

3. Methoden

Eine detaillierte Betrachtung und Bewertung der Einflüsse der Verarbeitungstechnik auf antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe bei der Fruchtsaftherstellung erfordert gut reproduzierbare und leistungsfähige Analysenmethoden zur Untersuchung der Proben. Für die Stufenkontrollen sind eine schnelle und einfache Aufarbeitung und Messung der Proben notwendig, um Veränderungen der Proben durch Lagerung und lange Wartezeiten zu vermeiden.

3.1. Polyphenolanalytik

3.1.1. Polyphenolmuster und -gehalte mittels HPLC

Die qualitative und quantitative Bestimmung der in Proben enthaltenen Polyphenole kann wichtige Ergebnisse über Sortenunterschiede und die Art und Weise der Einflussnahme der angewendeten Verarbeitungstechnik liefern.

Für die Polyphenolanalytik in den anfallenden Proben lag keine Methode vor, die diese Bedingungen ausreichend erfüllt, so dass eine neue Methode für die notwendige Analyse der einzelnen Polyphenole in Säften entwickelt wurde. Ziel sollte eine einfache Probenvorbereitung, eine gute Trennung der Substanzen, eine gleichzeitige Bestimmung von farblosen Polyphenolen und Anthocyanen, eine kurze Analysendauer sowie eine hohe Empfindlichkeit sein. Viele in der Literatur beschriebenen Methoden erfüllen diese Zielsetzung nicht ausreichend. Daher wurde bei der Entwicklung zur Verbesserung der Polyphenolanalytik mittels HPLC eine neue fluorierte RP-Phase und zusätzlich zur üblichen UV/Vis-Detektion eine elektrochemische Detektion verwendet.

Geräte:

HPLC-System	: Hewlett Packard HP 1090 Series II HPLC System
Detektor 1	: DAD Hewlett Packard HP 1090 Series II HPLC System
Wellenlängen	: Kanäle frei wählbar von 190-600 nm Polyphenole allgemein 280 nm Hydroxyzimtsäurederivate 320 nm Flavonole 360 nm Anthocyane 525 nm
Detektor 2	: Trace TED 4020
Elektrode	: silanisierte Platinelektrode
DC-Amperometrie	: 500 mV, Messbereich: 200 nA, Offset: 20 nA
PAD	: 0.00 - 0.39 min 500 mV (Delay-Phase) 0.40 - 0.70 min 500 mV (Integrationsphase) 0.71 - 0.79 min 900 mV (Oxidation) 0.80 - 0.85 min -100 mV (Reduktion) Messbereich: 2000 nC, Offset: 0,
Säule	: Fluofix 120 E; 250 - 4,6; 5 µm, NEOS Company Ltd., Kobe, Japan

Chemikalien:

Acetonitril gradient grade; o-Phosphorsäure 85%; doppelt entmineral. Wasser
Polyphenol Standards von Roth ; Extrasynthese, Genay, Frankreich; Aldrich; Fluka; Sigma Chemicals Co., Steinheim

Fließmittel:

- A. Doppelt entmineral. Wasser / 85%ige o-Phosphorsäure (99,5 / 0,5 v/v)
- B. Acetonitril / doppelt entmineral. Wasser / 85%ige o-Phosphorsäure (50 / 49,5 / 0,5 v/v/v)
- C. Acetonitril / doppelt entmineral. Wasser (50 / 50 v/v)

Die Fließmittel müssen vor ihrer Verwendung membranfiltriert (0,45 µm) und entgast werden. Fließmittel C dient zum Spülen der Säule.

Die Mischungsverhältnisse sind additiv, d. h. 1 Liter Fließmittel A setzt sich aus 995 mL doppelt entmineral. Wasser und 5 mL 85%iger o-Phosphorsäure zusammen. Die Fließmittel sollten nicht länger als 5 Tage aufbewahrt werden. Wird das Gerät länger nicht benutzt, sind die Fließmittelbehälter sowie der Abfallbehälter zu entfernen und die Ansaugfritten zu reinigen.

Der Fließmittel-Abfall wird in einer Plastikwanne als Schutzunterlage zur Entsorgung mit NaOH-Plätzchen auf ca. pH>9 gebracht und mit ca. 25ml Perhydrol (Wasserstoffperoxid 30%ig) versetzt. Dabei den Deckel der Flasche nicht zuschrauben. Am nächsten Tag kann der Abfall bei fließendem Wasser in den Abguss entsorgt werden.

Chromatographie-Bedingungen:

Säulentemperatur : 25°C
Fluss : 1mL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	A	B
0.0	100%	0%
5.0	100%	0%
45.0	75%	25%
65.0	0%	100%
70.0	0%	100%
70.1	100%	0%
89.9	100%	0%

Standardabweichung und Nachweisgrenzen:

Die Bestimmung der Standardabweichung erfolgte durch fünfmaliges Injizieren von 10 µL einer Standardlösung einzelner Polyphenole. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden durch eine Verdünnungsreihe der Standardlösungen bei einem Injektionsvolumen von 10 µL bestimmt. Als Nachweisgrenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 2:1 angenommen, als Bestimmungsgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 5:1.

