

# ANALYTIK VON POLYPHENOLEN IN BUNTSÄFTEN IM HINBLICK AUF SAFTQUALITÄT, FARBE UND ANTIOXIDATIVE AKTIVITÄT



# ANALYTIK VON POLYPHENOLEN IN BUNTSÄFTEN IM HINBLICK AUF SAFTQUALITÄT, FARBE UND ANTIOXIDATIVE AKTIVITÄT

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte D i s s e r t a t i o n

> von Silke Hillebrand aus Waltrop

#### **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <u>http://dnb.ddb.de</u> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004 Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2004 ISBN 3-86537-289-9

1. Referent:	Prof. Dr. P. Winterhalter
2. Referent:	apl. Prof. Dr. U. H. Engelhard
eingereicht am:	22.07.2004
mündliche Prüfung (Disputation) am:	29.09.2004
Druckjahr:	2004

 CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004 Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen Telefon: 0551-54724-0 Telefax: 0551-54724-21 www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
1. Auflage, 2004
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-289-9

#### Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

#### Publikationen

Puertas-Mejía, M.; Hillebrand, S.; Stashenko, E.; Winterhalter, P. *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Colombian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. Flavour Fragr. J. 17: 380-384 (2002).

Schwarz, M.; Hillebrand, S.; Habben, S.; Degenhardt, A.; Winterhalter, P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. Biochem. Engineering J. 14: 179-189 (2003).

Osorio, C.; Hillebrand, S.; Duque, C.; Winterhalter, P. Antioxidant activity of Colombian fruits: Anthocyanins from Corozo (*Bactris major*) fruit. J. Agric. Food Chem. (eingereicht).

Hillebrand, S.; Schwarz, M.; Winterhalter, P. Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice. J. Agric. Food Chem. (im Druck).

#### Tagungsbeiträge

Hillebrand, S.; Cuevas Montilla, E.; Winterhalter, P. Preparative isolation of anthocyanins from elderberry (*Sambucus nigra* L.) by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. (Poster) International Workshop on Anthocyanins, Paradise Wirrina Cove, Australien (2002).

Hillebrand, S.; Cuevas Montilla, E.; Winterhalter, P. Holundersaft (*Sambucus nigra* L.): Anthocyanprofil und antioxidative Aktivität. (Vortrag) Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft innerhalb der GDCh, Kiel (2002). Kurzfassung veröffentlicht in: Lebensmittelchemie 56: 78 (2002).

Schwarz, M.; Hillebrand, S.; Cuevas Montilla, E.; Winterhalter, P. Präparative Isolierung und antioxidative Wirkung von Anthocyanen aus Brombeere und Himbeere. (Poster) 31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt (2002). Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie 57: 61 (2003).

Hillebrand, S.; Schwarz, M.; Winterhalter, P. Charakterisierung von Anthocyanen aus Blutorange (*Citrus sinensis* L., Rutaceae) mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>. (Poster) 32. Deutscher Lebensmittelchemikertag, München (2003). Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie 58: 3 (2004). Osorio, C.; Hillebrand, S.; Duque, C.; Winterhalter, P. Pigments in Columbian fruits: Anthocyanins from Corozo (*Bactris major*) fruit. (Poster) 3<sup>rd</sup> International Congress on Pigments in Food, Quimper, Frankreich (2004).

S. Hillebrand, S.; Jerz, G.; Tseng, L-H.; Fliegel, A.; Winterhalter, P. Charakterisierung von Anthocyanen aus Taybeere mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> und HPLC-NMR. (Vortrag) Arbeitstagung der Regionalverbände Nord und Nord-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft innerhalb der GDCh, Hannover (2004). Kurzfassung veröffentlicht in: Lebensmittelchemie 58: 74 (2004).

Hillebrand, S.; Quast, P.; Anago, A.; Winterhalter, P. Isolation of a novel anthocyanin derivative and application of the color activity concept: anthocyanin composition of sour cherry juice. (Poster) XXII. International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finnland (2004).

Quast, P.; Hillebrand, S.; Winterhalter, P. Composition of polymeric pigments in fruit juices. (Poster) XXII. International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finnland (2004).

Hillebrand, S.; Schwarz, M.; Quast, P.; Winterhalter, P. Charakterisierung von Anthocyanen und neuen Anthocyanderivaten aus Früchten und Fruchtsäften. (Vortrag) 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn (2004). Veröffentlicht in: Lebensmittelchemie (im Druck).

Quast, P.; Hillebrand, S.; Winterhalter, P. Analytik polymerer Pigmente aus Fruchtsäften. (Poster) 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn (2004). Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie (im Druck).

#### Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2000 bis Juli 2004 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. P. Winterhalter am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Winterhalter für die Förderung und Unterstützung der vorliegenden Arbeit. Seine stete Diskussionsbereitschaft und der mir gewährte großzügige Freiraum bei der Durchführung von Untersuchungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. U. H. Engelhardt danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie der Universität Braunschweig sowie meinen Kollegen im Arbeitskreis möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Dabei gilt mein Dank vor allem meinen Laborkollegen Frau Carola Stingl, Herrn Nils Köhler, Frau Katrien Schäfer und Frau Monika Messerer sowie meinem Projekt-Kollegen Herrn Peter Quast für deren stete Hilfsbereitschaft und das harmonische Miteinander. Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Kollegin und Freundin Frau Elyana Cuevas Montilla für die unzähligen hilfreichen Gespräche, guten Ratschläge sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Den Studenten Herrn Bijan Kawiani, Frau Melanie Hieber, Frau Alexandra Fliegel und Frau Afiwa Anago danke ich für die im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit geleisteten Beträge zu der vorliegenden Arbeit.

Frau Carola Stingl, Frau Monika Messerer und Herrn Dr. Gerold Jerz danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Ein Dankeschön richtet sich auch an Frau Carola Balcke, die mit ihrem Engagement beim Korrekturlesen dieser Arbeit so manchem Rechtschreibfehler und Buchstabenverdreher keine Chance gegeben hat.

Für meine lieben Eltern und Peter

## Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung und Zielsetzung	. 1
2	The	oretische Grundlagen	_ 6
2.1	Inha	Itsstoffe von Obst	. 6
	2.1.1	Allgemeine Angaben	. 6
	2.1.2	Klassifizierung der Polyphenole	. 7
	2.1.2.1	Phenolcarbonsäuren bzw. Phenolsäuren	. 7
	2.1.2.1.1	Hydroxyzimtsäure-Derivate	. 8
	2.1.2.1.2	Benzoesäure-Derivate	. 8
	2.1.2.2	Flavonoide	. 9
	2.1.2.2.1	Flavan-3-ole (Catechine)	10
	2.1.2.2.2	Flavonole	11
	2.1.2.2.3	Proanthocyanidine	12
	2.1.2.2.4	Anthocyanidine	13
	2.1.3	Biosynthese der Polyphenole	15
	2.1.4	Gesundheitliche Wirkungen der Polyphenole	17
	2.1.4.1	Bioverfügbarkeit und Stoffwechsel	17
	2.1.4.2	Negative Wirkungen/ Toxizität der Polyphenole	18
	2.1.4.3	Positive Wirkungen der Polyphenole	19
	2.1.4.3.1	Antioxidatives Potential von Polyphenolen	19
	2.1.4.3.2	Bestimmung der antioxidativen Aktivität – TEAC Assay	21
2.2	Fruc	chtsäfte	_ 24
	2.2.1	Allgemeines	24
	2.2.2	Fruchtsaftherstellung	. 25
	2.2.3	Veränderungen des Polyphenolprofils von Fruchtsäften	_ 27
	2.2.4	Copigmentierungsreaktionen	29
	2.2.5	Farbaktivitätskonzept	31
2.3	Aus	gewählte neue analytische Techniken zur Trennung und	
	Cha	rakterisierung von Substanzen	. 34

	2.3.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit	
		NMR-Spektroskopie (LC-NMR)	34
	2.3.2	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)	37
3	Erç	gebnisse und Diskussion	41
3.1	Prä	parative Isolierung von Anthocyanen aus Obst	41
	3.1.1	Aufarbeitung und Isolierung	41
	3.1.2	Isolierung von Anthocyan-Standardsubstanzen aus	
		Früchten mittels High-Speed Countercurrent	
		Chromatography (HSCCC)	42
	3.1.2.1	Anthocyane in Schalen von violetter Passionsfrucht	
		(Passiflora edulis)	42
	3.1.2.2	Anthocyane der Himbeere ( <i>Rubus idaeus</i> L.)	44
	3.1.2.3	Anthocyane der Süßkirsche ( <i>Prunus avium</i> L.)	45
	3.1.2.4	Anthocyane der Sauerkirsche (Prunus cereasus L.)	47
	3.1.2.5	Anthocyane der schwarzen Johannisbeere	
		(Ribes nigrum L.)	49
	3.1.2.6	Anthocyane der roten Johannisbeere ( <i>Ribes rubrum</i> L.)	50
	3.1.2.7	Anthocyane der Pflaume ( <i>Prunus domestica</i> L.)	52
	3.1.2.8	Anthocyane des schwarzen Holunders (Sambucus nigra L.)	54
	3.1.2.9	Anthocyane der Apfelbeere (Aronia melanocarpa)	55
3.2	Ana	lytik ausgewählter Früchte	57
	3.2.1	Untersuchung ausgewählter kolumbianischer Früchte	57
	3.2.1.1	Antioxidatives Potential und Polyphenolgehalt	57
	3.2.1.2	Anthocyanprofil der Corozofrucht (Bactris major)	59
	3.2.2	Taybeere	61
	3.2.2.1	Fraktionierung mittels HSCCC	62
	3.2.2.2	Charakterisierung der Anthocyane mittels LC-NMR	64
3.3	Frue	chtsaftanalytik verschiedener Buntsäfte	73
	3.3.1	Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt	73
	3.3.2	Holundersaft	75
	3.3.2.1	Allgemeines	75
	3.3.2.2	Anthocyanprofil von Holundersäften	75

3.3.2.3	Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf Holundersäfte	78
3.3.2.4	Charakterisierung der farblosen Polyphenole in	
	Holundersäften	80
3.3.2.5	Antioxidative Aktivität von Holundersäften	83
3.3.2.6	Einfluß der Lagerung	88
3.3.2.6.1	Anthocyangehalt und Gehalt an polymeren Farbpigmenten.	88
3.3.2.6.2	Gehalt an nichtfarbigen polyphenolischen Verbindungen	90
3.3.2.6.3	Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt	92
3.3.2.6.4	Farbintensität und Farbtönung	93
3.3.2.7	Farbintensivierung durch Copigmentierung	94
3.3.2.7.1	Einfluß des Verhältnisses Copigment zu Anthocyan	
	(C/A-Verhältnis)	94
3.3.2.7.2	Copigmentierungseffekte in Holundersaft	96
3.3.3	Schwarzer Johannisbeersaft	97
3.3.3.1	Allgemeines	97
3.3.3.2	Anthocyanprofil von schwarzen Johannisbeersäften	98
3.3.3.3	Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf schwarze	
	Johannisbeersäfte1	00
3.3.4	Sauerkirschsaft1	03
3.3.4.1	Allgemeines1	03
3.3.4.2	Anthocyanprofil von Sauerkirschsäften1	03
3.3.4.3	Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf	
	Sauerkirschsaft1	07
3.3.5	Cranberrysaft1	09
3.3.5.1	Allgemeines1	09
3.3.5.2	Anthocyanprofil von Cranberrysäften1	10
3.3.5.3	Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf	
	Cranberrysäfte1	12
3.3.5.4	Charakterisierung der farblosen Polyphenole in	
	Cranberrysäften1	14
3.3.6	Blutorangensaft1	18
3.3.6.1	Allgemeines1	18
3.3.6.2	Anthocyanprofil eines handelsüblichen Blutorangensaftes1	18
3.3.6.3	Anthocyanprofil eines frischen Blutorangensaftes1	21

	3.3.6.4	Einfluss der Lagerung auf das Anthocyanprofil	122
	3.3.7	Aroniasaft	124
	3.3.7.1	Allgemeines	124
	3.3.7.2	Anthocyanprofil von Aroniasäften	124
	3.3.7.3	Charakterisierung der farblosen Polyphenole in	
		Aroniasäften	125
4	Exp	erimenteller Teil	129
4.1	Prol	benmaterial und Chemikalien	129
	4.1.1	Verwendete Früchte und Fruchtsäfte	129
	4.1.1.1	Früchte	129
	4.1.1.2	Fruchtsäfte	130
	4.1.2	Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel	131
4.2	Prä	parativer Teil	132
	4.2.1	Geräte und Parameter	132
	4.2.1.1	Photometer	132
	4.2.1.2	pH-Meter	132
	4.2.1.3	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	132
	4.2.1.4	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC).	133
	4.2.1.5	Massenspektrometrie (MS)	133
	4.2.1.6	Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Massenspektron	netrie
		(LC-MS)	133
	4.2.1.7	Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Nuclear Magneti	ic
		Resonance-Spektroskopie (LC-NMR)	134
	4.2.1.8	Verwendete Säulen	134
	4.2.1.9	Verwendete Fließmittelsysteme und Gradienten	134
	4.2.2	Methoden zur Aufreinigung und Isolierung von	
		Anthocyanen aus Früchten, Fruchtkonzentraten,	
		Fruchtschalen und Fruchtsäften	135
	4.2.2.1	Extraktion von Früchten	135
	4.2.2.2	Extraktion von roten Fruchtsäften (Ethylacetatextrakt)	136
	4.2.2.3	Adsorptionschromatographie an Amberlite <sup>®</sup> XAD-7	136
	4.2.2.4	Trennung eines XAD-7 Extraktes mittels High-Speed	

		Countercurrent Chromatography (HSCCC)	137
	4.2.3	Versuche zur Copigmentierung von Anthocyanen in	
		Holunder	140
	4.2.3.1	Einfluß verschiedener Verhältnisse von Copigment zu	
		Anthocyan (C/A-Verhältnis)	140
	4.2.3.2	Einfluß der Copigmente auf die Anthocyane in	
		Holundersaft	142
	4.2.4	Durchführung des Farbaktivitätskonzeptes nach Hofmann	144
	4.2.4.1	Versuchsaufbau und allgemeine Durchführung	144
	4.2.4.2	Bestimmung der Schwellenwerte von Reinsubstanzen	144
	4.2.4.3	Bestimmung der Verdünnungsfaktoren von Säften	146
	4.2.5	Lagerversuche	146
	4.2.6	Umsetzung von Anthocyanen mit Pyruvat zu	
		Vitisin-Derivaten	147
4.3	Analy	tischer Teil	_147
	4.3.1	Quantitative Bestimmungen	147
	4.3.1.1	Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach	
		Folin-Ciocalteau	147
	4.3.1.2	Bestimmung der Antioxidativen Aktivität (AA) mittels	
		TEAC-Assay	148
	4.3.1.3	Bestimmung des Polymeranteils (Bleichmethode)	149
	4.3.1.4	Farbmessungen (Farbintensität, Farbtönung)	150
	4.3.1.5	HPLC-Bestimmungen	151
	4.3.2	Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten	
		Reinsubstanzen	152
	4.3.2.1	Charakterisierung der isolierten Anthocyane	152
	4.3.2.2	Charakterisierung der isolierten Copigmente	161
5	Zusa	mmenfassung und Ausblick	_164
6	Litera	atur	170
7	Anha	ng	_185

# Abkürzungen

А	Absorption
AAPH	2,2'-Azino-bis(2-amidinopropan)
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
arab	arabinosid
br	breit
BuOH	Butanol
BPC	Base Peak Chromatogram
C/A	Copigment/Anthocyan
CCC	Countercurrent Chromatography
CD <sub>3</sub> OD	deuteriertes Methanol
Del	Delphinidin
CoA	Coenzym A
Су	Cyanidin
d	Dublett
DAD	Diodenarray-Detektor
δ	Symbol für die chemische Verschiebung [ppm]
D <sub>2</sub> O	deuteriertes Wasser
E	Extinktion
ESI	Elektrospray-Ionisation
F	Farbbeitrag
FA	Farbaktivität
GAE	Gallic Acid Equivalent (Gallussäureäquivalent)
gal	galactosid
glc	glucosid
glcrut	glucosylrutinosid
h	Winkel
HOAc	Essigsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography
(M)Hz	(Mega)Hertz

Symbol für die Kopplungskonstante [Hz]
Konzentration
Luminanz
Liquid Chromatography
Symbol für Wellenlänge
Low Density Lipoproteine
Multiplett
Molar
Pseudomolekülion (pos. Modus)
Pseudomolekülion (neg. Modus)
maximal
Methyl
Methanol
Mindesthaltbarkeitsdatum
Minuten
Massenspektrum
Verhältnis Masse zu Ladung
Nanometer
Nuclear Magnetic Resonance (Kernmagnetische Resonanz)
per Analysis (zur Analyse)
Pelargonidin
Peonidin
parts per million
Rest
Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspecies)
rutinosid
Schwellenwert
Singulett
sambubiosid
Superoxid-Dismutase
sophorosid
Solid Phase Extraction
Triplett

TBME	<i>tert.</i> -Butylether
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TFA	Trifluoressigsäure
TFA-d₁	deuteriertes TFA
Trolox	6-Hydroxy-2-5-7-8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
UV	Ultraviolett
VCEAC	Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity
VF	Verdünnungsfaktor
Vis	visible (sichtbar)

#### 1 Einleitung und Zielsetzung

"Five-a-day - fünf am Tag" ist das Motto einer großangelegten Kampagne der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) und der Deutschen Krebsgesellschaft. Diese Gesundheitskampagne fordert im Gegensatz zu vielen anderen propagierten Diäten nicht zum Verzicht auf, sondern sie ermuntert vielmehr zum Verzehr von 5 Portionen Obst und Gemüse (insgesamt ca. 600 g) über den gesamten Tag verteilt. Erlaubt sind hierbei Obst und Gemüse sowohl frisch und tiefgefroren als auch aus dem Glas oder der Konserve sowie Trockenfrüchte, Frucht- und Gemüsesäfte und Kräuter (5 am Tag e.V., 2000; DGE, 2000; BITSCH ET AL., 2000). Der Hintergrund dieser Kampagne ist der in vielen epidemiologischen Studien (BLOCK ET AL., 1992; HERTOG ET AL., 1992 und 1993a) ermittelte Zusammenhang zwischen Gemüseverzehr und Krebsrisiko, wobei ein erhöhter Verzehr von Obst und Gemüse das Krebsrisiko deutlich reduziert. Auch das Risiko für sogenannte "Zivilisationskrankheiten" wie Herz- und Kreislauferkrankungen (HERTOG ET AL., 1993b) wird durch eine erhöhte Obst- und Gemüseaufnahme reduziert. Den Anlass zu dieser Kampagne lieferten umfangreiche statistische Erhebungen deutscher Ernährungswissenschaftler, bei denen immer wieder darauf hingewiesen wird, dass gerade auf "bundesdeutschen Tellern" im Gegensatz zu den südeuropäischen Ländern Obst und Gemüse viel zu kurz kommen. Das Modell "Five-a-day" wird in den USA bereits seit Anfang der 90er Jahre vom National Cancer Institut erfolgreich propagiert (STIFTUNG WARENTEST, 2001).

Wichtige Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse sind die sogenannten *sekundären Pflanzenstoffe*, die für diese gesundheitspräventiven Effekte verantwortlich sein sollen. Die Bezeichnung "sekundär" geschieht hier in Anlehnung an die *primären Pflanzenstoffe* (Fett, Eiweiß, Kohlenhydrate), welche als Nährstoffe am Aufbau von Zellen beteiligt sind und darüber hinaus die Energieversorgung sichern. Sekundäre Pflanzenstoffe hingegen dienen im weitesten Sinne der Kommunikation der Pflanze mit der Außenwelt. Sie werden entweder von der Pflanze als Farb-, Duft- und Lockstoffe produziert oder dienen der Abwehr von Schädlingen, als Schutz gegen UV-Strahlen, als *Antioxidantien* und vieles andere (NAUMANN, 1997). Von den bisher ca. 30.000 bekannten sekundären Pflanzenstoffen konnten annähernd 10.000 in der

Nahrung nachgewiesen werden. Die sekundären Pflanzenstoffe sind chemisch sehr unterschiedlich. Aufgrund ihrer chemischen Struktur und ihrer funktionellen Eigenschaften lassen sie sich jedoch in Gruppen einteilen. Dazu zählen unter anderem Flavonoide, Phenolsäuren, Carotinoide, Glucosinolate, Sulfide, Phytoöstrogene. Den verschiedenen Gruppen von sekundären Pflanzenstoffen werden bestimmte Gesundheitswirkungen zugeschrieben (s. Tab. 1; WATZL und LEITZMANN, 1999).

**Tabelle 1**: Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre Gesundheitswirkungen (nach WATZL und LEITZMANN, 1999)

Sekundäre Pflanzenstoffe	Gesundheitliche Wirkungen									
	Α	в	С	D	Е	F	G	н	Т	J
Carotinoide	+		+		+			+		
Phytosterine	+							+		
Saponine	+	+			+			+		
Glucosinolate	+	+						+		
Polyphenole	+	+	+	+	+	+	+		+	
Protease-Inhibitoren	+		+							
Monoterpene	+	+								
Phytoöstrogene	+		+							
Sulfide	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Phytinsäure	+		+		+				+	

A = hemmt Krebsentstehung; B = antimikrobiell; C = antioxidativ; D = Beeinflussung der Blutgerinnung; E = Beeinflussung des Immunsystems; F = entzündungshemmend; G = Beeinflussung des Blutdrucks; H = cholesterinsenkend; I = Beeinflussung des Blutzuckerspiegels; J = verdauungsfördernd.

Hierbei wird vor allem der Gruppe der Polyphenole (Flavonoide und Phenolsäuren), welche wichtige Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse sind, eine Reihe von gesundheitsfördernden Wirkungen zugeschrieben. Diese beziehen sich vor allem auf das hohe *antioxidative Potential* und die guten *Radikalfängereigenschaften* gegenüber freien Sauerstoffradikalen (LECHLER, 1996). Die *freien Radikale* oder *reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)* nehmen hierbei eine Schlüsselposition im Organismus ein. Die Bildung von freien Radikalen erfolgt im Organismus stetig und ist normalerweise auch wünschenswert, da diese beispielsweise während eines Entzündungsprozesses die Zerstörung von Krankheitserregern bewerkstelligen. Auf

der anderen Seite können sie aber auch aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit Körperzellen schädigen und somit die Entstehung von Krankheiten wie Krebs fördern. Normalerweise besitzt der Körper ein hochwirksames Schutzsystem gegen diesen oxidativen Angriff in Form von körpereigenen Enzymen, den antioxidativen Vitaminen E und C sowie  $\beta$ -Carotin, die mit der Nahrung zugeführt werden. Bei einem gesunden Organismus herrscht ein sogenanntes *prooxidatives/antioxidatives Gleichgewicht* vor. Ist dieses Gleichgewicht durch die vermehrte Bildung von freien Radikalen und/oder durch die ungenügende Verfügbarkeit von Antioxidantien gestört, spricht man von *oxidativem Stress*, welcher durch *endogene* (z.B. Stress, Entzündungen, chronische Krankheiten) oder *exogene Quellen* (z.B. Ozonbelastung, Medikamenteneinahme, UV-Strahlung, Rauchen) verursacht werden kann (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1:** Quellen reaktiver Sauerstoffspezies und ihre Wirkungen (nach VOGES, 1997)

Ein dauerhaftes Ungleichgewicht kann zu Funktions- und Gesundheitsstörungen bis hin zu den sogenannten *Free Radical Diseases* führen (VOGES, 1997). Zu letzteren zählen eine Vielzahl von Krankheiten wie z.B. Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Krebs und Leberschäden, welche unmittelbar mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden.

Vor allem phenolische Verbindungen besitzen die Fähigkeit, Wasserstoffatome an freie Sauerstoffradikale (LECHLER, 1996) abzugeben, wobei diese neutralisiert werden und somit an der oxidativen Schädigung von Biopolymeren gehindert werden. Dieses wird auch als *Scavenging* bezeichnet (BÖHM, 2000a). Daher sollte auf eine regelmäßige Zufuhr von Antioxidantien in Form von Obst und Gemüse Wert gelegt werden. Es gibt eine Reihe von epidemiologischen Studien bezüglich der Zufuhr von Flavonoiden und Phenolsäuren durch bestimmte Lebensmittel (BÖHM ET AL., 1998; RADTKE ET AL., 1998; LINSEISEN ET AL., 1997).

Neben Obst und Gemüse stellen Säfte eine wichtige Quelle zur Aufnahme von sekundären Pflanzenstoffen dar. Eine Vielzahl von Gemüse- und Fruchtsäften stehen dem Verbraucher nicht mehr nur im Reformhaus, sondern auch in jedem gutsortierten Supermarktregal zur Auswahl. Bei den Gemüsesäften haben sich Sorten wie Sauerkrautsaft, Tomatensaft, Brokkolisaft aber auch "Exoten" wie Schwarzer Karottensaft längst neben dem herkömmlichen Möhrensaft etabliert. Die Vielfalt bei den Fruchtsäften ist noch wesentlich größer als bei den Gemüsesäften. Hier unterscheidet man in erster Linie nach Farbe zwischen hellen und roten Fruchtsäften. Die hellen Fruchtsäfte werden längst nicht mehr nur durch die klassischen Vertreter Apfel- und Orangensaft repräsentiert. Zu dieser Gruppe gehören vielmehr auch Säfte wie heller Traubensaft, Aprikosensaft, Sanddornsaft und Quittensaft. Besonders die roten Fruchtsäfte erfreuen sich bei dem Verbraucher immer größerer Beliebtheit. Hierzu zählen die klassischen Vertreter roter Traubensaft sowie die Nektare der Schwarzen Johannisbeere und der Sauerkirsche. Des weiteren gibt es eine Vielzahl von Mehrfruchtbuntsäften, die "Exoten" wie Holundersaft, Aroniasaft und Cranberrysaft enthalten. Vor allem bei den roten Fruchtsäften spielt neben dem Geschmack und dem Geruch auch die Farbe, welche durch die rotgefärbten Anthocyane bedingt ist, eine wesentliche Rolle bei der Qualitätsbeurteilung. Ein qualitativ hochwertiger Buntsaft sollte eine reine tiefrote Farbe besitzen. Eine bräunlich-orange Färbung wird vom Verbraucher als negativ bewertet.

Da sowohl die Anthocyane als auch die nichtfarbigen Polyphenole sich durch ein hohes antioxidatives Potential auszeichnen, können sie auch als wertgebende Komponenten einer Frucht bzw. eines Fruchtsaftes angesehen werden. Durch Verarbeitung, Abfüllung und Lagerung können jedoch diese Verbindungen mannigfaltige Reaktionen eingehen (MILLER, 1998). Hierbei entstehen durch die Umsetzung mit anderen Komponenten des Saftes neue Verbindungen, so dass das Polyphenolprofil nun im Gegensatz zur Ausgangsfrucht deutliche Unterschiede aufweist (SPANOS ET AL., 1990a; ROMMEL ET AL., 1992). Von besonderem Interesse ist hierbei auch die Umsetzung der originären monomeren Frucht-Anthocyane zu Polymeren und neuen monomeren Farbpigmenten (*Alterungspigmente*). Die bei der Verarbeitung und Alterung eines Fruchtsaftes neu entstehenden Verbindungen sowie deren Auswirkung auf die Qualität (Färbung, Trübung etc.) eines Buntsaftes, deren antioxidatives Potential sowie die Bioverfügbarkeit sind bisher wenig untersucht und somit von hohem aktuellem Interesse für die Forschung.

Im Rahmen dieser Arbeit werden von sechs verschiedenen roten Fruchtsäften (Holunder-, Cranberry-, schwarzer Johannisbeer- Sauerkirsch-, Blutorangen- und Aroniasaft) und zwei roten Früchten (Corozo und Taybeere) die polyphenolischen Inhaltsstoffe charakterisiert. Als interessant hat sich hierbei ein Vergleich der Polyphenolkomposition der Säfte mit den entsprechenden frischen Früchten erwiesen. Weiterhin werden die antioxidative Aktivität und der Gesamtpolphenolgehalt verschiedener heller und dunkler Fruchtsäfte miteinander verglichen und die antioxidative Aktivität der isolierten Reinsubstanzen sowie deren Anteil an der Gesamtaktivität ermittelt. Darüber hinaus werden mit zwei Säften Lagerversuche über einen bestimmten Zeitraum durchgeführt und anhand von verschiedenen Parametern (Gehalt an Anthocyanen und Copigmenten, antioxidative Aktivität, Gesamtpolyphenolgehalt etc.) bewertet. Zwei weitere Versuchsteile beziehen sich explizit auf die Farbigkeit von roten Fruchtsäften. So soll das von HOFMANN ET AL. (1998a, b) konzipierte Farbaktivitätskonzept auf die Farbe verschiedener Säfte übertragen werden. Weiterhin soll anhand verschiedener Versuche ein möglicher intermolekularer Copigmentierungseffekt (Anstieg der Farbintensität und/ oder Verschiebung des Absorptionsmaximums) der Anthocyane des Holunders mit anderen nichtfarbigen phenolischen Komponenten des Holundersaftes untersucht werden.

### 2 Theoretische Grundlagen

#### 2.1 Inhaltsstoffe von Obst

#### 2.1.1 Allgemeine Angaben

Als *Obst* wird eine Reihe von essbaren Früchten bzw. Scheinfrüchten, Fruchtständen sowie Samenkerne mehrjähriger Pflanzen bezeichnet (BELITZ und GROSCH, 1992). Man unterteilt hierbei die folgenden sechs Hautgruppen: Beerenobst, Kernobst, Schalenobst, Steinobst, Südfrüchte und Wildfrüchte.

Obst dient in der menschlichen Ernährung vor allem als Träger von Mineral- und Ballaststoffen und ist ein wichtiger Vitaminlieferant. Der Wassergehalt beträgt im allgemeinen 80-90% (FRANZKE, 1996). Die Inhaltsstoffe lassen sich nach HERRMANN (2001) und FRANZKE (1996) in folgende Gruppen einteilen:

- Lipide: Sie kommen meist nur in geringen Mengen vor. Ausnahmen findet man hier in den Samen und dem Fruchtfleisch einiger Früchte (z.B. Avocado) mit einem Gehalt bis zu 65%.
- Kohlenhydrate: Sie machen bei allen Obstarten den Hauptanteil der Trockenmasse aus. Neben Mono- (z.B. Glucose und Fructose), Di- (z.B. Saccharose) und Oligosacchariden (z.B. die Triose Raffinose oder die Tetrose Stachyose) spielen auch Polysaccharide wie Stärke und Pentosane eine Rolle.
- 4. *Ballaststoffe*: Hierbei handelt es sich im wesentlichen um unverdauliche Polysaccharide wie Cellulose, Hemicellulose und Pektine. Hinzu kommt das Lignin.
- 5. *Mineralstoffe*: Der Gesamtgehalt liegt meist um 0,5 %. Hierbei dominiert Kalium neben Calcium, Phosphor und Magnesium.
- 6. *Vitamine*: Als wasserlösliches Vitamin kommt vor allem das Vitamin C vor. Die Vitamine der B-Gruppe sind in geringen Mengen vertreten.

- 7. *Carotinoide*: Diese sind bei einigen Obstarten wie Aprikose, Mandarine und Mango von Bedeutung.
- 8. *Pflanzenphenole*: Polyphenole zählen zu den wichtigsten Bestandteilen des Obstes und werden im Abschnitt 2.1.2 gesondert betrachtet.
- 9. Enzyme
- 10. *Fruchtsäuren*: z.B. Äpfelsäure, Citronensäure, Oxalsäure, Chinasäure
- 11. Aroma- und Geschmacksstoffe (z.B. Bitterstoffe)

#### 2.1.2 Klassifizierung der Polyphenole

Phenolische Verbindungen kommen im Pflanzenreich in außerordentlicher Mannigfaltigkeit vor. Sie sind wichtige Inhaltsstoffe des Obstes (HERRMANN, 1992) und tragen maßgebend zum Aussehen und Geschmack bei. Die wichtigsten Polyphenole der Früchte lassen sich wie folgt einteilen (RECHNER, 2001):

- Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate ("Nichtflavonoide")
- Flavonoide
- Niedermolekulare Phenole (Aromastoffe)

Aufgrund der vorliegenden strukturellen Unterschiede der Polyphenole kann jedoch noch eine weitere Einteilung bezüglich ihrer Grundkörper gemacht werden (FRANZKE, 1996):

- C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-Grundkörper
- C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Grundkörper
- C6-C3-C6-Grundkörper

#### 2.1.2.1 Phenolcarbonsäuren bzw. Phenolsäuren

Unter dem Begriff Phenolsäuren fasst man *Hydroxyzimtsäuren* und *Hydroxybenzoesäuren* zusammen. Sie kommen häufig in den Randschichten der Pflanzen vor und tragen hier zur Stabilität der Zellwände in den Schalen bei (WATZL und RECHKEMMER, 2001a).

#### 2.1.2.1.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate

Die Hydroxyzimtsäuren besitzen einen C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Grundkörper. Die wichtigsten Vertreter leiten sich von der Kaffeesäure, der p-Cumarsäure und der Ferulasäure ab. Die freien Säuren kommen normalerweise genuin in Pflanzen nicht vor, sondern sie werden erst während der Aufarbeitung durch Hydrolyse freigesetzt. Sie treten in Obst deshalb häufig als Ester mit D-Chinasäure oder Glucose auf (HERRMANN, 1992). Insbesondere die Chlorogensäure, die aus Kaffeesäure und Chinasäure gebildet wird und der bekannteste Vertreter unter den Hydroxyzimtsäureestern ist, ist in Früchten weit verbreitet (MACHEIX ET AL., 1990). Abbildung 2 zeigt die Strukturen der in Obst häufig vorkommenden Hydroxyzimtsäuren.



Abbildung 2: Strukturen einiger in Lebensmitteln vorkommender Hydroxyzimtsäuren

Die Hydroxyzimtsäure-Derivate spielen eine wichtige Rolle in der Polyphenolanalytik von Früchten. Es gibt zahlreiche Publikationen, die sich bereits seit Jahrzehnten mit Hydroxyzimtsäure-Derivaten in Früchten wie Brombeeren (MOSEL und HERRMANN, 1974a), schwarzen Johannisbeeren (STÖHR und HERRMANN, 1975a), Himbeeren (MOSEL und HERRMANN, 1974a), Sauerkirschen (MÖLLER und HERRMANN, 1983) etc. befassen.

#### 2.1.2.1.2 Benzoesäure-Derivate

Hydroxybenzoesäuren besitzen einen C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-Grundkörper. Sie kommen jedoch im Gegensatz zu den Hydroxyzimtsäuren seltener und nur in geringen Konzentrationen vor (HERRMANN, 1992). Am häufigsten findet man hierbei p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Protocatechusäure und Gallussäure (s. Abb. 3). So konnten von SCHUSTER und HERRMANN (1985) Hydroxybenzoesäuren in einigen Beerenobstsorten nachgewiesen werden. HÄKKINEN ET AL. (1997) berichten über die Anwesenheit

größerer Mengen an Ellagsäure, einem Dilacton der Hexahydroxydiphensäure, welche sich aus zwei Gallussäure-Einheiten zusammensetzt (FRANZKE, 1996) und vor allem in der Familie der Rosaceae (Himbeere, Erdbeere etc.) eine Rolle spielt.



Abbildung 3: Häufig vorkommende Hydroxybenzoesäuren in Früchten

#### 2.1.2.2 Flavonoide

Flavonoide stellen die wichtigste Gruppe der Pflanzenphenole dar. Es existiert eine Mannigfaltigkeit an Flavonoiden, von denen viele eine biologische Wirkung auf Pflanze, Tier und Mensch ausüben. Sie besitzen einen  $C_6$ - $C_3$ - $C_6$ -Grundkörper und leiten sich strukturell vom *Flavan* (2-Phenyl-benzo-dihydropyran) ab (HERRMANN, 1992). Aufgrund der vielen unterschiedlichen Grundstrukturen ist es sinnvoll, eine Unterteilung in verschiedene Untergruppen (s. Abb. 4) vorzunehmen. Laut BELITZ und GROSCH (1992) ist folgende Einteilung möglich:

- Flavan-3-ole (Catechine)
- Flavan-3,4-diole
- Flavanonole und Flavanone
- Flavone und Flavonole
- Isoflavone und Isoflavane
- Proanthocyanidine
- Anthocyanidine

Die wichtigsten Untergruppen und ihre in Obst häufig vorkommenden Vertreter werden nachfolgend beschrieben.



Abbildung 4: Die wichtigsten Grundstrukturen der Flavonoide (nach FRANZKE, 1996)

#### 2.1.2.2.1 Flavan-3-ole (Catechine)

In Früchten kommen in der Regel lediglich vier Vertreter der Flavan-3-ole vor. Hierbei handelt es sich um die zwei Diastereomerenpaare (+)-Catechin und (-)-Epicatechin sowie (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin (s. Abb. 5).



Abbildung 5: Strukturen der in Früchten vorkommenden monomeren Flavan-3-ole

Sie kommen in der Regel in Früchten frei vor. Eine Ausnahme bildet jedoch die Veresterung der Catechine mit Gallussäure zu O-3-Gallaten (HERRMANN, 1992; MACHEIX ET AL., 1990). Es gibt eine Vielzahl an Publikationen, die sich seit Jahrzehnten mit der Charakterisierung von Flavan-3-olen in Früchten befassen (u.a MOSEL und HERRMANN, 1974b; STÖHR ET AL., 1975a,b; PICINELLI ET AL., 1997; MÄÄTTÄ ET AL., 2003).

#### 2.1.2.2.2 Flavonole

Die Flavonole bilden unter den Flavonoiden die größte und am weitesten verbreitete Gruppe. Sie kommen in vielen Früchten vor. Die wichtigsten Vertreter sind hierbei Quercetin, Kämpferol sowie Myricetin und Isorhamnetin (s. Abb. 6).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Kämpferol	Н	Н
Quercetin	OH	Н
Myricetin	OH	OH
Isorhamnetin	OCH <sub>3</sub>	Н

Abbildung 6: Grundstrukturen der wichtigsten Flavonole

Die Flavonole kommen in Früchten nicht frei, sondern meist glykosiliert vor, wobei der Zuckerrest häufig an der C3-Position vorzufinden ist. Es gibt jedoch auch einige wenige Beispiele, bei denen sich der Zuckerrest in C7- oder C4'-Position befindet. So konnte Quercetin-4'-*O*-glucosid in Sauerkirsche (SHRIKHANDE und FRANCIS, 1973) und Kämpferol-7-*O*-xylosid in Pfirsich (DUGGAN, 1969) nachgewiesen werden. Bei den Zuckerresten dominieren vor allem die Monosaccharide Glucose, Galactose, Rhamnose und Arabinose sowie die Dissaccharide Rutinose, Sophorose und Sambubiose. Die Zucker können weiterhin acyliert (mit Hydroxyzimtsäuren, p-Hydroxybenzoesäure oder Malonsäure etc.) vorliegen (HERRMANN, 1992). Auch mit der Flavonolzusammensetzung diverser Früchte befassen sich seit Jahrzehnten zahlreiche Veröffentlichungen (WILDANGER und HERRMANN, 1973; STARKE und HERRMANN, 1976; HÄKKINEN ET AL., 1999; GIL-IZQUIERDO und MELLENTHIN, 20001; MÄÄTTÄ ET AL., 2003).

#### 2.1.2.2.3 Proanthocyanidine

Proanthocyanidine besitzen die allgemeine Struktur von mehr oder weniger polymerisierten Flavan-3-olen. Sie werden auch als kondensierte Tannine bezeichnet und weisen infolge der Verschiedenheit ihrer Komponenten und der unterschiedlichen Verknüpfungsmöglichkeiten eine große Vielfalt auf (BÖHM, 2000b). Die Untergruppen unterscheidet man anhand ihrer unterschiedlichen Bausteine. Die Procyanidine, welche reine Catechin-/Epicatechin-Kondensate sind, bilden hierbei die größte Untergruppe. Aber auch Prodelphinidine, die aus reinen Gallocatechin-/Epigallo-catechin-Kondensaten bestehen, kommen vor (s. Abb. 7).



**Abbildung 7:** Struktur eines Proanthocyanidin-Dimers mit C4→C8-Interflavan-Verknüpfung

Die häufigste Interflavanverknüpfung ist die C4→C8-Verknüpfung. Aber auch eine C4→C6-Verknüpfung ist möglich (MACHEIX ET AL., 1990). Proanthocyanidine tragen zum adstringierenden Geschmack von Früchten bei. Bis zu einem Molekulargewicht von etwa 7000 Dalton, was einem Oligomer aus ca. 20 Flavanoleinheiten entspricht, sind Proanthocyanidine löslich. Aber auch unlösliche, polymere Formen kommen vor, welche kovalent an die Polysaccharidmatrix der Zelle gebunden sein können. Der Name der Proanthocyanidine ist historisch bedingt. Schon 1914 wurde von Tswett demonstriert, dass durch die Behandlung von bestimmten farblosen Flavonoiden mit Mineralsäuren farbige Anthocyanidine entstehen. Somit können Proanthocyanidine als farblose Vorstufen von Anthocyanidinen angesehen werden (MARKAKIS, 1982).

#### 2.1.2.2.4 Anthocyanidine

Anthocyanidine sind hydroxylierte 2-Phenylbenzopyryliumkationen (Flavyliumkationen). Fast ausschließlich kommen nur die in Abbildung 8 dargestellten sechs Anthocyanidine in Früchten, Blättern und Blüten vor, wobei Cyanidine, gefolgt von Delphinidinen und Pelargonidinen, im Pflanzenreich am häufigsten vertreten sind (HERRMANN, 1972).



Abbildung 8: Grundstrukturen der Anthocyanidine

Die Anthocyanidine kommen in der Natur jedoch nicht in freier Form sondern als Glykoside vor und werden dann als Anthocyane bezeichnet. Die Anthocyane (griech. Anthos = Blüte, kyanos = blau) bewirken die rote, violette oder schwarze Färbung von Früchten, Blüten und Blättern und zählen zu den wichtigsten wasserlöslichen Pigmenten in Pflanzen (CLIFFORD, 2000). Sie befinden sich bevorzugt in den Randschichten von Pflanzen. Die Glykosidbildung, welche als Voraussetzung für die Stabilität des Anthocyanmoleküls gilt, findet an C3-Position des C-Ringes statt. Ein weiterer Zuckerrest kann an C5-Position des A-Ringes gebunden sein. Trägt das Anthocyan an C3- und C5- Position gleichzeitig einen Zuckerrest, so spricht man von 3,5-Diglykosiden (WATZL ET AL., 2002). Es gibt aber auch Beispiele für Anthocyane, welche die Zuckerkomponente an C7-Position tragen. Laut SUN und FRANCIS (1967) konnte das Anthocyan Cyanidin-7-arabinosid in Apfelstielen charakterisiert werden. Auch 3,7-Diglykoside konnten gefunden werden (CLIFFORD, 2000). Als Zuckerkomponenten findet man häufig die Monosaccharide Glucose, Galactose, Arabinose oder Rhamnose, aber auch Disaccharide wie Rutinose, Sambubiose und Sophorose. Daneben gibt es eine Vielzahl von weniger häufig auftretenden Zuckerkomponenten. So wurde in roter Zwiebel das Anthocyan Cyanidin-3-laminariobiosid (Cyanidin-3 $(1\rightarrow3)$ -glucosyl-glucosid) charakterisiert (DU ET AL., 1974). Weiterhin konnten eine Vielzahl von acylierten Anthocyan-Derivaten der p-Cumarsäure, Kaffesäure oder Ferulasäure, Essigsäure oder Malonsäure gefunden werden (FOSSEN ET AL., 1996; FOSSEN und ANDERSEN, 1998; SLIMESTAD ET AL., 1999; FOSSEN ET AL., 2001; SAITO ET AL., 2002; FOSSEN und ØVSTEDAL, 2003). Auch mehrfach acylierte Derivate konnten gefunden werden (OTSUKI ET AL., 2002; SAITO ET AL., 2002).



Abbildung 9: Anthocyan-Strukturen in Abhängigkeit vom pH-Wert

Charakteristisch für Anthocyane ist, dass ihre Farbe stark vom pH-Wert abhängig ist. In saurer Lösung (pH-Wert ≤ 1) liegt das Anthocyan als rotes Flavyliumkation vor. Bei einem pH-Wert von 4-5 wird die Lösung farblos, da nun die farblose Carbinolbase vorherrscht. Bei einem pH-Wert von 7-8 entsteht die blauviolette Chinoidbase, die sich unter Ringöffnung in das gelb gefärbte Chalkon umlagern kann (s. Abb. 9). Beim Ansäuern werden die Chinoidbase und die Carbinolbase sehr schnell wieder in das Flavyliumkation überführt. Die Rückbildung des Chalkons hingegen verläuft sehr langsam (HERRMANN, 1986; SHRIKHANDE, 1976).

#### 2.1.3 Biosynthese der Polyphenole

Die Biosynthese polyphenolischer Verbindungen ist in der Literatur bereits vielfach beschrieben worden (MACHEIX ET AL., 1990). Die Precursoren Phosphoenolpyruvat und Erythrose-Phosphat stammen hierbei aus dem Kohlenhydrat-Stoffwechel. Über den Shikimisäure-Weg entstehen dann aus der Shikimisäure in mehreren Reaktionsschritten die beiden aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Aus Phenylalanin wird zunächst die Zimtsäure und nachfolgend die p-Cumarsäure gebildet, aus welcher durch weitere Hydroxylierung und Methylierung Kaffeesäure und Ferulasäure entstehen. Aus Hydroxyzimtsäure-Derivaten können nun die Hydroxybenzoesäure-Derivate gebildet werden, wobei der Mechanismus einer bei Fettsäuren bekannten  $\beta$ -Oxidation gleicht. Sie können aber auch direkt aus der Shikimisäure entstehen. Dieser Weg wird vor allem bei der Bildung von Gallussäure bevorzugt.

Die Biosynthese der Flavonoide wird eingeleitet durch die Reaktion der an Coenzym A gebundenen p-Cumarsäure (p-Cumarsäure-CoA) und Malonyl-CoA zu einem Chalcon. Dieser Reaktionsschritt wird katalysiert durch die Chalcon-Synthase und ist der Schlüsselschritt für die Flavonoid-Synthese. Nachfolgend findet durch die Chalcon-Isomerase der Ringschluß zum Flavanon statt.

Aus dem Flavanon-Grundgerüst können dann durch verschiedene Reaktionsschritte und –wege Isoflavone, Flavanonole, Flavone, Flavonole, Flavan-3-ole und Anthocyanidine gebildet werden. Auf die diversen Reaktionsschritte zur Bildung einzelner Flavonoid-Gruppen und Verbindungen soll nicht weiter eingegangen werden. Hier bietet STAFFORD (1990) eine umfassende Übersicht. Abbildung 10 zeigt die wichtigen Reaktionsschritte der Biosynthese von Polyphenolen.



Abbildung 10: Biosynthesewege der Polyphenole (nach MACHEIX ET AL., 1990)

#### 2.1.4 Gesundheitliche Wirkungen der Polyphenole

#### 2.1.4.1 Bioverfügbarkeit und Stoffwechsel

Während freie Hydroxyzimtsäuren sowohl im Dünn- als auch im Dickdarm absorbiert werden können, werden veresterte Hydroxyzimtsäuren im Dünndarm nicht absorbiert. Diese Tatsache liegt darin begründet, dass der Mensch keinerlei Esterasen besitzt, welche beispielweise Kaffeesäure aus Chlorogensäure freisetzen können. Deshalb erfolgt die Metabolisierung von Phenolsäureestern ausschließlich durch Enzyme (Xylanasen und Esterasen) der Mikroflora im Dickdarm. Im menschlichen Blutplasma konnten Hydroxyzimtsäureester bisher nicht nachgewiesen werden. Jedoch konnte kürzlich eine signifikante Zunahme an Chlorogensäure im Urin nach Verabreichung von 100 g Pflaumen beobachtet werden. Auch freie Hydroxyzimtsäuren konnten nach Verzehr von Früchten im Urin nachgewiesen werden. Ein Biomarker für die Bioverfügbarkeit und die Metabolisierung von Kaffeesäuren sowie deren Derivate stellt die Iso-Ferulasäure dar. Diese kommt in Lebensmitteln nicht vor und wird durch Methylierung von Kaffeesäure vor oder nach der Absorption gebildet. Absorbierte Hydroxyzimtsäuren können dann in der Leber durch  $\beta$ -Oxidation abgebaut bzw. dort methyliert werden. Danach werden sie mit dem Gallensaft wieder ausgeschieden. Über die Bioverfügbarkeit und den Stoffwechsel von Hydroxybenzoesäuren sowie deren Derivate ist weniger bekannt. Hier wurden Studien fast ausschließlich mit gereinigten Substanzen duchgeführt. Da z.B. die Ellagsäure in Pflanzen als Glykosid oder Ester vorliegt, ist ihre Bioverfügbarkeit vermutlich geringer als jene, die in Studien mit der Reinsubstanz ermittelt wurde (WATZL und RECHKEMMER, 2001a).

