

Hochschule Anhalt (FH)
Fachbereich Landwirtschaft, Ökotoxikologie und Landschaftsentwicklung

Masterarbeit

Bestimmung des Inhaltsstoffspektrums sowie die antifungale
Testung unterschiedlicher Extraktionsvarianten des
Rheum officinale Baill. gegenüber dem Phytopathogen
Blumeria graminis f. sp. *hordei*

Vorgelegt von: Marcus Lembke
geboren am: 15.06.1985
Studiengang: Ökotoxikologie

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Ingo Schellenberg
2. Gutachter: Frau Dr. agr. Kathrin Kabrodt

Datum der Abgabe: 31.05.2018

Bibliographische Beschreibung

Name: Lembke

Vorname: Marcus

Thema: Bestimmung des Inhaltsstoffspektrums sowie die antifungale Testung unterschiedlicher Extraktionsverfahren des *Rheum officinale* Baill.

2018 / 123 Seiten / 32 Tabellen / 37 Abbildungen / 8 Anlagen

Bernburg: Hochschule Anhalt (FH)

Fachbereich Landwirtschaft – Ökotrophologie – Landschaftsentwicklung

Masterarbeit

Autorreferat

Subject of this master thesis was to test the content range of different extraction process of rhubarb extracts. In addition to that, was to test the antifungal effect of the obtained extracts against *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Furthermore the composition of the substances contained in those extracts were analyzed to drive a correlation between their antifungal activity and their structure. In order to achieve that, various extraction variants, like ASE Extraction, technical sized DIG-MAZ extraction and manual extraction were used.

The antifungal assays have been investigated by using a leaf segment test. According to this system, leaves were inoculated by air with the conidia of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* and later the infected parts were estimated. In according to this test, the extracts have been analyzed for typical substances contained in *Rheum* spp.. First of all would be a short introduction. The Second Part gives a review of all the literature about *Rheum* spp., *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* and the fundamentals of the used methods. In the third part of this thesis, are hold the information's about these methods and their parameters. The results of the antifungal activity as well as the analyzed substances of the different extracts are described in more detail in the fourth part. In combination with several scientific studies, the results were derived and discussed concerning the antifungal activity. The final part of thesis is a summary of this thesis as well as a prospect of subsequent investigations related to this topic.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ingo Schellenberg danke ich für die Vergabe des interessanten und anspruchsvollen Themas sowie für die fachlichen Anregungen und das Korrekturlesen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Kathrin Kabrodt für die Betreuung der Arbeit, für die Hilfestellungen während der gesamten Bearbeitungszeit, das intensive Korrekturlesen und die vielen Tipps für das Schreiben dieser Arbeit.

Weiterhin gilt ein großer Dank Frau Silvia Ballert für die Unterstützung während der Durchführung der Analysen mittels HPLC sowie HPLC-MS. Auch möchte ich mich für die Einarbeitung und die Hilfestellung bei der Auswertung der Daten sowie das Korrekturlesen bedanken.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Marit Gillmeister für die Unterstützung bei der Durchführung des Blattsegmenttests und der anschließenden Bonitur.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Mario Scharmer und Herrn Marc Schöler für die Durchführung der kleintechnischen Extraktion und die Bereitstellung der DIG-MAZ-Extrakte bedanken. Auch danke ich für die ständige und freundliche Hilfsbereitschaft.

Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institute of Bioanalytical Science danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ständige Hilfsbereitschaft sowie das Interesse an meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium in vielfältiger Weise ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen kann.

Ein ganz besonderer Dank gilt Loreen, die mich auch bei dieser Arbeit wieder unterstützt, motiviert hat und immer für mich da war.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung und Zielstellung.....	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1 Rhabarber.....	3
2.1.1 Grundlegendes zum Rhabarber und dessen Verwendung.....	3
2.1.2 Inhaltsstoffe des Rhabarbers.....	4
2.1.3 Nachgewiesene Wirkung der Rhabarberinhaltsstoffe	10
2.2 Testsysteme zur Untersuchung der antifungalen Wirkung von <i>Rheum</i> -Extrakten	11
2.3 Das Phytopathogen Echter Mehltau (<i>Blumeria graminis</i>)	12
2.3.1 Grundlegendes zum Echten Mehltau.....	12
2.3.2 Schadbild des Phytopathogens <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	13
2.3.3 Lebenszyklus des Echten Mehltaus.....	14
2.4 Extraktionsverfahren	16
2.4.1 Accelerated Solvent Extraction (ASE).....	19
2.4.2 Industrielle Extraktionsmethoden (DIG-MAZ).....	20
2.5 HPLC	21
2.6 Massenspektroskopie	22
3. Material und Methoden.....	25
3.1 Rhabarberernte.....	25
3.2 Extraktion des Wurzelmaterials nach IBAS-Standardarbeitsanweisung	25
3.3 ASE-Extraktion des Rhabarbers	27
3.3.1 Probenvorbereitung.....	27
3.3.2 Lösungsmittelvorversuche	27
3.3.3 Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Extraktionstemperatur.....	28
3.3.4 Herstellung der Ethylacetat-Phasen der ASE-Extrakte	29

3.4 Voruntersuchungen an der HPLC	29
3.5 Extraktion des GT 42 im kleintechnischen Maßstab	32
3.6 High-Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie	33
3.7 Blattsegmenttest	41
4. Ergebnisse und Diskussion	46
4.1 Ergebnisse der Extraktion des GT 42.....	46
4.1.1 Ergebnisse und Diskussion der manuellen Extraktion	46
4.1.2 Ergebnisse und Diskussion der ASE-Extraktion	47
4.1.2.1 Lösungsmittelvorversuche mittels ASE	47
4.1.2.2 Auswertung der Lösungsmittelvorversuche unter Verwendung der HPLC	50
4.1.2.3 Temperaturbedingte Vorversuche mittels ASE	53
4.1.2.4 Auswertung der temperaturbedingten Vorversuche mittels HPLC	55
4.1.2.5 Herstellung der Ethylacetat-Phasen der temperaturbedingten ASE-Extrakte.....	57
4.1.3 Ergebnisse und Diskussion der DIG-MAZ 10-Extraktion.....	60
4.1.4 Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsverfahren des GT 42 E2017	63
4.2 HPLC-MS.....	66
4.2.1 Quantifizierung der Standardsubstanzen in den verschiedenen Gesamtextrakten des GT 42 sowie des GT 10	67
4.2.1.1 Quantitative Bestimmung der Flavan-3-ole und Procyanidine	68
4.2.1.2 Quantitative Bestimmung der Phenolcarbonsäuren und Stilbene	71
4.2.2 Semiquantifizierung der weiteren identifizierten <i>Rheum</i> -Inhaltsstoffe in den verschiedenen Gesamtextrakten des GT 42 sowie des GT 10	75
4.2.2.1 Semiquantitative Bestimmung der Stilbene.....	75
4.2.2.2 Semiquantitative Bestimmung der Anthrachinone.....	80
4.2.2.3 Semiquantitative Bestimmung der weiteren Substanzen	84
4.2.2.4 Semiquantitative Bestimmung der koeluierten Substanzen	88
4.3 Limitierung der HPLC-MS-MS Methode	93
4.4 Ergebnisse der antifungalen Wirkung der Gesamtextrakte des GT 10 und des GT 42 gegenüber <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> im Blattsegmenttest.....	95

4.4.1 Wirkungen der Gesamtextrakte in den Konzentrationen 500 ppm sowie 125 ppm	96
4.4.2 Wirkungen der Gesamtextrakte in den Konzentrationen 1000 ppm sowie 500 ppm	99
4.5. Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen	104
4.5.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen: Vergleich der klassischen Gesamtextrakte des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017	105
4.5.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen: Vergleich der DIG-MAZ-Extrakte und des klassisch extrahierten GT 42	112
5. Zusammenfassung und Ausblick	120
Literaturverzeichnis	VII
Anlagenverzeichnis	XIII
Anlagen	XIV
Selbstständigkeitserklärung	XXXII

Abkürzungsverzeichnis

Amu	atomic mass unit
BgH	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>Hordei</i>
BST	Blattsegmenttest
C	Catechin
CAD	collisionally activated dissociation
CE	collision energy
CHLS	Chlorogensäure
Cps	Counts per second
CUS	p-Cumarsäure
CUR	Curtain Gas
CXP	collision cell exit potential
DAD	Diodenarray-Detektor
Da	Dalton
Da/s	Dalton pro Sekunde
DP	Declustering Potential
Dra	Desoxyrhaponticin
E2017/2013/2009	Erntejahr 2017/2013/2009
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EP	Entrance Potential
EPI	Enhanced Product Ion Scan

EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FES	Ferulasäure
GS1	Gas 1
GS2	Gas 2
GT 42	Genotyp 42 (interne IBAS Bezeichnung)
HPLC-	high performance liquid chromatography
IBAS	Institute of Bioanalytical Science
IS	Ion Spray Voltage
LOD	Level of detection (Erfassungsgrenze)
LOQ	Level of quantitation (Bestimmungsgrenze)
mDa	Millie Dalton
MeOH	Methanol
[M-H] ⁻	Quasimolekül
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NPK-Dünger	Natrium/Phosphat/Kaliumnitrat Dünger
p	p-Wert
p.a.	pro analysi
PB1	Procyanidin-Dimer
PB2	Procyanidin-Dimer, monogalloyliert
PC1	Procyanidin-Trimer
PFE	Peakflächeneinheiten

PI	Piceatannol
ppm	parts per million
Psi	Einheit für den Druck
Q1-Scan	Quadrupol 1-Scan
RA	Rhaponticin
RC	regenerierte Cellulose
RE	Resveratrol
rF	relative Luftfeuchte
RT	Retentionszeit
PTFE	Polytetrafluoräthylens
S/N	Signal to Noise Ratio → Signal-Rausch Verhältnis
Sec/cycle	Sekunden pro Zyklus
TEM	Temperatur in °C
THSGL	3,4',5-Trihydroxystilben-3-O-beta-D-glukopyranosid
VK	Variationskoeffizient

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stilbengrundstruktur und deren Derivate.....	8
Tabelle 2: Anthrachinonderivate im Rheum	9
Tabelle 3: Naphtholglukoside im Rheum.....	10
Tabelle 4: Lösungsmittel der manuellen Extraktion nach IBAS-interner Standardarbeitsanweisung	26
Tabelle 5: ASE-Parameter der Lösungsmittelvorversuche.....	28
Tabelle 6: Verwendete Lösungsmittel der ASE-Vorversuche.....	28
Tabelle 7: ASE Parameter der temperaturbedingten Lösungsmittelvorversuche.....	29
Tabelle 8: Lösungsmittel für die LC-Taste.....	30
Tabelle 9: Geräte und Materialien der LC-Taste	31
Tabelle 10: Parameter der DIG-MAZ 10 für die Fest-Flüssig- und die Flüssig-Flüssig- Extraktionen.....	33
Tabelle 11: Standardsubstanzen für die Quantifizierung	34
Tabelle 12: Compoundparameter der MRM Übergänge der 16 Standardsubstanzen	38
Tabelle 13: Include List	39
Tabelle 14: Exclude List.....	39
Tabelle 15: Parameter Range	40
Tabelle 16: Kenndaten der Quantifizierung für die 16 Standardsubstanzen	40
Tabelle 17: Ausbeuten der Ethylacetat-Phasen nach der manuellen Extraktion des GT 42 sowie des GT 10.....	46
Tabelle 18: Überblick der gewählten Lösungsmittelvarianten der ASE-Extraktion...	48
Tabelle 19: Mittelwerte (MW) der Gesamtpeakflächen bei 430 nm und 280 nm und dem daraus resultierenden Verhältnis	52
Tabelle 20: Überblick der gewählten Extraktionstemperaturen der ASE-Extraktion.	54
Tabelle 21: Mittelwerte der Gesamtpeakflächen sowie deren Verhältnis (40°C/80°C/100°C n = 3 (Partikelgröße zwischen 250 – 4000 µm); 60°C n = 4(Partikelgröße kleiner 250 µm))	55
Tabelle 22: Ausbeuten der Ethylacetat-Phasen nach vorheriger ASE-Extraktion in Abhängigkeit von der gewählten Extraktionstemperatur.....	58
Tabelle 23: Parameter der Feststoffextraktion im Modul 1 der DIG-MAZ 10.....	60

Tabelle 24: Ausbeuten der Ethylacetat-Phasen der Gesamtextrakte der verschiedenen Erntejahre des GT 42 nach der DIG-MAZ Extraktion	63
Tabelle 25: Ausbeuten der Ethylacetat-Phasen des GT 42 in Abhängigkeit vom Extraktionsverfahren sowie des Erntejahrs im Vergleich zum manuell extrahierten GT 10 E2014	64
Tabelle 26: Darstellung der quantitativ bestimmten Flavan-3-ole und Procyanidine in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 im Vergleich mit den klassisch extrahierten Varianten des GT 42 und des GT 10 ...	68
Tabelle 27: Quantifizierung der Phenolcarbonsäuren und Stilbene in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 im Vergleich mit den klassisch extrahierten Varianten des GT 42 und des GT 10 (n=2)	71
Tabelle 28: Darstellung der Aussaat, Standzeit, Ernte und Lagerzeit der unterschiedlichen DIG-MAZ Extrakte des GT 42	74
Tabelle 29: Anteile der mittels externer Standardkalibration bestimmten hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen in den klassisch extrahierten Ethylacetatphasen des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017 in Prozent	105
Tabelle 30: Anteile der mittels semiquantitativer Bestimmung ermittelten hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen in den klassisch extrahierten Ethylacetatphasen des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017 in Prozent	106
Tabelle 31: Anteile der mittels externer Standardkalibration bestimmten hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen in den Ethylacetatphasen unterschiedlicher Erntejahre und Extraktionsvarianten des Genotyp 42 in Prozent	112
Tabelle 32: Anteile der mittels semiquantitativer Bestimmung ermittelten hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen in den Ethylacetatphasen unterschiedlicher Erntejahre und Extraktionsvarianten des Genotyp 42 in Prozent	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blütenstand <i>Rheum officinale</i> Baill.....	4
Abbildung 2: Staude sowie Blattstand des GT 42 (<i>Rheum officinale</i> Baill.).....	4
Abbildung 3: Wurzelwerk des GT 10 (<i>Rheum rhabarbarum</i> L.).....	4
Abbildung 4: Grundstruktur des Phenols	5
Abbildung 5: Grundstruktur des Flavans.....	6
Abbildung 6: Darstellung der Struktur der Pentagalloylglukose	7
Abbildung 7: Darstellung der Struktur des Catechin	8
Abbildung 8: Struktur des Procyanidin C1 aus drei Catechinmonomeren.....	8
Abbildung 9: A) Echter Mehltau auf Gerste B) ältere Mehлтаubeläge mit Cleistothezien.....	13
Abbildung 10: Sexueller und asexueller Entwicklungszyklus des Echten Mehltaus	15
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Extraktion.....	17
Abbildung 12: Schematischer Aufbau einer ASE-Apparatur.....	19
Abbildung 13: “DIG-MAZ 10“ Anlage am IBAS (von rechts)	20
Abbildung 14: “DIG-MAZ 10“ Anlage am IBAS (von links).....	20
Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Elektrospray Ionisation	23
Abbildung 16: Quadrupol mit Beispiel einer Ionenbewegung.....	24
Abbildung 17: Klassisches Extraktionsschema modifiziert nach Richter 2000.....	26
Abbildung 18: Darstellung des Gradientenverlaufes der angewandten HPLC-MS Methode.....	36
Abbildung 19 und 20: Darstellung des verwendeten Mehлтаurms	43
Abbildung 21: Auszug des verwendeten Boniturschemas zur visuellen Abschätzung der prozentual mit Echtem Mehltau befallene Blattfläche.....	43
Abbildung 22: Trockensubstanzgehalt der beiden Extraktionsstufen der Lösungsmittelvorversuche mittels ASE-Extraktion	49
Abbildung 23: Chromatogramm der ersten Extraktionsstufe der Lösungsmittelvariante 4 bei 430 nm (blau) und bei 280 nm (rot).....	51
Abbildung 24: Trockensubstanzgehalt der beiden Extraktionsstufen der temperaturbedingten ASE-Extraktion (40°C/80°C/100°C n = 3 (Partikelgröße zwischen 250 – 4000 µm); 60°C n = 4 (Partikelgröße kleiner 250 µm))	54
Abbildung 25: Petrolether-Extrakt-Gemisch mit Zwischenphase	57

Abbildung 26: Darstellung der zeitbasierten prozentualen Trockensubstanzen der jeweiligen Extraktionsstufen der Feststoffextraktion für Erntejahre 2017, 2013 sowie 2009 der DIG-MAZ Gesamtextrakte des GT 42	61
Abbildung 27: Chromatogramm des Gesamtextraktes (EtOAc-Phase) des klassisch extrahierten GT 42 E2017 (HPLC-Methode mit DAD-Detektion).....	66
Abbildung 28: Darstellung der quantitativ bestimmten Flavan-3-ole und Procyanidine in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 im Vergleich mit den klassisch extrahierten Varianten des GT 42 und des GT 10	68
Abbildung 29: Darstellung der quantitativ bestimmten Phenolcarbonsäuren und Stilbene in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 im Vergleich mit den klassisch extrahierten Varianten des GT 42 und des GT 10.....	71
Abbildung 30: Semiquantitative Darstellung der identifizierten Stilbene in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 gegenüber des klassisch extrahierten GT 42 sowie des GT 10.....	76
Abbildung 31: Semiquantitative Darstellung der identifizierten Anthrachinone in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 gegenüber den klassisch extrahierten GT 42 sowie des GT 10	80
Abbildung 32: Semiquantitative Darstellung der weiteren identifizierten und unbekannt Substanzen in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ Extrakte des GT 42 gegenüber den klassisch extrahierten GT 42 sowie des GT 10.....	85
Abbildung 33: Semiquantitative Darstellung der Peakflächen der koeluiierenden Substanzen in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 gegenüber den klassisch extrahierten GT 42 sowie des GT 10	89
Abbildung 34: Darstellung der prozentualen befallenen Blattfläche aus der Bonitur der mit in unterschiedlichen Konzentration (500 ppm und 125 ppm) behandelten Gerstenblättern sowie der Kontrolle gegenüber dem Phytopatogen <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	96
Abbildung 35: Nachgewiesene Wirkung der protektiven Behandlung durch die Gesamtextrakte des GT 10 sowie der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42 bei Konzentrationen von 500 ppm und 125 ppm gegen <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> an Gerste.....	98

Abbildung 36: Darstellung der prozentual befallenen Blattfläche aus der Bonitur der mit unterschiedlichen Konzentrationen (500 ppm und 1000 ppm) behandelten Gerstenblätter sowie der Kontrolle gegenüber dem Phytopathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* 100

Abbildung 37: Nachgewiesene Wirkung der protektiven Behandlung durch den Gesamtextrakt des GT 10 sowie der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42 bei Konzentrationen von 1000 ppm und 500 ppm gegen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* an Gerste..... 102

1. Einleitung und Zielstellung

Pflanzen stellen die Grundlage allen Lebens auf der Erde dar. Sie beinhalten aus Sicht der Menschen zwei Funktionen. Zum einen sind sie als Wildpflanzen ein Bestandteil der Vegetationsdecke, welcher innerhalb der komplex verzweigten Nahrungskette die Grundlage aller nicht photosynthetisch aktiven Lebensformen, wie Mikroben, Pilze und Tiere bildet. Zum anderen werden sie seit Jahrtausenden als Nutzpflanzen für die Lebens- und Nahrungsgrundlage der Menschen eingesetzt. Die Entwicklung von Kulturpflanzensorten sowie deren systematischer Anbau haben eine Koevolution von Schadorganismen ausgelöst. Zwar ist dieser Prozess in einem bestehenden Ökosystem unvermeidlich, doch gefährdet dies das Pflanzenwachstum, die Ertragsbildung und auch die Produktqualität. (Hallmann, et al., 2009)

Dabei kann ein Großteil der Ernteverluste in der Landwirtschaft auf pilzliche Erkrankungen zurückgeführt werden. Einige der wichtigsten stellen unterschiedliche Mehltauerreger dar. Diese führen im Getreide sowie im Weinanbau zu häufigen Ernteaufschlägen. Trotz einer stetig wachsenden Menge an eingesetzten Pflanzenschutzmitteln können Verluste von bis zu 25 Prozent nicht vermieden werden. Zudem wächst die Besorgnis bzw. die Unsicherheit bei den Verbrauchern, dass mögliche Rückstände in den Lebensmitteln verbleiben. Daher rücken vermehrt neue Wege zur Entwicklung innovativer Pflanzenschutzmittel in den Fokus, welche einerseits eine hohe Umweltverträglichkeit und zum anderen geringe Chancen der Resistenzbildung aufweisen (Schellenberg, 2015).

In Anbetracht dieser Fragestellung und weiteren Aspekten auf dem Gebiet der Phytopathologie wurde am Institute of Bioanalytical Sciences (IBAS) ein zentrales Forschungsthema mit dem Schwerpunkt der Testung auf antifungale Wirkungen von *Rheum*-Extrakten etabliert. Als Ziel dessen soll ein ökologisches Fungizid auf Basis dieser *Rheum*-Extrakte entwickelt werden. Dabei kann das IBAS auf ein umfangreiches Sortiment an Rhabarbergenotypen unterschiedlicher Herkünfte zurückgreifen. So konnte Kabrodt in den Genotypen *Rheum rhaponticum* L., *Rheum palmatum* L. und *Rheum spec.* Landsorte Polen anhand der enthaltenen Stilbene und Gerbstoffe eine Struktur-Wirkungsbeziehung hinsichtlich der antioxidativen, antiinflammatorischen und antiviralen Wirkung ableiten (Kabrodt, 2006).

Des Weiteren gelang es durch die *in vitro* Kultivierung verschiedener Phytopathogene (unter anderem *Fusarium* spp., *Phytophthora capsici*) die antifungalen Wirkungen von *Rheum officinale* Baill. und *Rheum rhabarbarum* nachzuweisen. Ebenfalls bestätigt werden konnte dies am Modellsystem Echter Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) an Gerste (Meissner, 2013). Auf der Basis dieser Ergebnisse ist die Identifizierung wirkungsvoller Substanzen und Substanzgruppen für die Entwicklung eines Fungizids auf *Rheum*-Basis erforderlich.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, verschiedene Gesamtextrakte des *Rheum officinale* Baill. (GT 42) auf deren antifungale Wirkung zu untersuchen und im Zusammenhang mit deren Inhaltsstoffspektren Struktur-Wirkungsbeziehungen herzuleiten. Dabei sollen als Schwerpunkte die Einflüsse unterschiedlicher Extraktionsverfahren sowie verschiedener Erntejahre des GT 42 (2017, 2013, 2009) berücksichtigt werden. Parallel dazu werden vergleichende Untersuchungen eines klassisch gewonnenen Extrakts des GT 10 E2014 berücksichtigt, welcher bereits in seiner antifungalen Wirkung bestätigt worden ist. Die klassische Extraktion des Genotyps 42 aus dem Jahr 2017 soll dabei den Ausgangspunkt nach dem im IBAS etablierten Verfahren darstellen.

Zusätzlich sollen mit dem Wurzelmaterial von 2017 geeignete Extraktionsparameter an der ASE erarbeitet werden, welche die Grundlage für das Up-Scaling auf einen kleintechnischen Maßstab an der DIG-MAZ-Anlage bilden, um auch größere Mengen der entsprechenden Extrakte herstellen zu können.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Rhabarber

2.1.1 Grundlegendes zum Rhabarber und dessen Verwendung

Die Gattung *Rheum* spp. enthält eine der bedeutendsten Heilpflanzen und wird der Familie der *Polygonaceae* (Knöterichgewächse) zugeordnet. Weltweit sind ca. 50 Unterarten des Rhabarbers bekannt. (Haryanto, 1984) So wurde bereits ca. 2800 Jahre v. Chr. in chinesischen Kräuterbüchern über dessen positive Wirkungen berichtet. (Kabrodt et al., 2009) Vorwiegend wurde dabei auf den Gemeinen Medizinalrhabarber (*Rheum officinale* Baill.) und dessen laxierende Wirkung eingegangen, welche auf den hohen Gehalt an Anthrachinonen zurückzuführen ist (Krafczyk, 2008). Bezüglich der Systematik der Gattung *Rheum* spp. erfolgt nach Sitte et al. (Jahr 2002) folgende Einteilung:

Abteilung: *Spermatophyta* (Samenpflanzen)
Unterabteilung: *Magnoliophytina*
Klasse: *Rosopsida* (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige)
Unterklasse: *Caryophyllidae*
Ordnung: *Polygonales*
Familie: *Polygonaceae* (Knöterichgewächse)
Gattung: *Rheum*

Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit besteht in der Untersuchung des *Rheum officinale* Baill. (IBAS-interne Bezeichnung GT 42), welcher in den Gebirgen Nordost-Tibets sowie Nordwestchinas beheimatet ist.

Wie in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt, weist der GT 42 bis zu 75 cm großen Blätter auf, welche ein rundes bis nierenförmiges Aussehen besitzen. Während der Blütezeit von Mai bis Juni werden kleine, grünlich bis weiße Rispen ausgebildet. Weiterhin können die Stauden eine Wuchshöhe von bis zu 3 m erreichen (Bös, 2000).



Abbildung 1: Blütenstand *Rheum officinale* Baill. (Bös, 2000)



Abbildung 2: Staude sowie Blattstand des GT 42 (*Rheum officinale* Baill.) (IBAS)



Abbildung 3: Wurzelwerk des GT 10 (*Rheum rhabarbarum* L.) (IBAS)

Die Abbildung 3 zeigt das Wurzelwerk einer Rhabarberpflanze beispielhaft am *Rheum rhabarbarum* L. Generell stellt diese für alle im IBAS zu untersuchenden Genotypen der *Rheum* spp. die Hauptquelle der im Fokus stehenden Polyphenole dar. Als ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit werden die Polyphenole im folgenden Abschnitt näher behandelt.

2.1.2 Inhaltsstoffe des Rhabarbers **Polyphenole**

Die Gruppe der Polyphenole stellt eine im Pflanzenreich weit verbreitete Gruppe dar. Phenolische Verbindungen zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, da sie weder im primären Stoffwechsel gebildet bzw. verbraucht werden (Hilal, 2010).

Die Grundstruktur aller Polyphenole lässt sich auf das in der Abbildung 4 dargestellte Phenol zurückführen. Zur Synthese der aus aromatischen Verbindungen bestehenden Polyphenole sind ausschließlich pflanzliche Organismen fähig. Da tierische Organismen über keinen Syntheseweg dieser Stoffgruppe verfügen, sind sie auf eine exogene Zufuhr lebensnotwendiger Aromaten wie z. B. Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan angewiesen. Pflanzen können auf drei unterschiedliche Mechanismen zur Bildung phenolischer Verbindungen zurückgreifen. Zu diesen zählen der Shikimisäureweg, der Acetat-Malonat-Weg sowie der Acetat-Mavalonat-Weg (Hänsel & Sticher, 2009). Auf Grund ihrer Vielfalt sind die Polyphenole an den verschiedensten Aufgaben beteiligt. So bieten sie der Pflanze Schutz vor Pathogenen, Mikroorganismen, UV-Einwirkung und Bedingungen des oxidativen Stresses. So halten z. B. Tannine auf Grund ihrer adstringierenden Eigenschaft Fraßfeinde davon ab, die Früchte bestimmter Pflanze zu fressen. Neben den genannten Schutzeigenschaften tragen sie maßgebend zum Aussehen und Geschmack der entsprechenden Pflanzenteile bei (Neukam, 2006) (Hillebrand, 2004).

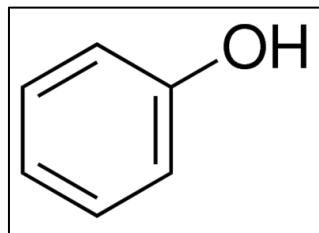


Abbildung 4: Grundstruktur des Phenols (MP Biomedicals, 2017)

Unterschiedliche Autorengruppen konnten bereits eine Vielzahl an unterschiedlichen Derivaten von Polyphenolen in *Rheum* spp. nachweisen, wie z. B. Flavonoide, Stilbene, Anthrachinone sowie Naphthalenglykoside (Krafczyk, 2008), (Harbone & Williams, 2000), (Ye, et al., 2007). Diese konnten auch in verschiedenen Forschungsprojekten am IBAS bestätigt werden (Kabrodt, 2006), (Ballert, 2017), (Sommermann, 2015). Darüber hinaus stellen sie für die vorliegende Arbeit einen wichtigen Aspekt dar, weshalb im Folgenden näher auf diese eingegangen wird.

Flavonoide

Flavonoide und deren Derivate stellen die größte Gruppe innerhalb der Stoffklasse der Polyphenole. Die hohe Varianz lässt sich auf die vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten der in der Abbildung 5 dargestellten Grundstruktur des Flavans zurückführen.

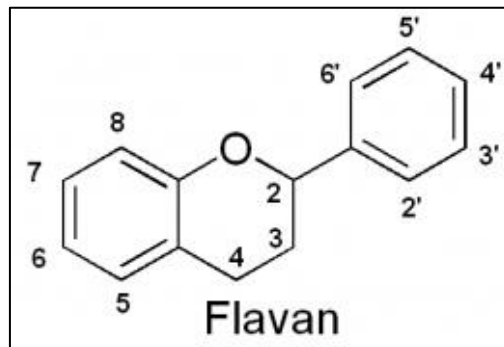


Abbildung 5: Grundstruktur des Flavans (naturstoffwiki, 2017)

Neben einem hohen Grad der Hydroxylierung am aromatischen Ringsystem können zudem Verknüpfungen der Hydroxylgruppen mit einem Zucker bzw. Phosphat entstehen. Weiter kann es ebenfalls zu Variationen am Pyranring kommen. Bisher konnten ca. 4000 unterschiedliche Verbindungen isoliert und identifiziert werden (Hänsel & Sticher, 2009). Für eine bessere Klassifizierung der enormen Anzahl an Stoffen unterteilte Harbone (1988) sie in folgende Untergruppen:

- Flavanone
- Flavone
- Flavonole
- Flavan-3-ole
- Proanthocyanidine
- Anthocyanidine

In der vorliegenden Arbeit ist ein breites Spektrum an Flavonoiden relevant, welche im Folgenden näher betrachtet werden.

Gerbstoffe

Im *Rheum* spp. können mit den hydrolysierbaren und den kondensierten zwei Gruppen von Gerbstoffen unterschieden werden. Hydrolysierbare Gerbstoffe sind Gallotannine sowie Ellagtannine, welche aus der entsprechenden Phenolcarbonsäure und einem Zucker bestehen. Der estergebundene Zucker kann über weitere Esterbindungen mit mehreren Phenolcarbonsäuren reagieren, siehe Abbildung 6. Höherpolymere Tannine entstehen durch eine Anbindung von Digallussäureester. Die Bezeichnung hydrolysierbar beruht auf der Möglichkeit der Esterbindungen, durch Enzyme oder Säuren gespalten zu werden (Hänsel & Sticher, 2009).

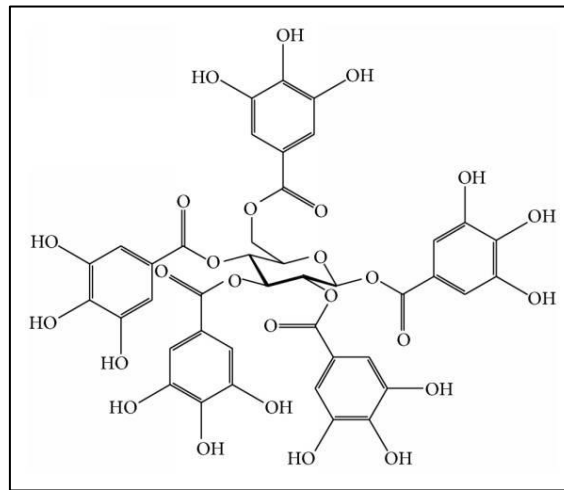


Abbildung 6: Darstellung der Struktur der Pentagalloylglukose (Deiab, et al., 2015)

Proanthocyanidine

Die Proanthocyanidine werden zu den kondensierten Gerbstoffen gezählt und bilden somit die zweite Gruppe der in *Rheum* spp. vorkommenden Gerbstoffe. Aufgebaut sind diese aus Untereinheiten der Flavan-3-ole bzw. Flavan-3,4-ole. Hierbei stellen die Procyanidine eine Untergruppe der Proanthocyanidine dar. Procyanidine sind Polymerstrukturen, aufgebaut aus mehreren Catechin- bzw. Epicatechin-Untereinheiten, siehe Abbildung 7 und 8 (Hänsel & Sticher, 2009).

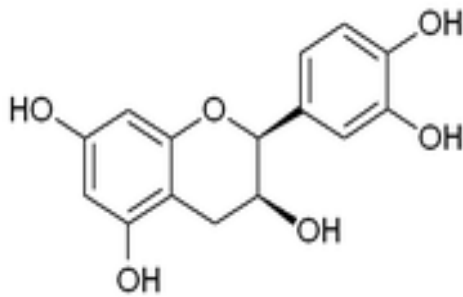


Abbildung 7: Darstellung der Struktur des Catechin (Wikipedia, 2018)

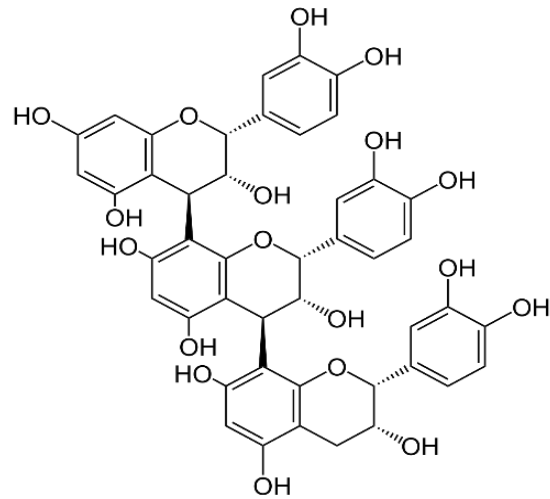


Abbildung 8: Struktur des Procyanidin C1 aus drei Catechinmonomeren (Wikipedia, 2016)

Stilbene

Die Stilbene basieren auf einer charakteristischen C6 - C2 - C6 - Struktur (siehe Tabelle 1). Die beiden äußeren Benzenringe (C6) werden durch eine ungesättigte C2-Kette miteinander verbunden. Verbindungen dieser Art können als Aglykone oder in glykosylierter Form vorliegen. Bisher bekannte Stilbene von *Rheum* spp. wurden vor allem aus den Wurzeln der Pflanze isoliert (Kabrodt, 2006), (Krafczyk, 2008). In der folgenden Tabelle 1 sind die Stilbengrundstruktur und die wichtigsten Derivate dargestellt.

Tabelle 1: Stilbengrundstruktur und deren Derivate (Delaunois, et al., 2008)

R ₁ am C-3	R ₂ am C-5	R ₃ am C-3'	R ₄ am C-4'	Name der Verbindung
O-Glukose	OH	CH ₃	OH	Rhaponticin
OH	OH	CH ₃	OH	Rhapontigenin
O-Glukose	OH	CH ₃	OH	Desoxyrhaponticin

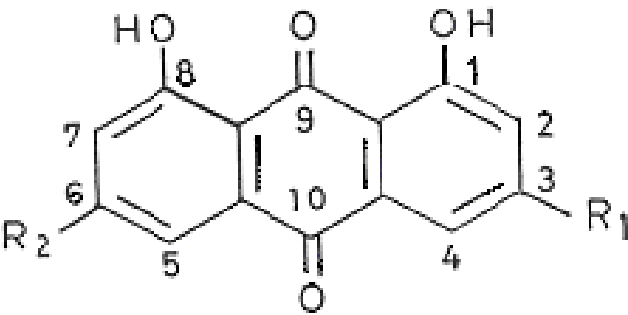
OH	OH	CH ₃	OH	Desoxyrhapontigenin
OH	OH	H	OH	Resveratrol
O-Glukose	OH	OH	H	Piceid
OH	OH	OH	OH	Piceatannol
CH ₃	CH ₃	H	OH	Pterostilben

Fortsetzung Tabelle 1

Anthrachinone

Anthrachinone besitzen eine für diese Stoffgruppe typische 1,8-Dihydroxyanthron-Struktur, welche ein spezifisches Substitutionsmuster aufweist. Ein besonderes pharmakologisches Merkmal der Anthrachinone liegt in ihrer laxierenden Wirkung. Neben dem Vorkommen in den Wurzeln des Rhabarbers, sind diese auch in Sennesfrüchten und -blättern sowie in der Aloe zu finden (Hänsel & Sticher, 2009). In der Tabelle 2 sind die Grundstruktur der Anthrachinone sowie auch deren Derivate dargestellt.

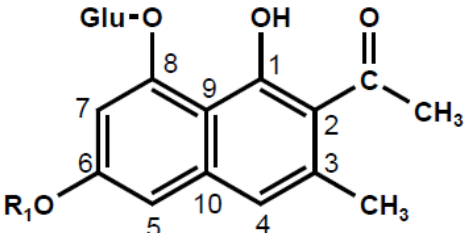
Tabelle 2: Anthrachinonderivate im Rheum (Hänsel & Sticher, 2009)

 <p>The diagram shows the chemical structure of an anthraquinone derivative. It consists of three fused rings: two benzene rings on the ends and a central quinone ring. The positions are numbered 1 through 10. Position 1 is the carbon at the top of the right-hand benzene ring, which has a hydroxyl group (OH) attached. Position 8 is the carbon at the top of the left-hand benzene ring, which has a hydroxyl group (HO) attached. The central quinone ring has carbonyl groups (C=O) at positions 9 and 10. Substituents R₁ and R₂ are attached at positions 3 and 6, respectively.</p>	R₁	R₂	Name der Derivate
	CH ₂ OH	H	Aloe-Emodin
	CH ₃	H	Chrysophanol
	CH ₃	OH	Emodin (=Rheumemodin, Frangulaemodin)
	CH ₃	OCH ₃	Physcion
	COOH	H	Rhein

Naphtholglukoside

Abschließend ist die Gruppe der Glykoside der Naphtholderivate Torachryson und 6 – Hydroxymusizin zu nennen. Die Tabelle 3 stellt die Grundstruktur sowie die Derivate mit den dazugehörigen Resten dar (Krafczyk, 2008).

Tabelle 3: Naphtholglukoside im Rheum (Krafczyk, 2008)

	R ₁	R ₂ (Glu)	Name der Derivate
	CH ₃	H	Torachryson-8-O-β-D-glukopyranosid
	CH ₃	Oxalyl	Torachryson-8-O-β-D-(6'-oxalyl)-glukopyranosid
	H	H	6-Hydroxymusizin-8-O-β-D-glukopyranosid

2.1.3 Nachgewiesene Wirkung der Rhabarberinhaltsstoffe

Im Laufe der Zeit wurden an den unterschiedlichen *Rheum* spp. bezüglich ihrer pharmazeutischen Wirkung weitere Untersuchungen durchgeführt. Anhand der daraus resultierenden Erkenntnisse wurden durch die Autorengruppen Ferrari und Torres sowie Harbone und Williams folgende Wirkungen der Inhaltsstoffe aus *Rheum*-Extrakten beschrieben (Ferrari & Torres, 2003), (Harbone & Williams, 2000):

- Antioxidative Wirkung
- Schutz der Blutgefäße
- Hemmung der LDL-Oxidation
- Antikarzinogene und antimutagene Wirkung
- Antiinflammatorische Wirkung
- Schutz vor UV- und ionisierender Strahlung
- Antibakterielle Eigenschaften
- Antivirale Eigenschaften
- Antikariogene Eigenschaften
- Anti-Histamin-Wirkung
- Antiallergene Wirkung
- Unterstützung der Vitamin C Wirkung

Weiterhin gilt die antifungale Aktivität der Flavonoide durch Harbone und Williams (2000) als gesichert. Anhand der von ihnen durchgeführten Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass Flavonoide in der Lage sind, die Sporenkeimung von Phytopathogenen zu inhibieren. Eine wichtige Rolle spielte dabei das Vorhandensein von hydroxylierten bzw. methoxylierten Substituenten (Harbone & Williams, 2000). Dieser Aspekt wurde im Besonderen anhand der Stilbene in Form des Resveratrols untersucht, da es als Phytoalexin gilt. Diese Stoffe werden im Sinne einer Abwehrreaktion nach einer Infektion unspezifisch im Bereich der Infektion akkumuliert. Dabei konnte eine Wirksamkeit gegenüber Bakterien und Pilzen festgestellt werden (Heß, 2008), (Sommermann, 2015).

2.2 Testsysteme zur Untersuchung der antifungalen Wirkung von Rheum-Extrakten

Untersuchungen in Bezug auf eine fungizide Wirkung von Testsubstanzen auf Pilze wurden bereits seit Anfang des 19. Jahrhunderts durchgeführt. Bei dieser Methode, welche auch noch heutzutage zu den gängigen Methoden zählt, werden potentielle Wirksubstanzen unter wässrigen Bedingungen mit entsprechenden Pilzsporen vereint. Anschließend wird eine eventuelle Einflussnahme auf die Keimung der Sporen unter dem Mikroskop bewertet. Neben diesem Verfahren gibt es eine weitere *in vitro* Methode, welche eine wirtspflanzenunabhängige Aussage zur fungiziden Wirkung einer Verbindung oder eines Extraktes geben kann. Bei dem sogenannten Agardiffusionstest wird die zu untersuchende Testsubstanz in den noch flüssigen Agar gegeben und in Platten gegossen. Daraufhin werden die Platten beimpft. Für diesen Zweck werden Myzelstücke des zu untersuchenden Pilzes verwendet. Stellvertretend können aber auch Sporen der entsprechenden Pilze für die Untersuchung herangezogen werden (Grewe, 1970). Um letztlich Aussagen über die Wirkung treffen zu können, werden unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanz eingesetzt. Anhand dieser wird das Wachstum des Myzels stärker bzw. schwächer gehemmt. Die beschriebenen Testsysteme geben als *in vitro* Tests lediglich eine Orientierung der fungiziden Wirkung, da sie im Gegensatz zu *in vivo* Tests den Einfluss der Wirtspflanze außer Acht lassen (Grewe, 1970). Für eine aussagekräftige Bestimmung der antifungalen Wirkung ist diese Interaktion jedoch von großer Bedeutung. In Anbetracht dessen wird im Fungizidscreening oftmals der Blattsegmenttest durchgeführt.

Bei diesem Verfahren werden abgetrennte Pflanzenteile, in den meisten Fällen die Blätter, mit einem pflanzlichen Pathogen innokuliert. Die so behandelten Pflanzenteile werden so lange am Leben erhalten, bis sich Symptome der Erkrankung entwickeln bzw. sichtbar werden (Sinclair & Dhingra, 1995).

2.3 Das Phytopathogen Echter Mehltau (*Blumeria graminis*)

2.3.1 Grundlegendes zum Echten Mehltau

Der Echte Mehltau (*Blumeria graminis*) zählt zu den wichtigsten Blattkrankheiten, da dieses Pathogen bei befallenen Beständen zu einem 30 prozentigen Ernteaussfall führen kann. Die Familie der *Erysiphaceae* umfasst eine Vielzahl von streng wirtsspezifischen Gattungen. Auf Grund dieser Spezialisierung kommt der Echte Mehltau vorwiegend auf Obst- und Gemüsepflanzen wie Erdbeeren, Gurken, Salaten sowie auf vielen Zierpflanzen vor (Hoos, 2017).

Die vorliegende Arbeit behandelt die Art *Blumeria graminis* als einen Themenschwerpunkt, weshalb im Folgenden genauer auf diesen eingegangen wird. Von einem Befall mit *Blumeria graminis* sind vor allem Getreidepflanzen und Gräser sowie eine Vielzahl von Wild- und Futtergräsern betroffen. (Heitefuss, et al., 2000) Gebietsbezogen (Deutschland, Österreich, Schweiz und Südtirol) werden 202 Arten zum Echten Mehltau gezählt, darunter auch die Gattungen *Blumeria* und *Erysiphe* (Klenke & Scholler, 2015). Es ist zu erwähnen, dass der Gattungsname *Erysiphe* ein Synonym darstellt. Wird in der Fachliteratur vom *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* gesprochen, so ist damit im eigentlichen Sinne die Gattung *Blumeria* gemeint. Die taxonomische Einordnung des Echten Mehltaus gliedert sich nach Klenke & Scholler (2015) wie folgt:

Abteilung:	<i>Ascomycota</i>
Unterabteilung:	<i>Pezizomycotina</i>
Klasse:	<i>Leotiomycetes</i>
Ordnung:	<i>Erysiphales</i>
Familie:	<i>Erysiphaceae</i>
Gattung:	<i>Blumeria</i> / <i>Erysiphe</i>
Art:	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>

Zur Art ist zu sagen, dass diese aus acht Spezialformen besteht, zu diesen zählen *f. sp. tritici* (Weizen), *f. sp. Hordei* (Gerste), *f. sp. secalis* (Roggen), *f. sp. avenae* (Hafer), *f. sp. agropyri* (*Agropyron spp.*), *f. sp. bromi* (*Bromus spp.*), *f. sp. poae* (Wiesenrispe), *f. sp. lolii* (Raigras).

Die jeweilige Spezialform kann dabei nur auf einer bestimmten Wirtspflanzenart parasitieren. So kann zum Beispiel *Blumeria graminis f. sp. hordei* nur Gerstenpflanzen infizieren und nicht auf eine Weizenpflanze übergreifen (Schubiger, 2018).

2.3.2 Schadbild des Phytopathogens *Blumeria graminis f. sp. hordei*

Die Art *Blumeria graminis f. sp. hordei* kann nur auf lebendigem Wirtspflanzengewebe wachsen und stellt somit einen obligat biotrophen Parasiten dar. Das Schadbild nach einem Befall ist durch die Ausbildung eines weiß flauschigen Polsters auf der Blattoberseite junger Blätter gekennzeichnet (Abbildung 9 A). Dieser entwickelt sich schnell zu dem typischen mehligem Belag. Im weiteren Verlauf kommt es zur Beeinträchtigung des Spross- und Wurzelwachstums der Wirtspflanze. Daraus resultiert eine Reduzierung der Bestandsdichte sowie des Tausendkorngewichts. Zum Ende der Vegetation bewirkt der Mehлтаubefall eine beschleunigte Chlorotisierung (Abbau des Chlorophylls), welche wiederum zur Nekrotisierung der Blattfläche führt. In der Abbildung 9 B sind ältere Myzele zu sehen, welche mit kleinen schwarzen Punkten gesprenkelt sind. Bei diesen handelt es sich um Cleistothecien, die die Hauptfruchtform des Echten Mehltaus darstellen (Heitefuss, et al., 2000) (Prigge, et al., 2004) (Schubiger, 2018).

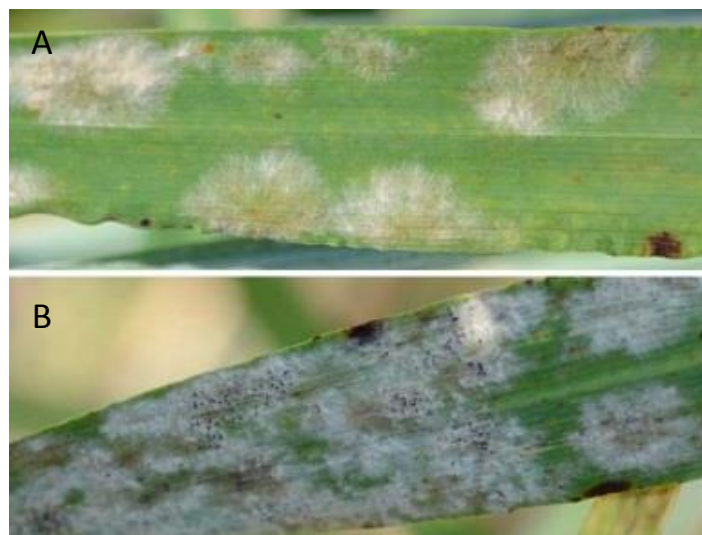


Abbildung 9: A) Echter Mehltau auf Gerste B) ältere Mehлтаubeläge mit Cleistothecien (Schubiger, 2018)

Das Phytopathogen setzt sich aus ineinander verfilzten, septierten Hyphen zusammen. Auf diesen werden Konidienträger gebildet, welche ihrerseits ellipsenförmige Konidien produzieren.

Die Größe unterliegt einer hohen Variabilität und reicht von 14 – 17 x 25 – 33 µm. Die Aufgabe der Konidien ist es eine asexuell bedingte epidemische Ausbreitung des Pathogens zu gewährleisten. Im Verlauf der sexuellen Vermehrung bilden sich die Cleistothecien. Auf dem Myzel stellen sich diese Hauptfruchtkörper als kugeliges Gebilde mit einem Durchmesser von ca. 135 – 250 µm und ohne jegliche Öffnungen dar. Im Inneren befinden sich zwischen 8 bis 25 Asci, welche wiederum 8 Ascosporen enthalten (Schubiger, 2018).

2.3.3 Lebenszyklus des Echten Mehltaus

Eine Vermehrung des Echten Mehltaus ist durch zwei unterschiedliche Strategien gekennzeichnet. So ist es diesem Pilz möglich, sich einerseits auf sexuelle und andererseits auf asexuelle Art fortzupflanzen. In der Abbildung 10 sind die beiden Strategien dargestellt.

Der sexuelle Lebenszyklus von *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* ist durch die heterothallischen Eigenschaften des Pilzes gegeben, auf Grund dessen die Hyphen in der Lage sind, zwei unterschiedliche Paarungstypen auszubilden.

Diese Art der Vermehrung tritt vor allem in den warmen und trockenen Spätsommermonaten auf, um die Vegetationsruhe in Form von Ascosporen zu überdauern. Andererseits nutzt der Pilz diese, wenn die Schädigung der Wirtspflanze bereits so weit vorangeschritten ist, dass diese kurz vor dem Absterben ist (Schubiger, 2018).

Bei der sexuellen Vermehrung beginnt die erste Phase der Fortpflanzung durch die Annäherung zweier Pilzmyzele (zwei Thalli) mit anschließender Verschmelzung der Ascogonien mit den Antheridien. Das Resultat dieser Vereinigung ist die Entstehung des Cleistotheciums. Wie bereits im Kapitel 2.3.2 erläutert, stellen diese den Hauptfruchtkörper des Echten Mehltaus dar. Innerhalb des Cleistotheciums reifen Asci heran, die bis zu acht Ascosporen beinhalten können. Während des Herbsts werden die gebildeten Ascosporen aktiv ausgeschleudert, um das aufgelaufene Wintergetreide bzw. andere Gräser zu infizieren und den Fortbestand zu sichern.

Vereinzelt können auch Cleistothecien auf lebendigem oder toten Pflanzenteilen die Winterperiode überstehen (Merz, 2014) (Schubiger, 2018).

