

Abschlussbericht zur Auftragsforschung
- Analytik von Hanfsaft -

Bergische Universität Wuppertal
Management Chemischer Prozesse in der Chemie
Akad. Dir. Dr. Helga Mölleken

Frau Galatea Biesterfeld von Meer
Claremont Collection GmbH

Wuppertal, 30.06.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

Inhaltsverzeichnis.....	2
1.1 Hanf in der Lebensmittelindustrie.....	4
1.1.1 Aromastoffe aus Harz.....	4
1.1.2 Hanffrucht (Nussfrucht)	4
1.1.3 Hanföl	5
1.1.4 Aufgabenstellung.....	6
2. Material und Methoden	6
2.1 Verwendete Geräte	7
2.2 Chemikalien und allgemeine Verbrauchsmaterialien	8
2.3 Methoden.....	9
2.3.1 Pflanzen und Gewinnung des Pflanzensafts	9
2.3.2 Quantifizierung des Wassergehalts.....	9
2.3.3 Quantifizierung der Trockenmasse	10
2.3.4 Quantifizierung des Proteingehalts	10
2.3.5 Quantifizierung der freien Aminosäuren	10
2.3.6 11	
2.3.7 Quantifizierung der freien Fettsäuren.....	11
2.3.8 Quantifizierung von Mono- und Disacchariden.....	12
2.3.8.1 Identifizierung mittels DC.....	12
2.3.8.2 Quantifizierung mittels HPLC	12
2.3.9 Quantifizierung des Mineralstoffgehalts.....	13
2.3.10 Quantifizierung von Anionen	14
2.3.11 Quantifizierung des Gesamtkohlenstoffgehalts	14
2.3.12 Quantifizierung des Gesamtpolyphenolgehalts	15
2.3.13 Quantifizierung von Tocopherolen und Sterinen	15
2.3.14 Quantifizierung des Rückstands aus dem Blütenstandsft.....	16
3. Ergebnisse und Diskussion	18
3.1 Gewinnung des Pflanzensafts.....	18
3.2 Charakterisierung des Pflanzensaftes	19
3.3 Quantifizierung des Wassergehalts	20
3.4 Quantifizierung der Trockenmasse.....	21
3.5 Ernährungsrelevante Nährstoffe.....	21
3.5.1 Quantifizierung des Proteingehalts.....	21
3.5.2 Quantifizierung des Gehalts an freien Aminosäuren	22

Inhaltsverzeichnis

3.5.2.1	Pflanzensaft.....	22
3.5.2.2	Alkoholextrakt.....	24
3.5.3	Quantifizierung des Gehalts an freien Fettsäuren.....	25
3.5.3.1	Pflanzensaft.....	25
3.5.3.2	Alkoholextrakt.....	26
3.5.4	Qualitative und Quantitative Bestimmung des Zuckergehalts.....	27
3.5.4.1	Identifizierung mittels Dünnschichtchromatografie.....	27
3.5.4.2	Quantifizierung mittels HPLC.....	28
3.5.5	Quantifizierung des Mineralstoffgehaltes.....	29
3.5.5.1	Pflanzensäfte.....	29
3.5.5.2	Alkoholextrakt.....	31
3.5.6	Quantifizierung des Anionengehalts.....	32
3.5.6.1	Pflanzensaft.....	32
3.5.6.2	Alkoholextrakt.....	34
3.5.7	Quantifizierung von Tocopherolen und Phytosterine.....	34
3.5.7.1	Pflanzensaft.....	35
3.5.7.2	Alkoholextrakt.....	35
3.6	Weiterer Inhaltsstoffe.....	35
3.6.1	Quantifizierung des Gesamtkohlenstoffgehaltes.....	35
3.6.2	Quantifizierung des Gesamtpolyphenolgehalts.....	37
3.7	Analyse des unlöslichen Rückstands aus dem Blütenstandsft.....	37
3.7.1	Quantifizierung des Gehalts an freien Fettsäuren.....	38
3.7.2	Quantifizierung von Tocopherolen und Sterinen.....	39
3.7.3	Qualifizierung mittels GCxGC-MS.....	39
4.	Vergleich mit anderen Untersuchungen.....	41
5.	Zusammenfassung.....	45
	Literaturverzeichnis.....	47
	Anhang A : Schriftliche Versicherung gemäß § 10 Abs. 5 APVOL Fehler! Textmarke nicht definiert.	

1. Einleitung

1.1 Hanf in der Lebensmittelindustrie

In der Lebensmittelherstellung werden vorrangig Samen und Öl verwendet, seltener werden auch Blüten, Blätter und Harz genutzt. Die Verwendung als Lebensmittel lässt sich in drei Kategorien unterteilen: Samen und Hanföl sowie Aromastoffe aus dem Harz [8].

1.1.1 Aromastoffe aus Harz

Durch Destillation der weiblichen Blüten werden die im Hanfharz enthaltenen ätherischen Öle gewonnen. Diese besitzen ein typisches Hanfaroma und werden hauptsächlich zur Aromatisierung verschiedener alkoholischer und nichtalkoholischer Getränke sowie als Zusatz in Süßwaren verwendet [35].

1.1.2 Hanffrucht (Nussfrucht)

Durch Trocknung und Dreschen der weiblichen Pflanzen werden die Samen freigesetzt und nach einem zusätzlichen Trocknungsschritt in der Lebensmittelherstellung verwendet [11]. Die Samen können geschält oder ungeschält, roh oder geröstet verzehrt werden. Sie enthalten keine psychoaktiven Cannabinoide, so dass durch den Verzehr keine berauschende Wirkung auftritt [13, 31]. Der ungeschälte, rohe Samen besitzt, aufgrund der Fruchtschale, einen nussigen Kaugindruck und findet daher weniger Verwendung. Durch das Schälen der Nuss wird die Fruchtschale abgetrennt, welche zur Ballaststoffanreicherung anderer Lebensmittel genutzt wird [13]. Der geschälte Samen besitzt einen weichen Kern und kann ohne weitere Behandlung verschiedenen Nahrungsmitteln zugesetzt werden. Dieser Zusatz führt zu einem besonderen, nussartigen Geschmack, z.B. in hellen Backwaren, Feingebäck, Milch- und Wurstwaren [31]. Die Hauptinhaltsstoffe des Samens mit Fruchtschale sind [13]:

- 28-35 % Öl
- 30-35 % Kohlenhydrate, davon 33 % Ballaststoffe
- 20-24 % Protein

Der Samen besitzt außerdem hohe Gehalte an B-Vitaminen, Vitamin E, Calcium, Magnesium, Kalium und Eisen. Das im Samen enthaltene Protein enthält alle acht

essentiellen Aminosäuren und ist daher besonders hochwertig. Hanfsamen sind zudem cholesterinfrei, glutenfrei und leichtverdaulich [13, 29].

1.1.3 Hanföl

Durch ein schonendes Kaltpress-Verfahren wird aus den ungeschälten Nüssen ein Qualitätsspeiseöl von grünlicher Farbe, mit hochwertigen Inhaltsstoffen und einem charakteristischen Geschmack gewonnen [13]. Hanföl zeichnet sich durch einen sehr hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus, wozu Linolsäure und α -Linolensäure zählen. Zudem ist in geringen Mengen die in Pflanzenöl selten vorkommende ν -Linolensäure enthalten [13].

Der Gehalt an freien Fettsäuren (FFS) im Öl beträgt ungefähr 9 %, davon sind 72-80 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren (MUF). Die Hauptkomponente ist Linolsäure ($C_{18:2}(9,12)$; $w-3$), mit einem relativen Anteil von 54 %. Weitere vorkommende MUF im Öl sind α -Linolensäure ($C_{18:3}(9, 12, 15)$; $w-3$) mit ungefähr 18 % und γ -Linolensäure ($C_{18:3}(6,9,12)$; $w-6$) mit ungefähr 2-4 %. Der Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren (EUF) beträgt 11 % [13].

Die ungesättigten Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure sind für den menschlichen Organismus essentiell und müssen deshalb mit der Nahrung aufgenommen werden. Diese sind für den Körper nicht nur Energielieferant, sondern auch auf Grund ihrer Strukturmerkmale Ausgangsstoffe essentieller Stoffwechselfvorgänge. Sie dienen zur Synthese von Eicosanoiden, die zur Regelung einiger Stoffwechselfunktionen im Körper notwendig sind [3, 25].

Die Haltbarkeit von Hanföl ist auf Grund der Photooxidation der ungesättigten Fettsäuren gering. Insbesondere Lichteinwirkung führt zu einer oxidativen Degradierung der MUF, die so ihre Funktion verlieren [2].

Ein weiterer wichtiger Bestandteil im Öl ist Vitamin E (Tocopherol), ein fettlösliches Vitamin mit antioxidativer Wirkung. Der Gehalt beträgt 80 mg/100 g Öl und ist im Vergleich zu anderen Speiseölen erhöht. Es unterdrückt die oxidative Abbaureaktion der MUF und steigert so die Haltbarkeit des Öls. Tocopherole kommen in vier verschiedenen Formen vor und werden je nach Anzahl und Stellung der Methylgruppe in α -, β -, γ - und δ -Tocopherol unterteilt. In Hanföl kommen alle vier Formen vor, wobei γ -Tocopherol mit 85 % den Hauptanteil darstellt [13,31].

1.1.4 Aufgabenstellung

Hanfpflanzen werden aufgearbeitet in

- Fasern
- Holzteil
- Blatt- und Blütenabschnitt

und die einzelnen Fraktionen werden hinsichtlich verschiedener chemisch/biochemischer Parameter analysiert.

Es wurden entsprechend des Angebots die folgenden Parameter analysiert und die Ergebnisse diskutiert:

- > Wassergehalt und Trockenmasse
- > Stickstoffgehalt nach Kjeldahl
- > Proteingehalt
- > freie Fettsäuren nach Schultes
- > Zuckergehalt
- > Phytosterine
- > Tocopherole
- > TC/TIC/TOC
- > Mineralstoffgehalt
- > Nitrat, Nitrit, Phosphat, Chlorid, Sulfat
- > Gesamtphenolgehalt

2. Material und Methoden

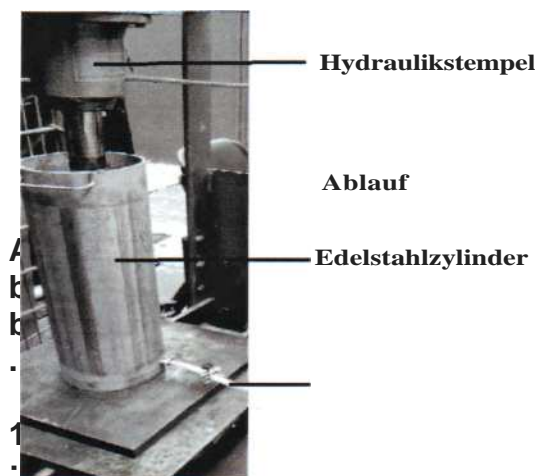
2.1 Verwendete Geräte

Gas- und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (GC und HPLC)

Chrompack CP-3380 GC	Varian, Agilent Technologies, USA
HPLC-System-HITACHI	Merck, Darmstadt
GCxGC-FID Leco 6890 N-System-FID	LECO Corporation, USA
GCxGC-MS-System Leco Pegasus IM 6890	LECO Corporation, USA
IC-System-790 Personal IC	Metrohm, Schweiz

Hydraulikpresse

Zur Gewinnung des Pflanzensaftes wurde eine Hydraulikpresse mit Edelstahlzylinder [Durchmesser: 200mm, Höhe: 500 mm] entwickelt und verwendet. Diese wurde von der Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal angefertigt (s. Abb. 5)-



Hydraulikpflanzenpresse

ICP-QES - Messsystem

ICP Ultima ICP-720-ES	HORIBA Jobin Yvon, Bensheim
	Agilent Technologies, USA

Kjeldahl-Stickstoffbestimmung

Aufschlußeinheit K 435	Büchi, Essen
Destillationssystem Unit K 350	Büchi, Essen

Photometer

UV-Vis Photometer Helios y 680 Microplate READER	Thermo Fisher Scientific, Erlangen BioRAD, München
---	---

Sonstige verwendete Geräte

Karl-Fischer Titrator DL 31	Mettler-Toledo, Giessen
Lyophylle Alpha	Christ, Kalletal

Alle hier nicht separat aufgeführten Geräte gehören zur Grundausstattung chemischer Laboratorien.

