

Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Fachbereich 08 – Chemie und Biologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Massenspektrometrische Analyse von Anthocyanen und deren Metaboliten in komplexen biologischen Proben

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Sebastian Dold
aus Möttau

Gießen 2013

Dekan : Prof. Dr. Holger Zorn
Erstgutachter : Prof. Dr. Bernhard Spengler¹
Zweitgutachter : Prof. Dr. Gerd Hamscher²
Tag der Disputation : 31.03.2014

1: Institut für anorganische und analytische Chemie, Justus-Liebig-Universität Gießen
2: Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

Versicherung nach § 17.2 der Promotionsordnung vom 04.02.2005

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Die Größe und unendliche Weisheit des Schöpfers wird nur derjenige wirklich erkennen,
der sich bestrebt, aus dem gewaltigen Buche, das wir Natur nennen,
seine Gedanken herauszulesen.

Justus Liebig

1803-1873

Danksagung

Diese Arbeit ist das Resultat von dem Zusammenwirken vieler Personen. Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Spengler für die Bereitstellung des sehr interessanten Forschungsthemas, die intensive wissenschaftliche Unterstützung und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen, danken. Ohne die hervorragende Ausstattung des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie wären die Resultate dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Gerd Hamscher möchte ich sehr herzlich für seine Tätigkeit als Zweitgutachter danken.

In besonderer Weise danke ich Herrn Dr. Andreas Römpf für die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung, die wissenschaftlichen Gespräche und Diskussionen, die besonders zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke allen Kollegen der Arbeitsgruppe für die Hilfen im Alltag und das stets gute Umfeld, in dem es sich, wie unter Freunden arbeitete. Besonders möchte ich Dr. Franziska Unger, Arton Berisha, Stefanie Gerbig und Dr. Yvonne Schober für die stete fachliche Hilfe, ihre Unterstützung im Labor und auch bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Den Kollegen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Clemens Kunz (Institut für Ernährungswissenschaften) danke ich für die fortwährende gute, hilfsbereite und fruchtbare Zusammenarbeit bezüglich der Festphasenextraktionen und der Zellkulturproben. Besonders sei hier Dr. Sabine Kuntz gedankt.

Ebenso möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die stets zu mir hielten und viel Verständnis zeigten, wenn ich oft und lange keine Zeit für sie hatte. Ganz besonders möchte ich Dir, Jan, danken, dass Du immer zu mir stehst, mich nie im Stich lässt und immer ein offenes Ohr für mich hast.

Ich danke ebenfalls dem Bundesministerium für Bildung und Forschung der Bundesrepublik Deutschland für die finanzielle Förderung im Rahmen der ANTHONIA-Studie (Förderkennzeichen 0315379A).

Kurzfassung deutsch

Anthocyane stellen rote, blaue oder purpurfarbene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe dar, welchen in verschiedenen epidemiologischen Studien gesundheitsfördernde oder präventive Wirkungen aufgrund von antioxidativen Eigenschaften zugeschrieben werden. Durch die geringe Bioverfügbarkeit ist deren tatsächliche Rolle im menschlichen Organismus unklar. Um dies zu untersuchen wurde im BMBF-Verbundprojekt ANTHONIA eine umfassende Studie durchgeführt, bestehend aus einer Zellkultur-, einer Tier- und einer Humanstudie. Die daraus resultierenden komplexen Proben verlangten nach einer dezidierten Probenpräparation (Festphasenextraktion), einer robusten und dennoch schnellen Analysenmethode, die in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wird. Eine Separation wurde durch Ultra-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (U-HPLC) erreicht. Mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) wurde diese mit einem hochauflösenden akkuraten Massenspektrometer (MS) gekoppelt. Die Identifizierung wurde durch Fragmentierungsexperimente des Aglykons unterstützt, da zumeist keine Standardverbindungen verfügbar waren. Mittels der verwendeten Instrumentierung ist eine Quantifizierung ohne Fragmentierungsexperiment (MS/MS) möglich. Anthocyane und direkte Metaboliten können aus Massenspektren auch retrospektiv analysiert werden, was durch „All Ion Fragmentation“ (AIF) Experimente unterstützt wird. Anthocyan-Glucoside, -Glucuronide und andere Derivate der Anthocyane konnten in über 1000 Proben quantifiziert werden. Mögliche Degradationsprodukte der Anthocyane, wie 3,4-Dihydroxybenzoesäure, können parallel analysiert werden, da die Polarität des Massenspektrometers innerhalb einer Messung kontinuierlich gewechselt werden kann. Die Massengenauigkeit im positiven Ionenmodus war generell besser als 1 ppm, daher konnte die Quantifizierung mit einem Massenfenster von $\Delta m/z = 0,002$ durchgeführt werden. Die entwickelte Methode kann für unterschiedlichste Probenmatrizes angewandt werden. In dieser Arbeit konnten Anthocyane, Metaboliten und 3,4-Dihydroxybenzoesäure in Plasma, Urin, Pflanzenextrakten, Darminhalt- und Fäzesproben analysiert werden. Die hohe Massengenauigkeit war essentiell, um eine korrekte Identifizierung und Quantifizierung durchzuführen.

Abstract english

Anthocyanins, red, blue and purple colorants in fruits, are widely discussed for their antioxidant properties. Their bioavailability is very low and therefore their role as health promoting substances is unclear. A comprehensive human, animal and cell culture study was designed in the framework of the BMBF project 'ANTHONIA' in order to study the bioavailability of anthocyanins. A dedicated sample preparation protocol and a robust and fast method was developed for diverse sample types. Separation was achieved via U-HPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography) and HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) analysis was conducted by electro-spray ionization and orbital trapping mass spectrometry. Reference substances were not available for all analytes and identification was therefore based on dedicated MS/MS experiments. High mass accuracy allowed for quantitation without the need for MS/MS experiments and consequently metabolites (e.g. products of glucuronidation) can be analyzed retrospectively supported by the 'all ion fragmentation' (AIF) mode. Glucuronides, glucosides and other anthocyanins could be analyzed in more than 1000 samples by this procedure. Phenolic acids such as 3,4-dihydroxy benzoic acid could be analyzed in parallel by switching polarity continuously during the measurement. The developed method allows for identification by HRMS and MS/MS experiments and quantification in positive and negative ion mode by using full MS spectra. Mass accuracy in positive ion mode was better than 1 ppm, so quantification could be done by a mass window of $\Delta m/z = 0.002$. The shown method can be used for different sample types with different matrices. Plasma, urine, cell culture, extracts of intestine content and feces could be analyzed using the presented method. The developed method is not limited to the introduced application, but can be extended to raw grape extracts or other plant extracts which contain anthocyanins. High mass accuracy proved to be essential in our U-HPLC-MS measurements for the correct identification and quantification of anthocyanins and related metabolites in complex biological samples.

Inhalt

1.	Motivation	1
2.	Einleitung	2
2.1	Chemische und physikalische Eigenschaften der Anthocyane	2
2.1.1	Struktur, pH-abhängige Umwandlung und chemischer Zerfall	2
2.1.2	Grundlegende physikalische Eigenschaften	5
2.1.3	Absorptionsspektren	6
2.1.4	Copigmentierung und Stabilisierung	6
2.1.5	Metallkomplexe	7
2.2	Biologische und physiologische Wirkungen der Anthocyane	7
2.3	Bioverfügbarkeit, Metabolismus, Aufnahme- und Verteilungs-mechanismen	8
2.4	Analysemethoden	11
2.4.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	11
2.4.2	Elektrosprayionisierung	14
2.4.3	Hochauflösende FT-Massenspektrometer	15
2.4.3.1	Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS)	16
2.4.3.2	Orbitalfallen-Massenanalysator	18
2.5	Analytik der Anthocyane	22
3.	Methodenentwicklung	25
3.1	Probenextraktion	25
3.1.1	Flüssigextraktion	25
3.1.1.1	Darminhalt	26
3.1.1.2	Fäzes	26
3.1.2	Festphasenextraktion	27
3.1.2.1	Plasma	29
3.1.2.2	Urin	30
3.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	31
3.3	Massenspektrometrische Analyse	38
3.3.1	Identifizierung von Anthocyanen, Metaboliten und Abbauprodukten	43

3.3.1.1 Charakteristische Fragmente der Anthocyane aus Standardproben mittels hochauflösender akkurater Massenspektrometrie	43
3.3.1.2 Unterschiede zwischen HCD- und CID-Fragmentierung	52
3.3.1.3 <i>All ion fragmentation</i> (AIF) als Möglichkeit der retrospektiven Identifizierung	54
3.3.1.4 Stabilität des Isolationsvermögens des Q Exactive Massenspektrometers	55
3.3.2 Quantifizierung.....	56
3.3.2.1 Simultane Messungen im positiven und negativen Ionenmodus	57
3.3.2.2 Wahl und Bedeutung des Massenfensters	58
3.3.2.3 Rekalibrierung und Massenverschiebung	60
3.3.2.4 Stabilität der Messung	62
3.3.2.5 Sensitivität.....	65
3.4 Diskussion	66
4. Identifizierung von Anthocyanen und Metaboliten in verschiedenen biologischen Proben	68
4.1 Identifizierte Anthocyane in Dakapo-Trauben-Extrakt.....	68
4.2 Identifizierung von Anthocyanen in Proben der Zellkulturstudie.....	72
4.3 Identifizierung von Anthocyanen und deren direkten Metaboliten in Proben der Tierstudie.....	73
4.4 Identifizierung von Anthocyanen und deren direkten Metaboliten in Proben der Humanstudie.....	75
5. Quantitative Ergebnisse.....	77
5.1 Zellkulturstudien	77
5.1.1 LC-UV- und LC-MS-Messungen der apikalen Proben.....	78
5.1.2 LC-MS-Messungen der basalen Proben.....	80
5.2 Tierstudie.....	81
5.2.1 Darminhalt und Fäzes.....	82
5.2.2 Plasma und Urin-Proben	84
5.3 Humanstudie.....	85
5.3.1 Plasmaproben	86
5.3.2 Urinproben	92
5.3.3 Reproduzierbarkeit	93

5.3.4 Abschließende Betrachtung zum humanen Metabolismus	94
6. Zusammenfassung und Ausblick	97
7. Literaturverzeichnis.....	102
8. Abkürzungsverzeichnis	113
9. Abbildungsverzeichnis	116
10. Tabellenverzeichnis.....	119
Anhang	120
A.1 Materialien, Chemikalien und Geräte	120
A.1.1 Materialien und Chemikalien	120
A.1.2 Geräte	121
A.1.3 Flüssigchromatographen	122
A.1.3.1 SUMMIT (Kapillar-LC).....	122
A.1.3.2 <i>UltiMate 3000 UHPLC</i>	123
A.1.4 Massenspektrometer	123
A.1.4.1 LTQ FT ULTRA (FT-ICR-MS).....	123
A.1.4.2 LTQ Orbitrap Discovery	123
A.1.4.3 Exactive Orbitrap und Q Exactive Orbitrap	123
A.2 Charakteristische Fragmentationen für Aglyka der Anthocyane aus Standardverbindungen mittels hochauflösender, akkurater MS	125
A.3 MassFrontier und FISh-Suche.....	130
A.4 Anthocyane in Dakapo-Extrakt und Metabolite, hochaufgelöste, akkurate Massenspektren und mit akkurater Masse detektierte charakteristische Fragmente, div. Stabilitätsmessungen	132
A.5 Ergebnisse der Zellkulturstudien.....	140
A.6 Ergebnisse der Tierstudie	146
A.7 Ergebnisse Humanstudie	150
A.8 Abbildungsverzeichnis Anhang	169
A.9 Tabellenverzeichnis Anhang	169

Vorbemerkung

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Rahmen des BMBF-Verbundprojekts „Anthocyane in Fruchtsäften aus Beerenobst“ ANTHONIA-Studie (BMBF-Förderkennzeichen: 0315379A) durchgeführt.

Die in der Dissertation beschriebene Konzeption und Durchführung von Human- und Zellkulturstudien sowie deren Probensammlung und Probenaufarbeitung wurden am Institut für Ernährungswissenschaft durchgeführt (BMBF-Teilprojekt 4: *Anthocyane und Metabolite - antioxidative und antiinflammatorische Wirksamkeit in vitro und in vivo*. Projektleitung: Prof. Dr. S. Rudloff; BMBF-Teilprojekt 6: *Bioverfügbarkeits- und Interventionsstudien*. Projektleitung: Prof. Dr. C. Kunz). Die Konzeption und Durchführung der Tierstudie, sowie deren Probensammlung wurden am Max-Rubner-Institut (Karlsruhe) durchgeführt (BMBF-Teilprojekt 5: *Anthocyane im Tiermodell – Bioverfügbarkeit und immunologische Wirkungen von Anthocyanen im Tiermodell*. Projektleitung: Prof. Dr. B. Watzl). In der Dissertation analysierte Säfte und Extrakte wurden von der Forschungsanstalt Geisenheim zur Verfügung gestellt (BMBF-Teilprojekt 1: *Functional Food – Entwicklung von Produkten mit Zusatznutzen (functional food) unter Berücksichtigung besonderer lebensmitteltechnologischer Methoden*. Projektleitung: Prof. Dr. H. Dietrich).

Die Entwicklung der Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Anthocyanen und deren Metaboliten sowie die Analyse und die quantitative Auswertung der aus diesen Studien hervorgegangenen Proben (Plasma, Urin, Zellkulturüberstände, Fäzes, Darminhalte) erfolgte in der vorliegenden Arbeit im Rahmen des BMBF-Teilprojekts 2: *Analytik von Anthocyanen und Metaboliten in Rohstoffen, Extrakten und biologischen Flüssigkeiten* (Projektleitung: PD Dr. A. Römpf).

1. Motivation

Die Gruppe der Anthocyane wurde in den letzten Jahrzehnten zunehmend im Detail untersucht. In den Fokus der Forschung geriet sie durch interessante chemische, physikalische und physiologische Eigenschaften, die vor allem darauf beruhen, dass Radikale (insbesondere reaktive Sauerstoffspezies, ROS) effektiv abgefangen werden können (siehe Kapitel 2.2). Verschiedene epidemiologische Studien zeigten eine Korrelation zwischen einer obst- und gemüsereichen Ernährung und einer verminderten Inzidenz für Tumorerkrankungen, kardiovaskuläre und andere chronische Erkrankungen. Hierfür werden neben zahlreichen anderen Verbindungen auch viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe aufgeführt, zu denen auch die Anthocyane zählen.^{2,3}

Durch Neuzüchtungen können Anthocyane, wie zum Beispiel in Weintrauben, schon in der Frucht hochgradig akkumuliert werden. Neuartige Techniken ermöglichen es, Extrakte aus diesen Früchten zu gewinnen und hohe Mengen an Anthocyanen zur Verfügung zu stellen. So können diese Stoffe der Nahrung in hohen Dosen zugefügt und mögliche positive gesundheitsfördernde Effekte erforscht werden. In der vorliegenden Arbeit soll eine analytische Methode auf Basis von vorgeschalteter flüssigchromatographischer Trennung und anschließender Detektion durch hochauflösende, akkurate Massenspektrometrie entwickelt werden, die sowohl eine Quantifizierung, als auch die Identifizierung der Inhaltsstoffe erlaubt. Grundlegende Fragmentierungseigenschaften der Anthocyane sollen beschrieben werden. Diese charakteristischen Fragmentationen dienen anschließend zur Identifizierung von Anthocyanen und deren Metaboliten in Extrakten und anderen realen komplexen Proben. Besonders sollte auf neue Metabolite geprüft werden. Dies waren in erster Linie Glucuronide, sulfatierte oder methylierte Anthocyane sowie freie Anthocyanidine. Die Verwendung hochauflösender, akkurater Massenspektrometrie zur Quantifizierung und zur Identifizierung soll für eine sehr umfangreiche Humanstudie, eine Tierstudie, Zellkulturstudien und Pflanzenextrakte gezeigt werden. Eine vorgeschaltete zuverlässige, robuste, aber auch schnelle chromatographische Trennung ist ebenfalls unerlässlich, um dem hohen Probenaufkommen und den sehr unterschiedlichen Matrizes der verschiedenen Studien (Zellkultur-, Tier- und Humanstudie) gerecht zu werden. Ein Überblick über die verschiedenen Studien und deren Ergebnisse verdeutlichen den Erfolg der entwickelten Methode.

2. Einleitung

In der Natur sind Anthocyane weitverbreitet. Sie kommen vorwiegend in Beeren, Früchten und Blüten in erhöhten Konzentrationen vor und sind für deren rote, blaue und violette Färbung verantwortlich.⁴ In Pflanzen dienen sie als färbende Attraktantien, wodurch sie Tiere anziehen und somit zur Verbreitung und Befruchtung beitragen. Weiterhin wirken sie in Pflanzen als Antioxidantien, Phytoalexine und zeigen antibakterielle Wirkung.³

2.1 Chemische und physikalische Eigenschaften der Anthocyane

2.1.1 Struktur, pH-abhängige Umwandlung und chemischer Zerfall

Anthocyane zählen zur Familie der Flavonoide, die wiederum den sogenannten Pflanzenphenolen zugeordnet werden und ein C₆-C₃-C₆-Grundgerüst aufweisen. Somit leiten sie sich strukturell vom Flavan ab und sind in fast jeder höheren Pflanze präsent. Die über 500 Verbindungen zählende Gruppe der Anthocyane beschreibt eine eigene Untergruppe der Flavonoide, die sich im Aglykon und im Glycosylierungsmuster unterscheiden. Sie leiten sich chemisch von den Pyriliumsalzen ab.⁴⁻⁷ Man findet sie als wasserlösliche Pigmente im Zellsaft der Vakuolen, aber überwiegend in Epidermis- und Subepidermiszellen der Früchte.⁸

In Abbildung 2-1 ist der Grundkörper der sechs am häufigsten in der Natur vertretenen Anthocyanidine dargestellt. Sie variieren im Substitutionsmuster des B-Rings in Bezug auf Hydroxy- (-OH) und Methoxylierung (-OCH₃). Einigen selteneren Anthocyanidinen fehlt beispielsweise die 3-OH-Gruppe oder es sind Methoxygruppen an den Positionen 5 oder 7 im A-Ring vorhanden. Solche Anthocyanidine treten häufig in Blütenblättern auf.⁹

Anthocyane sind mindestens mit einer Zuckerkomponente substituiert. Dies geschieht am C3-Atom meist durch Glukose, Galaktose, Rhamnose oder Arabinose. Ein weiterer Substituent wird meist an Position C5 beobachtet. Di- und Trisaccharide sind ebenfalls als Substituenten möglich. Pflanzeneigene Säuren (aliphatische und aromatische) können mit den Zuckerkomponenten verestert sein und erhöhen die Komplexität der Anthocyane. Diese Anthocyane werden als acyliert bezeichnet.¹⁰ Hierbei wird die betreffende Säure im Namen vor dem Zucker angeführt und es wird dort vermerkt, an welchem C-Atom die Veresterung

stattgefunden hat. Somit wird eine Veresterung durch Coumarsäure an Malvidin-3-glucosid als Malvidin-3-(6`'-O-coumaryl)glucosid beschrieben.

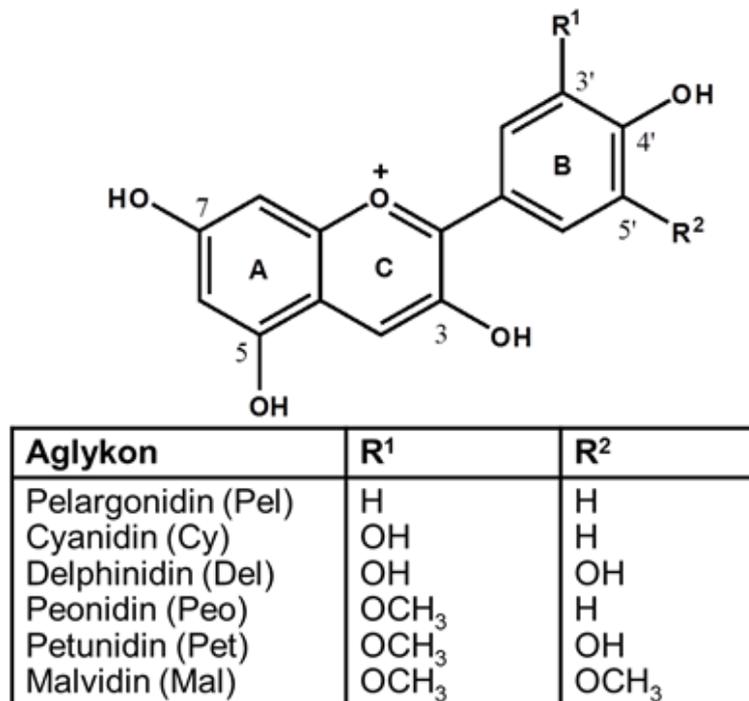


Abbildung 2-1: Struktur der in der Natur am häufigsten vertretenen Anthocyanidine¹

Die Biosynthese der Anthocyane bedient sich der Ausgangssubstanzen Acetyl-CoenzymA und L-Phenylalanin, wobei alle Reaktionen enzymkatalysiert sind und zunächst das Chalkon bilden. Daraus wird in mehreren Kaskaden vom Flavanon aus das Flavanol, hiernach das Anthocyanidin und letztlich das Anthocyan gebildet.^{11 12}

Im wäßrigen Milieu liegen Anthocyane in Abhängigkeit vom pH-Wert in verschiedenen Strukturen im chemischen Gleichgewicht nebeneinander vor, was in unterschiedlichen Farben und Farbintensitäten resultiert. Bei sehr niedrigen pH-Werten (pH=1-3) überwiegt das intensiv rot gefärbte Flavyliumkation. Bei steigendem pH-Wert lagert sich am C2-Atom eine Hydroxylgruppe an und es bildet sich die farblose Carbinol-Pseudobase (Chromenol). Steigt der pH-Wert weiter an, bildet sich das gelbe Chalkon, wobei es nun zu einer Öffnung des C-Ringes kommt. Ebenfalls können ionische und chinoide Anhydrobasen entstehen, die eine ins blaue gehende Färbung aufweisen (siehe Abbildung 2-2).^{13 14}

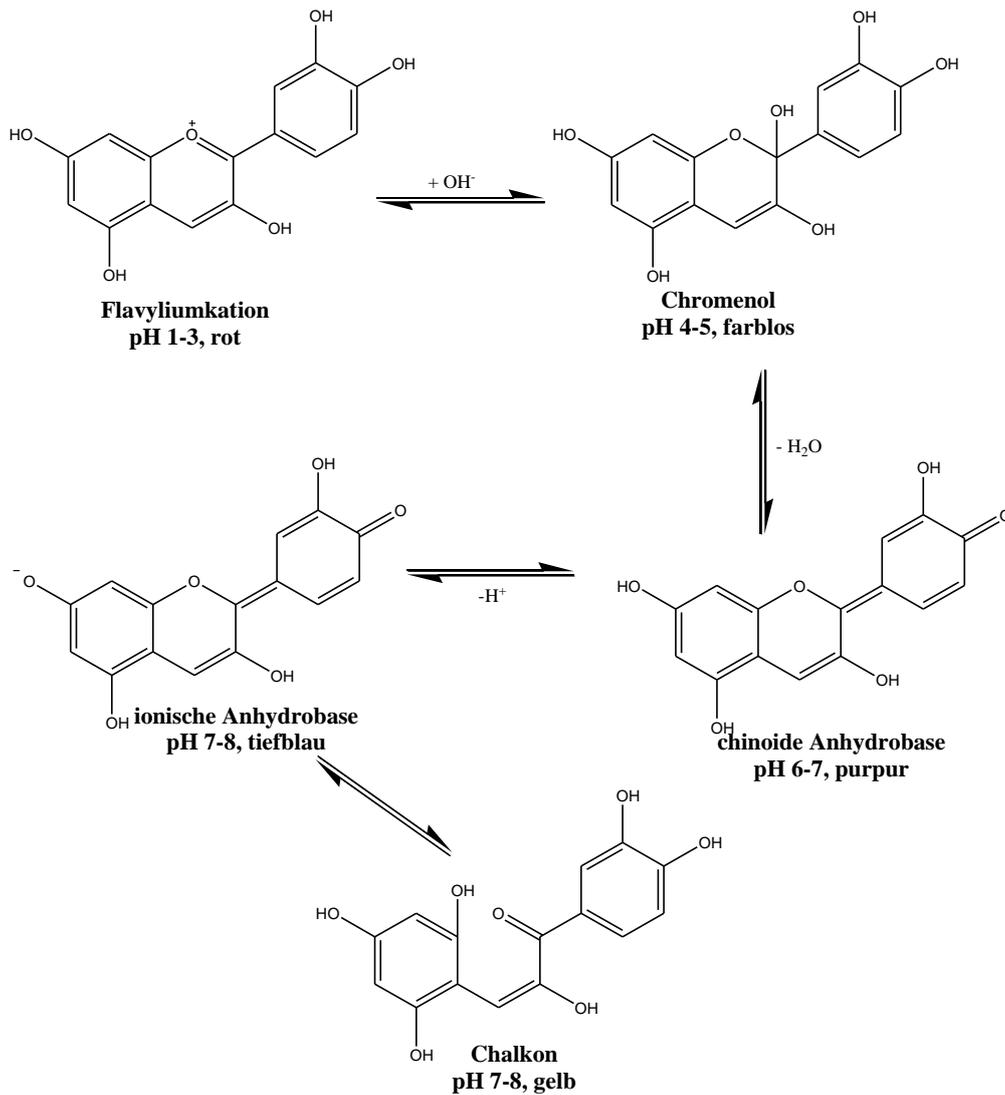


Abbildung 2-2: Veränderung der Struktur in Abhängigkeit vom pH-Wert

Der Grundkörper der Anthocyane, das jeweilige Aglykon (Anthocyanidin), ist chemisch sehr instabil und zerfällt v.a. bei höheren pH-Werten. Drei Theorien beschäftigen sich mit der Chemie des Zerfalls, von denen die am weitesten verbreitete in Abbildung 2-3 dargestellt wird. Nach der Ringöffnung entstehen über die Zwischenstufe des A-Diketons ein Aldehyd und eine phenolische Carbonsäure. Erst die Glycosylierung bedingt eine größere Stabilität des jeweiligen Anthocyans.¹⁵⁻¹⁸

Der entstehende Aldehyd resultiert aus dem A-Ring des Anthocyans. Die Substituenten am A-Ring sind für die am häufigsten in der Natur vorkommenden Anthocyane identisch, daher ist der entstehende Aldehyd stets derselbe. Die aus dem B-Ring gebildete Carbonsäure ist hingegen für das jeweilige Anthocyanidin charakteristisch. So entsteht beispielsweise beim

Zerfall von Malvidin Syringasäure, im Falle von Peonidin entsteht Vanillinsäure und im Falle von Cyanidin entsteht 3,4-Dihydroxybenzoesäure (3,4-DHB).

Die Zerfallsgeschwindigkeit der Anthocyane nimmt mit steigender Temperatur zu und ist eng mit dem pH-Wert verknüpft. Eine Glycosylierung in 3-Position (siehe Flavylumkation in Abbildung 2-3) zeigt einen deutlich stabilisierenden Effekt, auch wenn nach längerer Zeit hier ebenfalls ein Zerfall stattfindet.¹⁹ Acylierungen der Zuckerreste bewirken eine weitere Stabilisierung des Moleküls.¹⁴

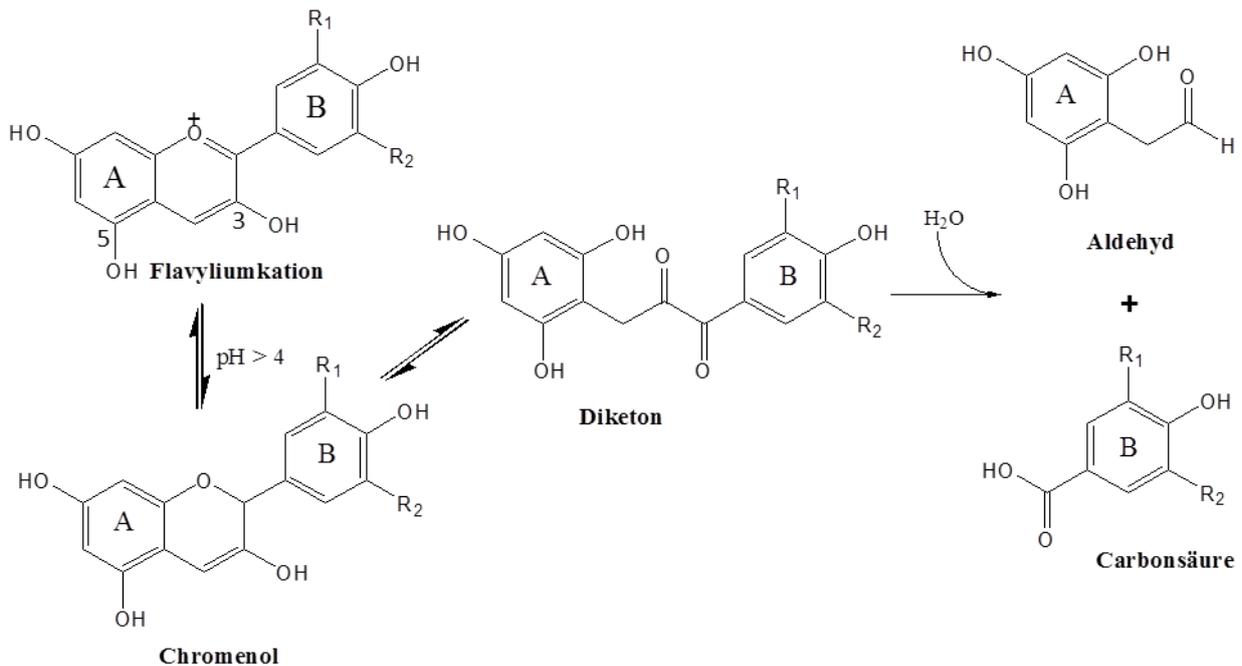


Abbildung 2-3: Zerfall des Aglykons (nach Harper und Clifford)

2.1.2 Grundlegende physikalische Eigenschaften

Im Zuge der Arbeiten mit den Verbindungen der Anthocyane ist in besonderem Maße aufgefallen, dass grundlegende physikalische Eigenschaften der Anthocyane bisher nur äußerst unzureichend ermittelt wurden. So kann beispielsweise keine Information zur Polarität aus Standardtabellenwerken erhalten werden. Dies wäre für die chromatographische Trennung eine sehr interessante Größe, da so deren Optimierung besser durchgeführt werden könnte. Weiterhin ist die Löslichkeit in der Literatur nur unzureichend mit „schwach löslich in Wasser“ und „löslich in Methanol“ bezeichnet.²⁰ Die Schwierigkeit diese elementaren physikalischen und chemischen Eigenschaften zu ermitteln, beruht zum Teil auf der

Instabilität der Substanzen, andererseits auf der schwierigen Trennung der verschiedenen Verbindungen voneinander.

2.1.3 Absorptionsspektren

In saurem Milieu liegen die Anthocyane als Flavylumkation vor, wobei die positive Ladung durch das konjugierte aromatische System über das gesamte Molekül mesomerieverteilt ist. Sie zeigen daher zwei Absorptionsmaxima. Das erste liegt im sichtbaren Bereich mit einem Maximum zwischen 465-560 nm und die zweite im Bereich von 265-275 nm. Das erste Absorptionsmaximum (465-560 nm) wird von der Struktur beeinflusst, was sich somit auch in der Farbänderung äußert.²¹ Eine Erhöhung des Hydroxylierungsgrades im B-Ring bewirkt eine Rotverschiebung (bathochromer Effekt), ein zunehmender Methylierungs- oder Glycosylierungsgrad, sowie eine Acylierung mit aromatischen Carbonsäuren bewirken eine Blauverschiebung (hypsochromer Effekt). Eine Acylierung mit aliphatischen Säuren hingegen bewirkt keine Farbänderung.^{15, 22}

2.1.4 Copigmentierung und Stabilisierung

Eine Stabilisierung der Anthocyane im nur schwach sauren Medium der Pflanzen bewirkt die inter- und intramolekulare Copigmentierung mit anderen Pflanzenphenolen.²³ Diese führt ebenfalls zu einem Anstieg der Farbintensität und einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen.²⁴ Bei intramolekularer Copigmentierung handelt es sich um Interaktionen innerhalb des Anthocyanmoleküls, bei denen es sich um Wechselwirkungen zwischen dem Anthocyanidin-Grundgerüst und acylierten aromatischen Carbonsäuren handelt.²⁵ Diese zum Teil hochkomplexen Gebilde führen dazu, dass diese nicht mehr in gelöster Form, sondern als Partikel vorliegen, weshalb man bei Anthocyanen auch von Pflanzenpigmenten spricht.

2.1.5 Metallkomplexe

Anthocyane sind in der Lage mit Metallionen, die vorwiegend dreifach aber auch zweifach positive Ladung tragen, Komplexe zu bilden. In Pflanzen gehen überwiegend Ionen wie Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} oder Ca^{2+} mit Anthocyanen eine Komplexreaktion ein. Durch die Komplexbildung erfolgt eine Blauverschiebung (hypsochromer Shift) des Absorptionsspektrums.²⁶ So können blaue Blütenfarben, wie etwa die der Kornblume oder der Hortensie hervorgerufen werden. Durch die Komplexbildung wird gleichfalls eine Stabilisierung hervorgerufen, die vor allem den enzymatischen Abbau verhindert.¹

2.2 Biologische und physiologische Wirkungen der Anthocyane

Die Anthocyane und andere phenolische bzw. polyphenolische Verbindungen dienen in Pflanzen als Pigmente, Attraktantien,²⁷ Phytoalexine (u.a. zum Schutz vor Pilz- und Bakterieninfektionen), zum Schutz vor UV-Strahlung²⁸ und darüber hinaus auch zum Schutz vor Insekten.^{8, 10, 26-28} Weiterhin sind sie an der Regulation des pflanzlichen Hormonhaushaltes, der Genexpression und der Enzymaktivität beteiligt. Zudem tragen sie zum Geschmack und zum Aussehen, insbesondere von Blüten und Früchten, bei.^{29, 30}

Im Körper werden sie mit einer Reihe von gesundheitsfördernden Wirkungen in Zusammenhang gebracht. Zum einen sind dies antioxidative Eigenschaften, ebenso sollen sie vor koronaren Herz- und Krebserkrankungen schützen. Es wird ihnen weiterhin auch eine antibakterielle und antivirale Wirkung zugesprochen.

Die antioxidativen Eigenschaften der Anthocyane äußern sich durch die Möglichkeit des Transfers von Elektronen oder Wasserstoffatomen von den Hydroxylgruppen auf freie Radikale. Dies konnte bereits *in vitro* gezeigt werden.³¹⁻³³ Weiterhin können freie Radikale abgefangen und durch das konjugierte Doppelbindungssystem stabilisiert werden, um so die Radikal-Kettenreaktion zu unterbrechen.

Antientzündliche Effekte werden ebenfalls im Zusammenhang mit den Anthocyanen diskutiert. Solche Effekte konnten nach dem Verzehr eines Smoothies (Fruchtshake) aus schwarzen Johannisbeeren nicht nachgewiesen werden.³⁴ Im Zuge dieser Diskussion wurde auch auf den präventiven Schutz vor koronaren Herzerkrankungen verwiesen. Jedoch konnten Giordano *et al.* keine zellulären Marker für eine mögliche präventive Eigenschaft in einer

vierwöchigen Studie an 18 Personen feststellen.³⁵ Ebenfalls sei hier eine großangelegte Studie von Cassidy *et al.* genannt, in der sie nachgewiesen haben wollen, dass ein reichlicher Verzehr von Früchten, in jungen Jahren bereits das Risiko eines Herzinfarktes im späteren Leben senken könne.³⁶ Kritisch äußerte sich Prof. Watzl (Max-Rubner-Institut, Karlsruhe) in einem Interview hierzu. Er möchte die Effekte nicht allein den Anthocyanen zuschreiben und kritisiert, dass man über die Aufnahme anderer Flavonoide aus der Studie nichts erfährt. Ebenfalls wird über die Aufnahme von Alkohol oder Kaffee keine Aussage gemacht.³⁷

Durch die Möglichkeit reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abzufangen, werden im Zuge epidemiologischer Studien auch die Anthocyane als mögliche onkologisch präventiv wirkende Substanzen diskutiert. Sie zeigen antikarzinogene Effekte und bedingen so die Apoptose-Induktion (Einleitung des Zelltodes) in Tumorzellen.^{38, 39} Die größten Effekte erzielte man mit Delphinidin (Del), Petunidin (Pet) und Cyanidin (Cy). Es konnte den Anthocyanen weiterhin ein antiproliferativer Effekt (Wucherungsunterdrückung) zugeschrieben werden, der die Metastasierung verhindern könnte.^{40, 41}

Die antibakterielle und antivirale Aktivität von Flavonoiden hängt mit der Phytoalexin-Wirkung in Pflanzen zusammen und beruht auf der Permeabilitätsänderung der Zellmembran ebenso wie auf der Bindung und Denaturierung von lebenswichtigen Enzymen in Bakterien, Pilzen und Viren⁴². In verschiedenen Untersuchungen konnten Extrakten aus Holunder- und schwarzer Johannisbeere antivirale Aktivität gegenüber Influenza A und B sowie gegen Herpesviren 1 und 2 zugeordnet werden.⁴³⁻⁴⁶ In einer weiteren Studie konnten diese Effekte der Anthocyanfraktion eines Johannisbeer-Extraktes zugeordnet werden.⁴⁷

2.3 Bioverfügbarkeit, Metabolismus, Aufnahme- und Verteilungsmechanismen

Lange Zeit wurde angenommen, dass nur die Aglyka der Flavonoide vom Körper aufgenommen werden können und Flavonoid-Glucoside erst durch die intestinale Flora mikrobiell in das Aglykon und den Zucker gespalten werden müssen, um für den Organismus verfügbar zu sein. Durch Studien, die eine bessere Aufnahme des Flavonoids Quercetin-Glucosid, verglichen mit dem Aglykon Quercetin, belegten, wird diese Theorie stark angezweifelt.⁴⁸⁻⁵⁰

Anthocyan-Glucoside fand man nach Aufnahme bislang v.a. in unmetabolisierter Form wieder, so dass auf eine direkte Resorption auch schon über den Magen, Blut-Verteilung und Exkretion über den Harn als Glucosid geschlossen werden konnte.⁵¹⁻⁵⁶ Auch in anderen Geweben, wie Leber, Augen oder Gehirn, wurden Anthocyane unmetabolisiert nachgewiesen.^{57, 58} Generell sei angemerkt, dass die Anthocyane in Plasma und Urin in nur sehr geringen Konzentrationen, verglichen mit der aufgenommenen Menge, vertreten sind.^{59, 60}

Nach oraler Aufnahme liegen andere Flavonoide (z.B. Quercetin) im Urin überwiegend in metabolisierter Form als Glucuronsäure- oder Sulfat-Konjugate vor.⁶¹⁻⁶³ Die metabolischen Veränderungen finden dabei hauptsächlich im Dickdarm durch Bakterien und nach Absorption in Leber und Niere statt.⁶⁴⁻⁶⁷ Die wichtigsten Reaktionen der Bakterien sind dabei die Hydrolyse von Konjugaten und Glucosiden sowie die Ringspaltung des Aglykons, wodurch Substanzen wie Benzoesäure, Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyphenyllessigsäuren entstehen, die ihrerseits wiederum absorbiert, metabolisiert und ausgeschieden werden.^{18, 68} In Leber und Niere finden Glucuronidierungs-, Sulfatierungs- und Methylierungsreaktionen statt.^{69, 70}

Für die Anthocyane wurden solche Untersuchungen erst in jüngerer Vergangenheit durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die humane Darmflora in der Lage ist, die Anthocyane bis zum jeweiligen Aglykon abzubauen und danach die Degradation des Aglykons einzuleiten, wobei die jeweils typische Carbonsäure erhalten wurde. Dieser Prozess läuft jedoch nicht vollständig ab. Es bleiben größere Mengen an Anthocyan-Glucosiden erhalten.⁶⁹ Auch die erhaltenen Carbonsäuren wurden ebenfalls humaner Darmflora ausgesetzt, die sie jedoch nicht weiter metabolisierte. Die meisten Studien zum Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Anthocyanen umfassten nur wenige Probanden und in vielen Fällen nur einen Versuchstag.⁷¹⁻⁷⁴

In Humanstudien führte die Verwendung von Blutorangensaft, Erdbeeren, Brombeeren oder Karotten meist nur zur Zufuhr von Cyanidin- bzw. Pelargonidin-Derivaten.^{72, 73, 75} Komplexere Proben, wie Hibiskusextrakt, Heidelbeere oder Aroniaextrakt wurden wesentlich seltener untersucht.^{60, 71, 76} Neben einer Publikation vom Max-Rubner-Institut in Karlsruhe (Bub *et al.*) gab es nur eine weitere Gruppe, die Arbeiten zur Bioverfügbarkeit und dem Metabolismus von Anthocyanen aus Trauben lieferte.⁷⁷⁻⁷⁹

Die Metabolite der Anthocyane in Form von Glucuroniden, Sulfatiden oder methylierten Produkten werden in der Literatur noch kontrovers diskutiert. In einigen Fällen konnten

Glucuronide der Anthocyane detektiert werden.^{78, 80, 81} Bub *et al.* und Kurilich *et al.* beschrieben jedoch keine Metabolite in ihren Arbeiten.^{77, 82} Weiterhin ist es unschlüssig welche weiteren metabolischen Produkte entstehen. Die von einigen Studien bereits gezeigten methylierten^{82, 83} und sulfatierten^{73, 76, 80} Anthocyanmetabolite, können nicht in allen Studien nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass die Struktur des Aglykons bestimmte metabolische Reaktionen ausschließt.⁸⁴ So wurden bisher nur sulfatierte Spezies von Pelargonidin und Cyanidin nachgewiesen.^{73, 76, 80} Kurilich *et al.* konnten jedoch weder sulfatierte noch glucuronidierte Anthocyane nachweisen, obwohl die analytische Methode explizit darauf ausgelegt war.⁸² Etwas spekulativ mutet die Annahme von Kay *et al.* an, dass neben einer Methylierung auch eine Oxidation von Anthocyanen erfolgt. Hierbei würde beispielsweise Cyanidin bis hin zum Malvidin methyliert und oxidiert werden. Diese Hypothese wird allerdings ohne eine gegebene detaillierte Analyse des Saftes aufgestellt, welcher nur Cyanidin-Derivate enthalten soll.^{76, 85}

Die Rolle der möglichen Abbauprodukte in Form von Phenolsäuren ist nach wie vor nicht eindeutig zu beantworten. Vitaglione *et al.* konnten zwar hohe Konzentrationen von 3,4-Dihydroxybenzoesäure (3,4-DHB) in Plasmaproben (492 ± 62 nmol/L) detektieren und wiesen dies als Hauptmetabolit von Cyanidin im Menschen aus. Es wurden jedoch keine Angaben zum Gehalt von 3,4-DHB im Ausgangsprodukt (Saft) gemacht.⁷² Somit ist eine eindeutige Zuordnung zum Abbau von Anthocyanen nicht möglich. In einer ähnlichen Studie wurden weitere Phenolsäuren gefunden, eine direkte Verbindung zu Anthocyanen wurde aber als „spekulativ“ bezeichnet.⁸⁶ Teilweise wurde keine Analytik in Bezug auf diese möglichen Metabolite durchgeführt.^{71, 73} Um hier Klarheit zu schaffen, müsste mit radioaktiv markierten Substanzen gearbeitet werden, um die wirklichen Abbauprodukte zu identifizieren. Dies wurde bereits für das isotoopenmarkierte [^{14}C]Quercetin-4-O-Glucosid durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die angenommene Phenolsäure nachgewiesen werden konnte.⁸⁷⁻⁸⁹ Dies müsste aber ebenfalls für isotoopenmarkierte Anthocyane durchgeführt werden.⁸⁶

In der vorliegenden Arbeit soll in einer Zellkulturstudie, einer Tierstudie und einer Humanstudie ein komplexer Traube-Heidelbeer-Saft, -Smoothie oder Extrakt als Anthocyan-Quelle verwendet werden. Schwerpunktmäßig soll auf direkte Anthocyan-Metabolite, wie Glucuronide, freie Aglyka, methylierte und sulfatierte Spezies geprüft werden. Von besonderem Interesse ist die Fragestellung, ob methylierte oder sulfatierte Produkte von Malvidin oder Peonidin nachgewiesen werden können. Glucuronide und intakte Anthocyan-

Glucoside sollen quantifiziert werden. Ebenfalls sollen mögliche Abbauprodukte der Anthocyane in Form von Phenolsäuren (3,4-DHB, Syringasäure) quantifiziert werden.

2.4 Analysemethoden

Im Folgenden sollen die verwendeten Analysemethoden vorgestellt werden. Um Anthocyane in komplexen Medien qualitativ und quantitativ nachweisen zu können sind verschiedene analytische Methoden erforderlich. Insbesondere die geringe Bioverfügbarkeit und die daraus resultierenden niedrigen Konzentrationen (bis ca. 20 nmol/L) erfordern eine sensitive Analyse. Ein hohes Probenaufkommen ($n > 1000$) und sehr komplizierte Matrices (Plasma, Urin) erfordern zusätzlich ein robustes und dennoch schnelles analytisches System. Die Komplexität der einzelnen Proben erfordert eine vorgeschaltete chromatographische Trennung der Analyten, die über eine Elektrospray Ionisation (ESI) mit dem Massenspektrometer gekoppelt werden kann. Die hier auf Deutsch verwendeten Fachbegriffe wurden aus dem Lehrbuch „Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch“ von Jürgen H. Gross übernommen.⁹⁰

2.4.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Der Begriff Chromatographie geht auf den russischen Botaniker M. Tswett zurück. Er konnte 1901 (veröffentlicht 1903) zeigen, dass sich bei der Elution der Blattfarbstoffe mit Petrolether in einem mit Calciumcarbonat gefüllten Glaszylinder unterschiedliche Farbzonen ausbilden. So konnte er verschiedene Farbstoffe isolieren. Im Jahr 1906 verwendete er für diese Methode erstmals den Begriff Chromatographie.⁹¹

Auf der Grundlage der Arbeiten von Tswett entwickelte sich die Säulenflüssigkeitschromatographie. Eine dieser Entwicklungsstufen ist die HPLC, welche häufig Anwendung in der Bioanalytik findet. Ein Pionier auf dem Gebiet der HPLC war Piel. Er erreichte Mitte der sechziger Jahre, in einem zunächst wenig beachteten Experiment, die Trennung verschiedener Farbstoffe innerhalb weniger Sekunden.⁹² Für dieses Experiment nutzte er eine mit gefälltem Kieselgel (Partikelgröße 12 μm) gefüllte kurze Glaskapillare und einen Druck von 250 bar. In den siebziger Jahren setzten sich dann kleinere Partikelgrößen

auch allgemein durch ($\sim 10 \mu\text{m}$).⁹³ Heute geht der Trend zu noch kleineren Partikelgrößen von weniger als $2 \mu\text{m}$. Ein weiteres Ziel ist die Verringerung der Flussrate und die Auftragung kleinster Probenmengen. Dies ist beispielsweise in Form der nanoHPLC schon gelungen. Man arbeitet hierbei mit Flussraten im Bereich von Nanolitern pro Minute (nL/min) und Probenmengen ebenfalls im Bereich von Nanolitern. Die Entwicklung hin zu noch kleineren Flussraten, einhergehend mit einem noch geringeren Probenvolumen und Lösungsmittelverbrauch, schreitet weiter voran.

In Abhängigkeit von seiner Löslichkeit und dem verwendeten Laufmittel wird der Analyt entweder in einem Puffer oder in einer Mischung aus Wasser und organischen Laufmitteln aufgenommen. Das Laufmittel wird auch als mobile Phase bezeichnet. Die Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase erwirken einen verzögerten Transport der einzelnen Komponenten, so dass die jeweilige enthaltene Substanz eine charakteristische Zeit, die Retentionszeit (RT), zum Verlassen der Trennsäule benötigt. Das Laufmittel (Lösungsmittel), welches die jeweiligen Analyte enthält, wird als Eluat bezeichnet. Bleibt während eines Laufes die Lösungsmittelzusammensetzung unverändert, so spricht man von isokratischen Bedingungen. Ändert sich dagegen die Zusammensetzung der mobilen Phase während eines Laufes, so bezeichnet man dies als Gradiententrennung. Hierbei kann die Laufmittelzusammensetzung schrittweise (Stufengradient) oder kontinuierlich (linearer Gradient) verändert werden.⁹⁴

Eine HPLC-Anlage besteht im einfachsten Fall aus einer Trennsäule, einer Lösungsmittelpumpe, der Probenaufgabeschleife und einem Detektor. Ein solches System kann noch durch einen automatischen Probenaufgeber, eine Vorsäule und beispielsweise einen Fraktionensammler erweitert werden.

Das Herzstück einer solchen Anlage ist die Trennsäule. Diese besteht aus einer zylindrischen Röhre, die mit einem Füllmaterial (stationäre Phase) gepackt wird. Je nach verwendeter stationärer Phase unterscheidet man die Normalphasen-HPLC (polare stationäre Phase, wie beispielsweise Silicagel) und die Umkehrphasen-HPLC (unpolare stationäre Phasen, z.B C18, ein Silicagel mit C₁₈-Ketten, als funktionelle Gruppen). Die Bezeichnungen rühren aus der Anfangszeit der Säulenflüssigkeitschromatographie, da nur polare stationäre Phasen bekannt waren und diese somit als „normal“ definiert wurden.

Bei porösen stationären Phasen steht den Analytmolekülen, sofern diese kleiner sind als die Partikelporen, neben der äußeren Oberfläche auch die innere Partikeloberfläche für

Wechselwirkungen zur Verfügung. Nicht-poröse stationäre Phasen kann man hingegen in kleineren Partikeldurchmessern herstellen, was einen Vorteil darstellt. Durch die kleineren Partikel wird die Auflösung verbessert, da die Analytione einen „kürzeren“ Weg um die Partikel der stationären Phase zurücklegen müssen. Partikelgröße ($< 2\text{-}100\ \mu\text{m}$) und Porengröße ($10\text{-}100\ \text{nm}$) werden heute in modernen stationären Phasen angewendet. Weiterhin muss auch die physikalische Stabilität berücksichtigt werden, da diese beim Einsatz von hohen Drücken eine wichtige Rolle spielt.⁹⁵

Als Laufmittel stehen eine große Zahl von Lösungsmitteln zur Verfügung. Die Elutrope Reihe stellt eine Liste der häufig verwendeten Lösungsmittel dar, in dieser sind die Lösungsmittel entsprechend ihrer Polarität geordnet.⁹⁴ Neben vielen anderen sind dort als gängigste Laufmittel unter anderem Wasser, Methanol oder Acetonitril verzeichnet.

Mit Einführung von funktionellen Gruppen in die stationäre Phase wird deren chromatographischer Trennmodus festgelegt. Die Funktionalisierung der Ausgangsmaterialien erfolgt durch chemische Umsetzung der freien Hydroxylgruppen, die sich an der Oberfläche des Füllmaterials befinden, beispielsweise mit unpolaren Kohlenwasserstoffketten. Für die Umkehrphasen-Chromatographie werden solche stationären Phasen mit hydrophoben Eigenschaften verwendet. Säulenfüllmaterialien für Ionenaustauscher werden mit geladenen Seitenketten funktionalisiert.^{94, 95}

Ein weiterer Schritt in der Entwicklung stellen die Ultra-Hochdruck-Flüssigchromatographen (UHPLC) dar. Sie erlauben mittels neuer Pumpentechnologie sowohl im nL als auch bis μL oder mL-Bereich Drücke von 600-1000 bar zu betreiben. Ein solches System kann die Dauer einzelner Messungen sehr stark minimieren. Zhang *et al.* beschreiben, dass eine Reduzierung der Messzeit um den Faktor 10 bei Einsatz eines UHPLC-Systems möglich ist.⁹⁶

Zur Detektion wird häufig ein UV-Detektor eingesetzt, hierfür werden bestimmte Wellenlängenbereiche verwendet, die ein charakteristisches Absorptionsmaximum des Analyten einschließen. Im Falle der Anthocyane liegt dies bei einer Wellenlänge von 520 nm und für die Abbauprodukte in Form von Syringasäure oder 3,4-DHB bei 320 nm.

Eine weitere Möglichkeit der Detektion, die in dieser Arbeit ebenfalls verwendet wird, ist die Kopplung des flüssigchromatographischen Systems mit einem Massenspektrometer via Elektrospray-Ionisation.

2.4.2 Elektrosprayionisierung

Für die Kopplung von HPLC und MS hat sich die Elektrospray-Ionisation (ESI) seit mehreren Jahrzehnten bewährt. Der Analyt wird kontinuierlich durch eine leitfähige Kapillare zugeführt. Dieser wird durchdrungen von einem anliegenden elektrischen Feld. Hierdurch kommt es zu einer Auftrennung der Ionen, ähnlich der Elektrophorese. Liegt äußerlich eine positive Spannung an, so werden negativ geladene Ionen an die Kapillaroberfläche, die positiv geladenen Ionen zur Flüssigkeitsmitte gezogen. Durch den Zug der an der Oberfläche akkumulierten positiv geladenen Ionen in Richtung einer in der Nähe befindlichen Gegenkathode (Einlass Massenspektrometer) wird der Flüssigkeitsmeniskus zu einem Konus deformiert.⁹⁰ Dieser Konus wurde von Zeleny⁹⁷ entdeckt und von Taylor⁹⁸ erstmals theoretisch beschrieben. Der sog. *Taylor-Konus* emittiert bei hohem elektrischem Feld, wenn die Oberflächenspannung durch die elektrostatischen Kräfte überwunden ist, von seiner Spitze aus einen kontinuierlichen, filamentartigen Flüssigkeitsstrom mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern.⁹⁹ Der Strahl entsteht am Punkt der höchsten Ladungsdichte und trägt in obigem Beispiel einen großen Überschuss an positiven Ionen.¹⁰⁰ In einer Entfernung von wenigen Nanometern von der Anode (Glaskapillare) wird dieser aber instabil und zerfällt in winzige aneinander gereihte Tröpfchen, die aufgrund von Coulomb-Abstoßung rasch auseinanderdriften.¹⁰¹ Dieser Prozess führt in Summe zu einem sehr feinen Spray.

Durch Verdunsten des Lösungsmittels reichert sich die Tröpfchenoberfläche nun zusehends mit positiven Ladungen an, welche keine Gegenionen mehr besitzen. Die Tröpfchen verkleinern sich durch kontinuierliches Desolvatisieren der Lösungsmittelmoleküle bei konstanter Ladung. Dies geschieht solange bis das so genannte *Rayleigh-Limit* überschritten ist und die Coulomb-Kräfte nicht mehr durch die Oberflächenspannung ausgeglichen werden können. Danach zerfallen die Tröpfchen in viele kleine Tröpfchen mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern. Dieser Vorgang wird als *Coulomb-Explosion* bezeichnet. Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass die Mikrotröpfchen nicht explodieren, sondern aus ihrem verjüngten Ende eine Reihe von noch kleineren Tröpfchen abstoßen. Diese Erkenntnisse wurden mithilfe der Blitzlicht-Mikrofotografie gewonnen, die zeigt, dass die Tröpfchen nicht vollkommen sphärisch geformt sind. Hierdurch ist ebenfalls die Ladung nicht homogen verteilt. Die kleinen Ableger der Tropfen tragen ihrerseits nur 1-2% der Masse, jedoch 10-18% der Ladung des Vorläufertröpfchens. Der Mechanismus findet bei Atmosphärendruck

statt und die letztlich desolvatisierten Ionen können nun durch ein Einlaßsystem in das Vakuumsystem des Massenspektrometers gelangen.^{102, 103}

Eine weitere relativ neue Theorie beschreibt die Freisetzung von Ionen aus geladenen Tröpfchen. Hierbei wird die Bildung von desolvatisierten Ionen durch direkte Verdampfung von der Oberfläche hochgeladener Mikrotröpfchen angenommen.

Bei der Elektrospray-Ionisation handelt es sich um eine der sanftesten Ionisierungsmethoden, die auch große Analytmoleküle von mehr als 100 kDa unzersetzt in die Gasphase überführen kann und diese zugänglich für massenspektrometrische Untersuchungen macht. Für Biomoleküle ist die Methode hervorragend geeignet, da andere Ionisierungsverfahren diese häufig zersetzen.¹⁰⁴ Im Falle der Anthocyane erhält man, aufgrund ihrer bereits vorhandenen Ladung $[M]^+$ -Ionen.

2.4.3 Hochauflösende FT-Massenspektrometer

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Massenspektrometer mit hohem Auflösungsvermögen und akkurater Massendetektion verwendet. Die komplexen biologischen Proben und hohe Mengen, sich in der Molekularmasse nur marginal unterscheidender Verbindungen, machten diesen Schritt notwendig. Die Massengenauigkeit ist in dieser Arbeit angegeben als *relative Massengenauigkeit*, welche nach Formel 2-1 definiert ist. Durch Multiplikation mit dem Faktor 10^6 kann die Massengenauigkeit in *parts per million* (ppm) angegeben werden.⁹⁰

Formel 2-1

$$\delta m/m = (m/z_{\text{experimentell}} - m/z_{\text{berechnet}}) / (m/z_{\text{berechnet}})$$

Analog zu Zubarev *et al.* soll im Folgenden für die Akkuratessse eines einzelnen Massensignals der Begriff Massenabweichung und der Begriff Massengenauigkeit für die Beschreibung eines Geräts oder mehrerer Messungen verwendet werden.¹⁰⁵

2.4.3.1 Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS)

Das Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS) erlaubt die Aufnahme von Massenspektren mit ultrahohem Auflösungsvermögen ($R = 10^5-10^6$)^{106, 107} und höchster Massengenauigkeit ($\Delta m = 10^{-4}-10^{-3}u$).^{108, 109} Im Gegensatz zu einem Ionenfallenmassenspektrometer, bei welchem Ionen sequentiell aus der Falle geschleust und dann detektiert werden, sind hier Massenselektion und –detektion nicht räumlich voneinander getrennt. In der FT-ICR-Zelle werden die Ionen über Bestimmung des Radiofrequenzspektrums simultan detektiert.

Die FT-ICR-Zelle besteht aus mehreren Elektroden: Anregungsplatten und Detektionsplatten, sowie zwei Endkappen. Häufig ist die Zelle zylindrisch geformt und dabei längs in vier Segmente unterteilt, verschlossen wird die Zelle von zwei Endkappen. Eine ebenfalls häufig verwendete Bauweise ist die kubische Form, deren Flächen elektrisch voneinander isoliert sind. Eine der als Endkappen fungierenden Platten besitzt ein zentrales Loch, welches als Ioneneinlass dient (siehe Abbildung 2-4).^{110, 111}

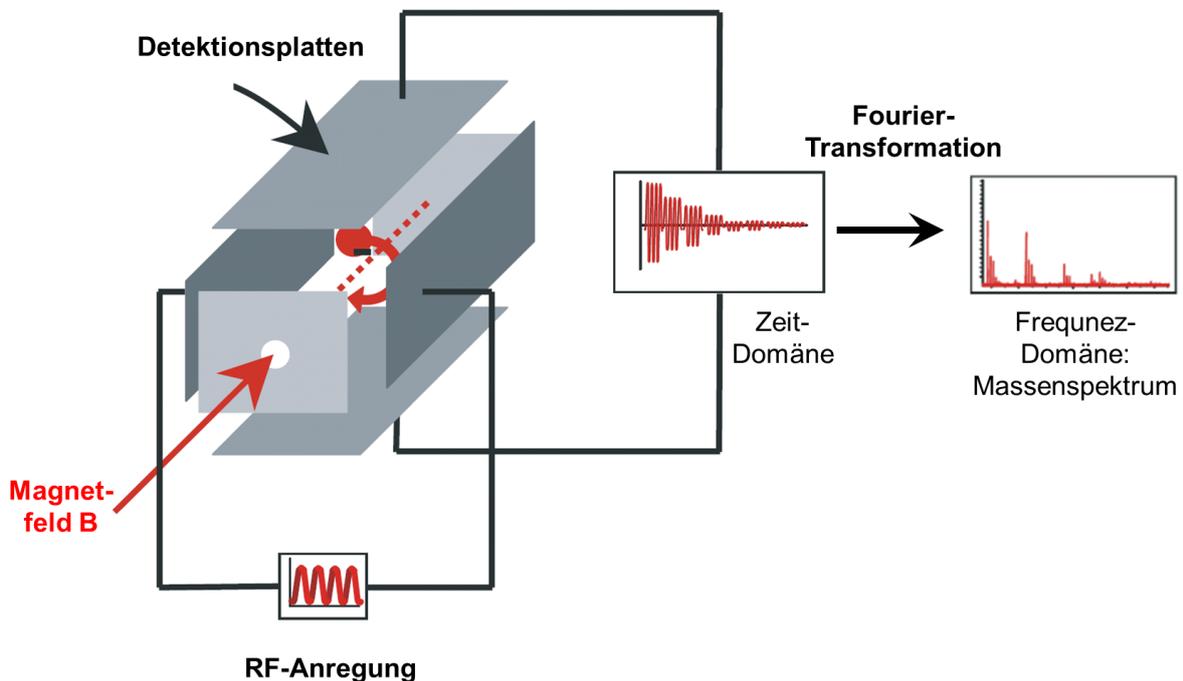


Abbildung 2-4: Schema der Messzelle eines FT-ICR-Massenspektrometers (verändert nach Thieu, Dissertaion)¹¹²

Die Endkappen sind mit einem elektrischen Potential belegt, welches dieselbe Polarität wie die Ionen besitzt, so gelangen diese in eine zentrale Potentialmulde, die ihre Bewegung in

axialer Richtung einschränkt. Weiterhin herrscht ein homogenes Magnetfeld in der Zelle, welches parallel zur Einflugrichtung der Ionen steht und sie auf eine senkrecht zu den Magnetfeldlinien stehende Kreisbahn zwingt. Die Bewegung der Ionen wird in die Zyklotronbewegung, die Magnetronbewegung und die Trappingbewegung untergliedert. Für die Aufnahme der Massenspektren kann jedoch nur die Zyklotronbewegung angewendet werden, da nur sie von der Masse der Ionen abhängig ist. Die Zyklotronbewegung beschreibt eine Kreisbewegung um die Magnetfeldlinien, deren Frequenz f_c durch Formel 2-2 beschrieben werden kann. Hieraus ist abzulesen, dass die Zyklotronfrequenz bei konstanter magnetischer Flußdichte nur noch vom m/z -Verhältnis der Ionen abhängig ist. Da Frequenzen unter allen physikalischen Größen mit der höchsten Genauigkeit messbar sind, bietet die Zyklotronfrequenz eine ideale Voraussetzung für eine leistungsstarke m/z -Analyse.

Formel 2-2

$$f_c = \frac{zB}{2\pi m}$$

B = magnetische Flussdichte

z = Ladungszahl

m = Masse

Die Kreisbewegung der Ionen ist im Vergleich zur Größe der ICR-Zelle gering. Zur Detektion wird ein kurzer Wechselstromimpuls an den Anregungsplatten angelegt, der die Ionen auf eine größere Kreisbahn bringt. Der Radius der Kreisbewegung von Ionen, die mit der Frequenz des Impulses in Resonanz stehen, wird durch Energieaufnahme vergrößert. Die weiteren Ionen verbleiben auf der Kreisbahn im Zentrum der Zelle. Nach Beendigung des Impulses bleiben die Ionen noch einige Zeit auf der größeren Kreisbahn und induzieren einen sogenannten Bildstrom auf den Empfängerplatten, welcher von der Anzahl der angeregten Ionen abhängt. Die Frequenz dieses Stromes ist charakteristisch für das jeweilige m/z -Verhältnis der angeregten Ionen. In der Praxis wird häufig ein linear anwachsender Hochfrequenzpuls verwendet, der alle Ionen gleichzeitig anregt. Die gebündelten Ionenpakete erzeugen so ein harmonisches Signal in einem Spektrum der Zeitdomäne, welches die Zyklotronbewegung der unterschiedlichen Ionen widerspiegelt und mittels Fouriertransformation in ein Frequenzspektrum transformiert wird.⁹⁰ Um eine Überladung der Zelle bei hohem Probenfluss und damit eine zu hohe Ionendichte zu vermeiden, kann über eine *automatische Verstärkungsregelung* oder *automatische Beladungsregelung* (*automated gain*

control, AGC) mittels eines Vorscans die Befülldauer geregelt werden.^{113, 114} Eine zu hohe Ionendichte geht mit einem Raumladungseffekt einher, der die Massengenauigkeit der Messung beeinflusst.¹¹⁵ Umgekehrt kann durch eine längere Befülldauer auch eine höhere Empfindlichkeit bei sehr niedriger Ionenintensität gewährleistet werden.

Das Auflösungsvermögen und die Scangeschwindigkeit des FT-ICR-MS nehmen linear mit der Feldstärke des Magnetfeldes zu. Durch einen supraleitenden Magneten werden üblicherweise eine Feldstärke von 7 Tesla bis 9,4 Tesla erzeugt. Weiterhin benötigt das Gerät in der ICR-Zelle ein Vakuum von ca. 10^{-10} mbar, um möglichst lange freie Weglängen zu garantieren.⁹⁰

Neben den hohen Betriebs- und Anschaffungskosten liegen im Vergleich zu anderen herkömmlichen Massenspektrometern einige Vorteile klar offen. Somit ist die Ionendetektion nicht destruktiv. Die Ionen können so mehrere Sekunden in der Falle gehalten werden. Dies bedingt die hohe Massenauflösung und Massengenauigkeit. Ein weiterer wichtiger Unterschied zu anderen Massenspektrometern ist, dass die Massendetektion nicht von der Energie der Ionen abhängt. Durch externe Kalibration, kann das Gerät stabil über einen längeren Zeitraum Massengenauigkeiten von < 1 ppm erreichen, durch interne Kalibration, sogar noch deutlich darunter bleiben.⁹⁰

Weiterhin sind die Ionen für MS^n -Experimente verfügbar. Eine Fragmentierung kann allerdings in der FT-ICR-Zelle nicht durchgeführt werden. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten LTQ FT-ICR-MS (*Thermo Fisher Scientific*) erfolgt die Fragmentierung in einer vorgeschalteten LTQ (*linear trap quadrupole*) mittels *stoßinduzierter Dissoziation (collision-induced dissociation, CID)*.^{116, 117} Die Fragmentierung erfolgt durch Kollision des Ionenstrahls mit einem inerten Stoßgas (N_2 , He, Ar), welches über ein Nadelventil eingeleitet wird.

