



Technische  
Universität  
Braunschweig

# Institut für Lebensmittelchemie



**Entwicklung einer neuartigen  
membranchromatographischen Methode zur Isolierung  
von Anthocyanen aus Heidelbeeren und anderen  
anthocyanhaltigen Früchten.**

Andreas Juadjur und Prof. Dr. Peter Winterhalter

20.03.2012

# Gliederung

- Die europäische Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*)
- HPLC-DAD Methode zur Charakterisierung von Heidelbeerinhaltsstoffen
- Bisherige Fraktionierungsmethoden und ihre Nachteile
- Membranchromatographie
- Anwendungsbeispiele



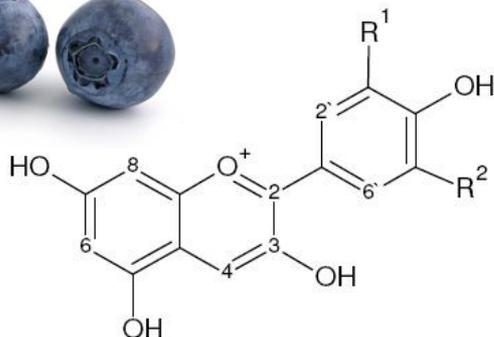
# Die europäische Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*)

- **Vorkommen:** gemäßigte und nordische Zonen Eurasiens.
- Unterscheidet sich von der amerikanischen Heidelbeere (*Vaccinium corymbosum*) und der daraus gezüchteten Kulturheidelbeere durch Färbung des Fruchtfleisches
- **Ist reich an bioaktiven sekundären Pflanzeninhaltsstoffen**
  - Phenolische Säuren, **Anthocyane** und Procyanidine
- **Zeigt hohes antioxidatives Potential**
  - Schutz vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen
  - Präventive Wirkung: Krebs (Darm), neurodegenerative Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson)
- **Extrakt wird eingesetzt zur**
  - Behandlung von Nachtblindheit und Lichtempfindlichkeit, Spannungskopfschmerzen und Migräne (stabilisierender Effekt auf die kleinen Blutgefäße im Gehirn und den Augen)

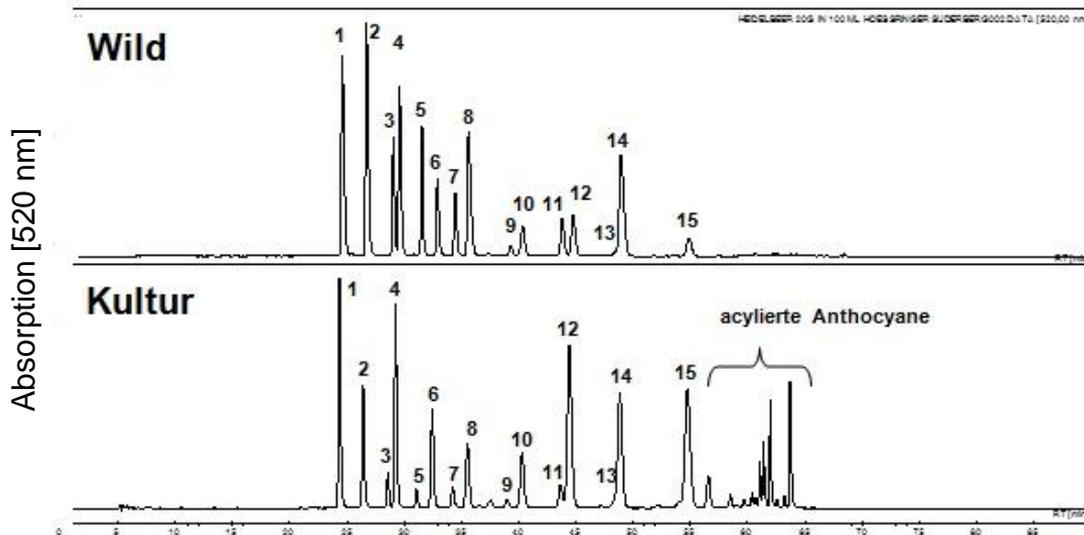


**Zur Beurteilung der biologischen Aktivität sowie möglicher synergistischer Effekte zwischen den einzelnen Gruppen der Polyphenole sind effiziente präparative Trenntechniken erforderlich.**

# Methodenoptimierung zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung der Anthocyane mittels HPLC-DAD und HPLC-MS<sup>n</sup>



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MW [g/mol]
Cyanidin (Cy)	OH	H	287
Delphinidin (Del)	OH	OH	303
Malvidin (Mal)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	331
Peonidin (Peo)	OCH <sub>3</sub>	H	301
Petunidin (Pet)	OH	OCH <sub>3</sub>	317