2.2 Chemikalien und allgemeine Verbrauchsmaterialien

Feinchemikalien

Acetonitril	Sigma Aldrich, Seelze
Aktivkohle	Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma, San Louis USA Sigma Aldrich, Seelze Sigma Aldrich, Seelze Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R 250 Folin-Ciocalteus	
Phenolreagenz Inositolhexakisphosphat (InsP ₆)	Machrey-Nagel, Düren
Methanolische Schwefeldiooxid-Lösung	Machrey-Nagel, Düren
Methanolische Jod-Lösung	Fluka, Buchs Schweiz
Mehrelementenstandardgemisch	Carl Roth, Karlsruhe
N-methyl-N-Trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA)	Reacton, Cheshire, GB
N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)	
4-(2- pyridylazo)resorcinol (PAR)	
Rinderserumalbumin (BSA) Yttriumchlorid (YCl ₃)	

Verbrauchsmaterialien

EZ:faast™ Amino Acid Analysis Kit	Phenomenex, USA
Kieselgel - DC - Platten	Machrey-Nagel, Düren
Mikrotiterplatten (Maxi Sorp)	VWR, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe
Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF	
Sep-Pak® Classic C18 cartridge 360mg 55-105um	Waters, Eschborn

2. Material und Methoden

Alle hier nicht ausdrücklich erwähnten Laborchemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden in Analysequalität von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Seelze) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.3 Methoden

2.3.1 Pflanzen und Gewinnung des Pflanzensafts

Zur Gewinnung des Pflanzensafts wurden Anfang Oktober 50 Hanfpflanzen von einem Versuchsfeld in Sande bei Paderborn geerntet. Die Pflanzen hatten eine Wuchshöhe von 2,2 bis 2,5 m und die Blüten befanden sich bereits im Zustand der Samenreife, teilweise trugen sie vollständig ausgereifte Samen. Die Blätter zeigten teilweise bereits beginnende Seneszenz.

Zunächst wurden Wurzel und Blütenstände vom Stängel getrennt und dieser in Holz- und Faserteil getrennt. Aus den einzelnen Pflanzenkomponenten (Blütenstand, Faser und Holz) wurde mit Hilfe einer Hydraulikpresse der jeweilige Pflanzensaft gewonnen. Die im Saft enthaltenen Schwebstoffe wurden durch Zentrifugation bei 3000 U/min sedimentiert. Der klare Saft wurde portioniert und bei 20°C gelagert.

Die einzelnen Säfte werden entsprechend der Pflanzenkomponente als Blütenstand-, Faser-, Wurzel- und Holzsaft bezeichnet.

Das Zentrifugieren des gewonnenen Blütenstandsafte führte zur Ausbildung von zwei unterschiedlichen Phasen. Die untere wässrige Phase ist der Blütenstandsafte. Die obere Phase wurde abgenommen und in Ethanol überführt. Sie wird im weiteren Verlauf als Ethanolphase bezeichnet.

Zusätzlich wurden die gepressten Pflanzenteile mit Ethanol extrahiert, diese werden im Folgenden Alkoholextrakte genannt.

2.3.2 Quantifizierung des Wassergehalts

Die Bestimmung des Wassergehalts erfolgte titrimetrisch unter Verwendung des DL 31 Karl-Fischer Titrators [19].

Durchführung

Ein definiertes Volumen von 100 µl je Pflanzensaft wurde mittels Mikroliterspritze in das Titrationsgefäß überführt und unter kurzzeitigem Rühren in der Solvent-

Lösung (methanolische Schwefeldioxid-Lösung) homogenisiert. Die Titration mit der Titrant-Lösung (methanolische Jod-Lösung) erfolgte automatisch und der Endpunkt wurde anhand der Dead-Stop-Methode bestimmt. Die Berechnung des Wassergehalts erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware.

2.3.3 Quantifizierung der Trockenmasse

Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte gravimetrisch. Dazu wurde ein definiertes Volumen von 1 ml je Pflanzensaft lyophilisiert und der Rückstand bis zur Massenkonstanz gewogen [16].

2.3.4 Quantifizierung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach Kjeldahl [17]. Über die oxidative Zersetzung der Probe wurde der Gesamtstickstoffgehalt bestimmt und auf den Proteingehalt in der Probe zurückgerechnet. Durchführung

Eine definierte Menge von je 1 ml Pflanzensaft wurde mit jeweils 25 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und in der Aufschlusseinheit oxidativ zersetzt. Der gebundene Stickstoff wurde freigesetzt und lag in Form von Ammoniumsulfat in Lösung vor. Durch Zugabe von Natronlauge wurde dieses zu Ammoniak umgesetzt, der durch Wasserdampfdestillation in eine Borsäure-Lösung (30g/100ml) überführt wurde. Der Stickstoffanteil in der Lösung wurde durch die Titration mit einer 0,05 M Schwefelsäure-Lösung erfasst [17].

2.3.5 Quantifizierung der freien Aminosäuren

Die Bestimmung der freien Aminosäuren erfolgte mit Hilfe eines EZ:faast™ Amino Acid Analysis Kits [33]. Durchführung

Zur Isolierung der freien Aminosäuren wurde jeweils ein Volumen von 100 µl zunächst an einen Kationenaustauscher gebunden und nach einem zusätzlichen Waschschrift durch die Elutionslösung herausgespült. Die Carboxyl- und Amino-gruppen wurden mittels Derivatisierungsreagenz umgesetzt. Diese Aminosäuren wurden anschließend gaschromatographisch entsprechend der in Tabelle 1 angegebenen Geräteparameter analysiert.

Zur Identifizierung wurde ein Aminosäure-Standardgemisch verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mit Norvalin (nichtproteinogene α -Aminosäure) als interner Standard.

Tabelle 1: Geräteparameter GC: EZ.faastrTM

Chromatograph	Varian Gas Chromatograph
Säule	Zebtron ZB-AAA (L: 10 m x ID: 0,25 mm x 0,1 μ m)
Injektortemperatur	250°C
Detektor	FID
Detektortemperatur	320°C
Trärgas	Helium
Make-up-Gas	Helium
Brenngase	Synthetische Luft und Wasserstoff
Temperaturprogramm	1 1 0°C/Omin//35°/min//320°C/1 Omin

2.3.6

2.3.7 Quantifizierung der freien Fettsäuren

Die freien Fettsäuren wurden als Fettsäuremethylester nach Schulte bestimmt [26].

Durchführung

Die freien Fettsäuren wurden viermal mit je 5 ml Diisopropylether aus jeweils 15 ml der Pflanzensäfte extrahiert. Die gewonnenen organischen Phasen wurden vereinigt und mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Die Rückstände der Säfte wurden in je 1 ml internem Standard (Magarinsäuremethylester, $c = 1$ mg/ml) resuspendiert. Zusätzlich wurde ein Volumen von je 10 ml der Alkoholextrakte am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und in 1 ml der internen Standardlösung gelöst.

Die im Saft und Alkoholextrakt enthaltenen Fettsäuren wurden durch Zugabe von Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) zu ihren Fettsäuremethylester (FSME) umgesetzt. Diese wurden nach den in Tabelle 2 angegebenen Geräteparametern gas-

chromatografisch analysiert. Zur Identifizierung der einzelnen Fettsäuren wurde ein FSME-Standardgemisch verwendet. Die Quantifizierung erfolgte über den internen Standard.

Tabelle 2: Geräteparameter GC: Fettsäuren

Chromatograph	Trimethyl-ester Varian CHROMPACK CP-3380 Gas Chromatograph
Vorsäule	FS-cw-Desaktiviert/ 3m x 0,25mm
Säule	FFAP/ 30m x 0,32mm x 0,5µm
Injektor	Split/Splitless-Injektor Varian 1 079
Injektortemperatur	250°C
Detektor	FID
Detektortemperatur	250°C
Trägergas	Helium
Make-up-Gas	Helium
Brenngase	Synthetische Luft und Wasserstoff
Temperaturprogramm	35 ⁰ /4"/15°/min//220°/20"

2.3.8 Quantifizierung von Mono- und Disacchariden

Zunächst wurden die Zucker mittels Dünnschichtchromatographie (DC) identifiziert und durch ein HPLC-Verfahren quantifiziert [1, 27].

2.3.8.1 Identifizierung mittels DC

Die Identifizierung der Zucker erfolgte nach der § 64-LFGB-Methode L 44.00-5 [1]. Abweichend von dieser Methode wurde, zur besseren Trennung, ein Dichlor-methan/Eisessig/Wasser-Gemisch (70/60/10, v/v/v) als Fließmittel verwendet. Die Probe wurde auf die Standardzucker Fructose, Glucose, Mannose, Rhamnose, Xylose, Ribose, Maltose, Saccharose, Lactose analysiert. Die Zucker wurden durch den Vergleich der Retentionsfaktoren der erhaltenen Spots aus Probe und Standards bestimmt.

2.3.8.2 Quantifizierung mittels HPLC

Die Quantifizierung erfolgte nach der Methode Nr. 308.1 des Schweizer Lebensmittelbuches [27].

Durchführung

Der Pflanzensaft wurde zur Abtrennung störender Substanzen nach Carrez geklärt [27]. Die gewonnene Lösung wurde membranfiltriert und analysiert. Zur Optimierung der Trennung wurde als Eluent, abweichend von der Methode, ein Acetonitril/Wasser-Gemisch (90/10, v/v) verwendet. Glucose und Fructose konnten so basislinien getrennt werden. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierreihe im Konzentrationsbereich von 0-5 mg/ml einer Glucose- und Fructose-Standardlösung aufgenommen. Die Messung wurde mit den in Tabelle 3 angegebenen Geräteparametern durchgeführt.

<i>Tabelle 3: Geräteparameter HPLC: Mono- und Disaccharide Merck</i>	
HPLC-System	HITACHI-System
Detektor	HITACHI L -2490, RI - Detektor
Säule	Lichrospher Gart 250 x 4 mm
Säulenmaterial	Lichrospher 100 NH ₂ (5 µm)
Fluß	1,0 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl
Temperatur	35°C
mobile Phase	Acetonitril/Wasser (90/10, v/v); (85/15, v/v)

2.3.9 Quantifizierung des Mineralstoffgehalts

Die Bestimmung der Mineralstoffe erfolgte anhand ihrer elementspezifischen elektromagnetischen Strahlung, welche mit Hilfe des Ultima ICP-Optical Emission Spektrometer, HORIBA Jobin Yvon und Varian 720-ES gemessen wurde.

Durchführung

Der wässrige Pflanzensaft wurde zur Analyse um den Faktor 10 verdünnt. Zur Messung des Alkoholextrakts wurde ein definiertes Volumen von 10 ml bis zur Trockne eingedunstet und in 10 ml Wasser resuspendiert. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierreihe eines Mehrelementen-Standardgemisch in einem Konzentrationsbereich von 30-300 mg/ml aufgenommen.

2.3.10 Quantifizierung von Anionen

Die Identifizierung der Anionen erfolgte durch chromatographische Trennung unter Verwendung des 790 Personal IC-Systems [9]. Der Pflanzensaft wurde auf folgende, biologisch relevante Anionen untersucht: Chlorid, Nitrit, Nitrat, Phosphat und Sulfat. Die Elutionsreihenfolge ergibt sich aufgrund der unterschiedlichen Größe und Ladung der Anionen. $Cl^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow MT^- \rightarrow HPO_4^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$ [9].

Durchführung

Zur Analyse wurden Pflanzensaft und Alkoholextrakt um den Faktor 10 verdünnt. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte unter Verwendung eines Anionen-Standardgemischs mit einem IC-System nach den in Tabelle 4 angegebenen Geräteparametern.