Standardabweichung der Bestimmung (n = 5): ± 2%

Tabelle 19: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen einiger Polyphenole bei einem Injektionsvolumen von 10 µL

	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
Flavan-3-ole (280 nm)	1 mg/L	2 mg/L
Chlorogensäure (320 nm)	0,5 mg/L	1 mg/L
Phloridzin (280 nm)	0,2 mg/L	0,5 mg/L
Cyanidin-3-rutinosid (525 nm)	1 mg/L	2 mg/L

Identifizierung und Quantifizierung:

Zur Identifizierung von Chromatogrammpeaks wurden Standardsubstanzen verwendet. Durch Vergleich der Retentionszeit, Addieren von Standardsubstanz zur Probe und dem Vergleich der UV/Vis-Spektren mittels Dioden-Array-Detektion (DAD) bzw. der Reaktion bei der elektrochemischen Detektion wurde die Identifikation eines Chromatogrammpeaks verifiziert. Waren keine Standardsubstanzen erhältlich, wurde eine tendenzielle Identifikation anhand von Retentionszeit, UV/Vis-Spektrum sowie Verhalten bei der elektrochemischen Detektion basierend auf Angaben in der Literatur vorgenommen.

Die Quantifizierung erfolgt ebenfalls über Standardsubstanzen. Bei tendenziell identifizierten Chromatogrammpeaks wurde die Quantifizierung relativ zu einer chemisch und strukturell möglichst nahe verwandten Standardsubstanzen durchgeführt.

Probenvorbereitung:

Allgemein:

Flüssige Proben (trüb und klar) werden membranfiltriert (0,45 µm) und anschließend direkt injiziert. Das Injektionsvolumen beträgt je nach Polyphenolgehalt 5-25 µL.

Erdbeeren:

Die kleingeschnittenen Erdbeeren werden nach Zugabe von Fructozym BE (Erbslöh, Geisenheim, Germany) mit einem Stabmixer homogenisiert, 1 Stunde stehen gelassen und anschließend bei 4500 U/min zentrifugiert. Der membranfiltrierte Überstand wird zur HPLC-Analyse verwendet.

Maische siehe 3.1.4.

3.1.2. Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu**Chemikalien**

- Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (Merck, Darmstadt)
- Natriumcarbonatlösung, gesättigt bei Raumtemperatur
- (+)-Catechin

Probenvorbereitung

Proben mit einem hohen Gesamtphenolgehalt (> 1g/L) werden verdünnt. Störende L-Ascorbinsäure, natürlich oder zugesetzt, wird vor der Bestimmung enzymatisch durch Eintauchen von L-Ascorbat Oxidase-Spateln in 1 mL Probe oder durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (10 µL auf 5 mL Probe) beseitigt.

Messung

(modifizierte Vorschrift nach RITTER 1994 basierend auf SINGLETON und ROSSI 1965)

- 8,4 mL entmineralisiertes Wasser
(bei Reagenzienblindwert 8,5 mL entmineral. Wasser)
- + 0,1 mL Probe
- + 0,5 mL Folin-Ciocalteu-Reagenz
mischen und 3 – 6 Minuten stehen lassen
- + 1,0 mL gesättigte Natriumcarbonatlösung
nach 60 Minuten die Extinktion bei 720 nm in 1 cm Einmalküvetten gegen den Reagenzienblindwert messen

Berechnung

Die Berechnung erfolgte anhand einer Eichgerade der Bezugssubstanz (+)-Catechin, die zwischen 40 und 1000 mg Catechin/L linear ist ($r^2 > 0,998$). Die Ergebnisse werden in mg Catechin/L angegeben.

Reproduzierbarkeit

Nach RITTER 1994 beträgt die Standardabweichung des Mittelwertes der Bestimmung $\pm 2,2\%$. Sie wurde durch zehnmahlige Bestimmung eines Apfelsaftes ermittelt.

3.1.3. Farbmessungen**Chemikalien**

0,1 n HCl

Messungen

Klarer Apfelsaft:

Zur Bestimmung der Bräunung wird die Extinktion bei 420 nm der Proben in 1 cm Glasküvetten gegen entmineral. Wasser gemessen.

Schwarzer Johannisbeersaft und andere stark gefärbten Säfte:

Zur Bestimmung der Farbintensität werden die Proben mit 0,1 n HCl 1:100 verdünnt ($\text{pH} < 1$) und die Extinktion bei 520 nm in 1 cm Glasküvetten gegen entmineral. Wasser gemessen. Die Messung erfolgte in dieser Variante wegen der einfacher Handhabung der 1 cm Küvetten gegenüber den üblichen 1 mm Küvetten. Die aufgrund der Farbintensität der Proben nötige Verdünnung wurde mit 0,1 n HCl vorgenommen, um einen Fehler durch einen verdünnungsbedingten pH-Wert-Anstieg zu vermeiden. Die pH-Wert-Erhöhung würde das Gleichgewicht der Anthocyane (siehe 2.1.1.) verschieben, was die Farbintensität um mehr als den Verdünnungsfaktor reduzieren würde, während bei einem pH-Wert < 1 die Anthocyane in der Lösung vollständig als Flavyliumkationen vorliegen.

Die Resultate werden als E 420 nm/cm bzw. E 520/cm oder E 520/mm ($\text{pH} < 1$) angegeben.

3.1.4. Extraktionsmethode für Maischeproben**Screening-Variante :**

Zweck der Screening-Variante war eine schnelle Extraktion und vor allem eine sofortige Unterbindung jeglicher Enzymtätigkeit in der Maische. Ziel dieser Extraktionsmethode war es, grobe Veränderungen in der Maische selbst durch Prozesse, z.B. Oxidation der Polyphenole und damit verbundene Verluste an Polyphenolen, schnell feststellen und analysieren zu können. Diese Variante stellt keine vollständige Extraktion der Polyphenole aus der Maische dar, so dass die Analysendaten der erhaltenen Extrakte nur aufgrund der gleichen Vorgehensweise miteinander vergleichbar sind.

