

S. Koswig, H.-J. Hofsommer

HPLC-Methode zur Untersuchung von Anthocyanen in Buntsäften und anderen gefärbten Lebensmitteln

• Anthocyane • Authentizität • Buntsäfte • Fingerprints • HPLC-Methode



S. Koswig



H.-J. Hofsommer

Anthocyane stellen die Hauptkomponente der färbenden Substanzen in roten, blauen und violetten Früchten und Gemüse dar. Sie gehören zur großen Klasse der unterschiedlich substituierten Flavonkomponenten. Dabei wird zwischen glycosidischen und nichtglycosidischen Anthocyanen unterschieden. In Früchten und Gemüse liegen sie in der Regel in der glycosidischen Form vor. Bei den nichtglycosidischen Anthocyanen – den sogenannten Anthocyanidinen – wird je nach Derivatisierung des Grundkörpers zwischen 6 verschiedenen Verbindungen unterschieden: Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Pelargonidin, Peonidin sowie Malvidin. Die Vielfalt der natürlich vorkommenden Anthocyane ergibt sich dann aus der Substitution der Anthocyanidine mit natürlich vorkommenden Zuckern. Zu den hauptsächlich in Anthocyanen nachweisbaren Zuckern zählen Glukose, Rutinose, Sophorose, Sambubiose, Glycosylrutinose und Xylosylrutinose.

Für die Charakterisierung sowie den Nachweis von Verfälschungen in Buntsäften ist es deshalb ausreichend, die wichtigsten Komponenten zu kennen, die die natürliche Färbung hervorrufen. Dabei handelt es sich in der Regel um 1-10 verschiedene Substan-

zen, die für ca. 90 % der natürlichen Farbgebung verantwortlich sind.

Die Literatur über die Analytik von Anthocyanen umfaßt vor allem papier-, dünn-schichtchromatographische und HPLC-Methoden. Hong (1) faßt eine Vielzahl publizierter HPLC-Methoden für die Untersuchung der Anthocyanzusammensetzung zusammen. Die am häufigsten beschriebene Methodik ist die Verwendung der Reversed Phase-HPLC mit C18-Phasen. Die Unterschiede bestehen lediglich in der Eluentenzusammensetzung und der verwendeten Arbeitsweise (isokratisch bzw. Gradient). Aufgrund der starken Abhängigkeit der Stabilität der Anthocyane vom pH-Wert werden jeweils eine wäßrige saure Komponente (Ameisen-, Essig- oder Phosphorsäure) und eine organische Komponente (Methanol, Acetonitril, Tetrahydrofuran oder Aceton) verwendet. Die Detektion erfolgt in der Regel bei 520 nm, in einigen Arbeiten wird jedoch auch die Verwendung eines Photodioden-Array-Detektors in der Anthocyananalytik beschrieben (1, 2).

Macrae (5), Markakis (6) sowie Mazza und Miniati (7) geben einen umfassenden Überblick über den allgemeinen Kenntnisstand auf dem Gebiet der Anthocyane,

Ebenso befassen sich Wrolstad und Mitarbeiter (2, 4, 8, 9, 10) seit vielen Jahren mit der Zusammensetzung und der Stabilität der Anthocyane in verschiedenen Fruchtarten.

In der Weinanalytik wurde durch Untersuchung der Anthocyanzusammensetzung von 50 verschiedenen Traubensorten anhand sogenannter „Fingerprints“ eine Einteilung in 5 verschiedene Gruppen vorgenommen:

1. die Pinot Noir Gruppe
2. die Trollinger Gruppe
3. die Malvidin Gruppe
4. Varietäten mit etwa gleicher Verteilung
5. die Hybrid Gruppe [Wenzel et al. (3)].

In der Fruchtsaftanalytik aber sind derartige chromatographische „Fingerprints“ nur für die wichtigsten Buntsäfte bekannt. Auch gibt es nur wenig Aussagen über den Einfluß von Technologie, Reifegrad, Sorte sowie Herkunft auf die Zusammensetzung der Anthocyane. Unser Ziel war es daher, eine HPLC-Methode für die Routineanalytik zu entwickeln, mit der eindeutige Aussagen hinsichtlich der Authentizität von Buntsäften ermöglicht werden, wobei dies mit möglichst geringem Probenvorbereitungsaufwand erreicht werden sollte.

