

HPTLC-ESI-MS zur Bestimmung von Anthocyanen in Futtermitteln und Lebensmitteln

S. Krüger, O. Urmann und G. Morlock

Lehrstuhl für Lebensmittelwissenschaften,
Justus-Liebig-Universität Giessen

JLU Study life
Explore the world

Einleitung

Anthocyane sind natürlich vorkommende, wasserlösliche, meist rote, violette und blaue Flavonoid-Farbstoffe. Ihnen werden gesundheitsfördernde Eigenschaften, z. B. entzündungshemmend, antimikrobiell, antioxidativ und krebsvorbeugend, zugesprochen [1] und ein positiver Einfluss auf die durch oxidativen Stress ausgelösten chronischen Krankheiten wie Diabetes [2]. Anthocyanextrakte werden als Farbstoff E 163 verschiedensten Lebensmitteln zugesetzt. Zudem wird Trester anthocyanhaltiger Früchte für Futtermittel verwertet. Die Bestimmung erfolgt überwiegend mit RP-HPLC und UV/Vis/DAD/MS-Detektion. Da die aktuelle Analytik zeitaufwendig ist, wurde eine matrix-robuste HPTLC-Methode entwickelt, die zudem einen hohen Probendurchsatz erlaubt. Durch die Aufnahme von Massenspektren nach Elution mit dem TLC-MS-Interface konnten unbekannte Anthocyan-Zonen weitergehend charakterisiert werden. Außerdem wurden die Bioaktivität (*Vibrio fischeri*) und die Radikalfänger-Eigenschaften (DPPH*) der einzelnen Anthocyane für viele Proben simultan bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Nach minimaler Probenaufarbeitung, i.e. Extraktion von 5 Traubentrester- bzw. Futtermittelproben mit angesäuertem Methanol sowie Zentrifugieren von angesäuerten 15 Saft- bzw. Weinproben, konnten die Anthocyane in nur 20 min mit Ethylacetat - 2-Butanon - Ameisensäure - Wasser (7:3:1.2:0.8) getrennt werden. Die Platten wurden dokumentiert und nach Absorptionsmessung bei den entsprechenden Wellenlängen quantifiziert (Abb. 1).

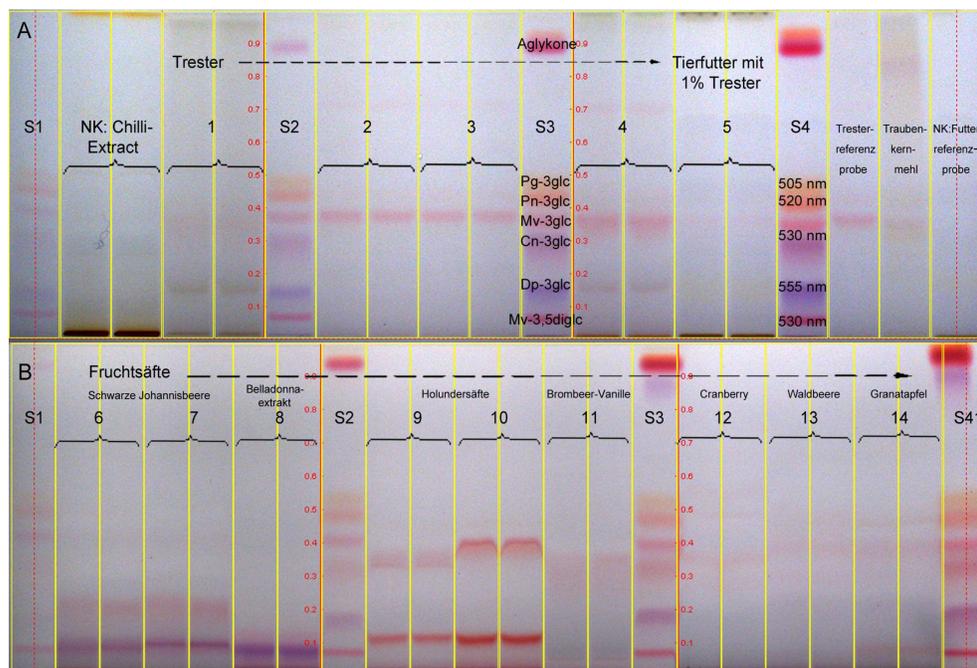


Abb.1 HPTLC-Chromatogramme: Traubentrester und Tierfutter (A), verschiedene Fruchtsäfte aus dem Handel (B); entsprechende 3-Glucoside (3-glc) sowie 3,5-Diglucosid (3,5-diglc) von Pg (Pelargonidin), Pn (Peonidin), Mv (Malvidin), Cn (Cyanidin) und Dp (Delphinidin), NK (Negativ-Kontrolle)

Wurden im oberen hR_F -Bereich Anthocyanidine (=Aglykone) in Proben detektiert, wurde die untere Plattenhälfte abgeschnitten und der obere Teil mit Ethylacetat - Toluol - Ameisensäure - Wasser (10:3:1.2:0.8) 13 min entwickelt. Die Methode zeigte gute Validierungskennzeichen [3]. Die Korrelationskoeffizienten der Kalibrierfunktion der 11 Anthocyane lagen zwischen 0.9993 und 0.9999. Die LOQs waren alle ≤ 90 ng/Band, meist ≤ 30 ng/Band und für Pn-3-glc und Pg-3-glc sogar ≤ 7 ng/Band. Für die Analytik von Mv-3-glc in Traubentrester und Tierfutter lag die mittlere Wiederholpräzision bei 1.4 % (Labor 1) und 1.8 % (Labor 2). Die Laborpräzision lag bei ≤ 6.7 % und die Robustheit der Methode bei ≤ 5.5 %. Die LOD-/LOQ-Werte unterschieden sich bei der Vis- und DPPH*-Detektion nur minimal (Abb. 2). Sie lagen bei letzterer etwas höher, aber immer noch unter 100 ng/Band. Die LOD der Bioaktivitätsdetektion mit *Vibrio fischeri* war für die Aglykone vergleichbar, jedoch für die Glucoside waren bis zu 20-fach höhere Mengen erforderlich (> 1000 ng/Zone).