2.4.3.2 Orbitalfallen-Massenanalysator

Der Orbitalfallen-Massenanalysator stellt eine Ionenfalle dar, jedoch werden weder eine Frequenzanregung, noch ein Magnet benötigt, um die Ionen innerhalb der Ionenfalle zu halten. Die 1923 von Kingdon konzipierte Ionenfalle bestand aus einem geraden Draht entlang einer Achse einer ihn umgebenden zylindrischen Elektrode. Ionen, die sich dem Draht, an welchem ein anziehendes Potential anliegt, tangential nähern, treffen nicht auf diesen auf, sondern werden in eine Rotationsbewegung um den Draht gezwungen. Die Ionen

werden durch ein elektrostatisches Feld festgehalten.^{90, 118} Die elektrostatische Anziehung in Richtung der zentralen Elektrode (Draht) wird durch die Zentrifugalkraft kompensiert, die von der anfänglichen Tangentialgeschwindigkeit der Ionen herrührt. Die Ionen zeigen also ähnliches Verhalten wie Satelliten auf ihrer Umlaufbahn.¹¹⁹ Knight entwickelte die sogenannte ideale Kingdon-Falle mit einem in der Mitte großen und nach außen kleiner werdenden Radius der äußeren Elektrode. Die Falle erlaubte eine Ionenspeicherung und einen Auswurf auf einen Detektor, jedoch war keine m/z -Analyse möglich.^{120, 121}

Die Bildstromdetektion der Rotationsfrequenzen der Ionen zur Massenbestimmung zu nutzen hatte den Nachteil, dass sich diese Frequenzen aufgrund der Ioneneintrittsgeschwindigkeit in die Falle nur schlecht definieren ließen.¹²² Makarov hingegen machte sich die periodische Vorwärts- und Rückwärtsbewegung der Ionen entlang der zentralen Elektrode zunutze.¹²³ Die Voraussetzung hierfür ist ein exakt definiertes Feld, das aus einem Quadrupolfeld der Ionenfalle und dem logarithmischen Feld eines in zwei Hälften geteilten zylindrischen Kondensators besteht. Sie ist also als eine nach Knight verfeinerte Kingdon-Falle zu betrachten und verfügt über eine spindelförmige Zentralelektrode und eine zylindrige zweiteilige äußere Elektrode.^{90, 121}

Die Frequenz der harmonischen axialen Schwingung verhält sich umgekehrt proportional zur Quadratwurzel des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses der Ionen (siehe Formel 2-3).^{123, 124, 115}

Formel 2-3

$$\omega_z = \sqrt{k \left(\frac{q}{m_i} \right)}$$

ω = Frequenz

k = Konstante (instrumentabhängig)

m_i = Masse Ion

q = Ladung

Die Frequenz ω_z , der harmonischen axialen Schwingung, lässt sich durch Bildstromdetektion mithilfe eines Differenzialverstärkers bestimmen, der mit den beiden Hälften der äußeren Elektrode verbunden ist; für jeden m/z -Wert wird eine Sinuswelle erzeugt. Analog zur FT-ICR wird der Bildstrom aufgezeichnet, gespeichert und mittels schneller Fourier-Transformation in ein Signal der Frequenzdomäne umgewandelt. Dies läßt eine exakte Bestimmung des Messwertes für m/z zu.^{119, 125} Im Gegensatz zur FT-ICR kommt die

Orbitalfalle ohne Anregung vor der Detektion aus. Stattdessen induziert der elektrische Feldgradient die axiale Schwingung, wenn die Ionen tangential, aber dezentral bezüglich der Spiegelebene eingeschossen werden. Alle Ionen haben dieselbe Amplitude, während sich die Frequenz der Axialbewegung nach ihrem m/z -Wert richtet.

Der Einschuss der Ionen in die Orbitalfalle ist ein wesentlicher Aspekt, um einen solchen Analysator zu betreiben. Verschiedene Grundvoraussetzungen, wie etwa Injektionswinkel, Ausbreitungswinkel und Position, aber auch die Dosierung der Ionen sind hierbei zu beachten. Das Ultrahochvakuum (ca. 10^{-10} mbar) ist erforderlich, um die mittlere freie Weglänge für zehntausend bis hunderttausend von ungehinderten Umrundungen der Zentralelektrode zu gewährleisten. Durch die Verwendung eines vorgeschalteten gekrümmten Radiofrequenz-Quadrupols (C-Falle) ist die Akkumulation und Thermalisierung der Ionen vor dem Einschuss in die Orbitalfalle gewährleistet. Durch die Verwendung von Stickstoff können die Ionen in der Mitte der C-Falle gesammelt werden und kommen regelrecht „zur Ruhe“. Die C-Falle entkoppelt damit die Orbitalfalle von der Ionenerzeugung, der Desolvatation und schließlich von der Selektion der Vorläufer-Ionen.^{90, 125}

Um ein Massenspektrometer für die Analyse brauchbar zu machen, muss die oben beschriebene Gerätekombination noch mit einer Ionenquelle verbunden werden. Daneben kann dem Gerät, um ein Höchstmaß an Vielseitigkeit zu gewährleisten, eine voll funktionsfähige lineare Ionenfalle vorgeschaltet werden. Eine solche Kombination wurde in dieser Arbeit verwendet. Das Instrument trägt den Namen LTQ-Orbitrap (*Thermo Fisher Scientific*). Eine solche Komposition ermöglicht einerseits im LTQ-Abschnitt niedrigauflösende Massenspektrometrie und MS^n -Experimente, andererseits hochauflösende m/z -Analysen der eingeschossenen Ionen und Fragmentionen (nach CID in der LTQ) in der Orbitalfalle im ppm-Bereich.^{90, 119, 125-128}

Die Fragmentierung ist bei einer LTQ-Orbitrap nicht nur in der LTQ via CID möglich, sondern ebenfalls nach Überführen der Ionen in einem separaten Oktopol. Dies wird vom Hersteller als *Higher-Energy Collisional Dissociation* (HCD) bezeichnet.¹²⁹ Mit dieser Oktopol-Stoßzelle lassen sich Ionen über einen breiten m/z -Bereich einfangen und wieder in die C-Falle transferieren, dort werden sie thermalisiert und zur abschließenden m/z -Analyse in die Orbitalfalle überführt.^{90, 129}

Neben der LTQ-Orbitrap wurden in dieser Arbeit noch zwei weitere Massenspektrometer mit Orbitalfallen-Analysator verwendet. Das als Exactive (*Thermo Fisher Scientific*) auf dem

Markt gebrachte Instrument besteht lediglich aus einer Ionenquelle und einem Orbitalfallen-Analysator mit C-Falle und Stoßzelle. Die Ionen werden nach dem Einlaß in das Massenspektrometer direkt zur C-Falle überführt und von dort gelangen sie in die Orbitalfalle. Die Fragmentierung via HCD ist hier ebenfalls möglich. Jedoch resultiert dies in der sogenannten „all ion fragmentation“ (AIF), hier werden Ionen des gesamten detektierten Massenbereichs fragmentiert und hiernach alle daraus entstehenden Fragmentionen hochaufgelöst akkurat vermessen. Ein MS/MS-Experiment mit vorheriger Isolierung des interessierenden Ions vor der Fragmentierung ist so nicht möglich.

Um eine vorherige Massenselektion durchzuführen wurde ein sogenanntes Q Exactive Massenspektrometer verwendet. Zusätzlich zur Exactive ist die Q Exactive mit einem effektiven Quadrupol ausgestattet, welcher hier als Massenfilter benutzt wird. Hierdurch werden MS/MS-Experimente ermöglicht (siehe Abbildung 2-5).

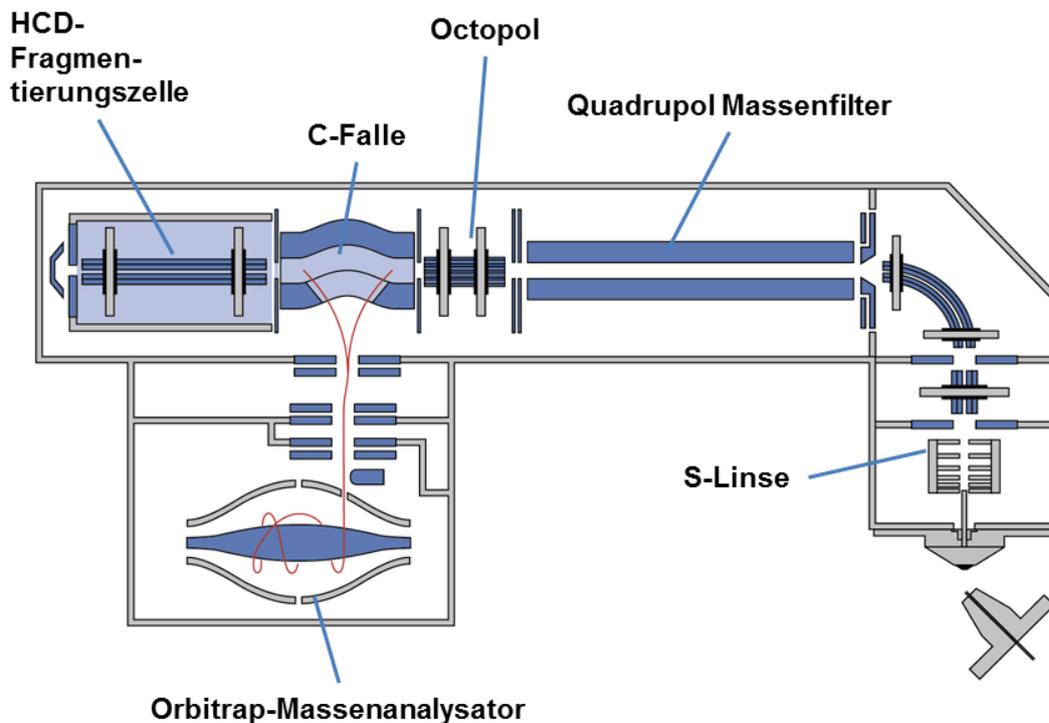


Abbildung 2-5: Schema eines Q Exactive™ Orbitrap Massenspektrometers¹⁸⁶

Die Betriebskosten solcher Instrumente sind wesentlich geringer, als bei FT-ICR-Massenspektrometern, da kein supraleitender Magnet mit flüssigem Helium und Stickstoff gekühlt werden muss.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben einem LTQ FT-ICR-MS, wie in Kapitel 2.4.3.1 beschrieben, drei Orbitalfallen-basierte Massenspektrometer verwendet. Die LTQ Orbitrap

Discovery (*Thermo Fisher Scientific*) verfügt wie das LTQ FT-ICR-MS über eine vorgeschaltete lineare Ionenfalle und ermöglicht so hochaufgelöste MSⁿ-Experimente. Mit dem Exactive Orbitrap Massenspektrometer konnte in einer Messung kontinuierlich zwischen dem positiven und negativen Ionenmodus geschaltet werden und zusätzlich AIF-Experimente durchgeführt werden. Das Q Exactive Instrument erlaubte zusätzlich die vorherige effektive Isolierung von Molekülen vor der Fragmentierung via HCD.

2.5 Analytik der Anthocyane

Die geringe Bioverfügbarkeit der Anthocyane verlangt eine dezidierte Probenvorbereitung, welche in den meisten Fällen mit einer Festphasenextraktion zur Aufkonzentrierung und Isolierung einhergeht. In der Literatur werden die verwendeten Methoden zum Teil nur ungenügend charakterisiert und teils missverständlich beschrieben. So ist beispielsweise der Faktor der Aufkonzentrierung der Festphasenextraktion nicht nachvollziehbar oder die genaue Behandlung der Proben vor der Messung, z.B. Kurilich *et al.* 2005.⁸²

Die Verwendung von LC-UV-Messungen zur Identifizierung ist sehr weitverbreitet.^{60, 72, 76, 130}

Über die Verschiebung von Absorptionsmaxima können Hinweise auf Metabolite, wie Glucuronide oder die Anwesenheit von acylierten Zuckerkomponenten sowie mehrerer Zuckerkomponenten, erhalten werden.^{131, 132} Eine tatsächliche Identifizierung ist letztlich aber nur über Standardverbindungen möglich. Aber auch nur dann, wenn die Trennung optimal verläuft, was für komplexe Gemische mit vielen analogen Verbindungen nahezu nicht möglich ist.¹³³ Standardverbindungen sind für viele in der Natur vorkommenden Anthocyane und deren Metabolite allerdings nicht verfügbar. In der Flüssigchromatographie kann für die Anthocyane eine charakteristische Elutionsreihe beobachtet werden. Zunächst werden Diglucoside, danach die Monoglucoside und zuletzt die freien Aglyka, sowie acylierte Verbindungen beobachtet. Mit optimierten HPLC-Systemen können auch die Elemente der einzelnen Gruppen getrennt werden, wobei die Elution durch die Substitution des B-Rings bestimmt wird.¹³⁴ Innerhalb jeder Gruppe eluieren zunächst die Anthocyane, die keine Methoxygruppen tragen: Delphinidin zuerst, gefolgt von Cyanidin und Pelargonidin. Anschließend eluieren die mit jeweils einer Methoxygruppe substituierten Anthocyane Petunidin und Peonidin. Den Abschluss jeder Gruppe bildet das mit zwei Methoxygruppen substituierte Malvidin.

Eine universelle und sensitivere Methode stellt hier die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie dar. Vielfach wurde diese Kombination schon zur Analyse von Anthocyanen angewendet.^{71, 75, 80, 135, 136} Die Identifizierung erfolgt hier meist über ein MS/MS-Experiment in Form des *Selected Reaction Monitoring* (SRM) oder *Multiple Reaction Monitoring* (MRM, in einem Zyklus werden zwei oder mehr Fragmentierungen erfasst) in beiden Fällen muss vor der Analyse die Vorläuferverbindung und deren Fragment bekannt sein,^{75, 137, 138} wobei die Fragmentierung der Anthocyane ausgenutzt wird, die jeweils durch Abspaltung einer oder mehrerer Zuckerkomponenten, oder des acylierten Substituenten das Aglykon produziert. So können Verbindungen mit gleicher nomineller Masse, aber unterschiedlichem Aglykon differenziert werden.^{139, 140} Jedoch werden in diesen Studien keine hochauflösenden, akkuraten Techniken der Massenspektrometrie verwendet. Daher sind die detektierten Massen eines Massenspektrums nicht immer eindeutig zuzuweisen. Insbesondere hochkomplexe Flüssigkeiten, wie Urin oder Plasma, aber auch Traubenextrakte enthalten möglicherweise viele isomere Verbindungen, die es zu unterscheiden gilt. Eine Differenzierung oder auch Identifizierung ist etwa über die charakteristischen Fragmente des Aglykons möglich. Oliveira et al lieferten charakteristische Fragmentierungsspektren von verschiedenen Anthocyanen, allerdings mit niedrigauflösenden Massenspektrometern und schlugen verschiedene Fragmentierungsmechanismen für diese vor.¹⁴¹ Barnes et al. stellten eine Studie zur Fragmentierung von Cyanidin und Pelargonidin vor, welche mit höherer Massengenauigkeit arbeitete als Oliveira. Die Massenabweichung einzelner Signale lag aber immer noch bei bis zu 70 ppm, was nicht immer eine eindeutige Zuordnung der Fragmentationen zulässt. Weiterhin waren in dieser Studie keine Anthocyane mit Methoxygruppen (z.B. Malvidin und Peonidin) enthalten.¹⁴²

In anderen bioanalytischen Anwendungsgebieten nimmt die Verwendung von hochauflösenden Massenspektrometern stetig zu. Dies gilt zum Beispiel für die Proteinanalytik.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Moderne Massenspektrometer erlauben eine hochgenaue Bestimmung der Molekülmasse, bei gleichzeitiger hochempfindlicher Detektion der Fragmentationen. Diese Informationen sind für die strukturelle Aufklärung der Analyten von entscheidender Bedeutung. In lediglich einer Studie wurde hochauflösende Massenspektrometrie zur Analyse von Anthocyanen eingesetzt.⁵⁷ Hier wurden allerdings keine Metabolite beschrieben und auch die Identifizierung mittels Fragmentierung wurde nicht durchgeführt.

Die Vorteile der hochauflösenden Massenspektrometrie (HR-MS, *High Resolution Mass Spectrometry*) zur Analyse komplexer Proben wurden in den letzten Jahren für mehrere Anwendungsgebiete gezeigt. Im Bereich der Umweltchemie und Lebensmittelanalytik wurden in jüngerer Vergangenheit mehrere Methoden mit Orbitalfallen-Massenanalytoren (Exactive) publiziert. So können full scan Massenspektren zur Identifizierung, Quantifizierung und retrospektiven Identifizierung herangezogen werden.^{146, 147} Ebenfalls wurden für die Quantifizierung und Identifizierung von Pestiziden Kombinationen aus UHPLC (Ultra Hochdruck Flüssigkeitschromatographie) und HR-MS verwendet. Des Weiteren wurde zur Identifizierung die AIF erfolgreich im Bereich Pestizidanalytik eingesetzt.¹⁴⁶ Im Bereich der Allergenforschung konnten mittels solcher Systeme Proteine mit allergischem Potential identifiziert werden.¹⁴⁸ Auch auf anderen Feldern wird die HR-MS ebenfalls erfolgreich eingesetzt, so können auch im Bereich Doping, klinische und forensische Toxikologie diese Trends aufgezeigt werden.^{147, 149}

3. Methodenentwicklung

Durch die geringe Bioverfügbarkeit der Anthocyane in Blut und Urin war eine Extrahierung, verbunden mit einer Isolierung durch eine Festphasenextraktion notwendig. Die komplexen Medien erforderten eine chromatographische Auftrennung mit anschließender massenspektrometrischer Detektion. Aufgrund der Komplexität wurden hier hochauflösende akkurate Massenspektrometer verwendet, welche auch eine sehr sensitive Analyse gewährleisten. Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien zur Durchführung der Extraktion sind im Anhang in Tabelle A-1 und Tabelle A-2 aufgeführt. Die verwendeten Geräte, Flüssigchromatographen und Massenspektrometer sind im Anhang in den Abschnitten A.1.2, A.1.3 und A.1.4 aufgelistet.

3.1 Probenextraktion

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Bioverfügbarkeit der Anthocyane äußerst gering ist. Nur kleinste Mengen werden in Blut und Urin detektiert. Absorbierte Mengen der Anthocyane liegen im unteren nanomolaren Bereich, daher waren eine Aufkonzentrierung aber auch eine Aufreinigung unerlässlich, um verlässliche Daten aus den verschiedenen hochkomplexen Matrices, wie Urin und Plasma, zu generieren. Weiterhin war eine Isolierung der Anthocyane aus Darminhalt- oder Fäzesproben nötig, die aus der Tierstudie zur Verfügung standen. Hier sollten größere Mengen an Verunreinigungen von den Analysegeräten ferngehalten werden. Dazu wurden verschiedene Prozeduren aus der Literatur übernommen, weiterentwickelt und an die hier eingesetzten Proben adaptiert.^{69, 150, 151}

3.1.1 Flüssigextraktion

Eine Flüssigextraktion war für Darminhalt- und Fäzesproben der Tierstudie notwendig. Die Durchführung orientierte sich an der Dissertation von Dr. Susanne Skrbek (Max-Rubner-Institut, Karlsruhe) und soll im Folgenden beschrieben werden.⁶⁹ Ein deutlicher Unterschied zur Durchführung in der Arbeit von Skrbek ist der Einsatz von Pelargonidin-3-rutinosid (Pel-3-rut) als interner Standard, da der von ihr eingesetzte Standard (Cyanidin-3,5-diglucosid, Cy-3,5-dglc) ein Bestandteil des den Ratten gegebenen Saftes darstellte.

3.1.1.1 Darminhalt

Nach der Sektion wurden den Tieren jeweils drei Abschnitte des Darms entnommen, deren Inhalte gesammelt und sofort bei -80°C tiefgefroren. Die Abschnitte beliefen sich auf Teile des Dün- und Dickdarms: Ileum, Caecum und Colon. Ein Aliquot der aufgetauten und homogenisierten Proben der einzelnen Darminhalte wurde mit $50\ \mu\text{L}$ Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert. Mit $500\ \mu\text{L}$ einer 50%igen wässrigen Lösung aus Methanol und $500\ \mu\text{L}$ Ameisensäure (FA) wurde die Darminhaltprobe für 20 Minuten in einem mit Eis gekühlten Ultraschallbad extrahiert. Die Lösung wurde zentrifugiert. Es zeigten sich nun drei Phasen, die aus dem Bodensatz, einer darüberstehenden durch Anthocyane violett gefärbten Flüssigkeit und obenauf einer Fettschicht aus der Spezialnahrung der Tiere bestanden. Die Flüssigkeit wurde mittels einer sehr dünnen Mikropipette sehr langsam aufgenommen, um die Entnahme von Fett aus der Spezialnahrung der Ratten zu vermeiden. Anschließend wurde die Extraktion erneut durchgeführt. Die Überstände wurden vereinigt und nach Zugabe der internen Standards Pel-3-rut für den positiven Ionenmodus und 2-Chlor-5-Nitro-Benzoesäure (2-Cl-5-Nitro-B) für den negativen Ionenmodus, im Stickstoffstrom eingengt. Die Rücklösung erfolgte hier mit $100\ \mu\text{L}$ einer 5%igen wässrigen TFA-Lösung. Vor der Messung wurde die Probe jeweils 8 Minuten im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert.

3.1.1.2 Fäzes

Die Fäzesproben wurden über 24 Stunden in einem Stoffwechselkäfig am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe gesammelt und tief gefroren. Die gesamte Menge der jeweiligen Probe wurde in einem Mörser in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Ein Aliquot der Homogenate wurde mit $1\ \text{mL}$ Methanol, $500\ \mu\text{L}$ einer 50%igen wässrigen Methanollösung und $1\ \text{mL}$ $10\ \text{M}$ Salzsäure versetzt, anschließend wurde für 45 Minuten im Ultraschallbad unter Eiskühlung extrahiert. Die Lösung wurde zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Diese Prozedur wurde noch mindestens einmal, bei starker Färbung durch noch enthaltene Anthocyane erneut wiederholt. Im Anschluss wurde die organische Phase der vereinigten Überstände im Stickstoffstrom eingengt und eine Festphasenextraktion der wässrigen Phase zur Eliminierung von Partikeln, wie weiter unten beschrieben, durchgeführt. Der wässrige Rückstand war noch zu einem erheblichen Teil mit Pflanzenteilen und Fett aus der Nahrung

der Tiere verunreinigt. Dies konnte auch mittels Pipettieren nicht entfernt werden. Es wurden für diesen Schritt Strata X Kartuschen (100 mg, 6 mL, Phenomenex) verwendet. Die Kartuschen wurden zunächst mit 4 mL Methanol und hiernach mit 4mL 10%iger wässriger Ameisensäure konditioniert. Anschließend wurde die komplette Probe (1,25-2,5mL) appliziert und abschließend die Kartusche mit 2 mL destilliertem Wasser gewaschen. Nachdem die Kartusche trocken gezogen war, wurde mit 4 mL 10%iger methanolischer Ameisensäure eluiert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingengt, nachdem 25 µL konzentrierte TFA zugegeben wurden.

Die Rücklösung der Fäzesproben erfolgte in jeweils 100 µL 5% TFA in Wasser. Es schloß sich jeweils eine Behandlung im Ultraschallbad (Eiskühlung) und anschließender Zentrifugation an. Anschließend wurden die Proben bis zur Messung bei -80°C tiefgefroren.

3.1.2 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion der humanen Urin- und Plasmaproben wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Ernährungswissenschaften der Justus Liebig Universität Gießen erarbeitet, etabliert und auch getestet. Die Festphasenextraktion der gesamten für die Humanstudie relevanten Proben wurde ebenfalls am Institut für Ernährungswissenschaften der Justus Liebig Universität Gießen durchgeführt. Die vergleichenden Messungen (LC-UV, LC-MS) der Proben der Optimierungsexperimente und der Humanstudie fanden am Institut für Anorganische und Analytische Chemie statt.

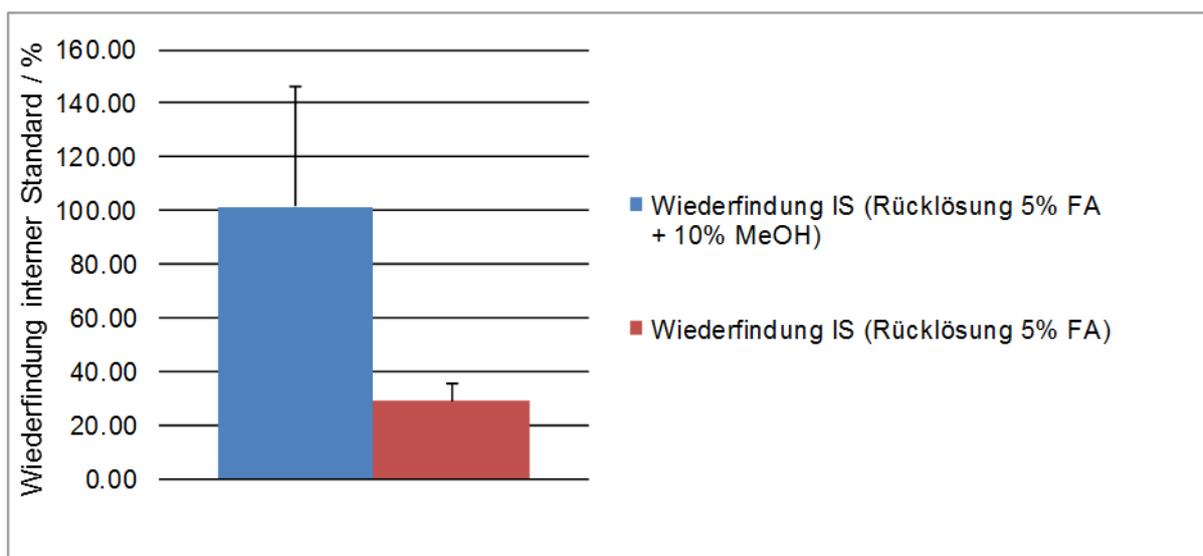


Abbildung 3-1: Wiederfindung des internen Standards nach der SPE in Abhängigkeit des organischen Anteils nach der Rücklösung.

Es wurden mehrere Verfahren aus der Literatur getestet, jedoch für die Extraktion der Urinproben der Humanstudie wurde schließlich die Methode nach Urpi-Sarda *et al.* verwendet (siehe zur Durchführung Abschnitt 3.1.2.2).¹⁵⁰ Im Gegensatz zu Urpi-Sarda *et al.* wurde in dieser Arbeit zur Rücklösung eine Mischung aus wässriger Ameisensäure und Methanol verwendet. Der Vergleich der Wiederfindung des internen Standards mit rein wässriger 5 %iger Ameisensäure zeigt Abbildung 3-1. Mit einem 10%igen organischen Anteil Methanol konnte einerseits eine höhere Wiederfindung der Standards aus Tests detektiert werden (siehe Abbildung 3-1) und andererseits wurde deutlich weniger Rückstand nach der Rücklösung erhalten. Dies bildete gute Voraussetzungen für die HPLC-Messung. Der organische Anteil erhöht die Löslichkeit der Anthocyane deutlich, insbesondere bei kleinen Volumina ist dies bedeutsam. Anthocyane werden als Pflanzenpigmente bezeichnet, die sich auch in Beeren und Blüten nicht vollständig lösen, sondern zur Copigmentierung neigen. Möglicherweise entgehen sie mit rein wässriger Rücklösung auf diese Weise zum Teil der Analyse. Weiterhin spielt die Matrix des Urins eine große Rolle, da hier möglicherweise Anthocyane an Partikel absorbieren, analog zur Copigmentierung, und so der Analyse nicht zugänglich sind. Mit einem organischen Anteil von bereits 10% Methanol läßt sich diesen Nachteilen vorbeugen.

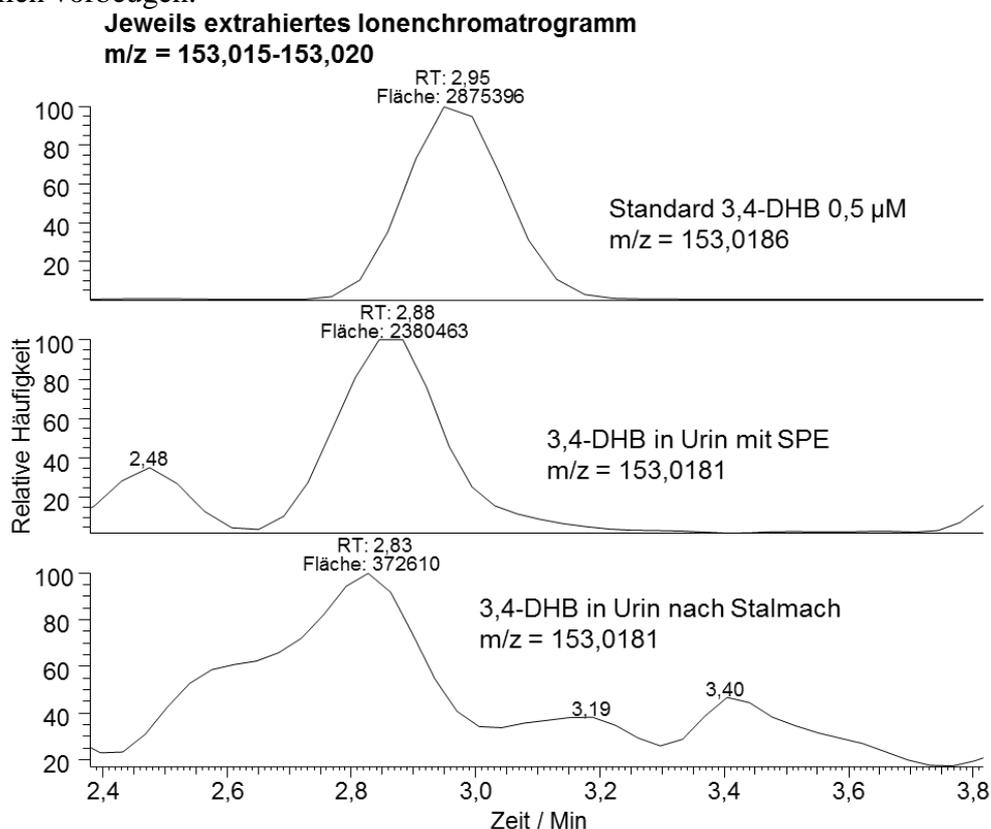


Abbildung 3-2: Vergleich der massenspektrometrischen Detektion von 3,4-DHB (3,4-Dihydroxibenzoessäure) eines Standards (oben), einer Urinprobe mit SPE (mitte) und einer nach Stalmach eingengten Urinprobe ohne SPE (unten).

Für die Analytik von Phenolsäuren (3,4-Dihydroxybenzoesäure, Syringasäure, Vanillinsäure), als Degradationsprodukte der Anthocyane, wurden verschiedene Extraktionsprozeduren getestet. Hierzu wurden Versuche mit humanen Urinproben, bezüglich der Option durchgeführt, durch Vermeiden einer Festphasenextraktion die genannten Phenolsäuren besser detektieren zu können. Es wurde befürchtet, dass durch die Festphasenextraktion vorhandene Phenolsäuren verlorengehen. Hier wurde ein Vergleich der Prozedur nach Urpi-Sarda *et al.*¹⁵⁰ mit der nach Stalmach *et al.*¹⁵² durchgeführt. Urpi-Sarda *et al.* wenden eine Festphasenextraktion an.¹⁵⁰ Das Verfahren nach Stalmach *et al.* beschreibt ein direktes Einengen der Urinprobe bis zur Trockne und sofortiges Rücklösen ohne sonstige Behandlung.¹⁵² Hierbei wird jedoch eine erhebliche Anzahl an Störsignalen erhalten, die die Messung insbesondere im negativen Ionenmodus massiv beeinträchtigen, die Detektion (hier von 3,4-Dihydroxybenzoesäure) stören und die Integration erheblich erschweren (siehe hierzu Abbildung 3-2). Die schließlich verwendete Methode (nach Urpi-Sarda) war deutlich besser für die Phenolsäureanalytik mit den verwendeten Analysengeräten geeignet, als die anderen getesteten Extraktionsmethoden, da wesentlich weniger Störsignale erhalten wurden.

Die Extraktion der Plasma- und Urinproben der Tierstudie wurde am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe durchgeführt. Die Aufarbeitung der Darminhalt- und Fäzesproben fand vollständig im Institut für Anorganische und Analytische Chemie in Gießen statt. Die verwendete Methode war bereits in Karlsruhe durch die Arbeiten von Dr. Susanne Skrbek etabliert.⁶⁹ Auch der Einsatz von TFA sollte, wie dort beschrieben, beibehalten werden. Im Folgenden sollen die verwendeten Methoden für die komplexen Plasma- und Urinproben erläutert werden.

3.1.2.1 Plasma

Plasmaproben der Human- als auch der Tierstudie wurden in Absprache mit den Projektpartnern nach der Methode von Skrbek aufgearbeitet.⁶⁹ Hier wurden die internen Standards an die vorhandenen Proben angepasst und für den positiven Ionenmodus Pelargonidin-3-Rutinosid, für den negativen Ionenmodus 2-Chlor-5-Nitrobenzoesäure verwendet. Humane Blutproben wurden parallel zur Einnahme des an Anthocyanen reichen Saftes (nach einer mehrtägigen speziellen Diät zur Reduzierung von Anthocyanen aus der Nahrung) und 10, 20, 30, 40, 60, 90 und 120 Min danach entnommen. Blutproben der Tierstudie wurden direkt nach der Dekapitierung der Tiere gesammelt.

Das EDTA anti-koagulierte Vollblut wurde nach Entnahme sofort für 15 Minuten und temperiert auf 4°C bei 2500g zentrifugiert (Plasmaproben Tierstudie: 2000g, 7°C). 1 mL Plasma wurde mit 50 µL einer 10 mM wässrigen Ascorbinsäurelösung und 100 µL einer 50%igen wässrigen Ameisensäurelösung (v:v) zur Verhinderung einer Oxidation und zum Ansäuern der Lösung versetzt und bis zur SPE bei -80°C tiefgefroren. Am Tage der Festphasenextraktion wurden die Proben aufgetaut und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die internen Standards Pelargonidin-3-rutinosid für den positiven Ionenmodus und 2-Chlor-5-Nitro-Benzoesäure für den negativen Ionenmodus zugefügt. Es wurde eine Extraktionsmethode gewählt, die schon von den Projektpartnern in Karlsruhe angewendet wurde.^{69,153} Die *Strata X*-Kartusche (polymere Umkehrphase; 30mg/1mL; *Phenomenex*) wurde mit 2 mL Methanol und anschließend mit 2 mL einer 10%igen wässrigen Ameisensäurelösung konditioniert. 1mL Plasma wurde mit 1 mL einer 10%igen wässrigen Ameisensäurelösung (v:v) verdünnt und anschließend komplett appliziert. Die Kartusche wurde mit 1 mL destilliertem Wasser gewaschen, anschließend wurde sie mittels einer Vakuumkammer trockengezogen. Schließlich wurde mit 2 mL einer 10%igen methanolischen FA-Lösung eluiert. Das Eluat wurde nach Zugabe von 25 µL TFA im Stickstoffstrom eingengt und mit 100 µL einer 5%igen wässrigen TFA rückgelöst.

3.1.2.2 Urin

Humane Urinproben wurden ab einer Stunde vor der Einnahme bis zur Einnahme des anthocyanreichen Saftes gesammelt, um als Startwert zu dienen. Urinproben, die innerhalb von drei Stunden anfielen, wurden jeweils zu einer Fraktion zusammengefasst. Nach Saftgabe beliefen sich diese auf 0-3, 3-6, 6-9, 9-12, 12-15 und 15-24 Stunden (h) nach Einnahme des Saftes. Der Urin der Tiere wurde über 24 h in einem Stoffwechselkäfig gesammelt.

1 mL humanen Urins wurde mit 50 µL einer 10 mM wässrigen Ascorbinsäurelösung und 100 µL einer 50%igen wässrigen Ameisensäurelösung (v:v), zur Verhinderung einer Oxidation und zum Ansäuern der Lösung, versetzt. Anschließend wurde bei 2500g und temperiert auf 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Bis zur Festphasenextraktion wurden die Proben bei -80°C tief gefroren. Nach Auftauen und Zentrifugieren der Urinprobe wurde die Konditionierung der Kartusche (*Oasis HLB*, 30 mg, 1 mL, *Waters*, Umkehrphase mit hydrophiler-lipophiler Gruppe, um auch polare Metabolite zu absorbieren) mit 1mL Methanol und 1 mL 1,5 M wässriger FA durchgeführt. Nach Applikation der Urinprobe wurde die Kartusche mit 1 mL

1,5 M wässriger FA und 1 mL 5%igem wässrigen Methanol gewaschen. Nach Trocknen der Kartusche mittels Vakuumkammer, wurde mit 2 mL 0,1%iger methanolischer FA eluiert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingengt und mit 100 µL einer Lösung von 5% FA und 10% Methanol in Wasser (v:v:v) aufgenommen.¹⁵⁰

Der nach Skrbek verwendete interne Standard Cyanidin-3,5-diglucosid erwies sich als nicht stabil.⁶⁹ Daher musste eine direkte Quantifizierung über Mal-3-glc durchgeführt werden. Nähere Angaben zu dieser Prozedur werden in Kapitel 3.3.2 gemacht.

Urinproben der Tierstudie (24 h im Stoffwechsellkäfig gesammelt) wurden für fünf Minuten bei 3000 Runden/Minute und temperiert bei 7°C zentrifugiert. 500 µL des Urins wurden anschließend mit 100 µL einer 50%igen wässrigen Lösung von FA angesäuert. Vor der Festphasenextraktion wurden die internen Standards Pel-3-rut und 2-Cl-5-Nitro-BS zugefügt. Die Festphasenextraktion für Urinproben der Tierstudie erfolgte auf Wunsch der Projektpartner aus Karlsruhe nach dem gleichen Protokoll, wie das der Plasmaproben der Humanstudie (siehe 3.1.2.1). Die Methode war dort etabliert und die spezielle Matrix von Rattenurin und die erwarteten höheren Konzentrationen unterstützen diesen Schritt. Die Proben wurden nach dem Einengen bei -80°C tiefgefroren und erst nach dem Transport nach Gießen rückgelöst. Bis zur Analyse wurden sie bei -80°C gelagert. Die Rücklösung erfolgte hier mit 100µL einer 5%igen wässrigen TFA.

3.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die flüssigchromatographische Methode wurde zunächst an einer Kapillar-HPLC (*SUMMIT Dionex*) etabliert. Hierzu wurden verschiedene Säulen und Laufmittel unterschiedlicher Zusammensetzung getestet. Zu einem späteren Stadium des Projektes stand ein Ultrahochdruck-System zur Verfügung, welches für die hohen Probenaufkommen der Humanstudie und der Tierstudie verwendet wurde.

Eine sehr gute Trennung der Hauptanthocyane wurde mit der Kombination aus Wasser / Ameisensäure (Laufmittel A) und Methanol (Laufmittel B) an der Kapillar-HPLC erzielt. Hier wurde zunächst mit einem Anteil an Ameisensäure von 5% begonnen und bei relativ langer Dauer eine hervorragende Trennung der Anthocyan-Monoglucoside erreicht. Tabelle 3-1 zeigt den verwendeten Gradienten (Abwandlung nach Fleischhut).¹ Hierbei wurde eine NUCLEOSIL 300 C18 Säule (Macherey-Nagel GmbH + Co. KG) mit der Länge 150 mm und

einem Innendurchmesser von 1 mm (Partikelgröße 5 µm) verwendet. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 520\text{nm}$.

Tabelle 3-1: Gradient für die optimierte Trennung der Anthocyan-Monoglucoside (50-80 Minuten Spül- und anschließende Equilibrierungsphase)

Zeit [min]	Eluent A (5% FA in Wasser) [%]	Eluent B (Methanol) [%]	Flussrate [mL/min]
0 – 2	95	5	0,07
10-15	80	20	0,07
30	70	30	0,07
35-40	63	37	0,07
41 – 43	60	40	0,07
50 – 62	5	95	0,07
70 - 80	95	5	0,07

Ein für LC-MS-Methoden weit verbreitetes Laufmittel ist Acetonitril. In der Literatur wurde dieses auch für die Trennung der Anthocyane und deren Abbauprodukte eingesetzt.^{1, 69} Mit Acetonitril als Laufmittel B konnte allerdings in dieser Arbeit nicht die gewünschte Trennleistung erzielt werden, da die Anthocyan-Gruppe (Monoglucoside) des Extraktes immer sehr stark zusammengedrängt eluierte. Zudem waren die einzelnen Signale sehr breit und überlagerten einander stark. Gleiches gilt für die interessierenden Phenolsäuren, wie 3,4-DHB und Syringasäure. Eine Verbesserung konnte auch mit dem Einsatz von in der Literatur beschriebenen Säulen (Luna, C18, 150 x 1 mm, Partikelgröße 3 µm, Porengröße 100Å, *Phenomenex*) nicht realisiert werden. Verschiedene Optimierungsversuche mit unterschiedlichsten isokratischen Stufen und Gradienten mussten verworfen werden. Auch war die Dauer der einzelnen Messungen ungeeignet für ein hohes Probenaufkommen.

Ein weiterer experimenteller Punkt bezog sich auf den Anteil der Säure im wässrigen Laufmittel. Es wurde ausschließlich Ameisensäure verwendet, da hier gute Erfahrungen in Bezug auf die Detektion mit dem Massenspektrometer vorlagen. Höhere Säureanteile konnten hier die Trennung mittels pH-Gradienten während des Laufs mit Acetonitril als Laufmittel B ebenfalls nicht verbessern. Daher wurde Methanol als Laufmittel B für die Messungen der realen Proben gewählt. Ein zusätzlicher Vorzug des Methanols gegenüber Acetonitril ist die geringere Toxizität, die besonders im Hinblick auf die Ionisierungsmethode des MS von

Bedeutung war, da hierbei eine Verdampfung durch den angelegten Gasstrom stattfand (siehe Kapitel 3.3).

Es muss berücksichtigt werden, dass die Dauer der Messung von 80 Minuten, für eine hohe Probenanzahl, wie sie in diesem Projekt bei verschiedenen Studien anfiel, ungeeignet war. Ein weiterer Punkt war der hohe Anteil an Ameisensäure. Hier wurden verschiedene Anteile und Gradienten getestet. Im Wesentlichen war ein Anteil von 0,3 % FA in Wasser zu gering, um einen pH-Gradienten aufzubauen. Ziel war es, unter 1% FA zu bleiben, da ansonsten die Analyse der 3,4-DHB im negativen Ionenmodus nicht parallel durchgeführt werden konnte. Letztlich wurde ein Anteil von 0,7% Ameisensäure verwendet, welcher einen deutlichen pH-Effekt zeigte, jedoch die Detektion von 3,4-DHB erlaubte. Dies war ebenfalls für das Trennsystem und das Massenspektrometer von Vorteil, da diese nicht kontinuierlich der hohen Menge an aggressiver und korrodierender Säure ausgesetzt waren. Viele Bauteile beider Instrumente sind aus Edelstahl oder Aluminium gefertigt und bei hoher Temperatur gegen Ameisensäure besonders empfindlich.

Für die flüssig-chromatographische Trennung der Plasma- und Urinproben der Humanstudie und der Plasma-, Urin-, Darminhalt- und Fäzesproben der Tierstudie wurde ein binäres UHPLC-System (Ultra High Pressure Liquid Chromatography; *Dionex*) verwendet. Die UltiMate 3000 RSLC (Rapid Separation LC) bestand aus einer Pumpe (mit zwei Pumpeneinheiten) mit Entgasungs-Einheit und einem Autosampler (siehe Anhang Abschnitt A.1.3.2). Die Trennung erfolgte mittels einer 100 mm x 2.1 mm (ID) Kinetex (*Phenomenex*) Umkehrphasensäule (C18) mit einer Partikelgröße von 2.6 µm.

Als Eluenten wurden, wie oben bereits beschrieben, 0,7% Ameisensäure in Wasser (v:v) (Eluent A) und Methanol (Eluent B) verwendet. Der geringe Säureanteil gewährleistete eine Analyse der interessierenden Phenolsäuren und schonte zugleich die Analysenapparaturen. Da die Dauer der einzelnen Messung ebenfalls möglichst weit herunter gesetzt werden sollte, resultierte dies in einer nicht optimalen Trennung, die jedoch durch die Verwendung hochauflösender Massenspektrometer ausgeglichen wurde. Einen Vorteil bot der Gradient in Bezug auf die Trennung der direkten Abbauprodukte der Anthocyane in Form von verschiedenen Phenolsäuren (3,4-DHB, Syringasäure). Beispielsweise wurden verschiedene Dihydroxyphenolsäuren mit dieser Methode sehr gut separiert (siehe Abbildung 3-12 unten). Der verwendete Gradient ist in Tabelle 3-2 aufgeführt. Hierbei wurden zeitweise Drücke von bis zu 600 bar erreicht, die nur durch den Einsatz der UHPLC verarbeitet werden konnten.

Tabelle 3-2: Gradient für Messungen der Human- und Tierstudie (13-24 Minuten Spül- und anschließende Equilibrierungsphase)

Zeit [min]	Eluent A Wasser/0,7% FA [%]	Eluent B Methanol [%]	Flussrate [mL/min]
0 – 0,5	98	2	0,4
1	93	7	0,4
5	85	15	0,4
10	60	40	0,4
13 - 16	30	70	0,4
18 - 24	98	2	0,4

Die Massenspuren der Hauptanthocyane für den Gradienten aus Tabelle 3-2 sind in Abbildung 3-3 dargestellt. Sie können deutlich im extrahierten Ionenchromatogramm detektiert werden und weisen eine verminderte Peakbreite, im Vergleich zum in Tabelle 3-1 beschriebenen Gradienten, auf. Die Signale können unter diesen Bedingungen sehr gut integriert werden, welches die Quantifizierung ermöglicht. Weitere Einzelheiten zur massenspektrometrischen Analyse sind in Kapitel 3.3 beschrieben.

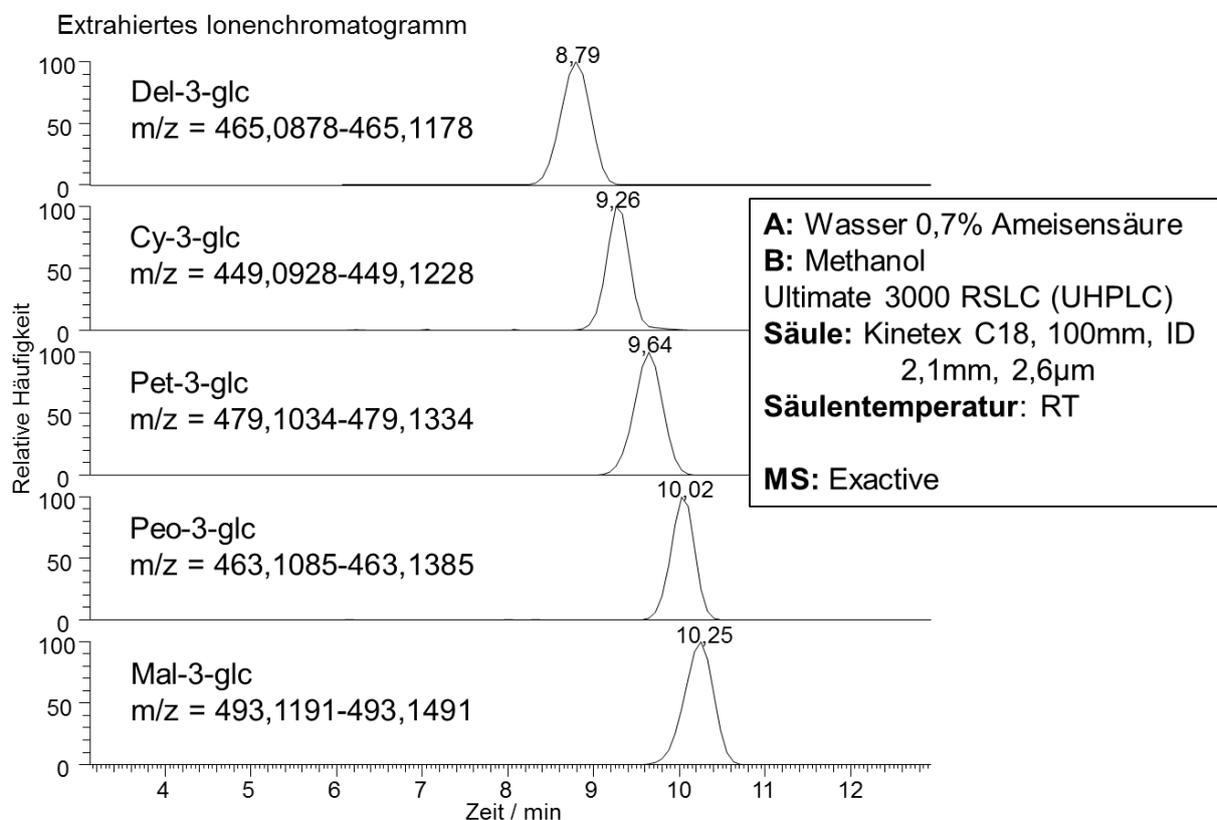


Abbildung 3-3: Massenspektrometrische Detektion der Hauptanthocyane aus Dakapo mittels des Gradienten aus Tabelle 3-2

Für die Urinproben der Humanstudie wurde nach einigen Messungen zusätzlich ein Ventil zwischen Trennsäule und Massenspektrometer eingesetzt. Das Ventil wurde zwischen 0 – 2,8 Minuten so geschaltet, dass die ersten hydrophilen Verunreinigungen in einen separaten Behälter gelangten, dies wurde während des Spülschrittes des Gradienten zwischen 13,5 – 24 Minuten wiederholt. Dies beugte übermäßigem Verschmutzen und schnellem Verstopfen der Einlaßkapillare des MS durch stark hydrophile und hydrophobe Verunreinigungen vor. Die Analyse der enthaltenen Metabolite, wie Glucuronide oder den enthaltenen interessierenden Phenolsäuren (Syringasäure oder 3,4-DHB), wurde durch die Verwendung des Ventils nicht beeinträchtigt. Für die Plasmaproben der Humanstudie wurde das Ventil nach 2,48 Minuten bzw. später nach einer Minute und dann ebenfalls bei 13,5 Minuten geschaltet. Hier wurde TFA in der Rücklösung verwendet, diese sollte von der ESI-Quelle ferngehalten werden, da TFA die Ionisierung durch seine starke Polarität beeinträchtigt und somit die gesamte Messung stört. Die Messzyklen konnten so deutlich verlängert werden, ohne das System zu trennen und zu reinigen.

Die verwendeten Injektionsvolumina wurden für jede Probenart diversifiziert und richteten sich nach den prognostizierten enthaltenen Konzentrationen. Für die Humanstudie waren es jeweils 40 µL für Plasma- und Urinproben. In der Tierstudie wurden für Plasma ebenfalls 40 µL verwendet, jedoch für Urin nur 20 µL, da es sich um sehr konzentrierte und matrixbelastete Proben handelte. Für Darminhalt- und Fäzesproben wurde ein Injektionsvolumen von 5 µL verwendet.

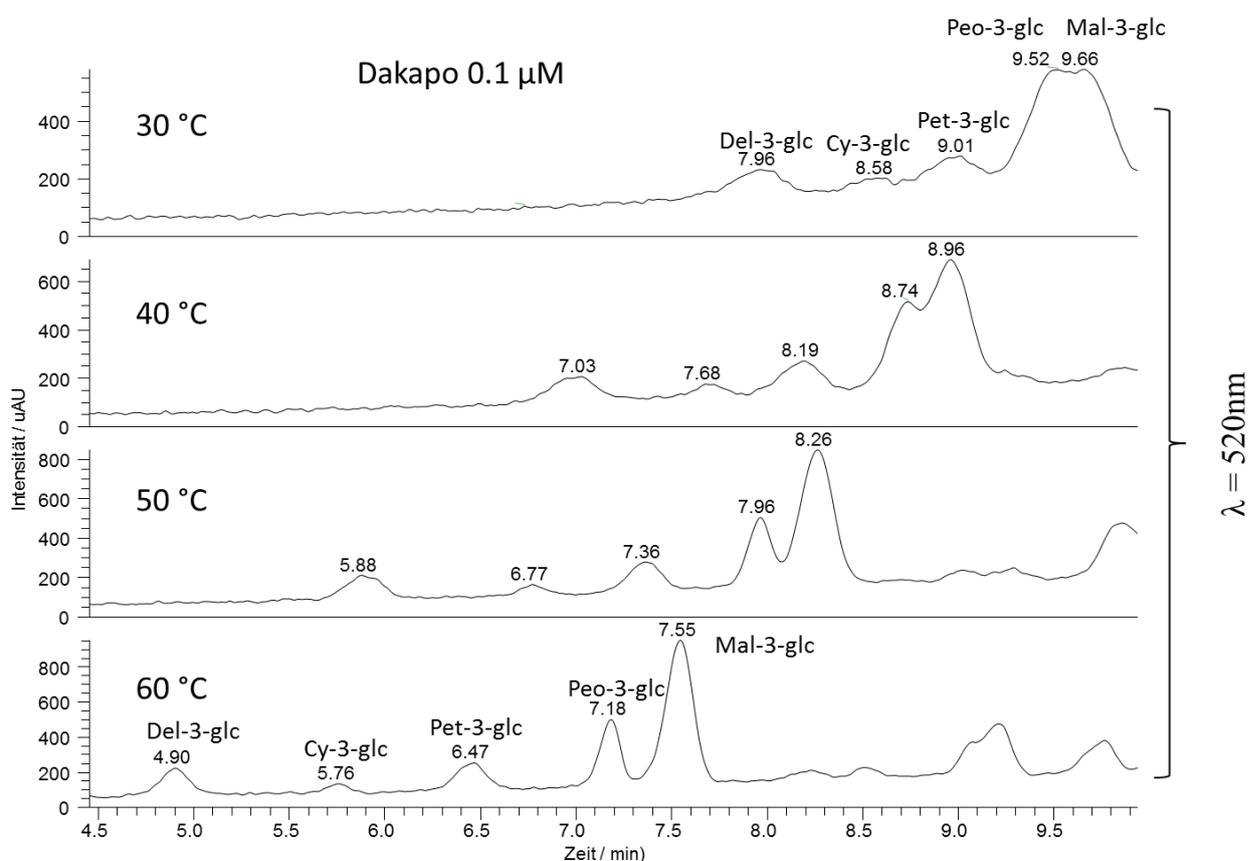


Abbildung 3-4: Einfluss der Säulentemperatur auf die Trennung der Hauptanthocyane aus Dakapo

Für Identifizierungsmessungen der Anthocyane und direkten (Phase-II) Anthocyan-Metabolite an der Q Exactive (siehe Kapitel 4), standen im weiteren Verlauf der Analytik für die UHPLC zusätzlich ein Säulenofen und ein UV-VIS-Detektor zur Verfügung. Die verwendete *Kinetex* Säule konnte bis zu einer Temperatur von 60°C betrieben werden. Es wurden verschiedene Temperaturen und Gradienten-Einstellungen getestet, jedoch konnten bei 60°C die beste Trennung und Auflösung erreicht werden, wie in Abbildung 3-4 dargestellt. Der Gradient wurde abschließend nur geringfügig variiert, wie Tabelle 3-3 wiedergibt, um die Trennung von Peonidin-3-glucosid (Peo-3-glc) und Mal-3-glc zu optimieren. Die Peakbreite konnte weiter reduziert werden, reziprok dazu nahm die Peakhöhe zu. Ebenfalls variierten die Anfangs- bzw. Maximaldrücke mit und ohne Säulenofen (bei Messungen von Standards) um max. 0,5-1 bar.

Tabelle 3-3: Gradient der UHPLC für Identifikationsmessungen mit dem Q Exactive Massenspektrometer

Zeit [min]	Eluent A Wasser/0,7% FA [%]	Eluent B Methanol [%]	Flussrate [mL/min]
0 – 0,5	98	2	0,4
1	93	7	0,4
5	85	17	0,4
10	60	40	0,4
13 - 16	30	70	0,4
18 - 24	98	2	0,4

Die Variation der Temperatur des Säulenofens betrug nur etwa $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Für die massenspektrometrische Analyse wurde für den Einsatz des Säulenofens ebenfalls die Reproduzierbarkeit der Messung bestimmt und dies über die Flächen der Hauptanthocyane des Dakapo-Extrakts durchgeführt. Alle Hauptanthocyane zeigen eine sehr hohe Stabilität bei einer Säulentemperatur von 60°C , siehe Tabelle 3-4. Somit stellt der Einsatz des verwendeten Säulenofens keine Nachteile für die massenspektrometrische Analyse dar.

Tabelle 3-4: Einfluss der Säulentemperatur (60°C) auf die Stabilität der massenspektrometrischen Detektion

Temperatur Säulenofen / $^{\circ}\text{C}$	Del-3-glc Konz nmol/L	Cy-3-glc Konz nmol/L	Pet-3-glc Konz nmol/L	Peo-3-glc Konz nmol/L	Mal-3-glc Konz nmol/L
60	$8,69 \pm 0,58$	$3,42 \pm 0,29$	$15,07 \pm 0,52$	$46,65 \pm 2,62$	$100,58 \pm 6,24$

Abschließend sei noch ein zusammenfassender Vergleich der ersten Methode an der *SUMMIT* Kapillar-HPLC und der Methode mit Säulenofen (0,7% Ameisensäure) in Abbildung 3-5 gezeigt. Mit ersterem System konnte die Trennung der Hauptanthocyan-Glucoside (aus Dakapo) in etwa 48 Minuten (blaue Linie im oberen Teil der Abbildung) sehr zufriedenstellend erfolgen. Auch die danach eluierenden acylierten Anthocyane (siehe Kapitel 4.1) konnten getrennt werden. Allerdings war die Dauer der Messung von 80 Minuten inakzeptabel und Peakbreite ebenfalls nicht zufriedenstellend. Im unteren Teil der Abbildung 3-5 ist die Methode mit einem Säulenofen temperiert auf 60°C und einem Anteil von 0,7% Ameisensäure in Laufmittel A dargestellt. Diese gewährleistete eine vergleichbare Trennung

der Hauptanthocyane, die jedoch bereits nach ca. 8 Minuten abgeschlossen war (blaue Linie im unteren Bereich der Abbildung 3-5).

Die chromatographischen Signale sind deutlich schmaler und weisen auch bei geringen Konzentrationen eine annehmbare Intensität auf. Durch den geringeren Anteil an Ameisensäure wurden auch die Analysengeräte geschont und es ermöglichte eine parallele Messung in positivem und negativem Ionenmodus (siehe Kapitel 3.3.2.1). Die erhöhte Grundlinie in Abbildung 3-5 unten resultiert aus der geringen Konzentration der Probe von 0,1 $\mu\text{mol/L}$ (bezogen auf Mal-3-glc) und ist daher kein Indiz für eine schlechte Sensitivität oder instabile Messung.

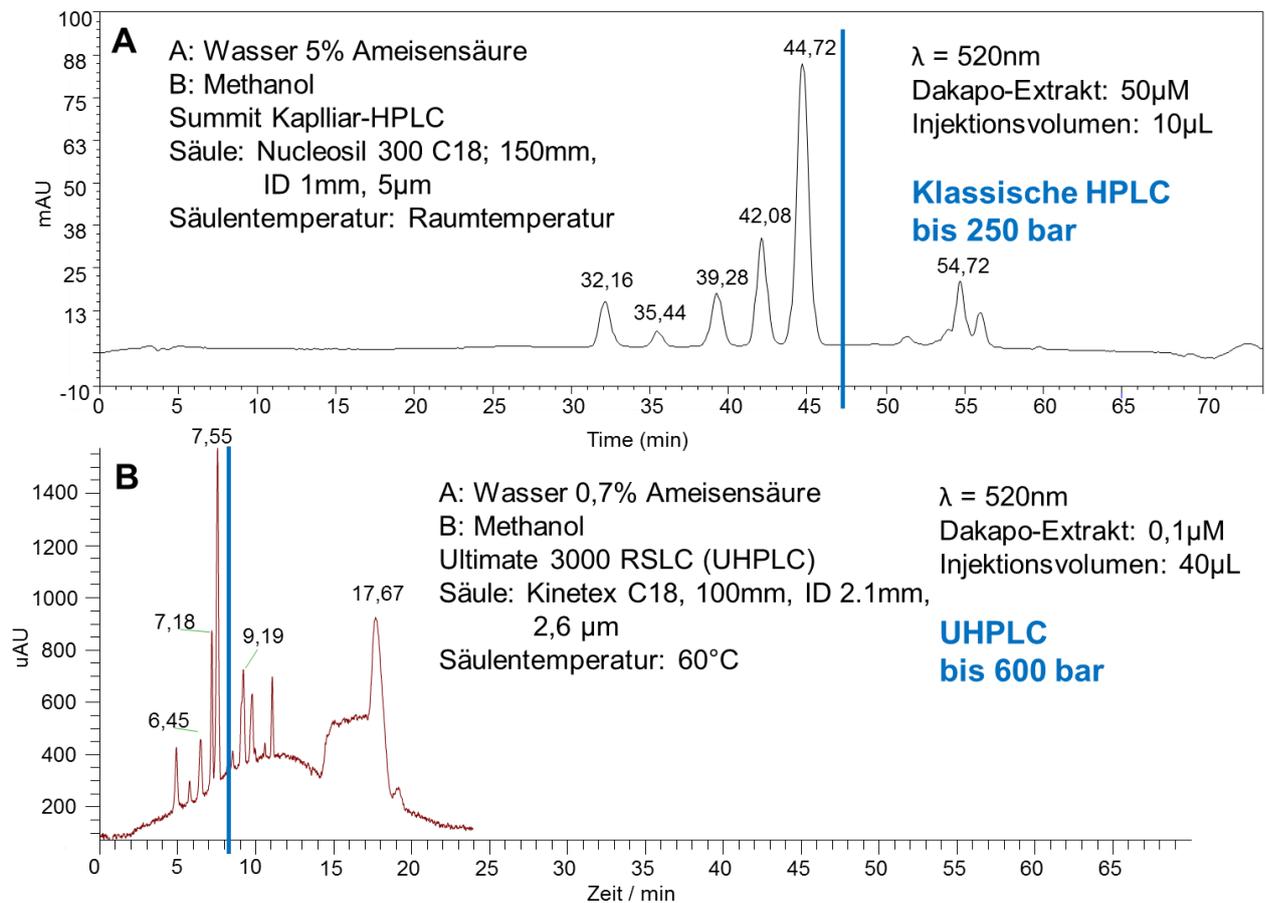


Abbildung 3-5: Vergleich der Dauer und Separationsleistung des ursprünglichen Gradienten (oben) und des optimierten Gradienten mit Säulenofen (unten; Elution der Hauptanthocyan-Glucoside endet mit der blauen Linie)

3.3 Massenspektrometrische Analyse

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometern handelte es sich ausschließlich um hochauflösende Geräte mit akkurater Massendetektion. Insgesamt kamen vier unterschiedliche Geräte zum Einsatz. Zum einen wurde ein FTICR-MS verwendet, welches

zur Optimierung der LC-MS-Methode benutzt wurde. Da an diesem Instrument eine Messung in nur einem Ionenmodus möglich ist, wurden hier nur wenige reale Proben vermessen. Jedoch sind mittels vorgeschalteter LTQ detaillierte MSⁿ-Experimente möglich. Zu Beginn des Projektes stand noch eine LTQ Orbitrap Discovery zu Verfügung, mit welcher detaillierte Fragmentierungsexperimente von verfügbaren Standardverbindungen durchgeführt wurden. Analog zum FTICR-MS sind hier mittels LTQ MSⁿ-Experimente möglich. Hier ist neben stoßinduzierter Dissoziation (CID) auch *Higher energy collisional dissociation* (HCD) als Fragmentierungsmethode ausführbar. An den beiden anderen Orbitalfallen basierten Massenspektrometern, Exactive und Q Exactive, ist im Gegensatz zum FTICR-MS ein kontinuierliches Wechseln der Polarität (Ionenmodus) innerhalb einer LC-MS-Messung möglich, ebenfalls sind deutliche Sensitivitätsvorteile vorhanden. Weiterhin bieten diese Geräte die Möglichkeit der AIF (*All Ion Fragmentation*, vgl. Kapitel 2.4.3.2). Hierbei werden alle Ionen im gesamten Massenbereich von der C-Trap in die HCD-Zelle überführt und dort effektiv fragmentiert. Die Fragmente werden anschließend in die Orbitalfalle überführt und hochauflösend und mit hoher Massengenauigkeit analysiert. Allerdings sind an der Exactive keine MS/MS-Experimente eines vorher isolierten Ions möglich, sondern nur AIF Experimente. Dies wird an der Q Exactive durch einen vorgeschalteten Massenseparator (effektiver Quadrupol) ermöglicht, jedoch sind keine MSⁿ-Experimente (n>2)durchführbar. Durch Verwenden von HCD als Fragmentierungsmethode führt dies aber nicht zu einem Nachteil, da auf diesem Wege genügend hohe Kollisionsenergien erreicht werden können, um eine effektive Fragmentierung durchzuführen. Alle massenspektrometrischen Daten wurden mit der Software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Bremen) bearbeitet.

Vor jeder Messserie wurde das jeweilige Massenspektrometer im positiven und im Falle von Exactive oder Q Exactive auch im negativen Ionenmodus kalibriert. Über eine interne Kalibrierung mittels Referenz-Massen („*lock mass*“-Funktion) konnte für orbitalfallenbasierte Massenspektrometer die Massengenauigkeit im positiven Ionenmodus zumeist auf < 1 ppm optimiert werden. Zu diesem Zweck wurden im positiven Ionenmodus drei *m/z*-Werte verwendet: *m/z* = 391,28428 ([M+H]⁺, Diisooctylphthalat, C₂₂H₃₈O₄), *m/z* = 429,08872 ([M+H-CH₄]⁺, Polysiloxan,[C₂H₆SiO]₆) und *m/z* = 519,13882 ([M+H]⁺, Polysiloxan, [C₂H₆SiO]₇).¹⁵⁴

Welche Gerätekombination zur Messung bestimmter Proben verwendet wurde, ist in Tabelle 3-5 angegeben.

Tabelle 3-5: Auflistung Probenart und jeweilige Gerätekombination

Probe	Ionenmodus	Gerätekombination
Standardverbindungen	positiv	LTQ Orbitrap Discovery (nano-ESI)
Dakapo-Trauben-Extrakt	positiv	SUMMIT-HPLC-FTICR-MS
Zellkultur basal	positiv	UHPLC-FTICR
Tierproben Fäzes/Darminhalt	positiv	UHPLC-FTICR
Tierproben Urin/Plasma Humanproben Urin/Plasma Dakapo-Trauben-Extrakt	positiv/negativ	UHPLC-Exactive
Identifizierung verschiedenste Proben	positiv/negativ	UHPLC-Q Exactive

Für LC-MS-Messungen wurde das jeweilig verwendete Massenspektrometer (FTICR-MS, Exactive oder Q Exactive) direkt mit der Säule oder dem UV-Detektor des flüssigchromatographischen Trennsystems über eine Elektrospray-Quelle (IonMax, *Thermo-Fisher Scientific*) verbunden. Bei Messungen mit einem Eluentenfluß von 0,07 mL/min konnte mit den Einstellungen in Tabelle 3-6 ein stabiles Spray erhalten werden. Im nächsten Schritt wurde die Kapillartemperatur optimiert. Hier zeigte sich, dass bei einer Temperatur von 250°C eine mehr als ausreichende Intensität der Analytionen, aber auch eine sehr gute Stabilität der Messung erreicht werden konnte. Von höheren Temperaturen wurde abgesehen, da ein Anteil von 5% Ameisensäure in Laufmittel A verwendet wurde. Viele Bauteile des Instruments sind aus Edelstahl oder Aluminium gefertigt und bei hoher Temperatur gegen Ameisensäure besonders empfindlich.