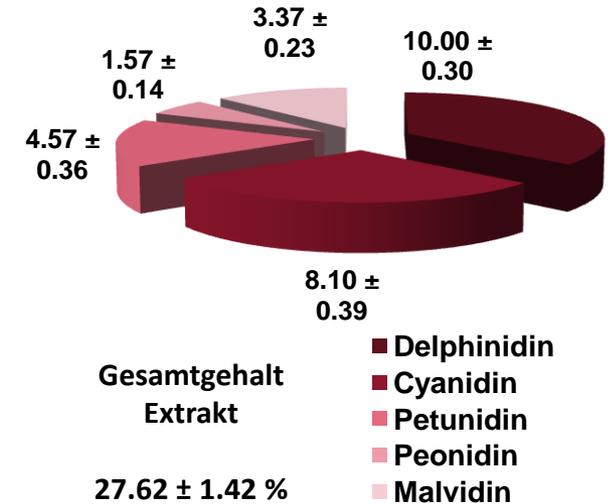
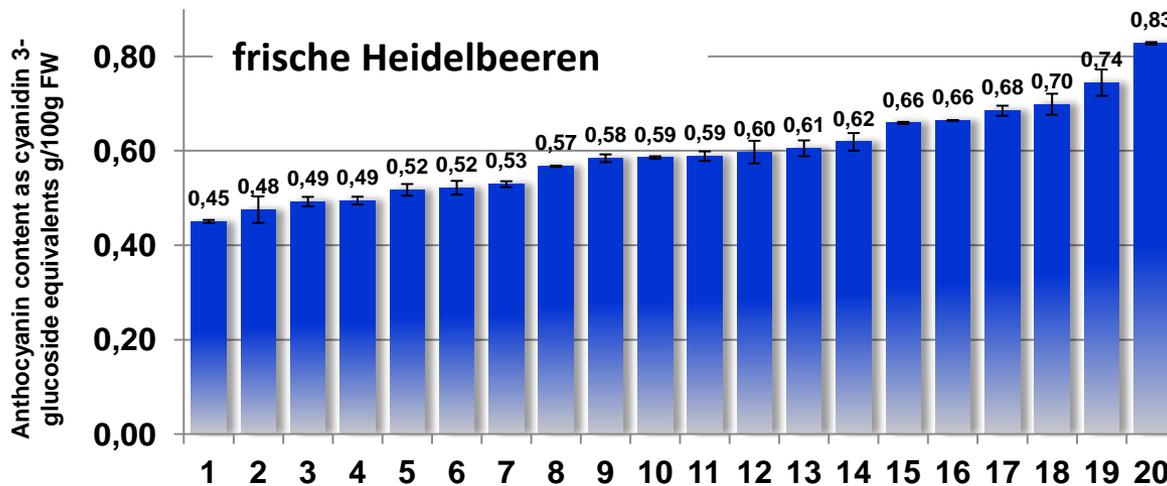
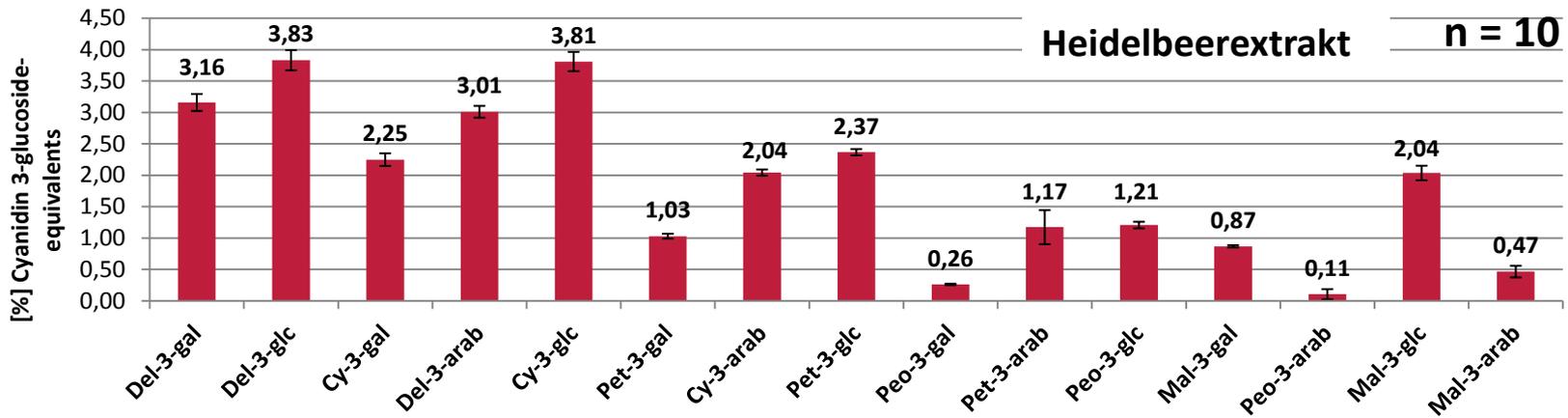


**Säule:** Luna 3 $\mu$  C18, 250 x 4,6 mm  
**Fließmittelsystem und Gradient :**  
 Wasser/Acetonitril/Ameisensäure  
 FM A: 87/03/10 (v/v/v)  
 FM B: 40/50/10 (v/v/v)  
 Flussrate: 0,5 mL/min

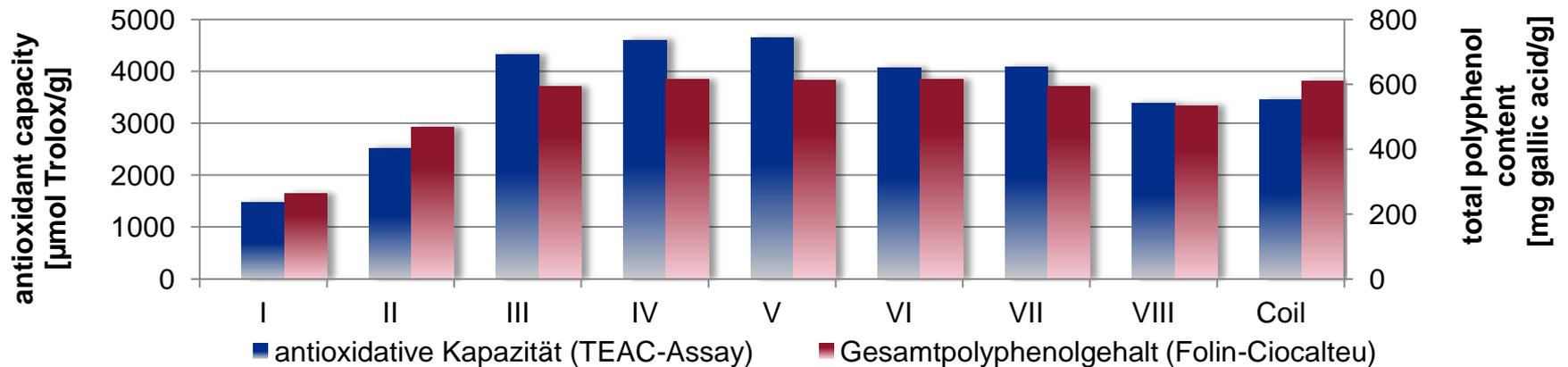
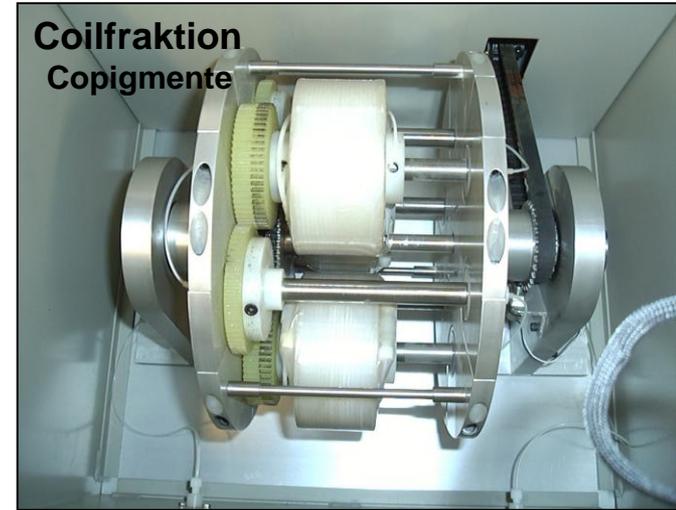
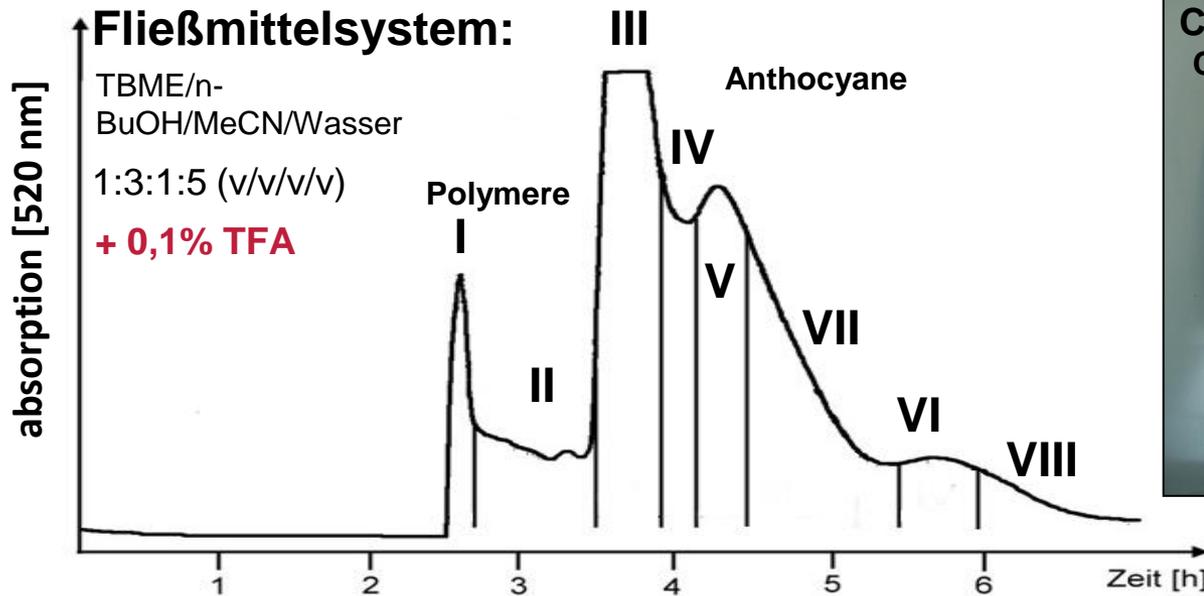
Gradient: 0 min 2% B; 20 min 14% B; 25 min 14% B; 40 min 18% B; 45 min 18% B; 70 min 90% B; 80 min 2% B; 90 min 2% B;