Tabelle 4: Geräteparameter IC: Anionen

IC-System	790 Personal IC
Detektor	Leitfähigkeitsdetektor
Säule	Anion-Trennsäule
Säulenmaterial	Polyvinylalkohol-Partikel mit quaternären Ammoniumgruppen
Eluent	Natriumcarbonat-Natriumhydrogencarbonat - Gemisch (Verhältnis 1:4)

2.3.11 Quantifizierung des Gesamtkohlenstoffgehalts

Durch Umsetzung der Kohlenstoffverbindungen zu Kohlenstoffdioxid und der Messung mit einem nicht-dispersiven Infrarot-Absorptionsanalysator (NDIR) wurde der TC-Gehalt (Gesamtkohlenstoffgehalt) und der TIC-Gehalt (anorganischer Gesamtkohlenstoff) der Probenlösung bestimmt. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Total Organic Carbon Analyt TOC-V_E der Firma Shimadzu. Der TOC-Gehalt (organischer Gesamtkohlenstoff) ergibt sich aus der Differenz von TC und TIC:
 $TOC = TC - TIC$ [32]

Durchführung

Der Pflanzensaft wurde zur Messung um den Faktor 100 verdünnt. Zur Quantifizierung des TC-Gehaltes wurde je 1 µl der verdünnten Pflanzensäfte direkt in das Reaktionsgefäß injiziert. Zur Quantifizierung des TIC-Gehalts wurde je 1 µl der verdünnten Pflanzensäfte zuvor in eine, im Gerät integrierte, Säurekammer injiziert. Die gelösten Carbonatverbindungen wurden zu Kohlenstoffdioxid umgesetzt und dieser gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Kalium-Hydrogenphthalat-Lösung als Kalibrierlösung in einem Konzentrationsbereich von 50-500 mg/L verwendet.

2.3.12 Quantifizierung des Gesamtpolyphenolgehalts

Die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehalts erfolgte gemäß der Methode SOP-Total Content nach Meckelmann [18].

Durchführung

Zur Bestimmung wurden je 100 µL Pflanzensaft mit 900 µL Milli-Q-Wasser verdünnt und mit je 5 ml Polin & Ciocalteu's Lösung umgesetzt. Diese reagierte mit reduzierenden Verbindungen zu einem blauen Farbkomplex. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die Lösung mit 4 ml 7,5 %iger Natriumcarbonatlösung versetzt, homogenisiert und eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 750 nm in Mikrotiterplatten gegen eine Standard-Gallussäurelösung ($c=1,1\text{mg/ml}$) gemessen.

2.3.13 Quantifizierung von Tocopherolen und Sterinen

Die Identifizierung von Tocopherolen und Sterinen erfolgte nach der Methode von Slover [28]. Als Silylierungsmittel wurde ein BSTFA-MSTFA-Gemisch im Verhältnis 5:1 verwendet.

Durchführung

Tocopherole und Sterine aus dem Pflanzensaft und dem Alkoholextrakt wurden unter Verwendung von Sep-Pak®-Kartuschen extrahiert. Je 10 ml Pflanzensaft bzw. Alkoholextrakt wurden zur Messung eingesetzt. Enthaltene lipophile Substanzen adsorbieren an der Oberfläche der Kartusche. Nach einem Waschschrift

wurden sie mit je 3 ml Hexan eluiert. Zur Messung wurde Hexan abgedampft, der Rückstand in einer definierten Menge Silylierungsmittel gelöst und gaschromatographisch nach den in Tabelle 5 angegebenen Parametern analysiert. Als Vergleichssubstanz wurde α -, γ - und 5-Tocopherol sowie Stigmasterol und Stigmastanol verwendet (Standardlösung, $c=1$ mg/ml).

Tabelle 5: Geräteparameter GCxGC: Tocopherole und Sterine

1. Säule	ZB - 5HT Interno (unpolar) 30 m / 0,25 mm ID/0,25 μ m
2. Säule	VF - 17 MS (polar) 1 m / 0,1 mm ID 70,1 μ m
Detektor	FID
Detektortemperatur	300°C
Trärgas	Helium
Make-up-Gas	Stickstoff
Split	1 :20
Brenngase	Synthetische Luft und Wasserstoff
Temperaturprogramm	260 °C isotherm
Injektortemperatur	270 °C

2.3.14 Qualifizierung des Rückstands aus dem Blütenstandsaf

Die Identifizierung der enthaltenen Inhaltsstoffe des Ethanolextraktes aus dem Blütenstandsaf erfolgte mittels GCxGC-MS, einer Methode zur Trennung komplexer Stoff-Gemische. Durchführung

Zur Messung wurde ein Volumen von 10 ml des Ethanolextrakts auf 1 ml eingengt und gaschromatographisch, entsprechend der in Tabelle 6 angegebenen Geräteparameter, analysiert.

Tabelle 6: Geräteparameter GCxGC-MS: Rückstand des Blütenstandsafte

GCxGC-MS-System	Agilent Technologie
1. Säule	ZB - 5HT Interno (5 % Phenyl / 95 % Methylpolysiloxanen) 30m /0,25mm ID/ 0,25 um,
2. Säule	Bpx 50 (50% Diphenyl 50% Dimethyl Polysilphenylene-siloxane) 1 m/ 0,1 mm ID/0,1 um,
Trägergas	Helium
Make-up-Gas	Stickstoff
Temperaturprogramm Säule	30 ⁰ C/1min//8°C/min//300°C/1 min
Mass Scan	50 - 800 m/z
Acquisition rate	50
Ionisierung	-70 eV
Ionenquelle	200 °C
Massenspektrometer	Time-of-flight

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Gewinnung des Pflanzensafts

Mit Hilfe der Hydraulikpresse wurde der Pflanzensaft der einzelnen Pflanzenkomponenten gewonnen (siehe 2.3.1). Unter Berücksichtigung des Gewichts vor und nach dem Pressen wurde die prozentuale Ausbeute an Pflanzensaft ermittelt und in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: prozentuale Ausbeute der einzelnen Pflanzenkomponenten

Pflanzenorgan	Blütenstand	Faser	Holz
Einwaage [g]	3360	4013	5920
Auswaage [g]	3235	2290	3826
Ausbeute [%]	3,7	42,9	35,2

In Tabelle 7 ist zu erkennen, dass die höchste Ausbeute an Pflanzensaft, mit 42,7%, aus den Fasern gewonnen werden konnte. Im Holzteil beträgt der Wasseranteil ca. 35%. Die Ausbeute aus den Blütenständen ist hingegen mit 3,7% erheblich geringer.

Pflanzensaft ist das im pflanzlichen Gewebe vorkommende Gefäßwasser, welches durch Pressen gewonnen wurde. Dieses Gefäßwasser ist das Transport- und Lösungsmittel innerhalb der Pflanze. In Xylem und Phloem der Leitbündel werden gelöste Salze bzw. Assimilate transportiert. Der Transport erfolgt von der Wurzel über den Stängel zu den Blättern und zur Blüte, bzw. der Nährstofftransport auch umgekehrt. Folglich ist im Blütenstand, u.a. auch durch die biochemische Stoffaktivität und dem damit einhergehenden Verbrauch an Wasser sowie durch die Transpiration der Blätter, der Wasseranteil im Vergleich zu den Transportorganen verringert [24]. Weiterhin kann der niedrige Wasseranteil des Blütenstands safts auch durch den seneszenten und somit trockenen Zustand der geernteten Blüten und Blütenstandblätter erklärt werden. Die Aussaat erfolgte am 11. April 2010 und die Pflanzen wurden am 7. Oktober 2010 geerntet. Die Hanfpflanzen befanden sich somit in einem überreifen Zustand, da sie erst ca. drei Monate nach eigentlichem Erntezeitpunkt geerntet wurden. Die Samenreifung beginnt nach der Befruchtung der weiblichen Blüten ca. drei Monate nach Aussaat und ist nach zwei bis vier

Wochen ausgereift. Die geernteten Samen befanden sich demnach bereits in einem vollständig ausgereiften Zustand.

3.2 Charakterisierung des Pflanzensaftes

Zur Beurteilung einer möglichen Verwendung des Pflanzensaftes als Getränk oder Getränkekomponente wurde dieser unmittelbar nach der Extraktion von zehn Personen, unabhängig voneinander, sensorisch bewertet und charakteristische Merkmale, wie Farbe, Geruch, Geschmack, notiert. Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die untersuchten Eigenschaften.

Tabelle 8: sensorische Bewertung der verschiedenen Pflanzensäfte

Pflanzensaft	Blütenstand	Faser	Holz
Farbe	trüb, intensiv grün	klar, grün gefärbt	klar, grün gefärbt
Geruch	typischer Hanfgeruch	nach gemähtem Gras	nach gemähtem Gras
Geschmack	bitter, salzig, öliger Nachgeschmack	süßlich, leicht grasig	neutral, leicht grasig
pH-Wert	8,0	7,6	8,3

Der Blütenstandssaft ist eine intensiv grün gefärbte Flüssigkeit mit einem typischen Hanfgeruch (siehe Tab. 8). Der leicht bittere, salzige Geschmack wird von einem öligen Nachgeschmack gefolgt. Die intensive Farbe und der Geruch des Safts lassen auf einen hohen Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen wie Färb- und Geruchsstoffen schließen. Diese sind überwiegend phenolische Verbindungen, z.B. Phenolsäuren und Flavonoide, die zum Großteil in der Blüte vorkommen [24, 34]. Die Grünfärbung lässt auf Chlorophylle schließen. Der ölige Nachgeschmack kann auf mitgepressten Samen zurückgeführt werden.

Der Fasersaft ist eine klare, grün gefärbte Flüssigkeit mit einem süßlichen Geschmack und einem leichten Geruch nach frisch gemähtem Gras, eventuell bedingt durch Cumarine. Die grünliche Farbe des Safts resultiert vermutlich aus ge-

löstem Chlorophyll, welches aus Chloroplasten im Abschlussgewebe des Stängels stammt [24].

Der Holzsaft ist, ähnlich wie der Fasersaft, eine klare, grün gefärbte Flüssigkeit. Bei der Trennung von Faser und Holz blieb ein geringer Anteil der Fasern am Holz haften, worauf die leichte Grünfärbung zurückzuführen ist. Da der Holzteil überwiegend dem Wasser - und Stofftransport dient, ist der Geschmack des Saftes relativ neutral. Der pH-Wert aller Säfte liegt im schwach alkalischen Bereich.

3.3 Quantifizierung des Wassergehalts

Wasser ist ein Hauptbestandteil der Pflanze und folglich auch des Pflanzensaftes. Die Bestimmung des Wassergehalts wurde mit der Methode nach Karl-Fischer (siehe 2.3.2.) durchgeführt [19]. Tabelle 9 gibt einen Überblick der relativen Wassergehalte.

Tabelle 9: Wassergehalte

Pflanzensaft	Blütenstand	Faser	Holz
Wassergehalt	84,7	88,3	93,3
[%]	±2,8	±1,1	±4,5

Aus Tabelle 9 ist zu entnehmen, dass wie erwartet im Holz der Wassergehalt am höchsten ist. Hier sind die für den Transport wichtigen Leitbündel lokalisiert. Pflanzensaft besteht hauptsächlich aus Wasser und den darin gelösten Stoffen, wie Zuckern, wasserlöslichen Proteinen, Aminosäuren, Anionen und Kationen. Über den Wassergehalt können so auch Rückschlüsse auf die gelösten Stoffanteile gezogen werden. Da der Holzsaft zu über 90 % aus Wasser besteht, ist der Anteil an gelösten Substraten daher gering. Der relative Wassergehalt des Fasersaftes ist erwartungsgemäß vergleichbar hoch. Der Wassergehalt im Blütenstands saft ist am geringsten, so dass hier ein höherer Anteil an gelösten Substraten erwartet werden kann. Zur genaueren Bestimmung des gelösten Anteils an gelösten Stoffen wurde die Trockenmasse der Säfte bestimmt (siehe 4.4).

3.4 Quantifizierung der Trockenmasse

Die Trockenmasse ist die Summe aller nichtflüchtigen Substanzen, dazu gehören Kohlenhydrate, Lipide, Proteine, Mineralstoffe sowie weitere nichtflüchtige Substanzen. Der Gehalt an Trockenmasse korreliert mit dem Wassergehalt [16]. Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte gravimetrisch (siehe 2.3.3.). In Tabelle 10 sind die relativen Gehalte dargestellt.

