

Bestimmung von Anthocyanen in Fruchtsäften per HPLC – UV

H. R. Wollseifen, Düren/D, T. Kretschmer, Düren/D

Dr. H. R. Wollseifen, MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Valencienner Str. 11, 52355 Düren/D



Einleitung:

Fruchtsäfte weisen typische Profile von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie Anthocyanen auf, die für eine Prüfung der Authentizität von Lebensmittelgruppen herangezogen werden können [1, 2]. Der Nachweis einer Verfälschung oder die Produktprüfung bei der Wareneingangskontrolle sind fester Bestandteil der Routineanalytik der amtlichen Lebensmittelüberwachung und von QM-Systemen lebensmittelverarbeitender Betriebe [3]. Daher ist eine leistungsfähige chromatographische Trennung der in Fruchtsäften enthaltenen Anthocyane erforderlich.

Nachfolgend wurde eine Methode entwickelt, deren chromatographischer Trennmechanismus im Wesentlichen auf π – Wechselwirkungen beruht. Dadurch ist es möglich, komplexe Anthocyanprofile, wie von Heidelbeersaft, schnell und einfach zu trennen. Die Methodik wird mit einer chromatographischen Trennung verglichen, die unter Einsatz einer monomeren Octadecylphase erzielt wurde.

Anthocyanidine

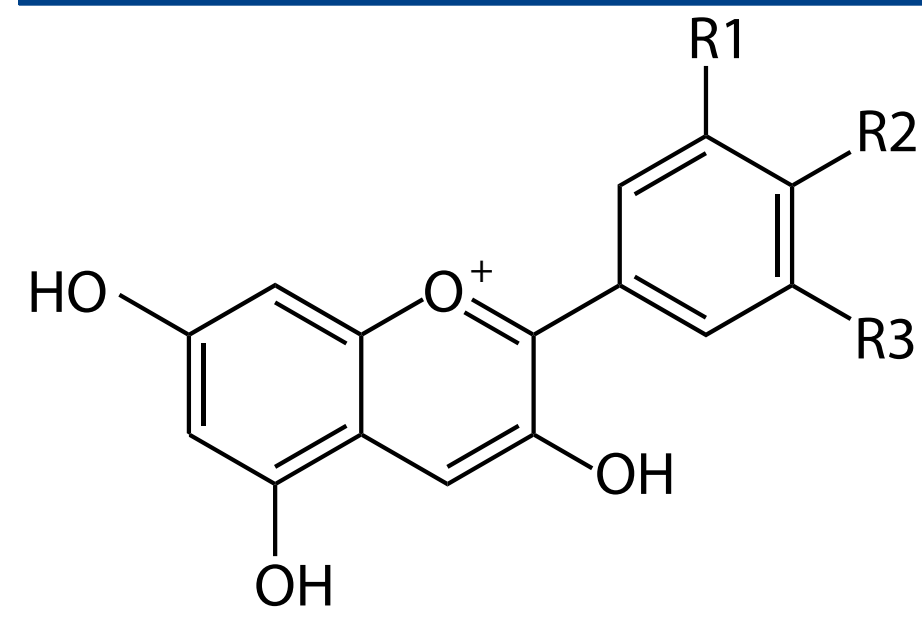


Abbildung 1: Molekülformel Anthocyanidine

Anthocyanidin R1	R2	R3
Pelargonidin	H	OH
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃



Probenvorbereitung

Probenvorbereitung: Probe 1:10 mit Eluent A verdünnen, membranfiltrieren (CHROMAFIL® PET 2013)

Anschlussanalytik: HPLC-UV-VIS

Chromatographische Bedingungen:

HPLC-Säule: EC 250/4 NUCLEODUR® π^2 , 5 μ m, (REF 760625.40)

Eluent A: 5 % Ameisensäure in Wasser

Eluent B: Methanol

Gradient: 5–95 % B in 30 min, 95 % B für 10 min halten, 95–5 % B in 1 min, 5 % B für 9 min halten

Fluss: 0,75 mL/min

Temperatur: 65 °C

Injektionsvolumen: 20 μ L

Detektion: 520 nm

HPLC-Säule: EC 250/4.6 NUCLEODUR® C₁₈ Gravity-SB, 5 μ m, (REF 760619.46)

