Technische Universität Braunschweig
Institut für Lebensmittelchemie

Braunschweig, 05.01.2004

Name der Forschungsstelle Ort, Datum

AiF-Vorhaben Nr.: 12895 N

Forschungsthema:

„Untersuchungen über die antioxidativ wirksamen Bestandteile von teeähnlichen Getränken („Kräuter- u. Früchtetees“)“

Gefördert aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (BMWA/AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI).

Schlussbericht *) Abschluss des Vorhabens am 31.10.2003

1 INHALTSVERZEICHNIS

1 INHALTSVERZEICHNIS 1

2 ZUSAMMENFASSUNG 7

3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 10

4 PROBLEMSTELLUNG 11

5 ÜBERSICHTSUNTERSUCHUNGEN (SCREENING) 12

5.1 Testprinzipien 12

5.1.1 Folin-Ciocalteau-Test 12

5.1.2 Modifizierter TEAC-Test 13

5.2 Extrahierbare Feststoffe 14

5.3 Ergebnisse der Gesamtphenolbestimmung 15

5.3.1 Auswertung Gesamtpolyphenole im Getränk 15

5.3.2 Auswertung Gesamtphenole bezogen auf extrahierte Feststoffe 17

5.4 Antioxidative Aktivität (Trolox-Äquivalente) 17

6 LAGERVERSUCHE 20

7 UNTERSUCHUNG DER EINZELNEN PRODUKTE 20

7.1 Extraktionstechniken 20

7.2 Flavan-3-ole (Catechine) 21

7.3 Hydroxyzimtsäuren (Chlorogensäuren) 21

7.4 Flavonol-O-glykoside (FOG) 22

7.4.1 Acide Flavonol-O-glykoside 22

7.5 Flavon-C-glykoside 23

7.6 Brombeerblätter 23

7.6.1 Untersuchungen mittels HPLC-DAD und HPLC-MS 23

7.6.2 Ergebnisse der Polyamid-Säulenchromatographie 24

7.6.3 Vergleich der TEAC-Werte 26

7.6.4 Quantitative Bestimmungen 26

7.6.4.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren) 26
7.6.4.2 Flavonol-O-Glykoside (FOG) 26

7.7 Cystus incanus 27
7.7.1 Quantitative Bestimmungen 27
7.7.1.1 Flavan-3-ole (Catechine) 27
7.7.1.2 Hydroxyzimtsäuren (Chlorogensäuren) 27
7.7.1.3 Flavonol-O-glykoside 27

7.8 Fenchelsamen 28
7.8.1 Flavonol-O-glykoside 28
7.8.2 Flavon-C-glykoside 29
7.8.3 Hydroxyzimtsäurederivate 29

7.9 Himbeerblätter 29
7.9.1 Quantitative Bestimmungen 29
7.9.1.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren) 29
7.9.1.2 Flavonol-O-Glykoside (FOG) 29

7.10 Melisse 30
7.10.1 Extraktionsausbeute 30
7.10.2 Untersuchungen der Extrakte mittels HPLC-DAD und HPLC-MS 31
7.10.3 Ergebnisse der PA-Säulenchromatographie 31
7.10.4 Vergleich der TEAC-Werte 33
7.10.5 Quantitative Bestimmungen 34
7.10.5.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren) 34
7.10.5.2 Flavonol-O-Glycoside (FOG) 34
7.10.5.3 Rosmarinsäure 34

7.11 Pfefferminze 34
7.11.1 Extraktionsausbeute 35
7.11.2 Untersuchungen der Extrakte mittels HPLC-DAD und HPLC-MS 35
7.11.3 Ergebnisse der PA-Säulenchromatographie 36
7.11.4 Vergleich der TEAC-Werte 37
7.11.5 Quantitative Bestimmungen 39
7.11.5.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren) 39
7.11.5.2 Flavonol-O-Glykoside (FOG) 39

7.12 Rooibos 39
7.12.1 Untersuchungen der Extrakte mittels HPLC-DAD und HPLC-MS 39
7.12.2 Ergebnisse der PA-Säulenchromatographie 40

7.12.3 Vergleich der TEAC-Werte 42
7.12.4 Aufreinigung 42
7.12.5 Quantitative Bestimmungen 42
7.12.5.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren) 42
7.12.5.2 Flavonol-O-Glycoside (FOG) 42
7.12.5.3 Flavon-C-Glycoside (FCG) 43
7.13 Rotes Weinlaub 43
8 UNTERSUCHUNGEN ZUR HERSTELLUNG VON INSTANT-PRODUKTEN ...43
9 DISKUSSION 45
9.1 Vergleich mit dem Antrag 45
9.2 Darstellung der Verwertbarkeit der Ergebnisse und Nutzen für kmU 45
9.3 Zusammenstellung von Veröffentlichungen 46
10 MATERIAL UND METHODEN 46
10.1 Haushaltsüblicher Teeaufguss 46
10.2 Extrahierbare Feststoffe 46
10.3 Methanolische Extraktion 46
10.4 Gesamtphenol-Bestimmung 47
10.5 Bestimmung der antioxidativen Kapazität 47
10.5.1 Erzeugung des ABTS-Radikals 47
10.5.2 Kalibrierung 47
10.5.3 Messung 48
10.6 HPLC 48
10.6.1 Analytische HPLC-Anlagen 48
10.6.1.1 HPLC-DAD-Anlage 48
10.6.1.2 HPLC-ESI-MS^n-Anlage 48
10.6.1.3 Bestimmung von Flavan-3-olen (Catechine) 49
10.6.1.4 Bestimmung von Hydroxyzimtsäure-Derivaten (Chlorogensäuren) 50
10.6.1.5 Bestimmung von Flavonol-O-glykosiden 52
10.6.1.6 Bestimmung von Flavon-C-glykosiden 54
10.6.1.7 Bestimmung der Rosmarinsäure 55
10.7 Extraktion zur Gewinnung von Reinsubstanzen 56

10.8 Probenaufreinigung 57
10.8.1 Reinigung über XAD-2 57
10.8.2 Reinigung über XAD-16HP 57
10.8.3 Polyamid-Säulenchromatographie 57
10.9 HSCCC 58
11 LITERATUR 59
12 ANHANG 61
12.1 Übersichtsuntersuchungen (Screening) 61
12.1.1 Extrahierbare Feststoffe (TSS) und Gesamtphenole (Folin) 61
12.1.2 Antioxidative Aktivität 62
12.2 Daten Lagerversuche 63
12.3 Ergebnisse der Quantifizierungen 64
12.3.1 Einwaagen der wässrigen Extrakte und Trockenmassen 64
12.3.2 Einwaagen der methanolischen Extrakte 64
12.3.3 Ergebnisse der Flavan-3-ol-Bestimmung (Catechine) 64
12.3.3.1 Gallussäure 64
12.3.3.2 Epigallocatechin 65
12.3.3.3 Catechin 65
12.3.4 Ergebnisse der Hydroxyzimtsäure-Bestimmung (Chlorogensäuren) 65
12.3.5 Ergebnisse der Flavonol-O-glykosid-Bestimmung (FOG) 66
12.3.6 Ergebnisse der Bestimmung der aciden FOG 66
12.3.7 Ergebnisse der Flavon-C-glykosid- Bestimmung (FCG) 67
12.4 Daten zur Instant-Produktherstellung 67
12.4.1 Lösliche Feststoffe 67
12.4.2 Trolox-Äquivalente 68
12.5 Ergebnisse der Einzeluntersuchungen 69
12.5.1 Brombeerblätter 69
12.5.1.1 Rohextrakt 69
12.5.1.2 Methanolisches PA-Eluat 69
12.5.1.3 Ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat 69
12.5.2 Melisse 70
12.5.2.1 Rohextrakt 70
12.5.2.2 Methanolisches PA-Eluat 70
12.5.2.3 Ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat 70

12.5.3 Pfefferminze 70
12.5.3.1 Rohextrakt 70
12.5.3.2 Methanolisches PA-Eluat 70
12.5.3.3 Ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat 71
12.5.4 Rooibos 71
12.5.4.1 Rohextrakt 71
12.5.4.2 Methanolisches PA-Eluat 71
12.5.4.3 Ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat 71

2 Zusammenfassung

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

In einer Übersichtsuntersuchung wurden von 42 Proben die extrahierbaren Feststoffe, die Gesamtphenolgehalte und die antioxidativen Aktivitäten von 42 Produkten aus methanolischen und wässrigen Extrakten bestimmt.

Die Gehalte an **extrahierbaren Feststoffen** (Extraktgehalte) bewegten sich im Bereich von 3 % bis 63 %. Eine Spitzenstellung nahmen dabei Tees aus Früchten und Beeren aufgrund des hohen Zuckergehaltes ein (z. B. Apfel, Hagebutte). Mittlere Extraktgehalte fanden sich hauptsächlich bei Blatt- und Blütentees (z. B. Kamille, Pfefferminze), geringe Extraktgehalte wiesen Tees aus Samen, Rinden und Wurzeln auf (z. B. Fenchel, Zimt).

Insbesondere bei Blättern waren hohe Gehalte an **Gesamtphenolen** (Folin-Ciocalteau-Test) zu erwarten, was sich auch durch die Ergebnisse verifizieren ließ. Besonders hohe Gehalte fanden sich bei Melissenblättern und Brombeerblättern, höhere Gehalte bei Cystus inc., Rooibos, Pfefferminze und Hibiscus, relativ niedrige Gehalte bei Apfel, Johannisbeeren, Fenchel und Ginsengwurzel. Die methanolischen und die wässrigen Extrakte wiesen dabei eine relativ hohe Übereinstimmung auf.

Bezogen auf die extrahierten Feststoffe ergab sich ein leicht verändertes Bild, da hier die vergleichsweise schlecht extrahierenden Zimtsorten die höchsten Gehalte aufwiesen. Weiterhin wiesen Melissenblätter, Rooibos, Brombeerblätter, Mate, Cystus inc., Rosmarin, Himbeerblätter und Lindenblüten hohe Gehalte auf.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass bei einem hohen Gesamtphenolgehalt der Probe auch die **antioxidative Aktivität** (TEAC-Test) hoch ist. Eine völlig lineare Beziehung zwischen beiden Parametern war nicht zu erwarten. Die methanolischen und die wässrigen Extrakte weisen auch hier eine relativ hohe Übereinstimmung auf. Werden die Werte für die antioxidative Aktivität auf die gesamten extrahierbaren Feststoffe bezogen, ändert sich das Bild wie bereits bei den Gesamtphenolen beschrieben. Die im Antrag genannten Produkte Pfefferminze, Hibiskus, Fenchel und Hagebutte zeigen keine besonderen Auffälligkeiten hinsichtlich ihres antioxidativen Potenzials. Dies bedeutet natürlich nicht, dass diese Produkte keine positiven Eigenschaften aufweisen, sondern nur, dass im Sinne des Antrages andere Produkte höhere antioxidative Eigenschaften haben. Von den 4 genannten Produkten zeigt Fenchel die geringsten Gesamtphenolgehalte sowie die geringste antioxidative Aktivität.

An individuellen Verbindungen bzw. Verbindungsklassen wurden die Gehalte an **Flavonolglykosiden** (FOG) von u.a. Cystus inc., Brombeer- und Himbeerblättern quantitativ bestimmt. Brombeer- und Himbeerblätter ergaben aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur selben Planzenfamilie ähnliche Zusammensetzungen. Es konnten Glykoside des Quercetins und des Kämpferols identifiziert werden. Der Gesamtgehalt bei Brombeerblättern wurde im wässrigen Extrakt mit ca. 2,5 g/kg und im methanolischen Extrakt mit ca. 5,3 g/kg ermittelt (Ergebnisse bezogen auf die TS des eingesetzten Produkts). Bei Himbeerblättern wurde der Gesamtgehalt im wässrigen Extrakt mit ca. 5,3 g/kg und im methanolischen Extrakt mit ca. 8,2 g/kg bestimmt. Beim Cystus inc. wurden neben Quercetinglykosiden auch Myricetinglykoside gefunden (s.o.). Der Gesamtgehalt an FOGs liegt im wässrigen Extrakt bei ca. 6 g/kg, im methanolischen Extrakt bei ca. 12 g/kg. Sehr hohe Gehalte an FOG wurden im roten Weinlaub (2,75 %) gefunden.

Phenolische Säuren, insbesondere **Chlorogensäuren** und ähnliche Verbindungen wurden in zahlreichen der untersuchten Proben gefunden. Die Gehalte in wässrigen Extrakten lagen zwischen 90 mg/kg (Hagebuttenschalen) und 5278 mg/kg (Brombeerblätter), die in methanolischen Extrakten meist geringfügig höher (100 – 6077 mg/kg). In Melisse wurden, wie laut Literatur zu erwarten, hohe Gehalte an Rosmarinsäure (33 g/kg) gefunden.

Für neun der Teeproben (Brombeerblätter, Cystus inc., Fenchelsamen, Hagebuttenschalen, Hibiskusblüten, Himbeerblätter, Melissenblätter, Pfefferminze und Rooibos) wurden über einen längeren Zeitraum (3, 6, 9, 15 und 18 Monate) **Lagerversuche** durchgeführt. Mittels modifiziertem TEAC-Test (RE ET AL., 1999) wurden die antioxidativen Wirkungen gemessen. Die Versuche umfassten folgende Lagerungen:

- Diffuses Tageslicht, Raumtemperatur

- Dunkelheit, Raumtemperatur

- Tiefkühlraum, -18°C, Dunkelheit

- Erhöhte Temperatur, 40°C, Dunkelheit

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die antioxidative Wirkung der Proben bei den getesteten Lagerungsbedingungen nicht signifikant verändert hat. In Einzelfällen war zu beobachten, dass die Aktivität wider Erwarten sogar leicht anstieg, was z.T durch Methodenschwankungen erklärbar ist.

Insgesamt gesehen wurden Daten für relevante Bestandteile von Kräuter- und Früchtetees generiert, die zu einer Beurteilung der Produkte beitragen. Die antioxidative Aktivität, die

Gesamtphenolgehalte und die Gehalte an individuellen Komponenten können aber natürlich nicht das einzige Beurteilungskriterium für Kräuter- und Früchtetees darstellen. Dass die ermittelten Daten aber durchaus genutzt werden können, wird daran sichtbar, dass aufgrund der ermittelten Daten ein Produkt („OXBLOXX“) mit einer hohen antioxidativen Aktivität („in-vitro“) entwickelt wurde.

3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonsäure)
aq.	Wäßrig
C	Catechin
CQA	Caffeoyl-Chinasäure
DAD	Photodiodenarray-Detektor
DMF	N,N-Dimethylformamid
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EHIA	European Herbal Infusions Association
ESI	electrospray ionisation
FCG	Flavon-C-Glykoside
FOG	Flavonol-O-Glykoside
FQA	Feruloylchinasäure
FS	Feinschnitt
GAE	Gallussäureäquivalente
-glu	Glucosid
-gal	Galactosid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
i.D.	innerer Durchmesser
i.Tr.	in Trockenmasse
ISO	International Organisation for Standardization
K	Kämpferol
M	Myricetin
M_G	relative Molekülmasse
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungszahl
n.n.	nicht nachweisbar
NMR	nuclear magnetic resonance
PA	Polyamid
RP	Umkehrphasen (reversed phase)
RT	Retentionszeit
Q	Quercitin
QA	Chinasäure (quinic acid)
-rut	Rutinosid
SC	Säulenchromatographie
SPE	solid phase extraction = Festphasenextraktion
TAA	Total antioxidative activity
TEAC	Trolox-equivalent antioxidative capacity
TPP	Total Polyphenols
TSS	extrahierbare Feststoffe (total soluble solids)

4 Problemstellung

Über die antioxidativen Wirkungen von pflanzlichen Lebensmitteln und die möglicherweise damit verbundenen Wirkungen bei der Prävention von chronischen Erkrankungen gibt es eine Vielzahl von Veröffentlichungen in wissenschaftlichen und populären Medien (z.B. Weisburger, 1999). Während es über die antioxidative Wirkung verschiedener Getränke, wie z.B. Rotwein (Paganga et al.,1999), Tee (Wiseman et al., 1997), Fruchtsäften, Kaffee und Kakao (z.B. Henn und Stehle, 1998) und einer Reihe von weiteren Lebensmitteln (Paganga et al., 1999) zahlreiche Veröffentlichungen gibt, ist diese Fragestellung bei den Kräuter- und Früchtetees bislang wenig bearbeitet worden. Ebenso stellt sich die Datenlage hinsichtlich der Zusammensetzung der antioxidativ wirksamen Bestandteile dieser Produkte dar. Zumindestens bei Rotwein und Tee kann festgestellt werden, dass verschiedene physiologische Wirkungen erfolgreich als Marketing-Instrumente benutzt werden, was bei teeähnlichen Getränken aufgrund der mangelhaften Datenlage bislang nicht möglich war. Relevant sind von den in den Leitsätzen genannten Produkten unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten vor allem Pfefferminze, Fenchel, Hibiskus, Hagebutte, Melisse, Apfel (als Bestandteil von Mischungen) und Mate. Daneben sollten für den Vergleich der antioxidativen Wirkungen von Verbraucheraufgüssen auch weitere Produkte aufgenommen werden, da es zahlreiche neue teeähnliche Getränke gibt bzw. laufend neue Produkte auf den Markt kommen (vgl. WKF, 2000). Ausdrücklich ausgenommen werden sollen Zubereitungen, die vorrangig im Pharmabereich eine Rolle spielen. Die hier vorgestellte Problemstellung beschränkt sich auf Produkte, die als Lebensmittel verzehrt werden (zur Problematik der Abgrenzung vgl. WKF, 2000). – Zunächst werden Daten darüber benötigt, wie hoch das antioxidative Potential der einzelnen Produkte ist.

Über die antioxidative Aktivität von Labiaten (u.a. Melisse, Oregano, Pfefferminze, Rosmarin) gibt es zahlreiche Untersuchungen, die sich vor allem auf die Stabilisierung der Fettfraktionen verschiedener Lebensmittel (Schmalz, Öl, Würste etc.) beziehen (Cuppett und Hall, 1998). Für die antioxidative Wirkung von Labiaten spielen auch die etherischen Öle, insbesondere die Monoterpene (Thymol, Carvacrol, Borneol u.a.m.) eine wichtige Rolle, vor allem, wenn Hydroxylgruppen am Ring vorhanden sind (Cuppett und Hall, 1998). In den verschiedenen Labiaten tragen aber auch Hydroxyzimt- und Benzoesäuren, sowie phenolische Diterpenoide (Carnosol, Rosmanol, u.a.m.) bei (Schwarz und Ternes, 1992a, b; Schwarz et al., 1992; Cuppett und Hall, 1998).

5 Übersichtsuntersuchungen (Screening)

Im Antrag waren die genauer zu untersuchenden Kräuter- und Früchtetees spezifiziert worden (Pfefferminze, Hagebutte, Hibiskus, Fenchel). Diese wurden hinsichtlich ihrer extrahierbaren Feststoffe, ihrer antioxidativen Wirkung und ihres Gesamtphenolgehaltes mit anderen, zurzeit wirtschaftlich bedeutenden Kräuter- und Früchtetees verglichen. In dieses „Screening“ wurden auch schwarzer und grüner Tee mit einbezogen.

Von den insgesamt 42 Proben wurden zunächst wässrige und methanolische Extrakte hergestellt und anschließend vermessen (s. Abschnitt 10.1 und 10.3).

Prinzipiell wurden die Gesamtphenolgehalte mittels Folin-Ciocalteau-Test (SINGLETON und ROSSI, 1965) bestimmt. Als Kalibriersubstanz diente Gallussäuremonohydrat, das auch in der derzeit aktuellen Vorschrift des ISO-Arbeitsausschusses für Tee empfohlen wird. Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität erfolgte analog dem modifizierten TEAC-Test (Trolox equivalent antioxidant capacity) nach RE ET AL., 1999.

Von einigen Proben, die vom Gehalt an Phenolen, ihrer antioxidativen Wirksamkeit und ihrer wirtschaftlichen Bedeutung her interessant sind, wurden darüber hinaus die Gehalte an Flavonolglykosiden qualitativ und quantitativ bestimmt.

5.1 Testprinzipien

5.1.1 Folin-Ciocalteau-Test

Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Reduktionskraft phenolischer Verbindungen. Leicht oxidierbare Verbindungen wie Polyphenole oder Ascorbinsäure können im alkalischen Milieu aus Wolframat- und Molybdat-Ionen und Phosphorsäure gebildete Komplexe zu blauen Farbpigmenten reduzieren. Die Konzentration der gebildeten Färbung wird photometrisch bestimmt (SINGLETON und ROSSI, 1965).

Verschiedene phenolische Verbindungen reagieren mit den Metallkomplexen mit unterschiedlicher Empfindlichkeit. Die Reaktivität einer Verbindung steigt dabei annähernd proportional mit der Anzahl freier phenolischer Hydroxylgruppen, wobei zwei zueinander in ortho- oder para-Stellung stehende OH-Gruppen die Reaktivität noch erhöhen. Entsprechende strukturelle Merkmale werden auch für die antioxidative Wirkung von Polyphenolen verantwortlich gemacht.