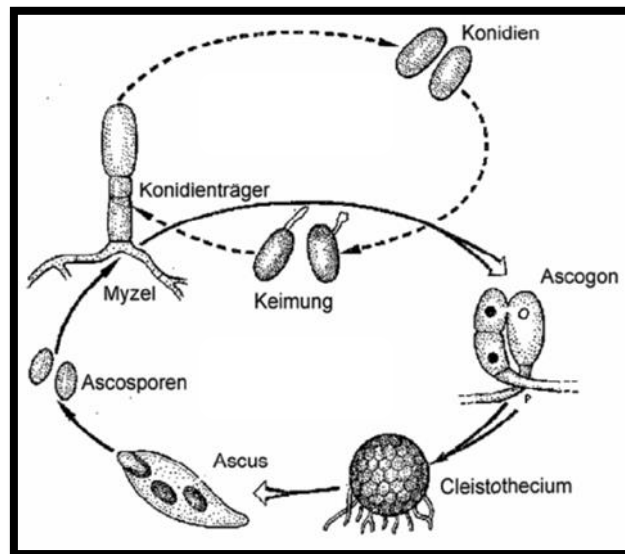


Abbildung 10: Sexueller und asexueller Entwicklungszyklus des Echten Mehltaus (Braun, 2018)

Der asexuelle Zyklus beginnt mit der Windverbreitung von Konidien, die zuvor von den Konidienträgern auf dem Myzel gebildet wurden. Konidien stellen ähnlich den Ascosporen eine weitere Sporenform des Phytopathogens dar. Nach dem Auftreffen der Konidien auf einen Wirt kommt es zur Ausbildung einer extrazellulären Matrix, welche einerseits zur Fixierung an den Wirt dient und zum anderen zur Kommunikation zwischen Wirt und Pathogen beiträgt. Circa eine halbe Stunde nach dem ersten Kontakt bildet die angehaftete Konidie den primären Keimschlauch aus.

Dessen Aufgabe besteht darin, die Identität des Wirtes zu erkennen und die Wasserversorgung über diesen zu gewährleisten. Weitere drei bis acht Stunden später bildet sich der zweite Keimschlauch aus, der sogenannte appressoriale Keimschlauch. Die Länge des zweiten Keimschlauches liegt zwischen 30 und 40 μm und an seinem Ende entwickelt sich das hakenförmige Appressorium, das durch ein Septum von der eigentlichen Konidie getrennt ist. Aus dem hakenförmigen Gebilde wächst, ca. 15 Stunden nach dem Erstkontakt, der Penetrationsschlauch, wodurch die Konidien-spore in der Lage ist, die Zellwand der Wirtszelle zu durchdringen. Ziel der Penetration ist die Bildung des Haustoriums am Ende des Penetrationsschlauches. Die Aufnahme von Nährstoffen aus der Wirtszelle wird auf diese Weise gewährleistet. Ist die zelluläre Versorgung mit Nährstoffen durch das Haustorium gesichert, fängt der Pilz an, seine Oberfläche auf dem Wirt zu vergrößern.

Auf Grund der Ausbreitung bilden sich etwa 24 Stunden nach dem Kontakt aus dem entstehenden Myzel, elongierende sekundäre Hyphen. Aus diesen wiederum entwickeln sich weitere appressoriale Keimschläuche, die zum Wachstum von sekundären Haustorien führen. Im Verlauf von drei bis vier Tagen hat sich das Myzel so weit ausgebreitet, dass es zur Bildung von Konidiophoren kommt, welche wiederum neue Konidien bilden (Nowara, 2008), (Schubiger, 2018). Die beschriebene Art der asexuellen Vermehrung stellt einen wesentlichen Bestandteil bei der Verbreitung von *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* dar, jedoch sind beide Arten der Vermehrung für den Fortbestand von entscheidender Bedeutung.

2.4 Extraktionsverfahren

Bei einer Extraktion werden Komponenten aus einem bestimmten Stoffgemisch unter Verwendung eines selektiven Lösungsmittels herausgelöst. Der so gewonnene Extrakt wird in nachfolgenden Schritten aufgereinigt, um das Extrakt-Lösungsmittelgemisch voneinander zu trennen. Extraktionsverfahren können auf Grund des Aggregatzustandes des verwendeten Lösungsmittels und des Extraktionsgutes in unterschiedliche Methoden eingeteilt werden: die Flüssig-Fest-Extraktion, die Flüssig-Flüssig-Extraktion, die Flüssig-Gas-Extraktion, die Gas-Flüssig-Extraktion bzw. die Fest-Flüssig-Extraktion (Schäfers, 2016). Der Wirkungsgrad einer Extraktion ist, ungeachtet vom gewählten Lösungsmittel, von mehreren Faktoren abhängig. Einer dieser Faktoren bezieht sich auf die Löslichkeit der zu extrahierenden Stoffe.

Dabei gilt, dass die Ähnlichkeit der Polarität des Lösungsmittels und des zu extrahierenden Stoffes sehr hoch sein sollte. Weiterhin haben die Faktoren Temperatur, Partikelgröße sowie die Portionsgröße einen Einfluss auf die Ausbeute der Extraktion. Durch den Einsatz hoher Temperaturen kann die Extraktionszeit deutlich verkürzt werden, jedoch sollte die Temperatur nicht zu hoch gewählt werden, da diese temperaturempfindliche Inhaltsstoffe zerstören können. Bezüglich der Partikelgröße ist zu erwähnen, dass diese so klein wie möglich zu wählen ist, da mit sinkender Partikelgröße die Extraktionsoberfläche steigt und somit der Stoffaustausch schneller ablaufen kann (Aprentas, 2017).

Als grundlegende Bestandteile dieser Arbeit werden vor allem die Methoden der Fest-Flüssig- sowie der Flüssig-Flüssig-Extraktion im Folgenden näher erläutert. In der Abbildung 11 ist der allgemeine Ablauf einer Extraktion schematisch dargestellt.

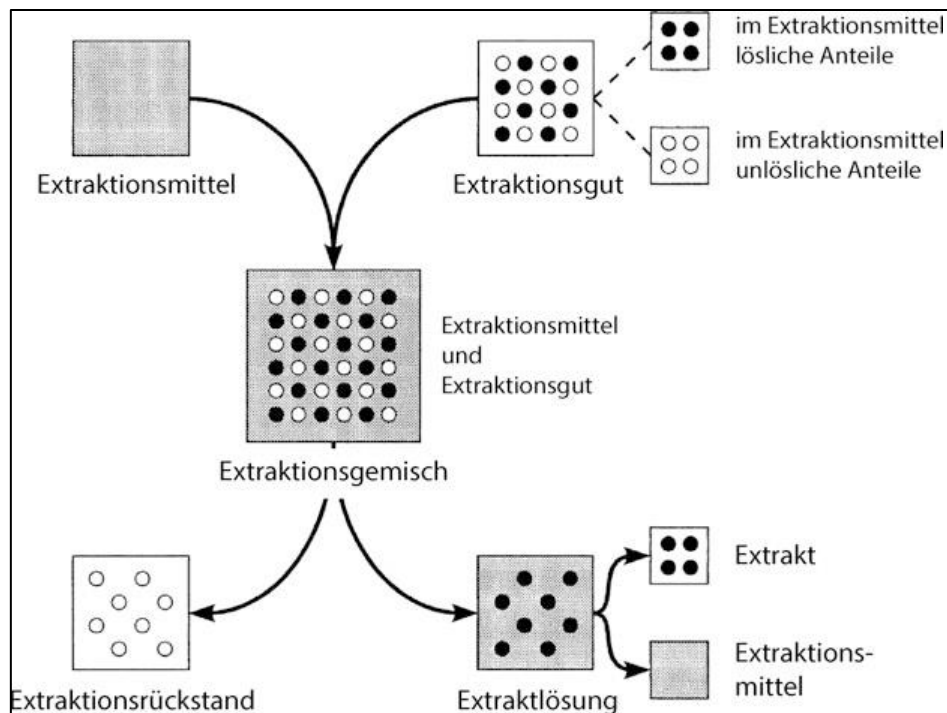


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Extraktion (Aprentas, 2017)

Die Feststoffextraktion wird vor allem für die Isolation von Naturstoffen aus pflanzlichem Ursprungsmaterial angewandt. Bei diesem Verfahren werden die löslichen Bestandteile unter Gebrauch eines geeigneten Lösungsmittels, wie zum Beispiel Methanol, aus dem Feststoff herausgelöst. Ein bestmögliches Extraktionsergebnis wird gewährleistet, wenn das Extraktionsgut im Vorfeld größtmöglich zerkleinert wird.

Dies führt dazu, dass die Austauschoberfläche vergrößert wird und somit kürzere Diffusionswege ermöglicht werden. Der Grad der Zerkleinerung sollte jedoch nicht zu klein gewählt werden, da es sonst zum Verklumpen der Extraktionsmasse kommen könnte, was sich wiederum negativ auf die Extraktionsausbeute auswirkt. Nach einer erfolgreichen Extraktion folgt die Aufreinigung der Extraktlösung. Eine der gängigsten Methoden ist die Vakuumrotationsverdampfung. Nachdem das verwendete Lösungsmittel abgetrennt worden ist, folgt ein Trocknungsschritt, zum Beispiel unter Zuhilfenahme der Gefriertrocknung, wie sie auch am IBAS durchgeführt wird.

Hierfür wird der Extrakt mit destilliertem Wasser aufgenommen, eingefroren und der Gefriertrocknungsanlage zugeführt. Im Laufe dieses Prozesses wird ein Vakuum erzeugt, welches die Temperatur so weit herabsenkt, dass das enthaltene Wasser direkt vom festen in den gasförmigen Zustand übergeht und somit der Extrakt getrocknet wird (Aprentas, 2017) (Heckmann, 2018).

Neben der Fest-Flüssig-Extraktion stellt die Flüssig-Flüssig-Extraktion einen weiteren Aspekt dieser Arbeit dar. Bei diesem Verfahren wird aus einem Flüssigkeitsgemisch unter Verwendung eines Lösungsmittels eine Komponente herausgelöst. Das eingesetzte Lösungsmittel muss dabei folgende Eigenschaften aufweisen: eine hohe Selektivität, es darf sich nicht mit dem Extraktionsgut mischen und es muss ein ausreichend großer Dichteunterschied zwischen Extraktionsmittel und Extraktionsgut vorhanden sein. Zur Verbesserung des Extraktionsergebnisses wird das Gemisch im Kreislauf gepumpt und über Rührwerke gefördert. Der Prozess ist abgeschlossen, sobald sich ein Stoffgleichgewicht eingestellt hat. In den meisten Fällen enthält das Flüssigkeitsgemisch nach der Extraktion einen Anteil nicht herausgelöster Substanzen. Aus diesem Grund bedarf es mehrerer Extraktionsstufen, um eine erschöpfende Extraktion zu gewährleisten. Anschließend erfolgt ähnlich der Fest-Flüssig-Extraktion die Abtrennung des Lösungsmittels und die weitere Aufbereitung des Extraktes (Hahn, et al., 2003) (Heckmann, 2018).

2.4.1 Accelerated Solvent Extraction (ASE)

Die Abkürzung ASE steht für Accelerated Solvent Extraction und stellt eine Spezialform der Fest-Flüssig-Extraktion dar. Bei diesem Verfahren werden die zu extrahierenden Substanzen unter Druck und bei hohen Temperaturen aus einer festen Probenmatrix herausgelöst. Abbildung 12 zeigt schematisch den Aufbau einer ASE-Apparatur.

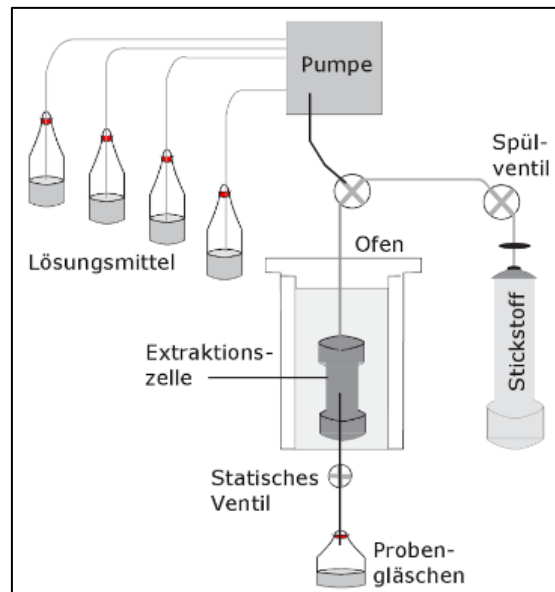


Abbildung 12: Schematischer Aufbau einer ASE-Apparatur (Gey, 2015)

Die Probe befindet sich bei diesen Verfahren in einem Edelstahlzylinder, welcher ein Volumen von 11 ml bis ca. 500 ml aufweisen kann. Um das Austreten von Probenmaterial zu verhindern, sind an den jeweiligen Enden der Extraktionszelle Edelstahlfritten sowie Papierfilter enthalten. Während der Extraktion befindet sich die Zelle in einem regulierbaren Ofen. Je nach Beschaffenheit der Proben können Temperaturen zwischen 40°C und 200°C sowie Drücke von 0,3 bis 20 MPa angelegt werden. Auf Grund dieser variablen Parameter kann die Reaktionskinetik stark beschleunigt werden, was sich darin äußert, dass der Prozess der Extraktion wesentlich schneller abläuft (Muermann & Salzer, 2016) (Gey, 2015). Je nach Aufgabenstellung werden im Anschluss weitere Extraktions- beziehungsweise Analyseschritte durchgeführt.

2.4.2 Industrielle Extraktionsmethoden (DIG-MAZ)

Die Extraktionsanlage „DIG-MAZ 10“ der österreichischen Firma SamTech stellt eine multifunktionale Anlage dar, in der mehrere Extraktionsverfahren kombiniert werden. So kann einerseits eine Fest-Flüssig-Extraktion und andererseits eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt werden. Im Rahmen einer mehrstufigen Extraktion laufen diese Prozesse nacheinander und nicht parallel ab. Der Extraktionsprozess kann unter Druck von bis zu 10 bar sowie unter Vakuum durchgeführt werden. Besonderheiten der „DIG-MAZ 10“ sind, dass der gesamte Extraktionsverlauf in einem geschlossenen Kreislauf abläuft. Die Auslaugung des jeweiligen Produktes kann sowohl warm also auch kalt erfolgen. Weiterhin verfügt die Anlage über eine mechanische Kräuterpresse, um eine höhere Extraktionsausbeute zu ermöglichen. Zudem ist auf Grund der Bauweise eine einfache Befüllung, Entleerung und Reinigung gewährleistet. Für eine erleichternde Arbeitsweise können automatische Prozessabläufe programmiert werden (SamTech, 2018).

In den Abbildungen 13 und 14 ist die Extraktionsanlage „DIG-MAZ 10“ der Firma SamTech dargestellt, wie sie im Extraktionstechnikum des IBAS aufgebaut ist.



Abbildung 13: „DIG-MAZ 10“ Anlage am IBAS (von rechts) (Schellenberg, 2017)



Abbildung 14: „DIG-MAZ 10“ Anlage am IBAS (von links) (Schellenberg, 2017)

2.5 HPLC

Die Abkürzung HPLC steht für Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie und bezeichnet ein Verfahren zur Trennung von Stoffen mit geringen physikalischen und chemischen Unterschieden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Gesetz der Verteilung, bei welchem sich die zu trennenden Stoffe zwischen zwei Phasen verteilen. Eine Phase besteht aus einem festen Trägermaterial und wird als stationäre Phase (Sorbenz) bezeichnet. Für diese wird hauptsächlich Silicagel als Träger eingesetzt. Die andere wird als mobile Phase (Eluent) bezeichnet (Gey, 1998) (Löffler & Petrides, 2013). Die angestrebte Trennung ist zum einen auf Adsorptions-, Austausch- und Verteilungsvorgänge zurückzuführen, welche sich gegenseitig beeinflussen und zum anderen bedingt durch die Polarität der Stoffe (Latscha & Klein, 2013).

Auf Basis der polaren Eigenschaften können zwei Arten von HPLC-Methoden unterschieden werden. Bei der Normalphasenchromatographie weist die stationäre Phase einen polaren und die mobile Phase einen unpolaren Charakter auf. Die Umkehrphasenchromatographie (RPLC), welche in dieser Arbeit angewandt wird, weist eine unpolare stationäre und eine polare mobile Phase auf. (Löffler & Petrides, 2013) Auf Letztere wird aus diesem Grund im Folgenden näher eingegangen. Als Eluenten werden im Rahmen der RPLC vor allem hochreines Wasser in Kombination mit einem organischen Lösungsmittel, wie zum Beispiel Methanol oder Acetonitril, verwendet. Um eine höhere Trennleistung zu erzielen, werden die entsprechenden Lösungsmittel in einem Gradienten eingesetzt. Das heißt, dass sich die Konzentration der zugeführten Lösungsmittel über die gesamte Dauer der HPLC-Methode ändert. Durch eine höhere Menge an organischem Lösungsmittel im Verhältnis zum Wasser kann damit eine Erhöhung der Elutionskraft bewirkt werden. (Salzer, et al., 2016) Die stationäre Phase besteht aus Silicagel, welches homogen in einen Stahlzylinder eingebracht wird. Dieses Material kann eine Vielzahl an unterschiedlichen Strukturen aufweisen. So können zum Beispiel sphärische bzw. gebrochene kugelförmige (core shell) Partikel als Säulenmaterial genutzt werden. Je gleichmäßiger die Verteilung und die Packung des Füllmaterials erfolgt, desto höher ist die spätere Trennleistung. Neben den sphärischen können auch kompakte Monolithen für die Packung einer HPLC-Säule eingesetzt werden. In RPLC werden an das verwendete Trägermaterial schwach polare bis unpolare funktionelle Gruppen kovalent gebunden, wie zum Beispiel „Octyl-Gruppen“ bzw. „Octadecyl-Gruppen“.

Auf Grund der sterischen Behinderung bereits gebundener, unpolarer Seitengruppen können nicht alle Silanol-gruppen abgedeckt werden. Um weiterhin mögliche polare Wechselwirkung zu unterbinden, werden in einem zweiten Schritt kurzkettige Silane auf dem Trägermaterial umgesetzt. Dieser Prozess wird als „Endcapping“ bezeichnet. (Aprentas, 2017) (Salzer, et al., 2016)

Letztendlich wird das zu trennende Probengemisch bei einem definierten Fluss unter hohem Druck auf Grund der spezifischen Wechselwirkungen mit den unpolaren Bestandteilen der stationären Phase sowie der mobilen Phase getrennt. In der RPLC eluieren die polarsten Substanzen dementsprechend zuerst.

2.6 Massenspektroskopie

Mit Hilfe der Massenspektroskopie (MS) kann das Masse/Ladungs-Verhältnis von ionisierten Teilchen im Hochvakuum bestimmt werden. Die MS-Technik besitzt dabei eine hohe Spezifität bei einer gleichzeitigen hohen Sensitivität. Eine Identifikation der Analyten erfolgt dabei über das Quasimolekülion und seine spezifischen Fragmentationen bzw. bei Kopplung mit der HPLC zusätzlich über die Retentionszeit. (Gressner & Arndt, 2013) Durch MRM-Übergänge können darüber hinaus Quantifizierungen vorgenommen werden, um den Gehalt bestimmter definierter Inhaltsstoffe in einer Probenmatrix zu bestimmen.

Generell besteht ein Massenspektrometer aus drei Bestandteilen. Erstens aus der Quelle, welche die zu analysierenden Ionen erzeugt. Zweitens aus dem Massenanalysator, welcher die Ionen nach ihrem spezifischen Masse/Ladungs-Verhältnis trennt und drittens aus dem Detektor, der dem Nachweis der Ionen dient. (Salzer, et al., 2016)

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde die ESI (Elektronenspray-Ionisation) als Ionenquelle angewandt und wird im Folgenden beschrieben. Die Abbildung 15 zeigt den schematischen Ablauf einer Ionisation unter Verwendung der Electrospray-Ionisation. Bei dieser Methode werden die Analytmoleküle von der HPLC kommend in die Ionenquelle gefördert. In der Ionenquelle treten die in Lösung vorliegenden Analytmoleküle aus einer unter Spannung stehenden Stahlkapillare heraus und die Lösung wird bei Atmosphärendruck mittels eines Gasstroms als Aerosol zerstäubt. Das Aerosol besteht dabei aus kleinen, bei negativer Ionisierung, negativ geladenen

Tröpfchen (Droplets). Im weiteren Verlauf kommt es zum Verdampfen des Lösungsmittels in den Droplets, wodurch die Größe ab- und die Oberflächenladungsdichte zunimmt. Bei hohen Flüssen aus der HPLC wird die Verdampfung zudem durch das Erhöhen der Temperatur unterstützt. Haben die Droplets eine kritische Größe erreicht, kommt es zur Coulomb Explosion. In Folge derer negativ geladene Quasimolekülonen entstehen, welche durch den Massenanalysator weiter zum Detektor geleitet werden.

Da es sich bei der ESI um eine sanfte Ionisierung handelt, entstehen nur wenige Fragmentationen. Der Transport der entstandenen Ionen wird durch eine angelegte Gleichspannung ermöglicht. (Gey, 1998)

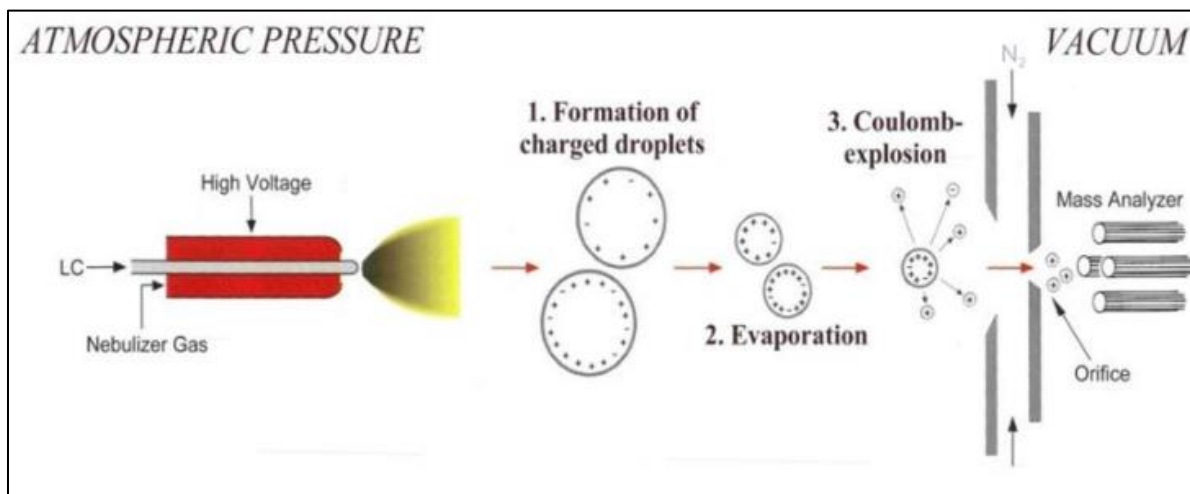


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Elektrospray Ionisation (Kaiser, 2009)

In der Abbildung 16 sind der schematische Aufbau eines Quadrupol-MS sowie die Ionenbewegung von der Ionenquelle durch den Massenanalysator hin zum Detektor dargestellt. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Massenanalysator handelt es sich um einen Triple-Quadrupol. Ein Quadrupol besteht dabei aus vier gegenüberliegenden Metallstäben. An den jeweils gegenüberliegenden Stäben ist einerseits eine Hochfrequenzspannung und andererseits eine überlagerte Gleichspannung angelegt, wobei die Ladungen in kurzen Intervallen gewechselt werden, um so eine oszillierende Bewegung der Ionen zu ermöglichen. Dabei werden jedoch nur die Ionen zum Detektor transportiert, die dem gesuchten Masse/Ladungs-Verhältnis entsprechen.

Nicht gesuchte Ionen berühren ab einem bestimmten Punkt einen der vier Stäbe und verlieren dadurch ihre Ladung.

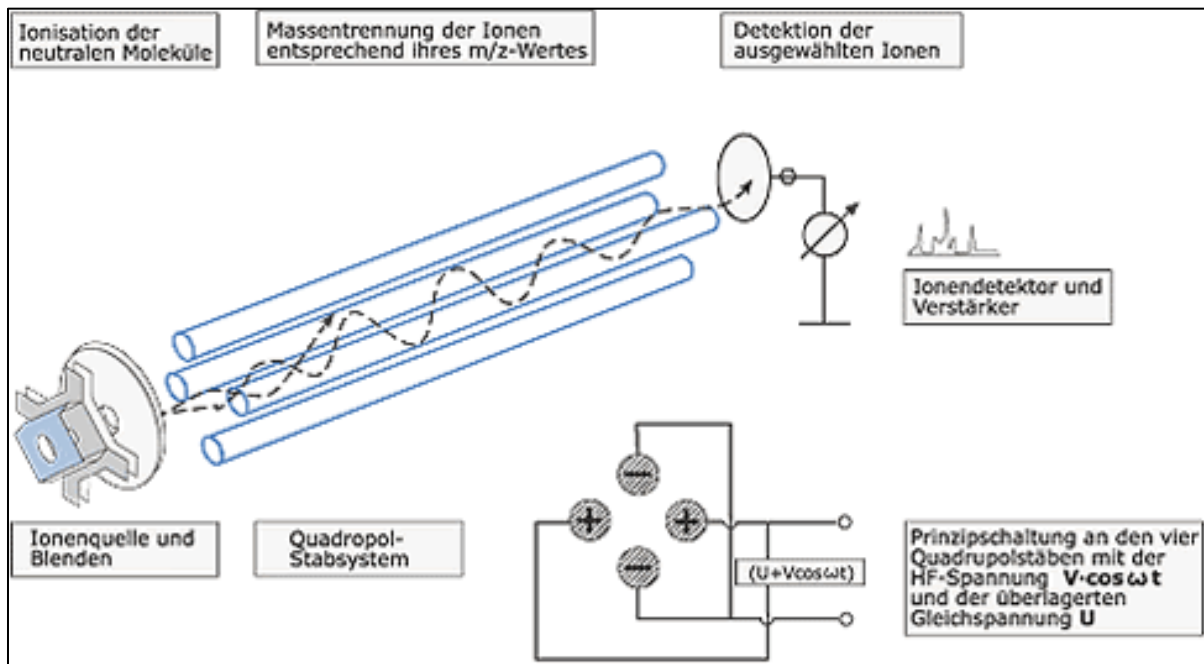


Abbildung 16: Quadrupol mit Beispiel einer Ionenbewegung (Schröter, Ernst; Laser, Carsten, 2018)

Für einen qualitativen Nachweis der in der Probe enthaltenen Substanzen wird ein vollständiger Scan (full scan) durchgeführt. Dieser erfasst über die gesamte Analyse alle Massen im ausgewählten Scanbereich. Der quantitative Nachweis der enthaltenen Substanzen erfolgt, wie bereits erwähnt, über die mittels Standardsubstanzen bekannten MRM-Übergänge. Für diese Methode werden alle drei Quadrupole in Serie geschaltet. Im Q1 erfolgt die Selektion des gesuchten Quasimoleküliens, welches in den Q2 transportiert wird. Letztere fungiert unter Verwendung des Kollisionsgases Stickstoff als Stoßzelle. Im Inneren des Q2 kollidieren die Ionen mit dem eingebrachten Stickstoff, in Folge dessen sogenannte Fragmentionen entstehen. Diese werden im Q3 selektiv zum Detektor, einem Sekundärelektronenvervielfältiger, geführt. Anhand einer im Vorfeld durchgeführten externen Standardkalibrierung werden die generierten Peakflächen der am Q3 detektierten Fragmente quantifiziert. (Ballert, 2014) (Sommermann, 2015)

3. Material und Methoden

3.1 Rhabarberernte

Das für diese Arbeit verwendete Pflanzenmaterial von *Rheum officinale* Baill. (Interne IBAS-Bezeichnung GT 42) wurde im Oktober 2017 auf dem Versuchsfeld der Hochschule Anhalt am Standort Bernburg-Strenzfeld geerntet. Im Zuge der Ernte wurde das Wurzelmaterial auf dem Feld grob zerkleinert. Anschließend erfolgte eine Lufttrocknung für zwei Tage.

Die vereinzelt Wurzeln wurden wiederum weiter zerkleinert und für mehrere Tage bei 60 °C getrocknet. Nach diesem Schritt erfolgte die Zerkleinerung der getrockneten Wurzeln unter Gebrauch einer Schneidmühle (Schneidmühle GSL 180/120, Zerma Zerkleinerungsmaschinen GmbH, Zuzenhausen) mit einem Siebdurchmesser von 4 mm. Dabei wurden Partikelgrößen von 2 bis 4 mm erreicht. Neben dem so aufbereiteten GT 42 E2017 stand weiterhin Wurzelmaterial aus den Erntejahren 2009 und 2013 des GT 42 zur Verfügung. Dieses Pflanzenmaterial wies ebenfalls eine Körnung von 2 – 4 mm auf und wurde seit der Ernte bei -18 °C gelagert. Alle drei Proben wurden als Rohmaterial für verschiedene Extraktionsverfahren genutzt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

3.2 Extraktion des Wurzelmaterials nach IBAS-Standardarbeitsanweisung

Die Extraktion des Wurzelmaterials des GT 42 E2017 wurde anhand der Standardarbeitsanweisung „AA23_Vo1_Extraktion_Rheum“ vorgenommen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist diese Anweisung modifiziert worden, indem die Schritte der Kältefällung sowie die Zentrifugation der Proben entfielen. Durch diesen Prozessschritt der Kältefällung sollten lipophile Bestandteile abgetrennt werden. Die Abbildung 17 zeigt den angepassten Ablauf. Der Umfang der Extraktion besteht aus mehreren Teilschritten. Den ersten Schritt stellt eine mehrstufige methanolische Extraktion dar. Schritt zwei und drei sind durch das mehrmalige Ausschütteln mit Petrolether sowie Ethylacetat gekennzeichnet. Die Proben der ASE-Extraktion durchliefen ebenfalls das mehrmalige Ausschütteln mit Petrolether und Ethylacetat. Nachdem das Lösungsmittel der generierten EtOAc-Phase verdampft war, wurden die lösungsmittelfreien Proben, in Abhängigkeit von der Probenmenge, in ca. 50 bis

250 ml reines Wasser aufgenommen und bei einer Temperatur von $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Anschließend erfolgte die Gefriertrocknung der Proben. Die gewonnenen Lyophilisate wurden homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der für diese Arbeit ebenfalls genutzte GT 10 E2014 lag bereits als Lyophilisat vor und war auch nach der IBAS-Standardmethode aufbereitet worden (Sommermann, 2015). Die ebenfalls im Zuge der klassischen Extraktionsmethode hergestellten Wasserphasen des GT 10 E2014 und GT 42 E2017 wurden im weiteren Verlauf der Arbeit nicht genutzt.

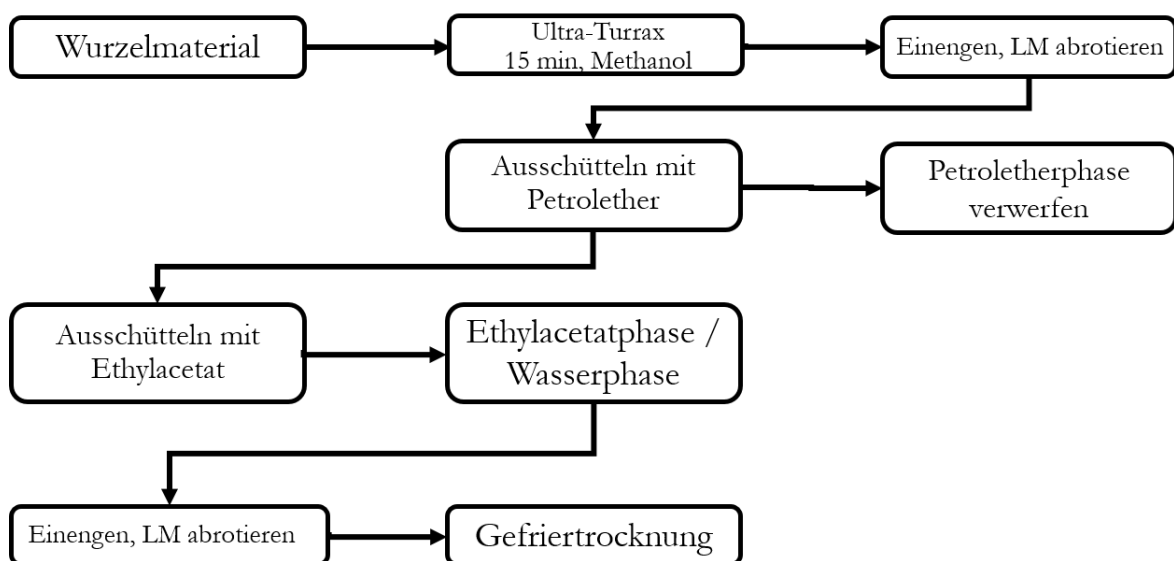


Abbildung 17: Klassisches Extraktionsschema modifiziert nach Richter 2000

Nachfolgend zeigt die Tabelle 4 die Lösungsmittel für die Herstellung der EtOAc-Phase des GT 42 E2017 nach interner Standardarbeitsanweisung.

Tabelle 4: Lösungsmittel der manuellen Extraktion nach IBAS-interner Standardarbeitsanweisung

<u>Lösungsmittel</u>	<u>Reinheit</u>	<u>Hersteller</u>
Methanol	99 % technisch	Jäklechemie
Wasser	destilliert	-
Petrolether	99 % technisch	Jäklechemie
Ethylacetat	99 % technisch	Jäklechemie

3.3 ASE-Extraktion des Rhabarbers

Im Folgenden wird näher auf die ASE-Extraktion eingegangen, welche ausschließlich für den GT 42 E2017 verwendet wurde.

3.3.1 Probenvorbereitung

Als Vorbereitung für die ASE wurde das Probenmaterial (siehe Kapitel 3.1) unter Verwendung weiterer Mühlen ((IKA M 20 Universalmühle; Laborfachhandel Gaudig, Osterweddingen), (IKA Yellowline A10 analytische Mühle; Laborfachhandel Gaudig, Osterweddingen)) feinst vermahlen. Das hergestellte Pulver wurde gesiebt. Für die nachfolgenden Versuche sind vorrangig Partikel mit einer Größe kleiner als 250 µm verwendet worden.

Dafür wurden ca. 6 g des GT 42 E2017 abgewogen, mit etwa der gleichen Menge an Diatomeenerde (Diatomeenerde ISOLUTE HM-N; Separtis GmbH, Grenzach-Wyhlen) vermengt, die Extraktionszellen damit befüllt und verschlossen. Eine genaue Dokumentation der entsprechenden Mengen erfolgte auf einem separaten Datenblatt (siehe Anlage 6).

3.3.2 Lösungsmittelvorversuche

Im Rahmen der Vorversuche ist eine Vielzahl von Lösungsmitteln hinsichtlich ihrer Extraktionseigenschaften an der ASE (ASE 200, DIONEX ThermoFisher Scientific) untersucht worden. Alle Proben durchliefen eine zweistufige Extraktion in Doppelbestimmung. Für die in der Tabelle 5 dargestellten Varianten 1, 2 und 3 wurden reine Lösungsmittel mit differenzierten Eigenschaften hinsichtlich ihrer Polarität in absteigender Reihenfolge für die Vorversuche herangezogen. Die Lösungsmittelvarianten 4, 5 und 6 bestanden hingegen aus einem Methanol-Wasser-Gemisch (70:30, v/v). Den Varianten 5 und 6 wurde jeweils 0,1 % Essigsäure sowie 0,05 % Ameisensäure zugesetzt, um den pH-Wert des Lösungsmittelsystems leicht in den sauren Bereich zu verschieben. Das für die unterschiedlichen Versuche genutzte Wasser wurde einer Reinstwasseranlage (arium® pro Reinstwasser System; Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG; Göttingen) entnommen.

Im Gegensatz zu den Varianten 1 bis 6 kamen in den Varianten 7 und 8 in den beiden Extraktionsstufen unterschiedliche Lösungsmittel zum Einsatz. Die ASE-Parameter sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: ASE-Parameter der Lösungsmittelvorversuche

<u>Variante</u>	<u>Lösungsmittelstufe</u>		<u>Temperatur</u> (°C)	<u>Druck</u> (mPa)	<u>Haltezeit</u> (min)
	<u>Stufe 1</u>	<u>Stufe 2</u>			
1	MeOH (100 %)		60	10	20
2	EtOH (100 %)		60	10	20
3	Aceton (100 %)		60	10	20
4	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v)		60	10	20
5	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v) + 0,1 % Essigsäure		60	10	20
6	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v) + 0,05 % Ameisensäure		60	10	20
7	H ₂ O (100%)	MeOH (100 %)	60	10	20
8	H ₂ O + 0,1 % Eisessig	MeOH (100 %)	60	10	20

In der Tabelle 6 werden die für die durchgeführten Extraktionen verwendeten Lösungsmittel aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Lösungsmittel der ASE-Vorversuche

<u>Lösungsmittel</u>	<u>Reinheit</u>	<u>Hersteller</u>
Methanol	HPLC	Roth
Ethanol	HPLC	Roth
Aceton	HPLC	VWR
Wasser	Reinst	-
Essigsäure	100 % p.a.	Roth
Ameisensäure	98 % p.a.	VWR

3.3.3 Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Extraktionstemperatur

Im Anschluss an die Lösungsmittelvorversuche wurde mit einem ausgewählten Lösungsmittelsystem die optimale Extraktionstemperatur an der ASE ermittelt. Für die durchgeführten Versuche wurde, im Gegensatz zur vorherigen Extraktion, eine andere Körnung des Probenmaterials eingesetzt.

Aus technischen Gründen musste das Probenmaterial in einer Partikelgröße von 250 µm bis 4 mm gewählt werden (siehe Kapitel 4.1.2.3). Die Tabelle 7 stellt die ASE-Parameter der Varianten dar. Die Verwendung der Lösungsmittel erfolgte analog zu Tabelle 6.

Tabelle 7: ASE Parameter der temperaturbedingten Lösungsmittelvorversuche

<u>Variante</u>	<u>Lösungsmittelstufe</u>		<u>Temperatur (°C)</u>	<u>Druck (mPa)</u>	<u>Haltezeit (min)</u>
	<u>Stufe 1</u>	<u>Stufe 2</u>			
9	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v)		40	10	20
10	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v)		80	10	20
11	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v)		100	10	20

3.3.4 Herstellung der Ethylacetat-Phasen der ASE-Extrakte

Die so erarbeiteten ASE-Extrakte wurden innerhalb ihrer jeweiligen Variante vereinigt und in anschließenden Arbeitsschritten, wie im Folgenden beschrieben, weiter behandelt. Im ersten Schritt wurden die verwendeten Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers abgetrennt. Anschließend wurden die lösungsmittelfreien Proben in reinst Wasser aufgenommen und mit Petrolether sowie nachfolgend mit Ethylacetat, angelehnt an die Arbeitsanweisung AA23_Vo1_Extraktion_Rheum, mehrmals ausgeschüttelt. Aus dem entstandenen Zweiphasengemisch wurde jeweils nur die Ethylacetatphase weiterverwendet. Als Abschluss wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers das enthaltene Ethylacetat ebenfalls entfernt und der lösungsmittelfreie Extrakt in ca. 50 ml reinst Wasser aufgenommen. Dieser wurde bei – 18 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert, homogenisiert und letztlich auch bei – 18 °C bis zur Verwendung gelagert. Die für die Herstellung der EtOAc-Phasen benötigten Chemikalien (Petrolether, Ethylacetat) sowie Wasser wurden bereits in Tabelle 6 dargestellt.

3.4 Voruntersuchungen an der HPLC

Die durchgeführten Untersuchungen an der HPLC (interne IBAS Bezeichnung LC-Taste) dienten zur Festlegung eines geeigneten Lösungsmittelsystems sowie der optimalen Extraktionstemperatur.

Als vorbereitenden Schritt wurden 500 µl jeder Extraktionsstufe in ein vorgewogenes 1,5 ml Tube (Safe-Lock Tubes 1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Anschließend wurden die jeweiligen Lösungsmittel in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301; Eppendorf AG, Hamburg) bei einer Temperatur von 40 °C abgedampft. Je nach zurückgewogener Menge an Extrakt wurden die Proben mit einem entsprechenden Volumen MeOH auf eine Konzentration von 20 bzw. 10 mg/ml eingestellt. Für die HPLC-Läufe wurden alle Proben auf eine einheitliche Konzentration von 1 mg/ml verdünnt, filtriert (Spritzenvorsatzfilter ([Ø 0,45µm PTFE] 13 mm Spritzenvorsatzfilter; VWR International GmbH, Dresden)) und in ein 1,5 ml Tubes überführt. Anschließend wurden 200 µl der methanolischen Probenlösung mit 800 µl des Eluenten A (H₂O + 0,5 % Essigsäure + 0,1 % MeOH) der HPLC-Methode (Tabelle 8) gemischt.

In der Tabelle 8 sind die Lösungsmittel für die Probenherstellung sowie die Analyse mittels LC-Taste dargestellt. Das für die unterschiedlichen Versuche genutzte Wasser wurde einer Reinstwasseranlage (arium® pro Reinstwasser System; Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG; Göttingen) entnommen.

Tabelle 8: Lösungsmittel für die LC-Taste

<u>Lösungsmittel</u>	<u>Reinheit</u>	<u>Hersteller</u>
Methanol	HPLC	Roth
Wasser	reinst	-
Essigsäure	100% p.a.	Roth

Für die Analyse an der LC-Taste wurde je 1 ml der verdünnten Proben in 1,5 ml Vials ([1,5 ml Rollrand Vial; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren], [Bördelkappe N11 (Butyl); Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren]) überführt. Nach der Bestückung des Autosamplers mit den entsprechenden Probenvials erfolgte die Analyse der Proben.

Die Tabelle 9 stellt die Geräte sowie verwendeten Materialien für die Chromatografie an der LC-Taste.

Tabelle 9: Geräte und Materialien der LC-Taste

<u>Gerät</u>	<u>Geräte-Nr.</u>	<u>Serie</u>	<u>Hersteller</u>
Degaser	G1379B	1200	Agilent Technologies
Binary Pump	G1312A	1200	Agilent Technologies
Autosampler ALS	G1329A	1200	Agilent Technologies
Säulenofen	G1330B	1260	Agilent Technologies
DAD-Detektor	G1315D	1200	Agilent Technologies

Software: Agilent ChemStation for LC 3D systems Agilent Technologies 2001-2010

Nachfolgend sind die Parameter der HPLC-Methode dargestellt, die für die Untersuchung der Proben aus den Lösungsmittelvorversuchen sowie den temperaturbedingten Extraktionen angewendet wurden:

Säule: Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250mm, 5µm)

Vorsäule: EC 4/3 Universal RP (3 x 4mm)

Solvent A: Wasser mit 0,5 % Essigsäure

Solvent B: Methanol

Laufzeit: 47 min

Flußrate: 0,8 ml/min

Temperatur: 30°C

Wellenlängen: 280nm, 320 nm, 430nm

Gradient:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0	72	28
6	66	34
38	0	100
45	0	100
46	72	28
47	72	28

3.5 Extraktion des GT 42 im kleintechnischen Maßstab

Die kleintechnische Extraktion des *Rheum officinale* Baill. (GT 42 E2009, E2013 und E2017) erfolgte unter Verwendung der „DIG-MAZ 10“ der Firma SamTech. Ein Vorteil dieser Extraktionsanlage besteht darin, dass verschiedene Extraktionsmethoden in einem Apparat durchgeführt werden können. Dabei besteht die IBAS-Anlage aus zwei Modulen. In dem Modul 1, welches den Feststoffextraktor beinhaltet, erfolgte die Fest-Flüssig-Extraktion des Wurzelmaterials. Für diese stand ein Füllvolumen von 10 l zur Verfügung. In Abhängigkeit des zu extrahierenden Materials können zwischen einem und vier kg (genaue Auflistung siehe Kapitel 4.1.3 Tabelle 23) mit entsprechenden Lösungsmittelmengen aufbereitet werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden unterschiedliche Erntejahre des GT 42 mit dem im Vorfeld erarbeiteten Lösungsmittelsystem (MeOH:H₂O, 70:30 v/v) in zwei Stufen extrahiert. Ein genaues Fließschema der Anlage ist in der Anlage 1 hinterlegt. Nach der Feststoffextraktion des Wurzelmaterials erfolgte die Flüssig-Flüssig-Extraktion im Modul 2. Wie in der manuellen Extraktion wurde im ersten Schritt das enthaltene Extraktionsmittel vom eigentlichen Extrakt getrennt. Dieser Verfahrensvorgang wurde im Dünnschichtverdampfer durchgeführt. Das entstandene Extraktkondensat wurde daraufhin in einem zweistufigen Prozess mit Petrolether im Flüssig-Flüssig-Extraktor entfettet. Nach der Abtrennung des verwendeten Petrolethers wurde dieser Schritt mit Ethylacetat wiederholt. Die so entstandene EtOAc-Phase der Gesamtextrakte wurde wiederum vollständig vom Lösungsmittel befreit, eingefroren und anschließend lyophilisiert. Diese wurden homogenisiert und bei – 18 °C gelagert. Die Tabelle 10 fasst die Anlagenparameter für die beiden Extraktionstechniken an der DIG-MAZ 10 zusammen.

Tabelle 10: Parameter der DIG-MAZ 10 für die Fest-Flüssig- und die Flüssig-Flüssig-Extraktionen

Fest-Flüssig-Extraktion				
Extraktions- temperatur (°C)	Extraktionsstufe 1		Extraktionsstufe 2	
	Lösungsmittel- menge (kg)	Extraktionszeit (min)	Lösungsmittel- menge (kg)	Extraktionszeit (min)
60	20	180	16	120
Flüssig-Flüssig-Extraktion				
Lösungs- mittel	Extraktionsstufe 1		Extraktionsstufe 2	
	Lösungsmittel- menge (kg)	Extraktionszeit (min)	Lösungsmittel- menge (kg)	Extraktionszeit (min)
Petrolether	20	180	20	120
Ethylacetat	20	180	20	120

Die verwendeten Lösungsmittel wurden bereits in Tabelle 4 erfasst.

3.6 High-Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometrie

Die vorliegende Methode für die HPLC-MS Messungen wurde von Frau Ballert 2017 erarbeitet (Ballert, 2017). Im Folgenden sind die Standardsubstanzen sowie deren exakte Massen aufgeführt, welche für die externe Standardkalibrierung dieser Methode genutzt wurden:

Flavan-3-ole:

(C) Catechin	$C_{15}H_{14}O_6$	290,0790 g/mol
(EC) Epicatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	290,0790 g/mol
(EGC) Epigallocatechin	$C_{15}H_{14}O_7$	306,0740 g/mol
(ECG) Epicatechingallat	$C_{22}H_{18}O_{10}$	442,0900 g/mol
(EGCG) Epigallocatechingallat	$C_{22}H_{18}O_{11}$	458,0849 g/mol

Procyanidine:

(PB1) B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578,1424 g/mol
(PB2) B2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578,1424 g/mol
(PC1) C1	$C_{45}H_{38}O_{18}$	866,2058 g/mol

Stilbene:

(THSGL) 3,4',5-Trihydroxystilben-3-O-beta-D-glukopyranosid	$C_{20}H_{22}O_8$	390,1315 g/mol
(PI) Piceatannol	$C_{14}H_{12}O_4$	244,0736 g/mol
(RA) Rhaponticin	$C_{21}H_{24}O_9$	420,1420 g/mol
(DRA) Desoxyrhaponticin	$C_{21}H_{24}O_8$	404,4200 g/mol
(RE) Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	228,0786 g/mol

Phenolcarbonsäuren:

(CHLS) Chlorogensäure	$C_{16}H_{18}O_9$	354,0951 g/mol
(FES) Ferulasäure	$C_{10}H_{10}O_4$	194,0579 g/mol
(CUS) p-Cumarsäure	$C_9H_8O_3$	164,0473 g/mol

Die Tabelle 11 gibt die Standards, deren Reinheit sowie die jeweiligen Hersteller an.

Tabelle 11: Standardsubstanzen für die Quantifizierung

Standard	Reinheit	Hersteller
(+) - Catechin	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
(-) - Epicatechin	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
(-) - Epigallocatechin	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
(-) - Epicatechingallat	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
(-) - Epigallocatechingallat	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
Procyanidin B1	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
Procyanidin B2	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
Procyanidin C1	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
3,4',5-Trihydroxystilben-3-O-beta-D-glukopyranosid (Piceid)	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
Piceatannol	HPLC	BIOTREND, Chemicals AG, Wangen/Zürich, Schweiz
Rhaponticin	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
Desoxyrhaponticin, from Rhubarb Root	HPLC	Sigma
Resveratrol	HPLC	Extrasynthese, Genay Frankreich
Chlorogensäure	HPLC	Roth, Karlsruhe
Ferulasäure	HPLC	Roth, Karlsruhe
p-Cumarsäure	HPLC	Roth, Karlsruhe

Probenvorbereitung für LC-MS Analyse

Die lyophilisierten Proben wurden in einem Methanol-Wasser-Gemisch mit dem Verhältnis 20:80 (v/v) gelöst. Die Konzentration lag dabei bei 1 mg/ml. Für die im Folgenden beschriebenen MS-Methoden Q1-Scan und Quantifizierung mussten diese Lösungen mit dem oben genannten Lösungsmittelgemisch (MeOH:H₂O (20:80 v/v)) 1:100 verdünnt werden. Sämtliche Proben wurden im letzten Schritt der Probenvorbereitung mit einem Membranfilter (Spritzenvorsatzfilter([Ø 0,2 µm RC] 13 mm Spritzenvorsatzfilter; Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel)) filtriert.