Vergleich der HPLC-Chromatogramme frischer Wild- (oben) und Kulturheidelbeeren (unten): Del-3-galactosid (1), Del-3-glucosid (2), Cy-3-galactosid (3), Del-3-arabinosid (4), Cy-3-glucosid (5), Pet-3-galactosid (6), Cy-3-arabinosid (7), Pet-3-glucosid (8), Peo-3-galactosid (9), Pet-3-arabinosid (10), Peo-3-glucosid (11), Mal-3-galactosid (12), Peo-3-arabinosid (13), Mal-3-glucosid (14), Mal-3-arabinosid (15).

# Anthocyanengehalte im Extrakt und in frischen Heidelbeeren



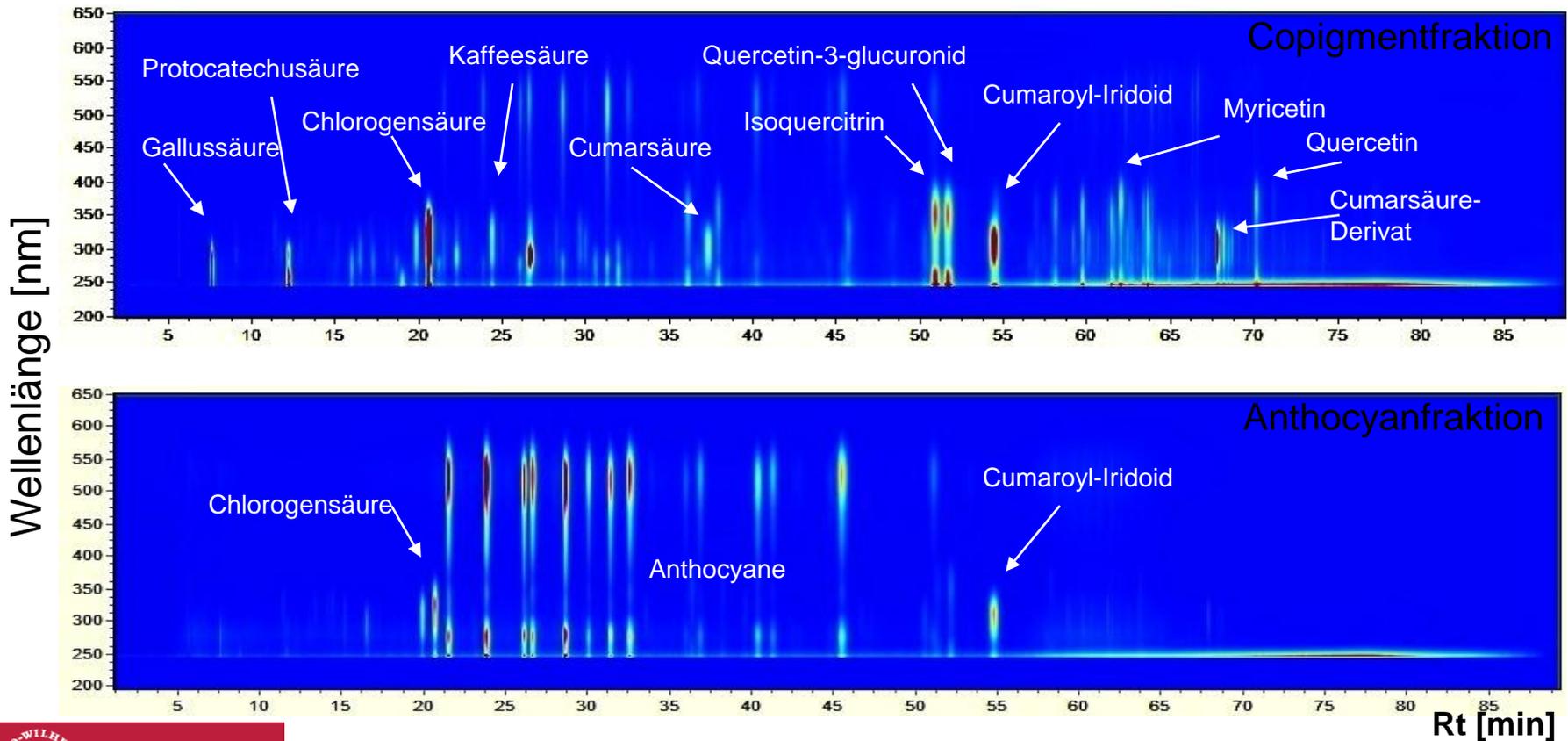
# Trennung des Extraktes mittels HSCCC und Bestimmung der antioxidativen Kapazität der erhaltenen Fraktionen