Die Maische wird mittels eines Stabmixers homogenisiert. Von der homogenisierten Maische werden etwa 100g in einem 400 mL Becherglas abgewogen und das selbe Gewicht wie die Maische einwaage an 0,1 n HCl in Ethanol hinzugefügt (Gewichtsverhältnis Maische:Extraktionsmittel = 1:1). Das salzsaure Ethanol dient zur Extraktion der Polyphenole und zur Inhibierung der Enzymaktivität in der Maische. Das Maische-Extraktionsmittel-Gemisch wird 45 min auf dem Magnetrührer gerührt und anschließend durch ein normalen Laborpapierfilter (185 mm Durchmesser) filtriert. Die Maische wird am Ende der Filtration manuell noch mal im Filtertrichter ausgedrückt. Das Filtrat wird für die Bestimmungen verwendet.

Komplett-Extraktions-Variante:

Mit der Komplettextraktion sollen die gesamten Polyphenole aus der Maische extrahiert werden. Ziel ist der Vergleich der Polyphenolgehalte und Gehalte an antioxidativ wirksamen Substanzen eines aus der Maische im technischen Maßstab hergestellten frischen Presssaftes mit den maximal möglichen Gehalten, die im Extrakt enthalten sind. Daraus kann eine Bilanz über die Verteilung der ursprünglich in der Maische enthaltenen Polyphenole oder Antioxidantien, die durch die Extraktionsprozedur vollständig extrahiert werden sollen, in Saft und Trester nach dem Entsaftungsvorgang erstellt werden. Dazu wird der absolute Gehalt an Polyphenolen mittels Folin-Ciocalteu und antioxidativer Kapazität von Extrakt und Presssaft aus 100 g Maische bestimmt. Die Saftausbeute und das Volumen an Extrakt werden zur Berechnung verwendet.

Der Vergleich der absoluten Gehalte von Presssaft und Extrakt ergibt die prozentuale Bilanz des Übertrags an Polyphenolen und antioxidativer Kapazität in den Presssaft beim angewendeten Entsaftungssystem.

Apfel

Frisch gemahlene Apfelmaische (Rätzmühle) wird nach Konservierung und Oxidationsschutz mit SO_2 mit einem Stabmixer homogenisiert und sieben mal mit salzsaurem Ethanol zum Erreichen einer vollständigen Extraktion (farblose Maische) extrahiert. Das Extraktionsmittel wird durch Zentrifugation bei 4500 U/Min von den festen Bestandteilen der Maische abgetrennt, dekantiert und anschließend der Vorgang wiederholt. Die extrahierte Maischeprobe wird nach der letzten Extraktion durch einen normalen Laborpapierfilter (185 mm Durchmesser) filtriert und am Ende nochmals manuell ausgepresst. Die vereinigten Extrakte werden gewogen (Extraktionsausbeute) und nach Bestimmung der Dichte $d_{20/20}$ zur Analyse verwendet.

Der Rest der Maische wurde mit einem Dekanter (Flottweg Dekanter, Vilsbiburg; Drehzahl: 5300 U/Min, Differenzdrehzahl: 3 U/Min) entsaftet.

Schwarze Johannisbeeren

Frisch gequetschte schwarze Johannisbeermaische (Walzenmühle) wird wie oben beschrieben ohne die Zugabe von SO_2 extrahiert.

Der Rest der erwärmten Maische wurde nach einstündiger Enzymierung mit Fructozym MB (Erbslöh Geisenheim, Geisenheim) in einer Horizontalpresse (Bucher HPL 200) entsaftet.

Von den Extrakten und dem frischen Presssäften wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und die Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

3.2. Präparative Isolierung einzelner Polyphenole aus Fruchtsäften

Für eine reproduzierbare Polyphenolanalytik der anfallenden Proben mittels HPLC erwies sich das Fehlen von Standardsubstanzen zur Quantifizierung und Identifizierung der enthaltenen Polyphenole als Problem für die genaue Beurteilung der Veränderungen der Polyphenole bei den vorgenommenen Stufenkontrollen. So sind beispielsweise die Hauptphenole des schwarzen Johannisbeersaftes, die Anthocyane Delphinidin-3-glucosid, Delphinidin-3-rutinosid und Cyanidin-3-rutinosid, sowie zwei der Hauptphenole des Apfelsaftes, 4-p-Coumaroylchinasäure und Phloretin-2'-xyloglucosid, kommerziell nicht erhältlich. Zur Beurteilung der schwarzen Johannisbeersaftproben war das Vorhandensein von Standardsubstanzen der Anthocyane essentiell, da diese den quantitativen Hauptteil der analysierbaren Polyphenole in den Proben darstellten. Daher wurde ein Lösungsweg zur Isolierung der Substanzen im präparativen Maßstab erarbeitet.

Die isolierten Reinsubstanzen wurden auch als Standards bei Bioverfügbarkeitsstudien der Fruchtsäfte verwendet. Die beiden Apfelpolyphenole konnten bedauerlicherweise erst so

spät isoliert werden, dass sie in der Polyphenolanalytik mittels HPLC keine Verwendung mehr fanden.