HPLC-DAD-Methode

Bei dieser Methode erfolgte keine Kopplung der Chromatografie mit dem MS, da die Proben für die massenspektrometrische Detektion zu konzentriert vorlagen. Die Detektion erfolgte mittels DAD. Von den so nachgewiesenen Substanzen wurden jeweils die Peakflächen ermittelt. Da der DAD keine Auskunft über die Substanz selbst liefert, muss zur Identifizierung dieser Substanzen eine Q1-Scan-Methode durchgeführt werden (s.u.). Dabei wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die genauen Parameter der Methode sind folgend aufgeführt:

Säule: SYNERGI Hydro-RP 80 A; 250 x 2,0 mm, 4 µm Phenomenex
 Mobile Phase: A: Wasser, 0,1% Ameisensäure
 B: 100% Methanol

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
25	30	70
30	0	100
34	0	100
35	75	25
45	75	25

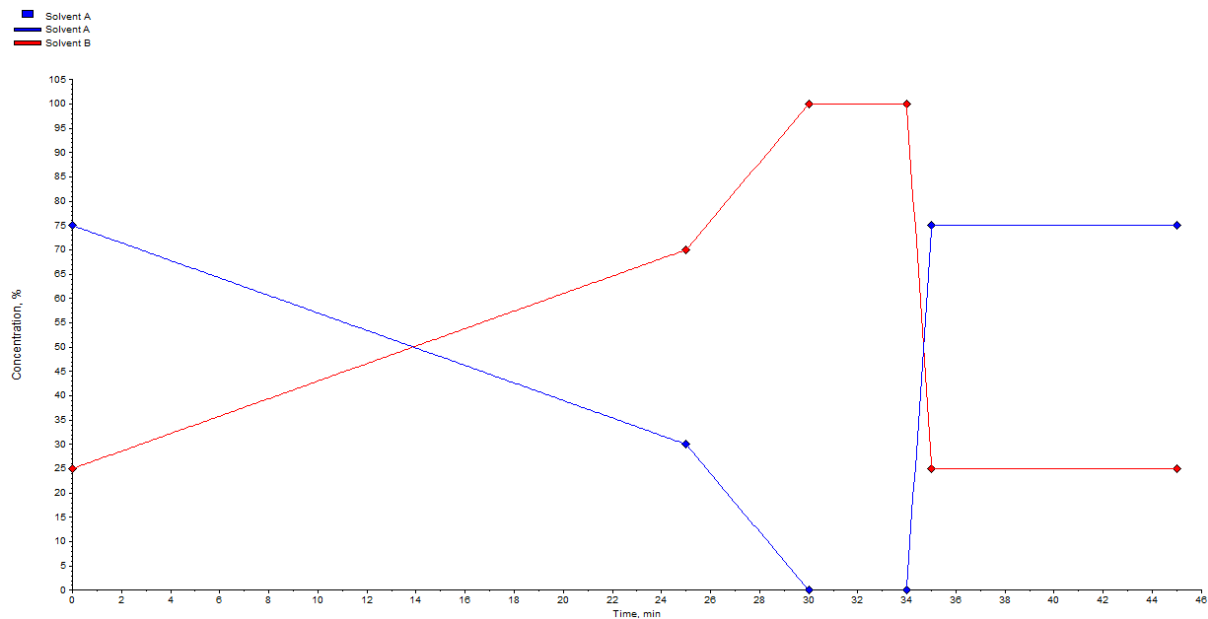


Abbildung 18: Darstellung des Gradientenverlaufes der angewandten HPLC-MS Methode

Flussrate: 0,250 ml/min.
 Injektion: 10 µl Probe/ Standard
 Konzentration: 1 mg/ml
 Temperatur Autosampler: 4°C
 Temperatur Ofen: 40° C
 Detektor: DAD, Spectral Data:
 UV/VIS Start (nm): 190 Stop (nm): 950
 Step Width (nm): 2 Slit Width (mm): 4
 Zeit: 45 Minuten

MS-Methode Q1-Scan

Unter Verwendung des Quadrupol 1 (Q1 MS (Q1)) wurde ein Full-Scan durchgeführt, welcher einen Total-Ion-Current (TIC) lieferte. Für jeden erhaltenen Peak wurde das entsprechende Massenspektrum generiert und das sich daraus ergebene Masse/Ladungs-Verhältnis mit Angaben aus der Literatur für *Rheum*-typische Inhaltsstoffe verglichen. Somit konnte eine semiquantitative Auswertung der Konzentrationsverhältnisse in den Proben erfolgen. Die entsprechenden Parameter dieser Methode sind im Folgenden aufgeführt. Für die Analyse wurden die Proben im Vorfeld mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (20:80 v/v) 1:100 verdünnt.

Identifizierung der Substanzen

Proben 1:100 verdünnen.

MS: Gerät: 5500 Qtrap
 Quelle: Elektronenspray-Ionisation (ESI)
 Scan type: Q1-Scan
 Polarity: Negativ
 Scan rate: 200 Da/s
 Time: 5,7555 sec/cycle
 Cycles: 469
 Duration: 44,989 min

Parameter Range:

Start amu: 100
 Stop amu: 1250

<u>Source/Gas:</u>		<u>Compound:</u>
CUR:	35 psi	EP: - 10 V
IS:	- 4200 V	DP: - 120 V
TEM:	475°C	
GS1:	70 psi	
GS2:	75 psi	

MS-Methode Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte über eine MRM-Methode (Multiple Reaction Monitoring) mit jeweils einem Übergang pro Standardsubstanz. Die Substanz wurde jeweils zugleich über einen, mittels IDA-Criteria, angehängten EPI-Scan bestätigt. Für die Analyse musste die Probe im Vorfeld mindestens 1:100 verdünnt werden.

Injektion: 10 µl

MS: Gerät: 5500 Qtrap
 Quelle: ESI
 Scan type: MRM (MRM)-IDA-EPI
 Polarity: Negativ

Source/Gas:

CUR: 35 psi
 CAD: Medium
 IS: - 4200 V
 TEM: 475°C
 GS1: 70 psi
 GS2: 75 psi

MRM-MS:

Dwell time: 150 msec
Duration: 44,944 min

Compound-MRM:

EP: - 10 V
DP, CE, CXP siehe Tab. 2

Die Tabelle 12 fasst die Compoundparameter für die 16 Standardsubstanzen zusammen. Aufgeführt ist neben dem Quasimolekülion (schwarz) auch der MRM-Übergang für den Quantifier (rot) zur Quantifizierung mit den zugehörigen Werten für DP, CE und CXP.

Tabelle 12: Compoundparameter der MRM Übergänge der 16 Standardsubstanzen

ID	[M-H] ⁻	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Catechin	289.079/ 245.180	-150	-20	-7
Epicatechin	289.080/ 245.100	-110	-22	-11
Epigallocatechin	305.074/ 125.000	-125	-30	-13
Epicatechingallat	441.090/ 169.100	-125	-24	-15
Epigallocatechingallat	457.085/ 169.000	-105	-22	-17
Procyanidin B1	577.143/ 289.080	-160	-34	-15
Procyanidin B2	577.142/ 289.100	-120	-34	-11
Procyanidin C1	865.206/ 125.000	-95	-96	-9
Trihydroxystilben-glc	389.132/ 227.000	-155	-22	-27
Piceatannol	243.074/ 158.800	-130	-38	-23
Rhaponticin	419.142/ 256.900	-140	-26	-13
Resveratrol	227.079/ 142.800	-125	-36	-19
Desoxyrhaponticin	403.420/ 241.100	-55	-24	-9
Chlorogensäure	353.095/ 190.900	-50	-30	-9
Ferulasäure	193.058/ 133.900	-50	-20	-9
p-Cumarsäure	163.047/ 119.000	-40	-20	-11

IDA-Criteria:**IDA-First Level Criteria**

Select: 1 to 2 most intense Peaks

Häkchen bei „After Dynamic Background Subtraction of Survey Scan“

Survey → IDA Experiment: Which exceeds 500 cps

Exclude former target ions: After 2 occurrences

For 60 sec

Mass Tolerance: 250 mDa

Include/Exclude

Tabelle 13: Include List

Mass (Da)	RT (min)	Width (sec)	Intensity (cps)
865.206	6.620	90	100
577,100	5.460	90	100
577,140	3.880	90	100

Die Include List (siehe Tabelle 13) stellt sicher, dass ein EPI trotz geringer Intensität des Survey scans aufgenommen wird.

Die Tochter (119,0 Da) der p-Cumarsäure (163,047 Da) war über den gesamten Chromatografie-Lauf als hohes Untergrundsignal vorhanden und verursachte dadurch häufige Spektrenaufnahmen. Durch den Ausschluss des Mutterions (siehe Exclude List Tabelle 14) von 0 bis 10 min sowie 14 bis 44 min wurde die Anzahl der Spektren auf die Retentionszeit der p-Cumarsäure ($t_R = 11,77$ min) reduziert.

Tabelle 14: Exclude List

Mass (Da)	RT (min)	Width (sec)
163.047	5.000	600
163.047	29.000	1800

EPI (2 EPI-Experimente aufgesetzt)

Scan rate: 1000 Da/s

Number of Scans to sum: 1

Product of: 30,000 Da

Delay Time: 0 sec

Advanced MS: Dynamic-Fill-Time aktiviert

Compound-EPI:

EP:	- 10 V
DP:	-120 V
CE:	-35 eV
CES:	20 eV

Um den gesamten Bereich vom kleinsten Fragmention bis zum größten Mutterion abzudecken, wurde der Bereich des EPI von 80 bis 870 Da gewählt.

Tabelle 15: Parameter Range

Start (Da)	Stop (Da)	Time (sec)
80.000	216.629	0.1367
216.629	870.000	0.6534

Kenndaten der Quantifizierung

In der nachfolgenden Tabelle 16 sind neben der Retentionszeit der 16 Standardsubstanzen auch die Anzahl der zur Kalibrierung verwendeten Standardkonzentrationen, die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in ng/ml für jede Substanz sowie die EPI-Schwelle dargestellt und werden als LOD und LOQ angegeben. Darunter versteht man für den LOD einen Wert der noch zuverlässig nachgewiesen werden kann. Der LOQ hingegen gibt die kleinste Konzentration an, welche quantitativ anhand einer vorgegebenen Methode nachgewiesen werden kann. Die EPI-Schwelle ist die Konzentration, bei der ein EPI aufgenommen wird. Ohne EPI ist keine qualitative Bestätigung der Standardsubstanz möglich, wodurch die Substanz nicht quantifiziert werden kann.

Tabelle 16: Kenndaten der Quantifizierung für die 16 Standardsubstanzen

Standardsubstanz	Kalibrierlevel	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	EPI-Schwelle [ng/ml]	MW der Rt [min] (n=36)
Catechin	18	<0,25	0,25	0,25	5,299
Epicatechin	18	0,5	1	0,25	7,870
Epigallocatechin	16	0,25	1	0,5	4,912
Epicatechingallat	18	<0,25	0,25	0,25	10,418
Epigallocatechingallat	16*	<0,25	0,25	0,25	7,086

Procyanidin B1	18	0,25	1	0,25	3,869
Procyanidin B2	18	0,5	1	0,25	5,472
Procyanidin C1	18	1,5	3	3	6,616
Trihydroxystilben-glc	17*	<0,25	0,25	0,25	12,048
Piceatannol	18	<0,25	0,25	0,25	13,080
Rhaponticin	18	<0,25	0,25	0,25	14,276
Resveratrol	18	<0,25	0,25	0,25	16,326
Desoxyrhaponticin	18	<0,25	0,25	0,25	19,895
Chlorogensaeure	18	<0,25	0,25	0,25	6,963
Ferulasaeure	18	<0,25	0,25	0,25	12,821
p-Cumarsaeure	18	0,25	0,5	0,25	11,760

(Fortsetzung Tabelle 16)

18 Kalibrierlevel von 0,25 ng/ml bis 200 ng/ml

* höchstes Kalibrierlevel ist 100 ng/ml (danach tritt Sättigung auf)

Anzahl Messungen: M = 2 (Doppelbestimmung von jedem Level)

Korrelationskoeffizient $r^2 > 0,99$

LOD: Level of detection → S/N-Ratio > 3

LOQ: Level of quantitation → S/N-Ratio > 10

Der EPI sollte einen Purity-Wert über 80 % erreichen. Befindet sich die Probe in einer anderen Matrix als die in der Library vorhandenen Spektren, können auch Purity-Werte unter 80 % die Standardsubstanz qualitativ bestätigen. Da die Standards und die Proben aus unterschiedlichen Matrices stammen, sind teilweise schlechtere Werte möglich.

3.7 Blattsegmenttest

Für die Testung der antifungalen Wirkung der *Rheum*-Extrakte des GT 42 der Erntejahre 2017, 2013 und 2009 sowie des GT 10 Erntejahr 2014 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das *in vivo* Verfahren des Blattsegmenttests durchgeführt.

Als Modellsystem wurde der Echte Mehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* [Bgh]) an Gerste verwendet. Das Pflanzenpathogen wurde von der JLU Gießen (Institut für Phytopathologie) bereitgestellt.

Seine Kultivierung erfolgte in einem wöchentlichen Zyklus. Am Anfang jedes Zyklus wurde eine Pflanzschale mit jungen Gerstenpflanzen in einem Kühlbrutschrank (RUMED®; Typ 3201; Rubarth Apparate; Laatzen) bereitgestellt. Die Durchführung der Versuche erfolgte an anfälliger Sommergerste der Sorte „Steffi“ (Ackermann Saatzucht GmbH & Co. KG, Irlbach).

Für die Anzucht der Gerstenpflanzen wurden je 6 Samenkörner pro Gefäß in Göttinger 7x7x8 cm Töpfe (Hermann Meyer KG, Rellingen) in Fruhstorfer Topferde Typ T (feine Struktur; Gärtnereibedarf Kammlott GmbH, Erfurt) ausgesät. Das Substrat setzte sich aus Vulkanton, Torf sowie Rindenumus zusammen. Die Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen (\varnothing 19,5 °C und 51,8 % relativer Luftfeuchte) für drei Wochen angezogen und dabei wöchentlich mit 0,1 % 8 – 8 – 6 NPK – Dünger – Lösung (acht Prozent Stickstoff, acht Prozent Phosphat, sechs Prozent Kalium) mit Spurenelementen (Proagro GmbH, Abendberg) gedüngt. Im geeigneten Pflanzenstadium, d.h. wenn das zweite Blatt eine Länge von mindestens 10 cm erreicht hatte, erfolgte die Applikation der ausgewählten Gesamtextrakte. Dabei wurden die EtOAc-Phasen protektiv ca. 48 h vor der Inokulation mit *Bgh* eingesetzt. Appliziert wurde mittels Sprühverfahren, bei dem eine Vakuummembranpumpe mit Zerstäuberaufsatz (Hofmann Glastechnik GmbH; Staudt) und einem Druck von 1 bar zum Einsatz kam. Zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Benetzung der Blattober- sowie Blattunterseite wurde den Extrakten als Adjuvans 0,1 % BREAK-THRU® S 240 (Evonik Industries AG, Essen; polyethermodifiziertes Polysiloxan) zugemischt. Am Tag der Inokulation wurden je 15 Blattsegmente der zweit- bzw. drittjüngsten Blätter beginnend von der Halmbasis zu je 10 cm abgeschnitten und auf Wasseragarplatten mit enthaltener Benzimidazolösung (0,5 % Agar und 40 ppm Benzimidazol) ausgelegt. Letzteres diente dem Grünerhalt der Blätter. Die quadratischen Petrischalen und Benzimidazol wurden von Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe bzw. Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bezogen. Anschließend wurden die präparierten Blattsegmente mittels Mehltauturm durch Rieselverteilung mit *Bgh* inokuliert. In den Abbildungen 19 und 20 ist der Mehltauturm dargestellt.



Abbildung 19 und 20: Darstellung des verwendeten Mehltauturms (IBAS)

Nach einer Inkubation von 7 Tagen bei 20 °C, 80 % relativer Luftfeuchte und einem 12 h / 12 h Tag/Nacht-Rhythmus erfolgte eine visuelle Abschätzung des Befalls (prozentuale Anzahl von *Bgh*-Pusteln pro Blattsegment auf 7 cm Blattlänge). Neben der Bonitur wurden die Konidien pro Milliliter auf einer Fläche von 10 cm² mittels mikroskopischer Auszählung bestimmt. Dafür wurden vier Objektträger, an zufällig gewählten Stellen, im Mehltauturm platziert und zusammen mit den Testplatten inokuliert. Die Anzahl der Konidien ergab sich durch die Auszählung der vier Objektträger. Der sich daraus ergebende Mittelwert ergab rund 64400 Konidien pro ml bezogen auf 10 cm². Die folgende Abbildung 21 stellt exemplarisch das verwendete Boniturschema der evaluierten Blattsegmente dar. Das detaillierte Boniturschema ist in der Anlage 2 abgebildet.



Abbildung 21: Auszug des verwendeten Boniturschemas zur visuellen Abschätzung der prozentual mit Echtem Mehltau befallene Blattfläche (bezogen auf die Blattfläche bei einer Blattlänge von 7 cm)

3.8 Statistische Auswertung

Die erhobenen Ergebnisse wurden unter Verwendung der Software SigmaPlot 13 ausgewertet. Für einen Überblick der Daten hinsichtlich der Mittelwerte bzw. Mediane wurde die deskriptive Statistik angewandt. Anhand dieser Daten wurden die Messwerte mit weiteren statistischen Testverfahren auf signifikante Unterschiede überprüft.

Auf Grund der in dieser Arbeit angewandten Versuchsgestaltung zur Evaluierung der antifungalen Wirkung von verschiedenen Extrakten des GT 42 (Klassisch Extrahiert E2017; DIG-MAZ Extrakte E2017/E2013/E2009) sowie GT 10 (Klassisch Extrahiert) gegenüber einer Kontrollgruppe mit Wasser, wiesen diese mehr als drei Stichproben auf. Diesbezüglich wurden die erarbeiteten Daten auf signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben mit der Varianzanalyse (ANOVA) getestet. Grundlage dieses parametrischen Testverfahrens ist die Voraussetzung der Normalverteilung sowie einer Varianzhomogenität der Daten. Hierbei wird von SigmaPlot standardmäßig der Kolmogorov-Smirnov-Test für die Ermittlung der Normalverteilung und für die Untersuchung auf gleiche Varianzen der Levene-Mediane-Test angewandt. (SigmaPlot, 2010) Dabei nimmt die Nullhypothese der ANOVA an, dass zwischen den Stichproben keine Unterschiede in Bezug auf die Mittelwerte vorliegen (Von Detten, et al., 2008). Die Grundlage der ANOVA bezieht sich dabei auf das Verhältnis der Varianzen, die zwischen den Stichproben resultieren, zu der Varianz, die innerhalb der Stichproben besteht. Hierbei spricht man von der sogenannten F-Teststatistik. Bei geringen Unterschieden der entsprechenden Mittelwerte zwischen den jeweiligen Stichproben liegt der F-Wert um den Wert 1. Sollten größere Unterschiede bestehen, so nimmt der F-Wert ebenfalls einen größeren Wert an. Daraus resultierend würde die Nullhypothese abgelehnt werden, da ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben vorliegt. (Von Detten, et al., 2008) Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 95\%$ zu Grunde gelegt, d.h. bei 5% ($p = 0,05$) der Daten wird die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt. Besaßen die Daten nicht die entsprechende Voraussetzung für eine ANOVA, wurde von SigmaPlot analog der nicht-parametrische Test Kruskal-Wallis-ANOVA nach Rängen durchgeführt. Für diesen Test wurden die jeweiligen Daten unabhängig ihrer entsprechenden Stichprobe nach Rängen geordnet und die daraus ergebenden durchschnittlichen Rangwerte jeder Stichprobe miteinander verglichen.

Bei einer entsprechenden Abweichung voneinander wurde die Nullhypothese verworfen. (SigmaPlot, 2010) (Von Detten, et al., 2008)

Anhand des Multiplen Vergleichstest (Post-hoc Test) wurde ermittelt, zwischen welchen Stichproben signifikante Unterschiede bestanden. Auf Grund des Versuchsdesigns des in dieser Arbeit verwendeten Blattsegmenttests kam der Dunnett-Test zur Anwendung. Dieser verglich die Mittelwerte des Gesamtextrakts des GT 10 sowie die verschiedenen Varianten des GT 42 mit der entsprechenden Kontrollgruppe (inokulierte Wasserkontrolle). Die Darstellung der Boniturergebnisse erfolgte anhand von Boxplot-Diagrammen. Die Verteilung der Boniturergebnisse sowie deren statistische Auswertung durch SigmaPlot 13 sind den Anlagen 7 und 8 dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Zu Beginn werden im folgenden Kapitel die Herangehensweise und die daraus resultierenden Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten des GT 42 E2017 dargestellt. Im weiteren Verlauf erfolgt die Auswertung der semiquantitativen sowie quantitativen Bestimmung der Inhaltsstoffspektren sowohl unter Berücksichtigung der angewandten Extraktionsmethoden als auch der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 im Vergleich zum GT 10 E2014. Abschließend werden die Ergebnisse zur funktionellen Wirkung der EtOAc-Phasen der Gesamtextrakte des GT 42 (E2017 / E2013 / E2009) sowie des GT 10 (E2014) anhand des durchgeführten Blattsegmenttests gegen das Phytopathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* aufgezeigt.

4.1 Ergebnisse der Extraktion des GT 42

4.1.1 Ergebnisse und Diskussion der manuellen Extraktion

Die Extraktion des GT 42 E2017 erfolgte nach der im Kapitel 3.2 beschriebenen, jedoch modifizierten Standardarbeitsanweisung „AA23_Vo1_Extraktion_Rheum“. Die Modifikation beruhte darauf, dass das Probenmaterial im Vorfeld zerkleinert wurde, um die spezifische Oberfläche zu vergrößern und einen höheren Stoffübergang zu ermöglichen. Für diese wurden, ähnlich der Probenvorbereitung für die ASE, Partikel von einer Größe von 250 µm bis 4000 µm verwendet (vergleiche Kapitel 4.1.2.3). Darüber hinaus wurde der Prozessschritt der Kältefällung ausgelassen. In der Tabelle 17 sind die Ausbeuten der manuellen Extraktion des GT 42 E2017 sowie die des GT 10 E2014 dargestellt. Das zugehörige Extraktionsprotokoll ist in der Anlage 6 aufgeführt. Die Angaben des GT 10 E2014 stammen aus dem Juni 2014 (Sommermann, 2015).

Tabelle 17: Ausbeuten der Ethylacetat-Phasen nach der manuellen Extraktion des GT 42 sowie des GT 10

Probe	Einwaage (g)	Ausbeute EtOAc-Phase (g)	Ausbeute (%)
GT 42 E2017	1000,44	52,15	5,21
GT 10 E2014	18240,00	1596,00	8,75

Im Verlauf der manuellen Extraktion des GT 42 E2017 konnte aus einer Probeneinwaage von 1000,44 g eine Ausbeute der Ethylacetat-Phase von 52,15 g generiert werden. Bezogen auf die eingesetzte Menge ergibt sich eine Ausbeute von 5,21 %. Im direkten Vergleich der prozentualen Ausbeuten zeigt sich, dass diese im Gegensatz zu dem GT 10 mit 8,75 % um ca. ein Drittel geringer ausfällt. Zum einen kann vermutet werden, dass der GT 42 E2017 auf Grund seiner genotypspezifischen Eigenschaften im Vergleich zum GT 10 weniger Inhaltsstoffe enthält. Zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Auslassen der Kältefällung sich negativ auf die Ausbeute auswirkt. Der Einfluss der Kältefällung kann nur durch den Methodenvergleich des gleichen Wurzelmaterials (Genotyp, Erntejahr, Lagerungszeitraum) nachgewiesen werden.

4.1.2 Ergebnisse und Diskussion der ASE-Extraktion

Die ASE-Extraktion stellt jenes Extraktionsverfahren in dieser Arbeit dar, mit dem die Vorversuche zur Auswahl geeigneter Extraktionsbedingungen durchgeführt wurden. Im Rahmen dieser sind sowohl verschiedene Lösungsmittel als auch Extraktionstemperaturen untersucht worden. Ziel war es dabei, ein optimiertes Lösungsmittelsystem zu finden, welches bei einer hohen Extraktionsausbeute gleichzeitig einen möglichst geringen Anteil an Anthrachinonen ermöglicht.

4.1.2.1 Lösungsmittelvorversuche mittels ASE

Die Extraktionsversuche an der ASE erfolgten mit einer Einwaage von ca. 6 g des GT 42 E2017 mit jeweils unterschiedlichen Lösungsmittelvarianten bei einer einheitlichen Extraktionstemperatur von 60 °C in Doppelbestimmung. In der Tabelle 18 sind die gewählten Lösungsmittelsysteme dargestellt, wobei alle Varianten eine zweistufige Extraktion durchliefen (siehe Kapitel 3.3.2). Um eine möglichst hohe Extraktionsausbeute zu generieren, wurde das Probenmaterial im Vorfeld mehrfach zerkleinert und anschließend gesiebt. Die Maschenweite des Siebes betrug 250 µm. Als Ausgangsmaterial wurden Partikel mit einer Größe kleiner 250 µm herangezogen. Die Zerkleinerung hatte dabei das Ziel, die Oberfläche der Probe zu vergrößern, um dem jeweiligen Lösungsmittel eine größere Extraktionsfläche zu ermöglichen.

Abweichend von den Varianten 1 bis 6 kamen bei den Varianten 7 und 8 in den beiden Extraktionsstufen unterschiedliche Lösungsmittel zum Einsatz. Hierbei wurde in der ersten Stufe destilliertes Wasser und in der zweiten Stufe Methanol bzw. Methanol mit 0,1 % Essigsäure verwendet. Die Varianten wurden jedoch verworfen, da das eingesetzte Wasser der ersten Extraktionsstufe zum Aufquellen der Probe führte. Dies wiederum führte zum Verstopfen der Extraktionszelle, woraufhin das Lösungsmittel nicht vollständig in diese gefördert werden konnte. Der zu hohe Druck in der Zelle führte zum Abbruch des gesamten Extraktionsvorgangs für diese Varianten.

Tabelle 18: Überblick der gewählten Lösungsmittelvarianten der ASE-Extraktion

Variante	Lösungsmittelsystem
V 1	MeOH (100%)
V 2	EtOH (100 %)
V 3	Aceton (100 %)
V 4	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v)
V 5	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v) + 0,1 % Essigsäure
V 6	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v) + 0,05 % Ameisensäure
V 7	EX1 H ₂ O / Ex 2 MeOH
V 8	EX1 H ₂ O / Ex 2 MeOH + 0,1 % Essigsäure

Um eine Aussage treffen zu können, inwieweit die Lösungsmittelversuche zu der angestrebten, erschöpfenden Extraktion führten, wurden im Anschluss die jeweiligen Extraktionsstufen auf ihren Trockensubstanzgehalt, bezogen auf die Einwaage von ca. 6 g, untersucht. Hierfür wurden 500 µl der jeweiligen Extraktionsstufe in vorgewogenen Tubes an der Speedvac eingengt.

In der nachfolgenden Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Bestimmung der beiden Extraktionsstufen der sechs erfolgreich abgelaufenen Lösungsmittelvorversuche dargestellt.

Anhand dieser lässt sich aufzeigen, dass für die Variante 1 (100 % Methanol) mit ca. 27 mg in der ersten und ca. 22 mg in der zweiten Extraktionsstufe ähnliche Trockensubstanzen ermittelt wurden. Daraus lässt sich schließen, dass mit dem gewählten Lösungsmittel Methanol keine vollständig erschöpfende Extraktion erzielt werden konnte. Bei den nachfolgend aufgeführten Varianten 2 bis 6 waren hingegen deutliche Unterschiede hinsichtlich des Trockensubstanzgehaltes zwischen den durchgeführten Extraktionsstufen erkennbar.

In Variante 2 (100 % Ethanol) wies die erste Stufe mit rund 32 mg den dreifachen Trockensubstanzgehalt auf als die zweite Stufe mit rund 11 mg. Daraus lässt sich schließen, dass Ethanol im Vergleich zum Methanol eine bessere, erschöpfende Extraktionswirkung für diese Probenmatrix aufweist.

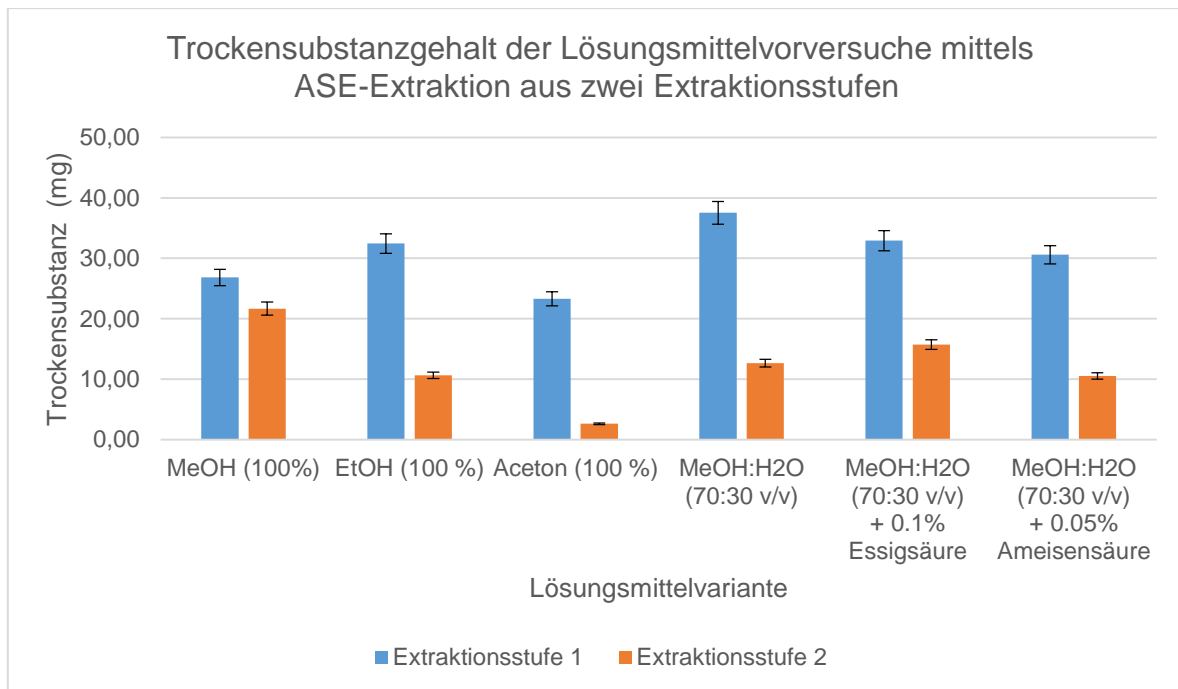


Abbildung 22: Trockensubstanzgehalt der beiden Extraktionsstufen der Lösungsmittelvorversuche mittels ASE-Extraktion ($n = 4$)

Das Extraktionsmittel Aceton (100 %) der Variante 3 weist zwar eine ähnliche erschöpfende Extraktion wie die Variante 2 auf, jedoch fallen die ermittelten Ausbeuten mit ca. 23 mg (Stufe 1) und ca. 3 mg (Stufe 2) geringer aus als beim Ethanol.

Im Vergleich dazu weist die Variante 4, in der zu den bereits erwähnten Varianten 1 bis 3, bessere Ergebnisse in Bezug auf die erzielten Trockensubstanzgehalte auf. Für die Variante 4 wurde kein reines Lösungsmittel für die Extraktion verwendet, sondern ein Lösungsmittelgemisch, bestehend aus Methanol-Wasser (70:30, v/v). Die Variante 4 zeigt in der ersten Extraktionsstufe mit ca. 38 mg den höchsten extrahierten Trockensubstanzgehalt aller untersuchten Varianten (Abbildung 22). Der Gehalt von ca. 12 mg der zweiten Stufe deutet darauf hin, dass diese Lösungsmittelvariante einen nahezu erschöpfenden Charakter aufweist. Die Varianten 5 und 6 stellen, durch zugesetzte Additive, Modifikationen der Variante 4 da. Als Additiv ist diesen Essigsäure (0,1 %) bzw. Ameisensäure (0,05 %) hinzugefügt worden.

Allerdings wiesen diese mit rund 32 mg (Variante 5) und etwa 31 mg (Variante 6) in der ersten Extraktionsstufe und in der zweiten mit ca. 16 mg und rund 11 mg, geringe Extrakt Ausbeuten auf. Ein Grund dafür war die Annahme, dass durch diese eine bessere Extraktionswirkung erzielt werden würde. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine Ansäuerung zur vermehrten Protonierung der enthaltenen Verbindungen führen würde. Dies wiederum würde dazu führen, dass die Wasserlöslichkeit der zu extrahierenden Substanzen steigt, was zu einer Ersparnis von organischem Lösungsmittel führt. Begründet lag diese Herangehensweise in der wissenschaftlichen Arbeit von Pogačnik 2015. In dieser wurden positive Korrelationen zwischen der extrahierten Menge an Polyphenolen aus Knöterichgewächsen und dem Einsatz angesäuerter Lösungsmittel nachgewiesen (Pogačnik, et al., 2015). Anhand der in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse kann dies jedoch nicht bestätigt werden. Da ein direkter Vergleich der Variante 4 mit den Varianten 5 und 6 heraus stellt, dass die Additive zu keiner Verbesserung der Extraktionsleistung des Lösungsmittelsystems MeOH:H₂O (70:30 v/v) führten. Im Gegenteil, die Extraktionsmenge nimmt durch die zugesetzten Additive sogar ab.

Eine nahezu erschöpfende Extraktion ist dann gegeben, wenn in der nachfolgenden Extraktionsstufe nur noch geringe Mengen des Extraktes enthalten sind. Einzig die Variante 3 mit Aceton war nahezu erschöpfend. Dieser Umstand wurde, bis auf Variante 1, bei allen untersuchten Lösungsmitteln im unterschiedlichen Maße annähernd erfüllt. Für eine abschließende Wahl des geeigneten Lösungsmittels wurden beide Extraktionsstufen der Lösungsmittelvarianten mittels analytischer HPLC auf ihren Anteil an Anthrachinonen untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im folgenden Kapitel dargestellt.

4.1.2.2 Auswertung der Lösungsmittelvorversuche unter Verwendung der HPLC

Die Varianten 1 bis 6 aus den Vorversuchen der ASE-Extraktion wurden der im Kapitel 3.3 beschriebenen Probenaufbereitung und anschließend der in Kapitel 3.6 beschriebenen HPLC-Analytik unterzogen. Die Chromatogramme der Proben wurden bei den Wellenlängen 280 nm, 320 nm und 430 nm aufgezeichnet und ausgewertet.

Bei 280 nm absorbieren alle in Kapitel 2.1.2 aufgeführten für *Rheum spp.* beschriebene Substanzen (wie Stilbene, Anthrachinone, Flavan-3-ole, Procyanidine). Stilbene haben zudem ein zweites Absorptionsmaximum bei 320 nm und Anthrachinone bei 430 nm. Als Kriterium für die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels wurde das Verhältnis der Gesamtpeakfläche von 430 nm zu der von 280 nm herangezogen, wobei der daraus resultierende Wert so gering wie möglich sein sollte. Ein größerer Wert würde mit einem höheren Gehalt an Anthrachinonen korrelieren und somit das verwendete Lösungsmittelsystem als ungeeignet charakterisieren. In der Abbildung 23 sind beispielhaft die Chromatogramme der ersten Extraktionsstufe der Variante 4 bei den beiden genannten Wellenlängen dargestellt.

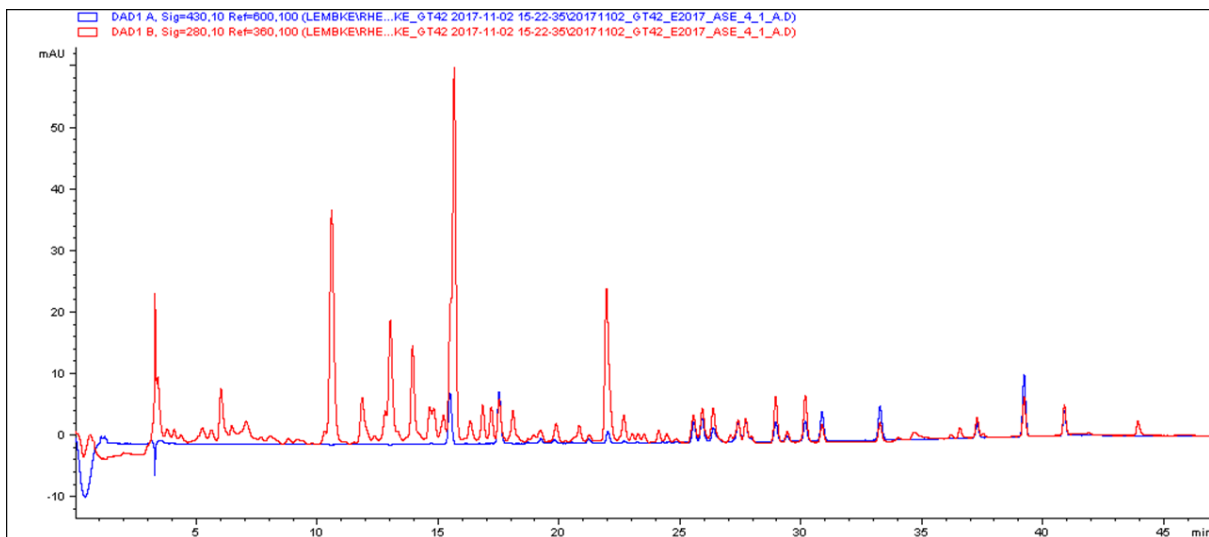


Abbildung 23: Chromatogramm der ersten Extraktionsstufe der Lösungsmittelvariante 4 bei 430 nm (blau) und bei 280 nm (rot)

In der folgenden Tabelle 19 sind die Mittelwerte der aus den Chromatogrammen ermittelten Gesamtpeakflächen bei den Wellenlängen 430 nm und 280 nm für die beiden Extraktionsstufen der untersuchten Varianten 1 bis 6 dargestellt. Die ermittelten Werte wurden dabei auf die jeweiligen Probeneinwaagen bezogen. Daher können für die dargestellten Ergebnisse lediglich Tendenzen aufgezeigt werden.

Tabelle 19: Mittelwerte (MW) der Gesamtpeakflächen bei 430 nm und 280 nm und dem daraus resultierenden Verhältnis ($n = 4$)

Variante	MW 430 AU		MW 280 AU		Verhältnis 430 AU / 280 AU [%]		MW Verhältnis 430 AU / 280 AU [%]
	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	
1	1459 (182)	243 (78)	11090 (2777)	1891 (643)	13,8	13,0	13,40
2	1825 (58)	463 (27)	13642 (1838)	2383 (71)	13,6	19,5	16,55
3	2117 (426)	290 (83)	17645 (3859)	1464 (549)	12,1	20,5	16,30
4	2414 (1391)	358 (86)	19803 (8003)	2132 (773)	11,5	17,6	14,55
5	1497 (39)	477 (39)	13927 (284)	2941 (823)	10,8	16,7	13,75
6	1288 (116)	460 (136)	10660 (2080)	2808 (1297)	12,4	17,7	15,05

() = Standardabweichung

Die Extraktion der Varianten 1 bis 3 erfolgte mit reinen Lösungsmitteln. Aus der Tabelle 19 lässt sich ableiten, dass die Variante 2 (100 % Ethanol) und Variante 3 (100 % Aceton) mit über 16 % die höchsten Mengen an Anthrachinonen aufweisen, obwohl diese Lösungsmittel gute Extraktionseigenschaften aufwiesen (Vergleich Kapitel 4.1.2.1 Abbildung 22). Die Anwendung dieser Lösungsmittel erfolgte unter der Annahme, dass diese höhere Mengen an wertgebenden Inhaltsstoffen herauslösen können als das bisher verwendete Methanol (100 %). Als Nachteil sei zu erwähnen, dass Ethanol sehr hohe Anschaffungskosten aufweist. Dagegen besitzt Aceton keine deutlich besseren Extraktionseigenschaften, die eine Umrüstung der Anlage rechtfertigen würden. Aus diesen Gründen kamen die Varianten 2 und 3 für die ausstehenden Extraktionen an der DIG-MAZ 10 nicht in Betracht. Im Vergleich konnte mit 100 % Methanol (Variante 1) das günstigste Verhältnis von ca. 13 % hinsichtlich der herausgelösten Anthrachinone ermittelt werden. Allerdings wies diese Variante zu geringe Trockensubstanzgehalte (Vergleich Kapitel 4.1.2.1 Abbildung 22) auf, da mit dieser Variante keine erschöpfende Extraktion erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Variante 1 ebenfalls für die folgenden Extraktionen nicht weiter betrachtet. Im Gegensatz zu den Varianten 1, 2 und 3 wurde für die Varianten 4 - 6 kein reines Lösungsmittel, sondern ein Methanol-Wasser-Gemisch (70:30 v/v) genutzt. Die Varianten 5 und 6 enthielten zusätzlich unterschiedlich saure Additive.

Innerhalb dieser Varianten wies die Variante 6 mit etwa 15 % den höchsten Anteil an Anthrachinonen auf. Weiterhin zeigte diese die geringste Extraktionsausbeute bezogen auf die bestimmten Trockensubstanzgehalte dieser drei Varianten. Die Variante 4 besaß mit ca. 14,5 % einen geringfügig höheren Anteil an Anthrachinonen als die Variante 5 mit knapp unter 13,8 %. Trotz des etwas besseren qualitativen Ergebnis der Variante 5 ist zu erwähnen, dass der Hauptteil der extrahierten Bestandteile der Variante 4 auf die erste Stufe Extraktionsstufe zurückzuführen sind und diese auch ein geringeres Verhältnis der enthaltenen Anthrachinone aufweist. Zusätzlich zu diesem, konnten für die Variante 4, mit rund 38 mg (EX1) und ca. 13 mg (EX2), höhere Ausbeuten der beiden Stufen als für die der Variante 5, mit etwa 33 mg (EX1) und rund 16 mg (EX2), ermittelt werden.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Anteile an unerwünschten Anthrachinonen und der errechneten Extraktionsausbeuten sowie unter Berücksichtigung der finanziellen und technologischen Aspekte wird die Variante 4 als geeignetes Lösungsmittelsystem für die Extraktion an der DIG-MAZ erachtet. Auf dieser Grundlage wurden mit dem Lösungsmittelgemisch Methanol-Wasser (70:30, v/v) weitere Untersuchungen hinsichtlich einer geeigneten Extraktionstemperatur durchgeführt, auf welche im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.

4.1.2.3 Temperaturbedingte Vorversuche mittels ASE

Auf Basis des im Vorfeld erarbeiteten Lösungsmittelsystems Methanol-Wasser (70:30 v/v, Variante 4) wurden unter Verwendung der ASE-Extraktion weitere Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Anhand dieser sollte erarbeitet werden, ob niedrigere oder höhere Temperaturen zu einer Verbesserung der Extraktionsausbeute führen. Die Tabelle 20 stellt die durchgeführten Varianten 4, 9, 10 und 11 dar. Auf Grund technischer sowie distributiver Gründe wurden die bereits im Vorfeld erarbeiteten Ergebnisse der Variante 4 bei 60 °C (Kapitel 4.1.2.1 und 4.1.2.2) zum Vergleich in die Ergebnisdarstellung mit einbezogen.

Tabelle 20: Überblick der gewählten Extraktionstemperaturen der ASE-Extraktion

Variante	Temperatur	Lösungsmittelsystem
V 4	60 °C	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v)
V 9	40 °C	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v)
V 10	80 °C	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v)
V 11	100 °C	MeOH:H ₂ O (70:30 v/v)

Wie bereits im Kapitel 3.2.3 aufgeführt, wurde abweichend von den vorherigen Extraktionsversuchen der ASE, gröberes Probenmaterial mit einer Partikelgröße von 250 µm bis 4 mm für die temperaturbedingten Vorversuche eingesetzt. Das im Vorfeld genutzte, feinere Probenmaterial mit einer Partikelgröße kleiner 250 µm führte nach wiederholten Versuchen zum Verstopfen der Extraktionszellen. Auf Grund einer Lieferverzögerung der für diese Untersuchungen benötigten Diatomeenerde von mehreren Wochen wurde die Anzahl der Wiederholungen dementsprechend für die Varianten 9 - 11 auf drei reduziert. Zu dieser Thematik ist abschließend zu erwähnen, dass der Einsatz unterschiedlicher Partikelgrößen keine Zielstellung der vorliegenden Arbeit darstellte und ausschließlich auf Grund der auftretenden Verstopfungen erfolgte. In Anbetracht der Ergebnisdarstellung wurde diese jedoch mit in die Betrachtung einbezogen. In der Abbildung 24 sind die ermittelten Trockensubstanzen der unterschiedlichen Varianten bezogen auf die Einwaage dargestellt.

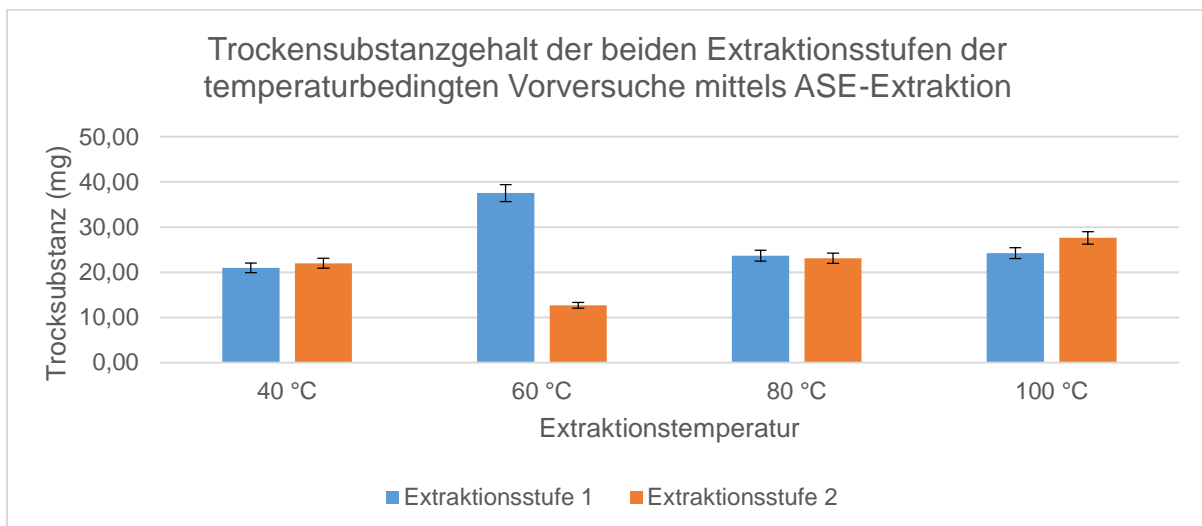


Abbildung 24: Trockensubstanzgehalt der beiden Extraktionsstufen der temperaturbedingten ASE-Extraktion (40°C/80°C/100°C n = 3 (Partikelgröße zwischen 250 – 4000 µm); 60°C n = 4 (Partikelgröße kleiner 250 µm))

Anhand der Abbildung 24 konnte gezeigt werden, dass größere Partikel (250 µm bis 4 mm) im Verlauf der temperaturbedingten ASE-Extraktion zu einem verschlechterten Extraktionsergebnis führen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Diffusionsweg der größeren Partikel vergrößert wurde und somit in den Varianten 9 (40 °C), 10 (80 °C) und 11 (100 °C) keine erschöpfende Extraktion erzielt werden konnte. Vergleicht man die ermittelten Werte der Trockensubstanzen der jeweiligen Extraktionsstufen, kann davon ausgegangen werden, dass noch entsprechende Mengen an nicht extrahierten Substanzen in den jeweiligen Proben verblieben sind. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass eine höhere Extraktionstemperatur tendenziell zu einer höheren Gesamtausbeute führt, da sich die Diffusionsgeschwindigkeit bedingt durch die höhere Temperatur ebenfalls beschleunigt. Für eine Voreinschätzung der untersuchten Temperaturen, hinsichtlich ihrer Extraktionsbedingten Eignung, wurden diese Extrakte mittels analytischer HPLC hinsichtlich des enthaltenen Anthrachinon Gehalts analysiert. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel dargestellt.

4.1.2.4 Auswertung der temperaturbedingten Vorversuche mittels HPLC

Wie bereits im Kapitel 4.1.2.3 beschrieben, wurden die jeweiligen Extraktionsstufen der temperaturbedingten ASE-Extrakte hinsichtlich der Gesamtpeakflächen bei 430 nm und 280 nm unter Verwendung der im Kapitel 3.3 beschriebenen Methode untersucht. In der Tabelle 21 sind die Ergebnisse diesbezüglich dargestellt.

Tabelle 21: Mittelwerte der Gesamtpeakflächen sowie deren Verhältnis (40°C/80°C/100°C n = 3 (Partikelgröße zwischen 250 – 4000 µm); 60°C n = 4 (Partikelgröße kleiner 250 µm))

Variante	MW 430 AU		MW 280 AU		Verhältnis 430 AU / 280 AU [%]		MW Verhältnis 430 AU / 280 AU [%]
	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	EX 1	EX 2	
V 9	684 (136)	737 (37)	7914 (232)	8663 (712)	8,60	8,50	8,55
V 4	2414 (182)	358 (78)	19803 (2777)	2132 (643)	11,50	17,60	14,55
V 10	944 (68)	1061 (86)	9205 (490)	9551 (646)	10,20	11,10	10,65
V 11	913 (18)	1125 (17)	8567 (353)	9432 (188)	10,70	11,90	11,30

Legende: EX = Extraktionsstufe / () = Standardabweichung

Anhand der in der Tabelle 21 dargestellten Daten lässt sich ableiten, dass die Temperatur für die Extraktion des GT 42 E2017 einen wichtigen Parameter darstellt. Im direkten Vergleich der Verhältnisse der entsprechenden Wellenlängen ist die Variante 4 gesondert zu sehen. Wie bereits im vorherigen Kapitel 4.1.2.3 beschrieben, wurden für diese Variante die bereits vorhandenen Daten der Lösungsmittelbedingten Vorversuche herangezogen. Der Unterschied zwischen der Variante 4 und den Varianten 9, 10 und 11 liegt in der unterschiedlichen Partikelgröße, welche ausschließlich aus technologischen Gründen verändert werden musste und keinen Bezug zur Zielstellung besaß. In Anbetracht der erarbeiteten Daten weist die Variante 4 mit 14,55 % das höchste Verhältnis innerhalb der vermessenen Varianten auf, was wahrscheinlich auf die kleineren Partikelgrößen zurückzuführen ist. Die feinere Körnung der Variante 4 (<250 µ) wies einen geringeren Querschnitt als die Varianten 9, 10 und 11 (250 µm bis 4000 µm) auf, so dass die Inhaltsstoffe wesentlich zügiger in das Extraktionsmittel übergehen konnten als in den anderen Varianten. Dies zeigte sich bereits in der ermittelten Extraktionsausbeute (siehe Kapitel 4.1.2.1 Abbildung 22). Im Vergleich aller Varianten enthielt die Variante 9 mit einem Verhältnis von 8,55 % den geringsten Anteil an unerwünschten Anthrachinonen. Mit höherer Extraktionstemperatur stieg der Anthrachinongehalt in den Varianten 10 und 11 an. Daraus kann man schlussfolgern, dass eine Extraktionstemperatur von rund 60 °C das Extraktionsergebnis hinsichtlich eines geringen Anthrachinongehalts positiv beeinflusst. Es ist davon auszugehen, dass der Wert der 60 °C bei gleicher Partikelgröße zwischen dem Ergebnis der 40 °C und 80 °C liegt. In Anbetracht der zu extrahierenden Inhaltsstoffe sollte die eingesetzte Extraktionstemperatur nicht zu hoch gewählt werden. Einerseits stellen hohe Temperaturen einen nicht zu vernachlässigen Kostenfaktor dar. Andererseits können hohe Temperaturen, welche über einen längeren Zeitraum auf ein Produkt einwirken, zu Schäden an wertgebenden Inhaltsstoffen führen beziehungsweise können diese über einen längeren Zeitraum zu einer verminderten Extraktionsausbeute führen.

4.1.2.5 Herstellung der Ethylacetat-Phasen der temperaturbedingten ASE-Extrakte

Die aus den temperaturbedingten Vorversuchen der ASE-Extraktionen hervorgegangenen Varianten 4 sowie 9, 10 und 11 wurden im weiteren Verlauf nach dem im IBAS etablierten Extraktionsverfahren „AA23_Vo1_Extraktion_Rheum“ zur Erzeugung polyphenolhaltiger Extrakte bearbeitet (siehe Kapitel 3.2.4). In der Anlage 6 sind die dazugehörigen Extraktionsprotokolle aufgeführt. Während des Ausschüttelns mit Petrolether trat eine deutlich sichtbare, stabile und gallertartige Zwischenphase gleichermaßen in allen vier Varianten auf (siehe Abbildung 25).



