



universität  
wien

# Diplomarbeit

Analyse von Inhaltsstoffen in Beeren des schwarzen  
Holunders (*Sambucus nigra*) mittels HPLC gekoppelt  
mit verschiedenen Detektoren

angestrebter akademischer Grad  
Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat)

am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie  
der Universität Wien

Verfasser: Norbert Neger  
Matrikel-Nummer: 9605720  
Studienrichtung: Ernährungswissenschaften  
Betreuer: Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag

Wien, Dezember 2008

# Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum Februar 2007 bis Oktober 2008 am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Wien.

Ich danke folgenden Personen:

Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag für die Betreuung der Arbeit, für seine Anregungen und allzeitige Diskussionsbereitschaft,

meinen Eltern, die mir das Studium zumindest teilweise ermöglichten,

meiner Lebensgefährtin, die meine Ausbildung in den vergangenen Jahren mitfinanziert hat und mich immer wieder antreibt, weiterzukämpfen,

dem Laborleiter der Firma Radlberger Dipl. Ing. Rainer Höllmüller und dem Geschäftsführer Ing. Manfred Speiser, für den idealen Arbeitsplatz mit sehr flexiblen Arbeitszeiten, der mir das finanzielle Überleben leichter gemacht und mir damit die Möglichkeit eröffnet hat, diese Arbeit fertigzustellen und mein Studium abzuschließen,

den Kollegen in der Arbeitsgruppe, die immer für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben,

besonders meiner Kollegin Dr. Heidi Schwartz für die maßlose Geduld bei zahlreichen Diskussionen und die aufrichtenden Worte in ausweglos erscheinenden Situationen.

# Inhaltsverzeichnis

---

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abstract .....	4
Zusammenfassung.....	5
1 Einleitung .....	7
2 Allgemeine Grundlagen .....	9
2.1 Zur systematischen Botanik des schwarzen Holunders .....	9
2.2 Die Inhaltsstoffe der Holunderbeeren .....	10
2.3 Phenolische Verbindungen in Pflanzen .....	11
2.3.1 Flavonoide.....	12
2.3.1.1 Proanthocyanidine und Anthocyanidine.....	14
2.3.2 Phenolsäuren .....	15
2.3.3 Synthese polyphenoler Verbindungen in pflanzlichen Organismen.....	17
2.3.4 Metabolismus der Flavonoide und Phenolsäuren .....	19
3 Bisheriger Stand der Analytik und Zielsetzung .....	20
4 Theoretische Grundlagen der angewandten Analytik .....	23
4.1 Die chromatographische Trennung .....	23
4.1.1 Wichtige Kenngrößen der Chromatographie .....	24
4.1.2 Trennleistung eines chromatographischen Systems .....	26
4.1.3 Verfahrensweisen der Quantifizierung .....	28
4.2 Methoden der Elektroanalytik.....	29
4.2.1 Der Aufbau einer coulometrischen Detektorzelle.....	30
4.2.2 Grundlagen der coulometrischen Detektion.....	31
4.2.3 HPLC gekoppelt mit dem coulometrischen Elektroden Array Detektor ..	34
4.3 HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie .....	38
4.3.1 Instrumente.....	39
4.4 Festphasenextraktion, Solid Phase Extraktion (SPE).....	40
5 Material und Methoden .....	42
5.1 Verwendete Chemikalien .....	42
5.2 Standardsubstanzen für die Analysen .....	42
5.2.1 Erstellen der Urstandardlösungen .....	43
5.3 Verwendete Geräte, allgemeine Laborausüstung .....	44
5.3.1 Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	44
5.4 Qualitative Analyse phenolischer Verbindungen mittels HPLC-CEAD .....	45

5.4.1	Einleitung .....	45
5.4.2	Instrumente.....	45
5.4.3	Chromatographische Trennung.....	47
5.4.3.1	Reversed Phase HPLC-Säule.....	47
5.4.3.2	Wahl der mobilen Phasen .....	49
5.4.3.2.1	Mobile Phase der polaren Fraktion .....	49
5.4.3.2.2	Mobile Phase der apolaren Fraktion.....	50
5.4.4	Die Konfiguration des Multielektroden-Detektors .....	51
5.4.5	Herkunft, Vorbereitung und Charakterisierung der Proben.....	52
5.4.5.1	Festphasenextraktion des Holundersaftes.....	52
5.4.5.1.1	Herstellen des methanolischen Extraktes .....	53
5.4.5.2	Probenvorbereitung zur Analyse der apolaren Fraktion.....	54
5.4.5.2.1	Herstellen der Proben der apolaren Fraktion.....	55
5.5	Analyse der Phenolsäuren und der Flavonoide.....	56
6	Ergebnisse und Diskussion .....	58
6.1	Durchführung der qualitativen Analyse mittels HPLC-CEAD.....	58
6.2	Voltammogramme der Standardsubstanzen im Vergleich mit korrespondierenden Peaks im Holundersaft .....	62
6.3	Kapazitätsfaktoren.....	64
6.4	Strukturformeln der identifizierten Substanzen .....	65
6.5	Voltammogramme der Vergleichssubstanzen.....	65
6.5.1.1	Voltammogramme von Substanzen im Holundersaftextrakt.....	70
6.5.1.1.1	Chromatogramme und Voltammogramme der polaren Fraktion .	72
6.5.1.1.2	Chromatogramme und Voltammogramme der apolaren Fraktion	75
6.6	Qualitative Analyse mittels LC/UV-ESI/MS.....	80
6.6.1	Einleitung .....	80
6.6.2	Die Phenolsäurefraktion.....	81
6.6.2.1	Chromatographische Trennung.....	83
6.6.2.2	Ergebnisse der qualitativen Analyse mittels LC/UV-ESI/MS.....	86
6.6.3	Die Flavonoidfraktion .....	88
6.6.3.1	Chromatographische Trennung.....	88
6.6.3.2	Ergebnisse der qualitativen Analyse mittels LC/UV-ESI/MS.....	90
6.7	Quantitative Analyse der Verbindungen im Holunderbeerensaft .....	94
6.7.1	Einleitung .....	94
6.7.2	Standardadditionsmethode .....	94
6.7.3	Reinheit des Rutinstandards.....	96

6.7.4	Standardlösungen zum Erstellen der Eichfunktionen .....	96
6.7.5	Bestimmung der Wiederfindung .....	98
6.7.6	Ergebnisse der quantitativen Analyse .....	102
6.7.6.1	Statistische Betrachtung der Methoden und Ergebnisse.....	103
6.7.6.2	Nachweisgrenzen und Erfassungsgrenzen.....	104
7	Diskussion und Schlussbetrachtung .....	106
7.1	Einleitung .....	106
7.2	Die analytischen Methoden.....	106
7.2.1	Die Vor- und Nachteile der coulometrische Detektion.....	107
7.2.2	Der Vorteil der LC/UV-ESI/MS Kopplung.....	109
Anhang A:	Abbildungsverzeichnis .....	CX
Anhang B:	Abkürzungen.....	CXIII
Anhang C:	Tabellenverzeichnis .....	CXIV
Anhang D:	Literaturverzeichnis .....	CXV
Anhang E:	Curriculum Vitae .....	CXIX

# Abstract

---

The shrubs or small trees of the common European elder are rampant all over Europe, especially in ruderal areas. In naturopathy, preparations of Elder are effectively used for treatment of flu, cough, sneeze, laryngitis, nephritic diseases or cystitis without referring all effects to special constituents of the plant.

As elderberry juice is rich in antioxidant compounds, the aim of this work was to identify and quantify some of these secondary plant compounds in the berry juice with main focus on phenolic acids and flavonoids. The given task was to accomplish the analysis using HPLC coupled with the Coulometric Electrode Array Detection system (CEAD).

Levels of protocatechuic acid, chlorogenic acid, rutin, and avicularin had been earlier determined by Nagl et al. (2002) using SPE for sample preparation and HPLC-UV. These sample preparation and analytical methods were improved and modified to meet the premises of RP-HPLC coupled with CEAD for qualitative and quantitative analysis. Two isocratic methods were developed to separate phenolic acids (mobile phase 2% methanol, 98% 20 mM sodium acetate buffer adjusted to pH 2.90 with acetic acid (v/v), flow 0.8 ml/min) and flavonoid glycosides and aglycons (mobile phase 50% methanol, 50% 20 mM potassium dihydrogenphosphate buffer adjusted to pH 3.50 with phosphoric acid (v/v), flow 1.2 ml/min) on a M&N EC 150 x 4.6 mm Nucleodur Sphinx column. Sample work-up for determination of phenolic acids included SPE. For analysis of flavonoids simple dilution and centrifugation steps were sufficient. CEAD (potentials +50 to +820 mV) allowed selective detection of oxidizable constituents and isocratic elution kept running times short and prevented tailing in aglycon peaks. Protocatechuic acid, chlorogenic acid, rutin, nicotiflorin and quercetin could be identified by comparison of retention times and current voltage curves. LC-ESI/MS was used as additional identification tool. Quantification was carried out by standard addition method based on HPLC-CEAD data.

# Zusammenfassung

---

Der schwarze Holunder ist in Europa weit verbreitet. In der Naturheilkunde und Pharmakognosie werden seit langem Präparationen des Holunders bei Erkältungs- und urologischen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt ohne, dass die Wirkmechanismen im Detail geklärt sind.

Bekannt ist, dass Holundersaft aus den Beeren reich an antioxidativ wirksamen Verbindungen ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war einige dieser sekundären Pflanzeninhaltsstoffe zu identifizieren und zu quantifizieren, wobei Phenolsäuren und Flavonoide im Mittelpunkt des Interesses standen. Die Analysen sollten dabei mit einer HPLC-Apparatur durchgeführt werden, die mit einem Coulometrischen Elektroden-Array Detektor gekoppelt wurde.

Im Jahr 2002 konnten Nagl et. al die Verbindungen Protocatechusäure, Chlorogensäure, Rutin und Avicularin im Holundersaft nach Reinigung auf SPE-Kartuschen (solid phase extraction) mittels HPLC und Dioden-Array Detektion (DAD) nachweisen und quantifizieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die von Nagl et. al entwickelten Aufarbeitungsmethode zu verbessern und daran anschließend, die Substanzen mittels HPLC zu trennen und mit der selektiven coulometrischen Elektroden-Array Detektion (CEAD) zu bestimmen. Zwei isokratische Methoden wurden entwickelt, um Phenolsäuren (mobile Phase 2% Methanol, 98% 20 mM Natriumacetat-Puffer, eingestellt auf pH 2.90 mit Essigsäure (v/v), Flussrate 0.8 ml/min) und Flavonoidglykoside und Aglykone (mobile Phase 50% Methanol, 50% 20 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer, eingestellt auf pH 3.50 mit Phosphorsäure (v/v), Flussrate 1.2 ml/min) auf einer M&N EC 150x4.6 mm Nucleodur Sphinx Säule zu trennen.

Der Vorteil des CEAD (Potentiale von +50 mV bis +820 mV) ist die selektive Erfassung der oxidierbaren Inhaltsstoffe, isokratische Elution sorgte für kurze Laufzeiten und verbesserte das Peaktailing bei Aglykon-Peaks. Protocatechusäure, Chlorogensäure, Rutin, Nicotiflorin und Quercetin konnten durch Vergleich der Retentionszeiten und der Strom-Spannungskurven identifiziert werden.

Um die Ergebnisse der qualitativen CEAD Analysen zu untermauern, wurden diese durch Messungen mit LC-ESI/MS überprüft und ergänzt.



# 1 Einleitung

Der auf nährstoffreichen Böden als Strauch oder als Baum wachsende schwarze Holunder, ist in Europa als Heckenpflanze, an Waldrändern und auf Schutt oder Ruderalplätzen weit verbreitet (Täufel et al., 2005). Neben dem schwarzen Holunder (*Sambucus nigra*) sind in Mitteleuropa auch der krautige Attich bzw. Zwergholunder (*Sambucus ebulus*) und der rote Holunder (*Sambucus racemosa*) heimisch. Die beiden Letztgenannten spielen in der menschlichen Ernährung und auch als Nutzpflanze kaum eine bedeutende Rolle.

Der schwarze Holunder gewinnt gegenwärtig wirtschaftlich an Bedeutung nachdem dieser als Nutzpflanze in den vergangenen Jahrzehnten immer mehr zu verschwinden drohte. In Österreich wurden 2006 auf eine Fläche von 963 ha ca. 7400 t Holunderbeeren geerntet. Verwendung finden nicht nur die Beeren, sondern auch die Blüten, obwohl die Blütenerzeugung wegen der Konkurrenz aus den osteuropäischen Ländern unrentabel geworden ist (BMLFUW, 2007).

Die Pharmazie und Naturheilkunde nutzt nahezu sämtliche Teile der Pflanze (Rinde, Wurzeln, Blätter, Blüten und Beeren) zu phytotherapeutischen Zwecken.

In der Lebensmitteltechnologie bedient man sich des Farbstoffes der Beeren und die Nahrungsmittelindustrie spezialisiert sich auf die Herstellung von Sirupen, Fruchtsäften und Schorlen, sowohl aus den Beeren (*Sambuci fructus*) wie auch aus den Blüten (*Sambuci flos*).

Zu den wichtigen Inhaltsstoffen des Holunders zählen die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Sie unterscheiden sich von den primären Pflanzenstoffen (Protein, Fett und Kohlenhydrate) dadurch, dass ihr Hauptzweck nicht der Energiespeicherung bzw. der Versorgung dient, sondern sie erfüllen in der Pflanze u.a. antinutritive Aufgaben wie Farbgebung, Schutz gegen UV-Strahlung, desweiteren agieren sie als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten. Chemisch und strukturell betrachtet handelt es sich jedenfalls um eine sehr heterogene Gruppe von Verbindungen. Die wichtigsten Vertreter sind Phytosterine, Saponine, Glucosinolate, Phenolsäuren, Flavonoide, Protease-Inhibitoren, Monoterpene, Phytoöstrogene, Sulfide und Phytinsäure (Elmadfa et al., 1998)

Die oftmals noch nicht stichfest bewiesenen Gesundheitswirkungen der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe erscheinen genauso mannigfaltig wie deren chemische Beschaffenheit:

- immunmodulatorisch,
- antioxidativ,
- antikanzerogen,
- antimikrobiell, antiviral,
- antithrombotisch,
- antiinflammatorisch,
- blutdruckregulierend,
- Senkung des Cholesterins,
- Beeinflussung des Blutzuckers,
- verdauungsfördernd

**Tabelle 1:** Wirkung der sekundären Pflanzenstoffe nach (Watzl et al., 2005)

Anfang der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts begann sich die Ernährungswissenschaft intensiver mit den bioaktiven Sekundärmetaboliten der Pflanzen auseinanderzusetzen, da man zunehmend die antioxidative Kapazität vieler phenolischer Verbindungen erkannt hatte.

Die Bedeutung zur Prophylaxe im Bereich Herz-Kreislaufkrankungen, Krebs, chronisch entzündlichen Erkrankungen und Katarakt wurde vielfach diskutiert.

Biogene phenolische Verbindungen verringern möglicherweise die Schädigung von Zellkernen und Zellmembranen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), andere freie Radikale und oxidierende Stoffe. Letztendlich ist noch nicht ausreichend geklärt, in welchem Ausmaß diese alimentären, nicht enzymatischen Antioxidantien eine Rolle im menschlichen Organismus bei der Abwehr von oxydativem Stress spielen.

Die vermehrte Verwendung der Beeren des Holunders in der menschlichen Ernährung könnte aus volks- und präventivmedizinischer Sicht ein wertvoller Beitrag für die Versorgung der Bevölkerung mit Antioxidantien sein.

## **2 Allgemeine Grundlagen**

### **2.1 Zur systematischen Botanik des schwarzen Holunders**

In früheren Zeiten wurde der Strauch althochdeutsch „Holuntar“ genannt, dessen Bedeutung als „Baum der hohlen Zweige interpretiert wurde. Der Holunder galt schon in der Antike als universelles Naturheilmittel (Bühning, 2004). Im deutschen Sprachraum wird die Pflanze auch synonym als Alhorn, Elhorn, deutscher Flieder, Eiderbaum, Fliederbeere, Hitschel, Holder, Holler, Hulertrauben, Kelkenbusch, Elder, Pisseke oder Schwarzholder bezeichnet. Die genaue Herkunft des Gattungsnamens „Sambucus“ ist etymologisch nicht geklärt, während das „nigra“ im Bezug auf die Farbe der Früchte dem lateinischen Wort für „schwarz“ entspricht (Bäumler, 2006).

Systematisch zählt der Holunder zur Familie der Geißblattgewächse (Caprifoliaceae), die zur Ordnung der Dipsacales (kardenartige) gehören (Baltisberger, 2002).

Die Gattung „Sambucus“ wird kontrovers auch in die monotypische Familie der Sambucaceae oder in die Familie der Adoxaceae mit der Unterfamilie Adoxoidea eingeordnet.

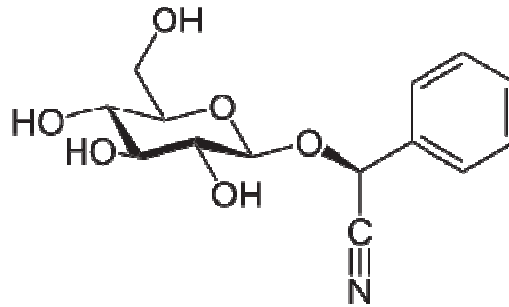
Die Caprifoliaceae haben einen 3-5 blättrigen Fruchtknoten. Die Blätter sind unpaarig gefiedert und die stark duftenden weißen Blüten wachsen als Schirmrispen oder Trugdolden. Die purpurnen bis violetten kugeligen Steinfrüchte enthalten 3-6 Steine. Der Strauch oder Baum des *Sambucus nigra* ist ein Flachwurzler mit einer Höhe von bis zu 7 Metern (Hager et al., 1994).

## 2.2 Die Inhaltsstoffe der Holunderbeeren

Die schwarzen Früchte, die aufgrund der cyanogenen Glykoside Sambunigrin (siehe **Abbildung 1**), Prunasin, Zierin und Holocalin nicht ohne Vorbehandlung zum Verzehr geeignet sind, enthalten u.a. neben den in **Abschnitt 3** erwähnten Flavonoid- und Anthocyanglykosiden auch Zucker, organische Säuren (Zitronen-, Ascorbin-, Weinstein- und Valeriansäure), Bitterstoffe und Vitamine (A,B<sub>1</sub>,B<sub>2</sub>,C). Der Anteil an ätherischen Ölen beträgt 0.01% (Bäumler, 2006, Schwendt, 2007, Hager et al., 1994).

Bestandteile			Bestandteile		
Feuchtigkeit	80	g	<b>Vitamin B<sub>1</sub></b>	0,06	mg
Protein	0,7	g	<b>Vitamin B<sub>2</sub></b>	0,08	mg
Fett	0,5	g	<b>Niacin</b>	1,5	mg
Kohlenhydrate	9,1	g	<b>Carotin</b>	0,3	mg
Glucose	2,9	g	<b>Vitamin C</b>	16	mg
Fructose	2,8	g	<b>Zitronensäure</b>	1,2	g
Saccharose	0,2	g	<b>Apfelsäure</b>	0,3	g
Sorbit	1-7	mg	<b>Isozitronensäure</b>	16	mg
Faserstoffe	6,6	g	<b>Chinasäure</b>	40	mg
Mineralstoffe	0,8	g	<b>Shikimisäure</b>	6	mg
Kalium	305	mg	<b>Gerbstoffe</b>	3	g
Magnesium	24	mg	<b>Quercetin</b>	17	mg
Calcium	35	mg	<b>Ätherisches Öl</b>	0,01	g
Phosphor	57	mg			
Eisen	1,6	mg			
Energiewert	200	kJ			

**Tabelle 2:** Zusammensetzung und Energiewert des schwarzen Holunders, durchschnittlicher Gehalt je 100 g essbaren Anteils nach (Täufel et al., 2005)



**Abbildung 1:** Strukturformel des cyanogenen Glykosids Sambunigrin

Für die sensorischen Eigenschaften des Holunderbeerensaftes sind neben den Zuckern und Säuren auch flüchtige Aromen bestimmend. Kaack et al., (2005) isolierten mittels Headspace-Technik die flüchtigen Komponenten aus dem Saft und identifizierten mittels GC-FID und GC-MS 59 verschiedene Stoffe. Die Meisten von ihnen waren Abbau-Produkte von Fettsäuren wie Alkohole, Ester, Aldehyde, Ketone und Furane.

Bei den „character impact compounds“, die für die olfaktorischen Eigenschaften des Saftes verantwortlich zeichnen, handelte es sich vor allem um  $\beta$ -Damascenone, Nonal und Dihydroedulan.

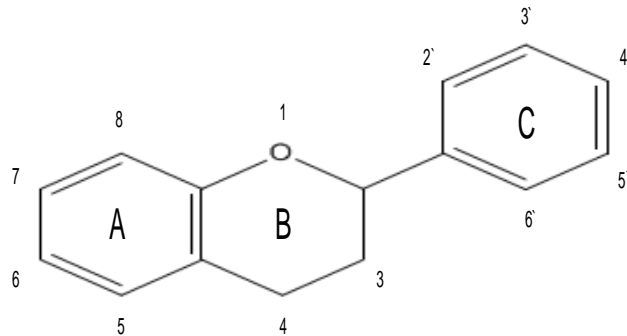
### 2.3 Phenolische Verbindungen in Pflanzen

Phenolische Stoffe in Pflanzen umfassen im weitesten Sinne alle aromatischen und heterozyklischen Hydroxyverbindungen, insbesondere die Flavonoide und Phenolsäuren. Sie gehören allgemein zu der großen Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe.

Flavonoide und Phenolsäuren sind in vielen Obstarten ein Beitrag zur Farbgebung und zum Geschmack. Ihre sonstigen Aufgaben im pflanzlichen Organismus sind vielfältig. Sie sind an Wachstums- und Differenzierungsvorgängen beteiligt, wirken antioxidativ, antifungal, allelopathisch und bakterizid. Als Phytoalexine helfen sie den Pflanzen Infektionen durch Bakterien und Pilze zu hemmen und deren Ausbreitung zu begrenzen.

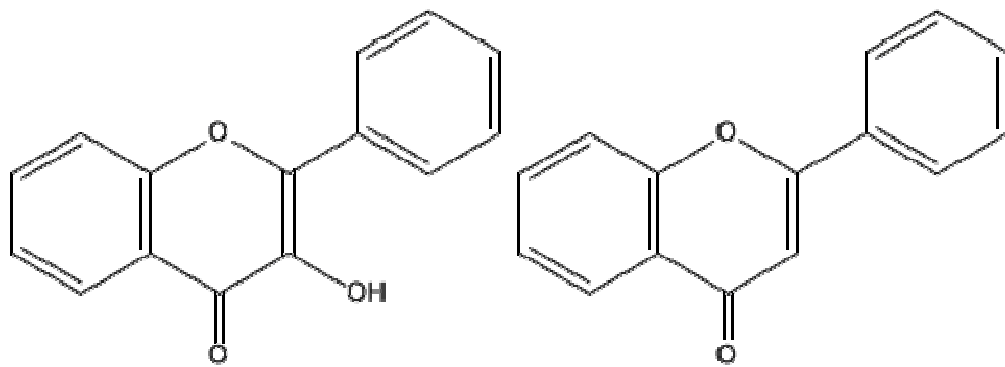
### 2.3.1 Flavonoide

Die Flavonoide kommen in allen höheren Pflanzen vor, sie sind die in der Nahrung am häufigsten auffindbaren Polyphenole. Ihr Grundkörper ist das 2-Phenylchroman. Dieses besteht aus 3 Kohlenstoffringen mit 2 aromatischen und einem O-heterozyklischen Ring.



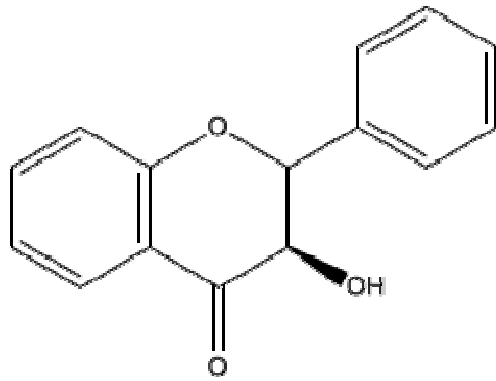
**Abbildung 2:** Das Grundgerüst der Flavonoide, das 2-Phenylchroman

Durch Modifizierungen am Grundgerüst ergibt sich eine große strukturelle Vielfalt. Je nach Oxidation an den Kohlenstoffatomen C-2, -3 und -4 können die einzelnen Flavonoidtypen unterschieden werden:

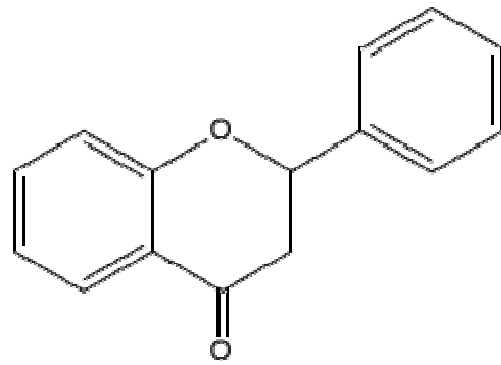


Flavonole

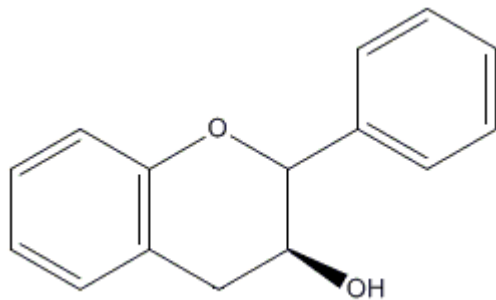
Flavone



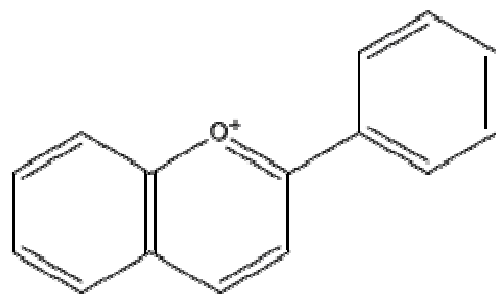
Flavanonole



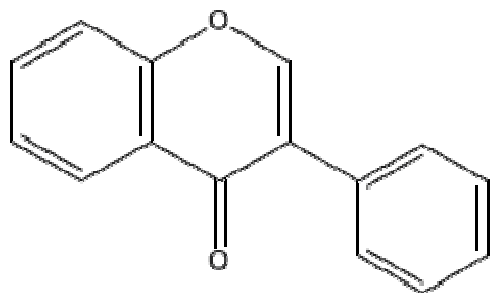
Flavanone



Flavanole



Anthocyanidine



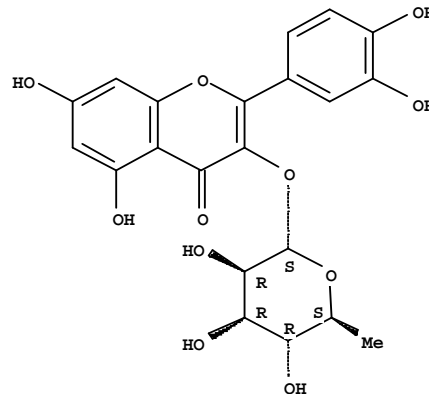
Isoflavonoide

**Abbildung 3:** Die Verbindungsklassen der Flavonoide

Die meisten Flavonoide kommen in der Natur an einen Zuckerteil, an das sogenannte Glykon gebunden vor, wie beispielhaft am Quercitrin in **Abbildung 4** dargestellt. Der Nicht-Zuckerteil des Quercitrins ist das Quercetin, der Zuckerteil die Rhamnose.

In der freien Form, auch Aglykon genannt, findet man in der Natur lediglich die Flavonole. Die Flavonole und Flavone treten im Gemüse meist als O-Glykoside des Quercetins oder des Kämpferols auf. Sie sind weniger häufig aufzufinden als das Luteolin- oder Apigeninglykosid.

Früchte enthalten fast ausschließlich Quercetin-Glykoside während Kämpferol- und Myricetin-Glycoside nur in geringen Mengen zu finden sind. (HERMANN, 1976), (HERMANN, 1988).



**Abbildung 4:** Strukturformel des Quercitrins, das 3-O-alpha-rhamnosid des Quercetins

### 2.3.1.1 Proanthocyanidine und Anthocyanidine

In pflanzlichen Lebensmitteln findet sich ebenfalls die polymere Gruppe der Proanthocyanidine (OPC). Diese bestehen im Allgemeinen aus polymerisierten Flavan-3-ole Einheiten mit einer Molmasse von bis zu 7000. Man bezeichnet sie auch als kondensierte Tannine, ihr Geschmack ist bitter und sie wirken adstringierend (Böhm, 2000).

Bestehen die Flavaneinheiten nur aus Catechin und Epicatechin, so spricht man von Procyanidinen. Einfache Dimere sind die aus Catechin bzw. Epicatechin aufgebauten Procyanidine B-1 bis B-4 (Habermehl et al., 2002). Die Procyanidine sind die in der Natur am weitest verbreitete Gruppe der Proanthocyanidine und sie finden sich in Früchten wie Bananen, Datteln, Pflaumen, Äpfeln, Birnen, Pfirsichen und Trauben (Kaul, 1996).

Die Zweite der beiden Hauptklassen der Gerbstoffe, neben den oben erwähnten kondensierten Tanninen, bilden die hydrolysierbaren Tannine. Diese sind Ester der Gallussäure und der Hexahydroxydiphensäure mit Monosacchariden, häufig Glucose (Belitz et al., 2007).

Als Anthocyanidine werden die Aglykone der Anthocyane bezeichnet. Als Zuckerrest dienen Monosaccharide wie Arabinose, Glucose, Galaktose, Rhamnose oder Disaccharide wie Rutinose und Sambubiose.



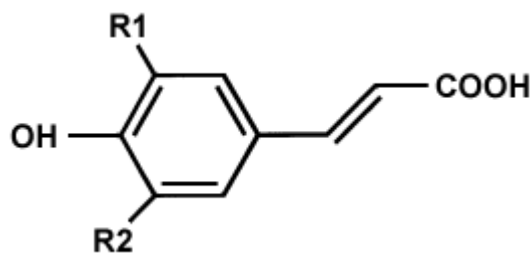
Die wasserlöslichen Anthocyane sind für Blau- und Rotfärbungen in den Blüten und Früchten verantwortlich. Eine Charakteristik der Anthocyane ist, dass ihre Farbe vom pH-Wert abhängig ist.

### 2.3.2 Phenolsäuren

Unter dem Begriff Phenolsäuren (Phenolcarbonsäuren) werden die Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren zusammengefasst. Sie sind in nahezu allen Pflanzenteilen vorhanden, die Hydroxyzimtsäuren können mit organischen Säuren oder Zuckern verestert sein.

Die Derivate der Hydroxybenzoesäuren besitzen einen C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> Grundkörper, die der Hydroxyzimtsäuren einen C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> Grundkörper:

Hydroxyzimtsäuren



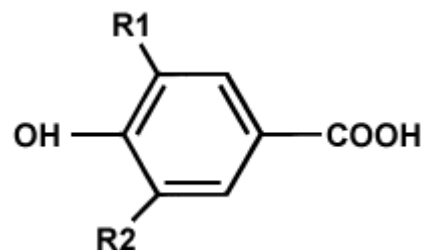
p-Cumarsäure R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H

Ferulasäure: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>

Sinapinsäure R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>

Kaffeesäure R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH

Hydroxybenzoesäuren



Gallussäure

R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH

Protocatechusäure

R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H

Syringasäure

R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>

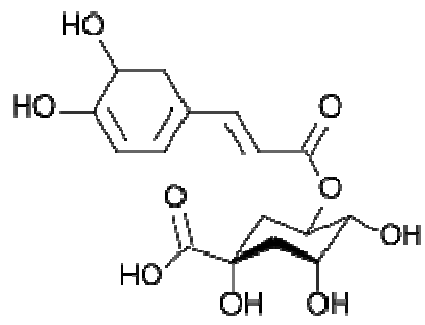
Vanilinsäure

R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H

**Abbildung 5:** Die Strukturen der Phenolsäuren

Hydroxybenzoesäuren kommen allgemein in geringeren Konzentrationen vor als Hydroxyzimtsäuren (Hermann, 1992).

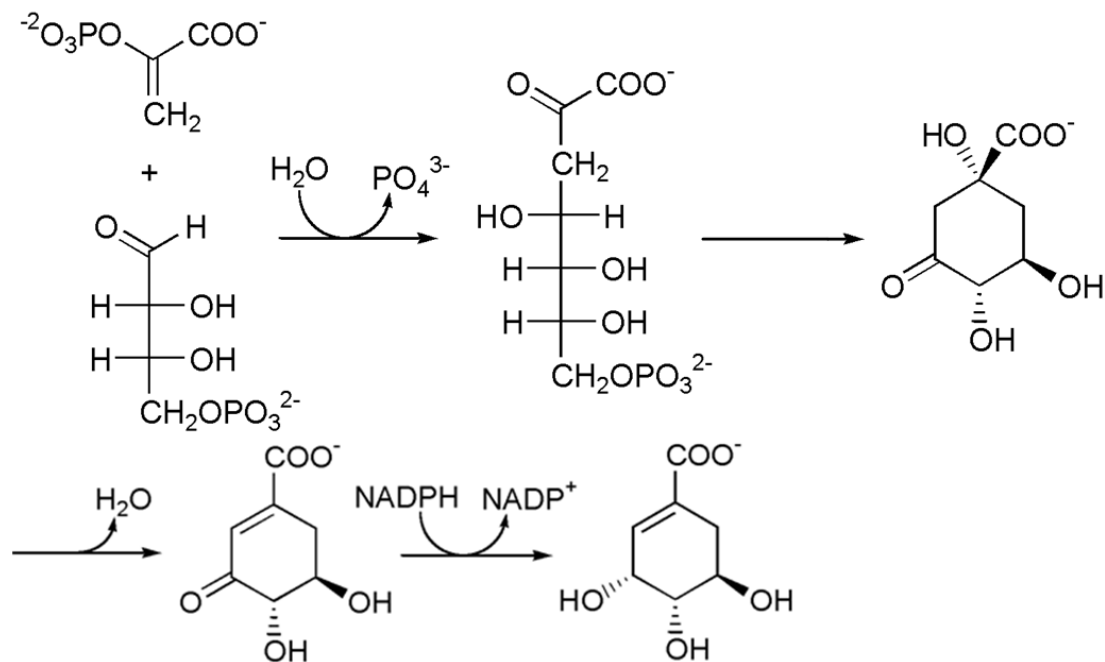
Bei den Hydroxyzimtsäuren findet man häufig Ester der Kaffee-, Cumar- und Ferulasäure mit D-Chinasäure und D-Glucose. Allen voran steht die Chlorogensäure, der Ester der Kaffee- und der Chinasäure.



**Abbildung 6:** Strukturformel der Chlorogensäure

### 2.3.3 Synthese polyphenoler Verbindungen in pflanzlichen Organismen

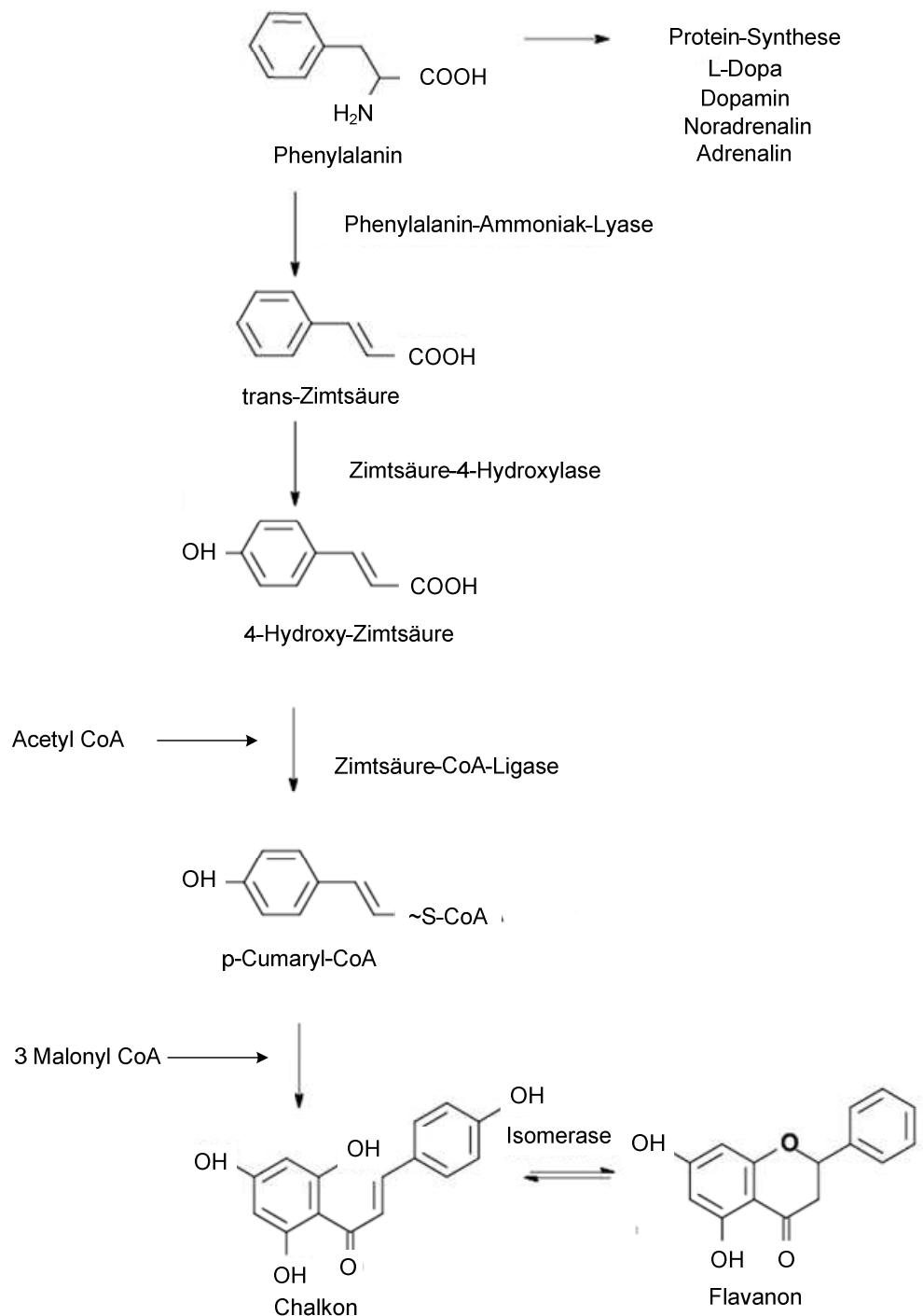
Dem tierischen Organismus ging im Laufe der Evolution die wichtige Fähigkeit aromatische Strukturen aufzubauen verloren. Es fehlt das Enzym, das die Bildung der Shikimisäure aus Zwischenprodukten der Glykolyse und des Pentosephosphatweges katalysiert. Damit wird auch die Bildung der Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan unmöglich gemacht (Löffler et al., 1998).



