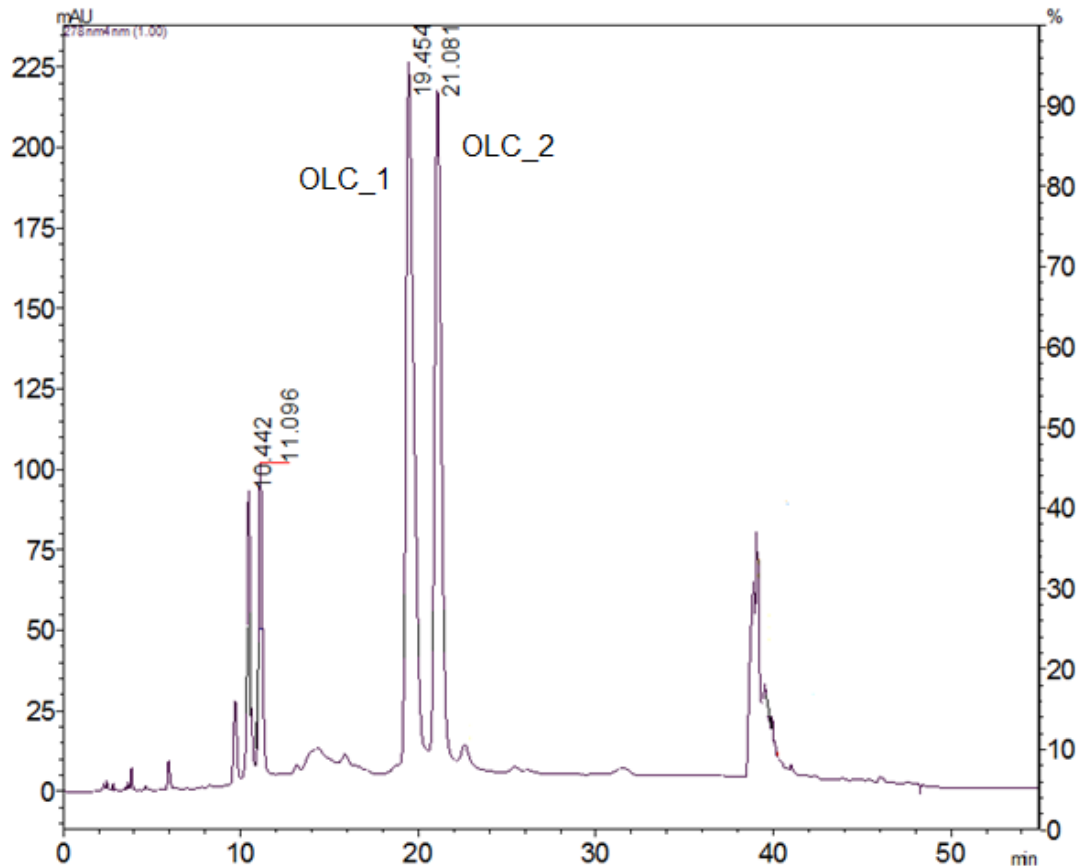


Abb.21: HPLC der OLC-Fraktion nach semipräparativer HPLC; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)

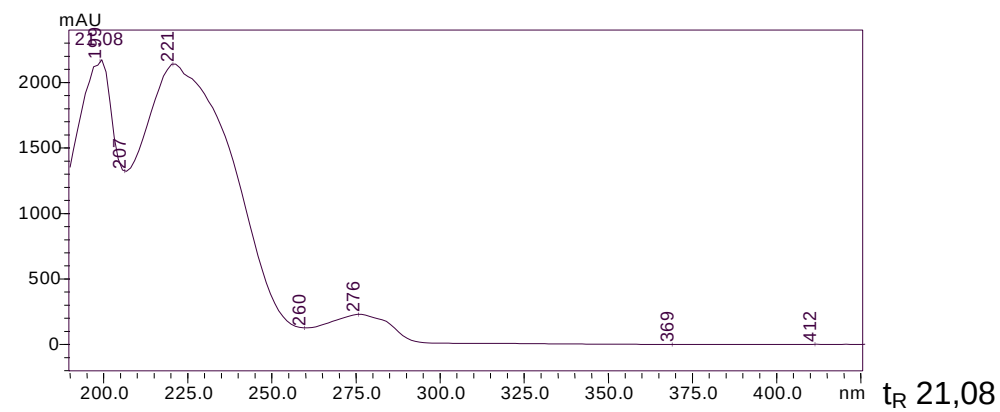
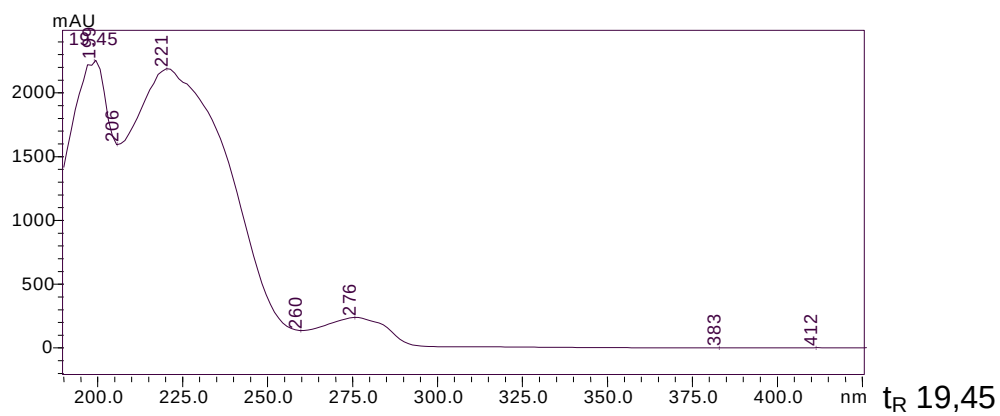
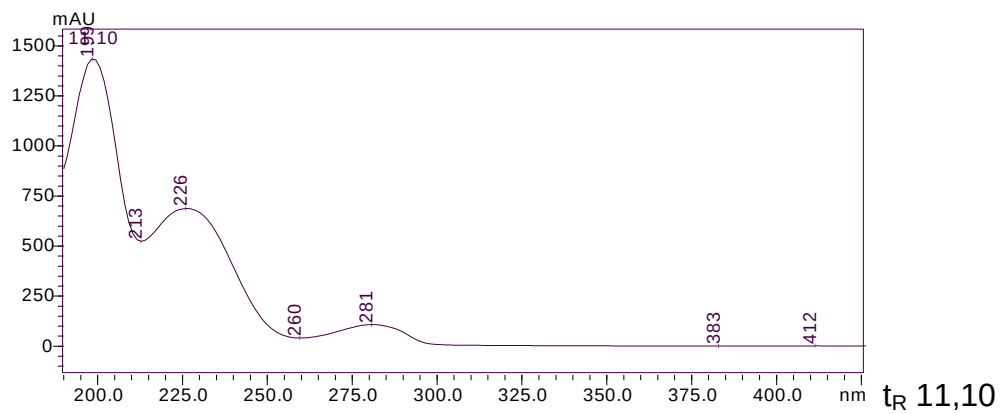
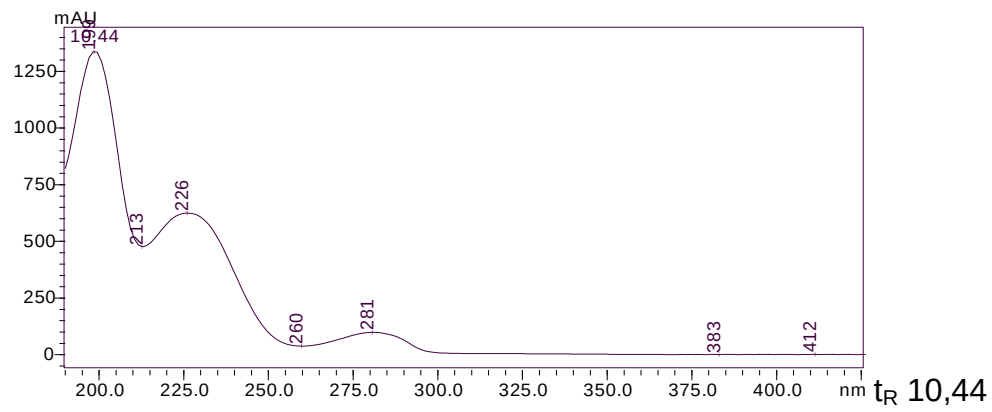


Abb.22: UV-Spektren der Oleocanthal-Isomeren und deren Abbauprodukte

Die in der Literatur erwähnten UV-Daten für Oleocanthal beziehen sich auf Vermessungen in Chloroform und Methanol. Da in unseren Analysen in Acetonitril/Wasser (1+3) vermessen wurde, waren leichte Shifts zu erwarten [6].

Lösungsmittel	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\min}$
Chloroform	242, 277, 283 sh, 325	265
Methanol	225, 277, 284 sh, 330*	208, 266

* das Maximum bei 330nm wird als schwach und kaum ausgeprägt bezeichnet

Tab.9: UV-Daten Oleocanthal [6]

Retentionszeit	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\min}$
10,4	226, 281, 290sh	260
11,1	226, 281, 290sh	260
19,4	221, 276, 284sh	260
21,0	221, 276, 284sh	260

das Maximum bei ~330nm ist in den UV-Spektren nicht zu erkennen

Tab.10: UV-Daten der vier Analyten im angereicherten Gemisch

Sowohl bei den Maxima als auch bei den Minima lässt sich aber eine Übereinstimmung erkennen. Weiters fällt auf, dass sowohl die beiden Peaks bei RT 10,44 und 11,10 , als auch jene bei RT 19,45 und 21,08 idente Werte bei den Minima und Maxima aufweisen.

4.2.3. Strukturklärung mittels NMR-Spektroskopie

Die auf ca. 60% angereicherte Probe des Gemisches wurde zur Substanzklärung mittels H-NMR und C¹³-NMR untersucht. In beiden Fällen konnten gute Übereinstimmungen mit den Angaben aus der Literatur [9] festgestellt werden.