Bei den Flavonoiden werden die Aglykone der Flavonole und Flavone im Dünndarm durch passive Diffusion absorbiert, in der Leber nachfolgend glukuroniert, sulfatiert oder methyliert und mit dem Gallensaft ausgeschieden. Bei den Flavonoidglykosiden wurde lange Zeit angenommen, dass diese erst im Dickdarm durch Mikroorganismen aufgespalten und die Aglykone absorbiert werden. Auch ein weiterer mikrobieller Abbau der Flavonoide wurde angenommen. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass bestimmte Flavonoidglykoside über einen aktiven Transport im Dünndarm bioverfügbar sind. Hierbei scheint jedoch der Zuckerrest von entscheidender Bedeutung für die Absorptionsrate zu sein. Gezeigt wurde in einer Studie, dass lediglich Quercetinglucoside im Gegensatz zu Quercetindisacchariden im Dünndarm eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen. Dies gilt vermutlich auch für andere Flavonoidglykoside. Die Metabolisierung der Flavonoide erfolgt in der Hauptsache in der Leber. Auch die Mikroflora im Dickdarm, welche Glykosidasen, Glukuronidasen und Sulfatasen besitzen, bewirkt eine Metabolisierung. Die Abbauprodukte der Aglykone, wie z.B. Phenolsäuren, werden im Kolon absorbiert und können im Urin nachgewiesen werden (WATZL und RECHKEMMER, 2001b; METZ, 2000c). Die Anthocyane nehmen unter den Flavonoiden eine Sonderstellung ein. Sie scheinen in ihrer originären Form lediglich eine geringe Bioverfügbarkeit zu besitzen, da sie nur in niedrigen Konzentrationen im Plasma und Urin nachgewiesen werden konnten. Eine Hydrolyse der Zuckerkomponenten vor der Absorption, wie bei den Flavonolen beobachtet wurde, scheint nicht unbedingt notwendig zu sein, jedoch ist über die endogene Metabolisierung der Anthocyane bisher wenig bekannt. Die geringe Bioverfügbarkeit könnte z.B. in ihrer pH-Instabilität begründet sein, da im Dünn- und Dickdarm ein neutraler bis schwach basischer pH-Wert vorliegt. Ein weiterer Grund könnte die Metabolisierung durch die intestinale Mikroflora und durch intrazelluläre Enzyme der Enterozyten sowie der Leberzellen sein (WATZL ET AL., 2002).

#### 2.1.4.2 Negative Wirkungen/ Toxizität der Polyphenole

Im Fall der Phenolsäuren hat eine Langzeitstudie an Ratten ergeben, daß eine tägliche Zufuhr von Kaffeesäure mit dem Futter (2% des Futters) zu Magenkrebs führt. Auf den Menschen übertragen würde das einer täglichen Dosis von 140 g Kaffeesäure entsprechen. Des weiteren wurde in Tierversuchen eine Beeinträchtigung der Zinkabsorpion durch Gabe von Kaffee- und Chlorogensäure bewirkt. Aus mehreren Studien ist bekannt, dass Kaffeekonsum zu einer erhöhten Plasmacysteinkonzentration führt. Diese Erhöhung geht mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten einher. Die Chlorogensäure wurde hierbei als einer der dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe identifiziert (WATZL und RECHKEMMER, 20001a).

Bei den Flavonoiden konnte bisher in Tierversuchen keine kanzerogene Wirkung nachgewiesen werden, obwohl *in vitro* für einige Verbindungen mutagene und genotoxische Wirkungen belegt sind (WATZL und RECHKEMMER, 20001b).

#### 2.1.4.3 Positive Wirkungen der Polyphenole

Den Polyphenolen werden eine Reihe positiver Wirkungen zugeschrieben. Zu den wichtigsten positiven Eigenschaften zählen (PIETTA und MILLER, 1998; WATZL und RECHKEMMER, 2001a, b; METZ, 2000a-c):

- anticancerogene und antimutagene Wirkung
- antimikrobielle Wirkung
- antivirale Wirkung
- antiallergische Wirkung
- entzündungshemmende Wirkung
- blutgefäßschützende und blutdruckregulierende Wirkung
- antithrombotische Wirkung
- Hemmung der Histaminfreisetzung
- Hemmung der LDL-Oxidation und der Lipidperoxidation
- Schutz vor UV- und Röntgenstrahlung
- antioxidative Wirkung.

Der *antioxidativen Wirkung* kommt hierbei eine besondere Bedeutung unter den positiven Eigenschaften zu, da Polyphenole ein außergewöhnlich hohes *antioxi- datives Potential* und somit gute Radikalfängereigenschaften besitzen. Dieser Aspekt soll nachfolgend näher erläutert werden.

#### 2.1.4.3.1 Antioxidatives Potential von Polyphenolen

Wissenschaftliche Studien belegen, dass die beiden häufigsten Todesursachen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs, zu einem großen Teil von äußeren Faktoren wie falsche Ernährung, Konsum von Genussmitteln, Bewegungsmangel und Stress abhängen. Die Schätzungen von Wissenschaftlern gehen davon aus, dass 80-85 % aller Krebserkrankungen "hausgemacht" und somit vermeidbar sind. Während sich unsere Vorfahren vor Jahrhunderten noch überwiegend von pflanzlicher Nahrung ernährten (Blätter, Früchte, Pilze etc.), da die Jagd auf Großtiere sehr risikoreich und relativ selten von Erfolg gekrönt war, hat sich seit Beginn der Industrialisierung die Lebensweise des Menschen bezüglich seiner körperlichen Bewegung und der Ernährungsgewohnheiten grundlegend verändert.
Die Konsequenz daraus ist, dass die Ernährung und die Lebensweise des "modernen Menschen" nicht mehr den Bedingungen entspricht, an die sich der Mensch im Laufe der jahrtausendelangen Evolution angepasst hat. Zuwenig Bewegung, zu viele Kalorien und falsche Ernährung sind damit die wichtigsten Gründe für eine Vielzahl der typischen Zivilisationserkrankungen (VOGES, 1997).

Oxidation und die Produktion von Freien Radikalen und sogenannten "reaktiven Sauerstoffverbindungen" (ROS = reactive oxygen species) sind ein wichtiger Teil des Lebens. Sie entstehen bei einer Vielzahl von Stoffwechselvorgängen als Nebenprodukte, bevorzugt dort, wo viel Sauerstoff verarbeitet wird. Generell handelt es sich bei den ROS um sehr reaktionsfreudige Produkte wie z.B. Singulettsauerstoff oder das aus Wasserstoffperoxid entstehende Hydroxyradikal HO<sup>-</sup> (vgl. Abb. 1). Die freien Radikale und ROS spielen im Körper eine wichtige Rolle. Sie schützen aufgrund ihrer Aggressivität vor körperfremden Eindringlingen wie Bakterien und Viren und dienen somit dem Immunsystem. Sie sind jedoch nur dann nützlich, wenn sie in der richtigen Konzentration vorhanden sind. Ist ein Überangebot vorhanden, so richtet sich die Aggressivität gegen den eigenen Organismus. Der menschliche Körper besitzt jedoch ein hochwirksames und komplexes antioxidatives System, welches einer Schädigung durch den Angriff von freien Radikalen und ROS entgegenwirkt. Zu diesem System gehören eine Reihe von Verbindungen, welche als Antioxidantien bezeichnet werden. Sie beseitigen hierbei entweder freie Radikale und ROS oder sie inaktivieren Zwischenprodukte, die zu freien Radikalen und ROS weiterreagieren würden. Antioxidantien können sowohl vom Körper selbst gebildet oder aber mit der Nahrung aufgenommen werden (PAPAS, 1999).

Man unterscheidet hierbei zwischen *enzymatischen* und *nichtenzymatischen Schutzmechanismen.* Zu den körpereigenen antioxidativ wirksamen Substanzen gehören in erster Linie die Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und Glutathion-Peroxidase, welche bei bestimmten Prozessen und Radikalen entgiftend wirken. Die nichtenzymatischen Antioxidantien werden in wasserlösliche (z.B. Ascorbinsäure, Harnsäure) und fettlösliche (z.B. Tocopherole, Carotinoide) unterteilt (VOGES, 1997). Laut HALLIWELL ET AL. (1995) wird jede Substanz als Antioxidans bezeichnet, die im Vergleich zu einem oxidierbaren Substrat in niedriger Konzentration vorhanden ist und die dessen Oxidation signifikant verzögert oder verhindert. Hierbei ist wichtig, dass die Funktion der einzelnen Antioxidantien nicht isoliert betrachtet werden sollte, sondern als Bestandteil eines Systems mit signifikanter Wechselwirkung und additiven oder synergistischen Effekten (PAPAS, 1999).

Für den Körper ist somit der *antioxidative Status* von großem Interesse, welcher die Balance zwischen der antioxidativen Abwehr und den Prooxidantien beschreibt. Diese Balance ist dynamisch und kann unter bestimmten Bedingungen aus dem Gleichgewicht geraten. Bei einem Ungleichgewicht in Richtung vermehrter Bildung von freien Radikalen und ROS spricht man vom sogenannten *oxidativen Stress*, welcher zu einer Vielzahl von Erkrankungen führen kann, die unter dem Begriff *Free Radical Diseases* (siehe Abb. 1) zusammengefasst werden (HANDELMAN und PRYOR, 1999). Zu den Krankheiten, welche durch freie Radikale verursacht werden, zählen nach VOGES (1997) folgende:

- Herz-/Kreislauferkrankungen
- Arteriosklerose
- Asthma
- Diabetes mellitus
- Entzündungsreaktionen
- Hauterkrankungen (UV-Strahlung)
- Immunschwäche
- Katarakt (grauer Star)
- Krebs
- Leberschäden

- Lungenerkrankungen
- Morbus Alzheimer
- Morbus Parkinson
- multiple Sklerose
- neurologische Störungen
- Pankreatitis
- chronische Polyarthritis
- Rheuma
- Strahlenschäden
- Sehstörungen

Die Quellen zur Bildung von freien Radikalen können hierbei *endogen* (z.B. Immunabwehr oder Stress) oder *exogen* (z.B. Rauchen oder Alkoholkonsum) sein (siehe Abb. 1). Somit bildet eine ausgewogene Mischkost mit viel Obst und Gemüse aufgrund der hohen antioxidativen Aktivität der darin enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe, insbesondere der Polyphenole und Carotinoide, eine wirkungsvolle Gesundheitsprophylaxe.

#### 2.1.4.3.2 Bestimmung der antioxidativen Aktivität – TEAC Assay

Es gibt eine Vielzahl von Methoden, die sich mit der Bestimmung der antioxidativen Aktivität befassen. Diese Methoden unterscheiden sich im Messprinzip und in der Funktionsweise des Testsystems. Das hat zur Folge, dass die Messergebnisse der unterschiedlichen Testsysteme nicht unmittelbar miteinander verglichen werden können. So muß bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität einer Probe immer das verwendete Testsystem angegeben werden, damit der erhaltene Wert aussagekräftig ist. Auch müssen die verschiedenen Tests nach einer streng vorgeschriebenen Norm durchgeführt werden. Jede Abweichung kann zu einer Beeinflussung des Ergebnisses führen und beeinträchtigt somit die Reproduzierbarkeit der Methode. In Tabelle 2 sind die wichtigsten Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität zusammengestellt.

Tabelle 2:	Methoden	zur Bestimmung	g der	antioxidativen	Aktivität

Methode	Literatur
TEAC-Test	MILLER ET AL. (1993); MILLER ET AL.
( <u>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</u> )	(1995); RE ET AL. (1999)
DPPH-Test	HOGG ET AL. (1961); BRAND-WILLIAMS ET
(1,1- <u>Dip</u> henyl-2- <u>p</u> icryl <u>h</u> ydrazyl)	AL. (1995)
ORAC-Test	CAO ET AL. (1993); CAO ET AL. (1997);
( <u>O</u> xygen <u>R</u> adical <u>A</u> bsorbance <u>C</u> apacity)	EHLENFELDT ET AL. (2001)
<b>TRAP-Test</b> ( <u>T</u> otal <u>R</u> adical <u>T</u> rapping <u>A</u> nti-	WAYNER ET AL. (1985); GHISELLI ET AL.
oxidant <u>P</u> arameter)	(1995)
FRAP-Test	BENZIE und STAIN (1996)
( <u>F</u> erric <u>R</u> educing / <u>A</u> ntioxidant <u>P</u> ower)	
LDL-Oxidations-Test	ESTERBAUER ET AL. (1989); FRANKEL ET
	AL. (1993)
β-Carotin-Bleichung	MARCO (1968)
Chemilumineszenz-Test	WHITEHEAD ET AL. (1992)
ESR-Messung	RAMADAN ET AL. (2003)
( <u>E</u> lectron <u>S</u> pin <u>R</u> esonance)	

Der TEAC-Test ist hierbei das am häufigsten verwendete Testsystem in der Lebensmittelanalytik. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde der TEAC-Test zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Fruchtsäften und deren Inhaltsstoffen verwendet. Aus diesem Grund soll das Prinzip dieses Tests nachfolgend näher erläutert werden.

Der ursprüngliche TEAC-Test basiert auf einer Vorschrift nach MILLER ET AL. (1993). Hierbei wird ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)), ein Peroxidase-Substrat, mittels Metmyoglobin und Wasserstoffperoxid zum Radikalkation

ABTS<sup>+</sup> umgesetzt. Exakt 6 Minuten nach Zugabe des Wasserstoffperoxides wird die Extinktion der entstandenen Grünfärbung, welche durch das gebildete ABTS<sup>+</sup>-Radikalkation entsteht, bei 734 nm photometrisch bestimmt. Antioxidativ wirksame Verbindungen zögern hierbei die Radikalbildung um eine gewisse Zeit hinaus (Lagphase), fangen aber auch andererseits bereits gebildete Radikale ab. Der Test wird auch "decolorisation assay" genannt, denn je schwächer die Grünfärbung der resultierenden Reaktionslösung ist, desto höher ist die Konzentration an Antioxidantien in der Probe. Als Bezugssubstanz dient Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8tetramethylchroman-2-carbonsäure), welches ein wasserlösliches Vitamin E Analogon ist. Das Ergebnis wird in Trolox-Äquivalenten angegeben. Diese Methode hat jedoch einen entscheidenden Nachteil. Da das Reaktionsmedium wässrig ist, kann lediglich die antioxidative Aktivität von wasserlöslichen Antioxidantien und wässrigen Proben vermessen werden. Diese Einschränkung gilt bei der nach RE ET AL. (1999) modifizierten Variante des TEAC-Tests nicht mehr. Das ABTS<sup>· +</sup>-Radikalkation wird hierbei vor Beginn der eigentlichen Messung aus ABTS und Kaliumpersulfat erzeugt. Die daraus resultierende blau-grün gefärbte ABTS<sup>· +</sup>-Lösung reagiert dann direkt mit den in der Probe vorhandenen Antioxidantien. Exakt 6 Minuten nach Zugabe der Probelösung wird die verbleibende Färbung bei 734 nm photometrisch vermessen. Je stärker sich die ABTS<sup>+</sup>-Lösung entfärbt, desto höher ist die antioxidative Aktivität der Probe. Auch hier dient Trolox als Bezugssubstanz. Die antioxidative Aktivität (AA) wird als Trolox-Äquivalente berechnet. Da die Reaktion in ethanolischer Lösung stattfindet, können mit diesem Testsystem nicht nur wasserlösliche Proben, sondern auch lipophile Substanzen wie Carotinoide vermessen werden. PUERTAS-MEJÍA ET AL. (2002) zeigen, dass sich diese modifizierte TEAC-Methode sehr gut zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von ätherischen Ölen eignet. Darüber hinaus ist die modifizierte Variante wesentlich schneller durchzuführen als der ursprüngliche Test. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit der modifizierte TEAC-Test nach RE ET AL. (1999) verwendet.

Eine abgewandelte Variante dieser Methode ist der VCEAC-Test (<u>V</u>itamin <u>C</u> <u>E</u>quivalent <u>A</u>ntioxidant <u>C</u>apacity). Hier wird anstelle von Trolox Ascorbinsäure als Bezugssubstanz verwendet. Des weiteren wird ein ABTS<sup>--</sup>-Radikalanion postuliert, welches aus ABTS und AAPH (2,2'-Azino-bis(2-amidinopropan) gebildet wird (VAN DEN BERG, 1999; KIM ET AL. , 2002; LEE ET AL. , 2003).

#### 2.2 Fruchtsäfte

#### 2.2.1 Allgemeines

Die Gewinnung von Säften aus Früchten reicht bis in die menschliche Frühzeit zurück. Hierbei bediente man sich jedoch recht einfacher Verfahren zur Abtrennung des Saftes von der Frucht, wobei die Ausbeute natürlich bescheiden war. Im Laufe der Jahrhunderte haben sich die Verfahren zur Gewinnung von Säften verändert und verfeinert (neue Anbaumethoden, Neuzüchtungen etc.), wobei früher die Haltbarmachung des Saftes ein zentrales Problem darstellte. So war es lange Zeit nicht möglich, einen Saft ohne wesentliche Verluste an Nähr- und Genusswert aufzubewahren. Aus diesem Grunde wurden Früchte in erster Linie zu Met, Mostwein oder anderen hochprozentigen Getränken verarbeitet. Erst dank Louis Pasteur (1822-1895) gelang in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts der Meilenstein hin zur Entwicklung der Fruchtsaftindustrie. Mit Hilfe des von Pasteur entwickelten Pasteurisationsverfahrens war es möglich, die Produkte schonend und dauerhaft haltbar zu machen. Zusätzlich hat eine ständige Verbesserung der Technologie, wie z.B. die enzymatische Klärung der Säfte oder die Technik der Konzentrat- und Aromagewinnung, und eine wachsende Vielfalt im Sortiment der Fruchtsäfte stattgefunden. Durch die Erfindung der Konzentratherstellung wurde es schließlich möglich, kostengünstig über längere Zeiträume Fruchtsaftkonzentrate herzustellen, ohne von der Jahreszeit und der Ernte der Früchte abhängig zu sein. Weiterhin konnten durch das kleinere Volumen der Konzentrate Kostenvorteile bei der Lagerung und dem Transport erzielt werden.

Während Anfang der 30er Jahre die Saftproduktion durch kleingewerbliche oder mittelständige Betriebe stattgefunden hat, entwickelte sich die Fruchtsaftindustrie nach dem 2. Weltkrieg zu einem erheblichen Faktor in der Weltwirtschaft. Der Pro-Kopf-Verbrauch an Fruchtsaft und Nektar beziffert sich hierbei für Deutschland auf über 40 Liter pro Jahr (SCHOBINGER, 2001).

Tabelle 3 zeigt den Fruchtsaftverbrauch im Jahre 1997 nach Geschmacksrichtungen aufgeteilt. Orangensaft dominiert hierbei in allen Ländern – außer Deutschland – deutlich gegenüber Apfelsaft. Traubensaft und andere Säfte spielen bis auf die Länder Polen, Südafrika und Spanien eine untergeordnete Rolle.

**Tabelle 3:** Fruchtsaftverbrauch 1997 nach Geschmacksrichtungen (nachSCHOBINGER, 2001)

	Citrus*	Apfel	Traube	andere
Bundesrepublik Deutschland	38%	45%	4%	13%
Belgien	74%	16%	2%	8%
Niederlande	56%	22%	3%	19%
Frankreich	66%	12%	7%	15%
Italien**	60%	32%	_	8%
Großbritannien	80%	9%	_	11%
Schweiz	63%	27%	5%	5%
USA	68%	16%	4%	12%
Österreich	44%	39%	_	17%
Polen	37%	18%	_	45%
Südafrika	44%	14%	8%	34%
Spanien	27%	5%	9%	59%

\* vornehmlich Orange, \*\* Jahr 1980

Quelle: Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V. (VdF), Bonn

#### 2.2.2 Fruchtsaftherstellung

Der Verbraucher erwartet von einem Fruchtsaft grundsätzlich alle positiven Eigenschaften der ursprünglichen Frucht wie ausgereift, frisch, natürlich oder fruchtig. Deshalb müssen diese Eigenschaften einerseits bereits im Rohmaterial vorhanden sein, andererseits bei der Verarbeitung möglichst unverändert bleiben. Bereits durch die Wahl einer bestimmten Fruchtsorte oder eines speziellen Reifestadiums des Rohmaterials können *spezielle Geschmacks- und Geruchswünsche* wie säurereich, mild, herb oder aromatisch beeinflusst werden. Weiterhin können die sensorischen Eigenschaften zusätzlich durch die Verarbeitungstechnologie (z.B. Filtrieren, Ultrafiltration, Schönen, Gerbstoffentfernen, Entsäuern) beeinflusst werden. Es können zur Fruchtsaftbereitung fast alle genussfähigen Frucht- und Beerenarten verwendet werden, wobei bei einigen Arten ein *unausgewogenes Zucker/Säure-Verhältnis* vorherrscht. Dieses kann oftmals bereits durch Mischen von verschiedenen Fruchtsäturen etc. notwendig (SCHOBINGER, 2001).

Abbildung 11 zeigt das Fließschema der Verarbeitung von Steinobst und Beeren am Beispiel der Sauerkirsche und der schwarzen Johannisbeere.



**Abbildung 11:** Verarbeitung von Steinobst und Beeren am Beispiel von Kirschen und Johannisbeeren (nach SCHOBINGER, 20001)

Wie aus Abbildung 11 ersichtlich wird, gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten der Saftherstellung. Zum einen kann ein Saft als *Press- oder Muttersaft* in den Handel

gelangen. Bei diesem Verfahren findet üblicherweise eine thermische Behandlung statt, welche im Fließschema als *Kurzzeiterhitzung* bezeichnet wird. Hierbei stellt das *Pasteurisieren* von Säften das klassische Haltbarmachungsverfahren dar. Die Pasteurisation (Temperaturen <100 °C) dient der Abtötung der für den Verderb verantwortlichen Mikroorganismen und der Inaktivierung von Enzymen. Der Wärmebehandlung sind jedoch Grenzen gesetzt. Einerseits soll die Pasteurisation wirkungsvoll sein, aber andererseits sollen keine unerwünschten chemischen Reaktionen ablaufen, welche die Qualität des Produktes negativ beeinflussen können. Somit richten sich Temperatur und Zeitdauer der Pasteurisation nach dem jeweiligen Produkt. Es gibt Richtwerte, aber allgemeingültige Temperatur- und Zeitangaben gibt es nicht (SCHOBINGER, 2001).

Zum anderen gibt es die Möglichkeit der Herstellung eines *Saftkonzentrates*. Hierbei wird durch Konzentrierungsprozesse der Trockensubstanzgehalt der Säfte von ursprünglich 5 bis 20 % auf 60 bis 75 % erhöht. Dadurch nimmt die Wasseraktivität ab und das Produkt ist in mikrobieller Hinsicht erheblich stabilisiert. Ebenso wird das erforderliche Transport- und Lagervolumen auf das 6-7 fache reduziert. Die Technik der Konzentratherstellung wurde ca. 1920 durch *Verdampfen* eingeführt. Nachteile dieses Verfahrens waren jedoch starke sensorische und chemische Veränderungen. Durch die thermische Belastung ging der Fruchtsaftcharakter weitgehend verloren. Es folgte eine stetige Entwicklung und Verbesserung des Konzentrierungprozesses sowie die Möglichkeit der Aromagewinnung, so dass dieses Verfahren aufgrund seiner Vorteile auch heute noch für die Fruchtsaftindustrie von erheblicher Bedeutung ist. Neben der Entwicklung verschiedener thermischer Konzentrierungsverfahren gibt es weiterhin die Möglichkeit der *Gefrierkonzentrierung* und der *Konzentrierung durch Membranprozesse* wie Ultrafiltration, Umkehrosmose, Dialyse etc. (SCHOBINGER, 2001).

#### 2.2.3 Veränderungen des Polyphenolprofils von Fruchtsäften

Während der Fruchtsaftherstellung und der Lagerung unterliegen polyphenolische Saftinhaltsstoffe aufgrund ihrer hohen Reaktivität ständigen Veränderungen (SPANOS ET AL., 1990 a-c). Verantwortlich dafür sind *enzymatische* und *nichtenzymatische* Reaktionen. Die Polyphenole können hierbei sowohl untereinander als auch mit z.B. Proteinen und Kohlenhydraten vielfältige Reaktionen eingehen. So unterscheidet sich das Polyphenolprofil eines Fruchtsaftes im allgemeinen deutlich von dem der eingesetzten Frucht. Diese Veränderungen können sich nicht nur auf die Qualität des Saftes, sondern auch auf die antioxidative Aktivität und die Bioverfügbarkeit auswirken.

Durch Einwirken von Oxidationsenzymen (Phenoloxidasen, weniger Peroxidasen) auf phenolische Inhaltsstoffe wird die sogenannte *Mostoxidation* (enzymatische Oxidation) eingeleitet. Phenoloxidasen kommen in allen heimischen Obstsorten vor und sind in Kern- und Steinobst sowie in Trauben von beträchtlicher Aktivität. Sie befinden sich in der intakten Zelle getrennt vom phenolischen Substrat. Nach Zerstörung der Zelle durch Druck, Schnitt oder Abpressen des Saftes können die Phenoloxidasen in Anwesenheit von Luftsauerstoff das Substrat zum *ortho*-Chinon oxidieren. Die für die enzymatische Reaktion verantwortlichen Enzyme zeigen insbesondere eine hohe Affinität zu Hydroxyzimtsäurederivaten wie z.B. Kaffeesäurederivaten, während Flavonoide weniger schnell umgesetzt werden. Die nachfolgende Reaktion des *ortho*-Chinons mit anderen Polyphenolen, Aminosäuren, Proteinen oder Polysacchariden führt zu mannigfaltigen, braunen mehr oder weniger polymeren Reaktionsprodukten. Dieser zweite Reaktionsschritt ist vorwiegend nichtenzymatischer Natur (RECHNER, 2001).

Die Mostoxidation ist die Hauptursache des Polyphenolabbaus während der Saftherstellung. Sie kann durch rasches Arbeiten vor der Erhitzung und Inaktivierung der Enzyme durch Hitze weitgehend vermieden werden (SCHOBINGER, 2001).

Das Mindesthaltbarkeit eines Saftes beträgt üblicherweise 12 bis 24 Monate, so dass während der Lagerung ebenfalls eine Veränderung des Saftprofils durch den Abbau monomerer Polyphenole stattfindet, welcher stark temperaturabhängig ist. Hierbei folgt der Anthocyanabbau in roten Fruchtsäften sowie der Bräunungsanstieg in hellen Säften einer Reaktionskinetik 1. Ordnung (RECHNER, 2001). Die Formel für eine Reaktion 1. Ordnung lautet wie folgt (WEDLER, 1987):

$$c/c_0 = e^{-kt}$$

mit:  $c_0$ = Anfangskonzentration zum Zeitpunkt  $t_0$ ; c = Konzentration zum Zeitpunkt t; t = Zeit; k= Geschwindigkeitskonstante

Ferner können Polyphenole oberhalb eines pH-Wertes von 4 mit Schwermetallsalzen reagieren, wobei blaugraue bis blauschwarze Verfärbungen und ein sogenannter "Metallgeschmack" auftreten. Aufgrund des sauren pH-Wertes von Säften spielt diese Reaktion jedoch keine große Rolle (SCHOBINGER, 2001).

#### 2.2.4 Copigmentierungsreaktionen

Das Phänomen der Copigmentierung ist seit langer Zeit bekannt und in der Natur weit verbreitet. Bereits 1916 beobachteten WILLSTÄTTER und ZOLLINGER, dass die Farbe von Oenin, einem Traubenpigment, nach Zugabe von Tannin oder Gallussäure auch in Gegenwart von Mineralsäure blauer wurde (MARKAKIS, 1982). Die intermolekulare Copigmentierung von Anthocyanen mit anderen Polyphenolen, welche von GOTO seit 1985 allgemein auch als Copigmentierung bezeichnet wird (HUTTER-BEDA, 1992), bewirkt einen Anstieg der Farbintensität (hyperchromer Effekt) und eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (bathochromer Effekt), was zu einer violetten bis blauen Farbe führt (MAZZA und BROUILLARD, 1990). Im Zuge der Copigmentierung kommt es auch zu einer Stabilisierung des Flavyliumkations. Es konnte gezeigt werden, dass Anthocyan-Lösungen bei pH-Werten von 4-6, aufgrund des vermehrten Vorhandenseins der farblosen Carbinolbase, fast farblos erscheinen. Bei Zugabe eines sogenannten Copigments jedoch zeigt sich keine signifikante Abnahme der Farbintensität der Anthocyan-Lösung mit steigendem pH-Wert (MAZZA und BROUILLARD, 1987). Verbindungen, die einen derartigen Effekt bewirken, tragen in der Regel nichts zur Farbe der Lösung bei und werden somit aufgrund ihrer Wirkung auch als Copigmente (bzw. Co-Pigmente) bezeichnet (ASEN ET AL., 1972). Eine große Vielzahl von Molekülen kann hierbei als Copigment fungieren, darunter sind vor allem Flavonoide, Phenolsäuren, Alkaloide, Aminosäuren oder Organische Säuren zu finden (MAZZA und BROUILLARD, 1987; MAZZA und MINIATI, 1993).

Die Struktur des Anthocyan-Copigment-Komplexes wurde in der Literatur vielfach kontrovers diskutiert. Heutige Modellvorstellungen gehen davon aus, dass ein nucleophiler Angriff von Wasser, und eine damit verbundene Reaktion des farbigen Flavyliumkations zur farblosen Carbinolbase durch die parallele Anordnung von aromatischen Kernen unter und oberhalb der Anthocyanebene verhindert wird. Die daraus resultierenden Sekundärstrukturen werden durch  $\pi$ -Komplex-artige Bindungen oder durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert (HUTTER-BEDA, 1992). Eine derartige Anordnung der Moleküle wurde von GOTO ET AL. im Jahre 1979 vorgeschlagen und wird als *vertikale Stapelung* (engl. vertical stacking) bezeichnet (s. Abb. 12). Die Vorstellung einer *horizontalen Stapelung* (engl. end-to-end-complex), wie sie von SCHEFFELDT und HRAZDINA (1978) oder CHEN und HRAZDINA (1981) postuliert wurde, ist unwahrscheinlich. Hier erfolgt die Erklärung der Stabilität des Anthocyan-Copigment-Komplexes in Wasser über Wasserstoffbrücken-Bindungen, obwohl Wasser selbst ein sehr guter H-Brücken-Donor und Akkzeptor ist. Außerdem kann ein unerwünschter nucleophiler Angriff von Wasser bei der horizontalen Stapelung aufgrund der Anordnung leichter erfolgen (MAZZA und BROUILLARD, 1987).

Die Copigmente können jedoch auch kovalent an das Anthocyan gebunden sein. In diesem Fall spricht man von *intramolekularer Copigmentierung*. GEORGE ET AL. (1996) beschreiben einen speziellen Fall dieses Typs, die sogenannte *Sandwich-Typ Copigmentierung*. Hierbei handelt es sich um Anthocyane, welche als Zuckerreste 1,6-Diacylierte- $\beta$ -D-glucopyranosen besitzen. Die beiden aromatischen Reste fungieren als Copigment und stabilisieren das Anthocyan somit intramolekular. Abbildung 12 stellt diesen Sachverhalt graphisch dar.

Es gibt eine Reihe von Faktoren, die den Copigmentierungseffekt beeinflussen. Hierzu zählen vor allem die Art sowie die Konzentration des Anthocyans und des Copigments, das molare Verhältnis von Copigment zu Anthocyan (C/A-Verhältnis), der pH-Wert und die Temperatur (MULDER-KRIEGER und VERPOORTE, 1994). Die Konzentration des Anthocyans ist hierbei der limitierende Faktor der Copigmentierung. Erst ab einer Konzentration von etwa 3,5×10<sup>-5</sup> M zeigen sich signifikante Copigmentierungseffekte (MARKAKIS, 1982). Auch das Verhältnis von Copigment zu Anthocyan ist wichtig. Die bathochrome sowie die hyperchrome Verschiebung des Chromophores werden mit zunehmendem C/A-Verhältnis größer.

Es existieren in der Literatur zahlreiche Publikationen, welche sich mit dem Phänomen der Copigmentierung in Säften befassen (z.B. WILSKA-JESZKA und KORZUCHOWSKA, 1996; MALIEN-AUBERT ET AL., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit sollen mögliche Copigmentierungseffekte in Holundersaft untersucht werden.

#### Intermolekulare Copigmentierung:



**Abbildung 12:** Graphische Darstellung der inter- und intramolekularen Copigmentierung (nach HUTTER-BEDA, 1992; GEORGE ET AL., 1996)

#### 2.2.5 Farbaktivitätskonzept

Bei roten Fruchtsäften spielt neben Geschmack und Geruch vor allem die Farbe eine wesentliche Rolle bei der Beurteilung der Qualität. Ein Buntsaft gilt als besonders ansprechend, wenn er eine tiefrote Farbe besitzt. Eine bräunlich-orange Verfärbung hingegen wird als negativ empfunden. Aus diesem Grund gibt es analytische Verfahren, mit deren Hilfe eine Beurteilung der Qualität der Farbe ermöglicht wird. Dabei handelt es sich vor allem um photometrische und sensorische Methoden. Die photometrische Messung der *Farbintensität* und *Farbtönung* ist zugeschnitten auf rote Fruchtsäfte (WROLSTAD ET AL., 1982) und Weine (MAZZA ET AL., 1999):

Farbintensität	$= (A_{420} - A_{700}) + (A_{520} - A_{700})$
Farbtönung	$= (A_{420} - A_{700}) / (A_{520} - A_{700})$

Die Messung der Absorption A<sub>520</sub> bei einer Wellenlänge von 520 nm findet statt, da Anthocyane in diesem Bereich ein Absorptionsmaximum aufweisen. Der Wert der Absorption A<sub>420</sub> bei 420 nm berücksichtigt eine mögliche Verschiebung in den braun/orange-Bereich, welche durch die Bildung von Polymeren zustande kommt. Die Messung der Absorption A<sub>700</sub> bei 700 nm entspricht einem Korrekturfaktor für die Trübung.

Es gibt verschiedene *Farbmodelle*, mit deren Hilfe eine Farbe klassifiziert und Aussagen bezüglich ihrer Qualität wie Buntton (engl. hue), Buntheit (engl. chroma) oder Helligkeit (engl. lightness) gemacht werden können. Die wichtigsten Modelle stellen die sogenannten *CIE-Farbmodelle* (CIEXYZ, CIELUV und CIELAB) dar. CIE steht hierbei für *Commission Internationale de l'Eclairage* (International Commission on Illumination). Sie wurde 1913 gegründet. Das bekannteste und in der Literatur häufig verwendete Farbmodell ist das CIELAB-System (oder CIE L\*a\*b\*), welches 1976 eingeführt wurde. Im CIELAB-Farbraum bezeichnet der *L-Wert* (z-Achse, Helligkeitsachse) die Luminanz bzw. die psychometrische Helligkeit (von Schwarz bis Weiß). Die *a-Werte* (x-Achse) reichen von –100 (grün) bis +100 (rot) und die *b-Werte* (y-Achse) von –100 (blau) bis +100 (gelb). Je näher die a- und b-Werte bei Null liegen, desto neutraler ist der Farbton (d.h. L=50 und a=0/b=0 entspricht einem mittleren, absolut neutralen Grau). Abbildung 13 zeigt die graphische Darstellung des CIELAB-Systems.

Verwendet man im CIELAB a/b-Bezugssystem die entsprechenden Polarkoordinaten, so lassen sich alle Farbarten nach Buntheit (Chroma) und Buntton (Hue) beschreiben. Die Entfernung vom neutralen Grau (gleicher Helligkeit) nennt man somit Buntheit oder Chroma C. Je größer die Buntheit, desto brillianter ist die Farbe. Als Buntton h wird der Winkel zwischen der positiven a-Achse und der Verbindungslinie vom 0-Punkt (Graupunkt) zum Farbort F bezeichnet. Dies ist der Winkel, unter dem ein Farbton vom Zentrum des Farbsystems aus gesehen wird. Er wird durch folgende Winkelfunktion ausgedrückt:

$$h_{a,b} = \arctan(b/a)$$

Ein Winkel von 0° bzw. 180° entspricht somit einem blaustichigen Rot bzw. blaustichigen Grün.



Abbildung 13: Graphische Darstellung des CIELAB-Systems (nach GONNET, 1998)

Die Farbanalyse bzw. die Bestimmung der Farbparameter wird in der Regel mit speziellen Tristimulus-Colorimetern durchgeführt. Sie kann aber auch mittels eines Photometers und anschließender Berechnung der Farbparameter erfolgen. Das CIELAB-System wird auch heute noch häufig zur Beurteilung der Farbe herangezogen (GONNET, 1998; MALIEN-AUBERT ET AL., 2001; STINTZING ET AL., 2002 b; GONZÁLEZ ET AL., 2002).

Mit dem von HOFMANN (1998a,b) konzipierten *Farbaktivitätskonzept* wurde ursprünglich der Einfluss einzelner Maillard-Produkte auf die Gesamtfarbe einer Maillard-Lösung untersucht. Hierbei wird die Farbanalyse im Gegensatz zum CIELAB-System sensorisch (visuell) durchgeführt. Das Konzept leitet sich aus der Aromaforschung ab, wobei der *Schwellenwert S<sub>x</sub>* als die Konzentration definiert wird, die gerade noch zur farblichen Erkennung einer Verbindung ausreicht. Dieser Sachverhalt wird durch folgende Formel ausgedrückt:

$$S_{X} = \frac{Konz_{X} [mg/l]}{VF_{X}}$$

mit: Kon $z_x$  = Konzentration der Substanz x in der Substanzlösung VF<sub>x</sub> = Verdünnungsfaktor der Substanzlösung Der Wert der *Farbaktivität FA<sub>x</sub>* einer Substanz (engl. CAV =  $\underline{c}$ olour  $\underline{a}$ ctivity  $\underline{v}$ alue) wird wie folgt definiert:

$$\mathsf{FA}_{\mathsf{X}} = \frac{\mathsf{Konz}_{\mathsf{P}}\left[\mathsf{mg}/\mathsf{I}\right]}{\mathsf{S}_{\mathsf{X}}\left[\mathsf{mg}/\mathsf{I}\right]}$$

mit: Konz<sub>P</sub> = Konzentration an x in der Probenlösung

Abgeleitet von den Definitionen aus der Aromaforschung trägt eine Verbindung zum Gesamtfarbeindruck bei, wenn ihre Farbaktivität  $FA_x \ge 1$  ist.

Somit kann eine Gewichtung der untersuchten Verbindungen einer Lösung anhand der Größe des jeweiligen Farbaktivitätswertes erfolgen. In Bezug auf den *Gesamtfarbeindruck* wird mit folgender Formel der *prozentuale Farbbeitrag*  $F_x$  einer Substanz in der Probe ermittelt:

$$F_{X} [\%] = \frac{FA_{X}}{VF_{P}} \times 100$$

mit: VF<sub>P</sub> = Verdünnungsfaktor der Probe

Das Farbaktivitätskonzept wurde von DEGENHARDT ET AL. (2000) und SCHWARZ ET AL. (2003) bereits erfolgreich auf Rotwein angewendet und soll im Rahmen dieser Arbeit auf verschiedene rote Fruchtsäfte übertragen werden.

# 2.3 Ausgewählte neue analytische Techniken zur Trennung und Charakterisierung von Substanzen

## 2.3.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit NMR-Spektroskopie (LC-NMR)

Die Kopplung der HPLC mit der Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (*LC*-*NMR*) ist eine der leistungsfähigsten Methoden zur strukturellen Charakterisierung

unbekannter Verbindungen in Substanzgemischen. Gerade bei der Strukturbestimmung von licht- und sauerstoffempfindlichen Verbindungen, wie zum Beispiel Carotinoid-Isomeren, bietet die *direkte on-line HPLC-NMR-Kopplung* wesentliche Vorteile, da diese Substanzklasse bei Anwendung des klassischen Verfahrens der *off-line Trennung* und anschließender Überführung der isolierten Substanz in ein NMR-Meßröhrchen sehr leicht isomerisiert. Dies ist in einem *geschlossenen HPLC-NMR-Durchflußsystem* nicht der Fall (ALBERT, 1999). Die Methode der LC-NMR-Kopplung bietet weiterhin den Vorteil, dass eine zeitaufwändige Isolierung der zu charakterisierenden Substanz entfallen kann und die zur Analytik benötigte Probenmenge im Vergleich zur konventionellen NMR-Technik deutlich geringer ist.

Bei der LC-NMR-Kopplung können verschiedene Techniken durchgeführt werden:

- Durchfluß-Messungen (continuous-flow oder on-flow)
- Stopped-flow-Meßverfahren: "direct stopped-flow" und "loop collection"
- SPE-trapping (Solid Phase Extraction)

Das am häufigsten verwendete Verfahren ist das *Stopped-flow-Meßverfahren*. Dieses kann als *"direct stopped-flow"* durchgeführt werden. Hier findet eine Unterbrechung der chromatographischen Trennung statt, sobald sich die zu untersuchende Substanz in der Durchflußzelle befindet. *"Unterbrochen" wird im* Maximum des Peaks (durch den UV-Detektor angezeigt). Hierbei können auch Spektren von Minorkomponenten aufgenommen werden, was mit der *"continuousflow"*-Methode schwer möglich ist (ALBERT ET AL., 1999). Eine weitere Möglichkeit bietet die Methode des *"loop collection oder loop storage"*. Die gewünschten Peaks werden mittels einer <u>Bruker Peak Sampling Unit</u> (BPSU) nach Trennung in kleinen Kapillaren, den sogenannten *Loops*, gespeichert und können nacheinander in der Meßzelle vermessen werden (TSENG ET AL., 2000; SPRAUL ET AL., 1990).

Vor allem bei der Analyse von Minorbestandteilen bietet sich die Methode des "*SPE-trappings*" an, bei der die Substanzen auf einer SPE-Kartusche durch wiederholte HPLC-Trennung angereichert werden können. Nach Anreicherung wird die Substanz eluiert und vermessen. Im Gegensatz zu allen anderen Methoden benötigt man lediglich zur Elution der Substanzen deuterierte Lösungsmittel.

In der Regel beziehen sich die Informationen, welche aus der LC-NMR Analytik gewonnen werden können, in der Hauptsache auf einfache <sup>1</sup>H-Spektren sowie <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H Korrelationen. <sup>13</sup>C-Informationen können mittels *inversem Meßkopf*, der zwei coaxial angeordnete Meßspulen besitzt und der sowohl zur Aufnahme von <sup>1</sup>H- als auch <sup>13</sup>C-Spektren und vor allem für die invers detektierten Stopped-flow-2D-NMR-Experimente Verwendung findet, prinzipiell erhalten werden. Hierbei dient die innere Spule zur Aufnahme von <sup>1</sup>H-Spektren sowie zur Feld/Frequenz-Stabilisierung (Lock), die äußere Spule kann entweder zur <sup>13</sup>C-Entkopplung oder zur Aufnahme von <sup>13</sup>C-Spektren verwendet werden (ALBERT, 1999). Jedoch ist wegen des geringen natürlichen Vorkommens des <sup>13</sup>C-Isotopes (1,1%) die Empfindlichkeit der <sup>13</sup>C-NMR-Messungen für eine direkte Messung mittels LC-NMR nicht ausreichend. <sup>13</sup>C-Informationen können lediglich indirekt aus invers detektierten Experimenten gezogen werden (WOLFENDER ET AL., 2003).

Abbildung 14 zeigt den schematischen Aufbau einer HPLC-NMR-Kopplung. Die HPLC-Anlage, ausgestattet mit Injektionsventil, Pumpe, Trennsäule und UV-Detektor, befindet sich in der Regel in einem Abstand von 1,5 bis 2,5 m vom Kryomagneten. Der Ausgang des UV-Detektors ist mit einem Schaltventil verbunden, welches je nach Einstellung die Aufnahme von *Durchfluß- oder Stopped-flow-NMR-Spektren* ermöglicht. Anstelle des Schaltventils kann eine *Peak Sampling Unit* verwendet werden (ALBERT, 1999).



**Abbildung 14:** Experimenteller Aufbau zur LC-NMR Kopplung nach WOLFENDER ET AL. (2003)

Die Hauptschwierigkeit der LC-<sup>1</sup>H-NMR-Kopplung besteht in der Unterdrückung der Lösungsmittelsignale. Diese können anhand von verschiedenen Techniken unterdrückt werden, z.B. durch Vorsättigungs-Methoden oder Relaxationsmethoden. Abbildung 15 zeigt eine konventionelle (a) sowie eine Durchfluß-Meßzelle zur Aufnahme von Durchfluß-NMR-Spektren (b). Bei dem Durchflußprobenkopf handelt es sich um ein senkrecht stehendes Glasrohr, dessen unteres Ende sich auf einen Durchmesser des jeweiligen Zuleitungsschlauches, welcher durch einen Teflon-Schrumpfschlauch mit dem Glasrohr verbunden ist, verjüngt. Das obere Ende wird auf den Durchmesser des Ableitungsschlauches verengt oder als U-förmiger Bogen weitergeführt (ALBERT, 1999).



**Abbildung 15:** Vergleich zwischen einer konventionellen (a) und einer Durchfluß-Meßanordnung (b) nach ALBERT (1999)

Im Rahmen dieser Arbeit wird die LC-NMR-Kopplung nach erfolgter HSCCC-Trennung eines XAD-7 Extraktes der Taybeere zur Charakterisierung der in den einzelnen HSCCC-Fraktionen enthaltenen Anthocyane durchgeführt.

#### 2.3.2 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Die Technik der *Gegenstromverteilungschromatographie* (engl. Countercurrent Chromatography; Abkürzung CCC) ist bereits seit den 70er Jahren bekannt.

Hierunter ist vor allem die *High-Speed Countercurrent Chromatography* (HSCCC) hervorzuheben, welche in den letzten Jahren stetig weiterentwickelt und bereits zur präparativen Isolierung einer Vielzahl von Naturstoffen erfolgreich angewendet wurde (DEGENHARDT, 2002). Sie zeichnet sich durch eine schonende, kostengünstige und einfache Handhabung aus. Einer der wichtigsten Vorteile dieser Trennmethode ist das Fehlen einer festen stationären Phase, wodurch irreversible Adsorptionen der Proben ausgeschlossen werden können. Die Methode hat sich weiterhin aufgrund ihrer schonenden Bedingungen bei der Isolierung von labilen Naturstoffklassen vielfach bewährt.

Ein handelsübliches *HSCCC-System* gleicht in der Regel einer HPLC-Anlage: Mittels einer *HPLC-Pumpe* werden die Lösungsmittel transportiert. Die Injektion der Probe erfolgt über eine *Dosierschleife*. Danach folgt die Trennvorrichtung, der sogenannte *"Coil"*, der aus einem Teflonschlauch besteht und in mehreren Lagen über eine Spule gewickelt ist. Gegebenenfalls sind auch ein Detektor und ein Fraktionensammler vorhanden. Der schematische Aufbau einer HSCCC-Anlage ist in Abbildung 16 dargestellt.



Abbildung 16: Aufbau einer HSCCC-Anlage nach Sutherland (1987)

Die Trennung des Analyten wird bei der CCC aufgrund von Verteilungsvorgängen zwischen zwei nicht mischbaren Lösungsmittelphasen bewirkt. Hierbei gilt das Nernst'sche Verteilungsgesetz (CONWAY, 1990):

#### $K = c_s/c_m$

mit: K = Verteilungskoeffizient;  $c_s =$  Konzentration des gelösten Stoffes in der stationären Phase;  $c_m =$  Konzentration des gelösten Stoffes in der mobilen Phase

Das Prinzip der HSCCC soll am Beispiel der synchronen, planetaren and coaxialen Typ J HSCCC-Apparatur erklärt werden (DEGENHARDT, 2002; siehe Abb. 17). Der Coil rotiert zusätzlich zur Rotation um die Zentralachse in gleicher Richtung um seine eigene Achse. Dabei findet aufgrund der wechselnden Zentrifugalkräfte im Verlauf der Bahnbewegung des Coils ein ständiges Mischen und Entmischen der Phasen statt, was einer Vielzahl von Ausschüttelschritten entspricht. Deshalb handelt es sich bei der HSCCC um eine besonders effiziente verteilungschromatographische Trenntechnik. Weitere theoretische Grundlagen sind ausführlich bei DEGENHARDT (2002) dargestellt.