5.1.2 Modifizierter TEAC-Test

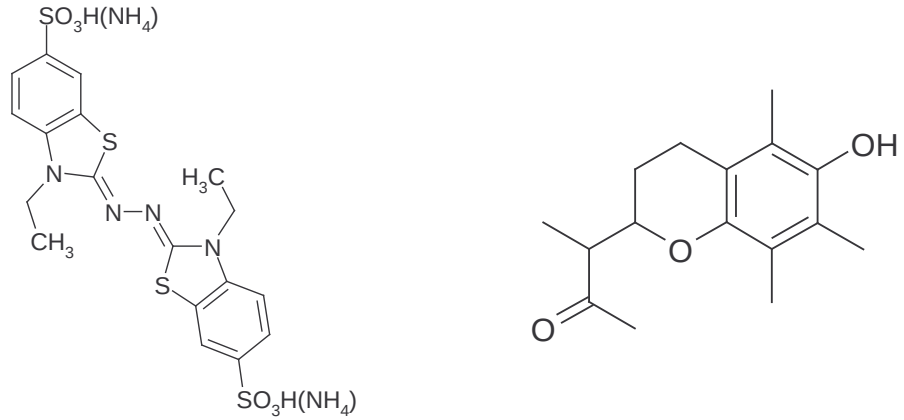

Abb. 1 ABTS: 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) und Trolox: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure

Zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität sind zahlreiche Testsysteme beschrieben. Es besteht ein deutlicher Einfluss des Testmediums (hydrophil, lipophil) auf die antioxidative Wirksamkeit der untersuchten Komponenten. Das Prinzip der ursprünglichen ABTS-Methode (MILLER ET AL., 1993) beruht auf der Verzögerung der linear ansteigenden Farbreaktion von Metmyoglobin und ABTS (2,2´-Azinobis-(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonsäure)) bei Zugabe von Wasserstoffperoxid. Das bei der Reaktion entstehende, relativ stabile $ABTS^{+\bullet}$-Radikal besitzt eine grüne Farbe und wird photometrisch bei 734 nm bestimmt. In Anwesenheit von Antioxidantien, die als Wasserstoffdonatoren fungieren, wird die Radikalbildung gehemmt. Dies steht im direkten Zusammenhang mit der antioxidativen Aktivität der jeweiligen Verbindung. Als Bezugssubstanz wird das wasserlösliche Tocopherolderivat „Trolox" verwendet. Die gemessenen Werte werden als TEAC-Werte (Trolox equivalent antioxidant capacity) in Bezug auf die Aktivität einer 1 millimolaren Troloxlösung angegeben. Je höher der TEAC-Wert einer Substanz ist, desto höher ist somit ihre antioxidative Kapazität (RECHNER ET AL., 1997). Der Einsatz der ABTS-Methode zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität bietet folgende Vorteile: Da diese Methode in zahlreichen neueren Veröffentlichungen angewendet worden ist, ist ein Vergleich der ermittelten Werte mit denen von hier nicht untersuchten Flavonoiden möglich. Darüber hinaus zeichnet sich die Methode durch ihre einfache Durchführbarkeit aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Test als „decolorization assay“ ausgeführt, das heißt die Entfärbung (bedingt durch Reduktion des Radikals zur ungefärbten Ausgangsverbindung) durch das Antioxidans wurde gemessen (RE ET AL., 1999)

RICE-EVANS ET AL. (1996) führten die antioxidative Aktivität der Flavonoide auf bestimmte Strukturmerkmale zurück. So kommt der o-dihydroxy „catechol“–Struktur am B-Ring eine wichtige Bedeutung zu. Der höhere TEAC-Wert von Quercetin gegenüber den unveresterten Flavanolen bestätigt eine Steigerung der Aktivität durch eine C-2-C-3 Doppelbindung am C-Ring, die mit einer Carbonylgruppe an C-4 konjugiert ist (RICE-EVANS ET AL., 1996). Daneben ist das antioxidative Potenzial einer Verbindung abhängig von der Anzahl und der Position der Hydroxylgruppen. So ist die höhere antioxidative Aktivität von Quercetin gegenüber Rutin auf die zusätzliche Hydroxylgruppe am C-Ring zurückzuführen, die beim Glykosid durch den Zuckerrest blockiert ist. Dementsprechend zeigte sich bei den Flavanolen eine Steigerung der antioxidativen Aktivität mit zunehmender Anzahl an Hydroxylgruppen (C≈EC<EGC<ECG<EGCG).

5.2 Extrahierbare Feststoffe

Wie Abbildung Abb. 2 zeigt, variieren die Gehalte an extrahierbaren Feststoffen in einem sehr weiten Bereich (die zugehörigen Werte finden sich unter 12.1.1). Bei den Brombeerfrüchten handelt es sich offenbar um einen Extrakt. Die anderen Produkte liegen zwischen 3 und 63 % (0,3 – 6,3 g/L bei 10 g/L Probeneinwaage), wobei die Früchte wegen des hohen Zuckergehaltes die Spitzenstellung einnehmen, Tees aus Rinde/Wurzel liegen am unteren Ende. Blätter wie Grün- und Schwarztee liegen im mittleren Bereich.

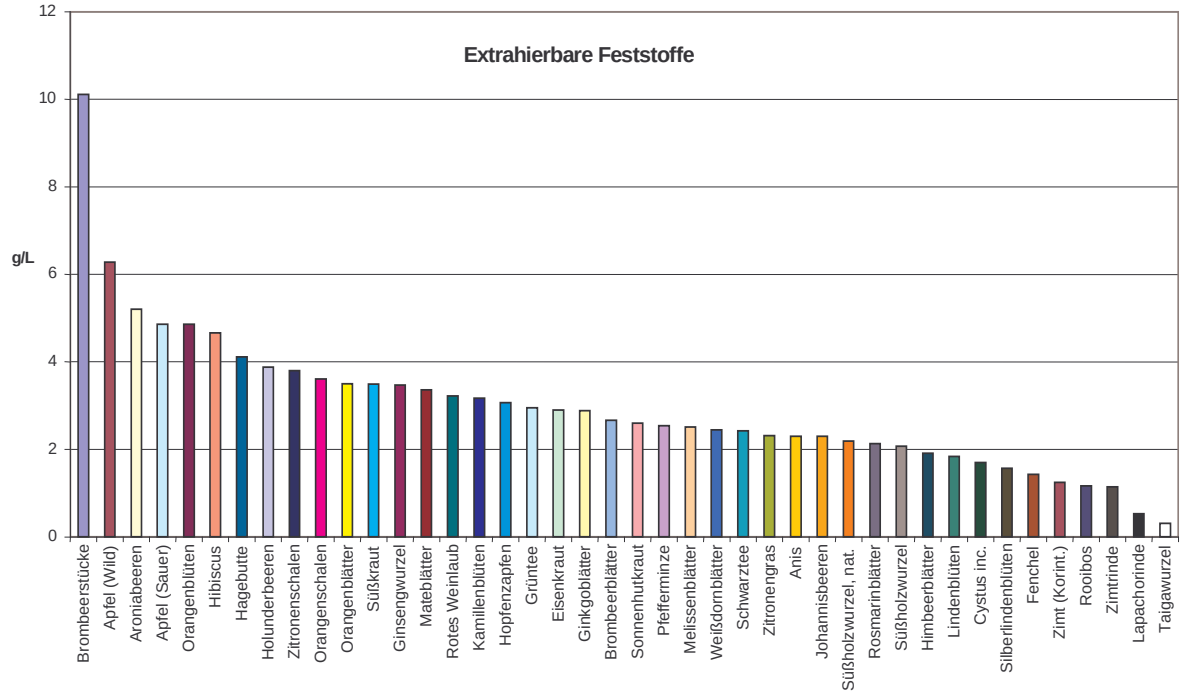

Abb. 2 Extrahierbare Feststoffe (2 g Probe/200 mL Wasser; 10 min Ziehzeit)

5.3 Ergebnisse der Gesamtphenolbestimmung

5.3.1 Auswertung Gesamtpolyphenole im Getränk

Die Gehalte der Gesamtphenolbestimmung variieren – wie zu erwarten – ziemlich deutlich. Insbesondere bei Blättern sind hohe Gehalte zu erwarten, was sich auch durch die Ergebnisse verifizieren lässt. Abb. 3 zeigt graphisch die (nach absteigendem Gehalt sortierten) Produkte; die zugehörigen Werte finden sich im Anhang unter 12.1.1. Die Daten dieser Graphik sind noch nicht korrigiert mit den entsprechenden Daten für die löslichen Feststoffe. Durch diese Korrektur soll der Anteil der phenolischen Verbindungen an den aus der Pflanze herausgelösten Stoffen charakterisiert werden. Es kann allerdings festgestellt werden, dass die Tendenzen in beiden Fällen vergleichbar sind.

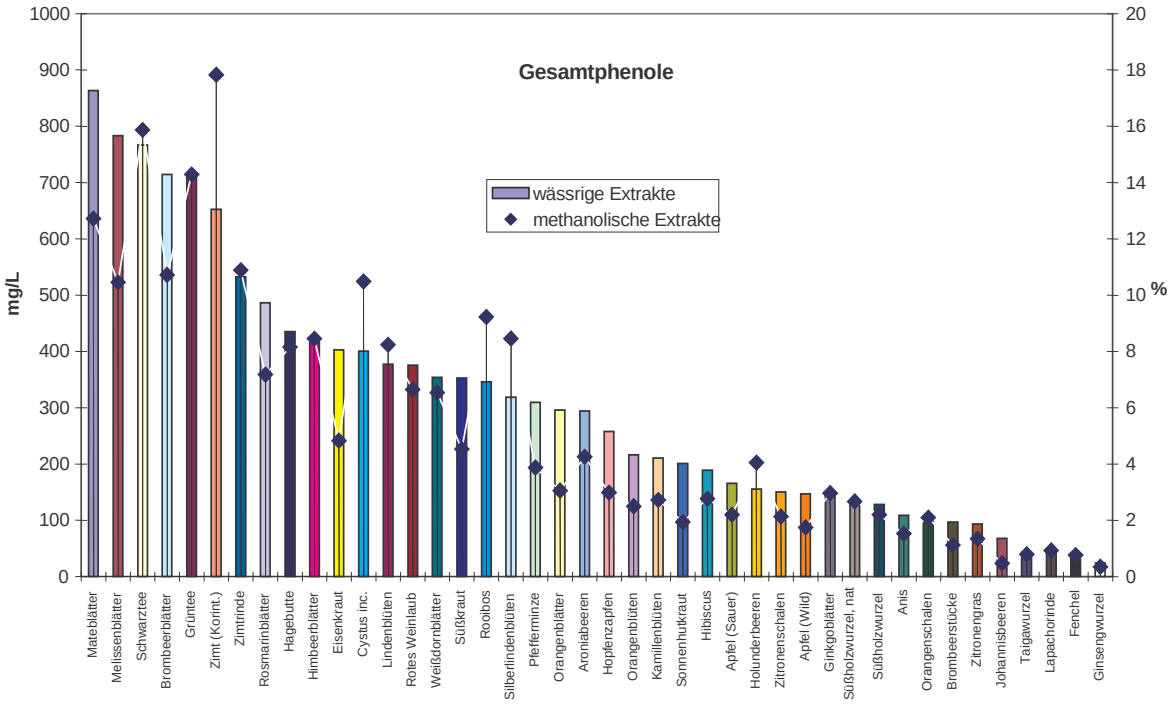

Abb. 3 Gesamtphenolgehalte der wässrigen und der methanolischen Extrakte im Vergleich (2 verschiedene Größenachsen: % i.Tr. für die methanolischen, mg/L für die wässrigen Extrakte)

Unter den Produkten mit hohen Gesamtphenolgehalten befinden sich keine der im Antrag genannten vier Kräuter- und Früchtetees (Pfefferminze, Hibiskus, Fenchel und Hagebutte). Lediglich Hagebutte und Pfefferminze haben im Vergleich einigermaßen hohe Gehalte an Gesamtphenolen. Die methanolischen und die wässrigen Extrakte weisen eine relativ hohe Übereinstimmung auf. Sehr geringe Gesamtphenolgehalte besitzen die folgenden Proben:

- Sonnenhutkraut
- Apfel (Sauer)
- Ginkgoblätter
- Zitronenschalen
- Anis
- Brombeerstücke
- Apfel (Wild)
- Süßholzwurzel
- Zitronengras
- Orangenschalen
- Süßholzwurzel, geschn.
- Johannisbeeren, schwarz
- Taigawurzel
- Fenchel AM
- Ginsengwurzel
- Lapachorinde

5.3.2 Auswertung Gesamtphenole bezogen auf extrahierte Feststoffe

Bezogen auf die extrahierten Feststoffe ergibt sich ein leicht verändertes Bild, da hier die vergleichsweise schlecht extrahierenden Zimtsorten die höchsten Gehalte aufweisen. Daneben sind noch Schwarztee, Melissenblätter, Rooibos, Brombeerblätter, Mateblätter, Grüntee, Cystus inc., Rosmarinblätter, Himbeerblätter, und Lindenblüten als Proben mit hohen Gehalten zu nennen.

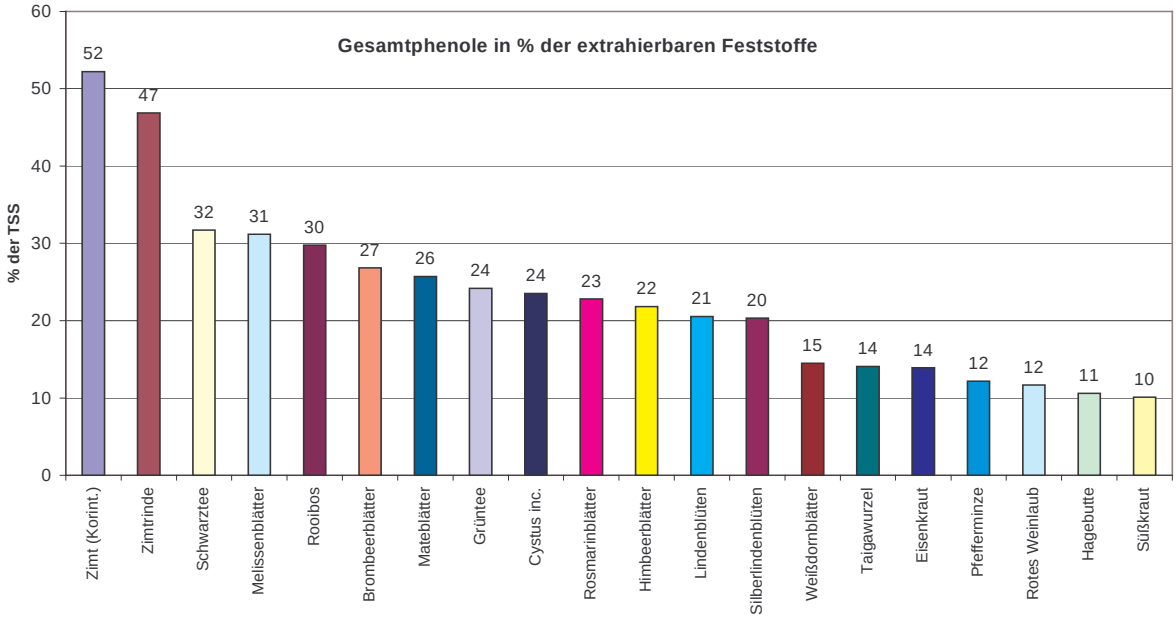

Abb. 4 Gesamtphenole auf extrahierbare Feststoffe bezogen (Weitere Daten siehe Tabelle im Anhang unter 12.1.1)

5.4 Antioxidative Aktivität (Trolox-Äquivalente)

Die antioxidative Aktivität wurde, wie bereits erwähnt, mit dem ABTS-Test in der Ausführungsform nach RE ET AL. (1999) bestimmt. Der ursprüngliche Test, der von MILLER ET AL. (1993) in der gleichen Arbeitsgruppe entwickelt wurde, unterscheidet sich von dem neuen Test dadurch, dass jetzt eine Entfärbung des gebildeten Radikals gemessen wird, während ursprünglich eine verminderte Radikalbildung gemessen wurde. Weiterhin wird die Radikalbildung mit anderen Chemikalien induziert (ursprünglicher Test: Metmyoglobin/H_2O_2; neuer Test: Kaliumpersulfat).

Laut RE ET AL. sind die Werte, die mit dem „alten“ und mit dem „neuen“ Testsystem gemessen werden, nicht zwangsläufig gleich, allerdings liegen sie meist in einer ähnlichen Größenordnung.

In Abb. 5 sind Süßholzwurzel (geschn.), Orangenschalen, Johannisbeeren, Taigawurzel, Fenchel, Lapachorinde und Ginsengwurzel nicht dargestellt, da diese eine sehr geringe antioxidative Aktivität haben.

Wenn die Gesamtphenolgehalte hoch sind ist auch die antioxidative Aktivität hoch. Eine völlig lineare Beziehung zwischen beiden Parametern war nicht zu erwarten.

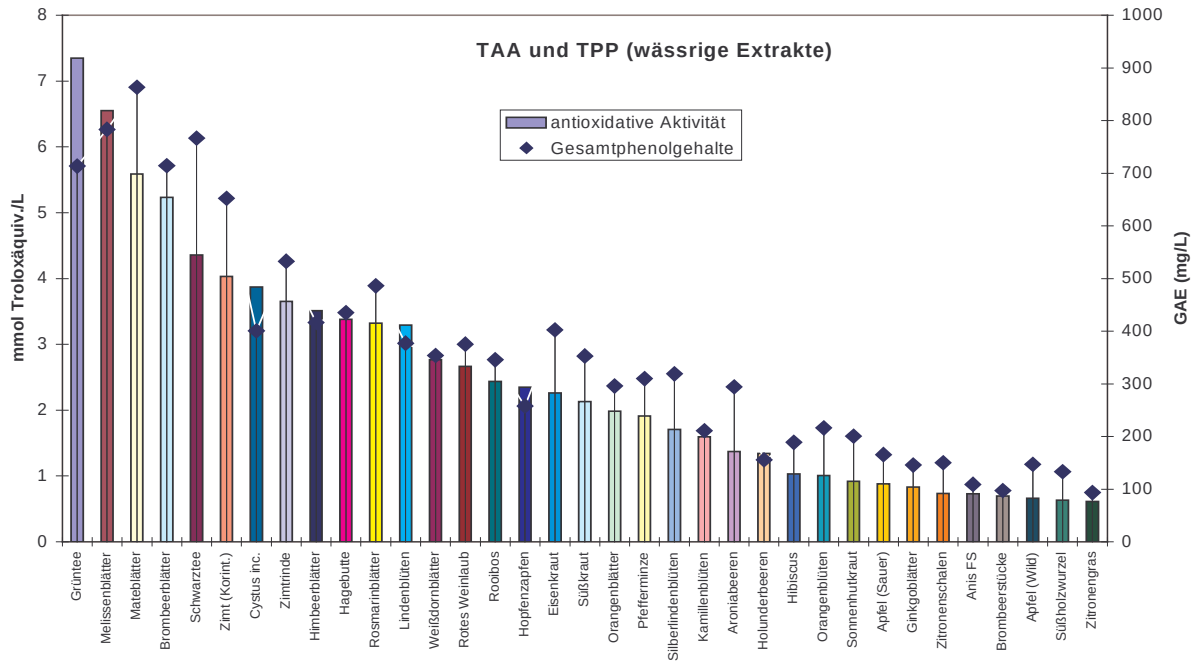

Abb. 5 Antioxidative Aktivität der wässr. Extrakte im Vergleich mit den Gesamtphenolgehalten (Auswahl – vollständige Daten siehe Anhang unter 12.1.2); TAA = total antioxidant activity , TPP = total (poly)phenols, GAE = Gallussäureäquivalente

Abb. 6 zeigt den Vergleich für die methanolischen Extrakte. Prinzipiell kann festgestellt werden, dass diejenigen Kräuter- und Früchtetees, deren wässrige Aufgüsse eine hohe antioxidative Aktivität aufweisen, auch im Methanolextrakt wirksam sind.

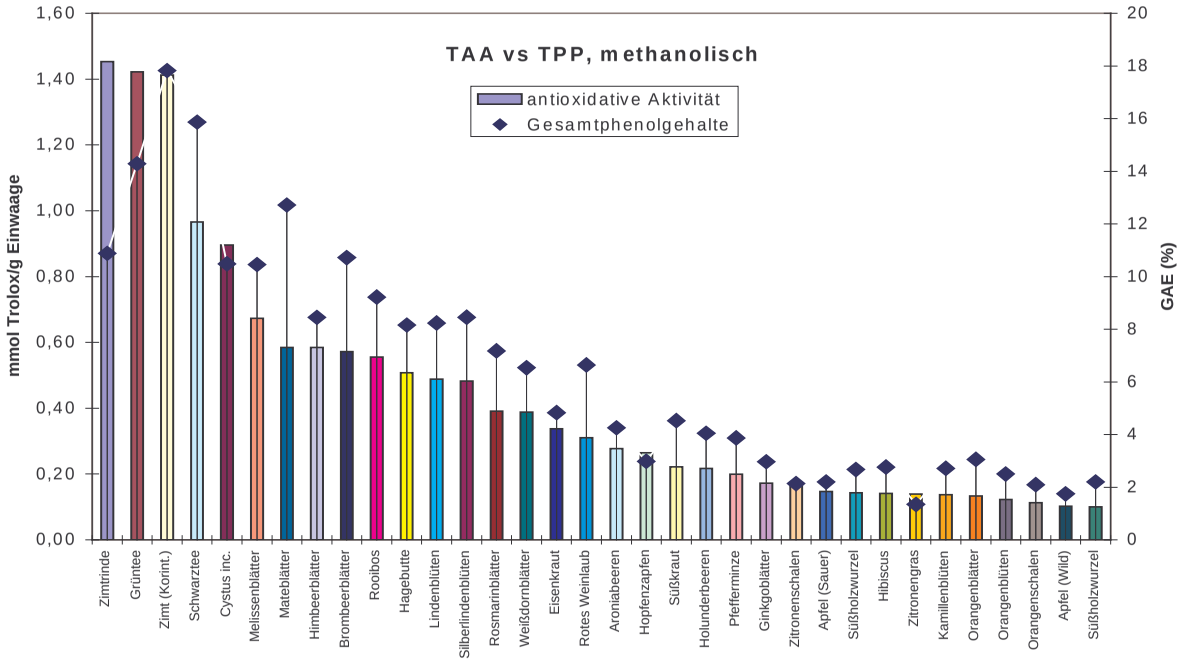

Abb. 6 Antioxidative Aktivität (TAA) und Gesamtphenole (TPP), methanolische Extrakte.

Werden die Werte für die antioxidative Aktivität auf die gesamten extrahierbaren Feststoffe bezogen, ändert sich das Bild wie bereits bei den Gesamtphenolen beobachtet und dort auch diskutiert (Abb. 7).