¹ H-NMR				
Lit.[9]		Protonen	3S/4E-Oleocanthal	3S/4Z-Oleocanthal
9,64		CHO- an CH ₂ s 1H	9,64	9,64
9,24	J=2,0 Hz	CHO- an 4 d 1H	9,22	9,22
7,04	J=8,3 Hz	Ar-H ₂ ,H ₆ d 2H	7,04	7,04
6,74	J=8,5 Hz	Ar-H ₃ ,H ₅ d 2H	6,75	6,75
6,64	J=7,1 Hz	H-5 q 1H	6,64	6,62
4,19		H-1' m 2H	4,20	4,20
3,65		H-3 m 1H	3,63	3,24
2,90		CH ₂ - an C3 m 1H	2,96	
2,78	J=7,0 Hz	H-2' t 2H	2,81	2,81
2,72*		CH ₂ - an C3 m1H von 3R/4E*		2,75
2,65		H-2 d 2H	2,65	2,63
2,08	J=7,1 Hz	H-6 d 3H	2,08	1,99

Tab.11: H-NMR-Daten von Oleocanthal

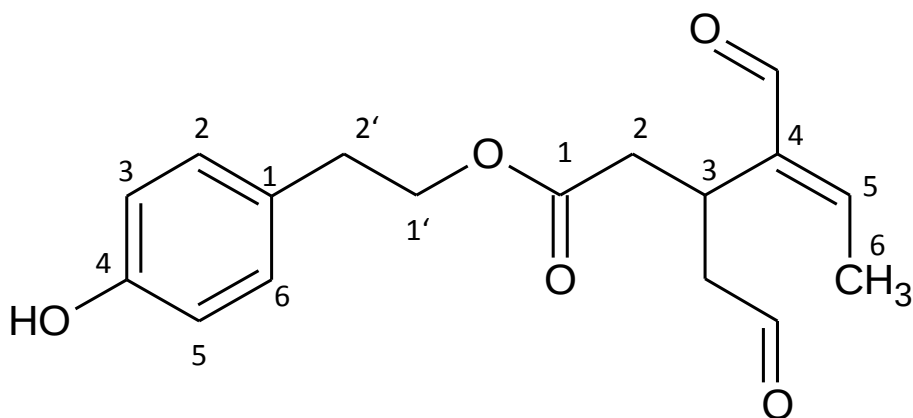
* Dieses Signal wurde von Smith et al. [14] nicht zugeordnet und lässt darauf schließen, dass in dieser Untersuchung ebenfalls ein Gemisch aus dem 3S/4E und dem 3S/4Z Isomer vorgelegen hat.

Im ^1H -NMR wurde eine sehr gute Korrelation mit den Daten von Smith et al. [14] festgestellt.

Die Aldehydgruppe an Position 2 kam jeweils bei δ 9,64 zur Resonanz. Die zweite Aldehydgruppe an Position 4 kam bei δ 9,24 bzw. in unserer Analyse bei δ 9,22 zur Resonanz [14].

Ebenso gute Übereinstimmung konnte die Protonen des Arylrestes, sowie für H1' und H2' festgestellt werden. Bei den Protonen an C-2, C-3, C-5 und C-6 war kein Unterschied zu den Daten der Literatur feststellbar [14].

Für Oleocanthal stimmten die die Shifts von δ 2,96 und δ 3,63 sehr gut mit den publizierten Daten überein, während für das 3S/4Z-Derivat die Protonen bei δ 2,75 und δ 3,74 zu Resonanz kamen. Auch die Protonen der CH_3 -Gruppe an C-6 zeigten einen größeren Unterschied zwischen der 3S/4E und der 3S/4Z Konformation (Shifts von δ 2,08 bei Oleocanthal bzw. δ 1,99 für 3S/4Z-Isomer).



¹³ C-NMR			
Lit. [9]	C-Atom	3S/4E-Oleocanthal	3S/4Z-Oleocanthal
171,9	C – 1	171,96	172,47
36,9	C – 2	36,08	37,32
27,3	C – 3	27,17	29,46
143,4	C – 4	143,18	143,81
154,3	C – 5	154,40	153,67
15,2	C – 6	15,25	14,93
46,3	CH ₂ -	46,14	46,21
65,2	C – 1'	65,16	65,02
34,2	C – 2'	34,12	34,40
129,5	C – 1 Ar	129,62	129,73
130,1	C-2,C-6 Ar	130,01	130,01
115,4	C-3,C-5 Ar	115,32	115,32
154,2	C – 4 Ar	154,36	154,36
200,4	CHOCH ₂	200,53	200,90
195,1	CHO – 4	195,24	195,88

Tab.12: C-NMR-Daten von Oleocanthal

Auch im C¹³-NMR waren die Verschiebungen der C-Atome mit publizierten Daten [14] des Arylrestes übereinstimmend. Die größte Abweichung gab es bei C-2 und C-3, wobei die Shifts von δ 36,08 und δ 27,17 wieder gut mit den publizierten Daten korrelierten.

Beim 3S/4Z-Isomer kamen diese bei δ 37,32 und δ 29,46 zur Resonanz.

Weitere geringfügige Unterschiede waren bei C-1, C-4, C-5 und C-6 zu erkennen.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, Oleocanthal, einen phenolischen Inhaltsstoff aus Olivenöl zu isolieren. Oleocanthal löst ein Kratzen im Rachenbereich ähnlich wie Ibuprofen aus und hemmt ebenso wie Ibuprofen COX-1 und COX-2. Für weitere Testungen wurde eine entsprechende Menge an Testsubstanz benötigt, die isoliert werden sollte.

Dazu wurde aus Extra Nativem Olivenöl mit Methanol ein Extrakt hergestellt. Mit Hexan wurden verbleibende Ölrreste entfernt. Anschließend wurde das Extrakt mittels semipräparativer HPLC weiter aufgereinigt und einzelne Fraktionen gesammelt und analysiert.

Da in den Fraktionen offensichtlich Abbau- und Umlagerungsprodukte vorlagen, wurden verschiedene Versuche unternommen, um Belastungen zu vermeiden.

Um den Extrakt vor UV-Licht zu schützen, wurde ohne UV-Detektor fraktioniert. Da trotzdem Abbau- und Umlagerungsprodukte auftraten, wurde versucht, das Lösungsmittel so schonend wie möglich zu entfernen und anstatt zu lyophilisieren im Genevac oder unter Stickstoffstrom einzuziehen sowie bei der Lyophilisation mit DMSO zu unterschichten. Die besten Ergebnisse konnten durch Einziehen unter Stickstoffstrom und durch Unterschichten mit DMSO bei der Lyophilisation erreicht werden.

Trotz aller getroffenen Maßnahmen war es nicht möglich, Oleocanthal in reiner Form zu erhalten. Dennoch konnte eine Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie und eine LC-MS-Analyse das Vorliegen von Oleocanthal sowie eines Isomers bestätigen.

Um als Basis für weitere Versuche ein geeignetes Ausgangsmaterial zu finden, wurde der Oleocanthalgehalt 6 verschiedener Extra Nativer Olivenöle aus unterschiedlichen, mediterranen Regionen mit Hilfe des internen Standards 3,5-DMP quantifiziert.

Obwohl mit der angewendeten Extraktionsmethode und der folgenden semipräparativen HPLC die OLC-Isomeren zu 60% angereichert werden konnten, war eine Reindarstellung der Einzelkomponente im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

5. Zusammenfassung

Es wurden Versuche zur Isolierung von Oleocanthal (= 2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoat bzw. (3S,4E)-4-Formyl-3-(2-oxoethyl)-4-hexenoic acid 2-(4-hydroxyphenyl)ethylester) unternommen. Hierbei wurden etablierte Methoden zur Extraktion aus der Literatur adaptiert und abgewandelt. Aus Extra Nativem Olivenöl wurde mit Methanol ein phenolreicher Extrakt hergestellt und mittels semipräparativer HPLC fraktioniert. Es kam jedoch auch unter UV-Abschirmung und Stickstoffüberschichtung der Fraktionen zu einer Umlagerung und zu einem Abbau von Oleocanthal. Die Struktur von Oleocanthal und das Vorliegen eines Isomers konnten mittels NMR-Spektroskopie und LC-MS bestätigt werden. Mit einer optimierten HPLC-Methode wurde der Oleocanthalgehalt 6 verschiedener Extra Nativer Olivenöle unterschiedlicher Herkunft mit Hilfe des internen Standards 3,5-DMP quantifiziert.

Abstract

This diploma thesis, focussed on the isolation of oleocanthal (= 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoat = (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)-4-hexenoic acid 2-(4-hydroxyphenyl)ethylester) from extra virgin olive oil. For this purpose established methods were adapted and modified. Semipreparative HPLC was performed with a methanolic extract to obtain oleocanthal-enriched fractions. Despite UV-protection and overlay with nitrogen a degradation of oleocanthal occurred. The structure of oleocanthal and the presence of an isomer was confirmed by NMR-spectroscopy and LC-MS. The concentration of oleocanthal in 6 extra virgin olive oils of different type and origin was quantified, by using the internal standard 3,5-DMP.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Strukturformel von (-)-Oleocanthal	8
Abb.2: verschiedene Olivenöle in handelsüblicher Verpackung und in Erlenmeyerkolben	11
Abb.3: analytische HPLC-Station	12
Abb.4: präparative HPLC-Station	13
Abb.5: Analysen der Extrakte von Methode A (links) und Methode B (rechts); stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobilePhase: Acetonitril/Wasser (1+3)	18
Abb.6: HPLC des Extraktes aus Olivenöl; stationäre Phase: LiChro CART® 250-10, Purospher® STAR, RP-18e, 5µm mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)	24
Abb.7: HPLC der OLC-Fraktion nach semipräparativer HPLC stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)	25
Abb.8: Trennschema der Fraktionierung der Oleocanthal-Isomeren mittels semipäparativer HPLC	26
Abb.9: Ethanolbad (links) und Lyophilisator (rechts)	27
Abb.10: Analyse der 6 Fraktionen nach semipräparativer Trennung der Tautomeren; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobilePhase: Acetonitril/Wasser (1+3)	28
Abb.11: Chromatogramm von Fraktion 3 nach Lyophilisation; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)	30