Eluent A: 5 % Ameisensäure in Wasser

Eluent B: Methanol

Gradient: 5 % B für 2 min halten, 5–20 % in 8 min, 20 % B für 5 min halten, 20–25 % B in 15 min, 25 % B für 5 min halten, 25–33 % B in 15 min, 33 % B für 5 min halten, 33–36 % B in 10 min, 36–45 % B in 5 min, 45–53 % B in 5 min, 53–55 % B in 5 min, 55–70 % B in 4 min, 70–5 % B in 4 min, 5 % für 2 min halten

Fluss: 1,0 mL/min

Temperatur: 25 °C

Injektionsvolumen: 20 μ L

Detektion: 520 nm

Methodenvergleich:

Beispiel: Anthocyane in Heidelbeersaft

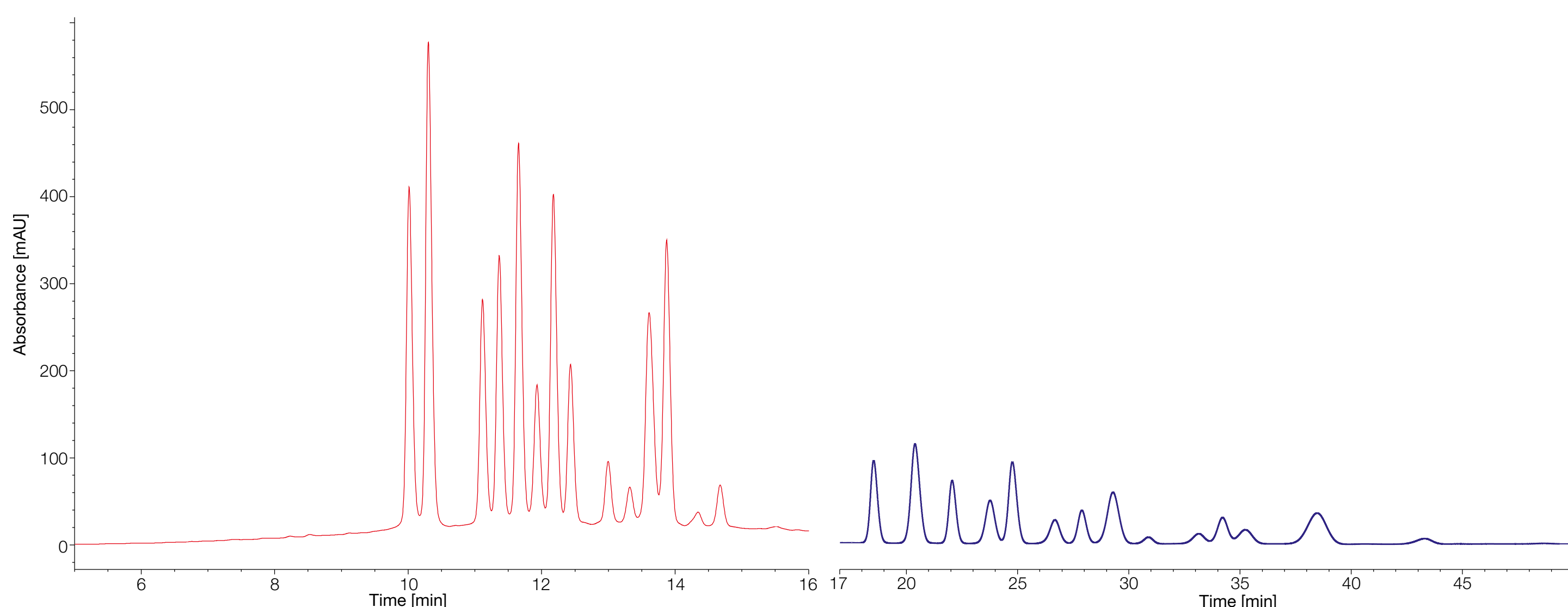


Abbildung 2: Methodenvergleich unter Verwendung einer Biphenylphase (NUCLEODUR® π^2) und einer monomeren Octadecylphase (NUCLEODUR® C₁₈ Gravity-SB).

