



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

Analytik von Cranberry- und Preiselbeerpräparaten

verfasst von / submitted by
Kerstin Grauer

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree program code as it appears
on the studentrecord sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the studentrecord sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich sowohl im Rahmen dieser Diplomarbeit als auch während meines ganzen Studiums begleitet haben.

Ich bedanke mich bei Frau Univ.- Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an ihrem Department.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau ao. Univ. Prof. Liselotte Krenn, für das interessante Thema und die sehr gute Betreuung während der gesamten Arbeitszeit. Vielen Dank für die Zeit und Mühen, die Sie in meine Arbeit investiert haben und für jede noch so kleine Frage offen waren.

Ein großes Dankeschön auch an das ganze Department für das tolle Arbeitsklima. Herzlichen Dank an Apothekerin Andrea Lubich für die geduldige Beantwortung etwaiger Fragen und auch ein Dankeschön an Martina Sykora für die Hilfe bei den LC-MS Analysen.

Nicht zu vergessen ist natürlich meine Familie, meine Freunde und Studienkollegen, die mich in dieser Phase des Lebens begleitet, motiviert und immer unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

ANC	Anthocyane
Btl	Beutel
Cya-3-ara	Cyanidin-3-arabinosid
Cya-3-gal	Cyanidin-3-galactosid
Cya-3-glu	Cyanidin-3-glucosid
Ftb	Filmtablette
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kps	Kapsel
LCMS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
MeOH	Methanol
MW	Mittelwert
PAC	Proanthocyanidin
Peo-3-ara	Peonidin-3-arabinosid
Peo-3-gal	Peonidin-3-galactosid
Peo-3-glu	Peonidin-3-glucosid
PTFE	Polytetrafluorethylen
RSD	Relative Standardabweichung = Variationskoeffizient
Rt	Retentionszeit
STABW	Standardabweichung
Tbl	Tablette

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	4
2.1 MATERIAL	4
2.1.1 <i>Untersuchungsmaterial</i>	4
2.1.2 <i>Referenzsubstanzen</i>	5
2.2 METHODEN	6
2.2.1 <i>Extraktionsmethoden</i>	6
2.2.2 <i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	7
2.2.3 <i>Liquid Chromatography – Mass spectrometry (LC-MS)</i>	8
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	9
3.1 ANTHOCYANMUSTER IN CRANBERRY- UND PREISELBEERPRÄPARATEN	9
3.2 PROANTHOCYANIDINMUSTER IN CRANBERRY- UND PREISELBEERPRÄPARATEN	18
3.3 METHODENVALIDIERUNG	32
3.3.1 <i>Kalibrierung</i>	32
3.3.2 <i>Reproduzierbarkeit</i>	42
3.3.3 <i>Bestimmungs- und Nachweisgrenze</i>	47
3.4 QUANTITATIVE ANALYSE DER CRANBERRY- UND PREISELBEERPRÄPARATE.....	48
3.5 DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	58
4 ZUSAMMENFASSUNG	60
5 ABSTRACT	62
LITERATURVERZEICHNIS	63
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	65
TABELLENVERZEICHNIS	66
ANHANG	I

1 Einleitung und Problemstellung

Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) und Preiselbeeren (*Vaccinium vitis-idaea* L.) werden in Europa und Nordamerika schon lange volksmedizinisch angewendet. Die Beeren sind heute in Form von Nahrungsergänzungsmitteln mit verschiedenen gesundheitsfördernden Effekten weit verbreitet und das Interesse daran steigt stetig (Krenn et al., 2007).

Für den positiven Nutzen werden die in hohem Maße enthaltenen Polyphenole verantwortlich gemacht. Es gibt eine Reihe von Studien zu antioxidativen und antimikrobiellen Aktivitäten, antiviralen und antiproliferativen Eigenschaften sowie zur entzündungshemmenden Wirkung. Einige Versuche an gesunden Probanden haben außerdem einen positiven Effekt auf die Zahngesundheit, kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes gezeigt (Sanchez-Patan et al., 2012, Pappas et al., 2009).



Abbildung 1: *Vaccinium macrocarpon* Ait.¹

Die am häufigsten untersuchte Bioaktivität von Cranberries bezieht sich auf die Prävention von Harnwegsinfekten. *Escherichia coli* ist für 80 % aller Harnwegsinfekte verantwortlich, da sich die Keime an die Blasenschleimhaut anhaften und einen Biofilm erzeugen. Diese Anhaftung wird durch die Inhaltsstoffe der Beeren verhindert (Rodriguez-Perez et al., 2016).

¹ <http://www.pollinator.ca/bestpractices/cranberries.html> 30.05.2016

Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Proanthocyanidine (PACs). PACs sind dimere, oligomere und polymere Formen der monomeren Flavan-3-ole Catechin oder Epicatechin. Man unterscheidet zwei Arten von PACs (Abbildung 2). In Vertretern der B- Reihe sind die monomeren Einheiten durch eine C4-C6 oder C4-C8 Bindung miteinander verlinkt. PAC der A-Reihe weisen eine zusätzliche Ether-Brücke zwischen C2-O-C7 oder C2-O-C5 auf. Speziell die PACs der A-Reihe werden für den antiadhäsiven Effekt an der Blasenschleimhaut verantwortlich gemacht (Krueger et al., 2013).

Rodriguez-Perez et al. (2016) haben festgestellt, dass auch andere Komponenten – hauptsächlich Flavonoide - gegen den von *E.coli* produzierten Biofilm wirken können. Jedoch ist festzuhalten, dass die stärkste Aktivität vom Gesamtextrakt ausgeht, die auf einen Synergismus der einzelnen Verbindungen oder deren Metaboliten in Cranberry – Früchten deuten.

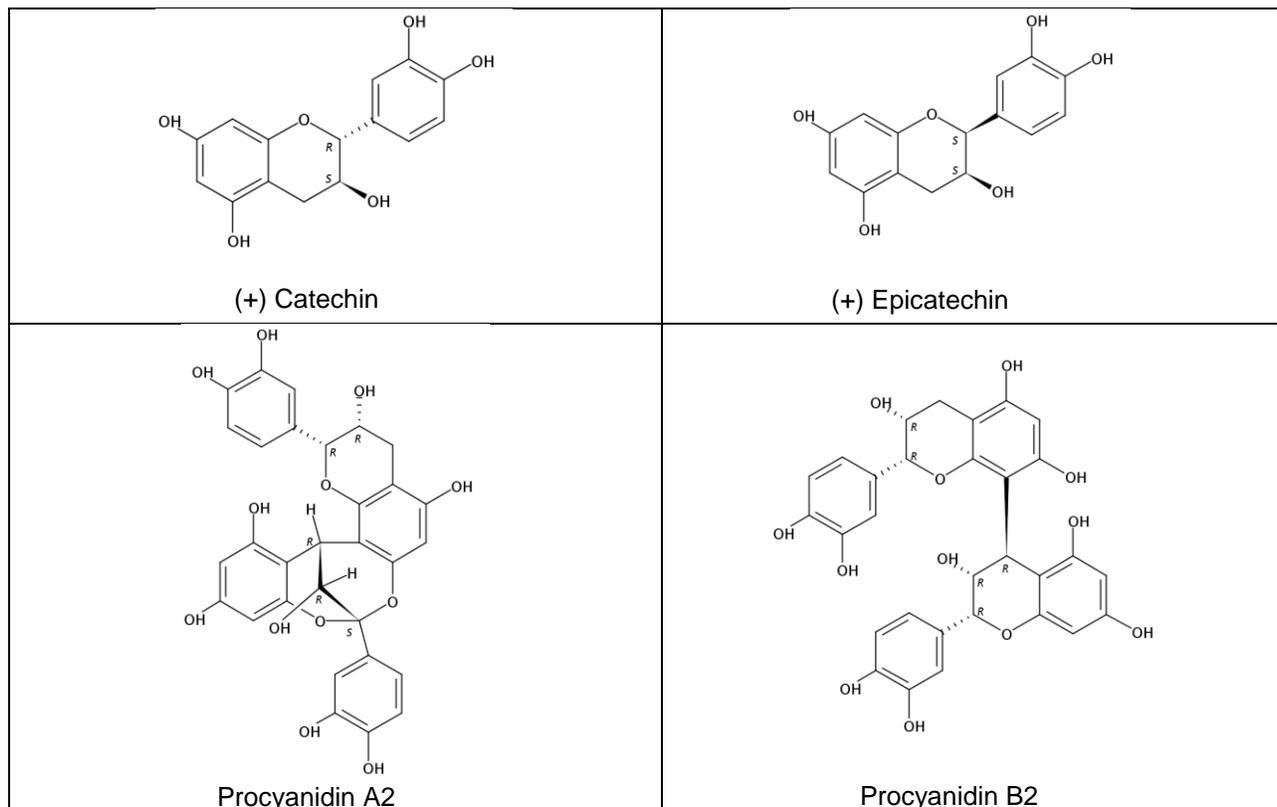
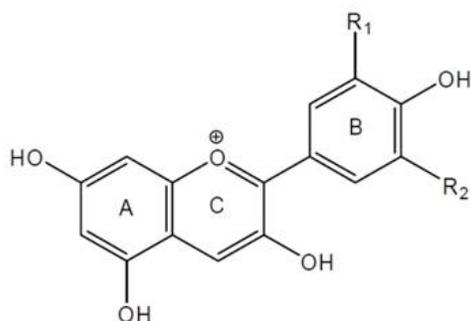


Abbildung 2: Inhaltsstoffe von Cranberries und Preiselbeeren²

² <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> am 14.3.2016

Neben den PACs enthalten die Beeren auch Anthocyane. Diese Verbindungen sind für die rote Farbe der Beeren verantwortlich. Cranberries enthalten hauptsächlich die 3-Monogalaktoside, 3-Monoglucoside und 3-Monoarabinoside von Cyanidin und Peonidin. Dagegen enthalten Preiselbeeren lediglich Cyanidin-3-galactosid, -glucosid und -arabinosid (Lee, 2016; Pappas et al., 2009).



Name	R ₁	R ₂
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Abbildung 3: Anthocyanidine³

Viele der auf dem Markt befindlichen Nahrungsergänzungsmittel sind Kombinationen aus verschiedenen Früchten und können Zusätze von Vitaminen oder Spurenelementen enthalten. Sie weisen nur selten Gehaltsangaben für Anthocyane und PACs oder Informationen über das Extraktionsmittel und Droge-Extrakt-Verhältnis auf. Nicht nur das Fehlen dieser Information, sondern auch die problematische Analyse der Polyphenole erschwert den Vergleich von Cranberry- und Preiselbeer - Produkten (Krenn et al., 2007)

Aufgrund dieser Tatsache beschäftigt sich diese Diplomarbeit mit der Analyse von Cranberry- und Preiselbeerpräparaten. Das Ziel war es, einen qualitativen und quantitativen Vergleich zwischen diesen Nahrungsergänzungsmitteln durchzuführen.

³ <http://www.generation-wein.com/wordpress/anthocyane/> am 11.08.2016

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Für die Analyse wurden 16 im deutschsprachigen Raum erhältliche Cranberry- und Preiselbeerpräparate gekauft und im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht. In Tabelle 1 sind die Präparate, deren Deklaration und die Anwendungsempfehlung aufgelistet (C = Cranberrypräparat, P= Preiselbeerpräparat).

Tabelle 1: Cranberry- und Preiselbeerpräparate

Pr.	Produkt und Firma	Deklaration		Verzehr - empfehlung pro Tag
		PAC	ANC	
C1	Apremia Cranberry Kapseln	k.A.	25 mg/ 2 Kps	2 Kps
C2	Biogelat Cranberry Filmtabletten	36 mg/ 1 Ftb	k.A.	1 Ftb
C3	Biogelat Cranberry Granulat	36 mg/ 2 Btl	k.A.	2 Btl
C4	Avitale Cranberry Kapseln	36 mg/ 2 Kps	k.A.	2 Kps
C5	Canea Cranberry Kapseln*	k.A.	k.A.	1-2 Kps
C6	Preiselaktiv Tabletten	k.A.	k.A.	2 Tbl
C7	Hafesan Cranberry Kapseln	k.A.	k.A.	3 Kps
C8	Pure Encapsulate Cranberry NS	k.A.	k.A.	1 Kps
C9	GPH Cranberry Kapseln	k.A.	k.A.	3 Kps
C10	Dr. Böhm Cranberry complex Tabletten** von Apomedica	134 mg/ 2 Kps	k.A.	2 Kps
C11	MensSana Cranberry akut Kapseln	80 mg/ 2 Kps	k.A.	2 Kps
C12	Raab Vitalfood Cranberry Tabletten	36 mg/ 3 Tbl	k.A.	3 Tbl
C13	Zein Pharma Bio Cranberry Kapseln	80 mg / 2 Kps	k.A.	2 Kps
C14	Junek Cranberry Kapseln	k.A.	k.A.	3 Kps
P1	Alpinamed Preiselbeer Filmtabletten	32.4 mg/ 1 Ftb	k.A.	2-12 Ftb
P2	Junek Preiselbeer Kapseln	k.A.	k.A.	3 Kps

k.A. = keine Angabe

*enthält zusätzlich Rotweineextrakt

**enthält zusätzlich Brunnenkresse-Extrakt und Meerrettich-Extrakt



Abbildung 4: Untersuchte Cranberry- und Preiselbeerpräparate

2.1.2 Referenzsubstanzen

Es wurden folgende Referenzsubstanzen als externe Standards herangezogen.

Tabelle 2: Referenzsubstanzen

DL-Catechin	Carl Roth, Karlsruhe, Art. 8822, 1020889
(-)-Epicatechin	Carl Roth, Karlsruhe, Art. 7293, 0192151
Peonidin-3-glucosidchlorid	Phytolab, Germany, Artikel Nr.: 89754, Charge Nr.: 10364, Bericht Nr.:20902450
Cyanidin-3-galactosidchlorid	Extrasynthese, France, 0923, Lot: 03012708
Procyanidin A2	Phytolab, Germany, Artikel Nr.: 83223, Charge Nr.: 9009, Bericht Nr.: 20902469
Procyanidin B2	Phytolab, Germany, Artikel Nr.:89552, Charge Nr.: 5525, Bericht Nr.: 112596367
Myricetin	Carl Roth, Karlsruhe, Art. 6461
Quercetin	Sigma Aldrich, USA, Art. 4951
Quercitrin Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Art. 9226, 1169907
2,4 Dihydroxybenzoesäure	Sigma Aldrich, USA, Art. D109401

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktionsmethoden

Die Präparate sollten auf den Gehalt der Anthocyane und Proanthocyanidine untersucht werden. Dafür wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden angewandt. Beide Methoden wurden aus der Literatur übernommen (Lamien-Meda et al., 2009) und teilweise modifiziert.

Extraktionsmethode A

Zur Analyse der Anthocyane wurde der Inhalt aus zwei Kapseln beziehungsweise zwei Tabletten in einer Reibschale verrieben und eine definierte Menge (ca. 0,8 g) des homogenisierten Pulvers für die Extraktion verwendet. Dieses Pulver wurde mit 10,00 ml Methanol versetzt und für 2 h im gekühlten Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte durch ein HPLC-PTFE-Membran-Filter (0.45 µm) filtriert und für die HPLC – Analyse verwendet.

Extraktionsmethode B

Zur Analyse der Proanthocyanidine wurde der Inhalt aus zwei Kapseln beziehungsweise zwei Tabletten in einer Reibschale verrieben und eine definierte Menge (ca. 0,8 g) des homogenisierten Pulvers für die folgende Extraktion verwendet. Das Pulver wurde mit 100 ml Wasser und 50,00 ml Ethylacetat 2 h bei 40 °C unter Rotation am Rotavapor extrahiert. Das Gemisch wurde in einen Scheidetrichter übergeführt. Mit der Vollpipette wurde ein aliquoter Teil (40,00 ml) der Ethylacetat-Phase entnommen und dieser mit 40 ml Natriumacetat-Puffer (0.1M, pH 7.0) ausgeschüttelt. Daraus wurde ein weiterer aliquoter Teil (30,00 ml) mit der Vollpipette entnommen und am Rotavapor bei 40 °C zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in 1,00 ml Methanol aufgenommen, kurz im Ultraschallbad behandelt und durch ein HPLC-PTFE-Membran-Filter (0.45 µm) filtriert und für die weitere Analyse mittels HPLC verwendet.

2.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC wurde zur Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen herangezogen. Folgende Bedingungen wurden für die Analysen verwendet.

Tabelle 3: HPLC - Bedingungen

Entgaser	SHIMADZU DGU-20A5
Pumpe	SHIMADZU LC-20AD
Autoinjektor	SHIMADZU SIL – 20AC HAT
Controller	SHIMADZU CBM-20A
Detektor	SHIMADZU SPD – M20A (Dioden-Array-Detektor)
Säulenofen	SHIMADZU CTO – 20 AC
Säule	Acclaim 120Å C18, 3µm, 2.1 X 150 mm, Thermo Scientific
Mobile Phase	Solvent A: Wasser + 1% Ameisensäure conc. (pH 2.00) Solvent B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure conc.
Gradient	0-50 min: 5-25 % 50-55 min: 25 % isokratisch 55-56 min: 25-100 % 56-61 min: 100 % isokratisch 61-62 min: 100-5 % 62-70 min: 5% isokratisch
Detektion	ANC bei 515 nm, PAC bei 280 nm
Flussrate	0.5 ml/min
Injektionsvolumen	5 µl
Temperatur	25 °C

2.2.3 Liquid Chromatography – Mass spectrometry (LC-MS)

Die LC-MS wurde zur Bestimmung der molekularen Massen der in den Extrakten enthaltenen Verbindungen verwendet, um Information über diese Komponenten zu erhalten. In folgender Tabelle befinden sich die Angaben des verwendeten Gerätes und der Bedingungen.

Tabelle 4: LC-MS - Bedingungen

Gerät	UltiMate 3000 Rapid Separation LC System
Controller	UltiMate 3000 Dionex
Pumpe	UltiMate 3000 RS Dionex Pump
Detektor	UltiMate 3000 RS Dionex Dioden Array Detector
Säulenofen	UltiMate 3000 RS Dionex column compartment
Autoinjektor	UltiMate 3000 RS Dionex Autosampler
Ionenmodus	Positiv- und Negativionen Modus mit automatischen DDA
Ionisation	ESI
Temperatur des Trockengases	340 °C
Fluss des Trockengases	9.0 ml/min N ₂
Vernebler	26.0 N ₂
Kapillarspannung	3500 V
Kollisionsgas	Helium
Säule	Acclaim 120Å C18, 3µm, 2.1 X 150 mm, Thermo Scientific
Mobile Phase	Solvent A: Wasser + 1 % Ameisensäure conc. (pH 2.00) Solvent B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure conc.
Gradient	0-50 min: 5-25 % 50-55 min: 25 % isokratisch 55-56 min: 25-100 % 56-61 min: 100 % isokratisch 61-62 min: 100-5 % 62-70 min: 5% isokratisch
Detektion	280 nm, 515 nm
Flussrate	0.5 ml/min
Injektionsvolumen	5 µl
Temperatur	25 °C

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Anthocyanmuster in Cranberry- und Preiselbeerpräparaten

Anthocyane verleihen vielen Früchten und Blüten eine intensiv rote, violette oder auch blaue Farbe. Cyanidin, Peonidin, Delphinidin, Pelargonidin, Petunidin und Malvidin kommen dabei am häufigsten vor (Abbildung 3, Seite 3). An diesen Aglyka können sowohl in Position 3 als auch in Position 5 Zuckerreste verknüpft sein (Lee et al., 2008).

Um die Anthocyane in den Präparaten zu analysieren, wurden sie mit der Extraktionsmethode A (Kapitel 2.2.1, Seite 6) aufgearbeitet und anschließend mit Hilfe der HPLC charakterisiert. Für die Identifizierung der Anthocyane wurde der Vergleich mit den Referenzsubstanzen Cyanidin-3-galaktosid und Peonidin-3-glucosid, deren UV/Vis-Spektren, die LC-MS und ein Vergleich mit der Literatur herangezogen.

Wie schon in einigen vorangegangenen Publikationen konnte ein deutlicher Unterschied zwischen dem Anthocyanmuster der Preiselbeere und der Cranberry gezeigt werden (Lee, 2016; Lee et al., 2012; Wu et al., 2005).

Cranberries enthalten typischerweise sechs Anthocyane, die im verwendeten System in folgender Elutionsreihe auftreten: (1) Cyanidin-3-galactosid, (2) Cyanidin-3-glucosid, (3) Cyanidin-3-arabinosid, (4) Peonidin-3-glucosid, (5) Peonidin-3-galactosid und (6) Peonidin-3-arabinosid.

Hingegen sind in Preiselbeeren lediglich die Glykoside Cyanidin-3-galactosid, Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-arabinosid nachweisbar. (Lee, 2016; Lee et al., 2012; Wu et al., 2005).

Abbildung 5 auf Seite 10 zeigt ein typisches Anthocyanprofil eines Cranberry – Präparates mit den sechs Hauptpeaks und deren UV/Vis – Spektren.

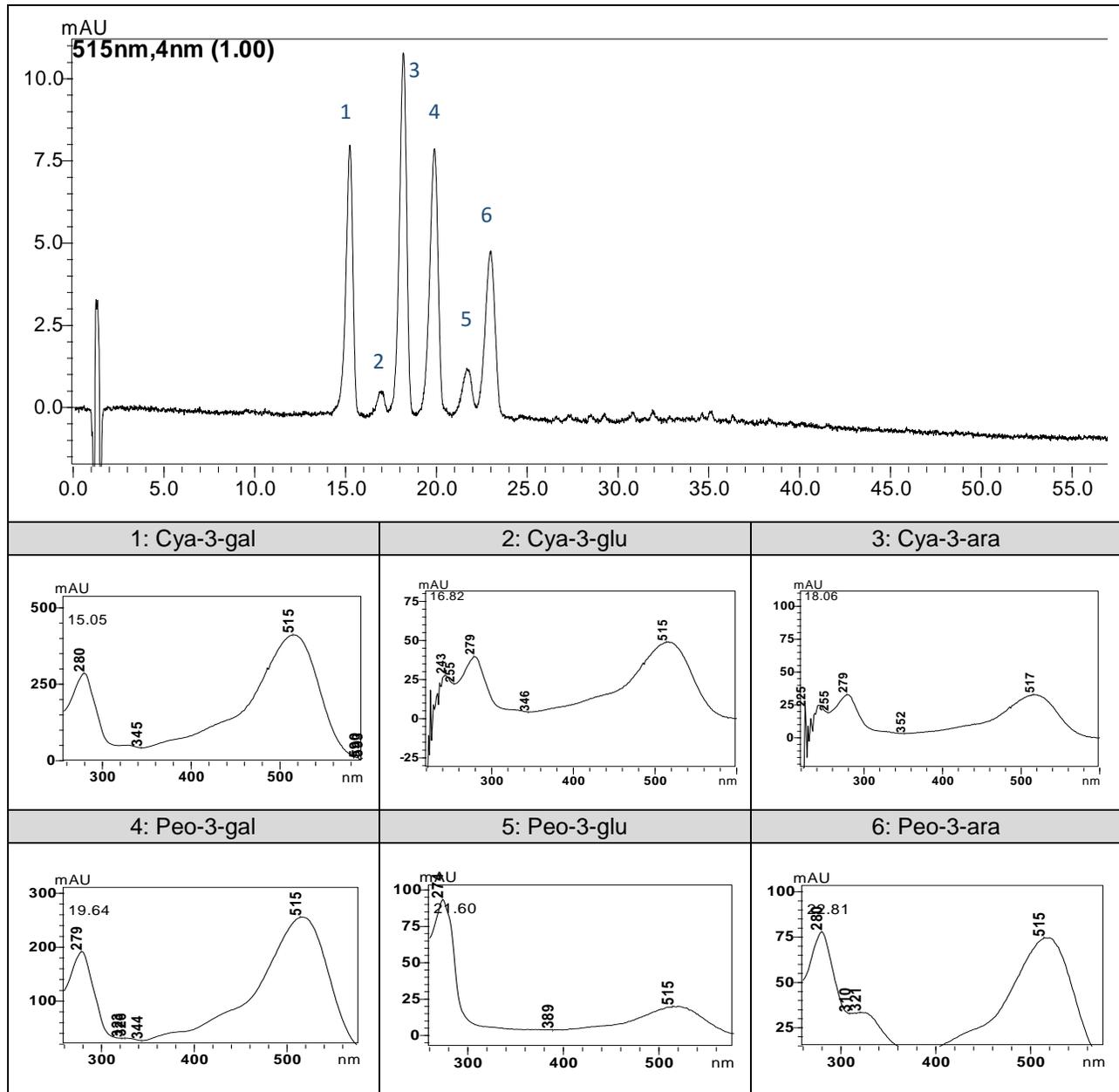


Abbildung 5: ANC - Chromatogramm des Cranberrypräparates C1 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7)

Die Präparate C1, C2, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14 und P2 wiesen alle das gleiche Peakmuster der Anthocyane von Cranberries auf (Abbildung 6 Seite 11). Es variierte lediglich das Mengenverhältnis der einzelnen Anthocyane. In sechs dieser zwölf Präparate war Peonidin-3-galactosid das Hauptanthocyan.

Es ist festzuhalten, dass P2 als Preiselbeerpräparat deklariert war, jedoch dasselbe Anthocyanmuster wie die Cranberrypräparate aufwies.

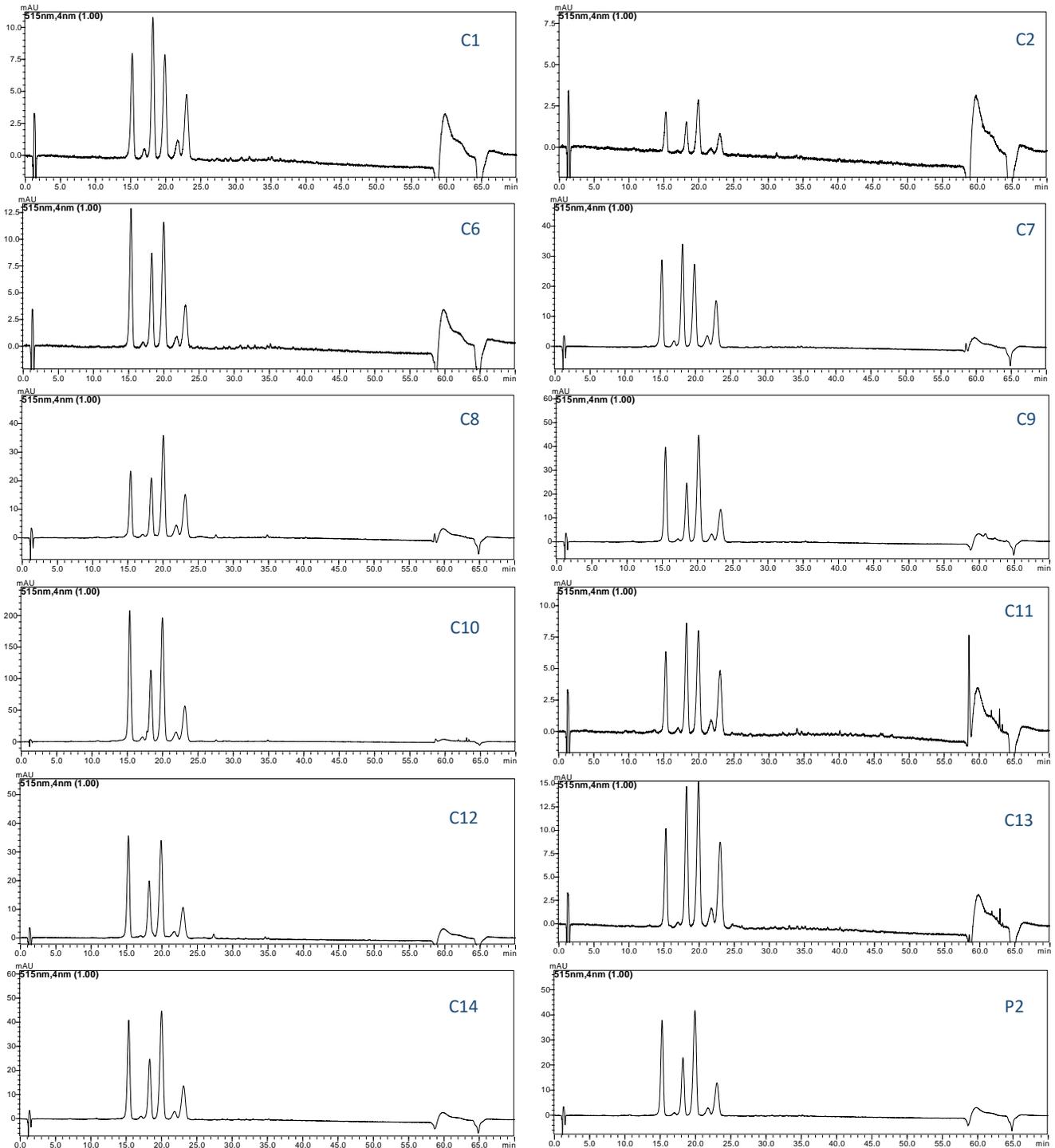


Abbildung 6: ANC - Chromatogramme der Präparate C1, C2, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14 und P2 (HPLC-Bedingungen Kap 2.2.2, Seite 7)

Abbildung 7 zeigt das Chromatogramm des Präparates P1 mit den drei Anthocyanen Cyanidin-3-galactosid, -glucosid, und -arabinsid als charakteristische Inhaltsstoffe von Preiselbeeren. Cyanidin-3-galactosid lag als Hauptkomponente vor.