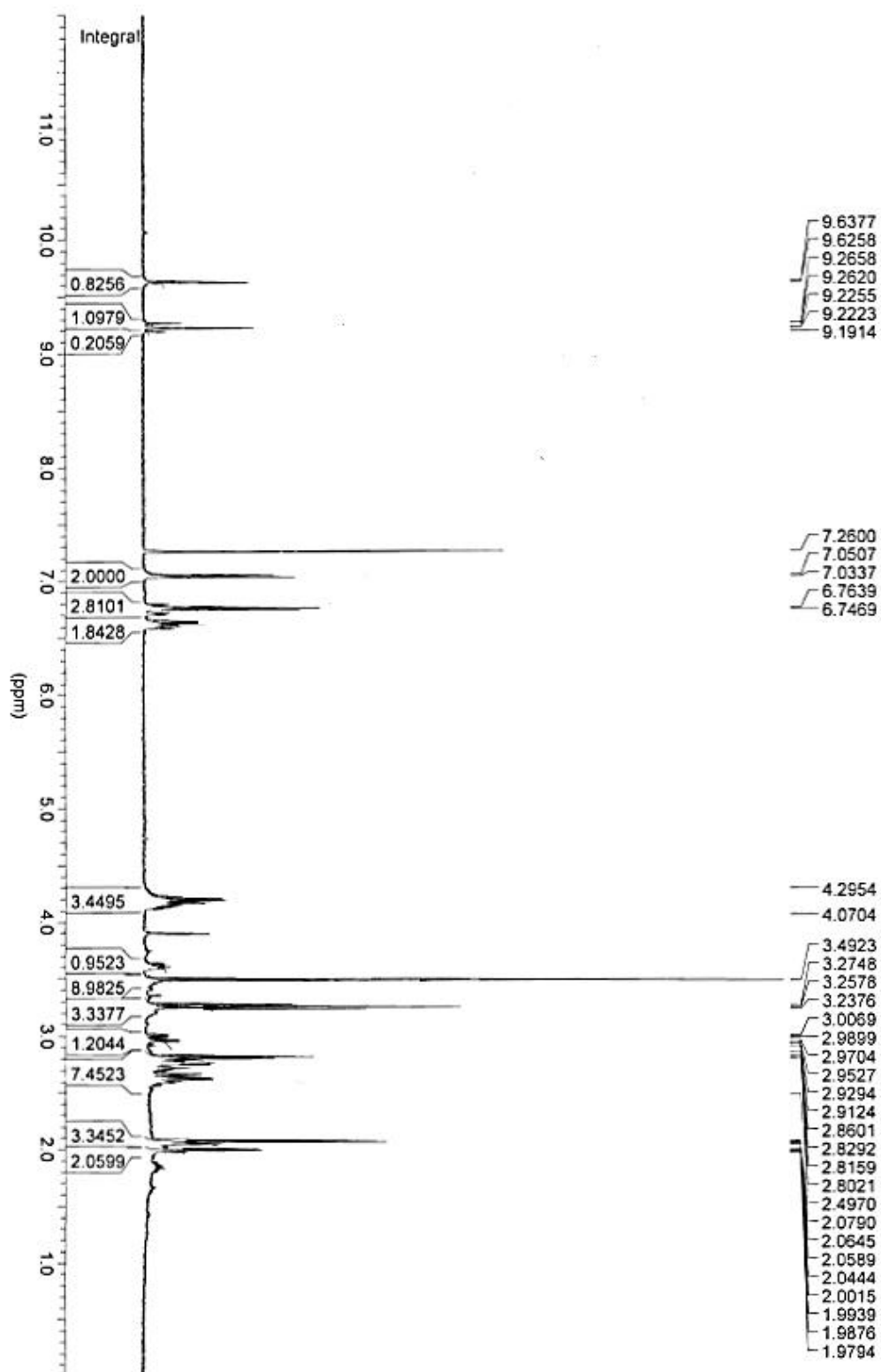
Abb.12: Chromatogramm von Fraktion 3 nach dem Einengen unter Stickstoffstrom; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)	30
Abb.13: Chromatogramm von Fraktion 2 nach dem Einengen unter Stickstoffstrom stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)	31
Abb.14: Chromatogramme der Fraktionen 3 und 4 in DMSO stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)	32
Abb.15: Eichgeraden	36
Abb.16: Chromatogramme der Olivenölextrakte mit 3,5-DMP (t_R 16,8 min) als internem Standard; OLC_1 bei t_R 20,6 min und OLC_2 t_R 22,4 min; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)	39
Abb.17: LC-MS Chromatogramm Olivenölextrakt; OLC-Abbauprodukt bei t_R 11,7 min; OLC bei t_R 22,1 min; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)	40
Abb.18: ESI-Massenspektrum von Oleocanthal	41
Abb.19: ESI-Massenspektrum des Oleocanthal-Abbauproduktes	41
Abb.20: $[M-H]^-$ Massenspektrum von Oleocanthal [16]	42
Abb.21: HPLC-Analyse; stationäre Phase: Phenomenex Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm 5µm; mobile Phase: Acetonitril/Wasser (1+3)	43
Abb.22: UV-Spektren von Oleocanthal und dessen Abbauprodukten	44

Tabellenverzeichnis

Tab.1: verwendete Olivenöle, Herkunft	11
Tab.2: verwendete Flüssigkeiten mit relativen Dichten	18
Tab.3: Elutionsgradient der Methode A	21
Tab.4: Elutionsgradient der Methode B	21
Tab.5: Elutionsgradient bei semipräparativer HPLC	22
Tab.6: Eichlösungen in μl	35
Tab.7: Eichlösungen in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	35
Tab.8: Oleocanthalgehalt verschiedener Olivenöle in mg/l	38
Tab.9: UV-Daten Oleocanthal, Literatur	45
Tab.10: UV-Daten der vier Analyten im angereicherten Gemisch	45
Tab.11: H-NMR-Daten von Oleocanthal	46
Tab.12: C-NMR-Daten von Oleocanthal	48