Anthocyane in Fruchtsäften

Anthocyane in Heidelbeersaft

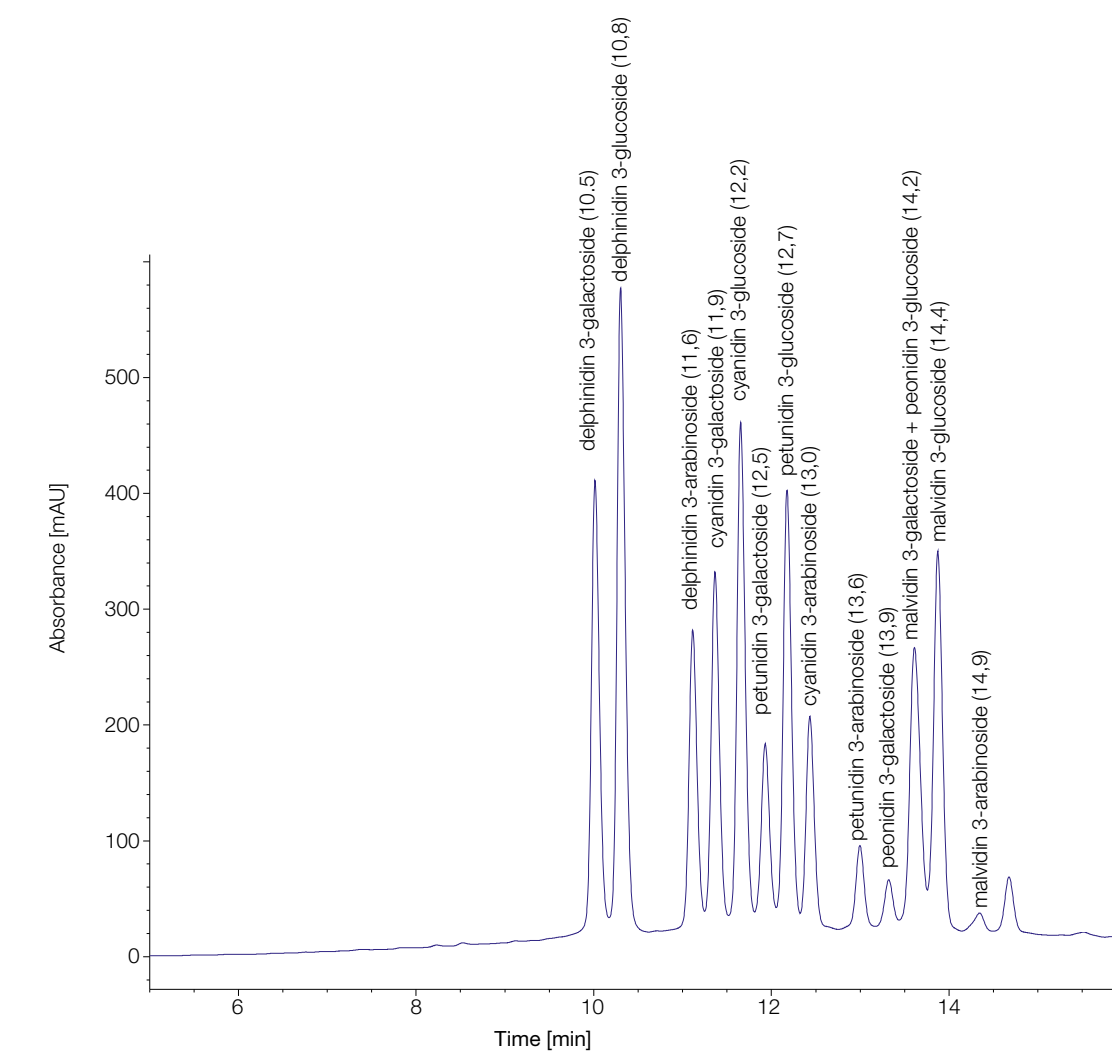


Abbildung 3: Anthocyane in Heidelbeersaft.

