



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Optimierung der Isolierung von Oleocanthal

Verfasser

Marco Johannes Stadler

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn



MEINEN ELTERN

## **Danksagung**

Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch danke ich für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes am Departement für Pharmakognosie.

Bei Frau ao. Univ-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn bedanke ich mich ganz besonders für die ausgezeichnete Betreuung während der Diplomarbeit. Ihre stets freundliche und humorvolle Art hat eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Andreas Schinkovitz und Herrn Pharm. D. Hamid-Reza Adhami, die mir immer geduldig mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Studienfreunden bedanken, die mich durch das Studium begleitet haben. Ihr Eifer und ihre Zielstrebigkeit, aber auch ihr Humor, lockerten so manch eintönige Lerneinheit auf und gaben mir viel Motivation und Ausdauer für die Bewältigung dieses Studiums.

## Abkürzungsverzeichnis

AcCN	Acetonitril
bzw.	beziehungsweise
DC	Dünnschichtchromatografie
EtOAc	Ethylacetat
EVOO	Extra virgine olive oil
EW	Einwaage
F	Fraktion
FMS	Fließmittelsystem
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPCCC	High Performance Counter Current Chromatography
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
KG	Kieselgel
MeOH	Methanol
OPF	Olivenölphenolfraktion
OLC	Oleocanthal
Rt	Retention time = Retentionszeit
SC	Säulenchromatografie
SF	Sammelfraktion
z.B.	zum Beispiel

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
2	MATERIAL und METHODEN.....	6
2.1	Material.....	6
2.2	Methoden.....	6
2.2.1	Dünnschichtchromatografie.....	6
2.2.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)....	6
2.2.3	High Performance Counter Current Chromatography) (HPLC).....	7
3	ERGEBNISSE.....	9
3.1	Extraktion.....	9
3.2	Analyse mittels HPLC.....	9
3.3	High Performance Counter Current Chromatography.....	11
3.3.1	Auswahl des Fließmittelsystems.....	12
3.3.2	Trennungen in der analytischen Säule.....	15
3.3.2.1	Lauf 1.....	15
3.3.2.2	Versuche zum Scale-up.....	19
3.3.2.2.1	Lauf 2.....	20
3.3.2.2.2	Lauf 3.....	22
3.3.3	Trennung in der präparativen Säule.....	25
3.3.4	Trennung im Umkehrphasenmodus.....	28
3.3.5	Versuche zur Anreicherung mit geändertem Fließmittel.....	30
3.3.5.1	Trennung im Normalphasenmodus.....	30
3.3.5.2	Trennung im Umkehrphasenmodus.....	31
4	DISKUSSION.....	32

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	34
6	SUMMARY.....	36
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	38
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	41
9	TABELLENVERZEICHNIS .....	42
	CURRICULUM VITAE.....	43



# 1 EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG

Die mediterrane Ernährung findet ihre Wurzeln im antiken Griechenland und im römischen Reich. Die Grundelemente dieser Essgewohnheiten haben sich seit damals nicht wesentlich verändert und bestehen bis in die heutige Zeit [1].

Im antiken Griechenland wurde weitgehend Olivenöl statt Fleisch als Quelle für Fett verwendet, da bereits damals tierisches Fett als ungesunder Nahrungsbestandteil angesehen wurde. Der Verzehr von Oliven und dem daraus gewonnenen Öl wurde erst durch die Besiedelung der Küsten und der damit verbundenen Kultivierung von Olivenbäumen möglich, während nomadische Volksgruppen weiterhin auf Fleisch und Tierprodukte angewiesen waren [2].

Olivenöl wird durch Auspressen von Fruchtfleisch und Kern der Früchte des Olivenbaums *Olea europaea* L. aus der Familie der Oleaceae gewonnen (siehe Abbildung 1).

**Abbildung 1:** *Olea europaea* (Oleaceae) [3]

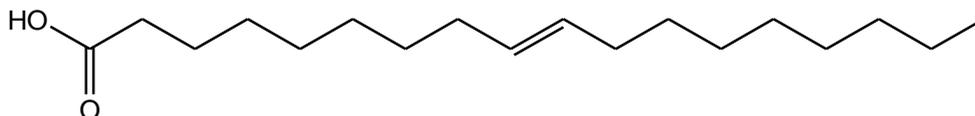


Heute gilt es als gesichert, dass Bewohner des Mittelmeerraumes unter anderem aufgrund ihrer Essgewohnheiten deutlich weniger an kardiovaskulären Erkrankungen, Atherosklerose und einigen Krebsarten leiden und im Vergleich zu Bewohnern anderer Länder von einer höheren Lebenserwartung profitieren [4]. Eine von Allbaugh im Jahr 1953

veröffentlichte Studie über die Bevölkerung der griechischen Insel Kreta konnte dies erstmals an epidemiologischen Daten nachweisen [5]. Eine daraufhin von der World Health Organization finanzierte Studie untersuchte die Essgewohnheiten der Bevölkerung in sieben verschiedenen Ländern (Finnland, Griechenland, Holland, Italien, Japan, Jugoslawien und USA) [6]. Es konnte gezeigt werden, dass es bei den Männern auf der Insel Kreta trotz ihres hohen Konsums an fetthaltiger Nahrung außerordentlich wenige Todesfälle aufgrund von Herz-Kreislaufkrankungen gab. Die klassisch-mediterrane Ernährung beinhaltet diverse Nahrungsmittel, die zu den gesundheitsfördernden Eigenschaften beitragen, wie z.B. Brot, Fisch, sehr viel Obst und Gemüse, moderate Mengen an Rotwein und ein hoher Konsum an Olivenöl von 25-50 ml/Tag [6,7].

Ursprünglich wurden diese positiven Eigenschaften einfach ungesättigten Fettsäuren, wie zum Beispiel Ölsäure, zugeschrieben, deren Anteil bis zu 80% der Fettsäuren in extra-nativem Olivenöl ausmacht (siehe Abbildung 2) [8]. Samenölen, wie zum Beispiel Raps-, Soja- oder Sonnenblumenöl, die ebenfalls reich an einfach ungesättigten Fettsäuren sind, fehlen diese gesundheitsfördernden Eigenschaften. Aguilera et al. [9] und Harper et al. [10] zeigten, dass derartige Öle keinen Effekt auf das Ausmaß an Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL) [9] oder auf Lipoproteinkonzentration und -größe [10] besitzen, ganz im Gegensatz zu extra-nativem Olivenöl. Daher mussten andere Komponenten des extra-nativen Olivenöls von Relevanz sein.

**Abbildung 2:** Ölsäure



Bei weiteren Untersuchungen wurde man auf phenolische Verbindungen aufmerksam. Diese besitzen ein Secoiridoidgrundgerüst, welches mit Tyrosol oder Hydroxytyrosol verestert ist und sind teilweise glucosidiert (siehe Abbildung 3). Im Olivenöl sind insbesondere die Secoiridoide Oleuropein und

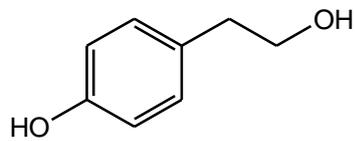
Ligstrosid und deren Derivate sehr intensiv untersucht (siehe Abbildung 4). Diese Verbindungen sind für die Stabilität von Olivenöl gegenüber Oxidation verantwortlich [11]. Deren Aglykone sind sehr empfindliche Halbacetale, die sich sehr leicht in die Form des Dialdehyds umlagern [12]. Im Falle des Oleuropeins kann diese Form auch zum Dihydropyranring isomerisieren [13,14].

Ein im Jahr 2012 veröffentlichter Review [15] fasste die gesundheitsfördernden Effekte von phenolischen Verbindungen aus extra-nativem Olivenöl zusammen. Für diese Komponenten wurde in vitro starke antimikrobielle Aktivität gegen zahlreiche nicht-pathogene und pathogene Bakterienstämme wie zum Beispiel *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* oder *Staphylococcus aureus* nachgewiesen. Es wurde auch eine ausgeprägte antioxidative Wirkung durch Hemmung der Oxidation von Blutkörperchen, Fettsäuren oder oxidativen Prozessen in renalen und intestinalen Zellen durch Hemmung von reactive oxygen species (ROS) gezeigt. Außerdem zeigte sich durch eine Hemmung von Entzündungsmediatoren wie Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Cyclooxygenase I und II, iNO-Synthetase, Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  oder Interleukin-1 $\beta$  eine starke anti-inflammatorische Aktivität.

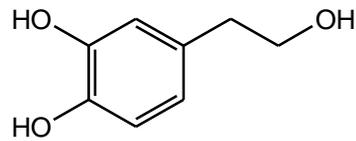
Eine dieser phenolischen Verbindungen, die aufgrund ihrer möglichen gesundheitsfördernden Eigenschaften besonderes Interesse geweckt hat, ist das Aglykon von Decarboxymethyl-Ligstrosid, welches das erste Mal in extra-nativem Olivenöl im Jahre 1993 von Montedoro et al. identifiziert wurde [16]. 2003 berichteten Andrewes et al., dass diese Verbindung für das kratzende Gefühl beim Konsum von Olivenöl verantwortlich sei [17].

Wenige Jahre später konnte gezeigt werden, dass diese Eigenschaft, welche auch von Ibuprofen-haltigen Säften bekannt war, gleichzeitig ein Indikator für eine gemeinsame pharmakologische Wirkung ist. Das Aglykon von Decarboxymethyl-Ligstrosid wurde als potentes natürliches NSAID beschrieben und Oleocanthal genannt [18], wobei die Wortteile oleo- für Olive, -canth- für Stich und -al für Aldehyd stehen (siehe Abbildung 4).