Tabelle 10: Trockenmassen

Pflanzensaft	Blütenstand	Faser	Holz
Trockenmasse	4,3	2,4	0,6
[%]	±0,3	±0,3	±0,1

Mit einem relativen Anteil der Trockenmasse im Blütenstandsafte von 4,3 % ist dieser im Vergleich aller Säfte am höchsten. Dies korreliert mit dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen geringeren Wassergehalt. Der relativ hohe Gehalt an Trockenmasse lässt daher auf einen höheren Anteil an stofflichen Komponenten wie Kohlenhydraten, Aminosäuren, Eiweißen und anderen Substraten schließen. Der relative Anteil an Trockenmasse im Fasersafte ist ungefähr um die Hälfte niedriger als im Blütenstandsafte und der Anteil an Trockenmasse im Holzsafte ist, wie der Wassergehalt erwarten lässt, im Vergleich sehr gering. Dies korreliert mit den ermittelten Wassergehalten der entsprechenden Pflanzensäfte dieser Organe und ihrer Funktion als Transportorgan.

3.5 Ernährungsrelevante Nährstoffe

3.5.1 Quantifizierung des Proteingehalts

Proteine setzen sich aus Aminosäuren zusammen, welche über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Über die menschliche Verdauung werden sie in die einzelnen Aminosäuren gespalten, die im Körper zur Proteinsynthese und zum geringen Anteil auch zur Energiegewinnung genutzt werden [25]. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach Kjeldahl (siehe 2.3.4) unter Berücksichtigung des Faktors 6,25 [17]. Der Faktor entspricht dem durchschnittlichen

Stickstoffgehalt im Protein von Obst und Gemüse und wurde daher zur Berechnung gewählt. Für die einzelnen Pflanzensäfte ergaben sich die in Tabelle 11 dargestellten Proteingehalte.

Tabelle 11: Proteingehalte

Pflanzensaft	Blütenstand	Faser	Holz
Proteingehalt saft [g/1 00ml] x 6,25	1,6 ±0,03	0,8 ±0,05	0,3 ±0,03

Der bestimmte Gehalt an wasserlöslichen Proteinen des Blütenstandsafte ist mit 1,6 g am höchsten. Dies kann auf die hohe Stoffaktivität in der Blüte zurückzuführen sein [24]. Der Proteingehalt im Fasersaft ist etwa um die Hälfte geringer. Beide Pflanzenkomponenten besitzen lebende Zellen, in denen Proteinsynthese stattfinden kann [24]. Zudem werden Nährstoffe im Phloem transportiert. Im Holzsaft ist der Proteingehalt mit 0,3 g am niedrigsten. Dies kann aus dem hohen Anteil toter Zellen im Holzteil resultieren. Xylem dient außerdem primär dem Wassertransport [24].

3.5.2 Quantifizierung des Gehalts an freien Aminosäuren

In der Natur kommen 20 verschiedene Aminosäuren vor, die frei in der Pflanze vorliegen können. Der Gehalt an freien Aminosäuren wurde mit Hilfe eines EZ:faast™ Amino Acid Analysis Kits (siehe 2.3.5) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die für den Menschen essentiellen Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Methionin, Phenylalanin, Lysin und Tryptophan) sind grau markiert. Sie können im Körper nicht synthetisiert werden und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden [25].

3.5.2.1 Pflanzensaft

In Tabelle 12 sind die in den untersuchten Pflanzensäften identifizierten Aminosäuren zusammengefasst.

Tabelle 12: freie Aminosäuren im Pflanzensaft

Pflanzensaft von	Blütenstand	Faser	Holz
	[mg/1 00ml]	[mg/1 00ml]	[mg/1 00ml]
Alanin	12,03	1,09	0,11
Glycin	1,43	0,48	0,02
γ -Aminobuttersäure	0,63	0,04	0
<i>Valin</i>	10,63	0,62	0
<i>Leucin</i>	3,57	0,41	0
<i>Isoleucin</i>	4,75	0,29	0
<i>Threonin</i>	35,07	0,82	0,07
Serin	0	0,59	0
Asparagin	7,86	1,25	0
Asparaginsäure	32,69	0,92	0
<i>Methionin</i>	0,38	0,11	0
Glutaminsäure	43,2	3,44	0
<i>Phenylalanin</i>	9,08	0	0
D-Aminoadipinsäure	0	1,9	0
Ornithin	2,22	0	0
<i>Lysin</i>	10,29	2,2	0,06
Tyrosin	2,39	0	0
<i>Tryptophan</i>	0,52	0	0
Cystin	2,91	0	0
Z freie Aminosäuren [mg/1 00ml]	179,7 $\pm 1,7$	14,2 $\pm 0,5$	0,3 $\pm 0,01$

Aus Tabelle 12 ist zu entnehmen, dass der höchste Gehalt an Aminosäuren mit 179,9 mg/100ml Saft im Blütenstands saft nachgewiesen werden konnte. In diesem Saft sind zudem alle acht essentiellen Aminosäuren enthalten. Besonders auffällig ist der hohe Gehalt an Threonin mit 35,1 mg/100 ml Saft. Valin, Phenylalanin und Lysin konnten jeweils zu etwa 10 mg/100 ml Saft nachgewiesen werden. Neben essentiellen Aminosäuren konnte auch ein hoher Anteil an Glutaminsäure und Asparaginsäure bestimmt werden. Sie sind zwar nicht essentiell, werden jedoch im

menschlichen Organismus zum Stickstoff-Transport benötigt [25]. Im Fasersaft sind außer Phenylalanin und Tryptophan ebenfalls essentielle Aminosäuren, jedoch mit geringeren Anteilen als im Blütenstandschaft, enthalten. Im Holzsaft konnten nur wenige Aminosäuren - Alanin, Glycin, Threonin und Lysin - in geringen Mengen identifiziert werden.

Im Blütenstandschaft sind die acht essentiellen Aminosäuren enthalten. Im Fasersaft konnten kein Phenylalanin und Tryptophan nachgewiesen werden. Der Holzsaft enthält zwar zwei essentielle Aminosäuren, Lysin und Threonin, weist aber insgesamt den geringsten Anteil an Aminosäuren auf.

3.5.2.2 Alkoholextrakt

Neben dem Aminosäuregehalt des Pflanzensafts wurde ebenfalls der Aminosäuregehalt des Alkoholextrakts der einzelnen Pflanzenteile bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten der Aminosäuren und deren Anteile im jeweiligen Pflanzenextrakt konnten diese nur im Blütenstandextrakt identifiziert werden. Die ermittelten Mengen werden in Tabelle 13 dargestellt. Die essentiellen Aminosäuren sind grau markiert.

Tabelle 13: freie Aminosäuren im Alkoholextrakt

Alkoholextrakt	Blütenstand
freie Aminosäuren	[mg/1 00ml]
Alanin	0,41
Glycin	0,23
Valin	1,2
Leucin	0,17
Isoleucin	0,16
Threonin	0,13
Asparaginsäure	0,11
Phenylalanin'	1,5
I. freie Aminosäure [mg/1 00ml]	3,91 ±0,5

Mit 3,91 mg/100ml ist der Anteil an freien Aminosäuren im Alkoholextrakt des Blütenstandes im Vergleich zum Blütenstandsft um ein Vielfaches geringer. Zudem konnten nur die essentiellen Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin und Phenylalanin identifiziert werden. Der geringe Gehalt an Aminosäuren im Alkoholextrakt ist mit den unterschiedlichen Löslichkeiten von Aminosäuren in Wasser und Alkohol zu erklären. Die identifizierten Aminosäuren besitzen zum Teil eine unpolare Seitenkette und sind relativ gut in Alkohol löslich. Im Faser- und Holzextrakt konnten keine Aminosäuren identifiziert werden. Der Anteil an alkohollöslichen Aminosäuren in diesen Pflanzenteilen ist anscheinend sehr gering.

3.5.3 Quantifizierung des Gehalts an freien Fettsäuren

Fettsäuren werden in den Chloroplasten und dem Cytosol der pflanzlichen Zellen synthetisiert [24]. Neben den einfach gesättigten und ungesättigten Fettsäuren werden zudem mehrfach ungesättigte Fettsäuren gebildet. Diese sind für den menschlichen Organismus essentiell und sollten mit der Nahrung aufgenommen werden [25]. Diese sind in Tabelle 14 grau markiert.

Die Bestimmung des Fettsäuregehalts im Pflanzensaft und Alkoholextrakt erfolgt nach Schulte (siehe 2.3.6).

3.5.3.1 Pflanzensaft

Die ermittelten Fettsäuregehalte der einzelnen Pflanzensäfte sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: freie Fettsäuren im Pflanzensaft

Pflanzensaft		Blütenstand	Faser	Holz
		[mg/1 00ml]	[mg/1 00ml]	[mg/1 00ml]
Palmitinsäure	C16:0	1,9	0,5	0
Stearinsäure	C-18:0	1,0	0,3	0,2
Olsäure	C18:1(9)	5,2	0,3	0,2
<i>Linolsäure</i>	C18:2(9,12)	0	0	0
<i>Linolensäure</i>	C18:3(9,12,15)	0	0.	0
I freie Fettsäuren		8,1	1,1	0,4
[mg/1 00ml]		±0,1	±0,1	±0,01

Tabelle 14 veranschaulicht, dass die ermittelte Fettsäurezusammensetzung aller Pflanzensäfte identisch ist. Es konnten jedoch nur C_{16:0} (Palmitinsäure) bis C_{18:i} (Ölsäure) identifiziert werden. Die essentiellen Fettsäuren C_{18:2} (Linolsäure) und C_{18:3} (α-Linolensäure) sind demnach nicht als freie Fettsäuren enthalten. Der höchste Gesamtfettsäuregehalt ist im Blütenstandsaft mit 8,1 mg/100ml nachweisbar, besonders hoch ist der Gehalt an Ölsäure (C_{18:i}) mit 5,2 mg/100ml Saft. Der hohe Anteil kann darauf zurückzuführen sein, dass in die Blüten bereits im Zustand der Samenreife waren, die den Anteil an Fettsäuren erhöhen. Der Gehalt an Fettsäuren im Faser- und Holzsaft ist dagegen vergleichsweise niedrig. Es zeigt sich, dass die Anteile an Fettsäuren in allen Pflanzenextrakten im Vergleich zum gepressten Hanföl aus den Samen sehr gering sind, was auf die niedrige Wasserlöslichkeit zurückzuführen ist. Die im Saft enthaltenen Fettsäuren sind für den menschlichen Organismus nicht essentiell, können jedoch zur Energiegewinnung genutzt werden.

3.5.3.2 Alkoholextrakt

Die ermittelte Fettsäurezusammensetzung aus der Analyse des Alkoholextrakts ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung freie Fettsäuren des Alkoholextrakts

Pflanzensaft		Blütenstand	Faser	Holz
		[mg/100ml]	[mg/100ml]	[mg/100ml]
Palmitinsäure	C _{16:0}	1,7	1,0	0,5
Stearinsäure	C _{18:0}	0,5	0,3	0
Ölsäure	C _{18:1} (9)	0,9	0,2	0
<i>Linolsäure</i>	C _{18:2} (9, 12)	5,4	0,6	0,5
<i>Linolensäure</i>	C _{18:3} (9, 12,15)	3,0	0,3	0
I. freie Fettsäuren		12,0	2,4	1,0
[mg/100ml]		±0,5	±0,5	±0,1

Der Anteil der identifizierten Fettsäuren im Alkoholextrakt ist im Vergleich zum Pflanzensaft (s. Tabelle 14) höher. Neben gesättigten Fettsäuren (Stearin- und Palmitinsäure) und einfach ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure) sind besonders im

Blütenextrakt die essentiellen Fettsäuren Linolsäure (C_{18:2}) und α-Linolensäure (C_{18:3}) vorhanden. Im Blütenextrakt konnte ein Gesamtfettsäuregehalt von 12,0 mg/100ml ermittelt werden, mit einem hohen Anteil der essentiellen Linolsäure und Linolensäure. Dieser hohe Gehalt in der Alkoholextraktion kann auch auf vorhandene Samen sowie auf die Extraktion mit einem höher polaren Lösungsmittel, zurückgeführt werden. Im Faserextrakt konnte das gleiche Fettsäurespektrum wie im Blütenextrakt identifiziert werden. Der Gehalt an Linol- und Linolensäure ist jedoch geringer und liegt unter 1 mg/100ml Extrakt. Im Holzextrakt sind nur geringe Mengen an Palmitinsäure (C_{16:0}) und Linolsäure (C_{18:2}) vorhanden. Davon ist nur die Linolsäure für den menschlichen Organismus essentiell. Im Vergleich zum Pflanzensaft ist der Gehalt an Fettsäuren, besonders an essentiellen Fettsäuren, im Ethanolextrakt höher.