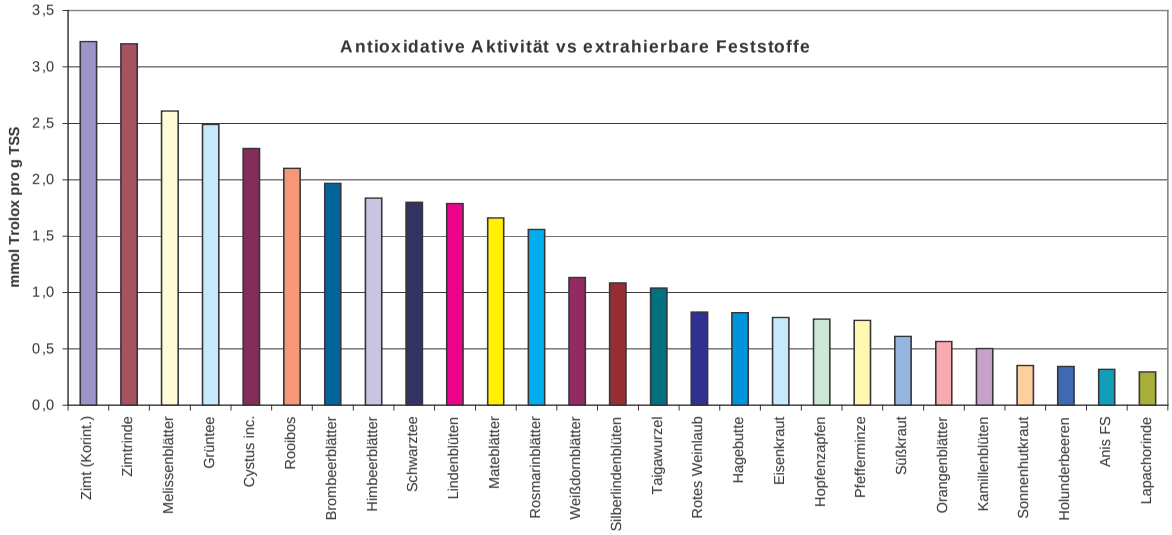

Abb. 7 Antioxidative Aktivität bezogen auf extrahierbare Feststoffe (wässr. Extrakte)

6 Lagerversuche

Anhand der aus dem Screening gewonnenen Daten und der wirtschaftlichen Bedeutung wurden für die weitere Untersuchung neun Teesorten ausgewählt. Dies sind Brombeerblätter, Cystus inc., Fenchelsamen, Hagebuttenschalen, Hibiscusblüten, Himbeerblätter, Melissenblätter, Pfefferminze und Rooibos.

Um eine mögliche Abnahme der antioxidativen Aktivität während der Lagerung zu untersuchen, wurden die Tees unter verschiedenen Bedingungen für einen längeren Zeitraum gelagert (3 bis 18 Monate). Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln sowie bei diffusem Tageslicht, bei erhöhter Temperatur (40 °C) im Dunkeln sowie Tiefgefroren bei –18 °C ebenfalls im Dunkeln.

Signifikante Abnahmen der antioxidativen Aktivität, gemessen als Trolox-Äquivalente, konnten bei keiner Probe und keiner Lagerbedingung festgestellt werden. Lediglich bei erhöhter Temperatur zeigen die Proben mit insgesamt hohen antioxidativen Aktivitäten wie Brombeerblätter und Cystus inc. eine Tendenz zur Abnahme. Einige Proben wie Pfefferminze und Rooibos zeigen sogar eine leichte Zunahme der antioxidativen Aktivität. Die Ursachen dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, dürften aber durch Methodenschwankungen erklärbar sein.

Die genauen Daten der Lagerversuche finden sich im Anhang unter 12.2.

7 Untersuchung der einzelnen Produkte

7.1 Extraktionstechniken

Mit neun Tees (siehe unter 6) wurden verschiedene Aufarbeitungen zur Bestimmung der wichtigsten antioxidativen Stoffgruppen Flavan-3-ole (Catechine), Hydroxyzimtsäuren (Chlorogensäuren), Flavonol-O-glykoside und Flavon-C-glykoside durchgeführt (s. Abschnitte 10.6.1.3 bis 10.6.1.6). Gemessen wurden jeweils die wässrigen Extrakte nach einem haushaltsüblichen Aufguss (Abschnitt 10.1) und die methanolischen Extrakte nach ISO-Norm für Schwarztee (Abschnitt 10.3).

Zur genaueren Untersuchung einiger Inhaltsstoffe wurden Brombeerblätter, Melissenblätter, Pfefferminze und Rooibos einer Aufarbeitung in größerem Maßstab unterzogen. Nach einer Hauptextraktion von je 50 g Probe pro Aufarbeitung mit 750 mL

70%igem Methanol bei 60 °C für eine Stunde wurden verschiedene säulenchromatographische Trennungen an XAD-2, XAD-16HP und Polyamid durchgeführt (s. Abschnitte 10.7 und 10.8). Anschließend wurden teilweise weitere Trennungen mit den erhaltenen Fraktionen über „High Speed Countercurrent Chormatography“ und präparative HPLC durchgeführt.

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengestellt. Die genauen Daten befinden sich im Anhang ab 12.3.

7.2 Flavan-3-ole (Catechine)

Die Bestimmungen wurden nach Abschnitt 10.6.1.3 durchgeführt.

Flavan-3-ole konnten lediglich im Cystus inc. und in Hagebuttenschalen nachgewiesen werden. Die Werte beziehen sich jeweils auf die Trockenmasse, die bei allen Proben zwischen 91 und 95 % liegen (s. Anhang 12.3.1).

Cystus inc. enthält als einziges Flavan-3-ol Gallussäure mit einem Gehalt von 292 mg/kg im wässrigen und 342 mg/kg im methanolischen Extrakt.

Hagebuttenschalen enthalten Epigallocatechin mit 298 mg/kg im wässrigen und 1092 mg/kg im methanolischen Extrakt sowie Catechin mit 528 mg/kg im wässrigen und 1035 mg/kg im methanolischen Extrakt.

7.3 Hydroxyzimtsäuren (Chlorogensäuren)

Die Bestimmung der Hydroxyzimtsäuren erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.4.

In allen Proben konnten Substanzen dieser Klasse identifiziert werden. Die Angaben beziehen sich wieder auf die Trockenmasse. Angegeben sind hier nur die Summenparameter. Die Gehalte einzelner Verbindungen sind jeweils in den späteren Abschnitten bei den einzelnen Teesorten aufgeführt.

Tab. 1 Gehalte an Hydroxyzimtsäuren, Summenparameter bezogen auf Trockenmasse

Probe	wässr. Extrakt	methanol. Extrakt
	mg/kg	mg/kg
Brombeerblätter	5278	6077
Cystus inc.	-	376
Fenchelsamen	-	56
Hagebuttenschalen	90	100
Hibiskusblüten	1766	2282
Himbeerblätter	1357	1535
Melissenblätter	1171	394
Pfefferminze	399	116
Rooibos	182	109

7.4 Flavonol-O-glykoside (FOG)

Die Bestimmung erfolgte nach Abschitt 10.6.1.5.

Flavonol-O-glykoside konnten ebenfalls in allen Teesorten nachgewiesen werden. Auch hier beziehen sich die Angaben wieder auf die Trockenmasse, Gehalte einzelner Verbindungen finden sich bei der Beschreibung der einzelnen Tees.

Tab. 2 Gehalte an Flavonol-O-glykosiden, Summenparameter bezogen auf Trockenmasse

Probe	wässr. Extrakt	methanol. Extrakt
	mg/kg	mg/kg
Brombeerblätter	198	240
Cystus inc.	5260	10590
Fenchelsamen	-	40
Hagebuttenschalen	211	552
Hibiskusblüten	880	765
Himbeerblätter	327	740
Melissenblätter	120	216
Pfefferminze	11760	15306
Rooibos	2263	5003

7.4.1 Acide Flavonol-O-glykoside

Bei Fenchelsamen, Himbeerblättern, Brombeerblättern und Pfefferminze wurden zusätzlich auch FOGs bestimmt, die als Glykosid-Baustein eine Zuckersäure (Glucuronid oder Galacturonid) enthalten.

Tab. 3 Gehalte an aciden Flavonol-O-glykosiden, Summenparameter bezogen auf Trockenmasse

Probe	**wässr. Extrakt**	**methanol. Extrakt**
	mg/kg	**mg/kg**
Brombeerblätter	2372	5083
Himbeerblätter	4972	7427
Pfefferminze	2527	2958
Fenchelsamen	-	137

7.5 Flavon-C-glykoside

Die vierte Klasse antioxidativ wirksamer Verbindungen sind die Flavon-C-glykoside. Diese konnten jedoch nur im Rooibos und in sehr geringer Menge in Fenchelsamen nachgewiesen werden. Die Bestimmung erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.6. Bezogen auf die Trockenmasse ergibt sich für Rooibos hier ein Gesamtgehalt im wässrigen Extrakt von 2,8 g/kg und im methanolischen Extrakt von 7,2 g/kg.

7.6 Brombeerblätter

Von den Brombeerblättern wurden die Hauptextraktion (Abschnitt 10.7), die Polyamid-Säulenchromatographie (Abschnitt 10.8.3) sowie die Reinigung über XAD-16HP (Abschnitt 10.8.2) durchgeführt. Die Hauptextraktion ergab eine Ausbeute an löslichen Feststoffen von 22,5 %.

7.6.1 Untersuchungen mittels HPLC-DAD und HPLC-MS

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse in Tabellenform findet sich im Anhang unter 12.5.1. Im Rohextrakt aus Brombeerblättern wurden Daten für 6 Verbindungen zusammengestellt. In Abb. 8 ist das Chromatogramm bei 354 und 280 nm dargestellt.

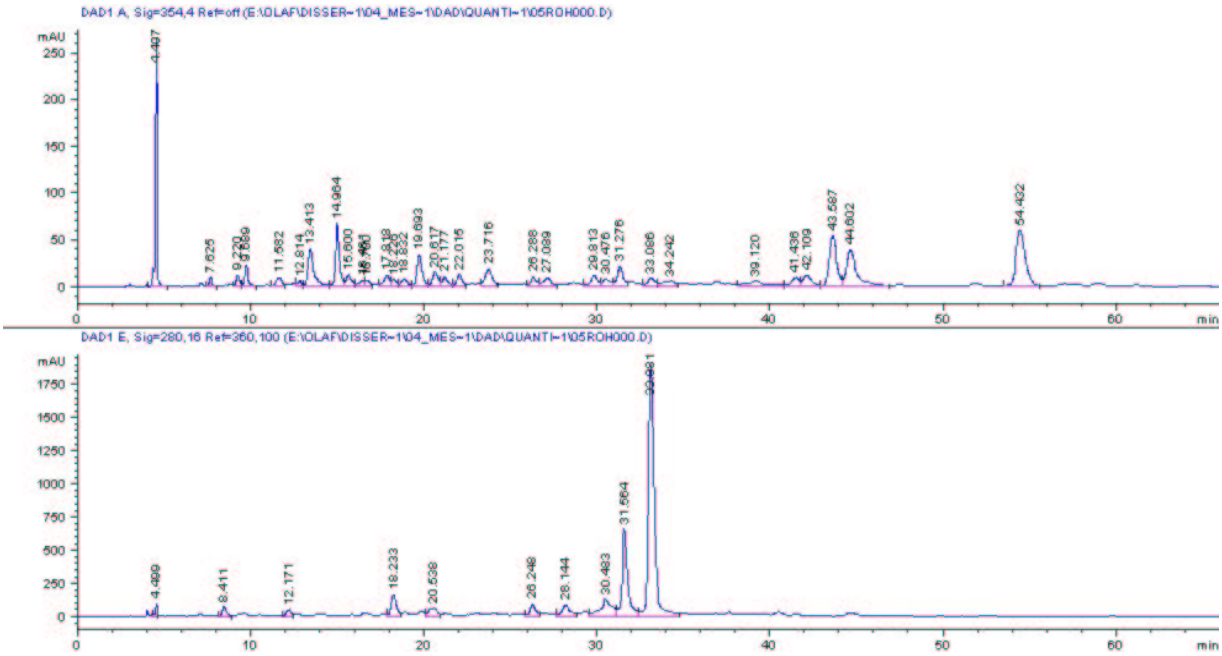

Abb. 8 Chromatogramm Brombeerblätter-Rohextrakt, Detektion bei 354 und 280 nm

Anhand von UV- und Massenspektren konnten Kaffee- und Ferulasäureglucoside, Quercetin- bzw. Hesperetin- und Kämpferol- bzw. Luteolin-glucuronide identifiziert werden.

7.6.2 Ergebnisse der Polyamid-Säulenchromatographie

Die Eluate der Polyamid-Säulen (s. Abschnitt 10.8.3) wurden unter den gleichen Bedingungen per HPLC-DAD und HPLC-MS untersucht, wie der Rohextrakt. Abb. 9 und Abb. 10 zeigen die Chromatogramme des methanolischen und des ammoniakalisch-methanolischen Eluats bei 354 und 280 nm. Eine tabellarische Auflistung der Daten findet sich im Anhang unter 12.5.1.2 und 12.5.1.3.

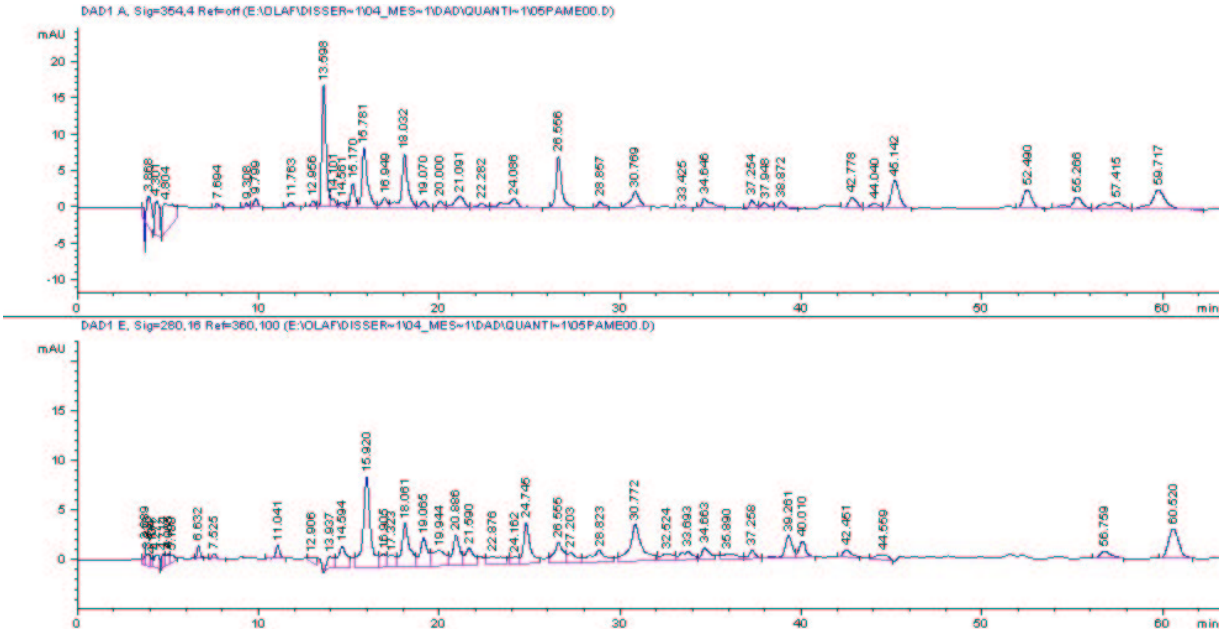

Abb. 9 Brombeerblätter, methanolisches PA-Eluat (Detektion bei 354 und 280 nm)

Im methanolischen PA-Eluat konnten 5 Verbindungen identifiziert werden. Neben Kaffee- und Ferulasäure-glucosiden finden sich hier Rutin (Quercetin-rutinosid), Kämpferol-rutinosid sowie Quercetin-glucosid bzw. –galactosid. Eine genaue Zuordnung der Zucker wurde nicht durchgeführt.

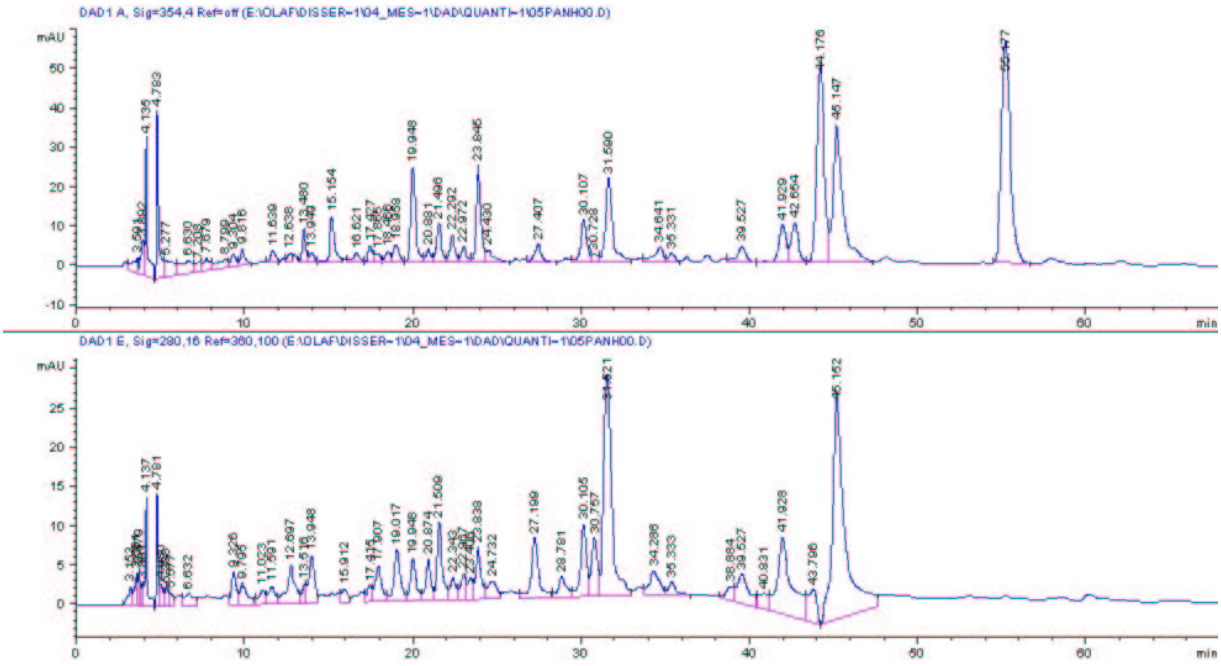

Abb. 10 Brombeerblätter, ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat (Detektion bei 354 und 280 nm)

Aus dem ammoniakalisch-methanolischen Eluat konnten 8 Verbindungen identifiziert werden. Hier finden sich vor allem Glucuronide von Kämpferol und Quercetin. Darüber hinaus konnten anhand der Massenspektren Verbindungen mit aciden Pentosiden ermittelt werden.

In allen Extrakten und Eluaten der Brombeerblätter wurden weitere Derivate von Hydroxyzimtsäuren (anhand von DAD-Spektren) gefunden. Die genauen Strukturen konnten nicht aufgeklärt werden.

7.6.3 Vergleich der TEAC-Werte

Die Untersuchung des Rohextraktes und der PA-Eluate mittels modifiziertem TEAC-Test (RE ET AL., 1999) ergab folgende Werte bezogen auf jeweils 1 g.

Tab. 4 TEAC-Werte der verschiedenen Brombeerblätter-Fraktionen

Fraktion	***TEAC [mmol Trolox/g Einwaage]***	***TEAC bezogen auf Rohextrakt [mmol/g]***
Brombeerblätter, Rohextrakt	2,69	
Brombeerblätter, PA, methanol. Eluat		0,08
Brombeerblätter, PA, NH_3/MeOH-Eluat		0,21

Da keine weiteren Aufreinigungsschritte unternommen wurden, ist ein Vergleich dieser Daten noch nicht möglich.

7.6.4 Quantitative Bestimmungen

7.6.4.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren)

Die Bestimmung der Hydroxyzimtsäure-Derivate erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.4. Die Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 92,6 %.

Kaffeoylglucose/Kaffeesäure-glucosid:	H_2O-Extrakt:	4,11 g/kg
	MeOH-Extrakt:	4,22 g/kg
4-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	1,17 g/kg
	MeOH-Extrakt:	1,85 g/kg

7.6.4.2 Flavonol-O-Glykoside (FOG)

Die Bestimmung der FOG erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.5. Die Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 92,6 %.

Quercetinglucosid/-galactosid:	H_2O-Extrakt:	65 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	75 mg/kg

Kämpferolrutinosid:	H_2O-Extrakt:	88 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	95 mg/kg
Kämpferolglucosid/-galactosid:	H_2O-Extrakt:	45 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	70 mg/kg
Quercetinglucuronid/-galactu-ronid:	H_2O-Extrakt:	0,92 g/kg
	MeOH-Extrakt:	1,83 g/kg
Kämpferolglucuronid/-galactu-ronid:	H_2O-Extrakt:	1,45 g/kg
	MeOH-Extrakt:	3,25 g/kg

7.7 Cystus incanus

7.7.1 Quantitative Bestimmungen

7.7.1.1 Flavan-3-ole (Catechine)

Cystus inc. enthält als einziges Flavan-3-ol Gallussäure mit einem Gehalt von 292 mg/kg im wässrigen und 342 mg/kg im methanolischen Extrakt.

7.7.1.2 Hydroxyzimtsäuren (Chlorogensäuren)

Die Bestimmung der Hydroxyzimtsäure-Derivate erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.4.

3-CouQA (Cumaroylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	n.n.
	MeOH-Extrakt:	313 mg/kg
5-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	n.n.
	MeOH-Extrakt:	63 mg/kg

Die Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 92,9 %.

7.7.1.3 Flavonol-O-glykoside

Die Bestimmung der FOG erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.5.

Myricetinglucosid/-galactosid:	H_2O-Extrakt:	1,43 g/kg
	MeOH-Extrakt:	3,11 g/kg
Myricetin-pentosesäure[*)]:	H_2O-Extrakt:	2,80 g/kg
	MeOH-Extrakt:	5,34 g/kg

Quercetinglucosid/-galactosid:	H_2O-Extrakt:	272 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	595 mg/kg
Quercetin-pentosid*):	H_2O-Extrakt:	210 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	458 mg/kg
Quercetin-pentosesäure*):	H_2O-Extrakt:	0,55 g/kg
	MeOH-Extrakt:	1,08 g/kg

*) Der Zuckerrest wurde nicht näher identifiziert.

Alle Angaben beziehen sich wieder auf die Trockenmasse von 92,9 %.

7.8 Fenchelsamen

Fenchelsamen werden vor allem durch das etherische Öl charakterisiert, dessen Zusammensetzung gut beschrieben ist (HÄNSEL ET AL., 1999). Die wichtigsten Komponenten sind die Phenylpropane trans-Anethol und Estragol, sowie die Monoterpene Limonen, α-Pinen und Fenchon. HARBORNE ET AL. (1971) unterschieden zwei chemische Rassen von Fenchel anhand ihrer FOG-Zusammensetzung. Die eine Rasse enthält Kämpferol- und Quercetin-3-glucuronid in den Blättern, die andere zusätzlich noch Kämpferol- und Quercetin-3-arabinose.

