

Endbericht

Deutsche Bundesumweltstiftung (DBU), Osnabrück

„Extrahierung etherischer Öle/Polyphenole mit
Zerschäumungsanalyse.“

AZ: 24148

Berichtersteller: Prof. Dr. Dr. Harun Parlar, Dr. Perihan Ekici, Dipl.-Ing. (FH) Albrecht Friess

Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische
Lebensmitteltechnologie; Forschungszentrum für Brau- und
Lebensmittelqualität

Weihenstephaner Steig 23, 85354 Freising-Weihenstephan

Tel.: +49-(0)8161-71-3283; Fax: +49-(0)8161-71-4418; E-Mail:
cta@wzw.tum.de, parlar@wzw.tum.de

Projektlaufzeit: 24 Monate (01.08.2006 bis 31.07.2008)

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	24148-31	Referat	Fördersumme	108.955,95 EUR
Antragstitel	Extrahierung etherischer Öle/Polyphenole mit Zerschäumungsanalyse			
Stichworte	Zerschäumungsanalyse, etherische Öle, Polyphenole			
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)	
24 Monate	01.08.2006	31.07.2008	2	
Zwischenberichte	1			
Bewilligungsempfänger	Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie; Technische Universität München Weihenstephaner Steig 23 85354 Freising-Weihenstephan		Tel	(0)8161-71-2383
			Fax	(0)8161-71-4418
			Projektleitung Prof. Dr. Dr. Harun Parlar	
			Bearbeiter	
Kooperationspartner	Adalbert-Raps-Stiftung Kulmbach WADI GmbH Neufahrn			

Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens

Für die Anreicherung bzw. Isolierung von etherischen Ölen und Polyphenolen kommen derzeit Methoden zum Einsatz, die sich zwar im industriellen Maßstab bewährt haben, jedoch mit erheblichen Nachteilen verbunden sind. Ökologisch bedenklich wegen des hohen Lösungsmittelverbrauchs ist die Lösungsmittelextraktion, der Einsatz der Wasserdampfdestillation kann thermisch labile Verbindungen zersetzen und die Hochdruck-CO₂-Extraktion ist mit hohen Investitions- und Betriebsaufwand verbunden. Die Zerschäumungsanalyse hingegen ist eine in ihrer Verfahrensweise einfach zu installierende und durchführbare Methode, die zudem auf die Verwendung von Lösungsmittel verzichtet. Sie eignet sich vor allem für die schonende Anreicherung von unpolaren und semipolaren Naturstoffen und gilt deswegen als echte Alternative zu den genannten Methoden mit Potenzial für den halbtechnischen bzw. industriellen Maßstab. Mit diesem Projekt sollte daher die Zerschäumungsanalyse für die nachhaltige Anreicherung einer Reihe von ausgewählten etherischen Ölen und Polyphenolen getestet werden, um damit eine ökologische Alternative zu den herkömmlichen Methoden zu schaffen.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Bereits 1920 durch W. Ostwald als Patent zum Verdampfen von Flüssigkeiten zur Anreicherung gelöster oder emulgierter Stoffe durch Zerschäumung angemeldet, funktioniert die Zerschäumungsanalyse durch Einleiten von Gasen in Lösungen wie wässrigen Extrakten woraufhin Gasblasen innerhalb einer gasflüssigen Grenzschicht entstehen, an denen sich die wertgebenden Substanzen anreichern und anschließend hochkonzentriert isoliert werden können. Die Zerschäumung geschieht bei Raumtemperatur was eine schonende Anreicherung bedeutet. Außerdem kommen nur einfache Materialien wie z.B. Glaswaren zum Einsatz, so dass die Entwicklungs- und Betriebskosten vergleichsweise niedrig bleiben. Nicht zuletzt aus diesen Gründen, sondern auch weil auf Lösungsmittel verzichtet werden kann, gilt dieses Verfahren als nachhaltig. Es verläuft besonders effektiv bei niedrigen Ausgangskonzentrationen der wertgebenden Substanzen und kann sowohl im Batch- als auch im kontinuierlichen Modus eingesetzt werden. Die Effizienz bemisst sich anhand von Anreicherungsfaktoren (AF) und Ausbeuten, die über die Variation von Parametern wie u.a. pH Wert, Schäumungshilfsmittel, Dauer, Gasflussrate und Anlagendimensionen optimiert werden müssen. Zuerst werde ausgewählte Leitsubstanzen (etherische Öle und Polyphenole) in pflanzlichen Rosen-, Melissen-, Thymian und Lorbeerblattsäften gaschromatisch bestimmt und durch einfache Zerschäumung (im Batch-Modus) angereichert, um festzustellen wie sich die einzelnen Säfte dabei verhalten (Ansatz 1). Danach erfolgt die Zerschäumung durch tensidische Hilfsmittel (Ansatz 2). Schließlich sollen ausgewählte Polyphenole mit dem eigens entwickelten Pinzettenschäumungsverfahren, bei der durch synthetisierte Chelate die Substanzen noch selektiver in die Schaumphase transferiert werden können, angereichert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Nachdem die Zusammensetzung von Rosen-, Melissen-, Thymian- und Lorbeersaft analytisch mit hochauflösender Gaschromatographie erfasst wurde, erfolgten einfache Zerschäumungsversuche, in denen das Verhalten bzw. Tauglichkeit der einzelnen Säfte während des Verfahrens festgestellt werden sollte. Dabei lieferten Rosen- und Zitronenmelissensaft stabile Schäume über einen längeren Zeitraum hinweg (> 60 min). Für Thymiansaft konnte die Schaumstabilität nur über 15 min lang aufrechterhalten werden. Die Zerschäumung von Rosensaft lieferte die besten Ergebnisse bei pH 6,5 für cis-Rosenoxid, Farnesol, Linalool, Nerol und Methyleugenol. Bei pH 4,9 wurden cis-Hex-3-enol, 6-Methyl-5-hepten-on, Nerol, Geraniol, β -Caryophyllenoxid, Citronellol, Elemol und Geranial in Zitronenmelissensaft mit fast quantitativen Ausbeuten sowie mit Anreicherungsfaktoren von zwischen 8 und 10 angereichert. Für Thymiansaft konnte zwar Limonen mit 99 % Ausbeute isoliert werden, β -Cymen und Thymol jedoch nur mit je 22 und 18,4 % und vergleichsweise niedrigen AF Werten (zwischen 3 und 5). Die konzentrationsabhängigen Untersuchungen aller drei Säfte zeigten für Rosensaft bei den niedrigsten Konzentration die höchsten AF-Werte von respektive 22,1 und 23, was sich ebenfalls auf die Ausbeuten übertrug (80,45 % für Citronellol und 84,2 % für Geraniol). Die Zerschäumung von Geraniol und Geranial in Zitronenmelissensaft lieferte bei jeweils 105 und 205 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ die höchsten AF Werte von respektive 11,2 und 10,5 (bei höheren Konzentration fielen diese kontinuierlich ab). Ab 800 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ konnte für Geranial keine 100 %ige Ausbeute mehr erreicht werden kann, wohingegen für Geraniol die Ausbeute stetig fiel, nachdem sie für 105 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ noch bei 100 % lag. Dieser festgestellte Trend bestätigte sich ebenfalls für Thymiansaft, wobei hier für signifikant niedrige Konzentrationen von 11 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ für Limonen und 44 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ für Thymol die höchste Anreicherung erzielt wurde. Für Limonen bedeutete dies eine fast quantitative Anreicherung. Da sich Lorbeersaft ohne tensidische Hilfsmittel als nicht schaumfähig erwies, wurde anhand dieser Matrix getestet, mit welchen Tensiden (Natriumdocecylsulfat, Saponindepur oder Tween 20) sich ausgewählte Catechine als polyphenolische Substanzen am besten anreichern lassen. Vor allem Tween 20 lieferte vergleichsweise hohe Ausbeuten, die für (+)-Catechin und (-)-Gallocatechingallat sogar quantitativ verliefen. Die Anreicherungsfaktoren waren dabei ebenfalls hoch mit 21,27 für (+)-Catechin und 18,45 für (-)-Epicatechin. Auch Saponindepur kann für (+)-Catechin, (-)-Gallocatechingallat, (-)-Epigallocatechingallat und (-)-Epicatechin als Schäumungshilfsmittel eingesetzt werden. Für Natriumdodecylsulfat war dies jedoch nicht der Fall. Die Möglichkeit diese Polyphenole in Lorbeersaft mit dem eigens entwickelten Pinzettenschäumungsverfahren noch selektiver und damit effizienter anreichern zu können, wurde ebenfalls getestet. Die Komplexierung wurde für (-)-Epigallocatechingallat und (-)-Epicatechingallat verifiziert und geschah dabei mit Cu^{2+} und Fe^{3+} Ionen, wobei als tensidisches Schäumungshilfsmittel ADA-C8 (N-(2-Acetamido) Iminodiessigsäure-C8) diene. Unter Verwendung von $\text{Cu}^{2+}/\text{ADA-C8}$ als Komplexbildner konnten bei pH 5,0 die Catechine (+)-Catechin, (-)-Gallocatechingallat, (-)-Epigallocatechingallat, (-)-Epicatechin, (-)-Epicatechingallat und (-)-Epigallocatechin mit teilweise gesteigerten Anreicherungsfaktoren isoliert werden. Der höchste AF Wert von 32,7 wurde dabei für (+)-Catechin erzielt, zusammen mit einer quantitativen Ausbeute.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

- Vortrag: Sustainable Isolation of Valuable or Undesirable Substances Using Adsorptive Bubble Separation. Green Chemistry Symposium Helmholtz Zentrum München, 16. Oktober 2008
- Kolloquium: Isolierung und Anreicherung von biologisch aktiven Verbindungen mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse. Fakultät der Natur- und Ingenieurwissenschaften an der TU Dortmund, 7. November 2007

Fazit

Anhand eines umweltfreundlichen, alternativen Verfahrens, der Zerschäumungsanalyse, wurden eine Reihe von wertgebenden etherischen Ölen und Polyphenolen aus flüssigen Pflanzenextrakten wie Rosen, Zitronenmelisse, Thymian und Lorbeer mit hoher Effizienz angereichert. Das Verfahren erwies sich für ausgewählte Leitsubstanzen bei niedrigen Konzentrationen, mit ausgewählten Schäumungshilfsmitteln sowie unter Einsatz von speziell synthetisierten Komplexbildnern (Pinzettenschäumung) als besonders wirkungsvoll. Bedenkt man die geringe Umweltfreundlichkeit und/oder hohe Aufwendung von bisherig angewendeten Verfahren auf diesem Gebiet, so kann das diesbezüglich deutlich vorteilhaftere Verfahren der Zerschäumung als eine echte und ausbauwürdige Alternative angesehen werden.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
1. Kurzfassung	5
2. Ziele des Vorhabens	6
2.1 Stand des Wissens und Technik	6
2.1.1 Bisherige Verfahren zur Anreicherung von etherischen Ölen und Polyphenolen	6
2.1.1.1 Hochdruckextraktion mit Kohlendioxid	6
2.1.1.2 Lösungsmittlextraktion	7
2.1.2 Die Zerschäumungsanalyse	8
2.1.3 Einsatz der Zerschäumungsanalyse bzw. eigene Vorarbeiten.....	9
2.2 Basis der grundlegenden Ideen zur Erreichung der Projektziele	9
2.2.1 Problemstellung und Ansätze zur Lösung.....	10
3. Materialien und Methoden	12
3.1 Chemikalien und Lösungsmittel	12
3.2 Probenvorbereitung und Zerschäumung	14
3.3 Probenaufarbeitung für Aromastoffbestimmung	15
3.4 GC-MS-Analyse	15
4. Ergebnisse und Diskussion	16
4.1 Bestimmung der einzelnen Substanzen in den Proben	16
4.1.1 Rosen	16
4.1.2 Melisse	17
4.1.3 Thymian	19
4.2 Verhalten der Aromastoffe bei einmaliger Zerschäumung	20
4.2.1 Rosensaft	20
4.2.2 Zitronenmelissensaft	20
4.2.3 Thymiansaft	21
4.2.4 Fazit aus den Vorversuchen	21
4.3 Zerschäumungsversuche mit ausgewählten Leitsubstanzen	22
4.3.1 Rosensaft	22
4.3.2 Zitronenmelissensaft	26
4.3.3 Thymiansaft	29
4.4 Ansatz 2 – Isolierung etherischer Öle mit tensidischen Hilfsmitteln.	31
4.5 Ansatz 3 – Pinzettenzerchäumung von Polyphenolen	33
4.5.1 Komplexierung der Catechine (19 und 21) als Standards mit Cu ²⁺ Ionen.....	33
4.5.2 Zusätzliche Komplexierung des gebildeten Polyphenol-Cu ²⁺ Komplexes mit ADA-C8	34
4.5.3 Komplexierung der Catechine 19 und 21 als Standards mit Fe ³⁺ Ionen.....	35
4.5.4 Zerschäumungsexperimente mit Lorbeersaft und Cu ²⁺ /ADA-C8 Komplexen.....	35
5. Fazit	36
6. Literatur	40

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schema der kontinuierlichen Zerschäumungsapparatur.....	9
Abbildung 2. Prinzip der einfachen Pinzettenschäumung von Polyphenolmetallkomplexen.	12
Abbildung 3. Schema der verwendeten Zerschäumungsapparatur (vgl. Abbildung 1).	15
Abbildung 4. Zerschäumung von Rosensaft (pH abhängig); Anreicherungsfaktoren (AF) entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.	23
Abbildung 5. Zerschäumung von Rosensaft (konzentrationsabhängig), Anreicherungsfaktoren entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 6,5; Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.	25
Abbildung 6. Zerschäumung von Rosensaft (konzentrationsabhängig); Ausbeuten entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 6,5; Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.	25
Abbildung 7. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (pH abhängig); Anreicherungsfaktoren (AF) entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer: 60 min.	26
Abbildung 8. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (konzentrationsabhängig); Anreicherungsfaktoren (AF) der Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 4,9; Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.	28
Abbildung 9. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (konzentrationsabhängig); Ausbeuten entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 4,9; Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.	28
Abbildung 10. Zerschäumung von Thymiansaft (pH abhängig); Anreicherungsfaktoren (AF) entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen wie in Tabelle 10.	29
Abbildung 11. Zerschäumung von Thymiansaft (konzentrationsabhängig); Anreicherungsfaktoren entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 5,7; Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 mL/min; Dauer 15 min.	30
Abbildung 12. Zerschäumung von Thymiansaft (konzentrationsabhängig); Ausbeuten entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 5,7; Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 mL/min; Dauer 15 min.	31
Abbildung 13. Postulierte Komplexbildung von (-)-Epigallocatechingallat (19) mit Cu ²⁺ Ionen und anschließende Reaktion mit ADA-C8.	34
Abbildung 14. Zerschäumungsapparatur im halbtechnischen Maßstab. A: Vorlagebehälter, B: Gasanschluss mit eingebauter Fritte, C: Zerschäumungssäule, D: Behälter für bereits zerschäumte Flüssigkeit. Eine Rückführung der zerschäumten Flüssigkeit in den Vorlagebehälter für ein kontinuierliches Verfahren ist möglich. (Henderson Plastics Ltd., Dereham, Great Brittan)	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Pflanzen mit den zu extrahierenden etherischen Ölen und Polyphenolen.....	10
Tabelle 2. Identifizierte Verbindungen in Rosen (<i>Rosa damascena</i> Miller, Türkei, 2007).....	17
Tabelle 3. Zusammensetzung der <i>Melissa officinalis</i> L. Probe.....	18
Tabelle 4. Zusammensetzung von Thymian, bestimmt mit HRGC-MS.....	19
Tabelle 5. Zerschäumung von Rosensaft (pH 6,5); Ausgangsvolumen: 20 ml, N ₂ Volumenstrom: 19,8 ml/min, Dauer: 60 min.....	20
Tabelle 6. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (pH 4,9; Ausgangsvolumen: 20 ml; N ₂ Gasflussrate: 19,5 ml/min; Zerschäumungsdauer: 60 min).....	21
Tabelle 7. Zerschäumung von Thymiansaft (pH 5,7; Ausgangsvolumen: 20 ml; N ₂ Gasflussrate: 19,8 ml/min; Zerschäumungsdauer: 15 min).....	21
Tabelle 8. Zerschäumung von Rosensaft (pH 6,5), Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.....	24
Tabelle 9. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (pH 4,9); Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.....	27
Tabelle 10. Zerschäumung von Thymiansaft (pH 5,7; Ausgangsvolumen 20 mL, N ₂ Volumenstrom 19,8 mL/min; Dauer 15 min).....	30
Tabelle 11. Analytisch nachgewiesene Catechine und deren Konzentrationen.....	32
Tabelle 12. Anreicherungsfaktoren (AF) und Ausbeuten durch Zerschäumung von Lorbeersaft je nach Tensid (20 mg/L); pH 6,1–6,2; Mittelwert aus 2 Messungen.....	32
Tabelle 13. Anreicherung der Catechine 17–22 aus Lorbeersaft mit Hilfe der Pinzettenschäumung, unter Verwendung von Cu ²⁺ /ADA-C8 als Komplexbildner (pH 5,0; Ausgangsvolumen 20 ml; N ₂ Volumenstrom 19,8 ml/min; Dauer 10 min; Mittelwerte aus zwei Messungen).....	36

1. Kurzfassung

Die Isolierung von biologisch aktiven Verbindungen aus entsprechenden Pflanzenmaterialien geschieht meist durch Lösungsmittlextraktion. Bei der Aufreinigung der gewonnenen Substanzen kommen Lösungsmittel zum Einsatz, was erhebliche ökologische Nachteile mit sich bringt. Auch der Einsatz von Hochdruck-CO₂-Extraktion ist möglich, jedoch verbunden mit hohen Anschaffungs- und Unterhaltungskosten sowie hohen Anforderungen an das Personal.