Experimenteller Teil

Es wurden verschiedene Literaturmethoden getestet, bei welchen sowohl mit Gradientenelution als auch isokratisch gearbeitet wurde.

Bei der Methode von Spanos and Wrolstad (1987) (4), die auch als Grundlage für die provisorische Methode des Schweizer Lebensmittelbuches (11) diente, werden die Anthocyane über eine aufwendige Probenvorbereitung angereichert, was letztendlich

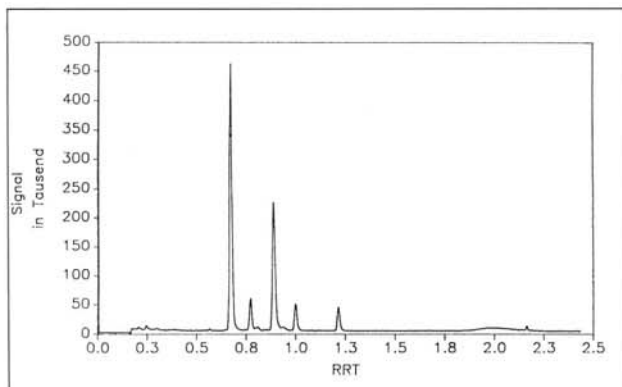


Abb. 1a: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Aroniabeere

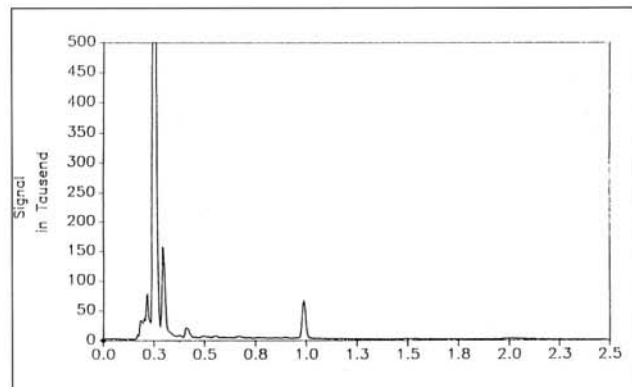


Abb. 1b: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Rote Bete

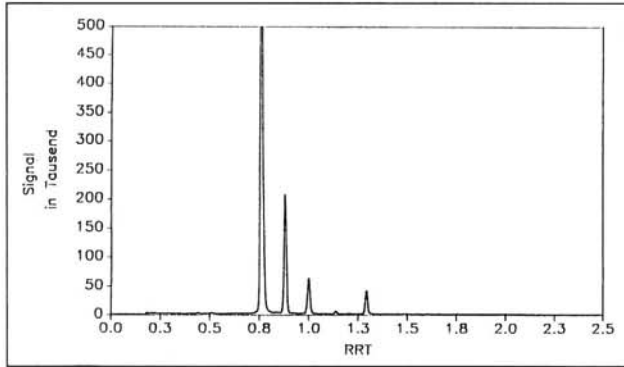


Abb. 1c: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Brombeere

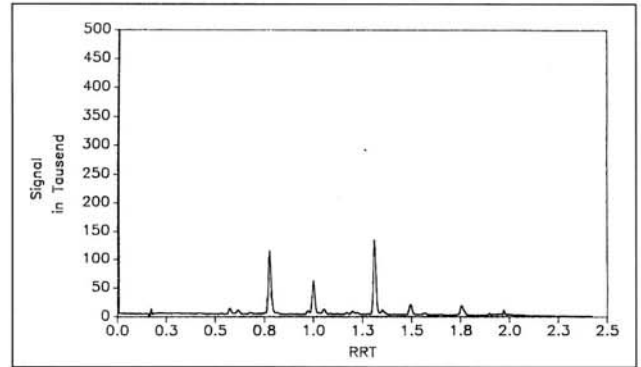


Abb. 1d: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Blutorange

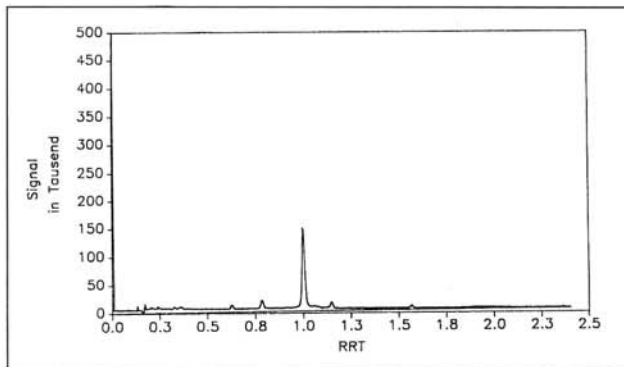


Abb. 1e: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Erdbeere

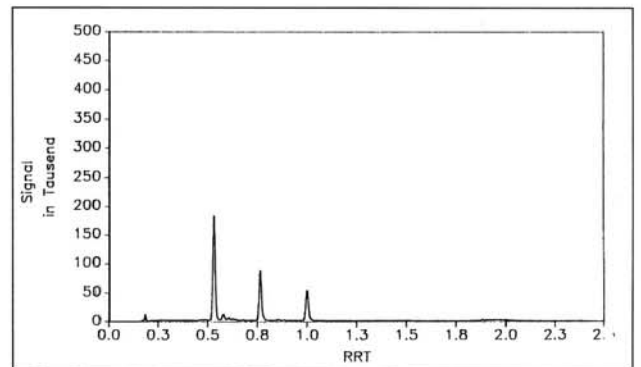


Abb. 1f: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Hibiskus

aber zu beträchtlichen Konzentrationsverlusten führte.

Die Methode von Wenzel et al. (3) liefert Chromatogramme mit hohen Peakintensitäten, ermöglicht aber keine vollständige Trennung. Es wurde auch eine isokratische Ver-

fahrensweise (12) getestet, um Probleme hinsichtlich der Übertragbarkeit von Gradientenmethoden auf HPLC-Systeme verschiedener Fabrikate auszuschließen. Bedingt durch gerätetechnische Konstruktionsmerkmale unterscheiden sich Gradientensysteme

zum Teil beträchtlich in ihren Verweilvolumina und erschweren damit die Übertragung von Methoden (13). Mit einer isokratischen Verfahrensweise ist es jedoch nicht möglich, Zumischungen von Fremdfrüchten eindeutig zu erkennen.