# Probleme bei der Fraktionierung des Extraktes mittels HSCCC und Lösungsmittlextraktion

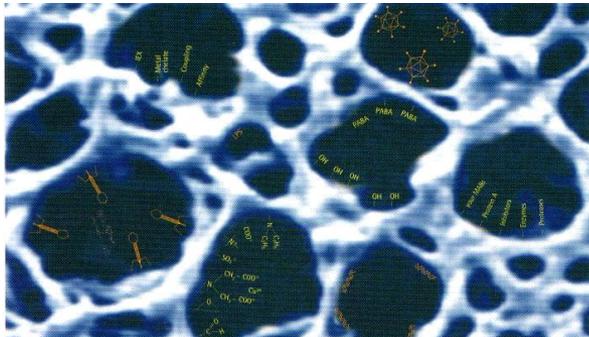
- Trennungen mittels **CCC** erfordern **TFA-Zusatz**
- **Lösungsmittlextraktion**: keine vollständige Trennung möglich

HPLC-DAD-Chromatogramme der Anthocyan- und der Copigmentfraktion

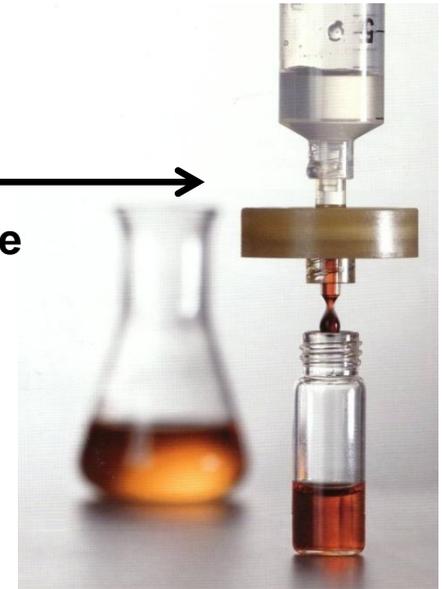


# Abtrennung und Aufreinigung der Anthocyane durch SARTOBIND® Membranchromatographie

- Membran aus stabilisierter Cellulose mit negativ geladenen Sulfonsäure-Gruppen
- Adsorption der nach Ansäuern vorliegenden Flavylumkationen an der Membranoberfläche
- Elution der Flavylumkationen mit NaCl-Lösung im Austausch gegen Na<sup>+</sup>-Ionen
- **Eluat = Polymere & Copigmente**
- **Retentat = Anthocyane**



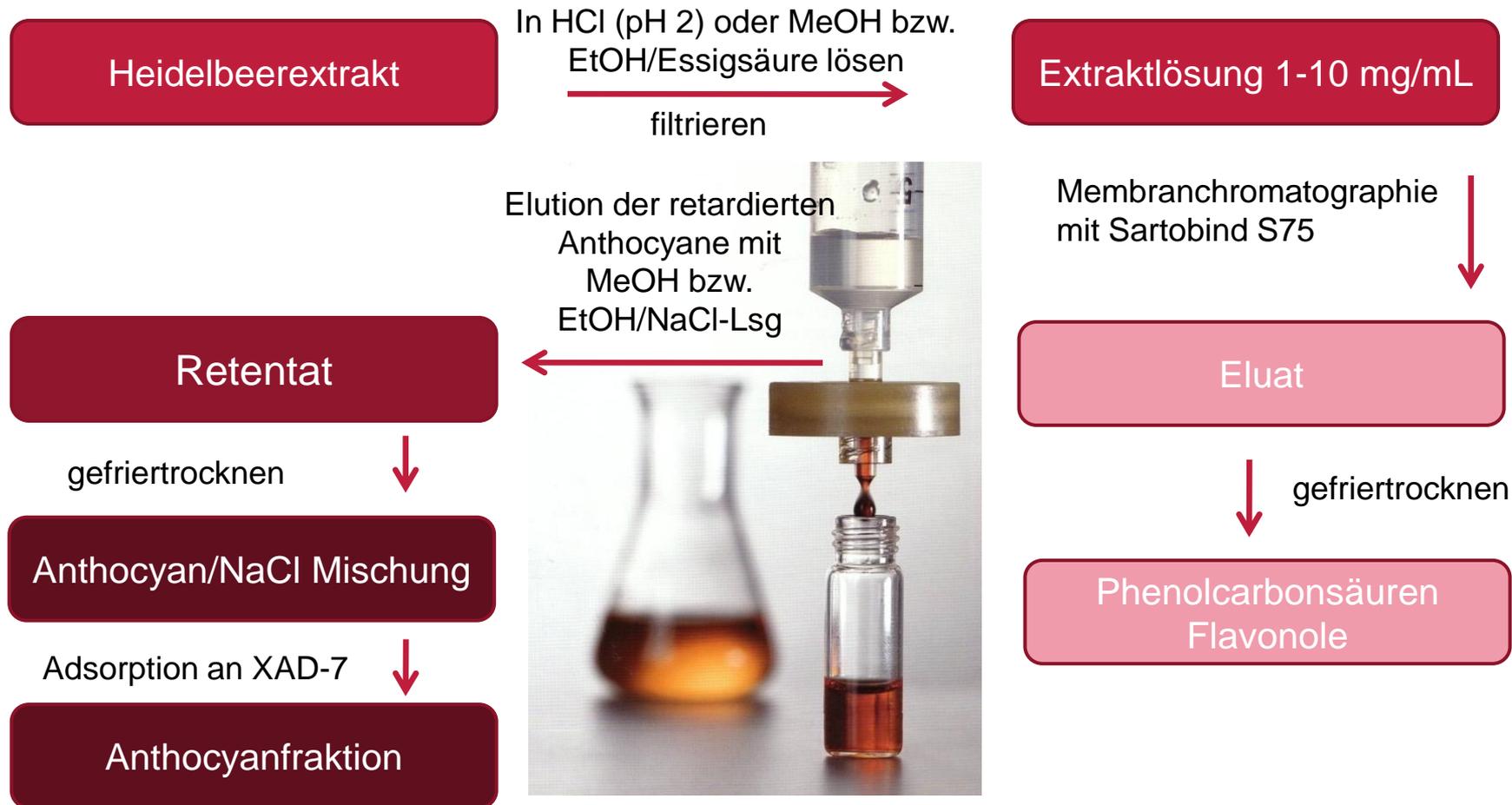
Entwicklung und Optimierung mit Sartobind S75 (75 cm<sup>2</sup> Membrane area)