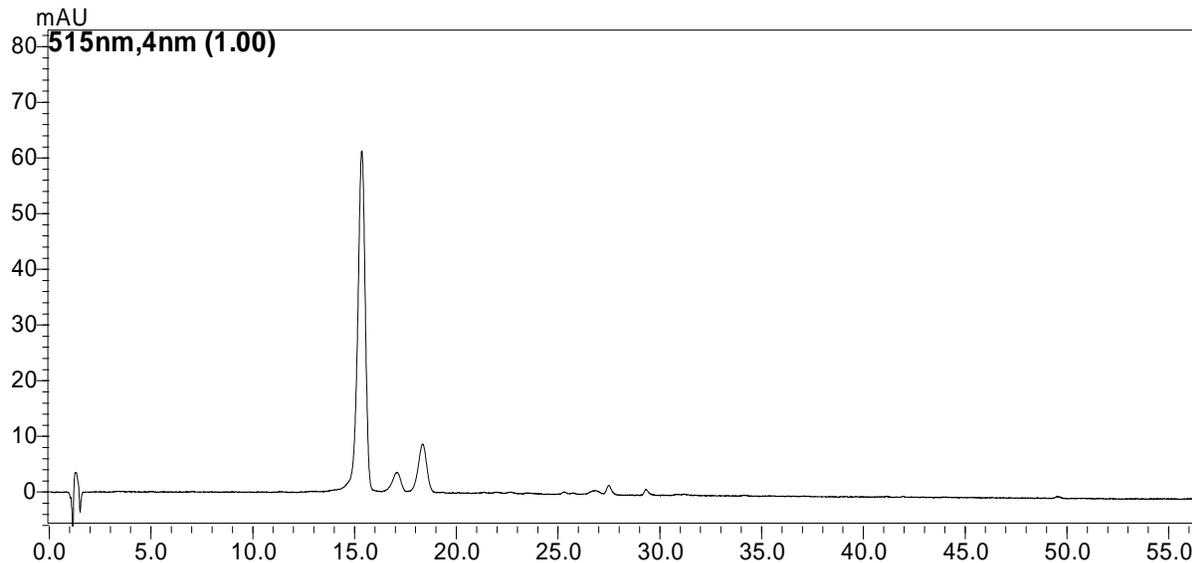


Abbildung 7: ANC - Chromatogramm des Preiselbeer-Präparates P1 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7)

Die Präparate C3, C4 und C5 unterschieden sich deutlich von dem für Cranberry – Präparate charakteristischen Anthocyanmuster.

In Präparat C3 (Abbildung 8, Seite 13) wurden sechs Hauptkomponenten bei 515 nm mit folgende Retentionszeiten detektiert. Peak 1+2 bei ca. 6 Minuten, Peak 3+4 bei ca. 8 Minuten, Peak 5 bei 9.9 Minuten und Peak 6 bei 13.4 Minuten. Sowohl die Retentionszeiten als auch die UV/Vis – Spektren waren deutlich von Cyanidin- und Peonidinglykosiden zu unterscheiden. Die Ähnlichkeit lässt jedoch auf weitere Anthocyane und/oder rote Farbstoffe schließen.

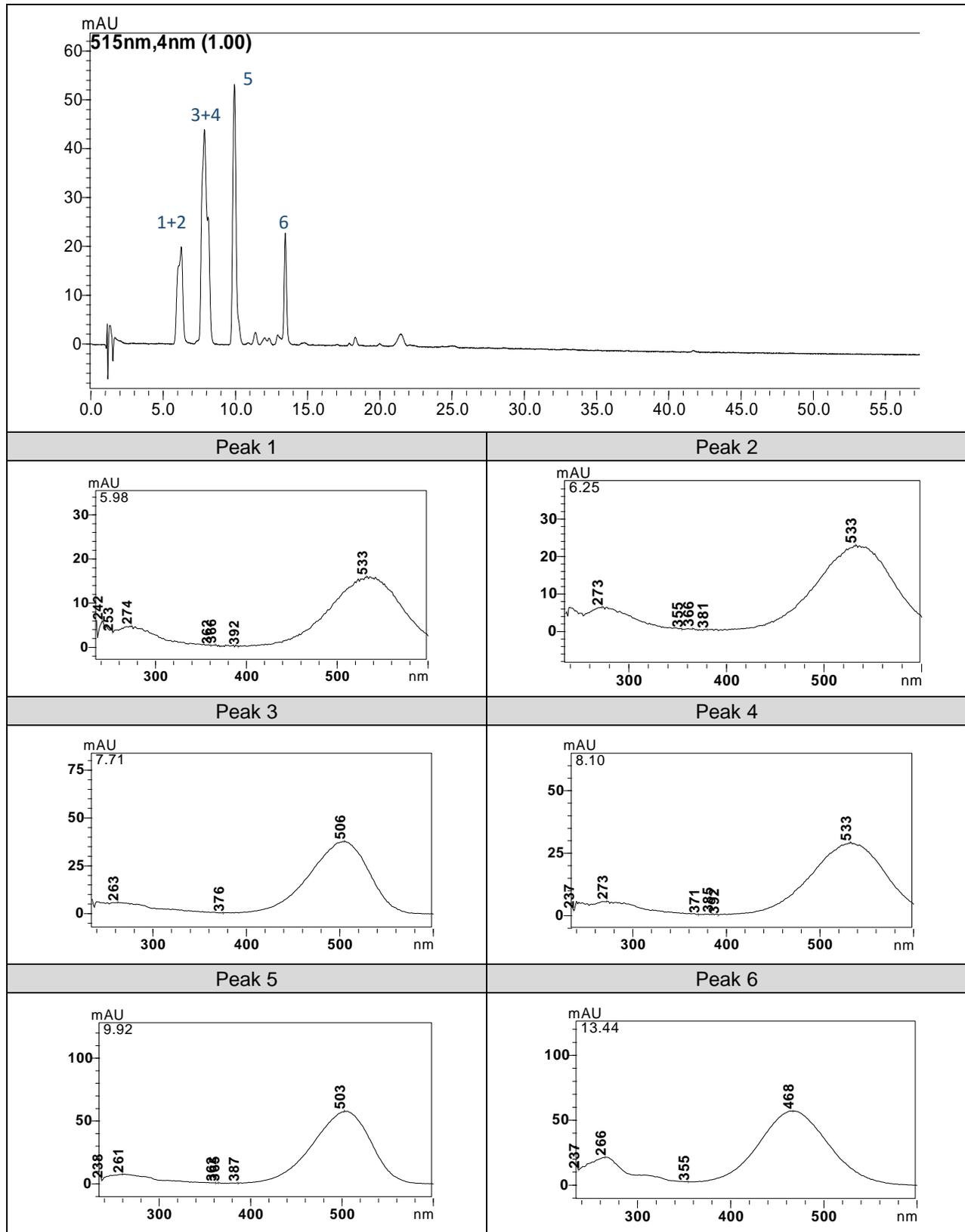


Abbildung 8: ANC Chromatogramm von Präparat C3 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7)

Die LC-MS Analyse ergab ein Molekulargewicht von 506.0 Da (m/z 507.0 $[M+H]^+$ im Positiv-Ionen Modus) für Peak 1, 2, 3 und 4. Dies würde auf acetylierte Delphinidinglucoside oder -galactoside schließen lassen. Aufgrund der Retentionszeit kann es sich jedoch nicht um diese Verbindungen handeln. Acetylierte Delphinidinglucoside / -galactoside würden im verwendeten System erheblich später eluieren (Wu et al., 2005)

Für Peak 5 konnte ein Molekulargewicht von 520.0 Da analysiert werden (m/z 521.0 $[M+H]^+$ im Positiv-Ionen Modus). Ein acetyliertes Petuninglucosid / -galactosid weist dasselbe Molekulargewicht auf. Jedoch würde dieses ebenfalls erheblich später eluieren (Wu et al., 2005). Daher ist das Vorliegen dieses Anthocyans für die auszuschließen.

Peak 6 ergab ein Molekulargewicht von 462.0 Da (m/z 463.0 $[M+H]^+$ im Positiv-Ionen Modus). Sowohl Peonidinglykoside als auch ein Malvidin-Pentosid mit demselben Molekulargewicht können aufgrund der Retentionszeiten ausgeschlossen werden (Wu et al., 2005).

Um mehr Informationen über diese Verbindungen zu erhalten, wäre eine weiterführende Strukturaufklärung notwendig. Jedoch ließ dies der zeitliche Rahmen der Diplomarbeit nicht zu.

Man kann davon ausgehen, dass Präparat C3 kein Cranberry-Extrakt enthält oder einen Cranberry-Auszug in einer mit diesem System nicht detektierbaren Menge enthält.

Interessanterweise stimmte dieser Fingerprint genau mit dem eines Präparates überein, das wegen des deklarierten Zusatzes von Rote Bete Saftpulver und Carotin nicht in die Auswertung aufgenommen worden war (siehe Anhang).

Präparat C4 (Abbildung 9, Seite 15) beinhaltet die sechs charakteristischen Anthocyane der Cranberries. Jedoch trat ein weiterer Peak mit einer R_t von 13.6 Minuten auf. Das UV/Vis – Spektrum deutete auf ein Anthocyan hin (Abbildung 10, Seite 15).

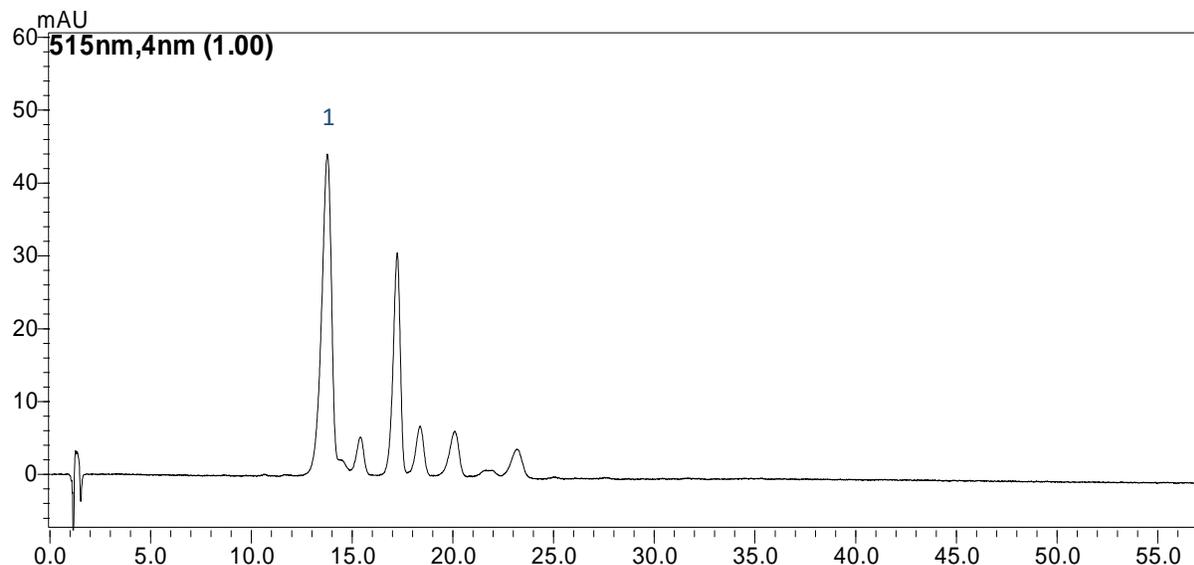


Abbildung 9: ANC - Chromatogramm von Präparat C4 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7)

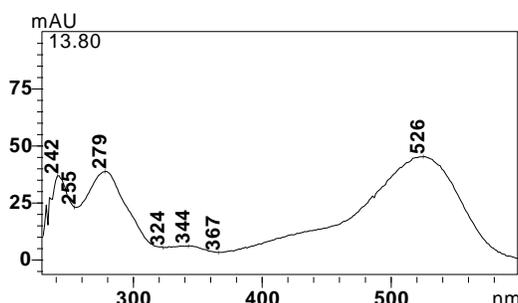


Abbildung 10: UV/Vis - Spektrum von Peak 1 aus Präparat C4

Die LC-MS Analyse ergab ein Molekulargewicht von 595.9 Da (m/z 596.9 $[M+H]^+$ im Positiv-Ionen Modus) und ein Fragment mit m/z 303.0 welches auf das Molekulargewicht des Aglykons Delphinidin schließen lässt. Die Differenz zum Molekulargewicht deutete auf das Vorliegen des Delphinidin-diglykosides hin. Delphinidin-3-sambubiosid mit dem gleichen Molekulargewicht wurde in roter Johannisbeere beschrieben (Wu et al., 2004). Aufgrund der frühen Elution dieser Substanz könnte es sich um dieses Glykosid handeln. Eine Bestätigung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Da die Verbindung in diesem Produkt als Hauptkomponente vorliegt, kann man davon ausgehen, dass es sich um kein reines Cranberry - Präparat handelt und von einem Zusatz ausgegangen werden muss.

Im Chromatogramm von Präparat C5 (Abbildung 11) zeigten sich deutlich mehr Peaks als in allen anderen Präparaten. Neben Cyanidin-3-galactosid, -glucosid, -arabinsid und Peonidin-3-galactosid, -glucosid, -arabinsid deuteten die LC-MS Analyse und die UV/Vis-Spektren (Tabelle 6, Seite 16) auf fünf weitere Anthocyane hin.

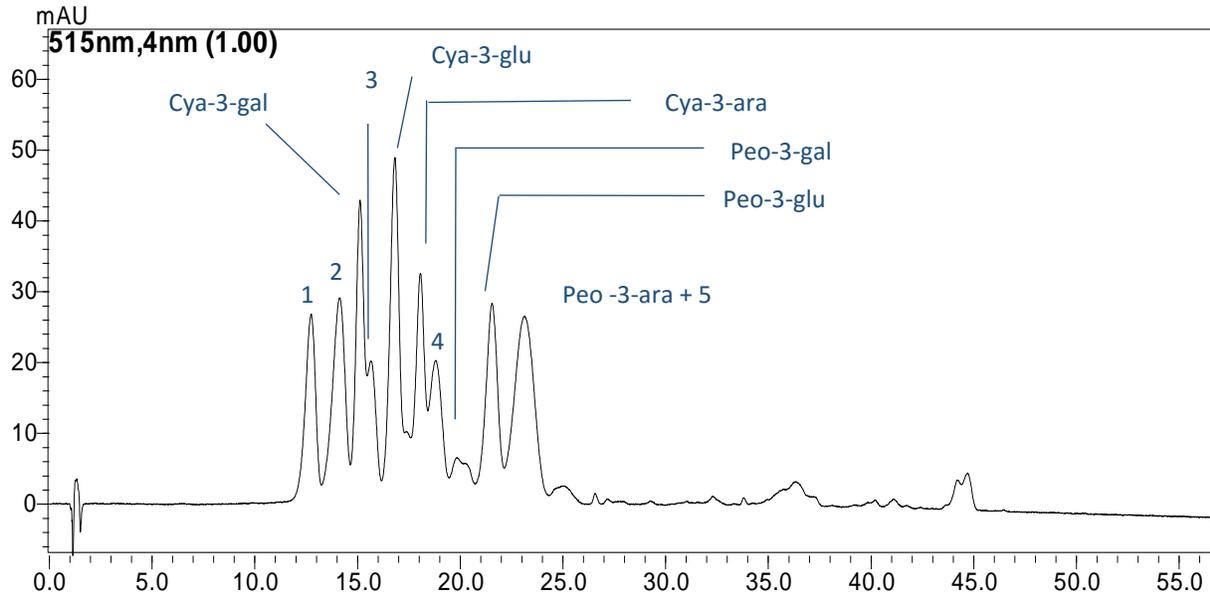
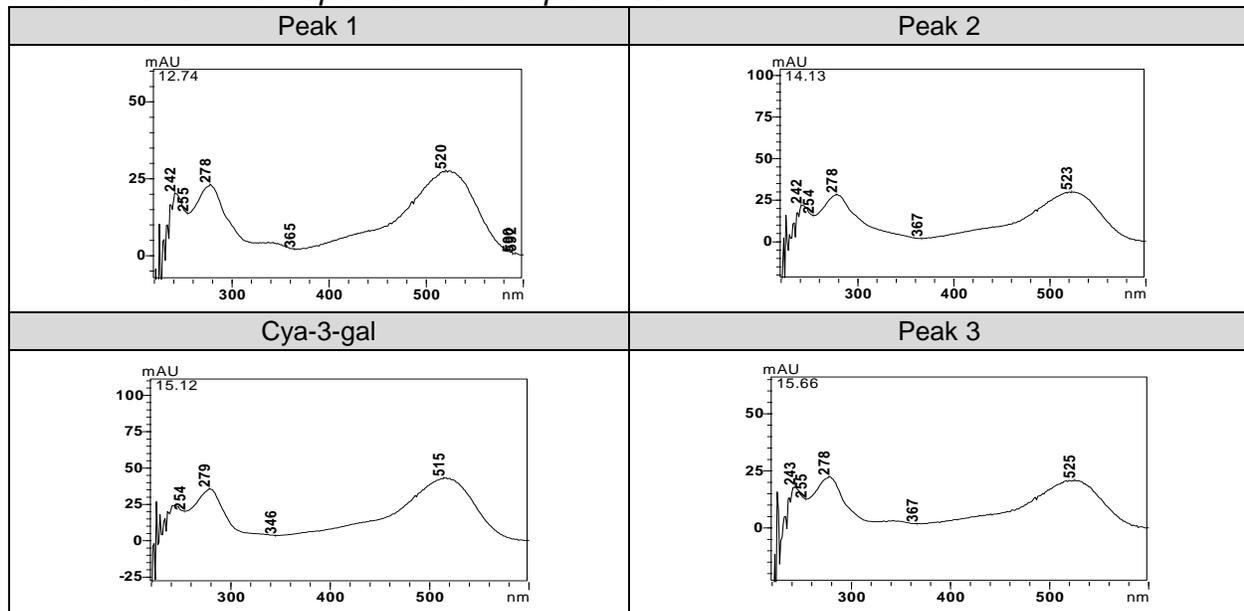
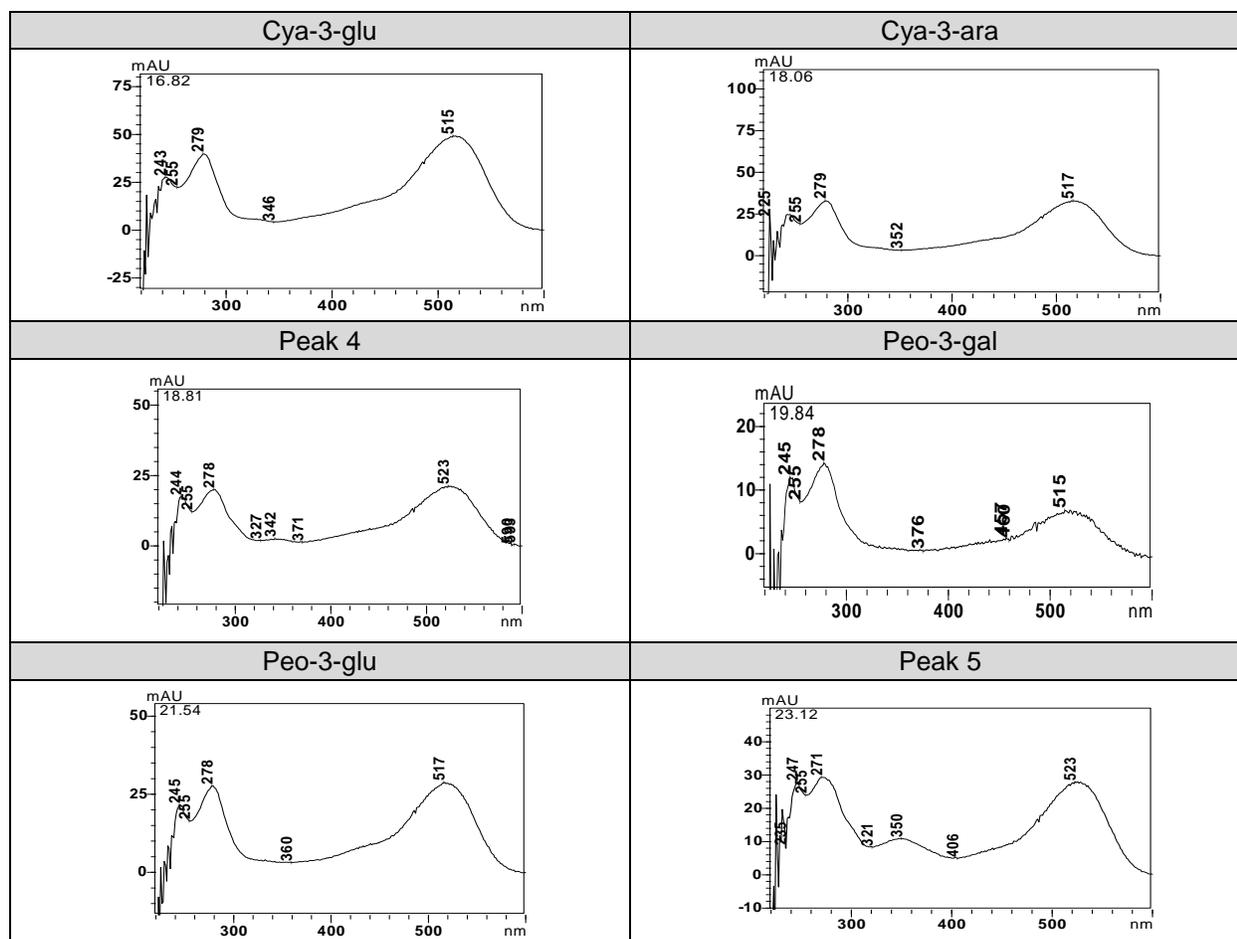


Abbildung 11: ANC - Chromatogramm von Präparat C5 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7)

Tabelle 5: UV/Vis - Spektren von Präparat C5





Folgende Molekulargewichte konnten analysiert werden:

Peak 1: 463.9 g/mol (m/z 464.9 $[M+H]^+$ im Positiv Ionenmodus); Peak 2: 463.9 g/mol (m/z 464.9 $[M+H]^+$ im Positiv Ionenmodus); Peak 3: 434.0 g/mol (m/z 435.0 $[M+H]^+$ im Positiv Ionenmodus); Peak 4: 477.9 g/mol (m/z 478.9 $[M+H]^+$ im Positiv Ionenmodus); Peak 5: 492.0 g/mol (m/z 493.0 $[M+H]^+$ im Positiv-Ionenmodus). Diese Molekulargewichte stimmen mit Delphinidin-3-galactosid, -glucosid, -arabinsid, Petunidin-3-hexosid, Malvidin-3-hexosid überein, welche in zahlreichen anderen Beeren und Früchten identifiziert worden waren (Wu et al., 2005; Lee, 2016)

Da in der Zusammensetzung des Präparats C6 auch ein Rotweineextrakt deklariert war und Delphinidin-, Petunidin- und Malvidinglykoside in roten Trauben beschrieben worden waren (Wu et al., 2005), bestätigten die Analysenergebnisse die Deklaration.

3.2 Proanthocyanidinmuster in Cranberry- und Preiselbeerpräparaten

Proanthocyanidine (PACs), auch bekannt als kondensierte Tannine, sind oligomere und polymere Verbindungen, welche die farblosen Vorstufen der Anthocyane darstellen (Krenn et al., 2007).

PACs vom „Typ A“ stellen den Hauptanteil in Cranberries dar (siehe Abbildung 2, Seite 2). Ihre Struktur wird für antiadhäsive Effekte an der Blasenschleimhaut verantwortlich gemacht (Prior et al., 2010).

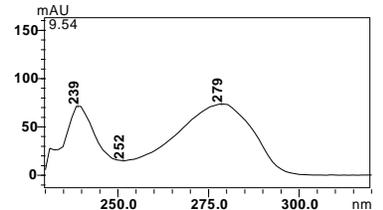
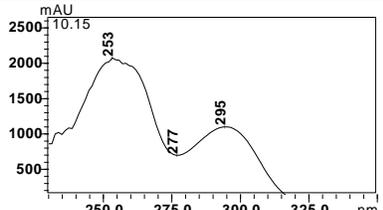
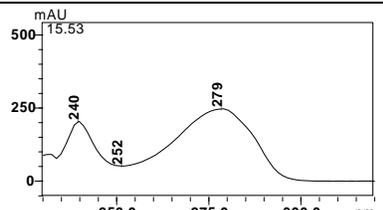
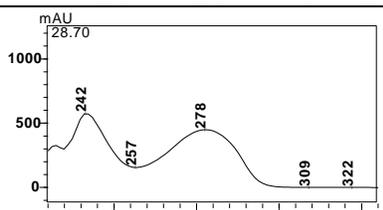
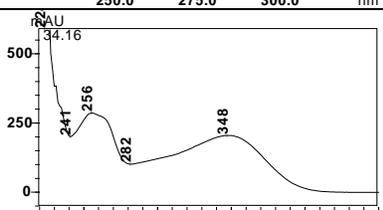
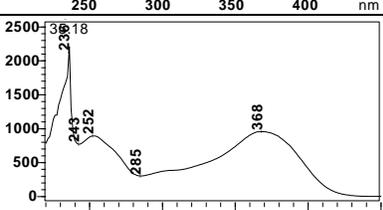
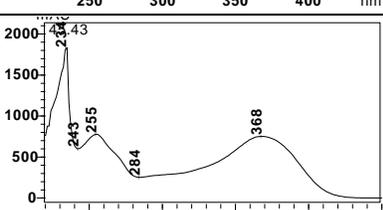
Daher werden Nahrungsergänzungsmittel, welche Cranberries beinhalten, immer mit einem positiven Effekt auf die Blase beworben.

Um Informationen über den Gehalt an Proanthocyanidinen in diesen Nahrungsergänzungsmitteln zu erhalten, wurden sie nach Extraktionsmethode B (Kap. 2.2.1, Seite 6) aufgearbeitet und analysiert.

Es konnten neben den Proanthocyanidinen auch noch andere phenolische Komponenten in den Untersuchungslösungen festgestellt werden.

Folgende Substanzen wurden durch den Vergleich mit Reinsubstanzen, UV - Spektren und/oder der LC-MS identifiziert (Tabelle 7, Seite 19).

Tabelle 6: Identifizierte Verbindungen nach Extraktionsmethode B

Peak	Rt	Verbindung	m/z Im Positiv-Ionen Modus [M+H] ⁺	UV-Spektrum
1	9.5	Catechin	291,0	
2	9.7	2,4 - Dihydroxybenzoesäure	*	
3	15.5	Epicatechin	291,0	
4	28.9	PAC A2	577,0	
5	34.1	Quercitrin	448,4	
6	35.3	Myricetin	319,0	
7	45.4	Quercetin	303,0	

*LC-MS Daten wurden nicht bestimmt

Die Chromatogramme der untersuchten Präparate wiesen alle ein sehr ähnliches Peakmuster auf. Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm von Präparat C1 mit den identifizierten Peaks 1-7 (Tabelle 7, Seite 19).