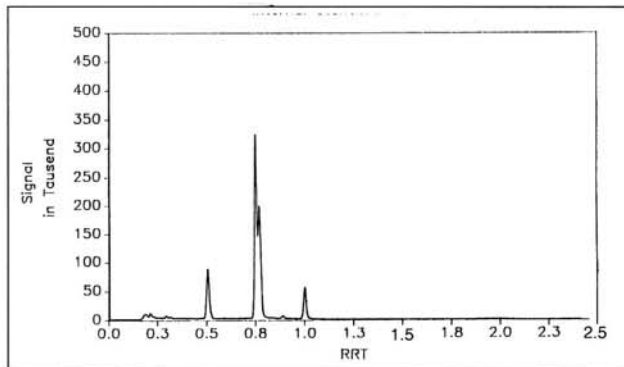


Abb. 1g: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Holunder

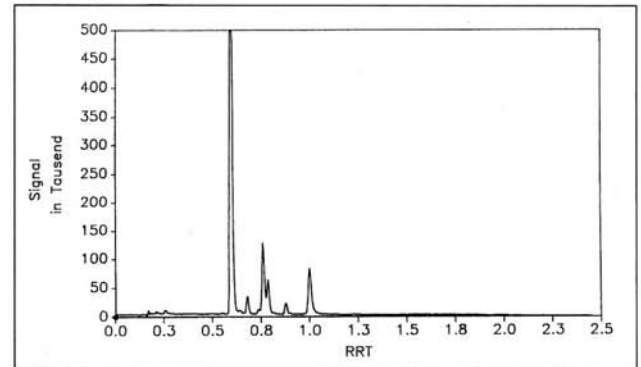


Abb. 1h: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Himbeere

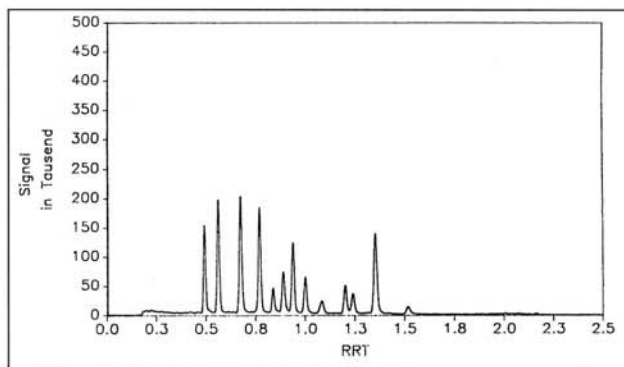


Abb. 1i: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Heidelbeere

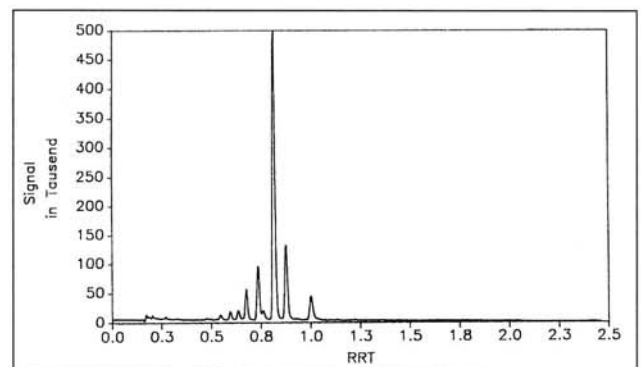


Abb. 1j: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – rote Johannisbeere

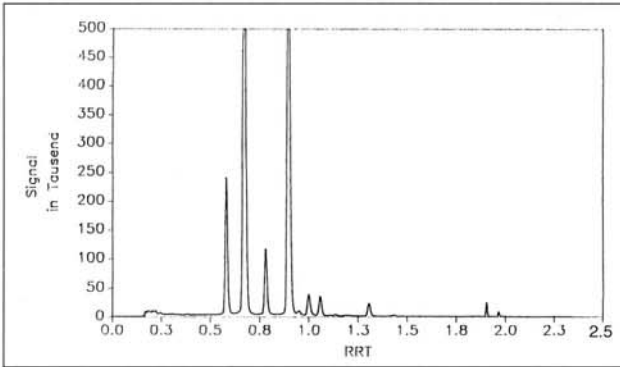


Abb. 1k: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – schw. Johannisbeere