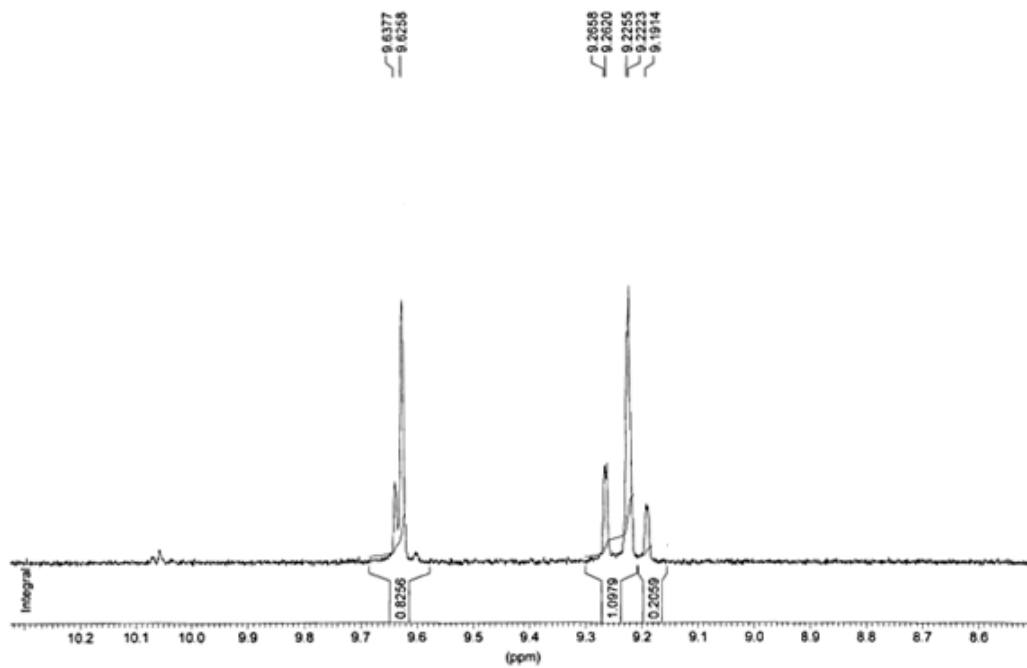
7. Anhang

^1H -NMR von Oleocanthal

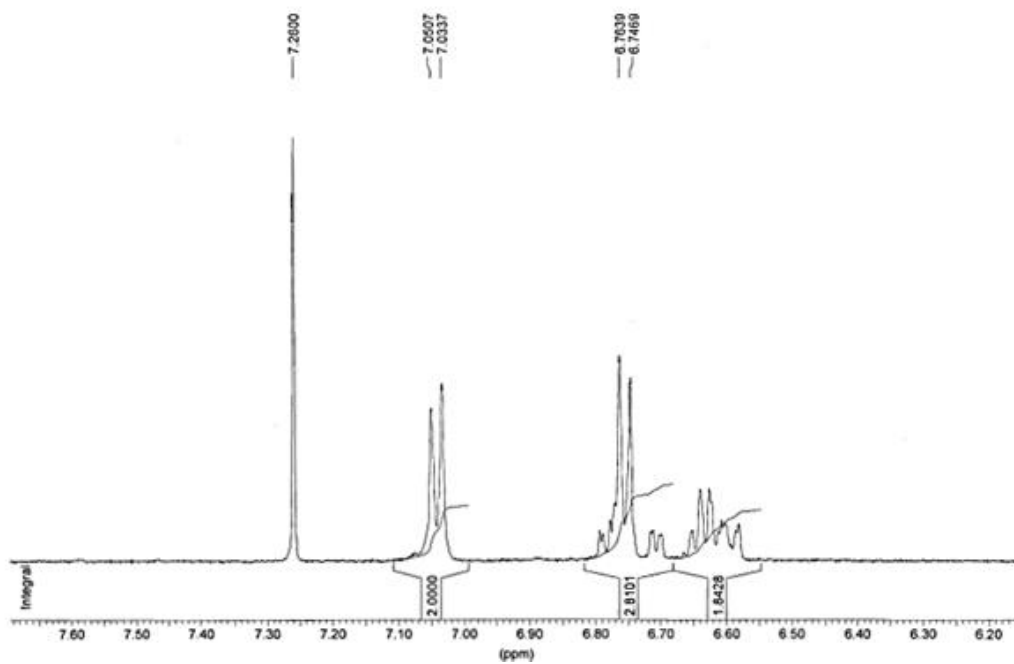


Fortsetzung ^1H -NMR

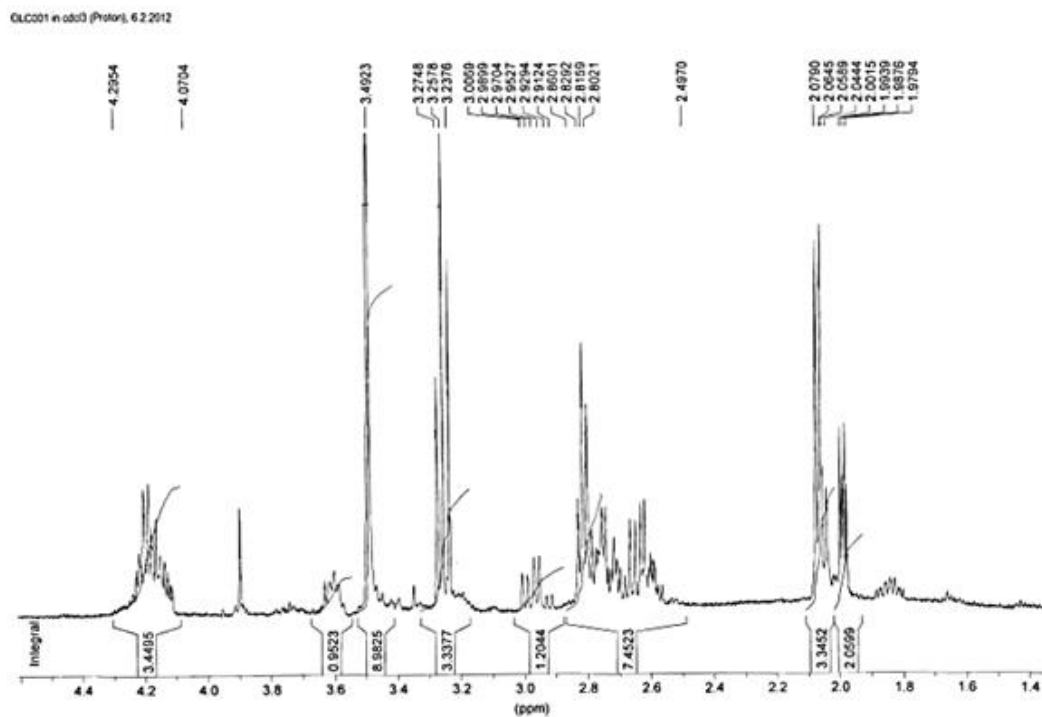
OLC001 in cdCl₃ (Proton), 6.2.2012



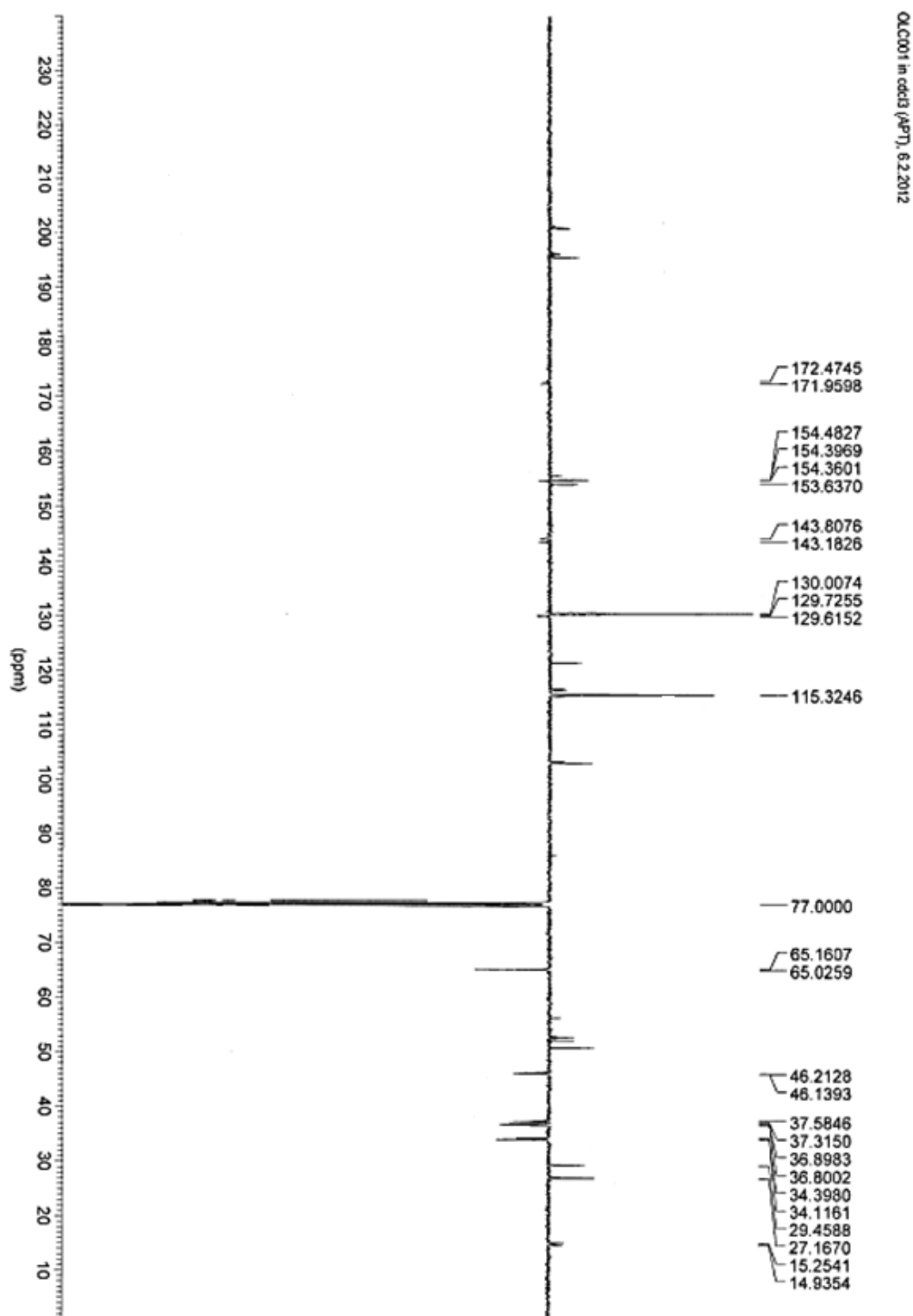
OLC001 in cdCl₃ (Proton), 6.2.2012



Fortsetzung ^1H -NMR

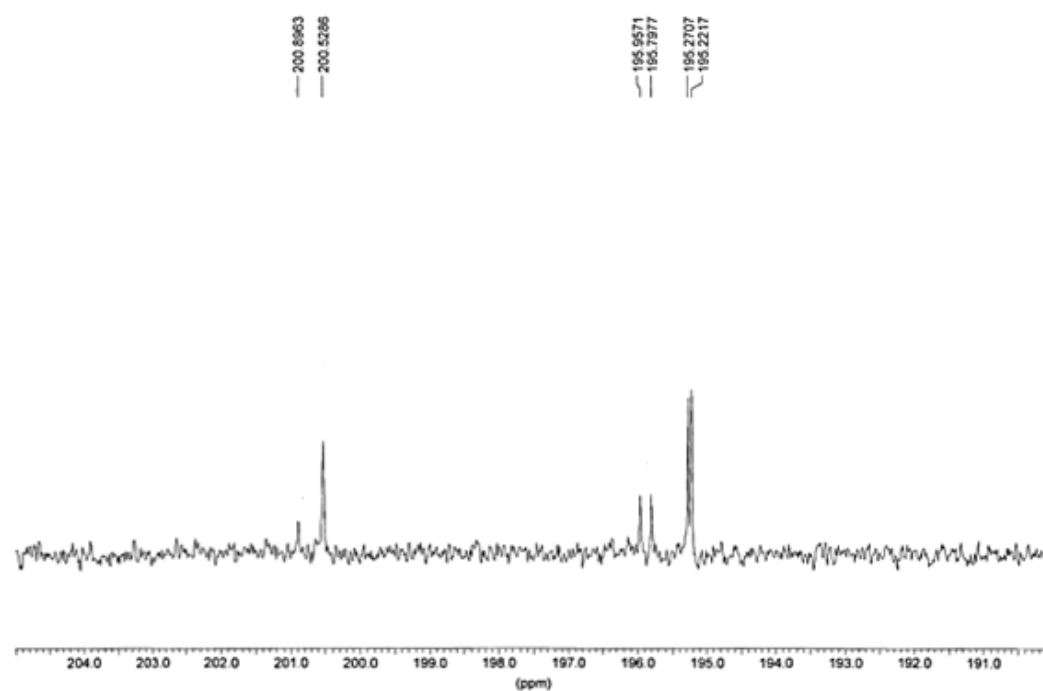


^{13}C -NMR von Oleocanthal

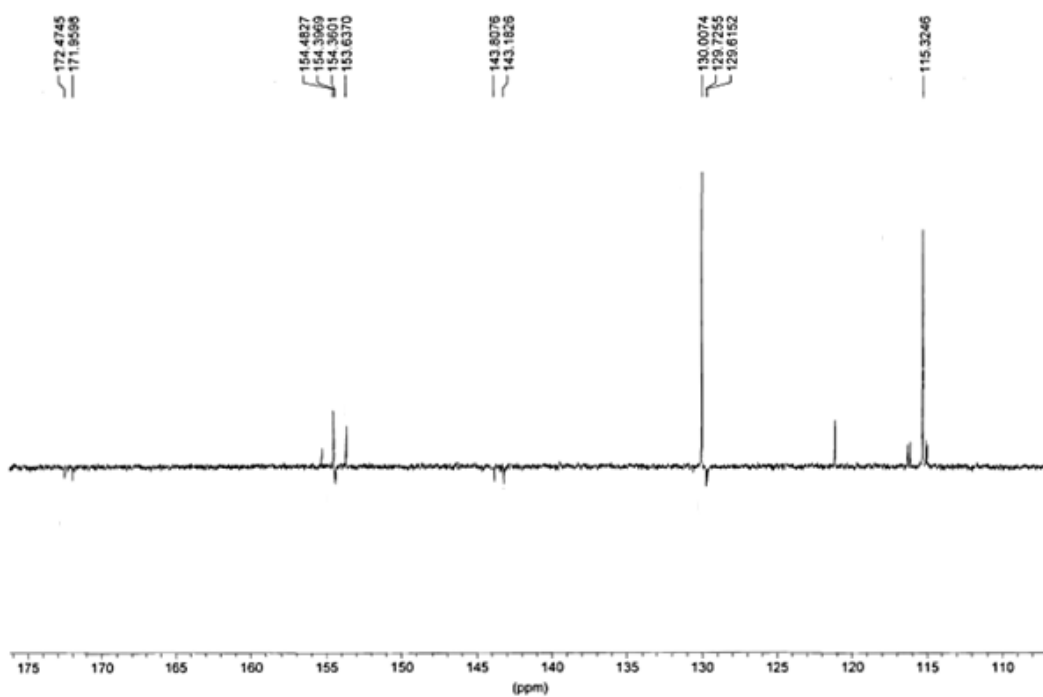


Fortsetzung ^{13}C -NMR

OLC001 in cdcl₃ (APT), 6.2.2012

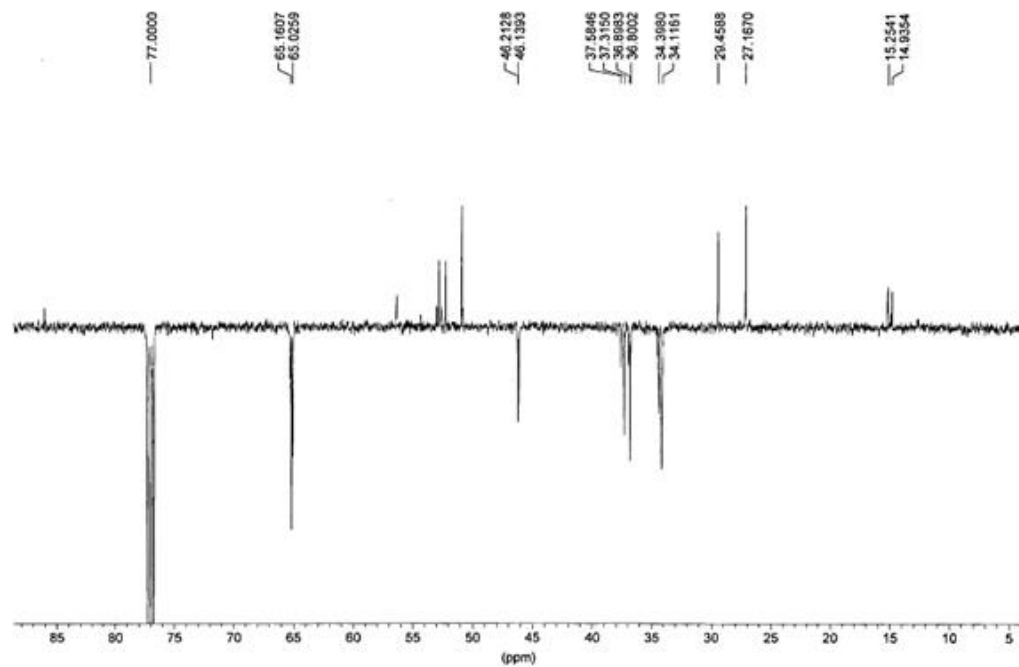


OLC001 in cdcl₃ (APT), 6.2.2012



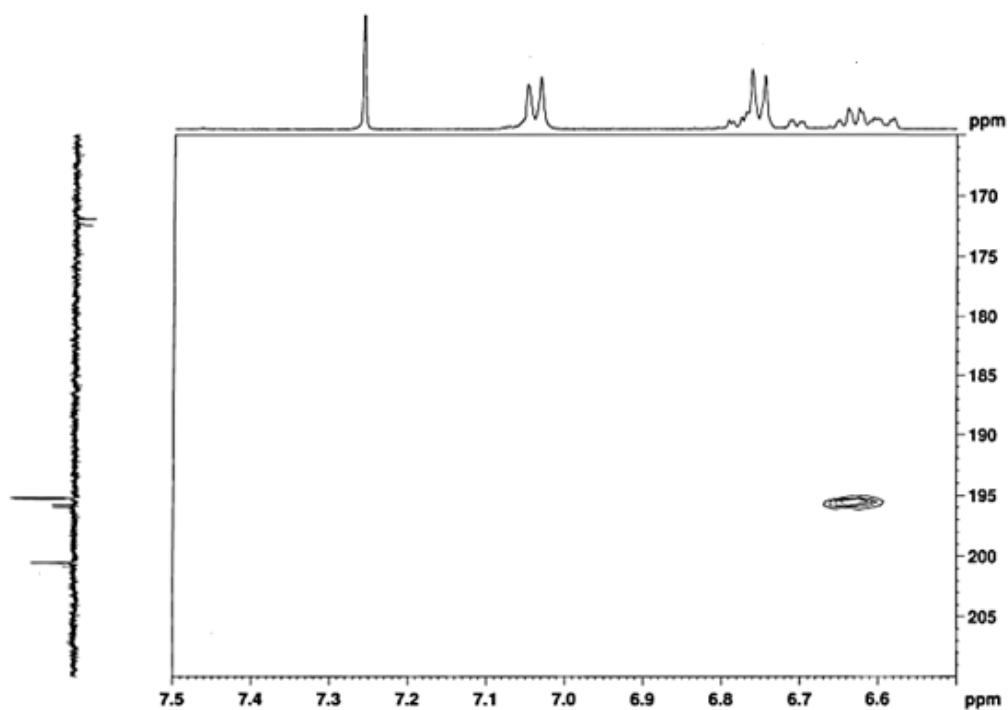
Fortsetzung ^{13}C -NMR

OLC001 in odd3 (APT), 8.2.2012

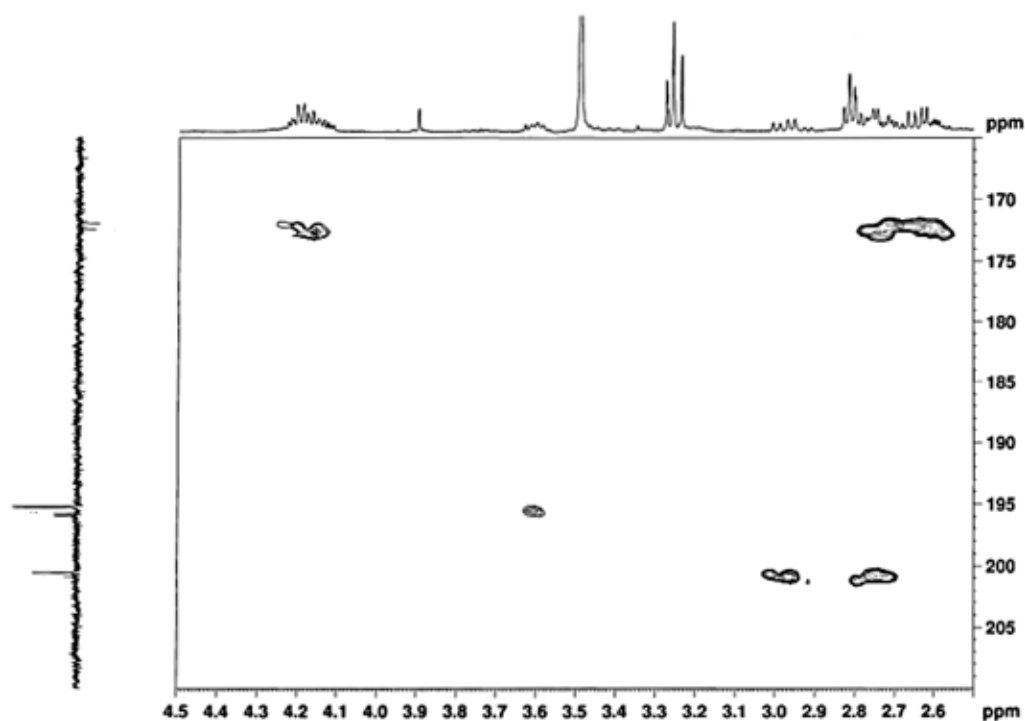


HMBC von Oleocanthal

OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

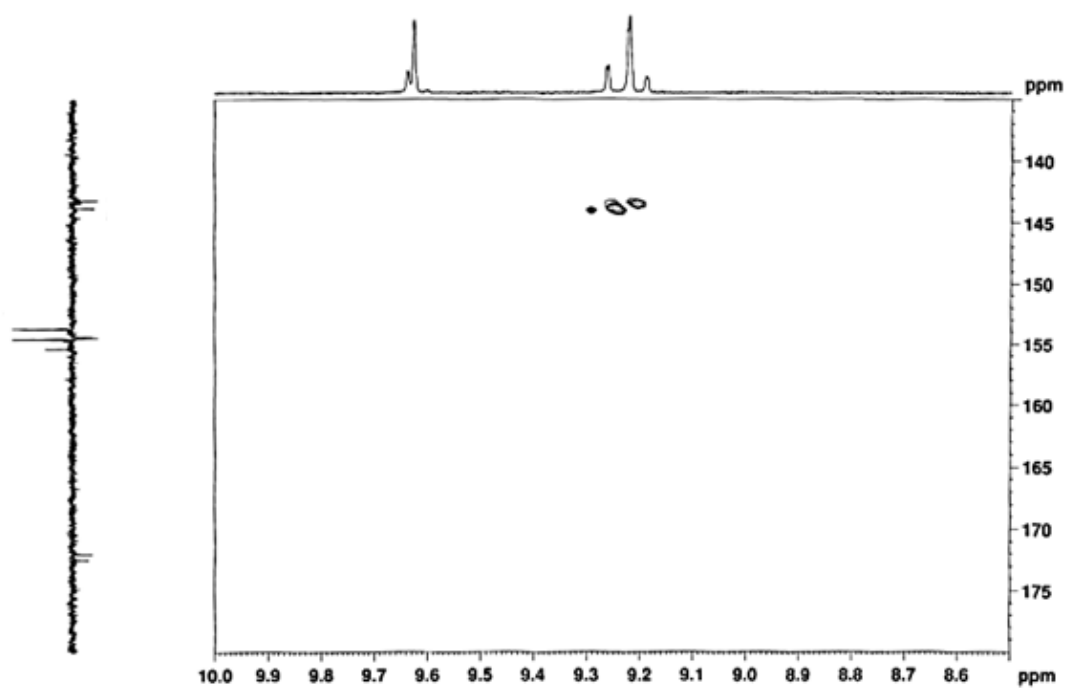


OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

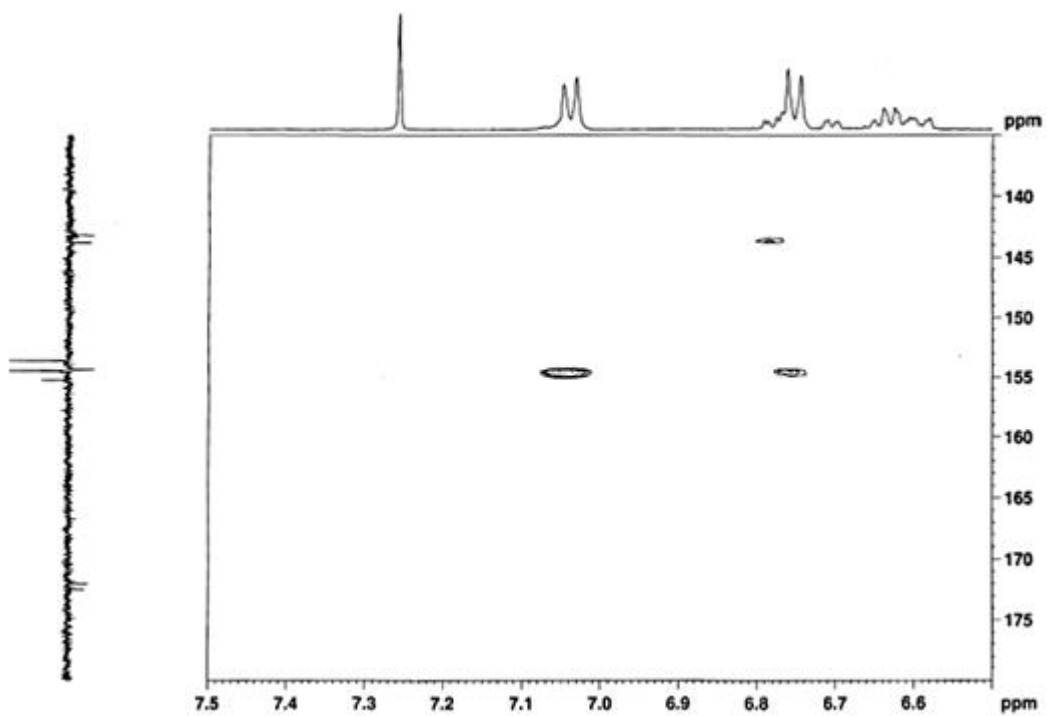


Fortsetzung HMBC

OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

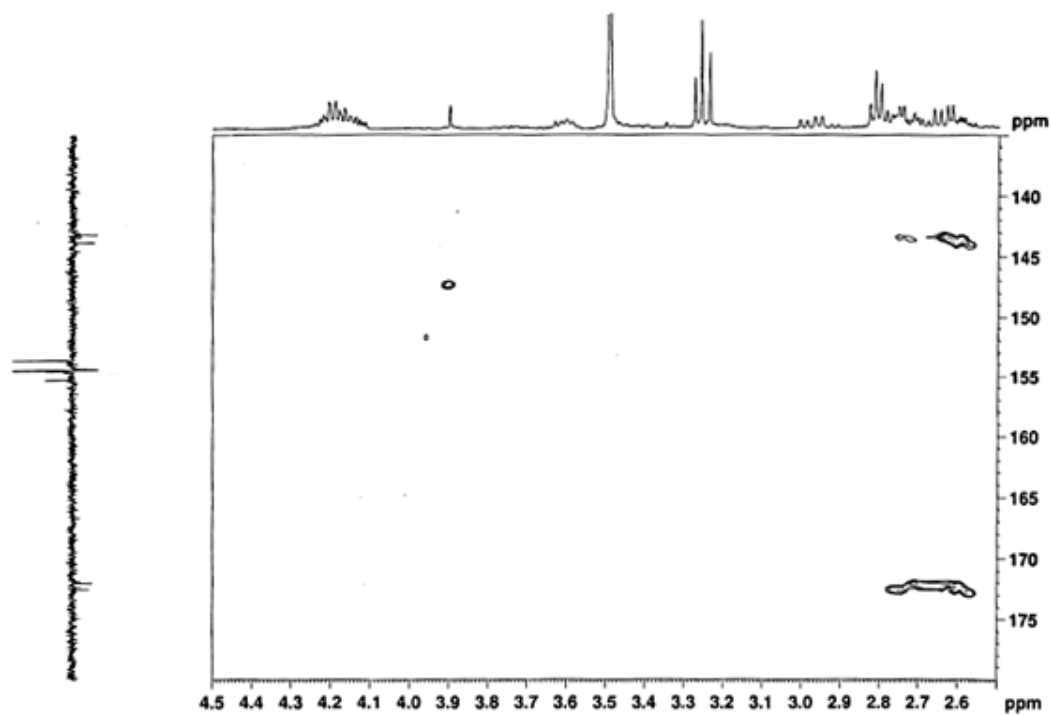


OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

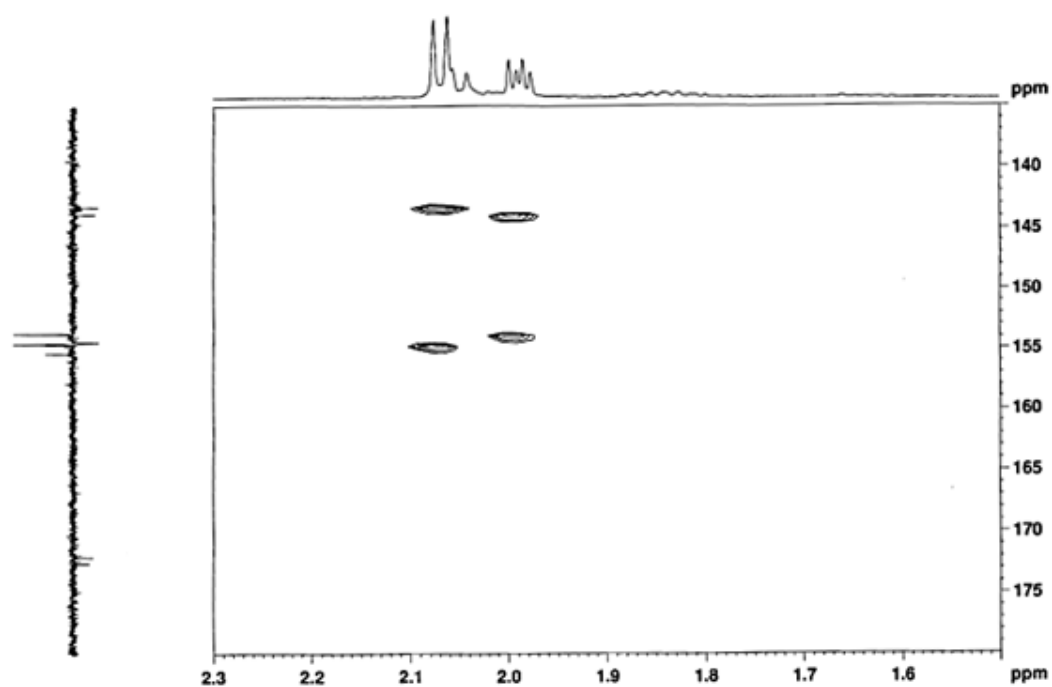


Fortsetzung HMBC

OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