Der Gehalt an antioxidativ wirksamen Verbindungen ist vergleichsweise gering. Der Gesamtpolyphenolgehalt wurde hier mit 0,76 % i. Tr. bestimmt, der TEAC-Wert mit 0,05 mmol Trolox/g.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf eine Extraktion und Aufreinigung im größeren Maßstab verzichtet. Die Identifizierung und Quantifizierung antioxidativ wirksamer Verbindungen wurde nach methanolischer Extraktion gemäß ISO-Norm für Schwarztees (s. Abschnitt 10.3), teilweise mit anschließender Reinigung über Polyamid-Säulenchromatographie (Abschnitt 10.8.3), teilweise über Festphasenextraktion an RP-18 Fertigkartuschen (Abschnitt 10.6.1.4), über HPLC-MS und HPLC-DAD durchgeführt.

7.8.1 Flavonol-O-glykoside

Der Gesamtflavonolglykosidgehalt konnte mit 177 mg/kg ermittelt werden. Davon entfallen auf neutrale FOGs 40 mg/kg, den Hauptteil bilden acide FOGs mit 137 mg/kg. Als Hauptaglykon wurde Quercetin bestimmt. Mit 126 mg/kg stellt das Quercetinglucuronid die

Hauptverbindung der untersuchten Fenchelsamen dar, Quercetinrutinosid (Rutin), Quercetingalactosid und Quercetinglucosid weisen Gehalte von 10 mg/kg, 2 mg/kg und 8 mg/kg auf. Als weiteres Aglykon konnte Kämpferol, mit Gehalten von 20 mg/kg Kämpferolrutinosid und 11 mg/kg Kämpferolglucuronid, ermittelt werden.

7.8.2 Flavon-C-glykoside

Als einziges Flavon-C-glykosid in Fenchelsamen konnte das Isoschaftosid (Apigenin-6-C-arabinosyl-8-C-glucosid) mit einem Gehalt von 10 mg/kg bestimmt werden.

7.8.3 Hydroxyzimtsäurederivate

Von den Hydroxyzimtsäurederivaten konnte die n-Chlorogensäure identifiziert und mit einem Gehalt von 56 mg/kg bestimmt werden.

7.9 Himbeerblätter

7.9.1 Quantitative Bestimmungen

7.9.1.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren)

Die Bestimmung der Hydroxyzimtsäure-Derivate erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.4. Die Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 93,1 %.

Kaffeoylglucose/Kaffeesäure-glucosid:	H_2O-Extrakt:	0,96 g/kg
	MeOH-Extrakt:	1,31 g/kg
3-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	393 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	225 mg/kg

7.9.1.2 Flavonol-O-Glykoside (FOG)

Die Bestimmung der FOG erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.5. Die Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 93,1 %.

Quercetinglucosid/-galactosid[*)]:	H_2O-Extrakt:	51 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	186 mg/kg
Quercetinglucosid/-galactosid[*)]:	H_2O-Extrakt:	168 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	262 mg/kg

Quercetin-pentosid**):	H_2O-Extrakt:	57 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	221 mg/kg
Kämpferolglucosid/-galactosid:	H_2O-Extrakt:	51 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	71 mg/kg
Quercetinglucuronid/-galactu-ronid:	H_2O-Extrakt:	3,86 g/kg
	MeOH-Extrakt:	5,73 g/kg
Kämpferolglucuronid/-galactu-ronid:	H_2O-Extrakt:	1,11 g/kg
	MeOH-Extrakt:	1,70 g/kg

*) Es sind beide Glycoside des Quercetins vorhanden, eine genaue Zuordnung wurde jedoch nicht durchgeführt

**) Die Pentose wurde nicht näher identifiziert.

7.10 Melisse

7.10.1 Extraktionsausbeute

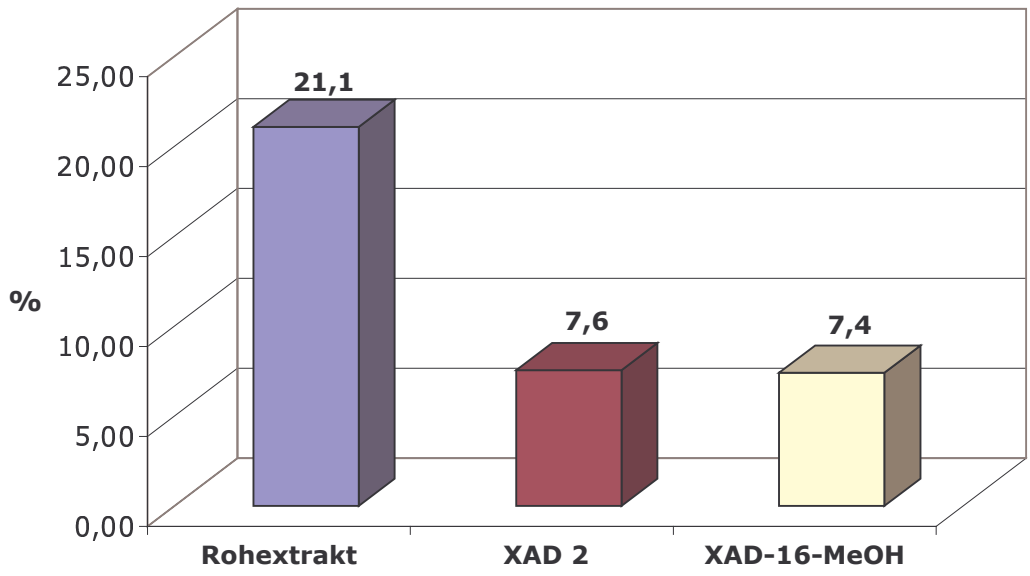

Abb. 11 Extraktionsausbeute Melisse

Von der Melisse wurden die Hauptextraktion, die Polyamid-Säulenchromatographie, die XAD-2 sowie die XAD-16HP-Extraktion durchgeführt. Die Ausbeute an löslichem Feststoffen der Hauptextraktion beträgt 21,1 %. Bei der anschließenden Aufarbeitung mit XAD-2 und XAD-16HP wurden 35,8 % bzw. 35,2 % des eingesetzten Rohextraktes erhalten.

7.10.2 Untersuchungen der Extrakte mittels HPLC-DAD und HPLC-MS

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse in Tabellenform findet sich im Anhang unter 12.5.2. Im Rohextrakt aus Melisse wurden Daten für 4 identifizierte Verbindungen zusammengestellt. In Abb. 12 sind die Chromatogramme dargestellt.

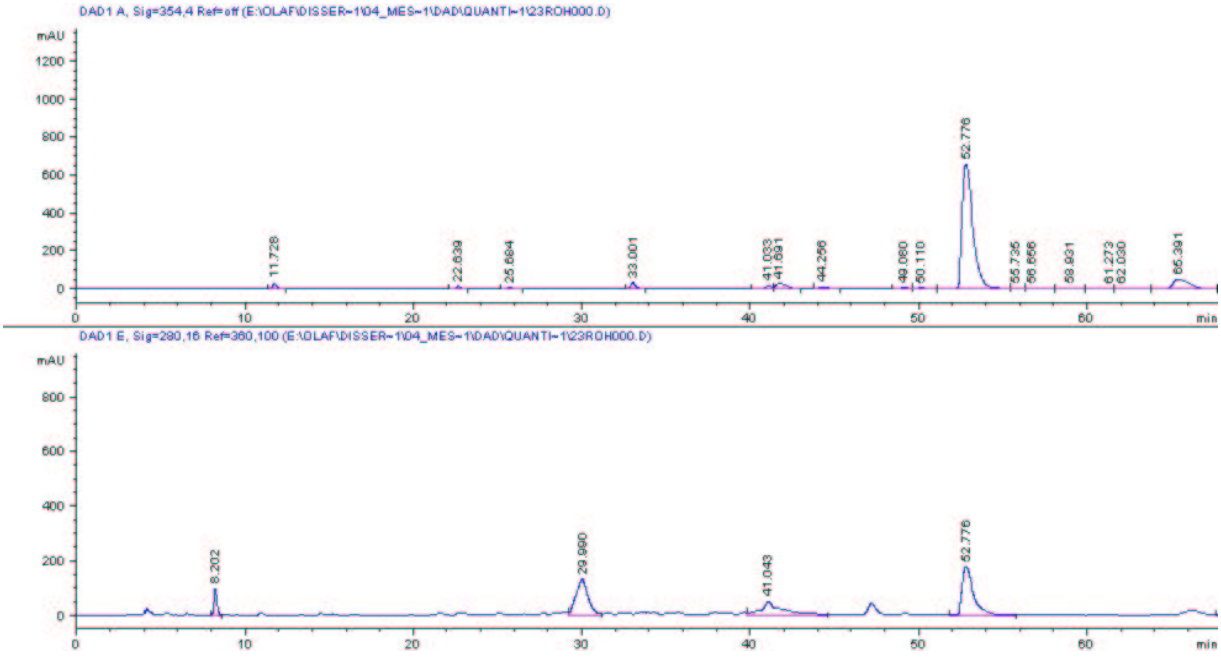

Abb. 12 Chromatogramm Melisse, Rohextrakt bei 354 und 280 nm

Der Extrakt enthält Rosmarinsäure (RT = 52,8 min) und Kämpferolglucuronid (RT = 65,4 min) und Luteolin-rutinosid (RT = 44,3 min).

7.10.3 Ergebnisse der PA-Säulenchromatographie

Die Eluate der PA-Säulen wurden unter den gleichen Bedingungen mit HPLC-DAD und HPLC-MS untersucht, wie der Rohextrakt. Abb. 13 und Abb. 14 zeigen die Chromatogramme des methanolischen und des ammoniakalisch-methanolischen Eluats bei 354 und 280 nm. Eine tabellarische Auflistung der Daten findet sich im Anhang unter 12.5.2.2 und 12.5.2.3.

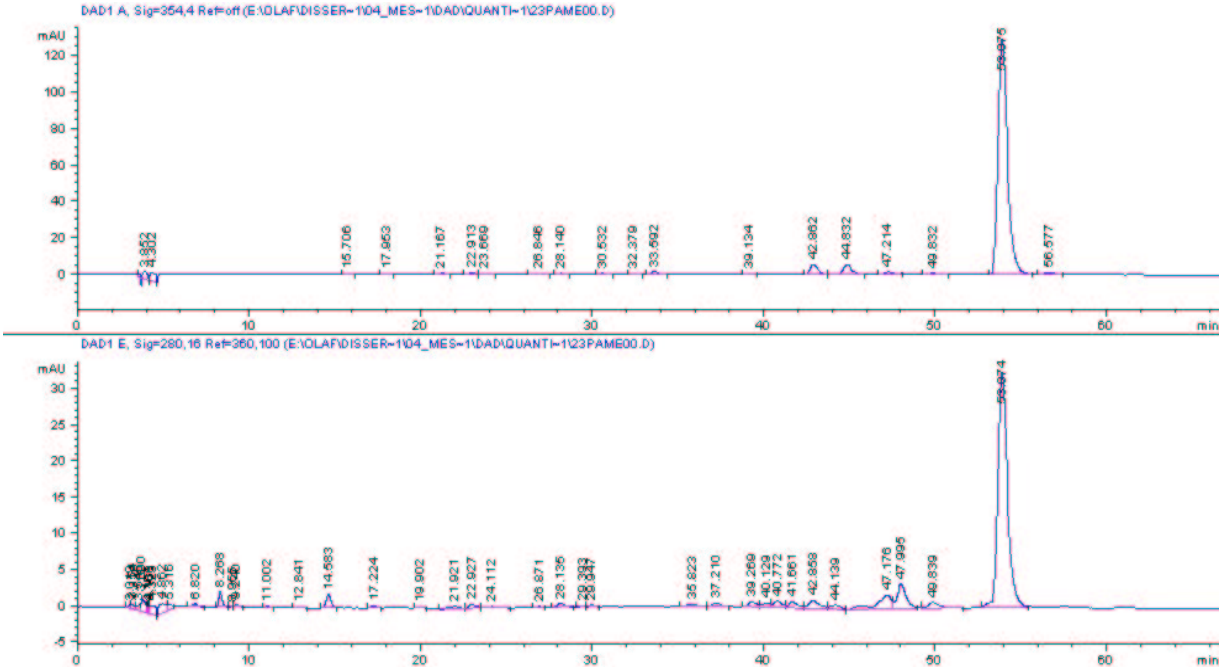

Abb. 13 Melissenblätter, methanolisches PA-Eluat (Detektion bei 354 und 280 nm)

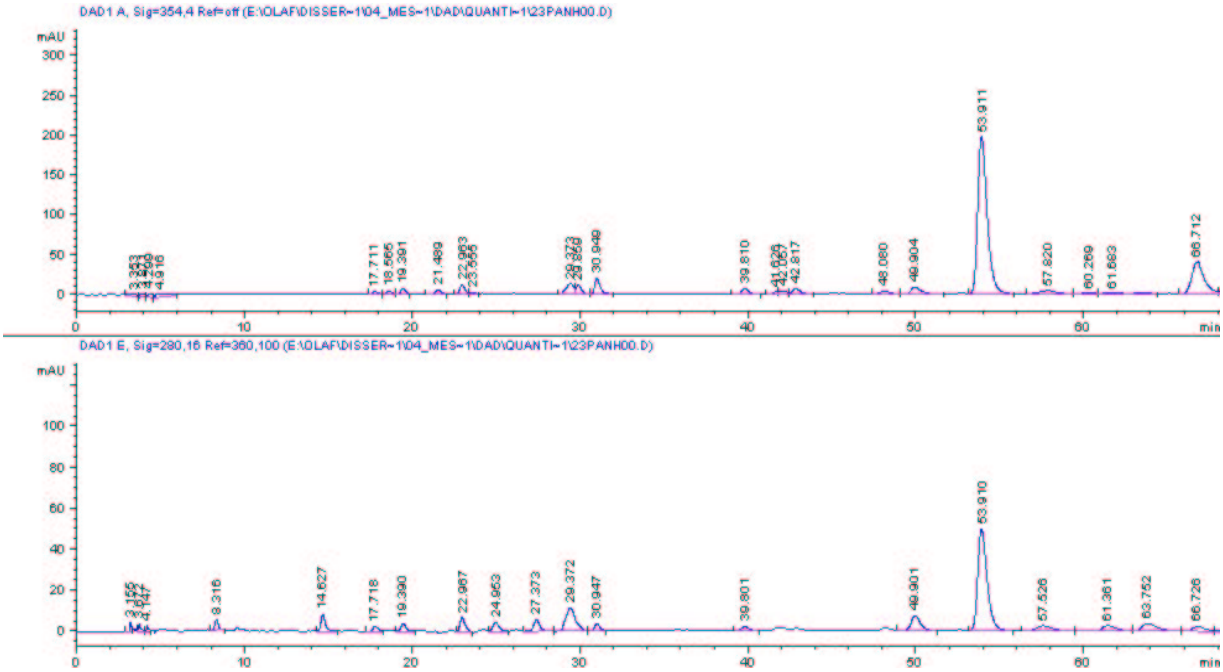

Abb. 14 Melissenblätter, ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat (Detektion bei 354 und 280 nm)

Identifiziert wurden im methanolischen PA-Eluat Rosmarinsäure und Luteolinrutinosid, im ammoniakalisch-methanolischen PA-Eluat Rosmarinsäure und Kämpferolglucuronid.

7.10.4 Vergleich der TEAC-Werte

Die Untersuchung des Rohextraktes und der PA-Eluate mittels modifiziertem TEAC-Test (RE ET AL., 1999) ergab folgende absolute Werte bezogen auf jeweils 1 g.

Tab. 5 TEAC-Werte der verschiedenen Melisse-Fraktionen

Fraktion	***TEAC [mmol Trolox/g Einwaage]***	***TEAC bezogen auf Rohextrakt [mmol/g]***
Melissenblätter, Rohextrakt	2,12	
Melissenblätter, XAD-2, methanol. Eluat	3,26	1,17
Melissenblätter, XAD-16HP, methanol. Eluat	3,39	1,19
Melissenblätter, PA, methanol. Eluat		0,13
Melissenblätter, PA, NH_3/MeOH-Eluat		0,63

Der Rohextrakt der Melissenblätter ist mit 2,12 mmol Trolox/g in seiner antioxidativen Aktivität etwa doppelt so hoch wie Pfefferminze (0,97 mmol Trolox/g). Wie zu erwarten, weisen auch hier die methanolischen XAD-Eluate wesentlich höhere antioxidative Aktivitäten auf, da hier eine Aufkonzentrierung entsprechend wirkender Verbindungen stattfindet. Die geringen Unterschiede zwischen XAD-2 und XAD-16HP sind ebenfalls auf das unterschiedliche Adsorptionsverhalten zurückzuführen. Die antioxidative Aktivität des XAD-16HP-Eluates ist um ca. 20 % höher. Die in der rechten Tabellenspalte aufgeführten, um die jeweilige Ausbeute korrigiert dargestellten TEAC-Werte, zeigen deutliche Verluste an antioxidativer Aktivität (1,17 bzw. 1,19 mmol Trolox/g gegenüber 2,12 mmol Trolox/g des Rohextraktes). Auch die Summe des neutralen und alkalischen PA-Eluats ist mit 0,76 mmol Trolox/g deutlich schwächer wirksam als der Rohextrakt. Da die Hauptverbindung, in Bezug auf antioxidative Aktivität, die Rosmarinsäure ist, bleibt zu vermuten, dass diese nur ungenügend von den entsprechenden Säulenmaterialien adsorbiert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass eine weitere, bisher nicht identifizierte Verbindung, überhaupt nicht adsorbiert wird und im Spülschritt von der Säule gewaschen wird. Diese Vermutung konnte allerdings durch Untersuchung der Waschphase nicht bestätigt werden.

7.10.5 Quantitative Bestimmungen

7.10.5.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren)

Die Bestimmung der Hydroxyzimtsäure-Derivate erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.4.

3-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	682 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	238 mg/kg
5-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	68 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	28 mg/kg
4-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	421 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	127 mg/kg

Alle Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 92,4 %.

7.10.5.2 Flavonol-O-Glycoside (FOG)

Die Bestimmung der FOG erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.5.

Kämpferolglucosid/-galactosid:	H_2O-Extrakt:	120 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	216 mg/kg

Alle Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 92,4 %.

7.10.5.3 Rosmarinsäure

MeOH-Extrakt	33,1 g/kg

Für die Quantifizierung werden die nach Abschnitt 10.3 gewonnenen methanolischen Extrakte nach Membranfiltration direkt zur HPLC eingesetzt. Es wird eine 5-Punkt-Kalibrierung mit der Standardsubstanz Rosmarinsäure (ROTH) durchgeführt und die Geradengleichung über die Peakflächen durch lineare Regression ermittelt.

7.11 Pfefferminze

Von der Pfefferminze wurden die Hauptextraktion (Abschnitt 10.7), die Polyamid-Säulenchromatographie (Abschnitt 10.8.3) sowie die Reinigung über XAD-2 und XAD-16HP (Abschnitte 10.8.1 und 10.8.2) durchgeführt.

7.11.1 Extraktionsausbeute

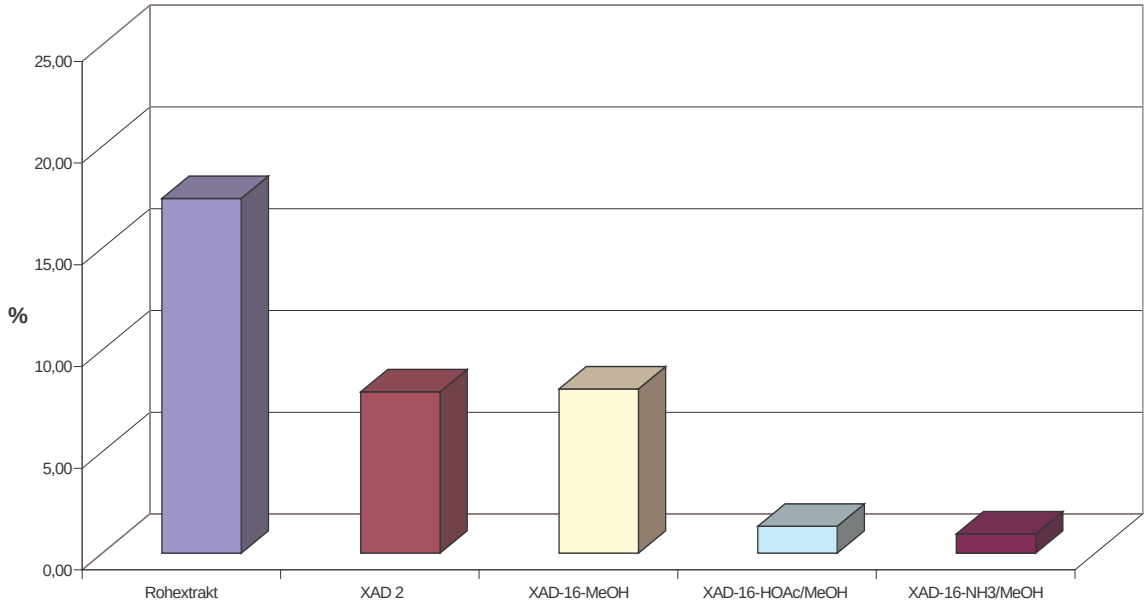

Abb. 15 Extraktionsausbeute Pfefferminze

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, wurden bei der Hauptextraktion 17,5 % an löslichen Feststoffen aus Pfefferminze extrahiert. Eine Fraktionierung über XAD-16HP ergab die Hauptmenge in der Methanolfraktion. Aufgrund der noch vorhandenen Färbung des Adsorberharzes nach der methanolischen Elution, wurde in einem weiteren Elutionsschritt mit 2%ig essigsaurem Methanol, in einem anderen Durchgang mit 0,5%ig ammoniakalischem Methanol eluiert. Hier konnten jeweils noch einmal geringere Mengen an Substanz erhalten werden. Insgesamt wurden mit XAD-2 etwa 45 % des aufgegebenen Extraktes wiedergefunden, mit XAD-16HP nach neutraler und saurer Elution zusammen 53 % und mit XAD-16HP nach neutraler und alkalischer Elution 51 % bezogen auf den Rohextrakt.

7.11.2 Untersuchungen der Extrakte mittels HPLC-DAD und HPLC-MS

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse in Tabellenform findet sich im Anhang unter 12.5.3.

Im Rohextrakt aus Pfefferminze wurden Daten für 4 Verbindungen zusammengestellt. In Abb. 16 ist das Chromatogramm dargestellt. Drei der Hauptverbindungen konnten anhand ihrer UV- und Massenspektren und unter Vergleich mit Literaturdaten (AREIAS ET AL., 2001) zugeordnet werden: Eriodictyolrutinosid ($RT_{(UV)}$ = 34,0 min); Luteolinrutinosid ($RT_{(UV)}$ =

42,2 min) und Hesperetinrutinosid ($RT_{(UV)}$ = 49,6 min). Als weitere Substanz findet sich Kämpferolglucuronid ($RT_{(UV)}$ = 44,3 min).