Anthocyane in Cranberrysaft

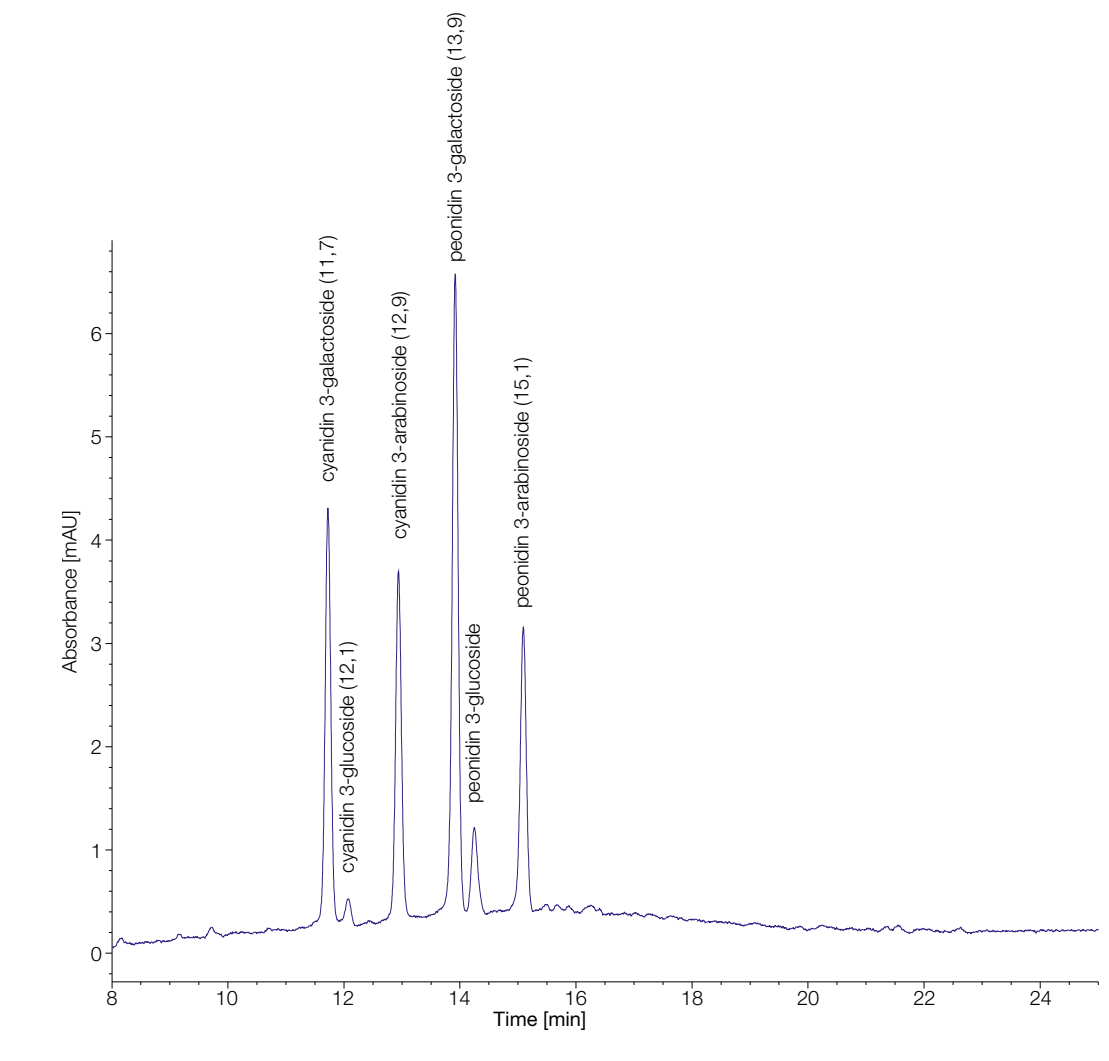


Abbildung 4: Anthocyane in Cranberrysaft.