3.5.4 Qualitative und Quantitative Bestimmung des Zuckergehalts

3.5.4.1 Identifizierung mittels Dünnschichtchromatografie

Zucker werden im menschlichen Körper hauptsächlich zur Energiegewinnung genutzt. Sie kommen in der Natur als Monosaccharide, Disaccharide oder Polysaccharide vor [25].

Zur Bestimmung der Zucker in Pflanzensaft und Alkoholextrakt wurden diese zunächst mittels Dünnschichtchromatographie (DC) identifiziert. Die Methode ist in 2.3.7.1 erläutert.

Die verschiedenen Pflanzensäfte und sowie der alkoholische Extrakt wurden auf die Monosaccharide Glucose, Fructose, Mannose sowie Rhamnose und auf die Disaccharide Maltose, Saccharose und Lactose analysiert. In Tabelle 16 sind die identifizierten Zucker zusammengefasst.

Tabelle 16: Identifizierte Monosaccharide mittels DC

Pflanzenfraktion	Blütenstand	Faser	Holz	Alkoholextrakte
Zucker	Glucose Fructose	Fructose	keine Zucker	keine Zucker

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Blütenstandschaft wurden die Monosaccharide Glucose und Fructose nachgewiesen, in Faser- und Wurzelsaft wurde lediglich Fructose identifiziert (s. Tabelle 16). Im Holzsaft wurden keine Zucker nachgewiesen. Im Alkoholextrakt wurden aufgrund der schlechten Löslichkeit ebenfalls keine Zucker nachgewiesen.

3.5.4.2 Quantifizierung mittels HPLC

Die Quantifizierung erfolgte nach der in 2.3.7.2 beschriebenen Methode mit RI-Detektor. Der Zuckergehalt der Pflanzensäfte wird in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Zuckergehalt in Pflanzensaft

Pflanzensaft	Blütenstand [g/100ml]	Faser [g/100ml]
Zucker		
Glucose	0,6 ±0,01	n.i.
Fructose	0,3 ±0,02	n.d.
<i>l.</i> Zucker [mg/100ml]	0,9 ±0,02	n.d.

n.d. = nicht detektierbar, *n.i.* = nicht identifiziert

Im Blütenstandschaft konnte der höchste Gehalt an Glucose und Fructose identifiziert werden (s. Tabelle 17). Diese Zucker liegen in einem Verhältnis von 1:2 vor, mit einem Gesamtgehalt von 0,9 mg/100ml. Der Gehalt an Fructose im Fasersaft war so gering, er unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Im Blütenstandschaft konnte im Vergleich zum Fasersaft ein hoher Gehalt an frei gelösten Monosacchariden nachgewiesen werden. Im Alkoholextrakt können wegen der schlechten Löslichkeit keine Zucker identifiziert werden.

3.5.5 Quantifizierung des Mineralstoffgehaltes

Mineralstoffe gehören zu den anorganischen Bestandteilen unserer täglichen Nahrung und sind für den menschlichen Organismus essentiell. Sie beeinflussen bestimmte Stoffwechselforgänge im Körper und sind Bestandteile der Zellen [25]. Die Bestimmung des Mineralstoffgehalts in den Pflanzensäften und dem Alkoholextrakt erfolgte mittels ICP-OES (siehe 2.3.8).

3.5.5.1 Pflanzensäfte

Der ermittelte Mineralstoffgehalt der einzelnen Pflanzensäfte ist in Tabelle 18 dargestellt.

Wichtige Mineralstoffe werden ernährungsphysiologisch in Mengen- und Spurenelemente unterteilt. Mengenelemente sind in größeren Mengen im Körper vorhanden, zu diesen zählen z.B. Magnesium (Mg), Natrium (Na) und Calcium (Ca). Spurenelementen kommen hingegen nur in geringen Mengen im Körper vor, davon sind nur bestimmte Elemente essentiell, wie Eisen (Fe), Kobalt (Co), Kupfer (Cu), Mangan (Mn) und Zink (Zn) [25].

Tabelle 18: Gehalt an Mengen- Spurenelementen im Pflanzensaft

Pflanzensaft	Blütestand	Faser	Holz
	[mg/100ml]	[mg/100ml]	[mg/100ml]
Mengenelemente			
Magnesium	0,5	0,1	-
Calcium	1,0	0,2	0,2
Natrium	0,1	0,1	0,3
Z Gehalt an Mengenelementen [mg/1 00ml]	2,5 ±0,5	0,5 ±0,1	0,6 ±0,2
Spurenelemente			
Al	-	0,09	0,4
Cu	-	0,04	0,04
Fe	-	0,1	1,0
Mn	0,004	0,04	0,1
Ni	0,006	0,01	0,01
S	0,5	4,0	2,0
Zn	0,01	0,2	0,2
I. Gehalt an Spurenelementen [mg/1 00ml]	0,52 ±0,1	4,4 ±0,1	4,3 ±0,1
Gesamt-MST-Gehalt [mg/1 00ml]	3,0 ±0,5	5,0 ±0,5	5,0 ±0,5

Die Gesamtmineralstoffgehalte des Faser-, und Holzsaftes liegen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich, da über diese Pflanzenteile überwiegend in Wasser gelöste Ionen transportiert werden (s. Tabelle 18) [24]. Der Gesamtgehalt des Blütenstands safts ist mit 3,0 mg/100ml dagegen am niedrigsten, jedoch ist der Anteil an Mengenelementen (Mg, Ca, Na) vergleichsweise hoch. Insbesondere Calcium, das an vielen physiologischen Prozessen beteiligt ist, weist erwartungsgemäß den höchsten Gehalt auf.

In Faser- und Holzsaft ist der Anteil an Spurenelementen vergleichsweise höher. Auffällig ist der hohe Gehalt an Eisen im Holzsaft sowie der hohe Schwefelgehalt in allen drei Pflanzensäften. Der Schwefelgehalt liegt im Holzsaft bei ca. 4,0 mg/100 m. ist in allen Presssäften stark erhöht und macht über 50 % bis 80 % des

Gesamtmineralstoffgehalts aus. Schwefel kann in gelöster Form als Sulfat oder als schwefelhaltige Verbindungen in der Pflanze vorkommen [24]. Zu diesen gehören z.B. die Aminosäuren Cystein und Methionin. Diese konnten jedoch nur in geringen Mengen in diesen Pflanzensäften nachgewiesen werden (siehe 4.4.2.1) und haben somit wohl nur einen geringen Einfluss auf den Schwefelgehalt. Der hohe Schwefelgehalt beruht also scheinbar auf einem hohen Anteil an Sulfat oder Sulfit bzw. anderen schwefelhaltigen Verbindungen.

3.5.5.2 Alkoholextrakt

Neben dem Pflanzensaft wurde auch der Mineralstoffgehalt im Alkoholextrakt bestimmt. Der Mineralstoffgehalt ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Gesamtmineralstoffgehalt des Alkoholextrakts

Alkoholextrakt	Blütenstand	Faser	Holz
Mengenelemente [mg/100ml]			
Magnesium	0,06	0,03	0
Calcium	0,08	0,01	0,01
Natrium	0,01	0,02	0,01
E Gehalt an Mengenelementen [mg/1 00ml]	0,15 ±0,01	0,06 ±0,01	0,02 ±0,001
Spurenelemente [mg/100ml]			
Al	0	0	0,4
Cu	0,003	0,0004	0,0007
Fe	0,002	0,0001	0
Mn	0,0003	0	0,0001
Ni	0,003	0,001	0,0004
S	0,5	0,3	0,051
Zn	0,01	0,002	0,0053
I. Gehalt an Spurenelementen [mg/1 00ml]	0,5 ±0,1	0,31 ±0,1	0,057 ±0,1
Gesamt-MST-Gehalt [mg/1 00ml]	0,65 ±0,05	0,37 ±0,05	0,08 ±0,01

3. Ergebnisse und Diskussion

Der Gehalt an Mineralstoffen im Alkoholextrakt ist um ein Vielfaches niedriger als im Pflanzensaft. Im Blütenstandextrakt ist der höchste Gehalt an Spuren- und Mengenelementen vorhanden, im Vergleich zum Saft liegen die Gehalten jedoch wesentlich niedriger (s. Tabelle 19). Auch im Alkoholextrakt wird ein erhöhter Schwefelgehalt nachgewiesen, dieser ist im Blütenstandextrakt am höchsten. Eine höhere Ausbeute an Mineralstoffen ist daher nicht mit Alkohol möglich, zudem ist der Gehalt an Mengenelementen sehr gering.

3.5.6 Quantifizierung des Anionengehalts

Zu den essentiellen Mineralstoffen zählen unter anderem Chlorid, Sulfat und Phosphat, die überwiegend in gelöster Form vorliegen [25]. Die Bestimmung des Gehaltes an ernährungsrelevanten Anionen im Pflanzensaft und im Alkoholextrakt erfolgte mittels Ionenchromatographie (siehe 2.3.9.).

3.5.6.1 Pflanzensaft

Die Ergebnisse aus der Analyse des Pflanzensaftes sind in Tabelle 20 angegeben.

Tabelle 20: Anionengehalt im Pflanzensaft

Pflanzensaft	Blütenstand	Faser	Holz
Anion	[mg/1 00ml]		
Chlorid	40,6 ±0,3	79,1 ±0,8	30,7 ±0,001
Nitrit	9,3 ±0,1	75,7 ±0,8	-
Nitrat	57,5 ±0,5	2,1 ±0,02	0,2 ±0,001
Phosphat	11,9 ±0,1	12,2 ±0,1	3,4 ±0,001
Sulfat	60,0 ±0,5	23,4 ±0,2	7,1 ±0,001
Gesamtanionengehalt [mg/100ml]	179,4 ±0,5	192,5 ±0,5	41,3 ±0,5

In summa ist im Fasersaft der höchste Gesamtanionengehalt vorhanden. Für die einzelnen Anionen ergibt sich dabei folgende Analytik:

Auffällig ist der hohe Gehalt an Nitrat und Nitrit im Blütenstand- sowie Fasersaft. Nitrit ist vorwiegend im Fasersaft enthalten. Für die Pflanze sind diese Anionen wichtige Stickstoffquellen z. B. zur Synthese von Aminosäuren, die primär über die Wurzel aus dem Boden aufgenommen werden [24]. Auf den menschlichen Organismus können sie jedoch in hohen Mengen toxisch wirken. Nitrat reagiert im Körper zu Nitrit, welches mit sekundären Aminen krebserzeugende Nitrosamine bildet. Außerdem kann eine erhöhte Nitrataufnahme bei Säuglingen zu Methämoglobinämie (Sauerstoffunterversorgung) führen [25]. Folglich müsste vor der Verwendung des Saftes aus solchen Fraktionen das Nitrat mit Hilfe spezifischer Ionenaustauscher entfernt werden.

Im Holzsaft sind der Nitrit- und Nitratgehalt vergleichsweise niedriger. In diesem Saft wurde stattdessen Chlorid erhöht nachgewiesen. Chlorid ist das Hauptanion des Extrazellulärraums und beeinflusst den Säure-Base-Haushalt. Sulfat und Phosphat kommen hier auch nur in geringen Mengen vor. Diese Anionen sind in größeren Mengen im Blütenstand-, Wurzel- und Fasersaft vorhanden. Im Blütenstandschaft ist der höchste Gehalt an Sulfat zu finden. Sulfat oder auch Schwefel sind wichtige Bestandteile von sekundären Pflanzenstoffen, Proteinen, Vitaminen und anderen Stoffen, welche erhöht im Blütenstand vorkommen können [24]. Dem Körper liefert Sulfat den notwendigen Schwefel und kann durch Aktivierung die Bindegewebsbildung oder andere Stoffwechselforgänge beeinflussen [25].