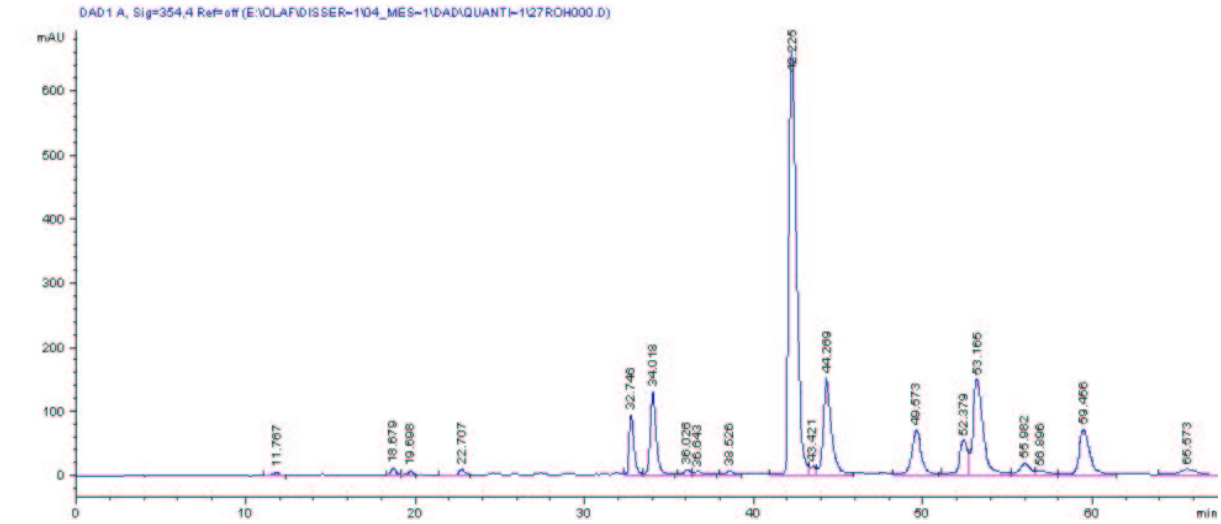

Abb. 16 Chromatogramm Pfefferminze-Rohextrakt, Detektion bei 354 nm

7.11.3 Ergebnisse der PA-Säulenchromatographie

Die Eluate der PA-Säulen wurden unter den gleichen Bedingungen per HPLC-DAD und HPLC-MS untersucht, wie der Rohextrakt. Abb. 17 und Abb. 18 zeigen die Chromatogramme des methanolischen und des ammoniakalisch-methanolischen Eluats bei 354 und 280 nm. Eine tabellarische Auflistung der Daten findet sich im Anhang unter 12.5.3.2 und 12.5.3.3.

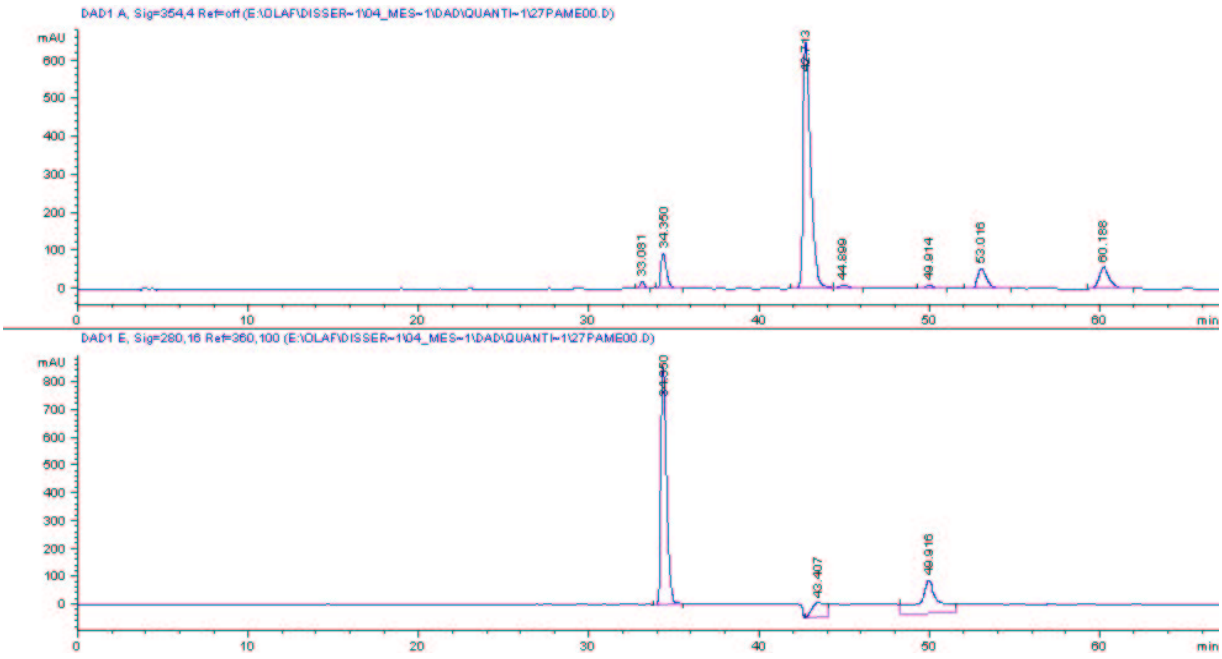

Abb. 17 Pfefferminze, methanolisches PA-Eluat (Detektion bei 354 und 280 nm)

Im methanolischen PA-Eluat konnten die bereits im Rohextrakt identifizierten Verbindungen Eriodictyolrutinosid ($RT_{(UV)}$ = 34,4 min), Luteolinrutinosid ($RT_{(UV)}$ = 42,7 min) und Hesperetinrutinosid ($RT_{(UV)}$ = 49,9 min) wiedergefunden werden. Darüber hinaus konnten hier das ebenfalls in der Literatur beschriebene Apigeninrutinosid ($RT_{(UV)}$ = 53,0 min) sowie Kämpferolglucosid bzw. –galactosid ($RT_{(UV)}$ = 44,9 min) – eine Unterscheidung des Zuckerrestes wurde nicht durchgeführt – zugeordnet werden.

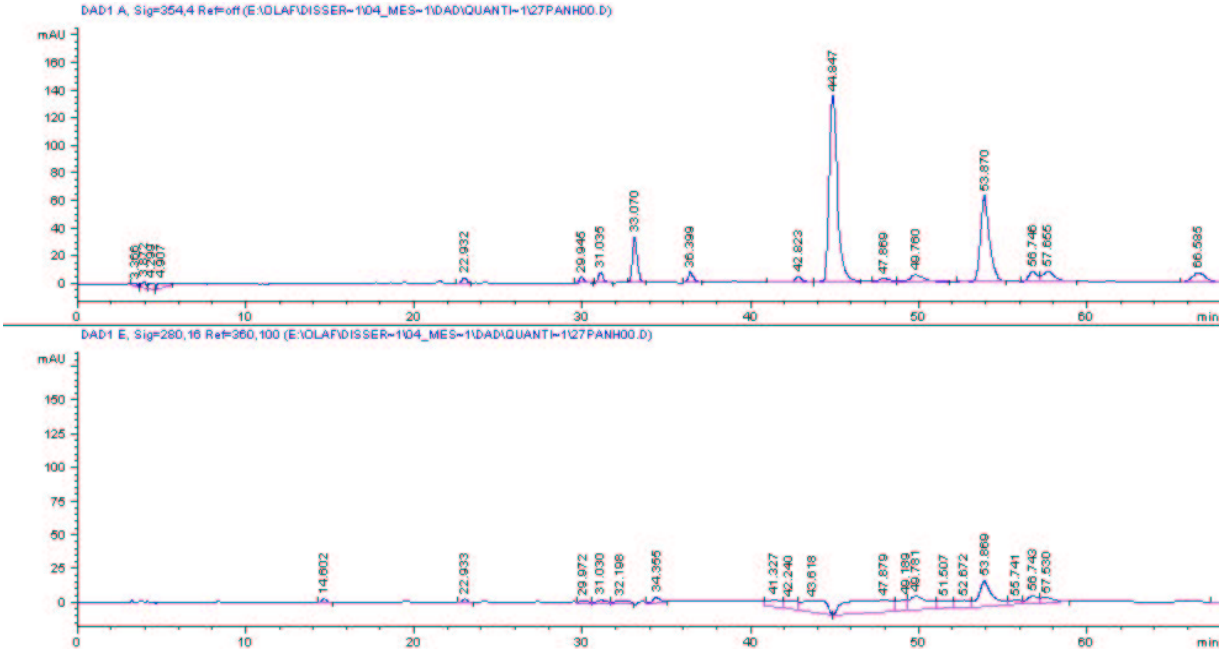

Abb. 18 Pfefferminze, ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat (Detektion bei 354 und 280 nm)

Im ammoniakalisch-methanolischen Eluat konnten neben Luteolin- bzw. Kämpferolrutinosid zwei Glucuronide (Luteolin- und Kämpferolglucuronid) detektiert werden. Darüber hinaus zeigt das Massenspektrum die typischen Signale der Rosmarinsäure.

7.11.4 Vergleich der TEAC-Werte

Die Untersuchung der verschiedenen Extrakte und Eluate mittels modifiziertem TEAC-Test (RE ET AL., 1999) ergab folgende Werte bezogen auf jeweils 1 g.

Tab. 6 TEAC-Werte der verschiedenen Pfefferminz-Fraktionen

Fraktion	***TEAC [mmol Trolox/g Einwaage]***	***TEAC bezogen auf Rohextrakt [mmol/g]***
Pfefferminze, Rohextrakt	0,97	
Pfefferminze, XAD-2, methanol. Eluat	1,83	0,83
Pfefferminze, XAD-16HP, methanol. Eluat	1,43	0,66
Pfefferminze, XAD-16HP, HOAc/MeOH-Eluat	0,24	0,02
Pfefferminze, XAD-16HP, NH_3/MeOH-Eluat	0,74	0,04
Pfefferminze, PA, methanol. Eluat		0,16
Pfefferminze, PA, NH_3/MeOH-Eluat		0,41

Der Rohextrakt ist hier mit 0,97 mmol Trolox/g in seiner antioxidativen Aktivität mit der reiner Ascorbinsäure (ca. 1,00 mmol Trolox/g, RE ET AL., 1999) vergleichbar. Wie zu erwarten, weisen die methanolischen XAD-Eluate wesentlich höhere antioxidative Aktivitäten auf, da hier eine Aufkonzentrierung entsprechend wirkender Verbindungen stattfindet. Die etwas geringere Aktivität des XAD-16HP-Eluates ist auf das unterschiedliche Adsorptionsverhalten gegenüber XAD-2 zurückzuführen. Durch einen zusätzlichen nachträglichen Elutionsschritt, vorzugsweise mit ammoniakalischem Methanol, konnte hier jedoch eine weitere Fraktion erhalten werden, deren antioxidative Aktivität mit 0,74 mmol Trolox/g ermittelt wurde.

Die rechte Tabellenspalte zeigt die TEAC-Werte bezogen auf den Rohextrakt. Die Umrechnung erfolgt jeweils über die Ausbeute der entsprechenden Fraktion. Dadurch ist es möglich, die Eluate der PA-Säulenchromatographie mit denen des XAD zu vergleichen. Im Idealfall sollte in der Summe jeweils wieder der Wert 0,97 mmol Trolox/g des Rohextraktes erreicht werden. Es zeigt sich, dass das Eluat des XAD-2 mit 0,83 mmol Trolox/g diesem Wert am nächsten kommt. XAD-16HP in der Summe aus methanolischem und saurem bzw. alkalischem Eluat erreicht 0,68 bzw. 0,70 mmol Trolox/g, die Summe aus neutralem und alkalischem Eluat der PA-Säule erreicht 0,57 mmol Trolox/g.

Diese Daten sprechen zwar dafür, die Aufreinigung über XAD-2 durchzuführen, da hiermit jedoch zu geringe absolute Ausbeuten erzielt werden, ist dennoch XAD-16HP vorzuziehen.

7.11.5 Quantitative Bestimmungen

7.11.5.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren)

Die Bestimmung der Hydroxyzimtsäure-Derivate erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.4. Die Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 91,3 %.

3-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	127 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	36 mg/kg
4-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	162 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	52 mg/kg
5-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	110 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	28 mg/kg

Wider Erwarten zeigen die wässrigen Extrakte hier höhere Gehalte. Eine Erklärung dafür wurde nicht gefunden.

7.11.5.2 Flavonol-O-Glykoside (FOG)

Die Bestimmung der FOG erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.5. Die Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 91,3 %.

Kämpferolrutinosid:	H_2O-Extrakt:	11,76 g/kg
	MeOH-Extrakt:	15,31 g/kg
Kämpferolglucuronid/-galactu-ronid:	H_2O-Extrakt:	2,53 g/kg
	MeOH-Extrakt:	2,96 g/kg

7.12 Rooibos

Vom Rooibos-Kraut wurden die Hauptextraktion (Abschnitt 10.7), die PA-Säulenchromatographie (Abschnitt 10.8.3) sowie die Reinigung über XAD-16HP (Abschnitt 10.8.2) durchgeführt. Die Ausbeute an löslichen Feststoffen aus der Hauptextraktion beträgt 13,2 %.

7.12.1 Untersuchungen der Extrakte mittels HPLC-DAD und HPLC-MS

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse in Tabellenform findet sich im Anhang unter 12.5.4. Im Rohextrakt aus Rooibos wurden Daten für 8 Verbindungen zusammengestellt. In Abb. 19 ist das Chromatogramm dargestellt.

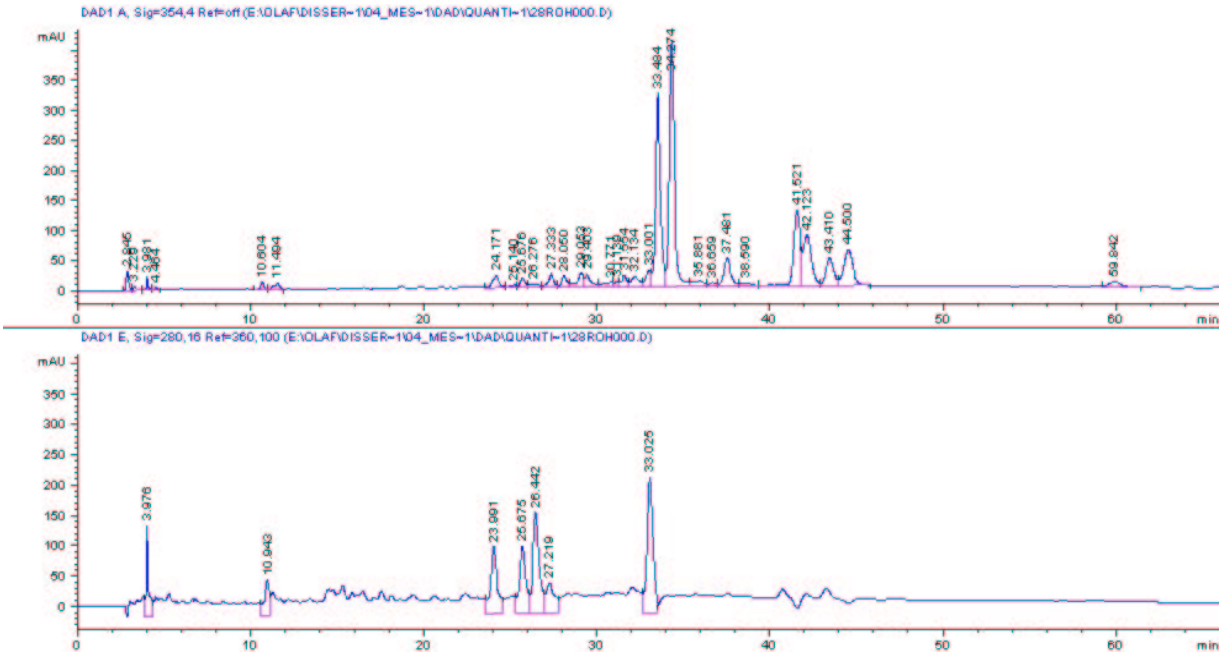

Abb. 19 Chromatogramm Rooibos, Rohextrakt bei 354 und 280 nm

Identifiziert werden konnten Aspalathin, Orientin, Iso-Orientin, Vitexin bzw. Iso-Vitexin (eine genaue Identifizierung wurde nicht durchgeführt), Schaftosid bzw. Iso-Schaftosid (ebenfalls nicht genau identifiziert) und Quercetin-Rutinosid (Rutin). Weiterhin enthält der Extrakt Quercetin-glucuronid sowie Feruloylglucose bzw. Ferulasäureglucosid (nicht genau identifiziert).

7.12.2 Ergebnisse der PA-Säulenchromatographie

Die Eluate der PA-Säulen wurden unter den gleichen Bedingungen per HPLC-DAD und HPLC-MS untersucht, wie der Rohextrakt. Abb. 20 und Abb. 21 zeigen die Chromatogramme des methanolischen und des ammoniakalisch-methanolischen Eluats bei 354 und 280 nm. Eine tabellarische Auflistung der Daten findet sich im Anhang unter 12.5.4.2 und 12.5.4.3.

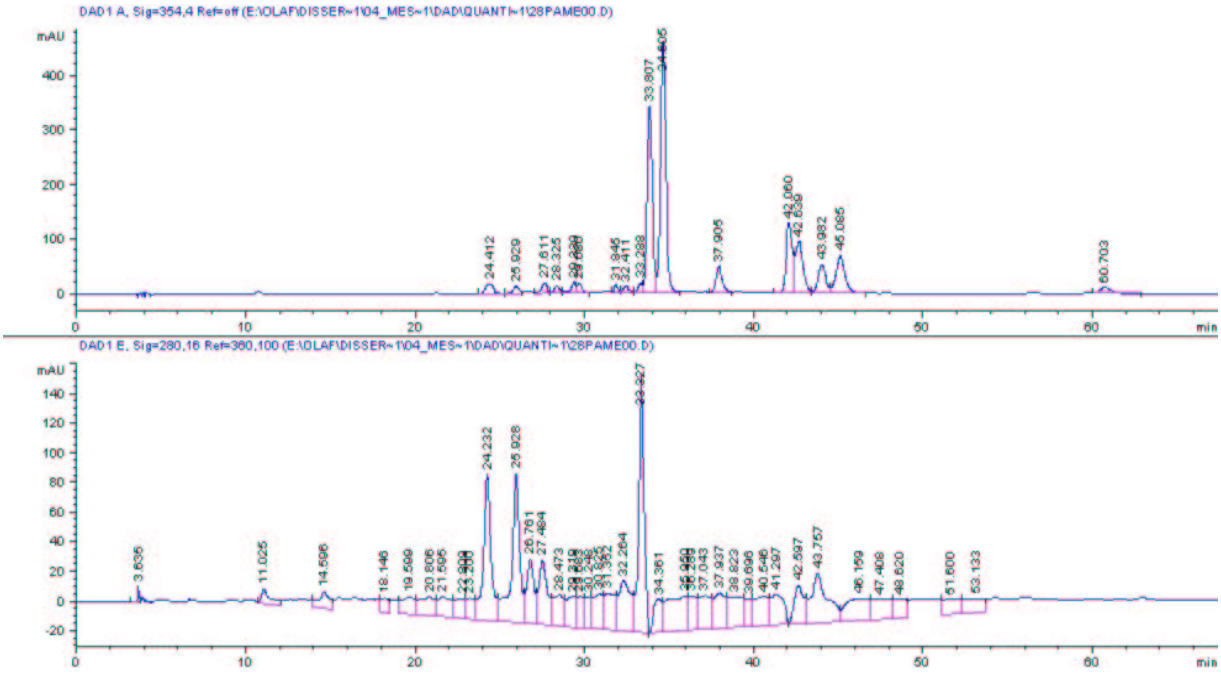

Abb. 20 Rooibos, methanolisches PA-Eluat (Detektion bei 354 und 280 nm)

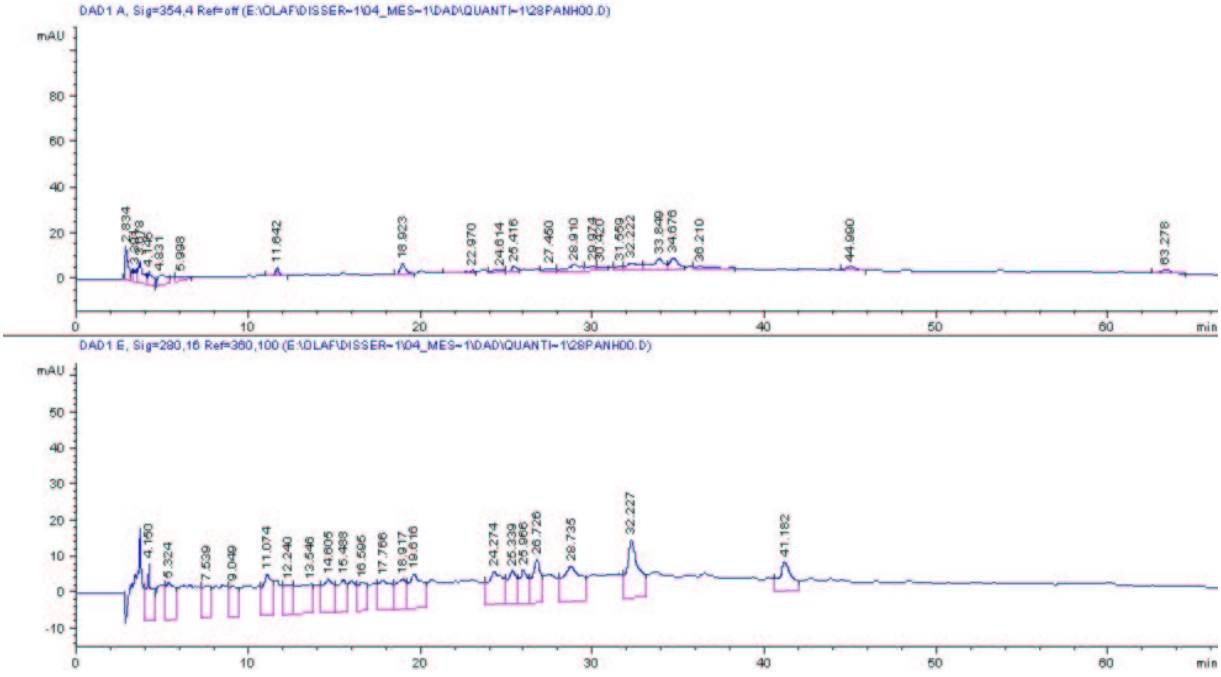

Abb. 21 Rooibos, ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat (Detektion bei 354 und 280 nm)

Im ammoniakalischen PA-Eluat wurde Kaffeoylchinasäure identifiziert. Im methanolischen Eluat finden sich Aspalathin, Orientin und Iso-Orientin, Vitexin bzw. Iso-Vitexin, Quercetin-Rutinosid (Rutin), sowie Quercetinglucosid und Quercetingalactosid.