Anthocyane in Kirschsaff

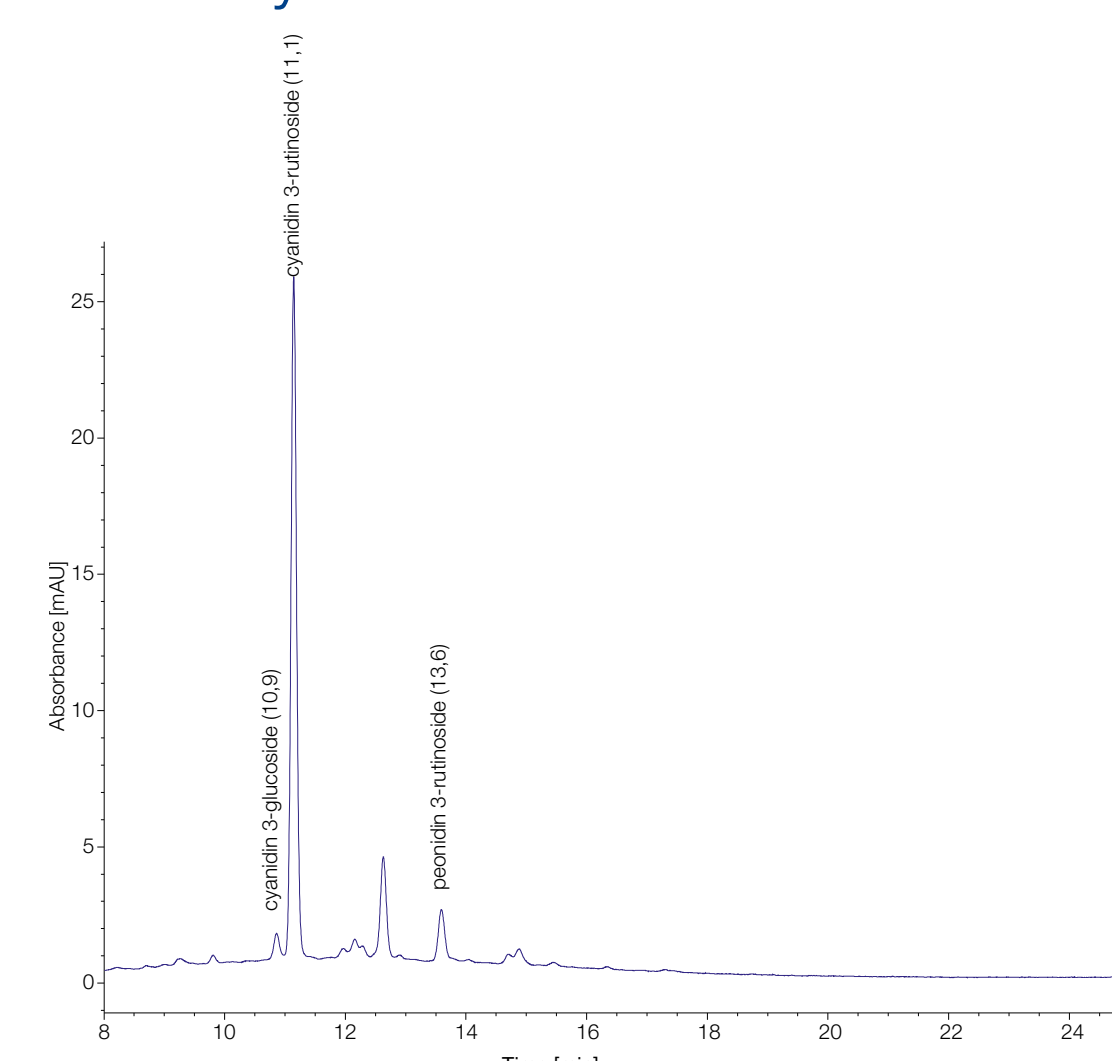


Abbildung 5: Anthocyane in Kirschsaff.

Anthocyane in Johannisbeersaft (schwarz)