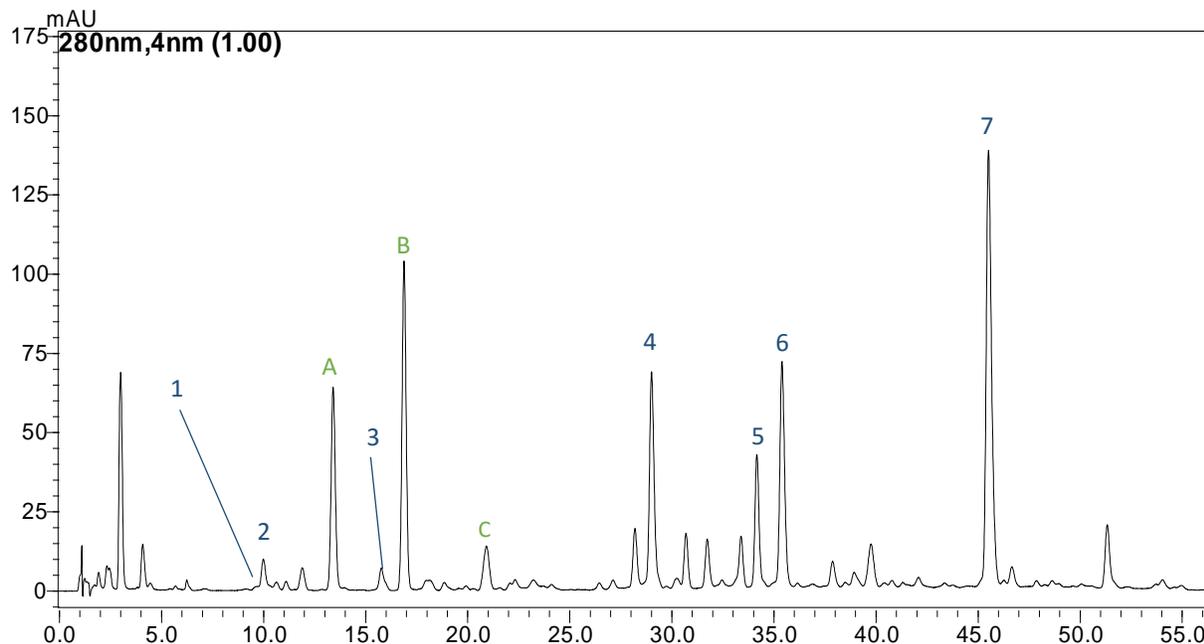


Abbildung 12: PAC-Chromatogramm von Präparat C1 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7)

Substanz A und B wurden in allen Nahrungsergänzungsmitteln detektiert. In den meisten Präparaten stellten die Verbindungen Hauptkomponenten dar.

Für Peak A mit einer Retentionszeit von 13,4 Minuten ergab die LC - MS Analyse ein m/z von 155,0 $[M+H]^+$ im Positiv-Ionenmodus. Aufgrund des Molekulargewichts wurde auf das Vorliegen einer Dihydroxybenzoesäure geschlossen.

Dihydroxybenzoesäuren haben ein Molekulargewicht von 154,12 g/mol und wurden bereits in Cranberries beschrieben (Pappas et al., 2009).

Aufgrund dieser Tatsache und dem Ergebnis der LC-MS Analyse wurden die folgenden vier Säuren chromatographiert: 2,4-, 2,5-, 3,4- und 3,5-Dihydroxybenzoesäure. Die Substanzen hatten alle Retentionszeiten unter 10 min und ihre UV-Spektren stimmten nicht mit dem UV-Spektrum von Peak A überein (Abbildung 13, Seite 21).

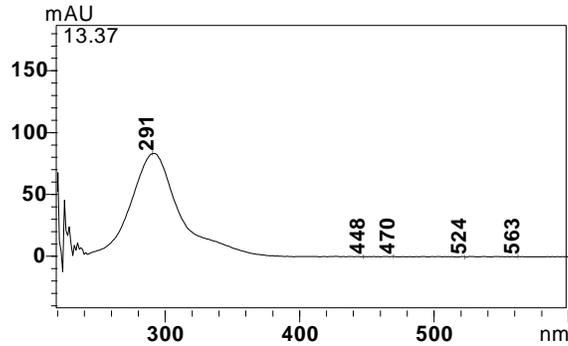


Abbildung 13: UV-Spektrum von Peak A

Für die Identifizierung von Peak A als auch von Peak B mit einer Retentionszeit von 16.8 Minuten sind weitere Analysen notwendig, welche im zeitlichen Rahmen dieser Diplomarbeit nicht möglich waren.

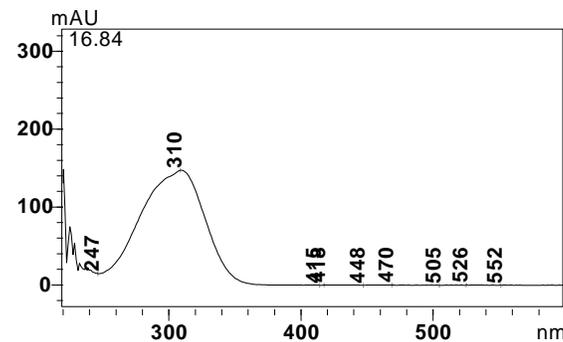


Abbildung 14: UV-Spektrum von Peak B

Peak C mit einer Retentionszeit von 20.7 Minuten wurde in allen Präparaten als Nebenkomponente detektiert. Sowohl das UV-Spektrum als auch die LC-MS Analyse (m/z 577.0 $[M+H]^+$ im Positiv-Ionenmodus) deuteten auf ein Proanthocyanidin hin.

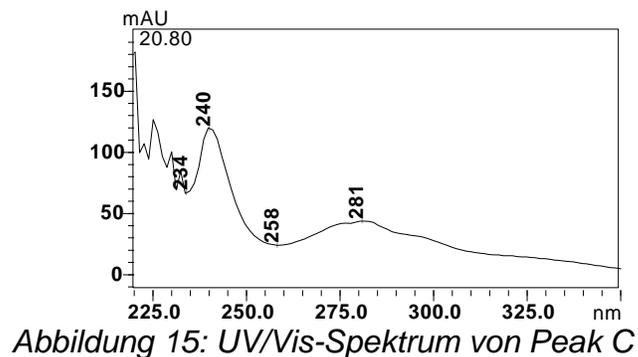


Abbildung 15: UV/Vis-Spektrum von Peak C

Procyanidin B2 mit der Retentionszeit bei Minute 13.6 konnte in keinem Präparat detektiert werden. Das für PACs, Catechin und Epicatechin typische UV-Spektrum, wurde zur Identifizierung solcher Verbindungen in den Extrakten herangezogen. (Abbildung 16).

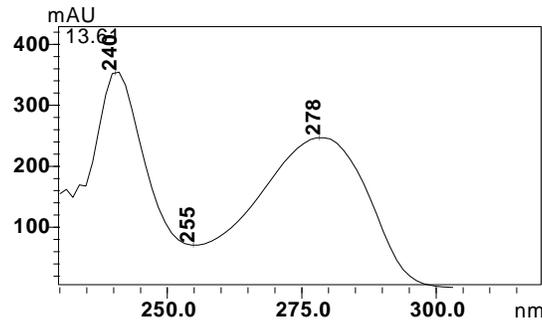


Abbildung 16: UV-Spektrum von Procyanidin B2

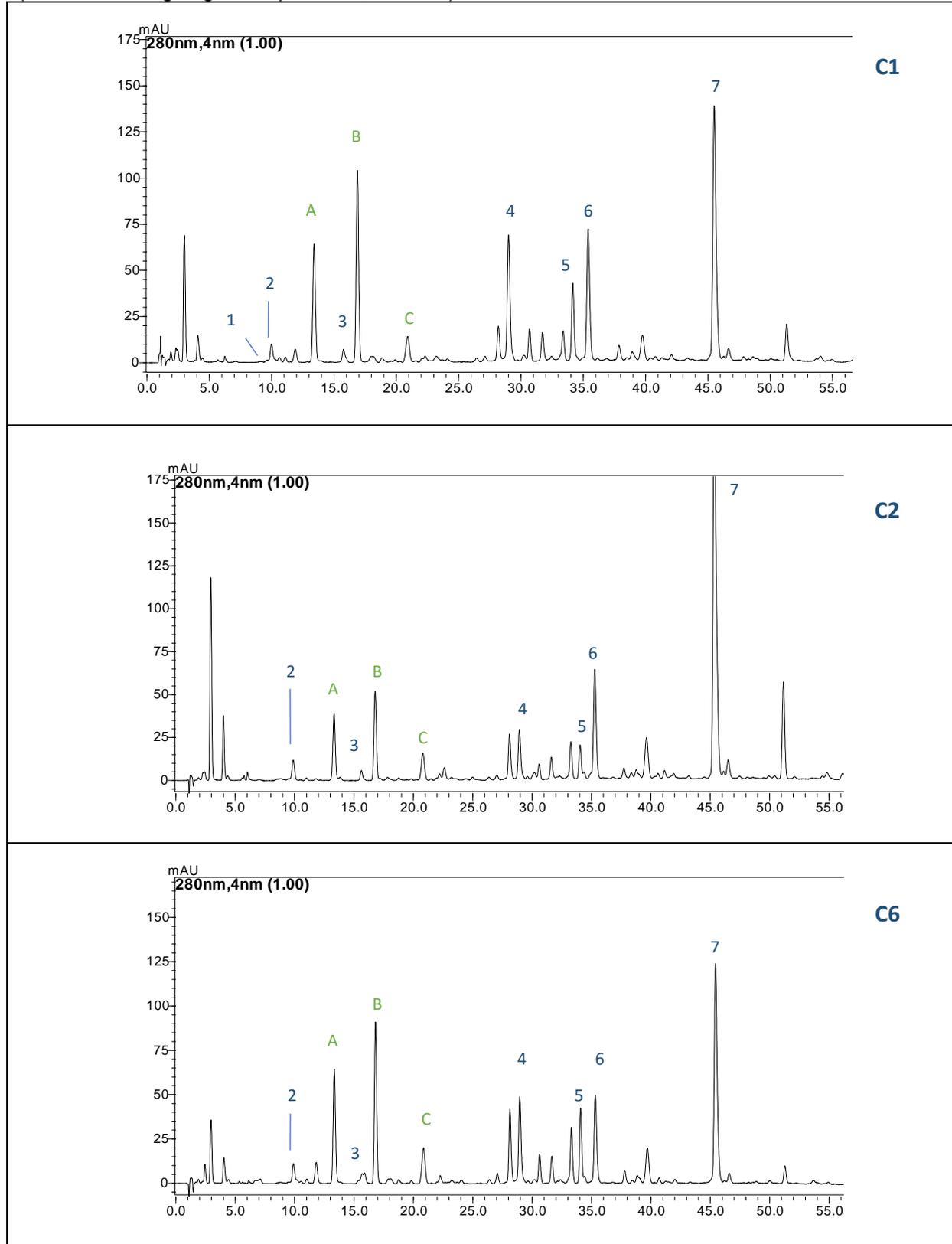
Weitere Verbindungen mit den Retentionszeiten von 22.0, 22.6, 32.4, 36.6 und 42.7 Minuten wiesen das charakteristische UV-Spektrum der PACs auf. Diese Verbindungen wurden jedoch nur in einzelnen Präparaten detektiert und lagen nur in Spuren vor.

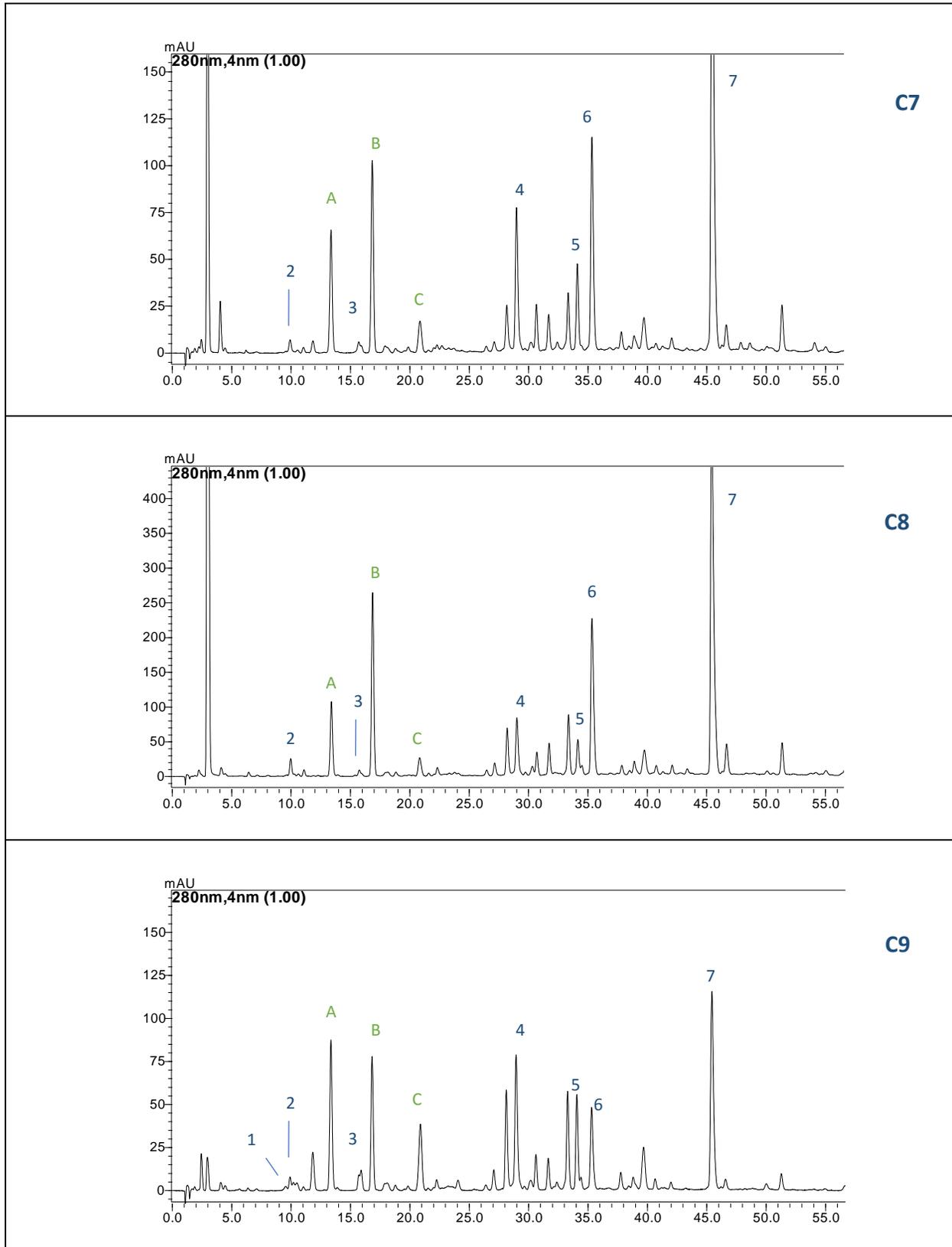
Catechin (=Peak 1) und Epicatechin (=Peak 3) waren immer Nebenkomponenten und konnten nicht in allen Präparaten nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Konzentration kam es auch zu Überlagerungen durch andere Substanzen.

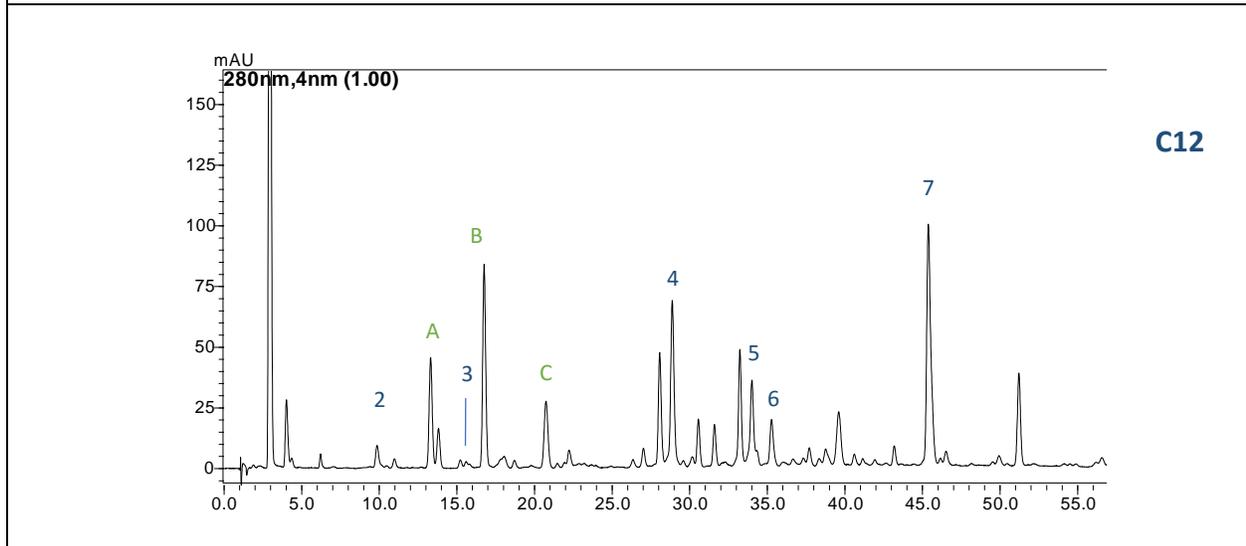
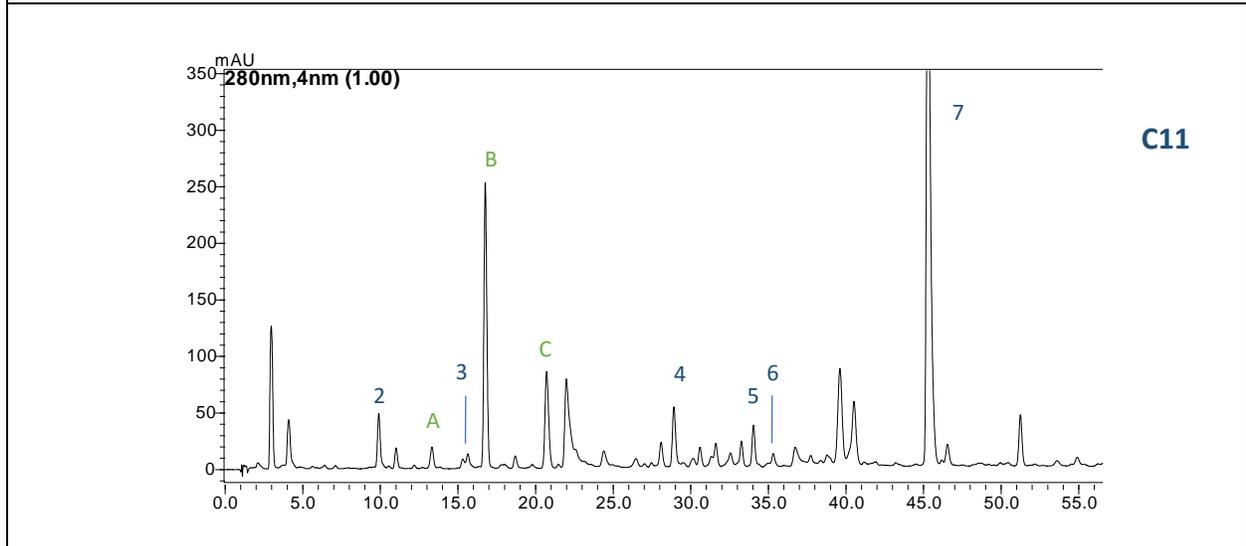
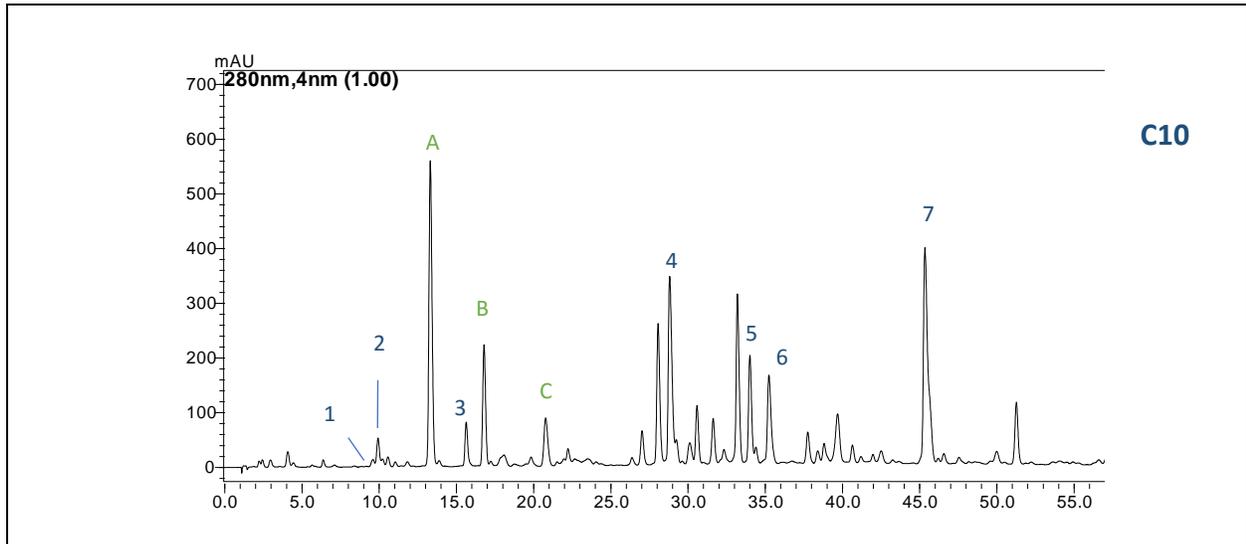
Quercetin (=Peak 7) lag in 70 % der Präparate als Hauptkomponente vor.

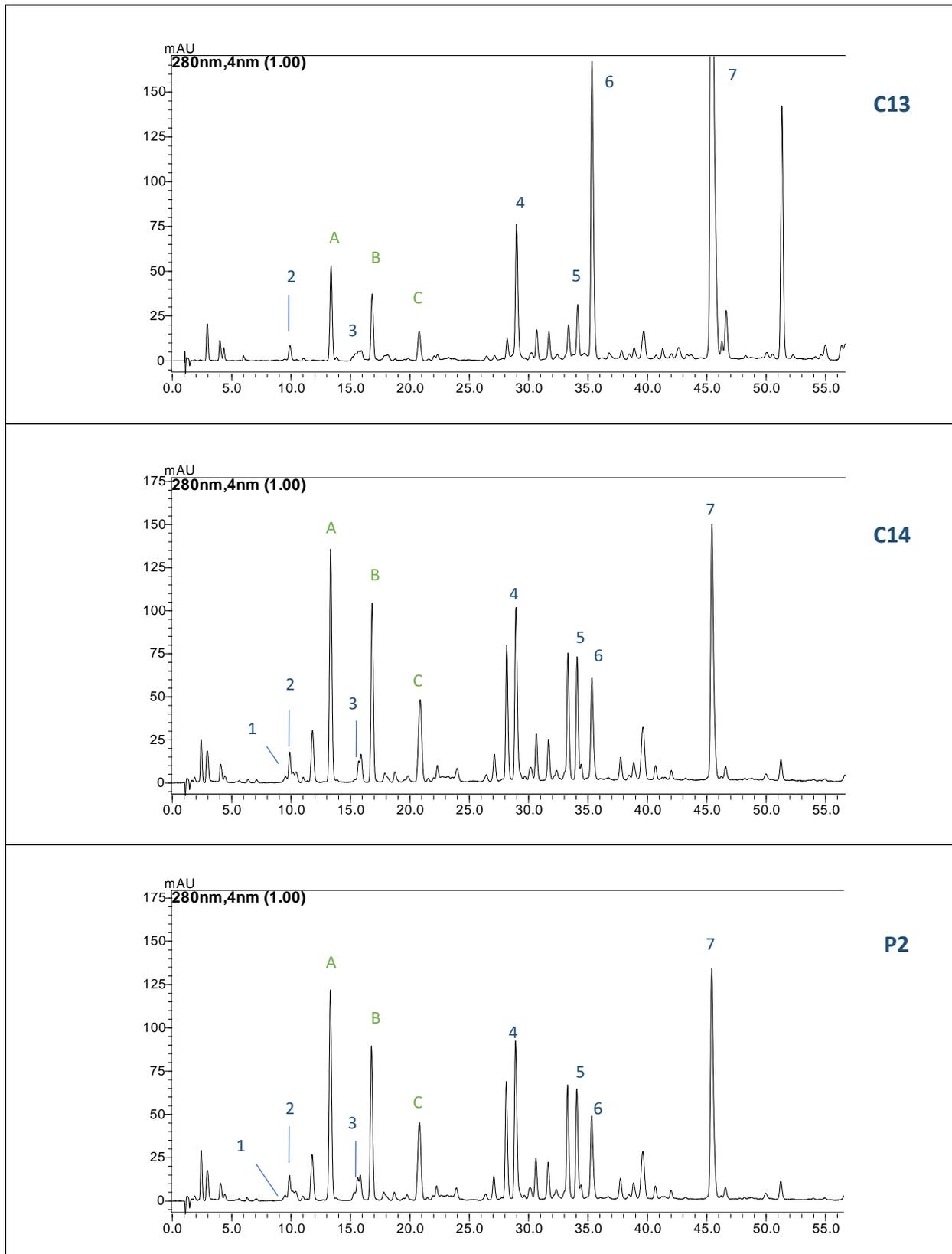
In Tabelle 11 (Seiten 23-26) sind die Chromatogramme der Präparate C1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 und P2 zusammengefasst, wobei übereinstimmende Fingerprints mit quantitativen Unterschieden erkennbar sind.

Tabelle 7: Chromatogramme der Präparate C1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 und P2 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7)









Die Präparate C14 und P2, die von derselben Firma stammten, wiesen wie schon bei den Anthocyanen (Abbildung 6, Seite 11) ein identes Peakmuster auf. C14 ist als Cranberrypräparat deklariert, hingegen wird P2 als Preiselbeerpräparat gekennzeichnet. Es ist anzunehmen, dass derselbe Cranberry-Extrakt für beide Nahrungsergänzungsmittel verwendet wird. Zur Bestätigung dieser Resultate sollten weitere Chargen der beiden Produkte getestet werden.

Das Preiselbeerpräparat P1 wies ebenfalls ein ähnliches Peakmuster wie die Cranberrypräparate auf (Abbildung 17). Catechin (=Peak 1) war in deutlich höherer Konzentration enthalten und Quercitrin (=Peak 5) wurde als Hauptkomponente detektiert. 2,4 Dihydroxybenzoesäure und Myricetin fehlten im Fingerprint des Preiselbeerpräparates.

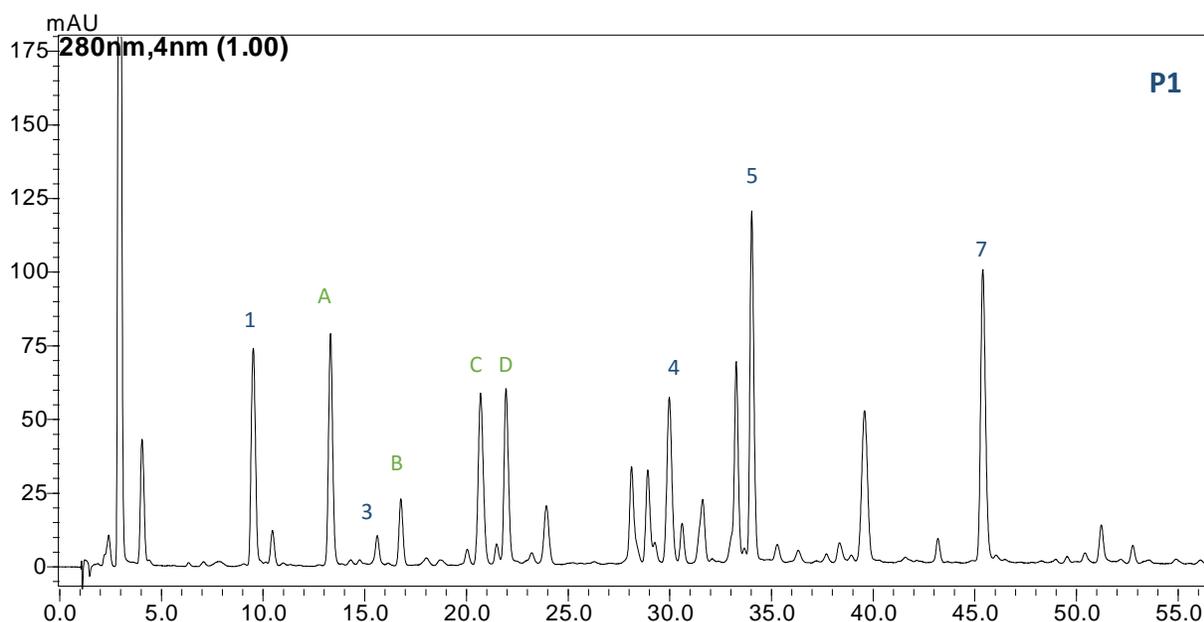


Abbildung 17: Chromatogramm von Präparat P1 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, S. 7)

Komponente C und D, welche nur in Spuren in den Cranberry-Präparaten detektiert wurden, konnten in diesem Präparat in wesentlich höheren Konzentration nachgewiesen werden. Eine weitere Verbindung mit geringer Konzentration bei der Retentionszeit von 20.0 Minuten zeigte dasselbe UV-Spektrum wie die Proanthocyanidine.