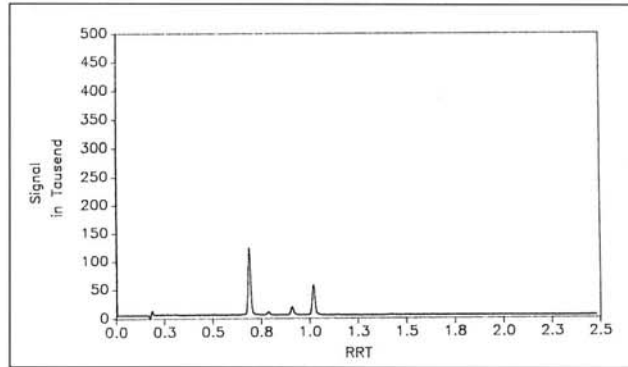


Abb. 1l: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Preiselbeere

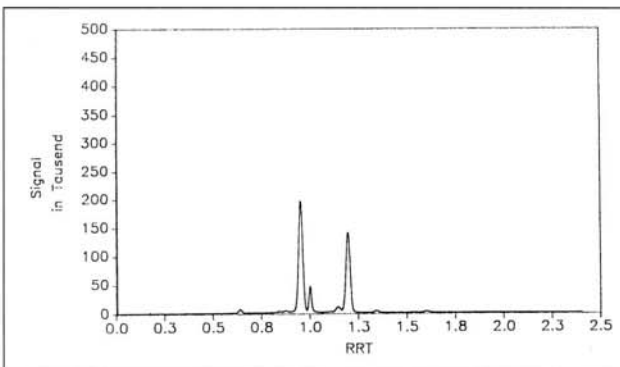


Abb. 1m: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Malve

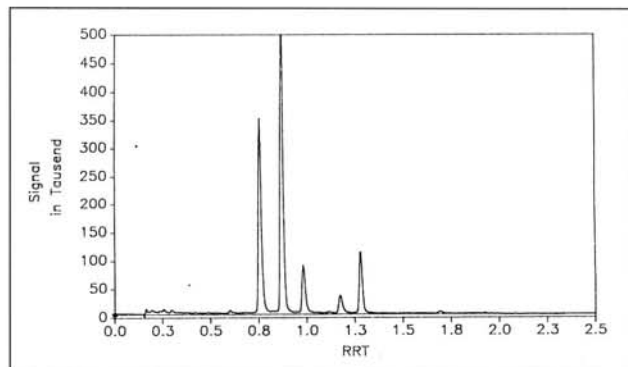


Abb. 1n: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Schlehe

HPLC-Bedingungen

- Trennsäule: analytische HPLC-Säule, Reversed phase RP18, 5 µm, 250x4.6mm (Hypersil ODS)
- Säulentemperatur: 40 °C
- Flußrate: 1.0 ml/min
- Detektion: UV-Detektor, 518 nm (Fa. Perkin Elmer LC 75)
- HPLC-System: Fa. LKB Pharmacia, bestehend aus 2 HPLC-Pumpen Nr.2248 sowie einem Autosampler Nr.2157
- Chemikalien: Acetonitril (HPLC-Qualität)
- Wasser (HPLC-Qualität bzw. bidestilliert)
- Ameisensäure (98-100 %, p.a.)
- Eluent A: Wasser/Ameisensäure (90:10) (v:v)
- Eluent B: Wasser/Ameisensäure/Acetonitril (40:10:50) (v:v:v)

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	% A	% B
0	88	12
26	70	30
35	0	100
38	0	100
43	88	12
45	88	12

Analysenzeit: 45 Minuten; Equilibrierung: 5 Minuten

Das Gradientenprogramm wurde auf dem beschriebenen HPLC-System der Fa.

LKB Pharmacia erstellt. Für die Übertragung der Methode auf andere HPLC-Gradientensysteme ist das Verweilvolumen der jeweils verwendeten Anlage zu berücksichtigen (13). Identische Retentionszeiten und Selektivitäten zwischen benachbarten Peaks sind nur bei identischen Verweilvolumina zu erwarten.

- Injektionsvolumen: in der Regel 10 µl, bei schwach gefärbten Säften 50-100 µl.
- Standard: Callistephin-Chlorid (Pelargonidinchlorid-3-glucosid, Fa. Roth, 8956.1). Dieser wird sowohl als interner Standard den Probelösungen zugesetzt (0.05 g/l) als auch als externer Standard verwendet.