Abbildung 25: Petrolether-Extrakt-Gemisch mit Zwischenphase

Diese Phase enthielt neben Petrolether entsprechende Mengen der wässrigen Extraktionslösung. Die Trennung der wässrigen Phase von der Petrolether-Phase erfolgte mittels Vakuumrotationsverdampfer. Allerdings wurde dies abgebrochen, da die Probe bei einem Druck von etwa 400 mbar anfang unkontrolliert zu schäumen. Es wird angenommen, dass auf Grund der Temperaturen von 40 °C bis 100 °C in Kombination mit dem eingestellten Druck von 10 mPa während der ASE neben den erwünschten Polyphenolen auch entsprechend hohe Mengen an Saponinen aus dem GT 42 E2017 extrahiert wurden. Weiterhin lagen die Extraktionstemperaturen mit 40 °C bis 100 °C weit über der der manuellen Extraktion unter Eiskühlung. Durch die Autorengruppe Aurich konnte bereits 1965 nachgewiesen werden, dass das Wurzelmaterial von *Rheum* spp. Saponine enthalten.

Diese untersuchten mittels Dünnschichtchromatographie die Sprossorgane als auch die Wurzeln unterschiedlicher Pflanzenarten auf diese Substanzgruppe. Um letztlich den Nachweis von Saponinen, in den untersuchten Pflanzenteilen zu erbringen, erfolgte eine Applikation von Blutgelatine (Aurich, et al., 1967). Bei den Saponinen handelt es sich um glykosidisch gebundene Pflanzeninhaltsstoffe, die in Wasser gelöst, beim Schütteln einen stabilen Schaum bilden. Dabei lösen sie sich gut in Methanol-Wasser-Gemischen, während sie in Verbindung mit Petrolether unlöslich sind (Hänsel & Sticher, 2009). Um so viel wie möglich des wässrigen Extraktes aus der Zwischenphase zu lösen, wurde diesem das Fünffache der in der Standardarbeitsanweisung „AA23_Vo1_Extraktion_Rheum“ vorgegebenen Menge an Wasser zugesetzt. Außerdem wurden zur besseren Trennung beide Phasen über Nacht stengelassen. Bei beiden Vorgehensweisen blieb die entsprechende Phasentrennung aus, so dass die gebildeten Zwischenphasen verworfen und die Extraktion wie im Kapitel 3.4 mit der vom Petrolether gut abgesetzten, Wasserphase weitergeführt wurde. Die Ausbeuten der somit generierten Ethylacetat-Phasen der Gesamtextrakte des GT 42 E2017 sind in der Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Ausbeuten der Ethylacetat-Phasen nach vorheriger ASE-Extraktion in Abhängigkeit von der gewählten Extraktionstemperatur

Variante	Temperatur	Einwaage (g)	Ausbeute EtOAc-Phase (g)	Ausbeute (%)
V 4	60 °C	24,05	1,86	7,73
V 9	40 °C	18,17	1,11	6,11
V 10	80 °C	18,11	1,22	6,74
V 11	100 °C	18,05	0,43	2,38

Mit 7,73 % ergab Variante 4 die höchste Ausbeute, was vermutlich auf die größere Oberfläche der Partikel von kleiner 250 µm zurückzuführen ist. Die Varianten 9 mit ca. 6 % sowie V10 mit 6,7 % zeigten vergleichbare Ausbeuten der größeren Partikel auf. Die V 11 wies mit knapp 2,4 % die niedrigste Ausbeute auf.

Anhand dieser Werte kann daraus geschlossen werden, dass für die Extraktion des GT 42 ein Temperaturbereich von 40 bis 80 °C in Kombination mit dem gewählten Lösungsmittelsystem (Methanol-Wasser) als geeignet zu bewerten ist. Die Überschreitung dieser Temperatur führte zu einer deutlichen Verringerung der Ausbeute der Ethylacetat-Phase bei der Variante 11, bedingt durch eine größere Zwischenphase.

Fazit

Auf Grundlage der Ergebnisse aus den Vorversuchen mittels ASE erfüllte das Lösungsmittelgemisch Methanol-Wasser (70:30, v/v) bei einer Extraktionstemperatur von 60 °C am besten die Anforderungen für die weiterführenden Extraktionen an der DIG-MAZ 10. Zum einen ermöglichte es die höchste Extraktionsausbeute und zum anderen enthielten die gewonnenen Extrakte den geringsten Anteil an unerwünschten Anthrachinonen. Im weiteren Verlauf, und nicht als Zielstellung in dieser Arbeit formuliert, konnte zusätzlich festgestellt werden, dass sich eine Partikelgröße kleiner als 250 µm positiv auf die gewonnene Extraktionsmenge sowie auf den Anteil an Anthrachinonen auswirkt. Demgegenüber führten Partikelgrößen größer als 250 µm zu geringeren Extraktionsausbeuten beziehungsweise zu keiner erschöpfenden Extraktion mittels der gewählten Lösungsmittelvarianten an der ASE. Im weiteren Verlauf erschwerte die entstandene Zwischenschicht aus Saponinen die Aufarbeitung der Ethylacetatphasen, die vermutlich durch die angewandten Temperaturen in Verbindung mit Druck mittels ASE deutlich besser extrahiert wurden als bei der manuellen Extraktion.

Abschließend ist zu erwähnen, dass mittels ASE eine Vielzahl an unterschiedlichen Lösungsmittelsystemen hinsichtlich ihrer Extraktionseigenschaften in einem relativ kurzen Zeitraum untersucht werden konnte. Durch die anschließende Analyse mittels HPLC (LC-Taste) war es möglich, ungeeignete Lösungsmittelvarianten zu verwerfen und die Extraktionsbedingungen mit dem Lösungsmittelsystem Methanol-Wasser im weiteren Verlauf zu optimieren.

4.1.3 Ergebnisse und Diskussion der DIG-MAZ 10-Extraktion

Die Extraktion der verschiedenen Erntejahre des GT 42 erfolgte auf Grundlage der in den Vorversuchen erarbeiteten Extraktionsparameter bei 60 °C und mit dem Lösungsmittelgemisch Methanol-Wasser (70:30, v/v). In der Tabelle 23 sind die Parameter für die Feststoffextraktion von GT 42 in der DIG-MAZ dargestellt.

Tabelle 23: Parameter der Feststoffextraktion im Modul 1 der DIG-MAZ 10

Ernte-jahr	Einwaage (g)	Extraktions-temperatur (°C)	Extraktionsstufe 1		Extraktionsstufe 2	
			Lösungs-mittelmenge (kg)	Extraktions-zeit (min)	Lösungs-mittelmenge (kg)	Extraktions-zeit (min)
2017	3700	60	20	180	16	120
2013	1700	60	20	180	16	120
2009	4100	60	20	180	16	120

Da aus den verschiedenen Erntejahren unterschiedliche Mengen an getrocknetem Material vorlagen, differierten die Einwaagen von 1,7 bis 4,1 kg. Jede Extraktion wurde einmal durchgeführt, da nicht mehr Material für diesen Maßstab der Extraktion zur Verfügung stand.

Ähnlich der Erfassung der Extraktionsausbeuten mittels ASE wurden auch für die verschiedenen DIG-MAZ Extraktionen die prozentualen Gehalte der Trockensubstanzen bestimmt. Dies erfolgte für alle drei Erntejahre des GT 42, welche in der folgenden Abbildung 26 grafisch dargestellt werden. Anders als bei den ASE-Extrakten erfolgten die Probennahmen zeitbasiert in Abständen von 30 min über die gesamte Extraktionsdauer. Die Ermittlung des prozentualen Trockensubstanzgehalts erfolgte durch eine thermogravimetrische Messung. Bei dieser wurde die Probe bis zum Erreichen der Massenkonstanz getrocknet und endete somit mit dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes. In der folgenden Abbildung 26 werden die ermittelten Werte für die drei Erntejahre des GT 42, jeweils für beide Extraktionsstufen dargestellt.

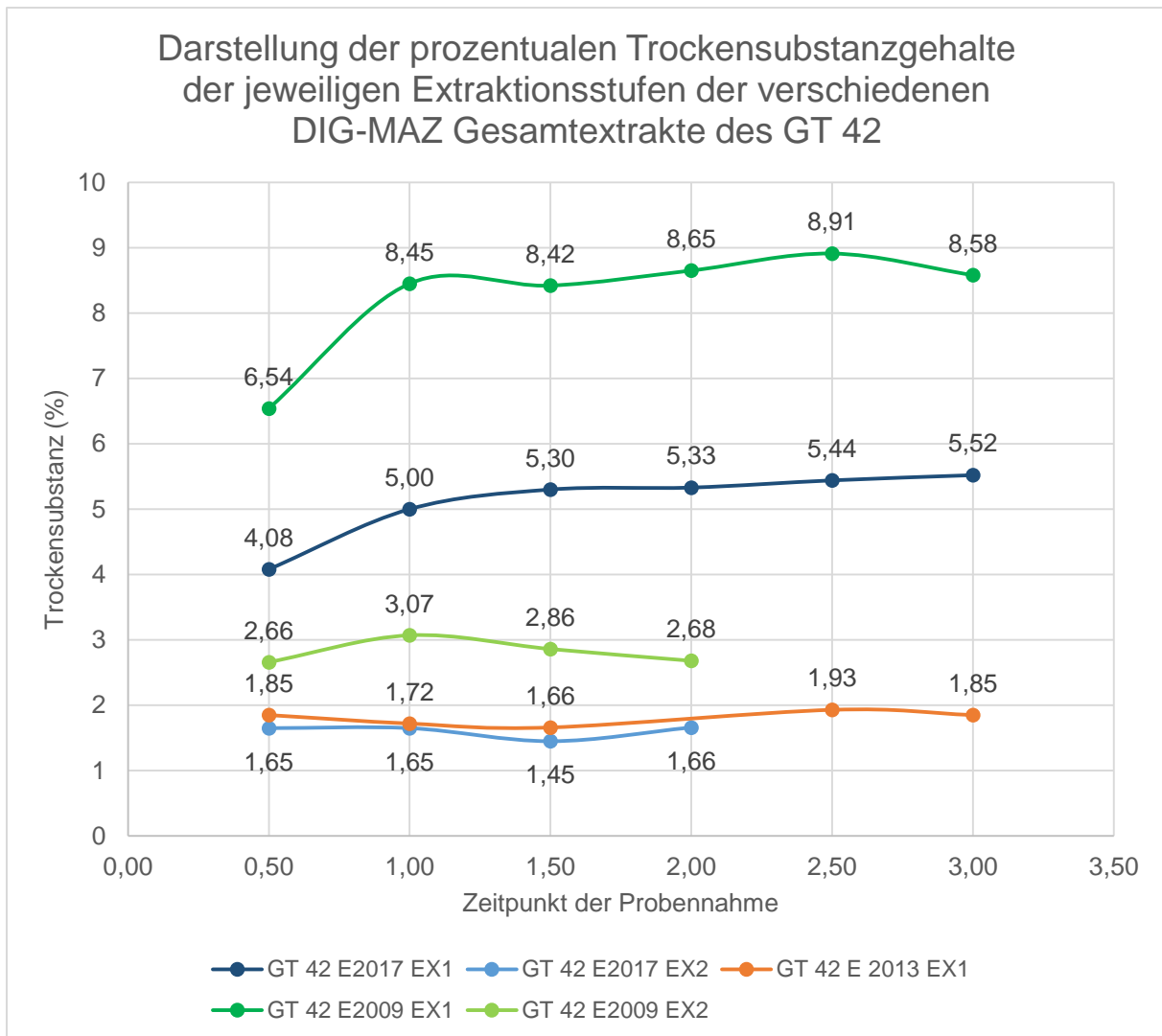


Abbildung 26: Darstellung der zeitbasierten prozentualen Trockensubstanzen der jeweiligen Extraktionsstufen der Feststoffextraktion für Erntejahre 2017, 2013 sowie 2009 der DIG-MAZ Gesamtextrakte des GT 42

Anhand der Abbildung 26 kann abgeleitet werden, dass die DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 Ernte 2009 und Ernte 2017 in der ersten Extraktionsstufe die größten Mengen der gemessenen prozentualen Trockensubstanz aufwiesen. Die Höhe der bestimmten Trockensubstanz stand dabei in Verbindung mit dem eingesetzten Probenmaterial. So zeigte sich, dass der GT 42 E2009 bei einer Einwaage von ca. 4100 g die höchste prozentuale Trockensubstanz aufwies. An dieser Kurve lässt sich sehr gut der Anstieg der Trockensubstanz im verwendeten Lösungsmittelgemisch aufzeigen. Diese stieg innerhalb der dreistündigen Extraktion auf rund 8,5 % Trockensubstanzgehalt an. Im Verlauf der weiteren Extraktion schwankte dieser Wert lediglich um ca. 0,3 %. Auf Grund der geringen Schwankungen der gemessenen zeitbasierten Proben wurde davon ausgegangen, dass das eingesetzte Lösungsmittel mit dem Extrakt für diesen Durchlauf nahezu abgesättigt war (Schöler & Scharmer, 2018).

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die erste Extraktionsstufe des GT 42 E2017 auf. Mit einer geringeren Einwaage von rund 3700 g konnten für diese Probe auch geringere Trockensubstanzgehalte ermittelt werden. Ebenfalls zeigte sich für diese Extraktionsstufe ein flacherer Anstieg, welcher nach zweistündiger Extraktion stetig um ca. 0,1 % anstieg. Wie auch für das Erntejahr 2009 wurde die Extraktion des GT 42 E2017 nach drei Stunden beendet. Eine längere Extraktionsdauer hätte daher keinen wirtschaftlichen Ausbeutezuwachs erbracht, da sich die Änderungsrate der ermittelten prozentualen Trockensubstanz über die letzten drei Messungen nur noch im Bereich von 0,3 % bzw. 0,1 % änderten. So könnte es im Gegenteil auf Grund einer länger andauernden, thermischen Belastung zu Schädigungen der wertgebenden Inhaltsstoffe kommen. Auf Grund dessen und anhand der Erfahrungen der Mitarbeiter des IBAS ist die Extraktionsdauer der ersten Stufe auf drei Stunden limitiert (Schöler & Scharmer, 2018). Wie bereits in der Tabelle 23 aufgezeigt, stand für die Extraktion des Erntejahres 2013 des GT 42 nur eine Probeneinwaage von 1700 g zur Verfügung. Die Abbildung 26 zeigt aus diesem Grund lediglich die erste Extraktionsstufe, da eine zweite Stufe auf Grund der geringen Menge an Wurzelmaterial nicht erfolgen konnte. Es lag nahe, dass die erste Extraktionsstufe bereits nahezu erschöpfend war. Auf Grund der geringen Probenmenge wurde der Feststoffextraktor nicht komplett befüllt und somit konnte, im Gegensatz zu den Erntejahren 2017 und 2009 des GT 42, das Lösungsmittel das Extraktionsgut gleichmäßiger umströmen. Ebenfalls bestand, bedingt durch die geringe Probenmenge, eine größere Extraktionsoberfläche.

Ebenfalls konnte anhand der Abbildung 26 aufgezeigt werden, dass die zweite Extraktionsstufe geringere Extraktionsausbeuten anhand der prozentualen Trockensubstanz aufwies. Für diese konnten zeitbasiert mit ca. 0,4 % (E2009) und ca. 0,2 % (E2017) nur minimale Schwankungen der Trockensubstanz ermittelt werden. Auf dieser Datengrundlage wurde angenommen, dass mit längerer Extraktionsdauer keine zusätzliche Ausbeute an Extrakt generiert werden kann. Somit wurde die Extraktion nach zwei Stunden beendet.

Im Anschluss an den Prozessschritt der Feststoffextraktion wurden die zweistufigen Flüssig – Flüssig - Extraktionen zuerst mit Petrolether und im Anschluss mit Ethylacetat durchgeführt.

Ähnlich wie beim Ausschütteln mit Petrolether der ASE-Extrakte bildete sich ebenfalls eine schwer trennbare Zwischenphase innerhalb des Petrolether-Wassergemisches.

Auf Grund größerer Querschnitte im Inneren der DIG-MAZ Extraktionsanlage bildeten sich anders als im Scheidetrichter geringere Zwischenschichten in den Flüssig – Flüssig – Extraktionen der jeweiligen Proben des GT 42 aus. Dies führte dazu, dass die Zwischenschichten fast vollständig getrennt werden konnten. In der Tabelle 24 sind die resultierenden Ausbeuten der jeweiligen EtOAc-Phasen der Gesamtextrakte der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 aufgeführt.

Tabelle 24: Ausbeuten der Ethylacetat-Phasen der Gesamtextrakte der verschiedenen Erntejahre des GT 42 nach der DIG-MAZ Extraktion

Probe	Einwaage (g)	Ausbeute EtOAc-Phase (g)	Ausbeute (%)
GT 42 E2017	3700	215,32	5,82
GT 42 E2013	1700	111,16	6,54
GT 42 E2009	4100	192,49	4,69

Dabei wurden für die verschiedenen Erntejahre des GT 42 unterschiedliche Ausbeuten erzielt. Die Probe aus dem Jahr 2013 wies mit der geringsten Einwaage von 1700 g, bedingt durch größere zur Verfügung stehende Oberfläche, mit 6,5 % die höchste Ausbeute der Ethylacetat-Phase auf. Im Gegensatz dazu ergab sich für das Erntejahr 2009 mit der höchsten Einwaage von 4100 g die niedrigste Ausbeute mit ca. 4,7 %. Zwischen diesen Varianten befand sich die ermittelte Ausbeute des Jahres 2017. Für dieses konnte eine prozentuale Ausbeute von 5,8 % bei einer Einwaage von 3700 g ermittelt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass eine geringe Einwaage zu einer höheren Ausbeute der Ethylacetat-Phase führt, da die jeweils eingesetzte Lösungsmittelmenge bei allen Erntejahren identisch war. Auf Grund dessen konnte kein Sättigungsgleichgewicht im Extraktionsmittel entstehen und somit konnten mehr Extrakt herausgelöst werden.

4.1.4 Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsverfahren des GT 42 E2017

Zusammenfassend werden in der Tabelle 25 die absoluten Ausbeuten der Ethylacetat-Phasen der Gesamtextrakte des GT 42 in Abhängigkeit von den jeweiligen Extraktionsverfahren sowie der unterschiedlichen Erntejahre dargestellt.

Tabelle 25: Ausbeuten der Ethylacetat-Phasen des GT 42 in Abhängigkeit vom Extraktionsverfahren sowie des Erntejahrs im Vergleich zum manuell extrahierten GT 10 E2014

Probe	Extraktionsart	Einwaage (g)	Ausbeute EtOAc-Phase (g)	Ausbeute (%)
GT 42 E2017 (V 4)	ASE	24,05	1,86	7,73
GT 42 E2017 (V 9)	ASE	18,17	1,11	6,11
GT 42 E2017 (V 10)	ASE	18,11	1,22	6,74
GT 42 E2017 (V 11)	ASE	18,05	0,43	2,38
GT 42 E2017	DIG-MAZ	3700,00	215,32	5,82
GT 42 E2013	DIG-MAZ	1700,00	111,16	6,54
GT 42 E2009	DIG-MAZ	4100,00	192,49	4,69
GT 42 E2017	Manuell	1000,44	52,15	5,21
GT 10 E2014	Manuell	18240,00	1596,00	8,75

Die Tabelle 25 zeigt, dass unabhängig von der eingesetzten Menge in den unterschiedlichen Extraktionsverfahren prozentuale Ausbeuten zwischen 5 % und 8 % erzielt werden konnten. Dies deckt sich mit Extraktionen anderer Genotypen, welche am IBAS durchgeführt worden sind (Sommermann, 2015). Als Ausreißer ist die Variante 11 der ASE-Extraktion zu betrachten. Nach der Durchführung der Feststoffextraktion sowie der anschließenden Flüssig-Flüssig-Extraktion konnte lediglich eine Ausbeute der Ethylacetat-Phase von 2,38 % generiert werden. Diese Abweichung ist wahrscheinlich, wie bereits im Kapitel 4.1.2.3 beschrieben, auf erhöhte eingesetzte Temperaturen zurückzuführen.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit haben sich für die verschiedenen Verfahren unterschiedlichen Vor- und Nachteile herausgestellt.

Die Extraktion unter Verwendung der ASE bietet die Vorteile, dass bedingt durch die Programmierbarkeit, eine Vielzahl an möglichen Versuchsparameter eingestellt wurden und die Extraktion anschließend automatisiert ablaufen konnte. Als Versuchsparameter konnten zum Beispiel Temperaturen oberhalb der Siedetemperatur, Druck sowie Extraktionsdauer eingestellt werden. Ein weiterer Vorteil stellt die benötigte Probenmenge dar.

Für eine Extraktion an der ASE reichten bereits ca. 20 g Probenmaterial aus, um ca. 1 bis 2 g der Ethylacetat-Phase zu generieren. Zu den Nachteilen ist zu sagen, dass auf Grund von Temperatur und Druck während der Extraktion ebenfalls Substanzen herausgelöst wurden, die bei einer Weiterverarbeitung störten (siehe Kapitel 4.1.2.3).

Die Ermittlung einer, für die ASE-Extraktion, geeigneten Partikelgröße war zwar nicht Bestandteil dieser Arbeit, jedoch hat sich dies im Verlauf der Durchführung mit ergeben. Partikel, die kleiner als 250 µm groß sind, führen zu einem Verstopfen der Extraktionszellen, was wiederum den unmittelbaren Abbruch des jeweiligen Versuches zur Folge hatte. Um dies zu verhindern sollten, wenn möglich, nur Proben mit einem durchschnittlichen Durchmesser von größer 250 µm verwendet werden.

Im Gegensatz zu der ASE konnten mit der DIG-MAZ große Menge an Probenmaterial aufgearbeitet werden. Die extrahierbare Einwaage variierte von 1 kg bis zu 4 kg je durchgeführter Feststoffextraktion in Abhängigkeit von der entsprechenden Schüttdichte. Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit, die Feststoffextraktion sowie die Flüssig-Flüssig-Extraktion in einem Gerät durchführen zu können (siehe Kapitel 3.5 sowie Anlage 1). Nachteilig ist zu nennen, dass es zu Ausbeuteverlusten bedingt durch das Totvolumen der vielen Schläuche kommen kann.

Im Vergleich zu den bisher aufgeführten Extraktionsmöglichkeiten bot die klassisch durchgeführte, manuelle Extraktion den Vorteil einer, schonenden, methanolischen Extraktion, da diese unter Eiskühlung stattfand. Die maximale Menge an Wurzelmaterial ist auf etwa 1 kg begrenzt. Für Vorversuche und für Probenmaterialien mit geringen Einsatzmengen stellt die klassische Extraktion allerdings eine geeignete Methode dar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass jedes beschriebene und angewandte Extraktionsverfahren durch die jeweils aufgeführten Vor- und Nachteile charakterisiert ist. Die Wahl eines geeigneten Verfahrens ist daher vor allem auch von der jeweiligen Fragestellung abhängig. Im Fall der vorliegenden Arbeit war es eine Methode zu erarbeiten, die aus *Rheum spp.* neben einer hohen Extraktionsausbeute auch einen möglichst geringen Anteil von Anthrachinonen ermöglicht.

4.2 HPLC-MS

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die Ethylacetat-Phasen der klassisch extrahierten Gesamtextrakte des GT 42 E2017 und des GT 10 E2014 (*Rheum rhabarbarum*) und aus der kleintechnischen Extraktion (DIG-MAZ-Anlage) der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 (*Rheum officinale* Baill.) analysiert. Neben diesen wurden ebenfalls die Ethylacetat-Phasen der mit unterschiedlichen Temperaturen extrahierten ASE-Varianten untersucht. Auf Letztere wird im weiteren Verlauf jedoch nicht näher eingegangen, da diese nicht für die *in vivo* Versuche zur antifungalen Wirkung herangezogen wurden. Der Vollständigkeit halber sind die Daten dieser Analysen in den Anlagen 4 und 5 aufgeführt.

Die Abbildung 27 stellt beispielhaft das Chromatogramm der Ethylacetat-Phase des klassisch extrahierten GT 42 E2017 nach der im Kapitel 3.6 beschriebenen HPLC-Methode mit DAD-Detektion dar.

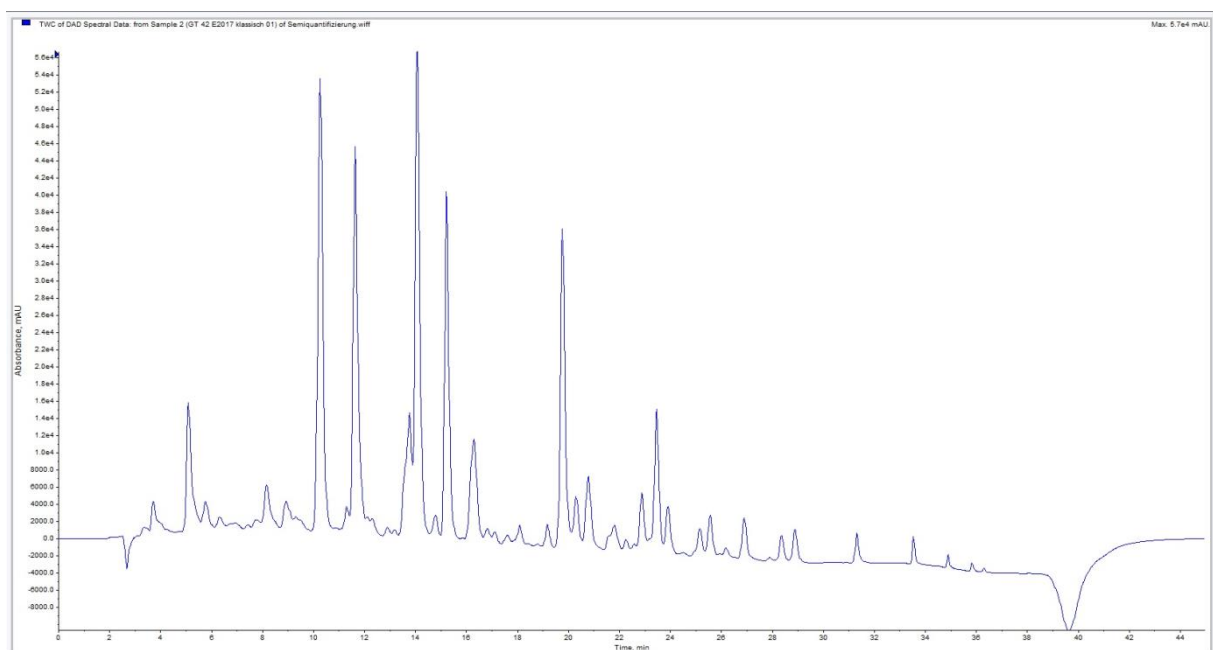


Abbildung 27: Chromatogramm des Gesamtextraktes (EtOAc-Phase) des klassisch extrahierten GT 42 E2017 (HPLC-Methode mit DAD-Detektion)

4.2.1 Quantifizierung der Standardsubstanzen in den verschiedenen Gesamtextrakten des GT 42 sowie des GT 10

Die jeweiligen Ethylacetat-Phasen beider Genotypen wurden in einer Konzentration von 1 Milligramm pro 1 Milliliter hergestellt und 1:100 verdünnt in die HPLC injiziert. Mittels externer Standardkalibrierung wurden die Substanzen anhand eines MRM-Überganges und eines EPI (siehe Kapitel 3.6) quantifiziert und qualitativ bestätigt. Durch den MRM-Übergang wurde das jeweilige Quasimolekülion der Standardsubstanz selektiert und fragmentiert. Die Quantifizierung erfolgte anschließend über die Peakfläche eines spezifischen Fragmentions. Für die qualitative Bestätigung der jeweiligen Standardsubstanz mittels EPI wurden alle Fragmentionen ebenfalls zum Detektor geleitet. Auf Grund dessen wurde ein charakteristisches Spektrum der Substanz erstellt. Generierte Spektren bei unterschiedlichen Konzentrationen dieser Verbindung wurden in einer Datenbank hinterlegt. Wurde bei der Analyse der Proben ein MRM-Übergang erfüllt, erfolgte ein EPI-Scan. In diesem wurde das jeweilige Spektrum der Fragmentionen erfasst. Anschließend konnten die so generierten Spektren mit den Angaben aus der Datenbank verglichen und auf Grundlage derer ausgewertet werden. Jedoch muss erwähnt werden, dass im Zuge der Auswertung nicht für alle Standardsubstanzen verwertbare Ergebnisse generiert werden konnten. So konnte für die Substanzen Epigallocatechingallat, Piceatannol sowie Resveratrol auf Grund großer Abweichungen bei der Mehrfachbestimmung keine Quantifizierung erfolgen, weshalb diese dementsprechend nicht in der quantitativen Auswertung berücksichtigt wurden. Auf diese Problematik wird im späteren Kapitel 4.3 näher eingegangen. Die Substanzen Epigallocatechin sowie Chlorogensäure konnten in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung in Abhängigkeit von den Substanzgruppen dargestellt und interpretiert. Zur besseren Übersichtlichkeit werden zuerst die Ergebnisse für die beiden klassisch extrahierten Genotypen 10 und 42 verglichen. Im Anschluss erfolgt der Vergleich des klassisch extrahierten GT 42 E2017 mit dem DIG-MAZ-Extrakt des gleichen Erntejahres. Abschließend werden die verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 miteinander verglichen.

4.2.1.1 Quantitative Bestimmung der Flavan-3-ole und Procyanidine

Die folgende Abbildung 28 sowie die ergänzende Tabelle 26 zeigen die Quantifizierungsergebnisse der identifizierten Flavan-3-ole und Procyanidine in den Ethylacetat-Phasen der verschiedenen Gesamtextrakte dar.

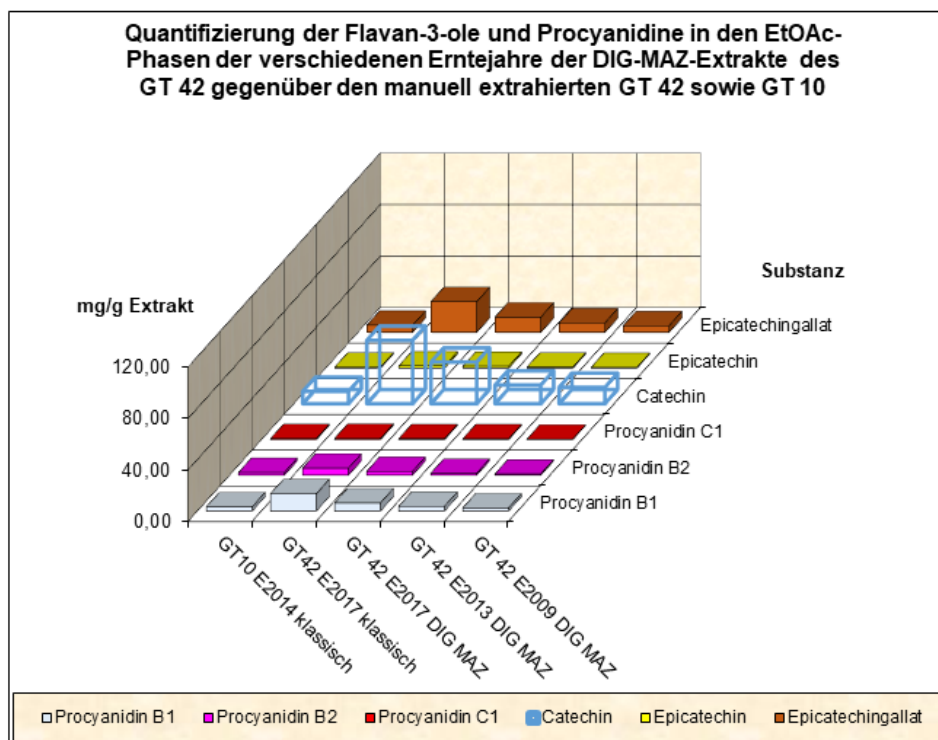


Abbildung 28: Darstellung der quantitativ bestimmten Flavan-3-ole und Procyanidine in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 im Vergleich mit den klassisch extrahierten Varianten des GT 42 und des GT 10

Tabelle 26: Darstellung der quantitativ bestimmten Flavan-3-ole und Procyanidine in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 im Vergleich mit den klassisch extrahierten Varianten des GT 42 und des GT 10

Substanz	GT 10 E2014 klassisch (mg/g Extrakt)	GT 42 E2017 klassisch (mg/g Extrakt)	GT 42 E2017 DIG-MAZ (mg/g Extrakt)	GT 42 E2013 DIG-MAZ (mg/g Extrakt)	GT 42 E2009 DIG-MAZ (mg/g Extrakt)
Epicatechin-gallat	5,56	23,86	11,89	7,38	5,11
Epicatechin	0,67	1,67	1,39	0,69	0,49
Catechin	9,63	49,37	32,43	14,58	12,75
PC1	0,69	0,86	0,60	0,54	0,22
PB2	2,10	5,46	3,00	1,46	0,90
PB1	3,24	13,37	6,21	3,60	2,38

Vergleich der klassischen Gesamtextrakte des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017

Anhand der Abbildung 28 sowie der ergänzenden Tabelle 26 geht hervor, dass in dem Gesamtextrakt des klassisch extrahierten GT 42 E2017 im Gegensatz zum klassisch extrahierten GT 10 E2014 ein deutlich höherer Gehalt an Flavan-3-olen und Procyanidinen nachgewiesen wurde. Das Flavan-3-ol Epicatechingallat konnte zum Beispiel in der ca. vierfachen Menge (24 mg/g) im GT 42 E2017 gegenüber dem GT 10 E2014 ermittelt werden. Größer fiel der Unterschied bei der Substanz Catechin aus. Für diese wurde im Gesamtextrakt des GT 42 E2017 im Verhältnis zu dem des GT 10 E2014 mit 50 Milligramm pro Gramm etwa die fünffache Menge nachgewiesen. Dagegen wies Epicatechin im GT 42 mit ca. 1,7 Milligramm pro Gramm lediglich die zweifache Menge auf.

Für das zu den höhermolekularen Gerbstoffen zählende Procyanidin C1 konnten mit weniger als je einem Milligramm pro Gramm Extrakt ähnliche Gehalte in beiden Genotypen ermittelt werden. Demgegenüber wurden für die Procyanidine B2 und B1 abweichende Werte festgestellt. Der Gesamtextrakt des GT 42 enthielt mit ca. 5,5 Milligramm pro Gramm die zweieinhalbfache Menge an PB2 als der GT 10 mit 2 Milligramm pro Gramm. Auffälliger war hingegen der unterschiedliche Gehalt des Procyanidin B1. Von dieser Substanz war im GT 42 ungefähr die zehnfache Menge gegenüber des GT 10 enthalten. Die aufgezeigten Ergebnisse unterstreichen die genotypisch bedingten Unterschiede der Flavan-3-ole und Procyanidine der beiden klassisch extrahierten Genotypen. Weiterhin können Abbauprozesse während der Lagerung des GT 10-Extrakts zum verminderten Gehalt gegenüber dem GT 42 beigetragen haben.

Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsmethoden des GT 42 Erntejahr 2017 (Klassische Extraktion und DIG-MAZ-Extraktion)

Der Vergleich der beiden Extraktionsmethoden des GT 42 (E2017) zeigte, dass mit der DIG-MAZ-Extraktion geringere Gehalte für die sechs Standardsubstanzen nachgewiesen wurden (Abbildung 28, Tabelle 26). Catechin stellte in beiden Extrakten die Hauptkomponente mit 50 bzw. 30 Milligramm pro Gramm dar. Mit rund 24 Milligramm pro Gramm wies der klassische GT 42 die doppelte Menge im Vergleich

zum DIG-MAZ-Extrakt mit ca. 12 Milligramm pro Gramm auf. Weniger stark fiel der Unterschied für Epicatechin aus. Für diese wurde eine Menge von 1,7 mg/g im klassischen und rund 1,4 mg/g in dem DIG-MAZ Extrakt bestimmt.

Ähnliche Tendenzen konnten für die erfassten Procyanidine festgestellt werden. Die Procyanidine B1 und B2 konnten mit 14 und sechs Milligramm pro Gramm in etwa der doppelten Menge im Vergleich zum DIG-MAZ-Extrakt nachgewiesen werden. Der Gehalt an Procyanidin C1 fiel mit unter einem Milligramm pro Gramm Extrakt etwa identisch aus.

Durch den Vergleich der beiden Extraktionsvarianten mit dem gleichen Wurzelmaterial wird davon ausgegangen, dass die unterschiedlichen Gehalte auf die verschiedenen Temperaturen während der Feststoffextraktionen zurückzuführen sind. Da die manuelle Extraktion unter Eiskühlung durchgeführt wurde, kann angenommen werden, dass weniger Inhaltsstoffe geschädigt wurden als bei der DIG-MAZ-Extraktion mit 60 °C Extraktionstemperatur.

Vergleich der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 mittels DIG-MAZ-Extraktion

Anhand der Abbildung 28 und der Tabelle 26 geht hervor, dass die Gehalte an Flavan-3-olen sowie Procyanidinen der an der DIG-MAZ hergestellten Gesamtextrakte aus den Erntejahren 2017, 2013 und 2009 mit längerer Lagerzeit abnahmen. Dabei wies das frische Probenmaterial des GT 42 E2017 für Epicatechingallat mit rund 12 mg/g, für Epicatechin mit ca. 1,4 mg/g und für Catechin mit etwa 32 mg/g die höchsten Gehalte der erfassten Flavan-3-ole auf. Weiterhin stellte sich heraus, dass der Verlust der Flavan-3-ole durch die Lagerung von 2009 zu 2013 sowie von 2013 zu 2017 durchschnittlich ca. 30 % betrug.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch wieder bei den Procyanidinen. So wies der Extrakt E2017 die etwa dreifache Menge der drei Procyanidine im Vergleich zum Extrakt E2009 auf. Der Vergleich der Erntejahre zeigt, dass die unterschiedlichen Proben als biologisches Material vor der Extraktion nicht unbegrenzt haltbar sind (Hänsel & Sticher, 2006). Das Wurzelmaterial der Erntejahre 2013 und 2009 wurde zudem in zerkleinerter Form gelagert. Die daraus resultierende vergrößerte Oberfläche begünstigte wahrscheinlich eine Beschleunigung von qualitätsmindernden Ab- bzw. Umbauprozessen während der Lagerung.

4.2.1.2 Quantitative Bestimmung der Phenolcarbonsäuren und Stilbene

Nachfolgend stellen die Abbildung 29 sowie Tabelle 27 die Quantifizierungsergebnisse der identifizierten Phenolcarbonsäuren und der Stilbene in den Ethylacetat-Phasen der verschiedenen Gesamtextrakte dar.

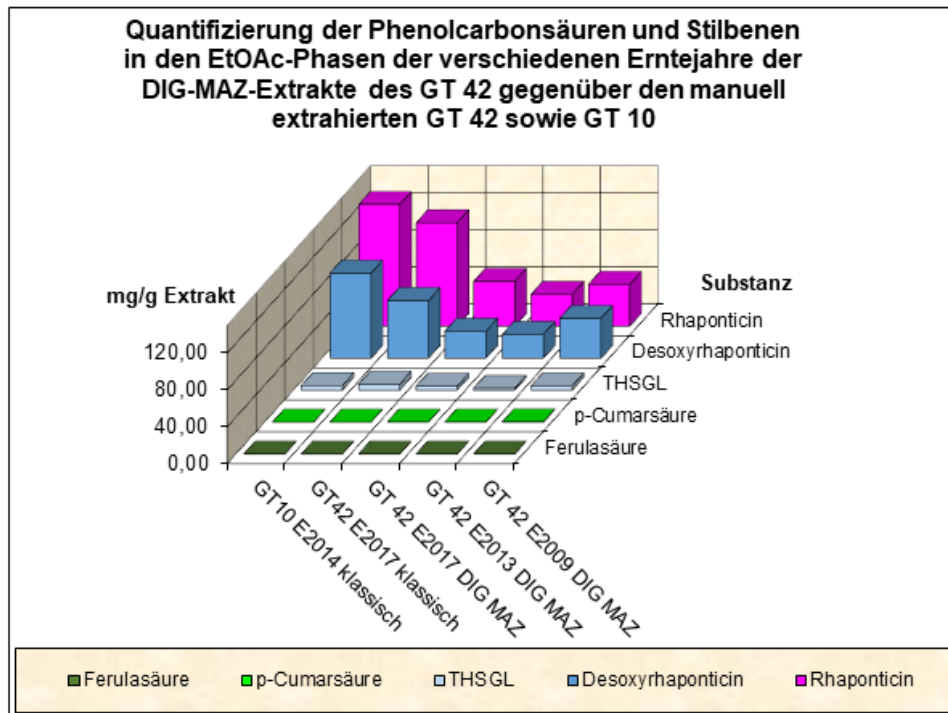


Abbildung 29: Darstellung der quantitativ bestimmten Phenolcarbonsäuren und Stilbene in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 im Vergleich mit den klassisch extrahierten Varianten des GT 42 und des GT 10

Tabelle 27: Quantifizierung der Phenolcarbonsäuren und Stilbene in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 im Vergleich mit den klassisch extrahierten Varianten des GT 42 und des GT 10 (n=2)

Substanz	GT 10 E2014 klassisch (mg/g Extrakt)	GT 42 E2017 klassisch (mg/g Extrakt)	GT 42 E2017 DIG-MAZ (mg/g Extrakt)	GT 42 E2013 DIG-MAZ (mg/g Extrakt)	GT 42 E2009 DIG-MAZ (mg/g Extrakt)
Rhaponticin	132,00	112,26	48,55	34,50	45,33
Desoxyrhaponticin	92,26	62,54	29,20	25,81	43,14
3,5,4'-Trihydroxystilben-3-O-β-D-glukosid	5,04	6,68	4,20	2,01	4,58
p-Cumarsäure	0,08	0,07	0,16	0,14	0,34
Ferulasäure	0,11	0,08	0,13	0,10	0,13

Vergleich der klassischen Gesamtextrakte des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017

Im Vergleich der klassisch extrahierten Genotypen konnte ermittelt werden, dass Rhaponticin mit 132 Milligramm pro Gramm im GT 10-Extrakt mehr enthalten war als im Extrakt des GT 42 mit 112 Milligramm pro Gramm (Abbildung 29, Tabelle 27). Ähnliches traf auch auf die Substanz Desoxyrhaponticin zu, wobei dieses mit etwa 92 Milligramm pro Gramm im GT 10 und mit rund 62 Milligramm pro Gramm im GT 42 jeweils den zweithöchsten Gehalt der nachgewiesenen Stilbene aufwies. Da diese Substanz in Medizinalrhabarber laut Arzneibuch nicht enthalten sein darf, kann es sich bei dem untersuchten Probenmaterial nicht zweifelsfrei um *Rheum officinale* Baill. handeln. Diese Problematik ist bereits in früheren, am IBAS durchgeführten Arbeiten erkannt worden (Sommermann, 2012), (Schneiderheinze, 2009). Auf Grund der enthaltenen Mengen stellten diese Substanzen die Hauptkomponenten in den klassischen Extrakten des GT 10 E2014 sowie des GT 42 E2017 dar.

Hingegen ist THSGL mit ca. 5 mg/g in einem etwas geringeren Anteil im GT 10 E2014 als im GT 42 E2017 mit 6,7 mg/g enthalten.

Die zwei Phenolcarbonsäuren p-Cumarsäure und Ferulasäure konnten in den beiden Genotypen der klassischen Extraktion nur in geringen Konzentrationen von rund 0,10 Milligramm pro Gramm nachgewiesen werden.

Die ermittelten Unterschiede der aufgeführten Substanzen könnten wie bei den Flavan-3-olen auf die verschiedenen Genotypen zurückzuführen sein.

Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsmethoden des GT 42 Erntejahr 2017 (Klassische Extraktion und DIG-MAZ-Extraktion)

Der Vergleich der beiden Extraktionsmethoden des GT 42 (E2017) zeigte, dass mit der DIG-MAZ-Extraktion geringere Gehalte an Stilbenen und Phenolcarbonsäuren ermittelt werden konnten (Abbildung 29, Tabelle 27).

Rhaponticin war dabei mit ca. 112 Milligramm pro Gramm Extrakt in der klassischen Variante etwa in der doppelten Menge als im DIG-MAZ Extrakt mit rund 49 mg/g enthalten. Ein ähnliches Verhältnis zeigte die Substanz Desoxyrhaponticin mit ca. 63 mg/g im klassischen und mit ca. 29 mg/g in der DIG-MAZ Variante auf. Auch für THSGL fiel der Unterschied mit etwa 7 mg/g und 4 mg/g ähnlich aus.

Für die beiden Phenolcarbonsäuren Ferulasäure und p-Cumarsäure konnten dagegen mit jeweils über 0,1 mg/g geringfügig höhere Gehalte in der DIG-MAZ-Variante im Vergleich zur klassischen Methode nachgewiesen werden. Dies könnte, wie bereits bei den Flavan-3-olen beschrieben, auf die unterschiedlichen Extraktionstemperaturen zurückzuführen sein.

Vergleich der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 mittels DIG-MAZ-Extraktion

Für die an der DIG-MAZ-Anlage hergestellten Extrakte konnten in Abhängigkeit der Erntejahre Unterschiede aufgezeigt werden (Abbildung 29, Tabelle 27). Dabei wiesen die Erntejahre 2017 und 2009 mit bis zu 50 Milligramm pro Gramm Extrakt deutlich höhere Gehalte an Rhaponticin auf als der Extrakt des Erntejahrs 2013 mit 35 Milligramm pro Gramm. Auch beim THSGL zeigten E2017 und E2009 mit über 4 Milligramm pro Gramm ähnliche Gehalte auf, während diese Substanz im E2013 um etwa die Hälfte reduziert vorlag. Auch bei Desoxyrhaponticin konnte eine ähnliche Tendenz aufgezeigt werden. Allerdings wiesen die Extrakte E2017 und E2015 mit etwa 30 Milligramm pro Gramm vergleichbarere Gehalte auf. Der Extrakt des Erntejahres 2009 zeigte mit 43 Milligramm pro Gramm den höchsten Gehalt. Die identifizierten Mengen der beiden Phenolcarbonsäuren p-Cumarsäure und Ferulasäure unterschieden sich zwischen den Extrakten relativ gering. Nur der Gehalt an p-Cumarsäure im E2009 war gegenüber den Extrakten der anderen Erntejahre um das etwa Doppelte erhöht. Da für die Gehalte der aufgeführten Stilbene weder eindeutige Zunahmen noch Abnahmen über alle Erntejahre nachgewiesen werden konnten, wurde die Kultivierungszeit des Wurzelmaterials im Boden bei der Interpretation berücksichtigt. Aus der Tabelle 28 geht dabei hervor, dass die Kultivierungszeit des Erntematerials 2013 mit sieben Jahren am längsten war. Somit könnte davon ausgegangen werden, dass eine längere Kultivierungszeit mit einer Abnahme der glykosylierten Stilbene Rhaponticin, Desoxyrhaponticin und THSGL einherging.

Tabelle 28: Darstellung der Aussaat, Standzeit, Ernte und Lagerzeit der unterschiedlichen DIG-MAZ Extrakte des GT 42

Probe	Jahr der Aussaat	Kultivierungszeit	Erntejahr	Lagerzeit (Jahre)
GT 42 E2017	2012	5	2017	0
GT 42 E2013	2006	7	2013	4
GT 42 E2009	2006	3	2009	8

Neben den verschiedenen Kultivierungszeiten könnte die stressbedingte, verstärkte Produktion der Stilbene kurz vor der jeweiligen Ernte zu den unterschiedlichen Gehalten der einzelnen Inhaltsstoffe beigetragen haben. Als Ursache dafür sind neben Witterungsbedingungen auch durch Pathogene, wie Bakterien oder Pilze, hervorgerufene Abwehrreaktionen zu nennen (Dudenhöffer, 2016).

Fazit

Abschließend kann man festhalten, dass die Gehalte der unterschiedlichen Inhaltsstoffe neben dem Genotyp, dem Erntejahr, der Extraktionsmethode auch von der jeweiligen Lagerdauer abhängig sein können.

Für die Flavan-3-ole, die Stilbene und die Procyanidine des GT 42 (2017) konnte somit der negative Einfluss höherer Extraktionstemperaturen auf deren Gehalt nachgewiesen werden. Zudem wies dieses Wurzelmaterial auf Grund genotypischer Ursachen höhere Gehalte der untersuchten Inhaltsstoffe auf als der GT 10 (2014). Für die Flavan-3-ole und die Procyanidine konnten mit älterem Erntejahr geringere Mengen in den Extrakten der EtOAc-Phasen nachgewiesen werden, was wiederum auf einen Abbau der Substanzen über den längeren Lagerungszeitraum erklärbar ist. Bei den Stilbenen konnten hingegen keine eindeutigen Tendenzen beim Vergleich der Erntejahre aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu den Flavan-3-olen wies das älteste untersuchte Wurzelmaterial (GT 42, 2009) insgesamt den höchsten Gehalt an Stilbenen auf. Weiterhin wurde ersichtlich, dass es sich bei dem GT 42 auf Grund der nachgewiesenen Mengen an Rhaponticin nicht zweifelfrei um einen *Rheum officinale* handeln kann.

Zudem muss darauf hingewiesen werden, dass die Substanzen Epigallocatechingallat, Piceatannol sowie Resveratrol auf Grund limitierender Faktoren nicht eindeutig in den untersuchten Gesamtextrakten quantitativ nachgewiesen und somit nicht berücksichtigt werden konnten.

4.2.2 Semiquantifizierung der weiteren identifizierten *Rheum*-Inhaltsstoffe in den verschiedenen Gesamtextrakten des GT 42 sowie des GT 10

Die vollständige Quantifizierung aller in den *Rheum*-Extrakten enthaltenen Substanzen mittels einer externen Standardkalibration war nicht möglich, da nicht alle identifizierten Substanzen als Standard zur Verfügung standen. Aus diesem Grund wurde die Mehrzahl der Substanzen unter Verwendung eines Full-Scan-MS-Spektrums qualitativ bestimmt. Die Identifizierung dieser Substanzen erfolgte durch den Vergleich der Massenspektren mit den entsprechenden Literaturangaben. Um eine quantitative Einschätzung bezüglich der auf diese Weise identifizierten Substanzen geben zu können, wurden die zusätzlich aufgenommenen DAD-Chromatogramme integriert. Anhand der Peakflächen konnte eine semiquantitative Auswertung getroffen werden.

Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert aus zwei Bestimmungen dar.

Im Folgenden werden die semiquantitativen Ergebnisse für die Stilbene, die Anthrachinone, die weiteren identifizierten Substanzen sowie für Substanzen mit Koelution jeweils separat dargestellt.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden die Diagramme bezüglich der Skalierung der y-Achse auf die insgesamt größte Peakfläche normiert. Diese stammte von Trihydroxystilben-galloyl-glukosid aus dem Gesamtextrakt des klassisch extrahierten GT 42 E2017 sowie aus dem DIG-MAZ-Gesamtextrakt des GT 42 E2009 mit ca. 1.250.000 Peakflächeneinheiten (PFE).