**Abbildung 17:** Aufbau eines Coils mit Gegengewicht (J Typ) nach MARSTON und HOSTETTMANN (1994)

Jeder Coil besitzt definitionsgemäß ein *Head*- (Zentrum) und ein *Tail-Ende* (Peripherie). Häufig wird im sogenannten *Elutionsmodus Head nach Tail* gearbeitet. Der Coil wird bei diesem Modus mit leichter Phase (stationäre Phase) gefüllt und in Rotation versetzt. Die schwere Phase, welche die mobile Phase bildet, wird am Head-Ende eingepumpt und bewegt sich zum Tail-Ende. Sie strömt somit in

entgegengesetzter Richtung zur leichten Phase, welche sich in Richtung Head-Ende bewegt. Ein Großteil der stationären Phase bleibt deshalb im Coil, während die Substanzen sich gemäß ihres Verteilungskoeffizienten zwischen den beiden Phasen verteilen und mit der mobilen Phase (schwere Phase) eluieren. Verwendet man hingegen die schwere Phase als stationäre Phase, so spricht man von einem *Elutionsmodus Tail nach Head* (SUTHERLAND, 2002).

Vergleicht man die Trennleistung der HSCCC mit der einer HPLC, so ist die Auflösung R bei der HSCCC trotz einer geringen Trennstufenzahl zufriedenstellend und läßt sich mit der einer präparativen HPLC vergleichen, wobei das Volumen der stationären Phase einen großen Einfluß auf die Auflösung hat (DEGENHARDT, 2002).

# 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Präparative Isolierung von Anthocyanen aus Obst

#### 3.1.1 Aufarbeitung und Isolierung

Über die Zusammensetzung der Anthocyanfraktion von neun verschiedenen Obstsorten bzw. Fruchtschalen wird im folgenden berichtet. Die Isolierung der Anthocyane kann hierbei wahlweise aus frischen oder tiefgefrorenen Früchten sowie Fruchtextrakten erfolgen. Abbildung 18 zeigt das allgemeine Schema der Aufarbeitung mit anschließender High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) zur präparativen Isolierung der Anthocyane. Nachfolgend findet eine Reinheitskontrolle und Charakterisierung der isolierten Reinsubstanzen mittels HPLC-DAD, ESI-MS<sup>n</sup> und <sup>1</sup>H- sowie <sup>13</sup>C-NMR statt.



#### Abbildung 18: Schematische Darstellung der Aufarbeitung und Isolierung

Die erhaltenen reinen Anthocyane werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Standards zur Quantifizierung von Anthocyanen sowie zur Ermittlung der Farbaktivität und des Farbbeitrages in Fruchtsäften herangezogen. Des weiteren soll die antioxidative Aktivität der isolierten Anthocyane sowohl als Reinsubstanz als auch der jeweilige Beitrag an der antioxidativen Gesamtaktivität eines Fruchtsaftes bestimmt werden. Zudem werden Standardsubstanzen zur Durchführung von Copigmentierungsversuchen verwendet.

Die physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Substanzen erfolgt unter Kapitel 4.3.2. Die Verbindungen werden dort systematisch nach Anthocyan (**A**) und Copigment (**C**) aufgelistet. Alle charakterisierten Verbindungen werden deshalb im nachfolgenden Text mit den entsprechenden Buchstaben **A** bzw. **C** sowie einer fortlaufenden Nummerierung versehen.

## 3.1.2 Isolierung von Anthocyan-Standardsubstanzen aus Früchten mittels High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

# 3.1.2.1 Anthocyane in Schalen von violetter Passionsfrucht (*Passiflora edulis*)

Die violette Passionsfrucht ist beheimatet im Süden Brasiliens. Sie gehört zur Pflanzenfamilie Passifloraceae und zur Gattung *Passiflora*. Die Schale ist 3 bis 6 mm dick und von mittlerer Härte. Während die Pulpe der Passionsfrucht gelb bis orange erscheint, sind die Anthocyane ausschließlich in der Schale lokalisiert (MAZZA und MINIATI, 1993). Sie werden mit einer Konzentration von 1,4 mg Pigment pro 100 g frischer Frucht angegeben. Es gibt widersprüchliche Angaben über die Identifizierung der Anthocyane in der Schale. Während in einer Literaturstelle Pelargonidin-3-glucosid angegeben wurde (PRUTHI ET AL., 1961), werden an anderer Stelle die Anwesenheit von Delphinidin-3-glucosid (HARBORNE, 1967) bzw. Cyanidin-3-glucosid (MAZZA und MINIATI, 1993) beschrieben.

Die Abbildung 19 zeigt das HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Extraktes der Schale der violetten Passionsfrucht bei 520 nm. Lediglich ein Hauptanthocyan ist hier zu erkennen, welches in Einklang mit der Literaturstelle von MAZZA und MINIATI (1993) als Cyanidin-3-glucosid identifiziert werden konnte. Des weiteren sind zwei

Minoranthocyane vorhanden. Mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> konnte einer der beiden Minorbestandteile als Pelargonidin-3-glucosid charakterisiert werden. Bei der zweiten Minorkomponete handelt es sich um ein bisher unbekanntes Cyanidin-Derivat.



Abbildung 19: HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Extraktes der Schale der lila Passionsfrucht bei 520 nm

Da sich in dem XAD-7 Extrakt weitere nichtfarbige phenolische Komponenten befinden, wurde eine High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) zur Abtrennung des Cyanidin-3-glucosids durchgeführt.



Abbildung 20: Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Extraktes der Passionsfruchtschale

Aus 544 mg XAD-7 Extrakt konnten 8 Fraktionen erhalten werden, wobei die Fraktion F8 die Hauptfraktion darstellt und 43 mg reines *Cyanidin-3-glucosid* (A1) enthält (siehe Abb. 20).

Die Schale der violetten Passionsfrucht stellt somit aufgrund der Abwesenheit von weiteren Majorkomponenten ein gutes Ausgangsmaterial zur präparativen Isolierung von Cyanidin-3-glucosid dar.

#### 3.1.2.2 Anthocyane der Himbeere (*Rubus idaeus* L.)

Himbeeren gehören zur Familie der Rosengewächse (Rosaceae) und zählen zur Gattung *Rubus*. Kommerziell von Bedeutung ist die europäische Waldhimbeere (*Rubus idaeus* L.), von der die Gartenhimbeere abstammt. Weiterhin sind die in Nordamerika beheimatete Schwarze Himbeere (*Rubus occidentalis* L.) sowie zahlreiche wildwachsende Arten, wie zum Beispiel die amerikanische Wildhimbeere (*Rubus strigosus* L.) zu nennen (HERRMANN., 1996a). Quantitative Untersuchungen des Anthocyangehaltes von Himbeeren haben ergeben, dass Cyanidin-3-sophorosid das Hauptanthocyan der Himbeere bildet (20-60 mg/ 100 g Frucht). Als Minoranthocyane werden Cyanidin-3-rutinosid, Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid), Pelargonidin-3-sophorosid und Pelargonidin-3-glucosylrutinosid genannt (MAZZA und MINIATI, 1993; MULLEN ET AL., 2002a, b; BOYLES und WROLSTAD, 1993).



**Abbildung 21:** HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Extraktes der Himbeere bei einer Detektionswellenlänge von 520 nm

Die Abbildung 21 zeigt das HPLC-Chromatogramm eines XAD-7 Extraktes bei 520 nm, welcher aus frischen Himbeeren erhalten wurde. Mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> konnten Cyanidin-3-sophorosid und Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) als Hauptpigmente charakterisiert werden. In geringeren Mengen kommen die Anthocyane Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3rutinosid vor.

Bei der nachfolgenden präparativen Isolierung mittels HSCCC wurden 7 Fraktionen erhalten (Chromatogramm siehe Abb. 22). Von Interesse sind hierbei die Fraktionen F3, F5 und F7. In F3 befindet sich das Pigment *Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid)* (**A2**), in Fraktion F5 *Cyanidin-3-sophorosid* (**A3**) und in Fraktion F7 das Anthocyan *Cyanidin-3-rutinosid* (**A4**). Alle Fraktionen sind von hoher Reinheit und können als Standardsubstanzen verwendet werden.

Aus 158 mg XAD-7 Extrakt konnten 9 mg Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid), 18 mg Cyandin-3-sophorosid und 16 mg Cyanidin-3-rutinosid isoliert werden.



Abbildung 22: Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Extraktes der Himbeere

#### 3.1.2.3 Anthocyane der Süßkirsche (*Prunus avium* L.)

Die Süßkirsche gehört ebenfalls zur Familie der Rosengewächse (Rosaceae) und zählt zur Gattung *Prunus*. Als Hauptpigmente wurden Cyanidin-3-rutinosid (129-211 mg /100 g entsteinter Frucht) sowie Cyanidin-3-glucosid (12-44 mg /100 g entsteinter Frucht) nachgewiesen. Die Minoranthocyane konnten als Peonidin-3-rutinosid, Peonidin-3-glucosid und Pelargonidin-3-rutinosid charakterisiert werden (MAZZA und MINIATI, 1993 und HERRMANN, 2001).



**Abbildung 23:** HPLC-Chromatogramm ( $\lambda$  = 520 nm) des XAD-7 Extraktes der Süßkirsche

Das HPLC-Chromatogramm eines XAD-7 Extraktes bei 520 nm, welcher aus frischen italienischen Früchten (ohne Kerne) hergestellt wurde, zeigt jedoch im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen zwei Hauptpigmenten lediglich Cyanidin-3-rutinosid als Majorkomponente und Cyanidin-3-glucosid als Minorbestandteil (siehe Abb. 23). Die Zuordnung der Anthocyane erfolgte hierbei über LC-ESI-MS<sup>n</sup>.



Abbildung 24: Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Extraktes der Süßkirsche

Das Chromatogramm der präparativen Isolierung des XAD-7 Extraktes mittels HSCCC zeigt vier Fraktionen (Chromatogramm siehe Abb. 24). Die Fraktion F2 enthält das Anthocyan *Cyanidin-3-rutinosid* (A4) in hoher Reinheit. Die HSCCC-Fraktionen F3 sowie F4 beinhalten nichtfarbige phenolische Substanzen, wobei die Fraktion F3 als *Neochlorogensäure* (C1) und die Fraktion F4 als *Chlorogensäure* (C2) identifiziert werden konnte. Beide Substanzen liegen in den entsprechenden Fraktionen als Reinsubstanzen vor und können als Standards verwendet werden. 580 mg des XAD-7 Extraktes liefern 46 mg Cyanidin-3-rutinosid, 19 mg Neochlorogensäure sowie 13 mg Chlorogensäure.

#### 3.1.2.4 Anthocyane der Sauerkirsche (*Prunus cereasus* L.)

Die Sauerkirsche zählt ebenso wie die Süßkirsche zur Familie der Rosengewächse (Rosaceae) und zur Gattung *Prunus*. Im Gegensatz zur Süßkirsche enthalten Sauerkirschen einen weitaus höheren Anthocyananteil. Als Hauptpigmente konnten in vier Züchtungen je 100 g entsteinter Früchte Cyanidin-3-sophorosid (78-203 mg), Cyanidin-3-glucosid (25-69 mg) und Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) (10-65 mg) nachgewiesen werden. Als Minorbestandteile enthalten Sauerkirschen weiterhin Cyanidin-3-rutinosid sowie Peonidin-3-galactosid (HERMANN, 2001).



Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Extraktes der Schale der Schattenmorelle bei 520 nm

Bei der Sauerkirsche (Schattenmorelle) wurde die Schale von Fruchtfleisch und Kern separiert und aufgearbeitet. Das rote Fruchtfleisch wurde nicht verwendet, da sich im Fruchtfleisch eine Vielzahl von nichtfarbigen phenolischen Komponenten befinden, die eine Isolierung reiner Anthocyanstandards erschweren. Das HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 520$  nm) des XAD-7 Extraktes der Schale ist in Abbildung 25 dargestellt, wobei die Zuordnung der Peaks wiederum über LC-ESI-MS<sup>n</sup> erfolgen konnte. Die Hauptanthocyane bilden die beiden Cyanidin-Derivate Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosyl-rutinosid) und Cyanidin-3-rutinosid. Als Minorbestandteile konnten weiterhin Cyanidin-3-sophorosid, Cyanidin-3-glucosid und Peonidin-3-rutinosid charakterisiert werden.

Die HSCCC-Trennung (Chromatogramm siehe Abb. 26) des XAD-7 Extraktes der Sauerkirschschale liefert 6 Fraktionen, wobei die Fraktionen F2 und F5 die Anthocyane *Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid)* (**A2**) sowie *Cyanidin-3-rutinosid* (**A4**) in hoher Reinheit enthalten.



Abbildung 26: Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Extraktes der Sauerkirschschale

Aus 720 mg des XAD-7 Extraktes der Schale konnten 99 mg reines Cyanidin-3-(2<sup>*G*</sup>-glucosylrutinosid) und 82 mg Cyanidin-3-rutinosid gewonnen werden.

#### 3.1.2.5 Anthocyane der schwarzen Johannisbeere (*Ribes nigrum* L.)

Die Schwarze Johannisbeere gehört zur Familie der Stachelbeergewächse (Grossulariaceae) und zählt zur Gattung *Ribes*. Sie wird in Europa sehr häufig zur Herstellung von Saft verwendet und weist mit 250 mg/100 g Frischgewicht einen Anthocyangehalt auf, der circa eine Zehnerpotenz höher liegt als bei roten Johannisbeeren (HERRMANN, 2001). Aus schwarzen Johannisbeeren konnten als Hauptkomponenten bezogen auf den Gesamtgehalt an Anthocyanen 35 % Cyanidin-3-rutinosid, 30 % Delphinidin-3-rutinosid, 17 % Cyanidin-3-glucosid und 13 % Delphinidin-3-glucosid isoliert werden (MAZZA und MINIATI, 1993; MATSUMOTO ET AL., 2001; SLIMESTAD und SOLHEIM, 2002). Als Minorkomponenten wurden Pelargonidin-3-rutinosid, Cyanidin-3-sophorosid und Delphinidin-3-sophorosid (1-3 % des Gesamtgehaltes) ermittelt.





Zur präparativen Isolierung der Anthocyane der schwarzen Johannisbeere wurden lediglich die Schalen der Früchte eingesetzt, da sich in der Schale der Gesamtanteil an Anthocyanen befindet. Der Anteil an weiteren Pflanzenphenolen in der Schale ist sehr gering und wirkt sich aufgrund dieser Tatsache bei der anschließenden Trennung nicht störend aus. Abbildung 27 zeigt das HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Extraktes der Schale bei 520 nm. Hier zeigt sich, dass die in der Literatur beschriebenen vier Anthocyane als Hauptkomponenten vorhanden sind. Zu bemerken ist, dass die Verteilung der Anthocyane bezogen auf den Gesamtanthocyangehalt mit den in der Literatur beschriebenen Daten gut übereinstimmt. So konnte ermittelt werden, dass der XAD-7 Extrakt bezogen auf den Anthocyangehalt 15 % Delphinidin-3-glucosid, 34 % Delphinidin-3-rutinosid, 10 % Cyandin-3-glucosid und 39 % Cyanidin-3-rutinosid enthält, wobei die Zuordnung der Anthocyane über LC-MS erfolgte.

Die HSCCC-Trennung (Chromatogramm siehe Abb. 28) von 793 mg des XAD-7 Extraktes liefert 5 Fraktionen. Folgende Fraktionen enthalten reine Anthocyane: Fraktion F2 ergibt 135 mg *Delphinidin-3-rutinosid* (**A5**), Fraktion F3 beinhaltet 180 mg *Cyanidin-3-rutinosid* (**A4**), die Fraktionen F4 und F5 ergeben 42 mg *Delphinidin-3glucosid* (**A6**) bzw. 29 mg *Cyanidin-3-glucosid* (**A1**).



Abbildung 28: Chromatogramm der HSCCC-Trennung der schwarzen Johannisbeere bei 520 nm

#### 3.1.2.6 Anthocyane der roten Johannisbeere (*Ribes rubrum* L.)

Die rote Johannisbeere gehört ebenfalls zur Familie der Stachelbeergewächse und zur Gattung *Ribes*. Sie wird vor allem zur Herstellung von Marmeladen, Weinen und Kuchen benutzt und enthält laut HERRMANN (2001) im Vergleich zu schwarzen Johannisbeeren einen geringen Anteil an Anthocyanen. In 5 Sorten konnte ein Gesamtgehalt von 11,9 bis 18,6 mg/ 100 g Frischgewicht ermittelt werden. Nach HERMANN (2001) enthalten rote Johannisbeeren ausschließlich diverse

Cyanidinderivate. Aufgelistet wurden Cyanidin-3-glucosid (2-10%), Cyanidin-3rutinosid (8-19%), Cyanidin-3-sambubiosid (7-31%), Cyanidin-3-sophorosid (0-9%), Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosyl-rutinosid) (0-33%) und Cyanidin-(2<sup>G</sup>-xylosylrutinosid) (28-73%). Die beachtlichen Schwankungen zeigen, dass eine Aussage über Major- und Minoranthocyanen generell schwer zu treffen ist. MAZZA und MINIATI (1993) berichten von einer Abnahme des Gehaltes an Cyanidin-3-sambubiosid während der Reifung der Frucht. Es werden zwei unterschiedliche Gruppen von roten Johannisbeeren beschrieben: Die erste Gruppe zeichnet sich durch das Vorhandensein von sechs verschiedenen Cyanidinderivaten aus, während die zweite Gruppe weniger als vier verschiedene Cyanidinderivate enthält, da in dieser Gruppe weder das Anthocyan Cyanidin-3-sophorosid noch Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) nachgewiesen werden konnte (MAZZA und MINIATI, 1993).





Abbildung 29 zeigt das HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 520$  nm) des XAD-7 Extraktes von roten Johannisbeeren. Es konnten sieben verschiedene Anthocyane nachgewiesen werden. Mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> wurden die Anthocyane zugeordnet. Es handelt sich um fünf Cyanidin- und zwei Delphinidinderivate. Die Majorpigmente bilden hierbei das Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) und das Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-xylosylrutinosid), welche bezogen auf den prozentualen Gesamtanthocyangehalt zu 35% bzw. 33% vorhanden sind. Mit deutlichem Abstand folgen Cyanidin-3-rutinosid

(13%) und Cyanidin-3-sambubiosid (8%). Der verbleibende Rest entfällt auf die drei Minorkomponenten Cyanidin-3-sophorosid, Delphinidin-3-glucosid und Delphinidin-3-rutinosid.



Abbildung 30: Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Extraktes der roten Johannisbeere bei 520 nm

Die HSCCC-Trennung (Chromatogramm siehe Abb. 30) des XAD-7 Extraktes (552 mg) ergibt 8 Fraktionen, wobei die Fraktionen F2 bis F4 als Reinsubstanzen vorliegen. Fraktion F2 liefert 32 mg reines *Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid)* (**A2**), die Fraktion F3 beinhaltet 14 mg reines *Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-xylosylrutinosid)* (**A7**) und in Fraktion F4 befindet sich 5 mg *Cyanidin-3-sophorosid* (**A3**).

#### 3.1.2.7 Anthocyane der Pflaume (*Prunus domestica* L.)

Die Pflaume zählt ebenso wie die Süßkirsche und die Sauerkirsche zur Familie der Rosengewächse (Rosaceae) und zur Gattung *Prunus*. Es gibt eine große Vielzahl an unterschiedlichen Varietäten, wobei die Europäische Pflaume (*Prunus domestica* L.) eine wichtige Rolle spielt. Die Anthocyane der Europäischen Pflaume sind in der Schale lokalisiert (MAZZA und MINIATI, 1993). Nach HERRMANN (2001) befinden sich in der Schale als Hauptpigmente Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-rutinosid. Als Minorkomponenten konnten Peonidin-3-glucosid und Peonidin-3-rutinosid nachgewiesen werden.



**Abbildung 31:** HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Extraktes aus Pflaumenschalen bei 520 nm

Das HPLC-Chromatogramm eines XAD-7 Extraktes von italienischen Pflaumenschalen bei 520 nm ist in Abbildung 31 dargestellt. Mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> konnten die Anthocyane als Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-rutinosid charakterisiert werden.





Bei der HSCCC-Trennung (Chromatogramm siehe Abb. 32) von 630 mg des XAD-7 Extraktes wurden sechs verschiedene Fraktionen erhalten. Lediglich die Fraktionen F4 und F6 bestehen aus Reinsubstanzen, wobei die Fraktion F4 76 mg reines *Cyanidin-3-rutinosid* (A4) und die Fraktion F6 80 mg reines *Cyandin-3-glucosid* (A1) liefert.

#### 3.1.2.8 Anthocyane des schwarzen Holunders (*Sambucus nigra* L.)

Der schwarze Holunder (*Sambucus nigra* L.) ist ein strauchartiges oder baumartiges Gehölz, welches in Mitteleuropa weit verbreitet vorkommt. Er gehört zur Familie der Geißblattgewächse (*Caprifoliaceae*). Die Beerenreife findet im August bis September statt. Der schwarze Holunder besitzt etwa zwanzig Verwandte, von denen der rote Holunder (*Sambucus racemosa* L.) und der Attich oder Zwergholunder (*Sambucus ebulus* L.) zu nennen sind (TREPTOW, 1985; HERRMANN, 1996b).





Nach MAZZA und MINIATI (1993) sind die schwarzen Beeren besonders reich an Anthocyanen, welche in der Beerenschale lokalisiert sind. BRØNNUM-HANSEN und HANSEN (1983) haben die Anthocyane des Holunders charakterisiert. Als Hauptpigmente wurden das Cyanidin-3-glucosid mit einem Anteil von 65,7% und das Cyanidin-3-sambubiosid mit einem Anteil von 32,4% beschrieben. Die Anthocyane Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid und Cyanidin-3,5-diglucosid wurden mit einem Anteil von jeweils 1,1% bzw. 0,8% als Minorkomponenten nachgewiesen.

Die Abbildung 33 zeigt das Chromatogramm des XAD-7 Isolates eines Holunderextraktes der Firma Dr. Marcus (Geesthacht) bei einer Detektionswellenlänge von 520 nm. Mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> konnten die beiden Hauptkomponenten als Cyanidin-3-sambubiosid und Cyanidin-3-glucosid identifiziert werden. Auch die von BRØNNUM-HANSEN und HANSEN (1983) beschriebenen Minoranthocyane Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid und Cyandin-3,5-diglucosid konnten nachgewiesen werden. Die HSCCC-Trennung (Chromatogramm siehe Abb. 34) von 816 mg des XAD-7 Isolates des Holunderextraktes lieferte acht Fraktionen. Die Fraktionen F2, F5 und F8 enthalten Reinsubstanzen. In Fraktion F2 befinden sich 62 mg reines *Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid* (A8). Die Fraktionen F5 und F8 liefern 82 mg reines *Cyanidin-3-sambubiosid* (A9) bzw. 38 mg reines *Cyanidin-3glucosid* (A1). Die Minorkomponente *Cyanidin-3,5-diglucosid* (A10), welche sich in Fraktion F3 befindet, konnte erst durch eine nachfolgende Aufreinigung mittels präparativer HPLC als Reinsubstanz erhalten werden. Zu Zwecken der Charakterisierung wurden allerdings lediglich 5 mg dieser Substanz aufgereinigt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde jedoch ein Standard der Firma Roth verwendet.



**Abbildung 34:** Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Holunderextraktes bei 520 nm

#### 3.1.2.9 Anthocyane der Apfelbeere (Aronia melanocarpa)

Die Apfelbeere (Aronia) gehört zu den Rosengewächsen (Rosaceae) und wächst an einem 1-4 m hohen Strauch. Sie stammt ursprünglich aus Nordamerika und ist erst seit dem späten 18. Jahrhundert in Europa bekannt, wobei sich die Anbaugebiete
zuerst ausschließlich in Osteuropa befanden. Die kleinen schwarzvioletten Früchte sind reich an Anthocyanen und schmecken süß-säuerlich-herb, heidelbeerähnlich mit einem adstringierenden Beigeschmack. Sie sind zum Rohverzehr nicht geeignet. Deshalb werden sie zu Marmeladen, Säften und Weinen verarbeitet (MAZZA und MINIATI, 1993). Nach OSZMIANSKI und SAPIS (1988) enthält die Aronia als Hauptanthocyane Cyanidin-3-galactosid (64,5%) und Cyanidin-3-arabinosid (28,9%). Des weiteren wurden Cyanidin-3-glucosid (2,4%) und Cyanidin-3-xylosid (4,2%) als Minorkomponenten nachgewiesen.

Zur Isolierung der Anthocyane aus Aronia wurde ein Aroniakonzentrat der Firma Dr. Marcus (Geesthacht) eingesetzt. Abbildung 35 zeigt das HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Isolates des Konzentrates bei 520 nm. Mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> konnten in Einklang mit Daten von OSZMIANSKI und SAPIS (1988) Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-arabinosid als Hauptpigmente und Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3xylosid als Minorkomponenten charakterisiert werden.



**Abbildung 35:** HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Isolates des Aroniakonzentrates bei 520 nm

Die HSCCC-Trennung (Chromatogramm siehe Abb. 36) von 2200 mg des XAD-7 Isolates ergibt 4 Fraktionen, wobei die Fraktionen F2 als *Cyanidin-3-galactosid* (A11) (220 mg) und F3 als *Cyanidin-3-arabinosid* (A12) (97 mg) charakterisiert werden konnten. Bei der Fraktion F4 handelt es sich um eine Mischfraktion, welche zwei Anthocyane beinhaltet. Die nachfolgende Aufreinigung dieser Fraktion mittels präparativer HPLC ergibt 25 mg reines *Cyanidin-3-xylosid* (A13).



**Abbildung 36:** Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Isolates des Aroniakonzentrates bei 520 nm

# 3.2 Analytik ausgewählter Früchte

# 3.2.1 Untersuchung ausgewählter kolumbianischer Früchte

## 3.2.1.1 Antioxidatives Potential und Polyphenolgehalt

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwölf kolumbianische Früchte untersucht, welche hauptsächlich im Amazonasgebiet und in der "Cafetera"-Region Kolumbiens gesammelt wurden (siehe Tab. 4). Da es bisher von der Mehrzahl dieser Früchte keine Angaben über deren antioxidatives Potential gibt, wurden die gefriergetrockneten wässrigen Extrakte der Früchte auf ihre antioxidative Aktivität mittels TEAC-Test (RE ET AL., 1999) untersucht. Des weiteren wurde von jedem Fruchtextrakt der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteau (SINGLETON und ROSSI, 1965) als Gallussäureäquivalente (GAE) bestimmt.

Tabelle 4: Namen der untersuchten kolumbianischen Früchte

Botanischer Name	Trivialname	Familie	Material
Bactris major	Corozo	Arecaceae	Schale
Rubus glaucus	Mora de castilla	Rosaceae	gesamte Frucht
Solanum quitoense	Lulo	Solanaceae	Fruchtfleisch
Solanum sessiliflorum	Cocona	Solanaceae	Fruchtfleisch
Eugenia stipitata	Arazá	Myrtaceae	Fruchtfleisch
Campomanesia lineatifolia	Champa	Myrtaceae	Fruchtfleisch
Spondias purpurea	Ciruela calentana	Anacardiaceae	gesamte Frucht*
Spondias mombin	Ubos	Anacardiaceae	gesamte Frucht*
Pouteria sapota	Zapote costeño	Sapotaceae	Fruchtfleisch
Vaccinium floribundum	Agraz	Ericaceae	gesamte Frucht
Solanum betaceum	Tamarillo	Solanaceae	Fruchtfleisch
Sicana odorifera	Melón de olor	Curcurbitaceae	Fruchtfleisch

\* gesamte Frucht außer Kern

Zunächst wurde das antioxidative Potential dieser Früchte mittels TEAC-Test bestimmt (siehe Tab. 5). Die Früchte Mora de castilla (*Rubus glaucus*) und Agraz (*Vaccinium floribundum*) weisen hierbei gefolgt von Corozo (*Bactris major*) und Melón de olor (*Sicana odorifera*) die mit Abstand höchsten antioxidativen Aktivitäten auf. Bemerkenswert ist, dass es sich nur bei den drei erstgenannten Früchten um rote Früchte bzw. Fruchtbestandteile handelt, welche Anthocyane enthalten. Aus diesem Grund sind die ermittelten hohen TEAC-Werte nicht weiter erstaunlich. Die vierte Frucht enthält jedoch keine Anthocyane. Die restlichen Früchte hingegen besitzen im Vergleich zu den vier erstgenannten eine relativ geringe antioxidative Aktivität.

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteau spiegelt den bereits bei der antioxidativen Aktivität beobachteten Trend wider (siehe Tab. 5). Hier besitzt Mora de castilla (*Rubus glaucus*) gefolgt von Agraz (*Vaccinium floribundum*) den mit Abstand höchsten Gesamtphenolgehalt. Bemerkenswert sind auch die Polyphenolgehalte der Früchte bzw. Fruchtbestandteile von Corozo (*Bactris major*) und Melón de olor (*Sicana odorifera*). Die weiteren Früchte bzw. Fruchtbestandteile zeigen einen niedrigen Gesamtphenolgehalt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den ermittelten niedrigen TEAC-Werten. **Tabelle 5:** Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt kolumbianischer

 Früchte

Frucht	TEAC <sup>1</sup> (mmol Trolox/kg*)	Gesamtpolyphenol- gehalt <sup>2</sup> (mg Gallussäure/kg*)
Corozo	0,36	109,3
Mora de castilla	1,08	296,4
Lulo	0,06	16,4
Cocona	0,05	7,5
Arazá	0,02	3,7
Champa	0,04	8,9
Ciruela calentana	0,10	35,6
Ubos	0,02	12,0
Zapote costeño	0,04	2,8
Agraz	0,61	183,0
Tomate de árbol	0,12	27,3
Melón de olor	0,24	103,6

<sup>1</sup> nach RE ET AL. (1999); <sup>2</sup> nach SINGLETON und ROSSI (1965)

\* bezogen auf den untersuchten Fruchtanteil

## 3.2.1.2 Anthocyanprofil der Corozofrucht (*Bactris major*)

Corozo (*Bactris major*) gehört zur Familie der Arecaceae. Es handelt sich um eine tropische Frucht, die im zentral-/südamerikanischen Regenwald beheimatet ist (OBOH, 1987). Sie wächst an circa vier Meter hohen Palmen. Die Frucht besitzt eine ellipsoide bis eiförmige Form und hat ein Maß von 3-4,5 mal 1,7-3,5 cm. Der Querschnitt durch die Frucht zeigt einen großen Kern, der umgeben ist von hellem Fruchtfleisch und einer roten bis violetten Schale. Die Frucht ist genießbar und hat einen angenehmen, sauren Geschmack. Aus der Fruchtpulpe wird Saft und ein alkoholisches Getränk hergestellt. Wie bereits unter 3.2.1.1 gezeigt wurde, zeichnet sich der wässrige Extrakt der Fruchtschale durch ein hohes antioxidatives Potential aus. Des weiteren sind die Anthocyane, welche lediglich in der Schale lokalisiert sind, bisher noch nicht charakterisiert worden.

Die Aufarbeitung der Schale und die Isolierung der darin enthaltenen Anthocyane erfolgt nach dem unter 3.1.1 dargestellten Schema. Das HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Extraktes der Corozoschale bei 520 nm zeigt zwei Hauptkomponenten und drei Minoranthocyane (siehe Abb. 37). Mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> konnte eine Zuordnung der Peaks erfolgen.



**Abbildung 37:** HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Isolates aus Schalen der Corozofrucht (Detektionswellenlänge bei 520 nm)

Zur vollständigen Charakterisierung der Anthocyane der Corozofrucht findet eine präparative Isolierung der Pigmente mittels HSCCC statt. Abbildung 38 zeigt das Chromatogramm der HSCCC-Trennung bei 520 nm. Erhalten wurden sechs Fraktionen und der Coilrückstand. Die Fraktionen und der Coilrückstand wurden mittels HPLC-DAD untersucht. Von Interesse sind hierbei die Fraktionen F2, F3, F6 und der Coilrückstand. Bei der Fraktion F2 handelt es sich um eine Mischfraktion, aus der mittels präparativer HPLC die Minorkomponente Cyanidin-3-sambubiosid (A9) erhalten werden konnte. Die Fraktion F3 enthält ein Majoranthocyan sowie ein Minorpigment. Zur Charakterisierung wurden diese zwei Verbindungen mittels präparativer HPLC aufgereinigt und konnten als Cyanidin-3-rutinosid (A4) und Peonidin-3-rutinosid (A14) identifiziert werden. Die Fraktion F6 enthält lediglich eine Komponente, welche als Cyanidin-3-glucosid (A1) identifiziert werden konnte. Der Coilrückstand enthält mehrere Komponenten. Hieraus konnte mittels präparativer HPLC Cyanidin-3-(6"-malonylglucosid) das Anthocyan (A15) isoliert und charakterisiert werden.

Die Frucht Corozo enthält, wie es in den meisten Früchten üblich ist, fast ausschließlich Cyanidin-Derivate (96,5 % des Gesamtanthocyangehaltes). Die Anwesenheit von Cyandin-3-glucosid und Cyanidin-3-rutinosid als Hauptpigmente ist nicht weiter verwunderlich, da diese beiden Derivate in fast jeder Frucht in unterschiedlichen Mengen vertreten sind.



Abbildung 38: Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Extraktes der Corozo-Frucht

Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte über NMR-Spektroskopie und ESI-MS<sup>n</sup>. Tabelle 6 faßt die gewonnenen Daten bezüglich der fünf isolierten Verbindungen zusammen.

**Tabelle 6:** Spektroskopische und chromatographische Daten der Anthocyane der

 Corozo-Frucht

Peak*	Fraktion	Verbindung	Peakfläche	[M⁺]	Fragmente
(HPLC)	(HSCCC)		(%)	( <i>m/z</i> )	( <i>m/z</i> )
1	F2	Cyanidin-3-sambubiosid	2,4	581	287
2	F6	Cyanidin-3-glucosid	16,3	449	287
3	F3	Cyanidin-3-rutinosid	72,5	595	449/287
4	F3	Peonidin-3-rutinosid	5,3	609	463/301
5	Coil	Cyanidin-3-malonylglucosid	3,5	535	449/287

\* Nummerierung der Peaks erfolgt analog der Abbildung 37

#### 3.2.2 Taybeere

Die Taybeere gehört zur Familie der Rosengewächse (Rosaceae) und zählt zur Gattung *Rubus*. Sie ist eine Kreuzung zwischen der Brombeere "Aurora" und einer verbesserten tetraploiden Himbeere (McKEOWN, 1988). Sie wurde 1979 durch das Schottische Forschungsinstitut für Gartenbau gezüchtet und nach dem schottischen

Fluß "Tay" benannt. Die länglichen Früchte haben eine rotviolette Farbe. Die Erntezeit ist im Juli bis August. Die Früchte eignen sich zur Herstellung von Marmelade und Gelees.

Während in der Literatur zahlreiche Artikel über das Anthocyanprofil der Brombeere (HERRMANN, 1996a; STINTZING ET AL., 2002b) und Himbeere (MULLEN ET AL., 2002a, b; BOYLES ET AL., 1993) veröffentlicht wurden, ist über die Anthocyanzusammensetzung der Taybeere bisher nichts bekannt. Im nachfolgenden sollen nach erfolgter Fraktionierung eines XAD-7 Extraktes mittels HSCCC die Anthocyane der Taybeere mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> und LC-NMR charakterisiert werden.

#### 3.2.2.1 Fraktionierung mittels HSCCC

Die Aufarbeitung der Taybeeren erfolgt nach dem unter 3.1.1 dargestellten Schema.





Die Fraktionierung mittels HSCCC bietet den Vorteil, dass durch die Anreicherung einzelner Verbindungen in den verschiedenen Fraktionen eine leichtere Charakterisierung mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> und LC-NMR stattfinden kann. Gerade bei Minorkomponenten und bei Verbindungen, die eine nahezu identische Retentionszeit aufweisen, ist eine Charakterisierung unmittelbar aus dem XAD-7 Extrakt nicht oder nur schwer möglich. Abbildung 39 zeigt das HPLC-Chromatogramm des XAD-7 Isolates der Taybeere bei 520 nm. Das Anthocyanprofil besteht aus zwei Hauptpigmenten und fünf Minoranthocyanen. Die Zuordnung der Peaks konnte hierbei mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> sowie durch die bereits aus Himbeere und Brombeere isolierten Standards erfolgen.



**Abbildung 40:** Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Isolates aus Taybeere (Detektionswellenlänge bei 520 nm)

Bei der nachfolgenden HSCCC-Trennung des XAD-7 Isolates der Taybeere wurden 6 Fraktionen erhalten. Das Chromatogramm ist in Abbildung 40 dargestellt. Bei sämtlichen Fraktionen handelt es sich um Substanzgemische.

Tabelle 7 fasst die gewonnen Daten bezüglich der sieben Anthocyane der Taybeere zusammen. In den Fraktionen F2 und F3 befinden sich die Anthocyane Cyanidin-3- (2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) bzw. Cyanidin-3-sophorosid als Hauptkomponenten. Die Fraktion F4 stellt eine sehr kleine Fraktion dar, in der drei Anthocyane vorhanden sind. Mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> konnten die Pigmente Cyanidin-3-sophorosid und Cyanidin-3-sambubiosid charakterisiert werden. Bei dem dritten Pigment handelt es sich um ein Pelargonidin-Derivat, welches aufgrund des Vergleiches mit Literaturdaten (MULLEN ET AL., 2002a, b) als Pelargonidin-3-sophorosid identifiziert werden konnte. Die Fraktionen F5 und F6 enthalten das Anthocyan Cyandin-3-rutinosid bzw. Cyanidin-3-glucosid als Hauptkomponente. Im Coilrückstand befindet sich ein weiteres Pelargonidin-Derivat. Hierbei handelt es sich um das Anthocyan Pelargonidin-3-glucosid, welches von MULLEN ET AL. (2002a, b) bereits in der Himbeere nachgewiesen werden konnte.

Peak* (HPLC)	Fraktion (HSCCC)	Verbindung	Peak- fläche (%)	[M⁺] ( <i>m/z</i> )	Fragmente ( <i>m/z</i> )
1	F3/F4	Cy-3-sophorosid	45,9	611	287
2	F2	Cy-3-(2 <sup>G</sup> -glucosylrutinosid)	40,4	757	611/287
3	F4	Cy-3-sambubiosid	0,8	579	433/271
4	F6	Cy-3-glucosid	7,8	449	287
5	F4	Pel-3-sophorosid	0,4	595	271
6	F5	Cy-3-rutinosid	2,7	595	449/287
7	Coil**	Pel-3-glucosid	0,6	433	271

 Tabelle 7: Spektroskopische und chromatographische Daten der Anthocyane der Taybeere

Nummerierung der Peaks erfolgt analog der Abbildung 39

\*\* Coil = Rückstand, der nach erfolgter Trennung auf dem Coil zurückbleibt Abbkürzung: Cy = Cyanidin, Pel = Pelargonidin

Ein Vergleich des Anthocyanprofils der Taybeere mit denen der beiden Kreuzungspartner zeigt, dass die Anthocyanzusammensetzung der Taybeere dem Profil der Himbeere sehr ähnlich ist (vgl. Abschnitt 3.1.2.2). Die Brombeere enthält als Hauptanthocyan ausschließlich Cyanidin-3-glucosid (MAZZA und MINIATI, 1993), welches in der Taybeere lediglich in geringen Mengen vorhanden ist.

## 3.2.2.2 Charakterisierung der Anthocyane mittels LC-NMR

Die in Abschnitt 3.2.2.1 erhaltenen HSCCC-Fraktionen wurden zur Charakterisierung der darin enthaltenen Anthocyane mittels LC-NMR-Kopplung analysiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass keine aufwändige Isolierung von Reinsubstanzen notwendig ist. Aufgrund der benötigten geringen Substanzmenge ist auch dann eine Charakterisierung möglich, wenn wenig Probenmaterial vorhanden ist. Die Kombination von HSCCC und LC-NMR stellt eine außerordentlich effiziente Analysenmethode dar. Durch die vorhergehende Aufkonzentrierung von bestimmten Substanzen (auch Spurenbestandteile!) in den entsprechenden CCC-Fraktionen gelingt es, auch von Minorkomponenten des Isolates NMR-Spektren aufzunehmen.

Die nachfolgende Analyse der CCC-Fraktionen F2 bis F6 wurde mit der Methode des "loop storage" durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.3.1). Die HPLC-Trennung wird hierbei mit einem Fließmittelsystem aus Fließmittel A ( $D_2O + 0,1\%$  TFA-d<sub>1</sub>) und Fließmittel B ( $CD_3CN + 0,1\%$  TFA-d<sub>1</sub>) durchgeführt. Der Gradient verläuft linear beginnend mit 5% B und endet mit 95% B bei 40 min. Im folgenden sollen die Fraktionen einzeln diskutiert werden. Anhang 1 enthält die wichtigsten chromatographischen Daten der HPLC-Trennungen der Fraktionen F2 bis F6.

Das HPLC-Chromatogramm der CCC-Fraktion F2 bei 520 nm (siehe Abb. 41) zeigt einen Hauptpeak und mehrere kleinere Peaks. Von dieser Fraktion wurden 6 Peaks (Loop 1 bis 6) gesammelt. Mittels NMR wurde nachfolgend die Hauptverbindung dieser Fraktion, welche in Loop 4 enthalten ist, analysiert.



Abbildung 41: HPLC-Chromatogramm der CCC-Fraktion F2 von Taybeere bei 520 nm

Bei der Verbindung in Loop 4 handelt es sich um das Anthocyan Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>glucosylrutinosid). Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum und die Struktur dieser Verbindung sind in Abbildung 42 dargestellt. Ein Vergleich der beiden <sup>1</sup>H-Spektren der zuvor isolierten Verbindung (vgl. 3.1.2.2 und 4.3.2.1) und der Verbindung in Loop 4 zeigt, dass es sich um dieselbe Substanz handelt. Die Signale und die chemischen Verschiebungen stimmen überein. Charakteristisch für diese Verbindung ist das Dublett bei einer chemischen Verschiebung von 0,98 ppm. Hierbei handelt es sich um die drei Protonen des CH<sub>3</sub>-Gruppe der Rhamnose. Weiterhin ist das Proton am anomeren Kohlenstoff-Atom der Glucose, welche direkt mit der 3-Position des Aglykons verbunden ist, bei 5,40 ppm mit einer für das  $\beta$ -Anomere typischen Kopplungskonstante von 7,5 Hz gut sichtbar. Die beiden anderen Signale für die Protonen an den weiteren anomeren Kohlenstoff-Atomen (H1<sup>"</sup>"</sup> sowie H1<sup><math>""</sup>"</sup>) sinddurch das Lösungsmittel-Signal (D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O) verdeckt. Die Signale der restlichenZuckerprotonen befinden sich im Bereich von ca. 3,1 bis 4,0 ppm. Die chemischenVerschiebungen der Protonen des Aglykons sind in Abbildung 42 gekennzeichnet.Sie befinden sich zwischen 6,6 und 8.8 ppm.</sup></sup>



**Abbildung 42:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum und Struktur der Verbindung Cyanidin-3-(2<sup>*G*</sup>-glucosylrutinosid) aus Loop 4

Das HPLC-Chromatogramm der CCC-Fraktion F3 bei 520 nm (siehe Abb. 43) zeigt wiederum einen Hauptpeak und mehrere kleinere Peaks. Von dieser Fraktion wurden 8 Peaks (Loop 7 bis 14) gesammelt. Mittels NMR wurde nachfolgend die Hauptverbindung dieser Fraktion, welche sich in Loop 9 befindet, untersucht.

Bei der Verbindung in Loop 9 handelt es sich um das Anthocyan Cyanidin-3sophorosid. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum und die Struktur dieser Verbindung sind in Abbildung 44 abgebildet. Ein Vergleich der beiden <sup>1</sup>H-Spektren der zuvor isolierten Verbindung (vgl. 3.1.2.2 und 4.3.2.1) und der Verbindung in Loop 9 zeigt, dass es sich um dieselbe Substanz handelt. Die Dubletts für die Protonen der beiden anomeren Kohlenstoff-Atome befinden sich bei 4,57 ppm (H1<sup>"</sup>) sowie 5,40 ppm (H1<sup>"</sup>). Die restlichen Signale der Glucosemoleküle findet man bei einer chemischen Verschiebung von 3,0 bis 4,0 ppm. Die Signale des Aglykons sind in Abbildung 44 gekennzeichnet.



Abbildung 43: HPLC-Chromatogramm der CCC-Fraktion F3 der Taybeere bei 520 nm



**Abbildung 44:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum und Struktur der Verbindung Cyanidin-3sophorosid aus Loop 9 Das HPLC-Chromatogramm der CCC-Fraktion F4 zeigt bei 520 nm mehrere Peaks (siehe Abb. 45). Es wurden insgesamt 8 Peaks (Loop 15 bis 22) gesammelt, wobei mittels <sup>1</sup>H-NMR nachfolgend die Verbindung in Loop 17 charakterisiert werden konnte.



Abbildung 45: HPLC-Chromatogramm der CCC-Fraktion F4 der Taybeere bei 520 nm

Das <sup>1</sup>H-NMR und die Struktur der Verbindung in Loop 17 ist in Abbildung 46 dargestellt. Bei dieser Verbindung handelt es sich um das Anthocyan Cyanidin-3-sambubiosid, welches bereits unter anderem aus Holunder isoliert werden konnte. Ein Vergleich der beiden <sup>1</sup>H-Spektren der zuvor isolierten Verbindung (vgl. 3.1.2.8 und 4.3.2.1) und der Verbindung in Loop 17 zeigt, dass es sich um dieselbe Substanz handelt. Die Dubletts für die Protonen der beiden anomeren Kohlenstoff-Atome befinden sich bei 4,55 ppm (H1''') sowie 5,37 ppm (H1'') mit einer Kopplungskonstante von jeweils 7,5 Hz. Das Signal für das Proton H1''' liegt hierbei im Bereich des Lösungsmittel-Signals (D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O). Die restlichen Signale des Glucose- sowie des Xylosemoleküls findet man bei einer chemischen Verschiebung von 2,7 bis 3,9 ppm. Die Signale des Aglykons sind in Abbildung 46 gekennzeichnet.



**Abbildung 46:** Struktur und <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung Cyanidin-3sambubiosid aus Loop 17

Das HPLC-Chromatogramm der CCC-Fraktion F5 zeigt bei 520 nm eine Hauptkomponente (siehe Abb. 47). Es wurden insgesamt 8 Peaks (Loop 23 bis 30) gesammelt, wobei mittels <sup>1</sup>H-NMR nachfolgend die Verbindung in Loop 26 charakterisiert werden konnte.





Das <sup>1</sup>H-NMR und die Struktur der Verbindung in Loop 26 ist in Abbildung 48 dargestellt. Bei dieser Verbindung handelt es sich um das Anthocyan Cyanidin-3rutinosid, welches bereits unter anderem aus schwarzer Johannisbeere isoliert werden konnte. Ein Vergleich der beiden <sup>1</sup>H-Spektren der zuvor isolierten Verbindung (vgl. 3.1.2.5 und 4.3.2.1) und der Verbindung in Loop 26 zeigt, dass es sich um dieselbe Substanz handelt. Charakteristisch für diese Verbindung ist das Dublett bei einer chemischen Verschiebung von 1,00 ppm, welche die Anwesenheit der Methylgruppe des Zuckers Rhamnose bestätigt. Die Dubletts für die Protonen der beiden anomeren Kohlenstoff-Atome befinden sich bei 4,56 ppm (H1") sowie 5,23 ppm (H1"). Die Kopplungskonstante für das Proton H1" ist hierbei sehr klein, da es sich um eine  $\alpha$ -Rhamnose handelt, wohingegen die Kopplungskonstante für H1" mit 7,5 Hz die Anwesenheit einer ß-Glucose bestätigt. Die restlichen Signale des Glucose- sowie des Rhamnosemoleküls findet man bei einer chemischen Verschiebung von 3,4 bis 3,9 ppm. Die Signale des Aglykons sind in Abbildung 48 gekennzeichnet.



**Abbildung 48:** Struktur und <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung Cyanidin-3-rutinosid aus Loop 26

Das HPLC-Chromatogramm der CCC-Fraktion F6 zeigt bei 520 nm ebenfalls eine Hauptkomponente (siehe Abb. 49). Es wurden insgesamt 5 Peaks (Loop 31 bis 35)

gesammelt, wobei mittels <sup>1</sup>H-NMR nachfolgend die Verbindung in Loop 32 charakterisiert werden konnte.