Alternativ soll die Technik der Zerschäumungsanalyse eingesetzt werden, da sie als umweltfreundlich gilt und geringe Investitions- bzw. Instandhaltungskosten mit sich bringt. Eine große Anzahl von Naturstoffen kann so unter milden Bedingungen angereichert werden. Auch können unter Bedingungen der Lösungsmittlextraktion instabile Verbindungen unzersetzt isoliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum ersten Mal mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse eine Reihe von etherischen Ölen und antioxidativ wirkenden Polyphenolen aus vier relevanten Pflanzen – Rosen, Zitronenmelisse, Thymian und Lorbeerblätter – angereichert werden, um so neue Einsatzgebiete dieser umweltfreundlichen Technik auszuloten.

Zuerst sollten aromatisch wirksame Terpene aus diesen Pflanzen angereichert werden. Dies ist ohne Zusatz von Tensiden möglich, da die wässrigen Pflanzenextrakte ausreichend Oberflächenaktivität aufweisen und damit stabile Schäume bilden. Um die Extraktionsausbeuten erheblich zu steigern, sollten danach Experimente mit oberflächenaktiven Hilfsmitteln durchgeführt werden, wofür von unserer Arbeitsgruppe bereits gut untersuchte Verbindungen eingesetzt wurden. Diese können auch nach der Zerschäumung leicht wieder abgetrennt und für weitere Experimente neu eingesetzt werden.

Da die Zerschäumungsanalyse zur Anreicherung von unpolaren und semipolaren Verbindungen besonders gut geeignet ist, sollte überprüft werden, ob bei der Schaumextraktion neben etherischen Ölen auch Polyphenole in hohen Ausbeuten separiert werden können. Als letzter Schritt sollte die von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Pinzettenschäumung zum Einsatz kommen und zwar für Polyphenole, die mit Metallionen Chelate bilden können. Diese Komplexe können dann leicht in die Schaumphase transferiert werden, sodass die Polyphenole frei von allen anderen Pflanzenbestandteilen vorliegen.

Mit diesem Projekt sollte somit gezeigt werden, dass die Zerschäumungsanalyse eine echte, umweltfreundliche Alternative zu anderen Extraktionsmethoden darstellt, die zudem noch kostengünstig und einfach zu handhaben ist.

2. Ziele des Vorhabens

2.1 Stand des Wissens und Technik

2.1.1 Bisherige Verfahren zur Anreicherung von etherischen Ölen und Polyphenolen

Eine herkömmliche Methode zur Isolierung von etherischen Ölen und Polyphenolen ist neben der Wasserdampfdestillation die Lösungsmittlextraktion. Hierfür werden vorwiegend unpolare bzw. mittelpolare, mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel, eingesetzt. Die Lösungsmittlextraktion ist daher ökologisch bedenklich und gilt somit als nicht nachhaltig. Die Wasserdampfdestillation hat den Nachteil, dass unter praktischen Bedingungen mehrere aromatische Verbindungen vollständig zersetzt bzw. thermisch umgesetzt werden können. Alternativ dazu kommt die Hochdruck-CO₂-Extraktion zum Einsatz, die aber wegen ihrer aufwendigen Technologie hohe Anforderungen an Personal und Material stellt. Auch sind die Investitionskosten dieser Methode höher als für die Lösungsmittlextraktion. Diesbezüglich bringt die Zerschäumungsanalyse erhebliche Vorteile mit sich, auf denen im Folgenden eingegangen wird.

2.1.1.1 Hochdruckextraktion mit Kohlendioxid

Die Extraktion ist definitionsgemäß ein Trennverfahren, wonach bestimmte Substanzen aus festen oder flüssigen Gemischen mit Hilfe geeigneter Lösungsmittel (Extraktionsmittel) herausgetrennt werden, wobei jedoch zwischen dem Lösungsmittel und dem gelösten Stoff keine chemischen Reaktionen stattfinden soll. Für die HD-Extraktion bedeutet dies der Einsatz von überkritischen Gasen, wie Trifluormethan, Kohlendioxid, Ethan, Distickstoffmonoxid, Schwefelhexafluorid, Propen und Propan, die oberhalb eines kritischen Drucks bzw. Temperatur eine nur geringe gastypische Viskosität besitzen, aber eine vergleichsweise hohe von Flüssigkeiten entsprechende Dichte [Kessler, 1996]. Unter Verwendung von überkritischen Kohlendioxid als gebräuchlichstes Lösungsmittel werden hauptsächlich unpolare oder stark flüchtige Inhaltsstoffe aus verschiedenen Gewürzen und Heilpflanzen, wie z.B. Chili, Hopfen, Paprika, Pfeffer, Pfefferminze, Kamille, usw., im bereits industriellen Maßstab extrahiert. Als Beispiel für die Entfernung von unerwünschten Substanzen kann die Entcoffeinierung aus Kaffee oder Tee genannt werden [Stahl et al., 1982, 1987; Forster, 1991; Hartmann, 1993; Smith, 1996; Palmer, 1995].

Eine maximale Ausbeute kann im Allgemeinen nicht erreicht werden, da bereits gelöste Bestandteile wieder an die Matrix adsorbieren und sich ein Gleichgewicht zwischen gelösten und angelagerten Teilchen einstellen kann, das je nach Ausbildung entscheidend für den praktischen Erfolg der Extraktion ist. Ein wesentlicher Vorteil bei der HD-Extraktion ist die vollständige Verflüchtigung des Lösungsmittels Kohlendioxid nach Abscheidung der Extrakte, wobei das Problem der teils aufwendigen oder sogar nichtmöglichen Entfernung von Lösungsmittelrückständen, wie dies bei der Lösungsmittlextraktion der Fall ist, entfällt. Ebenfalls müssen im Gegensatz zur Lösungsmittlextraktion keine Schutzmaßnahmen im Umgang mit brennbaren Lösungsmitteln getroffen werden [Stumpf et al., 1992].

Die Nachteile der Hochdruck-Extraktion liegen zum Einen ihrem hohen Aufwand, was dementsprechend hohe Investitionskosten sowie anschließend hohe Betriebskosten verursacht. Für

einen einfachen Batchprozess müssen im Grunde genommen drei Prozessschritte zusammen geführt werden. So wird das Ausgangsmaterial in einen Extraktor mit dem Lösungsmittel in Verbindung gebracht, der Extrakt mit dem Lösungsmittel in einen Abscheider überführt (wobei der Extrakt entnommen wird) und anschließend das Lösungsmittel in einen wieder regeneriert, bevor es in den Extraktor wieder zurück geführt wird.

Die verdichteten Gase besitzen zudem ein vergleichsweise geringes Lösungsvermögen, weshalb große Volumina umgewälzt werden müssen. Außerdem kann es bei Mischungen unter hohen Drücken zu komplexen und undefinierbaren Phasenverhältnissen kommen, was die Findung der richtigen Verfahrensweise bezüglich Druck und Temperatur erschwert bzw. genauere Kenntnisse der Phasen bei den genannten Parametern erfordert, wofür eine Sichtzellenvorrichtung zum Einsatz kommt.

2.1.1.2 Lösungsmittlextraktion

Aus pflanzlichen Materialien, die nur einen geringen Gehalt an etherischen Ölen aufweisen, kann neben der CO₂-Extraktion ebenfalls die reine Lösungsmittlextraktion eingesetzt werden, um diese als natürlich geltenden Aromastoffe zu gewinnen. Für die Extraktion kommen unterschiedliche Solvents wie *n*-Hexan, Cyclohexan, Toluol, Benzol, Diethylether, Aceton, Dioxan, Essigsäureethylester (Ethylacetat), Acetonitril, Ethanol Methanol, Wasser, und Dimethylformamid, je nach Art der Gewürze und Fruchtextrakte, die es zu untersuchen gilt bzw. nach Polarität (eluotrope Reihe). Die Art und Weise, wie die Lösungsmittlextraktion zum Einsatz kommt ist damit stark Matrix- bzw. aromastoffabhängig. Je nachdem welche Aromafraktion gewonnen werden soll, schließen sich nach der Abtrennung des Lösungsmittels noch weitere Trennverfahren wie eine Chromatographie oder Gegenstromverteilung an.

Generell gilt es zwischen Flüssig-Flüssig- und Fest-Flüssig-Extraktion zu unterscheiden. Ersteres entspricht von der Definition her der klassischen Lösungsmittlextraktion von flüssigen Gemischen, und letzteres, wenn die Matrix in fester Form vorliegt (öhlhaltigem Saatgut) [Ziegler, 1998]. Im industriellen Maßstab können bei der Lösungsmittlextraktion bereits Volumina von mehreren 1.000 m³/h verarbeitet werden. Die Energiekosten können dabei gering gehalten werden, wenn bei Raumtemperatur gearbeitet wird (zumindest für Anlagen im Labor- bzw. Pilotmaßstab). Der Aufwand für eine Lösungsmittlextraktion ist jedoch ebenfalls beachtlich. So muss das Lösungs- bzw. Extraktionsmittel vom Extrakt getrennt werden, wofür eine Rektifikationsstufe nötig ist. Auch die Raffinatphase mit dem Trägerstoff muss nachbehandelt werden, da in ihr ebenfalls noch Lösungsmittelreste vorhanden sein können [Mersmann, 2006]. Wie praktisch bei allen Extraktionen nötig, verwendet auch die Lösungsmittlextraktion eine Regenerationsstufe für den Solvent, der danach wieder in den Prozess rückgeführt wird.

Problematisch ist die Lösungsmittlextraktion hinsichtlich des Rückstandes an Lösungsmitteln im Extrakt, was je nach Lösungsmittel und Verfahren in Kauf genommen werden muss und bezüglich der Menge nicht über den Angaben nach der Rückstands- bzw. Lösungsmittelhöchstmengenverordnung (LHmV) liegen darf. Halogenierte Kohlenwasserstoffe können als Rückstände in beispielsweise Futtermitteln auftauchen, wenn diese innerhalb eines Vorprozesses mit Lösungsmitteln behandelt worden sind, woraufhin diese Rückstände auch in tierische Lebensmittel migrieren können. Tetrachlorethylen, nach Extraktionsexperimenten mit Tierkörpermehl, das anschließend verfüttert

wurde, konnte als Rückstand im Fleisch, der Leber und in Eiern von Hühnern in Mengen zwischen 0,02 und 0,6 mg/kg nachgewiesen und damit ein Carry-over Effekt hin zu Lebensmitteln festgestellt werden [Pfannhauser, 1985].

Viele der aliphatischen chlorierten Kohlenwasserstoffe wurden früher im großen Umfang in der Lebensmittelindustrie zur Extraktion eingesetzt [Diehl, 2000]. Weil damals die Analysemethoden noch nicht soweit fortgeschritten waren, konnten diese Lösungsmittel nicht nachgewiesen werden, woraufhin die Anwendung für unbedenklich gehalten wurde. Fälle jedoch wie die Dürerer Krankheit, dessen Ursache dahin gehend aufgeklärt werden konnte, das Trichlorethylen mit Cystein in Sojaschrot reagiert und dabei S-(Dichlorvinyl)-l-cystein gebildet wird, was wiederum die Anämie verursachte, ließ die Anwendung von Lösungsmitteln in Frage stellen.

Zwar ist die Rückstandsproblematik von Lösungsmitteln in Lebensmitteln mit erheblich verbesserten Nachweismethoden und der Erlassung der Höchstmengeverordnung (LHMV, 25. Juli 1989) weitestgehend in den Griff bekommen worden, für die Umweltproblematik gilt dies jedoch noch nicht. Der Verbrauch an chlorhaltigen Lösungsmitteln (Perchlorethen, Trichlorethen, Trichlorethan, Methylenchlorid) in Deutschland belief sich im Jahr 1990 auf 100.000 Tonnen [Blumenthal, 1990]. Dies bedeutet für den Arbeits- und Umweltschutz einen erheblichen Aufwand, um Lösungsmittelabfälle sachgerecht zu entsorgen.

2.1.2 Die Zerschäumungsanalyse

Auf die Zerschäumungsanalyse wurde schon Anfang des 20. Jahrhunderts hingewiesen. Bereits 1920 ließ sich Ostwald ein Verfahren zum Verdampfen von Flüssigkeiten zur Anreicherung von gelösten oder emulgierten Stoffen durch Zerschäumung patentieren [Ostwald, 1920]. Er konnte schließlich zeigen, dass strukturell ähnliche Stoffe durch diese Methode quantitativ getrennt werden können [Ostwald, 1936 & 1937]. Bei der experimentellen Durchführung werden Gasblasen über das Einleiten eines inerten Gases (Luft, Stickstoff, Sauerstoff, CO₂ oder Edelgase) durch eine poröse Glasfritte erzeugt, die sich in einer mit den anzureichernden Substanzen stark verdünnten Lösung befindet. Im dadurch aufsteigenden Schaum entsteht eine gasflüssige Grenzschicht, an der die erwünschten Substanzen adsorbiert werden, was ebenfalls die Entwicklung des Schaums begünstigt. Drainage- und Koaleszenzeffekte, die in der Säule stattfinden, führen zu einer weiteren Aufkonzentrierung im Schaum, der letztendlich in rückverflüssigter Form die erwünschten Substanzen hoch konzentriert enthält [Lemlich, 1968]. Die Zerschäumung kann im Batch- aber auch im kontinuierlichen Modus durchgeführt werden. D.h. entweder wird ein bestimmtes Volumen einer Lösung vollständig oder durch einen kontinuierlichen Zulauf-Ablauf zerschäumt [Maas, 1974]. Letzteres erlaubt die Verarbeitung von größeren Volumina.

Die Wirtschaftlichkeit dieser Methode zeichnet sich durch die Verwendung einfacher Apparaturen sowie durch geringe Energie-, Investitions- und Betriebskosten aus [Uraizee, 1990; Brown, 1999 a & b]. Die Zerschäumungsanalyse verzichtet auf die Verwendung von Lösungsmitteln, was erheblich zur Umweltentlastung beitragen kann [Backleh-Sohrt, 2005]. Die richtige Wahl bzw. Einstellung der Versuchsparameter ermöglicht es, Substanzen selektiv und effektiv anzureichern [Loha, 1997; Weeks, 1992]. Ein weiterer Vorteil besteht in der schonenden Anreicherung von Substanzen, die hitze- und oxidationsempfindlich sind, da bei der Zerschäumung meist inerte Gase eingesetzt werden.

2.1.3 Einsatz der Zerschäumungsanalyse bzw. eigene Vorarbeiten

Die Einsatzgebiete der Zerschäumungsanalyse waren bisher vielfältig; so zum Beispiel zur Eliminierung von Schadstoffsubstanzen aus Abwässern [Hussenot, 1998], inklusive von Schwermetallen [Doyle, 2003], oder zur Anreicherung von Makromolekülen für pharmazeutische Zwecke [Crofcheck et al., 2003], um nur einige Beispiele zu nennen. Unsere Arbeitsgruppen haben sich in den letzten Jahren intensiv mit dieser Technik befasst: Backleh et al. (2003 a & b, 2004, 2005) haben eine Reihe von erwünschten und unerwünschten Substanzen aus pflanzlichen Extrakten angereichert bzw. eliminiert. Ekici et al. haben einzelne Proteinfractionen aus Molke separiert [Ekici et al., 2005]. Schließlich haben Gerken und Nicolai et al. Oxidoreduktasen und Insulin selektiv und effektiv gewinnen können [Gerken et al., 2005; Nicolai et al., 2008]. Gerken et al. (2006) konnten zudem mit Hilfe der kontinuierlichen Zerschäumung Laccase C in hohen Ausbeuten und Anreicherungen gewinnen.