Tabelle 3-6: MS-Parameter für Eluentenfluss von 0,07 mL/min

Parameter	Wert
Sheath gas	4 (willkürliche Einheit)
Auxillary Gas	8 (willkürliche Einheit)
Spray Voltage	4,4 kV
Capillary Voltage	25 V
Capillary Temp.	250°C
Tube Lens	135 V
AGC on	1E6
Auflösung	100000

Um dem hohen Probenaufkommen gerecht zu werden, wurde ein U-HPLC-System für die weiteren Analysen eingesetzt. Die Einstellungen wurden zunächst am FTICR-MS (LTQ FT Ultra, *Thermo Fisher Scientific*) optimiert. Der wesentlich höhere Eluentenfluss von 0,4 mL/min der UHPLC (*UltiMate3000, Dionex*) im Gegensatz zu 0,07 mL/min der HPLC (SUMMIT, *Dionex*) erforderte andere Bedingungen in Bezug auf die Stabilität des Sprays, siehe hierzu Tabelle 3-7. Aufgrund der geringeren Säurekonzentration von 0,7% wurde die Temperatur der Einlasskapillare auf 350°C angehoben. Weiterhin wurde für die Einlasskapillare eine neue Dichtung aus Graphit verwendet, die sich auch für hohe Temperaturen eignete. Mit diesen Einstellungen wurden die Messungen von Darminhalt- und Fäzesproben der Tierstudie (siehe Kapitel 5.2.1) durchgeführt (Kombination aus *Ultimate 3000* U-HPLC-FTICR-MS, vgl. Tabelle 3-5).

Tabelle 3-7: MS-Parameter für einen Eluentenfluss von 0,4 mL/min

Parameter	Wert
Sheath gas	18 (willkürliche Einheit)
Aux Gas	6 (willkürliche Einheit)
Spray Voltage	4,5 kV
Capillary Voltage	40 V
Capillary Temp.	350°C
Tube Lens	120 V
AGC on	1E6
Auflösung	100000

Für Messungen der Plasma- und Urinproben der Humanstudie, sowie Plasma- und Urinproben der Tierstudie wurde ein LC-MS-System bestehend aus einer *UltiMate 3000* UHPLC zur chromatographischen Trennung, verbunden mit einer *Exactive* verwendet. Die Einstellungen für die Temperatur und Sprayparameter wurden, wie in Tabelle 3-7 beschrieben, übernommen. Im negativen Ionenmodus wurde eine Spray-Spannung (*Spray Voltage*) von -3,5 kV verwendet.

Weitere Einstellungen für die hier verwendete AIF und die jeweiligen optimierten Massenbereiche der verschiedenen Studienproben sind in Tabelle 3-8 und Tabelle 3-9 aufgeführt.

Tabelle 3-8: Parameter UHPLC-Exactive

Parameter	Wert
Injection time (positiver Ionenmodus)	250ms
Injection time (negativer Ionenmodus)	250ms
AIF HCD (ab 6 Minuten) positiver Ionenmodus (nur bei humanem Urin) für $m/z=100-850$	15 %

Tabelle 3-9: Detektierter Massenbereich bei verschiedenen Proben in positivem und negativem Ionenmodus (Exactive)

Probe	Ionenmodus	Massenbereich
Urin human	positiv	$m/z=180-850$
	negativ	$m/z=100-850$
Plasma human	positiv	$m/z=200-850$
	negativ	$m/z=120-850$
Tierstudie: Plasma und Urin	positiv	$m/z=200-850$
	negativ	$m/z=100-850$

Für die Identifizierung der einzelnen Anthocyane und ihrer Metabolite wurde eine Q Exactive (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet. Hier ist neben der AIF eine Massenselektion der zu fragmentierenden Ionen über einen Quadrupol Massenfilter möglich. Die Massenisolation ist so effektiv, dass bis herunter zu einem Fenster von $\Delta m/z = 0,4$ selektiert werden kann. Die Kollisionsenergie für CID- und HCD-Experimente werden nicht mit einer Absolutangabe, sondern in Prozent (%) angegeben. Die Einstellungen der verschiedenen Parameter in Tabelle 3-7, Tabelle 3-8 und Tabelle 3-9 wurden verwendet. Welche Kollisionsenergien für die angegebenen Experimente verwendet wurde, wird in den jeweiligen Kapiteln separat beschrieben. Es wurde hier auf den negativen Ionenmodus verzichtet, da das Augenmerk primär auf den Anthocyanen und deren direkten Metaboliten (Glucuronide, freie Aglyka) lag. Wie oben bereits beschrieben, stand zu Beginn dieser Arbeit eine *LTQ Orbitrap Discovery* zu Verfügung. Hiermit wurden Experimente zur gezielten Fragmentierung verfügbarer Anthocyanstandards und Extrakte durchgeführt. Hierzu wurden nano-ESI-Experimente ohne vorherige chromatographische Trennung durchgeführt. Die Messungen der Standards wurden immer in zwei verschiedenen Fragmentierungsmethoden durchgeführt, jeweils MS^n -Experimente mit CID und ebenfalls mit HCD. Für diese Experimente wurden

goldbeschichtete nano-ESI-Nadeln mit ca. 30 µL einer schwach sauren Lösung des jeweiligen Standards befüllt und mit den Einstellungen in Tabelle 3-10 eine stabile Messung erhalten. Die Kollisionsenergien wurden bei CID-Experimenten von 10%-50% variiert. Ab einer Energie von 50% konnte im CID-Experiment keine Veränderung mehr erhalten werden. In HCD-Experimenten wurden Energien bis zu 80% verwendet.

Tabelle 3-10: Parameter für nano-ESI-Messungen

Parameter	Wert
Spray Voltage	1,9 kV
Capillary Voltage	30 V
Capillary Temp.	250°C
Tube Lens	100 V

3.3.1 Identifizierung von Anthocyanen, Metaboliten und Abbauprodukten

Von vielen Verbindungen der Anthocyane, insbesondere aber von Metaboliten, wie Glucuroniden oder sulfatierten Spezies sind keine Standardverbindungen verfügbar. Eine Identifizierung von Signalen hochaufgelöster akkurater Massenspektren sollte daher durch Fragmentierungsexperimente abgesichert werden. Eine Fragmentierung zeigt zunächst eine charakteristische Abspaltung der (acylierten) Zuckerkomponente bzw. der metabolischen Komponente. Dabei entsteht das Aglykon (Anthocyanidin) des jeweiligen Anthocyans. Eine Identifizierung des Aglykons kann über dessen exakte Masse und charakteristische Fragmentationen erfolgen. Dies ist insofern notwendig, als in komplexen Medien, wie Plasma und Urin eine hohe Anzahl isomerer Verbindungen vorhanden ist.

3.3.1.1 Charakteristische Fragmente der Anthocyane aus Standardproben mittels hochauflösender akkurater Massenspektrometrie

In der Literatur beschäftigen sich zwei Quellen intensiv mit der Fragmentierung der Aglyka der Anthocyane. Oliveira *et al.* beschrieben mittels MS/MS Experimenten an einem oa-TOF-Hybridmassenspektrometer (orthogonal-Beschleuniger-Flugzeit-Hybridmassenspektrometer) bereits einige charakteristische Fragmente und wiesen hierbei auch Strukturen zu.¹⁴¹ Zum

anderen arbeiteten Barnes *et al.* mit einem Ionenfallen-TOF-Hybrid-Massenspektrometer und setzten neben höherer Massengenauigkeit auch computerbasierte Simulationen ein, um Strukturen zuzuweisen.¹⁴² Beide Quellen beziehen sich auf die generellen Nomenklaturempfehlungen für Flavonoidfragmente nach Ma *et al.*, in welcher die Fragmente nach ihrem Entstehungsort, aus A- und B-Ring, kombiniert mit der Fragmentierung durch den C-Ring als Hochzahlen, benannt werden (siehe Abbildung 3-6).¹⁵⁵ Auch in dieser Arbeit soll diese Nomenklatur angewendet werden.

Zudem beschrieben Oliveira *et al.*, sowie Abrankó *et al.* verschiedene Spaltprodukte der Zuckerkomponenten, die noch mit dem Aglykon verbunden sind.^{141,156} Dies wurde bereits von Domon und Costello für andere Flavonoide beschrieben, konnte aber von Barnes *et al.* nicht für Anthocyane bestätigt werden.^{157,142}

Insgesamt können die Anthocyane in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe beschreibt Anthocyane ohne Methoxygruppen als Substituenten am B-Ring, wie Cyanidin oder Delphinidin. Die zweite Gruppe enthält Anthocyane mit einer oder mehreren Methoxygruppen am B-Ring, wie Malvidin oder Peonidin. Oliveira *et al.* bearbeiteten Substanzen aus beiden Gruppen.¹⁴¹ Im Detail wurden Strukturen für Fragmente von Malvidin und Delphinidin beschrieben. Barnes *et al.* beschränkten sich auf die erste Gruppe und beschrieben Spektren und Strukturen für Cyanidin und Pelargonidin.¹⁴²

Für die Gruppe der Anthocyane ohne Methoxygruppen am B-Ring (Cyanidin, Delphinidin und Pelargonidin) wurden von Oliveira *et al.* jeweils die Abspaltung eines Radikals $\bullet\text{OH}$ beschrieben.¹⁴¹ Die Messungen mit höherer Massengenauigkeit in den Arbeiten von Barnes *et al.* zeigten diese Fragmentierung allerdings nicht. Beide beobachteten hingegen Fragmente, die sie nach der Empfehlung von Ma *et al.* als $^{0,3}\text{A}^+$, $^{0,2}\text{A}^{+\bullet}$, $^{0,2}\text{B}^+$ und $^{0,2}\text{B}^+-\text{CO}$ beschrieben und ihnen Strukturen zuwiesen. Barnes *et al.* gingen noch einen Schritt weiter und simulierten computerbasiert die energetisch günstigste Konfiguration für $^{0,3}\text{A}^+$, $^{0,2}\text{A}^{+\bullet}$ und $^{0,2}\text{A}^+$. Hierbei stellten sie fest, dass jeweils die cyclisierte Variante dieser Strukturen die energetisch günstigere darstellt. Beide Quellen beschrieben weiterhin, dass kleine Moleküle, wie CO oder H₂O aus dem C-Ring abgespalten werden (siehe Abbildung 3-6). Oliveira *et al.* geben für diesen Vorgang bei Delphinidin auch Strukturen an.¹⁴¹

Die Gruppe der Methoxygruppen tragenden Anthocyane wurde von Barnes *et al.* nicht bearbeitet.¹⁴² Oliveira *et al.* beschrieben hier Strukturen und die dafür notwendige Abspaltung bestimmter Fragmente, wie $-\text{CO}$, $-\text{H}_2\text{O}$ oder $-\bullet\text{OCH}_3$.¹⁴¹ Neben der Detektion der

Fragmentationen aus A-Ring und B-Ring von Malvidin, wurden auch Strukturen für weitere detektierte Fragmentationen angegeben ($m/z = 178$, $m/z = 203$, $m/z = 229$, $m/z = 270$, $m/z = 287$, $m/z = 300$, $m/z = 315$ und $m/z = 316$). Für alle Anthocyane dieser Gruppe konnte zunächst eine Abspaltung von formal $\bullet\text{CH}_3$ beobachtet werden. Ausgehend davon konnte, wie oben beschrieben, eine Eliminierung von CO oder weiteren kleineren Molekülen oder Radikalen beobachtet werden.

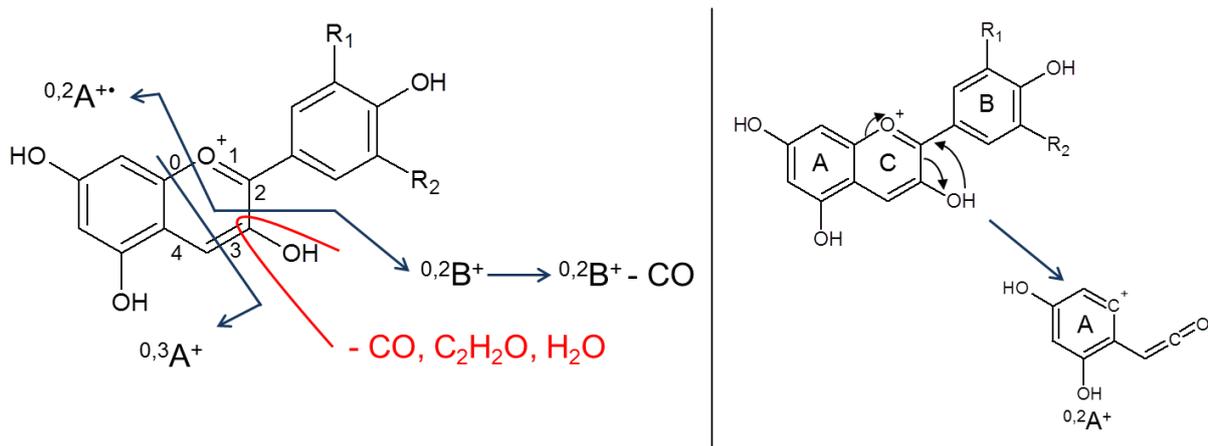


Abbildung 3-6: Charakteristische Fragmente der Anthocyane nach Ma *et al.*, Oliveira *et al.* und Barnes *et al.* ^{141,142}

In der vorliegenden Arbeit wurden von verfügbaren Standardverbindungen aller sechs in der Natur hauptsächlich vorkommenden Anthocyanidine (Aglyka) Fragmentierungsexperimente durchgeführt. Hier standen folgende Verbindungen zur Verfügung: Petunidin-Chlorid (*Extrasynthese*), Myrtillin-Chlorid (Del-3-glc-Chlorid, *Extrasynthese*), Peo-3-glc-Chlorid (*Extrasynthese*), Cyanin-Chlorid (Cy-3,5-dglc-Chlorid, *Extrasynthese*), Pel-3-rut-Chlorid (*Extrasynthese*) und Oenin-Chlorid (Mal-3-glc-Chlorid, *Extrasynthese*). Mit Hilfe von nano-ESI Experimenten konnten an einer LTQ Orbitrap Discovery (siehe Kapitel 3.3) Fragmentierungen via HCD und auch CID durchgeführt werden. Die hochaufgelösten, akkuraten Daten wurden zur Identifizierung von Anthocyanen in biologischen Proben herangezogen. Die verschiedenen Fragmentierungsmuster aus diesen Experimenten wurden dazu genutzt, den erzeugten Fragmenten von Malvidin teilweise Strukturen zuzuweisen. Hierzu wurden neben Ergebnissen aus vorherigen Veröffentlichungen auch Berechnungen des kommerziellen Programmes *MassFrontier 7.0* (*Thermo Scientific*) verwendet. Eine wesentliche Neuerung ist die Nutzung akkurater und hochaufgelöster Massenspektrometrie (Massengenauigkeit < 1 ppm) und Zuweisung neuer Fragment-strukturen.

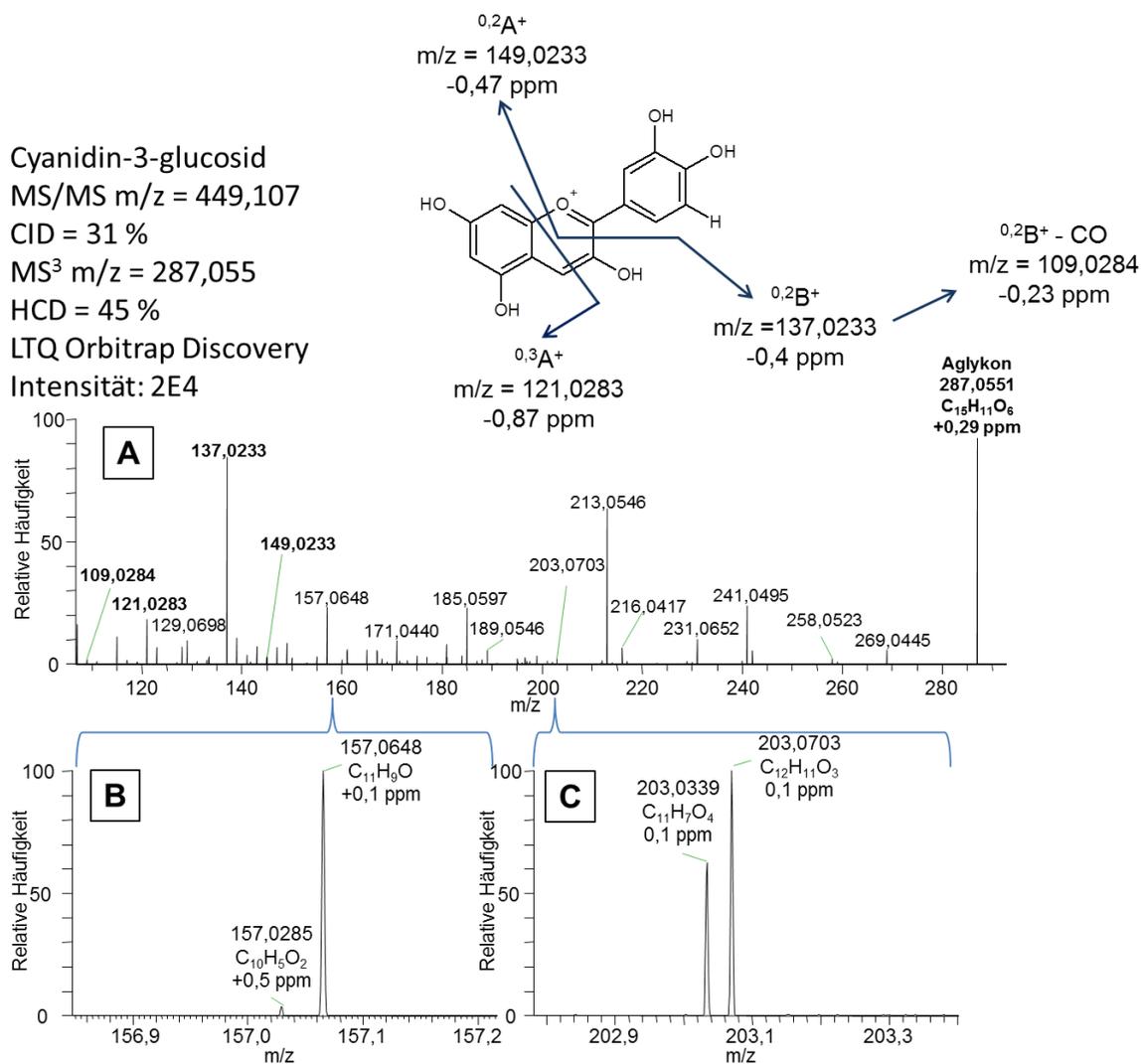


Abbildung 3-7: Charakteristische Fragmentationen von Cyanidin-3-glucosid mit Nachweis zweier Signale, die ohne hochauflösende MS nicht detektiert würden (LTQ Orbitrap Discovery)

Die Gruppe der Anthocyanidine ohne Methoxygruppen sei hier repräsentiert durch Cyanidin. Wie in Abbildung 3-7 dargestellt, können sowohl das Ion des Aglykons ($m/z = 287,055$), als auch dessen charakteristische Fragmentationen ^{0,3}A⁺, ^{0,2}A⁺, ^{0,2}B⁺ und ^{0,2}B⁺-CO mit einer Massenabweichung von -0,9 ppm bis +0,3 ppm detektiert werden. Neben Signalen, die ebenfalls bei Oliveira *et al.* und Barnes *et al.* beschrieben wurden, können kleinere Signale, die sich nur in $\Delta m/z = 0,036$ unterscheiden, detektiert werden.^{141,142} Hier kann für Cyanidin neben $m/z = 203,0703$ zusätzlich das Signal $m/z = 203,0339$ (Massenabweichung +0,4 ppm) detektiert werden, was formal durch einen Verlust von zwei C₂H₂O Fragmenten erklärt werden kann. Weiterhin kann neben dem Signal $m/z = 157,0648$ auch $m/z = 157,0284$ (Massenabweichung +0,2 ppm) detektiert werden, welches einem zusätzlichen Verlust von

CO und H₂O aus $m/z = 203,0339$ entspricht (siehe Abbildung 3-7). Mittels Fragmentierung durch HCD können neue Fragmentationen detektiert werden, so beispielsweise das Signal bei $m/z = 131,0491$ (Aglykon- 3CO - 2C₂H₂O). Die Intensität dieser Fragmentationen ist sehr gering und im Spektrum können diese erst nach Vergrößerung beobachtet werden. Trotzdem können sie mit einer Massenabweichung < 2 ppm detektiert werden. In Tabelle A-3 (siehe Anhang) sind die detektierten Fragmentationen für Cyanidin-3-glucosid aufgelistet. Die Fragmentationenspektren von Delphinidin-3-glucosid und Pelargonidin-3-rutinosid, mit Zuweisung einiger wichtiger Fragmentationen sind in Abbildung A-3 und Abbildung A-2 (siehe Anhang) gezeigt. Auch hier konnte mit einer Massengenauigkeit von < 2 ppm detektiert werden.

Für die Methoxygruppen tragenden Anthocyane soll im Folgenden Malvidin im Detail besprochen werden. Malvidin stellt in den Anthocyanquellen der verschiedenen hier gezeigten Studien das Hauptanthocyan als Glucosid und im Falle der Tierstudie als Diglucosid dar. Es ist daher von besonderem Interesse, Malvidin ausführlich zu charakterisieren. In Abbildung 3-8 ist ein typisches Fragmentationenspektrum von Malvidin-3-glucosid dargestellt. Für jedes Signal sind die Masse, die jeweilige Elementarzusammensetzung und die Massenabweichung angegeben. Das Aglykon ($m/z = 331,0813$), sowie die anderen beobachteten Signale konnten mit einer Massenabweichung von $< 0,6$ ppm detektiert werden.

Die Bildung von Radikalkationen kann im Verlauf der Fragmentierung zur Erklärung von einigen Fragmentationen dienen. Die relative Stabilität eines Radikalions ist möglicherweise über die Stabilisierung durch das aromatische System gegeben. Nichtradikalische Moleküle zeigen teils höhere Intensität und damit bevorzugte Stabilität. Ein sehr gutes Beispiel hierfür sind die Signale $m/z = 315,0501$ und $m/z = 316,0579$. Für $m/z = 315,0501$ wird eine Abspaltung von formal CH₄ angenommen, wohingegen für $m/z = 316,0579$ ein formaler Verlust von CH₃ beobachtet wird. Die Intensität für das Produkt des als nicht radikalisch postulierten Vorgangs ist wesentlich höher, als die des Produkts des postulierten Radikalmechanismus. Im Gegensatz dazu zeigen sich Signale, wie $m/z = 242,057$ oder $m/z = 150,031$ als sehr intensive Signale im Vergleich zu deren nichtradikalischen Nachbarmolekülen. Durch die Position des radikalischen Elektrons am Aromaten bei $m/z = 242,057$ oder die Möglichkeit eine cyclisierte Struktur einzugehen könnte die besondere Stabilität erklärt werden.

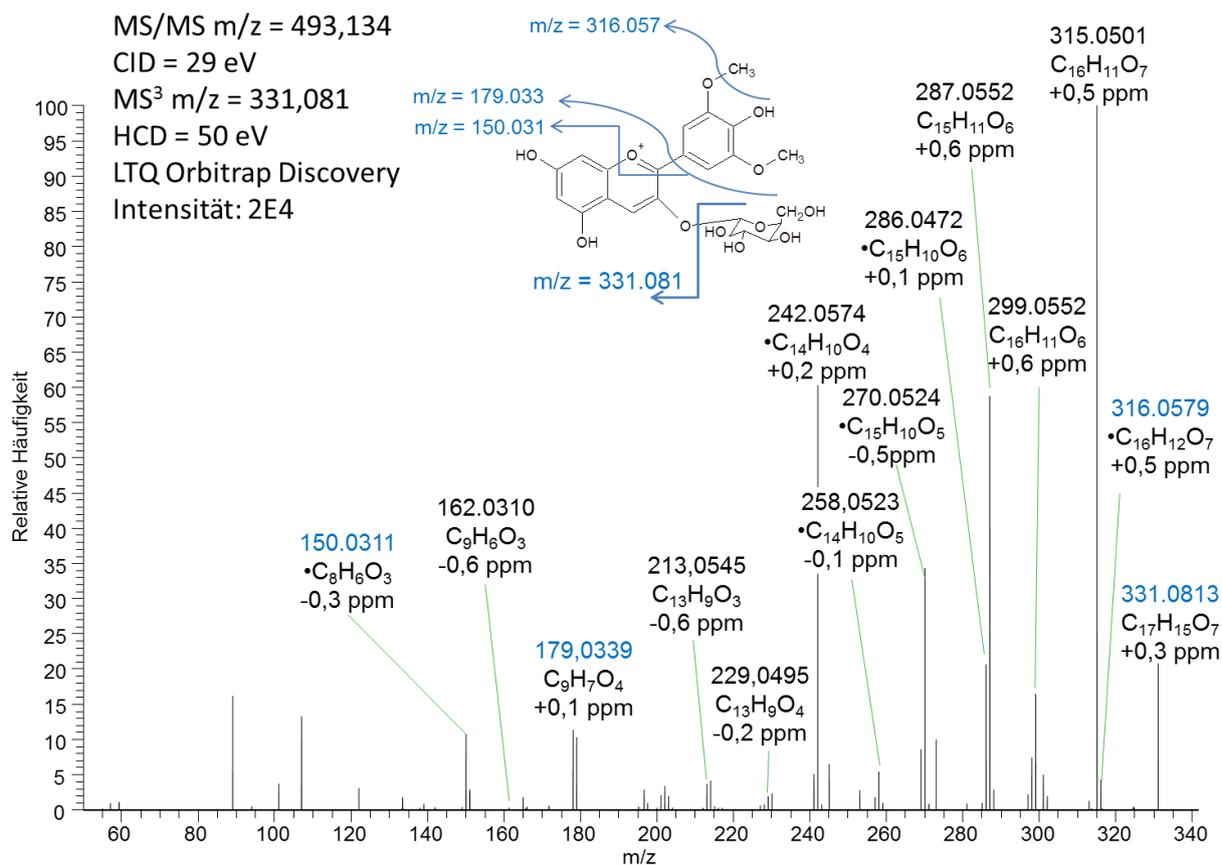


Abbildung 3-8: Charakteristische Fragmentationen von Malvidin-3-glucosid mit Zuweisung der Elementarzusammensetzung und Massenabweichung

Eine Übersicht der möglichen Strukturen für einige detektierte Fragmentationen von Malvidin ist in Abbildung 3-9 gegeben. Diese Vorschläge beziehen sich auf neue Berechnungen via *MassFrontier* 7.0, welche die Veröffentlichungen von Oliveira *et al.* (blau) und die Berechnungen von Barnes *et al.* (rot) implementiert.^{141, 142} Die plausibelsten Vorschläge der Software wurden durch manuelle Intervention ausgewählt. Die verschiedenen gegebenen Strukturen im Falle der Radikalkationen können über Reaktionen, wie die α -Spaltung von Bindungen, radikalische Umlagerungen etc. (siehe Anhang Kapitel A.3) erklärt werden. Mit „Lib“ (Library) werden Reaktionspfade bezeichnet, die bei Oliveira *et al.* oder Barnes *et al.* bereits beschrieben, jedoch nicht näher charakterisiert wurden.^{141, 142} Insgesamt bestätigen die Messungen und manuell ausgewählter Berechnungen mittels der Software die Struktur der Signale $m/z = 316,057$, $m/z = 315,050$, $m/z = 287,055$, $m/z = 270,052$ (alle nach Oliveira *et al.*) und $m/z = 150,031$ (nach Barnes *et al.*).^{141, 142} Für die Signale $m/z = 299,055$, $m/z = 286,047$, $m/z = 242,057$, $m/z = 213,049$, $m/z = 179,033$ und $m/z = 163,031$ konnten erstmals

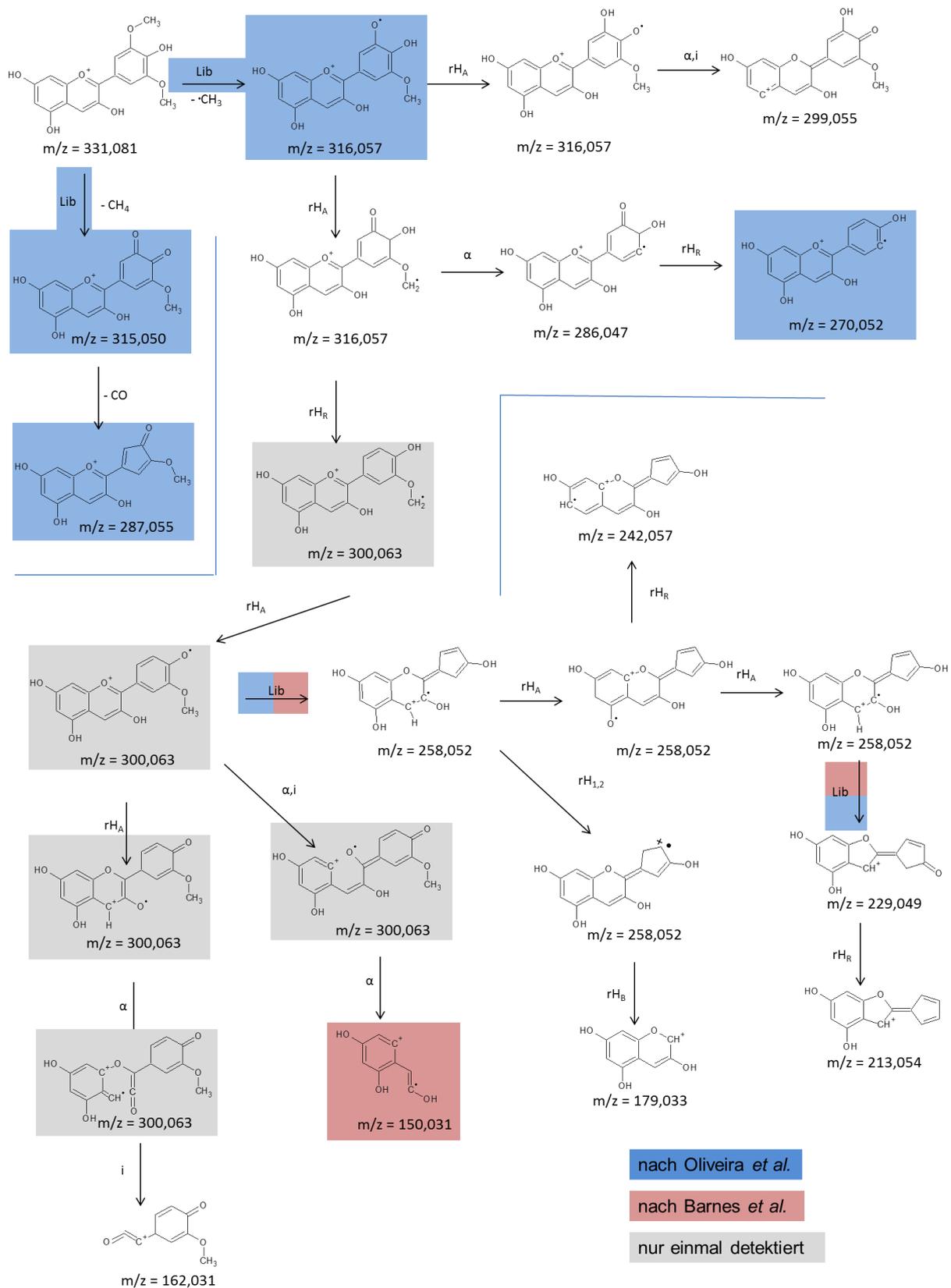


Abbildung 3-9: Zuweisung von Strukturen und diese verknüpfende Reaktionen verschiedener beobachteter charakteristischer Fragmentionen von Malvidin, basierend auf Berechnungen der Software *MassFrontier*^{141,142}

Strukturen mit den zu ihnen führenden Reaktionen angegeben werden, welche auf Berechnungen der Software *MassFrontier* beruhen. Die Signale $m/z = 258,052$ und $m/z = 229,049$ beruhen auf Reaktionen, die explizit an anderen Anthocyanidinen in der Literatur (Oliveira *et al.* sowie Barnes *et al.*)^{141, 142} beschrieben wurden und nun von der Software auf Fragmentationen von Malvidin angewendet wurden. Das Signal bei $m/z = 300,06$ (siehe Abbildung 3-9) konnte nur einmal in einem CID-Massenspektrum mit sehr geringer Intensität detektiert werden. Hierfür kann eine sehr instabile Verbindung angenommen werden.

Größtenteils können aber die von Barnes *et al.* dargestellten Ergebnisse bestätigt werden. Jedoch geben Barnes *et al.* an, dass mit hoher Massengenauigkeit gearbeitet wurde, selten ist jedoch die Massenabweichung einzelner Signale kleiner als 2 ppm.¹⁴² Im Falle der Fragmentationen des Cyanidins werden Massenabweichungen von bis zu 18,8 ppm angegeben. Weiterhin lieferte ein systematischer Fehler in der Betrachtung des Fragmentions Aglykon-4CO-C₂H₂O einen Wert, der um $\Delta m/z = 0,0061$ zu hoch liegt. Für Pelargonidin beispielsweise wurde angegeben, dass dieses Fragment detektiert wurde, es ergibt sich so für das detektierte $m/z = 117,0781$ mit einem theoretischen $m/z = 117,0699$ eine Massenabweichung von +70 ppm.¹⁴² Mit einer solchen Abweichung der Massengenauigkeit ist die Angabe der Zusammensetzung sehr unsicher. Bei Verwendung eines Orbitalfallen-Massenanalysators, wie er in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, sind diese Werte deutlich kleiner und stabiler (< 1 ppm). Daher sind diese Ergebnisse besser dazu geeignet die exakte Zusammensetzung zu bestimmen. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Massenauflösung. Diese gewährleistet neben der hohen Massengenauigkeit, dass keine Signale von anderen überlagert werden, bzw. zu Signalen zusammenfallen. Sie können bei der Interpretation zu falschen Annahmen führen. Bei dem von Barnes *et al.* verwendeten Ionenfallen-TOF-Hybrid-Massenspektrometer ist die Massenauflösung stark begrenzt, dagegen ist sie bei Verwendung von Orbitalfallen-Massenanalysatoren deutlich höher.¹⁴² Für die in diesem Kapitel gezeigten Messungen wurde eine Auflösung von $R = 30000$ (bei $m/z = 200$) verwendet.

Die Fragmentierung mittels HCD erlaubt die Detektion von Fragmentationen, welche bei Barnes *et al.* zum Teil nur berechnet wurden, jedoch nicht detektiert werden konnten.¹⁴² Als Beispiel sei hier $m/z = 131,0491$ genannt (vgl. Tabelle A-3 im Anhang).

Für Malvidin konnten in dieser Arbeit hochaufgelöste akkurate Massenspektren des Aglykons und verschiedener charakteristischer Fragmentationen erhalten werden. Die von Oliveira *et al.* beschriebenen Fragmentationen konnten größtenteils bestätigt werden.¹⁴¹ Die Fragmentmasse,

welche von Oliveira *et al.* mit $m/z = 300$ angegeben wurde, konnte in dieser Arbeit nur einmal in sehr geringer Intensität detektiert werden.¹⁴¹ Oliveira *et al.* geben dieses jedoch als ein sehr intensives und scheinbar kontinuierlich detektiertes Signal an.¹⁴¹ Die Ergebnisse dieser Arbeit legen für die hier verwendeten Methoden nahe, dass es sich dabei möglicherweise um das Signal bei $m/z = 299,05$ handelt, welches von Oliveira *et al.* nicht beschrieben wurde.¹⁴¹ Eine Massengenauigkeit kann für die Messungen von Oliveira *et al.* nicht angegeben werden, da keine Dezimalstellen der m/z -Werte angegeben wurden, obwohl ein orthogonal-Beschleuniger-Flugzeit-Hybridmassenspektrometer für diese Messungen eingesetzt wurde.¹⁴¹

Oliveira *et al.* beschrieben weiterhin Spaltprodukte der Kohlenhydrate, welche noch mit dem Aglykon verbunden sind.¹⁴¹ In der vorliegenden Arbeit konnten Signale, die in der Nähe dieser m/z -Werte liegen detektiert werden. Aber weder mit CID- noch mit HCD-Fragmentierung konnten sinnvolle Zusammensetzungen für diese Massen, sowohl für Anthocyan-Glucoside, als auch für Anthocyan-3,5-diglucoside, sowie Anthocyan-3-Rutinoside beschrieben werden. Hierfür wurden Massenabweichungen von > 70 ppm erhalten. Dies deckt sich mit den Angaben von Barnes *et al.*¹⁴² Daher muss davon ausgegangen werden, dass mit den in dieser Arbeit verwendeten Fragmentierungsmethoden die Zuckerkomponente als Ganzes abgespalten wird und sogleich das Aglykon nachgewiesen werden kann.

Die vorliegenden Ergebnisse machen die Notwendigkeit der hochauflösenden, hochgenauen Massenspektrometrie für solche Anwendungen deutlich. Um eine fundierte Aussage über die exakte elementare Zusammensetzung treffen zu können, ist der Einsatz dieser modernen Technik unerlässlich. Die mit sehr hoher Massengenauigkeit (< 1 ppm) aufgenommenen Fragmentationenspektren können nun die in den Arbeiten von Barnes *et al.* und Oliveira *et al.* vorgeschlagenen Strukturen bestätigen. Mittels der Software *MassFrontier* konnten weitere Strukturen vorgeschlagen werden, die in der Literatur bisher nicht beschrieben wurden.

Im Folgenden sollen diese Fragmente als Schablonen dienen, um das Aglykon möglichst zweifelsfrei zu identifizieren, wenn dies aus Verbindungen hervorgeht, welche nicht als Standardsubstanz erworben werden konnten. Die aufgenommenen hochaufgelösten Massenspektren der Fragmentationen für die weiteren vier Aglyka der Anthocyane Pelargonidin, Delphinidin, Peonidin und Petunidin sind in Abbildung A-1, Abbildung A-2, Abbildung A-3 und Abbildung A-4 (siehe Anhang) gezeigt.

3.3.1.2 Unterschiede zwischen HCD- und CID-Fragmentierung

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, tragen die Fragmentationen des Aglykons zu dessen Identifizierung bei. Um charakteristische Fragmentationen zu erzeugen kann man sich verschiedener Techniken bedienen. Hier standen die CID- und die HCD-Fragmentierung zur Verfügung. CID findet dabei mittels stoßinduzierter Dissoziation durch ein Kollisionsgas innerhalb der Ionenfalle (hier LTQ) statt. HCD findet in einer separaten Oktopol-Stoßzelle statt und gewährleistet die Stabilisierung eines breiten Massenbereichs sowie höhere Kollisionsenergien als CID. In Abbildung 3-10 ist die Fragmentierung von Malvidin-3-O-(6''-O-coumaryl)-Glucosid mittels HCD-Technik an einem Q Exactive Massenspektrometer dargestellt. Man erhält neben dem Signal des Aglykons von Malvidin auch intensive Signale charakteristischer Fragmentationen, welche schon im vorhergehenden Kapitel im Detail beschrieben wurden. Der Massenbereich, welcher zur Detektion zur Verfügung steht, erstreckt sich von $m/z = 50-700$. Die grau eingefärbte Fläche symbolisiert den mittels CID-Fragmentierung nicht detektierbaren m/z -Bereich. Die Fragmentierung erfolgt hierbei zwar ebenfalls in einem Quadrupol, dieser ist allerdings als lineare Ionenfalle konzipiert. Der detektierte Massenbereich reicht hier, abhängig von der Masse des Vorläuferions durch die Isolierung, nur bis zu $m/z = 165$ herab (detektierter Massenbereich $m/z = 165-650$). Via CID können daher nur bestimmte diskrete Massenbereiche, abhängig von der Masse des Vorläuferions, aufgenommen werden. So kann hier für Malvidin-3-O-(6''-O-coumaryl)-glucosid nur mittels HCD das für die Aglyka der Anthocyane charakteristische Fragment des A-Ringes $m/z = 150,031$ detektiert werden und so zur Identifizierung beitragen. Insbesondere bei Verbindungen, die nicht als Standardsubstanzen erworben werden können, wie etwa acylierte Anthocyane oder Metabolite, wie Glucuronide, ist dies von großer Bedeutung.

Ein weiterer interessanter Punkt ist die effektiv nutzbare Kollisionsenergie, die anhand der Fragmentationen beobachtet werden kann. Mittels CID kann auch bei sehr hohen Kollisionsenergien nur das Aglykon als Hauptfragmentation detektiert werden. Charakteristische Fragmentationen können lediglich mit sehr geringer Signalintensität beobachtet werden (vgl. Abbildung 4-1 in Kapitel 4.1). Bei gleicher nomineller Kollisionsenergie (beispielsweise 50 % an LTQ Orbitrap) können hingegen mittels HCD charakteristische Fragmentationen mit hoher Intensität bereits im MS/MS-Experiment

beobachtet werden. Die realen Kollisionsenergien weichen daher offensichtlich voneinander ab. Die Geometrie der HCD-Zelle ist speziell auf die Fragmentierung ausgerichtet, aber auch die Stoßprozesse laufen hier in anderer Art und Weise ab. So sind hier Mehrfachstöße der Fragmentationen selbst möglich, welche eine Fragmentierung der Fragmentationen zur Folge haben und diese in höheren Intensitäten beobachtet werden können, als dies bei CID-Experimenten der Fall ist.

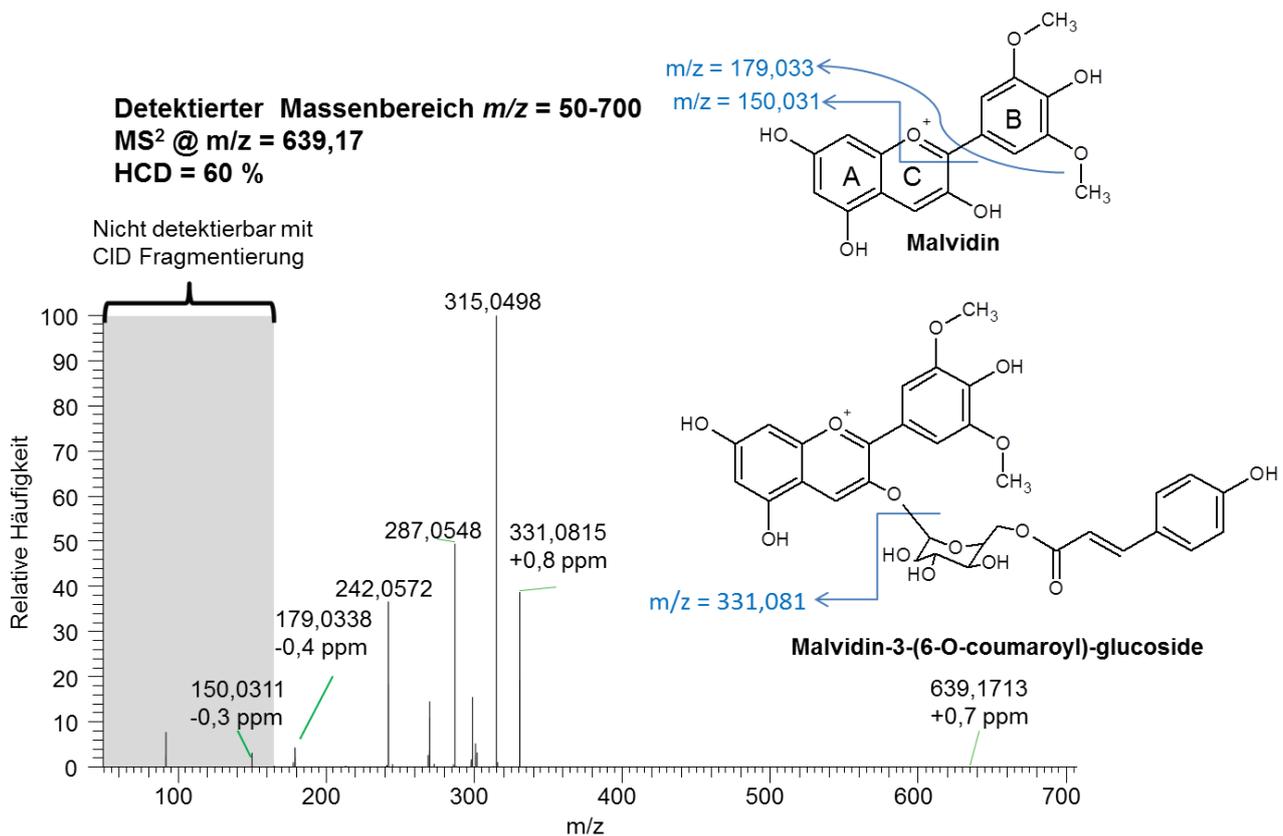


Abbildung 3-10: HCD-Fragmentierung am Beispiel von Malvidin aus seinem Coumaroyl-glycosid ($m/z = 639,171$, Q Exactive)

Dies bedeutet ebenfalls, dass mittels CID mindestens ein weiteres Fragmentierungsexperiment (MS^3) erforderlich wäre, um eindeutige Signale mit ausreichender Intensität der Fragmentationen des Aglykons zu erhalten. Ein solcher Schritt wäre innerhalb eines LC-MS-Experiments von Nachteil, da wertvolle Zeit für die Aufnahme von weiteren massenspektrometrischen Daten verloren ginge und kleinere chromatographische Signale nicht ausreichend detektiert würden. Verwendet man hingegen eine Fragmentierung via HCD, so kann schon in einem MS/MS-Experiment das Aglykon und dessen charakteristische Fragmente erzeugt werden. Die Messzeit kann so deutlich effektiver

genutzt werden, um ausreichend chromatographische Daten zur Quantifizierung zu generieren.

3.3.1.3 All ion fragmentation (AIF) als Möglichkeit der retrospektiven Identifizierung

Humane Urinprobe 0-3 h nach Saftgabe

AIF Massenbereich $m/z = 200-850$

Fragmentierung: HCD = 15 eV

Extrahiertes Ionenchromatogramm

$m/z = 331,0809-331,0829$

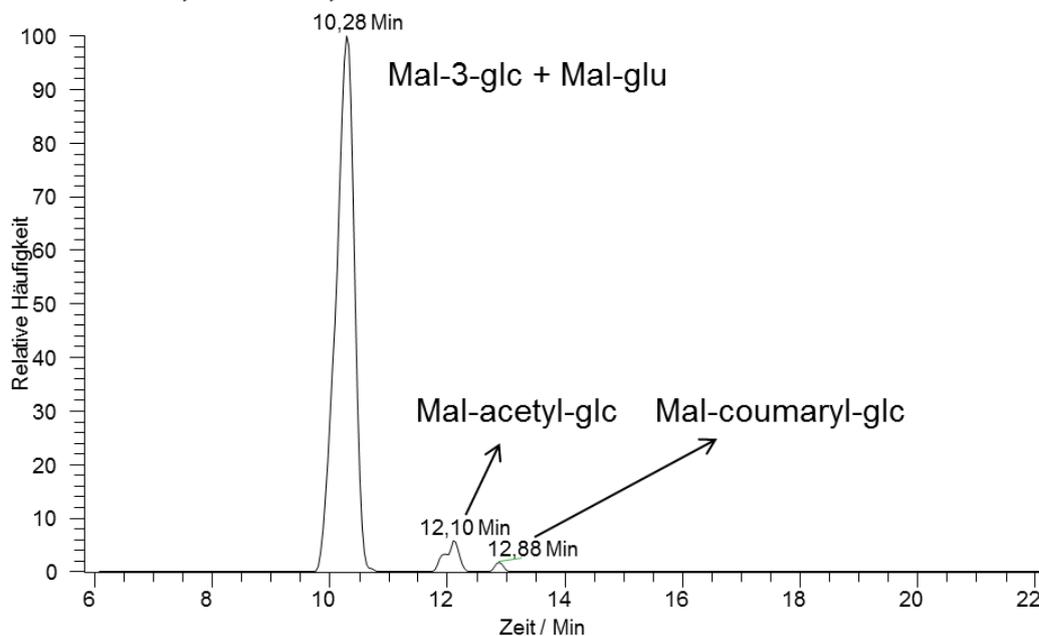


Abbildung 3-11: AIF-Ionenchromatogramm einer humanen Urinprobe (*Exactive*) zeigt Aglykonsignale von Malvidin zur Retentionszeit von dessen Glucosid bzw. Glucuronid und acylierter Spezies

Im Zuge der Messungen der humanen Urinproben konnte mit Hilfe der neuartigen Fragmentierungsmethode HCD eine sogenannte „All Ion Fragmentation“ (AIF) durchgeführt werden. Hierbei wird das gesamte Ionenpaket des detektierten Massenbereiches fragmentiert und anschließend alle Fragmentationen hochaufgelöst und mit hochgenauer Masse vermessen. In Abbildung 3-11 ist ein extrahiertes AIF-Ionenchromatogramm der Masse von Malvidin ($m/z = 331,0809-331,0829$) einer humanen Urinprobe dargestellt. Das Experiment wurde an einem Exactive Massenspektrometer durchgeführt. Die Fragmentierung liefert nach Spaltung der Zuckerkomponente das Aglykon Malvidin. Das Glucosid und das Glucuronid eluieren hier parallel, dementsprechend ist das Signal bei einer Retentionszeit von 10,28 Minuten für die beiden Substanzen identisch. Acylierte Spezies von Malvidin eluieren bei

Retentionszeiten < 12 Minuten. Die hier gezeigten Signale stammen von Mal-3-(6-O-acetylglucosid) und Mal-3-(6-O-coumarylglucosid). Weitere Signale sind nicht zu beobachten, daher kann ausgeschlossen werden, dass Metabolite, wie Sulfatide oder Glucosid-glucuronide in den Proben in relevanten Mengen enthalten waren.

Die verschiedenen Probenarten wurden, wie vorhergehend beschrieben, ebenfalls auf Aglykon-Fragmente geprüft, die zu Retentionszeiten detektiert werden, die nicht mit den bekannten Anthocyanen oder Glucuroniden korrelieren. Bei diesem Verfahren konnten keine weiteren hohen Aufkommen von Aglykon-Fragmenten neuer Verbindungen detektiert werden. Speziell wurde nach sulfatierten oder methylierten Verbindungen der Anthocyane gesucht, da diese in der Literatur, vor allem für andere Flavonoide, wie Quercetin, beschrieben wurden.⁸⁷⁻⁸⁹ Daher wurde spezifisch nach Signalen gesucht, die zu einer identischen Retentionszeit auftreten. Dies führte ebenfalls zu keiner weiteren Identifizierung.

3.3.1.4 Stabilität des Isolationsvermögens des Q Exactive Massenspektrometers

Es wurde eine Prüfung am Q Exactive Massenspektrometer bezüglich der Stabilität des Isolationsvermögens bei MS/MS Experimenten, abhängig vom gewählten Isolationsfenster, durchgeführt. Dies geschah um zu gewährleisten, dass durch die teilweise sehr geringe Isolationsbreite auch bei unterschiedlichen Konzentrationen stabile Ionenströme vorhanden sind. Die Messung wurde jeweils fünfmal wiederholt und eine Kollisionsenergie von 25 % (HCD) verwendet. Die resultierende Fläche der Fragmentionen der Anthocyan-3-Glucoside ist dabei außerordentlich stabil und variiert nie mehr als 7% (siehe Anhang Tabelle A-6). Somit kann ein kleines Massfenster unterhalb von $\Delta m/z = 1$ zur Isolation vor der Fragmentierung verwendet werden, um so auch zu gewährleisten, dass zu einer hohen Wahrscheinlichkeit tatsächlich nur die jeweilige interessierende Masse fragmentiert wird. Das Isolationsvermögen wurde somit deutlich gegenüber der Ionenfalle verbessert und erlaubt auch eine Isolierung von m/z -Werten, die relativ nahe beieinander liegen, um eine Differenzierung über ihre Fragmente vorzunehmen.

Es ist allerdings ebenfalls zu beachten, dass durch die geringe Breite des Isolationsfensters auch eine kleinere Anzahl von Vorläuferionen in die HCD-Zelle gelangen. Hierdurch sinken die resultierenden Flächen der Signale in den Fragmentionenspektren (Kollisionsenergie jeweils 25%). In Tabelle 3-11 ist die Fläche bei einem Isolationsfenster von $\Delta m/z = 2$ auf 100% festgelegt. Bei einer Reduzierung auf $\Delta m/z = 1$ ist die detektierte Fläche nur um bis zu

12,6% geringer. Eine weitere Reduzierung auf $\Delta m/z = 0,5$ resultiert jedoch in einer Abnahme um bis zu 35,2%. Da aber diese Messungen sehr hohe Stabilität zeigen, ist es möglich eine solch niedrige Breite für das Isolationsfenster zu verwenden, allerdings sollte für sehr gering vorliegende Substanzen beachtet werden, dass die resultierenden Fragmente möglicherweise in ihrer Intensität stark gemindert werden. Daher wurde ein Isolationsfenster von $\Delta m/z = 1$ zur Messung verwendet.

Tabelle 3-11: Detektierte Flächen der jeweiligen Fragmentationen (Aglykon) bei unterschiedlichen Isolationsbreiten

Isolationsfenster/ $\Delta m/z$	% Fläche Aglykon Del	% Fläche Aglykon Cy	% Fläche Aglykon Pet	% Fläche Aglykon Peo	% Fläche Aglykon Mal
2 (n=5)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 (n=5)	94,7	94,6	87,4	92,7	91,9
0,5 (n=5)	76,3	73,9	66,8	68,1	64,8

3.3.2 Quantifizierung

Neben der Identifizierung der verschiedenen Substanzen stand die Quantifizierung im Fokus der verschiedenen Studien. Eine Quantifizierung erfolgte mittels Dakapo-Extraktlösungen. Durch umfangreiche quantitative Untersuchungen der Forschungsanstalt Geisenheim konnte der Gehalt an Mal-3-glc im Extrakt ermittelt werden. Die Konzentration von Mal-3-glc in den Extraktlösungen der Dakapo-Traube wurde hierbei über eine Standardverbindung ermittelt und dies regelmäßig überprüft. Eine Lösung des Traubenextrakts diente in der Folge als immer wieder vermessene Referenz. Das in der Extraktlösung enthaltene Mal-3-glc wurde als Referenz zur Quantifizierung aller Anthocyane verwendet, wie es oftmals bei LC-MS-basierten Anthocyanstudien durchgeführt wurde.^{35, 72, 158, 159} Die Gründe für dieses Verfahren sind unterschiedlicher Natur. Einerseits war der Extrakt kostenneutral in ausreichender Menge vom Projektpartner aus Geisenheim zu erhalten und unterlag bei -20°C keinen Veränderungen. Andererseits gewährleisteten die weiteren enthaltenen Anthocyane des Extrakts eine kontinuierliche Überprüfung der Stabilität der Retentionszeit und der Linearität der Signalintensität. Eine Quantifizierung sollte nicht nur im positiven, sondern auch im negativen Ionenmodus durchgeführt werden, um parallel auch mögliche Abbauprodukte der Anthocyane in Form von phenolischen Säuren, wie 3,4-DHB oder Syringasäure

durchzuführen. Das Hauptaugenmerk lag aber auf der Analyse der Anthocyane selbst und ihren direkten (Phase-II) Metaboliten, wie Glucuroniden.

3.3.2.1 Simultane Messungen im positiven und negativen Ionenmodus

Wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben, degradieren Anthocyane in neutralem oder schwach basischem Milieu zu einer Aldehyd- und einer Phenolsäurekomponente. Auch für den Abbau durch Mikroorganismen (siehe Tierstudie Darminhaltproben Kapitel 5.2.1) wird eine solche Reaktion angenommen. Phenolsäuren, wie Syringasäure oder 3,4-DHB, werden massenspektrometrisch im negativen Ionenmodus detektiert. Bei Exactive und Q Exactive Massenspektrometern besteht die Möglichkeit, sehr schnell zwischen dem positiven und negativen Ionenmodus zu schalten. Das Wechseln des Ionenmodus kann während einer LC-MS-Messung kontinuierlich durchgeführt werden. Bei einem FT-ICR-MS ist dies nicht möglich. Die Beschränkung auf eine Polarität pro Experiment ist notwendig.

Wie in Abbildung 3-12 dargestellt, erhält man in beiden Modi chromatographische Signale für Ionen, die eine Quantifizierung gewährleisten. So kann beispielsweise parallel auf Malvidin-glucuronid im positiven Ionenmodus (A) und auf Dihydroxybenzoesäuren im negativen Ionenmodus (B) analysiert werden.

Urin- und Plasmaproben der Humanstudie wurden kontinuierlich in beiden Ionenmodi vermessen. 3,4-DHB, ein Bestandteil des verzehrten Saftes, konnte in den verschiedenen Proben identifiziert und quantifiziert werden (siehe Kapitel 5.3).

Im Falle der Syringasäure, dem Degradationsprodukt von Malvidin (Hauptanthocyan der Dakapo-Traube), war die Detektionsschwelle jedoch so hoch, dass diese erst in höherer mikromolarer Konzentration detektiert werden konnte. Um eine Aussage über diese Verbindung machen zu können, wurde mit dem neuen U-HPLC System eine UV/VIS-Methode entwickelt, um diese Säure zu quantifizieren. Im Falle von Zellkulturversuchen war dies auch möglich. Bei Plasma- oder Urinproben war die Verunreinigung mit anderen Substanzen zu groß, um eine solche Analyse via UV/VIS-Chromatogrammen durchzuführen. (vgl. Kapitel 4.2 und Kapitel 4.3).

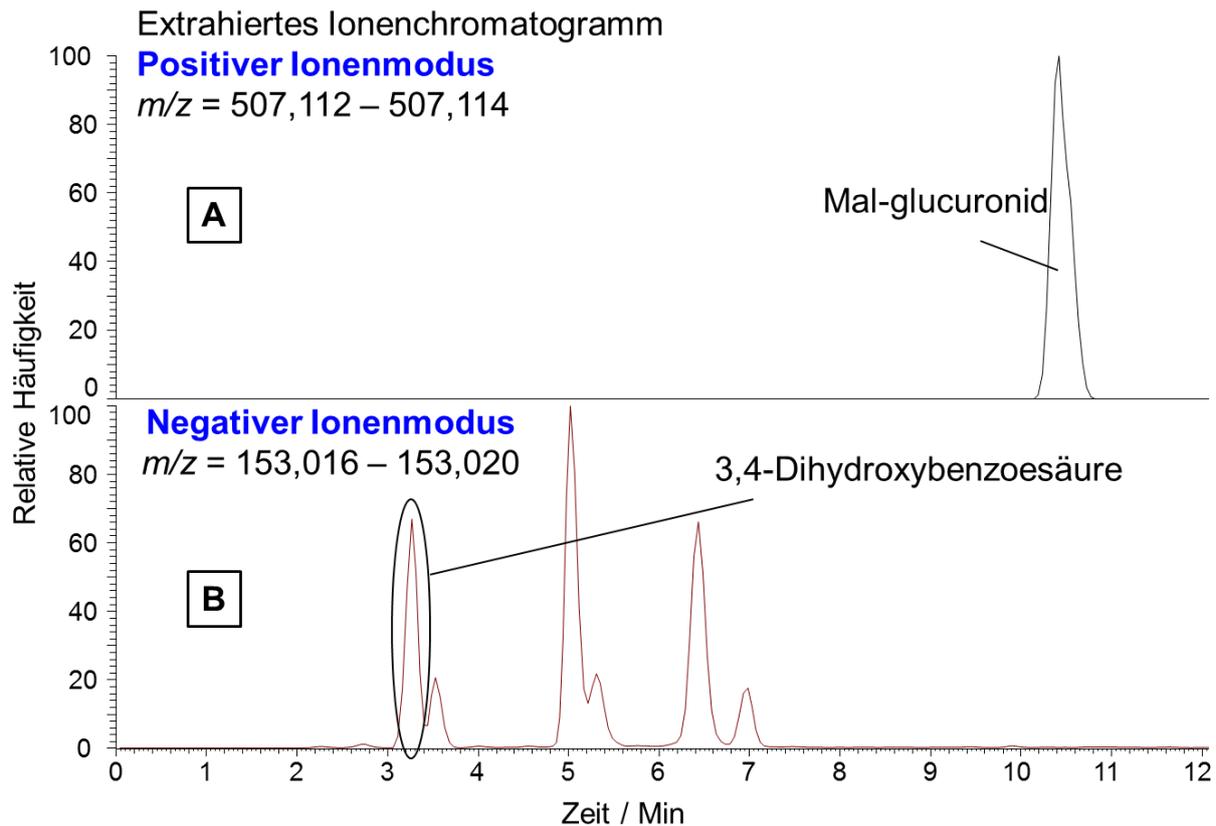


Abbildung 3-12: Simultane Aufzeichnung der Massenspektren im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus anhand einer humanen Urinprobe (Exactive Massenspektrometer)

3.3.2.2 Wahl und Bedeutung des Massenfensters

Die exakte Bestimmung des m/z -Wertes ist nicht nur bei der Identifizierung, sondern auch bei der exakten Quantifizierung von Bedeutung. Durch die höhere Spezifität der Messungen mit hochauflösenden hochgenauen Massenspektrometern (FTICR-MS oder Orbitalfallen-Massenanalysator) kann auf MS/MS-Experimente bei der Quantifizierung verzichtet werden.^{160, 161} Dies bietet den Vorteil, dass mehrere Analyten zeitgleich analysiert werden können. Darüber hinaus müssen nicht alle Analyten (und deren Fragmentierungsverhalten) vor der Messung bekannt sein. So können eventuell interessante Analyten auch noch nach der Messung zugeordnet werden. Dies ist bei herkömmlichen Messungen mit MRM- (Multiple Reaction Monitoring) oder SRM- (Selected Reaction Monitoring) Modus nicht ohne weiteres möglich.

In Abbildung 3-13 wird deutlich, wie sich die quantitative Information für einen Analyten einer humanen Urinprobe in einem extrahierten Ionenchromatogramm durch Eingrenzen des

Massenbereiches präzisieren lässt. Bei einem Massenfenster von nur $\Delta m/z = 0,01$ ist eine deutliche chromatographische Schulter sichtbar. Bei einer Reduktion des Massenfensters auf $\Delta m/z = 0,002$ ist hingegen nur noch das Signal von Peonidin-Glucuronid sichtbar und man ist in der Lage eine wesentlich genauere Quantifizierung über die Peakflächen der Ionenchromatogramme durchzuführen. Dies ist nur möglich, da die gewählte Methode der verwendeten Massenspektrometer kontinuierlich stabil läuft, so dass ein sehr kleines Massenfenster dauerhaft zur Integration der Daten herangezogen werden kann. Wie sich dies auf die quantitativen Daten auswirkt, ist in Kapitel 5.3.1 in Abbildung 5-11 näher erläutert. Eine Ausnahme stellen die in Kapitel 3.3.2.3 angesprochenen apikalen Zellkulturproben dar.

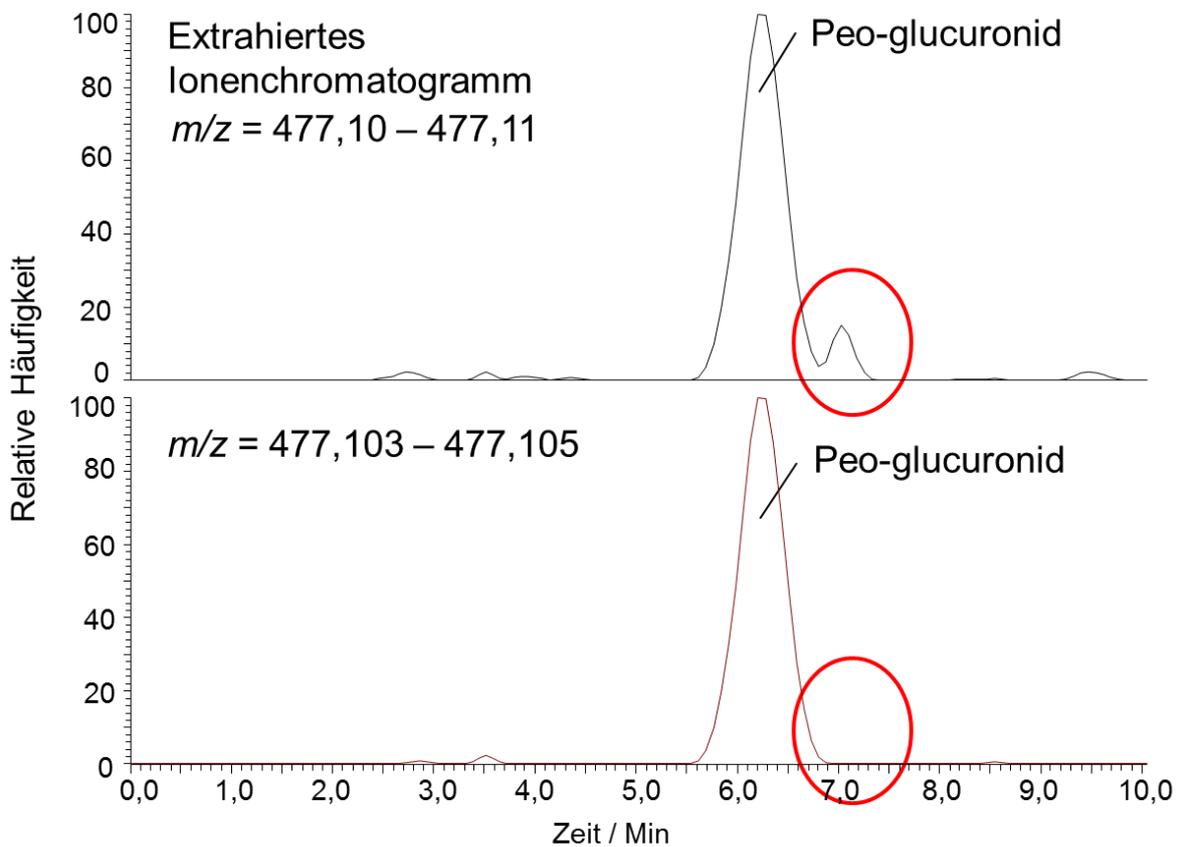


Abbildung 3-13: Einfluss des Massenfensters auf die Quantifizierungsdaten am Beispiel einer humanen Urinprobe

Durch die kontinuierliche Messung mit hoher Massengenauigkeit und hoher Auflösung in einem breiten Massenbereich ($m/z = 180-850$ bzw. $m/z = 200-850$) wird eine retrospektive Identifizierung ermöglicht. Es ist möglich, die Daten zu einem späteren Zeitpunkt nach der Messung nach chromatographischen Signalen bestimmter m/z -Werte zu durchsuchen und diese auf ihre Zusammensetzung bis herunter zu sehr geringen Abweichungen einzugrenzen.

Dies kann durch die „All Ion Fragmentation“ unterstützt werden, mit welcher auf parallel auftretende Aglykonfragmente geprüft werden kann (vgl. Kapitel 3.3.1.3).

3.3.2.3 Rekalibrierung und Massenverschiebung

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, wurde kontinuierlich eine interne Kalibrierung der einzelnen Spektren mittels „lock mass“-Funktion im positiven Ionenmodus durchgeführt. In einigen wenigen Messungen wurden durch ein Softwareproblem die ausgewählten Referenz-Massen nicht mehr korrekt zugeordnet. Infolgedessen belief sich die Massenabweichung in diesen Messungen auf 50-70 ppm. Dieses Problem wurde nur einmal für wenige Messungen ($n < 15$) beobachtet. Durch die Möglichkeit der Rekalibrierung von ganzen LC-MS-Messungen („RecalOffline“-Funktion) auf interne Standards oder bestimmte kontinuierlich auftretende Signale, welche auch als Referenz-Massen verwendet wurden (siehe Kapitel 3.3), konnten diese Daten trotzdem verwendet werden. Nach der Rekalibrierung konnten die interessierenden Substanzen mit einer Massengenauigkeit < 4 ppm quantifiziert werden.