**Abbildung 3:** Alkoholkomponenten in Phenolen in Olivenöl

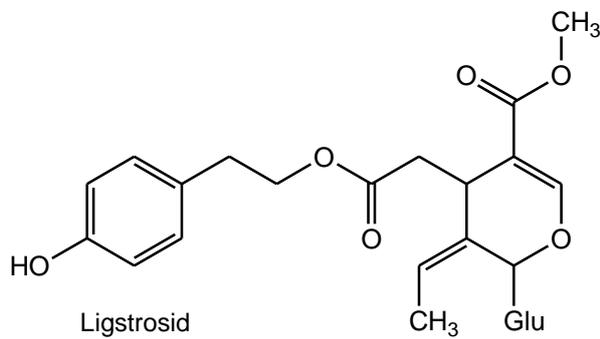


Tyrosol

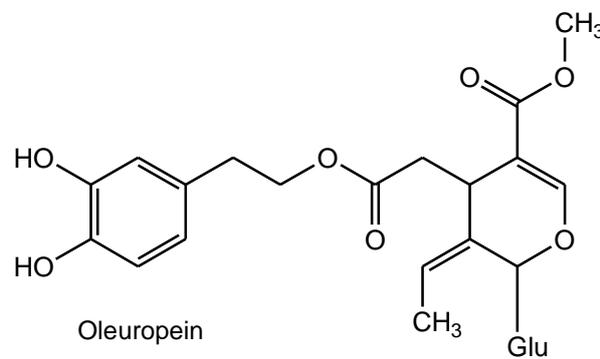


Hydroxytyrosol

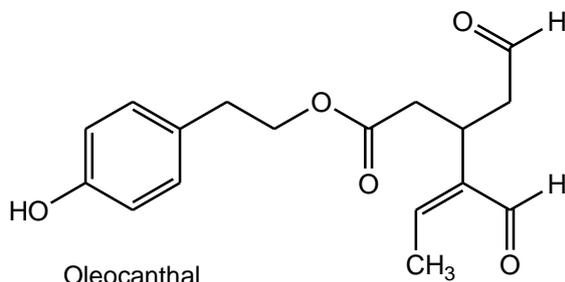
**Abbildung 4:** Secoiridoide in Olivenöl



Ligstrosid



Oleuropein



Oleocanthal

Oleocanthal ist aufgrund zweier Aldehyd-Funktionen eine instabile Verbindung, die an der Luft und unter Einwirkung von UV-Strahlung leicht zu Derivaten umgesetzt wird. Daher muss bei Arbeiten zur Isolierung dieser

Substanz darauf geachtet werden, Extrakte und Fraktionen so wenig wie möglich Luftsauerstoff auszusetzen und unter Stickstoffbegasung zu lagern. Des Weiteren reagiert Oleocanthal empfindlich auf höhere Temperaturen, weswegen jegliche Temperaturerhöhung zu vermeiden ist. Die Verbindung ist kommerziell nicht erhältlich, sondern nur durch Volsynthese oder aus Olivenöl zugänglich. Da die chemische Volsynthese ein mehrstufiges und sehr zeitaufwendiges Verfahren darstellt, ist es von Interesse, geeignete Verfahren zu entwickeln, um Oleocanthal rasch für pharmakologische Tests oder analytische Arbeiten zur Verfügung stellen zu können.

Im Vorfeld hat sich bereits eine Diplomarbeit [19] mit der Isolierung von Oleocanthal beschäftigt. Im Zuge dieser Arbeiten wurde ein Extrakt aus Olivenöl durch Flüssig-Flüssig-Extraktion hergestellt und mittels HPLC eine Methode für die Isolierung von Oleocanthal entwickelt. Allerdings zeigten sich hier Probleme, da Oxidationsprodukte gebildet wurden und ein Scale-up auf die präparative HPLC nicht erfolgreich war. Daher wurden alternative Möglichkeiten zur Isolierung von Oleocanthal gesucht.

Im Zuge dieser Diplomarbeit sollte mittels Counter Current Chromatography eine neue Methode zur Isolierung getestet werden, um Oleocanthal in kurzer Zeit und in möglichst hoher Reinheit gewinnen zu können.

## **2. MATERIAL und METHODEN**

### **2.1 Material**

Als Ausgangsmaterial wurde extra-natives Olivenöl der Marke „Kloster Toplou“ der österreichischen Diskonter-Kette Hofer verwendet, da es vergleichsweise preiswert ist und gezeigt worden war [19], dass es unter den Olivenölen am österreichischen Markt einen der höchsten Gehalte an Oleocanthal besitzt.

Für alle Arbeiten im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Lösungsmittel Acetonitril, n-Hexan, Methanol und Ethylacetat in p.a. Qualität verwendet.

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Dünnschichtchromatografie (DC)**

Stationäre Phase: KG60 F<sub>254</sub> Fertigplatten (Merck)

Schichtdicke 0,25 mm

Größe 10x10 cm

Mobile Phase: Oberphase des Fließmittelsystems Hexan - EtOAc - MeOH - Wasser (5+6+5+6)

Detektion: Die Platte wurde bei Raumtemperatur getrocknet und mit 2%iger Echtblausalz B-Lösung besprüht.

Anschließend wurde 30 Sekunden bei 100°C getrocknet und unter Tageslicht betrachtet.

#### **2.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Pumpe: Shimadzu LC-20AD

Controller: CBM-20A

Detektor: Shimadzu SPD-M20A Diode Array Detektor

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

Mobile Phase: AcCN – H<sub>2</sub>O (1+3)

Durchflussrate: 1ml/min

Laufzeit: 35 Minuten

Purge: 15 Min. mit 80% AcCN

Equilibrierung: 5 Minuten

Temperatur: 25°C

Detektion: 278 nm

### **2.2.3 High Performance Counter Current Chromatography (HPCCC)**

Gerät: DE Spectrum Centrifuge

Pumpe: ECOM Alpha 10+ isocratic pump

Kühlung: H50/H150 Smart Water Chiller

Umdrehungsgeschwindigkeit: 1620 Umdrehungen/min

#### **Bedingungen:**

Lauf 1,2,3:

Analytische Säule

Normalphasenmodus

FMS: Hexan-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (5+6+5+6)

Flussrate: 1ml/min

120 Fraktionen á 1 ml

Lauf 4:

Präparative Säule

Normalphasenmodus

FMS: Hexan-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (5+6+5+6)

Flussrate: 4ml/min

180 Fraktionen á 4 ml

Lauf 5:

Analytische Säule

Umkehrphasenmodus

FMS: Hexan-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (5+6+5+6)

Flussrate 1 ml/min

290 Fraktionen á 1ml

Lauf 6:

Analytische Säule

Normalphasenmodus

FMS: Hexan-MeOH-H<sub>2</sub>O (10+9+1)

Flussrate: 1ml/min

120 Fraktionen á 1ml

Lauf 7:

Analytische Säule

Umkehrphasenmodus

FMS: Hexan-MeOH-H<sub>2</sub>O (10+9+1)

Flussrate: 1ml/min

120 Fraktionen á 1ml

## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Extraktion**

Für die Extraktion der phenolischen Verbindungen wurde eine Extraktionsmethode verwendet, welche in einer vorangegangenen Diplomarbeit erprobt worden war [20].

Zur Extraktion der phenolischen Verbindungen aus Olivenöl wurden insgesamt 7,5 l EVOO in Portionen zu je 0,5 l mit jeweils 0,625 l Methanol-Hexan (4+1) versetzt und 1 Minute kräftig geschüttelt. Danach wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur am Ultraschallbad extrahiert. Die untere Phase wurde abgetrennt und die Extraktion wiederholt. Die phenolhaltigen methanolischen Oberphasen<sup>1</sup> wurden jeweils gesammelt und am Rotavapor bei Raumtemperatur und vermindertem Druck zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol-Wasser (1+1) aufgenommen und mit 3 ml Hexan versetzt, bevor das Gemisch anschließend 10 Minuten lang bei 3500 U/min zentrifugiert wurde. Die untere trübe Phase wurde entnommen und weitere 10 Minuten lang bei 13500 U/min zentrifugiert. Die nun klare untere Phase wurde entnommen und gesammelt.

Nach Beendigung der Extraktion wurde die vereinigte Olivenölphenolfraction (OPF) zur Entfernung des Lösungsmittels lyophilisiert und mit Stickstoff begast, bevor sie bei -80°C unter Sauerstoffausschluss gelagert wurde.

### **3.2 Analyse mittels HPLC**

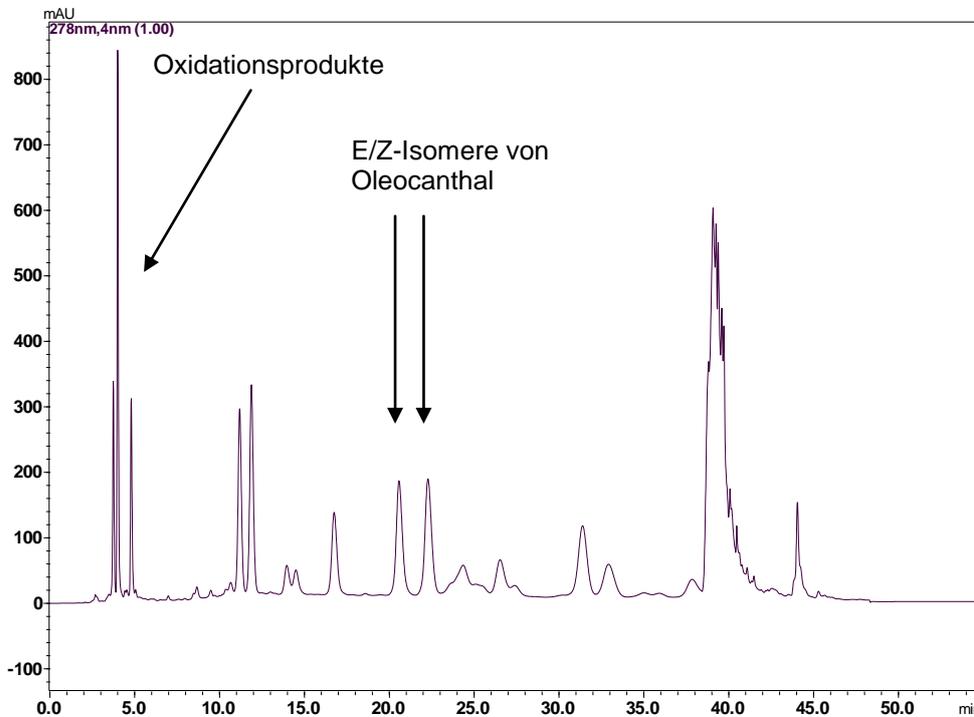
Eine geeignete Methode für die Bestimmung von Oleocanthal war in einer vorangegangenen Diplomarbeit [19] optimiert worden. Dabei wurde festgestellt, dass die aufgereinigte OLC-Fraktion aus zwei Verbindungen bestand, offensichtlich E/Z-Isomere [20], die nicht getrennt werden konnten. Für die Analyse wurden 10 mg von OPF in 1 ml MeOH gelöst. 20 µl wurden in die HPLC injiziert. Der Lauf wurde gemäß den Angaben unter 2.2.2 (siehe Seite 6 f) durchgeführt.

Das Chromatogramm zeigte die beiden OLC-Isomere bei Retentionszeiten

---

<sup>1</sup> Aufgrund der hohen Dichte des Olivenöls ist die apolare Phase hier die Unterphase

von ca. 20,5 und 22 Minuten. Weiters wurden Oxidationsprodukte detektiert, die zu Beginn bei einer Rt von etwa 4 Minuten eluiert wurden (siehe Abbildung 5).