**Abbildung 7:** Biosynthese der Shikimisäure vereinfacht nach Karlson et al., 2005

Aus Phosphoenolpyruvat der Glykolyse und Erythrose-4-phosphat, einem Zwischenprodukt des Pentosephosphat-Zyklus, entsteht die C<sub>7</sub> Verbindung 2-Keto-3-desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat. Nach Eliminierung des Phosphats wird diese zu Dehydrochinat cyclisiert. Wasser wird abgespalten und durch Reduktion der Oxo-Gruppe entsteht Shikimat.

Aus der Shikimisäure leiten sich zahlreiche in Pflanzen vorkommende Aromaten wie die Phenolsäuren und auch die aromatischen Aminosäuren ab. Das aus ihr entstehende Phenylalanin wird für die weiteren Syntheseschritte bei Bildung der Flavonoide benötigt.



**Abbildung 8:** Der Phenylpropan-Stoffwechsel der Pflanzen

Über den Zimtsäureweg wird das Phenylalanin von der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase nicht-oxydativ desaminiert. Aus der erhaltenen trans-Zimtsäure wird die 4-Hydroxyzimtsäure gebildet und in einem weiteren Schritt p-Cumaryl-CoA. Dieses

kondensiert mit Malonyl-CoA zu dem Flavanon Grundgerüst aus dem dann durch weitere Reaktionsschritte die Flavonoide und Stilbenoide entstehen. Die aus den Zwischenschritten stammenden Hydroxyzimtsäure-Derivate sind die Basis für die Synthese von Hydroxybenzoesäure-Derivaten. Aus p-Cumarsäure entsteht durch weitere Hydroxylierungs- und Methylierungsschritte die Ferula- und Kaffeesäure (Karlson et al., 2005).

#### **2.3.4 Metabolismus der Flavonoide und Phenolsäuren**

Die Aglykone der Flavonoide werden im Dünndarm durch passive Diffusion resorbiert und in der Leber sulfatiert, methyliert oder glukoruniert und mit dem Gallensaft wieder ausgeschieden. Möglich sind auch der mikrobielle Abbau der Glykoside im Kolon und eine nachfolgende Aufnahme der Aglykone. Diskutiert wird ebenfalls die Möglichkeit einer aktiven Aufnahme bestimmter Flavonolglukoside im Dünndarm (Watzl et al., 2001).

Freie Phenolsäuren werden im Dünndarm aufgenommen. Hydroxyzimtsäuren werden sowohl im Dünndarm sowie im Dickdarm resorbiert. Die Ester allerdings müssen erst durch Enzyme der Dickdarmflora gespalten werden, um dort absorbiert zu werden (Watzl et al., 2001).

### 3 Bisheriger Stand der Analytik und Zielsetzung

Brønnum-Hansen et al. (1983) berichten nach ihren HPLC-Analysen über die Strukturen von vier qualitativ und quantitativ erfassten Anthocyanen im schwarzen Holunder: Cyanidin-3-glucosid (~66%), Cyanidin-3-sambubiosid (~32%), Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid (~1%) und Cyanidin-3,5-diglucosid (<1%).

In der Studie von Watanabe et al., (1998) erfolgte die Analyse der vier bekannten Anthocyane in handelsüblichen Konfitüren, Gelees, Süßigkeiten und Säften, die bei der Herstellung mit Holunderextrakt eingefärbt wurden. Die Holunderpigmente wurden aus den Proben mit Hilfe der Festphasenextraktion extrahiert und nach micellarer elektrokinetischer Chromatographie gekoppelt mit einem UV-VIS Detektions-System bestimmt.

Nagl et al. (2002) entwickelten eine HPLC-Methode mit UV-Detektion, um phenolische Verbindungen in Press-Säften des schwarzen Holunders zu analysieren. Die Säfte wurden mittels Solid Phase Extraction (SPE) gereinigt. Die dadurch erhaltenen methanolischen Extrakte wurden danach mit Gradientenelution auf einer Reversed Phase C<sub>18</sub> Säule aufgetrennt und bei 260, 280, 320 und 350 nm detektiert. Durch Vergleich, der mittels Dioden Array Detektors aufgenommenen UV-Spektren (220-450 nm) und der relativen Retentionszeiten von Standardlösungen, konnten die farblosen Polyphenole Protocatechusäure,  $\beta$ -D-1-O-Caffeoylglucose, Kaffeesäure, Chlorogensäure, Isoquercitrin, Rutin, Avicularin, Quercetin und Kämpferol in hundert Holundersaftkonzentraten aus drei europäischen Ländern (Dänemark, Österreich, England) identifiziert werden. Gehalte der Protocatechusäure, Chlorogensäure, von Rutin und Avicularin wurden bei 260 nm quantifiziert.

Eine Beschreibung der farblosen Polyphenole erfolgte durch Hillebrand (2004). Die Isolierung der Copigmente in dieser Arbeit erfolgte durch das Herstellen eines Ethylacetat-Extraktes aus einem handelsüblichen Holundersaft. Dieser Extrakt wurde anschließend mit High-Speed-Counter-Current-Chromatography (HSCCC) fraktioniert und die erhaltenen Fraktionen mittels HPLC/DAD/ESI-MS(n) und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) untersucht. Durch die Daten der NMR-Spektroskopie wurden Chlorogensäure, Rutin, Quercetin-3-Glucosid und Protocatechusäure identifiziert.

Die Strukturzuordnung des Nicotiflorins (Kämpferolrutosid) erfolgte aufgrund des Fragmentierungsmusters aus den HPLC-ESI/MS(n) Daten.

Wu et al. (2004) charakterisierten insgesamt 7 verschiedenen Anthocyane im *Sambucus nigra*: Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid, Cyanidin-3,5-diglucosid, Cyanidin-3-sambubiosid und Cyanidin-3-glucosid. Zum ersten Mal konnten auch die Verbindungen Cyanidin-3-rutosid, Pelargonidin-3-glucosid und Pelargonidin-3-sambubiosid nachgewiesen werden. Die Extraktion der getrockneten Beeren erfolgte in dieser Studie mit „accelerated solvent extraction“ (ASE), die Analysen der Extrakte durch HPLC-ESI-MS/MS gekoppelt mit DAD und/oder Fluoreszenzdetektion.

Lee et al. (2007) identifizierten und quantifizierten im europäischen Holunder mittels HPLC/DAD/ESI-MS/MS die bekannten Anthocyane Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid, Cyanidin-3,5-diglucosid, Cyanidin-3-sambubiosid und Cyanidin-3-glucosid. Im Spurenbereich fanden sich des Weiteren Cyanidin-3-rutosid, Pelargonidin-3-glucosid und Delphinidin-3-rutosid. Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-sambubiosid konnten als mengenmäßig dominierend charakterisiert werden.

Die in der Arbeit von Lee nachgewiesenen farblosen, polyphenolen Verbindungen umfassten Rutin, Kämpferolrutosid (Nicotiflorin), Isoquercitrin, Neochlorogensäure, Chlorogensäure, Cryptochlorogensäure, Isorhamnetin-3-rutosid und Isorhamnetin 3-glucosid, die jeweils qualitativ nachgewiesen und quantitativ bestimmt wurden.

Rieger et al. (2008) setzen die Technik der ASE zu Probenaufarbeitung ein und identifizierten bzw. quantifizierten Anthocyane, Flavonolglykoside und Hydroxyzimtsäuren in den Beeren und Blüten von *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra* und *Vaccinium myrtillus* mittels RP/HPLC/PDA und/ oder LC/PDA-MS.

In der Literatur findet sich, im Vergleich zu den Anthocyanen, wenig Information über die farblosen Polyphenole. Diese auch als Copigmente bezeichneten Stoffe haben selbst keine eigene Farbe, wirken aber auf die Farbwirkung der Anthocyane ein (Asen et al., 1972).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich vor allem auf die Gruppe der Copigmente. Dabei basiert die Methodenentwicklung auf der apparativen Kopplung der Hochdruckflüssigkeitschromatografie mit der coulometrischen Elektroden Array Detektion (CEAD). Die coulometrische Detektion bietet den Vorteil der elektrochemischen Selektivität. Es werden organische Verbindungen umgesetzt, die je nach Wahl der Potentiale in den

Detektorzellen reduzier- oder oxidierbar sind. Das UV-Chromatogramm hingegen lässt sämtliche Verbindungen erkennbar werden, deren funktionelle Gruppen bzw. konjugierte Doppelbindungen im Bereich der gewählten Wellenlänge absorbieren. Die Selektivität des UV-Detektors unterscheidet sich damit grundsätzlich von der des CEAD.

Um die Ergebnisse der qualitativen Analyse mittels HPLC-CEAD zu untermauern, sollten zusätzlich Chromatogramme und MS(1)-Spektren mittels LC/UV-ESI/MS aufgenommen werden.

Die Quantifizierung sollte ausschließlich mit dem hochempfindlichen elektrochemischen Detektor durchgeführt werden.



## **4 Theoretische Grundlagen der angewandten Analytik**

### **4.1 Die chromatographische Trennung**

Bei der Chromatographie wird ein Stoffgemisch durch Verteilungsvorgänge zwischen zwei Phasen aufgetrennt. In der mobilen Phase (gasförmig oder flüssig) wird die Probe über die stationäre Phase (fest oder flüssig) transportiert. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen dem Probengemisch, der stationären- und der mobilen Phase werden die einzelnen Komponenten unterschiedlich stark retardiert und dadurch voneinander getrennt. Ist die mobile Phase flüssig spricht man von flüssigkeitschromatographischen Trennverfahren. In der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie fließt die mobile Phase über eine feste stationäre Phase, die sich in einer Säule befindet. Die Geschwindigkeit mit der die einzelnen Substanzen der Probe die Säule durchwandern, ist abhängig von den Wechselwirkungen zwischen den beiden Phasen. Diese beruhen auf den Vorgängen Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch, Ausschluss oder Affinität.

Bei der Reversed-Phase oder Umkehrphasen-Chromatographie ist die stationäre Phase apolar und die mobile Phase relativ polar, es werden apolare Stoffe später eluiert als polare. Als Trägermaterial der stationären Phase dient oft Silicagel an dem Alkylchlorsilane (C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>) zu Siloxanen reagieren. Mit zunehmender Kettenlänge werden die Phasen unpolarer. Aus sterischen Gründen können nicht alle Silanolgruppen des Kieselgels umgesetzt werden. Eine Nachbehandlung mit Trimethylchlorsilan (end-capping) verringert die Anzahl der freien –OH Gruppen (Meyer, 2004).

### 4.1.1 Wichtige Kenngrößen der Chromatographie

Der Verteilungskoeffizient  $K$  ist ein Maß für die Tendenz eines Stoffes sich bevorzugt in der mobilen bzw. in der stationären Phase aufzuhalten, konstante Volumina der Phasen vorausgesetzt. Diese Konstante beschreibt, laut Nernstschem Verteilungsgesetz, den theoretischen Gleichgewichtszustand der Konzentrationen des Analyten in den zwei miteinander nicht mischbaren Phasen:

$$K = \frac{c_{stat}}{c_{mob}}$$

$c_{stat}$  Konzentration des Analyten in der stationären Phase [molL<sup>-1</sup>]

$c_{mob}$  Konzentration des Analyten in der mobilen Phase [molL<sup>-1</sup>]

Das Phasenverhältnis  $\beta$  beschreibt das konstante Volumenverhältnis der Phasen. Es dient der Korrektur des Verteilungskoeffizienten und es ist groß, wenn die Säule relativ durchgängig ist und damit ein großes Volumen an mobiler Phase vorliegt:

$$\beta = \frac{V_{mob}}{V_{stat}}$$

$V_{mob}$  Volumen der mobilen Phase

$V_{stat}$  Volumen der stationären Phase

Zusammenfassend ergibt sich die entscheidende Kenngröße des Kapazitätsfaktors  $k'$ :

$$k' = \frac{c_{stat} \cdot V_{stat}}{c_{mob} \cdot V_{mob}} = \frac{K}{\beta} = \frac{n_{stat}}{n_{mob}} = \frac{m_{stat}}{m_{mob}}$$

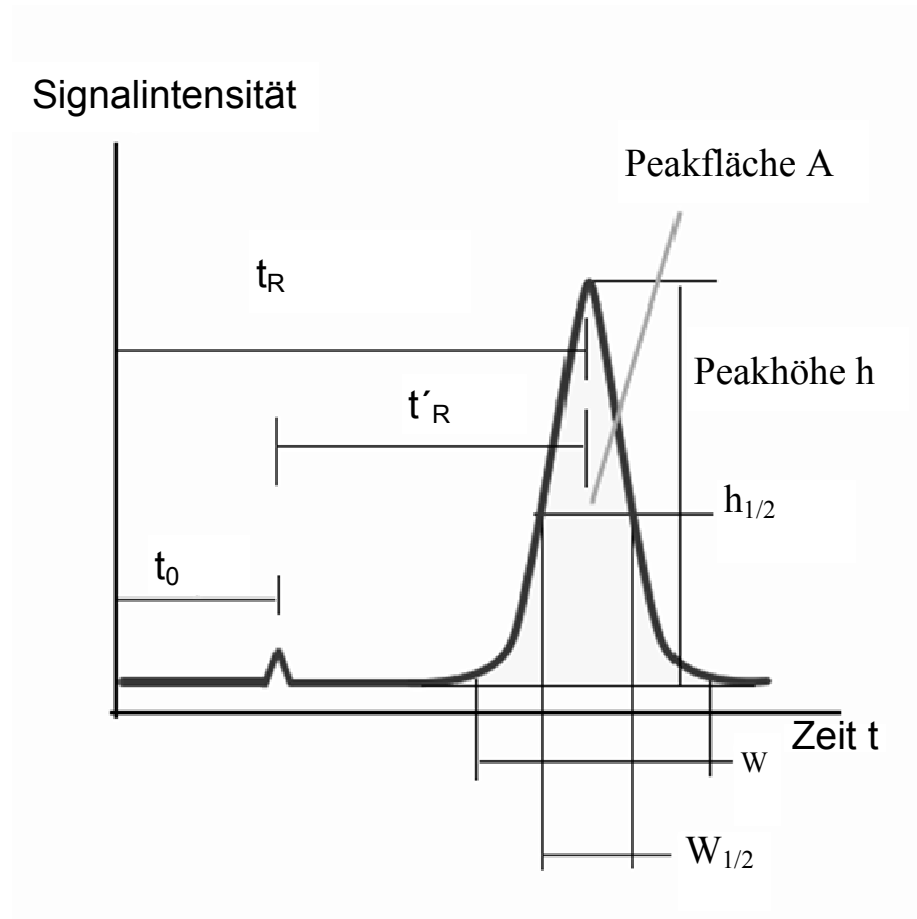
$n_{stat}, n_{mob}$  Molzahl des Analyten in der stationären bzw. mobilen Phase

$m_{stat}, m_{mob}$  Masse des Analyten in der stationären bzw. mobilen Phase [gL<sup>-1</sup>]

Der Kapazitätsfaktor lässt sich auch experimentell beschreiben:

Die Bruttoretentionszeit  $t_R$  ist jene Zeit, die vom Einspritzen des Stoffs bis zum Erreichen seines Peakmaximums verstreicht (siehe **Abbildung 9**) und kann zur qualitativen Charakterisierung einer Substanz herangezogen werden. Sie ist bei gleichen Bedingungen immer gleich groß. Die Totzeit  $t_0$  des HPLC-Systems ist jene Zeit, die die mobile Phase benötigt, um vom Injektor, über das gesamte chromatographische System bis zum Detektor zu wandern. Da beide Faktoren von der Länge der Trennsäule und der Fließge-

schwindigkeit der mobilen Phase abhängig sind, definiert man den günstigeren Kapazitäts- oder Retentionsfaktor  $k'$ . Dieser ist von der Säulenlänge und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase unabhängig.



**Abbildung 9:** Schema eines theoretischen Chromatogramms

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Die Nettoretentionszeit  $t'_R$  ergibt sich also aus der Bruttoretentionszeit abzüglich der Totzeit. Dividiert man durch den Wert der Totzeit, so ist der sich daraus resultierende Kapazitätsfaktor ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung einer bestimmten Substanz mit einem chromatographischen System.

Zwei Komponenten einer Mischung werden dann getrennt, wenn sich ihre Kapazitätsfaktoren  $k'_1$  und  $k'_2$  voneinander unterscheiden.

Maß dafür ist der Selektivitätsfaktor  $\alpha$ :

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Die Trennung erfolgt umso einfacher, je größer die Differenz zwischen den Kapazitätsfaktoren von Substanz 1 und Substanz 2 ist. Der Selektivitätsfaktor ist stets größer als eins, da die später eluierte Substanz immer der Dividend im Quotient ist.

Um zwei Substanzen quantifizieren zu können, müssen diese mit genügend großer Auflösung ( $R \geq 1,5$ ) voneinander getrennt sein. Die Auflösung  $R$  ist wie folgt definiert:

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{\frac{1}{2}1} + w_{\frac{1}{2}2}}$$

Eine weitere Gleichung definiert die Auflösung über  $\alpha$ ,  $k'$  und die Zahl der theoretischen Trennstufen  $N$  einer Säule:

$$R_{21} = \frac{1}{4} (\alpha - 1) \frac{k'}{k' + 1} \sqrt{N}$$

#### 4.1.2 Trennleistung eines chromatographischen Systems

Die Charakterisierung einer Säule erfolgt durch deren theoretische Zerlegung in Abschnitte, den sogenannten Trennstufen. Die Trennstufen- oder Bodenhöhe ist jene Distanz in der Säule innerhalb der sich ein Verteilungsgleichgewicht einmal eingestellt hat.

Die Trennstufen- oder Bodenzahl  $N$  der Säule lässt sich wie folgt berechnen:

$$N = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad \text{oder} \quad N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{w_{\frac{1}{2}}} \right)^2$$

Eine Erhöhung der Bodenzahl erreicht man durch die Wahl einer längeren Säule.

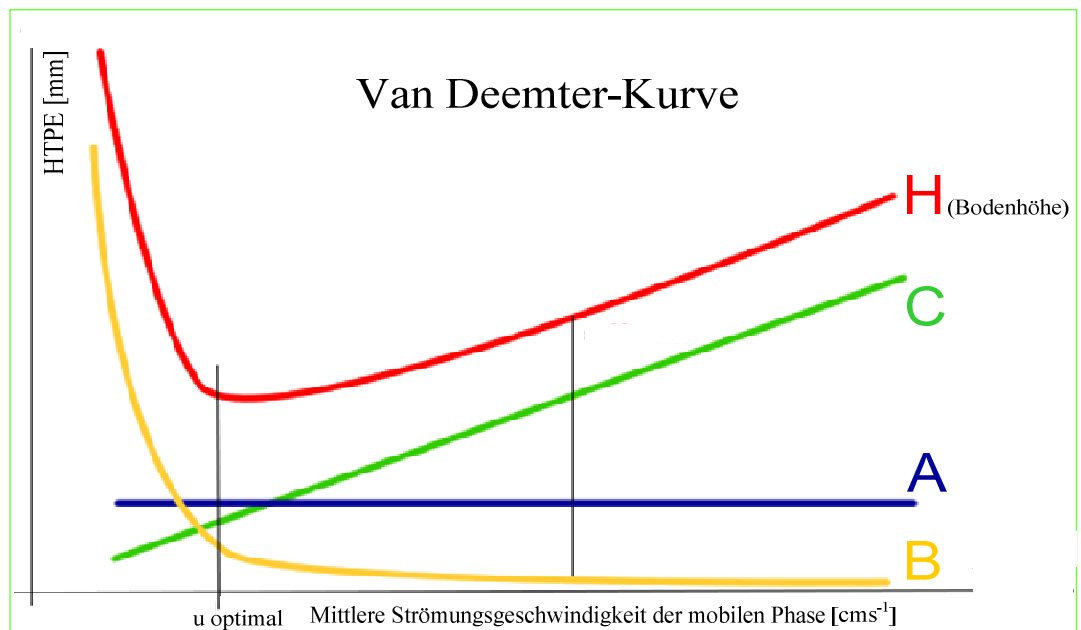
Viele Böden in einer Säule bewirken eine bessere Auflösung aber auch eine größere Bandenverbreiterung je länger die zurückgelegte Strecke und die Verweilzeit in der Säule sind.

Ist die Länge der Säule  $L$  bekannt lässt sich auch die Trennstufenhöhe  $H$  berechnen:

$$H = \frac{L}{N}$$

Je kleiner  $H$  desto mehr Böden befinden sich in einer Säule gleicher Länge und daraus resultiert eine bessere Auflösung. Kleinere Teilchen im Füllmaterial ergeben eine Verkleinerung der Bodenhöhe.

Neben den bereits genannten Faktoren gibt es auch noch andere Prozesse, die die Peakform und die Trennung beeinflussen. Die van Deemter Kurve beschreibt diese:



Das Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens (engl. height equivalent to a theoretical plate) wird durch folgende Formel dargestellt:

$$HTPE = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

A Eddy Diffusion, Streu- Wirbeldiffusion, unabhängig von der Fließgeschwindigkeit

B Longitudinal-Diffusion

C Stoffaustauschphänomene zwischen stationärer und mobiler Phase

u Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase

Somit existiert eine optimale Fließgeschwindigkeit ( $u_{\text{optimal}}$ ) bei der die Bodenhöhe am kleinsten ist. Bei diesem Minimum hat die Säule ihre effizienteste Trennstärke bei optimaler Peakbreite.

### 4.1.3 Verfahrensweisen der Quantifizierung

Zur quantitativen Analyse eignen sich sowohl Peakhöhe  $h$  wie auch die Peakfläche  $A$ . Der Peak entspricht im Idealfall einer Gauß'schen Glockenkurve (siehe **Abbildung 9**). Sowohl Fläche als auch Höhe sind der injizierten Stoffmenge proportional. Die eigentliche Quantifizierung wird durch die Bestimmung der Höhen bzw. Flächen verschiedener, aber bekannter Konzentrationen von Standardlösungen und einer daraus resultierenden externen Kalibrierfunktion erreicht. Diese kann zusätzlich auch einen internen Standard enthalten.

Peaküberlappung ist eine Fehlerquelle bei der Integration. Die Bestimmung der Peakhöhen anstatt der Peakflächen ist bei ungenügender Auflösung oft weniger falsch. Andererseits liefert die Auswertung der Peakflächen bei unsymmetrischen Peaks genauere Ergebnisse.

Eine weitere Methode ist die Standardaddition (siehe **Abschnitt 6.6.1**).

## 4.2 Methoden der Elektroanalytik

Für die Elektrochemie sind Redoxvorgänge an Elektroden entscheidend. In der Potentiometrie nutzt die analytische Chemie die Konzentrationsabhängigkeit des elektrochemischen Potentials einer Elektrode. Die Bestimmung unterschiedlicher Konzentrationen ergibt sich praktisch durch die stromlose also leistungslose Messung der Potentialdifferenz zwischen einer Indikator- und einer Referenzelektrode.

In der Voltammetrie (aus Volt- und Amperometrie) und Polarographie wird die chemische Zusammensetzung von Stoffgemischen anhand der Messung des Stromes gegenüber einer zeitlich veränderten Spannung bestimmt. Art und Menge von Depolarisatoren werden aus dem Verlauf von Strom-Spannungskurven ermittelt.

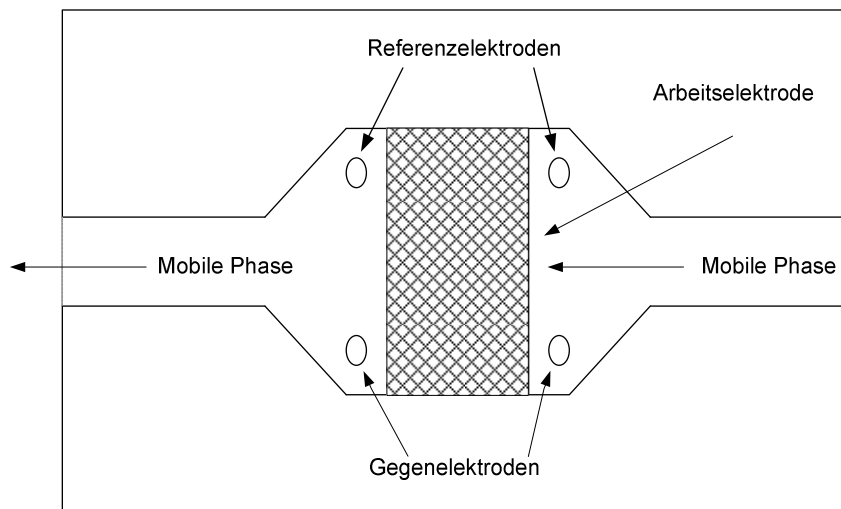
Wird der Strom bei einer konstanten Spannung gemessen, spricht man von Amperometrie, Messungen des Potentials bei konstantem Strom nennt man Voltammetrie.

Erfolgt der elektrochemische Umsatz des Analyten quantitativ spricht man von Coulometrie.

Eine weitere Möglichkeit der elektrochemischen Quantifizierung bietet die Messung der Leitfähigkeit einer Flüssigkeit (Konduktometrie). Bei dieser Methode wird der Kehrwert des Ohmschen Widerstandes einer Analysenlösung bestimmt (in Siemens  $S=\Omega^{-1}$ ). Leitfähigkeitsdetektoren werden unter anderem in der Ionenchromatographie eingesetzt.

### 4.2.1 Der Aufbau einer coulometrischen Detektorzelle

In jeder Zelle befindet sich eine aus porösem Kohlenstoff bestehende Arbeitselektrode (AE) und je zwei Palladium-Referenz- und zwei Platin-Gegenelektroden. Da die Arbeitselektrode eine im Vergleich zu Referenz- und Gegenelektrode sehr große Oberfläche besitzt, benötigt man die Letzteren in zweifacher Ausführung, um ein eventuell auftretendes Potentialgefälle zu verhindern.



**Abbildung 15:** Schematischer Querschnitt durch eine coulometrische Detektorzelle

Zwischen Arbeits- und Referenzelektroden wird ein konstantes Potential angelegt. Fließt eine elektrochemisch aktive Substanz durch die poröse Kohlenstoffelektrode und wird oxidiert oder reduziert, so wird simultan der Stromfluss zwischen Arbeits- und Gegenelektrode registriert und ergibt ein Detektorsignal.



## 4.2.2 Grundlagen der coulometrischen Detektion

Detektoren am Ende einer HPLC-Apparatur wandeln die analytische Information der chromatographischen Trennung in elektrische Signale um. Bei der elektrochemischen Detektion wird ein Faradayscher Strom gemessen, der bei einer Redoxreaktion an einer Arbeitselektrode entsteht. Um eine Stoffmenge  $n$  eines  $z$ -wertigen Ions vollständig abzuscheiden, braucht es die Ladung  $Q$ :

$$Q = n \cdot z \cdot F$$

$F$  Faraday Konstante ( $96\,485,309\text{ Cmol}^{-1}$ )

$n$  Stoffmenge [Mol]

$Q$  Ladungsmenge [C]

$z$  Ladungszahl

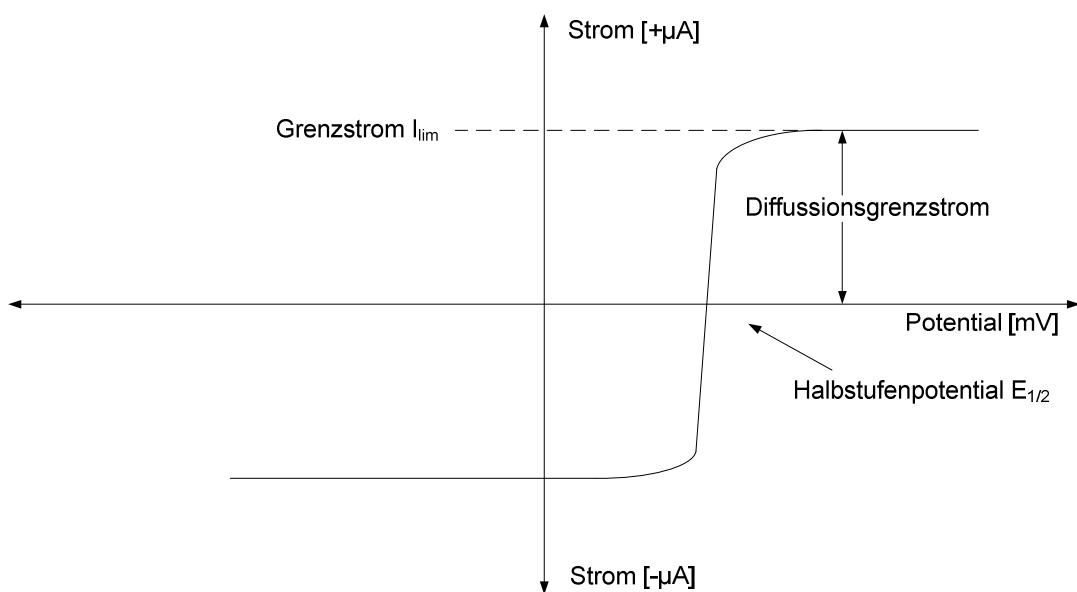
Nach den Faradayschen Gesetzen besteht eine direkte Proportionalität zwischen dem Umsatz des zu analysierenden Stoffes und der verbrauchten Menge an Elektrizität.

$$m = \frac{M \cdot Q}{z \cdot F}$$

$m$  Masse der elektroaktiven Substanz [g]

$M$  molare Masse [ $\text{gmol}^{-1}$ ]

$Q$  Ladungsmenge [C]



**Abbildung 9:** Schematische Strom-Spannungskurve einer reversiblen Redoxreaktion

Mit steigendem Potential der Arbeitselektrode nimmt der Faradaysche Strom zu, bis der Grenzstrombereich ( $I_{lim}$ ) erreicht ist. Der Grenzstrom ist dann der Konzentration des elektrochemisch aktiven Analyten proportional. Das Potential, bei dem die Hälfte des Diffusionsgrenzstromes erreicht wird, wird als Halbstufenpotential ( $E_{1/2}$ ) bezeichnet.

Die Messung erfolgt zum Zeitpunkt  $t$  im Grenzstrombereich des Analyten:

$$Q_t = I_{lim} \cdot t$$

$I_{lim}$  Grenzstrom [ $\mu A$ ]

$t$  Zeit [s]

Wenn also:

$$m/M = c_0 \cdot V$$

und

$$v = V / t$$

so gilt:

$$I_{lim} = z \cdot F \cdot c_0 \cdot v_f$$

$c_0$  Konzentration des Analyten [ $molL^{-1}$ ]

$v_f$  Volumengeschwindigkeit [ $mlmin^{-1}$ ]

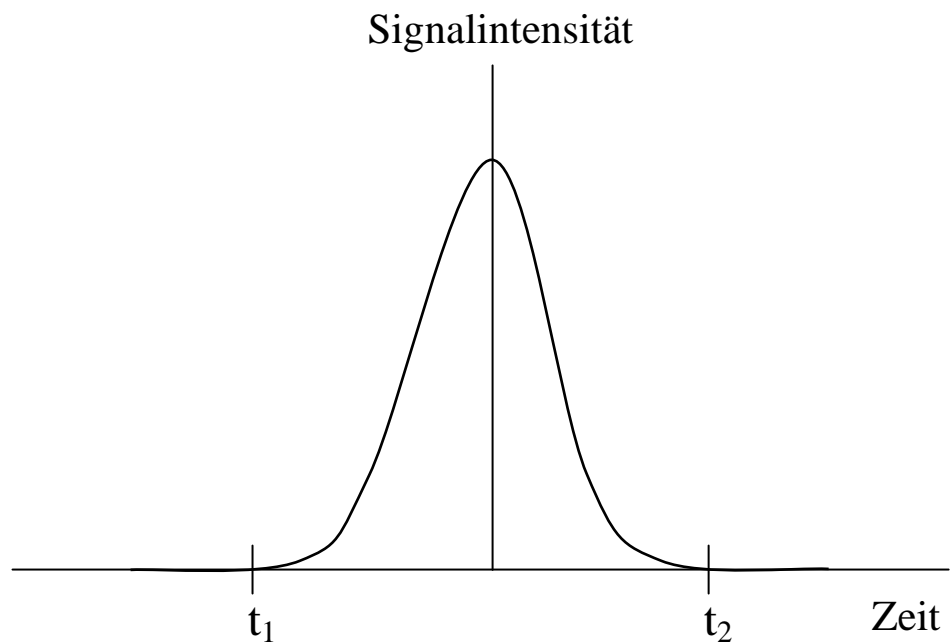
$V$  Volumen [ml]

Damit ist der Zusammenhang der erhaltenen Peakhöhe aus dem Detektorsignal  $I_{lim}$  und der Konzentration des Analyten gegeben. Aufgrund der Tatsache, dass kein vollständiger Umsatz des Analyten erfolgt, muss der sogenannte Konversationsfaktor  $R_{conv}$  berücksichtigt werden:

$$c_0 = \frac{I_{lim}}{R_{conv} \cdot z \cdot F \cdot v_f}$$

Erfolgt die Auswertung der Chromatogramme nicht über die Peakhöhen sondern über die Peakflächen, so gilt:

$$Q = \int_{t_1}^{t_2} I dt = \frac{m}{M} \cdot z \cdot F$$



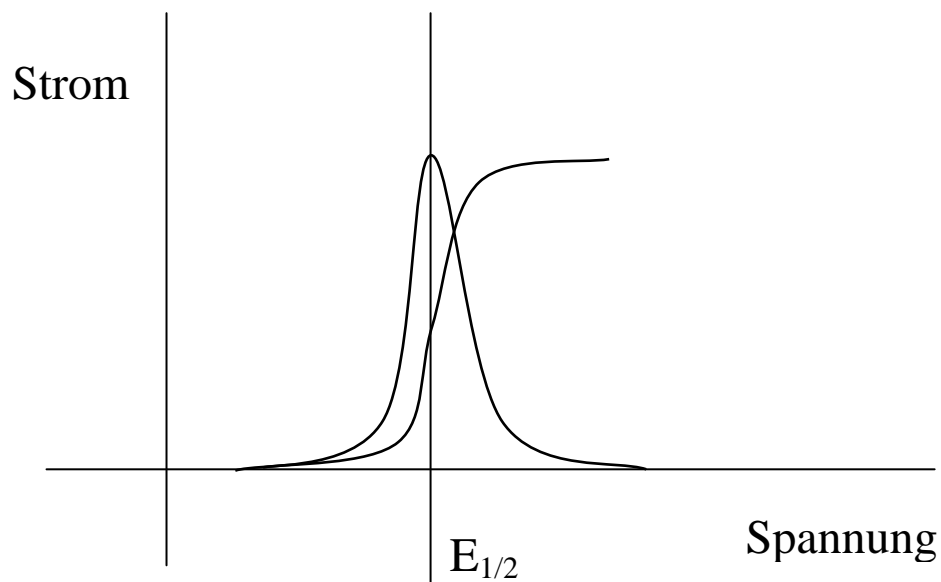
**Abbildung 10:** Messung der Peakfläche

Bei der Auswertung der Chromatogramme über die Peakflächen, ist die Peakfläche unabhängig von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase.

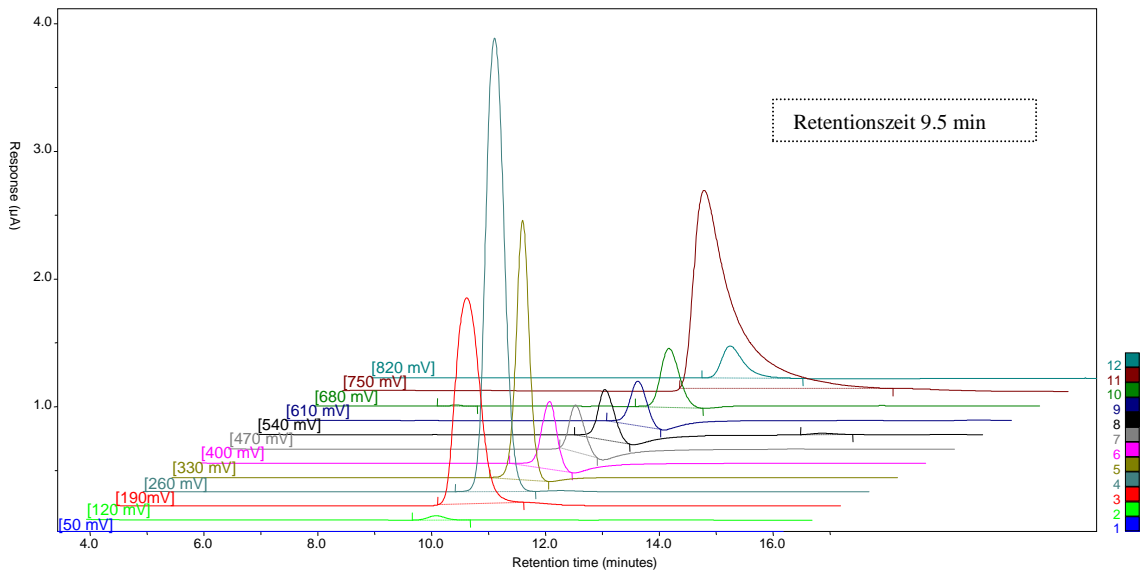
### 4.2.3 HPLC gekoppelt mit dem coulometrischen Elektroden Array Detektor

Im CEAD arbeiten bis zu 16 voneinander unabhängige coulometrische Zellen (Kanäle) in Serie. Das Potential jedes einzelnen Kanals kann spezifisch eingestellt werden. Die Unterscheidung von Substanzen gelingt damit nicht nur durch die chromatographische Trennung, sondern auch durch deren elektrochemische Eigenschaften. Das heißt, Substanzen die beispielsweise zeitgleich eluieren, könnten bei ausreichend unterschiedlichem Halbstufenpotential selektiv detektiert werden. Dazu muss das Potential der Arbeitselektrode im Grenzstrombereich des gewählten Analyten liegen. Nur dann wird beim elektrochemischen Umsatz dieser Substanz das maximale Signal (im Chromatogramm als Peakhöhe oder Peakfläche erkennbar) des Detektors erreicht. Das Signal dieses sogenannten „optimalen Kanals“ wird im Regelfall auch zur Quantifizierung des Analyts herangezogen.