3.2.1. Anthocyane aus schwarzem Johannisbeersaft

Aufarbeitung für die präparative HPLC

Die Aufarbeitung des schwarzen Johannisbeersaftes soll der Isolierung und Konzentrierung der Polyphenole aus dem Saft dienen, um für die nachfolgende präparative HPLC die Polyphenole des schwarzen Johannisbeersaftes möglichst frei von anderen störenden Saftinhaltsstoffen und in einer hohen Konzentration vorliegen zu haben.

Probenvorbereitung

Schwarzer Johannisbeersaft wird mit Fructozym P (Erbslöh, Geisenheim) depektinisiert und anschließend 10 Min bei 4000 U/Min zentrifugiert.

Probenmenge:

1L klarer, depektinierter, schwarzer Johannisbeersaft

Säule:

Eine Chromatographiesäule mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Länge von ca. 80 cm wird mit etwa 8 g Adsorberharz XAD 16 HP (Rohm and Haas S.A., Chauny, France) befüllt, was einem Bettvolumen von etwa 80 mL entspricht.

Konditionierung:

3 Bettvolumen Ethanol, 10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Probenaufgabe: 1L Probe wird bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 3 Tropfen pro Sekunde über die Säule gegeben

Spülen:

10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn zur Entfernung von Zuckern, Mineralstoffen, Proteinen etc.

Elution:

3 Bettvolumen salzsaures Ethanol bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 3 Tropfen pro Sekunde

Reinigung:

3 Bettvolumen entmineral. Wasser, 4 Bettvolumen 2 %ige NaOH-Lösung, 10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Nach der Reinigung kann die Säule wieder für eine Probenaufarbeitung, beginnend mit der Probenaufgabe, verwendet werden.

Extrakt:

Das gewonnene ethanolische Eluat wird im Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 10 – 20 mL eingengt, bei 4°C gelagert und nach Membranfiltration für die präparative HPLC verwendet.

Isolierung der einzelnen Polyphenole mittels präparativer HPLC:

Nach manueller Injektion des Extraktes auf die HPLC-Säule werden die entsprechenden Substanzpeaks per Hand in Rundkolben gesammelt. Die über 15 Chromatographieläufe gesammelten Fraktionen werden bei 40°C und 30 mbar am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend gefriergetrocknet.

HPLC-Bedingungen:

Pumpe	: Merck-Hitachi L-6200 mit präparativem Pumpenkopf
Detektor	: Philips Pye Unicam PU 4020 UV detector
Schreiber	: Philips PM 8251 single-pen recorder
Säule	: Merck Prepar 250 x 25, LiChrospher RP 18, 12 µm
Injektion	: Rheodyne 7125
Injektionsvolumen	: 1 mL (Loop)

Wellenlänge	: 280 nm
Fliessmittel	: Doppelt entmineral. Wasser / Essigsäure (82,5 / 17,5 v/v)
Elution	: isokratisch

Überprüfung der Reinheit mittels analytischer HPLC

Die Überprüfung der Reinheit der isolierten Substanz erfolgt durch Auflösen der gewonnenen gefriergetrockneten Substanz in doppelt entmineral. Wasser und anschließender Analyse mittels HPLC (siehe 3.1.1.).

3.2.2. Coumaroylchinasäure und Phloretin-2'-xyloglucosid aus Apfelsaft

Aufarbeitung für die präparative HPLC

Probenvorbereitung

Ein komplexes Polyphenolmuster ist aufgrund möglicher Koelutionen und Überlappungen der Zielsubstanzen mit unerwünschten Substanzen für eine saubere Isolierung der Zielsubstanz ungünstig. Ein einfaches Polyphenolmuster mit wenigen, in großem Abstand zueinander eluierende Substanzpeaks ist ideal. Um dies für die Isolierung der Coumaroylchinasäure und des Phloretin-2'-xyloglucosids zu erreichen, wird der Apfelsaft vor der Aufarbeitung einer Laccase/O₂-Behandlung unterzogen. In anderen Untersuchungen wurde festgestellt, dass durch die Laccase Coumarsäure- und Phloretinderivate kaum oxidiert werden, während Polyphenole, die eine o-Dihydroxyphenol-Struktur besitzen, wie Kaffeesäurederivate (Chlorogensäure), Quercetinderivate, Flavan-3-ole und Procyanidine, oxidiert werden. Die bei vorangegangenen Versuchen störende Chlorogensäure und andere störende Substanzen können so aus dem Saft entfernt werden.

Probenmenge:

1,5L klarer, depektinierter, Laccase/O₂-behandelter Apfelsaft einer polyphenolreichen Sorte

Säule:

Eine Chromatographiesäule mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Länge von ca. 80 cm wird mit etwa 10 g Adsorberharz Purolite MN 200 befüllt, was einem Bettvolumen von etwa 100 mL entspricht.

Konditionierung:

3 Bettvolumen Ethanol, 10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Probenaufgabe: 1,5L Probe wird bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 3 Tropfen pro Sekunde über die Säule gegeben

Spülen:

10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Elution:

3 Bettvolumen Ethanol bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 3 Tropfen pro Sekunde

Reinigung:

3 Bettvolumen entmineral. Wasser, 4 Bettvolumen 2 %ige NaOH-Lösung, 10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Nach der Reinigung kann die Säule wieder für eine Probenaufarbeitung, beginnend mit der Probenaufgabe, verwendet werden.