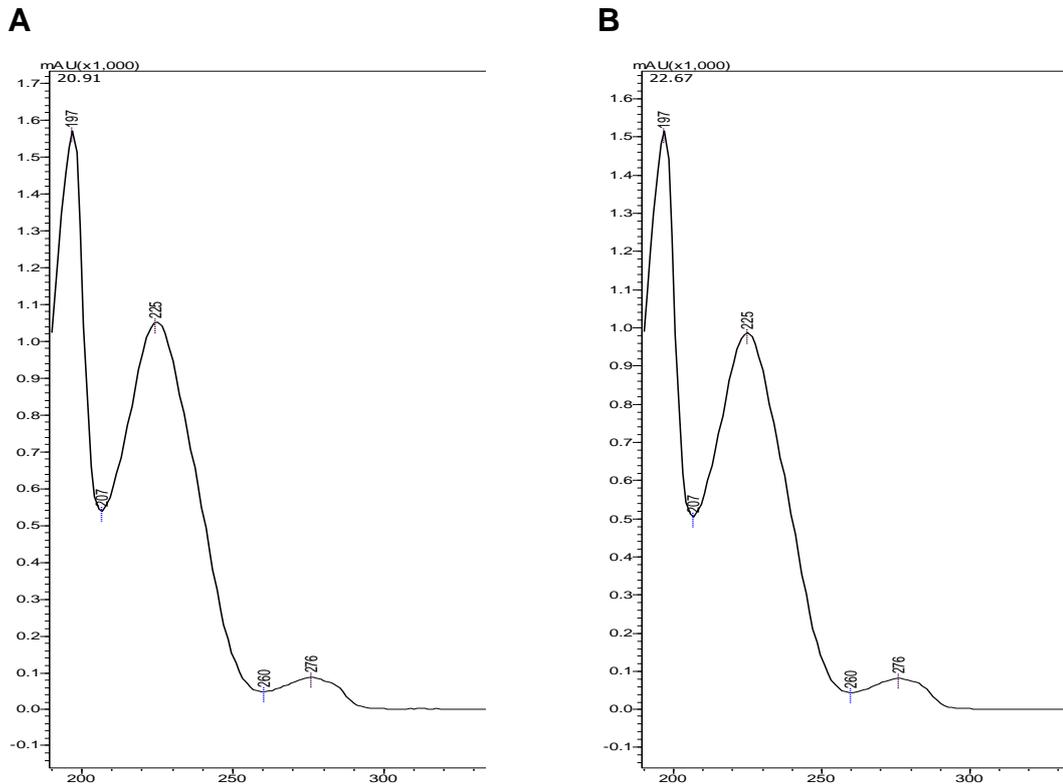


**Abbildung 5:** Chromatogramm des OPF-Lyophilisats des Öls der Marke „Kloster Toplou“

Bedingungen siehe 2.2.2, Seite 6 f

Das UV/VIS-Spektrum von OLC zeigt charakteristische Absorptionsmaxima bei ca. 225nm und 276nm, während Minima bei ca. 205nm und 260nm zu sehen sind (siehe Abbildung 5).

**Abbildung 6:** UV-Spektren der OLC-Peaks bei Rt 20,91 (A) und Rt 22,67 (B)



### 3.3 High Performance Counter Current Chromatography (HPCCC)

In einer vorangegangenen Diplomarbeit [19] konnte OLC mittels präparativer HPLC angereichert werden. Allerdings zeigten sich auch die Grenzen der HPLC. Bei den Analysen entstanden durch die Anreicherung an der analytischen Säule Oxidationsprodukte, die nicht von OLC abgetrennt werden konnten, beziehungsweise immer wieder nachgebildet wurden. Versuche zur Trennung auf einer präparativen Säule waren nicht erfolgreich gewesen.

Im Zuge dieser Diplomarbeit sollte die Qualität der Auftrennung der OPF mittels High Performance Counter Current Chromatography (HPCCC) untersucht werden. Diese basiert auf dem Prinzip der Flüssig-Flüssig-Verteilung, sowohl die mobile als auch die stationäre Phase sind flüssig. Die HPCCC besitzt eine Reihe von Vorteilen gegenüber der HPLC oder SC. Aufgrund des fehlenden festen Trägers kann es zu keiner irreversiblen

Adsorption von Substanzen kommen, wodurch auch empfindliche Substanzen nicht denaturiert werden können. Die Trennzeiten liegen bei etwa 2-8 Stunden und sind somit im Vergleich zu anderen Trennmethoden verkürzt [21]. Das Substanzgemisch wird nach Injektion unter Einwirkung von Zentrifugalkräften zwischen den beiden Phasen aufgetrennt. Es wurde ein Multi Layer Coil-System verwendet.

### **3.3.1 Auswahl des Fließmittelsystems**

Die Auftrennung mittels HPCCC ist von der Wahl des Fließmittelsystems (FMS) abhängig, daher musste zu Beginn ein optimales System ermittelt werden.

Basierend auf dem sogenannten HEMWAT-System (Hexan, Ethylacetat, Methanol, Wasser) [22] (Tabelle 1, siehe Seite 13) werden je nach erforderlicher Polarität unterschiedliche Anteile der vier vorgegebenen Lösungsmittel verwendet. Hierfür werden, dem jeweiligen System entsprechend, die unterschiedlichen Mengen der Lösungsmittel vereinigt und am Scheidetrichter ausgeschüttelt. Nachdem sich das Zwei-Phasen-System eingestellt hat, werden die Unter- und die Oberphase getrennt.

**Tabelle 1: HEMWAT-System [22]**

Fließmittelsystem		Hexan	EtOAc	MeOH	Wasser
1		0	0	0	5
2		0	1	0	5
3		0	2	0	5
4		0	3	0	5
5		0	4	0	5
6		0	1	0	5
7		1	19	1	19
8		1	9	1	9
9		1	6	1	6
10		1	5	1	5
11		1	4	1	4
12		1	3	1	3
13		2	5	2	5
14		1	2	1	2
15		2	3	2	3
16		5	6	5	6
17		1	1	1	1
18		6	5	6	5
19		3	2	3	2
20		2	1	2	1
21		5	2	5	2
22		3	1	3	1
23		4	1	4	1
24		5	1	5	1
25		6	1	6	1
26		9	1	9	1
27		19	1	19	1
28		1	0	1	0

polar



apolar

Im Normalphasenmodus wird die untere polare Phase als stationäre Phase verwendet und die obere Phase als mobile Phase, im Umkehrphasenmodus

wird die untere polare Phase als mobile Phase verwendet und die obere Phase als stationäre Phase.

Um zu eruieren, welches FMS am besten geeignet ist, musste der Verteilungskoeffizient  $K$  wie folgt bestimmt werden:

Es wurden jeweils 25 mg OPF in 2 ml des zu testenden FMS gelöst und die Unter- und Oberphase anschließend eingedampft. Die Rückstände wurden in jeweils 1 ml MeOH gelöst und 20  $\mu$ l mittels HPLC analysiert.

$$K = \frac{C_{UP}}{C_{OP}} \quad 0,5 \leq D \leq 2$$

### Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

$C_{UP}$ : Konzentration in der unteren Phase

$C_{OP}$ : Konzentration in der oberen Phase

Der Verteilungskoeffizient ergibt sich als Quotient aus der Konzentration von Oleocanthal in der unteren Phase und der Konzentration in der oberen Phase. Der Wert sollte zwischen 0,5 und 2 liegen, das bedeutet, dass in einer Phase nicht mehr als das Doppelte der Zielsubstanz gelöst sein sollte als in der anderen Phase.

Tabelle 2 zeigt unterschiedliche FMS des HEMWAT-Systems, die getestet wurden, und ihre jeweiligen Verteilungskoeffizienten für OLC.

**Tabelle 2:** Verteilung von Oleocanthal in ausgewählten FMS

Fließmittelsystem	Verteilungskoeffizient D
20	72
23	467
12	0,02
13	0,1
14	0,2
16	0,85

Das System 16 hat sich als optimal erwiesen, da der Verteilungskoeffizient im erforderlichen Bereich lag.

### 3.3.2 Trennungen in der analytischen Säule

Für diese Trennungen wurde die analytische Säule verwendet, welche ein Säulenvolumen von 32 ml besitzt.

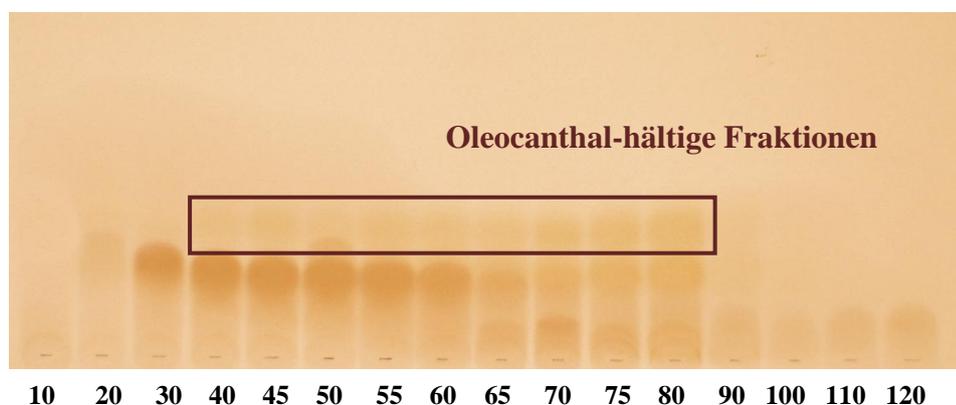
#### 3.3.2.1 Lauf 1

Für Lauf 1 wurden 100 mg OPF in 3 ml des FMS gelöst und in die HPCCC injiziert. Die Parameter des Laufs sind unter 2.2.3 (siehe Seite 7) aufgelistet. Die eluierten Fraktionen wurden mittels Fraktionssammler aufgefangen, wobei pro Fraktion 1 ml gesammelt wurde. Insgesamt wurden 120 Fraktionen und ein Nachlauf von 30 ml gesammelt.

Da die verwendete HPCCC-Säule ein Totvolumen von etwa 10 ml besitzt, wurde ab Fraktion 10 jede zehnte beziehungsweise jede fünfte Fraktion mittels Dünnschichtchromatografie analysiert (siehe Abbildung 7). Hierfür wurden 10 µl der Fraktion auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Als mobile Phase wurde die Oberphase des FMS Hexan + EtOAc + MeOH + H<sub>2</sub>O (5+6+5+6) verwendet.

#### Abbildung 7: DC der Fraktionen von Lauf 1

Bedingungen siehe 2.2.1, Seite 6



OLC wurde zwischen den Fraktionen 40 und 80 eluiert. Nach Anfärbung der Phenole mit Echtblausalz B wurde OLC in der Dünnschichtchromatografie

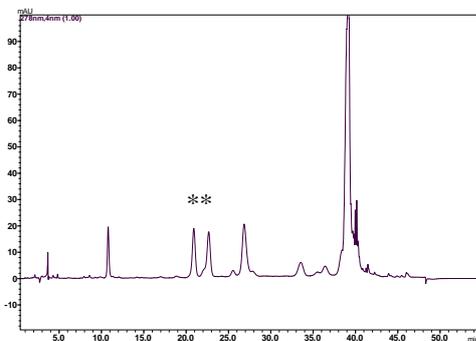
bei einem  $R_f$ -Wert von ca. 0,35 detektiert.

Anschließend wurden die Fraktionen mittels Stickstoffbegasung zur Trockene eingengt und in 1 ml MeOH aufgenommen.