Im Fall der in Serie geschalteten coulometrischen Durchflusszelle erhält man jedoch keine stufenförmigen, sondern peakförmige Strom-Spannungskurven. Der Strom im Peakmaximum tritt bei einem Potential auf, das dem Halbstufenpotential einer Strom-Spannungskurve, die an einer einzelnen Zelle aufgenommen wurde, entspricht.



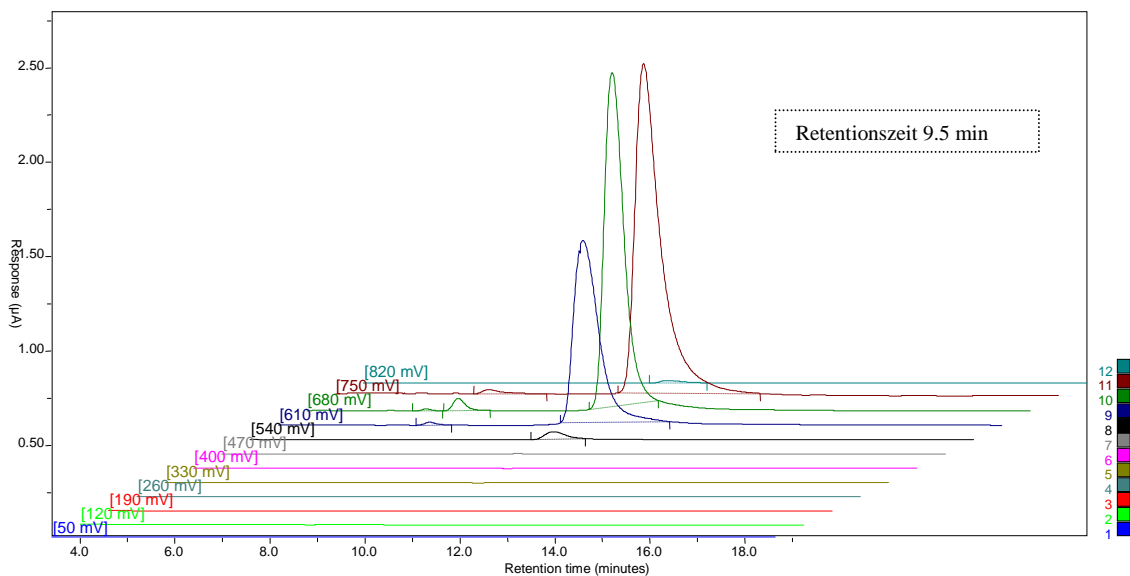
**Abbildung 11:** Stufenförmige bzw. peakförmige Strom-Spannungskurven



**Abbildung 12:** Elektroden Array Chromatogramme des Quercitrins,

1 Kanal: +50 mV    2 Kanal: +120 mV    3 Kanal: +190 mV    4 Kanal: +260 mV  
 5 Kanal: +330 mV    5 Kanal: +400 mV    7 Kanal: +470 mV    8 Kanal: +540 mV  
 9 Kanal: +610 mV    10 Kanal: +680 mV    11 Kanal: +750 mV    12 Kanal: +820 mV

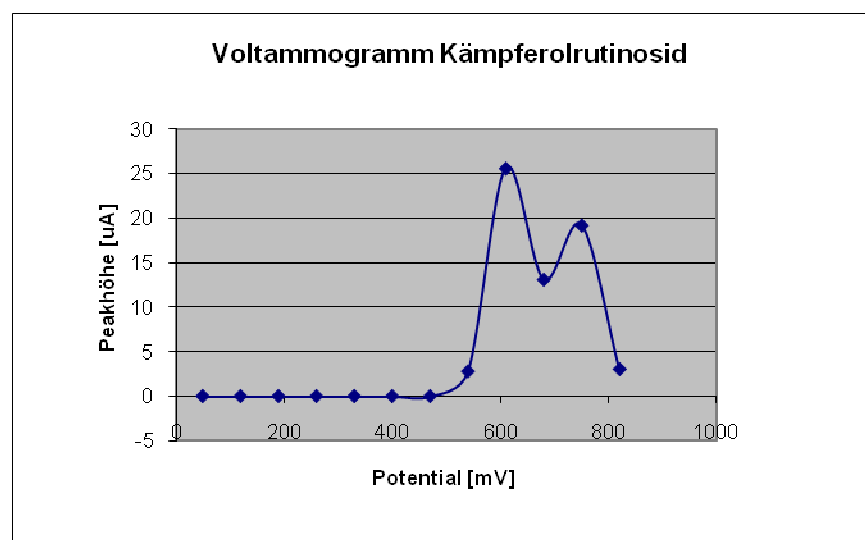
Quercitrin zeigt ein Maximum im Kanal 4 bei einem Potential von (+260 mV), auffällig ist die Peakverbreiterung bzw. das Tailing in den hinteren Kanälen bei steigendem Potential



**Abbildung 13:** Chromatogramme des Kämpferolrutinosids (Nicotiflorin)

Beim Vergleich von **Abbildung 12 und 13** ergeben sich für beide Substanzen gleiche Retentionszeiten. Sie unterscheiden sich aber hinsichtlich ihres elektrochemischen Verhaltens. Es wäre also theoretisch möglich beim Vorliegen beider Substanzen in derselben Probenlösung das Quercitrin im Kanal 4 zu quantifizieren. Bei den gewählten Einstellungen der Potentiale des Detektors könnte man das Kämpferolrutinosid nicht erfassen, da durch die Anwesenheit des Quercitrins die Kanäle in denen das Kämpferolrutinosid Signale aufweist verfälscht werden würden.

Trägt man, wie in **Abbildung 14** dargestellt, die Detektorsignale gegen die gewählten Zellpotentiale auf, so erhält man eine Strom-Spannungskurve oder ein Voltammogramm. Diese hydrodynamischen Kurven sind für die jeweilige Substanz charakteristisch und tragen neben der Retentionszeit zur Identifikation bei.



**Abbildung 14:** Voltammogramm des Kämpferolrutinosids

Die Lage eines Potentials im Peakmaximum ist nicht nur vom Analyten, sondern auch von der Zusammensetzung der mobilen Phase (z.B.: pH-Wert, Art und Konzentration der verwendeten Pufferlösung) abhängig. Bei jeglicher Veränderung der mobilen Phase in ihrer Zusammensetzung müssen daher die Strom-Spannungskurven neu erstellt werden.

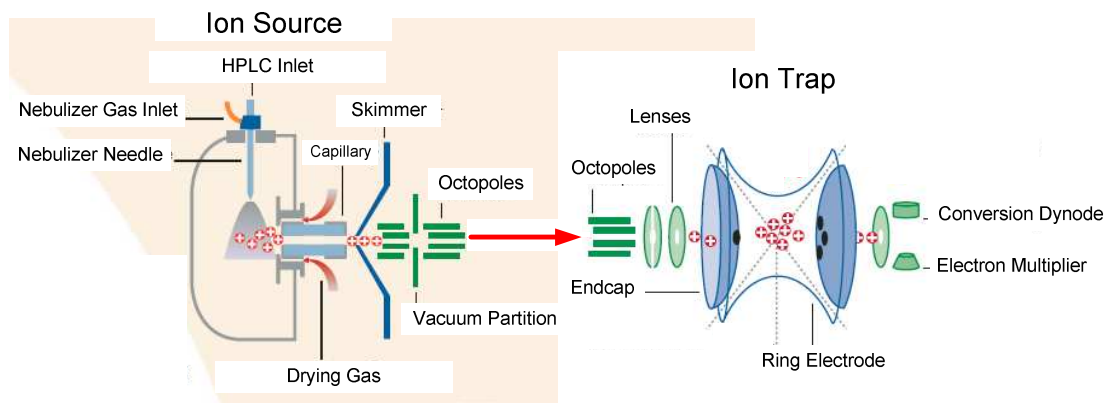
Dies gilt ebenfalls beim Austausch eines der Detektorzellblocks gegen einen anderen. Der Grund dafür ist, dass sich die Oberflächen der Elektroden in den Zellen im Laufe

der Zeit verändern und damit auch die Intensitäten der betreffenden Signale von Zelle zu Zelle verschieden sein können.

### 4.3 HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie

Nach Auftrennung der Lösung eines Stoffgemisches über ein HPLC-System, können einzelne Substanzen in einem Massenspektrometer detektiert werden. Zwischen dem Massenspektrometer und dem HPLC-System ist im Normalfall ein weiteres Detektionssystem (UV oder DAD usw.) zwischengeschaltet.

Das Interface zwischen der HPLC und dem Massenspektrometer bildet die Ionenquelle. Hier haben sich aktuell zwei Systeme durchgesetzt: die Elektrospray-Ionization- (ESI) siehe **Abbildung 16** und die Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) Quelle.



**Abbildung 16:** Schema Elektrospray-Ionisation und Ionenfalle, modifiziert aus Bruker Daltonics Brochure Esquire 6000

Beim dem in dieser Arbeit verwendeten Elektrospray wird die Lösung des Analyten unter Atmosphärendruck an der Spitze einer Kapillare (nebulizer needle) durch Anlegen einer Hochspannung (2-6 kV) vernebelt. Es kommt zur Bildung gasförmiger Ionen aus Mikrotropfen, ein inertes Gas (Stickstoff) dient als Trocknungsgas.

Je nach Polarisierung der Ladung entstehen einfach positiv oder negativ geladene Pseudomolekülonen entweder durch Protonenanlagerung  $[M+H]^+$  oder Protonenabspaltung  $[M-H]^-$ . Im positiven Modus finden sich häufig Natrium- und Kaliumaddukte, im negativen Modus Chloridaddukte.

Die erzeugten Ionen nehmen ihren Weg durch die anschließende Glaskapillare. Treibende Kraft für den Ionentransport ist ein Druckgradient innerhalb des Massenspektrometers. „Skimmer“, „octopoles“ und „lenses“ gehören dem Bereich des Ionentransports und der Fokussierung an.



Die Ionenfalle ist ein geschlossenes elektrisches Quadrupol-Feld und akkumuliert die in der Ionenquelle erzeugten Ionen. Diese werden durch Veränderung des quadrupolaren und dipolaren Felds aus der Falle herausgeschleudert und im Scan Mode nach steigendem Masse/Ladung Verhältnis aufgetrennt. Somit können große Massenbereiche abgetastet werden.

Im MS(n) Mode können spezifische Ionen in der Ionenfalle isoliert werden. Durch Stöße mittels eines inerten Kollisionsgases (Stickstoff, Helium oder Argon) wird Translationsenergie (resonance excitation) auf die zu fragmentierenden Ionen übertragen. Die dadurch ausgelösten intramolekularen Schwingungen resultieren in strukturspezifischen Fragmentierungsreaktionen. Aus den entstandenen Fragment-Ionen kann ein MS(2)-Spektrum aufgenommen oder ein weiteres Tochter-Ion isoliert werden. Dieses kann nun wieder als Mutter-Ion für einen neuerlichen Fragmentierung-Zyklus dienen MS(n). Theoretisch ist dieser Vorgang bis zu 10 Mal wiederholbar.

### 4.3.1 Instrumente

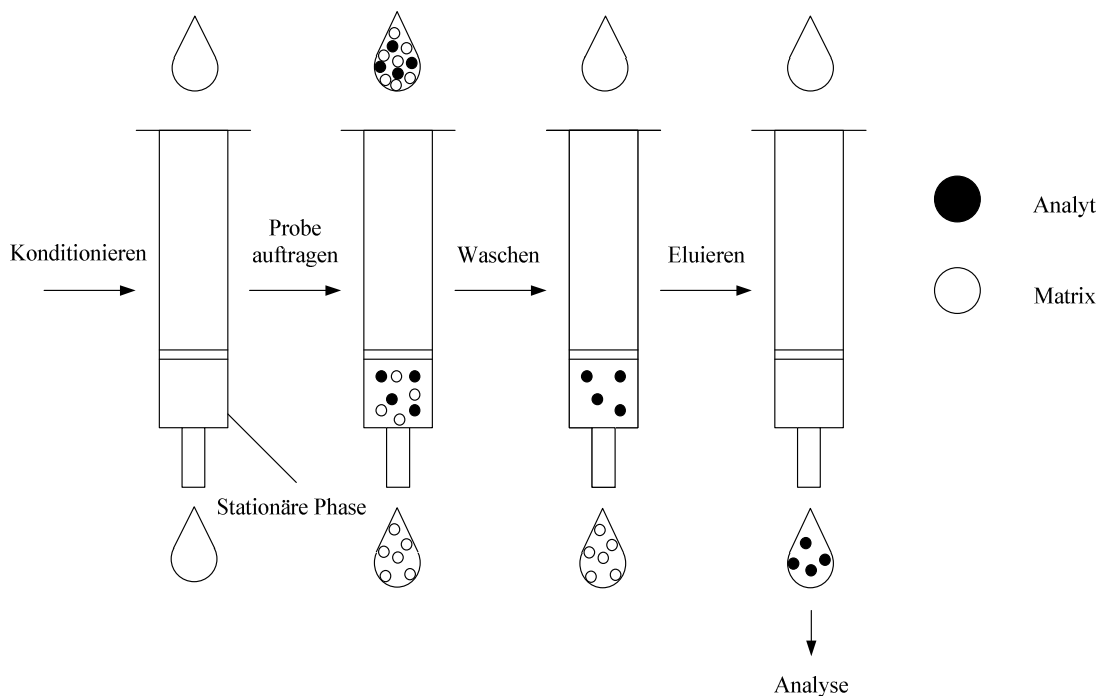
HPLC/UV-ESI/MS:

System:	Agilent 1100 Series HPLC
Vacuum Degasser:	Agilent G1322A
HPLC-Pumpe:	Agilent G1312A Binary Pump
Säule:	Machery&Nagel EC 150x4.6 mm, 5 µm Nucleodur Sphinx colum
Autosmapler:	Agilent G1313A
Detektion UV:	Agilent G1314A
Detektion MS:	High Capacity Trap Ionenfalle, Elektrospray Ionenquelle, Bruker Daltonics
Software:	Hystar 3.1. und DataAnalysis Version 3.3. Bruker Daltonics

## 4.4 Festphasenextraktion, Solid Phase Extraction (SPE)

Diese Probenvorbereitungsmethode ähnelt der Säulenchromatographie. Sie dient der Reinigung einer flüssigen Probe, der Anreicherung und Aufkonzentrierung von Substanzen oder Isolation der Analyten aus unterschiedlichen Matrices (Fruchtsaft, Blut, Urin usw.).

Die Auftrennung und Separation erfolgt, wie bei den HPLC-Säulen, auf stationären Umkehr-, Normal- oder Ionentauscher Phasen. Die kommerziell erhältlichen Kartuschen (Cartridges) ähneln Injektionsspritzen und sind, je nach Kapazität mit unterschiedlichen Mengen an stationärer Phase erhältlich. Das schmale Ende ist passend für eine Vorrichtung zur Durchführung der Extraktion (Vakuumwanne). An diese, auch SPE-Rack genannte Vorrichtung, kann mit Hilfe einer Vakuumpumpe ein Unterdruck angelegt werden, um das Eluieren zu beschleunigen.



**Abbildung 17:** Schema der Festphasenextraktion modifiziert nach (Henze, 2001)

Die Durchführung der Festphasenextraktion erfolgt in 5 Schritten:

1. Wahl der geeigneten stationären Phasen, abhängig vom Analyt. Dieser muss am Sorbent reversibel binden und durch das Eluens wieder gelöst werden können. Die Kapazität der Säule ist abhängig von der Menge an stationärer Phase. Die

Masse des Analyten sollte maximal 5% der Masse der Packung im Säulchen entsprechen.

2. Die Konditionierung der Säule erfolgt durch Reinigung mit einem Lösungsmittel in dem die Analyten gut löslich sind und anschließendem Spülen mit einem Lösungsmittel, das ein vorzeitiges und ungewolltes eluieren der Analyten verhindert. Zum Beispiel kann bei Durchführung an einer RP-SPE mit Methanol gereinigt und anschließend mit H<sub>2</sub>O konditioniert werden.
3. Auftragen eines definierten Volumens der Analytenlösung mittels Pipette. Bei der RP-SPE darf der Anteil an organischem Lösungsmittel in der aufgetragenen Lösung nicht zu hoch, da sonst die Analyten unkontrolliert eluieren würden.
4. Wenn die Analyten an der stationären Phase reversibel gebunden sind, folgen ein oder mehrere Waschschritte, üblicherweise mit einem oder zwei Säulenvolumina. Das verwendete Lösungsmittel darf die Analyten nicht von der Säule lösen, sondern nur störende bzw. schwach gebundene Matrixbestandteile.
5. Die Packung wird mit einem adäquaten Volumen an Lösungsmittel gespült, dessen Elutionskraft ausreicht, um die Analyten von der Packung zu lösen. Bei der Wahl des Eluens und dessen Stärke muss jedoch auch darauf geachtet werden, dass möglichst wenige, nicht gewollte Verunreinigungen von der Säule in den Extrakt übergehen (Sigma-Aldrich publications, 1998).

Der bei der SPE enthaltene Extrakt kann direkt oder nach weiterer Verdünnung zur Analyse in der HPLC verwendet werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Abkürzung	Hersteller	CAS-Nr.	Reinheit
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma	67-68-5	>99,9%
Essigsäure	CH <sub>3</sub> COOH	Fluka	64-19-7	>99,5%
Kaliumdihydrogenphosphat.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	7778-77-0	p.a.
Methanol	MeOH	Merck	67-56-1	gradient grade
Natriumacetat-Trihydrat	CH <sub>3</sub> COONa x 3H <sub>2</sub> O	Merck	127-09-3	>99,0% p.a.
Natronlauge Titrierlösung 1 mol/l	NaOH	Merck	1310-73-2	
ortho-Phosphorsäure 85%.	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	7664-38-2	p.a.

**Tabelle 3:** Chemikalien

### 5.2 Standardsubstanzen für die Analysen

Apigenin	Fluka
Astragalin	Rotichrom
Chlorogensäure	Roth
Gallussäure	Roth
Gentisinsäure	Indofine Chemical Company
Hesperitin	Roth
Isoquercitrin	Rotichrom
Isorhamnetin	Fluka
4-Hydroxyphenyllessigsäure	Fluka
Kaffeesäure	Rotichrom
Kämpferol	Fluka
Luteolin	Sigma
Myricetin	Fluka

Nicotiflorin	Rotichrom
p-Hydroxybenzoesäure	Roth
Protocatechusäure	Roth
Quercitrin	Rotichrom
Quercetin	Fluka
Rutin	Fluka
Syringasäure	Roth
Salicylsäure	Roth
Vanilinsäure	Roth

### 5.2.1 Erstellen der Urstandardlösungen

Die Einzelsubstanz-Stammlösungen wurden in Konzentrationen von 200 bis 400 mg/l hergestellt. Dazu wurden auf der Mikrowaage zwischen 2 und 4 mg eingewogen und in 10 ml Messkolben gelöst. Da die Phenolsäuren gut in polaren Lösungsmitteln löslich sind, wurden die Urstandardlösungen der Phenolsäuren mit Methanol/Wasser (50:50, v:v) hergestellt. Die Flavonoid und Flavonoidglykoside waren nur schwer oder gar nicht in Methanol löslich, sie wurden daher in DMSO gelöst.

Bei weiteren Verdünnungsschritten wurde mit der mobilen Phase der entsprechenden HPLC-Methode verdünnt mit der auch die jeweilige Messung des Standards erfolgte.

Die in DMSO gelösten Standards wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Das Kühlstellen bei +4°C führte zur Kristallisation des DMSO. Die aus den DMSO-Lösungen durch Pipettieren hergestellten Verdünnungen mit der mobilen Phase wurden bei -20°C aufbewahrt. Für die quantitative Analyse wurden die Urstandards der Flavonoide und Flavonoidglykoside in jener Woche, in der die betreffenden Analysen stattfanden erneut hergestellt, um den durch einen eventuellen Abbau der Substanzen entstandenen Fehler ausschließen oder minimieren zu können.

Die in Methanol/Wasser (50:50, v:v) gelösten Phenolsäurestandards wurden bei -20°C aufbewahrt. Die Verdünnungen daraus wurden bei 4°C aufbewahrt, da bei diesen der Anteil an organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase mit der sie verdünnt wurden zu gering war, um ein vollständiges Einfrieren zu verhindern.

Für die Lagerung aller Urstandardlösungen wurden braune Glasgefäße zu je 5 ml verwendet und deren Schraubverschlüsse nach Verwendung mit Parafilm versiegelt.

Für die qualitativen Analysen wurden Mischstandards mit einer Konzentration von 2 µg/ml durch Pipettieren erstellt. Zusammensetzungen der Mischstandards siehe **Tabellen 4,5,8,10**.

Die Standardlösungen zum „Spiken“ der SPE-Extrakte für die Standardaddition wurden jeweils aus den Urstandards durch Verdünnen mit bidestilliertem Wasser hergestellt, jene für das Spiken der Probe zur Bestimmung der Flavonoide mit MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v:v).

### **5.3 Verwendete Geräte, allgemeine Laborausrüstung**

Analysenwaage:	Mettler AT 400
Mikrowaage:	Sartorius Mikro M 3P
pH Meter:	Metrohm 691 pH Meter
Ultraschallbad:	Bandelin Sonorex RK 103H
Pipetten:	Gilson 200-1000 µl
Zentrifuge:	Hettich Universal
SPE-Rack:	12-Ports Vacuum SPE Manifold, Baker
Titration:	Mettler Toledo DL 53
Density Meter:	DMA 4500 Anton Paar

#### **5.3.1 Sonstige Verbrauchsmaterialien**

SPE-Kartuschen, Machery Nagel, Chromabond, C<sub>18</sub> 500 mg

Sterilin Zentrifugenröhrchen PP, 50 ml, 15 ml

Eppendorfgefäße, 2 ml

Membranfilter 0,45 µm, Polyamid, Sartorius

## **5.4 Qualitative Analyse phenolischer Verbindungen mittels HPLC-CEAD**

### **5.4.1 Einleitung**

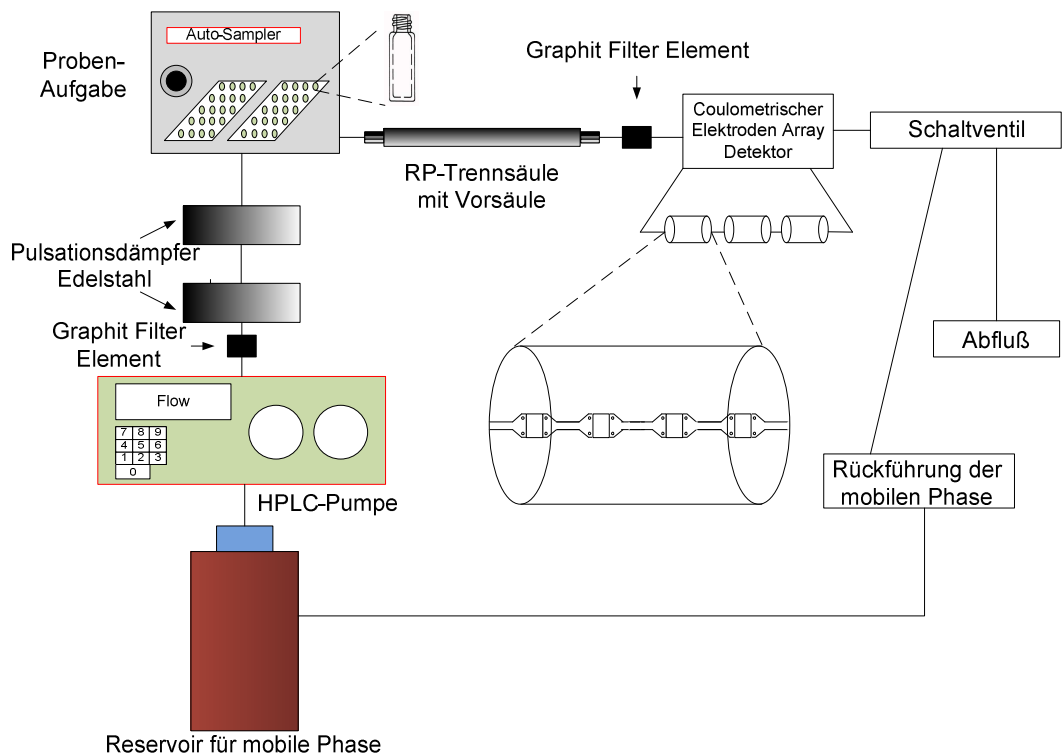
Die untersuchten phenolischen Verbindungen unterscheiden sich stark in ihrer Polarität. Zur Analyse stand eine HPLC Apparatur zur Verfügung, bei der ausschließlich isokratische Elution durchführbar war. Daher wurden zwei unterschiedliche HPLC- und Probenaufarbeitungsmethoden entwickelt, die es erlaubten den Presssaft in eine polare (Phenolsäuren) und eine weniger polare oder apolare Fraktion (Flavonoidglykoside und Aglykone) zu zerlegen.

Die Literaturrecherche führte zu einer Reihe von Verbindungen, die sich eventuell in den Beerensaftproben befinden könnten. Deshalb wurden Mischstandardlösungen aus verfügbaren Reinsubstanzen hergestellt, deren Chromatogramme als Referenzen für die Identifikation der unbekannt Substanzen in den Chromatogrammen der Holundersaftproben dienen.

Die qualitative Bestimmung erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten bzw. der Kapazitätsfaktoren als auch über den Vergleich der Strom/Spannungskurven im Fließsystem.

### **5.4.2 Instrumente**

Die Messanordnung ist auf die Bedingungen der isokratischen Elution abgestimmt. Das Laufmittel wird aus einer Vorratsflasche über eine Doppelkopf-Kolbenpumpe angesaugt und durch das HPLC-System gepumpt. Die Restpulsation der Pumpe wird durch zwei Pulsationsdämpfer auf ein Minimum reduziert. Zwei Graphitfilterelemente und eine Vorsäule sorgen für Reinheit der mobilen Phase bzw. Verhindern ein Verschmutzen der Trennsäule und des Detektors. Der Autosampler ist mit einer 20 µL Dosierschleife ausgestattet und injiziert die Probe in die mobile Phase, welche dann auf der Säule aufgetrennt wird. Die chromatographische Trennung wurde bei einer Säulentemperatur von 30°C durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch einen aus 12 Zellen bestehenden Multielektroden Detektor.



**Abbildung 18:** HPLC mit coulometrischem Elektroden Array Detektor

HPLC CEAD:

HPLC Pumpe: ESA 580 HPLC Pump

Injektor: ESA HPLC Autosampler 465, 20 µl Injektionsschleife

Vorsäule: C<sub>18</sub>-Kartusche

Säule: Machery&Nagel EC 150x4.6 mm, 5 µm Nucleodur  
Sphinx column

Detektion: ESA Coulochem Electrode Array System mit 3 Zellblö-  
cken (12 Zellen)

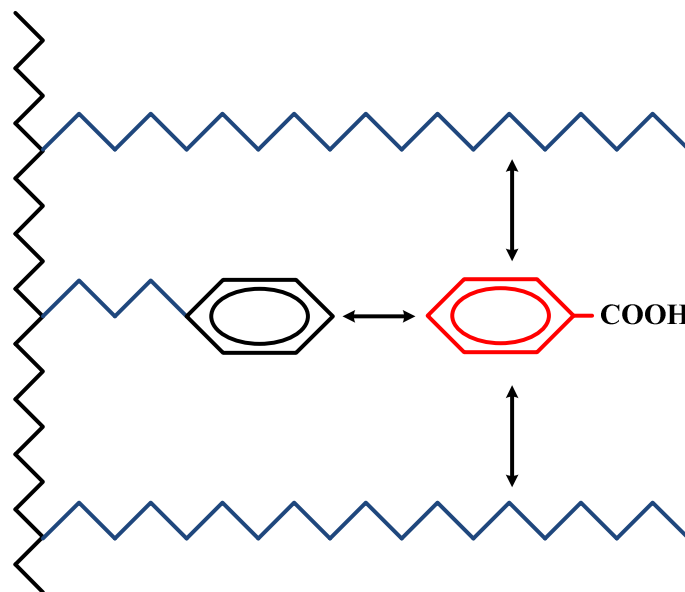
Software: ESA Coullarray für Windows



## 5.4.3 Chromatographische Trennung

### 5.4.3.1 Reversed Phase HPLC-Säule

Zur Trennung beider Fraktionen (polar und apolar) wurde ein bifunktionales Phasensystem verwendet. Dieses bietet ein ausgeglichenes Verhältnis von Propylphenyl- und C<sub>18</sub> Liganden und ist daher prädestiniert für die Trennung von substituierten Aromaten. Die Trennmechanismen beruhen nicht nur auf  $\pi$ - $\pi$ -sondern auch auf hydrophoben van der Waals Wechselwirkungen (Croes et al., 2005).



**Abbildung 19:** Schema des bifunktionalen RP-Phasensystems

Die Verwendung von Säulen mit unterschiedlichen Längen und Durchmessern und reinen C<sub>18</sub>-Phasen führte zu Schwierigkeiten bei der Auftrennung der Flavonoidfraktion in Verbindung mit dem CEAD.

Die Peaks der Standardchromatogramme zeigten nicht zu verhindernde Tailings bei niedriger Konzentration an organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase. Eventuelle Totvolumina innerhalb des LC-Systems wurden als Grund für die Bandenverbreiterung ausgeschlossen. Eine Erhöhung der Konzentration des organischen Lösungsmittels verbesserte die Peakform, dies aber auf Kosten der Auflösung. Parallele Versuche auf einem CEAD-System, das die Möglichkeit der Gradientenelution bot, ergaben keine

adäquate Methode, bei der ein zufriedenstellendes Ergebnis hinsichtlich Trennung und Peakform gefunden werden konnte.

Messungen von Verdünnungen der Standardsubstanzen von 2 µg/ml auf bis zu 0.002 µg/ml zeigten keine Verbesserung des Problems. Eine Konzentrationsabhängigkeit vom Analyten oder die Überladung der Säule oder des Detektors als Grund für die schlechten Peakformen konnte infolgedessen ausgeschlossen werden.

Die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel (Tetrahydrofuran, Acetonitril, Methanol) und Puffersysteme (Phosphat und Acetat mit unterschiedlichen pH-Werten) konnten die Probleme nicht lösen. Bei Läufen auf einem System mit UV-Detektion (260 nm) unter identen Bedingungen (mobile Phase, Flussrate) wie auf dem CEAD-System, trat das Phänomen des Peaktailings mit der C<sub>18</sub>-Säule nicht auf.

Folgedessen war das Phänomen der Peakverbreiterung nur in Kombination coulometrischen Detektion und C<sub>18</sub>-Säulen zu beobachten. Bewiesen wurde dies in gleicher Weise durch Läufe auf einem HPLC-System, das mit einer einfachen coulometrischen Messzelle als Detektor ausgestattet wurde. Dabei zeigte sich genauso das bekannte Peaktailing.

Ein Erklärungsversuch wäre, dass es durch Absorption des hydrophoben Analyts in der porösen Arbeitselektrode, bei nicht ausreichend starker Elutionskraft der mobilen Phase, zu einer Peakverbreiterung kommt.

Offensichtlich war, dass die Peak-Verbreiterung mit zunehmendem Detektorpotential zunimmt, was auf eine Oxidation der absorbierten Verbindungen schließen lässt.

Eine geeignete Lösung des Problems war der Austausch der C<sub>18</sub>-Säule gegen eine Propylphenyl-C<sub>18</sub>-Säule. Diese großvolumige Säule erlaubte die Verwendung von mobilen Phasen mit hohem Anteil an organischem Lösungsmittel und erzielte gleichzeitig die benötigte Auflösung. Mit der so gesteigerten Elutionskraft konnte erreicht werden, dass die Absorption der hydrophoben Verbindungen an der porösen Arbeitselektrode verringert wurde. Das Problem des Peaktailings wurde nicht gänzlich behoben, konnte auf diesem Weg aber zumindest so stark verbessert werden, dass bei isokratischer Elution eine korrekte, reproduzierbare Integration der Peaks möglich wurde.

### **5.4.3.2 Wahl der mobilen Phasen**

Zur Auffindung geeigneter mobiler Phasen wurden zahlreiche Eluenszusammensetzungen mit unterschiedlichen Anteilen an organischen Lösungsmitteln verwendet und getestet. Methanol erhöht signifikant die Selektivität bei aromatischen Analyten in Kombination mit der stationären Phenyl-Phase. Acetonitril hingegen unterdrückt die Retention von aromatischen Verbindungen aufgrund von kompetitiven  $\pi$ - $\pi$  Interaktionen zwischen Acetonitril und dem gelösten Stoff in der mobilen Phase (Croes et al., 2005, Euerby et al., 2007).

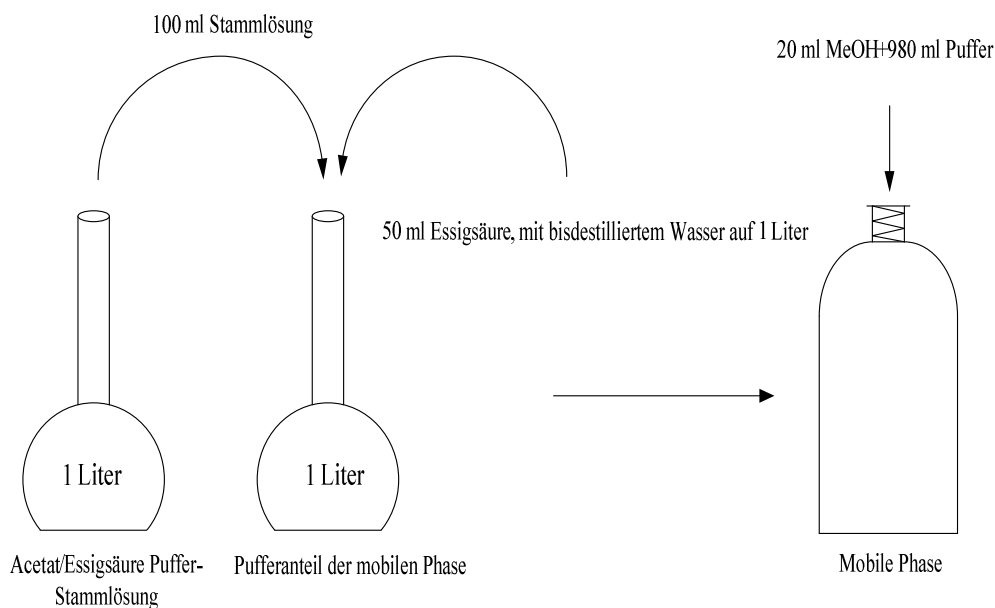
Entscheidend für die Trennung war die Wahl des Puffersystems, um die ionischen bzw. ionisierbaren Analyten in ein Gleichgewicht der undissoziierten Form zu drängen. Bei pH-Werten über 3.0 verschlechterte sich die Trennung bei den Phenolsäuren bzw. Peak-tailing trat vermehrt auf.

Bei der Trennung der Flavonoide zeigte sich, dass der pH-Wert nicht so bedeutsam war wie bei den leichter dissozierbaren Phenolsäuren. Die Trennung verschlechterte sich im basischen Bereich. Bei einem pH-Wert von 3,5 in der verwendeten mobilen Phase war die Trennung der Flavonoid-Fraktion zufriedenstellend.

Die mobilen Phasen wurden vor Verwendung im HPLC-System über lösungsmittelresistente 0.45  $\mu$ m Polyamid Membranfilter vakuumfiltriert und 20 Minuten im Ultraschallbad entgast. Als wässriger Anteil bei sämtlichen im HPLC-System verwendeten Lösungen diente bidestilliertes Wasser.

#### **5.4.3.2.1 Mobile Phase der polaren Fraktion**

Es wurde eine Essigsäure/Natriumacetat Stammlösung hergestellt, wobei zu 200 mmol Natriumacetat 25 ml konzentrierte Essigsäure zugesetzt und mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wurde. Zu 100 ml dieser Lösung wurden in einem 1 Liter Messkolben 50 ml konzentrierter Essigsäure hinzupipettiert und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Mit einem Messzylinder wurde aus 980 ml dieser Lösung und 20 ml Methanol die mobile Phase hergestellt.