4.2.2.1 Semiquantitative Bestimmung der Stilbene

Die folgende Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der Ethylacetat-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 sowie der klassisch extrahierten Varianten des GT 42 E2017 und des GT 10 E2014 für die nachgewiesenen Stilbene.

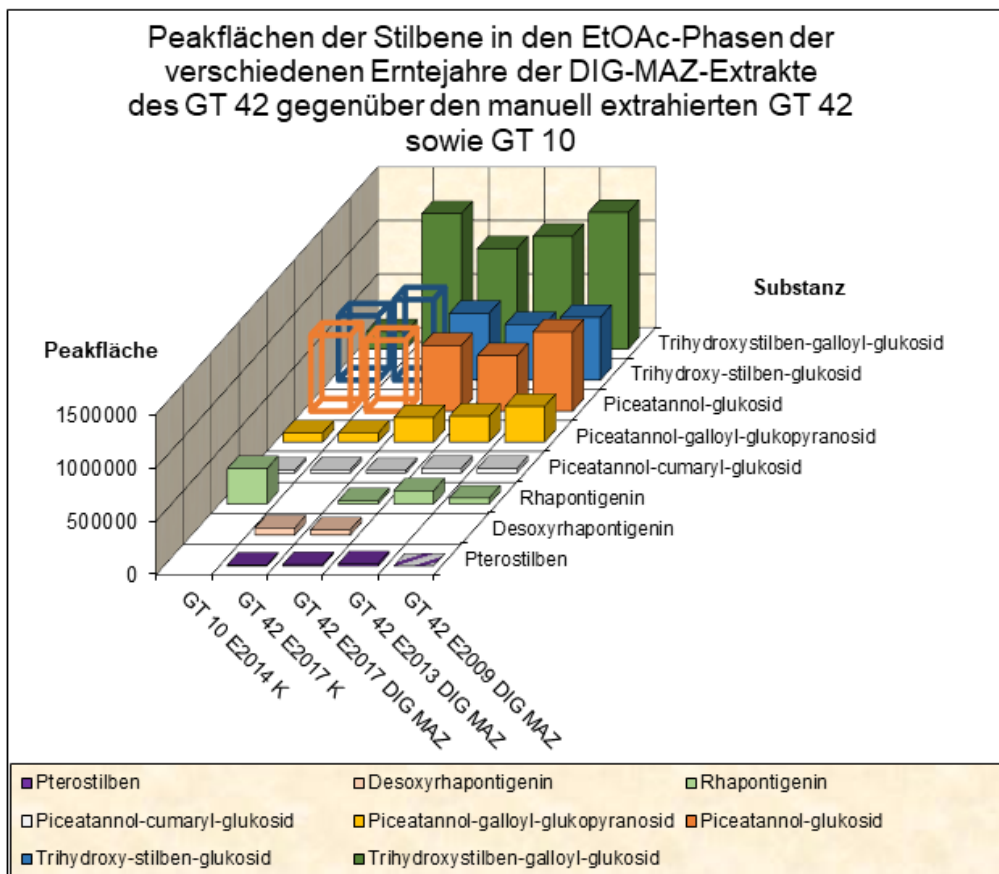


Abbildung 30: Semiquantitative Darstellung der identifizierten Stilbene in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 gegenüber des klassisch extrahierten GT 42 sowie des GT 10

Die Stoffgruppe der Stilbene war sowohl hinsichtlich des mengenmäßigen Anteils als auch bei der Anzahl an unterschiedlichen Verbindungen die umfangreichste. Anhand der Abbildung 30 wird ersichtlich, dass diese hauptsächlich in glykosylierter Form vorlagen, wobei Glukose als Hauptzuckerkomponente ermittelt werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren, am IBAS durchgeführten Analysen (Kabrodt, 2006) (Sommermann, 2012). Neben diesen glykosylierten Substanzen stellen Rhapontigenin und Desoxyrhapontigenin auf Grund der fehlenden Glukose das jeweilige Aglykon der Stoffe Rhaponticin sowie Desoxyrhaponticin dar. Für die beiden zuletzt genannten Stoffe lagen Standards vor, weshalb diese ausschließlich in der quantitativen Bestimmung berücksichtigt wurden.

Vergleich der klassischen Gesamtextrakte des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017

In Bezug auf die identifizierten Stilbene lässt sich anhand der Abbildung 30 aufzeigen, dass im klassischen Gesamtextrakt des GT 42 E2017 Trihydroxy-stilben-galloyl-glukosid die Haupts substanz darstellt. Für diesen konnten rund 1.250.000 PFE ermittelt werden. Vergleichend dazu wurden im GT 10 E2014 mit rund 162.000 PFE lediglich ein Achtel dieser Substanz nachgewiesen, so dass man bei diesem Inhaltsstoff von einem genotypischen Unterschied ausgehen kann. Das Trihydroxy-stilben-glykosid lag im GT 42 mit einem Unterschied von 3 % ebenfalls in einer geringfügig höheren Menge als im GT 10 vor. Demgegenüber wurde für Piceatannol-glukosid mit ca. 710.000 PFE eine rund 10 % höhere Menge im GT 10 bestimmt. Die Peakflächen der Substanzen Piceatannol-galloyl-glukopyranosid und Piceatannol-cumaryl-glykosid waren in beiden Genotypen mit ca. 85.000 PFE und 30.000 PFE etwa ähnlich.

Rhapontigenin konnte dagegen ausschließlich im GT 10 E2014 mit etwa 330.000 PFE als eine weitere Hauptkomponente der identifizierten Stilbene erfasst werden. Dagegen wurden Desoxyrhapontigenin mit rund 66.000 PFE sowie Pterostilben mit etwa 10.000 PFE ausschließlich im Extrakt des GT 42 E2017 nachgewiesen.

Aus den aufgezeigten Daten ergab sich, dass die klassisch generierten Extrakte Unterschiede hinsichtlich des spezifischen Inhaltsstoffspektrums auf Grundlage der genotypischen Eigenschaften aufwiesen. Besonders veranschaulichen lässt sich dies anhand von Trihydroxystilben-galloyl-glukosid, welches im GT 42 E2017 in der achtfachen Menge im Gegensatz zum GT 10 E2014 bestimmt werden konnte. Allgemein wurde beobachtet, dass die Peakflächen der Substanzen, die in beiden Genotypen nachgewiesen wurden, im GT 10 geringer ausfielen.

Eine Ausnahme stellt dabei die Substanz Piceatannol-glukosid dar, welches eine um 50.000 Einheiten größere Peakfläche im GT 10 zeigte. Als Besonderheit stellten sich die Substanzen Desoxyrhapontigenin und Pterostilben dar, welche nur im GT 42 ermittelt wurden. Rhapontigenin konnte ebenfalls nicht im klassischen Extrakt des GT 42 bestimmt werden. Bezieht man sich dabei jedoch auf die Angabe von Krafcyk (2008), müssten beide Genotypen die Substanz Rhapontigenin enthalten bzw. hätte Desoxyrhapontigenin in dem Gesamtextrakt des GT 10 E2014 und nicht in dem des GT 42 E2017 nachgewiesen werden dürfen. Dabei bezog sich Krafcyk auf die Untersuchungen der Autorenguppen Kashiwada et al. (1986, 1988, 1989) und

Nonaka et al. (1977) bezüglich der Charakterisierung von Stilbenderivaten aus *Rheum officinale* und aus *Rheum rhabarbarum* durch Matsuda et al. (2001), Choi et al. (2005) und Komatsu et al. (2006) (Krafczyk, 2008). Diese Beobachtungen zu den genannten Substanzen lassen mehrere Schlussfolgerungen zu. Es könnte einerseits zu einer Bastardisierung im Verlauf der Kultivierung auf dem Feld bei den jeweiligen Genotypen gekommen sein. Diese wiederum könnte zu einer Veränderung des Inhaltsstoffspektrums beigetragen haben. Andererseits könnten auch Ab- bzw. Umbauprozesse im Verlauf der Lagerung zu Veränderungen des spezifischen Inhaltsstoffspektrums in der Probe des GT 10 geführt haben. Um jedoch exakte Vergleiche der beiden Proben zu ermöglichen, hätten die Proben im gleichen Jahr und nach identischen Wachstumsperioden entnommen und bei identischen Bedingungen gelagert werden müssen. Für das Rhapontigenin sind extraktionsbedingte und erntejahrabhängige Unterschiede ebenfalls nicht auszuschließen.

Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsmethoden des GT 42 Erntejahr 2017 (Klassische Extraktion und DIG-MAZ-Extraktion)

Ausgehend von der Abbildung 30 stellte die Substanz Trihydroxystilben-galloylglukosid unabhängig von der Extraktionsmethode in beiden Gesamtextrakten die Hauptkomponenten dar. Dabei konnte in der klassischen Variante mit etwa 1.250.000 PFE eine um rund 30 % höhere Menge als in der DIG-MAZ-Variante nachgewiesen werden.

Weiterhin konnten extraktionsbedingt die Substanzen Trihydroxystilben-glykosid, Piceatannol-glykosid und Piceatannol-cumaryl-glykosid mit höheren Gehalten im klassischen Extrakt ermittelt werden. Gleiches galt auch für Desoxyrhapontigenin mit 70.000 PFE (GT 42 E2017 K) und 50.000 PFE (GT 42 E2017 DIG-MAZ). Im Gegensatz dazu wurde für Pterostilben mit rund 13.000 PFE eine um etwa 30 % größere Menge im DIG-MAZ-Extrakt nachgewiesen. Das Aglykon Rhapontigenin konnte, mit ca. 32.000 PKE ausschließlich im Gesamtextrakt der DIG-MAZ-Variante erfasst werden. Beruhend auf den Erfahrungen der Mitarbeiter am IBAS wird davon ausgegangen, dass bei der klassischen Extraktion weniger wertgebende Inhaltsstoffe geschädigt werden (Schöler & Scharmer, 2018). Im Kapitel 4.1.4 konnte zwar gezeigt werden, dass die meisten DIG-MAZ-Extrakte im Vergleich zur klassischen Extraktion eine höhere Gesamtausbeute aufwiesen, allerdings zeigte sich anhand der

semiquantitativen Auswertung, dass der Gehalt der wertgebenden Inhaltsstoffe nicht mit einer erhöhten Extraktionsausbeute einherging. Als Ausnahme gelten die Substanzen Piceatannol-galloyl-glukopyranosid und Pterostilben, welche in einem höheren Maße in dem DIG-MAZ-Extrakt nachgewiesen wurden, sowie das ausschließlich im DIG-MAZ-Extrakt nachgewiesene Rhapontigenin.

Vergleich der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 mittels DIG-MAZ-Extraktion

Für den Vergleich der verschiedenen Erntejahre des GT 42 wird neben der Abbildung 30 auch erneut, wie im Kapitel 4.2.1.2, die Tabelle 28 herangezogen. In diesem Zusammenhang geht hervor, dass der Gehalt einzelner Substanzen mit der Kultivierungszeit auf dem Feld und mit der Lagerdauer des Wurzelmaterials in Verbindung zu stehen scheint.

Innerhalb der Erntejahre des GT 42 wies E2009 mit rund 1.250.000 PFE die größte Peakfläche für die Substanz Trihydroxystilben-galloyl-glukosid auf. Dieses und Piceatannol-galloyl-glukopyranosid nahmen mit zunehmender Lagerzeit zu.

Weiterhin zeigten die beiden Substanzen Piceatannol-glykosid und Trihydroxystilben-glykosid hohe Peakflächen von über 500.000 PFE. Der höchste Gehalt wurde dabei im E2013 nachgewiesen, was wiederum mit der längsten Kultivierungszeit von sieben Jahren einhergeht. Ähnliches galt für Rhapontigenin, welches mit ca. 125.000 PFE im E2013 nachzuweisen war. Dies war die doppelte bis vierfache Menge im Vergleich zum E2009 und E2017. Eine Erklärung dafür könnte eine hohe UV-Exposition oder eine Mykose sein (Richter, 1998). In beiden Fällen würde eine vermehrte Stilbensynthese hervorgerufen werden. Bedingt durch die Tatsache, dass für diese Arbeit lediglich eine Mischprobe aus mehreren Wurzeln untersucht worden war, ist die folgende Annahme mit Vorbehalt zu betrachten. Um diese zu bestätigen, müssten mehrere einzelne Wurzeln auf diese These untersucht werden.

Ähnliche Peakflächen von ca. 40.000 PFE wurden für Piceatannol-cumaryl-glykosid in den Erntejahren 2009 und 2013 nachgewiesen. Die Menge im E2017 betrug mit ca. 25.000 PFE knapp die Hälfte. Desoxyrhapontigenin wurde ausschließlich im Erntejahr 2017 des GT 42 nachgewiesen, so dass angenommen wird, dass dies auf das frische Wurzelmaterial zurückzuführen ist. Ähnliches galt für Pterostilben, welches nur in der Ernte 2017 und 2013 identifiziert wurde. Allerdings konnte die doppelte Menge im

E2013 bestimmt werden, so dass wie bei Rhapontigenin beschrieben ebenfalls die Kultivierungszeit zu diesem Gehalt beigetragen hat. Da Pterostilben in der Probe des Erntejahres 2009 mit einer weiteren koeluierte (siehe dazu Kapitel 4.2.2.4), kann diese Vermutung nur unter Vorbehalt getroffen werden.

4.2.2.2 Semiquantitative Bestimmung der Anthrachinone

In der folgenden Abbildung 31 sind die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der Ethylacetat-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 sowie der klassisch extrahierten Varianten des GT 42 E2017 und des GT 10 E2014 für die identifizierten Anthrachinone dargestellt.

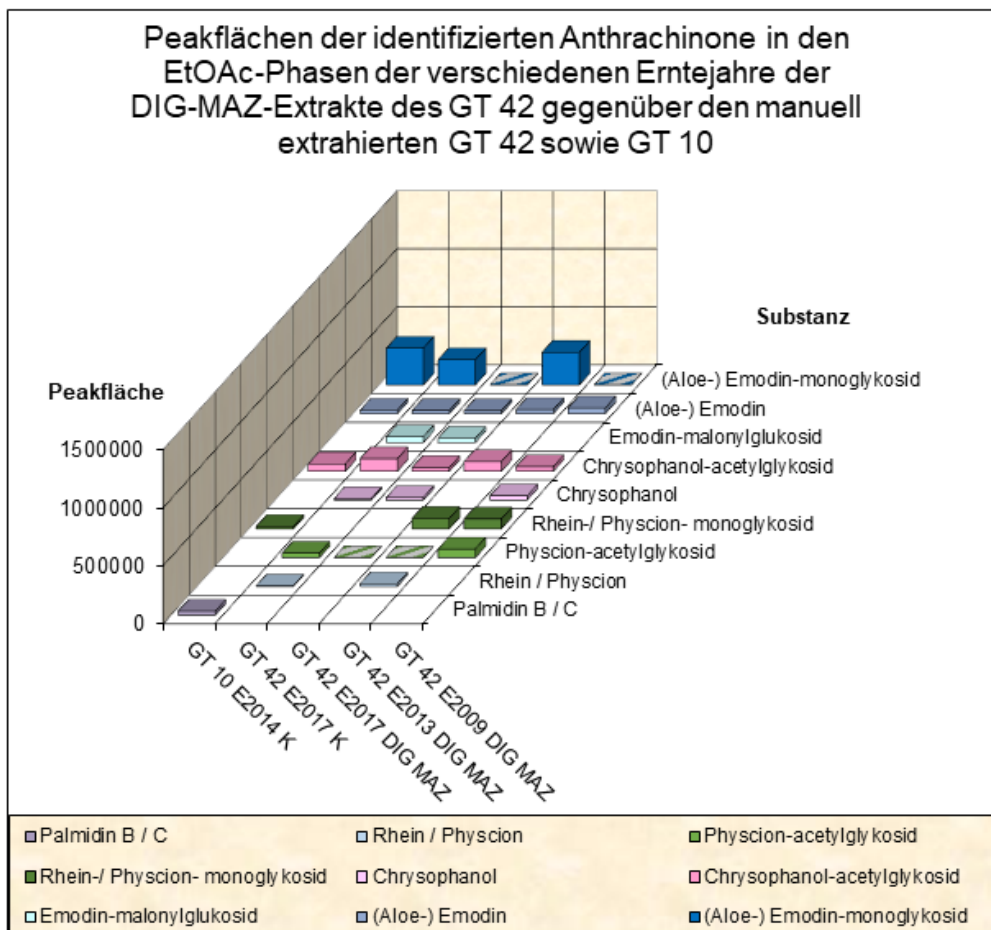


Abbildung 31: Semiquantitative Darstellung der identifizierten Anthrachinone in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 gegenüber den klassisch extrahierten GT 42 sowie des GT 10 (schraffierte Säulen stehen für koeluierte Substanzen)

Laut Abbildung 31 ist generell festzuhalten, dass die detektierten Anthrachinone in wesentlich geringeren Gehalten in den Extrakten vorlagen als die Stilbene.

Dies beruht auf den spezifischen Bedingungen der Extraktionsverfahren, welche zu einer weitestgehend ausreichenden Entfernung dieser Substanzgruppe geführt hat.

Im Folgenden werden die beiden Genotypen auf ihre Gehalte an Anthrachinonen verglichen.

Vergleich der klassischen Gesamtextrakte des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017

Innerhalb der klassischen Gesamtextrakte des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017 konnten mit (Aloe-) Emodin, Chrysophanol und Rhein / Physcion *Rheum*-typische Anthrachinone ermittelt werden (Yim, et al., 1999).

Für (Aloe-) Emodin-monoglykosid konnte mit etwa 316.000 PFE im GT 10 und rund 217.000 PFE im GT 42 die höchsten Mengen ermittelt werden. Das dazugehörige Aglykon (Aloe -) Emodin war in beiden Gesamtextrakten mit etwa 30.000 PFE nahezu identisch. Ebenfalls konnte in beiden Gesamtextrakten Chrysophanol-acetylglukosid ermittelt werden. Dabei wies der GT 42 mit ca. 108.000 PFE eine um etwa 30 % höhere Menge auf als der GT 10 mit rund 63.000 PFE. Die größten Unterschiede zwischen den untersuchten Gesamtextrakten waren zwischen den Substanzen Emodin-malonylglukosid, Chrysophanol, Physcion-acetylglykosid und Rhein / Physcion erkennbar, da diese ausschließlich in dem klassischen Gesamtextrakt des GT 42 nachzuweisen waren. Das Heterodianthron Palmidin B / C, bestehend aus Emodin und Chrysophanol, wurde zwar lediglich im GT 10 E2014 ermittelt, dieses müsste laut Literaturangaben jedoch in beiden Genotypen vorkommen (Zhou, et al., 2011). Trotz der Abtrennung mit Petrolether in der Flüssig-Flüssig-Extraktion (siehe Kapitel 3.2) konnten entsprechende Mengen an Anthrachinonen in beiden Genotypen ermittelt werden. Vier der identifizierten Anthrachinone wurden dabei ausschließlich im GT 42 nachgewiesen. Inwieweit dies auf genotypische Unterschiede zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden, da auch ein lagerungsbedingter Abbau dieser Substanzen im GT 10 nicht ausgeschlossen werden kann. Generell könnte eine Fraktionierung der *Rheum*-Extrakte mittels präparativer HPLC die weitere Abtrennung der Anthrachinone verbessern (Ballert 2014).

**Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsmethoden des GT 42 Erntejahr 2017
(Klassische Extraktion und DIG-MAZ-Extraktion)**

Durch die Gegenüberstellung der beiden Extraktionsvarianten des GT 42 E2017 wird ersichtlich, dass auf Grundlage der semiquantitativen Daten nicht alle Substanzen miteinander verglichen werden konnten. Einige der Substanzen koeluierten mit einer weiteren Substanz, was eine eindeutige Aussage zu der jeweiligen Peakfläche verhindert.

Für die eindeutig chromatographisch getrennten Verbindungen kann aufgezeigt werden, dass (Aloe-) Emodin-monoglykosid in dem klassischen Extrakt die Hauptsubstanz darstellte, während es im DIG-MAZ-Extrakt koeluierte.

Das dazugehörige Aglykon (Aloe-)Emodin war in beiden Extrakten mit rund 26.000 PFE nahezu identisch. Im Gegensatz dazu wies der klassisch extrahierte GT 42 mit ca. 50.000 PFE eine größere Menge Emodin-malonyl-glykosid auf als der DIG-MAZ Extrakt mit rund 36.000 PFE. Chrysophanol-acetyl-glykosid konnte mit der dreifachen Menge (109.000 PFE) ebenfalls mehr im klassisch extrahierten Extrakt nachgewiesen werden. Das Aglykon Chrysophanol wiederum wurde dagegen fast in der doppelten Menge im DIG-MAZ-Extrakt (ca. 21.000 PFE) ermittelt als in dem klassischen Extrakt (ca. 12.000).

Da Physcion-acetylglykosid wie (Aloe-) Emodin-monoglykosid mit einer weiteren Substanz koeluierte, konnte für diese kein Vergleich gezogen werden. Mit einer geringen Peakfläche von 4500 wurde die Substanz Rhein bzw. Physcion lediglich im klassischen Extrakt ermittelt. Eine eindeutige Identifizierung blieb aus, da beide Substanzen die gleiche Masse aufweisen, aber die charakteristischen Tochterionen nicht ermittelt werden konnten. Mit keiner der beiden Extraktionsvarianten konnte Palmidin B / C nachgewiesen werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass in dem DIG-MAZ-Extrakt einige der identifizierten Anthrachinone mit einer weiteren Substanz in einem Peak koeluierten, können vergleichende Aussagen nur für wenige Verbindungen getroffen werden. Für Chrysophanol-acetyl-glykosid und Emodin-malonyl-glykosid galt, dass diese mit einer höheren Peakfläche im klassisch extrahierten Extrakt nachgewiesen wurden, was vermutlich auf die niedrigere Temperatur während der Extraktion beruht (vgl. Kapitel 4.2.1.1).

Lediglich das Aglykon Chrysophanol wies im DIG-MAZ-Extrakt eine höhere Peakfläche auf. Möglicherweise ließe sich daraus schließen, dass durch die Extraktion mit der DIG-MAZ-Anlage Extrakte mit geringeren Anthrachinongehalten hergestellt werden könnten. Dies bedarf aber weiterer Untersuchungen.

Vergleich der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 mittels DIG-MAZ-Extraktion

Anhand der Abbildung 31 ist erkennbar, dass nicht für alle aufgezeigten Anthrachinone eindeutige Vergleiche zwischen den Erntejahren des GT 42 möglich waren, da diese einerseits nicht in allen Extrakten nachgewiesen werden konnten oder andererseits koeluierten.

So wurden ausschließlich (Aloe-) Emodin und Chrysophanol-acetylglykosid in allen Erntejahren nachgewiesen. Bei ersterem ging eine erhöhte Peakfläche mit der längeren Lagerung bzw. mit dem älteren Erntejahr 2009 einher. So betrug der Gehalt im Extrakt des frischen Erntematerials E2017 ca. 25.000 PFE und im E2009 mit ca. 50.000 PFE das Doppelte. Auch wenn Chrysophanol nicht im E2013 nachgewiesen werden konnte, zeigte der Gehalt von 20.000 PFE im E2017 und von fast 40.000 PFE im E2009 die gleiche Tendenz auf.

Chrysophanol-acetylglykosid war dagegen mit über 80.000 PFE im E2013 gegenüber den anderen Erntejahren um etwa das Doppelte erhöht. Möglicherweise traten bei diesem auf Grund der längeren Kultivierung (siehe Kapitel 4.2.1.2 Tabelle 28) Glykosylierungen auf.

Rhein/Physcion-mono-glykosid konnte nur im E2013 und E2009 nachgewiesen, allerdings war der Gehalt mit knapp 90.000 PFE relativ ähnlich.

(Aloe-)Emodin-monoglykosid wies im E2013 unter allen Anthrachinonen und Erntejahren die höchste Peakfläche von ca. 300.000 PFE auf. Allerdings ist dies unter Vorbehalt zu betrachten, da diese Substanz in E2017 und E2009 koeluierte. Die Anreicherung im E2013 könnte wie bei Chrysophanol-acetylglykosid auf die längere Kultivierung zurückzuführen sein.

Physcion-acetylglykosid konnte mit ca. 74.000 PFE nur eindeutig im E2009 ermittelt werden, da dieses im E2017 und E2013 mit einer anderen Substanz koeluierte.

Rhein/Physcion wurde mit 23.000 PFE nur im E2013 und Emodin-malonylglykosid mit 37.000 PFE nur im E2017 nachgewiesen. Diese trat über alle Extrakte hinweg nur im Erntejahr 2017 auf und stellt somit eine Besonderheit dar.

Bei Malonsäure handelt sich um eine Dicarbonsäure, die an ein Molekül Glukose verestert ist, welches wiederum mit Emodin über eine glykosidische Bindung verknüpft ist (Mortimer & Müller, 2015). Hierzu ist zu sagen, dass das Probenmaterial des GT 42 E2017 von einem benachbarten Feld stammt als das der anderen Erntejahre. Der Unterschied könnte möglicherweise durch ein differenziertes Nährstoffangebot zur Bildung der Substanz in dieser Probe geführt haben. Des Weiteren könnten die nicht vorhandene Lagerzeit ebenfalls einen Einfluss gehabt haben.

4.2.2.3 Semiquantitative Bestimmung der weiteren Substanzen

Die Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der Ethylacetat-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 sowie der klassisch extrahierten Varianten des GT 42 E2017 und des GT 10 E2014 für die weiteren identifizierten Substanzen. Bei diesen handelt es sich unter anderem um die Flavan-3-ole, Naphtholglukoside sowie um unbekannte Substanzen.

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln werden im Folgenden die weiteren *Rheum*-typischen Substanzen hinsichtlich der genotypischen Unterschiede, der Extraktionsvarianten sowie der verschiedenen Erntejahre dargestellt.

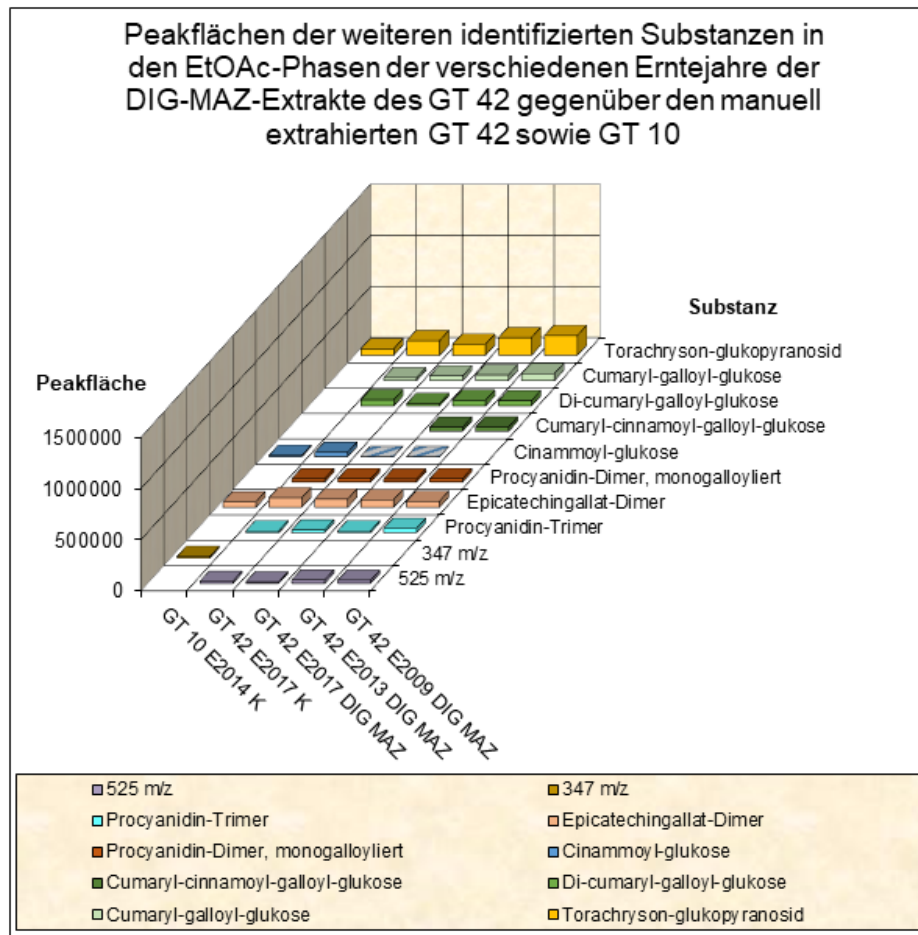


Abbildung 32: Semiquantitative Darstellung der weiteren identifizierten und unbekannt Substanzen in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ Extrakte des GT 42 gegenüber den klassisch extrahierten GT 42 sowie des GT 10

Vergleich der klassischen Gesamtextrakte des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017

Ausgehend von der Abbildung 32 ist zu erkennen, dass das Naphtholglykosid Torachryson-glykopyranosid bei diesen Verbindungen als Hauptkomponente nachgewiesen werden konnte. Dabei war im GT 42 mit 140.000 PFE etwa die doppelte Menge enthalten als im GT 10 mit 63.000 PFE. Weiterhin konnte die Substanz Cinnamoyl-glukose ebenfalls in beiden klassischen Extrakten nachgewiesen werden. Auch für diese wurde mit rund 41.000 PFE eine deutlich höhere Menge im GT 42 bestimmt als im GT 10 mit ca. 12.000 PFE.

Epicatechingallat-Dimer konnte mit über 90.000 PFE in fast der doppelten Menge im Vergleich zum GT 10 nachgewiesen werden.

Die Substanzen Procyanidin-Trimer sowie monogalloyliertes Procyanidin-Dimer, Cumaryl-galloyl-glukose und Di-cumaryl-galloyl-glukose wurden mit Peakflächen zwischen 17.000 und 60.000 nur im GT 42 nachgewiesen. Lagerungsbedingte Abbauprozesse des GT 10 können dabei natürlich nicht ausgeschlossen werden. Bei den Substanzen Procyanidin-Trimer, Procyanidin-Dimer (monogalloyliert) sowie Cumaryl-galloyl-glukose kann davon ausgegangen werden, dass diese im GT 10 ebenfalls enthalten sind, da dies bereits bestätigt wurde (Sommermann 2015). Allerdings konnten die Substanzen nur in einzelnen Fraktionen und ebenfalls nicht im Gesamtextrakt nachgewiesen werden.

Darüber hinaus enthielten die Proben auch unbekannte Substanzen, welche sich jeweils nur in einem der beiden Genotypen nachweisen ließen.

So wurde im Gesamtextrakt des GT 10 E2014 die bisher unbekannte Masse von $[M-H]^- = 347$ und im GT 42 von $[M-H]^- = 525$ erfasst.

Weiterhin verstärkten diese differenzierten Inhaltsstoffspektren den genotypischen Unterschied der beiden *Rheum*-Extrakte. Diese Annahme kann nicht eindeutig geklärt werden, da die untersuchten Proben nicht zum selben Zeitpunkt gesetzt, geerntet und aufgearbeitet wurden, so dass weitere Faktoren und deren Einfluss nicht ausgeschlossen werden können.

Um eine fundierte Aussage der enthaltenen Substanzen treffen zu können, müssten die jeweiligen Genotypen parallel erneut aufgearbeitet und analysiert werden. Im Allgemeinen ist zu sagen, dass dem Gesamtextrakt des GT 42 E2017 insgesamt größere Peakflächen zugeordnet werden konnten.

Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsmethoden des GT 42 Erntejahr 2017 (Klassische Extraktion und DIG-MAZ-Extraktion)

Anhand der Abbildung 32 können zwischen den beiden Varianten des GT 42 E2017 extraktionsbedingte Unterschiede aufgezeigt werden. Das Naphtholglykosid Torachryson-glykopyranosid wies mit über 140.000 PFE eine deutlich höhere Menge auf als der klassisch extrahierte Extrakt mit ca. 110.000 PFE. In beiden Extrakten war dies damit die Hauptkomponente unter den weiteren Substanzen.

Epicatechingallat-Dimer zeigte mit über 90.000 PFE im klassischen Extrakt eine höhere Peakfläche auf als im DIG-MAZ-Extrakt mit 80.000 PFE. Auch der Substanz Di-Cumaryl-galloyl-glukose konnte im klassischen Extrakt mit über 60.000 PFE eine

deutlich größere Peakfläche zugeordnet werden als dem DIG-MAZ-Extrakt mit 23.000 PFE. Bezüglich Cinnamoyl-glukose konnte kein Vergleich der Extraktionsvarianten erfolgen, da diese im DIG-MAZ-Extrakt mit einer weiteren Substanz koeluierte.

Dagegen war Cumaryl-galloyl-glukose mit über 45.000 PFE stärker im DIG-MAZ-Extrakt angereichert. Weiterhinkonnten neben Epicatechingallat-Dimer noch die beiden höherpolymeren Procyanidine Procyanidin-Trimer und Procyanidin-Dimer (monogalloyliert) ermittelt werden. Die Unterschiede zwischen den Extrakten fielen aber sehr gering aus.

Vergleich der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 mittels DIG-MAZ-Extraktion

Durch die Abbildung 32 wird deutlich, dass sich auch für die weiteren Substanzen Unterschiede zwischen den Erntejahren des GT 42 ergaben.

Zunächst ist allerdings zu sagen, dass Torachryson-glukopyranosid in allen Erntejahren des GT 42 nachgewiesen wurde und unter diesen Verbindungen die Hauptkomponente darstellte. Dabei nahmen die Peakflächen mit dem Alter des Erntematerials zu, d.h. E2017 zeigte mit knapp 100.000 PFE den geringsten Gehalt und E2009 mit fast 200.000 PFE den höchsten Gehalt.

Als eine weitere Substanzgruppe konnten unterschiedliche Phenolsäurederivate semiquantitativ bestimmt werden. So wurde für diese aufgezeigt, dass die galloylierten Substanzen Cumaryl-galloyl-glukose und Cumaryl-cinnamoyl-galloyl-glukose die höchsten Konzentrationen nach dreijähriger Kultivierungsdauer auf dem Feld aufwiesen. Eine Ausnahme war innerhalb dieser Substanzgruppe Di-Cumaryl-galloyl-glukose. Auf Grund der Daten der Abbildung 32 wird angenommen, dass diese Substanz im Laufe der Dauer auf dem Feld natürlichen Auf- und Abbauprozessen unterlag. Dabei lagen die erfassten Verbindungen sowohl galloyliert als auch glykosyliert vor. Die Verbindungen Cumaryl-galloyl-glukose und Di-Cumaryl-galloyl-glukose konnten in allen Erntejahren des GT 42 nachgewiesen werden. In Bezug auf die ermittelten Flächen ist zu sagen, dass für die unterschiedlichen Erntejahre eine Tendenz zwischen den ermittelten Peakflächen dieser Substanzen und dem Erntezeitpunkt festgestellt wurde. Je weiter der Erntezeitpunkt zurück lag, desto größer war die detektierte Peakfläche und somit der Gehalt. Für die Substanz Di-Cumaryl-galloyl-glukose hingegen bestand keine Tendenz zwischen Erntezeitpunkt und detektierter Fläche. Als ein weiteres Phenolsäurederivat wurde Cumaryl-cinnamoyl-

galloyl-glukose im Rahmen der semiquantitativen Bestimmung mit rund 40.000 PFE nur in den Gesamtextrakten des GT 42 E2013 und GT 42 E2009 ermittelt. Für Cinnamoyl-glukose konnten keine Aussagen der enthaltenen Mengen in den Erntejahren des GT 42 getroffen werden, da diese mit einer weiteren koeluierte.

Neben den bereits erwähnten Substanzen konnten in den verschiedenen Erntejahren des GT 42 drei Procyanidine anhand von Literaturangaben identifiziert werden. Bei diesen handelte es sich um Procyanidin-Dimer (monogalloyliert), Epicatechingallat-Dimer und Procyanidin-Trimer. Für die Substanz Procyanidin-Dimer (monogalloyliert) konnte in allen Erntejahren der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 ein Gehalt von ca. 30.000 PFE ermittelt werden, was darauf schließen lässt, dass diese Substanz weder durch Lagerungsprozesse noch durch eine entsprechende Kultivierungsdauer verändert wird. Im Gegensatz dazu ging eine größere Peakfläche des Epicatechingallat-Dimers mit frischerem Erntematerial einher. So wies der E2017 80.000 PFE auf, während es beim E2009 nur 60.000 PFE waren. Procyanidin-Trimer wies den geringsten Gehalt von 17.000 PFE im E2013 und den höchsten von 41.000 PFE im E2009 auf. Die längere Kultivierungsdauer von sieben Jahren bei E2013 könnte mit einem Abbau dieser höherpolymeren Substanz einhergehen. Gleichzeitig wäre dadurch im Umkehrschluss der hohe Gehalt im kürzer kultivierten E2009 (siehe Tabelle 28) erklärbar.

Weiterhin ist zu sagen, dass für die unterschiedlichen *Rheum*-Arten ein großes Spektrum an unterschiedlichen Flava-3-olen sowie höherpolymeren Procyanidinen bekannt ist (Kaul, 1996). In dem Kapitel 4.2.1.2 wurde bereits auf entsprechende Substanzen dieser Stoffgruppe eingegangen.

4.2.2.4 Semiquantitative Bestimmung der koeluierten Substanzen

Bei der Auswertung der Spektren eines Peaks trat in allen untersuchten Gesamtextrakten die Problematik auf, dass mehrere Substanzen gemeinsam in einem Peak eluierten. Dabei werden im Folgenden ausschließlich die Substanzen aufgeführt, welche nicht eindeutig über deren MS-Spektren identifiziert werden konnten. In der Abbildung 33 werden die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der Ethylacetat-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 sowie die der klassisch extrahierten Varianten des GT 42 E2017 und des GT 10 E2014 für Substanzen aufgezeigt, welche in einem Peak eluierten.

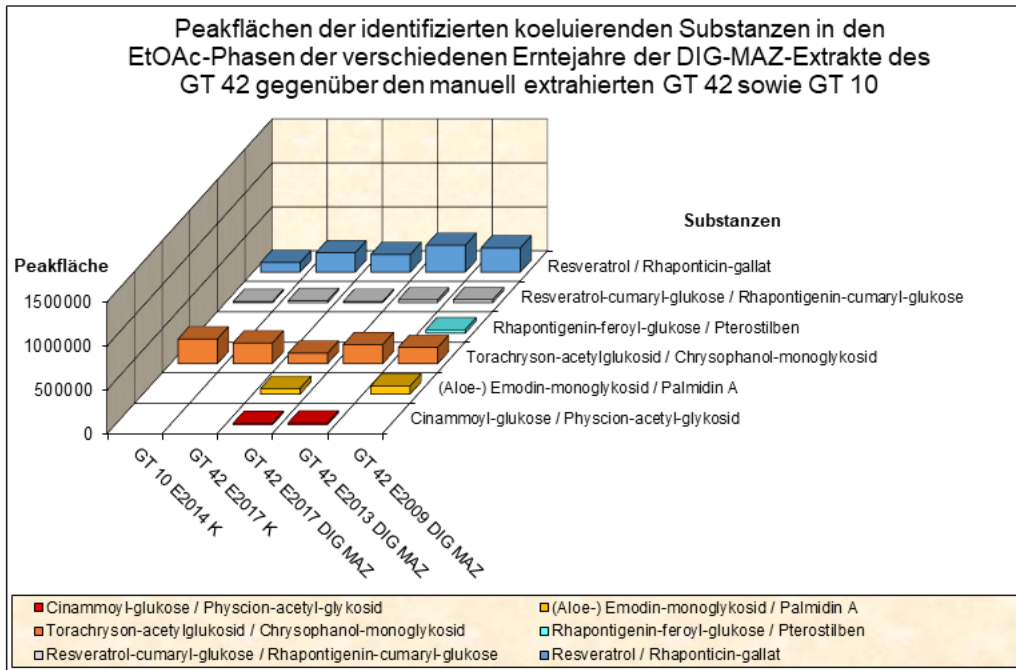


Abbildung 33: Semiquantitative Darstellung der Peakflächen der koeluiierenden Substanzen in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Erntejahre der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 gegenüber den klassisch extrahierten GT 42 sowie des GT 10

Im Folgenden wird zunächst auf den Vergleich der Genotypen eingegangen.

Vergleich der klassischen Gesamtextrakte des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017

Anhand der Abbildung 33 ist erkennbar, dass für die beiden untersuchten Genotypen 10 und 42 im Verlauf der semiquantitativen Untersuchungen drei Substanzpaare erfasst wurden, welche jeweils in einem Peak koeluierten.

Bei diesen handelt es sich um Resveratrol / Rhaponticin-gallat, Resveratrol-cumaryl-glucose / Rhapontigenin-cumaryl-glucose und Torachryson-acetylglukosid / Chrysophanol-monoglykosid. Dabei bestehen die ersten beiden Substanzgruppen aus jeweils zwei Stilbenderivaten. Das weitere Paar bestand dagegen aus Verbindungen unterschiedlicher Substanzgruppen. So ist die Substanz Torachryson-acetylglukosid den Naphtholglykosiden zuzuordnen und Chrysophanol-monoglykosid dagegen den Anthrachinonen.

Die prozentualen Anteile in Bezug auf die Gesamtpeakfläche der Proben betrug für Resveratrol / Rhaponticin-gallat im GT 10 rund 4 % und im GT 42 ca. 5 %. Für Resveratrol-cumaryl-glucose / Rhapontigenin-cumaryl-glucose belief sich der Anteil in beiden Genotypen auf etwa 0,5 %. Somit lagen keine großen Unterschiede für diese Paarungen vor.

Dagegen wurde für Torachryson-acetylglukosid / Chrysophanol-monoglykosid mit rund 10 % die doppelte Menge im GT 10 ermittelt als im GT 42 mit ca. 5 %. Als Grund könnte die begrenzte Selektivität der eingesetzten HPLC-Säule genannt werden, da es sich bei den *Rheum*-Gesamtextrakten um komplexe biologische Matrices handelt. Das bedeutet, dass es kaum möglich ist sämtliche Substanzen, eines Gesamtextraktes, in einem Probenlauf trennen zu können. Um dies dennoch zu ermöglichen, müsste eine Fraktionierung der EtOAc-Phasen erfolgen. Da dies für diese Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt wurde, ergab sich das Problem, dass die enthaltenen Substanzen oftmals nicht basisliniengetreunt vorlagen, große Peaks mehrere Schulterpeaks aufwiesen und teilweise die gleiche Substanzkombination in der ansteigenden bzw. abfallenden Peakseite im MS-Spektrum vorhanden war. Der Grund, warum weniger koeluiierende Substanzen in der Probe des GT 10 erfasst wurden, ist darauf zurückzuführen, dass die ursprüngliche HPLC-Methode mit diesem Genotyp optimiert wurde.

Im Folgenden wird auf die koeluiierenden Substanzen der beiden Extraktionsmethoden des GT42 eingegangen.

Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsmethoden des GT42 Erntejahr 2017 (Klassische Extraktion und DIG-MAZ-Extraktion)

Aus der Abbildung 33 geht hervor, dass auch bei den beiden Extraktionsmethoden für den GT 42 E2017 die Substanzpaare Resveratrol / Rhaponticin-gallat, Resveratrol-cumaryl-glukose / Rhapontigenin-cumaryl-glukose sowie Torachryson-acetylglukosid / Chrysophanol-monoglykosid koeluierten. Des Weiteren wurden in dem DIG-MAZ-Extrakt zwei weitere Paare nachgewiesen. Dabei handelte es sich um (Aloe-)Emodin-monoglykosid / Palmidin A und Cinnamoyl-glukose / Physcion-acetylglukosid. (Aloe-)Emodin-monoglykosid und Palmidin A werden beide zu den Anthrachinonen zugeordnet. Im Speziellen besteht Palmidin A aus den Untereinheiten Aloe-Emodin sowie Emodin, die zusammen ein sogenanntes Dianthrone bilden. Das zweite Paar besteht aus dem Zimtsäurederivat Cinnamoyl-glukose und dem Anthrachinon Physcion-acetylglukosid. Bezogen auf die Gesamtpeakfläche stellte das Substanzpaar (Aloe-)Emodin-monoglykosid / Palmidin A einen prozentualen Anteil von ca. 2 % dar, während das zweite Paar Cinnamoyl-glukose / Physcion-acetylglukosid mit rund 0,4 % noch geringer ausfiel.

Weiterhin wurde für Torachryson-acetylglukosid / Chrysophanol-monoglykosid im klassischen Gesamtextrakt mit 5 % ein fast doppelt so hoher Anteil im Vergleich zum DIG-MAZ-Extrakt mit rund 3 % ermittelt.

Das Substanzpaar Resveratrol / Rhaponticin-gallat wies dagegen in beiden Extrakten einen Anteil an der Gesamtpeakfläche von 5 % auf. Gleiches galt für Resveratrol-cumaryl-glucose / Rhapontigenin-cumaryl-glucose mit 0,5 %.

Vergleich der unterschiedlichen Erntejahre des GT42 mittels DIG-MAZ-Extraktion

Anhand der Abbildung 33 ergaben sich für die verschiedenen Erntejahre des GT42 insgesamt sechs Substanzpaare, welche gemeinsam eluierten. Dabei wurden die Substanzpaare Resveratrol / Rhaponticin-gallat, Resveratrol-cumaryl-glucose / Rhapontigenin-cumaryl-glucose und Torachryson-acetylglukosid / Chrysophanol-monoglykosid in allen untersuchten Proben des GT 42 nachgewiesen. Dabei sind für Resveratrol / Rhaponticin-gallat mit rund 7 %, für Resveratrol-cumaryl-glucose / Rhapontigenin-cumaryl-glucose mit ca. 0,7 % und für Torachryson-acetylglukosid / Chrysophanol-monoglykosid mit 5 % die höchsten prozentualen Anteile bezogen auf die Gesamtpeakfläche für das Erntejahr 2013 ermittelt worden. Hingegen wies das Erntejahr 2017 mit 5 %, 0,4 % und 3 % die geringsten prozentualen Anteile für diese Substanzpaare auf. Dies lässt vermuten, dass die Höhe des jeweiligen Anteils dieser Verbindungen auf eine längere Kultivierungsdauer zurückzuführen ist. Da die exakten Anteile der einzelnen Substanzen in den Substanzpaaren nicht bestimmt werden können, kann diese Annahme an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Für eine solche Aussage, müssten weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

Darüber hinaus konnten weitere Substanzpaare aufgezeigt werden, welche jedoch nur in bestimmten Erntejahren auftraten. So koeluierte, Rhapontigenin-feroyl-glucose / Pterostilben aus zwei Stilbenderivaten bestehend mit ca. 0,8 % ausschließlich in dem Gesamtextrakt des GT 42 E2009. (Aloe-) Emodin-monoglykosid / Palmidin A kam jeweils mit ca. 2 % in den Erntejahren 2017 und 2009 vor. Als letztes Substanzpaar wurde Cinnamoyl-glucose / Physcion-acetylglukosid mit je ca. 0,4 % in den beiden Erntejahren 2017 und 2013 ermittelt.

Fazit

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die größten Unterschiede hinsichtlich des Inhaltsstoffspektrums zwischen den beiden Genotypen 10 (*Rheum rhabarbarum* L.) und 42 (*Rheum officinale* Baill.) auftraten. Dies konnte zum Beispiel anhand der Substanzen Trihydroxystilben-galloyl-glykosid und Rhapontigenin aufgezeigt werden. In Bezug auf die beiden verschiedenen Extraktionsmethoden konnte gezeigt werden, dass die geringere Extraktionstemperatur beim klassischen Verfahren für eine Vielzahl an Substanzen zu höheren Peakflächen führte. Als Beispiele sind Trihydroxystilben-galloyl-glykosid, Torachryson-glukopyranosid und Epicatechingallat-Dimer zu nennen. Durch den Vergleich der verschiedenen Erntejahre wurde innerhalb der DIG-MAZ-Extrakte aufgezeigt, dass die Kultivierungszeit der Pflanzen einen Einfluss auf den ermittelten Gehalt der jeweiligen Inhaltsstoffe hat. Dies bezog sich vor allem auf das Rhapontigenin. Andererseits konnten für verschiedene Substanzen Tendenzen in Abhängigkeit zum Alter des Wurzelmaterials nachgewiesen werden. So zeigte Epicatechingallat-Dimer in dem jüngeren Wurzelmaterial höhere Gehalte, während zum Beispiel Trihydroxystilben-galloyl-glykosid und Cumaryl-galloyl-glukose mit längerer Lagerung höhere Gehalte aufwiesen.

Da die Proben nach der Ernte auf unterschiedliche Arten behandelt und gelagert wurden, was wiederum zu Veränderungen des Inhaltsstoffspektrums geführt haben könnte, sollte dieser Aspekt zur Begründung einzelner Substanzen nicht vernachlässigt werden. Um dahingehend spezifischere Aussagen treffen zu können, sollten die Versuche zur Bestimmung des Inhaltsstoffspektrums der unterschiedlichen Extraktionsvarianten sowie verschiedener Erntejahre mit vergleichbaren Proben aus dem Versuchsfeld wiederholt werden.

Weiterhin wäre eine Optimierung der derzeitigen HPLC-MS-Methode auch für die weiteren identifizierten *Rheum*-Inhaltsstoffe zur besseren semiquantitativen Einschätzung sinnvoll.

4.3 Limitierung der HPLC-MS-MS Methode

Im Verlauf der Quantifizierung der Substanzen, welche als externe Standardsubstanzen im Vorfeld der analytischen Untersuchungen kalibriert worden sind, traten Probleme hinsichtlich der ermittelten Ergebnisse auf. Diese äußerten sich darin, dass die berechneten Daten eine gewisse Inhomogenität aufwiesen. So wurden für die Mehrfachbestimmungen der 16 extern kalibrierten Standardsubstanzen Variationskoeffizienten zwischen 6 % und 79 % ermittelt. Der Variationskoeffizient (VK) berechnet sich wie folgt:

$$v = \text{Variationskoeffizient} \qquad v = \frac{s}{\bar{x}}$$

S = Standardabweichung
 \bar{x} = Mittelwert

Dieser gibt eine Aussage darüber, wie groß die Streuung innerhalb einer Grundgesamtheit ist. Je größer der VK ist, desto größer ist die Streuung (Engelhardt, 2014). Üblicherweise sollte dieser Wert über alle gemessenen Werte unterhalb von 10 % liegen. Als mögliche Ursache für die teilweise hohen VKs wurde angenommen, dass die Inhomogenität der biologischen Probenmatrix, die unterschiedlichen Einwaagen von verschiedenen Personen beziehungsweise eine starke Ionensuppression auf Grund von Matrixeffekten in der Ionenquelle des MS zu diesen Ergebnissen führten.

Für eine Fehlersuche wurden weitere Versuche mit zusätzlicher Addition von drei Standardsubstanzen (Epigallocatechin, Piceatannol sowie Chlorogensäure), in Proben des Gesamtextraktes des GT 42 E2017 durchgeführt. Der Versuchsaufbau bestand aus drei Einwaagen. Jede dieser Einwaagen wurde nach dem lösen in drei Aliquote aufgeteilt. Für die drei o.g. Standardsubstanzen wurden drei unterschiedliche Konzentrationsniveaus hergestellt und je einem Aliquot einer Einwaage zugesetzt. Anschließend wurden fünf Verdünnungsstufen aller neun Proben erstellt. Auf Grund der hohen Anzahl und aus zeitlichen Gründen wurde jede der 45 Proben in einer Einfachbestimmung vermessen. Anhand dieser Daten wurde wiederum für die 13 verbliebenen Standardsubstanzen jeder einzelnen Probe der entsprechende VK ermittelt. Diese zeigten jedoch, dass die Einwaagen in den jeweiligen Verdünnungen zu keiner Verbesserung der ermittelten VK-Werte führten.