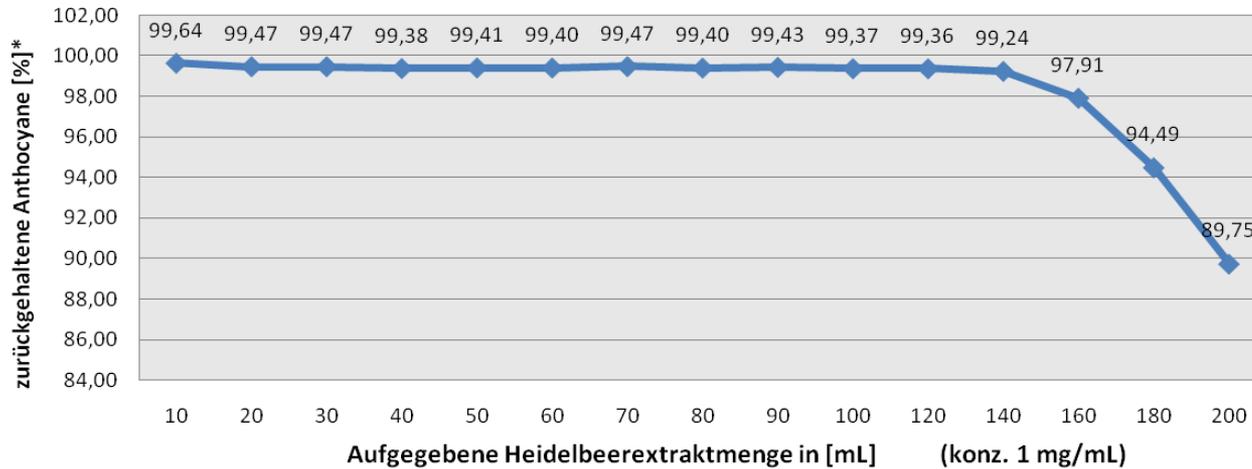
Scale-up mit Sartobind S IEX 150 ml

Size	Nano 3 ml	150 ml	Jumbo 5 l
Membrane area	110 cm <sup>2</sup>	0.55 m <sup>2</sup>	18.2 m <sup>2</sup>
Bed height	8 mm	8 mm	8 mm
Dyn. binding capacity 10%	45 mg IgG	2.2 g IgG	73 g IgG
Recommended flow rate	10 ml/min	0.75 l/min	25 l/min

# Durchführung der Membranchromatographie mittels Sartobind S75 Membranen



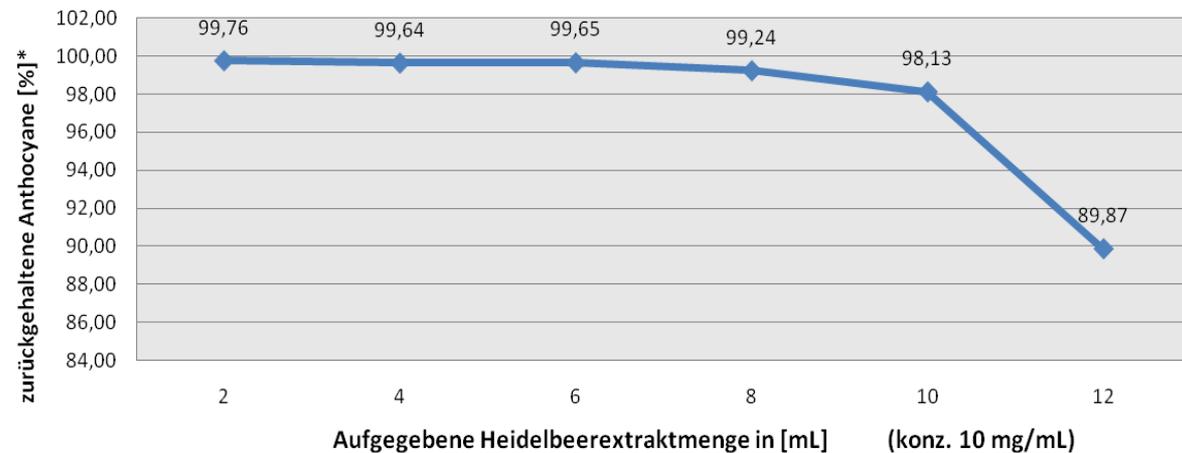
# Anthocyanretention während der Membranchromatographie



**Heidelbeerextrakt**  
**[1 mg/mL]**  
**in HCL pH 2**

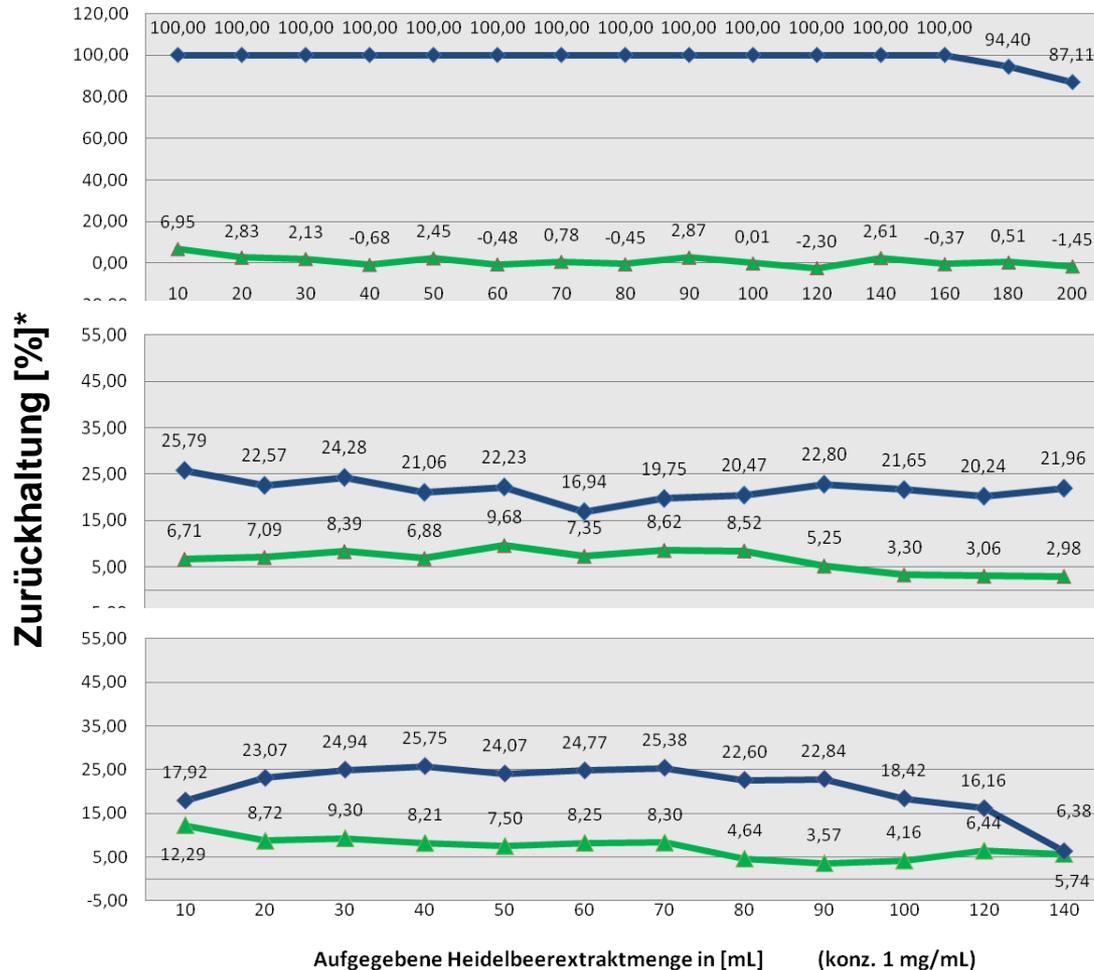
\* bezogen auf die Ausgangskonzentration