Die Chromatogramme der Präparate C3, C4 und C5 unterschieden sich von jenen aller anderen Präparate.

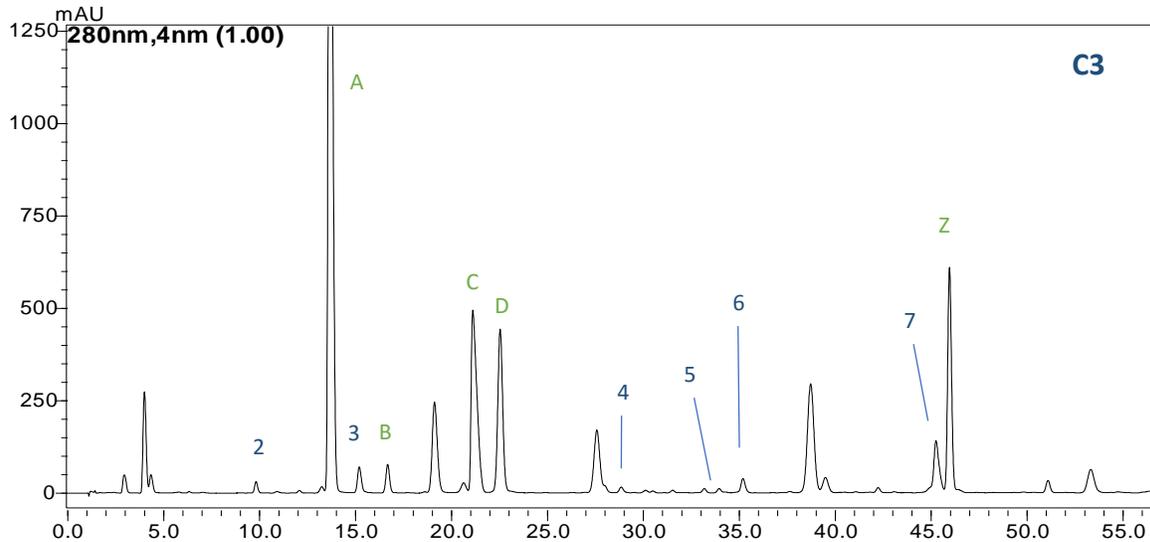


Abbildung 18: Chromatogramm von Präparat C3 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, S.7)

In Präparat C3 (Abbildung 18) wurde Catechin nicht identifiziert, außerdem waren die Konzentrationen von PAC A2, Quercitrin, Myricetin und Quercetin (=Peaks 4, 5, 6 und 7) im Vergleich zu den anderen Präparaten erheblich geringer. Peak A mit einer Rt von 13.7 Minuten wurde als überwiegende Hauptkomponente nachgewiesen. Wie schon im Preiselbeerpräparat stellten die Verbindungen C und D Hauptkomponenten des Extrakts dar. Die Substanz Z mit der Retentionszeit bei 46.1 wies ebenfalls eine auffallend hohe Konzentration auf. Für die Identifizierung dieser Substanzen sind weitere Untersuchungen notwendig, welche im zeitlichen Rahmen dieser Diplomarbeit nicht mehr möglich waren.

Bei diesem Nahrungsergänzungsmittel handelte es sich um ein Granulat mit hohem Anteil an Füllstoffen und zusätzlichem Süßungsmittel und Aroma. Es besteht daher die Annahme, dass es sich bei den Verbindungen eventuell um Zusätze handelt, welche nicht vom deklarierten Cranberry-Extrakt stammen.

In Präparat C4 (Abbildung 21) wurden neben den Substanzen 2,4-Dihydroxybenzoesäure, Epicatechin, PAC A2, Quercitrin, Myricetin und Quercetin (=Peak 2, 3, 4, 5, 6 und 7) auch die Verbindungen A und B nachgewiesen.

Zusätzlich konnten die Komponenten C und D, welche teilweise auch in den anderen Präparaten vorlagen, analysiert werden. Außerdem wurden fünf weitere Verbindungen bei Retentionszeiten von 22.6, 22.9, 28.5, 30.1 und 32.4 Minuten detektiert, welche das UV -Spektrum von PACs aufwiesen, wobei die Struktur nicht aufgeklärt wurde.

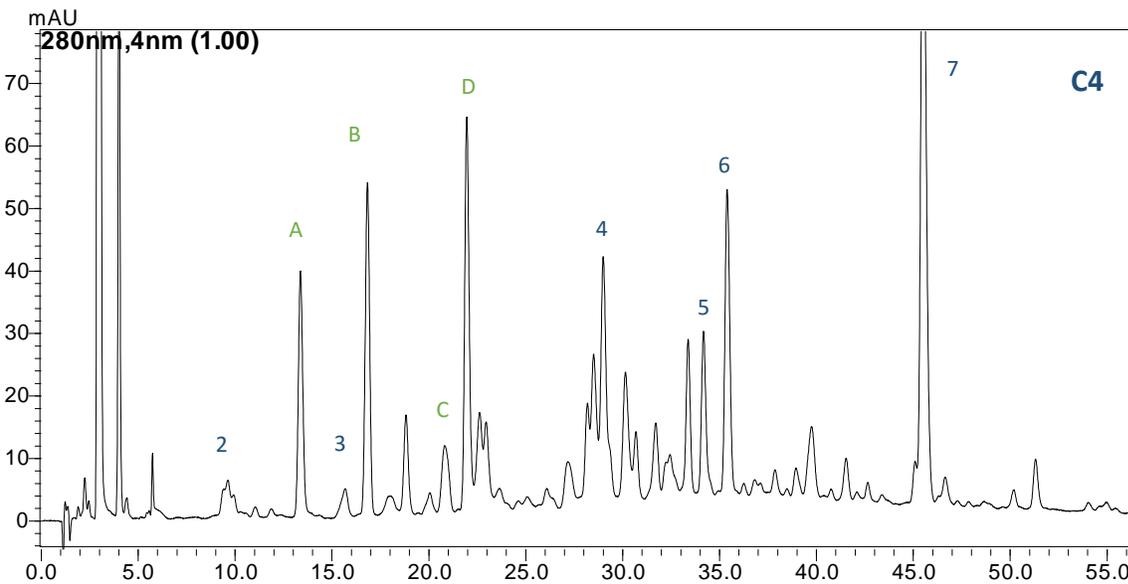


Abbildung 19: Chromatogramm von Präparat C4 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7)

In diesem Präparat fiel bereits bei der Analyse der ANC ein zusätzliches Anthocyan auf. Es besteht daher der Verdacht, dass es sich bei diesem Nahrungsergänzungsmittel um kein reines Cranberrypräparat handelt. Das Unternehmen kennzeichnet jedoch den Inhalt der Kapseln als eingetragenes Markenzeichen „Cranberrypulver AV 36®“ und gibt keinen Hinweis auf spezielle Zusätze an.

In Präparat C5 (Abbildung 22) war ein besonders hoher Anteil an Catechin (= Peak 1) enthalten und Epicatechin, Quercitrin, Myricetin und Quercetin (= Peak 3, 5, 6 und 7) konnten identifiziert werden. Substanz A wurde als Hauptkomponente ermittelt. Präparat C5 war das einzige Nahrungsergänzungsmittel, in dem kein PAC A2 nachgewiesen werden konnte. Es enthielt jedoch eine andere Verbindung (= Peak X) in niedriger Konzentration mit dem gleichen UV -Spektrum, die jedoch deutlich früher als PAC A2 eluierte.

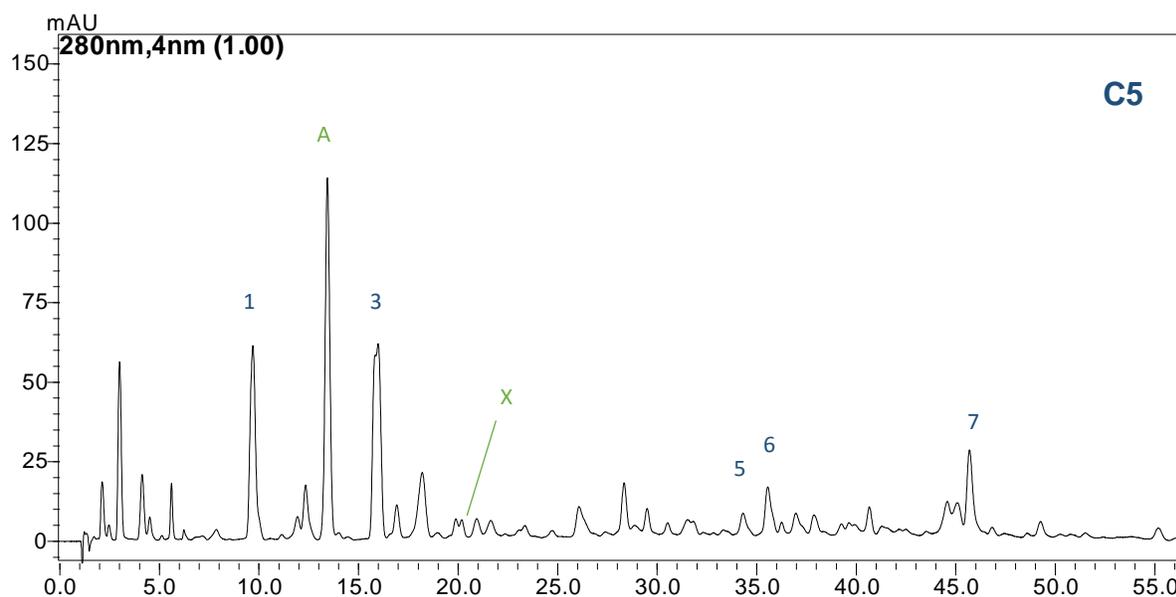


Abbildung 20: Chromatogramm von Präparat C5 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, S. 7)

Für dieses Nahrungsergänzungsmittel war bereits bei der Analyse der ANC ein hoher Anteil an Anthocyanen nachgewiesen worden, welcher vermutlich auf den enthaltenen Rotweinextrakt zurückzuführen war (Kap. 3.1, Seite 16). Es besteht die Vermutung, dass der Rotweinextrakt auch der Grund für den großen Unterschied im Fingerprint der PAC-Analyse dieses Präparates zu den anderen Nahrungsergänzungsmitteln ist. Die Deklaration gibt allerdings keine Hinweise auf das Verhältnis vom Cranberrypulver zum Rotweinextrakt im Präparat.

Zusammenfassend konnte in allen Präparaten zumindest ein Proanthocyanidin detektiert werden, wobei PAC A2 das wichtigste darstellte. Die meisten Verbindungen, welche das typische UV-Spektrum der PACs aufwiesen, wurden in Präparat C4

analysiert. Die Extraktion der PACs zeigte, dass sich der Fingerprint in diesen Analysen grundsätzlich nicht zur Unterscheidung zwischen Cranberry- und Preiselbeerpräparaten eignet. Hierfür erwies sich die Extraktion der ANC als bessere Methode.

Die Quantifizierung sowohl der ANC als auch der PAC sollte für einen besseren Vergleich zwischen den Präparaten dienen.

3.3 Methodenvalidierung

Für die Quantifizierung der Analyten wurde die Kalibrierung mittels externen Standards verwendet. Außerdem wurde die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft und die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen festgestellt.

3.3.1 Kalibrierung

Für die Kalibrierung wurde die Mehrpunktkalibration mittels linearer Regression gewählt.

Es standen die Referenzsubstanzen Cyanidin-3-galactosidchlorid und Peonidin-3-glucosidchlorid zur Verfügung. Catechin, Epicatechin, PAC A2, Quercitrin, Myricetin und Quercetin wurden durch Kalibrierung mit der authentischen Substanz quantifiziert.

Für die präzise Quantifizierung wurde die Reinheit aller Referenzsubstanzen mittels HPLC bestimmt und in die Berechnung eingesetzt (Tabelle 13).

Tabelle 8: Reinheit der Referenzsubstanzen

Substanz	Reinheit
Cya-3-gal	97,8 %
Peo-3-glu	93,3 %
PAC A2	96,3 %
Quercitrin Dihydrat	80,8 %
Myricetin	86,4 %
Quercetin	95,8 %
Catechin	98,8 %
Epicatechin	98,4 %

Es wurden Eichlösungen mit sechs unterschiedlichen Konzentrationen der Referenzsubstanzen hergestellt, vermessen und zur Erstellung der Kalibrierfunktion verwendet. Von jeder Standardlösung wurden zweimal 5 µl analysiert.

Herstellung der Eichlösungen:

Cyanidin-3-galactosidchlorid:

Stammlösung: 1.17 mg / 500µl DMSO

	Verdünnungsschritt	Verwendete µl	Konzentration (mg/ml)
Cya 1	1 T Stammlsg + 14 T MeOH	50 + 700	0.1560
Cya 2	1 T Stammlsg + 29 T MeOH	50 + 1450	0.0780
Cya 3	1 T Stammlsg + 69 T MeOH	50 + 3450	0.0334
Cya 4	1 T (Cya 3) + 1 T MeOH	1000 + 1000	0.0167
Cya 5	1 T (Cya 4) + 2 T MeOH	500 + 500	0.0055
Cya 6	1 T (Cya 5) + 3 T MeOH	500 + 1500	0.00139

Peonidin-3-glucosidchlorid:

Stammlösung: 0.65 mg / 500 µl DMSO

	Verdünnungsschritt	Verwendete µl	Konzentration (mg/ml)
Peo 1	1 T Stammlsg + 24 T MeOH	50 + 1200	0.0520
Peo 2	1 T Stammlsg + 49 T MeOH	50 + 2450	0.0260
Peo 3	1 T Stammlsg + 99 T MeOH	50 + 4950	0.0130
Peo 4	1 T (Cya 3) + 2 T MeOH	500 + 1000	0.0040
Peo 5	1 T (Cya 4) + 2 T MeOH	500 + 1000	0.0014
Peo 6	1 T (Cya 5) + 4 T MeOH	500 + 2000	0.00035

Um eine genauere Quantifizierung zu gewährleisten, wurden die Kalibriergeraden von Cya-3-gal und Peo-3-glu in zwei Konzentrationsbereiche bestimmt, da sich die Konzentrationen in den verschiedenen Präparaten deutlich unterschieden (Abbildung 21 und 22, Seiten 35-36).

PAC A2:

Stammlösung: 1.35 mg / 500 µl DMSO

	Verdünnungsschritt	Verwendete µl	Konzentration (mg/ml)
PAC 1	1 T Stammlsg + 2 T MeOH	50 + 100	0.9000
PAC 2	1 T Stammlsg + 6 T MeOH	50 + 300	0.3860
PAC 3	1 T Stammlsg + 14 T MeOH	50 + 700	0.1800
PAC 4	1 T Stammlsg + 24 T MeOH	50 + 1200	0.1080
PAC 5	1 T (PAC 4) + 1 T MeOH	400 + 400	0.0540
PAC 6	1 T (PAC 5) + 4 T MeOH	100 + 400	0.0108
PAC 7	1 T (PAC 6) + 3 T MeOH	100 + 300	0.0027

Quercitrin:

Stammlösung: 3.15 mg / 2.00 ml DMSO

	Verdünnungsschritt	Verwendete µl	Konzentration (mg/ml)
Qur 1	1 T Stammlsg + 4 T MeOH	50 + 200	0.3150
Qur 2	1 T Stammlsg + 9 T MeOH	50 + 450	0.1575
Qur 3	1 T Stammlsg + 19 T MeOH	50 + 950	0.0788
Qur 4	1 T Stammlsg + 29 T MeOH	50 + 1450	0.0525
Qur 5	1 T (Qur 4) + 1 T MeOH	400 + 400	0.0263
Qur 6	1 T (Qur 5) + 1 T MeOH	400 + 400	0.0131

Myricetin:

Stammlösung: 3.13 mg / 2.00 ml DMSO

	Verdünnungsschritt	Verwendete µl	Konzentration (mg/ml)
Myr 1	1 T Stammlsg + 2 T MeOH	50 + 100	0.5216
Myr 2	1 T Stammlsg + 4 T MeOH	50 + 200	0.3130
Myr 3	1 T Stammlsg + 9 T MeOH	50 + 450	0.1565
Myr 4	1 T Stammlsg + 19 T MeOH	50 + 950	0.0783
Myr 5	1 T (Myr 4) + 1 T MeOH	200 + 200	0.0391
Myr 6	1 T (Myr 5) + 9 T MeOH	100 + 900	0.0039

Quercetin:

Stammlösung: 3.31 mg / 2.00 ml DMSO

	Verdünnungsschritt	Verwendete μl	Konzentration (mg/ml)
Que 1	1 T Stammlsg + 1 T MeOH	100 + 100	0.5216
Que 2	1 T Stammlsg + 2 T MeOH	100 + 200	0.3130
Que 3	1 T Stammlsg + 4 T MeOH	100 + 400	0.1565
Que 4	1 T Stammlsg + 9 T MeOH	100 + 900	0.0783
Que 5	1 T (Que 4) + 2 T MeOH	100 + 200	0.0391
Que 6	1 T (Que 5) + 6 T MeOH	100 + 600	0.0039

Catechin:

Stammlösung: 1.22 mg / 500 μl DMSO

	Verdünnungsschritt	Verwendete μl	Konzentration (mg/ml)
Cat 1	1 T Stammlsg + 14 T MeOH	50 + 700	0.1626
Cat 2	1 T Stammlsg + 29 T MeOH	50 + 1450	0.0813
Cat 3	1 T Stammlsg + 49 T MeOH	50 + 2450	0.0488
Cat 4	1 T (Cat 3) + 2 T MeOH	500 + 1000	0.0163
Cat 5	1 T (Cat 4) + 1 T MeOH	500 + 500	0.0081
Cat 6	1 T (Cat 5) + 9 T MeOH	100 + 900	0.0008

Epicatechin:

Stammlösung: 1.52 mg / 500 μl DMSO

	Verdünnungsschritt	Verwendete μl	Konzentration (mg/ml)
Epi 1	1 T Stammlsg + 14 T MeOH	20 + 280	0.2027
Epi 2	1 T Stammlsg + 29 T MeOH	20 + 580	0.1013
Epi 3	1 T Stammlsg + 49 T MeOH	20 + 980	0.0608
Epi 4	1 T Stammlsg + 69 T MeOH	20 + 1380	0.0434
Epi 5	1 T (Epi 4) + 1 T MeOH	400 + 400	0.0217
Epi 6	1 T (Epi 5) + 1 T MeOH	400 + 400	0.0109
Epi 7	1 T (Epi 6) + 1 T MeOH	200 + 200	0.0054