2.2 Basis der grundlegenden Ideen zur Erreichung der Projektziele

Erstmalig sollte mit diesem Projekt die Zerschäumungsanalyse zur Extraktion von etherischen Ölen und Polyphenolen aus vier ausgewählten Pflanzenmaterialien eingesetzt werden. In einer Reihe von Experimenten sollte getestet werden, wie sich die Verbindungen möglichst selektiv und schließlich in reiner Form isolieren lassen. Dabei kommt eine Apparatur nach Abbildung 1 zum Einsatz. Diese Anordnung erlaubt es, entweder im kontinuierlichen Modus, oder im Batch-Modus zu verfahren, wobei die Lösung einfach und ohne Ablauf zerschäumt wird. Letzteres erlaubt eine standardisierte Verfahrensweise und damit die bessere Optimierung von Operationsparametern.

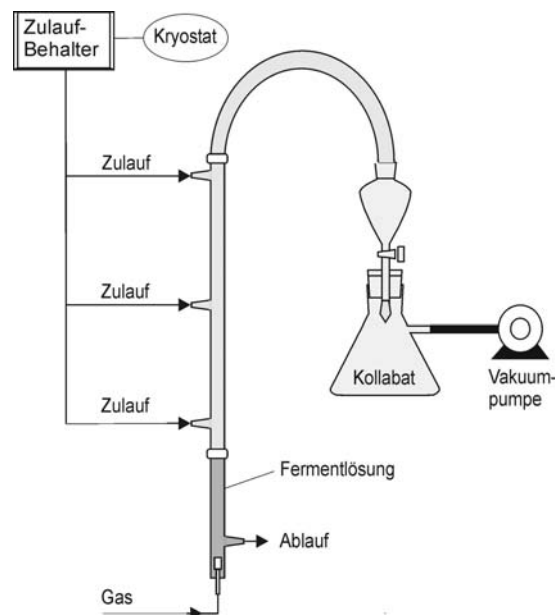


Abbildung 1. Schema der kontinuierlichen Zerschäumungsapparatur.

Die Apparatur besteht aus einer Glassäule, die am unteren Ende mit einer Glasfritte bestimmter Porosität bestückt ist. Durch diese Fritte wird Gas eingeleitet, welches dann durch eine bestimmte Menge an der zu untersuchenden Lösung strömt und diese zur Schäumung bringt. Der Schaum wird anschließend durch eine Vakuumpumpe zu dem so genannten Kollabat oder Spumat rückverflüssigt. Nach der Anreicherung kann die Ausgangslösung kontinuierlich abgeführt bzw. über einen Zulaufbehälter ersetzt werden, wobei der Füllstand über einen gewissen Zeitraum auf konstantem Niveau gehalten wird. Zu den wichtigsten Verfahrensparametern zählen: Ausgangsvolumen der Syntheselösung, Gasdurchflussrate, pH-Wert der Ausgangslösung sowie deren Temperatur, Art des zur Schaumbildung evtl. notwendigen Tensids, die Zerschäumungsdauer, Säulendimensionsgrößen und Porengröße der Glasfritte. Diese gilt es ständig zu optimieren, damit eine höchstmögliche Effizienz an Anreicherung erreicht werden kann. Die Effizienz wird über den Anreicherungsfaktor (AF) und die Wiederfindung bzw. Ausbeute wie folgt bestimmt:

$$AF = \frac{E_{C1}}{E_{C2}}$$

E_{C1} ist die Konzentration im Schaum
 E_{C2} ist die Konzentration in der Ausgangslösung

$$\text{Ausbeute} = \frac{E_{C1} \cdot V_f}{E_{C2} \cdot V_s} 100 \%$$

V_f ist das Volumen des Spumats (L)
 V_s ist das Volumen der Ausgangslösung (L)

2.2.1 Problemstellung und Ansätze zur Lösung

Über folgende Ansätze der Zerschäumungsanalyse sollten die etherischen Öle und Polyphenole aus vier unterschiedlichen Pflanzenmaterialien extrahiert werden, um die Bandbreite der Zerschäumungsanalyse weiter auszuleuchten.

Ansatz 1: Isolierung von etherischen Öle und Polyphenolen

Mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse sollten aus folgenden pflanzlichen Materialien die wertvollen Substanzen auf schonende Weise ohne Hilfsmittel extrahiert und angereichert werden (Tabelle 1).

Tabelle 1. Pflanzen mit den zu extrahierenden etherischen Ölen und Polyphenolen.

Pflanzen	Leitkomponenten der etherischen Öle	Bestimmung bzw. Bewertungsmethode	Polyphenole	Bestimmung bzw. Bewertungsmethode
Rosen	α - u. β -Pinen, cis-Rosenoxid, trans-Rosenoxid, Linalool, Citronellol, Geraniol, 2-Phenylethanol,	Multidimensionale Gaschromatographie-Sniffing-Massenspektroskopie (MD-HRGC-O-MS)	trans-Resveratrol, cis-Resveratrol, Rutin, Myricetin, Gallussäure	Kapillarelektrophorese (CEP), Neocuproin-Methode [Kupfer(II)-Neocuproin komplex]*

	Methyleugenol, Eugenol			
Zitronen- melisse	Linalool, Citronellol, Neral, Geraniol, Geranylacetat, β - Caroxphyllenoxyd	MD-HRGC-O-MS	Tannin, Nontannin	Ultraviolett-Visible- Spektroskopie (UV- VIS), Neocuproin- Methode
Thymian	γ -Terpinen, β -Cymen, Linalool, Borneol, Thymol, Carvacrol	MD-HRGC-O-MS	Dihydroxy- tri- & tetra- & penta- methoxyflavone	Hochdruckflüssigkeits- Chromatografie-UV- Detektor (HPLC-UV), HPLC-Fluoreszenz, Neocuproin-Methode
Lorbeer- blätter	Sabinen, 1,8-Cineol, Linalool, Bornylacetat, α -Terpinylacetat, Eugenol, Eugenolmethylester	MD-HRGC-O-MS	(-)-Epicatechin, (+)-Catechin, (+)-Gallocatechin, (-)-Epigallo- catechin	HPLC-Fluoreszenz, HPLC-MS, Neocuproin-Methode

* Apak et al., 2004

Dabei sollten zuerst die Terpene, wie sie in Tabelle 1 aufgelistet sind, direkt in die Schaumphase transferiert werden. Hierbei galt es zusätzlich festzustellen, ob die phenolischen, antioxidativ wirkenden Verbindungen (Tabelle 1) ebenfalls fraktioniert werden können.

Ansatz 2: Isolierung etherischer Öle mit tensidischen Hilfsmitteln

Hierbei sollte überprüft werden, ob bessere Ausbeuten durch den Einsatz von geeigneten Tensiden erreicht werden können. Sie haben den Vorteil, dass sie nach der Zerschäumung durch Änderung des pH-Werts abgetrennt werden können und somit für weitere Versuche wieder zur Verfügung stehen. Bei diesen Substanzen handelt es sich um die Verbindungen Natriumdodecylsulfat (SDS), Saponindepur und Tween 20.

Ansatz 3: Pinzettenschäumung von Polyphenolen

Mit Hilfe des eigens entwickelten Verfahrens der Pinzettenschäumungsanalyse werden Polyphenole, welche die strukturellen Voraussetzungen erfüllen, zuerst mit Metallionen in Analogien zu Gerken et al. (2005) komplexiert. Danach können mittels eines speziell synthetisierten Komplexbildners die Verbindungen an den Metallionen chelatisiert werden. Der so entstandene Komplex, der oberflächenaktiv ist, wird anschließend in die Schaumphase transferiert. Die Metallionen wiederum werden durch eine einfache Änderung des pH-Werts ausgefällt und die Verbindung mit dem Komplexbildner wird freigesetzt (Abbildung 2). Sowohl der Komplexbildner als auch die Metallionen können danach für weitere Zerschäumungsexperimente wieder eingesetzt werden (volles Recycling).

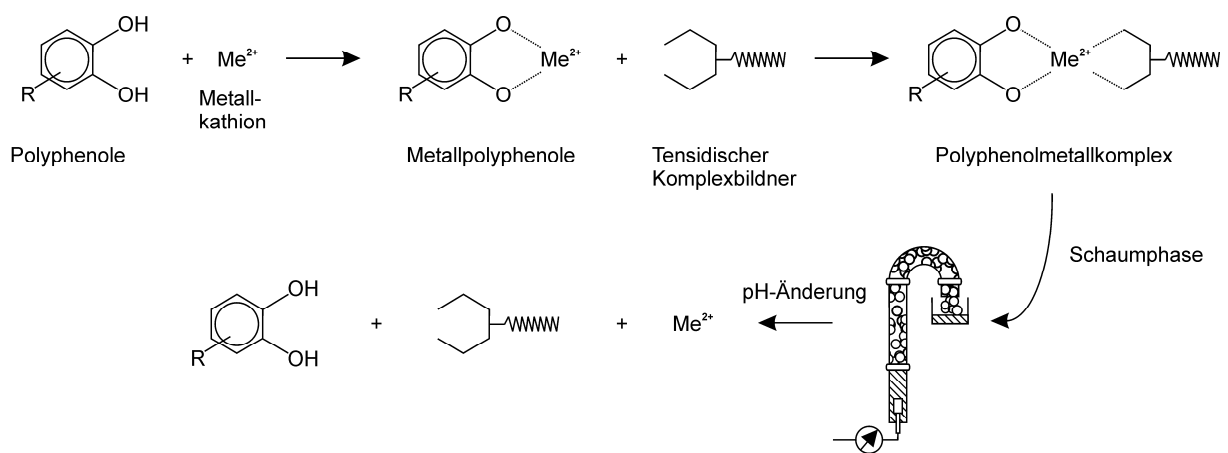


Abbildung 2. Prinzip der einfachen Pinzettenschäumung von Polyphenolmetallkomplexen.

Mit dieser Methode der Pinzettenschäumung sollten Flavone aus Thymian und Catechine aus Lorbeerblättern angereichert werden (vgl. Tabelle 1). Als Metallionen könne Fe^{2+} und Cu^{2+} verwendet werden sowie N-(2-Acetamido)-iminodiessigsäure-C8 (ADA-C8) Addukt als tensidischer Komplexbildner. Vorversuchsreihen mit solchen Metallchelaten lieferten bereits erfolgsversprechende Ergebnisse.

3. Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Für die Zerschäumung:

- Zerschäumungsgas: Stickstoff 5,0; Messer Griesheim GmbH

Für die Probenaufbereitung bei der HRGC/MS-Analyse:

- H₂O bidest.
- NaCl, puriss. p.a.; Fluka, gesättigte Lösung
- Dichlormethan, p.a., Merck
- Pentan, destilliert
- Na₂SO₄ wasserfrei, p.a., Merck

Für die Zuckerbestimmung:

- Natriumacetat 3 H₂O, p.a.
- Essigsäure 0,1 N
- α-Glucosidase (Maltase)

Test-Kombination Saccharose/D-Glucose enthaltend:

- Flasche 1 mit ca. 7,2 g Pulvergemisch; zusammengesetzt aus: Triethanolamin-Puffer, pH 7,6; NADP, 110 mg; ATP, 260 mg; Magnesiumsulfat; Stabilisatoren
- Flasche 2 mit 1,1 ml Enzymsuspension, zusammengesetzt aus: Hexokinase, ca. 320U; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, ca. 160U
- Flasche 3 mit ca. 0,5 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Citratpuffer, pH 4,6; β-Fructosidase, ca. 720U; Stabilisatoren

Für die Säurebestimmung:

- NaOH, p.a. Merck; 0,25 M

Untersuchungsmaterial:

- Rosenblätter, Thymian und Zitronenmelisse

Analytischer Standard:

- Hexansäuremethylester

Geräte:

- Haushaltssaftpresse
- Sieb
- Zerschäumungsapparatur mit Ventil und Flowmeter zur Gasregulierung

Zur Zerschäumung diene ein 1,50 m langes Glasrohr mit 2 cm Innendurchmesser, an dem oben ein Vorstoß und unten ein Ablasshahn zur Probenahme bzw. Restentleerung angebracht sind.

Eine Fritte (Porosität 3), die mittels eines Gewindes in die zerschäumende Flüssigkeit ragt, wird begast und der gebildete Schaum wird in einem Auffangbehälter, der in das der Vorstoß mündet, gesammelt und verflüssigt.

- Schütteltrichter (250 ml, 500 ml)
- Vigreux-Kolonne
- Aromakolben (25 ml mit Graduierung)
- pH-Meter

3.2 Probenvorbereitung und Zerschäumung

- Rosenblätter, Thymian und Zitronenmelisse wurden mit Hilfe der Saftpresse manuell gepresst und über einen Sieb von groben Bestandteilen getrennt. Jeweils 20 ml des Saftes wurden in die Zerschäumungsapparatur als Ausgangslösung eingebracht.

Säurebestimmung:

- Das Probenvolumen von 25 ml wurde mittels Vollpipette in ein Becherglas übergeführt. Die Glaselektrode des pH-Messgerätes wurde in die Probeflüssigkeit eingetaucht und unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers die pH-Messung durchgeführt. Mit Hilfe der Bürette wurde die Natriumhydroxid-Maßlösung zu titriert, bis ein pH-Wert von 8,1 erreicht wurde. Der Verbrauch an NaOH wurde notiert.

Berechnungsformel:

- $C(H^+) = 1000 \times V_1 \times c / V_0$

Wobei V_0 ist das Probenvolumen, V_1 der Verbrauch an NaOH, und C die Konzentration an NaOH in Mol je Liter.

Zerschäumung (Abbildung 3):

- Zu Beginn der Zerschäumung wurde Stickstoff durch die Fritte geleitet, um zu verhindern, dass diese durch die Versuchslösung verlegt bzw. verunreinigt wird. Dann wurde das graduierte Glasrohr mittels eines Schlauchtrichters mit der Probenflüssigkeit (Extrakt) gefüllt. Die Gasflussrate betrug 19,8 ml/min. Nach Beendigung der Zerschäumung läuft der gewonnene Rückstand über den Wechsel aus und der Stickstoffstrom wurde abgestellt. In den hierin beschriebenen Versuchen wurde im Batch-Modus verfahren, da hier unter einfachen und standardisierten Bedingungen gearbeitet werden kann und dies bestmöglich zu optimierten Ergebnissen führt.

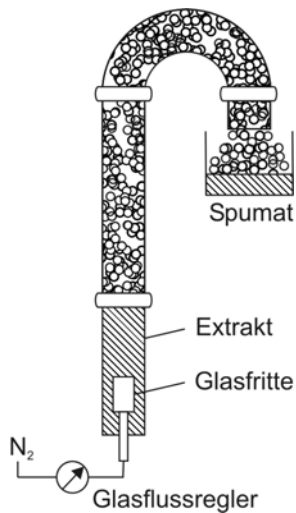


Abbildung 3. Schema der verwendeten Zerschäumungsapparatur (vgl. Abbildung 1).

3.3 Probenaufarbeitung für Aromastoffbestimmung

Herstellung der Standardprobe:

- Hexansäuremethylester (0,05 g) wurde zu 100 ml Pentan/Dichlormethan (2:1) gegeben. Die Standardprobe wurde als externer Standard eingespritzt, um die Peaks zu kontrollieren.

Herstellung der Proben unter Zusatz von Hexansäuremethylester als internen Standard:

- 10 ml + 10 ml ges. NaCl-Lösung + 0,005 g Standard
- 10 ml Rückstand + 10 ml ges. NaCl Lösung + 0,005 g Standard
- 5 ml Spumat + 5 ml ges. NaCl Lösung + 0,005 g Standard

Dreimal Ausschütteln mit je 90, 60 und 50 ml Pentan/Dichlormethan (2:1)

- Die erhaltenden organischen Extrakte der jeweiligen Proben wurden zusammengemischt und über Na_2SO_4 (wasserfrei) 15 min lang unter Rühren getrocknet, danach über einen Faltenfilter abfiltriert und mit jeweils 30 ml Lösungsmittel nachgespült. Die getrocknete wasserfreie Phase wurde danach schonend bei 40 °C im Wasserbad mittels Vigreux-Kolonne auf ca. 1 ml eingengt.