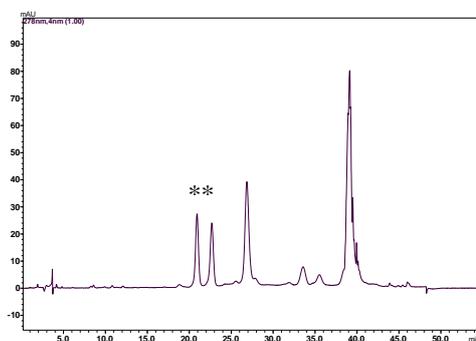
Um die Trennleistung der HPCCC genauer zu überprüfen und die OLC-Anteile abschätzen zu können, wurden 10  $\mu$ l der OLC-haltigen Fraktionen mittels HPLC analysiert (siehe Abbildung 8).

**Abbildung 8:** HPLC-Chromatogramme der OLC-Fraktionen von Lauf 1  
Bedingungen siehe 2.2.2, Seite 6 f

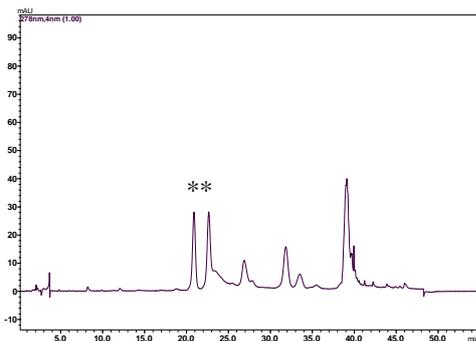
\*\* OLC-Isomere



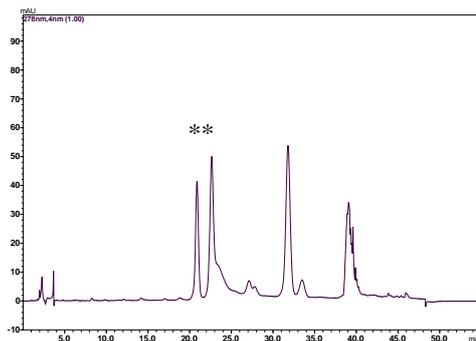
**F 40**



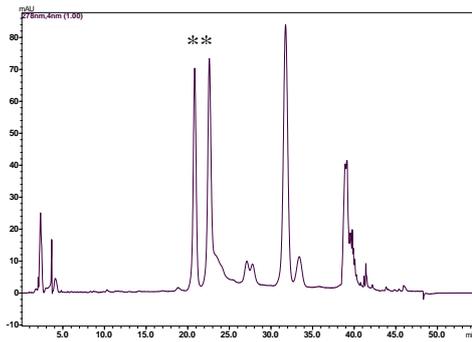
**F 45**



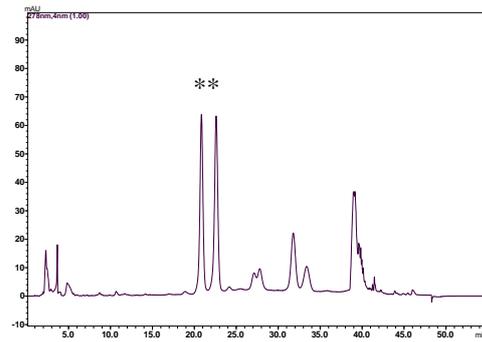
**F 50**



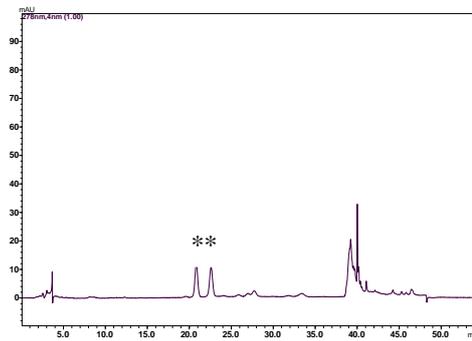
**F 55**



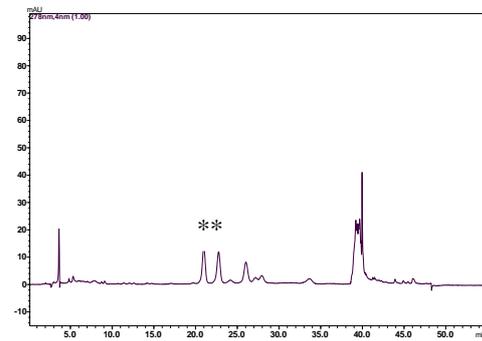
**F 60**



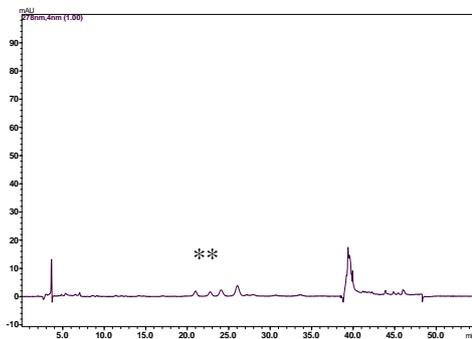
**F 65**



**F 70**



**F 75**



**F 80**

Die HPLC-Chromatogramme jener Fraktionen, in denen Oleocanthal enthalten war, zeigten die Peaks der beiden OLC-Isomere bei einer Rt von etwa 21 und 22,5 Minuten. Die höchsten Anteile der beiden Komponenten wurden zwischen den Fraktion 60 und 65 erzielt, sie betragen hier zwischen 36 und 38% der Gesamtfraktion.

Entsprechend ihrer Zusammensetzung wurden die Fraktionen zu Sammelfractionen (SF) vereint. Die erhaltenen SF wurden am Rotavapor

eingengt und das Trockengewicht bestimmt. Weiters wurde anhand der Chromatogramme der erzielte Anteil an OLC berechnet (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Trockengewicht und OLC-Anteil der SF von Lauf 1

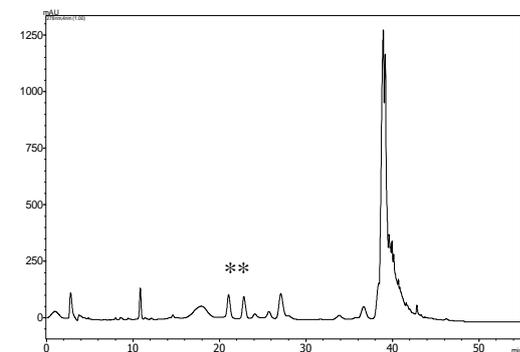
SF	Fraktionen	Gewicht [mg]	OLC-Anteil [%]
1	9-19	0,09	-
2	20-28	0,33	-
3	29-38	0,27	-
4	39-50	3,59	5,1
5	51-60	6,66	19,2
6	61-75	10,23	29,4
7	76-86	14,97	30,8
8	87-120	3,69	12,4
9	Nachlauf	5,73	-

Die SF wurden in 1 ml MeOH aufgenommen und 10 µl mittels HPLC analysiert (siehe Abbildung 9). Die am stärksten polaren Anteile der OPF verblieben in der stationären Phase und wurden nicht gesammelt.

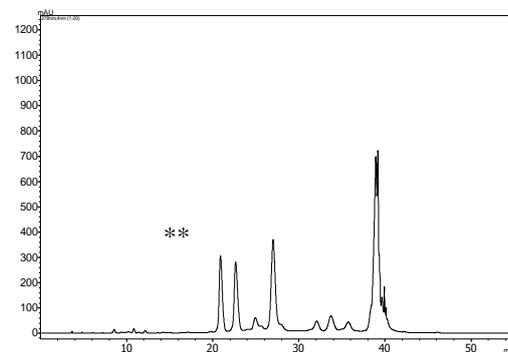
**Abbildung 9:** HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 1

Bedingungen siehe 2.2.2, Seite 6 f

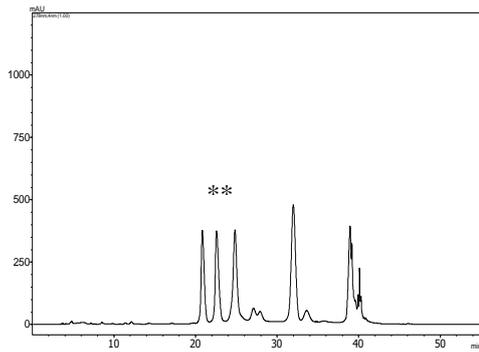
\*\* OLC-Isomere



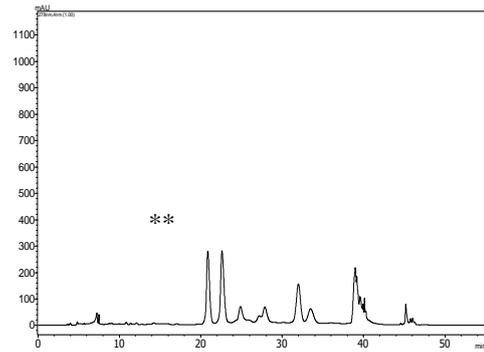
**SF 4**



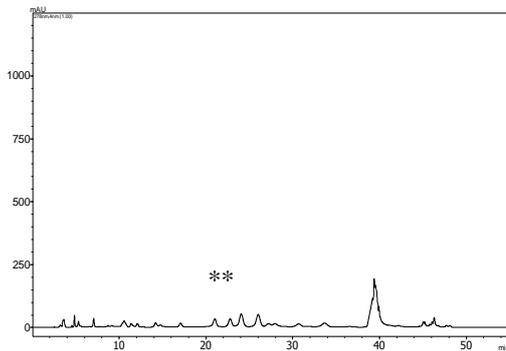
**SF 5**



**SF 6**



**SF 7**



**SF 8**

Neben OLC zeigten sich in den Chromatogrammen der SF weitere Komponenten mit höherer Retentionszeit (siehe Abbildung 9).

### 3.3.2.2 Versuche zum Scale-up

Da durch die Auftrennung der OPF mittels HPCCC der OLC-Anteil mit lediglich einem Aufreinigungsschritt auf ca. 31% erhöht werden konnte, wurden nun weitere HPCCC-Läufe mit einer größeren Probenmenge durchgeführt.

In den Versuchen zum „Scale-up“ wurde Lauf 2 mit 200 mg OPF und Lauf 3 mit 400 mg durchgeführt, wobei beide Probenmengen in jeweils 3 ml FMS gelöst wurden. Damit sollte getestet werden, inwieweit die Trennkapazität der analytischen Säule auch für größere Probenmengen ausreicht, um eine ähnlich gute Trennung erzielen zu können wie mit 100 mg Ausgangsmenge.

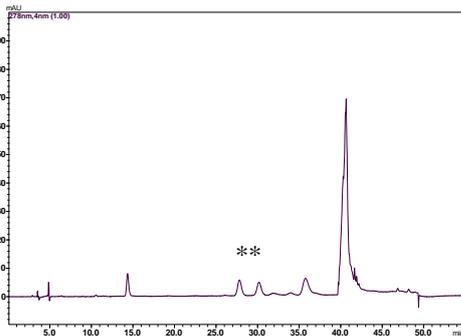
### 3.3.2.2.1 Lauf 2

In Lauf 2 wurden 200 mg OPF mittels HPCCC analysiert (Bedingungen siehe Seite 7).