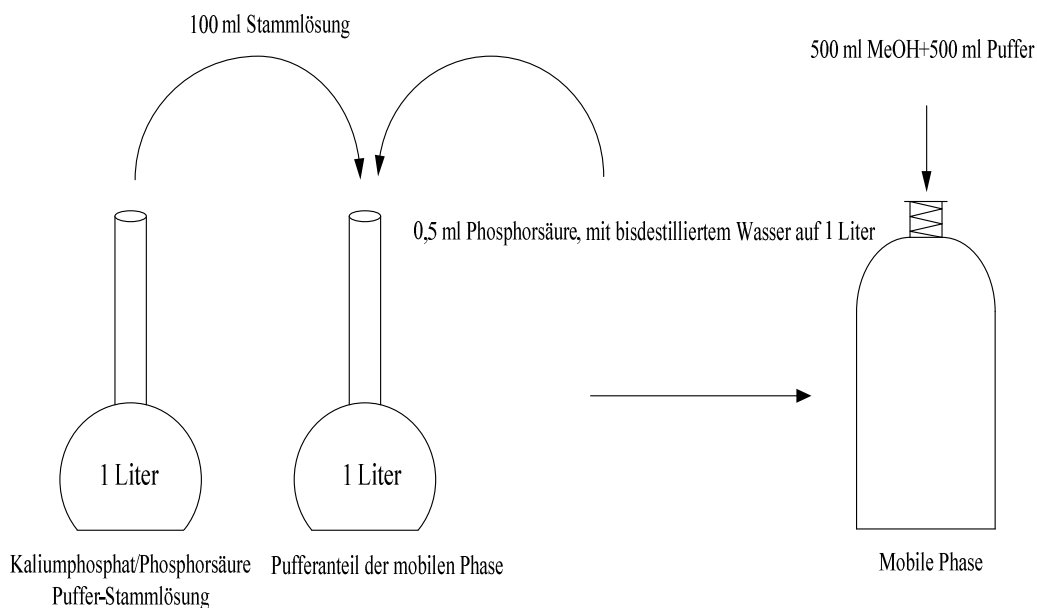


**Abbildung 20:** Schema der Bereitung der mobile Phase, polare Fraktion

Die letztliche Zusammensetzung der mobilen Phase war 2% Methanol und 98% Natriumacetatpuffer (v:v) bei pH 2.9 (Überprüfung mit dem pH Meter). Der hohe Anteil an Essigsäure in der mobilen Phase brachte den pH-Wert in einen Bereich, in dem die Phenolsäuren größtenteils undissoziiert vorliegen. Zusätzlich wirkte der Anteil an Essigsäure stark eluierend.

#### 5.4.3.2.2 Mobile Phase der apolaren Fraktion

Es wurde eine Phosphorsäure/Kaliumdihydrogenphosphat Stammlösung hergestellt, wobei zu 200 mmol Kaliumdihydrogenphosphat 2,5 ml Phosphorsäure zugesetzt und mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wurden. Zu 100 ml dieser Lösung wurden in einem 1 Liter Messkolben 0,5 ml Phosphorsäure hinzupipettiert und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Mit einem Messzylinder wurde aus 500 ml dieser Lösung und 500 ml Methanol die mobile Phase hergestellt.



**Abbildung 21:** Schema der Bereitung der mobile Phase, polare Fraktion

Diese mobile Phase, bestehend aus 50% Methanol und 50% Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (v:v) bei pH 3.5 (Überprüfung mit dem pH Meter), war für Trennung der Flavonoide und der Flavonoidglykoside am besten geeignet.

#### 5.4.4 Die Konfiguration des Multielektroden-Detektors

Auf dem aus zwölf Kanälen bestehenden Detektor wurden Potentiale zwischen +50 und +820 mV angelegt, ausgehend vom Wert des ersten Kanals betrug das Inkrement jeweils 70 mV.

Die Analyten, die den Detektor passierten, wurden entsprechend ihrer Struktur in einem bestimmten Potentialbereich oxidiert. Bei den Läufen mit den Standardsubstanzen zeigte sich, dass es im gewählten Potentialbereich möglich war, alle Substanzen zu detektieren.

## **5.4.5 Herkunft, Vorbereitung und Charakterisierung der Proben**

Der Holunderpresssaft wurde mit einer haushaltsüblichen Saftpresse am Tag der Ernte aus den selbstgesammelten Beeren hergestellt. Der schattige Standort der ca. 4 m hohen strauchartigen Pflanze befindet sich im hauseigenen Garten in Niederösterreich, genauer in Krems-Egelsee. Der Zeitpunkt der Ernte war Mitte September 2007.

Vor dem Pressen wurden sämtliche Grünanteile der Rispe per Hand entfernt und nur die losen Beeren zur Pressung verwendet. Der hergestellte Saft wurde in 50 ml Sterilin Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen aufgeteilt und 20 min. bei 5000 rpm zentrifugiert, um feste Bestandteile zu entfernen. Der Überstand des Saftes wurde anschließend aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen tiefgefroren. Um den Holundersaft charakterisieren zu können, wurde die titrierbare Gesamtsäure am Titrator bestimmt und als Zitronensäureäquivalent berechnet. Die Endpunkttitration erfolgte bis zu einem pH-Wert von 8.1, der Verbrauch an 1 M NaOH betrug 1.16 ml. Das ergibt ein Zitronensäureäquivalent von 14.20 mg/g Holundersaft bei einem Anfangs pH-Wert von 3.79.

Als zweites charakterisierendes Merkmal wurde der Brix-Gehalt im Biegeschwinger bestimmt. Die Dichte des Saftes betrug 1.0506 kg/l, dies entspricht einem Wert von  $13.00^{\circ}$  Brix.

### **5.4.5.1 Festphasenextraktion des Holundersaftes**

Die Säfte enthalten großteils niedermolekulare polare Begleitstoffe in hoher Konzentration (Zucker, Carbonsäuren), die die Trennsäule kontaminieren und die Detektion im coulometrischen Detektor erschweren würden. Die Entfernung dieser Matrixbestandteile war daher vor den Analysen notwendig. Zugleich dürfen natürlich die phenolischen Verbindungen bei der Probenvorbereitung nicht verlorengehen.

Nagl et al. entwickelten 2002 eine Festphasenextraktion von Holundersaft, die von mir so modifiziert wurde, dass sie zur Analyse der polaren Fraktion des Saftes verwendet werden konnte.

#### 5.4.5.1.1 Herstellen des methanolischen Extraktes

Vor dem Auftragen der Holundersaftprobe wurden die Festphasenröhrchen schrittweise konditioniert. Dazu wurden die Kartuschen in das zur Verfügung stehende SPE-Rack montiert und anschließend mit je 2 Säulenvolumina (je ca.5 ml) MeOH (100%), MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50, v:v) und H<sub>2</sub>O (bidest.) gespült. Danach wurden 1000 µl des zentrifugierten, aufgetauten Probenaliquots auf die C<sub>18</sub>-Kartusche aufgebracht und 10 Minuten auf der Kartusche belassen. Eluiert wurde mit 3 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v:v).

Am SPE-Rack wurde während der Elution kein Unterdruck angelegt, sondern erst nach vollständigem Durchlauf der Elutionslösung. Danach wurden die Kartuschen für zwei Minuten trockengesaugt. Die erhaltene Lösung wurde in 10 ml Rollrandgläsern aufgefangen und anschließend quantitativ in einen 5 ml Messkolben überführt und mit der 80%igen Methanol-Lösung auf ein Endvolumen von 5 ml gebracht.

Für die CEAD Analyse wurden dann 100 µl dieses Extraktes mit der mobilen Phase der HPLC<sub>1</sub>-Methode (siehe **Abbildung 22**) in einem 5 ml Messkolben verdünnt.

### 5.4.5.2 Probenvorbereitung zur Analyse der apolaren Fraktion

Bei der apolaren Flavonoid-Fraktion wurde versucht auf die Festphasenextraktion zu verzichten, um einen schnelleren und einfacheren Weg zur Probenaufbereitung zu entwickeln. Die hohe Empfindlichkeit des coulometrischen Detektors erlaubt die Verwendung sehr hoher Verdünnungsstufen der Analysenlösungen. Bei den durchgeführten Verdünnungsschritten liegen die störenden Stoffe der Matrix des Saftes nur in relativ niedrigen Konzentrationen vor. Also können die störenden Begleitstoffe die Detektion der im Fokus stehenden Analyten nicht in dem Maß beeinflussen wie bei der „polaren“ Methode. Zusätzlich wurden die Analyte, die nicht im Mittelpunkt der Analyse dieser apolaren Fraktion standen, durch den hohen Anteil an organischem Lösungsmittel zu Beginn des Chromatogramms eluiert. Beim ersten Verdünnungsschritt der Aufarbeitungsmethode konnte die Bildung eines Niederschlages beobachtet werden. Vermutlich handelte es sich dabei um in der mobilen Phase schlecht lösliche Kohlendhydrate und Schleimstoffe, die bei der anschließenden Zentrifugation entfernt wurden.

Die Verluste, die durch die ermittelte Wiederfindung charakterisiert werden betragen beim Rutin zwischen 5-9%, beim Nicotiflorin 38-43%. Damit waren die Verluste beim Rutin akzeptabel. Die Verluste beim Nicotiflorin liegen möglicherweise an einer etwas schlechteren Löslichkeit des Glykosids in der zur Verdünnung verwendeten 80%igen MeOH/Wasser-Lösung (v:v). Eine Erhöhung des organischen Anteils hätte vielleicht die Ausbeute des Nicotiflorins erhöht. Gegen dieses Argument spricht allerdings die beobachtete Wiederfindung des noch hydrophoberen Quercetins, die zwischen 96-103% lag. Die Störung durch die Verunreinigung des Rutinstandards mit Quercetin (siehe **Abschnitt 6.7.3**) könnte bei der Quantifizierung des Quercetins mit Hilfe der Standardadditionsmethode ein Grund für die relativ hohen Ausbeuten beim Quercetin bedeuten, auch wenn diese Verunreinigung mit Quercetin in die Berechnungen bei der Quantifizierung miteinbezogen wurden. Da es beim Quercetin allgemein Probleme bei der Integration des Detektorsignals gab und die Variationskoeffizienten bei den ermittelten Konzentrationen stark schwankten, sind die Wiederfindungen bzw. auch die ermittelten Konzentrationen kritisch zu betrachten (siehe **Abschnitt 6.7.5**).



#### 5.4.5.2.1 Herstellen der Proben der apolaren Fraktion

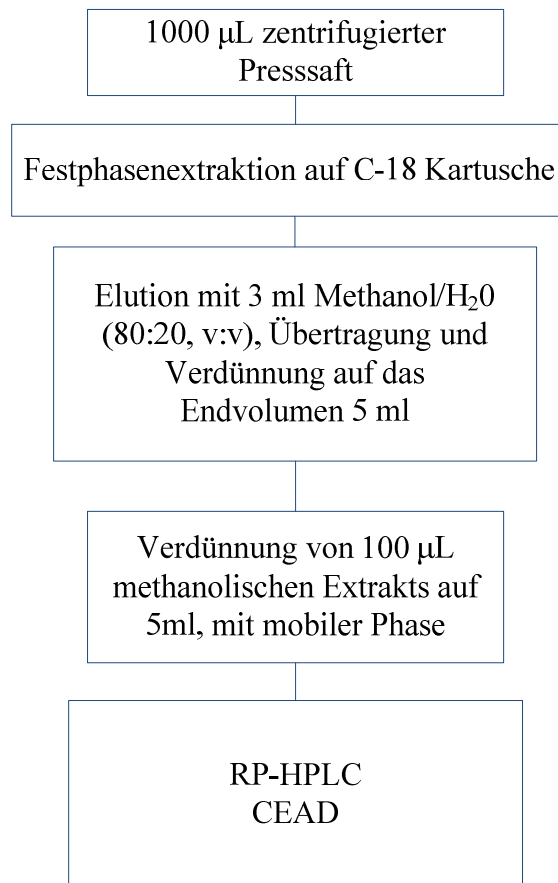
1000 µl des aufgetauten zentrifugierten Holundersaftes wurden mit der mobilen Phase in einem 10 ml Messkolben verdünnt. Danach wurde diese Lösung für 20 Minuten im Ultraschallbad bei Raumtemperatur homogenisiert. Anschließend wurde die erhaltene Lösung in 15 ml Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt und für 20 min bei 5000 rpm zentrifugiert.

Es waren zwei unterschiedliche Verdünnungsstufen notwendig, um bei der quantitativen Bestimmung von Rutin bzw. Nicotiflorin und Quercetin im linearen Bereich der externen Kalibrierfunktion zu bleiben.

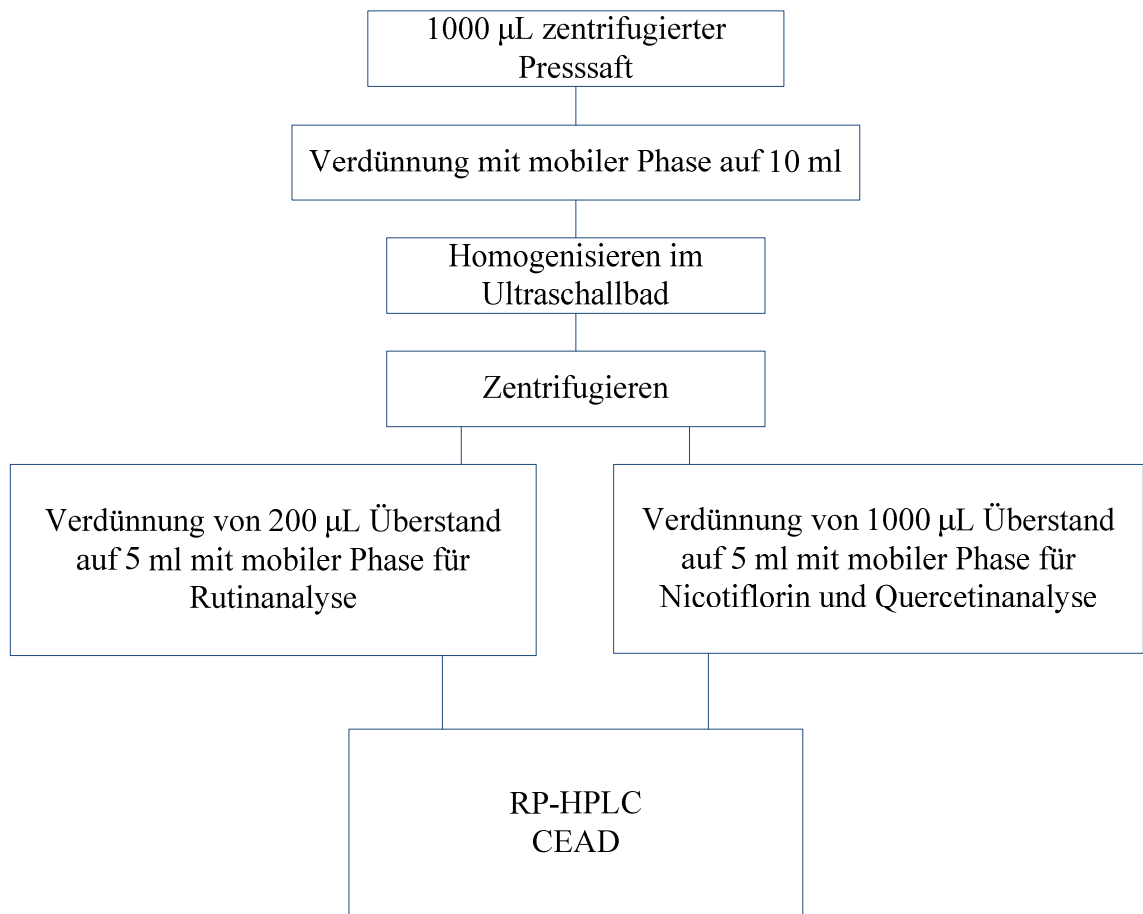
Der Überstand wurde daher für die HPLC Analysen mit der mobilen Phase der HPLC<sub>2</sub>-Methode (siehe **Abbildung 23**) weiterverdünnt: 200 µl bzw. 1000 µl Überstand auf 5 ml Gesamtvolumen für die Rutin bzw. für die Nicotiflorin- und Quercetin Analyse.

## 5.5 Analyse der Phenolsäuren und der Flavonoide

In **Abbildung 22** und **23** sind die Analysenschemata der HPLC-Methode dargestellt, mit denen die phenolischen Substanzen im Holunder identifiziert und quantifiziert wurden.



**Abbildung 22:** Analysenschema für die polare Fraktion des Holundersaftes (HPLC<sub>1</sub>)



**Abbildung 23:** Analysenschema für die apolare Fraktion des Holundersaftes (HPLC<sub>2</sub>)

## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Durchführung der qualitativen Analyse mittels HPLC-CEAD

Zur Identifikation der phenolischen Substanzen dienten Voltammogramme und Kapazitätsfaktoren, die aus den Standardchromatogrammen erstellt bzw. berechnet wurden. Diese wurden jeweils mit den Strom-Spannungskurven und den Kapazitätsfaktoren der unbekannt Substanzen aus den Chromatogrammen der Saftproben verglichen.

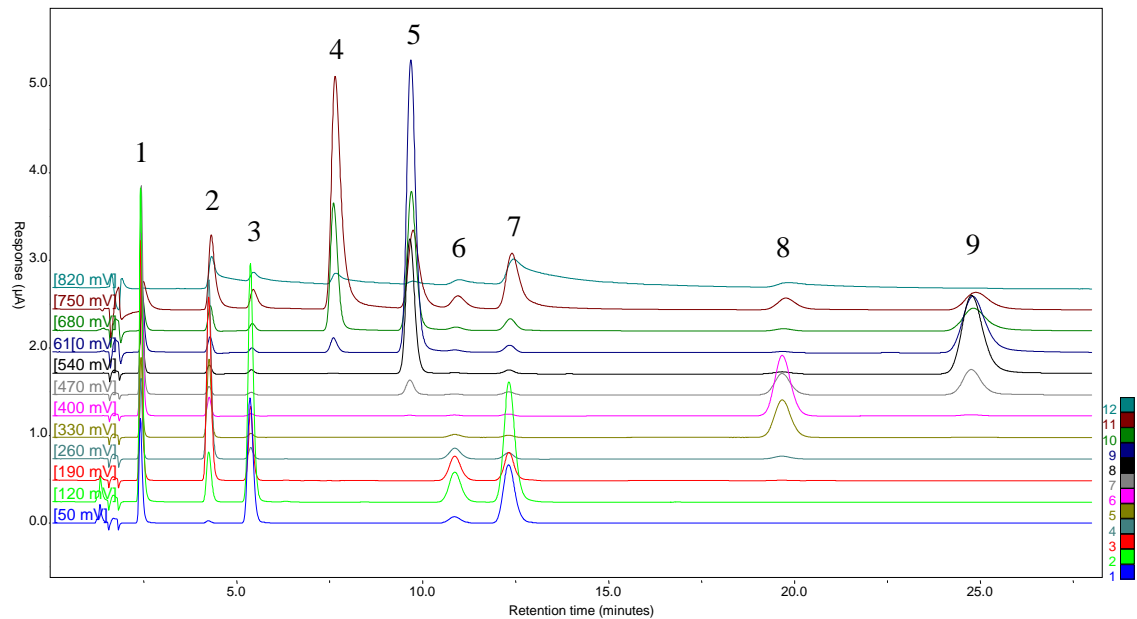
Die Peakhöhen für die Voltammogramme der Standardsubstanzen wurden den Chromatogrammen für die externen Kalibrierfunktionen der quantitative Analyse entnommen, wobei jene Konzentrationen ausgewählt wurden, die jeweils der Konzentration der korrespondierenden Substanzen in der Holundersaftprobe bzw. deren Verdünnung am nächsten lagen. Dadurch konnte eine mögliche Ungenauigkeit minimiert werden, die sich bei der Erstellung der Voltammogramme ergeben könnte, wenn die Konzentrationen der Standards zu sehr von den Konzentrationen der Verbindungen die natürlicherweise im Saft vorkommen, abweichen.

Das bedeutet, dass auch bei der qualitativen Analyse jene Verdünnungsstufen verwendet wurden, bei denen nachweislich die Konzentrationen der ermittelten Analyten im linearen Konzentrationsbereich der externen Kalibrierfunktionen lagen. Das hat den Vorteil, dass ein Überladen des Detektors bei falsch bzw. zu hoch gewählten Konzentrationen verhindert wird und damit die Ähnlichkeit der zu vergleichenden Voltammogramme maximiert werden kann.

Da der Zustand der Elektrodenoberfläche des CEAD variieren kann, wurden alle Chromatogramme am selben Tag unter Verwendung derselben mobilen Phase aufgenommen. In **Abbildung 24** und **Abbildung 25** sind die Standardchromatogramme und Probenchromatogramme der Phenolsäuren zum direkten Vergleich dargestellt.

**Abbildung 26** und **27** sind analog beispielhaft für die Standardchromatogramme der Flavonoide und jene der Holundersaftprobe. In **Abbildung 26** ist besonders gut zu erkennen, dass die Peaks der Flavonoidglykone, die später eluieren, zum Phänomen des Tailings neigen. Beim Erhöhen des organischen Anteils der mobilen Phase konnte eine Verbesserung der Peakform erzielt werden, allerdings wäre damit die Erfassung der Glykoside nicht mehr möglich bzw. deren Auflösung untereinander zu gering gewesen.

Der Kompromiss, der gefunden wurde, ermöglichte die Trennung der Glykoside und der Aglykone bei Inkaufnahme der verschlechterten Peakform der Aglykone.

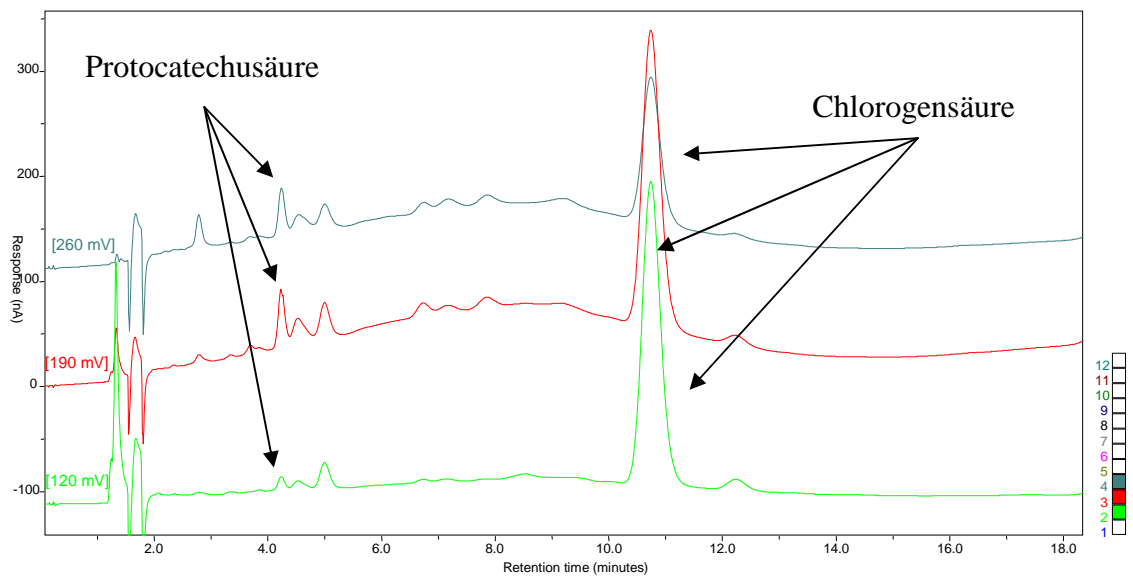


**Abbildung 24:** Elektroden-Array Chromatogramme des Phenolsäuremischstandards

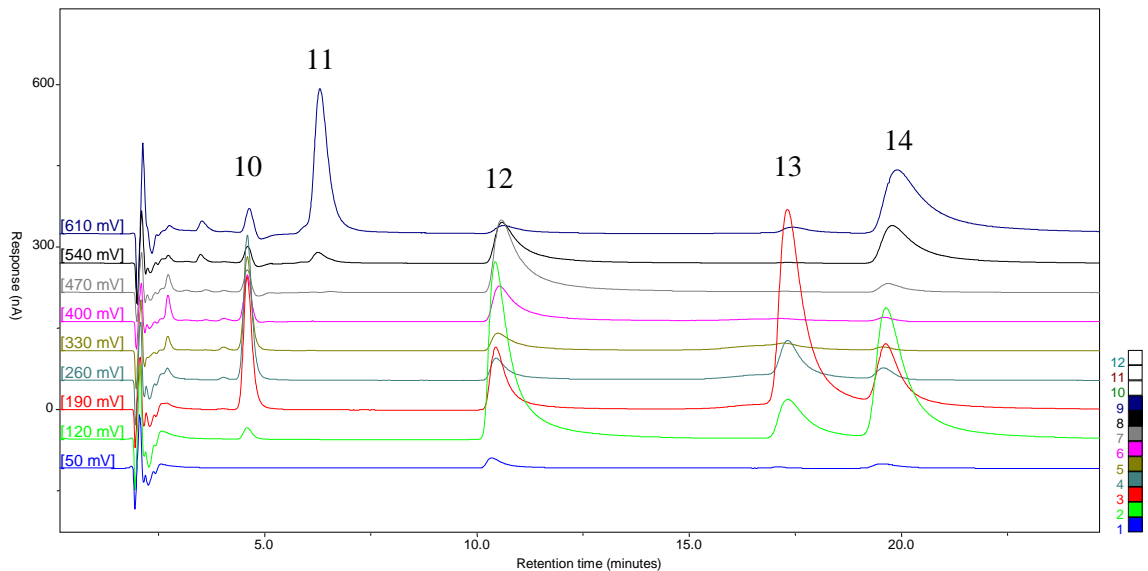
1 Kanal: +50 mV      2 Kanal: +120 mV      3 Kanal: +190 mV      4 Kanal: +260 mV  
 5 Kanal: +330 mV      5 Kanal: +400 mV      7 Kanal: +470 mV      8 Kanal: +540 mV  
 9 Kanal: +610 mV      10 Kanal: +680 mV      11 Kanal: +750 mV      12 Kanal: +820 mV

Nr.	Bezeichnung	CAS Nr.	Masse	t <sub>R</sub> [min]
1	Gallussäure	149-91-7	170.12	2,3
2	Protocatechusäure	99-50-3	154.12	4,3
3	Gentisinsäure	490-79-9	154.12	5,4
4	p-Hydroxybenzoesäure	99-96-7	138.12	7,4
5	4-Hydroxyphenyl-essigsäure	156-38-7	152.15	9,7
6	Chlorogensäure	327-97-9	354.31	10,1
7	Kaffeesäure	331-39-5	180.16	12,3
8	Syringasäure	530-57-4	198.17	19,7
9	Salicylsäure	69-72-7	138.12	24,9

**Tabelle 4:** Zusammensetzung des Mischstandards der polaren Fraktion



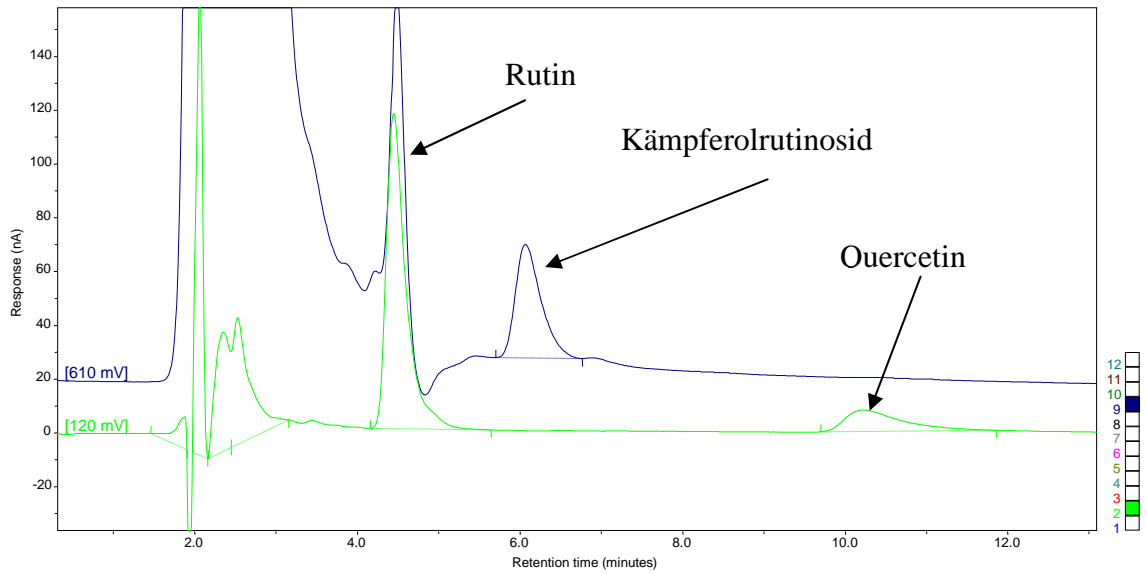
**Abbildung 25:** Zweiter (+120 mV), dritter (+190 mV) und vierter Kanal (+260 mV) eines Elektroden-Array Chromatogramms eines methanolischen SPE-Holunderextraktes, polare Fraktion



**Abbildung 26:** Kanal eins bis neun eines Elektroden-Array Chromatogramms des Flavonoid-Mischstandards

Nr.	Bezeichnung	CAS Nr.	Masse	$t_R$ [min]
10	Rutin	153-18-4	610.52	4,6
11	Nicotiflorin	17650-84-9	594.52	6,1
12	Quercetin	117-39-5	302.24	10,4
13	Isorhamnetin	480-19-3	316.26	17,3
14	Kämpferol	520-18-3	286.24	19,6

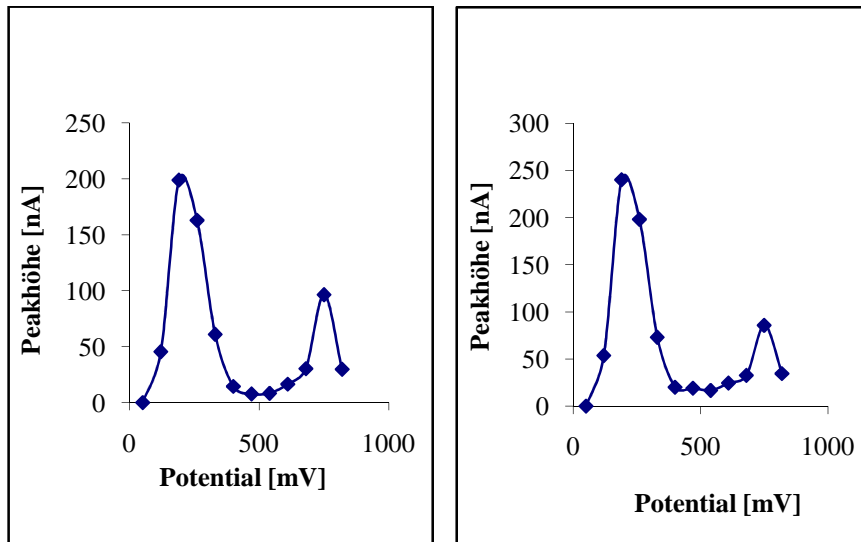
**Tabelle 5:** Zusammensetzung des Mischstandards der apolaren Fraktion



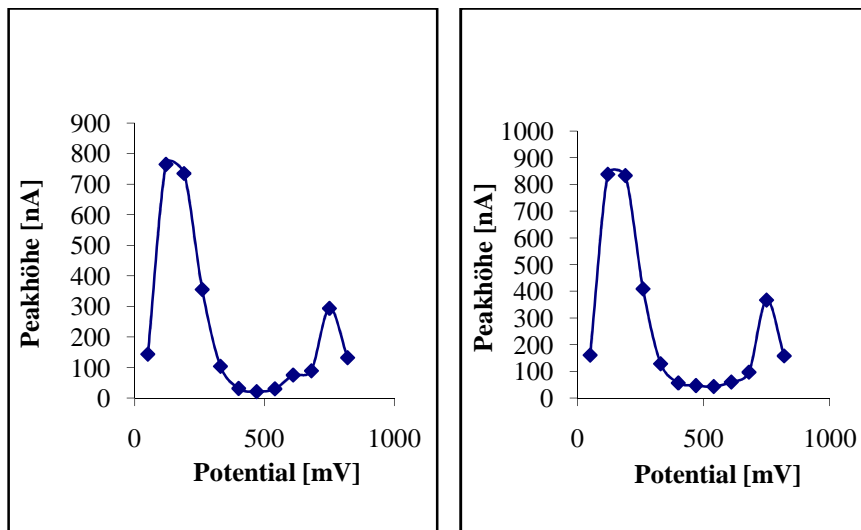
**Abbildung 27:** Zweiter (+190 mV) und neunter Kanal (+610 mV) des Elektroden- Array Chromatogramms einer Holunderprobe, apolare Fraktion

## 6.2 Voltammogramme der Standardsubstanzen im Vergleich mit korrespondierenden Peaks im Holundersaft

Durch Messung der Peakhöhen der einzelnen Substanzen bei verschiedenen Elektrodenpotentialen konnten die Strom/Spannungskurven im Fließsystem erstellt und verglichen werden (siehe **Abbildung 28-32**).

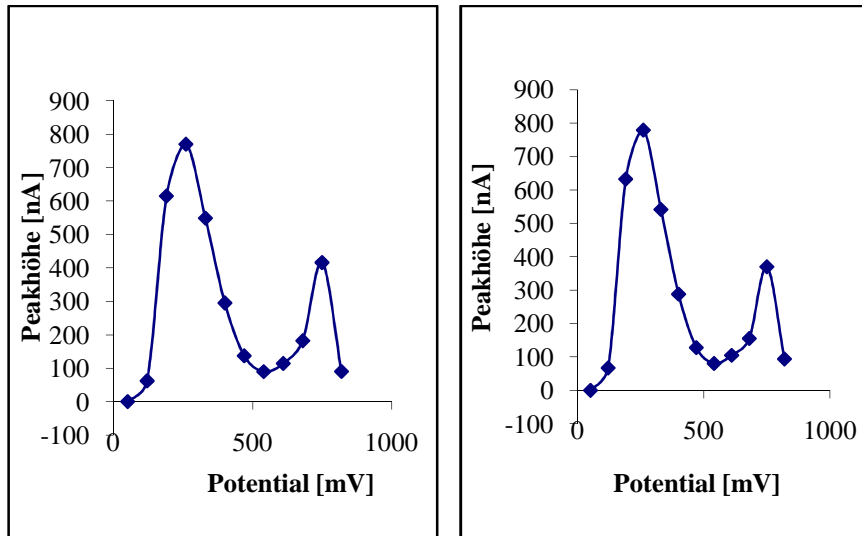


**Abbildung 28:** Links: Voltammogramm der Protocatechusäure (optimales Detektorpotential +190 mV), Rechts: Voltammogramm der Protocatechusäure im Holundersaft

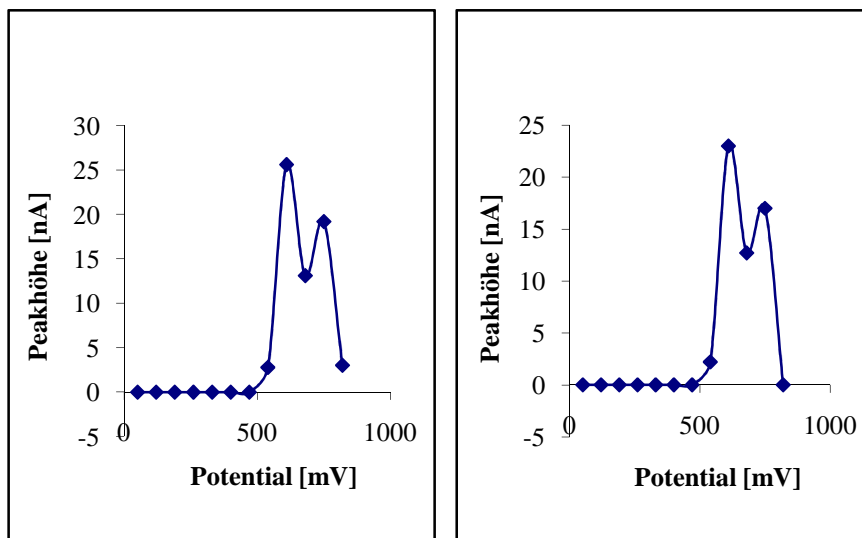


**Abbildung 29:** Links: Voltammogramm der Chlorogensäure (optimales Detektorpotential +120 mV), Rechts: Voltammogramm der Chlorogensäure im Holundersaft

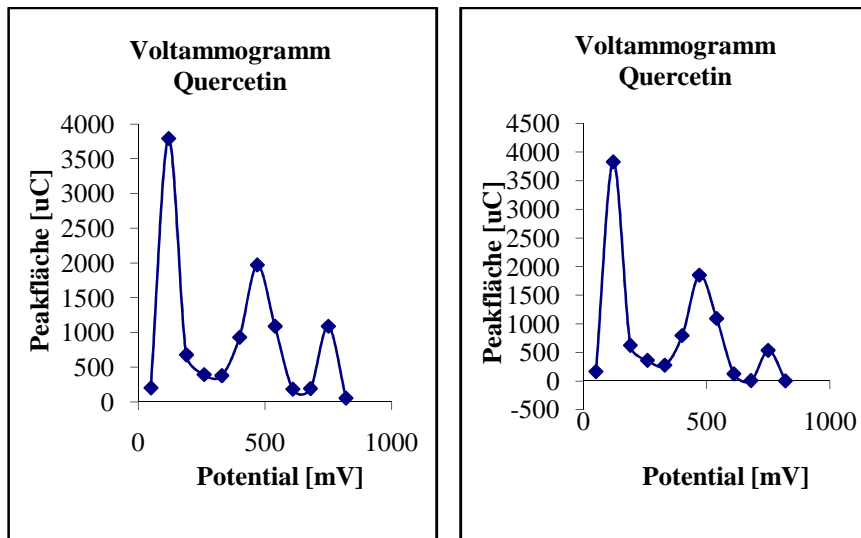




**Abbildung 30:** Links: Voltammogramm des Rutins (optimales Detektorpotential 260 mV), Rechts: Voltammogramm des Rutins im Holundersaft



**Abbildung 31:** Links: Voltammogramm des Kämpferolrutosids (optimales Detektorpotential +610 mV), Rechts: Voltammogramm des Kämpferolrutosids im Holundersaft



**Abbildung 32:** Links: Voltammogramm des Quercetins (optimales Detektorpotential +120 mV), Rechts: Voltammogramm des Quercetins im Holundersaft

### 6.3 Kapazitätsfaktoren

Zur Identifikation wurden neben den Strom-Spannungskurven die Kapazitätsfaktoren berechnet. Ein Vergleich der Werte aus den Holunder-Proben mit denen der Standardsubstanzen ergab eine exakte Übereinstimmung (siehe **Tabelle 6**).