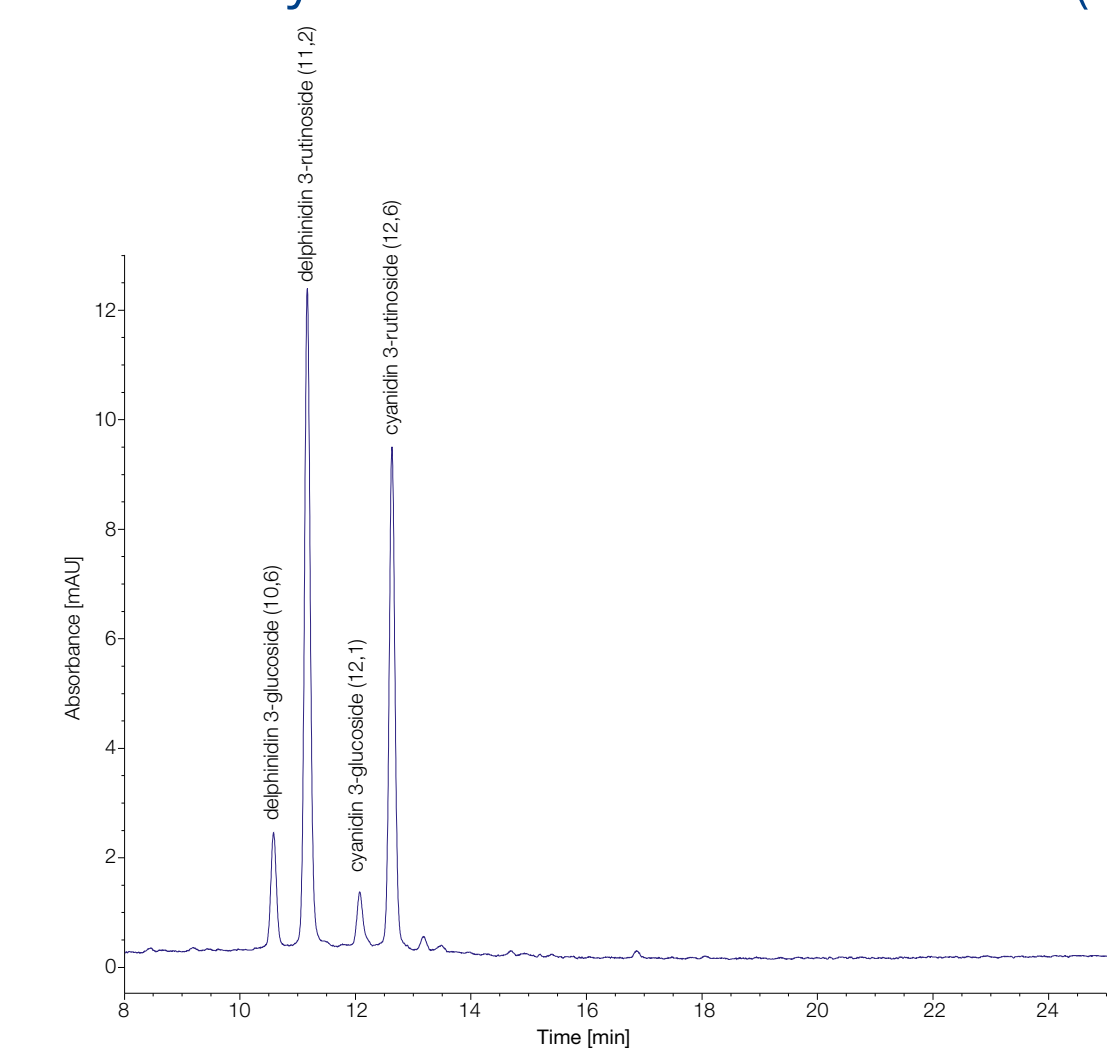


Abbildung 6: Anthocyane in Johannisbeersaft (schwarz).