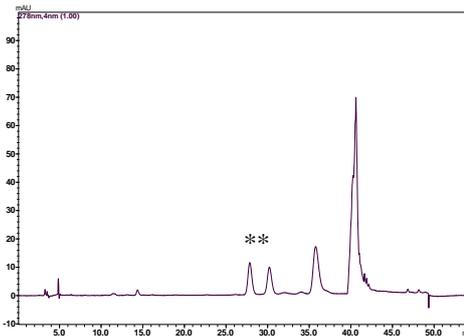
**Abbildung 10:** HPLC-Chromatogramme der OLC-Fractionen von Lauf 2

Bedingungen siehe 2.2.2, Seite 6 f

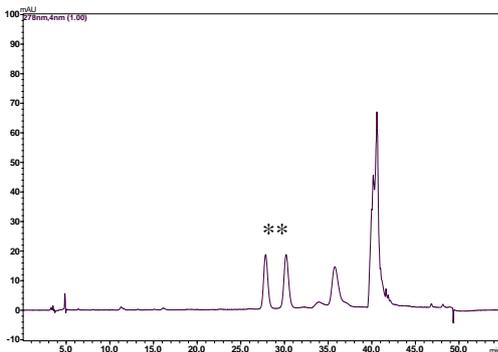
\*\* OLC-Isomere



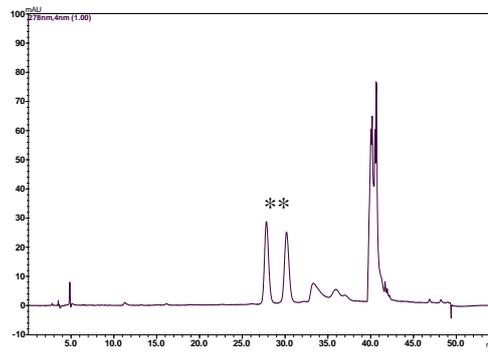
**F 50**



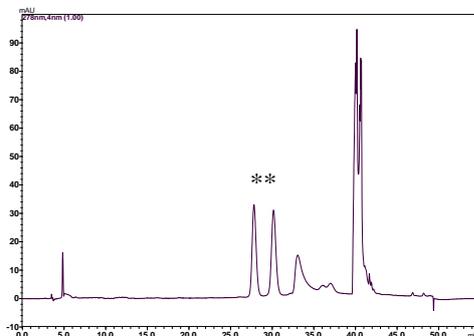
**F 55**



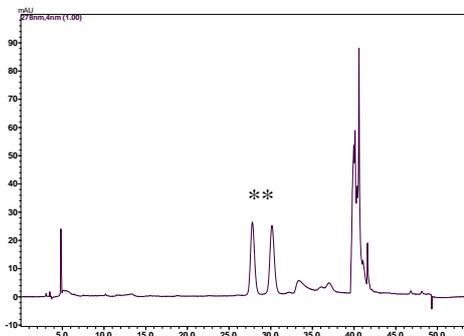
**F 60**



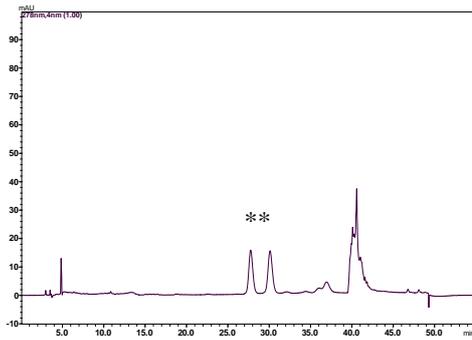
**F 65**



**F 70**



**F 75**



## F 80

Im Lauf 2 wurde OLC zwischen den Fraktionen 50 und 80 eluiert. Die beste Anreicherung wurde in den Fraktionen 70 und 75 erzielt. Der Anteil an OLC betrug zwischen 30 und 32 %.

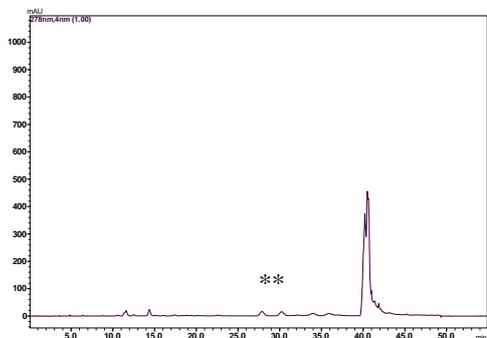
**Tabelle 4:** Trockengewicht und OLC-Anteil der SF von Lauf 2

SF	Fraktionen	Menge [mg]	OLC-Anteil [%]
1	10-39	36,6	-
2	40-49	21,1	2,1
3	50-59	11,6	8,6
4	60-85	24,7	29,3
5	86-120	9,0	-
6	Nachlauf	3,2	-

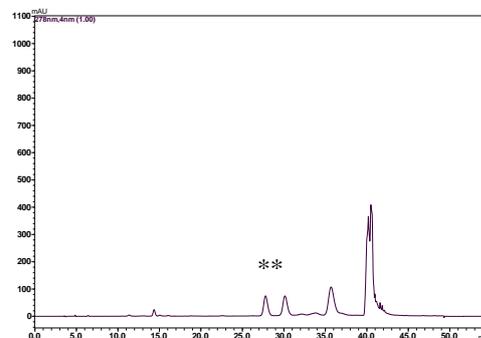
**Abbildung 11:** HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 2

Bedingungen siehe 2.2.2, Seite 6 f

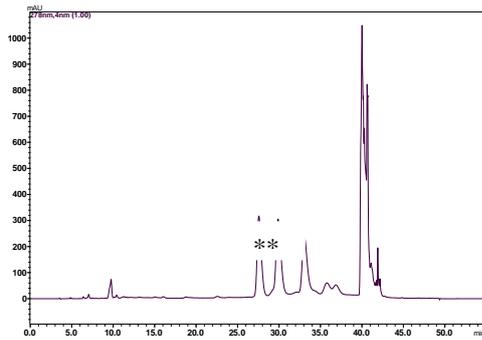
\*\* OLC-Isomere



**SF 2**



**SF 3**



## SF 4

In den OLC-haltigen SF von Lauf 2 waren Begleitstoffe, die mit kürzerer Rt als die beiden OLC-Peaks in der HPLC-Analyse eluiert wurden, größtenteils abgetrennt. Der größte Anteil an OLC wurde in der SF 4 mit ca. 29% detektiert.

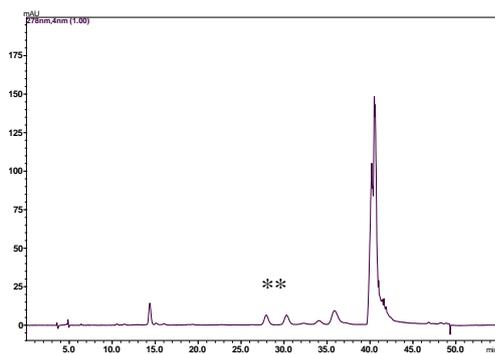
### 3.3.2.2.2 Lauf 3

Für Lauf 3 wurden 400 mg OPF als Ausgangsmenge in die HPCCC eingebracht (Bedingungen für Lauf 3 siehe Seite 7).

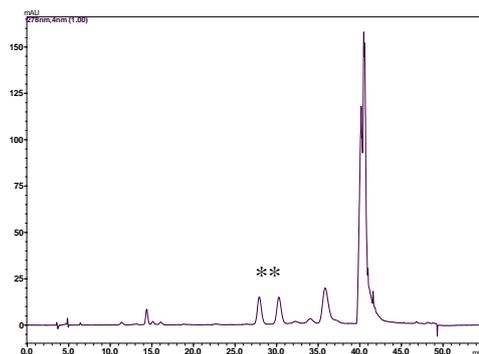
## Abbildung 12: HPLC-Chromatogramme der OLC-Fractionen von Lauf 3

Bedingungen siehe 2.2.2, Seite 6 f

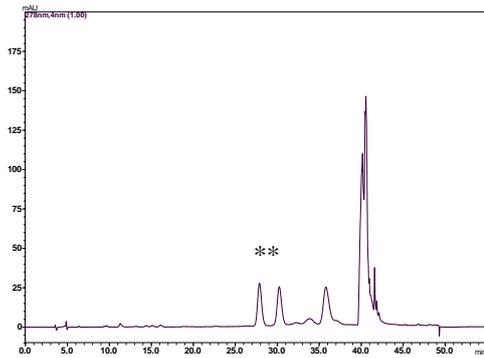
\*\* OLC-Isomere



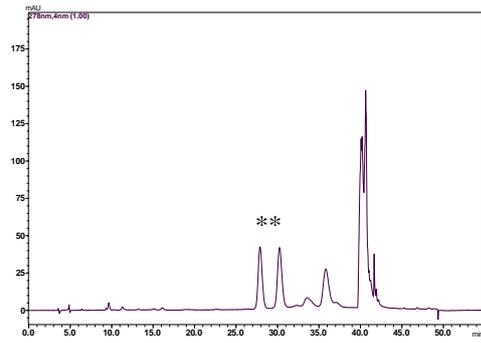
## F 55



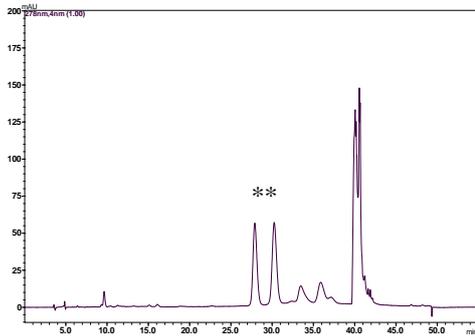
## F 60



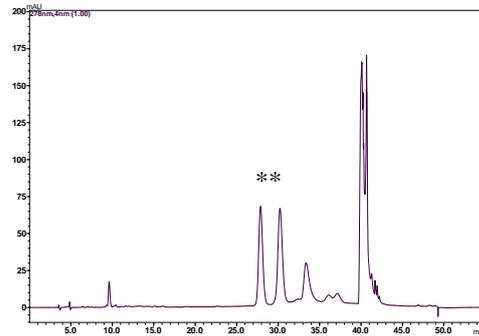
**F 65**



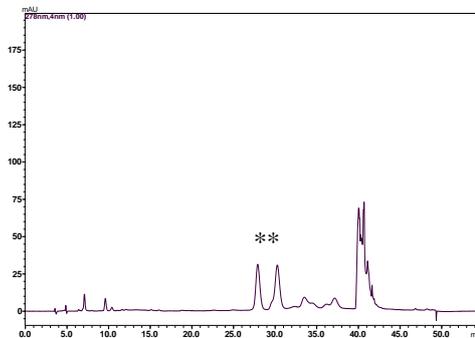
**F 70**



**F 75**



**F 80**



**F 90**

OLC wurde im Lauf 3 zwischen den Fraktionen 55 und 90 eluiert. Die größte Reinheit wurde in den Fraktionen 75 bis 80 erzielt. Sie betrug zwischen 27 und 29 %. Oxidationsprodukte konnten größtenteils abgetrennt werden.