Im Falle einer Ionensuppression ist anzunehmen, dass bei höheren Verdünnungen eines Extrakts auch größere Mengen quantifiziert werden würden. Allerdings konnte diese Annahme für die 13 Standardsubstanzen nicht bestätigt werden.

Zuletzt erfolgte die Auswertung der Proben mit gleicher Konzentration der zugesetzten Standardsubstanzen (Epigallocatechin, Piceatannol sowie Chlorogensäure) bei unterschiedlichen Einwaagen und Verdünnungen. Auch hier konnten in Bezug auf die angenommene Ionensuppression keine einheitlichen Werte ermittelt werden. Zudem konnte der Soll-Wert (1000, 5000 und 10000 µg/g) auf Basis der zugegebenen Standardsubstanzen nicht erreicht werden. Anhand der Auswertung wurde für sämtliche Proben eine Unterbestimmung der vorgegebenen Soll-Werte festgestellt. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass dieses Problem an dem üblicherweise genutzten 4000 Quadrupol Massenspektrometer der Firma Agilent nicht aufgetreten war. Erst an dem, für diese Arbeit genutzten 5500 Quadrupol-Massenspektrometer der Firma Agilent trat es in diesem Ausmaß auf.

Abschließend ist deshalb zu sagen, dass nach der bisherigen Fehleranalyse keine zufriedenstellenden Lösungen für die aufgetretenen Probleme erarbeitet werden konnten. Um trotzdem eine Auswertung der Quantifizierung der Standardsubstanzen zu ermöglichen, wurden alle ermittelten VK-Werte verglichen. Aus diesem Vergleich heraus wurde beschlossen, dass alle Substanzen, welche einen geringeren VK als 31 % aufwiesen, für eine Auswertung herangezogen wurden. Anhand dieser Vorgabe sind die Standardsubstanzen Epigallocatechingallat, Piceatannol sowie Resveratrol für die vorliegende Arbeit nicht weiter betrachtet worden. Darüber hinaus lagen die in den Extrakten bestimmten Gehalte an den Standardsubstanzen Epigallocatechin sowie Chlorogensäure unterhalb der Erfassungsgrenze.

4.4 Ergebnisse der antifungalen Wirkung der Gesamtextrakte des GT 10 und des GT 42 gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* im Blattsegmenttest

Im Blattsegmenttest wurde die antifungale Wirkung der Ethylacetat-Phasen der verschiedenen Erntejahre (E2017, E2013, E2009) der DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 E2017 neben der der klassisch extrahierten Varianten des GT 42 und des GT 10 E2014 gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* untersucht. Für den Blattsegmenttest wurden je Prüfglied sieben Gerstenpflanzen, der Sorte Steffi; pro Versuch mit Extrakt appliziert. Dieser Versuch wurde zweimal mit jeweils 2 unterschiedlichen Anwendungskonzentrationen (Versuch 1: 500 ppm und 125 ppm; Versuch 2: 1000 ppm und 500 ppm) durchgeführt. Zwei Tage nach der Applikation, mit der entsprechenden Anwendungskonzentration des *Rheum*-Extraktes, wurden 15 Blätter der sieben Gerstenpflanzen (Sorte Steffi) abgetrennt, auf Wasseragarplatten ausgelegt und mit *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* inokuliert. Bei den verwendeten Blättern handelte es sich jeweils um das zweitjüngste Blatt. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen mit definiertem Tag-Nacht-Zyklus erfolgte die Auswertung anhand einer visuellen Bonitureinstufung (siehe Kapitel 3.7). Bis auf die Konzentrationen 500 ppm und 125 ppm der Ethylacetat-Phase des GT 10 E2014 des ersten Versuchs (fehlendes Pflanzenmaterial) wurden sämtliche Konzentrationen in einer Doppelbestimmung untersucht. Die Rohdaten und die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in den Anlagen 7 und 8 enthalten. Im Rahmen der durchgeführten Bonituren wurden der Befall mit Echtem Mehltau mit Werten zwischen 0 % und 100 % laut der Boniturskala charakterisiert (siehe Kapitel 3.7) bestimmt.

Zusätzlich zur Bonitur der Mehлтаupusteln wurden die Konidien pro Milliliter auf einer Fläche von 10 cm² mittels mikroskopischer Auszählung bestimmt. Die Anzahl der Konidien ergab sich durch die Auszählung von vier Objektträgern, wobei jeweils zwei pro Inokulation im Mehлтаurturm genutzt wurden. Der sich daraus ergebende Mittelwert ergab rund 64400 Konidien pro ml bezogen auf 10 cm² (siehe Kapitel 3.7)

4.4.1 Wirkungen der Gesamtextrakte in den Konzentrationen 500 ppm sowie 125 ppm

Nachfolgend werden die Ergebnisse des durchgeführten Blattsegmenttests zur antifungalen Wirkung der Gesamtextrakte des GT 10 sowie des GT 42 bei den eingesetzten Konzentrationen von 500 ppm und 125 ppm aufgeführt. Dafür wird auf die mit Echtem Mehltau befallenen Blattflächen sowie auf den Wirkungsgrad nach ABBOTT eingegangen. Die im Versuch verwendeten Konzentrationen basierten auf den bereits in früheren Untersuchungen untersuchten *Rheum*-Extrakten an diesem Modellsystem (Gillmeister 2015, Gillmeister, 2016). Auf Grund von unzureichendem Pflanzenmaterial konnten für die Untersuchungen der Gesamtextrakte des GT 10 E2014 lediglich 15 Prüfglieder herangezogen werden. Diese Entscheidung wurde getroffen, da bei diesem Gesamtextrakt bereits auf Grund früherer Arbeiten eine positive antifungale Wirkung aufgezeigt werden konnte (Sommermann, 2015) (Gillmeister, 2016) (Gillmeister, 2017). In der folgenden Abbildung 34 sind die mit Mehltaupusteln befallenen Blattflächen (in %) aller untersuchten Extrakte als Boxplot-Diagramm dargestellt.

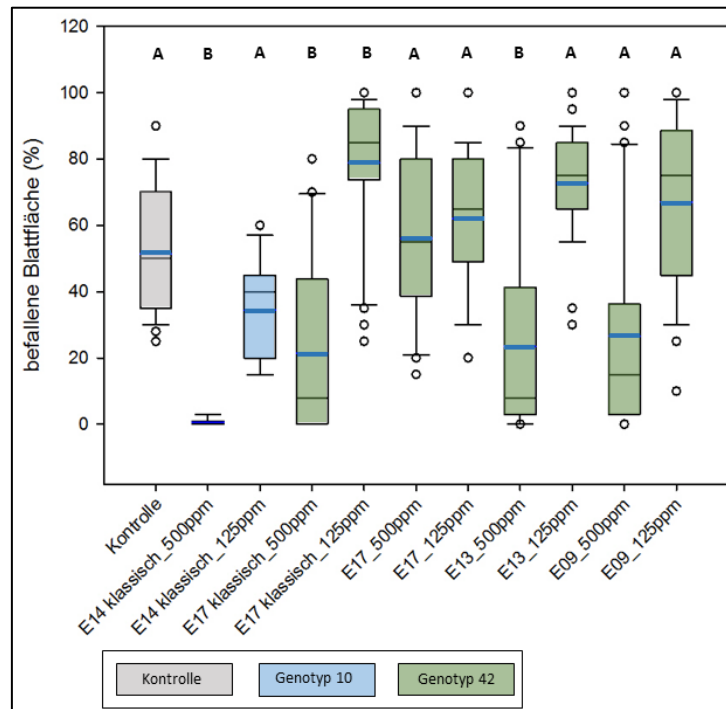


Abbildung 34: Darstellung der prozentualen befallenen Blattfläche aus der Bonitur der mit in unterschiedlichen Konzentration (500 ppm und 125 ppm) behandelten Gerstenblättern sowie der Kontrolle gegenüber dem Phytopatogen *Blumeria graminis* f. sp. hordei (Kontrolle: n = 30 / Gesamtextrakte GT 42: n = 20 / Gesamtextrakt GT 10: n = 15), Unterschiedliche Buchstaben weisen signifikante Unterschiede zur Kontrolle auf, $p < 0,05$, Mittelwert der Prüfglieder: blau gekennzeichnet, Median der Prüfglieder: schwarz gekennzeichnet)

Bezüglich der durchgeführten Kontrolle ist zu sagen, dass der eingesetzte Mehltau mit einer mittleren Befallsfläche von lediglich 50 % nicht optimal gewachsen war. Ein Grund dafür könnte gewesen sein, dass bei der Applikation unter Verwendung des Mehltauturms eine ungenügende Menge Konidien auf die Kontrollplatten gelangte. Anhand einer mikroskopischen Untersuchung wurden rund 17500 Konidien pro ml auf einer Fläche von 10 cm² ausgezählt. Dieser Wert stellt einen Mittelwert der vier ausgezählten Objektträger dar, welche wie die Proben mit Mehltau Konidien inokuliert wurden (siehe auch Kapitel 4.4.2). Im Vergleich zum Mittelwert beider Inokulationen (64400 Konidien) lag die Konidienanzahl somit deutlich niedriger. Da der Echte Gerstenmehltau ein obligat-biotrophes Pflanzenpathogen ist, konnte die Inokulation nur durch die Übertragung der Konidien erfolgen. Dieses Vorgehen birgt gewisse Unsicherheiten, da das Wachstum des Pathogens sich versuchsweise unterscheiden kann und die Einschätzung zur Nutzung bereits zwei Tage vor der Inokulation erfolgte, so dass die verminderte Konidienanzahl auch dadurch erklärbar wäre.

Die geringste befallene Blattfläche von fast 0 % konnte bei dem klassisch extrahierten GT 10 bei einer Konzentration von 500 ppm ermittelt werden. Die klassisch extrahierte Variante des GT 42 (E2017) sowie die DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 der Erntejahre 2013 und 2009 zeigten mit etwa 20 % ebenfalls eine geringe, befallene Blattfläche auf. Die beiden klassisch extrahierten Varianten (GT 10, GT 42) sowie der DIG-MAZ-Extrakt des Erntejahres 2013 unterschieden sich dabei signifikant zur Kontrolle ($p < 0,001$, $p = 0,006$, $p = 0,023$). Obwohl der Befall bei dem DIG-MAZ-Extrakt des Erntejahres 2009 ähnlich ausfiel, konnte auf Grund der hohen Ausreißer und der entsprechenden Streuung für diesen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Der DIG-MAZ-Extrakt des GT 42 des Erntejahres 2017 wies im Vergleich zur klassisch extrahierten Variante mit über 50 % einen deutlich stärkeren Befall auf, der möglicherweise auf die angewandten Extraktionstechniken zurückzuführen ist. Eine weitere Erklärung wäre ebenfalls eine ungleichmäßige Verteilung der Konidien und somit ein höherer Befall bei dieser Variante, da alle Varianten dieses Genotyps bei dieser angewandten Konzentration eine ähnliche Wirkung von etwa 20 % aufzeigten. Für eine Bestätigung dieser Annahme müssten weitere Versuche zur gleichmäßigen Verteilung der Konidien unter Verwendung des Mehltauturms durchgeführt werden. Dagegen wiesen alle untersuchten Extrakte bei der eingesetzten Konzentration von 125 ppm einen höheren Befall auf als die unbehandelte Kontrolle. Eine Ausnahme stellte dabei der GT 10 dar, bei dem der Befall etwa 40 % betrug.

Keiner der erzeugten Extrakte erwies sich bei der eingesetzten Konzentration als wirksam, da sich keiner signifikant zur Kontrolle unterschied. Die Ausnahme stellte der klassisch extrahierte Extrakt des GT 42 E2017 dar, was auf Grund des höheren Befalls im Vergleich zur Kontrolle aber als ein falsch-positives Ergebnis zu werten war.

Zur Darstellung der antifungalen Wirkung wurde für die untersuchten Extrakte der Wirkungsgrad nach ABBOTT (Portz, 2008) bezogen auf die prozentualen Befallsflächen berechnet. Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der mittleren, bonitierten Befallsflächen in Bezug zur Kontrollvariante nach der unten aufgeführten Formel.

$$\text{Wirkung (\%)} = \frac{\text{befallene Blattfläche der Kontrolle} - \text{befallene Blattfläche des Gesamtextrakts}}{\text{befallene Blattfläche der Kontrolle}} * 100$$

Dargestellt werden die Ergebnisse in der folgenden Abbildung 35.

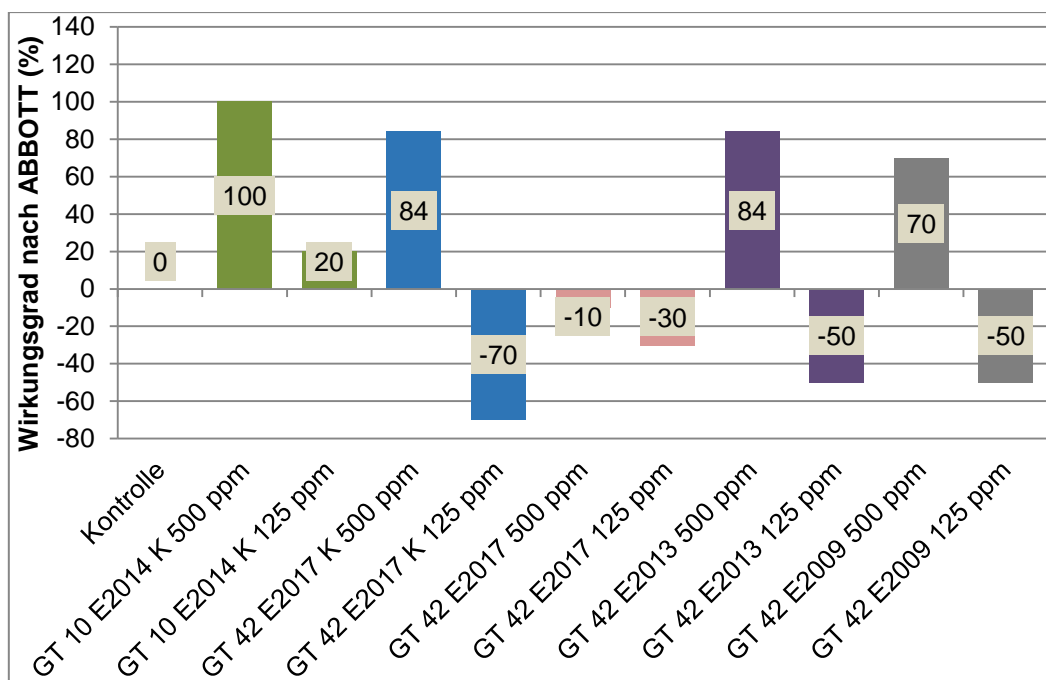


Abbildung 35: Nachgewiesene Wirkung der protektiven Behandlung durch die Gesamtextrakte des GT 10 sowie der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42 bei Konzentrationen von 500 ppm und 125 ppm gegen *Blumeria graminis f. sp. hordei* an Gerste (7 Tage nach Inokulation), (Kontrolle: n = 30; Prüfglied je Gesamtextrakte GT 42: n = 30; Prüfglied je Gesamtextrakt GT 10: n = 15)

Anhand der Abbildung 35 ist zu erkennen, dass bei einer applizierten Konzentration von 500 ppm ausschließlich die klassisch extrahierten Varianten (GT 10, GT 42) sowie die Extrakte der Erntejahre 2013 und 2009 des GT 42 eine antifungale Wirkung erzielten.

Für die drei zuerst genannten konnte dies, wie bereits erwähnt, statistisch abgesichert werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine ausreichende antifungale Wirkung mit einem Wirkungsgrad größer 70 % einhergeht. Auf Grund des höheren Befalls im Vergleich zur Kontrolle traten bei allen Extrakten mit einer applizierten Konzentration von 125 ppm sowie bei dem GT 42 mit 500 ppm negative Wirkungsgrade auf.

4.4.2 Wirkungen der Gesamtextrakte in den Konzentrationen 1000 ppm sowie 500 ppm

Im Folgenden werden der prozentuale Mehltaubefall, der Wirkungsgrad nach ABBOTT sowie die statistische Auswertung auf Grundlage der Boniturergebnisse der untersuchten Gesamtextrakte des zweiten Versuches aufgezeigt. In diesem wurde einerseits die Anwendung der Konzentration von 500 ppm wiederholt, um die antifungale Wirkung einzelner Extrakte (siehe 4.4.1) abzusichern und andererseits die Wirkung bei einer höheren Konzentration von 1000 ppm ermittelt. Die nachstehende Abbildung 36 stellt den prozentualen Mehltaubefall nach Applikation des GT 10 sowie der unterschiedlichen Varianten des GT 42 anhand eines Boxplot-Diagrammes im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dar. Aus diesem geht hervor, dass bei diesem Versuch die befallene Blattfläche der Kontrolle mit 80 % einen um 30 % höheren Befall zeigte als beim ersten Versuch. Möglicherweise erwies sich der Mehltau bei diesem Versuch als infektiöser im Vergleich zum ersten Versuch. Natürliche Schwankungen der Kontrolle beim Test von Pathogenen im Blattsegmenttest wurden bereits bei Sommermann (2015) erwähnt.

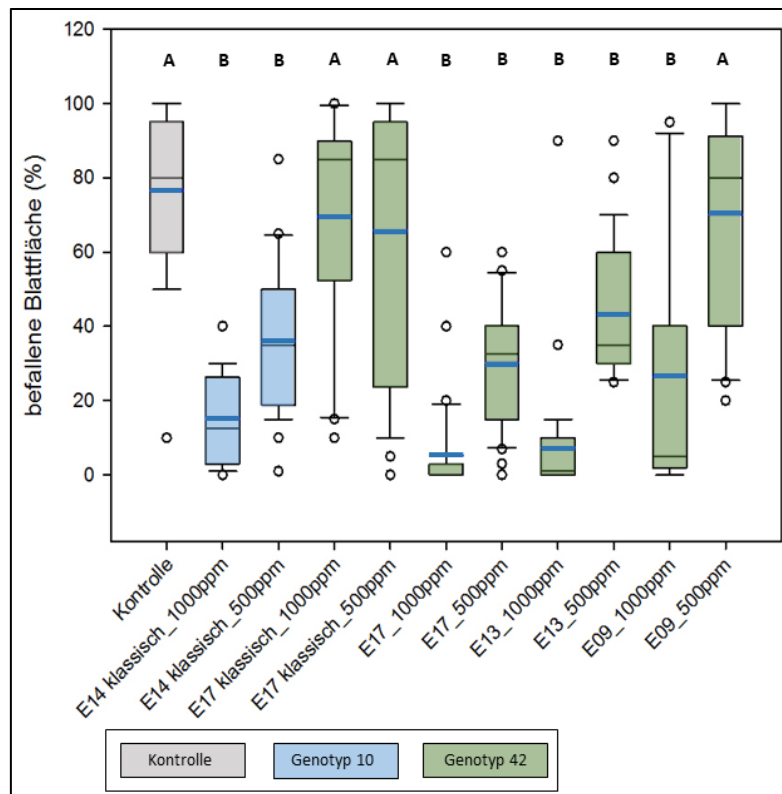


Abbildung 36: Darstellung der prozentual befallenen Blattfläche aus der Bonitur der mit unterschiedlichen Konzentrationen (500 ppm und 1000 ppm) behandelten Gerstenblätter sowie der Kontrolle gegenüber dem Phytopathogen *Blumeria graminis* f. sp. hordei (Kontrolle: $n = 45$ / Gesamtextrakte: $n = 30$), Unterschiedliche Buchstaben weisen signifikante Unterschiede zur Kontrolle auf, $p < 0,05$, Mittelwert der Prüfglieder: blau gekennzeichnet, Median der Prüfglieder: schwarz gekennzeichnet)

Die Abbildung 36 zeigt, dass mit einer eingesetzten Konzentration von 1000 ppm wie zu erwarten alle Varianten einen deutlich verminderten Mehltaubefall und somit eine bessere antifungale Wirkung aufzeigten, was durch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle anhand entsprechender p-Werte ($p < 0,001$) bestätigt werden konnte. Der geringste Befall (5 bis 10 %) war bei den DIG-MAZ-Extrakten der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 zu erkennen. Der klassisch extrahierte GT 10 wies mit 13 % ebenfalls einen geringen Befall auf. Eine antifungale Wirkung dieses Genotyps konnte bereits in früheren Abschlussarbeiten und Vorträgen sowie durch ein Patent vom IBAS belegt werden (Sommermann, 2015), (Gillmeister, 2016), (Gillmeister, 2017), (Schellenberg, et al., 2017).

Die klassisch extrahierte Variante des GT 42 stellte dabei jedoch eine deutliche Ausnahme dar, da diese einen ähnlichen prozentualen Mehltaubefall zeigte wie die Kontrolle von etwa 80 %. Auch bei der niedrigeren Konzentration von 500 ppm wurde ein ähnlicher Befall ermittelt. Somit ergaben sich basierend auf den unterschiedlich

durchgeführten Extraktionstechniken am Beispiel des klassisch extrahierten GT 42 E2017 Befallsunterschiede von 80 % und ca. 50 %. Ob diese ausschließlich auf die Extraktionstechniken oder eine ungleichmäßige Verteilung der Konidien zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nicht eindeutig belegt werden. Inwieweit die Verwendung des Mehлтаurms (siehe Kapitel 3.7) zu diesem Ergebnis beigetragen hat, kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden. Um hinsichtlich dieser Annahme, eine statisch gesicherte Aussage treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen in Bezug auf die Konidienverteilung des Mehлтаurms durchgeführt werden. Der Aufbau dieses Versuchs könnte so gestaltet werden, dass in mehreren Wiederholungen, zum Beispiele je sechs Objektträger im Mehлтаurm platziert werden und eine Mehltau Inokulation durchgeführt wird. Anschließend würden diese Ausgezählt werden.

Wie zu erwarten, führte eine applizierte Konzentration von 500 ppm gegenüber 1000 ppm zu einem höheren Mehлтаubefall bei den untersuchten Varianten. Der klassisch extrahierte GT 10 sowie die DIG-MAZ-Varianten des GT 42 der Erntejahre 2017 und 2013 zeigten mit ca. 35 % einen ähnlichen Mehлтаubefall auf und unterschieden sich somit signifikant zur Kontrollvariante ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,005$). Der Extrakt aus dem ältesten Wurzelmaterial (E2009) zeigte allerdings einen ähnlichen Befall wie die Kontrolle auf und erwies sich somit als nicht wirksam.

Des Weiteren wird aus Abbildung 36 ersichtlich, dass eine geringere Anwendungskonzentration mit einer größeren Streuung der Daten einhergeht. Dies ist besonders für die DIG-MAZ Gesamtextrakte des GT 42 E2017 und E2013 hervorzuheben. Demgegenüber konnten für die Extrakte dieser Proben in der Konzentration von 1000 ppm mit ca. 5 % (GT 42 E2017) und ca. 10 % (GT 42 E2013) die geringsten Streuungen aller Proben aufgezeigt werden. Zudem besaßen diese Extrakte, mit jeweils rund 100 % die höchsten Wirkungsgrade. Beim GT 42 E2009 konnte zwar ebenfalls bei 1000 ppm ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden, jedoch wies dieser, mit ca. 40 %, die größte Streuung der Boniturergebnisse innerhalb der untersuchten Erntejahre auf.

Ein ähnliches Ergebnis ergab auch die Auswertung der Versuche bei einer applizierten Konzentration von 500 ppm. So nimmt die Streuung der Daten zu, je weiter der Erntezeitpunkt in der Vergangenheit liegt bzw. mit zunehmender Lagerzeit. Dabei wird angenommen, dass sich das Inhaltsstoffspektrum, während der Lagerung des *Rheum*-Materials, so verändert, dass sich potentiell wirksame Substanzen ab- bzw. umbauen.

In dem folgenden Kapitel 4.5 werden daher auf etwaige Ableitungen von Struktur-Wirkungsbeziehungen zu dieser Annahme aufgeführt. Wie bereits im vorherigen Kapitel 4.4.1 wurde für eine bessere Ergebnisdarstellung der untersuchten Prüfglieder zusätzlich der Wirkungsgrad nach ABBOTT in Prozent berechnet.

In der folgenden Abbildung 37 werden die Wirkungsgrade der jeweiligen Gesamtextrakte des GT 10 und des GT 42 nach ABBOTT für die in diesem Versuch applizierten Konzentrationen von 1000 und 500 ppm gegenüber dem Pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in Prozent dargestellt.

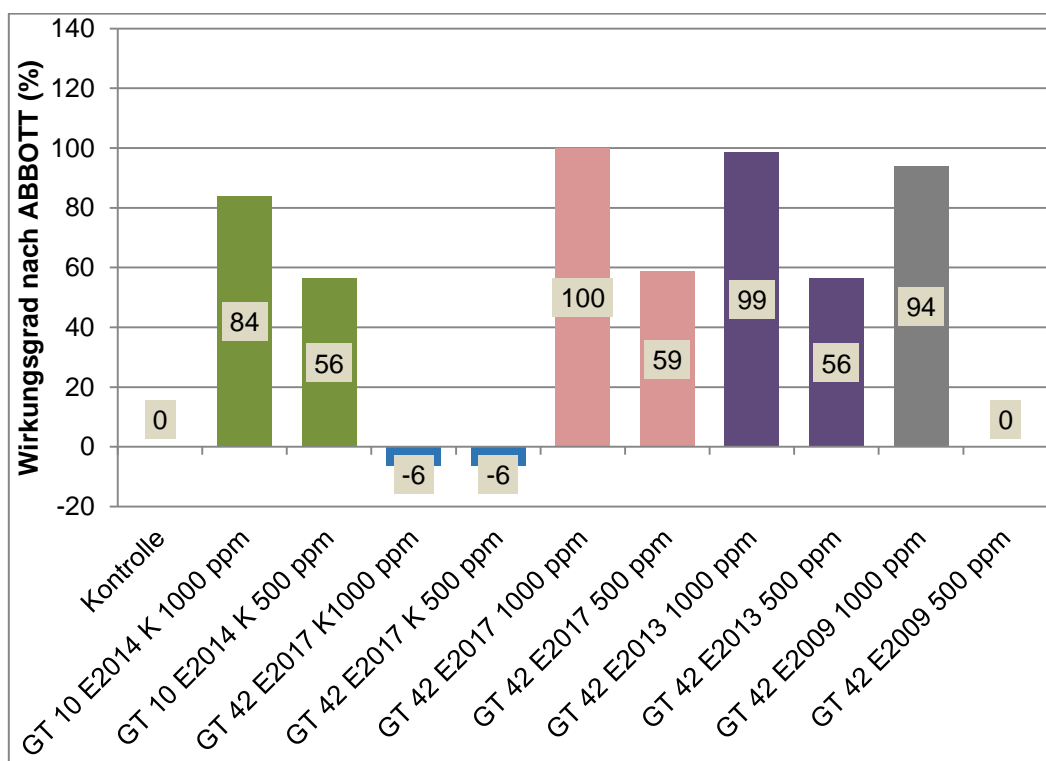


Abbildung 37: Nachgewiesene Wirkung der protektiven Behandlung durch den Gesamtextrakt des GT 10 sowie der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42 bei Konzentrationen von 1000 ppm und 500 ppm gegen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* an Gerste (7 Tage nach Inokulation) (Kontrolle: n = 45; Prüfglied je Gesamtextrakt n = 30)

Die berechneten Wirkungsgrade aus Abbildung 37 decken sich mit den Ergebnissen, die bereits zur Abbildung 35 beschrieben wurden. Die DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 zeigten bei 1000 ppm die beste Wirkung zwischen 94 und 100 % auf. Der GT 10 zeigte mit einer Wirkung von über 80 % ebenfalls eine gute Wirkung. Die Wirkungsgrade des klassisch extrahierten GT 42 bei beiden Konzentrationen (1000 ppm und 500 ppm) waren mit der Kontrolle vergleichbar und hatten demzufolge keine antifungale Wirkung. Gleiches galt für die Wirkung des GT 42 des Erntejahres 2009 bei 500 ppm.

Fazit

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die untersuchten Gesamtextrakte ausschließlich in den Anwendungskonzentrationen von 1000 ppm und 500 ppm eine signifikante antifungale Wirkung zeigten. Der GT 10 des Erntejahres 2014 erwies sich bei 1000 ppm und beide Male mit 50 ppm als signifikant wirksam. Im Vergleich dazu konnte der klassisch extrahierte GT 42 (E2017) nur einmal bei 500 ppm und bei einer gering befallenen Kontrolle als wirksam eingestuft werden. Ähnliches galt für den DIG-MAZ-Extrakt dieses Erntejahres, wenngleich die Wirksamkeit bei 1000 ppm und 500 ppm nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund müssten entsprechende Versuche mit diesen Gesamtextrakten wiederholt werden, um eine fehlende bzw. vorhandene Wirkung eindeutig zu bestätigen und somit den Einfluss der Extraktionsvariante eindeutig zu belegen. Aus zeitlichen Gründen war eine weitere Durchführung des Versuches für diese Arbeit nicht realisierbar. Ähnlich wie der GT 10 zeigte der GT 42 E2013 bei 1000 ppm eine signifikante Wirkung auf, die auch bei einer verminderten Konzentration von 500 ppm in beiden Versuchen bestätigt werden konnte. Das älteste Wurzelmaterial des GT 42 aus dem Erntejahr 2009 zeigt ausschließlich bei 1000 ppm eine signifikante Wirkung. Eine verringerte Konzentration von 500 ppm erwies sich beide Male als nicht wirksam. Eine bessere antifungale Wirkung scheint demnach innerhalb eines Genotyps mit jüngerem Wurzelmaterial einherzugehen. Um die dargestellten Wirkungen der untersuchten Gesamtextrakte, aus den Kapitel 4.4.1 und 4.4.2 zu unterstützen, werden im folgenden Kapitel diese Daten mit denen des Kapitels 4.2 verknüpft, um daraus etwaige Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten zu können.

4.5. Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen

Im Folgenden sollen mögliche Zusammenhänge zwischen den identifizierten Inhaltsstoffen der Ethylacetat-Phasen des klassisch extrahierten GT 10 E2014 und des GT 42 E2017 sowie der DIG-MAZ Extrakte des GT 42 der Erntejahre 2017, 2013 und 2009 und deren antifungalen Wirkung im Blattsegmenttest abgeleitet werden. Da die Ergebnisse des ersten Versuches mit den eingesetzten Konzentrationen von 500 ppm und 125 ppm der Ethylacetat-Phasen nicht eindeutig genug ausfielen bzw. auch falsch-positive Ergebnisse erbrachten, wurden die Struktur-Wirkungsbeziehungen vor allem aus den Ergebnissen des Versuches mit 1000 ppm und 500 ppm hergeleitet. Anhand der Strukturen der innerhalb der MS-Untersuchungen identifizierten und quantitativ bestimmten Substanzen war es möglich, diese in hydroxylierte, glukosylierte und galloylierte Substanzen zu unterteilen und den jeweiligen prozentualen Anteil am Gesamtextrakt zu berechnen, um zunächst in Abhängigkeit von diesen funktionellen Gruppen Aussagen zur Wirkung der Ethylacetat-Phasen treffen zu können. Die Darstellung erfolgt nachfolgend dabei separat für die Standardsubstanzen sowie für die weiteren identifizierten typischen *Rheum*-Inhaltsstoffe aus Kapitel 4.2. Als Grundlage für die Betrachtung der Standardsubstanzen wurden die Quantifizierungsergebnisse des Kapitels 4.2.2 herangezogen. Für die Ableitung möglicher Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden die Gehalte aller identifizierten Standardsubstanzen der externen Standardkalibrierung (siehe Kapitel 4.2.2) je Extrakt summiert und die prozentualen Anteile der einzelnen Standards ermittelt. Für die weiteren identifizierten Substanzen wurden die ermittelten Peakflächen der semiquantitativen Auswertung (siehe Kapitel 4.2.1) genutzt und diese je Extrakt summiert und die Anteile der einzelnen Substanzen prozentual bestimmt. Nicht berücksichtigt wurden Substanzen, die nicht eindeutig bestimmbar waren sowie Substanzen, die unter einem Peak koeluierten. Sowohl die Standardsubstanzen als auch die weiteren Substanzen wurden in hydroxylierte, glukosylierte und galloylierte Verbindungen eingeordnet. Nachfolgend werden zunächst Struktur-Wirkungsbeziehungen für die klassisch extrahierten Extrakte der Genotypen 10 und 42 abgeleitet.

Im Anschluss erfolgt die Darstellung für den GT 42 in Abhängigkeit der unterschiedlichen Erntejahre und der angewandten Extraktionstechniken.

4.5.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen: Vergleich der klassischen Gesamtextrakte des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017

Im Folgenden werden für die beiden klassisch extrahierten Genotypen 10 und 42 im Vergleich Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet. Die folgenden Tabellen 29 und 30 stellen die prozentualen Anteile der hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen bei den Standardsubstanzen (Tabelle 29) und den weiteren *Rheum*-typischen Inhaltsstoffen (Tabelle 30) dar.

Tabelle 29: Anteile der mittels externer Standardkalibration bestimmten hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen in den klassisch extrahierten Ethylacetatphasen des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017 in Prozent

<u>Standardsubstanzen</u>	<u>GT 10 E2014</u>	<u>GT 42 E2017</u>
hydroxylierte Verbindungen	6,57	25,66
Catechin	3,83	17,87
Epicatechin	0,26	0,60
Procyanidin B1	1,29	4,84
Procyanidin B2	0,84	1,98
Procyanidin C1	0,27	0,31
p-Cumarsäure	0,03	0,02
Ferulasäure	0,04	0,03
glukosylierte Verbindungen	91,22	65,70
Rhaponticin	52,51	40,64
Desoxyrhaponticin	36,70	22,64
3,4',5-Trihydroxystilben-3-O-beta-D-glukopyranosid	2,00	2,42
galloylierte Verbindungen	2,21	8,64
Epicatechingallat	2,21	8,64

Anhand der Tabellen 29 und 30 wird ersichtlich, dass beide Genotypen vor allem glukosylierte Stilbene beinhalten. Der GT 10 wies dabei mit über 90 % einen deutlich höheren Anteil an den quantifizierbaren Stilbenen Rhaponticin und Desoxyrhaponticin auf als der GT 42 mit ca. 66 % (siehe Tabelle 29). Diese beiden Verbindungen waren mit ca. 40 % und 23 % gegenüber dem GT 10 um jeweils etwa 12 % reduziert. Beiden glukosylierten Stilbene waren jedoch in beiden Genotypen die Hauptkomponenten unter den quantifizierten Standardsubstanzen. 3,4',5-Trihydroxystilben-3-O-beta-D-glukopyranosid machte mit 2 % bei GT 10 und 2,4% bei GT 42 den geringsten Anteil unter den glukosylierten Standardsubstanzen in beiden Genotypen aus.

Vergleicht man den Anteil hydroxylierter Verbindungen, so ist der im GT 42 um ca. 20 % höhere Anteil vor allem auf 3 Verbindungen zurückzuführen, das Flavan-3-ol Catechin sowie die beiden dimeren Procyanidine B1 und B2. Bei den anderen

hydroxylierten Verbindungen einschließlich der beiden Phenolcarbonsäuren p-Cumarsäure und Ferulasäure waren die Anteile vergleichbar.

Besonders zu erwähnen ist die ca. vierfach höhere Menge an Epicatechingallat bei GT 42 gegenüber GT 10.

Laut der Tabelle 30 ist zu erkennen, dass auch bei den weiteren identifizierten Substanzen die glukosylierten Verbindungen den höchsten Anteil bei beiden Genotypen einnahmen. Im GT 10 war der Anteil von über 70 % vorwiegend auf die beiden Stilbene Piceatannol-glukosid und Trihydroxystilben-glukosid zurückzuführen, die mit je ca. 25 % die beiden Hauptkomponenten darstellten. Diese beiden Substanzen betragen im GT 42 jeweils etwa nur 20 %, so dass der Anteil der glukosylierten Verbindungen insgesamt nur ca. 55 % betrug. Diese Reduktion wurde auch durch den bei GT 42 beobachteten geringeren Anteil glukosylierter Anthrachinone verursacht, was konkret auf das (Aloe-) Emodin-monoglykosid zurückzuführen war. Dieses nahm im GT 42 mit 6 % etwa nur die Hälfte im Vergleich zum GT 10 ein. Die restlichen Substanzen, wie zum Beispiel das Naphtholglykosid Tyrachrysonglukopyranosid, waren mit 3,0 und ca. 5 % bei beiden Genotypen annähernd ähnlich zu finden.

Tabelle 30: Anteile der mittels semiquantitativer Bestimmung ermittelten hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen in den klassisch extrahierten Ethylacetatphasen des GT 10 E2014 und des GT 42 E2017 in Prozent

Substanzen	GT 10 E2014	GT 42 E2017
hydroxylierte Verbindungen	15,83	3,68
Stilbene	13,21	2,03
Rhapontigenin	13,21	-
Desoxyrhapontigenin	-	1,78
Pterostilben	-	0,25
Flavan-3-ole/Procyanidine	-	0,45
Procyanidin-Trimer	-	0,45
Anthrachinone	2,62	1,19
(Aloe-) Emodin	1,20	0,73
Chrysophanol	-	0,34
Rhein / Physcion	-	0,12
Palmidin B / C	1,42	-
restliche Substanzen	-	-
glukosylierte Verbindungen	72,21	54,59
Stilbene	53,29	38,65
Piceatannol-glukosid	28,29	17,71
Trihydroxy-stilben-glukosid	23,95	20,08
Piceatannol-cumaryl-glukosid	1,05	0,86

Flavan-3-ole/Procyanidine	-	-
Anthrachinone	15,93	11,02
(Aloe-) Emodin-monoglykosid	12,58	5,79
Chrysophanol-acetylglykosid	2,52	2,90
Rhein-/ Physcion- monoglykosid	0,83	-
Emodin-malonylglukosid	-	1,31
Physcion-acetylglykosid	-	1,03
restliche Substanzen	2,98	4,92
Torachryson-glukopyranosid	2,50	3,80
Cinammoyl-glukose	0,48	1,12
galloylierte Verbindungen	11,96	41,73
Stilbene	9,88	36,08
Piceatannol-galloyl-glukopyranosid	3,40	2,25
Trihydroxystilben-galloyl-glukosid	6,48	33,83
Flavan-3-ole/Procyanidine	2,09	3,31
Epicatechingallat-Dimer	2,09	2,48
Procyanidin-Dimer, monogalloyliert	-	0,83
Anthrachinone	-	-
restliche Substanzen	-	2,35
Cumaryl-galloyl-glukose	-	0,74
Di-cumaryl-galloyl-glukose	-	1,61

(-: Substanzen wurden nicht nachgewiesen)

Fortsetzung Tabelle 30

Der klassische Gesamtextrakt des GT 10 zeigte im Blattsegmenttest in den applizierten Konzentrationen von 1000 und 500 ppm eine signifikante Wirkung gegenüber dem Pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Für den klassisch extrahierten Gesamtextrakt des GT 42 konnte lediglich einmal bei einer applizierten Konzentration von 500 ppm eine antifungale Wirkung signifikant nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.4.2). Beide Extrakte enthielten vorwiegend glukosylierte Stilbene, sowohl unter den quantifizierbaren Substanzen (Tabelle 29) als auch unter den weiteren identifizierten Stoffen (Tabelle 30).

Innerhalb der Pflanze wirken Stilbene als Schutz gegen biotische und abiotische Stressoren. Weiterhin ist anzumerken, dass die Anlagerung von Zuckerkomponenten, z.B. in Form von Glukose, in der Pflanzenwelt eine typische Methode ist, um zum Beispiel die Polarität, die Stabilität bzw. die Bioaktivität etwaiger Stoffe zu ändern. Weiter beschrieben die Autoren, dass glykosylierte Verbindungen vorrangig gespeichert werden. Durch die Modifizierung werden die Pflanzen besser vor oxidativen Veränderungen geschützt als ohne diese (Castellari, et al., 2012) (Chong, et al., 2009).

Gabaston et al. isolierten mittels präparativer HPLC verschiedene Stilbene aus Fichtenrindenextrakt (Ethanol-Wasser, 85:15, v/v), analysierten diese mittels UHPLC–DAD/ESI–MS und identifizierten diese mittels NMR. In anschließenden *in vivo*-Tests wurden Weinblätter (*Vitis vinifera*) mit einer Sporenlösung von *Plasmopara viticola* (Falscher Mehltau der Weinrebe) inokuliert, welche mit verschiedenen Konzentrationen der isolierten Einzelsubstanzen versetzt wurden. Dabei zeigte das Aglykon Isorhapontigenin nach Cassigarol E (Piceatannol-Piceatannol Dimer) die beste Wirkung auf. Dagegen erwies sich Astringin, die glukosylierte Form von Piceatannol, als dreimal weniger wirksam als dessen Aglykon. Astringin stellte dabei ebenfalls eine Hauptkomponente des Extraktes dar. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Abspaltung des Zuckers auf chemischem oder enzymatischem Weg die antifungale Wirkung erhöhen würde (Gabaston, et al., 2017).

Allerdings zeigten Pezet et al. Zusammenhänge auf, dass anfällige Rebsorten nach einer Infektion mit *Plasmopara viticola* vor allem Piceid (3,4',5-Trihydroxystilben-3-O-beta-D-glukopyranosid), also glukosyliertes Resveratrol, aufwiesen. Resistente Sorten enthielten dagegen hohe Mengen an Resveratrol und dessen Dimere. (Pezet et al. 2004b) Auch die Autorengruppe Báidez et al. konnte in *in vitro*-Tests nachweisen, dass die Aglykone Quercetin und Luteolin eine 9 bzw. 90fach bessere Wirkung gegenüber dem Schimmelpilz *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten zeigten als die Glukoside Rutin und Luteolin-7-glukosid (Báidez et al. 2006).

Der hohe Anteil an glukosylierten Substanzen, vor allem glykosylierter Stilbene, könnte demnach zur antifungalen Wirkung beider Extrakte beigetragen zu haben. Der höhere Anteil der glukosylierten Verbindungen ging mit einer besseren antifungalen Wirkung des GT 10 im Vergleich zum GT 42 einher. Inwieweit die einzelnen glukosylierten Substanzen zur antifungalen Wirkung beitragen, kann an dieser Stelle auf Grund der Anwendung von Gesamtextrakten nicht eindeutig belegt werden. Diese Wirkung kann aus synergistischen Effekten der einzelnen Komponenten resultieren. Generell müssen aber nicht zwangsläufig die Verbindungen mit den höchsten Anteilen in den Extrakten die wirksamsten Substanzen darstellen. Demnach könnten Substanzen mit geringeren Anteilen durchaus auch in den *Rheum*-Extrakten einen deutlich höheren Beitrag zur antifungalen Wirkung leisten wie es Gabaston et al. ebenfalls suggerierten. Für die hydroxylierten Verbindungen Resveratrol und Pterostilben wiesen bereits mehrere Autorengruppen die antifungale Wirkung nach (Adrian, et al., 1997), (van Baarlen, et al., 2007), (Pezet, et al., 2004a), auf die im Folgenden näher eingegangen

werden soll. In einer Vielzahl dieser Untersuchungen stand die Wirkung von Resveratrol im Fokus. Adrian et al. zeigten, dass die Stilbene Resveratrol und Pterostilben die Konidienkeimung von *Botrytis cinerea*, dem Erreger der Grauschimmelfäule, inhibierten (Adrian, et al., 1997). Gegen das gleiche Pathogen zeigten die Autoren van Baarlen et al., dass Resveratrol zu einer Komplexbildung mit den Pilzproteinen führte, so dass deren Atmung gestört bzw. inhibiert wurde. (van Baarlen, et al., 2007). Nach Pezet et al. zeigten Resveratrol und Pterostilben ebenfalls antifungale Wirkungen gegen *Plasmopara viticola* auf (Pezet, et al., 2004a). Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) weist dabei drei Hydroxylgruppen auf. Pterostilben, für welches ebenfalls antifungale Wirkungen nachgewiesen werden konnte, stellt die dimethylierte Form von Resveratrol dar, d.h. zwei Hydroxylgruppen sind durch Methoxygruppen ersetzt, (Adrian, et al., 1997), (Pezet, et al., 2004a). Die vorhandenen Methoxygruppen führen zu einer erhöhten Hydrophobizität, welche die Diffusion durch die Membranen erleichtert und somit sogar zu einer erhöhten Wirkung beiträgt (Pezet & Pont, 1994).

Im Gegensatz zu den glukosylierten Substanzen konnten bei den hydroxylierten Substanzen keine Tendenzen zwischen den Anteilen an Standardsubstanzen (siehe Tabelle 29) und den weiteren identifizierten Inhaltsstoffen (siehe Tabelle 30) im Vergleich der antifungalen Wirkung der Genotypen nachgewiesen werden. Während der GT 42 bei den Standardsubstanzen den vierfachen Gehalt der hydroxylierten Verbindungen im Vergleich zum GT 10 aufwies, zeigte letzterer wiederum den fast fünffachen Anteil dieser Verbindungen unter den weiteren Substanzen. Der hohe Anteil hydroxylierter Standardsubstanzen im GT 42 war vor allem auf den deutlich höheren Gehalt des Flavan-3-ols Catechin mit 18 % (GT 10: 4 %) zurückzuführen. Weiterhin waren auch das Flavan-3-ol Epicatechin sowie die polymeren Strukturen Procyanidin B2 (ca. 2%) und B1 (ca. 5 %) im GT 42 um das Zwei- bis Vierfache erhöht, wengleich diese in deutlich geringeren Mengen vorlagen. Die weiteren, hydroxylierten Standardsubstanzen Procyanidin C1, p-Cumarsäure sowie die Ferulasäure wiesen die geringsten Anteile unter allen Standardsubstanzen auf (jeweils < 1 %) und unterschieden sich dabei kaum zwischen den beiden Genotypen.

Ähnlich wie bei den Standardsubstanzen unterschieden sich die untersuchten Genotypen bezüglich der hydroxylierten Verbindungen auch bei den weiteren Substanzen deutlich (siehe Tabelle 30). Im GT 10 konnte die etwa fünffache Menge (16%) an diesen nachgewiesen werden, was fast ausschließlich auf das enthaltene

Stilben Rhapontigenin zurückzuführen war. Dies stellte die dritte Hauptkomponente im GT 10 unter den weiteren Substanzen dar. Rhapontigenin (3,3',5-Trihydroxy-4'-methoxystilben) weist wie Resveratrol drei Hydroxylgruppen aber eine zusätzliche Methoxygruppe auf. Im GT 42 konnte Rhapontigenin nicht ermittelt werden, da es möglicherweise unterhalb der Erfassungsgrenze der massenspektrometrischen Untersuchungen war. Dafür wurden jedoch die beiden Stilbene Desoxyrhapontigenin und Pterostilben ermittelt, deren Anteil allerdings nur die Hälfte der etwa 4 % an hydroxylierten Verbindungen ausmachte. Auch die Menge der hydroxylierten Anthrachinone fiel im GT 10 mit 2,6 % etwa doppelt so hoch aus als im GT 42. Procyanidin-Trimer konnte ausschließlich im GT 42 in geringen Mengen nachgewiesen werden.

Die bessere antifungale Wirkung des GT 10 könnte demnach auch mit dem deutlich höheren Anteil an Rhapontigenin einhergehen, dessen Wirkung z.B. bereits durch Gabaston nachgewiesen wurde (Gabaston, et al., 2017). Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass in einer weiteren am IBAS durchgeführten Arbeit zur antifungalen Wirkung von *Rheum*-Fraktionen Rhapontigenin in einer signifikant antifungal wirksamen Fraktion des gleichen Extraktes des GT 10 (Ernte 2014) als Hauptkomponente bestimmt werden konnte (Sommermann, 2015).

Auf Grund der Limitierung der HPLC-MS-Methode (siehe Kapitel 4.3) war die Quantifizierung von Resveratrol als *Rheum*-typische Standardsubstanz leider nicht möglich. Allerdings konnten Ballert und Sommermann diese Substanz bereits in GT 10 nachweisen (Ballert, 2014, Sommermann, 2015). Bei Letzterer wurde der gleiche Extrakt GT 10 Ernte 2014 wie in dieser Arbeit verwendet, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Resveratrol definitiv enthalten ist. Bestätigt wird dies durch die semiquantitative Auswertung (siehe Kapitel 4.2.1), bei der Resveratrol mit einer weiteren Substanz koeluierte, was auch im GT 42 der Fall war. Weiterhin zeigte Sommermann für den GT 10 (E 2014) auf, dass die beste antifungale Wirkung in einer Fraktion mit Resveratrol als Hauptkomponente ermittelt werden konnte. Das lässt für diese Arbeit die Schlussfolgerung zu, dass Resveratrol zur signifikanten antifungalen Wirkung des GT 10 beigetragen hat. Entsprechend dieser Annahme würde der Anteil an hydroxylierten Standardsubstanzen im GT 10 zu Lasten der glukosylierten und galloylierten Substanzen ansteigen. Die gleiche Annahme trifft dann auch für das Piceatannol zu, das ebenfalls nicht quantifiziert werden konnte.

Da für den GT 42 einerseits die Wirkung des klassisch extrahierten GT 42 gegenüber dem GT 10 schlechter ausfiel, so zeigte dieser nur einmal bei 500 ppm eine signifikante Wirkung, andererseits die Menge an Resveratrol methodenbedingt ebenfalls nicht bestimmt werden konnte, kann für diesen keine Tendenz hinsichtlich der antifungalen Wirkung abgeleitet werden. Obwohl auch ein relativ hoher Anteil an Catechin nachgewiesen wurde, dessen antifungale Wirkung bekannt ist (Hirasawa & Takada, 2004), trug dies offensichtlich nicht zu einer höheren antifungalen Wirkung bei. Der GT 42 wies allerdings mit 32 % einen doppelt so hohen Anteil an hydroxylierten Anthrachinonen ((Aloe)-Emodin, Chrysophanol, Rhein/Physcion) auf als der GT 10 ((Aloe)-Emodin, Palmidin B/C). Auch für diese Verbindungen sind antifungale Wirkungen bereits bekannt (Agarwal, et al., 2000). Möglicherweise führte aber die bereits im Kapitel 4.4.1 erwähnte ungleichmäßige Verteilung der Konidien während der Inokulation mit dem Echten Mehltau zu einer erhöhten Infektion und damit zu einer schwächeren Wirkung des GT 42.