Analyt	Kapazitätsfaktor	Kapazitätsfaktor	HPLC-Methode
	Holunder	Standardlösung	
Protocatechusäure	2,4	2,4	polar
Chlorogensäure	7,6	7,6	polar
Rutin	1,5	1,5	apolar
Nicotiflorin	2,2	2,2	apolar
Quercetin	3,3	3,3	apolar

**Tabelle 6:** Die Kapazitätsfaktoren der im Holundersaft identifizierten Substanzen und der Standardsubstanzen

## 6.4 Strukturformeln der identifizierten Substanzen

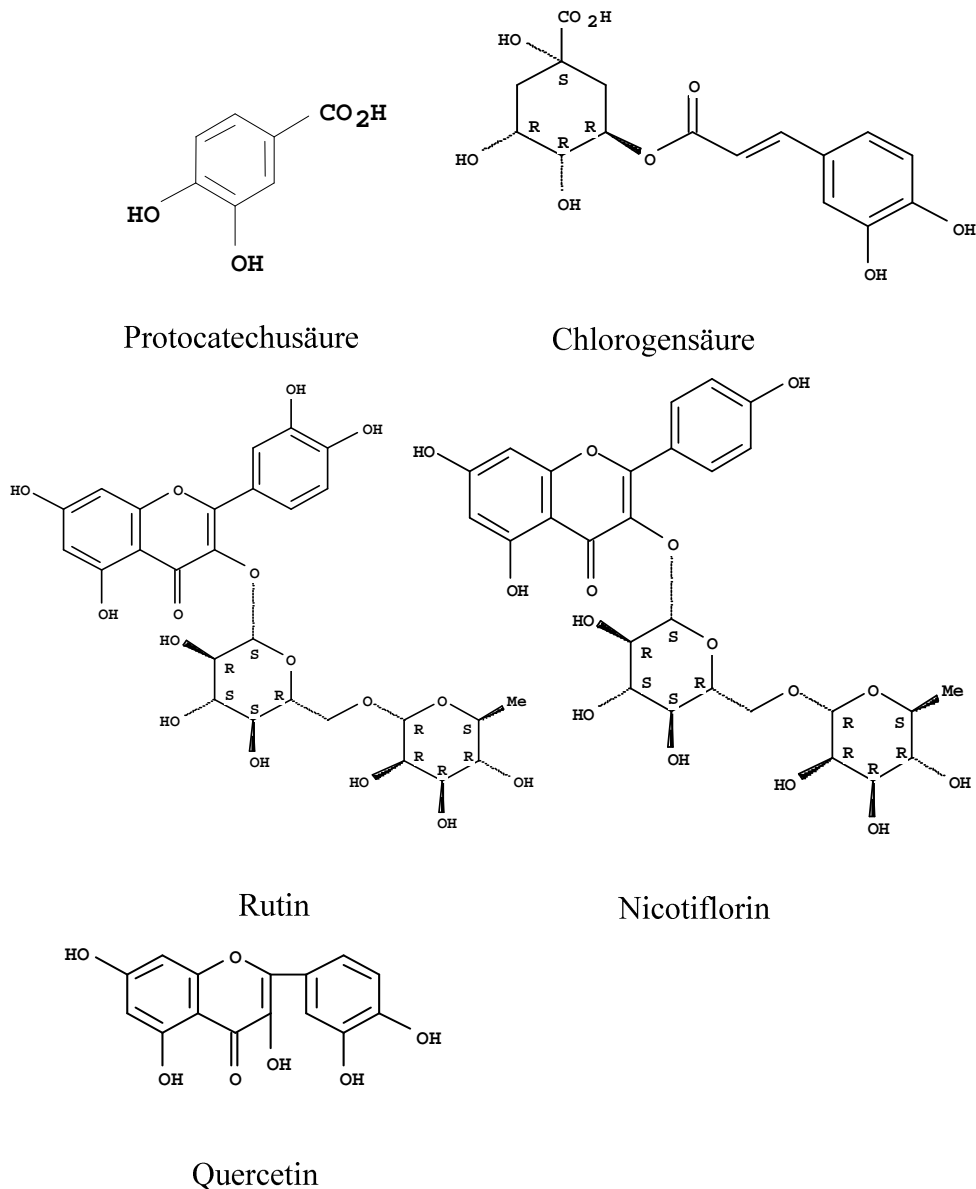
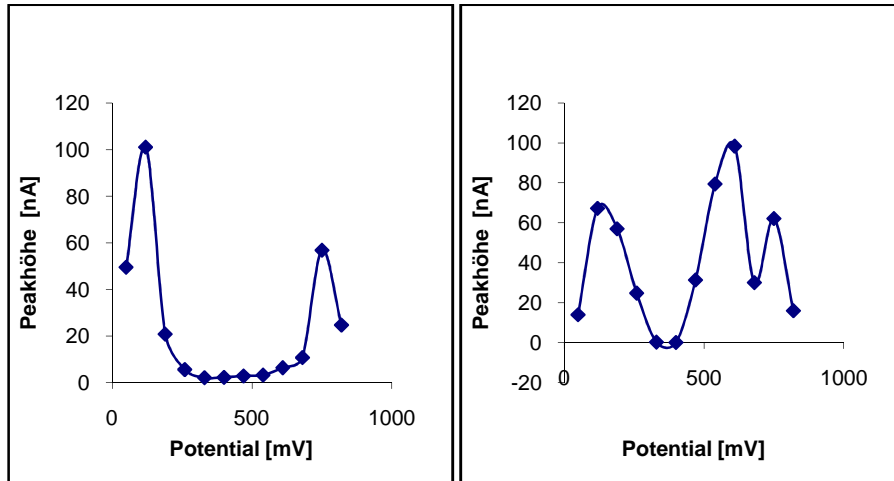


Abbildung 33: Strukturformeln

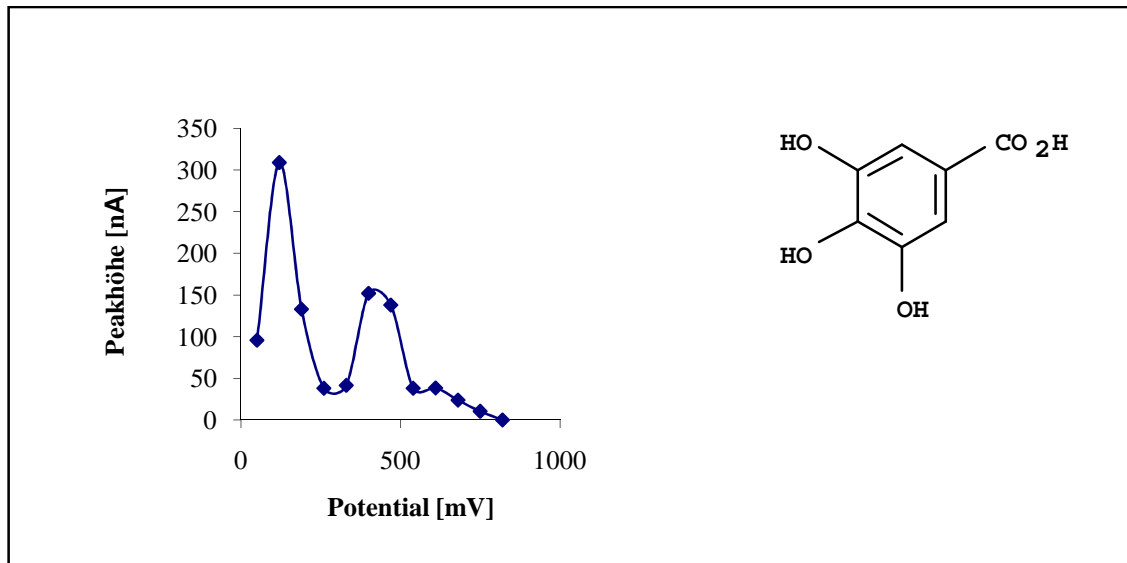
## 6.5 Voltammogramme der Vergleichssubstanzen

In diesem Abschnitt werden die Voltammogramme der restlichen Standardverbindungen dargestellt, die nicht im Holundersaft gefunden wurden. Die Kaffesäure konnte zwar anhand des Kapazitätsfaktors in ihrem dominanten Kanal errahnt werden, aber die Erstellung der Voltammogramme zeigte, dass sie mit einer unbekanntem Substanz zeitgleich eluiert. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass diese coeluiierende Substanz

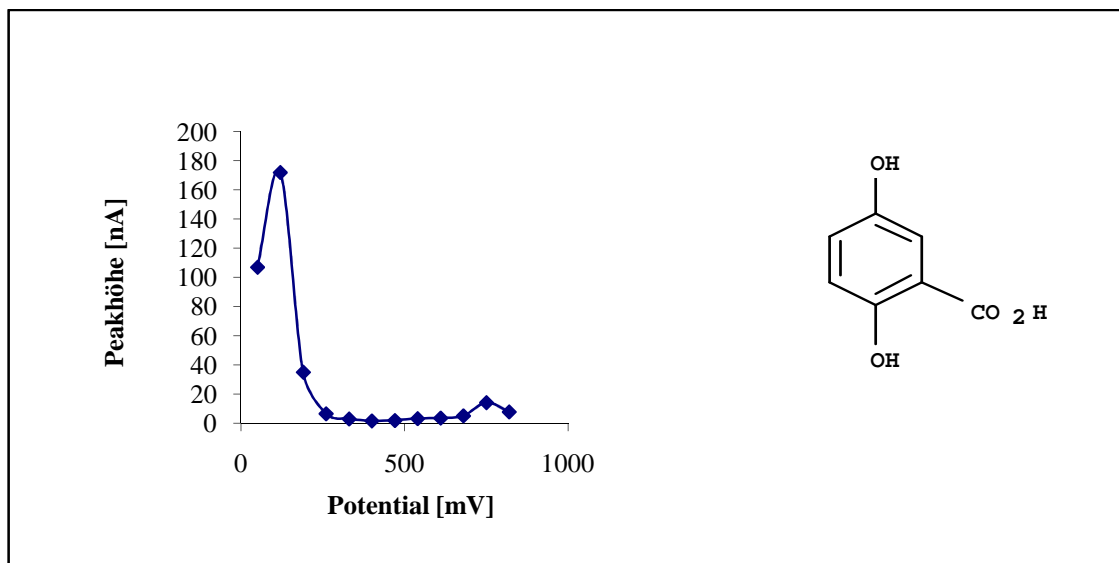
den Kaffesäurepeak in seinem Maximum beeinflusst, wurde auf die spätere Quantifizierung verzichtet.



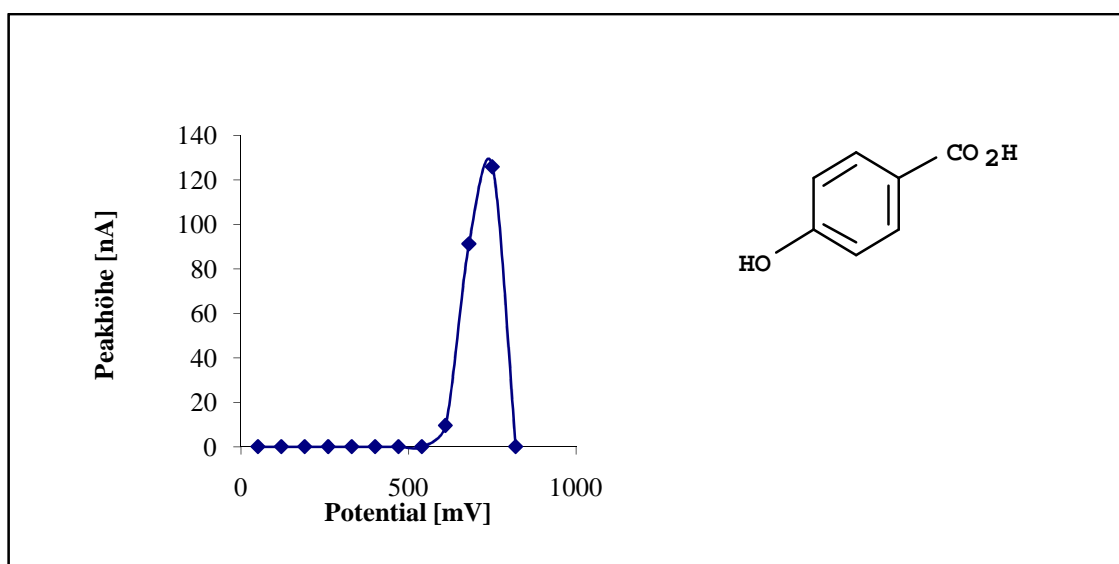
**Abbildung 34:** Links: Voltammogramm einer Kaffesäurestandardlösung, Rechts: Voltammogramm der coeluerierenden Substanzen im Holundersaft



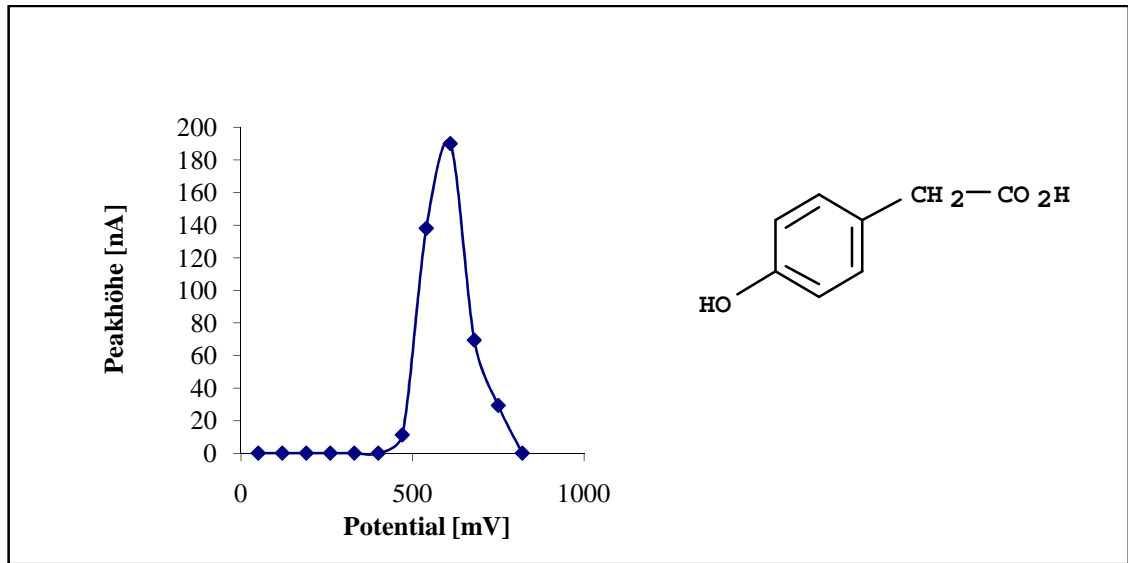
**Abbildung 35:** Voltammogramm einer Gallussäurestandardlösung



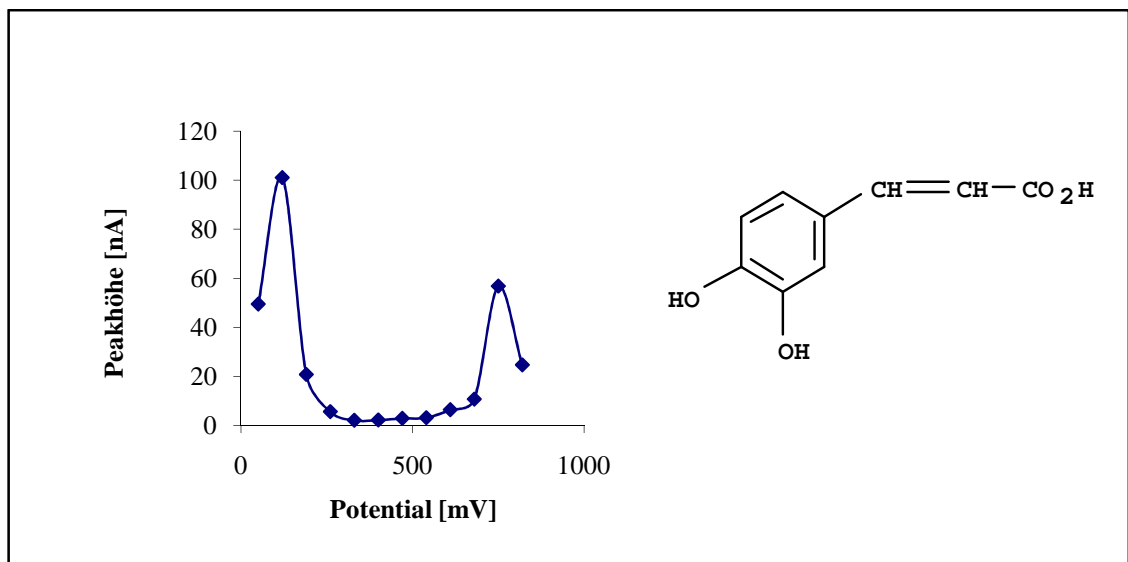
**Abbildung 36:** Voltammogramm einer Gentisinsäurestandardlösung



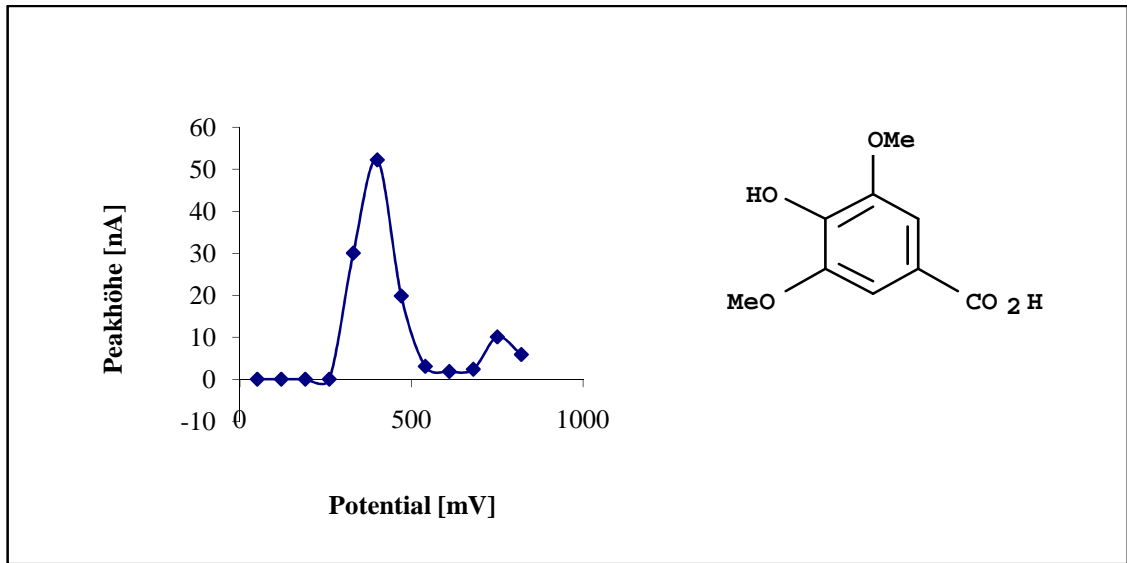
**Abbildung 37:** Voltammogramm einer p-Hydroxybenzoesäurestandardlösung



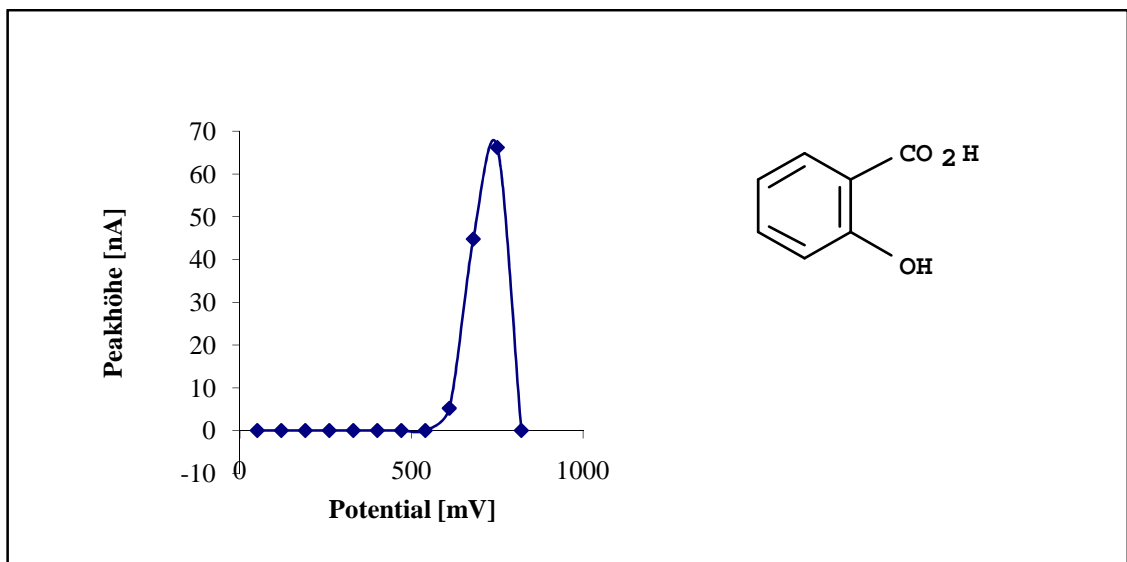
**Abbildung 38:** Voltammogramm einer 4-Hydroxyphenylessigsäurestandardlösung



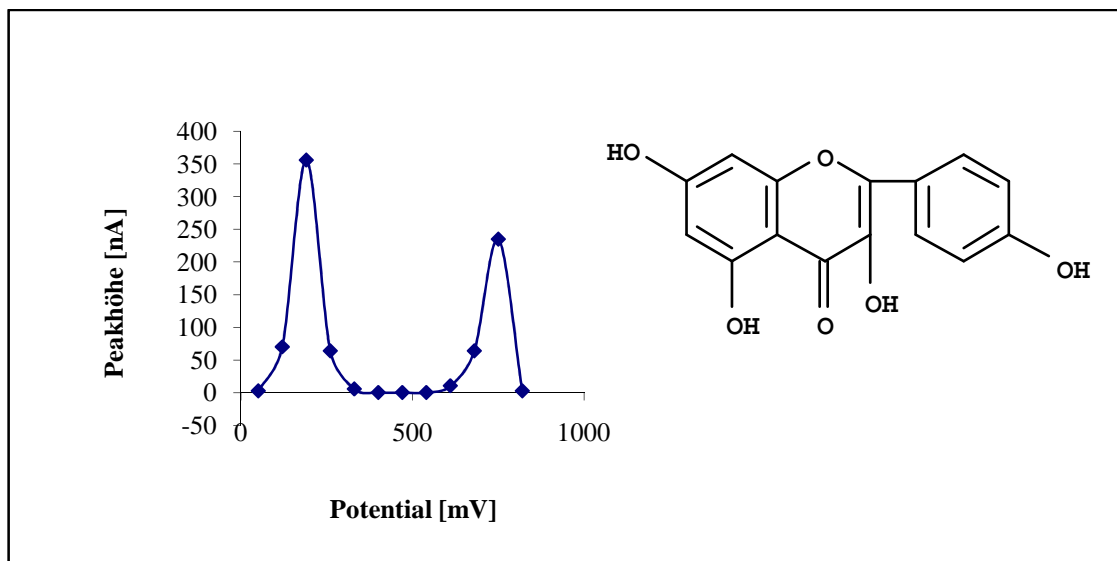
**Abbildung 39:** Voltammogramm einer Kaffeesäurestandardlösung



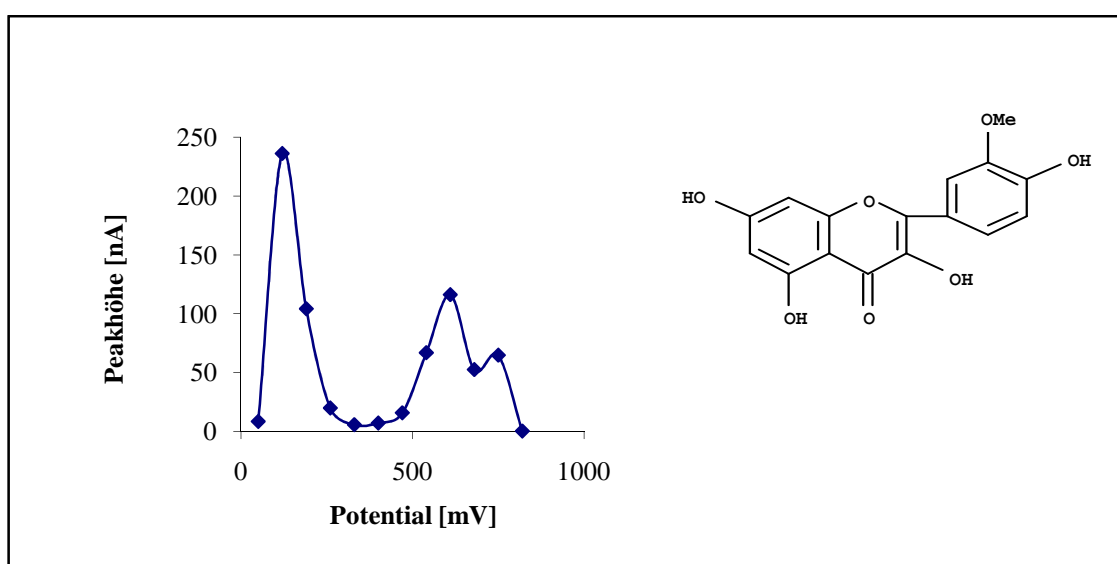
**Abbildung 40:** Voltammogramm einer Syringensäurestandardlösung



**Abbildung 41:** Voltammogramm einer Salicylsäurestandardlösung



**Abbildung 42:** Voltammogramm einer Kämpferolstandardlösung



**Abbildung 43:** Voltammogramm einer Isorhamnetinstandardlösung

### 6.5.1.1 Voltammogramme von Substanzen im Holundersaftextrakt

Die chromatographischen Profile des Saftes zeigten eine große Anzahl von Verbindungen, die nicht über die zur Verfügung stehenden Vergleichssubstanzen identifizierbar waren. Naheliegender erschien, dass es sich dabei vor allem um die oxidierbaren Glykoside einiger phenolischer Verbindungen handeln könnte, wie auch um Anthocyane und deren Glykoside. Neben den cyanogenen Verbindungen wie z.B. Sambunigrin enthalten

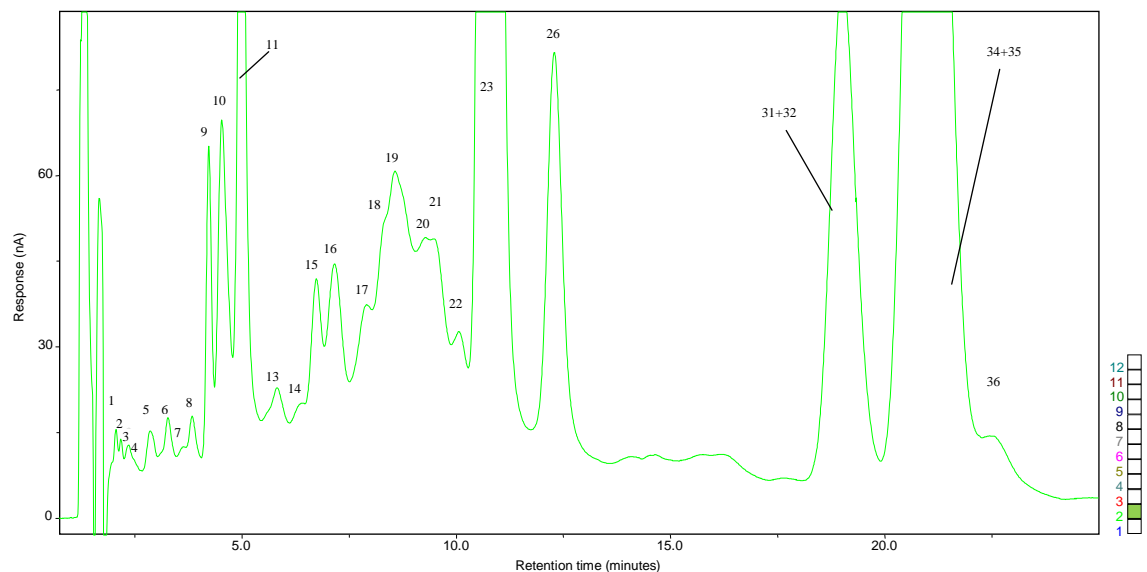


die Beeren auch weitere organische Säuren wie Ascorbinsäure oder Carotine (siehe auch **Tabelle 2**), die elektrochemisch aktiv sind (Jensen et al., 1973, Elmadfa et al., 2003). Das Vorliegen von Lignanen und Lektinen ist ebenfalls wahrscheinlich und in der Literatur beschrieben.

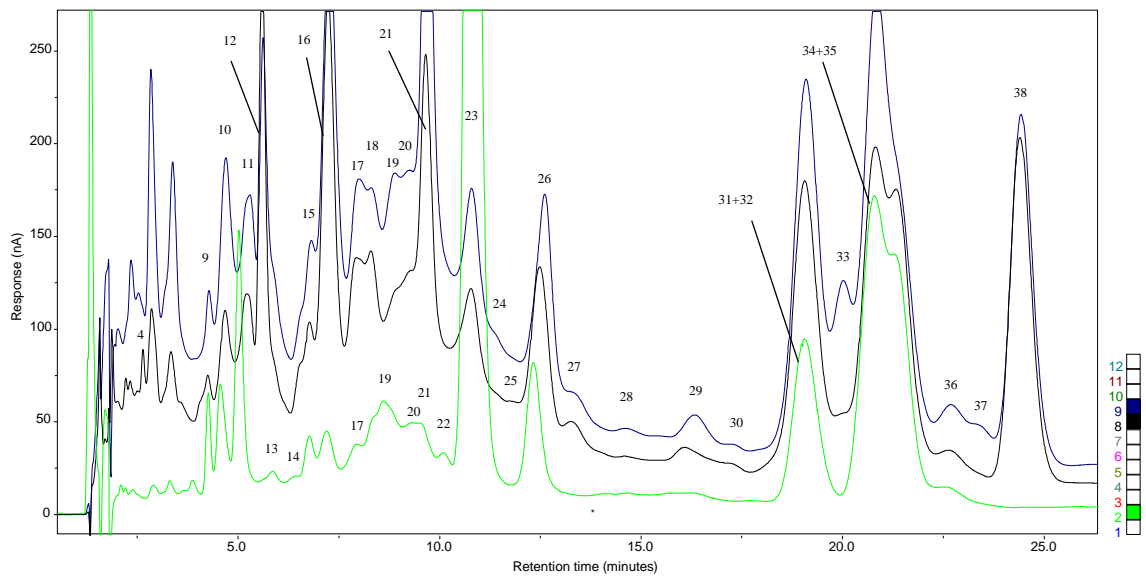
Von Substanzen, die durch die beiden chromatographischen Methoden getrennt werden konnten, wurden Strom-Spannungskurven erstellt. Bei überlappenden Peaks von Verbindungen wurden keine Voltammogramme erstellt. Dies sei erwähnt, da auf Grund des elektrochemischen Verhaltens zwar bei manchen Substanzen die Trennung in einem oder in mehreren Kanälen gelungen ist, jedoch teilweise in den restlichen Kanälen eine Coelution mit den unmittelbar danach eluierenden Substanzen erkennbar wurde. Trotzdem erhielten diese Peaks in den Kanälen bei denen keine Coelution auftrat bei der späteren Durchnummerierung in den Chromatogrammen eine eigene Nummer. Sie fehlen aber dann logischerweise bei den erstellten Voltammogrammen.

### 6.5.1.1.1 Chromatogramme und Voltammogramme der polaren Fraktion

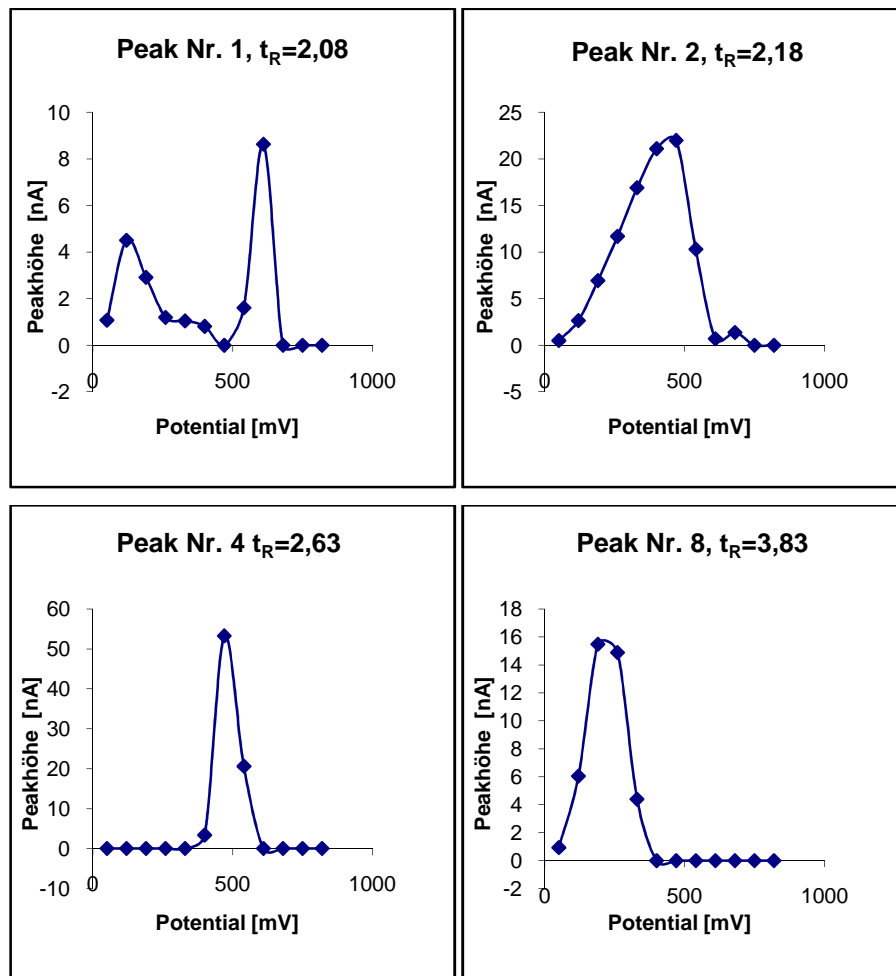
In den folgenden Abbildungen werden nicht die Signale aller 12 Kanäle dargestellt, da die Übersichtlichkeit dadurch leiden würde. **Abbildung 44** zeigt gesondert die Signale des zweiten (+120 mV) Kanals, **Abbildung 45** zusätzlich die Signale des achten (+540 mV) und neunten (+610 mV) Kanals. **Abbildung 46** zeigt sämtliche Voltammogramme der Substanzen der polaren Fraktion, die aus den Chromatogrammen erstellt werden konnten. Verwirrend ist bei flüchtiger Betrachtung nur eines Chromatogramms, dass die Nummerierung der Peaks nicht durchgehend erscheint. Sie ist es jedoch, vergleicht man beide Chromatogramme nebeneinander. Man bedenke, nicht jede Substanz erzeugt automatisch in allen Kanälen ein Signal! Ist die Substanz also z.B. im Kanal mit niedrigem Potential erkennbar, so kann sie doch im Kanal mit dem höheren Potential unsichtbar sein und umgekehrt.