**Heidelbeerextrakt**  
**[10 mg/mL]**  
**in MeOH/**  
**Essigsäure 19:1**  
**(v/v)**



\* bezogen auf die Ausgangskonzentration

# Chlorogensäure- und Quercetinretention der Sartobind Membranadsorber



Extrakt gelöst in wässriger HCl (pH2)

Extrakt gelöst in Methanol/Essigsäure 19:1 (v/v)

Extrakt gelöst in Ethanol/Essigsäure 19:1 (v/v)

■ Chlorogensäure  
■ Quercetin

\*bezogen auf die Ausgangskonzentration der Extraktlösung



# Scale-up der Membranchromatographie

1-10 g Extrakt wird in 1 L EtOH/Essigsäure 19:1 (v/v) gelöst

Filtration durch Faltenfilter zur Eliminierung der unlöslichen Extraktbestandteile

Regeneration des Membranadsorbers mit 2,5 L 1M NaOH und Equilibration mit 2,5 L 0,01 M HCl und 1 L EtOH/Essigsäure 19:1 (v/v)

\* Aufgabe der Extraktlösung 1 L

\* Spülen mit 1 L EtOH/Essigsäure 19:1 (v/v)

\* Elution 1M NaCl/EtOH 50:50 (v/v)

\* Flussrate 100 mL/min,  
Probennahme für HPLC-DAD-Analyse nach jeweils 200 mL



Eluat 1 L  
(Copigmente und Polymere)

Spüllösung 1L

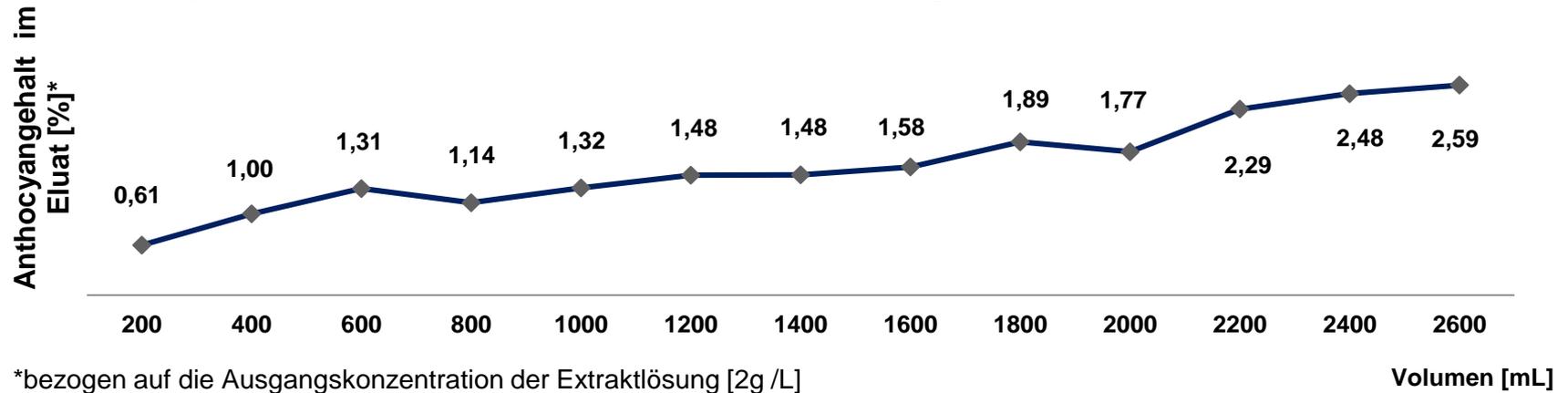
Anthocyanfraktion

Eluat und Spüllösung werden vereinigt und es erfolgt ein zweiter Zyklus zur Befreiung der Eluatfraktion von Restanthocyanen

# Scale-up der Membranchromatographie

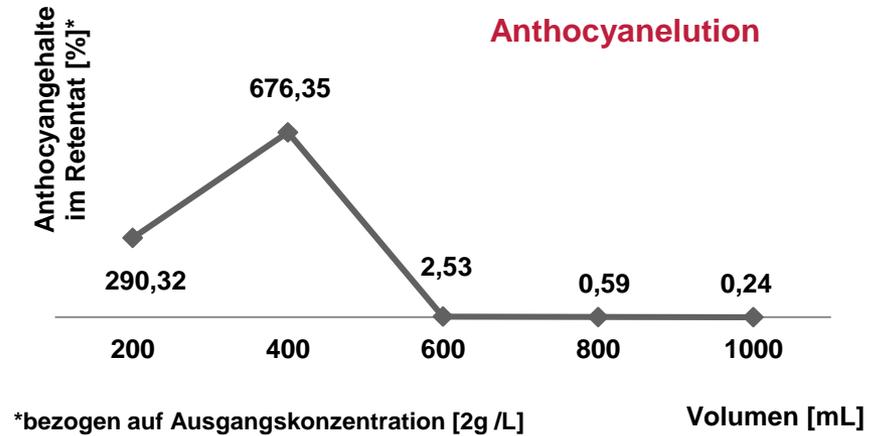
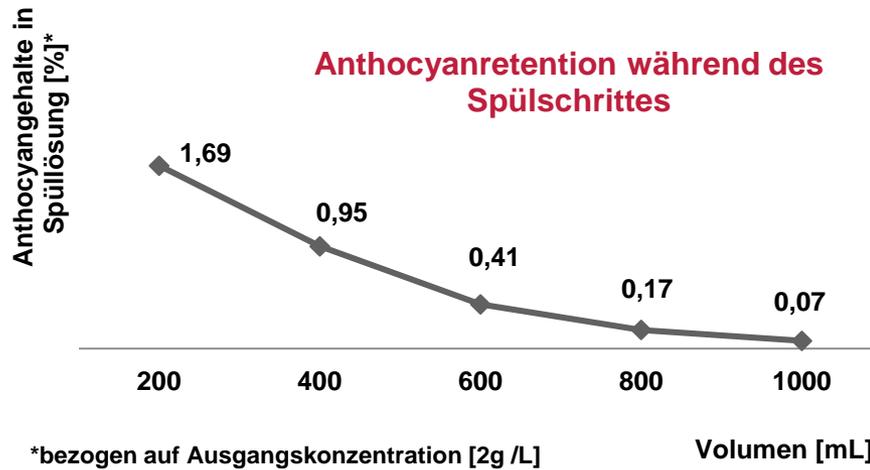