Anthocyane in Holunderbeersaft

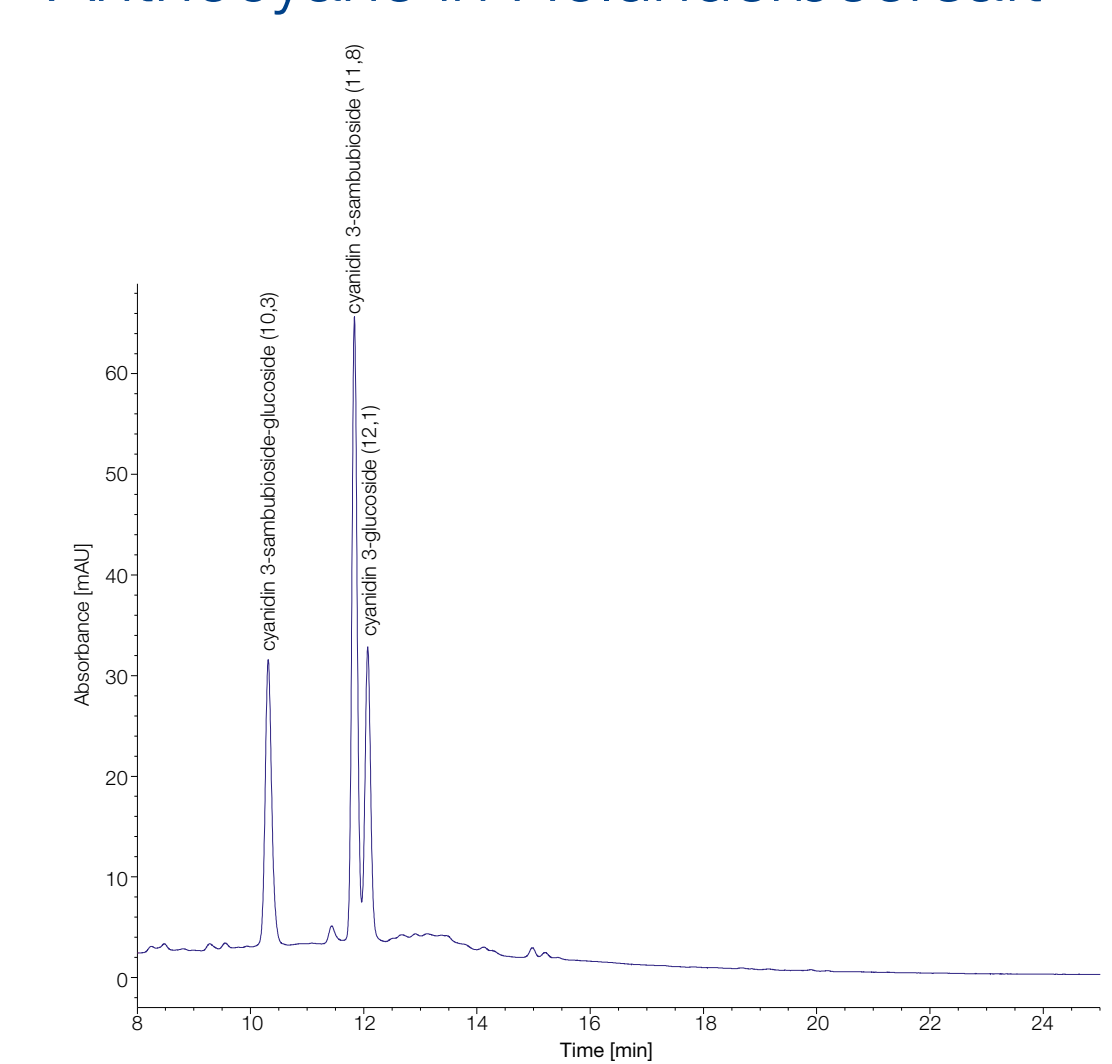


Abbildung 7: Anthocyane in Holunderbeersaft.