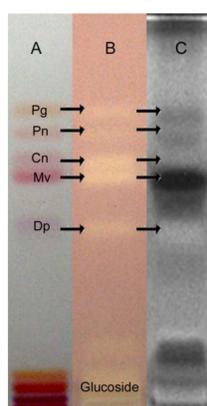


Abb. 2 Vergleich der Detektionsmethoden: Vis (A), DPPH*-Reagenz (B) sowie *Vibrio fischeri*-Suspension (C), exemplarisch gezeigt für Anthocyanidine

Bei einigen Saftproben konnten nicht alle Zonen zufriedenstellend zugeordnet werden. Die Zonen dieser unbekannt Anthocyane wurden mittels HPTLC-ESI-MS aufgenommen. Da noch relativ wenig über das Anthocyanmuster der Tollkirsche bekannt ist, war die Identifikation der beiden Komponenten von besonderem Interesse (Abb. 3).

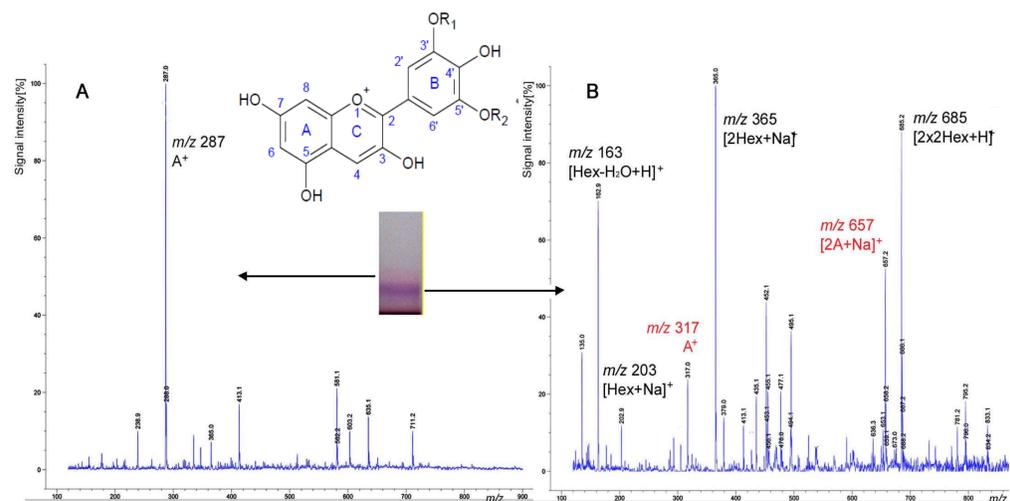


Abb. 3 HPTLC-ESI-MS: Massenspektren der 2 unbekannt Zonen von Probe 8 (Tollkirschenextrakt)

Das Massenspektrum der oberen, rosafarbenen Zone zeigt bei $m/z 287$ das Ion des Cn-Aglykons $[A^+]$. Somit lässt sich auf ein mehrfach glykosyliertes Cn-Derivat schließen. Das Massenspektrum der unteren, lilafarbenen Zone zeigt bei $m/z 317$ das Ion des Petunidin (Pt)-Aglykons $[A^+]$ und bei $m/z 657$ das Natrium-Addukt des Pt-Dimers $[2A+Na]^+$. Zudem konnten Natrium-Addukte von Einfachzuckern $[Hex+Na]^+$ und Zweifachzuckern $[Hex_2+Na]^+$ sowie deren Dimere $[2Hex_2+Na]^+$ zugeordnet werden, was ebenfalls auf ein mehrfach glykosyliertes Anthocyan hinweist.

Fazit

Die neu entwickelte Trennmethode eignete sich gut zur Quantifizierung von Anthocyanen in Futter- und Lebensmitteln. Saft- und Weinproben der gleichen Pflanze zeigten ein vergleichbares Anthocyanin-Muster, wohingegen sich dieses zwischen Pflanzenspezies charakteristisch unterschied. Zudem konnte die Bioaktivität (*Vibrio fischeri*) und Radikalfänger-Eigenschaft (DPPH*-Detektion) der Anthocyane sehr einfach und simultan für alle Proben bestimmt werden. Unbekannte Anthocyan-Zonen konnten mittels HPTLC-ESI-MS weitergehend charakterisiert werden.

Literatur [1] J. Shipp, E.-S. Abdel-Aal, The Open Food Science Journal 4 (2010) 7-22. [2] H.A. Hassan, A.F. Abdel-Aziz, Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1999-2004. [3] S. Krüger, O. Urmann, G. Morlock, J Chromatogr A, in Druck.

Dank an Prof. Dr. Klaus Eder und Denise Gessner, JLU Gießen, sowie Dr. Rudolf Binder und Carina Lämmle, Schüler-Forschungszentrum Südwürttemberg, für Proben und Standardsubstanzen, an CAMAG, Muttenz, Schweiz und Merck, Darmstadt, für die Unterstützung mit Geräten und HPTLC-Platten.

IFZ Interdisziplinäres
Forschungszentrum
Giessen Research Centre for
BioSystems, Land Use and Nutrition