## Anthocyanretention während der Membranchromatographie

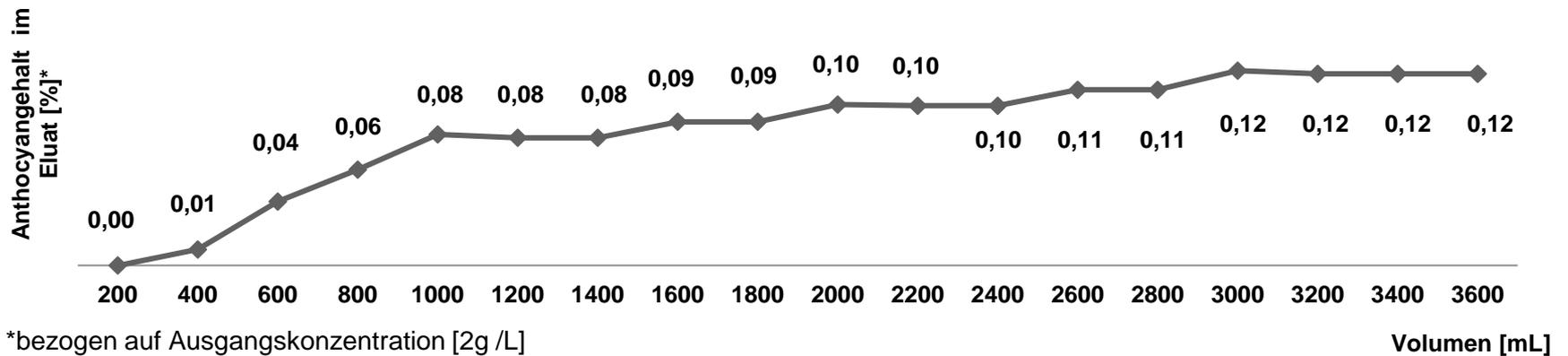


\*bezogen auf die Ausgangskonzentration der Extraktlösung [2g /L]

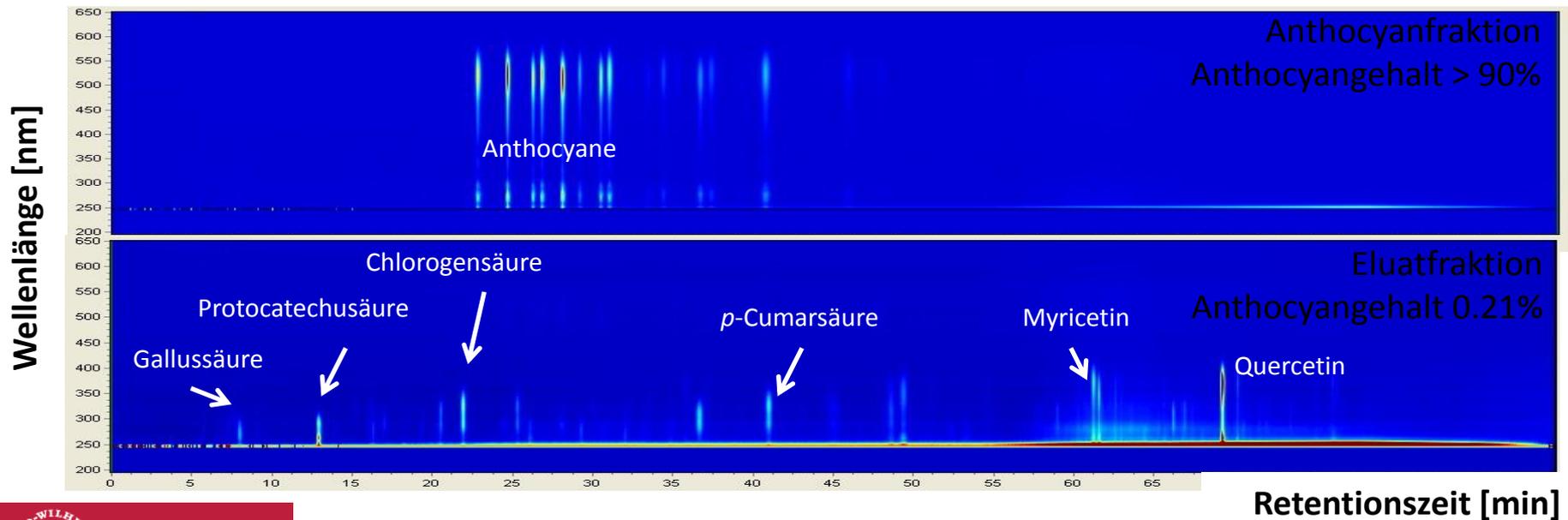
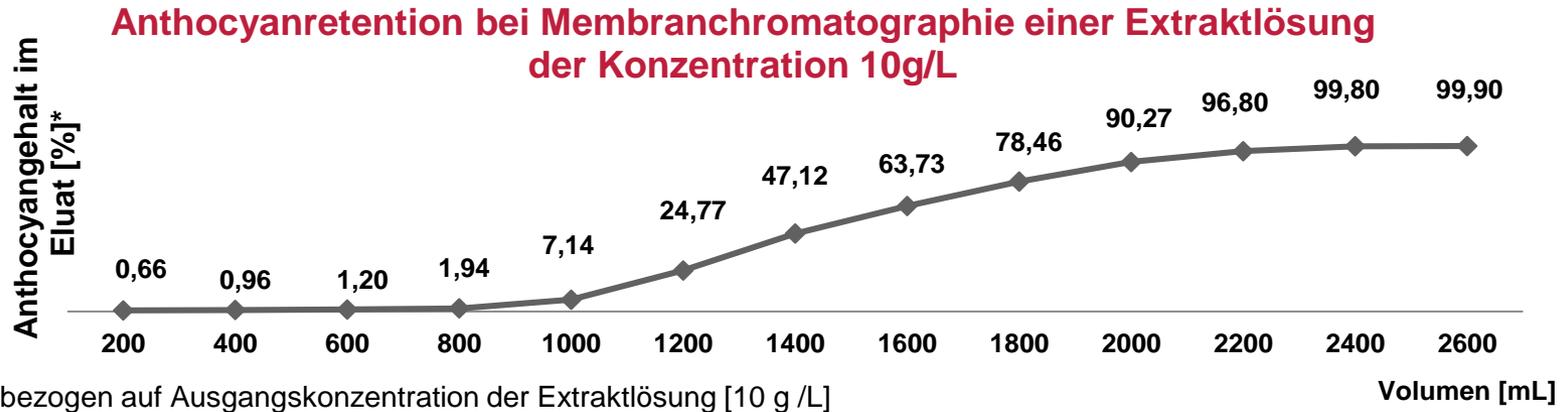
# Scale-up der Membranchromatographie