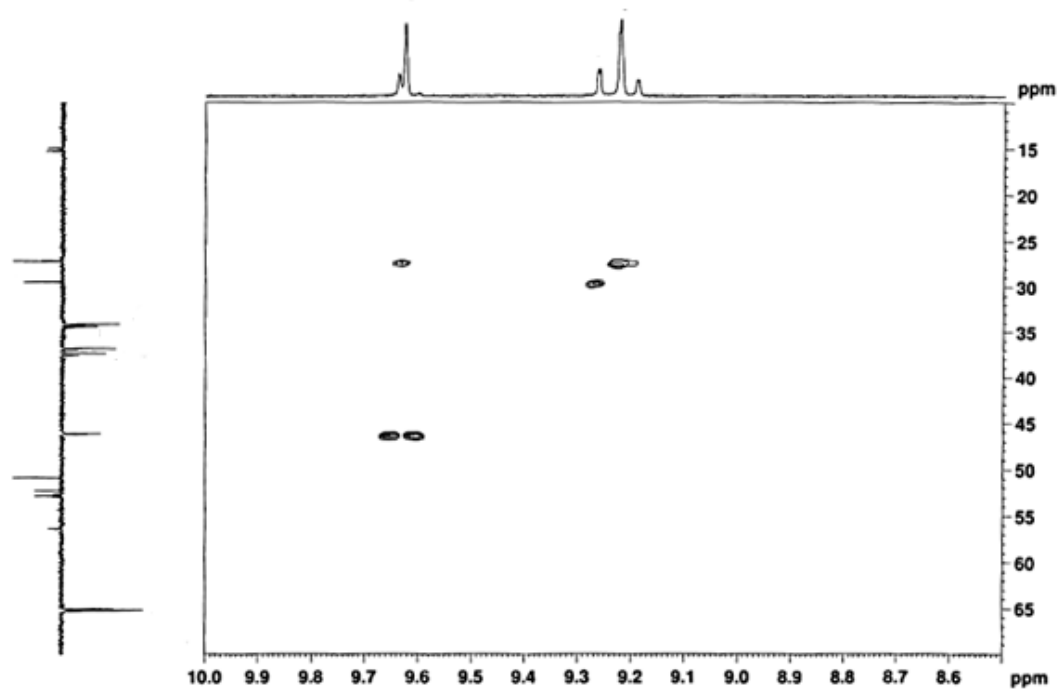


OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

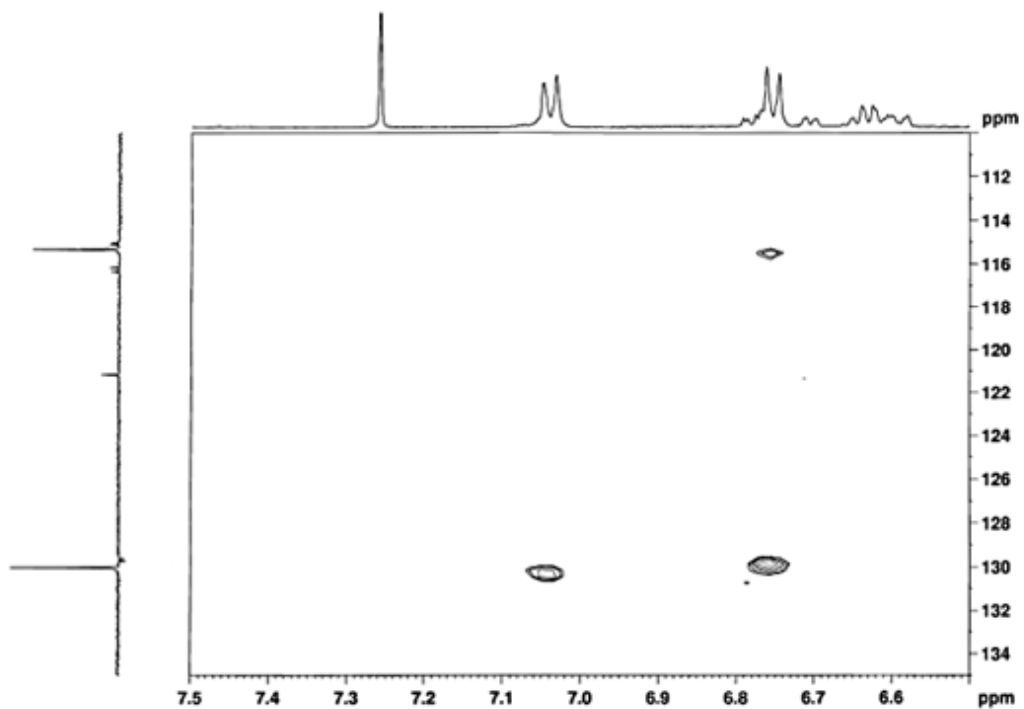


Fortsetzung HMBC

OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

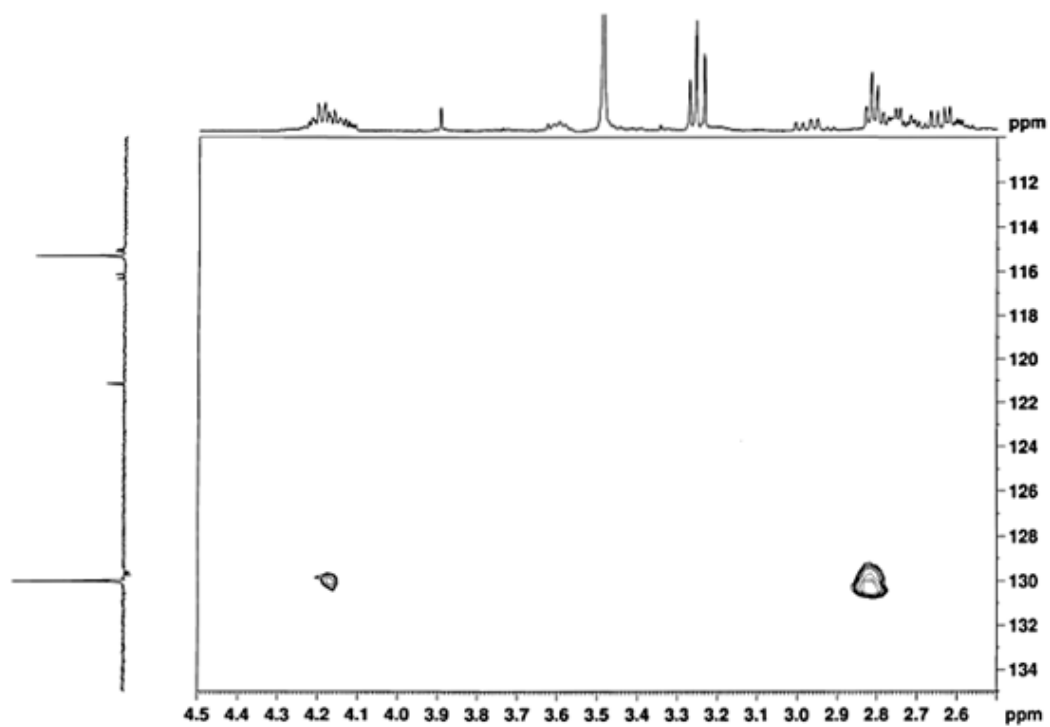


OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

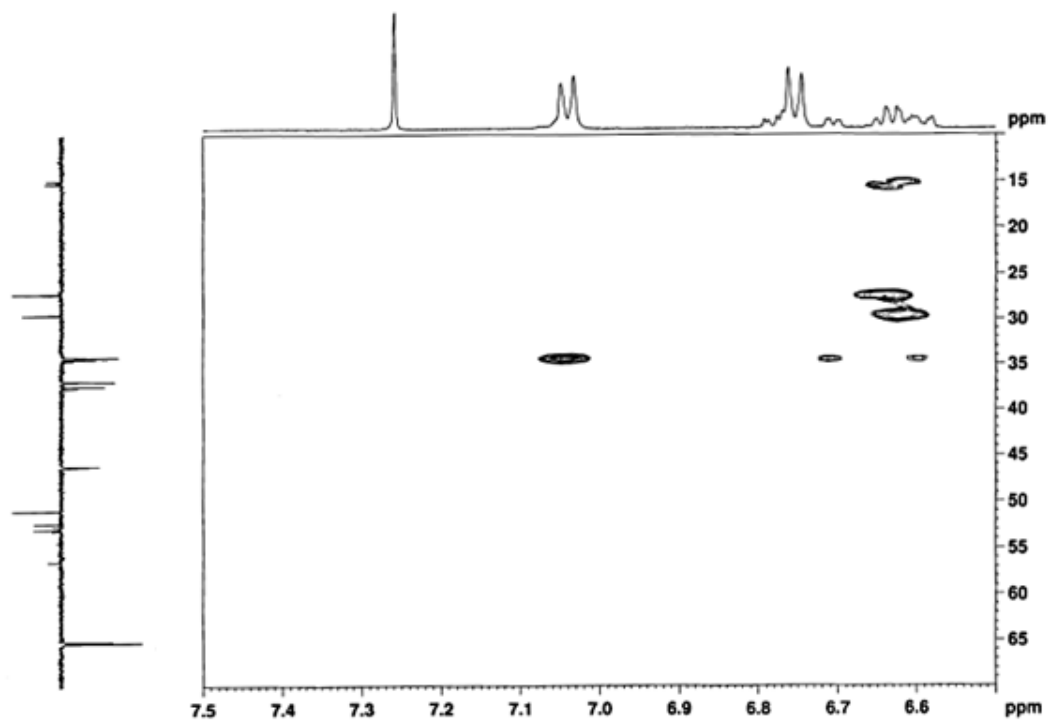


Fortsetzung HMBC

OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

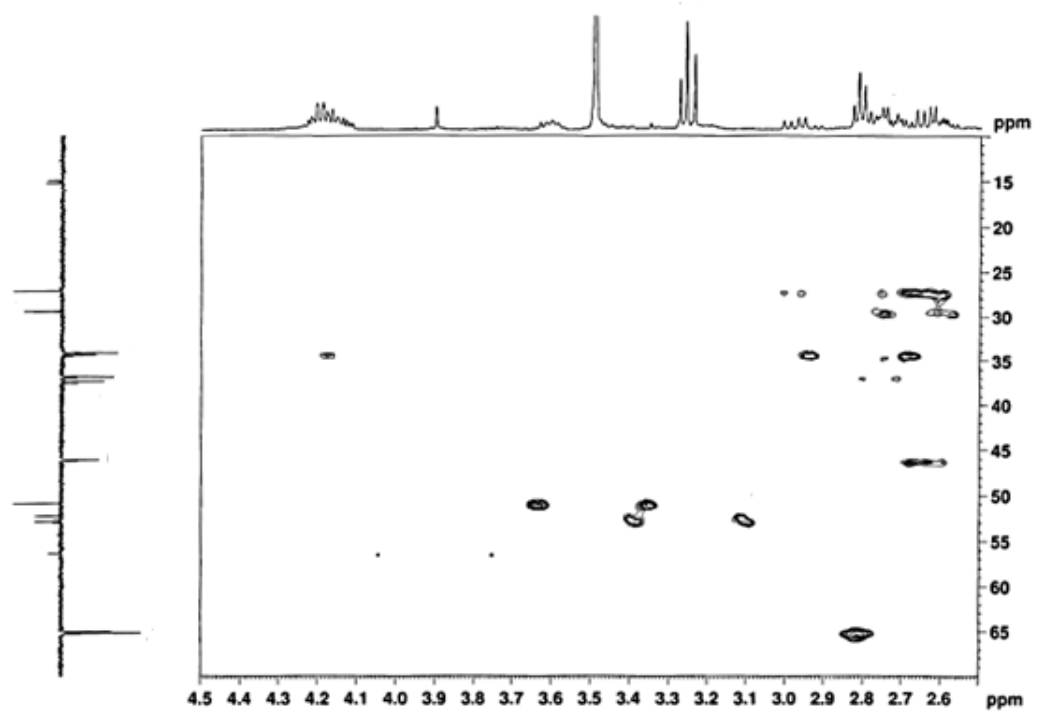


OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

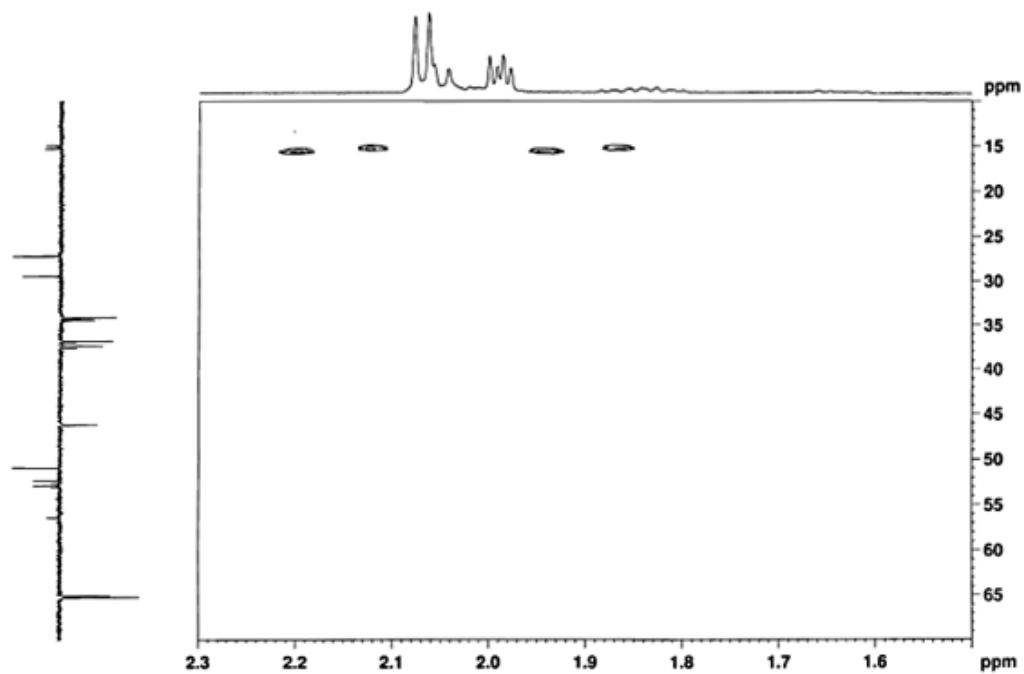


Fortsetzung HMBC

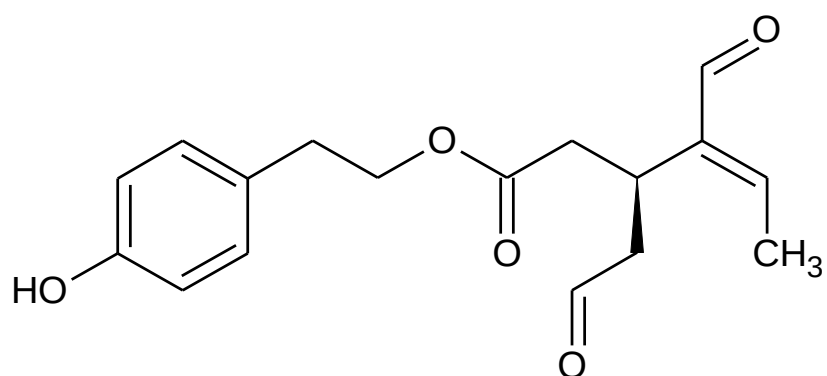
OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012



OLC001 in cdcl3 (HMBC), 6.2.2012

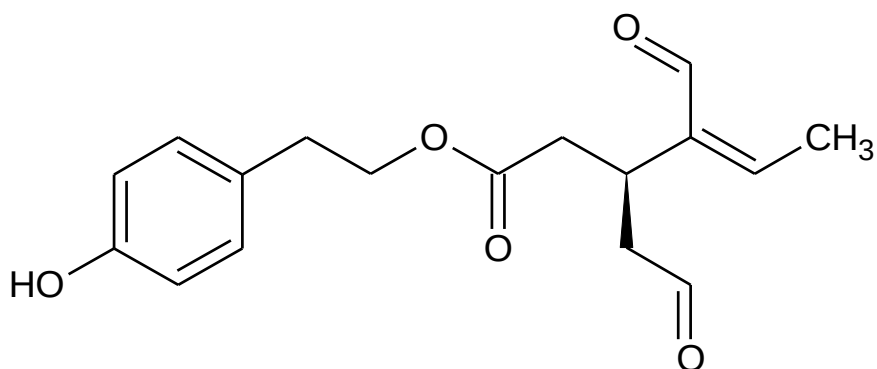


3S/4E-Konfiguration



2-(4-hydroxyphenyl)ethyl (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoate

3S/4Z-Konfiguration



2-(4-hydroxyphenyl)ethyl (4Z)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoate

8. Literaturverzeichnis

- [1] Carl von Linné. Species Plantarum, Impensis Laurentii Salvii, Holmiae 1753, Band 1, S. 8
- [2] Dr.Hans-Jochen Fiebig Qualität und Vermarktung von Olivenölen in der Europäischen Union Max Rubner Institut
<http://www.dgfett.de/material/olivenoel.pdf> (14.5.2013)