7.12.3 Vergleich der TEAC-Werte

Die Untersuchung des Rohextraktes und der PA-Eluate mittels modifiziertem TEAC-Test (RE ET AL., 1999) ergab folgende Werte bezogen auf jeweils 1 g Rohextrakt.

Tab. 7 TEAC-Werte der verschiedenen Rooibos-Fraktionen

Fraktion	***TEAC [mmol Trolox/g Einwaage]***	***TEAC bezogen auf Rohextrakt [mmol/g]***
Rooibos, Rohextrakt	1,91	
Rooibos, PA, methanol. Eluat		0,26
Rooibos, PA, NH_3/MeOH-Eluat		0,25

7.12.4 Aufreinigung

Die Aufreinigung des Rohextraktes erfolgte über ein Adsorberharz XAD-16HP, um störende Begleitstoffe wie z. Bsp. Zucker zu entfernen. Die Ausbeute bezogen auf die Extrakt-Einwaage beträgt hier 41,15 %. Anschließend erfolgten weitere Untersuchungen mittels präparativer bzw. analytischer HPLC mit dem Ziel der Isolierung und Identifizierung von Einzelverbindungen. Die bisher im Rohextrakt identifizierten Verbindungen (12.5.4.1) konnten auch im gereinigten Extrakt bestätigt werden. Weitere Untersuchungen von noch unbekannten Komponenten befinden sich derzeit in der Bearbeitung.

7.12.5 Quantitative Bestimmungen

7.12.5.1 Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren)

Die Bestimmung der Hydroxyzimtsäure-Derivate erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.4. Die Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 92,7%.

3-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	160 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	98 mg/kg
5-CQA (Kaffeoylchinasäure):	H_2O-Extrakt:	22 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	11 mg/kg

7.12.5.2 Flavonol-O-Glycoside (FOG)

Die Bestimmung der FOG erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.5.

Quercetinrutinosid:	H_2O-Extrakt:	1,6 g/kg
	MeOH-Extrakt:	3,5 g/kg
Quercetinglucosid/-galactosid:	H_2O-Extrakt:	184 mg/kg

	MeOH-Extrakt:	399 mg/kg
Quercetinglucosid/-galactosid:	H_2O-Extrakt:	461 mg/kg
	MeOH-Extrakt:	1,1 g/kg

Alle Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse von 92,7 %.

7.12.5.3 Flavon-C-Glycoside (FCG)

Die Bestimmung erfolgte gemäß Abschnitt 10.6.1.6.

Tab. 8 Gehalte der identifizierten Flavon-C-Glykoside im Rooibos

	H_2O - Extrakt [mg/kg]	**MeOH - Extrakt [mg/kg]**
Schaftosid	145	327
Iso-Schaftosid	92	237
Orientin	1028	2876
Iso-Orientin	945	2291
Vitexin	292	685
Iso-Vitexin	255	741

Alle Angaben beziehen sich ebenfalls auf die Trockenmasse von 92,7 %.

7.13 Rotes Weinlaub

Vom roten Weinlaub wurden Flavonol-O-Glykoside als Summenparameter nach wässriger und methanolischer Extraktion analog der Abschnitte 10.1 und 10.3 bestimmt. Der Gesamtgehalt beläuft sich dabei auf 11,57 g/kg im wässrigen und 27,24 g/kg im methanolischen Extrakt. Quercetin-Glykoside bilden dabei den Hauptanteil mit 11,03 g/kg im wässrigen und 25,85 g/kg im methanolichen Extrakt. Den Rest bilden Kämpferol-Glykoside mit 0,55 g/kg im wässrigen und 1,57 g/kg im methanolischen Extrakt.

8 Untersuchungen zur Herstellung von Instant-Produkten

Die Untersuchungen zur Herstellung von Instant-Produkten im Hinblick auf einen möglichst vollständigen Übergang der antioxidativ wirksamen Verbindungen wurden exemplarisch am Beispiel der Pfefferminze durchgeführt. Hierzu wurden die Extraktionsbedingungen ausgehend vom haushaltsüblichen Aufguss (s. Abschnitt 10.1) variiert. Jeweils 2 g Probe wurden dazu in je 200 mL temperiertes Wasser überführt und

nach Ablauf der Extraktionszeit über ein handelsübliches Teesieb abgegossen. Extrahiert wurde bei 40 °C, 60 °C, 80 °C und 95 °C für jeweils 1, 2, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten. Zu Beginn der Extraktion, jeweils nach der Hälfte der Extraktionszeit und kurz vor Ende (bei 30 Minuten alle 10 Minuten) wurde mit einem Glasstab gründlich umgerührt.

Nach Abkühlen wurden dann jeweils 50 mL Extrakt zur Bestimmung der löslichen Feststoffe analog Abschnitt 10.2 abgenommen, sowie ein aliquoter Teil, ggf. nach Verdünnung, zur Bestimmung der TEAC-Werte (analog Abschnitt 10.5) eingesetzt.

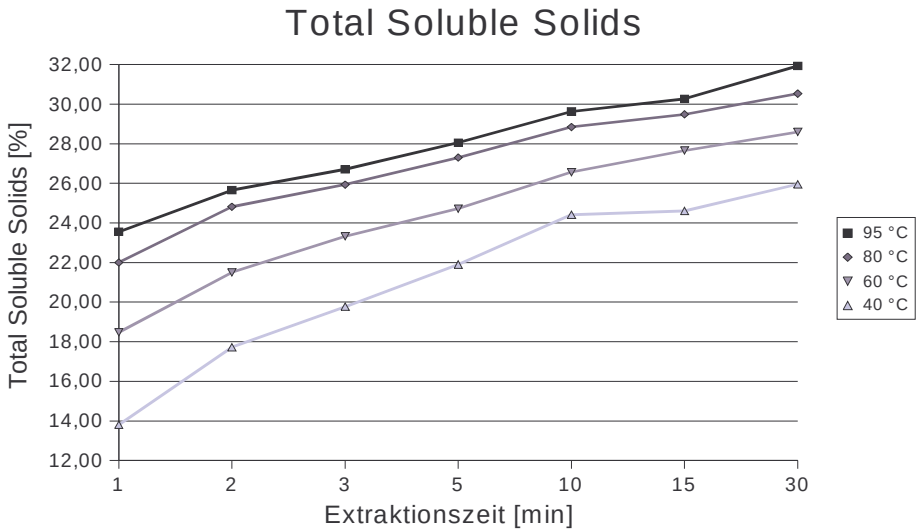

Abb. 22 Lösliche Feststoffe – Pfefferminze, Herstellung von Instant-Produkten

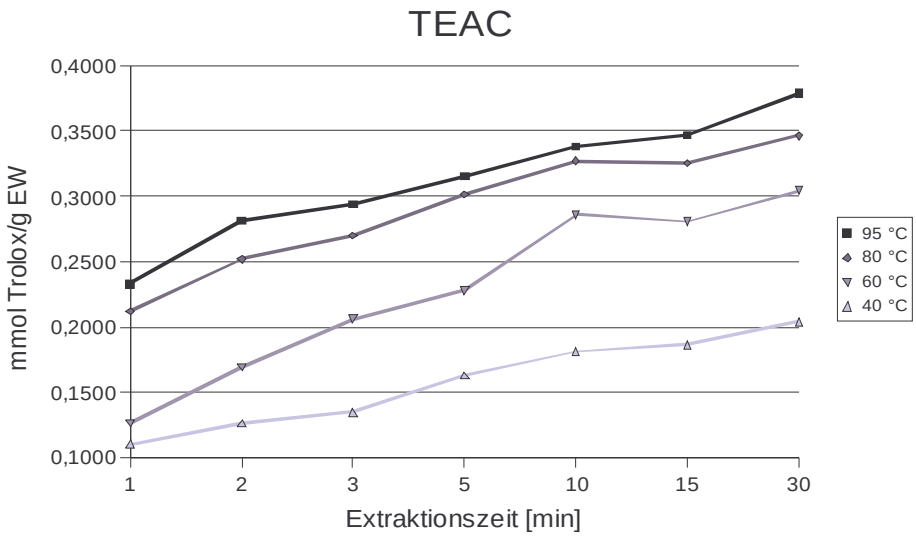

Abb. 23 Trolox-Äquivalente – Pfefferminze, Herstellung von Instant-Produkten

Anhand der Grafiken zeigt sich, dass nach 10 Minuten Extraktionszeit der Hauptanteil an löslichen Verbindungen und damit verbunden auch der Hauptanteil an antioxidativ

wirksamen Verbindungen in den Extrakt übergegangen ist. Ebenfalls lässt sich feststellen, dass die Zunahme an löslichen Feststoffen und antioxidativer Aktivität von 80 °C zu 95 °C deutlich geringer ist als zwischen 60 °C und 80 °C.

Die Messdaten finden sich im Anhang unter 12.4.

9 Diskussion

9.1 Vergleich mit dem Antrag

Es wurden, wie im Antrag beschrieben, eine Reihe von Daten für den Gesamtphenolgehalt und die antioxidative Aktivität von ausgewählten Kräuter- und Früchtetees etabliert. Dazu wurde zusätzlich eine vergleichende Untersuchung über eine größere Anzahl von Produkten mit eingebunden, da dies seitens des projektbegleitenden Ausschusses für sinnvoll erachtet wurde.

Die Isolierung und Strukturaufklärung von individuellen Verbindungen aus den intensiver untersuchten Produkten erwies sich als relativ zeitaufwändig. Immerhin konnten einige Verbindungen, z.B. Kämpferolglucuronid aus Pfefferminze, Brombeer- und Himbeerblättern, sowie Quercetinglucuronid aus Brombeer- und Himbeerblättern vorläufig anhand ihrer spektroskopischen Daten identifiziert werden.

9.2 Darstellung der Verwertbarkeit der Ergebnisse und Nutzen für kmU

Die kmU haben durch die Ergebnisse des Projektes umfangreiche Informationen über Extraktgehalte, Gesamtphenole und die antioxidative Aktivität zahlreicher Produkte erhalten. Ein Vergleich der Kräuter- und Früchtetees untereinander und mit anderen Produkten – wie grünem und schwarzem Tee – wird dadurch ermöglicht. Weiterhin werden erste Vergleiche eines eingekauften Produktes mit einem hier untersuchten „Standardprodukt“ möglich. Die Daten können auch zur Produktentwicklung genutzt werden, was bereits umgestzt wurde. Die Ergebnisse stellen auch die Basis für weitere Untersuchungen dar, z.B. den Vergleich von Produkten aus verschiedenen Anbaugebieten, dar. Auch eine Information darüber, was bei Extraktionen maximal an wertgebenden Inhaltsstoffen erzielbar ist, wird aufgrund der Ergebnisse der methanolischen Extraktionen möglich.

Aufgrund der Ergebnisse wurde ein neues Produkt mit hoher antioxidativer Aktivität („OXBLOXX“) entwickelt. Es steht zu vermuten, dass weitere Produkte dieser Art folgen werden.

9.3 Zusammenstellung von Veröffentlichungen

Pokorny, O., Engelhardt, U.H. (2002) Antioxidatives Potenzial und Gesamtphenolgehalte von Kräuter- und Früchtetees. *Lebensmittelchemie* **56**, S. 77

10 Material und Methoden

10.1 Haushaltsüblicher Teeaufguss

Als haushaltübliche Zubereitung wird folgender Aufguss definiert. Ca. 2 g Probe (genau gewogen) werden mit 200 mL Wasser aufgebrüht. Nach einer Ziehzeit von 10 min wird der Aufguss über ein Feinsieb gegossen. Jeweils 4 Extrakte werden vereinigt und weiter bearbeitet. Diese Zubereitung folgt dem Vorschlag der EHIA.

10.2 Extrahierbare Feststoffe

Jeweils 50 mL des haushaltsüblichen Teeaufgusses werden nach Abkühlen in ein 100 mL-Becherglas pipettiert, bei 103 °C im Trockenschrank getrocknet und konstant gewogen.

10.3 Methanolische Extraktion

Die methanolische Extraktion erfolgt analog der ISO-Norm für Schwarztee. Es wird davon ausgegangen, dass bei dieser Form der Extraktion alle relevanten Verbindungen vollständig extrahiert werden.

0,2 g fein gemahlene Probe (Partikelgröße < 0,5 mm) werden mit 5 mL 70%igem, 70 °C heißem Methanol übergossen und für genau 10 min im Wasserbad auf 70 °C erhitzt. Zu Beginn der Extraktion, nach 5 min und am Ende wird gründlich durchmischt. Am Ende der Extraktionszeit wird der Extrakt auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 3500 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in einen 10 mL-Messkolben dekantiert und der Rückstand noch einmal mit 5 mL für genau 10 min extrahiert, abgekühlt und zentrifugiert. Der Überstand wird ebenfalls in den 10 mL-Messkolben dekantiert und dieser bis zur Marke mit 70%igem Methanol aufgefüllt.

10.4 Gesamtphenol-Bestimmung

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes erfolgte als Summenparameter nach einer Modifikation der Methode von SINGLETON und ROSSI (1965). Die Methodik wurde in der Ausführungsform durchgeführt, die für Tee derzeit international genormt wird.

10.5 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität erfolgte in Anlehnung an den von RE et. al. (1999) entwickelten modifizierten TEAC-Test. Dieser beruht auf einer durch antioxidativ wirksame Verbindungen hervorgerufenen Entfärbung einer ABTS-Radikal-Kationen-Lösung. Da bei den untersuchten Proben Matrix-Effekte eine Rolle spielen, wurde die beschriebene Vorgehensweise den gegebenen Bedingungen angepasst.

10.5.1 Erzeugung des ABTS-Radikals

38,41 mg ABTS (7 mmol) werden mit 6,63 mg (2,45 mmol) Kaliumperoxodisulfat (Kaliumpersulfat, $K_2S_2O_8$) in 10 mL Wasser gelöst und zur Bildung des Radikals für 12-16 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Danach kann die Lösung für ca. 6 Wochen im Kühlschrank dunkel aufbewahrt werden.

Zum Herstellen der täglich frisch anzusetzenden Arbeitslösung werden 0,5 mL dieser Stammlösung mit ca. 50 mL Ethanol (p.A., > 98 %) versetzt und auf eine Extinktion von 0,70 +/- 0,02 eingestellt.

10.5.2 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wird eine Verdünnungsreihe der Standardsubstanz Trolox erstellt und vermessen. Dazu werden 12,5 mg Trolox in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und mit Ethanol (p.A., > 98 %) bis zur Marke aufgefüllt (5 mmol/L). Von dieser Stammlösung werden 250 µL, 500 µL, 750 µL und 1000 µL in je einen 5 mL-Messkolben überführt und ebenfalls mit Ethanol (p.A., > 98 %) bis zur Marke aufgefüllt (entspricht bei der Messung Konzentrationen von 0,25 mmol/L, 0,50 mmol/L, 0,75 mmol/L und 1,00 mmol/L).

Die Kalibrierung wird vor jeder Messreihe mit der frisch hergestellten ABTS-Arbeitslösung durchgeführt.

10.5.3 Messung

Jeweils 20 µL Standard bzw. Probe werden in Halbmikroküvetten (Kunststoff, Schichtdicke 1 cm) vorgelegt, mit 1,5 mL ABTS-Arbeitslösung versetzt und gründlich durchmischt. Nach genau 10 Minuten Reaktionszeit wird die Extinktion der Lösungen bei 734 nm gegen Luft vermessen. Von der Kalibrierreihe wird jeweils nur eine Messung pro Standard durchgeführt, die Proben werden einer Dreifach- bzw. Vierfachbestimmung unterzogen.

Zur Kontrolle wird bei jeder Messreihe ein Ascorbinsäure-Vergleichsstandard mit vermessen. Dazu werden 4,41 mg Ascorbinsäure in einen 50 mL-Messkolben eingewogen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt (entspricht 1 mmol/L bei einem eingesetzten Probenvolumen von 20 µL). Diese Lösung ist täglich frisch anzusetzen. Die Messung erfolgt analog der Kalibrierung bzw. der Proben.

Die gesamte Messung findet bei Raumtemperatur statt.

Geräteparameter:
- PERKIN-ELMER Lambda 3 UV/VIS Spectrophotometer
- Miton Roy – Spectronic 301, Spectrophotometer
- Zeiss SPECORD UV/Vis S10

10.6 HPLC

10.6.1 Analytische HPLC-Anlagen

10.6.1.1 HPLC-DAD-Anlage

Pumpe: Hewlett-Packard Series 1100 – Bin Pump G1312A

Probenaufgabe: Hewlett-Packard Series 1100 – Autosampler ALS G1329A, ALS Therm G1330A

Säulenofen: Hewlett-Packard Series 1100 – Colcom G1316A

Detektor: Hewlett-Packard Series 1100 – DAD G1315A

Datenverarbeitung: Hewlett-Packard ChemStation Software V. A.06.03

10.6.1.2 HPLC-ESI-MS^n-Anlage

Pumpe: Hewlett-Packard Series 1100 – Bin Pump G1312A

Injektor: Rheodyne 7725i mit 20 µL-Probenschleife,

MS-Anlage: Bruker Esquire~LC mit Elektrosprayionisierung, Bruker Daltonik GmbH, Bremen

Datenverarbeitung: Esquire Control Software V. 4.5, Bruker Data Analysis V. 3.0

10.6.1.3 Bestimmung von Flavan-3-olen (Catechine)

Die wässrigen Extrakte wurden nach Membranfiltration direkt per HPLC-DAD vermessen, die methanolischen Extrakte zuvor 1:5 verdünnt.

Fließmittel: A: 2 % Essigsäure, 9 % Acetonitril, aq
B: 80 % Acetonitril, aq

Fluss: 1 mL/min

Messwellenlänge: 278 nm

Temperatur: 35 °C

Injektionsvolumen: 20 µL

Trennsäule: Phenomenex, Type Luna Phenyl-Hexyl, 5 µm, 250 x 4.6 mm i.D. mit Phenyl-Vorsäulenkartusche 4 x 3 mm i.D.

Gradient: mit 0 % B 15 min isokratisch
in 15 min auf 32 % B
5 min isokratisch – Ende der Datenerfassung nach 35 min
in 1 min auf 100 % B
9 min mit 100 % B spülen
in 1 min auf 0 % B
20 min mit 0 % B konditionieren – Methodenende nach 66 min

Standards: Coffein (Konzentration: 0,2006 g in 100 mL: 2,006 mg/mL)

STD A: 50,15 µg/mL
STD B: 100,30 µg/mL
STD C: 150,45 µg/mL

Retentionszeiten/ Responsefaktoren:

Gallussäure (GA)	4,16 min	R = 0,84
EGC	8,46 min	R = 11,24
Catechin (+C)	10,93 min	R = 3,58
Coffein	15,07 min	R = 1
EC	18,24 min	R = 3,67
EGCG	21,26 min	R = 1,72
ECG	27,51 min	R = 1,42

Berechnung:

$$\frac{A_{Sample} - A_{Intercept} \times RRF_{STD} \times V \times d \times 100}{Slope_{Caffeine} \times EW \times 10000 \times DM}$$

A_{Sample}	Peak Area des Catechins in der Probe
$A_{Intercept}$	y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden der Kalibrierung
RRF_{STD}	Relative Response Factor des jeweiligen Catechins
V	Extraktionsvolumen der Probe (800 mL bei H_2O; 10 mL bei MeOH)
d	Verdünnungsfaktor (1 bei H_2O; 5 bei MeOH)
EW	Einwaage der Probe (8 g bei H_2O; 0,2 g bei MeOH)
DM	Trockenmasse in %

10.6.1.4 Bestimmung von Hydroxyzimtsäure-Derivaten (Chlorogensäuren)

10.6.1.4.1 Aufarbeitung der wässrigen Extrakte

Zu Beginn der Aufarbeitung (Festphasen-Extraktion) müssen die verwendeten RP-18-Kartuschen (pro Probe 2: A+B; Bakerbond 500 mg) mit 9 mL Methanol und anschließend 6 mL Wasser konditioniert werden. Danach wird pro Kartusche 1 mL wässriger Extrakt aufgeben und in einen 50 mL-Spitzkolben eluiert (Supelco-Vakuumkammer). Um die Hydroxyzimtsäuren quantitativ zu eluieren, wird die Kartusche mit 9 mL Wasser gewaschen (Eluat auch im Spitzkolben auffangen). Die Konditionierung der Kartusche, die Probenaufgabe und die Elution werden pro Probe insgesamt viermal durchgeführt!

Das Eluat (40 mL) wird anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt, der Rückstand mit 1 mL Wasser aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Mit einer Pasteurpipette wird die Lösung dann in einen 2 mL-Messkolben überführt und der Spitzkolben erneut mit 1 mL Wasser gespült und ebenfalls in den Messkolben überführt. Schließlich wird der Messkolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösungen werden ohne weitere Membranfiltration direkt zur HPLC-DAD-Messung eingesetzt.

10.6.1.4.2 Aufarbeitung der methanolischen Extrakte

Vom hergestellten Methanolextrakt werden 5 mL in einen 50 mL-Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer soweit eingeengt, bis die Lösung methanolfrei ist (etwa bei 40 mbar, 40 °C). Der methanolfreie Rückstand wird mit Wasser quantitativ in einen 10 mL-Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Festphasenextraktion erfolgt mit dieser Lösung analog der wässrigen Extrakte.