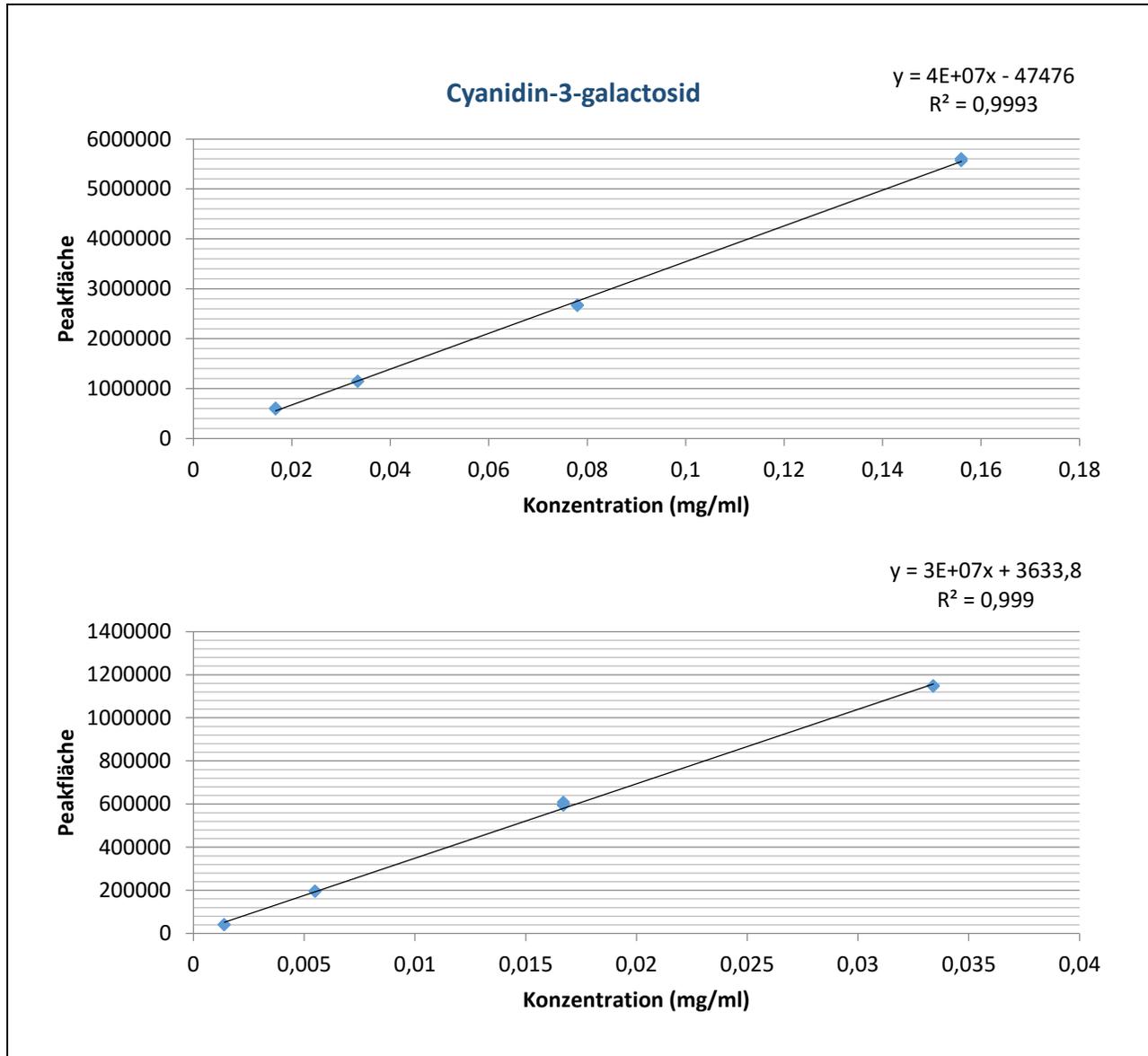


Abbildung 21: Kalibriergeraden für Cyanidin-3-galactosid

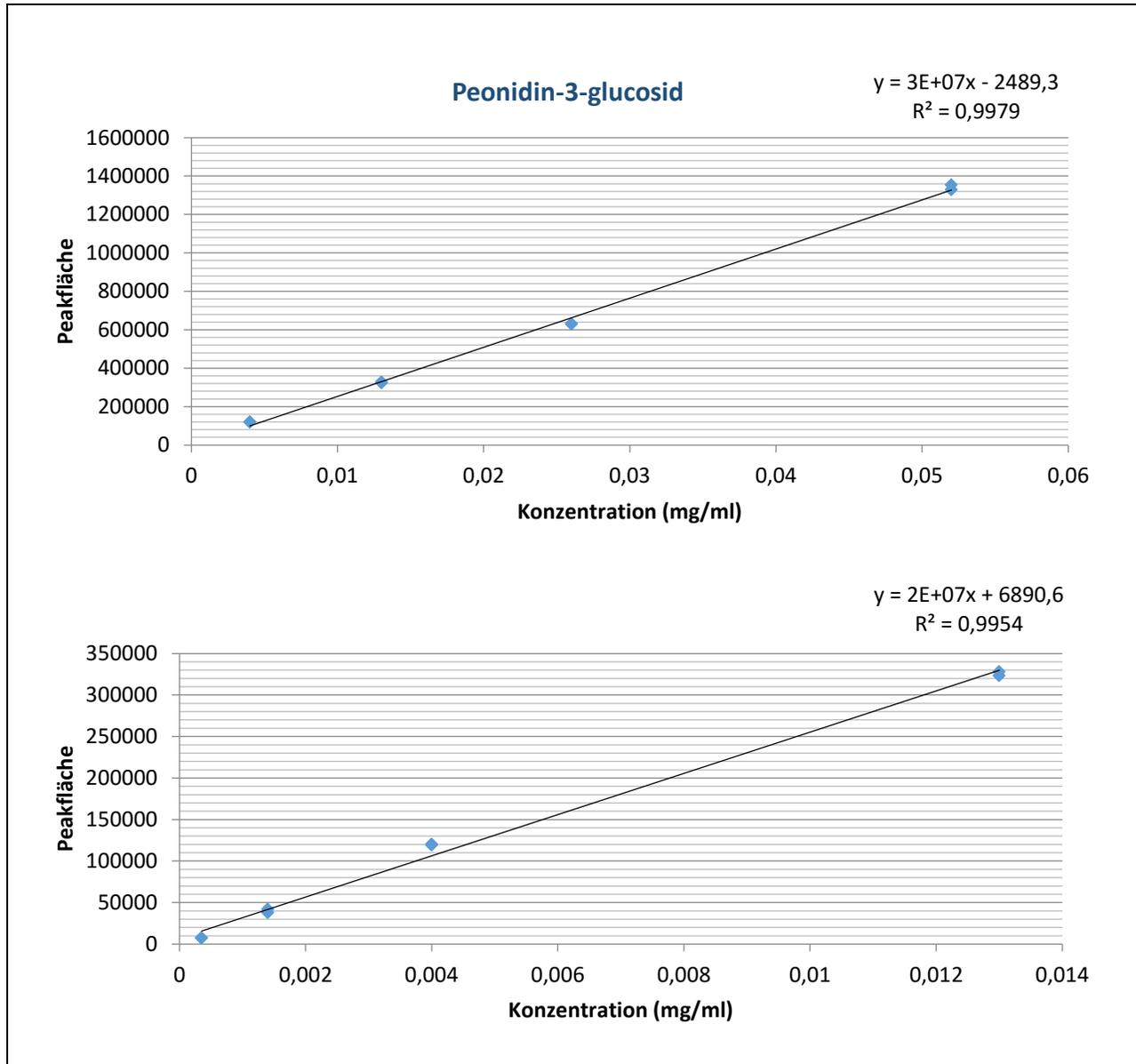


Abbildung 22: Kalibriergeraden für Peonidin-3-glucosid

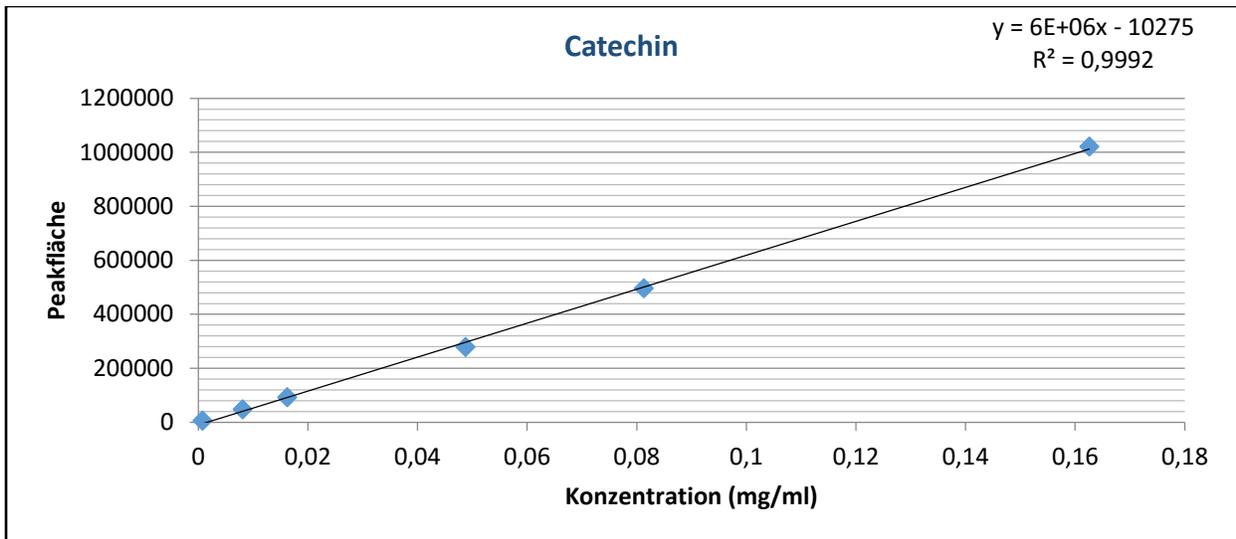


Abbildung 23: Kalibriergerade für Catechin

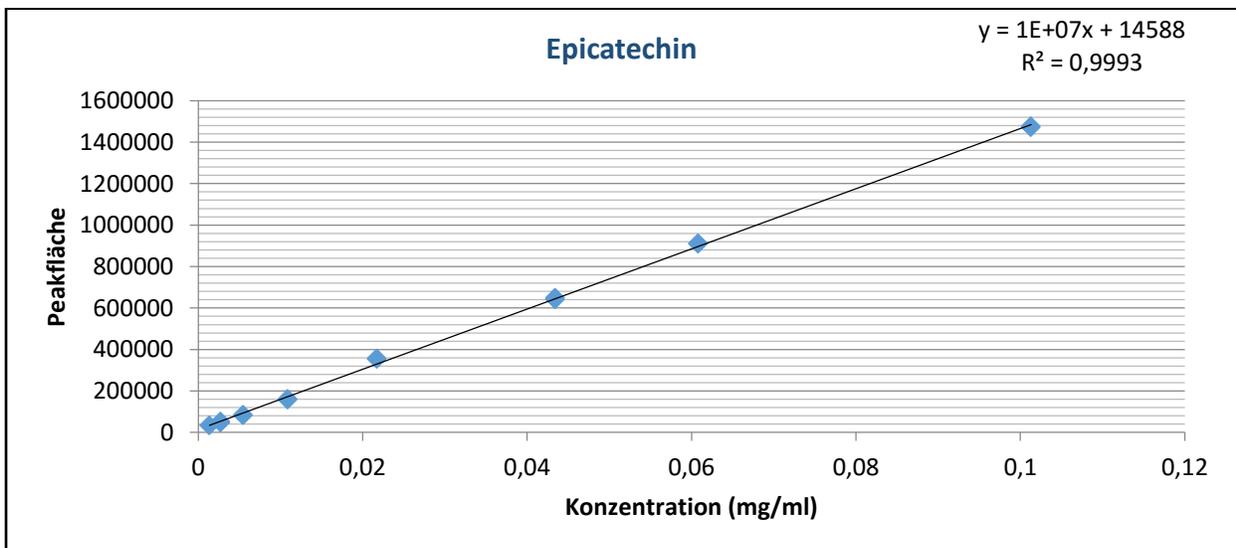


Abbildung 24: Kalibriergerade für Epicatechin

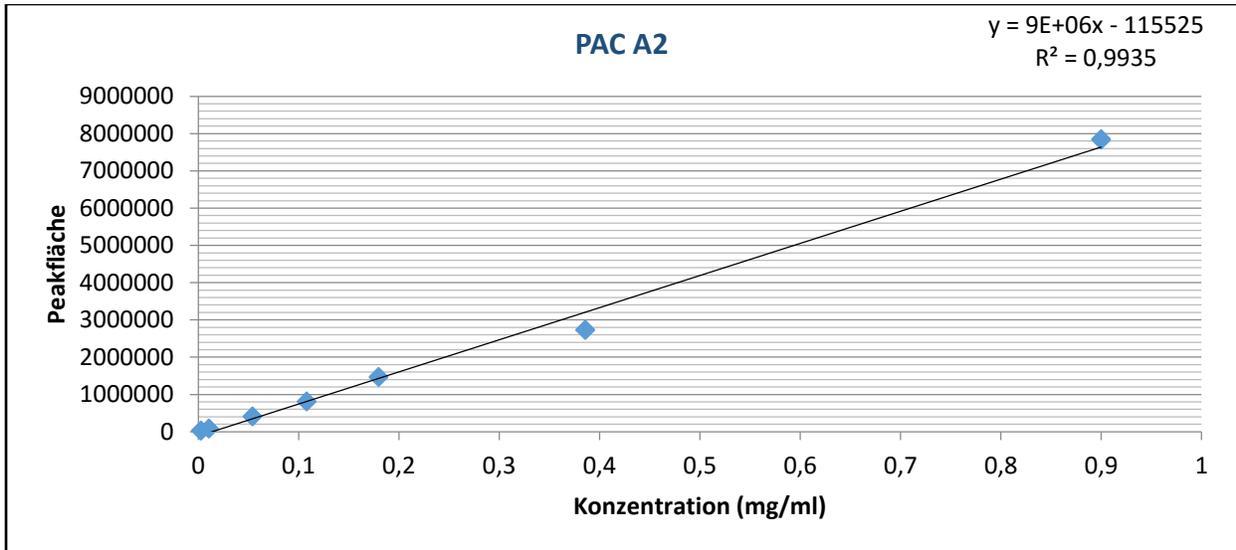


Abbildung 25: Kalibriergerade für Procyanidin A2

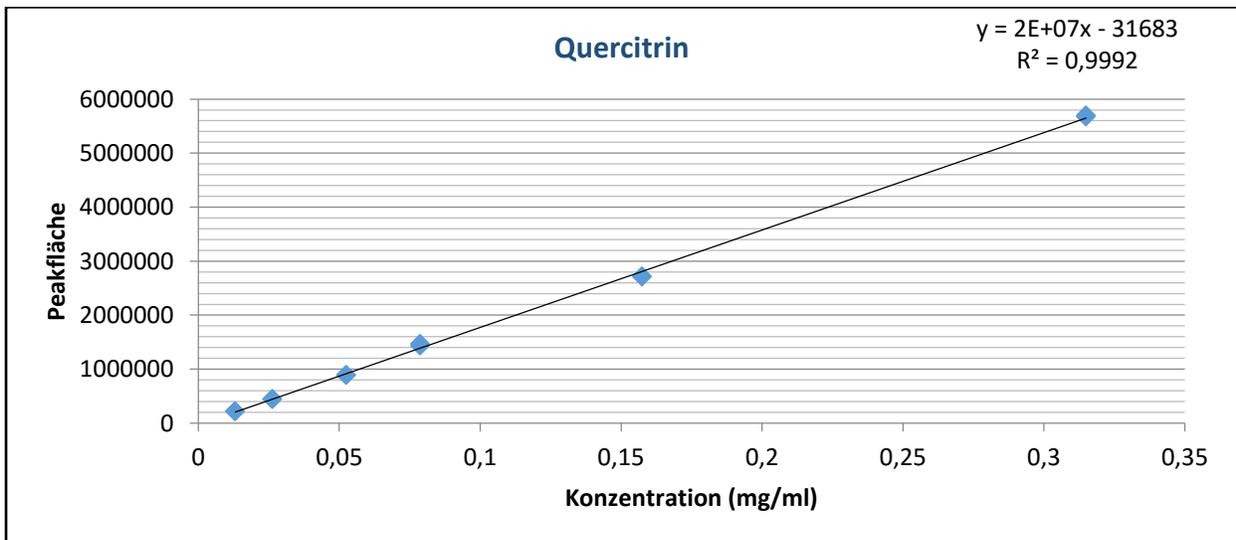


Abbildung 26: Kalibriergerade für Quercitrin

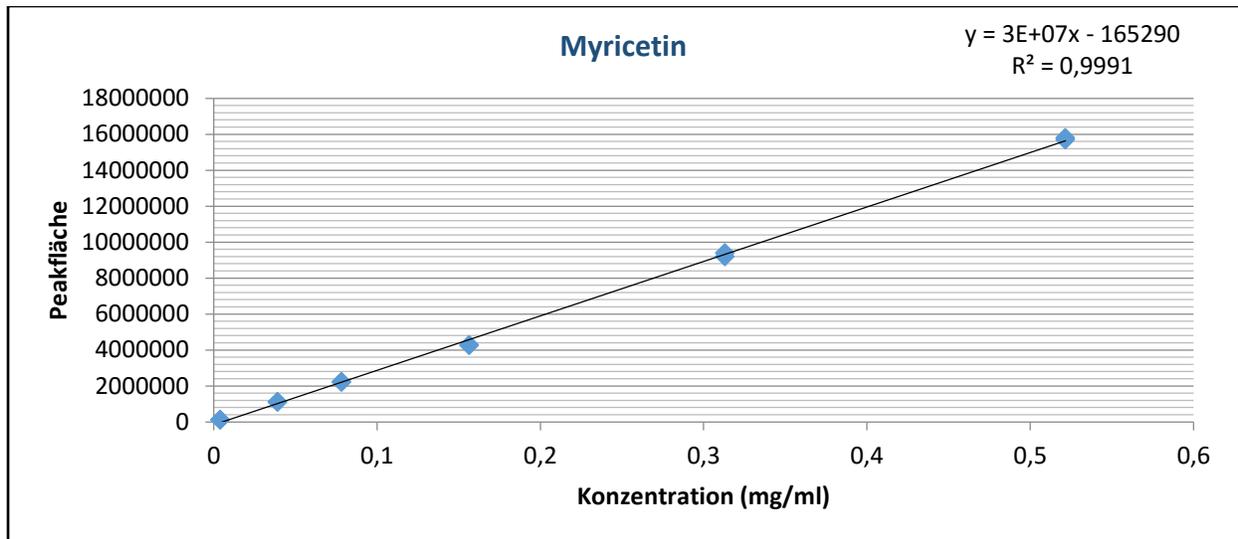


Abbildung 27: Kalibriergerade für Myricetin

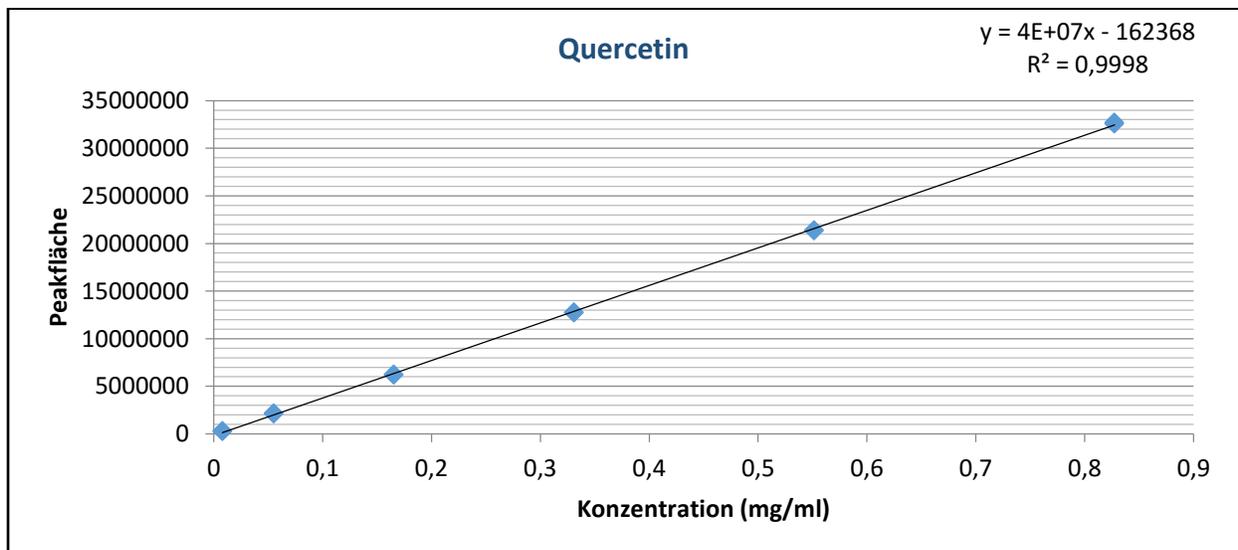


Abbildung 28: Kalibriergerade für Quercetin

Die erstellten Kalibriergeraden verliefen alle linear und annähernd durch den Nullpunkt. Daher konnte die Kalibrierfunktion der jeweiligen Substanz für die Quantifizierung herangezogen werden.

Kalibrierfunktion:

$$y = m * x + b$$

y = Peakfläche
x = Konzentration des Analyten
m = Steigung der Gerade
b = Ordinatenabschnitt

Analysenfunktion:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

3.3.2 Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit beider Extraktionsmethoden und der Analysemethoden wurden sowohl „intra-day“ als auch „inter-day“ Analysen durchgeführt.

Für die Extraktionsmethode A wurde Präparat C7 zwölfmal aufgearbeitet und für Extraktionsmethode B wurde Präparat C1 herangezogen. Sechs Aufarbeitungen wurden an einem Tag, sechs weitere innerhalb der darauffolgenden zwei Wochen durchgeführt und die Extrakte mittels HPLC analysiert. Aus jeder Extraktlösung erfolgten drei Analysen (Einspritzmenge 5µl), welche gemittelt wurden.

Es wurden die Retentionszeiten und der Gehalt der Analyten in mg/100g bestimmt und davon die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten (RSD) berechnet.

Tabelle 9: Reproduzierbarkeit der ANC - Gehaltsbestimmung (intra day)

	Cya-3-gal	Cya-3-glu	Cya-3-ara	Peo-3-gal	Peo-3-glu	Peo-3-ara	Gesamt
1	30,214	2,231	30,479	34,643	5,849	23,514	126,930
2	30,657	2,382	30,779	35,101	6,006	23,360	128,285
3	29,913	2,391	30,802	34,820	5,914	23,180	127,020
4	30,226	2,450	30,865	35,004	6,185	23,437	128,167
5	29,659	2,172	30,243	33,686	5,574	22,575	123,909
6	30,766	2,446	31,385	34,957	5,975	23,280	128,809
MW	30,239	2,345	30,759	34,702	5,917	23,224	127,187
STABW	0,423	0,116	0,387	0,523	0,203	0,339	1,768
RSD [%]	1,399	4,958	1,259	1,506	3,425	1,459	1,390

Tabelle 10: Reproduzierbarkeit der ANC - Gehaltsbestimmung (inter day)

	Cya-3-gal	Cya-3-glu	Cya-3-ara	Peo-3-gal	Peo-3-glu	Peo-3-ara	Gesamt
1	30,107	2,007	29,885	33,932	5,656	22,961	124,548
2	30,657	2,106	30,247	34,585	5,701	23,308	126,604
3	29,885	2,298	30,480	34,914	6,107	23,334	127,018
4	30,525	2,141	29,434	33,980	5,624	22,998	124,702
5	30,955	2,180	29,961	34,110	5,480	23,081	125,767
6	30,554	2,009	30,481	34,898	5,798	23,643	127,383
MW	30,447	2,123	30,076	34,403	5,728	23,221	126,004
STABW	0,387	0,110	0,408	0,453	0,213	0,259	1,197
RSD [%]	1,272	5,196	1,356	1,317	3,717	1,115	0,950

Bei der Gehaltsbestimmung der ANC lagen die relativen Standardabweichungen unter 5% und zeigten die ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Methode. Lediglich für Cya-3-glu „inter day“ wurde ein RSD – Wert von 5,196 % bestimmt, was sich jedoch auf die geringe Konzentration der Substanz im Extrakt zurückführen lässt.

Tabelle 11: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der ANC (intra day)

	Cya-3-gal	Cya-3-glu	Cya-3-ara	Peo-3-gal	Peo-3-glu	Peo-3-ara (n=3)
1	15,115	16,850	18,049	19,775	21,581	22,797
2	15,139	16,871	18,061	19,761	21,601	22,801
3	15,087	16,829	18,037	19,735	21,590	22,758
4	15,084	16,807	18,031	19,731	21,552	22,756
5	15,113	16,829	18,031	19,725	21,529	22,736
6	15,134	16,845	18,061	19,755	21,563	22,769
MW	15,112	16,839	18,045	19,747	21,569	22,770
STABW	0,023	0,022	0,014	0,020	0,027	0,025
RSD [%]	0,153	0,130	0,079	0,099	0,123	0,110

Tabelle 12: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der ANC (inter day)

	Cya-3-gal	Cya-3-glu	Cya-3-ara	Peo-3-gal	Peo-3-glu	Peo-3-ara
1	15,218	16,952	18,168	19,871	21,715	22,925
2	15,229	16,970	18,162	19,872	21,690	22,936
3	15,128	16,851	18,071	19,781	21,609	22,831
4	15,054	16,764	17,987	19,689	21,516	22,722
5	15,024	16,762	17,948	19,641	21,475	22,674
6	14,990	16,712	17,910	19,612	21,418	22,645
MW	15,107	16,835	10,041	19,745	21,570	22,789
STABW	0,101	0,107	0,110	0,114	0,120	0,127
RSD [%]	0,667	0,638	0,609	0,578	0,557	0,556

Die Variationskoeffizienten der Retentionszeiten der Anthocyane lagen sowohl „intra day“ als auch „inter day“ alle unter 1 % und spiegeln daher die äußerst zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Methode wider.

Tabelle 13: Reproduzierbarkeit der Gehaltsbestimmung der Polyphenole (intra day)

	Catechin	Epicatechin	PAC A2	Quercitrin	Myricetin	Quercetin
1	1,066	2,198	27,371	9,070	14,077	32,086
2	1,054	2,363	27,293	9,461	16,861	30,632
3	0,928	2,050	24,911	8,568	15,523	32,619
4	0,942	2,106	25,921	8,702	15,405	32,106
5	0,954	1,945	25,279	8,688	15,628	30,923
6	0,898	2,178	25,742	8,803	15,095	32,747
MW	0,974	2,140	26,086	8,882	15,432	31,852
STABW	0,070	0,143	1,028	0,330	0,899	0,879
RSD [%]	7,149	6,663	3,941	3,717	5,825	2,759

Tabelle 14: Reproduzierbarkeit der Gehaltsbestimmung der Polyphenole (inter day)

	Catechin	Epicatechin	PAC A2	Quercitrin	Myricetin	Quercetin
1	0,920	2,230	25,431	8,957	16,226	32,703
2	0,851	2,266	25,620	8,632	15,227	33,907
3	0,948	2,354	26,790	9,319	16,847	30,418
4	1,030	2,144	25,675	8,710	15,314	31,282
5	0,970	2,227	25,872	8,705	15,486	31,687
6	1,080	2,304	25,936	9,166	16,727	32,439
MW	0,966	2,254	25,887	8,915	15,971	32,073
STABW	0,081	0,072	0,478	0,281	0,724	1,217
RSD [%]	8,348	3,198	1,846	3,148	4,535	3,796

Bei der Reproduzierbarkeit der Gehaltsbestimmung der Polyphenole nach Extraktionsmethode B lagen die Variationskoeffizienten bei den „intra day“ Analysen unter 7,2 %. „Inter day“ lagen die RSD-Werte unter 4,5 %. Lediglich für Catechin war der RSD-Wert mit 8,3 % etwas erhöht. Dies lässt sich auf die geringe Konzentration der Substanz im Extrakt zurückführen. Die relativen Standardabweichungen der Gehaltsbestimmungen der Polyphenole zeigen eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Methode.

Tabelle 15: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Polyphenole (intra day)

	Catechin	Epicatechin	PAC A2	Quercitrin	Myricetin	Quercetin
1	9,469	15,570	28,813	33,996	35,218	45,310
2	9,488	15,572	28,831	34,002	35,214	45,313
3	9,569	15,523	28,777	33,956	35,438	45,273
4	9,481	15,542	28,793	33,973	35,198	45,296
5	9,524	15,603	28,884	34,045	35,267	45,374
6	9,550	15,631	28,898	34,069	35,292	45,384

MW	9,502	15,573	28,833	34,007	35,271	45,325
STABW	0,030	0,039	0,049	0,043	0,089	0,044
RSD [%]	0,318	0,253	0,170	0,126	0,252	0,098

Tabelle 16: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Polyphenole (inter day)

	Catechin	Epicatechin	PAC A2	Quercitrin	Myricetin	Quercetin
1	9,383	15,512	28,761	33,940	35,150	45,265
2	9,457	15,485	28,733	33,909	35,125	45,225
3	9,490	15,542	28,808	33,991	35,202	45,314
4	9,464	15,558	28,807	33,980	35,194	45,296
5	9,500	15,548	28,817	33,884	35,206	45,305
6	9,529	15,569	28,829	34,019	35,236	45,346
MW	9,471	15,536	28,793	33,954	35,186	45,292
STABW	0,050	0,031	0,037	0,052	0,041	0,042
RSD [%]	0,530	0,201	0,129	0,152	0,115	0,092

Die relative Standardabweichung bei den Retentionszeiten der Polyphenole lag durchwegs unter 1 %.

Die sehr niedrigen Variationskoeffizienten der Retentionszeiten zeigten eine sehr zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Analysenmethode sowohl „intra day“ als auch „inter day“. Ebenso war die Reproduzierbarkeit für Extraktion und Analyse der ANC sehr zufriedenstellend. Bei den PAC wurden etwas höhere RSD-Werte ermittelt, was sich auf die komplexere Aufarbeitung der Proben zurückführen lässt. Die Variationskoeffizienten befanden sich jedoch in einem akzeptablen Rahmen.

3.3.3 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Neben der Reproduzierbarkeit wurden auch die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen der Analyten ermittelt.

Unter der Bestimmungsgrenze versteht man die kleinste Konzentration eines Analyten, welche quantitativ mit einer festgelegten Präzision bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenze bezeichnet die kleinste, qualitativ erfassbare Konzentration eines Analyten. In der HPLC - Analytik ist ein Bezug auf das Rauschen der Basislinie gebräuchlich. Ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 entspricht der Bestimmungsgrenze, wogegen ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 die Nachweisgrenze eines Analyten definiert. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde nach Formel $\frac{S}{N} = \frac{2 \times H}{h}$ berechnet (Kromidas et al., 2008).

Für die Bestimmung wurden Verdünnungen der Stammlösungen von Catechin, Epicatechin, PAC A2, Quercitrin, Myricetin und Quercetin verwendet. Für die Anthocyane wurde das Extrakt von Präparat C1 mit bekannter Konzentration der Inhaltsstoffe eingesetzt. Diese wurden mit Methanol schrittweise soweit verdünnt bis die Peaks das Grundrauschen der Basislinie erreicht hatten. In Tabelle 17 sind die Werte der Bestimmungs- und Nachweisgrenze in ng aufgelistet.

Tabelle 17: Bestimmungs- und Nachweisgrenzen

Substanz	Bestimmungsgrenze in ng	Nachweisgrenze in ng
Cya-3-gal	5,11	0,55
Cya-3-glu	6,14	1,29
Cya-3-ara	3,56	0,87
Peo-3-gal	4,84	0,24
Peo-3-glu	6,40	0,71
Peo-3-ara	2,70	0,64
Catechin	4,36	1,31
Epicatechin	5,49	1,65
PAC A2	3,88	0,55
Quercitrin	10,53	3,16
Myricetin	10,93	3,28
Quercetin	9,30	2,79

3.4 Quantitative Analyse der Cranberry- und Preiselbeerpräparate

Mit den validierten Methoden konnte anschließend die Quantifizierung der Analyten in den Cranberry- und Preiselbeerpräparaten vorgenommen werden. Dafür wurden die Präparate, wie in Kapitel 2.2.2, Seite 7 beschrieben, aufgearbeitet. Es wurde von jedem Präparat eine Doppelbestimmung durchgeführt und 5µl jedes Extrakts in zwei Analysen mittels HPLC bestimmt.

Mit Hilfe der ermittelten Kalibrierfunktionen (Kapitel 3.3, Seite 38-42), wurden die Konzentrationen der Substanzen bestimmt. Dafür wurden die Peakflächen der jeweiligen Verbindungen in die Analysenfunktion eingesetzt.

Für Cyanidin-3-glucosid und –arabinosid wurde die Kalibrierfunktion des Cyanidin-3-galactosids verwendet. Ebenso wurde für Peonidin-3-galactosid und –arabinosid die Kalibrierfunktion von Peonidin-3-glucosid verwendet. Für alle anderen Substanzen wurden die dafür bestimmten Kalibrierfunktionen verwendet.

Die Anthocyane wurden bei einer Wellenlänge von 515 nm, dem UV-Maximum der Komponenten entsprechend, quantifiziert. In den folgenden Tabellen sind die Konzentrationen in mg/ml und der Gehalt in mg/100 g der jeweiligen Anthocyane für jedes analysierte Präparat angegeben.

Tabelle 18: Gehalt von Cyanidin-3-galactosid

Cyanidin-3-galactosid			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,007258	0,007726	10,153
C2	0,001959	0,002065	2,604
C3	-	-	-
C4	0,004062	0,004729	4,762
C5	-	-	-
C6	0,010412	0,011478	10,093
C7	0,024190	0,021947	31,343
C8	0,022772	0,022930	21,944
C9	0,026926	0,026648	34,077
C10	0,127310	0,129837	89,478
C11	0,005131	0,006078	6,671
C12	0,028333	0,026668	29,991
C13	0,008709	0,008105	10,833
C14	0,028218	0,025441	33,949
P1	0,040228	0,040250	59,163
P2	0,025023	0,026062	33,596

Tabelle 19: Gehalt von Cyanidin-3-glucosid

Cyanidin-3-glucosid			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,0062552	0,0073210	0,920
C2	-	-	-
C3	-	-	-
C4	0,02437819	0,02521963	26,873
C5	-	-	-
C6	0,00014426	0,00033305	0,217
C7	0,00150197	0,00166109	2,159
C8	0,00113651	0,00110761	1,077
C9	0,00082523	0,00102995	1,181
C10	0,00506246	0,00454813	3,344
C11	0,00028819	0,00031134	0,358
C12	0,00023417	0,00020441	0,241
C13	0,00036971	0,00030715	0,435
C14	0,00099445	0,00090702	1,203
P1	0,00316613	0,00311994	4,619
P2	0,00092231	0,00092231	1,232

Tabelle 20: Gehalt von Cyanidin-3-arabinosid

Cyanidin-3-arabinosid			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,010131	0,010869	14,229
C2	0,001612	0,001677	2,128
C3	-	-	-
C4	0,005710	0,006388	6,554
C5	-	-	-
C6	0,007501	0,008750	7,484
C7	0,030448	0,028022	39,736
C8	0,022155	0,021591	21,003
C9	0,022712	0,021959	28,413
C10	0,071915	0,072887	50,386
C11	0,007725	0,008780	9,837
C12	0,017953	0,016817	19,139
C13	0,013903	0,012991	17,329
C14	0,023887	0,021133	28,478
P1	0,008335	0,008548	12,419
P2	0,0205191	0,021712	27,771

Tabelle 21: Gehalt von Peonidin-3-galactosid

Peonidin-3-galactosid			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,0084675	0,0092349	11,994
C2	0,0045750	0,0044163	5,819
C3	-	-	-
C4	0,0087258	0,0093066	9,770
C5	-	-	-
C6	0,0113991	0,0128749	11,186
C7	0,0277587	0,0254479	36,155
C8	0,0416790	0,0411326	39,760
C9	0,0456661	0,0449428	57,633
C10	0,2028181	0,1922589	137,473
C11	0,0083146	0,0096560	10,703
C12	0,0323740	0,0306520	25,777
C13	0,0158843	0,0150557	19,939
C14	0,0474588	0,0421586	56,691
P1	-	-	-
P2	0,0624016	0,0643793	83,385

Tabelle 22: Gehalt von Peonidin-3-glucosid

Peonidin-3-glucosid			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,0022741	0,0025307	3,255
C2	0,0002447	0,0002003	0,288
C3	-	-	-
C4	0,0019831	0,0021003	2,212
C5	-	-	-
C6	0,0007870	0,0017633	1,159
C7	0,0063356	0,0058476	8,280
C8	0,0093909	0,0085930	8,633
C9	0,0052653	0,0051630	6,633
C10	0,0255030	0,0259102	17,890
C11	0,0014972	0,0017940	1,958
C12	0,0029570	0,0020110	2,709
C13	0,0036503	0,0034289	4,562
C14	0,0051932	0,0048101	6,330
P1	-	-	-
P2	0,0050616	0,0052896	6,807

Tabelle 23: Gehalt von Peonidin-3-arabinosid

Peonidin-3-arabinosid			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,008781	0,009565	12,430
C2	0,001886	0,001930	2,469
C3	-	-	-
C4	0,006206	0,006074	6,654
C5	-	-	-
C6	0,006463	0,007824	6,574
C7	0,018779	0,017051	24,342
C8	0,021612	0,021140	20,526
C9	0,016783	0,016410	21,112
C10	0,067716	0,068234	47,306
C11	0,008666	0,009826	11,032
C12	0,013041	0,011767	13,640
C13	0,011041	0,010474	13,866
C14	0,018245	0,016263	21,830
P1	-	-	-
P2	0,016179	0,016661	21,599

Aus den Gehaltsbestimmungen der sechs Anthocyane wurden die mg Anthocyane /100g für jedes Präparat berechnet (Abbildung 32).