Extrakt:

Das gewonnene ethanolische Eluat wird im Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 10 – 20 mL eingeeengt, bei 4°C gelagert und nach Membranfiltration für die präparative HPLC verwendet.

Isolierung der einzelnen Polyphenole mittels präparativer HPLC:

Nach manueller Injektion des Extraktes auf die HPLC-Säule werden die entsprechenden Substanzpeaks per Hand im Rundkolben gesammelt. Die über 15 Chromatographieläufe gesammelten Fraktionen werden bei 45°C und 30 mbar am Rotationsverdampfer eingeeengt und anschließend gefriergetrocknet.

HPLC-Bedingungen:

Pumpe	: Merck-Hitachi L-6200 mit präparativem Pumpenkopf
Detektor	: Merck-Hitachi L 4250 UV-Vis Detector
Schreiber	: Kipp & Zonen Bd 40
Säule	: ReproSil Pur C18-Aq, 10 µm. 250 x 40 (Dr. A. Maisch, Ammerbuch)
Injektion	: Rheodyne 7125
Injektionsvolumen	: 2 mL (Loop)
Fluss	: 6 mL/min
Wellenlänge	: 280 nm
Fliessmittel	: A. Methanol / doppelt entmineral. Wasser / Essigsäure (50 / 49 / 1 v/v/v) B. Methanol

Gradientenprogramm:

Time [min]	A	B	Flow [ml/min]
0.0	100%	0%	6.0
10.0	100%	0%	6.0
50.0	50%	50%	6.0
65.0	0%	100%	7.5
80.0	0%	100%	9.0
80.1	100%	0%	6.0

Überprüfung der Identität sowie der Reinheit mittels analytischer HPLC

Die Überprüfung der Reinheit der isolierten Substanz erfolgte durch Auflösen der gewonnenen gefriergetrockneten Substanz in doppelt entmineral. Wasser und anschließender Analyse mittels HPLC (siehe 3.1.1.). Weiterhin erfolgte eine Identifizierung der beiden isolierten Substanzen mittels LC/MS und beim Phloretin-2'-xyloglucosid durch Hydrolyse und anschließender Bestimmung der freigesetzten Zucker und des Phloretins.

Identifizierung der isolierten Substanzen durch Bestimmung der Zuckerbausteine mittels HPAEC

Zur Bestimmung der monomeren Zuckerbausteine der isolierten Substanz, die hypothetisch als Phloretin-2'-xyloglucosid bezeichnet wurde, müssen diese vom gebundenen Polyphenol und voneinander getrennt werden. Dazu wird die in entmineral. Wasser gelöste Substanz nach Zugabe von Salzsäure bei 70°C sauer hydrolysiert. Im Hydrolysat befinden sich dann die monomeren Zuckerbausteine. Für Phloretin-2'-xyloglucosid sollten Xylose und Glucose im Mengenverhältnis 1:1 nachweisbar sein.

Hydrolyse:

1 mL einer wässrigen Lösung der isolierten Substanz (verbliebene Reste im Rundkolben nach der Gefrier Trocknung) wurde mit 1 mL 4 N HCl versetzt und 1 Stunde bei 70°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde nach Verdünnung zur Analyse verwendet.

Prinzip der Zuckernalytik:

Die Identifizierung und Quantifizierung monomere Zucker erfolgt in wässriger, alkalischer Lösung im Hochdruckbereich an einer Trennsäule, die einen schwachen Anionentauscher darstellt. Durch die stark alkalischen Eluenten gehen die Monomere in ihre anionische Form über, die mit dem Material der Trennsäule in Wechselwirkung tritt. Die Elution erfolgt mittels geeigneter Gradienten verschiedener Ionenstärke, die Detektion auf elektrochemischem Wege. Die mitgeschickten Referenzsubstanzen ermöglichen über das Auswerteprogramm

sowohl die Identifikation bzgl. Retentionszeiten, als auch eine Quantifizierung durch Ein- bzw. Mehrpunktkalibrierung.

HPAEC-Bedingungen:

Gerät	: DIONEX BIO-LC
Säule	: 4 x 250 mm (CARBO PAC PA-100)
Vorsäule	: 4 x 50 mm (CARBO PAC PA-100)
Pumpe	: Gradientenpumpe LCM-2 und Gradientenmixer GM-2
Detektor	: PED mit Gold-Arbeits Elektrode, Gegenelektrode Stahl, Kombination pH-Ag/AgCl- Referenzelektrode
Injektor	: Autosampler Spectra Physics AS 3500
Injektionsvolumen	: 20 µl über Probenschleife
Säulentemperatur	: 15°C
Eluenten	1. Doppelt entmineral. Wasser 2. 0,5 M NaOH 3. Doppelt entmineral. Wasser 4. 0,1 M NaOH
Standardsubstanzen	: Fucose, Rhamnose, Arabinose, Galaktose, Glucose, Xylose

Gradientenprogramm:

Time [min]	Flow [ml/min]	Eluent
0 - 3	1,0	16 mmol NaOH
3,1 - 22,5	1,0	Doppelt entmineral. Wasser
22,6 - 28,0	1,0	20 mmol NaOH
28,1 - 40,0	1,0	500 mmol NaOH
40,1 - 45,0	1,0	Doppelt entmineral. Wasser
45,1 - 75,0	1,0	16 mmol NaOH
75,0 - ∞	0,1	16 mmol NaOH

3.3.3. Isolierung von Polyphenolen aus Apfelsaft mittels Gelchromatographie an einer Säule mit Sephadex LH 20

Die Gelchromatographie wurde als alternatives Verfahren zur Isolierung der einzelnen Polyphenole aus Apfelsaft untersucht. Der Vorteil der Gelchromatographie gegenüber der präparativen HPLC ist die erheblich größere Probenaufgabemenge.