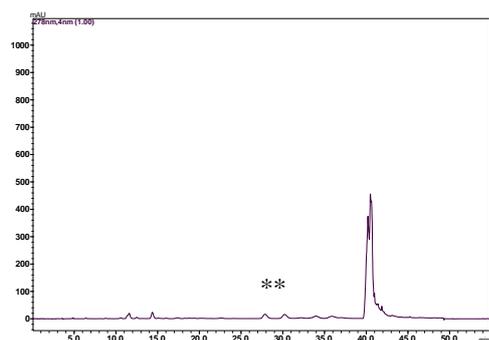
**Tabelle 5:** Trockengewicht und OLC-Anteil der SF von Lauf 3

SF	Fraktionen	Gewicht [mg]	OLC-Anteil [%]
1	10-39	109,6	-
2	40-49	23,0	3,1
3	50-59	27,4	10,9
4	60-85	103,9	28,3
5	86-120	38,9	-
6	Nachlauf	24,9	-

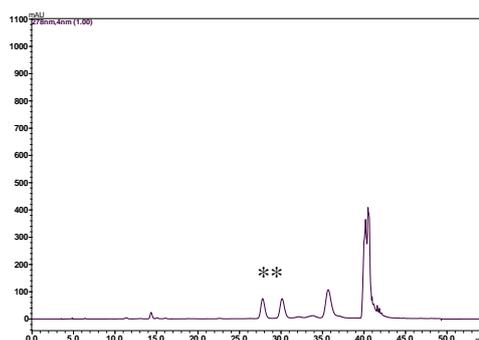
**Abbildung 13:** HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 3

Bedingungen siehe 2.2.2 (siehe Seite 6)

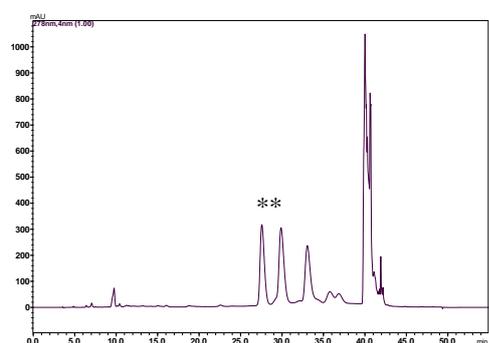
\*\* OLC-Isomere



**SF 2**



**SF 3**



**SF 4**

Auch in den OLC-haltigen SF des Lauf 3 konnten polare Nebenprodukte größtenteils entfernt werden. Die SF 4 wies einen OLC-Anteil von ca. 28% auf.

### 3.3.3 Trennung in der präparativen Säule

Da die Auftrennung mittels HPCCC unter Verwendung der analytischen Säule in kurzer Zeit gute Ergebnisse für Probenmengen von bis zu 400 mg geliefert hatte, wurden in weiterer Folge Versuche zur Auftrennung auf der präparativen Säule unternommen. Diese Säule wies ein Volumen von 140 ml auf. Die Bedingungen im Vergleich zum analytischen Modus unterschieden sich in folgenden Punkten:

Es wurden für Lauf 4 1000 mg OBF in 10 ml des FMS gelöst (Bedingungen siehe Seite 7). Um abschätzen zu können, zu welcher Retentionszeit OLC aus der präparativen Säule näherungsweise eluiert würde, wurde die spezielle Formel nach Schaufelberger [22] herangezogen, mit der die Retentionszeit der analytischen Säule umgerechnet werden konnte.

Formel zur Umrechnung der  $R_t$  von analytischer auf präparative Säule:

$$K = \frac{(T \frac{F}{Vol_c} - 1)}{SF} + 1$$

<b>K:</b>	Verteilungskoeffizient
<b>T:</b>	Retentionszeit (min)
<b>F:</b>	Flussrate (ml/min)
<b>Vol<sub>c</sub>:</b>	Säulenvolumen
<b>SF:</b>	Totvolumen

Um die Retentionszeit T auszudrücken, wurde der Verteilungskoeffizient K mittels folgender Parameter aus den Läufen auf der analytischen Säule bestimmt:

- <b>T:</b>	40 min
- <b>F:</b>	1 ml/min
- <b>Vol<sub>c</sub>:</b>	32 ml
- <b>SF:</b>	10 ml

Der auf diesen Parametern beruhende Verteilungskoeffizient K betrug

gerundet 1,04. Für die Berechnung der Retentionszeiten an der präparativen Säule wurden folgende Parameter eingesetzt:

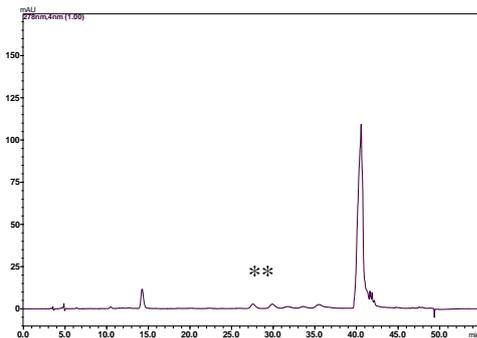
- **K:** 1,04
- **F:** 4 ml/min
- **Vol<sub>c</sub>:** 140 ml
- **SF:** 28 ml

Die Retentionszeit, bei der OLC zu erwarten war, betrug bei einer Flussrate von 4 ml/min etwa 74 min.

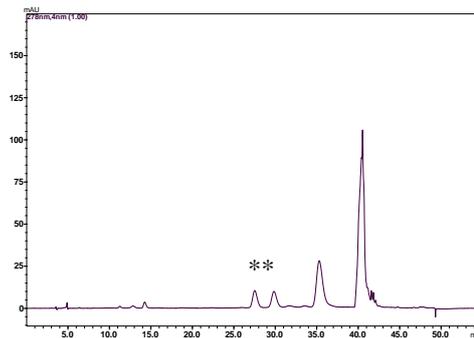
In Lauf 4 sollte OLC nach etwa 80 Minuten eluiert werden und die Fraktionen wurden entsprechend mittels HPLC kontrolliert.

**Abbildung 14:** HPLC-Chromatogramme der OLC-Fraktionen von Lauf 4  
Bedingungen siehe 2.2.2, Seite 6 f

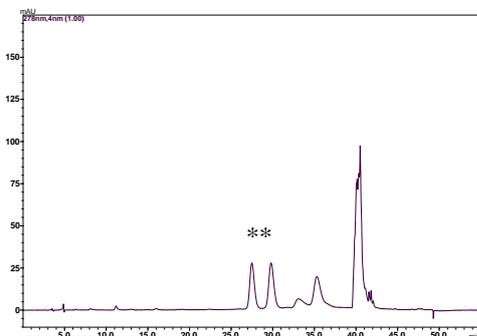
\*\* OLC-Isomere



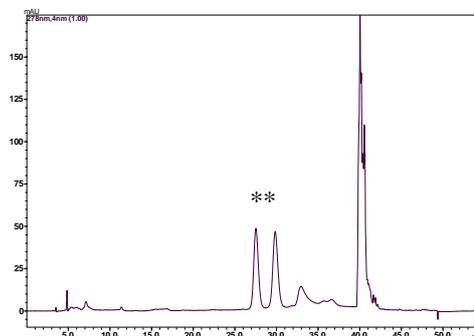
**F 80**



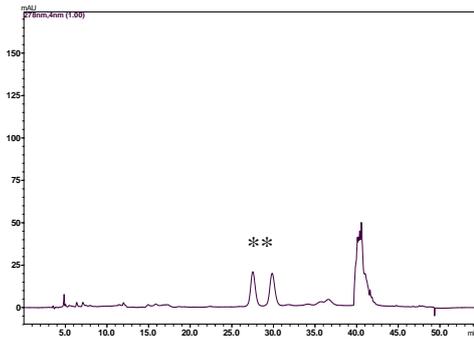
**F 90**



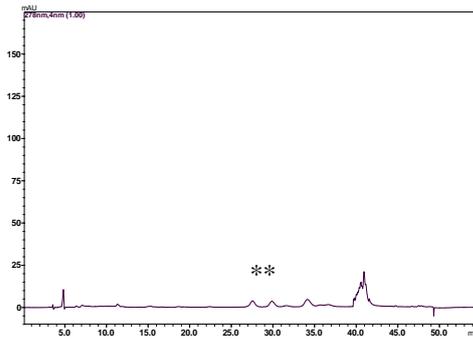
**F 100**



**F 110**



**F 120**



**F 130**

OLC wurde zwischen den Fraktionen 80 und 140 eluiert. Die Trennleistung war mit jener der analytischen Säule vergleichbar, Oxidationsprodukte und Nebenprodukte konnten ebenso abgetrennt werden.

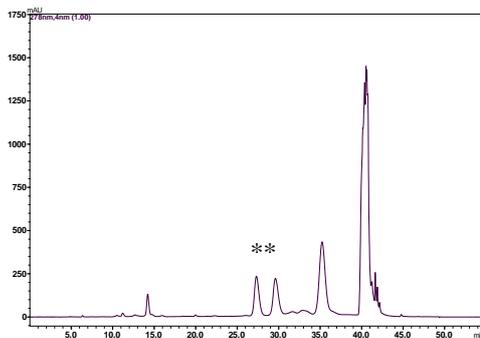
**Tabelle 6:** Trockengewicht und OLC-Anteil der SF von Lauf 4

SF	Fraktionen	Gewicht [mg]	OLC-Anteil [%]
1	10-49	87,8	-
2	50-79	87,8	-
3	80-99	62,3	11,2
4	100-130	114,8	20,1
5	131-150	74,4	12,3
6	151-180	53,1	-
7	Nachlauf	56,8	-

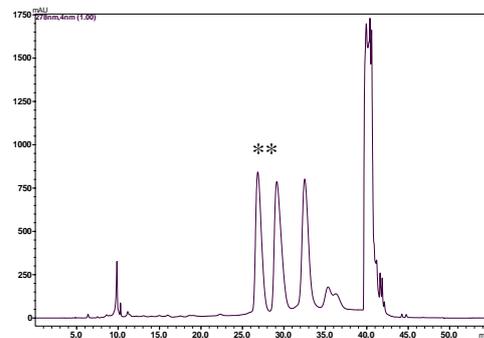
**Abbildung 15:** HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 4

Bedingungen siehe 2.2.2, Seite 6 f

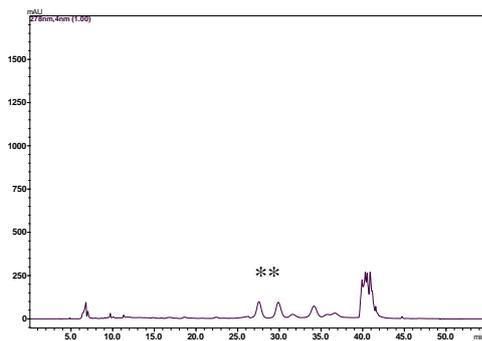
\*\* OLC-Isomere



**SF 3**



**SF 4**



## SF 5

In den SF von Lauf 4 war die Anreicherung von OLC geringer. Zwischen Minute 33 und 35 wurde in SF 4 ein Peak detektiert, der der Intensität der OLC-Peaks entsprach (siehe SF 4). Der Gehalt von OLC in dieser Fraktion lag daher nur bei ca. 20 %.