- Probenvorbereitung: Fruchtsäfte bzw. Konzentrate nach Verdünnung auf Saftstärke werden nach Membranfiltration (Sartorius Minisart NML, 0.2 µm) und Zusatz des internen Standards direkt injiziert. Fruchtzubereitungen werden nach 1:2 bzw. 1:5 Verdünnung wie oben beschrieben behandelt.

Bei zu geringer Intensität der Anthocyanpeaks in Fruchtzubereitungen ist eine Anreicherung der Anthocyane aus verdünnten wäßrigen Lösungen über konditionierte Baker-C18-Kartuschen möglich.

Ergebnisse

Die vorgeschlagene Methode liefert Chromatogramme mit scharfen gut getrenn-

ten Peaks über den gesamten Retentionsbereich. Zumischung von Roter Bete (deren Anthocyane sehr früh eluieren) wie auch von Früchten mit spät eluierenden Peaks (z.B. schwarzer Johannisbeere, Heidelbeeren und roten Trauben) werden eindeutig erkannt und ermöglichen eine deutliche Zuordnung. Bei einigen Traubensäften werden im hinteren Bereich des Gradienten nicht vollständig getrennte „Peakgebirge“ eluiert, deren Zuordnung unklar ist. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich hierbei um polymerisierte Anthocyane handelt.

Die Untersuchungen wurden an 18 verschiedenen Buntsäften durchgeführt, wobei die Zahl der jeweiligen Proben je nach Fruchtart zwischen 2 (z.B. bei Aroniabeere) bis zu ca. 100 schwarzen Johannisbeeren, 70 Kirschen bzw. 60 roten Traubensäften variierte.

Für jede Fruchtart wurde die typische Anthocyanzusammensetzung als Fingerprint ermittelt und in Form eines Atlas der relativen Retentionszeiten zusammengestellt (Abb. 1a-r). Die Auswertung der Anthocyane als Fingerprint ermöglicht die Erkennung von unerlaubten Zusätzen natürlicher färbender Säfte sowie die Charakterisierung von Mischungen verschiedener Früchte, auch ohne daß jeder einzelne Peak eindeutig strukturell identifiziert wurde.