Chromatographie-Bedingungen:

Probe	: Ethanolischer Polyphenolextrakt von einem zuvor mit Laccase enzymierten Apfelsaft, gewonnen an einer Adsorberharzsäule mit dem Adsorberharz XAD 16 HP (siehe 3.2.2.)
Injektionsvolumen	: 10 mL
Fliessmittel	: Isopropanol
Fluss	: 0,8 mL/min
Säulenmaterial	: Sephadex LH 20
Säule	: 100 cm x 2,2 cm i.D.
Bettvolumen	: 65cm x 2,2 cm i.D., etwa 125 ml
Fraktionsgrösse	: 10 mL
Dauer	: ca. 13 Stunden

Von den gesammelten Fraktionen wurde die Extinktion bei 280 nm photometrisch bestimmt. Anschließend wurde von ausgewählten Fraktionen ein Polyphenolmuster mittels HPLC ermittelt.

3.4. Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode

Mit der TEAC-Methode (Trolox-Equivalent-Antioxidative-Capacity) lässt sich die antioxidative Kapazität von wässrigen Lösungen bestimmen. Die von MILLER et al. 1993 beschriebene Methode wurde zur Vereinfachung und besseren Handhabung modifiziert.

Chemikalien

ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)), Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) (Aldrich), di-Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhexacyanoferrat-(III), Natriumchlorid, Wasserstoffperoxid 30%ig (Merck, Darmstadt), Myoglobin (Sigma), Sephadex G-15

Geräte

Chromatographie-Säule 100 cm x 2,2 cm i.D. (Pharmacia) Spektralphotometer, Stoppuhr, 1.5 mL Halbmikro -Küvetten (Schichtdicke 1 cm)

Lösungen

PBS-Puffer

0,714 g di-Kaliumhydrogenphosphat + 0,123 g Kaliumdihydrogenphosphat + 8,766 g NaCl mit doppelt entmineral. Wasser auf 1 L auffüllen, pH-Wert kontrollieren (pH=7,2-7,4)

PBS-Probenpuffer

7,14 g di-Kaliumhydrogenphosphat + 1,23 g Kaliumdihydrogenphosphat + 8,766 g NaCl mit doppelt entmineral. Wasser auf 1 L auffüllen. pH-Wert kontrollieren (pH=7,2-7,4)

ABTS-Stammlösung (5000 µmol/L)

55 mg ABTS mit PBS-Puffer im Messkolben auf 20 mL auffüllen

ABTS-Arbeitslösung (500 µmol/L)

von der ABTS-Stammlösung die benötigte Menge in einer 1:10-Verdünnung (500 µM/L) herstellen

Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/L)

64 mg Trolox in 100 mL-Messkolben mit PBS-Puffer auffüllen, am besten zum Anlösen in wenigen Tropfen Ethanol aufnehmen

Wasserstoffperoxid-Lösung (450 µmol/L)

10µL Wasserstoffperoxid (30%ig) auf 200ml doppelt entmineral. Wasser geben; im Kühlschrank max. 2 Tage haltbar, am besten täglich frisch ansetzen

Herstellung der Metmyoglobinlösung

Das in PBS-Puffer gelöste Myoglobin (142 mg/20 mL) wird durch eine K-Hexacyanoferrat-(III)-Lösung (5 mg/20 mL) zu Metmyoglobin oxidiert. Diese Mischung wird anschließend auf eine vorbereitete Chromatographiesäule (Füllmaterial: Sephadex G-15, 70 cm x 2 cm, mind. 60 cm Trennlänge, vorher mit 2fachem Säulenvolumen PBS-Puffer bei 2 mL/min gespült) mit einem Fluss von 2 mL/min gegeben, um das Metmyoglobin vom K-Hexacyanoferrat abzutrennen. Es wird dann die braune Fraktion aufgesammelt. Dabei ist darauf zu achten, dass das danach eluierende KHCF(III) (gelb) nicht mit aufgesammelt wird!

Die aufgesammelte Metmyoglobinlösung wird nun auf ihren Gehalt an Metmyoglobin überprüft: Hierzu wird in einer 1 cm-Kunststoffküvette die Absorption bei 490, 560 und 580nm gegen PBS-Puffer gemessen. Die Konzentration errechnet sich nach:

$$c[\mu\text{M/L}] = 146 \cdot E_{490} - 108 \cdot E_{560} + 2,1 \cdot E_{580}$$

Die Lösung sollte Konzentrationen um 140 $\mu\text{M/L}$ besitzen. Zum Schutz vor Licht mit Alufolie umwickeln und im Kühlschrank aufbewahren.

TEAC-Testlösung:

300 μL ABTS-Arbeitslösung
50 μL Metmyoglobin-Lösung
400 μL PBS-Puffer

Die Testlösung kann in größeren Mengen angesetzt werden und ist ca. 1 Woche im Kühlschrank haltbar.