In apikalen Zellkulturmedien mit sehr hohen Konzentrationen an Anthocyanen konnte ein Phänomen beobachtet werden, bei welchem sich die Masse der Hauptanthocyane, wie Mal-3-glc, bei zunehmender Intensität erhöht. Bei geringerer Konzentration ist dieses Phänomen nicht in diesem Ausmaß festzustellen, wie beispielsweise für Cy-3-glc. Wie aus Abbildung 3-15 zu entnehmen ist, kann mit einem Massenfenster von $m/z = 493,133-493,138$ (A) ein chromatographisches Signal erzeugt werden. Bei einem Massenfenster von $\Delta m/z = 0,002$ bricht die Intensität am vorherigen Signalmaximum (B) abrupt ein, um am Ende des chromatographischen Signals wieder anzusteigen. Wie die aufgetragene Massengenauigkeit in C zeigt, weicht das Signal von Mal-3-glc zunächst nur mit 0,1 ppm von der exakten Masse ab. Im Maximum aus A jedoch weist es eine Abweichung von 4-5 ppm auf. Für die Quantifizierung musste hier beachtet werden, dass kontinuierlich größere Massenfenster zur Integration verwendet wurden.

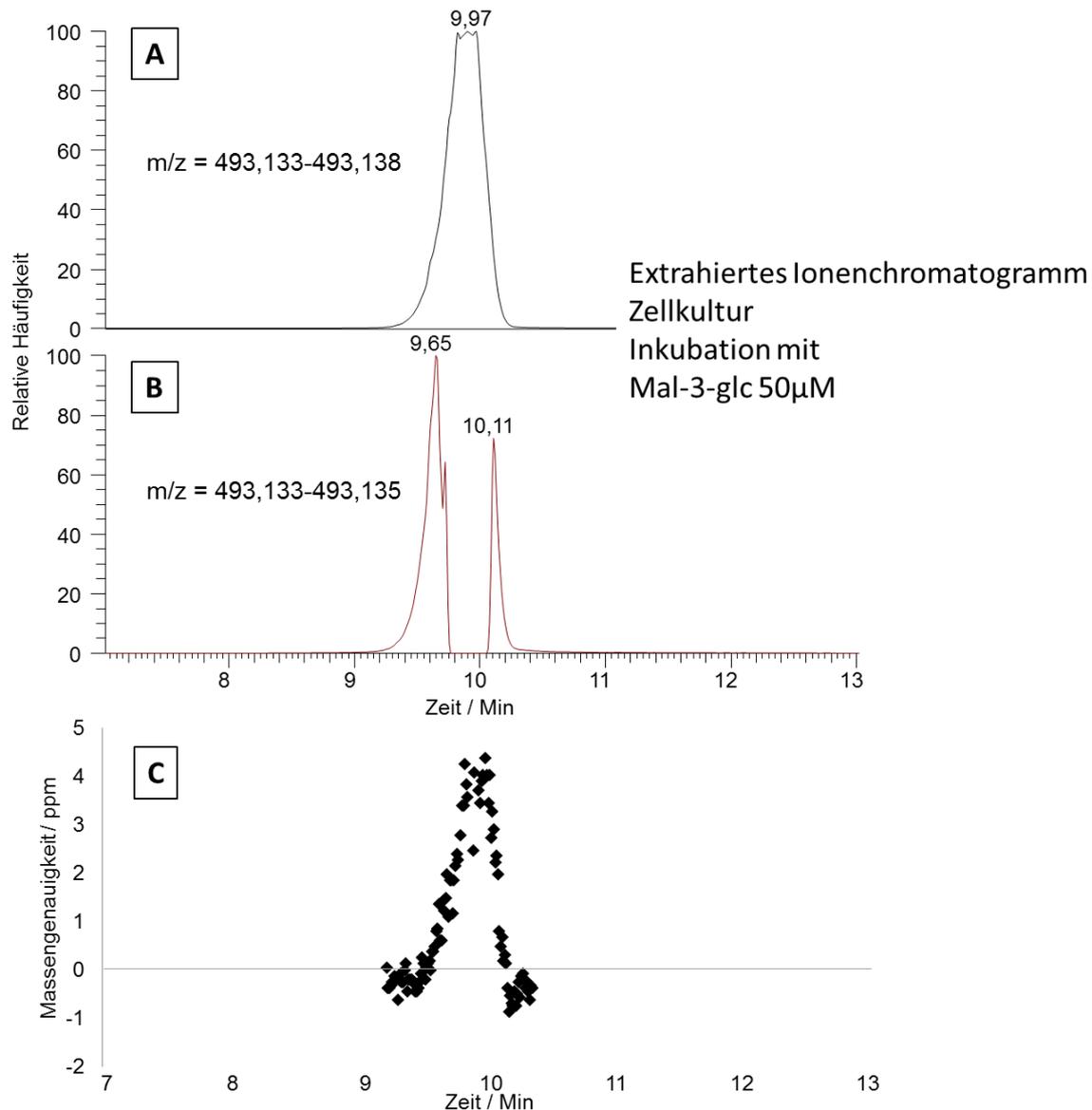


Abbildung 3-15: Massenverschiebung in einem LC-MS-Experiment einer apikalen Zellkulturprobe bei Verwendung eines Exactive Orbitrap Massenanalysators

Für FTICR-Massenspektrometer ist dieses Phänomen bereits beschrieben worden.¹¹⁵ Interessanterweise wurde dieser Effekt auch für einen Orbitalfallen-Massenanalysator beobachtet, die aber weit unempfindlicher gegen dieses Phänomen sein sollten. Hierbei erzeugen viele Ionen gleicher Masse und Ladung eine Veränderung der Wechselwirkung von Raumladung¹⁶²⁻¹⁶⁴ und Bildströmen¹⁶⁵. Dies resultiert in einer veränderten gemessenen Frequenz, über welche die m/z -Werte bestimmt werden. Das Phänomen trat trotz einer angewandten AGC („automated gain control“, automatische Verstärkungsregelung) auf, die für alle Experimente verwendet wurde, um die Konzentration der Ionen in der Orbitalfalle

gering zu halten. Parallel wurde die kontinuierliche Regelung der Injektionszeit von 250 ms auf ein Minimum von nur 2 ms beobachtet. Dies reichte nicht aus, um den oben beschriebenen Effekt zu unterbinden.

Dieses Phänomen konnte nur bei einzelnen apikalen Proben ($n < 10$) der Zellkulturstudie beobachtet werden, bei welchen absichtlich ein sehr hohes Injektionsvolumen bezogen auf die Konzentration gewählt wurde, um mögliche sehr gering enthaltene Metabolite zu suchen. Um solche Probleme auszuschließen wurde kontinuierlich eine manuelle Überprüfung der Daten durchgeführt. Im Verlauf dieser Prüfung aller Studien konnte auch bei sehr hochkonzentrierten Proben (Plasma, Urin, Darminhalt) kein analoges Phänomen beobachtet werden.

3.3.2.4 Stabilität der Messung

Im Folgenden soll dargestellt werden, dass die hochkomplexen Proben reproduzierbar vermessen werden konnten. Den Urin- und Plasmaproben wurde vor der SPE ein interner Standard zugegeben, welcher Schwankungen bei der Prozedur der Extraktion oder der Messung korrigieren soll. Mittels kontinuierlicher Messungen von Referenzlösungen (Dakapo-Extrakt) und Betrachtung des internen Standards soll die Stabilität der Messung überprüft werden.

Im Falle des humanen Urins wurde vor der Festphasenextraktion Cyanidin-3,5-Diglucosid als interner Standard zugegeben. Entgegen der zuvor durchgeführten Versuche mit Standardlösungen stellte sich diese Substanz im Gefüge der Urinmatrix als instabil heraus. Daher musste eine direkte Quantifizierung über Malvidin-3-Glucosid durchgeführt werden (siehe auch Kapitel 3.1.2.2).

Um die Stabilität der Messung in dieser komplexen Matrix zu prüfen, wurde eine Urinmischprobe aus verschiedenen humanen Proben der Fraktion 0-3 h siebenmal nacheinander vermessen. Die relative Standardabweichung stellt hier Werte mit maximal 8,6% dar, welches die direkte Quantifizierung als ausführbar bestätigt (siehe Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12: Sieben Wiederholungsmessungen einer Urinmischprobe und die Stabilität zweier Hauptanthocyane und deren Glucuronide

Mal-3-glc	Mal-3-glu	Peo-3-glc	Peo-3-glu
Konz./ nM ± Stdabw.			
4,58 ± 0,39	3,80 ± 0,31	2,89 ± 0,16	10,04 ± 0,72

Es wurden kontinuierlich Dakapo-Extrakt-Lösungen (vgl. Kapitel 3.3.2) zwischen den Probenreihen einzelner Probanden analysiert um die Stabilität und den Einfluss der Proben auf die Messanordnung zu prüfen. Zu bestimmten Zeiten wurde das System getrennt und gereinigt. Dies ergibt fünf Messabschnitte. Jedem liegt eine geltende Kalibrierreihe zugrunde. Die Standardabweichung wurde hier für Mal-3-glc bestimmt. Die Urinproben sind äußerst komplex und beeinflussen die Messung sehr stark. Auch durch Verwendung eines Ventils, welches zu Beginn der Trennung stark hydrophile und während des Spülschritts stark hydrophobe Verunreinigungen vom System fern hielt (vgl. Kapitel 3.2), konnte eine mit der Zeit eintretende Verschmutzung des Einlasssystems nicht gänzlich unterbunden werden. Trotzdem konnte auch über einen langen Zeitraum von nahezu 140 Messungen eine Abweichung von maximal 13% (Stdabw) der als Standard verwendeten Dakapo-Extrakt-Lösung beobachtet werden (siehe Tabelle 3-13).

Tabelle 3-13: Standardabweichung der Standardproben (Mal-3-glc), welche in einzelnen Messabschnitten zwischen Urinproben gemessen wurden

	Standard zwischen Probenreihen in Urinproben (Mal-3-glc)				
Messabschnitt	1	2	3	4	5
Anzahl Messungen im jeweiligen Abschnitt	116 7 Standards	138 29 Standards	96 14 Standards	64 12 Standards	113 17 Standards
Stdabw %	10	13	12	13	13

Den Plasmaproben wurde schon vor der Festphasenextraktion Pel-3-rut als interner Standard zugegeben, welcher eine sehr gute Stabilität in diesen Proben zeigte. Hier konnte aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Volumina der einzelnen Proben jedoch keine

Mischprobe, analog zu Urin, erstellt werden. Um dennoch eine Aussage zur Stabilität der Messung machen zu können, wurden parallel zu den Messreihen der Plasmaproben kontinuierlich Standardlösungen vermessen. Es ergaben sich aufgrund verschiedener Faktoren (Reinigen des Einlasssystems und der ESI-Quelle) insgesamt 4 Abschnitte während der Messserie der Plasmaproben. Für jeden Messabschnitt gilt eine Kalibriereihe, die auf ihre Eignung überprüft wurde. Wie aus Tabelle 3-14 zu entnehmen ist, sind die Werte für Mal-3-glc auch für sehr lange Messzyklen sehr stabil und zeigen bezüglich ihrer relativen Standardabweichung Werte deutlich unterhalb von 10%.

Tabelle 3-14: Standardabweichung der Standardproben (Mal-3-glc/Pel-3-rut), welche in einzelnen Messabschnitten zwischen Plasmaproben gemessen wurden

Standard zwischen Probenreihen in Plasmaproben (Mal-3-glc/Pel-3-rut)				
Messabschnitt	1	2	3	4
Anzahl Messungen im jeweiligen Abschnitt	137 7 Standards	281 30 Standards	73 6 Standards	54 11 Standards
Stdabw / %	4,1	3,8	1,3	7,2
Stabilität interner Standard in Plasmaproben-Reihen (Pel-3-rut)				
Messabschnitt	1	2	3	4
Stdabw / %	8,3	6,2	7,0	8,7

Der interne Standard (Pel-3-rut) der Plasmaproben war im Wesentlichen ebenfalls sehr stabil und die Standardabweichung liegt gemittelt für jeden Messabschnitt unterhalb von 10% (vgl. Tabelle 3-14). Bei einigen Proben jedoch wurden leicht erhöhte oder stark verminderte Intensitätswerte für den internen Standard detektiert, welche auf ein geringfügiges Injektionsproblem, wahrscheinlicher jedoch auf die Festphasenextraktion und Effizienz der Rücklösung zurückzuführen sind. In einigen sehr wenigen Fällen musste nochmals injiziert werden, da die Messung unvermittelt abbrach, die Ursache konnte nicht geklärt werden. In diesem Fall war zudem nicht mehr genügend Volumen vorhanden und so der absolute Wert für den IS gering. In diesem Fall wurde ein Vermerk für diese Probe erstellt. Generell wurde hier jedoch nie eine höhere Abweichung als 15% berechnet. Sollten sich Probleme im Gasstrom der ESI-Quelle oder Verstopfung der Einlasskapillare einstellen, so ist die

Quantifizierung über den internen Standard in der Lage, dies zu korrigieren. Der verwendete interne Standard trägt so maßgeblich dazu bei, die Qualität der Quantifizierung über eine längere Messdauer aufrecht zu erhalten.

3.3.2.5 Sensitivität

Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze werden klassisch über einen Bezug auf den Mittelwert und die Streuung des (chromatographischen) Signals für einen wässrigen Blindwert (Konzentration = 0 nM) angegeben. Hier wurde auf die Methode zur Bestimmung der Nachweisgrenze bzw. der Bestimmungsgrenze aus den Lehrbüchern von M. Otto⁹⁵ und G. Schwedt¹⁶⁶ zurückgegriffen. Zur Berechnung der Nachweisgrenze (NWG) wird zum Mittelwert dessen dreifache Standardabweichung addiert. Die Bestimmungsgrenze (BSG) wird über den Mittelwert des Blindwertes unter Addition der sechsfachen Standardabweichung berechnet.

In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck reale Urin- und Plasmaproben der Humanstudie verwendet, welche theoretisch frei von Anthocyanen sein sollten. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass ein Proband vor dem Verzehr des Saftes schon Anthocyane aus irgendeiner Quelle zu sich genommen hat und diese in der ersten Fraktion von Plasma oder Urin enthalten waren.

Für die Berechnung der Nachweisgrenze aus Urin wurden daher alle Proben des Zeitpunktes - 1 – 0 h (vor der Gabe des anthocyanreichen Saftes) als Blindwerte verwendet. Aus diesen Proben (n = 40) wurde über die jeweilige Kalibrierfunktion eine Konzentration ermittelt. Die Nachweisgrenze für Urin beträgt unter Addition der dreifachen Standardabweichung zum Mittelwert $NWG = 0,47 \text{ nmol/L}$. Die Bestimmungsgrenze beträgt nach der Addition der sechsfachen Standardabweichung zum Mittelwert $BSG = 0,81 \text{ nmol/L}$.

Die Angabe der Nachweis- und Bestimmungsgrenze in Plasma wurde analog erstellt. Hiermit ergibt sich $NWG = 0,07 \text{ nmol/L}$. Damit beträgt $BSG = 0,13 \text{ nmol/L}$. Beobachtungen in realen Plasmaproben zeigten zusätzlich, dass für Werte unterhalb 0,1 nmol/L nur noch unvollständige chromatographische Signale erhalten wurden. Ein Grund für die Berücksichtigung dieser Daten, die gesondert markiert wurden, stellten die kinetisch sinnvollen Konzentrationsverläufe dieser Substanzen unterhalb der BSG dar (vgl. Kapitel 5.3.1). Die im

Vergleich zu Plasma relativ hohe BSG des Urins kann möglicherweise auf zuvor aufgenommene Anthocyane zurückgeführt werden.

3.4 Diskussion

Mit den zuvor aufgezeigten Sachverhalten können aus den verschiedenen hochkomplexen Medien und Extrakten enthaltene Anthocyane extrahiert und aufkonzentriert werden, um anschließend spezifisch vermessen zu werden.

Die Behandlung der Proben vor der Messung ist von essentieller Bedeutung und wurde in einigen Punkten optimiert bzw. den Proben angepasst. Hierbei wurden insbesondere die Rücklösung der verschiedenen Proben mit einem bestimmten Anteil Methanol optimiert und die verwendeten internen Standards an die Proben und die beiden Messmodi (positiver und negativer Ionenmodus) angepasst. Bei den humanen Urinproben wurde bei der Rücklösung auf TFA verzichtet, um die Qualität der Massenspektren und die Sensitivität nicht zu beeinträchtigen. Für humane Plasmaproben konnte durch Einbau eines Ventils die enthaltene TFA vom Massenspektrometer ferngehalten werden, ohne die Analyse der interessierenden Substanzen zu beeinträchtigen.

Die Messungen waren stabil und empfindlich genug um eine qualitative Analyse sowie eine Quantifizierung durchzuführen. Dem hohen Probenaufkommen ($n > 1000$) konnte mit einer robusten, sehr schnellen chromatographischen Trennung, verbunden mit einer simultanen massenspektrometrischen Detektion im positiven und negativen Ionenmodus Rechnung getragen werden. Der reduzierte Anteil an Ameisensäure im Eluenten bewirkte einen ausreichenden pH-Gradienten, um zur Trennung der Anthocyane beizutragen. Durch den später verfügbaren Säulenofen konnte über eine Säulentemperatur von 60°C die Separation der Anthocyane noch weiter optimiert werden. Die Detektion von Phenolsäuren war möglich, jedoch zeigten diese teilweise eine sehr hohe Detektionsschwelle. Der Fokus dieser Arbeit lag jedoch auf Anthocyanen und spezifischen Phase-II-Metaboliten (Glucuronide und sulfatierte Anthocyane).

Mittels der Fragmentierung des Aglykons konnten charakteristische Signale generiert werden. Mithilfe der Software *MassFrontier* und Vergleich mit der Literatur (Oliveira *et al.*, Barnes *et al.*) konnte einigen signifikanten Fragmenten von Malvidin eine mögliche Struktur mit postulierten Reaktionsmechanismen zugewiesen werden. Dies trug maßgeblich zur Identifizierung von Verbindungen, die nicht als Reinsubstanz erworben werden konnten, bei.

Auf diese Resultate wurde für die Identifizierung von Anthocyanen aus biologischen Proben zurückgegriffen.

Die relativ neue Methode der HCD-Fragmentierung stellt ein wesentlich effektiveres Fragmentierungsverfahren dar, als die bisher gebräuchliche CID-Methode, um in lediglich einem MS/MS-Schritt das Aglykon und dessen charakteristische Fragmente, in einem sehr breiten Massenbereich, zu generieren und zu detektieren. Durch diese Instrumentierung war weiterhin die sogenannte „All Ion Fragmentation“ möglich, welche dazu dienen kann, die Messung wesentlich effektiver zu nutzen, um beispielsweise nach weiteren Metaboliten zu suchen.

Die Suche nach Metaboliten und die korrekte Quantifizierung in Proben der verschiedenen Studien wurden durch die hohe Stabilität der Messung selbst, aber auch durch die Massengenauigkeit und die hohe Auflösung der Massenspektrometer gewährleistet. Hierdurch war es möglich, die Integration mit einem sehr kleinen Massenfenster verlässlich durchzuführen, um falsch positiv integrierte Signale zu vermeiden. Falsch negativ detektierte Signale wurden nur sehr selten, bedingt durch technische Probleme, in einigen wenigen apikalen Zellkulturproben beobachtet.

Die hier entwickelte Methode ist dazu geeignet, Anthocyane und deren direkte Metabolite aus komplexen biologischen Proben zu extrahieren, verlässlich zu identifizieren und zu quantifizieren, wie es in den Kapiteln 4 und 5 dargestellt wird. Die Grenzen der in dieser Arbeit etablierten Methode zeigten sich bei der Analyse von schwer ionisierbaren Phenolsäuren, wie z.B. Syringasäure, was sich in einer für diese Substanzen stark erhöhten Nachweisgrenze niederschlägt.

4. Identifizierung von Anthocyanen und Metaboliten in verschiedenen biologischen Proben

Im Detail soll in diesem Kapitel auf die identifizierten Anthocyane der verschiedenen biologischen Proben eingegangen werden. Hierzu zählen auch verschiedene Abbauprodukte und Metabolite aus Proben der Human- und der Tierstudie. Zur Identifizierung wurden hochaufgelöste, akkurate massenspektrometrische Signale der jeweiligen Anthocyane und Metaboliten und die ihrer charakteristischen Fragmentationen herangezogen. Zusätzlich konnten über Retentionszeit und Elutionsreihe weitere Hinweise zur Identifizierung erhalten werden.

4.1 Identifizierte Anthocyane in Dakapo-Trauben-Extrakt

Zunächst sollen die identifizierten Anthocyane des Extrakts der Weintraube Dakapo besprochen werden. Dakapo ist eine Rebsorte, die 1972 an der Forschungsanstalt Geisenheim gezüchtet wurde und aus einer Kreuzung von Deckrot mit Blauer Portugieser hervorgegangen ist.¹⁶⁷ Durch die Forschungsanstalt wurden bereits teilweise qualitative und umfangreiche quantitative Untersuchungen durchgeführt.¹⁶⁸ In Ergänzung dieser Messungen konnten in dieser Arbeit mit hochauflösenden, akkuraten Daten eine Reihe von Anthocyanen erstmals im Dakapo-Trauben-Extrakt identifiziert werden. Die Identifizierung acylierter Anthocyane im Dakapo-Extrakt konnte besonders ausgeweitet werden.

Tabelle 4-1: Bereits bekannte und neu identifizierte Anthocyane im Dakapo-Extrakt

Bekannte Substanzen ¹⁶⁸	Neu nachgewiesene Substanzen
Delphinidin-3-glucosid	Pelargonidin-3-glucosid
Cyanidin-3-glucosid	Hydroxy-Delphinidin-glucosid
Petunidin-3-glucosid	Cyanidin-3-(6``-O-Acetyl)glucosid
Peonidin-3-glucosid	Cyanidin-3-(6``-O-Coumaryl)glucosid
Malvidin-3-glucosid	Delphinidin-3-(6``-O-coumaryl)glucosid
Delphinidin-3-(6``-O-Acetyl)glucosid	Malvidin-3-(6``-O-caffeoyl)glucosid
Malvidin-3-(6``-O-Acetyl)glucosid	Malvidin-3-(6``-O-coumaryl)glucosid
Peonidin-3-(6``-O-Acetyl)glucosid	Peonidin-3-(6``-O-coumaryl)glucosid
Petunidin-3-(6``-O-Acetyl)glucosid	Petunidin-3-(6``-O-coumaryl)glucosid

In Tabelle 4-1 sind die durch Kooperationspartner bereits detektierten Verbindungen in Spalte 1 aufgelistet. In Spalte 2 sind diejenigen Verbindungen aufgelistet, die mit der in dieser Arbeit verwendeten Analysemethode erstmals für den Extrakt dieser Traubensorte nachgewiesen wurden (siehe auch Abbildung A-7 und Abbildung A-8 im Anhang). Der Dakapo-Extrakt besteht zu einem überwiegenden Teil aus den fünf Anthocyan-Monoglucosiden von Malvidin, Peonidin, Petunidin, Cyanidin und Delphinidin. In sehr geringen Konzentrationen konnte Pel-3-glc nachgewiesen werden (siehe Abbildung A-9 im Anhang). Dies ist insofern eine Besonderheit, da Berente in seiner Dissertation beschreibt, dass in Weinreben Pelargonidin generell nicht vorkommt.¹⁶⁹ Durch die effektive Extraktion nach der Methode aus Geisenheim (1 L ergibt ca. 1 g Feststoff an Anthocyanen) und die sensitive Analysenmethode der vorliegenden Arbeit, konnte nach bisheriger Recherche erstmals Pelargonidin in Weinreben nachgewiesen werden.¹⁶⁸ Somit wurden alle in der Natur hauptsächlich vorkommenden Anthocyan-Glucoside (Malvidin, Peonidin, Cyanidin, Delphinidin, Petunidin, Pelargonidin) im Dakapo-Traubenextrakt konstatiert.

An acylierten Verbindungen waren bereits einige durch Essigsäure veresterte Anthocyane bekannt. In der Literatur werden neben Essigsäure auch Kaffeesäure und Coumarsäure als die zur Acylierung von Anthocyanen möglichen Verbindungen in Trauben genannt.¹³⁴ Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für die Dakapo-Traube bestätigt werden. Neben verschiedenen weiteren Acetyl-Glucosiden, konnten Coumaryl-Glucoside und auch ein Caffeeoyl-Glucosid in Dakapo nachgewiesen werden.

Unter der Berücksichtigung, dass in den vorliegenden komplexen Proben viele interessierende Verbindungen in unterschiedlichsten Konzentrationen auftreten, die sich zum Teil nur unwesentlich in ihrem m/z -Wert unterscheiden, kann mittels hochauflösender hochgenauer Massenspektrometrie beispielsweise zwischen Malvidin-3-(6''-O-coumaryl)Glucosid (Mal-coum-glc, $m/z = 639,1713$) und Malvidin-Rutinosid (Mal-rut, $m/z = 639,1919$) unterschieden werden. Hierbei handelt es sich lediglich um eine Differenz der Masse von $\Delta m/z = 0,02$. Die hohe Massengenauigkeit der Messung trägt in hohem Maße zur korrekten Analyse solcher komplexer biologischer Proben bei, ohne die eine eindeutige Zuordnung der in Tabelle 4-1 genannten Anthocyane nicht möglich wäre.

Fragmentierungsexperimente unterstützen die Identifizierung zusätzlich durch die Absicherung des Aglykons, welches bei der Fragmentierung entsteht. Die Differenz zum Vorläuferion entspricht der (evtl. acylierten) Zuckerkomponente. Bei genügend hoher

Kollisionsenergie können zusätzlich charakteristische Fragmentationssignale des Aglykons detektiert werden (siehe Kapitel 3.3.1.1). Wie aus oben genanntem Beispiel (Mal-coum-glc und Mal-rut) deutlich wird, ist jedoch die exakte Masse notwendig, um den Substituenten korrekt zuzuordnen, da hier als Fragmentation in beiden Fällen Malvidin entsteht. In Abbildung 4-1 ist zu dieser Prozedur ein MS/MS-Experiment mittels CID gezeigt. Die Ausgangsverbindung Mal-coum-glc ($m/z = 639,1713$) konnte zuvor mit einer Massengenauigkeit von +0,7 ppm detektiert werden. Das CID-Experiment liefert in diesem Fall das Aglykon Malvidin ($m/z = 331,0816$), welches mit einer Massenabweichung von +1,1 ppm detektiert werden kann. Über die Differenz des Vorläuferions zum Aglykon Malvidin kann nun auf das Coumaryl-glucosid als Substituent geschlossen werden. Weitere charakteristische Fragmentationen des Aglykons, die schon in den Standardverbindungen detektiert werden konnten (siehe Kapitel 3.3.1.1), tragen ebenfalls zur Identifizierung des Aglykons bei.

MS² Malvidin-3-(6''-O-Coumarylglucosid)
 CID = 25 eV @ $m/z = 639,17$

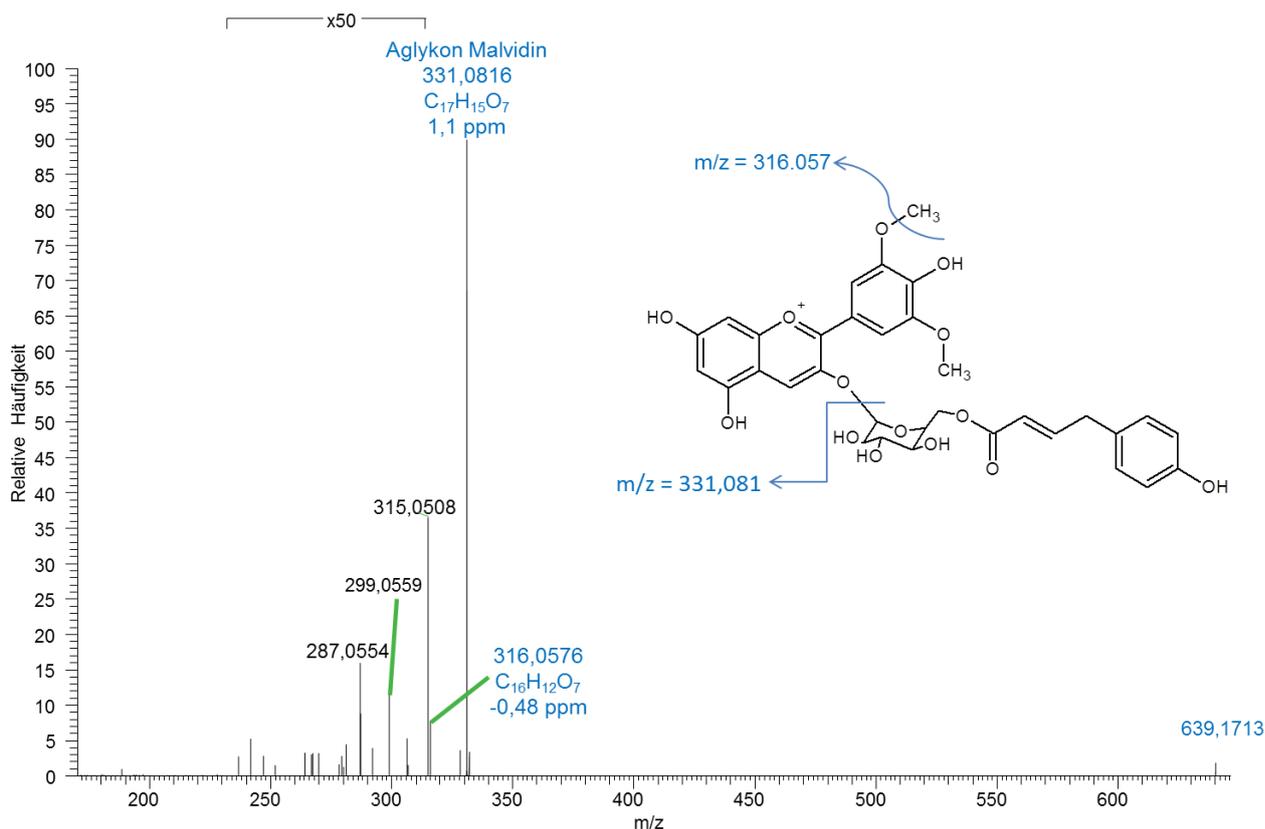


Abbildung 4-1: Charakteristische Fragmente von Malvidin, hervorgegangen aus dem acylierten Malvidin-3-(6-O-Coumarylglucosid) an einem FTICR-Massenspektrometer durchgeführt

Die Retentionszeit stellt ein zusätzliches Indiz für ein acyliertes Anthocyan, welches in der Elutionsreihe nach den Monoglucosiden erscheint, dar. Der Nachweis mittels exakter Masse, MS/MS-Experiment und Absicherung über die relative Retentionszeit wurde für alle in Tabelle 4-1 aufgeführten acylierten Verbindungen durchgeführt (siehe Abbildung A-8, Abbildung A-9 und Abbildung A-10 im Anhang).

Weiterhin wurden Signale bei $m/z = 481,09$ detektiert, diese passten zur Elementarzusammensetzung des sehr seltenen Anthocyans Hydroxy-Delphinidin-Glucosid. Die relative Retentionszeit für diese Verbindung passt zur Elutionsreihe der Anthocyan-Monoglucoside. Hier konnten via HCD-Fragmentierung das Aglykon und weitere Fragmentationen detektiert werden. Nach den Veröffentlichungen von Oliveira *et al.* und Barnes *et al.* konnten einigen Fragmenten Strukturen zugeordnet werden, wie in Abbildung 4-2 dargestellt.^{141, 142} Diese Fragmente werden parallel zur Fragmentierung des Delphinidin gebildet. Die Fragmentationen des A-Ringes können jeweils mit einem zusätzlichen Sauerstoffatom ($m/z + 16$) detektiert werden, dies ist ein Indiz für eine weitere Hydroxygruppe an diesem Ring. Insbesondere die Fragmente $^{0,2}A^+$ ($m/z = 165,018$) und $^{0,3}A^+$ ($m/z = 137,023$), die jeweils mit einer Massenabweichung von +0,39 bzw. +0,65 ppm detektiert wurden, zeigten eine zusätzliche Sauerstoffeinheit in ihrer Zusammensetzung und unterstützen diese Schlussfolgerung. Mit diesen Messungen kann allerdings nicht festgestellt werden, ob sich die Hydroxygruppe auf Position 6 oder 8 des A-Ringes befindet, hierzu müssten NMR-Experimente durchgeführt werden. Eine Isolierung dieser Verbindung wäre wegen der äußerst geringen Menge und der Komplexität des Extraktes mit einem sehr hohen Aufwand verbunden. Mit Bezug auf die Arbeit von Saito *et al.*, in welcher in *Alstroemeria* (Inkalilie) 6-Hydroxy-Delphinidin-3-Rutinosid detektiert und via NMR und FAB-MS (Fast Atom Bombardment) identifiziert wurde, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich hier ebenfalls um ein 6-Hydroxy-Delphinidin-Derivat handelt, welches nun erstmals für eine Traube beschrieben wurde.¹⁷⁰ Ebenfalls wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals charakteristische Fragmente für dieses Anthocyanidin beschrieben und zur Identifizierung herangezogen. Die Konzentration dieser Verbindung spielt jedoch für die Anthocyan-Menge der Traube keine Rolle und ist eine Nebenkomponente, welche vermutlich nur durch die effektive Extraktion (Forschungsansalt Geisenheim) und durch die verwendete, äußerst sensitive Nachweismethode nachgewiesen werden konnte.

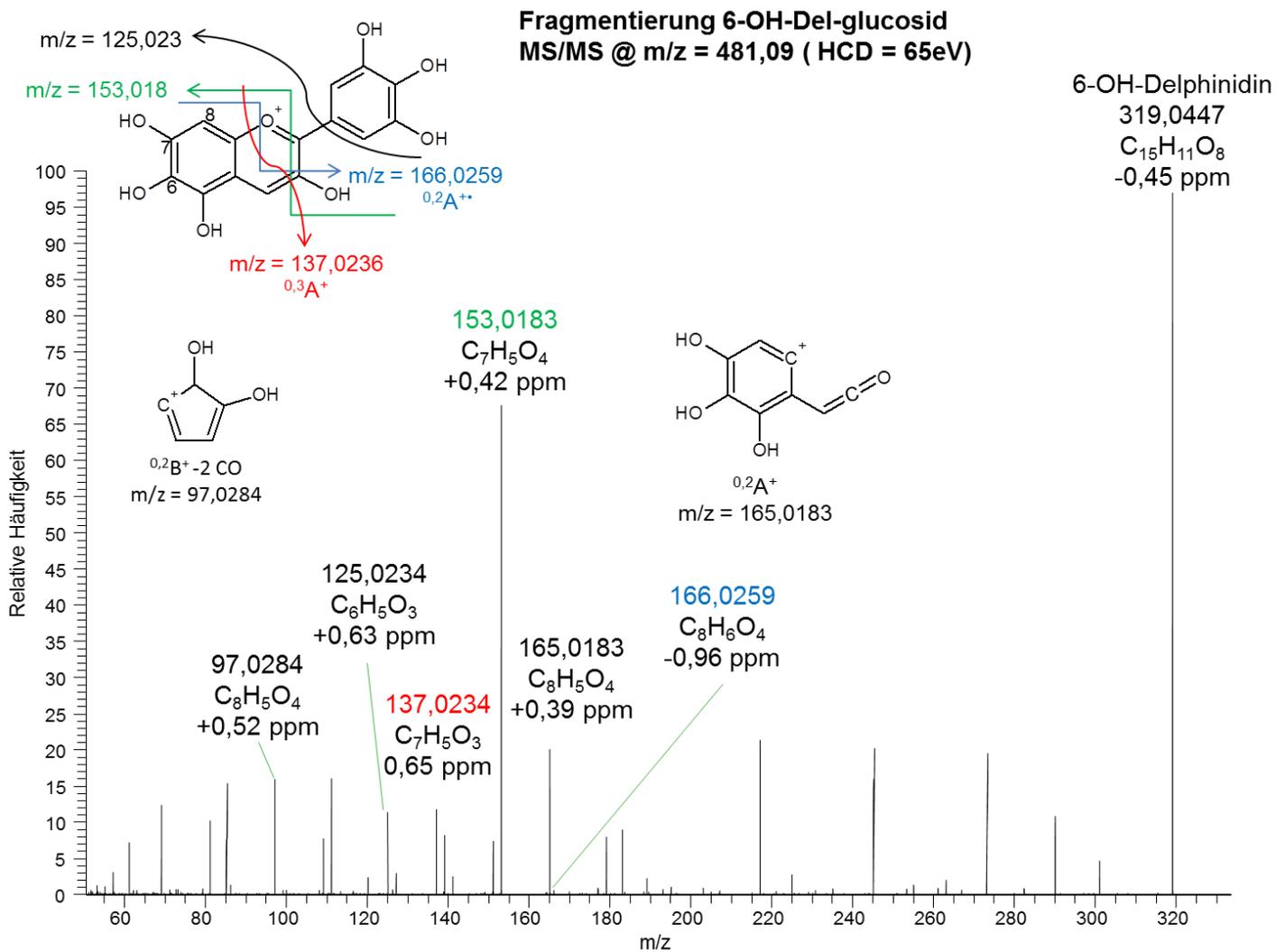


Abbildung 4-2: Charakteristische Fragmentationen von 6-OH-Delphinidin und der Zuweisung Zusammensetzung, Strukturen und Massenabweichung (Q Exactive Massenspektrometer)

4.2 Identifizierung von Anthocyanen in Proben der Zellkulturstudie

Die Zellkulturen wurden mit einer Lösung des Dakapo Extrakts inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Inkubationszeiten) wurden apikale und basale Proben genommen. In den apikalen Proben der Zellkulturstudien konnten jeweils nur die unveränderten Hauptanthocyane des verwendeten Dakapo-Extrakts in unterschiedlichen Konzentrationen detektiert werden (vgl. Kapitel 5.1.1). In den basalen Proben konnten zu späteren Inkubationszeiten ebenfalls intakte Anthocyan-Glucoside im Konzentrationsbereich von bis zu 100 nmol/L detektiert werden (siehe Kapitel 5.1.2). Metabolite wie Glucuronide konnten nicht detektiert werden. Auch LC-UV/VIS Untersuchungen der Proben in Bezug auf

Syringasäure, als Hauptdegradationsprodukt von Malvidin, dem Hauptanthocyan des Dakapoextrakts, wurden durchgeführt. Diese lieferten jedoch keine eindeutigen Erkenntnisse, in Bezug auf die Bedeutung der Syringasäure als Degradationsprodukt von Malvidin (siehe Kapitel 5.1.2).

4.3 Identifizierung von Anthocyanen und deren direkten Metaboliten in Proben der Tierstudie

Die Tiere erhielten einen an Anthocyanen reichen Saft als einzige Flüssigkeitsquelle. Bei der Durchführung der Tierstudie standen durch jahrgangsbedingte Schwankungen nur sehr wenige Dakapotrauben zur Verfügung. Daher wurde ein Saft, bestehend aus einer Mischung aus Accent, Dakapo und Heidelbeeren eingesetzt. Durch die Verwendung von Accent-Trauben wurden nun Anthocyan-3,5-diglucoside zugefügt. Das Profil ist hier zugunsten der Diglucoside von Malvidin, Peonidin und Petunidin verschoben, die hier als Hauptanthocyane dominieren.¹⁶⁸ Weitere Hauptanthocyane stellen die Monoglucoside von Malvidin und Peonidin dar. Im Anhang befindet sich eine Auflistung und die Menge der von der Forschungsanstalt in Geisenheim detektierten Anthocyane für den Extrakt dieser Mischung (siehe Tabelle A-5).

In den Plasma- und Urinproben der Tiere dominieren die Diglucoside von Malvidin und Peonidin vor den Monoglucosiden der Hauptanthocyane. Glucuronide von Malvidin oder Peonidin wurden hier nur in sehr geringen Mengen detektiert (siehe Kapitel 5.2.2). Die Identifizierung erfolgte hier analog zu den oben für humane Proben beschriebenen Messungen.

In Darminhaltproben der Tierstudie konnten teils hohe Konzentrationen von Anthocyan-Monoglucosiden und Anthocyan-Diglucosiden detektiert werden. Weiterhin konnten Aglykonsignale der Anthocyane detektiert werden. In Abbildung 4-3 ist ein extrahiertes Ionenchromatogramm für die Masse der Aglyka von Malvidin und Petunidin dargestellt. Bei den Signalen zu einer Retentionszeit (RT) von 9,95 bzw. 9,34 Minuten handelt es sich um Spaltprodukte der jeweiligen Glucoside von Malvidin und Petunidin, welche durch den ESI-Prozess entstanden. Ein weitaus intensiveres Signal zeigt die Masse der Aglyka für Malvidin bei RT = 12,26 Minuten und für Petunidin bei RT = 11,66 Minuten. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um Fragmentationen von acylierten Verbindungen handelt, wurde gezielt nach diesen gesucht. Hier konnten nur sehr geringe Mengen detektiert werden, die für die sehr

intensiven Signale nicht verantwortlich sein konnten. Acylierte Anthocyane stellen nur einen sehr geringen Anteil im gegebenen Saft dar. Die relativen Mengen der acylierten Verbindungen sind so gering, dass die hier detektierten Signale nicht von Fragmentationen acylierter Spezies aus dem ESI-Prozess stammen können. Die detektierten Aglykonsignale waren wesentlich intensiver, als diejenigen, welche aus der Fragmentierung des weitaus höher konzentrierten Mal-3-glc herrührten. Eine Petunidin (Aglykon) Standardverbindung wurde ebenfalls mit gleicher Methode vermessen Die Standardverbindung wies eine Retentionszeit von 11,49 Minuten auf, siehe Abbildung 4-3 C. Die Retentionszeit für die Standardverbindung und der des freien Petunidins aus der Caecumprobe korrelieren sehr stark. Die Retentionszeit des freien Aglykons von Malvidin passt mit 12,26 Minuten sehr gut zur allgemeinen Elutionsreihe der Anthocyane. Diese freien Aglyka stammen aus der bakteriellen Verstoffwechselung im Darm der Tiere (siehe 5.2.1).

Extrahiertes Ionenchromatogramm

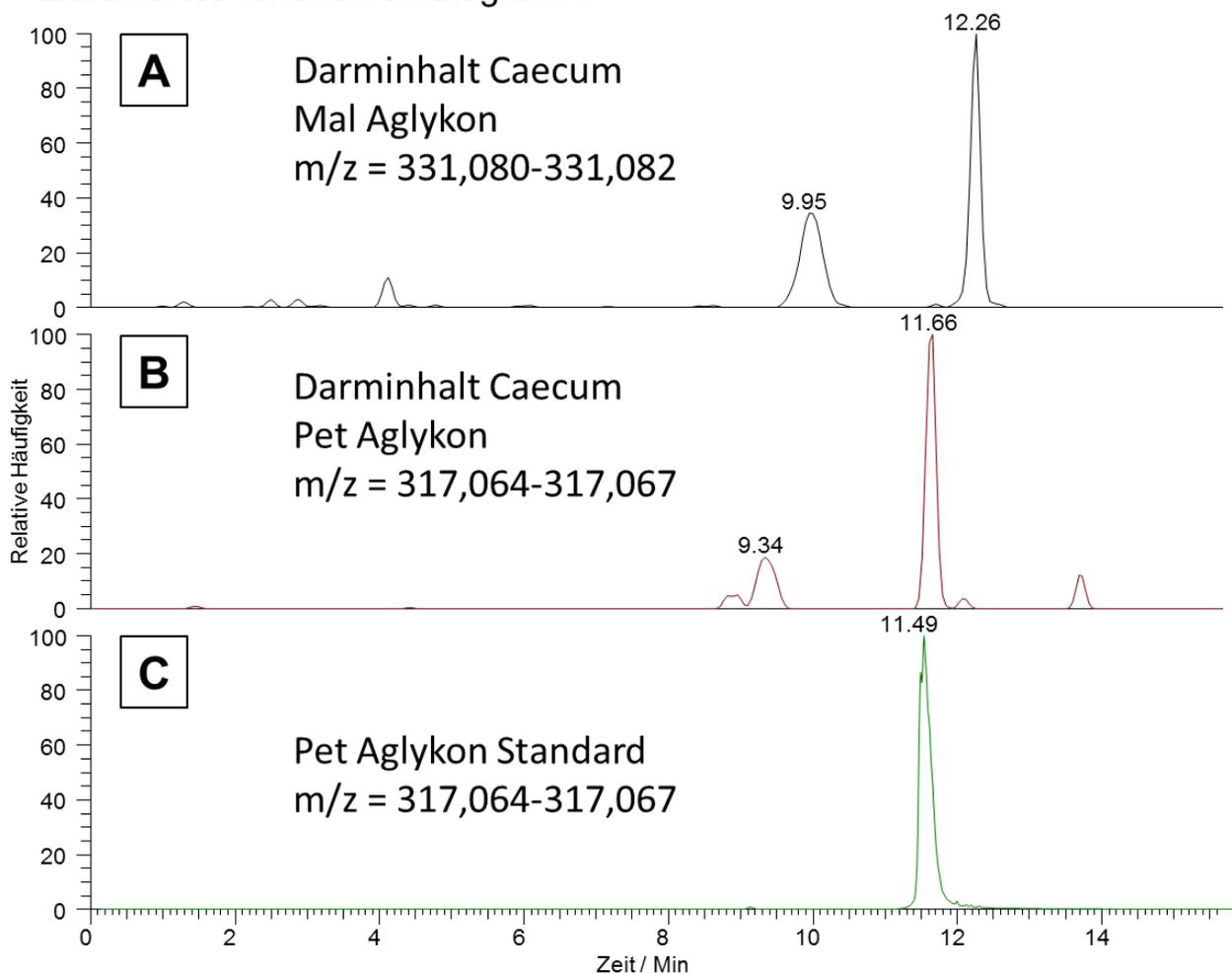


Abbildung 4-3: Signale des Aglykons von Malvidin und Petunidin (FTICR-Massenspektrometer) aus Darminhaltproben (A und B) und eines Standards von Petunidin-Aglykon (C)

4.4 Identifizierung von Anthocyanen und deren direkten Metaboliten in Proben der Humanstudie

Im Weiteren soll auf die verschiedenen Proben der Humanstudie eingegangen werden. Die zu analysierenden biologischen Flüssigkeiten beliefen sich auf Urin- und Plasmaproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Saftaufnahme. Es konnten hier, wie in der Dakapotraube, die fünf Hauptanthocyane (Cy-3-glc, Del-3-glc, Pet-3-glc, Peo-3-glc und Mal-3-glc) in unterschiedlichen nanomolaren Konzentrationen nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte auch über die Fragmentierung mittels HCD und die charakteristischen Fragmentationenspektren der jeweiligen Anthocyan-Grundstruktur. Ebenfalls konnten hier deutliche Signale der Glucuronide von Malvidin und Peonidin detektiert werden.

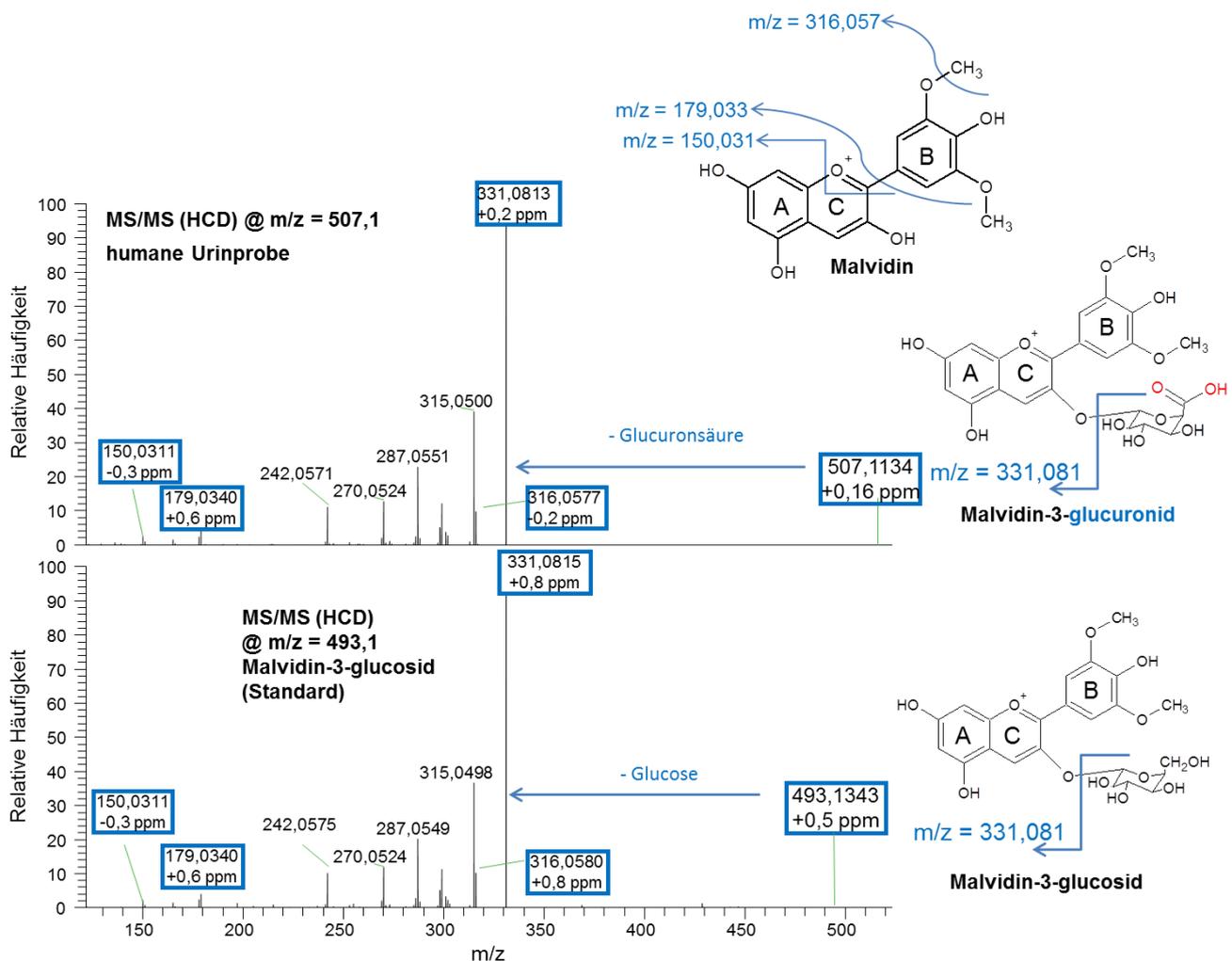


Abbildung 4-4: Identische Fragmentationen von Malvidin aus dessen Glucosid (unten, Standardverbindung) und dessen Glucuronid (oben) aus einer humanen Urinprobe (Q Exactive Instrument)

Mit Hilfe der HCD-Fragmentierung wurden diese während eines LC-MS-Experiments fragmentiert. Es zeigten sich die charakteristischen Fragmentationensignale für das jeweilige Aglykon. In Abbildung 4-4 ist der direkte Vergleich der Aglykonfragmentationen aus einem Standard von Mal-3-glc und von Malvidin-Glucuronid aus einer humanen Urinprobe dargestellt. Beide Fragmentationenspektren wurden mit einer Kollisionsenergie von 50 % (HCD) erzeugt und zeigen nach der Abspaltung des Zucker- (Standard) bzw. des Glucuronsäuresubstituenten (Metabolit) neben dem Aglykon ($m/z = 331,081$) die charakteristischen Signale, wie sie schon in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben wurden. Die hier zur Identifizierung gezielt durchgeführte Fragmentierung bis hin zu charakteristischen Fragmentationen des Aglykons aus einem Glucuronid wird hier erstmals im Detail eingesetzt und dargestellt. Zudem wurden erstmalig Fragmentationen des Aglykons von Anthocyan-glucuroniden mit akkurater, hochaufgelöster Masse beschrieben, welche einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung des Aglykons und damit zur Interpretation der Daten liefern. Neben Malvidin-Glucuronid konnte auch Peonidin-Glucuronid auf diese Weise nachgewiesen werden (siehe Abbildung A-11 im Anhang). Das Aglykon, welches aus dem Glucuronid hervorgeht, zeigt in der Fragmentierung die typischen Fragmente, wie beispielsweise den Verlust von CH_3 und das Fragment $^{0,2}\text{B}^+$. Es soll hier hervorgehoben werden, dass mittels massenspektrometrischer Analyse allein die Position des Glucuronsäureaddukts am Anthocyanidin nicht geklärt werden kann. Der prognostizierte Metabolismus spricht hier jedoch für die Position 3 am C-Ring.⁶⁹

5. Quantitative Ergebnisse

Um die Relevanz der zuvor entwickelten Methoden zu demonstrieren, soll im Folgenden auf die unterschiedlichen Studien mit ihren verschiedenen komplexen Proben eingegangen werden. Hierbei war die ständige Interaktion mit den Kooperationspartnern der verschiedenen Fachbereiche sehr wichtig, um kontinuierlich die erhaltenen quantitativen Daten zu überprüfen. Die quantitativen Daten wurden mit der Software Quanbrowser (Bestandteil der Software Xcalibur) erstellt.

5.1 Zellkulturstudien

Zur Studie des Transports und der Verstoffwechslung der Anthocyane des Dakapo-Extrakts durch humane Darmzellen wurden Intestinalzellen (Caco-2) in der Arbeitsgruppe Prof. Kunz (Institut für Ernährungswissenschaften, Justus Liebig Universität Gießen) unter der Leitung von Dr. Sabine Kuntz ausgesät und als zusammenhängende Kultur gezüchtet. In Abbildung 5-1 ist ein Schema des Aufbaus dieser Versuche dargestellt. Die aufgewachsene zusammenhängende Zellschicht symbolisiert die Darmwand; diese wird von der apikalen Lösung bedeckt, welche das Volumen des Darms simuliert. Das basale Kompartiment symbolisiert die nächste Zellreihe, welche am Transport der Nährstoffe, oder in diesem Fall der Anthocyane, in das Blutssystem beteiligt ist. Die Lösung des Extrakts wurde aufgegeben und nach bestimmten Inkubationszeiten zur Analyse eingefroren. Zur Simulation verschiedener Abschnitte des Darms wurden zudem Mixturen mit HT29-Zellen ausgesät und mit Dakapo-Extrakt inkubiert.¹⁷¹⁻¹⁷⁴ Die Ergebnisse der Zellkulturstudie sind im Anhang in Abschnitt A.5 im Detail aufgelistet.

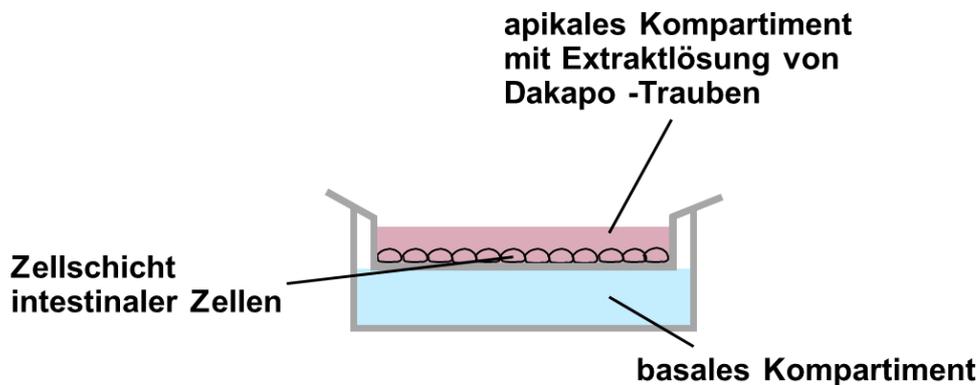


Abbildung 5-1: Schema eines Zellkulturexperiments mit apikaler Lösung auf den jeweiligen Zellen und basalem Kompartiment im unteren Behältnis

5.1.1 LC-UV- und LC-MS-Messungen der apikalen Proben

Zur Untersuchung der apikalen Kompartimente wurde eine LC-UV/vis-Methode (*SUMMIT* Kapillar-HPLC, siehe Tabelle 3-1 in Kapitel 3.2) herangezogen, da die Konzentrationen mit 50 $\mu\text{mol/L}$ (Mal-3-glc) ausreichend hoch waren, um sie auf die Weise zu analysieren. Neben den Inkubationsproben wurden hier Degradationsexperimente ohne Zellen vermessen, die zeigen sollen, wie schnell die Anthocyane unter diesen Bedingungen (gelöst in Nährlösung, pH = 7,4) zerfallen. Ein Vergleich beider Messungen lässt Rückschlüsse auf die tatsächliche Aufnahme der Anthocyane in die Zellen zu. Abbildung 5-2 zeigt ein Degradationsexperiment und ein Inkubationsexperiment mit Caco-2-Zellen. Die Konzentration im Degradationsexperiment nimmt durch den Zerfall der Anthocyane kontinuierlich ab. Die Endkonzentration in diesem Experiment liegt bei 38 $\mu\text{mol/L}$ (bzgl. Mal-3-glc). Das Inkubationsexperiment mit Darmzellen zeigt hingegen eine deutlich schnellere Abnahme der Konzentration von Mal-3-glc auf 12 $\mu\text{mol/L}$ nach bereits 90 Minuten. Die Endkonzentration liegt bei nur etwa 3 $\mu\text{mol/L}$. Dies lässt den Schluss zu, dass die ausgesäten humanen Darmzellen die Anthocyane absorbieren. Dies wurde bereits von Skrbek *et al.*^{69, 174} beschrieben, indem die Zellen gewaschen und im Ultraschallbad zum Platzen gebracht wurden. Diese Lösung wurde anschließend positiv auf Anthocyane geprüft.

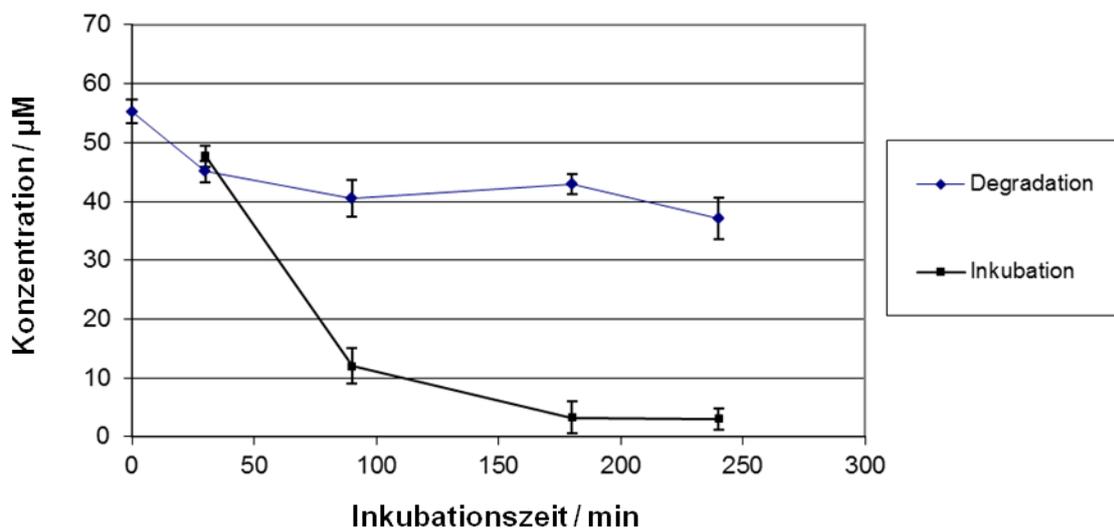


Abbildung 5-2: Degradation von Mal-3-glc aus Dakapo bei pH = 7 und der apikale Konzentrationsverlauf bei Inkubation von Caco-2-Zellen mit Dakapo-Lösung

Bei Zellmischungen mit einem höheren Anteil an HT29-Zellen konnten leichte Unterschiede im Verlauf der Abnahme detektiert werden (siehe Abbildung 5-3). Da HT29-Zellen nur zu

einem geringen Teil über Glucose-Transporter verfügen, die im Wesentlichen für den Anthocyan-Transport verantwortlich sein sollen, können hier geringere Aufnahmeraten zur Erklärung herangezogen werden.¹⁷¹

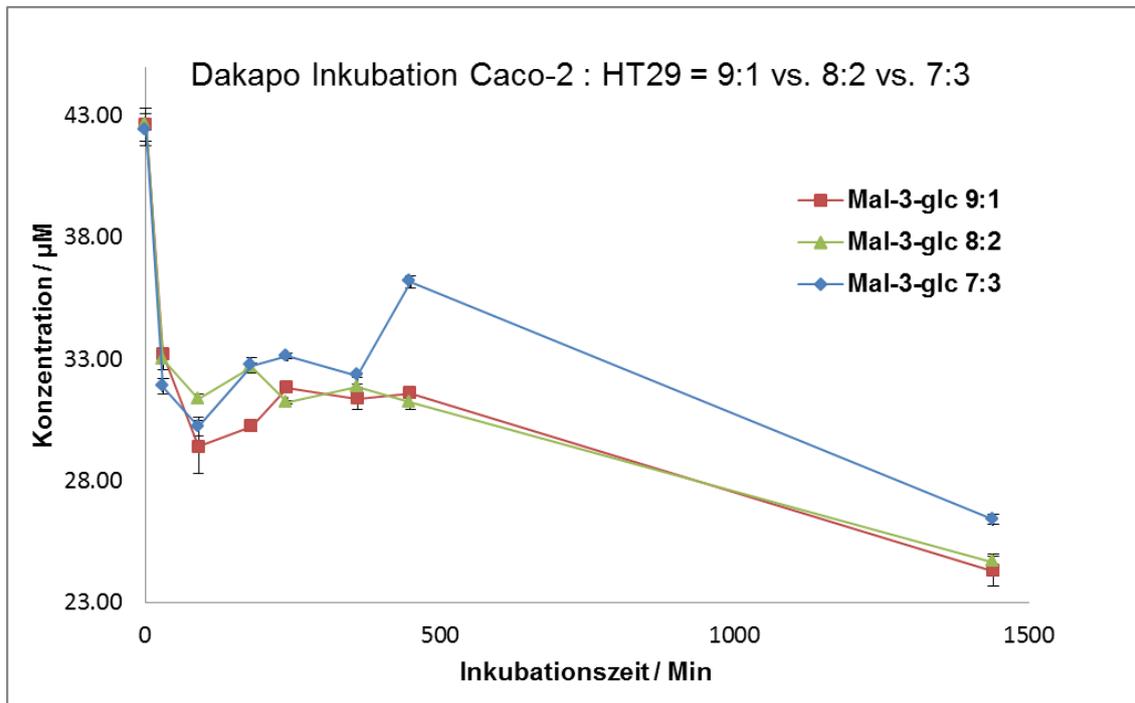


Abbildung 5-3: Apikale Lösungen eines Inkubationsexperiments zweier Zellarten in unterschiedlichem Mischungsverhältnis mit Dakapo-Extrakt

Die verschiedenen in der Dakapo-Lösung enthaltenen Anthocyane werden nach dem gleichen kinetischen Verlauf von den Zellen aufgenommen, was wiederum zu einem großen Teil auf den aktiven Transport durch einen Glucose-Transporter schließen lässt. Analoge Ergebnisse konnten für eine Mal-3-glc Standardlösung erhalten werden. Die jeweilige Zwei- bzw. Dreifachbestimmung zeigte eine hohe Stabilität der HPLC-UV/VIS-Messungen, mit dem alle apikalen Proben der Vorexperimente vermessen wurden. Die Werte aller Messungen sind im Anhang in Tabelle A-7, Tabelle A-8, Tabelle A-9, Tabelle A-10, Tabelle A-11, Tabelle A-12 und Tabelle A-13 angegeben.

Mit massenspektrometrischer Detektion wurden die Proben ebenfalls auf Metabolite untersucht und vergleichsweise hohe Injektionsvolumina von bis zu 100µL verwendet. Hierbei konnten die Hauptanthocyane mit sehr intensiven Signalen detektiert werden. In keiner Probe jedoch wurden Anthocyan-Glucuronide, weder methylierte noch sulfatierte Spezies, detektiert.

5.1.2 LC-MS-Messungen der basalen Proben

Basale Kompartimente einiger der zuvor genannten Versuche wurden ebenfalls vermessen. Da sich in Vorversuchen mit basalen Proben (siehe Abbildung 5-1) eine sehr geringe Konzentration der inkubierten Anthocyane abzeichnete, für welche die LC-UV/VIS-Detektion nicht empfindlich genug war, wurde hier eine LC-MS-Methode analog der Dakapo-Analyse gewählt (siehe Tabelle 3-3 in Kapitel 3.2; siehe Tabelle 3-7 in Kapitel 3.3). Zusätzlich wurden diese Proben mittels Festphasenextraktion (analog zu humanem Plasma; siehe Kapitel 3.1.2.1) aufkonzentriert. Die Auswertung dieser Proben zeigte, dass bei den höheren Inkubationszeiten höhere Konzentrationen der Anthocyane detektierbar sind (siehe Abbildung 5-4). Neben den beiden Hauptanthocyanen Mal-3-glc und Peo-3-glc konnten in basalen Proben nach einer Inkubationszeit von 240 Minuten auch die weniger konzentrierten Anthocyane aus dem Dakapo-Extrakt wie Cy-3-glc und Pet-3-glc detektiert werden.

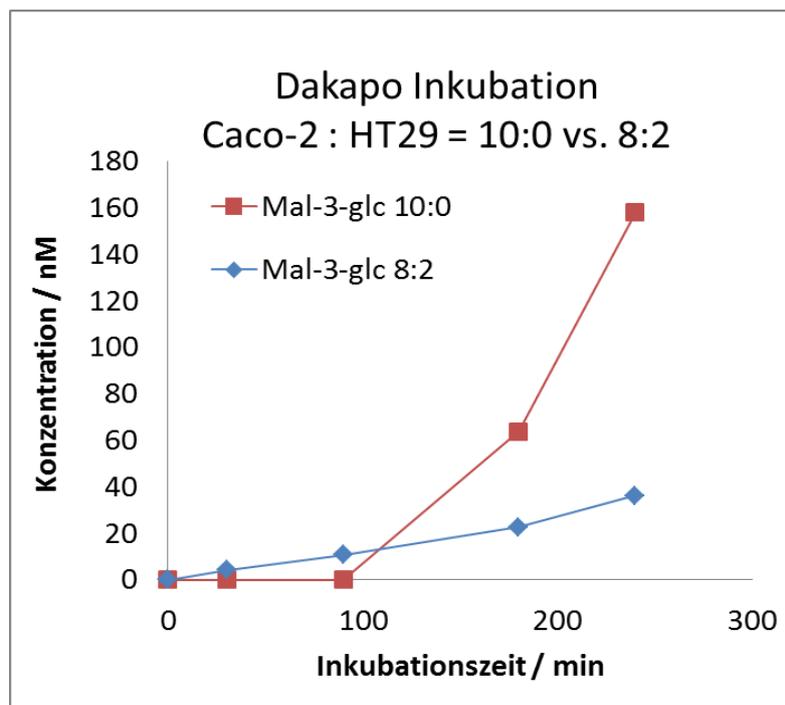


Abbildung 5-4: Basale Konzentrationen von Malvidin-3-Glucosid bei unterschiedlichen Zellmischungen

Die Variation der basalen Proben ist allerdings sehr groß, dass nur die allgemeine Aussage gemacht werden kann, dass die Zellen die Zielsubstanzen tatsächlich in das basale Kompartiment überführen. Metabolite, wie Anthocyan-Glucuronide, methylierte oder sulfatierte Spezies sowie spezielle Abbauprodukte in Form von Syringasäure (aus Malvidin), konnten indes massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurde eine

spezielle Methode zur Analyse von Syringasäure via UHPLC-UV/VIS entwickelt. Hierbei wurde der Gradient analog zu den Messungen der Humanstudie verwendet. Zusätzlich wurde eine UV-Detektion durchgeführt. Im Bereich von 0,3-2 µmol/L konnten damit Spuren der Säure detektiert, werden. Bezogen auf die inkubierte Menge an Anthocyanen (50 µmol/L), ist dies aber nur ein äußerst geringer Teil (0,44% apikal; 0,15% basal). Für Syringasäure lieferten die Daten weiterhin keine eindeutigen Konzentrationsverläufe, die Aufschluss darüber geben können, ob diese Substanz ein Degradationsprodukt darstellt oder ob sie schon im Extrakt enthalten war. Somit spielen sie kaum eine Rolle für den Verbleib der Anthocyane nach der Aufnahme in die jeweiligen Zellen. Die Daten sind in Tabelle A-14 und Tabelle A-15 im Anhang einzusehen.