### 3.3.4 Trennung im Umkehrphasenmodus

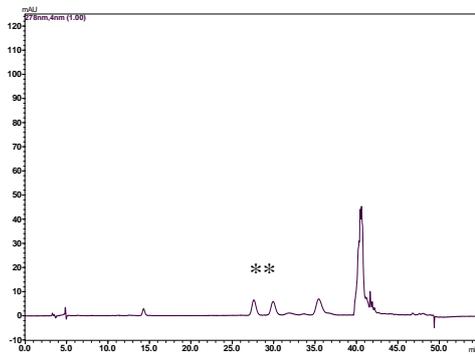
Bei den HPCCC-Läufen im Normalphasenmodus hatte sich gezeigt, dass der Großteil der Sammelfractionen apolare Komponenten enthält, die erst im Zuge des Purge (Minute 35-50) eluiert wurden. Um den Anteil dieser apolaren Verbindungen möglicherweise zu reduzieren und somit den Anteil an OLC in den entsprechenden SF steigern zu können, wurde ein HPCCC-Lauf im Umkehrphasenmodus durchgeführt.

Für Lauf 5 wurden 100 mg OPF in 3 ml FMS gelöst (Bedingungen siehe Seite 7). In diesem Lauf wurde OLC bis zu Fraktion 30 vollständig eluiert. Im Umkehrphasenmodus erfolgte keine erfolgreiche Auftrennung, der Anteil an apolaren Begleitstoffen konnte nicht reduziert werden. Ein weiterer Nachteil ergab sich aufgrund des Wassergehalts in den Fraktionen, die am Rotavapor eingengt wurden um einen hohen Verbrauch an Stickstoff zu vermeiden (siehe Abbildung 16).

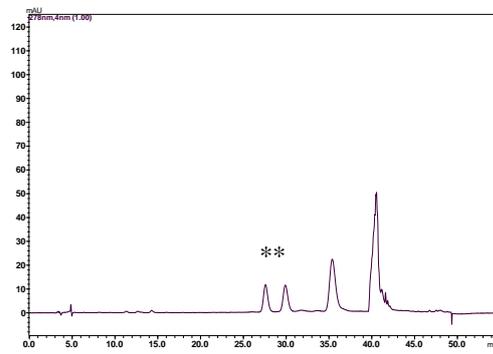
**Abbildung 16:** HPLC-Chromatogramme der OLC-Fractionen von Lauf 5

Bedingungen siehe 2.2.2, Seite 6 f

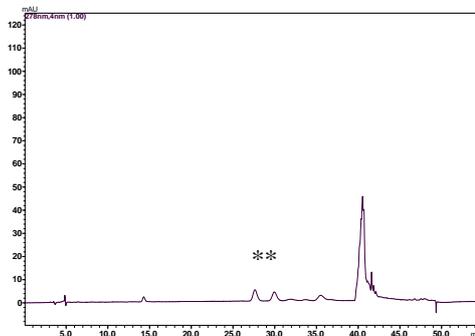
\*\* OLC-Isomere



**F 20**



**F 25**



**F 30**

In Fraktion 25 lag der Anteil von OLC bei etwa 20%.

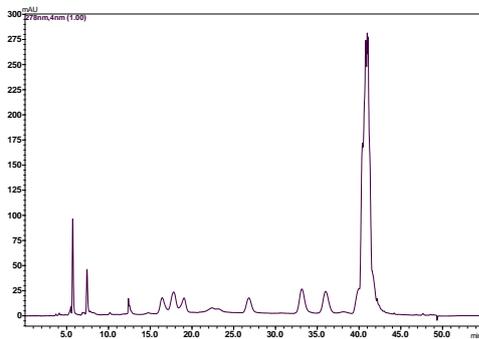
**Tabelle 7:** Bestimmung des Trockengewichts der SF von Lauf 5

SF	Fraktionen	Gewicht [mg]	OLC-Anteil [%]
1	10-15	10,6	-
2	16-30	20,4	11,3
3	31-45	14,5	-

## Abbildung 17: HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 5

Bedingungen siehe 2.2.2, siehe Seite 6 f

\*\* OLC-Isomere



### SF 2

Die HPLC-Analyse der Einzelfractionen und der Sammelfractionen zeigte, dass im Umkehrphasenmodus keine Verbesserung der Trennung erzielt werden konnte. Im Chromatogramm der SF wurden vermehrt Oxidationsprodukte detektiert, welche möglicherweise aufgrund des Eindampfschrittes am Rotavapors entstanden sein könnten. Der Anteil an OLC lag in dieser Fraktion bei etwa 11%.

### 3.3.5 Versuche zur Anreicherung mit geändertem Fließmittel

Durch Variation des FMS sollte untersucht werden, ob die Auftrennung der OPF noch verbessert werden könnte, um eine höhere Anreicherung von OLC zu erzielen. Dazu wurde ein FMS getestet, welches zur Auftrennung von polaren Fettsäurederivaten verwendet worden war [23]. Dieses FMS setzte sich aus 10 Teilen Hexan, 9 Teilen MeOH und 1 Teil H<sub>2</sub>O zusammen.

Die HPCCC-Läufe mit diesem FMS wurden sowohl im Normal- als auch im Umkehrphasenmodus mit jeweils 100 mg OPF in 3 ml FMS durchgeführt (Bedingungen siehe Seite 8)

#### 3.3.5.1 Trennung im Normalphasenmodus

Für den Lauf 6 im Normalphasenmodus wurde eine Elution von OLC innerhalb von 3 Stunden angestrebt, um eine erhebliche Verlängerung der Trennzeit im Vergleich zu den vorausgegangenen Trennungen zu

vermeiden. Innerhalb dieser Zeit wurden die Phenole nicht eluiert, und dieser Trennmodus nicht weiter verfolgt.

#### **3.3.5.2 Trennung im Umkehrphasenmodus**

Dieselben Bedingungen wurden bei Lauf 7 im Umkehrphasenmodus angewendet. In diesem Versuch erfolgte keine Auftrennung, die injizierte Probe wurde innerhalb von 10 Fraktionen nahezu vollständig eluiert. Aufgrund dieser Resultate wurden keine weiteren Versuche mit dem FMS Hexan + MeOH + H<sub>2</sub>O (10+9+1) durchgeführt.

Die Testung anderer FMS war im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

## 4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Fraktionierung von Olivenöl, mit dem Ziel die Isolierung von Oleocanthal zu optimieren, mittels HPCCC durchgeführt werden.

Dazu wurden insgesamt 7,5 L extra-natives Olivenöl der „Marke Kloster Toplou“ mit MeOH am Ultraschallbad extrahiert, da sich gezeigt hat, dass es einen hohen Gehalt an OLC besitzt. Mit diesem Extraktionsschritt konnten knapp 4 g der OPF gewonnen werden.

Die Auftrennung der OPF wurde mit der HPCCC durchgeführt, wobei gezeigt werden sollte, ob diese Methode eine gute Alternative zur präparativen HPLC darstellt. Dafür musste zunächst ein geeignetes FMS ermittelt werden, welches durch Bestimmung des Verteilungskoeffizienten eruiert wurde. Das FMS Hexan - EtOAc - MeOH - H<sub>2</sub>O (5+6+5+6) erwies sich aufgrund eines Verteilungskoeffizienten von 0,85 als optimal. Für die Auftrennung wurde ein Multi-Layer-Coil-System der Firma Dynamic Extractions verwendet.

Für den ersten Versuch wurde die analytische Säule verwendet, welche ein Volumen von 32 ml besitzt. Hierfür wurden 100 mg OPF, gelöst in dem FMS, mittels HPCCC aufgetrennt. OLC wurde zwischen den Fraktionen 40 und 80 eluiert, wobei der Anteil der beiden Komponenten in der Sammelfraktion mit knapp 31 % relativ hoch war.

In weiterer Folge wurde die Ausgangsmenge an OPF für die Trennung auf 200 und auf 400 mg erhöht, wobei die erhaltenen Fraktionen in ihrem chromatografischen Fingerprint sehr ähnlich waren. Die Auftrennung war ähnlich gut, allerdings wurden geringere Anteile an OLC in den Sammelfraktionen von 29% erzielt wurden. Hier zeigte sich, dass an der analytischen Säule bessere Trennleistungen erzielt wurden.

Neben der analytischen Säule wurde auch die Trennleistung der präparativen Säule mit einem Säulenvolumen von 140 ml getestet. Hierfür

wurden 1000 mg OPF mittels HPCCC aufgetrennt. Die Trennung war ähnlich zu den analytischen Läufen, wobei Nebenprodukte sehr gut abgetrennt und das Auftreten von Oxidationsprodukten vermieden werden konnte. In SF 4 lag OLC mit einem Anteil von etwa 20 % vor, diese SF hatte ein Trockengewicht von etwa 115 mg.

Um den Anteil an apolaren Begleitstoffen zu reduzieren und somit den OLC-Anteil zu steigern, wurde die HPCCC auch im Umkehrphasenmodus betrieben (wässrige Phase als mobile Phase). Der OLC-Anteil lag bei etwa 11%, somit konnte keine Verbesserung der Trennleistung erzielt werden.

Die Variation des FMS zu Hexan - MeOH - H<sub>2</sub>O (10+9+1), einem für die Auftrennung von polaren Fettsäuren verwendeten System, erbrachte keine weitere Verbesserung. Im Lauf 6 wurde OLC innerhalb von 2 Stunden nicht eluiert, im Lauf 7 wurde die OPF bereits direkt nach dem Totvolumen der Säule eluiert und nicht aufgetrennt.

Die HPCCC stellt unter Verwendung des FMS Hexan-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (5+6+5+6) eine effiziente Methode dar, um OLC aus Olivenöl anreichern zu können. Innerhalb eines Arbeitstages können 50 mg OLC in 31%iger Reinheit angereichert werden. Somit ist die HPCCC ausgezeichnet dafür geeignet, OLC schnell anzureichern, um es für pharmakologische Tests zur Verfügung stellen zu können. Von den getesteten FMS hat sich Hexan - EtOAc - MeOH - H<sub>2</sub>O (5+6+5+6) als am besten geeignet erwiesen. Weitere Arbeiten zur Erprobung anderer FMS waren im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht mehr möglich.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Konsum an Olivenöl in mediterranen Ländern gilt als bedeutsamer Beitrag für das deutlich geringere Auftreten von chronisch-degenerativen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems in der Bevölkerung Griechenlands oder Italiens im Vergleich zu Nord- oder Mitteleuropa, das mit einer höheren Lebenserwartung verbunden ist.

Olivenöl enthält neben ungesättigten Fettsäuren auch phenolische Secoiridoide, wie z.B. Oleuropein oder Ligstrosid, welche antiinflammatorische, antimikrobielle und antioxidative Wirkung besitzen.

Oleocanthal (OLC) ist ein besonders aktives offenkettiges Derivat dieser Phenole, das aufgrund seines Ibuprofen-ähnlichen kratzenden Geschmacks wissenschaftliches Interesse erlangt hat.