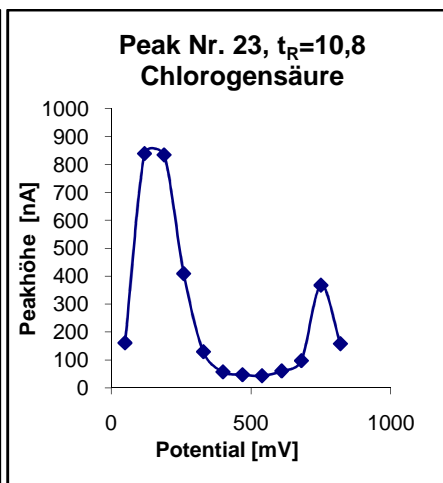
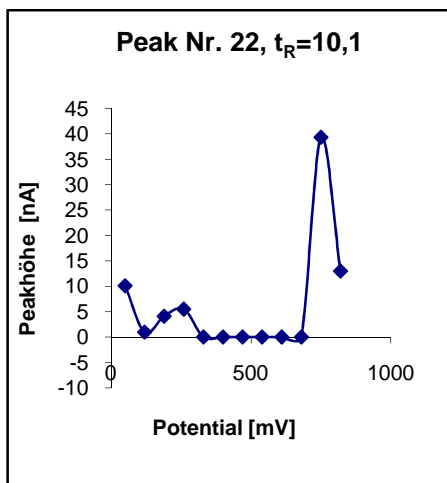
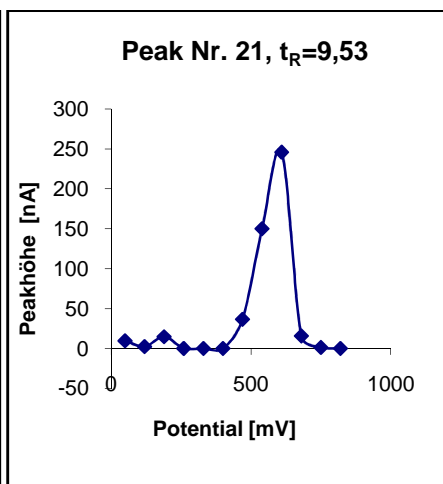
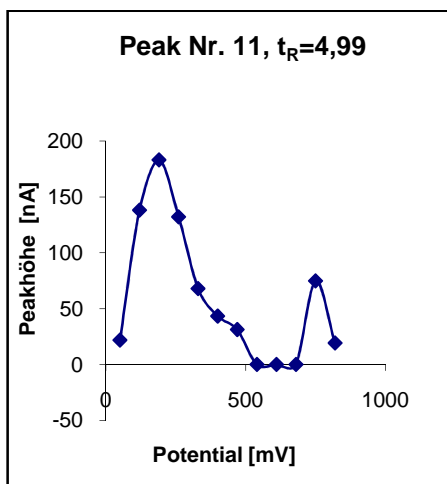
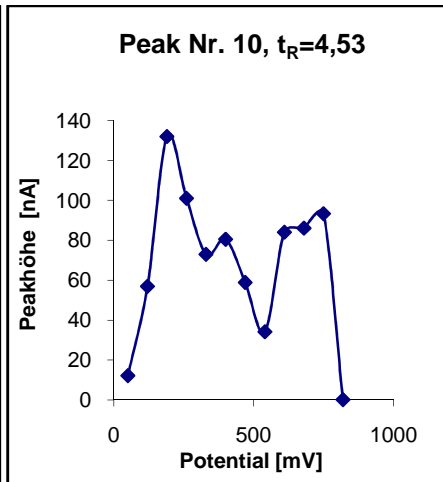
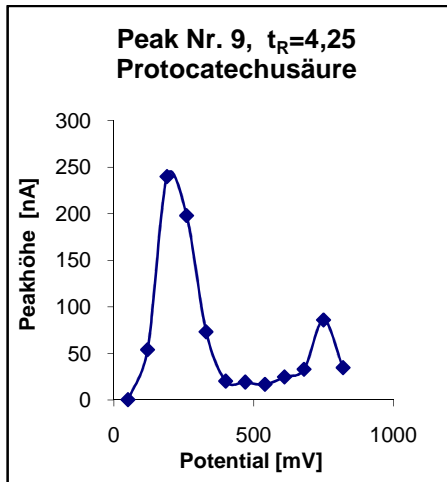


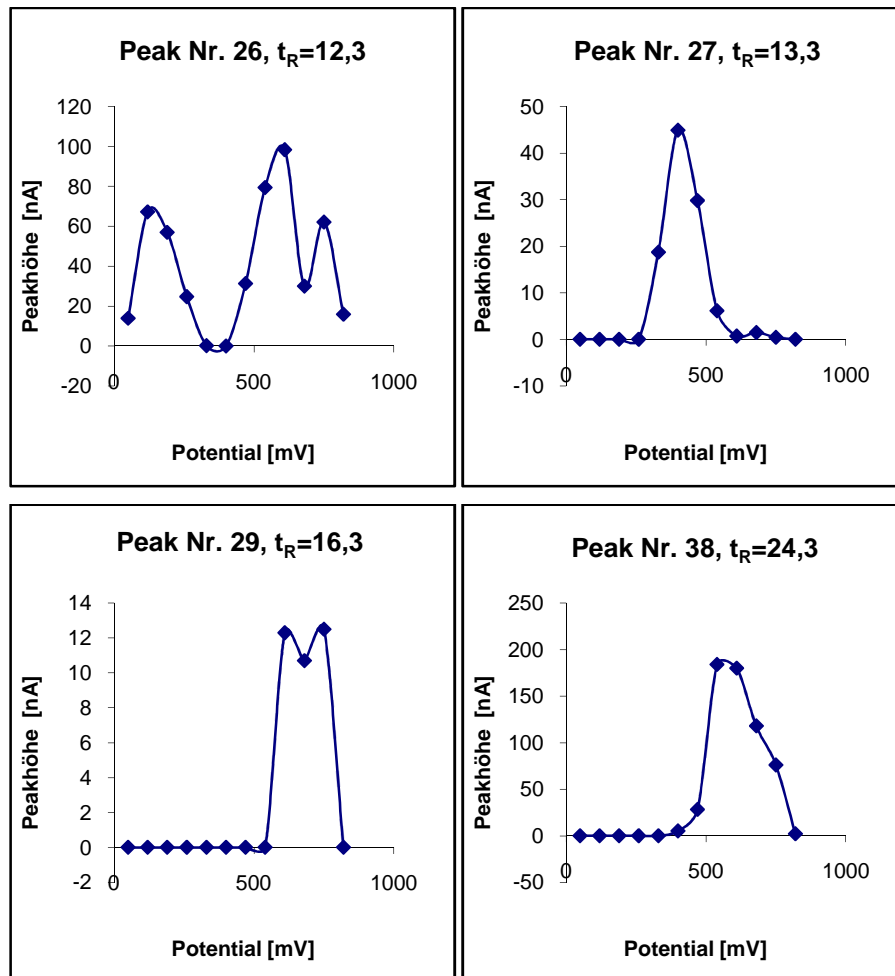
**Abbildung 44:** Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aufgenommen im zweiten (+120 mV) Kanal



**Abbildung 45:** Chromatogramme des methanolischen Extraktes aufgenommen im zweiten (+120 mV), achten (+540 mV) und neunten (+610 mV) Kanal



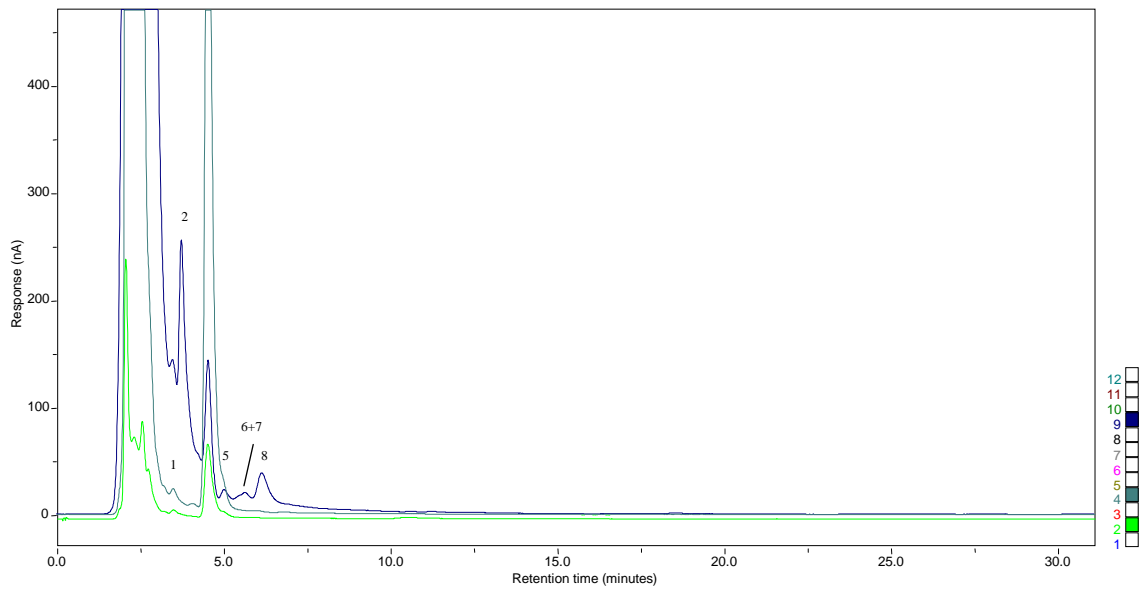




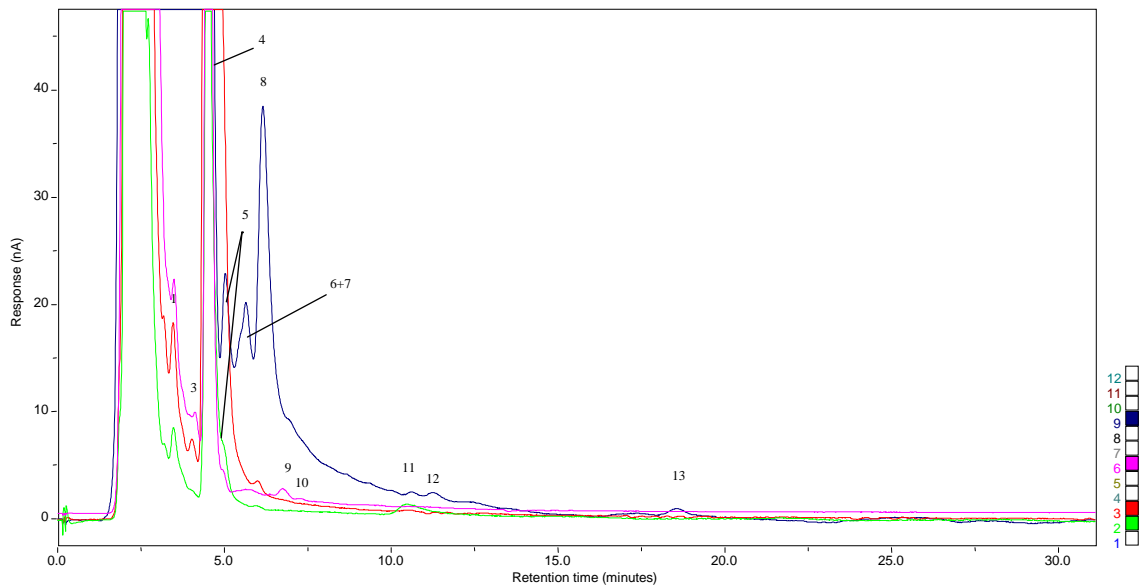
**Abbildung 46:** Voltammogramme von Substanzpeaks der polaren Fraktion des Holundersaftextraktes

### 6.5.1.1.2 Chromatogramme und Voltammogramme der apolaren Fraktion

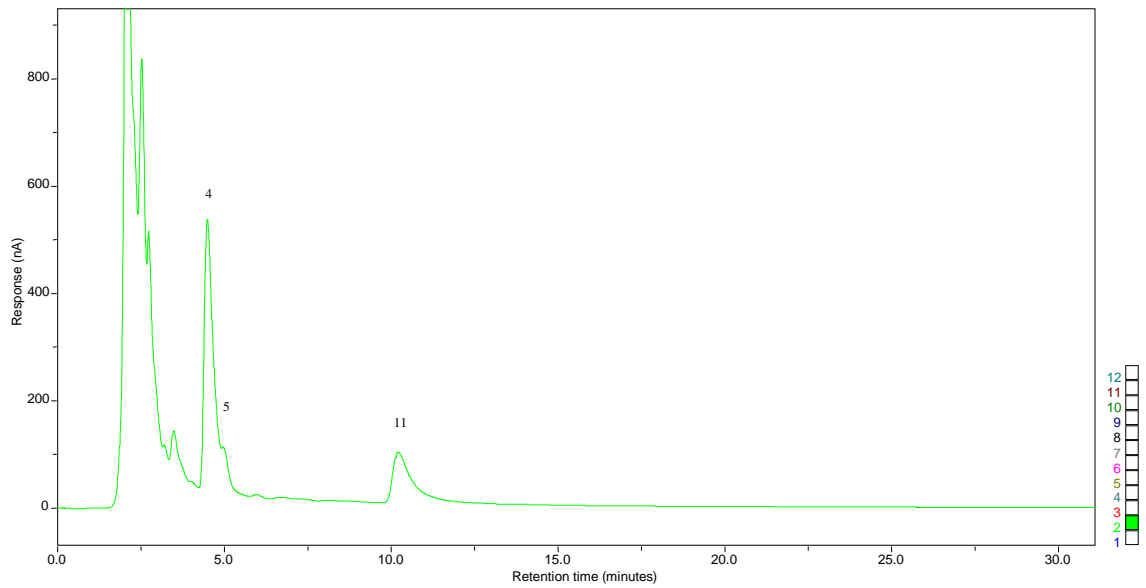
Die Chromatogramme der Flavonoidfraktion mussten auf Grund der hohen Konzentrationsunterschiede der vorliegenden Substanzen mit verschiedenen Empfindlichkeiten gemessen werden. Es ist auch zu bedenken, dass es sich bei den folgenden Abbildungen um unterschiedliche Verdünnungsstufen der aufgearbeiteten Saftprobe handelt. Rutin verursacht ein relativ hohes Signal, während Quercetin wegen der sehr geringen Konzentration nur bei Messungen bei sehr hoher Empfindlichkeit sichtbar wird. Wieder ist es wichtig alle Chromatogramme zu betrachten, um die vollständige Nummerierung der Peaks zu erfassen.



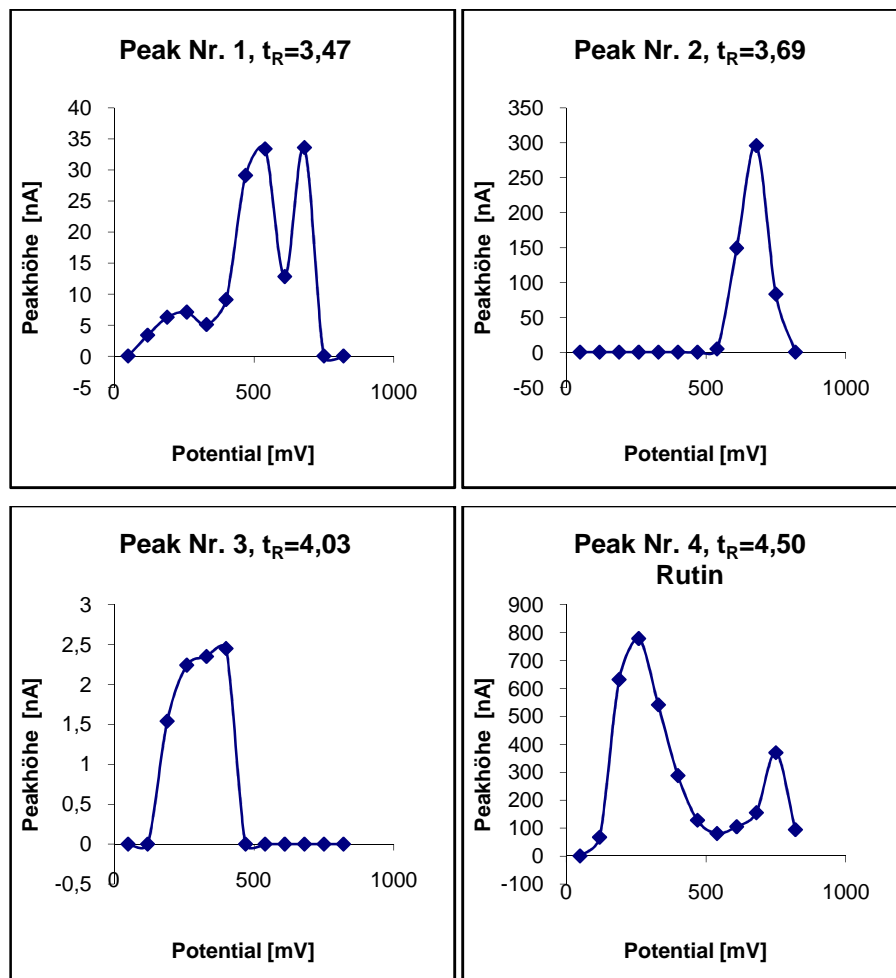
**Abbildung 47:** Chromatogramm des Holundersaftextraktes, Verdünnungsstufe 1:250, Kanal 2 (+120 mV), Kanal 4 (+260 mV), Kanal 9 (+610 mV), Empfindlichkeit: 500 nA

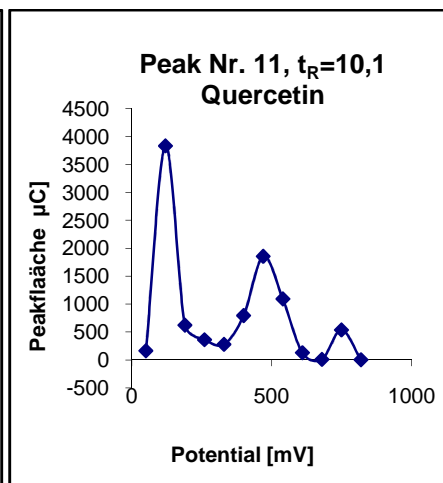
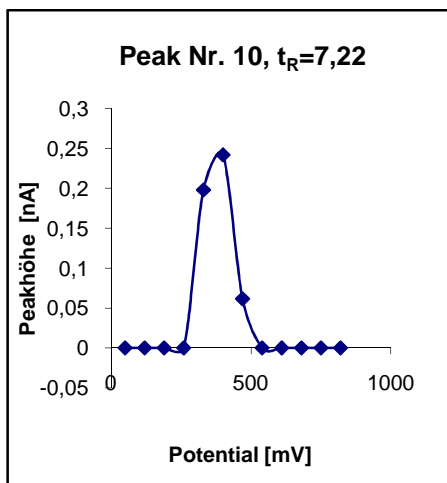
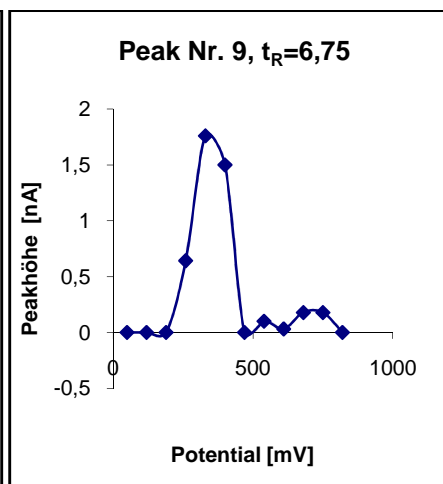
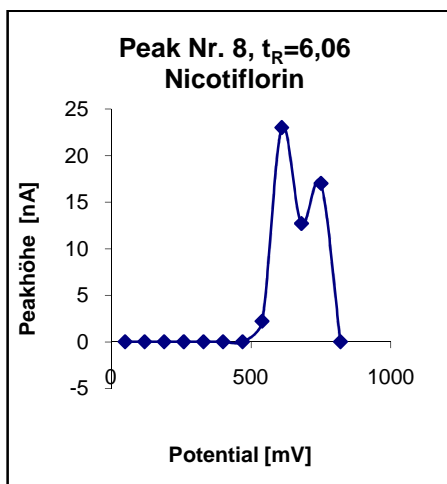
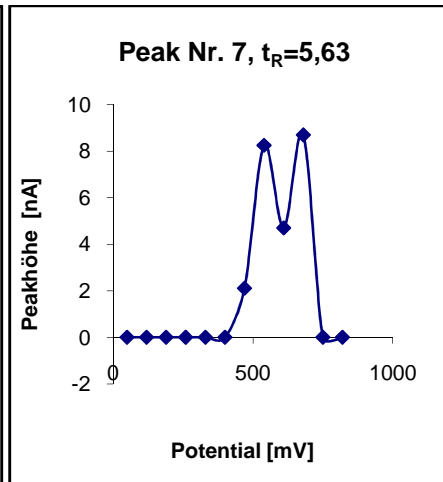
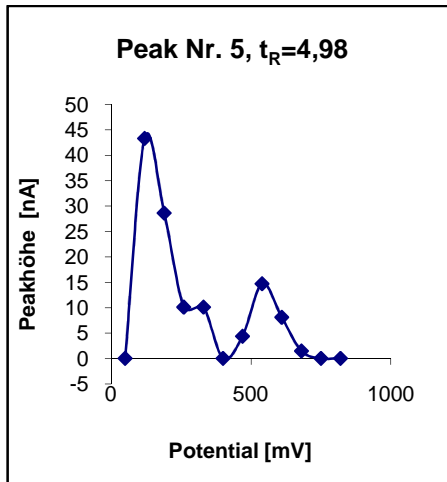


**Abbildung 48:** Chromatogramm des Holundersaftextraktes, Verdünnungsstufe 1:250, Kanal 2 (+120 mV), Kanal 3 (+190 mV), Kanal 6 (+400 mV), Kanal 9 (+610 mV), Empfindlichkeit: 50 nA

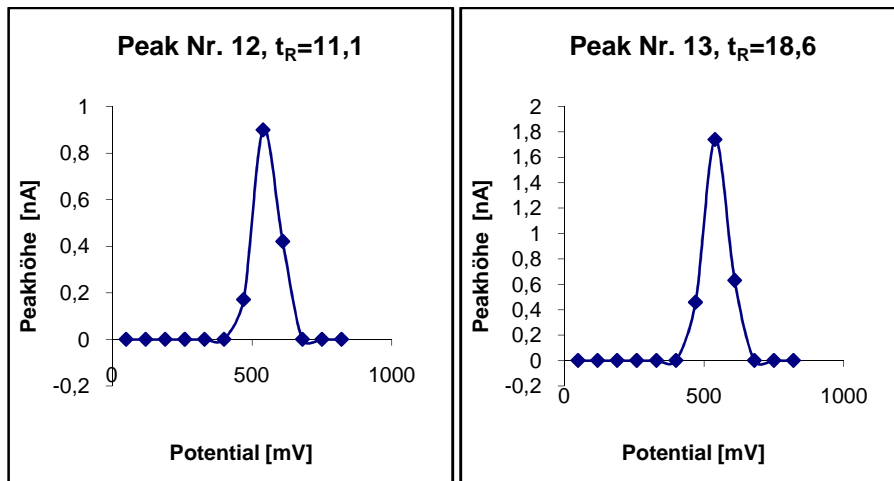


**Abbildung 49:** Chromatogramm des Holundersaftextraktes Verdünnungsstufe 1:5, Kanal 2 (+120 mV), Empfindlichkeit: 1000 nA









**Abbildung 50:** Voltammogramme von Substanzpeaks der apolaren Fraktion des Hundsaftextraktes

## 6.6 Qualitative Analyse mittels LC/UV-ESI/MS

### 6.6.1 Einleitung

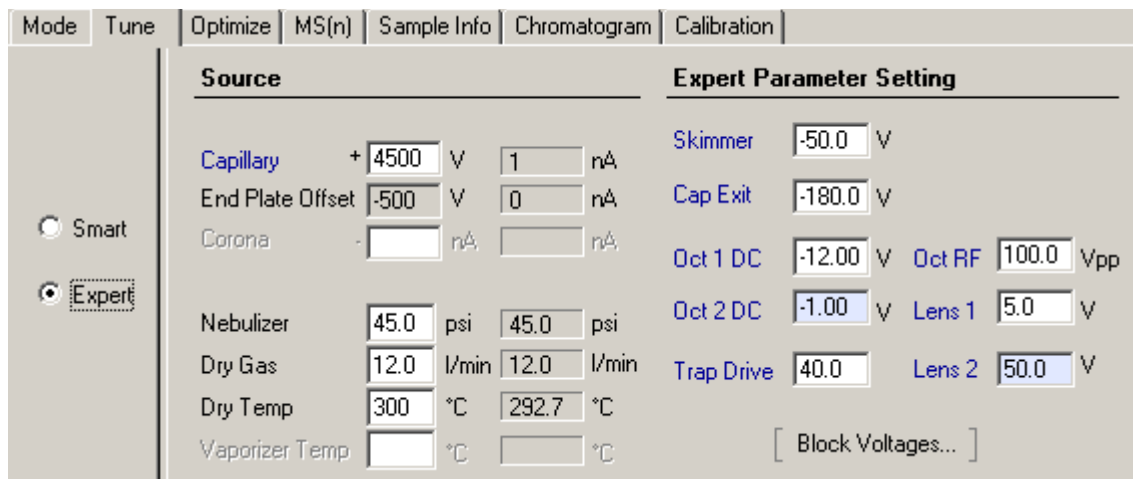
Die Ergebnisse der qualitativen Analyse, die mit dem elektrochemischen Detektor gewonnen wurden, sollten durch die Analysen mittels LC/UV-ESI/MS bestätigt werden. Dabei wurden die Inhaltsstoffe der polaren und der apolaren Fraktion des Holundersaftextraktes getrennt untersucht, um konform bei der HPLC-CEAD und der HPLC-ESI/MS vorzugehen. Im Prinzip wäre es möglich gewesen, ein gemeinsames Extrakt des Holundersaftes herzustellen, die Substanzen mittels Gradientenelution zu trennen und dann zu identifizieren.

Zur Erinnerung: das HPLC-CEAD-System gibt zuverlässige Resultate, wenn mit isokratischer Elution oder mit einem „flachen“ Gradienten gearbeitet wird.

Leider stand für die LC-MS Messungen nur jene analytische Säule (150x4.6 mm) zur Verfügung, die auch bei den HPLC-CEAD Messungen verwendet wurde. Die Säule ist zwar für HPLC-CEAD Messungen bestens geeignet, jedoch nicht für die HPLC-ESI/MS Messungen, da die Fließgeschwindigkeit relativ hoch gewählt werden musste. Der hohe Anteil an mobiler Phase in der Ionenquelle führt zu einer zu geringen Desolvation der durch den Spray erzeugten Flüssigkeitstropfen. Besonders bei einem geringen Anteil an organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase kann dies eine adäquate Vernebelung der Flüssigkeitstropfen verhindern. Es gelang jedoch durch Testen verschiedener Parameter insbesondere bei der Konfiguration des Nebulizers, die Ionisierung zu optimieren. Dennoch wäre es von Vorteil eine möglichst dünne Säule zu verwenden, um die Empfindlichkeit des konzentrationsabhängigen Massendetektors zu steigern.

## 6.6.2 Die Phenolsäurefraktion

Da die zu untersuchenden Verbindungen leicht deprotonieren und daher vorzugsweise negativ geladene Ionen bilden, wurden die Messungen im negativen Modus durchgeführt.



**Abbildung 51:** Die wichtigsten Parameter der MS-Methode für die polare Fraktion

Die mobile Phase der LC-Methode konnte modifiziert werden, da ja im Gegensatz zu den Analysen mit der elektrochemischen Detektion, die Gradientenelution möglich war. Der Unterschied bestand nicht nur in dieser Tatsache, sondern auch darin, dass bei Verwendung eines Massendetektors die Verwendung von nicht flüchtigen Pufferanteilen in der mobilen Phase zu vermeiden ist.

Da die Ionisierung in der Quelle besonders einfach im Bereich des pKs Wertes der Analyten erfolgt bzw. bei der Entwicklung der mobilen Phase für die elektrochemischen Analysen die beste Trennung bei einem pH-Wert von 2,9 erreicht wurde, wurden die beiden Anteile A und B der mobilen Phase auf diesen pH-Wert mit Essigsäure eingestellt.

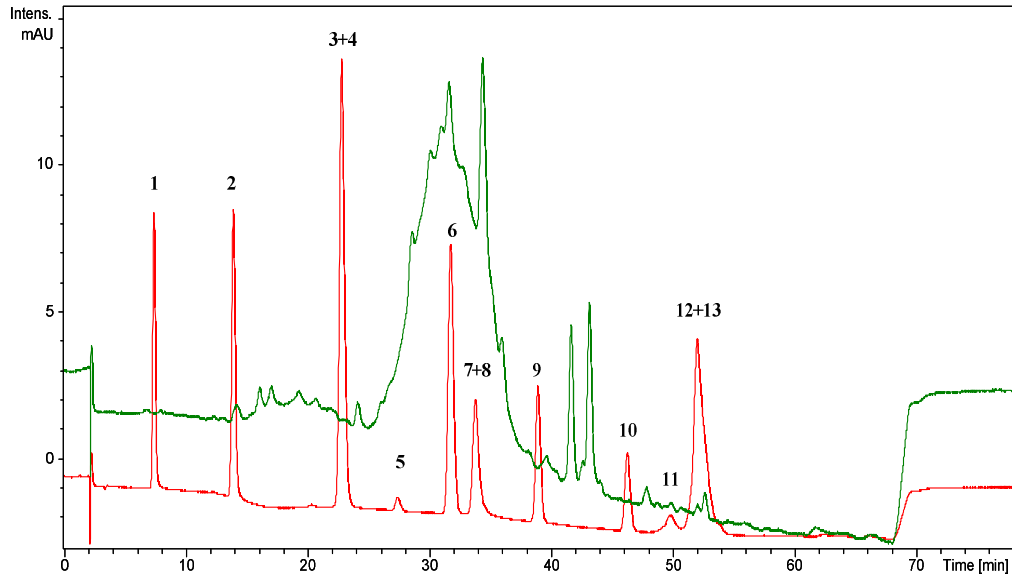
Als Lösung A diente eine MeOH/H<sub>2</sub>O (5:95, v:v) Lösung, justiert mit CH<sub>3</sub>COOH auf pH 2,9 und Lösung B, MeOH, H<sub>2</sub>O (30:70, v:v), justiert mit CH<sub>3</sub>COOH auf pH 2,9. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0.8 ml/min. Der für die Trennung der Substanzen geeignete Gradient ist in **Tabelle 7** dargestellt.

<b>LC-Timetable</b>	<b>Anteil A</b>	<b>Anteil B</b>
<b>Zeit [min]</b>	<b>Wert[%]</b>	<b>Wert[%]</b>
0,00	100,0	0,0
30,00	50,0	50,0
50,00	0,0	100,0
65,00	0,0	100,0
66,00	100,0	0,0
78,00	100,0	0,0

**Tabelle 7:** Gradientenelution für die Analyse der Phenolsäuren

### 6.6.2.1 Chromatographische Trennung

**Abbildung 52** zeigt einen Vergleich des UV-Chromatogramms der Standardsubstanzen mit dem UV-Chromatogramm des methanolischen Extraktes bei 260 nm. Eine vollständige Trennung wurde nicht angestrebt, da der Massendetektor die selektive Detektion der Pseudomolekülonen bei coeluerenden Substanzen ermöglicht.

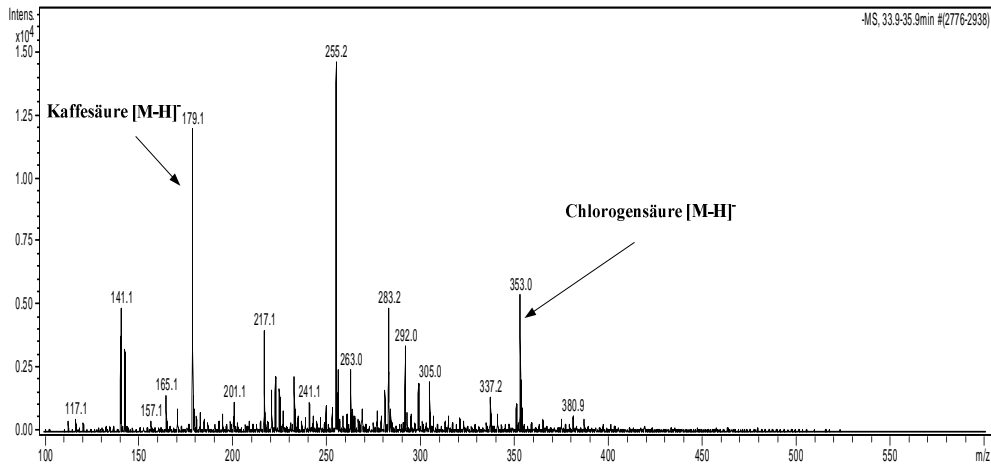


**Abbildung 52:** UV-Chromatogramme des methanolischen Holunderextraktes (grün) im Vergleich mit dem Standardchromatogramm (rot) der Substanzen in **Tabelle 8**

Nr.	Bezeichnung	CAS Nr	Masse	[M-H] <sup>-</sup>
1	Gallussäure	149-91-7	170.12	169.1
2	Protocatechusäure	99-50-3	154.12	153.1
3	Gentisinsäure	490-79-9	154.12	153.1
4	p-Hydroxybenzoesäure	99-96-7	138.12	137.1
5	4-Hydroxyphenyl-essigsäure	156-38-7	152.15	151.1
6	Vanilinsäure	121-34-6	168.15	167.1
7	Chlorogensäure	327-97-9	354.31	353.3
8	Kaffeesäure	331-39-5	180.16	179.1
9	Syringasäure	530-57-4	198.17	197.1
10	p-Cumarsäure	7400-08-0	164.16	163.2
11	Salicylsäure	69-72-7	138.12	137.1
12	Gentisinsäuremethylester	2150-46-1	168.15	167.1
13	Ferulasäure	1135-24-6	194.18	193.2

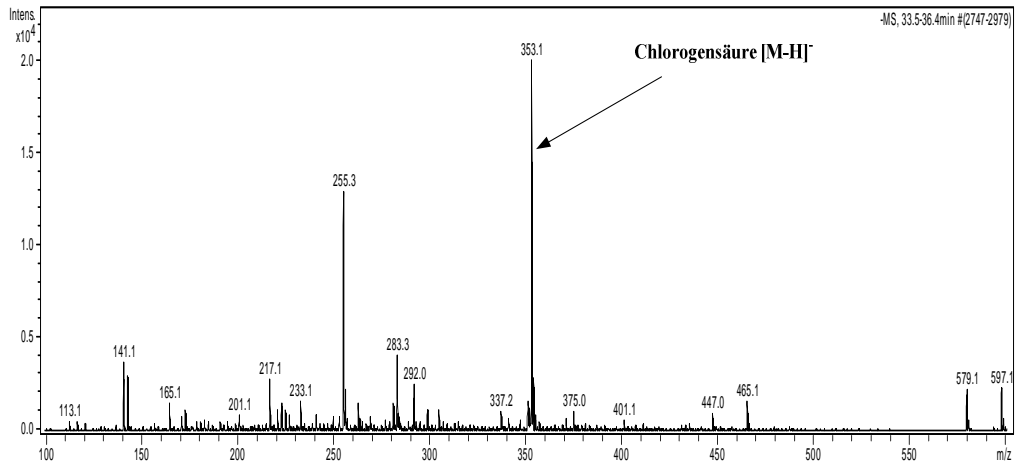
**Tabelle 8:** Standardsubstanzen der polaren Fraktion

Das UV- Chromatogramm der Standardlösung in **Abbildung 52** zeigt, dass die Verbindungen Kaffeesäure und Chlorogensäure (Peak 7,8) zeitgleich eluieren. Bestätigt wird dies durch das Massenspektrum des betreffenden Peaks, in dem die Massen beider Ionen zu finden sind.

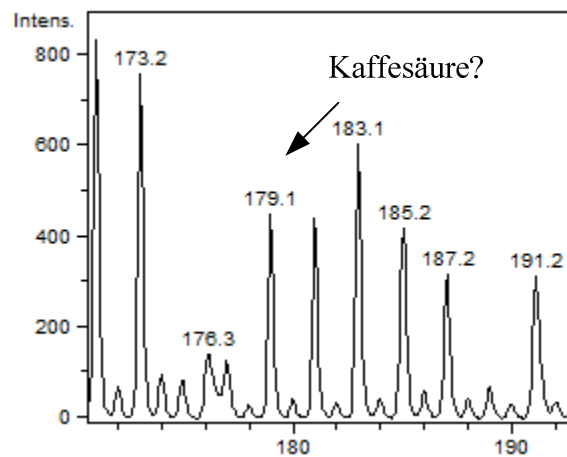


**Abbildung 53:** Pseudomolekülonen im Massenspektrum des UV- Peaks 7,8 des Standardchromatogramms der **Abbildung 52**, mit den Pseudomolekülonen der Kaffeesäure und der Chlorogensäure

Im Gegensatz dazu zeigt der zeitgleiche Peak des methanolischen Holunderextraktes vorerst nur den Massenpeak des Pseudomolekülonen der Chlorogensäure. Die Betrachtung des Massenspektrums bei höherer Empfindlichkeit gibt jedoch den Hinweis, dass die Kaffeesäure ebenfalls vorliegt. Dies wird auch durch die Ergebnisse der qualitativen Analyse mit dem CEAD-System bestätigt (siehe **Abschnitt 6.5**). Ein stichfester Beweis konnte aber auch mit der gewählten Methode nicht erfolgen, da die Chlorogensäure bekanntlich der Ester aus Kaffeesäure und Chinasäure ist, ist das Vorkommen der Kaffeesäure höchst wahrscheinlich.



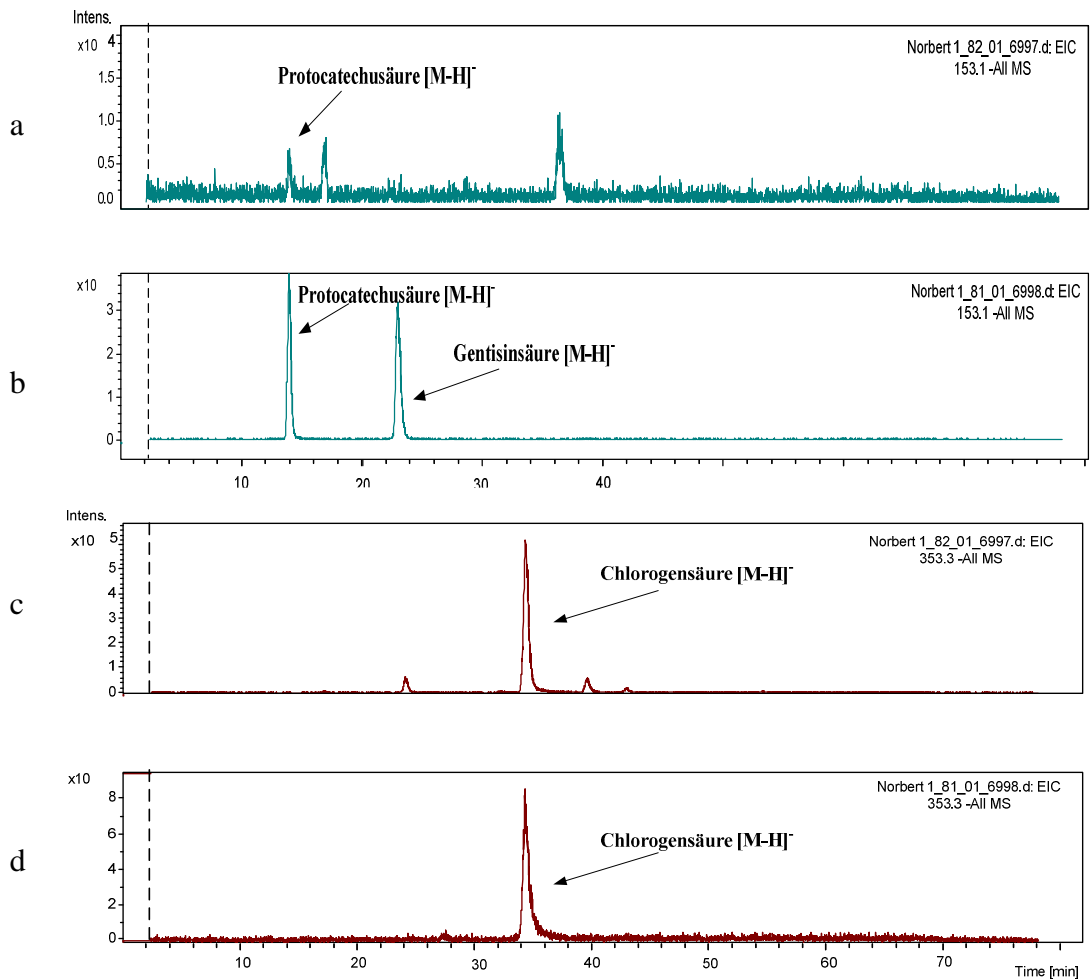
**Abbildung 54:** Massenspektrum des Chlorogensäure-Peaks im methanolischen Holunderextrakt mit dem Pseudomolekülion der Chlorogensäure



**Abbildung 55:** Empfindlichere Darstellung des Massenspektrums in **Abbildung 54** mit dem verdächtigen Peak des Pseudomolekülions der Kaffesäure

### 6.6.2.2 Ergebnisse der qualitativen Analyse mittels LC/UV-ESI/MS

Die Identifikation erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten und der MS-Spektren der Reinsubstanzen mit den Substanzen der Probe. Zu diesem Zweck wurden sogenannte „Extracted Ion Chromatograms“ (EIC) erstellt, die jeweils nur die Substanzpeaks ausgewählter und definierter Massen darstellen.