3.4 GC-MS-Analyse

- Massenspektrometer: Finnigan 8200, Magnetsektorfeldgerät
- Gaschromatograph: Hewlett Packard 5890 Series II
- Ionisierungsenergie: 70eV, Kathode 2A., Emission 1 mA, 3 kV

- Beschleunigungsspannung: 1,8 kV Multiplierspannung, Massenbereich 33-400 amu (1 sec/decade; 0,2 sec inter scan delay), Kalibrierung mit FC 43
- Bearbeitung der Massenspektren mit MASPEC Data System für Windows (MSS, Manchester), Vers.2.11., Nist-Library
- Trennsäule: Fused silica, quervernetzt SE 54; 30 m × 0,25 mm i.D., Filmdicke 0,25 µm
- Injektortemperatur: 260°C
- Transferline: 230°C
- Ionenquelle: 250°C
- Trägergas: Helium; 1,5 ml/min (60°C)
- Splitverhältnis: 1:10

Die Methoden zur Quantifizierung wurden im Vorfeld auf ihre Reproduzierbarkeit hin verifiziert (Standardabweichung der Methode). Bei den quantitativen Angaben handelt es sich um Mittelwerte aus 2-fach Bestimmungen mit jeweils nahezu identischen Werten. Bei abweichenden Werten wurde die Doppelbestimmung wiederholt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bestimmung der einzelnen Substanzen in den Proben

Als erstes wird auf die Bestimmung von etherischen Ölen und Polyphenolen in Rosen, Zitronenmelisse, Thymian und Lorbeerblätter sowie deren analytische Verifizierung eingegangen.

4.1.1 Rosen

Hierfür hat man sich auf die Rosensorte *Rosa damascena* Miller von der Familie *Rosaceae* beschränkt. Die Rosen wurden aus der Türkei im Jahr 2007 importiert und hatten im Vergleich zu den Rosen aus Marokko einen sehr intensiven Geruch. Zur Analyse wurden 500 g Rosenblätter zweimal mit Diethylether (je 100 ml) bei Raumtemperatur extrahiert. Die Extrakte wurden vom Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 25 °C befreit und mit HRGC-MS (DBS Säule, 30 m, 40 bis 200 °C Temperaturprogramm mit 10 °C/min, Trägergas N₂). Die wichtigsten Komponenten wurden identifiziert und quantifiziert. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 2. Identifizierte Verbindungen in Rosen (*Rosa damascena* Miller, Türkei, 2007).

Verbindung	Extrakt (%)	Verbindung	Extrakt (%)
Ethanol	2,0	Nonanal	0,10
Pentanol	0,15	Decanal	0,38
α + β -Pinen	0,49	Benzaldehyd	0,20
Sabinen	0,05	Linalool	1,50
Myrcen	0,32	α -Guaien	0,41
Heptanal	0,10	β -carophyllene	0,55
Limonen	0,10	Terpinen-4-ol	0,40
2-Methylbutanol	0,15	Citronellylacetat	0,60
3-Methylbutanol	0,21	α -Humulen	0,31
Cis-Rosenoxid	0,58	Neral	0,40
Trans-Rosenoxid	0,25	α -Terpineol	0,10
Geraniol	12,00	Citronellol	43,20
Heptadecan	11,54	Nonadecan	12,14

Vor allem Geraniol, Citronellol, Heptadecan und Nonadecan mit insgesamt fast 80 % der registrierten Substanzen, gilt es hier als wichtigste identifizierte Verbindungen in Rosenextrakt zu nennen.

4.1.2 Melisse

Melisse (*Melissa officinalis* L.) wurde vom Handel im Jahr 2007 bezogen. Auch hier wurden 500 g Melisse zweimal mit 1000 ml Diethylether bei Raumtemperatur extrahiert. Die Extrakte wurden vom Lösungsmittel unter vermindertem Druck befreit und unter den gleichen Bedingungen wie für den Rosenextrakt beschrieben mit HRGC-MS untersucht (Tabelle 3).

Tabelle 3. Zusammensetzung der *Melissa officinalis* L. Probe.

Verbindung	Extrakt (%)	Verbindung	Extrakt (%)
Cis-Hex-3-enol	0,05	Methylsalicylat	0,20
Benzaldehyd	0,03	Safranal	0,05
6-Methyl-5-hepten-on	7,00	δ -Terpineol	0,10
Octan-3-on	0,10	Cyclocitral	1,00
6-Methyl-5-hepten-ol	0,60	β -Citronellol	1,05
Anhydrolinalooloxid	0,05	Nerol	1,52
Limonen	0,21	Neral	20,50
Trans- β -ocimen	0,20	Geraniol	0,85
Cis-Linalooloxid	0,35	Geranial	27,10
Trans-Linalooloxid	0,20	Geranialacetat	2,63
Linalool	2,55	Eugenol	0,63
4-Isoprenylcyclohexanon	0,15	Eugenal	0,27
Cis-Rosenoxid	0,05	Nerylacetat	0,24
Trans-Rosenoxid	0,05	Damascenon	0,17
Photocitral	0,03	Humulen	0,15
Isogeranial	0,05	β -Curcumen	0,07
Pulegol	0,10	β -Ionon	0,55
Citronellal	5,52	β -Caroyphyllenoxid	9,20
Neroloxid	0,90	γ -Cadinen	0,41
Isopulegol	0,09	δ -Cadinen	0,40
		Hexahydrofarnesylaceton	0,22

Die wichtigsten Verbindungen sind 6-Methal-5-hepten-on, Linalool, Citronellal, Neral, Geraniol, Geraniolacetat und β -Caroyphyllenoxid, die über 70 % an registrierten Substanzen im Extrakt ausmachen.

4.1.3 Thymian

Thymian wurde ebenfalls vom Handel bezogen. Nach den Angaben stammte die Probe aus Spanien aus dem Jahr 2007. Auch hier wurden 500 g zweimal mit 1000 ml Diethylether bei 25 °C extrahiert und nach dem Einengen mit HRGC-MS analysiert (Bedingungen, siehe Rosenextrakt). Folgende Tabelle 4 zeigt die Zusammenstellung der Ergebnisse.

Tabelle 4. Zusammensetzung von Thymian, bestimmt mit HRGC-MS.

Verbindung	Extrakt (%)	Verbindung	Extrakt (%)
α -Pinen	1,05	Camphor	0,15
α -Thujen	0,70	Linalool	6,00
Camphen	0,84	(2)-Sabinenhydrat	0,14
β -Pinen	0,20	Bornylactetat	0,10
β -Caren	0,10	β -Caryphyllen	1,10
Myrcen	1,40	Methylcarvacrol	0,65
α -Phellendren	0,10	Terpinen-4-ol	1,17
1,8-Cineol	0,40	α -Terpineol	0,33
γ -Terpinen	3,65	Borneol	1,78
β -Cymen	22,50	δ -Cadineu	0,15
Terponden	0,15	Geraniol	0,30
(E)-Dabinenhydrat	0,67	Thymol	50,10
		Carvacrol	3,14

Die wichtigsten Verbindungen sind Thymol mit über 50 % gefolgt von β -Cymen mit 22,5 %, Linalool (6 %), Carvacrol (über 3 %) und schließlich γ -Terpinen mit 3,65 %.

4.2 Verhalten der Aromastoffe bei einmaliger Zerschäumung

4.2.1 Rosensaft

Rosensaft schäumt ohne Zusätze an Schaumbildnern und bildet verhältnismäßig stabile Schäume. In dem Vorversuch wurde so lange geschäumt, bis kein stabiler Schaum mehr gebildet wurde. Sowohl der Saft, Spumat und Rückstand wurden analytisch untersucht und quantitativ bewertet. Änderungen des pH Wertes haben nur Einfluss auf die Stabilität der Schäume; aromatische Verbindungen werden durch den pH-Wert kaum verändert. Alle Zerschäumungen wurden bei dem pH Wert des Safts durchgeführt (Rosensaft: pH 6,5; Thymian: pH 5,7 und Zitronenmelisse: pH 4,9). Die Ergebnisse dieser Vorversuche für Rosensaft sind in folgender Tabelle 5 zusammen gefasst.

Tabelle 5. Zerschäumung von Rosensaft (pH 6,5); Ausgangsvolumen: 20 ml, N₂ Volumenstrom: 19,8 ml/min, Dauer: 60 min.

Leitverbindung	Konzentration (µg/100 ml)			AF *	Ausbeute (%)
	Saft	Spumat	Rückstand		
Cis-Rosenoxid	15 ± 2	120 ± 10	n.n.	8,00	> 99,0
Citronellol	120 ± 15	1420 ± 120	22 ± 4	11,83	81,66
Geraniol	92 ± 11	1710 ± 150	10 ± 2	18,58	89,13
(2E,6E)-Farnesol	14 ± 2	210 ± 40	n.n.	15,00	> 99,0

* Anreicherungsfaktor: $C_{\text{Spumat}} / C_{\text{Saft}}$; n.n. nicht nachgewiesen

Aus diesen Daten geht hervor, dass eine fast quantitative Anreicherung der Leitverbindungen möglich ist. Die Anreicherungsfaktoren bewegen sich zwischen 8,0 und 18,58 und deuten darauf hin, dass die Zerschäumungsanalyse für Rosensaft zufriedenstellend abläuft.

4.2.2 Zitronenmelissensaft

Dieser Saft bildet sehr stabile und trockene Schäume. Die Ergebnisse dieser Vorversuche zeigen deutlich, dass die Leitverbindungen hervorragend angereichert werden können (Tabelle 6).

Tabelle 6. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (pH 4,9; Ausgangsvolumen: 20 ml; N₂ Gasflussrate: 19,5 ml/min; Zerschäumungsdauer: 60 min).

Leitverbindung	Konzentration (µg/100 ml)			AF *	Ausbeute (%)
	Saft	Spumat	Rückstand		
Cis-Hex-3-enol	4 ± 1	82 ± 8	n.n.	20,50	> 99,0
6-Methyl-5-hepten-on	29 ± 5	2700 ± 210	1,05 ± 0,1	93,10	96,55
Nerol	21 ± 3	224 ± 30	n.n.	10,66	> 99,0
Geraniol	210 ± 25	1820 ± 120	n.n.	8,66	> 99,0
β-Cerayphyllenoxid	80 ± 20	824 ± 48	1,56 ± 0,2	10,30	98,1

* Anreicherungsfaktor: $C_{\text{Spumat}} / C_{\text{Saft}}$; n.n. nicht nachgewiesen

4.2.3 Thymiansaft

Auch Thymiansaft bildet stabile Schäume, die sich aber nach ca. 15 min zurückbilden. Dies hat Auswirkungen auf die Anreicherungs-faktoren und Wiederfindungsraten. Die erzielten Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle 7 dargestellt. Somit ist es prinzipiell möglich, die Leitverbindungen aus Thymiansaft mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse anzureichern, allerdings sind sowohl die Anreicherungs-faktoren als auch die Ausbeuten (mit Ausnahme von Limonen) weniger zufriedenstellend.

Tabelle 7. Zerschäumung von Thymiansaft (pH 5,7; Ausgangsvolumen: 20 ml; N₂ Gasflussrate: 19,8 ml/min; Zerschäumungsdauer: 15 min).

Leitverbindung	Konzentration (µg/100 ml)			AF *	Ausbeute (%)
	Saft	Spumat	Rückstand		
Limonen	11 ± 3	43 ± 7	n.n.	3,90	99,0
β-Cymen	82 ± 8	410 ± 25	28 ± 6	5,00	22,0
Thymol	91 ± 10	270 ± 14	20 ± 4	2,96	18,4

* Anreicherungsfaktor: $C_{\text{Spumat}} / C_{\text{Saft}}$; n.n. nicht nachgewiesen

4.2.4 Fazit aus den Vorversuchen

Die Zerschäumung von Rosen- und Zitronenmelissensäften verlief mit jeweils hohen Anreicherungs-faktoren und teils quantitativen Ausbeuten, weil u.a. die Säfte stabile Schäume über einen längeren Zeitraum (60 min) bildeten. Für Thymiansaft konnte der Schaum nur über 15 min

aufrecht erhalten werden. Damit konnte Limonen zwar fast quantitative angereichert werden, war jedoch für zufriedene Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten von Cymen und Thymol unzureichend. Eine Begründung hierfür liefern die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser drei Substanzen: Limonen mit 4,57 besitzt einen wesentlich höheren log Kow Wert (Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient) als wie Cymen und Thymol [GESTIS Stoffdatenbank]. Letztere sind physikalisch-chemisch sehr ähnlich und weisen log Kow Werte von um 3,3 auf. Limonen ist damit im Vergleich wesentlich unpolarer was sich positiv auf die Zerschäumung auswirkt und eine schnelle Überführung in die Schaumphase ermöglicht [Backleh et al., 2005].

Für die instabilen Schaumverhältnisse von Thymiansaft können Matrixeffekte eine Rolle spielen, wofür jedoch noch genauere Untersuchungen nötig wären. Abhilfe kann die Anwendung von Schäumungshilfsmitteln schaffen (siehe Ansatz 2).

4.3 Zerschäumungsversuche mit ausgewählten Leitsubstanzen

Nachdem in den Vorversuchen die Tauglichkeit der einzelnen Säfte für die Zerschäumungsanalyse festgestellt werden konnte, folgten die anschließenden Experimente mit dem Ziel, einzelne Leitsubstanzen in Abhängigkeit vom pH-Wert und Konzentration als mitentscheidende Effizienzparameter mit höchstmöglichen Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten anzureichern bzw. zu isolieren [Backleh et al., 2003a, 2003b; Backleh-Sohrt et al., 2005]. Die Zerschäumungsversuche erfolgten dabei im Batchmodus, d.h. die Zerschäumung verlief statisch, ohne kontinuierliche Zufuhr der Ausgangslösung, über einen abgeschlossenen Zeitraum, da hier unter standardisierten Bedingungen gearbeitet und dabei bestmögliche Resultate erzielt werden können.

4.3.1 Rosensaft

Da aus Erfahrung heraus der pH-Wert ein entscheidender Parameter für die erfolgreiche Durchführung der Zerschäumungsanalyse ist, wurde dieser in einfachen Schritten variiert und dessen Abhängigkeit anhand von vorerst drei Leitsubstanzen in Rosensaft getestet. Unter den angegebenen Zerschäumungsbedingungen ergaben sich für cis-Rosenoxid (**1**), Citronellol (**2**) und Linalool (**6**) die jeweils höchst möglichst ermittelten Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten bei pH 6,5; bei höheren bzw. niedrigeren pH Werten nahmen die jeweiligen Effizienzwerte ab (Abbildung 4).

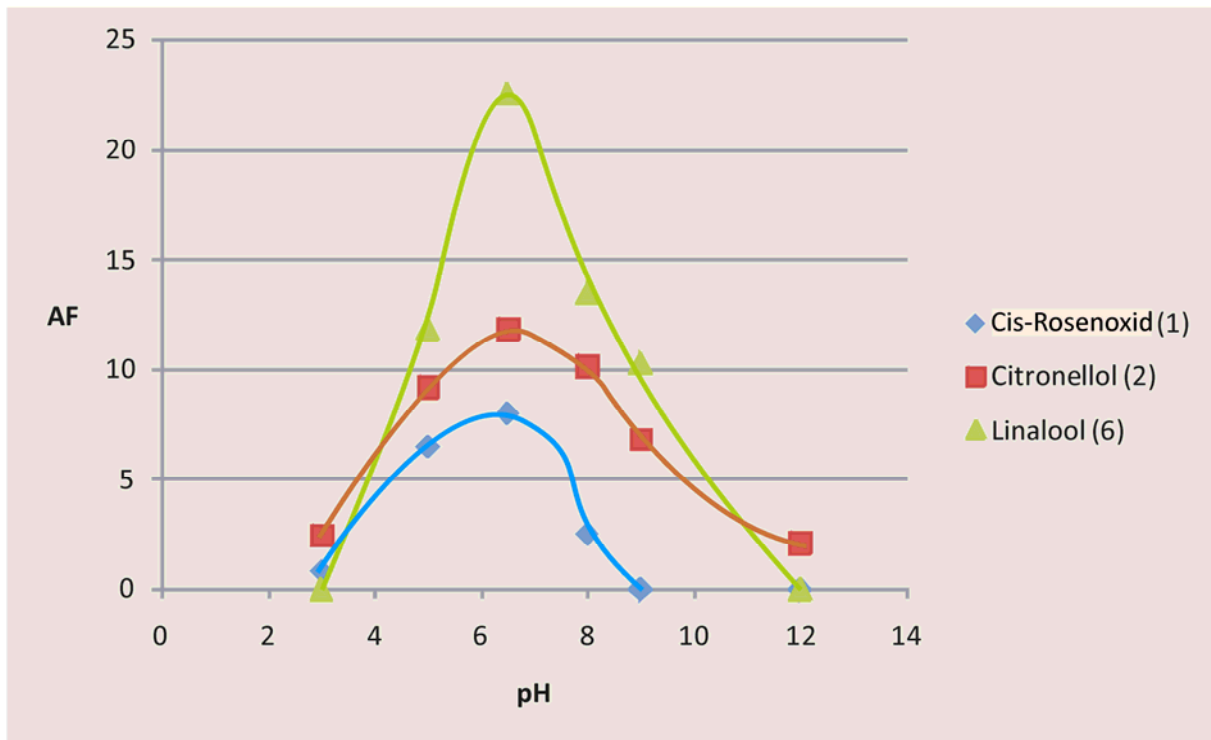


Abbildung 4. Zerschäumung von Rosensaft (pH abhängig); Anreicherungsfaktoren (AF) entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.