Messprinzip:

Die Messung beruht auf der Hemmung der Bildung des Radikalkations ABTS^+ über die Reduktion des Ferrylmyoglobinradikals, das in wässriger Lösung durch die Oxidation von Metmyoglobin durch Wasserstoffperoxid gebildet wird. Die Hemmung erfolgt durch in der Messlösung enthaltene Radikalfänger (z. B. Polyphenole) aus der zugegebenen Probe. Das entstandene Farbstoffradikal wird bei 734 nm photometrisch bestimmt. Die Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations ABTS^+ durch die Reduktion des Ferrylmyoglobinradikals ist konstant und ergibt daher einen nahezu linearen Anstieg der Extinktion in der Testlösung. Je länger nun die durch eine antioxidative Probe bewirkte „lag“-Phase ist, desto geringer ist die Extinktion zu einem festgelegten Messzeitpunkt, da die Bildung des Radikalkations ABTS^+ verzögert nach dem Verbrauch der antioxidativ wirksamen Substanzen einsetzt. Da diese Verzögerung der Farbreaktion proportional zur Konzentration der antioxidativen Substanz ist, entspricht die Extinktion zum Messzeitpunkt bei gleicher Steigung bzw. Kurvenverlauf der Farbreaktion dem Gehalt an antioxidativ wirksamen Substanzen in der Messlösung. Zur Kalibrierung der Methode wird das wasserlösliche Tocopherol und Vitamin E-Analogen Trolox verwendet. Bei steigenden Troloxkonzentrationen resultiert durch die Verlängerung der lag-Phase eine Kurvenschar, deren Extinktionsabstände zum Messzeitpunkt der Konzentration entsprechen, was bedeutet, dass eine Erhöhung der Troloxkonzentration um 0,5 mmol/L zu einer Verringerung der Extinktion zum Messzeitpunkt um 0,08 - 0,1 Extinktionseinheiten führt (Abbildung 10).

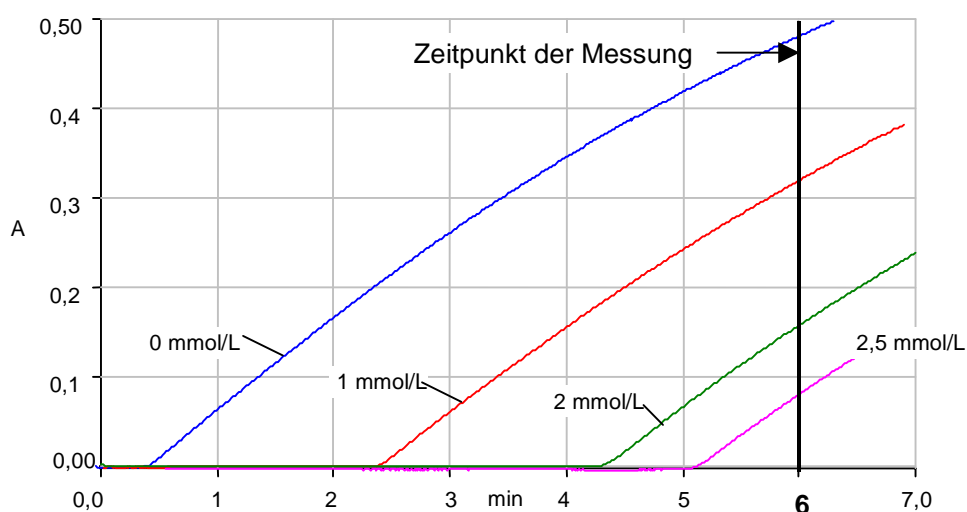


Abbildung 10: Verlauf der Farbreaktion im TEAC-Test bei verschiedenen Trolox-Konzentrationen

Die Bestimmung der Länge der Lagphase stellt als Variation des Testes ebenfalls eine Möglichkeit zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität einer Probe dar.

Bei der Kalibrierung ergibt sich eine Gerade mit negativer Steigung, da die Extinktion um so niedriger ist, je höher die Troloxkonzentration ist (Abbildung 11). Die Messgröße ist mmol/L Trolox.

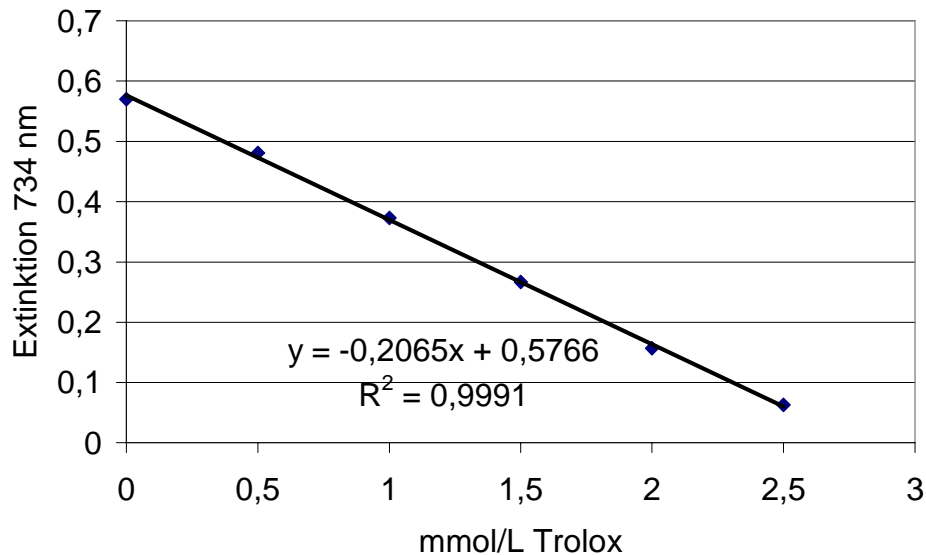


Abbildung 11: Eichgerade des TEAC-Testes, Messzeitpunkt 6 min

Um den TEAC-Wert von Proben aus deren Extinktion am Messzeitpunkt mittels der erstellten Eichgerade zu berechnen, wird die Geradengleichung nach x (Konzentration in mmol/L Trolox[®]) aufgelöst (z. B. $y = -0,2065x + 0,5766$ wird zu $x = -4,8426y + 2,7923$) und die Extinktion der untersuchten Probe (y-Wert) in die umgestellte Gleichung eingesetzt.