Abbildung 49: HPLC-Chromatogramm der CCC-Fraktion F6 der Taybeere bei 520 nm

Abbildung 50 zeigt die Struktur und das <sup>1</sup>H-NMR der Verbindung aus Loop 32. Hierbei handelt es sich um das Anthocyan Cyanidin-3-glucosid, welches bereits unter anderem aus der Schale der violetten Passionsfrucht isoliert und charakterisiert werden konnte (vgl. 3.1.2.1 und 4.3.2.1). Das Dublett des Protons am anomeren Kohlenstoff-Atom (H1") befindet sich bei einer chemischen Verschiebung von 5,23 ppm, wobei die Kopplungskonstante 7,5 Hz beträgt, welche für eine  $\beta$ -Glucose typisch ist. Die weiteren Signale des Glucosemoleküls befinden sich in einem Bereich von 3,3 bis 3,8 ppm. Die Signale des Cyanidin-Aglykons sind im einzelnen in Abbildung 50 vermerkt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass mittels der LC-NMR Technik eine schnelle und eindeutige Charakterisierung der Anthocyane der Taybeere möglich wurde, ohne dass die Verbindungen mittels präparativer HPLC aus den jeweiligen HSCCC Fraktionen isoliert werden mussten. Gerade bei der Identifizierung der Minorkomponenten, welche sich zum Teil in CCC-Fraktionen befinden, von denen lediglich wenige Milligramm erhalten wurden, ist die Kopplung der HSCCC mit der LC-NMR Technik als besonders effizient zu beurteilen. Hier wären zur Charakterisierung dieser Substanzen mittels konventioneller NMR-Technik mehrere HSCCC-Trennungen notwendig gewesen, um die hierzu notwendige Substanzmenge zu liefern. Da bereits von diversen Anthocyanen Datensätze (MS, NMR, Retentionszeit) zur Verfügung standen, konnten die vorhandenen Anthocyane der Taybeere auch ohne das Vorhandensein eines <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum eindeutig charakterisiert werden. Problematisch könnte die Methode der LC-NMR-Kopplung lediglich bei solchen Verbindungen werden, bei denen zur vollständigen Identifizierung zusätzliche Informationen notwendig sind (z.B. bezüglich der Stereochemie oder der Verknüpfung der Zucker). In diesen Fällen ist eine Isolierung der Substanz unabdingbar.



**Abbildung 50:** Struktur und <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung Cyanidin-3-glucosid aus Loop 32

# 3.3 Fruchtsaftanalytik verschiedener Buntsäfte

#### 3.3.1 Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt

In diesem Kapitel werden die antioxidative Aktivität und der Gesamtpolyphenolgehalt verschiedener heller und roter Fruchtsäfte verglichen. Das antioxidative Potential mittels modifiziertem TEAC-Test nach RE ET AL. (1999) und der wird Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteau (SINGLETON und ROSSI, 1965) als Gallussäureäguivalente (GAE) bestimmt. Die Tabelle 8 listet die erhaltenen Durchschnittswerte sowie die Schwankungsbreiten und die Anzahl der jeweiligen pro Sorte untersuchten Säfte auf. Analysiert wurden hierbei ausschließlich handelsübliche Fruchtsäfte mit einem Fruchtgehalt von 100%. Das Probenmaterial stammt zum Teil von unterschiedlichen Herstellern. Es wurden aber auch Proben einbezogen, die von demselben Hersteller, jedoch aus verschiedenen Chargen stammen. Vergleicht man die Werte, die für die antioxidative Aktivität und den Gesamtphenolgehalt ermittelt wurden, so zeigt sich, dass bei hellen Fruchtsäften tendenziell für beide Parameter ein niedrigerer Wert ermittelt wurde als im Falle der untersuchten Buntsäfte. Rote Fruchtsäfte enthalten zusätzlich zu den in hellen Fruchtsäften vorhandenen Polyphenolen, wie z.B. Derivate des Quercetin oder der Hydroxyzimtsäuren, verschiedenartige Anthocyane wie Cyanidin- oder Delphinidin-Derivate. Die Anwesenheit von Anthocyanen in Buntsäften bewirkt aufgrund ihres hohen antioxidativen Potentials eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Saftes. Die antioxidative Aktivität liegt für helle Fruchtsäfte hierbei in der Regel zwischen 1 bis 4 mmol Trolox/Liter, während die der Buntsäfte zumeist über 10 mmol Trolox/Liter liegen (RECHNER ET AL., 2001; HENN und STEHLE, 1998). Die Gesamtpolyphenolgehalte der untersuchten hellen Fruchtsäfte liegen in jedem Fall unter 1000 mg GAE/Liter. Bei den Buntsäften konnte in einigen Fällen der bis zu zehnfache Polyphenolgehalt ermittelt werden.

Betrachtet man nun ausschließlich die Buntsäfte, so wird aus der Tabelle 8 deutlich, dass für einige Säfte sowohl ein hoher Gesamtpolyphenolgehalt als auch eine hohe antioxidative Aktivität ermittelt werden konnte (z.B. Holundersaft, Heidelbeersaft). Bei diesen Säften handelt es sich um dunkelrote Fruchtsäfte mit einem sehr hohen Anthocyangehalt. Andere Säfte, wie z.B. Cranberrysaft oder Blutorangensaft, zeigen für beide Untersuchungsparameter deutlich kleinere Werte, was durch den niedrigen Anthocyangehalt dieser Säfte erklärt werden kann. Eine dritte Gruppe von Buntsäften zeichnet sich durch eine hohe antioxidative Aktivität und einen hohen Gesamtpolyphenolgehalt aus, obwohl diese Säfte (Aroniasaft, Grantapfelsaft und Preiselbeersaft) lediglich eine geringe Rotfärbung aufweisen, welche mit einem niedrigen Anthocyangehalt korreliert. Dieses Ergebnis liegt in dem sehr hohen Gehalt an Copigmenten (nichtfarbige Polyphenole) der betreffenden Säfte begründet.

Fruchtsaft	Anzahl	TEAC <sup>1</sup>	Gesamtpolyphenole <sup>2</sup>
	der Proben	mmol Trolox/Liter	mg GAE*/Liter
	n	(Schwankungsbreite)	(Schwankungsbreite)
Ananassaft	1	2,0	353,7
Apfelsaft	1	1,5	561,8
Apfelsinensaft	1	2,4	163,4
Aprikosensaft	1	4,0	973,4
Aroniasaft	1	25,0	5349,5
Blutorangensaft	4	5,1 (2,7-7,15)	1302,1 (840,4-1615)
Brombeersaft	2	22,0 (20,4-23,6)	3713,1 (3664,3-3761,8)
Cranberrysaft	2	6,6 (2,9-10,3)	1670,8 (1642,6-1698,9)
Granatapfelsaft	1	14,1	2575,0
Grapefruitsaft	1	1,8	711,2
Heidelbeersaft	2	28,8 (27,1-30,5)	4515,5 (3889,2-5141,8)
heller Traubensaft	1	1,6	392,8
Himbeersaft	2	13, 2 (11,7-14,6)	1183 (566,9-1799,1)
Holundersaft	17	20,8 (4,2-32,8)	5410,7 (3967,3-9810,1)
Orangensaft	2	2,2 (1,6-2,8)	552,6 (552,3-552,6)
Pflaumensaft	1	6,8	4143,3
Preiselbeersaft	2	21,3 (17,3-25,3)	3247,6 (1559,2-4936,0)
Quittensaft	2	2,3 (1,8-2,7)	551,7 (509,5-593,9)
roter Johannisbeersaft	2	6,5 (6,2-6,7)	1615,3 (1422,9-1807,6)
roter Traubensaft	7	4,9 (2,12-9,4)	1166,0 (563-2205)
Sauerkirschsaft	2	9,1 (7,4-10,8)	2025,6 (1975,7-2075,4)
Schlehensaft	1	13,9	3125,7
schwarzer	4	22,0(18,1-24,1)	3407 (2187-4227)
Johannisbeersaft			
Zitronensaft	1	0,8	621,1

Tabelle 8: Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt verschiedener Säfte

<sup>1</sup> nach RE ET AL. (1999); <sup>2</sup> nach SINGLETON und ROSSI (1965); Angabe der Werte als Durchschnittswerte

\* Abkürzung: GAE = Gallussäureäquivalente

In den folgenden Kapiteln werden einige Analysen der in Tabelle 8 aufgelisteten Buntsäfte aufgeführt. Zu diesen Säften zählen Holundersaft, schwarzer Johannisbeersaft, Sauerkirschsaft, Blutorangensaft, Cranberrysaft und Aroniasaft. Ein Großteil der Untersuchungen wurde unter dem Aspekt der antioxidativen Aktivität durchgeführt. Hierbei soll z.B. eine Erklärung für die erstaunlich große Schwankungsbreite der antioxidativen Kapazität bei den Holundersäften gefunden werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Beeinflussung der antioxidativen Aktivität durch die Lagerung der Fruchtsäfte, da die meisten Säfte ein Mindesthaltbarkeitsdatum von 12 bis 24 Monaten besitzen.

## 3.3.2 Holundersaft

## 3.3.2.1 Allgemeines

Während die Anthocyanzusammensetzung von Holunder und Holundersäften in der Literatur bisher vielfach beschrieben wurde (TREPTOW, 1985; HERRMANN, 1996b; INAMI ET AL., 1996; DRDÁK und DAUCIK 1990; vgl. Abschnitt 3.1.2.8), ist über die Zusammensetzung der nichtfarbigen phenolischen Komponenten (Copigmente) überraschend wenig bekannt. Ebenfalls sind die Veränderungen des Anthocyan- und Copigmentgehaltes während der Herstellung und Lagerung und die daraus resultierenden Konsequenzen bezüglich der antioxidativen Aktivität, des Gesamtpolyphenolgehaltes sowie der Farbe des Saftes weitgehend unbekannt. Der Farbbeitrag der einzelnen monomeren Anthocyane und der polymeren Farbpigmente konnte mittels des von HOFMANN (1998a, b) entwickelten Farbaktivitätskonzeptes erstmals auf Holundersäfte übertragen werden.

## 3.3.2.2 Anthocyanprofil von Holundersäften

Ein Vergleich des Anthocyanprofils des Holunders (vgl. Abschnitt 3.1.2.8) mit dem eines Holundersaftes zeigt keine gravierenden Unterschiede in der Anthocyanzusammensetzung (siehe Abb. 51). Ein Vergleich der prozentualen Peakflächen des Holunderextraktes der Firma Sensient Food Colors und eines handelsüblichen Holundersaftes macht deutlich, dass die beiden Diglykoside Cyanidin-3-sambubiosid und Cyanidin-3,5-diglucosid im Saft in höheren Konzentrationen vorliegen als im Extrakt. Der Gehalt an Cyanidin-3-sambubiosid ist in beiden Proben gleich, während das Cyanidin-3-glucosid im Saft in deutlich geringeren Konzentrationen vorhanden ist als im Extrakt (siehe Tabelle 9). Diese Ergebnisse decken sich mit der von DRDÁK und DAUCIK (1990) ermittelten starken Abnahme der Konzentration an Cyanidin-3glucosid während des Fermentationsschrittes und der Pasteurisiation im Zuge der Saftherstellung. Grundsätzlich läßt sich feststellen, dass die Diglykoside hierbei stabiler sind als die Monoglykoside. Als besonders instabil hat sich das Cyanidin-3glucosid erwiesen.





Nach DIETRICH (2003) konnte eine Abnahme des Anthocyangehaltes eines steril eingelagerten Holundersaftes um 39% während einer sechs monatigen Lagerung beobachtet werden, wobei ebenfalls Cyanidin-3-glucosid als das am wenigsten stabile Anthocyan ermittelt werden konnte.

Die nachfolgende quantitative Bestimmung der einzelnen Anthocyane von verschiedenen Holundersäften ist in Tabelle 10 dargestellt. Hierbei erfolgt die Quantifizierung über HPLC unter Zuhilfenahme der in Abschnitt 3.1.2.8 isolierten Anthocyanstandards. Untersucht wurden fünf handelsübliche Holundersäfte verschiedener Hersteller, wobei zwei Säfte als Saftkonzentrate und drei Säfte als Muttersäfte (Preßsäfte) deklariert wurden.

Die Anthocyangesamtgehalte liegen in einem Bereich von 1279 bis 2428 mg/l und weisen somit eine große Schwankungsbreite auf. Weiterhin läßt sich keine allgemeine Tendenz aufzeigen, dass Konzentrate, die aufgrund des

Konzentrierungsprozesses einer zusätzlichen thermischen Belastung ausgesetzt sind, einen niedrigeren monomeren Anthocyangehalt aufweisen als Muttersäfte, bei denen dieser Prozeßschritt fehlt.

Tabelle 9: Vergleich der relativen prozentualen Anthocyanverteilung von Holunderextrakt und Holundersaft

Verbindung	Holunderextrakt <sup>1</sup> Peakfläche (%)	Holundersaft <sup>2</sup> Peakfläche (%)
Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid	7,6	20,1
Cyanidin-3,5-diglucosid	1,7	5,5
Cyanidin-3-sambubiosid	43,6	43,2
Cyanidin-3-glucosid	47,1	31,2

<sup>1</sup> vgl. Abbildung 33; Anthocyanprofil des Holunderextraktes der Firma Sensient Food Colors <sup>2</sup> vgl. Abbildung 51; Anthocyanprofil eines handelsüblichen Holundersaftes

Die Quantifizierung über die einzelnen Standardsubstanzen zeigt ein erstaunliches Ergebnis. Nicht die beiden Monoglykoside Cyanidin-3-sambubiosid und Cyandin-3glucosid sind die Hauptanthocyane des Holundersaftes, sondern das Anthocyan Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid konnte als Majorpigment charakterisiert werden. Hierbei sieht die prozentuale Anthocyanverteilung, die aus den in Tabelle 10 ermittelten Werten berechnet wurde, für Holundersäfte wie folgt aus: ca. 80-86% Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid, 1-2% Cyanidin-3,5-diglucosid, 8-12% Cyanidin-3-sambubiosid und 4-8% Cyanidin-3-glucosid.

**Tabelle 10:** Quantitative Bestimmung (HPLC) des Anthocyangehaltes verschiedener Holundersäfte mittels Standardsubstanzen

Anthocyan [mg/l]	Konzentrat 1	Konzentrat 2	Muttersaft 1	Muttersaft 2	Muttersaft 3
Cy-3-samb-5-glc	1082	1397	1106	1185	1955
Cy-3,5-diglc	21	32	20	24	59
Cy-3-samb	121	195	134	115	232
Cy-3-glc	55	79	62	51	182
Gesamtgehalt	1279	1703	1322	1375	2428

Abkürzungen: Cy = Cyanidin; samb = sambubiosid; glc = glucosid

#### 3.3.2.3 Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf Holundersäfte

Das von HOFMANN (1998a, b) entwickelte Farbaktivitätskonzept wurde erstmals auf Säfte angewendet. Um das Saftmedium zu simulieren wurden alle Versuche in McIIIvaine-Puffer mit dem durchschnittlichen pH-Wert der betreffenden Säfte durchgeführt. Bei den Holundersäften wurde ein mittlerer pH-Wert von 3,6 zugrundegelegt.

Anthocyan	Schwellenwert [mg/l]	Schwellenwert [mmol/l]
Cy-3-samb-5-glc	0,25	3,4· 10 <sup>-4</sup>
Cy-3,5-diglc	0,34	5,7·10 <sup>-4</sup>
Cy-3-samb	0,09	1,5·10 <sup>-4</sup>
Cy-3-glc	0,17	3,7·10⁻⁴
Polymerfraktion*	0,27	-

Tabelle 11: Schwellenwerte der Anthocyane des Holunders bei pH 3,6

Fraktion F1 der HSCCC-Trennung eines handelsüblichen Holundersaftes Abkürzungen: Cy = Cyanidin; samb = sambubiosid; glc = glucosid

Die ermittelten Werte für die Schwellenwerte der Anthocyane des Holunders (vgl. 3.1.2.8) und der durch HSCCC-Trennung eines handelsüblichen Holundersaftes gewonnenen Polymerfraktion (HILLEBRAND ET AL., 2002) bei pH 3,6 sind in Tabelle 11 dargestellt. Anhand der erhaltenen Daten wird ersichtlich, dass das Monoglykosid Cyanidin-3-sambubiosid den niedrigsten Schwellenwert (berechnet als Konzentration in mg/l) besitzt und somit das farbintensivste Anthocyan des Holunders darstellt. Für das Pigment Cyanidin-3-glucosid und die Diglykoside Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid und Cyanidin-3,5-diglucosid wurde ein höherer Schwellenwert ermittelt, wobei das Cyanidin-3,5-diglucosid hierbei den mit Abstand höchsten Wert aufweist. Der Schwellenwert der Polymerfraktion liegt in der Größenordnung des Diglykosides Cyandin-3-sambubiosid-5-glucosid. Vergleicht man den Schwellenwert auf molarer Basis (mmol/l), so wird deutlich, dass das Cyandin-3-sambubiosid den niedrigsten und das Anthocyan Cyandin-3,5-diglucosid wiederum den höchsten molaren Schwellenwert besitzt.

Betrachtet man nun die Farbaktivität FA<sub>x</sub> der einzelnen monomeren Anthocyane der bereits in Tabelle 10 quantifizierten Holundersäfte (vgl. 3.3.2.2) bezogen auf den monomeren Gesamtgehalt, wird deutlich, dass das Anthocyan Cyandin-3-

sambubiosid-5-glucosid mit 68-75% den größten Farbbeitrag innerhalb der monomeren Anthocyane leistet. Das Pigment Cyanidin-3-sambubiosid trägt mit 19-25% zur Farbe der Monomeren bei, während der Farbbeitrag des Cyanidin-3glucosides (5-9%) und des Cyanidin-3,5-diglucosides (ca. 1-2%) als äußerst gering zu bewerten ist. Betrachtet man die Farbaktivität FA<sub>X</sub> der einzelnen Anthocyane der fünf untersuchten Holundersäfte, so zeigt sich, dass die prozentuale Verteilung bei allen Säften innerhalb geringer Schwankungen recht einheitlich ist. Hierbei ist keine Unterscheidung zwischen Muttersäften und Säften, welche aus Konzentraten hergestellt wurden, möglich. Abbildung 52 stellt die prozentuale Farbaktivität der Anthocyane der fünf untersuchten Holundersäfte graphisch dar.



**Abbildung 52:** Prozentuale Farbaktivität FA<sub>X</sub> der monomeren Anthocyane der untersuchten Holundersäfte

Da in roten Fruchtsäften jedoch nicht nur monomere Anthocyane vorhanden sind, sondern ein mehr oder weniger beträchtlicher Anteil an polymeren Farbpigmenten ermittelt werden konnte, wurde der prozentuale Anteil des Farbbeitrages F des monomeren Gesamtanthocyangehaltes sowie der polymeren Pigmente berechnet. Der Vorgang der Polymerisierung sowie der einhergehende Abbau von monomeren Anthocyanen während der Saftherstellung und der Lagerung eines Saftes ist unerwünscht, da sich dieser Sachverhalt negativ auf die Farbe des Saftes auswirken kann. Im schlechtesten Fall erhält der Saft durch einen hohen Polymergehalt und einen niedrigen Gehalt an originären monomeren Anthocyanen eine unerwünschte bräunliche Färbung. Deshalb ist die Bestimmung des Polymergehaltes ein wichtiges Merkmal zur Qualitätsbeurteilung eines Saftes. In Abbildung 53 sind die für die fünf untersuchten Säfte (vgl. 3.3.2.2) erhaltenen Verteilungen graphisch dargestellt. In allen Säften bis auf Konzentrat 2 überwiegt der Farbbeitrag der monomeren Anthocyane deutlich. Lediglich bei dem Konzentrat 2 besteht ein ausgewogenes Verhältnis des Farbbeitrages der Polymere und der Monomere. Ein hoher Farbbeitrag der polymeren Pigmente hat jedoch bei den Holundersäften bezüglich der Bewertung der Farbintensität eines Saftes keine negativen Auswirkungen, da der ermittelte Schwellenwert der Polymerfraktion im Bereich der monomeren Anthocyane liegt.



Abbildung 53: Prozentualer Farbbeitrag F der monomeren Anthocyane und der polymeren Pigmente der untersuchten Holundersäfte

# 3.3.2.4 Charakterisierung der farblosen Polyphenole in Holundersäften

Über die Zusammensetzung der farblosen Polyphenole (Copigmente) des Holunders ist in der Literatur bislang wenig bekannt. HERRMANN (1996b) beschreibt lediglich die Anwesenheit von Chlorogensäure, Quercetin-3-rutinosid (Rutin) sowie Quercetin-3-glucosid.

Zur Charakterisierung und Isolierung der Copigmente eines handelsüblichen Muttersaftes wurde ein Ethylacetatextrakt hergestellt. Durch die Extraktion mit Ethylacetat erfolgt eine Abtrennung der farblosen Polyphenole von den Anthocyanen und weiteren wasserlöslichen Komponenten wie Zucker oder Säuren. Der erhaltene Ethylacetatextrakt wurde nachfolgend mittels HSCCC fraktioniert. Abbildung 54 zeigt das Chromatogramm der HSCCC-Trennung dieses Extraktes bei 280 nm. Die sechs HSCCC-Fraktionen wurden nachfolgend mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> untersucht. Bis auf Fraktion F6 handelt es sich bei allen Fraktionen um Substanzgemische, die mittels präparativer HPLC weiter aufgereinigt werden mußten.



**Abbildung 54:** HPLC-Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Ethylacetatextraktes eines Holundersaftes bei 280 nm

Tabelle 12 listet die mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> und NMR erhaltenen Daten bezüglich der in den einzelnen CCC-Fraktionen enthaltenen Verbindungen auf. Aus der Fraktion F1 konnten *Chlorogensäure* (C2), *Quercetin-3-rutinosid* (C3) sowie *Quercetin-3glucosid* (C4) isoliert und mittels NMR charakterisiert werden. Weiterhin befinden sich in dieser Fraktion als Minorkomponenten ein weiteres Quercetin-Derivat, das als Zuckerkomponente eine acetylierte Hexose aufweist, sowie ein Kaempferol-Derivat, bei dem es sich aufgrund des Fragmentierungsmusters um Kaempferol-rutinosid handelt. In der Fraktion F2 befinden sich zwei Hauptkomponenten, von denen die eine Verbindung als Chinasäure-Derivat und die andere als Ferulasäure-Derivat identifiziert werden konnte. Die Fraktion F3 enthält ein Cumarsäure-Derivat als Hauptkomponente. Bei der Fraktion F6 handelt es sich um eine Reinsubstanz. Diese konnte mittels NMR als *3,4-Dihydroxybenzoesäure* bzw. *Protocatechusäure* (C5) charakterisiert werden. 3,4-Dihydroxybenzoesäure wird in der Literatur als Abbauprodukt des Anthocyans Cyanidin-3-glucosid beschrieben (TSUDA ET AL., 1996), was im Fall des Holundersaftes ebenfalls als recht wahrscheinlich anzusehen ist.

**Tabelle 12:** ESI-MS<sup>n</sup>-Daten der Verbindungen des Ethylacetatextraktes einesHolundersaftes

Peak <sup>*</sup> (HPLC)	Fraktion (HSCCC)	Verbindung	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	Fragmente ( <i>m/z</i> )
1	F6	3,4-Dihydroxybenzoesäure <sup>a</sup>	153	109
2	F1	Chlorogensäure <sup>a</sup>	353	191
3	F2	Chinasäure-Derivat <sup>b</sup>	337	191
4	F3	Cumarsäure-Derivat <sup>b</sup>	323	163
5	F1	Quercetin-3-rutinosid <sup>a</sup>	609	301
6	F1	Quercetin-3-glucosid <sup>a</sup>	463	301
7	F2	Ferulasäure-Derivat <sup>b</sup>	353	193
8	F1	Quercetin-(acetyl)-hexosid <sup>b</sup>	505	463/301
9	F1	Kaempferol-rutinosid <sup>b</sup>	593	285
10	Coil <sup>**</sup>	Quercetin	301	-

Nummerierung der Peaks erfolgt analog der Abbildung 55

\*\* Coil = Rückstand, der nach erfolgter Trennung auf der Trennsäule ("Coil") zurückbleibt

<sup>a</sup> Strukturaufklärung mittels NMR

<sup>b</sup> Strukturzuordnung basiert auf HPLC-ESI MS<sup>n</sup> Daten



**Abbildung 55:** HPLC-Chromatogramm des Ethylacetatextraktes eines Holundersaftes bei 280 nm (Peak-Zuordnung siehe Tabelle 12) Abbildung 55 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Ethylacetatextraktes eines Holundersaftes bei 280 nm. Ersichtlich ist, dass es sich bei den bereits charakterisierten Verbindungen Chlorogensäure, Quercetin-3-rutinosid, Quercetin-3-glucosid sowie Quercetin um die nichtfarbigen phenolischen Hauptkomponenten handelt, während es eine Vielzahl weiterer nicht charakterisierter Minorkomponenten gibt. Die Trennung mittels HSCCC bietet hierbei in diesem Fall keine Möglichkeit der weiteren Aufkonzentrierung dieser Verbindungen in einzelnen Fraktionen.

# 3.3.2.5 Antioxidative Aktivität von Holundersäften

Es wurde die antioxidative Aktivität TAA (total antioxidant activity) der einzelnen Anthocyane des Holunders mittels TEAC-Test (RE ET AL., 1999) ermittelt. Tabelle 13 zeigt, dass das Anthocyan Cyanidin-3-glucosid die höchste antioxidative Aktivität (berechnet als TAA in µmol Trolox/mg) aufweist. Das Diglykosid Cy-3-sambubiosid-5-glucosid, welches das Hauptanthocyan des Holundersaftes darstellt, hat mit 1,0 µmol Trolox/ mg eine deutlich geringere antioxidative Aktivität. Die Berechnung der antioxidativen Aktivität auf molarer Basis zeigt, dass die beiden Monoglykoside wie auch die 3,5-Diglykoside einen recht identischen Wert aufweisen. Daraus kann einerseits geschlossen werden, dass die Art des Zuckers keinen Einfluß auf die antioxidative Aktivität ausübt. Andererseits führt die Einführung einer weiteren Zuckerkomponente zusätzlich zum Zuckerrest an C3-Position zu einer Erniedrigung der antioxidativen Aktivität eines 3,5-Diglykosides.

**Tabelle 13:** Bestimmung der antioxidativen Aktivität der Anthocyane des Holundersmittels TEAC-Test

Anthocyan	ТАА	ТАА
	[µmol Trolox/ mg]	[mmol Trolox/ mmol]
Cy-3-samb-5-glc	1,0	0,7
Cy-3,5-diglc	1,4	0,8
Cy-3-samb	2,8	1,7
Cy-3-glc	4,1	1,9

Abkürzungen: Cy = Cyanidin; samb = sambubiosid; glc = glucosid

Mittels der unter 3.3.2.2 quantifizierten Anthocyane der fünf Holundersäfte wurde der Anteil der Anthocyane an der antioxidativen Aktivität berechnet. Wie Tabelle 14 zeigt, liegen die Werte in einem Bereich von 8,9 bis 12,0%. Die Anthocyane des Holunders tragen somit lediglich zu einem geringen Teil zur antioxidativen Kapazität des Saftes bei. Der restliche Teil wird u.a. durch weitere phenolischen Komponenten und Säuren wie Ascorbinsäure bewirkt und wird nachfolgend diskutiert.

Der Einfluß der Sorten und der Verarbeitung hat einen großen Einfluß auf die antioxidativ wirksamen polyphenolischen Saftinhaltsstoffe. ZEITLHÖFLER (2001) beschreibt den unterschiedlichen Farbstoffgehalt einzelner Holunderbeersorten, wobei die Sorten 'Haschberg', 'Sambu' und 'Samyl' als besonders hoch bewertet wurden. Der Zeitpunkt der Ernte ist ebenfalls sehr wichtig, da sowohl unreife als auch überreife Früchte eine geringere Farbstoffausbeute ergeben (ZEITLHÖFLER, 2001). Auch die Lagerung (Alterung) eines Saftes darf hierbei nicht unterschätzt werden (DIETRICH, 2003).

**Tabelle 14:** TEAC-Werte und prozentualer Anteil der Anthocyane an der antioxidativen Aktivität von Holundersäften

Holundersaft	ТАА	Anthocyananteil
	[mmol Trolox/ I]	[%]
Konzentrat 1	18,9	8,9
Konzentrat 2	22,1	10,4
Muttersaft 1	15,0	11,7
Muttersaft 2	16,8	10,4
Muttersaft 3	28,7	12,0

Anhand von elf Holundersäften, welche zwei aus Konzentrat hergestellte Säfte (SK), fünf Muttersäfte (MS) und vier Säfte ohne Angabe (o.A.) beinhalten, wurde die Auswirkung der Anthocyankonzentration auf die antioxidative Aktivität der einzelnen Säfte diskutiert. Wie die Abbildung 56 zeigt, schwankt die antioxidative Aktivität der untersuchten Säfte zwischen 4,2 und 32,7 mmol Trolox/Liter. Bestimmt wurde diese mittels TEAC-Test nach RE ET AL. (1999).

Vergleicht man die erhaltenen Werte miteinander, so wird deutlich, dass für alle Säfte ein TEAC-Wert oberhalb von 10 mmol Trolox/Liter ermittelt werden konnte (s. Anhang 2). Lediglich ein Konzentrat wies einen vollkommen untypischen Wert von 4,2 mmol Trolox/Liter auf. Es wurde nachfolgend eine quantitative Bestimmung der einzelnen Anthocyane dieser Säfte durchgeführt, welche letztlich zur Klärung des Sachverhaltes geführt hat. Bei allen Säften konnten die vier Anthocyane des Holunders (Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid, Cyanidin-3,5-diglucosid, Cyanidin-3sambubiosid sowie Cyandin-3-glucosid) in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden.



Abbildung 56: TEAC-Werte der untersuchten Holundersäfte

Tendenziell läßt sich hierbei feststellen, dass Säfte mit einem hohen Anthocyangehalt eine höhere antioxidative Aktivität aufweisen als solche mit niedrigeren Anthocyangehalten. Die Untersuchung des Konzentrates mit der niedrigsten antioxidativen Aktivität von 4,2 mmol Trolox/Liter hat ergeben, dass in dieser Probe im Gegensatz zu allen anderen Säften kein Cyanidin-3-glucosid mehr vorhanden war. Da dieses Anthocyan mit 4,1 µmol Trolox/mg eine höhere antioxidative Kapazität aufweist, führt die Abwesenheit dieses 3-Glykosides zu einer deutlichen Erniedrigung des TEAC-Wertes. Es ist hierbei zu vermuten, dass das Cyanidin-3-glucosid, welches bereits als recht instabil beschrieben wurde, während des Prozesses der Konzentratherstellung aufgrund hoher thermischer Belastung abgebaut wurde. Es wurde eine weitere Probe dieses Herstellers aus einer anderen Charge untersucht, nachdem der Hersteller seine Konzentratanlage erneuert hatte. Diese Probe weist im Gegensatz zu der ersten einen deutlich höheren TEAC-Wert auf. Im Anthocyanprofil der Probe sind alle vier Pigmente des Holunders vertreten. Somit scheint gesichert, dass die Bedingungen bei der Saftherstellung einen großen Einfluß auf die Saftqualität vor allem bezüglich der Höhe der antioxidativen Aktivität ausüben.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung des Anthocyangehaltes mittels HPLC der hier untersuchten Säfte finden sich in Anhang 2.

**Tabelle 15:** TEAC-Werte für die farblosen phenolischen Komponenten desHolunders

Verbindung	TAA [μmol Trolox/ mg]	TAA [mmol Trolox/ mmol]
Chlorogensäure	3,2	1,1
Quercetin-3-rutinosid	2,6	1,6
Quercetin-3-glucosid	2,2	1,0
Quercetin	10,2	3,1

Da Holundersaft nicht nur Anthocyane als phenolische Komponenten besitzt, sondern auch nennenswerte Mengen an Chlorogensäure, Rutin (Quercetin-3-rutinosid), Quercetin-3-glucosid sowie Quercetin enthält, sollen an dieser Stelle anhand eines Muttersaftes die prozentualen Anteile dieser acht Komponenten berechnet und diskutiert werden. Tabelle 15 listet die erhaltenen TEAC-Werte für diese farblosen phenolischen Verbindungen des Holunders auf. Hierbei wird anhand der beiden Quercetin-Derivate und des Quercetin-Aglykons deutlich, dass das Aglykon aufgrund der Abwesenheit des Zuckerrestes eine wesentlich höhere antioxidative Aktivität besitzt als die Quercetin-3-glykoside. Mit den bereits gewonnen Erkenntnissen bezüglich der antioxidativen Aktivität der 3,5-Diglykoside sowie 3-Glykoside der Anthocyane des Holunders (vgl. Tab. 13) läßt sich nun eine Verallgemeinerung hinsichtlich der Radikalfängereigenschaften aufstellen:

Aglykon > 3-Glykosid > 3,5-Diglykosid

Im Falle eines Holundersaftes (Muttersaft) wurde nun eine Quantifizierung der acht phenolischen Komponenten mittels HPLC unter Verwendung von Standardsubstanzen durchgeführt. Tabelle 16 listet die erhaltenen Werte für die einzelnen Verbindungen des Saftes auf. 
 Tabelle 16: Quantifizierung der phenolischen Komponenten eines handelsüblichen

 Holundersaftes

Verbindung	Gehalt* [mg/ l]
Cyanidin-3,5-diglucosid	41,0
Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid	1879,1
Cyanidin-3-sambubiosid	369,6
Cyanidin-3-glucosid	193,6
Chlorogensäure	129,8
Quercetin-3-rutinosid	300,3
Quercetin-3-glucosid	45,0
Quercetin	5,0

Quantifizierung mittels jeweiliger authentischer Standardsubstanz

Somit ergibt sich bei Berücksichtigung der in Tabelle 16 aufgelisteten Gehalte der einzelnen Verbindungen, des TEAC-Wertes der Einzelsubstanzen sowie des Saftes (16,1 mmol/l) der in Abbildung 57 dargestellte prozentuale Beitrag zur antioxidativen Aktivität des untersuchten Holundersaftes.



**Abbildung 57:** Prozentualer Beitrag einzelner Verbindungen zur antioxidativen Aktivität (ausgedrückt als TEAC-Wert) eines Holundersaftes

Die acht aufgeführten polyphenolischen Verbindungen des Holunders können lediglich 31,8% der ermittelten antioxidativen Aktivität des Saftes erklären. Ein Großteil (68,2%) der antioxidativen Aktivität hingegen ist mit den nachgewiesenen

monomeren Radikalfängern nicht kalkulierbar. Zu diesem Anteil gehören vor allem die polymeren Farbpigmente, deren Beitrag nicht berechnet werden kann. Darüber hinaus muß auch der Anteil der phenolischen Minorkomponenten berücksichtigt werden, deren Gehalt an dieser Stelle nicht ermittelt wurde. Der Anteil der Ascorbinsäure, deren Gehalt nach BERGMANN (1979) mit 116-160 mg/Liter in Holunderbeer-Muttersäften angegeben wird, darf ebenfalls nicht vernachlässigt werden. Dieser liegt im Bereich von 4-5% unter Berücksichtigung des für Ascorbinsäure ermittelten TEAC-Wertes nach RE ET AL. (1999).

#### 3.3.2.6 Einfluß der Lagerung

In diesem Kapitel soll der Einfluß der Lagerung eines handelsüblichen Holunderbeer-Muttersaftes auf verschiedene Parameter wie z.B. den Anthocyan- sowie Copigmentgehalt, die antioxidative Aktivität, den Gesamtpolyphenol- und den Polymergehalt beschrieben werden. Hierbei wird die Hälfte des Ausgangssaftes in dunklen und die andere Hälfte in hellen Flaschen gelagert, damit der Einfluß der Belichtung auf die verschiedenen Parameter diskutiert werden kann.

## 3.3.2.6.1 Anthocyangehalt und Gehalt an polymeren Fabpigmenten

Zuerst soll der Einfluß der Lagerung auf den Gesamtanthocyangehalt diskutiert werden. Hierzu wurden die Anthocyane des Holunders einzeln mittels HPLC quantifiziert und daraus der Gesamtanthocyangehalt berechnet. Abbildung 58 zeigt den graphischen Verlauf des Anthocyanabbaus, der über sechs Monate beobachtet werden konnte. Hierbei ist ein deutlicher Anthocyanabbau sowohl in hellen als auch in dunklen Flaschen zu beobachten. In hellen Flaschen verläuft der Abbau in den ersten drei Monaten rapide, während in den letzten drei Monaten lediglich ein geringer Abbau beobachtet werden kann. Bei den dunklen Flaschen verläuft der Abbau eher stetig und zeigt erst in den letzten beiden Monaten nahezu konstante Werte. Betrachtet man den prozentualen Anthocyanabbau über die gesamten sechs Monate, so werden bei der Lagerung in hellen Flaschen 55% der monomeren Anthocyane abgebaut, während bei Lagerung in dunklen Flaschen lediglich 48% abgebaut werden. Deshalb sollten Holundersäfte zum Schutz der monomeren Anthocyane in dunklen Flaschen gelagert werden. Der Anteil der polymeren

Farbpigmente, welche nach der Methode von WROLSTAD ET AL. (1982) bestimmt wurde, steigt während der gesamten Lagerdauer stetig an (siehe Abb. 58). Hier ist die Zunahme in hellen Flaschen größer als in dunklen. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit dem beobachteten Abbau der monomeren Anthocyane.



Abbildung 58: Einfluß der Lagerung auf den Gesamtanthocyangehalt und den Anteil an polymeren Farbpigmenten eines Holundersaftes

Des weiteren wurde der Abbau der einzelnen Anthocyane des Holunders über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet. Abbildung 59 stellt den Verlauf für die Diglykoside graphisch dar, wobei das Cyanidin-3,5-diglucosid am Ende der Lagerversuche sowohl in den hellen als auch in den dunklen Flaschen vollständig abgebaut war. Das Hauptanthocyan des Holunders wurde bei der Lagerung in hellen Flaschen zu 46% abgebaut, während bei der Lagerung in dunklen Flaschen lediglich 39% abgebaut wurden.



Abbildung 59: Einfluß der Lagerung auf die Diglykosidgehalte eines Holundersaftes

Abbildung 60 zeigt den Verlauf des Abbaus der Monoglykoside über eine Dauer von sechs Monaten. Im Fall des Cyanidin-3-sambubiosides sind nach 6 Monaten bei der Lagerung in hellen Flaschen 84% abgebaut, während in dunklen Flaschen nur 74% abgebaut wurden. Bei Cyanidin-3-glucosid sehen die Größenverhältnisse ähnlich aus. Die sechsmonatige Lagerung des Saftes führt in hellen Flaschen zu einem Abbau des Cyanidin-3-glucosides um 82% und in dunklen Flaschen zu einer Reduzierung um ca. 72%.





Die Lagerversuche haben bezüglich der einzelnen Anthocyane gezeigt, dass das Diglykosid Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid während der Lagerung dem mit Abstand geringsten Abbau unterliegt. Die drei weiteren Anthocyane des Holunders haben sich als wesentlich instabiler gezeigt. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die Holundersäfte während der Lagerung bis hin zum Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums einer starken Veränderung im Polyphenolprofil unterliegen. In jedem Fall hat sich die Lagerung der Säfte in dunklen Flaschen als Vorteil erwiesen.

## 3.3.2.6.2 Gehalt an nichtfarbigen polyphenolischen Verbindungen

Nicht nur die Anthocyane des Holunders unterliegen einem mehr oder weniger starken Abbau während der Lagerung eines Saftes. Auch die Gehalte an nichtfarbigen polyphenolischen Verbindungen wie Chlorogensäure, Rutin und Quercetin-3-glucosid weisen hierbei je nach Alter eines Saftes starke Schwankungen auf. Abbildung 61 zeigt den Verlauf des Abbaus aus der Summe dieser drei Verbindungen sowie des Hydroxyzimtsäure-Derivates Chlorogensäure während einer Lagerdauer von sechs Monaten. Die Graphik zeigt für den Abbau des Gesamtgehaltes aus den drei phenolischen Hauptkomponenten, dass hier über den Zeitraum von sechs Monaten kaum eine Abnahme des Gesamtgehaltes sowohl in hellen Flaschen (ca. 4%) als auch in dunklen Flaschen (ca. 3%) zu verzeichnen ist. Betrachtet man nun den Gehalt der Einzelsubstanzen, so zeigt die Chlorogensäure nach Lagerung in hellen Flaschen eine Abnahme um ca. 18% und bei Lagerung unter Lichtausschluß um ca. 12% des ursprünglichen Gehaltes.



**Abbildung 61:** Einfluß der Lagerung auf die Summe der drei nichtfarbigen polyphenolischen Hauptkomponenten sowie der Chlorogensäure

Für das Flavonol-Derivat Rutin (Quercetin-3-rutinosid) konnte ein Abbau von ca. 4-5% ermittelt werden, wobei sich in diesem Fall die Lagerung in hellen Flaschen nicht negativ auf den Gehalt ausgewirkt hat. Erstaunlicherweise konnte für das zweite Flavonol-Derivat Quercetin-3-glucosid ein Anstieg des Gehaltes während der Lagerung um ca. 45% in hellen Flaschen und um ca. 48% in dunklen Flaschen beobachet werden, was durch einen möglichen partiellen Abbau des Rutins erklärt werden kann. Abbildung 62 stellt diesen Sachverhalt graphisch dar. Eine quantitative Untersuchung des Gehaltes an Quercetin hat ergeben, dass das Aglykon unabhängig von der Lagerung in hellen oder dunklen Flaschen während der gesamten Lagerdauer lediglich in Konzentrationen von unter 10 mg/l vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Falle der nichtfarbigen polyphenolischen Komponenten des Holundersaftes kein derartig rascher und deutlicher Abbau wie bei den Anthocyanen zu beobachten ist.


**Abbildung 62:** Einfluß der Lagerung auf die Flavonol-Derivate Rutin und Quercetin-3-glucosid in Holundersäften

### 3.3.2.6.3 Antioxidative Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt

Es wurde die antioxidative Aktivität mittels TEAC-Test (RE ET AL., 1999) und der Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteau (SINGLETON und ROSSI, 1965) des Holundersaftes über die Lagerdauer von sechs Monaten bestimmt.



Abbildung 63: Einfluß der Lagerung auf die antioxidative Aktivität und den Gesamtpolyphenolgehalt (März (M) – September (S))

Abbildung 63 zeigt, dass sowohl die ermittelten TEAC-Werte als auch der Gesamtpolyphenolgehalt während der Lagerung starken Schwankungen unterworfen sind. Es ist keine eindeutige Tendenz zu erkennen. Diese Tatsache liegt darin begründet, dass während der Lagerung Verbindungen abgebaut werden (z.B. Anthocyane) und neue Verbindungen entstehen (z.B. polymere Farbpigmente). Die neu entstandenen Verbindungen besitzen eine andere antioxidative Aktivität als die

originären Verbindungen und reagieren anders auf das zur Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes eingesetzte Folin-Ciocalteau-Reagenz. Da in beiden Fällen kein Trend zu verzeichnen ist, haben sich diese Parameter zur Beurteilung der Qualität während der Lagerung eines Saftes als ungeeignet erwiesen.

Berechnet man den Anteil der Anthocyane an der antioxidativen Aktivität, so nimmt dieser während der Lagerung rapide ab. Zu Beginn der Lagerversuche konnte für die Anthocyane des frisch hergestellten Holundersaftes (Ablauf des MHDs in 23 Monaten) ein Anteil von 23% ermittelt werden. Nach der sechsmonatigen Lagerung jedoch trugen sie nur noch zu ca. 10 % in hellen bzw. 13% in dunklen Flaschen zur antioxidativen Kapazität des Saftes bei. Dieser Wert deckt sich mit den bereits unter 3.3.2.5 ermittelten Werten.

### 3.3.2.6.4 Farbintensität und Farbtönung

Zuletzt soll der Einfluß der Lagerung auf die Farbintensität sowie die Farbtönung des Holundersaftes ermittelt werden (siehe Abbildung 64).



Abbildung 64: Einfluß der Lagerung auf die Farbintensität und die Farbtönung eines Holundersaftes

Die Farbintensität des vorliegenden Holundersaftes ändert sich hierbei während der Lagerung nur unwesentlich, obwohl vorab ein starker Abbau der monomeren Anthocyane und eine Zunahme der polymeren Farbpigmente beobachtet werden konnte. Normalerweise sollte die Farbintensität mit Zunahme der polymeren Pigmente und der einhergehenden Abnahme des Gesamtanthocyangehaltes stark abnehmen. Wie bereits gezeigt wurde, besitzt die Polymerfraktion eines Holundersaftes einen nur unwesentlich höheren Schwellenwert als das Hauptanthocyan Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid (vgl. Abschnitt 3.3.2.3), so dass im Fall des Holundersaftes keine negativen Auswirkungen auf die Farbintensität zu befürchten sind. Der Wert für die Farbtönung, welcher auf den Gehalt an polymeren Pigmenten und den dadurch verbundenen Anteil einer bräunlich-orangen Färbung des Saftes schließen lässt, nimmt während der Lagerung zu. Dieses Ergebnis korreliert mit der bereits ermittelten stetigen Zunahme des Anteils an polymeren Farbpigmenten.

### 3.3.2.7 Farbintensivierung durch Copigmentierung

In diesem Kapitel soll die Abhängigkeit des Verhältnisses von Copigment zu Anthocyan (C/A-Verhältnis) auf den Copigmentierungseffekt untersucht werden. Hierbei werden mögliche bathochrome (Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen) und hyperchrome (Anstieg der Farbintensität) Effekte anhand der in Holundersaft vorliegenden Copigmente Chlorogensäure, Rutin und Quercetin-3-glucosid und der Anthocyane Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid, Cyanidin-3,5diglucosid, Cyanidin-3-sambubiosid sowie Cyanidin-3-glucosid bei verschiedenen C/A-Verhältnissen untersucht. Des weiteren werden die C/A-Verhältnisse, wie sie durchschnittlich in Holundersäften vorliegen, in einer Modelllösung simuliert und es wird die Wahrscheinlichkeit von Copigmentierungseffekten in Holundersäften aufgrund der vorliegenden Daten diskutiert.

### 3.3.2.7.1 Einfluß des Verhältnisses Copigment zu Anthocyan (C/A-Verhältnis)

Tabelle 17 listet den Anstieg der Farbintensität sowie die Verschiebung des Absorptionsmaximums ( $\lambda_{max}$ ) bezogen auf die jeweilige Anthocyanlösung ohne Copigment (C/A = 0) bei verschiedenen C/A-Verhältnissen und unterschiedlichen Copigmenten auf. Das Copigment Rutin bewirkt mit Ausnahme des Anthocyans Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid bei allen anderen Anthocyanen des Holunders bereits bei einem C/A-Verhältnis von 5 eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen von deutlich mehr als 10 nm. In allen Fällen ist hierbei gleichzeitig ein Anstieg der Absorption zu erkennen. Dieses macht sich besonders bei dem Anthocyan Cyanidin-3-sambubiosid bei einem C/A-Verhältnis von

10 bemerkbar. Das Flavonol-Derivat Quercetin-3-rutinosid (Rutin) kann somit als sehr wirkungsvolles Copigment bezeichnet werden.

Copigment	Anthocyan	C/A	$\Delta A$ bei $\lambda_{max}$	$\Delta\lambda_{max}$
Rutin	Cy-3-samb-5-glc	1	0,02	0,4
		5	0,06	5
		10	0,32	6
	Cy-3,5-diglc	1	0,08	4,2
		5	0,13	11,6
		10	0,17	14,4
	Cy-3-samb	1	0,14	5,2
		5	0,25	14,4
		10	0,56	16
	Cy-3-glc	1	0,17	6,6
		5	0,36	15,4
		10	0,39	18,8
Quercetin-3-glc	Cy-3-samb-5-glc	1	0,10	0
		5	0,11	0,6
		10	0,16	0,8
	Cy-3,5-diglc	1	0	3,8
		5	0,04	9,6
		10	0,09	9,8
	Cy-3-samb	1	0,07	3,4
		5	0,11	11,4
		10	0,19	13,8
	Cy-3-glc	1	0,38	5,2
		5	0,57	13,2
		10	0,72	15,2
Chlorogensäure	Cy-3-samb-5-glc	1	0	0
-		5	0	0,4
		10	0	1,2
	Cy-3,5-diglc	1	0,05	0,2
		5	0,05	2,2
		10	0,14	4,2
	Cy-3-samb	1	0,07	0,8
		5	0,12	3
		10	0,20	5
	Cy-3-glc	1	0	0,6
		5	0,08	2
		10	0,28	5

Tabelle 17: Copigmentierungseinfluß bei verschiedenen C/A-Verhältnissen

Betrachtet man die Wirkung des Flavonols Quercetin-3-glucosid, welches sich lediglich durch die Zuckerkomponente vom Rutin unterscheidet, so stellt man fest, dass diese Verbindung, ebenfalls mit Ausnahme des Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosids, eine beachtliche Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen ab einem C/A-Verhältnis von 5 bewirkt. Einen deutlichen hyperchromen Effekt bewirkt Quercetin-3-glucosid im Falle des Anthocyans Cyanidin-3-glucosid. Das Quercetin-3-glucosid kann somit ebenfalls, zumindest in Bezug auf die Anthocyane des Holundersaftes, als effektives Copigment betrachtet werden.