Fließmittel: A: 2%ige Essigsäure
B: 100 % Acetonitril

Fluss:	1 mL/min
Messwellenlänge:	324 nm
Temperatur:	20 °C
Injektionsvolumen:	20 µL
Trennsäule:	ODS-Hypersil, 5 µm, 250 x 4,6 mm i.D., mit Vorsäule Nucleosil 100, C18, 5 µm, 10 x 4,6 mm i.D.
Gradient:	mit 6 % B 15 min isokratisch in 5 min auf 12 % B 25 min isokratisch mit 12 % B in 1 min auf 100 % B 10 min mit 100 % B spülen in 1 min auf 6 % B – Ende der Datenerfassung nach 60 min 20 min konditionieren – Methodenende nach 77 min
Standards:	a) p-Cumarsäure, Roth, $C_9H_8O_3$, MG: 164,16 g/mol b) n-Chlorogensäure-Hemihydrat (5-Caffeoyl-Chinasäureester), Fluka, $C_{16}H_{18}O_9$ x 0,5 H_2O, MG: 363,32 g/mol (wasserfrei: 354,32 g/mol) c) Ferulasäure, Fluka, $C_{10}H_{10}O_4$, MG: 194,19 g/mol
Konzentrationen:	Einwaage in 25 mL-Messkolben: a) 0,01527 g ≡ 0,6108 g/L p-Cumarsäure b) 0,01548 g ≡ 0,6192 g/L n-Chlorogensäure-Hemihydrat 0,6039 g/L n-Chlorogensäure (5-CQA) c) 0,01509 g ≡ 0,6036 g/L Ferulasäure
Verdünnungen:	1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400

Umrechnung von p-Cumarsäure zu 3-/4-/5-CouQA:

p-Cumarsäure:	164,16 g/mol
Chinasäure:	192,17 g/mol
Cou-QA-ester:	338,33 g/mol
Faktor:	2,06

Umrechnung von Ferulasäure zu 3-/4-/5-FQA:

Ferulasäure:	194,19 g/mol
Chinasäure:	192,17 g/mol
FQA-ester:	368,36 g/mol
Faktor:	1,90

Umrechnung von Ferulasäure zu Ferulasäureglucosid/Feruloylglucose:

Ferulasäure:	194,19 g/mol
Ferulasäureglucosid:	356,37 g/mol
Faktor:	1,84

Umrechnung von n-Chlorogensäure zu 3-/4-/5-CQA:

Faktor:	1,00

Umrechnung von n-Chlorogensäure zu 3,4-/3,5-/4,5-di-CQA:

n-Chlorogensäure:	354,32 g/mol
Kaffeesäure:	180,16 g/mol
di-CQA-ester:	516,48 g/mol
Faktor:	1,46

Umrechnung von n-Chlorogensäure zu Kaffeesäureglucosid/Kaffeoylglucose:

n-Chlorogensäure:	354,32 g/mol
Kaffeesäure:	180,16 g/mol
Kaffeesäureglucosid:	342,34 g/mol
Faktor:	0,97

Berechnung: $$x\,[\mathrm{g/kg}] = \frac{(y-b)\times \mathrm{RRF}\times \mathrm{VF}}{m\times \mathrm{EW}}$$

y	Peakfläche
b	y-Achsenabschnitt
RRF	Relative Response Factor der jeweiligen Chlorogensäure
VF	Verdünnungsfaktor
m	Steigung
EW	Einwaage in g

10.6.1.5 Bestimmung von Flavonol-O-glykosiden

Die Aufarbeitung erfolgt analog dem im Abschnitt „Polyamid-Säulenchromatographie“ beschriebenen Verfahren. Von den wässrigen Extrakten werden dabei jeweils 50 mL direkt auf die PA-Säule aufgegeben, von den methanolischen Extrakten werden zunächst jeweils 5 mL in einen 50 mL-Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer fast bis zur Trockne eingeengt. Der methanolfreie Rückstand wird dann mit Wasser quantitativ auf die vorbereiteten PA-Säulen überführt. Die Elution der FOG sowie der aciden FOG erfolgt ebenfalls wie im Abschnitt „Polyamid-Säulenchromatographie“ beschrieben. Die erhaltenen Eluate werden dann per HPLC-DAD vermessen.

Fließmittel	A: 2%ige Essigsäure B: 100 % Acetonitril
Fluss:	1 mL/min

Messwellenlänge: 354 nm

Temperatur: 20 °C

Injektionsvolumen: 50 µL

Trennsäule: Nucleosil 100, C-18, 5 µM, 250 x 4,6 mm i.D. mit Vorsäule Nucleosil 100, C-18, 5 µm, 10 x 4,6 mm i.D.

Gradient: 6 % B in 28 min auf 17 % B
in 25 min auf 20 % B
12 min isokratisch mit 20 % B
in 5 min auf 100 % B – Ende der Datenerfassung: 70 min
15 min isokratisch mit 100 % B
in 1 min auf 6 % B
Säule 20 min konditionieren – Methodenende: 106 min

Standards: a) Rutin, Roth, $C_{27}H_{30}O_{16}$, MG: 610,50 g/mol (Quercetin-3-rutinosid; hier verwendet: R-Trihydrat: MG: 664,58 g/mol)

b) Kämpferol-3-rhamnoglucosid, Roth, $C_{26}H_{30}O_{15}$, MG: 582,51 g/mol

c) Myricitrin, Roth, $C_{21}H_{20}O_{12}$, MG: 464,36 (Myricetin-3-rhamnosid)

MG Quercetin: 302,24 g/mol
MG Kämpferol: 286,24 g/mol
MG Myricetin: 318,24 g/mol

Umrechnung vom Glykosid zum Aglykon:

$$\frac{\text{Einwaage Glykosid[mg]} \times \text{MG Aglykon}}{\text{MG Glykosid}} = \text{mg Aglykon}$$

Mischstandard: Quercetin: 88,4 mg/L
Kämpferol: 72,0 mg/L
Myricetin: 86,8 mg/L

Verdünnungen: 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:100

Berechnung als Glykosid:

$$x\,[\text{mg/kg}] = \frac{(y - b) \times VF \times 1000}{m \times EW} \times \frac{M_G\ \text{Glykosid}}{M_G\ \text{Aglykon}}$$

y	Peakfläche
b	Achsenabschnitt
VF	Verdünnungsfaktor
m	Steigung

EW Einwaage in g

10.6.1.6 Bestimmung von Flavon-C-glykosiden

10.6.1.6.1 Probenaufarbeitung der wässrigen FCG

Von der restlichen Lösung der wässrigen FOG-Aufarbeitung werden 5 mL in einen 50 mL Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer bei 40 °C fast bis zur Trockne eingeengt. Zur Hydrolyse werden 2 mL Pectinol und 1 mL Wasser zugesetzt, im Ultraschallbad gelöst und 20 Stunden im Wasserbad bei 36 °C inkubiert. Eine Glassäule wird mit Glaswolle, Seesand und ca. 8 cm vorgequollenem Polyamid (PA) befüllt und mit 250 mL Wasser methanolfrei gewaschen. Die hydrolysierte Probe wird im Ultraschallbad gelöst und quantitativ auf die PA-Säule aufgeben. Anschließend wird erneut mit 100 mL Wasser gewaschen und dann die FCG mit 250 mL Methanol in einen 500 mL Rundkolben eluiert. Nun wird das Eluat am Rotationsverdampfer bei 40 °C fast bis zur Trockne eingeengt und mit Methanol (3 x 10 mL) in einen 100 mL Rundkolben überführt. Nach Zusatz von 0,4 mL DMF wird fast bis zur Trockne eingeengt, der Rückstand wird mit weiteren 0,4 mL DMF und wenig Wassser in einen 2 mL Messkolben überführt und bis zur Marke aufgefüllt. Nach Membranfiltration folgt die Messung per HPLC.

10.6.1.6.2 Probenaufarbeitung der methanolischen FCG

Von der restlichen Lösung der methanolischen FOG-Aufarbeitung werden 5 mL in einen 50 mL Spitzkolben pipettiert und analog der wässrigen FCG aufgearbeitet.

Fließmittel:	A: 2%ige Essigsäure B: 100 % Acetonitril
Fluss:	1 mL/min
Messwellenlänge:	340 nm
Temperatur:	20 °C
Injektionsvolumen:	50 µL
Trennsäule:	Phenomenex Aqua, 250 x 4,6 mm i.D. mit Vorsäulenkartusche „SecurityGuard“ C-18, 4 x 3 mm i.D.
Gradient:	4 % B 10 min isokratisch in 32 min auf 19 % B 8 min isokratisch mit 19 % B in 15 min auf 20 % B

5 min isokrat. mit 20 % B – Ende der Datenerfassung: 70 min
in 1 min auf 100 % B
10 min isokratisch mit 100 % B
in 1 min auf 4 % B
Säule 20 min konditionieren – Methodenende: 102 min

Standards: a) Orientin, $C_{21}H_{20}O_{11}$, M_G: 448,38 g/mol (Luteolin-8-C-glucosid)
b) Vitexin, $C_{21}H_{20}O_{10}$, M_G: 432,36 g/mol (Apigenin-8-C-glucosid)

Die Standardsubstanzen werden zunächst in DMF gelöst und nach dem Abkühlen mit Wasser aufgefüllt. Die Verdünnungen werden mit DMF/Wasser (2:3) hergestellt.

Mischstandard: (a) Orientin: 117 mg/L
(b) Vitexin: 111 mg/L

Umrechnung auf Aglyka:

$$\frac{\text{Einwaage Glykosid} \times \text{M}_\text{G}\ \text{Agylkon}}{\text{M}_\text{G}\ \text{Glykosid}} = \text{mg Aglykon}$$

(a) Orientin => Luteolin: (117 x 286,24) : 448,38
= 74,69 mg/L Luteolin

(b) Vitexin => Apigenin: (111 x 270,24) : 432,38
= 69,38 mg/L Apigenin

Verdünnungen: 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:100

10.6.1.7 Bestimmung der Rosmarinsäure

Die Aufarbeitung erfolgte nach ISO-Norm für Schwarztee (Abschnitt 10.3). Der erhaltene Extrakt wird dann per HPLC-DAD vermessen.

Fließmittel A: 2%ige Essigsäure
B: 100 % Acetonitril

Fluss: 0,8 mL/min

Messwellenlänge: 280 nm

Temperatur: 20 °C

Injektionsvolumen: 20 µL

Trennsäule: Nucleosil 100, C-18, 5 µM, 250 x 4,6 mm i.D. mit Vorsäule Nucleosil 100, C-18, 5 µm, 10 x 4,6 mm i.D.

Gradient: 6 % B in 28 min auf 17 % B

	in 25 min auf 20 % B 12 min isokratisch mit 20 % B in 5 min auf 100 % B – Ende der Datenerfassung: 70 min 15 min isokratisch mit 100 % B in 1 min auf 6 % B Säule 20 min konditionieren – Methodenende: 106 min
Standards:	Rosmarinsäure, Roth, $C_{18}H_{16}O_8$, MG: 360,34 g/mol
Konzentrationen:	Einwaage in 10 mL-Messkolben:
	6,09 mg = 609 mg/L (Stammlösung)
Verdünnungen:	1:10, 1:20, 1:25, 1:50, 1:200
Probeneinwaagen:	a) 20,97 mg/L
	b) 20,40 mg/L
Trockenmasse:	92,39 %

Berechnung:

$$x\,[g/kg] = \frac{(y - b) \times VF \times 1000}{m \times EW \times DM}$$

y	Peakfläche
b	Achsenabschnitt
VF	Verdünnungsfaktor (20)
m	Steigung
DM	Trockenmasse in %
EW	Einwaage in mg

10.7 Extraktion zur Gewinnung von Reinsubstanzen

Die Hauptextraktion zur Gewinnung von Reinsubstanzen der Kräutertees wurde mit jeweils 50 g des Feinschnitts unter Rühren mit 750 mL 70%igem Methanol bei 60 °C für eine Stunde durchgeführt. Nach Filtration (Rooibos: Dekantation und Zentrifugation) wurde das bei den "grünen" Produkten Pfefferminze, Melisse und Brombeerblättern mit extrahierte Chlorophyll mit je 3 x 50 mL n-Hexan ausgeschüttelt. Die Hexanphasen wurden verworfen. Aus den wässrigen Phasen wurde anschließend am Rotationsverdampfer das Methanol vollständig entfernt und der wässrige Rückstand gefriergetrocknet.

10.8 Probenaufreinigung

10.8.1 Reinigung über XAD-2

Die weitere Aufreinigung des Rohextraktes erfolgte zunächst über XAD-2 Säulenchromatographie (Säule: 50 x 3 cm; ca. 250 g XAD-2). Nach Reinigung des Säulenmaterials mit Methanol und Konditionieren mit ca. 2 L Wasser wurden jeweils 1-2 g Rohextrakt, gelöst in ca. 15 mL Wasser, auf die Säule aufgegeben und 30 min zum Adsorbieren am XAD stehen gelassen. Anschließend wurde mit ca. 1 L Wasser gewaschen und schließlich mit etwa 500 mL Methanol eluiert. Das Eluat wurde daraufhin am Rotationsverdampfer vom Methanol befreit, der wässrige Rückstand gefriergetrocknet.

10.8.2 Reinigung über XAD-16HP

Da sich die Adsorptionsfähigkeit des XAD-2 für die Probenmatrizes als unzureichend erwies, wurden die weiteren Aufarbeitungen mit XAD-16HP durchgeführt (Säule: 55 x 5 cm, ca. 650 g XAD-16HP). Nach Konditionierung mit ca. 2,5 L Wasser konnte hierbei wesentlich mehr Rohextrakt pro Lauf aufgegeben werden (bis zu 7 g, gelöst in 20 mL Wasser). Zum Adsorbieren wurde der Extrakt ebenfalls für ca. 30 Minuten auf der Säule belassen, um anschließend mit ca. 2,5 L Wasser gewaschen und mit ca. 2 L Methanol eluiert zu werden.

Aufgrund der noch vorhandenen starken Färbung des XAD-Materials wurde nun noch einmal mit ca. 2 L ammoniakalischem Methanol (Methanol/konz. Ammoniaklösung 99,5:0,5 v/v) eluiert, um acide Verbindungen, wie Flavonol-glucuronide zu lösen.

10.8.3 Polyamid-Säulenchromatographie

1,2 kg Polyamid SC 6 werden mit ca. 8 L Wasser und 1,5 L Methanol (Faßware, destilliert) versetzt, gut durchmischt und über Nacht absetzen gelassen. Der Überstand wird entfernt, der Vorgang ab Methanolzugabe zweimal wiederholt und das Polyamid unter Methanol stehengelassen. Vor Verwendung jeweils gut durchschütteln (FINGER, 1991).

Eine Glassäule (15 x 2 cm i. D.) wird mit Glaswolle (Merck, Darmstadt), Seesand, vorgequollenem Polyamid (Füllhöhe: 10 cm) und Glaswolle beschickt. Nach Konditionieren mit 250 mL Wasser werden 100 mg Rohextrakt, gelöst in 50 mL Wasser, auf die PA-Säule gegeben. Die Säule wird mit 100 mL Wasser gewaschen, die Waschflüssigkeit verworfen; dann werden mit 250 mL Methanol die FOG eluiert und anschließend, bei Fenchelsamen,

Brombeerblättern, Himbeerblättern und Pfefferminze, mit 250 mL ammonakalischem Methanol (s.o.) die aciden FOG. Die Eluate werden jeweils fast zur Trockne eingeengt (40 °C), mit 4 mL DMF in einen 10 mL Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Nach Membranfiltration werden die erhaltenen Probelösungen zur HPLC eingesetzt.

10.9 HSCCC

Anlage:	PTR (Pharma-Tech Research Corp.) High Speed Countercurrent Chromatograph Model CCC-1000 (Triple-Coil, ca. 850 mL)
Pumpe:	Programmable Solvent Module 116, Beckman System Gold
Fluss:	2,8 mL/min
Rotation:	1000 U/min
Modus:	head to tail (leichte Phase ist stationär)
Probenaufgabe:	30 mL-Probenschleife (Ansatz: je 15 mL leichte und schwere Phase); 0,4 bis 1,0 g/Lauf
Detektor:	Programmable Detektor Module 166, Beckman System Gold
Fraktionensammler:	Super Fraction Collector, Adventec SF-2120
Steuereinheit:	NEC PC-8300
Datenverarbeitung:	LSW Chromatography Station; Data Apex Ltd. V.1.7
Fließmittelsystem:	Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (1/5/1/5, v/v/v/v)

Die durchgeführten Untersuchungen führten im vorgegebenen Zeitraum zu keinen verwertbaren Ergebnissen. Mit Cystus inc., Melissenblättern, Pfefferminze und Rooibos wurden einige Trennungen durchgeführt, die jedoch keine Reinsubstanzen lieferten.

11 Literatur

AREIAS, F.M.; VALENTÃO, P; ANDRADE, P.B.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M. (2001): PHENOLIC FINGERPRINT OF PEPPERMINT LEAVES; *FOOD CHEMISTRY* **73**, S. 307-311

CUPPETT, S.L., HALL, C.A. 3RD (1998) Antioxidant activity of the Labiatae. Adv Food Nutr Res 42:245-71

FINGER, A. (1991): Flavonol- und Flavonglykoside des Tees, Dissertation, TU-Braunschweig

HÄNSEL, R.; KELLER, K.; RIMPLER, H., SCHNEIDER, G.: *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, Band **4** (1999), S. 160-178, 5. Vollständig überarbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

HARBORNE, J.B.; SALEH, N.A.M.: Flavonol glycoside variation in Fennel; *Phytochemistry*; **10** (1971), S. 399-400

HENN, T., STEHLE, P. (1998) Gesamtpolyphenolgehalt und antioxidative Kapazität handelsüblicher Getränke. Ernährungs-Umschau **45**(9): 308-313

MILLER, N.J.; C.A. RICE-EVANS, M.J. DAVIES, V. GOPINATHAN und A. MILNER (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates; *Clin. Sci.* **84**, S. 407-412.

PAGANGA G., MILLER N., RICE-EVANS C.A. (1999) The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? Free Radic Res 30(2):153-62

RE R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C.(1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26** (9-10), S.1231-7

RECHNER, A.; C-D. PATZ und H. DIETRICH (1997): Beitrag zur Bewertung der antioxidativen Kapazität verschiedener Getränke; *Flüssiges Obst* **64**, S. 62-65.

RICE-EVANS, C.A.; N.J. MILLER und G. PAGANGA (1996): Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids; *Free Radic. Biol. Med.* **20**, S. 933-956.

SCHWARZ, K., TERNES, W., SCHMAUDERER, E. (1992) Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195(2):104-7

SCHWARZ, K., TERNES, W. (1992a) Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. I. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195(2):95-8

SCHWARZ, K., TERNES W. (1992b) Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195(2):99-103

SINGLETON V.L.; ROSSI, J.A.(1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*., 37, S. 144-158.

WEISBURGER, J.H. (1999) Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. Food and Chemical Toxicology 37:943-948

WISEMAN, S.A.; D.A. BALENTINE, FREI, B. (1997): Antioxidants in Tea; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **37**, S. 705-718.

WKF (ed.) (2000) Inventarliste Lebensmitteldrogen der Wirtschaftsvereingung Kräuter- und Früchtetee(WKF). Deutsche Lebensm.- Rundschau 95(5): 172-176

12 Anhang

12.1 Übersichtsuntersuchungen (Screening)

12.1.1 Extrahierbare Feststoffe (TSS) und Gesamtphenole (Folin)

Probe	TSS	Folin, wässrige Extrakte	Folin, methanol. Extrakte
	g/L	mg/L	%
01 Anis	2,30	109,02	1,52
02 Apfel (Sauer)	4,86	165,65	2,20
03 Apfel (Wild)	6,28	147,15	1,75
04 Aroniabeeren	5,20	294,35	4,26
05 Brombeerblätter	2,66	714,43	10,72
06 Brombeerstücke	10,11	97,35	1,12
07 Cystus inc.	1,70	400,60	10,48
08 Eisenkraut	2,90	402,52	4,83
09 Fenchel	1,43	41,03	0,76
10 Ginkgoblätter	2,89	145,79	2,97
11 Ginsengwurzel	3,47	24,18	0,35
12 Grüntee	2,95	713,56	14,29
13 Hagebutte	4,11	435,21	8,16
14 Hibiscus	4,66	188,88	2,76
15 Himbeerblätter	1,91	416,57	8,45
16 Holunderbeeren	3,88	155,63	4,05
17 Hopfenzapfen	3,07	257,94	2,98
18 Johannisbeeren	2,30	67,85	0,48
19 Kamillenblüten	3,17	210,97	2,72
20 Lapachorinde	0,53	41,73	0,93
21 Lindenblüten	1,84	377,18	8,24
22 Mateblätter	3,36	863,33	12,72
23 Melissenblätter	2,51	783,25	10,46
24 Orangenblätter	3,50	295,90	3,06
25 Orangenblüten	4,86	216,41	2,50
26 Orangenschalen	3,61	97,52	2,10
27 Pfefferminze	2,54	309,79	3,87
28 Rooibos	1,16	345,82	9,22
29 Rosmarinblätter	2,13	486,21	7,18
30 Rotes Weinlaub	3,22	375,39	6,64
31 Schwarztee	2,42	766,60	15,86
32 Silberlindenblüten	1,57	318,96	8,45
33 Sonnenhutkraut	2,60	200,68	1,94
34 Süßholzwurzel, geschn.	2,07	127,89	2,20
35 Süßholzwurzel, nat.	2,19	133,25	2,67
36 Süßkraut	3,49	352,76	4,53
37 Taigawurzel	0,31	43,01	0,79
38 Weißdornblätter	2,44	353,93	6,54
39 Zimt (Korint.)	1,25	652,31	17,83
40 Zimtrinde	1,14	532,65	10,88
41 Zitronengras	2,31	93,55	1,34
42 Zitronenschalen	3,80	150,34	2,14