- [3] Eugène Leguen de Lacroix Der Olivenölsektor in der Europäischen Union EK, Generaldirektion Landwirtschaft, Europäische Kommission, Juni 2002
http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/oliveoil/2003_de.pdf (14.5.2013)
- [4] Hans-Jochen Fiebig Fettsäurezusammensetzung wichtiger pflanzlicher und tierischer Speisefette und –öle [21.12.2011], Münster, Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V.
<http://www.dgfett.de/material/fszus.php> (14.5.2013)
- [5] G. Montedoro, M. Servili, M. Baldioli, E. Miniati. Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1.Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. J. Agric. Food Chem. 1992, 40, 1571-1576
- [6] G. Montedoro, M. Servili, M. Baldioli, R. Selvaggini, E. Miniati, A. Macchioni. Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. J. Agric. Food Chem. 1993, 41, 2228-2234
- [7] G.K. Beauchamp. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. Nature 2005, 437, 45-46

- [8] F.M. Pirisi, P. Cabras, C.F. Cao, M. Migliorini, M. Muggelli. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1191-1196
- [9] S. Cicerale, P.A.S. Breslin, G.K. Beauchamp and R.S.J. Keast. Sensory Characterization of the Irritant Properties of Oleocanthal, a Natural Anti-Inflammatory Agent in Extra Virgin Olive Oil. *Chem. Senses* 2009, 34, 333–339