Vergleicht man das Hydroxyzimtsäure-Derivat Chlorogensäure mit den beiden Flavonol-Derivaten, so bewirkt dieses weder eine starke Verschiebung (> 10 nm) des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen noch einen derart deutlichen Anstieg der Absorption, wie es in den beiden ersten Fällen beobachtet werden konnte. Dieses gilt in Bezug auf alle vier Anthocyane des Holunders.

Es konnte somit anhand der Versuche zur Copigmentierung festgestellt werden, dass ein möglicher Copigmentierungseffekt erst bei einem deutlichen Überschuß an Copigment beobachtet werden kann. Fraglich ist, ob ein derartig großes C/A-Verhältnis in Holundersäften überhaupt vorhanden ist. Des weiteren muß auch das Anthocyan in einer gewissen Konzentration vorliegen, damit sich signifikante Copigmentierungseffekte zeigen. Diese Konzentration wird in der Literatur mit  $3,5 \times 10^{-5}$  M angegeben (HUTTA-BEDA, 1992).

### 3.3.2.7.2 Copigmentierungseffekte in Holundersaft

Ausgegangen wird in diesem Kapitel von einem Holundersaft, der folgende Anthocyan- und Copigmentkonzentrationen enthält:

Rutin:	300 mg/l (0,49 mmol/l)
Quercetin-3-glc :	30 mg/l (0,06 mmol/l)
Chlorogensäure:	150 mg/l (0,42 mmol/l)
Cyanidin-3-samb-5-glc:	1500 mg/l (2,02 mmol/l)
Cyanidin-3,5-diglc:	50 mg/l (0,08 mmol/l)
Cyanidin-3-samb:	400 mg/l (0,69 mmol/l)
Cyanidin-3-glc:	200 mg/l (0,44 mmol/l)

Die Konzentrationen der vier Anthocyane liegen oberhalb der erforderlichen 3,5×10<sup>-5</sup> Μ. Somit kann bei allen Cyanidin-Derivaten des Holundersaftes mit Copigmentierungseffekten gerechnet werden. Tabelle 18 zeigt die C/A-Verhältnisse für die jeweiligen Anthocyane und Copigmente sowie die Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen und einen möglichen Anstieg der Farbintensität.

Tabelle	18:	Copigmenteinfluß	der	Copigmente	auf	die	Anthocyane	des
Holunder	saftes	3						

Anthocyan	Copigment	C/A	$\Delta A$ bei $\lambda_{max}$	$\Delta\lambda_{max}$
Cy-3-samb-5-glc	Chlorogensäure	0,21	0,09	0
	Quercetin-3-glc	0,03	0	1
	Rutin	0,24	0	6
Cy-3,5-diglc	Chlorogensäure	5,2	0	0
	Quercetin-3-glc	0,79	0	1
	Rutin	6,0	0,50	5
Cy-3-samb	Chlorogensäure	0,61	0,12	0
	Quercetin-3-glc	0,09	0	1,4
	Rutin	0,71	0	3,4
Cy-3-glc	Chlorogensäure	0,95	0	0
	Quercetin-3-glc	0,15	0	2
	Rutin	1,10	0	5,6

Im Holundersaft liegen die berechneten C/A-Verhältnisse in der Regel weit unter 5. In diesen Fällen kann kein Copigmentierungseffekt beobachtet werden. Lediglich das Copigment Rutin bewirkt schon bei kleinen C/A-Verhältnissen eine leichte Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen und im Fall des Anthocyans Cyanidin-3,5-diglucosid sogar einen beachtlichen Anstieg der Absorption.

### 3.3.3 Schwarzer Johannisbeersaft

#### 3.3.3.1 Allgemeines

Schwarze Johannisbeersäfte wurden bereits von DIETRICH ET AL. (1994) in einem Sortenscreenning untersucht. Dabei hat man festgestellt, dass sich die einzelnen Sorten hinsichtlich ihrer Eignung zur Saftherstellung vor allem in der Farbintensität und dem Gehalt an Polyphenolen stark unterscheiden. Da die Beeren reich an L-Ascorbinsäure sind, ist die Stabilität der Anthocyane u.a. im schwarzen Johannisbeersaft vor allem in Wechselwirkung mit der L-Ascorbinsäure untersucht worden (IVERSEN, 1999). Hierbei stabilisieren die Anthocyane der schwarzen Johannisbeere einerseits die L-Ascorbinsäure, wobei jedoch andererseits ein stärkerer Verlust der monomeren Anthocyane zu verzeichnen ist. Dieses hat zur Folge, dass sich durch den Anthocyanabbau und dem zunehmenden Gehalt an polymeren Farbpigmenten die Farbe des Saftes verändert und sich von rot-violett nach orange-braun verlagert, was vom Verbraucher als inakzeptabel bewertet wird (EDER, 1996). Aus diesem Grund werden im folgenden Kapitel unterschiedliche handelsübliche schwarze Johannisbeersäfte analysiert und miteinander verglichen. Hierbei spielt vor allem der Farbbeitrag der einzelnen monomeren Anthocyane und der polymeren Farbpigmente eine wesentliche Rolle.

#### 3.3.3.2 Anthocyanprofil von schwarzen Johannisbeersäften

Ein Vergleich des Anthocyanprofils von schwarzen Johannisbeeren (vgl. Abschnitt 3.1.2.5) mit dem eines schwarzen Johannisbeersaftes zeigt keine gravierenden Unterschiede in der Anthocyanzusammensetzung (siehe Abb. 65).



**Abbildung 65:** HPLC-Chromatogramm eines handelsüblichen schwarzen Johannisbeersaftes (Detektionswellenlänge bei 520 nm) Vergleicht man die prozentualen Peakflächen des XAD-7 Extraktes von frischen schwarzen Johannisbeeren und eines handelsüblichen schwarzen Johannisbeersaftes, so wird deutlich, daß die beiden Pigmente Delphinidin-3-rutinosid und Cyanidin-3-rutinosid sowohl die Hauptanthocyane der frischen Frucht als auch des Saftes sind.

**Tabelle 19:** Vergleich der relativen prozentualen Anthocyanverteilung von schwarzen
 Johannisbeeren und schwarzem Johannisbeersaft

Verbindung	schwarze Johannisbeeren <sup>1</sup> Peakfläche (%)	schwarzer Johannisbeersaft <sup>2</sup> Peakfläche (%)
Delphinidin-3-glucosid	15,3	17,1
Delphinidin-3-rutinosid	34,7	44,8
Cyanidin-3-glucosid	9,8	6,7
Cyanidin-3-rutinosid	40,2	31,4

<sup>1</sup> vgl. Abbildung 27; Anthocyanprofil der Schalen frischer schwarzer Johannisbeeren <sup>2</sup> vgl. Abbildung 65; Anthocyanprofil eines handelsüblichen schwarzen Johannisbeersaftes

Die nachfolgende quantitative Bestimmung der einzelnen Anthocyane von zwei verschiedenen Muttersäften (Presssäfte) ist in Tabelle 20 dargestellt. Hierbei erfolgt die Quantifizierung über die in Abschnitt 3.1.2.5 isolierten Anthocyanstandards mittels HPLC. Während der Anthocyangehalt des ersten Saftes bei 837 mg/l liegt, konnte für den zweiten Saft lediglich ein Wert von 338 mg/l ermittelt werden. Vergleicht man die beiden Säfte miteinander, so zeichnet sich der erste Saft durch eine intensive rote Farbe aus. Der zweite Saft hingegen besitzt eine orangebräunliche Farbe und wirkt längst nicht so farbintensiv wie der erste Saft. Somit gehen die Ergebnisse, die aus der Sensorik ermittelt wurden, mit der quantitativen Analyse des monomeren Gesamtanthocyangehaltes bezüglich der Farbintensität der beiden Säfte einher. Interessant wäre an dieser Stelle ein Vergleich mit schwarzen Johannisbeersäften gewesen, welche aus Konzentrat hergestellt wurden. Leider konnte kein handelsübliches Konzentrat gefunden werden.

Die prozentuale Anthocyanverteilung, die aus den in Tabelle 20 ermittelten Werten berechnet wurde, sieht für schwarze Johannisbeersäfte durchschnittlich wie folgt aus: 18% Delphinidin-3-glucosid, 45% Delphinidin-3-rutinosid, 5% Cyanidin-3glucosid sowie 32% Cyandin-3-rutinosid. Sie deckt sich somit weitgehend mit den Werten, die über die prozentuale Peakflächenverteilung ermittelt wurden.

**Tabelle 20:** Quantitative Bestimmung (HPLC) des Anthocyangehaltes zweier

 schwarzer Johannisbeer-Muttersäfte mittels Standardsubstanzen

Anthocyan [mg/l]	Muttersaft 1	Muttersaft 2
Delphinidin-3-glucosid	145	63
Delphinidin-3-rutinosid	395	146
Cyanidin-3-glucosid	36	20
Cyanidin-3-rutinosid	261	109
Gesamtgehalt an Anthocyanen	837	338

# 3.3.3.3 Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf schwarze Johannisbeersäfte

Zur Simulierung des Saftmediums erfolgt die Durchführung des Farbaktivitätskonzeptes in McIIIvaine-Puffer bei einem pH-Wert von 2,7. Die ermittelten Werte für die Schwellenwerte der Anthocyane der schwarzen Johannisbeere (vgl. 3.1.2.5) und der durch HSCCC-Trennung eines handelsüblichen schwarzen Johannisbeersaftes gewonnenen Polymerfraktion sind in Tabelle 21 dargestellt.

**Tabelle 21:** Schwellenwerte der Anthocyane der schwarzen Johannisbeere bei pH2,7

Anthocyan	Schwellenwert [mg/l]	Schwellenwert [mmol/l]
Delphinidin-3-glucosid	0,10	2,2· 10 <sup>-4</sup>
Delphinidin-3-rutinosid	0,05	8,1 10 <sup>-5</sup>
Cyanidin-3-glucosid	0,06	1,3·10 <sup>-4</sup>
Cyanidin-3-rutinosid	0,05	8,4 10 <sup>-5</sup>
Polymerfraktion	0.71	-

Fraktion F1 der HSCCC-Trennung eines handelsüblichen schwarzen Johannisbeersaftes

Anhand der erhaltenen Daten wird ersichtlich, dass die Polymerfraktion einen deutlich höheren Schwellenwert besitzt als die monomeren Anthocyane. Bei schwarzen Johannisbeersäften wirkt sich somit im Gegensatz zu den Holundersäften ein hoher Polymergehalt negativ auf die Farbintensität des Produktes aus. Betrachtet man nun die 3-Glykoside, so zeigen diese Schwellenwerte (bezogen auf mg/l), die in einem Bereich zwischen 0,05 bis 0,1 mg/l liegen. Berechnet man die Schwellenwerte auf molarer Basis, so wird deutlich, dass unabhängig vom Aglykon die 3-Glykoside,

welche ein Disaccharid als Zuckerkomponente besitzen, einen deutlich kleineren Schwellenwert aufweisen als jene, die ein Monosaccharid als Zuckerrest tragen. Betrachtet man nun die Farbaktivität FA<sub>x</sub> der einzelnen monomeren Anthocyane der bereits in Tabelle 20 quantifizierten schwarzen Johannisbeersäfte (vgl. 3.3.3.2) bezogen auf den monomeren Gesamtgehalt, so wird deutlich, dass das Anthocyan Delphinidin-3-rutinosid etwa die Hälfte des Farbbeitrages innerhalb der monomeren Anthocyane leistet.



**Abbildung 66:** Prozentuale Farbaktivität FA<sub>X</sub> der monomeren Anthocyane der untersuchten schwarzen Johannisbeersäfte

Das Pigment Cyanidin-3-rutinosid trägt mit ca. 35% zur Farbe der Monomeren bei, während der Farbbeitrag des Delphinidin-3-glucosides (ca. 10%) und des Cyanidin-3-glucosides (ca. 5%) als äußerst gering zu bewerten ist. Da die Rutinosid-Derivate im schwarzen Johannisbeersaft dominieren, tragen sie zu annähernd 85% zum Farbbeitrag der monomeren Anthocyangehalte bei. Betrachtet man die Farbaktivität FA<sub>x</sub> der einzelnen Anthocyane der zwei untersuchten schwarzen Johannisbeersäfte, so zeigt sich, dass die prozentuale Verteilung, wie bereits bei den Holundersäften erwähnt, innerhalb geringer Schwankungen bei beiden Säften recht einheitlich ist. Abbildung 66 stellt die prozentuale Farbaktivität der Anthocyane der zwei untersuchten Muttersäfte der schwarzen Johannisbeere graphisch dar. Da auch bei den schwarzen Johannisbeersäften ein beträchtlicher Anteil der Farbpigmente in polymerer Form vorliegt, wurde der prozentuale Anteil des Farbbeitrages F des monomeren Gesamtanthocyangehaltes sowie der polymeren Pigmente berechnet. Wie die Abbildung 67 zeigt, tragen im Muttersaft 1 78% der monomeren Anthocyane zur Farbe des Saftes bei, während lediglich 22% von den polymeren Farbpigmenten stammen. Der Muttersaft 2 hingegen zeigt ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis des Farbbeitrages der Monomere und Polymere.



Abbildung 67: Prozentualer Farbbeitrag F der monomeren Anthocyane und der polymeren Pigmente der untersuchten schwarzen Johannisbeersäfte

Diese Tatsache erklärt letztlich auch die schlechte sensorische Bewertung des Muttersaftes 2. Ein Farbbeitrag von 52% der polymeren Fraktion, welche einen sehr hohen Schwellenwert besitzt, sowie ein niedriger Gehalt an originären monomeren Anthocyanen bewirkt eine deutliche Erniedrigung der Farbintensität des Saftes und ebenfalls jene unerwünschte bräunliche Färbung, die auf die polymeren Farbpigmente zurückzuführen ist. Aus diesem Grund sollte bei schwarzen Johannisbeersäften während der Herstellung und Lagerung der Säfte darauf geachtet werden, dass einerseits eine Sorte gewählt wird, die einen hohen Anthocyangehalt besitzt, andererseits sollte ein Anthocyanabbau und eine Polymerisierung der Pigmente weitgehend vermieden werden.

### 3.3.4 Sauerkirschsaft

## 3.3.4.1 Allgemeines

Sauerkirschsaft ist während des Herstellungsprozesses weniger stabil als schwarzer Johannisbeersaft und Holundersaft. So betragen die Verluste von antioxidativer Aktivität, Gesamtphenolgehalt und dem Farbwert E 520 nm/cm vom Entsaften der zerquetschten Kirschen über Separation und Pasteurisation mittels Kurzzeiterhitzung ca. 15% (RECHNER, 2001). Der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteau von frischem Sauerkirschpresssaft beträgt 3885-4821 mg/l und der TEAC-Wert wird mit 22,1 mmol Trolox/l angegeben (DIETRICH, 2003). Nach CEMEROGLU ET AL. (1994) zeigt während der Lagerung die Temperatur den größten Einfluß auf die Abnahme der Anthocyane in Sauerkirschsaft und –konzentrat.

# 3.3.4.2 Anthocyanprofil von Sauerkirschsäften

Das Anthocyanprofil eines handelsüblichen Sauerkirschsaftes (Muttersaft) weist im Gegensatz zur frischen Frucht deutliche Unterschiede auf. So zeigt sich im HPLC-Chromatogramm (siehe Abb. 68) ein bisher nicht identifizierter Peak.



**Abbildung 68:** HPLC-Chromatogramm eines handelsüblichen Sauerkirschsaftes bei 520 nm

Eine nachfolgende Charakterisierung der Peaks 1 bis 5 über LC-ESI-MS<sup>n</sup> bestätigt die Annahme, dass es sich bei Peak 3 um ein Anthocyanderivat handelt, welches originär nicht in Sauerkirschen vorkommt. Die Massen und Absorpionsmaxima der Anthocyane sind in Tabelle 22 aufgelistet.

Peak* (HPLC)	Verbindung	[M] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	Fragmente ( <i>m/z</i> )	lambda <sub>max</sub> (nm)
1	Cyanidin-3-sophorosid	611	287	518
2	Cyanidin-3-(2 <sup>G</sup> -glucosylrutinosid)	757	287, 611	520
3	unbekannt	825	355	510
4	Cyanidin-3-glucosid	449	287	518
5	Cyanidin-3-rutinosid	595	287, 449	520

Tabelle 22: Spektroskopische Daten der Anthocyane aus Sauerkirschsaft

\* Peakzuordnung analog Abbildung 68

Die Isolierung von 2 mg des Peaks 3 gelang aus einem XAD-7 Extrakt des Sauerkirschsaftes mittels präparativer HPLC. Die Farbe des erhaltenen Anthocyans in saurer Lösung ist jedoch nicht rot-violett, wie es bei den anderen Anthocyanen der Sauerkirsche der Fall ist, sondern orange. Es ist davon auszugehen, daß es sich bei der vorliegenden Substanz um ein Vitisin-Derivat handelt, welches sich durch Umsetzung des Hauptanthocyans Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) und Pyruvat bildet. Abbildung 69 zeigt das Massenspektrum der isolierten Reinsubstanz.



**Abbildung 69:** MS-Spektrum und MS/MS-Spektrum des unbekannten Vitisin-Derivates aus Sauerkirschsaft Die Umsetzung von Anthocyanen mit Pyruvat zu sogenannten "Vitisinen" ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden und beschränkt sich bisher fast ausschießlich auf Rotwein (SCHWARZ ET AL., 2003). Allerdings konnte kürzlich auch aus roten Zwiebeln ein derartiges Vitisin-Derivat isoliert werden (FOSSEN und ANDERSEN, 2003). Abbildung 70 zeigt den postulierten Reaktionsmechanismus der Bildung eines Vitisin-Derivates nach FULCRAND ET AL. (1998).



**Abbildung 70:** Postulierter Bildungsmechanismus eines Vitisin-Derivates nach FULCRAND ET AL. (1998)

Zur Absicherung der Struktur wurde die postulierte Verbindung auf synthetischem Wege hergestellt, indem ein Überschuß an Pyruvat mit dem Anthocyan Cyanidin-3- $(2^{G}$ -glucosylrutinosid) in McIIIvaine-Puffer bei pH 3,2 umgesetzt wurde. Die Reaktionslösung wurde im Trockenschrank bei 45 °C gelagert und mittels LCESI-MS<sup>n</sup> nach dreiwöchiger Lagerdauer analysiert. Abbildung 71 zeigt das Basispeak-Chromatogramm (BPC) dieser Reaktionslösung gemessen im positiven Modus. Aus dem Chromatogramm wird ersichtlich, dass sich ein Teil des Anthocyans Cyanidin-3- $(2^{G}$ -glucosylrutinosid) mit der Masse m/z 757 bereits umgesetzt hat. Dieses Pseudomolekülion [M<sup>+</sup>] fragmentiert hierbei unter Abspaltung der Zuckerreste zum Cyanidin-Aglykon (m/z = 287). Es zeigt sich nach drei Wochen ein weiterer Peak in der Lösung, welcher zu Beginn der Lagerdauer nicht in der Lösung vorhanden war. Die ESI-MS<sup>n</sup>-Analyse dieses Peaks liefert im positiven Modus ein Pseudomolekülion mit m/z 825 und einem Fragment mit m/z 355. Sowohl die Retentionszeit dieser Verbindung als auch die Masse und das Fragmentierungsmuster entsprechen dem bereits als Vitisin-Derivat bezeichneten Peak 3 des Sauerkirschsaftes.



**Abbildung 71:** Base Peak Chromatogramm (BPC) der Reaktionslösung aus Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) und Pyruvat

Abbildung 72 zeigt die postulierte Struktur des aus Sauerkirschsaft isolierten Vitisin-Derivates 5-Carboxypyranocyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid).



Abbildung 72: Postulierte Struktur des aus Sauerkirschsaft isolierten Vitisin-Derivates

Die Quantifizierung des handelsüblichen Sauerkirschsaftes über die einzelnen Standardsubstanzen zeigt ein erstaunliches Ergebnis (Tabelle 23). Das Vitisin-Derivat trägt mit ca. 61% zum Gesamtanthocyangehalt bei und ist somit die monomere Hauptkomponente des Sauerkirschsaftes. **Tabelle 23:** Quantitative Bestimmung (HPLC) des Anthocyangehaltes einesSauerkirschpresssaftes mittels Standardsubstanzen

Anthocyan [mg/l]	Sauerkirschsaft (Muttersaft)
Cyanidin-3-sophorosid	53
Cyanidin-3-(2 <sup>G</sup> -glucosylrutinosid)	252
5-Carboxypyranocyanidin-3-(2 <sup>G</sup> -glucosylrutinosid)	514
Cyanidin-3-glucosid	3
Cyanidin-3-rutinosid	24
Gesamtgehalt	843

### 3.3.4.3 Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf Sauerkirschsaft

Zur Simulierung des Saftmediums erfolgt die Durchführung des Farbaktivitätskonzeptes in McIIIvaine-Puffer mit einem pH-Wert von 3,2. Von besonderem Interesse ist hierbei die Bestimmung des Schwellenwertes und des Farbeitrages des Vitisin-Derivates.

**Tabelle 24:** Schwellenwerte der Anthocyane und Anthocyan-Derivate vonSauerkirschsaft bei pH 3,2

Anthocyan	Schwellenwert	Schwellenwert	
	[mg/l]	[mmol/l]	
Cyanidin-3-sophorosid	0,08	1,3·10 <sup>-4</sup>	
Cyanidin-3-(2 <sup>G</sup> -glucosylrutinosid)	0,15	2,0· 10 <sup>-4</sup>	
5-Carboxypyranocyanidin-3-(2 <sup>G</sup> -glucosylrutinosid)	5,46	6,6 10 <sup>-3</sup>	
Cyanidin-3-glucosid	0,12	2,7· 10 <sup>-4</sup>	
Cyanidin-3-rutinosid	0,10	1,7· 10 <sup>-4</sup>	
Polymerfraktion	0,64	-	

Fraktion F1 der HSCCC-Trennung eines handelsüblichen Sauerkirschsaftes

Die ermittelten Werte für die Schwellenwerte der Anthocyane der Sauerkirsche (vgl. 3.1.2.4), des Anthocyan-Derivates und der durch HSCCC-Trennung eines handelsüblichen Sauerkirschsaftes gewonnenen Polymerfraktion bei pH 3,2 sind in Tabelle 24 dargestellt. Anhand der erhaltenen Daten wird ersichtlich, dass die Polymerfraktion einen deutlich höheren Schwellenwert besitzt als die originären monomeren Anthocyane. Bei Sauerkirschsaft wirkt sich somit im Gegensatz zu den

Holundersäften ein hoher Polymergehalt negativ auf die Farbintensität des Produktes aus. Für das Vitisin-Derivat 5-Carboxypyranocyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) wurde ein extrem hoher Schwellenwert ermittelt. Betrachtet man nun im Falle des bereits in Tabelle 23 quantifizierten Sauerkirschsaftes (vgl. 3.3.4.2) die Farbaktivität FA<sub>x</sub> der einzelnen monomeren Anthocyane und des Vitisin-Derivates (bezogen auf den monomeren Gesamtgehalt), so wird deutlich, dass das Pigment Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>glucosylrutinosid mit über 60% den Großteil der Farbaktivität der Monomeren ausmacht. Dieser Befund ist erstaunlich, da es sich hierbei nicht um die monomere Hauptkomponente des Saftes handelt. Das Vitisin-Derivat trägt aufgrund des hohen Schwellenwertes nur zu ca. 3% zur Farbe der monomeren Pigmente bei, obwohl es sich bei dieser Verbindung um die Hauptkomponente handelt. Aus dem gewonnenen Resultat wird deutlich, dass bei der Herstellung und Lagerung eines Saftes die Bildung des Vitisin-Derivates und der einhergehende Abbau des Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>glucosylrutinosides) auf jeden Fall unterbunden werden sollte, da die Bildung dieser Verbindung einen negativen Einfluß auf die Farbintensität des Saftes ausübt. Abbildung 73 stellt die prozentuale Farbaktivität der Anthocyane und des Anthocyan-Derivates des untersuchten Muttersaftes der Sauerkirsche graphisch dar.



**Abbildung 73:** Prozentuale Farbaktivität FA<sub>X</sub> der originären monomeren Anthocyane und des Vitisin-Derivates des untersuchten Sauerkirschsaftes

Da auch bei Sauerkirschsäften ein beträchtlicher Anteil der Farbpigmente in polymerer Form vorliegt, wurde der prozentuale Anteil des Farbbeitrages F der monomeren Anthocyane, des Vitisin-Derivates sowie der polymeren Pigmente berechnet. Wie die Abbildung 74 zeigt, tragen die originären monomeren Anthocyane des Muttersaftes lediglich zu 16,6 % zur Farbe des Saftes bei. Der Farbbeitrag des Vitisin-Derivates ist mit ca. 0,6% vernachlässigbar gering. Der Rest von 82,8% stammt von den polymeren Farbpigmenten. Somit bestimmen die Polymere hauptsächlich die Farbe des Sauerkirschsaftes.



**Abbildung 74:** Prozentualer Farbbeitrag F der monomeren Anthocyane, des Vitisin-Derivates sowie der polymeren Pigmente des untersuchten Sauerkirschsaftes

### 3.3.5 Cranberrysaft

### 3.3.5.1 Allgemeines

Die Cranberry oder großfrüchtige Moosbeere (*Vaccinium macrocarpon*) gehört zur Familie der Heidekrautgewächse (Ericaceae) und zur Gattung *Vaccinium*. Die im Durchmesser 1 bis 2 cm große Frucht besitzt eine dunkelrote Schale, ein helles Fruchtfleisch sowie einen fruchtig-herben Geschmack. Die Cranberry blüht Ende Juni bis Anfang Juli, wobei die Ernte Mitte September beginnt und bis Anfang November dauert. In Nordamerika gibt es weit über 100 verschiedene Cranberry Sorten (CUNNINGHAM ET AL., 2004). Der Anbau und die Ernte der Cranberries zeigt eine Besonderheit. Um sie vor Frostschäden zu schützen und die Ernte effizienter zu gestalten, werden die Anbaufelder bis zu einer Höhe oberhalb der Sträucher überflutet. Diese Methode hat zum einen den Vorteil, dass das Wasser gefriert und somit die Sträucher vor Frostschäden schützt. Zum anderen können durch die Nassernte die Beeren, die durch einen Wasserstrahl vom Strauch gelöst werden und danach an der Oberfläche schwimmen, wesentlich schneller eingesammelt werden als bei einer trockenen Ernte. Riesige Anbauflächen findet man in den nördlichen Staaten der USA und in den angrenzenden kanadischen Provinzen.

Den Namen Cranberry (zu deutsch Kranichbeere) erhielt die Beere 1620 von den ersten Siedlern, die vor Neuengland strandeten, da die Blüten der Beere die Siedler an den Kopf eines Kranichs erinnerten. Die Beere besitzt in Amerika eine bereits seit mehreren Jahrhunderten gepflegte Tradition. Unter den amerikanischen Indianern wurde sie wegen ihrer heilenden Eigenschaften zur Wundpflege eingesetzt. Auch verschiedene wissenschaftliche Studien belegen. dass Cranberries der menschlichen Gesundheit förderlich sind. So wird Cranberrysaft u.a. zur Behandlung von Harnwegsinfekten verabreicht, da hierdurch ein Anhaften von Bakterien an den Wänden der Harnwege verhindert werden kann (Anti-Adhäsions-Effekt). Weitere Studien belegen, dass Cranberries aufgrund ihres außergewöhnlich hohen antioxidativen Potentials auch die Gesundheit der Herzmuskel-Gefäße unterstützen (CUNNIGHAM ET AL., 2004; PRIOR ET AL., 2001; ZUO ET AL., 2002).

Cranberry-Produkte erfreuen sich nicht nur in Amerika großer Beliebtheit. Auch in Deutschland werden Cranberries bzw. Cranberrysaft bereits als Fruchtzusätze in Joghurts oder als Zusatz zu Buntsäften verwendet.

### 3.3.5.2 Anthocyanprofil von Cranberrysäften

Abbildung 75 zeigt das Chromatogramm eines handelsüblichen Cranberrysaftes bei 520 nm. Der Cranberrysaft enthält die vier Cyanidin-Derivate Cyanidin-3-galactosid, Cyanidin-3-sambubiosid, Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-arabinosid sowie die drei Peonidin-Derivate Peonidin-3-galactosid, Peonidin-3-glucosid und Peonidin-3-arabinosid. Die Zuordnung der Peaks konnte hierbei mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> erfolgen.





Eine nachfolgende Quantifizierung der vier Hauptanthocyane Cyanidin-3-galactosid, Cyanidin-3-arabinosid, Peonidin-3-galactosid und Peonidin-3-arabinosid des Cranberrysaftes zeigt, dass dieser Saft im Gegensatz zu Holunder- oder schwarzen Johannisbeersäften mit 66,3 mg/l einen sehr niedrigen Gesamtanthocyangehalt besitzt (siehe Tab. 25). Folgende prozentuale Verteilung der Hauptanthocyane des Cranberrysaftes wurde ermittelt: 5,3% Cyanidin-3-galactosid, 2,9% Cyanidin-3arabinosid, 51,5% Peonidin-3-galactosid und 40,34% Peonidin-3-arabinosid. Cranberrysaft ist somit eines der wenigen Beispiele, bei denen Peonidin-Derivate das Anthocyanprofil des Saftes prägen. Der Anteil der polymeren Farbpigmente, welcher mit der Methode nach WROLSTAD ET AL. (1982) bestimmt wurde, ist mit 88,9% beachtlich.

**Tabelle 25:** Quantitative Bestimmung (HPLC) des Anthocyangehaltes einesCranberrysaftes mittels Standardsubstanzen

Anthocyan	Gehalte [mg/l]
Cyanidin-3-galactosid	3,5
Cyandin-3-arabinosid	1,9
Peonidin-3-galactosid	34,1
Peonidin-3-arabinosid	26,8
Gesamtgehalt an Anthocyanen	66,3

Zur Isolierung der Anthocyane aus Cranberrysaft wurde eine Fraktionierung mittels HSCCC durchgeführt. Die HSCCC-Trennung (Chromatogramm siehe Abb. 76) des XAD-7 Extraktes ergibt 4 Fraktionen.



Abbildung 76: Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Extraktes eines Cranberrysaftes bei 520 nm

Bei allen Fraktionen handelt es sich um Substanzgemische, so dass eine nachfolgende präparative Isolierung der Standardsubstanzen notwendig war. Nach Aufreinung der HSCCC-Fraktionen konnten aus Fraktion F3 die Pigmente *Cyanidin-3-galactosid* (A11) und *Peonidin-3-galactosid* (A16) isoliert werden. Aus Fraktion F4 konnten die Anthocyane *Cyanidin-3-arabinosid* (A12) und *Peonidin-3-arabinosid* (A17) gewonnen werden.

### 3.3.5.3 Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf Cranberrysäfte

Zur Simulierung des Saftmediums erfolgt die Durchführung des Farbaktivitätskonzeptes in McIIIvaine-Puffer bei einem pH-Wert von 3,0. Die ermittelten Werte für die Schwellenwerte der durch HSCCC-Trennung eines handelsüblichen Cranberrysaftes gewonnenen monomeren Anthocyane sowie der Polymerfraktion sind in Tabelle 26 dargestellt. Betrachtet man die Ergebnisse der Schwellenwertbestimmung auf molarer Basis, so wird deutlich, dass die Cyanidin-Derivate einen kleineren Schwellenwert besitzen als die Peonidin-Derivate. Der Schwellenwert für die Polymerfraktion liegt höher als die Schwellenwerte der monomeren Anthocyane. Es muß betont werden, dass ein weitaus höherer Wert als bei schwarzen Johannisbeersäften bzw. Sauerkirschsäften ermittelt wurde. Somit wirkt sich ein hoher Polymergehalt bei Cranberrysäften zwangsläufig negativ auf die Farbintensität des Saftes aus.

Tabelle 26: Schwellenwerte de	r Anthocyane der	Cranberry bei pH 3,0
-------------------------------	------------------	----------------------

Anthocyan	Schwellenwert	Schwellenwert	
-	[mg/l]	[mmol/l]	
Cyanidin-3-galactosid	0,06	1,3·10 <sup>-4</sup>	
Cyanidin-3-arabinosid	0,05	1,2· 10 <sup>-4</sup>	
Peonidin-3-galactosid	1,01	2,2·10 <sup>-4</sup>	
Peonidin-3-arabinosid	0,87	2,0·10 <sup>-4</sup>	
Polymerfraktion <sup>*</sup>	2,67	-	

Fraktion F1 der HSCCC-Trennung eines handelsüblichen Cranberrysaftes

Betrachtet man nun die Farbaktivität FA<sub>x</sub> der einzelnen monomeren Anthocyane des bereits in Tabelle 25 quantifizierten Cranberrysaftes (vgl. 3.3.5.2) bezogen auf den monomeren Gesamtgehalt, so wird deutlich, dass unter den vier Hauptanthocyanen des Cranberrysaftes das Pigment Cyanidin-3-galactosid mit ca. 35% den größten Beitrag leistet. Die drei weiteren Anthocyane zeigen mit jeweils 20-23% ein ausgeglichenes Verhältnis.



**Abbildung 77:** Prozentuale Farbaktivität FA<sub>X</sub> der monomeren Anthocyane des untersuchten Cranberrysaftes

Aus Abbildung 77 ist weiterhin ersichtlich, dass im Cranberrysaft keines der monomeren Anthocyane derart dominiert wie es bei anderen Säften, z.B. bei Holundersaft, der Fall ist.

Da auch bei Cranberrysäften ein beträchtlicher Anteil der Farbpigmente in polymerer Form vorliegt, wurde der prozentuale Anteil des Farbbeitrages F der monomeren Anthocyane sowie der polymeren Pigmente berechnet. Wie die Abbildung 78 zeigt, tragen die polymeren Farbpigmente zu 98% zur Farbe des Cranberrysaftes bei. Lediglich 2% des Farbbeitrages stammen von den monomeren Anthocyanen.



Abbildung 78: Prozentualer Farbbeitrag F der monomeren Anthocyane und der polymeren Pigmente des untersuchten Cranberrysaftes

### 3.3.5.4 Charakterisierung der farblosen Polyphenole in Cranberrysäften

Cranberries sind reich an polyphenolischen Inhaltsstoffen (VVEDENSKAYA ET AL., 2004). An phenolischen Säuren dominieren vor allem die Benzoesäure sowie die Chlorogensäure (ZUO ET AL., 2002; CUNNINGHAM ET AL., 2004). Außerdem konnten einige Glykoside der Flavonole Quercetin, Kaempferol sowie Myricetin in Cranberries charakterisiert werden (BILYK und SAPERS, 1986; YAN ET AL., 2002; VVEDENSKAYA ET AL., 2004). Zur Anreicherung der farblosen phenolischen Verbindungen des vorliegenden Cranberrysaftes wurde dieser mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Abbildung 79 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Ethylacetatextraktes des Cranberryextraktes bei 280 nm. Wie bereits vermutet, befinden sich in diesem

Extrakt eine Vielzahl an phenolischen Komponenten, welche zum Teil fast identische Retentionszeiten aufweisen. Deshalb ist eine Zuordnung der Peaks in diesem Chromatogramm nicht möglich.



Abbildung 79: HPLC-Chromatogramm des Ethylacetatextraktes eines Cranberrysaftes bei 280 nm

Abbildung 80 zeigt das Basis Peak Chromatogramm (BPC) der HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> Analyse des Ethylacetatextraktes.



**Abbildung 80:** Basis Peak Chromatogramm (BPC) des Ethylacetatextraktes eines handelsüblichen Cranberrysaftes bei 280 nm

Der erhaltene Ethylacetatextrakt wurde zur leichteren Charakterisierung und möglichen Isolierung von Reinsubstanzen mittels HSCCC fraktioniert. Abbildung 81 zeigt das Chromatogramm der HSCCC-Trennung bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm.



**Abbildung 81:** Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Ethylacetatextraktes eines Cranberrysaftes bei 280 nm

Bei der HSCCC-Trennung konnten vier Fraktionen erhalten werden. Diese Fraktionen wurden nachfolgend mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> untersucht. Die Fraktion F1 enthält eine Vielzahl an Verbindungen. Darunter sind vor allem Chlorogensäure sowie die Flavonol-Glykoside Myricetin-3-galactosid, Quercetin-3-galactosid und Quercetin-3-glucosid anzutreffen. Da es sich vor allem bei dem Myricetin-Derivat um eine nicht sehr häufig in diesen Mengen anzutreffende Verbindung handelt, ist die CCC-Fraktion F1 eine ideale Quelle zur Isolierung dieser Verbindung. In der Fraktion F2 sind ebenfalls mehrere Verbindungen enthalten, wobei die Verbindung Quercetin-3-rhamnopyranosid eine der Hauptkomponenten darstellt. Die CCC-Fraktion F3 beinhaltet vier Hauptkomponenten, von denen drei Verbindungen als Quercetin-Derivate, d.h. Quercetin-3-arabinopyranosid, Quercetin-3-arabinofuranosid sowie Quercetin-3-rhamnopyranosid identifiziert werden konnten. Die vierte Verbindung konnte nicht zugeordnet werden. Hierbei handelt es sich um eine bisher in Cranberrysaft nicht identifizierte Substanz. Die Fraktion F3 stellt eine gute Quelle zur Isolierung dieser Verbindung dar. Aus der CCC-Fraktion F4, welche als Majorkomponente Quercetin-3-rhamnopyranosid enthält, kann durch präparative Aufreinigung dieses Quercetin-Derivat leicht als Reinsubstanz isoliert werden. Der Coilrückstand enthält hauptsächlich die acetylierten Quercetin-3-galactoside sowie eine weitere unbekannte Substanz. Tabelle 27 fasst die Daten bezüglich der in den einzelnen CCC-Fraktionen enthaltenen Verbindungen zusammen.

**Tabelle 27:** ESI-MS<sup>n</sup>-Daten der Verbindungen des Ethylacetatextraktes einesCranberrysaftes

Peak	Fraktion	Verbindung**	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmente
(BPC)	(HSCCC)		( <i>m/z</i> )	( <i>m/z</i> )
1	F1	Chlorogensäure	353	191
2	F1	unbekannt	399	381/283
3	F1	Myricetin-3-galactosid	479	317
4	F1	Myricetin-3-xylopyranosid	449	317
5	_	unbekannt	458	334/172
6	F1	Myricetin-3-arabinofuranosid	449	317
7	F1	Quercetin-3-galactosid	463	301
8	F1	Quercetin-3-glucosid	463	301
9	_	unbekannt	_	_
10	_	unbekannt	_	_
11	F3	Quercetin-3-arabinopyranosid	433	301
12	F3	Quercetin-3-arabinofuranosid	433	301
13	F2/F3/F4	Quercetin-3-rhamnopyranosid	447	301
14	_	unbekannt	_	_
15	_	Methoxyquercetin-pentosid	447	315
16	Coil***	Quercetin-3-(6"-p-coumaroyl)-	609	463/301
		galactosid		
17	_	unbekannt	_	_
18	Coil***	Quercetin-3-(6"-benzoyl)-	567	301
		galactosid		
19	Coil***	unbekannt	_	_

Nummerierung der Peaks erfolgt analog der Abbildung 80 aus dem Basis Peak Chromatogramm (BPC)

\*\* Zuordnung erfolgt analog VVEDENSKAYA ET AL. (2004)

\*\*\* Coil = Rückstand, der nach erfolgter Trennung auf der Trennsäule ("Coil") zurückbleibt

Wie die Analyse des Ethylacetatextraktes eines handelsüblichen Cranberrysaftes gezeigt hat, kommen hier einige Flavonol-Glykoside vor, die in anderen Obstsorten nicht oder lediglich in geringen Mengen vertreten sind. Aufgrund dieser Tatsache ist die Isolierung und Charakterisierung dieser Verbindungen von großem Interesse. So ist zum Beispiel wenig über die antioxidative Aktivität dieser Verbindungen bekannt. Weiterhin gibt es auch keinerlei Literaturdaten über mögliche Copigmentierungseffekte dieser Verbindungen mit den Anthocyanen der Cranberry.

#### 3.3.6 Blutorangensaft

#### 3.3.6.1 Allgemeines

Blutorangen (*Citrus sinensis* L., Rutaceae) gehören zur Familie der Citrusgewächse und enthalten neben den in Orangen vorkommenden Flavonoiden zusätzlich als farbgebende Komponenten Anthocyane (HERMANN, 2001). Blutorangen stammen aus Südostasien (China) und werden heute hauptsächlich in Italien, Spanien, Algerien, Marokko und Tunesien angebaut. Der Gehalt an Anthocyanen und die Anthocyanzusammensetzung hängen dabei stark von der jeweiligen Varietät ab, wobei in allen Varietäten Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glucosid als Hauptpigmente gefunden wurden (MAZZA und MINIATI, 1993; MACCARONE ET AL., 1998; KRIFI ET AL., 2000; MONDELLO ET AL., 2000; LEE, 2002; RAPISARDA ET AL., 2003; KIRCA und CEMEROGLU, 2003). Die Varietät `Moro´ zeichnet sich durch einen besonders hohen Anthocyangehalt aus und eignet sich hervorragend zur Herstellung von frisch gepressten Blutorangensäften. So konnten in italienischen `Moro´-Blutorangen Anthocyangehalte von über 200 mg/100 ml Saft ermittelt werden (MAZZA und MINIATI, 1993)

#### 3.3.6.2 Anthocyanprofil eines handelsüblichen Blutorangensaftes

Abbildung 82 zeigt das HPLC-Chromatogramm eines handelsüblichen Blutorangensaftes bei 520 nm. Neben den zwei Hauptanthocyanen Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glucosid sind zahlreiche Minorpigmente vorhanden.

Nachfolgend wurde der XAD-7 Extrakt des handelsüblichen Blutorangensaftes mittels High-Speed Countercurrent Chromatography fraktioniert. Die Fraktionierung mittels HSCCC bietet hierbei den Vorteil, dass durch die Anreicherung der Anthocyane in den einzelnen Fraktionen eine leichtere Isolierung der Reinsubstanzen ermöglicht wird. Diese gestaltet sich aufgrund der komplexen Matrix des Saftes, welche durch den hohen Gehalt an Flavonoiden bedingt ist, ohne vorhergehende Fraktionierung vor allem bei Minorkomponenten recht schwierig. Gerade die Charakterisierung der Minorkomponenten ist von besonderem Interesse, da einige von diesen Verbindungen bisher in der Literatur nicht identifiziert werden konnten.





Abbildung 83 zeigt das Chromatogramm der HSCCC-Trennung bei 520 nm. Es wurden 8 Fraktionen sowie der Coilrückstand erhalten.



**Abbildung 83:** Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Extraktes eines handelsüblichen Blutorangensaftes bei 520 nm

Es handelt sich bei allen Fraktionen um Substanzgemische, welche nachfolgend zur Isolierung von Reinsubstanzen mittels präparativer HPLC aufgearbeitet werden mussten. Tabelle 28 fasst die gewonnen Daten bezüglich der acht charakterisierten Anthocyane der Blutorange zusammen. Aus der HSCCC Fraktion F2 konnten die Anthocyane *Cyanidin-3,5-diglucosid* (A10) und *Cyanidin-3-sophorosid* (A3) isoliert werden. Die Fraktionen F6 und F7 liefern nach Aufarbeitung jeweils die Pigmente *Delphinidin-3-glucosid* (A6) sowie *Cyanidin-3-glucosid* (A1). Bei der Fraktion F8 handelt es sich um ein Substanzgemisch, welches eine Vielzahl von Verbindungen umfasst. Hieraus konnten die Verbindungen *Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glucosid* (A15) und *Cyanidin-3-(6"-dioxalyl)-glucosid* (A18) isoliert werden. Bei dem Anthocyan Cyanidin-3-(6"-dioxalyl)-glucosid handelt es sich um ein Pigment, welches erstmals aus Blutorange isoliert werden konnte. Diese Verbindung wurde von STINTZING ET AL. (2002b) bereits in Brombeeren nachgewiesen. Das Pigment Peonidin-3-(6"-malonyl)-glucosid, welches sich ebenfalls in Fraktion F8 befindet, konnte nicht in reiner Form isoliert werden. Im Rückstand, der nach erfolgter Trennung auf der Trennsäule ("Coil") zurückbleibt, befinden sich ebenfalls eine Reihe von Verbindungen, so dass auch das Pigment Delphinidin-3-(6"-malonyl)-glucosid nicht als Reinsubstanz erhalten werden konnte.

**Tabelle 28:** Spektroskopische und chromatographische Daten der Anthocyane des frisch gepressten Blutorangensaftes der Varietät ` Moro´

Peak* (HPLC)	Fraktion (HSCCC)	Verbindung	Peak- fläche (%)	[M⁺] ( <i>m/z</i> )	Fragment ( <i>m/z</i> )
1	F2	Cyanidin-3,5-diglc <sup>a</sup>	2,1	611	449/287
2	F6	Delphinidin-3-glc <sup>ª</sup>	5,8	465	303
3	F2	Cyanidin-3-soph <sup>a</sup>	2,1	611	287
4	F7	Cyanidin-3-glc <sup>a</sup>	59,8	449	287
5	Coil**	Delphinidin-3-(6"-malonyl)-glc <sup>b</sup>	< 0,1	551	465/303
6	F8	Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glc <sup>a</sup>	21,7	535	449/287
7	F8	Cyanidin-3-(6"-dioxalyl)-glc <sup>a</sup>	5,1	593	449/287
8	F8	Peonidin-3-(6"-malonyl)-glc <sup>b</sup>	3,4	549	463/301

Abkürzungen: glc = glucosid; soph = sophorosid

\* Nummerierung der Peaks erfolgt analog der Abbildung 82

\*\* Coil = Rückstand, der nach erfolgter Trennung auf der Trennsäule ("Coil") zurückbleibt

<sup>a</sup> Strukturaufklärung mittels NMR

<sup>b</sup> Strukturzuordnung basierend auf HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> Daten

Das HPLC-Chromatogramm des Coilrückstandes zeigt weiterhin, dass sich dort weitere farbige Verbindungen mit Retentionszeiten über 40 min befinden. Bei diesen Pigmenten handelt es sich nicht um originäre Anthocyane, sondern um Anthocyan-Derivate (Pyranoanthocyane), wie sie bereits in Sauerkirschsaft nachgewiesen werden konnten. Die Strukturaufklärung dieser Substanzen ist das Ziel der laufenden Forschung.

### 3.3.6.3 Anthocyanprofil eines frischen Blutorangensaftes

Frische Blutorangen der Varietät `Moro´ wurden gepresst. Anschließend wurde der erhaltene Blutorangensaft mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> untersucht. Abbildung 84 zeigt das Chromatogramm des XAD-7 Extraktes des frisch gepressten Blutorangensaftes. Als Hauptpigmente konnten wie bereits bei dem handelsüblichen Produkt die Anthocyane Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glucosid charakterisiert werden. Bei den Minorkomponenten handelt es sich unter anderem um die Pigmente Cyanidin-3,5-diglucosid, Delphinidin-3-glucosid, Delphinidin-(6"-malonyl)-glucosid sowie Peonidin-3-(6"-malonyl)-glucosid. Diese Anthocyane wurden für die Blutorange bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (KRIFI ET AL., 2000; RAPISARDA ET AL., 2003; DUGO ET AL., 2003). Weitere, bisher in Blutorangensaft nicht identifizierte Minorkomponenten sind die Anthocyane Cyandin-3-sophorosid und Cyanidin-3-(6"-dioxalyl)-glucosid (vgl. 3.3.6.2).





Vergleicht man die Anthocyanzusammensetzung des frisch gepressten Blutorangensaftes (siehe Tab. 28) mit dem des handelsüblichen Saftes (siehe Tab. 29), so weisen die beiden Chromatogramme keine großen Unterschiede auf. Deutlich wird jedoch, dass sich das Peakflächenverhältnis der beiden Hauptanthocyane verändert hat. Während im frisch gepressten Saft ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis der beiden Pigmente beobachtet werden kann, zeigt der handelsübliche Saft, dass das Cyanidin-3-glucosid hier im Verhältnis zum Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glucosid überwiegt.