Bezüglich sulfatierter und glucuronidierter Spezies bedeutet dies, dass diese Metaboliten nicht einmal 1 ppm der inkubierten Menge an Anthocyanen in apikalen und basalen Zellmedien darstellen würden.

5.2 Tierstudie

In der Tierstudie wurden 12 Fischer-Ratten (durch Inzucht sind alle Tiere genetisch identisch) für zehn Wochen eingestallt und sechs dieser Tiere (Verumtiere) erhielten einen anthocyanreichen Accent-Dakapo-Heidelbeersaft (Forschungsanstalt Geisenheim), der von den Tieren sehr gut angenommen wurde. Dieser Saft enthielt zu einem dominanten Anteil Accent-Trauben, die einen hohen Beitrag an Anthocyan-Diglucosiden lieferten (vgl. Tabelle A-5 im Anhang). Die anderen sechs Tiere erhielten einen Placebosaft, der nur noch kleinste zu vernachlässigende Spuren an Anthocyanen enthielt. Neben der Intervention (Gabe des Saftes über mehrere Wochen) wurden die Tiere über 24 Stunden in einem Stoffwechsellkäfig belassen. Dort konnten Fäzes- und Urinproben getrennt gesammelt werden, um Daten für die Bioverfügbarkeit der Anthocyane zu gewinnen. Am Tage der Sektion wurden Plasma- und Darminhaltproben aus drei Abschnitten (Ileum, Caecum und Colon) entnommen. Die Flüssig- und Festphasenextraktion dieser Proben wurde mit den in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.2 besprochenen Methoden durchgeführt und mit der in den Kapiteln 3.2 und 3.3 entwickelten Methode vermessen. Die Quantifizierung umfasste hierbei folgende Substanzen: Diglucoside und Monoglucoside von Malvidin, Peonidin, Petunidin, Cyanidin und Delphinidin, sowie die freien Aglyka und Glucuronide von Malvidin und Peonidin. Diese Substanzen wurden als Mal-3-glc-Äquivalente quantifiziert (vgl. Kapitel 3.3.2).

Die Verumtiere konnten jeweils sehr deutlich anhand der Messwerte von den Placebotieren unterschieden werden. In den unterschiedlichen Proben (Plasma, Urin, Darminhalt und Fäzes) der Placebotiere sind keine Anthocyane oberhalb der Nachweisgrenze detektierbar (siehe Anhang: Tabellen A-16, A-17, A-18, A-19, A-20 und A-21).

Die Ergebnisse der Tierstudie wurden bereits veröffentlicht. Die Daten konnten keine generellen antiinflammatorischen Effekte für die Anthocyane zeigen. Solche Effekte werden als komplexer Zusammenhang zwischen der Anthocyanquelle, der Diät im Hintergrund der Untersuchung oder des allgemeinen Entzündungsstatus im Körper angenommen.¹⁷⁵ Die hier gesammelten Daten zeigen, dass die Anthocyane nur in sehr geringen Mengen im Körper der Tiere nachgewiesen wurden. Alle Meßergebnisse der Tierstudie sind im Anhang in Abschnitt A.6 im Detail aufgelistet.

5.2.1 Darminhalt und Fäzes

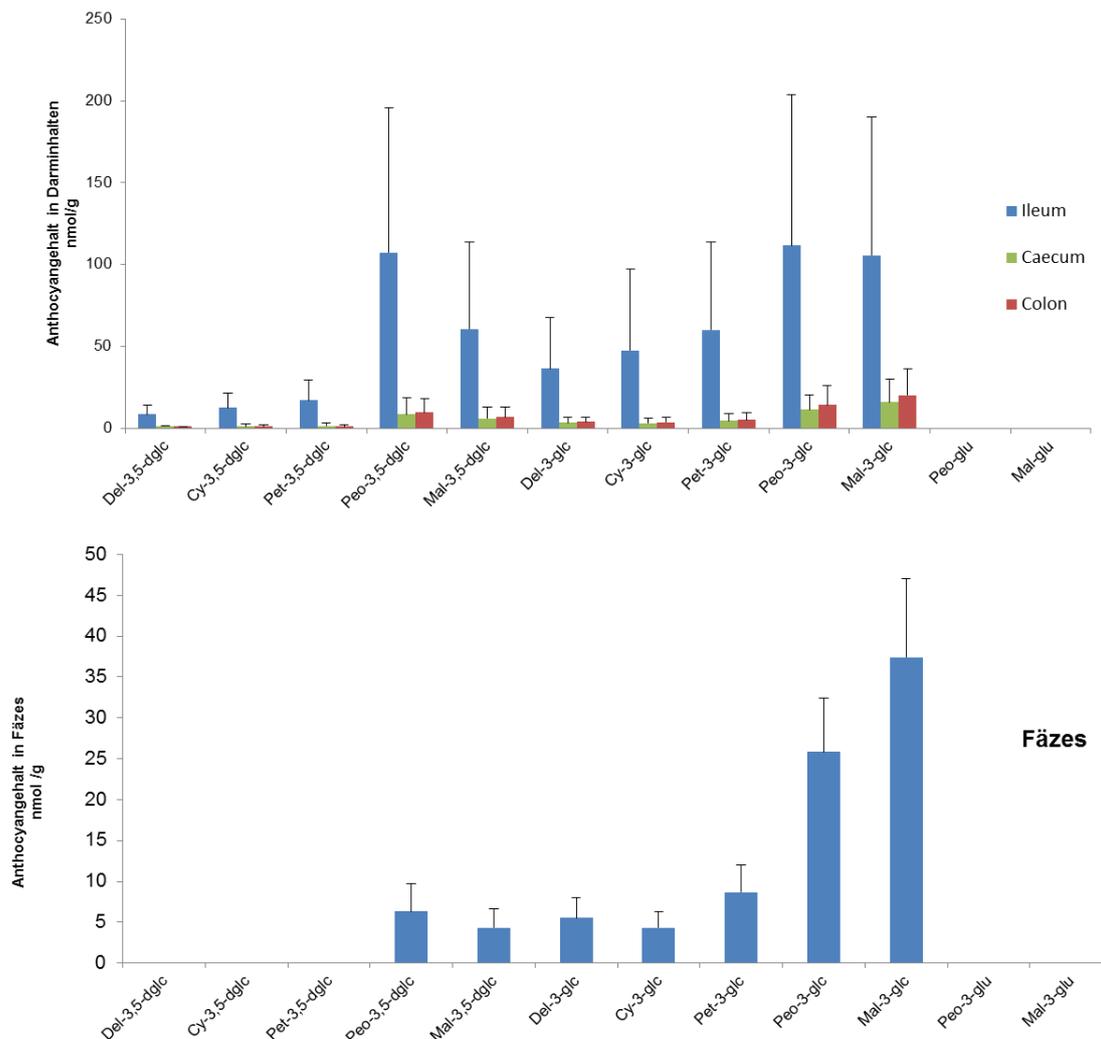


Abbildung 5-5: Gemittelte Anthocyangehalte der Verumtiere in Darminhalt (oben) und Fäzesproben (unten). Konzentration in nmol/(g Einwaage)

Für die Messung der Proben aus Darminhalt und Fäzes wurde eine Kombination aus UHPLC und FT-ICR-MS verwendet (vgl. Tabelle 3-5 in Kapitel 3.3). Die Schwierigkeit in der Auswertung und Interpretation der Daten bestand darin, dass nicht genau festgestellt werden konnte, wann das jeweilige Tier zuletzt getrunken hatte und welches Volumen es dabei akkumulierte. Dies ist vermutlich eine der Ursachen für die hohe Variabilität der Ergebnisse in dieser Studie.

Die Darminhaltproben wurden aus den Bereichen Ileum, Caecum und Colon gewonnen. Generell lagen, wie aus Abbildung 5-5 ersichtlich, die höchsten Anthocyangehalte im Ileum vor, da hier noch die Stabilisierung durch Copigmentierung und nur einen leicht erhöhten pH-Wert gegeben ist. Im folgenden Darmabschnitt, Caecum, war die absolute Konzentration der Anthocyane, verglichen mit Ileum, bereits stark reduziert und ändert sich zum Colon hin nicht mehr signifikant. Im Caecum konnten relativ gesehen höhere Werte für die Monoglucoside gegenüber den Diglucosiden ermittelt werden, da die Anthocyane von den im Darm enthaltenen Mikroorganismen abgebaut werden oder zerfallen zusätzlich durch den erhöhten pH-Wert.^{176, 177} Diglucoside werden zu Monoglucosiden abgebaut und Monoglucoside zu freien Aglyka, welche auch in den Darminhaltproben detektiert werden konnten. In den Abschnitten von Caecum und Colon konnten die höchsten Konzentrationen an freien Aglyka detektiert werden (vgl. Abbildung 5-6). Die Quantifizierung der freien Aglyka wurde, in Übereinkunft mit den Projektpartnern, auf die beiden Hauptanthocyanidine Malvidin und Peonidin begrenzt.

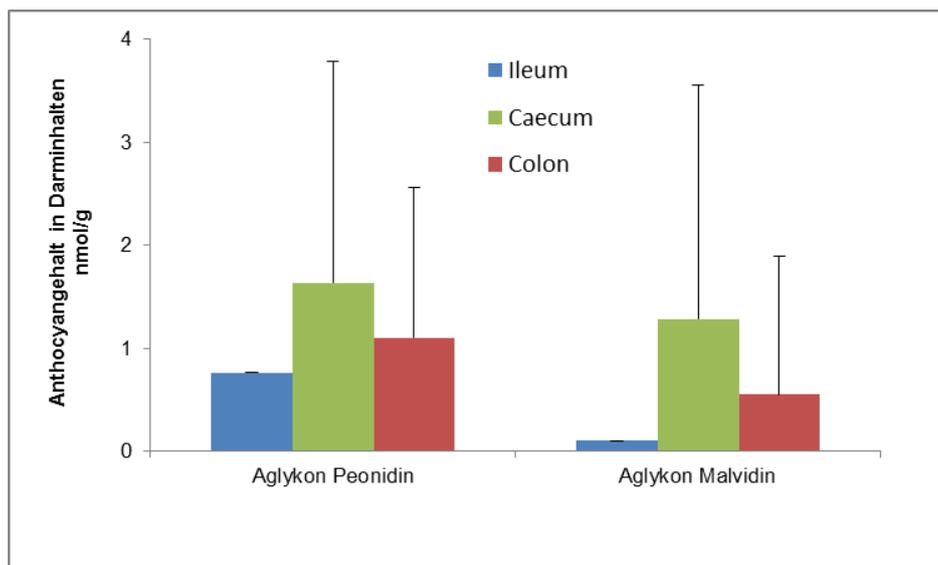


Abbildung 5-6: Konzentration an freien Aglyka von Malvidin und Peonidin in den verschiedenen Darmabschnitten der Tiere

In keiner Darminhaltprobe konnten Glucuronide der Anthocyane detektiert werden, was die Erkenntnisse aus den apikalen Proben der Zellkulturstudie bestätigt. Die Aktivität der Darmzellen Glucuronide oder Sulfatide zu bilden ist somit zu vernachlässigen. Man sollte sich allgemein hier vor Augen führen, dass die Anthocyane im Darmvolumen nicht als Flavyliumkation, sondern überwiegend in Form des Chalkons, also nicht geladen und mit geöffnetem C-Ring, vorliegen und auch so von den Zellen aufgenommen werden.^{69, 86, 178, 179}

Im Falle der Fäzesproben dominierten die Monoglucoside von Malvidin und Peonidin sehr deutlich und nur die Diglucoside dieser beiden Hauptanthocyane konnten noch detektiert werden, während dies bei freien Aglyka nicht möglich war. Eine Erklärung hierfür könnte deren Instabilität ohne die Kohlenhydratsubstituenten sein.

5.2.2 Plasma und Urin-Proben

Die Urin- und Plasmaproben der Tierstudie wurden, wie in Kapitel 3.2 und 3.3 bereits erwähnt, mit der bereits beschriebenen Kombination aus UHPLC und *Exactive* vermessen (vgl. Kapitel 3.3). Hier wurden die Anthocyane in niedrigen nanomolaren Konzentrationen quantifiziert. Die Verteilung der Anthocyane entspricht in etwa der Verteilung im gegebenen Verumsaft (vgl. Tabelle A-5 im Anhang) und ist vergleichbar für Plasma und Urin. Dies kann möglicherweise durch eine Aufnahme eines Großteils der Anthocyane in Magen und Jejunum erklärt werden.^{55,56} Es wurden die Diglucoside von Peonidin und Malvidin als Hauptkomponenten detektiert. Interessant ist hier die Tatsache, dass sowohl das Diglucosid als auch das Monoglucosid von Peonidin in höherer Konzentration auftritt, als das eigentliche Hauptanthocyan Malvidin. Die Daten dieser Studie zeigen somit, dass die Aufnahme von intakten Anthocyan-Diglucosiden zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen beitragen.

In Plasma und Urin konnten weiterhin in einzelnen Proben Glucuronide von Malvidin oder Peonidin nachgewiesen werden, was übereinstimmend für andere Tierstudien in der Literatur beschrieben wird.^{180,181} Dabei konnte Peonidin-Glucuronid in höherer Menge detektiert werden als das Glucuronid von Malvidin (siehe Abbildung 5-7). Welche Ursache diesem Sachverhalt zugrunde liegt, ist aus chemischer Sicht nicht vollständig nachzuvollziehen, da sich beide Verbindungen nur in einer Methoxygruppe am B-Ring unterscheiden. Dies genügt aber möglicherweise, um Peonidin-Derivate deutlich effektiver in den Körper zu transportieren, als jene von Malvidin. Dies konnte ebenfalls von Garcia-Alonso *et al.* beobachtet werden.⁵⁹

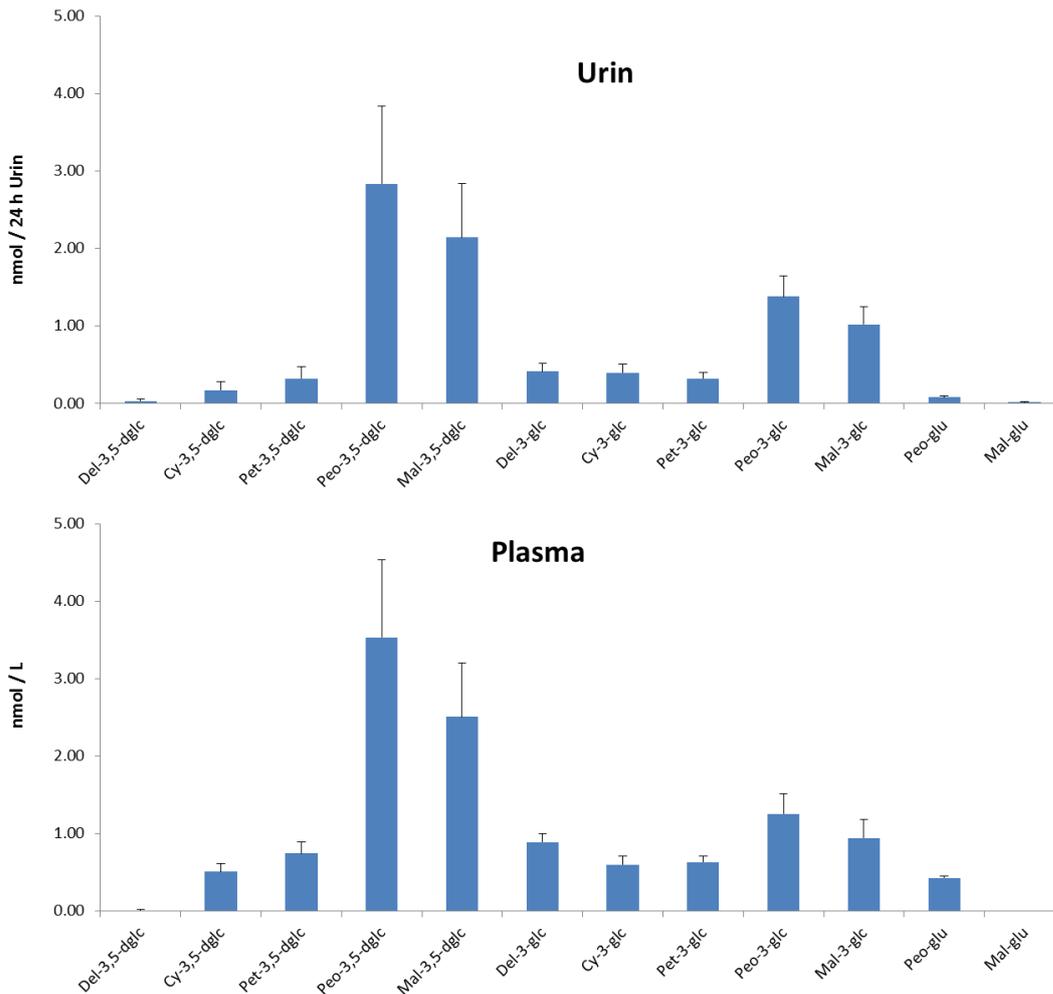


Abbildung 5-7: Gemittelte Anthocyankonzentrationen in Urin- und Plasmaproben der Verumtiere

Glucuronide wurden in der Tierstudie ebenfalls von Skrbek und Ichyanagi *et al.* beschrieben; im Gegensatz dazu konnten Borges *et al.* keine Glucuronide nachweisen.^{69,180,86} Jedoch wurden hier komplexe Anthocyane, wie das Cyanidin-3-O-(2-O-Glucosylrutinosid) in Plasma beschrieben, welche mit den in dieser Arbeit detektierten Anthocyan-3,5-Diglucosiden verglichen werden können.

5.3 Humanstudie

Die Bioverfügbarkeits-Humanstudie wurde mit insgesamt 10 Probanden durchgeführt. Für jeweils 4 Versuchstage (VT) wurden Plasma- und Urinproben zu 8 bzw. 7 Zeitpunkten ab Gabe eines anthocyanreichen Getränkes gewonnen (vgl. Kapitel 3.1.2.1 und Kapitel 3.1.2.2).

Zuvor mussten die Probanden eine spezielle Diät halten, die die Zufuhr von Anthocyanen verhinderte. Eine Quantifizierung der Anthocyane und deren Metabolite wurde für die gewonnenen Proben durchgeführt. Die Messung der ca. 600 Plasma- und Urinproben sowie der erforderlichen Kalibrierlösungen erfolgte mit der in den Abschnitten 3.2 und 3.3 beschriebenen LC-MS-Methode (UHPLC in Kombination mit *Exactive*), wobei die Proben in aufkonzentrierter Form (für Plasma siehe Kapitel 3.1.2.1; für Urin siehe Kapitel 3.1.2.2) vorlagen. Die endgültige Auswertung der Studie ist aus ernährungswissenschaftlicher Sicht noch nicht abgeschlossen; daher sollen im Folgenden beispielhaft einige Daten vorgestellt und grundlegende Zusammenhänge diskutiert werden. Die Messergebnisse der Humanstudie sind im Anhang in Abschnitt A.7 im Detail angegeben (Plasmaproben: Tabellen A-22, A-23, A-24, A-25, A-26, A-27, A-28, A-29, und A-30; Urinproben: Tabellen A-31, A-32, A-33, A-34, A-35, A-36, A-37, A-38, A-39 und A-40).

5.3.1 Plasmaproben

In den Plasmaproben der Humanstudie (entnommen bei 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90 und 120 Minuten nach Einnahme des Saftes/Smoothies) konnten, wie in Kapitel 4.2 bereits beschrieben, die fünf Hauptanthocyan-Glucoside sowie die Glucuronide von Malvidin und Peonidin im positiven Ionenmodus identifiziert werden. Für diese Substanzen konnte eine Quantifizierung durchgeführt werden. Analog dazu konnte im negativen Ionenmodus 3,4-DHB quantifiziert werden. Für die Hauptanthocyan-Glucoside kann ein Konzentrationsmaximum zwischen 60 und 90 Minuten detektiert werden. In Abbildung 5-8 ist dies für den Probanden CF48 an VT3 anhand der beiden Hauptanthocyan-Glucoside Mal-3-glc und Peo-3-glc dargestellt. Die im Verlauf des Metabolismus gebildeten Glucuronide von Malvidin und Peonidin weisen ein späteres Konzentrationsmaximum auf als die jeweiligen Glucoside. Das tatsächliche Konzentrationsmaximum der Glucuronide zeigt sich aber möglicherweise erst zu einem späteren Zeitpunkt und ist aus diesen Daten nicht ersichtlich, da keine Proben für spätere Zeitpunkte vorhanden waren. 3,4-DHB ist bei den meisten Probanden bereits bei der Probe „0 Minuten“ detektierbar. Diese Substanz wurde somit vorher schon in ausreichender Menge mit der Nahrung aufgenommen. In ihrem weiteren kinetischen Verlauf ähnelt sie den Anthocyan-Glucosiden.

Aus der Literatur konnte nur eine Aussage zum Konzentrationsverlauf der Anthocyan-Glucoside gefunden werden. Novotny *et al.* zeigten einen ähnlichen Verlauf für verschiedene Cyanidin-Derivate mit Ausnahme von Glucuroniden, welche nicht detektiert wurden.¹⁵⁹ Einen

analogen Verlauf beschrieben auch Vitaglione *et al.*⁷² Bub *et al.* hingegen beschrieben für die Anthocyane eines Traubensaftes ein gemitteltes, nicht eindeutiges Maximum für 80-180 Minuten nach Verzehr.⁷⁷

Analog zu den Ergebnissen der Tierstudie konnten hier oft höhere Konzentrationen an Peonidin-Glucuronid als an Malvidin-Glucuronid beobachtet werden. Dies kann ebenfalls als Hinweis darauf gewertet werden, dass die zusätzliche Methoxygruppe des Malvidin die Verstoffwechslung beeinträchtigt.⁵⁹ In den Plasmaproben der Tierstudie konnten ebenfalls keine sulfatierten Spezies der Hauptanthocyane detektiert werden. Möglicherweise sind ebenfalls die Methoxygruppen am B-Ring ein Grund für das Ausbleiben sulfatierter Metabolite.

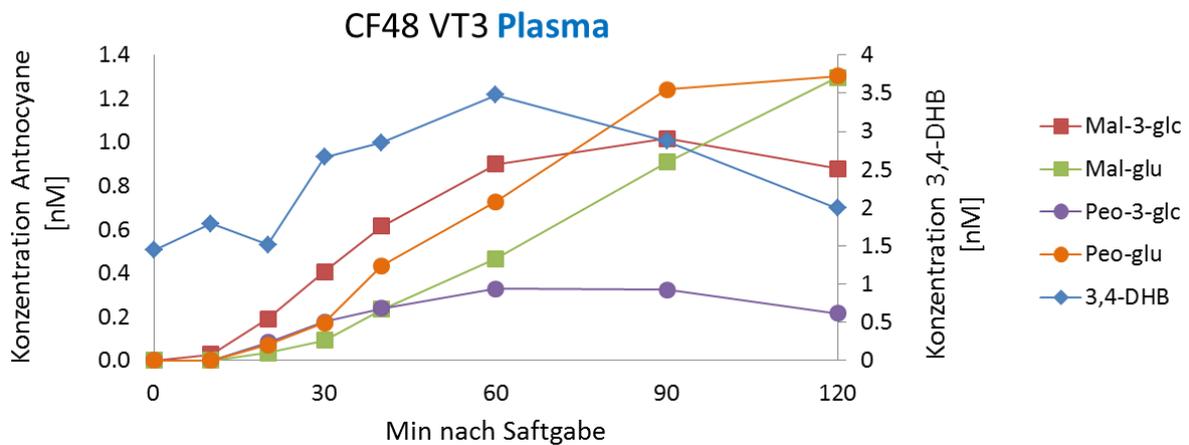


Abbildung 5-8: Konzentrationsverlauf der Glucoside und Glucuronide von Malvidin und Peonidin sowie 3,4-Dihydroxybenzoesäure in Plasmaproben einer Versuchsperson an Versuchstag 3

Interessant war der mit der Saftgabe einhergehende Konzentrationsanstieg an 3,4-Dihydroxybenzoesäure (3,4-DHB). Diese Säure kann auch als Abbauprodukt des Cyanidins angesehen werden, jedoch konnten die enthaltenen Mengen an Cyanidin hierfür nicht der Grund sein. Nach Untersuchung des gegebenen Saftes konnte festgestellt werden, dass 3,4-DHB in Konzentrationen von etwa 10 $\mu\text{mol/L}$ bereits im Saft enthalten waren. Die Kinetik der 3,4-DHB ähnelt derjenigen der Anthocyan-Glucoside und deutet darauf hin, dass diese Substanz, parallel zu den Anthocyanen aufgenommen wurde und nicht im Verlauf des Metabolismus als Abbauprodukt erzeugt wurde. Die ermittelten Konzentrationen sind physiologisch vertretbar und korrelieren mit den Angaben aus der Literatur (besonders Bub *et al.*, Novotny *et al.* und Milbury *et al.* beschrieben ähnliche Konzentrationen in Plasma).^{77, 159,}

¹⁸² Meist konnte in den Nullwerten (0 Minuten) ein geringer Anteil an 3,4-DHB detektiert

werden. Dies deutet darauf hin, dass die Säure in den Lebensmitteln der speziellen Diät bereits vorhanden war.

In der Literatur wird häufig eine Mittelung über alle Probanden aufgetragen, dies soll in Abbildung 5-9 dargestellt werden. Diese Auftragung bestätigt die oben gewonnenen Erkenntnisse der Kinetik für Anthocyan-Glucoside, -Glucuronide und 3,4-DHB, die am Beispiel eines einzelnen Probanden in Abbildung 5-8 diskutiert wurden.

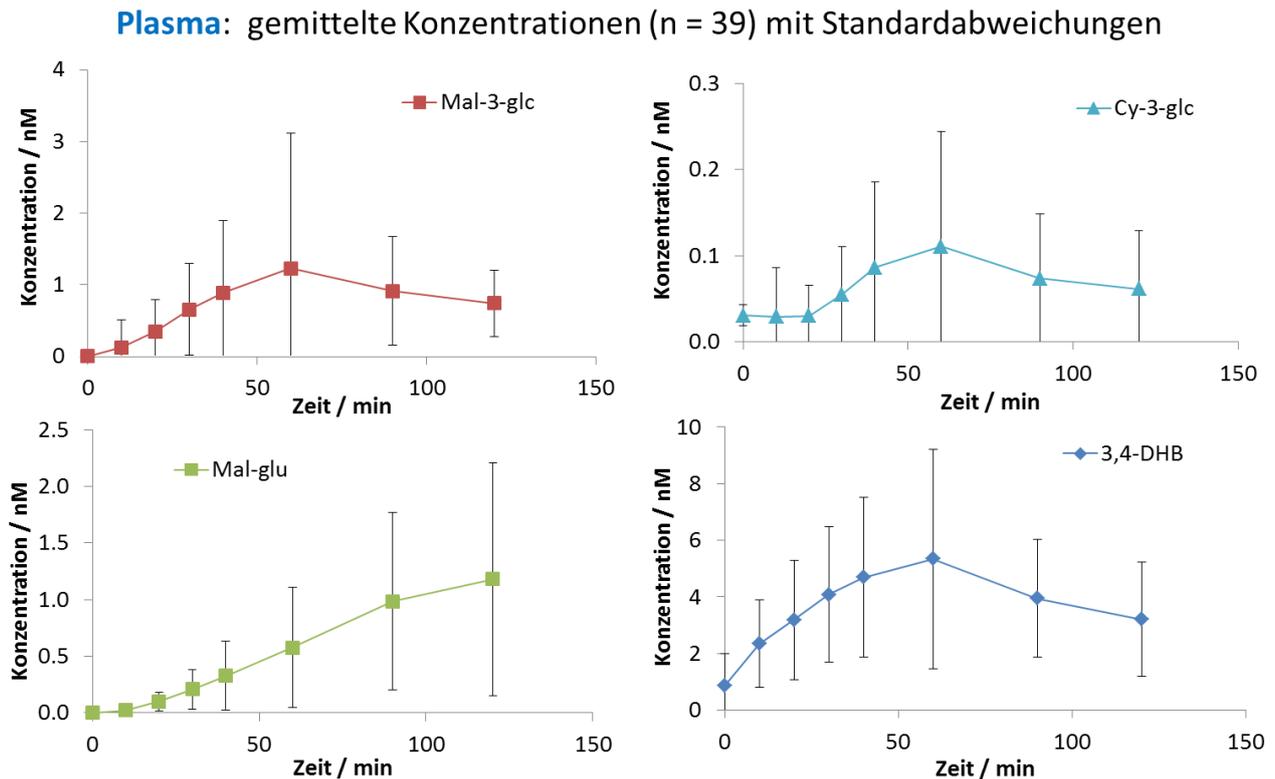


Abbildung 5-9: Gemittelte Konzentrationen von Mal-3-glc, Cy-3-glc, Mal-glu und 3,4-DHB in humanen Plasmaproben

Wie in Kapitel 3.3.2.5 beschrieben, wurden die quantifizierten Daten, wenn sie unter eine bestimmte Konzentration fielen, nur unter Vorbehalt verwendet. Ein Grund für die Berücksichtigung der Daten ist allerdings die Tatsache, dass auch unterhalb der BSG Konzentrationsverläufe, analog den in höheren Konzentrationen vorliegenden Substanzen, erhalten wurden. Abbildung 5-10 zeigt die Plasmaproben der Probanden C40 und CF49 an VT2 bzw. VT5. Sie lassen deutliche Unterschiede im individuellen Verlauf erkennen: So steigt die Gesamtkonzentration bei Proband CF49 nur auf maximal 0,65 nmol/L, wohingegen Proband C40 eine maximale Konzentration von 2,5 nmol/L Mal-3-glc zeigt. Die rechts angegebene zweite x-Achse stellt die Konzentration für Delphinidin-3-glucosid dar und zeigt

jeweils Werte unterhalb der angegebenen BSG. Die Kinetik des Del-3-glc (blaues Dreieck) ist ähnlich zu der von Mal-3-glc und Peo-3-glc. Sogar unterhalb von 0,1 nmol/L konnten für Proband CF49 noch sinnvolle Verläufe beobachtet werden. Daher war es interessant, diese Daten nicht zu verwerfen, sondern sie mit der nötigen Sorgfalt und Vorsicht in die Betrachtungen mit einzubeziehen, da diese sowohl die Stabilität als auch die Sensitivität der Methode innerhalb einer Probenreihe demonstrieren.

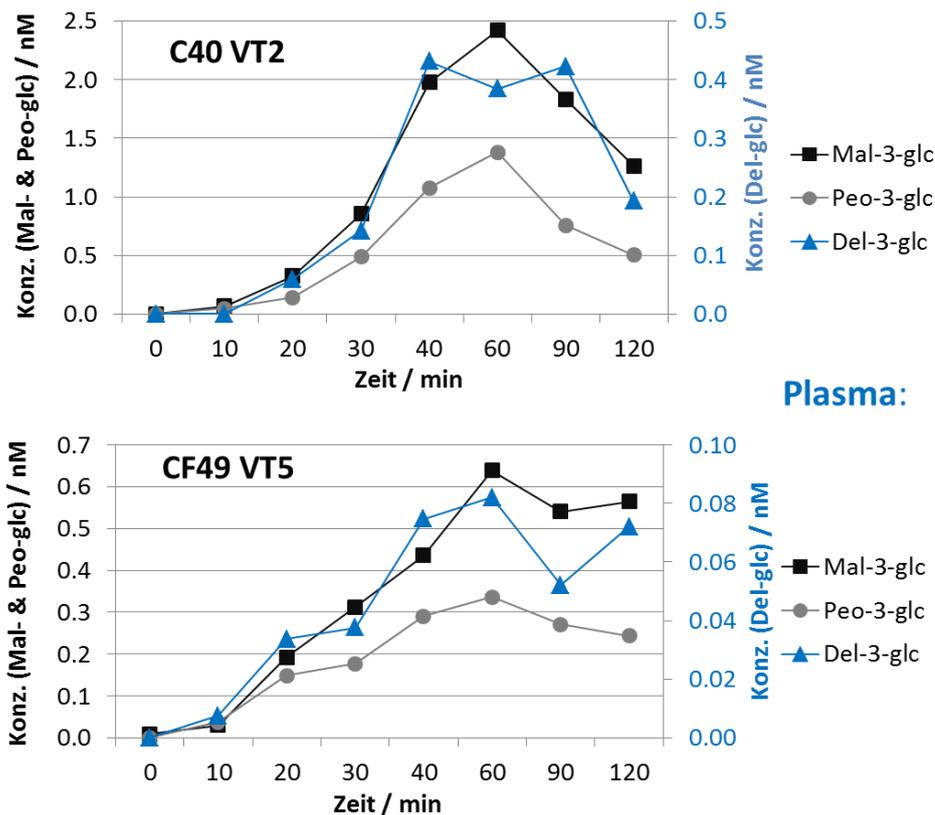


Abbildung 5-10: Sinnvolle Konzentrationsverläufe von Del-3-glc unterhalb oder nahe der Quantifizierungsgrenze

Um die zuvor beschriebenen quantitativen Ergebnisse, die in Abbildung 5-8 und in Abbildung 5-9 dargestellt sind, abzusichern, sei hier noch eine Betrachtung der quantitativen Resultate in Beziehung zur verwendeten massenspektrometrischen Methode durchgeführt und diskutiert wie stark diese die Ergebnisse beeinflusst. Wie bereits in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben, ist es sehr wichtig, das verwendete Massenfenster bei der Integration der massenchromatographischen Signale optimal auszuwählen. Eine Variation dessen kann die biologische Aussage der Messung deutlich verändern und damit die Ergebnisse der Studie verfälschen.

Daher ist es erforderlich, die jeweilige analytische Methode exakt zu prüfen und deutlich deren Vorteile und Limitierungen herauszuarbeiten.

Abbildung 5-11 A zeigt drei unterschiedliche extrahierte Ionenchromatogramme einer humanen Plasmaprobe, die 90 Minuten nach Saftgabe genommen wurde. Die unterschiedlichen Massenfenster wurden mit einer Breite von $\Delta m/z = 0,2$ (grün), $\Delta m/z = 0,02$ (rot) und $\Delta m/z = 0,002$ (blau) ausgewählt. Ein Massenfenster von $\Delta m/z = 0,2$ (grün) zeigt noch sehr viele intensive Signale. Auch kann die Integration nicht korrekt erfolgen, da keine klare Basislinie vorhanden ist. Ein Massenfenster von $\Delta m/z = 0,02$ (rot) ergibt ein chromatographisches Signal, welches ohne Probleme integriert werden könnte, jedoch zeigen sich immer noch weitere Signale im Ionenchromatogramm. Ebenfalls hat die integrierte Fläche von $\Delta m/z = 0,2$ (grün) zu $\Delta m/z = 0,02$ (rot) um etwa 50% abgenommen. Eine weitere Reduzierung des Massenfensters auf $\Delta m/z = 0,002$ liefert ein einzelnes chromatographisches Signal mit einer noch einmal geringeren Fläche. Dies wird insbesondere deutlich, wenn die y-Achsen der absoluten Häufigkeiten betrachtet werden. Hierbei zeigt das Maximum von $\Delta m/z = 0,2$ eine absolute Häufigkeit von 60000 Einheiten, das von $\Delta m/z = 0,02$ (rot) nur noch 20000 Einheiten und eine Integration der Fläche $\Delta m/z = 0,002$, um die exakte Masse des Analytens, nur noch eine relative Häufigkeit von 1500 Einheiten.

Ein Massenspektrum in Abbildung 5-11 C aus dem Maximum des Signals von 8,8 Minuten zeigt, dass Cy-3-glc mit einer Massenabweichung von + 0,4 ppm detektiert werden kann. Vergleicht man jedoch das aufsummierte Massenspektrum dieser Probe in Abbildung 5-11 D mit vorheriger Beobachtung, so zeigt sich, dass ein Massenfenster von $\Delta m/z = 0,2$ beispielsweise das sehr intensive Signal bei $m/z = 449,1993$ mit einschließt. Hierbei würde man, wie im Diagramm in Abbildung 5-11 B dargestellt, über alle Proben hinweg eine zu hohe Konzentration erhalten. Selbst bei einem Massenfenster von $\Delta m/z = 0,02$ würden noch Schultern benachbarter Signale integriert. Dies würde den Anschein einer zu hohen Konzentration und ein Verbleiben des Anthocyans in Plasma bis hin zu 120 Minuten nach Saftaufnahme erwecken (B). Erst bei einem gewählten Integral von $\Delta m/z = 0,002$ gewährleisten die hohe Massengenauigkeit und die hohe Auflösung des Massenspektrometers eine exakte Quantifizierung. Der Verlauf beginnt hier bei Konzentrationen unterhalb der BSG und beschreibt anschließend ein Konzentrationsmaximum zwischen 40-60 Minuten. Danach

Extrahierte Ionenchromatogramme, verschiedener Massenfenster, einer humanen Plasmaprobe, 90 Min nach Saftgabe

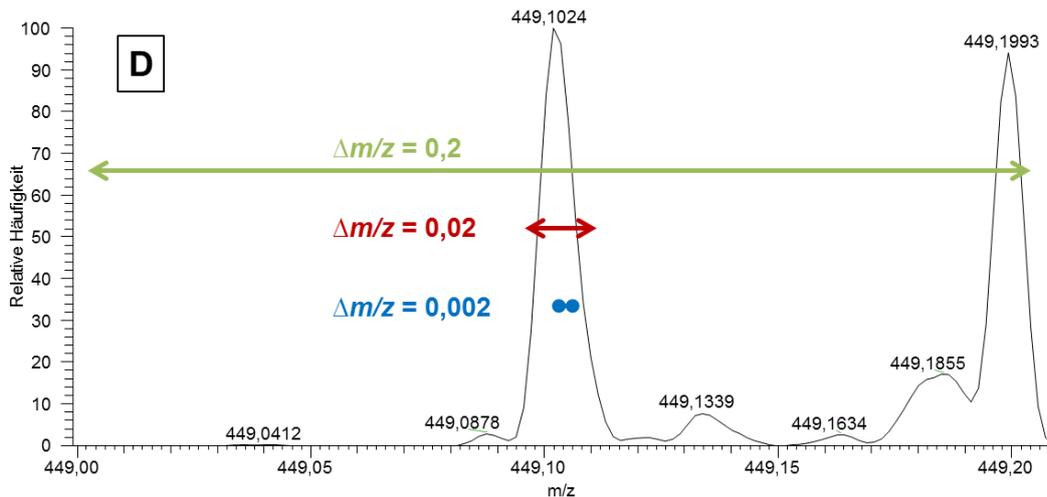
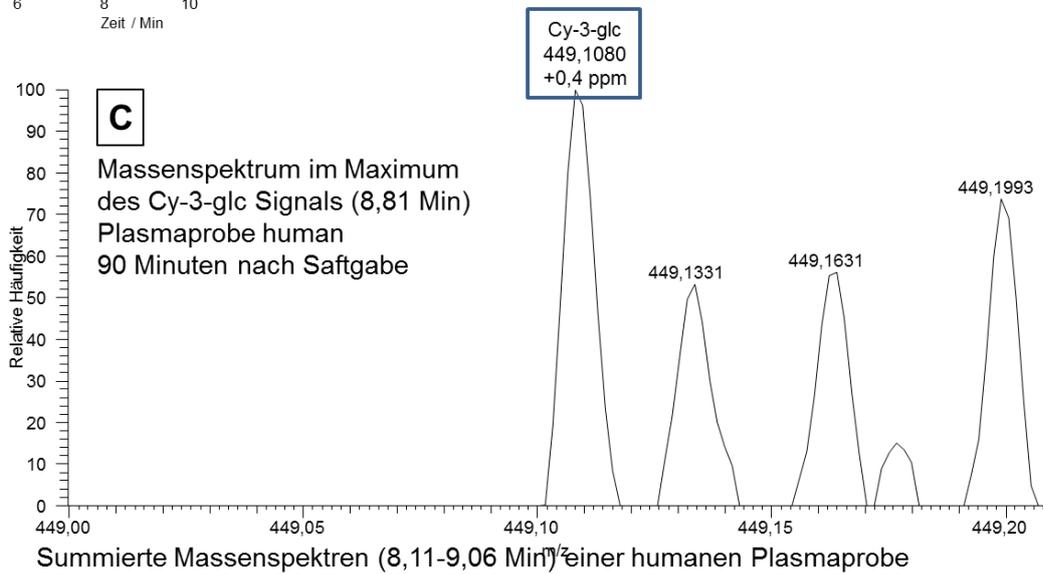
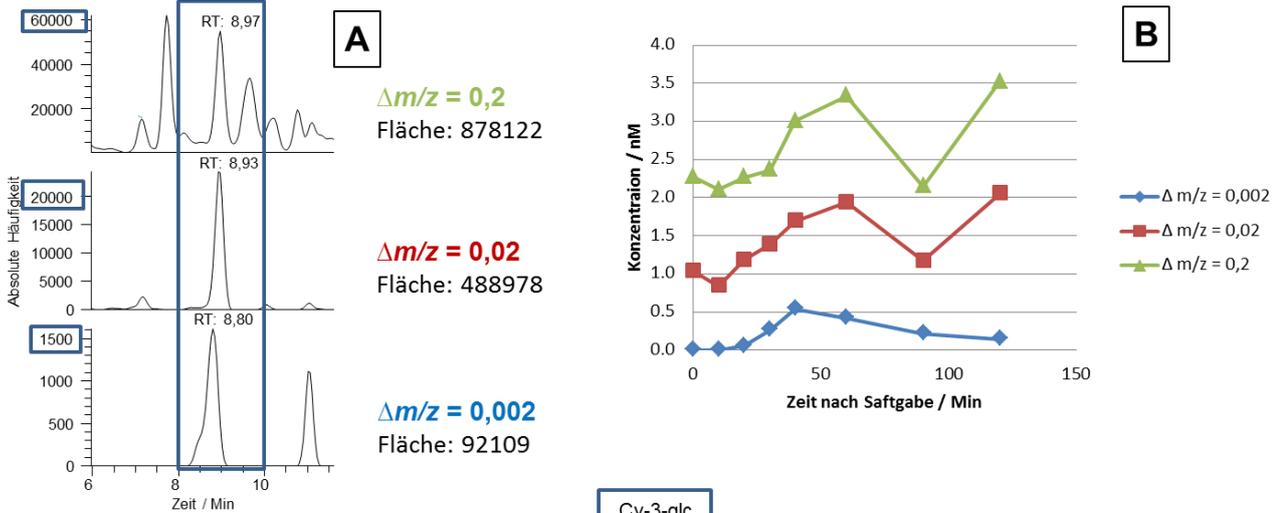


Abbildung 5-11: Einfluss des Massenfensters auf die Quantifizierung von Cyanidin-3-glucosid in humanen Plasmaprobe (Cy-3-glc kann mit geringer Massenabweichung (+0,4 ppm) (C) detektiert werden, jedoch werden bei Massenfenstern einer Breite von $\Delta m/z = 0,2 - 0,02$ weitere intensive Signale integriert (D))

fällt die Konzentration wieder auf Größen in der Nähe der BSG. Es ist daher sehr wichtig bei Messungen solch komplexer Proben darauf zu achten, welcher apparative Hintergrund diesen Daten zugrunde liegt. Bei Verwendung eines Ionenfallen-Massenspektrometers oder Quadrupols ist eine Fragmentierung des Anthocyan-Glucosids notwendig, um eine korrekte Quantifizierung über das Fragment des Aglykons durchführen zu können. Dies ist durch die Verwendung hochauflösender Massenspektrometer nicht notwendig. Die Möglichkeit der direkten Quantifizierung (ohne MS/MS) eröffnet die Chance, mehr Informationen aus einer Messung zu gewinnen, als dies mit anderen Methoden möglich ist (siehe auch Kapitel 3.3.1.3).

5.3.2 Urinproben

Mit der Sammlung der Urinproben der Humanstudie wurde eine Stunde vor Saftaufnahme begonnen. Nach der Saftaufnahme wurde in Intervallen von jeweils drei Stunden bis zu 15 Stunden gesammelt. Die letzte Fraktion bestand aus einer Sammlung des Urins 15-24 Stunden nach Saftaufnahme. In Abbildung 5-12 sind die Konzentrationen verschiedener Analyten gemittelt über alle Probanden dargestellt. Die Konzentration in den Urinproben wurde jeweils auf den im Institut für Ernährungswissenschaften bestimmten Kreatininwert normiert, welcher eine Referenz über die ausgeschiedene Urinmenge darstellt. Ist der Kreatininwert sehr klein, so wurde ein großes Volumen Urin ausgeschieden. Über diese Verknüpfung kann eine der ausgeschiedenen Urinmenge angepasste Anthocyankonzentration dargestellt werden.

Die höchsten Werte von Anthocyan-Glucosiden, Anthocyan-Glucuroniden und 3,4-DHB konnten in der Fraktion 0-3 h nach Verzehr des Saftes detektiert werden. Die gemittelte Konzentration der Anthocyan-Glucuronide erreichte jedoch in der nächsten Fraktion (3-6 h) das Maximum. Dies deutet darauf hin, dass nach 120 Minuten das Maximum im Plasma möglicherweise noch nicht erreicht wurde. Die Konzentration von Mal-3-glc sank bereits in der Fraktion 9-12 h auf nicht mehr nachweisbare Konzentrationen ab.

Vitaglione *et al.* beschrieben ein Verbleiben der Anthocyane im Organismus bis hin zu 12 h nach Saftaufnahme. In der Studie von Vitaglione *et al.* wurde ein Blutorangensaft als Anthocyanquelle eingesetzt, welcher nur Cyanidin-Derivate enthielt.⁷² Die Signale für Cy-3-glc können in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bis zu 15 h nach Saftaufnahme detektiert

werden (siehe Abbildung 5-12). Möglicherweise werden Cyanidin-Derivate schlechter als andere Anthocyane ausgeschieden und verbleiben so länger im Körper.

3,4-DHB weist eine ähnliche Kinetik wie die Anthocyan-Glucoside auf. Dies deutet in Analogie zu den Untersuchungen im humanen Plasma darauf hin, dass die Säure nicht aus dem Metabolismus stammt, sondern aus dem Saft aufgenommen wurde und unverändert über den Urin ausgeschieden wurde. Ähnliche Verläufe beschrieben bereits Nurmi *et al.*; sie verwenden ein Beerenpüree, welches ebenfalls 3,4-DHB enthielt.¹⁵⁸ Novotny *et al.* machten keine Angabe zu der Konzentration von 3,4-DHB im Urin, im Plasma jedoch wurden sehr hohe Konzentrationen gefunden, dies ist widersprüchlich. Die Substanz müsste bei den angegebenen Konzentrationen im Plasma auch im Urin nachweisbar sein.¹⁸³

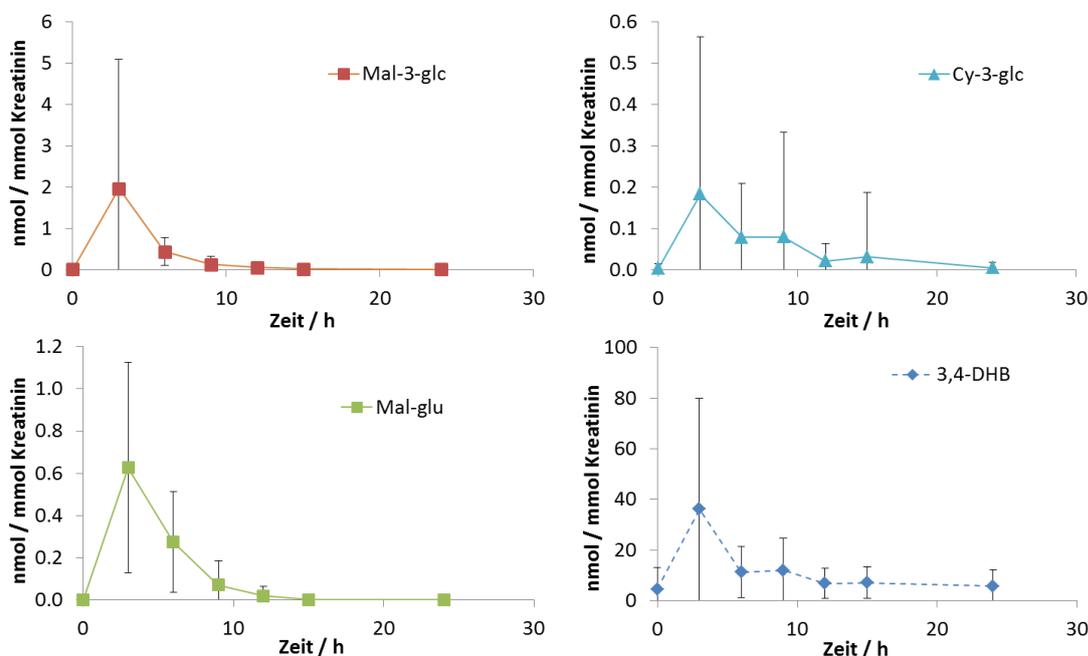


Abbildung 5-12: Gemittelte Verläufe für Mal-3-glc, Cy-3-glc, Mal-glu und 3,4-DHB in humanem Urin bzgl. Kreatinin

5.3.3 Reproduzierbarkeit

Wie bereits in Kapitel 3.3.2.4 beschrieben, zeigten die zwischen den realen Proben vermessenen Standardlösungen eine zufriedenstellende Stabilität der Messung über die gesamte Messserie. Die komplexen Proben mit Verunreinigungen beeinflussen die Stabilität des Messsystems sehr stark. Mit Hilfe einer Mischprobe von Urinproben, in der auch die interessierenden Substanzen in einer realen Konzentration vorhanden waren, konnte gezeigt

werden, dass die Schwankungen für Mal-3-glc oder Mal-3-glu eine relative Standardabweichung von $\leq 10\%$ zeigen. Die Standardabweichungen der Urinproben aus den Reihenmessungen zeigten Standardabweichungen von 8-10%.

Für Plasma konnte aufgrund des geringen Probenvolumens keine Mischprobe erstellt werden, die die nötigen Voraussetzungen für eine Betrachtung, analog zu Urin, bot. Daher wurde der kontinuierlich verwendete interne Standard und auch die Standardlösungen, die parallel dazu vermessen wurden, zu einer Diskussion herangezogen. Innerhalb einer Probenreihe eines Probanden schwankte die Wiederfindung des internen Standards meist nur $< 10\%$. Maximal wurde eine Schwankung von 16% beobachtet. In Bezug zur Stabilität der Standardlösungen über die gesamte Messzeit der humanen Plasmaproben kann hier eine Standardabweichung von 8-9 % angegeben werden.

5.3.4 Abschließende Betrachtung zum humanen Metabolismus

In diesem Kapitel soll noch einmal detailliert auf die verschiedenen möglichen Metabolite eingegangen werden. Aus ernährungswissenschaftlicher Sicht müssten die Anthocyane durch ihre Ähnlichkeit mit anderen Flavonoiden, wie beispielsweise dem Quercetin, im Metabolismus einer Methylierung und einer Sulfatierung unterliegen. Die Literatur berichtet auch immer wieder, aber nicht einheitlich, von solchen Metaboliten.^{71, 73, 80, 81, 85}

In einem abschließenden Experiment sollte noch einmal gezielt nach diesen Verbindungen gesucht werden. Die UHPLC-Anlage wurde um einen Säulenofen erweitert und mit einem Q Exactive Massenspektrometer verbunden.

Eine humane Urinprobe mit hoher Konzentration an Anthocyanen, aber höherer Quantität an Anthocyan-Glucuroniden, wurde gezielt ausgewählt und mit dem mehrfachen Probenvolumen (5 mL statt 1 mL) im Vergleich zum Standardprotokoll einer Festphasenextraktion unterzogen und vermessen. Diese Vorgehensweise konnte nicht routinemäßig durchgeführt werden, da nicht immer ausreichend Probenvolumen vorhanden war. Die Probenvorbereitung sollte keine Probleme für die Detektion der sulfatierten oder methylierten Spezies darstellen, da diese sich in ihren physikochemischen Eigenschaften nicht wesentlich von den unmetabolisierten Anthocyanen unterscheiden sollten. Daher sollten diese Substanzen durch die Festphasenextraktion ebenfalls effektiv aufkonzentriert werden.

Der Säulenofen bewirkt eine weitere Verbesserung der Trennleistung und trägt somit auch zur Verbesserung der Sensitivität der Messung bei. Mit zunehmender Temperatur wird die chromatographische Trennleistung deutlich erhöht, da die Peakbreite vermindert wird. (siehe Kapitel 3.2). Dies geht mit einer Intensitätserhöhung und schließlich mit verbesserter Sensitivität einher. Die massenspektrometrische Messung ist auch unter Verwendung des Säulenofens sehr stabil und reproduzierbar. Nach Abschluss der Messungen der humanen Probenreihen stand das neuartige Massenspektrometer Q Exactive (siehe Kapitel 2.4.3.2) zur Verfügung. Es gewährleistete eine weitere Steigerung der Nachweisgrenze (ca. Faktor 10) im Vergleich zur vorher eingesetzten Exactive.

Auch unter diesen optimierten Bedingungen wurden keine sulfatierten oder methylierten Produkte der Anthocyane detektiert. Die Kombination aus neuer Instrumentierung und gezielter Aufarbeitung führte zu einer Verbesserung der Nachweisgrenze um den Faktor 50, im Vergleich zu den routinemäßigen Messreihen. Wird dieser Faktor berücksichtigt, liegt die Nachweisgrenze der Messung bei 8 pmol/L. Dies entspricht etwa 0,1% der detektierten Konzentration des Peonidin-3-Glucuronids, welches den mit der höchsten Konzentration detektierten Metaboliten darstellt. Folglich könnte man sulfatiertes Peonidin auch dann noch nachweisen, wenn dieser Stoffwechselweg 1000-fach geringer ausgeprägt wäre, als die Glucuronidierung. Bezogen auf die ursprüngliche Konzentration im Saft/Smoothie ergibt sich sogar ein Wert von 0,1 ppm an eingesetztem Anthocyan, welches mit dieser Methode noch nachgewiesen werden könnte. Ähnliche Werte ergeben sich für sulfatiertes oder methyliertes Malvidin und Cyanidin. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorherigen Messungen, dass die metabolischen Pfade der Methylierung und Sulfatierung für die enthaltenen Anthocyane in der durchgeführten Humanstudie nicht vorliegen.

Ein spezielles Problem stellt die Methylierung im Verlauf des Metabolismus dar. Bei einer Methylierung, beispielsweise von Petunidin, würde Malvidin bzw. Iso-Malvidin entstehen. Durch den hohen Anteil an Malvidin in den verschiedenen Proben, könnten Malvidin und iso-Malvidin nicht voneinander unterschieden werden. Eine Methylierung von Malvidin hingegen könnte nachgewiesen werden.

Mit Hilfe von AIF-Experimenten (siehe Kapitel 3.3.1.3) wurde nach anthocyan-spezifischen Fragmenten (Aglyka) gesucht. Alle detektierten Signale konnten durch Glucoside und Glucuronide der Anthocyane bzw. durch freie Aglyka erklärt werden. Dies ist ein weiterer

Hinweis darauf, dass keine weiteren (unbekannten) Modifikationen der Anthocyane in signifikanten Konzentrationen in der Probe vorliegen.

Durch die hier beschriebenen Experimente (SPE mit mehrfachem appliziertem Volumen, Instrumentierung aus UHPLC und Q Exactive) kann ein Sensitivitätsproblem bei der Detektion weiterer Anthocyanmetabolite ausgeschlossen werden. Zudem ist die hier verwendete Messmethode äußerst spezifisch (akkurate Massen und detaillierte MS/MS-Experimente), so dass falsch positive Ergebnisse nahezu ausgeschlossen werden können.

Insgesamt können die hier vorliegenden Ergebnisse mit den Arbeiten von Novotny *et al.* sehr gut verglichen werden.^{159,183} Hier werden für Cyanidin-Derivate aus speziellen violetten Möhren ähnliche Konzentrationen in Plasma und Urin detektiert. Weiterhin konnten keine sulfatierten Spezies nachgewiesen werden. Dass keine Glucuronide detektiert wurden, ist dagegen überraschend. In der vorliegenden Arbeit konnten Glucuronide von Malvidin und Peonidin identifiziert und quantifiziert werden. Interessant wiederum ist die auch auf die Ergebnisse dieser Arbeit passende Feststellung, dass die Bedeutung der korrespondierenden Phenolsäure^{76, 184} im (humanen) Metabolismus nach wie vor unklar ist.^{176, 185} Oftmals werden die erwarteten Metabolite oder Abbauprodukte nicht detektiert oder nicht in der erwarteten Quantität nachgewiesen. Der Verbleib eines Großteils der Anthocyane ist somit nach wie vor unklar.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode ist die erste, die hochauflösende, hochgenaue Massenspektrometrie in Verbindung mit verschiedenen modernen Fragmentierungsmethoden und UHPLC für Anthocyane und deren Metabolite anwendet. Diese Methode wurde für eine Zellkultur-, Tier- und Humanstudie, verbunden mit der Untersuchung der eingesetzten anthocyanreichen Getränke und Extrakte genutzt.

Detaillierte Fragmentierungsexperimente aller Aglyka der Hauptanthocyane in der Natur (Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und Petunidin) wurden durchgeführt. Den Fragmentionen von Malvidin wurden mittels hochauflösender hochgenauer Massenspektren, basierend auf Berechnungen einer Spezialsoftware Strukturen und Fragmentierungswege zugewiesen.

Im Dakapo-Extrakt konnten die Glucoside von Malvidin, Peonidin, Petunidin, Cyanidin und Delphinidin sowie die Acetylglucoside von Malvidin, Peonidin, Petunidin und Delphinidin bestätigt werden. Erstmals konnten die Coumarylglucoside von Malvidin, Petunidin, Peonidin, Delphinidin und Cyanidin, sowie Cyanidin-3-(6-O-Acetyl-Glucosid) und Malvidin-3-(6-O-Caffeoyl-Glucosid) erstmals über detaillierte Fragmentierungsexperimente in Dakapo detektiert werden. In einer Traube generell konnte erstmals Pelargonidin-Glucosid nachgewiesen werden. Weiterhin konnte das sehr seltene 6-OH-Delphinidin-Glucosid zum ersten Male in einer Traube nachgewiesen werden. Erstmals wurden die charakteristischen Fragmentionen dieses Aglykons zur Identifizierung genutzt.

In Zellkulturstudien konnten in apikalen Proben eine Abnahme der Konzentration und in basalen Proben eine Zunahme der Konzentration der Anthocyane beobachtet werden. Jedoch konnten nur die eingesetzten Anthocyane des Dakapo-Extrakts detektiert werden. Es wurden keine Metabolite, wie Glucuronide nachgewiesen. Somit konnte die Aufnahme von intakten Anthocyan-Glucosiden durch humane Darmzellen simuliert und beobachtet werden.

Die Tiere der Tierstudie erhielten einen Saft aus Dakapo- und Accent-Trauben, sowie Heidelbeeren. Die Hauptanthocyane waren hier Malvidin-3,5-Diglucosid, Peonidin-3,5-Diglucosid und deren Monoglucoside. In Darminhaltproben der Tierstudie konnten neben den im gegebenen Saft vorhandenen Anthocyanen freie Aglyka als Metabolite (Darmflora) anhand ihrer Retentionszeit und erstmals mit Hilfe ihrer charakteristischen Fragmentionen nachgewiesen werden. In Plasma- und Urinproben der Tiere konnten ebenfalls intakte

Anthocyan-Glucoside und Anthocyan-Diglucoside detektiert werden. In sehr geringen Mengen konnten Glucuronide von Malvidin und Peonidin identifiziert werden.

Analog zur Zellkulturstudie konnten intakte Anthocyane in Plasma- und Urinproben der Humanstudie nachgewiesen werden. Es konnten weiterhin Glucuronide von Malvidin und Peonidin detektiert werden, diese konnten mittels ihrer charakteristischen Fragmentationen identifiziert werden. Ebenfalls konnte parallel im negativen Ionenmodus 3,4-Dihydroxybenzoesäure in humanen Proben detektiert werden. Da diese Säure einen nicht unerheblichen Bestandteil des gegebenen Saftes darstellte (10 µmol/L), kann hier nicht von Abbauprodukten des Cyanidins, welches in sehr geringen Konzentrationen vorlag, unterschieden werden. 3,4-Dihydroxybenzoesäure stellt das Degradationsprodukt von Cyanidin dar.

Um weitere Metabolite zu detektieren, wurde mithilfe von speziellen Fragmentierungsexperimenten („AIF“) nach anthocyan-spezifischen Fragmenten (Aglyka) gesucht. Alle detektierten Signale konnten durch die oben beschriebenen glycosilierten, acylierten und glucuronidierten Anthocyane bzw. durch freie Aglyka erklärt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass keine weiteren (unbekannten) Modifikationen der Anthocyane in der Probe vorliegen.

In Darminhaltproben der Tierstudie konnten kontinuierlich abnehmende Konzentrationen der Anthocyane vom Ileum über Caecum zum Colon hin beobachtet werden. In Plasma- und Urinproben der Tierstudie wurden speziell von Peonidin-3-Glucosid höhere Quantitäten gegenüber Malvidin-3-Glucosid detektiert. Dies kann nicht vollends auf die Humanstudie übertragen werden, aber beide Studien weisen in ihren Plasma- und Urinproben eine höhere Konzentration an Peonidin-Glucuronid gegenüber Malvidin-Glucuronid auf. Dies deutet darauf hin, dass sich die Aglykonstruktur ebenfalls auf die Metabolisierung und die Aufnahme in den Körper auswirkt.

In den Proben der Humanstudie konnten Konzentrationsverläufe für Anthocyan-Glucoside und -Glucuronide von Malvidin und Peonidin beobachtet werden. Die Anthocyan-Glucoside weisen in den Plasmaproben ein Konzentrationsmaximum (ca. 2-9 nmol/L) bei 60-80 Minuten nach Saftgabe auf. Die Glucuronide, welche erst durch metabolische Reaktionen entstehen, weisen ein späteres Maximum, bei 120 Minuten, auf. In humanen Urinproben konnte die höchste Konzentration an Anthocyan-Glucosiden und -Glucuroniden jeweils in der Fraktion 0-3 Stunden nach Saftgabe detektiert werden (ca. 2-15 nmol/L). Diese

Ergebnisse sind mit einem Großteil zuvor durchgeführter Studien in Einklang zu bringen und zeigen, dass die Anthocyane nur relativ kurz im Körper verbleiben und die maximalen Konzentrationen von bis ca. 10 nmol/L in Plasma, im Vergleich zur gegebenen Menge sehr gering sind.

Die Metabolisierung von Anthocyanen im (menschlichen) Organismus wird in der Literatur immer noch kontrovers diskutiert. Der Fokus der vorliegenden Studie und der entwickelten Analysemethoden waren direkte Metabolite der Anthocyane, wie Glucuronide, sulfatierte und methylierte Verbindungen. Die eingesetzten Anthocyanquellen anderer Studien wurden oft nicht auf bereits vorhandene Phenolsäuren, die auch als Degradationsprodukte erwartet wurden, geprüft. Daher wurde in dieser Arbeit explizit eine Analyse hinsichtlich 3,4-Dihydroxybenzoesäure im Saft der Humanstudie durchgeführt. Diese Phenolsäure konnte im Saft mit einer Konzentration von 10 µmol/L nachgewiesen werden und wurde ebenfalls in Plasma und Urin der Probanden nach Saftgabe in Konzentrationen von 2-10 nmol/L (Plasma) und 20-80 nmol/L (Urin) detektiert. Diese kann von Abbauprodukten aus Cyanidin, wie oben beschrieben, nicht unterschieden werden, jedoch deutet der kinetische Konzentrationsverlauf und die detektierten Konzentrationen auf eine Aufnahme aus dem Saft hin. In anderen Studien konnten die postulierten Hauptabbauprodukte in Form der Phenolsäuren sehr oft nicht nachgewiesen werden. Die Annahme, dass diese Abbauprodukte sofort und gänzlich in andere Phenolsäuren metabolisiert werden, muss als spekulativ bezeichnet werden. Die Bedeutung der Bildung von Phenolsäuren im Anthocyan-Metabolismus ist daher nicht abschließend zu beantworten. Eine detaillierte Untersuchung kleinerer (unspezifischer) Abbauprodukte von Anthocyanen im Organismus würde die Verwendung isopenmarkierter Ausgangsprodukte voraussetzen. Dies könnte allerdings nur in Tierstudien zur Anwendung kommen.

Aus ernährungswissenschaftlicher Sicht wurde insgesamt eine höhere Quantität an Metaboliten der Anthocyane, analog zu anderen Flavonoiden, erwartet. Eine Instrumentierung bestehend aus dem neuartigen, sensitiveren Massenspektrometer Q Exactive und dem bestehenden UHPLC-System, verbunden mit einer hochkonzentrierten Urinprobe konnte eine Sensitivitätssteigerung von Faktor 50 erreicht werden. Auch hier konnten die erwarteten methylierten oder sulfatierten Metabolite der Anthocyane nicht detektiert werden. Damit sind diese metabolischen Produkte für die Anthocyane Malvidin und Peonidin scheinbar nur von untergeordneter Bedeutung. Sulfate wurden bisherigen Recherchen zufolge nur für Pelargonidin und Cyanidin beschrieben. Die hier gezeigten Ergebnisse können jedoch durch

die angewandten Maßnahmen, wie methodisch saubere Arbeit und verschiedene Identifizierungsexperimente, abgesichert werden. Eine Sulfatierung sowie eine Methylierung der Hauptanthocyane konnte, wie oben beschrieben, nicht beobachtet werden. Dies widerspricht den Erkenntnissen anderer Studien zu Flavonoiden, wie beispielsweise dem Quercetin. Die Anthocyane lassen bezüglich ihres Verbleibs im Körper und ihres Metabolismus noch viele Fragen offen und bleiben daher ein interessantes Forschungsfeld.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse konnten nur durch eine sehr sensitive, robuste und dennoch schnelle Analyse gewonnen werden. Der Einsatz von hochauflösenden, hochgenauen Massenspektrometern ist in der Bioanalytik etabliert. Die hohe Anzahl und die hochkomplexen Proben verlangten nach einem ihrer Vielschichtigkeit entsprechenden Analysenverfahren. Durch den Einsatz hochauflösender, hochgenauer Massenspektrometrie ist die Quantifizierung direkt aus Massenspektren über die Peakflächen der zugehörigen Ionenchromatogramme möglich. Eine sehr stabile hohe Massengenauigkeit ($< 1,5$ ppm) ermöglichte hier die Verwendung von Massenfenstern von $\Delta m/z = 0,002$. Dies ermöglichte das parallele Erfassen vieler Analyten, ohne dass vorher ihre spezifische Retentionszeit oder ihr Fragmentierungsverhalten bekannt sein mussten. Ebenfalls war es möglich, durch kontinuierliches Wechseln der Polarität innerhalb eines LC-MS-Experiments im positiven und negativen Ionenmodus Daten aufzunehmen, die eine Quantifizierung zulassen. Durch dezidierte Fragmentierungsexperimente mit effektiven Fragmentierungsmethoden konnten Metabolite und Analyte, die nicht als Standardverbindungen verfügbar waren (insbesondere Glucuronide der Anthocyane und acylierte Anthocyane), identifiziert werden. Interessant wäre es, weitere Studien mit der vorliegenden Methode detailliert zu analysieren, die Säfte oder Extrakte verwenden, welche reich an Cyanidin- oder Pelargonidin-Derivaten sind. Dies würde im Detail darlegen, welchen Einfluss die Aglykonstruktur auf die jeweilige metabolische Reaktion hat. Neue Anthocyane und deren Metabolite könnten mit den hier aufgeführten Methoden aus verschiedensten Proben extrahiert, charakterisiert und identifiziert werden, ohne dafür eine NMR-Analyse, die aufwendige Extraktionen erfordert, durchführen zu müssen. Die Anwendung der ausgearbeiteten Methoden lässt sich auf viele Anthocyanquellen ausweiten (Obst, Gemüse, Blüten, div. biologische Flüssigkeiten).