**Abbildung 56:** EIC Spektren der Protocatechusäure (**b**, [M-H]<sup>-</sup> 169,1) und der Chlorogensäure (**d**, [M-H]<sup>-</sup> 353,3) in Standardlösungen

**a,c:** EIC Spektren bei den charakteristischen Ionen von Protocatechusäure und Chlorogensäure im Extrakt

In der polaren Fraktion konnten die beiden Verbindungen Protocatechusäure und Chlorogensäure zweifelsfrei nachgewiesen werden, da die Massenpeaks jeweils zur selben



Retentionszeit sowohl in der Standardlösung, wie auch im Holunderextrakt beobachtet werden konnten.

Eine mögliche Vorgangsweise für weiterführende Analysen des Holunderextraktes, nicht nur für den Nachweis der Kaffeesäure, wäre die Isolation der Massen von verdächtigen Pseudomolekülonen in der Ionenfalle und eine anschließende Fragmentierung. Die gebildeten Fragmente wären, im Vergleich mit den ebenfalls durchzuführenden Fragmentierungen der Substanzen aus einer bekannten Standardlösung bei identen Bedingungen, ein weiterer Hinweis auf das Vorkommen dieser Verbindungen.

### 6.6.3 Die Flavonoidfraktion

Die Vorgangsweise für die Anpassung und Konvertierung der Analysenparameter (Fließgeschwindigkeit, mobile Phase usw.) von der Untersuchung der Flavonoidfraktion am HPLC-System mit dem coulometrischen Detektor auf das HPLC-System mit dem Massenspektrometer als Detektor waren ähnlich wie bei den vorangegangenen Analysen der Phenolsäuren. Für die Konfiguration des Elektrosprays wurden dieselbe Methode und anloge Einstellungen verwendet wie bei den Untersuchungen der Phenolsäuren (siehe **Abbildung 51**).

Bei der Zusammensetzung der mobilen Phasen wurde auch hier, im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen mit dem CEAD-System, auf die Verwendung eines Puffers verzichtet.

Da bei den Flavonoiden der pH-Wert in der mobilen Phase auf die chromatographische Trennung keinen so großen Einfluss hatte wie bei den Phenolsäuren, wurde die Lösung A der Gradienten Methode der Phenolsäuren auch für die LC-Methode der Flavonoide verwendet, als Lösung B diente 100% MeOH. In **Tabelle 9** ist das verwendete Gradientenprogramm angeführt.

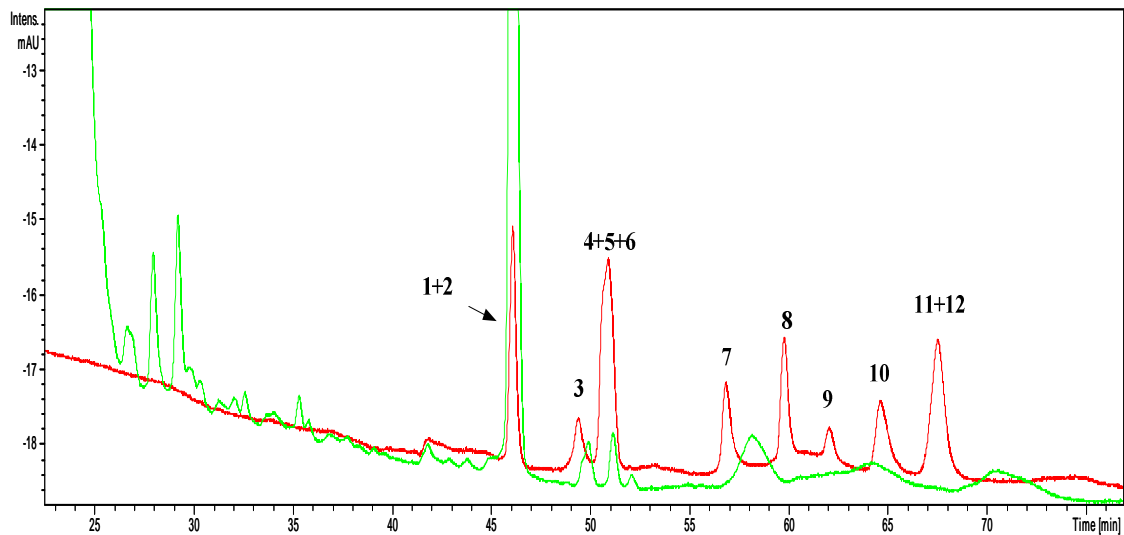
LC-Timetable	Anteil A	Anteil B
Zeit [min]	Wert [%]	Wert [%]
0,00	100,0	0,0
55,00	0,0	100,0
96,00	0,0	100,0
97,00	100,0	0,0
110,00	100,0	0,0

**Tabelle 9:** Parameter der Gradientenelution, Flavonoide

#### 6.6.3.1 Chromatographische Trennung

In **Abbildung 57** sieht man das UV-Chromatogramm des aufgearbeiteten Holundersaftextraktes im Vergleich mit dem UV-Chromatogramm der Standardmischung der Flavonoide. Eine perfekte Trennung wurde auch hier nicht erreicht bzw. angestrebt, da der Massendetektor in Verbindung mit der Analysensoftware die Möglichkeit bietet, sich

die Massen ausgewählter Peaks herauszugreifen und damit zu überprüfen, ob die gesuchte Substanz im Bereich dieses Peaks vorhanden ist oder nicht.



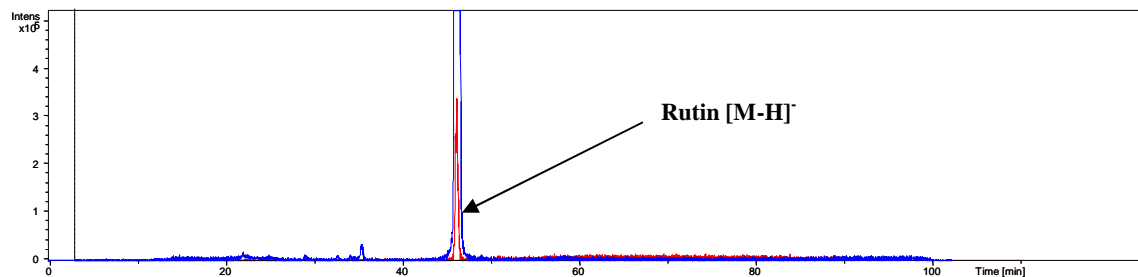
**Abbildung 57:** UV-Chromatogramme des aufgearbeiteten Holundersaftextraktes (grün) im Vergleich mit dem Standardchromatogramm (rot) der Substanzen in **Tabelle 10**

Nr.	Bezeichnung	CAS Nr	Masse	[M-H] <sup>-</sup>
<b>1</b>	Rutin	153-18-4	610.52	609,5
<b>2</b>	Isoquercitrin	21637-25-2	464.68	463,7
<b>3</b>	Myricetin	529-44-2	318.24	317,2
<b>4</b>	Nicotiflorin	17650-84-9	594.52	593,5
<b>5</b>	Astragalin	480-10-4	448.38	447,4
<b>6</b>	Quercitrin	522-12-3	448.38	447,4
<b>7</b>	Quercetin	117-39-5	302.24	301,2
<b>8</b>	Luteolin	491-70-3	286.24	285,2
<b>9</b>	Hesperitin	520-33-2	302.28	301,3
<b>10</b>	Kämpferol	520-18-3	286.24	285,2
<b>11</b>	Apigenin	520-36-5	270.24	269,2
<b>12</b>	Isorhamnetin	480-19-3	316.26	315,3

**Tabelle 10:** Standardsubstanzen der apolaren Fraktion

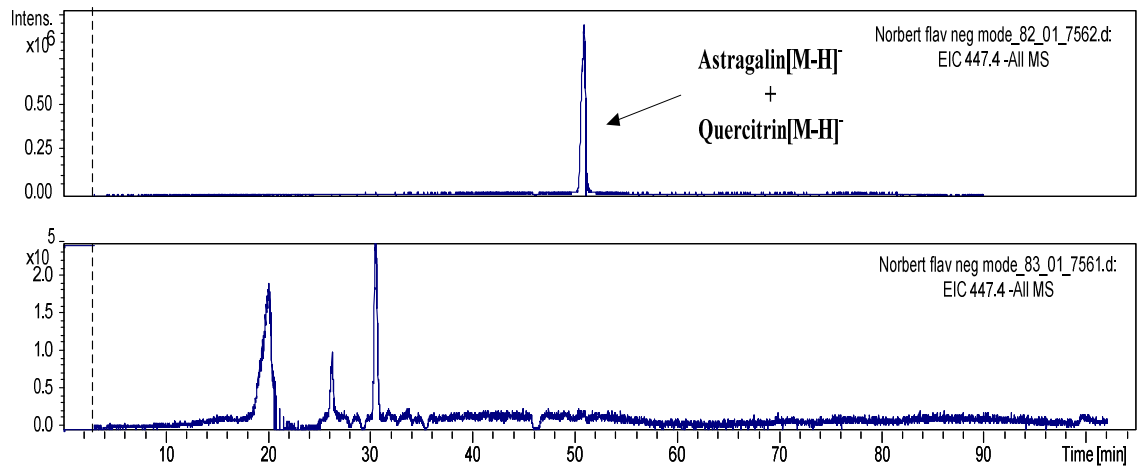
### 6.6.3.2 Ergebnisse der qualitativen Analyse mittels LC/UV-ESI/MS

Der Vergleich der Standard EIC bestätigte die Erkenntnisse aus der qualitativen Analyse mit Hilfe des coulometrischen Elektroden Array Detektors. Das Rutin aus der aufbereiteten Probe des Holundersaftes ergab ein deutliches Signal, das in Übereinstimmung mit dem Signal des Standards lag. Das, wie im UV-Chromatogramm der Standards erkennbar, zeitgleich eluierende Isoquercitrin war im Massenspektrum des korrespondierenden Peaks im aufgearbeiteten Holundersaft nicht nachweisbar.

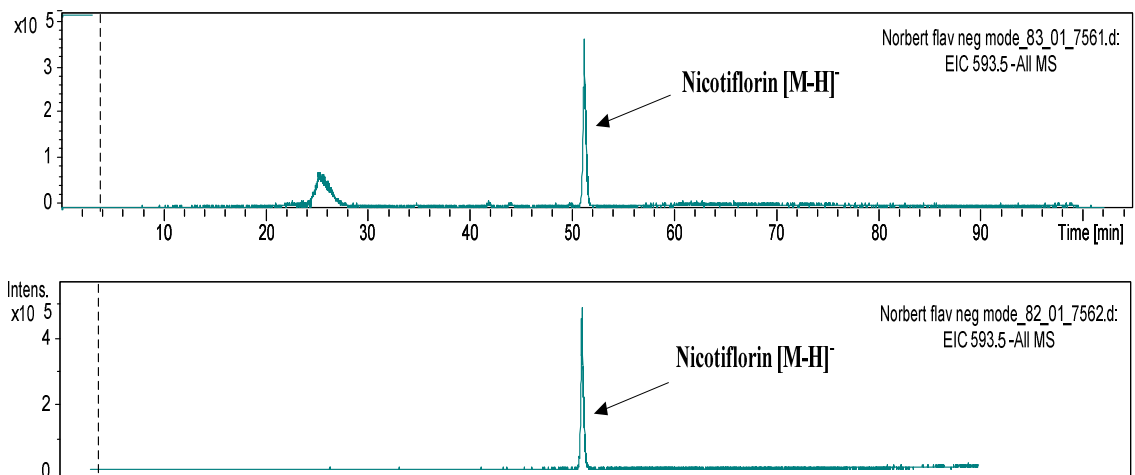


**Abbildung 58:** Gleichzeitige, überlappende Darstellung der EIC Spektren der Pseudomolekülonen des Rutinstandards (rot) mit dem des Rutins aus der Realprobe (blau)

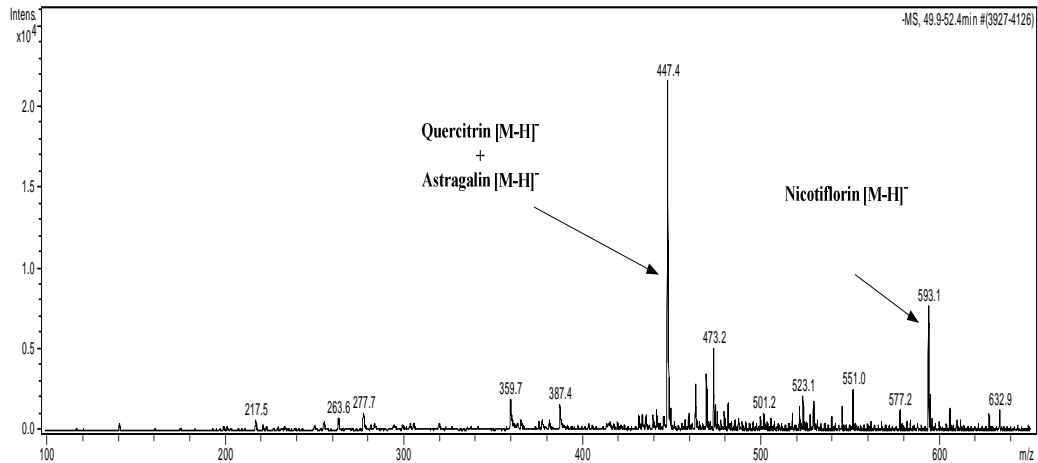
Bei weiteren Untersuchungen konnte durch den Vergleich der EIC-Spektren das Nicotiflorin im Holundersaft nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte man durch die Ergebnisse der Massenspektrometrie das Vorhandensein der mit dem Nicotiflorin coeluierenden Substanzen Quercitrin und Astragalin in der Holunderprobe ausschließen. In **Abbildung 59** und **60** sind jeweils die EIC-Spektren mit den ausgewählten Massen der Pseudomolekülonen dargestellt. **Abbildung 61** zeigt das Massenspektrum des Peaks des Standardchromatogramms aus den gleichzeitig eluierenden Substanzen Nicotiflorin, Quercitrin und Astragalin.



**Abbildung 59:** Oben, das EIC-Spektrum der Standards mit den Ionen des Astragalins und des Quercitrins. Das untere Spektrum des Holundersaftes zeigt keine der beiden Signale in diesem Bereich.

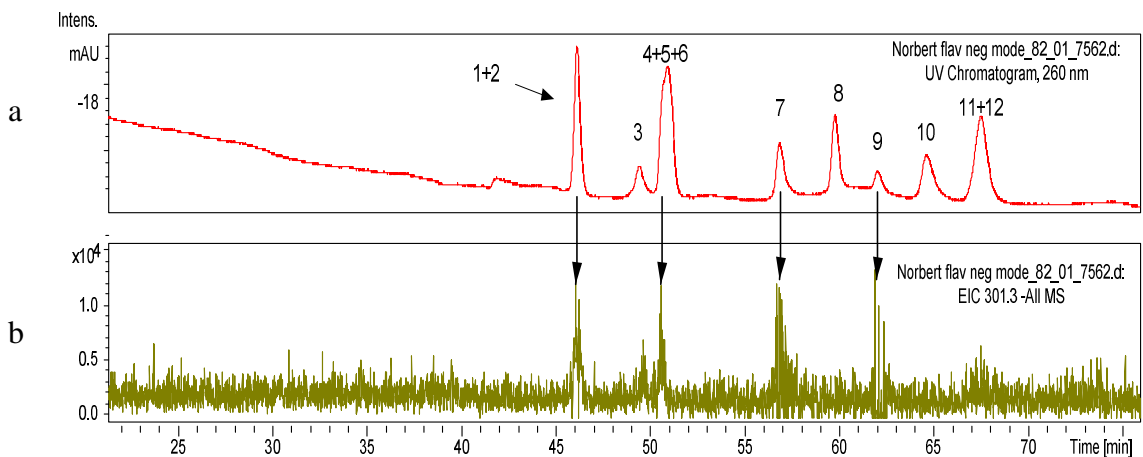


**Abbildung 60:** Paarweiser Vergleich zum Nachweis des Nicotiflorins, oben das EIC des Holunders, unten das der Standardlösung



**Abbildung 61:** Pseudomolekülonen im Massenspektrum des UV- Peaks 4,5,6 des Standardchromatogramms der **Abbildung 57**, mit den Pseudomolekülonen des Nicotiflorins, Quercitrins und Astragalins

Die Konfiguration des LC/MS Systems war für die Erfassung der Flavonoidglykoside geeignet, die Detektion der Flavonoidaglykone war jedoch problematisch. Die Peaks der EICs zeigten nicht die zu erwartenden scharf begrenzten Peakformen. Da das LC-MS System nur zeitlich begrenzt zur Verfügung stand, konnten in dieser Hinsicht keine weiteren Verbesserungen der Methode durchgeführt werden. Dennoch zeigten sich im EIC der **Abbildung 62b** Hinweise auf das Vorkommen des Quercetins in Form von erkennbaren Erhebungen der Basislinie.



**Abbildung 62a:** UV-Chromatogramm der Standardlösungen aus **Tabelle 10**, (siehe auch **Abbildung 57**)

**d:** EIC Spektren bei den charakteristischen Ionen von Quercetin und Hesperitin

Peaks von Pseudomolekülonen  $[M-H]^-$  301,3 zeigen sich im Bereich des Rutin- und Isoquercitrin-Peaks (UV-Chromatogramm Peak Nr. 1+2). Diese entstammen vermutlich dem Zerfall der beiden Standardsubstanzen in Quercetin und Rutinose (Rutin) bzw. Glucose (Isoquercitrin) bei der Ionisierung im Elektrospray. Der Nachweis der Glykone in den Massenspektren der Peaks konnte nicht erzielt werden, da die gewählte Methode für deren Ionisierung vermutlich nicht geeignet war.

Das Vorkommen von Pseudomolekülonen  $[M-H]^-$  301,3 im Bereich des Peaks des Quercitrins (Glykosid des Quercetins und der Rhamnose, UV-Chromatogramm Peak Nr. 6) dürfte ebenfalls im kausalen Zusammenhang mit dem Zerfall des Moleküls in der Ionenquelle stehen.

Das Signal eines Pseudomolekülonen  $[M-H]^-$  301,3 im Bereich des Quercetin (UV-Chromatogramm Peak Nr. 7) ist logisch und auch erkennbar sowie jener des Hesperitins (UV-Chromatogramm Peak Nr. 9), da dieses ja nahezu die gleiche Masse wie das Quercetin besitzt, sich davon aber durch die nicht idente Retentionszeit unterscheiden lässt.

Der Vergleich der EICs des Holunders mit denen der Standardsubstanzen konnte keinen stichfesten Beweis über das Vorliegen des Quercetins liefern. Die Existenz der Substanz stützt sich daher auf den Nachweis des Rutins, welches auch das Vorkommen des Quercetins nahelegt bzw. auf die Ergebnisse der qualitativen Analyse mit Hilfe des coulometrischen Elektroden Array Detektors.

## 6.7 Quantitative Analyse der Verbindungen im Holunderbeerensaft

### 6.7.1 Einleitung

Das Detektorsignal des CEAD ist abhängig von der Konzentration des Analyts. Die Bestimmung der Konzentrationen von Protocatechusäure, Chlorogensäure, Rutin, Nicotiflorin und Quercetin erfolgte mit der Standardadditionsmethode. Dazu wurde gleichen Aliquoten der Proben vor der Aufarbeitung zunehmende Mengen an Standardsubstanzen zugesetzt („Spiken“ der Probe). Durch die Standardaddition können Matrixeffekte, Verluste bei der Probenaufarbeitung bzw. instrumentelle Fehler minimiert werden. Die Durchführung setzt jedoch voraus, dass die gemessenen Konzentrationen im linearen Messbereich der analytischen Methode liegen. Dieser sogenannte Arbeitsbereich, also jener Bereich für den ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration des Analyten gegeben ist, musste festgelegt werden. Kommt es zu einer Überladung des Detektors, so flacht die Kalibrierfunktion wie in **Abbildung 63** bei zu hohen Konzentrationen des Analyts ab. **Abbildung 64** zeigt, dass die Linearität bei der Kalibrierfunktion der Protocatechusäure im Konzentrationsbereich von bis 0,005 µg/ml bis 0,5 µg/ml Protocatechusäure gegeben ist. Als Maß für die Linearität diente der Korrelationskoeffizient neben der visuellen Linearitätsprüfung, bei der grobe Abweichungen von der Linearität durch die graphische Darstellung erkannt werden können.

### 6.7.2 Standardadditionsmethode

Bei der praktischen Durchführung der Standardaddition werden zugesetzte Analytmengen (Abszisse) gegen das gemessene Signal (Ordinate) aufgetragen. Der Nullwert entspricht dem Messwert der ungespikten Probe. Durch Verlängerung der Kalibriergeraden erhält man einen Schnittpunkt mit der negativen Abszisse, dessen Absolutbetrag der Ausgangskonzentration des Analyten entspricht.

Um die Menge an Analyten abschätzen zu können, die bei der Standardaddition zum Probenaliquot zugespielt werden sollten, wurden die Konzentration der sogenannten Nullprobe vorab mit Hilfe der externen Kalibrierfunktion bestimmt. Die Nullprobe entspricht einer Verdünnungsstufe der Probe, die den Analyt in einer Konzentration ent-

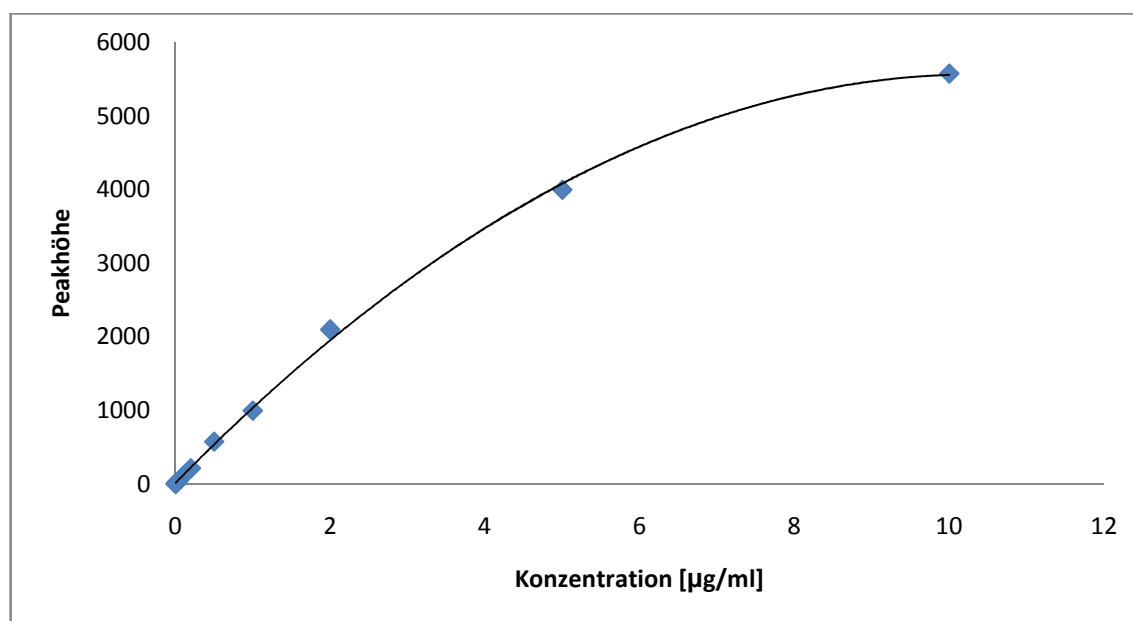


hält, die im Arbeitsbereich der jeweiligen Kalibrierfunktion der Methode liegt. Sie ist gleichzeitig jene Konzentration, die bei Erstellung der Standardadditionsgeraden als ungespiktes Probenaliquot gilt. Die zugesetzten Konzentrationen sollten jeweils rund 50, 100 und 150 Prozent der Konzentration des Analyts in der Realprobe betragen. In **Tabelle 11** sind die Mengen der Analyte dargestellt, die der Probe vor der Aufarbeitung zugesetzt wurden. Es wurde darauf geachtet, dass auch die erhaltenen Signale bei den Standardadditionsproben im jeweiligen Linearitätsbereich der Methode lagen.

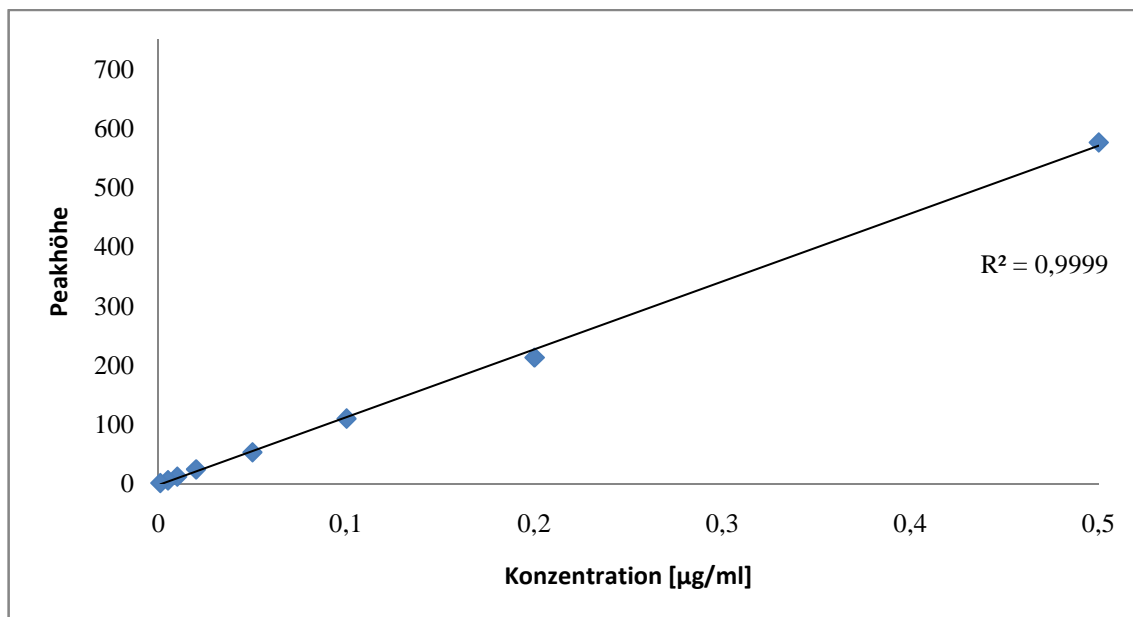
Protocatechusäure	Chlorogensäure	Rutin	Nicotiflorin	Quercetin
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	150,00	232,30	15,00	4,21
8,00	240,00	580,74	30,00	10,54
10,00	300,00	1161,48	60,00	21,07

**Tabelle 11:** Mengen in Mikrogramm jener phenolischen Verbindungen, die der Probe pro Milliliter vor der Aufarbeitung zum Erstellen der Standardadditionsgeraden zugesetzt wurden.

Die Konzentration des Rutins und des Quercetins mussten rechnerisch korrigiert werden, siehe auch **Abschnitt 6.7.3**. Die Menge des zugespikten Quercetins war in der Realität höher als geplant und lag weit über den angepeilten 50, 100 und 150% der Nullprobe.



**Abbildung 63:** Externe Kalibrierfunktion der Protocatechusäure bis zu 10 µg/ml



**Abbildung 64:** Externe Kalibrierfunktion der Protocatechusäure bis 0,5 µg/ml

### 6.7.3 Reinheit des Rutinstandards

Rutin ist das Glykosid des Quercetins mit Rutinose. Ein geringer Teil des Rutinstandards war bereits zu Quercetin abgebaut worden und dieses als Peak im Standardchromatogramm sichtbar. Beim Spiken der Probe musste daher der Anteil an Quercetin berücksichtigt werden, der nicht aus dem Holunder selbst stammen konnte, sondern aus dem verunreinigten Standard. Außerdem musste die Menge an Rutin um den Betrag korrigiert werden, der aus dem Abbau des Rutins resultiert. Dazu wurde mit Hilfe der externen Kalibrierfunktion des Quercetins der Gehalt an Quercetin im Rutin Urstandard bestimmt und der Rutin Gehalt, um den Wert des verlorengegangenen Rutins richtiggestellt.

### 6.7.4 Standardlösungen zum Erstellen der Eichfunktionen

Für die Erstellung der Eichgeraden wurden Lösungen mit bekannten Konzentrationen aus den Urstandards hergestellt. Die Konzentrationen der Rutinstandards wurden rechnerisch um den Wert des bereits zerfallenen Rutins korrigiert. Die Eichgeraden und

Korrelationskoeffizienten sind im **Abschnitt 6.7.5** mit den Standardadditionsgeraden dargestellt.

In **Tabelle 12** finden sich die Konzentrationen der Lösungen der phenolischen Verbindungen.

Protocatechusäure [µg/ml]	Chlorogensäure [µg/ml]	Rutin [µg/ml]	Nicotiflorin [µg/ml]	Quercetin [µg/ml]
0,5	1,25	9,61	1,5	0,5
0,25	0,5	4,81	0,75	0,3
0,1	0,25	1,92	0,3	0,1
0,05	0,125	0,96	0,15	0,07
0,025	0,05	0,48	0,075	0,04
0,01	0,025	0,19	0,03	
0,005		0,10	0,015	

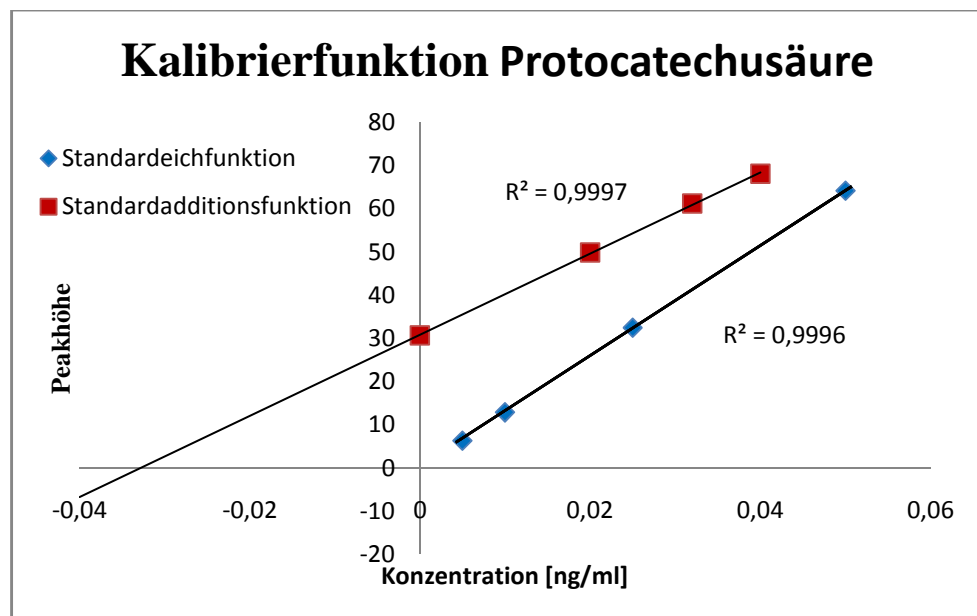
**Tabelle 12:** Konzentrationen der Eichlösungen

### 6.7.5 Bestimmung der Wiederfindung

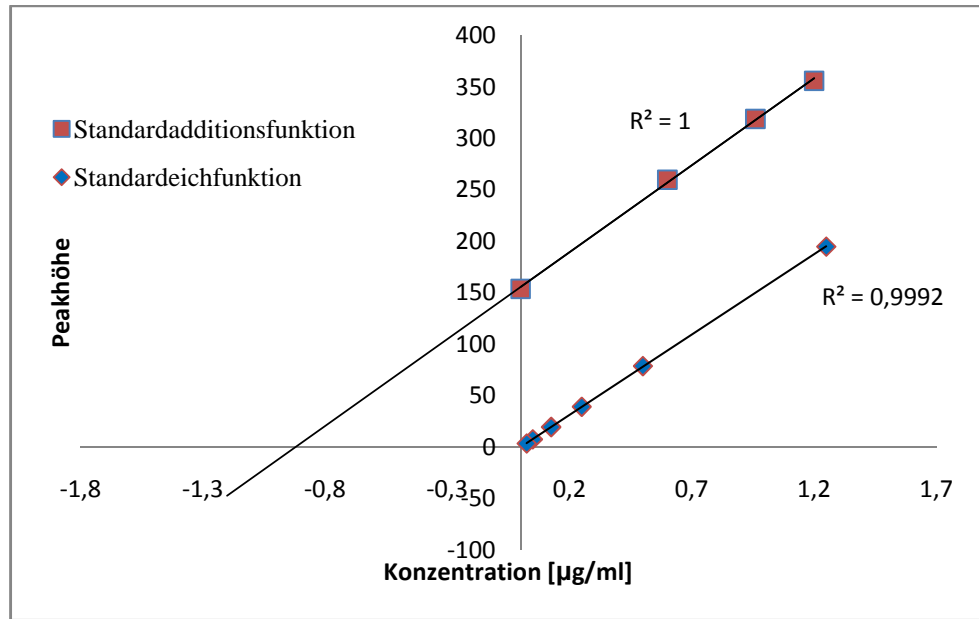
Um die Qualität des analytischen Messverfahrens und der Probenaufarbeitungsmethode zu bestimmen, wurde die Wiederfindung R bestimmt. Diese ergibt sich aus dem Quotienten der Steigungen der Standardadditionsgeraden  $k_{add}$  und der Steigung der externen Kalibrierfunktion  $k_{kal}$  in Prozenten:

$$R(\%) = \frac{k_{add}}{k_{kal}} \cdot 100$$

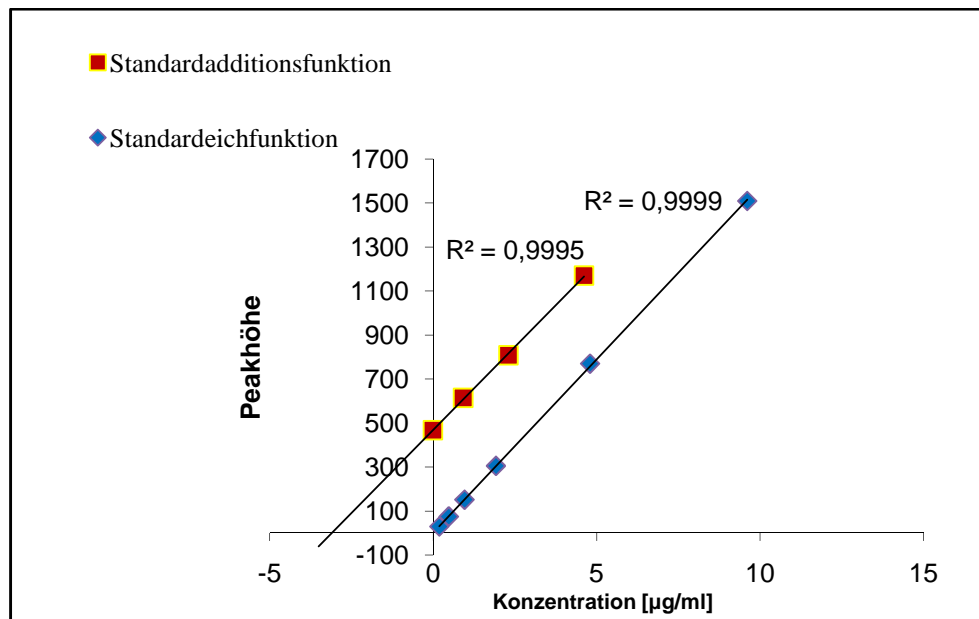
Die **Abbildungen 65 bis 69** stellen die externen Kalibrierfunktionen und Additionsgeraden zur Bestimmung der Wiederfindungsraten dar:



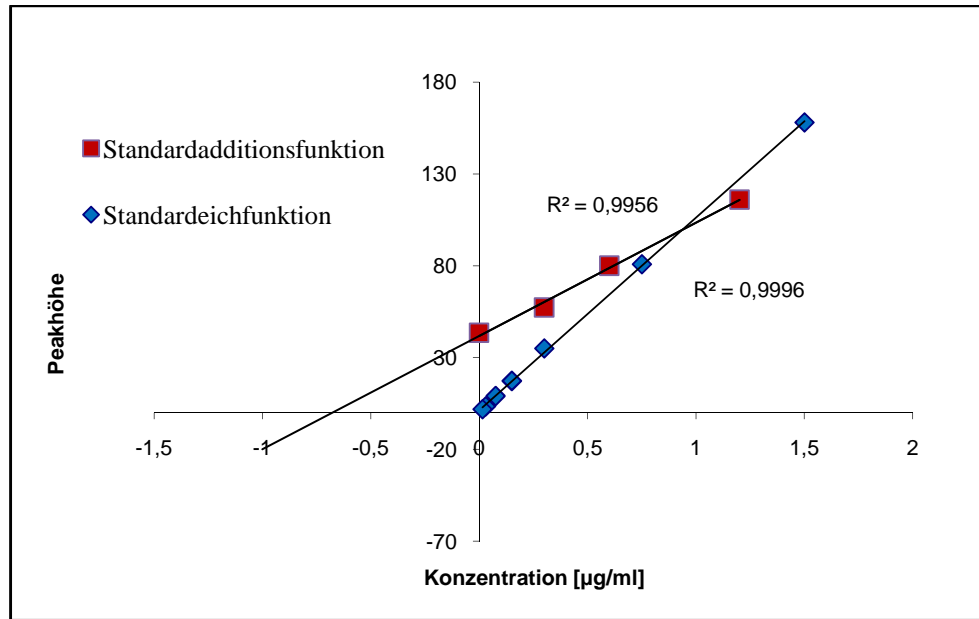
**Abbildung 65:** Eichgerade von Protocatechusäure und Standardadditionsgerade von Protocatechusäure im Holundersaftextrakt



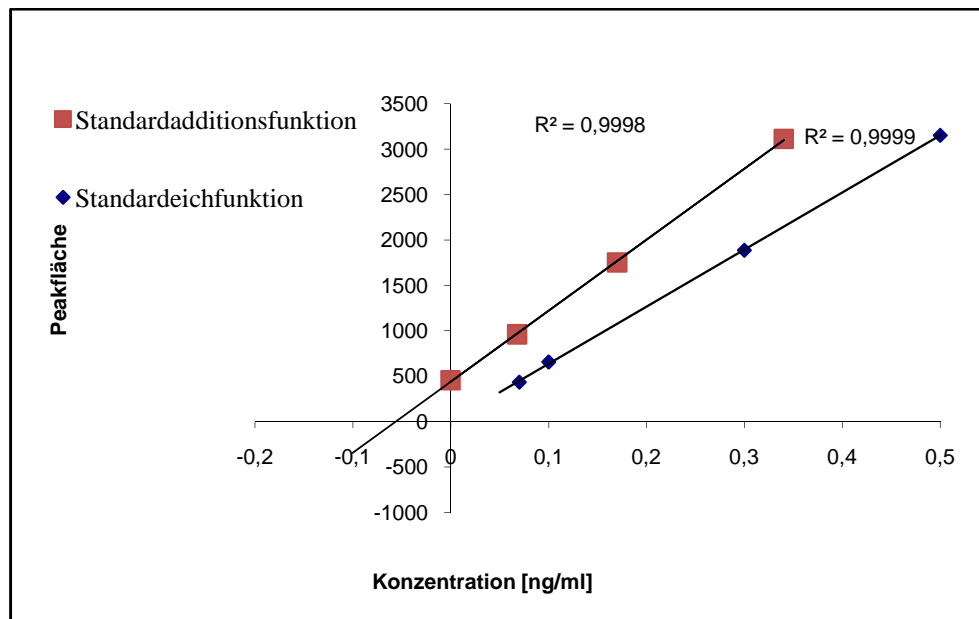
**Abbildung 66:** Eichgerade von Chlorogensäure und Standardadditionsgerade von Chlorogensäure im Holundersaftextrakt



**Abbildung 67:** Eichgerade von Rutin und Standardadditionsgerade von Rutin im Holundersaftextrakt



**Abbildung 68:** Eichgerade von Nicotiflorin und Standardadditionsgerade von Nicotiflorin im Holundersaftextrakt



**Abbildung 69:** Eichgerade von Quercetin und Standardadditionsgerade von Quercetin im Holundersaftextrakt

Die Ausführung der Standardaddition erfolgte im Doppelansatz an zwei nicht aufeinanderfolgenden Tagen. Die Einzelproben A und B bzw. C und D bilden dabei jeweils ein Paar eines Doppelansatzes. Diese Doppelansätze wurden parallel, also zeitgleich aufge-

arbeitet und am selben Tag analysiert. Die Detektorsignale für die bekannten Konzentrationen der Standardlösungen für die externen Kalibrierfunktionen wurden stets vor den Läufen der Standardadditionsproben ermittelt.