Da OLC kommerziell nicht erhältlich ist und synthetisch nur über eine aufwendige mehrstufige Synthese zugänglich ist, war es für geplante pharmakologische Versuche notwendig, Oleocanthal aus Olivenöl zu isolieren.

In vorangegangenen Arbeiten wurde Oleocanthal aus einem methanolischen Extrakt mittels HPLC angereichert und in Form von zwei cis/trans-Isomeren erhalten.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war, zu ermitteln, ob die HPCCC für die Auftrennung einer Olivenölphenolfraktion (OPF) und somit zur Isolierung von OLC geeignet ist. Für die Auftrennung wurde ein Multi layer coil-System (Dynamic Extractions, UK) verwendet.

Bei einer Injektionsmenge von 100 mg OPF konnte OLC mit Hilfe des Fließmittelsystems (FMS) Hexan-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (5+6+5+6) auf der analytischen Säule (Volumen 32 ml) in einer Reinheit von bis zu 31% in den Sammelfractionen angereichert werden. Diese Anreicherung wurde im Scale-

up (Auftrennung von 200 bzw. 400 mg OLC in der analytischen Säule) nicht erreicht, woraus sich schließen lässt, dass die analytische Säule nicht mit zu hohen Extraktmengen beschickt werden sollte.

Auf der präparativen Säule (Volumen 140 ml) wurden 1000 mg OPF aufgetrennt. Das chromatografische Muster der aufgetrennten Fraktionen war jenem des analytischen Laufs sehr ähnlich, was auf eine ähnlich gute Trennleistung schließen ließ. Unter diesen Bedingungen wurde ein Anteil von maximal 28% OLC in den Sammelfractionen erreicht.

Im Umkehrphasenmodus wurde OLC zu schnell eluiert und keine bessere Auftrennung erreicht.

In allen Experimenten wurde – wie in der HPLC-Trennung – ein Gemisch von zwei cis/trans-Isomeren erhalten. Daraus kann geschlossen werden, dass es in Lösungen von OLC immer zur Bildung dieser Isomeren kommt.

Das FMS Hexan-MeOH-H<sub>2</sub>O (10+9+1), das im Rahmen weiterer Versuche eingesetzt wurde und für die Auftrennung von polaren Fettsäuren beschrieben worden war, führte weder im Normal- noch im Umkehrphasenmodus zu erfolgreichen Auftrennungen.

OLC konnte im Zuge dieser Diplomarbeit mittels HPCCC unter Verwendung des FMS Hexan-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (5+6+5+6) in einem Arbeitsschritt in bis zu 31%iger Reinheit angereichert werden. Die Methode ist der analytischen bzw. semipräparativen HPLC deutlich überlegen, da größere Extraktmengen rasch getrennt werden können und Oxidationsprodukte besser abgetrennt bzw. ihre Bildung vermieden werden.

## 6 SUMMARY

The consumption of olive oil in Mediterranean countries is a significant factor for the less frequent occurrence of cardiovascular diseases in the population of Greece or Italy in comparison to Northern or Central European countries which leads to a higher life expectancy.

Besides unsaturated fatty acids olive oil contains phenolic secoiridoids, such as oleuropein or ligstrosid which show anti-inflammatory, anti-microbial and anti-oxidative activities. Oleocanthal (OLC) is a very potent derivative of these phenolics and came into the focus of interest due to its throat-irritating effect similar to the one known from the NSAID ibuprofen.

As OLC is commercially not available and can only be provided by complex chemical synthesis the elaboration of a convenient method for the isolation of OLC from olive oil to investigate its pharmacological properties, was the aim of this thesis.

In an earlier study OLC was obtained from a methanolic extract by HPLC and was enriched in the form of two cis/trans isomers.

This thesis investigated the potential of HPCCC for the separation of an olive oil phenol fraction (OPF) and the isolation of OLC. For this purpose a multi layer coil-system (Dynamic Extractions, UK) was used.

In the separation of 100 mg OPF under use of the solvent system hexane-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (5+6+5+6) in the analytical coil (volume 32 ml) OLC was enriched up to about 31%. In scale-up (separation of 200 und 400mg in the analytical coil) a similar separation but lower enrichment was achieved. This result showed that the loading to the analytical column should be kept in a lower range.

For the separation in the preparative coil (volume 140 ml) 1000 mg OPF

were injected. The similar chromatographic fingerprint in comparison to the one after separation in the analytical coil shows a comparable quality of separation. OLC was enriched up to about 28%.

In the reversed phase mode OLC was eluted very fast, and no separation was achieved.

The solvent system hexane-MeOH-H<sub>2</sub>O (10+9+1), which had been used for the separation of polar fatty acids, did not lead to a successful separation, neither in the normal phase nor in the reversed phase mode.

This study showed that OLC can be enriched from a methanolic extract of olive oil to a purity of about 31% in one single HPCCC run using the solvent system hexane-EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (5+6+5+6). The fractionation by HPCCC is superior to analytical and semipreparative HPLC as higher amounts of OPF can be separated in short time and oxidation/degradation products are removed more efficiently.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Grivetti LE. Mediterranean food patterns: the view from Antiquity, Ancient Greeks and Romans. In: Matalas AL, Zampelas A, Stavrinou V, Wolinsky I, editors. The Mediterranean diet. Lincoln: The CRC-Press Modern Nutrition Series; 2001, 3-30
- [2] Faustino R Pérez-López, Chedraui P, Haya J, Cuadros JL. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas* 2009, 64, 67-79
- [3] <http://www.olivenoelcreme.de/>, besucht am 01.07.2012
- [4] Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* 2010, 92, 1189-1196
- [5] Allbaugh LG. Food and nutrition in Crete: a case study of an underdeveloped area. Princeton, NJ: Princeton University Press 1953, 97–135
- [6] Keys A, Aravanis C, Blackburn HW, et al. Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40–59 in seven countries. *Acta Medica Scandinavica Supplementum* 1966, 460, 1–392
- [7] Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation* 2009, 119, 1093-1100
- [8] Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Review* 2005, 18, 98-112
- [9] Aguilera CM, Mesa MD, Ramirez-Tortosa MC, Nestares MT, Ros E, Gil A. Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease. *Clinical Nutrition* 2004, 23, 673-681

- [10] Harper CR, Edwards MC, Jacobson TA. Flaxseed oil supplementation does not affect plasma lipoprotein concentration or particle size in human subjects. *J. Nutr.* 2006, 136, 2844-2848
- [11] Baldioli, M, Servili, M, Perretti, G, Montedoro, GF Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 1589-1593
- [12] De Nino A, Mazzotti F, Perri E, Procopio A, Raffaelli A, Sindona G. Virtual Freezing of the hemiacetal-aldehyde equilibrium of the aglycones of oleuropein and ligstroside present in olive oils from *Carolea* and *Coratina* cultivars by ionspray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2000, 35, 461-467
- [13] Gariboldi G, Jommi G, Verotta I. Secoiridoids from *Olea europea*. *Phytochemistry* 1986, 25, 865-869
- [14] Limiroli R, Consonni R, Ottolina G, Marsilio V, Bianchi G, Zetta L. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR characterization of new oleuropein aglycones. *Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1995, 1519-1523
- [15] Cicerale S, Lucas LJ, Keast RSL. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology* 2012, 23, 129-135
- [16] Montedoro G, Servili M. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 2228-2234
- [17] Andrewes P, Busch JL, de Joode T, Groenewegen A, Alexandre H. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1415-1420
- [18] Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005, 437, 45-46
- [19] Dorfmeister D. Diplomarbeit, Universität Wien, in Vorbereitung
- [20] Impellizzeri J, Lin J. A simple High-Performance Liquid Chromatography Method for the determination of throat-burning Oleocanthal with probated antiinflammatory activity in extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, 3204-3208

- [21] Rebsamen B. Diplomarbeit, Universität Wien (2003)
- [22] Schaufelberger DE. High-Speed countercurrent chromatography, Chemical Analysis series. Ito Y & Conway WD, Eds; Wiley J, New York, 1996, 2, 45-70
- [23] Conway WD. Countercurrent Chromatography, Apparatus, Theory and Applications. VCH Publishers, Weinheim, New York, 1990

## 8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: <i>Olea europaea</i> (Oleaceae) .....	1
Abbildung 2: Ölsäure .....	2
Abbildung 3: Alkoholkomponenten in Phenolen in Olivenöl.....	4
Abbildung 4: Secoiridoide in Olivenöl .....	4
Abbildung 5: Chromatogramm des OPF-Lyophilisats des Öls der Marke „Kloster Toplou“ .....	10
Abbildung 6: UV-Spektren der OLC-Peaks bei Rt 20,91 (A) und Rt 22,67 (B).....	11
Abbildung 7: DC der Fraktionen von Lauf 1 .....	15
Abbildung 8: HPLC-Chromatogramme der OLC-Fraktionen von Lauf 1 .....	16
Abbildung 9: HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 1 .....	18
Abbildung 10: HPLC-Chromatogramme der OLC-Fraktionen von Lauf 2 .....	20
Abbildung 11: HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 2 .....	21
Abbildung 12: HPLC-Chromatogramme der OLC-Fraktionen von Lauf 3 .....	22
Abbildung 13: HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 3 .....	24
Abbildung 14: HPLC-Chromatogramme der OLC-Fraktionen von Lauf 4.....	26
Abbildung 15: HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 4.....	27
Abbildung 16: HPLC-Chromatogramme der OLC-Fraktionen von Lauf 5.....	29
Abbildung 17: HPLC-Chromatogramme der SF von Lauf 5.....	30

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HEMWAT-System .....	13
Tabelle 2: Verteilung von Oleocanthal in ausgewählten FMS .....	14
Tabelle 3: Trockengewicht und OLC-Anteil der SF von Lauf 1 .....	18
Tabelle 4: Trockengewicht und OLC-Anteil der SF von Lauf 2 .....	21
Tabelle 5: Trockengewicht und OLC-Anteil der SF von Lauf 3 .....	24
Tabelle 6: Trockengewicht und OLC-Anteil der SF von Lauf 4 .....	27
Tabelle 7: Bestimmung des Trockengewichts der SF von Lauf 5 .....	29

# CURRICULUM VITAE

Name Marco Stadler  
Geburtsdatum 24/01/1988  
Geburtsort Waidhofen/Ybbs  
Eltern Johanna Maria Stadler (geb. Fischböck)  
Johann Stadler

## Ausbildung

1994 – 1998 Volksschule, 3334 Gafrenz  
1998 – 2006 Bundesrealgymnasium, 3340 Waidhofen/Ybbs  
Juni 2006 Matura  
2006 Grundwehrdienst, 3300 Amstetten  
Okt. 2007 – 2012 Pharmaziestudium an der Universität Wien  
SS 2012 Praktische Arbeit am Departement für Pharmakognosie

## Praktika

Juli 2008 Apotheke an der Eisenstraße, 3331 Kematen/Ybbs  
Dez. 2012 – lfd. Madonnen-Apotheke, 1100 Wien (geringfüge Anstellung)