Substanzen die sich mit ihrem pH Wert am isoelektrischen Punkt befinden, besitzen im wässrigen Medium die geringste Löslichkeit und sind damit effektivsten anreicherbar. Die gilt für Proteine gleichermaßen wie für Naturstoffe [Chai et al., 1998; Ko et al., 1998; Uriazee, 1995; Loha, 1997; Desouza und Tanner, 1991; Prokorp, 1993; Backleh et al., 2005]. Der pH-Wert wirkt sich damit unmittelbar auf die Löslichkeit aus und bewirkt entweder eine gesteigerte oder verminderte Anreicherung, je nachdem ob mehr im alkalischen oder sauren Milieu gearbeitet wird. Hier verblieben die Verbindungen durch leichtes ansäuern stabil, woraufhin sie mit gesteigerten Effizienzwerten angereichert werden konnten.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die folgenden Experimente für die weiteren in Rosensaft bestimmten Substanzen bei pH 6,5 durchgeführt, mit den Ergebnissen, die in Tabelle 8 für alle Substanzen zusammengefasst sind.

Tabelle 8. Zerschäumung von Rosensaft (pH 6,5), Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.

Verbindung	Konzentrationen in µg/100 mL			AF *	Ausbeute (%)
	Saft	Spumat	Rückstand		
Cis-Rosenoxid (1)	15 ± 2	120 ± 10	n.n.	8	> 99,0
Citronellol (2)	120 ± 15	1420 ± 120	22 ± 4	11,83	81,66
Geraniol (3)	92 ± 11	1710 ± 150	10 ± 2	18,58	89,13
2E,6E-Farnesol (4)	14 ± 2	210 ± 40	n.n.	15	> 99,0
Nonadecan (5)	32 ± 4	420 ± 60	12 ± 3	13,1	72,54
Linalool (6)	2 ± 1	45 ± 5	n.n.	22,5	> 99,0
Nerol (7)	17 ± 3	205 ± 45	n.n.	12,05	> 99,0
Methyleugenol (8)	3 ± 1	62 ± 7	n.n.	20,66	> 99,0

* Anreicherungsfaktor: $C_{\text{Spumat}} / C_{\text{Saft}}$; n.n. nicht nachgewiesen

Aus Tabelle 8 lässt sich erkennen, dass einige Leitsubstanzen (**1, 4, 6–8**) quantitativ und teilweise mit hohen Anreicherungs Faktoren von über 20 isoliert werden können (kein Nachweis mehr im Rückstand möglich), was sich mit deren unpolaren Eigenschaften und damit vereinfachter Übertrag in die Schaumphase begründen lässt. Diskrepanzen zwischen den beiden Effizienzwerten sind jedoch für **1, 2, 5** und **7**, im Vergleich zu **3, 4, 6** und **8**, die hohe AF-Werte und gleichzeitig hohe Ausbeuten aufweisen, festzustellen. Hierfür können evtl. separierte Spumatvolumina, unterschiedliche Ausgangskonzentrationen bzw. Matrixfaktoren sowie analytische Unsicherheiten verantwortlich gemacht werden.

Im Folgenden sollte der Einfluss der Konzentration auf die Anreicherungs Faktoren und Ausbeuten einzelner Leitsubstanzen ermittelt werden, da bekannt ist, dass die Zerchäumungsanalyse besonders bei niedrigen Ausgangskonzentrationen effizient verläuft. Dieser Zusammenhang wird im Folgenden ebenfalls für die Anreicherungs Faktoren und Ausbeuten der untersuchten Leitsubstanzen Citronellol (**2**) und Geraniol (**3**) untersucht (Abbildung 5 und 6).

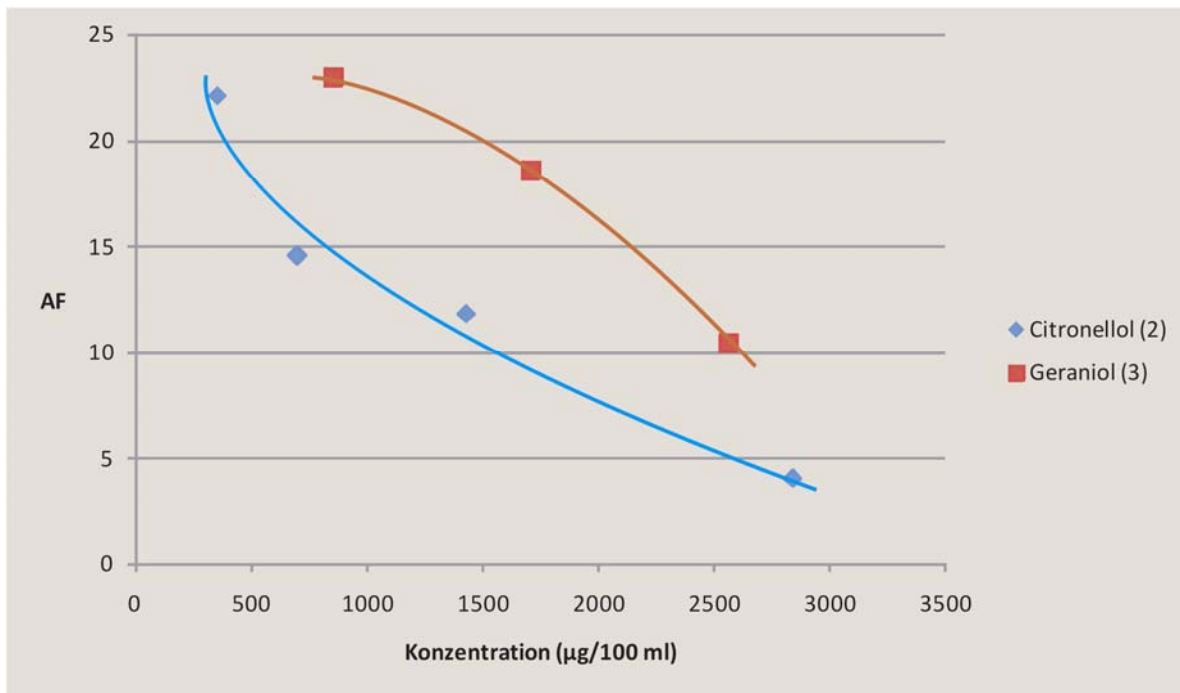


Abbildung 5. Zerschäumung von Rosensaft (konzentrationsabhängig), Anreicherungsfaktoren entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 6,5; Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.

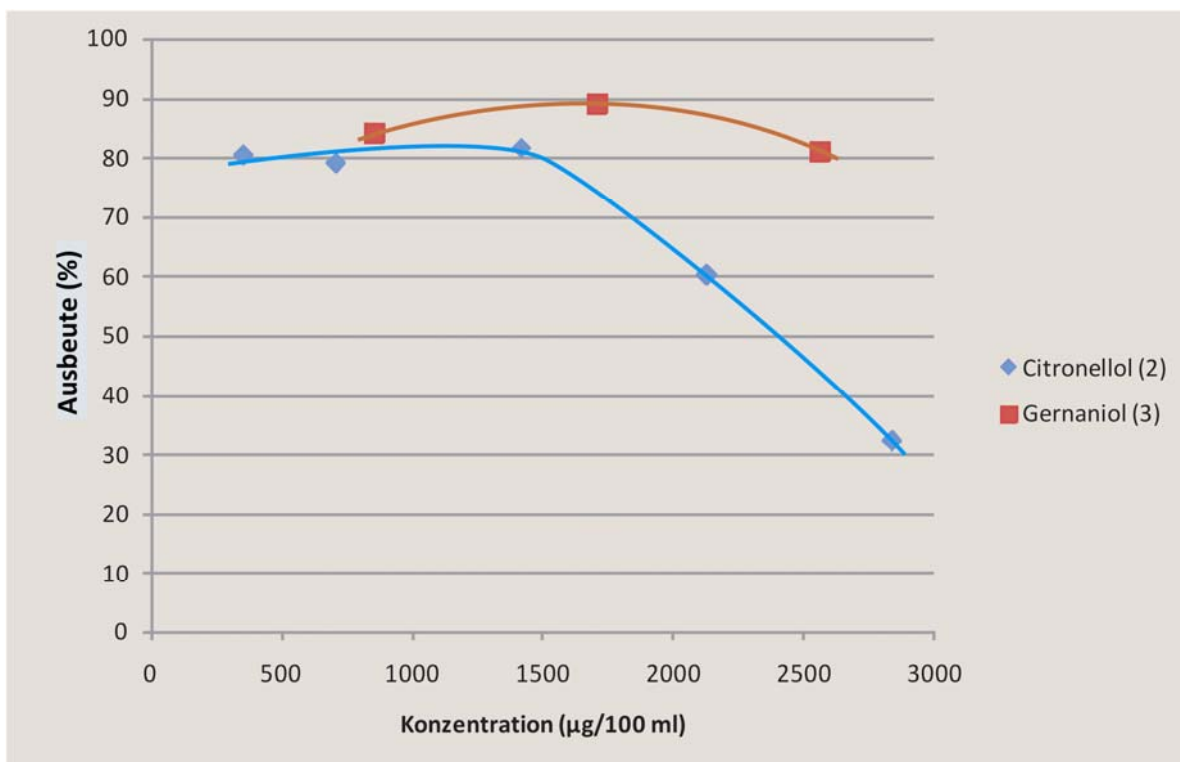


Abbildung 6. Zerschäumung von Rosensaft (konzentrationsabhängig); Ausbeuten entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 6,5; Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.

Wie anhand des Gibbs'schen Adsorptionstheorems erkennbar ist [Maas, 1974], beruht die Anreicherung von oberflächenaktiven Verbindungen mittels der Zerschäumungsanalyse auf der Erniedrigung der Oberflächenspannung der Lösungen. Nach dem Theorem lässt sich ein Zusammenhang zwischen Oberflächenspannung und Tensidkonzentration ableiten. Demnach ist die Konzentration an der Grenzfläche gas/flüssig bei einer möglichst großen Oberflächenspannung am größten, wenn die Substanz in einer möglichst geringen Ausgangskonzentration vorhanden ist [Maas, 1974; Karger und DeVivo, 1968]. Die Zerschäumungsanalyse verläuft damit am effektivsten, wenn die Ausgangskonzentration c der zu untersuchenden Substanz besonders niedrig ist.

$$\Gamma = \frac{c}{RT} \times \frac{d\gamma}{dc}$$

Gibbs Adsorptionstheorem; mit c gleich der Konzentration der oberflächenaktiven Verbindung in der Lösung, Γ der Konzentration der oberflächenaktiven Verbindung an der Grenzfläche gas/flüssig, γ der Oberflächenspannung, R der Gaskonstanten und T der Temperatur.

4.3.2 Zitronenmelissensaft

Die pH abhängigen Zerschäumungen von Zitronenmelissensaft ergaben für die Anreicherungsfaktoren der Leitsubstanzen β -Caryophyllenoxid (**11**) und Geranial (**13**) einen optimalen pH Wert von 4,9 mit jeweils 10,3 und 7,85 (Abbildung 7).

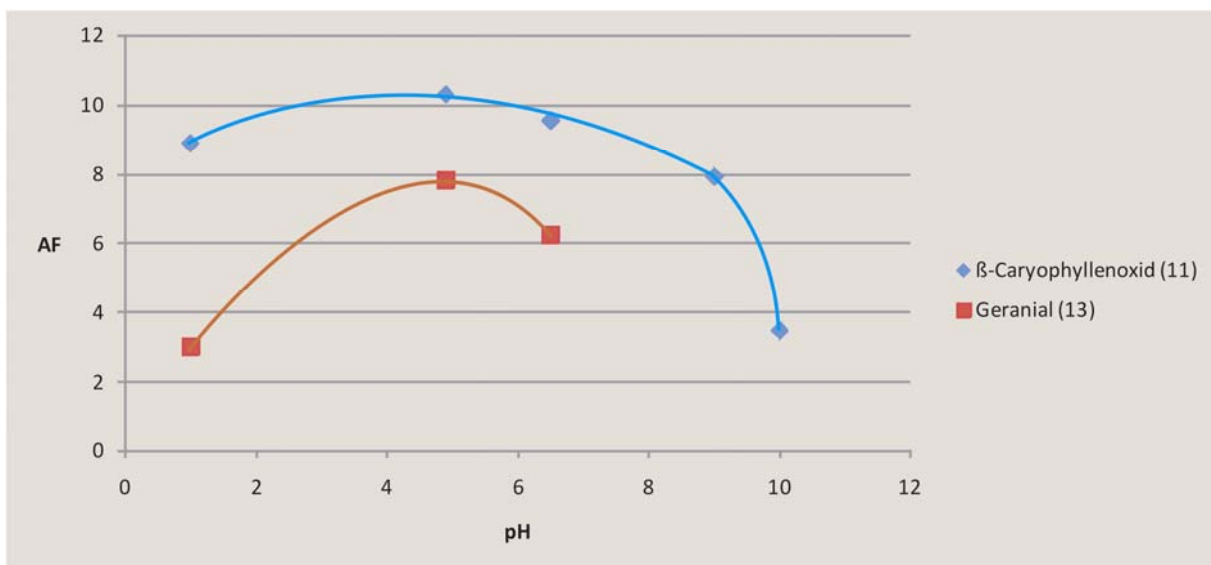


Abbildung 7. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (pH abhängig); Anreicherungsfaktoren (AF) entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.

Für alle Substanzen in Zitronenmelissensaft ergaben sich bei diesem pH Wert und den angegebenen Versuchsbedingungen quantitative Ausbeuten sowie für cis-Hex-3-enol (**9**) ein vergleichsweise hoher Anreicherungsfaktor von 20,5 (Tabelle 9). Auch hier können die unpolaren Eigenschaften der Verbindungen als Grund für die sehr effektive Isolierung mittels der Zerschäumung genannt werden.

Tabelle 9. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (pH 4,9); Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.

Substanz	Konzentration (µg/100 mL)			AF*	Ausbeute (%)
	Saft	Spumat	Rückstand		
Cis-Hex-3-enol (9)	4 ± 1	82 ± 8	n.n.	20,5	> 99,0
6-Methyl-5-hepten-on (10)	29 ± 5	2700 ± 210	1,05 ± 0,1	93,1	> 99,9
Nerol (7)	21 ± 3	224 ± 30	n.n.	10,66	> 99,0
Geraniol (3)	210 ± 25	1820 ± 120	n.n.	8,66	> 99,0
β-Caryophyllenoxid (11)	80 ± 20	824 ± 48	1,56 ± 0,2	10,3	99,8
Citronellol (2)	80 ± 40	320 ± 6	n.n.	4	> 99,0
Elemol (12)	2 ± 1	16 ± 2	n.n.	8	> 99,0
Geranial (13)	820 ± 80	6400 ± 90	18 ± 6	7,8	99,7

* Anreicherungsfaktor: $C_{\text{Spumat}} / C_{\text{Saft}}$; n.n. nicht nachgewiesen

In den konzentrationsabhängigen Untersuchungen wurden die höchsten Anreicherungsfaktoren für die Leitsubstanzen Geraniol (**3**) und Geranial (**13**) bei jeweils 105 µg/100 ml und 205 µg/100 ml ermittelt, mit respektive 11,2 und 10,5 (Abbildung 8). Bei höheren Konzentration der beiden Verbindungen vielen die AF-Werte kontinuierlich ab.