Dieser eben genannte Einflussfaktor könnte auch die eigentlich zu erwartenden Einflüsse der galloylierten Substanzen beeinflusst haben. Denn hinsichtlich deren Wirkung ist laut Dix bekannt, dass zum Beispiel die Gallussäure eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum unterschiedlicher Pilze hat (Dix, 1979). Des Weiteren konnte auch Hguyen (2013) aufzeigen, dass Gallussäure in einer Konzentration von 500 ppm zu einer destruktiven morphologischen Veränderung der Hyphen von *Fusarium solani* führte (Hguyen, et al., 2013). Zhou et al. zeigten, dass Epicatechingallat eine inhibierende Wirkung gegenüber der Bildung von pilzlichem Aflatoxin B1 besitzt. In höheren Konzentrationen konnte diese Bildung sogar komplett unterdrückt werden (Zhou, et al., 2015). Dies stellt zwar keine direkte antifungale Wirkung dar, dennoch ist die Unterdrückung dieser Toxinbildung nicht irrelevant. Der GT 42 wies sowohl bei den Standardsubstanzen (Tabelle 29) als auch bei den weiteren Substanzen (Tabelle 30) deutlich höhere Anteile an galloylierten Verbindungen im Vergleich zum GT 10 auf. Epicatechingallat wies in GT 42 mit fast 9 % dem etwa vierfachen Anteil im Vergleich zum GT 10 auf. Bei den weiteren identifizierten Substanzen wurde mit über 40 % Anteil das 3,5-Fache gegenüber GT 10 ermittelt. Zu diesem hohen Anteil trug vor allem das enthaltene Stilben Trihydroxystilben-galloyl-glukosid mit einem Anteil von 34 % bei. Diese Verbindung stellte somit die Hauptkomponente dieses Genotyps dar, was einen deutlichen genotypischen Unterschied darstellte, da der GT 10 lediglich 7 % aufwies.

Der Anteil des Stilbens Piceatannol-galloyl-glukopyranosid war dagegen mit zwei bis drei Prozent annähernd identisch. Nur einen geringen prozentualen Anteil dieser Verbindungen hatten die beiden Dimere Epicatechingallat-Dimer sowie das monogalloylierte Procyanidin-Dimer, wobei letzteres nur im GT 42 ermittelt werden konnte. Ähnliches galt für die restlichen Substanzen Cumaryl-galloyl-glukose und Di-cumaryl-galloyl-glukose, die ebenfalls nur im GT 42 nachgewiesen werden konnten. Die höheren Anteile an Epicatechingallat sowie an den weiterhin gefundenen galloylierten Verbindungen müssten demnach ebenfalls mit einer guten antifungalen Wirkung einhergehen, die im Blattsegmenttest beim GT 42 allerdings nicht beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund sollte die Anwendung des genutzten Mehltauturms, welcher am IBAS erstmalig eingesetzt wurde, noch einmal überprüft und entsprechende Wiederholungen durchgeführt werden.

4.5.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen: Vergleich der DIG-MAZ-Extrakte und des klassisch extrahierten GT 42

Im Folgenden werden für die DIG-MAZ-Extrakte des GT 42 mit unterschiedlichen Erntejahren und im Vergleich zum klassisch extrahierten GT 42 mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet. Die folgenden Tabellen 31 und 32 fassen die prozentualen Anteile der hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen bei den Standardsubstanzen und den weiteren *Rheum*-typischen Inhaltsstoffen zusammen.

Tabelle 31: Anteile der mittels externer Standardkalibration bestimmten hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen in den Ethylacetatphasen unterschiedlicher Erntejahre und Extraktionsvarianten des Genotyp 42 in Prozent

Standardsubstanzen	GT 42 E2017 klassisch	GT 42 E2017 DIG-MAZ	GT 42 E2013 DIG-MAZ	GT 42 E2009 DIG-MAZ
hydroxylierte Verbindungen	25,66	31,89	23,25	14,91
Catechin	17,87	23,54	16,05	11,05
Epicatechin	0,60	1,01	0,76	0,43
Procyanidin B1	4,84	4,51	3,97	2,07
Procyanidin B2	1,98	2,18	1,61	0,78
Procyanidin C1	0,31	0,43	0,59	0,19
p-Cumarsäure	0,02	0,12	0,16	0,29
Ferulasäure	0,03	0,10	0,11	0,11

glukosylierte Verbindungen	65,70	59,48	68,62	80,66
Rhaponticin	40,64	35,24	37,99	39,29
Desoxyrhaponticin	22,64	21,19	28,42	37,39
3,4',5-Trihydroxystilben-3-O-beta-D-glukopyranosid	2,42	3,05	2,22	3,97
galloylierte Verbindungen	8,64	8,63	8,13	4,43
Epicatechingallat	8,64	8,63	8,13	4,43

Fortsetzung Tabelle 31

Laut der Tabelle 31 ist erkennbar, dass die unterschiedlichen Varianten des Genotyps 42, wie auch schon im Kapitel 4.2 gezeigt, zwischen 60 und 80 % vorwiegend glukosylierte Verbindungen in Form von Stilbenen enthielten. Rhaponticin stellte in allen Varianten die Hauptkomponente mit jeweils ca. 40 % dar. Alle glukosylierten Stilbene reicherten sich dabei mit zunehmenden Alter in dem Wurzelmaterial an. Desoxyrhaponticin wies dabei mit ca. 16 % Differenz den größten Unterschied zwischen E2017 und E2009 auf. Der klassisch gewonnene Extrakt des GT 42 hatte auf Grund der Verbindung Rhaponticin einen etwas höheren Anteil (5 %) an glukosylierten Verbindungen als die DIG-MAZ-Variante des gleichen Erntejahres. Vergleicht man die Anteile der hydroxylierten Verbindungen in den DIG-MAZ-Extrakten des GT 42, nehmen diese mit längerer Lagerung ab. Dies war vor allem auf das Catechin als Hauptkomponente zurückzuführen, wenngleich auch Epicatechin, Procyanidin B1 und B2 die gleiche Tendenz in geringeren Mengen aufwiesen. Der Anteil an Catechin fiel zudem im DIG-MAZ-Extrakt des Erntejahres 2017 um 5 % höher aus als in klassisch extrahierten Variante.

Die galloylierten Substanzen stellten prozentual die geringsten Anteile an Verbindungen dar. Auffällig war der deutlich verminderte Anteil im Erntejahr 2009 im Vergleich zu allen anderen Extrakten dieses Genotyps.

Anhand der Tabelle 32 wird deutlich, dass die glukosylierten Verbindungen unter den weiteren identifizierten Inhaltsstoffen ebenfalls mit ca. 50 % den Hauptanteil in allen Varianten des GT 42 darstellten. Die Stilbene Piceatannol-glukosid und Trihydroxystilbenglukosid waren dabei zwei der drei Hauptkomponenten dieser Extrakte. Zwischen den Varianten des GT 42 konnten nur geringe extraktions- oder alterungsbedingte Unterschiede festgestellt werden. Lediglich das Erntejahr 2013 zeigte für die beiden o.g. glukosylierten Substanzen jeweils einen etwa 5 % geringeren Anteil auf.

Tabelle 32: Anteile der mittels semiquantitativer Bestimmung ermittelten hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen in den Ethylacetatphasen unterschiedlicher Erntejahre und Extraktionsvarianten des Genotyp 42 in Prozent

Substanzgruppen	GT 42 E2017 klassisch	GT 42 E2017 DIG-MAZ	GT 42 E2013 DIG-MAZ	GT 42 E2009 DIG-MAZ
hydroxylierte Verbindungen	3,68	5,63	6,36	4,84
Stilbene	2,03	3,16	4,20	1,47
Rhapontigenin	-	1,08	3,59	1,47
Desoxyrhapontigenin	1,78	1,64	-	-
Pterostilben	0,25	0,44	0,61	-
Flavan-3-ole/PC	0,45	0,87	0,48	1,09
Procyanidin-Trimer	0,45	0,87	0,48	1,09
Anthrachinone	1,19	1,60	1,68	2,28
(Aloe-) Emodin	0,73	0,87	1,02	1,31
Chrysophanol	0,34	0,72	-	0,97
Rhein / Phycion	0,12	-	0,66	-
restliche Substanzen	-	-	-	-
glukosylierte Verbindungen	54,59	48,72	49,08	46,22
Stilbene	38,65	42,72	31,08	35,96
Piceatannol-glukosid	17,71	20,75	14,89	19,44
Trihydroxy-stilben-glukosid	20,08	21,15	14,94	15,40
Piceatannol-cumaryl-glukosid	0,86	0,82	1,25	1,12
Flavan-3-ole/PC	-	-	-	-
Anthrachinone	11,02	2,35	13,06	5,23
(Aloe-) Emodin-monoglykosid	5,79	-	8,06	-
Chrysophanol-acetylglykosid	2,90	1,11	2,40	1,04
Rhein-/ Phycion- monoglykosid	-	-	2,60	2,24
Emodin-malonylglukosid	1,31	1,24	-	-
Phycion-acetylglykosid	1,03	-	-	1,95
restliche Substanzen	4,92	3,64	4,94	5,04
Torachryson-glukopyranosid	3,80	3,64	4,94	5,04
Cinammyl-glukose	1,12	-	-	-
galloylierte Verbindungen	41,73	45,66	44,56	48,93
Stilbene	36,08	39,59	37,29	42,36
Piceatannol-galloyl-glukopyranosid	2,25	7,77	6,99	8,78
Trihydroxystilben-galloyl-glukosid	33,83	31,82	30,30	33,58
Flavan-3-ole/PC	3,31	3,76	2,95	2,36
Epicatechingallat-Dimer	2,48	2,70	2,13	1,54
Procyanidin-Dimer, monogalloyliert	0,83	1,06	0,81	0,83
Anthrachinone	-	-	-	-
restliche Substanzen	2,35	2,31	4,32	4,21
Cumaryl-galloyl-glukose	0,74	1,52	1,60	1,79
Di-cumaryl-galloyl-glukose	1,61	0,79	1,60	1,33
Cumaryl-cinammyl-galloyl-glukose	-	-	1,12	1,09

(- : Substanzen wurden nicht nachgewiesen)

Im Gegensatz dazu waren die glukosylierten Anthrachinone in diesem Extrakt mit 13 % deutlich erhöht. Zurückzuführen war dies vor allem auf den Anteil an (Aloe-)Emodin-monoglykosid mit 8 %. In den DIG-MAZ-Extrakten der Erntejahre 2017 und 2009

konnte diese Verbindung überhaupt nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dieser Umstand mit der längeren Kultivierung des Wurzelmaterials von 2013 von sieben Jahre bis zur Ernte erklärbar. Beim Erntematerial von 2017 und 2009 dagegen betrug die Kultivierungszeit nur fünf und drei Jahre. Auch Chrysophanol-acetylglukosid fiel in dem Material von 2013 etwa doppelt so hoch aus (2 %). Die längere Kultivierung könnte somit mit diesem höheren Anteil an Anthrachinonen einhergehen. Weiterhin konnte anhand der Substanz (Aloe-)Emodin-monoglukosid ein extraktionsbedingter Unterschied des GT 42 E2017 aufgezeigt werden, da es ausschließlich im klassischen Extrakt mit ca. 6 % bestimmt wurde und nicht im DIG-MAZ-Extrakt des gleichen Erntejahres.

Bei den restlichen glukosylierten Substanzen konnte, wie bei den glukosylierten Standardsubstanzen, eine leichte Anreicherung mit zunehmendem Erntealter beobachtet werden. Inwieweit die zuletzt erwähnten Substanzen mit der beobachteten antifungalen Wirkung zusammenhängen, kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden. Wie bereits im vorigen Kapitel 4.5.1 erwähnt, stellen glukosylierte Substanzen schützende Verbindungen gegenüber oxidativen Veränderungen dar (Castellarin, et al., 2012) (Chong, et al., 2009) und könnten somit eher in dieser Funktion nützlich sein. Der klassisch extrahierte GT 42 (E2017) konnte nur einmal bei 500 ppm und bei einer gering befallenen Kontrolle als wirksam eingestuft werden. Ähnliches galt für den DIG-MAZ-Extrakt dieses Erntejahres, wenngleich die Wirksamkeit bei 1000 ppm und 500 ppm nachgewiesen werden konnte. Das älteste Wurzelmaterial des GT 42 aus dem Erntejahr 2009 zeigte ausschließlich bei 1000 ppm eine signifikante Wirkung. Die beste antifungale Wirkung wurde beim DIG-MAZ-Extrakt des Erntejahres 2013 beobachtet, die bei 1000 ppm und bei der verminderten Konzentration von 500 ppm (beide Versuche) signifikant ausfiel. Wie bereits beim Vergleich der antifungalen Wirkung der beiden klassisch extrahierten Genotypen beschrieben (siehe Kapitel 4.5.1), könnten die glukosylierten Verbindungen allgemein zur antifungalen Wirkung beigetragen haben, müssen aber als Hauptkomponenten nicht zwangsläufig die beste antifungale Wirkung aufzeigen. (Gabaston, et al., 2017). Die antifungale Wirkung der Anthrachinone als Reinsubstanzen ist ebenfalls belegt (Agarwal, et al., 2000) und somit könnten auch die glukosylierten Formen, ähnlich wie bei den im Kapitel 4.5.1 beschriebenen Stilbenen, zur generellen Wirkung beigetragen haben.

Auf den Einfluss der hydroxylierten Verbindungen hinsichtlich ihrer antifungalen Wirkung wurde im Kapitel 4.5.1 bereits ausführlich eingegangen. Bei den Standardsubstanzen fiel deren Anteil bei allen Varianten des GT 42 nach den glukosylierten Verbindungen am höchsten aus, allerdings schwankten die Anteile zwischen E2017 (32 %) und E2009 (15 %) stark (siehe Tabelle 31). So war zu beobachten, dass die Substanzen Catechin, Epicatechin, Procyanidin B1 und B2 in höheren Anteilen im E2017 und somit im jüngsten Wurzelmaterial auftraten. Bei den Extrakten der Erntejahre 2013 und 2009 könnten lagerungsbedingte Abbauprozesse zu einer Verringerung des Anteils geführt haben. Extraktionsbedingte Unterschiede zwischen den 2017er Varianten ergaben sich für das Catechin mit ca. 6 %. Die tendenziell bessere Wirkung des DIG-MAZ-Extraktes 2017 könnte mit diesem höheren Anteil auf Grund der bekannten antifungalen Wirkung von Catechin einhergehen (Hirasawa & Takada, 2004).

Gegenüber dem Anteil an den Standardsubstanzen wiesen die hydroxylierten Verbindungen mit etwa 5 % bei den weiteren bestimmten Substanzen den geringsten Anteil auf (siehe Tabelle 32). Ähnlich im Vergleich zu den glukosylierten Substanzen setzten sich diese vorwiegend aus Stilbenen und Anthrachinonen zusammen. Das Rhapontigenin, dessen Wirkung bereits im Kapitel 4.5.1 beschrieben wurde (Gabaston, et al., 2017), konnte in der bis zu 3fachen Menge im Extrakt des Erntejahres 2013 gegenüber dem klassisch extrahierten GT 42 und dem DIG-MAZ-Extrakt E2017 nachgewiesen werden. Da zwischen den Extrakten keine lagerungsbedingten Unterschiede erkennbar waren, könnte davon ausgegangen werden, dass sich das Rhapontigenin auf Grund der längeren Kultivierungszeit im Extrakt 2013 angereichert hat. Damit wäre auch dessen antifungale Wirkung, die bei diesem im Vergleich zu den anderen Extrakten des GT 42 am besten ausfiel, erklärbar. Dies würde auch mit der besseren Wirkung des DIG-MAZ-Extraktes 2017 im Vergleich zum klassisch extrahierten GT 42 einhergehen, da es extraktionsbedingt im ersten, wenngleich auch geringfügig, höher ausfiel. Inwieweit auch der geringe Anteil des Pterostilbens (< 1 %) Einfluss hatte, müssten weitere Untersuchungen zeigen. Die Stilbene Desoxyrhapontigenin und Pterostilben konnten nicht im Extrakt des Erntematerials 2009, bzw. ersteres auch nicht im Extrakt von 2013, nachgewiesen werden. Ob lagerungsbedingte Abbauprozesse oder auch klimatische Bedingungen während der Kultivierung dazu beigetragen haben, kann an dieser Stelle leider nicht geklärt werden.

Die Anteile der Anthrachinone ((Aloe)-Emodin und Chrysophanol) und des Procyanidin-Trimers stiegen tendenziell mit höherem Alter des extrahierten Erntematerials an.

Beim Vergleich der Anteile an galloylierten Verbindungen konnten ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Standardsubstanzen und den weiteren Substanzen ermittelt werden. Als einzige galloylierte Standardsubstanz wurde Epicatechingallat nachgewiesen, bei welchem sich ein alterungsbedingter Unterschied zwischen den Varianten ergab (siehe Tabelle 31). Die Varianten der Erntejahre 2013 und 2017 wiesen dabei etwa 8 % Epicatechingallat auf, während der Extrakt des Erntejahres 2009 nur 4 % beinhaltete. Dies würde mit der verminderten Wirkung dieses Extraktes in den Blattsegmenttests einhergehen. Die antifungale Wirkung galloylierter Substanzen wurde bereits im Kapitel 4.5.1 diskutiert (Dix, 1979), (Huyen, et al., 2013). Allerdings spricht dagegen, dass der klassisch extrahierte Extrakt 2017 eine noch geringere antifungale Wirkung hatte (siehe Kapitel 4.4). An dieser Stelle muss aber erneut die bereits im Kapitel 4.4.1 erwähnte ungleichmäßige Verteilung der Konidien während der Inokulation mit dem Echten Mehltau erwähnt werden, die zu einer erhöhten Infektion und damit zu einer schwächeren Wirkung des GT 42 geführt haben kann.

Bei den weiteren identifizierten Substanzen wiesen die galloylierten Verbindungen ähnliche prozentuale Anteile wie die glukosylierten auf (siehe Tabelle 32). Dabei stellte Trihydroxystilben-galloyl-glukosid mit jeweils über 30 % Anteil die Hauptkomponente des GT 42 dar. Extraktionsbedingte Unterschiede konnten jedoch nur für das weitere nachgewiesene Stilben Piceatannol-galloyl-glukopyranosid ermittelt werden, welches bei allen DIG-MAZ-Extrakten des GT 42 etwa die 3fache Menge beinhaltete gegenüber dem klassisch extrahierten Material. Ob darauf die bessere antifungale Wirkung des DIG-MAZ-Extraktes 2017 beruht, darf bezweifelt werden, da der Anteil im DIG-MAZ-Extrakt E2009 bei schlechterer Wirkung ähnlich ausfiel. Möglicherweise könnte die bessere Wirkung des DIG-MAZ-Extraktes E2017 eher auf Epicatechingallat-Dimer zurückzuführen sein, welches hier mit fast 3 % am höchsten und im GT 42 E2009 mit ca. 1,5 % am geringsten ausfiel. Bei den restlichen galloylierten Substanzen wies der GT 42 E2013 den höchsten Anteil auf. Inwieweit diese zur antifungalen Wirkung beigetragen haben, kann nicht aufgezeigt werden, da der GT 42 E2009 einen ähnlichen Anteil hatte, aber schlechtere antifungale Wirkung zeigte.

Fazit

Abschließend kann festgehalten werden, dass durch die Gegenüberstellung der Anteile an hydroxylierten, glukosylierten und galloylierten Verbindungen unter Einbeziehung der Substanzgruppen die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen der untersuchten Gesamtextrakte in gewissen Grenzen möglich waren. Der Vergleich der beiden klassisch extrahierten Genotypen 10 und 42 konnte für ersteren die antifungale Wirkung, die schon von (Sommermann, 2015) beschrieben worden war, bestätigen werden. Die bessere Wirkung des GT 10 ist dabei wahrscheinlich auf das enthaltene Rhapontigenin zurückzuführen, welches im klassischen Extrakt des GT 42 nicht nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnten in den DIG-MAZ-Extrakten der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 unterschiedliche Wirkungen aufgezeigt werden. Die gute antifungale Wirkung des E2013 gegenüber den anderen Erntejahren scheint ebenfalls mit dem enthaltenen Anteil an Rhapontigenin einherzugehen. Zusätzlich konnten unterschiedliche Anteile an Substanzen basierend auf den differenzierten Erntejahren und Kultivierungszeiten im Boden der Extrakte ermittelt werden. Dabei nahmen die Substanzen wie Rhaponticin und Desoxyrhaponticin mit zurückliegenden Erntejahr zu, während Catechin und Epicatechin vorwiegend in dem frischen Wurzelmaterial ermittelt werden konnte. Die Substanzen Rhapontigenin und Desoxyrhapontigenin waren auf Grund der längeren Kultivierung vor allem in dem GT 42 E2013 zu finden. Generell war die Aussage zur geringen antifungalen Wirkung des klassisch extrahierten GT 42 sowohl im Vergleich mit dem GT 10 als auch mit den weiteren Extrakten des GT 42 erschwert, obwohl Substanzen mit bekannter antifungaler Wirkung in entsprechenden Anteilen ermittelt werden konnten. Da für die vorliegende Arbeit ausschließlich komplexe Gesamtextrakte für die biologische Testung verwendet wurden, welche eine Vielzahl an Substanzen aufwiesen, ist die Ableitung und Diskussion etwaiger Struktur-Wirkungsbeziehungen nur als Tendenz und Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zu betrachten.

Damit eindeutiger Aussagen zur Wirkung der jeweiligen Substanzen bzw. Substanzgruppen abgeleitet werden können, müsste eine bessere präparative chromatografische Auftrennung der Gesamtextrakte durch Fraktionierung erfolgen, um die Vielzahl an polyphenolischen Verbindungen besser auftrennen und sowohl strukturell als auch quantitativ genauer bestimmen zu können. Dass dieser Schritt zu eindeutigeren Ergebnissen bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehungen von

Rheum spp. führte, wurde bereits anhand von verschiedenen Arbeiten am IBAS nachgewiesen (Ballert, 2014), (Sommermann, 2015). Eine Fraktionierung der Proben war jedoch leider aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Weiterhin wurde eine genauere Interpretation auch dadurch erschwert, dass die HPLC-MS-MS Methode für einige Verbindungen so hohe Unsicherheiten zeigte, dass diese nicht quantifiziert werden konnten. Das *Rheum*-typische Resveratrol, für das schon in zahlreichen Studien antifungale Wirkungen ermittelt werden konnten, fiel neben zwei weiteren Verbindungen aus der Diskussion der Struktur-Wirkungsbeziehungen heraus. Weiterhin ist neben entsprechenden Wiederholungen der Blattsegmenttests auch eine Überprüfung der Applikation des Mehltaus im Mehltauturm notwendig. Die ungleichmäßige Belegung der Gerstenblätter mit den Mehltaukonidien bei den einzelnen Versuchen hat die Interpretation ebenfalls erschwert.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Gesamtextrakte des *Rheum officinale* Baill. (GT 42) auf deren antifungale Wirkung zu untersuchen und im Zusammenhang mit deren Inhaltsstoffspektren Struktur-Wirkungsbeziehungen herzuleiten. Dabei sollten als Schwerpunkte die Einflüsse unterschiedlicher Extraktionsverfahren sowie verschiedener Erntejahre des GT 42 (2017, 2013, 2009) berücksichtigt werden. Parallel wurde bei den Untersuchungen ein klassisch gewonnener Extrakt des GT 10 E2014 mit verfolgt, der bereits in mehreren Arbeiten (Gillmeister, 2016) (Sommermann, 2015) hinsichtlich seiner antifungalen Wirkung charakterisiert worden war. Die klassische Extraktion dieses Genotyps des Erntejahres 2017 stellte dabei den Ausgangspunkt nach dem im IBAS etablierten Verfahren dar. Zusätzlich wurden mit dem Wurzelmaterial von 2017 geeignete Extraktionsparameter an der ASE erarbeitet, welche die Grundlage für das Up-Scaling auf einen kleintechnischen Maßstab an der DIG-MAZ-Anlage bildeten, um auch größere Mengen der entsprechenden Extrakte herstellen zu können.

In den Vorversuchen mit verschiedenen Lösungsmitteln und -gemischen an der ASE erwies sich das Lösungsmittelgemisch Methanol-Wasser (70:30 v/v) als am besten. Die Gründe hierfür waren die höchste ermittelte Extraktionsausbeute in Verbindung mit dem günstigsten Anthrachinon-Stilben-Verhältnis (HPLC). Durch weitere Versuche mit diesem Lösungsmittelgemisch wurde eine Extraktionstemperatur von 60 °C für die Extraktionen der Erntejahre 2017, 2013 und 2009 an der DIG-MAZ-Anlage festgelegt. Die quantitative Bestimmung der Standardsubstanzen in allen Extrakten des GT 42 erfolgte mittels HPLC-MS-MS in Verbindung mit externer Standardkalibration. Weitere *Rheum*-typische Inhaltsstoffe wurden semiquantitativ bestimmt, indem die Peakflächen der HPLC-DAD-Methode hergezogen wurden. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte über deren Massenspektren, die über einen Q1-Scan generiert wurden. Der Extrakt des GT 10 E2014 (*Rheum rhabarbarum*) wurde auf Grund seiner bereits bestätigten antifungalen Wirkung mit in die Untersuchungen einbezogen. Anhand der quantitativen und semiquantitativen Analyse der identifizierten Inhaltsstoffe konnten genotypische Unterschiede zwischen den Extrakten des GT 10 und des GT 42 vermutet werden. Des Weiteren ergaben sich extraktionsbedingte, lagerungsbedingte sowie erntejahrabhängige Unterschiede in den Gesamtextrakten des GT 42.

So wurden zum Beispiel höhere Peakflächen im klassischen Extrakt des GT 42 auf Grund der geringeren Extraktionstemperatur ermittelt. Innerhalb der untersuchten DIG-MAZ Gesamtextrakte des GT 42 wurde aufgezeigt, dass die Kultivierungszeit der Pflanzen einen Einfluss auf den ermittelten Gehalt der jeweiligen Inhaltsstoffe hatte. Ein Grund dafür könnte der Anbau der Rhabarberpflanzen auf zwei benachbarten Versuchsfeldern sein. Zusätzlich wurden die Proben nach der Ernte auf unterschiedliche Arten behandelt und gelagert, was wiederum zur Veränderung des Inhaltsstoffspektrums geführt haben könnte. Inwieweit die aufgeführten Gründe im Einzelnen dazu beigetragen haben, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Die Untersuchungen zur antifungalen Wirkung wurden am Modellsystem Echter Gerstenmehltau an Gerste (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) in Form eines am IBAS etablierten Blattsegmenttests durchgeführt. Dafür wurden die Gerstenpflanzen mit den verschiedenen *Rheum*-Extrakten in den Anwendungskonzentrationen 1000 ppm, 500 ppm und 125 ppm protektiv behandelt. Die Inokulation der auf Wasseragarplatten ausgelegten Gerstenblätter erfolgte mit dem Gerstenmehltau im Mehltauturm 48 h später. Nach siebentätiger Inkubation wurde der Befall der Gerstenblätter anhand einer Boniturskala von null bis 100 Prozent eingestuft. Bei der höchsten applizierten Konzentration von 1000 ppm konnte für fast alle Gesamtextrakte eine signifikante Wirkung ermittelt werden. Die besten antifungalen Wirkungen zeigten der GT 10 sowie der GT 42 E2013, da diese auch bei einer reduzierten Einsatzkonzentration von 500 ppm signifikant ausfielen. Jedoch wies der untersuchten Extrakte eine signifikante Wirkung bei 125 ppm auf.

Durch die Gegenüberstellung der prozentualen Anteile an hydroxylierten, glykosylierten und galloylierten Verbindungen unter Einbeziehung der Substanzgruppen konnten Ableitungen zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen der untersuchten *Rheum*-Extrakte aufgezeigt wurden.

Der hohe Anteil an glykosylierten Verbindungen bei den Standardsubstanzen und den weiteren identifizierten Inhaltsstoffen vor allem in Form von Stilbenen könnte demnach im Allgemeinen zur antifungalen Wirkung beigetragen haben. Die Wirkung dieser Substanzen konnte bereits durch Gabaston et al. (2017), Báidez et al. (2006) und Pezet et al. (2004b) bestätigt werden. Diese und weitere Autorenguppen konnten aber in ihren Untersuchungen deutlich bessere antifungale Wirkungen für hydroxylierte Substanzen aufzeigen (Adrian et al. 1997, van Baarlen et al. 2007, Pezet et al. 2004a).

Dies bestätigte sich zum Beispiel beim Vergleich der klassisch extrahierten Genotypen 10 und 42. Die hohe antifungale Wirkung des GT 10 ging mit einem deutlich hohen Anteil von Rhapontigenin einher, dessen antifungale Wirkung bereits bestätigt werden konnte (Gabaston et al. 2017, Sommermann 2015). Der Nachweis dieser Substanz konnte im GT 42 dagegen nicht erbracht werden.

Auch bei den DIG-MAZ-Varianten der verschiedenen Erntejahre zeigte der erhöhte Anteil an Rhapontigenin im E2013 eine deutlich bessere antifungale Wirkung auf. Auch ein Beitrag der galloylierten Verbindungen kann auf Grund entsprechender Nachweise (Dix, 1979, Hguyen et al. 2013) als bestätigt angesehen werden und könnte demnach zur Wirkung beigetragen haben.

Generell waren zur antifungalen Wirkung des klassisch extrahierten GT 42 sowohl im Vergleich mit dem GT 10 als auch mit den weiteren Extrakten des GT 42 erschwert, obwohl Substanzen mit bekannter antifungaler Wirkung in entsprechenden Anteilen ermittelt werden konnten. Möglicherweise könnte dies auf eine ungleichmäßige Konidienverteilung während der Inokulation im Mehltauturm zurückzuführen sein. Diese Vermutung müsste allerdings durch weitere Untersuchungen zur Verteilung der Konidien nachgewiesen werden.

Wenngleich Tendenzen zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgezeigt werden konnten, war die Herleitung in den Gesamtextrakten durch die Vielzahl der identifizierten Substanzen erschwert. Eindeutigere Aussagen zu den Wirkungen der einzelnen Substanzen könnten durch präparative chromatographische Auftrennung in Fraktionen erfolgen. Die Fraktionierung als methodische Vorgehensweise war aus zeitlichen Gründen nicht möglich.

Weiterhin war eine genauere Interpretation der Struktur-Wirkungsbeziehungen auch dadurch erschwert, da die quantitative Bestimmung einiger Substanzen bei der HPLC-MS-MS-Methode so hohe Unsicherheiten zeigten, dass diese bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt werden konnten. Dies galt unter anderem für das Resveratrol, für das schon in zahlreichen Studien antifungale Wirkungen ermittelt werden konnten (Adrian et al. 1997, Pezet et al. 2004a, van Baarlen et al. 2007). Man kann davon ausgehen, dass der ermittelte Gehalt an Resveratrol auch in der vorliegenden Arbeit zur besseren Ableitung der Wirkungen beigetragen hätte, da diese Verbindung bereits im GT 10 E2014 in einer Fraktion als Hauptkomponente nachgewiesen werden konnte (Sommermann 2015).

Abschließend ist zu sagen, dass der Blattsegmenttest in den signifikant wirksamen Anwendungskonzentrationen von 1000 ppm und 500 ppm wiederholt werden müsste, um die antifungalen Wirkungen der in dieser Arbeit untersuchten *Rheum*-Extrakte zu bestätigen. Weiterhin könnte sich eine zweidimensionale Betrachtung in der Form der Fraktionen anschließen, die zur besseren quantitativen Bestimmung der Substanzen beitragen würde.

Die Fraktionen könnten daraufhin auch im Blattsegmenttest angewandt werden, um die Herleitung der Struktur-Wirkungsbeziehungen zu unterstützen. Dabei scheinen die erneuten Vergleiche der vormals klassisch extrahierten Genotypen 10 und 42 einerseits sowie der DIG-MAZ-Extrakte der unterschiedlichen Erntejahre des GT 42 andererseits besonders interessant zu sein.

Literaturverzeichnis

Adrian, M. et al., 1997. Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold. *Journal of Chemical Ecology*, 23(7), pp. 1689 - 1702.

Agarwal, S. K., Singh, S. S., Verma, S. & Kumar, S., 2000. Antifungale activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), pp. 43 - 46.

Aprentas Hrsg., 2017. *Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden*. 6. Auflage Hrsg. Basel: Springer International Publishing Switzerland.

Aurich, O. et al., 1967. Phytochemische Untersuchungen an Pflanzen der einheimischen Flora und des Gaterslebener Sortiment. *III. Mitteilung*, Band III.

Ballert, S., 2014. *Masterarbeit - Entwicklung einer präparativen HPLC-Methode zur Fraktionierung von Rhabarberextrakten*. Masterarbeit Hrsg. Bernburg: Hochschule Anhalt (FH) - Fachbereich Landwirtschaft, Ökotoxikologie und Landschaftsentwicklung.

Ballert, S., 2017. *Erstellung einer HPLC-MS Methode* [Interview] (Dezember 2017).

Bös, B., 2000. *Giftpflanzen.compendium*. [Online]

Available at: <http://giftpflanzen.com/>

[Zugriff am 13 Januar 2018].

Braun, 2018. [Online]

Available at: https://www.proplanta.de/Fotos/Der-asexuelle-und-sexuelle-Entwicklungszyklus-des-Echten-Mehltaus_Bild1156426003.html

Castellarin, S. et al., 2012. Phenolics in Grape Berry and Key Antioxidants. In: H. Gerós, M. Cahves & S. Delrot, Hrsg. *The Biochemistry of the Grape Berry*. Benthan : Science Publishers, pp. 89 - 110.

Chong, J., Poutaraud, A. & Hugueney, P., 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 173(3), pp. 143 - 155.

Deiab, S. et al., 2015. 1,2,3,4,6-Penta- O -galloylglucose within *Galla Chinensis* Inhibits Human LDH-A and Attenuates Cell Proliferation in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(10), p. 11.

Delaunois, B., Cordelier, S., Contreux, A. & Jeandet, P., 2008. Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), pp. 2 - 12.

Dix, N. J., 1979. Inhibition of fungi by gallic acid in relation to growth on leaves and litter.

Transactions of the British Mycological Society, 73(2), pp. 329 - 336.

Dudenhöffer, J., 2016. *Molekulare Untersuchung von Resistenzen gegen den Falschen Mehltau der Weinrebe (Plasmopara viticola)*. Dissertation Hrsg. Quedlinburg: Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen.

Engelhardt, A., 2014. *Crashkurs Statistik*. [Online]

Available at: <http://www.crashkurs-statistik.de/variationskoeffizient/>

[Zugriff am 6 März 2018].

- Ferrari, C. & Torres, E., 2003.** Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 57(Issue 5-6), pp. pp 251-260.
- Gabaston, J. et al., 2017.** Pinus pinaster Knot: A source of Polyphenols against Plasmopara viticola. *Agriculture and Food Chemistry*, 65(40), pp. 8884 - 8891.
- Gey, M. H., 1998.** *Instrumentelle Bioanalytik - Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. 1. Auflage Hrsg. Nraunschweig/Wiesbaden: Friedrich Wieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH.
- Gey, M. H., 2015.** *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. 3. Auflage Hrsg. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Gillmeister, M., 2016.** *Antifungal potential of Rheum-root extracts in different model systems*. Magdeburg, Hochschule Anhalt (FH) - Fachbereich Landwirtschaft, Ökotrophologie und Landschaftsentwicklung.
- Gillmeister, M., 2017.** *Rheum-Polyphenole als biologische Fungizide in der Landwirtschaft*. Halle (Saale), Hochschule Anhalt (FH) - Fachbereich Landwirtschaft, Ökotrophologie und Landschaftsentwicklung.
- Gressner, A. M. & Arndt, T. Hrsg., 2013.** *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2, illustriert Hrsg. Berlin: Springer-Verlag.
- Grewe, F., 1970.** *Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*. Band 2: Fungizide. Herbizide. Natürliche Pflanzenwachststoffe. Rückstandsprobleme Hrsg. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.
- Hahn, A., Behle, B., Lischewski, D. & Rein, W., 2003.** *Produktionstechnische Praxis - Grundlagen chemischer Betriebstechnik*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A. & von Tiedemann, A., 2009.** *Phytomedizin - Grundwissen Bachelor*. 2. Auflage Hrsg. Stuttgart (Hohenheim): Eugen Ulmer KG.
- Hänsel, R. & Sticher, O., 2006.** *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 8. illustrierte Hrsg. Berlin: Springer-Verlag.
- Hänsel, R. & Sticher, O., 2009.** *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. s.l.:Springer-Verlag.
- Harbone, J. & Williams, C., 2000.** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, Issue 6(Vol. 55), pp. pp 481-504.
- Haryanto, H., 1984.** *Beitrag zur Kenntnis der Gerbstoffe und ihrer Vorstufen in den Blättern von Rheum officinale Baillon*. Münster: Fachbereich Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität, Dissertation 1984.
- Heckmann, R., 2018.** *Gunt*. [Online]
Available at:
http://www.gunt.de/de/produkte?option=com_gunt&view=panel&task=gunt.suche.suche.request&temid=119&back=1
[Zugriff am 05 Februar 2018].
- Heitefuss, R., König, K., Obst, A. & Reschke, M., 2000.** *Pflanzenkrankheiten und Schädlinge im Ackerbau*. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage Hrsg. Frankfurt am Main: DLG-Verlag.
- Heß, D., 2008.** *Pflanzenphysiologie*. 11. Auflage Hrsg. Stuttgart (Hohenheim): UTB GmbH.

- Hguyen, D.-M.-C. et al., 2013.** Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microbial Pathogenesis*, Band 56, pp. 8 - 15.
- Hilal, Y., 2010.** *Untersuchungen über Polyphenole in weißen und grünen Tees*. Dissertation Hrsg. Braunschweig: Technische Universität Braunschweig, Fakultät für Lebenswissenschaften.
- Hillebrand, S., 2004.** *Analytik von Polyphenolen in Buntsäften im Hinblick auf Saftqualität, Farbe und antioxidative Aktivität*. Dissertation Hrsg. Göttingen: Cuvillier Verlag.
- Hirasawa, M. & Takada, K., 2004.** Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Band 53, pp. 225 - 229.
- Hoos, G., 2017.** *Hortipendium*. [Online]
Available at:
http://www.hortipendium.de/Echter_Mehltau#Gattungen_und_Arten_mit_ihren_Wirtspflanzen
[Zugriff am 16 Januar 2018].
- Kabrodt et al., K., 2009.** *Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenbaus*. Bernburg: Verein für Arznei- und Gewürzpflanzen SALUPLANTA E.V..
- Kabrodt, K., 2006.** *Analytische und funktionelle Charakterisierung von Polyphenolen aus Rheum ssp.*. Dissertation Hrsg. Halle-Wittenberg: Martin-Luther-Universität, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Naturwissenschaftlichen Fakultät III.
- Kaiser, P., 2009.** *slideplayer*. [Online]
Available at: <http://slideplayer.org/slide/886028/>
[Zugriff am 09 Februar 2018].
- Kaul, R., 1996.** Pflanzliche Procyanidine - Vorkommen, Klassifikation und pharmakologische Wirkungen. *Pharmazie in unserer Zeit*, 25(4), pp. 175 - 185.
- Klenke, F. & Scholler, M., 2015.** *Pflanzenparasitische Kleinpilze*. 1. Hrsg. Berlin: Springer-Verlag.
- Krafczyk, N., 2008.** *Isolierung, Strukturaufklärung und Eigenschaften von polyphenolischen Verbindungen aus *Aspalathus linearis* und *Rheum rhaponticum**. Halle-Wittenberg: Martin-Luther-Universität, Naturwissenschaftliche Fakultät II - Chemie und Physik, Dissertation 2008.
- Latscha, H. P. & Klein, H. A., 2013.** *Analytische Chemie: Chemie — Basiswissen III*. 2., illustriert Hrsg. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Löffler, G. & Petrides, P. E., 2013.** *Biochemie und Pathobiochemie*. 6., illustriert Hrsg. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Meissner, G., 2013.** *Antifungale Wirkung von Wurzelextrakten aus *Rheum officinale* Baill. und Blattextrakten aus *Moringa oleifera* Lam. gegen phytopathogene Pilze*. Bachelorarbeit Hrsg. Bernburg: Hochschule Anhalt, Fachbereich Landwirtschaft / Ökotropologie / Landespflege.
- Merz, P., 2014.** *Dissertation - Die Untersuchung der Erkennung von *Plasmopara viticola* durch VRP1 Rezeptoren und der Regulation der Pathogenabwehr durch die Transkriptionsfaktoren VvWRKY33 und VvERF5 in der Weinrebe (*Vitis sp.*)*. Heidelberg: Ruprecht - Karls - Universität.
- Mortimer, C. E. & Müller, U., 2015.** *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*. 12., korrigierte und aktualisierte Auflage Hrsg. Heidelberg: Georg Thieme Verlag KG.

MP Biomedicals, 2017. *MP Biomedicals*. [Online]

Available at: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02194011&country=81>

[Zugriff am 08 09 2017].

Muermann, B. & Salzer, U.-J., 2016. *Aromen-Lexikon*. 2. Auflage Hrsg. Hamburg: Behr's Verlag.

naturstoffwiki, 2017. *naturalproducts*. [Online]

Available at: <https://de.naturalproducts.wiki/flavonoide>

[Zugriff am 12 09 2017].

Neukam, K. I., 2006. *Interventionsstudie und in-vitro-Untersuchungen zum Effekt von Polyphenolen und omega-3-Fettsäuren auf Endothelialfunktion und Hautphysiologie*. Dissertation Hrsg. Düsseldorf: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität.

Nowara, D., 2008. *Dissertation - Pflanzenvermittelte Unterdrückung der Genexpression in *Blumeria graminis* - Eine neuartige Methode zur Erzeugung von Resistenz*. Halle/Saale: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. & Richter, H., 2004a. Effects of Reveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis-Journal of Grapevine Research*, 43(3), pp. 145 - 148.

Pezet, R. & Pont, V., 1994. Mode of Toxic Action of Vitaceae Stilbenes on Fungal Cells. In: M. P. R. P. Maniel, Hrsg. *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc., pp. 317 - 331.

Pogačnik, L., Rogelj, A. & Ulrih, N., 2015. *Chemiluminescence Method for Evaluation of Antioxidant*. London: Taylor & Francis.

Portz, D., 2008. *Knoblauch im Pflanzenschutz - Wirkung, Anwendungsmöglichkeiten und molekularbiologische Studien unter besonderer Berücksichtigung des Inhaltsstoffes Allicin*. Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften.

Prigge, G., Gerhard, M. & Habermeyer, J., 2004. *Pilzkrankheiten und Schadyptome im Getreidebau*. Münster: Landwirtschaftsverlag.

Richter, G., 1998. *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen: Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels*. 6., völlig neubearbeitet Auflage Hrsg. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Salzer, R., Thiele, S., Zuern, A. & Zimmerer, C., 2016. *ChemGaroo*. [Online]

Available at:

http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/stat_phase/statphase_hplc2.vscml.html

[Zugriff am 08 Februar 2018].

SamTech, 2018. *SamTech Extraktionstechnik*. [Online]

Available at: <http://www.samtech-extraction.com/de/extraktionsverfahren.php>

[Zugriff am 19 Januar 2018].

Schäfers, J.-P., 2016. *LinkFang.de*. [Online]

Available at: [http://www.linkfang.de/wiki/Extraktion_\(Verfahrenstechnik\)](http://www.linkfang.de/wiki/Extraktion_(Verfahrenstechnik))

[Zugriff am 05 Februar 2018].

- Schellenberg, I., 2015.** *Bundesministerium für Bildung und Forschung.* [Online]
Available at: <https://www.unternehmen-region.de/de/7377.php>
[Zugriff am 19 April 2018].
- Schellenberg, I., 2017.** *IBAS - Institute of Bioanalytical Sciences.* [Online]
Available at: <http://www.bioanalytik-anhalt.de/technische-ausstattung/technologische-anlagen/>
[Zugriff am 06 Februar 2018].
- Schellenberg, I., Kabrodt, K. & Baltruschat, H., 2017.** Deutschland, Patentnr. EP2806743B1.
- Schneiderheinze, E., 2009.** *Identifizierung von Inhaltsstoffen in Rheum officinale Baill. mittel HPTLC-MS Kopplung.* Bachelorarbeit Hrsg. Bernburg (Saale): Hochschule Anhalt - Fachbereich Landwirtschaft, Ökotrophologie und Landschaftsentwicklung.
- Schöler, M. & Scharmer, M., 2018.** *Fragen zur Extraktionstechnik* [Interview] 2018.
- Schröter, Ernst; Laser, Carsten, 2018.** *InProcessInstruments.* [Online]
Available at: <http://www.in-process.com/massenspektrometrie-quadrupol-ms.html?PHPSESSID=ffozecws>
[Zugriff am 23 Januar 2018].
- Schubiger, F. X., 2018.** *Pflanzenkrankheiten.* [Online]
Available at: <http://www.pflanzenkrankheiten.ch/de/krankheiten-an-kulturpflanzen/getreide-mais/weizen/76-echter-mehltau-des-getreide>
[Zugriff am 15 Januar 2018].
- SigmaPlot, 2010.** *Benutzerhandbuch.* s.l.:s.n.
- Sinclair, J. & Dhingra, O., 1995.** *Basic Plant Pathology Methods.* 2nd Edition Hrsg. Florida: CRC Press.
- Sommermann, L., 2012.** *Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der säulenchromatographischen Auftrennung von Rheum-Extrakten am Beispiel von Rheum officinale Baill..* Bachelorarbeit Hrsg. Bernburg: Hochschule für angewandte Wissenschaften - Fachbereich Landwirtschaft, Ökotrophologie, Landschaftsentwicklung.
- Sommermann, L., 2015.** *Masterarbeit - Untersuchungen zur antifungalen Wirkung der Wurzelextrakte und Fraktionen aus Rheum rhabarbarum L. gegenüber dem Pflanzenpathogen Phytophthora capsici Leonian am Modellsystem Tomate.* Masterarbeit Hrsg. Bernburg: Hochschule Anhalt (FH) - Fachbereich Landwirtschaft, Ökotrophologie und Landschaftsentwicklung.
- van Baarlen, P., Legendre, L. & van Kan, J. A. L., 2007.** Plant Defence compounds against Botrytis Infection. In: Springer, Hrsg. *Botrytis: Biology, Pathology and Control.* Dordrecht: Springer, pp. 143 - 161.
- Von Detten, P., Faude, O. & Meyer, T., 2008.** *Leitfaden zur statistischen Auswertung von empirischen Studien.* Paderborn: Universität Padaborn. Institut für Sportmedizin.
- Wikipedia, 2018.** *Wikipedia.* [Online]
Available at: <https://en.wikipedia.org/wiki/Catechin>
[Zugriff am 05 März 2018].
- Ye, M. et al., 2007.** Analysis of Phenolic Compounds in Rhubarbs Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of America Society for Mass Spectrometry*, Band Vol. 18, pp. 82 - 91.

Yim, H., Lee, Y. H., Lee, C. H. & Lee, S. K., 1999. Emodin, an Anthrachinone Derivate Isolated from the Rhizomes of *Rheum palmatum*, Selectievely Inhibits the Activity of Casein Kinase II as a Competitve Inhibitor. *Planta Medica*, Band 65, pp. 9 - 13.

Zhou, J., Xie, G. & Yan, X., 2011. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications: Vol. 4: Isolated Compounds N-S.* Band 4. Hrsg. Heidelberg: Springer Science & Business Media.

Zhou, W. et al., 2015. Inhibition of Fungal Aflatoxin B1 Biosynthesis by Diverse Botanically-Derived Polyphenols. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(4), pp. 605 - 609.