## Anthocyanretention während 2. Membranchromatographie

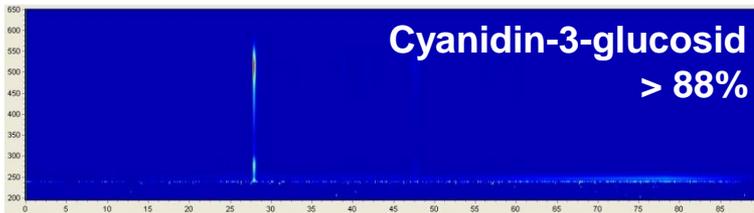
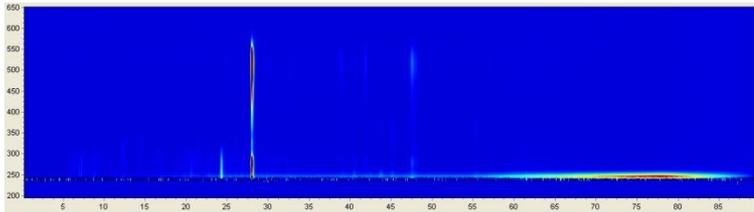


# Maximalbelastung des Membranadsorbers und HPLC-DAD Chromatogramme der erhaltenen Fraktionen

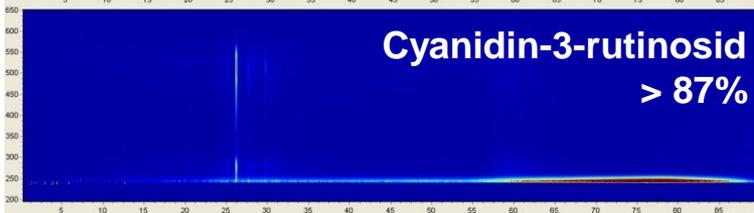
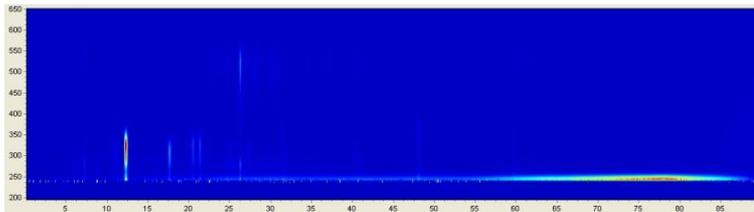


# HPLC-DAD-Chromatogramme der Fraktionen weiterer Trennungen

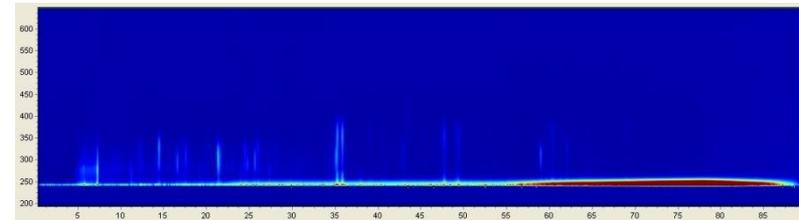
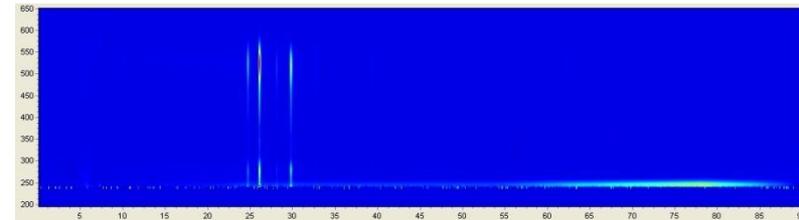
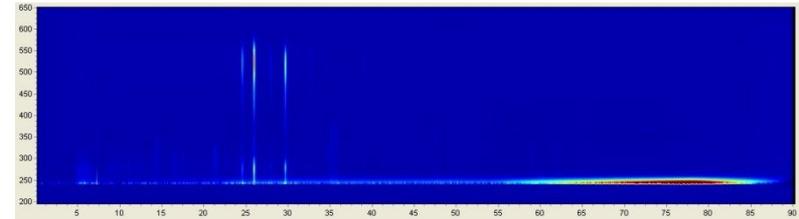
## Brombeerextrakt



## Süßkirschextrakt



## Schwarze Johannisbeere



**weitere:** Cranberry, Granatapfel, schwarze Karotte, Safran, pigmentierte Kartoffeln.

## Take Home Message

**Durch die Entwicklung eines membranchromatographischen Verfahrens ist es erstmals möglich, Anthocyane zu isolieren und vollständig von anderen phenolischen Inhaltsstoffen wie Copigmenten und Polymeren abzutrennen.**

**Die gewonnenen Fraktionen eignen sich für weiterführende *in vitro*, *in vivo* und Human-Studien, da die Methode vollständig auf perfluorierte Reagenzien und weitere giftige Chemikalien verzichtet.**

## Zeitschriftenbeiträge:

Juadjur, A.; Winterhalter, P.: Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. *J. Agric. Food Chem.* 60(10) 2427-2433 (2012)

Entwicklung einer neuen membranchromatographischen Methode zur Isolierung von Anthocyanen aus Heidelbeeren und anderen Früchten.

Eingereicht: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, BEHR'S VERLAG Hamburg

## Poster:

Juadjur, A.; Winterhalter, P.: Charakterisierung und Isolierung von Polyphenolen aus Wildheidelbeeren, 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14. - 16. September 2009, Berlin. *Lebensmittelchemie* 64(5), 124-125 (2010)

Juadjur, A.; Jerz, G.; Winterhalter, P.: Isolierung eines Cumaroyl-Iridoids, eines Depsids sowie eines seltenen p-Cumarsäurederivats aus Wildheidelbeerextrakt mittels LSRCCC. 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim, 2010. *Lebensmittelchemie* 65, 30 (2011)

Juadjur, A.; Jerz, G.; Winterhalter, P.: Characterization and isolation of polyphenols from wild bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), Shizuoka University International Symposium 2011 "Initiatives for Crossing Boundaries within Science and Technology", 28.-29. November 2011, Shizuoka, Japan.

# Vielen Dank

## für die Aufmerksamkeit

Förderung durch:



Das Forschungsvorhaben (**AiF 15610 N**) wurde im Programm zur Förderung der „Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert.