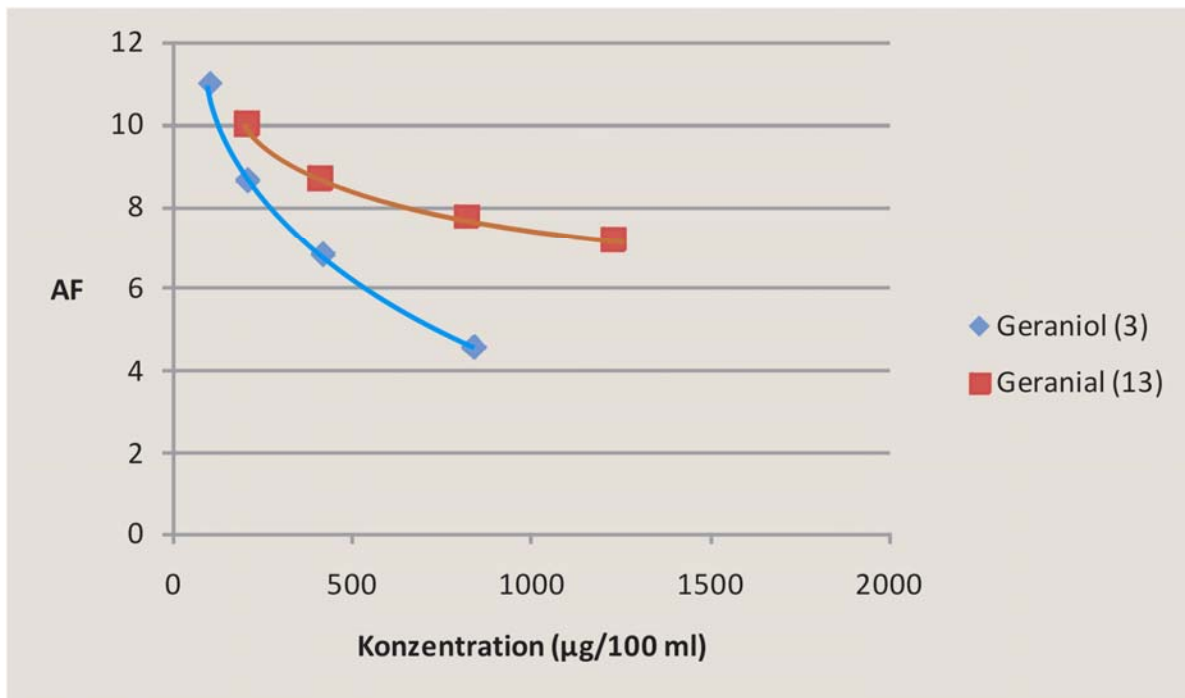


Abbildung 8. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (konzentrationsabhängig); Anreicherungsfaktoren (AF) der Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 4,9; Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.

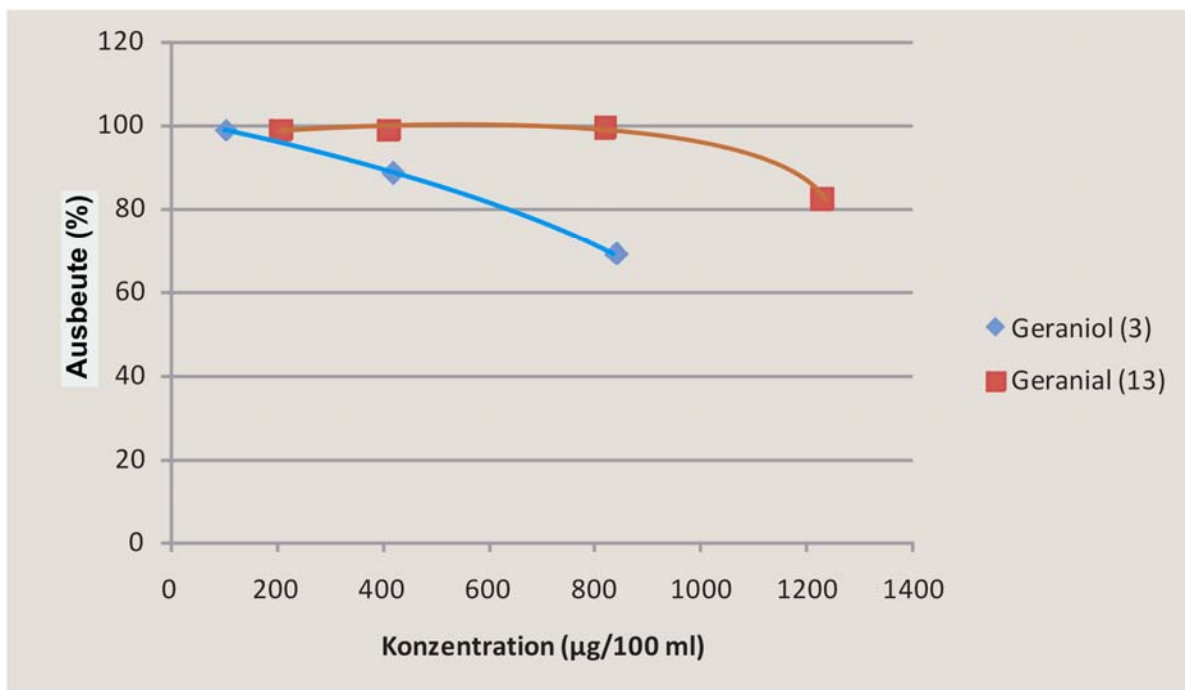


Abbildung 9. Zerschäumung von Zitronenmelissensaft (konzentrationsabhängig); Ausbeuten entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 4,9; Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 ml/min, Dauer 60 min.

Für die Ausbeuten zeigt sich dieser Trend für **13** erst ab 800 µg/100 ml, wobei keine 100 %ige Ausbeute mehr erreicht werden kann, wohingegen für **3** die Ausbeute stetig absteigt, nachdem sie für 105 µg/100 ml noch bei 100 % lag (Abbildung 9).

4.3.3 Thymiansaft

Anhand der Leitsubstanzen Limonen (**14**) und Thymol (**16**) in Thymiansaft wurde ein pH Wert von 5,7 für optimale Werte von Anreicherung und Ausbeute ermittelt (Abbildung 10). Für **14** ergab sich dabei eine AF Wert von 3,9 und für **16** einer von 2,96. Wie Tabelle 10 zeigt konnte ein noch höherer Anreicherungsfaktor von 5 für β-Cymen (**15**) erreicht werden. Viel die Ausbeute von **14** unter den angegebenen Bedingungen noch quantitativ aus, war dies für die anderen beiden Leitsubstanzen **15** und **16** nicht der Fall, was auf die instabilen Schaumverhältnisse nach 15 min Zerschäumungsdauer zurück geführt werden kann. Für die technologisch wichtige Substanz Limonen reichten die gegebenen Verhältnisse für eine vollständige Isolierung jedoch aus.

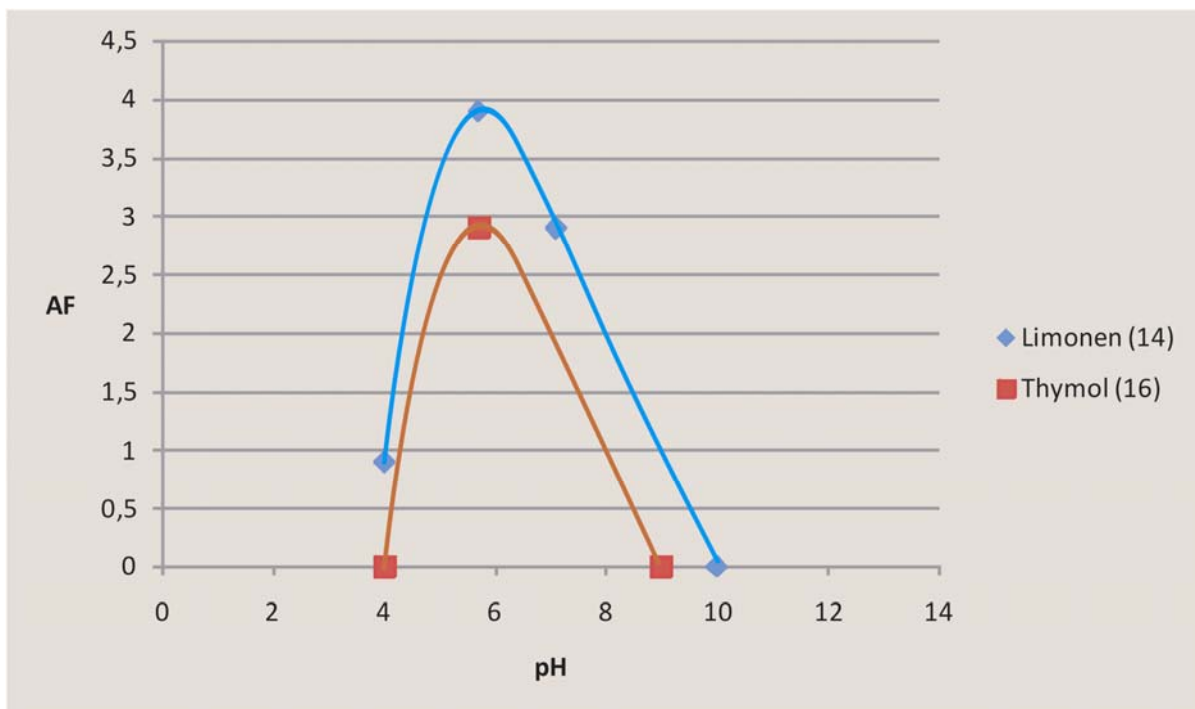


Abbildung 10. Zerschäumung von Thymiansaft (pH abhängig); Anreicherungsfaktoren (AF) entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen wie in Tabelle 10.

Tabelle 10. Zerschäumung von Thymiansaft (pH 5,7; Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 mL/min; Dauer 15 min).

Substanz	Konzentration (µg/100 mL)			AF *	Ausbeute (%)
	Saft	Spumat	Rückstand		
Limonen (14)	11 ± 3	43 ± 7	n.n.	3,9	99
β-Cymen (15)	82 ± 8	410 ± 25	28 ± 6	5	22
Thymol (16)	91 ± 1	210 ± 14	20 ± 4	2,96	18,4

* Anreicherungsfaktor: $C_{\text{Spumat}} / C_{\text{Saft}}$

Wie bereits in den vorherigen Versuchen mit Rosen- und Limonensaft gezeigt wurde, vielen die Anreicherungs-faktoren der Leitsubstanzen **14** und **16** nach ansteigenden Konzentrationen ebenfalls stetig ab. Bemerkenswert hier sind die vergleichsweise hohen AF Werte bei den signifikant niedrigen Konzentrationen von 11 µg/100 ml für **14** (AF = 3,9) und 44 µg/100 ml für **16** (AF = 4,0) (Abbildung 11). Wie aus Abbildung 12 ersichtlich bedeutete dies für Limonen eine fast quantitative Anreicherung (99 %), was eindrucksvoll die Stärke der Zerschäumungsanalyse beweist, wenn die Verbindungen in sehr niedrigen Ausgangskonzentrationen vorliegen.

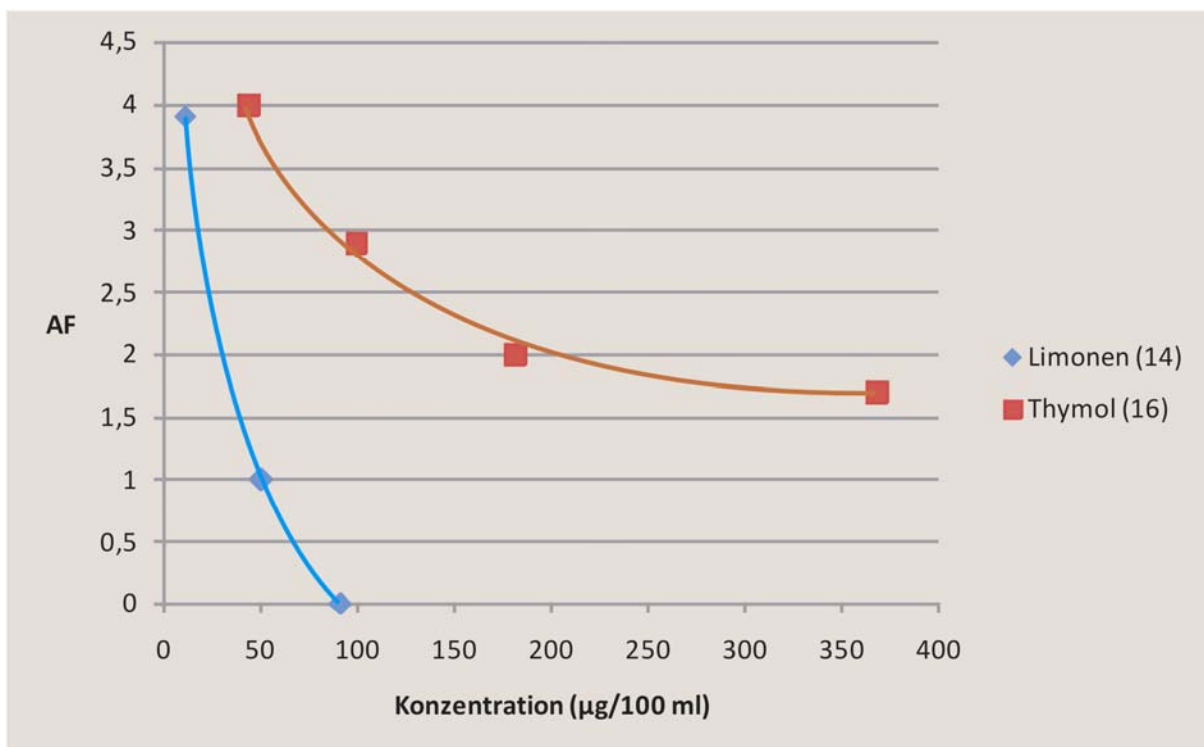


Abbildung 11. Zerschäumung von Thymiansaft (konzentrationsabhängig); Anreicherungs-faktoren entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 5,7; Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 mL/min; Dauer 15 min.

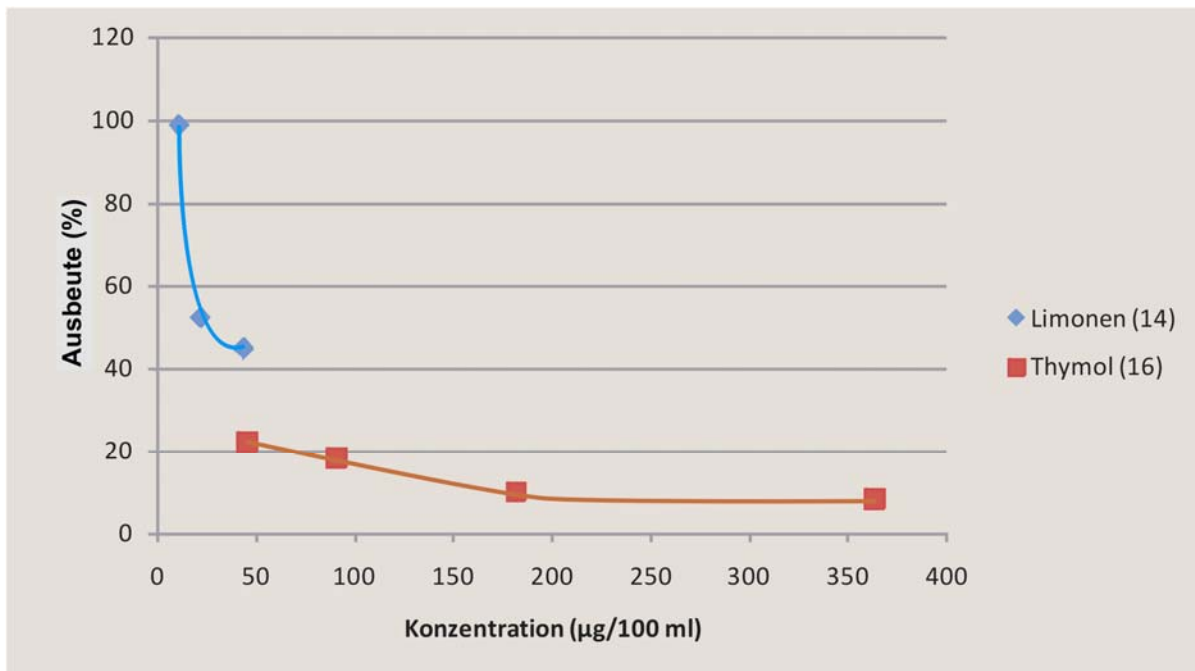


Abbildung 12. Zerschäumung von Thymiansaft (konzentrationsabhängig); Ausbeuten entsprechender Leitsubstanzen; Bedingungen: pH 5,7; Ausgangsvolumen 20 mL, N₂ Volumenstrom 19,8 mL/min; Dauer 15 min.

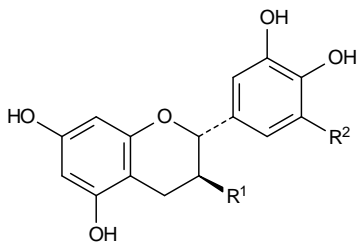
4.4 Ansatz 2 – Isolierung etherischer Öle mit tensidischen Hilfsmitteln.

Da die Zerschäumung von Rosen-, Zitronen- und Thymiansaft auch ohne Zusatz von Hilfsmitteln zu guten Ergebnissen führte, konzentrierte man sich hier auf Lorbeerblattsäfte, wobei auf die Bestimmung von Aromastoffen verzichtet wurde, weil sie in den wässrigen Extrakten nur in Spuren vorkommen. Dagegen sind die Polyphenole, zu denen die pharmakologisch wertvollen Catechine zählen, stark vertreten.