**Tabelle 29:** Prozentuales Peakflächenverhältnis der Anthocyane eines frischgepressten Blutorangensaftes der Varietät ` Moro´

Peak* (HPLC)	Verbindung	Peakfläche (%)
1	Cyanidin-3,5-diglucosid	2,5
2	Delphinidin-3-glucosid	6,6
3	Cyanidin-3-sophorosid	2,9
4	Cyanidin-3-glucosid	42,8
5	Delphinidin-3-(6"-malonyl)-glucosid	3,4
6	Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glucosid	31,6
7	Cyanidin-3-(6"-dioxalyl)-glucosid	5,8
8	Peonidin-3-(6"-malonyl)-glucosid	4,4

\* Nummerierung der Peaks erfolgt analog der Abbildung 84

Nachfolgend soll anhand von Lagerversuchen mit frisch gepresstem Blutorangensaft geklärt werden, ob diese Veränderung des Peakflächenverhältnisses durch eine Lagerung des Saftes hervorgerufen werden kann.

# 3.3.6.4 Einfluss der Lagerung auf das Anthocyanprofil

Es soll der Einfluss der Lagerung auf das Anthocyanprofil eines frisch gepressten Blutorangensaftes der Varietät `Moro´ untersucht werden. Dazu werden die Anthocyane des Saftes mittels HPLC quantifiziert.

Tabelle 30 listet zum Vergleich den Gesamtanthocyangehalt eines frisch gepressten Blutorangensaftes und von vier handelsüblichen Blutorangensäften auf. Hierbei wird deutlich, dass der frisch gepresste Saft mit 215 mg/l den mit Abstand höchsten Gesamtanthocyangehalt aufweist. Die handelsüblichen Produkte besitzen einen wesentlich niedrigeren Gehalt im Bereich von 81 bis 159 mg/l. Tabelle 30: Gesamtanthocyangehalt verschiedener Blutorangensäfte

Saft	Anthocyangehalt ber. als		
	Cy-3-glc [mg/l]		
frisch gepresster Blutorangensaft*	215		
pasteurisierter Blutorangensaft**	139		
direkt gepresster Blutorangensaft	121		
Blutorangensaft***	159		
pasteurisierter Blutorangensaft***	81		
* Varietät `M oro´			

\*\* Varietät `Sanguinello

\*\*\* ohne Angaben

Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme eines frisch gepressten Blutorangensaftes während einer Lagerdauer von drei Monaten zeigt, dass am Ende der Lagerdauer kaum noch monomere Anthocyane vorliegen. Der Gesamtanthocyangehalt (berechnet als Cyanidin-3-glucosid) sinkt von 215 mg/l auf weit unter 10 mg/l. Tabelle 31 zeigt die relativen prozentualen Peakflächen während der Lagerung von drei Monaten.

**Tabelle 31:** Einfluss der Lagerung auf die relativen prozentualen Peakflächen einesfrisch gepressten Blutorangensaftes

Anthocyan Peakfläche [%]	Beginn	Monat 1	Monat 2	Monat 3
Cy-3,5-diglc	2,5	5,1	8,2	6,7
Del-3-glc	6,6	9,5	10,6	10,8
Cy-3-soph	2,9	5,3	8,4	9,5
Cy-3-glc	42,8	42,5	38,3	49,6
Del-3-(6"-malonyl)-glc	3,4	4,1	0,1	9,2
Cy-3-(6"-malonyl)-glc	31,6	19,6	17,1	2,5
Cy-3(6"-dioxalyl)-glc	5,8	7,4	8,5	1,1
Peo-3-(6"-malonyl)-glc	4,4	6,5	8,8	10,6

Abkürzungen: Del = Delphinidin;Cy = Cyanidin; Peo = Peonidin; glc = glucosid; soph = sophorosid

Der prozentuale Anteil des Hauptanthocyans Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glucosid wird mit der Lagerung immer geringer. Aus den gewonnenen Daten kann somit geschlossen werden, dass das acetylierte Anthocyan Cyanidin-3-(6"-malonyl)glucosid noch instabiler ist als das Cyanidin-3-glucosid. Das Produkt Blutorangensaft ist deshalb aufgrund seiner zwei sehr labilen Hauptpigmente als sehr empfindlich einzustufen. Dieses sollte in jedem Fall bei der Herstellung und Lagerung des Saftes Berücksichtigung finden. Eine Lagerdauer von 12 bis 24 Monaten führt somit zwangsläufig zu einer negativen Beeinflussung der Farbe des Saftes. Von wesentlich besserer Qualität bezüglich der Farbe sind pasteurisierte Direkt- oder Presssäfte, welche lediglich ein MHD von mehreren Wochen besitzen. Diese werden im Handel in Tetrapacks unter Kühlung verkauft.

# 3.3.7 Aroniasaft

### 3.3.7.1 Allgemeines

Während Aroniafrüchte im rohen Zustand herb-adstringierend schmecken, weist der Saft einen leicht bittermandelartigen Geruch und ein herbes Aroma auf. Die Saftausbeute der Aroniafrucht beträgt 75-80%. Der Saft wird von der verarbeitenden Industrie als natürlicher Farbstoff geschätzt, da die dunkelrote Färbung auch noch bei starker Verdünnung erkennbar ist. Außerdem lässt sich durch Aroniasaft der Geschmack und die Farbe von sauren Säften verbessern (ZEITLHÖFLER, 2001). Daher wird Aroniasaft vielfach als Komponente von Mehrfruchtsäften verwendet.

# 3.3.7.2 Anthocyanprofil von Aroniasäften

Die quantitative Untersuchung eines handelsüblichen Aroniasaftes mittels HPLC ergab, dass dieser Saft lediglich einen Gesamtanthocyangehalt von 18,6 mg/l (berechnet als Cyanidin-3-glucosid) enthält. Abbildung 85 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Aroniasaftes bei 520 nm. Die Zuordnung der Anthocyane erfolgt hierbei über HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> (vgl. 3.1.2.9).

Der XAD-7 Extrakt des Aroniasaftes wird nachfolgend zur Isolierung und Charakterisierung der Anthocyane einer HSCCC-Trennung unterzogen. Abbildung 86 zeigt das Chromatogramm der HSCCC-Trennung bei 520 nm. Es konnten 4 Fraktionen sowie der Coilrückstand erhalten werden. Die Analyse der einzelnen Fraktionen mittels HPLC-DAD ergab, dass es sich bei jeder Fraktion um Substanzgemische handelt, welche zur Isolierung der Einzelsubstanzen mittels präparativer HPLC aufgereinigt werden mussten.





Aus der CCC-Fraktion F3 konnten 6,3 mg *Cyanidin-3-galactosid* (A11) isoliert werden. Die CCC-Fraktion F4 lieferte 1,2 mg *Cyanidin-3-arabinosid* (A12).



**Abbildung 86:** Chromatogramm der HSCCC-Trennung des XAD-7 Extraktes eines handelsüblichen Aroniasaftes bei 520 nm

#### 3.3.7.3 Charakterisierung der farblosen Polyphenole in Aroniasäften

Da in allen Fraktionen der HSCCC-Trennung weiterhin eine Vielzahl an farblosen phenolischen Komponenten vorhanden war, wurden diese ebenfalls mittels präparativer HPLC aus den einzelnen CCC-Fraktionen (vgl. 3.3.7.2) isoliert und charakterisiert. Über das polyphenolische Profil von Aroniasäften konnte in der Literatur nichts gefunden werden. Abbildung 87 zeigt das HPLC-Chromatogramm eines handelsüblichen Aroniasaftes bei 280 nm.



**Abbildung 87:** HPLC-Chromatogramm eines handelsüblichen Aroniasaftes bei 280 nm (Es wurde abweichend vom experimentellem Teil als Trennsäule eine "Luna" von Phenomenex sowie der Gradient und das Fließmittelsystem für die Anthocyananalyse verwendet.)

Abbildung 88 zeigt das Basis-Peak-Chromatogramm des XAD-7 Extraktes eines handelsüblichen Aroniasaftes. Die beiden Hauptkomponenten Peak 1 und Peak 3 (vgl. Abb. 87) konnten als Neochlorogensäure und Chlorogensäure identifiziert werden, wobei die *Neochlorogensäure* (C1) aus der CCC-Fraktion 4 isoliert werden konnte. Die *Chlorogensäure* (C2) konnte mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> im Coilrückstand nachgewiesen werden. Bei Peak 2 handelt es sich um die *Protocatechusäure* (C5), welche sich ebenfalls im Coilrückstand befindet und bereits aus Holundersaft isoliert werden konnte. Die Protocatechusäure konnte hierbei lediglich im HPLC-Chromatogramm (vgl. Abb. 87) detektiert werden. Das Basis-Peak-Chromatogramm (vgl. Abb. 88) zeigt aufgrund der schlechten lonisierung dieser Verbindung hingegen keinen Peak. Die ESI-MS<sup>n</sup>-Analyse der CCC-Fraktion F3 liefert im negativen Modus ein weiteres Pseudomolekülion mit *m/z* 353 und den Fragmenten mit *m/z* von 191, 179, 173 sowie 135. Dieses Abspaltungsmuster deutet auf eine weitere Verbindung hin, in der Kaffeesäure mit Chinasäure verknüpft vorliegt. Die genaue Struktur dieser

Verbindung konnte jedoch nicht ermittelt werden, da von dieser Verbindung keine NMR-Daten erhalten werden konnten. Bei den Peaks 5 und 6, welche aus der CCC-Fraktion F3 isoliert werden konnten, handelt es sich um zwei Quercetin-Derivate mit identischen Massen. Die Pseudomolekülionen [M-H]<sup>-</sup> mit einer Masse von m/z 625 spalten jeweils ein Fragment mit der Masse m/z von 324 ab. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Dissacharid, welches aus zwei Hexosen besteht. Die aus dem <sup>1</sup>H-NMR dieser beiden Verbindungen erhaltenen Daten unterstreichen diese Vermutung. Leider kann anhand des vorhandenen Datensatzes weder die Position der Verknüpfung des Zuckers mit dem Aglykon noch die genaue Benennung der Zuckerkomponenten erfolgen. Peak 7 ist ebenfalls ein Quercetin-Derivat, welches aufgrund des Abspaltungsmusters ebenfalls ein Disaccharid enthält. Hierbei handelt es sich um einen Zucker mit der Masse m/z von 162 (z.B. Glucose) und einen weiteren Zucker mit einer Masse m/z von 132 (z.B. Xylose). Da eine Isolierung dieser Verbindung nicht gelang, konnte diese jedoch nicht abschließend charakterisiert werden. Bei den Peaks 8 und 9 handelt es sich wiederum um zwei Quercetin-Derivate, welche eine identische Masse von m/z von 609 (neg. Modus) besitzen. Peak 8 konnte nicht weiter identifiziert werden. Peak 9 erwies sich als Quercetin-3-rutinosid (C3). Bei den beiden letzten Peaks handelt es sich um die Quercetin-Derivate Quercetin-3-galactosid sowie Quercetin-3-glucosid, welche sich in CCC-Fraktion F4 bzw. dem Coilrückstand befinden.



**Abbildung 88:** Basis-Peak-Chromatogramm des XAD-7 Extraktes eines handelsüblichen Aroniasaftes
Die erhaltenen Daten bezüglich der aus Aroniasaft charakterisierten Copigmente sind zusammenfassend in Tabelle 32 aufgelistet.

Peak <sup>*</sup> (HPLC)	Fraktion (HSCCC)	Verbindung	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	Fragmente ( <i>m/z</i> )
1	F4	Neochlorogensäure <sup>a</sup>	353	191
2	Coil	Protocatechusäure <sup>a</sup>	153 <sup>°</sup>	109 <sup>°</sup>
3	Coil <sup>**</sup>	Chlorogensäure <sup>a</sup>	353	191
4	F3	Verbindung aus Chinasäure	353	135/173/
		und Kaffeesäure <sup>b</sup>		179/191
5	F3	Quercetin-Derivat <sup>b</sup>	625	301
6	F3	Quercetin-Derivat <sup>b</sup>	625	301
7	Coil <sup>**</sup>	Quercetin-Derivat <sup>b</sup>	595	301
8	F4	Quercetin-Derivat <sup>b</sup>	609	301
9	F4/ Coil	Quercetin-3-rutinosid <sup>a</sup>	609	301
10	F4/ Coil <sup>**</sup>	Quercetin-3-galactosid <sup>b</sup>	463	301
11	Coil <sup>**</sup>	Quercetin-3-glucosid <sup>b</sup>	463	301

Tabelle 32: ESI-MS<sup>n</sup>-Daten der Copigmente eines handelsüblichen Aroniasaftes

Nummerierung der Peaks erfolgt analog den Abbildungen 87 und 88 \*\* Coil = Rückstand, der nach erfolgter Trennung auf dem Coil zurückbleibt

<sup>a</sup> Strukturaufklärung mittels NMR

<sup>b</sup> Strukturen basierend auf HPLC-ESI MS<sup>n</sup> Daten <sup>c</sup> basierend auf ESI-MS<sup>n</sup>-Analyse der Reinsubstanz

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Probenmaterial und Chemikalien

#### 4.1.1 Verwendete Früchte und Fruchtsäfte

#### 4.1.1.1 Früchte

- a) Es wurden folgende Früchte, Fruchtschalen und Fruchkonzentrate zur Isolierung und Charakterisierung von Reinsubstanzen aufgearbeitet:
- Schalen der violetten Passionsfrucht (Passiflora edulis)
- frische und gefrorene deutsche Himbeeren (*Rubus idaeus*)
- frische italienische Süßkirschen (Prunus avium)
- Schalen frischer deutscher Schattenmorellen (Prunus cereasus)
- Schalen frischer deutscher schwarzer Johannisbeeren (*Ribes nigrum*) und frische deutsche rote Johannisbeeren (*Ribes ribrum*)
- Schalen frischer deutscher Pflaumen (*Prunus domestica*)
- frische deutsche Taybeeren (Rubus loganobaccus "Tayberry")
- frische Corozo (Bactris major)
- Holunderextrakt HE 501010 der Firma Dr. Marcus (Sambucus nigra L.)
- Aronia-Konzentrat (989007) der Firma Dr. Marcus (Aronia melanocarpa)
- frische Blutorangen der Varietät `Moro' (Citrus sinensis L., Rutaceae)
- b) Folgende Früchte wurden zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität (TEAC-Test) und des Polyphenolgehaltes herangezogen:
- Corozo (Bactris major)
- Mora de castilla (*Rubus glaucus*)
- Lulo (Solanum quitoense)
- Cocona (Solanum sessiliflorum)
- Araźa (Eugenia stipitata)
- Champa (Campomanesia lineatifolia)
- Circuela calentana (Spondias purpurea)

- Ubos (*Spondias mombin*)
- Zapate costeño (Pouteria sapota)
- Agraz (Vaccinium floribundum)
- Tamarillo (*Solanum betaceum*)
- Melón de olor (Sicana odorifera)

#### 4.1.1.2 Fruchtsäfte

Bei allen Säften handelt es sich um Säfte mit einem Fruchtgehalt von 100%.

Tab. 33: Herstellerverzeichnis heller und roter Fruchtsäfte, die zur Analytikeingesetzt wurden

Saft	Hersteller
Ananassaft	Amecke's
Apfelsaft	Rabenhorst
Apfelsinensaft	Amecke's
Aprikosensaft	Eden
Aroniasaft	Eden
Blutorangensaft	Voelkel
Blutorangensaft	Naturgarten
Blutorangensaft	La Sienna
Blutorangensaft	Paradise fresh
Blutorangensaft	Tropicana
Brombeersaft	Eden
Cranberry-Saft	Rabenhorst
Granatapfelsaft	Eden
Grapefruitsaft	Paradiso
Heidelbeersaft	Eden
heller Traubensaft	Rabenhorst
Himbeersaft	Eden
Holundersaft	Bavaria
Holundersaft	Dr. Demuth
Holundersaft	Dr. Groß
Holundersaft	Eden
Holundersaft	Grünfink
Holundersaft	Grünland
Holundersaft	Naturgarten
Holundersaft	Schmieder
Holundersaft	Vitaborn
Holundersaft	Voelkel
Holundersaft	Walther's
Orangensaft	Eden
Orangensaft	Frispa

Saft	Hersteller
Pflaumensaft	Rabenhorst
Preiselbeersaft	Rabenhorst
Preiselbeersaft	Voelkel
Quittensaft	Promologie
roter Johannisbeersaft	Eden
roter Traubensaft	Becker's
roter Traubensaft	Chantino
roter Traubensaft	Eden
roter Traubensaft	Vaihinger
roter Traubensaft	Voelkel
Sauerkirschsaft	Eden
schwarzer Johannisbeersaft	Eden
schwarzer Johannisbeersaft	Voelkel
Zitronensaft	Rabenhorst

#### 4.1.2 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

- Acetonitril: für HPLC, Acros, New Jersey (USA)
- Acetonitril-d<sub>3</sub>: Lichrosolv<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt
- Amberlite XAD-7: Merck, Darmstadt
- Ameisensäure: p.a., 98-100%, Merck, Darmstadt
- *2,2<sup>-</sup>-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), Diammonium-Salz*. mind. 98%, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Citronensäure: wasserfrei, p.a., Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)
- *Chlorogensäure (Hemihydrat)*: purum, > 98,0%, Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)
- *Dimethylsulfoxid-d*<sub>6</sub>: 99,8%, Deutero GmbH, Kastellaun
- D<sub>2</sub>O: Deutero GmbH, Kastellaun
- Essigsäure: p.a., 99-100%, Riedel-de Haën, Seelze
- Ethanol: p.a., mind. 99,8 Vol%, Riedel-de Haën, Seelze
- Ethylacetat: für HPLC, Acros, New Jersey (USA)
- Folin-Ciocalteau Phenolreagenz: Merck, Darmstadt
- Gallussäure (Monohydrat): Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)
- Kaliumpersulfat: p.a., Riedel-de Haën, Seelze
- Methanol: techn.
- Methanol-d<sub>4</sub>: mind. 99,8%, Merck, Darmstadt
- Natriumcarbonat (Decahydrat): mind. 99%, Riedel-de Haën, Seelze
- *Natriumhydrogencarbonat (Dihydrat)*:p.a., Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)

- *n-Butanol*: p.a., Fisher Chemicals, Loughborough (UK)
- *n-Hexan*: für HPLC, 95%, Acros, New Jersey (USA)
- Quercetin (Dihydrat): Aldrich Chemical, Milwaukee (USA)
- Rutin: 95%, Sigma Chemical, St. Louis (USA)
- *Quercetin-3-glucosid*: > 90% (HPLC), Fluka BioChemika, Buchs (Schweiz)
- Schwefeldioxid-Lösung: 5-6% in Wasser, p.a., Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)
- tert-Butylmethylether. techn.
- *Trifluoressigsäure*: purum, > 98,0%, Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)
- Trifluoressigsäure-d<sub>1</sub>: 99,8%, Deutero GmbH, Kastellaun
- *Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)*: purum, > 98%,
   Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)

#### 4.2 Präparativer Teil

#### 4.2.1 Geräte und Parameter

#### 4.2.1.1 Photometer

Gerät:	Shimazu UV-2101 PC UV/VIS, Scanning Spectrophotometer
Software:	Mitac, Mistation 2, UV-PC
Wellenlänge:	190-600

#### 4.2.1.2 pH-Meter

Gerät: Metrohm 605 pH-Meter

#### 4.2.1.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

a) analytisch:

Pumpe:	Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Gradientenformer:	Niederdruckgradientenformer Jasco LG 980-02, ternary Gradient
	Unit
Detektor:	Jasco MD-910 Multiwavelength detector

Degaser:	Jasco DG-980-50 3-Line-Degaser
Injektor:	Rheodyne 7125 mit 20 $\mu l$ Probenschleife
Software:	Borwin-PDA Version 1.0

b) präparativ:

Pumpe:	Knauer HPLC Pump 64
Detektor:	Knauer Variable wavelength Monitor
Injektor:	Rheodyne mit 500 $\mu$ l Probenschleife
Software:	Knauer HPLC Software 2.0

## 4.2.1.4 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Gerät:	High Speed model CCC-1000
	Pharma-Tech Research Corporation, Baltimore, Maryland, USA,
	Triplecoil, Gesamtvolumen 850 ml
Pumpe:	Biotronik HPLC-Pump-BT 3020, Jasco
Fraktionensammle	r:Pharmacia LKB Super Frac fraction collector
Detektor:	Knauer UV-Vis Detektor

#### 4.2.1.5 Massenspektrometrie (MS)

Gerät:	Bruker	Esquire-LC-MS/MS,	Electrospray	Ionization	lon	Trap
	Multiple	Mass Spectrometry				
Spritzenpumpe:	Cole Pa	urmer®, 74900 series,	Cole-Parmer	Instrument (	Comp	bany
Fluß:	240 μl/h	l				

# 4.2.1.6 Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Gerät:	Bruker	Esquire-LC-MS/MS,	Electrospray	Ionization	lon	Trap
	Multiple	Mass Spectrometry				
Pumpe:	Hewlett	-Packard Series 1000	, G 1328 A Bir	n pump		
Injektor:	Rheody	ne, 20 μl Injektionsscl	hleife			
Detektor:	Merck H	litachi L-4000 UV-Det	ektor			

Schreiber:	Shimadzu C-R 6A Chromatopac
Software:	HP Kayat XA, HP Chemstation, Esquire Control

# 4.2.1.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie - Nuclear Magnetic Resonance-Spektroskopie (LC-NMR)

Gerät:	Bruker	DRX-600	ausgestattet	mit	einem	4	mm	<sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C-
	Durchflu	ıßprobenko	pf (Volumen 12	20 µl)				
Pumpe:	Hewlett-	Packard HF	P 1100					
Detektor:	Bruker [	DAD UV						
Software:	Bruker H	lyStar data	system					

#### 4.2.1.8 Verwendte Säulen

- a) analytisch
- 1. für die Anthocyan-Analytik: Luna 5 $\mu$  C18 (2), 250 × 4,6 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
- 2. für die Analytik der Copigmente: Nucleosil 5 $\mu$  C18 (ODS), 250 × 2,0 mm 5 micron (Phenomenex, Aschaffenburg)
- b) präparativ
- 1. Luna  $5\mu$  (18/2),  $250 \times 10$  mm mit Vorsäule (Phenomenex, Aschaffenburg)

#### 4.2.1.9 Verwendte Fließmittelsysteme und Gradienten

a) analytisch

System A:	Anthocyananalytik
Fließmittel A:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 87:3:10 (v:v:v)
Fließmittel B:	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 40:50:10 (v:v:v)
Fluß:	0,5 ml/min
Gradient:	0 min 6% B, 20 min 20% B, 35 min 40% B, 40 min 60% B, 45
	min 90% B, 55 min 6% B

System B:	Analytik der Copigmente
Fließmittel A:	2% ige Essigsäure
Fließmittel B:	Wasser/Acetonitril 20:80 (v:v)
Fluß:	0,35 ml/min
Gradient:	0 min 10% B, 30 min 35% B, 35 min 75% B, 45 min 10% B
System C:	LC-NMR-Analytik
Fließmittel A:	D <sub>2</sub> O + 0,1% TFA-d <sub>1</sub>
Fließmittel B:	Acetonitril-d <sub>3</sub> + 0,1% TFA-d <sub>1</sub>
Fluß:	0,8 ml/min
Gradient:	0 min 5% B, 35 min 70% B, 40 min 95% B

b) präparativ

System	Fließmittel (v:v:v)	Fluß [ml/min]
A	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 7,5:87,5:5	4,0
В	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 10:85:5	4,0
С	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 15:80:5	4,0

# 4.2.2 Methoden zur Aufreinigung und Isolierung von Anthocyanen aus Früchten, Fruchtkonzentraten, Fruchtschalen und Fruchtsäften

#### 4.2.2.1 Extraktion von Früchten

a) Extraktion mit Methanol/Essigsäure (19:1):

Zur Isolierung der Anthocyane aus verschiedenen Früchten wurden die unter 4.1.1.1 a) angegebenen Früchte bzw. Fruchtschalen zerkleinert und mittels eines Gemisches aus Methanol/Eisessig 19:1 (v:v) für 8 Stunden unter Rühren extrahiert. Nach Filtration wird der Rohextrakt eingeengt, gefriergetrocknet und wie unter 4.2.2.3 beschrieben weiter bearbeitet.

b) Extraktion mit Wasser:

Für die Bestimmung des Polyphenolgehaltes und der antioxidativen Aktivität werden die unter 4.1.1.1 b) angegebenen Früchte bzw. Fruchtteile zerkleinert, homogenisiert

und mit H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Filtration wird der wässrige Extrakt gefriergetrocknet. Anschließend wird der Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteau (s. 4.3.1.1) und die antioxidative Aktivität mittels TEAC-Assay (s. 4.3.1.2) bestimmt.

#### 4.2.2.2 Extraktion von roten Fruchtsäften (Ethylacetatextrakt)

Zur Abtrennung der nichtfarbigen phenolischen Komponenten (sog. Copigmente) werden jeweils 75 ml roter Fruchtsaft mit demineralisiertem Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt und jeweils dreimal mit 150 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wird über Natriumsulfat getrocknet und abrotiert. Der verbleibende Rückstand wird in demineralisiertem Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Ethylacetatextrakte werden ohne weitere Aufarbeitung einer Fraktionierung mittels HSCCC wie unter 4.2.2.4 beschrieben unterzogen. Tabelle 34 zeigt die dabei erhaltenen Ausbeuten.

#### Tab. 34: Ausbeuten der Ethylacetatextrakte roter Fruchtsäfte

Fruchtsaft	Ausgangsmaterial [ml]	Extrakt Ausbeute [g]
Holundersaft (Voelkel)	2100	1,52
Cranberrysaft (Rabenhorst)	990	2,39

#### 4.2.2.3 Adsorptionschromatographie an Amberlite<sup>®</sup> XAD-7

Zur Anreicherung der Anthocyane aus den unter 4.2.2.1 a) erhaltenen Rohextrakten wurde eine Chromatographiesäule mit Amberlite<sup>®</sup> XAD-7 gefüllt (Durchmesser 6 cm, Füllhöhe 45 cm). Die Rohextrakte, das Aroniakonzentrat sowie der Holunderextrakt werden mit Wasser verdünnt und mit Eisessig angesäuert. Die Säfte hingegen setzt man ohne weitere Verdünnung ein. Nach Aufgabe der Proben wird mit ca. 2 Litern demineralisiertem Wasser gewaschen und mit einem Gemisch aus Methanol/Essigsäure 19:1 (v:v) eluiert. Abschließend werden die XAD-7 Extrakte eingeengt und gefriergetrocknet. Tabelle 35 und 36 zeigen die Ausbeuten an XAD-7 Extrakt für die jeweiligen Früchte und Säfte.

Frucht	Ausgangsmaterial [g]	XAD-7 Ausbeute [g]
Violette Passionsfrucht	752 (51) *	0,55
Himbeere	203	0,15
Süßkirsche	1014	1,00
Schattenmorelle	997 (274) <sup>*</sup>	2,17
schwarze Johannisbeere	500 (180) <sup>*</sup>	1,88
rote Johannisbeere	540	0,61
Taybeere	284	1,03
Pflaume	989 (114) <sup>*</sup>	1.02
Corozo	1034	0,99
Blutorange (frisch gepreßt)	1000	2,41
Aronia-Konzentrat	400	6,22
Holunderextrakt	50	3,42

Tab. 35: Ausbeuten an XAD-7 Extrakt der Rohextrakte aus 4.2.2.1

die Angaben in Klammern beziehen sich auf den Schalenanteil des Ausgangsmaterials

Tab. 36: Ausbeuten an XAD-7 Extrakt der eingesetzten Fruchtsäfte

Fruchtsaft	Ausgangsmaterial [ml]	XAD-7 Ausbeute [g]
Blutorangensaft (Voelkel)	700	1,03
Aroniasaft (Eden)	330	2,47
Cranberrysaft (Rabenhorst)	330	0,83

## 4.2.2.4 Trennung eines XAD-7 Extraktes mittels High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Die aus 4.2.2.3 erhaltenen XAD-7 Extrakte sowie die aus 4.2.2.2 erhaltenen Ethylacetatextrakte wurden mittels HSCCC fraktioniert. Die Reinheit der hierbei erhaltenen Fraktionen wird über HPLC-DAD kontrolliert. Tabelle 37 listet die jeweils verwendeten chromatographischen Bedingungen, die aufgetragene Probenmenge und die erhaltenen Fraktionen pro HSCCC-Lauf. Alle Läufe wurden im "Head to Tail"-Modus durchgeführt (leichte Phase als stationäre Phase).

Tab. 37:ChromatographischeBedingungenundAusbeutenderHSCCC-Trennungen

Probe	Fließmittelsystem, Flußrate	XAD-7	Frakt.	Ausb.
		[mg]		[mg]
violette Passions-	TBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	544	F1	29
frucht	1:3:5:1 +0,1% TFA		F2	13
(Schale)			F3	15
	Flußrate: 4,0 ml/min		F4	12
			F5	20
			F6	14
			F7	7
			F8	43
Himbeere	TBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	158	F1	50
	1:3:5:1 +0,1% TFA		F2	2
			F3	9
	Flußrate: 2,5 ml/min bis 320		F4	4
	min, danach 5,0 ml/min		F5	18
			F6	8
			F7	16
			Coil	34
Süßkirsche	TBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	580	F1	155
	1:3:1:5 +0,1% TFA		F2	46
			F3	19
	Flußrate: 4 ml/min		F4	13
Schattenmorelle	IBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	720	F1	21
(Schale)	1:3:1:5 +0,1% IFA		F2	99
			F3	13
	Fluisrate: 4,0 mi/min			20
			F5	82
		700	F0	31
Schw. Jonannisbeere	$1 \text{ BWE/n-BUOH/ACEIONIIII/H}_2O$	793		105
(Schale)	1.3.1.5 +0,1% IFA			135
	Elugrato: 4.0 ml/min		го ⊏4	179
			F4 E5	42 20
				29
roto lobannishooro	TBME/n-BuOH/Acotonitril/H-O	552		99
		552	E2	32
	1.0.1.3 +0,1 /0 11 A		F3	1/
	Flußrate: 4.0 ml/min		F1	5
			F5	170
			F6	19
			F7	23
			F8	11

Probe	Fließmittelsystem, Flußrate	XAD-7	Frakt.	Ausb.
		[mg]		[mg]
Taybeere	TBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	900	F1	66
	1:3:1:5 +0,1% TFA		F2	112
			F3	101
	Flußrate: 4 ml/min		F4	14
			F5	13
			F6	10
Pflaume	TBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	630	F1	19
(Schale)	2:2:1:5 +0,1% TFA		F2	34
			F3	27
	Flußrate: 4,0 ml/min		F4	76
			F5	14
			F6	80
			Coil	105
Corozo	TBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	992	F1	234
	2:2:1:5 +0,1% TFA		F2	47
			F3	98
	Flußrate: 4,0 ml/min		F4	30
			F5	16
			F6	31
			Coil	104
Aronia-Konzentrat	TBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	2200	F1	614
	2:2:1:5 +0,1% IFA		F2	220
			F3	97
	Flußrate: 5,0 ml/min		F4 stat	80
				86
				20
Holunderextrakt	IBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	816	F1	78
	1:3:1:5 +0,1% IFA		F2	62
			F3	23
	FluBrate: 5,0 ml/min bzw. 2,5		F4	42
	mi/min		F5	82
			F6	17
				9
A ' ()		000	F8	38
Aroniasaft	I BME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	800	F1	420
	2.2.1.3 +0,1% IFA		F2	69
			F3	45
	Fiuisrate: 4,0 mi/min			35
			Coll	26

Probe	Fließmittelsystem, Flußrate	XAD-7	Frakt.	Ausb.
		[mg]		[mg]
Cranberrysaft	TBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	626	F1	122
-	2:2:1:5 +0,1% TFA		F2	19
			F3	34
	Flußrate: 3,5 ml/min		F4	15
			Coil <sup>*</sup>	47
Blutorangensaft	TBME/n-BuOH/Acetonitril/H <sub>2</sub> O	840	F1	200
	1:3:1:5 +0,1% TFA		F2	35
			F3	30
	Flußrate: 4,0 ml/min		F4	69
			F5	9
			F6	23
			F7	885
			F8	32
			Coil	51
Ethylacetatextrakt	Hexan/Ethylacetat/MeOH/H <sub>2</sub> O	1523	F1	896
von Holundersaft	1:5:1:5		F2	10
			F3	7
	Flußrate: 2,9 ml/min		F4	8
			F5	10
			F6	32
Ethylacetatextrakt	Hexan/Ethylacetat/MeOH/H <sub>2</sub> O	2396	F1	234
von Cranberrysaft	1:5:1:5		F2	44
			F3	68
	Flußrate: 2,9 ml/min		F4	2

Rückstände, die nach der Trennung auf dem System verbleiben (stat. = stationäre Phase, mobil = mobile Phase)

#### 4.2.3 Versuche zur Copigmentierung von Anthocyanen in Holunder

# 4.2.3.1 Einfluß verschiedener Verhältnisse von Copigment zu Anthocyan (C/A-Verhältnis)

Von den vier im Holunder vorkommenden Anthocyanen Cyanidin-3-glucosid (Cy-3glc), Cyanidin-3-sambubiosid (Cy-3-samb), Cyanidin-3,5-diglucosid (Cy-3,5-diglc) und Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid (Cy-3-samb-5-glc) werden 0,445 mmolare Lösungen in McIIIvaine-Puffer (pH =3,6, vgl. 4.2.4.2 a) hergestellt. Von den drei im Holunder in der Hauptsache vorkommenden Copigmenten Rutin, Quercetin-3glucosid und Chlorogensäure wird jeweils eine Lösung mit der Konzentration von 11,3 mmol/l in McIIIvaine-Puffer (pH = 3,6) hergestellt. Aus diesen Copigmentlösungen (Stammlösungen) werden verschiedene Meßlösungen mit einer molaren Konzentration von 4,5 mmol/l, 2,25 mmol/l und 0,445 mmol/l hergestellt. Es werden nun jeweils 1 ml der betreffenden Anthocyanlösung mit je 1 ml demineralisiertem Wasser bzw. 1 ml der verschiedenen Copigmentlösungen in einer Küvette (Schichtdicke 1 cm) vermischt, wobei C/A-Verhältnisse von 0, 1, 5 und 10 erhaltenen werden. Photometrisch bestimmt wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums, die Absorption im Maximum und die Veränderung des Absorptionsmaximums der Anthocyanlösung. Die Tabellen 38 bis 41 enthalten die Meßdaten für die jeweiligen Anthocyane.

Copigment	C/A	A (520 nm)	λ <sub>max</sub>	A bei $\lambda_{max}$
			511.0	0.000
	0	0,896	511,8	0,906
Rutin	1	1,076	518,4	1,072
	5	1,216	527,2	1,269
	10	1,247	530,6	1,299
	0	0,896	512	0,906
Quercetin-B-D-glucosid	1	1,275	517,2	1,288
	5	1,486	525,2	1,477
	10	1,619	527,2	1,625
	0	0,896	512,4	0,906
Chlorogensäure	1	0,930	513	0,867
	5	0,977	514,4	0,982
	10	1,186	517,4	1,186

Tab. 38: Einfluß des Copigmentes auf das Anthocyan Cy-3-glc

Tab. 39: Einfluß des Copigmentes auf das Anthocyan Cy-3-samb

Copigment	C/A	A (520 nm)	$\lambda_{max}$	A bei λ <sub>max</sub>
	0	0,862	511,8	0,887
Rutin	1	1,035	517	1,030
	5	1,086	526,2	1,140
	10	1,094	527,8	1,448
	0	0,862	513,6	0,887
Quercetin-B-D-glucosid	1	0,847	517	0,952
	5	0,993	525	1,001
	10	1,033	527,4	1,081
	0	0,862	513	0,887
Chlorogensäure	1	0,942	513,8	0,958
	5	1,013	516	1,008
	10	1,081	518	1,084

**Tab. 40:** Einfluß des Copigmentes auf das Anthocyan Cy-3-samb-5-glc

Copigment	C/A	A (520 nm)	$\lambda_{max}$	A bei $\lambda_{max}$
	0	0,333	513	0,332
Rutin	1	0,342	513,4	0,348
	5	0,368	518	0,388
	10	0,425	519	0,655
	0	0,333	512,6	0,330
Quercetin-B-D-glucosid	1	0,408	512,2	0,426
	5	0,441	513,2	0,437
	10	0,478	513,4	0,486
	0	0,333	522,8	0,332
Chlorogensäure	1	0,345	522,6	0,348
	5	0,350	523,2	0,353
	10	0,355	524	0,340

**Tab. 41:** Einfluß des Copigmentes auf das Anthocyan Cy-3,5-diglc

Copigment	C/A	A (520 nm)	$\lambda_{max}$	A bei $\lambda_{max}$
	0	0,521	512,2	0,547
Rutin	1	0,640	516,4	0,625
	5	0,710	523,6	0,680
	10	0,724	526,6	0,715
	0	0,521	512,2	0,547
Quercetin-B-D-glc	1	0,640	516	0,554
	5	0,710	521,8	0,588
	10	0,724	522	0,641
Chlorogensäure	0	0,521	514	0,547
	1	0,613	514,2	0,600
	5	0,686	516,2	0,599
	10	0,809	518,2	0,689

#### 4.2.3.2 Einfluß der Copigmente auf die Anthocyane in Holundersaft

Es werden folgende Lösungen der Anthocyane und Copigmente des Holunders in McIIIvaine-Puffer (pH = 3,6, vgl. 4.2.4.2 a) hergestellt: 0,491 mmolare Rutin-Lösung (300 mg/l), 0,425 mmolare Chlorogensäure-Lösung (150 mg/l), 0,065 mmolare Quercetin-3-glc-Lösung (30 mg/l), 0,445 mmolare Cy-3-glc-Lösung (200 mg/l), 0,688 mmolare Cy-3-samb-Lösung (400 mg/l), 2,019 mmolare Cy-3-samb-5-glc-Lösung

(1500 mg/l) und 0,082 mmolare Cy-3,5-diglc-Lösung (50 mg/l). Es werden nun 1 ml der Cy-3-glc-Lösung, Cy-3-samb-Lösung, Cy-3-samb-5-glc-Lösung und Cy-3,5-diglc-Lösung mit jeweils 1 ml Puffer bzw. Copigmentlösung in einer Küvette (Schichtdicke 1 cm) vermischt und photometrisch vermessen. Von der Lösung des Anthocyans Cy-3-samb-5-glc wird aufgrund der hohen Konzentration lediglich 0,1 ml mit dem gleichen Volumen an Puffer bzw. Copigmentlösung in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm verwendet. Die Tabellen 42 bis 45 zeigen die hierbei ermittelten Meßdaten.

Tab. 42: Copigmenteinfluß auf Cy-3-glc

Copigment	C/A	A (520 nm)	$\lambda_{max}$	A bei $\lambda_{max}$
Puffer	0	0,382	512	0,390
Chlorogensäure	0,95	0,391	512	0,404
Quercetin-3-glc	0,15	0,389	514	0,390
Rutin	1,10	0,390	517,6	0,402

 Tab. 43: Copigmenteinfluß auf Cy-3-samb

Copigment	C/A	A (520 nm)	$\lambda_{max}$	A bei $\lambda_{max}$
Puffer	0	0,508	517	0,513
Chlorogensäure	0,61	0,620	517	0,632
Quercetin-3-glc	0,09	0,492	518,4	0,512
Rutin	0,71	0,501	520,4	0,508

Tab. 44: Copigmenteinfluß auf Cy-3-samb-5-glc

Copigment	C/A	A (520 nm)	$\lambda_{max}$	A bei $\lambda_{max}$
Puffer	0	0,521	525	0,545
Chlorogensäure	0,21	0,628	525	0,630
Quercetin-3-glc	0,03	0,520	526	0,543
Rutin	0,24	0,492	531	0,534

#### Tab. 45: Copigmenteinfluß auf Cy-3,5-diglc

Copigment	C/A	A (520 nm)	$\lambda_{max}$	A bei $\lambda_{max}$
Puffer	0	0,202	512	0,211
Chlorogensäure	5,2	0,202	512	0,213
Quercetin-3-glc	0,79	0,193	513	0,202
Rutin	6	0,684	517	0,702

#### 4.2.4 Durchführung des Farbaktivitätskonzeptes nach Hofmann

#### 4.2.4.1 Versuchsaufbau und allgemeine Durchführung

Es werden 4 ml der unter 4.2.4.2 und 4.2.4.3 hergestellten Lösungen bzw. Pufferlösungen in Kunststoffküvetten (Schichtdicke 1 cm) gefüllt. Diese Küvetten werden in eine weiße Styroporschiene gesetzt, wobei sich Probenlösung und Pufferlösung (Vergleichslösung) abwechseln. Die Betrachtung erfolgt durch Aufsicht. Es wird von drei verschiedenen Probanden unabhängig voneinander die letzte noch farbige Verdünnung bestimmt und daraus der Mittelwert gebildet.

#### 4.2.4.2 Bestimmung der Schwellenwerte von Reinsubstanzen

Es werden 1 bis 2 mg der einzelnen Anthocyanstandards in einen 5 ml Meßkolben eingewogen und mit McIllvaine-Puffer (pH-Wert richtet sich nach dem pH-Wert des jeweiligen Saftes, in dem die Anthocyane vorliegen) aufgefüllt. Aus der vorliegenden Anthocyanlösung werden nun Verdünnungen hergestellt (1:100, 1:150, 1:200...). Mit diesen Lösungen wird wie unter 4.2.4.1 beschrieben verfahren und der Schwellenwert errechnet.

#### a) Lösungen:

- 0,1 mol Citronensäure-Lösung: 19,2 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> auf 1000 ml (Lösung A)
- 0,2 mol Dinatriumphosphat-Lösung: 28,7718 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 1000 ml (Lösung B)
- McIIIvaine-Puffer (pH 3,6): Es werden 67,80 ml Lösung A mit Lösung B auf 100 ml aufgefüllt.

- McIllvaine-Puffer (pH 3,0): Es werden 79,45 ml Lösung A mit Lösung B auf 100 ml aufgefüllt.
- McIIIvaine-Puffer (pH 2,7): Es werden 86,63 ml Lösung A mit Lösung B auf 100 ml aufgefüllt.
- McIIIvaine-Puffer (pH 3,2): Es werden 75,3 ml Lösung A mit Lösung B auf 100 ml aufgefüllt.
- b) Messdaten:

Tabelle 46 listet die für die Anthocyane erhaltenen Schwellenwerte (vgl. 2.2.5) auf.

**Tabelle 46**: Ermittlung der Verdünnungsfaktoren  $VF_X$  und Schwellenwerte  $S_X$  für die einzelnen Anthocyane der untersuchten Säfte

Anthocyan	Herkunft	Konz. <sub>x</sub>	Verdünnungsfaktor	Schwellenwert S <sub>X</sub>
	pH-Wert <sup>*</sup>	[mg/l]	VF <sub>x</sub> [Ø]	[mg/l]
Cy-3-glc	Holunder,	400	2333	0,17
Cy-3-samb	pH = 3,6	202	2167	0,09
Cy-3-samb-5-glc		182	733	0,25
Cy-3,5-diglc		335	1000	0,34
Polymere <sup>**</sup>		186	700	0,27
Cy-3-gal	Cranberry,	280	4500	0,06
Cy-3-arab	pH = 3,0	288	5500	0,05
Peo-3-gal		202	200	1,01
Peo-3-arab		304	350	0,87
Polymere		334	125	2,67
Cy-3-glc	schw.	278	4500	0,06
Cy-3-rut	Johannis-	252	5000	0,05
Del-3-glc	beere,	318	3250	0,10
Del-3-rut	pH = 2,7	378	7500	0,05
Polymere		248	350	0,71
Cy-3-soph	Sauer-	238	3000	0,08
Cy-3-glcrut	kirsche,	294	200	0,15
Vitisin-Derivat***	pH = 3,2	382	70	5,46
Cy-3-glc		260	2250	0,12
Cy-3-rut		256	2500	0,10
Polymere		290	450	0,64

\*pH-Wert des McIIIvaine-Puffers, welcher dem durchschnittlichen pH-Wert des Saftes entspricht \*\*hierbei handelt es sich um die Fraktion F1 (Polymerfraktion) des HSCCC-Laufes des betreffenden Saftes

\*\*\* vgl. Abschnitt 3.3.4.2; dortige Bezeichnung als 5-Carboxypyranocyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid)

#### 4.2.4.3 Bestimmung der Verdünnungsfaktoren von Säften

Die Ermittlung der Verdünnungsfaktoren erfolgt durch direkte Verdünnung der Säfte in McIIIvaine-Puffer (jeweils durchschnittlicher pH-Wert des Saftes), wobei die Verdünnungen wie unter 4.2.4.2 beschrieben durchgeführt werden. Die Ermittlung des Verdünnungsfaktors erfolgt wie unter 4.2.4.1 beschrieben. Die jeweiligen Verdünnungsfaktoren können der Tabelle 47 entnommen werden.

a) Lösungen: vgl. 4.2.4.2 a

#### b) Messdaten:

Anhang 3 enthält die Berechnungen der prozentualen Farbaktivität  $FA_X$  und des Farbbeitrages  $F_X$  (vgl. 2.2.5) für die untersuchten Säfte.

Saft	Bezeichnung*	pH-Wert**	Verdünnungsfaktor VF <sub>P</sub> [Ø]
Holundersaft	Konzentrat 1	3,6	9000
	Konzentrat 2		16000
	Muttersaft 1		10000
	Muttersaft 2		9000
	Muttersaft 3		14333
schwarzer Johannis-	Muttersaft 1	2,7	19500
beersaft	Muttersaft 2		12500
Sauerkirschsaft	Muttersaft	3,2	16000
Cranberrysaft	Muttersaft	3,0	8000

 Tabelle 47: Ermittlung der Verdünnungsfaktoren VFP der Säfte

\* Bezeichnung analog dem Teil Ergebnisse und Diskussion

\*\* pH-Wert des McIllvaine-Puffers, welcher dem durchschnittlichen pH-Wert des Saftes entspricht

#### 4.2.5 Lagerversuche

Von einer handelsüblichen Flasche Holundersaft der Firma Voelkel werden jeweils helle Glasflaschen (Volumen 30 ml) und braune Glasflaschen (Volumen 30 ml) unter aseptischen Bedingungen mit Saft gefüllt, mit Argon begast und verschlossen. Es werden nun monatlich eine ungeöffnete helle Flasche und eine ungeöffnete dunkle Flasche analysiert, wobei die Analyse des Saftes in der handelsüblichen Flasche als Bezugsgröße (Zeit = 0) angesehen wird. Bestimmt werden der Anthocyangehalt und der Gehalt an Copigmenten mittels HPLC (s. 4.3.1.5), der Gesamtpolyphenolgehalt (s. 4.3.1.1), die antioxidative Aktivität (s. 4.3.1.2), der Polymeranteil (s. 4.3.1.3) sowie die Farbtönung und die Farbintensität (s. 4.3.1.4).

Frisch gepresster Blutorangensaft wird zur Bestimmung des Anthocyangehaltes und der relativen Peakflächen ebenfalls in hellen Glasflaschen abgefüllt und monatlich mittels HPLC (s. 4.3.1.5) analysiert.

Anhang 4 listet die erhaltenen Daten für den untersuchten Holundersaft einzeln auf.

#### 4.2.6 Umsetzung von Anthocyanen mit Pyruvat zu Vitisin-Derivaten

Zur Synthese des Vitisin-Derivates 5-Carboxypyranocyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) werden 53,3 mg (0,07 mmol) des Anthocyans Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) mit 1,55 g (14,08 mmol) Natrium-Pyruvat in 100 ml McIIIvaine-Puffer (pH 3,2) gelöst. Der pH-Wert des Puffers richtet sich hierbei nach dem durchschnittlichen pH-Wert eines Sauerkirschsaftes, aus welchem dieses Vitisin-Derivat isoliert werden soll. Die Reaktionslösung wird mit Argon begast, verschlossen und bei einer Temperatur von 45° C über mehrere Wochen im Trockenschrank gelagert. Die Entstehung des Vitisin-Derivates wird mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> kontrolliert.