- [10] P.A. Breslin, T.N. Gingrich, B.G. Green. Ibuprofen as a chemesthetic stimulus: evidence of a novel mechanism of throat irritation. *Chem. Senses* 2001, 26, 55-65
- [11] A. Iacono, R. Gómez, J. Sperry, J. Conde, G. Bianco, R. Meli, J. J. Gómez-Reino, A.B. Smith III, O. Gualillo. Effect of Oleocanthal and Its Derivatives on Inflammatory Response Induced by Lipopolysaccharide in a Murine Chondrocyte Cell Line. *Arthritis & Rheumatism* 2010, 62, 1675–1682
- [12] W. Li, J. Sperry, A. Crowe, J.B. Trojanowski, A.B. Smith III, V.M. Lee. Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau. *J. Neurochem.* 2009, 110, 1339–1351
- [13] A.B. Smith III, Q. Han, P.A.S. Breslin, G.K. Beauchamp. Synthesis and Assignment of Absolute Configuration of (-)-Oleocanthal: A Potent, Naturally Occurring Non-steroidal Anti-inflammatory and Anti-oxidant Agent Derived from Extra Virgin Olive Oils. *Organic Letters* 2005, 22, 5075 – 5078
- [14] A.B. Smith III, J.B. Sperry, and Q.Han. Syntheses of (-)-Oleocanthal, a Natural NSAID Found in Extra Virgin Olive Oil, the (-)-Deacetoxy-Oleuropein Aglycone, and Related Analogues. *J.Org. Chem.* 2007, 72, 6891-6900