Anthocyane in Aroniabeersaft

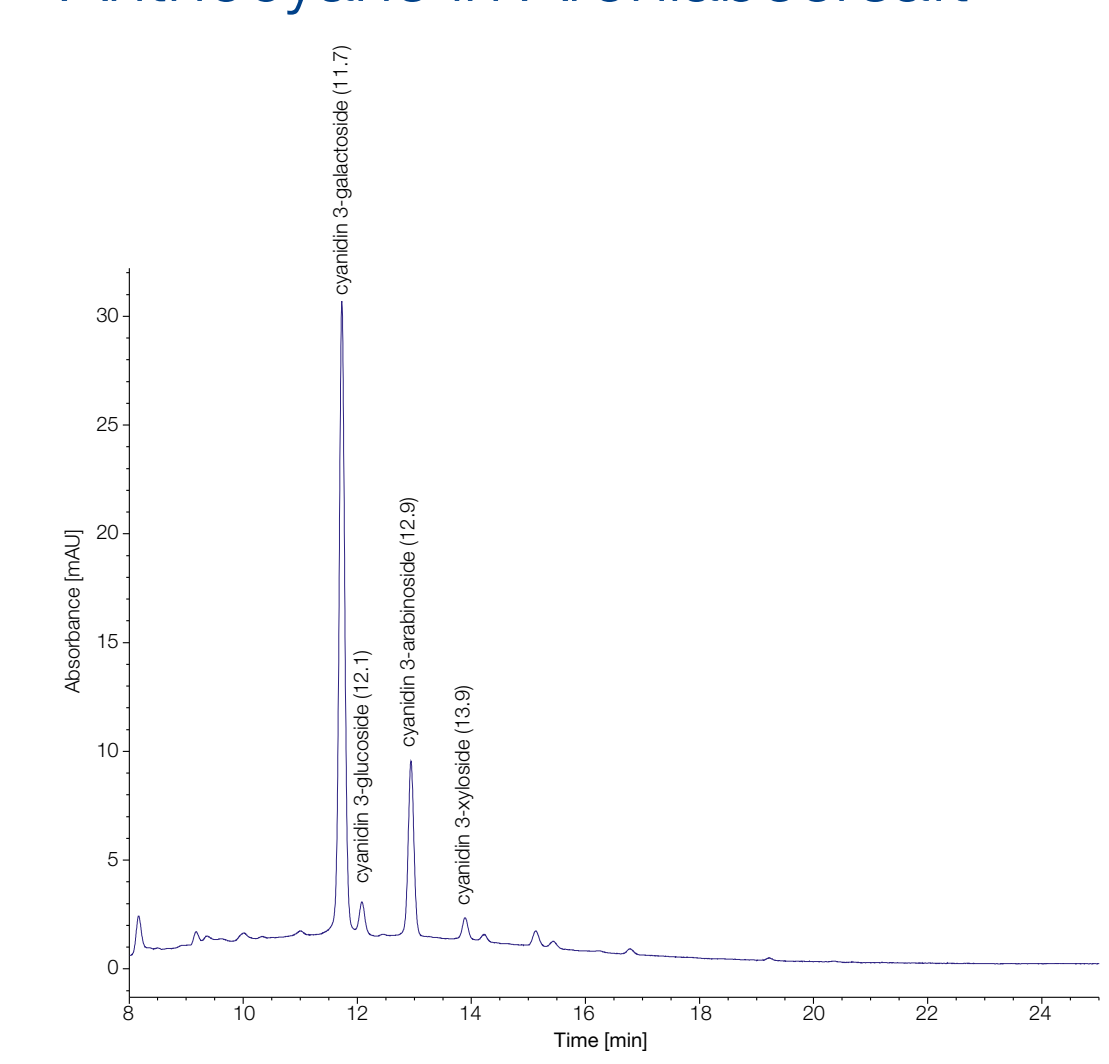


Abbildung 8: Anthocyane in Aroniabeersaft.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass eine sehr gute und schnelle chromatographische Trennung von Anthocyanen in Fruchtsäften mit Hilfe von π – Wechselwirkungen möglich ist. In Abbildung 2 ist ein Methodenvergleich dargestellt, der die wesentlich schnellere Chromatographie auf der NUCLEODUR® π^2 -Säule unterstreicht. Wesentlichen Einfluss bei der Methodik hat die Temperatur. Das Optimum für die chromatographische Trennung liegt bei 65 °C. Zusätzlich wurde die Methodik für 6 Fruchtsäfte getestet. Die Ergebnisse der untersuchten Saftproben sind in den Abbildungen 3–8 dargestellt und weisen die typischen Anthocyanprofile auf. Die flüssigchromatographische Methode könnte aufgrund der guten Retention der Analyten durch eine kleinere Partikelgröße oder eine kürzere Säule beschleunigt werden. Die Identifizierung der Anthocyane wurde per LC-MS/MS Detektion bestätigt.

Insgesamt konnte eine chromatographische Methode auf der NUCLEODUR® π^2 entwickelt werden, bei der der Trennmechanismus der π – Wechselwirkungen zu sehr guten Ergebnissen führte.

Literatur

- XIANLI WU et al., Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity, J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 7846–7856.
- Xianli Wu, and Ronald L. Prior, 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., 2005, 53 (7), 2589–2599.
- Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bestimmung von Authentizitäts – und Qualitätsmerkmalen von Cranberry, Granatapfel, Heidelbeere und Preiselbeere, AiF 16645.