Da Lorbeersaft ohne Schäumungshilfsmittel keinen stabilen Schaum bildet mussten Tenside eingesetzt werden, wobei auf Natriumdodecylsulfat (SDS), Saponindepur und Tween 20 zurückgegriffen wurde. Zuerst wurden 2000 g frische Lorbeerblätter Provinz Barta (Türkei) entsaftet, woraufhin 170 mL ein schwach grün gefärbter Saft erhalten wurde. Nach Abfiltrieren durch einen Faltpfilter wurden 155 mL schmutzfreier Lorbeersaft erhalten.

Der Saft wurde 10-fach verdünnt, um mittels HPLC-UV-DAD die Catechine zu quantifizieren (HPLC Säule: Kromasil 100 C8, 5 µm, 250 × 4,6 mm, Knauer Berlin, 20 °C, 20 µL Sample Loop, mobile Phase: Gradient: A = Essigsäure (2 %) – B = Acetonitril (100 %)). Folgende Catechine wurden nachgewiesen und quantifiziert (Tabelle 11):

Tabelle 11. Analytisch nachgewiesene Catechine und deren Konzentrationen.



Verdingung	R ¹	R ²	Konzentration (mg/L)
(+)-Catechin (17)	exo-OH	H	20,1 ± 1,3
(-)-Gallocatechingallat (18)	exo-O-gallat	OH	152,2 ± 5,8
(-)-Epigallocatechingallat (19)	endo-O-gallat	OH	310,4 ± 10,2
(-)-Epicatechin (20)	endo-OH	H	100,1 ± 4,3
(-)-Epicatechingallat (21)	endo-O-gallat	H	99,7 ± 4,1
(-)-Epigallocatechin (22)	endo-OH	OH	62,2 ± 3,8

Für die Schäumungsexperimente wurde ein 10-fach verdünnter Lorbeersaft eingesetzt. Danach wurde SDS, Saponindepur und Tween 20 mit jeweils 20 mg/L zu dosiert, wobei bei allen dreien Schäumungshilfsmitteln stabile Schäume erhalten wurde. Die Zerschäumungen wurden unter standardisierten Bedingungen (Ausgangsvolumen: 20 mL, N₂ Volumenstrom: 19,8 ml/min, Dauer: 60 min) durchgeführt. Der pH Wert der Lösungen wurde nicht variiert, da es nach kleinen Veränderungen zur Zerstörung der Lamellen kam.

In der folgenden Tabelle 12 sind die Ergebnisse je nach verwendetem Schäumungshilfsmittel aufgeführt.

Tabelle 12. Anreicherungsfaktoren (AF) und Ausbeuten durch Zerschäumung von Lorbeersaft je nach Tensid (20 mg/L); pH 6,1–6,2; Mittelwert aus 2 Messungen.

Tensid	Catechin-No.*	Konzentration (µg/100 ml)			AF **	Ausbeute (%)
		Saft	Spumat	Rückstand		
Natriumdodecylsulfat (SDS)	17	200	110	126	5,5	37
	18	1520	n.n.	1520	1,0	0
	19	3100	n.n.	3100	1,0	0
	20	1000	4210	625	4,2	37,5

	21	990	n.n.	990	1,0	0
	22	620	n.n.	620	1,0	0
Saponindepur	17	200	855	38	4,27	81,0
	18	1520	4800	216	3,15	85,7
	19	3100	9210	182	2,97	94,13
	20	1000	9225	310	9,22	69,0
	21	990	n.n.	990	1,0	0,0
	22	620	n.n.	620	1,0	0,0
Tween 20	17	200	4255	n.n.	21,27	> 99
	18	1520	12760	n.n.	8,39	> 99
	19	3100	16820	228	5,42	92,6
	20	1000	18450	125	18,45	87,5
	21	990	2425	416	2,45	57,98
	22	620	3885	220	6,26	64,52

* Vgl. Tabelle 11; ** Anreicherungsfaktor: $C_{\text{Spumat}} / C_{\text{Saft}}$; n.n. nicht nachgewiesen

Es zeigt sich, dass vor allem mit Tween 20 vergleichsweise hohe Ausbeuten erzielt wurden, die für die Catechine **17** und **18** sogar quantitativ verliefen (Tabelle 12). Die Anreicherungs-faktoren verliefen dabei ebenfalls in einem akzeptablen hohen Maß von 21,27 für **17** und 18,45 für **20**. Auch Saponindepur kann für die Catechine **17–20** als Schäumungshilfsmittel eingesetzt werden und liefert hohe Ausbeuten und Anreicherungs-faktoren. Dagegen kann Natriumdodecylsulfat für die Anreicherung der Catechine nicht verwendet werden, da hier keine akzeptablen Ausbeuten und AF Werte erreicht werden können.

4.5 Ansatz 3 – Pinzetterzerchäumung von Polyphenolen

Zur Zerschäumung von Polyphenolen anhand des Pinzetterzerschäumungsverfahrens wurde ebenfalls Lorbeersaft eingesetzt. Die Komplexierung geschah mit Cu^{2+} und Fe^{3+} Ionen. Als tensidisches Schäumungshilfsmittel diente ADA-C8 (N-(2-Acetamido) Iminodiessigsäure-C8).

4.5.1 Komplexierung der Catechine (19 und 21) als Standards mit Cu^{2+} Ionen

Es wurden 0,58 mM CuSO_4 zu 0,17 mM von **19** und 0,057 mM von **21** in 20 mM Acetatpuffer bei pH 5,0 portionsweise zugegeben. Die gebildeten Polyphenolmetallkomplexe wurden dabei im mol-Verhältnis bestimmt, wobei die UV-Absorptionen bei 270 nm (λ_{max} von Polyphenolen) gemessen wurden. So wurden stöchiometrische Informationen erhalten.

Spektralphotometrische Untersuchungen haben dabei ergeben, dass mit steigenden Konzentrationen von Cu^{2+} Ionen die Absorption bei 270 nm abnimmt, wobei eine neue Bande bei 325 nm registriert wird. Die Bildung von zwei isobestischen Punkten bei 263 nm und 290 nm für **21** sowie 257 nm und 295 nm für **19** zeigen, dass zwei konsekutive Gleichgewichte bei der Komplexbildung entstehen. Die Job-Plots und den daraus entstehenden Breakpoints für 0,2242 für **21** und 0,3247 für **19** deuten darauf hin, dass das Verhältnis **19** zu Cu^{2+} und **21** zu Cu^{2+} gleich 1:2 beträgt. Dies bedeutet, dass pro Catechin zwei Cu^{2+} Ionen gebunden werden.

4.5.2 Zusätzliche Komplexbildung des gebildeten Polyphenol- Cu^{2+} Komplexes mit ADA-C8

Fügt man in die Pufferlösungen von **19**-2 Cu^{2+} und **21**-2 Cu^{2+} tröpfchenweise eine 0,5 mM Lösung von ADA-C8 hinzu, so verschiebt sich λ_{max} bathochrom. Der gebildete Komplex zeigt eine mittelstarke Bande bei 420 nm und hat eine schwach gelbe Farbe. Die Bande bei 325 nm verschwindet. Dies bedeutet, dass die **19**-2 Cu^{2+} und **21**-2 Cu^{2+} Komplexe zusätzlich mit ADA-C8 komplexiert worden sind. Es ist anzunehmen, dass beide Cu^{2+} Ionen jeweils mit zwei Molekülen ADA-C8 reagiert haben (siehe Abbildung 13).

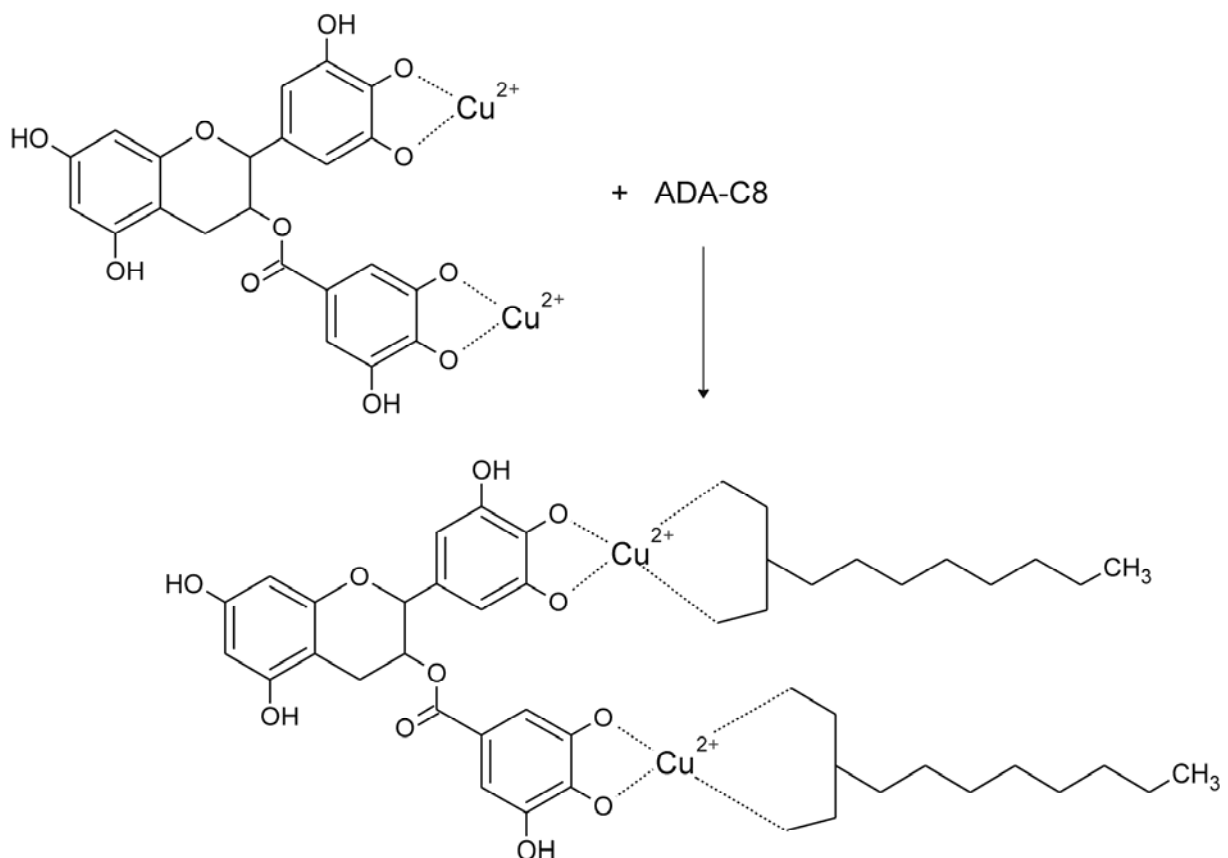


Abbildung 13. Postulierte Komplexbildung von (-)-Epigallocatechingallat (**19**) mit Cu^{2+} Ionen und anschließende Reaktion mit ADA-C8.

Analog reagiert auch (–)-Epigallocatechingallat (**21**) zu den Cu^{2+} /ADA-C8 Komplexen. Die Konzentrationen beider Komplexe können nur relativ angegeben werden. Unter der Annahme, dass die Komplexbildung vollständig abläuft, liegen ca. 0,10 mM Lösung von **19**- Cu^{2+} /ADA-C8 und 0,05 mM Lösung von **21**- Cu^{2+} /ADA-C8 vor. Die Konzentrationsabhängigkeit kann mit Hilfe der Bande bei 420 nm bestimmt werden.

4.5.3 Komplexbildung der Catechine **19** und **21** als Standards mit Fe^{3+} Ionen

Die Versuche führten zu sehr komplexen, nicht definierbaren Mischungen. Fe^{3+} reagiert unter den Versuchsbedingungen (pH 5,0) sehr schnell mit den Catechinen, wobei diese zu Benzochinonderivaten oxidiert werden. Ansätze mit Fe^{2+} zu komplexieren schlugen fehl, da die Catechine mit diesen Ionen reagieren.

4.5.4 Zerschäumungsexperimente mit Lorbeersaft und Cu^{2+} /ADA-C8 Komplexen

Aus diesen Gemischen wurden die Zerschäumungsexperimente mit Lorbeerblattsäften und Cu^{2+} /ADA-C8 Derivaten durchgeführt, wobei der pH Wert des Acetatpuffers nicht variiert wurde, da diese sowohl bei niedrigen, als auch höheren pH Werten sich zersetzten. In folgender Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Zerschäumung mit Lorbeersaft nach der Reaktion von Cu^{2+} und anschließender ADA-C8 Komplexbildung dargestellt (pH 5,0). Dazu wurde eine 10-fach verdünnte Lorbeersaftlösung eingesetzt, wofür 500 mg CuSO_4 zugegeben und danach für 2 h bei 25 °C gerührt wurde. Danach wurde ab filtriert und das erhaltende Filtrat mit 1000 mg ADA-C8 versetzt und über Nacht stehen gelassen.

Aus dem Pool wurden 20 ml entnommen und unter standardisierten Bedingungen zerschäumt (pH 5,0; Ausgangslösung 20 ml; N_2 Volumenstrom 19,8 ml/min; Dauer 10 min). Die Startlösung zeigte im UV-VIS Spektrum insgesamt gut definierte Banden bei $\lambda_1 = 620$ nm und $\lambda_2 = 420\text{--}430$ nm.

Nach 10-minütiger Schäumung konnte der Spumat, bestehend aus stabilen Lamellen, leicht ab separiert werden. Er zeigte sich schwach gelb und eine starke Bande bei 420–430 nm. Dies deutet darauf hin, dass die Catechin/ Cu^{2+} /ADA-C8 Komplexe in die Schaumphase transferiert worden sind. Diese Schaumphase wurde in 1 ml Ethanol aufgenommen, wobei eine vollständige Entschäumung bzw. Verflüssigung gewährleistet wurde. Nach Zugabe von 9 ml destilliertem Wasser wurde die erhaltene Lösung mit 1 n HCl auf pH 2,5 gebracht und 3 h lang intensiv gerührt. Dabei verschwindet die ursprünglich gelbe Farbe und man erhält eine klare Lösung, die anschließend auf alle Catechine hin untersucht wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammen gefasst.

Tabelle 13. Anreicherung der Catechine **17–22** aus Lorbeersaft mit Hilfe der Pinzettenschäumung, unter Verwendung von Cu^{2+} /ADA-C8 als Komplexbildner (pH 5,0; Ausgangsvolumen 20 ml; N_2 Volumenstrom 19,8 ml/min; Dauer 10 min; Mittelwerte aus zwei Messungen).

Catechin-No.	Konzentration ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)		AF *	Ausbeute (%)
	Ausgangslösung	Schaum		
17	200	6540	32,7	> 99
18	1520	11724	7,7	> 99
19	3100	20550	6,6	95,8
20	1000	21486	21,5	92,4
21	990	6115	6,2	89,5
22	620	5420	8,7	89,9

* Anreicherungsfaktor: $C_{\text{Spumat}} / C_{\text{Saft}}$

Die erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Pinzettenschäumung zu sehr guten Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten führt. Erwähnenswert ist, dass vor allem (+)-Catechin (**17**) und (–)-Epicatechin (**20**) hohe Anreicherungen aufweisen, mit signifikant höheren AF-Werten als wie für die anderen Catechine. Allerdings verliefen die Ausbeuten unterschiedlich. So wurden für die Catechine **18**, **19**, **21** und **22** zwar relativ geringe AF-Werte aber vergleichsweise hohe Ausbeuten erzielt, was mehrere Gründe haben kann. So können ab separierte Spumatvolumina, unterschiedliche Ausgangskonzentrationen sowie analytische Unsicherheiten eine wichtige Rolle spielen. Obwohl hier jedoch Uneinvernehmbarkeiten fest zustellen sind, kann jedoch festgehalten werden, dass nahezu alle Catechine fast quantitativ, mit Ausbeuten von um, oder sogar über 90 %, mit Hilfe der Pinzettenschäumung isoliert werden können.

5. Fazit

Alle Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden verliefen im Batch-Modus. Die Ausgangskonzentrationen der Substanzen waren dabei gering. Die Zerschäumungsanalyse im Allgemeinen funktioniert insbesondere bei stark verdünnten Lösungen sehr gut. Eine Erhöhung der Ausgangskonzentrationen führt immer zu kleineren Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten, weshalb nur mit einer kontinuierlichen Versuchsanordnung mit größeren Ausbeuten zu rechnen ist. Dies wurde bereits mit anderen Arbeiten realisiert [Gabel, 2008; Gerken et al., 2006].