Die vielen möglichen positiven Eigenschaften der Anthocyane in Bezug auf die Gesundheit des Menschen wurden in erster Linie an *in vitro*-Systemen mit sehr hohen Konzentrationen (teilweise 500 $\mu\text{mol/L}$) erforscht. Im Körper weisen Anthocyane in Blut und Urin, und damit

auch in vielen inneren Organen, nur eine sehr geringe Konzentration auf (ca. 5-10 nmol/L). Die Konzentration ist vermutlich zu gering, um antiinflammatorisch oder antikarzinogen zu wirken. Dies konnte ebenfalls in der Tierstudie zusammen mit unseren Kooperationspartnern aus Karlsruhe (Max-Rubner-Institut) bestätigt werden. Die kurze Verweildauer (120-180 Min) im Körper ist, verbunden mit den sehr niedrigen Konzentrationen, ein deutliches Indiz, den Anthocyanen keine zu großen präventiven Potentiale zuzuschreiben. Insgesamt hat aber wohl eine ausgewogene Ernährung mit viel frischem Obst und Gemüse eine größere positive Wirkung, als allein darauf zu achten, hohe Mengen an Anthocyanen zu sich zu nehmen.

7. Literaturverzeichnis

1. Fleschhut, J. (2004) Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen, *Dissertation*, Universität Karlsruhe.
2. Steinmetz, K. A., Kushi, L. H., Bostick, R. M., Folsom, A. R., and Potter, J. D. (1994) Vegetables, Fruit, and Colon Cancer in the Iowa Women's Health Study, *American Journal of Epidemiology* 139 (1), 1-15.
3. Keli, S. O., Hertog, M. G., Feskens, E. J. and Kromhout, D. (1996) Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: The Zutphen study, *Archives of Internal Medicine*, 156 (6), 637-642.
4. Mazza, G. and Miniati, E. (1993) Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains, *CRC Press Boca Raton*.
5. Balaban, A. T., Schroth, W. and Fischer, G. (1969) Pyrylium salts Part I. Syntheses, *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 10, 241-326.
6. Belitz, H., Grosch, W. and Schieberle, P. (2008) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
7. Watzl, B., Briviba, K. and Rechkemmer, G. (2002) Anthocyane, *Ernährungsumschau*, 48,148-150.
8. Harborne, J. E. and Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55, 481-504.
9. Tatsuzawa, F., Saito, N., Murata, N., Shinoda, K., Shigihara, A. and Honda, T. (2003) 6-Hydroxypelargonidin glycosides in the orange-red flowers of *Alstroemeria*, *Phytochemistry*, 62(8), 1239-1242.
10. Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., and Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, 64 (5), 923-933.
11. Kuhnau, J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24, 117-191.
12. Cooper-Driver, G. A. (2001) Contributions of Jeffrey Harbonre and co-workers to the study of anthocyanins, *Phytochemistry*, 56 (3), 229-236.
13. Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A., and Speers, R. A. (1987) Anthocyanins as food colorants - A Review, *Journal of Food Biochemistry*, 11(3), 201-247.
14. Bridle, P., and Timberlake, C. F. (1997) Anthocyanins as food colours - selected aspects, *Food Chemistry*, 58(1), 103-109.
15. Markakis, P. (1974) Anthocyanins and their stability in foods, *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 4(4), 437-456.
16. Seeram, N. P., Bourquin, L. D., and Nair, M. G. (2001) Degradation Products of Cyanidin Glycosides from Tart Cherries and Their Bioactivities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4924-4929.
17. Harper, K. A. (1968) Structural changes of flavylium salts. IV. Polarographic and spectrometric examination of pelargonidin chloride, *Australian Journal of Chemistry* 21(1), 221-227.
18. Clifford, M. N. (2000) Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7), 1063-1072.
19. Jurd, L. (1972) Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments, *Advances in Food Research Supplement*, 3, 123-142.
20. Haynes, W. M. (2012) *CRC Handbook of Chemistry and Physics (Tabellenwerk)*, Taylor & Francis.

21. Merken, H. M., and Beecher, G. R. (2000) Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (3), 577-599.
22. Tanaka, Y., Sasaki, N. and Ohmiya, A. (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids, *The Plant Journal*, 54 (4), 733-749.
23. Malien-Aubert, C., Dangles, O. and Amiot, M. J. (2000) Color Stability of Commercial Anthocyanin-Based Extracts in Relation to the Phenolic Composition. Protective Effects by Intra- and Intermolecular Copigmentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (1), 170-176.
24. Asen, S., Stewart, R. N. and Norris, K. H. (1972) Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissue and its effect on color, *Phytochemistry* 11(3),1139-1144.
25. Dangles, O., Saito, N. and Brouillard, R. (1993) Anthocyanin intramolecular copigment effect, *Phytochemistry* 34 (1), 119-124.
26. Harbounre, J. (1988) The Flavonoids: Recent Advances, *Chapman & Hall*, 299-343.
27. Simmonds, M. S. (2003) Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge, *Phytochemistry* 64 (1), 21-30.
28. Takahashi, A., Takeda, K. and Ohnishi, T. (1991) Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture, *Plant and Cell Physiology* 32 (4), 541-547.
29. Marrs, K. A., Alfenito, M. R., Lloyd, A. M. and Walbot, V. (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*, *Nature* 375, 397-400.
30. Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism, *The Plant Cell* 7 (7), 1085-1097.
31. Wang, H., Coa, G. and Prior, R. (1997) Oxygen Radical Absorbing Capacity of anthocyanins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (2), 304-309.
32. Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Schroder, N. and Rechkemmer, G. (1999) Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells, *European Journal of Nutrition* 38 (5), 227-234.
33. Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin-3-O-beta-D-Glucoside and Cyanidin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (11), 2407-2410.
34. Huebbe, P., Giller, K., de Pascual-Teresa, S., Arkenau, A., Adolphi, B., Portius, S., Arkenau, C. N. and Rimbach, G. (2012) Effects of blackcurrant-based juice on atherosclerosis-related biomarkers in cultured macrophages and in human subjects after consumption of a high-energy meal, *British Journal of Nutrition* 108 (2), 234-244.
35. Giordano, L., Coletta, W., Tamburrelli, C., D'Imperio, M., Crescente, M., Silvestri, C., Rapisarda, P., Recupero, G. R., De Curtis, A., Iacoviello, L., de Gaetano, G., Rotilio, D., Cerletti, C. and Donati, M. B. (2012) Four-week ingestion of blood orange juice results in measurable anthocyanin urinary levels but does not affect cellular markers related to cardiovascular risk: a randomized cross-over study in healthy volunteers, *European Journal of Nutrition* 51 (5), 541-548.
36. Cassidy, A., Mukamal, K. J., Liu, L., Franz, M., Eliassen, A. H. and Rimm, E. B. (2013) High Anthocyanin Intake Is Associated With a Reduced Risk of Myocardial Infarction in Young and Middle-Aged Women, *Circulation* 127 (2), 188-196.

37. Briseno, C. (2013) Herzinfarkt-Schutz: So gesund sind rote Beeren wirklich, Spiegelonline, <http://www.spiegel.de/gesundheit/ernaehrung/herzinfarkt-blaubeeren-sollen-vor-herz-kreislauf-krankheiten-schuetzen-a-877559.html>.
38. Hou, D. X. (2003) Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins, *Current Molecular Medicine* 3 (2), pp 149-159.
39. Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D., Steward, W. and Gescher, A. (2009) Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs?, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64 (1), 201-211.
40. Shih, P., Yeh, C. and Yen, G. C. (2005) Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells, *Food and Chemical Toxicology* 43 (10), 1557-1566.
41. Nagase, H., Sasaki, K., Kito, H., Haga, A. and Sato, T. (1998) Inhibitory effect of delphinidin from *Solanum melongena* on human fibrosarcoma HT-1080 invasiveness in vitro, *Planta Medica* 64 (3), 216-219.
42. Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry* 30 (12), 3875-3883.
43. Zakay-Rones, Z., Thom, E., Wollan, T. and Wadstein, J. (2004) Randomized study of the efficacy and safety of oral elderberry extract in the treatment of influenza A and B virus infections, *Journal of International Medical Research* 32 (2), 132-140.
44. Tengherdy, T. (1978) Accelerated remission of episodes of Herpes labialis in response to a bioflavonoid-ascorbate supplement, *Nutrition Reviews* 36 (10), 300-301.
45. Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Azuma, M. and Knox, Y. M. (2003) Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L., *Phytother Res* 17 (6), 609-613.
46. Knox, Y. M., Suzutani, T., Yoshida, I., Shibaki, T., Ogasawara, M. and Azuma, M. (1998) Antiviral activity of Kurokarin extracts, *Food Processing* 33 (8), 21-23.
47. Knox, Y. M., Hayashi, K., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Shiina, R., Tsukui, A., Terahara, N. and Azuma, M. (2001) Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses, *Acta Virol* 45 (4), 209-215.
48. Morand, C., Manach, C., Crespy, V. and Remesy, C. (2000) Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma, *Free Radic Res* 33 (5), 667-676.
49. Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J. and Katan, M. B. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers, *The American Journal of Clinical Nutrition* 62 (6), 1276-1282.
50. Olthof, M. R., Hollman, P. C., Builman, M. N. van Amelsvoort, J. M., and al., e. (2003) Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans, *Journal of Nutrition* 33 (6), 1806-1814.
51. Lapidot, T., Harel, S., Granit, R. and Kanner, J. (1998) Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine, *J Agric Food Chem* 46 (10), 4297-4302.
52. Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K. and Someya, K. (1999) Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans, *J Agric Food Chem* 47 (3), 1083-1091.
53. Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M., Tominaga, S., Hirayama, M. and Tsuda, T. (2001) Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms, *J Agric Food Chem* 49 (3), 1546-1551.

54. Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A. and Mattivi, F. (2003) The stomach as a site for anthocyanins absorption from food, *FEBS Lett* 544, 210-213.
55. Matuschek, M. V., Hendriks, W. H., McGhie, T. K. and Reynolds, G. W. (2006) The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice, *J. Nutr. Biochem.* 17 (1), 31-36.
56. Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A. and Mattivi, F. (2003) The stomach as a site for anthocyanins absorption from food, *FEBS Lett* 544, 210-213.
57. Mullen, W., Larcombe, S., Arnold, K., Welchman, H. and Crozier, A. (2010) Use of Accurate Mass Full Scan Mass Spectrometry for the Analysis of Anthocyanins in Berries and Berry-Fed Tissues, *J. Agric. Food Chem.* 58 (7), 3910-3915.
58. Kalt, W., Blumberg, J. B., McDonald, J. E., Vinquist-Tymchuk, M. R., Fillmore, S. A. E., Graf, B. A., O'Leary, J. M. and Milbury, P. E. (2008) Identification of anthocyanins in the liver, eye and brain of blueberry-fed pigs, *J. Agric. Food Chem.* 56 (3), 705-712,
59. Garcia-Alonso, M., Minigane, A. M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J. C. and de Pascual-Teresa, S. (2009) Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma, *Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (7), 521-529.
60. Frank, T., Janssen, M., Netzel, M., Strass, G., Kler, A., Kriesl, E. and Bitsch, I. (2005) Pharmacokinetics of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of Hibiscus sabdariffa L. extract, *J Clin Pharmacol* 45 (2), 203-210.
61. Lee, M. J., Wang, Z. Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D. A. and Yang, C. S. (1995) Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4 (4), 393-399.
62. Ueno, I., Nakano, N. and Hirono, I. (1983) Metabolic fate of [14C] quercetin in the ACI rat, *Jpn J Exp Med* 53 (1), 41-50.
63. Fuhr, U. and Kummert, A. L. (1995) The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions?, *Clin Pharmacol Ther* 58 (4), 365-373.
64. Bokkenheuser, V. D., Shackleton, C. H. and Winter, J. (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans, *Biochem J* 248 (3), 953-956.
65. Bokkenheuser, V. D. and Winter, J. (1988) Hydrolysis of flavonoids by human intestinal bacteria, *Prog Clin Biol Res* 280, 143-145.
66. Hollman, P. C. and Katan, M. B. (1998) Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man, *Arch Toxicol Suppl* 20, 237-248.
67. Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P. and Rice-Evans, C. A. (2002) The metabolic fate of dietary polyphenols in humans, *Free Radic Biol Med* 33 (2), 220-235.
68. Scheline, R. R. (1968) The metabolism of drugs and other organic compounds by the intestinal microflora, *Acta Pharmacol Toxicol* 26 (4), 332-342.
69. Skrbek, S. (2009) Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Anthocyanen im Tier- und Zellkulturmodell, *Dissertation Universität Karlsruhe*.
70. Boutin, J. A., Meunier, F., Lambert, P. H., Hennig, P., Bertin, D., Serkiz, B. and Volland, J. P. (1993) In vivo and in vitro glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats, *Drug Metab Dispos* 21 (6), 1157-1166.
71. Cooke, D. N., Thomasset, S., Boocock, D. J., Schwarz, M., Winterhalter, P., Steward, W. P., Gescher, A. J. and Marczyklo, T. H. (2006) Development of analyses by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/Tandem mass

- spectrometry of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) Anthocyanins in Human plasma and urine, *J. Agric. Food. Chem* 54 (19), 7009-7013.
72. Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L. and Fogliano, V. (2007) Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides, *Journal of Nutrition* 137 (9), 2043-2048.
 73. Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. and Remesy, C. (2003) Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans, *J. Nutr* 133 (5), 1296-1301.
 74. Charron, C. S., Clevidence, B. A., Britz, S. J. and Novotny, J. A. (2007) Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleraces* L. Var. capitata), *J. Agric. Food. Chem* 55 (13), 5354-5362.
 75. Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lyan, B., Lamaison, J.-L. and Scalbert, A. (2007) Strawberry pelargonidin glycosides are excreted in urine as intact glycosides and glucuronidated pelargonidin derivatives in rats, *British Journal of Nutrition* 98 (6), 1126-1131.
 76. Kay, C. D., Kroon, P. A. and Cassidy, A. (2009) The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products, *Mol. Nutr. Food Res* 53 (S1), 92-101.
 77. Bub, A., Watzl, B., Heeb, D., Rechkemmer, G. and Briviba, K. (2001) Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice, *Eur J Nutr* 40 (3), 113-120.
 78. Bitsch, R., Netzel, M., Sonntag, S., Strass, G., Frank, T. and Bitsch, I. (2004) Urinary excretion of cyanidin glucosides and glucuronides in healthy humans after elderberry juice ingestion, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5, 343-345.
 79. Bitsch, R., Netzel, M., Frank, T., Strass, G. and Bitsch, I. (2004) Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5, 293-298.
 80. Felgines, C., Talavera, S., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. and Remesy, C. (2005) Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans, *J. Agric. Food Chem* 53 (20), 7721-7727.
 81. Stalmach, A., Edwards, C. A., Wightman, J. D. and Crozier, A. (2011) Identification of (Poly)phenolic Compounds in Concord Grape Juice and Their Metabolites in Human Plasma and Urine after Juice Consumption, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (17), 9512-9522.
 82. Kurilich, A. C., Clevidence, B. A., Britz, S. J., Simon, P. W. and Novotny, J. A. (2005) Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots, *J. Agric. Food Chem* 53(16), 6537-6542.
 83. Kay, C. D., Mazza, G., Holub, B. J. and Wang, J. (2004) Anthocyanin metabolites in human urine and serum, *British Journal of Nutrition* 91 (6), 933-942.
 84. McGhie, T. K., Ainge, G. D., Barnett, L. E., Cooney, J. M. and Jensen, D. J. (2003) Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (16), 4539-4548.
 85. Kay, C. D., Mazza, G. and Holub, B. J. (2005) Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men, *J. Nutr* 135 (11), 2582-2588.
 86. Borges, G., Roowi, S., Rouanet, J. M., Duthie, G. G., Lean, M. E. J. and Crozier, A. (2007) The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats, *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (6), 714-725.

87. Mullen, W., Hartley, R. C. and Crozier, A. (2003) Detection and identification of ¹⁴C-labelled flavonol metabolites by high-performance LC-radiocounting and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1007, 21-29.
88. Mullen, W., Graf, B. A., Caldwell, S. T., Hartley, R. C., Duthie, G. G., Edwards, C. A., Lean, M. E. J. and Crozier, A. (2002) Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-¹⁴C]quercetin-4'-glucoside, *J. Agric. Food Chem* 50 (23), 6902-6909.
89. Graf, B. A., Mullen, W., Caldwell, C. T., Hartley, R. C., Duthie, G. G., Lean, M. E. J., Crozier, A. and Edwards, C. A. (2005) Disposition and metabolism of [2-¹⁴C]quercetin-4'-glucoside in rats, *Drug Metab. Dispos* 33 (7), 1036-1043.
90. Gross, J. (2012) *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch, Lehrbuch*, 1. Auflage, Springer Spektrum.
91. Tswett, M. S. (1906), Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen, *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft* 24, 316-323.
92. Piel, E. V. (1966) Accelerated Microparticulate Bed Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry* 38 (4), 670-672.
93. Eppert, G. J. (1997) Flüssigkeitschromatographie - HPLC- Theorie und Praxis, Lehrbuch, 3. Auflage, *Vieweg-Verlag Braunschweig/Wiesbaden*.
94. Cammann, K. (2001) Instrumentelle Analytische Chemie, *Spektrum akademischer Verlag*.
95. Otto, M. (2006) Analytische Chemie, Lehrbuch, 3. Auflage, *Wiley-VCH*.
96. Cooper, K. A., Campos-Gimenez, E., Alvarez, D. J., Nagy, K., Donovan, J. L. and Williamson, G. (2007) Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate, *J. Agric. Food Chem* 55 (8), 2841-2847.
97. Zeleny, J. (1917) Instability of Electrified Liquid Surfaces, *Phys. Rev* 10 (1), 1-7.
98. Taylor, G. (1964) Disintegration of Water Drops in an Electric Field, *Proc. Royal Soc. London A* 280 (1382), 383-397.
99. Wilm, M. and Mann, M. (1994) Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole's Beam of Macromolecules at Last? , *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc* 136 (2-3), 167-180.
100. Marginean, I., Nemes, P., Parvin, L. and Vertes, A. (2006) How Much Charge Is There on a Pulsation Taylor Cone? , *Applied Physics Letters* 89 (6), 064104.
101. Nemes, P., Marginean, I. and Vertes, A. (2007) Spraying Mode Effect on Droplet Formation and Ion Chemistry in Electrosprays, *Anal. Chem* 79 (8), 3105-3116.
102. Lottspeich, F. and Engels, J. W. (2006) Bioanalytik (Lehrbuch), *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.
103. Fenn, J. (1993) Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy and time , *J. Am. Soc. Mass. Spectrom* 4 (7), 524-535.
104. Yamashita, M. and Fenn, J. B. (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme, *The Journal of Physical Chemistry* 88 (20), 4451-4459.
105. Zubarev, R. and Mann, M. (2007) On the Proper Use of Mass Accuracy in Proteomics, *Molecular & Cellular Proteomics* 6 (3), 377-381.
106. He, F., Hendrickson, C. and Marshall, A. (2001) Baseline Mass Resolution of Peptide Isobars: A Record for Molecular Mass Resolution, *Anal. Chem.* 73 (3), 647-650.
107. Bossio, R. and Marshall, A. (2002) Baseline Resolution of Isobaric Phosphorylated and Sulfated Peptides and Nucleotides by Electrospray Ionization FT-ICR-MS: Another Step Toward MS-Based Proteomics, *Anal. Chem.* 74 (7), 1674-1679.

108. Marshall, A., Hendrickson, C. and Shi, S. (2002) Scaling MS Plateaus With High-Resolution FT-ICR-MS, *Anal. Chem.* 74 (9), 252A-259A.
109. Schaub, T., Hendrickson, C., Horning, S., Quinn, J., Senko, M. and Marshall, A. (2001) High-Performance Mass Spectrometry: FT-ICR at 14.5 Tesla, *Anal. Chem.* 73 (3), 647-650.
110. Marshall, A. and Hendrickson, C. (2002) FT-ICR Detection: Principles and Experimental Configurations, *Int. J. Mass Spectrom.* 215 (1), 59-75.
111. Marshall, A., Hendrickson, C. and Jackson, G. (1998) FT-ICR Mass Spectrometry: a Primer, *Mass Spectrom. Rev.* 17 (1), 1-35
112. Thieu-Simchen, V. A. (2007) Entwicklung neuer Methoden zur Ergebnisvalidierung in der massenspektrometrischen Proteomanalytik, Dissertation Justus Liebig Universität Giessen.
113. March, R. E. (1998) Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry: Theory, Simulation, Recent Developments and Applications, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (20), 1543-1554.
114. Siethoff, C., Wagner-Redeker, W., Schäfer, M. and Linscheid, M. (1999) HPLC-MS With an Ion Trap Mass Spectrometer, *Chimia* 53 (10), 484-491.
115. Leach III, F. E., Kharchenko, A., Heeren, R. M. A., Nikolaev, E. and Amster, I. J. (2010) Comparison of Particle-In-Cell Simulations with Experimentally Observed Frequency Shifts Between Ions of the Same Mass-To-Charge in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21 (2), 203-208.
116. McLafferty, F. W., Bente, P. F. I., Kornfeld, R., Tsai, S.-C. and Howe, I. (1973) Collisional Activation Spectra of Organic Ions, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (7), 2120-2129.
117. Levsen, K. and Schwarz, H. (1976) Collisional Activation MS - a New Probe for Structure Determination of Ions in the Gaseous Phase, *Angew. Chem.* 88, 589-601.
118. Kingdon, K. H. (1923) A Method for Neutralizing the Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Pressures, *Phys. Rev.* 21 (4), 408-418.
119. Scigelova, M. and Makarov, A. (2006) Orbitrap Mass Analyzer - Overview and Applications in Proteomics, *Practical Proteomics.* 6 (1), 16-21.
120. Knight, R. D. (1981) Storage from Ions in Laser-Produced Plasmas, *Applied Physics Letters.* 38 (4), 221-223.
121. Perry, R. H., Cooks, R. G. and Noll, R. J. (2008) Orbitrap Mass Spectrometry: Instrumentation, Ion Motion and Applications, *Mass Spectrom. Rev.* 27 (6), 661-699.
122. Oksman, P. (1995) A Fourier Transform TOF Mass Spectrometer. A SIMION Calculation Approach, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 141 (1), 67-76.
123. Makarov, A. (2000) Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis, *Anal. Chem.* 72 (6), 1156-1162.
124. Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. and Cooks, R. G. (2005) The Orbitrap: A New Mass Spectrometer, *J. Mass Spectrom.* 40 (4), 430-443.
125. Olsen, J. V., de Gogoy, L. M. F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S. and Mann, M. (2005) Parts Per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer Via Lock Mass Injection into a C-Trap, *Molecular and Cellular Proteomics.* 4 (12), 2010-2021.
126. Makarov, A., Denisov, E., Lange, O. and Horning, S. (2006) Dynamic Range of Mass Accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (7), 977-982.

127. Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K. and Horning, S. (2006) Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer, *Anal. Chem.* 78 (7), 2113-2120.
128. Macek, B., Waanders, L. F., Olsen, J. V. and Mann, M. (2006) Top-Down Protein Sequencing and MS³ on a hybrid linear Quadrupole Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer, *Molecular and Cellular Proteomics.* 5 (5), 949-958.
129. Olsen, J. V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S. and Mann, M. (2007) Higher-Energy C-Trap Dissociation for Peptide Modification Analysis, *Nature Methods.* 4 (9), 709-712.
130. Nyman, N. A. and Kumpulainen, J. T. (2001) Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 49 (9), 4183-4187.
131. Hong, V. and Wrolstad, R. E. (1990) Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC photodiode array detection, *J. Agric. Food Chem.* 38 (3), 698-708.
132. Hong, V. and Wrolstad, R. E. (1990) Use of HPLC separation photodiode array detection for characterization of anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.* 38 (3), 708-715.
133. Giusti, M. M., Rodríguez-Saona, L. E. and Wrolstad, R. E. (1999) Molar Absorptivity and Color Characteristics of Acylated and Non-Acylated Pelargonidin-Based Anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.* 47 (11), 4631-4637.
134. Berente, B. (2004) HPLC-Analyse von Anthocyanen im Rotwein und Klassifizierung deutscher Rotweine mittels multivariater statistischer Methoden, Dissertation Friedrich-Schiller-Universität Jena.
135. Wu, X., Pittman III, H. E. and Prior, R. L. (2004) Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs, *J. Nutr.* 134 (10), 2603-2610.
136. Cooney, J. M., Jensen, D. J. and McGhie, T. (2004) LC-MS identification of anthocyanins in boysenberry extract and anthocyanin metabolites in human urine following dosing, *J. Sci. Food Agric.* 84 (3), 237-245.
137. Giusti, M. M., Rodriguez-Saona, L. E., Griffin, D. and Wrolstad, R. E. (1999) Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization, *J. Agric. Food Chem.* 47 (11), 4657-4664.
138. Wu, X. and Prior, R. (2005) Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries, *J. Agric. Food Chem.* 53 (7), 2589-2599.
139. Mullen, W., Lean, M. E. J. and Crozier, A. (2002) Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 966 (1-2), 63-70.
140. Otake, K., Terahara, N., Saito, N., Toki, K. and Honda, T. (1992) Chemical structures of two anthocyanins from purple sweet-potato, *Ipomoea batatas*, *Phytochemistry* 31 (6), 2127-2130.
141. Oliveira, M. C., Esperanca, P. and Almoester Ferreira, M. A. (2001) Characterisation of anthocyanidins by electrospray ionisation and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (17), 1525-1532.
142. Barnes, J. S. and Schug, K. A. (2011) Structural characterization of cyanidin-3,5-diglucoside and pelargonidin-3,5-diglucoside anthocyanins: Multi-dimensional fragmentation pathways using high performance liquid chromatography-electrospray

- ionization-ion trap-time of flight mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 308 (1), 71-80.
143. Römpf, A., Dekker, L., Taban, I., Jenster, G., Boogerd, W., Bonfrer, H., Spengler, B., Heeren, R., Smitt, P. S. and Luider, T. M. (2007) Identification of leptomenigeal metastasis-related proteins in cerebrospinal fluid of patients with breast cancer by a combination of MALDI-TOF, MALDI-FTICR and nanoLC-FTICR MS, *Proteomics* 7 (3), 474-481.
 144. Römpf, A., Taban, I. M., Mihalca, R., Duursma, M. C., Mize, T. H., McDonnell, L. A. and Heeren, R. M. A. (2005) Examples of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry developments: from ion physics to remote access biochemical mass spectrometry, *European Journal of Mass Spectrometry* 11 (5), 443-456.
 145. Page, J. S., Masselon, C. D. and Smith, R. D. (2004) FTICR mass spectrometry for qualitative and quantitative bioanalyses, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (1), 3-11.
 146. Mol, H. G. J., Zomer, P. and de Koning, M. (2012) Qualitative aspects and validation of a screening method for pesticides in vegetables and fruits based on liquid chromatography coupled to full scan high resolution (Orbitrap) mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (10), 2891-2908.
 147. Kaufmann, A. (2012) The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (5), 1233-1249.
 148. Faeste, C. K., Ronning, H. T., Christians, W. and Granum, P. E. (2011) Liquid chromatography and mass spectrometry in food allergen detection, *J. Food Prot.* 74 (2), 316-345.
 149. Moulard, Y., Bailly-Chouriberry, L., Boyer, S., Garcia, P., Popot, M.-A. and Binnaire, Y. (2011) Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control, *Anal. Chim. Acta.* 700 (1-2), 126-136.
 150. Urpi-Sarda, M., Garrido, I., Monagas, M., Gomez-Cordoves, C., Medina-Remon, A., Andres-Lacueva, C. and Bartolome, B. (2009) Profile of Plasma and Urine Metabolites after the Intake of Almond *Prunus dulcis* (Mill.) DA Webb Polyphenols in Humans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (21), 10134-10142.
 151. Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, K., Yokota, T., Cavin, C., Steiling, H., Williamson, G. and Crozier, A. (2009) Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption, *Drug Metabolism and Disposition* 37 (8), 1749-1758.
 152. Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, K., Yokota, T., Cavin, T., Steiling, H., Williamson, G. and Crozier, A. (2009) Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption, *Drug Metabolism and Disposition* 37 (8), 1749-1758.
 153. Esselen, M., Barth, S. W., Winkler, S. and Baechler, S. (2013) Anthocyanins suppress the cleavable complex formation by irinotecan and diminish its DNA-strand-breaking activity in the colon of Wistar rats, *Carcinogenesis* 34 (4), 835-840.
 154. Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B. and Whittall, R. M. (2008) Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 627 (1), 71-81.

155. Ma, Y. L., Li, M., Van den Heuvel, H. and Claeys, M. (1997) Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 11 (12), 1357-1364.
156. Abrankó, L., García-Reyes, J. F. and Molina-Díaz, A. (2011) In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 46 (5), 478-488.
157. Domon, B. and Costello, C. (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate Journal* 5 (4), 397-409.
158. Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R. and Voutilainen, S. (2009) Metabolism of Berry Anthocyanins to Phenolic Acids in Humans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (6), 2274-2281.
159. Novotny, J. A., Clevidence, B. A. and Kurilich, A. C. (2012) Anthocyanin kinetics are dependent on anthocyanin structure, *British Journal of Nutrition* 107 (4), 504-509.
160. Mullen, W., Larcombe, S., Arnold, K., Welchman, H. and Crozier, A. (2010) Use of Accurate Mass Full Scan Mass Spectrometry for the Analysis of Anthocyanins in Berries and Berry-Fed Tissues, *J. Agric. Food Chem.* 58 (7), 3910-3915.
161. Zhang, N. R., Yu, S., Tiller, P., Yeh, S., Mahan, E. and Emary, W. B. (2009) Quantitation of small molecules using high-resolution accurate mass spectrometers – a different approach for analysis of biological samples, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (7), 1085-1094.
162. Jeffries, J. B., Barlow, S. E. and Dunn, G. H. (1983) Theory of space-charge shift of ion cyclotron resonance frequencies, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 54 (1-2), 169-187.
163. Francl, T. J., Sherman, M. G., Hunter, R. L., Locke, M. J., Bowers, W. D. and McIver Jr, R. T. (1983) Experimental determination of the effects of space charge on ion cyclotron resonance frequencies, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 54 (1-2), 189-199.
164. Wong, R. L. and Amster, I. J. (2007) Experimental evidence for space-charge effects between ions of the same mass-to-charge in Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry* 265 (2-3), 99-105.
165. Wineland, D. and Dehmelt, H. (1975) Line shifts and widths of axial, cyclotron and G-2 resonances in tailored, stored electron (ion) cloud, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* 16 (3), 338-342.
166. Schwedt, G. (2008) Analytische Chemie, *Wiley-VCH Verlag, Weinheim*.
167. VITIS. (2009) Vitis International Variety Catalogue.
168. Dietrich, H., Fröhling, B., Hofmann, D., Rühl, E. and Will, F. (2009) Herstellung von Roten Traubensäften und Anthocyanextrakten aus dem Trester anthocyanreicher Traubensorten, *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 105 (11), 695-702.
169. Berente, B. (2004) HPLC-Analyse von Anthocyanen im Rotwein und Klassifizierung deutscher Rotweine mittels multivariater statistischer Methoden, Dissertation Friedrich-Schiller-Universität Jena.
170. Saito, N., Yokoi, M., Ogawa, M., Kamijo, M. and Honda, T. (1988) 6-hydroxyanthocyanidin glycosides in the flowers of *Alstroemeria*, *Phytochemistry* 27 (5), 1399-1401.
171. Chen, T. R., Drabkowski, D., Hay, R. J., Macy, M. and Peterson, W. J. (1987) WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29, *Cancer Genet. Cytogenet.* 27 (1), 125-134.

172. Fogh, J., Fogh, J. M. and Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice, *J. Natl. Cancer Inst.* 59 (1), 221-226.
173. Fogh, J., Wright, W. C. and Loveless, J. D. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors, *J. Natl. Cancer Inst.* 58 (2), 209-214
174. Skrbek, S., Übelhör, M., Briviba, K., Watzl, B. and Rüfer, C. (2008) Zelluläre Aufnahme von Anthocyanen in vitro, *Lebensmittelchemie* 5, 115.
175. Graf, D., Seifert, S., Bub, A., Fröhling, B., Dold, S., Unger, F., Römpp, A. and Watzl, B. (2013) Anthocyanin-rich juice does not affect gut-associated immunity in Fischer rats, *Mol. Nutr. Food Res.* 57 (10), 1753-1761.
176. Prior, R. L. and Wu, X. (2006) Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities, *Free Radic. Res.* 40 (10), 1014-1028.
177. McGhie, T. K. and Walton, M. C. (2007) The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding, *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (6), 702-713.
178. McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A. and Stewart, D. (2005a) Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system, *J. Agric. Food Chem.* 53 (15), 5896-5904.
179. Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A. and García-Viguera, C. (2002) In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C, *J. Agric. Food Chem.* 50 (8), 2308-2312.
180. Ichiyangi, T., Shida, Y., Mamunur Rahman, M., Hatano, Y. and Konishi, T. (2005) Extended glucuronidation is another major path of cyanidin 3-O- β -D-glucopyranoside metabolism in rats, *J. Agric. Food Chem.* 53 , 7312-7319.
181. Ichiyangi, T., Shida, Y., Mamunur Rahman, M., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M. and Konishi, T. (2005) Metabolic pathway of cyanidin 3-O- β -D-glucopyranoside in rats, *J. Agric. Food Chem.* 53 (1), 145-150.
182. Milbury, P. E., Vita, J. A. and Blumberg, J. B. (2010) Anthocyanins are Bioavailable in Humans following an Acute Dose of Cranberry Juice, *The Journal of Nutrition.* 140 (6), 1099-1104.
183. Novotny, J. A., Clevidence, B. A., and Kurilich, A. C. (2011) Anthocyanin kinetics are dependent on anthocyanin structure, *British Journal of Nutrition* 107 (4), 504-509.
184. Woodward, G., Kroon, P., Cassidy, A., and Kay, C. (2009) Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples, *J. Agric. Food Chem.* 57 (12), 5271-5278.
185. Matsumoto, H., Ito, K., and Yonekura, K. (2007) Enhanced absorption of anthocyanins after oral administration of phytic acid in rats and humans, *J Agric Food Chem.* 55 (6), 2489-2496.
186. Mit freundlicher Genehmigung durch Thermo Fisher Scientific, verändert nach Homepage www.planetorbitrap.com. Im Original ohne jegliche Beschriftung.

8. Abkürzungsverzeichnis

AGC	<i><u>A</u>utomated <u>G</u>ain <u>C</u>ontrol</i> (automatische Verstärkungsregelung)
AIF	<i><u>A</u>ll <u>I</u>on <u>F</u>ragmentation</i> (Fragmentierung des kompletten Ionenpakets)
AU	<i><u>A</u>bsorption <u>U</u>nit</i> (Absorptionseinheit)
BSG	Bestimmungsgrenze
Caco-2	humane Adenokarzinomzellen
CID	<i><u>C</u>ollisional <u>I</u>nduced <u>D</u>issoziation</i> (Kollisionsinduzierte Dissoziation)
2-Cl-5-	
Nitro-B	2-Chlor-5-Nitro-Benzoesäure
Cy	Cyanidin
Cy-3-glc	Cyanidin-3-O-glucosid
Cy-3,5-dglc	Cyanidin-3,5-O-diglucosid
Del	Delphinidin
Del-3-glc	Delphinidin-3-O-glucosid
Del-3,5-dglc	Delphinidin-3,5-O-diglucosid
3,4-DHB	3,4-Dihydroxybenzoesäure
EDTA	Ethylendiamminotetraessigsäure
ESI	<i><u>E</u>lectro <u>S</u>pray <u>I</u>onisation</i>
eV	Elektronenvolt
FA	<i><u>F</u>ormic <u>A</u>cid</i> (Ameisensäure)
FAB-MS	<i><u>F</u>ast <u>A</u>tom <u>B</u>ombardment <u>M</u>ass <u>S</u>pektrometry</i>
FISH	<i><u>F</u>ragment <u>I</u>on <u>S</u>earch</i> (Methode zur Analyse von Fragmentionen)
FT	<u>F</u> ourier- <u>T</u> ransformation
FT-ICR-MS	<u>F</u> ourier- <u>T</u> ransform- <u>I</u> onencyklotron- <u>R</u> esonanz- <u>M</u> assenspektrometer
h	Stunde
HCD	<i><u>H</u>igher <u>E</u>nergy <u>C</u>-<u>T</u>rap <u>D</u>issoziation/<u>H</u>igher <u>E</u>nergy <u>C</u>ollisional <u>D</u>issoziation</i>
HPLC	<i><u>H</u>igh <u>P</u>erformance (<u>P</u>ressure) <u>L</u>iquid <u>C</u>hromatography</i>
HR-MS	<i><u>H</u>igh <u>R</u>esolution <u>M</u>ass <u>S</u>pektrometry</i> (Hochauflösende Massenspektrometrie)
HT29/B6	Humane Darmepithelzellen (Adenokarzinom)
ID	<u>I</u> nnendurchmesser
IS	<u>I</u> nterner <u>S</u> tandard

kDa	kilo-Dalton
kV	kilo-Volt
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
LC-MS	Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
LTQ	<i>Linear Trapping Quadrupole</i> (lineare Ionenfalle)
Mal	Malvidin
Mal-coum-glc	Malvidin-3-(6''-O-coumaryl)glucosid
Mal-3,5-dglc	Malvidin-3,5-O-diglucosid
Mal-3-glc	Malvidin-3-O-glucosid
Mal-glu	Malvidin-glucuronid
MRI	<u>M</u> ax- <u>R</u> ubner- <u>I</u> nstitut, Karlsruhe
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MeOH	Methanol
MS	<u>M</u> assenspektrometrie
MS/MS	Fragmentierungsexperiment
n	Anzahl (Proben, Probanden, Tiere etc.)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> Kernspinresonanz
NWG	<u>N</u> ach <u>w</u> eisgrenze
oa-TOF-MS	orthogonal-Beschleuniger-Flugzeit-Hybridmassenspektrometer
Pel	Pelargonidin
Pel-3-rut	Pelargonidin-3-O-rutinosid
Peo	Peonidin
Peo-3,5-dglc	Peonidin-3,5-O-diglucosid
Peo-3-glc	Peonidin-3-O-glucosid
Peo-glu	Peonidin-glucuronid
Pet	Petunidin
Pet-3,5-dglc	Petunidin-3,5-O-diglucosid
Pet-3-glc	Petunidin-3-O-glucosid
pH	potentia <u>H</u> ydrogenii
ppm	parts per <u>m</u> illion
Q	Quadrupol

RF-Q	Quadrupol im Wechselfspannungsbetrieb
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RSLC	<i>Rapid Separation Liquid Chromatography</i>
RT	<i>Retention Time</i> (Retentionszeit)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Festphasenextraktion)
SRM	<i>Single Reaction Monitoring</i>
Stdabw	Standardabweichung
TFA	<i>Tri-Flour Acetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
TOF-MS	<i>Time-Of-Flight-Mass Spectrometer</i> (Flugzeitmassenspektrometer)
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance/Pressure-Liquid-Chromatography</i> ,
UV	Ultraviolett
UV-VIS	Ultraviolett-Visueller Bereich
v:v	Volumen zu Volumen
VIS	Visueller Bereich
VT	Versuchstag

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Struktur der in der Natur am häufigsten vertretenen Anthocyanidine ¹	3
Abbildung 2-2: Veränderung der Struktur in Abhängigkeit vom pH-Wert	4
Abbildung 2-3: Zerfall des Aglykons (nach Harper und Clifford)	5
Abbildung 2-4: Schema der Messzelle eines FT-ICR-Massenspektrometers (verändert nach Thieu, Dissertaion) ¹¹²	16
Abbildung 2-5: Schema eines Q Exactive TM Orbitrap Massenspektrometers	21
Abbildung 3-1: Wiederfindung des internen Standards nach der SPE in Abhängigkeit des organischen Anteils nach der Rücklösung.	27
Abbildung 3-2: Vergleich der massenspektrometrischen Detektion von 3,4-DHB (3,4-Dihydroxibenzoesäure) eines Standards (oben), einer Urinprobe mit SPE (mitte) und einer nach Stalmach eingengten Urinprobe ohne SPE (unten).....	28
Abbildung 3-3: Massenspektrometrische Detektion der Hauptanthocyane aus Dakapo mittels des Gradienten aus Tabelle 3-2	34
Abbildung 3-4: Einfluss der Säulentemperatur auf die Trennung der Hauptanthocyane aus Dakapo	36
Abbildung 3-5: Vergleich der Dauer und Separationsleistung des ursprünglichen Gradienten (oben) und des optimierten Gradienten mit Säulenofen (unten; Elution der Hauptanthocyan-Glucoside endet mit der blauen Linie)	38
Abbildung 3-6: Charakteristische Fragmente der Anthocyane nach Ma <i>et al.</i> , Oliveira <i>et al.</i> und Barnes <i>et al.</i> ^{141,142}	45
Abbildung 3-7: Charakteristische Fragmentationen von Cyanidin-3-glucosid mit Nachweis zweier Signale, die ohne hochauflösende MS nicht detektiert würden (LTQ Orbitrap Discovery)	46
Abbildung 3-8: Charakteristische Fragmentationen von Malvidin-3-glucosid mit Zuweisung der Elementarzusammensetzung und Massenabweichung.....	48
Abbildung 3-9: Zuweisung von Strukturen und diese verknüpfende Reaktionen verschiedener beobachteter charakteristischer Fragmentationen von Malvidin, basierend auf Berechnungen der Software <i>MassFrontier</i>	49
Abbildung 3-10: HCD-Fragmentierung am Beispiel von Malvidin aus seinem Coumarylglucosid (m/z =639,171, Q Exactive).....	53

Abbildung 3-11: AIF-Ionenchromatogramm einer humanen Urinprobe (<i>Exactive</i>) zeigt Aglykonsignale von Malvidin zur Retentionszeit von dessen Glucosid bzw. Glucuronid und acylierter Spezies.....	54
Abbildung 3-12: Simultane Aufzeichnung der Massenspektren im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus anhand einer humanen Urinprobe (<i>Exactive</i> Massenspektrometer)	58
Abbildung 3-13: Einfluss des Massenfensters auf die Quantifizierungsdaten am Beispiel einer humanen Urinprobe.....	59
Abbildung 3-14 Einfluss des Massenfensters auf die Quantifizierungsdaten am Beispiel einer humanen Urinprobe.....	59
Abbildung 3-14: Massenverschiebung in einem LC-MS-Experiment einer apikalen Zellkulturprobe bei Verwendung eines <i>Exactive</i> Orbitrap Massenanalysators	61
Abbildung 4-1: Charakteristische Fragmente von Malvidin, hervorgegangen aus dem acylierten Malvidin-3-(6-O-Coumaryl)glucosid) an einem FTICR-Massenspektrometer durchgeführt	70
Abbildung 4-2: Charakteristische Fragmentationen von 6-OH-Delphinidin und der Zuweisung Zusammensetzung, Strukturen und Massenabweichung (Q <i>Exactive</i> Massenspektrometer)..	72
Abbildung 4-3: Signale des Aglykons von Malvidin und Petunidin (FTICR-Massenspektrometer) aus Darminhaltproben (A und B) und eines Standards von Petunidin-Aglykon (C).....	74
Abbildung 4-4: Identische Fragmentationen von Malvidin aus dessen Glucosid (unten, Standardverbindung) und dessen Glucuronid (oben) aus einer humanen Urinprobe (Q <i>Exactive</i> Instrument)	75
Abbildung 5-1: Schema eines Zellkulturexperiments mit apikaler Lösung auf den jeweiligen Zellen und basalem Kompartiment im unteren Behältnis	77
Abbildung 5-2: Degradation von Mal-3-glc aus Dakapo bei pH = 7 und der apikale Konzentrationsverlauf bei Inkubation von Caco-2-Zellen mit Dakapo-Lösung.....	78
Abbildung 5-3: Apikale Lösungen eines Inkubationsexperiments zweier Zellarten in unterschiedlichem Mischungsverhältnis mit Dakapo-Extrakt	79
Abbildung 5-4: Basale Konzentrationen von Malvidin-3-Glucosid bei unterschiedlichen Zellmischungen	80

Abbildung 5-5: Gemittelte Anthocyangehalte der Verumtiere in Darminhalt (oben) und Fäzesproben (unten). Konzentration in nmol/(g Einwaage)	82
Abbildung 5-6: Konzentration an freien Aglyka von Malvidin und Peonidin in den verschiedenen Darmabschnitten der Tiere	83
Abbildung 5-7: Gemittelte Anthocyankonzentrationen in Urin- und Plasmaproben der Verumtiere.....	85
Abbildung 5-8: Konzentrationsverlauf der Glucoside und Glucuronide von Malvidin und Peonidin sowie 3,4-Dihydroxybenzoesäure in Plasmaproben einer Versuchsperson an Versuchstag 3	87
Abbildung 5-9: Gemittelte Konzentrationen von Mal-3-glc, Cy-3-glc, Mal-glu und 3,4-DHB in humanen Plasmaproben	88
Abbildung 5-10: Sinnvolle Konzentrationsverläufe von Del-3-glc unterhalb oder nahe der Quantifizierungsgrenze	89
Abbildung 5-11: Einfluss des Massenfensters auf die Quantifizierung von Cyanidin-3-glucosid in humanen Plasmaproben (Cy-3-glc kann mit geringer Massenabweichung (+0,4 ppm) (C) detektiert werden, jedoch werden bei Massenfenstern einer Breite von $\Delta m/z = 0,2 - 0,02$ weitere intensive Signale integriert (D))	91
Abbildung 5-12: Gemittelte Verläufe für Mal-3-glc, Cy-3-glc, Mal-glu und 3,4-DHB in humanem Urin bzgl. Kreatinin.....	93

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Gradient für die optimierte Trennung der Anthocyan-Monoglucoside (50-80 Minuten Spül- und anschließende Equilibrierungsphase).....	32
Tabelle 3-2: Gradient für Messungen der Human- und Tierstudie (13-24 Minuten Spül- und anschließende Equilibrierungsphase).....	34
Tabelle 3-3: Gradient der UHPLC für Identifikationsmessungen mit dem Q Exactive Massenspektrometer.....	37
Tabelle 3-4: Einfluss der Säulentemperatur (60°C) auf die Stabilität der massenspektrometrischen Detektion.....	37
Tabelle 3-5: Auflistung Probenart und jeweilige Gerätekombination.....	40
Tabelle 3-6: MS-Parameter für Eluentenfluss von 0,07 mL/min.....	40
Tabelle 3-7: MS-Parameter für einen Eluentenfluss von 0,4 mL/min.....	41
Tabelle 3-8: Parameter UHPLC-Exactive.....	42
Tabelle 3-9: Detektierter Massenbereich bei verschiedenen Proben in positivem und negativem Ionenmodus (Exactive).....	42
Tabelle 3-10: Parameter für nano-ESI-Messungen.....	43
Tabelle 3-11: Detektierte Flächen der jeweiligen Fragmentionen (Aglykon) bei unterschiedlichen Isolationsbreiten.....	56
Tabelle 3-12: Sieben Wiederholungsmessungen einer Urinmischprobe und die Stabilität zweier Hauptanthocyane und deren Glucuronide.....	63
Tabelle 3-13: Standardabweichung der Standardproben (Mal-3-glc), welche in einzelnen Messabschnitten zwischen Urinproben gemessen wurden.....	63
Tabelle 3-14: Standardabweichung der Standardproben (Mal-3-glc/Pel-3-rut), welche in einzelnen Messabschnitten zwischen Plasmaproben gemessen wurden.....	64
Tabelle 4-1: Bereits bekannte und neu identifizierte Anthocyane im Dakapo-Extrakt.....	68

Anhang

A.1 Materialien, Chemikalien und Geräte

A.1.1 Materialien und Chemikalien

Tabelle A-1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Artikelnummer
Strata X Kartusche 30mg, 1mL	Phenomenex	73003-9-11
Strata X Kartusche 100mg, 6mL	Phenomenex	29510
OASIS HLB 30 mg 1mL	Waters	WAT094225
Flasche G1/10 klar, 1mL	CS-Chromatographie Service GmbH	301131
Schraubkappe mit Septum	CS-Chromatographie Service GmbH	97578
Mikroinsert mit Feder, 150mL	CS-Chromatographie Service GmbH	301401
Safe lock Gefäß: 0,5 mL 1,5 mL 2,0 mL	Eppendorff	0030 121.023 0030 120.086 0030 120.094
Pipettenspitzen 20µL (lange Spitze) 20µL (lange Spitze, schmal) 50-1000µL 2-200µL 0,1-100µL 0,1-20µL	Eppendorff	5242 956.003 0030 001.222 0030.000.919 0030.000.870 0030.000.811 0030.000.838
5µm-Nanospray (Glas)	DNU-MS GbR	BM120F-10

Tabelle A-2: Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller	Artikelnummer
Petunidin-Chlorid	Extrasynthese (Genay)	0942
Myrtillin-Chlorid	Extrasynthese (Genay)	0938
Peonidin-3-Glucosid-Chlorid	Extrasynthese (Genay)	0929
Cyanin-Chlorid	Extrasynthese (Genay)	0932 S
Pelargonidin-3-Rutinosid-Chlorid	Extrasynthese (Genay)	0943
Oeninchlorid	Roth, Karlsruhe	K030.1
Kuromaninchlorid	Roth, Karlsruhe	6136.1
Methanol Lichrosolv	Merck	1.06007.2500
Acetonitril Lichrosolv	Merck	1.00030.2500
Ameisensäure 98%	Fluka	94318
Wasser (for HPLC)	Sigma-Aldrich	95304
Suprapur Salzsäure 30%	Merck	1.00318.0250
Trifluoressigsäure	Fluka	91699
3,4-DHB	Aldrich	D10.980
2-Chlor-5-Nitro-Benzoesäure	Fluka	25415
Syringasäure	Merck	8.08638.0100
Stickstoff, flüssig	Linde	2200901

A.1.2 Geräte

SPE-Kammer

Chromabond[®] Vakuumkammer mit 12 Positionen

REF: 730150

Vakuumpumpe

KNF Neuberger; B811KT.18

Seriennummer: 2.04745584

Pipetten

Eppendorff: 0,1-2,5µL; 0,5-10µL; 20-200µL; 100-1000µL

Mikrowaage

Mettler-Toledo AX26 Comparator; SNR: 1121433491

Ultraschallbad

VWR T2023SX

Seriennummer: 17515

Autoklav

Systec DX-65

Seriennummer: D0575

Aufflichtmikroskop

Zeiss, Stemi DRC (2,5- und 4-fache Vergrößerung)

Zentrifuge

Eppendorff minispin

Seriennummer: 545201987

Mörser

Pistill

A.1.3 Flüssigchromatographen**A.1.3.1 SUMMIT (Kapillar-LC)****Pumpe:**

P580 A HPG

Seriennummer: S/N 1780004

Entgasungseinheit:

DEGASYS DG 1210

Probengeber:

ASI-100T Automated Sample Injector

Seriennummer: S/N 6680504

Detektor:

UVD 340U

Seriennummer: S/N 1910002

Säulen:

NUCLEOSIL 300 C18 Säule (Macherey-Nagel GmbH + Co. KG) 150x1 mm (ID), Partikelgröße 5 µm

Luna, C18 (Phenomenex), 150x1 mm (ID), Partikelgröße 3 µm

A.1.3.2 UtiMate 3000 UHPLC

Entgasungseinheit:

Model: Degasser

Seriennummer: 8032346

Pumpe:

Model: HPG 3200 RS

Seriennummer: 8031762

Probengeber:

Model: WPS-3000 TRS

Seriennummer: 8032329

Säulenofen:

Model: TCC-300 RS

Seriennummer: 8050703

UV/VIS-Detektor: DAD-3000

Seriennummer: 8050556

Säule:

100 mm x 2.1 mm (ID) Kinetex (*Phenomenex*, Aschaffenburg) Umkehrphasensäule (C18),
Partikelgröße 2.6 µm

A.1.4 Massenspektrometer

A.1.4.1 LTQ FT ULTRA (FT-ICR-MS)

Model: *Finnigan* LTQ FT

Seriennummer: SN 6115 F

A.1.4.2 LTQ Orbitrap Discovery

LTQ Orbitrap Discovery

SN01656

A.1.4.3 Exactive Orbitrap und Q Exactive Orbitrap

Exactive Orbitrap:

Model: EXACTIVE

Seriennummer: SN 01173 P

Q Exactive Orbitrap:

Model Q EXACTIVE

Seriennummer: SN 01202 L

A.2 Charakteristische Fragmentationen für Aglyka der Anthocyane aus Standardverbindungen mittels hochauflösender, akkurater MS

Tabelle A-3: Detektierte Fragmentationen von Cyanidin, in rot neue Fragmentationen, orange hinterlegt: nur mit HCD-Fragmentierung detektiert.

Fragment vergleichbar Barnes et al. ^[142]	Cyanidin-Fragmente	Zusammensetzung	Detektiertes Signal /		Massen- genauigkeit/ ppm
	Theor. Masse, m/z		m/z		
	Nur in HCD detektiert		LTQ	Orbitrap	Discovery
Cy-3-glc	449,1078	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁			
Cyanidin	287,055	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,0546		-1,393
0.2 A ⁺	149,0233	C ₈ H ₅ O ₃	149,023		-1,013
0.2A ⁺⁺	150,0311	C ₈ H ₆ O ₃	150,0309		-1,333
0.3 A ⁺	121,0284	C ₇ H ₅ O ₂	121,0282		-1,653
0.2 B ⁺	137,0233	C ₇ H ₅ O ₃	137,0231		-1,460
0.2B ⁺ - CO	109,0284	C ₆ H ₅ O ₂	109,0282		-1,834
0.2B ⁺ - CO-CO	81,0335	C ₅ H ₅ O	81,0334		-1,234
M- H ₂ O	269,0444	C ₁₅ H ₉ O ₅	269,0445		0,372
M-CO	259,0601	C ₁₄ H ₁₁ O ₅	259,0601		0,000
M-C•HO	258,05232	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	258,0523		-0,078
M-C ₂ H ₂ O	245,0447	C ₁₃ H ₉ O ₅	245,0443		-1,632
	242,05738	C ₁₄ H ₁₀ O ₄	242,0574		0,083
M-H ₂ O-CO	241,0495	C ₁₄ H ₉ O ₄	241,0496		0,415
M-C•HO-H ₂ O	240,04173	C ₁₄ H ₈ O ₄	240,0417		-0,125
M-CO-CO	231,0652	C ₁₃ H ₁₁ O ₄	231,06518		-0,087
M-C ₂ H ₂ O ₂	229,04946	C ₁₃ H ₉ O ₄	229,0495		0,175
M-H ₂ O-C ₂ H ₂ O	227,0339	C ₁₃ H ₇ O ₄	227,0337		-0,881
M-H ₂ O-H ₂ O-CO	223,0389	C ₁₄ H ₇ O ₃	223,0389		0,000
M-H ₂ O-CO-CO-CO	217,04953	C ₁₂ H ₉ O ₄	217,0495		-0,138
M-CH ₂ O-CO-H	216,04170	C ₁₂ H ₈ O ₄	216,0417		0,000
M-CHO-CO ₂	214,06247	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	214,0625		0,140
M-H ₂ O-CO-CO	213,0546	C ₁₃ H ₉ O ₃	213,0546		0,000
M-H ₂ O-CO-CO-H	212,04676	C ₁₃ H ₈ O ₃	212,0468		0,189
M-C ₄ H ₂ O ₂	205,0495	C ₁₁ H ₉ O ₄	205,0495		0,000
M-CO-CO-CO	203,0703	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	203,0703		0,000
M-C ₃ H ₄ O-CO	203,03392	C ₁₁ H ₇ O ₄	203,034		0,394
M-CO-CO-CO-H	202,06243	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	202,0625		0,346
M-CH ₂ O-CO-CO	201,05481	C ₁₂ H ₉ O ₃	201,0546		-1,044
M-MeOH (CH ₄ O) - CO-CO	200,0467	C ₁₂ H ₈ O ₃	200,0466		-0,500
M-H ₂ O-CO-C ₂ H ₂ O	199,039	C ₁₂ H ₇ O ₃	199,039		0,000
	196,05194	C ₁₃ H ₈ O ₂	196,052		0,306
M-H ₂ O-CO-CO-H ₂ O	195,0441	C ₁₃ H ₇ O ₂	195,0441		0,000
	193,04953	C ₁₀ H ₉ O ₄	193,0495		-0,155

Fortsetzung Tabelle A-3

	191,03388	C ₁₀ H ₇ O ₄	191,0339	0,105
M-CO-CO-C ₂ H ₂ O	189,0546	C ₁₁ H ₉ O ₃	189,0546	0,000
M-CO-CO-C ₂ H ₂ O-H	188,0468	C ₁₁ H ₈ O ₃	188,0468	0,000
M-CO-CO-C ₂ H ₂ O-H ₂	187,03896	C ₁₁ H ₇ O ₃	187,039	0,214
M-CO-CO ₂ -C•HO	186,06761	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	186,0677	0,484
M-H ₂ O-CO-CO-CO	185,0597	C ₁₂ H ₉ O ₂	185,0597	0,000
M-H ₂ O-CO-C•HO	184,0519	C ₁₂ H ₈ O ₂	184,0519	0,000
M-H ₂ O-CO-CH ₂ O	183,0441	C ₁₂ H ₇ O ₂	183,0439	-1,093
M-C ₄ H ₂ O-C ₂ H ₂ O	179,03393	C ₉ H ₇ O ₄	179,034	0,391
M-C ₅ H ₆ -CO ₂	177,01823	C ₉ H ₅ O ₄	177,0182	-0,169
M-C•HO-CO-CO-C ₂ H ₂	176,04684	C ₁₀ H ₈ O ₃	176,0469	0,341
M-CO-CO-CO-CO	175,0754	C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	0,000
M-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂ O-CO	175,039	C ₁₀ H ₇ O ₃	175,039	0,000
M-CO-CO-CO-C•HO	174,06755	C ₁₁ H ₁₀ O ₂	174,0675	-0,287
M-CO-CO-CO-CH ₂ O	173,05972	C ₁₁ H ₉ O ₂	173,0597	-0,116
M-CO-CO-C•HO-CH ₂ O	172,05184	C ₁₁ H ₈ O ₂	172,0519	0,349
M-H ₂ O-CO-CO-C ₂ H ₂ O	171,0441	C ₁₁ H ₇ O ₂	171,0441	0,000
M-CO ₂ -CO-CO-H ₂ O	169,06472	C ₁₂ H ₉ O	169,0648	0,473
M-CO ₂ -CO-C•HO-H ₂ O	168,05696	C ₁₂ H ₈ O	168,057	0,238
M-H ₂ O-CO-CO-CO-H ₂ O	167,0491	C ₁₂ H ₇ O	167,0491	0,000
M-CO-CO-C ₅ H ₆	165,0182	C ₈ H ₅ O ₄	165,0182	0,000
M-CO-CO-C ₄ H ₂ O	163,039	C ₉ H ₇ O ₃	-	-
M-CO-CO-C ₂ H ₂ O-CO	161,0597	C ₁₀ H ₉ O ₂	161,0597	0,000
M-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂ O-CO-O+H	160,0519	C ₁₀ H ₈ O ₂	160,0519	0,000
M-C ₂ H ₂ O-CO-CO-MeOH (CH ₃ OH)	157,02837	C ₁₀ H ₅ O ₂	157,0284	0,191
M-H ₂ O-CO-CO-CO-CO	157,0648	C ₁₁ H ₉ O	157,0648	0,000
M-C•HO-H ₂ O-CO-CO-CO	156,05697	C ₁₁ H ₈ O	156,057	0,192
M-C ₅ H ₆ -CO ₂ -CO	149,02328	C ₈ H ₅ O ₃	149,0233	0,134
M-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂ O-CO-CO	147,0441	C ₉ H ₇ O ₂	147,044	-0,680
M-H ₂ O-CO-CO-C ₂ H ₂ O-CO	143,0491	C ₁₀ H ₇ O	143,0491	0,000
M-H ₂ O-CO-CO-H ₂ O-CO- CO+H ₂	141,0698	C ₁₁ H ₉	141,0698	0,000
M-H ₂ O-CO-CO-H ₂ O-CO-CO	139,0542	C ₁₁ H ₇	139,0542	0,000
M-CO-CO-C ₄ H ₂ O-C ₂ H ₂	139,0389	C ₇ H ₇ O ₃	139,0389	0,000
M-CO-CO-C ₅ H ₆ -CO	137,02325	C ₇ H ₅ O ₃	137,0233	0,365
M-CO-CO-C ₂ H ₂ O-CO-CO	133,0647915	C ₉ H ₉ O	133,0647	-0,688
M-CO-CO-C ₂ H ₂ O-CO-C ₂ H ₂ O	131,0491	C ₉ H ₇ O	131,0491	0,000
M-H ₂ O-CO-CO-CO-CO-CO	129,0699	C ₁₀ H ₉	129,0698	-0,775
M-H ₂ O-CO-CO-CO-CO-CO-H	128,0621	C ₁₀ H ₈	128,062	-0,781
M-H ₂ O-CO-CO-CO-CO-CO-H ₂	127,0542	C ₁₀ H ₇	127,054	-1,574
M-C ₄ H ₂ O-C ₄ H ₂ O-CO	127,03885	C ₆ H ₇ O ₃	127,0389	0,394
M-C ₄ H ₂ O-C ₄ H ₂ O-CO-CO	123,04398	C ₇ H ₇ O ₂	123,044	0,163
M-C ₄ H ₂ O-C ₄ H ₂ O-CO-CH ₂ O	121,0284	C ₇ H ₅ O ₂	121,0283	-0,826
M-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂ O-CO-CO-CO	119,04913	C ₈ H ₇ O	119,0491	-0,252

Fortsetzung Tabelle A-3

M-H ₂ O-CO-CO-C ₂ H ₂ O-CO-CO	115,0542268	C ₉ H ₇	115,0542	-0,233
M-C ₄ H ₂ O-C ₄ H ₂ O-CO-H ₂ O	109,02834	C ₆ H ₅ O ₂	109,0284	0,550
M-C ₂ H ₂ O-CO-CO-CO-CO-CO	105,06988	C ₈ H ₉	105,0699	0,190
M-C ₂ H ₂ O-CH ₂ O-CO-CO-CO-CO	103,05424	C ₈ H ₇	103,0542	-0,388
M-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂ O-CO-CO-CO-CO	91,0541	C ₇ H ₇	91,0542	1,098
M-C ₅ H ₆ -CH ₂ O-CO-CO-CO-CO	79,01778	C ₅ H ₃ O	79,0177	-1,012

Petunidin
 MS/MS m/z = 317,065
 HCD = 45 eV
 LTQ Orbitrap XL
 Intensität: 5E5

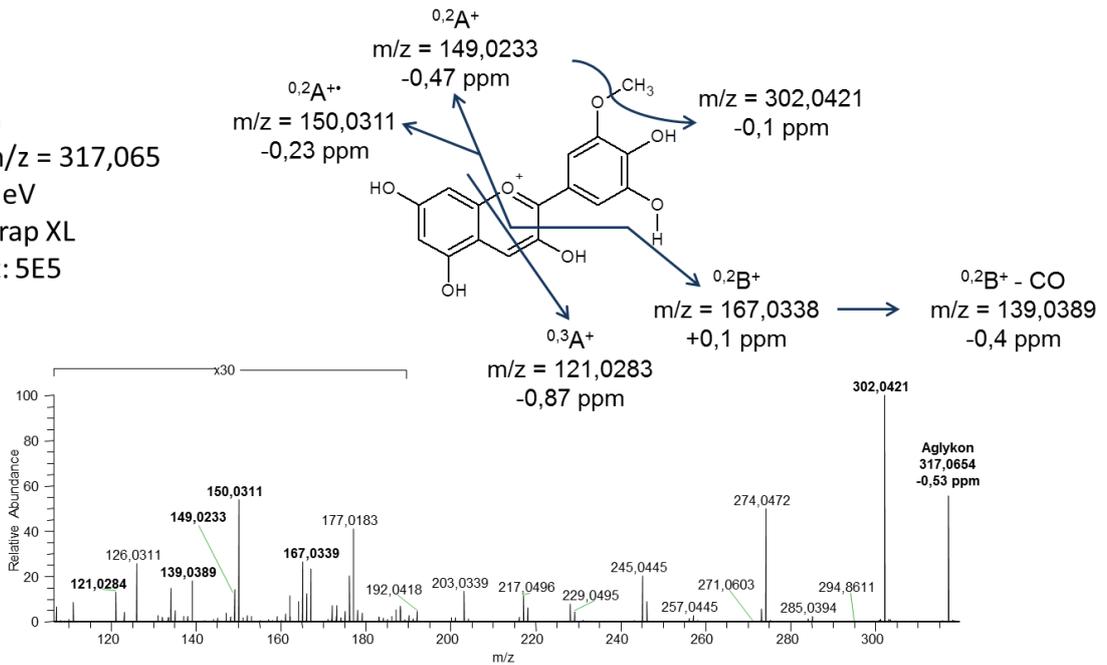


Abbildung A-1: Charakteristische Fragmentationensignale von Petunidin

Pelargonidin
 MS/MS $m/z = 579,171$
 CID = 23 eV
 MS³ $m/z = 271,060$
 HCD = 73 eV
 LTQ Orbitrap XL
 Intensität: 4E3

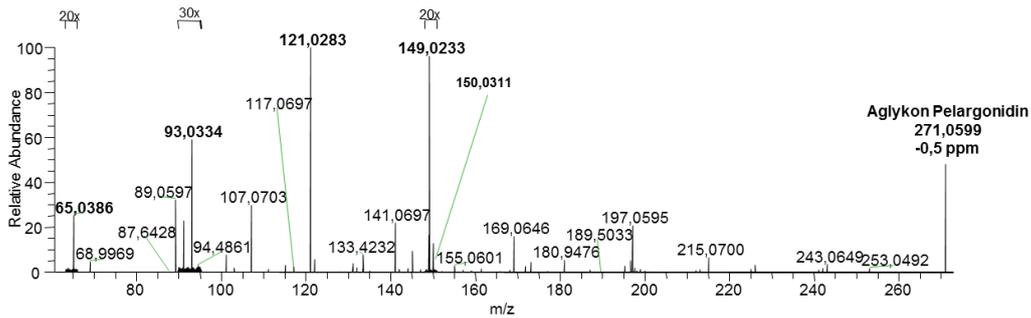
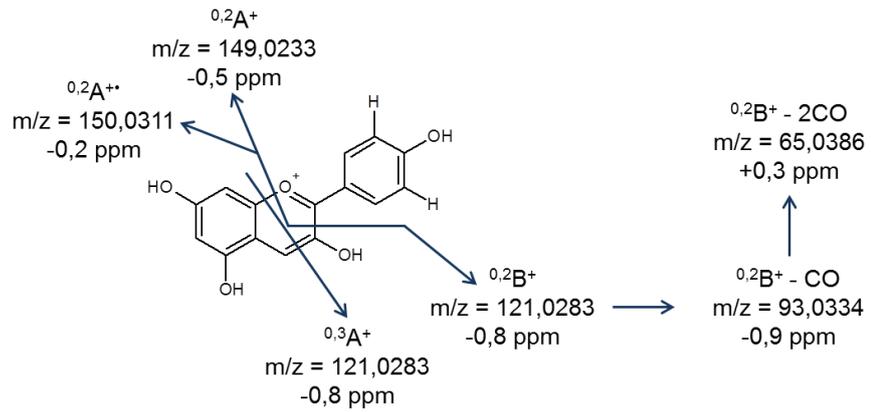


Abbildung A-2: Charakteristische Fragmentationensignale von Pelargonidin

Delphinidin
 MS/MS $m/z = 465,10$
 CID = 22 eV
 MS³ $m/z = 303,050$
 HCD = 75 eV
 LTQ Orbitrap XL
 Intensität: 8E3

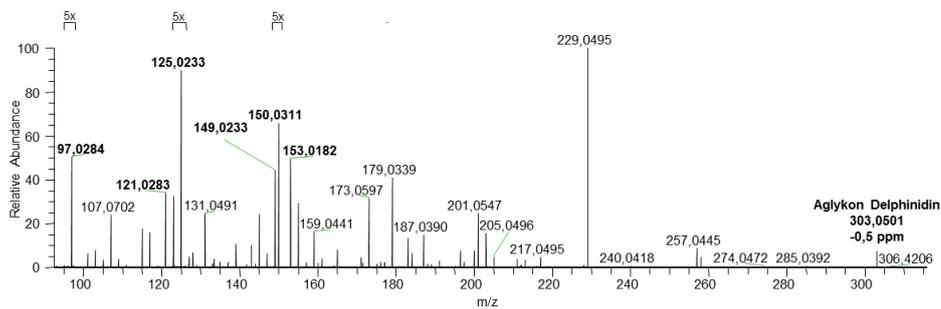
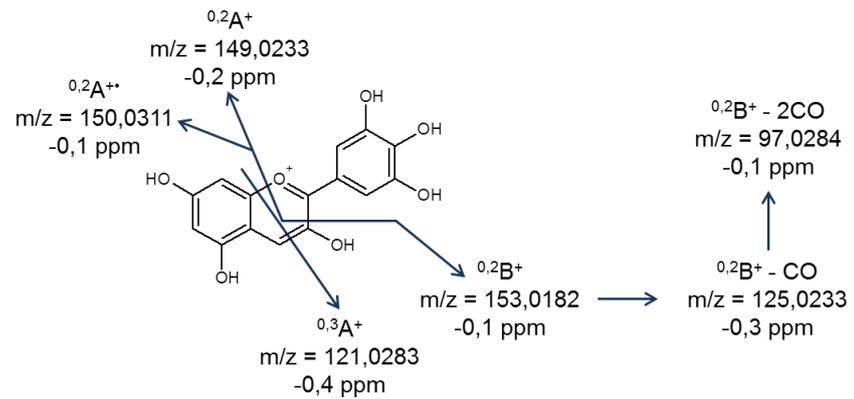


Abbildung A-3: Charakteristische Fragmentationensignale von Delphinidin

Peonidin
 MS/MS m/z = 463,12
 CID = 25 eV
 MS³ m/z = 301,070
 HCD = 55 eV
 LTQ Orbitrap XL
 Intensität: 7E3

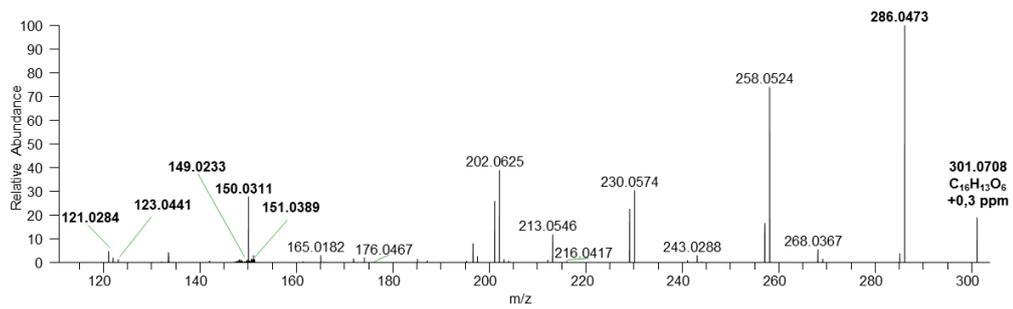
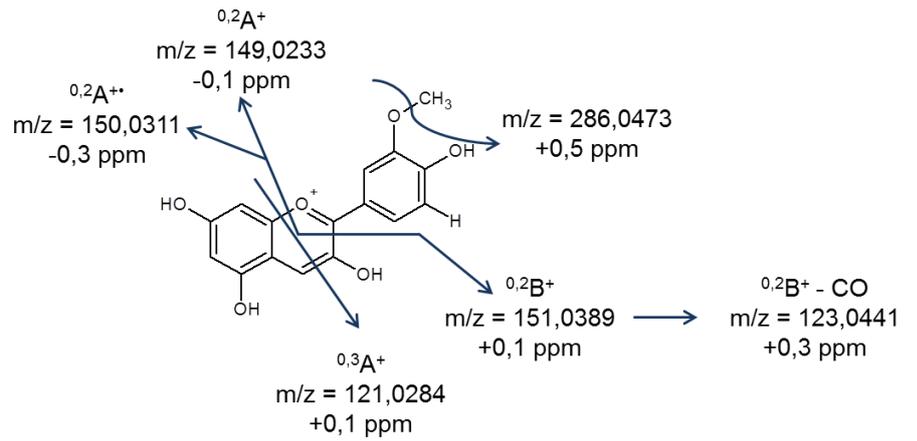


Abbildung A-4: Charakteristische Fragmentationensignale von Peonidin

Ein weiterer Vorteil dieser Software ist die Möglichkeit für verschiedene Fragmente den jeweiligen möglichen Fragmentierungsweg zu berechnen. Die Zuweisung der Fragmente aus dem Molekül $m/z=299,0535$ in Abbildung A5 wurde mit Hilfe der *FISH*-Suche gestaltet. Die *FISH*-Suche wird mit den in Abbildung A 6 gezeigten chemischen Reaktionsmechanismen für die Zuweisung des Fragmentierungswegs durchgeführt, aber ebenso werden auf bereits in der Literatur angegebene spezifische Fragmentierungen aufgeführt.