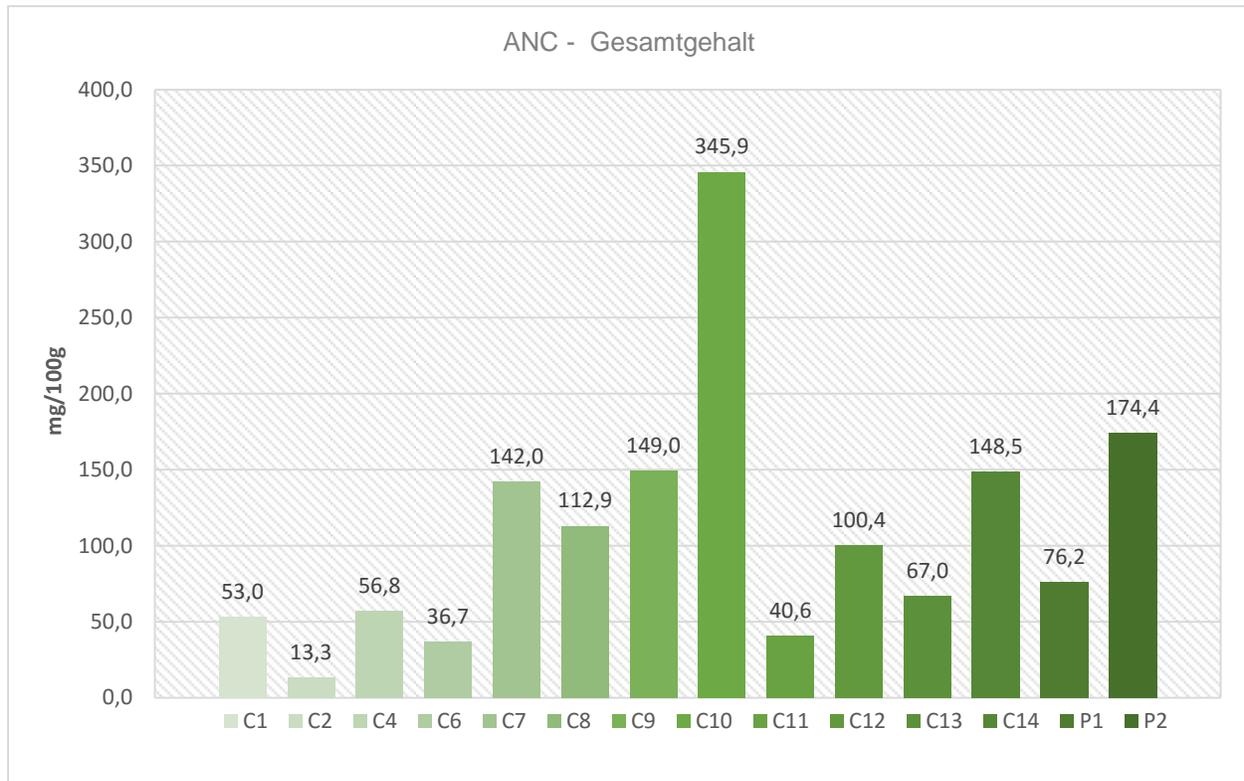


Abbildung 29: ANC - Gesamtgehalt

Es konnten große Unterschiede im ANC-Gehalt der 16 Präparate festgestellt werden. Der geringste Gehalt wurde in Präparat C2 mit 13,3 mg/100g und der höchste Gehalt in Präparat C10 mit 345,9 mg/100g analysiert. Bei Präparat C10 handelte es sich um ein Gemisch von Auszügen aus Cranberry, Brunnenkresse und Meerrettich.

In Präparat C3 konnte keines der sechs charakteristischen Anthocyane detektiert werden.

Präparat C5 wies ein sehr komplexes ANC-Spektrum auf. Im verwendeten HPLC-System waren die charakteristischen Komponenten schlecht von weiteren Inhaltsstoffen getrennt, wodurch eine präzise Quantifizierung der identifizierten Anthocyane nicht möglich war.

Die Quantifizierung der phenolischen Komponenten in den nach Extraktionsmethode B aufgearbeiteten Extrakten wurden ebenfalls mit Hilfe der ermittelten Analysenfunktionen (Kapitel 3.3, Seite 40-42) vorgenommen.

Catechin, Epicatechin und PAC A2 wurden bei 280 nm, Quercitrin bei 348 nm und Myricetin und Quercetin bei 368 nm quantifiziert. Dies entsprach den UV-Maxima der jeweiligen Verbindungen.

Von jedem Präparat wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und jedes Extrakt wurde zweimal (5 µl) mittels HPLC analysiert. In den folgenden Tabellen ist sowohl die Konzentration in mg/ml als auch der Gehalt in mg/100 g für Catechin, Epicatechin, PAC A2, Quercitrin, Myricetin und Quercetin in jedem Präparat angegeben.

Tabelle 24: Gehaltsbestimmung von Catechin

Catechin			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,004491	0,004626	0,939
C2	-	-	-
C3	-	-	-
C4	-	-	-
C5	0,196783	0,164117	34,127
C6	-	-	-
C7	-	-	-
C8	-	-	-
C9	0,008701	0,009071	1,849
C10	0,031679	0,031672	3,478
C11	-	-	-
C12	-	-	-
C13	-	-	-
C14	0,010457	0,012070	1,815
P1	0,018282	0,018049	2,923
P2	0,010121	0,011928	2,187

In sieben von den 16 untersuchten Präparaten konnte Catechin quantifiziert werden. In Präparat C5 und P1 stellte die Verbindung eine der Hauptkomponenten dar. In den anderen Präparaten wurde es lediglich als Nebenkomponente detektiert. Der Wert lag zwischen 0,9 mg/100g in Präparat C1 und 34,1 mg/100g in Präparat C5.

Tabelle 25: Gehaltsbestimmung von Epicatechin

Epicatechin			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,010534	0,011245	2,242
C2	0,007213	0,008013	1,836
C3	0,095563	0,064275	2,532
C4	0,010761	0,017885	2,579
C5	0,066540	0,074997	13,456
C6	0,006093	0,005252	0,760
C7	0,008972	0,009912	2,135
C8	0,010118	0,007078	1,374
C9	0,007625	0,008720	1,697
C10	0,100696	0,104090	11,242
C11	0,015087	0,015723	2,872
C12	0,002717	0,002868	0,490
C13	0,005285	0,004747	1,057
C14	0,011659	0,014854	2,139
P1	0,014442	0,014082	2,295
P2	0,013624	0,015664	2,903

Der Gehalt an Epicatechin lag zwischen 0,5 mg/100 g in Präparat C12 und 13,5 mg/100 g in Präparat C5. Epicatechin wurde in allen Präparaten als Nebenkomponente nachgewiesen. Lediglich in Präparat C5 wurde die Verbindung als eine der Hauptkomponenten detektiert.

Der Wert von PAC A2 in den Präparaten lag zwischen 1,2 mg/100g in Präparat C3 und 59,8 mg/100g in Präparat C10. In 2/3 der Nahrungsergänzungsmittel lag die Verbindung als eine der Hauptkomponenten vor. Präparat C5 war das einzige Produkt, in dem kein Procyanidin A2 detektiert werden konnte (Tabelle 32, Seite 55).

Tabelle 26: Gehaltsbestimmung von PAC A2

PAC A2			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,121222	0,130764	25,938
C2	0,059410	0,060853	14,506
C3	0,038326	0,036762	1,196
C4	0,080175	0,086776	15,017
C5	-	-	-
C6	0,090571	0,097549	12,566
C7	0,149014	0,171120	36,192
C8	0,142544	0,137515	22,365
C9	0,136922	0,144081	29,223
C10	0,553330	0,534805	59,756
C11	0,098104	0,096119	18,114
C12	0,120854	0,140377	22,861
C13	0,131017	0,139735	28,461
C14	0,171539	0,191693	29,262
P1	0,062333	0,059673	9,814
P2	0,158302	0,165394	32,093

Tabelle 27: Gehaltsbestimmung von Quercitrin

Quercitrin			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,0444307	0,0450984	9,217
C2	0,0217277	0,0221140	5,288
C3	0,0137072	0,0121000	0,410
C4	0,0299638	0,0329955	5,663
C5	0,0071971	0,0064291	1,290
C6	0,0436975	0,0446482	5,905
C7	0,0572319	0,0648700	13,801
C8	0,0549698	0,0549816	8,780
C9	0,0564300	0,0607284	12,179
C10	0,2196561	0,2296747	24,664
C11	0,0477251	0,0443291	8,589
C12	0,0327152	0,0369633	6,102
C13	0,0328767	0,0348282	7,117
C14	0,0735928	0,0807750	12,434
P1	0,1253731	0,1236952	20,040
P2	0,0661961	0,0690010	13,404

Quercitrin konnte in Präparat P1 als Hauptkomponente detektiert werden. In allen anderen Präparaten lag die Verbindung nur in geringer Konzentration vor. Der Wert von Quercitrin variierte von 0,4 mg/100g in Präparat C3 bis 24,2 mg/100g in Präparat C10.

Tabelle 28: Gehaltsbestimmung von Myricetin

Myricetin			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,096476	0,094129	19,623
C2	0,083173	0,099719	22,037
C3	0,052067	0,046606	1,570
C4	0,062119	0,066481	11,567
C5	0,026274	0,022457	4,610
C6	0,064259	0,070406	8,993
C7	0,171566	0,191249	41,013
C8	0,322577	0,324097	51,641
C9	0,061990	0,668980	13,397
C10	0,237031	0,262469	27,408
C11	0,018659	0,015645	3,203
C12	0,026831	0,059281	7,414
C13	0,206799	0,234918	46,399
C14	0,080145	0,080956	12,965
P1	-	-	-
P2	0,062745	0,068213	12,983

Myricetin wurde in mehr als der Hälfte der Präparate als eine der Hauptkomponenten nachgewiesen. Der Wert des Flavonoids schwankte in den Nahrungsergänzungsmitteln zwischen 1,6 mg/100g in Präparat C3 und 51,6 mg/100g in Präparat C8. Das Preiselbeerpräparat P1 war das einzige Produkt, in dem kein Myricetin detektiert wurde.

Tabelle 29: Gehaltsbestimmung von Quercetin

Quercetin			
Probe	Konzentration mg/ml		GEHALT in mg/100 g (n=4)
	A (n=2)	B (n=2)	
C1	0,159008	0,158547	32,692
C2	0,261930	0,274785	64,728
C3	0,161634	0,142439	4,836
C4	0,123829	0,137360	23,495
C5	0,036142	0,031594	6,411
C6	0,135156	0,139686	18,368
C7	0,363517	0,403705	86,726
C8	0,606509	0,586101	95,250
C9	0,124473	0,134110	26,879
C10	0,536604	0,536604	57,577
C11	0,640890	0,531899	109,510
C12	0,110570	0,126607	20,764
C13	0,561481	0,617362	123,592
C14	0,167362	0,175424	27,597
P1	0,101166	0,098203	16,038
P2	0,144950	0,148962	29,141

Der Gehalt von Quercetin war im Vergleich zu den quantifizierten Verbindungen in allen Präparaten am höchsten. In 11 der 16 Präparate wurde die Verbindung als Hauptkomponente detektiert. Die Werte reichten von 4,8 mg/100g in Präparat C3 bis 123,6 mg/100g in Präparat C13.

3.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der ANC – Analysen zeigten, dass die verwendete HPLC-Methode sehr gut geeignet ist, um Cranberrypräparate von Preiselbeerprodukten schnell und sicher zu unterscheiden.

Von 16 untersuchten Präparaten wiesen 12 das charakteristische Anthocyanmuster der Cranberries auf. In Präparat P2 konnte Cranberry-Extrakt anstatt des deklarierten Preiselbeerauszugs nachgewiesen werden. Präparat C4 enthielt ein zusätzliches, nicht für Cranberries charakteristisches Anthocyan und in Präparat C3 konnte mit dem verwendeten System kein Cranberry-Extrakt detektiert werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wäre es sinnvoll weitere Chargen dieser Produkte zu untersuchen.

Es waren große Unterschiede im Gehalt der Anthocyane in den Nahrungsergänzungsmitteln festzustellen. Der Wert schwankte zwischen 13,3 mg und 345,9 mg pro 100 g. Lediglich Präparat C1 deklarierte den Gehalt der enthaltenen Anthocyane mit 2,57 g pro 100 g (Tabelle 1, Seite 4). Dieser ist jedoch um das 50-fache höher als der im verwendeten System analysierte Gehalt dieses Produkts.

Bei der Extraktion der PACs konnten neben Procyanidin A2 auch Catechin, Epicatechin, 2,4-Dihydroxybenzoesäure, Quercitrin, Myricetin und Quercetin identifiziert werden.

Die Chromatogramme der Untersuchungslösungen der Cranberrypräparate als auch des Preiselbeerpräparats wiesen alle ein sehr ähnliches Peakmuster auf. Präparat C5 unterschied sich deutlich von den anderen. Es war das einzige Produkt, in dem kein PAC A2 detektiert wurde.

Bei der Quantifizierung des PAC A2 wurden starke Konzentrationsunterschiede deutlich. Der Gehalt variierte zwischen 1,2 mg und 60 mg pro 100 g. Diese Werte lagen erheblich unter den in der Deklaration angegebenen Konzentrationen der PACs. Die meisten Präparate enthielten jedoch keinen Hinweis auf die von ihnen verwendete Quantifizierungsmethode, wodurch keine Rückschlüsse auf den enormen Gehaltsunterschied gezogen werden konnte. Lediglich Präparat C10 gab den

Durchschnittswert der PACs unter Kennzeichnung der verwendeten Methode⁴ an (8,7 g/100 g). In dieser Methode werden alle Proanthocyanidine erfasst, was selbstverständlich zu einem höheren Gehalt führt. Da in der vorliegenden Untersuchung nur PAC A2 quantifiziert und alle anderen Verbindungen mit für PACs charakteristischen UV-Spektren nicht einbezogen wurden, ist dieser große Unterschied erklärbar.

Es lässt sich gut erkennen, dass der Gebrauch von unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden zu keinen vergleichbaren Ergebnissen führt. Daher ist es umso wichtiger, eine definierte Methode zu verwenden, um bessere Vergleiche zwischen den Präparaten ziehen zu können.

Besonders auffällig war die Ähnlichkeit sowohl der Chromatogramme als auch der Konzentrationen der analysierten Substanzen von Präparat C14 und Präparat P2 sowohl bei der ANC-Analyse als auch bei der PAC-Analyse. Es ist anzunehmen, dass die Firma, welche beide Produkte vertreibt, denselben Extrakt für das Cranberry- und das Preiselbeerpräparat verwendet.

⁴ *photometrische Methode nach der Europäischen Pharmakopoe*

4 Zusammenfassung

Cranberry- und Preiselbeerpräparate sind in Form von Nahrungsergänzungsmitteln „für eine gesunde Blase“ im Handel. Zahlreiche Studien zeigten, dass die Inhaltsstoffe dieser Präparate, insbesondere die Proanthocyanidine des A-Typs das Anhaften des uropathogenen Keims *Escherichia coli* an der Blasenschleimhaut verhindern. Dadurch können Blasenentzündungen reduziert oder sogar vermieden werden.

Aufgrund mangelnder Deklarationen der Inhaltsstoffe und/oder deren Quantifizierungsmethoden in den verschiedenen Nahrungsergänzungsmitteln wird ein Vergleich der Präparate unmöglich. Daher war Ziel dieser Diplomarbeit, Cranberry- und Preiselbeerpräparate mittels HPLC auf ihren Anthocyan- und Proanthocyanidingehalt zu analysieren.

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Inhaltsstoffe wurden zwei Extraktionsmethoden verwendet, um sowohl die Anthocyane als auch die Proanthocyanidine zu bestimmen. Die separate Aufarbeitung diente zur genaueren Analyse der Proanthocyanidine, um Begleitstoffe abzutrennen und die Substanzen anzureichern.

Die Anthocyan - Analyse eignete sich ausgezeichnet, um Cranberry- von Preiselbeerpräparaten zu unterscheiden. Elf der 14 untersuchten Cranberrypräparate wiesen das typische Anthocyanmuster mit den Glykosiden des Cyanidins und Peonidins auf und als Inhaltsstoff eines Preiselbeerpräparates wurde ein Cranberry-Extrakt identifiziert.

Bei der Extraktion der Proanthocyanidine zeigte sich PAC A2 als das wichtigste Proanthocyanidin. Zusätzlich wurden weitere phenolische Substanzen wie Catechin, Epicatechin, 2,4 – Dihydroxybenzoesäure, Quercitrin, Myricetin und Quercetin in den Extrakten der Proben identifiziert, wobei Quercetin in 70 % der Präparate die Hauptkomponente darstellte.

Die Konzentrationen der Anthocyane als auch des Procyanidins unterschieden sich deutlich von den in der Deklaration der Nahrungsergänzungsmittel angegebenen Werten. Dies ist vermutlich auf verschiedene Quantifizierungsmethoden zurückzuführen.

Es ist daher umso wichtiger, eine einheitliche Methode einzuführen, um einen besseren Vergleich dieser Nahrungsergänzungsmittel zu gewährleisten und insbesondere dem Endverbraucher die Beurteilung der Qualität dieser Produkte zu ermöglichen.

5 Abstract

Cranberry- and lingonberry products are widely consumed as dietary supplements for the prevention of urinary-tract infections.

Phytochemicals in these berries, especially procyanidins of type A, inhibit the adhesion of *Escherichia coli* to uroepithelial cells. Thus, the consumption of these preparations reduces or prevents the incidence of urinary tract infections.

The incomplete or missing declaration of the active compounds or the methods for the quantification of the compounds in these dietary supplements makes a comparison of the products difficult. The aim of this work was to analyze anthocyanins and procyanidins of cranberry- and lingonberry products by HPLC.

Two methods for extraction were applied to detect the anthocyanins and procyanidins, because of the complex composition of these berries. The purification was separated to enrich the procyanidins and to remove trace substances.

The analysis of anthocyanins is an excellent method to distinguish cranberry from lingonberry products. Eleven of the 14 examined cranberry products showed the typical anthocyanin fingerprint of cyanidin and peonidin glycosides. One of the lingonberry products turned out to contain a cranberry extract.

PAC A2 was the most significant proanthocyanidin in the extracts of these dietary supplements. Additionally, catechin, epicatechin, 2,4-dihydroxybenzoic acid, quercitrin, myricetin and quercetin were identified. In 70 % of the products quercetin was the main compound.

The concentration of anthocyanins and procyanidin was far below the declaration of the products, because of the different methods used for quantification.

Thus, it is very important to introduce a suitable method for the analyses to allow a better comparison of such products. This way, consumers would have the possibility to assess the quality of these dietary supplements.

Literaturverzeichnis

- Krenn L., Steitz M., Schlicht C., Kurth H., Gaedcke F. (2007)** Anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements - analysis with problems. *Pharmazie*; 62: 803-812.
- Krueger C.G., Reed J.D., Feliciano R.P., Howell A.B. (2013)** Quantifying and characterizing proanthocyanidins in cranberries in relation to urinary tract health. *Anal. Bioanal. Chem.*; 405(13): 4385-4395.
- Lamien-Meda A., Pulletz H. Zitterl-Eglseer K., Franz C. (2009)** Comparative Phytochemical Investigation of Selected Lingonberry and Cranberry Products. *Nutrition*; 33(6): 248-253.
- Lee J., Finn C.E. (2012)** Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) grown in the Pacific Northwest of North America: Anthocyanin and free amino acid composition. *J. Funct. Foods*; 4(1): 213-218.
- Lee J. (2016)** Anthocyanin analyses of *Vaccinium* fruit dietary supplements. *Food Sci Nutr.*; in press doi:10.1002/fsn3.339.
- Lee J., Rennaker C., Wrolstad R.E. (2008)** Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem.*; 110(3), 782-786.
- Pappas E., Schaich K.M. (2009)** Phytochemicals of Cranberries and Cranberry Products: Characterization, Potential Health Effects, and Processing Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*; 49(9): 741-781.
- Prior R.L., Fan E., Hongping J., Howell A., Nio C., Payne M.J., Reed J. (2010)** Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *J. Sci. Food Agric.*; 90(9): 1473-1478.
- Rodriguez-Perez C., Quirantes-Pine R., Uberos J., Jimenez-Sanchez C., Pena A., Segura-Carretero A. (2016)** Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*. *Food & Funct.*; 7(3): 1564-1573.
- Sanchez-Patan F., Bartolome B., Marin-Alvarez P.J., Anderson M., Howell A., Monagas M. (2012)** Comprehensive Assessment of the Quality of Commercial Cranberry Products. Phenolic Characterization and in Vitro Bioactivity. *J. Agric. Food Chem.*, 60(13): 3396-3408.

Wu X., Prior R.L. (2005) Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common Foods in the United States: Fruits and Berries. J. Agric. Food Chem.; 53(7): 2589-2599.

Wu X., Gu L., Prior R.L., McKay S. (2004) Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant Capacity. J. Agric. Food Chem.; 52(26): 7846-7856.

<http://www.pollinator.ca/bestpractices/cranberries.html> 30.05.2016

<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> am 14.3.2016

<http://www.generation-wein.com/wordpress/anthocyane/> am 11.08.2016

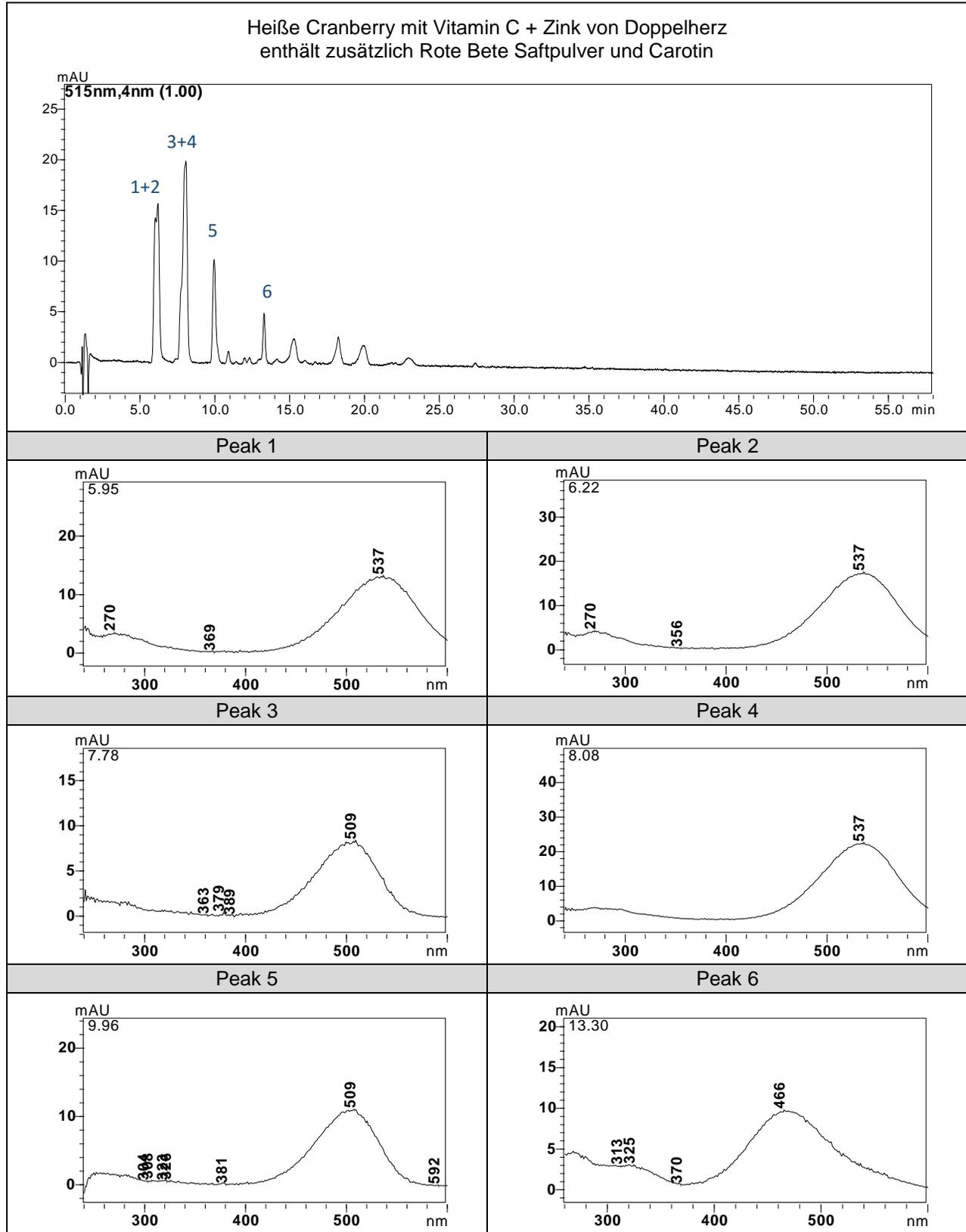
Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vaccinium macrocarpon Ait.....	1
Abbildung 2: Inhaltsstoffe von Cranberries und Preiselbeeren.....	2
Abbildung 3: Anthocyanidine.....	3
Abbildung 4: Untersuchte Cranberry- und Preiselbeerpräparate.....	5
Abbildung 5: ANC - Chromatogramm des Cranberrypräparates C1	10
Abbildung 6: ANC - Chromatogramme der Präparate C1, C2, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14 und P2 (HPLC-Bedingungen Kap 2.2.2, Seite 7).....	11
Abbildung 7: ANC - Chromatogramm des Preiselbeer-Präparates P1 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7).....	12
Abbildung 8: ANC Chromatogramm von Präparat C3 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7).....	13
Abbildung 9: ANC - Chromatogramm von Präparat C4 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7).....	15
Abbildung 10: UV/Vis - Spektrum von Peak 1 aus Präparat C4	15
Abbildung 11: ANC - Chromatogramm von Präparat C5 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7).....	16
Abbildung 12: PAC-Chromatogramm von Präparat C1 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7).....	20
Abbildung 13: UV-Spektrum von Peak A.....	21
Abbildung 14: UV-Spektrum von Peak B.....	21
Abbildung 15: UV/Vis-Spektrum von Peak C	21
Abbildung 16: UV-Spektrum von Procyanidin B2	22
Abbildung 17: Chromatogramm von Präparat P1 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, S. 7)	27
Abbildung 18: Chromatogramm von Präparat C3 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, S.7)	28
Abbildung 19: Chromatogramm von Präparat C4 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7).....	29
Abbildung 20: Chromatogramm von Präparat C5 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, S. 7)	30
Abbildung 21: Kalibriergeraden für Cyanidin-3-galactosid.....	36
Abbildung 22: Kalibriergeraden für Peonidin-3-glucosid.....	37
Abbildung 23: Kalibriergerade für Catechin.....	38
Abbildung 24: Kalibriergerade für Epicatechin	38
Abbildung 25: Kalibriergerade für Procyanidin A2	39
Abbildung 26: Kalibriergerade für Quercitrin	39
Abbildung 27: Kalibriergerade für Myricetin.....	40
Abbildung 28: Kalibriergerade für Quercetin	40
Abbildung 29: ANC - Gesamtgehalt	52