12.1.2 Antioxidative Aktivität

TEAC - Ergebnisse	wässrige Extrakte				methanolische Extrakte	
Probe	**EW [g/L]**	**TSS [g/L]**	**mmol Trolox/g EW**	**mmol Trolox/g TSS**	**EW [g/L]**	**mmol Trolox/g EW**
01 Anis FS	10,26	2,30	**0,07**	**0,32**	20,15	**0,08**
02 Apfel (Sauer)	10,21	4,86	**0,09**	**0,18**	20,77	**0,15**
03 Apfel (Wild)	10,14	6,28	**0,07**	**0,11**	20,95	**0,10**
04 Aroniabeeren	10,11	5,20	**0,14**	**0,26**	20,40	**0,28**
05 Brombeerblätter	10,03	2,66	**0,52**	**1,97**	20,19	**0,57**
06 Brombeerstücke	10,06	10,11	**0,07**	**0,07**	20,14	**0,09**
07 Cystus inc.	10,03	1,70	**0,39**	**2,28**	20,24	**0,90**
08 Eisenkraut	10,01	2,90	**0,23**	**0,78**	20,22	**0,34**
09 Fenchel	10,08	1,43	**0,03**	**0,20**	20,14	**0,05**
10 Ginkgoblätter	10,02	2,89	**0,08**	**0,29**	20,68	**0,17**
11 Ginsengwurzel	10,09	3,47	**0,02**	**0,06**	20,07	**0,03**
12 Grüntee	10,06	2,95	**0,73**	**2,49**	20,80	**1,42**
13 Hagebutte	10,05	4,11	**0,34**	**0,82**	20,76	**0,51**
14 Hibiscus	10,12	4,66	**0,10**	**0,22**	20,49	**0,14**
15 Himbeerblätter	10,03	1,91	**0,35**	**1,84**	20,09	**0,58**
16 Holunderbeeren	10,08	3,88	**0,13**	**0,35**	20,40	**0,22**
17 Hopfenzapfen	10,05	3,07	**0,23**	**0,77**	20,27	**0,26**
18 Johannisbeeren	10,02	2,30	**0,04**	**0,18**	20,44	**0,03**
19 Kamillenblüten	10,04	3,17	**0,16**	**0,50**	20,20	**0,14**
20 Lapachorinde	10,02	0,53	**0,02**	**0,30**	20,19	**0,04**
21 Lindenblüten	10,01	1,84	**0,33**	**1,79**	20,46	**0,49**
22 Mateblätter	10,03	3,36	**0,56**	**1,66**	20,48	**0,58**
23 Melissenblätter	10,02	2,51	**0,65**	**2,61**	20,19	**0,67**
24 Orangenblätter	10,01	3,50	**0,20**	**0,57**	20,62	**0,13**
25 Orangenblüten	10,01	4,86	**0,10**	**0,21**	20,08	**0,12**
26 Orangenschalen	10,03	3,61	**0,06**	**0,16**	20,66	**0,11**
27 Pfefferminze	10,03	2,54	**0,19**	**0,75**	20,04	**0,20**
28 Rooibos	10,01	1,16	**0,24**	**2,10**	20,54	**0,56**
29 Rosmarinblätter	10,02	2,13	**0,33**	**1,56**	20,40	**0,39**
30 Rotes Weinlaub	10,01	3,22	**0,27**	**0,83**	20,43	**0,31**
31 Schwarztee	10,00	2,42	**0,44**	**1,80**	20,31	**0,97**
32 Silberlindenblüten	10,01	1,57	**0,17**	**1,09**	20,18	**0,48**
33 Sonnenhutkraut	10,02	2,60	**0,09**	**0,35**	20,08	**0,08**
34 Süßholzwurzel, geschn.	10,00	2,07	**0,05**	**0,24**	20,18	**0,10**
35 Süßholzwurzel, nat	10,01	2,19	**0,06**	**0,29**	20,60	**0,14**
36 Süßkraut FS	10,00	3,49	**0,21**	**0,61**	20,14	**0,22**
37 Taigawurzel FS	10,02	0,31	**0,03**	**1,04**	20,15	**0,04**
38 Weißdornblätter	10,02	2,44	**0,28**	**1,13**	20,45	**0,39**
39 Zimt (Korint.)	10,01	1,25	**0,40**	**3,23**	20,31	**1,41**
40 Zimtrinde	10,00	1,14	**0,37**	**3,21**	20,13	**1,45**
41 Zitronengras	10,01	2,31	**0,06**	**0,27**	20,14	**0,14**
42 Zitronenschalen	10,01	3,80	**0,07**	**0,19**	20,10	**0,16**

12.2 Daten Lagerversuche

Die Werte sind in mmol Trolox/g Einwaage angegeben.

Diffuses Tageslicht, Raumt.	Monate			
	0	3	9	15
05 Brombeerblätter	1,0720	1,0939	1,0425	1,1577
07 Cystus inc.	1,2095	0,9984	0,9832	1,0900
09 Fenchelsamen	0,0525	-	0,0547	0,0663
13 Hagebuttenschalen	0,6666	0,8157	0,6463	0,6829
14 Hibiscusblüten	0,1393	0,1946	0,1518	0,2115
15 Himbeerblätter	0,6314	0,6955	0,5911	0,6501
23 Melissenblätter	0,6473	0,6633	0,6316	0,9009
27 Pfefferminze	0,2446	0,3370	0,2858	0,3228
28 Rooibos	0,5834	0,6142	0,5631	0,8001

Raumtemperatur	Monate			
	0	6	9	18
05 Brombeerblätter	1,0720	0,9670	1,2227	1,0844
07 Cystus inc.	1,2095	0,9833	1,1459	1,1210
09 Fenchelsamen	0,0525	0,0571	0,0602	0,0769
13 Hagebuttenschalen	0,6666	0,6119	0,7014	0,8869
14 Hibiscusblüten	0,1393	0,1453	0,1594	0,2068
15 Himbeerblätter	0,6314	0,5403	0,6878	0,7912
23 Melissenblätter	0,6473	0,6564	0,8743	0,8858
27 Pfefferminze	0,2446	0,2632	0,3239	0,4012
28 Rooibos	0,5834	0,6209	0,8334	0,7034

Tiefkühlraum (- 18 °C), dunkel	Monate		
	0	9	18
05 Brombeerblätter	1,0720	1,0978	1,1586
07 Cystus inc.	1,2095	1,0637	1,0169
09 Fenchelsamen	0,0525	0,0611	0,0722
13 Hagebuttenschalen	0,6666	0,7222	0,7371
14 Hibiscusblüten	0,1393	0,1510	0,1681
15 Himbeerblätter	0,6314	0,6109	0,6559
23 Melissenblätter	0,6473	0,7245	0,9167
27 Pfefferminze	0,2446	0,2884	0,3392
28 Rooibos	0,5834	0,7034	0,8084

Erhöhte Temperatur (40 °C), dunkel	Monate		
	0	3	9
05 Brombeerblätter	1,2227	1,2056	1,1399
07 Cystus inc.	1,1459	1,0323	0,9944
09 Fenchelsamen	0,0602	0,0581	0,0740
13 Hagebuttenschalen	0,7014	0,6971	0,8466
14 Hibiscusblüten	0,1594	0,1462	0,2060
15 Himbeerblätter	0,6878	0,6650	0,7071
23 Melissenblätter	0,8743	0,6553	0,8559
27 Pfefferminze	0,3239	0,2974	0,3665
28 Rooibos	0,8334	0,6538	0,6294

12.3 Ergebnisse der Quantifizierungen

12.3.1 Einwaagen der wässrigen Extrakte und Trockenmassen

Probe	Einwaage [g/L]	Trockenmasse [%]
Brombeerblätter	10,13	92,6
Cystus incanus	10,15	92,9
Hagebuttenschalen	10,21	94,9
Hibiskusblüten	10,18	93,6
Himbeerblätter	10,28	93,1
Melissenblätter	10,09	92,4
Pfefferminze	10,10	91,3
Rooibos	10,06	92,7

12.3.2 Einwaagen der methanolischen Extrakte

Probe		Einwaage [g]		
		Catechine/ Hydroxyzimtsäuren	FOG / FCG	acide FOG
Brombeerblätter	A	0,2002	0,2122	0,2016
	B	0,2004	0,2013	0,2014
Cystus inc.	A	0,2078	0,2014	
	B	0,2019	0,2014	
Hagebuttenschalen	A	0,2060	0,2017	
	B	0,2052	0,2036	
Hibiskusblüten	A	0,2016	0,2013	
	B	0,2033	0,2032	
Himbeerblätter	A	0,2028	0,2007	0,2072
	B	0,2001	0,2026	0,2037
Melissenblätter	A	0,2009	0,2038	
	B	0,2012	0,2009	
Pfefferminze	A	0,2021	0,2010	0,2014
	B	0,2007	0,2027	0,2051
Rooibos	A	0,2004	0,2027	
	B	0,2015	0,2048	

Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse beziehen sich jeweils auf die Trockenmasse der untersuchten Teesorte. (Fenchelsamen acid fehlt)

12.3.3 Ergebnisse der Flavan-3-ol-Bestimmung (Catechine)

12.3.3.1 Gallussäure

Probe	wässr. Extrakte	methanol. Extrakte
	[mg/kg]	[mg/kg]
Cystus inc.	292	342

12.3.3.2 Epigallocatechin

Probe	wässr. Extrakte	methanol. Extrakte
	[mg/kg]	[mg/kg]
Hagebuttenschalen	298	1092

12.3.3.3 Catechin

Probe	wässr. Extrakte	methanol. Extrakte
	[mg/kg]	[mg/kg]
Hagebuttenschalen	528	1035

12.3.4 Ergebnisse der Hydroxyzimtsäure-Bestimmung (Chlorogensäuren)

Probe	Substanz	wässr. Extrakt	methanol. Extrakt
		[mg/kg]	[mg/kg]
Brombeerblätter	Kaffeoylglucose/ Kaffeesäureglucosid	4105	4223
	4-CQA	1173	1854
Cystus inc.	3-CouQA	n.n.	313
	5-CQA	n.n.	63
Hagebuttenschalen	Kaffeesäureglucosid/ Kaffeoylglucose	90	100
Hibiskusblüten	3-CQA	1766	2282
Himbeerblätter	Kaffeesäureglucosid/ Kaffeoylglucose	964	1310
	3-CQA	393	225
Melissenblätter	3-CQA	682	238
	5-CQA	68	28
	4-CQA	421	127
Pfefferminze	3-CQA	127	36
	4-CQA	162	52
	5-CQA	110	28
Rooibos	3-CQA	160	98
	5-CQA	22	11

Daten für Fenchelsamen s. Abschnitt 7.8.3

12.3.5 Ergebnisse der Flavonol-O-glykosid-Bestimmung (FOG)

Probe	Substanz	wässr. Extrakt	methanol. Extrakt
		[mg/kg]	[mg/kg]
Brombeerblätter	Q-glu/gal	65	75
	K-rut	88	95
	K-glu/gal	45	70
Cystus inc.	M-glu/gal	1432	3114
	M-ac.pent	2798	5338
	Q-glu/gal	272	595
	Q-pent.	210	458
	Q-ac.pent	548	1084
Hagebuttenschalen	K-pent.	99	250
	Q-glu/gal	90	207
	Q-ac.pent	22	95
Hibiskusblüten	M-glu/gal	200	245
	Q-rut	495	315
	Q-glu/gal	185	205
Himbeerblätter	Q-glu/gal	51	186
	Q-glu/gal	168	262
	Q-pent.	57	221
	K-glu/gal	51	71
Melissenblätter	K-glu/gal	120	216
Pfefferminze	K-rut	11760	15306
Rooibos	Q-rut	1618	3514
	Q-glu/gal	184	399
	Q-glu/gal	461	1090

Daten für Fenchelsamen s. Abschnitt 7.8.1

12.3.6 Ergebnisse der Bestimmung der aciden FOG

Probe	Substanz	wässr. Extrakt	methanol. Extrakt
		[mg/kg]	[mg/kg]
Brombeerblätter	Q-glu/gal ac.	922	1830
	K-glu/gal ac.	1450	3253
Himbeerblätter	Q-glu/gal.ac	3860	5732
	K-glu/gal.ac	1112	1695
Pfefferminze	K-glu.ac	2527	2958

12.3.7 Ergebnisse der Flavon-C-glykosid- Bestimmung (FCG)

Probe	Substanz	wässr. Extrakt	methanol. Extrakt
		[mg/kg]	[mg/kg]
Rooibos	Schaftosid	145	327
	Iso-Schaftosid	92	237
	Orientin	1028	2876
	Iso-Orientin	945	2291
	Vitexin	292	685
	Iso-Vitexin	255	741
Fenchelsamen	Iso-Schaftosid	-	10

12.4 Daten zur Instant-Produktherstellung

12.4.1 Lösliche Feststoffe

Temp.	Zeit [min]	Probe	EW [g]	AW [g]	TSS [%]	MW TSS [%]
40 °C	1	A	2,0178	0,0672	13,32	**13,81**
		B	2,0243	0,0724	14,31	
	2	A	2,0044	0,0864	17,24	**17,72**
		B	2,0346	0,0926	18,21	
	3	A	2,0094	0,0976	19,43	**19,77**
		B	2,0149	0,1013	20,11	
	5	A	2,0154	0,1105	21,93	**21,90**
		B	2,0249	0,1107	21,87	
	10	A	2,0305	0,1241	24,45	**24,42**
		B	2,0193	0,1231	24,38	
	15	A	2,0224	0,1246	24,64	**24,61**
		B	2,0252	0,1244	24,57	
	30	A	2,0060	0,1317	26,26	**25,95**
		B	2,0294	0,1301	25,64	

Temp.	Zeit [min]	Probe	EW [g]	AW [g]	TSS [%]	MW TSS [%]
60 °C	1	A	2,0076	0,0932	18,57	**18,48**
		B	2,0021	0,0920	18,38	
	2	A	2,0121	0,1085	21,57	**21,51**
		B	2,0128	0,1079	21,44	
	3	A	2,0047	0,1174	23,42	**23,32**
		B	2,0514	0,1191	23,22	
	5	A	2,0084	0,1243	24,76	**24,72**
		B	2,0168	0,1245	24,69	
	10	A	2,0176	0,1347	26,70	**26,57**
		B	2,0506	0,1355	26,43	
	15	A	2,0163	0,1388	27,54	**27,66**
		B	2,0175	0,1401	27,78	
	30	A	2,0304	0,1456	28,68	**28,59**
		B	2,0151	0,1436	28,50	

Temp.	Zeit [min]	Probe	EW [g]	AW [g]	TSS [%]	MW TSS [%]
80 °C	1	A	2,0074	0,1112	22,16	**22,00**
		B	2,0175	0,1102	21,85	
	2	A	2,0042	0,1245	24,85	**24,82**
		B	2,0028	0,1241	24,79	
	3	A	2,0128	0,1307	25,97	**25,94**
		B	2,0198	0,1308	25,90	
	5	A	2,0149	0,1383	27,46	**27,30**
		B	2,0051	0,1361	27,15	
	10	A	2,0036	0,1453	29,01	**28,85**
		B	2,0108	0,1442	28,69	
	15	A	2,0120	0,1484	29,50	**29,48**
		B	2,0092	0,1480	29,46	
	30	A	2,0092	0,1536	30,58	**30,53**
		B	2,0117	0,1533	30,48	

Temp.	Zeit [min]	Probe	EW [g]	AW [g]	TSS [%]	MW TSS [%]
95 °C	1	A	2,0022	0,1194	23,85	**23,55**
		B	2,0132	0,1170	23,25	
	2	A	2,0183	0,1291	25,59	**25,65**
		B	2,0030	0,1288	25,72	
	3	A	2,0006	0,1323	26,45	**26,70**
		B	2,0048	0,1351	26,96	
	5	A	2,0146	0,1425	28,29	**28,05**
		B	2,0105	0,1398	27,81	
	10	A	2,0210	0,1491	29,51	**29,63**
		B	2,0079	0,1493	29,74	
	15	A	2,0124	0,1533	30,47	**30,27**
		B	2,0093	0,1510	30,06	
	30	A	2,0055	0,1606	32,03	**31,93**
		B	2,0172	0,1605	31,83	

12.4.2 Trolox-Äquivalente

	mmol Trolox/g EW			
Zeit [min]	**95 °C**	**80 °C**	**60 °C**	**40 °C**
1	0,2330	0,2122	0,1260	0,1103
2	0,2813	0,2518	0,1694	0,1260
3	0,2941	0,2700	0,2061	0,1347
5	0,3156	0,3016	0,2280	0,1628
10	0,3381	0,3270	0,2858	0,1811
15	0,3468	0,3252	0,2806	0,1863
30	0,3787	0,3464	0,3044	0,2039

12.5 Ergebnisse der Einzeluntersuchungen

Die Extinktionsmaxima bei der DAD-Messung, sowie die Hauptmassen im MS und MS/MS sind jeweils unterstrichen.

12.5.1 Brombeerblätter

12.5.1.1 Rohextrakt

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	4,5	234, 315	3,1	421, 341, 191	179	Kaffeoylglucose/ Kaffeesäureglucosid
2	15,0	233, 246, 302, 328	11,7	341	179	Kaffeoylglucose/ Kaffesäureglucosid
3	31,3	252, 292, 360	23,6	355	355, 161	Feruloylglucose/ Ferulasäureglucosid
4	31,8	234, 258	27,6	477	301	Quercetin-/Hesperetin-glucuronid
5	43,6	256, 354	37,9~	477, 301	301	Quercetin-/Hesperetin-glucuronid
6	54,4	222, 244, 266, 348	46,9	483, 461	285	Kämpferol-/Luteolin-glucuronid

12.5.1.2 Methanolisches PA-Eluat

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	13,6	232, 306, 330	13,4	461, 341, 161	179, 161, 135	Kaffeoylglucose/ Kaffesäureglucosid
2	26,6	244, 300, 326	26,2	475, 355	355, 161	Feruoylglucose/ Ferulasäureglucosid
3	42,8	230 (negativ)	42,3	707, 609,- 97	301, 179	Rutin
4	45,1	256, 352	44,4	561, 503, 463, 97	463, 301	Quercetin-glucosid/-galactosid
5	52,5	266, 342	51,8	691, 593, 97	285	Kämpferol-rutinosid

12.5.1.3 Ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	30,1	222, -230, 254, 358	29,4	661, 563, 447	301	Quercetin-/Hesperetin-pentosesäure
2	31,5	222, 254, 306, 360	30,9	575, 499, 447, 163	301	Quercetin-/Hesperetin-pentosesäure
3	37,4	230 (negativ)	36,7	707, 609, 97	301, 179	Rutin
4	41,9	222, 254, 360	41,0	491, 433	433, 301	Quercetin-/Hesperetin-pentosid
5	42,7	262, 340	42,0	727, 705, 629, 607	321, 285	Kämpferol-/Luteolin-Rhamnosid-glucuronid
6	44,2	222, 256, 356	43,3	575, 477	301	Quercetin-/Hesperetin-glucuronid
7	45,2	224, 254, 368	44,1	625, 477, 301	301	Quercetin-/Hesperetin-glucuronid
8	55,2	222, 246, 266, 346	54,4	581, 559, 483, 461	285	Kämpferol-glucuronid

12.5.2 Melisse

12.5.2.1 Rohextrakt

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	44,3	264, 352	42,0	463, 447	285	Luteolin-rutinosid
2	49,1	234, 288, 320	44,6	381, 359, 161	359, 197, 179, 161	Rosmarinsäure
3	52,8	236, 246, 292, 328	50,0	359, 197, 161	223, 197, 179, 161	Rosmarinsäure
4	65,4	242, 268, 356	61,7	483, 461, 285	285	Kämpferol-glucuronid

12.5.2.2 Methanolisches PA-Eluat

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	-	-	44,9	545, 447	447, 285	Luteolin-rutinosid
2	53,8	238, 288, 330	53,5	457, 359, 161	359, 223, 197, 179, 161	Rosmarinsäure

12.5.2.3 Ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	53,9	238, 288, 328	52,2	457, 359, 161	359, 223, 197, 179, 161	Rosmarinsäure
2	66,7	244, 268, 336	64,4	923, 559, 461	462, 285, 197, 179, 161	Kämpferol-glucuronid

12.5.3 Pfefferminze

12.5.3.1 Rohextrakt

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	34,0	232, 284, 334	32,8	595	287	Eriodictyol-rutinosid
2	42,2	236, 254, 266, 350	40,5	593	285	Luteolin-rutinosid
3	44,3	224, 254, 266, 350	42,0	461, 285	285	Kämpferol-glucuronid
4	49,6	234, 284, 338	47,5	609 , 301	301	Hesperetin-rutinosid

12.5.3.2 Methanolisches PA-Eluat

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	34,4	232, 284, 330	33,5	595	287	Eriodictyol-rutinosid
2	42,7	236, 256, 266, 350	41,7	691, 593	285	Luteolin-rutinosid
3	44,9	256, 268, 352	43,7	691, 593, 545, 463, 448	447, 285	Kämpferol-glu/gal.
4	49,9	234, 284, 332	48,9	707, 672, 609	610, 301	Hesperetin-rutinosid
5	53,0	244, 268, 338	51,9	675, 640, 577	578, 269	Apigenin-rutinosid

12.5.3.3 Ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	42,8	248, 346	42,1	691, 593	285	Luteolin-/Kämpferol-rutinosid
2	44,8	224, 254, 266, 348	43,8	559, 461	462, 357, 285	Luteolin-/Kämpferol-glucuronid
3	53,9	222, 242, 298, 330	52,4	359, 161, 97	359, 197, 179, 161	Rosmarinsäure
4	66,6	246, 268, 334	64,6	483, 462	285	Luteolin-/Kämpferol-glucuronid

12.5.4 Rooibos

12.5.4.1 Rohextrakt

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	10,6	232, 274, 342	9,3	355	355, 235, 192, 164	Feruloylglucose/ Ferulasäureglucosid
2	33,0	234, 288	30,0	563, 451, 331	361, 331	Aspalathin
3	33,5	234, 256, 268, 349	30,5	895, 447	357, 327	Iso-/Orientin
3	34,3	232, 256, 270, 350	31,3	447	429, 357, 327	Iso-/Orientin
4	37,5	222, 238, 270, 334	34,0	563, 431	311	Iso-/Vitexin
5	41,5	232, 256, 302, 360	36,7	609	611, 301	Rutin
6	42,1	232, 270, 338	37,6	609, 431	341, 311	Iso-/Schaftosid
7	43,4	232, 256, 292, 354	38,1	627, 463	301	Quercetin-glu/gal
8	44,5	230, 256, 354	39,2	463	301	Quercetin-glu/gal

12.5.4.2 Methanolisches PA-Eluat

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	33,3	234, 288	32,7	549 451	452, 331	Aspalathin
2	33,8	234, 256, 268, 348	33,2	895, 545, 447	448, 357, 327	Orientin/
3	34,6	234, 256, 270, 348	34,1	545, 447	429, 357, 327	Iso-Orientin
4	37,9	230, 242, 268, 338	37,2	529, 431	432, 311	Vitexin/Iso-Vitexin
5	42,1	224, 256, 356	41,1	707, 609	610, 301	Rutin
6	44,0	256, 292, 350	42,9	533, 463	301	Quercetin-glu/gal
7	45,1	256, 352	44,1	545, 463	301	Quercetin-glu/gal

12.5.4.3 Ammoniakalisch-methanolisches PA-Eluat

Nr.	$RT_{(DAD)}$	λ_{max}	$RT_{(ESI)}$	MS	MS/MS	Substanz
1	18,9	240, 296, 326	18,8	353	353	CQA