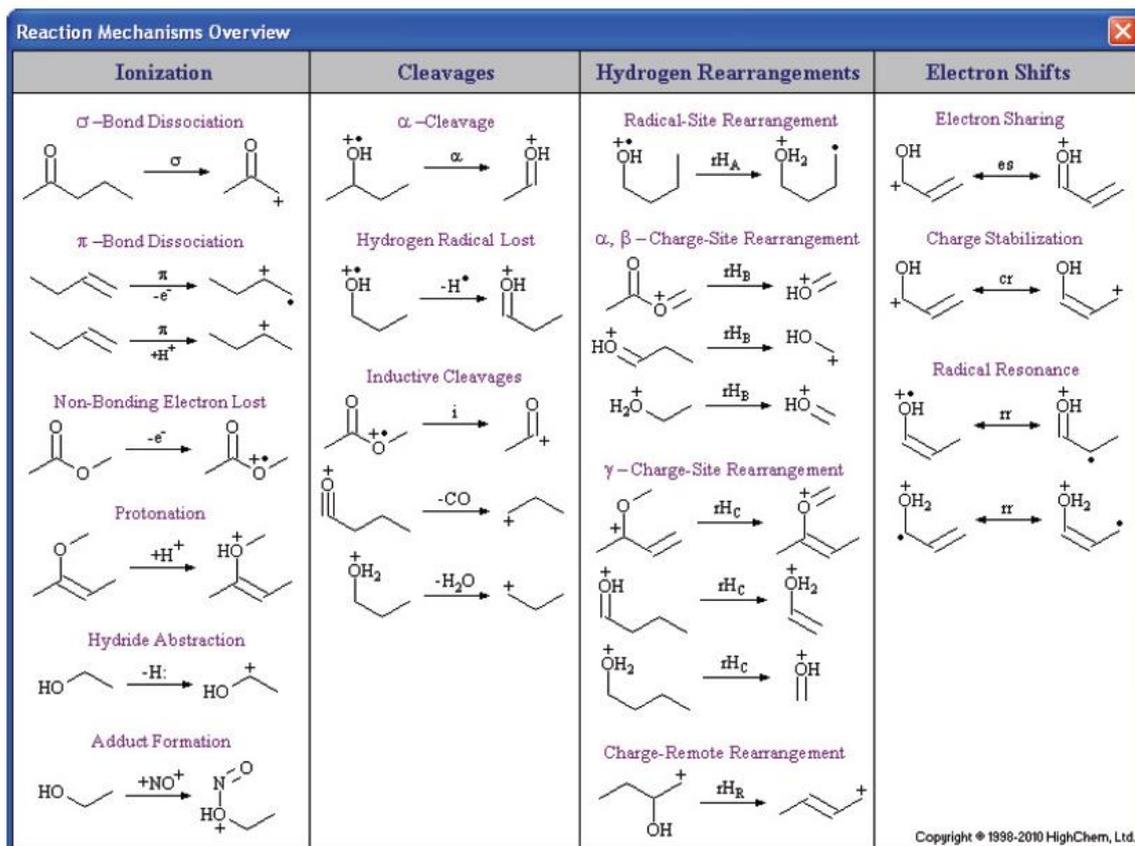


Abbildung A 6: Allgemeine Reaktionsmechanismen für die Zuweisung von Fragmentierungspfaden (aus Software-Unterlagen der Software MassFrontier, Thermo Fisher Scientific)

A.4 Anthocyane in Dakapo-Extrakt und Metabolite, hochaufgelöste, akkurate Massenspektren und mit akkurater Masse detektierte charakteristische Fragmente, div. Stabilitätsmessungen

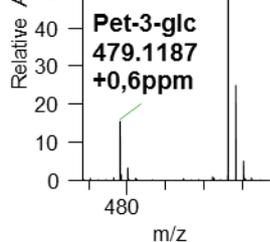
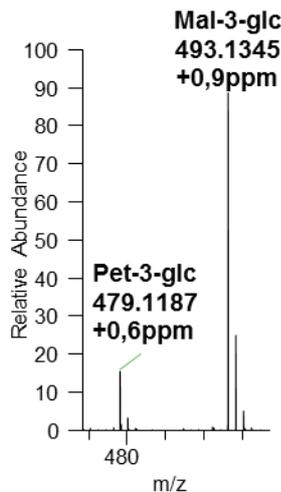
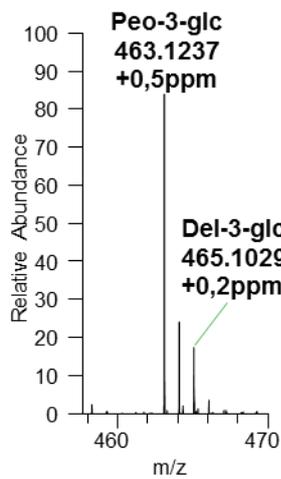
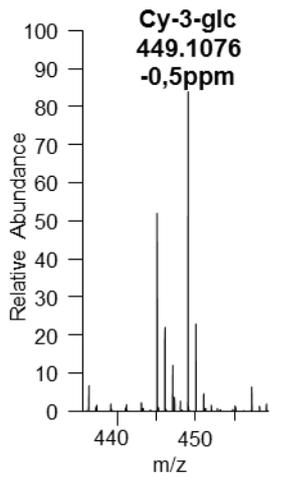
Tabelle A-4: Anthocyane aus Dakapo-Saft und Tresterextraktionssaft in mg/L (via Cy-3-glc, HPLC/UV, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen). Pet-3-rut wurde in dieser Arbeit als Pet-3-(6"-O-Coumaryl)glucosid identifiziert (Analyse aus Geisenheim)

Substanzen	Dakapo-Saft	Dakapotrester-extraktionssaft
Delphinidin-3-glucosid	234,4	173,2
Cyanidin-3-glucosid	44,0	47,2
Petunidin-3-glucosid	204,3	164,5
Peonidin-3-glucosid	238,6	345,2
Malvidin-3-glucosid	738,3	767,6
Delphinidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	37,8	20,6
Petunidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	42,1	22,6
Peonidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	131,8	137,9
Malvidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	19,6	13,0
Petunidin-3-rutinosid	81,5	74,3
Summe	1.772,5	1.766,1

Tabelle A-5: Anthocyane im Extrakt des Saftes der Tierstudie (Analyse aus Geisenheim)

Substanzen in Extrakt (Saft der Tierstudie)	g/100g
Delphinidin-3,5-diglucosid	0.3
Malvidin-3,5-diglucosid	0.3
Petunidin-3,5-diglucosid	0.7
Delphinidin-3-glucosid	1.1
Peonidin-3,5-diglucosid	2.5
Malvidin-3,5-diglucosid	3.0
Petunidin-3-glucosid	1.0
Peonidin -3-glucosid	1.4
Malvidin-3-glucosid	1.6
Delphinidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	0.2
Petunidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	0.3
Peonidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	0.3
Malvidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	0.2
Summe	12.9

Full MS Spektrum



MS/MS (HCD) Spektrum

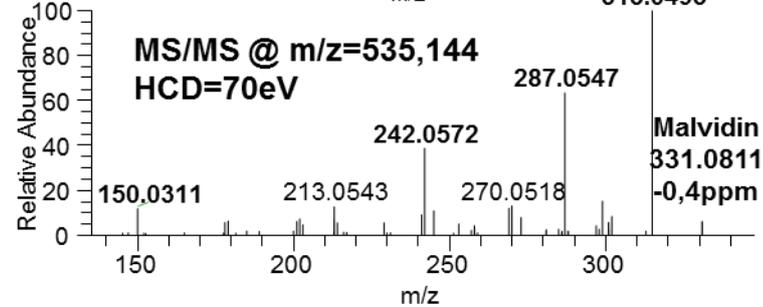
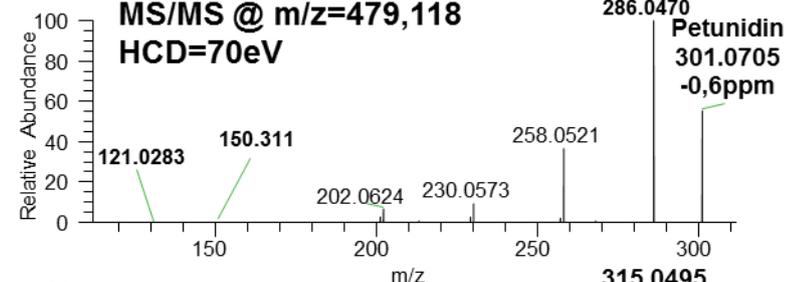
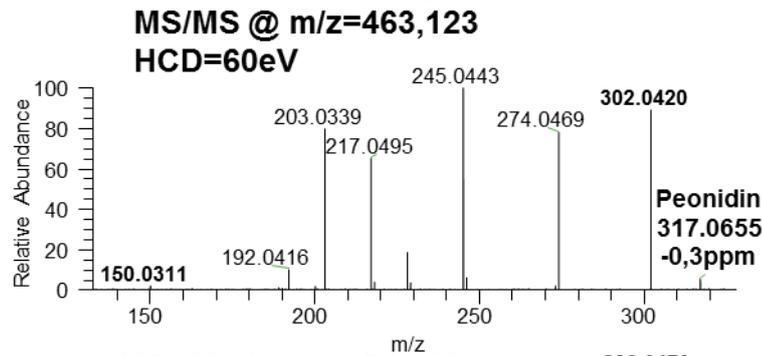
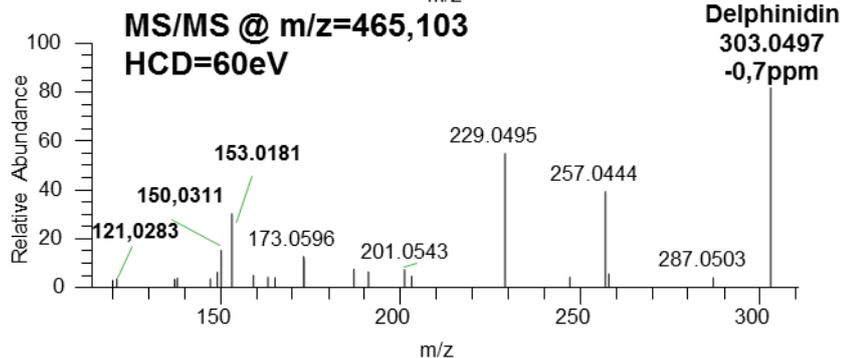
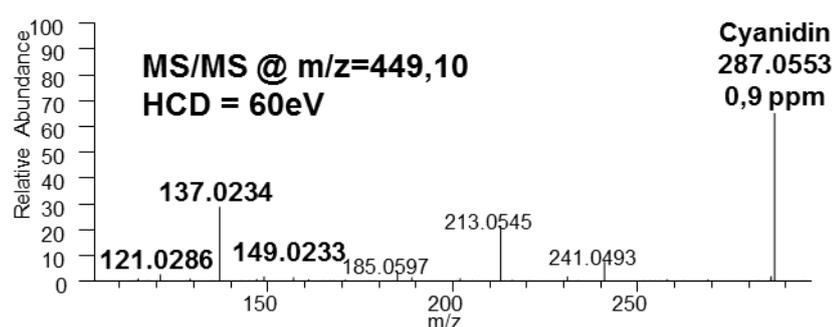


Abbildung A-7: Identifizierung der Hauptanthocyan-Monoglucoside mittels exakter Masse des Moleküliions und der exakten Masse der charakteristischen Fragmenten

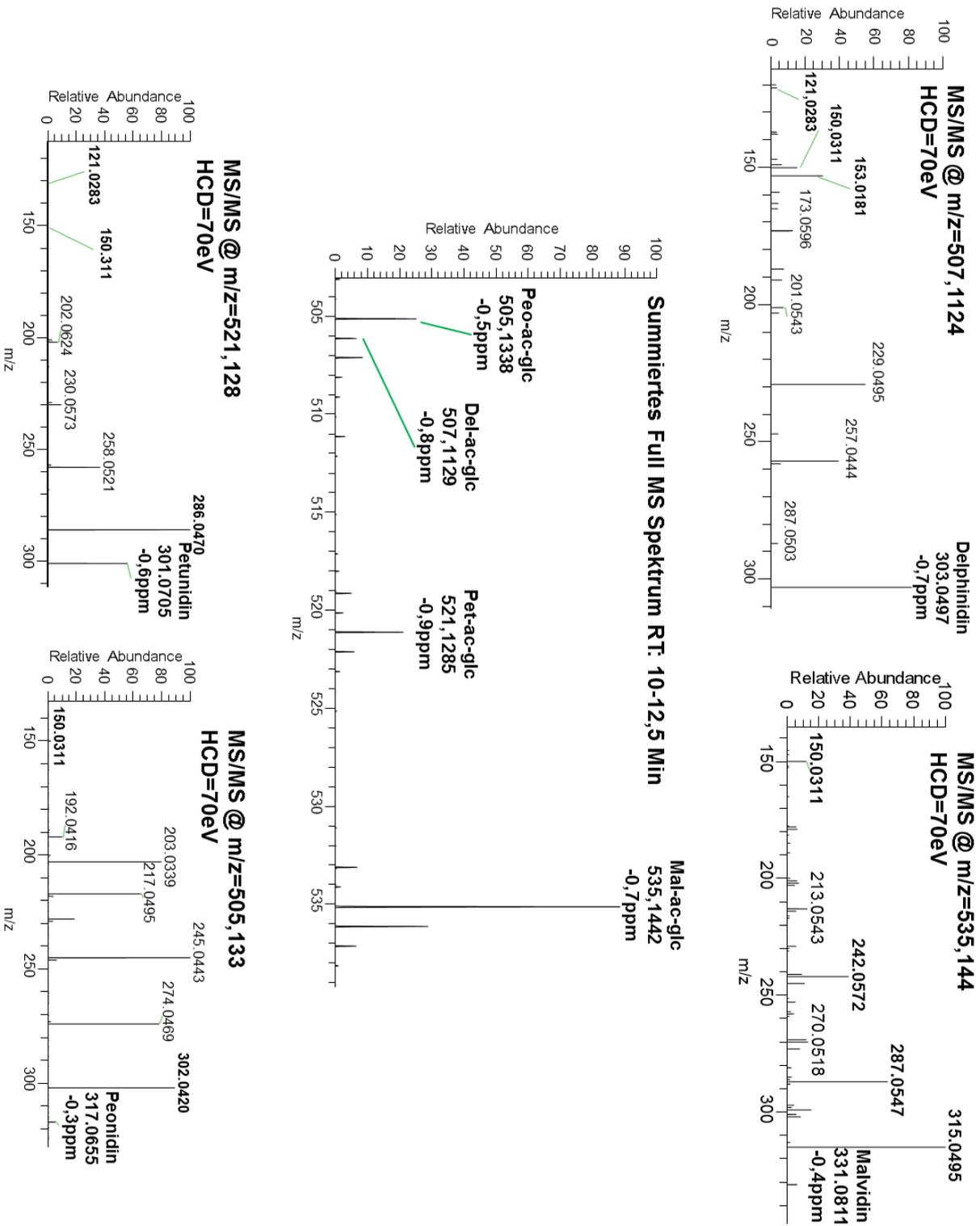


Abbildung A-8: Identifizierung der bekannten Acetyl-Glucoside der Anthocyane mittels exakter Masse des Moleküliions sowie der charakteristischen Fragmente

Full MS-Spektrum

MS/MS (HCD)-Spektrum

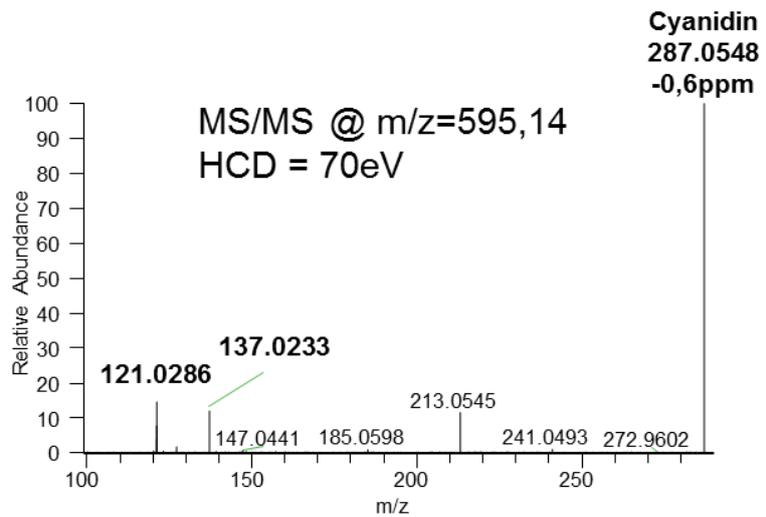
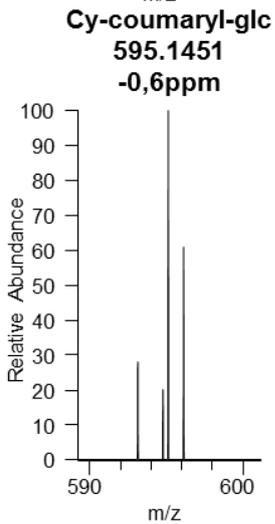
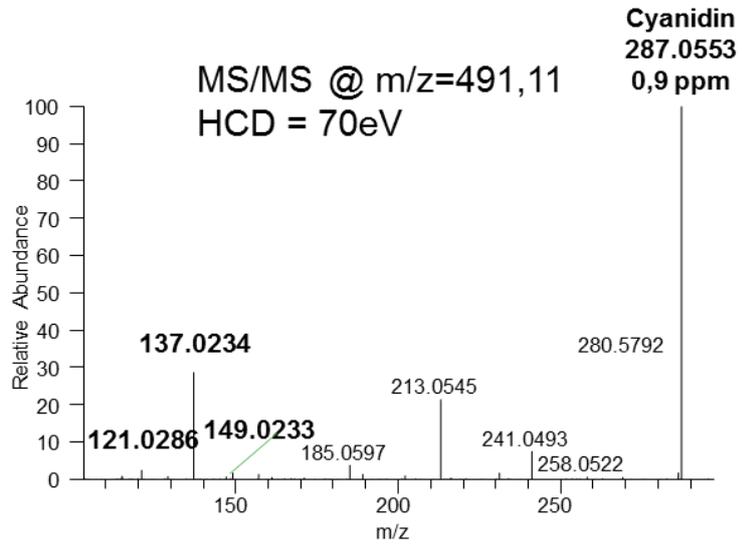
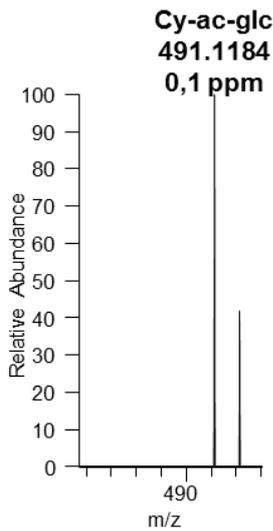
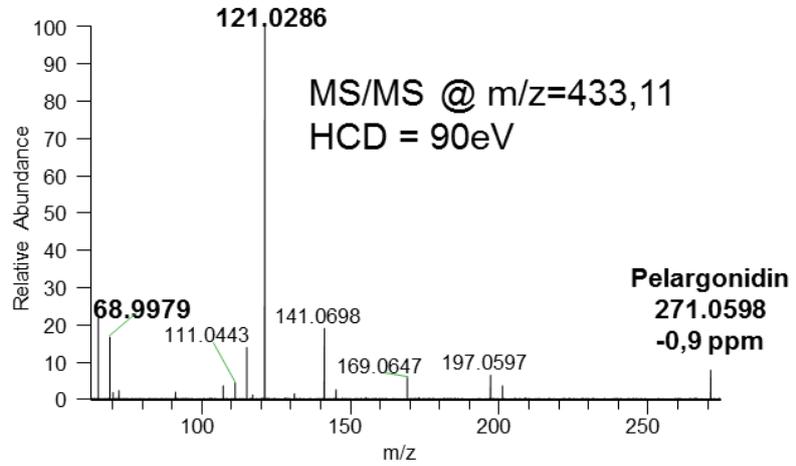
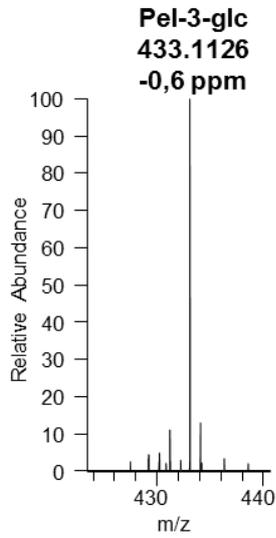


Abbildung A-9: Full-MS-Spektren mit der exakten Masse von Pel-3-glc, Cy-ac-glc und Cy-coumaryl-glc und die zugehörigen HCD-Spektren, welche charakteristische Fragmente zeigen

Full MS-Spektrum

MS/MS (HCD)-Spektrum

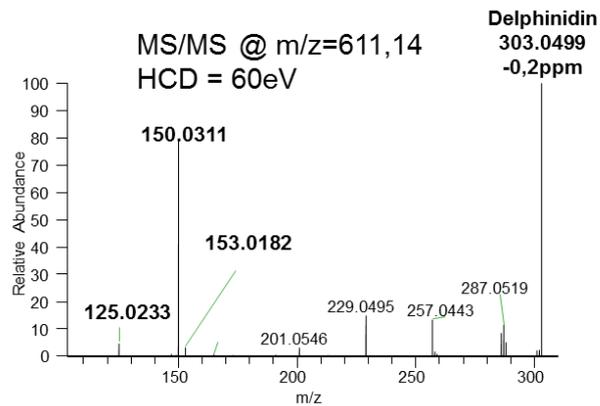
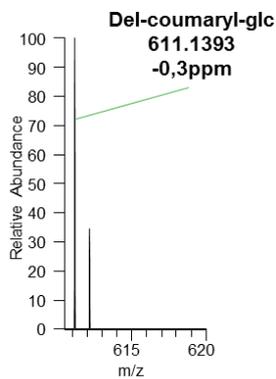
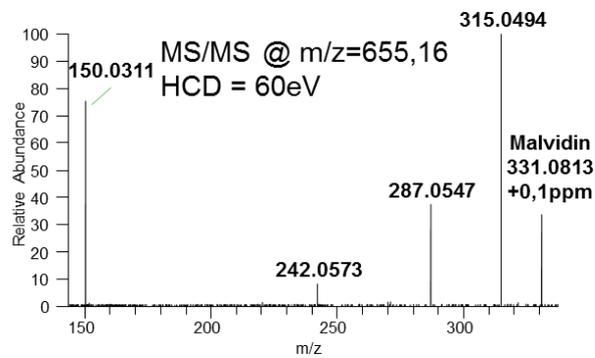
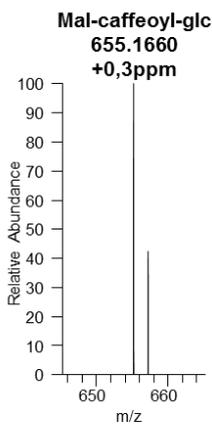
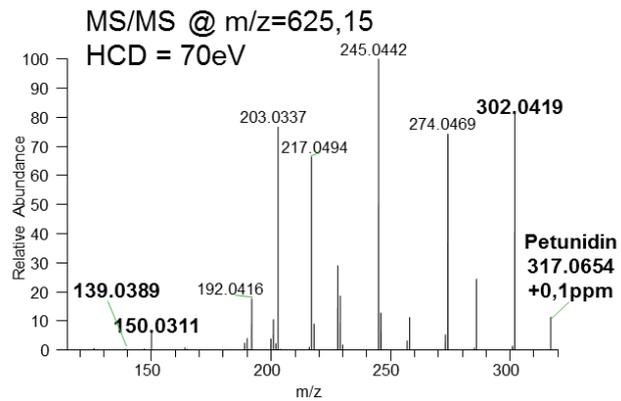
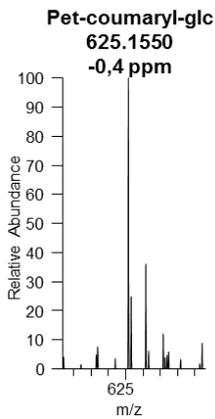
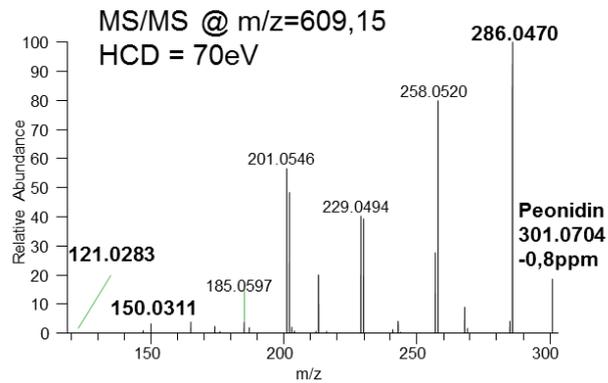
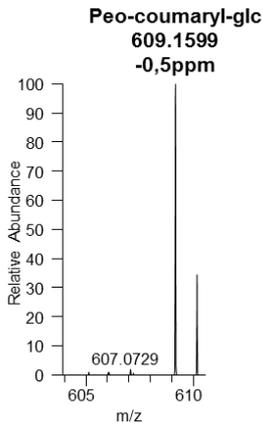


Abbildung A-10: Full-MS-Spektren mit der exakten Masse von Peo-, Pet- und Del-coumaryl-glc sowie Mal-caffeoyl-glc und die zugehörigen HCD-Spektren, welche charakteristische Fragmente zeigen

Peonidin-Glucuronid
 MS/MS $m/z = 477,10$
 HCD = 55 eV
 Q Exactive
 Intensität: 3E6

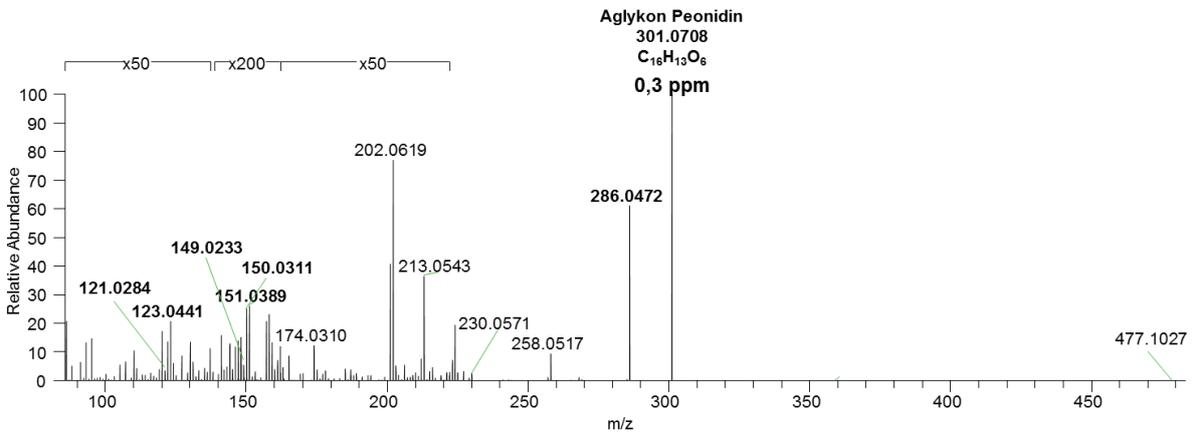
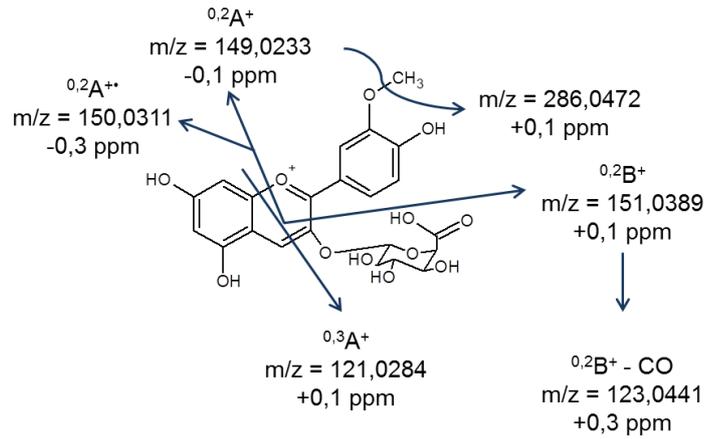


Abbildung A-11: Charakteristische Fragmente des Aglykons von Peonidin aus seinem Glucuronid

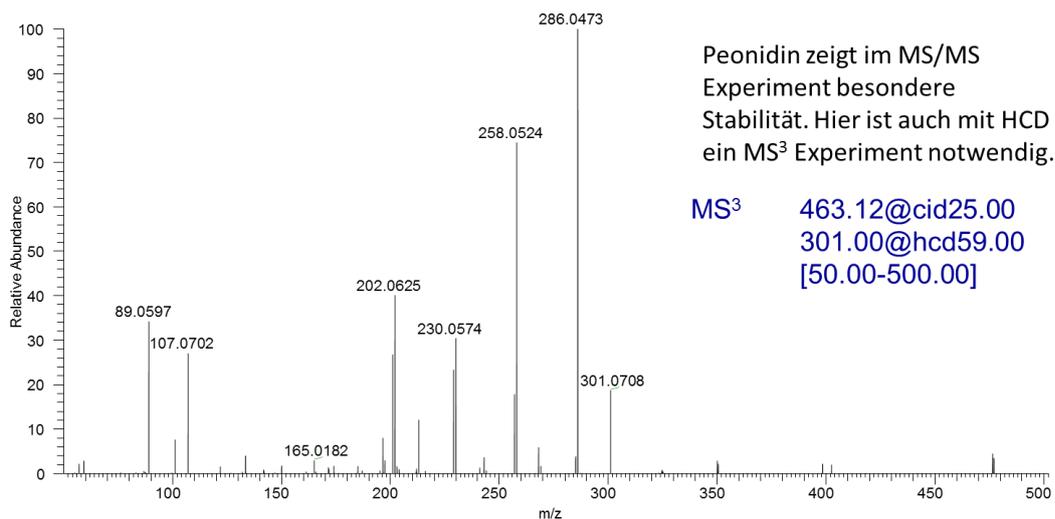
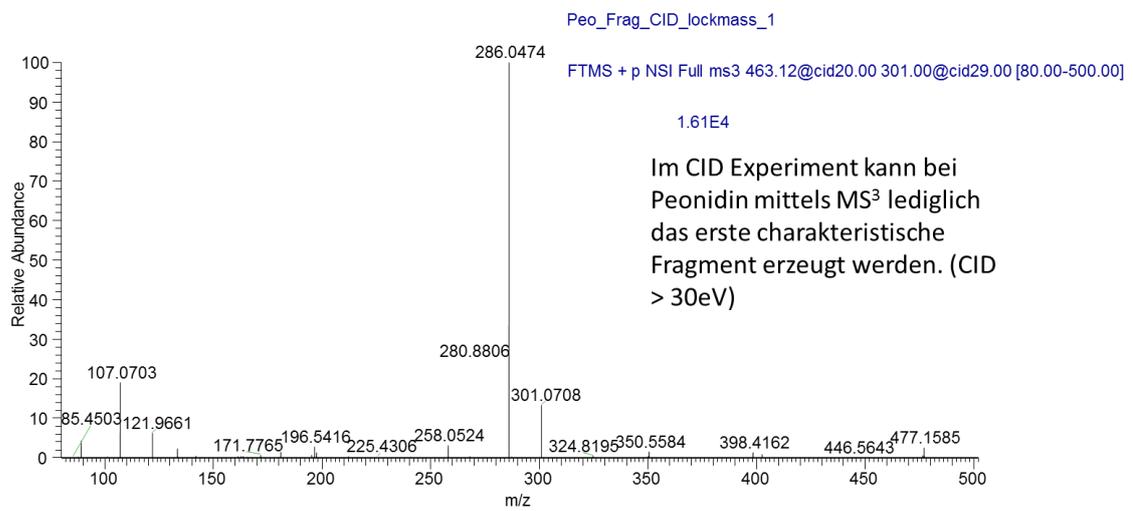
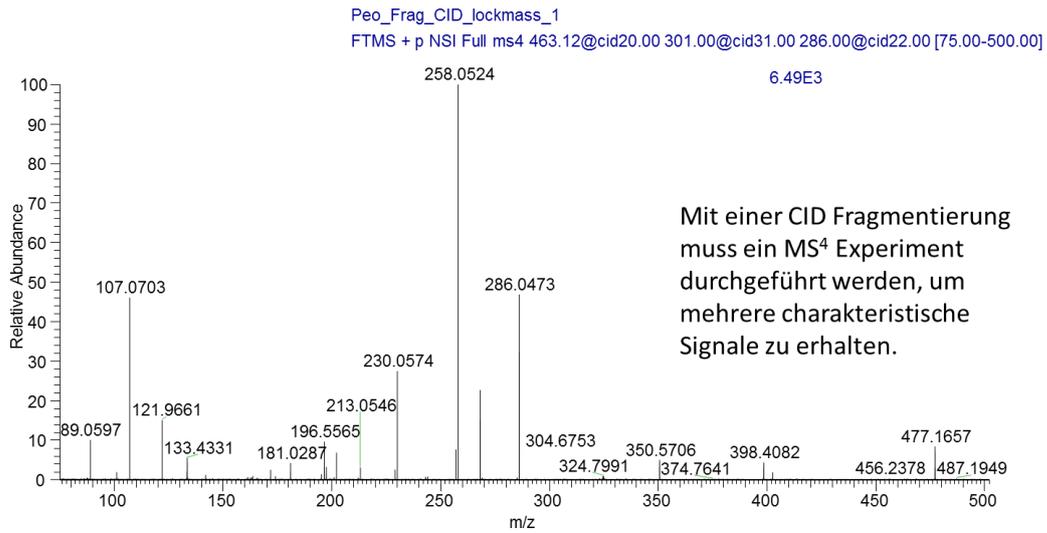


Abbildung A-12: Besondere Stabilität des Aglykons von Peonidin im Fragmentierungsexperiment

Tabelle A-6: Stabilität der Fläche des Fragments bei verschiedenen Einstellungen des Isolationsfensters an Q Exactive

Isolationsfenster / $\Delta m/z$	Fläche Fragment Del Stdabw /%	Fläche Fragment Cy Stdabw /%	Fläche Fragment Pet Stdabw /%	Fläche Fragment Peo Stdabw /%	Fläche Fragment Mal Stdabw /%
2 (n=5)	4,7	3,6	4,0	6,9	3,6
1 (n=5)	5,1	4,2	3,3	5,2	2,4
0,5 (n=5)	2,9	3,3	2,3	3,5	3,0

A.5 Ergebnisse der Zellkulturstudien

Tabelle A-7: Degradationsexperiment Mal-3-glc 50 μ M 0-1440 Min, Dreifachbestimmung (LC-UV)

Degradation Zeit / min	Mal-3-glc	
	Konz. / μ M	\pm Stdabw
0	44	5
30	45	5
90	41	1
180	40	2
240	45	4
360	40	3
1440	33	3

Tabelle A-8: Zwei Inkubationsexperimente (apikal) Caco-2-Zellen mit Mal-3-glc 50 μ M, Dreifachbestimmung (LC-UV)

Inkubation Zeit / min	Zellkultur Caco-2	Mal-3-glc	
		Konz. / μ M	\pm Stdabw
0		49	1
30	100%	18	1
90	100%	18	2
180	100%	18	1
240	100%	22	1
Inkubation Zeit / min	Zellkultur Caco-2	Mal-3-glc	
		Konz. / μ M	\pm Stdabw
0		49	1
30	100%	17	2
90	100%	21	3
180	100%	21	2
240	100%	24	1

Tabelle A-9: Degradationsexperiment zu Tabelle 10-9 Dakapo-Lösung 50 μ M, Dreifachbestimmung (LC-UV)

Degradation Zeit / min	Del-3-glc		Cy-3-glc		Pet-3-glc		Peo-3-glc		Mal-3-glc	
	Konz. / μ M	\pm Stdabw								
0	5,8	0,4	5,4	0,1	12	1	19	1	55	2
30	4,9	0,4	5,0	0,1	10	1	17	1	45	1
90	3,9	0,3	4,9	0,2	8,1	1,1	16	1	40	3
180	3,2	0,3	4,9	0,1	6,9	0,8	17	1	42	1
240	3,0	0,1	4,5	0,1	5,5	0,8	15	1	37	3

Tabelle A-10: Zwei Inkubationsexperimente (apikal) Caco-2-Zellen mit Dakapo-Lösung 50µM, Dreifachbestimmung (LC-UV)

Inkubation Zeit / min	Zellkultur Caco-2	Del-3-glc		Cy-3-glc		Pet-3-glc		Peo-3-glc		Mal-3-glc	
		Konz. / µM±Stdabw									
30	100%	1,3	0,3	3,8	0,1	9,7	0,1	17	1	47	1
90	100%	1,3	0,0	1,6	0,1	1,3	0,1	5,5	1,1	12	3
180	100%	1,3	0,0	1,3	0,0	1,5	0,0	2,5	1,0	3,2	2,7
240	100%	1,3	0,0	1,3	0,0	1,5	0,0	2,5	0,4	3,0	1,8
0		3,8	0,6	3,5	0,6	9,3	2,1	14	3	49	1
30	100%	6,8	1,0	3,3	0,2	8,7	1,0	14	1	39	2
90	100%	4,9	0,6	3,1	0,2	7,3	0,7	13	1	35	2
180	100%	4,4	0,2	3,1	0,1	7,5	0,5	14	1	40	2
240	100%	3,6	0,2	3,0	0,1	6,9	0,4	14	1	39	1

Tabelle A-11: Degradationsexperiment 0-1440 Minuten einer 50µM Dakapo-Lösung bei pH=7

Degradation Zeit / min	Del-3-glc		Cy-3-glc		Pet-3-glc		Peo-3-glc		Mal-3-glc	
	Konz. / µM ±Stdabw									
0	8,5	0,2	1,6	0,1	8,3	0,4	12	0,6	43	0,6
30	7,1	0,1	1,5	0,1	7,2	0,2	11	0,4	39	0,8
90	5,0	0,1	1,5	0,1	5,9	0,3	11	0,4	37	0,3
180	2,9	0,1	1,5	0,1	4,6	0,2	11	0,4	36	0,7
240	2,3	0,1	1,4	0,1	4,2	0,2	11	0,5	36	0,6
360	1,4	0,1	1,4	0,1	3,3	0,4	10	1,0	34	2
450	0,6	0,2	1,2	0,1	2,2	0,3	10	0,5	33	0,4
1440	0,0	0,0	0,8	0,1	0,1	0,1	6,0	0,4	19	1

Tabelle A-12: Zellkulturexperimente diverse Zellmischungen (apikal) inkubiert mit 50µM Dakapolösung (bzgl. Mal-3-glc), Dreifachbestimmungen (LC-UV)

Inkubation Zeit / min	Zellkultur	Del-3-glc		Cy-3-glc		Pet-3-glc		Peo-3-glc		Mal-3-glc	
		Konz. / µM	±Stdabw								
0		7,9	0,1	1,6	0,0	8,1	0,2	12	0,1	43	0,5
30	09:01	6,2	0,1	1,3	0,0	6,6	0,1	11	0,2	36	0,3
90	09:01	5,0	0,1	1,1	0,0	5,9	0,2	10	0,6	34	1,6
180	09:01	3,3	0,0	0,9	0,1	4,7	0,2	9,4	0,1	33	0,4
240	09:01	3,1	0,0	1,0	0,0	5,0	0,1	10	0,2	36	0,8
360	09:01	2,3	0,0	0,9	0,0	4,4	0,0	9,0	0,0	34	0,5
450	09:01	2,2	0,0	0,8	0,0	4,5	0,1	9,0	0,1	36	0,0
1440	09:01	0,4	0,0	0,2	0,0	2,0	0,0	3,6	0,1	24	0,1
0		8,0	0,0	1,6	0,0	8,1	0,1	13	0,0	42	0,6
30	09:01	6,0	0,0	1,2	0,0	6,3	0,0	10	0,0	33	0,1
90	09:01	4,3	0,0	1,1	0,0	5,2	0,1	8,9	0,2	30	1,0
180	09:01	3,3	0,1	1,0	0,0	4,8	0,0	8,9	0,0	30	0,2
240	09:01	2,9	0,0	1,0	0,0	4,6	0,1	9,3	0,1	31	0,0
360	09:01	2,1	0,0	0,9	0,0	4,1	0,1	8,8	0,1	31	0,4
450	09:01	1,6	0,1	0,9	0,0	3,6	0,0	8,8	0,1	31	0,1
1440	09:01	0,4	0,1	0,3	0,0	2,0	0,0	4,2	0,1	24	0,6
0		7,9	0,1	1,6	0,0	8,1	0,2	12	0,1	43	0,5
30	08:02	6,0	0,1	1,2	0,0	6,4	0,2	10	0,3	35	1,1
90	08:02	4,5	0,1	1,1	0,0	5,5	0,2	9,9	0,0	33	0,3
180	08:02	3,8	0,1	1,0	0,0	5,3	0,1	10	0,3	35	0,0
240	08:02	3,3	0,1	1,0	0,0	5,0	0,1	9,5	0,4	35	0,0
360	08:02	2,9	0,1	0,9	0,0	5,0	0,1	9,2	0,4	37	1,1
450	08:02	2,3	0,0	0,8	0,0	4,6	0,1	8,6	0,4	36	0,4
1440	08:02	0,7	0,0	0,2	0,0	2,6	0,1	4,0	0,1	28	0,0
0		8,0	0,0	1,6	0,0	8,1	0,1	13	0,0	42	0,6
30	08:02	5,9	0,0	1,2	0,0	6,2	0,1	9,9	0,0	33	0,4
90	08:02	4,7	0,0	1,1	0,0	5,5	0,1	9,5	0,0	31	0,2
180	08:02	3,6	0,0	1,0	0,0	5,2	0,2	9,4	0,1	32	0,1
240	08:02	3,0	0,0	0,9	0,0	4,6	0,1	8,8	0,2	31	0,0
360	08:02	2,3	0,0	0,8	0,0	4,3	0,1	8,1	0,2	31	0,1
450	08:02	1,9	0,0	0,8	0,0	3,8	0,1	7,9	0,2	31	0,2
1440	08:02	0,6	0,0	0,2	0,0	2,3	0,0	3,3	0,2	24	0,3
0		7,9	0,1	1,6	0,0	8,1	0,2	13	0,1	43	0,5
30	07:03	5,3	0,0	1,0	0,0	5,8	0,0	9,5	0,1	34	0,0
90	07:03	4,3	0,1	0,9	0,0	5,1	0,1	9,1	0,2	32	0,4
180	07:03	3,7	0,0	0,9	0,0	5,1	0,0	9,6	0,1	36	0,2
240	07:03	3,1	0,1	0,8	0,0	4,3	0,6	8,7	0,2	33	1,4
360	07:03	2,6	0,0	0,8	0,0	4,6	0,1	9,3	0,2	37	0,1
450	07:03	2,2	0,1	0,7	0,0	4,4	0,1	8,7	0,2	37	0,7
1440	07:03	0,5	0,0	0,2	0,0	2,0	0,2	3,3	0,3	25	1,9
0		8,0	0,0	1,6	0,0	8,1	0,1	13,1	0,0	42	0,6
30	07:03	5,5	0,0	1,1	0,0	5,8	0,1	9,5	0,2	31	0,3
90	07:03	4,2	0,0	1,0	0,0	5,0	0,1	8,9	0,3	30	0,3
180	07:03	3,4	0,0	1,0	0,0	4,9	0,1	9,4	0,2	32	0,3
240	07:03	3,0	0,0	1,0	0,0	4,8	0,1	9,3	0,2	33	0,1
360	07:03	2,3	0,0	0,8	0,0	4,3	0,0	8,4	0,1	32	0,0
450	07:03	2,2	0,0	0,8	0,0	4,5	0,1	8,7	0,1	36	0,2
1440	07:03	0,5	0,0	0,2	0,0	2,3	0,0	3,7	0,1	26	0,2

Tabelle A-13 Zellkulturexperimente diverse Zellmischungen (apikal), Inkubation mit 50 μ M Mal-3-glc Lösung, Zweifachbestimmungen (LC-UV)

Inkubation Zeit / min	Zellkultur Caco-2:HT29	Mal-3-glc	
		Konz. / μ M \pm obere/untere Grenze	
0		27	0,2
30	09:01	22	0,0
90	09:01	21	0,1
180	09:01	23	0,1
240	09:01	21	0,1
360	09:01	25	0,1
450	09:01	23	0,2
1440	09:01	24	0,1
0		29	0,4
30	09:01	24	0,2
90	09:01	22	0,1
180	09:01	24	0,2
240	09:01	24	0,0
360	09:01	24	0,0
450	09:01	25	0,1
1440	09:01	24	0,3
0		27	0,2
30	08:02	22	0,0
90	08:02	21	0,2
180	08:02	23	0,1
240	08:02	24	0,0
360	08:02	24	0,2
450	08:02	24	0,1
1440	08:02	22	0,0
0		29	0,4
30	08:02	23	0,3
90	08:02	23	0,0
180	08:02	24	0,0
240	08:02	24	0,3
360	08:02	24	0,1
450	08:02	24	0,0
1440	08:02	22	0,1
0		28	0,2
30	07:03	22	0,0
90	07:03	22	0,2
180	07:03	22	0,0
240	07:03	23	0,1
360	07:03	23	0,3
450	07:03	24	0,0
1440	07:03	22	0,0
0		28	0,0
30	07:03	23	0,3
90	07:03	22	0,5
180	07:03	25	0,9
240	07:03	25	0,1
360	07:03	25	0,3
450	07:03	26	0,6
1440	07:03	24	0,3

Tabelle A-14: Basale Zellkompartimente (Inkubation mit Mal-3-glc jew. 50 µM, LC-MS)

Inkubation Zeit / min	Zellkultur Caco-2:HT29	Inkubations- lösung	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Mal-glu	Peo-glu		
			Konz. basales Zellkompartiment / nM								
	basal		nq = nicht quantifizierbar								
0		Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq		
30	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq		
90	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	1,3	25	nq	nq		
180	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	1,6	32	nq	nq		
240	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	3,4	61	nq	nq		
0		Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq		
30	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	0,8	nq	nq		
90	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	4,1	nq	nq		
180	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	1,4	22	nq	nq		
240	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	3,8	66	nq	nq		
0		Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq		
30	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	0,0	nq	nq		
90	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	0,6	nq	nq		
180	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,1	2,7	nq	nq		
240	Caco-2	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,2	4,4	nq	nq		
0		Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq		
30	09:01	Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	1,9	nq	nq		
90	09:01	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,1	4,7	nq	nq		
180	09:01	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,6	18	nq	nq		
240	09:01	Mal-3-glc	nq	nq	nq	1,0	18	nq	nq		
0		Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq		
30	09:01	Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	1,0	nq	nq		
90	09:01	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,2	4,3	nq	nq		
180	09:01	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,2	9,5	nq	nq		
240	09:01	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,8	13	nq	nq		
0		Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq		
30	08:02	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,0	3,1	nq	nq		
90	08:02	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,3	10	nq	nq		
180	08:02	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,8	22	nq	nq		
240	08:02	Mal-3-glc	nq	nq	nq	1,4	37	nq	nq		
0		Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq		
30	08:02	Mal-3-glc	nq	nq	nq	nq	1,5	nq	nq		
90	08:02	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,1	5,7	nq	nq		
180	08:02	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,2	14	nq	nq		
240	08:02	Mal-3-glc	nq	nq	nq	0,6	17	nq	nq		

Tabelle A-15: Basale Zellkompartimente (Inkubation mit Dakapo-Lösung, jew. 50µM), massenspektrometrische Analyse

Inkubationsv Zeit / min	Zellkultur Caco-2:HT29	Inkubations- lösung	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Mal-glu	Peo-glu
			Konz. basales Zellkompartiment / nM						
	basal		nq = nicht quantifizierbar						
0		Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
30	Caco-2	Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
90	Caco-2	Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
180	Caco-2	Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
240	Caco-2	Dakapo	nq	nq	nq	0,2	0,7	nq	nq
0		Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
30	Caco-2	Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
90	Caco-2	Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
180	Caco-2	Dakapo	nq	1,9	1,7	42	63	nq	nq
240	Caco-2	Dakapo	nq	5,3	0,6	89	157	nq	nq
0		Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
30	09:01	Dakapo	nq	nq	nq	2,2	2,9	nq	nq
90	09:01	Dakapo	nq	nq	0,0	5,4	9,0	nq	nq
180	09:01	Dakapo	nq	0,4	nq	18	25	nq	nq
240	09:01	Dakapo	nq	1,1	0,4	20	31	nq	nq
0		Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
30	09:01	Dakapo	nq	nq	nq	1,7	2,1	nq	nq
90	09:01	Dakapo	nq	0,1	nq	4,6	6,6	nq	nq
180	09:01	Dakapo	nq	1,3	1,7	31	44	nq	nq
240	09:01	Dakapo	nq	0,7	0,3	13	19	nq	nq
0		Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
30	08:02	Dakapo	nq	nq	0,1	3,0	4,2	nq	nq
90	08:02	Dakapo	nq	0,4	nq	9,4	10	nq	nq
180	08:02	Dakapo	0,1	0,7	1,1	16	22	nq	nq
240	08:02	Dakapo	nq	1,1	nq	25	36	nq	nq
0		Dakapo	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
30	08:02	Dakapo	nq	0,1	nq	3,5	4,9	nq	nq
90	08:02	Dakapo	nq	0,2	10,9	18	nq	nq	nq
180	08:02	Dakapo	nq	1,6	0,5	35	46	nq	nq
240	08:02	Dakapo	nq	0,9	nq	26	39	nq	nq

A.6 Ergebnisse der Tierstudie

Tabelle A-16: Anthocyane in Plasmaproben (Tierstudie)

Tier	Del-3,5-dglc	Cy-3,5-dglc	Pet-3,5-dglc	Peo-3,5-dglc	Mal-3,5-dglc	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu
Konzentration Plasma / nM												
nq = nicht quantifizierbar												
10 a	nq	0,8	1,3	7,5	5,5	1,5	0,7	1,0	2,8	1,9	0,7	nq
10 b	nq	0,2	0,3	3,3	2,4	0,5	nq	0,4	1,1	0,8	nq	nq
14 a	nq	0,3	0,4	2,8	1,9	0,8	nq	0,4	1,1	0,8	0,4	nq
14 b	nq	0,5	0,8	4,4	3,0	0,8	0,4	0,7	1,3	1,0	0,3	nq
27 a	nq	nq	nq	1,1	0,7	nq	nq	nq	0,3	0,4	0,2	nq
27 b	nq	nq	nq	1,8	1,3	0,5	nq	0,4	0,8	0,5	nq	nq
19 a	nq	nq	nq	nq	nq	0,4	nq	nq	nq	nq	nq	nq
19 b	nq	nq	nq	nq	nq	0,3	nq	nq	nq	nq	nq	nq
25 a	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
25 b	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
32 a	nq	nq	nq	nq	nq	0,4	nq	nq	nq	nq	nq	nq
32 b	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq

Tabelle A-17: Anthocyane in 24h-Urin (Tierstudie)

Tier	Del-3,5-dglc	Cy-3,5-dglc	Pet-3,5-dglc	Peo-3,5-dglc	Mal-3,5-dglc	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu
nmol / 24h Urin												
nq = nicht quantifizierbar												
10 a	0,1	0,1	0,3	2,5	1,9	0,4	0,3	0,3	1,1	0,8	0,1	nq
10 b	0,1	0,1	0,2	2,4	1,9	0,4	0,4	0,3	1,6	1,1	0,1	0,1
14 a	nq	0,1	0,2	2,2	1,7	0,3	0,3	0,3	1,3	0,9	0,1	nq
14 b	nq	0,1	0,2	2,5	1,8	0,4	0,3	0,3	1,2	0,9	0,1	nq
27 a	0,1	0,3	0,6	4,8	3,5	0,6	0,6	0,4	1,7	1,4	0,1	0,1
27 b	0,1	0,1	0,2	2,3	1,7	0,3	0,2	0,2	1,0	0,7	0,1	nq
19 a	nq	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	nq
19 b	nq	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	nq
25 a	nq	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	nq
25 b	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
32 a	nq	nq	nq	0,1	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	nq
32 b	nq	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	nq

Tabelle A-18: Anthocyan-Diglucoside in Fäzesproben (Tierstudie)

Tier	Del-3,5-dglc	Cy-3,5-dglc	Pet-3,5-dglc	Peo-3,5-dglc	Mal-3,5-dglc
	nmol / g Fäzes				
	nq = nicht quantifizierbar				
10 a	nq	nq	nq	8,6	5,8
10 b	nq	nq	nq	12	8,0
14 a	nq	nq	nq	5,0	3,6
14 b	nq	nq	nq	3,8	2,4
27 a	nq	nq	nq	3,1	1,7
27 b	nq	nq	nq	5,1	4,0
19 a	nq	nq	nq	nq	nq
19 b	nq	nq	nq	nq	nq
25 a	nq	nq	nq	nq	nq
25 b	nq	nq	nq	nq	nq
32 a	nq	nq	nq	nq	nq
32 b	nq	nq	nq	nq	nq

Tabelle A-19: Restliche Anthocyane in Fäzesproben (Tierstudie)

Tier	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	Aglykon Peo	Aglykon Mal
	nmol / g Fäzes								
	nq = nicht quantifizierbar								
10 a	6,4	2,6	10	25	41	nq	nq	nq	nq
10 b	10	7,3	14	38	55	nq	nq	nq	nq
14 a	5,3	4,8	7,3	24	32	nq	nq	nq	nq
14 b	3,7	2,2	6,6	24	33	nq	nq	nq	nq
27 a	3,0	5,5	6,0	22	32	nq	nq	nq	nq
27 b	4,7	3,3	6,8	20	29	nq	nq	nq	nq
19 a	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
19 b	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
25 a	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
25 b	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
32 a	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
32 b	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq

Tabelle A-20: Anthocyan-Diglucoside in Darminhalten (Tierstudie) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Tier	Darm- abschnitt	Del-3,5-dglc	Cy-3,5-dglc	Pet-3,5-dglc	Peo-3,5-dglc	Mal-3,5-dglc
		nmol / g Gewebe				
		nq = nicht quantifizierbar				
10 a	Ileum	11	20	30	212	122
	Colon	1,0	1,9	3,0	26	18
	Caecum	1,2	2,6	3,9	29	19
10 b	Ileum	1,2	5,1	5,9	79	37
	Colon	nq	0,5	0,7	7,5	4,8
	Caecum	nq	0,3	0,5	5,2	3,6
14 a	Ileum	13	21	28	207	125
	Colon	nq	nq	0,7	10	8,4
	Caecum	nq	nq	nq	5,8	5,0
14b	Ileum	nq	nq	nq	7,8	3,8
	Colon	nq	nq	nq	6,8	5,2
	Caecum	nq	nq	nq	2,8	1,4
27 a	Ileum	nq	2,2	2,8	21	12
	Colon	nq	0,3	0,5	4,3	3,0
	Caecum	nq	0,3	0,5	4,5	3,3
27 b	Ileum	7,4	12	17	114	61
	Colon	nq	nq	0,2	2,1	1,5
	Caecum	nq	nq	0,3	2,5	2,1
19 a	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq
19 b	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq
25 a	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq
25 b	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq
32 a	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq
32 b	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq

Tabelle A-21: Restliche Anthocyane in Darminhalten (Tierstudie) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Tier	Darm- abschnitt	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	Aglykon Peo	Aglykon Mal
		nmol / g Gewebe								
nq = nicht quantifizierbar										
10 a	Ileum	74	138	127	228	136	nq	nq	0,8	nq
	Colon	8,2	8,5	1	36	48	nq	nq	2,8	3,3
	Caecum	9,6	9,3	13	29	43	nq	nq	4,8	5,8
10 b	Ileum	17	31	25	62	63	nq	nq	nq	nq
	Colon	2,1	2,5	3,1	9,2	12	nq	nq	nq	nq
	Caecum	1,7	1,6	2,3	6,0	8,3	nq	nq	0,3	0,2
14 a	Ileum	70	62	118	219	236	nq	nq	nq	nq
	Colon	7,0	5,1	6,8	17	29	nq	nq	nq	nq
	Caecum	3,7	2,6	3,4	12	18	nq	nq	nq	nq
14b	Ileum	3,9	5,6	5,9	20	15	nq	nq	nq	nq
	Colon	2,2	1,9	2,8	10	14	nq	nq	nq	nq
	Caecum	1,4	2,1	2,4	7,6	5,6	nq	nq	nq	nq
27 a	Ileum	6,6	7,4	11	29	30	nq	nq	nq	nq
	Colon	1,9	1,6	2,3	6,7	9,8	nq	nq	0,3	nq
	Caecum	2,1	1,7	2,9	8,2	13	nq	nq	0,7	0,9
27 b	Ileum	44	39	71	108	151	nq	nq	nq	0,6
	Colon	1,1	1,1	1,5	4,5	6,1	nq	nq	0,2	nq
	Caecum	1,0	0,6	1,5	4,1	6,0	nq	nq	0,7	0,8
19 a	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
19 b	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
25 a	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
25 b	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,3	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
32 a	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
32 b	Ileum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Colon	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
	Caecum	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq

A.7 Ergebnisse Humanstudie

Tabelle A-22: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C40 (Messunsicherheit 8-10%, vgl.

Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Plasma	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB
C40	/ Min	Konz. Plasma / nM							
VT	nach Saftgabe	nq = nicht quantifizierbar							
2	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	2,6
2	10	nq	nq	0,0	0,1	0,1	nq	nq	5,3
2	20	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	nq	nq	5,9
2	30	0,2	0,1	0,1	0,6	1,0	nq	nq	7,4
2	40	0,4	0,4	0,4	1,1	2,0	0,6	0,1	8,7
2	60	0,4	0,6	0,5	1,6	2,8	1,2	0,3	9,8
2	90	0,5	0,3	0,3	0,9	2,2	2,6	1,0	5,8
2	120	0,2	0,3	0,2	0,6	1,4	2,7	1,3	5,3
3	0	0,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,9
3	10	nq	nq	nq	0,0	0,1	nq	nq	2,3
3	20	0,1	0,1	nq	0,2	0,4	0,2	0,1	3,8
3	30	0,1	0,3	nq	1,0	2,0	0,4	0,2	7,5
3	40	0,4	0,5	0,2	1,8	3,8	0,7	0,4	10,1
3	60	0,3	0,4	0,1	1,4	3,5	1,2	0,7	9,2
3	90	0,0	0,2	0,0	0,6	1,5	2,0	1,5	6,4
3	120	0,1	0,1	nq	0,4	1,1	2,4	1,8	5,1
4	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	1,1
4	10	nq	nq	nq	0,0	0,0	0,0	nq	2,4
4	20	nq	0,0	0,0	0,1	0,3	0,3	0,2	2,4
4	30	0,1	0,0	0,1	0,2	0,4	0,4	0,2	2,6
4	40	0,2	0,0	0,2	0,5	0,9	0,7	0,4	3,4
4	60	0,2	0,0	0,2	0,4	1,1	0,9	0,5	3,5
4	90	0,2	0,1	0,1	0,3	0,8	1,9	1,0	3,9
4	120	0,0	0,0	0,1	0,2	0,7	2,2	1,5	1,7
5	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
5	10	nq	nq	nq	0,1	0,1	0,1	0,1	4,9
5	20	0,2	0,0	0,2	0,9	1,7	0,6	0,3	11,5
5	30	0,6	0,1	0,7	2,2	4,2	0,9	0,5	8,5
5	40	1,2	0,2	1,4	4,2	7,7	1,4	1,0	10,0
5	60	2,0	0,5	2,4	6,7	13,3	1,9	1,3	13,3
5	90	1,0	0,2	1,1	3,2	6,6	2,4	2,4	4,7
5	120	0,4	0,1	0,5	1,3	3,4	2,6	2,0	6,8

Tabelle A-13: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C41 (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Plasma	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB
C41	/ Min	Konz. Plasma / nM							
VT	nach Saftgabe	nq = nicht quantifizierbar							
2	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,8
2	10	nq	nq	nq	0,1	0,1	nq	nq	3,1
2	20	0,0	0,1	0,1	0,2	0,3	0,0	nq	4,4
2	30	0,1	0,1	0,2	0,6	0,9	0,1	nq	5,4
2	40	0,2	0,2	0,2	0,6	1,2	0,2	nq	3,9
2	60	0,4	0,4	0,2	0,9	1,7	0,3	0,0	4,7
2	90	0,2	0,2	0,2	0,7	1,5	0,7	0,1	6,0
2	120	0,2	0,2	0,2	0,5	1,3	1,0	0,2	7,3
3	0	nq	nq	nq	nq	0,0	0,1	nq	1,1
3	10	nq	nq	nq	nq	0,0	nq	nq	2,0
3	20	0,0	0,0	nq	0,1	0,2	0,0	nq	4,0
3	30	0,1	0,1	0,0	0,5	0,9	0,1	0,0	4,8
3	40	0,0	0,2	0,1	0,6	0,8	0,1	0,0	4,0
3	60	0,1	0,3	0,1	1,0	1,9	0,3	0,2	5,0
3	90	0,1	0,1	0,0	0,4	1,0	0,5	0,2	7,8
3	120	0,1	0,1	0,0	0,4	0,9	0,7	0,3	7,5
4	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
4	10	nq	nq	nq	0,0	0,1	nq	nq	1,8
4	20	0,0	nq	0,0	0,2	0,3	0,0	nq	2,3
4	30	0,1	0,1	0,1	0,3	0,8	0,1	0,1	3,1
4	40	0,1	0,0	0,1	0,4	0,8	0,2	0,1	4,6
4	60	0,1	0,0	0,1	0,4	0,9	0,5	0,2	4,4
4	90	0,1	0,0	0,1	0,4	0,7	0,7	0,4	5,2
4	120	0,1	nq	0,1	0,2	0,6	0,8	0,4	3,5
5	0	nq	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq
5	10	0,7	0,2	0,6	1,5	2,9	0,1	nq	1,9
5	20	0,8	0,2	0,8	1,6	3,4	0,2	0,1	2,0
5	30	0,6	0,2	0,6	1,2	2,5	0,4	0,2	3,8
5	40	0,5	0,1	0,5	0,9	1,7	0,9	0,2	3,5
5	60	0,5	0,1	0,5	0,9	1,9	0,9	0,3	5,6
5	90	0,3	0,1	0,3	0,6	1,0	0,6	0,6	3,8
5	120	0,3	0,1	0,3	0,5	1,1	0,5	0,7	4,6

Tabelle A-24: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C43 (Messunsicherheit 8-10%, vgl.

Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Plasma	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB
C43	/ Min	Konz. Plasma / nM							
VT	nach Saftgabe	nq = nicht quantifizierbar							
2	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	3,0
2	10	nq	nq	nq	0,0	0,1	nq	nq	4,7
2	20	0,0	nq	nq	0,2	0,3	0,0	0,0	4,7
2	30	0,1	0,1	0,0	0,3	0,6	0,2	0,1	6,4
2	40	0,1	0,1	0,0	0,5	0,9	0,3	0,1	6,7
2	60	0,2	0,2	0,1	0,9	1,7	0,7	0,3	7,3
2	90	0,1	0,1	0,1	0,5	1,0	0,8	0,4	7,7
2	120	0,1	0,1	0,0	0,4	0,9	1,4	0,5	6,8
3	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	1,0
3	10	nq	nq	nq	0,0	0,0	nq	nq	2,3
3	20	0,0	nq	0,0	0,1	0,2	0,1	0,0	1,7
3	30	0,1	nq	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	1,8
3	40	0,1	0,0	0,1	0,2	0,4	0,5	0,2	2,4
3	60	0,1	0,0	0,1	0,3	0,6	1,0	0,4	2,0
3	90	0,1	0,0	0,1	0,3	0,7	1,8	0,8	2,6
3	120	0,2	0,0	0,2	0,3	0,7	2,2	0,9	2,1
4	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
4	10	nq	nq	0,0	0,1	0,1	0,1	nq	1,2
4	20	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	nq	1,1
4	30	0,1	0,1	0,1	0,3	0,5	0,4	0,2	1,5
4	40	0,1	0,1	0,1	0,4	0,7	0,4	0,1	1,5
4	60	0,7	0,3	0,4	1,2	2,6	1,0	0,5	2,2
4	90	0,5	0,3	0,5	1,3	2,4	1,1	0,5	1,1
4	120	0,4	0,2	0,3	0,6	1,5	0,9	0,5	1,1
5	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,8
5	10	nq	nq	nq	0,1	0,1	0,1	nq	1,7
5	20	0,0	nq	0,0	0,2	0,3	0,3	0,1	2,4
5	30	0,0	nq	0,1	0,2	0,5	0,5	0,3	3,2
5	40	0,1	nq	0,1	0,4	0,7	0,8	0,4	4,2
5	60	0,2	0,0	0,2	0,7	1,1	1,3	0,6	6,0
5	90	0,1	nq	0,2	0,5	1,0	2,0	1,1	3,6
5	120	0,1	nq	0,1	0,4	0,9	2,2	1,2	3,8

Tabelle A-25: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C45 (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Plasma	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB
C45	/ Min	Konz. Plasma / nM							
VT	nach Saftgabe	nq = nicht quantifizierbar							
2	0	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	2,7
2	10	nq	0,0	nq	nq	0,0	nq	nq	5,4
2	20	0,0	0,1	0,0	0,2	0,3	0,2	0,0	5,8
2	30	0,1	0,1	0,1	0,3	0,7	0,6	0,2	6,9
2	40	0,1	0,2	0,1	0,4	0,9	1,0	0,3	5,3
2	60	0,2	0,3	0,1	0,1	1,6	2,4	0,7	6,4
2	90	0,2	0,2	0,1	0,4	1,2	3,1	0,9	5,9
2	120	0,2	0,3	0,0	0,4	1,7	4,9	2,0	4,7
3	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
3	10	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	1,6
3	20	0,1	nq	0,0	0,1	0,3	0,3	0,1	3,0
3	30	0,1	nq	0,1	0,3	0,6	0,6	0,3	3,3
3	40	0,0	nq	0,1	0,3	0,7	0,6	0,4	3,5
3	60	0,1	nq	0,1	0,3	0,8	1,0	0,7	3,0
3	90	0,1	0,0	0,2	0,3	1,0	2,2	1,5	2,5
3	120	0,0	0,0	0,1	0,3	0,7	2,3	1,9	1,6
4	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
4	10	nq	nq	nq	0,0	0,0	0,1	nq	1,2
4	20	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,0	1,7
4	30	0,1	0,1	0,1	0,3	0,5	0,3	0,0	1,7
4	40	0,2	0,1	0,2	0,4	1,0	0,7	0,4	2,0
4	60	0,3	0,2	0,3	0,6	1,5	1,8	0,5	2,3
4	90	0,3	0,1	0,2	0,5	1,4	2,5	1,2	1,8
4	120	0,2	0,1	0,2	0,4	1,2	2,4	1,6	1,1
5	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	1,0
5	10	nq	nq	nq	0,1	0,1	nq	nq	2,1
5	20	nq	nq	nq	0,1	0,3	0,3	0,1	3,8
5	30	0,0	nq	0,1	0,2	0,4	0,5	0,4	3,9
5	40	0,0	nq	0,1	0,3	0,5	1,1	0,6	5,1
5	60	0,1	nq	0,1	0,5	0,8	2,4	1,2	5,7
5	90	0,1	nq	0,1	0,4	1,0	3,9	2,8	4,9
5	120	0,1	nq	0,1	0,3	0,7	2,9	2,8	2,8

Tabelle A-26: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband CF 44 (*=negativer Ionenmodus nicht verwendbar) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Plasma	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB
C F44	/ Min	Konz. Plasma / nM							
VT	nach Saftgabe	nq = nicht quantifizierbar							
2	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
2	10	nq	nq	nq	0,1	0,2	nq	nq	1,5
2	20	0,0	nq	0,0	0,2	0,3	0,1	0,1	2,3
2	30	0,0	nq	0,1	0,3	0,5	0,4	0,3	2,7
2	40	0,0	nq	0,1	0,3	0,5	0,5	0,3	3,1
2	60	0,0	nq	0,1	0,3	0,5	0,8	0,5	3,9
2	90	0,0	nq	0,1	0,3	0,7	1,9	1,2	4,0
2	120	0,0	nq	0,1	0,3	0,8	2,0	1,3	2,9
3	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
3	10	nq	nq	nq	0,0	nq	nq	nq	1,4
3	20	0,0	nq	nq	0,1	0,1	0,4	0,2	1,9
3	30	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,4	0,4	1,8
3	40	0,1	nq	0,1	0,2	0,3	1,1	0,8	2,7
3	60	0,1	0,0	0,1	0,2	0,4	2,0	1,4	2,6
3	90	0,1	nq	0,1	0,3	0,5	3,4	2,5	1,4
3	120	0,1	0,0	0,1	0,3	0,6	3,4	3,2	2,0
4	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	1,2
4	10	nq	nq	nq	0,1	0,2	nq	nq	2,0
4	20	nq	nq	0,1	0,2	0,4	0,3	0,1	1,9
4	30	0,0	nq	0,1	0,4	0,6	0,6	0,2	2,6
4	40	nq	0,0	0,1	0,5	0,7	1,0	0,3	3,7
4	60	0,1	nq	0,1	0,4	0,8	1,9	0,8	2,6
4	90	0,1	nq	0,1	0,4	0,8	2,5	1,2	2,6
4	120	0,0	nq	0,1	0,4	0,9	3,0	1,6	2,1
5	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	-*
5	10	nq	nq	nq	0,1	nq	0,1	nq	-*
5	20	nq	nq	nq	0,3	0,1	0,4	nq	-*
5	30	nq	nq	nq	0,4	0,4	0,4	0,2	-*
5	40	nq	nq	nq	0,6	0,4	0,8	0,3	-*
5	60	nq	nq	0,1	0,6	0,6	1,1	0,3	-*
5	90	nq	nq	0,1	0,6	0,6	1,8	0,6	-*
5	120	nq	nq	0,2	0,6	0,7	1,9	1,0	-*

Tabelle A-27: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband CF46 (*=negativer Ionenmodus nicht verwendbar) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Plasma	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB
C F46	/ Min	Konz. Plasma / nM							
VT	nach Saftgabe	nq = nicht quantifizierbar							
2	0	nq	0,0	nq	nq	nq	nq	nq	5,1
2	10	nq	nq	nq	0,0	0,0	nq	nq	4,8
2	20	0,0	0,0	nq	0,1	0,2	0,2	0,2	4,8
2	30	0,1	0,1	0,0	0,1	0,4	0,8	0,7	5,2
2	40	0,0	0,1	0,0	0,2	0,5	2,1	1,0	5,7
2	60	0,1	0,1	0,0	0,2	0,6	3,4	1,6	7,4
2	90	0,1	0,1	0,0	0,3	0,9	6,3	3,2	7,0
2	120	0,1	0,1	nq	0,2	0,7	4,9	3,2	5,0
3	0	nq	nq	nq	nq	0,0	0,1	nq	1,7
3	10	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	-*
3	20	0,0	nq	0,0	0,1	0,3	0,4	0,2	2,9
3	30	nq	0,0	0,1	0,2	0,4	0,8	0,5	3,3
3	40	0,1	0,0	0,0	0,3	0,5	1,7	1,1	4,3
3	60	0,0	nq	0,1	0,3	0,5	2,7	1,6	3,3
3	90	nq	nq	0,1	0,2	0,6	3,3	1,7	3,8
3	120	nq	nq	0,0	0,2	0,7	4,5	2,8	3,3
4	0	nq	nq	nq	nq	nq	0,0	nq	nq
4	10	nq	nq	nq	0,1	0,1	0,1	0,0	1,2
4	20	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,4	0,3	1,4
4	30	0,1	0,0	0,1	0,3	0,5	1,1	0,6	2,2
4	40	0,1	0,0	0,1	0,4	0,7	2,3	1,0	2,2
4	60	0,1	0,0	0,1	0,5	0,8	4,2	1,6	2,8
4	90	0,1	nq	0,1	0,3	0,7	5,7	2,5	2,2
4	120	0,1	0,0	0,1	0,2	0,5	5,1	3,0	1,5
5	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	1,2
5	10	0,0	nq	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	1,9
5	20	0,1	0,0	0,1	0,3	0,5	1,2	0,4	2,5
5	30	0,2	nq	0,2	0,3	0,6	2,5	1,1	3,0
5	40	0,2	nq	0,2	0,4	0,9	4,3	2,1	3,5
5	60	0,2	0,1	0,2	0,5	1,2	7,7	4,0	4,0
5	90	0,3	nq	0,2	0,4	1,1	9,2	5,4	3,1
5	120	0,1	nq	0,2	0,3	0,9	7,7	7,8	2,5

Tabelle A-28: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband CF47 (*=negativer Ionenmodus nicht verwendbar) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Plasma	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB
C F47	/ Min	Konz. Plasma / nM							
VT	nach Saftgabe	nq = nicht quantifizierbar							
2	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
2	10	nq	nq	nq	nq	0,0	nq	nq	1,3
2	20	0,1	nq	0,1	0,2	0,4	0,2	0,0	2,2
2	30	0,1	nq	0,1	0,3	0,5	0,4	0,3	2,2
2	40	0,1	0,0	0,1	0,3	0,7	0,9	0,5	3,6
2	60	0,1	0,0	0,2	0,4	0,8	1,5	1,2	2,9
2	90	0,1	nq	0,2	0,4	1,2	2,0	2,1	0,5
2	120	nq	nq	nq	nq	0,8	1,4	3,8	nq
3	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
3	10	nq	nq	nq	0,0	nq	0,0	nq	0,8
3	20	nq	0,0	0,0	0,2	0,3	0,3	0,2	2,3
3	30	0,1	0,0	0,1	0,3	0,5	0,6	0,3	2,0
3	40	0,1	0,0	0,2	0,3	0,6	1,0	0,6	2,5
3	60	0,1	0,0	0,2	0,3	0,8	1,1	0,9	2,2
3	90	0,1	0,0	0,2	0,4	1,1	2,1	2,6	2,0
3	120	0,1	0,0	0,2	0,3	1,0	1,9	2,4	0,5
4	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
4	10	nq	nq	nq	0,0	0,1	0,1	0,0	0,6
4	20	nq	nq	nq	0,1	0,1	0,3	0,2	0,6
4	30	0,0	nq	0,0	0,2	0,3	0,6	0,3	2,7
4	40	nq	nq	0,0	0,2	0,3	0,8	0,3	3,4
4	60	0,0	nq	0,1	0,3	0,4	1,7	0,6	3,7
4	90	nq	nq	0,1	0,2	0,5	1,8	1,7	1,7
4	120	nq	nq	0,1	0,2	0,5	1,5	1,6	nq
5	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	-*
5	10	nq	nq	nq	0,1	0,1	nq	nq	-*
5	20	nq	nq	nq	0,2	0,2	0,2	nq	-*
5	30	Probe nicht messbar aufgrund von Niederschlag							
5	40	Probe nicht messbar aufgrund von Niederschlag							
5	60	Probe nicht messbar aufgrund von Niederschlag							
5	90	Probe nicht messbar aufgrund von Niederschlag							
5	120	Probe nicht messbar aufgrund von Niederschlag							

Tabelle A-29: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C F48 (*= negativer Ionenmodus nicht verwendbar) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Plasma	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB
C F48	/ Min	Konz. Plasma / nM							
VT	nach Saftgabe	nq = nicht quantifizierbar							
2	0	nq	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	nq
2	10	nq	nq	nq	0,0	0,1	nq	nq	nq
2	20	nq	0,0	nq	0,1	0,3	0,1	0,1	0,8
2	30	0,1	0,1	nq	0,3	0,6	0,3	0,1	0,9
2	40	0,1	0,1	0,0	0,5	1,1	0,5	0,4	nq
2	60	0,1	nq	0,1	1,0	0,7	1,2	0,4	-*
2	90	0,0	0,1	nq	0,3	0,6	1,0	0,7	0,5
2	120	nq	0,0	nq	0,2	0,5	1,0	0,9	0,8
3	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	1,4
3	10	nq	nq	nq	nq	0,0	nq	nq	1,8
3	20	0,0	nq	0,0	0,1	0,3	0,1	0,1	1,5
3	30	0,1	nq	0,1	0,2	0,6	0,2	0,1	2,7
3	40	0,1	nq	0,1	0,3	0,8	0,6	0,3	2,9
3	60	0,2	0,0	0,2	0,4	1,2	1,0	0,6	3,5
3	90	0,2	nq	0,2	0,5	1,4	1,7	1,3	2,9
3	120	0,2	0,0	0,2	0,3	1,3	1,9	1,8	2,0
4	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
4	10	nq	nq	nq	0,0	nq	nq	nq	1,2
4	20	0,1	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	2,2
4	30	0,1	0,0	0,1	0,2	0,5	0,3	0,1	2,2
4	40	0,1	0,1	0,1	0,3	0,8	0,7	0,4	2,6
4	60	0,2	0,1	0,2	0,3	0,9	1,3	0,6	2,7
4	90	0,2	0,0	0,2	0,4	1,0	2,3	1,2	3,7
4	120	0,1	0,0	0,2	0,3	1,0	2,4	1,5	1,7
5	0	nq	nq	nq	nq	0,0	nq	nq	2,8
5	10	nq	nq	nq	0,1	0,2	0,1	0,0	7,2
5	20	0,0	nq	0,1	0,3	0,5	0,3	0,2	8,1
5	30	0,1	nq	0,1	0,4	0,7	0,6	0,3	8,8
5	40	0,1	nq	0,1	0,5	0,9	0,8	0,4	14
5	60	0,0	0,0	0,1	0,6	0,8	1,4	0,6	21
5	90	0,1	nq	0,1	0,4	1,0	1,7	1,5	6,0
5	120	0,1	nq	0,1	0,3	0,8	1,5	1,7	5,1

Tabelle A-3014: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband CF49 (Messunsicherheit 8-10%, vgl.

Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Plasma	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB
C F49	/ Min	Konz. Plasma / nM							
VT	nach Saftgabe	nq = nicht quantifizierbar							
2	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
2	10	nq	nq	nq	nq	0,0	nq	nq	1,8
2	20	nq	nq	nq	0,1	0,2	0,1	nq	1,9
2	30	0,0	nq	0,0	0,2	0,4	0,3	0,1	3,3
2	40	0,1	0,1	0,0	0,5	0,7	0,5	0,1	5,4
2	60	0,1	0,1	nq	0,4	0,6	0,5	0,1	3,6
2	90	0,1	0,1	0,0	0,3	0,8	0,8	0,2	4,5
2	120	0,0	0,1	0,0	0,2	0,4	0,4	0,1	3,9
3	0	nq	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	0,4
3	10	nq	nq	nq	nq	0,0	0,1	nq	1,4
3	20	0,0	nq	0,0	0,1	0,1	0,1	nq	2,3
3	30	0,1	0,0	0,1	0,2	0,3	0,1	nq	2,5
3	40	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,2	0,0	2,4
3	60	0,1	0,0	0,1	0,3	0,5	0,6	0,1	3,5
3	90	0,1	0,0	0,1	0,2	0,5	0,9	0,2	2,9
3	120	0,1	0,0	0,1	0,2	0,4	1,0	0,3	1,7
4	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
4	10	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	1,9
4	20	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,0	nq	2,7
4	30	0,1	0,1	0,2	0,9	1,3	0,3	0,1	3,3
4	40	0,2	0,2	0,3	1,1	1,9	0,3	0,1	4,8
4	60	0,3	0,1	0,4	1,2	1,9	0,7	0,2	4,1
4	90	0,2	0,1	0,2	0,7	1,3	1,0	0,2	2,7
4	120	0,1	0,1	0,2	0,5	0,9	0,8	0,2	2,0
5	0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	1,2
5	10	nq	nq	nq	0,0	0,0	nq	nq	2,5
5	20	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	0,0	3,1
5	30	0,0	0,0	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	4,0
5	40	0,1	0,1	0,1	0,3	0,5	0,6	0,1	4,4
5	60	0,1	0,1	0,2	0,4	0,7	1,3	0,2	4,6
5	90	0,1	0,0	0,2	0,3	0,6	1,6	0,3	3,7
5	120	0,1	0,0	0,2	0,3	0,6	1,4	0,3	3,0

Für nachfolgende Werte der Urinproben gilt allgemein, dass durch die Umrechnung auf nM/mg Kreatinin sehr kleine Werte erhalten werden. **Die Auflistung von vier Dezimalstellen bei dieser Angabe sagt nichts über deren Signifikanz aus!**

Tabelle A-31: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C40 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften (JLU Gießen).

Messunsicherheit der ursprünglichen massenspektrometrischen Messung 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4. Nach Umrechnung auf nM/mg Kreatinin Angabe von vier Dezimalstellen)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
C 40	Fraktion / h	Konz. Urin / nM								/(mg/dL)	Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)								
VT		nq = nicht quantifizierbar									nq = nicht quantifizierbar								
2	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	48	22,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,22
2	0 - 3	0,7	nq	0,8	3,7	4,2	4,3	1,6	269	26,1	0,0027	nq	0,0031	0,0140	0,0160	0,0165	0,0060	1,03	
2	3 - 6	0,1	0,4	0,1	1,0	1,7	2,7	1,5	32	32,5	0,0004	0,0011	0,0004	0,0031	0,0052	0,0083	0,0046	0,10	
2	6 - 9	nq	0,3	nq	0,2	0,1	1,3	0,3	63	12,2	nq	0,0024	nq	0,0017	0,0011	0,0107	0,0029	0,52	
2	9 - 12	nq	0,3	nq	nq	nq	0,1	nq	20	51,8	nq	0,0005	nq	nq	nq	0,0003	nq	0,04	
2	12 - 15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	26	48,2	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,05	
2	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	24	46,1	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,05	
3	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	3,4	23,5	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
3	0 - 3	0,6	nq	0,5	3,6	3,2	2,6	1,0	55	9,4	0,0061	nq	0,0056	0,0381	0,0338	0,0278	0,0106	0,59	
3	3 - 6	nq	0,8	nq	1,3	1,5	3,3	1,5	20	34,4	nq	0,0022	nq	0,0037	0,0044	0,0096	0,0044	0,06	
3	6 - 9	nq	nq	nq	0,2	nq	0,3	0,2	6,9	23,1	nq	nq	nq	0,0008	nq	0,0014	0,0007	0,03	
3	9 - 12	0,1	0,3	0,1	nq	0,4	0,2	nq	25	49,7	0,0002	0,0006	0,0002	nq	0,0007	0,0004	nq	0,05	
3	12 - 15	0,1	0,2	nq	nq	0,2	nq	nq	42	51,1	0,0002	0,0004	nq	nq	0,0003	nq	nq	0,08	
3	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	38	86,3	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,04	
4	-1 -0	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	7,5	10,8	nq	nq	nq	nq	0,0013	nq	nq	0,07	
4	0 - 3	0,2	0,1	0,2	0,8	8,4	2,0	0,8	21	10,8	0,0015	0,0009	0,0018	0,0079	0,0775	0,0189	0,0078	0,20	
4	3 - 6	nq	0,2	nq	nq	1,0	1,5	0,5	39	66,4	nq	0,0003	nq	nq	0,0015	0,0023	0,0008	0,06	
4	6 - 9	0,7	0,9	0,2	0,5	0,3	0,5	0,3	107	112,0	0,0006	0,0008	0,0002	0,0004	0,0003	0,0004	0,0002	0,10	
4	9 - 12	nq	0,2	0,2	nq	0,3	1,4	0,6	132	76,1	nq	0,0003	0,0003	nq	0,0004	0,0018	0,0008	0,17	
4	12 - 15	nq	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	19	197,0	nq	nq	0,0001	nq	nq	nq	nq	0,01	
4	15 - 24	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	nq	61	82,6	nq	nq	nq	0,0002	nq	nq	nq	0,07	
5	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	16	60,1	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,03	
5	0 - 3	1,7	1,8	2,1	14	15	3,2	1,5	40	9,6	0,0175	0,0187	0,0218	0,1496	0,1580	0,0330	0,0154	0,42	
5	3 - 6	nq	0,5	0,5	1,8	2,8	2,1	1,3	36	37,8	nq	0,0013	0,0013	0,0047	0,0074	0,0055	0,0034	0,10	
5	6 - 9	0,2	2,9	0,5	nq	nq	nq	nq	35	21,5	0,0009	0,0134	0,0025	nq	nq	nq	nq	0,17	
5	9 - 12	nq	2,2	nq	nq	nq	nq	nq	60	114,0	nq	0,0019	nq	nq	nq	nq	nq	0,05	
5	12 - 15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	42	34,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,12	
5	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	36	75,2	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,05	

Tabelle A-32: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C41 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften (JLU Gießen).

Messunsicherheit der ursprünglichen massenspektrometrischen Messung 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4. Nach Umrechnung auf nM/mg Kreatinin Angabe von vier Dezimalstellen)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
C 41	Fraktion / h	Konz. Urin / nM									/ (mg/dL)	Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)							
VT		nq = nicht quantifizierbar										nq = nicht quantifizierbar							
2	-1 -0	0,6	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	26,5	153,0	0,0004	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	0,02	
2	0 - 3	0,5	nq	1,4	7,1	7,9	3,7	0,3	536	124,0	0,0004	nq	0,0012	0,0057	0,0064	0,0030	0,0003	0,43	
2	3 - 6	0,8	nq	0,5	1,2	2,4	1,4	0,2	148	45,0	0,0018	nq	0,0011	0,0026	0,0052	0,0031	0,0004	0,33	
2	6 - 9	nq	0,4	nq	0,4	1,0	0,4	nq	78	103,0	nq	0,0004	nq	0,0004	0,0010	0,0004	nq	0,08	
2	9 - 12	nq	0,1	nq	nq	0,1	nq	nq	74	101,0	nq	0,0001	nq	nq	0,0001	nq	nq	0,07	
2	12 - 15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	131	140,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,09	
2	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	104	31,3	nq	nq	nq	nq	nq	0,0003	nq	0,34	
3	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	43	160,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,03	
3	0 - 3	0,4	0,5	0,7	4,3	4,9	2,1	0,5	144	38,2	0,0011	0,0014	0,0019	0,0112	0,0127	0,0055	0,0012	0,38	
3	3 - 6	nq	0,6	0,4	0,9	1,2	0,9	0,2	12	15,2	nq	0,0038	0,0025	0,0062	0,0080	0,0059	0,0016	0,08	
3	6 - 9	nq	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	nq	12	16,5	nq	0,0011	0,0008	0,0008	0,0012	0,0006	nq	0,08	
3	9 - 12	nq	nq	0,1	nq	0,1	nq	nq	31	48,8	nq	nq	0,0003	nq	0,0002	nq	nq	0,06	
3	12 - 15	nq	5,7	nq	0,3	nq	nq	nq	44	65,6	nq	0,0087	nq	0,0004	nq	nq	nq	0,07	
3	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	15	68,1	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,02	
4	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	4,8	34,9	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
4	0 - 3	0,2	nq	0,4	1,7	2,1	1,7	0,6	56	10,8	0,0021	nq	0,0034	0,0159	0,0194	0,0160	0,0052	0,53	
4	3 - 6	1,1	0,3	nq	0,6	0,9	1,1	0,3	25	46,1	0,0024	0,0007	nq	0,0013	0,0020	0,0023	0,0006	0,06	
4	6 - 9	0,3	nq	nq	12	0,6	nq	nq	48	29,7	0,0011	nq	nq	0,0417	0,0020	nq	nq	0,16	
4	9 - 12	0,3	nq	nq	8,5	0,2	0,1	nq	29	50,4	0,0006	nq	nq	0,0168	0,0004	0,0002	nq	0,06	
4	12 - 15	nq	nq	nq	0,6	nq	nq	nq	129	237,0	nq	nq	nq	0,0002	nq	nq	nq	0,05	
4	15 - 24	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	nq	120	194,0	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	nq	0,06	
5	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	3,5	39,8	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
5	0 - 3	0,5	0,4	0,4	1,7	2,3	0,8	0,3	37	14,8	0,0032	0,0028	0,0030	0,0114	0,0155	0,0055	0,0019	0,25	
5	3 - 6	0,2	nq	nq	0,1	1,1	1,4	0,1	43	69,4	0,0003	nq	nq	0,0002	0,0016	0,0021	0,0002	0,06	
5	6 - 9	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	nq	32	37,5	0,0004	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,09	
5	9 - 12	0,2	nq	0,2	nq	nq	nq	nq	36	53,0	0,0003	nq	0,0004	nq	nq	nq	nq	0,07	
5	12 - 15	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	116	127,0	nq	0,0001	nq	nq	nq	nq	nq	0,09	
5	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	25	46,2	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,06	

Tabelle A-33: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C42 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen)

(Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
C 42	Fraktion / h	Konz. Urin / nM									/ (mg/dL)	Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)							
VT		nq = nicht quantifizierbar										nq = nicht quantifizierbar							
2	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	70	167,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,04	
2	0-3	0,2	nq	1,0	5,9	7,3	5,2	1,3	282	12,6	0,0017	nq	0,0080	0,0468	0,0583	0,0414	0,0103	2,24	
2	3-6	0,3	nq	nq	1,1	3,0	2,6	0,9	140	34,3	0,0008	nq	nq	0,0032	0,0088	0,0076	0,0025	0,41	
2	6-9	0,4	nq	nq	0,2	0,5	1,0	0,2	100	24,0	0,0017	nq	nq	0,0007	0,0021	0,0042	0,0009	0,42	
2	9-12	nq	nq	nq	nq	0,3	0,7	nq	192	83,7	nq	nq	nq	nq	0,0003	0,0009	nq	0,23	
2	12-15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	17	6,5	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,27	
2	15-24	nq	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	55	107,0	nq	nq	nq	nq	nq	0,0002	nq	0,05	
3	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	47	102,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,05	
3	0-3	0,5	nq	0,5	2,4	3,1	4,3	1,3	36	14,0	0,0037	nq	0,0037	0,0174	0,0222	0,0310	0,0091	0,26	
3	3-6	0,4	nq	0,7	2,3	4,3	5,9	1,8	102	91,3	0,0004	nq	0,0007	0,0025	0,0048	0,0064	0,0020	0,11	
3	6-9	nq	0,2	nq	nq	1,3	0,9	0,2	91	107,0	nq	0,0002	nq	nq	0,0013	0,0008	0,0002	0,09	
3	9-12	nq	nq	nq	nq	0,2	0,2	0,1	102	137,0	nq	nq	nq	nq	0,0002	0,0002	0,0001	0,07	
3	12-15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	109	141,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,08	
3	15-24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	10	46,7	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,02	
4	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	53	104,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,05	
4	0-3	0,8	0,3	0,8	2,0	3,0	5,7	1,6	26	10,6	0,0080	0,0028	0,0076	0,0191	0,0285	0,0534	0,0153	0,25	
4	3-6	1,3	0,4	2,1	5,0	8,2	16	6,4	104	105,0	0,0013	0,0004	0,0020	0,0048	0,0078	0,0159	0,0061	0,10	
4	6-9	nq	nq	nq	4,9	0,3	0,3	0,1	25	8,4	nq	nq	nq	0,0583	0,0040	0,0032	0,0015	0,31	
4	9-12	nq	nq	nq	2,2	0,4	0,2	nq	21	15,6	nq	nq	nq	0,0140	0,0023	0,0013	nq	0,14	
4	12-15	nq	nq	0,1	0,6	0,4	0,3	nq	40	20,8	nq	nq	0,0006	0,0030	0,0022	0,0015	nq	0,20	
4	15-24	nq	nq	nq	nq	0,6	0,2	nq	20	41,1	nq	nq	nq	nq	0,0016	0,0005	nq	0,05	
5	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	13	71,9	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,02	
5	0-3	0,5	0,6	0,5	1,1	2,0	2,1	0,3	12	7,7	0,0066	0,0073	0,0059	0,0144	0,0253	0,0266	0,0042	0,16	
5	3-6	nq	0,6	0,1	0,6	1,0	2,2	0,4	40	50,9	nq	0,0012	0,0002	0,0012	0,0019	0,0043	0,0009	0,08	
5	6-9	0,2	0,3	nq	nq	nq	0,5	nq	21	24,4	0,0008	0,0014	nq	nq	nq	0,0020	nq	0,09	
5	9-12	0,1	0,2	nq	nq	0,1	0,2	nq	22	24,3	0,0004	0,0006	nq	nq	0,0004	0,0007	nq	0,09	
5	12-15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	19	20,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,10	
5	15-24	nq	nq	0,3	nq	nq	nq	nq	16	36,0	nq	nq	0,0007	nq	nq	nq	nq	0,05	

Tabelle A-34: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C43 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen)

(Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin / (mg/dL)	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
C 43	Fraktion / h	Konz. Urin / nM									/ (mg/dL)	Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)							
VT		nq = nicht quantifizierbar										nq = nicht quantifizierbar							
2	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	36	324,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01
2	0-3	0,1	0,2	0,5	3,3	2,7	2,0	0,5	225	56,5	0,0002	0,0004	0,0008	0,0059	0,0049	0,0036	0,0009	0,40	
2	3-6	nq	0,2	0,2	0,8	1,7	2,3	0,8	51	35,8	nq	0,0005	0,0005	0,0022	0,0046	0,0063	0,0023	0,14	
2	6-9	nq	nq	nq	0,1	0,3	0,3	nq	17	15,3	nq	nq	nq	0,0009	0,0018	0,0019	nq	0,11	
2	9-12	nq	nq	nq	nq	0,1	0,2	nq	5,9	6,3	nq	nq	nq	nq	0,0014	0,0027	nq	0,09	
2	12-15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	3,4	9,6	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,03	
2	15-24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	44	189,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,02	
3	-1-0	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	10	104,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	0,01	
3	0-3	1,0	0,7	1,3	5,6	7,0	13	4,1	80	57,5	0,0018	0,0013	0,0022	0,0097	0,0121	0,0240	0,0072	0,14	
3	3-6	0,7	0,4	0,8	2,2	3,3	5,8	1,7	28	37,5	0,0018	0,0011	0,0022	0,0058	0,0089	0,0154	0,0044	0,08	
3	6-9	0,1	0,2	0,4	1,2	0,7	2,8	0,9	20	48,7	0,0002	0,0003	0,0008	0,0024	0,0015	0,0058	0,0018	0,04	
3	9-12	nq	0,1	nq	nq	0,5	0,2	0,2	20	10,7	nq	0,0010	nq	nq	0,0049	0,0018	0,0015	0,19	
3	12-15	nq	0,3	nq	nq	nq	0,5	nq	20	37,7	nq	0,0007	nq	nq	nq	0,0013	nq	0,05	
3	15-24	nq	nq	0,2	nq	nq	nq	nq	18	42,3	nq	nq	0,0004	nq	nq	nq	nq	0,04	
4	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	27	81,7	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,03	
4	0-3	1,6	1,7	1,7	8,4	5,3	2,8	0,2	304	102,0	0,0016	0,0016	0,0017	0,0083	0,0052	0,0027	0,0002	0,30	
4	3-6	0,4	0,4	0,4	1,9	3,4	1,3	0,4	33	26,3	0,0016	0,0016	0,0015	0,0071	0,0128	0,0048	0,0016	0,13	
4	6-9	nq	nq	nq	0,6	1,1	0,4	nq	31	57,1	nq	nq	nq	0,0010	0,0020	0,0007	nq	0,05	
4	9-12	nq	nq	nq	0,2	0,3	0,1	nq	24	26,7	nq	nq	nq	0,0007	0,0012	0,0006	nq	0,09	
4	12-15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	40	63,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,06	
4	15-24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	16	34,9	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,05	
5	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	8,6	39,4	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,02	
5	0-3	0,4	0,4	0,5	2,7	3,6	5,3	1,4	83	19,1	0,0020	0,0021	0,0029	0,0140	0,0190	0,0279	0,0076	0,44	
5	3-6	0,1	0,4	0,2	2,0	4,8	4,4	2,4	37	79,3	0,0001	0,0005	0,0002	0,0025	0,0060	0,0056	0,0030	0,05	
5	6-9	nq	0,1	0,2	0,3	1,0	1,0	0,3	21	10,1	nq	0,0015	0,0022	0,0028	0,0095	0,0100	0,0031	0,21	
5	9-12	nq	0,1	nq	0,1	0,3	0,3	nq	12	31,8	nq	0,0003	nq	0,0003	0,0010	0,0010	nq	0,04	
5	12-15	nq	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	27	27,1	nq	nq	nq	nq	nq	0,0004	nq	0,10	
5	15-24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	55	109,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,05	

Tabelle A-35: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband CF 44 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen)

(Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin / (mg/dL)	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
CF 44	Fraktion / h	Konz. Urin / nM									Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)								
VT		nq = nicht quantifizierbar									nq = nicht quantifizierbar								
2	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	9,8	161,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
2	0 - 3	nq	0,1	0,2	1,0	1,4	2,0	0,6	41	23,7	nq	0,0005	0,0007	0,0043	0,0060	0,0083	0,0026	0,17	
2	3 - 6	nq	nq	0,1	0,8	1,2	1,8	0,6	29	142,0	nq	nq	0,0001	0,0006	0,0008	0,0013	0,0004	0,02	
2	6 - 9	nq	nq	nq	0,3	0,8	1,4	0,5	20	174,0	nq	nq	nq	0,0002	0,0004	0,0008	0,0003	0,01	
2	9 - 12	nq	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	25	103,0	nq	nq	nq	nq	nq	0,0002	nq	0,02	
2	12 - 15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	8,3	7,5	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,11	
2	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	9,0	32,3	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,03	
3	-1 -0	nq	0,2	nq	nq	1,0	nq	nq	38	142,0	nq	0,0001	nq	nq	0,0007	nq	nq	0,03	
3	0 - 3	0,1	0,2	1,0	nq	0,2	12	4,6	148	125,0	0,0001	0,0002	0,0008	nq	0,0002	0,0103	0,0037	0,12	
3	3 - 6	nq	nq	0,4	nq	0,2	1,3	0,5	10	7,9	nq	nq	0,0054	nq	0,0031	0,0170	0,0058	0,14	
3	6 - 9	nq	nq	0,2	nq	0,4	0,6	0,2	10	9,1	nq	nq	0,0020	nq	0,0039	0,0070	0,0019	0,12	
3	9 - 12	nq	0,1	0,3	nq	nq	0,4	nq	Nq	53,0	nq	0,0002	0,0005	nq	nq	0,0007	nq	nq	
3	12 - 15	nq	nq	nq	nq	0,3	0,2	nq	7,7	116,0	nq	nq	nq	nq	0,0002	0,0002	nq	0,01	
3	15 - 24	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	5,1	33,4	nq	nq	nq	nq	0,0004	nq	nq	0,02	
4	-1 -0	nq	nq	nq	0,2	0,4	nq	nq	72	80,5	nq	nq	nq	0,0002	0,0005	nq	nq	0,09	
4	0 - 3	0,2	0,2	0,4	1,9	3,7	12	3,7	65	22,5	0,0009	0,0009	0,0019	0,0082	0,0166	0,0564	0,0166	0,29	
4	3 - 6	nq	0,1	nq	0,5	1,8	4,5	1,3	31	27,4	nq	0,0004	nq	0,0019	0,0065	0,0165	0,0048	0,12	
4	6 - 9	nq	nq	0,1	nq	0,3	1,2	0,3	68	45,2	nq	nq	0,0002	nq	0,0007	0,0027	0,0006	0,15	
4	9 - 12	nq	nq	nq	nq	0,1	0,3	nq	82	119,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	0,0002	nq	0,07	
4	12 - 15	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	49	32,6	nq	nq	nq	nq	0,0005	nq	nq	0,15	
4	15 - 24	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	26	14,2	nq	nq	nq	nq	0,0010	nq	nq	0,18	
5	-1 -0	0,3	0,3	0,1	nq	nq	nq	nq	47	102,8	0,0003	0,0003	0,0001	nq	nq	nq	nq	0,05	
5	0 - 3	nq	0,6	0,3	0,5	1,0	4,7	1,8	51	39,5	nq	0,0016	0,0008	0,0013	0,0024	0,0119	0,0046	0,13	
5	3 - 6	nq	0,4	nq	0,4	0,5	2,6	1,0	30	91,5	nq	0,0005	nq	0,0005	0,0005	0,0029	0,0011	0,03	
5	6 - 9	nq	0,3	nq	0,1	0,1	1,0	0,3	15	6,2	nq	0,0049	nq	0,0019	0,0019	0,0157	0,0045	0,25	
5	9 - 12	nq	0,2	nq	0,1	0,3	1,1	0,4	12	18,1	nq	0,0010	nq	0,0005	0,0014	0,0060	0,0021	0,07	
5	12 - 15	nq	0,3	nq	nq	0,3	nq	nq	61	55,6	nq	0,0005	nq	nq	0,0005	nq	nq	0,11	
5	15 - 24	nq	0,3	nq	nq	0,1	nq	nq	45	45,6	nq	0,0006	nq	nq	0,0002	nq	nq	0,10	

Tabelle A-36: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C45 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen)

(Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin / (mg/dL)	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
CF 44	Fraktion / h	Konz. Urin / nM									/ (mg/dL)	Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)							
VT		nq = nicht quantifizierbar										nq = nicht quantifizierbar							
2	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	9,8	161,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
2	0 - 3	nq	0,1	0,2	1,0	1,4	2,0	0,6	41	23,7	nq	0,0005	0,0007	0,0043	0,0060	0,0083	0,0026	0,17	
2	3 - 6	nq	nq	0,1	0,8	1,2	1,8	0,6	29	142,0	nq	nq	0,0001	0,0006	0,0008	0,0013	0,0004	0,02	
2	6 - 9	nq	nq	nq	0,3	0,8	1,4	0,5	20	174,0	nq	nq	nq	0,0002	0,0004	0,0008	0,0003	0,01	
2	9 - 12	nq	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	25	103,0	nq	nq	nq	nq	nq	0,0002	nq	0,02	
2	12 - 15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	8,3	7,5	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,11	
2	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	9,0	32,3	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,03	
3	-1 -0	nq	0,2	nq	nq	1,0	nq	nq	38	142,0	nq	0,0001	nq	nq	0,0007	nq	nq	0,03	
3	0 - 3	0,1	0,2	1,0	nq	0,2	12	4,6	148	125,0	0,0001	0,0002	0,0008	nq	0,0002	0,0103	0,0037	0,12	
3	3 - 6	nq	nq	0,4	nq	0,2	1,3	0,5	10	7,9	nq	nq	0,0054	nq	0,0031	0,0170	0,0058	0,14	
3	6 - 9	nq	nq	0,2	nq	0,4	0,6	0,2	10	9,1	nq	nq	0,0020	nq	0,0039	0,0070	0,0019	0,12	
3	9 - 12	nq	0,1	0,3	nq	nq	0,4	nq	Nq	53,0	nq	0,0002	0,0005	nq	nq	0,0007	nq	nq	
3	12 - 15	nq	nq	nq	nq	0,3	0,2	nq	7,7	116,0	nq	nq	nq	nq	0,0002	0,0002	nq	0,01	
3	15 - 24	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	5,1	33,4	nq	nq	nq	nq	0,0004	nq	nq	0,02	
4	-1 -0	nq	nq	nq	0,2	0,4	nq	nq	72	80,5	nq	nq	nq	0,0002	0,0005	nq	nq	0,09	
4	0 - 3	0,2	0,2	0,4	1,9	3,7	12	3,7	65	22,5	0,0009	0,0009	0,0019	0,0082	0,0166	0,0564	0,0166	0,29	
4	3 - 6	nq	0,1	nq	0,5	1,8	4,5	1,3	31	27,4	nq	0,0004	nq	0,0019	0,0065	0,0165	0,0048	0,12	
4	6 - 9	nq	nq	0,1	nq	0,3	1,2	0,3	68	45,2	nq	nq	0,0002	nq	0,0007	0,0027	0,0006	0,15	
4	9 - 12	nq	nq	nq	nq	0,1	0,3	nq	82	119,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	0,0002	nq	0,07	
4	12 - 15	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	49	32,6	nq	nq	nq	nq	0,0005	nq	nq	0,15	
4	15 - 24	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	26	14,2	nq	nq	nq	nq	0,0010	nq	nq	0,18	
5	-1 -0	0,3	0,3	0,1	nq	nq	nq	nq	47	102,8	0,0003	0,0003	0,0001	nq	nq	nq	nq	0,05	
5	0 - 3	nq	0,6	0,3	0,5	1,0	4,7	1,8	51	39,5	nq	0,0016	0,0008	0,0013	0,0024	0,0119	0,0046	0,13	
5	3 - 6	nq	0,4	nq	0,4	0,5	2,6	1,0	30	91,5	nq	0,0005	nq	0,0005	0,0005	0,0029	0,0011	0,03	
5	6 - 9	nq	0,3	nq	0,1	0,1	1,0	0,3	15	6,2	nq	0,0049	nq	0,0019	0,0019	0,0157	0,0045	0,25	
5	9 - 12	nq	0,2	nq	0,1	0,3	1,1	0,4	12	18,1	nq	0,0010	nq	0,0005	0,0014	0,0060	0,0021	0,07	
5	12 - 15	nq	0,3	nq	nq	0,3	nq	nq	61	55,6	nq	0,0005	nq	nq	0,0005	nq	nq	0,11	
5	15 - 24	nq	0,3	nq	nq	0,1	nq	nq	45	45,6	nq	0,0006	nq	nq	0,0002	nq	nq	0,10	

Tabelle A-37: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband CF 46 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen)

(Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin / (mg/dL)	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
CF 46	Fraktion / h	Konz. Urin / nM									Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)								
VT		nq = nicht quantifizierbar									nq = nicht quantifizierbar								
2	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	49	180,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,03
2	0-3	0,2	nq	0,2	0,6	0,7	4,7	1,8	11	16,0	0,0013	nq	0,0011	0,0037	0,0045	0,0296	0,0115	0,07	
2	3-6	nq	nq	nq	6,6	0,6	3,9	1,3	21	35,1	nq	nq	nq	0,0189	0,0018	0,0110	0,0038	0,06	
2	6-9	nq	nq	nq	nq	0,3	1,1	0,4	20	55,6	nq	nq	nq	nq	0,0005	0,0020	0,0007	0,04	
2	9-12	nq	nq	nq	nq	0,2	0,9	0,3	26	90,4	nq	nq	nq	nq	0,0003	0,0010	0,0004	0,03	
2	12-15	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	32	200,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	0,02	
2	15-24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	23	158,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
3	-1-0	nq	nq	nq	0,9	0,2	nq	nq	36	218,0	nq	nq	nq	0,0004	0,0001	nq	nq	0,02	
3	0-3	nq	nq	0,5	nq	1,8	9,1	4,9	56	39,0	nq	nq	0,0012	nq	0,0047	0,0232	0,0126	0,15	
3	3-6	0,2	nq	0,5	nq	1,0	7,5	3,8	20	44,4	0,0004	nq	0,0010	nq	0,0023	0,0168	0,0086	0,05	
3	6-9	nq	0,1	0,1	nq	0,5	3,0	1,6	5,4	106,0	nq	0,0001	0,0001	nq	0,0004	0,0028	0,0015	0,01	
3	9-12	nq	nq	nq	nq	nq	0,1	0,1	5,2	152,0	nq	nq	nq	nq	nq	0,0001	0,0001	0,00	
3	12-15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	37	193,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,02	
3	15-24	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	60	218,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	0,03	
4	-1-0	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	128	288,0	nq	nq	nq	nq	0,0000	nq	nq	0,04	
4	0-3	nq	nq	0,5	2,4	2,6	13	6,2	218	175,0	nq	nq	0,0003	0,0014	0,0015	0,0075	0,0036	0,12	
4	3-6	nq	nq	0,2	6,1	1,4	7,1	3,0	96	185,0	nq	nq	0,0001	0,0033	0,0008	0,0039	0,0016	0,05	
4	6-9	nq	0,3	nq	0,2	0,7	1,9	0,6	69	155,0	nq	0,0002	nq	0,0001	0,0004	0,0012	0,0004	0,04	
4	9-12	nq	nq	nq	0,5	nq	0,9	0,3	102	179,0	nq	nq	nq	0,0003	nq	0,0005	0,0002	0,06	
4	12-15	nq	nq	nq	0,3	nq	0,3	0,1	111	164,0	nq	nq	nq	0,0002	nq	0,0002	0,0001	0,07	
4	15-24	nq	nq	nq	0,3	nq	nq	nq	184	195,0	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	nq	0,09	
5	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	69	210,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,03	
5	0-3	0,7	0,7	1,1	3,6	6,8	34	12	83	226,0	0,0003	0,0003	0,0005	0,0016	0,0030	0,0152	0,0054	0,04	
5	3-6	nq	nq	0,1	1,2	2,6	14	5,1	221	156,0	nq	nq	0,0001	0,0008	0,0016	0,0092	0,0032	0,14	
5	6-9	nq	nq	nq	1,8	0,6	2,7	0,8	117	86,8	nq	nq	nq	0,0021	0,0006	0,0031	0,0009	0,14	
5	9-12	0,1	nq	nq	0,9	nq	0,5	0,1	79	163,0	0,0001	nq	nq	0,0005	nq	0,0003	0,0001	0,05	
5	12-15	nq	nq	nq	0,4	nq	0,5	nq	56	104,0	nq	nq	nq	0,0004	nq	0,0005	nq	0,05	
5	15-24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	61	203,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,03	

Tabelle A-38: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband CF 47 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen)

(Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
CF 47	Fraktion / h	Konz. Urin / nM									/(mg/dL)	Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)							
VT		nq = nicht quantifizierbar										nq = nicht quantifizierbar							
2	-1-0	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	nq	16	138,0	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	nq	0,01	
2	0-3	1,0	nq	1,0	3,7	5,0	6,5	3,6	152	121,0	0,0008	nq	0,0008	0,0030	0,0041	0,0054	0,0029	0,13	
2	3-6	nq	nq	0,1	7,8	1,3	1,9	1,0	84	125,0	nq	nq	0,0001	0,0063	0,0011	0,0015	0,0008	0,07	
2	6-9	0,2	nq	nq	7,8	0,2	0,3	0,1	64	107,0	0,0002	nq	nq	0,0073	0,0002	0,0003	0,0001	0,06	
2	9-12	nq	nq	nq	2,7	0,3	nq	nq	59	116,0	nq	nq	nq	0,0023	0,0002	nq	nq	0,05	
2	12-15	nq	0,2	nq	nq	0,2	0,1	nq	12	47,5	nq	0,0004	nq	nq	0,0004	0,0002	nq	0,03	
2	15-24	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	45	175,0	nq	0,0001	nq	nq	nq	nq	nq	0,03	
3	-1-0	nq	nq	nq	0,1	0,1	nq	nq	10	123,0	nq	nq	nq	0,0001	0,0001	nq	nq	0,01	
3	0-3	0,9	0,5	0,8	3,0	3,7	7,2	2,5	86	98,2	0,0009	0,0005	0,0008	0,0030	0,0037	0,0073	0,0025	0,09	
3	3-6	nq	0,2	nq	0,3	0,5	1,5	0,3	2,6	53,8	nq	0,0005	nq	0,0005	0,0009	0,0028	0,0006	0,00	
3	6-9	nq	nq	nq	0,3	nq	0,3	nq	3,2	49,5	nq	nq	nq	0,0006	nq	0,0006	nq	0,01	
3	9-12	nq	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	3,2	86,4	nq	nq	nq	nq	nq	0,0002	nq	0,00	
3	12-15	nq	0,1	nq	nq	nq	nq	nq	1,5	140,0	nq	0,0001	nq	nq	nq	nq	nq	0,00	
3	15-24	nq	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	0,8	132,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	0,00	
4	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	26	289,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
4	0-3	0,3	0,4	0,4	2,6	2,0	7,6	1,3	152	156,0	0,0002	0,0002	0,0002	0,0016	0,0013	0,0048	0,0009	0,10	
4	3-6	nq	nq	nq	1,6	0,4	3,1	1,1	95	240,0	nq	nq	nq	0,0007	0,0002	0,0013	0,0005	0,04	
4	6-9	nq	nq	nq	0,1	0,1	0,4	nq	35	175,0	nq	nq	nq	0,0001	0,0001	0,0002	nq	0,02	
4	9-12	nq	nq	nq	0,1	nq	0,1	nq	39	229,0	nq	nq	nq	0,0000	nq	0,0000	nq	0,02	
4	12-15	nq	nq	0,1	5,3	nq	0,1	nq	9,8	73,6	nq	nq	0,0001	0,0072	nq	0,0001	nq	0,01	
4	15-24	nq	nq	nq	0,9	0,1	nq	nq	6,3	64,2	nq	nq	nq	0,0014	0,0001	nq	nq	0,01	
5	-1-0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	23	163,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
5	0-3	0,1	0,5	0,2	1,3	1,5	2,2	1,0	66	67,9	0,0002	0,0007	0,0002	0,0019	0,0022	0,0033	0,0014	0,10	
5	3-6	0,1	0,3	nq	0,6	1,0	2,0	1,1	36	164,0	0,0001	0,0002	nq	0,0004	0,0006	0,0012	0,0007	0,02	
5	6-9	nq	0,3	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1	24	107,0	nq	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001	0,0006	0,0001	0,02	
5	9-12	nq	0,1	nq	nq	nq	0,3	nq	19	140,0	nq	0,0001	nq	nq	nq	0,0002	nq	0,01	
5	12-15	nq	nq	nq	0,1	nq	nq	nq	22	159,0	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	nq	0,01	
5	15-24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	19	159,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	

Tabelle A-39: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband CF 48 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen)

(Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
CF 48	Fraktion / h	Konz. Urin / nM								/(mg/dL)	Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)								
VT		nq = nicht quantifizierbar									nq = nicht quantifizierbar								
2	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	92,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
2	0 - 3	0,2	0,2	0,3	1,4	1,7	2,3	1,2	51	29,3	0,0007	0,0008	0,0011	0,0048	0,0059	0,0078	0,0041	0,18	
2	3 - 6	nq	nq	nq	0,5	0,7	1,6	1,0	20	22,4	nq	nq	nq	0,0024	0,0032	0,0069	0,0044	0,09	
2	6 - 9	nq	nq	nq	0,1	0,3	0,7	nq	17	76,5	nq	nq	nq	0,0002	0,0004	0,0009	nq	0,02	
2	9 - 12	nq	nq	nq	0,1	nq	0,5	0,3	15	146,0	nq	nq	nq	0,0001	nq	0,0003	0,0002	0,01	
2	12 - 15	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	nq	34	173,0	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	nq	0,02	
2	15 - 24	nq	nq	0,2	nq	0,2	nq	nq	nq	112,0	nq	nq	0,0001	nq	0,0002	nq	nq	nq	
3	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	3,3	91,7	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	
3	0 - 3	0,6	nq	0,7	2,4	3,9	5,6	2,6	97	26,4	0,0022	nq	0,0027	0,0091	0,0149	0,0211	0,0097	0,37	
3	3 - 6	0,1	0,3	0,2	0,6	1,4	3,2	1,8	36	44,4	0,0003	0,0006	0,0005	0,0014	0,0032	0,0073	0,0041	0,08	
3	6 - 9	nq	nq	nq	nq	0,1	0,5	nq	14	93,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	0,0005	nq	0,02	
3	9 - 12	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	18	140,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
3	12 - 15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	10	111,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
3	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	13	93,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
4	-1 -0	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	9,2	40,9	nq	nq	nq	nq	0,0004	nq	nq	0,02	
4	0 - 3	nq	0,2	0,1	1,6	2,0	4,4	1,7	57	34,7	nq	0,0005	0,0003	0,0046	0,0058	0,0127	0,0050	0,17	
4	3 - 6	0,1	nq	0,2	1,3	1,5	3,9	1,4	68	111,0	0,0001	nq	0,0001	0,0012	0,0014	0,0035	0,0013	0,06	
4	6 - 9	nq	nq	nq	nq	0,1	1,0	0,3	52	103,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	0,0010	0,0003	0,05	
4	9 - 12	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	32	49,9	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,07	
4	12 - 15	nq	nq	nq	0,5	nq	nq	nq	54	139,0	nq	nq	nq	0,0004	nq	nq	nq	0,04	
4	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	67	84,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,08	
5	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	106	23,5	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,45	
5	0 - 3	0,2	0,2	0,5	2,1	2,8	3,5	1,8	320	34,2	0,0006	0,0005	0,0014	0,0062	0,0083	0,0102	0,0054	0,94	
5	3 - 6	nq	nq	0,1	1,0	1,4	1,4	0,8	275	70,0	nq	nq	0,0001	0,0014	0,0019	0,0019	0,0011	0,39	
5	6 - 9	nq	nq	0,1	0,7	nq	0,2	nq	270	109,0	nq	nq	0,0001	0,0007	nq	0,0001	nq	0,25	
5	9 - 12	nq	nq	nq	0,2	0,2	nq	nq	197	146,0	nq	nq	nq	0,0002	0,0001	nq	nq	0,14	
5	12 - 15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	96	112,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,09	
5	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	93	106,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,09	

Tabelle A-40: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C F49 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen)

(Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)

Proband	Urin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	Kreatinin	Del-3-glc	Cy-3-glc	Pet-3-glc	Peo-3-glc	Mal-3-glc	Peo-glu	Mal-glu	3,4-DHB	
CF 48	Fraktion / h	Konz. Urin / nM								/(mg/dL)	Konz. Urin / (nM / mg Kreatinin)								
VT		nq = nicht quantifizierbar									nq = nicht quantifizierbar								
2	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	92,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq
2	0 - 3	0,2	0,2	0,3	1,4	1,7	2,3	1,2	51	29,3	0,0007	0,0008	0,0011	0,0048	0,0059	0,0078	0,0041	0,18	
2	3 - 6	nq	nq	nq	0,5	0,7	1,6	1,0	20	22,4	nq	nq	nq	0,0024	0,0032	0,0069	0,0044	0,09	
2	6 - 9	nq	nq	nq	0,1	0,3	0,7	nq	17	76,5	nq	nq	nq	0,0002	0,0004	0,0009	nq	0,02	
2	9 - 12	nq	nq	nq	0,1	nq	0,5	0,3	15	146,0	nq	nq	nq	0,0001	nq	0,0003	0,0002	0,01	
2	12 - 15	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	nq	34	173,0	nq	nq	nq	0,0001	nq	nq	nq	0,02	
2	15 - 24	nq	nq	0,2	nq	0,2	nq	nq	nq	112,0	nq	nq	0,0001	nq	0,0002	nq	nq	nq	
3	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	3,3	91,7	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	
3	0 - 3	0,6	nq	0,7	2,4	3,9	5,6	2,6	97	26,4	0,0022	nq	0,0027	0,0091	0,0149	0,0211	0,0097	0,37	
3	3 - 6	0,1	0,3	0,2	0,6	1,4	3,2	1,8	36	44,4	0,0003	0,0006	0,0005	0,0014	0,0032	0,0073	0,0041	0,08	
3	6 - 9	nq	nq	nq	nq	0,1	0,5	nq	14	93,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	0,0005	nq	0,02	
3	9 - 12	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	18	140,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
3	12 - 15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	10	111,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
3	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	13	93,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,01	
4	-1 -0	nq	nq	nq	nq	0,2	nq	nq	9,2	40,9	nq	nq	nq	nq	0,0004	nq	nq	0,02	
4	0 - 3	nq	0,2	0,1	1,6	2,0	4,4	1,7	57	34,7	nq	0,0005	0,0003	0,0046	0,0058	0,0127	0,0050	0,17	
4	3 - 6	0,1	nq	0,2	1,3	1,5	3,9	1,4	68	111,0	0,0001	nq	0,0001	0,0012	0,0014	0,0035	0,0013	0,06	
4	6 - 9	nq	nq	nq	nq	0,1	1,0	0,3	52	103,0	nq	nq	nq	nq	0,0001	0,0010	0,0003	0,05	
4	9 - 12	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	32	49,9	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,07	
4	12 - 15	nq	nq	nq	0,5	nq	nq	nq	54	139,0	nq	nq	nq	0,0004	nq	nq	nq	0,04	
4	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	67	84,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,08	
5	-1 -0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	106	23,5	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,45	
5	0 - 3	0,2	0,2	0,5	2,1	2,8	3,5	1,8	320	34,2	0,0006	0,0005	0,0014	0,0062	0,0083	0,0102	0,0054	0,94	
5	3 - 6	nq	nq	0,1	1,0	1,4	1,4	0,8	275	70,0	nq	nq	0,0001	0,0014	0,0019	0,0019	0,0011	0,39	
5	6 - 9	nq	nq	0,1	0,7	nq	0,2	nq	270	109,0	nq	nq	0,0001	0,0007	nq	0,0001	nq	0,25	
5	9 - 12	nq	nq	nq	0,2	0,2	nq	nq	197	146,0	nq	nq	nq	0,0002	0,0001	nq	nq	0,14	
5	12 - 15	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	96	112,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,09	
5	15 - 24	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	93	106,0	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nq	0,09	

A.8 Abbildungsverzeichnis Anhang

Abbildung A-1: Charakteristische Fragmentationensignale von Petunidin.....	127
Abbildung A-2: Charakteristische Fragmentationensignale von Pelargonidin.....	128
Abbildung A-3: Charakteristische Fragmentationensignale von Delphinidin	128
Abbildung A-4: Charakteristische Fragmentationensignale von Peonidin.....	129
Abbildung A-5: Durchführung einer <i>FISH</i> -Suche aus den MS ⁿ Daten mittels der allgemeinen Reaktionsmechanismen und Einträge aus der Literatur hin zu Fragmentierungsvorschlägen	130
Abbildung A-6: Allgemeine Reaktionsmechanismen für die Zuweisung von Fragmentierungspfaden (aus Software-Unterlagen der Software MassFrontier, Thermo Fisher Scientific)	131
Abbildung A-7: Identifizierung der Hauptanthocyan-Monoglucoside mittels exakter Masse des Molekülions und der exakten Masse der charakteristischen Fragmentationen	133
Abbildung A-8: Identifizierung der bekannten Acetyl-Glucoside der Anthocyane mittels exakter Masse des Molekülions sowie der charakteristischen Fragmente.....	134
Abbildung A-9: Full-MS-Spektren mit der exakten Masse von Pel-3-glc, Cy-ac-glc und Cy-coumaryl-glc und die zugehörigen HCD-Spektren, welche charakteristische Fragmente zeigen	135
Abbildung A-10: Full-MS-Spektren mit der exakten Masse von Peo-, Pet- und Del-coumaryl-glc sowie Mal-caffeoyl-glc und die zugehörigen HCD-Spektren, welche charakteristische Fragmente zeigen	136
Abbildung A-11: Charakteristische Fragmente des Aglykons von Peonidin aus seinem Glucuronid.....	137
Abbildung A-12: Besondere Stabilität des Aglykons von Peonidin im Fragmentierungsexperiment.....	138

A.9 Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle A-1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	120
Tabelle A-2: Liste der verwendeten Chemikalien.....	121

Tabelle A-3: Detektierte Fragmentionen von Cyanidin, in rot neue Fragmentionen, orange hinterlegt: nur mit HCD-Fragmentierung detektiert.	125
Tabelle A-4: Anthocyane aus Dakapo-Saft und Tresterextraktionssaft in mg/L (via Cy-3-glc, HPLC/UV, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen). Pet-3-rut wurde in dieser Arbeit als Pet-3-(6"-O-Coumaryl)glucosid identifiziert (Analyse aus Geisenheim).....	132
Tabelle A-5: Anthocyane im Extrakt des Saftes der Tierstudie (Analyse aus Geisenheim) ...	132
Tabelle A-6: Stabilität der Fläche des Fragments bei verschiedenen Einstellungen des Isolationsfensters an Q Exactive	139
Tabelle A-7: Degradationsexperiment Mal-3-glc 50µM 0-1440 Min, Dreifachbestimmung (LC-UV).....	140
Tabelle A-8: Zwei Inkubationsexperimente (apikal) Caco-2-Zellen mit Mal-3-glc 50µM, Dreifachbestimmung (LC-UV)	140
Tabelle A-9: Degradationsexperiment zu Tabelle 10-9 Dakapo-Lösung 50µM, Dreifachbestimmung (LC-UV)	140
Tabelle A-10: Zwei Inkubationsexperimente (apikal) Caco-2-Zellen mit Dakapo-Lösung 50µM, Dreifachbestimmung (LC-UV)	141
Tabelle A-11: Degradationsexperiment 0-1440 Minuten einer 50µM Dakapo-Lösung bei pH=7.....	141
Tabelle A-12: Zellkulturexperimente diverse Zellmischungen (apikal) inkubiert mit 50µM Dakapolösung (bzgl. Mal-3-glc), Dreifachbestimmungen (LC-UV).....	142
Tabelle A-13 Zellkulturexperimente diverse Zellmischungen (apikal), Inkubation mit 50µM Mal-3-glc Lösung, Zweifachbestimmungen (LC-UV)	143
Tabelle A-14: Basale Zellkompartimente (Inkubation mit Mal-3-glc jew. 50 µM, LC-MS)	144
Tabelle A-15: Basale Zellkompartimente (Inkubation mit Dakapo-Lösung, jew. 50µM), massenspektrometrische Analyse.....	145
Tabelle A-16: Anthocyane in Plasmaproben (Tierstudie).....	146
Tabelle A-17: Anthocyane in 24h-Urin (Tierstudie).....	146
Tabelle A-18: Anthocyan-Diglucoside in Fäzesproben (Tierstudie)	147
Tabelle A-19: Restliche Anthocyane in Fäzesproben (Tierstudie)	147
Tabelle A-20: Anthocyan-Diglucoside in Darminhalten (Tierstudie) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)	148
Tabelle A-21: Restliche Anthocyane in Darminhalten (Tierstudie) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	149

Tabelle A-22: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C40 (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	150
Tabelle A-23: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C41 (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	151
Tabelle A-24: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C43 (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	152
Tabelle A-25: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C45 (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	153
Tabelle A-26: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband CF 44 (*=negativer Ionenmodus nicht verwendbar) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)	154
Tabelle A-27: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband CF46 (*=negativer Ionenmodus nicht verwendbar) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)	155
Tabelle A-28: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband CF47 (*=negativer Ionenmodus nicht verwendbar) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)	156
Tabelle A-29: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband C F48 (*= negativer Ionenmodus nicht verwendbar) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4)	157
Tabelle A-30: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB in Plasma Proband CF49 (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	158
Tabelle A-31: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C40 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften (JLU Gießen). Messunsicherheit der ursprünglichen massenspektrometrischen Messung 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4. Nach Umrechnung auf nM/mg Kreatinin Angabe von vier Dezimalstellen).....	159
Tabelle A-32: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C41 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften (JLU Gießen). Messunsicherheit der ursprünglichen massenspektrometrischen Messung 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4. Nach Umrechnung auf nM/mg Kreatinin Angabe von vier Dezimalstellen).....	160

Tabelle A-33: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C42 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	161
Tabelle A-34: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C43 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	162
Tabelle A-35: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband CF 44 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	163
Tabelle A-36: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C45 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	164
Tabelle A-37: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband CF 46 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	165
Tabelle A-38: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband CF 47 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	166
Tabelle A-39: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband CF 48 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	167
Tabelle A-40: Anthocyane, Mal-glu und Peo-glu sowie 3,4-DHB bezogen auf Kreatinin in Urin Proband C F49 (Kreatininwert bestimmt am Institut für Ernährungswissenschaften, JLU Gießen) (Messunsicherheit 8-10%, vgl. Kapitel 3.3.2.4).....	168