### 4.3 Analytischer Teil

#### 4.3.1 Quantitative Bestimmungen

#### 4.3.1.1 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehalts nach Folin-Ciocalteau

#### a) Lösungen:

- 7,5 % ige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung
- 1:10 Verdünnung des Folin Ciocalteau-Reagenzes (siehe 4.1.2)

- Gallussäure-Stammlösung: 55,3 mg Gallussäure-Monohydrat (oder 50,0 mg Gallussäure) werden in 10 ml Methanol gelöst, mit demin. H<sub>2</sub>O in einen 100 ml Meßkolben überspült und bis zur Marke aufgefüllt.
- Gallussäure-Kalibrierlösungen: Es werden 1, 2, 3, 4 bzw. 5 ml der Gallussäure-Stammlösung jeweils in einen 50 ml Meßkolben pipettiert und mit demin. H<sub>2</sub>O bis zur Marke aufgefüllt. (Konzentrationsbereich 10 bis 50 mg/l Gallussäure)
- Probenlösungen: Es wird von den Säften je nach zu erwartendem Gesamtphenolgehalt eine 1:20 bis 1:200 Verdünnung in demin. H<sub>2</sub>O hergestellt.
- b) Versuchsdurchführung:

Es werden jeweils 200 µl der verdünnten Probenlösung, demin. H<sub>2</sub>O bzw. die Gallussäure-Kalibrierlösungen in Semimikroküvetten pipettiert. Dazu gibt man 1 ml des verdünnten Folin-Ciocalteau-Reagenzes und frühestens nach 30 Sekunden, aber spätestens nach 8 Minuten, 800 µl der 7,5 % igen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung, wobei für alle Proben hierbei der gleiche Zeitabstand eingehalten werden sollte. Die Lösungen werden durchmischt und nach 2 Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur photometrisch bei 760 nm vermessen.

#### c) Berechnung:

Es wird von der Extinktion der Standard- bzw. Probenlösung die Extinktion des Blindwertes subtrahiert (Extinktionsdifferenz  $\Delta E$ ). Die daraus erhaltenen Extinktionsdifferenzen für die Standardlösungen werden graphisch gegen die dazugehörige Konzentration aufgetragen. Durch lineare Regression erhält man eine Geradengleichung, welche zur Ermittlung des Gesamtpolyphenolgehaltes der Proben herangezogen wird.

#### 4.3.1.2 Bestimmung der Antioxidativen Aktivität (AA) mittels TEAC-Assay

- a) Lösungen:
- ABTS<sup>+</sup>-Stammlösung: 38,43 mg ABTS und 6,90 mg K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> werden in einen dunklen Erlenmeyerkolben mit Schliff eingewogen und mit 10 ml demin. H<sub>2</sub>O versetzt. Man läßt diese Lösung vor Gebrauch mindestens 12 Stunden stehen, damit sich das Radikal bilden kann.

- ABTS<sup>+</sup>-Arbeitslösung: Die Stammlösung wird mit Ethanol verdünnt, bis sie eine Extinktion von ca. 0,7 aufweist.
- Trolox<sup>®</sup>-Stammlösung: Es werden ca. 12,52 mg Trolox<sup>®</sup> in einen 5 ml Meßkolben eingewogen und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt.
- Trolox<sup>®</sup>-Kalibrierlösungen: Es werden von der Trolox<sup>®</sup>-Stammlösung jeweils 250, 500, 750 bzw. 1000 μl in einen 5 ml Meßkolben pipettiert und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt (Konzentrationsbereich 0,5 bis 2,0 mmol/l Trolox<sup>®</sup>).
- Probenlösungen: Es wird von den Säften je nach zu erwartender antioxidativer Aktivität eine 1:2 bis 1:20 Verdünnung in demin. H<sub>2</sub>O hergestellt. Von den isolierten Reinsubstanzen werden 1-3 mg in einen 5 ml Meßkolben eingewogen und je nach Löslichkeit mit demin. H<sub>2</sub>O, Ethanol oder Methanol bis zur Marke aufgefüllt.
- b) Versuchsdurchführung:

Es werden jeweils 1 ml der ABTS<sup>+</sup>-Arbeitslösung in eine Semimikroküvette pipettiert und es wird die Extinktion photometrisch bei 734 nm gemessen (Leerwert E1). Dazu gibt man je 20 µl Ethanol, Trolox<sup>®</sup>-Kalibrierlösung bzw. verdünnte Probenlösung. Die Lösungen werden durchmischt und nach genau 6 Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird wiederum bei 734 nm die Extinktion (E2) gemessen.

c) Berechnung:

Von der Extinktion E1 wird die Extinktion E2 ( $\Delta$ E) subtrahiert. Danach wird die Differenz aus  $\Delta E_{Standard bzw. Probe}$  und  $\Delta E_{Blindwert}$  gebildet. Die daraus erhaltenen Extinktionsdifferenzen für die Standardlösungen werden graphisch gegen die dazugehörige Konzentration aufgetragen. Durch lineare Regression erhält man eine Geradengleichung, welche zur Ermittlung der antioxidativen Aktivität der Proben herangezogen wird.

#### 4.3.1.3 Bestimmung des Polymeranteils (Bleichmethode)

- a) Lösungen:
- 5-6% ige SO<sub>2</sub>-Lösung (siehe 4.1.2)

- 0,1 mol Citronensäure-Lösung: 19,2 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> auf 1000 ml (Lösung A)
- 0,2 mol Dinatriumphosphat-Lösung: 28,7718 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 1000 ml (Lösung B)
- McIllvaine-Puffer mit dem jeweiligen pH-Wert des zu untersuchenden Saftes (vgl. 4.2.4.2 a)
- Probenlösung: Die Säfte werden mit Puffer-Lösung so verdünnt, dass die Extinktion bei 520 nm kleiner als 1,0 ist.
- b) Durchführung:

Pro Probe werden jeweils 1 ml des mit McIIIvaine-Pufer verdünnten Saftes in zwei Küvetten pipettiert. Zur ersten Küvette werden 130  $\mu$ l 5-6% ige SO<sub>2</sub>-Lösung pipettiert (A<sup>SO<sub>2</sub></sup>). Zur zweiten Küvette werden 130  $\mu$ l Puffer-Lösung zugesetzt (A<sup>Saft</sup>). Es werden nun die Extinktionen bei 420 nm, 520 nm und 700 nm bestimmt.

#### c) Berechnung:

Von den erhaltenen Werten bei 420 nm und 520 nm subtrahiert man jeweils den bei 700 nm erhaltenen Wert. Die Berechnung des Polymergehaltes erfolgt nach folgender Formel:

Polymer-Anteil [%] = 
$$\frac{(A_{420}^{SO_2} + A_{520}^{SO_2}) \times VF}{(A_{420}^{Saft} + A_{520}^{Saft}) \times VF} \times 100$$

mit VF: Verdünnungsfaktor der Lösung

#### 4.3.1.4 Farbmessungen (Farbintensität, Farbtönung)

- a) Lösungen:
- 0,1 mol Citronensäure-Lösung: 19,2 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> auf 1000 ml (Lösung A)
- 0,2 mol Dinatriumphosphat-Lösung: 28,7718 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 1000 ml (Lösung B)
- McIllvaine-Puffer mit dem jeweiligen pH-Wert des zu untersuchenden Saftes (vgl. 4.2.4.2 a)
- Probenlösung: Die Säfte werden mit Puffer-Lösung so verdünnt, dass die Extinktion bei 520 nm kleiner als 1,0 ist.

#### b) Durchführung:

Es werden jeweils 1 ml der Probenlösung in eine Semimikroküvette pipettiert. Danach wird die Extinktion dieser Lösungen bei 420 nm, 520 nm und 700 nm gemessen.

#### c) Berechnung:

Die Berechnung der Farbintensität und der Farbtönung erfolgt nach folgenden Formeln:

Farbintensität = 
$$(A_{420} - A_{700}) + (A_{520} - A_{700})$$

Farbtönung = 
$$\frac{(A_{420} - A_{700})}{(A_{520} - A_{700})}$$

#### 4.3.1.5 HPLC-Bestimmungen

- a) Lösungen:
- Kalibrierlösungen: Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wird jeweils die zuvor isolierte Reinsubstanz in einen Meßkolben eingewogen und mit einem Gemisch aus H<sub>2</sub>O/Acetonitril/Ameisensäure 87:3:10 (v:v:v) bis zur Marke aufgefüllt. Aus dieser Stammlösung werden die Kalibrierlösungen hergestellt (Konzentrationsbereich 7,8 mg/l bis 366 mg/l).
- Probenlösung: Die Säfte werden membranfiltriert und je nach Konzentration der zu quantifizierenden Substanz entweder unverdünnt eingesetzt oder in einem Gemisch aus H<sub>2</sub>O/Acetonitril/Ameisensäure 87:3:10 entsprechend verdünnt. Von jeder Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.
- b) Berechnung:

Die erhaltenen Peakflächen für die Standardlösungen werden graphisch gegen die dazugehörige Konzentration aufgetragen. Durch lineare Regression erhält man eine Geradengleichung, welche zur quantitativen Ermittlung der jeweils zu bestimmenden Substanz eines Saftes herangezogen wird.

### 4.3.2 Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Reinsubstanzen

#### 4.3.2.1 Charakterisierung der isolierten Anthocyane

#### A1: Cyanidin-3-O-η-D-glucopyranosid (Cyanidin-3-glucosid)

Herkunft: violette Passionsfrucht, schwarze Johannisbeere, Pflaume, Corozo, Holunder, Blutorange.

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>11</sub>.

Molekülmasse: 449.39 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 278.5 und 529.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 449  $[M]^+$ ; m/z bei 287  $[M-Glucose]^+$ .

<sup>1</sup>*H-NMR* (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.43 (1H, dd, J = 9.0, 9.5 Hz, H4"), 3.55 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H3"), 3.55 (1H, ddd, J = 2.0, 6.0, 9.5 Hz, H5"), 3.67 (1H, dd, J = 7.5, 9.0 Hz, H2"), 3.71 (1H, dd, J = 6.0, 12.0 Hz, H6b"), 3.91 (1H, dd, J = 2.0, 12.0 Hz, H6a"), 5.29 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.66 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.90 (1H, dd, J = 0.5, 2.0 Hz, H6), 7.02 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 8.05 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 8.26 (1H, dd, J = 2.0, 9.0 Hz, H6'), 9.03 (1H, s<sub>br</sub>, H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 62.4$  (C6"), 71.2 (C4"), 74.8 (C2"), 78.2 (C3"), 78.8 (C5"), 95.2 (C8), 103.4 (C6), 103.9 (C1"), 113.4 (C10), 117.4 (C5'), 118.5 (C2'), 121.3 (C1'), 128.3 (C6'), 137.1 (C4), 145.7 (C3), 147.4 (C3'), 155.8 (C4'), 157.8 (C9), 159.3 (C5), 164.5 (C2), 170.5 (C7).

#### A2: Cyanidin-3-O-[ζ-L-rhamnopyranosyl-(1<sup>'''</sup>↓ 6'')-(η-D-glucopyranosyl-(1<sup>''''</sup>↓ 2''))-η-D-glucopyranosid] (Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid))





12.0 Hz, H6"a), 3.77 (1H, dd, J = 1.5, 3.5 Hz, H2"'), 4.05 (1H, dd, J = 12.0, 1.0 Hz, H6"b), 4.65 (1H, d, 1.5 Hz, H1"'), 4.76 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"''), 5.43 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.68 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.89 (1H, d, J = 2.0 Hz, H6), 7.06 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 8.02 (1H, d, J = 2.5 Hz, H2'), 8.19 (1H, dd, J = 2.5, 9.0 Hz, H6'), 8.91 (1H, s, H4).

#### A3: Cyanidin-3-O-[η-D-glucopyranosyl-(1<sup>'''</sup>↓ 2'')-η-D-glucopyranosid] (Cyanidin-3-sophorosid)

Herkunft: Himbeere, rote Johannisbeere, Blutorange.

Summenformel:  $C_{27}H_{31}O_{16}$ .

Molekülmasse: 611.54 g/mol

UV (0.1% HCI-Methanol): ς<sub>max</sub> = 526.5 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 611 [M]<sup>+</sup>; m/z bei 287 [M-2·Glucose]<sup>+</sup>.



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 2.95 (1 H, ddd, J = 9.0, 1.5, 5.5 Hz, H5"), 3.23 (1H, dd, J = 7.5, 9.0 Hz, H2"), 3.25-3.36 (3H, m, H3"', H4"', H6"'a), 3.40 (1H, dd, J = 13.5, 1.5 Hz, H6"'b), 3.46 (1H, dd, J = 9.0, 9.5 Hz, H4"), 3.57 (1H, ddd, J = 2.0, 9.5, 5.5 Hz, H5"), 3.72 (1H, dd, J = 12.0, 5.5 Hz, H6"b), 3.76 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H3") 3.91 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H6"a), 4.02 (1H, dd, J = 7.5, 9.0 Hz, H2"), 4.75 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"'), 5.44 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.66 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.89 (1H, dd, J = 2.0, 0.5 Hz, H6), 7.06 (1H, d, J = 8.5 Hz, H5'), 8.05 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 8.19 (1H, dd, J = 2.0, 8.5 Hz, H6'), 9.01 (1H, s, H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 62.3$  (C6"), 70.9 (C4"), 71.3 (C4"), 75.9 (C2"), 77.8 (C6"), 77.9 (C3"), 78.0 (C3", C5"), 78.7 (C5"), 82.5 (C2"); 95.2 (C8), 102.1 (C1"), 103.4 (C6), 105.1 (C1"'), 113.4 (C10), 117.6 (C5'), 118.7 (C2'), 121.3 (C1'), 128.2 (C6'), 137.1 (C4), 145.4 (C3), 147.4 (C3'), 156.3 (C4'), 157.7 (C9), 159.2 (C5), 164.5 (C2), 170.4 (C7).

#### A4: Cyanidin-3-O-[ζ-L-rhamnopyranosyl-(1<sup>'''↓</sup> 6'')-η-D-glucopyranosid] (Cyanidin-3-rutinosid)

Herkunft: Süßkirsche, Himbeere, schwarze Johannisbeere, Sauerkirsche, rote Johannisbeere, Corozo.

Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>15.</sub>

Molekülmasse: 595.53 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 531.0 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 595 [M]<sup>+</sup>; m/z bei 449 [M-Rhamnose]<sup>+</sup>; m/z bei 287 [M-Glucose-Rhamnose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm): ι = 1.16 (3H, d, J = 6 Hz, C6'''), 3.41 (1H, dd, J = 10.0, 9.5 Hz, H4'''), 3.54 (1H,



dq, J = 9.5, 6.0 Hz, H5"', 3.54 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H4"), 3.61 (1H, dd, J = 3.5, 10.0 Hz, H3"), 3.65 (1H, dd, J = 7.5, 9.0 Hz, H2"), 3.67 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H3"), 3.70 (1H, ddd, J = 6.0, 9.5, 1.0 Hz, H5"), 3.72 (1H, dd, 6.0, 11.0 Hz, H6"a), 3.79 (1H, dd, J = 1.5, 3.5 Hz, H2"'), 4.06 (1H, dd, J = 11.0, 1.0 Hz, H6"b), 4.65 (1H, d, J = 1.5 Hz, H1"'), 5.27 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.68 (1H, d, J = 2 Hz, H8), 6.89 (1H, d, J = 2.0 Hz, H6), 7.02 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 8.03 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 8.26 (1H, dd, J = 9.0, 2.0 Hz, H6'), 8.94 (1H, s<sub>br</sub>, H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 20.4 (C6"), 70.4 (C6"), 72.3 (C5"), 73.8 (C4"), 74.4 (C2"), 75.0 (C3"), 76.5 (C4""), 77.3 (C2"), 80.0 (C5"), 80.6 (C3"), 97.8 (C8), 104.7 (C1"'), 106.1 (C1"), 106.2 (C6), 115.8 (C10), 120.0 (C5'), 121.1 (C2'), 123.8 (C1'), 131.0 (C6'), 139.0 (C4), 148.2 (C3), 150.1 (C3'), 158.9 (C4'), 160.5 (C9), 162.1 (C5), 165.8 (C2), 173.6 (C7).

# A5: Delphinidin-3-O-[ζ-L-rhamnopyranosyl-(1<sup>'''↓</sup> 6'')-η-D-glucopyranosid] (Delphinidin-3-rutinosid)

Herkunft: schwarzeJohannisbeere

Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>16.</sub>

Molekülmasse: 611.26 g/ mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 542.0 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 611  $[M]^+$ ; m/z bei 465 [M-Rhamnose]<sup>+</sup>; 303 [M-Rhamnose-Glucose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 1.15 (3H, d, J = 6 Hz, C6'''), 3.42 (1H, dd, J = 9.5, 9.0 Hz, H4'''), 3.56 (1H, dq, J = 6.0, 9.0 Hz, H5'''), 3.56 (1H, dd, J = 9.0, 9.0, H4''), 3.62 (1H, dd, J = 9.0, 9.0, 9.0, H4''), 3.62 (1H, dd, J = 9.0, 9.0, 9.0, H4''), 3.62 (1H, dd, J = 9.0, 9.0, 9.0, H4''), 3.62 (1H, dd, J = 9.0, 9.0, 9.0, H4''), 3.62 (1H, dd, J = 9.0, 9.0, 9.0, H4''), 3.62 (1H, dd, J = 9.0, 9.0, 9.0, H4''), 3.62 (1H, dd, J = 9.0, 9.0, 9.0, 9.0, 9.0), 9.0 (1H, 9.0), 9.

J = 3.5, 9.5 Hz, H3"'), 3.70 (1H, ddd, J = 1.0, 6.5, 9.0 Hz, H5"), 3.71 (1H, dd, J = 7.5, 9.0 Hz, H2"), 3.71 (1H, dd, J = 11.0, 6.5 Hz, H6"a), 3.72 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H3"), 3.79 (1H, dd, J = 1.5, 3.5 Hz, H2"'), 4.06 (1H, dd, J = 1.0, 11.0 Hz, H6"b), 4.65 (1H, d, J = 1.5 Hz, H1"'), 5.29 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.67 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.86 (1H, dd, J = 2.0, 0.5 Hz, H6), 7.76 (2H, s, H2', H6'), 8.88 (1H,  $s_{br}$ , H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 17.9$  (C6"'), 67.8 (C6"), 69.8 (C5"'), 71.2 (C4"), 72.0 (C2"'), 72.3 (C3"'), 74.0 (C4"'), 74.8 (C2"), 77.5 (C5"), 78.0 (C3"), 95.1 (C8), 102.2 (C1"'), 103.4 (C1"), 103.5 (C6), 112.7 (C2', C6'), 113.1 (C10), 120.0 (C1'), 135.6 (C4), 145.8 (C4'), 145.9 (C3), 147.5 (C3', C5'), 157.6 (C9), 159.0 (C5), 164.0 (C2), 170.0 (C7).



#### A6: Delphinidin-3-O-η-D-glucopyranosid (Delphinidin-3-glucosid)

Herkunft: schwarze Johannisbeere, Blutorange.

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>12.</sub>

Molekülmasse: 465.39 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 540.0 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 465 [M]<sup>+</sup>; m/z bei 303 [M-Glucose]<sup>+</sup>.



OH

OH

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.49 (1H, J = 8.5, 9.5 Hz, H4"), 3.56 (1H,dd, J = 8.5, 9.0 Hz, H3"), 3.56 (1H, ddd, J = 2.0, 5.5, 9.5 Hz, H5"), 3.71 (1H, dd, J = 8.0, 9.0 Hz, H2"), 3.72 (1H, dd, J = 5.5, 12.0 Hz, H6b"), 3.92 (1H, dd, J = 2.0, 12.0 Hz, H6a"), 5.30 (1H, d, J = 8.0 Hz, H1"), 6.65 (1H, d, J = 2.0, H8), 6.68 (1H, dd, J = 2.0, 0.5 Hz, H6), 7.77 (2H, s, H2', H6'), 8.97 (1H, s<sub>br</sub>, H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 62.4$  (C6"), 71.1 (C4"), 74.8 (C2"), 78.1 (C3"), 78.8 (C5"), 95.2 (C8), 103.3 (C6), 103.8 (C1"), 112.7 (C6', C2'), 113.3 (C10), 120.0 (C1'), 135.6 (C4), 144.8 (C3), 145.8 (C3', C5'), 147.5 (C4'), 157.7 (C9), 159.2 (C5), 164.3 (C2), 170.3 (C7).

HC

ОН

#### A7: Cyanidin-3-O-[ζ-L-rhamnopyranosyl-(1<sup>'''</sup>↓ 6'')-(η-D-xylopyranosyl-(1<sup>''''</sup>↓ 2''))-η-D-glucopyranosid] (Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-xylosylrutinosid))

Herkunft: rote Johannisbeere.

Summenformel: C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>O<sub>19</sub>.

Molekülmasse: 727.65 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol): ς<sub>max</sub> = 530.5 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 727  $[M]^+$ ; m/z bei 581 [M-Rhamnose]<sup>+</sup>; m/z bei 287 [M-Rhamnose-Xylose-Glucose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 1.14$  (3H, HO<sup>3,C</sup> d, J = 6.0 Hz, H6'''), 3.05 (1H, dd, J = 10.0, 11.5 Hz, H5b''''), 3.18 (1H, dd, J = 7.5, 9.0 Hz, H2''''), 3.28-3.33 (1H, m, H3''''), 3.41 (1H, ddd,

J = 10.0, 8.0, 5.0 Hz, H4""), 3.47 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H4"), 3.47 (1H, dd, J = 9.0, 9.5 Hz, H4"), 3.57 (1H, ddd, J = 9.0, 6.5, 2.0 Hz, H5"), 3.57-3.67 (2H, m, H3"', H5"'), 3.70 (1H, dd, J = 11.5, 5.0 Hz, H5a"''), 3.71 (1H, dd, J = 6.5, 11.5 Hz, H6b"), 3.77 (1H, dd, 9.0, 9.0 Hz, H3"), 3.77 (1H, dd, J = 3.5, 1.5 Hz, H2"'), 3.82-3.92 (1H, m, H6a"), 3.96 (1H, dd, J = 9.0, 7.5 Hz, H2"), 4.64 (1H, d, J = 1.5 Hz, H1"'), 4.75 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"''), 5.42 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.67 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.89 (1H, dd, J = 0.5, 2.0 Hz, H6), 7.03 (1H, d, J = 8.5 Hz, H5'), 8.03 (1H, d, J = 2.5 Hz, H2'), 8.27 (1H, dd, J = 2.5, 8.5 Hz, H6'), 8.89 (1H, s<sub>br</sub>, H4)

# A8: Cyanidin-3-O-[η-D-xylopyranosyl-(1<sup>'''</sup>↓ 2'')-η-D-glucopyranosid]-5-O-η-D-glucopyranosid (Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid)

Herkunft: Holunder.

Summenformel:  $C_{32}H_{39}O_{20}$ .

Molekülmasse: 743.65 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 528.5 und 279.0 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 743 [M]<sup>+</sup>; m/z bei 581 [M-Glucose]<sup>+</sup>; m/z bei 449 [M-Glucose-Xylose]<sup>+</sup>; m/z bei 287 [M-Glucose-Xylose-Glucose]<sup>+</sup>.



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.05 (1H, dd, J = 10.5, 11.5 Hz, H5"b), 3.15 (1H, dd, J = 8.0, 8.5 Hz, H2"), 3.26-3.37 (3H, m, H3", H3", H4""), 3.35-3.44 (2H, m, H4", H4""), 3.46 (1H, ddd, J = 9.5, 2.0, 6.0 Hz, H5"), 3.55 (1H, ddd, J = 8.5, 2.0, 5.5 Hz, H5""), 3.65 (1H, dd, J = 11.5, 5.5 Hz, H6""b), 3.70 (1H, dd, J = 12.0, 6.0 Hz, H6"b), 3.76 (1H, dd, J = 11.5, 5.0 Hz, H5"a), 3.76 (1H, dd, J = 8.5, 10.0 Hz, H3"), 3.85-4.05 (2H, m, H6"a, H6""a), 3.98 (1H, dd, J = 7.5, 8.5 Hz, H2"), 5.17 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 5.44 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 7.04 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 7.08 (1H, s<sub>br</sub>, H8), 7.09 (1H, s<sub>br</sub>, H6), 8.08 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 8.36 (1H, d, J = 9.0 Hz, H6'), 9.07 (1H, s<sub>br</sub>, H4).

#### A9: Cyanidin-3-O-[η-D-xylopyranosyl-(1<sup>'''</sup>↓ 2'')-η-D-glucopyranosid] (Cyanidin-3-sambubiosid) <sub>OH</sub>

Herkunft: Holunder, Corozo.

Summenformel:  $C_{26}H_{29}O_{15}$ .

Molekülmasse: 581.51 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol): ς<sub>max</sub> = 529.0 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 581  $[M]^+$ ; m/z bei 287 [M-Glucose-Xylose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $CD_3OD/TFA(d_1)$  19:1, ppm):  $\iota = 3.06$  (1H, dd, J = 10.5, 11.5 Hz, H5"b), 3.18 (1H, dd, J = 7.5, 8.5 Hz, H2"), 3.27-3.35 (1H, m, H3"), 3.42 (1H, ddd, J = 10.5, 8.5, 5.5 Hz, H4"), 3.51 (1H, dd, J = 9.0, 9.5, H4"), 3.58 (1H, ddd, J = 2.0, 5.5, 9.5 Hz, H5"), 3.69 (1H, dd, J = 5.5, 11.5 Hz, H5"a), 3.73 (1H, dd, J = 5.5, 12.0 Hz, H6"b), 3.78 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H3"), 3.92 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H6"a), 3.95 (1H, dd, J = 9.0, 7.5 Hz, H2"), 4.76 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 5.44 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.65 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.88 (1H, d, J = 2.0 Hz, H6), 7.01 (1H, d, J = 8.5 Hz, H5'), 8.02 (1H, d, J = 2.5 Hz, H2'), 8.26 (1H, dd, J = 2.5, 8.5 Hz, H6'), 8.95 (1H, s, H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 62.3 (C6"), 67.2 (C5""), 70.8 (C4"), 71.0 (C4""), 75.7 (C2""), 77.9 (C3""), 78.2 (C3"), 78.8 (C5"), 81.8 (C2"), 95.0 (C8), 101.7 (C1"), 104 (C6), 105.7 (C1""), 113.2 (C10), 117.3 (C5'), 118.5 (C2'), 121.2



(C1'), 128.6 (C6'), 136.1 (C4), 145.3 (C3), 147.5 (C3'), 156.0 (C4'), 157.5 (C9), 159.2 (C5), 164.1 (C2), 170.4 (C7).

#### A10: Cyanidin-3,5-O-n-D-di-glucopyranosid (Cyanidin-3,5-diglucosid)

Herkunft: Holunder, Blutorange.

Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>16</sub>.

Molekülmasse: 611.54 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol): ς<sub>max</sub> = 526.0 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 611 [M]<sup>+</sup>; m/z bei 449 [M-Glucose]<sup>+</sup>; m/z bei 287 [M-Glucose-Glucose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.38 (1H, dd, J = 9.5, 9.0 Hz, H3"), 3.38 (1H, dd, J = 9.5, 8.5 Hz, H4"), 3.43 (1H, dd, J = 9.5, 9.0 Hz, H3"), 3.43 (1H, dd, J = 9.5, 8.5 Hz, H4"), 3.52 (1H, ddd, J = 5.0, 2.0, 8.5 Hz, H5"), 3.59 (1H, ddd, J = 5.0, 2.0, 8.5 Hz, H5"), 3.67 (1H, dd, J = 7.5, 9.0 Hz, H2""), 3.69 (1H, dd, J = 7.5, 9.0 Hz, H2"), 3.73 (1H, dd, J = 5.0, 10.0 Hz, H6"b), 3.74 (1H, dd, J = 5.0, 10.0 Hz, H6"b) 3.95 (1H, dd, J = 2.0, 10.0 Hz, H6"a), 3.96 (1H, dd, J = 2.0, 10.0 Hz, H6"a), 5.15 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"'), 5.28 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 7.05 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 7.09 (2H, s, H6, H8), 8.09 (1H, d, J = 2.5 Hz, H2'), 8.36 (1H, dd, J = 2.5, 9.0 Hz, H6'), 9.16 (1H, s, H4).

#### A11: Cyanidin-3-O-n-D-galactopyranosid (Cyanidin-3-galactosid)

Herkunft: Aronia, Cranberry.

Summenformel:  $C_{21}H_{21}O_{11}$ .

Molekülmasse: 449.39 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 529.0 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 449  $[M]^+$ ; m/z bei 287 [M-Galactose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.67 (1H, dd, J = 9.5, 3.5 Hz, H3"), 3.77-3.84 (3H, m, H2", H4", H5"), 3.98 (1H, dd, J = 3.5, 10.0 Hz, H6"a), 4.00 (1H, dd, J = 8.0, 10.0 Hz, H6"b), 5.24 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.64 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.87 (1H, d, J = 2.0 Hz, H6), 7.00 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 8.05 (1H, d, J = 2.5 Hz, H2'), 8.23 (1H, dd, J = 2.5, 9.0 Hz, H6'), 9.01 (1H, s, H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 62.2 (C6"), 70.2 (C4"), 72.2 (C2"), 75.0 (C3"), 77.8 (C5"), 95.1 (C8), 103.5 (C6), 104.5 (C1"), 113.4 (C10), 114.7 (C5'), 117.4 (C2'), 121.3 (C1'), 128.1 (C6'), 137.0 (C4), 145.7 (C3), 147.4 (C3'), 155.8 (C4'), 157.7 (C9), 159.3 (C5), 164.4 (C2), 170.5 (C7).





ОН

OH

#### A12: Cyanidin-3-η-D-arabinopyranosid (Cyanidin-3-arabinosid)

Herkunft: Aronia, Cranberry.

Summenformel:  $C_{20}H_{19}O_{10}$ .

Molekülmasse: 419.36 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol): ς<sub>max</sub> = 530.0 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 419  $[M]^+$ ; m/z bei 287  $[M-Arabinose]^+$ .



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.76 (1H, dd, J = 10.5, 6.5 Hz, H5"b), 3.76 (1H, dd, J = 1.5, 4.0 Hz, H3"), 3.95-4.5 (1H, m, H2"), 3.99 (1H, dd, J = 10.5, 3.0 Hz, H5"a), 4.04 (1H, ddd, J = 6.5, 3.0, 1.5, H4"), 5.26 (1H, d, J = 6.0 Hz, H1"), 6.64 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.86 (1H, dd, J = 1.0, 2.0 Hz, H6), 6.99 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 8.05 (1H, d, J = 2.5 Hz, H2'), 8.28 (1H, dd, J = 9.0, 2.5 Hz, H6'), 8.91 (1H, s, H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 66.7$  (C5"), 68.7 (C4"), 72.1 (C2"), 73.7 (C3"), 95.3 (C8), 103.5 (C6), 104.1 (C1"), 114.2 (C10), 117.4 (C5'), 117.6 (C2'), 118.6 (C1'), 121.2 (C6'), 128.4 (C4), 136.3 (C3), 145.5 (C3'), 147.4 (C4'), 155.9 (C9), 157.6 (C5), 164.5 (C2), 170.4 (C7).

#### A13: Cyanidin-3-η-D-xylopyranosid (Cyanidin-3-xylosid)

Herkunft: Aronia.

Summenformel: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>10.</sub>

Molekülmasse: 419.36 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol): <sub>ζmax</sub> = 528.5 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 419 [M]<sup>+</sup>; m/z bei 287 [M-Xylose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.48 (1H, dd, J = 11.5, 9.5 Hz, H5"b), 3.53 (1H, dd, J = 8.5, 8.5 Hz, H3"), 3.65 (1H, ddd, J = 5.0, 8.5, 9.5 Hz, H4") 3,68 (1H, dd, J = 8.5, 7.0 Hz, H2"), 4.03 (1H, dd, J = 11.5, 5.0 Hz, H5"a), 5.25 (1H, d, J = 7.0 Hz, H1"), 6.65 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.87 (1H, d, J = 2.0 Hz, H6), 6.99 (1H, d, J = 8.5 Hz, H5'), 8.00 (1H, d, J = 2.5 Hz, H2'), 8.25 (1H, dd, J = 8.5, 2.5 Hz, H6'), 8.90 (1H, s, H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 67.1$  (C5"), 70.7 (C4"), 74.3 (C2"), 77.2 (C3"), 95.3 (C8), 103.5 (C6), 104.6 (C1"), 113.3 (C10), 117.5 (C5'), 117.9 (C2'), 118.4 (C1'), 131.2 (C6), 136.6 (C4), 145.5 (C3), 147.5 (C3'), 155.9 (C4'), 157.7 (C9), 159.1 (C5), 164.6 (C2), 170.5 (C7).



#### A14: Peonidin-3-O-[ζ-L-rhamnopyranosyl-(1<sup>'''</sup>↓ 6'')-η-D-glucopyranosid] (Peonidin-3-rutinosid)

OH

OH

ОН

OH

Herkunft: Corozo.

Summenformel:  $C_{28}H_{33}O_{15}$ .

Molekülmasse: 609.56 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 529.0 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 609  $[M]^+$ ; m/z bei 463 [M-Rhamnose]<sup>+</sup>; m/z bei 301 [M-Rhamnose-Glucose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 1.15$  (3H, d, J = 6.0 Hz, H6''') 3.40 (1H, t, J = 9.0 Hz, H4''), 3.20-3.40 (1H, m, H2''), 3.48-3.76 (4H, m, H2'', H5'', H4''', H5'''), 3.62 (1H, dd, J = 10.5, 3.5 Hz, H6''a), 3.69 (1H, dd, J = 8.5, 2.9 Hz, H3'''), 3.78 (1H, dd, J = 8.5, 1.5 Hz, H2'''), 4.02 (3H, s<sub>br</sub>, OC<u>H<sub>3</sub></u>), 4.05 (1H, d, J = 10.5 Hz, H6''b), 4.65 (1H, s<sub>br</sub>, H1'''), 5.29 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1''), 6.68 (1H, d, 2.0 Hz, H8), 6.94 (1H, d, J = 2.0 Hz, H6), 7.08 (1H, d, J = 8.5 Hz, H5'), 8.23 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 8.27 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H6''), 8.99 (1H, s, H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 17.9$  (C6'''), 57.0 (O<u>C</u>H<sub>3</sub>), 67.9 (C6''), 69.8 (C5'''), 71.3 (C4''), 71.9 (C2'''), 72.5 (C3'''), 73.9 (C4'''), 74.9 (C2''), 77.7 (C5''), 78.1 (C3''), 95.4 (C8), 101.9 (C1'''), 102.2 (C1''), 103.6 (C6), 113.5 (C10), 114.2 (C5'), 117.4 (C2'), 121.1 (C1'), 137.0 (C4), 145.6 (C3), 149.6 (C3'), 156.7 (C4'), 157.0 (C9), 159.0 (C5), 168.0 (C7).

#### A15: Cyanidin-3-O-(6''-malonyl-η-D-glucopyranosid) (Cyanidin-3-(6''-malonylglucosid))

Herkunft: Corozo, Blutorange.

Summenformel: C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>O<sub>14</sub>.

Molekülmasse: 535.44 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 527.5 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 535 [M]<sup>+</sup>; m/z bei 449 [M-Malonsäure]<sup>+</sup>; m/z bei 287 [M-Malonsäure-Glucose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.35 (2H, s, H1"a,b), 3.25-3.64 (4H, m, H2", H3", H4", H5"), 4.28 (1H, dd, J = 12.0, 7.0 Hz, H6"a), 4.55 (1H, dd, J = 12.0 Hz, H6"b), 5.26 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.68 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.90 (1H, d, J = 2.0 Hz, H6), 7.02 (1H, d, J = 8.5 Hz, H5'), 8.02 (1H, d, J = 2.5 Hz, H2'), 8.27 (1H, dd, J = 8.5, 2.5 Hz, H6'), 8.96 (1H, s<sub>br</sub>, H4).

#### A16: Peonidin-3-O-η-D-galactopyranosid (Peonidin-3-galactosid)

Herkunft: Cranberry.

Summenformel:  $C_{22}H_{23}O_{11}$ .

Molekülmasse: 463.42 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 529.0 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 463  $[M]^+$ ; m/z bei 301 [M-Galactose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota = 3.67$  (1H, dd, OH J = 3.5; 9.5 Hz, H3"), 3.77-3.84 (3H, m, H2", H4", H5"), 3.92-4.05 (2H, m, H6"a, H6"b), 3.94 (3H, s, OC<u>H<sub>3</sub></u>), 6.68 (1H, s, H8), 6.94 (1H, s, H6), 7.07 (1H, d, J = 8.5 Hz, H5'), 8.26 (1H, dd, J = 2.0; 8.5 Hz, H6'), 8.30 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 9.01 (1H, sbr, H4)

HO

OH

#### A17: Peonidin-3-η-D-arabinopyranosid (Peonidin-3-arabinosid)

Herkunft: Cranberry.

Summenformel:  $C_{21}H_{21}O_{10}$ .

Molekülmasse: 433.39 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 529.5 und 278.5 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 433  $[M]^+$ ; m/z bei 301  $[M-Arabinose]^+$ .

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.76 (1H, ddd, J = 6.5; 3.0, 1.5 Hz, H4"), 3.76 (1H, dd, J = 6.5, 3.5 Hz, H2"), 3.95 (1H, dd, J = 3.5, 1.5 Hz, H3"), 3.95-4.06 (2H, m, H5"a, H5"b), 4.02 (3H, s<sub>br</sub>, OC<u>H<sub>3</sub></u>), 5.28 (1H, d, J = 6.5 Hz, H1"), 6.68 (1H, s, H8), 6.95 (1H, s, H6), 7.07 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 8.27 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 8.34 (1H, dd, J = 2.0, 9.0 Hz, H6'), 9.01 (1H, sbr, H4).

### A18: Cyanidin-3-O-(6''-dioxalyl-η-D-glucopyranosid) (Cyanidin-3-(6''-dioxalylglucosid))



Summenformel:  $C_{25}H_{21}O_{17}$ .

Molekülmasse: 593.43 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol):  $\varsigma_{max}$  = 528.5 und 285nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion m/z bei 593  $[M]^+$ ; m/z bei 449 [M-Dioxalsäure]<sup>+</sup>; m/z bei 287 [M-Dioxalsäure-Glucose]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 3.51 (1H, dd, J = 9.0, 9.5 Hz, H4"), 3.89 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H3"), 3.94 (1H, ddd, J = 2.0, 5.5, 9.5 Hz, H5"), 4.27 (1H, dd, J = 5.5, 12.0 Hz, H6"a), 4.27 (1H, dd, J = 7.0, 9.0 Hz, H2"), 4.52 (1H, dd, J = 2.0, 12.0 Hz, H6"b), 5.29 (1H, d, J = 7.0 Hz, 9.0 Hz, H2"), 4.52 (1H, dd, J = 2.0, 12.0 Hz, H6"b), 5.29 (1H, d, J = 7.0 Hz, 9.0 Hz, H2"), 4.52 (1H, dd, J = 2.0, 12.0 Hz, H6"b), 5.29 (1H, dd, J = 7.0 Hz, 9.0 Hz, H2"), 4.52 (1H, dd, J = 2.0, 12.0 Hz, H6"b), 5.29 (1H, dz, J = 7.0 Hz, 9.0 Hz, 9



OH

H1"), 6.59 (1H, d, J = 1.5 Hz, H8), 6.91 (1H,  $s_{br}$ , H6), 7.04 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 8.04 (1H, d, J = 2.5 Hz, H2'), 8.26 (1H, dd, J = 2.5, 9.0 Hz, H6'), 8.96 (1H,  $s_{br}$ , H4).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 64.5 (C6"), 71.2 (C4"), 74.6 (C2"), 76.0 (C3"), 77.8 (C5"), 103.6 (C8), 110.3 (C1", C6), 113.2 (C10), 117.8 (C2'), 118.4 (C5'), 121.1 (C1'), 128.3 (C6'), 137.2 (C4), 145.3 (C3), 147.3 (C3'), 155.8 (C4'), 157.6 (C9), 158.1 (C1"'), 159.9 (C5), 164.4 (C2), 170.5 (C7), 172.4 (C2"', C3"'), 174.8 (C4"').

#### 4.3.2.2 Charakterisierung der isolierten Copigmente

#### C1: 3-Caffeoyl-(-)-Chinasäure (Neochlorogensäure)

Herkunft: Süßkirsche, Aronia.

Summenformel: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>.

Molekülmasse: 354.31 g/mol.

UV (Methanol): <sub>ζmax</sub> = 253, 297, 325 nm.

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülion m/z bei 353 [M-H], m/z bei 179 [M-H-Chinasäure], m/z bei 135 [M-H-Chinasäure-CO<sub>2</sub>].



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, ppm):  $\iota = 1.90 - 2.25$  (4H, m, H2a, H2b, H6a, H6b), 3.64 (1H, dd, J = 8.5, 3.5 Hz, H4), 4.16 (1H, ddd, J = 8.5, 4.5, 5.0 Hz, H5), 5.34 (1H, dd<sub>unaufgelöst</sub>, J = 3.5 Hz, H3), 6.30 (1H, d, J = 16.0 Hz, H8'), 6.78 (1H, d, J = 8.0 Hz, H5'), 6.94 (1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H6'), 7.05 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 7.59 (1H, d, J = 16 Hz, H7').

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD, ppm):  $\iota$  = 36.8, 41.6 (C2, C6), 68.3, 73.1 (C5, C3), 74.8 (C4), 75.4 (C1), 115.3 (C8'), 115.8 (2'), 116.5 (C5'), 122.9 (C6'), 128.1 (C1'), 146.8 (C3'), 149.4 (C4'), 168.7 (C9'), 177.0 (<u>C</u>OOH).

#### C2: 5-Caffeoyl-(-)-Chinasäure (Chlorogensäure)

Herkunft: Süßkirsche, Holunder, Aronia.

Summenformel: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9.</sub>

Molekülmasse: 354.31 g/mol.

HOOC  $\begin{pmatrix} 6 & 5 & 0 & 4 \\ 1 & 2 & 3 \\ 0H & 0H \end{pmatrix}$   $\begin{pmatrix} 0 & 7' & 2' & 0H \\ 8' & 8' & 6' & 3' \\ 6' & 5' & 0H \end{pmatrix}$ 

UV (Methanol): <sub>ζmax</sub> = 253, 297, 325 nm.

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülion m/z bei 353 [M-H], m/z bei 179 [M-H-Chinasäure], m/z bei 135 [M-H-Chinasäure-CO<sub>2</sub>].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, ppm):  $\iota = 1.99 - 2.33$  (4H, m, H2a, H2b, H6a, H6b), 3.72 (1H, dd, J = 8.5, 3.0 Hz, H4), 4.17 (1H, ddd, J = 3.0 Hz, H3), 5.34 (1H, ddd, J = 8.5, 4.5 Hz, H5), 6.26 (1H, d, J = 16.0 Hz, H8'), 6.78 (1H, d, J = 8.5 Hz, H5'), 6.95 (1H, dd, J = 2.0, 8.5 Hz, H6'), 7.05 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 7.56 (1H, d, J = 16 Hz, H7').

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD, ppm):  $\iota$  = 38.3, 38.9 (C2, C6), 71.4 (C3), 72.0 (C4), 73.6 (C5), 76.2 (C1), 115.3 (C8'), 115.4 (C2'), 116.5 (C5'), 123.0 (C6'), 127.9 (C1'), 146.8 (C3'), 147.1 (C7'), 149.5 (C4'), 168.7 (C9'), 177.0 (<u>C</u>OOH).

# C3: Quercetin-3-O-[ζ-L-rhamnopyranosyl-(1<sup>'''↓</sup> 6'')-η-D-glucopyranosid] (Quercetin-3-rutinosid)



(1H, d, J = 7.0 Hz, H1"), 6.18 (1H, d, J = 2H, H6), 6.37 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.83 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 7.52 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'), 7.53 (1H, dd, J = 2.0, 9.0 Hz, H6').

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):  $\iota = 17.6$  (C6""), 66.9 (C6"), 68.1 (C5""), 69.9 (C4"), 70.3 (C2""), 70.5 (C3""), 71.8 (C4""), 74.0 (C2"), 75.8 (C5"), 76.4 (C3"), 93.4 (C8), 98.5 (C6), 100.6 (C1""), 101.1 (C1"), 103.9 (C10), 115.1 (C5'), 116.2 (C2'), 121.1 (C1'), 121.5 (C6'), 133.2 (C3), 144.6 (C3'), 148.3 (C4'), 156.3 (C9), 156.5 (C2), 161.1 (C5), 163.9 (C7), 177.3 (C4).

HC

οн

0

ОН

#### C4: Quercetin-3-O-η-D-glucopyranosid (Quercetin-3-glucosid)

Herkunft: Holunder.

Summenformel:  $C_{21}H_{20}O_{12}$ .

Molekülmasse: 364.38 g/mol.

UV (0.1% HCI-Methanol): <sub>ζmax</sub> = 359, 257, 206 nm.

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülion *m*/z bei 463 [M-H]<sup>-</sup>; *m*/z bei 301 [M-H-Glucose]<sup>-</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):  $\iota = 3.05-3.82$  (3H, m, H2", H3", H4"), 4.15-4.45 (2H, m, H6"b, H5"), 4.80-5.05 (1H, m, H6"b), 5.44 (1H, d, J = 7.5 Hz, H1"), 6.19 (1H, d, J = 2.0 Hz, H6), 6.39 (1H, d, J = 2.0 Hz, H8), 6.83 (1H, d, J = 9.0 Hz, H5'), 7.54 (1H, dd, J = 2.0, 9.0 Hz, H6'), 7.57 (1H, d, J = 2.0 Hz, H2'),

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):  $\iota = 60.9$  (C6"), 69.9 (C4"), 74.0 (C2"), 76.5 (C5"), 77.4 (C3"), 93.4 (C8), 98.5 (C6), 100.9 (C1"), 103.9 (C10), 115.1 (C5'), 116.1 (C2'), 121.1 (C1'), 121.5 (C6'), 133.3 (C3), 144.7 (C3'), 148.3 (C4'), 156.1 (C9), 156.2 (C2), 161.2 (C5), 164.0 (C7), 177.4 (C4).

#### C5: 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure)

Herkunft: Holunder, Aronia.

Summenformel: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>.

Molekülmasse: 154.12 g/mol.



UV (0.1% HCI-Methanol): <sub>ζmax</sub> = 290, 248, 212 nm.

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülion m/z bei 153 [M-H]<sup>-</sup>; m/z bei 109 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm): ι = 6.80 (1H, d J = 8.5 Hz, H5), 7.43 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H6), 7.44 (1H, s, H2).

 $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD/TFA(d<sub>1</sub>) 19:1, ppm):  $\iota$  = 115.8 (C5), 117.8 (C2), 123.3 (C6), 123.9 (C1), 146.1 (C3), 151.5 (C4), 170.2 (C7).
## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit lag in der Charakterisierung der polyphenolischen Inhaltsstoffe, vor allem der Anthocyanzusammensetzung, von sechs verschiedenen roten Fruchtsäften und zwei roten Früchten. Hierbei konnte das von HOFMANN konzipierte Farbaktivitätskonzept erstmals erfolgreich auf Buntsäfte übertragen werden. Durch die Bewertung von Buntsäften anhand von verschiedenen Parametern, angegeben während einer bestimmten Lagerdauer, konnten aufschlussreiche Erkenntnisse über die Veränderung der polyphenolischen Inhaltsstoffe gesammelt werden, welche zur Festlegung des Mindesthaltbarkeitsdatums (MHD) von Buntsäften herangezogen werden können.

Im ersten Teil der Arbeit konnten zahlreiche Anthocyane aus neun Früchten und Fruchtextrakten mittels High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) präparativ isoliert werden. Hierbei handelt es sich in erster Linie um die in Obst häufig vorkommenden Cyanidin-Derivate Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-rutinosid, Cyanidin-3-sophorosid, Cyanidin-3-sambubiosid, Cyanidin-3-galactosid, Cyanidin-3-arabinosid, Cyanidin-3-xylosid, Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) sowie Cyanidin-3- (2<sup>G</sup>-xylosylrutinosid). Aus schwarzen Johannisbeeren konnten weiterhin die Delphinidin-Derivate Delphinidin-3-glucosid und Delphinidin-3-rutinosid in präparativem Maßstab isoliert werden. Der verwendete Holunderextrakt hat sich hierbei als guter Lieferant für das 3,5-Diglykosid Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid erwiesen. Vielfach wurden bei der Aufarbeitung der Früchte lediglich die Schalen der Früchte verwendet, in denen die Anthocyane angereichert sind. So wurden bereits vor Beginn der HSCCC-Trennung die in diesen Früchten (schwarze Johannisbeeren, Sauerkirsche, Passionsfrucht, Pflaume) vorzugsweise im Fruchtfleisch befindlichen farblosen polyphenolischen Komponenten abgetrennt.