Schwierigkeiten bei der Zuordnung gibt es allerdings bei Proben, in denen trotz hoher Injektionsvolumina keine oder nur sehr kleine Anthocyan-Peaks nachweisbar sind. Eindeutige Aussagen sind in solchen

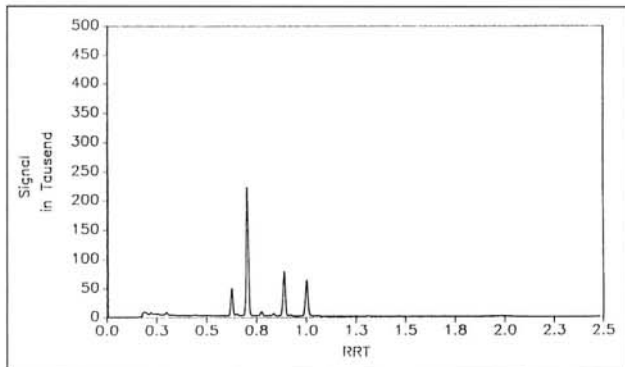


Abb. 1o: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Sauerkirsche

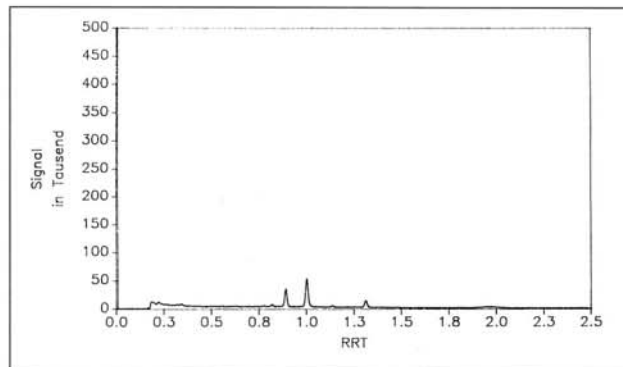


Abb. 1p: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Süßkirsche

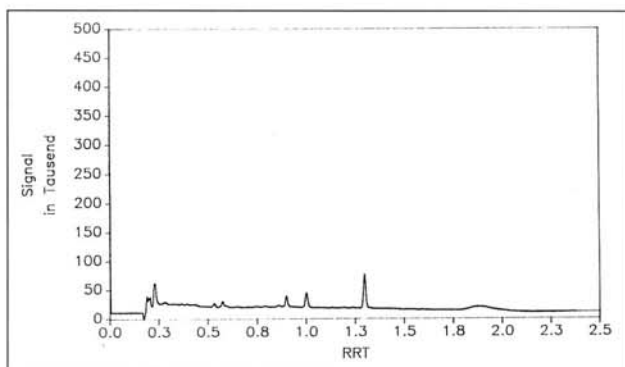


Abb. 1q: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – Pflaume

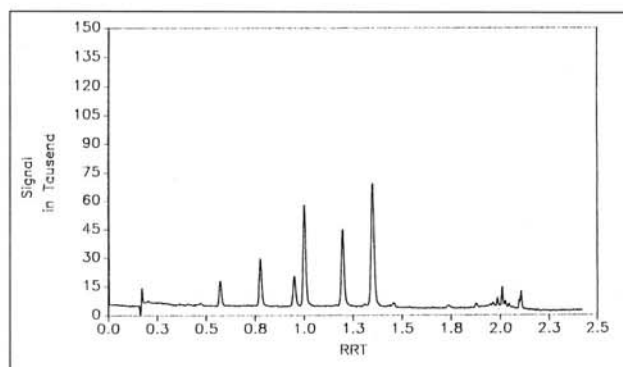


Abb. 1r: Anthocyan Fingerprint – Atlas der relativen Retentionszeiten – rote Traube

Fällen oft nicht möglich und limitieren die Nachweisgrenze der Methode. Zusätze von Säften/Konzentraten mit nur kleinen Anthocyanpeaks sind dann nicht zu erkennen und bedürfen anderer empfindlicherer Nachweismethoden. Vor allem in Erdbeer-, Himbeer- und Pflaumenkonzentraten, sowie in braungefärbten Traubensäften wurden derartige Anthocyanchromatogramme erhalten. Darüberhinaus kann auch bei technologisch behandelten Proben die Intensität der Anthocyanpeaks sehr gering sein.

Problematisch ist die im Vergleich zu anderen HPLC-Methoden geringe Stabilität der Säule, bedingt durch die hohe Konzentration an Ameisensäure im Eluenten (10%). Bei Verwendung neuer HPLC-Säulen mit gleichem Füllmaterial sowie vom gleichen Säulenhersteller bedarf es wesentlich längerer Einspülzeiten als üblich, um eine gute Konstanz der Retentionszeiten und damit auch der relativen Retentionszeiten zu erreichen.