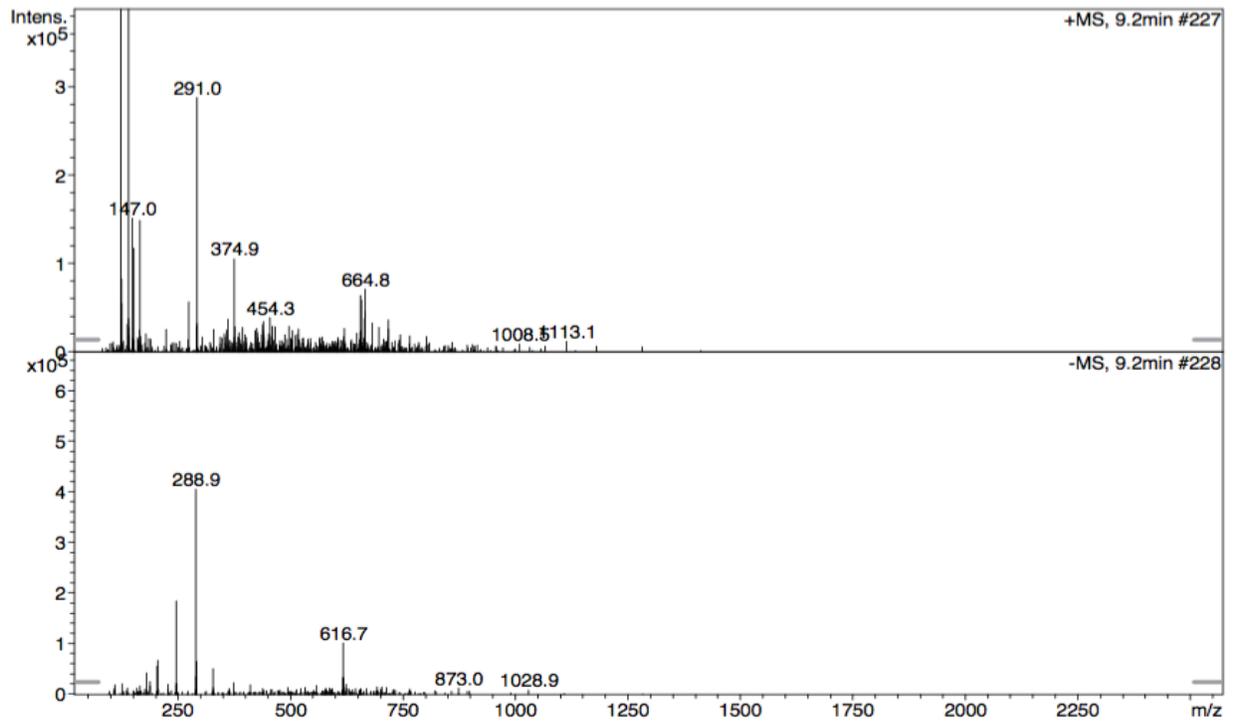
Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Cranberry- und Preiselbeerpräparate	4
Tabelle 2: Referenzsubstanzen.....	5
Tabelle 3: HPLC - Bedingungen.....	7
Tabelle 4: LC-MS - Bedingungen	8
Tabelle 5: UV/Vis - Spektren von Präparat C5.....	16
Tabelle 6: Identifizierte Verbindungen nach Extraktionsmethode B	19
Tabelle 7: Chromatogramme der Präparate C1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 und P2 (HPLC-Bedingungen Kap. 2.2.2, Seite 7)	23
Tabelle 8: Reinheit der Referenzsubstanzen	32
Tabelle 9: Reproduzierbarkeit der ANC - Gehaltsbestimmung (intra day).....	42
Tabelle 10: Reproduzierbarkeit der ANC - Gehaltsbestimmung (inter day).....	43
Tabelle 11: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der ANC (intra day).....	43
Tabelle 12: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der ANC (inter day).....	44
Tabelle 13: Reproduzierbarkeit der Gehaltsbestimmung der Polyphenole (intra day) ..	44
Tabelle 14: Reproduzierbarkeit der Gehaltsbestimmung der Polyphenole (inter day) ..	45
Tabelle 15: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Polyphenole (intra day).....	45
Tabelle 16: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Polyphenole (inter day).....	46
Tabelle 17: Bestimmungs- und Nachweisgrenzen	47
Tabelle 18: Gehalt von Cyanidin-3-galactosid.....	49
Tabelle 19: Gehalt von Cyanidin-3-glucosid.....	49
Tabelle 20: Gehalt von Cyanidin-3-arabinosid	50
Tabelle 21: Gehalt von Peonidin-3-galactosid.....	50
Tabelle 22: Gehalt von Peonidin-3-glucosid.....	51
Tabelle 23: Gehalt von Peonidin-3-arabinosid	51
Tabelle 24: Gehaltsbestimmung von Catechin	53
Tabelle 25: Gehaltsbestimmung von Epicatechin	54
Tabelle 26: Gehaltsbestimmung von PAC A2	55
Tabelle 27: Gehaltsbestimmung von Quercitrin	55
Tabelle 28: Gehaltsbestimmung von Myricetin.....	56
Tabelle 29: Gehaltsbestimmung von Quercetin	57