Testdurchführung:

Wellenlänge: 734nm

Zur einfacheren Handhabung wurde das Probenvolumen im Test von ursprünglich 10 µL unverdünnte Probe durch eine Verdünnung der Probe um den Faktor 10 auf 100 µL erhöht. Dabei ist zu beachten, dass die 1:10 verdünnte Probe bei 100 µL Volumen das ursprüngliche Probenvolumen von 10 µL enthält, also die Probe zwar 1:10 verdünnt wurde, aber das Probenvolumen im Test auch um den Faktor 10 erhöht wurde, was sich gegenseitig aufhebt. Dies muss bei der Berechnung beachtet werden. Auch die Trolox-Standardlösung muss deshalb zur Bestimmung einer Eichgerade 1:10 verdünnt werden. Erst bei Verdünnungen größer 1:10 muss diese in der späteren Berechnung verwendet werden (1:50 Verdünnung der Probe bedeutet einen Verdünnungsfaktor in der Berechnung von 5! nicht von 50). Die Proben werden entsprechend der folgenden Aufzählung mit entmineral. Wasser bzw. PBS-Probenpuffer verdünnt (richtet sich nach dem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu):

Gesamtphenolgehalt bis 750 mg/L	: 1:10 (PBS-Probenpuffer)
Gesamtphenolgehalt bis 1500 mg/L	: 1:25 (PBS-Probenpuffer)
Gesamtphenolgehalt bis 5000 mg/L	: 1:100
Gesamtphenolgehalt bis 10000 mg/L	: 1:200

Vor einer Testserie bzw. mehreren Testserien an einem Tag sollte eine Eichgerade mit sechs Messpunkten der Trolox-Standardlösungen mit Konzentrationen von 0 – 2,5 mmol/L (0,5 mmol/L Schritte) aufgenommen werden. Die Eichgerade dient dann zur Berechnung des

TEAC-Wertes. In einer Testserie können 11 Proben (Doppelbestimmung) sowie ein Leerwert gemessen werden, insgesamt 24 Einzelproben. Sind die Extinktionen der Leerwerte in Testserie und Eichgerade unterschiedlich (max. 0,05 Extinktionseinheiten), werden die gemessenen Extinktionen im Test um die Differenz der beiden Leerwerte korrigiert.

Die Lösungen müssen auf 20°C temperiert werden. Zum Test werden die Halbmikro-Küvetten wie folgt befüllt:

TEAC-Testlösung:	750 µL
+	
Leerwert:	100 µL PBS-Puffer
oder	
Probe (mind. 1:10 verdünnt)	100 µL (entspricht 10 µL Probe)
oder	
Standardlösung (1:10 verdünnt):	100 µL (entspricht 10 µL Standardlösung)

Die Extinktion des Leerwertes vor dem Reaktionsstart wird als Abgleich verwendet. Zum Starten der Reaktion werden nun im 15 Sekunden-Abstand 200 µL Wasserstoffperoxidlösung der Reihe nach in die Küvetten gegeben. Nach genau 6 min werden die Küvetten wieder im 15 Sekunden-Abstand der Reihe nach im Photometer gemessen, so dass jede Probe nach genau 6 min Reaktionszeit bestimmt wird. Bei zu hohen (Extinktionsdifferenz von Blindwert und Probe kleiner 0,020) oder zu niedrigen Extinktionen (< 0,020) der untersuchten Proben muss anders verdünnt werden.

Man berechnet den TEAC-Wert in der Einheit mmol/L Trolox durch Einsetzen der Extinktion im Test (eventuell korrigiert) in eine umgestellte Eichgerade.

Standardabweichung

Die Standardabweichung des Mittelwertes innerhalb einer Testserie wurde für eine Trolox®-Standardlösung, einen Apfelsaft und einen schwarzen Johannisbeernektar bestimmt (Tabelle 20).

Tabelle 20: Standardabweichung des Mittelwertes im TEAC-Test bei jeweils 16 Wiederholungen

Probe	Standardabweichung des Mittelwertes
Trolox®-Standardlösung (n = 16)	2,2%
Schwarzer Johannisbeernektar (n = 16)	3,5%
Naturtrüber Apfelsaft (n = 16)	3,3%

Der Standardabweichung des Mittelwertes der Methode lag bei allen Bestimmungen unter ± 3,5%. Die Messgenauigkeit kann daher als befriedigend bezeichnet werden.

3.4. Allgemeine Analysen

Die folgenden Analysenparameter wurden nach RENTSCHLER und TANNER 1976 bestimmt.

- pH-Wert
- titrierbare Gesamtsäure
- Dichte d 20/20 bzw. °Oechsle (d 20/20 – 1)
- Extraktgehalt in °Brix
- L-Ascorbinsäuregehalt (jodometrisch)