So wurde die Effizienz der Zerschäumungsanalyse im halbtechnischen Maßstab am Beispiel von *Humulus lupulus* L. und *Rosmarinus officinalis* L. getestet, wobei ebenfalls zu Vergleichszwecken im Labormaßstab verfahren wurde, wegen fehlender Erfahrungswerte für den angewendeten

halbtechnischen Maßstab [Gabel, 2008]. In Abhängig von optimierten Zerschäumungsparametern konnten vergleichbar hohe Anreicherungsfaktoren in beiden Maßstäben erzielt werden ($ER = 5 - 20$), jedoch mit signifikanten Unterschieden in den Wiederfindungsraten (25–30 %). Dies ließ sich zum Einen über die schwächere Löslichkeit der Substanzen in der Flüssigkeit im Ausgangsbehälter (zigfach größeres Volumen) erklären und zum Anderen über Verluste während des Prozesses bedingt durch anlagentechnische Parameter. Diese Versuche mit starkem Pilotcharakter haben jedoch gezeigt, dass der Sprung zum halbtechnischen Maßstab mit erfolgversprechender Effizienz nicht mehr allzu weit entfernt ist. (Abbildung 14)



Abbildung 14. Zerschäumungsapparatur im halbtechnischen Maßstab. A: Vorlagebehälter, B: Gasanschluss mit eingebauter Fritte, C: Zerschäumungssäule, D: Behälter für bereits zerschäumte Flüssigkeit. Eine Rückführung der zerschäumten Flüssigkeit in den Vorlagebehälter für ein kontinuierliches Verfahren ist möglich. (Henderson Plastics Ltd., Dereham, Great Brittan)

Auch für etherischen Öle ist die Entwicklung einer kontinuierlichen Anlage im halbtechnischen Maßstab zur Gewinnung der Aromastoffe möglich. Im Gegensatz zu semipolaren Substanzen, bei denen die Dampfdrücke niedrig sind und deshalb nur schwer bzw. kaum während der Zerschäumung entweichen können, sind viele Aromastoffe extrem flüchtig. Dies bedeutet einen zusätzlichen Aufwand, um entsprechend geeignete Vorlagen richtig auszuwählen. Nach Meinung des Antragstellers kann davon ausgegangen werden, dass bei der Gewinnung mittels Zerschäumungsanalyse, teure und empfindliche Aromastoffe auf diese Art und Weise kostengünstig isoliert werden können. Für die Isolierung von billigen und auch stabilen Aromastoffen wird sich der Einsatz der Zerschäumungsanalyse dagegen nicht lohnen.

Wegen der hohen Effizienz der Zerschäumungsanalyse bei geringen Ausgangskonzentrationen ergibt sich ein sinnvoller Einsatz der Zerschäumungsanalyse im Bereich von Wirkstoffen die in Spuren entweder angereichert oder eliminiert werden sollen wie beispielsweise Glykoalkaloide oder Flavokavine [Backleh et al.; 2003a, 2004]. Dabei sollten die anzureichernden Substanzen in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften möglichst unpolar und wenig abhängig von Matrixeffekten sein. So können neben Di- und Triterpenen und Alkaloide, auch Hormone, Enzyme und Vitamine angereichert werden [u.a. Chih-Chen, 2008; Berner, 2007]. Substanzen, die in ihren aktiven Zentren metallische Ionen aufweisen, oder mit diesen komplexiert werden können, können nochmals gesondert betrachtet werden und mittels des Pinzettenverfahrens mit gesteigerten Effizienzwerten angereichert werden.

Für die Weiterentwicklung der Zerschäumungsanalyse lohnt es sich, dieses Pinzettenverfahren nochmals genauer zu untersuchen, in dem z.B. Chelatoren synthetisiert werden, die noch selektiver mit der zu untersuchenden Substanz chelatisieren, um nochmals gesteigerte Effizienzwerte zu erzielen.

Ein derzeit ebenfalls angewandtes Verfahren zur Anreicherung etherischer Ölen aus Pflanzenteilen ist die Wasserdampfdestillation mit Klärungsprozess und Abscheidung von Wasser, wobei Druck und Temperatur so zu regeln sind, dass möglichst geringe Verluste durch thermische Zersetzung oder durch Hydrolyse- und Oxidationsprozesse in Kauf genommen werden müssen. Dies gilt vor allem für leicht oxidierende Terpenkohlenwasserstoffe wie Limonen. Die Zerschäumungsanalyse kann für die Anreicherung von derartigen Substanzen als Alternative verwendet werden, da hier Druck- und Temperaturverhältnisse weniger in Betracht gezogen werden müssen – Limonen konnte in dieser Arbeit äußerst effektive angereichert werden.

Als Alternative zu herkömmlichen Trennverfahren kann die Zerschäumungsanalyse innerhalb bestimmter Verfahrensprozesse eingesetzt werden. So kommen beispielweise für die Gewinnung von Insulin aufwendige chromatographische Konzentrierungs- und Reinigungsverfahren zum Einsatz, die durch die Zerschäumungsanalyse ersetzt werden können. In der Arbeit von Nicolai et al. (2008) konnte gezeigt werden, dass nicht-modifizierte und neu synthetisierte Rinderinsulinderivate mit diesem Verfahren, mit Rinderserumalbumin als Tweezer, angereichert lässt und damit, das eine Möglichkeit besteht, die Zerschäumungsanalyse für die Gewinnung von Humaninsulin in Betracht gezogen werden kann.

Der Bedarf bzw. die Nachfrage an ökologisch hergestellten Produkten schließt den Herstellungsprozess mit ein. Entsprechende Marketingstrategien können auf eine ökologische Produktion verweisen, was gleichzeitig ein Imagegewinn für das Produkt bedeutet. Da die Zerschäumungsanalyse die Vorteile mit sich bringt, nur einfache Materialien zu verwenden und auf den Einsatz von Lösungsmitteln verzichtet, kann sie für die Gewinnung von ökologischen Produkten in Betracht gezogen und zur Herstellung von natürlichen Pflanzenextrakten angewandt werden.

Für die Herstellung von Hopfen- und Rosmarinextrakten wurde ein solcher Ansatz bereits verfolgt [Gabel, 2008]. So können beispielsweise Hopfenextrakte, die mit der Zerschäumungsanalyse auf natürliche Art und Weise hergestellt wurden, entweder als Endprodukt oder als Zutat während der Bierherstellung verwendet werden, woraufhin das Produkt entsprechend mit „ökologisch hergestellt“ zertifiziert werden kann. Andererseits können derartige Extrakte bereits einen hohen

prozentualen Anteil an natürlichen Stoffen enthalten (beispielsweise 10 % Carnosolsäure), die anschließend mittels einer quantitativen HPLC in reiner Form im Milligramm- bis Grammbereich gewonnen werden können, was den Ansprüchen für pharmazeutische Produkte genügt.

Auf dem Markt existieren bereits einige Varianten von Anlagen im groß- bzw. halbtechnischen Maßstab, die aber vornehmlich dazu ausgerichtet sind, Abwässer mit organischen Materialien aus z.B. Aquarien zu verarbeiten (Protein Skimmer). Volumina von mehreren 100 l/h können bereits verarbeitet werden [tmc-ltd.co.uk, hendersons.co.uk]. Eine Konzeption in diesen Maßstäben ist für die Anreicherung von Naturstoffen bzw. der Herstellung von diesbezüglichen Extrakten nach Wissen des Antragstellers noch nicht erfolgt. Grundlagenforschung wie diese Arbeit liefert jedoch einen Beitrag, dass diesbezügliche Konzepte für eine Machbarkeitsstudie erstellt werden können.

Die Partner WADI hat bei der Auswahl der etherischen Ölen bzw. Modellverbindungen mitgewirkt und ebenfalls bei der Auswertung der Analysenergebnisse. Der Partner interessierte sich vor allem für die sensorische Qualität der Aroma-Extrakte und befand diese für „gut“, so dass Überlegungen zu einer Einführung dieser Technik für bestimmte Extrakte angestellt werden können. Dies gilt besonders für die etherischen Öle in Rosensaft bzw. für die nachhaltige Herstellungsmöglichkeit von Rosenextrakten, einem Hauptinteressensgebiet von WADI, da sich die Zerschäumungsanalyse hier als sehr effizient erwies.

Der Partner RAPS lieferte hauptsächlich die analytischen Methoden zur Bestimmung von Polyphenolen und den antioxidativ wirkenden Verbindungen. Auch hier zeigte sich der Partner von der analytischen Seite her zufrieden, da der Nachweis der Verbindungen sowie deren Quantifizierung erfolgreich verlaufen ist. Die Anreicherung der Catechine mit Tensiden verlief für einige Substanzen zwar effizient, für andere jedoch nicht. Außerdem müsse für den Endextrakt auf ein ungewolltes Tensid zurückgegriffen werden, wobei es in Abhängigkeit der anzuwendenden Menge rückstandsanalytische Bedenken gäbe sobald mit mehr als 2 % im Extrakt zu rechnen sei. Hingegen erwies sich die Anwendung des Pinzettenverfahrens für die untersuchten Catechine als vielversprechend und innovativ, da der Chelator einzelne Catechine selektiv in die Schaumphase transferieren und im Nachhinein wieder eliminiert werden könne.

6. Literatur

- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., & Karademir, S. E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 7970-7981.
- Backleh, M., Ekici, P., Leupold, G., Coelhan, M., & Parlar, H., 2004. Enrichment of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine from potato juice by Adsorptive Bubble Separation using a pH gradient. *Journal of Separation Science*, *27*, 1042-1044.
- Backleh, M., Ekici, P., Leupold, G., & Parlar, H., 2003a. Quantitative elimination of Flavokavines A and B from Kava Kava (*Piper methysticum* G. Forst) by isoelectric focused adsorptive bubble separation. *Naturwissenschaften*, *90*, 366-369.
- Backleh, M., Leupold, G., & Parlar, H., 2003b. Rapid quantitative enrichment of carnosic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by isoelectric focused adsorptive bubble chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 1297-1301.
- Backleh-Sohrt, M., Ekici, P., Leupold, G., & Parlar, H., 2005. Efficiency of foam fractionation for the enrichment of nonpolar compounds from aqueous extracts of plant materials. *Journal of Natural Products*, *68*, 1386-1389.
- Berner, S. Efficient enrichment and separation of the pathological prion protein (PrP^{Sc}) from infected bovine brain by foam fractionation. Dissertation Technische Universität München, 2007.
- Brown, A. K., Kaul, A., & Varley, J., 1999. Continuous foaming for protein recovery: Part I. Recovery of beta-casein. *Biotechnology and Bioengineering*, *62*, 278-290.
- Brown, A. K., Kaul, A., & Varley, J., 1999. Continuous foaming for protein recovery: Part II. Selective recovery of proteins from binary mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*, *62*, 291-300.
- Blumenthal, G., Dietmar Linke, D., & Vieth, S., 2006. In: Chemie: Grundwissen für Ingenieure (Taschenbuch), Verlag: Vieweg & Teubner, 1. Auflage, Seite 491.
- Chai, J. F., Loha, V., Prokop, A., & Tanner, R. D., 1998. Effect of bubble velocity and pH step changes on the foam fractionation of sporamin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2868-2872.
- Chih-Chen, Yen. Reinigung und Isolierung von Ig G's mit Hilfe der isoelektrisch fokussierten Zerschäumungsanalyse. Dissertation Technische Universität München, 2008 (in Arbeit).
- Crofcheck, C., Loiseau, M., Weekley, J., Maiti, I., Pattanaik, S., Bummer, P. M., et al., 2003. Histidine tagged protein recovery from tobacco extract by foam fractionation. *Biotechnology Progress*, *19*, 680-682.
- Desouza, A. H. G., Tanner, R. D., & Effler, W. T., 1991. The Effect of Ph and Gas-Composition on the Bubble Fractionation of Proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *28-9*, 655-666.
- Diehl, J.-F., 2000. Chemie in Lebensmitteln, Rückstände, Verunreinigungen, Inhalts- und Zusatzstoffe, Weinheim, WILEY-VCH.
- Doyle, F. M., 2003. Ion flotation - its potential for hydrometallurgical operations. *International Journal of Mineral Processing*, *72*, 387-399.
- Ekici, P., Backleh-Sohrt, M., & Parlar, H., 2005. High efficiency enrichment of total and single whey proteins by pH controlled foam fractionation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *56*, 223-229.

- Forster, A., & Gehrig M., 1985. Process for the Decaffeination of Black Tea, Patent DE 3413869.
- Gabel, Lorenz. Zur Effizienz der Zerschäumungsanalyse im halbtechnischen Maßstab am Beispiel von *Humulus lupulus* L. und *Rosmarinus officinalis* L. Dissertation Technische Universität München, 2008.
- Gerken, B. M., Nicolai, A., Linke, D., Zorn, H., Berger, R. G., & Parlar, H., 2006. Effective enrichment and recovery of laccase C using continuous foam fractionation. *Separation and Purification Technology*, 49, 291-294.
- Gerken, B. M., Wattenbach, C., Linke, D., Zorn, H., Berger, R. G., & Parlar, H., 2005. Tweezing-adsorptive bubble separation. Analytical method for the selective and high enrichment of metalloenzymes. *Analytical Chemistry*, 77, 6113-6117.
- GESTIS-Stoffdatenbank; Gefahrstoffinformationssystem der gewerblichen Berufsgenossenschaften des Instituts für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (BGIA) (www.dguv.de).
- Hartmann, G., 1993. Application of high-pressure extracts in food production. *Fleischwirtschaft*, 73(4), 404-406, 409-411.
- Hussenot, J., Lefebvre, S., & Brossard, N., 1998. Open-air treatment of wastewater from land-based marine fish farms in extensive and intensive systems: current technology and future perspectives. *Aquatic Living Resources*, 11, 297-304.
- Karger, B. L., & Devivo, D. G., 1968. General Survey of Adsorptive Bubble Separation Processes. *Separation Science*, 3, 393-&.
- Ko, S., Loha, V., Prokop, A., & Tanner, R. D., 1998. Batch foam recovery of sporamin from sweet potato. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-2, 547-558.
- Lemlich, R., 1968. Adsorptive Bubble Separation Methods - Foam Fractionation and Allied Techniques. *Industrial and Engineering Chemistry*, 60, 16-&.
- Loha, V., Tanner, R. D., & Prokop, A., 1997. The effect of pectinase on the bubble fractionation of invertase from alpha-amylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63-5, 395-408.
- Maas, K. Adsorptive bubble separation techniques, in: Korte, F. (Ed.), *Methodicum Chemicum*, Vol. 1, Aca-demic Press, New York, 1974, pp. 165–171.
- Mersmann, A., & Kind, M. (Eds), 2006. Extraktion. In: *Thermische Verfahrenstechnik*, 2. wesentlich erweiterte und aktualisierte Auflage, Verlag Springer Berlin Heidelberg, VDI-Buch, Seiten: 345-384.
- Nicolai, A., Friess, A., & Parlar, H., 2008. Efficient enrichment of alpha,beta-unsaturated bovine insulins-(C12)(n) using tweezing adsorptive bubble separation (TABS) with bovine serum albumin. *Journal of Separation Science*, 31, 2310-2317.
- Palmer, M. V., & Ting, S. S. T., 1995. Applications for Supercritical-Fluid Technology in Food-Processing. *Food Chemistry*, 52, 345-352.
- Pfannhauser, W., & Thaller, A., 1985. Determination of Halogenated Solvent Residues in Water, Waste-Water, Feeding-Stuffs and Food. *Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie*, 322, 220-222.
- Prokop, A., & Tanner, R. D., 1993. Foam Fractionation of Proteins - Potential for Separations from Dilute Starch Suspensions. *Starch-Starke*, 45, 150-154.
- Smith, R. M., 1995. Sample preparation perspectives: Supercritical fluid extraction of natural products. *Lc Gc-Magazine of Separation Science*, 13, 930-&.

- Stahl, E., & Gerard, D., 1982. Hochdruck-extraction von Naturstoffen mit überkritischen und verflüssigten Gasen. *Parfuemerie und Kosmetik*, 63, 117–125.
- Stahl, E., Quirin, K.-W., & Gerard, D., 1987. Dense gases for extraction and refining, Springer, Berlin.
- Stumpf, H., Spiess, E., & Habs, M., 1992. Plant-derived drugs – residual solvents. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 132(11), 508-513.
- Uraizee, F., & Narsimhan, G., 1990. Foam Fractionation of Proteins and Enzymes .1. Applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 232-233.
- Uraizee, F., & Narsimhan, G., 1990. Foam Fractionation of Proteins and Enzymes .2. Performance and Modeling. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 315-316.
- Uraizee, F., & Narsimhan, G., 1995. A Model for Continuous Foam Concentration of Proteins - Effects of Kinetics of Adsorption of Proteins and Coalescence of Foam. *Separation Science and Technology*, 30, 847-881.
- Weeks, N. C., Timmons, M. B., & Chen, S., 1992. Feasibility of Using Foam Fractionation for the Removal of Dissolved and Suspended-Solids from Fish Culture Water. *Aquacultural Engineering*, 11, 251-265.
- Ziegler, E., & Ziegler, H. (Eds.), 1998. In: Flavouring - Production, Composition, Applications, Regulations. WILEY-VCH.