Der Phosphatgehalt ist bei allen vier Pflanzensäften in vergleichbaren Mengen bestimmt worden. Phosphor erfüllt in der Pflanze essentielle Funktionen und beeinflusst u.a. die Photosynthese, den Wasserhaushalt und den Kohlenhydrathaushalt. Dieses bildet mit Calcium stabile Verbindungen, die für den Skelettaufbau notwendig sind [25].

Diese Analyse zeigt, dass für die Verwendung im menschlichen Verzehr einige Anionen zunächst aus dem Saft entfernt werden müssten.

3.5.6.2 Alkoholextrakt

Die Ergebnisse aus der Analyse des Alkoholextrakts sind in Tabelle 21 angegeben.

Tabelle 21: Anionengehalt im Alkoholextrakt

Alkoholextrakt	Blütenstand	Faser	Holz
Anion	[mg/1 00ml]		
Chlorid- cr	1,9 ±0,02	1,1 ±0,01	2,7 ±0,02
Nitrit-M ₂ ~	0,1 ±0,001	0,8 ± 0,005	0
Nitrat-M ₃ ~	2,9 ±0,03	1,3 ±0,01	2,1 ±0,02
Phosphat/P ₄ ² ~	3,8 ±0,04	1,5 ±0,01	0,6 ± 0,005
Sulfat- SO ₄ ~	4,5 ±0,04	1,4 ±0,01	0,3 ± 0,005
Gesamt-Nährsalzgehalt [mg/1 00ml]	13,2 ±0,5	6,1 ±0,5	5,7 ±0,5

Der Gehalt an Anionen im Alkoholextrakt ist im Vergleich zu den Pflanzensäften um den Faktor zehn niedriger. Der Gehalt an Anionen im Blütenextrakt ist mit einem deutlichen Anteil von Phosphat und Sulfat am höchsten. Im Faserextrakt ist der Nitritgehalt am höchsten, im Extrakt der Wurzel der Nitratgehalt. Durch die Alkoholextraktion der Pflanzenbestandteile ergibt sich nur eine geringe Menge an Anionen. Zudem ist in den einzelnen Extrakten der Nitrat- und Nitritgehalt erhöht. Eine höhere Ausbeute an Anionen wird somit über die Gewinnung des Pflanzensaftes erreicht.

3.5.7 Quantifizierung von Tocopherolen und Phytosterine

Tocopherol, auch bekannt als Vitamin E, ist ein fettlöslicher Vitaminkomplex aus alpha - delta Tocopherol und alpha bis delta Tocotrienolen, mit z. B. antioxidati-

3. Ergebnisse und Diskussion

ver Wirkung (siehe 2.4.3). Zu der Gruppe der Phytosterine gehören z. B. DDSitosterol, Campesterol, Stigmasterol und Stigmastanol [24]. Die Bestimmung der Tocopherole und Phytosterine im Pflanzensaft und im Alkoholextrakt erfolgte gaschromatographisch nach der in 2.3.13 erläuterten Methode.

3.5.7.1 Pflanzensaft

Tocopherole wirken hauptsächlich als Oxidantien im menschlichen Körper und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Neben dieser Wirkung beeinflusst Vitamin E zudem zahlreiche enzymatische Stoffwechselfvorgänge [2]. Phytosterine können außerdem antikanzerogen und cholesterinsenkend wirken und sind daher für den menschlichen Organismus wichtig [25]. In den einzelnen Pflanzensäften konnten jedoch keine Phytosterine und Tocopherole identifiziert werden. Dies lässt sich mit ihrer schlechten bis nicht vorhandenen Wasserlöslichkeit dieser Substanzen erklären. Durch die Gewinnung der Pflanzensäfte werden überwiegend wasserlösliche Stoffe freigesetzt, Tocopherole und Phytosterine sind primär fettlöslich.

3.5.7.2 Alkoholextrakt

In den einzelnen Alkoholextrakten konnten ebenfalls keine Tocopherole und Phytosterine identifiziert werden. Da sich diese wegen ihrer Fettlöslichkeit besser in Alkohol lösen sollten, ist vermutlich die Konzentration in den einzelnen Pflanzenkomponenten sehr gering liegt unterhalb der Nachweisgrenze.

3.6 Weitere Inhaltsstoffe

Neben dem Gehalt an Proteinen, Aminosäuren, Kohlenhydraten, Fettsäuren, Mineralstoffen und Vitaminen wurden weiterhin der Gesamtkohlenstoff- und Gesamtpolyphenolgehalt der einzelnen Pflanzensäfte bestimmt.

3.6.1 Quantifizierung des Gesamtkohlenstoffgehaltes

Ernährungsrelevante Nährstoffe, wie Proteine, Kohlenhydrate, Fette und Vitamine sind organische Substanzen mit einem Kohlenstoffgrundgerüst. Über den Gesamtkohlenstoff, besonders über den organischen Gesamtkohlenstoff, kann somit der Anteil an organischen Substanzen ermittelt werden [2,25].

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Bestimmung des Gesamtkohlenstoffgehaltes des Pflanzensaftes erfolgte mit Hilfe der in 2.3.10 erläuterten Methode. In Tabelle 22 sind die Gehalte der einzelnen Säfte dargestellt.

Tabelle 22: Gesamtkohlenstoffgehalt im Pfalzensaft

Pflanzensaft	Blütenstand	Faser	Holz
	[mg/100ml]		
Anorganischer Kohlenstoff (Total Inorganic Carbon)	36,6	48,6	10,7
%-Anteile am Gesamtkohlenstoff	2,6 %	11,3%	8,5 %
Organischer Kohlenstoff (Total Organic Carbon)	1347,9	382,9	115,8
%-Anteile am Gesamtkohlenstoff	97.4 %	88.7 %	91.5%
Gesamtkohlenstoff [mg/1 00ml] (Total Carbon-Gehalt)	1384,5 ±5,0	431,5 ±5,0	126,5 ±5,0

Der Gesamtkohlenstoffgehalt (TC) ist im Blütenstandschaft mit 1384,5 mg/100ml deutlich höher als im Faser- und Holzsaft (s. Tabelle 22). Zu 97 % ergibt sich dieser aus der Verbrennung organischer Substanzen. Die bereits durchgeführten Analysen zur Bestimmung des Gehalts an Proteinen, Kohlenhydraten, Aminosäuren, Fettsäuren und der Gesamtkohlenstoffgehalt zeigen, dass der Anteil an organischen Verbindungen im Blütenstandschaft am höchsten ist. Weitere organische Verbindungen sind zudem sekundäre Pflanzenstoffe, wie Färb-, Geruchs- und Gerbstoffe, die ebenfalls in erhöhter Konzentration im Blütenstandschaft vorliegen (vgl. 3.2.). Der Gehalt an Gesamtkohlenstoff im Fasersaft ist verglichen mit dem Blütenstandschaft geringer. Hier liegt ein erhöhter Anteil an anorganischem Kohlenstoff vor. Dieser kann sich aufgrund der gelösten Carbonat-

Verbindungen im Wasser, welches in den Fasern transportiert wird, ergeben. Dies gilt auch für den Holzsaft, dessen Gesamtkohlestoffgehalt am geringsten ist.

3.6.2 Quantifizierung des Gesamtpolyphenolgehalts

Polyphenole sind aromatische Verbindungen mit mindestens zwei gebundenen Hydroxygruppen. Sie können in der Pflanze als Färb-, Geschmacks- oder Gerbstoffe vorliegen, z.B. als Phenolcarbonsäuren oder Flavonoide. Aufgrund ihrer Struktur besitzen sie eine antioxidative und vitaminähnliche Wirkung. Außerdem können sie je Substanz auch toxisch wirken [2, 25, 34].

Der Gehalt wurde nach der in 2.3.11 erläuterten Methode bestimmt und in Tabelle 23 angegeben. Eine genaue Differenzierung in verschiedene Polyphenole ist nach dieser Methode nicht möglich, sollte aber im Hinblick auf die Nutzung der Extrakte in der Nahrungsmittelindustrie noch vorgenommen werden.

Tabelle 23: Gesamtpolyphenolgehalte im Pflanzensaft

Pflanzenorgan	Blütenstand	Faser	Holz
Gesamt-Polyphenolgehalt [mg/100ml]	191,2 ±0,7	37,9 ±0,2	11,7 ±0,8

Aus Tabelle 23 ist zu entnehmen, dass der höchste Polyphenolgehalt mit 191,2mg im Blütenstandssaft vorliegt. Der hohe Gehalt im Blütenstandssaft kann auf Verbindungen aus dem Harz in den Drüsenhaaren an Blättern und Blüten zurückzuführen sein. Zu den phenolischen Verbindungen gehören Cannabinoide, aber u. a. auch, Limonen und Piperidin. (vgl. 2.3) [10]. Der Gehalt im Fasersaft ist um etwa ein sechsfaches niedriger und der Gehalt im Holzsaft liegt unter 20 mg/100ml.

3.7 Analyse des unlöslichen Rückstands aus dem Blütenstandssaft

Durch Zentrifugieren der gewonnenen Blüten kann es zur Ausbildung von zwei Phasen kommen (vgl. 2.3.1), einer hydrophilen und einer lipophilen Phase. Dementsprechend wurde dieser auf fettlösliche Substanzen untersucht. Es wurden

freie Fettsäuren (siehe 3.3.6), Tocopherole sowie Phytosterine (siehe 3.3.13) bestimmt. Mittels GCxGC MS-Analyse (siehe 3.3.14) konnten weitere Substanzen identifizieren werden.

3.7.1 Quantifizierung des Gehalts an freien Fettsäuren

Die Bestimmung der Fettsäuren erfolgte mit der in 2.3.6 beschriebenen Methode nach Schulte [26]. Das ermittelte Fettsäurespektrum ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Fettsäuren im Rückstand

Fettsäure	Summenformel	Retentionszeit [min]	Konzentration [mg/1 00ml]
Myristinsäure	C ₁₄ :0	15,81	42,4
Palmitinsäure	C ₁₆ :0	17,35	5,1
Stearinsäure	C ₁₈ :0	19,22	1,6
Olsäure	C ₁₈ :1 (9)	19,49	7,9
Linolsäure	C ₁₈ :2(9, 12)	20,08	26,0
Linolensäure	C ₁₈ :3(9,12,15)	20,97	8,0
<i>I.</i> freie Fettsäuren [mg/1 00ml]			91,0

Im Rückstand wurden die Fettsäuren von C₁₄:0 bis C₁₈:3(9,12,15) identifiziert. Neben den einfach ungesättigten Fettsäuren sind in höheren Mengen auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten, davon insbesondere Linolsäure (C₁₈:2(9,i2))- Auffällig ist der hohe Gehalt an C₁₄:0, der doppelt so hoch ist, wie der Gehalt an Linolsäure. Die Synthese von Fettsäuren findet an einem membrangebundenen Multienzym-komplex statt. Die Reaktionskette startet mit der Reaktion von Acetyl-CoA (C₂-Einheit) mit Malonyl-CoA zu Butyryl-CoA (C₄-Einheit). Dies reagiert weiter bis zu einer Kettenlänge von 16 C-Atomen (Palmitinsäure) unter Anlagerung weiterer C₂-Einheiten. Die Palmitinsäure wird vom Enzymkomplex abgespalten und in der Zelle zu C₁₈:0-, C₁₈:1- und C₁₈:3 -Fettsäuren modifiziert [24, 34]. Die identifizierte Myristinsäure könnte auf Grund des fortgeschrittenen Reifegrades durch Abbau über β -Oxidation entstanden sein [24].

3.7.2 Quantifizierung von Tocopherolen und Sterinen

Im Rückstand konnten keine Tocopherole und Sterine identifiziert werden. Wahrscheinlich liegen die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze.