- [15] M.C. Monti, L. Margarucci, A. Tosco, R. Riccio, A. Casapullo. New insights on the interaction mechanism between tau protein and oleocanthal, an extra-virgin olive-oil bioactive component tau. *Food Funct.* 2011, 2, 423
- [16] S. Cicerale, X.A. Conlan, N.W. Barnett, R.S.J. Keast. Storage of extra virgin olive oil and its effect on the biological activity and concentration of oleocanthal. *Food Res. Int.* 2011,50, 597-602
- [17] S. Cicerale. Influence of Heat on Biological Activity and Concentration of Oleocanthal as a Natural Anti-inflammatory Agent in Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1326–1330
- [18] J. Impellizzeri, J. Lin. A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Throat-Burning Oleocanthal with Probed Antiinflammatory Activity in Extra Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 3204-3208

9. Lebenslauf

Dominic Dorfmeister

Geboren am 27.Mai 1988 in Waidhofen a.d. Ybbs/Niederösterreich

Eltern: Karl Dorfmeister (*11.Jänner 1958)

Annegret Dorfmeister (*6.August 1958)

Ausbildung: VS Haag (1994-1998)

Bundesrealgymnasium Amstetten (1998-2006)

Erstinskription: Johannes Kepler Universität Linz SS2007

Inskription Pharmazie: Universität Wien WS2007