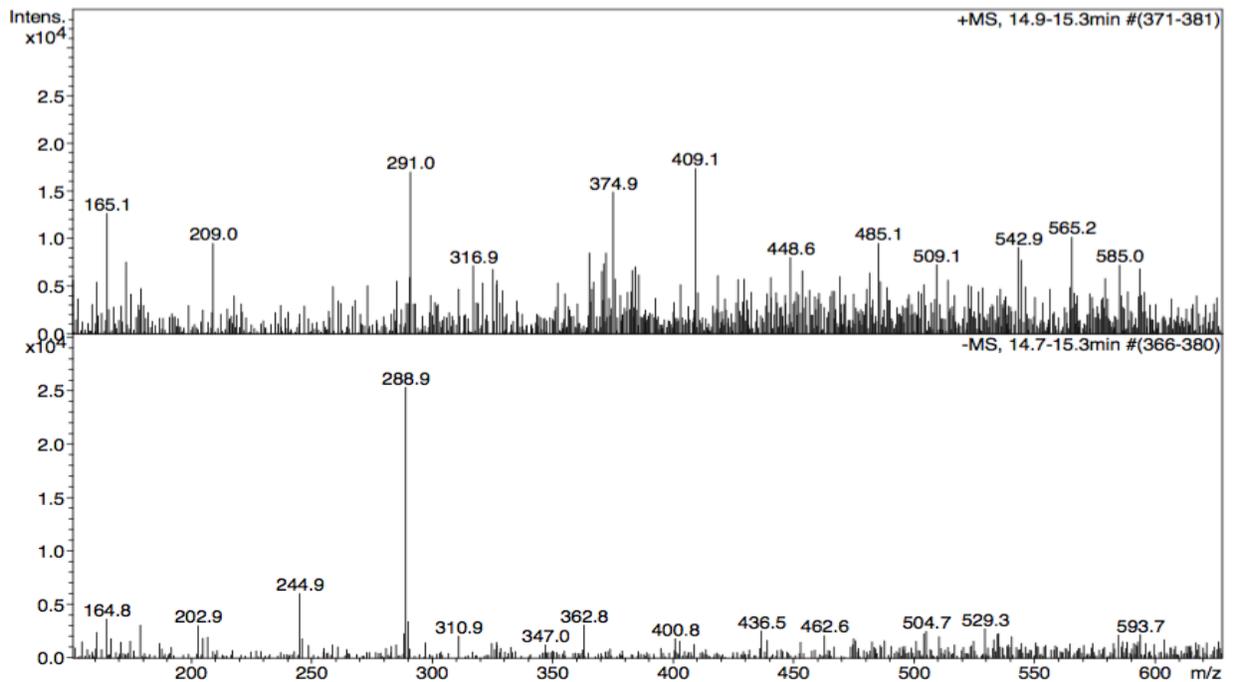
Anhang



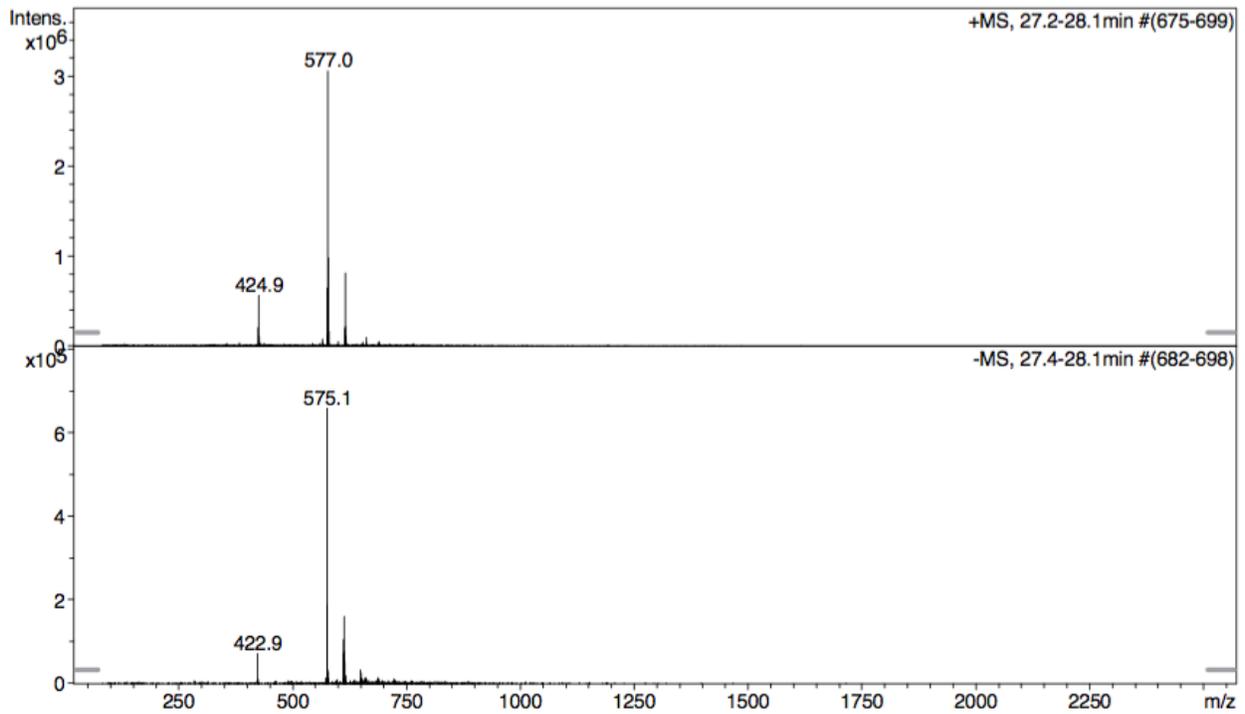
LC-MS Daten: Catechin



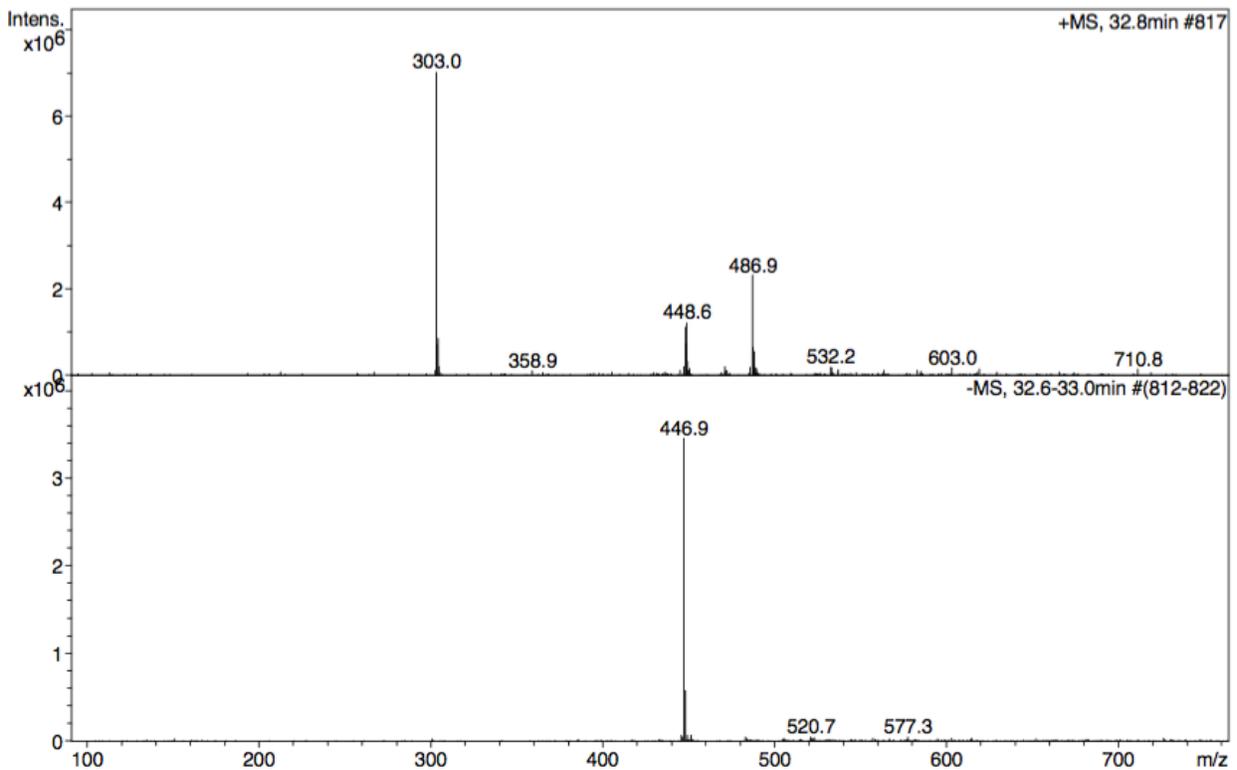
LC-MS Daten: Epicatechin



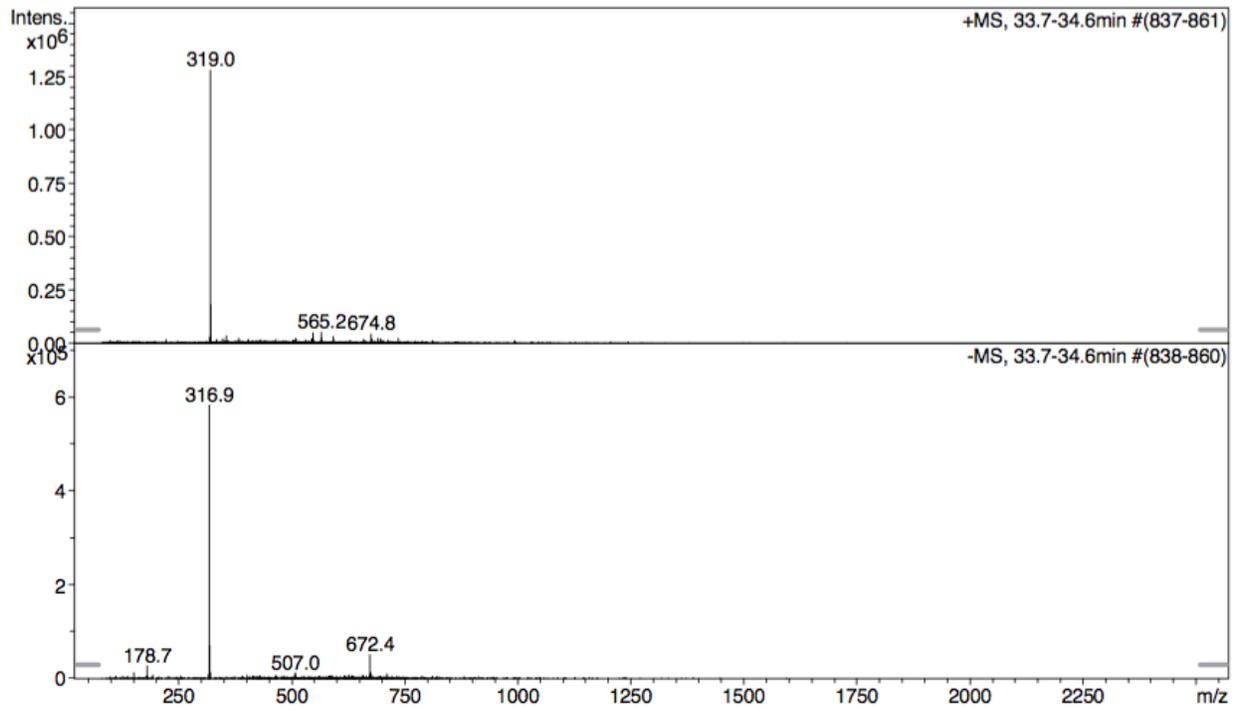
LC-MS Daten: PAC A2



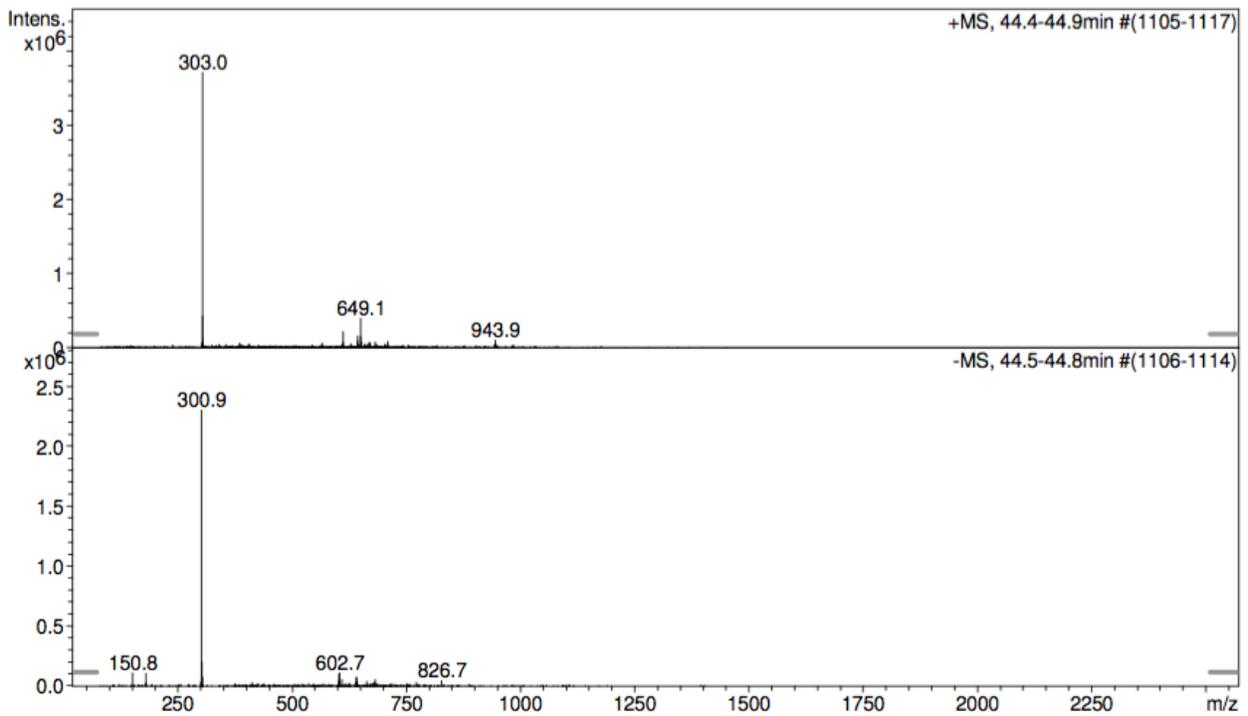
LC-MS Daten: Quercitrin



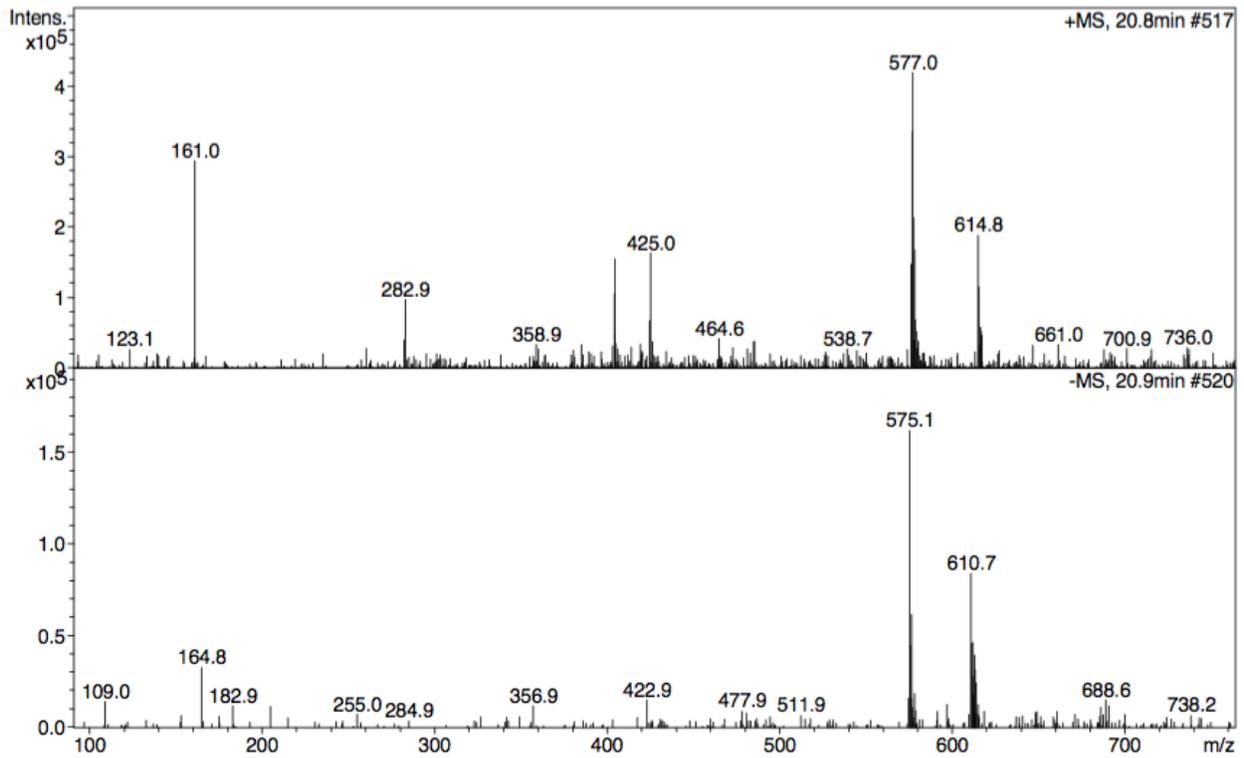
LC-MS Daten: Myricetin



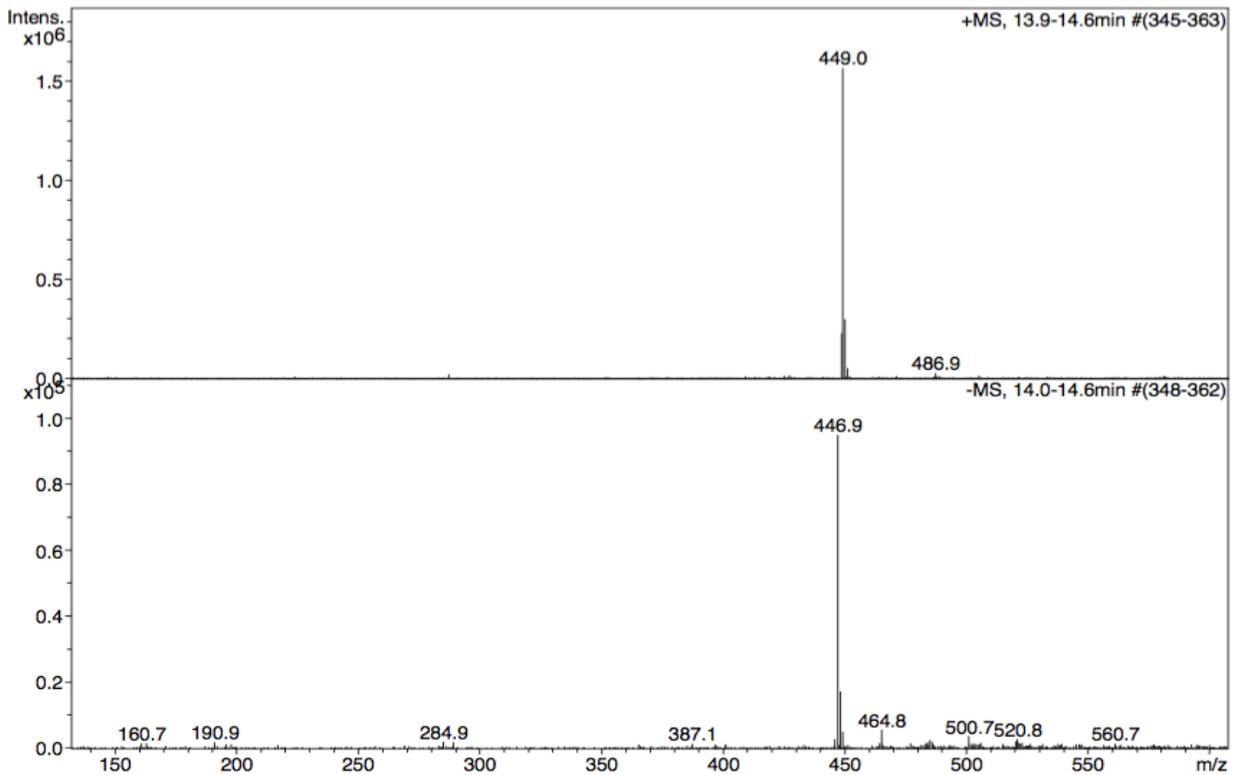
LC-MS Daten: Quercetin



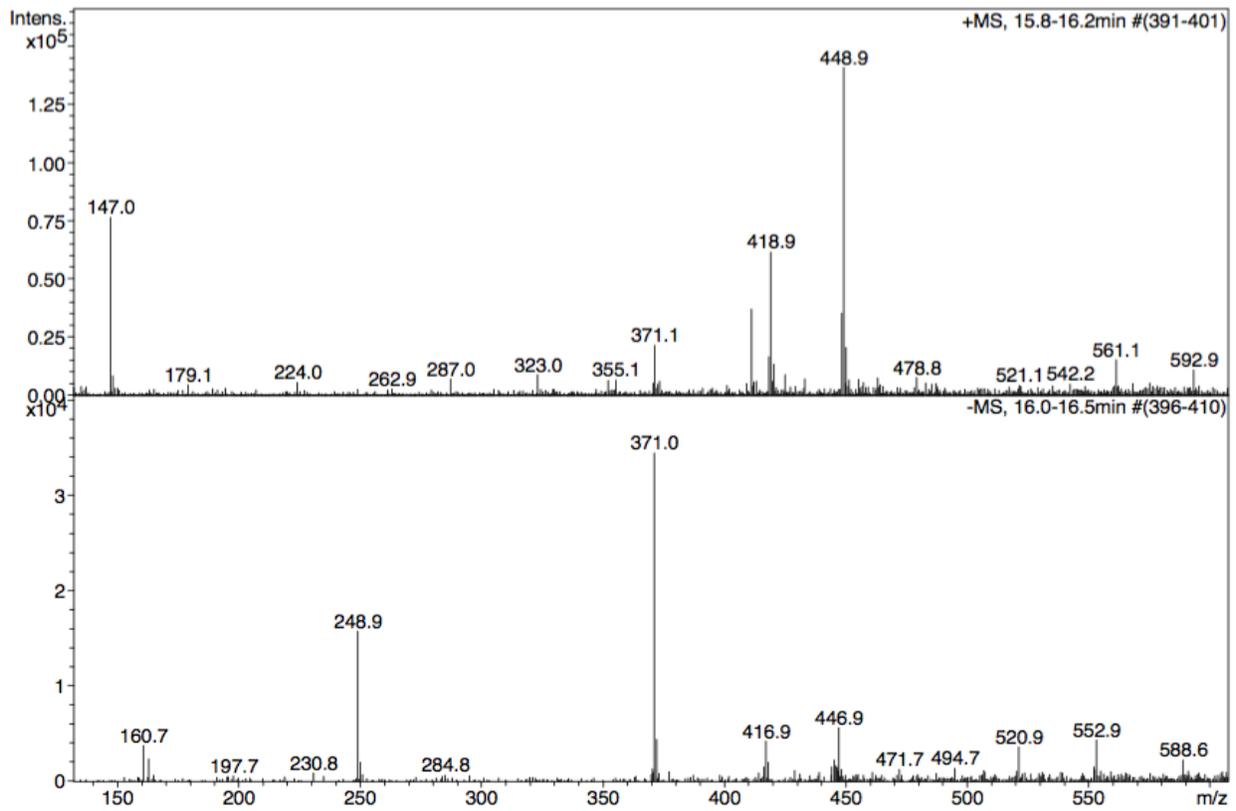
LC-MS Daten: PAC



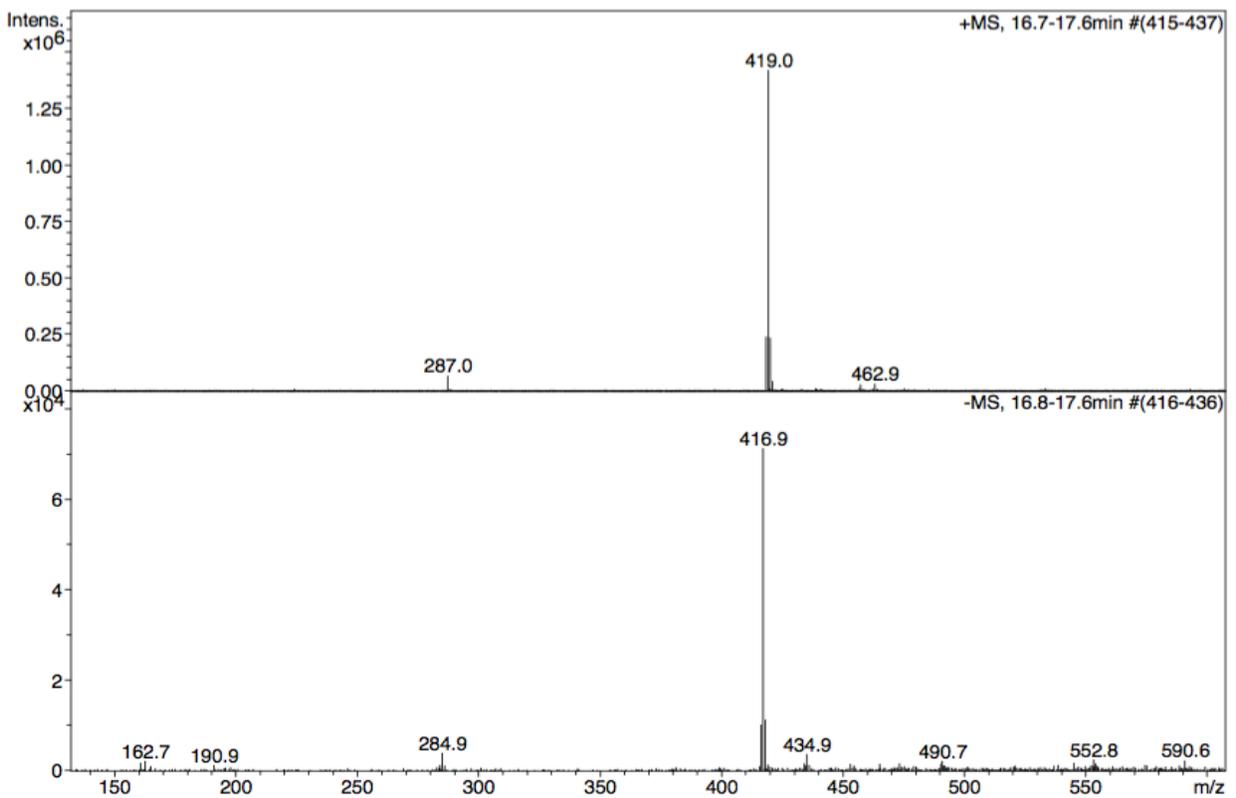
LC-MS Daten: Cya-3-gal



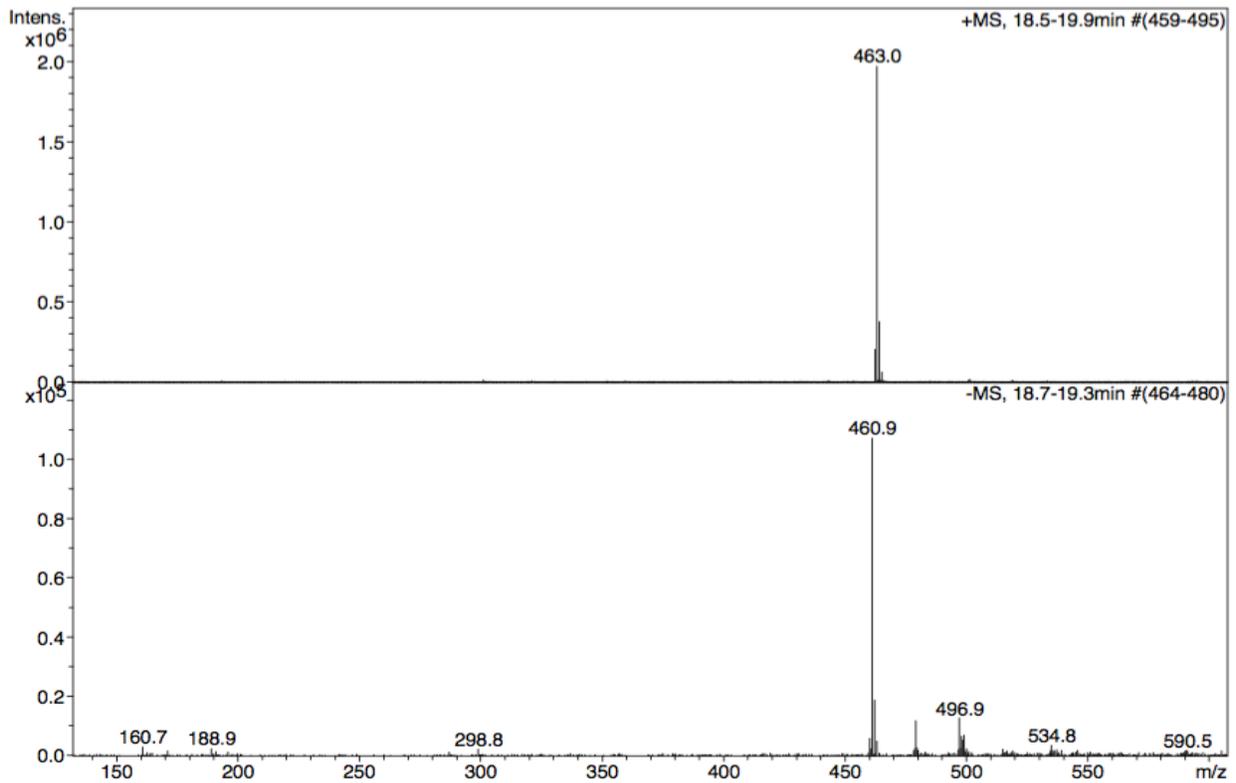
LC-MS Daten: Cya-3-glu



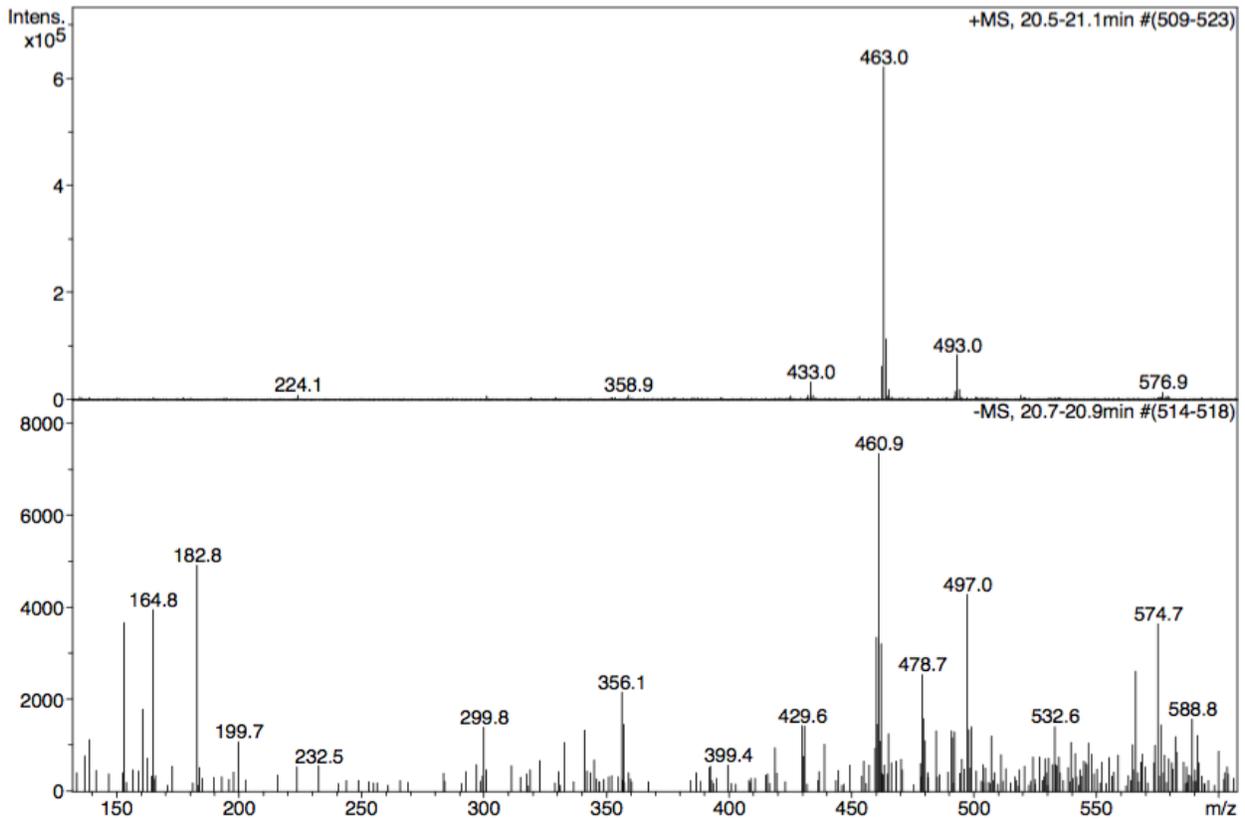
LC-MS Daten: Cya-3-ara



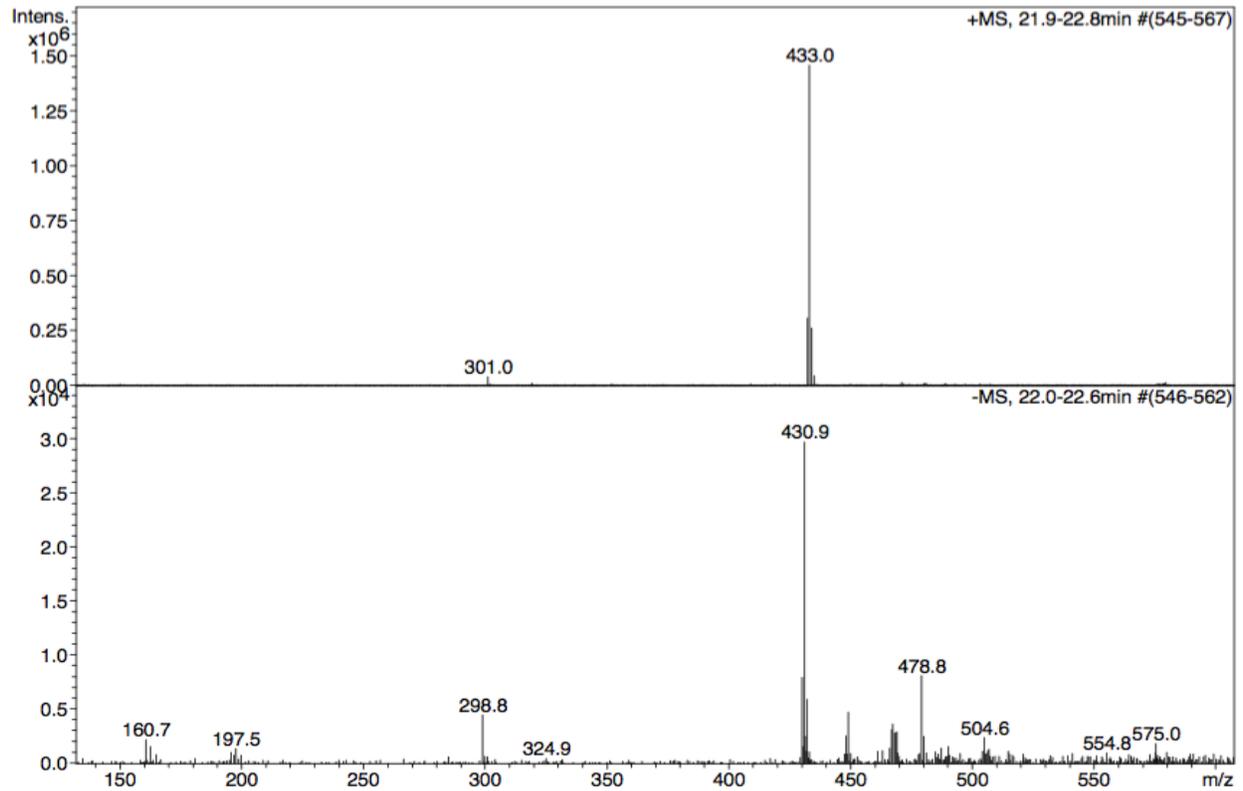
LC-MS Daten: Peo-3-gal



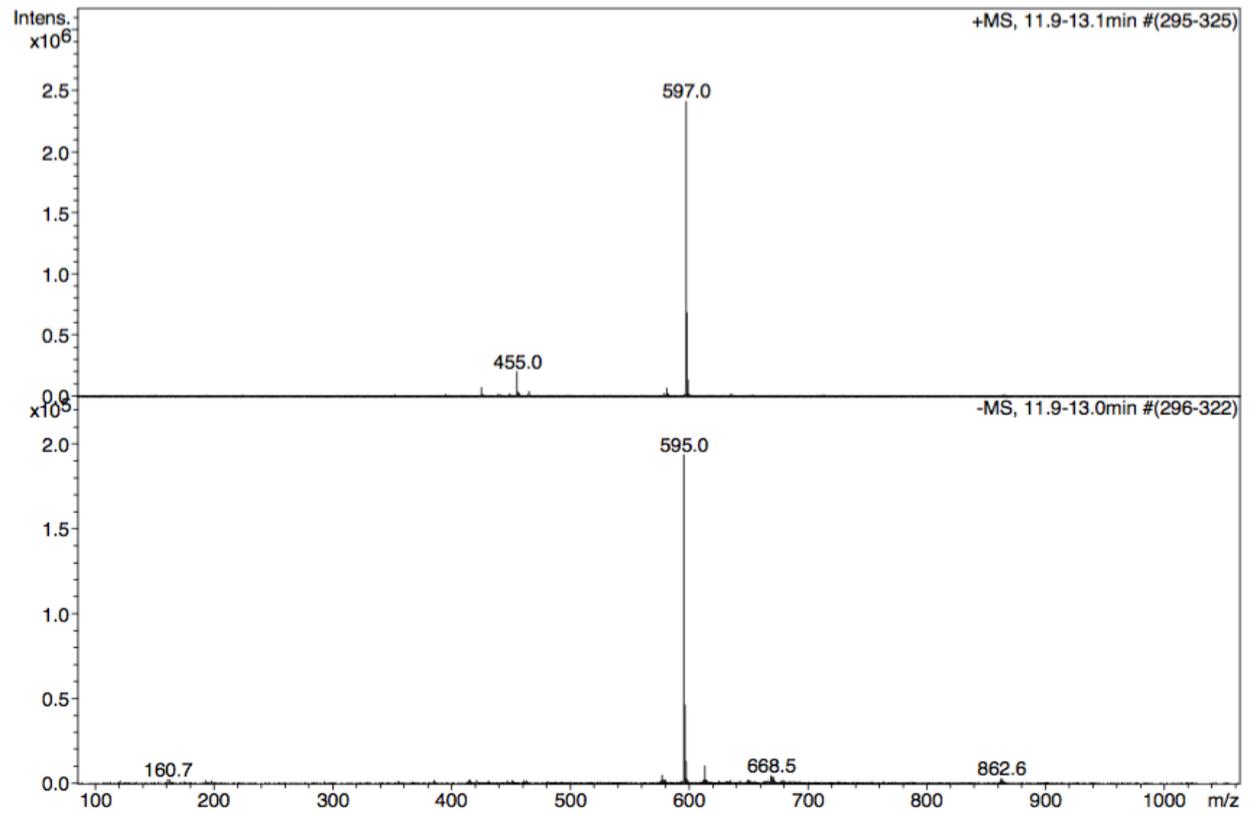
LC-MS Daten: Peo-3-glu



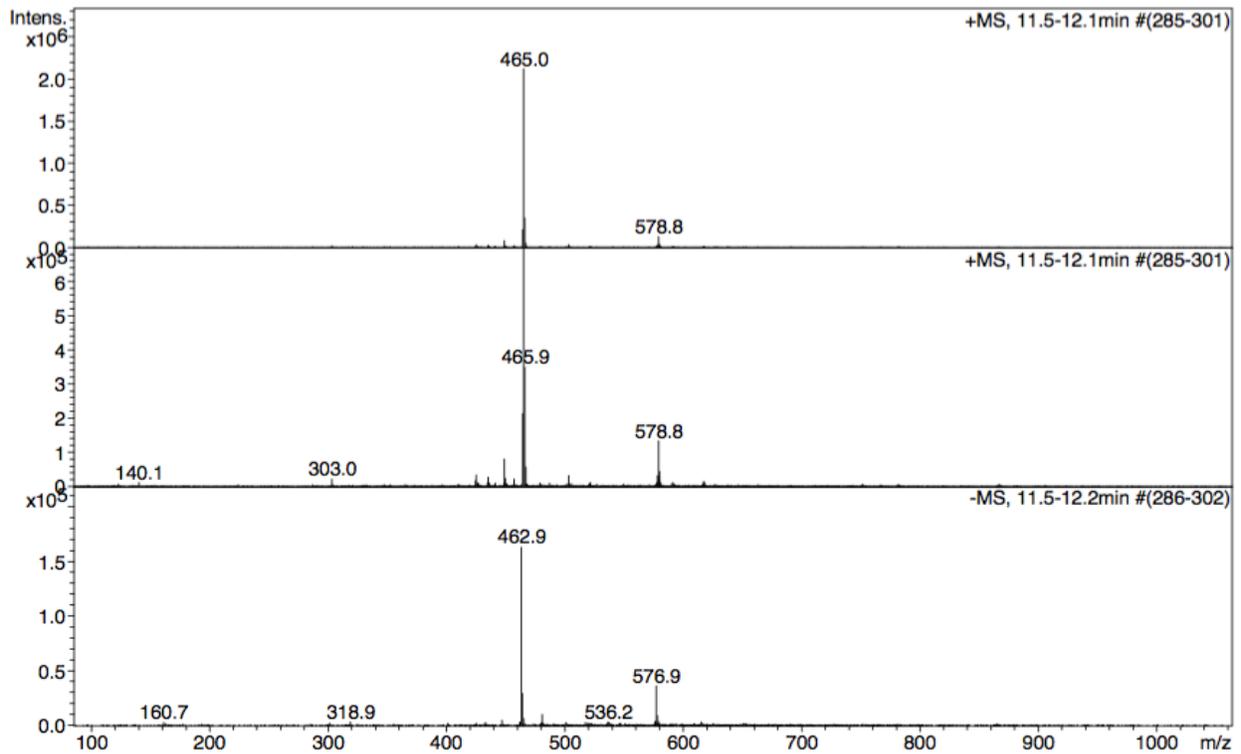
LC-MS Daten: Peo-3-ara



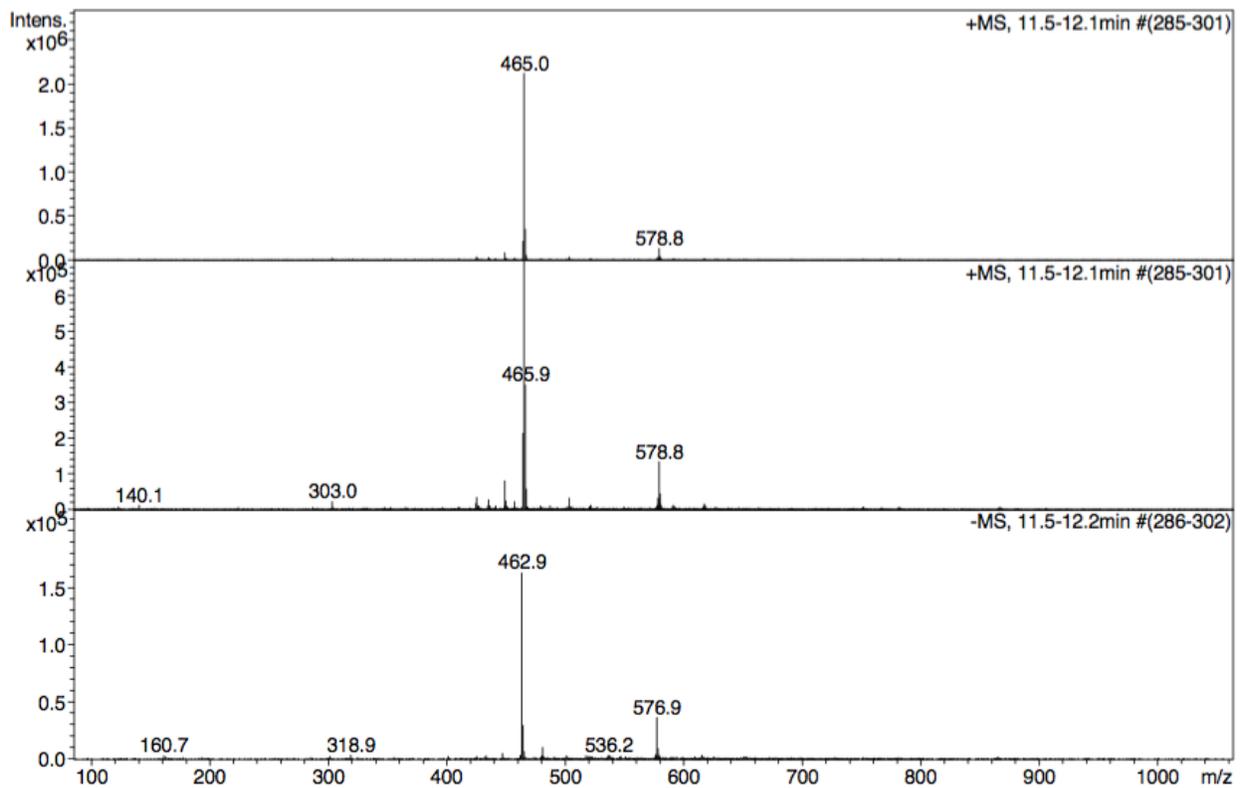
LC-MS Daten: Präparat C4 Peak 1



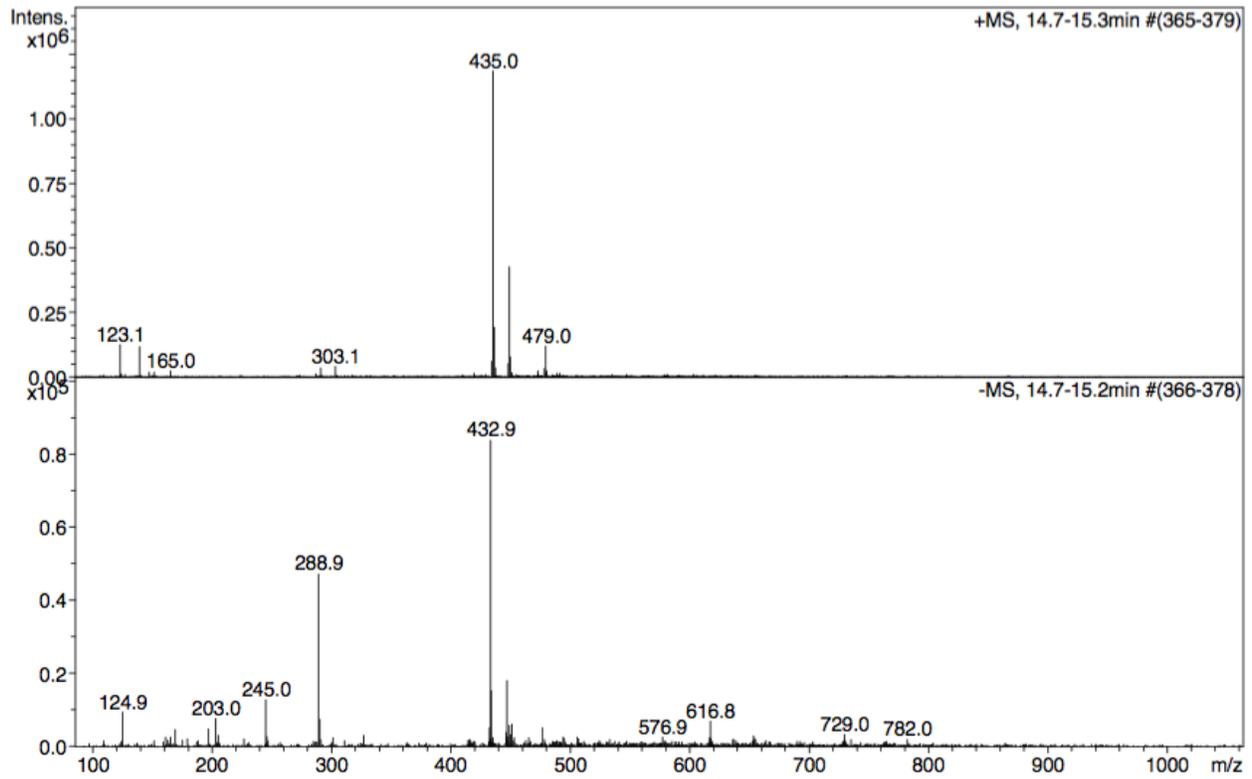
LC-MS Daten: Präparat C5, Peak 1 (Del-gal)



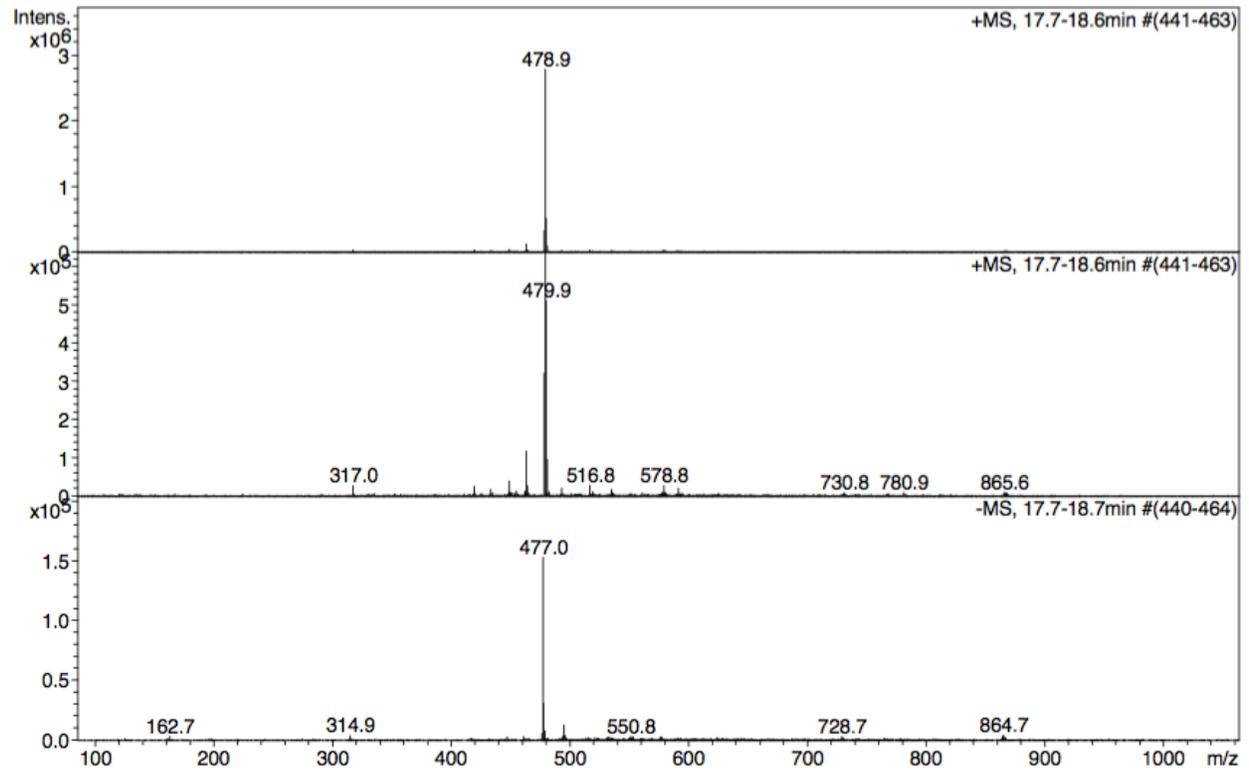
LC-MS Daten: Präparat C5, Peak 2 (Del-glu)



LC-MS Daten: Präparat C5, Peak 3 (Del-ara)



LC-MS Daten: Präparat C5, Peak 4 (Pet-hexose)



LC-MS Daten: Präparat C5 Peak 5