3.7.3 Qualifizierung mittels GCxGC-MS

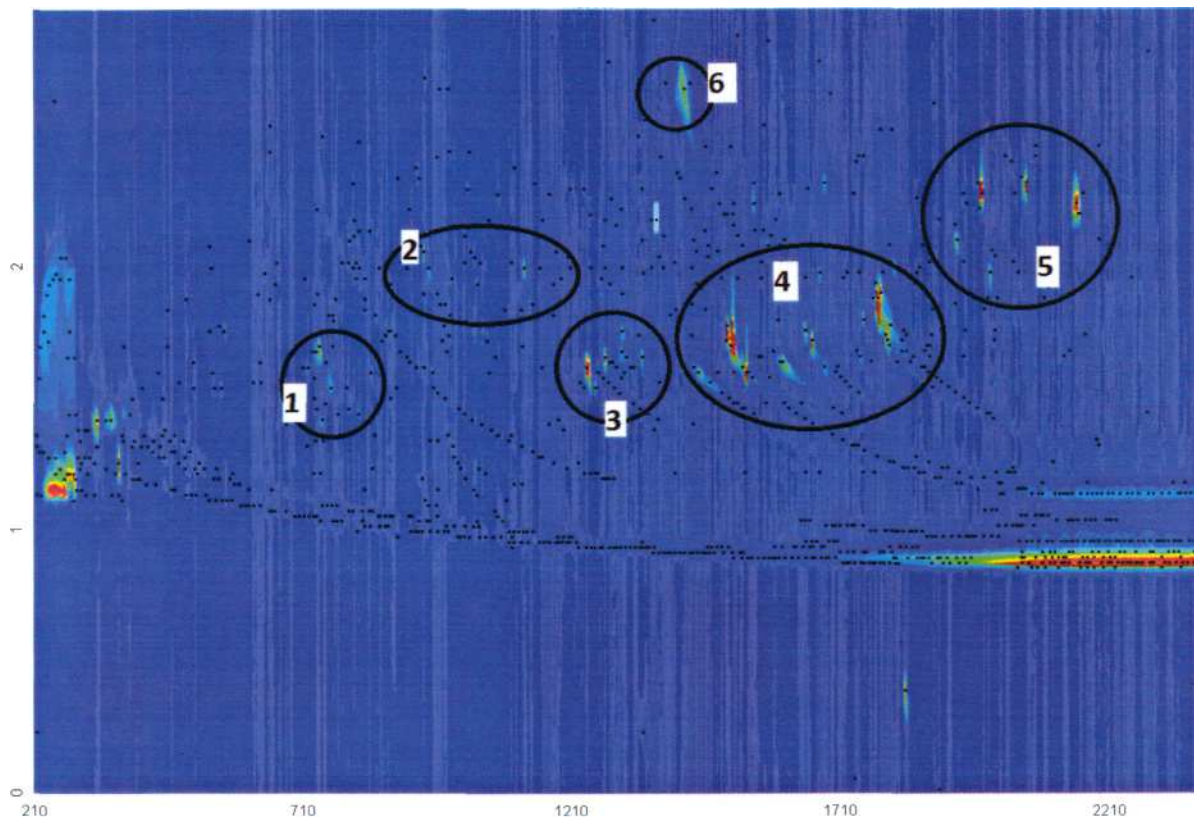


Abb. 6: 2D-Chromatogramm des unlöslichen Rückstands

Durch GCxGC-TOF-MS Analyse des unlöslichen Rückstands wurden ca. 20 getrennte Peaks ermittelt. Die Positionen der Peaks im 2-D-Chromatogramm gaben Aufschluss über die Flüchtigkeit (von links nach rechts abnehmend) und die Polarität (von unten nach oben zunehmend) der unbekannt Substanzen. So wurden Informationen über isomere und homologe Zusammenhänge ermittelt. Die Identifikation der Substanzen erfolgte aus dem Vergleich der ermittelten Massenspektren mit Massenspektren einer Datenbank. Im ersten Kreis konnten eine kurzkettinge Fettsäure (Capronsäure) und Alkene identifiziert werden (s. Abb. 7). Im zweiten

3. Ergebnisse und Diskussion

Kreis handelte es sich aromatische Verbindungen und zum Teil auch polyphenolische Verbindungen. Im dritten Kreis konnten Monoterpene (Pinene und Carenen), Sesquiterpene (Caryophyllene) und Phenole identifiziert werden. Im vierten Kreis sind vier größere, hintereinander folgende Peaks zu erkennen. Die einzelnen Peaks konnten als Fettsäuren identifiziert werden. Im Rückstand sind demnach Myristinsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure, Linolsäure, Linolensäure und Ölsäure enthalten. Dies bestätigt die ermittelte Fettsäurezusammensetzung der vorigen Messung (siehe 3.4.1.). Die drei Peaks im fünften Kreis konnten als Cannabinoide identifiziert werden (Cannabidiol, Cannabigerol). Der einzelne Peak im sechsten Kreis lässt auf eine vergleichsweise polare Substanz schließen, da sich dieser weit im oberen Bereich des Chromatogramms befindet. Anhand des Massenspektrums konnte es als myo-Inositol identifiziert werden.

Im Rückstand konnten die Fettsäuren von Myristinsäure ($C_{14:0}$) bis Linolensäure ($C_{18:3}$) identifiziert werden. Tocopherole und Sterine konnten nicht identifiziert werden. Die GCxGC-Analyse zeigte, dass es sich um ein Mehrkomponenten-Gemisch handelte, in dem überwiegend lipophile Substanzen enthalten waren. Da zum Erntezeitpunkt der Pflanzen (siehe 3.3.1) die Blüten bereits Samen ausgebildet hatten und diese mit gepresst wurden, kann es sich um Inhaltsstoffe des Hanföls handeln. In Hanföl sind hauptsächlich die Fettsäuren Palmitinsäure ($C_{16:0}$) bis Linolensäure ($C_{18:3}$) enthalten, wovon Linolsäure den höchsten Anteil ausmacht [13]. Die Fettsäuren $C_{16:0}$ bis $C_{18:3}$ konnten im Rückstand nachgewiesen werden, zudem ist der C-18:2 -Gehalt am größten. Zusätzlich wurde Myristinsäure ($C_{14:0}$ -Fettsäure) identifiziert. Das Vorkommen dieser Fettsäure konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Neben den Fettsäuren wurden zudem Cannabinoide, Mono- und Sesquiterpene und verschiedene phenolische Verbindungen identifiziert. Wie in Abschnitt 2.3. erklärt sind diese Verbindungen typisch für das Hanfharz [10]. Besonders auffällig ist das myo-Inositol im Rückstand. Diese cyclische, polare Verbindung war eher im wässrigen Extrakt zu erwarten.

Insgesamt setzt sich der Rückstand aus den in Hanföl und Hanfharz vorkommenden, lipophilen Substanzen zusammen.

4. Vergleich mit anderen Untersuchungen

Die ermittelten Gehalte an Nährstoffen der einzelnen Pflanzensäfte sollen nun mit den Nährstoffgehalten des gewonnenen Pflanzensaft aus den ganzen Pflanzen verglichen werden. Diese wurden aus einer vorherigen Arbeit der Arbeitsgruppe entnommen [4]. In diesem Projekt wurden drei Monate alte Pflanzen untersucht und der Stängel mit Blättern gepresst. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen sechs Monate alte Pflanzen verwendet, die in ihre einzelnen Bestandteile zerlegt wurden. Aufgrund des fortgeschrittenen Reifezustands waren die Blättern am Blütenstand bereits in einem seneszenten Zustand. Auch der Pressvorgang unterschied sich. Hier wurde ein handelsüblicher Entsafter verwendet wurde. Somit ist bei einem Vergleich der Analysendaten auch zu berücksichtigen, dass durch die unterschiedliche gewonnene Saftmenge verschiedene Konzentrationen an Inhaltsstoffen vorliegen können.

Im Folgenden wird der Gehalt an Mineralstoffen, freien Aminosäuren, freien Fettsäuren und Tocopherolen verglichen.

Tabelle 26: Vergleich der Mineralstoffgehalte

Pflanzensaft	Blütenstand (28 W.)	Faser (28 W.)	Holz (28 W.)	Pflanzen (12 W.)
Mineralstoffe	[mg/1 00ml]			[mg/1 00ml]
Calcium	1,0	0,2	0,2	55,5
Kupfer	0	0,04	0,04	>0,54
Eisen	0	0,1	1,0	0,17
Magnesium	0,5	0,1	0	21,8
Natrium	0,1	0,1	0,3	6,2
Zink	0,01	0,2	0,2	0,3

(x.W.) = Alter der Pflanzen in Wochen nach Aussaat

Der Gehalt an Mineralstoffen in den Säften der einzelnen Pflanzenteile ist um ein Vielfaches geringer im Vergleich zum Saft aus der kompletten jüngeren Pflanze (s. Tabelle 26). Besonders auffällig ist die Abnahme an Calcium, Magnesium und Natrium. Diese Kationen sind an vielen Stoffwechselfvorgängen der Pflanzewährend der Wachstumsperiode insbesondere in den Blättern beteiligt und somit im

4. Vergleich mit anderen Untersuchungen

seneszenten Zustand nur noch in geringen Mengen im Saft enthalten. Der Gehalt an Eisen, Zink und Kupfer ist im Vergleich auch nach einem späteren Zeitpunkt der Ernte noch in ähnlichen Mengen enthalten.

Tabelle 27: Vergleich der Gehalte an Fettsäuren

Pflanzensaft	Blütenstand (28 W.)	Faser (28 W.)	Holz (28 W.)	Pflanzen (12 W.)
Fettsäuren	[mg/1 00ml]			[mg/1 00ml]
Palmitinsäure C _{16:0}	1,9	0,5	0	0
Stearinsäure C _{18:0}	1,0	0,3	0,2	0,38
Olsäure C _{18:1(9)}	5,2	0,3	0,2	0,38
Linolsäure C _{18:2(9,12)}	0	0	0	0,51
a-Linolensäure C _{18:3(9,12,15)}	0	0	0	n.b.

(x W.) = Alter der Pflanzen in Wochen nach Aussaat, n.B. = nicht bestimmt

Der höchste Gehalt an Fettsäuren ist im Blütenstandschaft enthalten (s. Tabelle 27). Der Anteil an Fettsäuren ist im Saft der ganzen Pflanzen ungefähr um den Faktor 10 geringer als im Blütenstandschaft ist. Der hohe Gehalt an Fettsäuren im Blütenstandschaft kann sich zudem aus den enthaltenen Samen, welche mit gepresst wurden, ergeben. Da der Stängel primär die Funktion als Stütz- und Transportorgan übernimmt, entsprechen die niedrigeren Anteile den Erwartungen.

Wie in Tabelle 28 zu erkennen ist, wurden sowohl im Blütenstandschaft wie auch im Saft der ganzen Pflanze alle acht essentiellen Aminosäuren nachgewiesen (grau markiert). Der Anteil im Saft der ganzen Pflanze ist jedoch ungefähr um den Faktor 10 geringer als im Blütenstandschaft. Auch hier kann man davon ausgehen, dass der gereifte Samenanteil im Blütenstand zur Erhöhung der Aminosäuregehalte geführt hat..

4. Vergleich mit anderen Untersuchungen

Tabelle 28: Vergleich der Gehalte an Aminosäuren

Pflanzensaft	Blütenstand (28 W.)	Faser (28 W.)	Pflanzen (12 W.)
Aminosäure	[mg/100ml]		
Alanin	12,03	1,09	1,05
Glycin	1,43	0,48	0,16
γ-Aminobuttersäure	0,63	0,04	0
<i>Valin</i>	10,63	0,62	0,17
<i>Leucin</i>	3,57	0,41	0,78
<i>iso-Leucin</i>	4,75	0,29	1,13
<i>Threonin</i>	35,07	0,82	3,8
Serin	0	0,59	9,85
Asparagin	7,86	1,25	0
Asparaginsäure	32,69	0,92	1,25
<i>Methionin</i>	0,38	0,11	0
Glutaminsäure	43,2	3,44	0,55
<i>Phenylalanin</i>	9,08	0	1,04
α-Aminoadipinsäure	0	1,9	0,62
Ornithin	2,22	0	0,4
<i>Lysin</i>	10,29	2,2	0,4
Tyrosin	2,39	0	0,6
<i>Tryptophan</i>	0,52	0	0
Cystin (x.W.) = Alter der Pflanz	2,91 en in Wochen i	0 lach Ausse	0 iat

Es wurde zudem mit Hilfe eines HPLC-Verfahrens der Pflanzensaft auf den Gehalt an Tocopherolen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tocopherole gaschromatographisch bestimmt. Die Identifizierung erfolgte jeweils anhand der Retentionszeiten. Es konnten sowohl im Pflanzensaft der drei Monate alten Pflanzen, als auch in den Säften der einzelnen Pflanzenorgane keine Tocopherole nachgewiesen werden.