Probe:	Protocatechusäure	Chlorogensäure	Rutin	Nicotiflorin	Quercetin
<b>A</b>	77%	108%	91%	59%	103%
<b>B</b>	86%	110%	92%	57%	99%
<b>C</b>	88%	110%	95%	62%	99%
<b>D</b>	87%	111%	94%	59%	96%
$\bar{x}$	84,5%	110%	93%	59%	99%
$\sigma_x$	5,1	1,3	1,8	2,1	2,9
<b>Var (K)</b>	6,0%	1,1%	2,0%	3,5%	2,9%

**Tabelle 13:** Die prozentuelle Wiederfindung, Mittelwert  $\bar{x}$ , Standardabweichung  $\sigma_x$ , Variationskoeffizient Var (K)

Zur Beurteilung der Präzision der analytischen Methoden sind nicht nur die prozentuelle Wiederfindung der Analyte von Bedeutung, sondern auch deren Variabilität. Unabhängig von den beobachteten Wiederfindungen muss die Wiederfindung selbst eine geringe Variabilität aufweisen. Im Fall der hier untersuchten Verbindungen, lagen die Schwankungen, ausgenommen Protocatechusäure, im Bereich unter vier Prozent.

Die Wiederfindung der ersten Messung der Protocatechusäure könnte sich durch die offensichtliche Abweichung von den drei anderen Werten als Ausreißer charakterisieren lassen. Klammert man diesen Wert aus, würde sich der Variationkoeffizient auf 1,1% ändern.

## 6.7.6 Ergebnisse der quantitativen Analyse

Die ermittelten Konzentrationen der phenolischen Substanzen in der Probe sind den folgenden Tabellen aufgelistet:

Probe:	Protocatechusäure	Chlorogensäure	Rutin	Nicotiflorin	Quercetin
A	7,9	230,5	766,0	33,9	3,56
B	7,5	223,0	804,6	35,7	3,59
C	6,9	238,3	787,7	37,4	2,02
D	7,8	232,7	782,8	36,2	1,86

**Tabelle 14:** Die Konzentrationen der durch die Standardadditionsmethode quantifizierten Substanzen in mg/l Presssaft

Mittels Biegeschwinger wurde die Dichte des Holundersaftes ( $\rho=1,0506$ ) ermittelt. Damit ergeben sich die Konzentrationen in mg/kg wie folgt:

Probe:	Protocatechusäure	Chlorogensäure	Rutin	Nicotiflorin	Quercetin
A	7,5	219,4	729,1	32,3	3,4
B	7,1	212,2	765,8	34,0	3,4
C	6,6	226,8	749,8	35,6	1,9
D	7,4	221,5	745,1	34,4	1,8
$\bar{x}$	7,2	220,0	747,5	34,1	2,6
$\sigma_x$	0,3	5,2	13,1	1,2	0,8
Var (K) [%]	4,9	2,4	1,8	3,5	29,7

**Tabelle 15:** Konzentrationen in mg/kg, Mittelwert  $\bar{x}$ , Standardabweichung  $\sigma_x$ , Variationskoeffizient Var (K)

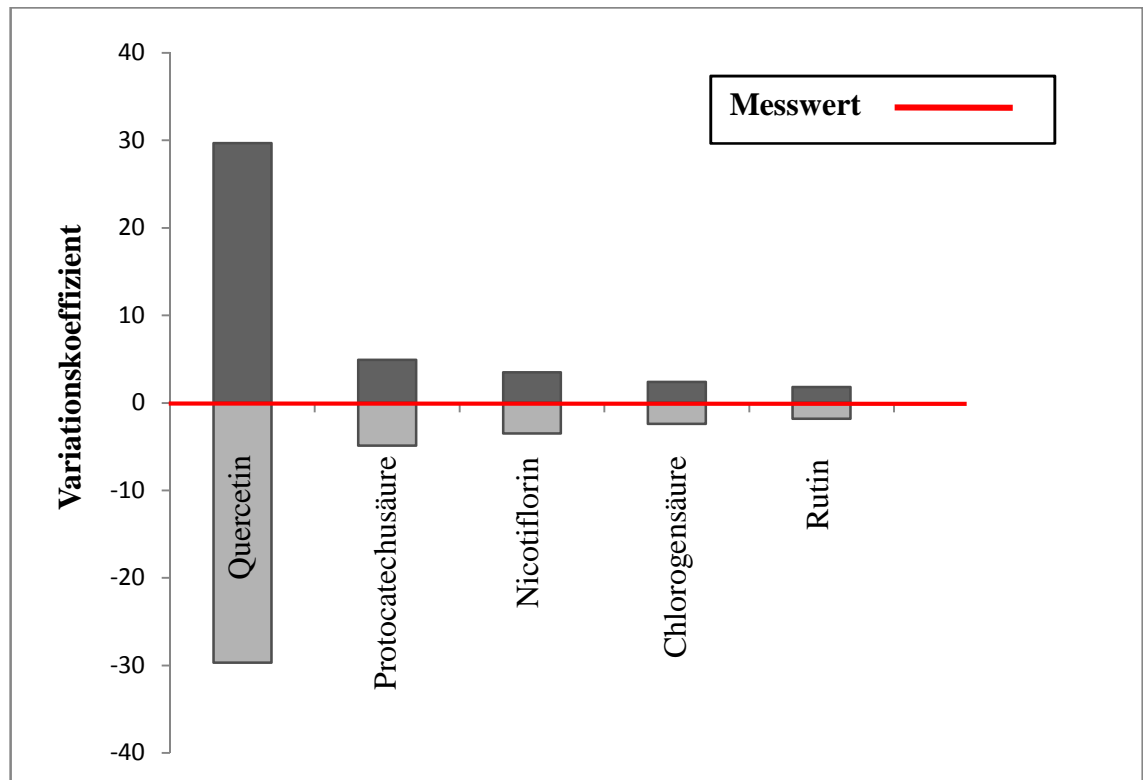
NAGL et al. (2006) ermittelten in ihrer Arbeit mit HPLC-UV im Durchschnitt Konzentrationen von 9,5 mg/kg Protocatechusäure, 292 mg/kg Chlorogensäure und 777 mg/kg Rutin in 100 Holundersaftproben. Die Ergebnisse der beiden Arbeiten liegen daher Größenordnungsmäßig in ähnlichen Bereichen.



### 6.7.6.1 Statistische Betrachtung der Methoden und Ergebnisse

Es macht durchaus Sinn, neben den Variationskoeffizienten der Wiederfindungen auch die der ermittelten Konzentrationen zu betrachten.

Der Variationskoeffizient Var (K) stellt die Standardabweichung als prozentualen Anteil des Mittelwerts dar. Je geringer die Konzentration der Analyten in der Probe war, desto mehr weicht der Meßwert vom Mittelwert ab.



**Abbildung 70:** Variationskoeffizienten der Analyte

Insbesondere das Aglykon Quercetin wies eine vergleichsweise hohe Variabilität der ermittelten Konzentrationen bei der Quantifizierung auf. Der Grund dafür liegt nicht nur in der relativ niedrigen Konzentration des Quercetins in der Probe als vielmehr an der nicht zufriedenstellenden Peakform in den Chromatogrammen. Durch das Tailing ist die einheitliche Vorgehensweise bei der manuellen Integration der Peaks problematisch. Die Variabilität des Detektorsignals beim Quercetin dürfte für die mangelnde Präzision ausschlaggebend sein auch wenn die Korrelationskoeffizienten der Kalibrierfunktionen dies vorerst nicht vermuten ließen.

Zur weiteren Überprüfung der analytischen Methoden bzw. der Messanordnung wurde die Intra- bzw. die Interday Reproduzierbarkeit jedes Analyten geprüft. Für die Intraday Reproduzierbarkeit wurde die ident aufgearbeitete Probe des Holundersaftes jeweils in fünf Serien am selben Tag und für die Interday-Variabilität an fünf aufeinanderfolgenden Tagen gemessen und die Peakhöhen bzw. Peakflächen statistisch ausgewertet. Als Intervall für die Akzeptanz der statistischen Sicherheit der Messmethoden dient der Mittelwert  $\pm$  zweifache Standardabweichung. Alle ermittelten Messwerte der Interday bzw. Intraday Variabilität lagen in diesem festgelegten Bereich.

	Protocatechusäure	Chlorogensäure	Rutin	Nicotiflorin	Quercetin
$\sigma_x$	2,7	8,9	0,1	0,7	0,02
Var (K) [%]	4,4	4,6	3,1	4,7	1,3

**Tabelle 16:** Interday Reproduzierbarkeit, Standardabweichung  $\sigma_x$ , Variationskoeffizient Var (K)

	Protocatechusäure	Chlorogensäure	Rutin	Nicotiflorin	Quercetin
$\sigma_x$	0,8	1,7	0,01	0,1	0,01
Var (K) [%]	2,3	0,9	0,5	0,6	0,6

**Tabelle 17:** Intraday Reproduzierbarkeit, Standardabweichung  $\sigma_x$ , Variationskoeffizient Var (K)

Die Interday Reproduzierbarkeit liegt bei allen Verbindungen in einem Bereich unter 5% Prozent. Aufgrund der Höhe der Werte muss eine Kalibrierung der Messanordnung täglich erfolgen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

### 6.7.6.2 Nachweisgrenzen und Erfassungsgrenzen

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurden die Chromatogramme der Nullprobe des Holundersaftextraktes herangezogen. Das Rauschen des optimalen Kanals jeder Verbindung wurde aus dem Mittelwert von fünf Messpunkten bestimmt. Die Eichgeraden wurden aus den Standardlösungen der phenolischen Substanzen erstellt, siehe **Abchnitt 6.7.4**. Dabei wurden die Peakhöhen des optimalen Kanals gegen die Konzentrationen der Lösungen aufgetragen.

Das „Limit of Detection“ entspricht der kleinsten Menge an Analyt die in der Matrix Holundersaft gerade noch detektierbar, aber nicht quantifizierbar ist. Die Bestimmung erfolgte mit einem Signal/Rauschverhältnis von 3:1.

Das „Limit of Quantification“ legt jene Untergrenze fest, an der die kleinste Menge des Analyten gerade noch quantifizierbar ist. Das Signal/Rauschverhältnis wurde mit 10:1 festgelegt.

Chlorogensäure	LOD (S/N=3) [ng/ml]	LOQ (S/N)=10 [ng/ml]	Korrelationskoeffizient Kalibrierfunktion
<b>Protocatechusäure</b>	0,04	0,26	0,99997
<b>Chlorogensäure</b>	1,89	3,65	0,99999
<b>Rutin</b>	2,43	3,82	0,99998
<b>Nicotiflorin</b>	1,62	3,59	0,99972
<b>Quercetin</b>	12,09	14,04	0,99571

**Tabelle 16.** LODs und LOQs der untersuchten Analyten im Holundersaftextrakt

## **7 Diskussion und Schlussbetrachtung**

### **7.1 Einleitung**

Die vorliegende Arbeit liefert Informationen über die im Holunderbeerensaft enthaltenen farblosen Polyphenole. Im Allgemeinen ist in der Literatur über diese Gruppe von Verbindungen, gerade im Bezug auf den schwarzen Holunder, nur wenig zu finden. Bisher gab es keine Arbeit in der die phenolischen Substanzen im Holunder mit Hilfe des coulometrischen Elektroden-Array Detektors untersucht wurden. Bei den Analysen konnten die Verbindungen Protocatechusäure, Chlorogensäure, Rutin, Nicotiflorin und Quercetin nachgewiesen und quantifiziert werden. Den Hauptanteil bei diesen Verbindungen bilden Chlorogensäure und Rutin. Es bleiben jedoch neben den identifizierten Substanzen eine große Anzahl weiterer Minorkomponenten, die nicht identifiziert werden konnten. In weiterer Folge ist auch nicht bekannt, wie sich die Substanzprofile im Holundersaft bei längerer Lagerung verändern und welche Methoden der Entsaftung die geeignetsten sind, um den ernährungsphysiologischen Nutzen bestmöglich zu erhalten bzw. zu maximieren. Bei der industriellen Verarbeitung sind Fruchtsäfte durch Pasteurisation oder Konzentrierung häufig einer thermischen Belastung ausgesetzt. Diese verändert wahrscheinlich den Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen. Bei sensorisch fehlerhaften Säften kann eine Schönung des Saftes mit Bentonit oder Gelatine erfolgen. Diese Maßnahmen könnten ebenfalls Einfluss auf den Polyphenolgehalt haben. In diesem Zusammenhang ist auch in Betracht zu ziehen, wie sich die in der Fruchtsaftherstellung immer gängiger werdende Enzymierung auf den Gehalt der antioxidativen Stoffe auswirkt.

### **7.2 Die analytischen Methoden**

Die beiden unterschiedlichen Analysenmethoden brachten Vor- und Nachteile, die in den folgenden Abschnitten gegenübergestellt werden sollen. Bei der HPLC-CEAD war durch die apparative Limitierung nur die Entwicklung einer Methode mit isokratischer Elution möglich. Dies hatte den Vorteil, dass die HPLC Läufe relativ kurz gehalten werden konnten und bei der Analyse der Flavonoide konnte das Peaktailing auf Grund

der raschen Elution verbessert werden. Der Nachteil der isokratischen Elution war, dass keine vollständigen Saftprofile erstellt werden konnten, da die Laufzeit viel zu viel Zeit in Anspruch genommen hätte, um stark retardierte Substanzen zu eluieren. Somit sind nicht alle Verbindungen, die im Holundersaft vorkommen vollständig erfasst worden. Das Finden der geeigneten mobilen Phase war immens zeitaufwendig. Langwierige Erprobungen waren nötig, um ein geeignetes Elutionssystem zu finden.

Die Gradientenelution bei der LC/MS Methode bot den Vorteil, dass die Methodenentwicklung des LC-Teils sehr rasch erfolgen konnte. Eine Optimierung war nicht in dem Maße dringlich wie bei der isokratischen Elution der CEAD-Methode, siehe auch **Abschnitt 7.2.2**. Die exotherme Mischungsreaktion von Methanol und Wasser ist bei der Verwendung dieser zwei Anteile in der mobilen Phase oft problematisch. Da die Trennung auf dem bifunktionalen Säulensystem aber mit Methanol am besten gelungen ist, 5.4.3.1 (siehe **Abschnitt 5.4.3.1**) musste dies beim Erstellen der Gradienten LC-Methode berücksichtigt werden.

### **7.2.1 Die Vor- und Nachteile der coulometrische Detektion**

Der CEAD bietet den Vorteil einer hohen Selektivität. Bei der qualitativen Analyse gelingt es damit verschiedene Verbindungen nachzuweisen, die sich durch ihre Oxidier- bzw. Reduzierbarkeit unterscheiden, wenn sie davor chromatographisch voneinander getrennt wurden. Die Differenzierung bei gleichzeitig eluierenden Verbindungen ist zu einem gewissen Maß dann möglich, wenn diese sich in ihrem elektrochemischen Verhalten so sehr unterscheiden, dass sie einander in einzelnen Kanälen nicht gegenseitig stören (Vergleich **Abschnitt 3.2.2**). Bei gleichzeitiger Elution von Verbindungen, die sehr ähnliches elektrochemisches Verhalten zeigen, ist es kaum möglich diese Coelution zu bemerken. Daher ist die Maximierung der Auflösung bei der Entwicklung einer HPLC-Methode unbedingte Voraussetzung.

Ein weiterer Vorteil sind die niedrigen Nachweisgrenzen, die hohe Linearität und Korrelation der Kalibrierfunktionen. Grundsätzlich kann bei Betrachtung der quantitativen Analysen und der statistischen Auswertung (siehe **Abschnitt 6.7**) der Schluss gezogen

werden, dass die verwendeten HPLC-CEAD Methoden exakte und reproduzierbare Ergebnisse bei den Analysen der Phenolsäuren und der Flavonoidglykoside liefern.

Bei den Nachteilen sind die Schwierigkeiten bei der Analyse der Flavonoidaglykone zu nennen. Das Peaktailing war trotz des Einsatzes unterschiedlicher Säulen und mobiler Phasen kaum zu verhindern. Damit wurde die Trennung erschwert und die manuelle Integration der Peaks war diffiziler zu bewerkstelligen. Eine Verbesserung konnte auf jeden Fall durch den Einsatz der Säule mit dem bifunktionalen RP-Phasensystems (Vergleich **Abschnitt 5.4.3.1**) erzielt werden, wobei die Trennleistung der Säule etwas zu gering war. Eine Erhöhung der Bodenzahl durch Verlängerung der Säule hätte vielleicht nicht nur eine bessere Trennleistung bedeutet sondern auch die Möglichkeit geboten, höhere Anteile an organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase zu verwenden. Ein hoher Anteil an Methanol in der mobilen Phase brachte stets eine verbesserte Peakform bei der Elution der Flavonoidaglykone jedoch bei verschlechterter Trennleistung.

Bei der Verlängerung der Säule könnte jedoch die Gefahr bestehen, dass die Effekte des hohen Anteils an organischer Phase in diesem Zusammenhang durch erhöhte Eddy-Diffusionseffekte wieder neutralisiert werden. Da die Verwendung von Pufferlösungen bei der coulometrischen Detektion notwendig ist, um die Reproduzierbarkeit der Voltammogramme und der Messungen zu gewährleisten, kann der organische Anteil der mobilen Phase auch nicht beliebig hoch gewählt werden, da die anorganischen Bestandteile des Puffers einen gewissen Anteil Wasser in der mobilen Phase benötigen, um nicht als Niederschlag auszufallen.

Ein Säulendurchmesser, der hohe Flussraten  $>0.4$  ml/min zulässt, ist ebenfalls ein Kriterium für die Qualität der Peakform. Zu geringe Flussraten führten vermutlich oftmals zu einer Verschleppung der Analyten auf der Elektrodenoberfläche des CEAD und daher zu Peakverbreiterung.

Als Vorteil des CEAD sei auch erwähnt, dass der geübte Anwender Informationen über die Struktur von Analyten erhalten wird, die dem Anfänger oft verborgen bleiben. Die Interpretation der Voltammogramme bei unbekanntem Verbindungen gestaltet sich als äußerst schwierig.

### **7.2.2 Der Vorteil der LC/UV-ESI/MS Kopplung**

Ein Vorteil des Massenspektrometers als Detektor ist die hohe Spezifität, da die Masse eines Analyten genau bestimmbar ist. Im Gegensatz zur HPLC-CEAD und anderen Routine HPLC-Anwendungen muss die exakte Konstanz bei den Retentionszeiten nicht per se angestrebt werden. Bei Routine HPLC-Anwendungen sind die konstanten Retentionszeiten für eine eindeutige Peakzuordnung Voraussetzung. Bei LC/MS erfolgt die Zuordnung über die Massen der Ionen der Analyte. Daher ist auch die Maximierung der Auflösung bei der Entwicklung einer LC-Methode nicht unbedingt nötig. Das Erreichen vollständiger Trennung ist bei herkömmlichen HPLC-Anwendungen oft schwierig und zeitaufwendig.

Im Gegensatz zur Verwendung einfacherer Detektoren liefert, bei Fragmentierung von ausgewählten Massen, das Quadrupol-Ionenfalle-Massenspektrometer Information zur Strukturaufklärung bzw. kann der Vergleich der Fragmentierungsmuster von Standardverbindungen und Substanz in der Probe als zusätzliche Identifikationshilfe genutzt werden. Die Erstellung von Datenbanken zum Vergleich der Massenspektren ist eine große Herausforderung für die Zukunft.

# Anhang A: Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Sambunigrin

Abbildung 2: 2-Phenylchroman

Abbildung 3: Verbindungsklassen der Flavonoide

Abbildung 4: Strukturformel des Quercitrins

Abbildung 5: Strukturen der Phenolsäuren

Abbildung 6: Strukturformel der Chlorogensäure

Abbildung 7: Biosynthese der Shikimisäure

Abbildung 8: Der Phenylpropan-Stoffwechsel der Pflanzen

Abbildung 9: Schematische Strom-Spannungskurve

Abbildung 10: Messung der Peakfläche

Abbildung 11: Peakförmige Strom-Spannungskurve

Abbildung 12: Chromatogramme des Quercitrins

Abbildung 13: Die Chromatogramme des Kämpferolrutosids

Abbildung 14: Voltammogramm des Kämpferolrutosids

Abbildung 15: Schematischer Querschnitt einer coulometrische Detektorzelle

Abbildung 16: Schema Elektrospray-Ionisation und Ionenfalle

Abbildung 17: Schema der Festphasenextraktion

Abbildung 18: HPLC-Schema

Abbildung 19: RP-Phasensystems

Abbildung 20: Mobile Phase, polar

Abbildung 21: Mobile Phase, apolar

Abbildung 22: Schema methanolischer Extrakt

Abbildung 23: Schema Analysenlösung der apolaren Fraktion

Abbildung 24: Chromatogramme Phenolsäurestandards

Abbildung 25: Chromatogramme methanolischer Extrakt

Abbildung 26: Chromatogramme Flavonoidstandards

Abbildung 27: Chromatogramme Holundersaft, apolare Fraktion

Abbildung 28: Voltammogramme Protocatechusäure

Abbildung 29: Voltammogramme Chlorogensäure

Abbildung 30: Voltammogramme Rutin



Abbildung 31: Voltammogramme Kämpferolrutosid

Abbildung 32: Voltammogramme Quercetin

Abbildung 33: Strukturformeln der identifizierten Substanzen

Abbildung 34: Voltammogramm Kaffeesäure

Abbildung 35: Voltammogramm der Gallussäure, Strukturformel

Abbildung 36: Voltammogramm der Gentisinsäure, Strukturformel

Abbildung 37: Voltammogramm der p-Hydroxybenzoesäure, Strukturformel

Abbildung 38: Voltammogramm der 4-Hydroxyphenyl-essigsäure, Strukturformel

Abbildung 39: Voltammogramm der Kaffeesäure, Strukturformel

Abbildung 40: Voltammogramm der Syringasäure, Strukturformel

Abbildung 41: Voltammogramm der Salicylsäure, Strukturformel

Abbildung 42: Voltammogramm des Kämpferols, Strukturformel

Abbildung 43: Voltammogramm des Isorhamnetins, Strukturformel

Abbildung 44: Chromatogramm, zweiter Kanals des methanolischen Extraktes

Abbildung 45: Chromatogramme, zweiter, achter, neunten Kanals des methanolischen Extraktes

Abbildung 46: Voltammogramme von Substanzpeaks, polare Fraktion

Abbildung 47: Chromatogramm des Holundersaftes Kanal 2, Kanal 4, Kanal 9

Abbildung 48: Chromatogramm des Holundersaftes Kanal 2, Kanal 3, Kanal6, Kanal 9

Abbildung 49: Chromatogramm des Holundersaftes, Kanal 2

Abbildung 50: Voltammogramme, apolaren Fraktion

Abbildung 51: Parameter der MS-Methode, polare Fraktion

Abbildung 52: UV-Chromatogramme, methanolischer Holunderextrakt, Standardchromatogramm

Abbildung 53: Massenspektrum, Standardchromatogramm Kaffesäure, Chlorogensäure

Abbildung 54: Massenspektrum, Chlorogensäurepeak, methanolischer Holunderextrakt

Abbildung 55: Massenspektrum mit dem Pseudomolekülion der Kaffesäure

Abbildung 56: EIC Spektren, Protocatechusäure und Chlorogensäure

Abbildung 57: UV-Chromatogramme, Holundersaft, Standardchromatogramm apolare Fraktion

Abbildung 58: EIC Spektren des Rutins

Abbildung 59: EIC Spektren Astragalin, Quercitrin

- Abbildung 60: EIC Spektrum des Nicotiflorins
- Abbildung 61: Massenspektrum des Nicotiflorins, Quercitrins und Astragalins
- Abbildung 62: EIC-Spektren Quercetin, Hesperitin
- Abbildung 63: Externe Kalibrierfunktion der Protocatechusäure, nicht linear
- Abbildung 64: Externe Kalibrierfunktion der Protocatechusäure, linear
- Abbildung 65: Wiederfindung der Protocatechusäure
- Abbildung 66: Wiederfindung der Chlorogensäure
- Abbildung 67: Wiederfindung des Rutins
- Abbildung 68: Wiederfindung des Nicotiflorins
- Abbildung 69: Wiederfindung des Quercetins
- Abbildung 70: Variationskoeffizienten der Analyte

## Anhang B: Abkürzungen

---

ASE	accelerated solvent extraction
bidest.	bidestilliert
BMLFUW	Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CEAD	coulometric electrode array detection
DAD	Diodenarray-Detektor
EIC	extracted ion chromatogram
ESI	electrospray ionisation
HPLC	high pressure liquid chromatography
HSCCC	High-Speed-Counter-Current-Chromatography
LC	liquid chromatography
MS	Massenspektroskopie
NMR	nuclear magnetic resonance
OPC	oligomeric proanthocyanidins
PDA	Photodiodenarray-Detektor
RP	reversed phase
rpm	rounds per minute
SPE	solid phase extraction
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

# Anhang C: Tabellenverzeichnis

---

- Tabelle 1: Wirkung der sekundären Pflanzenstoffe
- Tabelle 2: Zusammensetzung und Energiewert vom schwarzen Holunder
- Tabelle 3: Chemikalien
- Tabelle 4: Standards der Phenolsäuren
- Tabelle 5: Standards der Flavonoide und Flavonoidglykoside
- Tabelle 6: Kapazitätsfaktoren
- Tabelle 7: Parameter Gradientenelution, Phenolsäuren
- Tabelle 8: Standardsubstanzen der polaren Fraktion
- Tabelle 9: Parameter Gradientenelution, Flavonoide
- Tabelle 10: Standardsubstanzen der apolaren Fraktion
- Tabelle 11: Konzentrationen, Standardaddition
- Tabelle 12: Konzentrationen der Eichlösungen
- Tabelle 13: Prozentuellen Wiederfindung und Variationskoeffizienten
- Tabelle 14: Konzentrationen quantifizierten Substanzen in mg/l Presssaft
- Tabelle 15: Konzentrationen quantifizierten Substanzen in mg/kg Presssaft
- Tabelle 16: LODs und LOQs

## Anhang D: Literaturverzeichnis

---

- Ackworth, I. N., Naoi, M. und Parvez, S. 2001.** *Coulometric Electrode Array Detectors for HPLC*. 6. Auflage. Tokyo : VSP International Science Publishers, 2001. S. 6-8.
- Asen, S., Steward, R.N. und Norris, K.H. 1972.** Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*. 1972, 11, S. 1139-1144.
- Baltisberger, M. 2002.** *Systematische Botanik. Einheimische Farn- und Samenpflanzen*. 2. Auflage. s.l. : vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, 2002. S. 140.
- Bäumler, S. 2006.** *Heilpflanzenpraxis heute: Porträts, Rezepturen, Anwendung*. 1. Auflage. München : Urban & Fischer bei Elsevier, 2006. S. 204-205.
- Belitz, H. D., Grosch, W. und Schieberle, P. 2007.** *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6. Auflage. Berlin : Springer, 2007. S. 850.
- BMLFUW. 2007.** *Grüner Bericht*. s.l. : Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, 2007. S. 33-34.
- Böhm, H. 2000.** Das Französische Paradoxon - Gesundheit durch Phenole des Weins? Teil 1. *Ernährungs-Umschau*. 2000, 47, S. 44-49.
- Brønnum-Hansen, K. und Hansen, H. 1983.** High-performance liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Sambucus nigra* L. *Journal of Chromatography A*. 1983, 262,C, S. 385-392 .
- Bühring, U. 2004.** *Praxis-Lehrbuch der modernen Heilpflanzenkunde: Grundlagen - Anwendung - Therapie*. 1. Auflage. Stuttgart : Sonntag-Verlag, 2004, S. 199.
- Croes, K., Steffens, A., Marchand, D.H. und Snyder, L.R. 2005.** Relevance of  $\pi$ - $\pi$  and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1098, S. 123-130.
- Elmadfa, I. und Leitzmann, C. 1998.** *Ernährung des Menschen*. 3. Auflage. Stuttgart : Verlag Eugen Ulmer, 1998. S. 408-411.
- Elmadfa, I., Muskat, E. und Fritzsche, D. 2003.** *Die große GU Nährwert und Kalorien Tabelle*. 2003. S. 16-17.

- Euerby, M. R., Petersson, P., Campbell, W. und Roe, W. 2007.** Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1154, S. 138–151.
- Habermehl, G., Hammann, P. E. und Krebs, H. C. 2002.** *Naturstoffchemie*. Berlin : Springer, 2002. S. 435-456.
- Hager, H., Hänsel, R., Keller, K. und Rimpler, H. 1994.** *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*. 5. Auflage. Berlin : Springer, 1994. S. 574-586.
- Henze, G. 2001.** *Polarographie und Voltammetrie*. 1. Auflage. Berlin : Springer, 2001. S. 73-74.
- Hermann, K. 1976.** Flavonols and flavones in food plants: a review. *Journal of Food Technology*. 1976, 11, S. 433-438.
- Hermann, K. 1988.** On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1988, 186, S. 1-5.
- Hermann, K. 1992.** Über die Gehalte der hauptsächlichen Pflanzenphenole im Obst. *Flüssiges Obst*. 1992, 59, S. 66-70.
- Hillebrand, S. 2004.** *Analytik von Polyphenolen in Buntsäften im Hinblick auf Saftqualität, Farbe und antioxidative Kapazität*. Braunschweig : Cuvillier Verlag, Göttingen, 2004. S. 80-83. Dissertation, an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Jensen, S. R. und Nielsen, B. J. 1973.** Cyanogenic glucosides in *Sambucus nigra* L. *Acta Chemica Scandinavica*. 1973, 27, S. 2661-2662.
- Kaack, K., Christensen, L. P., Hughes, M. und Eder, R. 2005.** The relationship between sensory quality and volatile compounds. *European Food Research and Technology*. 2005, 221, S. 244-254.
- Karlson, K., Doenecke, D., Koolmann, S., Fuchs, G. und Gerok, W. 2005.** Besonderheiten der Biochemie der Pflanzen. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Auflage. Stuttgart : Thieme, 2005, S. 421-451.
- Karlson, P., Doenecke, D. und Koolman, J. 1994.** *Biochemie, Kurzes Lehrbuch der Biochemie*. 14. Auflage. Stuttgart : Thieme Verlag, 1994. S. 196-198.

- Kaul, R. 1996.** Pflanzliche Procyanidine, Vorkommen, Klassifikation und pharmakologische Wirkung. *Pharmazie in unserer Zeit*. 1996, 25, S. 175-185.
- Lee, J. und Chad, F. E. 2007.** Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*Sambucus nigra*) cultivars. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 2007, 87, S. 2665-2675.
- Löffler, G. und Petrides, P. E. 1998.** *Biochemie und Pathobiochemie*. Regensburg : Springer-Verlag, 1998. S. 543-544.
- Meyer, V.R. 2004.** *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*. 9. Auflage. Weinheim : Wiley-VCH, 2004. S. 15-49.
- Nagl, M., Eder, R., Wendlin, S., Sontag, G. und Reich, G. 2006.** Qualitative analysis of phenolic constituents in elderberry juices. *Ernährung/Nutrition*. 2006, Bd. 30, S. 409-415.
- Nagl, M. 2002.** *Analyse phenolischer Inhaltsstoffe in Beeren von Holunder (Sambucus nigra)*. 2002. Dissertation, an der Fakultät für Naturwissenschaften und Mathematik der Universität Wien.
- Rieger, G., Müller, M., Guttenberger, H. und Bucar, F. 2008.** Influence of Altitudinal Variation on the Content of Phenolic Compounds in Wild Populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56, S. 9080–9086.
- Schwendt, G. 2007.** *Chemie für alle Jahreszeiten*. 1. Auflage. Weinheim : Wiley-VCh, 2007. S. 139-141.
- Sigma-Aldrich publications. 1998.** Guide to Solid Phase Extraction. 1998, Bulletin 910, S. 1-12.
- Täufel, A., Ternes, W., Tunger, C. und Zobel, M. 2005.** *Lebensmittellexikon*. 4. Auflage. Hamburg : Behr Verlag, 2005. S. 802-803.
- Watanabe, T., Yamamoto, A., Nagai, S. und Terabe, S. 1998.** Analysis of Elderberry Pigments in the Commercial Food Samples by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Analytical Sciences*. 1998, 14, S. 839-844.
- Watzl, B. und Leitzmann, C. 2005.** *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. 3. Auflage. Stuttgart : Hippokrates, 2005. S. 49-68.
- Watzl, B. und Rechenkemmer, G. 2001.** Flavonoide. *Ernährungsumschau*. 2001, 48, S. 498-502.

**Watzl, B. und Rechenkemmer, G. 2001.** Phenolsäuren. *Ernährungsumschau*. 2001, 48, S. 413-416.

**Wilska-Jeszka, J. 1996.** Proanthocyanidins: Content in fruits and influence on health. *Food Chemistry*. 1996, 57, S. 57-59.

**Wu, X., Gu, L., Prior, R. L. und McKay, S. 2004.** Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, S. 7846–7856.



# Anhang E: Curriculum Vitae

---

**Norbert Neger**, geboren am 4. November 1975 in St. Pölten

## **Ausbildung**

1994 Matura, Informatikzweig BORG Krems

1999 Staatlich geprüfter Lehrwart für Gewichtheben

1996 - 2008 Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien

## **Berufserfahrung**

1994 -2004 Wachauer Getränke GmbH Mautern a. d. Donau

## **Ferienjob**

- Mitarbeit in der Produktion und Lieferservice  
Juli, August und September

1998 - 1999 Squash Insel Süd Wien

## **Fitnesstrainer**

- Erstellen von Ernährungs- und Trainingsplänen,  
Teilzeit

1997 - 2003 Japanese External Trade Organization Wien

## **Part-Timer**

- Büroarbeiten bei der japanischen Außenhandelsstelle

2000 – 2004 BAFL Wien

## **Vortragender**

- Referent über Ernährung im Kraftsport bei Trainer-  
Lehrwarte- und Übungsleiterausbildung des Österrei-  
chischen Gewichtheberverbandes in der Bundeslehr-  
anstalt für Leibeserziehung

- |          |   |                     |
|----------|---|---------------------|
| 2004     | Akras Flavours AG   | Biedermannsdorf     |
|          | <b>Ferialpraktikum, Labor</b>   |                     |
|          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualitätskontrolle von Aromen, Getränkegrundstoffen und eingehender Rohstoffe, Juli und August</li> </ul>                  |                     |
| 2005     | Akras Flavours AG   | Biedermannsdorf     |
|          | <b>Ferialpraktikum, Labor</b>   |                     |
|          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Musterabteilung, Herstellung von Trinkproben, Aromen, Getränkegrundstoffen und Gewürzmischungen, März und April</li> </ul> |                     |
| 2005-lfd | Radlberger Getränke GmbH & Co.  | Unterradlberg       |
|          | <b>Laborant, Produktion</b>   |                     |
|          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualitätssicherung der laufenden Getränkeproduktion und Wareneingangskontrolle, Teilzeit, Schichtarbeit</li> </ul>         |                     |
| 2007-lfd | Wachauer Getränke GmbH  | Mautern a. d. Donau |
|          | <b>HACCP Beauftragter</b>   |                     |
|          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Betreuung, Überwachung und Verifizierung des HACCP Konzepts, extern</li> </ul>   |                     |
| 2007     | Universität Wien  | Wien                |
|          | <b>Tutor</b>  |                     |
|          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lebensmittelchemischen Praktikum für Chemiker, Dezember</li> </ul>   |                     |
| 2008     | Universität Wien  | Wien                |
|          | <b>Tutor</b>  |                     |
|          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lebensmittelchemischen Praktikum für Ernährungswissenschaftler<br/>Mai, Dezember</li> </ul>                                |                     |