Weiterhin gelang die Charakterisierung des Anthocyanprofils von zwei bisher in der Literatur wenig beschriebenen Früchten. Zum einen wurde die kolumbianische Frucht Corozo (*Bactris major*) im Rahmen eines Screenings von zwölf kolumbianischen Früchten aufgrund ihres hohen antioxidativen Potentials einer

näheren Betrachtung hinsichtlich ihrer Anthocyanzusammensetzung unterzogen. Hierbei konnten mittels HSCCC-Trennung und nachfolgender Isolierung der Reinsubstanzen die vier Cyanidin-Derivaten Cyanidin-3-sambubiosid, Cyanidin-3glucosid, Cyanidin-3-rutinosid sowie die acylierte Verbindung Cyanidin-3-(6"malonyl)-glucosid charakterisiert werden. Als Minorpigment wurde ferner das Anthocyan Peonidin-3-rutinosid isoliert. Das Anthocyanprofil der Corozo-Frucht wird somit von den beschriebenen Cyanidin-Derivate dominiert, wobei das Pigment Cyanidin-3-rutinosid das Hauptanthocyan der Frucht darstellt. Bei der zweiten Frucht handelt es sich um die heimische Taybeere, welche eine Kreuzung aus Himbeere und Brombeere darstellt. Hauptbestandteile der Frucht sind die Anthocyane Cyanidin-3-sophorosid und Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid). Weiterhin konnten fünf Minorpigmente (Cyanidin-3-sambubiosid, Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-rutinosid, Pelargonidin-3-sophorosid, Pelargonidin-3-glucosid) charakterisiert werden. Ein Vergleich mit den Anthocyanprofilen der beiden Kreuzungspartner zeigt, dass die Anthocyanzusammensetzung der Taybeere dem Profil der Himbeere sehr ähnlich ist. Bei der Charakterisierung der Anthocyane der Taybeere wurde von uns methodisch erstmals die Kombination aus HSCCC und LC-NMR-Kopplung eingesetzt. Hierbei konnten die Anthocyane in einzelnen CCC-Fraktionen angereichert und nachfolgend mittels LC-NMR-Technik charakterisiert werden, ohne dass eine aufwändige Isolierung der Reinsubstanzen notwendig war. Diese Technik bietet sich somit auch für die Identifizierung von Minorkomponenten (Anthocyanen sowie farblosen polyphenolen Verbindungen) in einer Reihe von weiteren Früchten an.

Der dritte Abschnitt der vorliegenden Arbeit befasste sich mit sechs ausgewählten roten Fruchtsäften. Einleitend wurden die antioxidative Aktivität mittels TEAC-Test sowie der Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteau von hellen und roten Fruchtsäften verglichen. Aufgrund ihres hohen antioxidativen Potentials bewirkt die Anwesenheit von Anthocyanen in Buntsäften hierbei in der Regel eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Saftes. Es hat sich gezeigt, dass diese für helle Fruchtsäfte zwischen 1 bis 4 mmol Trolox/Liter liegt, während im Falle der Buntsäfte Trolox/Liter Werte von zumeist über 10 mmol ermittelt wurden. Die Gesamtpolyphenolgehalte der hellen Fruchtsäfte liegen in der Regel unter 1000 mg Gallussäureäguivalente/Liter, wobei bei einigen Buntsäften der bis zu zehnfache Polyphenolgehalt ermittelt werden konnte.

Am Beispiel von Holundersaft konnte erstmals mittels Standard gestützter Quantifizierung der einzelnen Anthocyane gezeigt werden, dass es sich bei dem 3,5-Diglykosid Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid um das Hauptanthocyan des Saftes handelt. Bisher wurden in der Literatur Cyanidin-3-sambubiosid und Cyanidin-3glucosid aufgrund ihrer prozentualen Peakflächenanteile als Hauptpigmente des Holunders beschrieben. Durch Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf verschiedene Holundersäfte konnte gezeigt werden, dass das Anthocyan Cyanidin-3sambubiosid-5-glucosid mit Abstand den größten Farbbeitrag innerhalb der monomeren Anthocyane leistet. Betrachtet man hingegen das Verhältnis des Farbbeitrages zwischen monomeren und polymeren Pigmenten, so wird deutlich, dass der Farbbeitrag der monomeren Farbpigmente im Falle der Holundersäfte überwiegt. Ein hoher Farbbeitrag der polymeren Pigmente zeigt jedoch bei Holundersäften keine negativen Auswirkungen auf die Farbtiefe, da der ermittelte Schwellenwert der Polymerfraktion im Bereich des Hauptanthocyans des Saftes liegt. Bei einem Vergleich der antioxidativen Aktivität einzelner Holundersäfte wird deutlich, dass Säfte mit einem hohen Anthocyangehalt tendenziell eine höhere antioxidative Aktivität aufweisen als solche mit niedrigeren Anthocyangehalten. In einem Fall führte das Fehlen des instabilen Anthocyans Cyanidin-3-glucosid, welches sich durch eine hohe antioxidative Aktivität auszeichnet, zu einer deutlichen Erniedrigung des TEAC-Wertes. Der Anteil der monomeren Anthocyane eines frisch hergestellten Holundersaftes an der antioxidativen Aktivität des Saftes beträgt ca. 20%, wobei dieser nach sechsmonatiger Lagerdauer auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes absinkt. Dieses liegt in der rapiden Abnahme des Gesamtanthocyangehaltes während der Lagerung begründet. Der Anteil der farblosen Polyphenole des Holundersaftes (Chlorogensäure, Rutin und Quercetin-3-glucosid) während der untersuchten Lagerdauer bleibt hingegen konstant.

Copigmentierungsversuche der Anthocyane des Holunders mit den in Holundersaft vorhandenen Copigmenten haben gezeigt, dass ein möglicher Copigmentierungseffekt erst bei einem deutlichen Überschuss an Copigment beobachtet werden kann (C/A-Verhältnis > 5). Als wirksame Copigmente haben sich hierbei die Flavonol-Derivate Rutin und Quercetin-3-glucosid erwiesen, wobei das Quercetin-3-glucosid in Holundersäften in sehr geringen Konzentrationen vorkommt, so dass in diesem Fall ein möglicher Copigmentierungseffekt in Holundersäften als eher unwahrscheinlich zu betrachten ist. Die Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf schwarzen Johannisbeersaft hat ergeben, dass das Pigment Delphinidin-3-glucosid etwa die Hälfte des Farbbeitrages innerhalb der Gruppe der monomeren Anthocyane leistet, gefolgt von Cyanidin-3rutinosid mit 35%. Der Farbbeitrag des Delphindin-3-glucosides (ca. 10%) und des Cyanidin-3-glucosides (ca. 5%) sind als gering zu bewerten. Anhand von zwei verschiedenen schwarzen Johannisbeersäften wurde der Farbbeitrag der polymeren Farbpigmente untersucht. Da im vorliegenden Fall die Polymerfraktion einen wesentlich höheren Schwellenwert aufweist als die monomeren Anthocyane, führt ein hoher Farbbeitrag der Polymere zwangsläufig zur Erniedrigung der Farbintensität eines Saftes und somit zu einer schlechteren sensorischen Bewertung.

Das Anthocyanprofil eines handelsüblichen Sauerkirschsaftes weist im Vergleich zur frischen Frucht deutliche Unterschiede auf. So konnte im Saft eine bisher nicht charakterisierte Verbindung, welche in der Ausgangsfrucht nicht vorhanden ist, als Vitisin-Derivat identifiziert werden, welches sich aus der Umsetzung des Hauptanthocyans der Sauerkirsche Cyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glycosylrutinosid) mit Pyruvat ergibt. Dieses 5-Carboxypyranocyanidin-3-(2<sup>G</sup>-glucosylrutinosid) macht etwa 61 % des Gesamtanthocyangehaltes des untersuchten Sauerkirschsaftes aus. Die Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes hat jedoch ergeben, dass diese Verbindung einen extrem hohen Schwellenwert besitzt und somit, obwohl es sich hier um die Hauptkomponente des Saftes handelt, nur zu 0,6% zur Farbe des Saftes beiträgt. Die originären monomeren Anthocyane des Saftes tragen ebenfalls lediglich nur zu 16,5% zur Farbe des Saftes bei. Der Rest (82,8%) stammt von den polymeren Farbpigmenten. Somit tragen in der Hauptsache die Polymere zur Farbe des Sauerkirschsaftes bei.

Der Anthocyangehalt eines handelsüblichen Cranberrysaftes ist deutlich geringer als in Holunder- bzw. schwarzen Johannisbeersäften (unter 100 mg/Liter). In diesem Fall dominieren im Anthocyanprofil die Peonidin-Derivate Peonidin-3-galactosid und Peonidin-3-arabinosid. Die Cyanidin-Derivate Cyanidin-3-galactosid sowie Cyanidin-3-arabinosid spielen bezüglich ihrer Konzentration in Cranberrysäften eine untergeordnete Rolle. Die Anwendung des Farbaktivitätskonzeptes auf den untersuchten Cranberrysaft hat ergeben, dass die polymeren Farbpigmente zu 98% zur Farbe des Cranberrysaftes beitragen. Lediglich 2% stammen von den monomeren Anthocyanen.

Cranberries sind reich an polyphenolischen Inhaltsstoffen. Die Charakterisierung mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> hat ergeben, dass in Cranberrysaft eine Vielzahl an Flavonol-Derivaten vorhanden sind. Hierbei handelt es sich vor allem um Myricetin- sowie Quercetin-Derivate, die in anderen Früchten nicht oder nur in geringen Mengen vorkommen. Die Cranberry bzw. der Cranberrysaft bietet daher eine gute Quelle zur Isolierung derartiger Verbindungen. Mittels HSCCC konnte eine Fraktionierung der komplexen Matrix durchgeführt werden. Aus den einzelnen Fraktionen ist nachfolgend eine präparative Isolierung mittels HSCCC leicht möglich. Die Betrachtung eines möglichen Copigmentierungseffektes der Copigmente des Cranberrysaftes steht noch aus.

Die vollständige Identifizierung der Anthocyane des Blutorangensaftes war bisher in der Literatur aufgrund der komplexen Matrix nicht möglich. Die in dieser Arbeit durchgeführte Fraktionierung mittels HSCCC bietet die Möglichkeit der leichteren Identifizierung und Isolierung von Anthocyanen aus der Blutorange. Hierbei konnten mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> acht verschiedene Anthocyane zugeordnet werden, wobei bei der nachfolgenden Isolierung der einzelnen Pigmente das Anthocyan Cyanidin-3(6"-dioxalyl)-glucosid erstmals in Blutorange identifiziert werden konnte.

Lagerversuche mit frisch gepresstem Blutorangensaft haben gezeigt, dass sich das Anthocyanprofil des Saftes während der Lagerung stark verändert. Der prozentuale Anteil des Hauptanthocyans Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glucosid wird mit der Lagerung immer geringer. Aus den gewonnenen Daten kann somit geschlossen werden, dass das acylierte Anthocyan Cyanidin-3-(6"-malonyl)-glucosid noch instabiler ist als das zweite Hauptpigment Cyanidin-3-glucosid. Das Produkt Blutorangensaft ist deshalb aufgrund seiner zwei sehr labilen Hauptpigmente als sehr empfindlich einzustufen. Dieses sollte in jedem Fall bei der Herstellung und Lagerung des Saftes Berücksichtigung finden. In Bezug auf eventuelle Stabilisierungsmöglichkeiten der Anthocyane der Blutorange sollten weitere Versuche durchgeführt werden.

Aroniasaft wird aufgrund seines Geschmackes und seiner Farbe häufig als Komponente von Mehrfruchtsäften verwendet. Die Untersuchung eines handelsüblichen Aroniasaftes hat jedoch ergeben, dass in dem Saft fast ausschließlich polymere Farbpigmente vorhanden sind. Der Anteil der monomeren Anthocyane liegt unter 20 mg/l. Über die farblosen Polyphenole von Aroniasäften ist bisher wenig bekannt. Die Analyse des Aroniasaftes hat ergeben, dass Neochlorogensäure und Chlorogensäure hier eindeutig das Profil der farblosen polyphenolischen Verbindungen dominieren. Weiterhin konnten die Protocatechusäure und einige Quercetin-Derivate als Minorbestandteile identifiziert werden. Aufgrund des niedrigen Anthocyangehaltes und des hohen Gehaltes an Copigmenten ist die Betrachtung möglicher Copigmentierungseffekte sinnvoll.

### 6 Literaturverzeichnis

Albert, K. LC-NMR-Kopplung. In: Günzler, H. (Hrsg.) Analytiker-Taschenbuch 20. *Springer Verlag*, Berlin, **1999**, 107-139.

Albert, K.; Dachtler, M.; Glaser, T.; Händel, H.; Lacker, T.; Schlotterbeck, G.; Strohschein, S.; Tseng, L.-H.; Braumann, U. On-Line coupling of separation techniques to NMR. *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 135-143.

Arbeitstagung der DGE zur bundesweiten Kampagne. "5-am-Tag" - Obst und Gemüse. *Ernähr.-Umsch.* **2000**, *47*, 442-443.

Asen, S.; Stewart, R.N.; Norris, K.H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effects on color. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1139-1144.

Belitz, H.-D.; Grosch, W. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. *Springer Verlag*, Berlin **1992**.

Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70-76.

Bergmann, R. Über die Zusammensetzung selbsthergestellter schwarzer Holunderbeer-Muttersäfte. *Flüss. Obst* **1979**, 46(*1*), 8-12.

Bilyk, A.; Sapers, G.M. Varietal Differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 585-588.

Bitsch, I.; Netzel, M.; Strass, G.; Janssen, M.; Kesenheimer, B.; Herbst, M.; Carlé, E.; Böhm, V.; Harwat, M.; Rechner, A.; Dietrich, H.; Bitsch, R. Hochwertige Fruchtsäfte aus speziellen Apfelsorten – Beitrag zu einer gesunden Ernährung im Rahmen der "5 am Tag"-Kampagne. *Ernähr.-Umsch.* **2000**, *47*, 428-431.

Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. Fruit, vegetables, and cancer preventation: - a review of the epidemiologic evidence. *Nutr. Cancer* **1992**, *18*, 1-29.

Böhm, H.; Boeing H.; Hempel, J.; Raab, B.; Krohe, A. Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z. Ernährungswiss*. **1998**, *37*, 147-163.

Böhm, H. Das Französische Paradoxon – Gesundheit durch Phenole des Weins. Teil 2: Antioxidative und andere Wirkungen von Wein und Weinphenolen. *Ernähr.- Umsch.* **2000 a**, *47*, 92-100.

Böhm, H. Das Französische Paradoxon – Gesundheit durch Phenole des Weins. Teil 1: Phenolische Inhaltsstoffe von Wein. *Ernähr.-Umsch.* **2000 b**, *47*, 44-49.

Boyles, M.J.; Wrolstad, R.E. Anthocyanin composition of red raspberry juice: influences of cultivar, processing, and environmental factors. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 1135-1141.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1995**, *28*, 25-30.

Brønnum-Hansen, K.; Hansen, S.H. High-performance liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Sambucus nigra* L. *J. Chromatogr.* **1983**, *262*, 385-392.

Cao, G.; Alessio, H.M.; Cutler, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*, 303-311.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 749-760.

Cemeroglu, B.; Velioglu, S.; Isik, S. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 1216-1218.

Chen, L.J.; Hrazdina, G. Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 297-303.

Clifford, M.N. Anthocyanins – nature, occurence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1063-1072.

Conway, W.D. Countercurrent Chromatography: apparatus, theory, and applications. *VCH Publishers, Inc.*, New York, **1990**.

Cunningham, D.G.; Vannozzi, S.A.; Turk, R.; Roderick, R.; O'Shea, E.; Brilliant, K. Cranberry phytochemicals and their health benefits. In: Shahidi, F.; Weerasinghe, D.K. (Hrsg.) Nutraceutical Beverages – Chemistry, Nutrition, and Health Effects. ACS Symp. Ser. 871, *American Chemical Society*, Washington DC, **2004**, 35-51.

Degenhardt, A.; Hofmann, S.; Knapp, H.; Winterhalter, P. Preparative isolation of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and application of the color activity concept to red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5812-5818.

Degenhardt, A. Entwicklung und Anwendung verteilungschromatographischer Trennverfahren in der Lebensmittelanalytik. *Dissertation*, TU Braunschweig, **2002**.

Dietrich, H.; Krueger, E.; Ritter, G.; Rheinberger, A.; Lengfeld, B. Beitrag zur Charakterisierung von Schwarzen Johannisbeersorten im Hinblick auf die Saft- und Nektarherstellung. *Vortragsseminar der GDCH, AG Fruchtsäfte*, Holzminden, **1994**.

Dietrich, H. Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die phenolischen Antioxidantien von Fruchtsäften (Holunder, Brombeere, Sauerkirsche, Stachelbeere). *Flüss. Obst* **2003**, 70(*12*), 714-721.

Drdák, M.; Daucik, P. Changes of elderberry (*Sambucus nigra*) pigments during the production of pigment concentrates. *Acta Aliment*. **1990**, *19*, 3-7.

Du, C.T.; Wang, P.L.; Francis, F.J. Cyanidin-3-laminariobioside in Spanish red onion (Allium cepa L.). *J. Food Sci.* **1974**, *39*, 1265-1266.

Duggan, M.B. Identity and occurrence of certain flavonol glycosides in four varieties of pears. *J. Agric. Food. Chem.* **1969**, *17*, 1098-1101.

Dugo, P.; Mondello, L.; Morabito, D.; Dugo, G. Characterization of the anthocyanin fraction of Sicilian blood orange juice by Micro-HPLC-ESI/MS. *J. Agric. Food. Chem.* **2003**, *51*, 1173-1176.

Eder, R. Degradation kinetics of anthocyanins in concentrated juice of black currants (*Ribes nigrum* L.). In: Vercauteren, J.; Chèze, C.; Dumon, M.C.; Weber, J.E. (Hrsg.) *Polyphenols Communications 96* – 18<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols, Bordeaux, Frankreich, **1996**, Vol. 2, 277-278.

Ehlenfeldt, M.K.; Prior, R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2222-2227.

Esterbauer, H.; Striegl, G.; Puhl, H.; Rotheneder, M. Continuous monitoring of invitro oxidation of human low-density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* **1989**, *6*, 67-75.

Fossen, T.; Andersen, Ø.M.; Øvstedal, D.O.; Pedersen A.T.; Raknes Å. Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium spp. J. Food Sci.* **1996**, *61*, 703-706.

Fossen, T.; Andersen, Ø.M. Cyanidin-3-O-(6"-succinyl-beta-glucopyranoside) and other anthocyanins from *Phragmites australis*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1065-1068.

Fossen, T.; Slimestad, R.; Andersen, Ø.M. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, *49*, 2318-2321.

Fossen, T.; Øvstedal, D.O. Anthocyanins from flowers of the orchids *Dracula chimaera* and *D. cordobae*. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 783-787.

Fossen, T.; Andersen, Ø.M. Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 1217-1220.

Frankel, E.N.; Kanner, J.; German, J.B.; Parks, E.; Kinsella, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **1993**, *341*, 454-457.

Franzke, C. Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie. *Behr's Verlag*, Hamburg, **1996**.

Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1401-1407.

5 am Tag e.V., c/o Deutsche Krebsgesellschaft e. V., Frankfurt/M. 5 am Tag - Obst und Gemüse, **2000**.

George, F.; Poux, I.; Fougerousse, A.; Dangles, O.; Brouillard, R. Sandwich-type copigmentation: New Models. In: Vercauteren, J.; Chèze, C.; Dumon, M.C.; Weber, J.E. (Hrsg.) *Polyphenols Communications 96* – 18<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols, Bordeaux, Frankreich, **1996**, Vol. 2, 379-380.

Ghiselli, A.; Serafini, M.; Maiani, G.; Azzini, E.; Ferro-Luzzi, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 29-36.

Gil-Izquierdo, A.; Mellenthin, A. Identification and quantitation of flavonols in rowanberry (Sorbus aucuparia L.) juice. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *213*, 12-17.

Gonnet, J.-F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited. – 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chem.* **1998**, *63*, 409-415.

Gonzáles, E.M.; de Ancos, B.; Cano, M.P. Preservation of raspberry fruits by freezing: physical, physico-chemical and sensory aspects. *Eur. Food. Res. Technol.* **2002**, *215*, 497-503.

Goto, T.; Hoshino, T.; Takase, S. A proposed structure of commelin, a sky-blue anthocyanin complex obtained from flower petals of *Commelina*. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *31*, 2905.

Häkkinen, S.; Mykkänen, H.; Kärenlampi, S.; Törrören, R. Phenolic profiles in Finish berries. In: Amadò R.; Andersson H.; Bardócz, S.; Barry, J.-L.; Galensa, R.; Mykkänen, H.; Serra F. (Hrsg.) *Polyphenols in food* – Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop, Aberdeen, Scottland, **1997**, 57-59.

Häkkinen, S.H.; Kärenlampi, S.O.; Heinonen, M.; Mykkänen, H.M.; Törrören, A.R. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2274-2279.

Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Lölinger, J.; Aruoma, O.I. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol.* **1995**, *33*, 601-617.

Handelman, G.J.; Pryor, W.A. Evaluation of antioxidant status in humans. In: Papas, A.M. (Hrsg.) Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. *CRC Press Boca Raton*, **1999**, 37-62.

Harborne, J.B. Comparative Biochemistry of the Flavonoids, *Academic Press*, London, **1967**.

Henn, T.; Stehle, P. Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität handelsüblicher Getränke. *Ernähr.-Umsch.* **1998**, *45*, 308-313.

Herrmann, K. Über das Vorkommen und die Bedeutung der Anthocyanine in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **1972**, *148*, 290-302.

Herrmann, K. Anthocyanin-Farbstoffe in Lebensmitteln. *Ernähr.-Umsch.* **1986**, *33*, 275-278.

Herrmann, K. Über die Gehalte der hauptsächlichen Pflanzenphenole im Obst. *Flüss. Obst* **1992**, *59*, 66-70.

Herrmann, K. Inhaltsstoffe der Himbeeren und Brombeeren. *Industr. Obst- u. Gemüseverwert.* **1996a**, *81*, 186-194.

Herrmann, K. Inhaltsstoffe der Schwarzen Holunderbeeren. *Industr. Obst- u. Gemüseverwert.* **1996b**, *81*, 394-397.

Herrmann, K. Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse. *Verlag Eugen Ulmer*, Stuttgart, **2001**.

Hertog, M.G.L.; Hollmann, P.C.H.; Katan, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2379-2383.

Hertog, M.G.L.; Hollmann, P.C.H.; van de Putte, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food. Chem.* **1993a**, *41*, 1242-1246.

Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J.M.; Hollmann, P.C.H.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet* **1993b**, *342*, 1007-1011.

Hillebrand, S.; Cuevas Montilla, E.; Winterhalter, P. Holundersaft (*Sambucus nigra*L.): Anthocyanprofil und antioxidative Aktivität. *Lebensmittelchemie* 2002, *56*, 78.

Hofmann, T. Studies on the relationship between molecular weight and the color potency of fractions obtained by thermal treatment of glucose/amino acid and glucose/protein solutions by using ultracentrifugation and color dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* **1998a**, *46*, 3891-3895.

Hofmann, T. Studies on the influence of the solvent on the contribution of single maillard reaction products to the total color of brownd pentose/alanine solutions – a quantitative correlation using the color activity concept. *J. Agric. Food Chem.* **1998b**, *46*, 3912-3917.

Hogg, J.S.; Lohmann, D.H.; Russell, K.E. Kinetics of the reaction of 2,2-diphenyl-1picrylhydrazyl with phenols. *Can. J. Chem. – Rev. Can. Chim.* **1961**, *39*, 1588-1594. Hutter-Beda, B. Aspekte der Intermolekularen Copigmentierung von Anthocyaninen. *Dissertation*, Zürich, **1992**.

Inami, O.; Tamura, I.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. Stability of anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. *J. Agric Food Chem*. **1996**, *44*, 3090-3096.

Iversen, C.K. Black Currant Nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 37-41.

Kim, D.-O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J. *Agric Food Chem.* **2002**, *50*, 3713-3717.

Kirca, A.; Cemeroğlu, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chem.* **2003**, *81*, 583-587.

Krifi, B.; Chouteau F.; Boudrant, J.; Metche, M. Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *Int. Food Sci. Technol.* **2000**, *35*, 275-283.

Lechler, T. Reaktive Sauerstofformen und –verbindungen. *Ernähr.-Umsch.* **1996**, *43*, 423-426.

Lee, H.S. Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed Budd blood orange (*Citrus sinensis*). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1243-1246.

Lee, K.W.; Kim, Y.J.; Kim, D.-O.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6516-6520.

Linseisen, J.; Radtke, J.; Wolfram, G. Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayrischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z. Ernährungswiss*. **1997**, *36*, 403-412.

Määttä, K.R.; Kamal-Eldin, A.; Törrönen, A.R. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: *Ribes* Species. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6736-6744.

Maccarone, E.; Rapisarda, P.; Fanella, F.; Arena, E.; Mondello, L. Cyanidin-3-(6"malonyl)-β-glucoside. One of the major anthocyanins in blood orange juice. *Ital. J. Food Sci.* **1998**, *4*, 367-372. Macheix, J.-J; Fleuriet, A.; Billot, J. Fruit Phenolics. *CRC Press*: Boca Raton, Florida, **1990**.

Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M.J. Color Stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 170-176.

Marco, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1968**, *45*, 594-598.

Markakis, P. Anthocyanins as Food Colors. *Academic Press, Inc.*, New York, **1982**.

Marston, A.; Hostettmann, K. Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. *J. Chromatogr. A* **1994**, *658*, 315-341.

Matsumoto, H.; Hanamura, S.; Kawakami, T.; Sato, Y.; Hirayama, M. Preparativescale isolation of four anthocyanin components of black currant (*Ribes nigrum* L.) Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1541-1545.

Mazza, G.; Brouillard, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.* **1987**, *25*, 207-225.

Mazza, G.; Brouillard, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1097-1102.

Mazza, G.; Miniati, E. Anthocyanins in Fruit, Vegetables and Grains. *CRC Press*, Boca Raton, **1993**.

Mazza, G.; Funkumoto, L.; Delaquis, P.; Girad, B.; Ewert, B. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Frank, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. J. *Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4009-4017.

McKeown, B. Downy mildew of boysenberry and tummelberry in the U.K. *Plant Pathol.* **1988**, *37*, 281-284.

Metz, G. Polyphenole - Einfache Strukturen mit hohem Potenzial. *Pharm. Ztg.* **2000a**, 145 (*16*), 23-27.

Metz, G. Flavonoide Teil I – Strukturvielfalt aus Obst und Gemüse. *Pharm. Ztg.* **2000b**, 145 (*26*), 24-26.

Metz, G. Flavonoide Teil II – Trotz Resorptionsschwächen gut wirksam. *Pharm. Ztg.* **2000c**, 145 (*27*), 30-32.

Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407-412.

Miller, N.J.; Diplock A.T.; Rice-Evans, C.A. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1794-1801.

Miller, N.J. Flavonoids and phenylpropanoids as contributors to the antioxidant activity of fruit juices. In: Rice-Evans, C.A.; Packer, L. (Hrsg.) Flavonoids in Health and Disease. *Marcel Dekker, Inc.*, New York, **1998**, 387-404.

Möller, B.; Hermann K. Quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in stone and pome fruit. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 477-481.

Mondello, L.; Cotroneo, A.; Errante, G.; Dugo, G.; Dugo, P. Determination of anthocyanins in blood orange juices by HPLC analysis. *J. Pharm. Biomed Anal* **2000**, *23*, 191-195.

Mosel, H. D.; Herrmann, K. Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. IV. Die phenolischen Inhaltsstoffe der Brombeeren und Himbeeren und deren Veränderungen während Wachstum und Reife der Früchte. *Z. Lebensm. Unters.- Forsch.* **1974 a**, *154*, 324-327.

Mosel, H. D.; Herrmann, K. The phenolics of fruits. III. The contents of catechins and hydroxycinnamic acids in pome and stone fruits. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **1974 b**, *154*, 6-11.

Mulder-Krieger, Th.; Verpoorte, R. Anthocyanins as flower pigments. *Kluwer Academic Publishers*, **1994.** 

Mullen, W.; Lean, M.E.J.; Crozier, A. Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2002a**, *966*, 63-70.

Mullen, W.; McGinn, J.; Lean, M.E.J.; McLean, M.R.; Gardner, P.; Duthie, G.G.; Yokota, T.; Crozier, A. Ellagtannins, flavonoids, and other phenolics in red

raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J. Agric. Food Chem.* **2002b**, *50*, 5191-5196.

Naumann, R. Bioaktive Substanzen: Die Gesundmacher in unserer Nahrung. *Rowohlt Taschenbuch*, Hamburg, **1997**.

Oboh, F. O. J. The composition of *Bactris major* kernel and kernel oil. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* **1987**, *64*, 365-367.

Oszmianski, J.; Sapis, J.C. Anthocyanins in fruits of *aronia melanocarpa* (chokeberry). *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 1241-1242.

Otsuki, T.; Matsufuji, H.; Takeda, M.; Toyoda, M; Goda Y. Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus* L.). *Phytochemistry* **2002**, *60*, 79-87.

Papas, A.M. Determination of antioxidant status in humans. In: Papas, A.M. (Hrsg.) Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. *CRC Press Boca Raton*, **1999**, 21-36.

Picinelli, A.; Suárez, B.; Mangas, J.J. Analysis of polyphenols in apple products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **1997**, *204*, 48-51.

Pietta, P. Miller, N.J. Flavonoids in medicinal plants. In: Rice-Evans, C.A.; Packer, L. (Hrsg.) Flavonoids in Health and Disease. *Marcel Dekker, Inc.*, New York, **1998**, 61-110.

Prior, R.L.; Lazarus, S.A.; Cao, G.; Muccitelli, H.; Hammerstone, J.F. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**,49, 1270-1276.

Pruthi, J.S.; Lal, G, Susheela, R. Anthocyanin pigment in passion fruit rind. *J. Food Sci.* **1961**, *26*, 385-387.

Puertas-Mejía, M.; Hillebrand, S.; Stashenko, E.; Winterhalter, P. *In Vitro* Radical scavenging activity of essential oils from colombian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour Fragr. J.* **2002**, *17*, 380-384.

Radtke, J.; Linseisen J.; Wolfram G. Phenolsäurezufuhr Erwachsener in einem bayrischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z. Ernährungswiss*. **1998**, *37*, 190-197.

Ramadan, M.F.; Kroh, L.W.; Mörsel, J.-T. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils and oil fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6961-6969.

Rapisarda, P.; Pannuzzo, P.; Romano, G.; Russo, G. Juice components of a new pigmented citrus hydrid *Citrus sinensis* (L.) Osbeck × *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1611-1616.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231-1237.

Rechner, A. Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften. *Dissertation*, Univ. Giessen, **2001**.

Rommel, A.; Wrolstad, R.E.; Heatherbell, D.A. Blackberry juice and wine: processing and storage effects on anthocyanin composition, color and appearance. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 384-410.

Saito, N.; Toki, K.; Moriyama, H.; Shigihara, A.; Honda, T. Acylated anthocyanins from blue-violet flowers of *Anemone coronaria*. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 365-373.

Scheffeldt, P.; Hrazdina, G. Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 517-520.

Schobinger, U. Fucht- und Gemüsesäfte. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 2001.

Schuster, B.; Hermann, K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2761-2764.

Schwarz, M.; Quast, P.; von Baer, D.; Winterhalter, P. Vitisin A content in Chilean wines from Vitis vinifera cv. Cabernet sauvignon and contribution to the color of aged red wines. J. *Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6261-6267.

Shrikhande, A.J.; Francis, F.J. Flavonol glycosides of sour cherries. *J. Food Sci.* **1973**, *38*, 1035-1037.

Shrikhande, A.J. Anthocyanins in foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutrit. 1976, 7, 193-218.

Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144-158.

Slimestad R.; Aaberg, A.; Andersen, ØM. Acylated anthocyanins from petunia flowers. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1081-1086.

Slimestad, R.; Solheim, H. Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3228-3231.

Spanos G.A.; Wrolstad, R.E. Influence of variety, maturity, processing, and storage on the phenolic composition of pear juice. *J. Agric. Food Chem.* **1990a**, *38*, 817-824.

Spanos G.A.; Wrolstad, R.E; Heatherbell, D.A. Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J. Agric. Food Chem.* **1990b**, *38*, 1572-1579.

Spanos, G.A.; Wrolstad, R.E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **1990c**, *38*, 1565-1571.

Spraul, M.; Dvortsak, P.; Hofmann, M.; Glaubner, H. LC-NMR: New life for an old technique, Part 2. *Bruker Report* **1990**, *2*, 6-11.

Stafford, H.A. Flavonoid Metabolism. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1990.

Starke, H.; Herrmann K. Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. VIII. Veränderungen des Flavonolgehaltes während der Fruchtentwicklung. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **1976**, *161*, 131-135.

Stiftung Warentest. Ernährung: was taugen Fertigprodukte und functional Food? *Econ Ullstein List Verlag*, München, 1. Auflage, **2001**.

Stintzing, F.C.; Stintzing, A.S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.* **2002 a**, *50*, 6172-6181.

Stintzing, F.C.; Stintzing, A.S.; Carle, R.; Wrolstad, R.E. A Novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Willd.). *J. Agric. Food Chem.* **2002 b**, *50*, 396-399.

Stöhr, H.; Herrmann, K. Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. VI. Die phenolischen Inhaltsstoffe der Johannisbeeren, Stachelbeeren und Kulturheidelbeeren. Veränderungen der Phenolsäuren und Catechine während Wachstum und Reife von Schwarzen Johannisbeeren. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **1975 a**, *159*, 31-37.

Stöhr, H.; Mosel, H.D.; Herrmann, K. The phenolics of fruits. VII. The phenolics of cherries and plums and the changes in catechins and hydrocinnamic acid derivatives during the development of fruits. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **1975 b**, *159*, 85-91.

Sun, B.H.; Francis, F.J. Apple anthocyanins: Identification of cyanidin-7-arabinoside. *J. Food Sci.* **1967**, *32*, 647-649.

Sutherland, I.A. Countercurrent Chromatography. *Laboratory Practice* **1987** (Februar).

Sutherland, I.A. Liquid stationary phase retention and resolution in hydrodynamic CCC. In: Berthod, A. (Hrsg.) Countercurrent Chromatography: The Support-free Liquid Stationary Phase. *Elsevier Science B.V.*, Amsterdam, **2002**, 159-176.

Thönges, H. Fruchtsäfte, Weine, Essig und Liköre. *Eugen Ulmer Verlag*, Stuttgart, **2002**.

Treptow, H. Schwarzer Holunder (Sambucus nigra L.) und seine Verwendung. *Ernähr.-Umsch.* **1985**, *32*, 296-300.

Tseng, L.-H.; Braumann, U.; Godejohann, M.; Lee, S.-S.; Albert, K. Structure identification of aporphine alkaloids by on-line coupling of HPLC-NMR with loop storage. *J. Chin. Chem. Soc.* **2000**, *47*, 1231-1236.

Tsuda, T.; Ohshima, K.; Kawakiski, S.; Osawa, T. Oxidation products of 3-O- $\beta$ -D-glucoside with a free radical initiator. *Lipids* **1996**, *31*, 1259-1263.

van den Berg, R.; Haenen, G.R.M.M.; van den Berg, H; Bast, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* **1999**, *66*, 511-517.

Voges, S.R. Antioxidanzien gegen freie Radikale. *Dr. Werner Jopp Verlag*, Wiesbaden, **1997**.

Vvedenskaya, I.O.; Rosen, R.T.; Guido, J.E.; Russell, D.J.; Mills, K.A.; Vorsa, N. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Powder. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 188-195.

Watzel, B.; Leitzmann, C. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. *Hippokrates-Verlag*, Stuttgart, 2. Auflage, **1999**.

Watzel, B.; Rechkemmer G. Phenolsäuren. Ernähr.-Umsch. 2001 a, 48, 413-416.

Watzel, B.; Rechkemmer G. Flavonoide. Ernähr.-Umsch. 2001 b, 48, 499-503.

Watzel, B.; Briviba, K; Rechkemmer G. Anthocyane. *Ernähr.-Umsch.* **2002**, *49*, 148-150.

Wayner, D.D.M.; Burton, G.W.; Ingold, K.U.; Locke, S. Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by human plasma proteins. *FEBS Lett.* **1985**, *187*, 33-37.

Wedler, G. Lehrbuch der Physikalischen Chemie. *VCH Verlagsgesellschaft*, Weinheim, **1987**.

Whitehead, T.P.; Thorpe, G.H.G.; Maxwell, S.R.J. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *266*, 265-277.

Wildanger, W.; Herrmann, K. Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. II. Die Flavonole des Obstes. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **1973**, *151*, 103-108.

Wilska-Jeszka, J.; Korzuchowska, A. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation – influence on the colour of strawbeery and chokeberry juices. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 38-42.

Wolfender, J.-L.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K. Application of LC-NMR in the structure elucidation of polyphenols. In: Santos-Buelga, C.; Williamson G. (Hrsg.) Methods in polyphenol analysis. *Royal Society of Chemistry*, Cambridge, **2003**, 128-156.

Wrolstad, R.E.; Culbertson, J.D.; Cornwell, C.J.; Mattick, L.R. Detection of adulteration in blackberry juice concentrates and wines. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1982**, *65*, 1417-1423.

Yan, X.J.; Murphy, B.T.; Hammond, G.B.; Vinson, J.A.; Neto, C.C. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5844-5849.

Zeitlhöfler, A. Die obstbauliche Nutzung von Wildobstgehölzen. *Diplomarbeit*, Weihenstephan, **2001**.

Zuo, Y.; Wang, C.; Zhan, J. Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3789-3794.

# 7 Anhang

Anhang 1: Chromatographische Daten der LC-NMR-Analytik der einzelnen CCC-Fraktionen der Taybeere (vgl. Abschnitt 3.2.2.2)

CCC-Fraktion	Loop-Nr.	Retentionszeit [min]	Fließmittelzusammensetzung*
F2	1	10,39	75,7 % A; 24,3 % B
	2	11,58	73,5 % A; 26,5 % B
	3	11,97	72,8 % A; 27,2 % B
	4	12,25	72,3 % A; 27,7 % B
	5	14,71	67,7 % A; 32,3 % B
	6	14,95	67,2 % A; 32,8 % B
F3	7	10,66	75,2 % A; 24,8 % B
	8	11,79	73,1 % A; 26,9 % B
	9	12,10	72,5 % A; 27,5 % B
	10	12,56	71,7 % A; 28,3 % B
	11	12,91	71,0 % A; 29,0 % B
	12	13,35	70,2 % A; 29,8 % B
	13	15,72	65,8 % A; 34,2 % B
	14	16,79	63,8 % A; 36,2 % B
F4	15	12,07	72,6 % A; 27,4 % B
	16	12,32	72,1 % A; 27,9 % B
	17	12,78	71,3 % A; 28,7 % B
	18	13,11	70,7 % A; 29,3 % B
	19	13,46	70,0 % A; 30,0 % B
	20	14,85	67,4 % A; 32,6 % B
	21	15,16	66,8 % A; 33,2 % B
	22	15,61	66,0 % A; 34,0 % B

\* Fließmittel A: D<sub>2</sub>O + 0,1 % TFA-d<sub>1</sub>; Fließmittel B: Acetonitril-d<sub>3</sub> + 0,1 % TFA-d<sub>1</sub>

CCC-Fraktion	Loop-Nr.	Retentionszeit [min]	Fließmittelzusammensetzung*
F5	23	10,94	74,7 % A; 25,3 % B
	24	12,07	72,6 % A; 27,4 % B
	25	12,34	72,1 % A; 27,9 % B
	26	13,03	70,8 % A; 29,2 % B
	27	13,45	70,0 % A; 30,0 % B
	28	13,83	69,3 % A; 30,7 % B
	29	14,54	68,0 % A; 32,0 % B
	30	15,47	66,3 % A; 33,7 % B
F6	31	12,49	71,8 % A; 28,2 % B
	32	13,28	70,3 % A; 29,7 % B
	33	13,53	69,9 % A; 30,1 % B
	34	14,07	68,9 % A; 31,1 % B
	35	14,77	67,6 % A; 32,4 % B

\* Fließmittel A: D<sub>2</sub>O + 0,1 % TFA-d<sub>1</sub>; Fließmittel B: Acetonitril-d<sub>3</sub> + 0,1 % TFA-d<sub>1</sub>

Holundersaft	TEAC-Wert	Cy-3-glc	Cy-3-samb	Cy-3-samb-5-glc
	[mmol Trolox/l]	[m <b>g/l</b> ]	[mg/l]	+Cy-3,5-diglc
				[mg/l]
Saftkonzentrat	4,2	n.n.*	348	918
Saftkonzentrat	24,7	300	493	2439
Muttersaft	18,3	29	41	519
Muttersaft	22,4	142	167	561
Muttersaft	13,0	79	132	775
Muttersaft	22,5	319	348	2217
Muttersaft	18,9	197	294	1099
ohne Angabe	29,0	148	244	1626
ohne Angabe	27,9	439	449	2722
ohne Angabe	22,5	217	319	2078
ohne Angabe	32,7	223	238	1905

# Anhang 2: Analysenergebnisse der untersuchten Holundersäfte (vgl. Abschnitt 3.3.2.5)

\* nicht nachweisbar

# Anhang 3: Prozentuale Farbaktivität $FA_x$ und prozentualer Farbbeitrag $F_x$ der untersuchten Fruchtsäfte

	Anthocyan	Farbaktivität FA <sub>X</sub>	Farbbeitrag $F_X$
		[%]	[%]
Konzentrat 1	Cy-3-samb-5-glc	71,5	48,1
	Cy-3,5-diglc	1,0	0,7
	Cy-3-samb	22,2	14,9
	Cy-3-glc	5,3	3,6
	Gesamtgehalt	100,0	67,3
	Monomere		
Konzentrat 2	Cy-3-samb-5-glc	67,2	34,9
	Cy-3,5-diglc	1,1	0,6
	Cy-3-samb	26,1	13,5
	Cy-3-glc	5,6	2,9
	Gesamtgehalt	100,0	51,9
	Monomere		
Muttersaft 1	Cy-3-samb-5-glc	69,8	44,2
	Cy-3,5-diglc	0,9	0,6
	Cy-3-samb	23,5	14,9
	Cy-3-glc	5,8	3,6
	Gesamtgehalt	100,0	63,3
	Monomere		
Muttersaft 2	Cy-3-samb-5-glc	74,2	52,7
	Cy-3,5-diglc	1,1	0,8
	Cy-3-samb	20,0	14,2
	Cy-3-glc	4,7	3,3
	Gesamtgehalt	100,0	71,0
	Monomere		

#### a) Holundersäfte (vgl. Abschnitt 3.3.2.3)

	Anthocyan	Farbaktivität FA <sub>X</sub>	Farbbeitrag $F_X$
		[%]	[%]
Muttersaft 3	Cy-3-samb-5-glc	67,2	54,6
	Cy-3,5-diglc	1,5	1,2
	Cy-3-samb	22,1	18,0
	Cy-3-glc	9,2	7,5
	Gesamtgehalt	100,0	81,3
	Monomere		

# b) schwarze Johannisbeersäfte (vgl. Abschnitt 3.3.3.3)

	Anthocyan	Farbaktivität FA <sub>x</sub>	Farbbeitrag F <sub>X</sub>
		[%]	[%]
Muttersaft 1	Del-3-glc	9,6	7,4
	Del-3-rut	52,1	40,5
	Cy-3-glc	4,0	3,1
	Cy-3-rut	34,3	26,7
	Gesamtgehalt	100,0	77,7
	Monomere		
Muttersaft 2	Del-3-glc	10,4	5,0
	Del-3-rut	48,2	23,4
	Cy-3-glc	5,5	2,7
	Cy-3-rut	35,9	17,4
	Gesamtgehalt	100,0	48,5
	Monomere		

#### c) Sauerkirschsaft (vgl. Abschnitt 3.3.4.3)

	Anthocyan	Farbaktivität FA <sub>X</sub>	Farbbeitrag F <sub>X</sub>
		[%]	[%]
Muttersaft	Cy-3-soph	24,5	4,2
	Cy-3-glcrut	62,6	10,7
	Vitisin-Derivat	3,4	0,6
	Cy-3-glc	0,9	0,2
	Cy-3-rut	8,6	1,5
	Gesamtgehalt	100,0	17,2
	Monomere		

# d) Cranberrysaft (vgl. Abschnitt 3.3.5.3)

	Anthocyan	Farbaktivität FA <sub>X</sub>	Farbbeitrag $F_X$
		[%]	[%]
Muttersaft	Cy-3-gal	35,8	0,7
	Cy-3-arab	23,4	0,5
	Peo-3-gal	21,3	0,4
	Peo-3-arab	19,5	0,4
	Gesamtgehalt	100,0	2,0
	Monomere		

## Anhang 4: Analysenergebnisse des Lagerversuches von Holunder-Muttersaft (vgl. Abschnitt 3.3.2.6 und 4.2.5)

#### a) Ergebnisse der Lagerung in hellen Flaschen

Parameter	März	April	Mai	Juni	Juli	Aug.	Sept.
Cy-3,5-diglc [mg/l]	41	30	14	n.n.*	n.n.*	n.n.*	n.n.*
Cy-3-samb-5-glc [mg/l]	1879	1487	1464	1394	1078	1087	1019
Cy-3-samb [mg/l]	370	182	166	136	85	83	59
Cy-3-glc [mg/l]	194	102	101	69	42	38	34
polymerer Pigmentanteil [%]	51,9	59,1	64,4	74,9	78,6	79,8	83,6
Chlorogensäure [mg/l]	130	123	124	124	117	110	106
Quercetin-3-rut [mg/l]	300	300	301	302	300	286	286
Quercetin-3-glc [mg/l]	45	54	53	57	59	69	65
TEAC-Wert [mmol Trolox/l)]	16,1	11,4	7,8	15,1	18,2	13,6	14,0
Polyphenolgehalt GAE [mg/l]	4192	4449	4019	3516	4175	2180	4104
Farbintensität	33,0	29,2	31,1	29,0	26,7	24,5	29,5
Farbtönung	0,76	0,87	0,84	0,94	1,00	1,02	1,12

\* nicht nachweisbar

#### b) Ergebnisse der Lagerung in dunklen Flaschen

Parameter	März	April	Mai	Juni	Juli	Aug.	Sept.
Cy-3,5-diglc [mg/l]	41	39	15	n.n.*	n.n.*	n.n.*	n.n.*
Cy-3-samb-5-glc [mg/l]	1879	1793	1728	1604	1302	1166	1137
Cy-3-samb [mg/l]	370	365	276	200	130	94	95
Cy-3-glc [mg/l]	194	192	142	99	64	53	54
polymerer Pigmentanteil [%]	51,9	51,9	56,0	63,8	66,0	70,2	71,4
Chlorogensäure [mg/l]	130	130	129	126	124	118	113

\* nicht nachweisbar

Parameter	März	April	Mai	Juni	Juli	Aug.	Sept.
Quercetin-3-rut [mg/l]	300	301	301	302	287	287	282
Quercetin-3-glc [mg/l]	45	48	52	56	52	71	67
TEAC-Wert [mmol Trolox/l)]	16,1	11,8	11,8	14,9	17,9	19,7	13,0
Polyphenolgehalt GAE [mg/l]	4192	3889	4016	3687	4279	2991	4444
Farbintensität	33,0	31,8	29,4	29,4	30,6	27,1	30,0
Farbtönung	0,76	0,77	0,78	0,84	0,86	0,99	1,03

# <u>Lebenslauf</u>

Name: Silke	e Hillebrand geb. Erny			
geboren:	18.07.1967 in Waltrop			
Nationalität:	deutsch			
Familienstand:	verheiratet mit Peter Hillebrand, Diplom-Physiker			
<u>Werdegang:</u>				
1974-1978	Grundschule in Waltrop			
1978-1984	Theodor-Heuss-Gymnasium in Waltrop			
1985-1987	Cäcilienschule (Gymnasium) in Oldenburg Abschluß: 5/87 Abitur			
08/87-03/90	Ausbildung zur Milchwirtschaftlichen Laborantin bei der Landwirt-schaftskammer Weser-Ems Abschluß: 15.12.1989 Befristetes Arbeitsverhältnis als Milchwirtschaftliche Laborantin bei der Landwirtschaftskammer Weser-Ems bis zum 31.03.1990			
04/90-11/95	Studium an der Universität Oldenburg Fachrichtung Chemie Vordiplom: 08.10.1992 Diplom: 29.11.1995			
04-12/96	Wissenschaftliche Hilfskraftstelle an der Universität Göttingen im Fachbereich Organische Chemie			
04/97-10/99	Studium an der Technischen Universität Braunschweig Fachrichtung Lebensmittelchemie Abschluß: 1. Staatsexamen			
11/99-10/00	Praktikantin der Lebensmittelchemie am Lebensmittelinstitut Braunschweig des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) Abschluß: 2. Staatsexamen			
seit 11/00	Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Herrn Prof. Dr. P. Winterhalter am Institut für Lebensmittelchemie der TU Braunschweig; Anfertigung der vorliegenden Arbeit			