4. Vergleich mit anderen Untersuchungen

Ein weiteres verwendetes Lebensmittel aus den Hanfpflanzen ist die Hanffrucht, der Samen der Pflanze. Dieser zeichnet sich durch einen hohen Nährstoffgehalt aus (s. Tabelle 29) [13, 31].

Tabelle 29: Vergleich Hanfsamen und die verschiedenen Pflanzensäfte

Nährstoff	Blütenstandssaft	Fasersaft	Holzsaft	Samen (ungeschält)
	[g/1 00ml]			[g/1 00g]
Protein	1,6	0,8	0,3	20-24
Fett	0	0	0	28-35
ges FS	0,0029	0,0008	0,0002	9-11
unges FS	0,0052	0,0003	0,0002	89-91
Olsäure	0,0052	0,0003	0,0002	10-16
Linolsäure	0	0	0	50-70
Linolensäure	0	0	0	15-25
Kohlenhydrate, überwiegend Ballaststoffe	0,9	<0,01	0	30-35
Natrium(mg)	0,3	0,5	0,5	1,3
Calcium(mg)	1,0	0,2	0,2	86,9
Eisen(mg)	0	0,1	1,0	2,3
Phosphor(mg)	1,2	1,2	3,0	361,0
Vitamin E(mg)	0	0	0	3,0

In der Tabelle 29 ist zu erkennen, dass der Proteingehalt des Samens bei 20-24 % liegt. Er zeichnet sich besonders durch einen hohen Anteil an allen acht essentiellen Aminosäuren aus und ist daher qualitativ besonders hochwertig [31]. Der Proteingehalt des Safts ist um ein Vielfaches geringer. Zudem konnten nur im Blütenstandssaft alle acht essentiellen Aminosäuren nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten sechs der essentiellen Aminosäuren im Fasersaft nachgewiesen werden. Im Holzsaft sind nur zwei essentielle Aminosäuren enthalten. Der Samen zeichnet sich ebenfalls durch einen hohen Fettanteil aus und wird deswegen zur Hanfölerstellung genutzt. Das Öl enthält einen hohen Gehalt an

essentiellen Fettsäuren, insbesondere Linolsäure ist in hohen Mengen enthalten. Der Gehalt an Fettsäuren in den Pflanzensäften ist um ein Vielfaches geringer und es konnten keine essentiellen Fettsäuren nachgewiesen werden. Mineralstoffen, Kohlenhydraten und Vitaminen sind im Vergleich zum Saft der einzelnen Pflanzenorgane ebenfalls in auffallend höheren Anteilen nachweisbar.

5. Zusammenfassung

In der Lebensmittelindustrie werden heute überwiegend Hanfsamen bzw. das gewonnene Öl des Samens als Lebensmittel verwendet. Zudem werden die Blätter und Blüten zur Gewinnung von Aromen genutzt. Neuartig wurde hier der Hanfakt aus Pflanzen bzw. verschiedenen Pflanzenteilen gewonnen und analysiert. Zur Analyse wurden zunächst die einzelnen Pflanzenkomponenten Blütenstand, Faser, Wurzel und Holz getrennt und der jeweilige Pflanzensaft gewonnen. Die Ausbeute an Pflanzensaft war je nach Pflanzenbestandteil sehr unterschiedlich. Die höchste Ausbeute konnte aus dem Faserteil, gefolgt vom Holzteil gewonnen werden. Die Ausbeute aus dem Blütenstand war deutlich geringer. Um eine Aussage über den Nährwert der Pflanzensäfte treffen zu können, wurden diese auf ihren Gehalt an Proteinen, Zuckern, freien Aminosäuren sowie Fettsäuren, Mineralstoffen und Vitamin E analysiert. Anhand der Analysen zeigte sich, dass der höchste Gehalt im Blütenstandssaft zu finden ist. Zudem konnten auch hier nur alle acht essentiellen Aminosäure und die Zucker Glucose sowie Fructose identifiziert werden. In keinem der Säfte wurden die essentiellen Fettsäuren Linol- und alpha-Linolensäure sowie die im Hanfsamen enthaltene gamma-Linolensäure und Vitamin E nachgewiesen. Neben den untersuchten Nährstoffen wurde zudem der Gesamtpolyphenolgehalt der einzelnen Säfte analysiert. Sie besitzen eine antioxidative Wirkung und waren in höheren Mengen im Blütenstandssaft vorhanden. Der Gesamtpolyphenolgehalt von Faser- und Holzsaft war im Vergleich zum Blütenstandssaft geringer. Mineralstoffanteile waren in allen Säften vergleichbar. Zudem wurden im Blütenstand- und Fasersaft höhere Mengen an Nitrat und Nitrit (um die 60 mg/100ml Blütensaft, um die 70mg/100 ml Fasersaft) identifiziert.

Auch durch die sensorischen Merkmale lassen die verschiedenen charakterisieren: Der Blütenstandssaft war intensiv grün gefärbt und hatte einen ausgeprägten hanftypischen Geruch. Der Fasersaft war leicht grün gefärbt und geschmacklich eher als süß einzuordnen. Der Holzsaft dagegen war geschmacksneutral und ebenfalls gering grün gefärbt..

Während der Aufarbeitung des Blütenstandsaftes kam es zur Ausbildung fettähnlicher Kügelchen auf der Oberfläche. Diese wurden abgetrennt und ebenfalls untersucht. Neben einem hohen Gehalt an Fettsäuren konnten Cannabinoide, Mono- und Sesquiterpene und einige phenolische Verbindungen identifiziert werden. Es handelte sich überwiegend um lipophile Substanzen. Diese wurden durch das Pressen der Pflanzen aus Harz und Samen gewonnen und setzten sich aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaft an der Oberfläche ab.

Literaturverzeichnis

- [1] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB, 44.00-5: „*Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Identifizierung von Zuckern in Schokolade*“, April 2006, S.945
- [2] Belitz, H.-D. u.a. (2007): „*Lehrbuch der Lebensmittelchemie*“, ö.Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg,
- [3] Biesalski, H. u.a. (2007): „*Taschenatlas der Ernährung*“, 4,Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [4] Bieschke, C. (2009): „*Untersuchung der Inhaltsstoffe von Cannabis sativa im Vergleich mit Humulus lupulus*“, Bachelorarbeit, Bergische Universität Wuppertal, Arbeitsgruppe Organische Chemie
- [5] Bröeckers, M. (2002): „*Cannabis*“, deutschsprachige Ausgabe, AT Verlag
- [6] Callaway, J.C. (2004): „*Hempseed äs a nutritional resource: An overview*“; Euphytica Nr. 140: 65-72
- [7] Gelinas, C. (2007): „*YourHemp Guide*“, http://www.hemp-qt7/de.com/nor/77a//ze-excess/ve-sebum-secretions./7tmlvss_1 Zugriff am 10. Oktober 2010.
- [8] Geyer, S. (2006): „*Warum Hanf? Über die ökologischen und ökonomischen Möglichkeiten des Biorohstoffs Hanf*“, Informationsbroschüre: 1-26
- [9] Handbuch IC 709 System, Shimadzu Coroperation Japan, IC-System-790 Personal IC Metrohm, Schweiz
- [10] Hazekamp, A. u.a. (2010) : „ *Chemistry of Cannabis*“, Comprehensive Natural Products II, Nr. 3(24): 1033-1084
- [II] Herer, J. u.a. (1995): „*Die Wiederentdeckung der Nutzpflanze Hanf*“, 21. Auflage, Zweitausendeins Verlag, S.299-322
- [12] Hiener, R. u.a. (1998): „*Hanf- Das Kochbuch*“, Hädecke Verlag
- [13] Karus, M. (1998): „*Hanf Samen und Hanföl als Lebens- und Heilmittel*“, S.Auflage, Die Werkstatt, S. 11-28
- [14] Lachenmeier, D. W. (2004): „*Hanfhaltige Lebensmittel - ein Problem?*“, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, B. Behr's Verlag GmbH, Nr. 100(12): 481-491

- [15] *Lamina Kraft der A/ator.*(2010):
http://www.lamina.at/shop/index.php?main_page=index&cPath=4, Zugriff am 10. Oktober 2010.
- [16] Matissek, R. (2006): „*Lebensmittelanalytik, Grundzüge, Methoden, Anwendungen*“, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, S.10
- [17] Matissek, R. (2006): „*Lebensmittelanalytik, Grundzüge, Methoden, Anwendungen*“, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg. S.87
- [18] Meckelmann, S. (2010): „*Ermittlung wertgebender Eigenschaften und Inhaltsstoffe von Chili-Varietäten verschiedener Provenienzen*“, Abschlussarbeit, Bergische Universität Wuppertal, Arbeitsgruppe Lebensmittelchemie
- [19] Mettler Toledo Titratoren, DL 31/ DL 38, Applikationsbroschüre, Verlag Mettler Toledo - GmbH Schweiz
- [20] Mielke, H. u.a. (2002): „*Pflanzenschutz bei Nachwachsenden Rohstoffen, Zuckerrübe, Öl- und Faserpflanzen*“, Parey Buchverlag Berlin, Nr. 391:71
- [21] Oomah, B. D. et al. (2002): „*Characteristics of hemp (Cannabis sativa L.) seed oil*“, Food Chemistry, Nr. 76: 33-37
- [22] Ranalli, P. (2004): „*Hemp as a raw material for industrial applications*“, Eu-phytica, Nr. 140(1-2): 1-6
- [23] *Renewable food, fuel and fiber. (1996-2010)*: www.hemp.com, Zugriff am 10. Oktober 2010
- [24] Richter, G. (1998): „*Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [25] Schek, A. (2008): „*Ernährungslehre kompakt*“, 3. Auflage, Umschau Zeitschriftenverlag, Sulzbach im Taunus
- [26] Schulte, E. u.a. (1989): „*Schnelle Herstellung der Fettsäuremethylester aus Fett mit Trimethylsulfoniumhydroxid oder Natriummethylat*“, European Journal of Lipid Science and Technology, Nr. 91(5):181-183
- [27] Schweizerisches Lebensmittelbuch(2006): „*Bestimmung von Zuckerarten und mehrwertigen Alkoholen in Speiseeis*“, Nr. 9/8, Untersuchungsmethode 308.
- [28] Slover, H. T.u.a. (1983): „*Determination of Tocopherole and Sterols by Capillary Gas Chromatography*“, Journal of the American Oil Chemists' Society, Nr. 60(8): 1524-1528

- [29] Werde, C. (2006): „*Hanf- ein glutenfreies Lebensmittel*“, Ernährung spezial, Umwelt und Gesundheit, Nr. 148:148-150 [30] Touw, M. (1981): „ *The Religious and Medicinal Uses of Cannabis in China, India and Tibet*“; Journal of Psychoactive Drugs, Nr.13(1)
- [31] Untersteller, A. (2006): „*Hanf in der menschlichen Ernährung*“; Ernährungslehre und -praxis, Umschau-Verlag, Nr. 10:41-44. [32] User Manual, Total Organic Carbon Analyt TOC-V_E , Shimadzu Cooperation Japan [33] User's Manual EZiaast™ Free Amino Acid Analysis, Phenomenex, Torrance, CA, USA [34] Weiler, E. u.a. (2008): „*Allgemeine und molekulare Botanik*“, Gerorg Thieme Verlage, S. 167-204 [35] Hupf, H. u.a.(1997): „*Nutzhanf-Drinks*“, Das deutsche Bier: Brauwelt, Hallwag Verlag, Nr.137:2119-2123