Anlagenverzeichnis

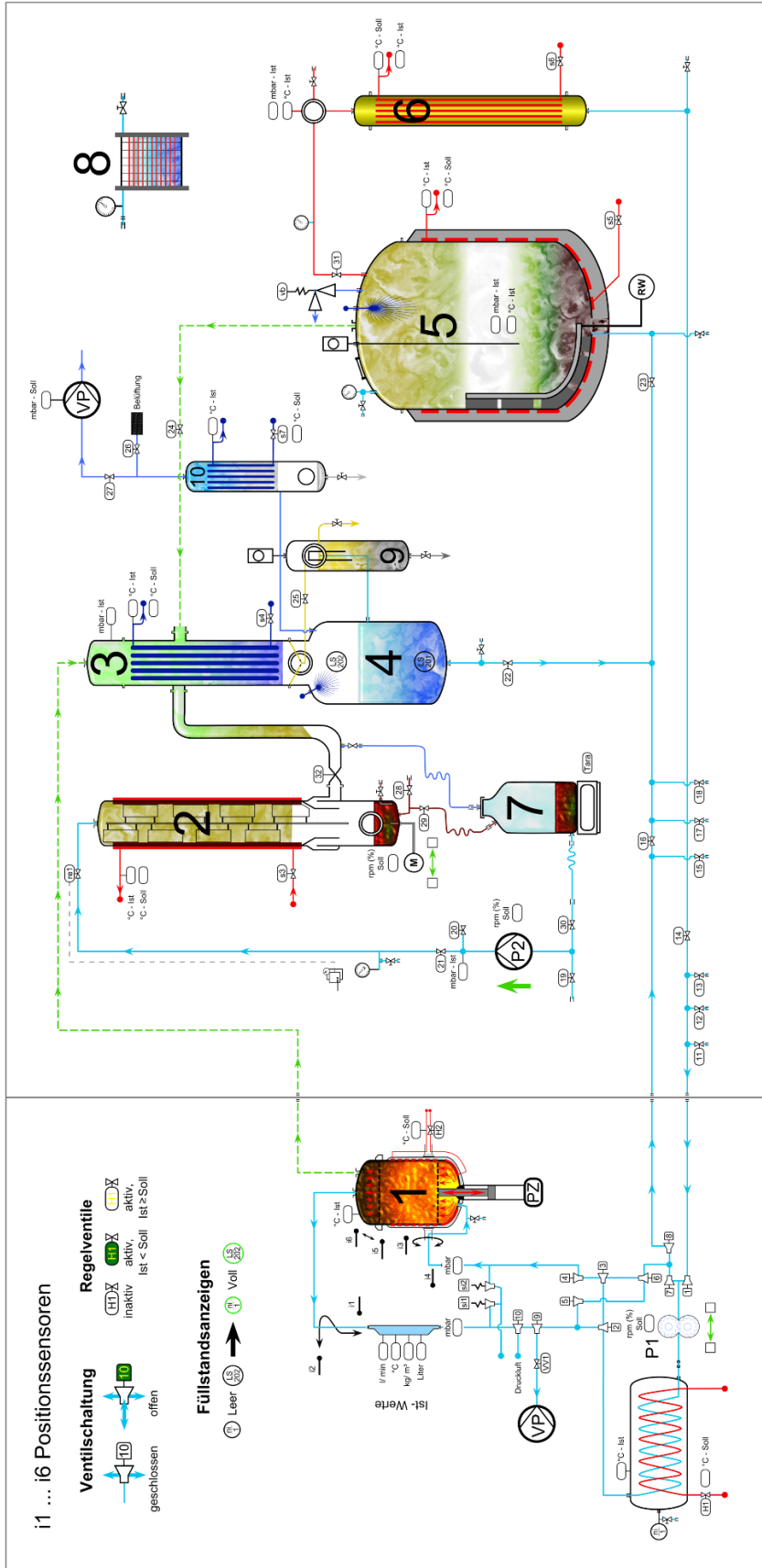
- Anlage 1:** Flowsheet der Extraktionsanlage DIG-MAZ 10
- Anlage 2:** ganzheitliches Boniturschema
- Anlage 3:** LC-Taste Spektren der Lösungsmittelvorversuche der ASE-Extraktion
- Anlage 4:** Semiquantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe der unterschiedlichen Extraktionsvarianten des GT 42 E2017
- Anlage 5:** Quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe der unterschiedlichen Extraktionsvarianten des GT 42 E2017
- Anlage 6:** Extraktionsprotokolle
- Anlage 7:** Statistische Auswertung (SigmaPlot) der Gesamtextrakte des GT 42 sowie des GT 10 im Blattsegmenttest gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in den Konzentration 1000 ppm und 500 ppm
- Anlage 8:** Statistische Auswertung (SigmaPlot) der Gesamtextrakte des GT 42 sowie des GT 10 im Blattsegmenttest gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in den Konzentration 500 ppm und 125 ppm

Anlagen

Anlage 1: Flowsheet der Extraktionsanlage DIG-MAZ 10

Modul 1

Modul 2



- 1 Fest- Flüssig- Extraktor
- 2 Dünnschichtverdampfer/ Flüssig- Flüssig- Extraktor
- 3 Kondensator
- 4 Kondensatsammelbehälter
- 5 Lösungsmittelbehälter (universeller Einsatz)
- 6 Heizung für Lösungsmittelbehälter
- 7 Extraktbehälter (Glas)
- 8 externer Plattenfilter
- 9 Ölabscheider
- 10 Nachkondensator

Anlage 2: ganzheitliches Boniturschema

	100
	95
	90
	85
	80
	75
	70
	65
	60
	55
	50
	45
	40
	35
	30
	25
	20
	15
	10
	5
	0

Anlage 3: LC-Taste Spektren der Lösungsmittelversuche der ASE-Extraktion

1. Spektren der verschiedenen Lösungsmittel der 1. Stufe der ASE-Extrakte des GT 42 E2017

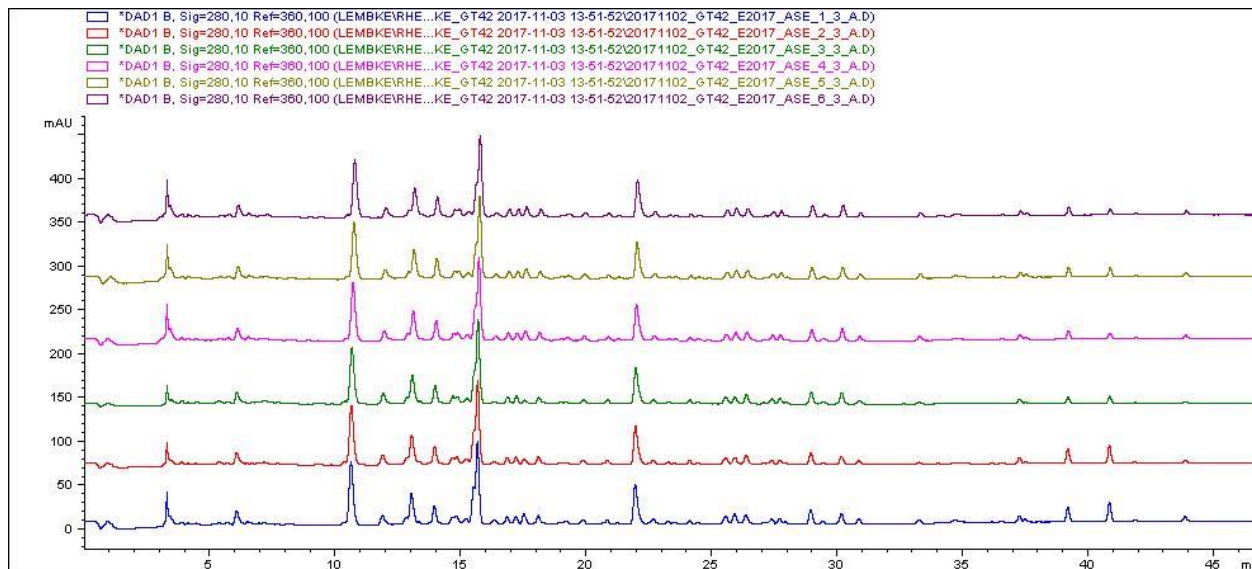


Abbildung 1: DAD-Spektren bei 280 nm der unterschiedlichen ASE-Extraktionsvarianten der ersten Stufe

2. Spektren der verschiedenen Lösungsmittel der 2. Stufe der ASE-Extrakte des GT 42 E2017

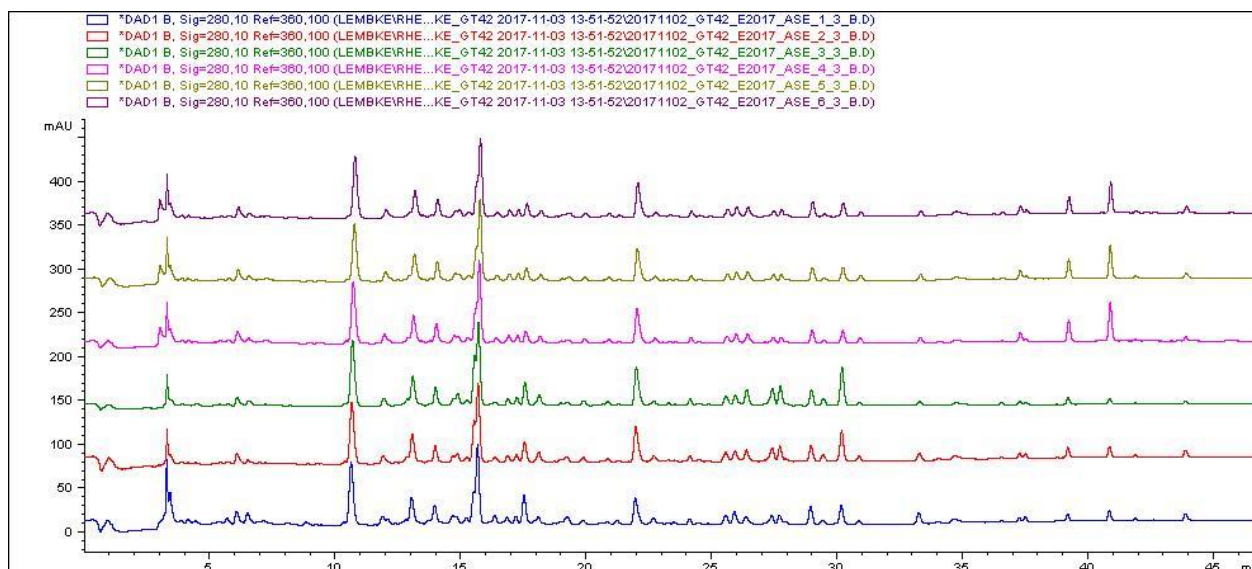


Abbildung 2: DAD-Spektren bei 280 nm der unterschiedlichen ASE-Extraktionsvarianten der zweiten Stufe

3. Spektren der verschiedenen Temperaturen der 1. Stufe der ASE-Extrakte des GT 42 E2017

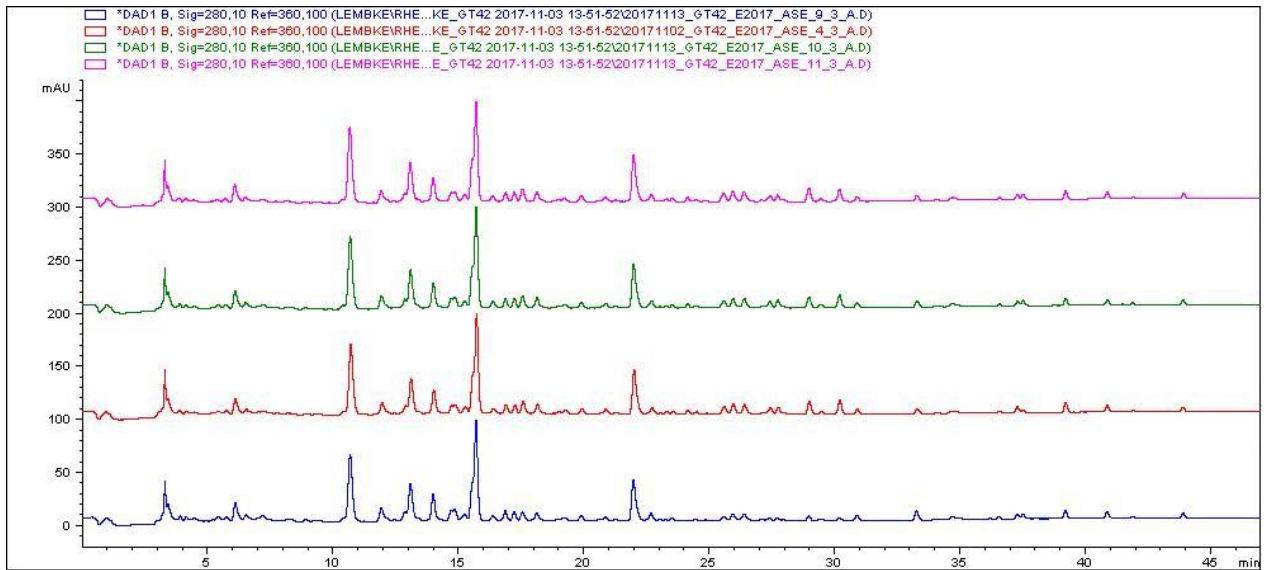


Abbildung 3: DAD-Spektren bei 280 nm der ASE-Extraktionsvariante 4 sowie unterschiedlichen Temperaturen der ersten Stufe

4. Spektren der verschiedenen Temperaturen der 2. Stufe der ASE-Extrakte des GT 42 E2017

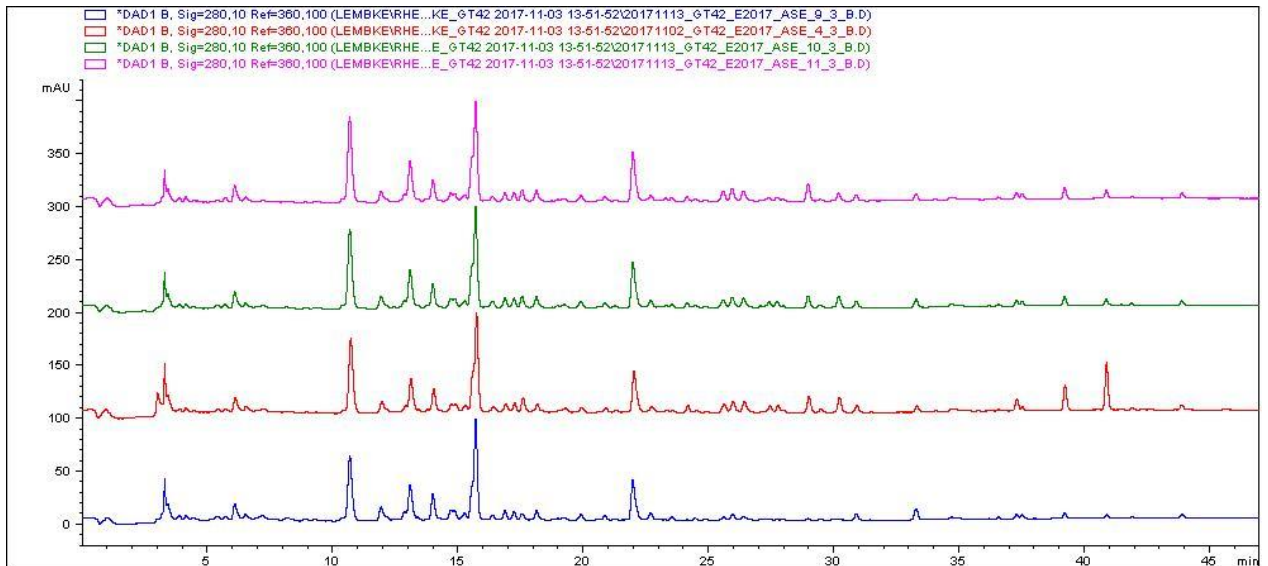


Abbildung 4: DAD-Spektren bei 280 nm der ASE-Extraktionsvariante 4 sowie unterschiedlichen Temperaturen der zweiten Stufe

Anlage 4: Semiquantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe der unterschiedlichen Extraktionsvarianten des GT 42 E2017

1. Darstellung der Semiquantitative Bestimmung der Stilbene

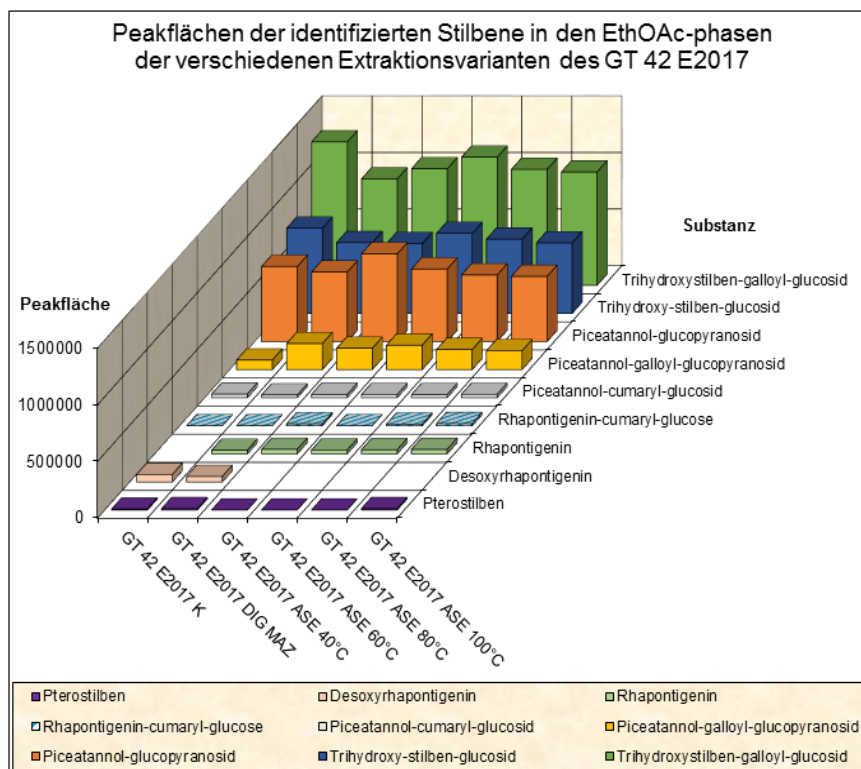


Abbildung 1: Darstellung der semiquantitativ identifizierten Stilbene in den Ethylacetatphasen der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42

Tabelle 1: Darstellung der Peakflächen der identifizierten Stilbene, in Abhängigkeit der Gesamtpeakfläche der jeweiligen Probe

Substanz	GT 42 E2017 K	GT 42 E2017 DIG-MAZ	GT 42 E2017 ASE 40°C	GT 42 E2017 ASE 60°C	GT 42 E2017 ASE 80°C	GT 42 E2017 ASE 100°C
Trihydroxystilben-galloyl-glucosid	1266633	940354	1028837	1131331	1024072	1001104
Trihydroxy-stilben-glucosid	752041	625000	616750	706456	655859	622892
Piceatannol-glucopyranosid	662990	613287	773967	639765	587334	574960
Piceatannol-galloyl-glucopyranosid	84265	229542	188232	216076	177192	166506
Piceatannol-cumaryl-glucosid	32122	24208	29423	28478	27529	29819
Rhapontigenin-cumaryl-glukose	-	-	17166	-	14028	19197
Rhapontigenin *	-	31929	40562	37204	36567	39598
Desoxyrhapontigenin	66781	48450	-	-	-	-
Pterostilben	9336	12928	-	-	-	12671

2. Darstellung der Semiquantitative Bestimmung der Anthrachinone

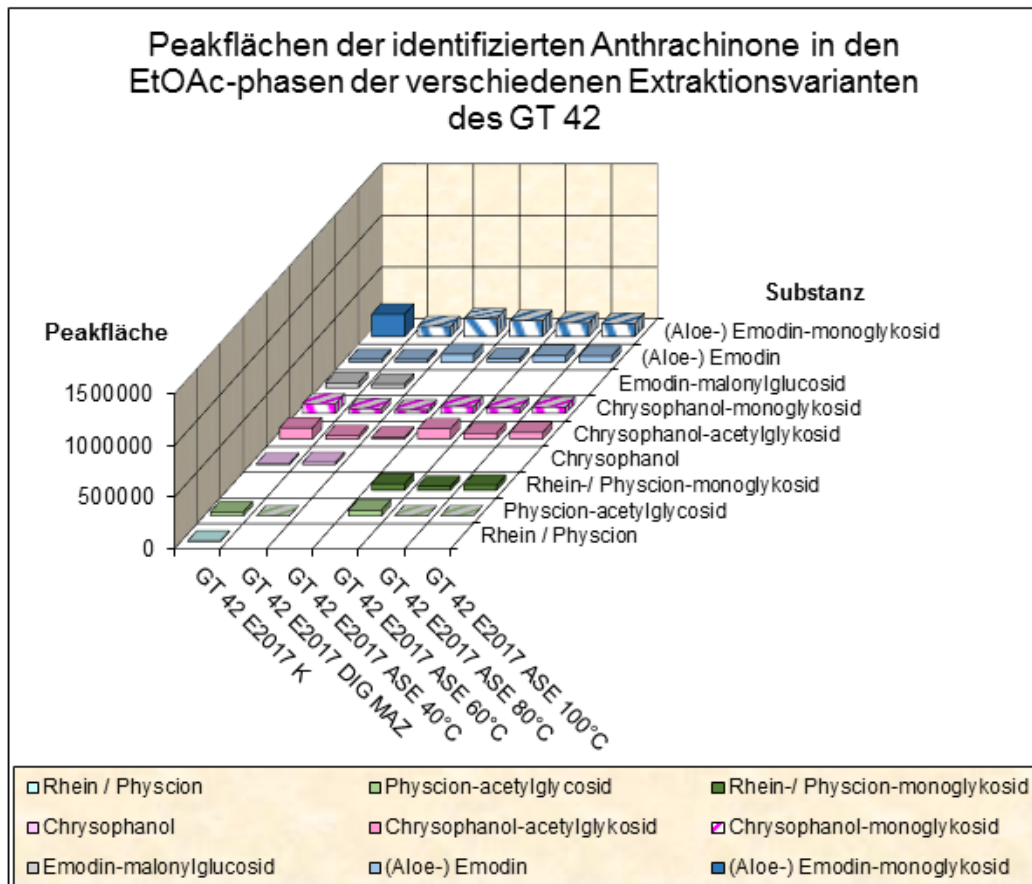


Abbildung 2: Darstellung der semiquantitativ identifizierten Anthrachinone in den Ethylacetatphasen der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42

Tabelle 2: Darstellung der Peakflächen der identifizierten Anthrachinone, in Abhängigkeit der Gesamtpeakfläche der jeweiligen Probe

Substanz	GT 42 E2017 K	GT 42 E2017 DIG- MAZ	GT 42 E2017 ASE 40°C	GT 42 E2017 ASE 60°C	GT 42 E2017 ASE 80°C	GT 42 E2017 ASE 100°C
(Aloe-) Emodin-monoglykosid	216633	-	-	-	-	-
(Aloe-) Emodin	27362	25822	77713	34429	62651	57593
Emodin-malonylglucosid	49010	36590	-	-	-	-
Chrysophanol-acetylglucosid	108633	32913	16359	98233	53872	62485
Chrysophanol	12730	21334	-	-	-	-
Rhein-/ Physcion-monoglykosid	-	-	-	62668	38062	49769
Physcion-acetylglucosid	38393	-	-	55365	-	-
Rhein / Physcion	4495	-	-	-	-	-

3. Darstellung der Semiquantitative Bestimmung der weiteren Substanzen

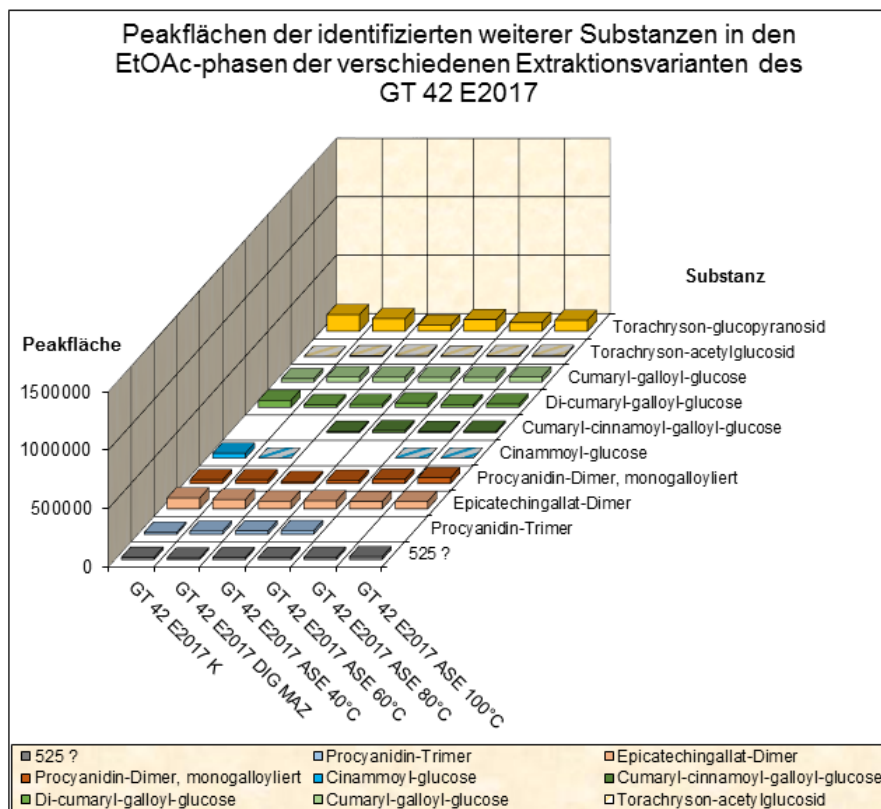


Abbildung 3: Darstellung der restlichen semiquantitativ identifizierten Substanzen in den Ethylacetatphasen der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42

Tabelle 3: Darstellung der Peakflächen der identifizierten weiteren Substanzen, in Abhängigkeit der Gesamtpeakfläche der jeweiligen Probe

Substanz	GT 42 E2017 K	GT 42 E2017 DIG-MAZ	GT 42 E2017 ASE 40°C	GT 42 E2017 ASE 60°C	GT 42 E2017 ASE 80°C	GT 42 E2017 ASE 100°C
Torachryson-glucopyranosid	142449	107530	52603	99540	74048	94729
Torachryson-acetylglucosid	1650	8256	10401	5402	8593	10057
Cumaryl-galloyl-glukose	27745	45015	40491	38734	39360	42003
Di-cumaryl-galloyl-glukose	60138	23248	25602	36912	22983	28007
Cumaryl-cinnamoyl-galloyl-glukose	-	-	11404	18509	10229	14127
Cinammoyl-glukose	41760	-	-	-	-	-
Procyanidin-Dimer, monogalloyliert	31015	31378	17342	27307	35483	48198
Epicatechingallat-Dimer	92913	79656	66454	69174	62476	63499
Procyanidin-Trimer	16985	25778	28044	30571	-	-
525 ?	19301	13302	17492	18498	19888	24197

4. Darstellung der Semiquantitative Bestimmung mit zwei Substanzen unter einem Peak

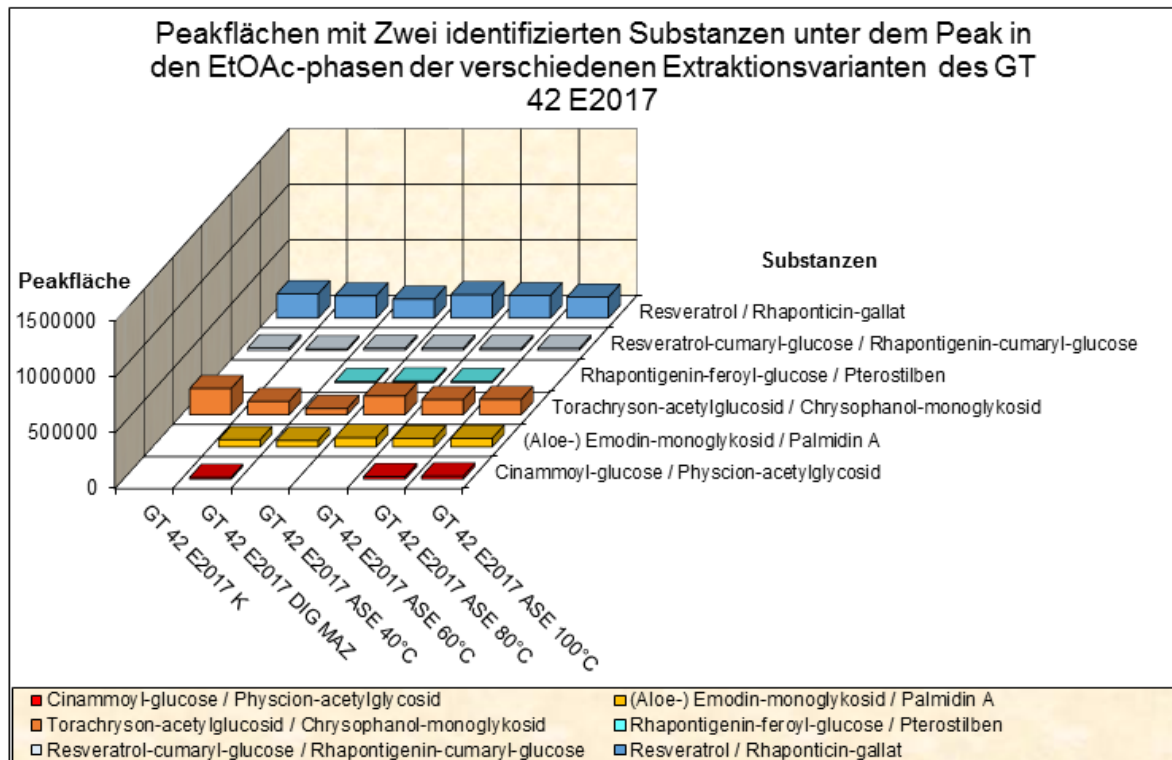


Abbildung 4: Darstellung der zweier semiquantitativ identifizierten Substanzen unter einem Peak in den Ethylacetatphasen der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42

Tabelle 4: Darstellung der Peakflächen von zwei identifizierten Substanzen unter einem Peak, in Abhängigkeit der Gesamtpeakfläche der jeweiligen Probe

Substanzen	GT 42 E2017 K	GT 42 E2017 DIG- MAZ	GT 42 E2017 ASE 40°C	GT 42 E2017 ASE 60°C	GT 42 E2017 ASE 80°C	GT 42 E2017 ASE 100°C
Resveratrol / Rhaponticin-gallat	218418	200098	170311	209109	201270	187801
Resveratrol-cumaryl-glukose / Rhapontigenin-cumaryl-glukose	22827	12928	19087	19414	16841	18148
Rhapontigenin-feroyl-glukose / Pterostilben			8616	14590	9236	
Torachryson-acetylglucosid / Chrysophanol-monoglykosid	235000	119685	55537	168368	135059	136948
(Aloe-) Emodin-monoglykosid / Palmidin A		64616	58089	82888	74297	76606
Cinammoyl-glukose / Physcion-acetylglykosid		14980			23442	27234

Tabelle 5: Überblick der semiquantitativ erfassten Substanzgruppen über alle Proben

Substanzgruppe	GT 42 E2017 K	GT 42 E2017 DIG-MAZ	GT 42 E2017 ASE 40°C	GT 42 E2017 ASE 60°C	GT 42 E2017 ASE 80°C	GT 42 E2017 ASE 100°C
Stilbene	66 %	71 %	75 %	68 %	70 %	69 %
Anthrachinone	13 %	7 %	8 %	12 %	9 %	10 %
restliche Substanzen	10 %	10 %	7 %	9 %	8 %	9 %
Zwei Substanzen unter einem Peak	11 %	12 %	9 %	12 %	13 %	12 %

Anlage 5: Quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe der unterschiedlichen Extraktionsvarianten des GT 42 E2017

1. Darstellung der quantitativen Bestimmung der Flavan-3-ole sowie Procyanidine

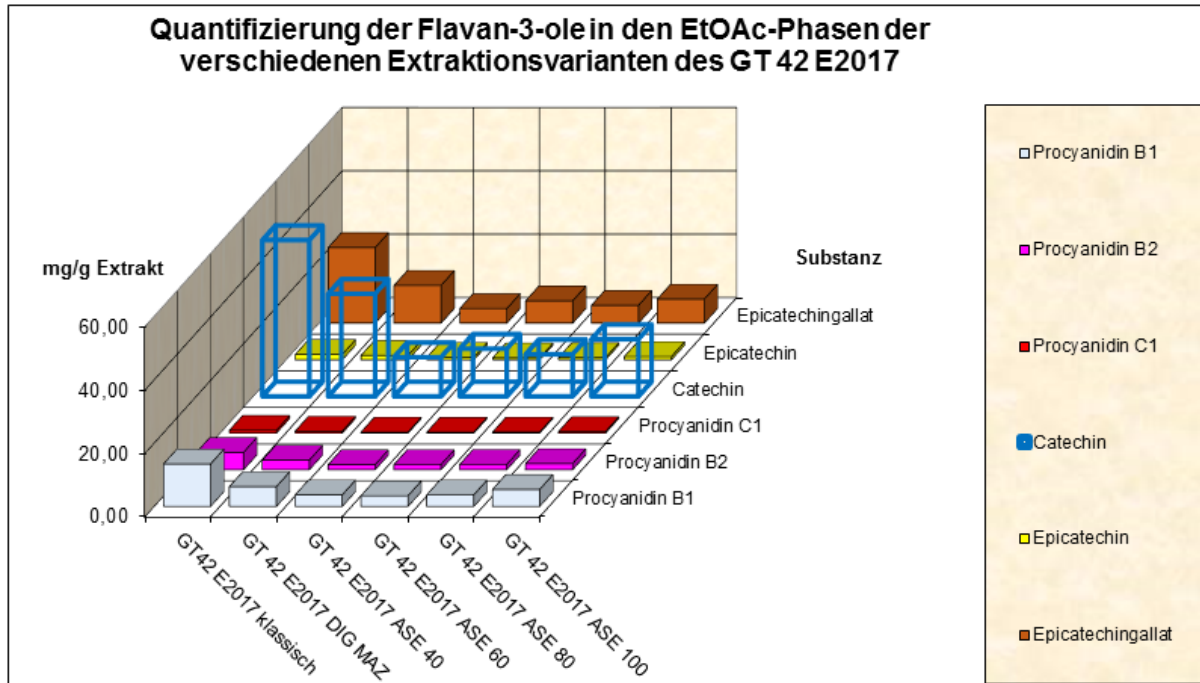


Abbildung 1: Darstellung der quantitativ bestimmten Flavan-3-ole in den EtOAc-Phasen der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42

Tabelle 1: Quantifizierung von Epicatechingallat, Epicatechin, Catechin sowie der Procyanidine PC1, PB2, PB1 in den Gesamtextrakten der DIG-MAZ Extrakte der verschiedenen Erntejahre sowie dem klassisch extrahierten GT 42 E2017

Substanz	<u>GT 42</u> <u>E2017 K</u>	<u>GT 42</u> <u>E2017</u> <u>DIG-MAZ</u>	<u>GT 42</u> <u>E2017</u> <u>ASE 40</u>	<u>GT 42</u> <u>E2017</u> <u>ASE 60</u>	<u>GT 42</u> <u>E2017</u> <u>ASE 80</u>	<u>GT 42</u> <u>E2017</u> <u>ASE 100</u>
Epicatechingallat	23,86	11,89	4,61	7,03	5,61	7,56
Epicatechin	1,67	1,39	0,76	0,59	0,67	0,98
Catechin	49,37	32,43	12,39	15,07	13,32	18,06
Procyanidin C1	0,86	0,60	0,28	0,26	0,30	0,44
Procyanidin B2	5,46	3,00	1,58	1,60	1,66	1,92
Procyanidin B1	13,37	6,21	3,60	3,34	3,64	5,35

2. Darstellung der quantitativen Bestimmung der Stilbene sowie Phenolcarbonsäuren

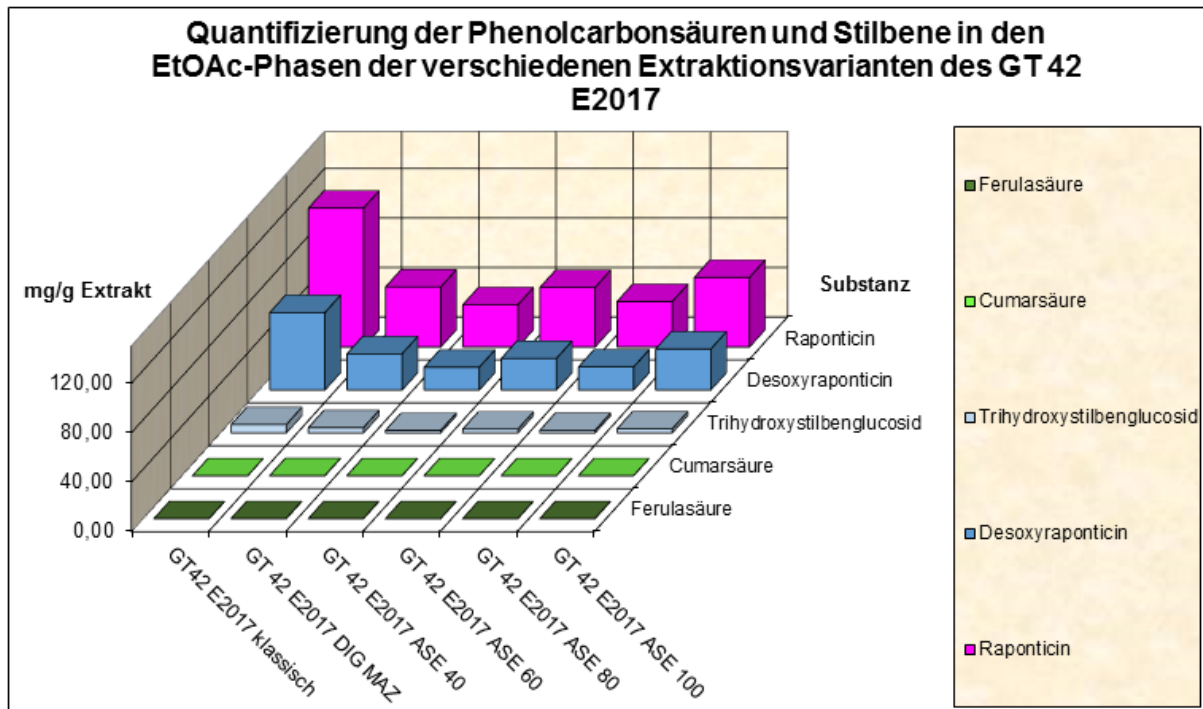


Abbildung 2: Darstellung der quantitativ Bestimmten Phenolcarbonsäuren und Stilbene in den EtOAc-phasen der verschiedenen Extraktionsvarianten des GT 42

Tabelle 2: Quantifizierung von Rhaponticin, Desoxyrhaponticin, Trihydroxystilbenglukosid sowie p-Cumarsäure und Ferulasäure in den Gesamtextrakten der DIG-MAZ Extrakte der verschiedenen Erntejahre sowie dem klassisch extrahierten GT 42 E2017

Substanz	<u>GT 42 E2017 klassisch</u>	<u>GT 42 E2017 DIG-MAZ</u>	<u>GT 42 E2017 ASE 40</u>	<u>GT 42 E2017 ASE 60</u>	<u>GT 42 E2017 ASE 80</u>	<u>GT 42 E2017 ASE 100</u>
Raponticin	112,26	48,55	34,10	48,11	36,75	56,22
Desoxyraponticin	62,54	29,20	18,34	25,48	18,58	33,07
Trihydroxystilbenglukosid	6,68	4,20	2,00	2,97	2,05	3,21
p-Cumarsäure	0,07	0,16	0,08	0,07	0,07	0,11
Ferulasäure	0,08	0,13	0,07	0,06	0,07	0,10

Anlage 6. Extraktionsprotokolle

Versuchsnummer:

Extraktionsprotokoll für die Matrix Rhabarber

IBAS AA23-01 modifiziert

Datum: 27.11.2017

Bearbeiter: Lembke, Marcus

(Material gegebenfalls aus "Datei LW: N: Rhabarber/ Rheumwurzelmaterial" austragen)

Geno-Typ, Variante: GT 42

Erntezeitraum: Oktober 2017

Anbauort / Herkunft:

Masse Wurzel [g]:

Bemerkungen: (dazu auch Blatrückseite benutzen)
DAD-HPLC:

Methanolische Extraktion und Abdampfung

Extraktion - Nr.	MeOH-Menge zur Extraktion [g]	Drehzahl Ultra turax [1/min]	Extraktion Dauer [min]	Extrakt-Menge in Roti. [g]	Temp./Druck am Roti. [°C] [mbar]	Kühlung-Eiswasser	N ₂ -Überschichtung	MeOH-Rückgewinnung [g]	Wasser-zugabe [g]
1	2113,6	5000	15	1311,2					
2	1020,81	5000	15	1559,2					
3	1020,8	5000	15	1542,6					
4	1085,5	5000	15	1085,1					
5	1428,1	5000	15	1378,8				6668,8	1106,4

Feststoffrückstand in Zentrifugenbecher nach Kältefällung [g]:

-	-	-	-
(Leergewicht)	(Leergewicht)	(Leergewicht)	(Leergewicht)

Abtrennen der lipophilen Bestandteile

Kältefällung

Beginn Datum [dd.mm.aa]	Beginn Zeit [hh:mm]	Ende Datum [dd.mm.aa]	Ende Zeit [hh:mm]	Gesamt-Extraktmenge [g]	Feststoffmenge im Kolben und nach Zentrifugation [g]
/	/	/	/	/	/
/	/	/	/	/	/
/	/	/	/	/	/

Petrolether-Extraktion

Verhältnis Extrakt zu LM = 1:1

Extraktion - Nr.	Extraktmenge [g]	Petrolether-menge [g]	Extraktion Dauer [min]	Drehzahl Ultra turax [1/min]	Zentrifugation
1	1328,58	1328,68	10	manuell	
2	1400,90	1403,37	10	manuell	
3					
4					

Feststoffrückstand im PE-Kolben [g]

(Leergewicht Kolben)

Ethylacetat-Extraktion:

Verhältnis Extrakt zu LM = 1:1,5

Extraktion - Nr.	Extraktmenge [g]	Ethylacetat-menge [g]	Extraktion Dauer [min]	Drehzahl Ultra turax [1/min]
1	1418,43	2138,72		
2	1516,63	2277,59		
3	1506,52	2264,77		
4	1511,44	2269,78		
5				

Menge MeOH-Phase [g]:

(Leergewicht Kolben)

Menge EtOAc-Phase [g]: (ohne Wasserzugabe)

(Leergewicht Kolben)

Menge H₂O-Phase [g]:

(Leergewicht Kolben)

Lyophilisation Ethylacetat-Phase

Beginn Datum	Beginn Zeit	Ende Datum	Ende Zeit	Kolben Leergewicht [g]	Kolbengewicht nach Lyophilisation mit EtOAc-Phase [g]	theoret. Ausbeute, Ethylacetat, Lyophilisat [g]
dd.mm.aa	hh:mm	dd.mm.aa	hh:mm			
				160,16	180,17	20,01
				161,74	202,21	40,07
						Σ 60,48

Lyophilisation Wasser-Phase

Beginn Datum	Beginn Zeit	Ende Datum	Ende Zeit	Kolben Leergewicht [g]	Kolbengewicht nach Lyophilisation mit H ₂ O-Phase [g]	theoret. Ausbeute, Wasser, Lyophilisat [g]
dd.mm.aa	hh:mm	dd.mm.aa	hh:mm			
						Σ

Leergewicht Aufbewahrungsgefäß für EtOAc-Phase [g]:

199,89 Ist-Menge [g]:

Leergewicht Aufbewahrungsgefäß für H₂O-Phase [g]:

Ist-Menge [g]:

Versuchsnummer:

Extraktionsprotokoll für die Matrix Rhabarber

IBAS AA23-01 modifiziert

Datum: 05.12.2017

Bearbeiter: Lembke, Marcus

(Material gegebenfalls aus "Daten LW: N: Rhabarber/ Rheumwurzelmaterial" austragen)

Geno-Typ, Variante: GT 42 (ASE 60°C Extrakt)

Erntezeitraum: Oktober 2017

Anbauort / Herkunft:

Masse Wurzel [g]:

Bemerkungen: (dazu auch Blattrückseite benutzen)
DAD-HPLC:

Methanolische Extraktion und Abdampfung

Extraktion - Nr.	MeOH-Menge zur Extraktion [g]	Drehzahl Ultraturax [1/min]	Extraktion Dauer [min]	Extrakt-Menge in Roti. [g]	Temp./Druck am Roti. [°C]/ [mbar]	Kühlung-Eiswasser	N ₂ -Überschichtung	MeOH-Rückgewinnung [g]	Wasser-zugabe [g]
1									
2									
3									
4									
5									

Feststoffrückstand in Zentrifugenbecher nach Kältefällung [g]:

-	-	-	-
(Leergewicht)	(Leergewicht)	(Leergewicht)	(Leergewicht)

Abtrennen der lipophilen Bestandteile

Kältefällung

Beginn Datum [dd.mm.aa]	Beginn Zeit [hh:mm]	Ende Datum [dd.mm.aa]	Ende Zeit [hh:mm]	Gesamt-Extraktmenge [g]	Feststoffmenge im Kolben und nach Zentrifugation [g]
/	/	/	/	/	/
/	/	/	/	/	/
/	/	/	/	/	/

Petrolether-Extraktion Verhältnis Extrakt zu LM = 1:1

Extraktion - Nr.	Extraktmenge [g]	Petrolether-menge [g]	Extraktion Dauer [min]	Drehzahl Ultraturax [1/min]	Zentrifugation
1	151,17	151,45	10	manuell	
2	250,55	251,18	10	manuell	
3	143,88	723,91	10	manuell	
4					

Feststoffrückstand im PE-Kolben [g]

(Leergewicht Kolben)

Ethylacetat-Extraktion: Verhältnis Extrakt zu LM = 1:1,5

Extraktion - Nr.	Extraktmenge [g]	Ethylacetat-menge [g]	Extraktion Dauer [min]	Drehzahl Ultraturax [1/min]
1	120,56	182,2		
2	140,20	210,68		
3	140,47	214,41		
4	148,98	224,06		
5				

Menge MeOH-Phase [g]:	Menge EtOAc-Phase [g]: (ohne Wasserzugabe)	Menge H ₂ O-Phase [g]:
(Leergewicht Kolben)	(Leergewicht Kolben)	(Leergewicht Kolben)

Lyophilisation Ethylacetat-Phase

Beginn Datum	Beginn Zeit	Ende Datum	Ende Zeit	Kolben Leergewicht [g]	Kolbengewicht nach Lyophilisation mit EtOAc-Phase [g]	theoret. Ausbeute Ethylacetat Lyophilisat [g]
dd.mm.aa	hh:mm	dd.mm.aa	hh:mm			
						Σ

Lyophilisation Wasser-Phase

Beginn Datum	Beginn Zeit	Ende Datum	Ende Zeit	Kolben Leergewicht [g]	Kolbengewicht nach Lyophilisation mit H ₂ O-Phase [g]	theoret. Ausbeute Wasser Lyophilisat [g]
dd.mm.aa	hh:mm	dd.mm.aa	hh:mm			
						Σ

Leergewicht Aufbewahrungsgefäß für EtOAc-Phase [g]:

13,26 Ist-Menge [g]:

Leergewicht Aufbewahrungsgefäß für H₂O-Phase [g]:

Ist-Menge [g]:

Versuchsnummer:

Extraktionsprotokoll für die Matrix Rhabarber

IBAS AA23-01 modifiziert

Datum: 05.12.2017

Bearbeiter: Lembke, Marcus

(Material gegebenenfalls aus "Datei LW: N: Rhabarber/ Rheumwurzelmaterial" austragen)

Geno-Typ, Variante: GT 42 (ASE 80°C Extrakt)

Emtezeitraum: Oktober 2017

Anbauort / Herkunft:

Masse Wurzel [g]:

Bemerkungen: (dazu auch Blatrückseite benutzen)
DAD-HPLC:

Methanolische Extraktion und Abdampfung

Extraktion - Nr.	MeOH-Menge zur Extraktion [g]	Drehzahl Ultraturax [1/min]	Extraktion Dauer [min]	Extrakt-Menge in Roti. [g]	Temp./Druck am Roti. [°C]/ [mbar]	Kühlung- Eiswasser	N ₂ -Über-schichtung	MeOH-Rück-gewinnung [g]	Wasser-zugabe [g]
1									
2									
3									
4									
5									

Feststoffrückstand in Zentrifugenbecher nach Kältefällung [g]:

-	-	-	-
(Leergewicht)	(Leergewicht)	(Leergewicht)	(Leergewicht)

Abtrennen der lipophilen Bestandteile

Kältefällung

Beginn Datum [dd.mm.aa]	Beginn Zeit [hh:mm]	Ende Datum [dd.mm.aa]	Ende Zeit [hh:mm]	Gesamt-Extraktmenge [g]	Feststoffmenge im Kolben und nach Zentrifugation [g]
/	/	/	/	/	/
/	/	/	/	/	/
/	/	/	/	/	/

Petrolether-Extraktion

Verhältnis Extrakt zu LM = 1:1

Extraktion - Nr.	Extraktmenge [g]	Petrolether-menge [g]	Extraktion Dauer [min]	Drehzahl Ultraturax [1/min]	Zentrifugation
1	88,08	88,13	10	manuell	
2	145,09	145,55	10	manuell	
3	51,93	283,30	10	manuell	
4					

Feststoffrückstand im PE-Kolben [g]

(Leergewicht Kolben)

Ethylacetat-Extraktion:

Verhältnis Extrakt zu LM = 1:1,5

Extraktion - Nr.	Extraktmenge [g]	Ethylacetat-menge [g]	Extraktion Dauer [min]	Drehzahl Ultraturax [1/min]
1	89,54	104,85		
2	87,83	133,02		
3	101,16	152,36		
4	94,19	142,08		
5				

Menge MeOH-Phase [g]:

(Leergewicht Kolben)

Menge EtoAc-Phase [g]:
(ohne Wasserzugabe)

(Leergewicht Kolben)

Menge H₂O-Phase [g]:

(Leergewicht Kolben)

Lyophilisation Ethylacetat-Phase

Beginn Datum	Beginn Zeit	Ende Datum	Ende Zeit	Kolben Leergewicht [g]	Kolbengewicht nach Lyophilisation mit EtoAc-Phase [g]	theoret. Ausbeute Ethylacetat Lyophilisat [g]
dd.mm.aa	hh:mm	dd.mm.aa	hh:mm			
						Σ

Lyophilisation Wasser-Phase

Beginn Datum	Beginn Zeit	Ende Datum	Ende Zeit	Kolben Leergewicht [g]	Kolbengewicht nach Lyophilisation mit H ₂ O-Phase [g]	theoret. Ausbeute Wasser Lyophilisat [g]
dd.mm.aa	hh:mm	dd.mm.aa	hh:mm			
						Σ

Leergewicht Aufbewahrungsgefäß für EtoAc-Phase [g]:

13,33 Ist-Menge [g]:

1,22

Leergewicht Aufbewahrungsgefäß für H₂O-Phase [g]:

Ist-Menge [g]:

Anlage 7: Statistische Auswertung (SigmaPlot) der Gesamtextrakte des GT 42 sowie des GT 10 im Blattsegmenttest gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in den Konzentration 1000 ppm und 500 ppm

One Way Analysis of Variance

Data source: Kombi A+B-Inokulation in Marcus_Master.JNB

Normality Test (Shapiro-Wilk): Failed(P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Kombi A+B-Inokulation in Marcus_Master.JNB

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Kontrolle	30	0	50,000	35,000	70,000
E17_500	30	0	55,000	38,750	80,000
E17_125	30	1	65,000	49,000	80,000
E13_500	30	0	8,000	3,000	41,250
E13_125	30	0	75,000	65,000	85,000
E09_500	30	0	15,000	3,000	36,250
E09_125	30	0	75,000	45,000	88,500
E17K_500	30	0	8,000	0,000	43,750
E17K_125	30	0	85,000	73,750	95,000
E14K_500	15	0	0,000	0,000	1,000
E14K_125	15	0	40,000	20,000	45,000

H = 146,357 with 10 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P	P<0,050
E14K_500 vs Kontrolle	138,950	5,082	<0,001	Yes
E17K_125 vs Kontrolle	77,533	3,473	0,005	Yes
E17K_500 vs Kontrolle	76,933	3,446	0,006	Yes
E13_500 vs Kontrolle	68,017	3,047	0,023	Yes
E09_500 vs Kontrolle	58,317	2,612	0,090	No
E13_125 vs Kontrolle	57,200	2,562	0,104	Do Not Test
E09_125 vs Kontrolle	45,067	2,019	0,435	Do Not Test
E14K_125 vs Kontrolle	42,150	1,542	1,000	Do Not Test
E17_125 vs Kontrolle	29,381	1,305	1,000	Do Not Test
E17_500 vs Kontrolle	15,350	0,688	1,000	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Anlage 8: Statistische Auswertung (SigmaPlot) der Gesamtextrakte des GT 42 sowie des GT 10 im Blattsegmenttest gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in den Konzentration 500 ppm und 125 ppm

One Way Analysis of Variance

Data source: A+B in Marcus_Master_2.BST.JNB

Normality Test (Shapiro-Wilk): Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 2 in Marcus_Master_2.BST.JNB

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Kontrolle	45	0	80,000	60,000	95,000
E17_500	30	0	32,500	15,000	40,000
E17_1000	30	0	0,000	0,000	3,000
E13_500	30	0	35,000	30,000	60,000
E13_1000	30	0	1,000	0,000	10,000
E09_500	30	0	80,000	40,000	91,250
E09_1000	15	0	5,000	2,000	40,000
E17K_500	30	0	85,000	23,750	95,000
E17K_1000	30	0	85,000	52,500	90,000
E14K_500	30	0	35,000	18,750	50,000
E14K_1000	30	0	12,500	3,000	26,250

H = 195,799 with 10 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P	P<0,050
E17_1000 vs Kontrolle	210,806	9,374	<0,001	Yes
E13_1000 vs Kontrolle	198,522	8,828	<0,001	Yes
E14K_1000 vs Kontrolle	161,589	7,186	<0,001	Yes
E09_1000 vs Kontrolle	137,589	4,837	<0,001	Yes
E17_500 vs Kontrolle	113,356	5,041	<0,001	Yes
E14K_500 vs Kontrolle	98,139	4,364	<0,001	Yes
E13_500 vs Kontrolle	78,839	3,506	0,005	Yes
E17K_500 vs Kontrolle	30,789	1,369	1,000	No
E17K_1000 vs Kontrolle	19,539	0,869	1,000	Do Not Test
E09_500 vs Kontrolle	17,572	0,781	1,000	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht in einem anderen Studiengang als Prüfungsleistung vorgelegt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen (einschließlich der angegebenen oder beschriebenen Software) benutzt habe.

Bernburg, den 31.05.2018

Marcus Lembke