Bei schwarzen Johannisbeeren wurden hinsichtlich der Anthocyanzusammensetzung keine Unterschiede festgestellt, die sich auf Sorte, Jahrgang, Herkunft und Technologie zurückführen lassen. Unterschiede waren nur in der Intensität der Peaks und in den Größenverhältnissen der Peaks untereinander nachweisbar.

Bei Sauerkirschen konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Anthocyanzusammensetzung in Abhängigkeit von Sorte, Jahrgang und Herkunft festgestellt werden. Es wurde bei allen Sauerkirschen das glei-

che typische Anthocyanmuster erhalten, lediglich die Intensität der Peaks wie auch die Größenverhältnisse untereinander waren verschieden. Vor allem Sauerkirschen der Sorte Stevnsbeere zeigten deutlich höhere Intensitäten. Bei Himbeeren, Heidelbeeren, Brombeeren sowie roten Johannisbeeren und roten Trauben sind jedoch deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Anthocyane in Abhängigkeit von Sorte und Herkunft zu erkennen.

In der Routineanalytik muß deshalb ausgeschlossen werden, daß es sich bei abweichenden Anthocyanmustern nicht um diese sortenbedingten Unterschiede handelt.

Zusätze von stark färbenden Säften (z.B. Holunder oder Rote Bete) bzw. von naturidentischen Farbstoffen wie z.B. Encocyanin oder Rubini sind aufgrund der deutlich erkennbaren typischen Peaks in fast allen Fruchtarten gut zu erkennen.

Zusammenfassung

Für jede Fruchtart läßt sich ein charakteristischer Anthocyan-Fingerprint nachweisen. Bei einigen Beerenfrüchten gibt es jedoch sorten- bzw. herkunftsabhängig verschiedene Anthocyan-Muster. Die Kenntnis des typischen Anthocyan-Pattern ermöglicht uns eindeutige Aussagen hinsichtlich der Authentizität von Fruchtsäften.

Die Schwierigkeiten, die eine eindeutige Zuordnung erschweren können, sind jedoch nicht so schwerwiegend, daß ein-

deutige Aussagen in der Regel nicht möglich sind. Sie limitieren aber die Nachweisgrenze der Methode.

Über den Einfluß der Technologie auf die quantitative Zusammensetzung der Anthocyane werden wir am Beispiel der schwarzen Johannisbeere und über unterschiedliche Qualitätsstufen auch am Beispiel der Kirsche und Traube in einer weiteren Arbeit berichten.

Literatur

- Hong, H.: Thesis 1987, Oregon State University 1987. "Characterization of anthocyanins in fruit juices and natural colorants"
- Hong, H. und R. E. Wrolstad: J. Agric. Food Chem. 38 (1990) 689, 703
- Wenzel, K., H.H. Dittrich und M. Heimfarths: Vitris 26 (1987) 65@@@
- Spanos, G.A. und R.E. Wrolstad: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70 (1987) 6, 1036; J. Agric. Food Chem. 38 (1990) 1565
- Macrae, R.: HPLC in food analysis, Academic Press Ltd, London 1988
- Markakis, P.: Anthocyanins as Food Colors, Academic Press Ltd, New York 1982
- Mazza G. und E. Miniati: Anthocyanins in fruits, Vegetables and Grains, CRC Press, Inc. 1993, BocaRaton, Ann Arbor, London, Tokyo
- Rommel, A., D.A. Heatherbell und R.E. Wrolstad: J. Food Science 55 (1990) 1011; J. Food Science 57 (1992) 385
- Wrolstad, R.E., J.D. Culbertson, Ch.J. Cornwell und L.R. Mattick: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65 (1982) 6, 1417
- Wrolstad, R.E., M.J. Boyles, A. Rommel und R.W. Durst: Internationale Fruchtsaft-Union, Zug, Kündig Druck AG, 1992, S. 501-509
- Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 28 A, provisorische Methode, „Anthocyanmuster mit HPLC“, Februar 1990
- CEN, provisorische Methode, „Determination of red fruit juice, concentrated juice and syrup anthocyanins with HPLC“, Juli 1991
- Snyder, L. R. und J.W. Dolan: LC/GC Mag. 8 (1990) 524

Verfasser: S. Koswig und H.-J. Hofsommer, GfL Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH, D-10787 Berlin